

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15346

半滑舌鲷骨形态发生蛋白 4 基因的克隆和表达分析

马骞, 冯文荣, 柳淑芳, 庄志猛, 马慧

山东省渔业资源与生态环境重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 本研究克隆了半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)骨形态发生蛋白 4(BMP4)基因的 cDNA 序列, 并分析其在半滑舌鲷成鱼的组织表达分布及其在早期发育阶段的定位和表达变化趋势。结果表明, 半滑舌鲷 BMP4 基因 cDNA 全长为 1680 bp, 包括了 419 bp 的 5'非翻译区(5'UTR)、编码 403 个氨基酸的 1212 bp 的开放阅读框(ORF)以及 49 bp 的 3'非翻译区(3'UTR)。同源性分析和分子进化聚类分析结果显示, 半滑舌鲷与已报道慈鲷科(Cichlidae)各鱼种的同源性最高, 并与之共同聚为鱼类 BMP4 分支。BMP4 mRNA 在半滑舌鲷成鱼的 13 个组织中具有广泛的分布, 并在鳃组织中表达量最高, 其次在背鳍、软骨等组织具有中等水平的表达。此外, BMP4 基因在早期胚胎发育阶段(卵裂期和原肠期)具有极高水平的表达, 此后其表达水平逐渐降低; 但在后期仔鱼期(孵化后 3 日龄和 4 日龄), 其表达水平再次升高。整体原位杂交检测结果表明, BMP4 mRNA 在早期仔鱼期主要在头部及躯干前部表达; 后期仔鱼 BMP4 基因主要在冠状幼鳍、上下颌及胸鳍处表达; 进入稚鱼期后在鳃盖骨及各鳍均有表达。上述研究结果揭示了 BMP4 在半滑舌鲷早期骨骼发育中的重要作用, 为揭示海水硬骨鱼类骨骼发生、发育的调控机制奠定了理论基础。

关键词: 半滑舌鲷; BMP4; 克隆; 基因表达; 整体原位杂交; 骨骼发育

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)03-0500-13

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族中最大的蛋白家族, 由 20 多个多功能的细胞生长因子组成, 在脊椎动物的骨骼发育中发挥着重要作用^[1]。BMP 家族成员在诱导骨形成过程中的功能主要体现在调节成骨细胞和软骨细胞的生长和分化, 促进骨愈合等^[2-3]。BMP4 是 BMP 家族中诱导成骨等生物学活性最强的活性因子之一, BMP4 主要由成骨细胞分泌合成, 其生物学功能是诱导未分化的间质细胞分化增殖、形成软骨和新生骨, 并且其生物学作用无种属特异性^[4-5]。据报道, BMP4 基因在大鼠骨形成的过程中主要在骨外膜下的前成骨细胞中表达, 并且其表达水平在牵引成骨的过程中显著提高, 表明该基因对于诱导原位骨的形成

至关重要^[6]。罗应伟等^[7]也发现 BMP4 mRNA 在大鼠胚胎下颌骨发育各时期的软骨细胞中均有表达, 提示其与诱导间充质细胞分化及下颌骨形成有关。除此之外, BMP4 还具有多种生物学功能, 参与调节脊椎动物胚胎发育过程中多种器官和组织的发生、发育过程。例如, BMP4 基因敲除会导致小鼠原肠胚的形成及中胚层的分化受到抑制^[8]。在蟾蜍胚胎发育过程中, BMP4 的表达对诱导背侧神经、脊索等的发育具有重要作用^[9]。由此可见, BMP4 是调控脊椎动物生长发育过程的关键生长因子。

目前, 国内外关于 BMP4 基因在调控鱼类生长发育过程的功能研究报道较少。1997 年, Hwang 等^[10]首次从斑马鱼(*Danio rerio*)基因组 DNA 文库中分离到长约 14.9 kb 的 BMP4 基因, 该基因编码

收稿日期: 2015-09-07; 修订日期: 2015-11-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201981); 中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费资助项目(20603022012032).

作者简介: 马骞(1983-), 女, 博士, 研究方向为渔业资源分子生态学. E-mail: maqian@ysfri.ac.cn

通信作者: 庄志猛, 研究员, 研究方向为渔业资源分子生态学. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

400 个氨基酸, 其氨基酸序列与人、小鼠的 BMP4 氨基酸序列之间具有 73% 的相似性。随后, 鱼类 BMP4 基因陆续在大西洋鲑(*Salmo salar*)^[11]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[12]和褐牙鲷(*Paralichthys olivaceus*)^[13]等少数硬骨鱼种类中被克隆并用于基因序列和系统进化分析。在鱼类 BMP4 基因时空表达模式研究方面, BMP4 mRNA 在斑马鱼的胚胎期、仔鱼等早期发育阶段直至成鱼中均有表达, 并且其表达量在胚胎期至 7 日龄左右处于相对较高水平^[14]。此外, BMP4 在褐牙鲷仔鱼阶段有少量表达, 且随着褐牙鲷的变态发育其表达量总体上呈递减趋势^[13]。上述研究中 BMP4 mRNA 在成鱼的组织表达分布特征显示, 斑马鱼 BMP4 mRNA 主要在鳞片、脾、眼、精巢等组织中表达; 而褐牙鲷 BMP4 基因在除肝以外的组织中均有表达, 在肠道、肾和皮肤中的表达量较高。这些研究为揭示 BMP4 基因在海水鱼类生长发育过程中的调控功能奠定了重要基础。

在早期发育阶段的胚胎期、仔鱼期和稚鱼期, 鱼类的个体形态发育特征、生态和生理变化相当剧烈, 并且对环境的变化特别敏感^[15-16]。因此, 研究 BMP4 基因的遗传学特征及功能, 尤其是与早期发育阶段重要形态特征发生、发育的相关性研究, 可作为从分子水平认识鱼类早期生长发育调控机制的基础。半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是中国重要海水增养殖对象, 其在早期发育阶段会经历特殊的变态发育过程。在这个过程中, 鱼体的骨骼形态和位置会伴随着外部形态与游泳方式的

改变而发生显著变化。因此, 本研究选取了半滑舌鳎 BMP4 基因作为研究对象, 克隆其 cDNA 序列并分析 BMP4 基因在成鱼中的组织表达分布特征, 并进一步研究 BMP4 mRNA 在早期发育阶段(卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期)的时空表达模式, 为从分子水平揭示 BMP4 基因与半滑舌鳎骨骼发生、发育过程的相关性提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

