

鸭骨形成蛋白4基因的克隆和序列分析

王茜¹, 张爱玲¹, 杨承忠², 李加琪¹, 王翀¹, 张豪¹

(1 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642;

2 佛山科学技术学院 生命科学学院, 广东 佛山 528231)

摘要:通过比较基因组学方法,采用 RT-PCR 技术克隆了鸭骨形成蛋白4(BMP4)基因的1 256 bp cDNA 序列,包含44 bp 的5'非翻译区和1 212 bp 的完整编码序列(编码404个氨基酸);对该基因的结构分析得知鸭 BMP4 基因包含2个外显子和1个内含子.经同源比对发现该编码序列与鸡的 BMP4 基因相似性达95.5%,15个物种的该基因成熟肽相似性很高.系统进化分析发现禽类包括鸭和鸡同两栖类、鱼类归为一大类;蛋白质预测结果显示,鸭 BMP4 基因1~19氨基酸序列为信号肽,与疏水、跨膜区域重合,相对分子质量为46 074,等电点是8.87;二级结构中近1/3为 α -螺旋,三级结构由7个 α -螺旋和2个 β -折叠片构成.

关键词:鸭;骨形成蛋白;克隆;RT-PCR;蛋白预测

中图分类号:S831.1

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2011)01-0083-06

Cloning and Sequence Analysis of Duck BMP4 Gene

WANG Xi¹, ZHANG Ai-ling¹, YANG Cheng-zhong², LI Jia-qi¹, WANG Chong¹, ZHANG Hao¹

(1 Guangdong Provincial Key Lab of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding,

College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Life Science, Foshan University, Guangzhou 528231, China)

Abstract: With the aid of comparative genomics, the cDNA sequence of duck BMP4 gene was cloned by the method of RT-PCR. The cloned 1 256 bp cDNA of duck BMP4 gene included a partial 5'UTR of 44 bps and the complete coding sequence of 1 212 bp, which encoded 404 amino acid residues. And the duck BMP4 gene contained two exons and one intron. Duck BMP4 CDS sequence shared a 95.5% homologous identity with that of chicken. Duck BMP4 mature peptide also expressed high homologue among 15 species. The result of phylogenetic analysis of BMP4 revealed that Aves (including duck and chicken) resided into the same cluster with amphibians and fish. The results of the protein structure prediction showed that first 19 amino acids formed signal peptide, which coincided with hydrophobic and transmembrane region. The relative molecular mass of duck BMP4 protein was 46 074 and the isoelectric focus point was 8.87. The secondary structure included α -helices accounting for one third, and the tertiary structure contained seven α -helices and two β -sheets. The results will provide data for the investigation of duck BMP4 gene mechanism and function.

Key words: duck; BMP4; cloning; RT-PCR; protein prediction

骨形成蛋白4(Bone morphogenetic protein-4, BMP4)是BMPs家族中诱导成骨生物活性最强的分子之一,属转化生长因子(transforming growth factor-

β , TGF- β)超家族成员,其主要作用是在生理情况下能有效地诱导胚胎期未分化的间叶细胞分化增殖,使之转化为含骨骼、软骨和结缔组织的骨关节系统,

收稿日期:2010-03-18

作者简介:王茜(1983—),女,硕士研究生;通信作者:李加琪(1965—),男,教授,博士, E-mail:jqli@scau.edu.cn;杨承忠(1963—),男,教授,硕士, E-mail:chengzhongyang@163.com

基金项目:国家自然科学基金(30771545);现代农业产业技术专项(nycytx-009);广东省科技计划项目(2004A20106002)

