

家兔 *BMP7* 基因 3'UTR 的克隆及序列分析

赵巧辉¹, 陈其新², 李明², 石晓卫¹, 刘孟洲¹

(1 甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

【摘要】【目的】研究家兔 *BMP7* 基因 3'非翻译区(3'UTR)序列的结构及功能特点。【方法】以家兔肾脏组织为材料,应用 3'RACE 技术对家兔 *BMP7* 基因 3'UTR 序列进行扩增,并与 GenBank 中登陆的其他哺乳动物相应序列进行比较分析。【结果】成功克隆了家兔 *BMP7* 基因的 3'UTR(GenBank 号:EU004072);在 3'UTR 序列末端存在 2 个切割与胞质多聚腺苷化特异因子(CPSF)结合位点(AAUAAA)和 1 个 11 bp 的 poly(A)。家兔 *BMP7* 基因 3'UTR 序列与小鼠、人、牛和猪的一致性分别为 41.45%, 50.30%, 47.84% 和 57.91%, 相对不保守。【结论】家兔 *BMP7* 基因 3'UTR 结构特点可能与其基因功能有关。

【关键词】 家兔; 哺乳动物; 骨形态形成蛋白 7; 3'UTR; 生物信息学分析

【中图分类号】 S829.11

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)02-0011-04

Cloning and sequence analysis of the 3'UTR of rabbit *BMP7*

ZHAO Qiao-hui¹, CHEN Qi-xin², LI Ming², SHI Xiao-wei¹, LIU Meng-zhou¹

(1 Animal Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2 Animal Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, He'nan 450002, China)

Abstract: 【Objective】The research investigated the structural and functional characteristics of 3' untranslated region (3'UTR) of rabbit bone morphological protein 7 gene (*BMP7*). 【Method】Taking the domestic rabbit kidney organization as the material, 3'UTR of rabbit *BMP7* gene was cloned by RACE method, then comparative analysis was conducted using bioinformation methods. 【Result】The sequence of 3'UTR of rabbit *BMP7* gene was cloned firstly (Genbank accepted number is EU004072). There were 2 binding sites of cleavage and ployadenylation factor specificity factor (CPSF) and a poly A tail (11 bases at length). The 3'UTR of rabbit was 41.45%, 50.30%, 47.84% and 57.91% identical to those of mouse, human, cow and pig respectively. 【Conclusion】The structure of 3'UTR of rabbit *BMP7* gene may be related to the function of the gene.

Keyword: rabbit; mammalian; *BMP7*; 3'UTR; bioinformation analysis

骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic proteins, BMPs) 在胚胎的发生和发育过程中起着重要的调节作用^[1]。BMP7 是骨形态发生蛋白家族中的一员, 主要在骨、肾组织中表达, 特别在骨骼发育和骨折愈合过程中高表达。BMP7 的生物学功能非常广泛^[2]。首先, BMP7 具有异位成骨作用, 在骨骼的

发育中也起一定的调节作用; 在体内可通过膜内成骨和软骨内化骨 2 种方式诱导成骨, 其中软骨内化骨为其主要成骨方式。其次, BMP7 在肾脏发育中起着重要的调节作用。最后, BMP7 还与动物繁殖机能有关^[3], 参与动物卵泡发生、黄体形成以及类固醇激素合成等生殖生理调节过程, 可降低大鼠初级

* [收稿日期] 2008-03-13

[基金项目] 河南省教育厅自然科学基金项目(2007230003); 河南省科技攻关项目(0524030011)

