第 38 卷 第 1 期　　华 中 农 业 大 学 学 报　　Vol.38 No.1
2019 年 1 月　　Journal of Huazhong Agricultural University　　Jan. 2019,91～96

黄颡鱼 bmp2a 与 bmp4 基因启动子的克隆及分析

邰志鹏　徐异桓　张电光　谭肖英

华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室,武汉 430070

摘要　为研究黄颡鱼 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因的功能及其相关转录因子的调控网络,采用 RLM-5′ RACE 方法确定 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因的转录起始位点,通过 hiTAIL-PCR 方法克隆 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因启动子序列并运用生物信息学方法预测启动子序列上的关键转录因子结合位点。结果显示,*bmp2a* 与 *bmp4* 基因的转录起始位点分别位于 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因编码区上游的 391 bp 与 351 bp 处。克隆 *bmp2a* 与 *bmp4* 的 1 830 bp、1 962 bp 启动子序列,在启动子序列的基础上预测出 AP1、SP1、E-box、GATA1、CREB、PPARγ、SOX5、SOX6 和 SOX9 等转录因子的结合位点,提示这些转录因子对 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因的转录调控发挥潜在的重要作用。

关键词　黄颡鱼;骨形态形成蛋白;启动子;转录因子

中图分类号　S 917　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1000-2421(2019)01-0091-06

骨形态形成蛋白(bone morphogenesis protein,BMP)最初因其具有诱导骨和软骨形成的能力而命名[1-2]。迄今为止,已经确定了 30 多个 BMP 家族成员,除了 BMP1 外均属于转化生长因子 β(transforming growth factor beta,TGF-β)超家族[3]。骨形态形成蛋白是一类具有多种生物功能的生长因子,除了具有诱导骨和软骨的形成功能外,还参与了胚胎发育、造血组织发育、神经发育和修复、诱导细胞凋亡、脂肪生成与代谢等诸多过程[4-6]。在 BMP 家族中,BMP2 与 BMP4 属于分泌性多功能蛋白,作为诱导骨细胞形成能力较强的因子受到了广泛的关注。近年来的研究发现,*bmp2* 与 *bmp4* 基因在动物机体发育中具有多种生物学功能,不仅具有诱导软骨和骨组织形成的作用,而且在脂肪细胞的形成过程中发挥着重要作用[7-8]。

bmp2 与 *bmp4* 基因正确有效的表达,依赖于一个复杂的调控系统。转录因子与目的基因启动子序列的转录因子结合位点相互作用,是这一系统的重要组成部分[9]。对这一调控系统的了解与研究,有助于理解 *bmp2* 与 *bmp4* 基因的功能。目前对 *bmp2* 与 *bmp4* 基因的启动子及其转录调控机制的研究主要集中在哺乳动物与两栖动物中[10-11],而对 *bmp2* 与 *bmp4* 基因在鱼类中的表达调控机制尚不了解。因此,本研究克隆了黄颡鱼 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因的启动子,运用生物信息学方法预测启动子序列上存在的关键转录因子结合位点,旨在为进一步分析启动子的活性及后续研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验用黄颡鱼来源于华中农业大学水产学院养殖试验基地。RNA 提取试剂盒(Trizol Reagent)与 FirstChoice™ RLM-RACE 试剂盒购自 Invitrogen 公司;基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒与凝胶纯化回收试剂盒均购自 Omega 公司;pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自武汉迪跃创新生物有限公司;化学试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2　转录起始位点的确定

根据笔者所在实验室获得的黄颡鱼 *bmp2a*(GenBank 登录号:KY930914)和 *bmp4*(GenBank 登录号:KY930915)cDNA 序列设计 5′ RACE 巢式引物(表 1)。利用 RLM-5′ RACE PCR 方法,根据 Invitrogen 公司的 TRIzol 说明书进行黄颡鱼总 RNA 的提取,以提取的总 RNA 为模板,用 Invitrogen 公司的 FirstChoice™ RLM-RACE 试剂盒合成

