

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00885

家兔 *BMP7* 基因的克隆及其生物信息学分析

李明^{1,2}, 赵巧辉^{1,2}, 陈其新¹, 刘孟洲², 石晓卫^{1,2}

1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002;

2. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070

摘要: 在对已知部分编码序列(CDS)进行分析的基础上, 采用 RT-PCR 分步扩增以及 RACE 方法, 对家兔 *BMP7* 基因 3' 和 5' 末端未知序列进行了克隆与生物信息学分析。测序结果综合分析表明, 所获序列共计 1 654 bp, 包括家兔 *BMP7* 近全长前肽、全长成熟肽 CDS 及 3' 非翻译序列(3'UTR), 将已有的序列向 5' 和 3' 端分别延伸了 395 bp 和 628 bp。序列对比表明, 克隆的家兔 *BMP7* CDS 部分与人、小鼠的对应序列的同源性分别为 91.89% 和 89.32%, 预测的氨基酸序列同源性分别为 96.51% 和 96.01%。家兔 *BMP7* 3'UTR 长 446 bp, 与人、小鼠对应序列同源性分别为 57.38% 和 45.57%; 具有 2 个转录终止信号位点。推测家兔 *BMP7* 成熟蛋白有 BMPs 特有的 7 个位置固定的半胱氨酸残基和 TGF- β 家族指纹。家兔 *BMP7* 3'UTR 区转录终止信号的可选择性可能与基因转录后调控有关。

关键词: 家兔; *BMP7*; 3' 非翻译序列; 克隆; 3'RACE; 生物信息学分析

Cloning and bioinformatic analysis of bone morphological protein 7(*BMP7*) in rabbit

LI Ming^{1,2}, ZHAO Qiao-Hui^{1,2}, CHEN Qi-Xin¹, LIU Meng-Zhou², SHI Xiao-Wei^{1,2}

1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Faculty of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: On the basis of known partial coding DNA sequence (GenBank accession No. AF413111), we tried to clone the full mRNA of rabbit *BMP7* gene by sub-cloning and RACE methods. Then after, bioinformatic analysis on the acquired sequences were conducted. The sequencing results showed that the all cloned sequences could be assembled into a 1 654 bp long DNA fragment, which contained the near full coding cDNA for the propetide, full coding cDNA for the mature protein, and full length of 3' UTR of rabbit *BMP7*. The newly cloned sequences extended the 5' and 3' ends of known partial DNA sequence by 395 bp and 628 bp, respectively. Sequence comparisons revealed that the full length of coding cDNA of rabbit *BMP7* was 91.89% and 89.32% identical to that of human and mouse, while the deduced amino acids was 96.51% and 96.01% identical, respectively. The 3' UTR of rabbit *BMP7* was 446 bp in length, 57.38% and 45.57% identical to that of human or mouse, respectively. In addition, there were two closely arranged AATAAA sites in the 3' UTR of rabbit *BMP7* gene, as well as in human *BMP7*. The deduced mature protein of rabbit *BMP7* had the seven conservative cysteines and a TGF- β family signature, which were the characters of all BMPs. Our results suggested that the main part of rabbit *BMP7* had been successively cloned. The alternation of polyadenization sites in the 3' UTR of rabbit *BMP7* maybe related to the posttranscriptional regulation of the gene.

收稿日期: 2007-12-03; 修回日期: 2008-01-17

基金项目: 河南省教育厅自然基金项目(编号: 2007230003)和河南省科技攻关项目(编号: 0524030011)资助[Supported by the Natural Science Foundation of Henan Educational Committee (No. 2007230003) and the Key Technologies Program of He'nan Province (No. 0524030011)]

作者简介: 李明(1965-), 男, 河南永城人, 博士, 专业方向: 动物遗传育种与生产利用。Tel: 013803849306; E-mail: leeminghnaui@163.com

通讯作者: 陈其新(1965-), 男, 甘肃景泰人, 副教授, 博士后, 研究方向: 动物遗传繁殖。Tel: 013598003978; E-mail: qixinchen@126.com

Keywords: rabbit; *BMP7*; 3' UTR; cloning; 3' RACE; bioinformatic analysis

骨形态发生蛋白 7(Bone morphogenetic protein 7, *BMP7*)是转化生长因子 (TGF- β)超家族的成员之一。*BMP7* 具有广泛而重要的生物学功能,可调节多种类型细胞的分化、增殖和凋亡。除对骨骼的强力诱导作用之外,*BMP7* 还影响动物生殖系统的生长发育及生理功能^[1,2]。在雌性动物中,*BMP7* 与垂体^[2,3]、卵巢^[4~7]和子宫^[8,9]的功能有关。*BMP7* 是FSH分泌的刺激因子,参与体内FSH基础表达的维持。*BMP7* 还与动物的卵泡发生、黄体形成以及类固醇合成调节有关。在卵巢的卵泡、黄体等组织,都已检测到*BMP7* 及其受体mRNA或蛋白质;*BMP7* 可促进雌二醇产生,抑制孕酮合成;促进卵泡募集过程,使更多的初级卵泡向次级卵泡转化。*BMP7* 也可能与动物妊娠有关,调节蜕膜化过程以及胎盘形成^[9]。在雄性生殖系统,*BMP7* 及受体在小鼠睾丸不同分化阶段的生精细胞以及附睾^[10]细胞表达,提示*BMP7* 参与精子发生、成熟等生理过程的调节。

