

三角褐指藻乳酸脱氢酶的原核表达及纯化鉴定

郑伊蒙[#], 段家文, 张艺, 李晨辉, 谢珍玉, 黄爱优^{*}

(海南大学 海洋生物与水产学院, 海南海口 570228 中国)

摘要: 为了探讨三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)中乳酸代谢的关键酶——乳酸脱氢酶(ptLDHA)上的乙酰化修饰位点及其在乳酰化和乙酰化交互作用中的潜在作用, 以三角褐指藻cDNA为模板克隆了ptLDHA基因序列, 并构建了原核表达载体pMBP-C-LDHA, 随后将其转入大肠杆菌BL21(DE3)中进行诱导表达。经优化, 在16℃、0.2 mmol·L⁻¹ IPTG诱导24 h条件下, ptLDHA蛋白成功表达且主要为可溶性蛋白。利用His标签进行融合蛋白的纯化, 并用ptLDHA多克隆抗体进行Western blot鉴定, 在约78 kDa处获得单一蛋白条带, 证实纯化蛋白为ptLDHA。本研究成功实现了ptLDHA在原核细胞中的表达与纯化, 为后续构建乙酰化修饰位点的定点突变及探究修饰与去修饰状态对酶活性的影响奠定了基础。

关键词: 三角褐指藻; LDHA; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: S565.1 文献标志码: A 文章编号: 1674–7054(2026)01–0136–08

郑伊蒙, 段家文, 张艺, 等. 三角褐指藻乳酸脱氢酶的原核表达及纯化鉴定[J]. 热带生物学报(中英文), 2026, 17(1): 136–143. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.20240176 CSTR: 32425.14.j.cnki.rdsxb.20240176



蛋白质的翻译后修饰(post-translational modification, PTM)是指在蛋白质翻译完成后, 一些特殊的酶(修饰酶)通过共价键将特定的功能基团或分子添加到蛋白质的一个或多个氨基酸残基上的过程^[1]。蛋白质的翻译后修饰会改变蛋白质的结构和功能, 从而在个体发育、免疫反应、细胞代谢调控等生物过程中起到重要调控作用^[2-3]。真核生物中已发现的蛋白质翻译后修饰类型多达400余种, 不同类型的蛋白质翻译后修饰之间存在交互作用(cross-talk), 即在同一蛋白质上相同或不同的位点上发生多种翻译后修饰, 共同调控复杂的生物过程^[4-5]。如Sun等^[6]的研究发现, 嗜水气单胞菌亚种(*Aeromonas hydrophila*)中的赖氨酸乙酰化和琥珀酰化可以发生在相同的赖氨酸残基上, 并在关键的生物学通路(如碳代谢和TCA循环)中共同发挥调控作用。

蛋白质的乳酰化修饰发现于2019年, 是一种由乳酸作为前体, 在修饰酶的作用下, 乳酰基团被连接到赖氨酸残基上的修饰过程。虽然发现的时

间短, 但大量的研究已表明, 乳酰化修饰在癌症、个体发育等重大疾病和细胞过程中起重要作用, 参与了碳氮代谢和能量代谢等生物过程的调控^[7-10]。蛋白质的乳酰化修饰发生在化学修饰种类最多、最丰富的蛋白质翻译后修饰位点——赖氨酸残基上^[11], 意味着其与其他蛋白质翻译后修饰类型之间可能存在竞争修饰位点的交互作用。其中, 乙酰化修饰的前体——乙酰辅酶A, 与乳酸共同来源于糖酵解过程; 研究表明, 乳酰化修饰和乙酰化修饰存在共用一套修饰酶(乙酰化酶)和去修饰酶(去乙酰化酶)的现象。因此, 推测乳酰化和乙酰化之间可能存在更紧密的交互作用^[12-13]。

蛋白质后翻译修饰与其底物浓度息息相关, 决定细胞内乳酸和乙酰辅酶A浓度的酶可能在乳酰化和乙酰化修饰中起重要作用。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)催化了丙酮酸与乳酸之间的可逆转化过程, 能够决定丙酮酸的去向, 进而决定了乳酸和乙酸辅酶A的浓度, 从而影响胞内蛋白质乳酰化和乙酰化修饰水平。本研究前



收稿日期: 2024-11-24

修回日期: 2025-01-15

基金项目: 海南大学科研启动经费项目(KYQD(ZR)20060)

*第一作者: 郑伊蒙(1999—), 男, 海南大学海洋生物与水产学院2022级硕士研究生。E-mail: zym133567@163.com

*通信作者: 黄爱优(1985—), 女, 研究员。研究方向: 微藻及微生物碳代谢。E-mail: huangaiyou08@163.com

期的研究发现, 在海洋模式生物三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin) 中, 存在蛋白质乳酰化修饰的现象, 但其乳酸脱氢酶——ptLDHA 上并没有发生乳酰化修饰^[14]; 而 Chen 等^[15]的研究表明, ptLDHA 上存在乙酰化修饰位点(K220), 但 ptLDHA 的乙酰化修饰对其酶活的影响仍未清楚。有研究表明, 人类和细菌的乳酸脱氢酶上均存在乙酰化修饰位点, 二者乳酸脱氢酶的乙酰化修饰均能够调节酶的活性, 从而调节胞内乳酸浓度^[16-17]; 因此推测, ptLDHA 的乙酰化修饰可能也能够通过酶活性的调节, 从而在三角褐指藻乳酰化和乙酰化交互中起作用。

