



山西大学
SHANXI UNIVERSITY

2024 届硕士学位论文

华溪蟹 *HMGBa* 基因克隆和表达纯化及对 镉暴露的应答研究

作者姓名	习志鹏
指导教师	王 兰 教授
学科专业	生物与医药
研究方向	重金属污染与食品安全
培养单位	生命科学学院
学习年限	2021 年 9 月至 2024 年 6 月

二〇二四年六月

山西大学

2024 届硕士学位论文

华溪蟹 *HMGBa* 基因克隆和表达纯化及对 镉暴露的应答研究

作者姓名	习志鹏
指导教师	王 兰 教 授
学科专业	生物与医药
研究方向	重金属污染与食品安全
培养单位	生命科学学院
学习年限	2021 年 9 月至 2024 年 6 月

二〇二四年六月

Thesis for Master' s Degree, Shanxi University, 2024

Cloning and expression purification of *HMGBa* gene in
Sinopotamon and its response to cadmium exposure

Student Name Zhi-Peng Xi

Supervisor Prof. Lan Wang

Major Biological and Pharmaceutical Engineering

Specialty Heavy metal pollution and food safety

Department School of Life Science

Research Duration 2021.09-2024.06

June, 2024

摘 要

高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 作为一种非组蛋白染色体结合蛋白, 在进化过程中呈现出高度的保守性, 在核内与 DNA 相互作用发挥调控基因转录的作用。当细胞受到外界刺激、损伤或坏死的情况下, HMGB1 会分泌到细胞外环境作为一个损伤相关分子模式 (Damage-associated molecular patterns, DAMP) 警示细胞处于危险状态, 可作为促炎因子在无脊椎动物组织修复和先天免疫防御系统中发挥重要作用。镉作为有毒重金属, 随食物链在水体中大量积累, 并通过多种途径聚集在甲壳类动物肝胰腺、鳃和肌肉等组织中且无法代谢。研究表明, 镉会造成线粒体形态的改变进而引起氧化应激, 导致减少能量的产生并影响动物的新陈代谢, 甚至造成组织损伤和细胞凋亡。也可直接与免疫细胞相互作用, 激活免疫细胞中多种信号传导途径。为了丰富 HMGB1 在无脊椎动物中的研究, 进一步探究 HMGB 作为 DAMP 分子在溪蟹先天免疫中的激活作用, 以及在镉胁迫下对免疫系统的预警和防御作用。基于本课题组前期获得的河南华溪蟹 (*Sinopotamon henanense*) *HMGBa* 基因片段, 完整克隆得到了溪蟹 *ShHMGBa* 基因序列。本学位论文就 HMGB1 对镉的应答、蛋白功能以及在先天免疫防御系统中的作用进行了进一步研究, 旨在发掘 HMGB1 在应对镉胁迫中发挥的功能。同时为重金属污染和绿色养殖提供新的方向和靶标。研究内容包括三个方面:

1. 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因全长的克隆、生信分析和组织分布情况。首先, 通过 RACE PCR 技术, 克隆得到溪蟹 *ShHMGBa* 基因序列全长; 其次, 分析了 *ShHMGBa* 基因序列, 构建了系统进化树; 最后, 利用实时荧光定量 PCR 技术对 *ShHMGBa* 基因的组织分布情况进行了检测。

2. 构建河南华溪蟹 *ShHMGBa* 原核表达系统, 并进行蛋白诱导和纯化以及对融合蛋白的功能检测。利用基因工程技术, 构建了原核表达载体 *pET-28a(+)-ShHMGBa*, 转入表达菌后成功诱导表达, 并利用亲和层析技术纯化目的蛋白。之后, 利用凝胶阻滞实验和抑菌圈实验对融合蛋白进行功能检测。

3. 分析镉暴露后河南华溪蟹 *ShHMGBa* 的表达模式, 并构建 r*ShHMGBa* 蛋白注射模型检测对核转录因子 *ShDorsal* 的影响。设计三个镉浓度组: 14.5 mg/L (1/16 LC₅₀)、29 mg/L (1/8 LC₅₀)、58 mg/L (1/4 LC₅₀) CdCl₂, 和一个空白对照组 (control), 在镉暴露 1 d、3 d、5 d, 取鳃、肝胰腺和肠组织提取总 RNA 并反转成 cDNA, 利用实时荧光定量 PCR 技术对 *ShHMGBa* 基因表达量进行检测。利用免疫荧光技术, 对

镉胁迫 1 d 后的血细胞和肝胰腺组织中的 ShHMGBa 蛋白定位进行检测。同时, 构建了 rShHMGBa 蛋白注射模型, 并观察了 ShDorsal 蛋白在血细胞中的定位。

研究结果如下:

1. 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因 cDNA 序列获取、序列信息和不同组织基因表达量。溪蟹 *ShHMGBa* 基因序列全长 1016 bp, 开放阅读框 684 bp, 5'端非编码区 69 bp 和 3'端非编码区 263 bp。开放阅读框编码 227 个氨基酸, 包含 2 个 70 个氨基酸左右的 HMG 盒子结构域, 以及 C 端一个富含天冬氨酸和谷氨酸的酸性尾部结构(Acidic tail)。与凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*) HMGBa 的同源性最高为 75.74%。*ShHMGBa* 先与无脊椎动物聚为一支, 其次与脊椎动物聚为一大支。组织分布结果显示, *ShHMGBa* 基因在肝胰腺中的表达量最高, 在肌肉中的表达量最低。

2. 河南华溪蟹 ShHMGBa 原核表达、蛋白纯化及功能研究。可溶性 rShHMGBa 蛋白大小约为 26 KD, 最佳诱导条件 37℃、200 rpm、0.8 mM IPTG 诱导 9.0 h。纯化浓缩后的蛋白浓度为 7.6 mg/mL, 且含 His 标签。检测发现, rShHMGBa 蛋白呈剂量依赖性延缓 DNA 的迁移, 且对质粒 DNA 的结合活性更强。但并不具备直接的抑菌活性。

3. 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 对镉暴露的应答以及对核转录因子 ShDorsal 的影响。镉处理后, *ShHMGBa* 基因在鳃、肝胰腺和肠组织中表达量均有明显变化, 且三个组织相比, 鳃和肝胰腺组织对镉胁迫效应的响应较快, 而肠组织的较慢。正常生理条件下, ShHMGBa 蛋白主要定位在血细胞和肝胰腺组织细胞核中。在镉胁迫处理 1 d 后导致 ShHMGBa 蛋白由细胞核向细胞质移位。另外, 注射 rShHMGBa 蛋白于蟹体内造成血细胞 ShDorsal 蛋白的核移位, 说明 ShHMGBa 蛋白可激活 Toll-Dorsal 信号通路。

关键词: 河南华溪蟹; ShHMGBa; 原核表达; Toll-Dorsal 信号通路; 镉

ABSTRACT

High mobility group protein B1 (HMGB1), as a non histone chromosomal binding protein, exhibits high conservatism during evolution and interacts with DNA in the nucleus to regulate gene transcription. When cells are stimulated, damaged, or necrotic from the outside, HMGB1 secretes into the extracellular environment as a damage-associated molecular patterns (DAMP) molecule to alert cells to a dangerous state. It can play an important role as a pro-inflammatory factor in the repair of invertebrate tissues and the innate immune defense system. Cadmium, as a toxic heavy metal, accumulates in large quantities in water along the food chain and accumulates in tissues such as the liver, pancreas, gills, and muscles of crustaceans through various pathways, and cannot be metabolized. Research has shown that cadmium can cause changes in mitochondrial morphology, leading to oxidative stress, reduced energy production, and affecting animal metabolism, even causing tissue damage and cell apoptosis. It can also directly interact with immune cells, activating various signaling pathways in immune cells. In order to enrich the research on HMGB1 in invertebrates, further explore the activation role of HMGB as a DAMP molecule in the innate immunity of *Sinopotamon henanense*, as well as its warning and defense effects on the immune system under cadmium stress. Based on the *HMGBa* gene fragment obtained by our research group in the early stage, the complete *ShHMGBa* gene sequence of *Sinopotamon henanense* was cloned. This thesis further investigates the response and protein function of HMGB1 to cadmium, as well as its role in the innate immune defense system, with the aim of exploring the role of HMGB1 in responding to cadmium stress. Simultaneously providing new directions and targets for heavy metal pollution and green aquaculture. **The research content includes three aspects:**

First , cloning, bioinformatics analysis, and tissue distribution of the *ShHMGBa* gene in *S. henanense*. Firstly, by using RACE PCR technology, the full-length *ShHMGBa* gene sequence of the crab was cloned; Secondly, the *ShHMGBa* gene sequence was analyzed and a phylogenetic tree was constructed;

Finally, real-time fluorescence quantitative PCR technology was used to detect the tissue distribution of the *ShHMGBa* gene.

Second, construct the prokaryotic expression system of *S. henanense* ShHMGBa, and perform protein induction and purification, as well as functional testing of the fusion protein. Using genetic engineering technology, the prokaryotic expression vector *pET-28a (+)* - *ShHMGBa* was constructed, and successfully induced expression in the expression strain. The target protein was purified using affinity chromatography technology. After that, the function of the fusion protein was tested by gel block test and inhibition zone test.

Third, analyze the expression pattern of *ShHMGBa* in *S. henanense* after cadmium exposure, and construct an rShHMGBa protein injection model to detect the effect on the nuclear transcription factor ShDorsal. Design three cadmium concentration groups: 14.5 mg/L (1/16 LC₅₀), 29 mg/L (1/8 LC₅₀), 58 mg/L (1/4 LC₅₀) CdCl₂, and a blank control group (control). After cadmium exposure for 1 day, 3 days, and 5 days, extract total RNA from gill, hepatopancreas, and intestinal tissues and invert it into cDNA. Use real-time fluorescence quantitative PCR technology to detect the expression level of *ShHMGBa* gene. Using immunofluorescence technology to detect the localization of ShHMGBa protein in blood cells and liver and pancreatic tissues after 1 day of cadmium stress. Meanwhile, a rShHMGBa protein injection model was constructed and the localization of ShDorsal protein in blood cells was observed.

The research results are as follows:

1. Obtaining cDNA sequence, sequence information, and gene expression levels of ShHMGBa gene in different tissues of *S. henanense*. The *ShHMGBa* gene sequence of the crab has a total length of 1016 bp, an open reading frame of 684 bp, a 5' non coding region of 69 bp, and a 3' non coding region of 263 bp. The open reading frame encodes 277 amino acids, including 2 HMG box domains with approximately 70 amino acids, as well as an acidic tail structure rich in aspartic acid and glutamic acid at the C-terminus. The highest homology with HMGBa from *Penaeus vannamei* is 75.74%. The *S. henanense* ShHMGBa first

forms a branch with invertebrates, and then forms a large branch with vertebrates. The organizational distribution results showed that the *ShHMGBa* gene in the crab had the highest expression level in the hepatopancreas, and the lowest expression level in the muscle.

2.Prokaryotic expression, protein purification, and functional study of ShHMGBa in *S. henanense*. The size of soluble rShHMGBa protein is about 26 KD, and the optimal induction conditions are 37 °C, 200 rpm, 0.8 mM IPTG induction for 9.0 hours. The protein concentration after purification and concentration is 7.6 mg/mL, and it contains His label. The detection found that the rShHMGBa protein delayed DNA migration in a dose-dependent manner and had stronger binding activity to plasmid DNA. But it does not have direct antibacterial activity.

3.The response of *S. henanense ShHMGBa* to cadmium exposure and its effect on the nuclear transcription factor ShDorsal. After cadmium treatment, the expression levels of *ShHMGBa* gene showed significant changes in gill, hepatopancreatic, and intestinal tissues. Compared with the three tissues, gill and hepatopancreatic tissues responded faster to cadmium stress, while intestinal tissues showed slower response. Under normal physiological conditions, the ShHMGBa protein is mainly localized in the nuclei of blood cells and liver and pancreatic tissues. After 1 day of cadmium stress treatment, ShHMGBa protein shifted from the nucleus to the cytoplasm. In addition, injection of rShHMGBa protein into the crab body caused nuclear translocation of ShDorsal protein in blood cells, indicating that ShHMGBa protein can activate the Toll Dorsal signaling pathway.

Keywords: *Sinopotamon henanense*; ShHMGBa; Prokaryotic expression; Toll-Dorsal signaling pathway; Cadmium

目 录

第一章 综述.....	1
1.1 镉的概述.....	1
1.1.1 镉的毒性.....	1
1.1.2 镉污染现状.....	2
1.1.3 镉对水生动物的危害.....	3
1.2 高迁移率蛋白 1 相关研究	4
1.2.1 HMGB1 分子结构和功能特征.....	4
1.2.2 HMGB1 分泌与释放机制.....	5
1.2.3 HMGB1 与核酸相互作用.....	6
1.2.4 HMGB1 与损伤相关分子模式.....	7
1.2.5 HMGB1 蛋白免疫学功能.....	7
1.3 高迁移率蛋白 1 在无脊椎动物研究现状	8
1.4 本论文的研究意义和研究内容	9
1.4.1 研究意义.....	9
1.4.2 研究内容.....	10
1.4.3 研究方案.....	10
第二章 河南华溪蟹 ShHMGBa 基因的克隆、生物信息学分析和组织表达模式	11
2.1 材料与方法.....	12
2.1.1 实验材料.....	12
2.1.2 实验方法.....	13
2.1.3 数据统计与分析.....	17
2.2 结果.....	17
2.2.1 河南华溪蟹 ShHMGBa 基因序列全长和生物信息学分析	17
2.2.2 河南华溪蟹 ShHMGBa 基因的组织定量表达分析	20
2.3 讨论.....	21
2.3.1 河南华溪蟹 ShHMGBa 基因序列分析	21
2.3.2 河南华溪蟹 ShHMGBa 基因各组织表达情况	21
第三章 河南华溪蟹 ShHMGBa 原核表达、蛋白纯化以及功能研究	24
3.1 材料与方法.....	25
3.1.1 实验材料.....	25
3.1.2 实验方法.....	25
3.2. 结果.....	30

3.2.1 原核表达载体的构建和诱导表达.....	30
3.2.2 rShHMGBa 蛋白的分离纯化及鉴定	34
3.2.3 rShHMGBa 蛋白的活性检测	36
3.3 讨论.....	37
3.3.1 rShHMGBa 蛋白的表达及纯化	37
3.3.2 rShHMGBa 蛋白的活性分析	38
第四章 河南华溪蟹 ShHMGBa 对镉暴露的应答以及对核转录因子 ShDorsal 的影响	40
4.1 材料与方法.....	41
4.1.1 实验材料.....	41
4.1.2 实验方法.....	41
4.1.3 数理统计与分析.....	43
4.2 结果.....	43
4.2.1 镉胁迫后 ShHMGBa 的表达和定位情况	43
4.2.2 rShHMGBa 蛋白注射后 ShDorsal 蛋白分布变化	46
4.3 讨论.....	47
4.3.1 河南华溪蟹 ShHMGBa 基因对镉暴露的应答	47
4.3.2 rShHMGBa 蛋白对核转录因子 ShDorsal 的影响	48
全文总结与今后工作展望	51
参考文献.....	52

第一章 综述

1.1 镉的概述

1.1.1 镉的毒性

镉(Cd)于 1817 年由 Friedrich Stromeyer 在德国发现，是碳酸锌(ZnCO_3)中的杂质，天然存在于地壳中，平均浓度约为 0.1~0.2 ppm^[1]。1993 年，镉被国际癌症研究机构 (IARC) 指定为 I 类致癌物，最严重的重金属污染物之一^[2]。它在人体中没有生理功能，而其毒性是众所周知的，并且已成为众多研究的主题^[3]。流行病学数据表明，长期接触镉可能与多种类型的癌症有关，包括乳腺癌、肺癌、肝癌和肾癌等^[4]。

镉中毒早在 1955 年就在日本被披露为“痛痛病”，这也是镉污染首次被证明对人类健康有严重后果^[5]。镉的毒性效应往往源于对锌介导的各种代谢过程的干扰，而锌处理可以减少或消除镉造成的不利影响。例如，镉与锌竞争与金属硫蛋白(metallothionein, MT)的结合，并阻止细胞内锌的积累，这表明了镉-锌相互作用在镉毒性中的机械作用^[6]。镉主要通过对机体炎症的诱导、造成氧化应激、减弱细胞凋亡、DNA 损伤、DNA 修复能力下降、基因改变表达（原癌基因的激活和抑癌基因的失活）和细胞过度增殖诱导癌症^[4]。

镉作为一种有毒重金属，直接与免疫细胞相互作用，改变其状态和功能，从而以时间和剂量依赖性方式损害免疫系统^[7]。长期接触低剂量的镉会导致先天免疫细胞中镉的积累。当镉进入细胞后，它通过抢占酶中充当辅助因子的必需金属位置，从而导致细胞正常能力的丧失^[8]。镉诱发癌症和组织损伤的最重要机制之一是氧化应激^[2, 9]。镉可通过 Ca^{2+} 通道进入细胞，并与细胞质和核成分结合，从而在细胞内积累^[10]。并可通过增加活性氧(ROS)的产生和破坏氧化防御系统引起氧化应激，自由基的产生不是由镉直接引起的，而是通过从蛋白质中的金属结合位点替换氧化还原活性金属离子(如 Fe^{2+} 和 Cu^{2+})而产生^[11]。自由基被认为是镉引发的组织损伤的关键介质^[9]。低剂量的镉暴露也可以通过引发对氧化应激的适应性反应或激活免疫细胞中的多种信号传导途径，特别是核因子 kB (NF- kB) 和丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 途径，并诱导炎症标记物和介质的上调^[12, 13]，因此，镉影响多种细胞功能，包括调

节免疫细胞活性以及先天性和适应性免疫中细胞因子的分泌。

镉中毒还可以通过不同途径的细胞凋亡导致细胞死亡，外在途径是通过结合细胞因子配体，例如 Fas 配体 (FasL) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 以及死亡受体 Fas (CD95/APO1) 和 TNF 受体来启动^[14]。另一方面，镉还可以影响细胞凋亡的内在途径，增加促凋亡蛋白 Bax 的表达，并抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达^[15]。此外，即使是无毒剂量的镉也被证明是一种内分泌干扰元素，因为它会改变睾丸中的基因表达模式，从而导致睾丸自身免疫的倾向增加。Cd 还可直接与雌激素和雄激素受体结合，从而增强雌激素和雄激素样活性^[16, 17]。

1.1.2 镉污染现状

镉(Cd)是一种有毒的非必需重金属，来源于天然和人类活动^[4]。自工业革命开始推动化石燃料燃烧和有色金属开采的增加以来，大量的镉被释放到环境中^[18]。大量的镉是锌冶炼的副产品，因为这两种金属通常天然伴生在矿物中。因此，许多镉造成的环境污染发生在靠近锌、铜和铅处理和冶炼厂的地区，这对公众健康构成了当前的威胁^[1]。镉可以在土壤中长期积累，通过植物代谢进入植物体内。它在可食用植物部分（包括水果和种子）中积累，导致镉进入食物链，从而增加了人类对这种金属的接触^[19]。镉最终被人类通过受污染的食物和水以及受污染的空气摄入或吸入^[4]。

值得注意的是，在 20 世纪 60 年代末的美国，平均镉消耗量估计约为 26 μg /天/人^[20]。现在，人类平均镉摄入量已降至 4.63 μg /天/人。这相当于毒性耐受限度下的 75%。过去 50 年镉摄入量的减少可归因于发达国家更有效的控制 and 环境意识，导致污水污泥泄漏到农业土壤中的活动减少^[21]。然而，在发展中国家的工作场所，镉暴露仍然被认为是一种威胁，因为这些国家的安全标准不受监管或尊重。一般人群接触镉的主要途径是摄入受镉污染的食物和吸烟，因为烟草植物从污染的土壤中吸收镉，镉与锌相似^[22]。

在重金属中，镉是土壤、水、空气和食品中最常见和最有毒的元素之一^[23]。通过食物链的生物放大作用，镉可导致人类严重的健康问题，甚至被认为是影响多种器官功能的强效致癌物^[1]。在陆生动物中，重金属进入体内的主要途径是胃肠道，通过受污染的食物和水^[24]。此外，能够积累重金属的浮游植物和浮游动物可能被不同的鱼类摄入^[25]。虽然鱼类的肌肉组织并不代表镉积累的部位。但在韩国南部的商业牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 中，发现 80 个样本

的平均镉浓度为 $0.591\mu\text{g/kg}$ ，远高于水样中镉的平均浓度， $0.0021\mu\text{g/L}$ ^[26]。

1.1.3 镉对水生动物的危害

水生栖息地中的多种污染物，包括来自天然来源和人类活动的不可降解的有毒重金属，急剧增加，通过进入食物网，对水生生物和人类日益构成健康挑战和威胁^[27]。与许多非必需的重金属和类金属（例如铅、汞和砷）一样，镉在生命系统中没有任何已知的生物功能^[28]。从人类健康的角度来看，受污染动物的消费是一个全球性的问题，特别是在甲壳类动物的消费与鱼类一样广泛和频繁的情况下。根据《2016-2020 年全球甲壳类市场报告》，全球范围内约 4 万种甲壳类动物的消费量有所增加，其中中国是主要消费国，占全球海鲜消费量的 35%。预计到 2030 年，中国将成为世界主要甲壳类出口国，约占出口量的 89%。日本将同时成为最大的甲壳类进口国，估计占世界进口量的 45%左右。

在水生物种中，与鱼类和软体动物相比，甲壳类动物（尤其是螃蟹）在金属评估方面表现突出。一般来说，大多数有毒金属积聚在甲壳类动物的肝胰腺和鳃中^[29]。肝胰腺由于其异物解毒功能而成为主要的生物蓄积器官^[29]。而鳃由于接触面高且上皮薄而通过水捕获和积累金属，肌肉性腺和甲壳也可能在较小程度上生物富集金属^[30, 31]。

Das 等人发现泥虾（*Austinopecten edulis*）暴露于高浓度镉后肝胰腺出现显着损伤，包括上皮细胞边界消失、细胞从基底层脱离、细胞肿胀、坏死、糖原减少、氧化损伤以及抗氧化酶的活性降低^[32]。Wu 等人发现与亚慢性镉暴露相比，河南华溪蟹（*S. henanense*）急性暴露后肝胰腺和中肠发生了更多的形态学变化，报告称坏死的上皮细胞区域与基底层分离，后肠肌肉细胞空泡化^[33]。Zhu 等人研究了镉暴露对拟穴青蟹（*Scylla paramamosain*）的影响，报告了重要的组织学变化，例如鳃片表面起皱，这可能导致渗透调节功能障碍，以及肝胰腺细胞核和线粒体形态的变化，这可能导致减少能量产生并损害动物新陈代谢^[34]。镉毒性会影响细胞和分子过程，可能增加氧化应激、细胞凋亡，以及抑制能量代谢、蜕皮和组织学变化^[34]。

