

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00022

## 仿刺参性别相关基因 *P450c17* 的克隆与序列分析

田燚, 张丙龙, 常亚青

大连海洋大学 农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

**摘要:** 本研究克隆了仿刺参(*Apostichopus japonicus*)*P450c17* 基因的全长 cDNA, 结果表明其 cDNA 的 5'端 UTR 为 256 bp, 3'端 UTR 为 250 bp, ORF 为 1 530 bp。在 3'端有特殊序列 ATTTA、终止密码子 TAA 和 polyA 加尾。其全长 cDNA 编码 509 个氨基酸的前体蛋白, 预测蛋白分子量 57.6 kD, 理论等电点 5.5。*P450c17* 的氨基酸序列存在长度为 25 个氨基酸的信号肽, 1 个长度为 22 个氨基酸的跨膜区, 1 个糖基结合位点 NHS, 1 个 *P450* 特有的结构域, 其氨基酸序列具有明显的细胞色素 *P450* 基因家族的特征。结构域中亚铁血红素结合域中的精氨酸 R 和发挥活性所必须的半胱氨酸 C 都是保守的。这些结构组成了血红素结合环、质子传递槽和 K 螺旋及绝对保守 EXXR 基序。蛋白前体二级结构中无规则卷曲占 41.22%, 延伸链占 12.77%,  $\alpha$ -螺旋占 46.01%, 不含  $\beta$ -折叠。氨基酸序列与其他物种氨基酸序列的同源性在 35% ~ 41% 之间。系统进化树表明仿刺参与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)及文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)聚为一支, 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、鲇(*Clarias gariepinus*)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)及白斑角鲨(*Squalus acanthias*)聚为一支, 三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、金眼门齿鲷(*Stenotomus chrysops*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、牙鲆及青鲈(*Fundulus heteroclitus*)聚为一支。研究结果为进一步探讨仿刺参 *P450c17* 在性激素调控性别分化方面的功能提供参考。

**关键词:** 仿刺参; *P450c17*; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)01-0022-11

*P450c17*(*CYP17*)是一种单一微粒体酶, 属于细胞色素 *P450* 家族, 利用细胞色素 *P450* 氧化还原酶和微粒体电子传递系统, 可以催化两种不同的类固醇激素进行生物合成, 具有  $17\alpha$ -羟化酶和  $17, 20$  裂解酶 2 种酶活性<sup>[1]</sup>。在类固醇激素的生物合成中, 孕酮在  $17\alpha$ -羟化酶的  $17\alpha$ -羟基化作用下, 生成  $17\alpha$ -羟孕酮。 $17\alpha$ -羟孕酮类固醇激素前体在 *P450c17* 的  $17, 20$  裂解酶催化下转化成雄烯二酮; 雄烯二酮经过类固醇脱氢酶( $17\beta$ -HSD)作用生成睾酮, 最终在 *P450* 芳香化酶作用下转化为  $17\beta$ -雌二醇。可见 *P450c17* 为体内雌激素合成提供重要前体, 在体内激素生成、性别分化中起到了重要的作用。如果 *CPY17* 的羟化酶活性或裂

解酶活性丧失, 肾上腺源孕酮则生成盐皮质激素; 当只有  $17\alpha$ -羟化酶活性时,  $17\alpha$ -羟孕酮生成皮质醇, 当 *CPY17* 的羟化酶活性或裂解酶活性都存在时, 则生成 DHFA 进而生成雄烯二酮(AND), 后者分别经  $17\beta$ -羟基类固醇脱氢酶转化为睾酮, 经芳香化酶 *CYP19* 转化为雌酮、雌二醇 E2。而雌二醇做为活性最高的性类固醇激素, 参与性别分化、性成熟等相关的重要繁殖过程的调控, 而且对中枢神经系统的形成和活动调节有重要作用。

在硬骨鱼类卵巢内, E2 对于卵母细胞生长中的卵黄生成是必需的, 而  $17\alpha, 20\beta$ -DHP 对于卵母细胞最终成熟至关重要<sup>[2]</sup>。对胖头鲟(*Pimephales promelas*)<sup>[3]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus Mykiss*)<sup>[4]</sup>和

收稿日期: 2011-07-05; 修订日期: 2011-09-16.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31072230, 41106128); 农业部科技成果转化资金项目(2010GB2B000080).

作者简介: 田燚(1979-), 女, 副教授, 主要从事海洋生物学研究. E-mail: tianyi@dlou.edu.cn

通信作者: 常亚青, 教授. E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)<sup>[5]</sup>的研究结果也表明,*P450c17* 与卵巢发育具有正相关性。因此推测,*P450c17* 活性调控对卵黄生成后卵母细胞最终成熟阶段至关重要的,且 Zhou 等<sup>[6]</sup>研究结果表明*P450c17* 在卵母细胞生长期间能够有助于 E2 产生。

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)具有较高的经济价值和药用价值,现已成为中国最有经济价值的海水养殖种类之一。为开展仿刺参性腺发育、性别分化调控机制的研究,本研究克隆了仿刺参*P450c17*全长 cDNA,并根据获得的*P450c17*基因序列,进行了氨基酸序列分析,预测蛋白质的性质及结构,为*P450c17* 基因表达和蛋白质生物活性研究奠定基础。因此,希望本研究能为下一步探讨仿刺参*P450c17* 在性激素调控性别分化的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用仿刺参于 2009 年 6 月取自辽宁省大连市瓦房店海区。主要试剂 Trizol、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、Marker(DL2000)、dNTP、EX<sup>Taq</sup> DNA 聚合酶、pMD19-T Vector、*Hind*III、*Bam*HI 购自宝生物(大连)公司,PCR 引物由宝生物合成。AXYGEN 柱式凝胶回收试剂盒、AXYGEN 小量质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 总 RNA 的提取与反转录

抽取仿刺参体腔液,按 Trizol 法提取总 RNA。采用紫外分光光度计与 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及完整性,-80℃保存备用。使用

MMLV 反转录 cDNA。反转录体系: 100 ng 总 RNA, 1 μL oligo(dT), 5×M-MLV Buffer 2 μL, dNTP Mixture(各 10 mmol/L)0.5 μL, RNase Inhibitor(40 U/μL)0.25 μL, RTase M-MLV(200 U/μL)0.25 μL, 用 RNase-free 的水定容至 10 μL。反应条件: 42℃ 水浴 30 min, 95℃ 5 min。

1.3 PCR 扩增、PCR 产物的克隆及测序

应用 Primer Premier 5.0 软件,根据实验室已有的 EST 序列设计 RACE 的特异性引物 F1、F2、R1、R2(表 1)。所有引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。利用 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒,采用巢式 PCR 进行 3'RACE 克隆。反应体系: 1 μL cDNA, 0.5 μL 正向引物, 0.5 μL 反向引物, 10×Ex Tap Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus)2.5 μL, dNTP Mixture(各 2.5mmol/L) 2μL, Ex DNA 聚合酶(5 U/μL)0.13 μL, 灭菌蒸馏水 18.37 μL。反应条件: 94℃, 3 min; 94℃, 30 s, 53℃, 60 s, 72℃, 15 min, 35 个循环; 72℃, 10 min, 4℃保温。5'RACE 以 oligo(dT)为引物,合成 cDNA 第一链,用 R1、R2 为引物扩增基因的 5'末端。PCR 反应体系及条件与前述相同。回收 cDNA 片段后,与 pMD19-T vector 载体连接,将连接好的质粒转化感受态 DH5α,通过蓝白斑筛选和菌落 PCR 初步鉴定后,阳性菌落于 37℃震荡培养过夜。提取质粒后将鉴定为阳性的克隆送宝生物工程(大连)有限公司进行测序。

1.4 序列分析

序列同源性比对和相似性搜索用 BLAST 软件进行;序列拼接用 DNAMAN 软件进行,开放阅读框(ORF)的寻找用 NCBI 上的 ORF Finder 进行;信号肽查找用 Target P 1.1 Server 程序进行;

表 1 本研究所用引物序列  
Tab. 1 Sequences of primers used in the study

| 引物<br>primer | 序列(5'-3')<br>sequence (5'-3')                 |
|--------------|-----------------------------------------------|
| F1(3'RACE)   | AGCCTGCCTTTGTTGTCTTCACGGAGT                   |
| F2 (3'GSP)   | AAGAAGGGTGTGGAGTTTGCT                         |
| R1(5'RACE)   | GGTCTGTTAGCAAACCTCCACACCCTTC                  |
| R2(5'GSP)    | GCCATTCAGGACTACAGCCCA                         |
| UPM SHORT:   | CTAATACGACTCACTATAGGGC                        |
| LONG:        | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT |
| NUP          | AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT                       |

利用 TMHMM 对跨膜域进行预测; 蛋白特征模体查找采用 SMART 软件; 蛋白质性质分析采用 ExPASy server 软件; 多序列比对采用 ClustalW1.8 软件, 用 MEGA4.0 的邻接法对仿刺参 P450c17 氨基酸序列与 GenBank 上发表的氨基酸序列构建系统进化树, 1 000 次重复计算自展分析值, 利用 NCBI 在线软件预测结构特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 RACE 的扩增结果

以总 RNA 逆转录得到的 RACE 1 st cDNA 为模板, 利用设计好的巢式引物进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增, 其中 Marker 为 DL2000, 获得了与预期大小一致的目的片段(图 1-2)。

