

doi: 10.7541/2021.2019.221

唇鲮**bmp2a**基因克隆及其与肌间刺骨化相关性分析

陈洁¹ 吕耀平¹ 戴庆敏¹ 张乐² 徐传保¹ 陆君³

(1. 丽水学院生态学院, 丽水 323000; 2. 丽水学院医学与健康学院, 丽水 323000; 3. 丽水市农业农村局, 丽水 323000)

摘要: 骨形成蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)属于转化生长因子 β (Transforming growth factor-beta, TGF- β)超家族。在骨形成蛋白家族中, BMP2属于分泌性多功能蛋白, 具有较强的诱导骨细胞形成的能力。为了探究BMP2与肌间刺骨化的相关性, 研究通过转录组测序和RT-PCR获得了唇鲮(*Hemibarbus labeo*) **bmp2a**基因cDNA序列。氨基酸序列比对结果显示, 唇鲮BMP2A和其他鱼类BMP2保守性较高, 都具有一个高度保守的TGF β 结构域, 在该结构域中存在一个N-糖基化位点。此外, 包括唇鲮BMP2A在内, 鱼类BMP2都具有7个保守的半胱氨酸残基。系统进化树分析表明, 唇鲮BMP2A与团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) BMP2A最为接近。通过荧光定量PCR检测发现唇鲮**bmp2a**基因在所有被检测的组织中均有表达, **bmp2a**基因在鳃中的表达量最高, 肝脏和肌肉中相对较高, 在心脏中表达量最低。免疫组化结果显示BMP2A分布于肌肉肌隔中。此外, **bmp2a**基因的表达与肌间刺骨化时机相吻合。综上, 唇鲮BMP2A与肌间刺骨化存在较高的相关性。研究结果将为进一步调查鱼类BMP2功能以及鱼类肌间刺形成分子机制提供理论依据。

关键词: 唇鲮; BMP2A; 肌间刺; 骨化; 基因表达; 免疫组化

中图分类号: Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)01-0008-06



多数淡水鱼类, 尤其是鲤科鱼类都具有一定数量的肌间刺^[1-3]。肌间刺的存在影响了鱼肉的食用和深加工。为了去除肌间刺, 人们早在20世纪60年代就开展了肌间刺的研究工作^[4]。肌间刺是位于椎骨两侧肌肉中的膜性硬骨, 由肌隔结缔组织不经软骨阶段直接骨化而成^[5, 6]。肌间刺的形成开始于间叶细胞, 由间叶细胞转变为成骨细胞^[7]。然而, 到目前为止, 对于肌间刺的研究工作主要集中于形态学方面^[3, 8], 对其形成的分子机制研究的较少。

骨形成蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)属于转化生长因子 β (Transforming growth factor-beta, TGF- β)超家族。目前, 已经鉴定了30多个骨形成蛋白^[9]。骨形成蛋白是一类具有广泛生物活性的生长因子, 除具有诱导骨形成功能外, 还参与了造血组织发育、胚胎发育、神经发育和脂肪生成与代谢等诸多过程^[10-12]。在骨形成蛋白家族中, BMP2属于分泌性多功能蛋白, 具有较强的诱导骨细胞形成的能力。例如, BMP2在间叶细胞分化为

成骨细胞过程中起到重要的调控作用^[13]。目前, **bmp2**基因已在斑马鱼(*Danio rerio*)^[14, 15]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[16]、建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)^[17]和金头鲷(*Sparus aurata*)^[18]等鱼类中被克隆报道。在团头鲂中, **bmp2**基因表达与肌间刺骨化存在一定的关系^[16]。

唇鲮(*Hemibarbus labeo*)属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲮亚科(Gobioninae)、鲮属(*Hemibarbus*), 是底栖淡水鱼类, 以水生昆虫为食, 主要分布于我国东部、日本及韩国。和其他鲤科鱼类一样, 唇鲮也存在肌间刺。在之前的研究中我们已经阐明了唇鲮肌间刺的形态特征和骨化时机^[19-21]。为了进一步研究肌间刺形成的分子机制, 本研究克隆得到了唇鲮**bmp2a**基因, 利用RT-qPCR和免疫组化检测了**bmp2a**基因mRNA和蛋白在不同组织中的表达和分布情况, 从而确定**bmp2a**基因与肌间刺骨化之间是否存在相关性。为研究唇鲮及其他鲤科鱼类肌间刺形成分子机制奠定基础。