1.2 高迁移率蛋白 1 相关研究

1.2.1 HMGB1 分子结构和功能特征

高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 是一种进化上高度保守的非组蛋白染色体结合蛋白, 因其在聚丙烯酰胺凝胶上的高电泳迁移率而得名^[35]。

根据识别染色质上单个 DNA 结构的特定功能域或基序, HMG 蛋白被分为三个超家族: HMGA、HMGB 和 HMGN。HMGA 家族的蛋白质含有一个 AT-hook, 这是一个 DNA 结合基序, 优先选择富含 A/T 的区域。相比之下, HMGB 家族含有 A-box 和 B-box 功能基序, HMGN 家族含有核小体结合结构域 (NBD)。HMGB 蛋白在大多数细胞中普遍存在且数量丰富, 可以与 DNA 结合且无序列特异性^[36]。HMGB 分子在脊椎动物和无脊椎动物中普遍存在^[37, 38]。哺乳动物的 HMGB 蛋白目前包含四个成员: HMGB1、HMGB2、HMGB3 和一个新成员 HMGB4。在这些成员中, HMGB1-3 由两个串联 HMG 盒 (称为 A-box 和 B-box) 组成, 它们带正电荷, 具有酸性 C 端结构域, 而 HMGB4 缺乏酸性 C 端尾部^[39, 40]。在遗传结构上, A-box 含有 1 个内含子, 而 B-box 含有 2 个内含子^[41]。

人 HMGB1 蛋白由 215 个氨基酸残基组成, 形成两个同源 DNA 结合域, 以及带负电的 C 端酸性尾部^[42, 43]。其中, C 端酸性尾部氨基酸残基对 HMGB1 的抗菌活性起着至关重要的作用^[44]。HMGB1 的 C 端酸性结构域也可作为转录激活因子^[45], 而据报道 HMGB1 的 B-box 可在细胞外刺激时诱导促炎信号, 而 A-box 可诱导拮抗作用^[46]。HMGB1 在物种间具有较高的序列同源性, 包括植物、细菌、鱼类、甲壳类、果蝇和酵母^[40, 47]。

HMGB1 在细胞核中大量且普遍表达, 在 DNA 复制、转录、修复和核小体稳定中发挥作用^[48]。它也存在于细胞质和线粒体以及膜表面, 并可通过主动或被动途径释放到细胞外环境^[49]。胞质 HMGB1 通过增加自噬、抑制细胞凋亡和调节线粒体功能参与免疫应答^[50]。细胞膜上的 HMGB1, 主要功能是通过刺激血小板, 诱导细胞移动。细胞外 HMGB1 作为一种典型的损伤相关分子模式 (DAMP), 当 HMGB1 在细胞死亡过程中被动释放或主动分泌到细胞外环境时, HMGB1 获得了一个新的身份, 作为一个强大的炎症介质, 并指导趋化因子、细胞因子、先天免疫或代谢活动^[51]。HMGB1 蛋白在生物体中

承担多种角色，而其功能因其所处位置、相互作用蛋白和其自身不同的氧化形式决定，且在不同的刺激下发挥不同的生物学效应。

1.2.2 HMGB1 分泌与释放机制

HMGB1 通常位于细胞核内，这是因为它有两个独特的核定位信号(NLS)，NLS1(残基 28-44)和 NLS2(残基 179-185)。NLS1 或 NLS2 的去乙酰化和乙酰化导致 HMGB1 蛋白从细胞核到细胞质的快速穿梭^[52]。HMGB1 的胞质易位可由触发翻译后修饰的细胞应激诱导，即氧化、甲基化、磷酸化或超乙酰化。这些修饰通过分泌溶酶体加速 HMGB1 从细胞分泌到细胞外环境。在氧化应激的细胞和动物中已经观察到 HMGB1 的超乙酰化^[53]。

HMGB1 中的三个半胱氨酸残基(人蛋白中的 Cys106、Cys45 和 Cys23)在氧化应激下调节其核胞质易位。C23 和 C45 可以形成分子间二硫键，C106 保持还原巯基态^[54]。HMGB1 的三种氧化还原形式分别是完全还原型 HMGB1(fully reduced HMGB,fr-HMGB1)，二硫键型 HMGB1(disulfide HMGB1,ds-HMGB1) 和 完全氧化型 HMGB1(fully oxidized HMGB1,ox-HMGB1)，它们是由每种 C 的不同状态产生的^[55]。免疫细胞通过活性氧(ROS)的形成氧化细胞外 HMGB1，产生 ds-HMGB1^[56]。Ds-HMGB1 是唯一具有促炎细胞因子样特性的异构体。原异构体和二硫异构体之间的交换是可逆的，而 ox-HMGB1 是不可逆的转化，且无免疫活性。Ds-HMGB1 在 fr-HMGB1 生成几小时后生成。它通过与 Toll 样受体(TLR)2 和 4 结合，激活单核细胞和巨噬细胞释放炎症介质作为细胞因子和趋化因子^[35]。HMGB1 的释放诱导细胞内 ROS 的形成，这些 ROS 起源于线粒体或由 NOX 家族酶激活产生^[57]。ROS 的产生诱导钙(Ca)过载，进而激活钙依赖性酶，如蛋白激酶 C(PKC)和钙依赖性蛋白激酶 IV(CaMKIV)。这些酶参与翻译后修饰，如核 HMGB1 的磷酸化将巨噬细胞暴露于脂多糖(LPS)会导致细胞内产生过氧化氢，从而导致 Cys45 和 Cys23 之间形成分子内二硫化物^[58]。这导致 HMGB1 从细胞核转移到细胞质，随后巨噬细胞分泌^[54]。

除了应激和翻译后修饰能够促进 HMGB1 的分泌外，该蛋白还可以被动地从坏死细胞中扩散出来诱导炎症^[59]。HMGB1 最初被认为是在坏死而非凋亡过程中释放的，被认为是区分两种细胞死亡形式的标志^[59]。然而，最近的研究表明，巨噬细胞、癌细胞等细胞在凋亡过程中也会释放 HMGB1^[60]。事

实上坏死细胞释放的 HMGB1 比凋亡细胞释放的 HMGB1 对炎症的促进作用更强、更持久^[61]。

1.2.3 HMGB1 与核酸相互作用

HMGB1 是一种广泛表达的核蛋白，与组蛋白 H1 一样，与核小体间(连接体)DNA 区域相互作用，影响转录调控^[62, 63]。HMGB 家族的所有蛋白都对具有各种结构异常的 DNA 区域具有非常高的亲和力和选择性，例如 4H DNA、弯曲和交叉，以及单链和双链断裂^[64, 65]。HMGB1 还调节 DNA 结合和拉伸、基因转录、DNA 复制、DNA 修复、基因转移和基因传递。这些发现证实了 HMGB1 在细胞核中具有广泛的 DNA 伴侣功能，不仅影响染色体稳态，还调节其他细胞核 DAMP 分子的释放。

核 HMGB1 作为 DNA 结合和弯曲调节因子，在许多 DNA 事件中起关键作用。HMGB1 还能显著弯曲 DNA，促进 DNA 与 p53、NFκB、类固醇受体等相关转录因子结合^[45]。有人认为转录因子(transcription factor,TF)与 DNA 的相互作用可能是通过形成一个中间复合体 TF-DNA-HMGB1 来发生的，该复合体的形成诱导了其他调节染色质蛋白的附着^[40]。值得注意的是，根据该模型，DNA-HMGB1 相互作用过程中 DNA 双螺旋本身的弯曲并不是转录因子附着的信号。只有 TF 与 HMGB1 直接相互作用才会导致转录因子与 DNA 结合。但体内转录起始或激活的分子机制尚不清楚。

研究表明，当组蛋白 H1 和 HMGB1/2 蛋白与 DNA 结合时，可能执行共同的功能。带正电的组蛋白 H1 不仅与 DNA 的磷酸基团相互作用，还与带负电的 HMGB1 的 C 端结构域相互作用^[66]。利用原子力显微镜对这些复合物进行分析，揭示了由几个 DNA 分子构成的纤维样结构的形成，这些结构不仅通过 DNA-蛋白质，而且通过蛋白质-蛋白质相互作用来稳定^[67-69]。因此，HMGB1 主要作为染色质中的建筑蛋白起作用^[40]。也有研究表明，该蛋白的 C 端尾部可调节该蛋白的 DNA 结合活性^[67]。酸性尾部的缺失或失活导致两个 HMG 结构域同时与 DNA 结合，而通常只有一个 HMG 结构域参与 DNA-蛋白复合物的形成^[70]。HMGB1 缺陷小鼠出生后很快死亡，也提示细胞核中 HMGB1 在维持生命中起关键作用^[71]。

1.2.4 HMGB1 与损伤相关分子模式

细胞受到可能导致损伤或死亡的外源刺激的挑战，细胞报警系统激活内源性分子，称为警报器或损伤相关分子模式 (Damage-associated molecular patterns, DAMP)，以发出危险诱导的细胞应激信号^[72, 73]。DAMP 通常存在于细胞内，在细胞内稳态中具有重要的作用，但当细胞受到应激时，它们被释放到细胞外空间促进炎症。可导致 DAMP 释放的细胞应激源包括多种物理(创伤、辐射)、化学(毒素、渗透压)、代谢(缺血/再灌注)和感染性(病毒、细菌、原生动物)因素^[74, 75]。

高迁移率蛋白 1 (HMGB1) 是一种典型的报警蛋白和 DAMP 分子，于 1973 年，从小牛胸腺染色质中分离出来^[76]。它们在稳态过程中具有特定的细胞内任务，但在响应危险信号时释放会促进炎症，作为关键的 DAMP 起作用。例如，苏云金芽孢杆菌感染昆虫中肠可通过释放 DSP1 产生一个 DAMP 信号，触发鳞翅目昆虫的免疫应答^[77]。背侧开关蛋白 1 (DSP1)，被称为昆虫 DAMP 分子，是脊椎动物高迁移性基团 B1 的同源物，在病原体感染过程中作为一个 DAMP 释放，并激活 Duox 在白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 肠道内产生 ROS，在昆虫肠道免疫应答中发挥重要作用^[78]。

1.2.5 HMGB1 蛋白免疫学功能

HMGB1 或其类似物可能作为促炎因子在脊椎动物和无脊椎动物的先天免疫系统中起着至关重要的作用。HMGB1 在所有真核细胞中都以高拷贝数存在，对体外生长至关重要。Yanai 等发现 HMGB 蛋白在哺乳动物先天免疫防御体系统中发挥重要作用，可识别具有免疫原性的核酸^[79]。Hyong Woo Choi 等首次证明了 HMGB 在植物先天免疫中作为 DAMP 的功能，这种蛋白在真菌感染时发挥警报功能^[80]。在甲壳动物中，Chen 等首次在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 中克隆得到了两个 HMGB 同源基因，且在白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 感染后有应答，揭示 HMGB 家族可能在无脊椎动物先天免疫发挥重要功能^[81]。

许多受体，如 CXCR4、蛋白聚糖、整合素、TIM-3 和 CD24，通过形成多蛋白复合物与 HMGB1 结合^[82]。CXCR4 是 G 蛋白偶联受体的成员，其主要配体是 CXCL12。HMGB1 与 CXCL12 结合后形成异复合体并与 CXCR4 结合，诱导炎症细胞向损伤组织募集^[83]。蛋白聚糖是与阴离子糖胺聚糖共价结

合的糖基化蛋白。HMGB1 与硫酸肝素的结合是由 RAGE 介导的。整合素是在白细胞募集中起关键作用的粘附蛋白，特别是 Mac-1，一种参与炎症细胞募集的白细胞整合素，可以调节 HMGB1 活性^[84]。

另有研究表明，TLR2、TLR4 和 TLR9 也是 HMGB1 的受体。Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 可以识别各种危险信号，如 DAMP 和病原体相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP)，从而触发针对病原体的免疫反应^[85, 86]。HMGB1 与 TLR2、TLR4 和 TLR9 结合，启动核因子- κ B (NF- κ B) 信号传导，释放趋化因子和促炎细胞因子。HMGB1 还结合 Toll 样受体 (TLR) 4 引发炎症反应^[87]。

1.3 高迁移率蛋白 1 在无脊椎动物研究现状

HMGB1 是一种具有双重功能的警报蛋白，它在细胞外环境可作为一个 DAMP 分子警告细胞处于危险状态，并告知细胞外环境有危险，在无脊椎动物生长发育和先天免疫防御系统中发挥重要作用。

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 HMGB1 同源物 DmDSP1 介导其免疫应答，它在免疫攻击时的诱导和释放表明它是一个 DAMP 分子。该 DAMP 信号可激活 PLA2 启动类二十烷，诱导果蝇的细胞和体液免疫应答^[88]。AaHMGB1 被鉴定为埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 的潜在免疫调节剂，并通过与 DNA 的相互作用增强转录因子 Rel1A 活性，参与 Toll 相关抗菌肽的转录^[89]。HMGB1 在直孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的先天免疫系统中起关键作用，不同 PAMPs 刺激后，其在血细胞中的 mRNA 表达水平均呈现先升高后降低的趋势。纯化后的 CfHMGB1 重组蛋白具有 DNA 结合能力和刺激炎症介质 TNF- α 的活性^[38]。

甲壳动物中，张杰在三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 克隆得到了 *PtHMGBa* 和 *PtHMGBb* 基因，且在机体应对病原入侵和抵抗过程中发挥重要作用^[90]。此外，孙雪君发现 WSSV 感染的日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)，其体内的 MjDorsal 蛋白会在 MjHMGB1 和 MjToll6 受体的相互作用下向核内移动，从而诱导抗菌肽的表达，抑制 WSSV 的复制^[91]。这表明 HMGB1 蛋白通过激活 Toll 信号通路在甲壳动物 DNA 病毒感染中发挥重要作用^[91]。

另外, 在 Cd、DOX 或 UV 暴露引起的家蝇 (*Musca domestica* Linnaeus) 幼虫氧化应激, 会显著上调家蝇幼虫 HMG 蛋白家族成员线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 的表达, 表明其在维持氧化还原平衡中起着至关重要的作用。由此可见, HMGB 家族基因在在维持无脊椎动物氧化平衡和先天免疫防御系统中发挥重要功能^[92]。

1.4 本论文的研究意义和研究内容

1.4.1 研究意义

自工业革命以来, 随着化石燃料和有色金属开采的日益增加, 大量的镉被释放到环境中, 尤其在水体环境中, 大量有毒重金属的排入, 对水生生物和人类日益构成健康挑战和威胁^[18]。而在水生物种中, 与鱼类和软体动物相比, 甲壳类动物 (尤其是螃蟹) 在金属评估方面表现突出。河南华溪蟹 (*S. henanense*) 广泛分布于我国的河南、山西、河北、湖北等地的淡水中, 营底栖生活, 体内极易蓄积重金属^[33]。因此, 是研究水体环境污染和重金属积累胁迫的理想研究材料。

高迁移率蛋白 1 作为一种广泛表达等的非组核蛋白, 在维持基因组稳定性, 调控基因转录方面发挥重要作用^[50]。但当细胞受到外源刺激时, HMGB1 会释放到细胞外, 发挥 DAMP 分子作用, 作为促炎因子在无脊椎动物先天免疫防御系统中发挥重要作用^[38, 89, 90]。据孙雪君研究发现, 日本对虾受 WSSV 感染后, MjHMGBa 蛋白在胞外发挥 DAMP 分子功能, 通过 Toll6-Dorsal-AMPs 通路抑制 WSSV 复制^[91]。这表明 HMGB1 蛋白通过激活 Toll 信号通路在甲壳动物先天免疫中发挥重要作用。以往的研究都是 HMGB1 蛋白对细菌和病毒的应答^[81, 90, 93], 本实验则是针对 HMGB1 蛋白对重金属胁迫的应答。郎朗在河南华溪蟹中克隆得到了 Shtoll1 和 Shtoll3 基因, 并应答 Cd 暴露^[94]。范海超也在河南华溪蟹中克隆得到了 ShDorsal 蛋白, 并在镉和嗜水气单胞菌联合胁迫下观察到了核移位现象, 且通过 Toll-Dorsal 信号通路直接调控抗菌肽的表达^[95]。

因此, 基于以上原因, 我们选取了河南华溪蟹为实验动物, 克隆得到了 *ShHMGBa* 基因序列全长, 研究了其在先天免疫防御系统中的功能。并探究了在镉暴露下, HMGB1 在河南华溪蟹中的应答模式以及其作用机制, 从而更

好的研究 HMGB1 在甲壳动物先天免疫中的作用，以及镉对甲壳动物先天免疫防御系统的影响。旨在发掘 HMGB1 在应对镉胁迫中的发挥的功能，丰富 HMGB1 蛋白在无脊椎动物的研究，同时为重金属污染和绿色养殖提供新的方向和靶标。

1.4.2 研究内容

(1) 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因 cDNA 序列全长克隆、生信分析和组织分布情况分析；

(2) 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 融合蛋白的诱导表达、分离纯化及功能研究；

(3) 镉胁迫对河南华溪蟹 *ShHMGBa* 的表达、亚细胞分布以及 *ShHMGBa* 对核转录因子 *ShDorsal* 的影响。

1.4.3 研究方案

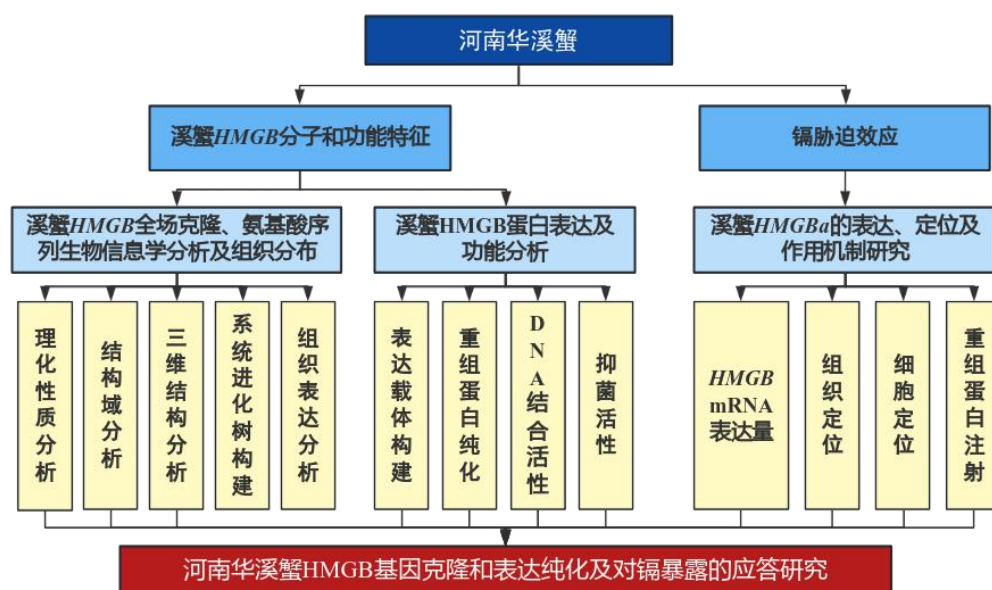


图 1-1 本学位论文研究方案

Fig. 1-1 Research plan for this thesis

第二章 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因的克隆、生物信息学分析和组织表达模式

摘要：以河南华溪蟹（*Sinopotamon henanense*）为材料，通过 RACE PCR 和实时荧光定量 PCR 技术，对河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因序列全长和组织分布情况进行了研究，并进行了生物信息学分析。结果显示，*ShHMGBa* 基因 cDNA 序列共 1016 bp，包含开放阅读框(ORF) 684 bp，5'端非编码区(5'UTR) 69 bp 和 3'端非编码区(3'UTR) 263 bp。其中 ORF 区编码 277 个氨基酸，构成蛋白分子量 25.96 KD 的理论等电点 7.15。蛋白结构域分析，其包含 2 个 70 个氨基酸左右的 HMG 盒子结构域，分别为位于 15-87 位的 A 盒和位于 112-182 位的 B 盒，两个盒结构域分子构象相似，以及 C 端一个酸性尾部结构(Acidic tail)。氨基酸序列比对与凡纳滨对虾（*Penaeus vannamei*）HMGBa 的同源性最高为 75.74%。系统进化分析发现，河南华溪蟹 *ShHMGBa* 蛋白先与无脊椎动物聚为一支，再与亲缘关系较远的脊椎动物聚为一大支。组织分布结果显示，*ShHMGBa* 基因在在肝胰腺中的表达量最高，肌肉中的表达量最低。本研究为丰富 HMGB1 的研究、进一步了解 *HMGB1* 基因在不同物种的表达差异提供了理论基础。

关键词：河南华溪蟹；*ShHMGBa* 基因；RACE PCR；组织分布

高迁移率族蛋白 B1 是一种进化上高度保守的非组蛋白染色体结合蛋白，且在在脊椎动物和无脊椎动物中普遍存在^[37, 38]。HMGB1 蛋白由两个同源 DNA 结合域 A-box 和 B-box 以及带负电的 C 端酸性尾部构成^[42, 43]。HMGB1 在细胞核中大量且普遍表达，在 DNA 复制、转录、修复和核小体稳定中发挥作用^[48]。它们在稳态过程中具有特定的细胞内任务，但在响应危险信号时释放会促进炎症，作为关键的 DAMP 起作用。HMGB1 蛋白在无脊椎动物肝胰腺和肠组织中高表达，参与无脊椎动物先天免疫防御系统，发挥 DAMP 分子作用或直接抑制细菌和病毒生长^[81, 93]。本实验利用 RACE PCR 技术的方法克隆得到了 *HMGB1* 基因在河南华溪蟹中的同源基因序列全长，并通过实时荧光定量 PCR 技术对其组织表达模式进行检测，为后续在体外表达 *ShHMGBa* 蛋白，对 HMGB1 在甲壳动物中的蛋白功能研究奠定理论基础。

2.1 材料与方法

2.1.1 实验材料

2.1.1.1 实验动物

实验动物河南华溪蟹 (*Sinopotamon henanense*) (以下简称“溪蟹”) 购自“芳草水族”。蟹体先在实验室驯养一周, 不喂食。之后放入水生动物养殖系统中喂养, 自然光照周期, 水温 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 每两日饲喂一次, 死亡个体及时挑出, 实验前一天停止喂食。实验时选取大小相近 (头胸甲宽 $4.0\pm 0.3\text{cm}$) 且完整活泼的个体。

2.1.1.2 主要实验试剂

Es Taq 酶购自康为世纪, KOD 酶购自东洋纺生物科技有限公司, AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 购自 Axygen 公司, 氯仿、异丙醇和无水乙醇购自中国国药集团有限公司, PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser, SMARTer® RACE 5'/3' Kit User Manual、DNA Ligation Kit Ver.2.1、TB Green® Premix Ex Taq™ II、T-Vector pMD™19 载体均购自 Takara, DH5 α 感受态购自全式金生物技术有限公司。