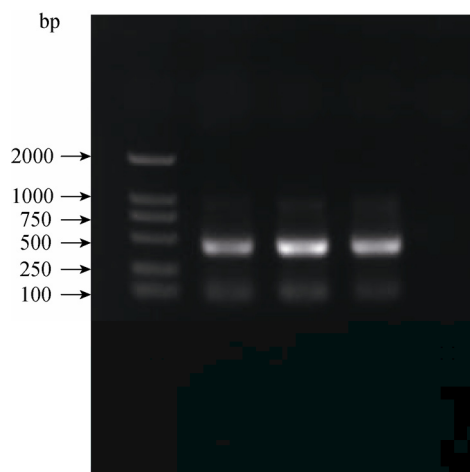


图 1 5'RACE 扩增产物检测结果

Fig. 1 Amplification product of *P450c17* 5'RACE

### 2.2 仿刺参 *P450c17* cDNA 的全长序列

将 *P450c17* 的 EST 片段和 RACE 获得的 cDNA 序列进行拼接后, 得到长度为 2 036 bp 的 cDNA(图 3)。*P450c17* cDNA 全长序列的 5'端非编码区长度为 256 bp, 3'端非编码区为 250 bp, 开放阅读框(ORF)为 1 530 bp。在起始密码子 ATG 的-3 位为 A, 符合 Kozak 规律。在 3'端有特殊序列 ATTTA, 并有终止密码子 TAA 和 polyA 加尾, 这些都符合有效翻译的基因全长 cDNA 的特征。对测序得到的 cDNA 片段序列进行分析, 计算碱基 A、T、C、G 的百分含量, 确定各碱基在 cDNA 中的偏好性。结果表明, 该 *P450c17* cDNA 全长序

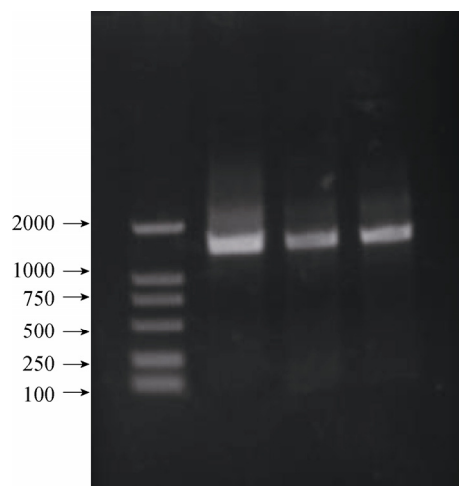


图 2 3'RACE 扩增产物检测结果

Fig. 2 Amplification product of *P450c17* 3'RACE

列的碱基 A 占 30.2%、碱基 G 占 22.6%、碱基 T 占 27.9%、碱基 C 占 19.2%。A+T 含量(58.1%)高于 G+C 含量(41.8%)。

### 2.3 仿刺参 *P450c17* 的氨基酸组成特征

用 DNA Star 分析 *P450c17* cDNA 可编码 509 个氨基酸的前体蛋白, 预测蛋白分子质量为 57.6 kD, 理论等电点是 5.5。*P450c17* 的 509 个氨基酸中强碱性氨基酸(K, R)有 59 个, 强酸性氨基酸(D, E)有 70 个, 疏水氨基酸(A, I, L, F, W, V)有 188 个, 不带电荷的极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y)有 114 个, 分子式为  $C_{2634}H_{4057}N_{665}O_{760}S_{13}$ 。*P450c17* 蛋白质在仿刺参体内半衰期大于 20 h, 不稳定系数为 38.36, 总平均亲水性为-0.217。以 ProtScale 程序分析 *P450c17* cDNA 编码的氨基酸, 发现第 5~28、48~53、62~68、77~80、83~92、95~97、114~119、121~123、144~146、159~168、184~197、210~212、222~236、248~253、276~279、296~299、305~311、313~328、341~343、363~369、373~383、391~393、402~407、452~455、458~468、498~501 残基为疏水性的; 第 29~47、54~61、69~76、98~101、104~113、124~127、130~139、147~158、169~180、198~209、213~221、237~247、257~275、280~295、300~304、332~335、344~362、370~372、394~398、408~447、449~451、469~495 残基为亲水性的(图 4)。

```

ggggactggattccgtaaacataattatgtagacactgacagtcctcatcgaattgtcaccacgaatatcatcatcaatccaggataatcagttctttgtcctcatcaatactggcag
acgtgattcgtataatcctgactgattatccaaattgtgaaagttctgagcagcaatattccaaggggtgactctgaaacggattagcataggcctaactaacgtgaactgctcagga
241   TCCATAAACTAGCAGCATGCTTTTGTAGTCTAGTGCAGTGGTAGTTAATTCCACATCTCT
1     M A F E S S A V V V N S T S L
301   AACTCTGGTTACCATAACAACAGTATTGGCTGGAATGTGGATATGGAGTCAACAAAAGCC
16    T L V T I T T V L A G M W I W S Q Q K P
361   GACTAAGAAGCTTCCACCTGGACCAAAGGGATGGCCTCTCATTTGGGAATATTCTGGAGCT
36    T K N F P P G P K G W P L I G N I L E L
421   TGCACGTAATGAGAAGCCTGCCTTTGTTGTCTTCACGGAGTATGCTAAGGAGTATGGAGA
56    A R N E K P A F V V F T E Y A K E Y G D
481   TATATTTTCCATAAGAGTAGGTCAGAGGTGGGCTGTAGTCCTGAATGGCGCTGCTACAAT
76    I F S I R V G Q R W A V V L N G A A T T I
541   AAAGGAAGCTCTCTTGAAGAAGGTGTGGAGTTTGCTAACAGACCAACAAAGCCTTAAAGT
96    K E A L L K K G V E F A N R P T S L K V
601   TGACTTATTCTGGAAGGTGGGCAGGATATTGTCTTTGGTCAGTATTCTCTTCTTGGAA
116   D L F L E G G Q D I V F G Q Y S P S W K
661   GCTACACAGAAAGCTGGCCTTTTCTGCTTTCAGGAAGTTGGCTACTGGTGACAACAAGAG
136   L H R K L A F S A F R K L A T G D N K R
721   ATTTGAAAAGCTGGTTTATTCCATCRTTCTTTTCTTACAGCAAACCTGGACTCCAAAGG
156   F E K L V Y S I X P F L T A N L D S K G
781   GTCAGAACCATTGACTCACGAACAGTTCTTGCATCATCCATATATAATATCTTGGCAAG
176   S E P F D S R T V L A S S I Y N I L A S
841   TTTGTGCTTTGGCAAACAGTACGAATTTGATGATCCGGAACCTACTCGCTTGATGTACCT
196   L C F G K Q Y E F D D P E L T R L M Y L
901   AAGTAAAGAAGGAATGATATTGCTGGAAGTGGTCTTCTAGCTGACTACATACCAATCTT
216   S K E G N D I A G S G L L A D Y I P I F
961   CAAATATGTTCTACCCCTAGGCAGACAAAACCTGAAAGCTATTTTTAAAGATTTCTTTAG
236   K Y V P T P R Q T K L K A I F K D F F S
1021  CTTGGTCAACAAGGAAGTGGATGAACACCATGAGAAGTATGATGGGGGTGAACCAAAGA
256   L V N K E V D E H H E K Y D G G E P K D
1081  TTTCATAGAGATGCTCTTTCAGTCTCGACAAGAAATCAAAGATGAAGGCAAAGAAGACAT
276   F I E M L F Q S R Q E I K D E G K E D M
1141  GAGTTTGATAACAGAGGCTCATATCAGACAGACAGTGGTAGATATATTGGAGCCGGTAC
296   S L I T E A H I R Q T V V D I F G A G T
1201  GGATACGTCCATTTTACCTTACAATGGTGTACTGGACTGATGGTGAATATCCAGAGGT
316   D T S I F T L Q W C T G L M V Q Y P E V
1261  GCAAGCCAAAGTAGCCGCCGAAGTGGATCGTGTGCTGGGAAGAGATAGGCTGCCCTCACT
336   Q A K V A A E V D R V V G R D R L P S L
1321  TGATGACCGTGAGGAGCTAGTATACACCACAGCGACCCTGTACGAGGTTATGCGATACAG
356   D D R E E L V Y T T A T L Y E V M R Y S
1381  TACCTTAGTTCCATTAGCCGTGCCGCATGCTACATCGGCAGATGTGGAGCTTGGTGGTTA
376   T L V P L A V P H A T S A D V E L G G Y
1441  TACCATCCCTAAAGATACTTGGGTTTTGGTGAACATCTACTCCATGCACTATGATGAAAA
396   T I P K D T W V L V N I Y S M H Y D E K
1501  ACTCTGGGACGACCCTAAAAAATTCACACCAGAACATTTCTGGATGAGAGCGGAAAAGT
416   L W D D P K K F T P E H F L D E S G K V
1561  TCGTCTCCACCCAGAAGGTTACATGCCTTTCTTACCAGGACGCCGTGTCTGCCTCGGTGA
436   R L H P E G Y M P E S T G R R V C L G E
1621  ATCGGTTGCCAAGGCTGAGCTCTTCTTCTTCTTTCGCTGGTTATTCCAGCATTACAAGTT
456   S V A K A E L F L L F A W L F Q H Y K F
1681  CAGCAAACCTATCGGGCAGGAAGAGAAAGATTTTTCAGAAGGAGATCCCCAGGCTACAGT
476   S K P I G Q E E K T D F S E G D P Q A T V
1741  GAATATGCTGAAGGATATAGAAGTGTTATAGAAAAACGCTTTTATTTGTCATGACAGCAG
496   N M L K D I E V V I E K R F
caaatgtttgtgctgctattttggaatggaagcttatgatgatgtggagaactgaatgaattgtacctcaaaaatatattgaagaacagtaaatcatatttaagctatatt
aaaaagaaaattatgtggacattgcatcgatttgattaatttgaaacatttagagactcatcaaaaaaaaaaaaaaaaaaagcgctgtttccggttttctttttt

```

图 3 仿刺参 *P450c17* 基因全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

起始密码子 ATG、终止密码子 TAA 和序列 ATTTA 用方框标出, P450 家族的标签序列用下划线标出, 跨膜区用双下划线标出, 信号肽序列用灰色背景标出。

Fig. 3 Full-length cDNA of *Apostichopus japonicus* *P450c17* gene and the deduced amino acid sequence. The letters in box indicated start codon (ATG), stop codon (TGA) and special sequence (ATTTA). The *P450c17* sequence label (-FSTGRRVCLG-) was underlined and the putative sequence of signal peptide was shaded by gray. Transmembrane region were double underlined.