人、小鼠等哺乳动物的*BMP7* 基因已得到完整的克隆,人*BMP7* 基因和蛋白质的各级结构已得到确定。研究表明,人*BMP7* 基因已被定位于第 20 号染色体上,由 7 个外显子和 6 个内含子组成;其 mRNA 全长编码由 431 个氨基酸组成的前体蛋白,其中第 1~29 位氨基酸为信号肽,第 30~292 位氨基酸称为前肽(Propeptide),第 293~431 位氨基酸称为成熟肽,成熟肽编码序列在第 6 和 7 外显子^[11]。人*BMP7* 单体具有 7 个半胱氨酸残基,形成 3 对链内二硫键,剩余的 1 个半胱氨酸参与链间二硫键形成。有活性的人*BMP7* 为二硫键相连的二聚体形式,呈“蝴蝶”状^[12]。目前有关家兔*BMP7* 基因的报道很少,在GenBank中仅可检索到编码第 162~367 位氨基酸的cDNA序列(GenBank 登录号: AF 413111),家兔*BMP7* 的成熟肽的部分编码序列(Coding DNA sequence, CDS)以及全部的前肽区CDS和 3' 非编码序列(3' untranslated region, 3' UTR)都尚未见报道。为进一步研究家兔*BMP7* 的结构和功能,揭示*BMP7* 对家兔生殖机能的影响,以及寻找与繁殖等性状相关联的分子标记,本研究根据已知家兔*BMP7* 基因

部分cDNA,设计并合成特异引物,采取分步克隆策略,应用常规PCR和 3' RACE法,成功克隆了包含前肽和成熟肽CDS以及 3' UTR在内的家兔*BMP7* mRNA基因大部分序列,并进行了相关的生物信息学分析,已将有关序列提交 GenBank(登录号为 EU599645、EU004072 和 EF583950)。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

将产后一周成年母家兔屠宰,取新鲜组织肾脏,于液氮内暂存。

1.1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 TOP10 感受态细胞购自天根生化(北京)有限公司,克隆载体 pUCm-T 购于上海生工生物工程技术服务有限公司, pMD18-T vector 由宝生物工程(大连)有限公司提供。

1.1.3 试剂

RNA 反转录试剂盒(BcBEST™ RNA PCR Kit Ver.1.1)、3' RACE 试剂盒(3'-Full RACE Core Set Ver.2.0)、Hind^{III}、Sal^I 和 EcoR^I 限制性内切酶、DNA Marker DL2000、IPTG、X-gal 及 Bca-optimized Taq 酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于天根生化(北京)有限公司;EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit 购自 Bio Basic Inc;Taq DNA 聚合酶购自郑州创世公司。

1.1.4 引物

采用 Oligo 6.0 引物设计软件,根据 AF413111 序列及其他物种 *BMP7* 基因同源序列,设计 2 对特异性引物,PCR 扩增得到两段前肽编码序列。根据此序列设计 3' RACE 的特异引物,引物序列及 PCR 得到的目的片段见表 1。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

使用总 RNA 抽提试剂盒提取家兔肾总 RNA。具体操作参见说明书。

表 1 家兔 *BMP7* cDNA 扩增引物
Table 1 PCR primers for rabbit *BMP7* cDNA

引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences(5' 3')	片段命名 Names of fragments	片段长度 Length of fragments (bp)
前肽编码片段扩增引物 Primers for the propeptide coding cDNA	P1: ACTTCAGCCTGGACAACGAG	CDS-F1	396
	P2: TGGACAGATCAAACCGGAAC		
	P3: AAGATCCCCGAGGGAGAAGCAGTG	CDS-F2	619
	P4: TCAGAGGGAAGGCGCACTCTCC		
3 RACE 的上游特异引物 Primer for 3' end	P5: CACGGCCACCAGCAACCACT	3' UTR	—
	P6: CCAGAACCGTCCAAGGCACC		

1.2.2 逆转录

以 Oligo(dT) 为引物, 用 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA 第一链: 取总 RNA 1.25 μL (0.5 μg/μL), 逆转录引物为 Oligo(dT) (50 μmol/L), 其他操作按照说明进行。

1.2.3 家兔 *BMP7* 前肽编码区序列的扩增

以合成的 cDNA 第一链为模板, 分别应用引物 P1 和 P2、P3 和 P4 分段扩增家兔 *BMP7* 前肽编码区序列。PCR 扩增的总体积为 50 μL。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 然后进行 30 个循环: 94 °C 变性 30 s, 56 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min; 最后 72 °C 再延伸 7 min。