[作者简介] 赵巧辉(1982-), 女, 河南郑州人, 在读硕士, 主要从事动物生产系统与工程研究。E-mail: zhaoqiaohui@163.com

[通信作者] 刘孟洲(1938-), 男, 陕西安康人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

E-mail: mengzhouliu@163.com

卵泡数目,增加成熟卵泡数目^[3-6],还可刺激 FSH 分泌,是体内维持 FSH 表达的重要生理因子。

目前,对兔 BMPs 的研究较少^[7],且 GenBank 中尚无家兔 BMP7 基因 3'非翻译区(3'UTR)的报道。为了研究家兔 BMP7 的结构和功能,阐明其在胚胎发生和发育及其他生殖生理过程中的作用,本研究根据 GenBank 中公布的兔 BMP7 基因片段设计并合成特异性引物,应用 RACE 法成功克隆了兔的 BMP7 3'UTR,对该序列的结构特征进行了分析,并以 GenBank 中其他哺乳动物的 mRNA、EST、基因组序列为素材,分析了 3'UTR 结构与 BMP7 基因表达转录后调节的关系,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验材料 无菌采取家兔新鲜肾脏组织,立即置于液氮内冻存,备用。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 TOP10 感受态细胞购自天根生化(北京)有限公司;克隆载体 pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.3 试剂 3'-RACE 试剂盒(3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0)、Hind III 和 EcoR I 限制性内切酶、pMD18-T vector 和 DNA Marker DL2000,均购自 TaKaRa 公司;凝胶 DNA 回收试剂盒,购自北京天为时代有限公司;EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit,购自 Bio Basic Inc. 公司;Taq DNA 聚合酶,购自郑州创生公司。

1.1.4 引物设计与合成 根据 GenBank 发表的 BMP7 序列(GenBank 号:EF583950),采用 oligo 6.0 引物设计软件设计 1 对 3'RACE 特异引物,外侧上游引物 P5:5'-CACGGCCACCAGCAACCACT-3';内侧上游引物 P6:5'-CCAGAACCGCTCCAAG-GCAC-3'。引物由赛百盛生物公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 兔总 RNA 的提取 用总 RNA 抽提试剂盒提取兔肾脏组织总 RNA,具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 家兔 BMP7 基因 3'UTR 的扩增 具体操作参照 3'-RACE 试剂盒说明书进行,即在反转录反应后,分别以 P5 加 RACE outer primer、P6 加 RACE inner primer 进行套式 PCR 扩增。PCR 扩增的反应程序为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 70 s,30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 家兔 BMP7 基因 3'UTR 的克隆、鉴定及 motif 分析 将 3'RACE 产物(命名为 F1 片段)纯化回收后,克隆于 pMD18-T 载体中构建 pMD18-T/F1 重组载体。将 pMD18-T/F1 转化 *E. coli* TOP10,在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中过夜培养,碱裂解法提取质粒,PCR 和双酶切(Hind III/EcoR I)法鉴定所获得的克隆。选取 2 个阳性克隆,送交上海捷瑞公司进行序列测定。用 DNAMAN 6.0 软件对测序结果进行定性及 3'UTR 区的 motif 分析。

1.2.4 家兔与其他哺乳动物 BMP7 基因 3'UTR 的比较生物信息学分析 1) mRNA 3'UTR 序列对比分析。从 GenBank 中查询各种哺乳动物的完整 mRNA 序列或者包含完整 3'UTR 的部分 mRNA 序列,截取其中 3'UTR 序列进行比较分析。3'UTR 相似性和结构分析,均使用 DNASTAR 软件的 clustal V methods 进行。

2) 3'UTR 下游基因组序列对比分析。从 GenBank 查找各哺乳动物 BMP7 基因组序列,截取 3'UTR 下游约 150 bp 长的片段,进行序列特征分析,所用的软件和方法同上。

3) 转录末端特征分析。查询 GenBank 中各哺乳动物 BMP7 基因的 EST 和 UniGene 数据库,获取带有明显 poly(A)尾的 EST,与家兔 BMP7 基因组序列进行对比,分析 BMP7 基因末端类型和组织分布,推测 3'UTR 结构特征与基因表达关系。

