

# 团头鲂(*Megahbrama amblycephala*) Caspase 9 基因全长 cDNA 的克隆及在氨氮胁迫下的 表达分析\*

章 琼<sup>1,2</sup> 孙盛明<sup>2</sup> 李 冰<sup>2</sup> 蒋高中<sup>1,2①</sup> 朱 健<sup>2</sup> 戈贤平<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 无锡 214081)

**摘要** 为了解团头鲂(*Megahbrama amblycephala*) Caspase 9 基因序列特征及其在氨氮胁迫过程中的作用,应用末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆得到团头鲂 Caspase 9 基因全长 1613 bp 的 cDNA 序列,包括 185 bp 的 5'末端非翻译区(Untranslated regions, UTR)、96 bp 的 3'UTR、1332 bp 的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)。氨基酸多序列比对显示,平均同源率为 77.74%,表明团头鲂 Caspase 9 基因具有较高的保守性;系统进化分析显示,该基因氨基酸序列与其他鱼类 Caspase 9 聚为一支,并与锦鲤(*Cyprinus carpio*) Caspase 9 亲缘关系较近;荧光定量 PCR 结果显示, Caspase 9 基因在团头鲂各组织中均有表达,在脑中表达量最高,在肌肉中表达量最低,同时,在胁迫和恢复过程中,该基因在肝和脑中的表达规律相似,均在胁迫期间出现表达量上调,整体呈类似波浪形表达谱。研究结果表明,氨氮胁迫下, Caspase 9 基因参与团头鲂的免疫防御,并与细胞凋亡分子过程有关。本研究结果可为进一步了解团头鲂应答氨氮胁迫分子机制提供理论依据。

**关键词** 团头鲂; 细胞凋亡因子; 基因克隆; 氨氮胁迫; 组织表达

**中图分类号** S941 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)01-0036-10

细胞凋亡的概念是病理学家 Kerr 于 1972 年正式提出的,凋亡途径可分为 Caspase 依赖性凋亡和 Caspase 非依赖性凋亡,而前者是凋亡的主要形式,又可分为死亡受体介导的外源性细胞凋亡和线粒体介导的内源性细胞凋亡(Kerr *et al*, 1972)。Caspase (Cysteinylaspartate specific proteinase)在 1996 正式命名(Nicholson *et al*, 1997),是一类具有天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶,几乎参与所有凋亡通路的级联反应,是细胞凋亡的核心(Thornberry *et al*, 1998)。Caspase 家族都有相似的催化部位,在其 C 端有一个

高度保守的含有活性位点 Cys 残基的 QACXG(X 为 R、Q 或 G)五肽序列和一个含有 His 残基的 SHG motif。

已鉴定并确定其功能的有 11 种 Caspase,其中 Caspase 1、4、11 负责白介素前体活化,不直接参与凋亡信号传递;Caspase 2、8、9、10、11 主要是凋亡的起始者(Apoptotic initiator);Caspase 3、6、7 主要是凋亡的执行者(Apoptotic executioner)。Caspase 9 是线粒体介导凋亡途径的关键蛋白酶,处于 Caspase“瀑布式”级联反应的顶端,是细胞凋亡的启动子。在机体受到外界因子诱导后, Caspase 9 酶原发生切割加

\* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2013A08XK01)、国家大宗淡水鱼类产业技术体系华东养殖岗位(CARS-46-14)和“十二五”国家科技支撑计划“长江下游池塘高效生态养殖技术集成与示范”(2012BAD25B07)共同资助。

章 琼, E-mail: 819153429@qq.com

① 通讯作者: 蒋高中, 研究员, E-mail: jianggz@ffrc.cn

收稿日期: 2014-12-05, 收修改稿日期: 2014-12-21

工,同时线粒体释放细胞色素 C 与凋亡因子 1(Apoptosis protease-activating factor-1, Apaf-1)形成多聚体, Caspase 9 需要与其结合形成凋亡体(Apoptosome)共同作用才能产生较高的催化活性(Mannick *et al*, 1999), 活化后 Caspase 9 可以直接活化 Caspase 3, 间接活化 Caspase 2、6、8、10, 进而引发级联反应, 诱导细胞凋亡。

目前, Caspase 细胞凋亡已经成为生命科学领域研究的热点之一, 水生动物细胞凋亡的研究也逐渐增多。张金洲(2008)<sup>1)</sup>获得了大黄鱼(*Larimichthys crocea*)中 Caspase 3 和 Caspase 9 等基因, 并得出了 Caspase 9 参与了细菌感染过程的免疫反应的结论; 贾旭颖等(2014)研究了温度和氨氮胁迫下凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) Caspase 3 的表达规律变化; 王芸(2011)<sup>2)</sup>对 pH 和氨氮胁迫下中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) Caspase 的应激机理进行了研究; 徐胜威等(2011)克隆到了唐鱼(*Tanichthys albonubes*)的 Caspase 9 基因, 并研究了唐鱼在氯氰菊酯胁迫下 Caspase 9 的表达情况; 黄吉芹(2013)<sup>3)</sup>克隆了草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) Caspase 3、Caspase 9 等凋亡相关基因; 李华涛(2013)<sup>4)</sup>探索了鲤鱼(*Cyprinus carpio*)细胞凋亡过程中 Caspase 的活性变化等。但是, 关于团头鲂(*Megahbrama amblycephala*) Caspase 9 基因的研究还未见报道。

团头鲂是我国重要的草食性经济鱼类(张飞明等, 2011; 苏建国等, 2000), 而水体中氨氮含量过高是促使团头鲂发病的重要因素, 严重制约其高密度养殖模式的发展(Sun *et al*, 2014a、b)。本实验室通过前期氨氮胁迫的转录组测序等研究筛选到 Caspase 9 相关基因, 因此, 该研究旨在通过克隆 Caspase 9 基因 cDNA 全长及序列分析, 应用荧光定量 PCR 技术分析该基因在团头鲂不同组织中的表达情况, 并分析脑和肝两种组织在不同氨氮胁迫时间下 Caspase 9 基因的表达模式, 研究结果可为进一步了解团头鲂 Caspase 9 在胁迫过程中的作用及其调控机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

团头鲂幼鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业

研究中心南泉养殖基地, 选择活泼健康、规格一致的团头鲂幼鱼[(15.00±0.86) g] 500 尾。试验前, 用基础饲料驯养 14 d。试验饲养期间, 水温为 23–24℃, 溶氧≥5 mg/L, 氨氮≤0.05 mg/L, pH 为 6.8–7.2。进行胁迫试验时, 提前 2 d 停止投喂饲料。通过前期试验, 获得团头鲂氨氮胁迫 96 h 的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为 52.87 mg/L, 以该浓度的 40%作为胁迫浓度, 即氨氮浓度约为 20 mg/L 和 0.02 mg/L 的试验组和对照组进行急性胁迫试验, 每组设 3 个重复, 每个重复 40 尾鱼, 分别随机放入 6 个蓄养槽(体积约为 300 L)。试验所用蓄养槽在空间位置上随机排布, 以减小各个试验组间因光线等因素造成的误差。胁迫试验过后, 用曝气自来水更换各组溶液, 并恢复投饵。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 总 RNA 的提取** 采用 TaKaRa 总 RNA 提取试剂盒(D9108A)提取。取团头鲂肝组织转入液氮预冷的研钵中, 加入液氮, 迅速将组织研磨成粉, 然后向研钵中加入 1.5 ml 的 RNAiso Plus, 按照试剂盒说明书上的步骤提取总 RNA, 用紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 通过琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 保存于-80℃低温冰箱。