基因克隆和组织表达检测用半滑舌鳎取自山东莱州明波水产养殖有限公司, 取健康 3 龄鱼 12 尾(雌、雄鱼各 6 尾)。其中, 雌鱼体长为(583.0±61.3) mm、体重(1479.2±280.8) g; 雄鱼体长(333.3±14.3) mm、体重(170.3±16.9) g。解剖并分别取其脑、吻软骨、背鳍、鳃、性腺、心脏、肠、肾、肝、肌肉、脾、脊髓及胃共计 13 个组织, 立即将样品投入液氮中速冻后, 在低温状态下转移至 -80℃超低温冰箱中保存待用。此外, 选取 3 龄雌雄亲鱼构建半滑舌鳎全同胞家系, 并根据陈大刚^[17]和万瑞景等^[18]对半滑舌鳎早期发育阶段的划分标准, 选取用于实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析用的仔、稚鱼样品(表 1)。其中, 用于基因克隆和荧光实时定量 PCR 检测的样品保存于液氮中用于后续总 RNA 的提取; 用于 RNA 整体原位杂交实验的样品采用新配置的 4%多聚甲醛(PFA)固定液 4℃固定 12~16 h, 随后依次转入 30%、50%和 70%乙醇中逐级脱水, 最后存于 70%乙醇中, -20℃备用。

表 1 早期发育阶段半滑舌鳎样品信息
Tab. 1 Information of *Cynoglossus semilaevis* samples in the early developmental stages

项目 item	胚胎期 embryo stage				仔鱼期 larva stage		稚鱼期 juvenile stage	幼鱼期 fingerling stage
	卵裂期 cleavage stage	原肠期 gastrula stage	胚胎期 embryonic stage	孵化期 hatching stage	前期仔鱼 early- stage larvae	后期仔鱼 late- stage larvae		
取样时间 sampling time	3 hpf	13 hpf	22 hpf	32 hpf	1, 2 dph	3, 4, 5, 10, 15 dph	20, 30, 40, 50 dph	90 dph
qRT-PCR 样品数量 samples for qRT-PCR	20 粒	20 粒	20 粒	20 粒	6 尾	6 尾	6 尾	6 尾

注: hpf 表示受精后时龄, dph 表示孵化后日龄。
Note: hpf represents hours post fertilization; dph represents days post hatching.

1.2 引物设计

根据 GenBank 数据库中已有的鱼类 *BMP4* cDNA 序列, 遵循引物设计原则, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物 BMP4-F 和 BMP4-R(表 2), 用于扩增 *BMP4* 基因的部分序列。随后, 基于上述 *BMP4* cDNA 部分序列分别设计

用于 3'和 5'RACE 扩增实验所需的引物(BMP4-3'-OUTER/INNER 和 BMP4-5'-OUTER/INNER)。此外, 根据克隆到的半滑舌鲷 *BMP4* cDNA 序列设计用于实时荧光定量 PCR 检测的引物(BMP4-RT-F/R), 并设计引物(BMP4-HY-F/R)扩增 *BMP4* 基因片段用于合成 RNA 整体原位杂交探针。

表 2 本研究所用的引物序列
Tab. 2 Oligonucleotide primers used in this study

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	应用 amplification target
BMP4-F BMP4-R	CCTGGTAAYCGAATGCAATGCTGATGGT GNGCCACDATCCARTCRTTCCA	<i>BMP4</i> 部分序列扩增 cDNA fragment of partial <i>BMP4</i>
BMP4-5'-OUTER BMP4-5'-INNER	TGGTGTAAGGAACGGCTGATGCGGAC GGATGCTGCTGAGGTTGAACAGGAAA	5' RACE 扩增 5' RACE amplification
BMP4-3'-OUTER BMP4-3'-INNER	TCCTGTTCAACCTCAGCAGCATCCCA CGTCCGCATCAGCCGTTCTTACACCA	3' RACE 扩增 3' RACE amplification
BMP4-RT-F BMP4-RT-R	CGCATCAGCCGTTTCCTT CATTCCAGCCTACGTCATAAA	<i>BMP4</i> 的荧光定量 PCR 检测 expression of <i>BMP4</i>
BMP4-HY-F BMP4-HY-R	ATGATTCTGCTGTAATCGAATGC CGATTGCGTTTACGACCCCT	<i>BMP4</i> 的原位杂交 in situ hybridization of <i>BMP4</i>
EF1A-F EF1A-R	GACAACTGAAGGCHGAGCG CAGCCTGAGAGGTTCCAGTGAT	mRNA 组织表达分布的内参 expression of <i>EF1A</i>
18S-F 18S-R	CCTGAGAAACGGCTACCACATCC CCAATTACAGGGCCTCGAAAG	早期发育阶段 mRNA 表达水平检测的内参 expression of 18S rRNA

1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

将半滑舌鲷成鱼的组织样品和早期发育阶段的全鱼样品在液氮中研磨后, 利用 Trizol 法 (Invitrogen)提取总 RNA。经检测浓度和纯度, 以提取的总 RNA 为模板, 利用 PrimeScript RTase 试剂盒(TaKaRa)合成第一链 cDNA。

1.4 *BMP4* 基因 cDNA 全序列的克隆

首先, 利用上述引物 BMP4-F/R, 以半滑舌鲷第一链 cDNA 为模板, 扩增 *BMP4* cDNA 的部分序列。PCR 反应体系为 25 μ L, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。RACE 扩增选取 SMARTer RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech), 用于扩增半滑舌鲷 *BMP4* 基因的 cDNA 全序列。PCR 反应体系及反应条件按试剂盒说明操作。上述 PCR 产物经回收纯化、连接、转化与重组子检测等, 送华大基因测序。

1.5 *BMP4* mRNA 的组织分布及其在早期发育阶段的表达水平检测

应用实时荧光定量 PCR 方法, 利用基因特异

性引物 BMP4-RT-F/R (表 2), 以半滑舌鲷第一链 cDNA 为模板, 检测 *BMP4* mRNA 在半滑舌鲷成鱼的组织分布以及早期发育阶段的表达变化。如表 2 所示, 分别选取延伸因子(elongation factor 1-alpha, *EF1A*)和 18S 核糖体 DNA(18S ribosomal RNA, 18S)基因作为荧光定量 PCR 的内参基因^[19]。实验流程参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒 (TaKaRa)操作说明, 在 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪上进行。所有引物均经过扩增效率检测($E>90\%$; $R^2>0.990$), 荧光定量 PCR 产物经测序验证, 每个样品设置 3 个重复。

