

马百全, 刘吉英, 李平华, 等. 苏淮猪 *BMP4* 基因克隆、组织表达及真核表达[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 581-587.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.015

## 苏淮猪 *BMP4* 基因克隆、组织表达及真核表达

马百全<sup>1</sup>, 刘吉英<sup>1</sup>, 李平华<sup>1,2</sup>, 潘增祥<sup>1</sup>, 吴 艳<sup>3</sup>, 王钧顺<sup>3</sup>, 刘红林<sup>1</sup>, 李齐发<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学淮安研究院, 江苏 淮安 223005; 3. 淮阴种猪场, 江苏 淮安 223322)

**摘要:** 为了解苏淮猪 *BMP4* 基因的序列特征和表达特征, 本研究采用克隆测序技术获得苏淮猪 *BMP4* 基因编码区全序列, 利用生物信息学方法分析 *BMP4* 基因的序列特征, 采用 RT-PCR 技术检测 *BMP4* 基因在苏淮猪不同组织中的表达情况, 构建苏淮猪 *BMP4* 基因真核表达载体并利用 Western blot 技术检测 *BMP4* 真核表达载体的表达情况。结果显示苏淮猪 *BMP4* 基因编码区序列长度为 1 230 bp, 编码 409 个氨基酸, 与其他哺乳动物氨基酸序列的一致性均在 97% 以上; 苏淮猪 *BMP4* 编码蛋白含有典型的 TGF- $\beta$  前肽和 TGF- $\beta$  样结构域; *BMP4* 基因在苏淮猪卵巢组织中高表达; 成功构建苏淮猪 *BMP4* 基因真核表达质粒 pcDNA3.1-*BMP4*, 转染后可显著上调猪卵巢颗粒细胞 *BMP4* 蛋白表达水平。

**关键词:** 苏淮猪; *BMP4*; 表达模式; 真核表达

**中图分类号:** S828 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0581-07

## Cloning, expression profile and eukaryotic expression of *BMP4* gene in Suhuai swine

MA Bai-quan<sup>1</sup>, LIU Ji-ying<sup>1</sup>, LI Ping-hua<sup>1,2</sup>, PAN Zeng-xiang<sup>1</sup>, WU Yan<sup>3</sup>, WANG Jun-shun<sup>3</sup>,  
LIU Hong-lin<sup>1</sup>, LI Qi-fa<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Huai'an Academy of Nanjing Agricultural University, Huai'an 223005, China; 3. Huaiyin Pig Breeding Farm, Huai'an 223322, China)

**Abstract:** The coding sequence of Suhuai pig *BMP4* gene obtained by cloning and sequencing was analyzed by bioinformatics and the expression patterns were identified by RT-PCR. The full length coding region of *BMP4* was 1 230 bp in length, encoding a protein with 409 amino acids which shared more than 97% similarities with other mammals. *BMP4* protein of Suhuai pig contained TGF- $\beta$  propeptide and TGF- $\beta$  domain. RT-PCR assays showed that *BMP4* is widely expressed in tissues and organs. *BMP4* protein level was upregulated in porcine ovarian granulosa cells transfected with recombinant plasmid pcDNA3.1-*BMP4*. The results laid a foundation for investigation on the role of *BMP4* in porcine follicular development.

**Key words:** Suhuai swine; *BMP4*; expression pattern; eukaryotic expression

收稿日期: 2016-02-25

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[SCX(12)2097]

作者简介: 马百全(1989-), 男, 河南濮阳人, 硕士研究生, 主要从事动物分子遗传研究。(E-mail) mbq8908@126.com

通讯作者: 李齐发, (E-mail) liqifa@njau.edu.cn

骨形态发生蛋白 4 (Bone morphogenetic protein 4, BMP4) 是 TGF- $\beta$  超家族骨形态发生蛋白亚家族的重要成员之一<sup>[1-2]</sup>, 在哺乳动物卵巢卵泡生长发育过程中发挥着重要的调节作用, 是卵泡生长发育过程中的必要促进因子<sup>[3-4]</sup>。BMP4 在哺乳动物卵

