

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160029

莱茵衣藻 IFT139 蛋白抗原的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备

田 伟¹, 董 彬¹, 李镇芳¹, 孟德梅^{1,2}, 樊振川^{1,2}

(1. 食品营养与安全教育国家重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;

2. 天津科技大学新农村发展研究院, 天津 300457)

摘 要: IFT139 是莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 纤毛内运输蛋白 IFT 复合物 A 中的一个重要组分. 其编码基因的突变、缺失或沉默将会影响纤毛正常的组装和解聚, 进而导致纤毛病的产生. 为深入研究 IFT139 的作用机制, 本实验首先 PCR 获得 *ift139* 5'端 458 bp 的 EST 片断, 成功构建了 pMAL-c2-*ift139* 与 pET-28a(+)-*ift139* 重组质粒. 然后将重组质粒转入大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 (DE3), 通过 IPTG 诱导表达, 分别得到相对分子质量为 6.0×10^4 和 2.5×10^4 的重组 MBP/HIS-IFT139 融合蛋白. 进一步将亲和纯化的 MBP-IFT139 融合蛋白 (纯度 95% 以上), 免疫新西兰大白兔获得抗血清, 间接 ELISA 法测得血清效价为 1 : 256 000. 最后将抗血清依次经 Protein A 和硝酸纤维素膜纯化后, 用 Western blot 检测抗体特异性, 结果显示所制备抗体能够正确特异性识别莱茵衣藻中的 IFT139, 从而为 IFT139 作用机制的阐明和纤毛相关疾病的研究奠定了重要基础.

关键词: 莱茵衣藻; 纤毛; IFT139; 表达纯化; 多克隆抗体

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2016)06-0027-07

Prokaryotic Expression, Purification and Polyclonal Antibody Preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT139 Protein Antigen

TIAN Wei¹, DONG Bin¹, LI Zhenfang¹, MENG Demei^{1,2}, FAN Zhenchuan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Institute for New Rural Development, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: IFT139 is a key component of the intraflagellar transport (IFT) complex A in *Chlamydomonas reinhardtii*. Mutations, deletions or silence of *ift139* gene can affect cilia assembly and depolymerization, and thus lead to ciliopathy. To further investigate the role of IFT139 in ciliogenesis, *ift139* 5'-458 bp EST cDNA fragment was firstly amplified and the recombinant plasmids pMAL-c2-*ift139* and pET-28a(+)-*ift139* were constructed and transferred into *Escherichia coli* BL21 (DE3). Under IPTG induction, fusion proteins MBP-IFT139 and HIS-IFT139 with a molecular weight of 6.0×10^4 and 2.5×10^4 , respectively, were obtained. The fusion protein MBP-IFT139 was purified by affinity adsorption purification (more than 95% purity) and then used for immunizing New Zealand white rabbits to produce antiserum. When the titer of antiserum reached 256 000, it was purified by Protein A, and then affinity adsorption purification was followed by nitrocellulose membrane purification procedure. The specificity of polyclonal antibodies was evaluated with Western blot. The result showed that the polyclonal antibody can specifically recognize IFT139. The research has provided an important tool for further clarifying the role of IFT139 in ciliogenesis and cilipathy.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; cilia; IFT139; expression and purification; polyclonal antibody

收稿日期: 2016-01-24; 修回日期: 2016-04-14

基金项目: 国际遗传工程与生物技术中心 (ICGEB) 研究资助项目 (CRP/CHN15-01)

作者简介: 田 伟 (1989—), 女, 山东人, 硕士研究生; 通信作者: 樊振川, 教授, fanzhen@tust.edu.cn.