2.1.1.3 主要实验设备

电热恒温摇床产自 Amerex 公司, 美国。

凝胶成像系统产自净信实业发展有限公司, 上海, 型号: FluroChem HD2。

全自动样品冷冻研磨仪产自净信实业发展有限公司, 上海, 型号: JXF-STPRP-CL-48。

实时荧光定量 PCR 仪产自 ABI 公司, 美国, 型号: ABI750。

冷冻离心机、金属浴、PCR 扩增仪、微量分光光度计型号分别为: Centrifuge 5424R、ThermoMixer C、Mastercycler nexus GSX1、BioSpectrometer, 均产自 Eppendorf 公司, 德国。

2.1.1.4 引物

下列实验引物均由 Primer Premier 5 软件设计, 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 序列具体信息见表 2-1:

表 2-1 PCR 引物序列

Tab. 2-1 The sequence of primers

引物名称	引物序列(5' → 3')	用途	扩增长度 (bp)
<i>ShHMGBa</i> -Fw	CCCGTCAATGTTCGGAGCG	片段验证	510bp
<i>ShHMGBa</i> -Rw	CAGGAGCCACGCCGTTTTC		
<i>ShHMGBa</i> -5'-1	CCACAGAGAAGTCGGGGTTCAGCAGCG	5'-RACE	——
<i>ShHMGBa</i> -5'-2	TCGCCCACAGAGAAGTCGGGGTTCAGC		
<i>ShHMGBa</i> -3'-1	GGACAAGGAACGCTACAACCTCCCAGACC	3'-RACE	——
<i>ShHMGBa</i> -3'-2	ACAAGGAACGCTACAACCTCCCAGACCCA		
<i>ShHMGBa</i> VerFw1	AGTTTGAGTGCCTCCTCGC	全长验证	883bp
<i>ShHMGBa</i> VerRv1	AGTACATGGTTCTGATACATTGTTG		924bp
<i>ShHMGBa</i> VerFw2	GGAGTGTGCGAGAGTGG		
<i>ShHMGBa</i> VerRv2	CATTCAGTACATGGTTCTGATACATTGT		
<i>ShHMGBa</i> RTFw	GGAACGCTACAACCTCCCAGAC	qPCR	147bp
<i>ShHMGBa</i> RTRv	GCGTAGTAGAAGAAGGCGGATAGA		

2.1.2 实验方法

2.1.2.1 河南华溪蟹总 RNA 提取与第一链 cDNA 文库构建

1) 总 RNA 提取

通过 Trizol 法提取溪蟹组织总 RNA，操作如下：

(1) 取溪蟹肝胰腺组织于含 1 mL RNAiso Plus 的离心管中，添加磁珠，使用匀浆仪，在-20℃，匀浆 180s*2 次。

(2) 匀浆结束后，冰上静置 5 min，于 4℃，12000 g，离心 5 min 后取上清。

(3) 加 200 mL 氯仿于上清溶液中，涡旋振荡 30s 至乳白色，静置 5 min，于 4℃，12000 g，离心 15 min 后取上层水相。

(4) 加入异丙醇，-20℃静置 30 min，于 4℃，12000 g，离心收集沉淀。

(5) 用 75%酒精洗沉淀，4℃，7500 g，离心 5 min 收集沉淀，重复一次。

(6) 开盖挥发至无味后，加 20 μL DEPC 水，于 55℃金属浴加热 10 min 溶解沉淀后，冰浴 20 min。

微量分光光度计测定总 RNA 浓度，1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取总 RNA 质量。

2) RACE-ready cDNA 文库构建

(1) 取 0.2 mL 无酶 PCR 管，分别加入 DTT、dNTPs 和第一链合成缓冲液 0.5 μL、1.0 μL 和 4.0 μL，混匀备用。

(2) 另取一个 0.2 mL 无酶 PCR 管, 分别加入 5'或 3'CDS Primer A、无酶水和总 RNA 各 1.0 μ L、6.0 μ L 和 5.0 μ L 混匀后, 72°C 孵育 3 min, 42°C 再孵育 2 min。

(3) 将两管试剂混在一起, 再分别加入 RNase Inhibitor 和 SMARTScribe Reverse Transcriptase 各 0.5 μ L 和 2.0 μ L。42°C 孵育 1.5 h, 70°C 再孵育 10 min, 分装保存于 -80°C。

2.1.2.2 RACE PCR 获得目的基因有效片段

(1) 根据前期获得的溪蟹 *HMGBa* 基因片段, 设计引物, 见表 2-4。

(2) 以第一链 cDNA 为模板, 先用 KOD 酶进行第一轮 PCR, 取一 0.2 mL 无酶 PCR 管, 分别加入 5'或 3'RACE cDNA、无酶水、UPM、dNTP、KOD 酶、特异性引物和 KOD 酶缓冲液分别 0.4 μ L、2.8 μ L、2 μ L、4 μ L、0.4 μ L、0.4 μ L 和 10 μ L。混匀, 离心后放入 PCR 仪反应。

(3) 调整反应程序为: 94°C, 2 min; 98°C, 10 s; 68°C $\rightarrow$ 63°C, 30 s; 68°C, 2 min (6 个循环); 98°C, 10 s; 63°C, 30 s; 68°C, 2 min (35 个循环); 68°C, 5 min, 4°C 保存。

(4) 取一轮产物, 稀释后作为底物, 用 Es Taq 酶进行第二轮 PCR, 取一 0.2 mL 无酶 PCR 管, 分别加入一轮产物、Es Taq 酶、特异性引物、NUP、无酶水分别 0.4 μ L、0.4 μ L、10 μ L、0.4 μ L 和 8.8 μ L, 混匀, 离心后放入 PCR 仪反应。

(5) 调整反应程序为: 94°C, 2 min; 94°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 2 min (35 个循环); 72°C, 3 min, 4°C 保存。

反应结束后, 将得到的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定, 凝胶成像系统检测结果。

2.1.2.3 PCR 产物的凝胶回收

使用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 对纯化回收目的基因片段, 操作如下:

(1) 切下含目基因片段的凝胶, 切碎, 称重 (一个凝胶体积), 加入 DE-A 溶液 (3 倍凝胶体积), 75°C 金属浴融化胶块。

(2) 加入 DE-B 溶液 (1.5 倍凝胶体积) 混匀后, 移至制备管, 12000 $\times$ g, 离心 1 min, 弃滤液。

(3) 加入 500 μ L Buffer W1, 12000 $\times$ g, 离心 1 min, 弃滤液。

(4) 加入 700 μ L Buffer W2, 12000 $\times$ g, 离心 30 s, 弃滤液。

(5) 重复步骤 (4) 一次

(6) 空制备管, 12000×g, 离心 1 min。

(7) 转移制备管到新离心管中, 在制备膜上滴加 15 μ L ddH₂O, 静置 1 min, 12000×g, 离心 1 min, 得到目的基因片段 DNA 溶液。

2.1.2.4 重组质粒的连接与转化

(1) 利用 DNA Ligation Kit Ver.2.1 将目的基因 DNA 片段与 T-Vector pMD™19 载体, 取 0.2 mL 无酶 PCR 管, 分别加入 Solution I 溶液、DNA 溶液和 19T 载体分别 5.0 μ L、4.8 μ L 和 0.2 μ L, 混匀, 离心后 4℃ 过夜连接。

(2) 取 2.5 μ L 的连接产物加入 25 μ L 感受态细胞中, 轻轻搅拌混匀, 冰上静置 30 min 后, 水浴锅 42℃ 热激 90 s, 迅速且小心转移至冰上, 冰浴 2 min。

(3) 加入 250 μ L LB 液体培养基, 37℃, 150 rpm, 培养 60 min。

(4) 取含氨苄抗性的 LB 固体培养基, 加入 100 μ L 菌液, 均匀涂开, 37℃ 过夜。

2.1.2.5 单克隆挑取与菌液 PCR

(1) 取过夜培养的平板, 挑取单一菌落于培养基中, 37℃, 200 rpm, 培养。

(2) 取菌液为底物模板, M13 作为引物, 进行菌液 PCR, 反应体系及程序同 2.1.2.2 步骤 (4) 和 (5)。

(3) 反应完成后, 利用琼脂糖凝胶电泳检测, 选含目的基因片段的菌液送测, 测序结果通过 NCBI 在线工具 Blast 进行比对。

2.1.2.6 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因全长验证

(1) 将测序得到的目的基因片段拼接, 得到基因全长序列, 设计全长验证引物见表 2-4。

(2) 用 2×Easy Taq DNA 聚合酶, 以溪蟹肝胰腺 cDNA 文库为模板, 进行 PCR 反应, PCR 反应体系及程序同 2.1.2.2 步骤 (4) 和 (5)。

(3) 反应结束后, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离鉴定, 凝胶成像系统检测结果。将目的条带凝胶回收、构建重组载体、筛选单菌落并测序。

2.1.2.7 *ShHMGBa* 基因序列生物信息学分析

通过 DNA MAN 6.0 软件拼接得到溪蟹 *ShHMGBa* 基因序列全长, 利用 NCBI 的 ORF Finder 功能对全长验证正确的 *ShHMGBa* 基因进行开放阅读框 (ORF) 预测, 并利用 SMART (<http://smart.embl.de>) 分析结构域, 将 *ShHMGBa* 基因 ORF 区翻译成氨基酸序列并利用蛋白 / 多肽等电点计算器

(http://www.novopro.cn/tools/protein_iep.html) 计算蛋白质分子量和分析等电点, 之后进行 HMGB 蛋白氨基酸序列在不同物种间进行多重比对并分析相似性, 网站为 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), 蛋白质三维结构采取 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测, 系统发育进化树 (N-J tree) 的绘制通过 MEGA 7.0 软件进行, 自举检测 1000 次。序列分析中用到的其他物种序列均来自 Gene Bank, 序列号见表 2-2。

表 2-2 生物信息学分析所用物种名称及 GenBank 注册号

Tab. 2-2 Species names and GenBank registration numbers used in bioinformatics analysis

物种名称	学名	注册号 (GenBank)
智人	<i>Homo sapiens</i>	CAG33144.1
小家鼠	<i>Mus musculus</i>	AAI10668.1
原鸡	<i>Gallus gallus</i>	NP_990233.1
热带爪蟾	<i>Xenopus tropicalis</i>	NP_989226.1
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	AAH67193.1
七鳃鳗	<i>Lampetra fluviatilis</i>	CAA67363.1
端足虫	<i>Hyalella azteca</i>	XP_018014074.1
长毛蜉	<i>Trinorchestia longiramus</i>	KAF2357080.1
南美白对虾	<i>Penaeus vannamei</i>	ADQ43366.1
三疣梭子蟹	<i>Portunus trituberculatus</i>	ATL75652.1

2.1.2.8 河南华溪蟹各组织 cDNA 模板制备

1) 随机选取 16 只活泼且发育相近的溪蟹, 冰浴麻醉后, 取出组织, 提取总 RNA, 操作步骤详见 2.1.2.1 (1)

2) 各组织 cDNA 文库构建, 操作如下:

(1) 取 0.2 mL EP 管, 在冰上配制试剂, 加入总 RNA 和无酶水 H_2O 共 7.0 μL , gDNA Eraser 1.0 μL 以及 gDNA Eraser 缓冲液 2.0 μL , 混匀, 离心后 42°C 孵育 2 min。

(2) 在原 EP 管中继续加入 PrimeScript RT Enzyme Mix I、RT Primer Mix、PrimeScript 缓冲液和无酶水分别 1.0 μL 、1.0 μL 、4.0 μL 和 4.0 μL 。混匀, 离心后 37°C 孵育 20 min, 85°C 再孵育 5s, 分装, 保存于 -80°C。

2.1.2.9 qPCR 检测河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因组织分布情况

(1) 取 96 孔板于冰上, 加入 cDNA、正反引物、SYBR green Premix Ex Taq II、ROX Reference Dye II 和无酶水分别 3 μL 、0.375 μL 、7.5 μL 、0.3 μL 和 3.45 μL 。离心后放入实时荧光定量 PCR 仪。

(2) 调整反应程序：95°C，10 min；95°C，15 s；60°C，1 min（40 个循环）；95°C，15 s；65°C，1 min。

(3) 每个样本重复两次，溪蟹 *ShHMGBa* 基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析，内参基因为 *rp138* 基因。

2.1.3 数据统计与分析

使用 GraphPad Prism 6.0 软件分析 qPCR 结果并做图，采用单因素分析 (One-way ANOVA) 进行差异性分析， $P < 0.05$ 为差异显著（用“*”表示）， $P < 0.01$ 为差异极显著（用“**”表示）。

2.2 结果

2.2.1 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因序列全长和生物信息学分析

通过 RACE PCR 的方法克隆得到溪蟹 *ShHMGBa* 基因 3'和 5'端序列片段，经拼接后设计特异性引物进行全长验证，结果如图 2-1 所示，经胶回收、连接、转化后测序分别得到 883 bp 和 924 bp 大小两条序列片段，并与 NCBI 数据库比对，确定均为溪蟹 *ShHMGBa* 基因。

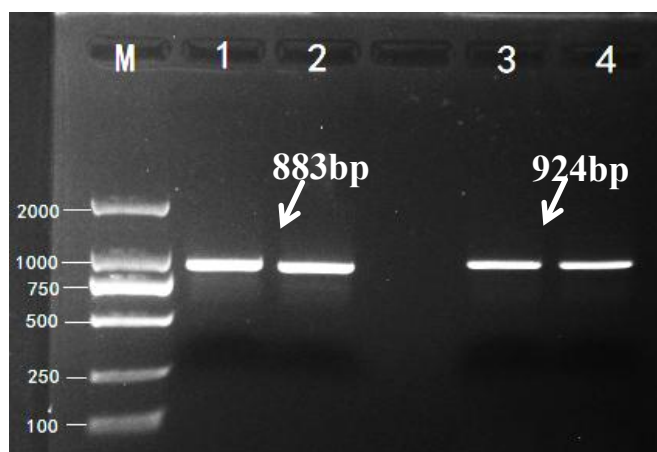


图 2-1 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 序列凝胶电泳

1%琼脂糖凝胶电泳检测，M：DNA 分子量标准 DL2000，1-2：全长验证引物 1（883 bp），3-4：全长验证引物 2（924 bp）。

Fig. 2-1 Gel electrophoresis of *ShHMGBa* sequence of *S. henanense*

1% agarose gel electrophoresis, M: DNA Marker 2000, 1-2: Full length validation primer 1(883 bp), 3-4: Full length validation primer 2(924 bp).

