

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2025.01.003

(L)-2- 羟基戊二酸脱氢酶的原核表达与活性鉴定 *

李俊辉¹ 王 璐² 谷 雨¹ 叶 菁^{1Δ} 袁 媛¹

(1 空军军医大学基础医学院病理学教研室 陕西 西安 710032;

2 空军军医大学第二附属医院耳鼻喉科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:构建带有 6× His 标签的大肠杆菌(L)-2- 羟基戊二酸脱氢酶(L2HGDH)的原核表达载体,并进行重组蛋白的原核表达和纯化,以及酶活性鉴定。**方法:**以 GenBank 中大肠埃希菌 K12 菌株(*Escherichia coli* strain K12)的 L2HGDH 编码基因为模板,将其克隆到 pET-28a(+)载体质粒中,在 BL21(DE3)菌中进行诱导表达,进一步采用 Ni-NTA 系统纯化 L2HGDH 蛋白,利用 SDS-PAGE 及 Western 印迹检测蛋白纯化效果。纯化的 L2HGDH 催化 (L)-2- 羟基戊二酸(L-2HG)生成 α- 酮戊二酸(α-KG),时还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)为 NADH,利用 NADH 在 340 nm 处有最大吸光度值,分析获得的大肠杆菌 L2HGDH 的酶活性,以及温度和 pH 值等对其酶活性的影响。**结果:**成功构建 pET-28a(+)-L2HGDH 原核表达质粒,并在 BL21(DE3)中获得可溶性重组蛋白,获得 L2HGDH 蛋白纯度大于 90%,且具有较高的(L)-2- 羟基戊二酸脱氢酶生物学活性。**结论:**成功原核表达并纯化 L2HGDH 重组蛋白,重组蛋白具有良好的生物学活性,为研究 L2HGDH 的功能奠定了基础。

关键词:(L)-2- 羟基戊二酸脱氢酶;原核表达;蛋白纯化;酶活性

中图分类号:R3;R34;Q554 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2025)01-19-07

(L)-2-hydroxyglutarate Dehydrogenase Expression in Prokaryotes and Determination of Enzyme Activity*

LI Jun-hui¹, WANG Lu², GU Yu¹, YE Jing^{1Δ}, YUAN Yuan¹

(1 Department of Pathology, Basic Medical Science Academy, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Department of Otolaryngology, the Second Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To construct a prokaryotic expression vector for *Escherichia coli* (L)-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (L2HGDH) incorporating a 6× His tag. Subsequently, the recombinant protein will be expressed and purified in *E. coli*, followed by the determination of the enzyme activity. **Methods:** The L2HGDH gene of the *Escherichia coli* K12 strain in GenBank was cloned into the pET-28a (+) vector plasmid and induced expression in BL21(DE3). The L2HGDH protein was purified by using the Ni-NTA system. SDS-PAGE and Western blot were employed to assess the efficiency of the protein purification. Purified L2HGDH catalyses the conversion of (L)-2-hydroxyglutaric acid (L-2HG) to α-ketoglutaric acid(α-KG) and reduces nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) to NADH. The enzymatic activity of the L2HGDH obtained from *E. coli* was analyzed by

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82170589);陕西省重点产业创新链重点项目(2019ZDLSF02-01);西京医院助推课题(XJZT24CY01)

作者简介:李俊辉(1992-),男,硕士研究生,主要研究方向:公共卫生,病理学,E-mail: lijunhui19921007@163.com

Δ 通讯作者:叶菁(1977-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:病理学,肿瘤代谢,E-mail: yejing@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2024-07-10)

using the maximum absorbance value at 340 nm, and the effects of temperature and pH value on its enzymatic activity were determined. **Results:** The prokaryotic expression plasmid pET-28a (+)-L2HGDH was successfully constructed, and the soluble recombinant protein was obtained in BL21 (DE3). The purity of the L2HGDH protein was greater than 90%, and the L2HGDH protein exhibited a high biological activity of (L)-2-hydroxyglutarate dehydrogenase. **Conclusions:** The recombinant L2HGDH protein was successfully expressed and purified in *Escherichia coli*, and the recombinant protein exhibited biological activity. This provided a foundation for further studies on the function of L2HGDH.

