抗IDH2 K280乙酰化修饰特异性抗体的制备与鉴定

冼雪敏1,2,3,李国丹2,汤喜连2,陈湖婷2,3,黄倩倩2,3,陈融融2,3,陈丽丽2,3,余华军2,4,伍俊3,5, 张海涛2,3,4

- 1.广东医科大学医学技术学院,广东东莞 523808
- 2.广东医科大学生物化学与分子生物学教研室,广东湛江 524023
- 3.广东医科大学多肽与蛋白质研究应用重点实验室,广东湛江 524023
- 4.广东医科大学实验动物中心,广东湛江 524023
- 5.广东医科大学附属医院呼吸疾病研究所,广东湛江 524000

摘 要:目的 制备识别异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)第280位赖氨酸残基(K280)乙酰化修饰的抗体,用于检测 IDH2 在该位点的乙酰化修饰。方法 利用在线数据库对 IDH2 蛋白的理化性质、跨膜结构、信号肽、蛋白结构及乙 酰化位点进行生物信息分析。依据IDH2氨基酸序列合成3条包含K280的多肽,其中2条多肽的K280经乙酰化修 饰处理。随后将这2条乙酰化多肽分别与钥孔血蓝蛋白(KLH)偶联,并免疫家兔以制备能够特异性识别IDH2 K280位乙酰化修饰的抗体。采用ELISA、Dot blot、Western blot、免疫组化对抗体效价和特异性进行检测。结果 生物信息学分析结果显示,IDH2 K280位乙酰化修饰和非乙酰化修饰蛋白在相对分子质量、理论等电点、带正电荷 残基总数、不稳定指数、疏水性上有差异;三级结构预测结果表明 IDH2 在 280 号位点上乙酰化修饰和非乙酰化修饰 突变体侧链在几何构型和长度上存在细微差异。合成的2条乙酰化修饰多肽和1条非乙酰化的多肽免疫家兔均成 功获得相应的抗体;ELISA 检测免疫血清抗体效价分别是1:1458×103、1:1458×103和1:54×103。制备的识别 IDH2 K280乙酰化修饰的抗体识别IDH2 K280乙酰化修饰性多肽的效价是识别非乙酰化多肽的效价的27倍:识别 IDH2 K280乙酰化修饰性多肽的杂交信号强度是识别非乙酰化多肽的效价的20倍;IDH2乙酰化抗体能特异性识 别IDH2 K280乙酰化修饰位点。结论 生物信息分析提示 IDH2 K280乙酰化修饰可能影响 IDH2 蛋白的结构;制 备的 IDH2 K280 乙酰化抗体能特异性识别 IDH2 K280 乙酰化修饰。

关键词: IDH2; 乙酰化; 肺腺癌; 抗体特异性; 生物信息学 DOI: 10.20227/j.cnki.2096-3610.2025.03.006

Preparation and identification of specific antibodies against acetylation modification of IDH2 K280

XIAN Xuemin^{1,2,3}, LI Guodan², TANG Xilian², CHEN Huting^{2,3}, HUANG Qianqian^{2,3}, CHEN Rongrong^{2,3}, CHEN Lili^{2,3}, YU Huajun^{2,4}, WU Jun^{3,5}, ZHANG Haitao^{2,3,4}

- 1. College of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China
- 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China
- 3. Key Laboratory of Peptide and Protein Research and Application, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China

4. Guangdong Medical University Laboratory Animal Centre, Zhanjiang 524023, China

5. Institute of Respiratory Diseases, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China

Abstract: Objective To prepare antibodies that specifically recognizing the acetylation modification at lysine 280 (K280) of isocitrate dehydrogenase 2(IDH2), facilitating the detection of IDH2 acetylation at this site. Methods Bioinformatics analysis was performed on the physicochemical properties, transmembrane structure, signal peptide, protein structure and acetylation sites of the IDH2 protein using online databases. Three peptides containing the lysine residue at position 280 were synthesized based on the amino acid sequence of IDH2, and two of these peptides were

收稿日期: 2024-11-27

基金项目: 国家自然科学基金(81772634),湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(2022A01197)