且其骨诱导作用无种属特异性^[1]. BMP4 还可以诱导牙本质、牙骨质的形成^[2], 能够调节保护神经组织^[3], 对心、肺、肾、眼等器官的发育形成也起着重要作用^[4-7]. BMP4 基因的缺陷将导致早期中胚层发育的缺陷及动物的胚胎性死亡; 而在骨形成时的过表达则影响指/趾线形成的数量及指/趾间细胞的凋亡^[8]. 胚胎干细胞中存在的某种特定蛋白质分子能与 BMP4 蛋白相互作用, 是决定人类干细胞最终发育成为胎盘的关键^[9]. 在体外, BMP4 能单独诱导异位成骨, 具有促进成骨细胞分化的能力^[10]. 此外, 有研究发现在不同的鸟类, 如草地鸟雀和沙漠鸟雀, 其喙的 BMP4 基因表达量和表达时间是有差别的, 喙的不同形状取决于 BMP4 基因在发育中被打开的时间和位置, 这为了解鸟喙多样性的分子基础提供了一个窗口^[11]. 人的 BMP4 基因被定位于 14q22-23^[13], 包括 5 个外显子, 有 2 种转录方式. 鸡 BMP4 基因包括 2 个外显子, 2004 年其 mRNA 序列公布, 开放阅读框为 1 218 bp, 只有 1 种转录方式, 定位于 5 号染色体上. 至今 20 余种脊椎动物的 BMP4 基因已被成功克隆. 皖西白鹅的 BMP4 基因的部分 cDNA 序列已被克隆, 该不完整的序列与鸡比对相似性达 95% 以上^[13]. 在我国养禽业中, 鸭是仅次于鸡的第二大饲养家禽. 鸭除了提供肉蛋以外, 其鸭毛、鸭绒的经济性能也不可忽视. BMP4 基因不仅对哺乳动物毛干分化起到重要调控作用, 而且该基因与禽类羽毛分支有关, 如 BMP4 基因与鸭毛的发育密切相关, 有研究表明该基因能够抑制已经形成的羽芽发育^[14], 而且阻止新生羽芽的发生^[15]. 因此认识鸭 BMP4 基因的结构和特点, 对于进一步研究 BMP4 基因对鸭的羽毛形成、骨组织形成、鸭喙发育、胚胎发育等方面的影响将提供重要的分子基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

24 胎龄仙湖肉鸭胚胎由佛山科技学院仙湖肉鸭孵化厂提供, 取其新鲜软骨组织(躯干、四肢)于液氮中速冻后, 置于 -70 °C 冰箱保存, 用于总 RNA 的抽提.

DNTP(2.5 mmol/L)、2 × GC Buffer I、*rTaq* 酶、LA *Taq* DNA 聚合酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品; Trizol 总 RNA 提取试剂盒为 Invitrogen 公司产品; RT-PCR 反转录试剂盒为南京凯基公司产品.

1.2 引物设计

根据比对 GenBank 人、鼠和鸡 BMP4 基因 cDNA 保守序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计鸭 BMP4 基因 cDNA 扩增引物对 Ex1 和 Ex2; 参考鸡 BMP4 基因

组序列, 设计鸭 BMP4 基因 5'端、3'端引物, 所有引物由上海生工生物工程公司合成, 引物名称和序列见表 1.

表 1 鸭 BMP4 基因的引物序列及其反应条件

Tab. 1 The PCR primers and reaction conditions of duck BMP4 gene

引物名称	上、下游引物序列(5'→3')	片段长度/bp	退火温度/°C	延伸时间/s
Ex1	Up: CCTGCTAACCGAATGCTGATGG Down: GGGATGACGGCTGATTTGCTG	239	61	30
Ex2	Up: ATCCGCTTCGTCTCAACCTCA Down: CAGCACACCTTGTCATACTCATCC	756	62	45
In1	Up: CGCTCTGCCCAAAGCCATGA Down: GCCCAGCTGCTGAAATCCACA	810, 1 771	64	120
5'-end	Up: TCCTTCTGCTTTGTTGTTGCG Down: GGATGACGGCTGATTTGCTG	287	62	20
3'-end	Up: CTGCCGCCACGCTCTCTATGT Down: CCGCACCCCTCCACCACCATCTC	302	68	20