2 结果与分析

2.1 家兔 BMP7 基因 3'UTR 的克隆

本试验通过 3'RACE 技术获得长约 875 bp 的 F1 片段,其中包括了 3'RACE 试剂盒所携带的下游内测接头引物(长度为 32 bp),与预期长度一致(图 1)。pMD18-T/F1 质粒经 EcoR I/Hind III 双酶切,得到一条 933 bp 的条带(包括 F1 片段和插入位点两侧 58 bp 的载体序列),与预期结果相符(图 1)。测序结果表明,F1 片段长度为 843 bp,其中包含 397 bp 的家兔 BMP7 mRNA 部分编码序列和 434 bp 的 3'UTR。用 DNAMAN 软件分析,F1 片段中部分 CDS 序列与已知的家兔部分 CDS 序列的相似性为 98.03%,说明扩增产物是家兔 BMP7 3'末端序列。3'RACE 产物末端有 11 bp 长的 poly(A)尾巴,说明本试验获得了家兔 BMP7 基因全长的 3'UTR。

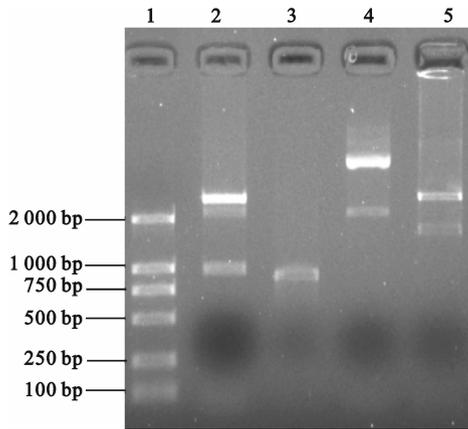


图 1 pMD18-T/F1 的克隆与鉴定

1. DNA Marker; 2. *EcoRI* / *Hind* III 双酶切产物; 3. PCR 扩增产物;
4. 阳性质粒 (pMD18-T/F1); 5. 蓝斑质粒 (pMD18-T) 对照

Fig. 1 Identification of pMD18-T/F1

1. DNA Marker; 2. Double digestion of the pMD18-T/F1 plasmid
by *EcoRI* & *Hind* III; 3. PCR amplification; 4. pMD18-T/F1
plasmid; 5. Blue plasmid (pMD18-T)

2.2 家兔 *BMP7* 基因 3'UTR 的 motif 分析

家兔 *BMP7* 基因 3'UTR 无胞质多聚腺苷酸化信号 (CPEs) UUUUA₁₋₂U、A-U 富集元件 (ARE) AUUUA 或 UUAUUUA 等经典的 mRNA 3'UTR 元件, 但有 2 个切割与胞质多聚腺苷化特异因子 (CPSF) 结合位点 (AAUAAA), 第 1 和第 2 个 CPSF 结合位点与 ploy(A) 起始处的距离分别为 42 bp 和 29 bp, 其间相距 6 bp。

2.3 家兔与其他哺乳动物 *BMP7* 基因 3'UTR 序列对比分析

家兔与小鼠、人、牛、猪 *BMP7* 基因 3'UTR 的同源性分别为 41.45%、50.30%、47.84% 和 57.91%, 表明哺乳动物 *BMP7* 基因 3'UTR 不保守。与 3'UTR 不同, 人、恒河猴、黑猩猩、小鼠、大鼠、牛和犬 3'UTR 下游基因组序列存在包括 CPSF 位点在内的 100 bp 的高度保守区, 小鼠、大鼠、人、恒河猴、黑猩猩、牛和犬的相似性均为 88.89%。

家兔、大鼠、牛、人、黑猩猩、恒河猴等物种 *BMP7* 基因 3'UTR 均有 2 个 CPSF 位点, 而小鼠、猪、犬等动物 *BMP7* 3'UTR 区仅有 1 个完整的 CPSF 位点, 与其他动物相对应的第 1 个 CPSF 位点发生了变异。在所分析的几类哺乳动物 (兔形目、啮齿目、灵长目、食肉目和偶蹄目) 中, 第 2 个 CPSF 位点 100% 一致, 第 1 个 CPSF 位点只在 70% 动物中一致。在 3'UTR 高度保守区内 (即第 2 个 CPSF 位点下游约 70 bp 的范围内), 有 3 个保守的富含 U 或 G/U 的序列。

