

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180906001

http://www.yykxjz.cn/

熊钢, 周先文, 马晓, 曾丹, 陈贞年, 康骊, 王晓清. 中华鳖 *GHITM* cDNA 基因克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 173-179

Xiong G, Zhou XW, Ma X, Zeng D, Chen ZN, Kang L, Wang XQ. Molecular cloning and expression analysis of *GHITM* cDNA in *Trionyx sinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 173-179

## 中华鳖 *GHITM* cDNA 基因克隆及表达分析\*

熊 钢<sup>1,2</sup> 周先文<sup>2</sup> 马 晓<sup>3</sup>  
曾 丹<sup>2</sup> 陈贞年<sup>2</sup> 康 骊<sup>1</sup> 王晓清<sup>2①</sup>

(1. 湖南生物机电职业技术学院动物科技系 长沙 410127;

2. 湖南农业大学动物科技学院 长沙 410128; 3. 河南师范大学水产学院 新乡 453007)

**摘要** 为研究 *GHITM* 基因在中华鳖(*Trionyx sinensis*)胚胎发育及生长中的作用, 本研究通过 RT-PCR 和 RACE 方法获得了中华鳖 *GHITM* 全长 cDNA 序列; 采用实时荧光定量 PCR 对 *GHITM* mRNA 组织表达及不同温度孵化胚胎发育过程中的表达特性进行分析。结果显示, 中华鳖 *GHITM* cDNA 序列长度为 2650 bp, 开放阅读框为 1050 bp, 5'非编码区为 123 bp, 3'非编码区为 1477 bp, 编码 349 个氨基酸, 编码蛋白的等电点为 10.01, 分子量为 37.12 kDa。*GHITM* 编码氨基酸序列由胞外区、跨膜区和胞内区组成, 7 个跨膜域组成跨膜区。*GHITM* 编码氨基酸序列的同源性分析显示, 中华鳖与锦龟(*Chrysemys picta bellii*)和绿海龟(*Chelonia mydas*)同属一个分支, 3 种鳄鱼构成一个分支, 7 种鸟类形成一个分支。实时荧光定量检测显示, *GHITM* 基因在肝脏、肌肉和脑垂体中的表达水平较高, 显著高于心脏、性腺、肠、肾脏和脾脏组织( $P<0.05$ ); 50 g 左右和 500 g 左右雄性个体肝脏中的 *GHITM* 基因表达量显著高于雌性个体( $P<0.05$ ); 低温胁迫孵化能显著抑制胚胎肝脏中 *GHITM* 基因的表达( $P<0.05$ )。上述研究结果表明, *GHITM* 基因与中华鳖生长和胚胎发育密切相关, 其在中华鳖胚胎中的表达受孵化温度调节。本研究为探讨中华鳖胚胎发育和生长提供理论依据。

**关键词** 中华鳖; *GHITM*; 基因克隆; 胚胎发育; 组织表达

中图分类号 S917; Q575; Q492 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)06-0173-07

生长激素诱导的跨膜蛋白(Growth-hormone inducible transmembrane protein, GHITM)是在研究转基因(Growth-hormone antagonist, GHA)小鼠的差异表达基因时被首次发现(Li *et al*, 2001)。GHITM 蛋白(Reimers *et al*, 2007)的氨基酸序列其 C 末端的特殊结构域, 将其归类为 Bax 抑制蛋白类似家族新成员, BI-1 家族(Bax inhibitory protein-like family)在细胞内质网中高表达,

并且参与细胞的程序性细胞死亡。这些家族成员在哺乳动物中保守存在, 都是定位于细胞膜上且具有 6~7 个典型跨膜结构域的高疏水性蛋白(罗少杰等, 2016), 在软体动物仿刺参(*Apostichopus japonicus*) (高杨等, 2014)和马氏珠母贝(*Pinctada martensi*) (罗少杰等, 2016)中有 8 个跨膜结构, 因而得名生长激素诱导的跨膜蛋白。

\* 国家自然科学基金(31672640)、湖南省自然科学基金(2017JJ3134; 2016NK2115)和湖南省教育厅基金项目(17C0935)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31672640), Natural Science Foundation of Hunan Province(2017JJ3134; 2016NK2115), and Scientific Research Fund of Hunan Province Education Department(17C0935)]. 熊 钢, E-mail: xionggang709@126.com

① 通讯作者: 王晓清, 教授, E-mail: wangxiao8258@126.com

收稿日期: 2018-09-06, 收修改稿日期: 2018-10-21

GHITM 蛋白在氧自由基对抗衰老的机制中发挥作用,与动物的年龄、生长相关(Knapp *et al*, 1994)。GHITM 在小鼠胚胎和成人组织以及哺乳动物组织中普遍存在表达,在小鼠胚胎发育过程中大量表达,胚胎分裂对 GHITM 表达量至关重要(Yoshida *et al*, 2006)。GHITM 在日本血吸虫(*Schistosoma japonicum* Katsurada) (熊涛等, 2012)童虫时期表达量高,推测其在生长发育中发挥作用。