本研究以三角褐指藻 cDNA 为模板, 克隆了 *ptLDHA* 基因序列, 构建了原核表达载体 pMBP-C-*LDHA*, 转入 BL21(DE3) 菌株中进行原核表达, 优化了诱导表达条件, 并进行 His 标签融合蛋白的纯化和鉴定; 为下一步构建其乙酰化修饰位点的定点突变; 并探究修饰和去修饰状态对其酶活的影响奠定基础, 有助于进一步揭示蛋白质翻译后修饰的交互作用在三角褐指藻代谢调控中的作用, 对拓展藻类生物学研究及相关应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 藻种 三角褐指藻取自于中国海洋大学微藻培养中心。培养基为人工海水 f/2 培养基^[18], 培养条件: 光照强度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度为 22°C , 光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗。

1.1.2 菌体与载体 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和大肠杆菌 BL21(DE3) 购于上海唯地生物技术有限公司(中国, 上海); 克隆载体 pMD-19T 购于宝日医生物技术有限公司(中国, 北京); 表达载体 pMBP-C 购于武汉森灵生物科技有限公司(中国, 武汉)。

1.1.3 试剂 植物 RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量提取试剂盒均购于 Omega Bio-Tek(美国, 诺克罗斯); 反转录试剂盒、DNA Maker DL2000、T4 DNA Ligase 均购于南京诺唯赞生物科技有限公司(中国, 南京); 限制性内切酶 BamH I、Nhe I 购于赛默飞世尔科技公司(中国, 上海); 彩色预染蛋白 maker 购于武汉博士德生物工程有限公司(中国, 武汉); Ni-IDA Agarose

6FF 购于生工生物工程股份有限公司(中国, 上海); LDHA 多克隆抗体定制于金斯瑞生物科技股份有限公司(中国, 南京); 二抗 HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG 购于上海金畔生物科技有限公司(中国, 上海); ECL 化学发光试剂盒购于爱必信生物科技有限公司(中国, 上海); 其他化学药品均为国产分析纯。

1.2 目标基因的克隆与载体构建

1.2.1 三角褐指藻 *LDHA* 基因片段克隆 提取三角褐指藻的总 RNA, 反转录为 cDNA, 以 cDNA 作为模板, 用带 BamH I、Nhe I 酶切位点的引物 *LDHA*-R 和 *LDHA*-F(表 1)进行 PCR 扩增, 获得目的基因 DNA 序列; PCR 扩增程序如下: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 15 s, 56°C 退火 15 s, 72°C 延伸 45 s, 共 35 个循环, 之后在 72°C 延伸 7 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并切胶回收目的基因片段。

表 1 本研究中使用的引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')
<i>LDHA</i> -F	<u>CGGGATCC</u> ATGGAGTTCACGACAG
	AG
<i>LDHA</i> -R	<u>CGGCTAGC</u> ACTCTCTACAGCTGGAT
	T
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
pMBP-C- <i>LDHA</i> -F	TTGACAATTAATCATCGGCTCG
pMBP-C- <i>LDHA</i> -R	ACTGGCCGTCGTTTAC

注: 下划线分别代表 BamH I 和 Nhe I 引物的酶切位点。

Note: The underlined represent the restriction sites for BamH I and Nhe I in the primers.

1.2.2 pMD-19T-*LDHA* 克隆载体的构建 采用 T4DNA Ligase 将回收的目的基因片段与克隆载体 pMD-19T 进行连接, 然后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 混合混匀, 冰浴 25 min, 42°C 热激 45 s, 冰浴 2 min, 加入 700 μL 的 LB 培养基, 放入摇床中(37°C , $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)培养 1 h, 随后离心($5\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)5 min, 弃 600 μL 上清液; 将剩余菌液混匀; 取 100 μL 菌液, 在含有 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的固体培养基上均匀涂布, 在 37°C 恒温培养箱中过夜培养; 挑取单菌落于含有

100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素的液体培养基中, 利用 M13F/M13R 引物对单一菌落进行 PCR 验证(表 1)。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 挑选条带大小符合预期的菌株, 提取质粒送生工生物工程有限公司测序。经测序确认的质粒命名为 pMD-19T-LDHA。

1.2.3 pMBP-C-LDHA 表达载体的构建 将测序确认的 pMD-19T-LDHA 质粒与原核表达载体 pMBP-C 分别以 BamH I 和 Nhe I 进行双酶切后, 回收获得酶切后的目的基因片段和 pMBP-C 空载体。随后, 利用 T4 DNA Ligase 将回收产物连接, 构建重组表达质粒。将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 随后取 100 μ L 菌液, 在 100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素的固体培养基上均匀涂布, 挑选单一菌落, 利用 pMBP-C-LDHA-F/pMBP-C-LDHA-R 引物对单一菌落 PCR 验证(表 1)。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 挑选条带大小符合预期的菌株, 提取质粒送生工生物工程有限公司测序。经测序确认的质粒命名为 pMBP-C-LDHA。