巢组织中高表达,在卵泡发育的各个阶段均能检测到 BMP4 蛋白的存在<sup>[5-6]</sup>。在卵巢组织中,BMP4 主要在卵泡膜细胞中表达<sup>[7]</sup>,在生殖激素合成、卵泡发育、颗粒细胞功能发挥、排卵等方面均发挥重要作用<sup>[8]</sup>。BMP4 可抑制颗粒细胞中孕酮<sup>[7,9]</sup>和雄激素<sup>[10]</sup>的产生,而对雌激素合成无影响<sup>[9]</sup>,进一步研究发现 BMP4 主要通过调节类固醇激素生成通路中关键酶如 *StAR* 等来抑制颗粒细胞中孕酮和雄激素的产生<sup>[10-11]</sup>。研究发现在牛卵巢卵泡中 BMP4 通过非 Smad 依赖途径的 PI3K/PDK-1/PKC 通路来抑制颗粒细胞凋亡,从而使生长卵泡免于发生闭锁<sup>[12-13]</sup>。BMP4 基因在哺乳动物生殖活动中的作用多有报道,但尚无关于 BMP4 在卵巢颗粒细胞中作用的相关报道。本研究拟以苏淮猪为研究对象,采用克隆测序技术获得苏淮猪 BMP4 基因编码区全序列,通过组织表达谱分析了解 BMP4 基因在苏淮猪不同组织中的表达情况,构建苏淮猪 BMP4 基因编码区真核表达载体,以期为进一步探讨 BMP4 基因在猪卵巢颗粒细胞中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

健康成年苏淮猪母猪( $n=3$ )来自江苏省淮安市淮阴种猪场,屠宰后立即采集心脏、肌肉、卵巢、肝脏、肾脏、脾脏 6 种组织,置于液氮中保存,用于提取组织总 RNA。猪卵巢颗粒细胞分离自南京天环屠宰场,采取卵巢组织样,立即置于 37℃ 生理盐水中,带回实验室后,用于抽取卵巢颗粒细胞,进行细胞培养实验。*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  菌株购于天根生化科技有限公司,用于克隆转化与扩增。pcDNA3.1 由本实验室保存,用于构建 BMP4 基因真核表达载体。

### 1.2 总 RNA 提取和反转录

采用 Trizol (Invitrogen 公司) 提取法提取苏淮猪各组织总 RNA。以总 RNA 为模板,以 OligodT 为引物,按照快速反转录试剂盒 (TaKaRa) 说明书进行反转录。cDNA 产物于 -20℃ 保存备用。

### 1.3 引物设计

根据猪 BMP4 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号: NM\_001101031.2), 利用 Primer5.0 软件设计引物,其中编码区扩增和真核表达载体构建用引物 (P1) 序列,上游引物: 5'-CTAGCTAGCGCAGCTCCT-

CTGAGCCTTT-3', 下游引物: 5'-CGGGGTACCCAGCTATAAGGAAGCGGTCT-3' (斜体部分分别为 *Nhe* I 和 *Kpn* I 酶切位点), 预期扩增产物为 1 421 bp; qRT-PCR 用引物 (P2) 序列, 上游引物: 5'-CCTGGTAACCGAATGCTGAT-3', 下游引物: 5'-CGGTAAAGATCCGCATGTA-3', 预期扩增产物为 257 bp。内参基因 *GAPDH* 的定量用引物 (P3) 序列, 上游引物: 5'-GGACTCATGACCACGGTCCAT-3', 下游引物: 5'-TCAGATCCACAACCGACACGT-3', 扩增片段为 246 bp。引物由 Invitrogen 公司合成。

### 1.4 克隆测序

以苏淮猪卵巢组织 RT-PCR 产物 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应程序为: 98℃ 预变性 30 s; 98℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 34 个循环; 72℃ 再延伸 7 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, Tanon-3500 凝胶成像系统拍照。采用胶回收试剂盒 (Axygen 公司生产) 进行琼脂糖胶回收。回收产物与 pMD19-T vector (TaKaRa 公司生产) 连接, 并转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 挑取阳性克隆, 采用质粒提取试剂盒 (Axygen 公司生产) 提取质粒, 由 Invitrogen 公司进行双向测序。

### 1.5 序列分析

苏淮猪 BMP4 基因编码区序列分析方法和所用软件参见文献 [14]。用于系统发育分析的其他物种序列均来自 GenBank 数据库, 分别为: 人 (*Homo sapiens*; NC\_000014.9), 牛 (*Bos taurus*; AC\_000167.1), 绵羊 (*Ovis aries*; NC\_019464.1), 猪 (*Sus scrofa*; NC\_010443.4), 小鼠 (*Mus musculus*; NC\_000080.6), 大鼠 (*Rattus norvegicus*; NC\_005114.4), 苏门答腊猩猩 (*Pongo abelii*; NC\_012605.1), 阿努比斯狒狒 (*Papio anubis*; NC\_018158.1), 马 (*Equus caballus*; NC\_009167.2), 恒河猴 (*Macaca mulatta*; NC\_007864.1) 和鸡 (*Gallus gallus*; NC\_006092.3)。