为探讨中华鳖胚胎发育和生长,本研究采用 RACE (Rapid-amplification of cDNA ends)扩增法获得中华鳖 *GHITM* cDNA 的全长序列,并采用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测 *GHITM* 基因的组织表达情况,及不同孵化温度对胚胎处理的研究,旨在为进一步探讨中华鳖 *GHITM* 基因的生物学功能及作用机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

从湖南省岳阳市临湘中华鳖养殖场采集同批次 50 g 左右和 500 g 左右的中华鳖雌雄个体各 3 个,取其肌肉、肝脏、脑垂体、肠道、心脏、脾脏和性腺组织。中华鳖受精卵取自湖南省常德柳叶湖河州甲鱼生态

养殖基地, 24℃、30℃和 34℃恒温孵化,取 15~17 期、20~22 期和破壳期胚胎肝脏组织,各组织放入 1.5 ml 离心管中,于液氮中冷冻后, -80℃保存。

### 1.2 主要药品与试剂

RNA 提取试剂盒(RNAiso Plus)、柱式胶回收试剂盒和凝胶回收试剂盒购于 Omega, cDNA 逆转录试剂盒、DNA Fragment Purification Kit Ver.2.0、纯化试剂盒和 TdT 酶购自大连宝生物工程(TaKaRa)公司, PCR 反应酶-2×EasyTaq PCR SuperMix (北京全式金生物)、SYBR Green real time PCR Mix 购自 Thermo Scientific 公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 引物合成** 从 GenBank 中下载相近物种的 *GHITM* 基因序列,在基因保守区内用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物,引物由上海铂尚生物科技有限公司(以下简称铂尚生物)合成,引物序列见表 1。

**1.3.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成** 用 RNA 提取试剂盒(Omega)提取总 RNA,加入 30 μl Rnase-free 水, 60℃孵化溶解 RNA 沉淀, -20℃保存备用。以提取的总 RNA 为模板,按逆转录试剂盒操作说明逆转录成第一条 cDNA 链。

表 1 中华鳖 *GHITM* cDNA 序列扩增及 RT-PCR 用引物  
Tab.1 Primers used for cloning of *GHITM* cDNA and RT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	目的 Purpose
GHITM1 <sup>+</sup>	AGGAATACTCATTGAATCAGTAGCAT	中间片段 1 扩增
GHITM1 <sup>-</sup>	GGGTCATATTTTGCCACTCCAT	
GHITM2 <sup>+</sup>	CTGTAGCAGTTTATGGTGGATTGAT	中间片段 2 扩增
GHITM2 <sup>-</sup>	GCCAAAACACACATTATAGCCAAA	
GHITM5'	CCATCTTCCCCTCTGGTCAACTT	5'巢式 PCR
GHITM3'	AGCCCTGCTTACTAAAACCTCGACTT	3'巢式 PCR
3'RACE Olig(T)-Adaptor	CTGATCTAGAGGTACCGGATCCCTTTTTTTTTTTTTTTT	3'端扩增
3'RACE Adaptor	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC	3'端扩增
5'RACE Olig(T)-Adaptor	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	5'端扩增
5'RACE Adaptor	GACTCGAGTCGACATCG	5'端扩增
Real-GHITM <sup>+</sup>	CACAGCAGGAATTGTAGGA	荧光定量引物
Real-GHITM <sup>-</sup>	CACAGCAGGAATTGTAGGA	
GAPDH <sup>+</sup>	CCCATTCAATGGCCTCAACTAC	内参引物
GAPDH <sup>-</sup>	CCCCACTTGTTGTTAGCAGGAT	

**1.3.3 *GHITM* cDNA 中间片段扩增和克隆** 以引物 GHITM1<sup>+</sup>和 GHITM1<sup>-</sup>扩增 *GHITM* 基因中间片段 1; GHITM2<sup>+</sup>和 GHITM2<sup>-</sup>扩增 *GHITM* 基因中间片段 2; PCR 扩增条件: 95℃预变性 3 min; 94℃ 30 s, 52℃

30 s, 72℃ 60 s, 共 33 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖电泳、切胶和回收纯化后克隆至 pGM-T 载体, 转化到感受态 TOP10, 进行蓝白斑筛选, 菌液 PCR 检测阳性克隆, 阳性克隆送铂尚生物测序。

### 1.3.4 *GHITM* cDNA 3'端和 5'端片段扩增和克隆

3'端片段扩增和克隆: 扩增采用 *GHITM2*<sup>+</sup>、*GHITMN3*'、3'RACE Olig(T)-Adaptor 和 3'RACE Adaptor 引物, 作为巢式 PCR 引物, *GHITMN3*'是根据已获得中间片段序列而设计的特异性引物, 并且 *GHITMN3*'在 *GHITM2*<sup>+</sup>的下游; 3'RACE Olig(T)-Adaptor 和 3' RACE Adaptor 是 1 对通用引物。反转录时, 用 3' RACE Olig(T)-Adaptor 代替反转录试剂盒中的 Olig(T)用于 mRNA 反转录; 扩增时, 采用 *GHITM2*<sup>+</sup>和 3' RACE Adaptor 进行第 1 次 PCR: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共 20 个循环; 72℃ 延伸 10 min。产物稀释 50 倍后, 用 *GHITMN3*'和 3' RACE Adaptor 进行巢式 PCR, 反应条件同上。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖电泳, 将出现的条带切胶和回收纯化后克隆至 pGM-T 载体, 转化到感受态 TOP10, 进行蓝白斑筛选, 菌液 PCR 检测阳性克隆, 阳性克隆送铂尚生物测序。

