

龙石太,胡亮,吴宪红,等. 川中黑山羊 *BMP2*、*BMP4* 基因 cDNA 克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):19-23.

川中黑山羊 *BMP2*、*BMP4* 基因 cDNA 克隆及生物信息学分析

龙石太,胡亮,吴宪红,字向东

(动物遗传育种学国家民委-教育部共建重点实验室/西南民族大学,四川成都 610041)

摘要:参照 GenBank 已公布的绵羊 *BMP2* 基因序列与牛 *BMP4* 基因序列分别设计一对引物,以川中黑山羊卵巢总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 技术扩增川中黑山羊 *BMP2* 基因和 *BMP4* 基因的 cDNA 序列并进行克隆、测序及相关生物信息学分析。结果表明,川中黑山羊 *BMP2* 基因编码区全长为 1 188 bp (GenBank 登录号为 KF492982),*BMP4* 基因编码区全长为 1 230 bp (GenBank 登录号为 KF492983),分别编码 395、409 个氨基酸。川中黑山羊与绵羊、牛、猪、人、马、鼠、鸡 *BMP2* 基因编码区序列的同源性分别为 99.7%、98.7%、92.0%、89.6%、91.4%、86.1%、78.9%;川中黑山羊与绵羊、牛、猪、人、马、鼠、鸡 *BMP4* 基因编码区序列的同源性分别为 99.3%、99.1%、95.9%、95.2%、94.4%、92.0%、80.1%。用 MEGA 4.0 构建物种间分子系统进化树,结果显示,*BMP2* 基因和 *BMP4* 基因的聚类反应基本一致,川中黑山羊首先与绵羊聚类,再分别与牛、猪、马、人和鼠聚类,最后与鸡聚类,这与动物分类学基本吻合。

关键词:川中黑山羊;*BMP2* 基因;*BMP4* 基因;克隆;生物信息学

中图分类号:S827.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)03-0019-04

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 是转化生长因子 β (TGF- β) 超家族中最大的亚族,是 Urist 等于 1965 年从脱钙骨基质中分离得到的一种有活性的蛋白质,并利用该蛋白质成功诱导了异位成骨^[1],所以命名为骨形态发生蛋白。许多研究表明,BMPs 不仅能诱导骨及软骨的形成、分化,而且能影响脊椎动物的神经细胞、造血组织、眼睛、肾和上皮附属器官的形成、器官发生以及组织定型与重塑等^[2]。BMPs 在动物大部分组织中均有表达,在机体的许多生命活动中发挥作用,所以关于 BMPs 的研究越来越受到重视。有研究发现,BMPs 与雌性动物的繁殖机能相关,通过旁分泌/自分泌调节作用对卵巢进行调节,从而调节卵泡发育^[3-4]。也有研究表明,*BMP4* 可以促进小鼠原始卵泡的形成及原始卵泡发育为初级卵泡^[5]。*BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 蛋白可抑制绵羊颗粒细胞分泌孕酮,但不会影响绵羊颗粒细胞增殖和存活^[6],*BMP2* 蛋白可抑制雌二醇与孕酮的合成及 cAMP 的释放^[7],*BMP4* 蛋白可抑制绵羊垂体细胞 FSH 释放^[8],由此推测,*BMP2* 与 *BMP4* 可能是多羔动物的黄体抑制剂。BMPs 还与早期胚胎的细胞凋亡与增殖密切相关,对细胞分化与器官发生、发育具有重要意义,*BMP2*、*BMP4* 位点的丢失均可导致动物胚胎性死亡^[9-10],是胚胎发育过程中必不可少的信号分子^[11-12]。