作者简介: 冼雪敏, 在读硕士研究生, E-mail: 15814646901@163.com

通信作者:张海涛,博士,教授,E-mail:taohaizhang33@163.com

伍 俊,博士,教授,E-mail:630206063@qq.com

acetylated at the K280 site. Subsequently, these two acetylated peptides were conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH) and used to immunize rabbits, aiming to generate antibodies specifically recognizing the acetylated modification at K280 of IDH2. The antibody titer and specificity were evaluated by ELISA, Dot blot, Western blot and immunohistochemistry. Results The results of bioinformatics analysis revealed significant differences in physicochemical properties between the IDH2 protein with acetylation modification at position K280 and its nonacetylated counterpart, including molecular weight, theoretical isoelectric point (pI), total number of positively charged residues, instability index, and hydrophobicity. The predictive analysis of the tertiary structure revealed slight differences in the geometric configuration and side chain lengths between acetylated and non-acetylated mutants of IDH2 at position 280. Antibodies were successfully generated by immunizing rabbits with two synthesized acetylated polypeptides and one non-acetylated polypeptide. The antibody titers of the immune sera, as determined by ELISA, were $1:1458 \times 10^3$, $1:1458 \times 10^3$, and $1:54 \times 10^3$ respectively. The titer of the antibody specific to the IDH2 K280 acetylation modification was 27 times higher for the acetylated polypeptide compared to the non-acetylated polypeptide. The hybridization signal intensity of this antibody for recognizing the IDH2 K280 acetylated polypeptide was 20 times higher compared to its recognition of the non-acetylated polypeptide, which suggested that the IDH2 acetylation antibody specifically recognized the IDH2 K280 acetylation modification site. Conclusion Bioinformatic analysis suggested that IDH2 K280 acetylation modification affects the structure of IDH2 protein. The prepared IDH2 K280 acetylation antibody specifically recognizes the IDH2 K280 acetylation modification, which provides a basis for further investigation of the mechanism of IDH2 acetylation.

Key words: IDH2; acetylation; lung adenocarcinoma; antibody specificity; bioinformatics

肺癌作为全球发病率和死亡率最高的恶性肿 瘤之一,严重威胁着人类健康[1-3]。在肺癌的研究进 程中,寻找有效的诊断标志物以及深入理解其发病 机制对于改善临床治疗效果和患者预后至关重 要^[4]。异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)定位于染色体 15q26,在细胞代谢中扮演关键角色,它能够催化异 柠檬酸脱羧,产生二氧化碳和α-酮戊二酸,同时将 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸还原为还原型烟酰胺 腺嘌呤二核苷酸磷酸,广泛参与多种细胞代谢过 程,包括谷氨酰胺代谢、脂肪生成和线粒体氧化磷 酸^[5-8]。本课题组发现 IDH2 蛋白在非吸烟女性肺腺 癌患者中存在第280位赖氨酸残基(K280)乙酰化 修饰水平增高啊。蛋白质乙酰化修饰是一种蛋白质 翻译后修饰方式,其过程是在乙酰基转移酶的催化 作用下,将乙酰辅酶A的乙酰基转移到肽链的赖氨 酸的ε-氨基侧链^[10-11]。蛋白质乙酰化现被认为是调 节蛋白质功能的主要翻译后修饰[12-13],参与调控包 括三羧酸循环、氨基酸代谢及脂肪酸代谢在内的多 个代谢途径[14-17]。IDH2蛋白质乙酰化可能在细胞 中发挥重要作用,潜在地参与调控线粒体能量代谢 等关键生理过程[18]。因此,深入研究 IDH2 K280 乙 酰化修饰的具体功能及其在肺癌中的作用机制具 有重要意义。然而,目前针对 IDH2 K280 乙酰化修 饰的研究仍缺乏高特异性检测工具,难以精确解析 其功能机制。基于此,本研究致力于制备能够特异 性识别 IDH2 K280 乙酰化修饰的抗体。该抗体不 仅有助于揭示 IDH2 K280 乙酰化修饰在细胞生理 过程中的作用机制,而且对于解析其在肺腺癌发 生、发展中的分子机制具有重要意义,同时也为理 解IDH2在其他癌症或疾病中的乙酰化相关作用机 制提供线索,可为开发基于IDH2乙酰化调控的新 型治疗策略提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 设备

电热恒温水槽 DK-600A(上海一恒科学仪器有限公司), HERAcell 240i GP CO₂细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific公司), 伯乐电泳仪、伯乐水平电泳槽(美国 Bio-Rad公司)。

