

鳙BMP基因家族成员的鉴定、进化及表达分析

武艳红 周小雨 陈庚 俞小牧 童金苟

GENOME WIDE IDENTIFICATION, PHYLOGENY, AND EXPRESSION OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN GENES IN BIGHEAD CARP (*HYPOPHthalmichthys nobilis*)

WU Yan-Hong, ZHOU Xiao-Yu, CHEN Geng, YU Xiao-Mu, TONG Jin-Gou

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2024.2023.0314>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

多倍体银鲫F系**bmp15**不同等位基因的分子特征、基因组结构和表达模式

MOLECULAR CHARACTERISTICS, GENOMIC STRUCTURE AND EXPRESSION PATTERNS OF DIVERSE *BMP15* ALLELES IN POLYPLOID GIBEL CARP CLONE F

水生生物学报. 2020, 44(3): 518–527 <https://doi.org/10.7541/2020.063>

三疣梭子蟹NF- κ B家族基因Relish和Dorsal的克隆及表达特征

CLONING AND EXPRESSION OF NF- κ B FAMILY GENES IN *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

水生生物学报. 2019, 43(2): 298–304 <https://doi.org/10.7541/2019.037>

唇**bmp2a**基因克隆及其与肌间刺骨化相关性分析

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A *BMP2A* HOMOLOGUE IN BARBEL STEED (*HEMIBARBUS LABEO*) AND ITS INVOLVEMENT IN INTERMUSCULAR BONE DEVELOPMENT

水生生物学报. 2021, 45(1): 8–13 <https://doi.org/10.7541/2021.2019.221>

八肋游仆虫微管蛋白基因家族的鉴定及进化分析

IDENTIFICATION AND EVOLUTION ANALYSIS OF TUBULIN SUPERFAMILY GENES IN *EUPLOTES OCTOCARINATUS*

水生生物学报. 2021, 45(5): 1005–1013 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.150>

黄颡鱼**Wnt**家族4个基因的克隆、组织表达及对铜的响应

CLONING AND TISSUE EXPRESSION OF FOUR *WNT* GENES IN YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* AND THEIR RESPONSE TO COPPER EXPOSURE

水生生物学报. 2018, 42(3): 463–472 <https://doi.org/10.7541/2018.058>

光棘球海胆**seali**基因克隆及表达特性分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE *SEALI* GENE IN *MESOCENTROTUS NUDUS*

水生生物学报. 2020, 44(3): 534–540 <https://doi.org/10.7541/2020.065>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2024.2023.0314

鳙BMP基因家族成员的鉴定、进化及表达分析

武艳红^{1,2} 周小雨^{1,2} 陈庚¹ 俞小牧¹ 童金苟^{1,2}

(1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了深入研究鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)基因(*Hyn-bmps*)的结构、功能和表达特征, 实验首先通过生物信息学方法对*Hyn-bmps*家族进行了全基因组水平的鉴定, 利用qRT-PCR法检测其在不同组织和快/慢速生长差异个体中的表达模式。在鳙全基因组水平上共鉴定出不均匀地分布于13条染色体上的18个BMP家族成员。分子系统发育分析将BMP划分为5个亚家族; 内含子-外显子结构和保守基序的分析结果不仅表明*Hyn-bmps*在进化上高度保守, 也为鳙亚家族的分类提供了证据。18个*bmps*在鳙不同组织中具有不同的表达模式。群体中极端快/慢速生长差异个体的组织表达分析结果表明, 绝大部分*Hyn-bmps*的高表达与快速生长呈高度正相关, 提示它们在鳙机体生长和头部发育中具有正调控作用。研究结果不仅表明BMP基因家族在鳙生长与发育中扮演重要角色, 而且也为鳙选择育种和分子育种研究提供了重要的基因资源。

关键词: BMP; 基因家族; 基因特征; 基因表达; 鳙

中图分类号: Q344⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2024)07-1085-10



骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)是TGF- β 家族最大的一类多肽生长因子^[1], 其主要通过与BMP配体结合, 激活参与成骨分化和骨形成的特定靶基因的转录, 从而诱导成骨细胞分化、骨发育和骨骼生长^[2,3]。BMP家族最初发现于小鼠脱钙骨基质中^[4], 研究表明它是诱导异位骨形成的蛋白质。直到1989年, 第一个*bmp*才被表征和克隆^[5]。截止目前, 脊椎动物中已鉴定出40多种BMP家族成员, 根据其序列同源性、蛋白质结构和功能, 将其进一步划分为4个亚家族: BMP2/4/16、BMP3/BMP3b、BMP5/6/7/8a/8b和GDF5/6/7^[6]。所有的BMP蛋白都含有一个保守的TGF- β 结构域^[7], 但*bmp1*不属于TGF- β 超家族, 而是一种金属蛋白酶, 可切割原胶原(Procollagens) I、II和III的C末端, 并且能够在体内诱导软骨形成^[8]。*Bmp16*仅存在于硬骨鱼, 不存在于其他脊椎动物^[9]。BMP在大脑、眼睛、心脏、肾脏、皮肤、骨骼和牙齿的发育中起着关键作用, 对胚胎背腹轴的建立及骨骼再生期

间的启动和维持、胚胎发生、生长和重塑过程中骨骼组织的形成及新骨的诱导都具有不可或缺的作用^[10-13]。最新的研究还表明其在脊椎动物免疫调节等方面的突出作用^[14]。

BMP在脊椎动物进化过程中保守性较高, 迄今已在条石鲷(*Oplegnathus*)^[15]、斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[16]和鲤(*Cyprinus carpio*)^[17]等鱼类中均鉴定出不同数量的*bmps*。鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)又名胖头鱼、花鲢, 是我国鱼类养殖中最为重要的“四大家鱼”之一^[18]。由于鳙营养价值高、市场需求潜力大, 鱼头成为近年来畅销的餐饮产品, 价格多年稳中有升。培育生长快、头大的鳙养殖新品种, 是其遗传改良的主要目标之一。近年来, 随着高通量测序技术的发展, 鳙的遗传学研究取得了显著进展。本课题组前期在对鳙生长和头部形态的全基因组定位(GWAS)研究中, 已经鉴定出少数*bmps*^[19,20], 如*bmp8a*, 该基因