1.3 总 RNA 的提取及反转录

使用通常的 Trizol 试剂法提取鸭软骨组织总 RNA, 具体操作按照 Invitrogen 产品说明进行. 基因的 RT-PCR 按照试剂盒说明合成 cDNA 第 1 链: 取总 RNA 2 μg, Oligo dT(18) (10 μmol/L) 1 μL, dNTP(10 mmol/L) 1 μL, 加 RNase-Free 水至 15.5 μL; 65 °C 保温 5 min, 然后冰浴 5 min; 再加 10 × AMV Reaction Buffer 2 μL, DTT(1 mol/L) 1 μL, RNase 抑制剂(40 U/μL) 0.5 μL, AMV 逆转录酶 1 μL, 混合 5 min 后, 于 37 °C 保温 1 h, 然后 70 °C 保温 15 min 即可.

1.4 PCR 扩增与测序

Ex1、Ex2 的 PCR 扩增体系: cDNA 1.2 μL, *rTaq* 酶 1 U, 10 × PCR Buffer (Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL, 引物(10 μmol/L) 各 0.75 μL, ddH₂O 加至 25 μL.

5'端、3'端扩增体系: cDNA 1.2 μL, *Ex Taq* 酶 1 U, 2 × GC Buffer I 12.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL, 引物(10 μmol/L) 0.75 μL, ddH₂O 加至 25 μL;

In1 扩增体系: DNA 模板 1.2 μL, LA *Taq* 酶 1 U, 2 × GC Buffer I 12.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL, 引物(10 μmol/L) 各 0.75 μL, ddH₂O 加至 25 μL.

94 °C DNA 预变性 3 min, 然后依表 1 中各对引物的循环条件进行 35 个循环, 再 72 °C 后延伸 5 min.

PCR 反应完成后, 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测后产物送上海英骏公司直接测序.

1.5 核酸序列比对、氨基酸序列分析和蛋白质结构预测

利用 DNASTar 软件中 MegAlign 分析鸭、人、小

鼠、大鼠、鸡、牛、南非爪蛙、西非爪蛙、斑马鱼、红胸罗非鱼等 15 个物种的 BMP4 编码序列,得到各物种间该基因的序列相似度;应用 ClustalW 方法分析以上 15 个物种的 BMP4 氨基酸序列,用 GeneDoc 软件显示比对结果;运用 ClustalW 软件 N-J Method 对上述 15 个物种的 BMP4 氨基酸序列进行比对,利用 Treeview32 软件制作进化树。

氨基酸序列在线分析和蛋白质结构预测主要在以下网站在线进行。

疏水性分析: <http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>

跨膜分析: http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

信号肽分析: <http://www.bs.dtu.dk/service/SignalP>

二级结构分析: http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html

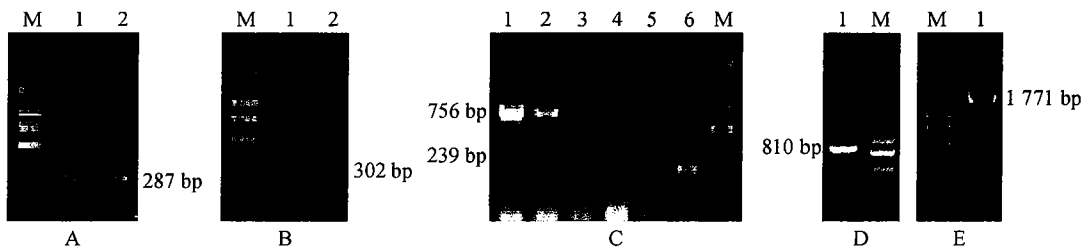
三级结构分析: <http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred>