Key words: L2HGDH; Prokaryotic expression; Protein purification; Enzymatic activity

Chinese Library Classification (CLC): R3; R34; Q554 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2025)01-19-07

前言

在生理条件下, 线粒体产生少量的 2- 羟基戊二酸 (2-hydroxyglutarate, 2-HG), 其具有两种空间结构, 分别为 L-2-HG 和 D-2-HG。在线粒体 TCA 循环发生障碍时, 能够产生大量的 L-2-HG, 而肿瘤中的突变异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH) 能够产生 D-2HG^[1,2]。因为 D 或 L-2-HG 的结构与 α -KG 类似, 能够抑制 α -KG 依赖的双加氧酶活性, 包含 Jmjd 结构域的组蛋白去甲基化酶, 和 DNA 去甲基化酶 (TETs) 等, 导致细胞表观修饰异常, 且 L-2HG 比 D-2HG 的作用更为明显^[3-5]。

研究发现苹果酸脱氢酶 (MDH1/2) 和乳酸脱氢酶 (LDHA/C) 在缺氧条件下可以催化 α -KG 生成 L-2-HG, 并将 NADH 氧化成 NAD⁺。在机制方面, 酸性 pH 条件被认为是 L-2-HG 产生的驱动因素。酸性 pH 会产生一种质子化的 α -KG 形式, 促进 α -KG 作为替代底物, 与 LDHA 和 MDH1/2 的非特异性结合^[6]。低 pH 条件也能够抑制与 L-2-HG 向 α -KG 的代谢过程, 因此缺氧等酸性微环境中通常可见 L-2-HG 的积聚。同时, 细胞酸性 pH 中 L-2-HG 的累积, 可以导致在常氧下 HIF-1 α 的稳定和积累^[7]。此外, 细胞在低氧条件下增加 L-2-HG, 可以以调节组蛋白甲基化水平 (包括 H3K9me3) 的能力, 表明 L-2-HG 具有重要的生理作用^[8]。有研究发现, L-2-HG 可作为 T 细胞功能和炎症的调节因子, 激活 CD8⁺T 细胞, 促进肿瘤杀伤作用^[9]。L-2-HG 是连接代谢重编程、表观遗传学改变和免疫细胞效应功能的重要信号分子。

(L)-2- 羟基戊二酸脱氢酶 (L2HGDH) 是唯一已知的作用于 L-2-HG 的酶, 可将 L-2-HG 氧

化为 α -KG。因此, L2HGDH 可以防止 TCA 循环中碳部分的损失, 并防止 L-2-HG 的积累, 从而起到 "代谢物修复" 的作用^[10]。在哺乳动物中, L2HGDH 主要定位于线粒体膜, 对 L-2-HG 具有高度特异性, 并且不作用于其他 2- 羟基酸, 如 L- 乳酸, L- 苹果酸或 D-2-HG^[11]。在大肠埃希菌中, LhgD 与人类 L2HGDH 同源, 功能上相同, 可能的作用是减少在丙酸盐生长环境中形成的 L-2-HG^[12]。

(L)-2- 羟基戊二酸脱氢酶 (L2HGDH) 基因突变时, 能够导致患者脑脊液、血和尿中 L-2-HG 水平的显著升高, 是一种常染色体隐性遗传病^[13,14]。在临床上, 可以表现出智力低下、癫痫、视神经萎缩、斜视、听力减退、运动障碍等。神经病理学检查显示, 轻度皮质神经元减少, 伴有严重的神经胶质增生和海绵状改变^[15]。

因此, L2HGDH 在限制 L-2-HG 的致病性积累, 以及 L-2-HG 和 α -KG 调节的表观遗传中发挥重要功能。获得具有特异性、较高酶活性的 L2HGDH 蛋白不仅有助于认识其分子功能, 也是建立 L-2HG 检测方法的重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pET28a (+) 载体质粒、*E.coli* DH5 α 、BL21 (DE3) [自北京全式金生物技术有限公司]; 质粒小提试剂盒、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind*III [Takara 公司]; His-Tag 融合蛋白纯化试剂盒 (Ni-NTA 亲和层析法); 胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉、卡那霉素、异丙基- β -D- 硫代半乳糖苷 (IPTG)、L-2-HG、NAD⁺、微量分光光度计、His 标签抗体、山羊抗小鼠 IgG 抗体、基因扩增引物和重组质粒 DNA 测序由北京擎科生物

科技有限公司合成。

1.2 大肠杆菌 K12 菌株 LHGD 基因的克隆 (质粒构建)