1.3 LDHA 重组蛋白的原核表达、纯化及鉴定

1.3.1 LDHA 重组蛋白的原核表达和诱导条件的优化 将 pMBP-C-LDHA 质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 命名为 pMBP-C-LDHA-BL21, 将菌液均匀涂布在含有 100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素的固体培养基上, 挑选单一菌落, 进行 PCR 验证。挑选正确的菌落接种于含有 100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素的液体培养基中, 37 °C 培养 12 h。随后, 取 10 μ L 菌液接种至 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 在 37 °C 摆床中培养, 直至菌液 OD₆₀₀≈0.6。接着, 在不同 IPTG 浓度和温度条件下诱导表达, 具体条件见表 2。诱导结束后, 取 1 mL 菌液, 12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 弃上清后加入 200 μ L 无菌水, 12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 弃上清。随后, 将菌体用 80 μ L 无菌水

表 2 不同温度和 IPTG 浓度的诱导表达条件

Tab. 2 Inducing conditions with different temperatures and IPTG concentrations

温度/ °C Temperature	诱导时间/h Inducing time	IPTG浓度/(mmol·L ⁻¹) IPTG concentration
16	24	0、0.2、0.5、1.0
30	6	0、0.2、0.5、1.0
37	4	0、0.2、0.5、1.0

重悬, 加入 20 μ L 5×蛋白上样缓冲液混匀后, 沸水浴 10 min。最后, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.3.2 LDHA 重组蛋白可溶性分析 根据探索出的 LDHA 重组蛋白的诱导最佳条件, 在 IPTG 浓度为 0.2 mmol·L⁻¹, 16 °C 24 h 条件下大量诱导 LDHA 重组蛋白的表达。将诱导后的菌液在 4 °C, 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清液, 加入 5 mL 蛋白裂解液重悬沉淀, 放入液氮中 5 min, 随后, 将冷冻后的裂解液在 4 °C 冰箱中过夜, 使样品液自然融化。将融化后的样品, 在冰水浴条件下进行超声波破碎, 设置功率为 180 w, 震杆为 2, 开关时间为 2 s 与 4 s, 持续 30 min。样品破碎后, 在 4 °C 条件下, 以 8 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 收集上清液蛋白。随后, 将离心后的包涵体蛋白加入 1 mL 缓冲液, 混匀后在水平摇床上摇动 4 h, 充分裂解包涵体蛋白。接着, 在 4 °C 条件下, 以 8 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 收集的上清即为包涵体蛋白。将收集的上清液中的可溶性蛋白和包涵体蛋白分别进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.3.3 LDHA 重组蛋白纯化 LDHA 重组蛋白主要存在于破碎菌体的上清液中, 因此, 用收集的上清液进行镍亲和层析柱的蛋白纯化。首先, 用 5 倍柱体积的结合液洗涤柱子 3 次, 然后将上清液上样, 在 4 °C 过夜; 次日, 依次使用浓度为 0、20、30、150、250 和 500 mmol·L⁻¹ 的咪唑洗脱液洗脱蛋白, 每个浓度洗脱 3 次; 收集不同咪唑浓度下洗脱的蛋白, 进行 SDS-PAGE 分析, 检测重组蛋白条带的位置, 从而确定最佳的纯化条件。