川中黑山羊是经过长期自然选择和人工重点培育而成的

多胎山羊品种,它具有性成熟早(母羊初情期为 3~4 月龄,初配年龄为 5~6 月龄)、产仔率高(平均产羔率为 270%)、生长速度快、产肉性能好、耐粗食、抗病力强、适应性良好等优点。为进一步阐明川中黑山羊多胎的分子生物学基础,本研究克隆了川中黑山羊 *BMP2*、*BMP4* 基因完整编码区,与 GenBank 已公布的其他物种进行序列比对,并在此基础上构建物种间分子系统进化树。到目前为止,有关山羊 *BMP2* 与 *BMP4* 在生物信息学方面的研究尚未见报道,所以本研究采用生物信息学方法分析这 2 个基因及其氨基酸序列的理化性质、结构特征等,旨在为进一步开展川中黑山羊 *BMP2*、*BMP4* 基因的结构功能、遗传变异、表达调控以及繁殖性状的相关分析等研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验动物

在四川省乐至县天龙科技示范园选取 6 只 3~5 岁的健康川中黑山羊,在其发情后 12~24 h (发情期中期)屠宰,立即采集卵巢等组织,迅速在室温下的生理盐水中冲洗 3 次,置于盛有 RNA later 的 EP 管中,迅速投入到液氮中保存,带回实验室保存于超低温冰箱(-80℃)中备用。

1.2 试剂和载体

川中黑山羊组织总 RNA 提取试剂盒、2×Taq PCR MasterMix、感受态细胞均购自天根生化科技(北京)有限公司,反转录试剂盒购自 Fermentas (MBI) 公司,X-Gal、IPTG、氨苄青霉素、克隆载体 PMD-19 Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司,DNA 胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。

1.3 卵巢总 RNA 的提取

用动物组织总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)提取川中黑山羊卵巢总 RNA。

收稿日期:2013-08-10

基金项目:西南民族大学研究生创新型科研项目(编号: CX2013SZ56)。

作者简介:龙石太(1988—),男,湖南邵阳人,硕士研究生,研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail:lstzy901015@126.com。

通信作者:字向东(1963—),男,云南云龙人,硕士,教授,主要研究方向为动物胚胎工程。E-mail:zixd@sina.com。

1.4 cDNA 第一链的合成

用反转录试剂盒进行 cDNA 第一链合成。

1.5 引物设计及 PCR 扩增目的基因

参照绵羊 *BMP2* 基因 (GenBank 登录号 XM_004014353) 设计 1 对引物 (F: 5' - AGAAGGAAGAGGCGAAGGAAGG - 3', R: 5' - TGCTGTGCTAACGACACCCAC - 3'), 扩增片段全长 1 331 bp。参照牛的 *BMP4* 基因 (GenBank 登录号为 NM_001045877) 的 mRNA 序列, 用软件 Primer Premier 5 设计 1 对引物 (F: 5' - ATGATTCCTGCTAACCGAATGC - 3', R: 5' - AGGGATGTGTTGCCGCTGA - 3'), 扩增片段全长 1 230 bp。引物序列送往上海英俊生物工程有限公司合成。

以合成的卵巢 cDNA 第一链为模板, 扩增 *BMP2*、*BMP4* 基因, PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 40 s (*BMP2*)/62 °C 退火 40 s (*BMP4*), 72 °C 延伸 80 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 4 °C 保存。产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 再用凝胶成像系统进行检测、拍照。

1.6 克隆及重组子筛选和鉴定

PCR 产物经电泳检测后, 按 DNA 胶回收试剂盒说明进行胶回收, 回收产物与 PMD-19 载体连接, 置于金属浴中 16 °C 过夜。连接反应产物转化宿主菌 5 α 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 固体平板上, 37 °C 培养过夜。挑选白色单克隆菌落于 LB 液体培养基中 37 °C 振荡培养 12 h, 取菌液作 PCR 进行阳性重组子鉴定, 并提取重组质粒。

1.7 生物信息学分析

1.7.1 核酸序列分析 测序完成后获得上下游序列, 利用 DNAMAN 软件进行序列拼接, 并根据测序峰图调整。从 NCBI 上查找相关物种的 *BMP2*、*BMP4* 基因序列, 保存备用。用 NCBI 在线程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找 ORF, 确定 CDS 区, 并将 CDS 区翻译成氨基酸序列。