溪蟹 *ShHMGBa* 基因序列全长 1016 bp，开放阅读框（ORF）包含 684 核苷酸，5' 端非编码区（5' UTR）和 3' 端非编码区（3' UTR）分别包含 69 和 263 个核苷酸，其中 3' 端包含一个多聚腺苷酸信号序列 AATAAA，以及 poly（A）尾，由 22 个腺嘌呤核苷酸组成。开放阅读框编码的蛋白由 227 个氨基酸构成，分子量为 25.96 KD，理论等电点 7.15。蛋白结构域分析结果如图 2-3 所示，*ShHMGBa* 蛋白包含两个 HMG 盒子结构域，A 盒位于 15—87 位，B 盒位于 112—182 位，两个盒结构域分子构象相似，如图 2-4 所示，均由 3 个 α 螺旋构成，以及一个由天冬氨酸和谷氨酸构成的酸性尾部结构（Acidic tail），位于 C 端。

```

1                                     M P R G R P R
1  gggacccggagtggtgcgagagtggtgctgcacccgaactacctcagtttgagtgcctcctgcagtgccagcATGCCGCGTGGGCGCCCTAGG
8  G S G M A V D K P R G R M S A Y A F F V Q T C R T E H K K L
91  GGCTCCGGGATGGCGGTAGACAAACCTCGAGGAAGGATGTGAGCTTACGCATTCTTCGTACAGACGTGCCGCACTGAACACAAGAACTT
38  H P D E N V Q L V E F S R Q C S E R W K T M S E E E K K K F
181  CACCCCGACGAGAACGTTTCAGCTCGTCGAGTTCTCCCGTCAATGTTCTGAGCGCTGGAAGACCATGTCTGAGGAGGAGAAGAAAAGTTC
68  H D L A D Q D K E R Y N S Q T Q M R N F G S P G S L G G R R
271  CATGATTAGCTGATCAGGACAAGGAACGCTACAACTCCAGACCCAGATGCGGAACCTCGGATCACCGGGAAGCCTCGGGGGGCGACGT
98  V R R A R G S K P P K D P N K P K R A L S A F F Y Y A N D E
361  GTGCGGCGGGCGCGAGGCTCCAAGCCGCCCAAGGATCCTAACAACCAAGCGCGCTCTATCCGCCTTCTTCTACTACGCCAACGACGAA
128  R A Q V R A A N P D F S V G E V A K E L G R Q W N E L G E A
451  CGGGCCCAGGTTTCGCGCTGCTAACCCCGACTTCTCTGTGGGCGAGGTAGCCAAAGAGCTGGGAAGGCAGTGGAAACGAGCTGGGCGAGGCC
158  D K V K Y E K L A E E D R A R Y D R E M T A Y R A G G A P P
541  GACAAGGTGAAGTACGAGAAGCTGGCAGAGGAGGACCGCGCCAGGTATGACCGGGAGATGACTGCGTACCGAGCCGGGGAGCCCCGCCT
188  K K M K A T N G H P A V I T R N D H H G D D E D D E N G V A
631  AAGAAGATGAAGGCTACTAATGGTCACCCAGCAGTGATTACTCGCAACGATCACCACGGTGACGACGAAGACGACGAAAACGGCGTGGCT
218  P D D D E D D D E D *
721  CCTGATGACGACGAGGACGATGATGAAGATTAAgtgaattggttggtgagatggtggtggtggtgtagtggtggtggtgtagtgtttat
811  ggcattgatgtacaaacttattttttatcaggctaagctctgtacatttttagggtgtaaggcgccccccgggctctcaaggatcttcacca
901  caacaatgtatcagaacctgtactgaatgacctcattttttgaacatttttttttttatattttgtacdaataaaatgggaaatcca
991  aaagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

图 2-2 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因全长序列

Fig. 2-2 Full-length sequence of *ShHMGBa* from *S. henanense*

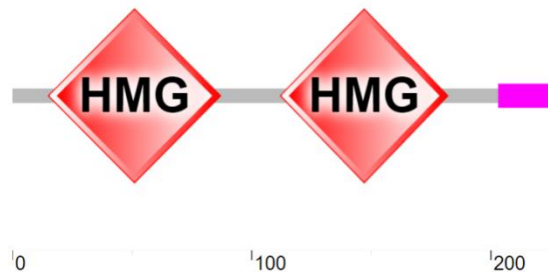
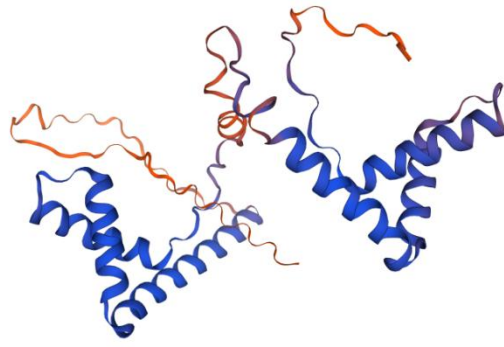


图 2-3 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 蛋白结构域预测

Fig. 2-3 Prediction of protein domain of *ShHMGBa* from *S. henanense*

图 2-4 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 蛋白三维结构预测Fig. 2-4 Prediction of three-dimensional structure of *ShHMGBa* from *S. henanense*

通过利用 BLAST 工具对溪蟹 *ShHMGBa* 基因的氨基酸序列进行同源性比对分析, 结果显示, 溪蟹 *ShHMGBa* 基因与凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*) 的同源性最高, 达到了 75.74% 的相似性, 其次与端足虫 (*Hyaletella azteca*) 等昆虫类同源性较高。

系统进化树利用 MEGA7.0 软件进行构建, 结果如图 2-6 所示, 10 个不同物种的 HMGB 家族基因分为脊椎和无脊椎动物两个类群, 先依次与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、凡纳滨对虾、长毛蜈 (*Trinorchestia longiramus*) 等无脊椎动物聚集为一支, 随后才与亲缘关系相对较远的脊椎动物, 如斑马鱼 (*Danio rerio*)、智人 (*Homo sapiens*) 和小家鼠 (*Mus musculus*) 等, 汇聚成一大支。

ShHMGBa	MERGFPRGSMVLDKPPFGMSAYAFVCTCRTEHKKLFEENVCIVEESRQCSFQWKTMSSEERKKHDLADCLREBYNSQTCORNFSGSIGGRRVR	99
HsHMGB1	MKGDEPKKPRGKMSYAFVCTCRDEHKKKFEEDASVNHSESKKCSFQWKTMSAKERKGEEDMAKACKAYER..ENKTYIPEKGETTKK.KF	89
MmHMGB1	MKGDEPKKPRGKMSYAFVCTCRDEHKKKFEEDASVNHSESKKCSFQWKTMSAKERKGEEDMAKACKAYER..ENKTYIPEKGETTKK.KF	89
PvHMGBa	MERGFPR..CVAAEKPRGNTAYAFVCTCRTEHKKLFEENVCIAEESRQCSFQWKTMSSEERKKHDLADCLREBYNSQTCORNFSGSIGGRRVR	94
PthHMGBa	MERGFPRGSMVLDKPPFGMSAYAFVCTCRTEHKKLFEENVCIAEESRQCSFQWKTMSSEERKKHDLADCLREBYNSQTCORNFSGSIGGRRVR	97
GgHMGB1	MKGDEPKKPRGKMSYAFVCTCRDEHKKKFEEDASVNHSESKKCSFQWKTMSSEERKKHDLADCLREBYNSQTCORNFSGSIGGRRVR	89
LfhMG	MKGDEPKKPRGKMSYAFVCTCRDEHKKKFEEDASVNHSESKKCSFQWKTMSSEERKKHDLADCLREBYNSQTCORNFSGSIGGRRVR	90
HaDSP1	MERGFPR..CCAGATKIKGMSAYAFVCTCRDEHKKLFEENVCIAEESRQCSFQWKTMSSEERKKHDLADCLREBYNSQTCORNFSGSIGGRRVR	95
XtHMGB1	MKGDEPKKPRGKMSYAFVCTCRDEHKKKFEEDASVNHSESKKCSFQWKTMSAKERKGEEDMAKACKAYER..ENKTYIPEKGETTKK.KF	89
Consensus	g k g ya iv tcr ehkk p v ef cs rwtms ek f ck r m	
ShHMGBa	RARGSKPFKDNKPRRAISAFYYANLEBAQVRAANEDFSVGEVAREIGRWNLGEALVKYERLAEEEDRAFYCRENTAYRACGA.FPK.....	188
HsHMGB1	KDNAPRRPESAFILFCSEYFEKIKGEHGLSTGIVARKIGEMWNTAADIKCEYERKAAKLKEKYEKIDAAVRAKGFDAARGVVKAES	181
MmHMGB1	KDNAPRRPESAFILFCSEYFEKIKGEHGLSTGIVARKIGEMWNTAADIKCEYERKAAKLKEKYEKIDAAVRAKGFDAARGVVKAES	181
PvHMGBa	RARGRR.FKDNKPRRAISAFYYANLEBAQVRAANEDFSVGEVAREIGRWNLGEALVKYERLAEEEDRAFYCRENTAYRACGA.FPK.....	183
PthHMGBa	RSRGKPFKDNKPRRAISAFYYANLEBAQVRAANEDFSVGEVAREIGRWNLGEALVKYERLAEEEDRAFYCRENTAYRACGA.FPK.....	186
GgHMGB1	KDNAPRRPESAFILFCSEYFEKIKGEHGLSTGIVARKIGEMWNTAADIKCEYERKAAKLKEKYEKIDAAVRAKGFDAARGVVKAES	181
LfhMG	KDNAPRRPESAFILFCSEYFEKIKGEHGLSTGIVARKIGEMWNTAADIKCEYERKAAKLKEKYEKIDAAVRAKGFDAARGVVKAES	179
HaDSP1	RRRGAKKRRDNKPRRAISAFYYAKTERAKVRANEDFSVGEVAREIGRWNLGEALVKYERLAEEEDRAFYCRENTAYRACGA.FPK.....	185
XtHMGB1	KDNAPRRPESAFILFCSEYFEKIKGEHGLSTGIVARKIGEMWNTAADIKCEYERKAAKLKEKYEKIDAAVRAKGFDAARGVVKAES	181
Consensus	dqn pkr saff r p g ak lg wn k ye y y	
ShHMGBa	KMKATNGHFV..IIRNLHGHGDEEDENGVAPELLEDEED..	227
HsHMGB1	KKKKEEEEDEDEEETEE...EETEEDEDEEDDDE..	215
MmHMGB1	KKKKEEEEDEDEEETEE...EETEEDEDEEDDDE..	215
PvHMGBa	KMKASNGHFV..AETEL...DEEVGGEEDDCLVSEGESELE	222
PthHMGBa	KMKATNGHFV..AAVTQ...DEENENGLAPDCLDDEDEE	225
GgHMGB1	KKKKEEEEDE..EETEL...EETEEDEDEEDDDE..	215
LfhMG	SKQRDCLDDE..EETEL...DETEDEEDDDE..	208
HaDSP1	KMKASNGH...PEA...GARDDEGEFDEEDDEEGDE..	217
XtHMGB1	KKKKEEEEDE..EETEL...EETEEDEDEEDDDE..	211
Consensus		

图 2-5 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因与其他物种 *HMGB1* 基因氨基酸序列的同源比对Fig. 2-5 Homologous alignment of amino acid sequences between the *ShHMGBa* gene of *S. henanense* and the *HMGB1* gene of other species

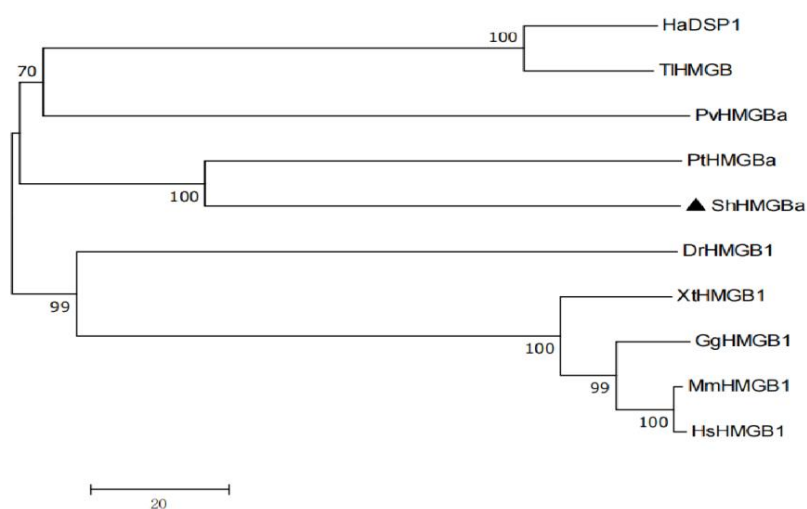


图 2-6 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因氨基酸序列的系统进化分析

Fig. 2-6 Phylogenetic analysis of the amino acid sequence of the *ShHMGBa* gene in *S. henanense*

2.2.2 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因的组织定量表达分析

以溪蟹 *rpl38* 基因为内参基因，通过实时荧光定量 PCR 技术对溪蟹 *ShHMGBa* 基因在不同组织的表达情况进行分析，结果如图 2-7 所示，在溪蟹的不同组织中 *ShHMGBa* 基因均有一定的表达量，其中表达量最高的是肝胰腺组织，而表达量最低的组织是肌肉。

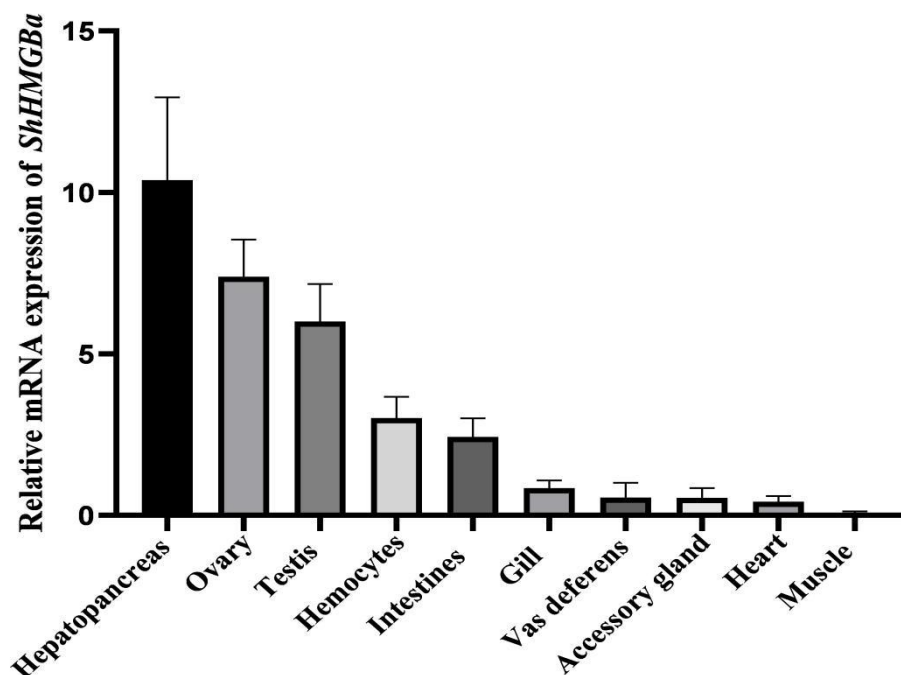


图 2-7 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因组织表达模式

Fig. 2-7 Expression pattern of *ShHMGBa* gene tissue in *S. henanense*

2.3 讨论

2.3.1 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因序列分析

HMGB1 分子在脊椎动物和无脊椎动物中普遍存在,且在大多细胞中表达丰富^[37, 38]。HMGB1 含有 A-box 和 B-box 两个同源 DNA 结合域,另具有带负电的酸性 C 端结构域^[42, 43]。正常情况下 HMGB1 作为 DNA 伴侣存在于细胞核中。当 HMGB1 在细胞死亡过程中被动释放或主动分泌到细胞外环境,作为一种典型的损伤相关分子模式 (DAMP),发挥促炎作用^[51]。哺乳动物细胞外的 HMGB1 可使先天免疫系统感测抗原入侵并引起宿主防御和组织修复^[96]。HMGB1 在物种间具有较高的序列同源性,包括植物、细菌、鱼类、甲壳类、果蝇和酵母^[40, 47]。关于 HMGB 基因的研究主要集中在对哺乳动物的研究,而关于其在无脊椎动物尤其是对甲壳类动物的研究相对较少,除凡纳滨对虾外、仅在三疣梭子蟹和日本囊对虾中克隆得到了 *HMGBa*、*HMGBb* 基因,且对其功能未进行较多深入研究^[81, 90, 91]。本研究利用 RACE PCR 技术成功克隆得到了溪蟹 *ShHMGBa* 基因序列全长。根据 SMART 预测得到的结构域可知, *ShHMGBa* 分子包含两个典型 DNA 功能结构域 A-Box 和 B-Box,以及富含天冬氨酸与谷氨酸的酸性 C 端结构域。HMGB1 的 B-box 是诱导促炎活性的主要作用位点,而 A-box 可诱导拮抗作用,另外, C 端酸性尾部不仅可作为转录激活因子,同时对 HMGB1 的抗菌活性起着至关重要的作用^[44-46]。通过与其他物种进行同源性比对,结果发现,溪蟹 *HMGBa* 基因编码的氨基酸序列与凡纳滨对虾相似度最高,为 75.74%。基于以上结果,可以说明本实验得到的 *ShHMGBa* 基因是溪蟹体内 HMGB 家族基因的同源基因。

2.3.2 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因各组织表达情况

HMGB1 在哺乳动物的各种组织器官中广泛表达,且在精巢和淋巴组织中含量较高^[97]。鱼类 HMGB1 的表达主要是在皮肤、肠道和鳃, HMGB1 的表达位置表明 HMGB1 可能在鱼类的免疫系统中发挥重要功能^[97]。凡纳滨对虾 *HMGBa* 在肝胰腺中表达量最高,三疣梭子蟹 *HMGBa* 除在血细胞中有较高表达量外,在肝胰腺和肠中的也有相对高的表达量,明显高于其他组织,这也表明 *HMGBa* 在甲壳动物先天免疫防御系统中发挥重要作用^[81]。通过对溪蟹 *ShHMGBa* 基因在不同组织中表达情况的分析发现, *ShHMGBa* 基因表达量最高的是肝胰腺组织,同时在生殖系统如卵巢和精巢中也有较高表达量。这说明 *HMGBa* 基因确实对甲壳动物的先天免疫作

用很重要。HMGB1 作为 DNA 伴侣，在 DNA 复制和转录等过程中发挥关键作用，具有调控 DNA 损伤修复，维持基因组稳定性的功能^[48]。同时高水平的 HMGB1 通常在分化程度较低的细胞中检测到，这也能解释 *ShHMGBa* 基因在增殖组织和活跃分裂的生殖系统中高表达^[98]。HMGB1 蛋白在无脊椎动物生长发育过程中同样也起到关键作用。

综上所述，我们通过对溪蟹 HMGB 家族基因进行克隆，并通过生物信息学分析确定为溪蟹 *ShHMGBa* 基因，并对其在不同组织的表达量进行分析，以期为进一步研究溪蟹 *ShHMGBa* 蛋白功能以及对镉的应答模式提供了理论基础，丰富 HMGB 家族蛋白在无脊椎动物中的研究。

Chapter Two Cloning, bioinformatics analysis, and tissue expression patterns of the *ShHMGBa* gene in *Sinopotamon henanense*

Abstract: Using *Sinopotamon henanense* as material, the full length and tissue distribution of the *ShHMGBa* gene sequence in *S. henanense* were studied using RACE PCR and real-time fluorescence quantitative PCR techniques, and bioinformatics analysis was conducted. The results showed that the cDNA sequence of the *ShHMGBa* gene consists of 1016 bp, including an open reading frame (ORF) of 684 bp, a 5' non coding region (5' UTR) of 69 bp, and a 3' non coding region (3' UTR) of 263 bp. The ORF region encodes 227 amino acids, forming a theoretical isoelectric point of 7.15 with a protein molecular weight of 25.96 KD. Protein domain analysis includes two HMG box domains with approximately 70 amino acids, namely the A box located at positions 15-87 and the B box located at positions 112-182. The molecular conformations of the two box domains are similar, and there is an acidic tail structure at the C-end. The highest homology between amino acid sequence alignment and HMGBa of *Penaeus vannamei* is 75.74%. Systematic evolutionary analysis found that the ShHMGBa protein of Henan Huaxi crab first aggregates with invertebrates, and then aggregates with vertebrates with distant relationships into a large branch. The organizational distribution results showed that the *ShHMGBa* gene had the highest expression level in the liver and pancreas, and the lowest expression level in muscles. This study provides a theoretical basis for enriching the research on HMGB1 and further understanding the expression differences of HMGB1 genes in different species.

Keywords: *Sinopotamon henanense*; *ShHMGBa* gene; RACE PCR; Distribution

第三章 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 原核表达、蛋白纯化以及功能研究

摘要：本实验以河南华溪蟹 (*Sinopotamon henanense*) *ShHMGBa* 基因 ORF 区为模板，构建原核表达载体 *pET-28a(+)-ShHMGBa*，转化 BL21(DE3)感受态表达菌株中，成功诱导表达并纯化了溪蟹 r*ShHMGBa* 融合蛋白，并对其蛋白功能进行了分析。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，可溶性 r*ShHMGBa* 蛋白大小约 26 KD，最佳诱导条件为 37°C、200 rpm、0.8mM IPTG 诱导 9.0 h。使用镍柱亲和层析技术，对可溶性重组蛋白进行了分离纯化，通过不同浓度的咪唑溶液进行蛋白洗脱收集，成功在 100 mM 咪唑溶液中收集得到大量 r*ShHMGBa* 蛋白。之后，用截留分子量为 10 KD 的超滤管进行浓缩，得到浓度为 7.6 mg/mL r*ShHMGBa* 的蛋白溶液，冷冻干燥后置 -80°C 保存。通过 Western Blot 检测发现，纯化蛋白含 His 标签，通过凝胶阻滞实验和抑菌圈实验对 r*ShHMGBa* 蛋白的 DNA 结合活性和抑菌活性进行检测发现，r*ShHMGBa* 蛋白呈现剂量依赖性地延缓 DNA 的迁移速率，且对质粒 DNA 的结合活性更强。但是并不具备直接的抑菌活性。本实验对进一步研究 HMGB1 的蛋白功能，以及在甲壳动物中的作用奠定了理论基础。

关键词：河南华溪蟹；*ShHMGBa* 蛋白；原核表达；蛋白纯化；凝胶阻滞

核 HMGB1 作为 DNA 结合和弯曲调节因子，在许多 DNA 事件中起关键作用。HMGB1 可通过结合和弯曲 DNA，促进 DNA 与 p53、NFκB、类固醇受体等相关转录因子结合^[45]。其中 A-box 和 B-box 为 DNA 结合结构域，而 C 端尾部可调节该蛋白的 DNA 结合活性，且对 HMGB1 的抗菌活性起着至关重要的作用^[44, 67]。本实验通过使用基因工程技术，对溪蟹 *ShHMGBa* 基因 ORF 区进行了原核表达载体 *pET-28a(+)-ShHMGBa* 的构建，并成功诱导并纯化到 r*ShHMGBa* 融合蛋白，对其 DNA 结合功能以及抑菌活性进行了检测，为后续继续研究 *ShHMGBa* 蛋白在机体内先天免疫防御系统中发挥的作用，以及应对镉胁迫的作用机制奠定了基础。

3.1 材料与方法

3.1.1 实验材料

3.1.1.1 实验动物

参见第二章 2.1.1.1。

3.1.1.2 主要实验试剂

DNA 小量抽提试剂盒、IPTG 和兔抗 6*His 多克隆抗体购自生工生物工程股份有限公司, QuickCut 限制酶和 T4 DNA 连接酶购自宝日医生物技术有限公司, Trans 5 α 和 BL21 (DE3) 感受态细胞购自全式金生物技术有限公司, Ni 层析介质 (NTA) 购自博奥龙免疫技术有限公司, Amicon® Ultra-15 离心过滤装置购自默克化工技术有限公司, Dylight 800, Goat Anti-Rabbit IgG 购自亚科因生物技术有限公司。

3.1.1.3 主要实验设备

参见第二章 2.1.1.3。

3.1.1.4 抗体

一抗兔抗多克隆抗体 anti-*ShHMGBa* 为抗肽段 C*RARGSKPPKDPNKP, 一抗由北京华大蛋白质研发中心有限公司合成。

3.1.2 实验方法

3.1.2.1 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 克隆载体的构建

(1) 引物设计

通过溪蟹 *ShHMGBa* 基因 cDNA 序列全长, 使用 Primer premier 5.0 软件设计 ORF 区片段引物, 序列信息见表 3-1, 并在两端分别引入 Sal I、EcoR I 酶切位点。

表 3-1 PCR 引物序列

Tab. 3-1 The sequence of primers

引物名称	引物序列(5' to 3')	引物长度(bp)
EcoR I S	cggaattcATGCCGCGTGGGCGCCCTA	27
Sal I A	gcgtcgacTTAATCTTCATCATCGTCCTCGT	31

(2) 溪蟹 *ShHMGBa* 基因 ORF 区克隆

具体操作同第二章 2.1.2.2 步骤 (4) 和 (5)。

(3) 重组质粒连接、转化、阳性克隆筛选与测序

具体操作同第二章 2.1.2.4 和 2.1.2.5。

3.1.2.2 *pET28a(+)-ShHMGBa* 表达载体的构建

1) 质粒的抽提

(1) 取上述测序正确的菌液，加入到 5 mL 新鲜 LB 液体培养基中，37°C，200 rpm，过夜培养 12-16 h。

(2) 8000×g 离心收集菌体。