所用到的软件有:DNASTar (<http://www.dnastar.com/>)、RasMol 26 (由 Roger Sayle 开发)等。

2 结果与分析

2.1 鸭 BMP4 基因序列及结构分析

5'端、3'端引物对扩增片段分别为 287 和 302 bp (图 1A 和图 1B); Ex1 和 Ex2 两引物对扩增出的目的片段外显子 1 和 2,分别为 239 和 756 bp (图 1C); In1 引物对以 cDNA 模板中扩增片段为 810 bp (图 1D)。对以上各序列按顺序拼接并除去重叠序列后得到 1 256 bp 的 cDNA 序列,与人、小鼠、鸡的该基因序列进行 BLAST 分析,确定其 1 ~ 44 bp 为部分 5' UTR 序列和 45 ~ 1 256 bp 为完整编码序列 (Coding sequence, CDS),编码 404 个氨基酸;将 1 212 bp 完整编码序列提交 GenBank,登录号为 EF540749。



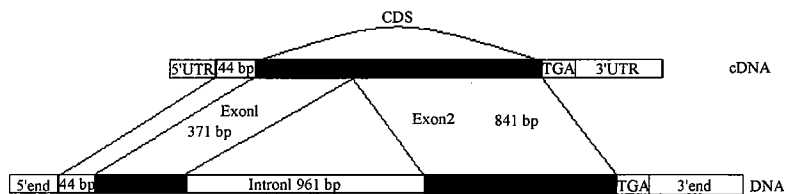
M: DNA Marker (由上至下为 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp); A: 5'端引物扩增片段 287 bp; B: 3'端引物扩增片段 302 bp; C: Ex2 和 Ex1 扩增外显子片段 756 和 239 bp; D: In1 引物扩增片段 810 bp (cDNA 为模板); E: In1 引物扩增片段 1 771 bp (DNA 为模板)。

图 1 鸭 BMP4 基因各目的片段电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis analysis of duck BMP4 gene fragments amplified by RT-PCR and PCR

以 DNA 为模板,以 In1 引物扩增获得的片段为 1 771 bp (见图 1E),与以 cDNA 为模板扩增得到的 810 bp 序列经比对后拼接成 2 217 bp 的基因组序列,提交 GenBank,登录号为 EF540750。比对分析,确定鸭 BMP4 基因的结构类似于鸡 BMP4 的基因组序

列,包含 2 个外显子和 1 个内含子,如图 2 所示。其中外显子 1 包括 44 bp 的 5'UTR 和 371 bp 的编码区,中间的内含子长 961 bp,第 2 外显子为 841 bp 加 1 个终止密码子。此外 5'UTR 和 3'UTR 的其他序列还需要进一步探索。



深色框: 已得序列; 浅色框: 未得序列; CDS: 编码序列。

图 2 鸭 BMP4 基因结构模式

Fig. 2 The structure of duck BMP4 gene

2.2 鸭 BMP4 基因的序列保守性及进化树构建

将获得的鸭的 BMP4 基因的编码序列与其他 14 个物种 BMP4 基因核酸编码序列进行比对,并进行系统进化分析。从进化树分析结果来看 (图 3), 15 个物种大致分为 3 大类,其中鸭与鸡同两栖类、鱼类归

为一大类,人、恒河猴、兔和狗,小鼠、大鼠和牛分别聚类成另两大类。该分析结果与理论上的物种进化顺序基本一致。同时还可得知 BMP4 基因在哺乳动物间的保守性相当高,这也解释了其生物学活性具有跨种属性的特点。