1.6 RNA 整体原位杂交

利用含有 *BMP4* 基因片段(903 bp)的重组质粒(pGEM-T, Promega)作为模版制备地高辛标记的 RNA 探针, 首先用限制性内切酶 *Noc* I (NEB Biolabs)将重组质粒线性化, 再用地高辛标记 UTP(DIG-UTP)和 SP6 反转录酶 (DIG RNA Labeling Mix, Roche)体外合成地高辛标记的反义 RNA 探针。反应体系为 10 μ L, 包括线性化质粒

DNA 4 μg , 1 μL 10 $\times$ buffer, 1 μL DIG-UTP Mixture, 1 μL 反转录酶, 1 μL RNA 酶抑制剂。整体原位杂交实验参照 Holland 等^[20]的方法进行。选取各早期发育阶段的仔、稚鱼固定样品, 进行梯度复水并洗涤, 蛋白酶 K 消化, 4% PFA 固定, 乙酰化; 加入杂交液 60 $^{\circ}\text{C}$ 下预杂交 3 h, 加入 RNA 探针(终浓度为 1 ng/ μL)60 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 16 h; 杂交完成后逐级洗涤, 封闭液(blocking reagent, Roche)室温作用 2 h, 加入碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(1:2000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 洗去抗体, 加入 NBT/BCIP(氯化硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸)进行显色反应, 待出现阳性信号时终止显色; 将胚胎置于 80%的甘油, 使用尼康体视显微镜 SMZ1500 进行观察拍照。

1.7 数据处理

DNA 和推测的氨基酸序列使用 EditSeq 和 DNAMAN 软件进行分析; 使用 NCBI 中的 BLAST 和 DNASTAR 软件, 分析半滑舌鳎与其他脊椎动物 BMP4 氨基酸序列的同源性; 推测的半滑舌鳎 BMP4 氨基酸序列用 ClustalX 软件与其他物种的 BMP4 氨基酸序列进行多重序列比对; 用 MEGA5.1 基于 Neighbor-Joining (NJ)方法构建系统进化树, 针对拓扑树各分支结点均进行重抽样检验, 各重复 1000 次^[21]。根据荧光实时定量 PCR 测得的 C_t 值, 运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 BMP4 基因的表达量。研究结果均以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示, 并利用 SPSS 16.0 软件中的 One-way ANOVA 分析 BMP4 mRNA 表达量在不同组织及各发育时期间的差异水平。

2 结果与分析

2.1 BMP4 基因全长 cDNA 的克隆和序列分析

如图 1 所示, 半滑舌鳎 BMP4 基因的 cDNA 全长为 1680 bp(GenBank 登录号: KC422339)。序列分析结果显示, BMP4 cDNA 由 419 bp 的 5'非翻译区(5'UTR)、1212 bp 的开放读码框(ORF)以及 49 bp 的 3'非翻译区(3'UTR)组成, 编码 403 个氨基酸。BMP4 氨基酸序列包含由 20 个氨基酸组成的信号肽区域和 383 个氨基酸组成的成熟肽区域,

预测其分子量为 46.07 kD, 等电点(pI)为 7.96。对半滑舌鳎 BMP4 氨基酸序列进行 BLAST 比对, 结果显示其具有保守的 Transforming growth factor-beta (TGF-beta)结构域, 属于转化生长因子 β 超家族。此外, 半滑舌鳎 BMP4 在 C 端成熟肽区域还具有 BMP 家族成员共有的 7 个半胱氨酸残基以及 1 个 BMP 家族标准的 RISR 序列(图 1)。

2.2 BMP4 基因的系统进化分析

半滑舌鳎与其他脊椎动物 BMP4 氨基酸序列比对结果表明(图 2), 脊椎动物 BMP4 氨基酸序列在 C 端具有较高的同源性, 不同物种的 BMP4 氨基酸序列存在极其保守的 7 个半胱氨酸残基、3 个 N 糖基化位点及 1 个蛋白水解位点(RXSR)。

运用 MEGA5.1 对半滑舌鳎和其他已报道的脊椎动物 BMP4 氨基酸序列进行系统进化分析, 结果表明, 半滑舌鳎与慈鲷科鱼种的 BMP4 遗传距离较近, 为 0.043~0.051(表 3)。而在硬骨鱼类 BMP4 同源性分析中, 半滑舌鳎与斑马鱼(*Danio rerio*)的遗传距离最大, 为 0.214。此外, 系统进化分析结果也表明, 慈鲷科 18 个鱼种的 BMP4 聚为一支, 而半滑舌鳎作为独立的一个分支与剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)和慈鲷科鱼类 BMP4 聚为一支(图 3)。

2.3 BMP4 mRNA 的组织表达分布及其在早期发育阶段的表达变化分析

利用实时荧光定量 PCR 技术检测半滑舌鳎成鱼 BMP4 mRNA 的组织表达分布。结果表明, BMP4 mRNA 具有较为广泛的组织分布特性。如图 4 所示, BMP4 在半滑舌鳎鳃组织中的表达量最高, 在背鳍、软骨、脾、心脏中具有中等水平的表达量, 在肾、肝、脊髓和性腺中的表达水平最低。差异显著性分析结果表明, 半滑舌鳎 BMP4 mRNA 在不同组织中的表达水平存在显著差异($P<0.05$)。