5'端片段扩增和克隆: 扩增采用 *GHITM1*<sup>-</sup>、*GHITMN5*'、5'RACE Olig(T)-Adaptor 和 5'RACE Adaptor 引物, *GHITMN5*'为根据已获得中间片段序列而设计的特异性引物, 并且 *GHITMN5*'在 *GHITM1*<sup>-</sup>的上游; 5'RACE Olig(T)- Adaptor 和 5'RACE Adaptor 为 1 对通用引物。首先, 用特异性引物 *GHITM1*<sup>-</sup>代替反转录试剂盒中的 Olig(T), 在 *Mulv* 逆转录酶作用下合成 cDNA 第一链, 用 DNA Fragment Purification Kit Ver.2.0 (Code: DV807A) 纯化试剂盒将 cDNA 纯化。然后, 在纯化产物 cDNA 3'端加 1 个 Poly(A) 尾巴。取纯化 cDNA 10.0 μl, 5×TdT buffer 10 μl, 0.1% BSA 5.0 μl, dATP (10 mmol/L) 2.5 μl, TdT 酶 1.0 μl, H<sub>2</sub>O 21.5 μl, 37℃ 保温 30 min 后 80℃ 10 min, 产物用 H<sub>2</sub>O 稀释为 0.5 ml 后 -20℃ 保存备用。最后用 *GHITM1*<sup>-</sup>和 5'RACE Olig(T)-Adaptor 进行第 1 次 PCR: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 53℃ 30s, 72℃ 60 s, 共 20 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 产物稀释 50 倍后再用 *GHITMN5*'和 5' RACE Adaptor 进行巢式 PCR, 反应条件同上。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖电泳, 将出现的条带切胶和回收纯化后克隆至 pGM-T 载体, 转化到感受态 TOP10, 进行蓝白斑筛选, 菌液 PCR 检测阳性克隆, 阳性克隆送铂尚生物测序。

**1.3.5 测序结果分析** 测序结果在美国基因库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 分析, 主要使用 DNAMAN 生物软件、开放阅读框 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), 蛋白质理化性质预测使用 ProtParam

(<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件, 信号肽 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、CLC Main workbench 软件和 SWISS-MODEL Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/interactive/>) 在线进行分析。应用 MEGA 6.06 (Librado *et al.*, 2009) 软件, 采用邻位相接法 (NJ 法) 构建系统发育树, 并用 Bootstrap 重复 1000 次计算各分支的置信度。

**1.3.6 基因发育及组织表达检测** 按 1.3.3 方法获得中华鳖心脏、肝脏、肌肉、性腺、肠、肾脏、脑垂体、脾脏和胚胎肝组织 cDNA, 每个组织取 3 个平行样, 其中, 雌雄中华鳖胚胎用本课题组筛选的中华鳖性染色体 PCR 引物进行鉴定, 50 g 左右和 500 g 左右中华鳖雌雄采用解剖肉眼观察筛选。用荧光定量引物 Real-*GHITM* 和内参引物 *GAPDH* 对各组织进行基因表达检测。对荧光定量数据采用 *GHITM* 基因相对内参 *GAPDH* 基因表达量 ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) 进行计算。实验结果采用 SPSS 17.0 进行 ANOVA 单因素方差分析 (One-way ANOVA),  $P < 0.05$  为显著差异,  $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GHITM* cDNA 克隆及序列分析

以中华鳖肝脏 RNA 为模板, 用特异性引物扩增获得 *GHITM* cDNA, 全长为 2650 bp (基因号: MH557794), 包括包含 123 bp 的 5'非编码区序列、1 477 bp 的 3'非编码区序列、长度为 1050 bp 开放阅读框, 编码 349 个氨基酸 (图 1), 编码蛋白的等电点为 10.01, 分子量为 37.12 kDa。

### 2.2 基因编码氨基酸序列生物信息分析

利用 SignalP 软件对 *GHITM* 基因编码氨基酸序列预测无明显信号肽。编码蛋白功能域预测发现, *GHITM* 基因编码氨基酸序列为典型的 7 个跨膜结构蛋白 (图 2)。从第 121 个氨基酸开始跨膜, 由 20 个氨基酸组成的第 4 个跨膜结构域长度最短, 由 31 个氨基酸组成的第 7 个跨膜结构域长度最长。

