

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00138

唐鱼 Caspase-3 和 Caspase-9 cDNA 全长克隆及胁迫表达分析

徐胜威¹ 李恬¹ 吴金英¹ 梁健宏² 刘汉生² 连常平²

(1. 中山大学生命科学学院, 水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广州 510275;
2. 广州市海洋与渔业自然保护区管理站, 广州 510405)

摘要: 研究以唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) 鳃部组织为材料, 利用同源克隆和 RACE 方法, 首次克隆得到唐鱼 Caspase-3 和 Caspase-9 cDNA 全长序列, 并对其生物信息学进行了分析和鉴定。实验结果表明唐鱼 Caspase-3 cDNA 全长 2153 bp, 开放读码框 (Open Reading Frame, ORF) 为 840 bp, 编码一段长为 279 个氨基酸的多肽序列; Caspase-9 cDNA 全长为 1758 bp, ORF 为 1323 bp, 编码 440 个氨基酸。生物信息学分析表明 Caspase-3 和 Caspase-9 与其他鱼类在蛋白结构上较为保守, 在重要的功能域呈现高度的保守性。应用实时荧光定量 PCR 技术, 分析了氯氰菊酯对唐鱼鳃部组织表达 Caspase-3 和 Caspase-9 的影响, 在氯氰菊酯的胁迫下, Caspase-3 和 Caspase-9 的表达呈现抑制状态, 且呈现明显的浓度和时间依赖效应。

关键词: 唐鱼; Caspase-3; Caspase-9; 克隆; 氯氰菊酯; 表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)01-0138-07

唐鱼(*Tanichthys albonubes*)又称白云山鱼、白云金丝鱼, 属鲤科(Cyprinidae)、唐鱼属(*Tanichthys Lin*)的一种小型鱼类, 是中国第一批公布的国家二级重点保护水生野生动物之一^[1]。唐鱼具有体形小、性成熟早、一年能繁殖多代等一系列优点, 并且拥有与斑马鱼(*Danio rerio*)等模式生物相似的特征, 适合培养成为一种新的鱼类毒性实验受试生物^[2, 3]。

氯氰菊酯(Cypermethrin, CP)属拟除虫菊酯类农药中重要的一种广谱性杀虫剂, 其产量和用量在拟除虫菊酯类农药中均占首位^[4]。虽然氯氰菊酯对哺乳类、鸟类及其他高等脊椎动物的毒性不大, 但这类农药对鱼类及其他水生生物属高毒性^[5]。

Caspase 家族是哺乳类动物细胞凋亡过程中最重要的影响因素, 它们是一组半胱氨酸天冬氨酸酶^[6]。众所周知, 细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的程序性死亡方式, 凋亡的发生有利于维持机体内环境稳定; 细胞凋亡的两条主要通路是线粒体通路和死亡受体通路, 最终都能激活 Caspase 效应分子,

而线粒体通路主要是由线粒体中细胞色素 c 释放激发^[7]。Caspase-3 是 Caspase 家族中的最重要的成员, 绝大多数触发细胞凋亡的因素, 最终都需要通过 Caspase-3 介导的信号传递途径^[8]。Duna, et al. 通过检测蛋白序列和 X 线晶体结构, 发现 Caspase-9 是 Caspase 家族的重要成员之一^[9]。细胞遭受凋亡刺激后, 细胞色素 c 迅速从线粒体释放入胞浆与凋亡蛋白酶活化因子-1 (Apaf-1) 结合, 形成复合物, 在 ATP 和 dATP 的参与下, 激活 Caspase-9 前体, 活化的 Caspase-9 进而激活 Caspase-3 前体, 最后活化的 Caspase-3 执行效应子的作用, 引起细胞凋亡^[10]。Caspase-9 处在该线粒体途径的顶端, 是该途径的关键蛋白酶。

随着氯氰菊酯用量和使用时间的增加, 近年来鱼体受水体环境污染事故造成鱼体大量死亡时有发生。作者在广东省广州市市郊从化调研唐鱼时, 发现唐鱼都是生活在山中清洁的溪流中, 周围都是农田, 当地唐鱼种群数量的减少是否与当地农田农药