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 是一种单细胞真核微藻, 由一个直径约为 8 μm 的细胞和两根长度约为 12 μm 的纤毛组成。纤毛是一种细胞表面突起较为保守的细胞器, 主要由细胞微管组成^[1]。纤毛主要为莱茵衣藻提供动力使其运动, 同时为其逃避敌害、寻觅食物等提供了便利。组装纤毛所需要的蛋白均在莱茵衣藻细胞内合成, 之后通过纤毛内运送蛋白 (intraflagellar transport, IFT) 运进纤毛, 合成纤毛所需物质^[2-3]。

IFT 复合物由 IFT-A 和 IFT-B 两个亚蛋白复合物组成^[4], 复合物 B 负责从纤毛基体到顶端的顺向运输, 依靠驱动蛋白-2 (kinesin-2); 复合物 A 负责从顶端到基部的逆向运输, 利用的是细胞质动力蛋白 (cytoplasmic dynein)^[5-7]。顺向运输的过程中, IFT 如同火车车厢般将合成纤毛所需要的蛋白组分运送到纤毛顶端, 合成纤毛相关结构, 进行纤毛的组装。逆向过程是将解聚的纤毛组分或周转蛋白运出纤毛, 从而完成一个循环过程^[8-10]。莱茵衣藻作为一种典型的模式生物, 与人类细胞的纤毛非常相近, 所以, IFT139 抗体的制备不仅可用于研究衣藻纤毛的相关功能, 也可用于研究人体内纤毛的结构及功能。多项研究表明, 纤毛中基因的突变或缺失, 会造成纤毛生成缺陷, 从而导致纤毛相关疾病的产生^[11-14]。

IFT139 作为一种纤毛内运输蛋白, 是 IFT-A 复合物中的重要组分。目前已有研究表明人类纤毛基因 *ift139* 的纯合错义突变会导致局灶节段性肾小球疾病, 造成肾小球基膜增厚, 肾小管萎缩, 颗粒物质的积累等症状^[15-16], 然而对于 IFT139 作用机制目前仍没有清晰的认识。本研究对于 IFT139 在大肠杆菌中的表达、纯化及其多克隆抗体的制备, 对于今后研究 IFT139 在纤毛中的作用及 IFT139 与其他蛋白复合物的相互作用提供了理论基础, 也对于纤毛病的诊断提供了有利的方法基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及实验动物

大肠杆菌 (*E. coli*) XL1-blue 与 BL21 (DE3) 菌株, pMAL-c2-acbp 与 pET-28a(+)-acbp 质粒均是本实验室保存; pBlu-*ift139* 由中科院水生所黄开耀老师实验室所赠; 实验动物为雄性新西兰大白兔, 购自天津欧阳实验种兔公司。

1.2 主要试剂

质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂

盒、DNA 产物纯化试剂盒、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG 和胰蛋白胨, 北京索莱宝生物科技有限公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*pfu* DNA 聚合酶和蛋白 Marker, 加拿大 Fermentas 公司; DNA Marker, 北京全式金生物技术有限公司; 亲和层析填料, GE 公司; AP (碱性磷酸酶) 标记的羊抗兔抗体 IgG 和 TMB (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺) 底物显色试剂盒, 北京康为世纪生物科技有限公司; 弗氏完全和不完全佐剂, 美国 Sigma 公司; 其他常用试剂均为国产分析纯。

1.3 PCR 扩增 *ift139* 基因

位于 pBlu-*ift139* 载体上的目的基因 *ift139*, 是属于全基因序列 5'端 458 bp 的 EST 片段, 根据 NCBI 中莱茵衣藻 *ift139* 的基因序列及原核表达载体图谱, 进行 PCR 引物设计。上游引物加入 *Bam*H I 酶切位点: 5'-ATGGATCCATGGCGGACAGGGTACTT-3', 下游引物加入 *Hind* III 酶切位点: 5'-ATAAGCTTCTGATGATGATCCAGCCCA-3', 加粗斜体部分即为引入的酶切序列, 引物设计后送往北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。利用含 *ift139* 基因的重组质粒 pBlu-*ift139* 为模板, 50 μL 的反应体系进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。取 2 μL PCR 产物进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析^[17-18]。

1.4 重组质粒的构建

将 PCR 产物和实验室现存质粒 pMAL-c2-acbp、pET-28a(+)-acbp 使用 *Bam*H I 和 *Hind* III 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 双酶切 3 h, 回收目的片段和对应载体, 然后分别将获得黏性末端的 PCR 产物和载体在 T4 DNA 连接酶的作用下重组质粒, 4 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 转化。分别在对应抗生素的培养基平板上筛选单克隆, 提取重组质粒并双酶切验证, 质粒测序由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成^[19-20]。