### 1.6 苏淮猪 BMP4 基因真核表达载体构建

用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Kpn* I 分别酶切引物 P1 的 PCR 回收产物, 纯化后与经相同酶切的真核表达载体 pcDNA3.1 连接, 并转化到感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 在含有 100 mg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养。采用质粒提取试剂盒提取质粒, 双酶切 (*Nhe* I/*Kpn* I) 法鉴定重组质粒, 并进行测序验证。

### 1.7 猪卵巢颗粒细胞分离、培养和转染

采集新鲜卵巢, 置于 37℃ 无菌生理盐水中运回

实验室。用注射器抽取直径为 3~5 mm 卵泡中颗粒细胞。PBS 清洗颗粒细胞,用 1ml DMEM/F-12 培养基重悬细胞,接种于 25 ml 培养瓶,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。2~3 d 换 1 次液,当细胞汇合度达到 80%时,将细胞传至 6 孔板;待孔内细胞贴壁达到 80%左右做转染试验。采用 lip2000 脂质体法做转染试验。转染分对照组和试验组:试验组加入 pcDNA3.1-BMP4 重组质粒,对照组加入 pcDNA3.1 空载质粒;4~6 h 后换成含有体积分数为 15%胎牛血清、1%双抗的 DMEM/F-12 培养基继续进行培养。

### 1.8 Western blotting 分析

转染质粒后的卵巢颗粒细胞在 CO<sub>2</sub>培养箱中培养 48 h 后,收集细胞并用含有苯甲基磺酰氟(PMSF)的蛋白裂解液收集细胞总蛋白。收集到的 2 个处理组的颗粒细胞总蛋白用 SDS-PAGE 进行凝胶分离,90 V、90 min 恒压转印至 PVDF 膜上。转印后,5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。一抗孵育,4 ℃过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,室温孵育二抗 2 h。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,显色仪上显色拍照。采用 SPSS11.0 软件进行数据分析。

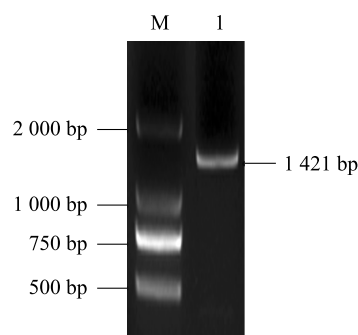
## 2 结果与分析

### 2.1 苏淮猪 *BMP4* 基因 PCR 扩增

利用引物 P1 扩增出 1 421 bp 片段(图 1),发现与预期扩增产物大小一致,与猪 *BMP4* (GenBank NO. NC\_010443.4)序列的一致性为 98.88%,说明目的片段为苏淮猪 *BMP4* 基因。

### 2.2 苏淮猪 *BMP4* 基因核苷酸序列分析

开放阅读框(ORF)预测发现苏淮猪 *BMP4* 基因编码区序列全长 1 230 bp(图 2),由 285 个碱基 A(占 23.17%)、353 个碱基 C(占 28.70%)、346 个碱基 G(占 28.13%)和 246 个碱基 T(占 20.00%)组成,其中 G、C 含量(56.83%)明显高于 A、T 含量(43.17%)。序列比对分析发现苏淮猪 *BMP4* 基因编码区核苷酸序列与人、小鼠、马、牛、羊等哺乳动物的一致性分别为 95.45%、91.46%、94.39%、95.93%、95.93%,但与鸡的一致性仅为 77.00%。基因组分析发现苏淮猪 *BMP4* 基因定位在猪 1 号染色体上,位于 203 773~203 781 kb。



M: DNA Marker DL2000; 1: PCR 扩增产物。

图 1 苏淮猪 *BMP4* 基因 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.1 Amplification profile of *BMP4* gene in Suhuai pig by PCR