收稿日期: 2009-11-24; 修订日期: 2010-10-13

基金项目: 国家人才基金(基地)项目(J0730638); 广州市海洋与渔业自然保护区管理站基金项目(2007-33000-4206649)资助

作者简介: 徐胜威(1983—), 男, 浙江兰溪人; 硕士; 主要从事水生生物免疫和病害防治研究。E-mail: xushengw@mail2.sysu.edu.cn

通讯作者: 吴金英(1963—), E-mail: lsswjy@mail.sysu.edu.cn

的使用有关? 围绕这个问题, 本文对唐鱼凋亡相关因子 Caspase-3 和 Caspase-9 进行克隆和生物信息学分析, 并通过模拟农药污染对唐鱼进行氯氰菊酯中毒实验, 对唐鱼在环境污染的胁迫环境中, Caspase-3 和 Caspase-9 的表达情况进行了探索。这对唐鱼毒理学研究具有重要的理论意义, 同时对于合理使用农药, 最大限度地减少其对环境的毒副作用具有参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物 野生唐鱼采自广州从化山中溪流, 平均体长(2.23 ± 0.52) cm、重量(0.36 ± 0.12) g, 实验前暂养 1 周以上。

药品试剂 Trizol[®] reagent 购自 Invitrogen (USA) 公司; DNA 酶 (RNase-free DNase I) 购自 MBI Fermentas (USA) 公司; Blend Taq 聚合酶、ReverTra Ace 反转录试剂盒及定量用试剂盒 SYBR Green Real-time PCR Master Mix plus kit 均购自 TOYOBO (Japan) 公司; DNA Ladder 购自广州东盛生物科技有限公司; E.Z.N.A.[®] Gel Extraction 和 E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit 购自 Omega Bio-Tek

(USA)公司; pMD19-T 载体、TdT 加尾试剂盒及 dCTP 均购自 TaKaRa (Japan)公司; 其余均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

总 RNA 的提取与反转录 快速取出唐鱼鳃组织于 1.5 mL 离心管, 加入 1 mL Trizol 试剂, 冰上匀浆提取总 RNA。具体抽提步骤按 Trizol Reagent 说明书进行。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 于-80℃保存。以 Oligo d (T)₂₀ 为接头引物, 用 TOYOB0 公司的 ReverTra Ace 反转录试剂盒将得到的总 RNA 反转录合成 cDNA, 产物保存于-20℃备用。

Caspase-3 与 Caspase-9 cDNA 克隆 根据 NCBI 上已发表的鱼类 Caspase-3 和 Caspase-9 基因序列分别设计一对兼并引物(表 1), 以唐鱼鳃部 RNA 反转录产物为模板进行 PCR 扩增。根据得到的 Caspase-3 和 Caspase-9 cDNA 中间片段设计特异性引物(表 1)进行 5'-RACE 和 3'-RACE 反应。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 经 E.Z.N.A.[®] Gel Extraction 回收目的片段, 将回收产物连接到 pMD19-T 载体并转化大肠杆菌 DH5 α , 测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

表 1 唐鱼 Caspase-3 和 Caspase-9 全长 cDNA 和定量所用引物

Tab. 1 Nucleotide sequences of the primers used for parital fragment, 3'-RACE, 5'-RACE and real-time quantitative PCR

引物名 Primers	引物方向: 5'→3' Primer sequence 5'→3'	用途 Information
Caspase-3 PS	TCATCATYACAAACAAGAAYTT	Caspase-3 partial
Caspase-3 PA	GASACRATRCADGGGATYTG	
Caspase-9 PS	THGACTGYGACARRCTGGAG	Caspase-9 partial
Caspase-9 PA	GAGTAGGACACCAGDATGTCACT	
β -actinF	TGCTGTCCCTGTATGCCTCT	
β -actinR	CCTTGATGTCACGCACGAT	β -actin partial
Caspase-3R1	GCTCCTTCCATACTTAGCCATC	Caspase-3 5'-RACE
Caspase-3R2	ACCAGTCATAGTGTCTCCAGG	
Caspase-9R1	GCGTCCATCTGGTCATCTATTCC	Caspase-9 5'-RACE
Caspase-9R2	GGACAGTTCTGCCATTGAGGTAG	
Caspase-3F1	TCCTGGAGAACACTATGACTGG	Caspase-3 3'-RACE
Caspase-3F2	TGATGGCTAAGTATGGAAAGGAG	
Caspase-9F1	CTACCTCAATGGCAAGAACTGTCC	Caspase-9 3'-RACE
Caspase-9F2	TGTCCTCCAGCAGCGACTCTCTC	
Caspase-3DF	TAGCCTGTTCAAGGAGACC	Caspase-3 real-time
Caspase3DR	CCTTCCATACTTAGCCATC	
Capse-9DF	TCTACAAAGGCAAGCCCAAGC	Caspase-9 real-time
Capse-9DR	CGTCCCATCTGGTCATCTATTCC	

