

中国明对虾 caspase 基因的克隆与表达分析

宋光年^{1,2}, 金松君¹, 张继泉¹, 相建海¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 利用细胞凋亡来清除多细胞器官受损伤或有害的细胞, 为动物发育过程中保持机体平衡起到关键作用。为了研究细胞凋亡在甲壳类动物应对病毒感染后所起到的作用, 作者利用同源克隆技术获得了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) caspase 基因(FcCasp)的 cDNA 序列, 并分析了该基因在对虾受到白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, 简称 WSSV)刺激后的表达变化规律。结果表明, 该基因的 cDNA 含有 954 个核苷酸, 编码 317 个氨基酸, 具有 caspase 家族典型的 QACRG 五肽蛋白酶活性位点(190-194 氨基酸)。对注射了 WSSV 的中国明对虾 FcCasp 的表达进行分析, 在 5 个时间点取其肝胰脏样本, 经 real-time PCR 检测发现, WSSV 刺激 3 h 后, 对虾肝胰脏中 FcCasp 的表达呈现显著性上调, 说明 FcCasp 的表达与 WSSV 感染密切相关, 提示 FcCasp 基因与细胞凋亡相关。

关键词: 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*); 基因克隆; Caspase; WSSV 攻毒; 实时定量 PCR 分析

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)12-0001-07

对虾是目前世界上大规模养殖、效益好的水产品种之一, 在中国水产养殖业中占据举足轻重的地位, 1988~1992 年, 中国养殖对虾的年产量一直保持在 20 万 t 左右, 占世界对虾年总产量的 1/3, 居世界第一位^[1]。由于病害频发, 特别是 1993 年以来开始爆发的 WSSV 病毒性疾病, 使中国养殖对虾的产量由 1992 年的 20 万 t 减至 1993~1994 年的 5 万~6 万 t, 给对虾养殖业的发展造成了巨大损失^[2]。迄今, 尚未找到特效的病害防治方法来对付对虾 WSSV 病害的危害。研究对虾对病原感染的免疫应答机制, 可以为有效地进行对虾的病害防治提供重要的理论指导。

1972 年, Kerr 等^[3]提出细胞凋亡的概念。细胞凋亡, 又称程序性细胞死亡(programmed cell death, 简称 PCD), 是多细胞生物调控机体发育、维护内环境稳定的一个重要的生理过程^[4]。细胞凋亡是由基因控制的, 其核心的分子机制首先在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中得到阐明。1992 年, Cerretti 等^[5]发现哺乳动物的白细胞介素-1 β 转换酶(leukin 1-converting enzyme, 简称 ICE)与其他已知的哺乳动物蛋白几乎没有同源性, 但与秀丽隐杆线虫中促进细胞凋亡的 CED-3 基因有很高的同源性, 这引起了人们对这类蛋白酶在细胞凋亡的作用的广泛研究。到 1996 年为止, 人们已经发现了 10 个 ICE/CED-3 的同源物^[6,7], 生物体利用这种机制有效地清除了衰老细胞和畸形细胞, 它们都是结构相

似的半胱氨酸蛋白酶, 并能特异地切割 Asp 后的肽键, 所以人们将其统一命名为 caspase^[8]。2000 年, Sperandio 等^[9]发现一种与细胞凋亡现象不同而且不受凋亡因子调控的细胞自行死亡的形式, 称为“paraptosis”。2007 年, Overholtzer 等^[10]发现一种通过特殊的细胞吞噬细胞导致细胞死亡的方式, 他把这种全新的细胞死亡方式称为“entosis”。

caspase 家族成员有相似的氨基酸序列、结构和底物特异性。caspase 的分子量大约在 30~50 kd, 通常以无活性的蛋白酶原形式在细胞内进行合成和分泌。结构上, caspase 可以分成 3 部分, N-端前肽(prodomain)、大亚基(p20, 20kd)和小亚基(p10, 10kd)。Prodomain 与 caspase 分子的功能密切相关, 功能性 caspase 分子的 Prodomain 长度小于 30 个氨基酸, 而与炎症相关的 caspase 分子的 Prodomain 长度则大于 100 个氨基酸。长的 Prodomain 往往含有明显的功能域, 如 caspase 募集结构域(caspase recruitment domain, 简称 CARD)、死亡效应结构域(death effector domain, 简称 DED)、死亡诱导结构域(death inducing domain, 简称 DID)等^[11,12]。这些功能