大肠埃希菌中 LhgD (Gene ID: 948069) 具有典型的 L2HGDH 活性。通过美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站的局部序列比对搜索工具 (BLAST) 将大肠埃希菌 K12 菌株 LhgD (Gene ID: 948069) 与智人 L2HGDH (Gene ID: 79944) 编码序列进行对比。使用瑞士生物信息学研究所的专业蛋白质分析系统 (Expert Protein Analysis System, ExPASy) 预测分析蛋白质的生物化学性质及可溶性, 并使用对蛋白质编码序列密码子进行优化。采用使用 SnapGene 软件自行设计 LhgD mRNA 序列上下游引物, 上游引物为 5'-CGGGATCCATGTATGATTTTGTGATTATTGGC-3' 带一个 *Bam*HI 酶切位点 (划线处); 下游引物为 5'-CCCAAGCTTAATAATTTACGCCGCACAT-TCCG-3' 带一个 *Hind*III 酶切位点 (划线处), 并委托北京擎科生物科技有限公司合成, 并构建 pET28-L2HGDH 质粒。

1.3 L2HGDH 融合蛋白的原核表达和纯化

取 pET-28a (+)-L2HGDH 重组质粒 4 μ L 加入 50 μ L BL21 (DE3) 感受态细菌中, 冰上融解 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热休克 90 s, 再冰浴 3 min, 加入无抗生素 LB 培养液 800 μ L, 恒温摇床 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 条件下振荡 40 min, 8000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 保留 100 μ L 液体与沉淀混匀后均匀涂抹于卡那霉素 LB 平板中, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 12 小时。挑取单克隆菌落至含 5 mL 卡那霉素抗性 LB 培养液的摇菌管中, 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床 210 r/min 摇菌 12 小时, 取 3 mL 菌液, 使用质粒提取试剂盒获得质粒, 行 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切鉴定, 并委托北京擎科生物科技有限公司测序。

取含有 pET28a (+)-L2HGDH 的 BL21 (DE3) 菌液 5 mL 加入 1 L 含有卡那霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床 210 r/min 条件下摇菌 10 小时至对数期, 加 IPTG 至最终浓度 0.1 mmol/L, 15 $^{\circ}$ C 摇菌, 诱导表达 15、20、25 小时后分别取 1 mL 菌液, 超声破碎菌体, 分离上清液与沉淀, 行 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色。将菌液于 4 $^{\circ}$ C 条件下 4000 $\times$ g 离心 20 min 弃去上清液, 每克菌体加 3 mL 裂解缓冲液, 搅拌重悬菌液后每克菌体加入 8 μ L 50 mmol/L 苯甲基磺酰

氟 (PMSF) 和 80 μ L 10 mmol/L 溶菌酶, 于冰上搅动 20 min 后, 每克菌体加入 4 mg 脱氧胆酸, 冰上继续搅动 20 min, 悬液 37 $^{\circ}$ C 水浴, 旋转混匀待其粘稠后, 至冰上超声裂解 30 min。菌液 4 $^{\circ}$ C 条件下 10000 $\times$ g 离心 3 min, 取菌液分离上清和沉淀, 行 SDS-PAGE 电泳与考马斯亮蓝染色, 验证原核表达 L2HGDH 融合蛋白是否可溶。使用 Ni²⁺-NTA 亲和层析系统分离纯化 L2HGDH 融合蛋白, 纯化的融合蛋白经稀释后, 1:1 加入甘油于 -80 $^{\circ}$ C 保存并进行 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色。

1.4 L2HGDH 生物活性检测

L2HGDH 可以将 L-2-HG 氧化为 α -KG, 同时辅酶 NAD⁺ 转化为 NADH, NADH 在 340 nm 处有最大吸光度值, 利用检测的反应前后 340 nm 处吸光度值变化探索 L2HGDH 的最适酶活温度、pH 值, 绘制 Lineweaver-Burk 曲线并计算 L2HGDH 的酶活性及米氏常数 (K_m)。

1.4.1 温度与 pH 值对 L2HGDH 酶活性的影响 取 96 孔板, 每孔反应体系 200 μ L 中含有 100 mmol/L 的 HEPES 缓冲液, 1 mmol/L 的 NAD⁺, 9 μ g/mL 的 L2HGDH 酶液, 1 mmol/L 的 L-2-HG。设定在缓冲体系 pH 值 8.0 的条件下, 反应 30 min, 分别测定上述反应体系在温度 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C 时 340 nm 处吸光度值的变化水平。同样, 设定在温度 37 $^{\circ}$ C 的条件下, 反应 30 min, 分别测定上述反应体系在 pH 值 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 时 340 nm 处吸光度值的变化水平。L2HGDH 最高酶活性为 100%, 每个温度重复测量 3 次。