1.2.4 家兔 *BMP7* 基因 3' 端非编码区序列的扩增

根据在 1.2.3 中获得的家兔 *BMP7* 前肽编码区 cDNA 序列, 设计两条特异性上游引物 P5 和 P6(表 1), 按照试剂盒提供的操作方法进行 3' RACE, 即在逆转录之后, 分别以 P5 和 RACE outer primer、P6 和 RACE inner primer 进行套式 PCR 扩增。在扩增中, 分别使用普通 *Taq* 酶、*Bca*-optimized *Taq* 酶, 以比较不同酶的扩增效果。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 3 min; 然后进行 30 个循环: 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min 10 s; 最后 72 °C 再延伸 10 min。

1.2.5 目的基因的克隆与鉴定

将 PCR 产物纯化回收后, 分别克隆于 pUCm-T 或 pMD18-T 载体中, 转化 *E.coli* TOP10, 在含有 Amp 抗生素的培养基中过夜培养, 用碱裂解法提取质粒, 以 PCR 法和双酶切法鉴定阳性重组子, 然后再进行序列测定, 测序由上海捷瑞公司完成。

1.2.6 核酸和蛋白质序列和结构预测

将各克隆片段序列用 DNAMAN 软件连接起来, 然后使用 DANMAN、DNASTAR、Gene doc 等软件进行核酸序列分析, 并与人、小鼠相应序列比较。3' UTR 区 motif 查找用 DNAMAN, 功能位点预测在 predictprotein 蛋白质结构预测服务器 (<http://www.predictprotein.org/>) 上进行。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增

以家兔肾总 RNA 为模板, 应用 P1/P2、P3/P4 两对引物分段扩增家兔 *BMP7* 前肽编码区 cDNA, 分别扩增出 396 bp(图 1A)和 619 bp 的片段(图 1B), 和预期的家兔 *BMP7* cDNA 片段大小相符。采用 3' RACE 方法, 扩增家兔 *BMP7* mRNA 的 3' UTR 区, 获得 3 条大小不等的条带(图 2)。其中由普通 *Taq* 酶扩增

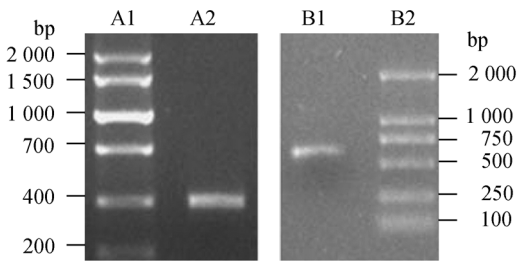


图 1 家兔 *BMP7* 编码 cDNA PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
A1, B2: DNA marker; A2: 396 bp 的 PCR 扩增片段; B1: 619 bp 的 PCR 扩增片段。

Fig. 1 The electrophoresis analysis of coding cDNA of rabbit *BMP7* gene
A1, B2: DNA marker; A2: 396 bp PCR product; B1: 619 bp PCR product.

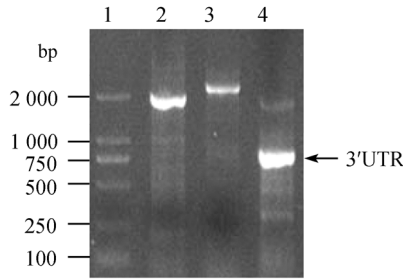


图 2 家兔 *BMP7* 3' RACE 产物的琼脂糖凝胶电泳
1: DL2000 DNA marker; 2, 4: 用 *Taq* 酶扩增 3' RACE 的片段; 3: 用 *Bca*-optimized 酶扩增 3' RACE 的片段。

Fig. 2 The electrophoresis analysis of 3' RACE for rabbit *BMP7* mRNA
1: DL2000 DNA marker; 2, 4: 3' RACE product by *Taq*; 3: 3' RACE product by *Bca*-optimized *Taq*.

的 843 bp 片段(lane 4)后经测序和分析证实包含家兔 *BMP7* 3' UTR。

2.2 重组质粒的鉴定

将扩增的各片段分别克隆到 pMD18-T 或 pUCm-T 载体中, 分别进行 PCR、双酶切鉴定。从家兔 *BMP7* 编码区扩增出的片段 CDS-F2 重组质粒鉴定见图 3。从图 3 可见, 经 PCR 从重组质粒 pUCm-T/CDS-F2 中扩增出了约 619 bp 的片段, 用 *EcoR* + *Sal* 双酶切 pUCm-T/CDS-F2 质粒, 切下了约 720 bp 片段, 与预期片段大小相符(目的片段 619 bp+插入位点两侧载体序列 101 bp), 进一步证实克隆中含有目的片段。将 843 bp 大小的 3' RACE 片段克隆到 pMD18-T 载体中, 进行鉴定(图 4), 质粒 PCR 扩增出 843 bp 片段, *EcoR* 和 *Hind* 双酶切下一条 901 bp 条带(目的片段 843 bp+插入位点两侧载体序列 58 bp), 与预期结果相符。

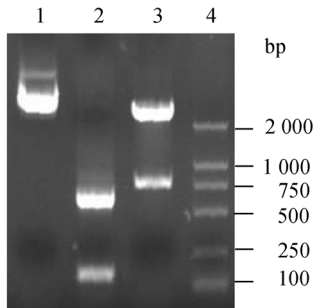


图 3 pUCm-T/CDS-F2 克隆鉴定

1: 质粒 pUCm-T/CDS-F2; 2: PCR 扩增; 3: 双酶切(*EcoR* + *Sal*); 4: DNA marker。

Fig. 3 Identification of pUCm-T/CDS-F2

1: pUCm-T/CDS-F2 plasmid; 2: PCR amplification; 3: Double digestion of the pUCm-T/CDS-F2 plasmid by *EcoR* and *Sal*; 4: DNA marker.