1.5 融合蛋白的表达与纯化

1.5.1 融合蛋白的表达

采用 CaCl_2 转化法将重组质粒 pMAL-c2-*ift139*、pET-28a(+)-*ift139* 转入 BL21, 在对应抗生素的平板上挑取单克隆, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜摇菌培养, 次日以 1:20 稀释继续培养, 待 1 h 后进行 A_{600} 的测定。当 $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 时, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 6 h, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 900 r/min 离心 10 min, 收集菌体, PBS 洗涤 3 次后, 置于冰上超声破碎 1 h。最后将破碎后的全蛋白、离心得到的上清液、用 PBS 处理后的沉淀按照一定的顺序等量上样, 采用 SDS-PAGE 电泳分析融合蛋白表达情况^[21-23]。

1.5.2 MBP-IFT139 融合蛋白的纯化

将 pMAL-c2-*ift139* 扩大培养获得大量菌液, 经超声破碎, 12 000 r/min 离心 10 min 得到上清液, 与 MBP 凝胶过夜结合, 未结合的液体流出。然后用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.5) 清洗杂蛋白 3 次, 最后用含 10% 麦芽糖的洗脱液将目标蛋白从直链淀粉树脂上竞争性地洗脱下来。取样进行 SDS-PAGE 电泳分析蛋白纯度^[24]。

1.5.3 HIS-IFT139 融合蛋白的纯化

将 pET-28a(+)-*ift139* 扩大培养获得大量菌液, 经超声破碎, 12 000 r/min 离心 10 min 得到沉淀。用含 20 mmol/L 咪唑的漂洗缓冲液 (含 1 mol/L 尿素) 洗涤沉淀 3 次, 用结合缓冲液 (含 8 mol/L 尿素) 将沉淀溶解 3 h 后, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 取上清液。然后与 Ni 柱凝胶过夜结合, 流出液体后, 分别用含 20、40、80 mmol/L 咪唑的漂洗缓冲液 (含 8 mol/L 尿素) 清洗杂蛋白 3 次, 用含 500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液 (含 8 mol/L 尿素) 洗脱目的蛋白, 取样进行 SDS-PAGE 电泳分析蛋白纯度^[25]。

1.6 多克隆抗体的制备及效价的测定

1.6.1 抗血清的制备

实验动物是 3 月龄、体质量在 1.5 ~ 2 kg 的雄性新西兰大白兔, 喂养 1 周后进行第 1 次免疫, 取 1 mol/L 抗原 1 mL 与同剂量的弗式完全佐剂进行充分乳化后, 采用背部皮下多点注射, 初次免疫之前取血作为后续实验的阴性对照。之后每隔 10 ~ 14 d 进行第 2 ~ 5 次加强免疫, 使用弗氏不完全佐剂, 最后以心脏穿刺的方法获得全血, 将血液室温静置 1 h 或 4 °C 静置过夜, 于 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 清澈透明的上清液即为抗血清, 如有红色溶血进入, 可再次离心取上清液, 然后于 -80 °C 分装保存^[26-27]。

1.6.2 抗血清效价的测定

采用间接 ELISA 法测定效价。将经包被液稀释的抗原 MBP-IFT139 包被于酶标板上, 每孔 1 µg, 4 °C 包被过夜; 加入 0.5% 脱脂乳粉 37 °C 封闭 1 h; 加入经 PBS 溶液 (pH 7.5) 梯度稀释的兔血清, 37 °C 孵育 1 h; 加入经 PBS 溶液 (pH 7.5) 稀释 20 000 倍的 HRP 标记的羊抗兔二抗, 37 °C 孵育 30 min; 加入 TMB 显色液, 室温避光显色 25 ~ 30 min; 最后加入 0.5 mol/L H₂SO₄ 终止液, 终止反应, 在 450 nm 波长下用酶标仪测定吸光度^[28-29]。

1.7 多克隆抗体的纯化及特异性分析

1.7.1 Protein A 纯化抗体

将填料 (Protein A Sepharose) 与亲和层析柱按照

其说明分别进行前处理后, 加入经 Binding Buffer 稀释的抗血清 (1 mL 抗血清 + 1 mL Binding Buffer), 充分结合, 用 Binding Buffer 冲洗层析柱, 约 1 h 后杂蛋白峰趋于水平状态, 加入 0.1 mol/L、pH 2.7 的甘氨酸洗脱液进行洗脱, 收集抗体, 为了保证酸不稳定的 IgG, 添加 1 mol/L、pH 9.0 的 Tris-HCl 以中和洗脱下来的抗体, 使 pH 为 7.0。将抗体于 -20 °C 暂时保存以备下一步纯化^[30-31]。