收稿日期: 2019-10-16; 修订日期: 2020-01-19

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y3110477); 丽水市高层次人才培养项目(2018RC01)资助 [Supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Y3110477); the Project of High Level Talented Person Cultivating in Lishui City (2018RC01)]

作者简介: 陈洁(1989—), 男, 博士; 主要从事水生生物学研究。E-mail: jchen@lsu.edu.cn

通信作者: 吕耀平(1967—), 男, 硕士; 主要从事水生生物学研究。E-mail: yplv@lsu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

唇鲮仔、稚鱼样本取自浙江省丽水学院实训基地—鱼类良种场。从受精后29d开始,每隔3天取样1次,一直取到62d。用4%多聚甲醛固定,室温存放,用于茜素红染色和免疫组化。取仔、稚鱼尾部30—40肌节之间肌肉固定于RNA样本保存液,存放于-20℃,用于检测**bmp2a**基因与肌间刺骨化的相关性。此外,取唇鲮成鱼健康组织(肝、肾、脾、鳃、心、脑、肌肉、皮和肠)固定于RNA样本保存液,存放于-20℃,用于检测**bmp2a**基因组织差异表达。

1.2 唇鲮**bmp2a**基因cDNA克隆及序列分析

对唇鲮尾部肌肉组织进行了转录组测序,使用亲缘关系最近的斑马鱼**bmp2a**和**bmp2b**基因序列进行本地blast比对。在转录组中仅发现**bmp2a**基因序列,而未发现**bmp2b**基因序列。可能唇鲮**bmp2b**基因并未参与到尾部肌间刺骨化的过程中。因此本文以**bmp2a**基因为研究对象。通过RT-PCR结合测序验证唇鲮**bmp2a**基因cDNA序列的真实性,所用引物见表1。使用ORF finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找开放阅读框;使用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测编码蛋白的理化性质;使用ClustalW(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)进行多序列比对,利用MEGA 7.0采用邻接法构建系统进化树,1000次Bootstraps,其他参数均使用默认值^[22]。

1.3 茜素红染色

为了验证唇鲮尾部肌间刺骨化的4个关键时期,根据柯中和等^[23]的方法对唇鲮仔稚鱼进行骨骼染色。用超纯水漂洗4%PFA固定的标本3次,每次30min;样本浸泡在1% KOH中,滴加少许H₂O₂,强光下照射去除色素;样本浸泡于胰蛋白酶消化液[100 mL体系: 65 mL ddH₂O, 35 mL饱和硼酸钠盐(Na₂B₄O₇·10H₂O)上清液, 1 g胰蛋白酶]中消化,直至头部肌肉

组织透明;用1% KOH漂洗几次后浸泡在该溶液中,滴加几滴茜素红溶液(1 g茜素红溶于100 mL 0.5% KOH)直至变成深红色,染色过夜。依次经过1% KOH:甘油(3:1、1:1和1:3),最后保存于加有少许麝香草酚的甘油。

1.4 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)

利用RT-qPCR检测唇鲮**bmp2a**基因表达量,用RNAiso抽提样本总RNA, DNase I 处理总RNA,利用AMV反转录酶反转录获得cDNA第一链。使用BioRad CFX96 Touch实时荧光定量PCR系统进行RT-qPCR,反应体系为: SYBR Premix Ex Taq(2×)缓冲液12.5 μL, cDNA模板0.5 μL, 引物(10 μmol/L)各1 μL,以ddH₂O补足至25 μL。反应程序为: 94℃预变性300s; 95℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 40个循环。RT-qPCR检测结果使用2^{-ΔΔC_t}方法分析^[24]。以唇鲮18S rRNA作为内参基因^[25],所用引物见表1。每个样品重复4次。

