

文章编号: 1000-0615(2016)01-0119-09

DOI: 10.11964/jfc.20150910089

中国明对虾 *caspase2* 基因克隆及其在抗白斑综合征病毒中的表达分析

邓康裕^{1,2}, 史晓丽², 张莹雪^{1,2}, 孟宪红^{2*},
孔杰^{1,2}, 罗坤², 栾生²

(1. 中国海洋大学海洋生命科学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 采用RACE技术克隆获得中国明对虾 *caspase2* 基因cDNA序列全长, 并对该序列进行分析。结果显示, 中国明对虾 *caspase2* 基因全长为1517 bp, 开放阅读框长924 bp, 5'非编码区长78 bp, 3'非编码区长515 bp, 命名为 *FcCasp2*。推测该基因编码307个氨基酸, 预测分子量为34.21 ku, 理论等电点为7.62。同源性和系统进化分析发现, *FcCasp2* 基因与凡纳滨对虾 *caspase2* 和斑节对虾 *caspase* 的相似性分别为88%和80%, 与其他节肢动物 *caspase* 家族基因聚为一类。荧光定量RT-PCR结果显示, *FcCasp2* 基因在肝胰腺中的相对表达量最高, 在肌肉中表达量最低。WSSV感染后该基因在中国明对虾肌肉、肝胰腺和鳃丝中的表达量有不同的时空表达趋势, 表明 *FcCasp2* 基因可能参与中国明对虾生物胁迫的应答反应。

关键词: 中国明对虾; *caspase2* 基因; 基因克隆; 组织表达; WSSV 感染

中图分类号: Q 785; S 966.1

文献标志码: A

中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 又称东方对虾, 隶属节肢动物门 (Arthropoda), 甲壳纲 (Crustacea), 十足目 (Decapoda), 枝鳃亚目 (Dendrobranchiata), 对虾总科 (Penaeoidea), 对虾科 (Penaeidae), 明对虾属 (*Fenneropenaeus*)。中国明对虾主要分布在我国黄海、渤海及朝鲜半岛西海岸, 其适应能力强、生长快、耐低温、品质好及营养价值高, 因而成为我国重要的海水养殖经济物种。

养殖对虾的白斑综合征 (white spot syndrome, WSS) 自1992年暴发以来, 对对虾养殖业造成严重影响, 是引起对虾暴发性死亡最为严重的传染性疾病之一, 其病原为白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV)^[1]。WSSV具有很高的侵染性和复制能力, 感染WSSV后养殖池中对虾死亡率在3~10 d内便可达到100%^[2]。国内外许多

学者尝试从中和抗体、免疫增强剂、疫苗、RNAi等^[3-6]方面防治WSSV的暴发, 但至今效果不显著。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。

一般认为甲壳动物无特异性免疫反应系统, 其主要以体液免疫和细胞免疫抵御外界真菌和病毒^[7]。在抵御细胞损伤和宿主对病菌感染反应中, 细胞凋亡具有重要的作用^[8]。*caspase* (cysteine specific proteinase) 又称为天冬氨酸-半胱氨酸蛋白酶, 能特异切割 Asp 后的肽键。*caspase* 家族一般有2种类型, 分别为起始 *caspase* 和效应 *caspase*^[8]。起始 *caspase* 可以切割并激活效应 *caspase*, 从而引发细胞凋亡的级联反应^[8-9]。研究表明, 抑制与细胞凋亡相关的 *caspase* 蛋白酶水解活性, 可延长感染病毒的细胞生命周

收稿日期: 2015-09-27 修回日期: 2015-10-11

资助项目: 国家自然科学基金 (31372523); 泰山学者种业计划专家良种工程项目

通信作者: 孟宪红, E-mail: mengxh@ysfri.ac.cn

期, 从而增强病毒复制^[10]。

本研究采用RACE、基因克隆、常规测序、RT-PCR等常规生物学技术, 克隆中国明对虾 *caspase2* 基因(以下称*FcCasp2*基因)并研究其受WSSV侵染后的时空表达特点, 为中国明对虾抗WSSV育种提供理论依据和实践材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国明对虾取自中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心, 平均体质量3.08 g; 实验前暂养1周, 实验前1天停止喂食。实验用海水为天然海水, 盐度30, 养殖水温25 ℃, pH 8.4, 持续充氧, 每天全部换水, 并投喂配合饲料。

1.2 总RNA提取及cDNA的合成

取健康中国明对虾肝胰腺, 置于液氮中研磨, 按Trizol法提取总RNA, 方法同韩俊英等^[11]。采用紫外分光光度计与1.0%琼脂糖凝胶电泳检测所提取总RNA质量及完整性。利用SMART™ RACE Amplification Kit反转录合成cDNA第一条链。