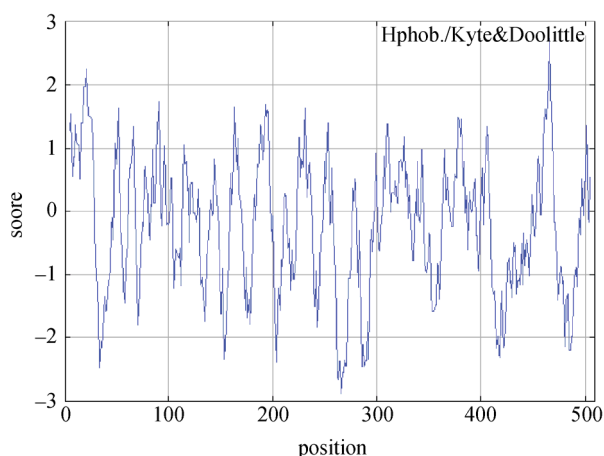


图 4 仿刺参 P450c17 蛋白质亲水性/疏水性分析结果

图中横坐标为氨基酸所在位置, 纵坐标为得分.

Fig. 4 Results of hydrophilicity/hydrophobicity analysis of P450c17 in *Apostichopus japonicus*

Horizontal coordinate indicates the position of amino acid, and vertical coordinate indicates the score.

亲水性残基所占比例远大于疏水性残基, 而且疏水性最大值为 2.722, 亲水性最大值为 2.889, 因此推测 P450 c17 编码蛋白质是亲水性的。

采用 Signal P 预测 P450c17 氨基酸序列特征, 结果表明存在 1 个信号肽, 长度 25 氨基酸, 信号肽序列为 MAFESSAVVVNSTSLTLVTITTVLA。这段信号肽二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋组成, 而且多数氨基酸是疏水性的氨基酸。故推测 P450c17 属于分泌型蛋白。利用 TMHMM 预测 P450c17 跨膜域。结果表明 P450c17 蛋白有 1 个明显的跨膜区, 长度为 22 个氨基酸, 与其进行膜内外电子传递催化功能有关, 属于跨膜蛋白类(图 5)。通过 NetNGlyc1.0 分析推测了一个糖基结合位点(NHS), 推测 P450c17 可能是个糖蛋白(图 6)。

## 2.4 仿刺参 P450c17 的结构预测

P450c17 前体蛋白结构域包含 1 个 P450 特有的结构域。预测 P450c17 的二级结构(图 7)中无规则卷曲占 41.22%, 延伸链占 12.77%,  $\alpha$ -螺旋占 46.01%。其二级结构中, 无规则卷曲和  $\alpha$ -螺旋构成了蛋白中较大的结构元件, 不含  $\beta$ -折叠。根据 NAD(P)H 的电子传送到催化部位的方式, 将 P450 家族分为 4 个等级, 虽然只有 3 个完全保守残留物, 保守序列在家族内相对较低, 但是他们的总体拓扑和折叠结构是高度保守的。该 P450

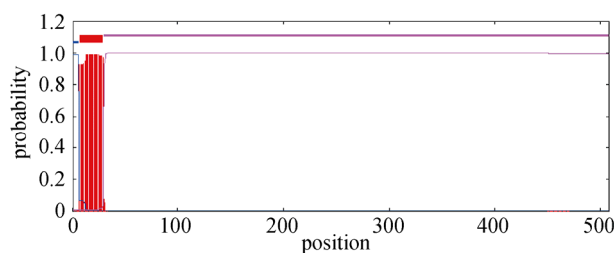


图 5 仿刺参 P450c17 蛋白质跨膜区分析结果

图中横坐标为氨基酸所在位置, 纵坐标为跨膜区域存在的概率, 纵坐标 1 位置为细胞膜.

Fig. 5 Prediction results of transmembrane region in P450c17 in *Apostichopus japonicus*

Horizontal coordinate indicates the position of amino acids, and vertical coordinate indicates the probability of transmembrane region occurrence. The position of 1 on vertical coordinate shows cell membrane.

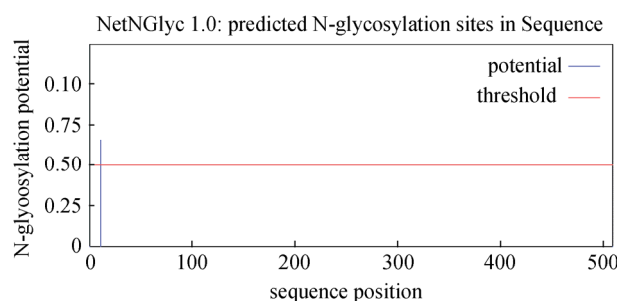


图 6 仿刺参 P450c17 的 N-糖基化位点预测结果

图中横坐标为氨基酸所在位置, 纵坐标为 N-糖基化存在的概率, 纵坐标 0.5 处表示阈值.

Fig. 6 Prediction result of predicted N-glycosylation sites of P450c17 in *Apostichopus japonicus*

Horizontal coordinate indicates the position of amino acid, and vertical coordinate indicates the probability of N-glycosylation sites. The position of 0.5 in vertical coordinate shows threshold.

特有结构域保守核心区域是由四螺旋束组成的卷曲组成的, 包括螺旋 J 和 K 及 2 个  $\beta$ -折叠。结构域的氨基酸序列具有明显的细胞色素 P450 基因家族的特征: 螺旋区、Ozols' 肽、亚铁血红素结合区(图 8), 这些组成了血红素结合环、质子传递槽和 K 螺旋及绝对保守 EXXR 基序。其中亚铁血红素结合域中的精氨酸 R 在所有的物种中都是保守的。

## 2.5 仿刺参与其他物种 P450 c17 氨基酸序列同源性

使用 Blast 程序检索分析了仿刺参 P450c17 氨基酸序列与其他物种的同源性(图 8)。选取了文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*, BAF61104.1)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*, ABR45717.1)、鲤(*Cyprinus*



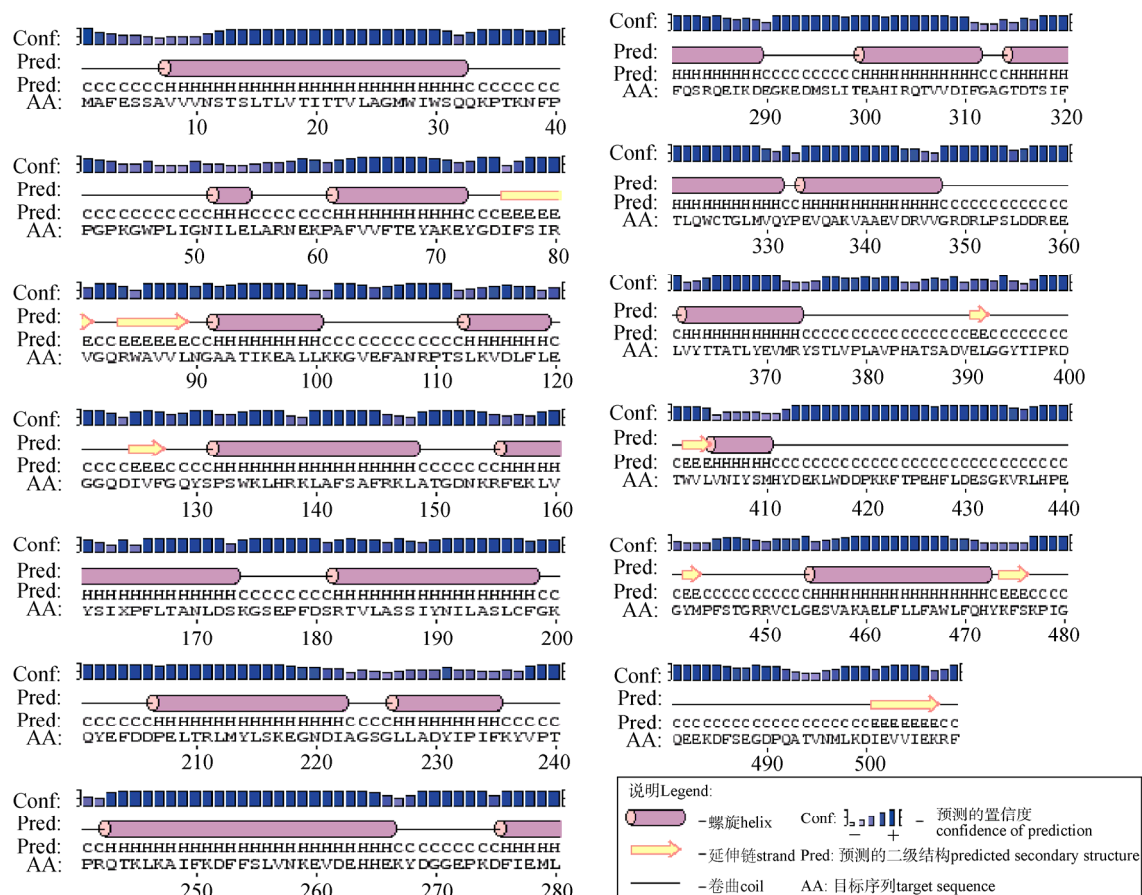


图 7 仿刺参 P450c17 蛋白质二级结构预测

Fig. 7 Prediction result of secondary structure of P450c17 in *Apostichopus japonicus*