1.2 主要试剂

乙腈(Merck公司),甲酸(上海麦克林生化科技 股份有限公司),丙烯酰胺(上海麦克林生化科技股 份有限公司),二硫苏糖醇(Merck公司),荧光标记 二抗(Thermo Fisher Scientific公司),甘氨酸(上海 麦克林生化科技股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 生物信息学分析 IDH2 K280乙酰化和非乙 酰化的区别 利用 ProtParam (https://web. expasy. org/protparam/)分析 IDH2 K280Q(第280位赖氨酸 突变为谷氨酰胺)和 IDH2 K280R(第280位赖氨酸 突变为精氨酸)的理化性质之间的区别;利用在线 数据库 TMHMMServer 分析 IDH2 K280Q 和 IDH2 K280R 的跨膜区;利用数据库 SignalP 分析 IDH2 K280Q 和 IDH2 K280R 信号肽切割位点;PSIPRED Workbench(ucl.ac.uk)在线网站绘制 IDH2 K280Q 和 IDH2 K280R 的二级结构图;利用 Swiss-Model (https://swissmodel.expasy.org/)同源建模服务器对 IDH2 K280Q 和 K280R 进行三级结构预测,所得到 的模型进一步通过 PyMOL(http://www.pymol.org/) 分子可视化工具进行差异分析,以揭示突变引起的 结构变化;探索数据库 phosphosite.org 分析 IDH2 的 蛋白翻译后修饰的位点。

1.3.2 设计和合成免疫原肽段 根据 IDH2 的蛋白 肽链信息设计2条包含 IDH2 K280 位赖氨酸位点乙 酰化修饰的多肽(IDH2 K280 acPeptide 1 和 IDH2 K280 acPeptide 2)和1条 IDH2 K280 位赖氨酸非乙 酰化修饰的多肽(Peptide3),合成多肽后进行质谱 鉴定分析,多肽是否符合质量要求。

1.3.3 多肽偶联 取适量钥孔血蓝蛋白(KLH)和 Sulfo-SMCC溶解后充分混合,将混合溶液置于室温 下进行2h的活化反应^[19]。活化反应结束后,将溶液 转移至4℃环境中过夜透析,透析完成后把得到的 活化KLH溶液保存于-80℃。使用时,按1:1的比 例将活化KLH与合成的2条修饰多肽混合,于4℃ 环境中过夜进行偶联反应,从而获得多肽-KLH偶 联物用于后续免疫实验。通过固定的阳性对照多 肽的偶联效率判定该批多肽是否合格。

1.3.4 家兔免疫 对制备所得的乙酰化多肽进行 与KLH的偶联操作。将纯化后的多肽以生理盐水 进行稀释,并与福氏佐剂按照1:1的比例混合。于 兔子双肩皮下2个位点以及双后腿肌肉区域进行注 射,分别在第1、21、28、35天实施1次共免疫。在第 45天采集30mL血液,在第50、65、70天分4次采集 全血20mL,经离心处理后获取上清液,进而通过 ELISA实验进行筛选,选取阳性结果进行纯化^[20]。 实验经广东医科大学实验动物伦理委员会批准(批 准编号:GDY1902056)。

1.3.5 抗体纯化 选取10 mL protein A 填料,将其 与等体积的PBS缓冲溶液混合并搅拌均匀,随后抽 气去除填料中的气泡。把处理后 protein A 填料缓 慢加入玻璃柱中灌制层析柱,在此过程中确保柱内 始终保持湿润状态,避免柱干,灌柱完成后用10倍 体积预冷PBS缓冲溶液平衡柱子。接着将血清用 过滤器过滤后上样到已平衡好的 protein A 层析柱 上,保留上样流出液以便检测抗血清与填料的结合 效率,随后依次用 PBS缓冲溶液清洗柱子,再用 150 mmol/L 甘氨酸缓冲液进行洗脱,收集洗脱液并 加入中和缓冲溶液将 pH 调制为7。之后把经 protein A 纯化后得到的粗纯 IgG 上样至平衡好的抗 原多肽亲和层析柱上,专一性地富集目的抗体,然 后将富集得到的目的抗体上样至非修饰的亲和层 析柱上,直接收集流出液,去除非特异性的抗体 成分^[21]。