Trizol Reagent购自Invitrogen公司(美国); SMART™ RACE Amplification Kit购自Clontech公司(美国); LA Taq、DEPC处理水、SYBR® Premix Ex Taq™、PMD18-T载体和Top10感受态细胞购自TaKaRa公司(日本); 胶回收试剂盒和实验所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 中国明对虾*caspase2*基因cDNA全长克隆及测序

根据本实验室中国明对虾的454转录组测序获得的*FcCasp2*基因的EST序列, 利用Primer Premier 5.0软件设计3'RACE和5'RACE引物(表1)。

RACE扩增产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 然后与PMD18-T载体进行连接, 转化入Top 10感受态细胞, 阳性克隆经菌落PCR鉴定后(所用引物为M13-F和M13-R)(表1), 送往上海生工公司进行测序。

1.4 中国明对虾*FcCasp2*基因序列分析

将测序获得的序列利用<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

表1 *FcCasp2*基因克隆和表达所用引物

Tab. 1 The primer sequences in clone and expression of *FcCasp2*

引物 primers	序列 sequences
UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC
UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
18s-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18s-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
<i>caspase2</i> -F1	GTGACTGTCTACAACGACCTCACT
<i>caspase2</i> -F2	ACGTAAACCACTCGGAATGC
<i>caspase2</i> -F3	ATTTCAAAGCCGACCGGTGCCCTAC
<i>caspase2</i> -F	GGCTTTGCGAGAATGTCAGT
<i>caspase2</i> -R1	GAGGTCGTTGTAGACAGTCACTTG
<i>caspase2</i> -R2	AAGAAGAGCTTCGGCTTTCC
<i>caspase2</i> -R3	GCATTCCGAGTGGTTACGT
<i>caspase2</i> -R	AGAGTTCTGTGCCTGGTCA

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。在GenBank中选取与*Fc*部分*Casp2*相似的其他物种*caspase*家族序列, 采用ClustalW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。

使用Clustal X软件对中国明对虾*FcCasp2*基因与其他物种*caspase*基因所翻译的氨基酸序列进行多重序列比对, 在此基础上采用MEGA5.0软件, 以邻接法(NJ)进行系统进化树构建。

1.5 人工WSSV感染实验

实验前随机挑选暂养的健康中国明对虾180尾, 平均分为2组(WSSV感染组和空白对照组), 每组3个平行。各组分别在实验开始后的0, 3, 6, 12, 24, 48 h取鳃、肝胰腺和肌肉组织, 每个时间点各取3尾, 保存于液氮, 用于RNA的提取。

采用单尾、等量、口饲WSSV方法进行对虾人工感染^[12],对每尾实验对虾单独投喂毒饵10 mg(约 10^6 copies WSSV病毒粒子),进食毒饵后,所有实验对虾按组别放于6个62 cm × 54 cm × 47 cm的整理箱中。

1.6 FcCasp2基因的表达分析

本实验选用18S rRNA作为内参基因,引物序列为18s-F和18s-R^[13],根据扩增得到的中国明对虾caspase2基因全长序列,设计引物caspase2-F和caspase2-R,利用RT-PCR对不同时间感染WSSV的鳃、肝胰腺和肌肉组织进行FcCasp2基因的表达量检测。RT-PCR的扩增体系为20 μL,其中包括SYBR Premix Ex Taq^{II}(2 ×)10 μL,正向引物(10 μmol/L)0.8 μL,反向引物(10 μmol/L)0.8 μL,ROX Reference Dye^{II}(50 ×)0.4 μL,cDNA模板2.0 μL,DEPC水6.0 μL。反应程序为:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 34 s,40个循环;95 °C 15 s,60 °C 1.0 min,95 °C 15 s。

荧光定量PCR检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析,数据均以平均值±标准差(mean ± SD)表示,经SPSS 17.0软件进行方差分析(One-Way ANOVA),显著水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 中国明对虾FcCasp2基因cDNA全长及序列分析

利用Trizol试剂提取获得中国明对虾肝胰腺总RNA,经紫外分光光度计检测,其 OD_{260}/OD_{280} 为1.98,表明RNA纯度较高;经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,18S和28S rRNA条带清晰,完整性较好,符合实验的要求。

3' RACE和5' RACE扩增产物分别测序后拼接,获得中国明对虾FcCasp2基因的全长cDNA序列,GenBank登录号为KP757876。该基因全长1517 bp,包括78 bp的5'端非编码区(5' UTR),492 bp的3'端非编码区(3' UTR)和924 bp的开放阅读框(ORF)。3'端含有PolyA尾,但不含多聚腺苷酸的加尾信号AATAA(图1)。