(3) 加 250 μL Buffer P1 悬浮沉淀。

(4) 加 250 μL Buffer P2，颠倒混匀，室温静置。

(5) 加 350 μL Buffer P3，颠倒混匀。

(6) 15000×g 离心 9 min，将上清转移至吸附柱，9000×g 离心 30 s，弃滤液。

(7) 吸附柱加 500 μL Wash Solution，9000×g 离心 30 s，弃滤液，重复一次。

(8) 空吸附柱 9000×g 离心 1 min，取吸附柱于新的 1.5 mL EP 管。

(9) 在吸附膜中央滴加 50 μL ddH₂O，室温静置 2 min，9000×g 离心 1 min，得到质粒 DNA 溶液。

2) 重组质粒和表达载体的双酶切

用限制酶 EcoR I、Sal I 对重组质粒 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 和表达载体 *pET-28a(+)* 进行双酶切，取 0.2 mL 无酶 PCR 管，加入快切酶 EcoR I 和 Sal I 各 1 μL，快切酶缓冲液 2 μL，无菌水 6 μL，质粒 DNA 10 μL，PCR 仪 37°C 反应 15 min。

双酶切完成之后，对目的片段进行胶回收，具体操作同第二章 2.1.2.3。

3) 原核表达载体的构建、转化与鉴定

利用 T4 DNA 连接酶，将胶回收片段连接取 0.2 mL 无酶 PCR 管，加入连接酶和缓冲溶液各 1 μL，胶回收片段共 8 μL，混匀离心后，4°C 过夜连接。载体的转化与鉴定具体操作同第二章 2.1.2.4 和 2.1.2.5。

3.1.2.3 *rShHMGBa* 蛋白的表达及可溶性检测

(1) 将测序成功的 *pET-28a(+)-ShHMGBa* 和 *pET-28a(+)* 表达质粒转化到 BL21(DE3) 表达菌，挑取单克隆菌落于液体培养基中，37°C，200 rpm，过夜培养 12 h。含 *pET-28a(+)* 质粒的表达菌作为对照。

(2) 将新鲜的菌液 1 : 100 加入到 20 mL 含 Kana 抗生素的 LB 液体培养基，37°C，200 rpm，培养至菌液 OD₆₀₀ = 0.5 左右，分别取含 *pET-28a(+)-ShHMGBa* 和 *pET-28a(+)*

质粒的菌液各 500 μ L 与 500 μ L 50%甘油充分混合, -20 $^{\circ}$ C 保存, 余下菌液添加 IPTG 至终浓度 1 mM, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 诱导 6 h。

(3) 诱导结束, 各取诱导后菌液 1 mL 保存待用, 4 $^{\circ}$ C, 6000 $\times$ g, 离心 30 min 收集余下含 *pET-28a(+)-ShHMGBa* 质粒的菌液沉淀。

(4) 加入 10mL Balance Buffer 重悬菌体, 并添加蛋白酶抑制剂 PMSF 至终浓度 1 mM, 之后在冰上进行超声破碎, 功率 200 W, 超声 2 s, 停顿 3 s, 破碎 50 min。

(5) 超声破碎结束, 4 $^{\circ}$ C, 1000 $\times$ g, 离心 25 min, 收集上清和沉淀。

(6) 分别取 200 μ L 的含 *pET-28a(+)-ShHMGBa* 和 *pET-28a(+)* 质粒的诱导后菌液, 12000 $\times$ g, 离心 2 min, 收集菌体沉淀, 加 80 μ L PBS 重悬, 加入 20 μ L 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液。

(7) 再分别取破碎菌体收集的上清和沉淀各 80 μ L, 加入 20 μ L 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 与上述菌体重悬液一起在恒温混匀仪, 100 $^{\circ}$ C, 1000 rpm 振荡加热 15 min, 冰上冷却后进行电泳。

(8) 配置 10% SDS-PAGE 蛋白胶, 取 20 μ L 样品进行电泳, 调整电压 80 V, 当样品进入分离胶后, 电压调整至 120 V, 继续 60 min。

(9) 电泳结束后, 用考马斯亮蓝染色, 再脱色, 之后用凝胶成像仪观察蛋白的表达及溶解性。

3.1.2.4 rShHMGBa 蛋白表达条件的优化

1) IPTG 诱导浓度的优化

(1) 按 3.1.2.3 方法培养至菌液 OD₆₀₀=0.5 左右, 在含 *pET-28a(+)-ShHMGBa* 质粒的菌液中分别添加 IPTG 至终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mM, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 诱导 6 h。

(2) 收集不同 IPTG 诱导后菌液, 进行蛋白凝胶电泳检测, 确定最佳 IPTG 诱导浓度, 具体操作同 3.1.2.3。

2) 诱导时间的优化

(1) 按 3.1.2.3 方法培养至菌液 OD₆₀₀=0.5 左右, 添加 IPTG 终浓度至最佳诱导浓度 0.8 mM, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 诱导, 每隔 1.5 h 取 1 mL 菌液待用。

(2) 收集不同时间诱导后菌液, 进行蛋白凝胶电泳检测, 确定最佳诱导时间, 具体操作同 3.1.2.3。

3.1.2.5 rShHMGBa 蛋白的分离纯化

(1) 按 3.1.2.3 方法培养至菌液 $OD_{600}=0.5$ 左右, 分别添加 IPTG 至最佳诱导浓度, 37°C , 200 rpm 诱导至最佳诱导时间。

(2) 诱导结束, 收集上清和沉淀, 具体操作同 3.1.2.3。

(3) 将上清用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤至新的 50 mL 离心管, 冰上待用。

(4) 将 Ni 层析介质 (NTA) 装柱后, 流出储存液, 加 2 倍柱体积 ddH_2O , 与填料混匀清洗 4 次。

(5) 用 10 mL Balance Buffer 平衡柱子, 控制流速 $2\ \text{mL}/\text{min}$ 左右, 待液体流尽后, 在柱子中添加过滤后上清, 使目的蛋白与镍柱充分结合, 收集流穿液。

(6) 依次在柱中加入两倍柱体积的 20 mM、50 mM、100 mM 和 250 mM 咪唑缓冲液, 分开回收过柱溶液。

(7) 纯化完成, 再加入 30 mL 的 250 mM 咪唑缓冲液洗脱残留蛋白, 再用 10 mL ddH_2O 清洗, 之后加入五倍柱体积的 20%乙醇溶液储存于 4°C 。

(8) 将收集到的菌液、上清、沉淀和过柱溶液进行蛋白凝胶电泳, 检测蛋白 rShHMGBa 的纯化情况, 具体操作同 3.1.2.3。

3.1.2.6 rShHMGBa 蛋白的浓缩和鉴定

1) rShHMGBa 蛋白的浓缩

将纯化收集到的 rShHMGBa 蛋白溶液转移至截留分子量为 10 KD 的 50 mL 超滤管中, 4°C , $4000\times g$ 离心, 收集浓缩液。

2) rShHMGBa 蛋白浓度检测

rShHMGBa 蛋白浓缩结束后, 按照碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书, 制作 BSA 标准曲线, 方法如下:

(1) 取 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ BSA 母液, 用 PBS 稀释成浓度为 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、 $0.5\ \text{mg}/\text{mL}$, 每个浓度 $100\ \mu\text{L}$ 。

(2) 每个浓度 BSA 溶液点样 $20\ \mu\text{L}$ 在 96 孔板中, 一个浓度做 3 个平行。

(3) 再取分离纯化并浓缩好的 rShHMGBa 蛋白 $10\ \mu\text{L}$, 稀释 20 倍后在 96 孔板中加入 $20\ \mu\text{L}$, 3 个平行。

(4) 各孔加入 $200\ \mu\text{L}$ BCA 工作液, 37°C 放置 30min。

(5) 用酶标仪测定 $A_{595\ \text{nm}}$ 吸光度, 并根据获得的数据利用 Excel 制作蛋白标曲, 并根据标曲计算重组蛋白浓度。

(6) 将浓缩后的蛋白溶液分装至 1.5 mL 离心管中, 每管 100 μ L, 置于-80 $^{\circ}$ C 冷冻, 之后转移至真空冷冻干燥仪中, 将蛋白溶液干燥成粉末后保存于-80 $^{\circ}$ C。

3) *rShHMGBa* 蛋白的鉴定

通过免疫印迹的方法来进行进一步鉴定 *rShHMGBa* 蛋白, 操作如下:

(1) 取浓缩后 *rShHMGBa* 蛋白, 用 PBS 稀释至 0.1 mg/mL, 取 20 μ L 进行蛋白凝胶电泳, 具体操作同 3.1.2.3。

(2) 电泳结束后, 取下胶块, 切除多余部分, 用于后续蛋白免疫印迹实验。

(3) 将切好的胶块放如转膜缓冲液平衡 2 min, 同时将大小合适的 PVDF 膜(聚偏氟乙烯)用甲醇激活 2 min, 按负极夹板-滤纸-胶块-PVDF 膜-滤纸-正极夹板的顺序将胶块与膜夹好, 避免两者间产生气泡, 冰浴条件下, 400 mA 恒流, 转膜 30 min。

(4) 将 PVDF 膜, TBST 冲洗 3 次, 放入含封闭液的小盒中, 室温振荡封闭 2 h。

(5) 封闭结束后, 将 PVDF 膜转移至含 1:1000 稀释的兔抗 6 $\times$ His 多克隆抗体或兔抗 anti-*ShHMGBa* 多克隆抗体中, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。

(6) 一抗孵育结束后, 用 TBST 漂洗 PVDF 膜 6 次(5 min, 40 rpm), 此后过程均需避光, 将 PVDF 膜转移至 1:2000 稀释的抗兔 IgG 抗体中, 室温孵育 2 h。

(7) 二抗孵育结束后, 用 TBST 漂洗 PVDF 膜 6 次(5 min, 40 rpm, 缓慢摇动)后, 用镊子取出 PVDF 膜转移至双色红外激光成像系统中观察, 并保存结果。

3.1.2.7 *rShHMGBa* 蛋白的活性检测

1) DNA 结合活性

通过 DNA 迁移率变化实验, 检测 *rShHMGBa* 蛋白的 DNA 结合活性, 操作如下:

(1) 为了检测 *rShHMGBa* 的 DNA 结合能力, 先如方法 3.1.2.1(3)克隆并得到河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因 ORF 区片段 DNA 溶液, 以及同方法 3.1.2.2(1)质粒抽提得到 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 质粒 DNA 溶液, 并用微量分光光度计测量 DNA 溶液浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DAN 质量。

(2) 取干燥保存的 *rShHMGBa* 蛋白粉末, 用 PBS 溶解, 并稀释浓度至 1 mg/mL。

(3) 将 *ShHMGBa* 基因 ORF 区片段或 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 质粒 DNA 溶液(100ng)与不同终浓度的 *rShHMGBa*、热变性 *rShHMGBa* 或 PBS 混合, 总体积 20 μ L, 室温孵育 1 h 后, 进行 1%琼脂糖凝胶电泳。

(4) 电泳结束, 凝胶成像仪观察 *rShHMGBa* 蛋白对不同种类 DNA 的阻滞作用。

2) 抑菌活性

通过抑菌圈实验，滤纸片法检测 rShHMGBa 蛋白对细菌的抑制作用，操作如下：

(1) 将大肠杆菌与金黄色葡萄球菌甘油菌 1：100 接种于 1 mL 新鲜 LB 液体培养基中，37℃，200 rpm，过夜培养 12 h。

(2) 将新鲜的菌液 1：100 加入到 1 mL LB 液体培养基，37℃，200 rpm，培养至菌液 OD₆₀₀=0.3 左右，吸取 2 μL，稀释 1000 倍，得到菌液各 1 mL。

(3) 各取稀释后的菌液 150 μL 加入无抗性的固体 LB 培养基中，均匀涂开。

(4) 取干燥后的 rShHMGBa 蛋白粉末，用 PBS 溶解，浓度为 7.6 mg/mL。

(5) 直径 4.5 mm 的圆形滤纸片，高压灭菌并干燥，取一片滤纸片，加 rShHMGBa 蛋白溶液 10 μL，用干净的镊子转移至已涂布细菌的固体培养皿上，以 PBS 为阴性对照，Kana 抗生素为阳性对照，每个处理三个重复，37℃培养 12 h 后观察抑菌圈。

3.2. 结果

3.2.1 原核表达载体的构建和诱导表达

3.2.1.1 原核表达载体的构建

前期已获得溪蟹 *ShHMGBa* 基因全长，在此基础上设计引物 EcoR I S、Sal I A，经克隆得到 *ShHMGBa* ORF 区。如图 3-1 所示，经琼脂糖凝胶电泳检测，目的条带清晰，且位于 500 bp-750 bp，与目的基因片段大小 684 bp 相吻合。将目的条带进行胶回收，并与克隆载体 *pMDTM19-T* 连接后转入克隆菌 DH-5α 中。通过菌液送测序以及序列比对验证，目的片段即为 *ShHMGBa* ORF 区，可用于后续表达载体的构建。

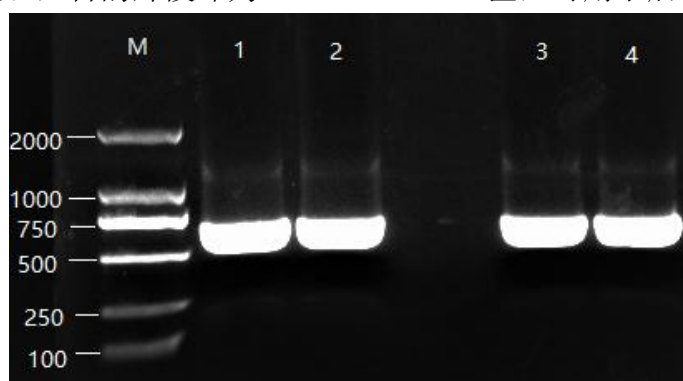


图 3-1 河南华溪蟹 *ShHMGBa* ORF 区的克隆

1%琼脂糖凝胶电泳检测，M：DNA 分子量标准 DL2000，1-4： *ShHMGBa* ORF 区。

Fig. 3-1 Cloning of the *ShHMGBa* ORF region in *S. henanense*

1% agarose gel Electrophoresis, M:DNA Marker 2000, 1-4: *ShHMGBa* ORF region.

如图 3-2 (a) 所示, 为 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 与 *pET-28a(+)* 质粒双酶切后凝胶电泳图, 说明成功利用限制酶 *EcoR* I、*Sal* I 完成了双酶切反应, 其中在 1000 bp 左右处条带为 *ShHMGBa* ORF 区片段, 3000 bp 左右处条带为 *pMDTM19-T* 质粒片段, 6000 bp 左右处条带为 *pET-28a(+)* 质粒片段。对 *ShHMGBa* ORF 区片段与 *pET-28a(+)* 质粒片段进行胶回收, 并进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 3-2 (b) 所示。

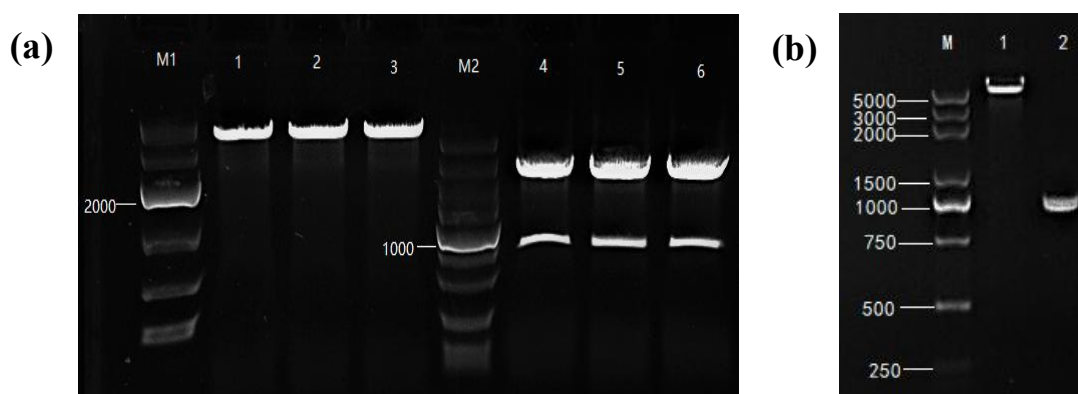


图 3-2 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 克隆载体与表达载体双酶切(a)及胶回收(b)

(a) *pET-28a(+)* 表达载体与 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 克隆载体的双酶切, M1: DNA 分子量标准 DL10000, M2: DNA 分子量标准 DL5000, 1-3: *pET-28a(+)* 表达载体, 4-6: *pMDTM19-T-ShHMGBa* 克隆载体;

(b) 双酶切胶回收产物, M: DNA 分子量标准 DL5000, 1: *pET-28a(+)* 表达载体片段, 2: *ShHMGBa* ORF 区, 1%琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 3-2 Double enzyme digestion (a) and gel recovery (b) of *pMDTM19-T-ShHMGBa* cloning vector and expression vector

(a) The expression vector of *pET-28a* and double digestion of *pMDTM19-T-ShHMGBa*, M1: DNA Marker 10000, M2: DNA Marker 5000, 1-3: Expression vector of *pET-28a(+)*, 4-6: Double digestion of *pMDTM19-T-ShHMGBa*

(b) Double digestion gel recovery products, M: DNA Marker 5000, 1: Expression vector fragment of *pET-28a(+)*, 2: *ShHMGBa* ORF region, 1% agarose gel Electrophoresis.

3.2.1.2 rShHMGBa 蛋白的表达及可溶性分析

将 *ShHMGBa* ORF 区片段与 *pET-28a(+)* 质粒片段连接, 构建 *pET-28a(+)-ShHMGBa* 表达载体, 并转入 BL21 (DE3) 表达菌中, 进行细菌培养和 IPTG 诱导表达重组蛋白 rShHMGBa。图 3-3 为 rShHMGBa 蛋白表达及可溶性

SDS-PAGE 电泳检测结果，结果显示，rShHMGBa 蛋白表达为可溶性蛋白，大小约为 26 KD，与理论分子量 25.96 KD 相符。

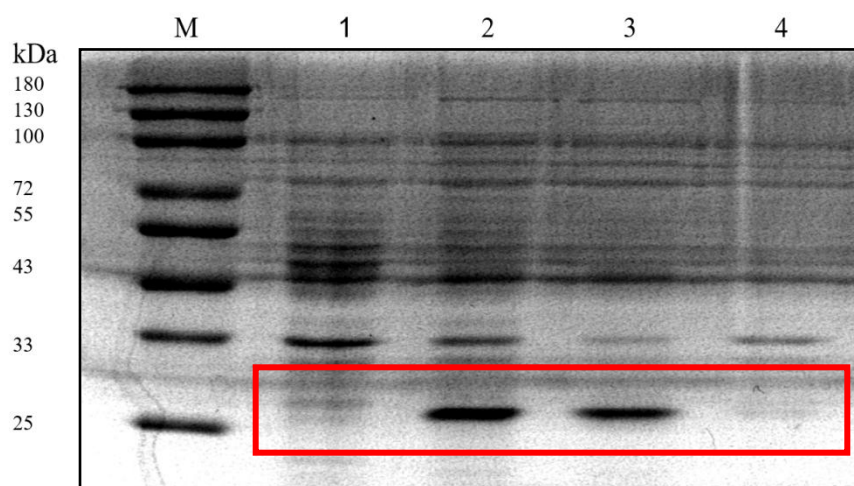


图 3-3 rShHMGBa 蛋白原核表达及可溶性检测

M: 蛋白分子量标准, 1:*pET-28a(+)* 1.0 mM IPTG 诱导 6 h, 2:*pET-28a(+)-ShHMGBa* 1.0 mM IPTG 诱导 6 h, 3: 破碎后菌液上清, 4: 破碎后菌液沉淀。

Fig. 3-3 Prokaryotic expression and solubility detection of rShHMGBa protein

M: Protein Marker, 1: *pET-28a(+)* 1.0 mM IPTG induction for 6 hours, 2:*pET-28a(+)-ShHMGBa* 1.0 mM IPTG induction for 6 hours, 3: Crushed bacterial liquid supernatant, 4: Crushed bacterial precipitate.

3.2.1.3 rShHMGBa 蛋白表达条件的优化

对可溶性蛋白 rShHMGBa 的诱导条件，IPTG 浓度和诱导时间进行优化，从而获得蛋白表达的最佳条件。表达结果如图 3-4 所示，图（a）是不同 IPTG 浓度诱导后 rShHMGBa 蛋白表达量 SDS-PAGE 电泳结果，结果显示 IPTG 最佳浓度为 0.8 mM，图（b）是固定 IPTG 浓度为 0.8 mM，在诱导不同时长后 rShHMGBa 蛋白表达量 SDS-PAGE 电泳结果，结果显示 *pET-28a(+)-ShHMGBa* 表达菌的最佳诱导条件为 0.8mM IPTG 诱导 9.0 h。

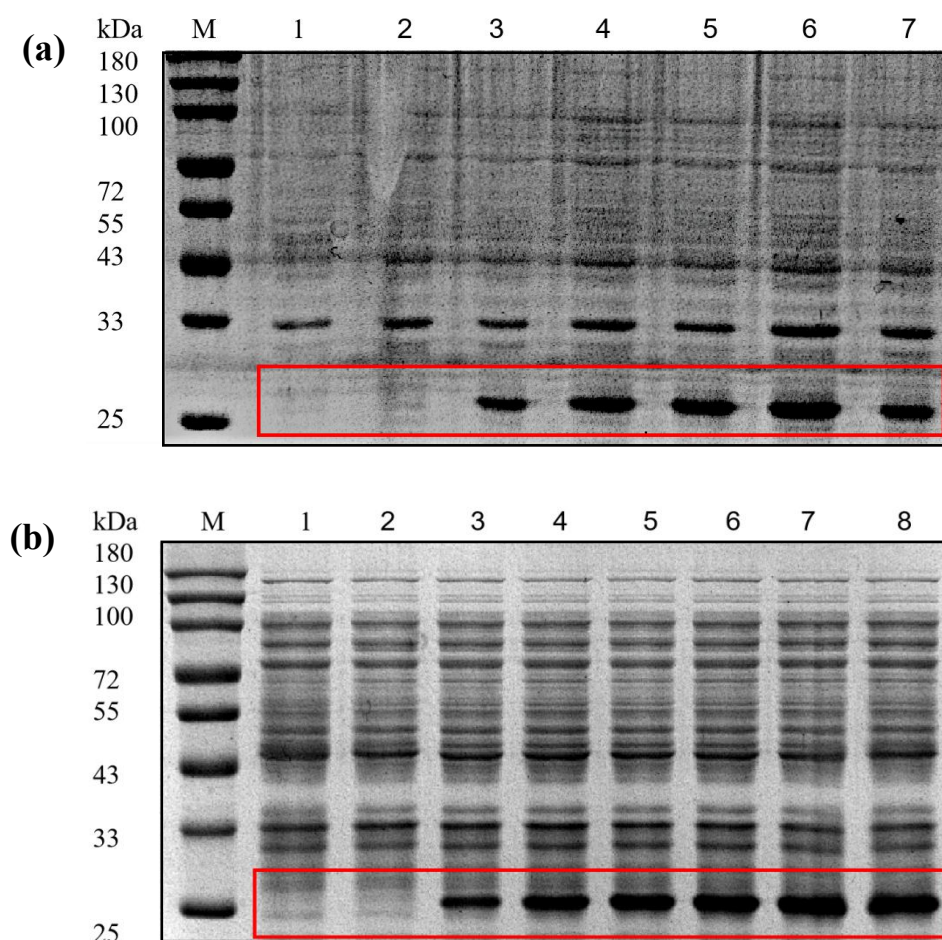


图 3-4 rShHMGBa 蛋白原核表达的 IPTG 浓度(a)和诱导时间(b)优化

(a) M:蛋白分子量标准, 1:*pET-28a(+)* 1.0 mM IPTG 诱导 6 h, 2-7:*pET-28a(+)-ShHMGBa*, 不同 IPTG 浓度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mM)诱导 6 h;

(b) M:蛋白分子量标准, 1:*pET-28a(+)* 0.8 mM IPTG 诱导 6 h, 2-8:*pET-28a(+)-ShHMGBa*, 0.8 mM IPTG 诱导不同时间(0、1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0 h)。

Fig. 3-4 Optimization of IPTG concentration (a) and induction time (b) for prokaryotic expression of rShHMGBa protein

(a) M: Protein Marker, 1: *pET-28a(+)* 1.0 mM IPTG induction for 6 h, 2-7: *pET-28a(+)-ShHMGBa*, different IPTG concentrations(0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mM) induction for 6 h;

(b) M: Protein Marker, 1: *pET-28a(+)* 0.8 mM IPTG 诱导 6 h, 2-8:*pET-28a(+)-ShHMGBa*, 0.8 mM IPTG induction for different times(0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0 h).

3.2.2 rShHMGBa 蛋白的分离纯化及鉴定

对 *pET-28a(+)-ShHMGBa* 表达菌大量扩增培养，并以最佳诱导条件诱导 rShHMGBa 蛋白表达，利用镍柱亲和层析技术对可溶性重组蛋白进行分离纯化，使用不同浓度的咪唑溶液进行蛋白洗脱收集，结果如图 3-5 所示，经 SDS-PAGE 电泳检测，在 100 mM 咪唑溶液中收集得到 rShHMGBa 蛋白。将重组蛋白溶液用截留分子量为 10 KD 的超滤管进行浓缩，并根据碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒获得的 BSA 蛋白标曲，如图 3-6 所示，测得浓缩后的 rShHMGBa 蛋白溶液浓度为 7.6 mg/mL，之后冷冻干燥保存于 -80℃。

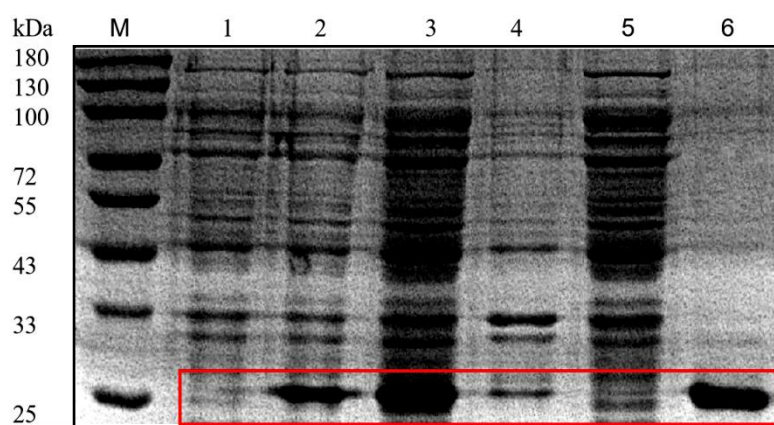


图 3-5 rShHMGBa 蛋白的分离纯化

M: 蛋白分子量标准, 1: *pET-28a(+)* 0.8 mM IPTG 诱导 9 h, 2: *pET-28a(+)-ShHMGBa* 0.8 mM IPTG 诱导 9 h, 3: 破碎后菌液上清, 4: 破碎后菌液沉淀, 5: 穿透液, 6: 100 mM 咪唑洗脱液。

Fig. 3-5 Isolation and purification of rShHMGBa protein

M: Protein Marker, 1: *pET-28a(+)* 0.8 mM IPTG induction for 9 h, 2: *pET-28a(+)-ShHMGBa* 0.8 mM IPTG induction for 9 h, 3: Crushed bacterial liquid supernatant, 4: Crushed bacterial precipitate, 5: Penetrating liquid, 6: 100 mM Imidazole eluent.

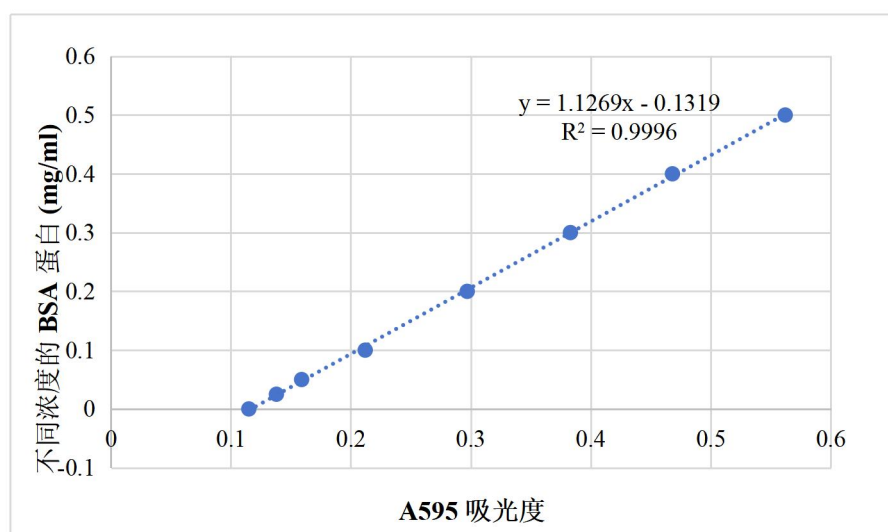


图 3-6 BSA 标准曲线

Fig. 3-6 BSA standard curve

对纯化的重组蛋白进一步鉴定，分别使用兔抗 6×His 多克隆抗体和兔抗 anti-ShHMGBa 多克隆抗体进行一抗孵育，结果如图 3-7 所示，分离纯化的蛋白大小约为 26 KD，且含 His 标签，是目的 rShHMGBa 蛋白。

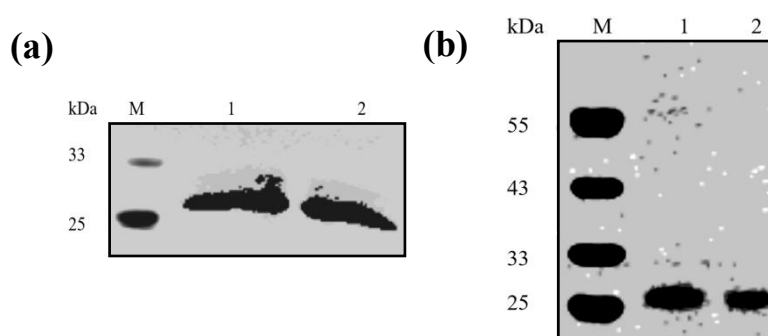


图 3-7 rShHMGBa 蛋白 Western-blot 检测

(a) 6×His 多克隆抗体，M：蛋白分子量标准，1,2:rShHMGBa 蛋白(0.1 mg/mL,10 μL)；

(b) 兔抗 anti-ShHMGBa 多克隆抗体，M：蛋白分子量标准，1,2:rShHMGBa 蛋白(0.1 mg/mL,5 μL,2 μL)。

Fig. 3-7 Western blot detection of rShHMGBa protein

(a) 6×His polyclonal antibody, M: Protein Marker, 1, 2: rShHMGBa protein(0.1 mg/mL, 10 μL)；

(b) Rabbit anti-ShHMGBa polyclonal antibody, M: Protein Marker, 1, 2: rShHMGBa protein(0.1 mg/mL, 5 μL,2 μL).

3.2.3 rShHMGBa 蛋白的活性检测

为了检测 DNA 结合能力, 将纯化的 rShHMGBa 蛋白、热变性的 rSsHMGBa 蛋白或 PBS 与 *ShHMGBa* DNA 片段或 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 质粒 DNA 孵育。孵育后, 对蛋白质-DNA 复合物进行电泳。结果如图 3-8 (a)、(b) 所示, rShHMGBa 蛋白可以呈剂量依赖性地延缓 *ShHMGBa* DNA 或 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 质粒 DNA 的迁移, 但相比之下, rShHMGBa 蛋白对 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 质粒 DNA 的结合活性更强, 如图 3-8 (c) 所示。而用热变性 rShHMGBa 蛋白或 PBS 孵育对 DNA 迁移没有阻滞作用。

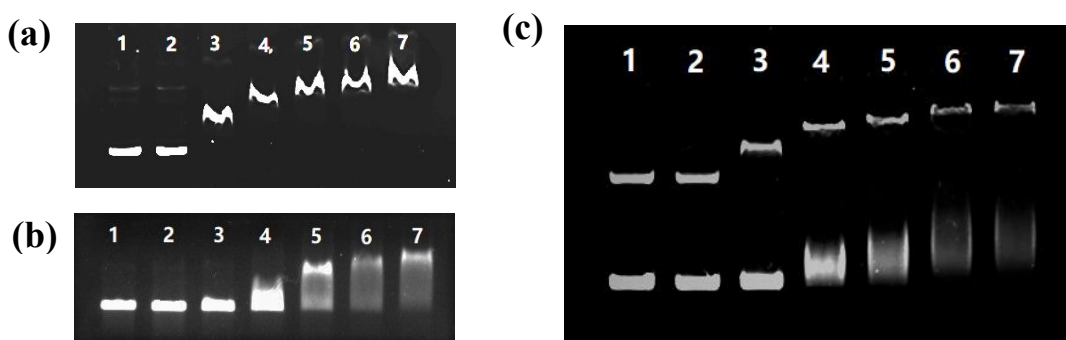


图 3-8 rShHMGBa 蛋白与 DNA 的结合

(a) rShHMGBa 蛋白与 *ShHMGBa* DNA 片段的结合;

(b) rShHMGBa 蛋白与 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 质粒 DNA 的结合;

