

九孔鲍 *BMP-2* 基因 cDNA 克隆及表达分析

艾加林¹, 栗志民^{1,2}, 刘建勇¹, 申玉春^{1,2}

(1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088; 2. 湛江市海洋生态与养殖环境重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 为探究 *BMP-2* 基因在九孔鲍(*Halotis diversicolor supertexta*)中的功能, 采用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术从九孔鲍外套膜中获得了 *BMP-2* 基因 cDNA 全长, 并用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测了 *BMP-2* 基因在各组织和发育时期的表达水平。结果表明: 九孔鲍 *BMP-2* 基因 cDNA 全长 2572bp, 其中 5'非编码区(5'UTR)123bp, 3'非编码区(3'UTR)1150bp, 开放阅读框(ORF)为 1299 bp, 编码 432 个氨基酸, 其分子质量为 48.59ku, 理论等电点(pI)为 9.84; 具有 N 端信号肽(1-39 aa)、TGF- β 前肽区域(63-294 aa)和 TGF- β 成熟肽区域(331-432 aa), 以及蛋白酶水解位点 RLRR (272-275 aa)和 7 个保守的半胱氨酸残基, 符合 TGF- β 超家族蛋白典型结构特征。系统进化树结果显示九孔鲍 *BMP-2* 基因和耳鲍聚为一支。qRT-PCR 结果表明 *BMP-2* 基因在九孔鲍的 6 个组织中均有表达, 在足、右侧壳肌、外套膜及肝脏中显著高表达; 在检测的 7 个发育时期均表达, 其中在受精卵、4 细胞、8 细胞、原肠胚、稚鲍时期表达量显著高于卵、幼鲍时期。研究表明 *BMP-2* 基因可能在九孔鲍贝壳形成中具有重要作用。

关键词: 九孔鲍; *BMP-2*; cDNA; 基因克隆

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2018)08-0107-09

DOI: 10.11759/hyxx20180310001

转化生长因子超家族(transforming growth factor type beta, TGF- β)是一组具有结构相关性的多功能分泌型细胞因子, 参与细胞增殖、分化和生长等多种生物学过程^[1]。骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMP)是转化生长因子超家族(TGF- β)中最大的分泌型信号传导分子家族, 最早在啮齿类动物中因诱导异位骨形成被发现^[2]。该家族成员具有 C 末端 7 个保守的半胱氨酸残基等 TGF- β 超家族典型结构, 又具有自身的特点: N 端含有较多的碱性氨基酸, 产生较多正电荷, 易在基质上吸附, 可能与其具有诱骨活性有关^[3]。研究表明 BMP 是一个多功能细胞因子, 参与 TGF- β /BMP 信号通路的信号传递^[4]、骨骼修复^[5]、骨骼发育、器官形成和生殖等许多生物学过程^[6, 7]。*BMP-2* 基因是 BMP 家族的重要成员, 通过与细胞膜表面丝氨酸/苏氨酸 II 型和 I 型激酶受体特异性结合形成复合体, 进而将信号传到细胞核内调控一系列基因转录^[8], 参与骨骼发育等生理调控过程^[9, 10], 是唯一能单独诱导成骨的因子^[11]。此外, 在胚胎发育过程中, *BMP-2* 基因可通过诱导生肌基因表达来促进胚胎肌肉的生长, 也可通过诱导细胞凋亡抑制肌肉生长^[12]。

贝壳是外套膜分泌物生物矿化的产物, 是软体

动物的外骨骼, 为大多数软体动物的内部器官提供保护和支撑。因此, 贝壳发生、钙化机制等成为人们研究的热点之一^[13]。贝壳形成的分子机制在合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)中研究的较为深入, 已发现 *BMP-2* 基因^[14]、酪氨酸酶基因^[15]、间液蛋白 *SPARC* (Secreted Protein Acidic and Rich in Cyteine)^[16]、贝壳蛋白家族 *RLCD*(related low complexity domain)^[17]和 *BMP-3*、*BMP-10*^[18]等参与贝壳形成、修复过程。此外, *BMP2/4* 的源基因 *engrailed*、*dpp* 也参与贝壳的形成调控过程, 欧洲帽贝(*Patella vulgata*)^[19]和静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)^[20]*engrailed*、*dpp-BMP2/4* 基因在胚胎的壳腺周围表达, 可能参与了贝壳区域边界的确定; 棘牡蛎(*Saccostrea kegaki*)^[21]*dpp* 基因参与了贝壳发生的调控。

九孔鲍(*Halotis diversicolor supertexta*)属于软体

收稿日期: 2018-01-21; 修回日期: 2018-03-06

基金项目: 深圳市大鹏新区产业发展专项资金科技研发项目 (KY20170211); 湛江市财政资金科技专项(2015A06006)

[Foundation: Development special fund of Shenzhen dapeng new district (KY20170211); special fund of Zhanjiang (2015A06006)]

作者简介: 艾加林(1989-), 男, 云南文山人, 硕士研究生, 研究方向为贝类遗传学, 电话: 13286994135, E-mail: 980158435@qq.com; 栗志民(1972-), 通信作者, 男, 博士, 教授, E-mail: lizhimin811@163.com

动物门(Mollusca), 腹足纲(Gastropoda), 前鳃亚纲(Prosobranchia), 原始腹足目(Archaeogastropoda), 鲍科(Haliotidae), 主要分布于日本、韩国及中国台湾等南方各省^[22], 有较高的营养和经济价值, 是中国南方重要的养殖贝类。此外, 九孔鲍的贝壳有一定的药用价值, 是中药石决明的来源之一^[23], 具有较高的药用价值。鉴于 *BMP-2* 基因在贝壳形成过程中的重要作用。本文运用 RACE 技术克隆出了九孔鲍 *BMP-2* 基因 cDNA 全长, 并通过 qRT-PCR 技术检测了该基因在不同组织和不同发育时期的表达, 初步探究了 *BMP-2* 基因在九孔鲍中的功能, 以期对 *BMP* 家族基因功能研究及贝壳形成机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

九孔鲍采自广东省湛江市硇洲岛养殖群体, 体质量(11.42±1.24)g, 壳长(50.7±2.52)mm, 壳宽(31.46±1.6)mm。选取活力强、健康的 5 个成鲍分别解剖右侧壳肌、鳃、外套膜、肝胰脏、足、性腺; 亲鲍催产受精后分别收集卵、受精卵、4 细胞、8 细胞、原肠胚($n>500$)、稚鲍($n>5$)、幼鲍($n>5$); 分别保存于 RNAlater (全式金, 北京)中, 4℃ 保存过夜后转移到 -20℃ 短期保存。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 TransZol Up Plus RNA Kit(全式金, 北京)试剂盒说明书提取外套膜总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 并用核酸微量定量仪(Nanodrop 2000 Thermo Scientific, 美国)检测 RNA 浓度, 保证 $A_{260/280}$ 为 1.8~2.0, RNA 具有完整的 28S、18S 和 5S rRNA 条带^[24]。根据 TransScript one-step gDNA Removal and cDNA Synthesis supermix (全式金, 北京)反转录试剂盒说明书, 利用检测合格的总 RNA (1μg)和 Oligo (dT) 引物合成 cDNA 20μL, 同时按 SMARTer™ RACE 5'、3'Kit user manual(TaKaRa, 大连)合成 5'、3'RACE cDNA 模板, -20℃ 短期保存。