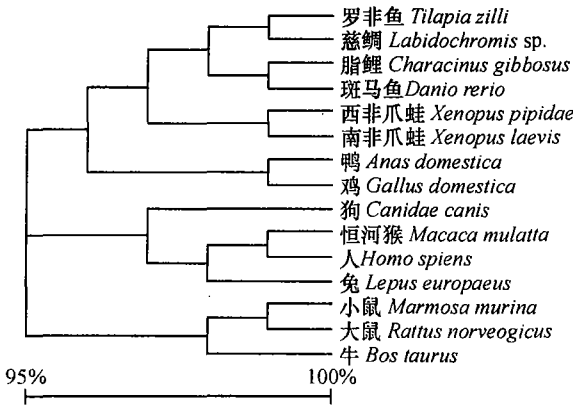
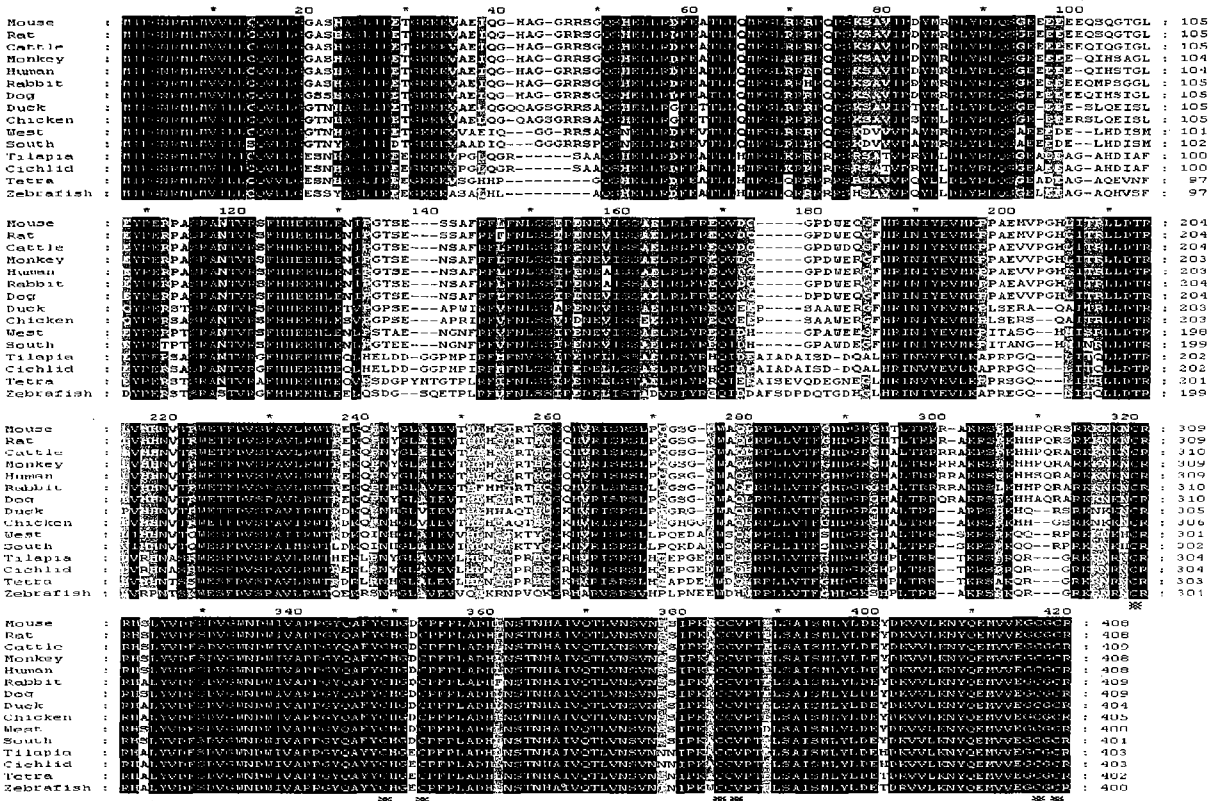


图3 15个物种 BMP4 基因分子进化树

Fig.3 The Phylogenetic tree of BMP4 gene among 15 species

2.3 氨基酸序列分析和蛋白质结构预测

氨基酸肽链分析结果表明,鸭 BMP4 蛋白的第 1~19 个氨基酸为信号肽序列,第 291~404 个氨基酸组成成熟肽;氨基酸序列比对显示,各物种的 BMP4 氨基酸序列保守性较高,尤其是前 20 个氨基酸的信号肽区域和后 120 个氨基酸的成熟肽区域均高度保守,仅个别氨基酸发生变化,各物种间成熟肽的相似性均在 95% 以上(图 4),且 BMP 家族 7 个特征性半胱氨酸残基均高度保守.将和鸭进化关系最近的鸡 BMP4 氨基酸序列进行比较,发现后面 120 个氨基酸序列完全相同.