1.7.2 蛋白质序列分析 用 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的一级结构及其理化参数 (分子量、等电点、分子式等); 用 ProtScale 程序 (<http://expasy.org/tools/protscale.html>) 分析疏水性; 用 TMHMM Server v2.0 程序 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行跨膜区预测; 用 SignalP 4.0 Server 程序 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; 用 PSORT 程序 (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 预测亚细胞定位; 用 GOR 程序 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 预测蛋白质二级结构; 用 Phyre2 程序 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测蛋白质三级结构。

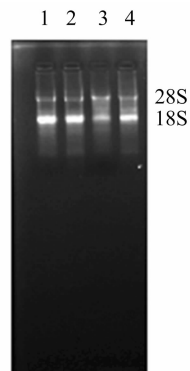
2 结果与分析

2.1 川中黑山羊总 RNA 提取

从提取的 RNA 中取 4 μ L 进行 RNA 纯度和完整性的检测。用 1.5% 琼脂糖凝胶在 150 V 下电泳 15 min, 结果如图 1 所示。图 1 显示, 28S 和 18S RNA 均比较完整, 条带明亮, 说明所提取的总 RNA 是完整的, 可用于下一步试验。

2.2 PCR 扩增结果

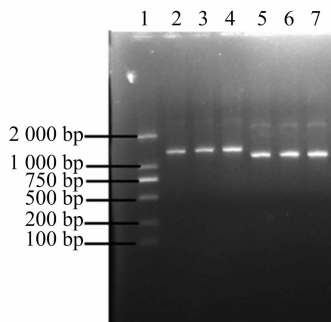
吸取 PCR 产物各 4 μ L, 对其进行电泳检测。用 1% 琼脂



1~4—依次为1、2、3、4号羊总 RNA

图1 卵巢总RNA的电泳检测结果

糖凝胶电泳检测条带, 结果如图 2 所示, 其中 *BMP2* 基因的条带与预期大小 1 331 bp 基本一致, *BMP4* 基因的条带与预期大小 1 230 bp 基本一致, 且目的条带明亮, 可以进行下一步胶回收试验。



1—Marker DL2000; 2~4—*BMP2* 基因; 5~7—*BMP4* 基因

图2 *BMP2*、*BMP4* 基因的PCR产物电泳检测结果

2.3 川中黑山羊 *BMP2*、*BMP4* 基因 CDS 区的核苷酸序列及其特征

用 DNAMAN 软件对测序所得序列进行序列比对、拼接, 去除载体序列后, 得到 *BMP2* 基因 1 331 bp, *BMP4* 基因 1 230 bp, 与预期一致。用 NCBI ORF Finder 查找其开放性阅读框, 并翻译出氨基酸序列。将川中黑山羊 *BMP2*、*BMP4* 基因序列提交给 GenBank, 登录号分别为 KF492982、KF492983。

通过 DNAMAN 分析川中黑山羊与其他物种 *BMP2*、*BMP4* 基因 CDS 区的核苷酸序列同源性, 结果显示, 川中黑山羊 *BMP2* 基因的 CDS 区核苷酸序列与绵羊 (XM_004014353)、牛 (NM_001099141)、猪 (NM_001195399)、人 (NM_001200)、马 (XM_514508)、鼠 (NM_007553) 和鸡 (NM_204358) 相应序列间的一致性分别为 99.7%、98.7%、92.0%、89.6%、91.4%、86.1%、78.9%; 川中黑山羊 *BMP4* 基因的 CDS 区核苷酸序列与绵羊 (NM_001110277)、牛 (NM_001045877)、猪 (NM_001101031)、人 (NM_130850)、马 (XM_003314330) 和鼠 (NM_007554) 相应序列间的一致性分别为 99.3%、99.1%、95.9%、95.2%、94.4%、92.0%、80.1%。说明在不同物种间这 2 个基因具有较高的一致性, 属于较保守的基因之一。

