

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20120420001

饶海鸥, 查金苗, 王子健, 等. 稀有鮡鲫细胞凋亡相关基因的克隆及序列分析[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(1): 105-110

Rao H O, Zha J M, Wang Z J, et al. Cloning and sequence analysis of genes involved in cell apoptosis of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(1): 105-110 (in Chinese)

稀有鮡鲫细胞凋亡相关基因的克隆及序列分析

饶海鸥^{1,2}, 查金苗^{2,*}, 王子健², 王卫民¹

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

2. 中国科学院生态环境研究中心 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

摘要: 细胞凋亡是调控机体发育和维护内环境稳定的重要机制。在克隆了稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)肝脏组织中凋亡相关的 *bcl-2*、*apaf-1*、*caspase-3* 和 *caspase-9* 基因的部分 cDNA 片段之后, 进行了序列分析。结果表明, *caspase-3* 和 *caspase-9* 基因片段与唐鱼(*Tanichthys albonubes*)相对应的核苷酸序列同源性最高, 而 *bcl-2*、*apaf-1* 基因片段则分别与鮡鱼(*Gobio gobio*)和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)相对应的核苷酸序列同源性最高, 为 99% 和 89%。基于稀有鮡鲫和已知物种的 *caspase-3* 基因核苷酸序列构建了系统发育树, 发现稀有鮡鲫与唐鱼、斑马鱼(*Danio rerio*)的亲缘关系最近, 而与金头鲷(*Sparus aurata*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)的亲缘关系较远。本研究为深入理解外源性化学物质对鱼类的毒理学机制及其生态健康风险评估提供科学数据, 同时也为稀有鮡鲫在鲤科鱼类的分类及进化地位的研究提供分子水平的重要参考。

关键词: 稀有鮡鲫; 基因克隆; 同源性分析; 系统发育树;

文章编号: 1673-5897(2013) 1-105-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Cloning and Sequence Analysis of Genes Involved in Cell Apoptosis of Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*)

Rao Haiou^{1,2}, Zha Jinmiao^{2,*}, Wang Zijian², Wang Weimin¹

1. College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 20 April 2012 accepted 1 June 2012

Abstract: Apoptosis is important for regulating development and maintaining homeostasis of the organism. The partial cDNA sequences of *bcl-2*, *apaf-1*, *caspase-3* and *caspase-9*, which are involved in cell apoptosis, were cloned and sequenced from the liver of *Gobiocypris rarus*. Sequence analysis showed that the *caspase-3* and *caspase-9* genes shared the highest sequence affinity with the nucleotide sequences of *Tanichthys albonubes*, whereas *bcl-2* and *apaf-1* genes showed the highest sequence affinity with those of *Gobio gobio* (99%) and *Cyprinus carpio* (89%), respectively. The phylogenetic trees were developed based on the *caspase-3* nucleotide sequences of *Gobiocypris rarus* and other known species, which showed the closest genetic relationship among *Gobiocypris rarus*, *Tanichthys albonubes* and *Danio rerio*, while *Sparus aurata* and *Takifugu rubripes* had a distant ge-

收稿日期: 2012-04-20 录用日期: 2012-06-01

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863 计划)(2010AA065105)

作者简介: 饶海鸥(1986-) 男, 硕士, 研究方向为水生态毒理学, E-mail: raohaiou@webmail.hzau.edu.cn;

* 通讯作者(Corresponding author) E-mail: jinmiaoza@gmail.com

netic relationship. The present study offered scientific information not only for discovering toxicological mechanism and assessing ecological health risk of aquatic xenobiotics, but also for classification and evolutionary status of *Gobiocypris rarus* at molecular level.