注: 简并碱基代号: R=A/G; S=C/G; Y=C/T; D=A/G/T; H=A/C/T

Note: The symbols of degenerate primers: R=A/G; S=C/G; Y=C/T; D=A/G/T; H=A/C/T

生物信息学分析 DNA 和氨基酸序列与 Genbank 数据的同源性分析通过 NCBI 提供的 BLAST 程序; DNA 和蛋白质重要位点及结构域使用 ExPASY 工具 (<http://www.us.expasy.org>) 和 CBS 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services>) 分析; 蛋白序列多重比对采用 CLUSTAL W 软件 (www.ebi.ac.uk/clustalw); 氨基酸序列进化树通过 MEGA 3.1 的邻位相连法 (neighbor-joining method) 构建。

氯氰菊酯体外刺激 用蒸馏水将 10% 氯氰菊酯乳剂配制为 40 mg/L 的母液。将实验分为 4 个浓度组, 分别为空白对照组和 3 个浓度组, 各实验组氯氰菊酯的质量浓度分别为 1、4、8 μg/L, 每组设 3 个平行, 每天更换药液。攻毒后的第 12、24、48、72 h 取唐鱼鳃组织, 迅速放于液氮罐中, 然后转置于 -80℃ 冰箱冷藏备用。RNA 的提取和反转录同前。

实时荧光定量 PCR 定量所用的仪器为 ABI 的 PRISM-7900 序列检测系统 (Applied Biosystems, 美国)。根据已得到的 Caspase-3 和 Caspase-9 cDNA 序列合成定量用特异性引物 (表 1), 以攻毒后各鳃组织的反转录产物为模板, β -actin 作为内参, 通过荧光定量检测唐鱼攻毒后 Caspase-3 和 Caspase-9 基因的表达谱。PCR 20 μL 体系包括: cDNA 模板 1 μL, 正反向引物各 0.4 μL, 双蒸水 8.2 μL, SYBR® Green Real-time PCR Master Mix 10 μL。PCR 的扩增条件: 94°C 2 min, (94°C 15 s, 55°C 15 s, 72°C 30 s) × 40。统计数值采用算术平均数 ± 标准误来表示。所有数据都采用 SPSS Statistics 17.0 分析。

2 结 果

2.1 Caspase-3 分子克隆与鉴定

唐鱼 Caspase-3 cDNA (Genbank 登录号: GQ406344) 全长 2153 bp, 其中 5' 非编码区为 275 bp, 3' 非编码区为 1038 bp, 开放读码框 (Open Reading Frame, ORF) 为 840 bp, 编码一段长为 279 个氨基酸的多肽, 分子量约为 30.8 kD。利用 PROSITE 软件发现唐鱼 Caspase-3 前体多肽中存在 p20 (K46-E170) 和 p10 (G185-A279) 结构域以及组氨酸活化位点 (Caspase 家族标志) H111SRCASLVCV MPSHG125 和半胱氨酸活化位点 K157PKLFFI QACRG168。氨基酸序列多重比对

表明, 唐鱼 Caspase-3 多肽序列中的五肽活性位点 (QACRG) 以及两个天冬氨酸切割位点 (Asp30, Asp178) 在各物种中是高度保守的。Asp30 处裂解使唐鱼 Caspase-3 多肽切除原结构域; 而 Asp178 处裂解使多肽剩余部分再次切割成大小两个亚基。