利用 DNAMAN、ClustalX、MEGA 4.0 对相应物种的 *BMP2*、*BMP4* 基因编码区进行多序列一致性比对, 计算出遗传距离, 并构建基因 Neighbor-Joining (NJ) 系统发生树 (图

3、图4)。从图3、图4可以看出,川中黑山羊与绵羊亲缘关系最近,其次是牛,与鸡的亲缘关系最远,这与遗传距离和核苷酸同源性比对的结果一致。

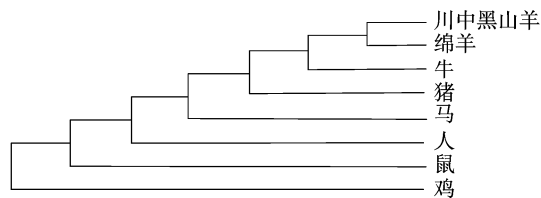


图3 BMP2基因的系统发生树

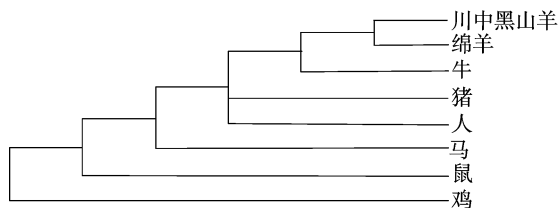


图4 BMP4基因的系统发生树

2.4 川中黑山羊 BMP2、BMP4 蛋白的结构特征

Prot Param 分析结果表明,川中黑山羊 BMP2、BMP4 蛋白的分子式分别为 $C_{1974}H_{3097}N_{581}O_{568}S_{16}$ 、 $C_{2050}H_{3214}N_{616}O_{598}S_{16}$, 相对分子质量分别为 44 569.8、46 570.8, 理论等电点 PI 分别为 8.96、8.11, 半衰期都为 30 h, 不稳定参数分别为 54.83、57.54, 二者均属不稳定蛋白; 脂肪系数依次为 79.49、80.05, 疏水性平均数依次为 -0.423、-0.545, 预测 BMP2、BMP4 蛋白均为亲水性蛋白。结合 ProScale 程序分析结果可知, 川中黑山羊 BMP2 蛋白共有 9 个高亲水区, BMP4 蛋白有 10 个高亲水区, 这是蛋白进化中氨基酸插入的主要位点。而在这 2 个蛋白的 N 段都存在明显的疏水区, 可能是信号肽。通过 SignalP 3.0 服务器进行信号肽预测, 结果显示, 在 BMP2 基因编码的氨基酸序列第 23 ~ 24 (甘氨酸 - 亮氨酸) 位点可能存在信号肽位点, 该多肽 N 端存在信号肽的概率为 0.837; BMP4 多肽 N 端存在信号肽的概率为 0.793, 信号肽位点可能位于第 24 位点与第 25 位点 (丙氨酸至丝氨酸) 之间, 二者属分泌型蛋白。

通过在线程序 TMHMM 2.0 进行跨膜区分析, BMP2 和 BMP4 都只存在 1 个跨膜区, 且跨膜区都位于信号肽位置, 结合对信号肽的考虑可知, 这 2 个基因编码的成熟肽都没有跨膜区。TargetP 亚细胞定位预测结果显示, BMP2 成熟蛋白位于细胞外的概率是 0.728, BMP4 蛋白位于细胞外的概率是 0.785。

用 GOR 程序在线预测 BMP2 蛋白二级结构, 结果显示, 该蛋白包括 α 螺旋 (127 个 AA 残基)、 β 折叠 (86 个 AA 残基)、无规卷曲 (182 个 AA 残基) 3 种模块, 分别占靶蛋白的 32.15%、21.77%、46.08%。BMP4 蛋白的 α 螺旋 (127 个 AA 残基)、 β 折叠 (74 个 AA 残基)、无规卷曲 (208 个 AA 残基) 分别占靶蛋白的 31.05%、18.09%、50.86%。