1.7.2 膜纯化抗体

取 2 mg 另一标签的融合蛋白 HIS-IFT139 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳; 电泳结束后, 凝胶转移至 NC 膜上; 将膜进行丽春红染色 10 min, 剪下目的条带, 用 TBST 溶液 (100 mL 10 × TBS 溶液, 895 mL 去离子水, 5 mL 10% 的吐温 20) 洗膜 3 次, 至膜上的颜色全部褪去; 加入 3 mL 的 5% 的脱脂乳粉室温封闭 1 h; 加入上步纯化的抗体 (≥3 mg) 进行孵育, 4 °C 摇床过夜; 用 TBST 溶液洗膜 3 次后加入 0.1 mol/L、pH 2.7 的甘氨酸洗脱液进行洗脱, 收集抗体。测定浓度后加入甘油至体积分数为 30% 于 -20 °C 短期保存, -80 °C 长期保存再加入叠氮化钠至终质量浓度为 0.3 g/L^[32]。

1.7.3 抗体特异性检测

采用蛋白免疫印迹 (Western blot) 方法。将微藻样品 CW92 经过处理后^[33]进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 转至 NC 膜上, 加入 5% 的脱脂乳粉进行室温封闭 1 h 后, 分别以 1 : 100 和 1 : 500 的稀释比例加入纯化后的抗体作为一抗, 室温孵育 1 h, 以 1 : 2 500 的稀释比例加入 AP 标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, 最后加入显色液进行显色, 凝胶成像仪观察^[34]。

2 结果与分析

2.1 重组质粒载体的鉴定

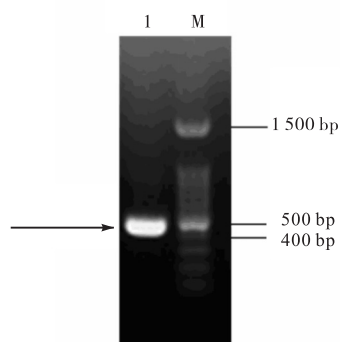
以质粒 pBlu-*ift139* 为模板进行 PCR, 获得约为 458 bp 的基因片段, 与预期大小相符合, 如图 1(a) 所示; 重组质粒 pMAL-c2-*ift139*、pET-28a(+)-*ift139* 经 BamH I 和 Hind III 双酶切之后, 分别得到对应的载体和 458 bp 的片段, 与目的基因大小相一致 (图 1(b)、(c)); 重组质粒的测序结果经比对后与 NCBI 中 *ift139* 基因序列一致, 证明重组质粒构建成功。

2.2 融合蛋白的表达与纯化

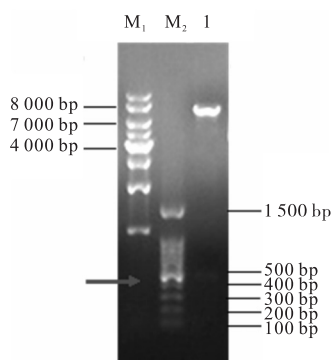
2.2.1 融合蛋白的表达

pMAL-c2-*ift139* 经 IPTG 诱导表达的重组蛋白

MBP-IFT139, 相对分子质量约为 6.0×10^4 , 与预期相符(图 2), 溶于上清液。

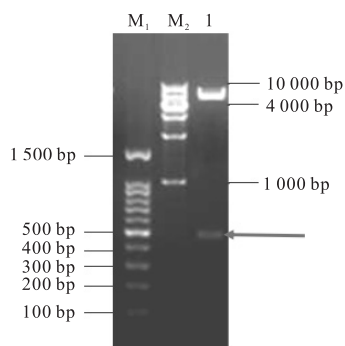


1. *ift139* 基因片段; M. 100 bp DNA Marker
(a) PCR 扩增 *ift139* 基因



M₁. 1 kbp DNA Marker; M₂. 100 bp DNA Marker; 1. *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 pMAL-c2-*ift139*