收稿日期: 2010-04-01; 修回日期: 2010-10-10

基金项目: 国家 973 资助项目(2006CB101804); 国家 863 计划项目(2006AA10A401); 国家自然科学基金项目(30970422)

作者简介: 宋光年(1984-), 男, 山东省青岛人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物分子生物学研究, 电话: 0532-82898570, E-mail: song-peter@163.com; 相建海, 通信作者, E-mail: jhxiang@qdio.ac.cn

域参与 caspase 分子之间的相互作用、caspase 酶原的活化和 caspase 分子的亚细胞定位等^[12,13], 而短的 Prodomain 的功能可能是抑制 caspase 的活化^[14]。caspase 在大亚基上均含有 QACXG 五肽保守序列(X 代表 R、Q)。在各种 caspase 酶原间, 大小亚基的同源性较高, 而 N-端前肽的同源性较低, 这是区别 caspase 家族各成员的主要指标。

作者以中国明对虾为研究对象, 利用同源克隆的方法获得了中国明对虾 FcCasp 基因的 cDNA 序列, 利用 real time PCR 研究了 WSSV 刺激后对虾肝胰脏中该基因表达变化规律, 初步探讨了该基因与对虾免疫的关系, 为深入系统了解对虾的先天性免疫机制增添了新的认识。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

中国明对虾(体长 14.5 cm±0.6 cm)购于青岛市南山市场, 实验前在水族箱中充气暂养 10 d, 使其适应实验室内养殖环境。取健康对虾肝胰脏, 并分离胃、肠、神经节、淋巴器官、腮等组织, 提取总 RNA 用于 cDNA 合成。

1.1.2 实验所用引物

CAS3-dF
(5'-ATGAGCRRCGCCGDY GAYKCAGCGAG-3')
CAS3-dR
(5'-TYAGAAGTAAATYTCACGRAGSAGYGT-3')
RT-CASF
(5'-CTAACCGCAAAGGAATCCAA-3')
RT-CASR
(5'-CTGCCACATCCCTGCTGACT-3')
18S-F
(5'-GCCTGAGAAACGGCTACCACATC-3')
18S-R
(5'-GTAGTAGCGACGGGCGGTGTGT-3')

其中, 括号中的 R 代表(A、G), Y 代表(T、C), D 代表(G、A、T), K 代表(G、T), S 代表(C、G)。

1.2 WSSV 感染实验

WSSV 组织提取液的制备方法如下: 将于-80℃保存的感染 WSSV 的中国明对虾组织 10 g(中国水产科学院黄海水产研究所黄健教授惠赠), 按 1:1 (W/W)比例加入含 2.4%氯化钠的 PBS, 在冰浴中匀浆 10 s, 匀浆液在 3 800 g, 4℃离心 15 min, 沉淀加入同体积的 PBS, 按上述方法匀浆和离心两次, 3 次所得上清合并, 加入蔗糖至 30%浓度; 于 31 000g,

4℃离心 50 min, 弃上清, 沉淀用 25 mL 生理盐水悬浮, 备用。

选取健康对虾若干尾, 采用腹节注射法进行 WSSV 感染实验。用 WSSV 悬液从对虾最后腹节进行注射, 每只虾注射 20 μL。感染实验的对照组, 每尾对虾注射 20 μL 无菌 PBS 溶液。免疫注射后 0、3、5、12、24、48、72 h 分别取虾 8 尾, 解剖取其肝胰脏组织, 用于总 RNA 的提取。