### 2.3 系统进化树分析

在 GenBank 中对中华鳖 *GHITM* 基因 BLAST 获得锦龟 (*Chrysemys picta bellii*, XP\_005294095.1)、墨西哥箱龟 (*Terrapene mexicana triunguis*, XM\_024209991)、绿海龟 (*Chelonia mydas*, XP\_007067303.1)、湾鳄 (*porosus*, XM\_019555975)、扬子鳄 (*Alligator sinensis*, XP\_006029557.1)、密西西比鳄 (*Alligator*

```

CTCAGCTCTGCCGCCGC 18
GGCTTCCCCGIGACCGTTTTGCGGAGTGACGCACAATTTGTGCTGGCACACACGGCGGGGTGTCGGTGGCGCGTGGCGAGGAATACTCATTGAATCAGTAGC 123
ATGCTGGCAGCAAGATTAGTGTCTACGGACTGCCATGCCGGAGTCTCCGCTCTGCAATTTTCACGGGCTTCCCAACTTTGAGGAATCCAGCATAAAAGCA 228
M L A A R L V C L R T L P C R S L R P A F S R V F P T L R N S S I K A 35
AATCAATGGACCTGCAACCTAACAGGGGTATGCCTCCAAAGCAAAAATGGAGTTCGGCGAGGAAGAACTGATCAAGAAATAAAAAGCAGCTTTTGAGCCA 333
N Q W T L Q P N Q G Y A S K A K M G V R R G R T D Q E I K K A A F E P 70
GCAATGGAACTGCATTAAACTTGACCAGATCGGAAGATGGATTGCTGGACGGGCTCTGCTGGCTTTGGACCTCTCTGTTATTATGGAATGCCAATGTC 438
A M E T A F K V D Q M G R W I V A G G A A V G L G A L C Y Y G M G M S 107
AATGAGATTGGACCAATTGAAAAAGCTGTATTTCGGCTCAGTATGTGAAAGACCGAATCCGTTCTACCTACATGTATTTGCAGGAAGTGTGGTTGACAGCA 543
N E I G A I E K A V I W P Q Y V K D R I R S T Y M Y F A G S V G L T A 140
CTGTCTGCTGACAGTCACTAGATCGCCTGCACTCATGAGCCTTATGATGAGGGTCTTGGCTGGCAATTTGGTCAACTTTTGCACTATGATTGGTGGTGGG 648
L S A V A V S R S P A L M S L M M R G S W L A I G A T F A A M I G A G 175
ATACTGGTACGCTCAATATCCTAAGGTAATCTGCTGCTAAACACCTTGCCTGGATGCTTCATGCAGGACTCATGGTGGCGTGGCTCCATGACCTTG 753
I L V R S I S Y E G N P G A K H L A W M L H A G V M G A V V A P L T L 210
TTGGGTGGTCTCTGCTAATCAGAGCTGCTTGTACACAGCAGGAATTGTAGGAGTCTCTCAACTGGCCATGTGCCGCCAAGTGAAGATTTCTGAACATG 858
L G G P L L I R A A W Y T A G I V G G L S T V A M C A P S E K F L N M 240
GGAGGACCACTTGGAGTAGGCCGTGGCCCTGTTTTGGCTTCTTCACTGGATCTATGTTCTCGCTCTACATCTGCATTTGGAGCAGGGCTGATTTCTGTAGCA 963
G G P L G V G L G L V L A S S V G S M F L P P T S A F G A G L Y S V A 280
GTTTATGGTGGATTGATCTGTTGGCATGTTCTTCTGTATGACACACAAAAAGTTATCAAAGTCGAGAGACACCCCACTTTCAGTATATGGATGGCAAAA 1068
V Y G G L I L F G M F L L Y D T Q K V I K R A E T H P V S V Y G V A K 315
TATGACCCCATTAACCTGCTATGGTATCTACATGGATACACTTAACATCTTATCCGGGTGCCACCATGCTTGGCATTGGTGGAGTAACAGCAGGAAATGA 1173
Y D P I N S C M G I Y M D T L N I F I R V A T M L G I G G S N R R K * 349
ATGAGATTTTCTTTTCAACCATCTGATATTTCCACAACTCTGCTGCTTAGAGACTATGCCCTAGTAAAAGTTAATCTGGTGTACAGCAGCTGTCTATGATA 1278
CATCAAAGTTTACGCACTTCAATATTTATTTAAAGTGTTTCTGTACAACATGACTCTCAAGGATGACTTACCTAATTTCTCATGTGAACAGGCCATATTTAAA 1383
TTGCACTGCAACACTTGTACATAATTTGATCATCAATGAGAGAAATATATTCAGTAAATATATTTCTAAACTTTAGTAAACAAAAGTGAATCAGCTGCTTTC 1488
ACTGAAAGTTTGACATCATTATTTGCGACTATCACTTCTGTGCTTACCATCAITGCATAATAAAAAATAAACTAATCCCTGAATGTAGAATAAAGTATAACAG 1593
AAAGGGCAGCATGAAACCTCGAGACTGACTACTGGAATACGGAACCTTATGCTTAAACAAGTGTGGTGTGAGTGAAGCCATTGCTGCTCTTTGATGGCCTTG 1698
GGTAATCTTTGTGAAAGGAACACAGCCCTGCTTACTAAAACCTCGACTTTGTCACAATTTGTAACATTTTACCATCTCAACTGAAATGTTAGAAGGATTACAG 1803
TGAACACAGAGAAACACAAAGCCCTTGGAAAGCAGTGTGGCACTGTAACCAAGCTTGTACTCTTACTGTGTATTTGCTCTGGGTAGATAAAAACCTCAGC 1908
ACTTTTCCGAGGACACTTGAAGAGTTAGTGTTCAGTGTGGCTGTAACGTTTCCAACTCTTATGTTGCTTCTGTATTTGCTTGGTGGTGAATAAACTTGGGAA 2013
CATCAAACATTTGAGTGTGCTTCCAGAACCAAAATATAATTTGGGCTATAATGTGTGTTTGGCATATAAAAAACACTAGCTTTTAAAAATTTGAAATCAAC 2118
TAAGTGTGTTTGGTGTGATGCTGAGCTTGCAGTGACCAGTCCCACTCTGAACCTGCTCAATGAGTGTACTGGAACAGCGGGAAGGCAAACTCTATTTGTTTT 2223
TTTGACCTGTGTTCCAGGCCCCAGAACCAAGGACGTTGGGCGGTAATCCTTTAGCTCTTACCAAATTACTTCCGTAATAATGGTATTTTCTTGACCATATTT 2328
AACAAAAGTCCCTCATTAAATGTTGATGGTGAATTTCTACAACATGTTCAAATGTTATAATACCATGCTTGAATTTGTCAAATGCACGTTTTATAAGATGGGATAA 2433
CAGGTAAGCTGTGAAAATTTTGGCACAGGCTAATTTGGAAATCCTTATAGTAAATGAGGCTTATGIAACTACTGTGTACTCAATCTAGTATTAGTITGG 2538
CAAAAATCAAATCCTCAGTGTAGAAAATTTATTTATCCTTTTCACTGATGTTGTGCTATGCTGTATCCTGAGTCTGAAAACAATAAATCCAAAACAGCAAAA 2643
AAAAAA 2650