Keywords: *Gobiocypris rarus*; clone of genes; analysis homology; phylogenetic trees

细胞增殖、分化与死亡是细胞经历的基本过程。细胞凋亡是多细胞有机体为调控机体发育和维护内环境稳定而由基因调控的细胞主动死亡过程,是细胞内在的决定动物发育和组织平衡的一个重要机制。Bcl-2(B-cell leukemia/lymphoma 2)、apaf-1(apoptotic protease activating factor-1)、caspase-3(cysteine aspartic acid specific protease-3)和 caspase-9 是参与细胞凋亡过程的关键基因。原癌基因 bcl-2 是 Tsujimoto 等^[1] 1984 年从伴有 t(14, 18)染色体易位的滤泡状 B 细胞淋巴瘤中发现的,定位于 18q21,大约长 230 kb,含 3 个外显子和 2 个内含子,与 ccd-9 基因有 23% 的同源性,编码 26KD 的线粒体膜整合蛋白。Bcl-2 家族成员含有 1~4 个同源结构域(BH1-4),并且通常有一个羧端跨膜结构域(transmembrane region, TM)。其中 BH4 是抗凋亡蛋白所特有的结构域,BH3 是与促凋亡有关的结构域。Bcl-2 为凋亡抑制基因,在线粒体参与的凋亡途径中起调控作用,能控制线粒体中细胞色素 c(Cyto-c)等凋亡因子的释放^[2]。Apaf-1 基因被称为凋亡酶激活因子 1,与线虫的 CED-4 基因同源,它含有 3 个不同的结构域:1) CARD 结构域,能募集 caspase-9;2) Ccd-4 同源结构域,能结合 ATP/dATP;3) C 端结构域,能结合细胞色素 c^[3-4]。Cyto-c 复合体与 ATP/dATP 结合后,apaf-1 就可以通过 CARD 结构域募集 caspase-9,形成凋亡体(apoptosome),激活 caspase-3,启动 caspase 级联反应^[5]。Caspase 属于半胱氨酸蛋白酶,可以分为 2 个亚族:ICE 亚族和 CED 亚族,ICE 亚族参与炎症反应,CED 亚族参与细胞凋亡。CED 亚族又可分为 2 类,一类为细胞凋亡执行者,如 caspase-3、caspase-6 和 caspase-7,它们可直接降解胞内的结构蛋白和功能蛋白,引起凋亡;另一类为启动者,如 caspase-8 和 caspase-9,受到信号后能通过自剪接而激活,引起 caspase 级联反应,从而引起细胞凋亡^[6]。

稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)是我国特有的小型鲤科鱼类,主要分布在四川省汉源县、石棉县、双流县、都江堰市和彭州市等地^[7]。王剑伟等^[8]已从多方面对其生物学进行了深入研究。研究表明,其性成熟时间短,繁殖季节长,而且在实验室控制饲养条

件下可常年繁殖,与国际实验动物委员会推荐的常用实验鱼斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、黑头软口鲮(*Pimephales promelas*)等有许多相似之处。急慢性毒性实验结果表明,稀有鮡鲫对参比毒物的敏感性与黑头软口鲮和斑马鱼相近,而且重现性好,是一种较为理想的急慢性毒性实验材料^[9]。现稀有鮡鲫已被我国正式认定为鱼类实验动物,应用于鱼类遗传、生理、病理以及毒理学等研究领域^[10]。Bcl-2、apaf-1、caspase-9 和 caspase-3 基因在细胞凋亡尤其是在线粒体通路介导的细胞凋亡过程中起着关键的作用。然而,目前在鱼类中,除了斑马鱼数据较为全面以外,其他鱼类在这方面的研究数据都较为贫乏,限制了其在细胞凋亡研究领域的应用。本研究采用 RT-PCR 法,同源克隆了稀有鮡鲫凋亡相关基因 bcl-2、apaf-1、caspase-3 和 caspase-9 的 cDNA 片段,并进行同源性比较及系统发育分析,为稀有鮡鲫在鲤科鱼类的分类及进化地位的研究提供了分子水平的科学参考,同时为阐明外源性化学物质对鱼类的毒理学机制等方面提供有用的背景资料。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验鱼饲养