1.3 *BMP-2* 基因 cDNA 全长克隆

根据 GeneBank 中耳鲍(*Haliotis asinina*DQ298396.1)等贝类的 *BMP-2* 基因保守序列设计引物 BMP-F, BMP-R(10uM)(表 1), PCR 反应程序: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 40 个循环, 72℃ 10 min, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳、切胶回收, 与

pEASY-T1 载体连接、转化培养后, 挑选阳性克隆送上海生工生物工程股份有限公司测序, 获得 1157 bp *BMP-2* 基因序列。

根据已获得片段设计巢式 PCR 引物 BMP-3F1, BMP-5F1, 与 SMARTer™ RACE 提供引物 UPM Mix、UPM (表 1)分别扩增 3'、5'端; 第一轮利用 SMARTer™ RACE 5'3'Kit user manual(TaKaRa, 大连)中 SeqAmp DNA Polymerase 分别进行扩增, PCR 反应程序: 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 25 个循环; 将第一轮 PCR 产物稀释 50 倍作为第二轮反应模板, 然后第二轮 PCR 产物稀释 3'端稀释 100 倍, 5'端稀释 50 倍分别作为第三轮 PCR 反应模板, 利用巢式引物(表 1)、TaKaRa LA Taq 酶(TaKaRa, 大连)分别进行扩增, 反应程序: 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 30 个循环; PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳、切胶回收后, 与 pEASY-T1(全式金, 北京)载体连接、转化培养后, 挑选阳性克隆送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.4 生物信息学分析

测序所得序列通过 DNAMAN6.0 软件和 NCBI blast 进行比对、去除接头以及重复序列, 然后拼接获得全长, 利用 NCBI ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找基因开放阅读框(ORF), SignalP 预测信号肽(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), ExPASy 计算相对分子量和等电点 pI (<http://www.expasy.org/>), ProtParam 分析蛋白的理化性质 (<http://web.expasy.org/protparam/>), NetPhos3.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)和 NetNGlyc1.0Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测功能位点, CBSPredictionServers ProP 分析蛋白酶水解位点(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>), 蛋白质结构域用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), 二级结构预测 SOPMA: (<http://pbil.ibcp.fr/>), 三级结构预测 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)。氨基酸多序列比对采用 DNAMAN6.0 软件。

从 GenBank 中下载虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis* OWF43831.1)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri* AGF68558.1)、耳鲍 (*Haliotis asinina* ABC00191.1)、九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*)、斑马鱼 (*Danio rerio* *BMP4* AAC60285.1)、斑马鱼 (*Danio rerio*

BMP2a AAC60287.1)、斑马鱼(*Danio rerio* *BMP2b* AAAC60286.1)、人(*Homo sapiens* NP001191.1)小鼠(*Mus musculus* NP031579.2)的氨基酸序列来构建系

统进化树。利用 MEGA6.0 软件先进行 clustaw 序列比对, 用邻位法(Neighbor-Joining)自展(bootstraps) 1000 次构建系统进化树。

表 1 实验中所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物	引物序列(5'-3')	退火温度/°C	用途
BMPF	TTAGCCTCACGTTGATTG	50	同源克隆(1157bp)
BMPR	CCATTCGTCCAGATACA		
BMP-3F1	GGTTAAATCATGGGCTTGAGGTTAG		
UPMMix	Long-CTAATACGACTCACTATAGGGCA	70	3'RACE
	AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAGGAG GCGGAGGAAGCACAGAATGAGGAGGCGG		
BMP-3F2	AGGAAGCACAAGAAT	63	3'RACE
UPM	short-CTAATACGACTCACTATAGGGC		
BMP-3F3	AATGATGTTGGCTGGAATGACTGGA	58.2	3'RACE
BMP-5F1	CCCGGTGCCTCTGGGATGTCTTTGC	70	5'RACE
BMP-5F2	CTAAGCTCGGACCAATCAACGTGAGG	61.7	5'RACE
BMP-5F3	CCTCACGTTGATTGGTCCGAGCTTAG	62	
β-actin-F	TGCCCATCTACGAAGGTTACGCC	60	荧光定量内参(200bp)
β-actin-R	GCTGCTGTGGACATCTCCTGCTC		
BMP-RF	GGGTTTAAAGAGTCGCCCA	60	荧光定量(151bp)
BMP-RR	TCCGCACAGTGTTAGCAGAG		

1.5 BMP-2 表达分析

采用 ABI7500 荧光定量 PCR, 以 *β-actin* 为内参基因, 利用 *BMP-2* 基因 cDNA 序列设计荧光定量引物 BMP-RF、BMP-RR(表 1), 分析成鲍的足、右侧壳肌、外套膜、性腺、鳃、肝脏等 6 个组织, 以及鲍卵、受精卵、4 细胞、8 细胞、原肠胚、稚鲍、幼鲍等 7 个不同发育期的 *BMP-2* 基因的表达水平, 每份组织样品 5 个重复, 反应体系为: PowerUp SYBR Green Master Mix(2x) (TaKaRa, 大连)5.0μL, 引物各 1.5μL (1μmol/L), cDNA 模板 2.0 μL (1ng/μL), 反应程序: 50°C 2 min; 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60°C 15 s。

分别以各组织和不同发育时期中基因表达量最低的为基准, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量, 数据采用平均值±标准差(means±SD), 通过 SPSS19.0 单因素方差分析(one way ANOVA), 进行统计学检验, 差异显著性为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 BMP-2 基因克隆及序列分析

九孔鲍 *BMP-2* 基因(*HS-BMP-2*) cDNA 全长 2572bp, 其中开放阅读框(ORF)为 1299 bp, 编码 432

个氨基酸, 预测其分子质量为 48.59ku, 理论等电点(pI)为 9.84。5'非编码区(5'UTR)123bp, 3'非编码区(3'UTR)1150bp, 含有 3 个加尾信号序列 AATAAA(第 1442、2526 bp)和 ATATAA(2241 bp)及 PolyA(28 bp)尾(图 1)。