3 讨论

RACE 是 20 世纪 80 年代末、90 年代初发展起来的一种快速获取 cDNA 全长的方法, 该方法步骤少、耗时短、且经济节省, 得到了广泛的应用^[8]。RACE 的关键影响因素之一是设计特异性的引物, 如果引物的特异性不好, 就会给试验带来困难, 甚至扩增不到预期的产物; 另一关键因素是选择高表达目的基因组织, 并保证所提取的总 RNA 质量。本试验作者在直向同源基因 (orthologous genes) 分析^[9] 以及电子克隆的基础上, 结合已知的兔 *BMP7* 基因 3'UTR 上游序列、人 *BMP7* 基因 3'UTR 片段以及 3'RACE 试剂盒接头引物序列信息, 得到了与实际模板相似的预想模板, 并据此模板设计与试剂盒提供的下游引物相匹配的特异性上游引物, 保证了引物的质量; 同时, 选择了高丰度表达 *BMP7* 的肾脏组织用于试验, 保证了总 RNA 的质量, 因此成功地扩增出家兔 *BMP7* 基因的 3'UTR。

比较分析不同物种、不同进化水平生物相关基因之间的关系, 可为在基因组水平上深入认识哺乳动物间的进化关系、揭示生命的起源提供依据^[9-10]。3'UTR 是真核生物基因的重要结构成分, 其功能主要涉及基因表达调控, 特别是转录后水平的调节^[11-12]。3'UTR 中含有一些主要的顺式作用元件, 如 CPSF 结合位点、胞质多聚腺苷酸化信号 (CPEs)、A-U 富集元件 (ARE)、铁应答元件 (IRE) 等, 这些顺式作用元件通过与反式作用因子的相互作用, 对 mRNA 的稳定性、基因表达定位及翻译效率等生理过程进行调控。3'UTR 在进化过程中有较大的不稳定性, 其序列和长度可以变化。本研究发现, 家兔、人和小鼠 *BMP7* 基因 3'UTR 长度约为 450 bp。Fritz 等^[13] 报道, 啮齿动物、人、狗、鹿、牛等的 *BMP2*、*BMP4* 基因的 3'UTR 长度分别约为 1500 和 300 bp。可见, *BMP7*、*BMP2*、*BMP4* 这几个旁系同源基因的 3'UTR 长度变化符合一般的进化规律。

公认的 3'UTR 高度保守区域的定义是: 在 3 亿年进化历程中, 100 bp 长序列的一致性保持在 70% 以上^[13-14]。本试验发现, 分属于兔形目、啮齿目、灵长目和偶蹄目的家兔、小鼠、人、牛和猪, *BMP7* 基因 3'UTR 的总体序列 (约 450 bp) 一致性小于 60%, 说明 *BMP7* 基因 3'UTR 在进化中相对不保守。

哺乳动物 CPSF 位点及富含 U/G 序列的可选择性提示, 选择性的多聚腺苷酸位点可能是 *BMP7*

基因表达调控的重要机制^[15-16]。CPSF 结合位点一般位于 mRNA 末端,即 poly(A)位点上游 15~35 bp。在断裂位点下游约 14~70 bp 内,一般有断裂刺激因子(Cleavage stimulation factor, CstF)的结合位点。CPSF 和 CstF 协同决定断裂位点,亦即转录本的长度。此外,CPSF 位点与其上游 60 bp 内的 CPE 元件一起参与 mRNA 的胞质磷酸化作用。本研究对哺乳动物 *BMP7* 基因进行了分析,发现其 3'UTR 没有 CPE 元件,因此可以推测 2 个 CPSF 位点的主要意义在于决定转录本的长度。mRNA 的可变终止及多聚腺苷化,可产生具有不同末端的 mRNA,而选择性的多聚腺苷化位点可强烈地影响 mRNA 功能和半衰期。有研究表明,2 个或多个 poly(A)信号可使转基因表达加倍^[16],因此选择性的多聚腺苷酸位点可能也是 *BMP7* 基因表达调控的重要机制^[13,15-16]。当然,有关的推测还需要进一步的试验来证实。

[参考文献]