收稿日期: 2023-10-06; 修订日期: 2023-12-18

基金项目: 中国科学院战略性科技先导专项(XDA24030505-1); 国家自然科学基金(32072973)资助 [Supported by the Special Fund for Strategic Pilot Technology of the Chinese Academy of Sciences (XDA24030505-1); the Natural Science Foundation of China (32072973)]

作者简介: 武艳红(1999—), 女, 硕士研究生; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: wuyanhong0228@163.com

通信作者: 童金苟, 男, 研究员; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: jgtong@ihb.ac.cn

不仅与头部宽度有显著相关性,还与体宽具有显著关联性,揭示其在鳙头部形态发育和生长过程中发挥着重要作用。但是,迄今对*Hyn-bmps*家族成员的构成及基因特征等方面尚没有基本信息。鉴于BMP在鱼类生长发育过程中的重要作用,有必要加深对*Hyn-bmps*家族成员的鉴定和分子特征的探究。本研究首先利用生物信息学方法,对*Hyn-bmps*家族成员进行了全基因组鉴定,随后研究了它们的基因结构与蛋白结构、染色体定位及其在各组织中的表达模式,并对极端生长差异鳙个体之间BMP基因的表达差异性进行探究。本研究结果将为深入研究*Hyn-bmps*家族基因结构、进化特征与功能提供参考,同时为进一步研究BMP在鳙机体生长发育和头部大小或体型改良中的潜力奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

鳙成鱼样本取自湖北省武汉市涨渡湖渔场的1个鳙全同胞家系,随机选择3尾健康个体(体重平均值120 g),麻醉后解剖取脑、下丘脑、垂体、心脏、肝、脾、肾、皮肤、肌肉、肠和鳃共11个组织样品暂存于液氮,随后转移至-80℃贮存,用于总RNA的提取。

用于极端生长个体基因表达差异分析的鳙样本取自于上述渔场同一池塘的另一个多家系组成的6月龄群体($n=500$),分别取3尾极大组个体(体重平均值117 g)和3尾极小组个体(体重平均值54.4 g)。麻醉后取脑、额顶骨、下丘脑、肠和肌肉5种组织,用液氮暂存,然后转移至-80℃贮存,用于总RNA的提取。

1.2 鳙BMP基因家族成员鉴定与序列分析

使用本地鳙基因组序列、基因组注释文件(GFF)、蛋白序列文件进行*Hyn-bmps*基因家族成员鉴定和序列分析。从Pfam数据库(<http://pfam-legacy.xfam.org/>)中获得BMP的Pfam号PF00688,下载其隐马尔可夫模型(HMM, Hidden Markov Model)文件。使用BMP的HMM文件作为输入文本,以本地鳙蛋白序列文件作为参考,使用HMMsearch软件在鳙蛋白序列文件中进行搜索,得到*Hyn-bmps*基因家族成员的信息。然后利用ExPASy ProtParam在线工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析BMP蛋白的理化性质,包括氨基酸数目、分子量、理论等电点等。

1.3 鳙BMP基因家族成员蛋白保守基序及基因结构分析

将鳙所有BMP蛋白质序列作为输入文件,使用

TBtools^[21]软件分析其保守基序,设置参数如下:鉴定保守基序数量为10,最小基序氨基酸长度为6,最大基序氨基酸长度为100,检索次数为10000次。使用TBtools软件分析基因结构,鉴定基因中的蛋白质编码区(Coding sequence, CDS)及非翻译区(Untranslated region, UTR)。最后使用TBtools软件对鳙BMP蛋白保守基序及基因结构进行可视化。

1.4 鳙BMP基因家族成员系统进化分析

在NCBI数据库分别下载鲤(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)BMP蛋白质序列,使用MEGA 11.0^[22]中的MUSCLE方法对所有BMP氨基酸序列进行多重序列比对,然后采用邻接法(Neighbor-joining method)构建系统进化树,选择泊松模型,boot值设置为1000。采用iTOL (<https://itol.embl.de/>)软件对进化树进行可视化。

1.5 鳙BMP基因家族成员染色体定位分析

以鳙基因组注释文件GFF为参考,用TBtools可视化*Hyn-bmps*染色体定位图,表示所有*Hyn-bmps*家族成员在染色体上的位置信息及距离关系^[23]。

1.6 鳙BMP基因家族成员的组织表达分析

为了分析*Hyn-bmps*在不同组织中的表达变化,本研究通过qRT-PCR检测了18个*bmps*在鳙健康成鱼11个组织(脑、下丘脑、垂体、心脏、肝、脾、肾、皮肤、肌肉、肠和鳃)中的表达模式。本研究还检测了18个*Hyn-bmps*在群体中极端差异生长(极大组、极小组)个体5种组织(脑、下丘脑、额顶骨、肌肉和肠)中的表达模式。

使用TRIzol试剂提取鳙健康成鱼不同组织及极端生长差异个体组织的总RNA,具体按照说明书进行。利用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,在NanoDrop2000微量分光光度计上测定总RNA浓度和 A_{260}/A_{280} 比值。

将提取的样本总RNA稀释至500 ng/ μ L,使用M-MLV第一链cDNA合成试剂盒(Illumina, 美国)反转录合成cDNA第一链,于-20℃保存备用。将鳙各组织cDNA稀释5倍作为模板。根据各个*Hyn-bmps*设计跨外显子引物用于荧光定量qRT-PCR扩增(表1)。PCR(qRT-PCR)反应体系:总体积10 μ L,其中包括5 μ L Power SYBR Green PCR Master Mix、0.5 μ L的上下游引物、1.2 μ L cDNA。在ABI StepOneTM Real-Time PCR System上进行qRT-PCR反应,反应程序:95℃预变性10min、95℃变性15s、60℃退火和延伸1min,40次循环,并绘制熔解曲线。各组织

表达的分析设计 3 个生物学重复, 每个样品的 qRT-PCR 反应设计 3 个操作重复。依据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算每个基因相对于内参基因 β -actin 的相对表达量^[24]。用 SPSS 22.0 软件分析表达差异水平, 并用 Prism 可视化表达结果; 将 *Hyn-bmps* 在健康成鱼各组织中的表达量以均值制作成矩阵数据后, 按基因归一化后进行聚类分析, 并使用 BMKCloud (www.biocloud.net) 绘制成热图 (Hotmap)。*BMPs* 在鳙群体中极端生长差异个体组织中的表达结果用柱状图表示, 并用 *t* 检验计算两组之间的差异性 ($P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著性)。