(c) rShHMGBa 蛋白与 *ShHMGBa* DNA 片段和 *pMDTM19-T-ShHMGBa* 质粒 DNA 的结合;

1: PBS, 2: 热变性 rShHMGBa 蛋白(1 mg/mL, 1.0 μL), 3-7: rShHMGBa 蛋白(1 mg/mL, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μL), 20 μL 体系, 室温孵育 1 h, 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

Fig. 3-8 Binding of rShHMGBa protein to DNA

(a) Binding of rShHMGBa protein to *ShHMGBa* DNA fragments;

(b) Binding of rShHMGBa protein to *pMDTM19-T-ShHMGBa* plasmid DNA;

(c) Binding of rShHMGBa protein to *ShHMGBa* DNA fragments and *pMDTM19-T-ShHMGBa* plasmid DNA;

1: PBS, 2: Heat denatured rShHMGBa protein (1 mg/mL, 1.0 μL), 3-7: rShHMGBa protein (1 mg/mL, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μL), twenty μL system, incubated at room temperature for 1 hour, 1% agarose gel electrophoresis.

采用抑菌圈法检测 rShHMGBa 蛋白对细菌的抑菌效果, 结果表如图 3-9 所示, rShHMGBa 蛋白无论对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌, 还是革兰氏阴性菌大肠杆菌都无明显抑菌活性。

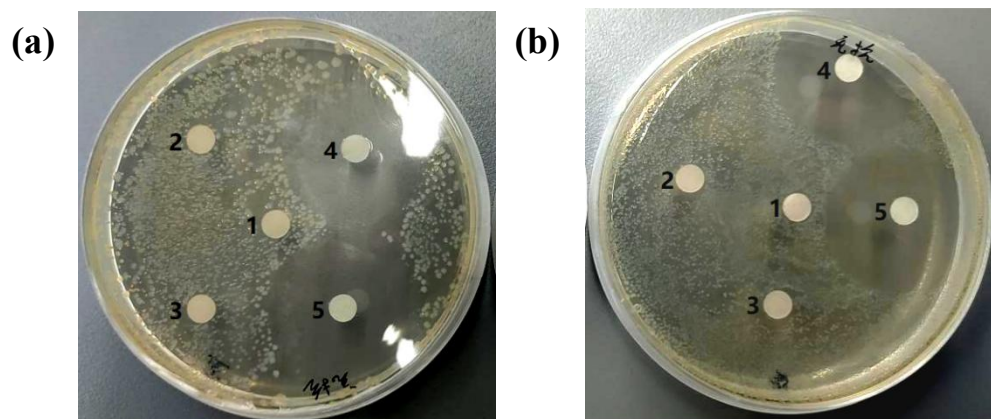


图 3-9 rShHMGBa 蛋白对金黄色葡萄球菌(a)和大肠杆菌(b)的抑菌效果

1: PBS, 2, 3: rShHMGBa 蛋白(7.6 mg/mL, 10 μ L), 4, 5: 卡那霉素 (50 mg/mL, 2 μ L)。

Fig. 3-9 Bacteriostatic effect of rShHMGBa protein on *Staphylococcus aureus*(a) and *Escherichia coli*(b)

1: PBS, 2, 3: rShHMGBa protein (7.6 mg/mL, 10 μ L), 4, 5: Kana (50 mg/mL, 2 μ L).

3.3 讨论

3.3.1 rShHMGBa 蛋白的表达及纯化

据报道，真核来源的天然 HMGB1 蛋白与原核来源的重组 HMGB1 蛋白在体外具有相似的生物活性^[99]。原核表达系统最为常见，且大肠杆菌有遗传背景清晰、表达量高和产物相对简单等优点，故本研究中我们使用大肠杆菌表达系统来表达溪蟹 ShHMGBa 蛋白。而据文献报道 HMGB1 具有抗菌活性，原核表达载体的选择对蛋白表达有明显影响^[100]。故本实验，为使目的基因表达，合适的载体很关键。基于以上的蛋白功能特点以及前期实验经验，选择了 DH-5 α 克隆菌和 PET-28a(+) 表达载体。首先，PET-28a(+) 载体具有 T7 强启动子，可以有效表达对某些具有抑菌活性的蛋白。该表达系统只有在添加 IPTG 诱导后，宿主菌才会表达 T7 RNA 聚合酶，控制目的蛋白表达。故即使在表达的目的蛋白有“毒性”，也不会宿主菌的生长造成太大影响。其次 PET-28a(+) 质粒含有标签肽 (6 $\times$ His-tag)，有利于蛋白诱导后的纯化与鉴定。同时标签肽小，对蛋白功能影响较小。

也有研究表明，诱导时间和 IPTG 浓度在原核表达系统中，对重组蛋白表达有较大影响^[101]。本实验中，对融合蛋白的 IPTG 诱导浓度和诱导时间进行了优化，最佳

诱导条件为 0.8 mM IPTG 诱导 9.0 h。由于 IPTG 具有一定的毒性，浓度太高会影响宿主细胞代谢，从而降低蛋白表达量，浓度太低甚至无法诱导蛋白表达。而诱导时间过长，宿主菌可能因达到死亡期死亡，反而导致诱导的蛋白被蛋白酶降解，从而影响表达量^[102]。因为融合蛋白含有 6×His-tag 标签，且可溶于水，故选取 Ni²⁺-NTA 亲和层析系统对其进行纯化。Ni²⁺-NTA 螯合物可与含 His 标签的融合蛋白特异性结合且可大量结合，但易受螯合剂干扰，因此，为避免 EDTA、EGTA 和 DTT 等螯合剂对洗脱的干扰，本实验蛋白洗脱液选取咪唑^[103]。而由于蛋白自身结构和生物活性的不同，需探究适合的咪唑浓度高效获取纯度更高目的蛋白。本实验采用 20 mM 和 50 mM 咪唑对弱结合蛋白和杂蛋白进行洗脱后，最后使用 100 mM 咪唑成功将目的蛋白 rShHMGBa 纯化，免疫印迹结果鉴定为目的蛋白。结果表明，本实验成功获得溪蟹 ShHMGBa 体外纯化蛋白，为进一步研究溪蟹 ShHMGBa 蛋白的功能以及在先天免疫 Toll-Dorsal 信号通路中发挥的作用提供了基础。

3.3.2 rShHMGBa 蛋白的活性分析

核 HMGB1 作为 DNA 结合和弯曲调节因子，可以非特异性的结合 DNA，且在核转录因子与 DNA 的结合和功能实现起关键作用^[40]。本实验通过凝胶阻滞实验发现溪蟹 rShHMGBa 重组蛋白具有 DNA 结合活性，可以以剂量依赖性地延缓 DNA 在核酸凝胶中的迁移速率。HMGB 家族的所有蛋白都对具有各种结构异常的 DNA 区域具有非常高的亲和力和选择性^[64, 65]。这也解释了溪蟹 rShHMGBa 重组蛋白对质粒 DNA 的结合活性更强这一现象。2002 年 Cecilia K. 等从健康学龄前儿童扁桃体分离出一种从未发现的能抑制多种细菌生长的蛋白质，经反相高效液相色谱法、氨基酸序列比对分析等实验确定该蛋白质为 HMGB1^[104]。2006 年龚薇证明酸性尾端对人 HMGB1 抗菌活性的发挥至关重要^[100]。同时发现小鼠重组 HMGB1 蛋白与人重组 HMGB1 蛋白具有相同的抗菌活性，并且酸性尾端对小鼠 HMGB1 抗菌活性的发挥也至关重要^[100]。同样，太平洋牡蛎重组 HMGB1 蛋白对细菌也有明显的抑菌活性^[93]。但本实验通过对纯化的溪蟹 rShHMGBa 重组蛋白进行抑菌活性分析，并未检测到抑菌活性。猜测可能是在原核表达过程中对抗菌活性发挥至关作用的酸性尾突变或者蛋白折叠错误，从而影响蛋白活性。总之，我们成功利用原核表达系统表达并纯化了溪蟹 rShHMGBa 重组蛋白，且具有 DNA 结合活性，但并无抑菌活性。

Chapter Tree Prokaryotic expression, protein purification, and functional study of ShHMGBa in *Sinopotamon henanense*

Abstract: This experiment used the ORF region of the *ShHMGBa* gene in *Sinopotamon henanense* as a template to construct a prokaryotic expression vector *pET-28a (+)* - *ShHMGBa*, and transformed it into a BL21 (DE3) competent expression strain. The rShHMGBa fusion protein in Henan Huaxi crab was successfully induced and purified, and its protein function was analyzed. SDS-PAGE gel electrophoresis showed that the size of soluble rShHMGBa protein was about 26 KD, and the optimal induction conditions were 37 °C、200 rpm、0.8 mM IPTG induction for 9.0 h. Soluble recombinant proteins were isolated and purified using nickel column affinity chromatography technology. Protein elution was performed using different concentrations of imidazole solution, and a large amount of rShHMGBa protein was successfully collected in a 100 mM imidazole solution. Afterwards, a protein solution with a concentration of 7.6 mg/mL rShHMGBa was concentrated using an ultrafiltration tube with a molecular weight of 10 KD. The solution was freeze-dried and stored at -80 °C. Western Blot test showed that the purified protein contained His tag. The DNA binding activity and antibacterial activity of rShHMGBa protein were detected by gel block test and inhibition zone test. It was found that rShHMGBa protein delayed the migration rate of DNA in a dose-dependent manner, and had stronger binding activity to plasmid DNA. But it does not have direct antibacterial activity. This experiment lays a theoretical foundation for further studying the protein function of HMGB1 and its role in crustaceans.

Keywords: *Sinopotamon henanense*; ShHMGBa protein; Prokaryotic expression; Protein purification; Gel retardation

第四章 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 对镉暴露的应答以及对核转录因子 *ShDorsal* 的影响

摘要：使用不同浓度镉对河南华溪蟹 (*Sinopotamon henanense*) 进行了镉暴露实验, 并对不同时间暴露后的肝胰腺、鳃和肠组织进行了 *ShHMGBa* 基因表达量分析。其中镉浓度设置为 14.5 mg/L (1/16 LC_{50})、29 mg/L (1/8 LC_{50}) 和 58 mg/L (1/4 LC_{50}) $CdCl_2$ 以及一个空白对照组 (control), 并在镉暴露 1 d、3 d 和 5 d 取肝胰腺、鳃和肠组织构建 cDNA 文库。实时荧光定量 PCR 结果分析表明, 镉处理后, 溪蟹 *ShHMGBa* 基因在鳃、肝胰腺和肠组织中表达量均有明显变化, 且受镉处理浓度和时间影响, 表达量随着镉浓度和暴露时间的增加和延长出现先升后降的趋势。三个组织相比, 鳃和肝胰腺组织对镉胁迫效应的响应较快, 而肠组织响应较慢。通过免疫荧光技术, 对镉胁迫 1 d 后的血细胞和肝胰腺组织中的 *ShHMGBa* 蛋白定位进行了检测。结果显示, 正常生理条件下, *ShHMGBa* 蛋白主要定位在血细胞和肝胰腺组织细胞核中。而在镉胁迫处理 1 d 后会致 *ShHMGBa* 蛋白由细胞核向细胞质大量移位。另外, 通过对溪蟹进行 r*ShHMGBa* 蛋白注射 12 h 后, 明显观察到血细胞 *ShDorsal* 蛋白的核移位, 说明 *ShHMGBa* 蛋白可激活 Toll-Dorsal 信号通路, 表明 *ShHMGBa* 蛋白对镉胁迫有应答, 且在先天免疫系统中发挥重要作用。

关键词：河南华溪蟹；实时荧光定量 PCR；免疫荧光；Toll-Dorsal 信号通路；镉

镉作为一种有毒重金属, 会通过细胞膜上 Ca^{2+} 通道在细胞内积累, 引起氧化应激, 或激活免疫细胞中的信号途径^[10, 11]。据报道镉可通过激活核因子 κB (NF- κB) 和丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 途径, 并诱导炎症标记物和介质的上调^[12, 13]。而高迁移率蛋白 1 (HMGB1) 是一种典型的报警蛋白和 DAMP 分子, 它们在稳态过程中具有特定的细胞内任务, 但在响应危险信号时释放会促进炎症, 作为关键的 DAMP 起作用。HMGB1 与细胞分化、增殖、死亡、抗菌防御、组织再生和肿瘤发生有关^[35]。HMGB1 作为一种多功能蛋白, 这些功能取决于其亚细胞定位、分子结合伴侣和氧化还原状态, 且在不同的刺激下发挥不同的生物学效应。已知, HMGB1 在细菌、真菌和病毒等病原表达, 在无脊椎动物先天免疫防御系统中发挥关键作用, 且对细菌有直接抑制

作用，对抗菌防御系统也极其重要^[81, 93, 100]。本实验通过对河南华溪蟹（*S. henanense*）进行镉胁迫处理，对 HMGBa 蛋白在溪蟹应对镉胁迫中发挥的作用以及在细胞中的定位进行了研究。同时还对 HMGBa 蛋白对先天免疫通路的激活作用进行了探究。本实验为 HMG 家族蛋白在无脊椎动物先天免疫系统中的功能研究提供了基础，同时也为甲壳动物应对重金属污染和绿色养殖提供新的依据。

4.1 材料与方法

4.1.1 实验材料

4.1.1.1 实验动物

参见第二章 2.1.1.1。

4.1.1.2 主要实验试剂

二甲苯、95%酒精、甲醇购自中国国药集团有限公司，FITC, Goat Anti-Rabbit IgG 购自亚科因生物技术有限公司，4%组织固定液、抗荧光衰减封片剂、Triton-100、载玻片、盖玻片均购自索莱宝科技有限公司，FITC, Goat Anti-Rabbit IgG 购自亚科因生物技术有限公司。

4.1.1.3 主要实验设备

参见第二章 2.1.1.3。

4.1.1.4 抗体

参见第三章 3.1.1.4。

4.1.2 实验方法

4.1.2.1 不同浓度镉胁迫处理河南华溪蟹

随机选取 80 只大小相近、活泼、完整的溪蟹用于不同浓度镉处理。镉浓度为 14.5 mg/L（1/16 LC₅₀）、29 mg/L（1/8 LC₅₀）、58 mg/L（1/4 LC₅₀）以及对照组，每组各放 20 只蟹。分别在镉胁迫第 1 d、第 3 d 和第 5 d 同一时间进行取材，取适量肝胰腺、鳃和肠组织置于含 1 mL RNAiso Plus 溶液的离心管中，存放-80℃冰箱，用于提取总 RNA。另抽取血细胞与部分肝胰腺置于含 1 mL 4%组织固定液的离心管中固定，4℃过夜。

4.1.2.2 河南华溪蟹肝胰腺组织石蜡切片制备

- (1) 将肝胰腺组织从组织固定液中取出，放入包埋盒中；
- (2) 再将肝胰腺组织进行梯度脱水处理；
- (3) 再将肝胰腺组织进行透明处理；
- (4) 再进行浸蜡处理，分别浸泡；
- (5) 取处理好的肝胰腺组织，用液体石蜡进行包埋，待自然晾干即可。

4.1.2.3 总 RNA 的提取与 cDNA 文库构建

将存于-80℃的镉胁迫处理后的肝胰腺、鳃、肠组织取处进行总 RNA 提取，并反转成 cDNA，具体操作步骤同第二章 2.1.2.8.

4.1.2.4 qPCR 检测镉胁迫后 *ShHMGBa* 基因的表达

通过实时荧光定量检测镉胁迫后，溪蟹 *ShHMGBa* 基因在肝胰腺、鳃和肠组织中的表达量变化，具体操作步骤同第二章 2.1.2.9。

4.1.2.5 免疫荧光检测镉胁迫后 *ShHMGBa* 蛋白核质分布

1) *ShHMGBa* 蛋白肝胰腺组织免疫荧光定位

- (1) 调整切片机切片厚度为 5 μm ，切片先用展片机展开，载玻片捞取晾干后，与 65℃烘烤。
- (2) 取烤干的玻片进行脱蜡处理。
- (3) 再进行复水处理，之后 PBS 冲洗 3 次。
- (4) 玻片置于柠檬酸盐缓冲液中，微波炉高温修复 20 min，冷却后 PBS 冲洗 3 次。
- (5) 用免疫组化笔圈出组织，滴加通透剂，室温通透 20 min。PBS 冲洗 3 次。
- (6) 用 3% H_2O_2 ，室温避光，处理 10 min，PBS 冲洗 3 次。
- (7) 10%的山羊血清室温封闭 1 h。
- (8) 滤纸吸干封闭液，滴加一抗（2%的山羊血清 1:800 稀释 *ShHMGBa* 兔抗阳性血清与阴性血清），4℃过夜孵育。
- (9) 依次使用 PBST 和 PBS 清洗玻片各 3 次。
- (10) 滴加二抗（1:800 稀释），室温避光孵育 1 h。
- (11) PBS 清洗三次，滴加含 DAPI 的抗荧光衰减封片剂，封片后荧光显微镜观察。

2) *ShHMGBa* 蛋白肝血细胞免疫荧光定位

(1) 血细胞用装有 0.5 mL 4%多聚甲醛溶液的 1 mL 注射器,在溪蟹最后一对附肢基节处等量抽取,4℃,固定 30 min。离心收集沉淀,再用 50 μ L 灭菌 PBS 重悬细胞,滴加 10 μ L 于载玻片上,推片制得血涂片。

(2) 血细胞免疫荧光定位操作同肝胰腺组织免疫荧光定位。

4.1.2.6 *rShHMGBa* 蛋白注射模型构建及 *ShDorsal* 蛋白核质分布

随机选取只 12 只大小相近,且活力形态较好的溪蟹,分为对照组与处理组,组 6 只。处理组取 *rShHMGBa* 蛋白粉末,用灭菌 PBS 稀释,按照每 g 体重 1 μ g 在溪蟹最后一对附肢基节处进行蛋白注射,对照组注射 100 μ L 灭菌 PBS,分别在蛋白注射后 6 h 和 12 h 进行血细胞抽取,制作血涂片,并进行 *ShDorsal* 蛋白免疫荧光定位。具体操作步骤同 4.1.2.5。

4.1.3 数理统计与分析

参见第二章 2.1.3。

4.2 结果

4.2.1 镉胁迫后 *ShHMGBa* 的表达和定位情况

4.2.1.1 镉胁迫后 *ShHMGBa* 基因的表达模式

镉处理后,溪蟹 *ShHMGBa* 基因表达量有明显变化,且受镉处理浓度和时间影响,在不同组织中表达模式略有差异。如图 4-1 (a) 所示,在鳃组织中,镉处理 1 d,实验组 *ShHMGBa* mRNA 表达量与对照组相比都有升高,且 Cd^{2+} 浓度为 29 mg/L 和 58 mg/L 组显著升高 ($P<0.05$),镉处理 3 d 和 5 d,实验组只有 Cd^{2+} 浓度为 14.5 mg/L 组 *ShHMGBa* mRNA 表达量极显著升高 ($P<0.01$),其他组则无显著性。如图 4-1 (b) 所示,在肝胰腺组织中,镉处理 1 d,全部实验组 *ShHMGBa* mRNA 表达量相比之对照组而言都有显著性的升高 ($P<0.05$),其中镉暴露 3 d 的溪蟹,只有 Cd^{2+} 浓度为 14.5 mg/L 实验组显著升高 ($P<0.05$),其他组有升高,但无显著性,镉处理 5 d, Cd^{2+} 浓度为 29 mg/L 和 58 mg/L 组 *ShHMGBa* mRNA 表达量反而降低,且显著降低 ($P<0.05$)。如图 4-1 (c) 所示,在肠组织中,镉处理 3 d 后, Cd^{2+} 浓度为 29 mg/L 实验组 *ShHMGBa* mRNA 表达量才极显著升高 ($P<0.01$),镉处理 5 d,实验组

ShHMGBa mRNA 表达量都有升高,其中 Cd^{2+} 浓度 14.5 mg/L 组极显著升高($P<0.01$), Cd^{2+} 浓度 29 mg/L 组显著升高($P<0.05$)。

在不同组织中,溪蟹 *ShHMGBa* 基因的表达量整体呈现一种,短时间内,高浓度处理组表达量显著升高;长时间后,低浓度处理组表达量升高,高浓度处理表达量反而降低的趋势。且三个组织相比,鳃和肝胰腺组织对镉胁迫效应的响应较快,而肠组织响应较慢。

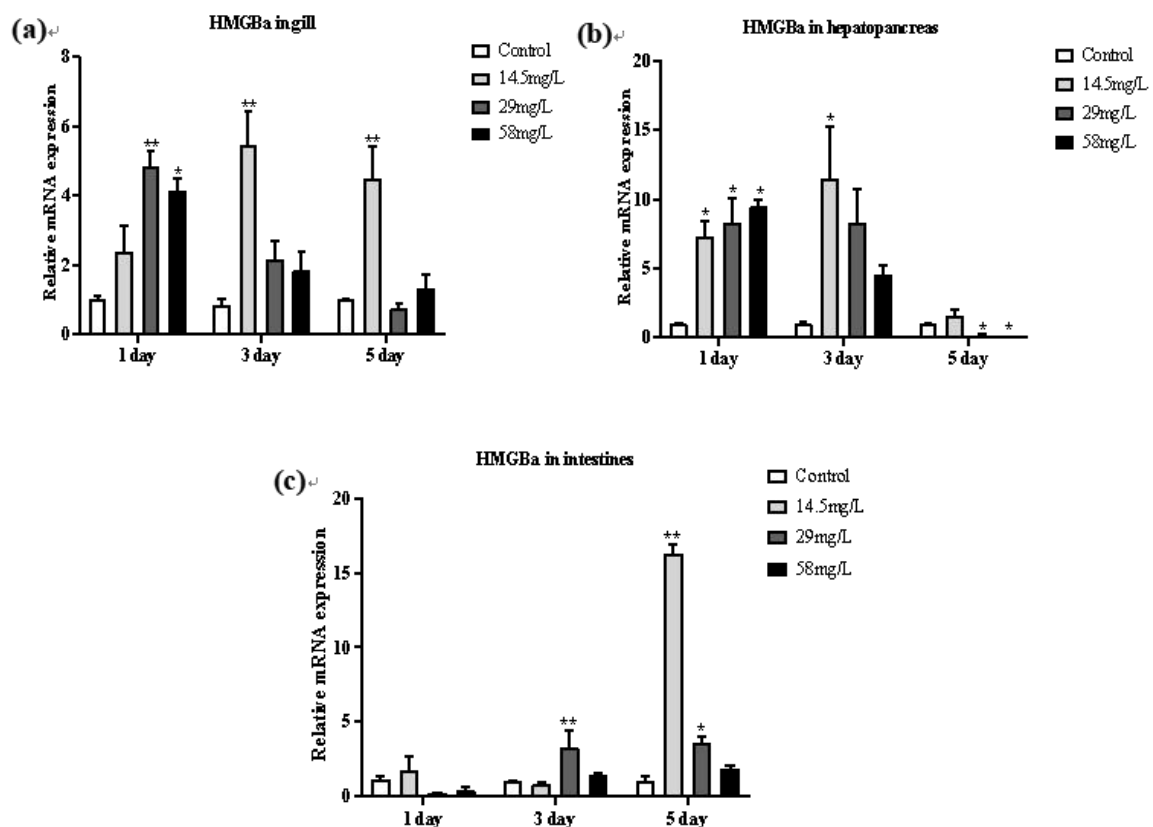


图 4-1 镉胁迫后 *ShHMGBa* 基因的表达量变化

(a) 鳃, (b), 肝胰腺, (c) 肠 (* $P<0.05$ ** $P<0.01$)

Fig. 4-1 Changes in the expression level of *ShHMGBa* gene after cadmium stress

(a) gill, (b) hepatopancreas, (c) intestines(* $P<0.05$ ** $P<0.01$)

4.2.1.2 镉胁迫后 *ShHMGBa* 蛋白分布情况

不同浓度镉处理 1 d 后 *ShHMGBa* 蛋白在血细胞中的定位发生了改变,结果如图 4-2 (a2) 所示,为 *ShHMGBa* 兔抗阴性血清,说明抗体可靠,如图 4-2 (b2) 所示,对照组 *ShHMGBa* 蛋白在血细胞核和质中均有分布,主要分布在细胞核中。 Cd^{2+} 浓度

为 14.5 mg/L 处理组，如图 4-2（c2）所示，细胞质内 ShHMGBa 蛋白明显增多。 Cd^{2+} 浓度为 29 mg/L 和 58 mg/L 处理组，如图 4-2（d2）和（e2）所示，ShHMGBa 蛋白主要分布在细胞质中。

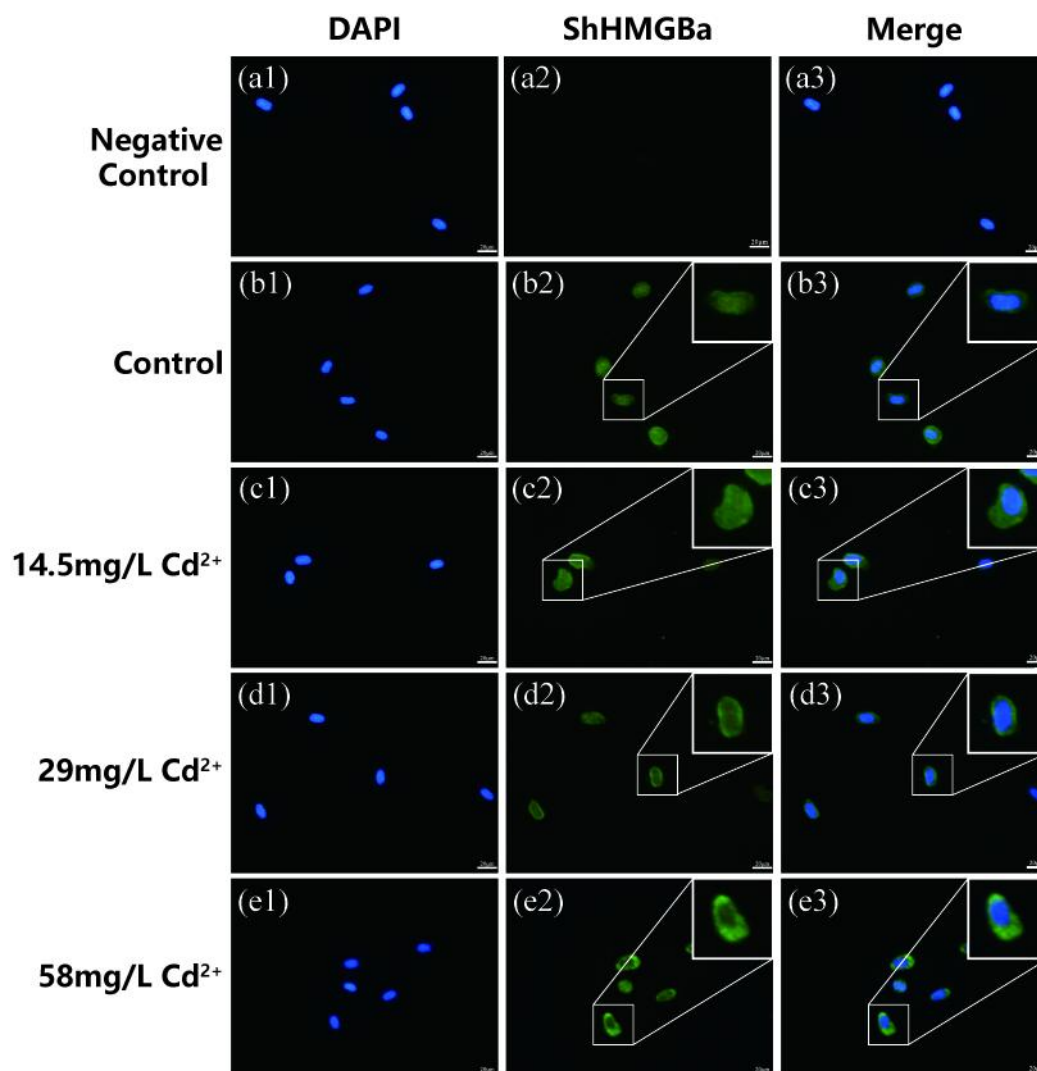


图 4-2 镉胁迫后 ShHMGBa 蛋白在血细胞中的定位

不同浓度镉胁迫 1 d，标尺=20 μm

Fig. 4-2 Localization of ShHMGBa protein in hemocytes after cadmium stress

Different concentrations of cadmium stress for 1 day, scale bar= 20 μm

不同浓度镉处理 1 d 后 ShHMGBa 蛋白在肝胰腺组织中的定位与血细胞相似，结果如图 4-3（a2）所示，对照组 ShHMGBa 蛋白定位在细胞核中。 Cd^{2+} 浓度为 14.5 mg/L 处理组，如图 4-3（b2）所示，ShHMGBa 蛋白定位在细胞核与细胞质中。 Cd^{2+} 浓度为 29 mg/L 处理组，如图 4-3（c2）所示，ShHMGBa 蛋白定位细胞质中。 Cd^{2+} 浓度

为 58 mg/L 处理组，如图 4-3（d2）所示，ShHMGBa 蛋白定位细胞核中。说明，镉胁迫处理会导致溪蟹 ShHMGBa 蛋白由细胞核向细胞质移位。

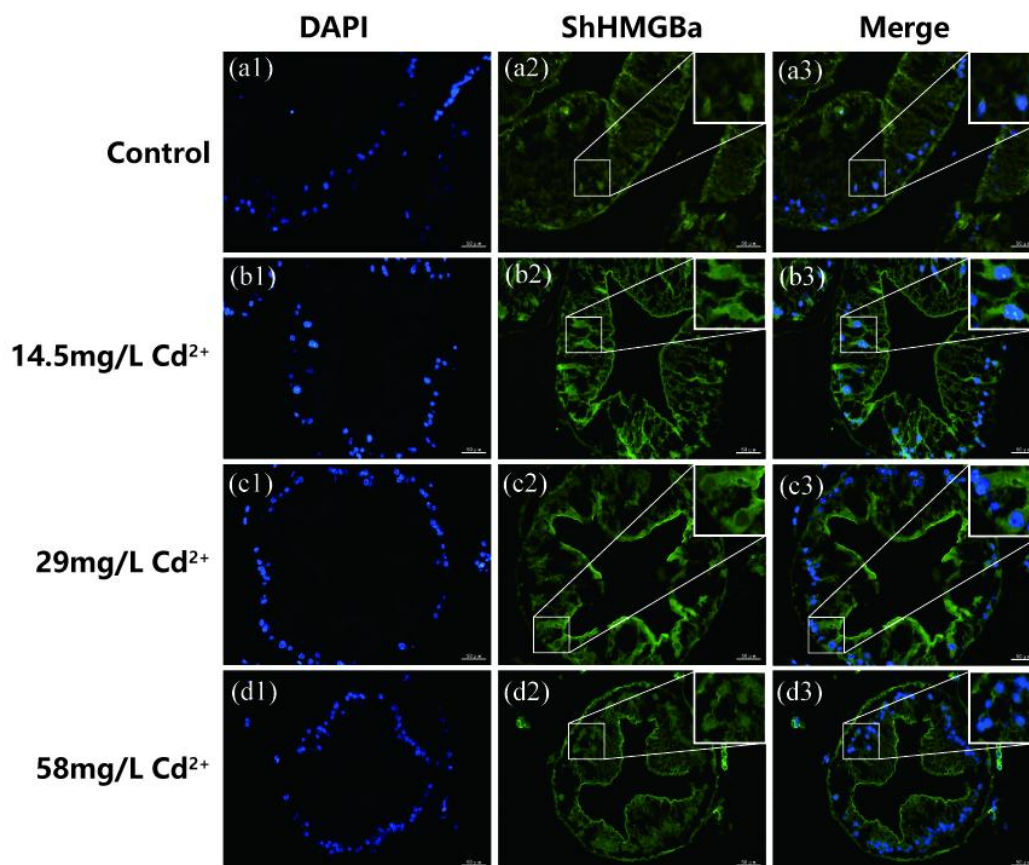


图 4-3 镉胁迫后 ShHMGBa 蛋白在肝胰腺组织中的定位

不同浓度镉胁迫 1 天，标尺=50 μ m

Fig. 4-3 Localization of ShHMGBa protein in hepatopancreas after cadmium stress

Different concentrations of cadmium stress for 1 day, scale bar= 50 μ m

4.2.2 rShHMGBa 蛋白注射后 ShDorsal 蛋白分布变化

在对溪蟹进行 rShHMGBa 蛋白注射 12 h 后，可以明显观察到 ShDorsal 蛋白的核移位，结果如图 4-4（a2）所示，为 ShDorsal 兔抗阴性血清，说明抗体可靠。对照组，结果如图 4-4（b2）所示，ShDorsal 蛋白定位在细胞质中。注射 rShHMGBa 蛋白 12 h 后，结果如图 4-4（c2）所示，ShDorsal 蛋白定位在细胞质和细胞核中。

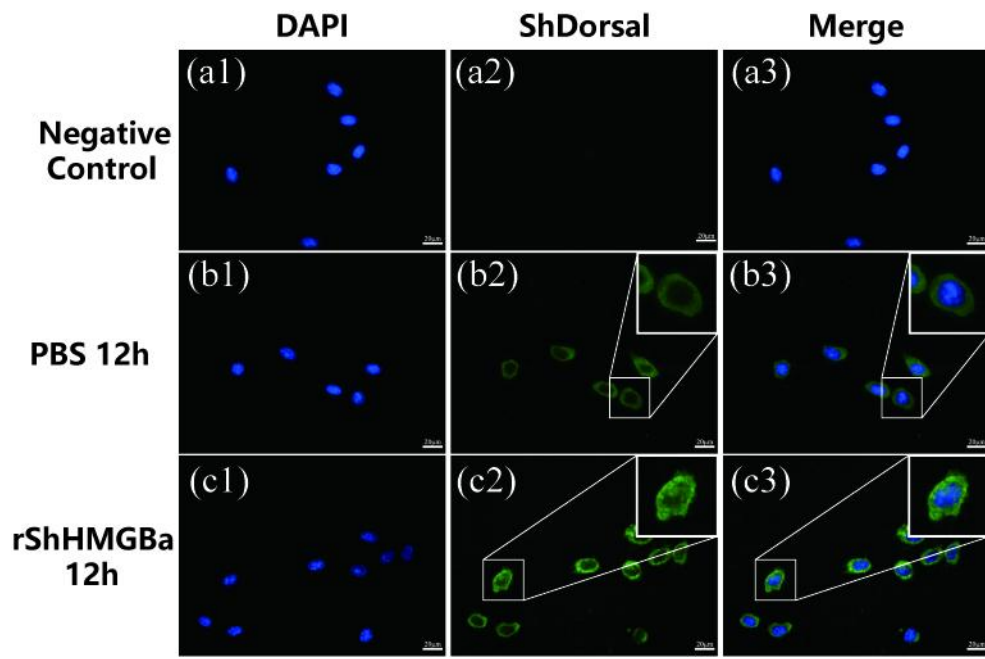


图 4-4 *rShHMGBa* 蛋白注射后 *ShDorsal* 蛋白在血细胞中的定位

标尺=20 μm

Fig. 4-4 Localization of *ShDorsal* protein in hemocytes after injection of *rShHMGBa* protein

scale bar= 20 μm

4.3 讨论

4.3.1 河南华溪蟹 *ShHMGBa* 基因对镉暴露的应答

镉（Cd）是一种环境和工业污染物，随着人类活动，大量的的镉被释放到环境中^[4]。甲壳动物由于营底栖生活，更易接触污染，镉污染通过胃肠道、鳃和皮肤进入体内大量蓄积。一般来说，肝胰腺是主要的生物蓄积器官，同时也是解毒器官，而鳃由于直接接触也容易积累重金属^[29]。镉诱导细胞损伤和致癌的最重要机制之一是氧化应激^[2, 9]。同时，细胞凋亡（程序性细胞死亡）也是是镉毒性的一个重要特征。Wang 等对溪蟹的研究发现，随着镉暴露时间的延长，活性氧（ROS）和脂质过氧化（LPO）水平增加，从而导致氧化应激^[105]。TUNEL 试验和透射电镜（TEM）结果显示，镉处理后的鳃细胞出现凋亡特征，之后逐渐出现上皮细胞坏死和炎症反应^[105]。本实验检测了溪蟹在镉暴露后 *ShHMGBa* 基因的表达量变化，结果发现镉暴露会引起溪蟹 *ShHMGBa* 基因的上调，提示 *ShHMGBa* 基因对镉胁迫有应答。同时发现当镉

暴露 5 d 后, 高浓度暴露组肝胰腺中 *ShHMGBa* 基因表达量下调, 这可能是高浓度镉对先天免疫防御系统造成了损伤。而肠对镉胁迫的响应最慢, 也说明镉在鳃和肝胰腺组织中最先蓄积。