2.3 家兔 *BMP7* cDNA 序列测定与生物信息学分析

2.3.1 序列测定

对克隆片段进行序列测定, 编码区插入片段(CDS-F1 和 CDS-F2)分别测出 396 bp 和 619 bp 长的序列, 与 3' RACE 产物测出的 843 bp 长序列进行拼接, 获得长度为 1 654 bp 长的家兔 *BMP7* cDNA 序列。用 DNASTar 软件对测序结果分析, 发现该序列包括 1 203 bp 的编码序列(图 5)、终止密码子 TAG、3' UTR 446 bp(图 6)。另外, 还有 10 bp 长的 poly(A)尾巴。

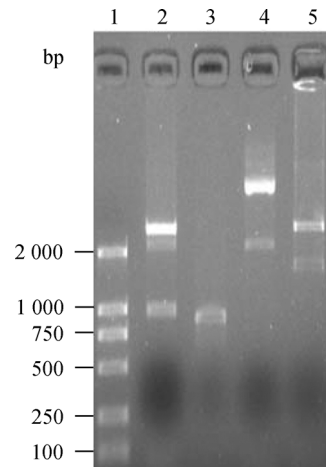


图 4 pMD18-T/3' UTR 克隆鉴定

1: DNA marker; 2: *EcoR* 和 *Hind* 双酶切; 3: PCR 扩增; 4: 质粒 pMD18-T/3' UTR; 5: 蓝斑质粒(pMD18-T)对照。

Fig. 4 Identification of pMD18-T/3' UTR

1: DNA marker; 2: double digestion of the pMD18-T/3' UTR plasmid by *EcoR* and *Hind*; 3: PCR amplification; 4: pMD18-T/3' UTR plasmid; 5: Blue plasmid(pMD18-T).

2.3.2 cDNA 同源性及结构分析

克隆的家兔部分编码序列与人和小鼠 *BMP7* 的同源性分别为 91.89%和 89.32%, 3' 者的同源性为 94.98%(图 5)。家兔与人和小鼠 *BMP7* mRNA 3' UTR 同源性分别为 57.38%和 45.57%, 三者同源性为 62.27%(图 6)。用 DNAMAN、DNASTAR 等软件分析, 家兔 *BMP7* 3' UTR 无胞质多聚腺苷酸化元件(CPE)、A-U 富集元件(ARE)、铁应答元件(IRE)等经典的 mRNA 3' UTR 元件, 但有两个转录终止信号(AAUAAA), 其中第 1、2 个与 ploy(A)尾巴起始处距离为 42 bp、29 bp, 两个 AAUAAA 位点间相距 6 bp, 与人和小鼠的相似。

2.3.3 预测氨基酸序列的同源性分析

用 DNAMAN 预测氨基酸序列, 所获 cDNA 序列可编码家兔 *BMP7* 单体蛋白 C 端的 401 个氨基酸, 包括除信号肽段在外的其他区段(缺少第 1 位氨基酸的前肽和成熟蛋白)。预测的家兔 *BMP7* 肽段的氨基酸序列与人、小鼠相应序列的同源性分别为 96.51%、96.01%。在家兔 *BMP7* 单体蛋白的 C 端(成熟肽区域)有 *BMP* 特有的 7 个位置固定的半胱氨酸残基, 与人和小鼠相似(图 7)。家兔 *BMP7* 成熟蛋白为碱性蛋白质, 理论等电点(*pI*)为 8.04, 低于人和小鼠 *BMP7* 成熟蛋白 *pI*(均为 9.33)。家兔 *BMP7* 仍包含 HIAPEGYAAYYCEGEC 序列(图 7), 符合 TGF- β 家族