收稿日期:2018-06-30
基金项目:国家自然科学基金项目(31572605,31001101)
邰志鹏,硕士研究生. 研究方向:鱼类分子营养. E-mail:422413099@qq.com
通信作者:谭肖英,博士,副教授. 研究方向:水产动物营养生理及代谢调控. E-mail:txy7933@mail.hzau.edu.cn

cDNA。按照 GeneRacer Kit 试剂盒的说明进行 PCR 扩增。Outer PCR 程序如下:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,35 个循环;72 ℃ 最终延伸 5 min。Inner PCR 程序如下:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,35 个循环;72 ℃ 最终延伸 5 min。扩增所得的目的片段用 Omega 公司生产的 EZNA Gel Extraction Kit 试剂盒回收纯化,通过 T/A 连接亚克隆到 pMD19-T(TaKaRa)载体上,然后转化进入 DH5α 感受态细胞,筛选阳性单克隆送往武汉擎科生物科技有限公司测序。测序结果通过 SeqMan 软件进行序列拼接,即可确定 *bmp2a* 与 *bmp4* 转录起始位点(TSS)。

表 1 *bmp2a* 与 *bmp4* 启动子克隆所用引物

Table 1 Primers used for *bmp2a* and *bmp4* promoters clone

引物名称 Primers	引物序列(5′-3′) Sequences (5′-3′)
bmp2a-TSS Outer	GCGATAGAGGTCCAGGAGATA
bmp2a-TSS Inner	TGGAGGTAGCAGCACAGTCAT
bmp4-TSS Outer	GGGCATTAGTCCCGAGAAAG
bmp4-TSS Inner	GAGTCCATTGGGCTTCACG
bmp2a R1	GATGGAGGAATGATGGACTTACAGAG
bmp2a R2	CTTCAGTTAGAAATGATCCCCGATGCTG
bmp2a R3	CCTCAGGAACCAGCAGAAACTTTTCACT
bmp4 R1	CGCAGCAAACACTCGGGATA
bmp4 R2	CGTTGGGGCATTAGTCCCGAGAAAG
bmp4 R3	TCCTGAGTCCATTGGGCTTCACGGT
LAD1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNNGGAA
LAD2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNNGGTT
LAD3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVVNVNNNCCAA
LAD4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDNBNNNCGGT
LAD5	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCHNVNNNCCAC
AC	ACGATGGACTCCAGAG

1.3 启动子序列的克隆

参照 Xu 等[12]和 Zhuo 等[13]的方法克隆黄颡鱼 *bmp2a* 与 *bmp4* 的启动子序列。克隆启动子序列所用的引物如表 1 所示。简要操作步骤如下:采用热不对称交错 PCR(hiTAIL-PCR)的方法,经过多轮 PCR 反应得到特定产物。首先根据 Omega 公司的基因组 DNA 提取试剂盒,从黄颡鱼尾鳍组织提取基因组 DNA。用 Premier 5 软件分别在 *bmp2a* 与 *bmp4* 的第一外显子(图 1)上(约 300～500 bp 长度)设计 3 条嵌套的反向引物 R1、R2 和 R3(表 1)。取适量基因组 DNA 作为模板(不同物种的最佳反应 DNA 量并不相同,实际用量参考说明书),以 LAD1～5 兼并引物其中一条引物作为上游引物,R1 作为下游引物,进行第 1 轮 PCR 反应。将第 1 轮 PCR 反应液稀释 50 倍后,取 1 μL 作为第 2 轮 PCR 反应的模板,以 AC 引物为上游引物,R2 为下游引物,进行第 2 轮 PCR 反应。将第 2 轮 PCR 反应液稀释 10 倍后,取 1 μL 作为第 3 轮 PCR 反应的模板,以 AC 引物为上游引物,R3 为下游引物,进行第 3 轮 PCR 反应。将第 3 轮 PCR 目标产物按照凝胶纯化回收试剂盒进行回收纯化,然后与 pMD-19T 载体连接 8 h 后转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,筛选阳性克隆送往武汉擎科生物科技有限公司测序,测序结果通过 SeqMan 软件进行序列拼接,即得到 *bmp2a* 与 *bmp4* 启动子序列。