1.3.6 抗体质控 将抗体进行 ELISA、Dot blot、 Western blot 和免疫组化(IHC)应用验证。(1)ELISA 检测:于酶标仪板中每孔加入50 µg的含抗原稀释 液,在4℃条件下进行过夜孵育。随后取出包被完 毕的酶标仪,使用1×TBST洗涤3次,再加入1% BSA进行封闭处理,于37℃孵育1h后再次洗涤3 次。以1:1000为起始,按照3倍梯度进行稀释后加 入酶标板,在37℃条件下孵育1.5h,接着洗涤3次。 加入二抗孵育45 min,洗脱3次后加入TMB显色 液,持续5~10 min,之后加入1 mol/L硫酸终止显色 反应,450 nm 处读取吸光度 A450 nm 位。(2) Dot blot 检 测:将未交联的抗原多肽以1、4、16、64 ng的梯度点 样至PVDF膜上,待膜干燥后,加入封闭液进行封闭 处理,时长为60min,接着用TBST洗涤10min。随 后进行一抗孵育,时间为2h,经TBST洗涤3次后加 入比例为1:10 000的二抗进行孵育,时长为45 min, 再次用TBST洗涤3次,最后加入显色液进行反应。 (3)Western blot:依据实验需求对细胞进行裂解以 提取蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。选取12%分 离胶,每孔上样量为20~40 µg,先以80 V进行电泳 30 min,再以120 V电泳1h。之后以120 V进行湿 转150min,接着用封闭液封闭1h,随后进行一抗孵 育且过夜。用TBST洗涤30min后,进行二抗孵育 1h,再用TBST洗涤45min,最后加入发光液进行曝 光操作。(4)IHC 检测:先将石蜡切片置于温度为 63~65 ℃的烤箱中放置1h。随后依次进行如下处 理:用二甲苯浸泡2次,每次浸泡时长为5~10 min, 接着用无水乙醇浸泡2次,每次浸泡时间为5 min, 再用95%乙醇浸泡2次,同样每次浸泡5min,之后 用 85% 乙醇浸泡 3 min, 再以 75% 乙醇浸泡 3 min, 最后用蒸馏水洗涤3次。完成上述步骤后进行抗原 修复,接着用血清封闭30min,然后进行一抗孵育且 过夜,洗涤3次后,进行二抗孵育1h,再次洗涤后对 切片进行染色处理,最后在显微镜下进行观察。

2 结果

2.1 IDH2 K280Q 和 IDH2 K280R 蛋白的生物信息 学分析

IDH2 K280Q和IDH2 K280R的理化性质见表1,

其中相对分子质量、理论等电点(pI)、带正电荷的残基总数(Arg+Lys)、不稳定指数、疏水性均有差异。

IDH2 K280Q和IDH2 K280R在跨膜概率上并未表现出显著差异。如图1所示,IDH2蛋白的二级结构

表1 IDH2 K280Q 和 IDH2 K280R 理化性质								
蛋白名称	相对分子 质量	理论pI	带负电荷的残基 总数(Asp+Glu)	带正电荷的残基 总数(Arg+Lys)	不稳定指数	脂肪族指数	疏水性	
IDH2 K280Q	50 909.24	8.80	53	60	29.96	77.26	-0.396	
IDH2 K280R	50 937 29	8 89	53	61	30.06	77.26	-0.399	



图1 生物信息学分析 IDH2 K280Q 和 IDH2 K280R 的区别

A. IDH2 K280Q和IDH2 K280R 跨膜结构域; B. IDH2 K280Q和IDH2 K280R 信号肽; C. IDH2 K280Q和IDH2 K280R二级结构。

类型由α螺旋、β折叠片层和无规则卷曲3个二级成 分组成。观察模拟IDH2 K280位乙酰化和非乙酰 化的二级结构类型差异时,发现两种突变体在二级 结构组成上没有显著差异。利用Swiss-Model同源 建模对IDH2 K280Q和K280R进行三级结构预测, 其GMQE(Global Model Quality Estimation)值分别 为0.87和0.88,接近1,提示所构建的模型具有较高 的质量和可靠性,表明预测的结构能够较好地反映 IDH2在K280位点乙酰化和非乙酰化状态下的真实 结构特征。IDH2 K280Q和K280R的三级结构预测 结果显示,在280号位点上,Q和R突变体存在差 异,观察到侧链在几何构型和长度上存在细微差 异(图2)。 2.2 IDH2 K280 乙酰化位点分析与多肽设计