实验用稀有鮡鲫由本实验室饲养。养殖用水为经活性碳过滤并曝气的自来水(pH = 7.2 ~ 7.6, T = (25 ± 1)℃,硬度为 44.0 ~ 61.0 mg·L⁻¹,以 CaCO₃ 计算),光照周期为 16 h: 8 h(昼:夜)。饲养期间投喂适量颗粒性商品饵料(TetraMin)和新孵化的丰年虫(*Artemia nauplii*),早晚各 1 次。

1.2 材料与试剂

动物组织 RNA 抽提试剂盒、反转录酶 M-MLV、Oligo(dT)、dNTP、Rnasin、纯化试剂盒等均购自美国 Promega 公司。大肠杆菌 DH5⁺ 为本实验室保存,PM D 18-T 载体购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 总 RNA 提取与 cDNA 合成

稀有鮡鲫经低温麻醉后,迅速取肝脏组织,于液氮中充分研磨,总 RNA 的提取方法参照动物组织 RNA 抽提试剂盒进行,提取出的总 RNA 于 -80℃ 超低温冰箱保存备用。

cDNA 的合成参照 M-MLV 逆转录酶说明书进行,以适量总 RNA 为模板,以 Oligo(dT)为引物,在 M-MLV 逆转录酶的作用下,合成 cDNA 第 1 条链,合成的 cDNA 于 -20℃ 保存。

1.4 引物设计及聚合酶链式反应

根据 GenBankGenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)中与稀有鮕鲫亲缘关系较近的已知鱼类目的基因序列,利用 DNAMAN 6.0.40 软件在其保守区设计引物,以肝脏组织的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 1 μL cDNA 模板、12.5 μL 2 × mastermix、9.5 μL ddH₂O、1 μL 上游引物和 1 μL 下游引物。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s 57℃ 30 s 72℃ 30 s 35 个循环; 最后延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 PCR 产物纯化回收、连接转化及测序

将含有目的条带的 PCR 产物用 Promega 纯化试剂盒(E.Z.N.A Cycle-Pure Kit)进行纯化,将目的条带切胶回收,实验步骤参照试剂盒说明书。回收产物在 T4 连接酶的作用下,与 PMD 18-T 载体 16℃ 连接过夜,重组子转化入感受态大肠杆菌 DH5^α 中,涂在含氨苄青霉素 X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上,37℃ 培养过夜。利用蓝白斑挑选重组子,随机挑取白色菌落用 PCR 方法鉴定阳性克隆并测序。

1.6 序列分析与系统发育树构建

将阳性克隆测序后所得序列在 NCBI(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 BLAST 分析,对所得目的基因进行验证,并将基因序列提交至 GenBank 数据库。从 GenBank 数据库中下载其他物种相对应的基因序列,采用 Clustal X 1.81 软件进行核苷酸序列多重比较,并用 Mega 2.1 软件构建核苷酸系统发育树(neighbour-join tree)。

2 结果(Results)

2.1 稀有鮕鲫细胞凋亡相关基因的克隆

实验克隆获得了 4 个与稀有鮕鲫细胞凋亡相关基因(bcl-2、apaf-1、caspase-3 和 caspase-9),片段大小分别为 231、241、295 和 257 bp。分别对各基因片段的反应条件进行优化,结果表明,在退火温度为 57℃ 时,各个 PCR 产物均为单一且明亮的条带(图 1),且实验结果重复性较好,可满足后续荧光定量实验要求。将克隆的基因片段及所用引物序列提交至 GenBank 数据库,获得 GenBank 登陆序列号(表 1)。

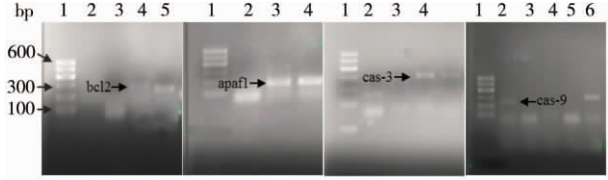


图 1 稀有鮕鲫各基因片段琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of gene segments of *Gobiocypris rarus*