(b) pMAL-c2-*ift139* 双酶切验证



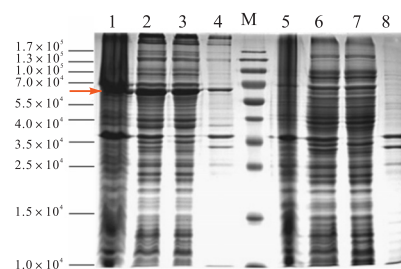
M₁. 100 bp DNA Marker; M₂. 1 kbp DNA Marker; 1. *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 pET-28a(+)-*ift139*

(c) pET-28a(+)-*ift139* 双酶切验证

图 1 *ift139* 的 PCR 扩增及重组质粒的双酶切验证

Fig. 1 PCR amplification of *ift139* and identification of recombinant plasmids with double restriction enzyme digestion

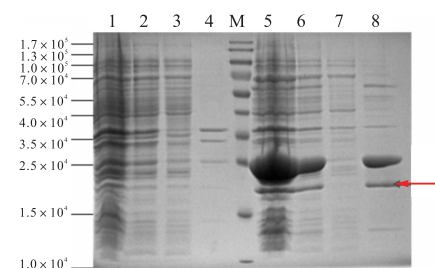
pET-28a(+)-*ift139* 经 IPTG 诱导表达的重组蛋白 HIS-IFT139, 相对分子质量约为 2.0×10^4 , 与预期相符(图 3), 以包涵体的形式存在。



1. 诱导后未裂解全蛋白; 2. 诱导后全蛋白; 3. 诱导后上清液; 4. 诱导后沉淀蛋白 Marker; 5. 诱导前未裂解全蛋白; 6. 诱导前全蛋白; 7. 诱导前上清液; 8. 诱导前沉淀

图 2 SDS-PAGE 检测重组表达载体 pMAL-c2-*ift139* 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant vector pMAL-c2-*ift139* in *E. coli* BL21 (DE3)



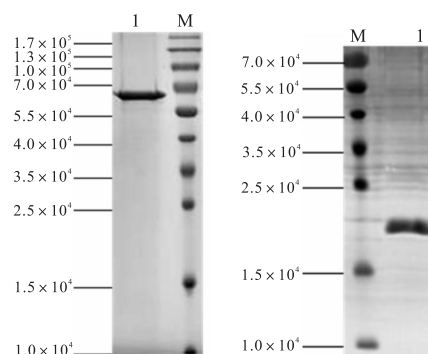
1. 诱导前未裂解全蛋白; 2. 诱导前全蛋白; 3. 诱导前上清液; 4. 诱导前沉淀蛋白 Marker; 5. 诱导后未裂解全蛋白; 6. 诱导后全蛋白; 7. 诱导后上清液; 8. 诱导后沉淀

图 3 SDS-PAGE 检测重组表达载体 pET-28a(+)-*ift139* 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant vector pET-28a(+)-*ift139* in *E. coli* BL21 (DE3)

2.2.2 融合蛋白的纯化

MBP-IFT139 和 HIS-IFT139 融合蛋白的亲亲和纯化结果如图 4 所示。



(a) MBP-IFT139 蛋白纯化 (b) HIS-IFT139 蛋白纯化

图 4 MBP-IFT139 和 HIS-IFT139 融合蛋白的亲亲和纯化
Fig. 4 Affinity purification of MBP-IFT139 and HIS-IFT139

MBP-IFT139 与 HIS-IFT139 融合蛋白分别经 MBP 和 HIS 亲和层析柱纯化后得到相对分子质量约

为 6.0×10^4 、 2.0×10^4 的目标条带, 分子质量大小均与预期相符, 对应质量浓度分别为 1.3、1.1 mg/mL. MBP-IFT139 蛋白纯度达 95% 以上, 可作为抗原进行免疫兔子, HIS-IFT139 上面有些杂带, 但是不影响切膜纯化抗体.

2.3 多克隆抗体的制备

2.3.1 抗血清效价的测定

用纯化得到的 MBP-IFT139 融合蛋白免疫新西兰大白兔, 经过 5 次免疫之后, 在耳缘静脉少量采血, 利用间接 ELISA 法测定抗血清的效价如图 5 所示, 免疫抗血清 A_{450} 与阴性对照血清 A_{450} 之比大于等于 2.1, 即为阳性. 所以, 可得最高稀释倍数 1 : 256 000 为抗血清的效价.