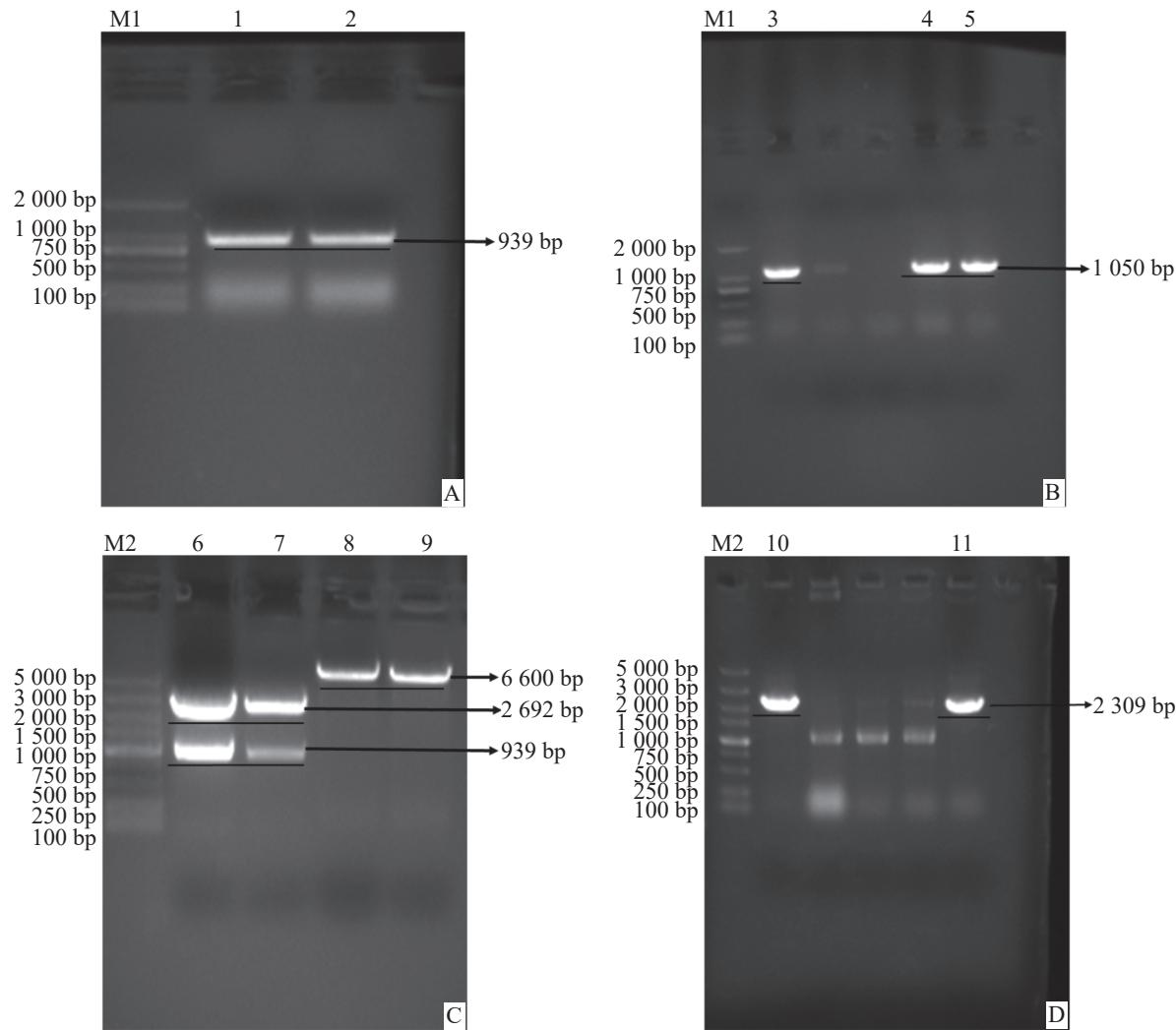
1.3.4 Western blot 鉴定 LDHA 重组蛋白 纯化后的 LDHA 重组蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 采用湿式转印法进行转膜, 设置电压为 100 V 转印 1.5 h, 转膜完成后, 将 NC 膜用 5% (w/w) 脱脂奶粉在室温下封闭 1.5 h, 1×Tris-盐酸缓冲液 TBST 重复洗涤 5 次, 每次间隔 5 min。洗膜结束后, 将 NC 膜放入用 5% (w/w) 脱脂奶粉稀释以 1:1 000 稀释过的 LDHA 多克隆抗体, 4 °C 孵育过夜。次日, 用 TBST 重复洗涤 5 次, 每次间隔 5 min; 加入用 TBST 缓冲液以 1:10 000 稀释过的 HRP 标记绵羊抗兔抗体, 室温孵育 1 h, 随后, 用 TBST 洗涤 5 次, 每次间隔 5 min。最后, 在 NC 膜上均匀滴加 ECL 化学发光液, 在 BIORAD 成像系统中进行显影, 观察并记录结果。

2 结果与分析

2.1 LDHA 编码序列的扩增和克隆载体的构建

以三角褐指藻 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到约 939 bp 大小的产物(图 1-A), 与目的基因片段的预期大小一致。该 PCR 产物克隆至 pMD-19T

载体后, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 电泳检测结果显示多个阳性克隆, 呈现出约 1 050 bp 的条带, 和预期片段大小一致, 对筛选出的阳性克隆测序, 结果与 NCBI 数据库(GenBank 登录号: NW_002238036.1)中的报道序列基本一致(图 1-B)。



A. LDHA 基因的PCR扩增结果; B. pMD-19T-LDHA PCR结果; C. pMD-19T-LDHA 和 pMBP-C 酶切结果; D. 重组质粒pMBP-C-LDHA PCR 鉴定结果。

A. PCR amplification of the LDHA gene; B. PCR results of pMD-19T-LDHA; C. Restriction digestion results of pMD-19T-LDHA and pMBP-C; D. PCR identification results of the recombinant plasmid pMBP-C-LDHA.

图 1 pMBP-C-LDHA 表达载体的构建

Fig. 1 Construction of the pMBP-C-LDHA expression vector

注: M1, DNA marker DL2 000; 1~2, LDHA 基因扩增产物结果; 3~5, pMD-19T-LDHA 酶切结果; M2, rrr marker DL5 000; 6~7, pMD-19T-LDHA 酶切结果; 8~9, pMBP-C 酶切结果; 10~11, 重组质粒 pMBP-C-LDHA PCR 鉴定结果。

Note: M1, DNA Marker DL2 000; 1~2, LDHA Gene amplification products; 3~5, Restriction digestion results of pMD-19T-LDHA; M2, DNA marker DL5 000; 6~7, Restriction digestion results of pMD-19T-LDHA; 8~9, Restriction digestion results of pMBP-C; 10~11, PCR identification results of recombinant plasmid pMBP-C-LDHA.