2 结果

2.1 鳙BMP基因家族成员鉴定及序列信息

通过 HMM search 结构域筛选和 Blastp 比对, 在鳙基因组中共鉴定到 18 个 *Hyn-bmps* 基因家族成员, 表 2 列出了 18 个 *Hyn-bmps* 基因家族成员的基因 ID、所在染色体编号、在基因组上的起始位置和

表 1 鳙 18 个 BMP 基因的 qRT-PCR 引物

Tab. 1 Primers for qRT-PCR expression analysis of 18 BMP genes identified in bighead carp

引物名 Primer name	引物 Primer (5'—3')
<i>Hyn-bmp2a</i>	AACAAACAGCGGAAGAAGCAC CACTCGCCCTGGCAGTAAAA
<i>Hyn-bmp2b</i>	GCAGCCAGCAGAGCAAACA TCGGCGGGAACAGAGGTAA
<i>Hyn-bmp3</i>	AGCAATGGAACGAGCCGAGGAA GGATGGTGGCGTGGTTTGAAGG
<i>Hyn-bmp4</i>	ATGAACTGCTGCGGGACTTG ACTGGTGGACCTTTCGGGATA
<i>Hyn-bmp5</i>	GCTTTATTTACAGGCGGTTGC CCGACGACGCTTGTGTTGC
<i>Hyn-bmp6</i>	AAGGAAGCGGGCTTAGTGGG CGATTGCGGCTCTGTTGACG
<i>Hyn-bmp7a</i>	CAGTGTGTTCCAGGTGCTTCG TGCTCTCCTTGGGTTCATTCTTT
<i>Hyn-bmp7b</i>	TGGATGGCAGGATTGGATTA TACGATGGCGTGGTTTGTG
<i>Hyn-bmp8a</i>	AGGGCTGGTTGGCATTG CGGTCTCCTCGGTTTCC
<i>Hyn-bmp9</i>	ACAGGCTCCTATTCAATGTTCC CGCCCATCCAGAAGGTGTAA
<i>Hyn-bmp10</i>	ACTGACCGCAACAATACGC TTTCCTTCAATACTGTGCGCTC
<i>Hyn-bmp11</i>	CACATACAACTGGGGCAT GTGAGAGGGTAGCGACAAC
<i>Hyn-bmp12</i>	TGCCGCTCCCTTCCTATG GCTCGTGCTGGCTTCTGC
<i>Hyn-bmp13a</i>	AGGAGCAAGGGTGCCAGGAG AGTTTTTCAGCGCGGAGTAAG
<i>Hyn-bmp13b</i>	CGACTGGATTATTGCTCCCTTAGA GAGTTTGTATGATGGCATGATTGG
<i>Hyn-bmp14</i>	TGCTGTCCCTGTACTGGTCACTG GCTCGGTGCTTGTCTCTATC
<i>Hyn-bmp15</i>	AGAAGAGCCACGCAAGGTAGG GCAATCATCTGTCGGAAGTCAT
<i>Hyn-bmp16</i>	TTGAAAGGCGAGTGAACGAA TATGGTCAGCCAGTGGGAAGC
<i>Hyn-β actin</i>	TATCCTATTGAGCACGGTATTG CCTGTTGGCTTTGGGATTTC

终止位置、基因编码氨基酸长度、蛋白质相对分子质量等理化信息。*Hyn-bmps* 基因家族成员所编码氨基酸的长度为 306—532 个 (平均 420.1), 对应蛋白质的相对分子质量为 35110.59—59588.79 Da, 等电点为 5.12—9.93。

2.2 鳙BMP蛋白保守基序及基因结构

为了阐明 *Hyn-bmps* 的基因结构和进化关系, 本研究对其内含子-外显子结构及 motifs 组成进行分析, 结果表明 *Hyn-bmps* 家族成员外显子的数目为 2—6 个不等, 且同一亚家族中的成员具有相似的外显子-内含子组成结构, 如 BMP2/4/16 亚家族成员均具有两个外显子 (图 1)。本研究共鉴定出 10 个保守的 motifs, 分别命名为 motif 1—10。蛋白保守基序分析结果表明, *Hyn-bmps* 中 motif 的数量和类型相对保守; 除了 *bmp11* 外, motif 1、3、2 存在于所有的家族基因成员中, 且排列顺序一致 (图 1)。另外, 同一亚家族成员具有非常相似的 motif 组成, 提示来源于同一亚家族的成员可能具有相似的功能。此外, 本研究还发现每个亚家族也具有其特有的保守 motif, 例如 motif 6、7、9 只存在于 BMP5/6/7/8 亚家族中, 这表明不同亚家族之间在功能上可能存在差异。

2.3 鳙BMP基因家族成员系统进化分析

为了对 BMP 基因家族进行分类, 阐明硬骨鱼类 BMP 与高等脊椎动物的进化关系, 用鲤、斑马鱼、大西洋鲑、青鳉、非洲爪蟾、红鳍东方鲀、小鼠和人共 163 个 BMP 氨基酸序列构建了系统发育树。根据结构同源性, BMP 蛋白可以分为 5 个分支, 图 2 中以不同的颜色表示出来, 分别是 BMP2/4/16、BMP5/6/7/8、BMP9/10、BMP12/13/14 和 BMP3/11/15。比较分析发现, 属于同一亚家族的 BMP 首先聚为一支, 表明它们在进化过程中高度保守, 推测其功能具有相对保守性。

2.4 鳙BMP基因家族成员在染色体上的定位

根据鳙基因组注释文件信息, 使用 TBtools 软件可视化 *Hyn-bmps* 在染色体上的位置 (图 3)。在鳙全基因组范围所鉴定出的 18 个 *Hyn-bmps*, 位于鳙 13 条染色体上, 且为不均匀分布。除 1、11 和 16 号染色体上分布有 2—3 个 *Hyn-bmps* 基因之外, 其他 10 条染色体上均只有 1 个 *bmp* 基因。同时, *bmp3*、*bmp10*、*bmp12* 和 *bmp13a* 位于鳙染色体中间部分, 即位于中部着丝粒附近; 而其他 *Hyn-bmps* 基因分布在染色体两端, 或远离着中部丝粒区域。