2.2 FcCasp2基因编码蛋白质及同源性分析

经过NCBI数据库BLASTX比对,发现FcCasp2与caspase家族基因具有较高的同源性,

FcCasp2 cDNA编码307个氨基酸,包括36个碱性氨基酸(K, R),35个酸性氨基酸(D, E),88个疏水性氨基酸(A, I, L, F, W, V),90个亲水性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y),71个带电荷氨基酸(D、E、R、K),蛋白预测分子量为34.21 ku,理论等电点为7.62。通过功能域分析发现FcCasp2推导的氨基酸序列中含有1个caspase家族典型的QACRG(其中R可为Q)五肽保守序列(定位在183~187位氨基酸)(图2)。

利用NCBI BLASTP对中国明对虾caspase2基因编码的氨基酸序列进行同源比对,发现FcCasp2与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)caspase2的相似性最高,为88%,但与中国明对虾FcCasp基因相似性仅为30%;与其他甲壳动物如斑节对虾(*Penaeus monodon*)caspase有80%的相似,与卤虫(*Artemia sinica*)caspase1则有50%的相似度。与节肢动物门中的内华达古白蚁(*Zootermopsis nevadensis*)、花绒寄甲(*Dastarcus helophoroides*)、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、家蝇(*Musca domestica*)caspase1基因的相似性分别为46%、51%、44%和45%。另外,经对比发现,所有物种除保守五肽QACRG外,在其上游还有一段保守的AGKPK序列(定位于174~178位氨基酸)(图2)。利用MEGA 5.0软件进行系统进化分析,发现中国明对虾FcCasp2基因和其他节肢动物caspase聚为一类(图3)。

2.3 中国明对虾FcCasp2基因的组织表达分析

利用RT-PCR分析中国明对虾FcCasp2基因在鳃、肝胰腺和肌肉组织中的表达水平。结果表明,该基因在鳃、肝胰腺和肌肉中均有表达,且在肝胰腺中的表达量最高,在肌肉中的表达量最少,而在肝胰腺和鳃中的表达量显著高于肌肉($P < 0.05$)(图4)。