	↓		
Rabbit	: A C T T C A G C C T G G A C A A C G A G G T G C A C T C C A G C T T C A T C C A C C G G C C C T C C G C A G C C A G G A G C G G C G C G A G A T G C A G C G G G A G A	: 84	
Human	: G C	: 84	
Mouse	: . T G	: 84	
Rabbit	: T C C T C T C C A T C T T G G G C T T G C C G C A C C G C C C G C C C C A C C T C C A G G G C A A G C A C A A C T C G G C G C C C A T G T T C A T G C T G G A C T	: 168	
Human	: T C G A C	: 168	
Mouse	: ... G ... A . G ... C . T ... G ... A ... T . T ... T ... C	: 168	
Rabbit	: T G T A C A A T G C C A T G G C G G T G G A G G A G G G C G G C C C G A C G G C C A G G G C T T C T C C T A C C C C T A C A A G G C C G T C T T C A G C A C C C	: 252	
Human	: C G T	: 252	
Mouse	: C A --- G A T	: 249	
Rabbit	: A G G G C C C C C C T C T G G C C A G C C T G C A A G A T A G C C G C T T C C T C A C C G A C G G G A C A T G G T C A T G A G C T T C G T G A A C C T C G T G G A A C	: 336	
Human	: T A T C C	: 336	
Mouse	: T . A G . C A T C C A	: 333	
Rabbit	: A C G A C A A G G A A T T C T T C C A C C C G C G C T A C C A C C A C C G C G A G T T C C G G T T T G A T C T G T C C A A G A T C C C C A G G G A G A A G C A G T G A	: 420	
Human	: . T A T . A T A G T . C	: 420	
Mouse	: . T A T . A T . G T T C G : 417		
Rabbit	: C G G C C G C C G A G T T C C G G A T C T A C A A G G A C T A C A T C C G G G A G C G C T T T G A C A A C G A G A C G T T C C G C A T C C G C G T G T A C C A G G T G C	: 504	
Human	: ... A ... A A C G . A T . T G	: 504	
Mouse	: . C . A ... A ... G T A C A G ... A C A . C . T : 501		
Rabbit	: T G C A G G A C A C T T G G G C A G G A G T C G G A C C T C T T C C T G C T T G A C A G C C G C A C C C T C T G G G C C T C G G A G G A G G G G T G G C T G G T C T	: 588	
Human	: . C A T C T C G G G	: 588	
Mouse	: . C C A T G A T . T C . T . G . : 585		
Rabbit	: T C G A C A T C A C G G C C A C C A G C A A C C A C T G G G T G G T C A A C C C T C G G C A C A A C C T G G G C C T G C A G C T C T C G G T G G A G A C T C T G G A T G	: 672	
Human	: . T A T G	: 672	
Mouse	: . T . T A A T C T C : 669		
Rabbit	: G G C A G A C A T C A A C C C A A G C T G G C G G G C C T G G T C G G G C G C A C G G G C C C A G C A C A A G C A G C C C T T C A T G G T G G C C T T C T T C G	: 756	
Human	: T A . T A A T A	: 756	
Mouse	: T A . T . A T . A A A A A	: 753	
Rabbit	: A G G C C A C G G A G G T C C A C C T G C G C A G C G T C C G G T C C A C C G G G G C A A G C A G C G C A G C C A G A A C C G C T C C A A G G C A C C C A A G G A C C	: 840	
Human	: T . C A G . A . A A . G A ...	: 840	
Mouse	: A T . C . T . T A G T A . G . A . A ...	: 837	
Rabbit	: A G G A G G C G C T C G G A G T G C C A A C G T G G C A G A A A A C A G C A G C A G T A C C A G C G G C A G G C C T G C A A G A A A C A C G A A C T G T A C G T C A	: 924	
Human	: ... A . C A G C A C . T G G T	: 924	
Mouse	: . A . C ... A . A G T A C T . G : 921		
Rabbit	: G C T T C C G C A C C T G G G C T G G C A G G A T T G G A T C A T T G C C C C G A A G G C T A C G C C G C T A C T A C T G C G A G G G A G A G T G C G C C T T C C	: 1008	
Human	: A C C . G . T T	: 1008	
Mouse	: A T C A . T T . T : 1005		
Rabbit	: C C C T C A A C T C C T A C A T G A A C G C C A C C A A C C A C G C C A T C G T G C A A A C G C T G G T C C A C T T C A T C G A C C C G G A C A C A G T G C C C A A G C	: 1092	
Human	: . T . G G A G : 1092		
Mouse	: . T . G G . A T A A A : 1089		
Rabbit	: C C T G C T G C G C C C C A C G C A G T C A A C G C C A T C T G T C C T C T A C T T C G A C G A C A G T T C C A A T G T C A T C C T G A A A A A G T A C A G G A	: 1176	
Human	: T T C T C G . A A	: 1176	
Mouse	: T C T G A : 1173		
Rabbit	: A C A T G G T G G T G C G G G C C T G C G G C T G C C A C T A G	: 1208	
Human	: C T : 1208		
Mouse	: C T : 1205		

图 5 家兔 *BMP7* 部分编码序列与人、小鼠相应序列的对比

两箭头间(第 3 ~ 786 核苷酸)为 *BMP7* 前肽编码区, 剩余部分为成熟肽编码序列; “.”表示保守核苷酸; “-”表示核苷酸缺失; 7 个保守的半胱氨酸密码子用“_”标示。

Fig. 5 Identical alignment of the coding cDNA sequence of rabbit *BMP7* with the corresponding parts of human and mouse *BMP7*

The nucleotides between two arrowheads code the propeptide, the remaining nucleotides code the mature peptide; “.” indicates conservative nucleotides; “-” indicates nucleotide deletion; “_” indicates the codons of the seven conservative cysteines.