NetPhos3.1 和 NetNGlyc 1.0 功能位点预测结果显示: *HS-BMP-2* 氨基酸序列中有 27 个丝氨酸磷酸化位点、12 个苏氨酸磷酸化位点、3 个酪氨酸磷酸化位点和 6 个 N-糖基化位点。SOPMA 分析表明: 九孔鲍 *BMP-2* 蛋白二级结构中 α -螺旋占 32.18%、 β 转角占 6.48%、无规则卷曲 42.36%、延伸链占 18.98%。

ProP 蛋白酶水解位点分析显示: *HS-BMP-2* 氨基酸序列中具有 2 个蛋白酶水解位点(RXXR), 为 RLRR (272-275 aa)和 RTRR (304-307 aa)(图 1), 位点之后有 7 个保守的半胱氨酸残基, 进一步分析发现 RLRR(272-275 aa)为 TGF- β 超家族物种间保守的蛋白酶水解位点(图 2)。

Phyre2 分析显示: 九孔鲍 *BMP-2* 基因三级蛋白结构与耳鲍的三级蛋白结构相似(图 3A)。

SignalP 和 SMART 分析结果显示: *HS-BMP-2* 氨基酸序列中 N 端信号肽序列为 1-39 aa, TGF- β 前肽区域为 63-294 aa、TGF- β 成熟肽区域为 331-432 aa (图 1、图 3C)。

1 ACATGTGAGAACATCATCAGTGAACATCATACTAGATTGGAACCTCCATCGTATTC AATTAATGTGTTGTGGGAGACATGTTGTACTGACAGCCGACGTGTT
106 CCATAGTCTGTGCGGAGTATGTATGGACTAAAACGATGGCCATTGGGTGCCACTTCAGCATGAGCGGGCTCCAGGACAACAGCTCTGTGCTCTGCTTAGC
1 M Y G L K R W P L G V H F S M S A V S R T T S L V L L L S
211 CTCACGTTGATTGGTCCGAGCTTAGAGCTCCTAGCAGCGTCTCAATCCAGACCGCATCAACTGACAATAACGGAAATATCAGGAAAAGCATCTGTGGGAAAAGAC
30 L T L I G P S L E L L A A S Q S R P A S T D N N G I S G K A S V G K D
316 AGCGACTTTTGGAAAATCGTGAAGCTGGCTTGTTTAAACAATCTGGGTTTAAAGAGTCGCCCCAATCCCAGCGAAAGTCCGACATACCAGATTACATGTTGGAA
65 S D F L K I V E A G L F N N L G L K S R P N P Q R K S D I P D Y M L E
421 CTGTACGATCTGTACTCAAGCCGACCTGGCTCAGCCAGTCCATTCTGAAAACCCAGAGGAAGAGGTCGACCTCTGCTAACACTGTGGGAGTTTCTTCATACA
100 L Y D L Y S S R P G S A S P F L K T R G R G L T S A N T V R S F L H T
526 GATGTGGGCAACAGATGCCGTTGTGATGAGAAGAGCTGTGTTCGGATGGTTC AATATCTCCACAATCCCAGCGTCGAGGCTTAGCAGCAGCGGAGCTC
135 D V G Q T D A G C D E K S C V R M W F N I S T I P D V E A L A A A E L
631 AGGGTATTCAAGGATGTGTATAAATGTGGAAGCTAACAAAAATAATAGTGTGTTAAACATGCAAAGACATCCAGAGCCAGGGTGGAGGTGCATGAGATT
170 R V F K D V Y K L L E A N K N N S A V K H A K T S Q R H R V E V H E I
736 ATGCAGCCTTAGGACAGGGCGTGTGTATATCAAGACTTATAGACACGAAGTGTGGATCTTAAGAACTTCTCAATGGGGTCTTTGATGTTCAATTCG
205 M Q P L G Q G A E C I S R L I D T K V V D L K N S S Q W G S F D V H S
841 GCAGTATTAAGTGAAGAAGCGGCCCGTTAAATCATGGGCTTAGAGTTAGACTTATAAACAACCCCTTCTGTAACAACAGATGCACATGTGGGTTACGA
240 A V L K W K K R P R L N H G L E V R L I T N N P S V T T D A H V R L R
946 CGTTCTACGTCGATGTCGACTCTACTGGCATAACAAAGACCTTGTGTAGTACTTATACGGACGATGGCCGGGACCGAAGCCCGACCGCTAGAGCCAGC
275 R S T S M S D S H W H T Q R P L L V T Y T D D G R G P K P R T R R A S
1051 AGTCGGGCGCGCCGGAAGCAACGAAGAAGAAGAGGAGGCGGAGGAAGCACAAGAATCAGTGTGCTAGACATGCGCTGTATGTTGACTTCAATGATGTTGGC
310 S R A R R R K Q R K K K R R R R K H K N Q R R H A L Y V D F N D V G
1156 TGGAACTGACTGGATCGTTGCGCAAGTGGTTACAATGCTTTTATTGCCAGGAGACTGTCCATTTCTCTGGCGCATCATCTCAACTCTACAAACCATGCAATA
345 W N D W I V A P S G Y N A F Y Q H G D Q P F P L A H H L N S T N H A I
1261 GTTCAGACTTTAGTCAACTCTGTAATCCAAGTCCGCGCCCAAGGCGTGTGTGCCACTGAGCTGACTGCTATCTCCATGTTGATCTGGACGAATGGGAC
380 V Q T L V N S V N P S A V P K A C C V P T E L T A I S M L Y L D E W D
1366 AAGGTTGTGTTGAAGAACTACCAGGATATGGTGGTGGAGGCTGTGGATGCCATAGTTGGCTGGCCGGCGCACAGAATAAACTATGCAAGCTCCGCTGCTGT
415 K V V L K N Y Q D M V V E A Q G R *
1471 GTTTTAGTGCCACAAAGCATGACAGGACATCTGTGGTACCAGCTCCTGAGTTAAACATCTTCGCCATTGCTTCTGGACATCCGGGACTTCCGGTTACTGCTGGCAGAAAAGGA
1586 TACGGCACCTACAGGAGCTGCGTGTGGTGTGACTGTTACCTCACCATGTAGCAGGATGTGAAGACAGGTGTGTCGGAATACTAAATACACTAGTCATAGCAT
1701 GGTGAGAGAGAAGAGAGTGGCTACACAAGGCATACCCTCCAGTGGCCCTGAGAATATTGCTGACATTATCCGATCGGGAGAGACGATATGAGTGTGTAGAAACTATTGGGG
1816 TCGAGTGTCAACGCTTGGACCCCATCTTACCCTTCCCATCCCCACACCCATCTCCCCACCCACCCCTCCACCCAACCAAGTTGAGCGTTGTGAAGCGCTCAGTTATGC
1931 CGGATATTGTACATATATTATAAAATATATTTTAAATGTTAATTTTATTTCAGTTAACCTTTCTTAGCGGTTACTCTGAATAACGTTAAGGATGTACATTCATGTAAGTAT
2046 ATTGTGTACAATCTGCTAGGAGCAGGTGCGCATACCTCAACAAGCGTCACAATGTGACTGTGACTTTGGACTACCTCTGTGTTTTCAGCTGGCTAACTGATACTAGTAATACAC
2161 CTATCCACCTCGTTACCCCGGGTGGCCGACGCGGTTTCATAACGCTCTACATTCATGTACTATAAAATACCGTCTTGATTAACGTTTGTGAATAATATTCTATTATGG
2276 ATTTATGCTGCTTTAGTAGTGTGTAACACAGAAATTTAAAGCATGTTGTTAAAGCAACTTTAGTTAAGGTACAACCTCTATGGGACCGTTTGTATTTATTGACTGTTTC
2391 GCCGCCATAGCGTAATCGGTATAGTTACTGGAGATATGTTACGATACTGAAATTTATACTACATTTACGTCACCAAGAAATGGTACGTCAGTGGTATTACAGCTGTGAT
2506 AAACGTACACTAAAATGAAAATAAAATACATGTAGAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 1 九孔鲍 *BMP-2* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *BMP-2* cDNA from *H. diversicolor supertexta*.