通过 Phyre 2.0 预测 BMP2 和 BMP4 的三级结构 (图 5 和图 6), 得到 BMP2 靶蛋白, 其残基建模覆盖率 81% (320 个氨基酸残基); BMP4 靶蛋白, 其残基建模覆盖率为 79% (324 个氨基酸残基), 置信度达 100%, 说明靶标蛋白与模板蛋白

的空间结构很接近, 适合的空间结构比例很大, 空间保真性很高, 川中黑山羊 BMP2 和 BMP4 蛋白多处氨基酸位点具有较高的能量, 处于不稳定状态, 说明二者为不稳定蛋白。



图5 BMP2蛋白三级结构预测结果



图6 BMP4蛋白三级结构预测结果

3 讨论

3.1 序列比对

本研究利用 PCR 技术从川中黑山羊卵巢组织中克隆得到川中黑山羊 BMP2、BMP4 基因的 cDNA 序列, 包含了长度为 1 188、1 230 bp 的完整编码区, 分别编码 395、409 个氨基酸。经同源性比对可知, 所得序列与绵羊 BMP2、BMP4 基因的 cDNA 序列一致性分别达到 99.7%、99.3%, 因此可确定克隆所得序列为川中黑山羊 BMP2、BMP4 基因 cDNA 序列。与其他物种进行核苷酸序列间的同源性比对, 结果表明, 川中黑山羊的 BMP2、BMP4 基因编码区序列与其他物种同源性很高, 基因序列较保守, 相对而言, BMP4 基因的保守性比 BMP2 基因更强。DNAMAN 比对结果显示, BMP2 基因编码区存在种属间特异插入或缺失, 人的 BMP2 基因编码区长度为 1 191 bp, 比川中黑山羊和牛多 3 bp, 编码 396 个氨基酸; 而鼠的 BMP2 基因编码区长为 1 185 bp, 比川中黑山羊和牛少 3 bp, 编码 394 个氨基酸。不同物种间 BMP4 基因编码区也有差异, 人和鼠比川中黑山羊和牛少 3 bp。不同组织来源也可能存在蛋白质前体长度的差异, 如骨肉瘤表达的 BMP4 前体蛋白为 408 个氨基酸, 而成熟胎盘组织中表达的 BMP4 前体蛋白为 402 个氨基酸^[13]。

3.2 分子系统进化关系

川中黑山羊与绵羊、牛、人、鼠、鸡等物种间 BMP2 基因构建的分子系统进化树结果表明, 川中黑山羊首先与绵羊聚为一类, 再分别与牛、猪、马、人、鼠聚类, 最后与鸡聚类, 各分支置信度均在 90% 以上, 聚类结果置信度高。由 BMP4 基因构

建的分子系统进化树可以看出,川中黑山羊与绵羊、牛始终聚为一支,再依次与猪、人、马、鼠、鸡聚类。牛和绵羊以及猪和人在聚类时置信度分别为 73% 和 78%,导致置信度偏低的原因在于 *BMP4* 在聚类物种间核苷酸同源性差异很小,川中黑山羊与绵羊和牛的 *BMP4* 基因核苷酸同源性分别为 99.3% 和 99.1%。由此可以看出,*BMP2* 基因更适用于构建物种间分子系统进化树,该分子系统进化树较准确、真实地反映了各物种间的进化关系和亲缘关系,即亲缘关系越近的物种,同源性越高,遗传距离越小。

3.3 结构与功能

川中黑山羊的 *BMP4* 基因位于第 14 号染色体长臂 2 区 2~3 带之间,由 5 个外显子、4 个内含子组成,其 cDNA 编码区全长均 1 230 bp,编码 409 个氨基酸,成熟肽为 116 个氨基酸残基^[14]。人的 *BMP2* 基因定位于第 20 号染色体短臂 1 区 2 带上,由 3 个外显子、2 个内含子组成^[15],编码区全长 1 191 bp,编码 396 个氨基酸残基的多肽,其成熟肽基因为 339 bp,成熟肽包括 113 个氨基酸分子^[16]。分析 *BMP2*、*BMP4* 基因的 cDNA 序列后发现,成熟肽基因序列均在 3'端编码区内^[17],同源性比对结果也表明,3'端是 BMPs 的保守区。