如图 5 所示, BMP4 基因在早期胚胎发育阶段(卵裂期和原肠期)具有极高水平的表达量; 在胚胎期(22 hpf)其表达水平骤降, 随后维持在较低水平; 但在后期仔鱼期(孵化后 3 日龄和 4 日龄)其表达水平显著提高。在孵化 10 日龄之后, 半滑舌鳎

```

1      ggagaagttttctctctgtgtgctgcgcctgcaccaactcttactgttgccgtgagt
61     ggaggcgggttgagagacgcgcgtgtgagtcggtgtgcgcggcggttactgtctgtctc
121    tcggcgcggtgtgaattttgtctcgtctgtgtggccgaaggattaatgagccgcaggagac
181    gaacagttttctctctgtgaggtcatttttaaggetttagcctggactgcgtttcagagc
241    ttctctttcacattcactctgtctgagagatacctggacctctactgatggaacagggtca
301    ctccaacgtttctctgcagccgcccacaccacctaactttgttggaataacgggtcca
361    tcgcctgtctcccaacaacatggactgttttcccatgctttattttctgtcgagacatA
421    TGATTCCTGGTAATCGAATGCTGATGGTCATTTAATATGCCAAGTCCTGCTGGGAGAGA
1      M I P G N R M L M V I L I C Q V L L G E
481    GCAACCATGCTAGTCTGATACCTGAAGAGGGGAAAAAGAAAGTACCGGGCTGCAGGGTC
21     S N H A S L I P E E G K K K V P G L Q G
541    GTTCGGCCGCTCAGAGCCATGAATGCTGCGGGACTTTGAGGCCACGCTGCTGCACATGT
41     R S A A Q S H E L L R D F E A T L L H M
601    TCGGCCTCAAGAGGCGGCCAAGGCCAGCCGCTCCACCACGTCCTCGCTACTTGTGG
61     F G L K R R P R P S R S T T V P R Y L L
661    ACCTCTATCGACTACAGTCGGGGAGGCCGAGGAGGCCGAGGACGATATTGCTTTCG
81     D L Y R L Q S G E A E E A G G H D I A F
721    AGTATCCAGAGAGGTCAGCCAGCCGGGCCAACACTGTAAGAGGCTTCCACCATGAAGAGC
101    E Y P E R S A S R A N T V R G F H H E E
781    ACATGGAAAGGGTGCATGAGCTGGACGATGGAGAAGCCACGCCCTGCGTTTCTGTTC
121    H M E R V H E L D D G E A T P L R F L F
841    ACCTCAGCAGCATCCAGAAGATGAGCTGCTCTTCTGCTGAACCTCGGCTCTACGGGC
141    N L S S I P E D E L L S S A E L R L Y R
901    AGCAGATCGACGAGGCCCTGGCCGACAGCCTCTCAGTCCAGCAGGGGCTTCACAGGATAA
161    Q Q I D E A L A D S L S V Q Q G L H R I
961    ACGTGTATGAGGTTTGAAGCCCCCGGCTGGGAGCTGATAACGCAGCTTTGGATA
181    N V Y E V L K P P R P G Q L I T Q L L D
1021   CTCGGCTTGTGCCCAACGCGTCCCGTTGGGAGAGCTTTGACGTGAGCCCCGACGTGC
201    T R L V R H N A S R W E S F D V S P A V
1081   TGCCTGGACTCGTGAGCGCCTCCCTAATTACGGCTAGCAATAGAGGTGCAGCACCTCA
221    L R W T R E R L P N Y G L A I E V Q H L
1141   ACCAGACTCCGCGCCACCAGGGCCGACACGTCCGCATCAGCCGTTCTTACACCAGGAGC
241    N Q T P R H Q G R H V R I S R S L H Q E
1201   CCGGTGAGGACTGGGAGCAGTACGCCCCCTACTGGTCACATTGGCCATGACGGGAAAG
261    P G E D W E Q L R P L L V T F G H D G K
1261   GTCACCCTTGAACCGCCGACCAAGCGCAGCCCCAAGCAAAGGGTCGTAACGCAATC
281    G H P L T R R T K R S P K Q R G R K R N
1321   GCAACTGCCGGCGTCACGCACTGTACGTGGACTTAGTGACGTAGGCTGGAATGACTGGA
301    R N C R R H A L Y V D F S D V G W N D W
1381   TAGTGGCGCCCCCTGGTTACCAGGCGTATTACTGCCATGGGGAATGCCCTTTCCTCTGG
321    I V A P P G Y Q A Y Y C H G E C P F P L
1441   CAGATCATCTGAACCTCACTAACCATGCCATTGTTGAGACACTGGTGAACCTGTGAACA
341    A D H L N S T N H A I V Q T L V N S V N
1501   GCAACATTCCCAAGGCTGTGCGTCCCAACAGAGCTCAGCGCATCTCCATGCTCTACC
361    S N I P K A C C V P T E L S A I S M L Y
1561   TGGACGAACATGACAAGGTGGTCCTAAAAAACCACAGGAGATGGTAGTGGAGGGCTGCG
381    L D E H D K V V L K N Y Q E M V V E G C
1621   GCTGCCGCTAAcacacactaagtagaactggacttgactggccactagaaaaaaaaaa
401    G C R *

```

图 1 半滑舌鳎 *BMP4* 基因及推导的氨基酸序列

5'UTR 和 3'UTR 用小写字母列出, 信号肽序列用下划线标出, 黑色框标记半胱氨酸残基, 蛋白水解位点 RISR 用双下划线标出, 终止密码子用星号标出。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Cynoglossus semilaevis BMP4* gene

The lowercases indicate the 5'UTR and 3'UTR. The signal peptide is underlined; Cys residues are boxed; RISR sequence is double underlined. The stop codon is marked by an asterisk.

[illegible]

图 2 半滑舌鳎与其他脊椎动物的 BMP4 氨基酸序列比对

信号肽序列用灰色阴影标出, 半胱氨酸残基用黑色框标记, 蛋白水解位点 RISR 用双下划线标出, N 糖基化位点用单下划线标出。

Fig. 2 Alignment of BMP4 amino acid sequences of *Cynoglossus semilaevis* and other vertebrates. The signal peptides are boxed by shaded rectangles; Cys residues are boxed; RISR sequences are double underlined; Conserved N-glycosylation sites are underlined.