灰色标注起始密码子和终止密码子，方框标注信号肽，单下划线标注 TGF-β 前肽区，双下划线标注 TGF-β 成熟区域，深灰色标注蛋白酶水解位点(RXXR)，灰色方框标注 9 个保守的半胱氨酸残基，波浪线标注加尾信号

Start codon and stop codon are shown in gray; the predicted signal peptide and the TGF-β propeptide domain are shown in boxes and single underline, respectively, TGF-β superfamily domain and proteolytic processing site (RXXR) are show in double underline and dark gray, respectively, seven conserved cysteine residues and putative eukaryotic polyadenylation signal are show in the boxed with gray and wavy line, respectively

<i>H. sapiens</i> 人MVAGTRCLALLLPQVLLGGA..AGLVPGLGRKRF	33
<i>M. musculus</i> 小鼠MVAGTRCLVLLLPQVLLGGA..AGLIPGLGRKRF	33
<i>D. rerio BMP2a</i> 斑马鱼MVSSTAAMVLMVTVQVFFAGS..SGLVPQVGRSSL	33
<i>D. rerio BMP2b</i> 斑马鱼MVAVVRAITVLLLCQVLLGGA..WGLIPEIDRRKY	33
<i>D. rerio BMP4</i> 斑马鱼MIPGNRMVMVILLCQVLLGESSYASLIPBEKKA	35
<i>M. yessoensis</i> 虾夷扇贝MLLLSPLGFNRQLYPRQLQSTAPRAVPTGVLTLSPFCVFTGIIIMIGGVRTLLLLALSVAVTVQ....QPADQNNLF	74
<i>C. farreri</i> 栉孔扇贝MIGRVKTLVLLALSVAVAVQ....QPTDQNNLF	30
<i>H. asinina</i> 耳鲍MWETCCALTAVVFFIGSDGIMHGLKRWPPG.VHFSMSAVSRTTSLVLLSLTLIGPSELLAASQS....RPASTDNNGI	75
<i>Hsupertexta</i> 九孔鲍MYGLKRWPLG.VHFSMSAVSRTTSLVLLSLTLIGPSELLAASQS....RPASTDNNGI	55
	1	
<i>H. sapiens</i> 人	AAASSGRPSSQPSDEVISEFELRLLSMFGLKQRFDP SRDAVVEPYMLDLYRRHSQG..PGSPAP...DHRLEAAASRA	107
<i>M. musculus</i> 小鼠	AAASS.RPLSRPSEDVISEFELRLLSMFGLKQRFDP SKDVVVEPYMLDLYRRHSQG..PGAPAP...DHRLEAAASRA	106
<i>D. rerio BMP2a</i> 斑马鱼	S.....PDVTHAFELRLLSMFGLKQRFDP STSAVVEPYMLDLYSAHSVN.AEQVSRPRAHLGKGSERASRA	100
<i>D. rerio BMP2b</i> 斑马鱼	SDSGD.THPERTDINFLNEFELRLLNMFGLKQRFDP SKSAVVEPYMLDLYMHSENDDENIQRPRSTMKGHVERAASRA	112
<i>D. rerio BMP4</i> 斑马鱼	S....ALHLAQSHELLRDREATELHMFGLKQRFDP SHSAVVEPYMLDLYRLQSGELEBEGAQHSV..FDYPERSTSRAS	108
<i>M. yessoensis</i> 虾夷扇贝	DNKFLDNVD SQKKEIIEAFESSLLNLFSLNARPRPKDKIKTPQYMLDLYKHTHRD..PDVLSF...NFNIRGKGVGTAN	149
<i>C. farreri</i> 栉孔扇贝	DSKFLDNVD SQKKGIEVEFESSLLNLFSLNARPRPKDKIKTPQYMLDLYKHTSD..PDVLSF...NFNIRGKGVGTAN	105
<i>H. asinina</i> 耳鲍	SGKASVCKDS...DFLKIIVEAGLENNLCLKSRPMPQRKSDIEDYMLELYDLYSSR..PGSASP...FLKTRGRGLTSAN	146
<i>Hsupertexta</i> 九孔鲍	SGKASVCKDS...DFLKIIVEAGLENNLCLKSRPMPQRKSDIEDYMLELYDLYSSR..PGSASP...FLKTRGRGLTSAN	126
	l e l l p p p y l y a	
<i>H. sapiens</i> 人	IVRSFHHEEEL..PETSGETTRRFENLSSIPTEEFITSAELQVFRE.....QMQDALGN...SSFHHRIN	172
<i>M. musculus</i> 小鼠	IVRSFHHEEAEEL..PEMSGTARRRFENLSSVPSDEFILSAELQIFRE.....QIQEALGN...SSPQHRIN	170
<i>D. rerio BMP2a</i> 斑马鱼	IVRSFHHEESTEDP...SSSSVRTTQRFENLTSIPDEELVTSADVRFRE.....QIVSSLNNA...SAGFHRIN	165
<i>D. rerio BMP2b</i> 斑马鱼	IVRSFHHEEAEAL...SSLKGTITQRFENLTFHSWRGADLRCGRGIFRD.....QVLG.DAS...TSGFHRIN	175
<i>D. rerio BMP4</i> 斑马鱼	IVRSFHHEEHLLELQ..SDGSQETPLRFVFNLSSIPDEELISTADVRIYRQ.....QIDDAFSDPDQTDGHLHRIN	178
<i>M. yessoensis</i> 虾夷扇贝	IVRSFVHEKDAEHPVQMTGCGKENCYRVWFVNSNIPVEEVLTAAEFRVFFD.....KDSAVENS...IKKGRLRWE	218
<i>C. farreri</i> 栉孔扇贝	IVRSFVHEKDVVEHPVQMTGCEENCYRVWFVNSNIPVEEVLTAAEFRVFFD.....KDSAVENS...VKKGRLRWE	174
<i>H. asinina</i> 耳鲍	IVRSFVHEKDVVQPT...DAGCDEKNCYRVWFVNSNIPVEEVLTAAEFRVFFD...VYKLEANKNNSAVKHA...KTSQRHWE	220