1.5 免疫组化

取孵化后29d和35d唇鲮依次经酒精梯度脱水、二甲苯透明和包埋;将蜡块进行修块和切片,切片厚度为4 μm;选择组织结构完整的切片脱蜡至水, 3% H₂O₂室温孵育10min以去除内源性过氧化物酶, PBS缓冲溶液清洗; 3% BSA 37℃封闭30min, 轻轻甩掉封闭液;兔抗BMP2多克隆抗体(PBS 1:100稀释, 武汉三鹰生物技术有限公司)37℃孵育30min, 4℃过夜; PBS缓冲溶液清洗; HRP-山羊抗兔IgG(PBS 1:100稀释, 上海碧云天生物技术有限公司)37℃孵育50min, PBS缓冲溶液冲洗; DAB显色20min, 蒸馏水终止反应, PBS缓冲液冲洗, 苏木素轻度复染、脱水、透明, 中性树胶封片。

1.6 数据分析

所有数据均以平均值±标准误表示。使用IBM公司SPSS 13.0软件进行单因素方差分析, *P*<0.05表示显著性差异。

2 结果

2.1 唇鲮**bmp2a**基因序列分析

唇鲮**bmp2a**基因cDNA序列(GenBank登录号: MN546003)由1911核苷酸组成, 包含一个由1170核苷酸组成的开放阅读框, 可编码389个氨基酸。预测唇鲮BMP2A蛋白大小为43.7 kD, 理论等电点为8.87。系统发育树分析显示鱼类BMP2具有两种亚型, 即BMP2A和BMP2B, 在进化树上显示为独立的两支, 唇鲮BMP2A属于鱼类BMP2A一支(图1)。

氨基酸多重序列比对显示鱼类BMP2保守性较高且都具有信号肽、TGFβ前肽结构域(TGFβ pro-

表1 引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

名称Primers	序列Sequence (5'—3')	用途Application
<i>bmp2a</i> -c (+)	CCAGATGGATCTAGCGCA GGTT	目的基因克隆
<i>bmp2a</i> -c (-)	ATAAAGTCCGGGGCGTC AGC	目的基因克隆
<i>bmp2a</i> -t (+)	TTCAACCTGACCTCCATC CC	目的基因荧光定量 引物
<i>bmp2a</i> -t (-)	ACGTCGAAACTCTCCCAC TT	目的基因荧光定量 引物
18S rRNA-t (+)	AGAAACGGCTACACAT CCA	内参基因荧光定量 引物
18S rRNA-t (-)	CCGAGATCCAACCTACGA GCT	内参基因荧光定量 引物

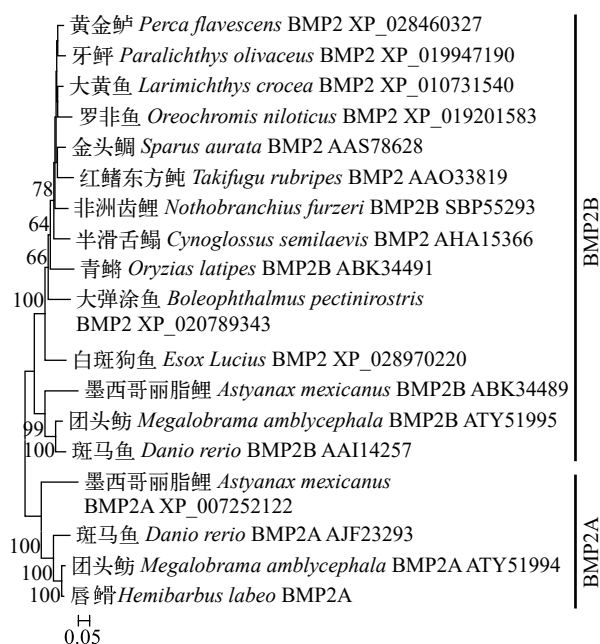


图 1 基于BMP2蛋白氨基酸序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the complete amino acid sequences of the BMP2 protein

peptide domain)和TGF β 结构域(TGF β domain)。在TGF β 结构域中存在一个N-糖基化位点。此外,包括唇鲮BMP2A蛋白在内,鱼类BMP2蛋白都具有7个保守的半胱氨酸残基。