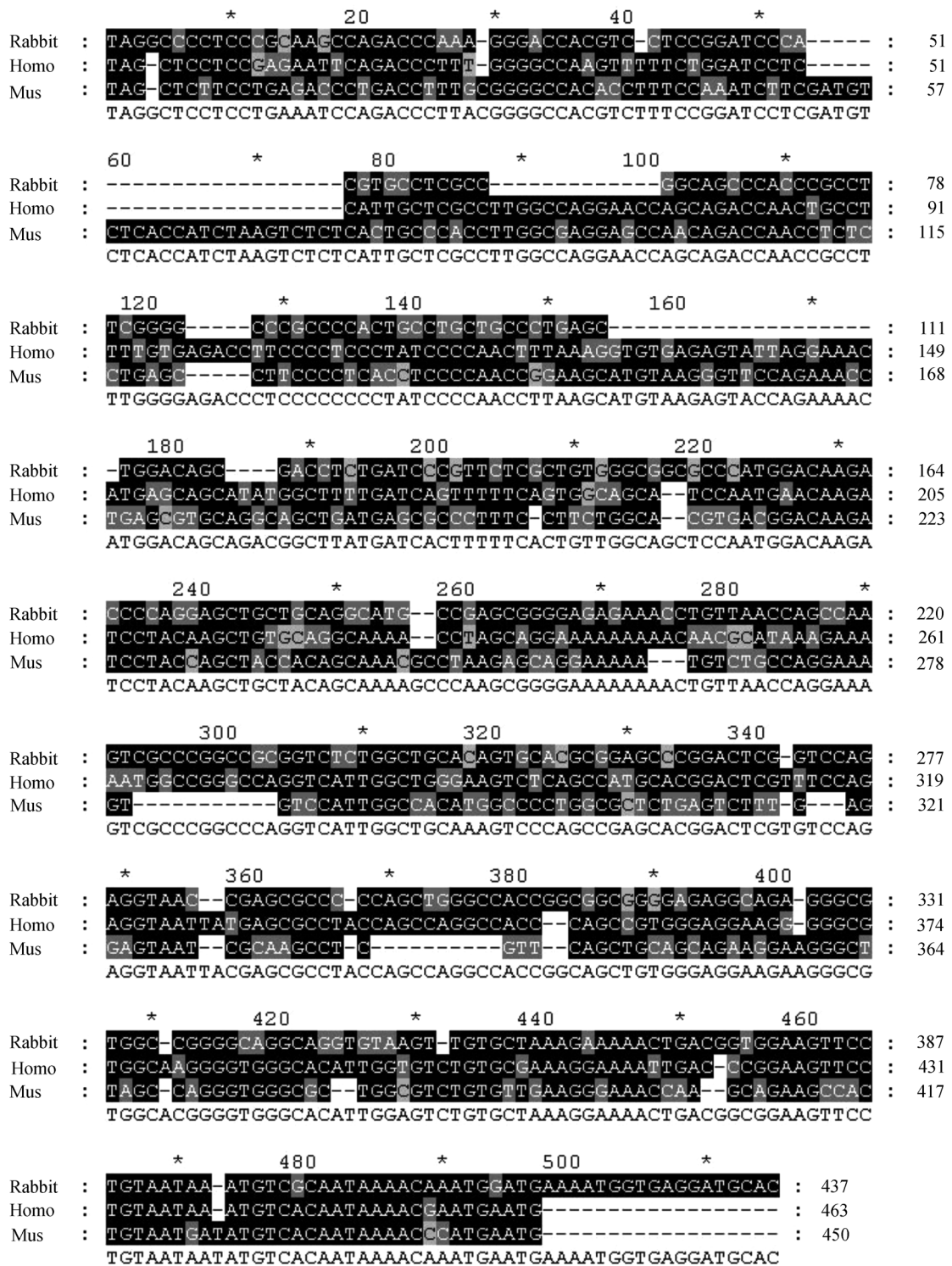


图 6 家兔、人及小鼠 *BMP7* 基因 3' UTR(包括终止密码子)区域核苷酸对比

黑色区域表示相对保守部分, 浅色区域表示变异部分; “-”表示核苷酸缺失; 省略了 Poly(A) 区域; *BMP7* mRNA 末端有 2 个转录终止识别信号(下划线部分), 其间核苷酸也高度保守。

Fig. 6 The 3' UTR of rabbit *BMP7* aligned with that of human and mouse

Relatively conservative nucleotides are shaded by dark blocks, the unconservative nucleotides by pale; Gaps by “-”; The poly (A) tails are omitted; Two AATAAA elements at the ends of *BMP7* mRNA are underlined.

```

Rabbit : ?FSLDNEUHSFIHRLRSQERREMQREILSILGLPHRPRPHLQGKHNSAPMFMLDLYNAMAUEEGGPDGQGFSPYKAVFSTQGP : 87
Human : D.....G..... : 87
Mouse : D.....S..... : 86

Rabbit : PLASLQDSRFLTDADMUMSFUNLUEHDKFEFFHPRYHREFRFDLSKIPEGEAUTAAEFRIYKDYIRERFDNETFRIRUYQULQEHLG : 174
Human : .....H.....S..... : 174
Mouse : .....H.....Q.T.....S..... : 173

Rabbit : RESDLFLLDSTRLWASEEGWLUFEDITATSNHWUNPRHNLGLQLSVETLDGQSIINPKLAGLUGRHGPQHKQPFMUAFFEATEUHLRS : 261
Human : .....I.....N.....K.....F..... : 261
Mouse : .....I.....N.....K..... : 260

Rabbit : URGSTGGKQRSQNRSKAPKDQALRUANUAENSSDQRQACKKHELVSFRDLGWQDWITIAPEGYAAVYCEGECFPLNSYMNATNHA : 348
Human : I...S.....T..N.....M.....△.....△.....△..... : 348
Mouse : I...S.....T..N.....M.S..... : 347

Rabbit : IVQTLUHFIDPDTUPKPCCAPTQLNAISULYFDDSSNVILKKYRNMUURACGCH : 402
Human : .....N.E.....△.....△.....△..... : 402
Mouse : .....N..... : 401