*Carpio*, AAR8772.3)、斑马鱼(*Danio rerio*, AAY2614 2.1)、虹鳟(NP001171961.1)、白斑角鲨(*Squalus acanthias*, Q92113.1)、日本鳗鲡(AAR88432.1)、金眼门齿鲷(*Stenotomus chrysops*, AAL78297.1)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*, ADO15703.1)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*, ADV59775.2)、鲑(*Clarias gariepinus*, ACT88154.1)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*, ABO38813.1)、青鳞(*Fundulus heteroclitus*, ACO51072.1)这 13 个物种的 P450 c17 氨基酸序列与本研究所得刺参的 P450 c17 序列进行比对, 结果发现相似性在 35% ~ 41% 之间。

## 2.6 系统进化树的构建

根据 GenBank 上已注册 P450c17 的氨基酸序列, 使用 MEGA 软件构建系统进化树, 多序列比对的参数设置 1 000 次重复计算自展分析值(图 9)。从系统进化树中可以看出, 仿刺参与长牡蛎及

文昌鱼聚为一支，黄颡鱼、鲇、日本鳗鲡及白斑角鲨聚为一支，三刺鱼、金眼门齿鲷、斑马鱼、鲤、虹鳟、牙鲆及青鲈聚为一支。

### 3 讨论

### 3.1 仿刺参 *P450c17* 基因全长序列及组成特征

本研究获得仿刺参 *P450c17* 的 cDNA 全长为 2 036 bp, 5'端非编码区长度为 256 bp, 3'端非编码区为 250 bp, 开放阅读框(ORF)为 1 530 bp。到目前为止, *P450c17* 的 cDNA 已经在很多水产动物中克隆得到, 如虹鳟、黄鳢(*Monoterus. albus*, AY224681- AY224684)、日本鳗鲡、白斑角鲨、半滑舌鳎 (*cynoglossus semilaevis*, EU732518)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, EF423917.1)、青鳉、斑马鱼、河鲀(*Takifugu rubripes*, EF62 4005.1)、三刺鱼、条斑星鲽(*Verasper moseri*, FJ168471)等水