2.2 唇鲮尾部肌间刺四个主要发育阶段的形态特征

为了验证唇鲮尾部肌间刺骨化的四个关键阶段,用茜素红对唇鲮进行整体骨骼染色(图2)。结果表明,唇鲮尾部肌间刺骨化经历了4个关键阶段。第I阶段:孵化后29d [体长(17.13 $\pm$ 1.26) mm],除肌间刺外,主轴骨骼和附肢骨骼已骨化完成(图2A);第II阶段:孵化后35d [体长(20.67 $\pm$ 1.43) mm],尾部肌肉中出现一些较短的肌间刺(图2B);阶段III:孵化后41d [体长(24.03 $\pm$ 1.29) mm],尾部肌间刺逐渐

增多且变长(图2C);第IV阶段:孵化后56d [体长(29.53 $\pm$ 2.10) mm],尾部所有肌间刺都已骨化完全(图2D)。

2.3 唇鲮bmp2a基因组织差异表达

利用RT-qPCR检测bmp2a基因在唇鲮成鱼不同组织中的表达情况,结果显示,bmp2a在被检测的组织中均有表达,在鳃中的表达量最高,肝中次之,在心脏中表达量最低。在鳃中的表达量是在心脏中的28.1倍(图3)。

2.4 唇鲮BMP2A蛋白在不同组织中的分布

利用免疫组化检测了唇鲮BMP2A蛋白在不同组织中的分布情况,发现唇鲮BMP2A在29d和35d唇鲮肌肉肌隔处均被检测到,其次BMP2A蛋白在皮肤、脊椎和肠道中也被检测到且信号较强(图4)。

2.5 肌间刺骨化过程中bmp2a基因的表达

利用免疫组化发现BMP2A蛋白在肌肉肌隔处有表达,为进一步确定bmp2a基因与肌间刺骨化的相关性,在肌间刺骨化的四个关键阶段,检测了尾部肌肉组织中bmp2a基因的表达情况。结果显示,唇鲮bmp2a基因随着肌间刺的骨化其表达量逐渐升高,与阶段I比较,bmp2a基因在阶段II和III的表达量显著升高,此时肌间刺正在快速骨化。到了阶段IV,bmp2a基因表达量有所降低,但与阶段I比较仍显著升高,此时肌间刺已进入最终骨化阶段(图5)。

3 讨论

BMP2属于骨形成蛋白家族,是分泌型多功能蛋白,具有较强的诱导骨细胞形成的能力。目前,bmp2基因已在斑马鱼^[14]、团头鲂^[16]、建鲤^[17]和金头鲂^[18]等鱼类中被克隆报道。在团头鲂中,bmp2基因表达与肌间刺骨化存在一定的关系^[16]。为进一步明确bmp2基因与肌间刺骨化的相关性。本研究

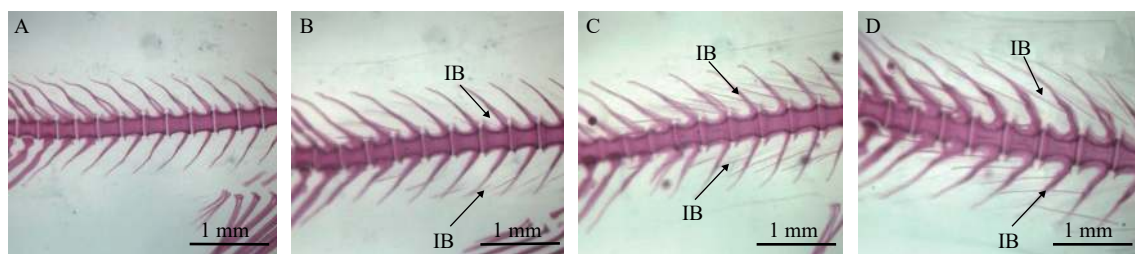


图 2 唇鲮肌间刺骨化的四个关键时期

Fig. 2 Development characteristics of intermuscular bones in the four key development stages of barbel steed