### 2.3 苏淮猪 *BMP4* 蛋白氨基酸序列分析

苏淮猪 *BMP4* 基因编码一个含有 409 个氨基酸残基的蛋白(图 2),其中酸性氨基酸(Asn、Asp、Gln、Glu)83 个,碱性氨基酸(Arg、His、Lys)73 个,负电荷氨基酸(Asp、Glu)46 个,正电荷氨基酸(Arg、Lys)50 个。20 种常见氨基酸残基在苏淮猪 *BMP4* 蛋白中均存在,但频率不同,其中亮氨酸(Leu)使用频率最高(出现 39 次,占 9.5%),色氨酸(Trp)使用频率最低(仅出现 6 次,占 1.5%)。序列比对发现苏淮猪 *BMP4* 蛋白氨基酸序列与人、小鼠、马、牛、羊等哺乳动物的一致性分别为 98.29%、97.56%、97.31%、98.53%、98.53%,但与鸡的一致性仅为 83.25%。理化性质分析结果显示苏淮猪 *BMP4* 蛋白质分子质量为 46 680,理论等电点为 8.57,疏水性均值为 -0.565,具有较强的亲水性;信号肽序列为 MIPGN-RMLMVLLCQVLLGGASHA。蛋白质功能域分析显示苏淮猪 *BMP4* 蛋白含有 TGF- $\beta$  前肽和 TGF- $\beta$  样结构域,分别位于第 13~276 位、第 309~409 位氨基酸残基(图 2)。三级结构预测(图 3)发现苏淮猪 *BMP4* 蛋白三级结构主要由 4 个  $\alpha$ -螺旋和 8 个  $\beta$ -折叠组成,另外还观察到  $\beta$  转角和  $\Omega$  环结构的存在。

### 2.4 哺乳动物 *BMP4* 系统发育分析

苏淮猪等 10 个哺乳动物 *BMP4* 基因编码区核苷酸序列含有保守位点 1 051 个,多态位点 182 个,多态位点百分率为 14.76%,核苷酸多样性( $\pi$ )为 0.052 3,平均核苷酸差异数目( $k$ )为 64.36。在哺乳动物 *BMP4* 基因编码区核苷酸序列变异中插入/缺失和碱基替换等变异类型均存在,其中灵长类和啮齿类物种 *BMP4* 基因编码区长度为 1 227 bp,而

```

1 ATGATTCTGGTAACCAATGCTGATGGTCGTTTTATTATGCCAAGTCTGCTAGGAGGCGCGAGCCATGCTAGTTTGATACCTGAGACG
1 M I P G N R M L M V V L L C Q V L L G G A S H A S L I P E T
91 GGGAGAAAAAGTCGCCGAGATTCAGGGCCACGCGGGAGGACGCCGCTCAGGGCAGAGCCATGAGCTCCTTCGGGACTTCGAGGCTACA
1 G K K K V A E I Q G H A G G R R S G Q S H E L L R D F E A T
181 CTTCTGCAGATGTTTCGGGCTGCGTCGCGCCCGCAGCCTAGCAAGAGCGCGTCATCCAGATTACATGCGGGATCTTTACCGGCTTCAG
61 L L O M F G L R R R P Q P S K S A V I P D Y M R D L Y R L Q
271 TCTGGAGAGGAGGAGGAGGAAGAGCAGACCCACAGCGTTGGTCTCGAGTATCCCGAGCGCCTGCCAGTCGGGCCAACACCGTGAGAAGC
91 S G E E E E E E Q T H S V G L E Y P E R P A S R A N T V R S
TGF-beta propeptide
361 TTCCACCACGAAGAATCTGGAGAATCTCCAGGAGGACCGAGCAAACTCTGCTTTTCGTTCTCTTTAACCTCAGCAGCATCCAGAG
121 F H H E E H L E N I P G T S E N S A F R F L F N L S S I P E
451 AACGAGGTGATCTATCCGACAGAGCTTCGACTCTTCGGGAGCAGGTGGACAGGGCCCTGACTGGGAGCAGGGCTTCCATCGTATAAAC
151 N E V I S S A E L R L F R E Q V D Q G P D W E Q G F H R I N
541 ATTTATGAGGTTATGAAGCCCCCACCAGAAGTGGTGCTGGACACTCATCACAGACTACTGGACACGAGACTGGTCCACCACATGTG
181 I Y E V M K P P P E V V P G H L I T R L L D T R L V H H N V
631 ACACGGTGGGAACTTTTGATGTGAGCCCTGCGGTCTTCGCTGGACCCGGGAGAAGCAGCCAACTATGGGCTGGCCATTGAGGTGACC
211 T R W E T D V S P A V L R W T R E K Q P N Y G L A I E V T
721 CACCTCCATCAGACACGGACCCACGAGGCCAGCATGTCAGGATTAGCCGATCGTTACCTCAAGGGAGTGGGGACTGGGCCACGCTCCGG
241 H L H Q T R T H Q G Q H V R I S R S L P Q G S G D W A Q L R
811 CCCCTCTGGTCACATTTGGCCATGATGGCCGGGACATGCCTTGACCCGACGCCGAGGGCCAAAGCTAGCCCCAACGATCACCCACAG
271 P L L V T F G H D G R G H A L T T R R R R A K R S P K H H P Q
901 AGGGCTCGGAAGAAGAATAAGAACTGCCGGGCCCACTCGCTCTATGTGGACTTCAGTGACGTGGGCTGGAATGACTGGATTGTGGCTCCA
301 R A R K K N K N C R R H S L Y V D F S D V G W N D W I V A P
991 CCAGGCTACCAGGCTTCTACTGCCATGGGACTGCCCTTTCAGTGGCTGACCACCTCAACTCAACCAATCATGCCATCGTTAGACAC
331 P G Y Q A F Y C H G D C P F P L A D H L N S T N H A I V Q T
1 081 CTGGTCAACTCTGTTAATCCAGTATCCCAAGCCTGTTGTGTGCCCAAGTGAAGTGCATCTCCATGCTATACCTGGATGAGTAT
361 L V N S V N S S I P K A C C V P T E L S A I S M L Y L D E Y
1 171 GACAGGTGGTACTGAAAAATTATCAGGAGATGGTAGTAGAGGATGTGGTTGCCGCTGA 1 230 TGF-beta like domain
391 D K V V L K N Y Q E M V V E G C G C R *