|       |                                |                                                                                                                                                                      |     |
|-------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 刺参    | <i>Apostichopus japonicus</i>  | ----- MAFESSAVVNSTSLTLVTI TTVLAGMWWSQQKPTKN- FPPGPKGWPLI GNI LELARN                                                                                                  | 58  |
| 鲤     | <i>Cyprinus carpio</i>         | -- MALTEAEFESGSI MEWGGQVQAL I ASFI I LFFLEACLWRNL I KKRLL . . . FA . . . V . . . AMQ.GQM                                                                             | 68  |
| 斑马鱼   | <i>Danio rerio</i>             | -- MEAEFLKSSSIMREWSGQVQAL I ASFVI LFFLEACLWRNL I KKRLL . . . FA . . . V . . . AMQ.GHM                                                                                | 67  |
| 金眼门齿鲷 | <i>Stenotomus chrysops</i>     | - MAMDTDYGVKGS SI I REWSGQVQAL VASVFLFCLAEACLWRNLRLKRRLL . . . FA . . . V . . . AMQ.GQM                                                                              | 69  |
| 三刺鱼   | <i>Gasterosteus aculeatus</i>  | - MALDTEFGVKGS SI I REWSGQVQAL VASVFLFCLAEACLWRNLRLKRRLL . . . FA . . . VV . . . AMQ.GQM                                                                             | 69  |
| 虹鳟    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | MALLETDFEVKGS SI I REWSGQVQAL VASVFLFCLAEACLWRNLRLKRRLL . . . FA . . . VV . . . AMQ.GQM                                                                              | 70  |
| 青鳉    | <i>Fundulus heteroclitus</i>   | MAQMDAEFDLRSGSI I KGWSGHVQALVAAVVFLFCLAEACLWRNLRLKRRLL . . . FA . . . VV . . . A . . . Q.GHM                                                                         | 70  |
| 牙鲆    | <i>Paralichthys olivaceus</i>  | - MMLMILPFI GSVSV . ESL . AMT . VCLVYL . LKFFHTDI PKGLR- ---- RL . . . PL . I . . . V . . . VGSK                                                                     | 63  |
| 长牡蛎   | <i>Crassostrea gigas</i>       | ----- MLKLSMN.QTVLAGI CV.LLVYVI . RMRYRL . . . WCI . . . V . . . HYKI.YSSP                                                                                           | 51  |
| 文昌鱼   | <i>Branchiostoma belcheri</i>  | ----- MMLMTI . VGVV . L . . VTLWRDYVR- -- RWRM . . . FF . . . I . F . . . LSLF . GK                                                                                  | 47  |
| 黄颡鱼   | <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> | ----- MGWLIC.FFI.FAAAI I V . LYLRLKI HGFLVDERA . . . NLPSL . I . . . SL . S . RSD                                                                                    | 51  |
| 鲈     | <i>Clarias gariepinus</i>      | ----- MAWHIC- . CVFSAVI . AVFYLRKI HGFLGDDRA . . . HLP SL . V . . . SL . S . RSD                                                                                     | 51  |
| 鳗鲡    | <i>Anguilla japonica</i>       | ----- MEWIFC . FL . FVVALTALLI KARI . KALKDTR- . . . SLPSF . I . . . S . . . S . RSE                                                                                 | 51  |
| 白斑角鲨  | <i>Squalus acanthias</i>       | ----- MSLMLA-ALI L . VAF . I CSLTGFT . R . LSGGRL . KCLPSF . . . SL . S . RSD                                                                                        | 51  |
| 刺参    | <i>Apostichopus japonicus</i>  | EKPAFVVFTYKEYGDI FSI RVGQRWAVVLNGAATI KEALLKKGVFANRPTSLKVDLFELEGQDI VFG                                                                                              | 128 |
| 鲤     | <i>Cyprinus carpio</i>         | P- -- HI T . SKL . . K . . NYVQ . . L . RSDI . . . . . DVA . RK . . I . EHST . . . G . . NF . SFQMIS- . . RSM . S                                                    | 134 |
| 斑马鱼   | <i>Danio rerio</i>             | P- -- HI T . SKL . . K . . NYVQ . . L . CSDI . . . . . D . A . RK . . VQHST . . . G . . NLVSFQMIS- . . RSLT . T                                                      | 133 |
| 金眼门齿鲷 | <i>Stenotomus chrysops</i>     | P- -- HI T . ARL . . K . . NYVQ . . L . CSDI . . . . . DKA . R . . I . QHST . . . G . . NFVSFQMIS- . . RSLT . N                                                      | 135 |
| 三刺鱼   | <i>Gasterosteus aculeatus</i>  | P- -- HI T . ATL . . K . . NYVQ . . L . CSDV . . . . . DRA . R . . . QH . T . . . G . . NFVSFQMIS- . . RSM . S                                                       | 135 |
| 虹鳟    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | P- -- HI T . SKL . . K . . NYVQ . . L . CNNI . . . . . D . S . R . . VQHST . . . G . . NFVSFQSVS- . . NSMF . T                                                       | 136 |
| 青鳉    | <i>Fundulus heteroclitus</i>   | P- -- HI T . A . L . . K . . NYVQ . . L . CSDI . . . . . RV . R . . VQHST . . . G . . NFVSFQSVS- . . KSL . S                                                         | 136 |
| 牙鲆    | <i>Paralichthys olivaceus</i>  | P- -- YLSL . AMS . R . HV . Q . QI . M . PV . . . . . S . SE . VRQ . I . . Q . E . . SG . . DLYSFRFI S-D . KSLA . S                                                  | 129 |
| 长牡蛎   | <i>Crassostrea gigas</i>       | --- MHKKI AALS . D . PVVR . SF . PQTW . . . . . DI . N . VV . . MV . RKAD . . . G . . HFTSG . V . T . . K . . A . S                                                  | 119 |
| 文昌鱼   | <i>Branchiostoma belcheri</i>  | F- -- YLT . I . DL . . K . . V . . LKQ . MDV . . . . . SLDA . R . . FV . . . . . G . . FVSA . I . T . . K . . A . T                                                  | 114 |
| 黄颡鱼   | <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> | S- APHI . F . QQLQ . K . . . . . Y . LMM . SHKVI I . V . SYHHA . . . . . KI . . . G . . RTVTT . I . LTRD . K . . A . A                                               | 120 |
| 鲈     | <i>Clarias gariepinus</i>      | S- . PHI . F . QQLQ . K . . . . . Y . LMM . SHKVI I . I . SLHHA . . . . . KI . . . G . . RTVTT . I . LTRD . K . . A . A                                              | 120 |
| 鳗鲡    | <i>Anguilla japonica</i>       | H- . PH . L . Q . LQ . K . . ETY . L . M . SHDV . I . V . SHQHA . . . . . V . . . R . KT . . . G . . RTVTT . I . LTRD . K . . A . A                                  | 120 |
| 白斑角鲨  | <i>Squalus acanthias</i>       | L- . PH . L . Q . LQ . K . . T . . NL . . LMM . PHY . . . . . I . NHQHA . . . . . KI . . . G . . SM . TT . . LSR . . K . . A . .                                     | 120 |
| 刺参    | <i>Apostichopus japonicus</i>  | -QYSPSWKLHRKLAFSAFRKLATGDN- ---- KRFEKLVYSI X- PFLTANLDSKGS- EPFDSRTVLASSI                                                                                           | 189 |
| 鲤     | <i>Cyprinus carpio</i>         | -S . . KQ . . V . . . V . Q . TL . AFSMANTQTKQ- -- T . . QH . VGEAMDLVQKF . RLSADRRD . NPSHEFTVAA                                                                    | 200 |
| 斑马鱼   | <i>Danio rerio</i>             | -N . . KQ . . T . . . V . Q . TL . AFSMANSQTRK- -- T . . QH . VGEAMDLVQKF . RLSADGRH . NPAHEATVAA                                                                    | 199 |
| 金眼门齿鲷 | <i>Stenotomus chrysops</i>     | -N . GKQ . . A . . I . Q . SL . AFSSANSQTKK- -- A . . QH . TAEAMDLVQSF . RQSDGRY . . PAHEFTVAA                                                                       | 201 |
| 三刺鱼   | <i>Gasterosteus aculeatus</i>  | -N . . KQ . . A . . I . Q . SL . AFTS . NSQTKK- -- A . . QOI . TAEAMELVQVF . RHSTDGRY . NPSQEFTEAA                                                                   | 201 |
| 虹鳟    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | -N . . KQ . RT . . I . QTTI . AFSSANSQTKK- -- A . . QH . VAEATELI . E . F . KLNAGQQF . NPAHE . TVAA                                                                  | 202 |
| 青鳉    | <i>Fundulus heteroclitus</i>   | -N . . KQ . RM . . I . QTTI . AFSSANSRTKK- -- A . . HQI . VAEATELVEI . F . QLSQGGY . NPGNE . TVAA                                                                    | 202 |
| 牙鲆    | <i>Paralichthys olivaceus</i>  | TDQAGV . RAR . . . . . Y . . L . SFS . LEGTTPPEYSCVL . EHI . CKEGEYLIKQLNTVMKADGS . . . PFYRI . VV . V                                                               | 199 |
| 长牡蛎   | <i>Crassostrea gigas</i>       | -N . . A . . F . . I . GK . L . HYLQ . . . . . LL . NMIQENMNK . . NKMEE . . . . . MFKEYYDLVM                                                                         | 177 |
| 文昌鱼   | <i>Branchiostoma belcheri</i>  | -D . . T . . . . . FHT . I . GY . S . E- ---- NLQNK . HESLEETI . AEFKME . . . QAV . LEDYI . VKLV                                                                     | 173 |
| 黄颡鱼   | <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> | -D . . AT . . F . . I . VH . G . LSMFGE . T- ---- ASI . . I . I . CQEASSMCETLTTLOS- -- SAV . LSPE . TRAV                                                             | 180 |
| 鲈     | <i>Clarias gariepinus</i>      | -D . . AT . . F . . I . VH . G . LCMFGE . T- ---- ASI . . I . I . CQEASSMCENLNTLOS- -- SAV . LGPE . TRAV                                                             | 180 |
| 鳗鲡    | <i>Anguilla japonica</i>       | -D . . AT . . RF . . . MHG . LCMFGE . S- ---- ASI . . QII . CREASSMCQVLVELQS- -- TAV . LAPE . TRAV                                                                   | 180 |
| 白斑角鲨  | <i>Squalus acanthias</i>       | -K . G . A . F . . . . . VL . . LHLFGD . S- ---- AGI . . . . . MICQEASSMCSTFERLNN- -- AAH . MMPDVTRAV                                                                | 180 |
| 刺参    | <i>Apostichopus japonicus</i>  | YNI LASCFCGKQYEFDDPEITRLMYSKEGNDI AGSGLLADYI PI FKYY- -- PIPRQIKLKAIFKDFSL                                                                                           | 256 |
| 鲤     | <i>Cyprinus carpio</i>         | A . VI . CA . . . . . R . GL . . . . . FRT . LKRVEKFGETV . A . S . V . VM . WLQFLPNNPVRVYQNF . L . NEE . . AY                                                        | 270 |
| 斑马鱼   | <i>Danio rerio</i>             | A . VI . CA . . . . . R . GH . . . . . FRT . LGRVKNFGETV . A . S . V . VM . WLQSFNNPVRVYQNF . T . N . E . . NY                                                       | 269 |
| 金眼门齿鲷 | <i>Stenotomus chrysops</i>     | A . . . . . MCA . . . . . RR . AHE . L . FRT . LKKVEKFGETV . A . S . V . VM . WLQSFNNPVRVYQNF . NLNEE . . AF                                                         | 271 |
| 三刺鱼   | <i>Gasterosteus aculeatus</i>  | A . . . . . MCA . . . . . RR . AHE . Q . FRNMLKKLDKFGGETV . A . S . V . VM . WLQRFNNPVRVYQNF . NLNEE . . AF                                                          | 271 |
| 虹鳟    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | A . VI . CA . . . . . R . GH . . . . . I . FRT . LGSVDKFGGETV . A . S . V . VM . WLQ . FNNPVRVYQSF . DLN . E . . TF                                                  | 272 |
| 青鳉    | <i>Fundulus heteroclitus</i>   | A . VI . CA . . . . . R . GH . A . FRA . LRHVDLFGRTV . A . S . V . VM . WLQSFNNPVRVYQNF . VSNQ . . NF                                                                | 272 |
| 牙鲆    | <i>Paralichthys olivaceus</i>  | A . VI . CGM . . . . . RR . DH . Q . . VS . VN . . D . FGQV . . . . . NP . . . . . F . . . LQFLPS- -- KSMKNMS . NER . I . F                                          | 266 |
| 长牡蛎   | <i>Crassostrea gigas</i>       | FHQ . YTI . . . . . EKRP . T . . . . . VNK . LKI . DNDLI . KL . T . . . . . FE . I . . . . . DI . Y . . . . . KKWQMFSLMDEMILTV                                       | 245 |
| 文昌鱼   | <i>Branchiostoma belcheri</i>  | . . . . . VI . C . AA . . . . . VR . NM . . . . . KDENT . . . . . KV . . . . . DSAEVF . E . I . . . . . VF . . . . . SLRFL- -- . . . . . GI . AI . QK . VRP . LDI    | 240 |
| 黄颡鱼   | <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> | T . . . . . VVCT . . . . . SSS . KRG . . . . . FEAMLQY . QGI . V . TVAKDS . V . I . F . WLQFL- -- . . . . . NEDLRI . RRCVSI . RDK                                    | 247 |
| 鲈     | <i>Clarias gariepinus</i>      | T . . . . . VVCT . . . . . SSS . KRG . . . . . FEAMLQY . QGI . V . TVAKDS . V . I . F . WLQFL- -- . . . . . NEDLKM . RSCVSI . RDK                                    | 247 |
| 鳗鲡    | <i>Anguilla japonica</i>       | T . . . . . VI . CA . . . . . SSS . QRG . C . FEAMLQY . QGI . V . TVAKDS . V . I . F . WLQFL- -- . . . . . NKDI . KI . . . . . QCVTVRD                               | 247 |
| 白斑角鲨  | <i>Squalus acanthias</i>       | T . . . . . VI . CL . . . . . NST . . . . . KE . . . . . FQTMRY . QGI . VNTVAKDS . I . I . F . WLQFL- -- . . . . . NENLHT . . . . . QCI . ATRD . I                   | 247 |
| 刺参    | <i>Apostichopus japonicus</i>  | VNKEVDEHHEKYDGGEPKDFI EMLFQSRQEI KD- EGKED- MSLI TEAHI RQTVVDI FAGAGTDSI FTLQW                                                                                       | 324 |
| 鲤     | <i>Cyprinus carpio</i>         | . . . . . KDK . VQ . RDT . . . . . PEVTR . MDAI . I . GVI . EHG . . . . . E . ML . KDFVES . . . . . T . LI . . . . . Q . . . . . VSTVM .                             | 332 |
| 斑马鱼   | <i>Danio rerio</i>             | . . . . . KDK . LQ . RDT . . . . . PDVTR . MDAI . I . GVI . EHG . . . . . E . TL . KDFVES . . . . . T . LI . . . . . Q . . . . . VSTVM .                             | 331 |
| 金眼门齿鲷 | <i>Stenotomus chrysops</i>     | . . . . . KDK . VQ . R . SF . PEVTR . MDAI . I . NVI . EHG . . . . . D . GLSKEFVEA . . . . . T . LI . . . . . Q . . . . . VSTVM .                                    | 333 |
| 三刺鱼   | <i>Gasterosteus aculeatus</i>  | . . . . . KDK . VQ . R . SF . PDVTR . MDAI . I . NVI . EHG . . . . . D . TLDNEYVEA . . . . . T . LI . . . . . Q . . . . . I . ST . . .                               | 333 |
| 虹鳟    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | . . . . . RDK . V . . . . . RF . PEVTR . MDAI . I . GVI . DKADS . . . . . DTGL . . . . . TEG . . . . . S . LI . . . . . L . . . . . VSTC . H .                       | 335 |
| 青鳉    | <i>Fundulus heteroclitus</i>   | . . . . . SSK . E . . . . . RQTF . PHNI . R . MDAI . I . ELI . D . SDG . . . . . DTE . . . . . KEYTEA . . . . . A . LI . . . . . M . . . . . VSTA . H .              | 335 |
| 牙鲆    | <i>Paralichthys olivaceus</i>  | . . . . . Q . I . T . . . . . YATF . KDNI . R . I . TDS . I . DHCEDR . LD . NS . . . . . NI . QMSDEK . VGI . N . L . . . . . F . . . . . I . STA . S .               | 333 |
| 长牡蛎   | <i>Crassostrea gigas</i>       | . . . . . LRRKFR . . . . . V . TFQP . VNR . . . . . DSMLIAK . . . . . A . . . . . D . AALEVMDT . LV . . . . . I . S . . . . . F . . . . . V . . . . . TR . MD .      | 314 |
| 文昌鱼   | <i>Branchiostoma belcheri</i>  | . . . . . MQHL . Q . R . TF . PNNLR . I . TDHMIKAQKDAEE . . . . . MQ . . . . . I . NSL . DT . L . . . . . I . A . . . . . G . . . . . T . . . . . L . R .            | 308 |
| 黄颡鱼   | <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> | . . . . . LQ . KY . . . . . KVDFSDNI . QR . LLD . LRAKHSENNNTS . . . . . TQDVLSDD . LLM . . . . . G . . . . . VE . . . . . TTTV . K .                                | 316 |
| 鲈     | <i>Clarias gariepinus</i>      | . . . . . LQ . KY . . . . . KADFSENI . QR . LPDA . LRAKYSENNNTS . . . . . TQDVGL . DD . LLM . . . . . G . . . . . L . . . . . VE . . . . . TTTV . K .                | 316 |
| 鳗鲡    | <i>Anguilla japonica</i>       | . . . . . LQ . KY . . . . . KAE . SDDTQR . LLD . I . RAKRS AENNNTS . . . . . SATPSGL . DD . LLM . . . . . G . . . . . VE . . . . . TTTV . K .                        | 317 |
| 白斑角鲨  | <i>Squalus acanthias</i>       | . . . . . LQ . KFED . KAN . SSDSAN . LFNI . LKAKMAENNNSS . . . . . VHEAGL . DD . MM . . . . . A . . . . . VE . . . . . STAF . A .                                    | 316 |
| 刺参    | <i>Apostichopus japonicus</i>  | CTGLM/QYPEVQAKVAEVDVVGRDRLPSLDDREELVYTTATLYEVMRYSLVPLAVPHATSADVELGG                                                                                                  | 394 |
| 鲤     | <i>Cyprinus carpio</i>         | I . LL . L . R . . . . . SI . T . LQE . QI . K . . . . . I . E . . . . . KSN . A . LD . FI . . . . . T . . . . . TSF . . . . . VTI . . . . . S . TS . . . . . TI . E | 402 |
| 斑马鱼   | <i>Danio rerio</i>             | MLL . L . K . . . . . SI . S . LQE . QI . K . . . . . I . E . . . . . CN . A . LD . FI . . . . . T . . . . . FTSF . . . . . VTI . . . . . S . TS . . . . . TI . E    | 401 |