A. 阶段I, 尾部肌间刺未出现; B. 阶段II, 尾部出现较短的肌间刺; C. 阶段III, 尾部肌间刺增多且变长; D. 阶段IV: 尾部的肌间刺骨化完成; IB. 肌间刺

A. Stage I, the intermuscular bones haven't emerged; B. Stage II, a few intermuscular bones of small length have emerged in the tail; C. Stage III, more intermuscular bones of greater length gradually emerged in the tail; D. Stage IV, all of the intermuscular bones in the tail have a mature morphology and length; IB. intermuscular bone

克隆得到了唇鲮**bmp2a**基因cDNA序列。经多重序列比对发现鱼类BMP2蛋白都具有一个高度保守的

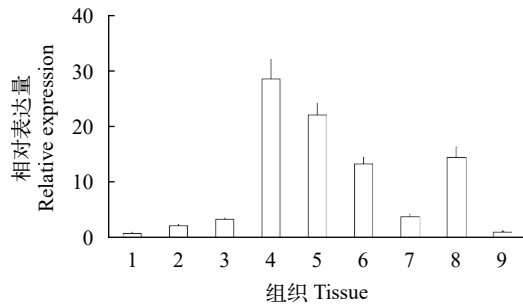


图3 唇鲮**bmp2a**基因组织差异表达分析

Fig. 3 The relative expression of *bmp2a* in different tissues of the barbel steed

1. 心; 2. 肾; 3. 脾; 4. 鳃; 5. 肝; 6. 肠; 7. 皮肤; 8. 肌肉; 9. 脑; 利用RT-qPCR检测唇鲮**bmp2a**基因在不同组织中的表达, 以18S rRNA作为内参基因, 数据以平均值±标准误差表示, $n=4$

1. heart; 2. kidney; 3. spleen; 4. gill; 5. liver; 6. intestine; 7. skin; 8. muscle; 9. brain. The expression levels of *bmp2a* transcripts were normalized to 18S rRNA gene. Data are expressed as the means±SEM ($n=4$)

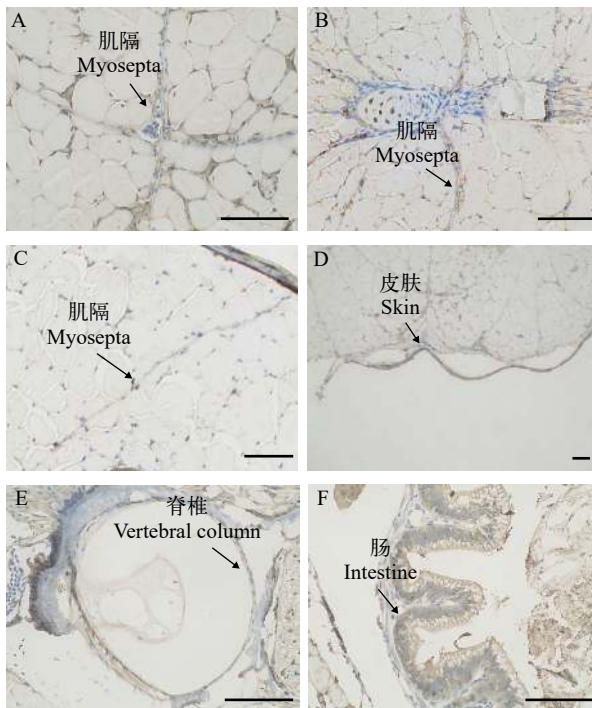


图4 唇鲮BMP2A蛋白在不同组织中的分布

Fig. 4 Distribution of BMP2A protein in different tissues

A. 29d唇鲮肌肉; B. 35d唇鲮肌肉; C. 29d唇鲮肌肉, 阴性对照; D. 皮肤; E. 脊椎; F. 肠, 黄色为信号, 图中标尺为50 μm

A. muscle of 29-day-old barbel steed; B. muscle of 35-day-old barbel steed; C. muscle of 29-day-old barbel steed, negative control; D. skin; E. vertebral column; F. intestine. Yellow is signal, scale bar=50 μm