```

虚线为 TGF- $\beta$  propeptide 结构域;实线为 TGF- $\beta$  样结构域; \* 为终止密码子。

图2 苏淮猪 *BMP4* 编码区核苷酸序列及预测氨基酸序列

Fig.2 Coding sequence and predicted amino acid sequence of *BMP4* gene in Suhui pig

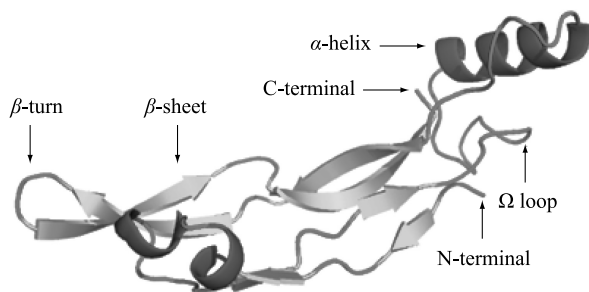


图3 苏淮猪 *BMP4* 蛋白三级结构

Fig.3 The three-dimensional structure of *BMP4* protein in Suhui pig

其他物种均为1 230 bp。在碱基替换中,碱基转换和碱基颠换均有发现,其中转换( $T_s$ )为47次,颠换( $T_v$ )为17次,转换颠换比值( $T_s/T_v$ )为2.80,明显大于转换颠换比临界值(2.0),说明哺乳动物 *BMP4* 基因的突变尚未达到饱和状态。哺乳动物 *BMP4* 基因编码区的同义替代数为0.230 8 $\pm$ 0.019 1,非同义替代数为0.009 3 $\pm$ 0.000 8,非同义替代数/同义替代数比值为0.040 1,极显著小于1,说明哺乳动物 *BMP4* 基因在进化过程中受负选择的影响。根据

*BMP4* 基因编码区序列,采用邻接法构建了哺乳动物系统发育树(图4)。从图4中可以看出哺乳动物10个物种聚为一类,外类群鸡单独聚为一类;而在哺乳动物中,灵长目(苏门答腊猩猩、人、阿努比斯狒狒和恒河猴)、偶蹄目(苏淮猪、牛和绵羊)、啮齿目(小鼠和大鼠)和奇蹄目(马)各自聚为一类,与经典分类法一致。

## 2.5 苏淮猪 *BMP4* 基因组织表达分析

以 *GAPDH* 为内参,采用 RT-PCR 方法对苏淮猪心脏、肌肉、卵巢、肝脏、肾脏、脾脏6种组织 *BMP4* 基因 mRNA 表达进行检测,结果见图5。从图5可见,*BMP4* 基因 mRNA 在苏淮猪心脏、肌肉、卵巢、肝脏、肾脏、脾脏组织中均有表达,其中在心脏、肌肉、卵巢和肾脏组织中高表达,而在肝脏和脾脏组织中低表达。

## 2.6 苏淮猪 *BMP4* 基因真核表达载体构建与鉴定

为了构建苏淮猪 *BMP4* 基因真核表达载体,我们将引物 P1 扩增产物用 *Nhe* I 和 *Kpn* I 进行双酶切,克隆到真核表达载体 pcDNA3.1 中,并转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。提取质粒进行双酶切鉴定,结果显示目的片段已连接到载体中(图6);质粒测