用注射器从对虾第一腹节基部腹窝处取血淋巴, 加入等体积的抗凝剂。8 尾对虾的血淋巴混在一起, 4℃, 800 g 离心 10 min, 收集的血细胞用于总 RNA 的提取。同时, 解剖未处理对虾的各组织, 液氮中冻存, 用于后期的 RNA 提取。

1.3 RNA 的提取和 cDNA 合成

利用 Unizol 试剂盒(上海博星公司)提取总 RNA, 方法参照使用说明书。用紫外分光光度计对 RNA 进行定量检测, 然后进行 MOPS 琼脂糖凝胶电泳, 确认 RNA 无降解后, -80℃保存备用。在进行反转录之前, 使用 RQ1 RNase-Free DNase(Promega, USA)去除总 RNA 中残留的基因组 DNA。cDNA 合成体系如下: 在 25 μL 的反应体系中加入 2 μg 总 RNA, 1×MMLV 缓冲液, 0.5 mmol/L dNTP, 0.4 mmol/L oligo-dT(或六聚体随机引物), 20 units RNase 抑制剂(Promega)和 200 units MMLV 反转录酶(Promega), 用于特异性基因片段克隆的 cDNA, 用 oligo-dT 进行反转录; 用于基因表达定量分析的 cDNA, 用随机引物六聚体进行反转录。

1.4 caspase 基因 cDNA(FcCasp)片段的克隆

根据 NCBI 上已经公布的部分 caspase 的氨基酸序列: 家蚕(*Bombyx mori*) (BAF74126)、疟蚊(*Anopheles gambiae*) (XP_308993)、墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*) (AY839873.1)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (EU421939.1)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*) (EF079670.1)和斑节对虾(*Penaeus monodon*) (DQ846887.1), 设计简并引物 CAS3-dF 和 CAS3-dR, 以中国明对虾血细胞 cDNA 为模板, 扩增中国明对虾 caspase 基因片段。PCR 反应条件为 94℃变性 4 min; 94℃变性 30 s, 62℃退火 30 s, 72℃延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 72℃延伸 10 min。扩增片段克隆到 pMD19-T 载体(大连宝生物公司)中, 重组质粒转化到大肠杆菌 TOP10 菌株, 挑取克隆经 PCR 验证后进行测序。

1.5 生物信息学分析

将测序获得的序列利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站上的 BLAST 工具进行数据库基因序列相似性及同源性的查找和比较。全长序列 ORF 分析等用 Bioedit 软件进行。选取部分在 GenBank 中与 FcCasp 相似的其他物种的 caspase 序列, 采用 Clustal W 软件进行多序列比对分析。将根据 cDNA 序列推导的氨基酸序列利用 <http://www.expasy.ch> 网站提供的蛋白质组和序列分析工具 (Proteomics and sequence analysis tools) 进行分析; 用 ProtParam 软件进行蛋白质基本物理化学参数分析。

1.6 FcCasp 的表达分析

利用 real-time PCR 检测中国明对虾肝胰脏中 FcCasp 在注射 WSSV 不同时间后转录水平的表达变化。取实验组和对照组不同时间点取样保存的肝胰脏样品, 按前述方法分别提取总 RNA 并反转录成 cDNA 后用于定量 PCR 检测。利用 RT-CASF/RT-CASR 进行转录表达检测。扩增片段大小为 129bp, 同时利用中国明对虾 18S rRNA 作为参考基因, 以 18S-F/18S-R 为引物对扩增产生 136bp 的 PCR 产物。real-time PCR 反应在 Eppendorf 公司 Mastercycler ep realplex 4S PCR 仪上进行, 采用 Blend Taq-Plus-PCR 反应体系 (TOYOBO), 所用染料为 SYBR Green。每个时间点的 cDNA 样品做两组 PCR, 一组为内标基因 18S rRNA, 另一组为目的基因 FcCasp, 每组反应进行 3 次重复。18S rRNA 基因的反应条件为: 94 °C 变性 2 min, 1 个循环; 94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环。FcCasp 基因的反应条件为: 94 °C 变性 2 min, 1 个循环; 94 °C 变性 15 s, 59.1 °C 退火 20s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[15]。