唐鱼与其他鱼类 Caspase-3 氨基酸序列的同一性比较表明, 唐鱼 Caspase-3 cDNA 与其他鱼类同一性为 67.7%—84.0%。其中与唐鱼同一性最高的为斑马鱼 (*D. rerio*, 84.0%), 其次是大西洋鲑 (*Salmo salar*, 74.7%) 和欧洲狼鲈 (*Dicentrarchus labrax*, 71.9%), 与红鳍东方 (*Takifugu rubripes*, 67.8%) 和青 (*Oryzias latipes*, 67.7%) 的同一性较低。进化树显示的结果与氨基酸序列同一性比对结果类似, 唐鱼 Caspase-3 与鲤形目(斑马鱼)亲缘关系最近, 其次是鲱形目(大西洋鲑), 与 形目(红鳍东方) 亲缘关系较远, 而与鲈形目(欧洲狼鲈)和 形目(青) 亲缘关系最远(图 1)。

2.2 Caspase-9 cDNA 克隆与鉴定

唐鱼 Caspase-9 cDNA 全长为 1758 bp (Genbank 登录号: GQ406345)。其中, ORF 为 1323 bp, 5' 非编码区为 183 bp, 3' 非编码区为 252 bp, 前体蛋白包括 440 个氨基酸残基, 分子量约为 49.2 kD。利用 BLAST 同源搜索, 发现唐鱼 Caspase-9 与其他脊椎动物比较保守。PROSITE 分析表明唐鱼 Caspase-9 前体蛋白 N 端含有 Caspase 募集域 (CARD), Caspase p20 (P175-E307) 和 p10 (A350-S437) 结构域也存在于前体蛋白中。另外, Caspase 家族中的组氨酸激活位点和半胱氨酸激活位点在唐鱼 Caspase-9 中也是保守的。唐鱼 Caspase-9 与其他物种的氨基酸序列多重比对, 发现五肽活性基序 (QACGG) 存在于大亚基中, 且在各物种中是高度保守的。唐鱼中存在两个可能的天冬氨酸残基 (Asp331 和 Asp349) 将前体蛋白分成大小亚基。

唐鱼与其他鱼类 Caspase-9 氨基酸序列同一性比较, 表明 Caspase-9 在鱼类中比较保守, 同一性从 58.9% 到 79.2%。与唐鱼 Caspase-9 氨基酸序列同一性最高的为斑马鱼 (*D. rerio*, 79.2%), 其次是大黄鱼 (*Larimichthys crocea*, 69.1%) 和欧洲狼鲈 (*D. labrax*, 68.3%), 以及虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*, 67.6%); 同源性最低的为绿河 (*Tetraodon nigroviridis*, 58.9%)。进化树(图 1)显示, 鱼类 Caspase-9 分布于

一个簇中, 相对比较保守, 其中唐鱼 Caspase-9 与鲤

形目(斑马鱼)亲缘关系最近, 其次是 形目(绿河)