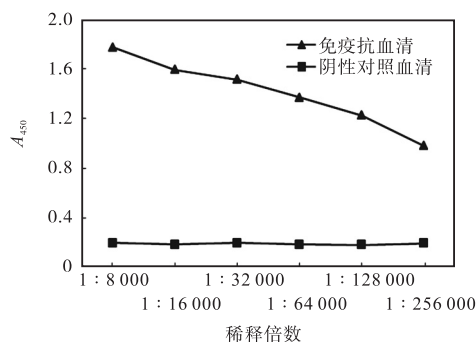


图 5 抗血清效价的 ELISA 法测定

Fig. 5 Determination of the antiserum titer with ELISA method

2.3.2 抗体的特异性分析

经 Protein A 纯化得到的 IgG 抗体, 经 Western blot 初步检测分析发现抗体的特异性较差, 又经过硝酸纤维素膜纯化法对抗体进一步纯化, 得到的抗体由 Western blot 检测分析, 结果如图 6 所示.

不同稀释倍数的抗体均可与微藻中的 IFT139 蛋白(相对分子质量约为 1.40×10^5) 特异性结合, 形成明显的单一条带且大小与预期相符合. 这表明多克隆抗体成功制备.

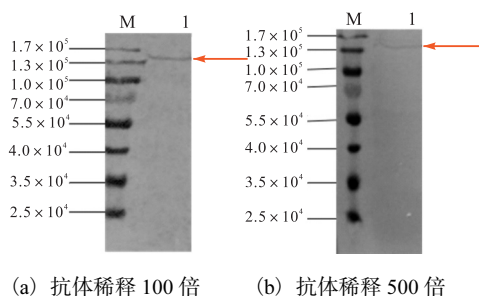


图 6 Western blot 检测 IFT139 抗体的特异性

Fig. 6 Specificity analysis of IFT139 polyclonal antibody with Western blot

3 讨论

纤毛不仅是莱茵衣藻重要的组成部分, 还分布于哺乳动物的多个器官和组织中, 调控着动物的生长及发育. 纤毛内基因的突变或蛋白缺失都将会对动物的生长及生理造成一定的影响, 从而导致各种纤毛相关疾病的出现. 像与纤毛运动功能相关的疾病: 原生纤毛不动综合征、呼吸道感染、生殖功能降低、输卵管异常、内脏移位等^[13]; 与纤毛感觉功能相关的疾病: 视觉系统异常造成的视力下降或完全失明、听觉系统中纤毛的结构变化导致听力下降或失聪、嗅觉不灵敏等^[14]; 与信号传导功能有关的疾病: 巴德毕氏综合征(BBS), 像多指症、肥胖症、视力下降、精神呆滞等^[35-37].

本研究中 *ift139* 基因的突变、沉默等都将会对 IFT139 蛋白的合成造成一定的影响, 继而可能会造成纤毛的组装缺陷, 最终导致肾消耗病和窒息性胸营养不良综合症等疾病^[15-16]. 在 IFT-B 如 IFT80、IFT46 等蛋白进行免疫共沉淀等实验研究中, IFT139 常作为 IFT-A 中的重要组分被对比使用. 然而, 对于 IFT139 的研究还有很多未知和值得探讨的东西, 它在纤毛中具体有哪些作用、其编码基因的突变或缺失会导致哪些疾病等内容均不清晰. 本实验从 PCR 扩增目的基因 *ift139* 开始, 成功构建了两种原核表达载体, 通过 IPTG 的诱导表达得到重组蛋白, 并进一步纯化抗原并免疫动物得到高效价的抗血清, 然后经过抗体的两步纯化及特异性分析验证, 成功获得了抗 MBP-IFT139 融合蛋白的多克隆抗体, 对于今后研究 IFT139 在纤毛中的作用及 IFT139 与其他蛋白复合物共同作用提供了研究基础, 也对纤毛病的进一步深层次研究提供了有利支持.