表 3 已报道的脊椎动物 *BMP4* 基因核苷酸编码区序列来源及其与半滑舌鳎 *BMP4* 的同源性比较
Tab. 3 Nucleotide sequences identity of *Cynoglossus semilaevis BMP4* gene with corresponding published sequences

种名 species	GenBank 登录号 GenBank access no	遗传距离 pairwise distance
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	KC422339	
艾氏坦加尼可丽鱼 <i>Tanganicodus irsacae</i>	AB084667	0.043
坦鲷 <i>Ophthalamotilapia nasuta</i>	AB084663	0.043
小鳞单列齿丽鱼 <i>Haplotaxodon microlepis</i>	AB084659	0.043
全颌颌丽鱼 <i>Gnathochromis permaxillaris</i>	AB084657	0.043
小鳞丽鱼 <i>Boulengerochromis microlepis</i>	AB084654	0.043
刚果隆头丽鱼 <i>Steatocranus casuarius</i>	AB084665	0.045
云斑尖嘴丽鱼 <i>Julidochromis transcriptus</i>	AB084661	0.045
坦湖慈鲷 <i>Tropheus duboisi</i>	AB084666	0.045
小鳞爱丽鱼 <i>Cyprichromis leptosoma</i>	AB084656	0.045
霍氏栉丽鱼 <i>Ctenochromis horei</i>	AB084655	0.045
布氏新亮丽鲷 <i>Neolamprologus brichardi</i>	XM_006798429	0.048
斑马宫丽鱼 <i>Maylandia zebra</i>	XM_004540344	0.048
伦氏非鲫 <i>Tilapia rendalli</i>	AB084668	0.048
伯氏朴丽鱼 <i>Haplochromis burtoni</i>	AB084658	0.048
奥氏溪丽鲷 <i>Astatoreochromis alluaudi</i>	AB084653	0.048
黄唇色鲷 <i>Labidochromis caeruleus</i>	AB084662	0.048
大唇朴丽鱼 <i>Haplochromis chilotes</i>	AB298807	0.051
维多利亚湖慈鲷 <i>Pundamilia nyererei</i>	AB084660	0.051
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	NM_001139844	0.056
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	XM_005815394	0.067
红点鲑 <i>Salvelinus alpinus</i>	JQ624875	0.076
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	XM_003962521	0.081
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	XM_004082199	0.096
墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	DQ915173	0.128
斑点雀鲷 <i>Lepisosteus oculatus</i>	XM_006632416	0.170
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	DRU82231	0.214
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	AY184241	0.250
狒狒 <i>Papio anubis</i>	NM_001169087	0.250
智人 <i>Homo sapiens</i>	NM_001202	0.250
爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AF058764	0.291

BMP4 mRNA 表达量维持在较低的水平。数据分析结果表明, *BMP4* mRNA 在卵裂期和原肠期的表达水平约为胚胎发育后期(胚胎期和孵化期)的 7 倍;而 3~4 日龄后期仔鱼 *BMP4* mRNA 的表达水平为孵化后(1~90 日龄)各发育时期的最高值,约为孵化后平均 *BMP4* 表达量的 2 倍。差异显著性分析结果表明, *BMP4* mRNA 表达水平在胚胎发

育的早期阶段显著高于其他发育时期,而在 5 日龄后其表达量趋于稳定。

2.4 *BMP4* mRNA 在早期发育阶段的空间表达分布

由图 6 可见, *BMP4* mRNA 在 1 日龄仔鱼的表达量较低,主要集中于头部和卵黄囊附近(图 6 A);在 2 日龄仔鱼头部、卵黄囊附近其表达量有所增加(图 6 B);3 日龄(图 6 C)和 5 日龄(图 6 D-F)仔鱼

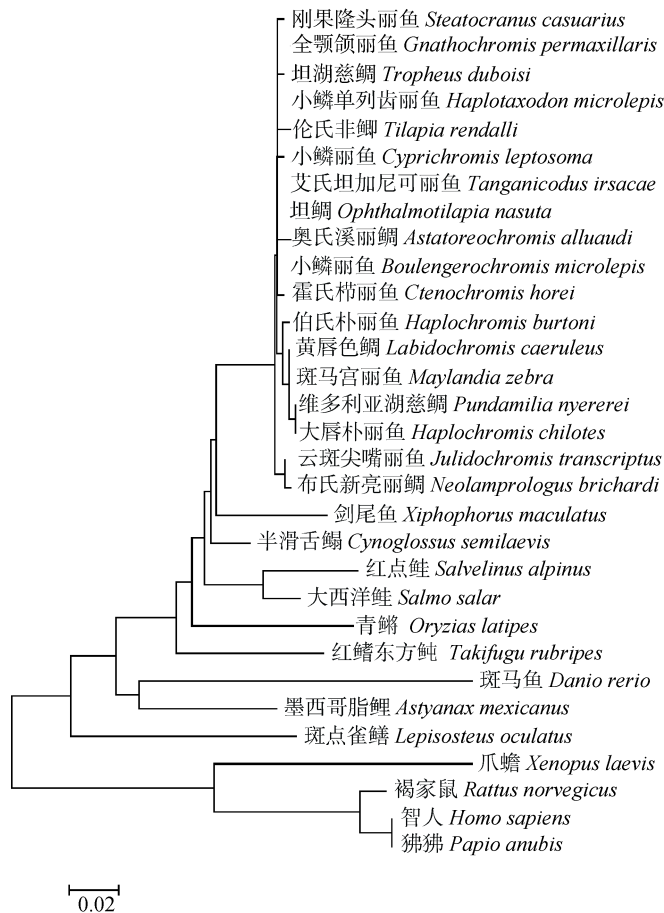


图 3 基于 BMP4 氨基酸序列构建的系统进化树(NJ 树)

Bootstrap 检验的重复次数为 1000 次, 标尺 0.02 为进化距离。

Fig. 3 Phylogenetic tree of BMP4 amino acid sequences based on Neighbor-Joining (NJ) method
The tree is based on a 1000 bootstrap procedure; the scale bar 0.02 in terms of genetic distance is indicated below the tree.

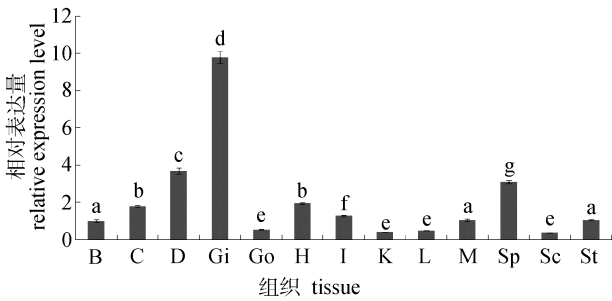


图 4 半滑舌鳎 BMP4 mRNA 的组织表达分布

B: 脑; C: 吻软骨; D: 背鳍; Gi: 鳃; Go: 性腺; H: 心脏; I: 肠; K: 肾; L: 肝; M: 肌肉; Sp: 脾; Sc: 脊髓; St: 胃。不同字母表示各组织 BMP4 mRNA 表达水平差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Expression of BMP4 mRNA in various tissues of *Cynoglossus semilaevis*

B: brain; C: cartilage; D: dorsal fin; Gi: gill; Go: gonad; H: heart; I: intestine; K: kidney; L: liver; M: muscle; Sp: spleen; Sc: spinal cord; St: stomach. Different letters indicate significant differences among BMP4 mRNA levels in various tissues ($P<0.05$).