感染WSSV的中国明对虾FcCasp2基因在各组织中的相对表达量变化分析结果显示:与对照组相比,FcCasp2基因相对表达量在鳃中表现为先下调后上升再下调的趋势,在第6 h达到最低并在第24 h达到最高,分别为对照组的0.59和3.71倍($P < 0.05$);在肝胰腺中的相对表达量在6 h急剧增高,为对照组的9.74倍($P < 0.05$);随后表达量出现下降,在24 h后低于对照组但表达水平无显著差异($P > 0.05$)(图5)。该基因在肌肉中

```

1  gaaacagtca gtcaaacgca gagaaacacg agaggtaac agacacagcg tgttcagaca aggccgccag 70
      M E D T I S G G S Q L D E P R G T
71  aagetacc ATG GAG GAC ACC ATC AGC GGA GGG AGC CAG CTC GAC GAG CCA AGG GGA ACC 129
      N G Q V G D S G S S E T D A G G M G Q T
130 AAT GGC CAA GTG GGT GAC AGC GGC AGC AGT GAG ACC GAC GCC GGG GGA ATG GGG CAG ACG 189
      G V G G V P E G F A R M S V N R D A V C
190 GGT GTG GGT GGC GTG CCT GAA GGC TTT GCG AGA ATG TCA GTA AAC CGT GAT GCT GTG TGC 249
      Y N M S H K Q R G H C V I F N H R H F D
250 TAC AAC ATG AGC CAC AAG CAG CGC GGC CAC TGC GTC ATC TTC AAC CAC CGC CAC TTC GAC 309
      Q H T G L G E R N G T D R D R D Q A Q K
310 CAG CAC ACA GGC CTT GGG GAG AGG AAT GGC ACA GAC CGT GAC CGT GAC CAG GCA CAG AAA 369
      L F T N L G F Q V T V Y N D L T V K E V
370 CTC TTC ACT AAC CTG GGG TTC CAA GTG ACT GTC TAC AAC GAC CTC ACT GTG AAA GAG GTC 429
      K K K I K G I A V D V N H S E C D A L A
430 AAG AAG AAA ATA AAG GGC ATC GCT GTC GAC GTA AAC CAC TCG GAA TGC GAT GCG CTG GCA 489
      V V F M L H G E K N V L W G R D D T F K
490 GTG GTG TTC ATG TTA CAC GGG GAG AAG AAT GTT CTT TGG GGC CGT GAT GAC ACA TTT AAA 549
      S D Y L F E N F K A D R C P T L A G K P
550 TCC GAT TAC CTG TTT GAA AAT TTC AAA GCC GAC CGG TGC CCT ACC CTC GCT GGC AAG CCG 609
      K L F F I Q A C R G E G L D S G T T L V
610 AAG CTC TTC TTC ATC CAG GCA TGC CGT GGT GAG GGT CTG GAT TCA GGT ACG ACC CTA GTG 669
      Q Q K T R D E I D S G Y Q A Y K I P N T
670 CAG CAG AAG ACC CGG GAC GAG ATC GAC TCA GGC TAC CAG GCC TAT AAG ATC CCC AAC ACG 729
      A D F L V C W S F I P G H F S W R N T T
730 GCC GAC TTC CTG GTG TGC TGG TCC ACC ATA CCT GGC CAC TTC TCT TGG CGC AAC ACC ACC 789
      N G S W F I Q S L V K V L T Q D S A R D
790 AAT GGC TCG TGG TTC ATT CAG TCG CTG GTG AAA GTG CTG ACC CAA GAC AGT GCG CGT GAT 849
      D L L S M M T S V N R N M I L N F E S N
850 GAC CTA CTC TCC ATG ATG ACC AGC GTG AAC CGT AAC ATG ATT CTG AAC TTC GAG TCA AAC 909
      C P S Q S H M H G K K Q A A C I V S T L
910 TGC CCA TCA CAA AGT CAC ATG CAT GGA AAA AAG CAA GCT GCC TGC ATT GTC TCA ACC CTG 969
      M R K V R F T P K Y *
970 ATG CGA AAG GTG CGC TTT ACG CCA AAG TAT TGA ctggtccccg agcatagaga aggaggaggc 1032
1033 aggtctgacg ctatgctcag ggacgtaata gaagaggccc caatagccag agctgaagag gtcagggaac 1102
1103 aagagctggg ggggtgcactt gcggccccca ataccaggga ggagcctaag atgttctcaa gattcctcca 1172
1173 acgagtctgg cctttttcaa tgaagaagaa gaaaaaggaa ggcaattga aacgtaacca gaagcctctt 1242
1243 tggaaagtttg gccgtcatga agagagctca gcagatcagg cacaactgac tgcctcagag aatgaaaga 1312
1313 gatccaaaca ttctccttc ttgacgctc acaagagcat ctgcctcagc tgttgtaggg tttaaaagaa 1382
1383 ggaatagatc acatgcattt actgtacagc agtgaaatgc atgatttgag taattttatg gtattttata 1452
1453 aaaaaaatat gatgtgcttt cagtagttaa acacaatttg acaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1517

```

图1 中国明对虾*FcCasp2*基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

起始密码ATG由粗线标出；终止密码子TGA由*标出；圆框内为预测的酶切位点；绿色方框内的为QACRG保守五肽；黑色方框内为大亚基P₂₀；黑色横线部分为小亚基P₁₀；红色下划线为活性位点。

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *FcCasp2* gene

Start codon (ATG) was marked with thick line; asterisk indicates stop codon (TGA); the predicted enzyme digestion site was marked with loop frame; QACRG conserved sequence was marked with green box; the large-subunit P₂₀ was marked with black box; the small subunit P₁₀ was marked with black line; the active site was marked with red line.

的相对表达量呈现先上调后下调再上调的变化趋势，且分别在12和48 h达到最大值，相对表达量分别为对照组的1.61($P > 0.05$)和2.76倍($P < 0.05$)；且在各时间点，该基因在WSSV感染组相

对表达量均高于对照组。

3 讨论

*caspase*家族在胞内通常无活性，在外界环境

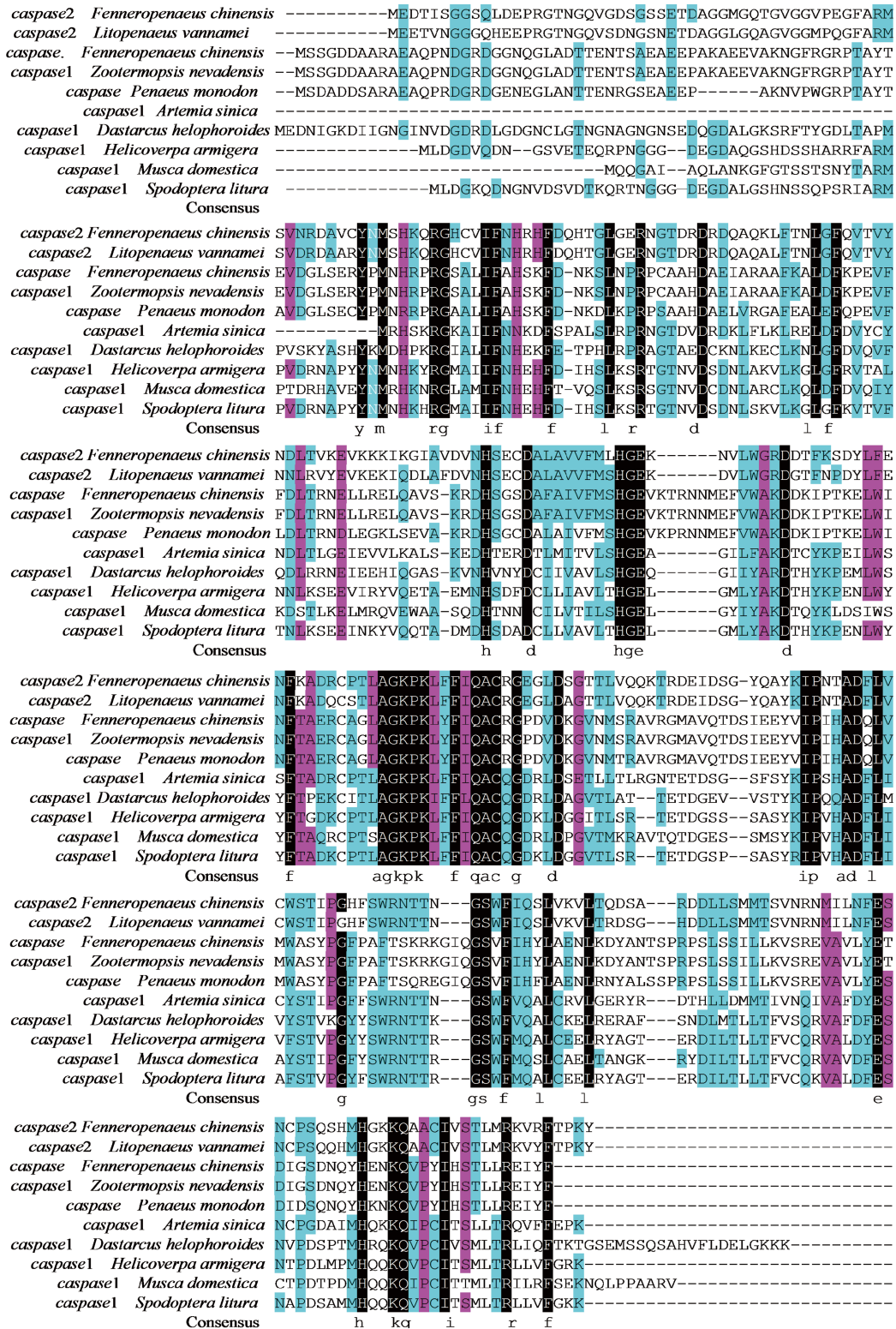


图 2 中国明对虾 *FcCasp2* 基因氨基酸序列与其它物种 *caspase* 氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequences alignment of *FcCasp2* with other species' *caspase*

改变诱发凋亡刺激时则被激活，不同的 *caspase* 分别在不同时期发挥作用^[14]。*caspase* 基因在对虾中研究较少，但在哺乳动物中研究较为

普遍，现已知15种 *caspase* 的结构与功能。一般根据结构和功能将 *caspase* 家族分为3类：第1类为炎症相关 *caspase* (*caspase-1*、-4、-5和-13)；第2类