BMP2 与 BMP4 作为 TGF- β 家族的重要成员,且属于同一亚族,具有分泌型蛋白质的特征,二者氨基酸同源性高达 90%,BMP2、BMP4、BMP7 是 BMPs 家族中生物活性最高的 3 种蛋白^[18]。BMPs 晶体结构的核心是一个胱氨酸结,从核心向外延伸来自于 β 链和反方向的 α 螺旋环的 2 个手指样凸起, α 螺旋环和 β 链则为手指。C 端是该家族的保守区,成熟的 BMPs 有 7 个半胱氨酸,并且位置绝对保守,其中 6 个半胱氨酸形成分子内二硫键,另一个半胱氨酸形成分子间二硫键,借此分子间二硫键连接 2 条多肽形成二聚体结构^[19]。与所有 TGF- β 家族一样,BMP2、BMP4 在蛋白质合成后期氨基端的前肽区会被切除,形成具有活性的成熟肽,二聚体的形成和分子成熟的过程可能发生于细胞内或分泌过程中。因此,只有形成二聚体形式,这些蛋白质才具有生物活性,才能启动细胞的信号传导。与石晓卫等对黄淮山羊 BMP4 的结构与功能的分析结果^[14]一致,BMP2 与 BMP4 具有 BMPs 家族的典型结构特征,这些结构特征构成了它们在骨组织形成、原始卵泡发育及早期胚胎发育中发挥作用的基础^[20]。

近年来,对山羊和绵羊 TGF- β 超家族的研究逐渐增多,大量研究表明,*BMP-1B*、*BMP15*、*GDF9* 是影响山羊与绵羊多胎的主效基因。*BMP2* 与 *BMP4* 作为山羊和绵羊繁殖性状候选基因的报道不多,储明星等检测到了小尾寒羊 *BMP4* 基因存在多态性,并命名为 AA/AB/BB 型,BB 型纯合子个体产羔量比 AA 型和 AB 型个体的平均产羔量多 0.6 只^[21]。徐业芬等对湖羊的 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6*、*BMP7* 基因的 mRNA 表达水平与排卵数关系进行了研究,结果发现,这几个基因在卵巢组织中均有表达,多羔组的 *BMP4* 基因 mRNA 水平极显著高于单羔组,*BMP4* 基因的 mRNA 表达量与湖羊排卵量呈正相关,可作为影响湖羊排卵数的候选基因进一步研究^[22]。目前,已在牛、猪、鼠、鸡等多种动物卵巢中检测到 *BMP2*、*BMP4* 的 mRNA,通过旁分泌作用控制颗粒细胞的增殖与分化,并作用于卵巢、子宫及调节生殖内分泌系统。因此,开展 *BMP2*、*BMP4* 基因的研究能提高雌性动物繁殖力,加快优良品种的