**1.2.2 Caspase 9 基因 3'端和 5'端扩增** 从本实验室构建的团头鲂 cDNA 文库中筛选出 1 个 Caspase 9 基因片段作为中间序列, 在 NCBI primer BLAST 上在线设计并筛选合适的 3' RACE 和 5' RACE 特异性引物(表 1), 并以提取的团头鲂肝总 RNA 为模板, 按照 TaKaRa 试剂盒上的步骤进行 Caspase 9 基因 3'端和 5'端扩增, 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离, 选择较亮的目的条带进行胶回收, 回收产物经 16℃过夜与 pMD18-T 载体连接, 然后转入到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 在含氨苄的固体培养基中过夜培养, 最后挑选白色单菌落扩大培养过夜, 将阳性产物送于 BioSune 测序。

**1.2.3 序列分析** 将 3'和 5'测序结果结合中间序列进行拼接, 得到团头鲂 Caspase 9 全长 cDNA 序列。在 Compute pI/Mw 程序中([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))预测蛋白分子量及等电点, 在 ORF Finder 程序中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找所拼接团头鲂 Caspase 9 cDNA 序列的开放阅读框, 在

1) 张金洲. 内源性凋亡途径在大黄鱼抗细菌感染中的作用及两个新的 CC 型趋化因子的功能研究. 厦门大学博士研究生学位论文, 2008

2) 王芸. pH、氨氮胁迫对中国对虾细胞凋亡和抗氧化系统影响机理的研究. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2011

3) 黄吉芹. DHA 对草鱼前体脂肪细胞及线粒体发育影响的初步研究. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2013

4) 李华涛. 谷氨酰胺抗鲤鱼红细胞凋亡作用及作用机制研究. 四川农业大学博士研究生学位论文, 2013

表 1 基因克隆和表达所用的引物及其序列  
Tab.1 Primers and their sequences used in the gene cloning and expression

引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5'-3')	用途 Usage
cas9 F1	GAGTGGAGATAGTGCTCATCGG	Caspase 9 3' RACE
cas9 F2	AGACTGAAAAGCCAGACAGACC	
cas9 R1	AGGTCTGTCTGGCTTTTCAGTC	Caspase 9 5' RACE
cas9 R2	CTCTCGTCTCCAAGTCTGTCAC	
cas9 qF	ACGGATTCTTCAGCGGCACAG	Caspase 9 qPCR
cas9 qR	ATGATGCCAGTCTCACGCAG	
$\beta$ -actin-F	TCGTCCACCGCAAATGCTTCTA	$\beta$ -actin qPCR
$\beta$ -actin-R	CCGTACCTTCACCGTTCCAGT	

Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)和 Inter pro 程序中(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)分析蛋白质结构域,运用 DNAMAN 软件进行氨基酸多序列比对分析,并用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。

**1.2.4 团头鲂不同组织 Caspase 9 的表达分析** 提取团头鲂肌肉、鳃、肾、脑、肝和肠道 6 个组织的总 RNA,按照 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒说明书进行反转得到 cDNA,根据拼接的 Caspase 9 基因全长 cDNA 序列设计荧光定量特异性引物 cas9 qF 和 cas9 qR(表 1),扩增长度为 226 bp;以团头鲂的  $\beta$ -actin 基因(序列号: AY170122)为荧光定量反应的内参基因,设计内参引物  $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R(表 1),扩增产物长度为 152 bp。对荧光定量基因特异性引物和内参引物进行 PCR 扩增,电泳检测其在团头鲂中的扩增情况,判断目的片段的大小。

荧光染料使用 TaKaRa 的 SYBR® Premix ExTaq II,反应在 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 定量仪上进行,反应总体积为 20  $\mu$ l: cDNA 2  $\mu$ l,引物各 0.8  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L), SYBR® Premix ExTaq II 10  $\mu$ l, ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l,采用两步法进行扩增。反应程序为 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s,共 40 个循环。每个样品 3 次重复试验以减少误差,先用标准品梯度稀释进行定量 PCR,获得内参基因及溶菌酶基因的标准曲线,数据均用“平均值 $\pm$ 标准差”表示(Schmittgen *et al*, 2008),采用双标准曲线法进行相对定量分析,使用 SPSS 17.0 软件用 Turkey 法及独立样本 T 检验进行比较显著性分析( $P < 0.05$  为显著水平)。

**1.2.5 团头鲂肝和脑组织应答氨氮胁迫和恢复后 Caspase 9 基因的表达分析** 在氨氮胁迫后 0、3、6、12、24、48、72 h 和恢复后 72 h 时,分别在试验组和对照组中随机取 3 尾团头鲂,取肝和脑组织保存于 -80℃ 冰箱,用于后续的荧光定量 PCR 分析试验。反应步骤同上,对照组和试验组的 cDNA 样品在每个时

间点进行 3 个特异性引物和内参基因的重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 团头鲂 Caspase 9 基因 3' RACE 和 5' RACE 扩增、克隆及全长拼接

根据实验室提供的中间序列,以团头鲂肝的 RNA 为模板,经 RACE PCR 扩增到了团头鲂 Caspase 9 的 3'端和 5'端序列,结果如图 1 所示,Caspase 9 5' RACE 在靠近 500 bp 处有一条明显很亮的条带,3' RACE 在 1000-2000 bp 间有一条很亮的特异性条带。

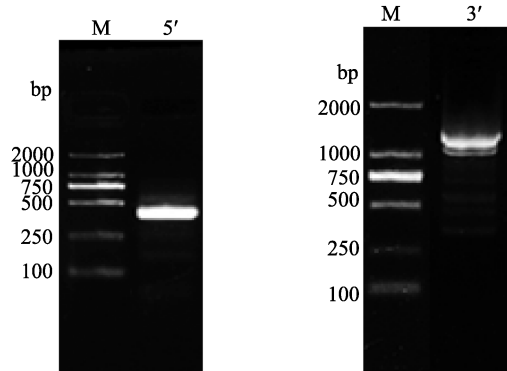


图 1 团头鲂 Caspase 9 5' RACE 和 3' RACE 扩增结果  
Fig.1 5' RACE and 3' RACE amplification results of Caspase 9 in *M. amblycephala*