采用数据库分析预测 IDH2 K280 的序列是 HYKTDFDKNKIWYEH(图3)。

根据IDH2的单边序列设计了2条乙酰化修饰的抗原多肽序列Peptide 1、Peptide 2以及1条非修饰的对照序列Peptide 3(表2)。

2.3 多肽的质谱鉴定

Peptide 1 多肽的基峰在质荷比为 802.20, Peptide 2 多肽的基峰在质荷比为 623.55,Peptide 3 多 肽的基峰在质荷比为 609.55,3 条肽段的实测质量和 理论质量的差别在 1×10⁻⁵之内,序列无误(图4)。

2.4 血清ELISA 结果

在不同稀释倍数下,血清对乙酰化修饰



图2 IDH2 K280Q 与 IDH2 K280R 三级结构的预测和对比

A. IDH2 K280Q 与 IDH2 K280R 三级结构预测图; B. IDH2 K280Q 与 IDH2 K280R 三级结构对比图, 蓝色为 IDH2 K280Q, 绿色为 IDH2 K280R。



多肽名称	多肽序列	修饰类型	相对分子质量
Peptide 1	KTDFD-(acetyl)K-NKIWYC	乙酰化修饰	1 602.82
Peptide 2	CKHYKTDFD-(acetyl)K-NKIW	乙酰化修饰	1 868.14
Peptide 3	CKHYKTDFDKNKIW	非修饰对照	1 826.10





图4 质谱检测结果 A.肽段1质谱检测结果;B.肽段2质谱检测结果;C.肽 段3质谱检测结果。

Peptide 1 和 Peptide 2 的 $A_{450 \text{ nm}}$ 值显著高于非修饰 Peptide-3(表3)。在稀释倍数为1:4×10³~1:16×10³, 乙酰化多肽的 $A_{450 \text{ nm}}$ 值基本>1.0,而非乙酰化多肽 的 $A_{450 \text{ nm}}$ 值则显著降低。以 $A_{450 \text{ nm}}$ 值>1.0 作为阳性 判定阈值,血清对乙酰化多肽的效价(即最大有效 稀释倍数)约为1:16×10³。 2.5 IDH2乙酰化抗体信息

针对上述3条抗原多肽设计了2种抗体[Antiacetyl-IDH2(K280) Rabbit pAb]Ab1和Ab3(表4), 用于IDH2乙酰化修饰的研究。

2.6 IDH2乙酰化修饰的抗体特异性

Ab1与乙酰化修饰 Peptide 1和 Peptide 2结合的 效价(最大有效稀释倍数)分别为1:1458×10³和 1:486×10³,与非修饰Peptide 3结合效价为1:54×10³; Ab3与乙酰化修饰 Peptide 1和 Peptide 2结合的效价 均为1:1458×10³,与非修饰 Peptide 3结合的效价为 1:54×10³(表5)。制备的识别 IDH2 乙酰化修饰的抗 体识别 IDH2 K280 乙酰化修饰性多肽的效价是识 别非乙酰化多肽的效价的27倍。

2.7 抗体 Dot blot 检测

Ab1 和 Ab3 对 IDH2 K280 acPeptide 1、IDH2 K280 acPeptide 2 和非修饰 Peptide 3 能检测到的最低质量为4 ng,见图 5,识别 IDH2 乙酰化修饰性多肽的杂交信号是识别非乙酰化多肽的效价的20倍,与ELISA 检测免疫血清抗体效价的结果基本吻合。

2.8 Western blot检测乙酰化抗体的反应性

Ab3抗体可识别内源性乙酰化修饰 IDH2 蛋白 且接近 43 kDa 附近(图 6),说明 Ab3 抗体可识别内 源性的乙酰化修饰 IDH2 蛋白。

2.9 IDH2 乙酰化抗体的 IHC 分析

Ab1抗体在IHC检测中特异性地识别并结合内 源性乙酰化修饰IDH2蛋白,尤其在小鼠肾脏组织 中显示出强烈的线粒体染色。修饰性多肽封闭实 验后,染色显著减弱,证实了Ab1与乙酰化IDH2的 特异性相互作用(图7)。

					III. (11 H J 122101				(11450 nm 1111)	
稀释倍数 —		Peptide 1			Peptide 2			Peptide 3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
$1:1 \times 10^{3}$	1.825	1.580	1.717	1.559	1.577	1.694	1.273	1.163	1.812	
$1:4 \times 10^{3}$	1.742	1.449	1.365	1.345	1.248	1.398	0.631	0.560	1.355	
1:16 ×10 ³	0.969	0.894	0.778	0.738	0.746	0.797	0.243	0.232	0.727	
$1:64 \times 10^{3}$	0.305	0.287	0.248	0.338	0.192	0.245	0.060	0.054	0.215	
$1:256 \times 10^{3}$	0.049	0.031	0.035	0.084	0.013	0.133	-0.023	-0.026	0.015	