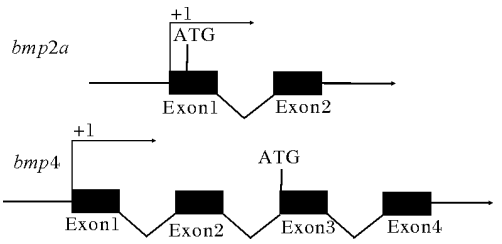

图 1 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因结构

Fig.1 The structure characteristics of *bmp2a* and *bmp4* genes in yellow catfish

1.4 启动子转录因子结合位点的预测

根据已获得的 *bmp2a* 与 *bmp4* 启动子序列,通过在线软件 MatInspector(http://www.genomatix.de/)、JASPAR 数据库(http://jaspar.gene-

reg.net/）和 TFSEARCH 数据库（http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html）等生物信息学方式预测 *bmp2a* 与 *bmp4* 启动子序列存在的关键转录因子结合位点。

1.5　启动子序列同源性分析与序列比对

通过 NCBI 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）下载斑点叉尾鮰、斑马鱼、热带爪蟾、小鼠与智人 1 830 bp 的 *bmp2a* 与 1 962 bp 的 *bmp4* 启动子序列，使用 MegAlign 软件进行黄颡鱼 *bmp2a* 与 *bmp4* 与其他物种对应基因启动子的同源性分析。

2　结果与分析

2.1　转录起始位点的确定与启动子序列的克隆

利用 RLM-5′ RACE PCR 方法成功确定了黄颡鱼 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因的转录起始位点，分别位于 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因编码区上游 391 bp 与 351 bp处。通过热不对称交错 PCR（hiTAIL-PCR）克隆得到 *bmp2a* 与 *bmp4* 转录起始位点上游 1 830 bp 和 1 962 bp 的启动子片段。

2.2　启动子转录因子结合位点的预测与确定

通过生物信息学方法分析基因的启动子区，得到转录因子可能的结合位点，根据得分和转录因子的相关功能进行筛选确定启动子序列存在的关键转录因子结合位点。*bmp2a* 含 16 个潜在的转录因子结合位点，包括 1 个 GATA1、1 个 E-box、1 个 SOX5、2 个 AP1、2 个 CREB、2 个 SOX6、3 个 SOX9、4 个 PPARγ；*bmp4* 含 17 个潜在的转录因子结合位点，包括 1 个 SOX3、1 个 PPARγ、2 个 AP1、2 个 SP1、2 个 SOX5、3 个 CREB、6 个 GATA1（图 2，图 3）。