TGFβ结构域, 在该结构域中存在一个N-糖基化位点, 这一特征表明BMP2蛋白在脊椎动物中具有非常保守的功能, 特别是与骨发生和骨形成等细胞分化相关^[18]。此外, 包括唇鲮BMP2A蛋白在内, 鱼类BMP2蛋白都具有7个保守的半胱氨酸残基^[17, 18]。

通过RT-qPCR检测发现唇鲮**bmp2a**基因在所有被检测的组织中都有表达, 唇鲮**bmp2a**基因在鳃中的表达量最高, 肝脏和肌肉中相对较高, 在心脏中表达量最低。这与在同属于鲤科鱼类的建鲤中检测到情况类似, 建鲤**bmp2**基因在肌肉中的表达量最高, 在肝脏中次之, 再次是脾脏、鳃和肠, 在心脏和脑中的表达量最低^[17]。在金头鲷中检测到**bmp2**基因在骨、鳞和尾鳍中表达较高^[18], 表明**bmp2**基因与骨形成的相关性。唇鲮**bmp2a**基因在肝脏中表达量较高, 很有可能与肝脏铁平衡密切相关^[26, 27]。此外, 利用免疫组化检测了唇鲮BMP2A蛋白在唇鲮肌肉、脊椎、皮肤和肠中的分布情况, 结果显示唇鲮BMP2A蛋白在孵化后29d和35d唇鲮肌肉肌隔中有分布, 这说明唇鲮BMP2A蛋白与肌间刺的骨化存在较高的相关性, 除了在肌隔中分布外, 唇鲮BMP2A蛋白在脊椎、皮肤和肠道中也有分布。这说明除了与骨骼发生相关, *bmp2*基因在其他组织中也起着不同的作用。

BMP2被认为是活性最强的唯一能单独诱导成骨的因子^[28], 在骨骼形成的起始和调节中具有主要作用^[29]。免疫组化实验证实唇鲮BMP2A蛋白分布于肌肉肌隔中。为了进一步明确唇鲮**bmp2a**基因与肌间刺骨化的相关性, 利用RT-qPCR检测了唇鲮**bmp2a**基因在肌间刺骨化的4个关键时期的表达。

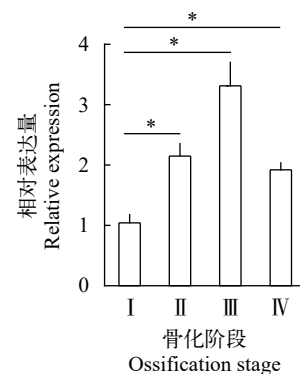


图5 唇鲮**bmp2a**基因在肌间刺骨化不同阶段的表达

Fig. 5 Relative expression patterns of *bmp2a* during intermuscular bone development

以18S rRNA作为内参基因, 数据以平均值±标准误差表示, $n=4$, $*P<0.05$

bmp2a transcript levels were normalized to those of 18S rRNA. The data are expressed as the mean±SEM ($n=4$, $*P<0.05$)

结果显示,唇鲮**bmp2a**基因随着肌间刺的骨化其表达量逐渐增加,与阶段 I 相比,阶段 II 到 IV 的表达量均显著增加。阶段 II 到 III,肌间刺处于快速骨化阶段,**bmp2a**基因表达量持续增加,到了阶段 IV,**bmp2a**基因表达量有所降低,此时肌间刺骨化接近于完成。**bmp2a**基因表达与肌间刺的骨化时序相吻合。此外,发现与阶段 I 相比,阶段 III 时 **bmp2a** 基因表达最高,表达增长3倍多,而在团头鲂中也发现类似的变化,团头鲂**bmp**家族基因从阶段 I 到阶段 IV 变化倍数都在2倍左右^[16]。虽然变化倍数不是特别明显,但是BMP蛋白属于转化生长因子 β 超家族,可通过其受体触发级联反应^[30],从而对肌间刺骨化起到一个较强的调控作用。