图中黑色背景表示完全保守氨基酸残基;※:7个特征半胱氨酸残基.

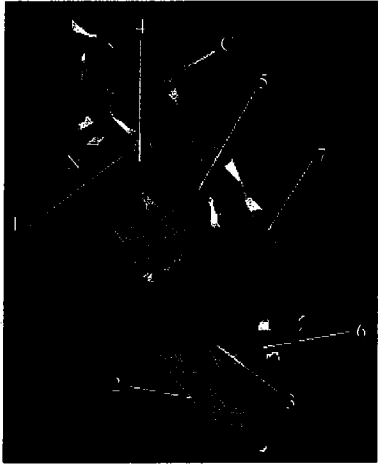
图4 15个物种 BMP4 前体多肽相似性分析

Fig.4 Similarity analysis of BMP4 precursor polypeptide chain among 15 species

疏水性分析表明,在 14 位氨基酸(Cys)疏水参数为最大值 3.011,其附近存在一疏水区域;而在 299 位氨基酸(Lys)疏水参数为最小值 -3.556,其附近存在一水解区域.跨膜分析显示,7~27 位氨基酸间的跨膜螺旋双向跨膜分值均远大于 500,预测为典型跨膜区域;而 291~303 位氨基酸间的双向跨膜分值均小于 -5 000,该区域跨膜的可能性最小.信号肽预测分析发现,BMP4 蛋白的最大可能裂解位点在 19~20 位,1~19 位氨基酸残基为信号肽序列.

用 DNASTar 软件 Protean 预测鸭 BMP4 蛋白的相

对分子质量为 46 074,等电点是 8.87;BMP4 成熟肽的相对分子质量为 12 904,等电点是 7.65.应用 GOR IV 在线分析 BMP4 蛋白的二级结构,预测 404 个氨基酸残基中近 1/3 为 α -螺旋(32.18%),24.01% 为延伸链,43.81% 呈无规卷曲.利用 Esyspred 在线预测 BMP4 成熟肽三级结构后,用 RasMol 26 软件显示出其三维构图,如图 5 所示;BMP4 成熟肽由 2 个 α -螺旋和 7 个 β -折叠,其中折叠 1~4 形成一折叠片,折叠 5~7 形成另一二级结构元件构成折叠片,且两折叠片相互平行.



红色为 α -螺旋,黄色为 β -折叠,蓝色为转角,白色为其他残基;1~7 为 β -折叠,N、C 分别为 N-和 C-末端。

图 5 BMP4 成熟肽的三级结构模拟图

Fig. 5 The third structure of BMP4 mature peptide

3 讨论

骨形成蛋白 4 (BMP4) 功能广泛,不仅具有促进软骨和骨组织形成的作用,而且对神经、上皮及生殖细胞等的生长、发育和分化都具有重要调节作用^[16-18],并参与细胞凋亡和细胞信号转导的调节^[19]. 本研究采用比较基因组学和 RT-PCR 克隆获得了鸭 BMP4 基因完整编码区 cDNA 序列,确定了鸭 BMP4 基因由 2 个外显子和 1 个内含子组成的基因组结构,编码 404 个氨基酸(不包括终止密码子),与鸡 BMP4 基因相差了 2 个氨基酸(后者编码 406 个氨基酸). 人、鼠、鹿等哺乳动物 BMP4 基因有 2 个不同的转录本,表达于不同组织中^[20];本研究从鸭胚的软骨组织中获得一种鸭的 BMP4 转录本,由于组织样本有限,尚不能确定是否还存在其他的转录本。