```

图 7 推测的家兔与人、小鼠 *BMP7*(前肽+成熟肽部分)氨基酸序列的对比

箭头前为前肽区, 剩余部分为成熟肽序列; “?”表示前肽第 1 个氨基酸尚属未知; “.”表示保守氨基酸; “-”表示氨基酸缺失; “△”处为 7 个保守的半胱氨酸; “ ” 内为 TGF- β 家族特征性指纹。

Fig. 7 Identical alignments of the amino acids sequence of rabbit *BMP7* with the corresponding parts of human and mouse *BMP7*

The amino acids before arrowhead are Propeptide region, the remaining amino acids are mature peptide; “?”signs the first unknown amino acids of propeptide; “.” is the conservative amino acids; “-” is amino acids deletion; “△” is the conservation cysteines; The signature of TGF- β family is blocked by “ ”.

指纹 [LIVM]-x(2)-P-x(2)-[FY]-x(4)-C-x-G-x-C(Prosite pattern PS00250), 属于TGF- β -propeptide和TGF- β 家族, 与人和小鼠相似。

3 讨论

3.1 *BMP7* 基因克隆与分析

基因全长cDNA的克隆是解析基因结构与功能的基础。目前获取基因全长cDNA序列的方法包括全长cDNA文库的构建、cDNA末端快速扩增和电子克隆等^[13]。全长cDNA文库法相对比较烦琐, 成本较高; 而电子克隆法需要大量EST序列, 但目前家兔基因组及其相关的研究相对比较落后, 各数据库EST和基因组DNA信息量不很丰富。因此, 本研究采用RACE方法结合普通PCR方法, 分段克隆了长度为 1 654 bp家兔*BMP7* cDNA序列(估计约占全长cDNA 90%), 包括成熟蛋白全长编码序列和完整的 3' UTR序列, 将已知的家兔*BMP7* 部分编码序列(619 bp)向 5' 端和 3' 端分别延伸了 395 bp和 628 bp。家兔*BMP7* 部分cDNA的克隆为进一步研究该基因的结构特性、表达调控以及遗传变异提供了基础, 对家兔基因工程药物研制以及动物育种分子标记的开发也有重要的意义。

序列比对结果表明, 本研究所获家兔 *BMP7* 基因开放阅读框部分与人和小鼠 *BMP7* 编码序列的同源性在 90%左右; 预测的氨基酸序列的同源性在

96%以上, 包含 *BMP* 特有的 7 个位置固定的半胱氨酸残基。因此, 可以确定克隆的序列为家兔 *BMP7* cDNA, 也说明哺乳动物的编码区在进化过程中保守性强。

3.2 3' UTR 与基因表达调节

3' UTR则有较大程度的自由, 其序列和长度可以变化^[14]。多种动物*BMP2*和*BMP4*的 3' UTR长度分别在 1 500 bp和 300 bp左右^[15], 而家兔、人和小鼠*BMP7* 3' UTR长度约为 450 bp。3' UTR序列一般比编码区保守性差。家兔、人及小鼠等动物*BMP7* 3' UTR保守性在 50%左右, 而编码区保守性约 90%, 符合上述规律。与*BMPs*家族其他成员相比, *BMP7* 基因 3' UTR的特征与*BMP4* 基因的类似, 保守性都差, 而与*BMP2* 基因 3' UTR有很大的区别。根据Fritz等^[15]的研究, *BMP2* 基因的 3' UTR序列保守性达 80%以上, 甚至比编码区高。

基因表达调控包括转录和转录后水平的调节, 涉及这种调节的序列大多群集于转录本的非翻译区, 包括 5' UTR和 3' UTR。3' UTR被认为是许多基因表达所必需的一个调节区, 其中的顺式作用元件通过与反式作用因子的互相作用, 对mRNA稳定性、基因表达定位以及翻译效率等生理过程进行调控^[14]。已发现的 3' UTR的顺式调节元件包括转录终止信号 AAUAAA(也称多聚腺苷酸化位点或CPSF结合位点)、胞质多聚腺苷酸化元件(CPE; UUUUA₁₋₂U)、