表 1 克隆基因所用的 PCR 引物序列及基因片段 GenBank 序列号

Table 1 Primers used for PCR and the GenBank accession numbers of cloned cDNA sequences

基因名称	引物序列(5' ~ 3')	产物	GenBank 序列号
		大小(bp)	
bcl-2	F: ACCCGCCACGCATACCAGA	231	JQ743658
	R: GAATCGCTCCCATCCTCC		
apaf-1	F: AGGTCTCTCTCTGGTGGTT	241	JQ743661
	R: TAGCAGGCACCTTTGATGTCT		
caspase-3	F: CATTAGTGTGTGTGTGCTCAG	295	JQ743659
	R: GGTCATTGTGTTTCTCCAGG		
caspase-9	F: GTGCTACAAGATGGATGCC	257	JQ743660
	R: GAAAGGATGATGACCACACA		

2.2 同源性分析

分别将各基因的 Blastn 同源性分析结果统计于表 2,并从 NCBI 上搜索其他鱼类相对应基因的核

表 2 稀有鮕鲫核苷酸序列同其他已知鱼类相应核苷酸序列的同源性比较

Table 2 Homology comparison of nucleotide sequences between *Gobiocypris rarus* and other fish species

基因名称	物种名称	同源性	GenBank 序列号
bcl-2	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	JQ743658
	鮕鱼 <i>Gobio gobio</i>	99%	FJ612582
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	92%	BC165156
	牙汉鱼 <i>Odontesthes bonariensis</i>	87%	FJ642277
	黑点青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	87%	JN642277
	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	86%	NM001141086
	点带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	86%	AY735006
	大西洋鳕鱼 <i>Gadus morhua</i>	85%	GQ387053
	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	JQ743661
	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	89%	EU490407
apaf-1	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	89%	NM001045243
	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	72%	XM003444978
	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	JQ743659
	唐鱼 <i>Tanichthys albonubes</i>	89%	GQ406344
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	83%	AB047003
	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	76%	BT059710
	大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	76%	EU878546
	黑红小丑 <i>Amphiprion melanopus</i>	75%	JF345174
	虾虎鱼 <i>Gobius niger</i>	75%	AY765348
	黄尾蓝魔 <i>Chrysiptera parasema</i>	75%	DQ073799
caspase-3	红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	75%	NM001032699
	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	JQ743660
	唐鱼 <i>Tanichthys albonubes</i>	92%	GQ406345
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	86%	NM 001007404
	银大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	75%	HQ184097
	大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	72%	EU878545
	海马 <i>Hippocampus kuda</i>	71%	FJ491406
	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	JQ743660
	唐鱼 <i>Tanichthys albonubes</i>	92%	GQ406345
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	86%	NM 001007404
caspase-9	银大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	75%	HQ184097
	大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	72%	EU878545
	海马 <i>Hippocampus kuda</i>	71%	FJ491406
	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	JQ743660
	唐鱼 <i>Tanichthys albonubes</i>	92%	GQ406345
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	86%	NM 001007404
	银大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	75%	HQ184097
	大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	72%	EU878545
	海马 <i>Hippocampus kuda</i>	71%	FJ491406
	稀有鮕鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	100%	JQ743660

核苷酸序列,运用 Clustal X 1.81 软件将稀有鮕鲫的序列与已知鱼类相对应序列进行同源性比较(图2)。可以看出, caspase-3 和 caspase-9 基因片段与唐鱼相对应的基因片段同源性最高,分别为 89% 和 92%, bcl-2、apaf-1 基因片段分别与鮕鱼、鲤鱼相对应的基

因片段同源性最高,为 99% 和 89%。此外,4 个基因片段(bcl-2、apaf-1、caspase-3 和 caspase-9)与斑马鱼相对应基因的核苷酸序列同源性都比较高,分别为 92%、89%、83% 和 86%。