1.4.2 NADH 紫外吸光度值标准曲线的测定 使用电子天平称量 0.382 g NADH 标准品粉末至 5 mL 去离子水中, 配置成 100 mmol/L 标准液, 用 100 mmol/L 的 HEPES 缓冲液 (pH8.0) 将 NADH 标准液稀释至 50、100、200、400、500、800、1000 μ mol/L 工作浓度, 取 96 孔板, 每孔加 200 μ L NADH 工作液, 每孔重复 3 次, 测定在 340 nm 波长的吸收值, 绘制 NADH 紫外吸光值标准曲线。

1.4.3 L2HGDH 酶活性测定 将重组 L2HGDH 酶活性定义为: 测定体系 pH8.0, 反应温度 37 $^{\circ}$ C 条件下, 每分钟消耗 1 μ mol L-2-HG 生成 α -KG 的酶量为 1 个酶单位 IU。根据公式计算酶比活力 (IU/mg) = $\frac{(\Delta A \times V)}{(a \times T \times M)}$, ΔA 为变化的 OD₃₄₀,

V 为反应液体积 (mL), a 为 NADH 标准曲线系数 ($L/\mu\text{mol}$), T 为反应时间 (min), M 为酶蛋白质量 (mg)。反应体系 200 μL 中含有 100 mmol/L 的 HEPEPS 缓冲液 (pH8.0), 1 mmol/L 的 NAD^+ , 不同浓度的 L2HGDH 酶液 (3、6、9 $\mu\text{g/mL}$), 1 mmol/L 的 L-2-HG。同时设置不加 L2HGDH 酶和底物为 D-2HG 的对照组, 其他反应条件不变。取 96 孔板, 每孔加 200 μL 反应体系, 每孔重复 3 次, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应每隔 5 min 测定 340 nm 波长吸光度值的变化, 至 50 min 结束。

1.4.4 L2HGDH 酶学动力学参数的测定 在上述实验中得出的最适反应温度及 pH 值条件下, 其他反应条件不变, 测定不同浓度反应底物 L-2-HG (50、100、200、400、500、800、1000 $\mu\text{mol/L}$) 与 9 $\mu\text{g/mL}$ 的 L2HGDH 酶液的反应速率, 每组重复 3 次。记录在 30 min 内 340 nm 处吸光度值的变化水平, 根据 NADH 紫外吸光值标准曲线计算 NADH 每分钟生成速率 V, 根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 将米氏方程改写为 $\frac{1}{V} = (\frac{K_m}{V_{\max}}) \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$, $\frac{1}{V}$ 为纵坐标, 以 $\frac{1}{S}$ 为横坐标做直线回归方程, 可计算 L2HGDH 酶最大反应速度 $V_{\max}$, 米氏常数 K_m 。

2 结果

2.1 生物信息学分析

经 Blast 程序结果分析得出, 大肠埃希菌 K12 菌株 LhgD (Gene ID: 948069) 与智人 L2HGDH (Gene ID: 79944) 编码序列同源性较高, 一致性 134/337 (40%)。LhgD 序列全长 1278 bp, 编码 422 个氨基酸, ExPASy ProtParam 预测 L2HGDH 的理论分子质量 46081.91 Da, 理论等电点 pI8.66。蛋白在溶液中的不稳定指数为 38.35, 为稳定蛋白质。氨基酸中仅含有 9 个半胱氨酸, 形成二硫键的可能性较小, 脂溶指数 90.19, 亲水性平均值 -0.085, 为可溶性蛋白。使用密码子优化工具 (OPTIMIZER (urv.es)) 优化密码子适应指数 CAI (Codon Adaption Index) 优化前 0.70, 优化后 0.93。

2.2 重组质粒 pET-28a(+)-L2HGDH 的构建和序列鉴定

重组质粒 pET-28a(+)-L2HGDH 经 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切鉴定结果显示, 6647bp 重组质粒质粒中含有 5369 bp pET-28a 及 1278 bp 插入片

段, 结果符合预期 (图 1)。测序结果序列与目的基因序列一致, 证明了重组质粒 pET-28a(+)-L2HGDH 构建成功。

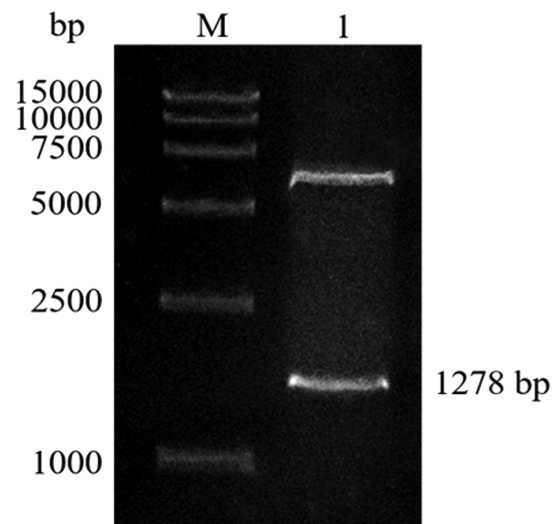


图 1 pET28a(+)-L2HGDH 重组质粒双酶切鉴定

Fig.1 The pET28a(+)-L2HGDH recombinant plasmid was identified by double enzyme digestion