A-U富集元件(ARE; AUUUA或UUAUUUA)、铁应答元件(IRE)等。Fritz等^[15]对啮齿动物、人、狗、鹿和牛等的研究表明, *BMP2* 3' UTR有两个转录终止信号, 8个ARE元件, RNA半衰期很短且具有组织特异性。*BMP2*的姐妹基因(Sister gene)*BMP4*与*BMP2*的3' UTR差异很大, 无选择性的多聚腺苷酸化位点(Alternative polyadenylation)。本研究表明, *BMP7*与*BMP2*基因的3' UTR结构特征部分相似, 即都有两个AAUAAA位点, 但无*BMP2*所具有的其他元件。可变的多聚腺苷酸化位点可以产生组织特异性、3'末端不同的mRNAs^[15]。有研究表明两个或多个poly(A)信号可使转基因表达加倍^[16]。因此, 选择性的多聚腺苷酸化位点可能也是*BMP7*基因表达调控的重要机制。此外, 家兔*BMP7*3' UTR的二级结构比人、小鼠的更复杂, 稳定性强(ΔG 分别为-127.09、-87.93和-80.85 kcal/mol), 也可能与转录后表达调控有关。

3.3 BMP7 蛋白性质和功能位点的预测

家兔 *BMP7* 成熟蛋白单体为碱性蛋白质, 但理论等电点低于人和小鼠 *BMP7* 成熟蛋白, 与氨基酸组成有关, 家兔 *BMP7* 含有较多的酸性氨基酸(谷氨酸)。在家兔 *BMP7* 单体蛋白的 C 端(成熟肽区域)有 *BMP* 特有的 7 个位置固定的半胱氨酸残基, 推测它们参与 3 对链内二硫键和 1 对链间二硫键形成; 有 TGF- β 家族指纹, 表明具有 TGF- β 家族属性。当然, 有关家兔 *BMP7* 蛋白的特性还需进一步的研究。

参考文献(References):

- [1] Shimasaki S, Moore RK, Ootsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Rev*, 2004, 25(1): 72-101. [\[DOI\]](#)
- [2] GE Yan, ZHANG Jia-Hua. Progress on bone morphogenetic proteins on animal reproduction. *China Academic Journal Electronic Press*, 2006, 27(6): 33-37.
葛燕, 张家骅. 骨形态发生蛋白在动物繁殖上的研究进展. *动物医学进展*, 2006, 27(6): 33-37.
- [3] Huang HJ, Wu JC, Su P, Zhirnov O, Miller WL. A novel role for bone morphogenetic proteins in the synthesis of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 2001, 142(6): 2275-2283. [\[DOI\]](#)
- [4] Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(6): 7282-7287. [\[DOI\]](#)
- [5] Glistler C, Kemp CF, Knight PG. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by folistatin. *Soc Reproduct Fertility*, 2004, 127(2): 239-254.
- [6] Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod*, 2001, 65(4): 994-999. [\[DOI\]](#)
- [7] Glistler C, Richards SL, Knight PG. Bone morphogenetic proteins (BMP)-4, -6, and -7 potentially suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: Could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling. *Endocrinology*, 2005, 146(4): 1883-1892. [\[DOI\]](#)
- [8] Erickson GF, Fuqua L, Shimasaki S. Analysis of spatial and temporal expression patterns of bone morphogenetic protein family members in the rat uterus over the estrous cycle. *Endocrinology*, 2004, 182(2): 203-217. [\[DOI\]](#)
- [9] Ying Y, Zhao GQ. Detection of multiple bone morphogenetic protein messenger ribonucleic acids and their signal transducer, Smad1, during mouse decidualization. *Biol Reprod*, 2000, 63(6): 1781-1786. [\[DOI\]](#)
- [10] Chen MY, Carpenter D, Zhao GQ. Expression of bone morphogenetic protein 7 in murine epididymis is developmentally regulated. *Biol Reprod*, 1999, 60(6): 1503-1508. [\[DOI\]](#)
- [11] ZHAO Tian-Na, HAN Jin-Xiang, WANG Shi-Li. Progress on bone morphogenetic proteins 7. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2005, 12(5): 328-331.
赵甜娜, 韩金祥, 王世立. 骨形态发生蛋白 7 的研究进展. *药物生物技术*, 2005, 12(5): 328-331.
- [12] Lin SJ, Lerch TF, Cook RW, Jardtetzky TS, Woodruff TK. The structural basis of TGF- β , bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction*, 2006, 132(2): 179-190. [\[DOI\]](#)
- [13] FAN Hong, LI Yu. Strategy and method of cloning new gene cDNA full length. *Foreign Medical Sciences Section of Genetics*, 2002, 25(1): 11-13.
樊红, 李钰. 克隆新基因 cDNA 全长的策略和方法. *国外医学:遗传学分册*, 2002, 25(1): 11-13.
- [14] CHEN Shu-Hua. Function regulation of the 3'-untranslated region (3' UTR) of eukaryotic mRNA. *Physiol Pathol Sci Clinic*, 2003, 23(6): 611-614.
陈淑华. 真核生物 mRNA 3'非翻译区的调控功能. *国外医学:生理、病理科学与临床分册*, 2003, 23(6): 611-614.
- [15] Fritz DT, Liu D, Xu J, Jiang S, Rogers MB. Conservation of *Bmp2* post-transcriptional regulatory mechanisms. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48950-48958. [\[DOI\]](#)
- [16] Zhang H, Lee JY, Tian B. Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biol*, 2005, 6(12): R100. [\[DOI\]](#)