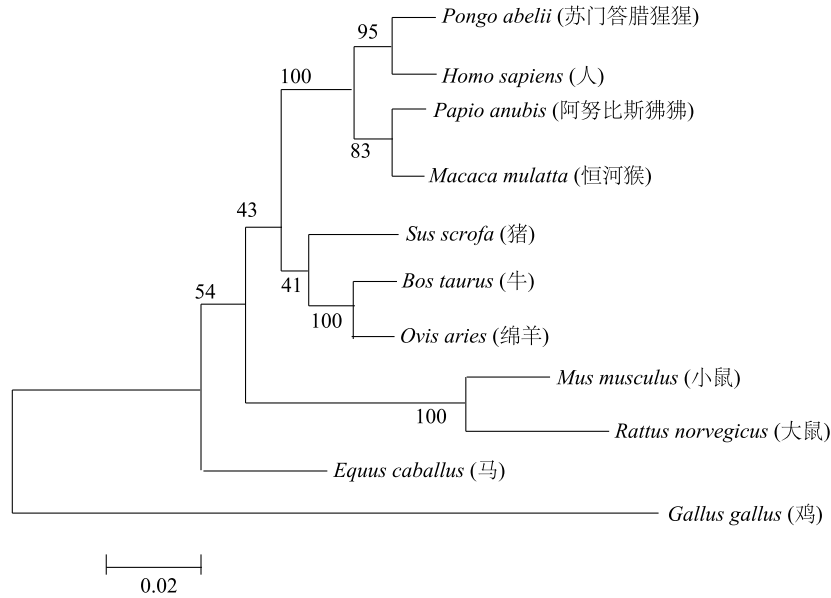
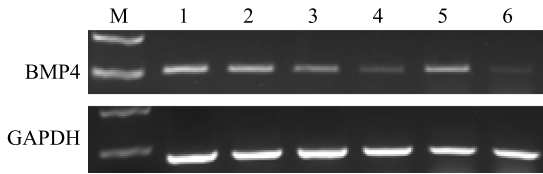


图4 基于 *BMP4* 基因编码区序列的哺乳动物系统发育树

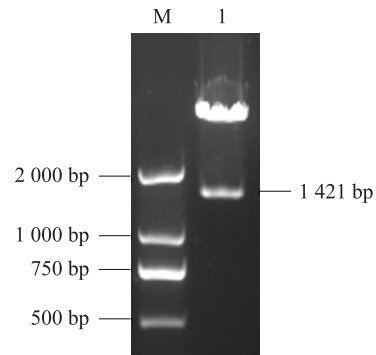
Fig.4 Mammalian phylogenetic tree based on the coding sequence of *BMP4* gene



M:Marker;1:心脏;2:肌肉;3:卵巢;4:肝脏;5:肾脏;6:脾脏。

图5 苏淮猪 *BMP4* 基因组织表达谱分析

Fig.5 The tissue expression pattern of *BMP4* gene in Suhuai pig



M:DNA Marker DL2000;1:重组质粒酶切产物。

图6 重组质粒 pcDNA3.1-*BMP4* 鉴定

Fig.6 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1-*BMP4*

序比对发现连接到载体中的目的片段序列完全正确,说明苏淮猪 *BMP4* 基因真核表达载体构建成功,并命名为 pcDNA3.1-*BMP4*。

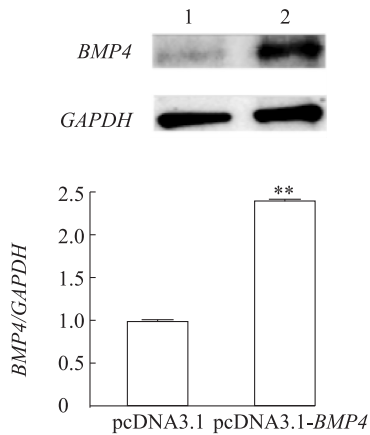
### 2.7 苏淮猪 pcDNA3.1-*BMP4* 重组质粒在卵巢颗粒细胞中的表达

将空载 pcDNA3.1 和重组质粒 pcDNA3.1-*BMP4* 分别转染体外培养的猪卵泡颗粒细胞,Western blotting 分析发现转染重组质粒 pcDNA3.1-*BMP4* 组的颗粒细胞23 000处出现明显 *BMP4* 蛋白条带(图7),说明 pcDNA3.1-*BMP4* 重组质粒可在猪卵巢颗粒细胞中表达。