2.5 鳙BMP基因家族成员的组织表达分布

利用 qRT-PCR 分析 BMP 基因家族成员在鳙成鱼的 11 个组织中的表达模式 (图 4)。结果表明:

*Hyn-bmps*家族成员在肌肉、下丘脑、鳃、皮肤及肝组织中的表达量较高;其次是心、垂体和肾;在脾脏、肌肉和大脑的表达量较低。例如, *bmp3*、*bmp8a*和*bmp12*在所有上述组织中都具有较高的表达, *bmp2a*除了在脾脏低表达以外,在其他组织中均有较高的表达; *bmp2b*则主要在肠、肝脏和肌肉组织表达; *bmp10*在所有上述组织中都具有较高的表达量,其中以心脏的表达量最高; *bmp14*主要在肝脏表达; *bmp7a*主要在下丘脑和肠组织表达; *bmp13a*和*bmp13b*具有相似的表达模式,均在下丘脑、肠、心和垂体的表达量较高,在脑和肌肉都只有较低的表达。

2.6 鳙BMP基因家族成员的在极端生长差异的组织表达分布

为了探究BMP基因家族成员在鳙生长发育过程中的作用,本研究检测了18个*Hyn-bmps*在群体中的极端生长个体(极大组、极小组)脑、下丘脑、额顶骨和肌肉组织中的表达量(qRT-PCR)。如图5所示,在极大组和极小组的5个组织中*Hyn-bmps*的表达量存在差异性,绝大多数*Hyn-bmps*在极大组中的表达高于极小组。如图5a所示, *bmp2a*、*bmp7b*和*bmp8a*在脑组织中,极大组的表达极显著高于极小组的表达量($P<0.01$), *bmp16*在极大组脑组织中的

表达量显著高于极小组($P<0.05$),但*bmp3*和*bmp13b*则相反,在极小组脑组织中的表达量极显著高于极大组($P<0.01$)。 *Bmp2a*在极大组肠的表达明显高于极小组(图5b)。如图5c所示,12个*Hyn-bmps*基因家族成员在极大组下丘脑中的表达都显著高于极小组。与极小组的肌肉表达量相比, *bmp2a*、*bmp4*、*bmp8a*和*bmp10*在极大组中的表达都显著升高(图5d)。如图5e所示, *bmp5*、*bmp6*、*bmp11*和*bmp16*在极大组额顶骨的表达显著高于极小组,然而*bmp3*则相反,与极大组的额顶骨组织表达量相比,在极小组额顶骨中的表达显著升高。

3 讨论

3.1 鳙BMP基因家族成员的序列分析

本研究从鳙基因组中共鉴定出18个*bmps*,这个数目在脊椎动物或鱼类中属于中间水平。据报道大多数二倍体脊椎动物的*bmps*成员为16—22个,例如:人类有17个,热带爪蟾有16个,青鳉有18个,军曹鱼有19个^[16],卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[25]有20个,斑马鱼有22个。然而,一些硬骨鱼类经历了额外的全基因组复制事件,染色体数目加倍,使得其BMP基因家族的成员数目也相应加倍,例如四倍体鲤^[17]有44个,大西洋鲑有40个*bmps*。这18个*Hyn-*

表 2 鳙18个BMP基因的理化特征

Tab. 2 Characteristic of 18 BMP genes identified in bighead carp

基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	染色体 Chromosome	基因起始位置 Gene starting position	基因终止位置 Gene termination position	链 Strand	氨基酸数(个) Number of amino acid	分子量 MW (Da)	等电点 pI
<i>Hyn-bmp2a</i>	evm.model.LG11.145 4	Ch11	32070842	32072981	(-)	389	43831.57	9.04
<i>Hyn-bmp2b</i>	evm.model.LG02.244	Ch02	4295051	4298248	(-)	351	40425.59	9.53
<i>Hyn-bmp4</i>	evm.model.LG11.45	Ch11	935097	938683	(-)	424	48604.27	7.7
<i>Hyn-bmp16</i>	evm.model.LG17.105	Ch17	2092733	2122373	(-)	424	47387.49	8.98
<i>Hyn-bmp5</i>	evm.model.LG10.149	Ch10	2466391	2488022	(-)	410	46005.07	9.23
<i>Hyn-bmp6</i>	evm.model.LG15.305	Ch15	7350509	7387901	(+)	306	35110.59	7.97
<i>Hyn-bmp7a</i>	evm.model.LG20.356	Ch20	7054007	7063990	(-)	408	46421.44	6.77
<i>Hyn-bmp7b</i>	evm.model.LG18.457	Ch18	10437740	10498517	(-)	427	48667.35	6.19
<i>Hyn-bmp8a</i>	evm.model.LG16.330	Ch16	7614177	7619972	(+)	452	50811.22	9.67
<i>Hyn-bmp9</i>	evm.model.LG05.143 6	Ch05	29391594	29392759	(+)	361	41786.68	6.16
<i>Hyn-bmp10</i>	evm.model.LG01.982	Ch01	19906898	19911096	(-)	532	59588.79	5.12
<i>Hyn-bmp11</i>	evm.model.LG20.444	Ch20	9130990	9138936	(+)	328	37742.31	7.98
<i>Hyn-bmp12</i>	evm.model.LG11.983	Ch11	20836006	20841133	(+)	427	47658.07	9.06
<i>Hyn-bmp13a</i>	evm.model.LG14.978	Ch14	17134105	17138889	(-)	407	46651.98	9.05
<i>Hyn-bmp13b</i>	evm.model.LG16.115 3	Ch16	22485166	22509085	(+)	461	52204.64	9.08
<i>Hyn-bmp14</i>	evm.model.LG04.192	Ch04	3748896	3752943	(+)	497	55638.3	9.93
<i>Hyn-bmp15</i>	evm.model.LG24.130	Ch03	2204406	2208263	(+)	413	48036.84	8.64
<i>Hyn-bmp3</i>	evm.model.LG01.115 8	Ch01	23241071	23244891	(+)	452	52270.78	9.33
<i>Hyn-bmp1a</i>	evm.model.LG06.141 2	Ch06	28354154	28445887	(+)	767	86546.47	6.89
<i>Hyn-bmp1b</i>	evm.model.LG09.370	Ch09	6325636	6350228	(+)	932	104728.17	5.87