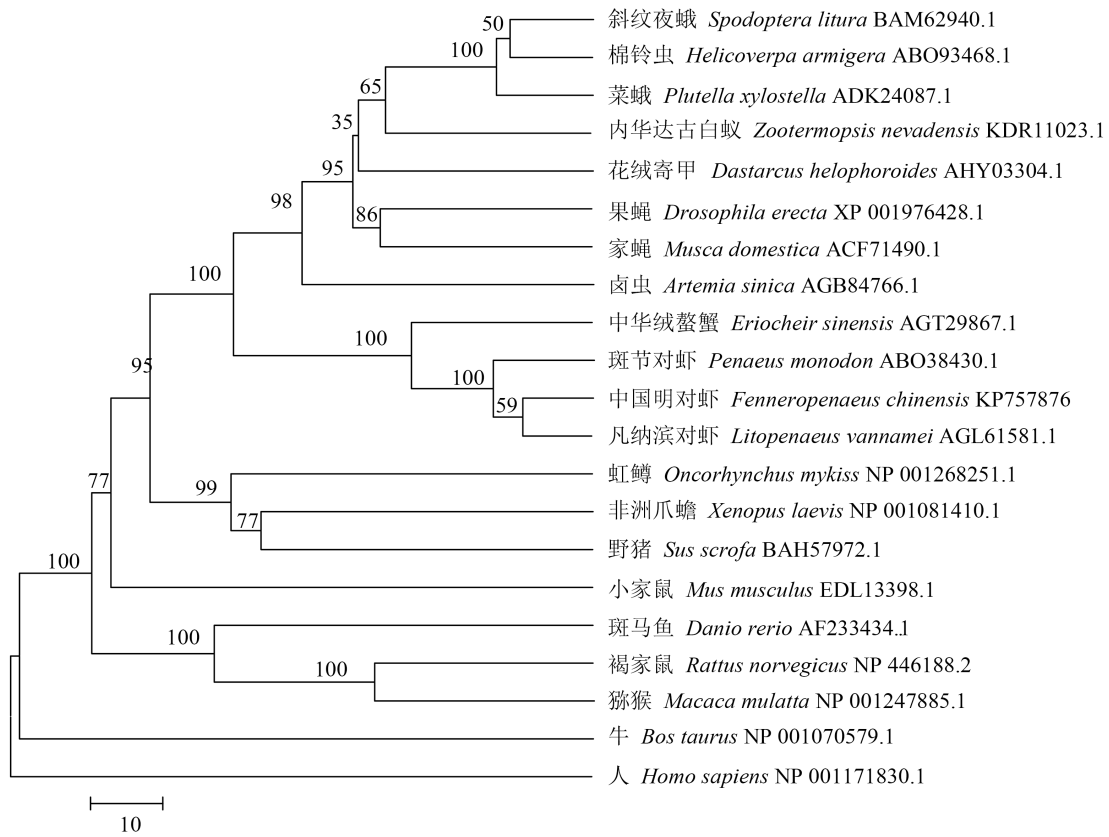


图3 利用MEGA5.0软件构建的基于caspase氨基酸序列的NJ系统进化树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on caspase amino acid sequences by MEGA 5.0

为启动凋亡caspase (caspase-2、-8、-9和-10); 第3类为效应凋亡caspase (caspase-3、-6和-7)。由于caspase基因的同源性较高但N端前肽的同源性较低, 因此N端序列是区别caspase家族各成员的主要指标。

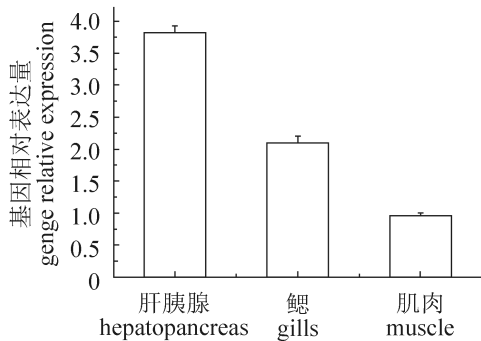


图4 中国明对虾FcCasp2基因在不同组织中的表达分布

Fig. 4 Distribution of caspase2 gene expression in different tissues of FcCasp2

caspase家族基因编码的蛋白质一般包含3个部分: N端前肽和大小2个亚基。研究表明, 对虾N端的短肽可能与哺乳动物的caspase3和caspase7具有相同的作用^[15-17]。正常生理状态下caspase蛋白以非活性状态存在, 经过2个蛋白水解被激活。caspase2序列中存在多个可供选择的裂解位点而得以激活, 分别是ASP²³和ASP¹⁹¹、ASP²⁰⁶。ASP²³(QVGD↓S)作为切割位点将原结构域与大亚基分离; ASP¹⁹¹(EGLD↓S)或ASP²⁰⁶(DEID↓S)将大亚基切割形成P₂₀和P₁₀2个亚基(图1)。P₂₀大亚基定位在64~189位氨基酸, P₁₀小亚基定位在210~305位氨基酸, 其中保守五肽QACRG位于大亚基(图1)。中国明对虾FcCasp2 cDNA的ORF、蛋白酶切活性结构域、推导切割位点及保守区域都与先前的研究相似^[17], 进一步证明中国明对虾caspase2基因与其余甲壳动物caspase家族基因具有较高的相似性, 这也可能暗示着其功能的同源性。综上所述, 可以确定FcCasp2 cDNA序列为中国明对虾caspase2基因序列。