参考文献:

- [1] Cole D G. Intraflagellar transport in the unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Protist, 2003, 154(2): 181-191.
- [2] 谢传晓, 韩伟, 余增亮. 模式生物衣藻及其研究进展[J]. 遗传, 2003, 25(3): 350-354.
- [3] Scholey J M. Intraflagellar transport[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2003, 19: 423-443.
- [4] Williamson S M, Silva D A, Richey E, et al. Probing the role of IFT particle complex A and B in flagellar entry and exit of IFT-dynein in *Chlamydomonas*[J]. Proto-

- plasma, 2012, 249(3): 851–856.
- [5] Lechtreck K F, Luro S, Awata J, et al. HA-tagging of putative flagellar proteins in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies a novel protein of intraflagellar transport complex B[J]. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2009, 66(8): 469–482.
 - [6] Awan A, Bernstein M, Hamasaki T, et al. Cloning and characterization of Kin5, a novel *Tetrahymena* ciliary kinesin II [J]. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2004, 58(1): 1–9.
 - [7] Pan J, Snell W J. Kinesin II and regulated intraflagellar transport of *Chlamydomonas* aurora protein kinase[J]. Journal of Cell Science, 2003, 116(11): 2179–2186.
 - [8] Wood C R, Wang Z, Diener D, et al. IFT proteins accumulate during cell division and localize to the cleavage furrow in *Chlamydomonas*[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30729.
 - [9] Wang Z, Fan Z C, Williamson S M, et al. Intraflagellar transport (IFT) protein IFT25 is a phosphoprotein component of IFT complex B and physically interacts with IFT27 in *Chlamydomonas*[J]. PLoS One, 2009, 4(5): e5384.
 - [10] Cole D G. The intraflagellar transport machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Traffic, 2003, 4(7): 435–442.
 - [11] Iomini C, Li L, Esparza J M, et al. Retrograde intraflagellar transport mutants identify complex A proteins with multiple genetic interactions in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Genetics, 2009, 183(3): 885–896.
 - [12] Gerdes J M, Davis E E, Katsanis N. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease [J]. Cell, 2009, 137(1): 32–45.
 - [13] 曹木青, 潘俊敏. 纤毛及纤毛相关疾病研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(9): 849–856.
 - [14] 潘俊敏. 衣藻纤毛与纤毛相关疾病[J]. 中国科学, 2008, 38(5): 399–409.
 - [15] Huynh Cong E, Bizet A A, Boyer O, et al. A homozygous missense mutation in the ciliary gene TTC21B causes familial FSGS[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2014, 25(11): 2435–2443.
 - [16] Davis E E, Zhang Q, Liu Q, et al. TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum[J]. Nature Genetics, 2011, 43(3): 189–196.
 - [17] 陈春琳, 刘祥, 俱雄. 溶藻弧菌外膜蛋白 OmpK 的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 西北农林科技大学学报, 2015, 43(7): 1–8.
 - [18] 羊扬, 厚华艳, 郁磊, 等. 大肠杆菌 K99 菌毛 fan 操纵子的克隆、表达及活性[J]. 微生物学报, 2012, 52(12): 1524–1530.
 - [19] 向斌, 周智广, 黄干. 人羧基肽酶 H 原核表达载体的构建及其应用[J]. 中国糖尿病杂志, 2007, 15(2): 84–86.
 - [20] 李骅, 胡嘉, 李艳君, 等. 人 LC3 蛋白在大肠杆菌中的表达纯化及其抗体的制备与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(5): 517–519.
 - [21] 徐秋芳, 陈倪. 灰飞虱原肌球蛋白的基因克隆、原核表达及多克隆抗体制备[J]. 中国农业科学, 2014, 47(19): 3791–3798.
 - [22] Wu Z, Wang W, Li Y, et al. Development of polyclonal antibodies against nucleocapsid protein of watermelon silver mottle virus and their application to diagnostic[J]. Acta Virologica, 2014, 58(2): 167–172.
 - [23] Liu F, Wu X, Li L, et al. Expression, purification and characterization of two truncated peste des petits ruminants virus matrix proteins in *Escherichia coli*, and production of polyclonal antibodies against this protein[J]. Protein Expression and Purification, 2013, 91(1): 1–9.
 - [24] Duplay P, Hofnung M. Two regions of mature periplasmic maltose-binding protein of *Escherichia coli* involved in secretion[J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170(10): 4445–4450.
 - [25] Li Y, Wang J, Yang J, et al. Recombinant expression, purification and characterization of antimicrobial peptide ORBK in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2014, 95(5): 182–187.
 - [26] 查宏贤, 刘罡, 张晨, 等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 4 (serpin-4) 的基因克隆、原核表达和多克隆抗体制备[J]. 昆虫学报, 2011, 54(6): 642–647.
 - [27] Kapoor R, Mandal B, Paul P K, et al. Production of cocktail of polyclonal antibodies using bacterial expressed recombinant protein for multiple virus detection [J]. Journal of Virological Methods, 2014, 196(2): 7–14.
 - [28] Jiang W, Liu X, Wu D, et al. A simple, rapid one-step ELISA using antibody-antibody complex[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2015, 62(1): 126–131.
 - [29] Limsuwanchote S, Wungsintaweeikul J, Yusakul G, et al. Preparation of a monoclonal antibody against notoginsenoside R1, a distinctive saponin from *Panax notoginseng*, and its application to indirect competitive ELISA [J]. Planta Medica, 2014, 80(4): 337–342.