<i>Hsupertexta</i> 九孔鲍	IVRSFVHEKDVVQPT...DAGCDEKNCYRVWFVNSNIPVEEVLTAAEFRVFFD...VYKLEANKNNSAVKHA...KTSQRHWE	200
	t r f h f n r	
<i>H. sapiens</i> 人	IYELIKPATANSKFPVTRLDLTRLVN.QNASRWFSDVTPAVMRWTAQGHANHCFFVVEVAHLEEK....QGVSKRHW	245
<i>M. musculus</i> 小鼠	IYELIKPAAANLKFPVTRLDLTRLVN.QNTSQWESFDVTPAVMRWTTQGHINHCFFVVEVAHLEEN....PGVSKRHW	243
<i>D. rerio BMP2a</i> 斑马鱼	VHEIIRPSSGS.LQEPITRLDTRLVQ.HLSRWFSDVTPAVLKWITTDGHPNHGILVEISHP.....DQDSREHW	234
<i>D. rerio BMP2b</i> 斑马鱼	IYEVFRPALAPSKPLTRLDTRLVQ.DSHTRWFSDVTPAVMRWTAQGHANHCFFVVEVAHLEEK....QGVSKRHW	254
<i>D. rerio BMP4</i> 斑马鱼	IYEWLKAPRE..GQLITQLDTRLVR.PNTSKWESFDVTPAVLKWITTDGHPNHGILVEISHP.....DQDSREHW	249
<i>M. yessoensis</i> 虾夷扇贝	VLQVMRFIKK.GQDSITRLDVKHVSRRKNASWASFDVTPAVLKWITTDGHPNHGILVEISHP.....DQDSREHW	292
<i>C. farreri</i> 栉孔扇贝	ILQVMRFIKK.GQDSITRLDVKHVSRRKNASWASFDVTPAVLKWITTDGHPNHGILVEISHP.....DQDSREHW	248
<i>H. asinina</i> 耳鲍	VHEIMQPLGQ.SAECISRLDITKVDLKNSSQWESFDVTPAVLKWITTDGHPNHGILVEISHP.....DQDSREHW	292
<i>Hsupertexta</i> 九孔鲍	VHEIMQPLGQ.SAECISRLDITKVDLKNSSQWESFDVTPAVLKWITTDGHPNHGILVEISHP.....DQDSREHW	272
	l d v w sfdv av w nhg h f	
<i>H. sapiens</i> 人	ISRSLHQD.EHSWSQIRPLLVTPCHDGKG.HPLHK.REKRQAK...HKQRKRLK..SSCRHPLVYDFSDVGVNDWIFA	316
<i>M. musculus</i> 小鼠	ISRSLHQD.EHSWSQIRPLLVTPCHDGKG.HPLHK.REKRQAK...HKQRKRLK..SSCRHPLVYDFSDVGVNDWIFA	314
<i>D. rerio BMP2a</i> 斑马鱼	VSRSLHNN.EDTWSQMRPLLVTPCHDGKG.NVLHS.REKRQAK.N.NKQRKRLK..ANCRHSLVYDFSDVGVNDWIFA	306
<i>D. rerio BMP2b</i> 斑马鱼	VSRSLHAD.EDSWAARPLLVTPCHDGKG.TAVLHNSRREKRQARRG..QKPRKHHQRSNCRHALYDFSDVGVNDWIFA	331
<i>D. rerio BMP4</i> 斑马鱼	VSRVHPLPNEEVDHVRPLLVTPCHDGKS.HPLTR.RAKRSPK...QRGRKRN...NCRHPLVYDFSDVGVNDWIFA	320
<i>M. yessoensis</i> 虾夷扇贝	LRRATINS.EDEWHLQRPPLLVTPDNGR.KSRTKRSSSRKSKRR.RPRNRKRRRHKKYCRKPLVYDFSDVGVNDWIFA	369
<i>C. farreri</i> 栉孔扇贝	LRRDTINS.EEBWHLQRPPLLVTPDNGR.KSRTKRSSSRKSKRR.RPRNRKRRRHKKYCRKPLVYDFSDVGVNDWIFA	325
<i>H. asinina</i> 耳鲍	LRRSASMS.DSHWHQRPPLLVTPDNGR.GPKPRTRASSRARRRQRKRRRHKKNQCRHALYDFSDVGVNDWIFA	371
<i>Hsupertexta</i> 九孔鲍	LRRSTMS.DSHWHQRPPLLVTPDNGR.GPKPRTRASSRARRRQRKRRRHKKNQCRHALYDFSDVGVNDWIFA	351
	r r r r c r ly df vgw wi a	
<i>H. sapiens</i> 人	PPGYHAFYCHGCEPFPPLADHLNSTNHAIVQDLVNSVNSK.IPKACCVPTLTAISMLYDDENERWILKNYQDMVVEGCGC	395
<i>M. musculus</i> 小鼠	PPGYHAFYCHGCEPFPPLADHLNSTNHAIVQDLVNSVNSK.IPKACCVPTLTAISMLYDDENERWILKNYQDMVVEGCGC	393
<i>D. rerio BMP2a</i> 斑马鱼	PPGYHAFYCHGCEPFPPLADHLNSTNHAIVQDLVNSVNSK.IPKACCVPTLTAISMLYDDENERWILKNYQDMVVEGCGC	385
<i>D. rerio BMP2b</i> 斑马鱼	PPGYHAFYCHGCEPFPPLADHLNSTNHAIVQDLVNSVNSK.IPKACCVPTLTAISMLYDDENERWILKNYQDMVVEGCGC	410
<i>D. rerio BMP4</i> 斑马鱼	PPGYHAFYCHGCEPFPPLADHLNSTNHAIVQDLVNSVNSK.IPKACCVPTLTAISMLYDDENERWILKNYQDMVVEGCGC	399
<i>M. yessoensis</i> 虾夷扇贝	PPGYHAFYCHGCEPFPPLADHLNSTNHAIVQDLVNSVNSK.IPKACCVPTLTAISMLYDDENERWILKNYQDMVVEGCGC	449
<i>C. farreri</i> 栉孔扇贝	PPGYHAFYCHGCEPFPPLADHLNSTNHAIVQDLVNSVNSK.IPKACCVPTLTAISMLYDDENERWILKNYQDMVVEGCGC	405
<i>H. asinina</i> 耳鲍	PSEYNAFYCHGCEPFPPLADHLNSTNHAIVQDLVNSVNSK.IPKACCVPTLTAISMLYDDENERWILKNYQDMVVEGCGC	440
<i>Hsupertexta</i> 九孔鲍	PSEYNAFYCHGCEPFPPLADHLNSTNHAIVQDLVNSVNSK.IPKACCVPTLTAISMLYDDENERWILKNYQDMVVEGCGC	431
	p gy a yc g c fp h n t a vq lvns p cc pt l s ly de v lk	