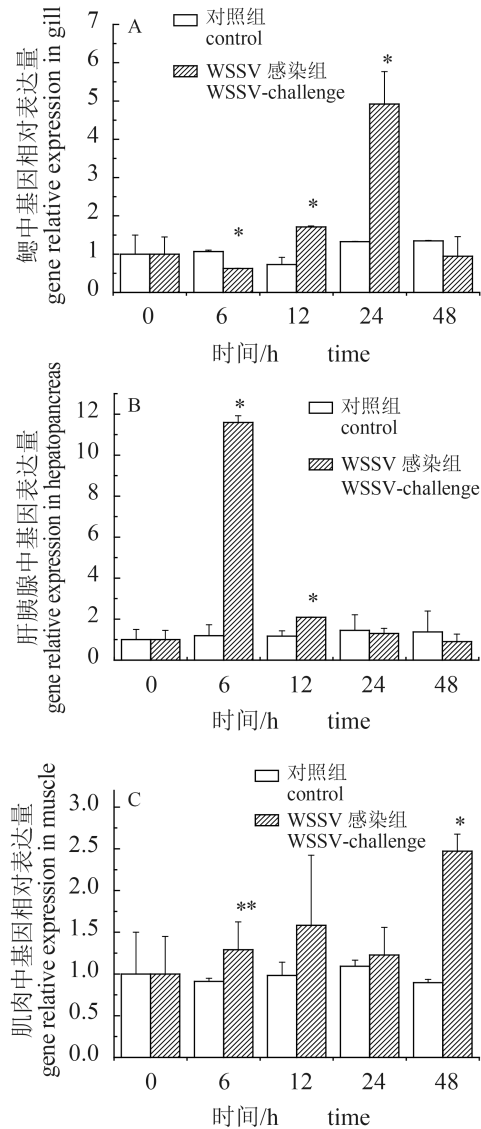


图5 WSSV感染后中国明对虾*FcCasp2*基因在不同组织中的表达变化

*表示WSSV感染组与对照组具有显著差异

Fig. 5 Expression of *caspase2* gene in *Fenneropenaeus chinensis* after WSSV-infected

The significant difference between the WSSV-infected group and the control group was marked with *

目前病毒对凋亡的调控机理尚不十分清楚,但是越来越多的实验证实,感染病毒的动物细胞命运是病毒编码产物和宿主细胞因子相互作用的结果^[8]。宋光年等^[15]发现*caspase*基因的表达与WSSV感染密切相关。而相同的研究结果也在日本对虾(*Penaeus japonicus*)和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)中发现^[16]。因此,*caspase*家族在抵抗WSSV侵染中具有不容忽视的应用价值。

在本实验中,利用RT-PCR分析了中国明对虾*FcCasp2*在鳃、肝胰腺和肌肉组织分布情况。结果显示*FcCasp2*基因在中国明对虾的鳃、肝胰腺和肌肉中均有表达,在肝胰腺中表达量最高,肌肉中表达最低。这与凡纳滨对虾*caspase2*基因在组织中分布情况不一致^[18],可能是由于物种差异性造成。另外,分析了中国明对虾感染WSSV后*caspase2*基因的表达趋势,结果显示鳃、肝胰腺和肌肉中对虾*caspase2*基因在WSSV感染后出现明显的上调表达,其中肝胰腺对WSSV感染最为敏感。说明WSSV对中国明对虾*caspase2*的表达是一个明显的刺激,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。从该角度出发,抑制*caspase2*基因的表达可以延长病毒感染细胞的寿命^[10]。这与Flegel^[19]的研究结果相似,其认为病毒感染后细胞凋亡基因表达变化是引起死亡的主要原因。若该理论成立,在对虾病毒感染中可阻断细胞凋亡过程的诱发,进而阻止对虾死亡直至对虾收获。

本研究克隆获得了中国明对虾*caspase2*基因的全长cDNA序列,并分析WSSV感染后中国明对虾*caspase2*基因在鳃、肝胰腺和肌肉中的表达特征,推断其可能参与中国明对虾对生物胁迫应答,但其在病毒感染后的作用机制仍需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Lightner D V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas [J]. *Revue Scientifique et Technique*, 1996, 15(2): 579-601.
- [2] Lightner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp [M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996.
- [3] 张衡,谷力,杨丰. 对虾白斑综合征病毒vp15基因的RNA干扰研究[J]. 台湾海峡, 2012, 31(1): 47-52.
Zhang H, Gu L, Yang F. RNA interference on vp15 gene of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2012, 31(1): 47-52 (in Chinese).
- [4] Yang Jr Y, Chang C I, Liu K F, et al. Viral resistance and immune responses of the shrimp *Litopenaeus*