表3 不同稀释倍数下血清的ELISA检测结果

 $(A_{450\,\mathrm{nm}}$ 值)

R1、R2、R3分别表示来自不同家兔的免疫血清样本。

表4 IDH2乙酰化抗体信息

编号	名称	应用
Ab1	Anti-acetyl-IDH2 (K280) Rabbit pAb	ELISA/Dot blot/IHC
Ab3	Anti-acetyl-IDH2 (K280) Rabbit pAb	ELISA/Dot blot/Western blotting

广东医科大学学报

2025年第43卷

		表5 不同稀释倍	致下免疫血清抗	体的ELISA检测结	果	(A450 nm 值)
		Ab1		Ab3		
稀释倍数	IDH2 K280 acPeptide 1	IDH2 K280 acPeptide 2	Peptide 3	IDH2 K280 acPeptide 1	IDH2 K280 acPeptide 2	Peptide 3
1:18 ×10 ³	2.714	2.126	1.962	2.679	2.548	1.342
$1:54 \times 10^{3}$	2.673	2.356	1.083	2.622	2.555	0.909
$1:162 \times 10^{3}$	2.357	1.996	0.471	2.259	2.257	0.332
$1:486 \times 10^{3}$	1.767	1.327	0.231	1.795	1.685	0.177
$1:1 458 \times 10^{3}$	0.952	0.594	0.108	0.954	0.858	0.070
1:4 474 ×10 ³	0.465	0.269	0.132	0.473	0.383	0.079





图6 抗体 Western blot 结果

3 讨论

3.1 IDH2 K280 乙酰化与去乙酰化的区别

本研究利用在线网站分析了 IDH2 K280 乙酰 化和 IDH2 K280 去乙酰化的理化性质、跨膜结构、 蛋白信号肽、二级结构、三级结构和IDH2蛋白的乙 酰化的位点。模拟蛋白乙酰化修饰选择赖氨酸突 变成谷氨酰胺,原因在于乙酸和谷氨酰胺在生理状 态下均带负电,同时赖氨酸和谷氨酰胺在化学结构 上相似[22]。赖氨酸和谷氨酰胺的电荷相反,乙酰化 修饰是可逆过程,而这种突变不可逆,所以这种方 法也限制了对乙酰化动态变化的模拟[23]。对于去乙 酰化的模拟,选择赖氨酸突变为精氨酸。这一选择 考虑到赖氨酸和精氨酸在化学结构上的相似性,尤 其是它们侧链上都带有正电荷[22]。精氨酸侧链末端 的正电荷氮原子减少了其被乙酰化的可能性,同时 保持了蛋白质整体的电荷特性[24]。这种突变导致了 IDH2 K2800 与 IDH2 K280R 在理化性质上的差异, 进而可能影响蛋白质的折叠动力学,从而影响其生 物学功能和在细胞代谢过程中的作用[25]。从三级结 构预测结果可知, IDH2 K280O 和 K280R 在 280 号 位点侧链的几何构型和长度上存在细微差异。这 种细微的结构变化可能对IDH2蛋白的功能产生重



图7 抗体IHC结果 A.非修饰多肽封闭; B.修饰多肽封闭; 蓝色表示细胞核苏木素复染。

10 µm

要影响,例如可能改变其与底物、辅酶或其他调节 蛋白的结合位点的空间构象,从而影响其酶活性或 在细胞信号传导中的作用。同时,这些结构差异也 为后续分析抗体特异性识别的分子基础提供了重 要线索,有助于理解抗体如何精准地识别并结合到 IDH2蛋白的K280乙酰化位点。