Note: 1: recombinant plasmid pET28a (+) - L2HGDH digested by *Bam* I and *Hind* III; M: 15000bp DNA marker

2.3 6 $\times$ His -L2HGDH 融合蛋白的诱导表达及纯化

考马斯亮蓝染色显示, pET28a(+)-L2HGDH 菌体破碎沉淀中可见 L2HGDH 融合蛋白条带, 蛋白浓度随 IPTG 诱导时间而增加, 约 20 小时后达到最大。pET28a(+)-L2HGDH 菌体破碎上清液中也可见 L2HGDH 融合蛋白, 提示 L2HGDH 融合蛋白具有可溶性。破碎剩余菌体后 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 10000 $\times$ g 离心 3 min, 收集上清液, 采用 Ni $^{2+}$ -NAT 亲和层析系统分离纯化蛋白, 行 SDS-PAGE 电泳与考马斯亮蓝染色, 结果显示纯化后 L2HGDH 蛋白条带较单一, 含量较高, 与预测分子质量 47KD 一致, 符合预期 (图 2)。

2.4 L2HGDH 生物活性检测

2.4.1 温度与 pH 值对 L2HGDH 酶活性的影响 绘制温度对 L2HGDH 酶活性影响的曲线图, 可见 37 $^{\circ}\text{C}$ 为 L2HGDH 酶活性最适温度, 温度过低或过高都会使酶活性降低 (图 3A)。缓冲体系 pH 值对酶活性也有显著影响, 可见在 HEPES 缓冲液 pH 值 8.0 条件下, L2HGDH 酶活性最高, pH 值过低或过高都会使酶活性降低, pH 值高于 8.0 后 L2HGDH 酶活性迅速降低 (图 3B)。

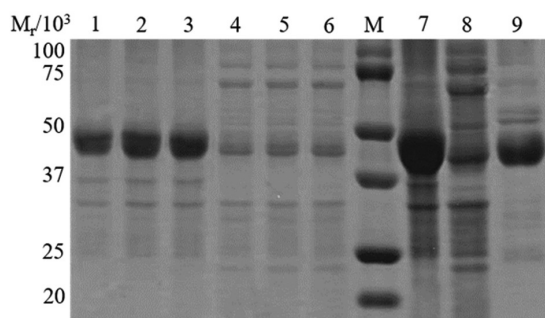


图2 L2HGDH 融合蛋白的纯化与 SDS-PAGE 分析

Fig.2 Expression analysis of the purified L2HGDH fusion protein by SDS-PAGE

Note: M: protein maker; Lane 1-3: precipitate of the whole cell lysates of BL21(DE3) harboring plasmid pET28a-L2HGDH induced by IPTG for 15 h, 20 h and 25 h; Lane 4-6: supernatant of the whole cell lysates of BL21 (DE3) harboring plasmid pET28a-L2HGDH induced by IPTG for 15 h, 20 h and 25 h; Lane 7: unpurified precipitate of the whole cell lysates; Lane 8: unpurified supernatant of the whole cell lysates; Lane 9: purified recombinant protein L2HGDH-6 × His by Ni²⁺-NTA resin.