|       |                                |                                                                          |     |
|-------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| 金眼门齿鲷 | <i>Stenotomus chrysops</i>     | I VL L KH DM L QELI K Q I E GS A LD FI T T FTSF VTI S TS TIE             | 403 |
| 三刺鱼   | <i>Gasterosteus aculeatus</i>  | I LL LAKH DI L HELI KA SE SR S LD FI T T FTSF TI TS TSG TI D             | 403 |
| 虹鳉    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | M L L K N TRLQEQL K CI E KAN A LD VI T T TSF TI S TS TIE                 | 405 |
| 青鳉    | <i>Fundulus heteroclitus</i>   | I VL LAKH DI T L HELI G VE VHMP LD FI T T FTSF VTI TS TV D               | 405 |
| 牙鲆    | <i>Paralichthys olivaceus</i>  | SVM L A I ERLYE I KEK L T L S KPN LFLE F I L I F H SFL FTI C K TS N      | 403 |
| 长牡蛎   | <i>Crassostrea gigas</i>       | FVYF TRF F CQE I SE Q MK SK D E C F S L NV GIGL M I C SQV                | 383 |
| 文昌鱼   | <i>Branchiostoma belcheri</i>  | AVLFLSAH I E L S E S ATP E I H MGSIA SSL T TV TT R                       | 378 |
| 黄颡鱼   | <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> | SI LYL HH Q L I QE L TKI K H Q N GN P LE I R L IQPVS LI VALS ANI E       | 386 |
| 鲇     | <i>Clarias gariepinus</i>      | TVLYLLHN Q R I QE L AKI H EVS KGN P LE I R L I RPVS LI VALS ASI E        | 386 |
| 鳗鲡    | <i>Anguilla japonica</i>       | AVA LI HH Q K I QE L SKI MN H K S GN P LE I R L I RPVS LI VAL SSI E      | 387 |
| 白斑角鲨  | <i>Squalus acanthias</i>       | M IYLI HH Q K I QE I SNI FE T KMS KGNMFLN I H I L I QPVS LI VAL SSI D    | 386 |
| 刺参    | <i>Apostichopus japonicus</i>  | YTI PKDTWLVNI YSMHYDEKLWDDPKKFTPEHFLDES GKVR LHPE GYMPFSTGRRVCLGESVAKAEI | 462 |
| 鲤     | <i>Cyprinus carpio</i>         | LH V FI QW VNH PQK Q HI N SR T ALDKDLTN SV I K R I DQI V V               | 471 |
| 斑马鱼   | <i>Danio rerio</i>             | LHT V FI QW VNH PQK S HI N SR N ALNKDLTN SV I K R I QI V V               | 470 |
| 金眼门齿鲷 | <i>Stenotomus chrysops</i>     | LH V FI QW VNH HLK K HT D SR N ALDKDI TN NV I S K R I DQI V V            | 472 |
| 三刺鱼   | <i>Gasterosteus aculeatus</i>  | LH V FI QW VNH PLK K HT D AR N ALNKDATS V I K R I NQI MV V               | 472 |
| 虹鳉    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | FH V FI QW VNH PLQ K HL D SR N ALDKDLTS SV I A K R I DQI V V             | 474 |
| 青鳉    | <i>Fundulus heteroclitus</i>   | LS VI FI QW VNH PLR K QA D SR NXSLDKDLTN NV I A K R I DQ V I             | 474 |
| 牙鲆    | <i>Paralichthys olivaceus</i>  | F C FI QWQ NH E K SS N DR SAD SGI KKLEGEKV V GM K R I VI RN V            | 473 |
| 长牡蛎   | <i>Crassostrea gigas</i>       | DV G T VI HWAL H P Y K EE D LRY N MKPAK D SWL A A P I                    | 452 |
| 文昌鱼   | <i>Branchiostoma belcheri</i>  | HR QG I MP LWAV H PDT G DV R R N PI PK P AL A A P A G DT                 | 446 |
| 黄颡鱼   | <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> | VQ G R I I LW L H E KN EL K R N E NSLCCPSL S L GA V AL L                 | 455 |
| 鲇     | <i>Clarias gariepinus</i>      | FVQ G R I LW L H G E KN EL N R EK SLCYSPS S L GA V AL L                  | 455 |
| 鳗鲡    | <i>Anguilla japonica</i>       | VG GAR I I LW L H E KN EI D TR E SNLCCPS S L GA I L M                    | 456 |
| 白斑角鲨  | <i>Squalus acanthias</i>       | G R I I LWAI H E KN DA D GR D YVCSSS S L GA T I ML RM                    | 455 |
| 刺参    | <i>Apostichopus japonicus</i>  | FLIFAWLFQHYKFSKPI GQEEKDFSEGDPAQTVN MLKDI EVVI EKRF                      | 509 |
| 鲤     | <i>Cyprinus carpio</i>         | FS I LHQCS ESNPS DLSMDCSY GLTLKPLHYTI SAKL GKLFGLVSPA                    | 524 |
| 斑马鱼   | <i>Danio rerio</i>             | FS I LHQCS ERDPS DLSMDCSY GLALKPLHYTI SAKL GKLFGLVSPA                    | 523 |
| 金眼门齿鲷 | <i>Stenotomus chrysops</i>     | YA I LHQCS ESDPSKPLTDCSY GLTLKPLRYC SARL GKLLGLVSPA                      | 525 |
| 三刺鱼   | <i>Gasterosteus aculeatus</i>  | FA V LHQCS ESDPSEPLTNCYSY GLTLKPLQLS RAKL GKLLGLVSPA                     | 525 |
| 虹鳉    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | FS I I HQCT ENNPS DLSLDCSY GLTLKPLNYKI SAKL GELLTGA                      | 524 |
| 青鳉    | <i>Fundulus heteroclitus</i>   | F I LHQCS E CPDEDFSLNYSY GLTLKPL YKI AAKL GELLKHK                        | 524 |
| 牙鲆    | <i>Paralichthys olivaceus</i>  | Y FL I I I KLH HTMP ELLDMTP Y GLTMKHRCHLKATM ARNEH                       | 521 |
| 长牡蛎   | <i>Crassostrea gigas</i>       | L MC N L RFEI L E VKPNLEHRL GFG E LPS YKI VKE NRD                        | 500 |
| 文昌鱼   | <i>Branchiostoma belcheri</i>  | LGG V NFC I E EGPP LTPDEKGGG TSLSPYK MFC K                               | 494 |
| 黄颡鱼   | <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> | FMS I L RFTLEV A PLPELKGK FG VLQPKQYK I ARL TGWEKQLQKQESG                | 514 |
| 鲇     | <i>Clarias gariepinus</i>      | FLS I L RFTLEV A PLPELQK FG VLQPKQYK I ARL TGWEKKVQSQESKG                | 514 |
| 鳗鲡    | <i>Anguilla japonica</i>       | FL I L RFTLEV P TLP LEGK FG VLQPKQYK CAQL PCWAENQTDG                     | 510 |
| 白斑角鲨  | <i>Squalus acanthias</i>       | FTS I L RFTVQV P YPPP KEGK FGI VLQPLKFK QLKL KAVENRGLHD                  | 509 |