2 结果

2.1 中国明对虾 FcCasp 的部分 cDNA 片段的克隆

通过 PCR 扩增获得了 954bp 的 cDNA 片段, 经过 NCBI 数据库 BlastX 比对 (图 1), 发现它与 caspase 家族基因具有很高的同源性, 该 cDNA 编码 317 个氨基酸。FcCasp 蛋白的预测分子量为 35592.8Da, 理论等电点为 5.37。通过功能域分析发现 FcCasp 推导的氨基酸序列中含有 1 个 caspase 家族典型的 QACRG 五肽保守序列 (定位在 190-194 位氨基酸)。P20 大亚

基定位在 67-196 位氨基酸, P10 小亚基定位在 218-317 位氨基酸。

2.2 FcCasp 的组织分布

采用 real-time PCR 方法分析 FcCasp 在其不同组织中的表达情况 (图 2)。从图 2 中可以看出 FcCasp 在各组织中均有表达, 其中在鳃、胃和肠等组织中表达量较低; 在血细胞、淋巴器官和肝胰脏等组织中表达量较高; 在血细胞中表达水平最高。

2.3 中国明对虾 FcCasp 与已报道的其他物种 caspase 的比较

作者比对了来自不同物种的 26 个 caspase 的氨基酸序列, 利用 MEGA4.1 软件对这些 caspase 进行了分子系统学分析, 在构建系统发生树的基础上研究了中国明对虾 FcCasp 的分类归属以及 FcCasp 和其他物种 caspase 之间的进化关系, 结果如图 3 所示。由图 3 可见, 系统进化树分叉为两个分支: 脊椎动物 (人) 的 caspase 与无脊椎动物 (包括昆虫、海洋无脊椎动物) 分别属于两个不同的类群, 这就体现了不同物种 caspase 的进化差异。所有关于人、鼠、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 caspase 都聚在进化树的一分支。而中国明对虾的 FcCasp 则与疟蚊 (*Anopheles gambiae*)、果蝇 (*Drosophila Virilis*)、凡纳滨对虾, 以及其他“昆虫型 (insect-type)”的 caspase 共同聚类于进化树的另一分支, 这个分支上的蛋白全都由无脊椎动物的 caspase 组成。

2.4 注射 WSSV 后 FcCasp 在中国明对虾肝胰脏中的转录表达

WSSV 感染后, 中国明对虾肝胰脏中 FcCasp 的表达变化如图 4 所示。在注射后 12 h, 对虾肝胰脏中 FcCasp 明显上调表达, 并达到表达的最高值。而在注射后 48 h, 肝胰脏中 FcCasp 的表达有明显下降, 并低于 0 h 的表达量; 在注射后 72 h, FcCasp 的表达大致恢复到注射前的水平。

3 讨论

有关 caspase 的基因克隆、表达已经在许多物种中得到研究。推测的蛋白质包含一个典型的保守蛋白酶活性结构域, 存在于大多数的 caspase 中。通常 caspase 以非活性状态存在, 由两个连续的蛋白水解激活, 首先位于 caspase 前体的 N-端前肽和大亚基之间的特定位点被水解去除 N-端前肽, 然后在大小亚