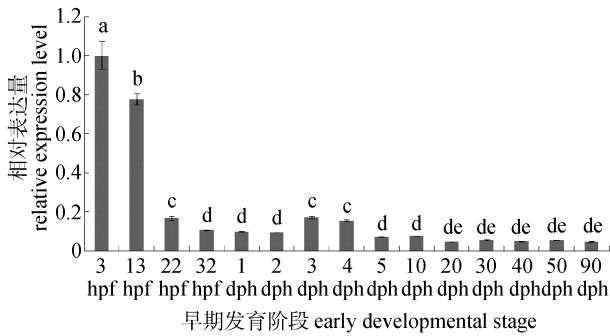


图 5 BMP4 mRNA 在半滑舌鳎早期发育阶段的表达水平
hpf 表示受精后时龄, dph 表示孵化后日龄。不同字母表示不同发育阶段 BMP4 mRNA 表达水平差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 BMP4 mRNA expression levels in early developmental stages of *Cynoglossus semilaevis*

hpf represents hours post fertilization; dph represents days post hatching. Different letters indicate significant differences among BMP4 mRNA levels at different developmental stages ($P<0.05$).

的 *BMP4* 基因在冠状幼鳍、上下颌及胸鳍表达明显,而在背鳍、腹鳍处尚无表达; *BMP4* mRNA 在 10 日龄仔鱼冠状幼鳍、上下颌、鳃盖骨及背鳍、腹鳍、臀鳍处均有表达(图 6G); *BMP4* 基因在 15~20 日龄稚鱼上下颌、鳃盖骨及背鳍、腹鳍、臀鳍处均有表达(图 6H, 图 6I), 此阶段冠状幼鳍逐渐萎缩直至消失。

3 讨论

本研究克隆得到半滑舌鲷 *BMP4* cDNA 全长序列,并推导出其编码的氨基酸序列。序列比对

分析结果表明,半滑舌鲷与已报道的其他脊椎动物 *BMP4* 氨基酸序列在 C 端高度保守(长度约为 110~130 aa),具备较为保守的 7 个半胱氨酸残基,符合 TGF- β 超家族成员在氨基酸序列的共同特征^[2]。此外,半滑舌鲷 *BMP4* 基因也具备脊椎动物 BMP 家族共有的 RXXR 蛋白水解位点,已报道的脊椎动物 *BMP4* 酶切位点序列为 R(I/V)SR,并且该位点的位置较为保守^[22]。

已有研究表明, *BMP4* 基因在脊椎动物中具有广泛的组织表达分布。例如,褐牙鲈 *BMP4* mRNA 在除肝之外的组织中均有表达,在肠道、肾和皮



图 6 *BMP4* 基因在半滑舌鲷早期发育阶段的空间表达分布

A. 1 日龄, B. 2 日龄, C. 3 日龄, D-F. 5 日龄, G. 10 日龄, H. 15 日龄, I. 20 日龄, J. 对照组(10 日龄)。 *BMP4* 表达的部位为淡蓝色或深蓝色。

Fig. 6 Spatial expression pattern of *BMP4* gene in early developmental stages of *Cynoglossus semilaevis* by whole mount in situ hybridization. A. 1 dph; B. 2 dph; C. 3 dph; D-F. 5 dph; G. 10 dph; H. 15 dph; I. 20 dph; J. Negative control (10 dph). Hybridization signals were reflected as blue color.

肤中的表达量较高^[13]。本研究中 *BMP4* mRNA 在半滑舌鳎成鱼的 13 个组织中均可检测出不同水平的表达。由此可见, *BMP4* 基因作为一个多功能的生长调控因子, 有助于成体各种组织器官功能的维持。据报道, 斑马鱼 *BMP4* mRNA 在鳞片中的表达水平极高, 而在脾、眼、精巢等组织中具有中等水平的表达量^[14]。 *BMP4* 基因这种在钙化组织中高水平的表达, 也进一步印证了其在鱼类骨代谢过程中的关键角色^[3]。本研究中, *BMP4* mRNA 在半滑舌鳎成鱼的背鳍、软骨中具有相对较高的表达, 揭示了其与骨骼发育存在一定的相关性。此外, 半滑舌鳎 *BMP4* mRNA 在鳃组织中表达水平最高。相似地, 塞内加尔鳎 *BMP4* mRNA 在鳃弓中也具有中等水平的表达量^[23]。推测其原因, 可能是 BMP 信号通路还参与调控海水鱼类的渗透调节和呼吸作用^[24]。

为进一步验证 *BMP4* 与半滑舌鳎早期生长发育, 尤其是骨骼发生、发育过程的相关性, 本研究采用荧光定量 PCR 技术检测了其在早期发育阶段的表达水平。首先, 半滑舌鳎 *BMP4* 基因在早期胚胎发育阶段(卵裂期和原肠期)具有极高的表达水平, 随后其表达量显著降低。相似地, 斑马鱼胚胎发育早期的卵裂期和囊胚期也可检测到 *BMP4* 基因的表达, 但其表达量在受精后 16 h 到孵化后 7 日龄维持在相对较高水平^[14]。此外, 塞内加尔鳎(*Senegalese sole*) *BMP4* 基因在胚胎发育后期至孵化后 2 日龄具有最高的 mRNA 表达量^[23]。据报道, 斑马鱼胚胎发育的早期阶段, 其形态发育过程主要集中于细胞分裂、内外胚层的形成及器官的发生^[25]。此外, 在高等脊椎动物胚胎发育的原肠期, *BMP4* 基因还参与调控心脏、脾、肺及神经系统的发生过程^[8, 26-27]。由此可见, *BMP4* 作为一个多效生长因子, 其在脊椎动物早期胚胎发育阶段的功能主要集中于细胞的分化和器官的发生发育。原肠期之后, 斑马鱼的鳍原基开始形成, 此时胚胎中 *BMP4* 基因的表达则主要集中于感觉器官、鳍原基、肠、肾和心脏组织^[25, 28]。由此可推测, *BMP4* 基因可能参与调节鱼类胚胎发育后期各器官及骨骼的发生、发育过程。