2.2 LDHA 基因与 pMBP-C 表达载体的构建

通过酶切克隆质粒 pMD-19T-LDHA 和空载体 pMBP-C, 得到 LDHA 目的基因片段和 pMBP-C 载体的双酶

切产物。电泳结果显示, 在预期位置出现特异性条带, 目的基因约为 939 bp, pMD-19T 空载体为 2 692 bp, pMBP-C 空载体为 6 600 bp(图 1-C), 表

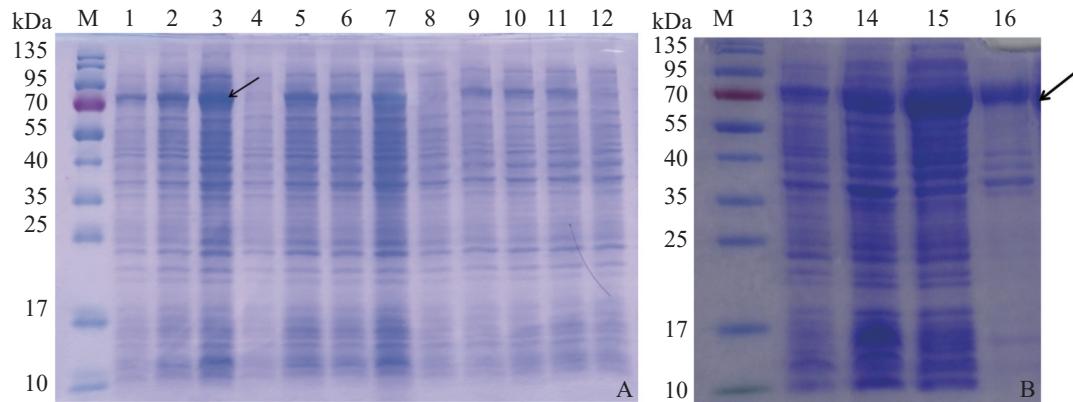
明双酶切成功。将目的基因与 pMBP-C 双酶切产物连接, 构建得到表达载体 pMBP-C-LDHA, 并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。电泳检测结果显示在预期位置出现约 2 309 bp 的条带(图 1-D), 符合预期目标片段大小。挑选阳性克隆测序, 结果显示, 序列包含目的基因序列和质粒上部分序列, 无移码突变, 表明含有目的基因 LDHA 的表达质粒构建成功。

2.3 LDHA 重组蛋白最佳诱导条件分析 原核表达蛋白会受到诱导温度、诱导时间和 IPTG 浓度的影响。本实验培养至菌液 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 在其中加入 IPTG 至终浓度分别为 0.2、0.5 和 1.0 $mmol \cdot L^{-1}$, 并在 180 $r \cdot min^{-1}$, 16、30 和 37 $^{\circ}C$ 下, 分别培养 24、8 和 4 h。结果显示, 在 16 $^{\circ}C$ 、IPTG 为 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ 下, 诱导表达 24 h 时, 表达量最高, 为最佳表达条件(图 2-A)。在此条件下, 目标蛋白的表达量显著高于在其他温度(30、37 $^{\circ}C$)下的表达水平, 且较低的 IPTG 浓度有助于避免高浓度 IPTG 对细胞生长的抑制作用, 为后续蛋白的大规模表达与纯化实验提供了可靠保障, 确保了目标蛋白的高效表达以及其良好的可纯化。

2.4 LDHA 重组蛋白可溶性分析 在最佳诱导条

件下诱导菌液表达 LDHA 重组蛋白, 并收集约 100 mL 菌体进行超声波破碎后, 分别以上清液和沉淀制备样品, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果表明, 在 16 $^{\circ}C$ 、IPTG 为 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ 诱导表达 24 h 后, LDHA 重组蛋白主要存在于上清液中(图 2-B), 进一步证实了在 16 $^{\circ}C$ 、0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导下, LDHA 重组蛋白的表达不仅具有较高的产量, 而且大部分以溶解状态存在, 为后续的蛋白纯化和功能研究提供了有利条件。

2.5 LDHA 重组蛋白的纯化及鉴定 由于 pMBP-C-LDHA 诱导表达的蛋白带有组氨酸标签, 将表达后的上清利用镍柱亲和层析进行纯化。SDS-PAGE 结果(图 3-A)显示, 在使用咪唑浓度分别为 150、250 和 500 $mmol \cdot L^{-1}$ 时, 都能在约 78 kDa 处观察到明显的目的蛋白条带。其中, 250 $mmol \cdot L^{-1}$ 浓度的咪唑洗脱获得的 LDHA 重组蛋白量较多且杂带较少, 结果表明, 250 $mmol \cdot L^{-1}$ 咪唑浓度能够有效地洗脱 LDHA 重组蛋白。此外, 通过 Western Blot 检测, 确认洗脱下来的蛋白条带与预期大小一致(图 3-B)。综上所述, 通过镍亲和层析和 Western Blot 验证, 成功纯化得到了 LDHA 重组蛋白, 为后续的功能研究和结构分析奠定了基础。