1	ATG AGC GAC GGC GGT GAT TCA GCG CAA GCC GAA GCC CAG CCG AAT	45
1	M S D A G D S A Q A E A Q P N	15
46	GAC GGG CTC GAT GAC GGG AAC CAA AGC TTG GAC AAC ACG ACG GAG	90
16	D G L D D G N Q S L D N T T E	30
91	AAC ACG GAC GCG GAG GCG GAG GAA GTT GCG AGG AAC GGT TCT GGG	135
31	N T D A E A E E V A R N G S G	45
136	GGG CGT TCT ACC GCA TAC ACG GAG GTG GAC AGA CTC AGT GAA CGT	180
46	G R S T A Y T E V D R L S E R	60
181	TAC CCA ATG AAC CAT CCG CCT CCG GGC CTT GCT CTC ATC TTC GCT	225
61	Y P M N H R P R G L A L I F A	75
226	CGT TCC GAG TTC GAT AAT CAA AGT CTC AAC CCG CGA CCC TGT GCC	270
76	R S E F D N Q S L N P R P C A	90
271	GCC CAC GAC GCC GAG ATC GCG AGA GCC GCC TTC CAG GCC CTC GAC	315
91	A H D A E I A R A A F Q A L D	105
316	TTC CAG CCT GAA ATG TTC TAC GAC CTC ACG AGG GAC GAG CTC TTG	360
106	F Q P E M F Y D L T R D E L L	120
361	GGG AAG CTG CAG GCA GTT TCT GAG CGC GAC CAC AGC AGC TGC GAC	405
121	G K L Q A V S E R D H S S C D	135
406	GCC CTT GTC ATA GTG TTC ATG AGC CAC GGT GAG CTA AAC GTT AAT	450
136	A L V I V F N S H G E L N V N	150
451	AAG AAT GAA GAA TCC TTG TGG GCC AAA GAC GGC AAG ATT ACT ACC	495
151	K N E E S L W A K D G K I T T	165
496	GAG CAA CTG TGG AAA AAC TTC ACG GCT GAA CCG TGT GCA ACT CTA	540
166	E Q L W K N F T A E R C A T L	180
541	GCT GGC AAA CCT AAG CTG TAC CTC ATT CAG GCA TGC AGG GGC TCC	585
181	A G K P K L Y L I Q A C R G S	195
586	GAC GTG GAT AAG GGC GTG AAA ATG TCT CAG GCA GTG CGT GGC ATA	630
196	D V D K G V K N S Q A V R G I	210
631	CCG GTT CAG ACG GAC AGC GTT AAG GAC TAC GTC ATT CCC AAC CAA	675
211	P V Q T D S V K D Y V I P N Q	225
676	GCT GAT CAG CTT ATT ATG TGG GCT TCC TAC CCT GGC CAT GTG GCT	720
226	A D Q L I M W A S Y P G H V A	240
721	TAC AGG ACT AAC CGC AAA GGA ATC CAA GGA AGT GTC TTC ATC CAC	765
241	Y R T N R K G I Q G S V F I H	255
766	TAC CTG GCC GAA AAC CTC AAG AAT TTT GAC AGA ACT TCT CCG CGA	810
256	Y L A E N L K N F D R T S P R	270
811	CGA AGT CTG TTT TCC ATT CTT CTC AAA GTC AGC AGG GAT GTG GCA	855
271	R S L F S I L L K V S R D V A	285
856	GTT CTC TAC GAA ACC GAT ATG CCT TGT GAA GAC AAG TAT CAC CAA	900
286	V L Y E T D M P C E D K Y H Q	300
901	AAG AAA CAA GTT CCT TCC ATT ATG TCG ACA CTG CTT CGT GAA ATT	945
301	K K Q V P S I M S T L L R E I	315
946	TAC TTC TAA 954	
316	Y F *	

图 1 中国明对虾 FcCasp 核苷酸和推导的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequences of FcCasp of *Fenneropenaeus chinensis*
QACRG 五肽保守序列用灰色□标出; P20 大亚基用横线标出; P10 小亚基用□标出

QACRG conserved sequence is marked with gray □; P20 large subunit is marked with the horizontal line; P10 small subunit is marked with □