2.3 系统发育分析

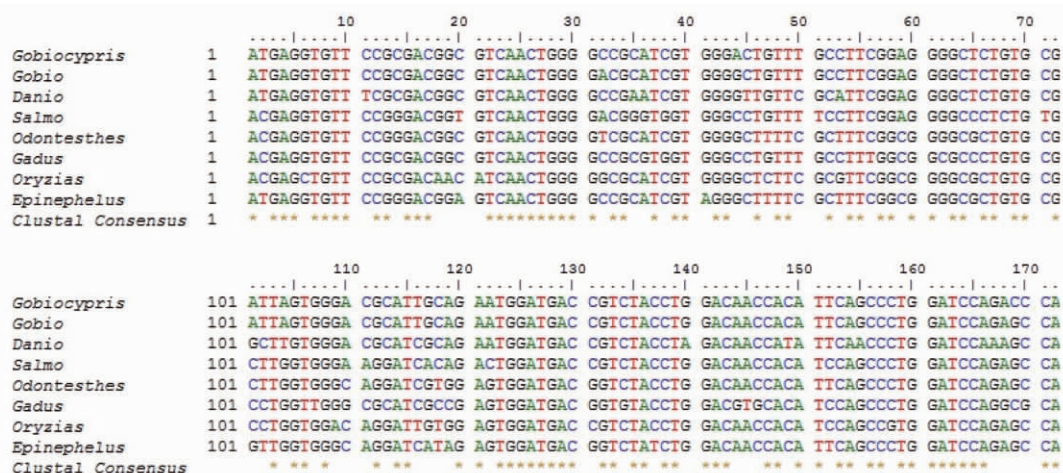


图2 稀有鮕鲫 bcl-2 基因核苷酸序列比对结果

Fig. 2 Results of alignment of bcl-2 nucleotide sequence in *Gobiocypris rarus*

分别将获得的 4 个不同的基因序列在 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 上做 Blastn 分析,结果显示,与稀有鮕鲫 caspase-3 基因相似的物种数量最丰富,因此,运用分子生物学软件 Mega 4 构建了 caspase-3 基因片段的核苷酸系统发育树(图3)。可以看出,稀有鮕鲫与唐鱼亲缘关系最近,首先聚为一枝,其次为斑马鱼。

注:涉及物种包括金头鲷 *Sparus aurata* (EU722334.1)、唐鱼 *Tanichthys albonubes* (GQ406344.1)、斑马鱼 *Danio rerio* (AB047003.1)、大西洋鲑 *Salmo salar* (BT059710.1)、大黄鱼 *Larimichthys crocea* (EU878546.1)、黑斑锯鱼 *Amphiprion melanopus* (JF345174.1)、黑鰕虎鱼 *Gobius niger* (AY765348.1)、副金翅雀鲷 *Chrysiptera parasema* (DQ073799.1)、红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes* (NM001032699.1)、大海马 *Hippocampus kuda* (FJ491405.1)、大鼠 *Rattus norvegicus* (NM012922.2)、奥尼罗非鱼 *Oreochromis niloticus* (EU887950.1)、虹鳉 *Oncorhynchus mykiss* (NM001246335.1)、斑点叉尾鮰 *Ictalurus punctatus* (NM001201081.1)、白鼠 *Mus musculus* (NM009810.2)、非洲爪蟾 *Xenopus tropicalis* (NM001127428.1)、欧洲狼鲈 *Dicentrarchus labrax* (DQ345774.1)、稀有鮕鲫 *Gobiocypris rarus* (JQ743660)、原鸡 *Gallus gallus* (NM204725.1)、原鸽 *Columba livia* (AB618543.1)、欧洲野兔 *Oryctolagus cuniculus* (NM001082117.1)、狗 *Canis lupus familiaris* (NM001003042.1)