## 3 讨论

骨形态发生蛋白 BMPs 是 TGF- $\beta$  超家族中最大

的一个亚家族<sup>[15]</sup>。在哺乳动物体内,BMP 是前体蛋白形式合成的,它的前体一般由 400~500 个氨基酸残基组成,包括 N 端信号肽、前蛋白区和 C 端成熟肽 3 个部分<sup>[16]</sup>。本研究以苏淮猪为研究对象,通过克隆测序技术获得苏淮猪 *BMP4* 基因编码区全序列,同源性比对发现苏淮猪 *BMP4* 基因编码区核苷酸序列与哺乳动物其他物种高度保守,与 Zhang 等<sup>[17]</sup>、韦涛<sup>[18]</sup> 的研究结果相一致。在基因组结构上,苏淮猪 *BMP4* 基因与哺乳动物其他物种如人<sup>[1,19]</sup>、小鼠<sup>[20]</sup> 和羊<sup>[18]</sup> 等一样,编码区仅由 2 个外显子构成。另外,BMP4 前体蛋白由 409 个氨基酸



1:转染 pcDNA3.1 空载体质粒组;2:转染 pcDNA3.1-BMP4 重组质粒组。\*\*表示差异达到极显著( $P<0.01$ )。

图7 苏淮猪 pcDNA3.1-BMP4 重组质粒在卵巢颗粒细胞中的表达

Fig.7 The expression of recombinant plasmid-pcDNA3.1-BMP4 in ovarian granulosa cells of Suhuai pig

残基组成,含有典型的 TGF- $\beta$  前肽和 TGF- $\beta$  样结构域,这与哺乳动物其他物种如牛<sup>[21]</sup>、羊<sup>[18]</sup> BMP4 蛋白是一致的。苏淮猪 BMP4 基因与其他哺乳动物在序列(包括核苷酸和氨基酸)等方面均具有较高的一致性,说明哺乳动物 BMP4 基因在进化过程中高度保守。Shimasaki 等<sup>[3]</sup>通过基因敲除方法也证实了 BMP4 基因在哺乳动物进化过程中的保守性和不可或缺性。

在哺乳动物中,BMP4 是一个多功能生长因子,在机体发育分化,组织和器官形成,细胞增殖及免疫反应等诸多生物过程中起着重要作用<sup>[14, 22-23]</sup>。本研究发现苏淮猪 BMP4 基因在所检测的组织中均有表达,特别是在心脏、肌肉、卵巢和肾脏组织中高表达,而在肝脏和脾脏组织中低表达,这与王峰<sup>[21]</sup>、田蕾<sup>[24]</sup>、Xu 等<sup>[25]</sup>在哺乳动物其他物种中的研究结果基本一致。石晓卫<sup>[26]</sup>研究发现 BMP4 基因在黄淮山羊肾脏中表达量最高,其次为脾脏、肝脏和卵巢,而在胰腺、肺脏、心脏中的表达量较低。王峰<sup>[21]</sup>、田蕾<sup>[24]</sup>分析发现 BMP4 在牛卵巢中高度表达,在子宫中的表达量相对较高,而在输卵管和肾脏中表达量较低。Xu 等<sup>[25]</sup>研究发现 BMP4 在检测的 11 个湖羊组织中均有表达,特别是在卵巢等组织中高表达。哺乳动物卵巢组织中 BMP4 基因的高表达与其在卵巢功能中发挥的重要作用是一致的。La 等<sup>[27]</sup>研究