选育,从而更加合理有效地开发利用品种资源等。

4 结论

本研究通过克隆测序获得了 *BMP2* 基因 (GenBank 登录号为 KF492982) 与 *BMP4* 基因 (GenBank 登录号为 KF492983) 的编码区全长 cDNA 序列,并运用生物信息学相关软件对所得基因序列及其推导的氨基酸序列进行分析,预测二者均有信号肽,无跨膜区,极有可能是定位于细胞外的分泌型蛋白,并预测了蛋白二级结构、三级结构,通过与其他物种进行同源性分析并构建分子系统进化树,揭示了川中黑山羊与其他物种进化的一致性,为后续研究提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Urist M R, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(4): 1828-1832.
- [2] Nakajima Y, Yamagishi T, Ando K, et al. Significance of bone morphogenetic protein-4 function in the initial myofibrillogenesis of chick cardiogenesis[J]. Developmental Biology, 2002, 245(2): 291-303.
- [3] 张驰, 周建设, 秦楠, 等. 骨形态发生蛋白 4 与哺乳动物卵泡发育的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 33(3): 141-144.
- [4] Knight P G, Glistler C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development[J]. Reproduction, 2006, 132(2): 191-206.
- [5] Tanwar P S, O'Shea T, McFarlane J R. *In vivo* evidence of role of bone morphogenetic protein-4 in the mouse ovary[J]. Animal Reproduction Science, 2008, 106(3-4): 232-240.
- [6] Juengel J L, Reader K L, Bibby A H, et al. The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat[J]. Reproduction, 2006, 131(3): 501-513.
- [7] Brankin V, Quinn R L, Webb R, et al. BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2005, 29(4): 593-604.
- [8] Faure M O, Nicol L, Fabre S, et al. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary[J]. Journal of Endocrinology, 2005, 186(1): 109-121.
- [9] Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development[J]. Development, 1996, 122(10): 2977-2986.
- [10] Duprez D, Bell E J, Richardson M K, et al. Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb[J]. Mechanisms of Development, 1996, 57(2): 145-157.
- [11] 管峰, 杨利国, 程瑞禾, 等. 骨形态发生蛋白家族及其受体在生殖调控中的作用[J]. 中国临床康复: 英文版, 2005, 35(42): 190-192.
- [12] Shimasaki S, Zachow R J, Li D, et al. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(13): 7282-7287.
- [13] Dudley A T, Lyons K M, Robertson E J. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye[J]. Genes & Development, 1995, 9(22): 2795-2807.

邓海娟,郑斯竹,高 渊,等. 基于 mtDNA *COI* 基因的皮蠹科三属的系统发育研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):23-26.

基于 mtDNA *COI* 基因的皮蠹科三属的系统发育研究

邓海娟,郑斯竹,高 渊,陈云芳,赵毓郎,葛华林,詹国辉

(苏州出入境检验检疫局,江苏苏州 215021)

摘要:下载整理了 NCBI 上公布的相关序列,通过 mtDNA *COI* 基因 620 bp 片段序列对皮蠹科斑皮蠹属、皮蠹属、圆皮蠹属 3 个属共 30 个分析对象的 *COI* 基因序列进行分析并构建分子系统树,结合形态学特征分析这 3 个属的分子系统发育关系。结果显示,mtDNA *COI* 基因可以作为皮蠹科昆虫生物系统发育分子水平上的依据,为今后深入开展皮蠹科分子系统进化研究奠定一定的理论基础。

关键词:斑皮蠹属;皮蠹属;圆皮蠹属;mtDNA *COI* 基因;遗传距离;分子系统树

中图分类号: Q969.492.503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0023-04

皮蠹科(Dermestidae)隶属于鞘翅目皮蠹总科,包括 6 亚科 34 属,约 700 种,分布在世界各地,我国已知 8 属约 40 种,遍布全国各地。该科昆虫多为小型甲虫,生活隐蔽,繁殖力强,食性广,可取食动物尸体、羽毛、水产品、皮张、药材等各种储藏物,是具有重要检疫意义的储藏物害虫^[1-2]。昆虫的 mtDNA 是一种闭合的双链环状遗传物质,稳定性高,大小一般为 15.4~16.3 kb,以高拷贝数存在于线粒体内,检测样品无论是完整还是残缺,均可通过测定 mtDNA 序列进行鉴别^[3]。mtDNA 进化速率较核 DNA 更快,且为母系遗传,在遗传过程中不会发生基因重组、倒位、易变等突变,是动物种内不同地理种群间相对保守又有一定变异的序列,即使是亲缘关系很近的类群也存在几个百分比的差异,所以常被用来反映种群遗传变异信息,被广泛应用于不同分类阶元的分子系统学研究^[4]。皮蠹科昆虫是十分重要的储藏物害虫,我国口岸多有截获。该科昆虫分类地位一直存在争议,准确进行种类鉴定对检验检疫口岸工作具有重要意义。因此,本研究对