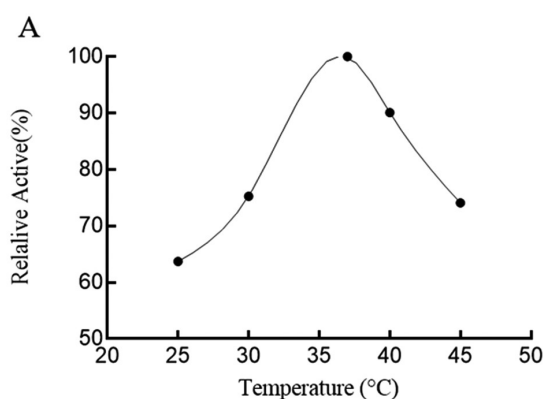


图3 A 温度对 L2HGDH 酶活性的影响

Fig.3A The effect of temperature on L2HGDH activity

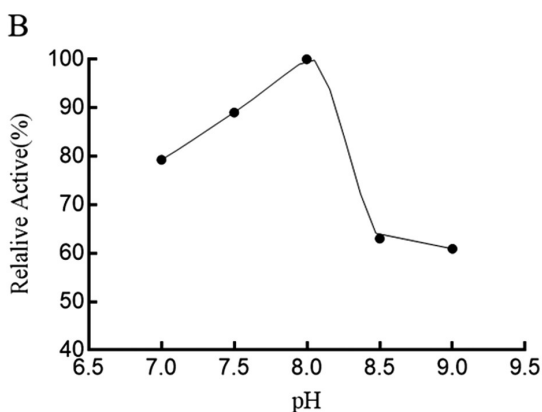


图3 B pH 值对 L2HGDH 酶活性影响

Fig.3B The effect of pH on L2HGDH activity

2.4.2 NADH 紫外吸光度值标准曲线的测定

NADH 在 340 nm 处有最大吸光度值,配置不同浓度的 NADH 工作液,以 OD_{340} 吸光度值为纵坐标, NADH 浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 为横坐标,绘制 NADH 紫外吸光值标准曲线(图 4),拟合公式为 $y=0.0013x+0.1401$ ($R^2=0.9995$)。

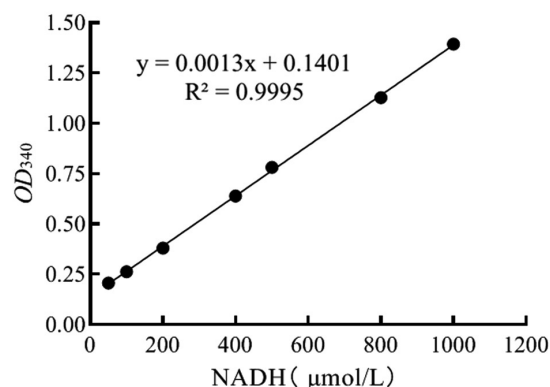


图4 NADH 紫外吸光值标准曲线

Fig.4 The standard curve of NADH

2.4.3 L2HGDH 酶活性测定 按照 1.4.3 配置反应体系,采用连续监测法,测定 340 nm 波长吸光度值,代入 2.4.2 紫外吸光度值标准曲线,计算出生成的 NADH 浓度为纵坐标,时间为横坐标,绘制 L2HGDH 酶反应活性曲线图(图 5)。可见 NADH 浓度随时间逐渐升高,无酶对照组与 D-2HG 底物组 NADH 浓度未发生变化且较为稳定,D-2HG 不与 L2HGDH 发生反应,在相同体系内,催化反应速度随 L2HGDH 酶含量增加而加快。以上说明 L2HGDH 酶可将 L-2-HG 氧化为 α -KG,同时将辅酶 NAD^+ 转化为 NADH,具有酶活性。L2HGDH 酶浓度为 $6 \mu\text{g/mL}$ 时,5 min 内 OD_{340} 值变化 0.084,根据 2.4.1NADH 标准曲线计算得出,NADH 浓度增加 $69.49 \mu\text{mol/L}$,代入 1.4.4 的酶比活计算公式可得 L2HGDH 酶比活力为 464.96 IU/mg 。

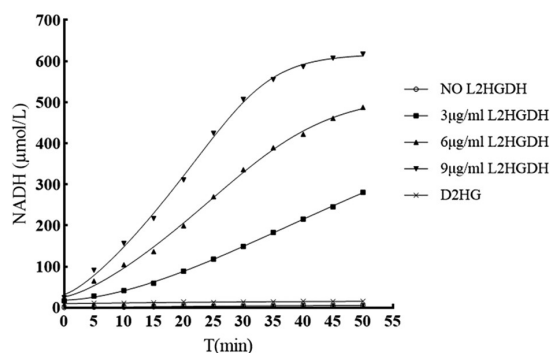


图5 L2HGDH 反应活性曲线

Fig.5 The reaction activity curve of L2HGDH

2.4.4 L2HGDH 酶学动力学参数的测定 根据 NADH 紫外吸光值标准曲线计算不同底物浓度 L-2-HG 条件下 NADH 每分钟生成速率 V , $1/V$ 为纵坐标, 以 $1/S$ 为横坐标使用 Lineweaver-Burk 双倒数法绘制双倒数曲线(图 6)。拟合公式为 $y=23.701x+0.0448$ ($R^2=0.9876$)。计算 L2HGDH 最大反应速度 $V_{\max}=22.32 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, $K_m=528.04 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。