2.3　启动子序列同源性分析

通过 *bmp2a* 与 *bmp4* 启动子序列比对发现，克隆所得的黄颡鱼 *bmp2a* 与 *bmp4* 启动子与其他物种启动子序列的同源性分别为 31.3%～35.6% 与 36.7%～83.2%（表 2）。黄颡鱼 *bmp2a* 的启动子序列与其他物种启动子同源性普遍较低；黄颡鱼 *bmp4* 的启动子序列与同为鲇形目的斑点叉尾鮰 *bmp4* 启动子序列同源性最高，达到 83.2%。

```
GAGGGCGTCT GCCAAATGCT GTAAATGTAA ATGTAACTCT CCGAATGCCG CCGACGGTAC TTACTGAGTT GCAGAACAAG ACATTAGGTA AAACCGGGGT -1830
      PPARγ                          SOX9
GTCCAGGAGA AAGGACTATT CCTTATCTTT AATATCAGTC AAATTGAGCC ACAGGTGCCT CTCTGCAGCA ACCAGCGCAG CCATCGAATG GCGGATGGAG -1730

TGGGCCATCT GCTTTGTGGC ACTGAGTGCA AAGTCAGTGG CTCGGCGGAG CACAGATACG TCCTGAGGTC CCAACCCCTC ATAACCATCA GCTGCCAGCA -1630

GGTCTGCCTG GTAGGCCAGC AAAATTGCCA TGGTGTGCAG GGCCGCACCT GCTTGGCCTG CTAATATATA GGCCTTACTA ACAAAGGCTG AAGTAGTTCT -1530

ACAAGGCTTG GATGGAAGGG CAGGCTTCCT CCATGAGGGC AATGTAGGTG AGGGATAGCC CGCAACCGTC TCTTCAATCC CAGGCATCGC CCCATACTCA -1430
                                                                                SOX9
TGGCTTTCAA GCCCTATAAT GCCCAAATAG CCAGAGATTG CAGGGGAAAA AATATGCGCT GAAAATGGAT TTCTTCAAGA CCTCGACTGT GTCGTCTGTT -1330

CAGAGGGGGG AAGCCCCTCC TAACCCACAA CAACGCTCCTC AGAGCCCGAT GCAGAAAGCA GCATGCTCTC TTCCGGATTG GGAGAAATTG CAGCATGAGC -1230
                                PPARγ                                                          AP1
TCCCAAAACC GAAATTGAGT GAACTGAGTC AGGGGAGAGG GAAAGAGAAA TGGAAATACC CATCTCTTGC TCCACTTCCT CTAACTCAAC CTGCGAACCC -1130

CTTCATTGAA GCCGCCCCAC TGCCTCGGTG GACGCAGGAC CCGAACCATG AGGCTTGACA GTACGCAGAG GGAATCCTTC ACAATCCTCC CTCAAGAGCC -1030

GATCGGGCAT GCTCCTCTCA CAAACAAACC ACGCAAAGAG AGTGCATGTT GCCCCCTGTG ATAGAGCTAG GGCACGGATG CACGCCTCTC TTAAAATGCT -930
                                                          SOX9                                  SOX6
TAGATTGCAA CATATTTTGT GTCTCTGCAT TAGACAGACA GGACAATCAA TCAACACAGA TACACAGAGC AATTCCTGAA GACAAAGAAG CTGGAGAAAT -830
   CREB                                 CREB                   E-box
GTGACGTAGA TACCCTTATA TGGACTTACT GACGTGTAAT CACTTCGTCA CGTGCCCTTC CCAAGCCATT AAATTGTCGT GTGTGCACAC AGAGCTTCAG -730
                                                                          AP1
ACTTCCTCAT AGAAGCGTTC CCATAGCATC AGCCCTGACA CAGCATCGAG TTCCCTCAAA AGCTAACTCA CTCTTTATGA TCAGCGATGT CATCATACAT -630
                                                          PPARγ
CATCACTACA AACTGTTCAT CTGGAATCCC ATTCTGGTGC ATGACTTGGT AAGCGTGACA CAGATTAGCC TGCAACAAAA ACAGTAAAAT TAGTTATGTA -530
                                SOX5
GTTTCAAAAA ACTAAATAAT TTTAAATAAC AATATTTTAA AAGTGAGACA ATGTAATTTA ATGTATTAGG TATTATATTT TTGCAAAATA TTTTAGAGTA -430
      SOX6
TGTATTTTTC TTTGTAAGCA ACCTATTTAG AAAAACCCTG TAAAAACAAC TGGTTTTAAT ATTCTCACCT GATGTCTGTA GTCTTTCCAA CCTGAAGAAC -330
                                                GATA1
CCGCTGCCAG GAGAACCCAG TGTTTACTGA GAACTCCCAT ATCGACTACA AAGTATTGTA AATGAAGTAG TGTGTGTTTG TGTATGTGAG TGTGTGTCTC -230
                                                                                                PPARγ
TCTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGGCAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAAAG AGAGAGAGAG GAAAAAGGGG -130
                                +1
GAGGAGAGTG AAAAAGAGAA GAGACAGGCA AAGGAAAGAA GAGACACAGT TACAAAACCA GGGAAT                                        +36
                                TSS
```