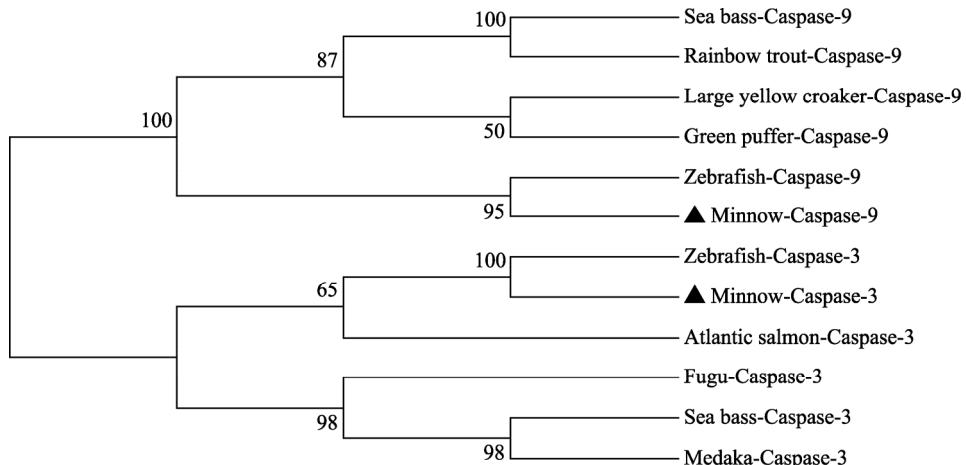


图 1 邻接法构建的 Caspase-3 和 Caspase-9 家族进化树

Fig. 1 Neighbour-joining phylogenetic tree of Caspase-3 and Caspase-9 families

和鲈形目(大黄鱼), 与鲈形目(欧洲狼鲈)和鲑形目(虹鳟)之间的亲缘关系相对较远。

2.3 Caspase-3 与 Caspase-9 在氯氰菊酯胁迫下的表达谱

各染毒组唐鱼 Caspase-3、Caspase-9 在不同时间段的相对表达量(图 2、图 3)。结果表明 Caspase-3 和 Caspase-9 在氯氰菊酯的胁迫下具有相似的表达谱。由图 2、图 3 可以看出, 加入氯氰菊酯后 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达量几乎都有所降低。随着染毒时间的延长, Caspase-3 和 Caspase-9 在低浓度($1 \mu\text{g}/\text{L}$)氯氰菊酯中, 其表达量在显著低于对照组的情况下, 先逐渐增加, 在 48h 后其表达量达到峰值, 并略高于对照组; 随后在 72h 有所下降; 而在中浓度($4 \mu\text{g}/\text{L}$)和高浓度($8 \mu\text{g}/\text{L}$)的氯氰菊酯中, 其表达量变化情况是: Caspase-3 和 Caspase-9 表达量先均逐渐降低, 随后又缓慢增加, 与 Caspase-9 相比 Caspase-3 在中浓度和高浓度中与对照组的差异更加明显。

3 讨 论

3.1 Caspase-3 生物信息学分析

BLAST 分析和测序验证表明唐鱼 Caspase-3 ORF 编码的多肽分子量为 30.7 kD, 与其他已报道的 Caspase-3 分子量相似^[11-14]。在人类中, 前体 Caspase-3 两个裂解位点位于 Asp28-Ser29 (ESMD ↓ S) 和 Asp175-Ser176 (IETD ↓ S), 前者使原结构域和大亚单位分离; 后者又在大亚单位上继续裂解形成大小亚基^[15]。经氨基酸序列多重同源比对分析,

作者认为唐鱼的裂解位点位于 Asp30 和 Asp178。但

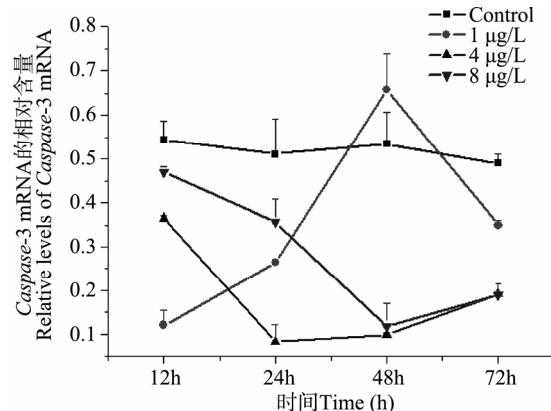


图 2 不同浓度的氯氰菊酯对唐鱼鳃组织 Caspase-3 mRNA 表达量的影响

Fig. 2 The effects on Caspase-3 mRNA expression level of *T. albonubes* in gill bathed with cypermethrin

所有数据均采用平均值 ± 标准误表示

Data are represented as means ± SEM ($n = 3$)

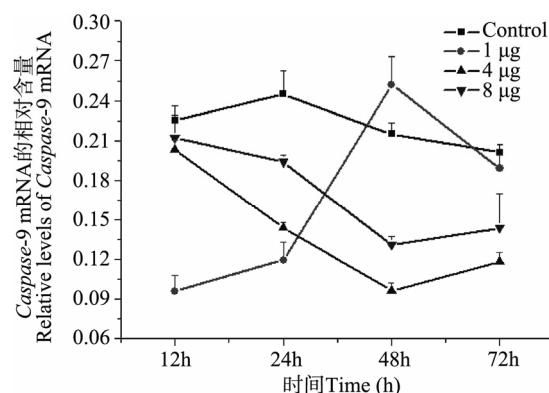


图 3 不同浓度的氯氰菊酯对唐鱼鳃组织 Caspase-9 mRNA 表达量的影响

Fig. 3 The effects on Caspase-9 mRNA expression level of *T.*

albonubes in gill bathed with cypermethrin

所有数据均采用平均值±标准误表示

Data are represented as means ± SEM ($n = 3$)

是, Caspase-3 可能存在多个可供选择的裂解位点而得以激活^[16], 因为有多的保守或不保守的天冬氨酸残基存在于唐鱼 Caspase-3 序列中, 因此预测的裂解位点可能不是唯一的。蛋白结合域 GSWFI^[13] 在分析的物种中除少数在最后一个氨基酸有保守置换外是高度保守的。唐鱼中两个色氨酸残基(W208, W216)在所有分析的物种中高度保守, 这两个色氨酸残基在 Caspase-3 激活的过程中具有重排作用, 使激活位点发生重排^[17], 这表明在鱼类和其他物种可能具有相同的重排机制。另外, 激活位点附近的整联蛋白识别域 (RGD)^[18] 在分析的物种中除了在狼鲈(*D. labrax*)外是保守的。在狼鲈中, 天冬氨酸残基被天冬酰胺取代。

3.2 Caspase-9 生物信息学分析

唐鱼 Caspase-9 N 端的 CARD 结构的存在具有重要的意义。在细胞凋亡的诱导上, 凋亡前体蛋白可以触发线粒体外膜的通透性增加^[19], 释放细胞色素 *c* 到胞质溶胶^[20], 之后细胞色素 *c* 结合到 Apaf-1, 并增加 Apaf-1 与 dATP 或 ATP 的亲和力, 从而诱导核苷酸结合到 Apaf-1/细胞色素 *c* 复合体上^[21], 这结果使 Apaf-1 寡聚化作用, 并暴露 CARD, 从而产生凋亡复合体^[22]。在人类中, Caspase-9 大亚基和小亚基的裂解位点发生在 PEPD315 和 DQLD330^[23], 通过匹配唐鱼和人以及其他物种的 Caspase-9 的裂解位点, 可以预测出唐鱼的裂解位点为 Asp331 和 Asp349, 这两个裂解位点在所分析的物种中是保守的。由于原结构域在不同物种中具有高变性, 因此原结构域的切割位点尚没有定论。不过, 由于唐鱼和斑马鱼该基因序列的高度同一性, 可以通过和斑马鱼的序列对比预测唐鱼原结构域裂解位点位于 Asp164。

系统进化分析显示唐鱼 Caspase-9 与其他脊椎动物特别是在鱼类中同一性较高。鱼类中 Caspase-9 的高保守性得到了多重比对和 BLAST 搜索以及进化树的支持。由于 Caspase-9 在进化中是比较保守的^[24], 唐鱼和其他物种 Caspase-9 的高度保守性可能暗示他们功能的同源性。

3.3 Caspase-3 与 Caspase-9 在氯氰菊酯胁迫下的表达规律

拟除虫菊酯类杀虫剂对哺乳类、鸟类毒性不大, 但对鱼等水生生物毒性极大, 是因为鱼类的鳃组织极易从外界吸收此类物质^[25]。将草鱼浸泡于氯氰菊酯溶液中, 发现氯氰菊酯的暴露能对草鱼鳃呼吸膜造成严重损伤^[26]。本实验中采用唐鱼鳃部组织 Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 表达规律来探讨氯氰菊酯对唐鱼的毒理效应。Caspase-3 和 Caspase-9 在氯氰菊酯的胁迫下, 表达量几乎都低于对照组, 显示了明显的应激反应。低浓度组与其他浓度组相比在早期显示了较强的应激反应, 表达量显著低于对照组($P < 0.01$), 随着刺激时间的延长, 低浓度组表达量持续上升, 在 48h 时其表达量达到最大值, 并略高于对照组, 而在 48h 后开始下降。我们推测唐鱼在起始阶段的应激反应后, 持续的胁迫产生了适应, 因此表达量上升, 但是长时间的胁迫使细胞开始受损, 所以表达量下降。但是在中浓度和高浓度刺激下, Caspase-3 和 Caspase-9 表达量的情况是先下降, 然后逐渐上升。如同低浓度组, 经氯氰菊酯作用后, 起始的应激反应使中浓度和高浓度组表达低于对照组; 然后由于代偿作用, 表达会逐渐达到一个新的动态平衡, 但胁迫后的适应比低浓度组要延迟, 这显示中浓度和高浓度的氯氰菊酯对唐鱼产生的应激反应更持久, 在细胞凋亡中对唐鱼鳃细胞的影响更大。实验结果表明唐鱼 Caspase-3 和 Caspase-9 在氯氰菊酯的胁迫下呈现明显的浓度和时间效应关系。另外, 唐鱼 Caspase-3 和 Caspase-9 在氯氰菊酯的刺激下表达谱呈现高度的一致性, 这可能与 Caspase-9 和 Caspase-3 上下游的级联反应有关, 细胞毒性作用时, 细胞色素 *c* 从线粒体释放到细胞质中, 使 Caspase-9 活化, 而 Caspase-9 可以活化 Caspase-3^[10], 从而引起更多的 Caspase-3 表达。在本实验中, 在各浓度氯氰菊酯的胁迫下, 所有实验鱼都能够存活, 但是 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达量有较明显的下降, Caspase-3 和 Caspase-9 表达量的下降可能有利于唐鱼在恶劣环境中生存。