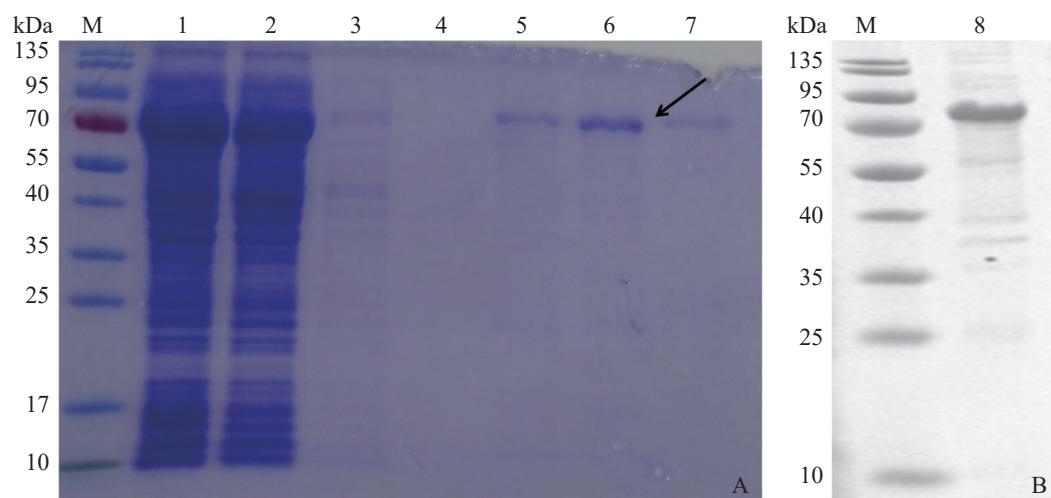
A. LDHA 重组蛋白最适表达条件优化; B. LDHA 重组蛋白在最适条件下的可溶性分析。
A. Optimization of the optimal expression conditions for LDHA recombinant protein; B. Solubility analysis of LDHA recombinant protein under optimal conditions.

图 2 LDHA 重组蛋白表达优化与可溶性分析

Fig. 2 Expression optimization and solubility analysis of LDHA recombinant protein

注: M, 彩色预染蛋白 Marker; 1) 16 $^{\circ}C$, 1.0 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 24 h; 2) 16 $^{\circ}C$, 0.5 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 24 h; 3) 16 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 24 h; 4) 16 $^{\circ}C$, 0 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 24 h; 5) 30 $^{\circ}C$, 1.0 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 8 h; 6) 30 $^{\circ}C$, 0.5 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 8 h; 7) 30 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 8 h; 8) 30 $^{\circ}C$, 0 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 8 h; 9) 37 $^{\circ}C$, 1.0 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 4 h; 10) 37 $^{\circ}C$, 0.5 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 4 h; 11) 37 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 4 h; 12) 37 $^{\circ}C$, 0 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 诱导 4 h; 13) 未诱导全蛋白; 14) 16 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG 24 h, 全蛋白; 15) 16 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG, 24 h, 上清液; 16) 16 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG, 24 h, 沉淀。

Note: M, Protein Marker; 1) 16 $^{\circ}C$, 1 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 24 h; 2) 16 $^{\circ}C$, 0.5 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 24 h; 3) 16 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 24 h; 4) 16 $^{\circ}C$, 0 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 24 h; 5) 30 $^{\circ}C$, 1 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 8 h; 6) 30 $^{\circ}C$, 0.5 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 8 h; 7) 30 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 8 h; 8) 30 $^{\circ}C$, 0 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 8 h; 9) 37 $^{\circ}C$, 1.0 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 4 h; 10) 37 $^{\circ}C$, 0.5 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 4 h; 11) 37 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 4 h; 12) 37 $^{\circ}C$, 0 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 4 h; 13) Samples were not induced; 14) 16 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 24 h, Total Protein; 15) 16 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 24 h, supernatant; 16) 16 $^{\circ}C$, 0.2 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG induction for 24 h, precipitate.



A. LDHA 重组蛋白纯化；B. LDHA 融合蛋白 Western blot 检测。

A. Purification of LDHA recombinant protein; B. Western blot detection of LDHA recombinant protein.

图 3 LDHA 重组蛋白的纯化与 Western Blot 检测

Fig. 3 Purification and Western Blot Detection of LDHA Recombinant Protein

注: M, 彩色预染蛋白 Marker; 1)未过柱蛋白; 2)0 mmol·L⁻¹咪唑洗脱液; 3)20 mmol·L⁻¹咪唑洗脱液; 4)30 mmol·L⁻¹咪唑洗脱液; 5)150 mmol·L⁻¹咪唑洗脱液; 6)250 mmol·L⁻¹咪唑洗脱液; 7)500 mmol·L⁻¹咪唑洗脱液; 8)纯化的 LDHA 蛋白与多克隆抗体的反应条带。

Note: M. Color pre-stained protein marker; 1) Unbound protein; 2) 0 mmol·L⁻¹ imidazole elution; 3) 20 mmol·L⁻¹ imidazole elution; 4) 30 mmol·L⁻¹ imidazole elution; 5) 150 mmol·L⁻¹ imidazole elution; 6) 250 mmol·L⁻¹ imidazole elution; 7) 500 mmol·L⁻¹ imidazole elution; 8) Purified LDHA protein reacted with polyclonal antibody.