*bmps*位于鳙13条染色体上,这也与已经报道*bmps*染色体定位的一些鱼类相似,例如斑马鱼22个*bmps*分布于15条染色体,鲤44个*bmps*分布于29条染色体^[17]。本实验室已经通过斑马鱼和鳙比较基因组学揭示染色体存在共线性关系(陈庚等,未发表),表明至少在近源鲤科鱼类中,BMP的空间分布与它们的功能作用模式可能也有一定的进化保守性。

本研究共收集了包括鳙在内9个物种的163个BMP蛋白序列,基于氨基酸序列比对构建系统发育树,将脊椎动物BMP家族成员分为5个分支: BMP2/4/16、BMP5/6/7/8、BMP9/10、BMP12/13/14和BMP3/11/15(图2)。尽管每个物种的BMP家族成员数目和具体*bmp*并不完全相同^[17],但是每个BMP均归为具有同源基因的同一簇,表明它们在进化过程中的高度保守性。同一亚家族成员具有相同的motif组成和相似的内含子-外显子结构,但是不一定呈现相似的表达模式。如图4所示,BMP2/4/16亚家

族的表达水平存在明显差异,*bmp2a*在鳃、下丘脑、肠、皮肤组织中表达丰度较高,其次是心、肝和肌肉,在脾脏表达丰度较低;*bmp16*和*bmp4*表现出相似的表达模式,然而它们在脾脏的表达明显高于*bmp2a*。*Bmp2b*则在肠、肝脏和肌肉表达较高,在其他组织的表达均比较弱。BMP3/11/15亚家族中,*bmp3*和*bmp11*的聚为一类,具有相似的表达模式,其在肾脏和垂体表达最高,而*bmp15*在肾脏存在显著下调。在条石鲷^[15]也有类似的报道,尽管属于同一亚家族,但不同成员的表达模式并不完全相同。

3.2 鳙BMP基因家族成员的表达分析

本研究使用基因特异性引物进行qRT-PCR,以检测BMP家族成员在鳙成鱼各种组织中的表达水平,结果表明所有*Hyn-bmps*都在不同组织中广泛表达,在肌肉、下丘脑、鳃、皮肤及肝组织中的表达水平相对较高,表明这些组织参与BMP途径^[17]。*Bmp10*在心脏中基因高水平的表达,表明其在维持



图1 鳙BMP蛋白保守基序及基因结构

Fig. 1 Conserved motif and gene structure of BMP in bighead carp

a. 鳙BMP系统进化树; b. 鳙BMP蛋白保守基序图; c. 鳙BMP基因结构图。使用TBtools软件进行保守基序和外显子-内含子分析, 数字1—10代表相应Motifs, 上游和下游分别代表未翻译的5'和3'UTR

a. evolutionary tree of BMP of bighead carp; b. conserved motifs of BMP protein; c. gene structure diagram of *Hyn-bmps*. Conserved motifs and exon-intron analysis are performed using TBtools Software. The numbers 1—10 represent the Motifs, Upstream and downstream indicate the untranslated 5' and 3'UTR

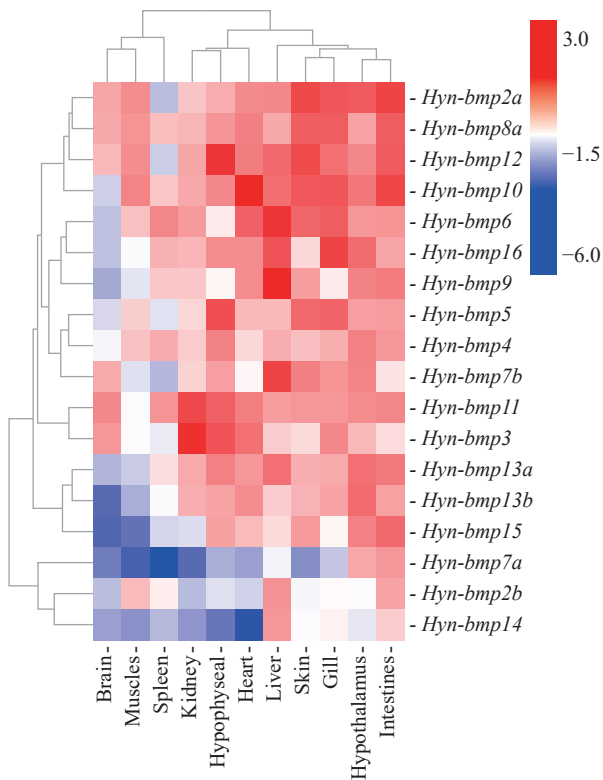


图4 *Hyn-bmps*在11种成鱼组织中的相对表达量

Fig. 4 The relative expression of the *Hyn-bmps* in 11 tissues of adult bighead carp

心脏发育和功能方面有关键作用^[26, 27]。*Bmp2a*、*bmp4*和*bmp16*在鳙鳃组织中的高水平表达与卵形鲳鲷^[25]和塞内加尔氏鳎(*Solea senegalensis*)^[28]鳃弓中*bmp2*和*bmp4*表达模式一致, 表明BMP信号在鱼类呼吸和渗透调节等过程中可能也发挥重要作用^[29]。此外, *bmp2a*、*bmp8a*、*bmp5*、*bmp12*和*bmp10*在脑、下丘脑和垂体中的高表达, 表明它们参与了鳙神经系统发育和机体(头部)的生长发育过程。几乎所有*Hyn-bmps*在肠道和鳃中都具有相对高的表达, 推测它们在免疫系统发挥作用^[17, 27]。此外, BMP的异常或失调可能与许多疾病有关^[30], 例如*bmp5*的异常表达是骨关节炎的一个易感因素^[31]; *Bmp9*与遗传性出血性毛细血管扩张症^[32]和肝纤维化^[33]相关; *Bmp2*与先天性巨结肠有关^[34]。这些报道表明BMP在脊椎动物不同器官发育过程中具有不同的功能。*Hyn-bmps*是否与免疫或疾病相关, 有待进一步的研究报道证实。