- [30] 张明娟, 张美程, 朱参战, 等. 抗钠泵 $\alpha 2$ 亚单位截断性片段多肽抗体的制备与鉴定[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(2): 168–173.
- [31] Reusch D, Habeger M, Selman M H, et al. High-throughput work flow for IgG Fc-glycosylation analysis of biotechnological samples[J]. Analytical Biochemistry, 2013, 432(2): 82–89.
- [32] 骆爱玲, 梁峥. 用硝酸纤维素膜亲和法纯化抗体[J]. 植物学报, 1997, 39(6): 534–536.
- [33] Pazour G J, Wilkerson C G, Witman G B. A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT) [J]. Journal of Cell Biology, 1998, 141(4): 979–992.
- [34] Sun J, Tu M, Han B, et al. Generation and characterization of rabbit polyclonal antibodies against Vasohibin-2 for determination of its intracellular localization[J]. International Journal of Oncology, 2013, 43(1): 255–261.
- [35] Pazour G J, Rosenbaum J L. Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases[J]. Trends in Cell Biology, 2002, 12(12): 551–555.
- [36] Bisgrove B W, Yost H J. The roles of cilia in developmental disorders and disease[J]. Development, 2006, 133(21): 4131–4143.
- [37] 柳林, 纪伟. 纤毛疾病和与之相关的基因[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(2): 373–376.

责任编辑: 郎婧

(上接第 26 页)

- [9] Mazzotta E, Malitesta C, Díaz-Álvarez M, et al. Electro-synthesis of molecularly imprinted polypyrrole for the antibiotic levofloxacin[J]. Thin Solid Films, 2012, 520(6): 1938–1943.
- [10] Tonelli D, Ballarin B, Guadagnini L, et al. A novel potentiometric sensor for *L*-ascorbic acid based on molecularly imprinted polypyrrole[J]. Electrochimica Acta, 2011, 56(20): 7149–7154.
- [11] 齐玉冰, 刘瑛, 宋启军. 碳纳米管修饰电极分子印迹传感器快速测定沙丁胺醇[J]. 分析化学, 2011, 39(7): 1053–1057.
- [12] 余会成, 黄学艺, 谭学才, 等. 基于电聚合的苯巴比妥分子印迹电化学传感器的制备及其应用研究[J]. 分析测试学报, 2014, 33(7): 752–757.
- [13] 王曼丽, 明华蜜, 尹洪宗, 等. 表面等离子体共振生物传感器的构建及对柠檬黄的检测[J]. 分析化学, 2014, 42(1): 53–58.
- [14] Abu-Shawish H M, Ghalwa N A, Saadeh S M, et al. Development of novel potentiometric sensors for determination of tartrazine dye concentration in foodstuff products[J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 126–132.
- [15] Ye X L, Du Y L, Lu D B, et al. Fabrication of β -cyclodextrin-coated poly(diallyldimethylammonium chloride)-functionalized graphene composite film modified glassy carbon-rotating disk electrode and its application for simultaneous electrochemical determination colorants of sunset yellow and tartrazine[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 779: 22–34.

责任编辑: 郎婧