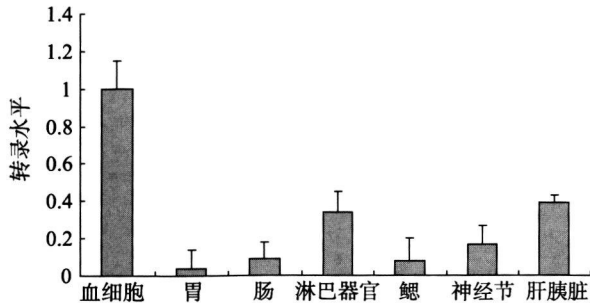


图 2 FcCasp 在中国明对虾中的组织分布

Fig. 2 Tissue distributions of FcCasp in *Fenneropenaeus chinensis*

基之间切割释放大小亚基, 由大亚基和小亚基组成同源二聚体, 再由两个二聚体形成有活性的四聚体^[16,17]。这些短的 N-端前肽可能与哺乳动物的 caspase-3 和 7 相似, 起到效应 caspase 的作用^[18,19]。在本研究中, 克隆得到的 caspase cDNA 的 ORF、蛋白的推导分子

量、典型蛋白酶活性结构域、推导切割位点以及 N-端前肽都与先前的已报道的研究相似^[20]。这个结果清晰地表明本研究分离得到的 caspase 与其他甲壳类动物的 caspase 具有高度相似性。

多细胞器官广泛利用细胞凋亡来清除受损伤或有害的细胞, 为动物发育过程中保持机体平衡起到关键作用^[21]。在脊椎动物中, 胸腺中的细胞凋亡是淋巴细胞死亡的主要机制。本研究通过使用 real-time PCR 的方法, 发现 FcCasp 基因广泛分布在对虾组织中, 包括血细胞、肝胰脏、鳃、淋巴器官、神经节等, 但没有发现该基因在心脏中存在。

caspase 蛋白酶家族在细胞凋亡过程中有重要作用, 它们接受外界信号, 使细胞发生细胞凋亡, 它们还是细胞凋亡过程中的具体执行者, 完成对特定蛋白底物的水解, 从而使细胞显示出一系列细胞凋亡的特征。作者利用 real-time PCR 分析研究的结果表