```

图1 中华鳖 *GHITM* cDNA 序列和推测的氨基酸序列  
 Fig.1 Nucleotides and deduced amino acids sequence of *T. sinensis* of *GHITM*

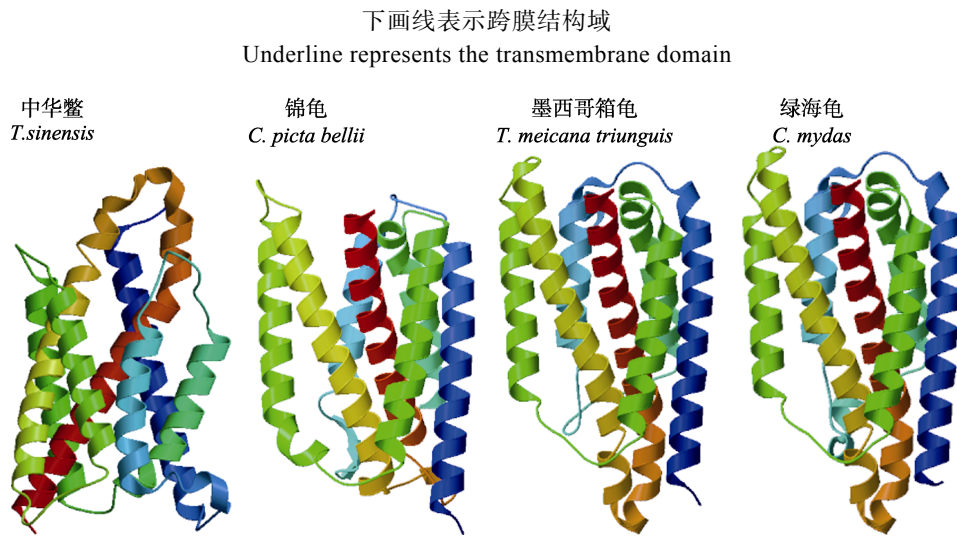


图2 *GHITM* 编码蛋白功能域预测  
 Fig.2 Prediction of protein functional domains of *GHITM*

*mississippiensis*, XP\_006270235.1)、非洲鸵鸟(*Struthio camelus australis*, XM\_009685550)、褐几维鸟(*Apteryx australis mantelli*, XM\_013961508)、日鳉(*Eurypyga helias*, XM\_010148176)、暴雪鸢(*Fulmarus glacialis*, XM\_009578185)、鹃 鸫(*Leptosomus discolor*, XM\_009958645)、日本冠 鸮(*Nipponia nippon*, XM\_009465931)和帝企 鹅(*Aptenodytes forsteri*, XM\_019473032)物种的 *GHITM* 基因。利用 MEGA 6.06 软件对 14 个物种 *GHITM* 基因编码氨基酸序列进行比对并构建 NJ 系统进化树分析, 结果显示, 鳖科的中华鳖与龟科的锦龟和海龟科的绿海龟亲缘关系最近, 同属一个分支, 泽龟科的墨西哥箱龟独立在一支, 湾鳄、扬子鳄和密西西比鳄 3 种鳄鱼构成一分支, 7 种鸟类形成一分支。