综上,本研究克隆得到了唇鲮**bmp2a**基因cDNA序列,分析了其编码蛋白的氨基酸序列特征。基因表达分析显示**bmp2a**基因在所检测的组织中均有表达,且在肌肉中有较高的表达。免疫组化结果显示BMP2A蛋白分布于肌隔中,同时**bmp2a**基因的表达与肌间刺骨化时序吻合。这表明**bmp2a**基因与肌间刺的骨化存在较高的相关性。研究结果将为进一步调查鱼类**bmp2**基因功能以及鱼类肌间刺形成分子机制提供理论依据。

参考文献:

- [1] He P P, Wang H, Wei P Y, *et al.* miRNAs sequencing and analysis of intermuscular bone between rice flower carp and Jian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(4): 757-762. [何莘莘, 王卉, 韦媛媛, 等. 禾花鲤与建鲤肌间骨miRNAs测序与分析比较 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(4): 757-762.]
- [2] Patterson C, Johnson G D. The intermuscular bones and ligaments of teleostean fishes [J]. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 1995(559): 1-83.
- [3] Yang K, Jiang W, Wang X, *et al.* Evolution of the intermuscular bones in the Cyprinidae (Pisces) from a phylogenetic perspective [J]. *Ecology and Evolution*, 2019, **9**(15): 8555-8566.
- [4] Lund R. Intermuscular bones in *Pholidophorus bechei* from the lower Lias of England [J]. *Science*, 1966, **152**(3720): 348-349.
- [5] Danos N, Ward A B. The homology and origins of intermuscular bones in fishes: phylogenetic or biomechanical determinants [J]? *Biological Journal of the Linnean Society*, 2012, **106**(3): 607-622.
- [6] Nie C H, Wan S M, Liu Y L, *et al.* Development of teleost intermuscular bones undergoing intramembranous ossification based on histological-transcriptomic-proteomic data [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(19): E4698.
- [7] Brighton C T, Hunt R M. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus [J]. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 1991, **73**(6): 832-847.
- [8] Johnson G D, Patterson C. The intermuscular system of acanthomorph fishes: a commentary [J]. *American Museum Novitates*, 2001, **2001**(3312): 1-24.
- [9] Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins [J]. *Kidney International*, 2000, **57**(6): 2207-2214.
- [10] Chen D, Zhao M, Mundy G R. Bone morphogenetic proteins [J]. *Growth Factors*, 2004, **22**(4): 233-241.
- [11] 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 Sciences*, 2009, **84**(9-10): 302-310.
- [12] Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, *et al.* Bone morphogenetic proteins: a critical review [J]. *Cellular Signalling*, 2011, **23**(4): 609-620.
- [13] Rogers M B, Shah T A, Shaikh N N. Turning bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on and off in mesenchymal cells [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2015, **116**(10): 2127-2138.
- [14] Martinez-Barbera J P, Toresson H, Da Rocha S, *et al.* Cloning and expression of three members of the zebrafish Bmp family: Bmp2a, Bmp2b and Bmp4 [J]. *Gene*, 1997, **198**(1-2): 53-59.
- [15] 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]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, **73**(4): 841-857.
- [16] Zhang W Z, Lan T, Nie C H, *et al.* Characterization and spatiotemporal expression analysis of nine bone morphogenetic protein family genes during intermuscular bone development in blunt snout bream [J]. *Gene*, 2018(642): 116-124.
- [17] Ma L X, Dong Z J, Su S Y, *et al.* Cloning of fragments of bone morphogenetic protein gene (BMP2B) of *Cyprinus carpio* var. Jian and its expression analysis [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, **29**(2): 370-378. [马良晓, 董在杰, 苏胜彦, 等. 建鲤骨形成蛋白质基因 (BMP2B) 片段的克隆及其表达分析 [J]. 江苏农业学报, 2013, **29**(2): 370-378.]
- [18] Rafael M S, Laize V, Cancela M L. Identification of *Sparus aurata* bone morphogenetic protein 2: molecular cloning, gene expression and in silico analysis of protein conserved features in vertebrates [J]. *Bone*, 2006, **39**(6): 1373-1381.
- [19] Lü Y P, Yao W J, Chen J, *et al.* Newly identified gene muscle segment homeobox C may play a role in intermuscular bone development of *Hemibarbus labeo* [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, **14**(3): 11324-1134.
- [20] Lü Y P, Chen J, Bao B L, *et al.* The ossificational process of the intermuscular bones in *Hemibarbus labeo* [J].

- Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, **21**(4): 549-553. [吕耀平, 陈洁, 鲍宝龙, 等. 唇鲮肌间小骨的骨化过程 [J]. 上海海洋大学学报, 2012, **21**(4): 549-553.]
- [21] Lü Y P, Bao B L, Jiang Y, *et al.* Comparative analysis of intermuscular bones in lower teleosts [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, **31**(5): 661-668. [吕耀平, 鲍宝龙, 蒋燕, 等. 低等真骨鱼类肌间骨的比较分析 [J]. 水产学报, 2007, **31**(5): 661-668.]
- [22] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, **33**(7): 1870-1874.
- [23] Ke Z H, Zhang W, Jiang Y, *et al.* Developmental morphology of the intermuscular bone in *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, **43**(6): 88-96. [柯中和, 张炜, 蒋燕, 等. 鲢肌间小骨发育的形态学观察 [J]. 动物学杂志, 2008, **43**(6): 88-96.]
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [25] Zhou N, Chen L L, Chen J, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of IL-1 β and two types of IL-1 receptor in barbel steed (*Hemibarbus labeo*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2020(241): 110393.
- [26] Canali S, Wang C Y, Zumbrennen-Bullough K B, *et al.* Bone morphogenetic protein 2 controls iron homeostasis in mice independent of Bmp6 [J]. *American Journal of Hematology*, 2017, **92**(11): 1204-1213.
- [27] Koch P S, Olsavszky V, Ulbrich F, *et al.* Angiocrine Bmp2 signaling in murine liver controls normal iron homeostasis [J]. *Blood*, 2017, **129**(4): 415-419.
- [28] Riley E H, Lane J M, Urist M R, *et al.* Bone morphogenetic protein-2: biology and applications [J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1996, **324**(324): 39-46.
- [29] 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.
- [30] 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.

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

CHEN Jie¹, LÜ Yao-Ping¹, DAI Qing-Min¹, ZHANG Le², XU Chuan-Bao¹ and LU Jun³

(1. College of Ecology, Lishui University, Lishui 323000, China; 2. College of Medicine and Health, Lishui University, Lishui 323000, China; 3. Bureau of Agriculture and Rural Affairs of Lishui City, Lishui 323000, China)

Abstract: Bone morphogenetic protein (BMP) belongs to the transforming growth factor-beta (TGF- β) superfamily, and BMP2 is a secreted multifunctional protein with strong ability to induce bone formation. To explore the correlation between BMP2 and intermuscular bone development, the *bmp2a* cDNA of barbel steed (*Hemibarbus labeo*) was cloned and sequenced. The amino acid sequence alignment showed that the barbel steed BMP2A is highly conserved with other fishes, and they all have the highly conserved TGF β domain in which an N-glycosylation site exists. In addition, fish BMP2 protein, including barbel steed BMP2A, have seven conserved cysteine residues. Phylogenetic tree analysis indicated that barbel steed BMP2A were closely related to that of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) BMP2A. The expression of barbel steed *bmp2a* transcripts was detected in all tested tissues, with the highest mRNA level in the gill, followed by the liver and muscle, and the lowest in the heart. Immunohistochemistry results showed that BMP2A protein was distributed in the myosepta. In addition, the expression of the *bmp2a* gene coincides with the development of intermuscular ossification. In summary, the high correlation between *bmp2a* gene and intermuscular ossification provides basic data for further investigation of the function of *bmp2* gene and its regulation role in intermuscular bone development.

Key words: Barbel steed; BMP2A; Intermuscular bone; Ossification; Gene expression; Immunohistochemistry