结果证实 BMP4 在牛卵母细胞成熟和胚胎发育过程中具有重要调控作用,是个体发育不可缺少的调控因子。BMP4 对各级卵泡发育均具有一定的调节作用<sup>[28]</sup>,不仅可促进原始卵泡存活和发育<sup>[4, 29]</sup>,还可增加体外培养的绵羊卵泡和卵母细胞大小<sup>[9]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] WOZNEY J M, ROSEN V, CELESTE A J, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities [J]. Science, 1988, 242(4885): 1528-1534.
- [2] NIO-KOBAYASHI J, TRENDLELL J, GIAKOMELOU S, et al. Bone morphogenetic proteins are mediators of luteolysis in the human corpus luteum. human corpus luteum [J]. Endocrinology, 2015, 156(4): 1494-1503.
- [3] SHIMASAKI S, MOORE R K, OTSUKA F, et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction [J]. Endocr Rev, 2004, 25(1): 72-101.
- [4] NILSSON E E, SKINNER M K. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development [J]. Biol Reprod, 2003, 69(4): 1265-1272.
- [5] LI M, CHEN Q, SUN G, et al. Characterization and expression of bone morphogenetic protein 4 gene in postnatal pigs [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(5): 2369-2377.
- [6] TANWAR P S, MCFARLANE J R. Dynamic expression of bone morphogenetic protein 4 in reproductive organs of female mice [J]. Reproduction, 2011, 142(4): 573-579.
- [7] SHIMASAKI S, ZACHOW R J, LI D, et al. A functional bone-morphogenetic protein system in the ovary [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(13): 7282-7287.
- [8] CHANG H M, CHENG J C, FANG L, et al. Recombinant BMP4 and BMP7 downregulate pentraxin 3 in human granulosa cells [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(3): E365-E374.
- [9] BERTOLDO M J, DUFFARD N, BERNARD J, et al. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex [J]. Anim Reprod Sci, 2014, 149(3-4): 124-134.
- [10] DOOLEY C A, ATTIA G R, RAINEY W E, et al. Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(9): 3331-3337.
- [11] YAMASHITA H, MURAYAMA C, TAKASUGI R, et al. BMP-4 suppresses progesterone production by inhibiting histone H3 acetylation of STAR in bovine granulosa cells *in vitro* [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 348(1-2): 183-190.
- [12] KAYAMORI T, KOSAKA N, MIYAMOTO A, et al. The differential pathways of bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 in the suppression of the bovine granulosa cell apoptosis [J]. Mol Cell Biochem, 2009, 323(1-2): 161-168.

- [13] SHIMIZU T, KAYAMORI T, MURAYAMA C, et al. Bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-7 suppress granulosa cell-apoptosis via different pathways: BMP-4 via PI3K/PDK-1/Akt and BMP-7 via PI3K/PDK-1/PKC [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(2): 869-873.
- [14] 姚 勇, 潘增祥, 张久峰, 等. 二花脸猪 *NR5A2* 基因克隆与卵巢组织转录水平分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36(3): 133-138.
- [15] BRAZIL D P, CHURCH R H, SURAE S, et al. BMP signalling: agony and antagonism in the family [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(5): 249-264.
- [16] XIAO Y T, XIANG L X, SHAO J Z. Bone morphogenetic protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(3): 550-553.
- [17] ZHANG D J, WU J H, HUSILE G, et al. Sequence variation and molecular evolution of *BMP4* genes [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(4): 9196-9201.
- [18] 韦 涛. 湖羊 *BMP4* 基因克隆、表达与多态性分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [19] SHORE E M, XU M, SHAH P B, et al. The human bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) gene: molecular structure and transcriptional regulation [J]. *Calcif Tissue Int*, 1998, 63(3): 221-229.
- [20] KURIHARA T, KITAMURA K, TAKAOKA K, et al. Murine bone morphogenetic Protein-4 gene: existence of multiple promoters and exons for the 5'-untranslated region [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192(3): 1049-1056.
- [21] 王 峰. 蒙古牛骨形态发生蛋白 (BMPs) 基因克隆和组织表达研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
- [22] MORRELL N W, BLOCH D B, TEN DIJKE P, et al. Targeting BMP signalling in cardiovascular disease and anaemia [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2016, 13(2): 106-120.
- [23] YANG Y, ADACHI K, SHERIDAN M A, et al. Heightened potency of human pluripotent stem cell lines created by transient BMP4 exposure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(18): E2337-E2346.
- [24] 田 蕾. 骨形态发生蛋白 (BMPs) 基因 mRNA 在牛不同组织中表达的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
- [25] XU Y, LI E, HAN Y, et al. Differential expression of mRNAs encoding BMP/Smad pathway molecules in antral follicles of high- and low-fecundity Hu sheep [J]. *Anim Reprod Sci*, 2010, 120(1-4): 47-55.
- [26] 石晓卫. 黄淮山羊 *BMP4* 基因的克隆与表达 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.
- [27] LA R I, CAMARGO L, PEREIRA M M, et al. Effects of bone morphogenic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on *in vitro* maturation and culture of bovine preimplantation embryos [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 9: 18.
- [28] AL-SAMERRIA S, AL-ALI I, MCFARLANE J R, et al. The impact of passive immunisation against BMPRII and BMP4 on follicle development and ovulation in mice [J]. *Reproduction*, 2015, 149(5): 403-411.
- [29] DING X, ZHANG X, MU Y, et al. Effects of BMP4/SMAD signaling pathway on mouse primordial follicle growth and survival via up-regulation of *Sohlh2* and *c-kit* [J]. *Mol Reprod Dev*, 2013, 80(1): 70-78.

(责任编辑: 陈海霞)