在脊椎动物中,BMP4 均包含 400 个以上氨基酸(哺乳类到鱼类 400~408 不等),剪切掉 N 端约 20 个氨基酸的信号肽段,再经蛋白水解生成约 120 个氨基酸残基的成熟肽^[21]. BMP4 成熟肽分子均有 7 个特征性半胱氨酸,其位置高度保守,形成 3 个分子内二硫键和 1 个分子间二硫键,以构成活性形式的二聚体^[22]. 本研究所获得鸭 BMP4 基因 cDNA 序列编码 404 个氨基酸,分析推测其经剪切水解后成熟肽包含 114 个氨基酸,C 端 7 个特征性半胱氨酸均一一对应. 鸭 BMP4 成熟肽特征性的半胱氨酸残基对 BMP4 特有的分子折叠起着关键作用,也是其受体结合和发挥生物学活性所必不可少的。

鸭 BMP4 三级结构类似于同亚组的 BMP2 蛋白,这些都从不同层面证实了所得序列的正确性. 氨基

酸比对结果显示不同物种间的氨基酸相似性很高,这表明哺乳动物的编码区在进化过程中保守性是很强的. 由进化树关系中的氨基酸变化可以看出,尽管鸭 BMP4 与其他哺乳动物和鱼类、两栖类的 BMP4 相似性相对较低,其信号肽和成熟肽的氨基酸序列与其他物种仍是高度保守的. 本研究选择氨基酸序列建树,是考虑到遗传密码子的通用性使得氨基酸序列更为准确. 但这只能是初步分析,还需要通过其他方法对其进化机理进行更深入的研究. 鸭的 BMP4 氨基酸序列与鸡的 BMP4 氨基酸高度相似,提示 BMP4 在这 2 个物种骨发生、喙发生和羽毛形成有相同的调控机制. 但是鸡和鸭的羽毛形成也有较大的不同,而鸭和鹅羽毛则有很多相同之处,如鸭绒和鹅绒品质类似,但是已发表鹅的 BMPcDNA 序列仅仅是其一部分,所以无法将 3 者进行完全比较。

BMP4 氨基酸序列在线分析结果表明信号肽区域与疏水区、跨膜区基本吻合,这也与分泌性蛋白信号肽的性质(疏水性、跨膜性)相一致. BMP4 在其裂解位点 19~20 发生裂解,产生 19 个氨基酸残基的信号肽和 385 个氨基酸残基的前肽,再于 290~291 位经内切蛋白酶切割,可生成 114 个氨基酸的成熟肽;疏水性预测发现在 9~25 位之间含有一个较典型的疏水性区域,同信号肽位置重合,这与信号肽多由疏水性氨基酸构成相一致;跨膜螺旋位于 7~27,其由内向外、由外向内的跨膜分值均高于 500,与该蛋白质的疏水性分析结果基本一致,可判定是一个重要的典型跨膜螺旋位点。

此外,通过 RT-PCR 还获得了鸭 BMP4 基因的部分 5'UTR 和 3'UTR 序列,这些序列在基因的表达调控方面起着重要的作用,前人研究成果表明 BMP4 基因的表达受到时空的调节,因而也造成了不同的雀其喙的形成也不同,可以推测,BMP4 基因氨基酸序列在物种间高度保守,但是由于调节时空不一样,因而也就形成了物种骨骼、皮毛等多样性。

参考文献:

- [1] TATSUYA K, KAREN M L, ANDREW P M, et al. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development [J]. PNAS, 2005, 102: 18023-18027.
- [2] TABATA M J, FUJII T, LIU JI-guang, et al. Bone morphogenetic protein 4 is involved in cusp formation in molar tooth germ of mice [J]. Europe Journal Oral Science, 2002, 110: 114-120.