3 讨 论

在蛋白质翻译后修饰(PTM)研究中,乙酰化和乳酰化修饰因其在细胞代谢调控中的关键作用而备受关注。乳酸脱氢酶(LDH)作为无氧糖酵解中的关键酶,负责催化乳酸和丙酮酸的相互转化,是维持细胞代谢平衡的重要调节因子。本研究的前期研究表明,尽管三角褐指藻中存在蛋白质乳酰化修饰的现象,但乳酸脱氢酶 ptLDHA 并未发生乳酰化修饰^[14]。然而,已有研究指出,LDH 在多种生物体内的乙酰化修饰位点能够显著调节其酶活性^[6, 12],暗示乙酰化修饰在乳酸代谢中可能发挥着重要作用。因此,本研究推测,ptLDHA 的乙酰化修饰可能通过影响其酶活性,在乳酰化与乙酰化修饰之间形成交互作用,从而进一步加深对三角褐指藻代谢调控机制的理解。

原核基因表达是研究蛋白质结构与功能的基础方法之一。本研究以三角褐指藻的 cDNA 为模板,成功克隆了 LDHA 基因,并分别构建了克隆载体 pMD-19T 和表达载体 pMBP-C-LDHA。通过 PCR 检测转化的阳性克隆,验证了载体构建的成功,预期的 LDHA 基因片段大小为 939 bp。然而,PCR 结果也分别显示了约 1 050 bp 和 2 309 bp 的条带。这一现象可以通过引物设计和扩增机制进

行解释。所使用的引物分别位于空质粒 pMD-19T 和 pMBP-C 的上下游区域,因此,扩增的产物为质粒上下游区域与 LDHA 基因片段的组合。具体而言,pMD-19T 的上下游区域扩增片段大小为 109 bp,加上 LDHA 基因的 939 bp,总大小约为 1 050 bp;而 pMBP-C 的上下游区域扩增片段大小为 1 367 bp,加上 LDHA 基因的 942 bp,总大小为 2 309 bp。上述结果进一步验证了克隆载体和表达载体均正确地包含了 LDHA 基因,为后续的原核表达和功能研究奠定了基础。

重组蛋白的结构能够影响其原核表达的形式,从而影响下游的蛋白结构和功能的研究。赵蕾等^[20]将猪 TGF II R 胞外域蛋白基因序列插入原核表达载体 pET-32a(+)中,所得重组蛋白为变性蛋白,需经过复性处理才能恢复其功能。同样,刘晓玥等^[21]通过构建原核表达载体 pET-29b(+) - ZmERF061,分析了玉米抗病基因 ZmERF061 的表达特性,发现 ZmERF061-His 融合蛋白主要以包涵体形式存在,也需要复性处理才能恢复其功能。与此不同,pMBP-C 载体含有 MBP 和 His 标签,MBP 能够与目的蛋白融合表达,从而显著提高蛋白的稳定性和溶解性;His 标签有助于后续的分离和纯化,便于进一步的酶活分析^[19]。Chen 等^[15]为了研究三角褐指藻 ptACSL1 的乙酰化修饰对酶活

性的影响,采用pMBP-C载体构建了ptACSL1的原核表达载体,显著提高了蛋白的溶解性与纯化效率。研究人员对ptACSL1中AMP结合域的乙酰化修饰位点K407和K425进行了定点突变,分别模拟乙酰化状态(K407Q, K425Q)和非乙酰化状态(K407R, K425R)。突变实验表明,K407和K425的突变均导致LACS活性下降,K407Q和K425Q的酶活性略高于K407R和K425R,提示赖氨酸乙酰化可能对酶活性具有正向调控作用。借鉴这一成功案例及其实验方法,本研究采用pMBP-C载体构建了三角褐指藻LDHA的原核表达载体,并通过融合MBP标签成功实现了LDHA蛋白的高效表达,在16℃的低温条件下,使用0.2 mmol·L⁻¹的IPTG浓度并诱导24 h,可获得大量的可溶性重组蛋白。进一步的可溶性分析结果显示,LDHA重组蛋白主要以可溶性形式存在。这种表达模式不仅有助于维持蛋白的非变性状态,同时也为后续的纯化和功能研究提供了有利条件。通过镍柱亲和层析法对融合蛋白进行纯化,利用His标签实现高效分离,成功获得了高纯度的LDHA重组蛋白。Western blot验证进一步确认了所纯化蛋白的特异性和正确性,证明了LDHA重组蛋白成功表达和纯化。这一策略为后续深入研究ptLDHA的生物学功能及其乙酰化修饰对活性的调控机制奠定了坚实基础。

尽管本研究成功克隆并表达了LDHA基因,并验证了其重组蛋白表达和纯化的可行性,但目前的研究尚未深入探讨其翻译后修饰对酶活性的具体影响,且蛋白在体外和体内的功能一致性还未能得到证实。未来研究需重点关注定点突变实验,以进一步确认乙酰化修饰对ptLDHA酶活性的调控作用,并验证修饰与去修饰状态对其功能的影响。此外,还应进一步验证表达蛋白在体外和体内的功能一致性,并对蛋白质修饰状态进行深入确认。这将为全面理解ptLDHA的生物学功能提供关键支持,并揭示蛋白质翻译后修饰的交互作用在三角褐指藻代谢调控中的潜在作用,为拓展藻类生物学研究及相关应用提供重要理论依据。