孵化后, 1~2 日龄半滑舌鳎仔鱼中的 *BMP4* mRNA 表达水平与胚胎发育后期并无显著差异。但在早期仔鱼形态特征方面: 1 日龄仔鱼的冠状幼鳍原基增大, 胸鳍原基(胸鳍芽)明显; 2 日龄仔鱼的冠状幼鳍形成, 其末端突出背鳍膜, 胸鳍基本形成^[18], 随后, 3~4 日龄仔鱼 *BMP4* mRNA 的表达水平显著提高, 可能与后期仔鱼的胸鳍和冠状幼鳍发育明显具有相关性; 5 日龄后, *BMP4* mRNA 的表达水平在一定范围内波动但无显著变化, 但仔稚鱼的形态发育特征日趋明显。因此, 研究 *BMP4* 基因在孵化后各阶段的空间分布可为探明其在早期生长发育中的功能奠定基础。

整体原位杂交技术是研究基因表达定位和表达分布模式的重要手段, 在本研究中主要用于检测 *BMP4* 基因在半滑舌鳎早期发育阶段的空间分布。研究结果表明, 早期仔鱼阶段 *BMP4* mRNA 的表达分布主要集中于头部和躯干前部, 但在鱼体其他位置的表达水平不明显。3 日龄后, *BMP4* 基因在冠状幼鳍、上下颌、胸鳍等位置起始表达, 并且其表达量逐渐增加。据报道, 后期仔鱼阶段各鳍(背鳍、腹鳍、臀鳍)正处于分化形成阶段; 而半滑舌鳎右眼转到左侧时, 冠状幼鳍完全萎缩, 胸鳍完全退化、消失, 各鳍鳍条发育完全^[18]。相应地, *BMP4* 基因在上述发育阶段的冠状幼鳍、上下颌及胸鳍、腹鳍等各处均有表达(图 6G-I), 并且其表达位置与外骨骼的发育显著相关。由此可见, *BMP4* 基因在调控半滑舌鳎早期骨骼发生、发育过程中至关重要。

无论在系统发生或个体发育, 硬骨鱼类骨骼的形成都要经过膜质期、软骨期和骨化期等一系列复杂过程。鳍作为鱼类骨骼的重要组成, 其生长发育过程表现出一定的次序和规律。硬骨鱼类各鳍鳍膜主要出现于胚胎发育的后期^[29]。在各鳍的发育过程中, 胸鳍原基发育最早且集中于胚后发育阶段^[30]。与其他硬骨鱼类相似, 半滑舌鳎在 1 日龄仔鱼中即可观察到胸鳍原基(胸鳍芽), 但目前尚无对其他各鳍原基的相关描述^[18]。在其他鲆鲽鱼类中, 尾鳍、背鳍、臀鳍等各鳍原基在胸鳍原基出现之后依次起始分化发育, 但各鳍原基的

出现顺序略有差异^[29, 31-32]。在大菱鲆仔鱼和稚鱼等早期发育阶段, 各鳍均处于软骨阶段; 28 日龄起, 腹鳍、尾鳍、背鳍及臀鳍开始依次骨化^[33]。本研究利用整体原位杂交技术揭示了各鳍早期发育过程中 *BMP4* 基因的表达分布, 结果表明 *BMP4* mRNA 在骨骼发生的膜质期未见明显表达, 但进入软骨期后具有较高的表达水平, 从而揭示了其在半滑舌鲷早期骨骼发生过程的重要作用。

目前, 国内外对半滑舌鲷骨骼发生、发育过程及其调节机制的研究甚少。本项研究克隆了 *BMP4* 的 cDNA 全序列, 并分析其在早期发育阶段的时空表达模式, 揭示了 *BMP4* 与半滑舌鲷早期骨骼发育的相关性。相关结果为揭示海水硬骨鱼类骨骼发生、发育的调控机制, 认识鱼类早期发育阶段的功能趋向及环境适应机制奠定了重要理论基础。

参考文献:

- [1] Chen D, Zhao M, Mundy G R. Bone morphogenetic proteins[J]. *Growth Fact*, 2004, 22(4): 233-241.
- [2] Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, et al. Bone morphogenetic proteins: A critical review[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(4): 609-620.
- [3] Nishimura R, Hata K, Matsubara T, et al. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors[J]. *J Biochem*, 2012, 151(3): 247-254.
- [4] Hongwei C, Wei J, Frank M, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)[J]. *J Bone Joint Surg*, 2003, 85(8): 1544-1552.
- [5] Canalis E. Growth factor control of bone mass[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108(4): 769-777.
- [6] Sato M, Ochi T, Nakase T, et al. Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis[J]. *J Bone Mineral Res*, 1999, 14(7): 1084-1095.
- [7] Luo Y W, Li S, Shen L N. The expression of bone morphogenetic protein-4 in the Meckel's Cartilage[J]. *Academic Journal of Kunming Medical College*, 2004, 25(3): 9-12. [罗应伟, 李松, 沈丽宁. *BMP4* mRNA 在 Meckel's 软骨中的表达及意义[J]. 昆明医学院学报, 2004, 25(3): 9-12.]
- [8] Chang H, Brown C W, Matzuk M M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily[J]. *Endocr Soc*, 2013, 23(6): 787-823.
- [9] Little S C, Mullins M C. Extracellular modulation of BMP activity in patterning the dorsoventral axis[J]. *Birth Defects Res C*, 2006, 78(3): 224-242.
- [10] Hwang S P L, Tsou M F, Lin Y C, et al. The zebrafish *BMP4* gene: sequence analysis and expression pattern during embryonic development[J]. *DNA Cell Biol*, 1997, 16(8): 1003-1011.
- [11] Leong J S, Jantzen S G, Schalburg K R V, et al. *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome[J]. *BMC Genom*, 2010, 11: 279.
- [12] Wise S B, Stock D W. Conservation and divergence of *Bmp2a*, *Bmp2b*, and *Bmp4* expression patterns within and between dentitions of teleost fishes[J]. *Evol Dev*, 2006, 8(6): 511-523.
- [13] Zeng X, Shi Z Y, Chen X W, et al. Skeleton development of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and expression analysis of related genes (*Sox9*, *Bmp4* and *Bmp2*) during metamorphosis[J]. *Marine Fisheries*, 2009, 31(4): 337-346. [曾宣, 施志仪, 陈晓武, 等. 褐牙鲆变态期间骨骼发育及其相关基因 *Sox9*, *Bmp4* 和 *Bmp2* 的表达分析[J]. 海洋渔业, 2009, 31(4): 337-346.]
- [14] Marques C L, Fernandez I, Viegas M N, et al. Comparative analysis of zebrafish bone morphogenetic proteins 2, 4 and 16: molecular and evolutionary perspectives[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(4): 841-857.
- [15] Blaxter J H S, Ehrlich K F. Change in behaviour during starvation of herring and plaice larvae[M]//The Early Life History of Fish. Heidelberg: Springer Verlag, 1974: 575-588.
- [16] Yin M C. Advances and studies on early life history of fish[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1991, 15(4): 348-358. [殷名称. 鱼类早期生活史研究与其进展[J]. 水产学报, 1991, 15(4): 348-358.]
- [17] Chen D G. Fishery Ecology of the Yellow Sea and Bohai Sea[M]. Beijing: China Ocean Press, 1991: 35-40. [陈大刚. 黄渤海渔业生态学[M]. 北京: 海洋出版社, 1991: 35-40.]
- [18] Wan R J, Jiang Y W, Zhuang Z M. Morphological and developmental characters at the early stages of the tongue fish *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, 50(1): 91-102. [万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鲷早期形态及发育特征[J]. 动物学报, 2004, 50(1): 91-102.]
- [19] Ma Q, Zhuang Z M, Feng W R, et al. Evaluation of reference genes for quantitative realtime PCR analysis of gene expression during early development processes of the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Acta Oceanologica Sinica*,