M. DL2000 Marker; 条带 5': 5'末端扩增结果;  
条带 3': 3'末端扩增结果

M. DL2000 Marker; Lane 5'. 5' RACE; Lane 3'. 3' RACE

序列拼接得到全长 1613 bp 的团头鲂 Caspase 9 基因 cDNA 序列(GenBank 注册号为 KM604705), 包含有 185 bp 的 5' UTR、96 bp 的 3' UTR、1332 bp 的 ORF, 编码 443 个氨基酸,并且有明显的 AATAAA 加尾信号和 Poly(A)尾(图 2)。Compute pI/Mw 程序预测该基因的蛋白分子量为 49.19 kDa,理论等电点(pI)为 5.93。结构域分析显示,该基因有大亚基(P20)、小亚基(P10)和 NH<sub>2</sub> 末端结构域(Prodomain) 3 个结构

```

gaaataaagcaccgagcggggagacgattgttctgtgtagattaatggccaattcaactcagttcaagcagaatagtt
tttacgctttactgtatattactttaacaaaataaccaacaaaagatcagttatattgaaaacgtctcaagtcac
aaatacttcaataccgaattattgcccagatggaccctaaacacagacggattcttcagcggcacagcgctgatctagtc
M D P K H R R I L Q R H R R D L V 17
acttcattaaatcctgctgacatctgcgatgggcttttgtcaaaggggtcttcaccaggacatgatcgatgaaata
T S L N P A D I C D G L L S K G V F T Q D M I D E I 43
aagagcaaggcaatcagacgagaccaagctaggcaactgggtgacagacttggagacgagaggagtcgaagcttccca
K S K A I R R D Q A R Q L V T D L E T R G S Q A F P 69
gccttctcggagtgccctgctgagactgggcatcatgatctcgagagctccttcagagtgagatagtgctcatcgg
A F L E C L R E T G H H D L A E L L Q S G D S A H R 95
cctcctccccaccagctacagccttcgccgatccctctgectgtccaaaatccaataaagactgaaaagccagacaga
P P P I P V Q P S P I P L P V Q N P I K T E K P D R 121
cctgatgcactctccagtagcagttgaaccactgagaccagtaagcctgctgtggccaagcctctagcccact
P D R T P P V A V E P L R P V S L P V A K P P S P P 147
tctgaaccagaaagaccaaacaggcagagacgtgacagtatacagtgctacaagatggatgccagtcctgtgggatc
S E P E R P N R Q R R D S I Q C Y K M D A S P C G I 173
tgtctgattataaacaatgttgattttgaaccagcctctgaactaaaagatcgaagggatccaacattgactgtgac
C L I I N N V D F E P A S E L K D R K G S N I D C D 199
aagatggagaatagatttaaagctctcaactttgaggttatgtgaaaaggaacttgaatacaacatataagacat
K M E N R F K A L N F E V I V K R N L K Y K H I R H 225
gagatgcatcttttagcgaagagggatcattctgcgtatgactgctgtgtggatgatcctttcacatggtactgag
E M S S L A K R D H S A Y D C C V V I I L S H G T E 251
gcaaacacaatcgtttccctggagcagttcatgggttgatggaccagctgtcccagttcagttatcacaactac
A N H N R F P G A V H G V D G P A V P V Q L I T N Y 277
ctcaatggccagaactgtccttctctcagggcgaagcccaagctgttcttccatccaggcctgtggaggaggtgagaag
L N G Q N C P S L Q G K P K L F F I Q A C G G G E K 303
gacacaggttttgaggttttccagatgaggtggaaccctctttgggtgggatagatgaccagatggacgccattccc
D T G F E V S P D E V E P S L G G I D D Q M D A I P 329
atgctctccagcagcagctctcagcagctctgatgaacttgatgctcgggccactttgccacaccagcgacatt
M S S S S D S L S T S D E L D A R A T L P T P S D I 355
ttggtgctcactcaactttccaggctatgtctcttggagggacacgcacgccgctcctggatgtggagaatcctt
L V S Y S T F P G Y V S W R D T H A G S W Y V E N L 381
gatcatgtcttgaggagaatgttgccacaaatgatctggtgaccatgctgatgatgtaaatgctgctgtctcccaa
D H V L E E N V A T N D L V T M L M M V N A A V S Q 407
atatctgccaaaggcctgtataacaaatgcccgatcttcaacttctcgaagcttctctactttcagttctcgc
I S A K G L Y K Q M P G S F N F L E S F S T F S L R 433
atcatgatgctgagatcagcagatgtttctgactgctcgtgtagaaactatgtacactatccctgcatatgatgac
I M M L R S A V C F * 443
tgtgatgtgtataaaaaacatattgtcattttttacatccaaaaaa

```

图 2 团头鲂 Caspase 9 基因 cDNA 全序列以及由此推测的氨基酸序列

Fig.2 cDNA sequence of Caspase 9 gene and putative amino acid sequence in *M. amblycephala*

浅色阴影表示 Prodomain, 包含 CARD 结构域; 深色阴影表示 P20 大亚基; 加粗下划线表示 P10 小亚基;

下划线表示 mRNA 不稳定信号; 虚线表示组氨酸催化位点; 波浪线表示半胱氨酸催化位点; 双下划线表示加尾信号  
The light shadow represents Prodomain, including CARD domain; dark shadow represents P20; bold underline represents P10; regular underline represents the unstable signal of mRNA; dotted line represents histidine catalytic site; wavy line represents cysteine catalytic site; double underline represent tailing signal

域, 同时在 P20 结构域中包含了半胱氨酸和组氨酸催化位点, 未检测到信号肽序列。序列中还存在一处 ATTTA 的 mRNA 不稳定信号, 多预示着 Caspase 9 的降解, 利于该基因的调控作用。

## 2.2 团头鲂 Caspase 9 基因的同源性分析

运用 DNAMAN 软件将团头鲂 Caspase 9 的氨基酸序列与其他已公布的 6 种鱼类的氨基酸序列进行比对分析, 平均同源水平高达 77.74%, 如图 3 所示, 黑色阴影表示同源性大于 75% 的氨基酸, 显示该基因

在鱼类中的同源性较高, 且均有比较保守的组氨酸和半胱氨酸活性位点。

## 2.3 团头鲂 Caspase 9 基因的系统进化树分析

用 MAGE 5.0 对已公布的几种哺乳动物和鱼类常见的 Caspase 氨基酸序列(表 2)以及团头鲂的 Caspase 9 氨基酸序列采用邻位相联法构建系统进化树(图 4)。系统进化树主要分为 5 大支, Caspase 1、2、3、8、9 各处一大支, 表明不同的 Caspase 基因在进化上存在着明显差异; Caspase 1 和 2 处于进化树的基部, 显

鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	GIGBAHG CASPASEM... ICHTHYSMIUIY... MEERHKKILQ	38
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	GIGBACVCASPASETAN... ICHTHYSALBNUBESMDPKHRGILQ	42
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	..... MDPKRRILQ	10
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	GIRRFNFCASPASEDAN... IRER..... IMEQKHRCILQ	32
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	GIGBAGMCASPASECYP... RINUSCARP... IMDPRHCILQ	37
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	GIGBABC CASPASEDICENTRARCHUSLABRAX... MEDRYRKKILQ	43
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	GIG .BAC CASPASELARI.M ICHTHYS CRCEA... MEERHKKILQ	40
鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	RNRRLNLRVLDLPSKLYDGLLEKGVFTQDMIDEIKSAGIRRRQOARO	83
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	RORRNVLKALNPEEIDGLLSKGIFITODVIDGIRKSKETRRRQOARO	87
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	RFRRLDVTSLNEADICDGLLSKGVFTQDMIDEIKSKAIRRQOARO	55
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	RFRRLNVLKALNEEDVCDKLLSKGVFTQDMIDEIKSKAIRRQOARO	77
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	RFRRLNVTALNEKEICDGLLSKGVFTQDMIDEIKSKAIRRQOARO	82
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	RNRRLNLRVLDLPSKLYDGLLEKGVFTQDMIDEIKSSGTRRRQASO	88
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	RNRRLNLRVLDLPSKLYDGLLEKGVFTQDMIDEIKSAGIRRRQOARO	85
鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	LVLDLETRGSRAPFLFLECLCETGOHSLAELLON... GAPPIQIQP	126
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	LVLDLETRGSRAPFAFLECLCETGHQDIAELLQSEGDGARHPLFTIP	132
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	LVLDLETRGSRAPFAFLECLRETGHDLAELLQSGDSAHRPEFIP	100
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	LVLDLETRGSRAPFAFLSRETRGHDLAELLQSGDGVHRPEVIS	122
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	LVLDLETRGSRAPFAFLECLRETGOHALAELLQCGDGVHRPEVSP	127
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	LVRDLETRGRAPFLFVECLCETGOQLAELLON... EAEAVQIQP	131
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	LVLDLETRGSRAPFLFLECLCETGOHSLAELLON... GAPPIQIQP	128
鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	ATFTQVVRPVLQCFILVSSFMVDKRIK . DEVPVYEVRRFTITSEF	170
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	VQFLQVLPVQIFKYITEKPRFEDLITSVVVLPKFEHLPHKSLIS	177
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	VQPSFPLPLVQNEIKTEKPRFEDLITPVAVEPLRFVSLPVKSPS	145
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	VQPSPIPLPVONLNHTEKPEKPDIASP . RLVPLRFESLPVHKITS	166
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	IQPSLILPLVONFVYIEKPRFEDLITP . LLEPVEKFLPENTPT	171
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	ATFTQVVRPVLQCFILVSSFMVDKRIK . DEVPVYEQIHSITFTF	175
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	ATFTQVVRPVLQCFILVSSFMVDKRIK . DEVPVYEVRRFTITSEF	172
鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	SPS...REYTRERPOCRERRDSIQYKMDASPCGECCLIINNVEF	211
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	PPMKRENORRRH...KRERRDSIQYKMDASPCGTCLINNVD	219
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	PP...SEPRR...NRERRDSIQYKMDASPCGICLIINNVD	182
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	PFS...ETVVR...TRERRDSIQYKMDASPCVCLINNIN	204
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	FFPG...APVVR...NRERRDSIQYKMDASPCGICLIINNVD	210
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	SPS...REYMR...OCRERRDSIQYKMDASPCGECCLIINNVEF	214
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	SPS...REHIERRPOCRERRDSIQYKMDASPCGECCLIINNVEF	213
鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	EERSFSLNRKGSNIDCDKLESRFKALNEIVEVKLNKQKIKHEH	256
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	EPASFLKDRKGSNIDCDSEKRFKALNEEIVKLNLYKIKHEM	264
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	EPASFLKDRKGSNIDCDKENRFKALNEEIVKLNLYKIKHEM	227
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	EKASFLKDRKGSNIDCDKLEKRFKALNEEIVKLNLSKRIHEM	249
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	DFDCFLKDRKGSNIDCDKLEKRFKALNEEIVKLNLSKRIHEM	255
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	EARSFSLNRKGSNIDCDKLEKRFKALNEIVEVKLNKQKIKHEH	259
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	EERSFSLNRKGSNIDCDKLESRFKALNEIVEVKLNKQKIKHEH	258
鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	SALCKMDHSEYDCCVVIISHGTEVSHSRFPFVAVYGVGDGLHVEVQ	301
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	SSLAKRDHSEYDCCVVIISHGTEANHRFPFVAVYGVGDGPALVQ	309
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	SSLAKRDHSAEYDCCVVIISHGTEANHRFPFVAVYGVGDGPVAVQ	272
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	ASLAKRDHSEYDCCVVIISHGTEASHRFPFVAVYGVGDGPVPIQ	294
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	TSLAKRDHSAEYDCCVVIISHGTEANHRFPFVAVYGVGDGPVAVQ	300
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	SALSKRDHSEYDCCVVIISHGTEVSHSRFPFVAVYGVGDQVAVQ	304
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	SALCKMDHSEYDCCVVIISHGTEVSHSRFPFVAVYGVGDGLHVEVQ	303
鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	NITNYLNGKNCPSLOGKPKLFFIOACGGGPKDI GFEVSPDEVQPS	346
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	LITNYLNGKNCPSLOGKPKLFFIOACGGGPKDI GFEVSPDEVQPS	354
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	LITNYLNGKNCPSLOGKPKLFFIOACGGGPKDI GFEVSPDEVQPS	317
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	LITNYLNGKNCPSLOGKPKLFFIOACGGGPKDI GFEVSPDDVQPS	339
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	LITNYLNGKNCPSLOGKPKLFFIOACGGGPKDI GFEVSPDEVQPS	345
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	HTITNYLNGKNCPSLOGKPKLFFIOACGGGPKDI GFEVSPDEVQPS	349
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	NITNYLNGKNCPSLOGKPKLFFIOACGGGPKDI GFEVSPDEVQPS	348
鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	IGG . ADDQDAIPMSSSSDSLSMS . DEPDARALPTPSDILVSY	388
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	SGG . IDDDQDAIPMSSSSDSLSMS . DEPDARASLPTPSDILVSY	396
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	IGG . IDDDQDAIPMSSSSDSLSMS . DELDARALPTPSDILVSY	359
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	IGG . IDDDQDAIPMSSSSDSLSMS . DELDARASLPTPSDILVSY	382
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	IGG . IDDDQDAIPMSSSSDSLSMS . DELDARALPTPSDILVSY	387
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	IGG . ADDQDAIPTSSSSSDSLSMS . DELDARASLPTPSDILVSY	391
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	IGGADDDQDAIPMSSSSDSLSMS . DEPDARALPTPSDILVSY	392
鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	STFPGYVSWRDTGAGSWYVEILDRILEENAAITDILVTMLMMVNHE	433
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	STFPGYVSWRDTGAGSWYVENLDRVLEENVAITDILVTMLMMVND	441
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	STFPGYVSWRDTGAGSWYVENLDRVLEENVAITDILVTMLMMVNA	404
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	STFPGYVSWRDTGAGSWYVENLDRVLEENAAITDILVTMLMLVND	427
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	STFPGYVSWRDTGAGSWYVENLDRVLEENAAITDILVTMLMMVNA	432
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	STFPGYVSWRDTGAGSWYVEILDRILEENVAITDILVTMLMMVNE	436
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	STFPGYVSWRDTGAGSWYVEILDRILEENAAITDILVTMLMMVNHE	437
鳊鱼( <i>Mitchthys miui</i> ) AHG06616	VSQNSAKGLYKMPGSENFRLR . . . . . KLLYFOSQA . .	463
金丝鱼( <i>Tanichthys albonubes</i> ) ACV31396	VSQNSAKGLYKMPGSENFRLR . . . . . KLLYFOSQAP . .	472
团头鲂( <i>M. amblycephala</i> ) KM604705	VSQNSAKGLYKMPGSENFRLR . . . . . KLLYFOSQAVCF . .	443
斑马鱼( <i>Danio rerio</i> ) NP_001007405	VSQNSAKGLYKMPGSENFRLR . . . . . KLLYFOSQS . .	458
锦鲤( <i>Cyprinus carpio</i> ) AGM34043	VSQNSAKGLYKMPGSENFRLR . . . . . KLLYFOSQSL . .	463
狼鲈( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) ABC70998	VSQNSAKGLYKMPGSENFRLR . . . . . KLLYFOSQSS . .	468
大黄鱼( <i>Larimichthys crocea</i> ) ACJ65024	VSQNSAKGLYKMPGSENFRLR . . . . . KLLYFOSQA . .	467

图 3 团头鲂 Caspase 9 基因推导氨基酸序列的多序列比较

Fig.3 DNAMAN multiple sequence alignment of Caspase 9 in *M. amblycephala* and other species

组氨酸活性位点以黄色方框框出, 半胱氨酸活性位点以红色方框框出

Histidine catalytic site was represented by yellow box; cysteine catalytic site was represented by red box

表 2 进化树所用物种 Caspase 基因及其登录号  
Tab.2 Protein and GenBank accession No. of different species in the evolutionary tree

物种 Species	基因 Gene	GenBank 登录号 Accession No.
人 <i>Homo sapiens</i>	Caspase 2	AAP35904
	Caspase 3	CAC88866
	Caspase 8	AAD24962
	Caspase 9	AAH06463
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	Caspase 2	ABG91569
	Caspase 3	BAB32409
	Caspase 8	AF273220
	Caspase 9	NP_001007405
鼠 <i>Mus musculus</i>	Caspase 1	NP_033937
	Caspase 2	AAH34262
	Caspase 3	AAH38825
	Caspase 8	AAH49955
	Caspase 9	BAA86895
家犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	Caspase 1	NP_001003125
	Caspase 3	NP_001003042
	Caspase 8	ABB02414
狼鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	Caspase 1	ABB05055
	Caspase 3	ABC70997
	Caspase 8	ACO53630
	Caspase 9	ABC70998
鳊鱼 <i>Miichthys miiuy</i>	Caspase 1	AHG06617
	Caspase 3	AHG06618
	Caspase 9	AHG06616
道氏虹鳟	Caspase 3	CDL67994
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Caspase 8	NP_001268251
	Caspase 9	NP_001118119
大黄鱼	Caspase 3	ACJ65025
<i>Larimichthys crocea</i>	Caspase 9	ACJ65024
金丝鱼	Caspase 3	ACV31395
<i>Tanichthys albonubes</i>	Caspase 9	ACV31396
锦鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	Caspase 8	AGQ03809
	Caspase 9	AGM34043
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	Caspase 2	XP_008429698
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	Caspase 1	CAM32183

示这两种 Caspase 在进化上是相对原始的类型; 团头鲂 Caspase 9 与锦鲤亲缘关系最近, 与其他鱼类聚为一支, 再与哺乳动物 Caspase 9 聚为一大支。总的来说, 进化树中不同物种的 Caspase 与其所处的进化地位大体一致。

#### 2.4 团头鲂 Caspase 9 基因的组织表达分析

以团头鲂  $\beta$ -actin 为内参基因, 检测健康团头鲂的 6 个组织中 Caspase 9 基因的相对表达量, 结果见图 5-1, 该基因在所检测组织中均有表达且均存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 在脑组织中表达量最高, 往后依次

是肝、肾、肠道、鳃, 在肌肉中表达量最少。电泳检测结果显示(图 5-2), 鳃和肌肉的条带较淡, 与其结果一致。

#### 2.5 团头鲂 Caspase 9 的 mRNA 在受到氨氮胁迫和恢复刺激后不同时间点的表达规律

采用实时荧光定量 PCR 方法探究团头鲂受到氨氮胁迫 3、6、12、24、48、72 h 以及氨氮恢复正常水平 72 h 后, 肝组织和脑组织中 Caspase 9 的表达规律。结果显示, 肝和脑在胁迫前后表达模式类似, 整体呈类似波浪形表达谱。如图 6 所示, 肝组织中的 Caspase 9 基因在氨氮胁迫的 3 h, 其表达量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 在此之后表达量有所下降, 6–12 h 表达量略高于对照组, 但是与对照组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 之后表达量又有所上升, 24–72 h 表达量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 并在 72 h 达到最高峰, 去除胁迫 72 h 后, 该基因的表达量有所下降, 有恢复至对照组水平的趋势; 如图 7 所示, 脑组织中的 Caspase 9 mRNA 在胁迫的 12 h 才出现表达量显著上升的趋势, 之后表达量有所下降, 24 h 和 48 h 与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 随后表达量又有所上升, 同样也在胁迫后的 72 h 表达量达到最大, 氨氮恢复至正常水平 72 h 后, Caspase 9 的表达量明显下降, 表达量与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 恢复至对照组水平。

### 3 讨论

细胞凋亡 (Apoptosis), 又称程序性细胞死亡 (Programmed cell death, PCD), 是一个主动的、由基因决定的、细胞自动结束的过程, 不同于细胞坏死的正常生理过程, 在对机体发育的调控、内环境稳态的维护、免疫耐受的形成以及肿瘤监控等多种生理和病理过程中发挥重要作用。Caspase 家族在进化上非常保守, 在细胞凋亡通路中起着至关重要的作用, 其中 Caspase 9 是线粒体凋亡途径的启动子, 是细胞凋亡过程中的关键蛋白酶 (LeBlanc, 2003)。由于 Caspase 的特殊功能, Caspase 的激活受到严格的控制, 只有在生物体内出现无用或者有害细胞才能激活其催化活性 (Menze *et al*, 2010)。

该研究首次克隆到团头鲂 Caspase 9 的全长 cDNA 序列 1613 bp, 包含开放阅读框 (ORF) 1332 bp, 编码 443 个氨基酸, 预测编码蛋白质分子量为 49.19 kDa。Caspase 9 与其他已经鉴定出来的 Caspase 类似, 存在  $\text{NH}_2$  末端原结构域 (Prodomain)、大亚基 (P20)、小亚基 (P10) 3 个典型的结构域, 同时 P20 中有 1 个含有 cys 活性位点的保守五肽序列 QACGG, 与已鉴定出的

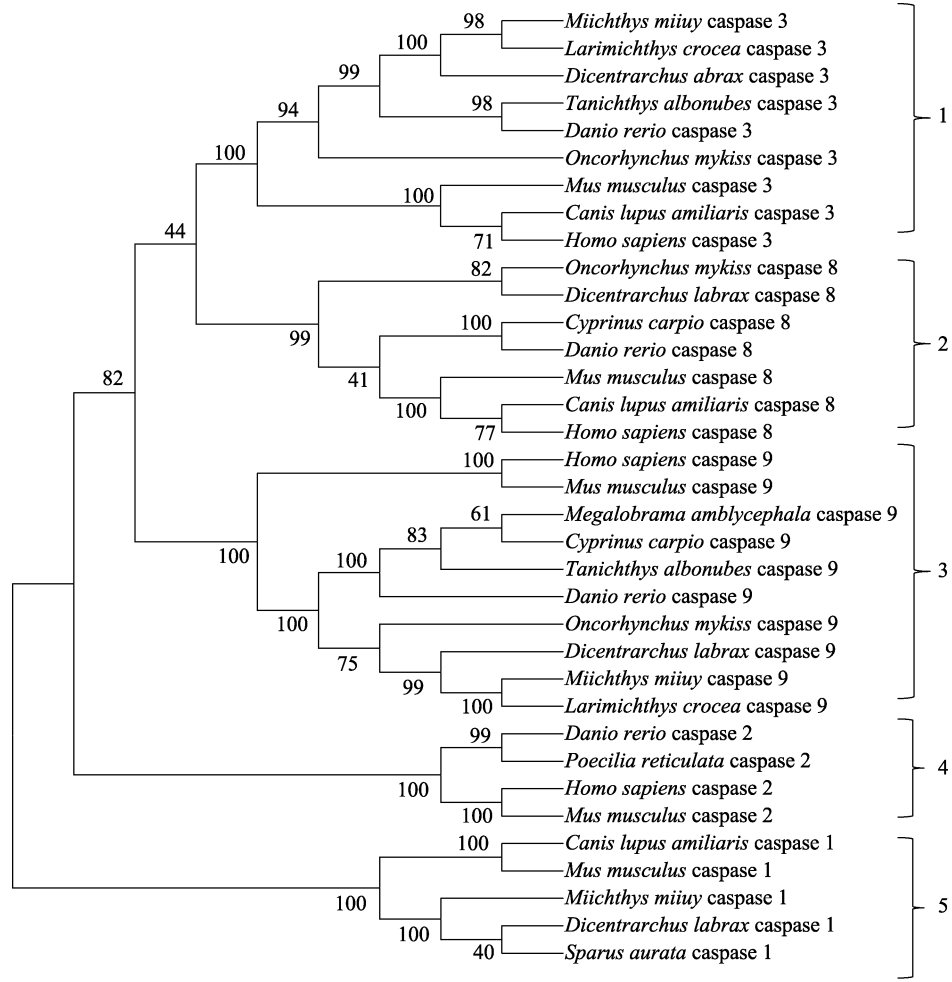


图 4 利用 MEGA 5.0 软件构建各物种 Caspase 进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of the Caspase amino acid sequence in different species by MEGA 5.0

1. Caspase 3; 2. Caspase 8; 3. Caspase 9; 4. Caspase 2; 5. Caspase 1

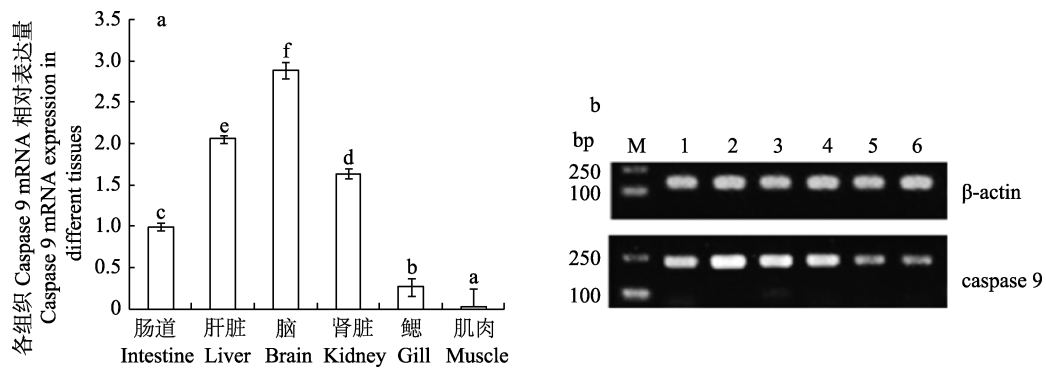


图 5 团头鲂 Caspase 9 基因 qRT-PCR 结果

Fig.5 qRT-PCR results of Caspase 9 gene of *M. amblycephala*

(a) qRT-PCR 方法检测团头鲂各组织中 Caspase 9 mRNA 的相对表达量, 柱上不同字母代表组间差异显著( $n=3, P<0.05$ )

(b) 团头鲂  $\beta$ -actin 基因和 Caspase 9 基因在 6 个不同组织的扩增结果

M. Marker DL2000; 1. 肠道; 2. 肝; 3. 脑; 4. 肾; 5. 鳃; 6. 肌肉

(a) Caspase 9 mRNA expression in different tissues of *M. amblycephala* by qRT-PCR, different letters represent significant difference between groups ( $n=3, P<0.05$ )

(b) Amplification results of caspase 9 and  $\beta$ -actin gene in six different tissues of *M. amblycephala*, M. Marker DL2000; 1. Intestine; 2. Liver; 3. Brain; 4. Kidney; 5. Gill; 6. Muscle

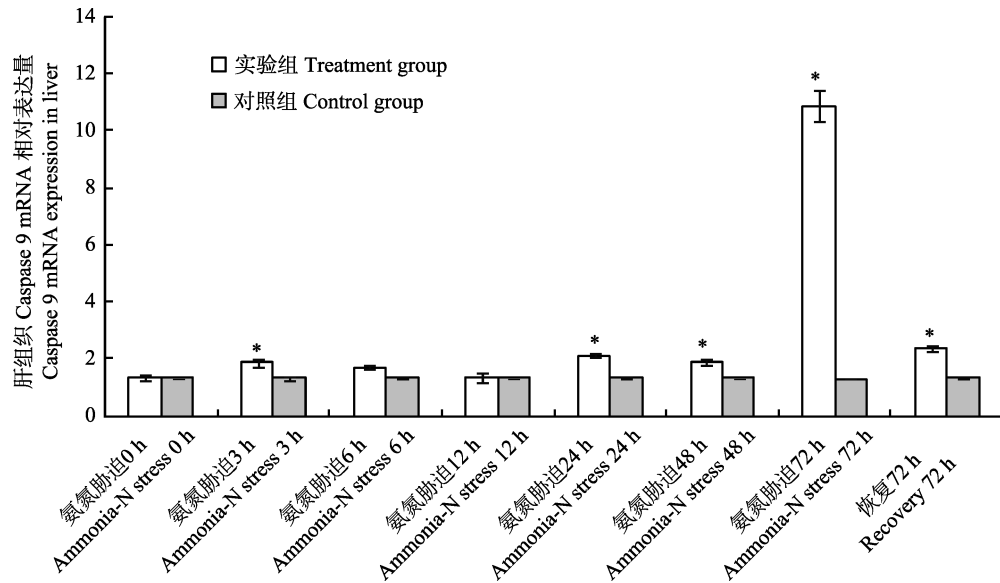


图 6 氨氮胁迫和恢复刺激后团头鲂肝组织中 Caspase 9 基因 mRNA 的表达量变化  
Fig.6 Expression of Caspase 9 in liver of *M. amblycephala* in response to ammonia-N stress and recovery

\*表示与对照组差异显著( $n=3, P<0.05$ )

\* means significant difference compared with control ( $n=3, P<0.05$ )

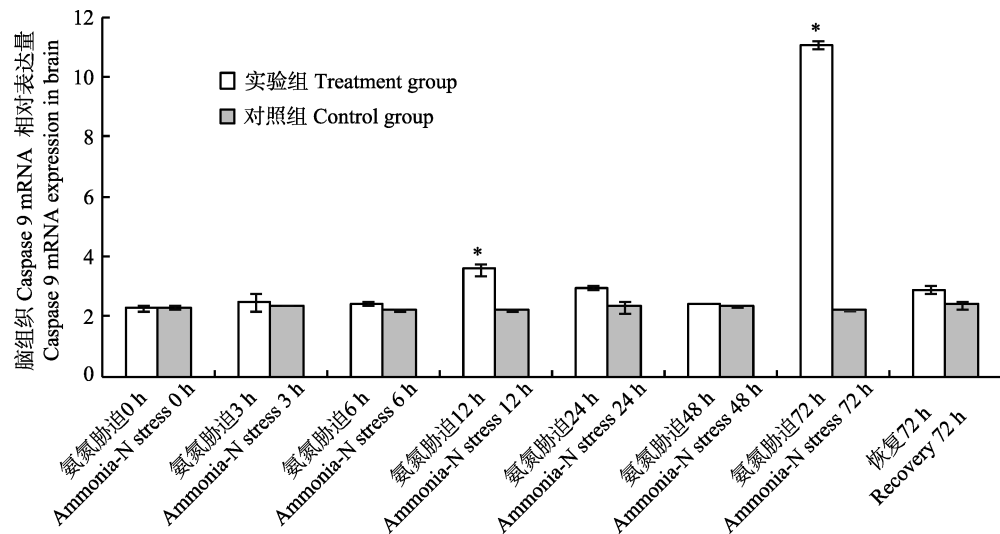


图 7 氨氮胁迫和恢复刺激后团头鲂脑组织中 Caspase 9 基因 mRNA 的表达量变化  
Fig.7 Expression of caspase 9 in the brain of *M. amblycephala* in response to ammonia-N stress and recovery

\*表示与对照组差异显著( $n=3, P<0.05$ )

\* means significant difference compared with control ( $n=3, P<0.05$ )

Caspase 9 相同(Duan *et al*, 1996; Srinivasula *et al*, 1996),同 Caspase 8 (QACQG)及其他 Caspase(QACRG)有差异。NH<sub>2</sub> 末端原结构域中包含 Caspase 9 募集结构域(Caspase-recruitment domain, CARD), 通过 CARD 与开放的 Apaf-1 结合, 进而与大小亚基结合使 Caspase 9

得到活化, 启动细胞凋亡(Hofmann *et al*, 1997; Li *et al*, 1997; Srinivasula *et al*, 1998)。同时该序列有一个 mRNA 不稳定信号(ATTTA), 该信号预示着 Caspase 9 mRNA 的快速降解, 利于 Caspase 9 的精确调控(杨莹莹等, 2012), 张金洲(2008)<sup>1)</sup>在大黄鱼 Caspase 9 中也发现

1) 张金洲. 内源性凋亡途径在大黄鱼抗细菌感染中的作用及两个新的 CC 型趋化因子的功能研究. 厦门大学博士研究生学位论文, 2008



了 3 个 mRNA 不稳定信号。氨基酸序列比对和系统进化树分析均显示, 团头鲂 Caspase 9 基因在进化上高度保守, 并与锦鲤的亲缘关系最近。

Caspase 9 的组织定量表达分析显示, 该基因在各组织中均有表达, 但在脑组织中的表达量最高, 然后依次是肝、肾、肠道, 鳃和肌肉表达量较低。而已报到的海鲈(*Lateolabrax japonicus*) Caspase 9 基因在肠和肝脏中表达量高, 头肾中表达量低(Reis *et al.*, 2007); 大黄鱼 Caspase 9 在肾中高表达, 在肠和肌肉中低表达(张金洲, 2008)<sup>1)</sup>, 这种差异可能与鱼的不同种类有关。脑和肾脏是鱼体神经内分泌系统中的重要组织, 同时脑对免疫反应有调控作用(王文博等, 2002), 而肾脏是鱼类重要的免疫器官, 由此推测团头鲂中 Caspase 9 可能参与机体免疫反应。组织定量表达结果显示, Caspase 9 在脑和肝组织中的表达量最高, 乔顺风(2005)研究显示, 氨氮先是侵袭黏膜, 其次是神经系统, 同时伴随着肝肾系统的破坏, 最终导致水产动物昏迷甚至死亡。因此, 试验选择脑和肝两个组织作为研究对象。在氨氮胁迫和恢复刺激后不同时间段对团头鲂肝和脑组织中 Caspase 9 基因的定量表达分析显示, 肝和脑组织中该基因的表达规律相似, 表达水平均呈现先升高后降低再升高的变化过程, 并都在胁迫后的 72 h 表达量达到最大, 恢复 72 h 后其表达量逐渐恢复至对照水平。王芸(2011)<sup>2)</sup>对中国对虾氨氮胁迫过程中 Caspase 基因表达量变化研究显示, Caspase 在鳃组织和血液淋巴的表达呈现先升高后降低再升高的变化过程, 该研究结果与其类似。研究显示, 凋亡系统被激活的作用是清除无用或者有害细胞, 以维持生物正常发育的稳态(White, 1996; Raff, 1992)。因此, 推测氨氮胁迫引起团头鲂 Caspase 9 表达量上调、激活细胞凋亡通路, 为了清除无用或有害细胞, 减少能量消耗来应对氨氮胁迫, 暗示 Caspase 9 基因可能参与团头鲂应激过程中的免疫防御, 且与细胞凋亡有关。