图 2　黄颡鱼 *bmp2a* 启动子预测的转录因子结合位点

Fig.2　The predicted transcription factor binding sites of the *bmp2a* promoter region in yellow catfish

```
                                                GATA1
GTGAGGGTCA GCCTGTATGC AGTTGTTCAC TTTGAGACCC TATCACTTCT AATATTCTAG GCTGTAAAAT ATTGGCAGGC AGTCTGCATG ATATTATATT -1962

TGTAACTGAC ATATAAGAGC CACCTACTGT GTTCAATAAG TAGAGCATAA TTAATTAAGC CCAACTGTTA CTGATACTGC TACTGCAAAC TGACAGTTGA -1862

CACCAACTTT AAGCAACCTC TTAATACAAC AAGCCGCTGG ATAGTCAACA TCACTACTAG AGCACAGCTG GGCTGTGTGT AGACACAGTG TCAAGAGTAT -1762

AGTGCACCCA GTGCTGAAAC TGTGTGAGTT GCACACTAAC CAGCCATGAG AGGAGTGTTG GGATGGGGTG TCCCTATCGC AATGCACCAC ATTATACTGT -1662

CGGTCATTGC TTTCTAGAGA TATCTATATA ATAAACATGA CAAATTCTAA TAAATGAAGA TGTGACATGA ATAAAGAGTG AGTGTACTTT ACAGTCTACT -1562

                                AP1                                     SOX5
TATTGGCTGA CAACTGTCTA TGTATAGCAC TGAGTGAGCA GTTACTCCAT CACATTTACA TAACAATTGT AATGACAGGG TCGTAATGAT GGACCCCCAC -1462

                                                                                                   SP1
CACTGCCAAC CCCTTCCCCA GTAGATATTT GGCCTTGTGT GTGATGTGTG AGCAATTTTT CTTTACAGTG AATTCAGAGG GGGTGGTGAT GTGTTAAAGG -1362
     SOX3                                                                                  AP1
TACCTTCTGC CTTTCTGTCT CTAAAGTGAA TGCAGCAGAC AGGGAAGCAA TATGGTAATG AGCGGTTGTC TGTGGGGACT CATTCAGGTA CAAGGCCTTT -1262
                CREB                                    GATA1
AGTGGGTAGA ATGAGGTCAA AAGGAGAATT GTAGTGATTC TGGTGATAAG GGACAATCAC TGATCCCCCT TTCTGCTGGA ATGTTGGTGT AATAATGCAA -1162
                                                        GATA1
TTGCCACAAT GCTGTTTAAT TGCTCCTCAG TAGTGATGAC TTTCTATCAC CACTATCATC ATTTCTATCA GTCTTTCTAA GAGCTGTGAG GTGTTGTAGC -1062
                CREB
TGTTTGGATA ATTCATTGAT GTAATTAAAC TTCACTAAAC AAACATTTTG TAAAACTTAC ATTGGCTTAT GTTTCCAATG TAAAGGCTTC ACAGACTTGT -962

                                                                                CREB
TGTTAGTGGC CACCTCAGCC TCATGGGGTT GTTTCAATGG AATATTTCAA TGGAAGTGTA AATGAACTGA CATACATGAA ATTTATGGTC AAGCATGGTC -862

ATTTGCATTC AATTTGTTCA GTCTCACTTG AATATTTACT GTATGTGTAT TTTGTCAGGC AAATTAAGTT ACACTGGGCA AAGAACTAGG GATCTAAAAT -762

ATTTTAATGC ATAGCTTTTA ATCCCAGTAT TTTTACGCAT ACATTAAGGC CATTGCAAAA CTGTAGTTAA ATTTATTTCT GTATTAAAGA GGCTGCTTTT -662

                                                                                SOX5
ACAACTTTTG GTGATCTTTA TGGAAACATC CCCGTAATAA TACATTTTCA TTCCCACCTT TTTTAAACAA TACAAAACAG CAGCTGTTAT TAAAAAAAAG -562
 GATA1
GAAATTATCT GTAAGATGCT TTGGCTATTC TCCTTCTCTC CGTGTGTGTG TGTCCGTGTG ACCGTGCGCG CGCGCGCGTG TATATTGAAC CTGTATACCG -462
                                PPARγ                                   GATA1
TAAGCGCTGA AGGCATTTTA ATAGGCTACA TGTGACTGCC AAAGGAGATG GTGCGCCACC CAGATATTGC ACAAATATGA CAAGTTCCAC CGTTTCTTCT -362
                                GATA1                                   SP1
TTCGAAGACA AAAAATGAAG GCATGTAACA GTTGTGATAA AACGATTTGA TTTTAGTTCT GTTCTGGGGT GGGCGGTCGA ACTTAGGTGT TTGGTGTGTG -262

TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG CGTGCGTGCG TGCGTGCGTG TGTGGGGGGG AGGAGGAACA GCGACTTAAG TGGGCGGCCA -162
                                                                        +1
CATAAAAACT GCAGACAACA TCAGGCGCGC GATCAGAGTG TCCGTGATAA ACGAGTGATG AACTAGTGGA GATAGGAGCC GAGTG                  +23
                                                                        TSS
```