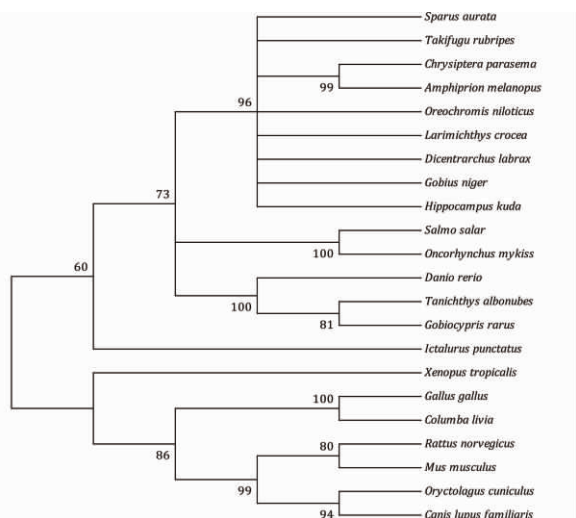


图3 基于 NJ (neighbor-joining) 法构建的稀有鮕鲫与其他物种 caspase-3 基因的核苷酸系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree of caspase-3 gene sequence between *Gobiocypris rarus* and other organisms based on NJ (neighbor-joining) method

3 讨论 (Discussion)

稀有鮕鲫是一种小型鲤科鱼类,有关其分类地位的研究报道相对较少。叶妙荣等^[11]从外部形态对稀有鮕鲫进行了详尽的描述,并对其进行了分类。然而,从外部形态上分析,稀有鮕鲫与鱼丹亚科、鮕亚科都存在一定的相似性,与北美广布的小型鲤科鱼类美洲鲢 (*Notropis*) 和胖头鲢 (*Pimephales*) 在形态上也极为相似。何舜平等^[12]利用 RAPD 法对稀有鮕鲫、中华细鲫、麦穗鱼、唐鱼和草鱼等亲缘关系进

行了分析,并对稀有鮕鲫的系统位置作了进一步的探讨,认为稀有鮕鲫与唐鱼、中华细鲫等鱼丹亚科鱼类有更近的亲缘关系。本研究根据稀有鮕鲫与其他鱼类的核苷酸序列构建了系统发育树,通过系统发育树可以看出,稀有鮕鲫与唐鱼亲缘关系最近,其次为斑马鱼,结果与稀有鮕鲫的形态学及分子生物学分类结果方法一致。本研究从分子生物学角度证实稀有鮕鲫与唐鱼等鱼丹亚科鱼类有更近的亲缘关系,为稀有鮕鲫的分类及进化地位的确立提供了分子水平的参考依据。

克隆获得了 4 个稀有鮕鲫细胞凋亡相关基因 (*bcl-2*、*apaf-1*、*caspase-9* 和 *caspase-3*),并与其他鱼类相应基因序列作了比较分析,结果显示, *caspase-9* 和 *caspase-3* 与唐鱼的同源性最高,分别为 89% 和 92%,而 *bcl-2*、*apaf-1* 基因片段分别与鮕鱼、鲤鱼对应的核苷酸序列同源性最高,分别为 99% 和 89%。Vidal 等^[13]用相似的方法克隆获得了与鲤鱼细胞凋亡相关的关键基因,包括 *apaf-1*、*bcl-2*、*mcl-1* 和 *caspase-8* 基因,并通过与已知脊椎动物相对应蛋白的序列比对构建了鲤鱼的系统发育树,为鲤鱼细胞凋亡的分子生物学研究奠定基础。另外,斑马鱼、唐鱼等少数实验鱼类细胞凋亡相关的重要基因也已经测序获得并应用于生理、病理以及生态毒理学等研究领域。细胞凋亡与动物免疫功能密切相关, Jin 等^[14]用斑马鱼胚胎作为实验材料,以细胞凋亡相关基因的表达为测试指标,对氯氰菊酯的免疫毒性作了初步评价,证实低浓度的氯氰菊酯可诱导斑马鱼胚胎发生凋亡,并造成先天免疫功能紊乱,对评价氯氰菊酯在水生态系统的环境健康风险以及阐明其毒性作用机制有一定的作用。除此之外,还有很多环境污染物质可对细胞凋亡产生影响,包括金属类污染物(如砷、铬等)、多环芳烃类污染物(如二恶英、苯并芘等)以及农药等,稀有鮕鲫凋亡相关基因的获得将有助于类似污染物的环境健康风险评价及其毒性作用机制的进一步阐明。