鱼类所具有的特异性基因组复制事件使鱼类比高等脊椎动物拥有更多的基因^[35]。已有报道表明, 基因组复制可能导致鱼类基因的不同命运, 如丢失、沉默、亚功能化和新功能^[36, 37]。本研究发现, 同一*Hyn-bmps*的两个拷贝具有相似的表达模

式, 如*bmp13a*和*bmp13b*。然而, 在某些基因的不同拷贝中也发现了不同的表达模式, 例如*bmp2a/2b*及*bmp7a/7b*。在鱼类中, *bmp2a*和*bmp2b*的表达模式并不相同^[38], *bmp2a*在正中鳍、神经血管弓和晶状体中表达^[39], 而*bmp2b*在皮肤^[40]、视神经^[41]和中胚层^[42]表达。在本研究中, *bmp2a*在鳙几乎所有组织都广泛表达, 而*bmp2b*主要在肌肉、肝脏和肠组织表达。研究报道已经证实*bmp7a*和*bmp7b*在斑马鱼中的生物学功能完全不同, *bmp7a*参与背腹模式发展, 而*bmp7b*参与眼睛和骨骼发育^[43]。这表明在不同物种中, 基因组复制事件会导致某些基因产生不同的生物学功能。

为了探究*Hyn-bmps*在相同养殖环境下同一个群体中快速生长和慢速生长个体之间的表达差异, 本研究选取体重极大个体和极小个体两组鳙, 对其头部重要组织(脑、下丘脑和额顶骨)、生长内分泌调控密切相关的生长轴组织(肌肉)和消化吸收相关的组织(肠)进行qRT-PCR分析, 结果显示, 绝大多数*Hyn-bmps*成员在极大组中的表达量都显著或极显著高于极小组(图5)。已有报道表明*bmp3*在骨骼形成和发育中起负反馈调节作用^[44], 同时本研究也表明, *bmp3*在鳙骨骼或骨骼肌的生长发育中可能也是通过负反馈调节, 进而影响鳙极大和极小个体的生长发育。BMP除了在早期神经系统发育过程的各个阶段发挥重要的调控作用外^[45], 还可以为成年个体的脑神经元提供能量^[46]。这提示BMP可能与鳙的脑或头部的生长发育密切相关。肌肉生长在鱼类快速生长中起着至关重要的作用。本研究发现BMP在鳙极大组个体肌肉组织中的表达量显著高于极小组个体肌肉中的表达量, 这与BMP在中华环鲤(*Sinocyclocheilus grahami*)快速生长组肌肉与慢速生长组肌肉中的结果一致^[47]。已有研究表明*bmp2*可以促进肠神经的分化^[34], 本研究也发现*Hyn-bmp2a*在快速生长组肠中的表达显著高于慢速生长组($P < 0.05$)。额顶骨是脊椎动物颅骨的关键组成部分, 它有助于推动颅骨的扩张, 对于头部的生长发育具有重要作用^[48]。不同*Hyn-bmps*成员在极大组和极小组额顶骨中的表达存在差异, 其中*bmp5*、*bmp6*、*bmp11*和*bmp16*在极大组额顶骨中的表达显著高于极小组, 表明这些BMP成员在推动颅骨扩张和头部生长发育过程中具有重要调控作用。极大组个体额顶骨中BMP的高表达可能有助于促进骨形成和扩张, 从而实现颅骨的快速生长发育^[49]。*Bmp3*在极小组额顶骨中的表达显著升高, 与极大组呈相反的趋势, 这可能是由于*bmp3*高表达延迟了软骨骨化从而影响颅骨扩张和头部生长发育过程^[44, 50]。