图3 黄颡鱼 *bmp*4 启动子预测的转录因子结合位点

Fig.3 The predicted transcription factor binding sites of the *bmp*4 promoter region in yellow catfish

表2 黄颡鱼 *bmp*2*a* 与 *bmp*4 启动子与其他物种同源性分析

Table 2 Promoter sequence identity of *bmp*2*a* and *bmp*4 from *P. fulvidraco* and other species %

基因 Gene	斑点叉尾鮰 *Ictalurus punctatus*	斑马鱼 *Danio rerio*	热带爪蟾 *Xenopus tropicalis*	小鼠 *Mus musculus*	智人 *Homo sapiens*
*bmp*2*a*	33.8	35.6	34.4	35.0	31.3
*bmp*4	83.2	40.1	36.7	38.4	40.9

基因的登录号如下(顺序分别为斑点叉尾鮰、斑马鱼、非洲爪蟾、小鼠、智人):*bmp*2*a*(NC_030424.1,NC_007128.7,NC_030681.1,NC_000068.7,NC_000020.11);*bmp*4(NC_030424.1,NC_007128.7,NC_030684.1,NC_000080.6,NC_000014.9)。Accession numbers as follows (the order is *Ictalurus punctatus*, *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*): *bmp*2*a* (NC_030424.1, NC_007128.7, NC_030681.1, NC_000068.7, NC_000020.11); *bmp*4 (NC_030424.1, NC_007128.7, NC_030684.1, NC_000080.6, NC_000014.9).

3 讨 论

为了研究黄颡鱼 *bmp*2*a* 与 *bmp*4 基因的表达调控机制,本研究克隆了 *bmp*2*a* 与 *bmp*4 基因转录起始位点上游 1 830 bp 和 1 962 bp 序列,发现它们的启动子含有关键转录因子 AP1、SP1、E-box、GATA1、CREB、PPARγ、SOX5、SOX6 和 SOX9 等的结合位点。AP1 (activating protein1) 是细胞核内重要的转录调控因子,在生长发育、细胞分化与凋亡和免疫调节等过程中具有重要作用[14]。AP1 是细胞核内介导众多信号转导途径的聚集点,首先细胞外的刺激信号由上游信号通路传递至细胞核内,进而激活 AP1 调控下游含有 AP1 结合位点的靶基因表达水平,从而使机体针对外界的刺激作出适应性反应。SP1 (specificity protein 1) 对 GC-box 有很强的亲和力,是众多基因的基本转录调控因子,在多种组织中广泛表达,几乎参与行使机体内所有细胞功能,在细胞的增殖与分化、动物体的生长与繁殖等方面发挥着重要的作用[15-16]。E-box 是一个广泛参与众多基因转录调控的顺式功能元件,能够促进或抑制相关基因的表达进而影响细胞的增生、分化、组织特异性反应以及细胞的死亡[17]。GATA1 是一种含有 2 个锌指结构的转录因子,参与红细胞、巨核细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞的多种生物学功

能[18]。CREB（cAMP response element binding protein）是一种重要的核转录因子，其生理功能包括调控基因的转录、生理节律、细胞与胚胎的发育以及成体神经发生等[19]。PPARγ（peroxisome proliferator activated receptors）是需要特异性配体激活的核转录因子。PPARγ 通过识别特异性配体，与特异性配体结合而被激活，转录调控一系列靶基因的表达，从而参与脂质代谢、脂肪形成、细胞分裂和凋亡等多种生物学过程[20]。SOX（SRY related HMG-box gene）基因家族的共同特点是均含有一个与 SRY 的 HMG box 同源的高度保守的 HMG-box DNA 结合域[21]。SOX 基因家族广泛参与了动物的早期胚胎发育、性别决定和分化、神经系统发育、软骨及多种组织器官的形成，具有重要的生物学功能。SOX5、SOX6 与 SOX9 转录因子在软骨生成阶段表达于所有的软骨前细胞和分化的软骨细胞[22]。