图 2 BMP-2 氨基酸序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of BMP-2 amino acid sequences from different species

方框标注标注蛋白酶水解位点(RXXR), 单下划线标注 TGF- β 前肽区域, 双下划线标注成熟区域

Proteolytic processing sites (RXXR) are shown in boxes; the predicted TGF- β propeptide domain and the TGF- β superfamily domain are shown in single underline and double underline, respectively

2.2 BMP-2 基因氨基酸序列及系统进化分析

运用 NCBI 在线 Blastx 比对, 结果表明: 九孔鲍 BMP-2 氨基酸序列与耳鲍的氨基酸相似性最高, 为 98%, 与虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*)、小鼠 (*Mus musculus*) 和人类 (*Homo sapiens*) 等的相似性为 47%~60%。

基于 NJ 法构建 BMP-2 氨基酸序列系统进化树结果显示: 哺乳动物单独聚类为一簇, 鱼类和无脊椎动物先聚类随后聚在一起形成一簇。在无脊椎动物中, 九孔鲍、耳鲍; 栉孔扇贝、虾夷扇贝各聚为一支 (图 4)。

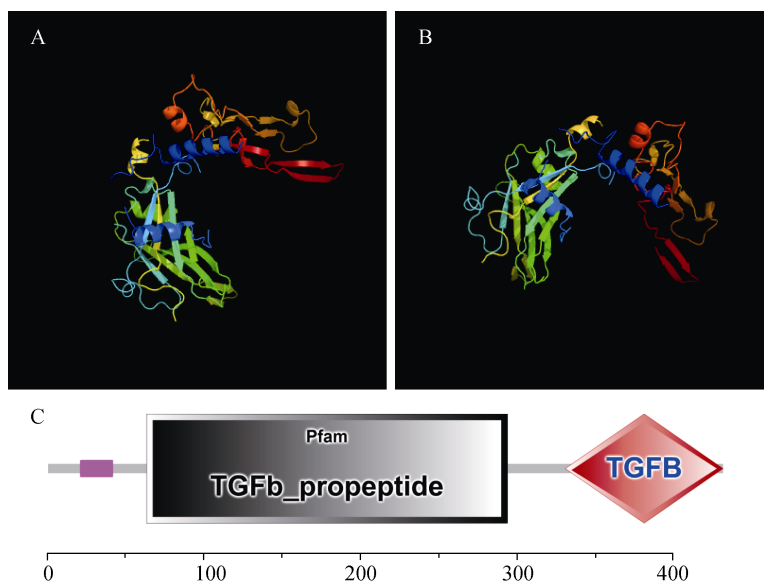


图 3 九孔鲍 *BMP-2* 基因三级结构(A)和结构域(C)

Fig. 3 The prediction of *BMP-2* tertiary structural (A) and structural domain (C) *H. diversicolor*

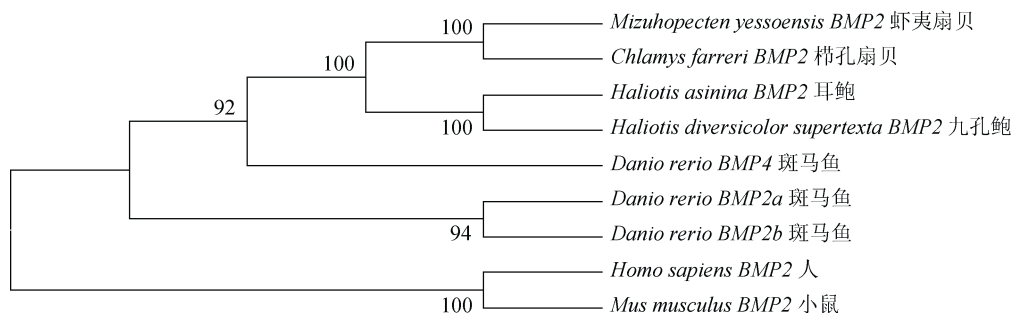


图 4 基于 NJ 法构建 *BMP-2* 氨基酸序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *BMP-2* was constructed using the neighbor-joining method

2.3 *BMP-2* 基因表达分析

通过荧光定量 PCR 分析 *HS-BMP-2* 基因在各组织和发育时期的表达水平, 结果显示: *BMP-2* 基因在九孔鲍成鲍的 6 个组织中均有表达, 其中, 足、右侧壳肌、外套膜及肝脏中高表达, 性腺、鳃中低表达 ($P < 0.05$, 图 5); 在检测的 7 个发育时期均有表达, *BMP-2* 基因在九孔鲍受精卵时期表达量最高, 其次是 4 细胞、8 细胞、原肠胚、稚鲍时期, 在卵、幼鲍时期表达量最低 ($P < 0.05$, 图 6)。

3 讨论

本文利用同源克隆的方法从九孔鲍外套膜中成功获得了 *BMP-2* 基因 cDNA 的全长, 其中开放阅读框(ORF)为 1299 bp, 编码 432 个氨基酸。序列分析结果显示 *HS-BMP-2* 氨基酸序列中具有 N 端信号肽、蛋白酶水解位点 RLRR(272~275aa)和 C 末端 7 个保

守的半胱氨酸残基, 具有 TGF- β 前肽区域和成熟肽区域两个典型的 TGF- β 结构域, 符合 TGF- β 超家族

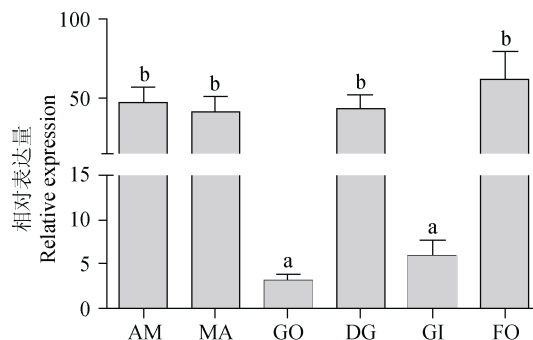


图 5 九孔鲍 *BMP-2* 基因组织表达情况

Fig. 5 The relative expression of *BMP-2* in different tissues AM: 右侧壳肌 MA: 外套膜 GO: 性腺 DG: 肝脏 GI: 鳃 FO: 足。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