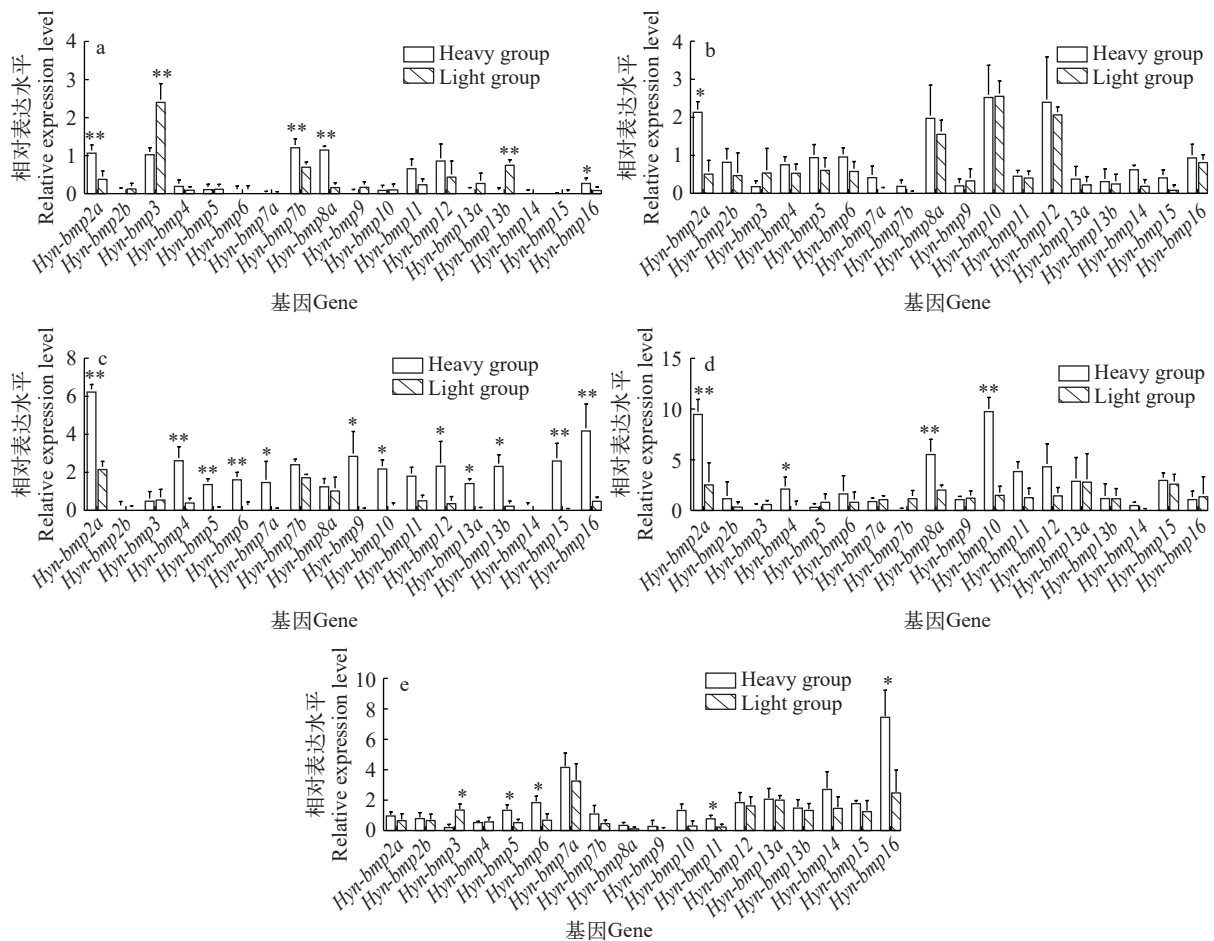


图5 *Hyn-bmps*在群体中极端生长个体5种组织中的相对表达水平

Fig. 5 Relative expression level of *Hyn-bmps* in 5 tissues of extremely growing individuals of a bighead carp population

a. 脑; b. 肠; c. 下丘脑; d. 肌肉; e. 额顶骨 (*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$)

a. brain; b. intestine; c. hypothalamus; d. muscle; e. frontal parietal bone (* indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$)

综合本研究中生长差异个体相关组织**bmps**表达分析结果: 绝大部分BMP具有正向调控鳙机体生长的作用。 这些信息可为鳙分子标记辅助选择育种或基因编辑育种提供参考。

综上所述, 本研究在鳙全基因组水平上共鉴定出18个BMP家族成员, 并对其编码蛋白的理化特性、序列特征、基因结构、基因空间表达及它们在快/慢速生长个体中表达量进行了探究。*Hyn-bmps*家族成员具有进化保守性和功能保守性。本研究对5种与生长相关的组织进行了基因表达分析结果表明, 鳙绝大部分BMP可能有较强的正向生长调控作用。本文结果对进一步研究*Hyn-bmps*家族的功能及生长与体型分子育种研究具有较大的理论和实际意义。

参考文献:

[1] Knight P G, Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development [J]. *Reproduction*, 2006,

132(2): 191-206.

- [2] Wu M, Chen G, Li Y P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease [J]. *Bone Research*, 2016(4): 16009.
- [3] Sánchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, *et al.* Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis [J]. *Bone*, 2015(80): 43-59.
- [4] Urist M R, Peltier L F. Bone: formation by autoinduction [J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2002(395): 4-10.
- [5] 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.
- [6] Carreira A C, Alves G G, Zambuzzi W F, *et al.* Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014(561): 64-73.
- [7] Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, *et al.* Bone morphogenetic proteins: a critical review [J]. *Cellular Signalling*, 2011, 23(4): 609-620.
- [8] Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, *et al.* Bone

- morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase [J]. *Science*, 1996, **271**(5247): 360-362.
- [9] Marques C L, Fernández I, Viegas M N, *et al.* Comparative analysis of zebrafish bone morphogenetic proteins 2, 4 and 16: molecular and evolutionary perspectives [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, **73**(4): 841-857.
- [10] Nakase T, Nomura S, Yoshikawa, *et al.* Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1994, **9**(5): 651-659.
- [11] Bostrom M P G. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing [J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998(3558): S116-S123.
- [12] Bostrom M P G, Lane J M, Berberian W S, *et al.* Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 1995, **13**(3): 357-367.
- [13] Nakashima M, Reddi A H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, **21**(9): 1025-1032.
- [14] Chen W, ten Dijke P. Immunoregulation by members of the TGF β superfamily [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, **16**(12): 723-740.
- [15] Ma Y, Xiao Y, Xiao Z, *et al.* Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the BMP family associated with beak-like teeth in *Oplegnathus* [J]. *Frontiers in Genetics*, 2022(13): 938473.
- [16] Ma Q, Yang Y, Mao F, *et al.* Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the bmp gene family associated with development and skeleton deformity in cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. *Aquaculture Reports*, 2023(31): 101644.
- [17] Chen L, Dong C, Kong S, *et al.* Genome wide identification, phylogeny, and expression of bone morphogenetic protein genes in tetraploidized common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Gene*, 2017(627): 157-163.
- [18] Chen Y Y, Cao W X, Zheng C Y. Ichthyofauna of the Zhujiang River with a discussion on zoogeographical divisions for freshwater fishes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1986, **10**(3): 228-236. [陈宜瑜, 曹文宣, 郑慈英. 珠江的鱼类区系及其动物地理区划的讨论 [J]. 水生生物学报, 1986, **10**(3): 228-236.]
- [19] Chen G, Zhou Y, Yu X, *et al.* Genome-wide association study reveals SNPs and candidate genes related to growth and body shape in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2022, **24**(6): 1138-1147.
- [20] Zhou Y, Fu B, Yu X, *et al.* Genome-wide association study reveals genomic regions and candidate genes for head size and shape in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) [J]. *Aquaculture*, 2021(539): 736648.
- [21] Chen C, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, **13**(8): 1194-1202.
- [22] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, **38**(7): 3022-3027.
- [23] Zheng W W, Xu X W, Chen S L, *et al.* Genome-wide identification of the MKK gene family in *Scophthalmus maximus* and its involvement in abiotic and biotic stress responses [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, **47**(1): 125-127. [郑卫卫, 徐锡文, 陈松林, 等. 大菱鲆 MKK 基因家族全基因组鉴定及其在生物和非生物应激下的表达分析 [J]. 水产学报, 2023, **47**(1): 125-127.]
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [25] Sun J, Zhu K, Guo H, *et al.* Genome-wide comparative analysis of bone morphogenetic proteins: genomic structure, phylogeny, and expression patterns in the golden pompano, *Trachinotus ovatus* (Linnaeus, 1758) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, **46**(1): 345-358.
- [26] Neuhaus H, Rosen V, Thies R S. Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF- β superfamily [J]. *Mechanisms of Development*, 1999, **80**(2): 181-184.
- [27] Chen H, Shi S, Acosta L, *et al.* BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis [J]. *Development*, 2004, **131**(9): 2219-2231.
- [28] Marques C L, Fernández I, Rosa J, *et al.* Spatiotemporal expression and retinoic acid regulation of bone morphogenetic proteins 2, 4 and 16 in Senegalese sole [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, **30**(4): 713-720.
- [29] Kultz D. The combinatorial nature of osmosensing in fishes [J]. *Physiology*, 2012, **27**(4): 259-275.
- [30] Wang R N, Green J, Wang Z, *et al.* Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases [J]. *Genes & Diseases*, 2014, **1**(1): 87-105.
- [31] Lorraine S, Barbara D, Athena F, *et al.* Microsatellite association mapping of a primary osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 6p12.3-q13 [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2004, **50**(12): 3910-3914.
- [32] Teekakirikul P, Milewicz D M, Miller D T, *et al.* Thoracic aortic disease in two patients with juvenile polyposis syndrome and SMAD4 mutations [J]. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2013, **161A**(1): 185-191.
- [33] Breitkopf-Heinlein K, Meyer C, König C, *et al.* BMP-9 interferes with liver regeneration and promotes liver fibrosis [J]. *Gut*, 2017, **66**(5): 939-954.
- [34] Huang S, Wang Y, Luo L, *et al.* BMP2 is related to hirschsprung's disease and required for enteric nervous system development [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019(13): 523.
- [35] Wittbrodt J, Meyer A, Scharl M. More genes in fish [J]? *BioEssays*, 1998, **20**(6): 511-515.
- [36] Sun X, Wei Z B, Sun X W. The fish specific genome duplications and fish diversity [J]. *Life Science Research*,