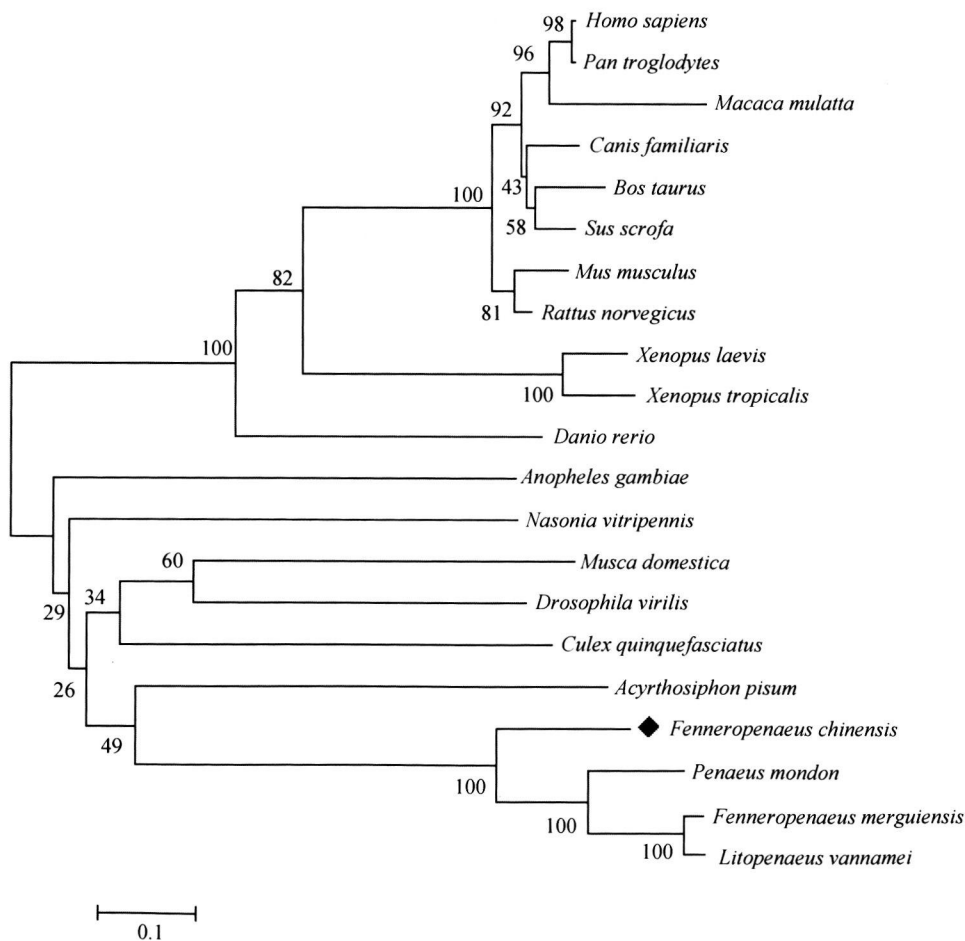


图 3 中国明对虾的 FcCasp 和其他物种 caspase 构建的系统进化树

◆表示本研究中的物种

Fig. 3 Phylogenetic analysis on the amino acid sequence of FcCasp and caspase family members of other species

◆denotes the species in this study

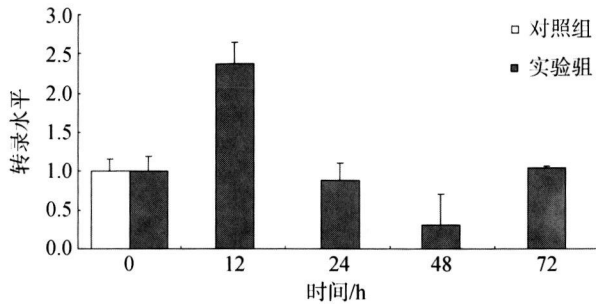


图4 对虾肝胰腺 FcCasp 基因在 WSSV 刺激后不同时间转录水平的变化

Fig. 4 Profile of FcCasp expression in the hepatopancreas of shrimps challenged with WSSV

明,对虾肝胰腺 FcCasp 基因在 WSSV^[22]感染后出现明显的上调表达。FcCasp 基因的表达与病毒刺激有相关性,说明该基因可能参与了对虾抗病毒免疫过程,推测该基因可能会通过细胞凋亡清除体内被病毒感染的细胞,从而清除体内的病毒,进而起到抗病毒的作用。目前已报道的有 4 种对虾 caspase: 凡纳滨对虾、日本囊对虾^[23]、斑节对虾^[24]、墨吉明对虾^[25],但对对虾的 caspase 具体功能目前尚不清楚,还正在进一步研究之中。迄今,对虾相关基因的研究还处于一个起步的阶段,主要由于还没有一套成熟的系统可用于研究对虾基因的功能。相比哺乳动物而言,由于没有对虾细胞系,进行其基因功能研究,显得十分困难。在接下来的工作中,通过获得的 FcCasp cDNA 序列,将采用 RNAi 技术用于对虾基因功能的研究。FcCasp 基因特异的 dsRNA 推测可能特异地抑制该基因的转录表达,由此来进一步研究该基因的作用,为对虾免疫病害防治提供指导。

参考文献:

- [1] 刘瑞玉, 胡超群, 曹登宫. 我国对虾养殖的现状、研究进展与存在的若干问题. 第四届世界华人虾类养殖研讨会论文集[C]. 青岛: 海洋出版社, 2004. 1-15.
- [2] 相建海. 海水养殖生物病害发生与控制[M]. 北京: 海洋出版社, 2001. 1-200.
- [3] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. *British Journal of Cancer*, 1972, 26: 239-257.
- [4] Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development[J]. *Cell*, 1997, 88(3): 347-354.
- [5] Cerretti D P, Kozlosky C J, Mosley B, *et al.* Molecular-cloning of the interleukin-1-Beta converting zymase[J]. *Science*, 1992, 256: 97-100.
- [6] Alnemri E S, Livingston D J, Nicholson D W, *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature[J]. *Cell*, 1996, 87(2): 171.
- [7] 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.
- [8] 李小明, 宋天保. “杀手”蛋白酶 caspase[J]. 细胞生物学杂志, 2000, 22: 58-63.
- [9] Sperandio S, Bredesen D E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(26): 14 376-14 381.
- [10] Overholtzer M, Mailleux A A, Mouneimne G, *et al.* A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion[J]. *Cell*, 2007, 131: 966-979.
- [11] Hu S, Yang X. dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the Drosophila caspase DREDD[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(40): 30 761-30 764.
- [12] Boldin M P, Varfolomeev E E, Pancer Z, *et al.* A novel protein that interacts with the death domain of Fas/Apo1 contains a sequence motif related to the death domain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(14): 7 795-7 798.
- [13] Fernandes-Alnemri T, Armstrong R C, Krebs J, *et al.* In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93: 7 464-7 469.
- [14] Meergans T, Hildebrandt A K, Horak D, *et al.* The short prodomain influences caspase3 activation in HeLa cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 135-140.
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [16] Cohen G M. Caspases: the executioners of apoptosis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 1-16.
- [17] Wolf B B, Green D R. Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(29): 20 049-20 052.
- [18] Song Z W, McCall K, Steller H. DCP-1, a Drosophila cell death protease essential for development[J]. *Science*, 1997, 275: 536-540.
- [19] Fraser A G, Evan G I. Identification of a Drosophila

- melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE[J]. **The EMBO Journal**, 1997, 16(10): 2 805-2 813.
- [20] Rijiravanich A, Browdy C L, Withyachumnarnkul B. Knocking down caspase-3 by RNAi reduces mortality in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* challenged with a low dose of white-spot syndrome virus[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2008, 24(3): 308-313.
- [21] Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens[J]. **Annual Review of Microbiology**, 1999, 53: 155-187.
- [22] Chang C C, Yeh M S, Lin H K, *et al.* The effect of *Vibrio alginolyticus* infection on caspase-3 expression and activity in white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2008, 25(5): 672-678.
- [23] Wang L, Zhi B, Wu W, *et al.* Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection[J]. **Development and Comparative Immunology**, 2008, 6: 706-715.
- [24] Leu J H, Kuo Y C, Kou G H, *et al.* Molecular cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from the tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. **Development and Comparative Immunology**, 2008, 32(2): 121-133.
- [25] Phongdara A, Wanna W, Chotigeat W. Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp *Penaeus merguensis*[J]. **Aquaculture**, 2006, 252 (2-4): 114-120.

Cloning and expression of a caspase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

SONG Guang-nian^{1, 2}, JIN Song-jun¹, ZHANG Ji-quan¹, XIANG Jian-hai¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Apr., 1, 2010

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; caspase gene cloning; WSSV challenge; real-time PCR

Abstract: Apoptosis eliminates unwanted cells, from an organism including damaged and virus-infected cells, being a fundamental cellular process that plays a critical role in normal development and tissue homeostasis. Here we studied a caspase homolog from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*, designated FcCasp. An open reading frame of 954 nucleotides encoding 317 amino acids (aa) contained a conserved motif, QACRG, of known caspases-3, and was located at aa 190–194. FcCasp expressions were measured in normal shrimp and in shrimp infected by white spot syndrome virus (WSSV) at five time-points post-injection (p.i.) with real-time PCR, revealing different expression profiles of FcCasp gene in hepatopancreas of shrimps after they were challenged by WSSV. The transcription of FcCasp in hepatopancreas showed up-regulation 12 h post-challenge, indicating the expression of FcCasp was closely related to WSSV challenge. Therefore, FcCasp might be involved in the apoptosis.

(本文编辑: 谭雪静)