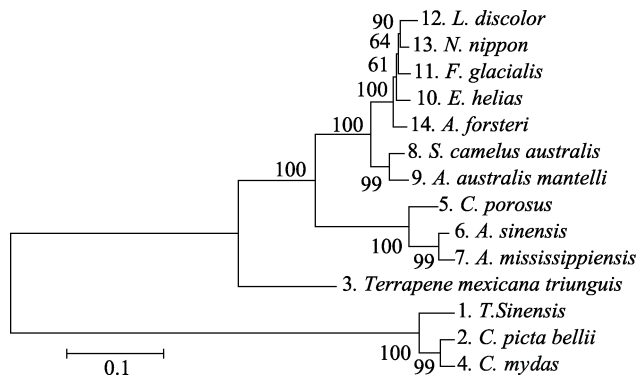


图 3 利用 MEGA 6.06 软件构建的基于 *GHITM* 基因所编码氨基酸序列的 NJ 系统进化树  
Fig.3 NJ phylogenetic tree based on *GHITM* amino acid sequences by MEGA 6.06

### 2.4 *GHITM* 基因的组织表达特性及胚胎发育阶段变化

采用相对实时定量 PCR 检测 *GHITM* mRNA 的组织 and 胚胎表达特性, 结果显示, *GHITM* 基因在 500 g 左右中华鳖的肝脏、肌肉和脑垂体中表达水平较高, 显著高于心脏、性腺、肠、肾脏和脾脏组织( $P < 0.05$ ), 在性腺中表达量最低, 且精巢与卵巢的表达量差异不显著( $P > 0.05$ ); 50 g 左右和 500 g 左右雄性中华鳖肝脏中表达量显著高于雌性( $P < 0.05$ ); 采用 30℃ 孵化的中华鳖胚胎性别决定期和分化期的雄性胚胎肝脏表达量不显著高于雌性( $P > 0.05$ ), 在胚胎破壳时, 雌性个体肝脏组织不显著高于雄性( $P > 0.05$ ); 经 24℃ 低温胁迫孵化处理胚胎肝脏能显著降低表达量( $P < 0.05$ ), 34℃ 高温胁迫孵化处理不能显著增加表达量( $P > 0.05$ )。

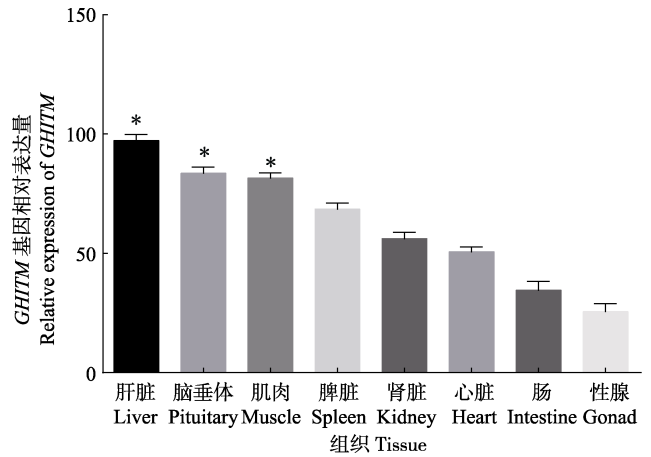


图 4 中华鳖组织 *GHITM* 基因相对表达量  
Fig.4 The relative expression of *GHITM* gene in different tissues of *T. sinensis*

“\*”代表组织间差异显著( $n=3, P < 0.05$ ), 下同  
“\*”represents significant difference between groups ( $n=3, P < 0.05$ ). The same as below

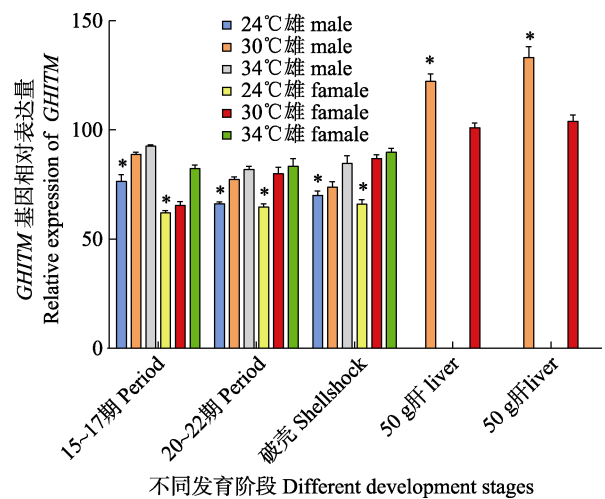


图 5 中华鳖肝脏 *GHITM* 基因相对表达量  
Fig.5 Expression of *GHITM* gene in liver of *T. sinensis*