参考文献:

- [1] Shi F, Lin X T, Sun J, et al. Age structure and growth characteristics of wild *Tanichthys albonubes* population [J]. Chinese Journal of Ecology, 2008, 27(12): 2159—2166 [史方,

- 林小涛, 孙军, 等. 自然种群唐鱼的耳石、日龄与生长. 生态学杂志, 2008, **27**(12): 2159—2166]
- [2] Wang R L, Ma G Z, Fang Z Q. Safety assessment and acute toxicity of copper, cadmium and zinc to white cloud mountain minnow *Tanichthys albonubes* [J]. *Fisheries Science*, 2006, **25**(3): 117—120 [王瑞龙, 马广智, 方展强. 铜、镉、锌对唐鱼的急性毒性及安全浓度评价. 水产科学, 2006, **25**(3): 117—120]
- [3] Wang H Y, Ye X, Bai J J, et al. Isolation of white cloud mountain minnow β -actin promoter and assay of its transcription activity [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, **15**(1): 47—54 [王海英, 叶星, 白俊杰, 等. 唐鱼 β -肌动蛋白基因启动子的分离及其驱动活性的检测. 中国水产科学, 2008, **15**(1): 47—54]
- [4] Wang R L, Chen Y M, Xu J, et al. Effects of cypermethrin on superoxide dismutase (SOD) activities in liver and gill tissues of *Tanichthys albonubes* [J]. *Ecology and Environment*, 2007, **16**(3): 790—793 [王瑞龙, 陈玉明, 徐军, 等. 氯氟菊酯对唐鱼肝和鳃组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响. 生态环境, 2007, **16**(3): 790—793]
- [5] Mu W, Xia W, Xiong L, et al. Study of metabolizable damage in *Carassius auratus* caused by Cypermethrin [J]. *Journal of Huazhong Normal University*, 2008, **42**(4): 602—605 [牟文, 夏伟, 熊丽, 等. 氯氟菊酯对鲫鱼机体代谢损伤效应研究. 华中师范大学学报, 2008, **42**(4): 602—605]
- [6] Xing M L, Chen J P, Wang X F, et al. Effect of okadaic acid on apoptosis in human amnion cells [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(4): 607—609 [邢鸣鸾, 陈加平, 王晓峰, 等. 大田软海绵酸对人胚胎羊膜细胞 FL 凋亡的影响. 水生生物学报, 2007, **31**(4): 607—609]
- [7] Zhang J, Huang B, Gao Q, et al. Molecular cloning and characterization of fas-associated death domain (FADD) from *Branchiostoma belcheri* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(6): 1175—1184 [张晶, 黄贝, 高谦, 等. 白氏文昌鱼 FADD 的克隆及功能研究. 水生生物学报, 2009, **33**(6): 1175—1184]
- [8] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*, 2000, **407**: 770—776
- [9] Duan H, Orth K, Chinnaiyan A M, et al. ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**: 16720—16724
- [10] Luo X, Budihardjo I, Zou H, et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome C release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors [J]. *Cell*, 1998, **94**: 481—490
- [11] Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri E S. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**: 30761—30764
- [12] Johnson A L, Bridgham J T. Caspase-3 and -6 expression and enzyme activity in hen granulosa cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2000, **62**: 589—598
- [13] Wang H, Keiser J A. Molecular characterization of rabbit CPP32 and its function in vascular smooth muscle cell apoptosis [J]. *American Journal of Physiological Heart and Circulatory Physiology*, 1998, **274**: H1132—H1140
- [14] Yabu T, Kishi S, Okazaki T, et al. Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish fathead minnow tailbud cells and zebrafish embryo [J]. *Biochemical Journal*, 2001, **360**: 39—47
- [15] Nicholson D W, Ali A, Thornberry N A, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [J]. *Nature*, 1995, **376**: 37—43
- [16] Wang X, Zelenski N G, Yang J, et al. Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis [J]. *EMBO Journal*, 1996, **15**: 1012—1020
- [17] Park I S, Moon H R, Seok H, et al. Rearrangement of tryptophan residues in caspase-3 active site upon activation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, **1700**: 5—9
- [18] Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1996, **12**: 697—715
- [19] Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome C by the mitochondrial channel VDAC [J]. *Nature*, 1999, **399**: 483—487
- [20] Liu X, Kim C N, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C [J]. *Cell*, 1996, **86**: 147—157
- [21] Jiang X, Wang X. Cytochrome C promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**: 31199—31203
- [22] Saleh A, Srinivasula S M, Acharya S, et al. Cytochrome C and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**: 17941—17945
- [23] Srinivasula S M, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, et al. The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**: 27099—27106
- [24] Hu Y, Benedict M A, Wu D, et al. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**: 4386—4391
- [25] Wang Y, Xiong L, Liu X P, et al. Subacute Toxicity of Cypermethrin to Carp [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, **25**(1): 200—203 [王媛, 熊丽, 刘喜平, 等. 氯氟菊酯对鲤鱼亚急性毒性研究. 农业环境科学学报, 2006, **25**(1): 200—203]