- vannamei* vaccinated by two WSSV structural proteins [J]. Immunology Letters, 2012, 148(1): 41–48.
- [5] He Y D, Zhang X B. Comprehensive characterization of viral miRNAs involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection [J]. RNA Biology, 2012, 9(7): 1019–1029.
- [6] Yang F, He J, Lin X H, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [J]. Journal of Virology, 2001, 75(23): 11811–11820.
- [7] Lee S Y, Lee B L, Söderhäll K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(10): 7927–7933.
- [8] Roulston A, Marcellus R C, Branton P E. Viruses and apoptosis [J]. Annual Review of Microbiology, 1999, (53): 577–628.
- [9] Kumar S, Bao Q, Shi Y. Apoptosome: A platform for the activation of initiator *caspases* [J]. Cell Death and Differentiation, 2007, 14(1): 56–65.
- [10] Tschopp J, Thome M, Hofmann K, *et al.* The fight of viruses against apoptosis [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 1998, 8(1): 82–87.
- [11] 韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70基因的克隆及其表达分析[J]. 水产学报, 2011, 35(8): 1130–1138.
- Han J Y, Li J, Li J T, *et al.* Cloning and expression of heat shock protein 70 (HSP70) of *Exopalaemon carinicauda* [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(8): 1130–1138 (in Chinese).
- [12] 孟宪红, 张天时, 孔杰, 等. 对虾抗白斑综合症病毒能力的等量、定量测试方法: 201210107377.8[P]. 2013–12–25.
- Meng X H, Zhang T S, Kong J, *et al.* The equivalent and quantitative test method of shrimps in resistance white spot syndrome virus: 201210107377.8 [P]. 2013–12–25 (in Chinese).
- [13] 逢锦菲. “黄海2号”中国对虾高通量SNP筛选及其与抗WSSV性状的关联分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Pang J F. High-throughout screening of SNP and its association with WSSV-resistance traits in *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai NO.2” [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [14] 冯骁, 田聆, 黄倩. *caspase-3*基因表达调控研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(9): 936–942.
- Feng X, Tian L, Huang Q. Advances in *caspase-3* gene expression regulation[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2014, 26(9): 936–942 (in Chinese).
- [15] 宋光年, 金松君, 张继泉, 等. 中国明对虾*caspase*基因的克隆与表达分析[J]. 海洋科学, 2010, 34(12): 1–7.
- Song G N, Jin S J, Zhang J Q, *et al.* Cloning and expression of a *caspase* gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Marine Sciences, 2010, 34(12): 1–7 (in Chinese).
- [16] Fraser A G, Evan G I. Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE [J]. The EMBO Journal, 1997, 16(10): 2805–2813.
- [17] 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.
- [18] Wang P H, Wan D H, Chen Y G, *et al.* Characterization of four novel *caspases* from *Litopenaeus vannamei* (*Lvcaspase2–5*) and their role in WSSV infection through dsRNA-mediated gene silencing [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e80418.
- [19] Flegel T W. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2007, 31(3): 217–231.

cDNA cloning of *caspase2* gene in *Fenneropenaeus chinensis* and its expression analysis in WSSV infection

DENG Kangyu^{1,2}, SHI Xiaoli², ZHANG Yingxue^{1,2}, MENG Xianhong^{2*},
KONG Jie², LUO Kun², LUAN Sheng²

(1. College of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao, 266003, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071, China)

Abstract: In this study, full-length cDNA sequence of *caspase2* gene from *Fenneropenaeus chinensis* was first cloned using RACE method. The full-length cDNA sequence of *caspase2* was 1517 bp, which contains a 78 bp 5'-UTR, 515 bp 3'-UTR and 924 bp open reading frame that encoded 307 amino acid residues, which had the isoelectric point (PI) of 7.62 and molecular mass of 34.21 ku. Homology analysis revealed that the amino acid sequences of *caspase2* highly identified with *caspase* family of other species, for example, it had 88% identity with *caspase2* of *Litopenaeus vannamei*, and had 80% identity with *caspase* of *Penaeus monodon*. The phylogenetic analysis showed that *Fenneropenaeus chinensis caspase2* was in the same class with other arthropods *caspase*. The expression levels of *caspase2* gene in different tissues were analyzed by quantitative real-time PCR. The results showed that the highest level of *caspase2* gene was in hepatopancreas. Real-time PCR analysis showed that the expression level of *caspase2* was up-regulated distinctly in muscle, hepatopancreas and gill after stimulation with WSSV infection, and *caspase2* showed different expression profiles. The results implied that *caspase2* might play an important role in WSSV-challenge response of *F. chinensis*.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; *caspase2* gene; gene cloning; expression; WSSV challenge

Corresponding author: MENG Xianhong, E-mail: mengxh@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China(31372523); Taishan Scholar Program for Seed Industry