图 8 不同物种 *P450c17* 氨基酸的多序列比对结果

*P450c17* 三个功能保守区用下划线标注, 铁血红素结合域中的精氨酸 R 在图中用\*标出, 发挥活性所必须的半胱氨酸 C 用#标出。

“.”代表保守碱基, “-”代表缺失碱基。

Fig. 8 Multiple sequence alignment of *P450c17* amino acid from different species

The functional (conserved) regions of *P450c17* are underline. Conserved arginine was marked with star and necessary cysteine was marked with #. “.” represented the conservative base and “-” represented deletion base.

产动物。仿刺参 *P450c17* cDNA 的 3'端有信号序列 ATTTA(AUUUA), 相同的序列在半滑舌鲷、条斑星鲷、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)等物种的 *P450* 基因家族 cDNA 中也有发现<sup>[7-9]</sup>。在多数哺乳动物中, *P450* 基因家族中也有 1 个或 2 个 ATTTA(AUUUA)序列, 该序列和 mRNA 的降解作用有关, 而 mRNA 的稳定性可控制基因的表达<sup>[10]</sup>。在鱼类中, 大西洋鲑(*Salmo salar*)中发现有 3 个 AUUUA(ATTTA)序列<sup>[11]</sup>, 大黄鱼 3'UTR 有 2 个 AUUUA(ATTTA)序列, 仿刺参 *P450c17* 中有 1 个 AUUUA(ATTTA)序列, 推测可能与细胞内快速降解去除 *P450c17* mRNA 有关, 或许这种降解机制能解释生物体为何能快速调节整个类固醇激素的平衡。

### 3.2 仿刺参 *P450c17* 的位点分析和结构域预测

分泌蛋白质首先必须透过内质网膜进入内质网腔, 而这一跨膜转移需要在信号肽的作用下完成。仿刺参 *P450c17* 具有长度为 25 个氨基酸残基的信号肽, 并且这段信号肽二级结构主要由延伸链组成, 而且多数氨基酸是疏水性的氨基酸; 存在 1 个长度为 22 个氨基酸残基的跨膜区, 这一区域二级结构为  $\alpha$ -螺旋, 与其进行膜内外电子传递催化功能有关; 有 1 个糖基结合位点(NHS), 这些结构特征符合分泌蛋白质的特征, 所以笔者认为仿刺参 *P450c17* 属于分泌型跨膜糖蛋白。实验结果推测, 这些特征性的结构有利于结合在膜上的 *P450c17* 蛋白前体穿过内质网的选择性膜, 在信



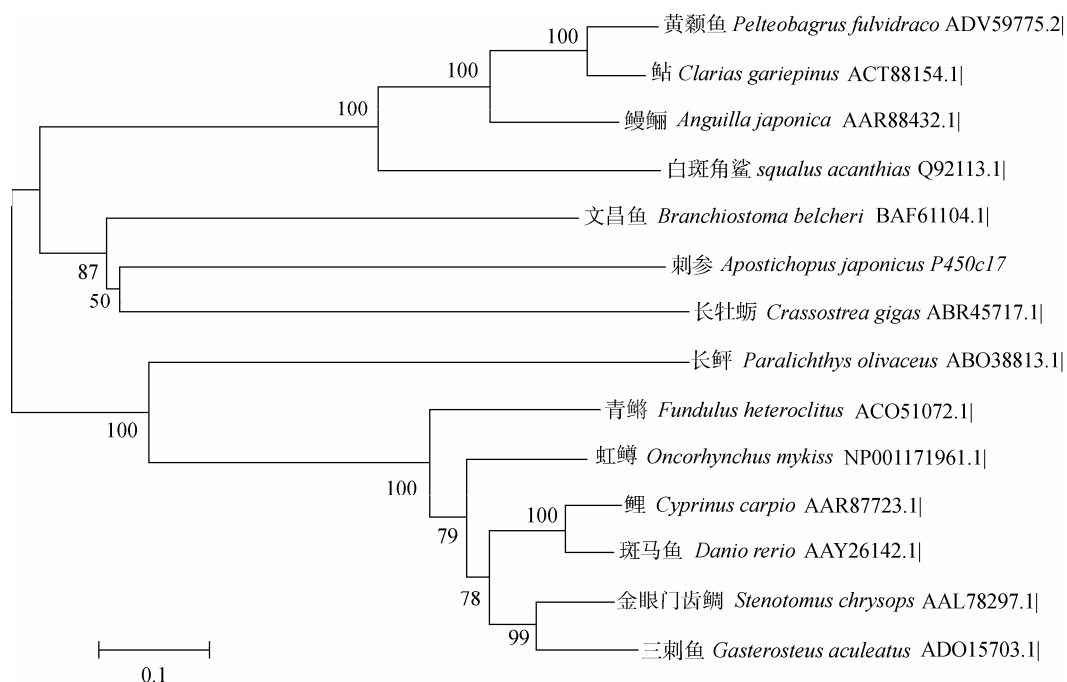


图 9 不同物种 P450c17 的系统进化树

Fig. 9 Phylogenetic tree of different species based on P450c17 sequence

号肽作用下, 协同翻译进入分泌途径。这符合 P450c17 是一种微粒体酶, 主要存在于内质网中的特性, 进而发挥  $17\alpha$ -羟化酶和  $17,20$  裂解酶两种酶活性的特性。实验结果与虹鳉<sup>[4]</sup>、日本鳗鲡<sup>[5]</sup>、半滑舌鲷<sup>[7]</sup>、条斑星鲷<sup>[8]</sup>、黄鳊<sup>[12]</sup>、斑马鱼<sup>[13]</sup>、白斑角鲨<sup>[14]</sup>、尼罗罗非鱼<sup>[15]</sup>、青鳉<sup>[16]</sup>等其他水产动物的研究结果相一致。软件预测 P450c17 的二级结构中无规则卷曲占 41.22%, 延伸链占 12.77%,  $\alpha$ -螺旋占 46.01%, 可见无规则卷曲和  $\alpha$ -螺旋构成了蛋白中较大的结构元件, 不含  $\beta$ -折叠。黄鳊 P450c17(CYP17)的二级结构表明, 该蛋白主要由  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠组成<sup>[12]</sup>, 其二级结构与仿刺参的存在一定的差异, 但是符合芳香化酶的保守序列在家族内相对较低的情况。

### 3.3 仿刺参 P450c17 与其他物种 P450c17 氨基酸序列的同源性

仿刺参 P450c17 氨基酸序列与其他物种 P450c17 的氨基酸序列的相似性在 35%~41%之间, 保守序列在家族内相对较低, 但是他们的总体拓扑和折叠结构是高度保守的。P450c17 前体蛋白质结构域分析表明包含 1 个 P450 特有的结构域, 结构域的氨基酸序列具有明显的细胞色素

P450 基因家族的特征: 螺旋区, Ozol's 肽, 亚铁血红素结合区。其中亚铁血红素结合域中的精氨酸 R 和发挥活性所必须的半胱氨酸在所有的物种中都是保守的。这些结构域及活性位点, 特别是亚铁血红素配体信号区与其他脊椎动物高度保守。这些组成了血红素结合环、质子传递链、K 螺旋及绝对保守 EXXR 基序。在雄激素的生物合成过程中, P450c17 能够  $17\alpha$  羟化孕激素, 继而切割  $17\alpha$  羟化产物的酰基碳<sup>[17]</sup>。人类细胞色素 P450c17 的 Arg<sup>358</sup>(精氨酸)为酶依赖于细胞色素 b5 的酰基碳切割活性(即裂解酶活性)所必需<sup>[18]</sup>。硬骨鱼类 P450c17 以及其他脊椎动物 P450c17 的 Arg<sup>358</sup>都位于 Ozol's 肽区, 这也与仿刺参 P450c17 的 Arg<sup>358</sup>的位置相一致。系统进化树结果表明, 仿刺参与长牡蛎及文昌鱼聚为一支, 黄颡鱼、鲇、日本鳗鲡及白斑角鲨聚为一支, 三刺鱼、金眼门齿鲷、斑马鱼、鲤、虹鳉及底鳉聚为一支。这一结果也与其他鱼类 P450c17 聚类分析结果一致<sup>[15]</sup>。