- 2015, 34(10): 90–97.
- [20] Holland L Z, Holland P W H, Holland N D. Revealing homologies between body parts of distantly related animals by in situ hybridization to developmental genes: amphioxus versus vertebrates[M]//Molecular Zoology: Advances, Strategies, and Protocols. New York: Wiley-Liss, 1996, 267–282: 473–483.
- [21] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [22] Goldman D C, Hackenmiller R, Nakayama T, et al. Mutation of an upstream cleavage site in the BMP4 prodomain leads to tissue-specific loss of activity[J]. Development, 2006, 133(10): 1933–1942.
- [23] Marques C L, Marques I, Rosa J, et al. Spatiotemporal expression and retinoic acid regulation of bone morphogenetic proteins 2, 4 and 16 in *Senegalese sole*[J]. J Appl Ichthyol, 2014, 30(4): 713–720.
- [24] Kultz D. The combinatorial nature of osmosensing in fishes[J]. Physiology, 2012, 27(4): 259–275.
- [25] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Dev Dynam, 1995, 203: 253–310.
- [26] Menshykau D, Kraemer C, Iber D. Branch mode selection during early lung development[J]. PLoS Comput Biol, 2012, 8(2): e1002377.
- [27] Mikawa S, Wang C, Sato K. Bone morphogenetic protein-4 expression in the adult rat brain[J]. J Comp Neurol, 2006, 499(4): 613–625.
- [28] Chin A, Chen J N, Weinberg E S. Bone morphogenetic protein-4 expression characterizes inductive boundaries in organs of developing zebrafish[J]. Dev Genes Evol, 1997, 207(2): 107–114.
- [29] Chen S Q, Gao T X, Wang C, et al. Study on developmental characters in early stage of spotted halibut *Verasper variegatus*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2006, 36(2): 281–286.[陈四清, 高天翔, 王琛, 等. 圆斑星鲽早期发育特征的研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2006, 36(2): 281–286.]
- [30] Du J, Xu G F, Han Y, et al. Development of embryos, larvae, fry and juveniles in lenok *Brachymystax lenok*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2010, 25(5): 379–385.[杜佳, 徐革锋, 韩英, 等. 尖吻细鳞鲱胚胎及仔、稚、幼鱼发育的研究[J]. 大连海洋大学学报, 2010, 25(5): 379–385.]
- [31] Qin Z Q, Lin Y J, Zhang Y Z, et al. Study on the early development of southern flounder *Paralichthys lethostigma*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2008, 27(4): 472–481.[秦志清, 林越超, 张雅芝, 等. 漠斑牙鲆仔、稚、幼鱼的形态发育研究[J]. 台湾海峡, 2008, 27(4): 472–481.]
- [32] Liu X Z, Xu Y J, Liu X F, et al. Embryonic and post-embryonic development of barfin flounder *Verasper Moseri*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(6): 699–706.[柳学周, 徐永江, 刘新富, 等. 条斑星鲽 (*Verasper moseri*)的早期生长发育特征[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(6): 699–706.]
- [33] Tong X H. Studies on early development and related physiological traits in turbot[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010: 93–97.[佟雪红. 大菱鲆早期发育及其相关生理特性研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2010: 93–97.]

Molecular cloning and expression analysis of *BMP4* gene in tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

MA Qian, FENG Wenrong, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng, MA Hui

Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: The growth and development of the vertebrate skeleton is regulated by the bone morphogenetic proteins (BMPs), among which BMP4 is one of the most active osteoinduction factors. In this study, we cloned the *BMP4* gene of the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and described its expression profiling. The *BMP4* cDNA sequence was 1680 bp, and contained a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 419 bp, an open reading frame (ORF) of 1212 bp encoding a protein of 403 amino acids, and a 3'-UTR of 49 bp. Homology and phylogenetic analyses revealed that the deduced amino acid sequence of the *C. semilaevis* BMP4 protein shares highest identity with those of Cichlidae species, and fish BMP4 forms a single lineage distinct from the BMP4 proteins of other vertebrates. The tissue expression distribution of the *BMP4* gene was examined in 13 adult tissues. *BMP4* mRNA was predominantly expressed in the gill, and less in the dorsal fin, cartilage, etc. In the early developmental stages, *BMP4* mRNA was also detected at the egg, larval, juvenile, and fingerling stages, with the highest expression in the egg stage (cleavage and gastrula periods), and the second highest in the larval stage (3–4 days old). Whole-mount in situ hybridization showed that *BMP4* mRNA was firstly detected in head and anterior region in the early larval stage, and then appeared in the crown-like larval fin, jaw, and pectoral fin. *BMP4* mRNA was then predominantly expressed in all the fins and the operculum during the early juvenile stage. These results demonstrate the important role of *BMP4* in the fin development of *C. semilaevis*, and provide a theoretical foundation for investigating the mechanisms regulating fish bone development.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *BMP4*; molecular cloning; gene expression; whole-mount in situ hybridization; skeletal development

Corresponding author: ZHUANG Zhimeng. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn