

生物技术与方法

莱茵衣藻纤毛内运输蛋白 IFT46 的原核表达纯化及其多克隆抗体的制备

任海月¹, 董彬¹, 樊振川^{1,2,3}, 孟德梅^{1,2,3}

1 天津科技大学 食品工程与生物技术学院 教育部食品营养与安全重点实验室, 天津 300457

2 天津市食品营养与安全药物化学联合实验室, 天津 300457

3 天津科技大学 新农村发展研究院, 天津 300457

任海月, 董彬, 樊振川, 等. 莱茵衣藻纤毛内运输蛋白 IFT46 的原核表达纯化及其多克隆抗体的制备. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1124–1132.

Ren HY, Dong B, Fan ZC. Prokaryotic expression and purification of *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport protein 46 (IFT46) and preparation of polyclonal antibody. Chin J Biotech, 2016, 32(8): 1124–1132.

摘 要: IFT46 是纤毛内运输蛋白 IFT 复合物 B (IFT-B) 的一个重要组分, 对于纤毛的组装、运动和感知发挥着重要作用。为深入研究 IFT46 的作用机制, 利用 *ift46* 基因全序列分别构建了带有 GST 和 MBP 标签的原核表达载体 pGEX-2T-*ift46* 和 pMAL-C2X-*ift46*, 并转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 诱导表达, 以 15% SDS-PAGE 鉴定, 分别获得了分子量为 70、86 kDa 的重组 GST/MBP-IFT46 融合蛋白。将亲和纯化的 GST-IFT46 融合蛋白 (纯度 95%以上) 免疫新西兰大白兔, 采集第 5 次免疫后血清用 ELISA 测定效价为 1 256 000。抗血清依次经 Protein A 和固定在 MBP-IFT46 纯化后, 用 Western blotting 和免疫荧光检测抗体特异性, 结果表明制备的多克隆抗体能很好地识别莱茵衣藻中的 IFT46, 而且发现 IFT46 绝大部分定位在纤毛基体, 极少部分沿纤毛呈点状分布, 为继续开展 IFT46 在肥胖症、糖尿病、多囊肾病等纤毛相关疾病中作用机制的研究奠定了重要基础。

关键词: 莱茵衣藻, 纤毛, IFT46, 原核表达, 蛋白纯化, 多克隆抗体

Received: November 10, 2015; **Accepted:** January 19, 2016

Supported by: Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (No. 13JCYBJC41900), Tianjin University of Science & Technology Foundation for Returned Scholars (No. 20130420), ICGEB Research Grants 2015 (No. CRP/CHN15-01).

Corresponding authors: Demei Meng. Tel: +86-22-60912418; Fax: +86-22-60602419; E-mail: mengdm@tust.edu.cn

Zhenchuan Fan. Tel/Fax: +86-22-60912419; E-mail: fanzhen@tust.edu.cn

天津市应用基础与前沿技术研究计划 (No. 13JCYBJC41900), 天津科技大学引进人才科研启动费 (No. 20130420), 联合国国际遗传工程与生物技术中心 (ICGEB) 研究项目 (No. CRP/CHN15-01) 资助。

Prokaryotic expression and purification of *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport protein 46(IFT46) and preparation of polyclonal antibody

Haiyue Ren¹, Bin Dong¹, Zhenchuan Fan^{1,2,3}, and Demei Meng^{1,2,3}

¹ Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

² International Research Center of Tianjin for Food Nutrition and Safety and Medicinal Chemical, Tianjin 300457, China

³ The New Rural Development Research Institute of Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: IFT46 is one of the important components of intraflagellar transport complex B in *Chlamydomonas reinhardtii*, and plays important roles in the assembly, movement and perception of ciliary. To study its functional mechanism, a GST-tagged and an MBP-tagged prokaryotic expression plasmid, pGEX-2T-ift46 and pMAL-C2X-ift46 were constructed, respectively, by inserting *ift46* into the pGEX-2T and pMAL-C2X vector, and then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for protein expression. SDS-PAGE (15%) analysis results showed that the molecular weights of the fusion protein GST-IFT46 and MBP-IFT46 were 70 kDa and 86 kDa, respectively. We used the fusion protein GST-IFT46 purified by affinity adsorption purification (more than 95% purity) for immunity to New Zealand white rabbits. The 5th immune serum was collected and the antibody titer was determined to be 256 000 by ELISA. The antiserum was purified by Protein A affinity adsorption purification and immobilized MBP-IFT46 purification, and the specificity of polyclonal antibodies was evaluated by Western blotting and immunofluorescence. Results showed that the polyclonal antibody prepared could specifically and precisely bind IFT46 in *C. reinhardtii*, and IFT46 was mainly concentrated at basal body regions and few localized along the entire length of the flagellum as punctuated dots, which will make a foundation to further study the mechanism of IFT46 in cilia related diseases such as obesity, diabetes and polycystic kidney disease.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, flagellar, IFT46, prokaryotic expression, protein affinity purification, polyclonal antibody

莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 是一种单细胞真核藻类，其细胞一侧两条等长的纤毛赋予了其游动的能力^[1-2]。纤毛是一种细胞表面突起的亚细胞结构，主要组成部分为细胞微管，是一种从原生生物到脊椎动物都存在的保守细胞器^[3]。纤毛不仅在脊椎动物胚胎发育过程中起着重要作用^[4-5]，而且在信号传导方面也起着重要作用，如脊椎动物的视觉、听觉和嗅觉都依赖于纤毛的调控^[6-7]。多项研究报道，纤毛的结构或功能障碍会导致许多疾病^[8-9]，如多囊

肾病、视网膜变性、脑积水和不孕等。然而，纤毛的组装与功能的发挥依赖于纤毛内运输机制。

纤毛内运输 (Intraflagellar transport, IFT) 是发生在纤毛膜和纤毛轴丝之间，从纤毛基部到顶部的一种蛋白质复合体双向运输过程^[10-11]，主要由 IFT 颗粒、顺行的马达蛋白和逆行的马达蛋白^[12] 3 个部分完成。其中 IFT 颗粒由 IFT-A 和 IFT-B 两个蛋白复合物组成^[13]。研究发现^[14-15]，IFT-A 和 IFT-B 蛋白组分突变均可引发纤毛相关疾病，如 Bardet-Biedl 综合征、Joubert 综合征

等^[16]。IFT46 是 IFT-B 的一个重要组分,在有纤毛的生物中是高度保守的,也是纤毛组装所必需的成分。多项研究报道,IFT46 不仅在脊椎动物发育过程中发挥重要作用^[17],而且无脊椎动物中 *ift46* 基因的突变或缺失也会导致纤毛组装缺陷^[18-19]。因此,利用莱茵衣藻这种模式生物来研究 *ift46* 在纤毛组装中的作用机制,将对于其他生物中纤毛组装机制的阐明奠定重要理论基础。

制备高特异性和灵敏性的莱茵衣藻 IFT46 抗体,是顺利完成 IFT46 在纤毛组装中发挥功能和发挥部位的确定及作用机制阐明的重要前提。因此,本实验室采用简单和经济的原核表达方法制备了高特异性的 IFT46 抗体,并运用多种方法对抗体纯化以提高抗体特异性。此外,利用 Western blotting、免疫荧光等方法检测了抗体的特异性,从而为全面鉴定 IFT46 在纤毛装配中的作用机制,并为最终理解纤毛病的致病机理奠定了重要基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* XL1-blue, BL21 (DE3) 感受态细胞和 pGAD-*ift46* 质粒均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶、DNA 连接酶、DNA 分子量 Marker 和蛋白 Marker 等均购自美国 Thermo 公司; Glutathione SepharoseTM 4B 和 Dextrin SepharoseTM High Performance 蛋白纯化介质以及 Protein A SepharoseTM CL-4B 抗体纯化介质均购自美国 GE Healthcare 公司; NC 膜购自北京

索来宝公司; 弗式完全佐剂和不完全佐剂均购自美国 Sigma 公司; HRP 标记的羊抗兔抗体及荧光标记 (Alexa Fluor 488) 的羊抗兔抗体均购自美国 Cell Signaling 公司; AP 标记的羊抗兔抗体购自北京康为世纪公司。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 试验动物

新西兰大白兔 2 只, 体重 1.5–2.0 kg, 由天津欧阳实验种兔场提供。

1.2 方法

1.2.1 pGEX-2T-*ift46* 和 pMAL-C2X-*ift46* 原核表达载体的构建

以 pGAD-*ift46* 质粒为模板, 用上游引物 5'-ATGGATCCATGGATGACTCTATGG-3' (斜体部分为 *Bam*H I 限制性酶切位点)、下游引物 5'-CTAAGCTTTCACAAGCCCAGCACA-3' (斜体部分为 *Hind* III 限制性酶切位点) 进行 *ift46* 基因扩增。然后再用 *Bam*H I 和 *Hind* III 将回收的目的基因、pGEX-2T 和 pMAL-C2X 载体进行双酶切, 然后将目的基因分别与两个载体用 T4 DNA 连接酶连接后, 转化入 *E. coli* XL1-blue 感受态细胞, 挑取阳性菌落过夜培养, 提取质粒, 酶切和测序验证。

1.2.2 GST-IFT46 融合蛋白的诱导表达及鉴定

将正确的重组质粒 pGEX-2T-*ift46* 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑取单菌落于 LB 液体培养基中 (含 120 μ g/mL 氨苄青霉素) 过夜培养, 再以 1 : 20 的比例放大培养至 *OD* 为 0.6–0.8, 加入 0.2 mmol/L IPTG, 28 $^{\circ}$ C 下诱导 6 h 使蛋白大量表达, 同时设置对照组即不加 IPTG 诱导组。离心收集菌体并超声裂解获得全蛋白, 全蛋白经 4 $^{\circ}$ C 离心 (12 000 r/min, 15 min) 收集上清和沉淀。取全蛋白、上清和沉淀分别与 2 \times 蛋

白上样缓冲液混合后进行 15% SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.3 GST-IFT46 融合蛋白的纯化

将诱导表达后的菌体进行超声波破碎后,离心 (4 °C、12 000 r/min 15 min),取上清用 0.45 μm 滤膜过滤后加入到预先平衡好的 Glutathione Sepharose™ 4B 纯化柱中,37 °C 结合 1 h 后使样品流经纯化柱,用洗涤缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, pH 7.4) 洗去杂蛋白,再用洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, pH 7.4) 洗脱并收集目的蛋白。将洗脱出的目的蛋白进行 15% 的 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 多克隆抗体的制备

取 2 mg 纯化后的 GST-IFT46 融合蛋白与 2 mL 弗氏佐剂混合后乳化完全,免疫新西兰大白兔,采用颈背部多点注射法,初次免疫使用弗氏完全佐剂且免疫前耳动脉采血^[20]作为阴性对照血清。后每 10 天进行加强免疫,使用弗氏不完全佐剂,一共加强免疫 4 次,最后一次加强免疫后耳动脉采血,利用间接 ELISA 法测定抗血清的效价,效价合格后,股动脉采血,4 °C 静置过夜后收集血清,分装冻存。

1.2.5 多克隆抗体效价的检测

本实验采用间接 ELISA 法测定抗血清的效价,以 MBP-IFT46 融合蛋白作为包被抗原,用 5% 的脱脂乳粉封闭后,以所得的抗血清为一抗,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔抗体为二抗,然后经过 TMB (3',3',5',5'-四甲基联苯胺) 显色,利用酶标仪测定 OD₄₅₀ 处的吸光值,并计算出抗血清的效价,实验组血清 OD₄₅₀/阴性对照血清 OD₄₅₀ ≥ 2.0 为阳性,其最高稀释度即为

抗血清的效价。

1.2.6 多克隆抗体的纯化

分离完的抗血清首先使用 Protein A Sepharose™ CL-4B 亲和纯化专一性吸附 IgG,去除 IgG 之外的其他抗体分子,纯化条件为:结合缓冲液 C (12 mmol/L Na₂HPO₄, 8 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.0),洗脱缓冲液 C (0.1 mol/L 甘氨酸, pH 2.7),流速 0.5 mL/min。收集吸收峰对应的洗脱液,用 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.0) 将洗脱液 pH 值调至中性。然后将 Protein A Sepharose™ 纯化完的抗体采用 MBP-IFT46 免疫亲和纯化法进一步纯化^[21]:首先将 MBP-IFT46 融合蛋白固定到琼脂糖凝胶树脂上,使其专一性吸附 IFT46 的抗体,随后再将抗体洗脱下来,Western blotting 检测显示还会有一些非特异性吸附的抗体,因此本实验又采用了将 MBP-IFT46 融合蛋白固定在硝酸纤维素膜亲和纯化法^[22]进一步纯化,经 Western blotting 检测多克隆抗体的特异性。

1.2.7 免疫印迹及免疫荧光法检测多克隆抗体的特异性

免疫印迹:取 6 μL 处理后的莱茵衣藻上清^[23],加入 1.5 μL 5×上样缓冲液混匀,进行 SDS-PAGE 和电转印后,衣藻蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉封闭;多克隆抗体稀释度 1 : 1 000,二抗分别为碱性磷酸酶 (AP) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG,稀释度为 1 : 5 000,然后加入显色液使底物显色 (即 AP 法) 或曝光压片显影 (即 ECL 法)^[24]。免疫荧光法:首先收集状态良好的莱茵衣藻细胞,经处理后固定到载玻片上并加入甲醇通透^[23],然后加入 5% 的 BSA 封闭,之后依次用制备的多克隆抗体和荧光标记的二抗 (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit

IgG 稀释度 1 400) 孵育, 最后经封片干燥后用显微镜拍照^[25]。

2 结果与分析

2.1 pGEX-2T-*ift46* 和 pMAL-C2X-*ift46* 原核表达载体的构建

PCR 扩增获得约 1 035 bp 的片段 (图 1A), 与 *ift46* 预期大小一致。将构建的 pGEX-2T-*ift46* 和 pMAL-C2X-*ift46* 重组表达载体进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切验证如图 1B 所示, 均获得条带大小约为 1 035 bp 的目的片段, 并经测序验证序列完全正确, 说明表达载体构建成功。

2.2 GST-IFT46 和 MBP-IFT46 融合蛋白的诱导表达

在 IPTG 的诱导下, 含有 pGEX-2T-*ift46* 和 pMAL-C2X-*ift46* 质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株会大量表达目的蛋白, 菌体经超声破碎后获得全蛋白, 所得全蛋白经低温高速离心分离上清和沉淀, 然后经电泳、染色、脱色后分别

在约 70 kDa 和 86 kDa 处可以看到目的蛋白大量表达, 且蛋白的表达主要在上清中, 其表达结果如图 2 所示, 其中图 2A 为 GST-IFT46 融合蛋白的表达, 图 2B 为 MBP-IFT46 融合蛋白的表达。

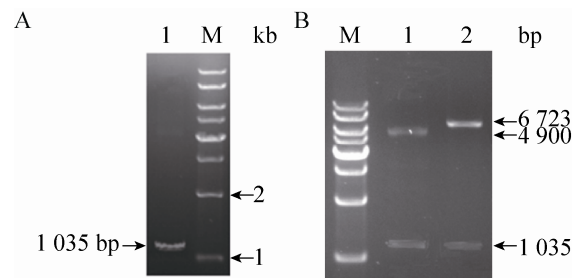


图 1 *ift46* 的 PCR 扩增和重组表达质粒的双酶切验证
Fig. 1 PCR amplification of *ift46* and the identification of recombinant expression plasmid by restriction enzyme digestion. (A) PCR verification of *ift46* gene. 1: PCR product of *ift46* gene; M: 1 kb marker. (B) Restriction digestion analysis of pGEX-2T-*ift46* and pMAL-C2X-*ift46*. M: 1 kb marker; 1: pGEX-2T-*ift46* digested with *Bam*H I and *Hind* III; 2: pMAL-C2X-*ift46* digested with *Bam*H I and *Hind* III.

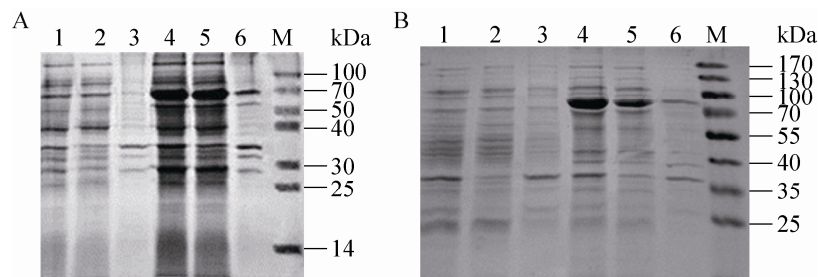


图 2 SDS-PAGE 检测重组蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein in *E. coli* BL21 (DE3). (A) Expression of the recombinant protein GST-IFT46. 1: the total protein of BL21 lysates with GST-IFT46 before induced; 2: the supernatant of BL21 lysates with GST-IFT46 before induced; 3: the sediment of BL21 lysates with GST-IFT46 before induced; 4: the total protein of BL21 lysates with GST-IFT46 induced with IPTG; 5: the supernatant of BL21 lysates with GST-IFT46 induced with IPTG; 6: the sediment of BL21 lysates with GST-IFT46 induced with IPTG; M: protein marker. (B) Expression of the recombinant protein MBP-IFT46. 1: the total protein of BL21 lysates with MBP-IFT46 before induced; 2: the supernatant of BL21 lysates with MBP-IFT46 before induced; 3: the sediment of BL21 lysates with MBP-IFT46 before induced; 4: the total protein of BL21 lysates with MBP-IFT46 induced with IPTG; 5: the supernatant of BL21 lysates with MBP-IFT46 induced with IPTG; 6: the sediment of BL21 lysates with MBP-IFT46 induced with IPTG; M: protein marker.

2.3 GST-IFT46 融合蛋白的纯化

由上述可知 GST-IFT46 融合蛋白的表达主要在上清中,因此将诱导表达后的菌体经超声破碎以及高速离心后取上清,于含有 Glutathione Sepharose™ 4B 填料的重力柱中进行亲和纯化,由于融合蛋白所含有的 GST 标签能够特异性与上述填料结合,因此经过洗涤、洗脱等步骤即得到纯度达 95% 以上的目的蛋白(图 3),可作为免疫动物所用抗原。

2.4 抗血清效价的检测

用纯化得到的 GST-IFT46 融合蛋白免疫新西兰大白兔,经耳缘静脉少量采血,室温静置 2 h 或 4 °C 过夜后获得析出血清,以间接 ELISA 法测定抗血清的效价,利用酶标仪测定 OD_{450} 处的吸光值后计算出抗血清的效价,结果如图 4 所示,以实验组血清 OD_{450} 与阴性对照血清 OD_{450} 的比值大于 2 即为阳性,其最高稀释度即为抗

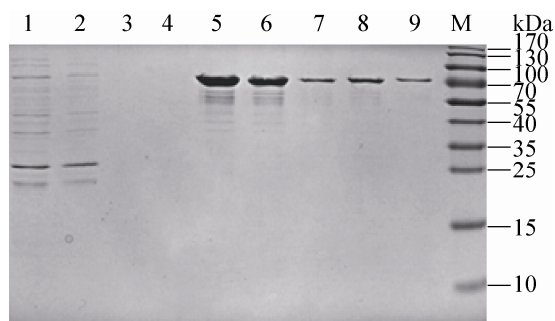


图 3 SDS-PAGE 检测亲和纯化后 GST-IFT46 重组蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified GST-IFT46 recombinant protein by affinity adsorption purification. 1: the flow-through fraction contains most of the non-target proteins from BL21; 2-4: the fraction of the first, second and third time washed by washing buffer, respectively; 5-9: the fraction of the first, second, third, fourth and fifth time eluted by elution buffer, respectively; M: protein marker.

血清的效价,由图 4 可知 1 号兔抗血清的效价大于 128 000,2 号兔抗血清效价大于 256 000,满足实验要求。

2.5 抗血清灵敏度和特异性检测

所得的抗血清由于含有多种抗体分子因此需要进行纯化,本研究首先进行 Protein A 纯化,结果如图 5 所示。然后利用免疫亲和纯化通过 MBP-IFT46 融合蛋白作为抗原,将其偶联到对应的基质上使其特异性吸附抗体,再经过洗涤、洗脱等步骤即可得到纯度较高的抗体。但是仍可存在少量杂带,因此又采用 MBP-IFT46 固定到硝酸纤维素膜亲和法进一步纯化。AP 显色结果(图 6A)和 ECL 曝光法(图 6B)均显示,抗血清能够正确的与 46 kDa 大小的 IFT46 蛋白特异结合,证明所制备的多克隆抗体具有很好的特异性,可与免疫原专一性结合。

2.6 免疫荧光法检测 IFT46 的定位及抗体的活性

免疫荧光技术即以荧光物质标记抗体而进行抗原定位的技术,基于抗原抗体反应的高度

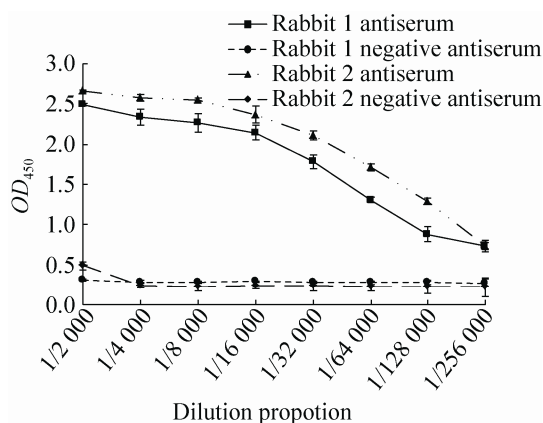


图 4 间接 ELISA 法测定抗血清的效价
Fig. 4 ELISA test of anti-IFT46 polyclonal antiserum.

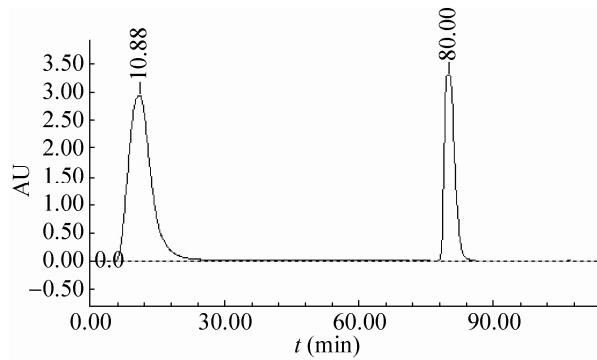


图5 IFT46 的抗体经 Protein A 纯化

Fig. 5 The anti-IFT46 was purified by Protein A. The first peak represents other antibodies besides IgG; the second peak represents IgG antibodies.

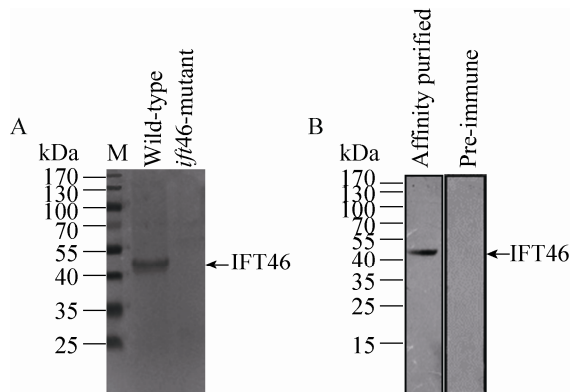


图6 Western blotting 验证抗体特异性-AP 显色法 (A) 和 ECL 曝光法 (B)

Fig. 6 The antibody specificity was detected by Western blotting through AP method (A) and ECL method (B). (A) AP method. M is protein marker, the wild-type flagella extract was probed with the affinity-purified anti-IFT46 antibody with a single band detected and the *ifi46* mutant flagella extract was probed with the affinity-purified anti-IFT46 antibody with no band detected. (B) ECL method. The wild-type flagella extract was probed with the affinity-purified anti-IFT46 antibody with a single band detected and in contrast the wild-type flagella extract was probed with pre-immune serum with no specific band.

特异性，将不影响抗体活性的荧光色素标记在抗体上，与其相应的抗原结合后在荧光显微镜下呈现一种特异性荧光反应，本实验采用的是间接法即将荧光色素标记在第二抗体上，来研究 IFT46 在莱茵衣藻中的定位，结果如图 7 所示，由图可以看到 IFT46 的抗体能够与莱茵衣藻 IFT46 蛋白特异性结合，且结合处主要位于纤毛的基体，表明 IFT46 蛋白主要定位在纤毛基体，少部分沿纤毛呈点状分布，与 IFT 复合物 B 组分的定位结果相一致。由于 IFT 是一种双向运输机制，包括纤毛基部到顶端的正向运输和顶端到基部的逆向运输，而 IFT 复合物 B 主要在正向运输中发挥作用，且其定位在基体，因此它的缺失或突变会引起复合物 B 的不稳定，进而影响纤毛的组装使纤毛形成缺陷，从而使纤毛的运动存在缺陷。

3 结论与讨论

纤毛是真核细胞表面的重要结构，尽管近年来人们对纤毛的研究逐渐加深，无论从其结

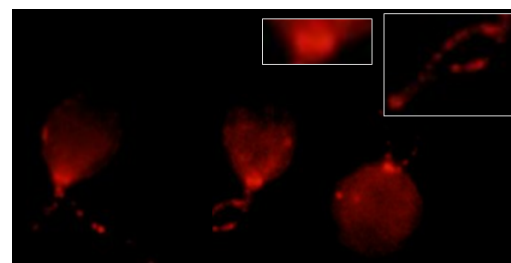


图7 免疫荧光检测 IFT46 蛋白在莱茵衣藻纤毛中的定位

Fig. 7 Immunofluorescence analysis the flagella localization of IFT46. It showed that IFT46 is concentrated at basal body regions and is localized along the entire length of the flagellum as punctuated dots. The insets show enlargements of the basal body region and the flagella.

构的研究到其组装与解聚,从其功能到其各组分间的相互作用研究都取得了一定进展,但纤毛在多种生命活动中都发挥重要功能,其复杂而保守的调控机制还未完全清楚,尤其是纤毛相关基因的变异会造成其结构缺陷,进而导致纤毛相关疾病的发生^[26-27],因此纤毛研究的必要性和紧迫性已成为科学界的共识,纤毛的研究将对人类认知生命的过程和健康事业的发展做出巨大贡献。

本文研究的 *ift46* 基因的变异也会导致纤毛的形成缺陷^[19],为了在蛋白水平和细胞水平研究其作用机制,我们制备了高特异性和高灵敏度的 IFT46 抗体。首先在大肠杆菌中经 IPTG 诱导大量表达 IFT46,然后用多步纯化获得高纯度(95%以上)的 GST-IFT46 融合蛋白,并作为抗原免疫新西兰大白兔获得抗血清。由于本研究使用的是 *ift46* 基因的全序列,包含所有抗原表位,因此所制备的抗体用途广泛。且经过亲和纯化后抗体的特异性和灵敏度极高,尤其是通过 ECL 曝光的方法更加肯定了所制备多克隆抗体的特异性和灵敏度。不仅如此,本实验所制备的 IFT46 抗体可以很好地用于免疫荧光实验,实验结果显示 IFT46 抗体能够专一性地与莱茵衣藻 IFT46 蛋白结合,且发现 IFT46 蛋白绝大部分定位在纤毛基体,极少部分沿纤毛呈点状分布,与相关研究结果一致^[18]。该部分结果表明 IFT46 是 IFT 复合物 B 的一个组分,它的缺失或突变会引起复合物 B 的不稳定,进而影响纤毛的组装使纤毛形成缺陷,导致莱茵衣藻运动存在缺陷。该抗体对进一步研究 IFT46 蛋白在纤毛的组装和解聚机制、与其他 IFT 蛋白的相互作用以及纤毛病的发病机理都具有重要的意义。

REFERENCES

- [1] Lucker BF, Miller MS, Dziedzic SA, et al. Direct interactions of intraflagellar transport complex B proteins IFT88, IFT52, and IFT46. *J Biol Chem*, 2010, 285(28): 21508–21518.
- [2] Li JC, Peng SQ, Hu ZL. Expression and immunological activity of enterotoxin C2 from *Staphylococcus aureus* in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Shenzhen Univ: Sci Eng*, 2012, 29(2): 159–164 (in Chinese).
李建成, 彭世清, 胡章立. SEC2 在莱茵衣藻中的表达及免疫学活性分析. *深圳大学学报: 理工版*, 2012, 29(2): 159–164.
- [3] Wheatley DN, Wang AM, Strugnell GE. Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol Int*, 1996, 20(1): 73–81.
- [4] Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, et al. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extra embryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*, 1998, 95(6): 829–837.
- [5] Salathe M. Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 401–402.
- [6] Axelrod JD. Basal bodies, kinocilia and planar cell polarity. *Nat Genet*, 2008, 40(1): 10–11.
- [7] Schneider L, Clement CA, Teilmann SC, et al. PDGFR α signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr Biol*, 2005, 15(20): 1861–1866.
- [8] Narasimhan V, Roy S. Cilia: organelles at the heart of heart disease. *Curr Biol*, 2015, 25 (13): 559–562.
- [9] Schmidts M, Vodopiutz J, Sonia C S, et al. Mutations in the gene encoding IFT dynein complex component WDR34 cause jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Am J Hum Genet*, 2013, 93 (5): 932–944.
- [10] Rosenbaum JL, Witman GB. Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(11): 813–825.
- [11] Scholey JM. Intraflagellar transport. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 423–443.
- [12] Fan ZC, Behal RH, Geimer S, et al.

- Chlamydomonas* IFT70/CrDYF-1 is a core component of IFT particle complex B and is required for flagellar assembly. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(15): 2696–2706.
- [13] Cole DG, Diener DR, Himelblau AL, et al. *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J Cell Biol*, 1998, 141(4): 993–1008.
- [14] Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, et al. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2006, 7: 125–148.
- [15] Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. *N Engl J Med*, 2011, 364(16): 1533–1543.
- [16] Ishikawa H, Ide T, Yagi T, et al. TTC26/DYF13 is an intraflagellar transport protein required for transport of motility-related proteins into flagella. *eLife*, 2014, 3(3): e01566.
- [17] Gouttenoire J, Valcourt U, Bougault C, et al. Knockdown of the intraflagellar transport protein IFT46 stimulates selective gene expression in mouse chondrocytes and affects early development in *Zebrafish*. *J Biol Chem*, 2007, 282(42): 30960–30973.
- [18] Hou YQ, Qin HM, Follit JA, et al. Functional analysis of an individual IFT protein: IFT46 is required for transport of outer dynein arms into flagella. *J Cell Biol*, 2007, 176(5): 653–665.
- [19] Lee MS, Hwang KS, Oh HW, et al. IFT46 plays an essential role in cilia development. *Dev Biol*, 2015, 400(2): 248–257.
- [20] Tian SJ, Li F, Wu YG. A new method of auricular arteriae blood sampling in rabbit for attaining immune serum of polyclonal antibodies. *Sichuan J Zool*, 2008, 27(5): 931 (in Chinese).
田树娟, 李芬, 武玉光. 多克隆抗体兔免疫血清取血新方法. *四川动物*, 2008, 27(5): 931.
- [21] Barton DE, Yang Feng TL, Mason A J, et al. Mapping of genes for inhibit subunits α , β_A , and β_B on human and mouse chromosomes and studies of *jsd* mice. *Genomics*, 1989, 5(1): 91–99.
- [22] Luo AL, Liang Z, Ku MSB. A method for purification of antibodies with protein immobilized on nitrocellulose membrane. *Acta Botan Sin*, 1997, 39(6): 534–536 (in Chinese).
骆爱玲, 梁峥, Ku MSB. 用硝酸纤维素膜亲和法纯化抗体. *植物学报*, 1997, 39(6): 534–536.
- [23] Pazour G J, Wilkerson C G, and Witman G B. 1998. A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT). *J. Cell Biol*, 1998, 141: 979–992.
- [24] Valcourt U, Gouttenoire J, Aubert-Foucher E, et al. Alternative splicing of type II procollagen pre-mRNA in chondrocytes is oppositely regulated by BMP-2 and TGF- β 1. *FEBS Lett*, 2003, 545(2/3): 115–119.
- [25] Zhang P, Xing WJ, Bao XH, et al. Cloning and prokaryotic expression of rat RVLG and preparation of mouse anti-RVLG polyclonal antibody. *Chin J Biotech*, 2008, 24(11): 1981–1987 (in Chinese).
张平, 邢万金, 包晓红, 等. 大鼠 RVLG cDNA 的克隆、原核表达和小鼠抗 RVLG 蛋白多克隆抗体的制备. *生物工程学报*, 2008, 24(11): 1981–1987.
- [26] Pan JM. Cilia and ciliopathies: from *Chlamydomonas* and beyond. *Sci China Ser C: Life Sci*, 2008, 51(6): 479–486.
潘俊敏. 衣藻、纤毛与“纤毛相关疾病”. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2008, 51(6): 479–486.
- [27] Cao MQ, Pan JM. Cilia and ciliopathies. *Chin J Cell Biol*, 2012, 34(9): 849–856 (in Chinese).
曹木青, 潘俊敏. 纤毛及纤毛相关疾病研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(9): 849–856.

(本文责编 郝丽芳)