AM: adductor muscle MA: mantle GO: gonad DG: digestive gland GI: gill FO: foot. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

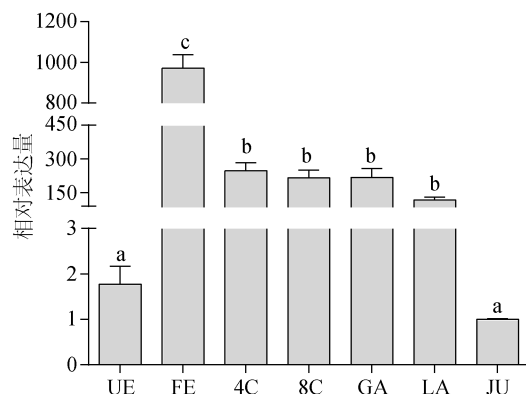


图 6 九孔鲍 *BMP-2* 不同发育时期表达情况

Fig. 6 The relative expression of *BMP-2* in different developmental stages

UE: 卵 FE: 受精卵 4C: 4 细胞 8C: 8 细胞 GA: 原肠胚 LA: 稚鲍 JU: 幼鲍。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

UE: unfertilized egg FE: fertilized egg 4C: 4-cell embryos 8C: 8-cell embryos GA: gastrulae LA: larvae JU: juvenile

蛋白典型结构特征, 这与在栉孔扇贝^[25]、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[26]等物种中的研究结果一致。多序列比对结果显示物种间 *BMP-2* 氨基酸序列具有较高的保守性, 九孔鲍与耳鲍的相似性最高, 为 98%, 且物种间 C 末端的蛋白酶水解位点和 7 个半胱氨酸残基高度保守, 这暗示着 *HS-BMP-2* 基因功能的保守。此外, 除保守的蛋白酶水解位点 RLRR(272~275aa)外, *HS-BMP-2* 氨基酸序列中还有一个蛋白酶水解位点 RTRR (304~307 aa), 为九孔鲍和耳鲍共有的位点, 该位点可能在九孔鲍中具有某种功能, 具体功能尚需进一步验证。系统进化树结果显示九孔鲍、耳鲍聚为一支, 表明 *HS-BMP-2* 基因与耳鲍亲缘关系较近。

本文 qRT-PCR 结果显示 *BMP-2* 基因在九孔鲍 6 个组织中均表达, 在足、右侧壳肌、外套膜及肝脏中表达量显著高于性腺和鳃 ($P < 0.05$)。研究表明, *BMP-2* 基因在贝类不同组织中的表达模式存在一定差异。譬如: *BMP-2/4* 基因在泥蚶 (*Tegillarca Granosa*) 的斧足、闭壳肌、外套膜中高表达, 在内脏团中低表达^[27]; *BMP-2* 的同源基因 *mGDF* 在长牡蛎的鳃、外套膜、肝脏中高表达, 在性腺、闭壳肌中低表达^[26]。*HS-BMP-2* 基因的表达模式与泥蚶、长牡蛎等贝类相似, 即在外套膜中高表达。通过原位杂交发现 *BMP-2* 基因在合浦珠母贝外套膜的外侧上皮和外褶内侧上皮高表达^[14], 这些部位是合成珍珠层的主要部位。外套膜是参与贝壳形成最重要的器官, 外套膜分泌物通过生物矿化形成贝壳。本文的上述研究结果表明: *BMP-2* 基因可能在九孔鲍贝壳形成中具有重要作

用。在不同发育时期, *HS-BMP-2* 基因在检测的 7 个时期均有表达, 在受精卵、4 细胞、8 细胞、原肠胚、稚鲍期的表达量显著高于卵、幼鲍期 ($P < 0.05$)。在栉孔扇贝中, *BMP-2* 基因在原肠胚高表达, 受精卵、4 细胞时期低表达^[25]; 在泥蚶中, *BMP-2/4* 基因在成熟卵、原肠胚、稚贝期均有较高表达^[27]; 在长牡蛎中, 从卵到原肠胚没有检测到 *mGDF* 基因的表达^[26], 贝类中这种复杂的表达模式暗示了 *BMP-2* 基因在胚胎发育过程中参与多种生理过程。面盘幼虫、稚贝时期等发育早期是贝壳形成的主要时期, 通过原位杂交发现在静水椎实螺和欧洲帽贝中 *DPP-BMP2/4* 在胚胎壳腺周围表达, 可能参与了贝壳区域边界的确定及贝壳形成过程^[19, 20]。*HS-BMP-2* 基因在原肠胚、稚鲍等发育早期高表达, 暗示该基因可能在九孔鲍早期贝壳形成发育中具有重要作用。

参考文献:

- [1] Kingsley D M. The TGF-B Superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms[J]. Genes & Development. 1994, (8): 133-146.
- [2] Urist M R. Bone: Formation by Autoinduction[J]. Science, 1965, 150(3698): 893-899.
- [3] 郭慧慧. 栉孔扇贝 TGF- β /Smad 信号通路基因的克隆、表达分析及生长性状相关 SNP 位点筛查[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012. Guo Hui Hui. TGF- β /Smad signaling pathway genes: molecular cloning, expression analysis and SNPs associated with growth traits in Zhikong scallop (*Chlamys Farreri*)[D]. Qindao: Ocean University of China, 2012.
- [4] Rahman M S, Akhtar N, Jamil H M, et al. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation[J]. Bone Research. 2015, 1(3): 11-30.
- [5] Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, et al. Bone morphogenetic proteins: A critical review[J]. Cellular Signalling. 2011, 23(4): 609-620.
- [6] Patricia D, Gerard K. The family of bone morphogenetic proteins[J]. Kidney International. 2000, 57(6): 2207-2214.
- [7] Carragee E J, Hurwitz E L, Weiner B K. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: Emerging safety concerns and lessons learned[J]. Spine Journal. 2011, 11(6): 471-491.
- [8] Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews. 1998, 9(1): 49-61.