通过低温诱导表达和镍柱亲和纯化策略,本研究高效表达并纯化了三角褐指藻的LDHA的重组蛋白,为下一步研究乙酰化对ptLDHA活性的

影响,进一步研究ptLDHA在三角褐指藻蛋白质乳酰化和乙酰化修饰交互中可能的作用及其生物学功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] Mann M, Jensen O N. Proteomic analysis of post-translational modifications [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(3): 255–261. <https://doi.org/10.1038/nbt0303-255>
- [2] Olsen J V, Mann M. Status of large-scale analysis of post-translational modifications by mass spectrometry [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(12): 3444–3452.
- [3] Khoury G A, Baliban R C, Floudas C A. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the Swiss-prot database [J]. *Scientific Reports*, 2011, 1: 90. <https://doi.org/10.1038/srep00090>
- [4] Huang Y, Xu B, Zhou X, et al. Systematic characterization and prediction of post-translational modification cross-talk [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2015, 14(3): 761–770.
- [5] 陈艳梅. 蛋白质翻译后修饰之间的互作关系及其协同调控机理[J]. 生物技术通报, 2024, 40(2): 1–8.
- [6] Sun L, Yao Z, Guo Z, et al. Comprehensive analysis of the lysine acetylome in *Aeromonas hydrophila* reveals cross-talk between lysine acetylation and succinylation in Lu_xS [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 8(1): 1229–1239.
- [7] Lund J, Aas V, Tingstad R H, et al. Utilization of lactic acid in human myotubes and interplay with glucose and fatty acid metabolism [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 9814. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28249-5>
- [8] Cai X, Ng C P, Jones O, et al. Lactate activates the mitochondrial electron transport chain independently of its metabolism [J]. *Molecular Cell*, 2023, 83(21): 3904–3920. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.09.034>
- [9] Duan J, Li C, Zheng Y, et al. Characterization of exogenous lactate addition on the growth, photosynthetic performance, and biochemical composition of four bait microalgae strains [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2023, 134(11): lxad259. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad259>
- [10] Zhang D, Tang Z, Huang H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation [J]. *Nature*, 2019, 574(7779): 575–580. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1678-1>
- [11] Wang Z A, Cole P A. The chemical biology of reversible lysine post-translational modifications [J]. *Cell Chemical Biology*, 2020, 27(8): 953–969. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.07.002>
- [12] Stacpoole P W, Dirain C O. The pyruvate dehydrogenase complex at the epigenetic crossroads of acetyla-

- tion and lactylation [J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2024, 143(1/2): 108540.
- [13] Yang Y, Luo N, Gong Z, et al. Lactate and lysine lactylation of histone regulate transcription in cancer [J]. *Heliyon*, 2024, 10(21): e38426. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38426>
- [14] Huang A, Li Y, Duan J, et al. Metabolomic, proteomic and lactylated proteomic analyses indicate lactate plays important roles in maintaining energy and C: N homeostasis in *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 61. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02152-8>
- [15] Chen Z, Luo L, Chen R, et al. Acetylome profiling reveals extensive lysine acetylation of the fatty acid metabolism pathway in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018, 17(3): 399–412.
- [16] Zhao D, Zou S W, Liu Y, et al. Lysine-5 acetylation negatively regulates lactate dehydrogenase A and is decreased in pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(4): 464–476. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.005>
- [17] Liu M, Huo M, Liu C, et al. Lysine acetylation of *Escherichia coli* lactate dehydrogenase regulates enzyme activity and lactate synthesis [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 966062. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.966062>
- [18] Hayashi S I, Lin E C C. Purification and properties of glycerol kinase from *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(5): 1030–1035. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)96228-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96228-9)
- [19] Young C L, Britton Z T, Robinson A S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications [J]. *Biotechnology Journal*, 2012, 7(5): 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>
- [20] 赵蕾, 李辉, 覃水平, 等. 猪 TGF- β II 型受体胞外域的表达及生物活性验证 [J]. *江苏农业学报*, 2024, 40(7): 1268–1275. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-4440.2024.07.013>
- [21] 刘晓玥, 董庆文, 许赢, 等. 玉米 *ZmERF061* 基因原核表达载体构建及蛋白表达分析 [J/OL]. 分子植物育种, (2024-03-21)[2024-12-13]. <http://link.cnki.net/urlid/46.1068.s.20240320.1148.011>.

Prokaryotic expression and purification identification of lactate dehydrogenase from *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin

Zheng Yimeng[#], Duan Jiawen, Zhang Yi, Li Chenhui, Xie Zhenyu, Huang Aiyou^{*}

(College of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: An attempt was made to investigate the expression of lactate dehydrogenase (ptLDHA), a key enzyme in lactate metabolism, and to explore the acetylation modification sites on ptLDHA and their potential role in the interplay between lactylation and acetylation modifications in *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. The ptLDHA gene sequence was first cloned from *P. tricornutum* Bohlin cDNA, and then a prokaryotic expression vector, pMBP-C-LDHA, was constructed. The recombinant plasmid was then transferred into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for induced expression. Under optimized conditions (16 °C, 0.2 mmol·L⁻¹ IPTG for 24 hours), ptLDHA protein was successfully expressed, predominantly in a soluble form. The fusion protein was purified using His-tag affinity chromatography and identified by Western blot with ptLDHA polyclonal antibodies. A single protein band at approximately 78 kDa was observed, confirming that the purified protein was ptLDHA. The expression and purification of ptLDHA in prokaryotic cells was successfully established, laying foundations for subsequent site-directed mutagenesis of acetylation modification sites and for investigation of the effects of modification and demodification on enzyme activity.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin; LDHA; prokaryotic expression; protein purification

(责任编辑:潘学峰)