另外, 通过对 *ShHMGBa* 蛋白在肝胰腺组织和血细胞中的定位也可以对其在镉应答中发挥的作用进行一些说明。首先, 正常生理情况下, *ShHMGBa* 蛋白主要定位在细胞核中, 主要发挥其在核内作用。*HMGB1* 蛋白核内的作用主要包括, 与 DNA 结合参与 DNA 复制、修复和转录的 DNA 重要事件; 弯曲 DNA 促进相关核转录因子的结合调控基因表达; 以及在机体受到一定量外源性病原微生物侵害时, 将进入细胞内部环境的微生物杀死^[45, 48, 104]。这提示, 在低镉 (14.5 mg/L) 胁迫 1 d 时, *ShHMGBa* 基因在肝胰腺的大量表达, 但未全部出核, 可能是在镉胁迫早期其在细胞内调控相关基因表达, 调节细胞对镉胁迫的应答。*HMGB1* 蛋白在胞质中的主要作用是通过增加自噬、抑制细胞凋亡和调节线粒体功能参与免疫应答^[50]。中、高浓度镉导致 *ShHMGBa* 蛋白大量出核, 从核内向胞质的转移可能是在镉造成的组织损伤修复发挥作用。而镉造成的氧化应激、细胞凋亡和坏死是造成 *HMGB1* 蛋白转移的主要因素, 在细胞外发挥 DAMP 和炎症介质作用^[34, 59, 60]。*ShHMGBa* 蛋白可能还参与了镉引起的炎症反应。*HMGB1* 蛋白在黑腹果蝇、直孔扇贝和太平洋牡蛎等中充当 DAMP 分子或免疫识别分子的角色, 诱导先天免疫的发生^[38, 88, 93]。但以往的研究都是 *HMGB1* 蛋白对细菌和病毒的应答, 本实验则是针对 *HMGB1* 蛋白对重金属胁迫的应答, 研究其潜在作用。

4.3.2 r*ShHMGBa* 蛋白对核转录因子 *ShDorsal* 的影响

胞外的 *HMGB1* 蛋白作为 DAMP 分子, 可激活先天免疫的发生^[38, 88, 89]。*Chen* 等发现凡纳滨对虾中 *HMGBa* 和 *HMGBb* 基因都可与 *Dorsal* 基因相互作用^[81]。而孙雪君通过敲低日本对虾 *Toll6* 基因, 发现胞外的 *HMGBa* 促进 *Dorsal* 向核移位的功能被抑制, 同时抗菌肽的表达也被抑制, 表明胞外的 *HMGBa* 可以通过 *Toll6* 受体, 引起下游信号转导, 促进 *Dorsal* 向核移位, 促进抗菌肽的表达, 从而发挥先天免疫功能^[91]。本实验通过溪蟹 r*ShHMGBa* 蛋白注射模型的构建, 研究 *ShHMGBa* 蛋白在溪蟹先天免疫中的作用。r*ShHMGBa* 蛋白注射 12h 后, 可以明显观察到 *ShDorsal* 蛋白的核移位。*ShDorsal* 蛋白的入核可以直接调控 arasin-like、alf6、c-lys、crustin 抗菌肽的表达^[95]。说明

ShHMGBa 蛋白可以作为一个 DAMP 分子激活溪蟹 Toll-Dorsal 信号通路，ShHMGBa 蛋白对溪蟹先天免疫防御系统的激活有重要作用，同时其在核内可能也协助核转录因子 ShDorsal 其发挥的基因调控作用。

总之，ShHMGBa 参与了溪蟹对镉胁迫的应答，且其位置的转移也可能与镉造成的氧化应激、细胞凋亡和坏死有关。且 ShHMGBa 可以作为一个 DAMP 分子激活溪蟹 Toll-Dorsal 信号通路，在溪蟹先天免疫防御系统中发挥重要的作用。

Chapter Four Response of *Sinopotamon henanense* ShHMGBa to cadmium exposure and its effect on the nuclear transcription factor

ShDorsal

Abstract: The cadmium exposure experiment was conducted on *Sinopotamon henanense* using different concentrations of cadmium, and the *ShHMGBa* gene expression levels were analyzed in the liver, pancreas, gills, and intestinal tissues after different exposure times. The cadmium concentrations were set at 14.5 mg/L (1/16 LC₅₀), 29 mg/L (1/8 LC₅₀), and 58 mg/L (1/4 LC₅₀) of CdCl₂, as well as a blank control group (control). cDNA libraries were constructed from liver, pancreas, gills, and intestinal tissues after 1, 3, and 5 days of cadmium exposure. The analysis of real-time fluorescence quantitative PCR results showed that after cadmium treatment, the expression level of the *ShHMGBa* gene in the gills, hepatopancreas, and intestinal tissues of the *S. henanense* showed significant changes, and was affected by cadmium treatment concentration and time. The expression level showed a trend of first increasing and then decreasing with the increase and extension of cadmium concentration and exposure time. Compared to the three tissues, gill and hepatopancreatic tissues respond faster to cadmium stress, while intestinal tissues respond slower. The localization of ShHMGBa protein in blood cells and liver and pancreatic tissues after 1 day of cadmium stress was detected using immunofluorescence technology. The results showed that under normal physiological conditions, the ShHMGBa protein is mainly localized in the nuclei of blood cells and liver and pancreatic tissues. After 1 day of cadmium stress treatment, ShHMGBa protein will shift significantly from the nucleus to the cytoplasm. In addition, after 12 hours of rShHMGBa protein injection into the stream crab, significant nuclear translocation of the blood cell ShDorsal protein was observed, indicating that the ShHMGBa protein can activate the Toll Dorsal signaling pathway, indicating that the ShHMGBa protein responds to cadmium stress and plays an important role in the innate immune system.

Keywords: *Sinopotamon henanense*; Quantitative real-time PCR; Immunofluorescence; Toll-Dorsal signaling pathway; Cadmium;

全文总结与今后工作展望

全文总结:

本学位论文以河南华溪蟹为材料, 克隆得到 *ShHMGBa* 基因序列全长并进行了原核表达; 研究了 *ShHMGBa* 蛋白的功能, 以及对镉胁迫的应答模式以及在溪蟹先天免疫系统中的作用。

1. 成功克隆得到溪蟹 *ShHMGBa* 基因序列全长 1016 bp, 包含 2 个 70 个氨基酸左右的 HMG 盒子结构域, 以及 C 端一个富含天冬氨酸和谷氨酸的酸性尾部结构。溪蟹 *ShHMGBa* 与无脊椎动物聚为一支。溪蟹 *ShHMGBa* 基因在肝胰腺中的表达量最高, 在肌肉中的表达量最低。

2. 成功诱导并纯化了可溶性 r*ShHMGBa* 蛋白。检测发现, r*ShHMGBa* 蛋白呈剂量依赖性地延缓 DNA 的迁移, 且对质粒 DNA 的结合活性更强。但并不具备直接的抑菌活性。

3. 镉胁迫对溪蟹 *ShHMGBa* 基因在鳃、肝胰腺和肠组织中表达量均有明显影响, 且正常生理条件下, *ShHMGBa* 蛋白主要定位在血细胞和肝胰腺组织细胞核中。镉胁迫后会导致 *ShHMGBa* 蛋白由细胞核向细胞质移位。另外, r*ShHMGBa* 蛋白可激活 Toll-Dorsal 信号通路, 在先天免疫中发挥重要作用。

综上所述, *ShHMGBa* 参与了溪蟹对镉胁迫的应答, 且 *ShHMGBa* 蛋白可以作为一个 DAMP 分子激活溪蟹 Toll-Dorsal 信号通路, 说明 *ShHMGBa* 蛋白在溪蟹先天免疫防御系统中发挥重要作用。本研究不但补充了 HMGB1 在溪蟹先天免疫防御系统中的作用, 以及镉对甲壳动物先天免疫防御系统影响的内容, 而且就 HMGB1 对镉胁迫的应答模式 and 作用机制进行了分析, 为进一步防治重金属污染和绿色养殖提供新的思路和靶标。

今后工作展望:

进一步探究 *ShHMGBa* 作为 DAMP 分子的功能, 以及对细菌、真菌和病毒等外源刺激物的应答模式 and 作用机制。另外, *ShHMGBa* 蛋白激活 Toll-Dorsal 信号通路的受体尚不明确。

参考文献

- [1]Wang R, Sang P, Guo Y, et al. Cadmium in food: Source, distribution and removal [J]. Food chemistry, 2023, 405(Pt A): 134666.
- [2]Lener M R, Reszka E, Marciniak W, et al. Blood cadmium levels as a marker for early lung cancer detection [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2021, 64: 126682.
- [3]Tian J, Li Z, Wang L, et al. Metabolic signatures for safety assessment of low-level cadmium exposure on human osteoblast-like cells [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 207: 111257.
- [4]Genchi G, Sinicropi M S, Lauria G, et al. The effects of cadmium toxicity [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(11): 3782.
- [5]胡紫茹. “痛痛病”的幕后凶手[J]. 农村青少年科学探究, 2023(5): 36-36.
- [6]Waalkes M P. Cadmium carcinogenesis in review [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2000, 79(1-4): 241-4.
- [7]Mirkov I, Aleksandrov A P, Ninkov M, et al. Immunotoxicology of cadmium: Cells of the immune system as targets and effectors of cadmium toxicity [J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 149: 112026.
- [8]Knoell D L, Wyatt T A. The adverse impact of cadmium on immune function and lung host defense [J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2021, 115: 70-6.
- [9]Kitamura M, Hiramatsu N. The oxidative stress: endoplasmic reticulum stress axis in cadmium toxicity [J]. Biometals, 2010, 23(5): 941-50.
- [10]Hemdan N Y A, Emmrich F, Sack U, et al. The in vitro immune modulation by cadmium depends on the way of cell activation [J]. Toxicology, 2006, 222(1-2): 37-45.
- [11]Rani A, Kumar A, Lal A, et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review [J]. International Journal of Environmental Health Research, 2014, 24(4): 378-99.
- [12]Misra U K, Gawdi G, Akabani G, et al. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: The role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms [J]. Cellular Signalling, 2002, 14(4): 327-40.

- [13]Olszowski T, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, et al. Pro-inflammatory properties of cadmium [J]. Acta Biochimica Polonica, 2012, 59(4): 475-82.
- [14]Yuan Y, Zhang Y, Zhao S, et al. Cadmium-induced apoptosis in neuronal cells is mediated by Fas/FasL-mediated mitochondrial apoptotic signaling pathway [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 8837.
- [15]Ghajari H, Hosseini S A, Farsi S. The effect of endurance training along with cadmium consumption on *Bcl-2* and *Bax* gene expressions in heart tissue of rats [J]. Annals of Military and Health Sciences Research, 2019, In Press(In Press).
- [16]Zhou T, Jia X D, Chapin R E, et al. Cadmium at a non-toxic dose alters gene expression in mouse testes [J]. Toxicology Letters, 2004, 154(3): 191-200.
- [17]Zhu Q, Li X, Ge R-S. Toxicological effects of cadmium on mammalian testis [J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 527.
- [18]Cullen J T, Maldonado M T. Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment [J]. Metal ions in life sciences, 2013, 11: 31-62.
- [19]Chavez E, He Z L, Stoffella P J, et al. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador [J]. Science of the Total Environment, 2015, 533: 205-14.
- [20]Duggan R E, Lipscomb G Q. Dietary intake of pesticide chemicals in the United States (II), June 1966--April 1968 [J]. Pesticides monitoring journal, 1969, 2(4): 153-62.
- [21]Mahjoub M, Fadlaoui S, El Maadoudi M, et al. Mercury, lead, and cadmium in the muscles of five fish species from the mechraa-hammadi dam in morocco and health risks for their consumers [J]. Journal of toxicology, 2021, 2021: 8865869.
- [22]Mannino D M, Holguin F, Greves H M, et al. Urinary cadmium levels predict lower lung function in current and former smokers: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey [J]. Thorax, 2004, 59(3): 194-8.
- [23]Jarup L, Akesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009, 238(3): 201-8.
- [24]Abedi A-S, Nasser E, Esfarjani F, et al. A systematic review and meta-analysis of lead and cadmium concentrations in cow milk in Iran and human health risk assessment [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27(10): 10147-59.

[25]Annabi-Trabelsi N, Guermazi W, Karam Q, et al. Concentrations of trace metals in phytoplankton and zooplankton in the Gulf of Gabes, Tunisia [J]. Marine Pollution Bulletin, 2021, 168: 112392.

[26]Mok J S, Yoo H D, Kim P H, et al. Bioaccumulation of heavy metals in oysters from the southern coast of Korea: Assessment of potential risk to human health [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2015, 94(6): 749-55.

[27]Karbassi A R , Bayati I, Moattar F. Origin and chemical partitioning of heavy metals in riverbed sediments [J]. International Journal of Environmental Science & Technology, 2006, 3(1): 35-42.

[28]Shakir S K, Azizullah A, Murad W, et al. Toxic metal pollution in Pakistan and its possible risks to public health [J] Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2017, 242: 1-60.

[29]Cogun H Y, Firat O, Aytekin T, et al. Heavy Metals in the Blue Crab (*Callinectes sapidus*) in Mersin Bay, Turkey [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2017, 98(6): 824-9.

[30]Baki M A, Hossain M M, Akter J, et al. Concentration of heavy metals in seafood (fishes, shrimp, lobster and crabs) and human health assessment in Saint Martin Island, Bangladesh [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 159: 153-63.

[31]Tang L, Hamid Y, Zehra A, et al. Mechanisms of water regime effects on uptake of cadmium and nitrate by two ecotypes of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk.) in contaminated soil [J]. Chemosphere, 2020, 246: 125798.

[32]Das S, Tseng L-C, Chou C, et al. Effects of cadmium exposure on antioxidant enzymes and histological changes in the *Mud shrimp* *Austinoegbia edulis* (Crustacea: Decapoda) [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(8): 7752-62.

[33]Wu H, Li Y, Lang X, et al. Bioaccumulation, morphological changes, and induction of metallothionein gene expression in the digestive system of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* after exposure to cadmium [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(15): 11585-94.

[34]Zhu Q-H, Zhou Z-K, Tu D-D, et al. Effect of cadmium exposure on hepatopancreas and gills of the estuary mud crab (*Scylla paramamosain*):

Histopathological changes and expression characterization of stress response genes [J]. Aquatic Toxicology, 2018, 195: 1-7.

[35]Kang R, Chen R, Zhang Q, et al. HMGB1 in health and disease [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2014, 40: 1-116.

[36]Murphy F V, Churchill M E A. Nonsequence-specific DNA recognition: a structural perspective [J]. Structure with Folding & Design, 2000, 8(4): R83-R9.

[37]Agresti A, Bianchi M E. HMGB proteins and gene expression [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2003, 13(2): 170-8.

[38]Wang M, Wang L, Guo Y, et al. A high mobility group box 1 (*HMGB1*) gene from *Chlamys farreri* and the DNA-binding ability and pro-inflammatory activity of its recombinant protein [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(2): 393-400.

[39]Catena R, Escoffier E, Caron C, et al. HMGB4, a novel member of the HMGB family, is preferentially expressed in the mouse testis and localizes to the basal pole of elongating spermatids [J]. Biology of Reproduction, 2009, 80(2): 358-66.