皮蠹科下斑皮蠹属(*Trogoderma*)、皮蠹属(*Dermestes*)、圆皮蠹属(*Anthrenus*)3 个属共计 30 个分析对象的 *COI* 基因序列进行分析,并构建出不同的分子系统发育树,以期在分子水平对这 3 个属的系统发育关系进行探讨。

1 材料与方法

1.1 分析对象及序列信息

分析对象共计 30 个,序列均从 GenBank 下载,信息见表 1。

1.2 DNA 序列数据的处理

应用 Mega 5.0 软件进行序列比对、拼接和剪切。将比对结果进行序列组成分析,基于 Kimura 2-parameter 模型计算各分类单元之间的遗传距离及其标准差、序列碱基组成、保守位点、变异位点、转换/颠换比值等^[5]。应用 Mega 5.0 软件,使用邻接法(NJ)、最大简约法(MP)和最大似然法(ML)分别构建分子系统树,1 000 次循环估计系统树中节点的自举置信水平,碱基转换和颠换赋予相同的加权值。

2 结果与分析

2.1 mtDNA *COI* 基因序列组成和变异

应用 Mega 5.0 软件对 30 个分析对象的 *COI* 基因序列进行比对剪裁,得到 620 bp 大小的序列片段进行分析。所有分析对象的 *COI* 基因的 620 个位点中没有插入、缺失现象,其中共有 104 个保守位点,502 个变异位点,265 个简约信

收稿日期:2013-08-01

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAK11B03);江苏出入境检验检疫局科技项目(编号:2012KG55、2013KJ55)。

作者简介:邓海娟(1983—),女,内蒙古锡林浩特人,硕士,农艺师,从事森林保护学工作。Tel:(0512)62825386;E-mail:haijuan_deng@163.com。

通信作者:詹国辉(1976—),男,博士,从事进出境植物检疫技术工作。Tel:(0512)62825386;E-mail:zhangh2@jsci.gov.cn。

[14]石晓卫. 黄淮山羊骨形态发生蛋白 4(*BMP4*)基因的克隆与表达[D]. 兰州:甘肃农业大学,2008.

[15]马庆军,党耕町,马大龙,等. 人骨形态发生蛋白-2 的基因重组及其在大肠杆菌中的表达[J]. 中华医学杂志,1998,78(4):68-70.

[16]张宏斌,张 余,付 娜,等. 重组人 BMP-2 基因克隆及原核表达[J]. 医学分子生物学志,2008,5(6):512-514.

[17]Li C,Zhan X Q,Li M Y,et al. Proteomic comparison of two-dimensional gel electrophoresis profiles from human lung squamous carcinoma and normal bronchial epithelial tissues[J]. Beijing Genomics Institute,2003,1(1):58-67.

[18]李 荣. 内蒙古绒山羊 *BMP-4*、*BMP-1B* 基因 cDNA 的克隆及 *BMP-1B* 在皮肤毛囊中的表达[D]. 呼和浩特:内蒙古农

业大学,2007.

[19]Burt D W,Law A S. Evolution of the transforming growth factor- β superfamily[J]. Progress in Growth Factor Research,1994,5(1):99-107.

[20]石晓卫,刘 燕. 黄淮山羊骨形态发生蛋白 4 结构与功能分析[J]. 中国草食动物,2011,31(4):12-15.

[21]储明星,周文然,孙少华,等. 小尾寒羊 *BMP4* 基因多态性及其与高繁殖力关系的研究[J]. 农业生物技术学报,2008,16(2):237-241.

[22]徐业芬,李齐发,李二林,等. 湖羊 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达水平与排卵数关系的研究[J]. 中国农业科学,2009,42(10):3655-3661.