3.2 IDH2 乙酰化后对细胞生理功能产生重要影响 并可能参与肿瘤发生发展调控

蛋白质乙酰化是在酶的催化作用下将乙酰基 结合到蛋白质赖氨酸残基上的过程[26]。蛋白质乙酰 化能够改变蛋白质的电荷状态,通常会减少蛋白质 的正电荷。这种电荷的改变进而导致蛋白的理化 性质发生变化^[27]。IDH2乙酰化可能调节其在三羧 酸循环中的催化活性。通过改变 IDH2 与底物异柠 檬酸及辅酶NADP+/NADPH的结合能力,进而影响 细胞内能量代谢的平衡[18]。在肿瘤发生发展方面, IDH2乙酰化可能发挥关键作用。异常的IDH2乙酰 化水平或位点可能导致其功能失调,影响细胞的正 常代谢和信号转导^[28]。IDH2乙酰化可能改变细胞 的代谢重编程,为肿瘤细胞的快速增殖提供物质和 能量基础。例如,过高的IDH2乙酰化可能促进糖 酵解途径的增强,同时抑制线粒体氧化磷酸化,使 肿瘤细胞适应低氧环境并获得生长优势[29]。因此, 深入研究 IDH2 乙酰化在肿瘤中的作用机制,对于 理解肿瘤的发病原理以及开发新的肿瘤诊断和治 疗方法具有重要意义。

3.3 IDH2 K280位乙酰化抗体的制备

为了深入探究 IDH2 蛋白中 K280 位赖氨酸的 乙酰化状态,本课题组计划开发一种特异性抗体以 识别该位点的乙酰化。利用原核表达系统生产所 需的抗原肽段,这种方法能够以经济高效的方式快 速获得具有高免疫原性的肽段[30]。所制备的肽段将 与钥孔血蓝蛋白(KLH)偶联,形成完整的免疫原。 利用这种免疫原,可以免疫家兔以产生特异性抗 体。通过 protein A 亲和层析技术对所得抗体进行 纯化, protein A 是一种来自金黄色葡萄球菌的膜蛋 白,它能特异性地结合IgG抗体的Fc段,从而有效 提高抗体的纯度。首先,将富集的抗体样本通过非 修饰的亲和层析柱,以去除非特异性结合的抗体。 经过验证,所制备的抗体满足实验需求,展现出高 亲和力和灵敏的反应性。实验结果表明,该抗体具 有高效价,能够与抗原产生强烈的特异性反应。本 研究发现,IDH2乙酰化后,其理化性质与结构发生 了改变,这极有可能致使其功能出现全部或部分的 变化。本研究成功制备的可识别 IDH2 K280 乙酰 化的抗体,能够用于进一步探究 IDH2 蛋白 K280 位 赖氨酸乙酰化在细胞生理过程中的作用。借助免 疫荧光、免疫共沉淀等技术,可以分析该位点乙酰 化与其他蛋白质或信号通路之间的相互关系,从而 深入了解 IDH2 蛋白在细胞代谢、信号转导等方面 的功能。这为深入研究 IDH2 乙酰化在肺腺癌中的 功能和作用机制奠定了坚实的基础。

参考文献:

- [1] LUO Y H, CHIU C H, SCOTT KUO C H, et al. Lung cancer in republic of China[J]. J Thorac Oncol, 2021, 16 (4): 519-527.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1): 17-48.
- [3] CHENG Y, SHEN Y, FANG Q, et al. Identification of epithelial-mesenchymal transition-related biomarkers in lung adenocarcinoma using bioinformatics and lab experiments[J]. Aging, 2023, 15(21): 11970-11984.
- [4] WEI Q, MIAO T, ZHANG P, et al. Comprehensive analysis to identify GNG7 as a prognostic biomarker in lung adenocarcinoma correlating with immune infiltrates[J]. Front Genet, 2022, 13: 984575.
- [5] CAROSI F, BROSEGHINI E, FABBRI L, et al. Targeting isocitrate dehydrogenase (idh) in solid tumors: current evidence and future perspectives[J]. Cancers, 2024, 16(15): 2752.
- [6] DE LA FÙÉNTE M I. Targeting IDH1/IDH2 mutations in gliomas[J]. Curr Opin Neurol, 2022, 35(6): 787-793.
- [7] MEDEIROS B C, FATHI A T, DINARDO C D, et al. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies[J]. Leukemia, 2017, 31(2): 272-281.
- [8] STEIN E M, DINARDO C D, FATHI A T, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib[J]. Blood, 2019, 133(7): 676-687.
- [9] WU J, LI N, HUANG X, et al. Proteomic quantification of lysine acetylation and succinylation profile alterations in lung adenocarcinomas of non-smoking females[J]. Yonago Acta Med, 2022, 65(2): 132-147.
- [10] SRIVASTAVA S, KUMAR S, BHATT R, et al. Lysine acetyltransferases (KATs) in disguise: diseases implications[J]. J Biochem, 2023, 173(6): 417-433.
- [11] YU W, CAO K, XU H, et al. Regulatory mechanism of exogenous ABA on gibberellin signaling and antioxidant responses in *Rhododendron chrysanthum* Pall. under UV-B stress[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(24): 13651.
- [12] SMOLKOVÁ K, ŠPAČKOVÁ J, GOTVALDÓVÁ K, et

al. SIRT3 and GCN5L regulation of NADP+- and NADPH-driven reactions of mitochondrial isocitrate dehydrogenase IDH2[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 8677.