在真核生物中，启动子位于基因的 5′端上游，它通过与 RNA 聚合酶Ⅱ结合，调控基因的表达。一个启动子上通常有众多的转录因子结合位点，某些相对应的转录因子与 RNA 聚合酶Ⅱ结合形成转录起始复合体，进而参与基因转录的起始过程。在 *bmp2a* 与 *bmp4* 启动子转录起始位点附近区域筛选出的转录因子中不存在典型的 RNA 聚合酶Ⅱ结合元件 TATA-box，这似乎是大多数 BMP 家族基因启动子共有的特性[23-24]。已有研究证明在哺乳动物中只有 10%～20%基因的启动子含有 TATA-box，而缺少 TATA-box 的启动子也可以调节基因的组织特异性表达[25-26]。在鱼类，TATA-box 调控基因表达的机制还需要进一步研究。由于 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因表达水平对骨骼与脂肪的生成、器官的发育起着重要作用，且转录因子 AP1、SP1、E-box、GATA1 和 CREB 等结合位点也存在于其他物种的 BMP 基因家族的启动子区[24,27]，因此，可以初步推断出 AP1、SP1、E-box、GATA1、CREB、PPARγ、SOX5、SOX6 和 SOX9 等转录因子可能对 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因的表达调控及功能行使具有重要作用。黄颡鱼 *bmp2a* 启动子序列与其他物种对应基因启动子序列的低同源性表明其调控下游基因的转录可能具有物种特异性，*bmp4* 启动子序列与斑点叉尾鮰 *bmp4* 启动子序列的高同源性则表明黄颡鱼与斑点叉尾鮰的 *bmp4* 启动子调控下游基因转录方式具有高度的保守性。本研究可为进一步研究黄颡鱼 *bmp2a* 与 *bmp4* 基因的功能及其他相关转录因子的调控网络提供一定参考。

参　考　文　献

[1] URIST M R, MIKULSKI A, LIETZE A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein[J]. PNAS USA, 1979, 76(4): 1828-1832.

[2] REDDI A H, REDDI A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(5/6): 341-342.

[3] TERMAAT M F, DEN BOER F C, BAKKER F C, et al. Bone morphogenetic proteins: development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects[J]. J Bone Joint Surg Am Vol, 2005, 87(6): 1367-1378.

[4] CHEN D I, ZHAO M, MUNDY G R. Bone morphogenetic proteins[J]. Growth factors, 2004, 22: 233-241.

[5] KATO S, KAWABATA N, SUZUKI N, et al. Bone morphogenetic protein-2 induces the differentiation of a mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26, into mature osteoblasts and adipocytes[J]. Life Sci, 2009, 84(9/10): 302-310.

[6] BRAGDON B, MOSEYCHUK O, SALDANHA S, et al. Bone morphogenetic proteins: a critical review[J]. Cell Signal, 2011, 23(4): 609-620.

[7] OTTO T C, BOWERS R R, LANE M D. BMP-4 treatment of C3H10T1/2 stem cells blocks expression of MMP-3 and MMP-13[J]. Biochem Bioph Res Co, 2007, 353(4): 1097-1104.

[8] KANG Q, SONG W X, LUO Q, et al. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(4): 545-559.

[9] 刘天婵，余应年. 生物信息学在基因转录调控研究中的应用[J]. 中国病理生理杂志，2004，20(4)：668-672.

[10] KIM J, AULT K T, CHEN H D, et al. Transcriptional regulation of bmp-4 in the xenopus embryo: analysis of genomic BMP-4 and its promoter[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 250(2): 516-530.

[11] GHOSH-CHOUDHURY N, CHOUDHURY G G, HARRIS M A, et al. Autoregulation of mouse BMP-2 gene transcription is directed by the proximal promoter element[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286(1): 101-108.

[12] XU Y H, LUO Z, WU K, et al. Structure and functional analysis of promoters from two liver isoforms of CPT I in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11): 2405. https://doi.org/10.3390/ijms18112405.