- [3] ALLAN M G, KATHERINE C B, ADELE M D, 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.
- [4] CHEN J N, FREDERICUS J, KERRI S W, et al. Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish [J]. *Development*, 1997, 124: 4373-4382.
- [5] MOLLY W, JONATHAN M Y, DUNN R N, et al. Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development [J]. *Development*, 1999, 126: 4005-4015.
- [6] LEIF O, ANDREW T D, ROBERT E G, et al. BMP4 substitutes for loss of BMP7 during kidney development [J]. *Developmental Biology*, 2005, 286: 637-646.
- [7] YUKA M, SUMIKO M, YOSHIHIRO H, et al. BMP4 expression in the developing rat retina [J]. *Brain Research*, 2006, 1122: 116-121.
- [8] MASSAGUE J, ATTISANO L, WRANA J L. The TGF- β family and its composite receptors [J]. *Trends Cell Biol*, 1994, 4: 172.
- [9] CHEN Gui-bin, YE Zhao-hui, YU Xiao-bing, et al. Trophoblast differentiation defect in human embryonic stem cells lacking PIG-A and GPI-anchored cell-surface proteins [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(4): 345-355.
- [10] 蒋欣泉, 陈建国, 袁荣涛, 等. 人骨形成蛋白4 反转录病毒体系的构建及裸鼠肌肉成骨实验 [J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2005, 3(1): 61-64.
- [11] ELIZABETH P. Bonemaking Protein Shapes Beaks of Darwin's Finches [J]. *Science*, 2004, 305(5689): 1383.
- [12] ARTHUR V M, DANIEL O W, CHRISTINE J B, et al. Fine mapping of the human bone morphogenetic protein-4 gene (BMP4) to chromosome 14q22-q23 by in situ hybridization [J]. *Genomics*, 1995, 27: 559-560.
- [13] 郭炫, 吴伟, 高光, 等. 皖西白鹅 BMP4 基因部分 cDNA 序列的克隆及序列分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(7): 873-878.
- [14] JUNG H S, FRANCIS-WEST P H, WIDEI R B, et al. Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning [J]. *Dev Biol*, 1998, 196: 11-23.
- [15] NORAML Y S, MORGAN B A. BMPs mediate lateral inhibition at successive stages in feather tract development [J]. *Development*, 1998, 12: 3775-3787.
- [16] MARCIA G H, SUZANNE J C, KIRAN M S, et al. The contributions of BMP4, positive guidance cues, and repulsive molecules to cutaneous nerve formation in the chick hindlimb [J]. *Developmental Biology*, 2005, 282: 257-273.
- [17] TAO Jian-ning, EMIN K, WANG Xi, et al. BMP4-dependent expression of xenopus grainy head-like is essential for epidermal differentiation [J]. *Development*, 2005, 132(3): 1021-1034.
- [18] HU Jie, CHEN Ya-xiong, WANG Dan, et al. Developmental expression and function of BMP4 in spermatogenesis and in maintaining epididymal integrity [J]. *Developmental Biology*, 2004, 276: 158-171.
- [19] ROBERT R B, JAE W K, TAMARA C O, et al. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: Role of the BMP-4 gene [J]. *PNAS*, 2006, 103: 13022-13027.
- [20] ARTHUR V W, MAUREEN V K, EVERARDUS J Z, et al. Genomic organization of the human bone morphogenetic protein-4 gene: Molecular basis for multiple transcripts [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1996, 219: 789-794.
- [21] JUAN P B, HAKAN T, SOL D R, et al. Cloning and expression of three members of the zebrafish Bmp family: Bmp2a, Bmp2b and Bmp4 [J]. *Gene*, 1997, 198: 53-69.
- [22] BRIGID L H. Bone morphogenetic proteins in development [J]. *Genetics & Development*, 1996, 6: 432-438.

【责任编辑 柴 焰】