- [1] Chen D, Zhao M, Mundy G R. Bone morphogenetic proteins [J]. *Growth Factors*, 2004, 22(4): 233-241.
- [2] 赵甜娜, 韩金祥, 王世立. 骨形态发生蛋白 7 的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2005, 12(5): 328-331.
Zhao T N, Han J X, Wang S L. Progress on bone morphogenetic proteins 7 [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2005, 12(5): 328-331. (in Chinese)
- [3] Shimasaki S, Moore R K, Ootsuka F, et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction [J]. *Endocrine Reviews*, 2004, 25(1): 72-101.
- [4] Glister C, Kemp C F, Knight P G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin [J]. *Society for Reproduction and Fertility*, 2004, 127(2): 239-254.
- [5] Glister C, Richards S L, Knight P G. Bone morphogenetic proteins (BMP)-4, -6, and -7 potentially suppress basal and LH-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture; Could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(4): 1883-1892.
- [6] Erickson G F, Fuqua L, Shimasaki S. Analysis of spatial and temporal expression patterns of bone morphogenetic protein family members in the rat uterus over the estrous cycle [J].

- Journal of Endocrinology*, 2004, 182(2): 203-217.
- [7] 刘永斌, 王峰, 田春英, 等. 用 RACE 技术扩增并克隆牛 BMP4 基因 3'端序列 [J]. *生物技术*, 2006, 16(6): 47-50.
Liu Y B, Wang F, Tian C Y, et al. Amplification and cloning of the 3' end sequence of using RACE system from cow [J]. *Biotechnology*, 2006, 16(6): 47-50. (in Chinese)
- [8] 樊红, 李钰. 克隆新基因 cDNA 全长的策略和方法 [J]. *国外医学: 遗传学分册*, 2002, 25(1): 11-13.
Fan H, Li Y. Strategy and method of cloning new gene cDNA full length [J]. *Foreign Medical Sciences: Section of Genetics*, 2002, 25(1): 11-13. (in Chinese)
- [9] 乔纳森·佩夫斯. 生物信息学与功能基因组学 [M]. 孙之荣, 译. 北京: 化学工业出版社, 2006: 340-347.
Jonathan Pevsner. *Bioinformatics and functional genomics* [M]. Translated by Sun Z R. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2006: 340-347. (in Chinese)
- [10] 李培青, 刘焕民, 朱必才. 比较基因组学在哺乳动物进化研究中的应用 [J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28: 47-50.
Li P Q, Liu H M, Zhu B C. Application of comparative genomics in mammalian evolution research [J]. *Journal of Cell Biology*, 2006, 28: 47-50. (in Chinese)
- [11] 江元清, 凌毅, 赵武玲. 真核 mRNA 的 3'非翻译区转录后水平调控作用研究进展 [J]. *植物学通报*, 2001, 18(1): 3-10.
Jiang Y Q, Ling Y, Zhao W L. Progress in the studies on function of 3' untranslated region on post-transcriptional level [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2001, 18(1): 3-10. (in Chinese)
- [12] 陈淑华. 真核生物 mRNA 3'非翻译区的调控功能 [J]. *国外医学: 生理、病理科学与临床分册*, 2003, 23(6): 611-614.
Chen S H. Function regulation of the 3' untranslated region (3' UTR) of eukaryotic mRNA [J]. *Foreign Medical Sciences: Section of Pathophysiology and Clinical Medicine*, 2003, 23(6): 611-614. (in Chinese)
- [13] Fritz D T, Liu D, Xu J, et al. Conservation of BMP2 post-transcriptional regulatory mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48950-48958.
- [14] 侯振芳, 李英, 张亚平. 灵长类和反刍动物生长激素受体的快速进化 [J]. *科学通报*, 2005, 50(1): 1-6.
Hou Z F, Li Y, Zhang Y P. Hormone receptor's tachytelic evolution of primates and ruminant [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(1): 1-6. (in Chinese)
- [15] Zhang H, Lee J Y, Tian B. Biased alternative polyadenylation in human tissues [J]. *Genome Biology*, 2005, 6(12): R100.
- [16] Tasheva E S, Corpuz L M, Funderburgh J L, et al. Differential splicing and alternative polyadenylation generate multiple mimecan mRNA transcripts [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(51): 32551-32556.