- [26] Xie W P, Zhu X P, Chen K C, et al. Toxic effects of cypermethrin on Na^+/K^+ -ATP activity and ultramicrostructure of gill and liver tissue in grass carp [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, **16**(1): 120—126 [谢文平, 朱新平,

陈昆慈, 等. 氯氰菊酯对草鱼组织 Na^+/K^+ -ATP 酶活性及肝、鳃超显微结构的影响. 中国水产科学, 2009, **16**(1): 120—126]

CLONING AND EXPRESSION OF WHITE CLOUD MOUNTAIN MINNOW (*TANICHTHYS ALBONUBES*) CASPASE-3 AND CASPASE-9 cDNAs

XU Sheng-Wei¹, LI Tian¹, WU Jin-Ying¹, LIANG Jian-Hong², LIU Han-Sheng² and LIAN Chang-Ping²

(1. Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275; 2. Guangzhou Management Station of Ocean and Fisheries Natural Reserves, Guangzhou 510405)

Abstract: The white cloud mountain minnow (*Tanichthys albonubes*) is an important aquarium fish, and also a potential experimental model organism. In order to get the knowledge of apoptosis under environmental stress in this species, we have firstly cloned and sequenced the full-length cDNAs of *Caspase-3* and *Caspase-9* from the gill tissue of *T. albonubes* using homology cloning approach combined with RACE method. In this study, the bioinformatics analysis of *Caspase-3* and *Caspase-9* full-length cDNA sequences were presented. The results indicated that the full-length cDNA of *Caspase-3* was composed of 2153 base pairs (bp), which included a 840 bp open reading frame (ORF) encoding a 279-amino acid peptide, whereas the full-length cDNA of *Caspase-9* was composed of 1758 bp, which included a 1323 bp ORF encoding a 440-amino acid peptide. The identity comparison and the phylogenetic analysis showed that the predicted *Caspase-3* and *Caspase-9* proteins of *T. albonubes* were structurally similar to those of other fish, with high conservation in important functional domains. Real-time PCR analysis showed that the expression levels of *Caspase-3* and *Caspase-9*, under cypermethrin-induced stress conditions, were suppressed compared to control group, and that *Caspase-3* and *Caspase-9* mRNA levels were significantly affected in a dose- and time-dependent manner by cypermethrin. These results suggest that cypermethrin plays a role in the suppression of apoptosis of *T. albonubes*, and that the anti-apoptotic effect of cypermethrin may be beneficial to this fish so that it can survive in harsh environments.

Key words: *Tanichthys albonubes*; Caspase-3; Caspase-9; Cloning; Cypermethrin; Expression