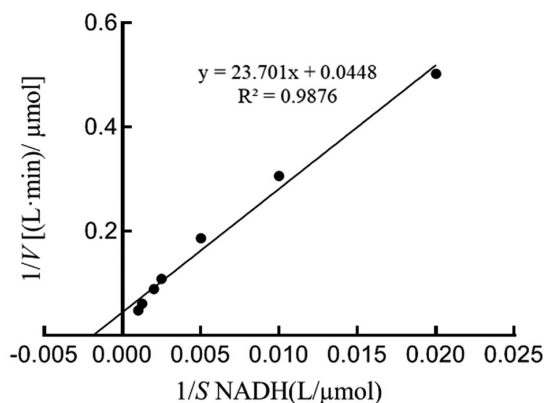


图 6 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig. 6 Lineweaver-Burk double reciprocal curve

3 讨论

(L)-2-羟基戊二酸脱氢酶(L2HGDH)是线粒体能量代谢中的重要组成部分, 酶活性减弱或失活, 可导致 L-2-HG 不能氧化成 α -KG, 并使得尿、血浆和脑脊液中 L-2-HG 水平升高, 导致神经系统功能损伤。新的研究显示, L2HGDH 还参与多种肿瘤的发生过程, 有相当一部分 L-2-HG 血症患者发展为多种类型的脑肿瘤, 包括髓母细胞瘤和胶质母细胞瘤, 提示 L2HGDH 与脑肿瘤的发生发展有密切联系^[16-18]。Shim 等发现, L2HGDH 表达降低了组蛋白的甲基化并抑制肾癌的发生^[19]。Tabata 等发现, 下调 L2HGDH 的表达增加直肠癌中的 L-2-HG 水平, 激活 mTOR-ATF4 信号传导, 从而促进了体内肿瘤生长和氨基酸代谢^[20]。Huamei He 等发现, 在心肌缺血再灌注期间, L2HGDH 缺失诱导 L-2-HG 积累, 并增强糖酵解向磷酸戊糖途径的代谢转移, 保护心肌免受损伤。L-2-HG 为清除心肌组织中的活性氧、缩小心肌梗死面积、保护心功能提供了一种新的机制^[21]。综上, L-2-HG 水平升高可导致神经系统损伤, 且已被证实缺氧或酸性 pH 条件下积累, 在肿瘤发生和减

轻氧化还原应激过程中起着至关重要的作用。

本研究成功构建 pET-28a(+)-L2HGDH 重组表达质粒, 利用 DNA 测序与双酶法切鉴定分析, 结果与预期基因序列一致。重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)行 L2HGDH 重组蛋白的诱导表达, 纯化后行 SDS-PAGE 电泳鉴定和酶活性测定。为获得具有酶活性的可溶性蛋白, 考虑大肠杆菌表达外源蛋白时, 正确折叠蛋白结构的诸多因素, 采用了低温, 低诱导剂浓度, 时间梯度诱导等策略进行原核表达^[22]。结果显示, 蛋白产物为可溶性蛋白, 但也有包涵体蛋白产生, 分子大小为 47KD 与预期相符, 可溶蛋白经纯化后, 纯度较高。纯化的 L2HGDH 重组蛋白具有良好的酶活性, 酶活性最适温度为 37℃, pH 值 8.0 条件下酶活性最高, 酶比活力为 464.96 IU/mg, 最大反应速度 $V_{\max}=22.32 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, $K_m=528.04 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。

近年来, 对线粒体小分子代谢物的研究正成为热点, L2HGDH 作为一种代谢物酶的特性外, 还参与缺氧损伤, 多种肿瘤的发生和免疫, 在肿瘤研究和临床治疗中存在巨大潜力。目前缺少 L-2-HG 酶法检测商品试剂, 且国内暂无 L2HGDH 重组蛋白制备相关研究, 所以我们研究获得具有特异性、较高酶活性的 L2HGDH 重组蛋白, 为后续制备 L-2-HG 酶法检测试剂盒, 认识其分子功能, 明确其生理和病理作用奠定了实验基础, 对相关疾病的诊断治疗均具有重要临床价值。

参考文献(References)