### 3 讨论

*GHITM* 在调节 GH 功能、胚胎发育、脂肪代谢和免疫等许多方面有重要功能。人类 Bax 抑制因子和 BI-1 蛋白在跨膜区有 6~7 个跨膜域, 在进化过程中是一个保守且具有复杂结构的蛋白, 主要存在于胞浆中, 作为细胞损伤和刺激的传感器等(Reimers *et al*, 2007)。本研究中的 4 种鳖龟 *GHITM* 蛋白跨膜结构域均为 7 个, 其 *GHITM* 基因编码氨基酸序列构建的 NJ 系统发育树与物种传统分类地位一致。

*GHITM* 在动物生长及能量代谢方面具有重要作用。*GHITM* 表达量与小鼠胚胎分裂关系紧密(Yoshida *et al*, 2006)。在生长方面, 鸡 *GHITM* 有调控生长的

作用,是 B 淋巴细胞的特异性基因之一(Koskela *et al.*, 2003)。*GHITM* 介导生长激素/胰岛素样生长因子 1 轴 (GH/IGF1) 对动物中枢神经系统的神经保护作用 (Baudet *et al.*, 2008)。罗非鱼的 *GHITM* (Qiang *et al.*, 2017) 在小分子 RNA(miR-1338-5p) 的调节下参与干扰生长激素(GH)-生长激素受体(GHT)-胰岛素样生长因子(IGF)信号通路,参与罗非鱼的生长和发育。中华鳖雌雄个体在生长过程中存在差异,雄性中华鳖生长速度显著高于雌性(马晓等, 2015)。本研究选取快速生长阶段中的 50 g 左右和 500 g 左右中华鳖为研究材料,结果表明,500 g 左右中华鳖 *GHITM* 基因在肝脏中表达量高于 50 g 左右中华鳖,据此推断, *GHITM* 基因参与了中华鳖生长调节。

此外, *GHITM* (Henke *et al.*, 2011) 通过细胞内钙内稳态维持线粒体的正常结构。LPS 刺激诱导仿刺参体腔细胞发现 *GHITM* (高杨等, 2014) 参与了仿刺参抗细菌感染和天然免疫防御反应。本研究发现,脾脏中 *GHITM* 有较高的表达量,其是否参与中华鳖的免疫尚需进一步研究。

*GHITM* 在 小 鼠 (Li *et al.*, 2001) 的 胎 儿 发 育 过 程 中, 含 量 不 断 增 加, 且 在 心、肝、肌、胃、肾、脑中均表达量较高。东方蜜蜂 (*Apis cerana*) 的 *GHITM* 能够协同 PGDR 参与蜕皮和变态过程,在工蜂幼虫中 *GHITM* 基因表达随日龄稳定增长,而蜂王蛹中该基因的表达模式为先下降后上升(龚志文等, 2016)。半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) GH/IGF- I 轴 (徐永江等, 2017) 对卵巢发育具有重要的调控作用。在中华鳖胚胎发育阶段,孵化温度与孵化性别(巫旗生等, 2011) 和胚胎重量存在相关性。本研究中,低温孵化处理对中华鳖胚胎 *GHITM* 基因表达量有显著抑制作用,高温孵化处理对其表达有上调作用,而在胚胎发育性别分化期(20~22 期) *GHITM* 基因表达量有所下降,这表明 *GHITM* 参与了中华鳖胚胎发育,但 *GHITM* 是否协同中华鳖性别调控还需进一步证实。综上所述,本研究是鳖龟类 *GHITM* 基因研究的首次报道,为进一步研究中华鳖胚胎发育和生长提供理论依据。