### 3.4 仿刺参 P450c17 基因的发展趋势及潜在的应用价值

性别的形成和分化与性激素息息相关, 在雌性发育时雌激素是必需的, 但雄激素也不能缺乏,

同理雄性正常发育雌激素也同样重要。*P450c17* 基因编码的细胞色素 P450c17 酶, 调节 17 $\alpha$ -羟化酶和 17, 20 裂解酶活性, 是性腺类固醇激素(雌激素和雄激素)合成中过程中的限速酶, 也是目前在类激素代谢中发现的唯一一个具有两种活性的酶。许多研究结果表明 *P450c17* 基因在雌雄中都表达, 而在间性中表达量较低, 说明该基因不是雄性发育或雌性发育特异的基因, 而是性腺发育所必须的基因, 只是在雌雄发育中功能不同<sup>[12]</sup>。*P450c17* 基因可以发生多种形式的突变, 此时其编码的细胞色素 P450c17 $\alpha$  酶出现异常的结构和功能, 使其介导的  $\alpha$ -羟化酶和/或 17, 20 裂解酶的活性下降或缺失, 从而出现性激素分泌的异常<sup>[19]</sup>, 引起和性激素代谢相关的疾病<sup>[20]</sup>。

人类 *P450c17* 基因定位于常染色体 10q24.3 上<sup>[21-22]</sup>, 该基因的表达部位有一定的区域限制<sup>[23]</sup>。目前正在进行的 *P450c17* 基因研究中, 其具体表达部位, 在不同组织中的表达情况, 以及该基因的表达受哪个基因的控制尚未阐明。阐明该基因的确切功能, 对其上游靶基因和下游靶基因的研究十分迫切和必要。但到目前为止, 从发育生物学的角度研究该基因的表达还很少, 仅在小鼠中知道该基因的表达在 11.5 dpc 开始表达, 18.5 dpc 表达量最高<sup>[24]</sup>, 这是性别发育和分化的关键时期。因此, 希望在本研究的基础上, 进一步开展基因的功能研究工作, 为下一步探讨仿刺参 *P450c17* 在性激素调控性别分化方面的功能提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Miller W L, Auehus R J, Geller D H. The regulation of 17, 20 lyase activity [J]. Steroids, 1997, 62:133-142.
- [2] Nagahama Y. 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation inducing hormone in fish oocytes: mechanism of synthesis and action [J]. Steroids, 1997, 62:19-196.
- [3] Halm S, Kwon J K, Randesweaver M, et al. Cloning and gene expression of P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17, 20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 130: 256-266.
- [4] Sakai N, Thnaka M, Adachi S, et al. Rainbow trout cytochrome P450c 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase cDNA cloning, enzymatic properties and temporal pattern of ovarian P450-c17 mRNA expression during oogenesis [J]. FEBS Lett, 1992, 301: 60-64.
- [5] Kazeto Y, Ijiri S, Todo T, et al. Molecular cloning and characterization of Japanese eel ovarian P450c17(CYP17) cDNA [J]. Gen Comp Endocrinol, 2000, 118:123-133.
- [6] Zhou L Y, Wang D S, Kobayashi T, et al. A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and headkidney [J]. Endocrinology, 2007, 148:4282-4291.
- [7] Chen C F, Wen H S, Wang Z P, et al. Cloning and expression of P450c17-I (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase) in brain and ovary during gonad development in *Cynoglossus semi-laevis* [J]. Fish Physiol Biochem, 2010, 36(4): 1001-1012.
- [8] 金国雄, 温海深, 何峰, 等. 条斑星鲽 CYP19a 基因克隆及其在雄鱼生殖周期中的表达 [J]. 水产学报, 2010, 34 (2): 194-203.
- [9] 宋娟娟, 钱伦, 钱云霞. 大黄鱼 CYP1A 基因 cDNA 的克隆与表达分析 [J]. 生物技术通报, 2011, 4: 120-126.
- [10] Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. Molecular biology of the cell [M]. 3<sup>rd</sup> Edition. New York: Garland Publishing Inc, 1994: 464-465.
- [11] Rees C B, Wu H, Li W M. Cloning of CYP1A in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. J Aquacult, 2005, 246(1-4):11-23.
- [12] Yu H, Cheng H, Guo Y, et al. Alternative splicing and differential expression of P450c17(CYP17) in gonads during sex transformation in the rice field eel [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 307 (1) :165-171.
- [13] Wang Y, Ge W. Cloning of zebrafish ovarian P450c17 (CYP17, 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase) and characterization of it sex expression in gonadal and extra-gonadal tissues [J]. Gen Comp Endocrinol, 2004, 135: 241-249.
- [14] Trant J M. Isolation and characterization of the cDNA encoding the spiny dogfish shark (*Squalus acanthias*) form of cytochrome P450c17 [J]. J Exp Zool, 1995, 272 (1): 25-33.
- [15] Zhou L Y, Wang D S, Kobayashi T, et al. A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney [J]. Endocrinology, 2007, 148 (9): 4282-4291.
- [16] Zanette J, Jenny M J, Goldstone J V, et al. New cytochrome P450 1B1, 1C2 and 1D1 genes in the killifish *Fundulus heteroclitus*: Basal expression and response of five killifish CYP1s to the AHR agonist PCB126 [J]. Aquat Toxicol, 2009, 93 (4) :234-243.

- [17] Qin K N, Rosenfield R L. Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 145:111–121.
- [18] Lee-Robiehaud P, Akhtar M E, Wright J N, et al. The cationic charges on Arg<sup>347</sup>, Arg<sup>358</sup> and Arg<sup>449</sup> of human cytochrome P450c17(CYP17) are essential for the enzyme's cytochrome b5-dependent acyl-carbon cleavage activities [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 92:119–130.
- [19] Berstén L M, Il'yanyitov E N, Susptsin E N, et al. CYP19 gene polymorphism in endometrial cancer patients[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127(3): 135–138.
- [20] Miki Y, Swenson J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1[J]. *Science*, 1994, 266: 66–71.
- [21] Gurtues B, Sebastian S, Yang S, et al. WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(9):4369–4377.
- [22] Meinhardt U, Mullis P E. The aromatase P-450 and its clinical impact[J]. *Horm Res Paediat*, 2002, 57(5):145–152.
- [23] Voutilainen R, Miller W L. Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450 (20, 22-desmolase), P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20lyase) in cultured human granulosa cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986, 63: 202–207.
- [24] Zhang P, Compagnone N A, Fiore C, et al. Developmental gonadal expression of the transcription factor SET and its target gene, P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20lyase) [J]. *DNA Cell Biol*, 2001, 20:613–624.

## Cloning and bioinformatics analysis of aromatization gene *P450c17* in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)

TIAN Yi, ZHANG Binglong, CHANG Yaqing

Dalian Ocean University, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Agriculture, Dalian 116023, China

**Abstract:** We cloned and characterized a unique and highly compartmentalized sea cucumber aromatization gene, *P450c17*. The full-length sea cucumber *P450c17* cDNA was 2 036 bp in length, and contained a 1 530 bp open reading frame (ORF), a 250 bp 3'UTR, and a 256 bp 5'UTR. Based on the effective length of gene translation, the full-length *P450c17* cDNA had ATTTA special sequences in the 3' UTR and polyA regions. The full-length *P450c17* cDNA encoded 509 amino acids constituting a 57.6 kD protein molecule with an isoelectric point of 5.5. The precursor protein was hydrophilic. The protein sequence had one signal peptide, consisting of a 25 amino acid residue. The signal peptide consisted primarily of an alpha helix. The sequence of amino acids contained one transmembrane region, involving in electronic transfer catalysis between the internal and external membrane. We found a single N-glycosylation site, suggesting the precursor protein belonged to the family of secretion transmembrane glycoproteins. The secondary structure of the precursor protein consisted primarily of an alpha helix, with irregular coiling and a strand chain, but without  $\beta$  folding in the complete protein. Sequence comparison revealed that the similarity of the P450c17 precursor protein ranged from 35% to 41% with other aquatic animals. We conducted a phylogenetic analysis using the neighbor joining (NJ) method. The evolutionary tree indicated that the P450c17 precursor protein was clustered with the oyster and lancelet amphioxus. The P450c17 precursor protein contained a P450 specific structure domain. The conserved core was composed of a coil termed the “meander”, a four-helix bundle, helices J and K, and two sets of beta-sheets. These constitute the haem-binding loop (with an absolutely conserved cysteine that serves as the 5th ligand for the haem iron), the proton-transfer groove, and the absolutely conserved EXXR motif in helix K. Our results provide a reference for investigating the function of this gene.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; *P450c17*; gene cloning; bioinformatics analysis

**Corresponding author:** CHANG Yaqing. E-mail: yqchang@dlou.edu.cn