- [1] Ye D, Ma S, Xiong Y, et al. R-2-hydroxyglutarate as the key effector of IDH mutations promoting oncogenesis[J]. Cancer Cell, 2013, 23(3): 274-276.
- [2] Ye D, Guan KL, Xiong Y. Metabolism, Activity, and Targeting of D- and L-2-Hydroxyglutarates [J]. Trends in Cancer, 2018, 4(2): 151-165.
- [3] Fantin VR, Dang L, White D W, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate [J]. Cancer Research, 2010, 465(7300): 966.
- [4] Ansó E, S.E. Weinberg, L.P. Diebold, et al. The mitochondrial respiratory chain is essential for haematopoietic stem cell function [J]. Nature Cell Biology, 2017, 19(6): 614-625.
- [5] Xu W, H. Yang, Y. Liu, et al. Oncometabolite

- 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases [J]. Cancer Cell, 2011, 19(1): 17-30.
- [6] Intlekofer A M, R.G. Dematteo, S. Venneti, et al. Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate[J]. Cell Metabolism, 2015, 22(2): 304-311.
- [7] Nadtochiy S M, X. Schafer, D. Fu, et al. Acidic pH Is a Metabolic Switch for 2-Hydroxyglutarate Generation and Signaling [J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(38): 20188-20197.
- [8] Oldham W M, C.B. Clish, Y. Yang, et al. Hypoxia-Mediated Increases in L-2-hydroxyglutarate Coordinate the Metabolic Response to Reductive Stress [J]. Cell Metab, 2015, 22(2): 291-303.
- [9] Tyrakis P A, A. Palazon, D. Macias, et al. S-2-hydroxyglutarate regulates CD8 (+) T-lymphocyte fate[J]. Nature, 2016, 540(7632): 236-241.
- [10] Engqvist M K, C. Esser, A. Maier, et al. Mitochondrial 2-hydroxyglutarate metabolism [J]. Mitochondrion, 2014, 19 Pt B: 275-281.
- [11] Rzem R, M. Veiga-da-Cunha, G. Noel, et al. A gene encoding a putative FAD-dependent L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L-2-hydroxyglutaric aciduria [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(48): 16849-54.
- [12] Kalliri E, Mulrooney Scott B, Hausinger Robert P. Identification of *Escherichia coli* YgaF as an l-2-Hydroxyglutarate Oxidase [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(11): 3793-3798.
- [13] Steenweg M E, C. Jakobs, A. Errami, et al. An Overview of L-2-Hydroxyglutarate Dehydrogenase Gene (L2HGDH) Variants: A Genotype-Phenotype Study[J]. Human Mutation, 2010, 31(4): 380-390.
- [14] Bellad A, V.V. Holla, R. Kumari, et al. Loss of function variants in L2HGDH gene causing l-2-hydroxyglutaric aciduria [J]. Acta Neurologica Belgica, 2023, 123(6): 2315-2323.
- [15] Seijo-Martí nez M, C. Navarro, M. Castro del Río, et al. L-2-Hydroxyglutaric Aciduria: Clinical, Neuroimaging, and Neuropathological Findings [J]. Archives of Neurology, 2005, 62(4): 666-670.
- [16] Rogers R E, R.J. Deberardinis, L.J. Klesse, et al. Wilms tumor in a child with L-2-hydroxyglutaric aciduria [J]. Pediatr Dev Pathol, 2010, 13(5): 408-411.
- [17] Moroni I, M. Bugiani, L. D'Incerti, et al. L-2-hydroxyglutaric aciduria and brain malignant tumors: a predisposing condition? [J]. Neurology, 2004, 62(10): 1882-1884.
- [18] Jezek P. 2-Hydroxyglutarate in Cancer Cells [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2020, 33(13): 903-926.
- [19] Shim E H, C.B. Livi, D. Rakheja, et al. L-2-Hydroxyglutarate: an epigenetic modifier and putative oncometabolite in renal cancer [J]. Cancer Discov, 2014, 4(11): 1290-1298.
- [20] Tabata S, Y. Kojima, T. Sakamoto, et al. L-2hydroxyglutaric acid rewires amino acid metabolism in colorectal cancer via the mTOR-ATF4 axis [J]. Oncogene, 2023, 42(16): 1294-1307.
- [21] He H M, R.M. Mulhern, W.M. Oldham, et al. L-2-Hydroxyglutarate Protects Against Cardiac Injury via Metabolic Remodeling [J]. Circulation Research, 2022, 131(7): 562-579.
- [22] He H M, R.M. Mulhern, W.M. Oldham, et al. Optimization of expression conditions and determination the proteolytic activity of codon-optimized SARS-CoV-2 main protease in *Escherichia coli* [J]. Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology, 2021, 37(4): 1334-1345.