- [9] Gill J, Connolly P, Roth M, et al. The effect of bone morphogenetic protein-2 on osteosarcoma metastasis[J]. PLoS One. 2017, 12(e01733223).
- [10] James A W, Lachaud G, Shen J, et al. A Review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2[J]. Tissue Engineering Part B-reviews. 2016, 22(4): 284-297.
- [11] Musgrave D S, Pruchnic R, Wright V, et al. The effect of bone morphogenetic protein-2 expression on the early fate of skeletal muscle-derived cells.[J]. Bone. 2001, 28(5): 499-506.
- [12] Amthor H, Christ B, Weil M, et al. The importance of timing differentiation during limb muscle development.[J]. Current Biology , 1998, 8(11): 642-652.
- [13] 刘刚, 郁聘, 刘保忠. 长牡蛎 Dpp 同源基因的克隆及其在贝壳发生中的功能研究[J]. 海洋科学. 2014, 38(9): 7-12.
Liu Gang, Xun Pin, Liu Baozhong. Clone of Dpp gene and its functions in larval shell formation of the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas*[J]. Marine Sciences. 2014, 38(9): 7-12.
- [14] Miyashita T, Hanashita T, Toriyama M, et al. Gene cloning and biochemical characterization of the BMP-2 of *Pinctada fucata*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2008, 72(1): 37-47.
- [15] 张岑. 合浦珠母贝贝壳形成相关蛋白及基因的研究[D]. 北京: 清华大学, 2006.
Zhang Cen. Studies on proteins and genes involved in the shell formation of *Pinctada fucata*[D]. Beijing: Tsinghua University, 2006.
- [16] 谢军. 间液蛋白在合浦珠母贝贝壳形成中的作用机制研究[D]. 北京: 清华大学, 2016.
Xie Jun. The mechanism study of extrapallial fluid protein in the shell formation of *Pinctada fucata*[D]. Beijing: Tsinghua University, 2016.
- [17] 郑哲. 基于多组学分析的马氏珠母贝矿化相关基因研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2017.
Zheng Zhe. The studies of biomineralization related genes based on multi-omic analysis in *Pinctada fucata martensii*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2017.
- [18] 周代志. 合浦珠母贝 Bmp3 和 Bmp10 基因的克隆与功能初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
Zhou Daizhi. Molecular Cloning and Preliminary Functional Studies of BMP3 and BMP10 Gene From Pearl Oyster, *Pinctada fucata*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [19] Nederbragt A J, van Loon A E, Dictus W. Expression of patella vulgata orthologs of engrailed and dpp-BMP2/4 in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism[J]. Developmental Biology, 2002, 246(2): 341-355.
- [20] Iijima M, Takeuchi T, Sarashina I, et al. Expression patterns of engrailed and Dpp in the gastropod *lymnaea stagnalis*[J]. Development Genes and Evolution, 2008, 218(5): 237-251.
- [21] Kin K, Kakoi S, Wada H. A novel role for Dpp in the shaping of bivalve shells revealed in a conserved molluscan developmental program[J]. Developmental Biology, 2009, 329(1): 152-166.
- [22] 高绪生, 王琦, 王仁波, 等. 鲍鱼[M]. 沈阳: 辽宁科学出版社, 2000: 11-29.
Gao Xusheng, Wang Qi, Wang Renbo, et al. Abalone[M]. Shenyang: Liaoning Science Press, 2000: 11-29.
- [23] 徐卫民, 吴德康. 杂色鲍的贝壳成分分析研究[J]. 时珍国药研究, 1997, 8(5): 28-29.
Xu Weimin, Wu Dekang. Ingredient analysis on the shell of *Haliotis diversicolor Reeve*[J]. Shi Zhen Journal of Traditional Chinese Medicine Research, 1997, 8(5): 28-29.
- [24] 冯政夫, 王琳, 李文侠, 等. 海洋无脊椎动物组织总 Rna 提取方法的探讨[J]. 海洋科学, 2014(11): 24-28.
Feng Zhengfu, Wang Lin, Li Wenxia, et al. Extraction of total RNA from marine invertebrate tissue[J]. Marine Sciences, 2014, (11): 24-28.
- [25] 封利颖, 郭慧慧, 李雪, 等. 栉孔扇贝骨形态发生蛋白 2 基因的克隆及表达分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 43(12): 48-55.
Feng Liying, Guo Huihui, Li Xue, et al. Cloning and expression analysis of bone morphogenetic protein 2 gene of *Chlamys farreri*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2013, 43(12): 48-55.
- [26] Lelong C, Mathieu M, Favrel P. Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor-beta superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*[J]. European Journal of Biochemistry. 2000, 267(13): 3986-3993.
- [27] 钱雪骏. 泥蚶 Smad1/5、BMP2/4 基因的克隆、表达分析及生长性状相关 SNP 位点筛选[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
Qian Xuejun. Cloning and spatiotemporal expression analysis of Smad1/BMP2/4 gene and growth traits related SNP screening in the *Tegillarca Granosa*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.

Molecular cloning and expression analysis of *BMP-2* cDNA in *Haliotis diversicolor supertexta*

AI Jia-lin¹, LI Zhi-min^{1, 2}, LIU Jian-yong¹, SHEN Yu-chun^{1, 2}

(1. Fisheries College Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Marine Ecology and Aquaculture Environment of Zhanjiang, Zhanjiang 524088, China)

Received: Jan. 21, 2018

Key words: *Haliotis diversicolor supertexta*; *BMP-2*; cDNA; molecular cloning

Abstract: This study was conducted to characterize and predict the function of the *BMP-2* gene of *Haliotis diversicolor supertexta*, an important aquaculture shellfish. The bone morphogenetic protein 2 (*Hs-BMP-2*) cDNA of *H. diversicolor supertexta* was cloned and characterized by the rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. The full-length *Hs-BMP-2* cDNA sequence consisted of 2572 bp containing a 5' untranslated region (UTR) of 123 bp, a 3' UTR of 1150 bp, and an open reading frame consisting of 1299 bp encoding a protein with 432 amino acid residues, whose calculated molecular mass was 48.59 ku and the theoretical isoelectric point was 9.84. The structure of *Hs-BMP-2* included a putative signal peptide (1–39 aa), a *TGF-β* propeptide domain (63–294 aa), and a conserved *TGF-β* domain (331–432 aa). Multiple sequence alignment results revealed conservation of the RLRR (272–275 aa) proteolytic site and seven conserved cysteines of *Hs-BMP-2* with *BMP-2* from other animals. Phylogenetic analysis revealed that the *Hs-BMP-2* gene was clustered in the same subgroup with *H. asinina*. Quantitative real-time PCR detection results indicated that the *Hs-BMP-2* gene was widely expressed in the adductor muscle, mantle, gonad, digestive gland, gill, and foot, with the highest expression level in the adductor muscle, mantle, foot, and digestive gland. The *Hs-BMP-2* transcript was widely detected in early developmental stages of the unfertilized egg, fertilized egg, 4-cell embryos, 8-cell embryos, gastrulae, larvae, and juvenile stage, with higher transcript levels being detected in the fertilized egg, 4-cell embryos, 8-cell embryos, larvae, and juvenile stage. These results indicate that *BMP-2* is involved in shell growth regulation of *H. diversicolor supertexta*.

(本文编辑: 梁德海)