[40]Stros M. HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Gen Regulatory Mechanisms, 2010, 1799(1-2): 101-13.

[41]Sessa L, Bianchi M E. The evolution of high mobility group box (HMGB) chromatin proteins in multicellular animals [J]. Gene, 2007, 387(1-2): 133-40.

[42]Bianchi M E, Falciola L, Ferrari S, et al. The DNA binding site of HMGB1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins [J]. Embo Journal, 1992, 11(3): 1055-63.

[43]Lee S-A, Kwak M S, Kim S, et al. The role of high mobility group box 1 in innate immunity [J]. Yonsei Medical Journal, 2014, 55(5): 1165-76.

[44]Gong W, Li Y, Chao F, et al. Amino acid residues 201-205 in C-terminal acidic tail region plays a crucial role in antibacterial activity of HMGB1 [J]. Journal of Biomedical Science, 2009, 16(1): 83.

[45]Livesey K M, Kang R, Vernon P, et al. p53/HMGB1 complexes regulate autophagy and apoptosis [J]. Cancer Research, 2012, 72(8): 1996-2005.

[46]Li J H, Kokkola R, Tabibzadeh S, et al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1 [J]. Molecular Medicine, 2003, 9(1-2): 37-45.

[47]Stros M, Kucirek M, Sani S A, et al. HMGB1-mediated DNA bending: Distinct roles in increasing p53 binding to DNA and the transactivation of p53-responsive gene promoters [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 2018, 1861(3): 200-10.

[48]Boonyaratanakornkit V, Melvin V, Prendergast P, et al. High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding in vitro and transcriptional activity in mammalian cells [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 18(8): 4471-87.

[49]Creagh-Brown B C, Quinlan G J, Evans T W, et al. The RAGE axis in systemic inflammation, acute lung injury and myocardial dysfunction: an important therapeutic target? [J]. *Intensive Care Medicine*, 2010, 36(10): 1644-56.

[50]Huebener P, Gwak G Y, Pradere J P, et al. High-mobility group box 1 is dispensable for autophagy, mitochondrial quality control, and organ function in vivo [J]. *Cell metabolism*, 2014, 19(3): 539-47.

[51]Rivera Vargas T, Apetoh L. Danger signals: Chemotherapy enhancers? [J]. *Immunological reviews*, 2017, 280(1): 175-93.

[52]Müller S, Ronfani L, Bianchi M E. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function [J]. *Journal of internal medicine*, 2004, 255(3): 332-43.

[53]Tang Y, Zhao X, Antoine D, et al. Regulation of posttranslational modifications of HMGB1 during immune responses [J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2016, 24(12): 620-34.

[54]Kwak M S, Kim H S, Lee B, et al. Immunological Significance of HMGB1 Post-Translational Modification and Redox Biology [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1189.

[55]Rapoport B L, Steel H C, Theron A J, et al. High Mobility Group Box 1 in Human Cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1664.

[56]Raucci A, Di Maggio S, Scavello F, et al. The Janus face of HMGB1 in heart disease: a necessary update [J]. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2019, 76(2): 211-29.

- [57]Pace E, Di Vincenzo S, Ferraro M, et al. Carbocysteine counteracts the effects of cigarette smoke on cell growth and on the SIRT1/FoxO3 axis in bronchial epithelial cells [J]. *Experimental Gerontology*, 2016, 81: 119-28.
- [58]Pace E, Di Vincenzo S, Ferraro M, et al. Effects of beclomethasone and carbocysteine in histone acetylation/deacetylation processes of bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke [J]. *European Respiratory Journal*, 2016, 48(suppl 60): PA3990.
- [59]Scaffidi P, Misteli T, Bianchi M E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 191-5.
- [60]Jiang W, Bell C W, Pisetsky D S. The relationship between apoptosis and high-mobility group protein 1 release from murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide or polyinosinic-polycytidylic acid [J]. *Journal of Immunology*, 2007, 178(10): 6495-503.
- [61]Schiller M, Heyder P, Ziegler S, et al. During apoptosis HMGB1 is translocated into apoptotic cell-derived membraneous vesicles [J]. *Autoimmunity*, 2013, 46(5): 342-6.
- [62]Chikhirzhina E, Starkova T, Beljajev A, et al. Functional diversity of non-histone chromosomal protein HMGB1 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 1-29.
- [63]Chikhirzhina E V, Starkova T Y, Polyanichko A M J B. The role of linker histones in chromatin structural organization. 2. Interaction with DNA and nuclear proteins [J]. 2020, 65(2): 202-12.
- [64]Jung Y W, Lippard S J. Nature of full-length HMGB1 binding to cisplatin-modified DNA [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(9): 2664-71.
- [65]Totsingan F, Bell A J, Jr. Interaction of HMG proteins and H1 with hybrid PNA-DNA junctions [J]. *Protein Science*, 2013, 22(11): 1552-62.
- [66]Polianichko A M, Vorob'ev V I, Chikhirzhina E V. The structure of the complexes of DNA with nonhistone chromosomal protein HMGB1 and the histone H1 in the presence of manganese ions. II. Vibrational circular dichroism spectroscopy [J]. *Molekuliarnaia biologii*, 2013, 47(2): 338-46.

[67]Cato L, Stott K, Watson M, et al. The interaction of HMGB1 and linker histones occurs through their acidic and basic tails [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 384(5): 1262-72.

[68]Guo C N, Shah R D, Dukor R K, et al. Enantiomeric excess determination by Fourier transform near-infrared vibrational circular dichroism spectroscopy: Simulation of real-time process monitoring [J]. *Applied Spectroscopy*, 2005, 59(9): 1114-24.

[69]Polyanichko A, Chikhirzhina E. Supramolecular organization of the complexes of DNA with chromosomal proteins HMGB1 and H1 [J]. *Advances in Biomedical Spectroscopy*, 2013, 7: 185-190.

[70]Stott K, Tang G S F, Lee K-B, et al. Structure of a complex of tandem HMG boxes and DNA [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 360(1): 90-104.

[71]Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, et al. The lack of chromosomal protein HMG1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice [J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(3): 276-80.

[72]Andersson U, Yang H, Harris H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells [J]. *Seminars in Immunology*, 2018, 38(C): 40-8.

[73]Li B, Peng X, Li H, et al. The performance of the alarmin HMGB1 in pediatric diseases: From lab to clinic [J]. *Immunity Inflammation and Disease*, 2021, 9(1): 8-30.

[74]Aziz M, Brenner M, Wang P. Extracellular CIRP (eCIRP) and inflammation [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2019, 106(1): 133-46.

[75]Krysko O, Aaes T L, Bachert C, et al. Many faces of DAMPs in cancer therapy [J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4(5): e631.

[76]Romani M, Rodman T C, Vidali G, et al. Serological analysis of species specificity in the high mobility group chromosomal proteins [J]. *The Journal of biological chemistry*, 1979, 254(8): 2918-22.

[77]Hrithik M T H, Ahmed S, Kim Y. Damage signal induced by *Bacillus thuringiensis* infection triggers immune responses via a DAMP molecule in lepidopteran insect [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2023, 139: 104559.

- [78]Ahmed S, Sajjadian S M, Kim Y. HMGB1-like dorsal switch protein 1 triggers a damage signal in mosquito gut to activate dual oxidase via eicosanoids [J]. *Journal of Innate Immunity*, 2022, 14(6): 657-72.
- [79]Yanai H, Ban T, Taniguchi T. High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity [J]. *Trends in Immunology*, 2012, 33(12): 633-40.
- [80]Choi H W, Manohar M, Manosalva P, et al. Activation of plant innate immunity by extracellular high mobility group box 3 and its inhibition by salicylic acid [J]. *Plos Pathogens*, 2016, 12(3): e1005518.
- [81]Chen Y-H, Jia X-T, Huang X-D, et al. Two *Litopenaeus vannamei* HMGB proteins interact with transcription factors LvSTAT and LvDorsal to activate the promoter of white spot syndrome virus immediate-early gene ie1 [J]. *Molecular Immunology*, 2011, 48(5): 793-9.
- [82]Wahid A, Chen W, Wang X, et al. High-mobility group box 1 serves as an inflammation driver of cardiovascular disease [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 139: 111555.
- [83]D'agostino G, Artinger M, Locati M, et al. β -Arrestin1 and β -Arrestin2 are required to support the activity of the CXCL12/HMGB1 heterocomplex on CXCR4 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 550824.
- [84]Aulin C, Lassacher T, Palmblad K, et al. Early stage blockade of the alarmin HMGB1 reduces cartilage destruction in experimental OA [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2020, 28(5): 698-707.
- [85]Akashi-Takamura S, Miyake K. TLR accessory molecules [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2008, 20(4): 420-5.
- [86]Li W, Deng M, Loughran P A, et al. LPS induces active HMGB1 release from hepatocytes into exosomes through the coordinated activities of TLR4 and Caspase-11/GSDMD signaling [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 229.
- [87]Wang Y, Du F, Hawez A, et al. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes trigger neutrophil recruitment via high-mobility group protein 1 (HMGB1)-toll-like receptors(TLR2)/TLR4 signalling [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2019, 176(17): 3350-63.

[88]Mollah M M I, Kim Y. HMGB1-like dorsal switch protein 1 of the mealworm, *Tenebrio molitor*, acts as a damage-associated molecular pattern [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2021, 107(3): e21795.

[89]Amarante A d M, Jupatanakul N, De Abreu Da Silva I C, et al. The DNA chaperone HMGB1 potentiates the transcriptional activity of Rel1A in the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 80: 32-41.

[90]张杰. 三疣梭子蟹 Toll、HMGB 家族基因在先天免疫中的功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.

[91]孙雪君. 高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 在日本囊对虾先天免疫中的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2020.

[92]Feng Q, Shao M, Han J, et al. TFAM, a potential oxidative stress biomarker used for monitoring environment pollutants in *Musca domestica* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 155: 524-34.

[93]Lv X, Yang W, Guo Z, et al. CgHMGB1 functions as a broad-spectrum recognition molecule to induce the expressions of CgIL17-5 and Cgdefh2 via MAPK or NF-KB signaling pathway in *Crassostrea gigas* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 211: 289-300.

[94]郎朗. 河南华溪蟹 ShToll1 和 ShToll3 对镉暴露和嗜水气单胞菌攻毒的免疫应答研究[D]. 太原: 山西大学, 2020.

[95]范海超. 镉对河南华溪蟹核转录因子 *ShDorsal* 基因转录调控功能的影响 [D]. 太原: 山西大学, 2023.

[96]Zhang S, Zhong J, Yang P, et al. HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2010, 3(1): 24-38.

[97]张杰, 张彩云, 赵贤亮, 等. 鱼类高迁移率族蛋白 B 的免疫学功能研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医 (下半月)*, 2022, (000-004).

[98]Müller S, Ronfani L, Bianchi M E. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function [J]. *Journal of internal medicine*, 2004, 255(3): 332-43.

- [99]Zimmermann K, Völkel D, Pable S, et al. Native Versus Recombinant High-Mobility Group B1 Proteins: Functional Activity In Vitro [J]. *Inflammation*, 2004, 28(4): 221-9.
- [100]龚薇. HMGB1 酸性尾端对其抗菌活性的影响[D]. 重庆: 第三军医大学, 2006.
- [101]李国强. 斑节对虾抗菌肽的筛选, 原核表达及活性分析[D]. 深圳: 深圳大学, 2019.
- [102]彭银辉, 蔡小辉, 熊向英, 等. 拟穴青蟹抗菌肽 *hyastatin* 基因原核表达条件的优化[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(7): 5.
- [103]李杨, 韩梅. 亲和层析技术在生物科学中的应用及发展[J]. *生命科学研究*, 2006, (01): 12-7.
- [104]Zetterström C K, Bergman T, Rynnel-Dagöö B, et al. High mobility group box chromosomal protein I (HMGB1) is an antibacterial factor produced by the human adenoid [J]. *Pediatric Research*, 2002, 52(2): 148.
- [105]Wang J, Zhang P, Shen Q, et al. The effects of cadmium exposure on the oxidative state and cell death in the gill of freshwater crab *Sinopotamon henanense* [J]. *Plos One*, 2013, 8(5): e64020.