团头鲂是我国主要的淡水养殖品种, 经济价值显著。本研究对团头鲂 Caspase 9 及其在氨氮胁迫中的表达变化的结果揭示, 氨氮胁迫下 Caspase 9 基因参与团头鲂的免疫防御。Randall 等(2002)报道指出, 氨氮对水产动物的危害机理是高浓度的氨氮会取代生物体内的钾离子, 引起 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体结合活性的降低, 导致中枢神经系统中流入过量的钙

离子, 进而导致脑缺血并引起细胞死亡; 也有卢娜娜等(2013)研究表明, Caspase 9 介导的细胞凋亡在脑缺血过程中发挥了重要作用, 本研究结果显示, 脑组织 Caspase 参与了团头鲂氨氮胁迫的分子过程, 支持了这一观点, 而具体的调控机制仍不清楚, Caspase 9 参与团头鲂氨氮胁迫应激的分子机制及具体的调控机制还有待进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 王文博, 李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况. 水产学报, 2002, 26(4): 368-374
- 卢娜娜, 刘琪, 顾立刚, 等. 疏风宣肺方和解表清里方干预流感病毒性肺炎小鼠细胞凋亡的研究. 医学研究生学报, 2013, 26(11): 1134-1137
- 乔顺风. 水体氨氮转化形式与调控利用的研究. 饲料工业, 2005, 26(12): 44-46
- 苏建国, 杨春荣. 团头鲂的繁殖技术. 畜牧兽医杂志, 2000, 19(4): 46-48
- 杨莹莹, 张其中, 李春涛, 等. 大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  基因 cDNA 克隆及表达分析. 水产学报, 2012, 36(3): 321-328
- 张飞明, 史建华, 施顺昌, 等. 采用标记方法比较不同群体团头鲂的生长情况. 水产科技情报, 2011, 38(1): 40-43
- 贾旭颖, 张丹, 路允良, 等. 温度突变和非离子氨胁迫对淡水养殖凡纳滨对虾 *cyt-C* 和 *caspase-3* 的影响. 中国水产科学, 2014, 21(4): 700-710
- 徐胜威, 李恬, 吴金英, 等. 唐鱼 Caspase-3 和 Caspase-9 cDNA 全长克隆及胁迫表达分析. 水生生物学报, 2011, 35(1): 138-144
- Duan H, Orth K, Chinnaiyan AM, *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 Biol Chem*, 1996, 271(28): 16720-16724
- Hofmann K, Bucher P, Tschopp J. The CARD domain: a new apoptotic signaling motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997, 22(5): 155-156
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis-basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British J Cancer*, 1972, 26(4): 239-257
- LeBlanc AC. Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(2): 215-229
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al.* Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, 91(4): 479-489
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, *et al.* Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 1999, 284(5414): 651-654

1) 张金洲. 内源性凋亡途径在大黄鱼抗细菌感染中的作用及两个新的 CC 型趋化因子的功能研究. 厦门大学博士研究生学位论文, 2008

2) 王芸. pH、氨氮胁迫对中国对虾细胞凋亡和抗氧化系统影响机理的研究. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2011

- Menze MA, Fortner G, Nag S, *et al.* Mechanisms of apoptosis in Crustacea: what conditions induce *versus* suppress cell death? *Apoptosis*, 2010, 15(3): 293–312
- Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22(8): 299–306
- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 1992, 356(6368): 397–400
- Randall DJ, Tsui TKN. Ammonia toxicity in fish. *Mar Poll Bull*, 2002, 45(1): 17–23
- Reis MIR, Vale AD, Pinto C, *et al.* First molecular cloning and characterization of caspase-9 gene in fish and its involvement in a gram negative septicemia. *Mol Immunol*, 2007, 44(7): 1754–1764
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protocols*, 2008, 3(6): 1101–1108
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, *et al.* Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, 1998, 1(7): 949–957
- Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, *et al.* The Ced-3/interleukin 1 $\beta$  converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2a are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem*, 1996, 271(43): 27099–27106
- Sun SM, Ge XP, Xuan FJ, *et al.* Nitrite-induced hepatotoxicity in Blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*): The mechanistic insight from transcriptome to physiology analysis. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014a, 37(1): 55–65
- Sun SM, Ge XP, Zhu J, *et al.* Identification and mRNA expression of antioxidant enzyme genes associated with the oxidative stress response in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in response to acute nitrite exposure. *Comp Biochem Physiol C*, 2014b, 159: 69–77
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998, 281(5381): 1312–1316
- White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & Development*, 1996, 10(1): 1–15

(编辑 冯小花)

## Molecular Cloning and Expression Analysis of Caspase 9 Gene from Blout Snout Bream (*Megahbrama amblycephala*) Under Ammonia-N Stress

ZHANG Qiong<sup>1,2</sup>, SUN Shengming<sup>2</sup>, LI Bing<sup>2</sup>, JIANG Gaozhong<sup>1,2①</sup>, ZHU Jian<sup>2</sup>, GE Xianping<sup>2</sup>

(1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

**Abstract** Caspase 9 is a key protease of the intrinsic apoptotic pathway. In this study, the cDNA encoding caspase 9 was cloned with rapid amplification of cDNA ends (RACE) approach from blout snout bream *Megahbrama amblycephala*. The full-length cDNA of caspase 9 was composed of 1613 bp, including a 185-bp 5' untranslated region, a 96-bp 3' untranslated region, and an open reading frame of 1332 bp. The amino acid similarity comparison and the phylogenetic tree analysis indicated that the caspase 9 gene was highly conserved among different fish species and had a close relationship with *Cyprinus carpio*. Quantitative real-time PCR analysis showed that the caspase 9 was expressed in most tissues of *M. amblycephala*, and the highest expression was in the brain and the lowest expression was in the muscles. In response to the ammonia-N stress, the relative expression level of caspase 9 in both the liver and the brain displayed an “up-down-up” pattern and reached the highest level in 72 h ammonia-N stress. After a 72 h recovery, the level of expression decreased. We speculated that the caspase 9 gene was involved in the molecular mechanism of ammonia-N stress. Our study provided insight into the molecular responsive mechanisms of *M. amblycephala* exposed to environmental stresses.

**Key words** *Megahbrama amblycephala*; Caspase 9; Gene cloning; Ammonia-N stress; Tissue expression

① Corresponding author: JIANG Gaozhong, E-mail: jianggz@ffrc.cn