## 参 考 文 献

- Baudet ML, Hassanali Z, Sawicki G, *et al.* Growth hormone action in the developing neural retina: A proteomic analysis. *Proteomics*, 2008, 8(2): 389-401
- Gao Y, Wang SN, Ye SG, *et al.* Cloning and LPS - induced expression analysis of *ghitm* gene in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(6): 543-549 [高杨, 王胜男, 叶仕根, 等. 仿刺参 *ghitm* 基因的克隆及 LPS 诱导后的表达分析. 大连海洋大学学报, 2014, 29(6): 543-549]
- Gong ZW, Fan Y, Yang MH, *et al.* Growth-hormone inducible transmembrane protein (*GHITM*) expression in different developmental stages of honeybee (*Apis cerana*). *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2016, 31(1): 81-86 [龚志文, 樊莹, 杨明华, 等. 生长激素诱导的跨膜蛋白基因(*GHITM*) 在东方蜜蜂 (*Apis cerana*) 幼虫不同发育阶段的相对表达分析. 云南农业大学学报(自然科学版), 2016, 31(1): 81-86]
- Henke N, Lisak DA, Schneider L, *et al.* The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. *Cell Calcium*, 2011, 50(3): 251-260
- Knapp JR, Chen WY, Turner ND, *et al.* Growth patterns and body composition of transgenic mice expressing mutated bovine somatotropin genes. *Journal of Animal Science*, 1994, 72(11): 2812-2819
- Koskela K, Kohonen P, Nieminen P, *et al.* Insight into lymphoid development by gene expression profiling of avian B cells. *Immunogenetics*, 2003, 55(6): 412-422
- Li Y, Kelder B, Kopchick J, *et al.* Identification, isolation, and cloning of growth hormone (GH)-inducible interscapular brown adipose complementary deoxyribonucleic acid from GH antagonist mice. *Endocrinology*, 2001, 142(7): 2937-2945
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452
- Luo SJ, Chen WY, Yang CY, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of growth-hormone inducible transmembrane protein gene (*GHITM*) from *Pinctada martensii*. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(8): 1973-1980 [罗少杰, 陈伟耀, 杨创业, 等. 马氏珠母贝生长激素诱导跨膜蛋白基因 *GHITM* 克隆与表达分析. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(8): 1973-1980]
- Ma X, Wang XQ, Xiong G, *et al.* Effect of morphological traits on body weight of female and male *Pelodiscus sinensis*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(1): 93-97 [马晓, 王晓清, 熊钢, 等. 不同日龄池塘养殖中华鳖形态性状对体重的影响. 淡水渔业, 2015, 45(1): 93-97]
- Qiang J, Bao JW, Li HX, *et al.* miR-1338-5p modulates growth hormone secretion and glucose utilization by regulating *ghitm* in genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 998
- Reimers K, Choi CY, Bucan V, *et al.* The growth-hormone inducible transmembrane protein (*GHITM*) belongs to the Bax inhibitory protein-like family. *International Journal of Biological Sciences*, 2007, 3(7): 471-476
- Wu QS, Wang XQ, Zeng YY, *et al.* Influence on sexual differentiation in *Trionyx sinensis* by temperature. *Feed*

- Review, 2011, 42(2): 42–44 [巫旗生, 王晓清, 曾亚英, 等. 孵化温度对中华鳖性别分化的影响. 饲料博览, 2011, 42(2): 42–44]
- Xiong T, Liu R, Zhao QP, *et al.* Cloning and expression of the transmembrane protein (*GHITM*) gene of *Schistosoma japonicum* *Katsurada*. Chinese Journal of Microcirculation, 2012, 22(4): 87 [熊涛, 刘榕, 赵琴平, 等. 日本血吸虫生长激素诱导的跨膜蛋白(*GHITM*)基因克隆与表达. 微循环学杂志, 2012, 22(4): 87]
- Xu YJ, Liu XZ, Shi Y, *et al.* Physiological role of *GH/IGF-I* axis in ovarian development of *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 73–80 [徐永江, 柳学周, 石莹, 等. *GH/IGF-I* 轴对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) 卵巢发育的调控作用. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 73–80]
- Yoshida T, Nagata S, Kataoka H. *GHITM* is an ortholog of the *Bombyx mori* prothoracic gland-derived receptor (PGDR) that is ubiquitously expressed in mammalian cells and requires an N-terminal signal sequence for expression. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 341(1): 13–18

(编辑 冯小花)

## Molecular Cloning and Expression Analysis of *GHITM* cDNA in *Trionyx sinensis*

XIONG Gang<sup>1,2</sup>, ZHOU Xianwen<sup>2</sup>, MA Xiao<sup>3</sup>, ZENG Dan<sup>2</sup>,  
CHEN Zhennian<sup>2</sup>, KANG Li<sup>1</sup>, WANG Xiaoqing<sup>2①</sup>

(1. Department of Animal Science and Technology, Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha 410127;

2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128;

3. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007)

**Abstract** In this study, we obtained the full-length cDNA of the *GHITM* gene from *Trionyx sinensis* for the first time using the RACE (rapid-amplification of cDNA ends) method. The full-length cDNA sequence was 2650 bp, including a 123 bp 5'-UTR, 1477 bp 3'-UTR, and 1050 bp open reading frame (ORF) that encoded 349 amino acid residues. The isoelectric point (pI) of this peptide was 10.01, and the molecular mass was 37.12 kDa. The amino acid sequence was composed of the extracellular region, the transmembrane region, and the intracellular region. The transmembrane region was composed of 7 transmembrane domains. The phylogenetic analysis of the amino acid sequences showed that *T. sinensis*, *Chrysemys picta bellii*, and *Chelonia mydas* belonged to the same branch, the three species of crocodiles formed a branch, and birds formed another branch. The expression of *GHITM* in different tissues was also analyzed with quantitative real-time PCR. The results showed that *GHITM* was expressed in all the tested tissues, including the liver, pituitary, muscle, spleen, kidney, heart, intestine, and gonad, with the high expression observed in the liver, muscle, and pituitary. At the specifications of 50 g and 500 g, the expression of *GHITM* was significantly higher in the liver of males than females ( $P < 0.05$ ). Low temperature incubation can inhibit the expression of *GHITM* in fetal embryos ( $P < 0.05$ ). The results indicated that *GHITM* was related to the growth and embryo development of *T. sinensis*.

**Key words** *Trionyx sinensis*; *GHITM*; Gene cloning; Embryonic development; Tissue expression

① Corresponding author: WANG Xiaoqing, E-mail: wangxiao8258@126.com