- 2007, **11**(4): 62-69. [孙新, 魏振邦, 孙效文. 鱼类特异的基因组复制及鱼类多样性 [J]. 生命科学研究, 2007, **11**(4): 62-69.]
- [37] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Fish-specific genome duplication [J]. *Zoological Research*, 2006, **27**(5): 525-532. [周莉, 汪洋, 桂建芳. 鱼类特异的基因组复制 [J]. 动物学研究, 2006, **27**(5): 525-532.]
- [38] Wu Y, Sun A, Nie C, *et al.* Functional differentiation of *bmp2a* and *bmp2b* genes in zebrafish [J]. *Gene Expression Patterns*, 2022(46): 119288.
- [39] Crotwell P L, Sommervold A R, Mabee M P. Expression of *bmp2a* and *bmp2b* in late-stage zebrafish Median fin development [J]. *Gene Expression Patterns*, 2004, **5**(2): 291-296.
- [40] Shao M, Wang M, Liu Y Y, *et al.* Vegetally localised Vrtm functions as a novel repressor to modulate *bmp2b* transcription during dorsoventral patterning in zebrafish [J]. *Development*, 2017, **144**(18): 3361-3374.
- [41] Veien E S, Rosenthal J S, Kruse-Bend R C, *et al.* Wnt signaling is required for the maintenance of dorsal retinal identity [J]. *Development*, 2008, **135**(24): 4101-4111.
- [42] Xue Y, Xing C, Zhang W, *et al.* Coordinate involvement of Nodal-dependent inhibition and Wnt-dependent activation in the maintenance of organizer-specific *bmp2b* in zebrafish [J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2016, **60**(1/2/3): 13-19.
- [43] Dong X R, Wan S M, Zhou J J, *et al.* Functional differentiation of *bmp7* genes in zebrafish: *bmp7a* for dorsal-ventral pattern and *bmp7b* for melanin synthesis and eye development [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022(10): 838721.
- [44] Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde M E, *et al.* Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density [J]. *Nature Genetics*, 2001, **27**(1): 84-88.
- [45] Goldstein A M, Brewer K C, Doyle A M, *et al.* BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system [J]. *Mechanisms of Development*, 2005, **122**(6): 821-833.
- [46] Ebendal T, Bengtsson H, Söderström S. Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 1998, **51**(2): 139-146.
- [47] Yin Y, Zhang Y, Hua Z, *et al.* Muscle transcriptome analysis provides new insights into the growth gap between fast- and slow-growing *Sinocyclocheilus graham* [J]. *Frontiers in Genetics*, 2023(14): 1217952.
- [48] Topczewska J M, Shoela R A, Tomaszewski J P, *et al.* The morphogenesis of cranial sutures in zebrafish [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(11): e0165775.
- [49] Liu D, Liu J, Li Y, *et al.* Upregulated bone morphogenetic protein 5 enhances proliferation and epithelial-mesenchymal transition process in benign prostatic hyperplasia via BMP/Smad signaling pathway [J]. *Prostate*, 2021, **81**(16): 1435-1449.
- [50] Gamer L W, Cox K, Carlo J M, *et al.* Overexpression of BMP3 in the developing skeleton alters endochondral bone formation resulting in spontaneous rib fractures [J]. *Developmental Dynamics*, 2009, **238**(9): 2374-2381.

GENOME WIDE IDENTIFICATION, PHYLOGENY, AND EXPRESSION OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN GENES IN BIGHEAD CARP (*HYPOPHthalmichthys nobilis*)

WU Yan-Hong^{1,2}, ZHOU Xiao-Yu^{1,2}, CHEN Geng¹, YU Xiao-Mu¹ and TONG Jin-Gou^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Bone morphogenetic protein (BMP) play a crucial role in regulating the skeletal development of fish, significant influencing external morphology, functional exercise and even survival rates in aquaculture breeding. Bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) is a species of particular interest due to the importance of its head and body shape. In this study, we identified a total of 18 BMP from the bighead carp genome, which are unevenly distributed on 13 chromosomes. BMP were divided into five sub-families based on phylogenetic analysis, revealing a high level of conservation among BMP. The expression of *Hyn-bmps* was investigated in a population exhibiting extremely fast/slow growth differences. Most *Hyn-bmps* revealed a positive correlation with growth, suggesting their potential positive regulatory effects on the growth and head development of bighead carp. These results not only indicate the significant role of the BMP genes family in the growth and development of bighead carp, but also provide valuable insights for molecular breeding efforts targeting this species.

Key words: BMP; Gene family; Gene feature; Gene expression; *Hypophthalmichthys nobilis*