[13] ZHUO M Q, LUO Z, XU Y H, et al. Functional analysis of promoters from three subtypes of the PI3K family and their roles in the regulation of lipid metabolism by insulin in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): 265. https://doi.org/10.3390/ijms19010265.

[14] KARIN M, LIU Z, ZANDI E. AP-1 function and regulation[J]. Curr Opin Cell Biol, 1997, 9(2), 240-246.

[15] XIA X, YAN C, WU W, et al. Characterization of the porcine peptidylarginine deiminase type Ⅵ gene (*PADI6*) promoter: Sp1 regulates basal transcription of the porcine *PADI6*[J]. Gene, 2016, 575: 551-558.

[16] NALVARTE I, TÖHÖNEN V, LINDEBERG M, et al. Estrogen receptor β controls MMP-19 expression in mouse ovaries during ovulation[J]. Reproduction, 2016, 151(3): 253-259.

[17] PICKWELL G V, SHIH H, QUATTROCHI L C. Interaction of upstream stimulatory factor proteins with an E-box located within the human CYP1A2 5′-flanking gene contributes to basal transcriptional gene activation [J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65(7): 1087-1096.

[18] DU C, XU Y, YANG K, et al. Estrogen promotes megakaryocyte polyploidization via estrogen receptor beta-mediated transcription of GATA1[J]. Leukemia, 2017, 31(4): 945-956.

[19] DWORKIN S, MANTAMADIOTIS T. Targeting CREB signalling in neurogenesis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14(8): 869-879.

[20] TONTONOZ P, SPIEGELMAN B M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARγ[J]. Annu Rev Biochem, 2008, 77: 289-312.

[21] BOWLES J, SCHEPERS G, KOOPMAN P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factorsbased on sequence and structural indicators[J]. Dev Biol, 2000, 227(2): 239-255.

[22] LEFEBVRE V, LI P, DE CROMBRUGGHE B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type Ⅱ collagen gene[J]. EMBO J, 1998, 17(19): 5718-5733.

[23] SIMON M, FELIERS D, ARAR M, et al. Cloning of the 5′-flanking region of the murine bone morphogenetic protein-7 gene [J]. Mol Cell Biochem, 2002, 233(1/2): 31-37.

[24] MA Q, FENG W, ZHUANG Z, et al. Cloning, expression profiling and promoter functional analysis of bone morphogenetic protein 6 and 7 in tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Fish Physiol Biochem, 2017, 43(2): 435-454.

[25] HOCHHEIMER A, TJIAN R. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissuespecific gene expression[J]. Genes Dev, 2003, 17(11): 1309-1320.

[26] LING F, WANG T, WEI L, et al. Cloning and characterization of the 5′-flanking region of the pig *AgRP* gene[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(4): 2233-2239.

[27] KAWAI S, SUGIURA T. Characterization of human bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 gene promoters: activation of BMP promoters by Gli, a sonic hedgehog mediator[J]. Bone, 2001, 29(1): 54-61.

Molecular cloning and analysis of *bmp2a* and *bmp4* promoters in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*

TAI Zhipeng XU Yihuan ZHANG Dianguang TAN Xiaoying

College of Fisheries/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, *China*

Abstract To explore the function of the *bmp2a* and *bmp4* genes and regulatory networks of the related transcription factors in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, RLM-5′RACE method was used to identify the transcription start site (TSS) of *bmp2a* and *bmp4*. Then, the promoters of *bmp2a* and *bmp4* were cloned by hiTAIL-PCR method and a cluster of putative binding sites of several transcription factors were identified by bioinformatics analysis. The results showed that the TSS of *bmp2a* and *bmp4* were located at 391 bp and 351 bp upstream of the coding sequence, respectively. Then 1 830 bp and 1 962 bp upstream of the TSS of *bmp2a* and *bmp4* were cloned and key binding sites of several transcription factors, such as AP1, SP1, GATA1, CREB, PPARγ, SOX5, SOX6 and SOX9, were predicted, suggesting that these transcription factors may play crucial roles in the transcriptional regulation of the *bmp2a* and *bmp4* genes.

Keywords *Pelteobagrus fulvidraco*; bone morphogenesis protein, BMP; promoter; transcription factor

(责任编辑:边书京)