- [13] HE Q, CHEN J, XIE Z, et al. Wild-type isocitrate dehydrogenase-dependent oxidative decarboxylation and reductive carboxylation in cancer and their clinical significance[J]. Cancers, 2022, 14(23): 5779.
- [14] ZHANG Y, LI N, WEI Q, et al. Lysine acetylome profiling reveals diverse functions of acetylation in Deinococcus radiodurans[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(5): e0101621.
- [15] HUANG Y, ZHU C, PAN L, et al. The role of *Mycobacte-rium tuberculosis* acetyltransferase and protein acetylation modifications in tuberculosis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1218583.
- [16] LIN T, YANG W Q, LUO W W, et al. Disturbance of fatty acid metabolism promoted vascular endothelial cell senescence via acetyl-CoA-induced protein acetylation modification[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 1198607.
- [17] 王义平, 雷群英. 乙酰化对代谢的调控及其在代谢相关 疾病中的作用[J]. 中国科学, 2015, 45(11): 1083-1092.
- [18] ZHAO S, XU W, JIANG W, et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation[J]. Science, 2010, 327(5968): 1000-1004.
- [19] PALACIOS M, TAMPE R, DEL CAMPO M, et al. Antitumor activity and carrier properties of novel hemocyanins coupled to a mimotope of GD2 ganglioside[J]. Eur J Med Chem, 2018, 150: 74-86.
- [20] 孙大康, 安新业, 李勐, 等. Trim22 B 细胞表位预测及多 克隆抗体制备与鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(10): 917-921.
- [21] 屈玉杏, 郭兴, 韩佳岐, 等. 基于人 ANP32A 蛋白的 C型 流感病毒聚合酶纯化及 PB2 蛋白单克隆抗体的高效制 备[J]. 生物工程学报, 2022, 38(8): 3041-3048.
- [22] CHENG Y W, ZENG F M, LI D J, et al. P300/CBP-

associated factor (PCAF)-mediated acetylation of Fascin at lysine 471 inhibits its actin-bundling activity and tumor metastasis in esophageal cancer[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(12): 1398-1416.

- [23] CHENG X, WANG K, ZHAO Y, et al. Research progress on post-translational modification of proteins and cardiovascular diseases[J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 275.
- [24] COPUR Ö, GORCHAKOV A, FINKL K, et al. Sexspecific phenotypes of histone H4 point mutants establish dosage compensation as the critical function of H4K16 acetylation in Drosophila[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(52): 13336-13341.
- [25] ZHANG L, WANG E, PENG G, et al. Comprehensive proteome and acetyl-proteome atlas reveals hepatic lipid metabolism in layer hens with fatty liver hemorrhagic syndrome[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 8491.
- [26] LIU M, GUO L, FU Y, et al. Bacterial protein acetylation and its role in cellular physiology and metabolic regulation [J]. Biotechnol Adv, 2021, 53: 107842.
- [27] KUCZYŃSKA-WIŚNIK D, MORUNO-ALGARA M, STOJOWSKA-SWĘDRZYŃSKA K, et al. The effect of protein acetylation on the formation and processing of inclusion bodies and endogenous protein aggregates in Escherichia coli cells[J]. Microb Cell Fact, 2016, 15(1): 189.
- [28] XU Y, SHI Z, BAO L. An expanding repertoire of protein acylations[J]. Mol Cell Proteomics, 2022, 21(3): 100193.
- [29] WANG Q, ZHANG Y, YANG C, et al. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux[J]. Science, 2010, 327(5968): 1004-1007.
- [30] WANG P, LIN Z, LIN S, et al. Prokaryotic expression, purification, and antibacterial activity of the hepcidin peptide of crescent sweetlips (*Plectorhinchus cinctus*) [J]. Curr Issues Mol Biol, 2023, 45(9): 7212-7227.

(责任编辑:李 晓)