细胞形态及其生化特征的改变是细胞凋亡的一个重要判定依据,如 *bcl-2*/*bax* 基因, *caspase* 基因等被认为是凋亡发生的专一性标志物,这些凋亡特征性标志为建立污染物对凋亡影响的生物标志物奠定了基础。由于当前有关细胞凋亡的研究还处于不断发展和深入阶段,因此从环境毒理学的角度来研究外源性化学物质对细胞凋亡的影响,在揭示环境污染物质对生物的早期毒性和机理,以及探索与细胞凋

亡相关疾病的药物研究等方面均具有重要的科学意义。

通讯作者简介: 查金苗(1975-),男,博士,副研究员,主要研究兴趣包括水生模型生物体系的构建和发展、水环境生物毒性测试方法、环境内分泌干扰物的筛选技术研究、环境污染物质对水生生物分子毒理机制和水生态系统完整性评估方法等,在国内外学术刊物上发表高水平论文 50 余篇,SCI 论文 30 余篇。

参考文献:

- [1] Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14; 18) chromosome translocation [J]. *Science*, 1984, 226(4678): 1097-1099
- [2] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ, et al. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. *Genes and Development*, 1999, 13(15): 1899-1911
- [3] Zou H, Henzel WJ, Liu X, et al. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 [J]. *Cell*, 1997, 90(3): 405-413
- [4] Kim H, Jung YK, Kwon YK, et al. Assignment of apoptotic protease activating factor-1 gene (APAF1) to human chromosome band 12q23 by fluorescence in situ hybridization [J]. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1999, 87(3-4): 252-253
- [5] Yonshida H, Kong YY, Yoshida R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development [J]. *Cell*, 1998, 94(6): 739-750
- [6] Boyce M, Degterev A, Yuan J, et al. Caspases: An ancient cellular sword of Damocles [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2004, 11(1): 29-37
- [7] 曹文宣, 王剑伟. 稀有鮕鲫: 一种新的鱼类实验动物 [J]. *实验动物科学与管理*, 2003, 20(S1): 96-99
- [8] 王剑伟. 稀有鮕鲫的繁殖生物学 [J]. *水生生物学报*, 1992, 16(2): 165-174
- [9] 周永欣, 成水平, 胡炜, 等. 稀有鮕鲫——一种新的鱼类毒性试验材料 [J]. *动物学研究*, 1995, 16(1): 59-63
- [10] Zhou YX, Cheng SP, Hu W, et al. A new toxicity test organism—*Gobiocypris rarus* [J]. *Zoological Research*,

- 1995, 16(1): 59–63 (in Chinese)
- [10] Zha J M, Sun L W, Spear P A, et al. Comparison of ethinylestradiol and nonylphenol effects on reproduction of Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(2): 390–399
- [11] 叶妙荣, 傅天佑. 鱼丹亚科鱼类——新属新种记述 [J]. *动物分类学报*, 1983, 8(4): 434–437
Ye M R, Fu T Y. Description of a new genus and species of danioninae from China [J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 1983, 8(4): 434–437 (in Chinese)
- [12] 何舜平, 汪亚平, 陈宜瑜, 等. 五种鲤科鱼类的 RAPD 分析兼论稀有鮡鲫的系统位置 [J]. *水生生物学报*, 1997, 21(3): 262–267
He S P, Wang Y P, Chen Y Y. The RAPD analysis for five cyprinid fishes with notes to the systematic position of *Gobiocypris rarus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, 21(3): 262–267 (in Chinese)
- [13] Vidal M C, Hoole D, Williams G T. Characterisation of cDNAs of key genes involved in apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(5): 494–507
- [14] Jin Y X, Zheng S S, Fu Z W. Embryonic exposure to cypermethrin induces apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(4-5): 1049–1054 ◆