DOI:10.12441/spyswjs.20220314003 [文章编号] 1673-1689(2024)09-0065-07

小G蛋白ARL3多克隆抗体制备及其突变体鉴定

张 婵[1,2] 张瑞凯[1,2] 刘雁霞[1,2] 樊振川[1,2*]

(1. 天津科技大学食品营养与安全国家重点实验室,天津 300457; 2. 天津科技大学大健康生物技术国家国际科技合作基地,天津 300457)

摘要:为探究ARL3在纤毛生成和纤毛信号转导中的功能,制备了兔抗莱茵衣藻ARL3多克隆抗体,并鉴定了*arl3*突变体。通过基因克隆获取*arl3*目的基因,构建原核表达载体pET-28a(+)-*arl3*,以大肠杆菌BL21(DE3)为宿主表达融合蛋白6×His-ARL3。将纯化后的目的蛋白质用于免疫兔子并获得抗血清,随后对抗血清中的protein A和抗原抗体进行纯化,并通过蛋白质免疫印迹检测莱茵衣藻ARL3抗原。结果表明,抗血清效价可达1∶102 400,纯化后的ARL3抗体在1∶400的稀释条件下检测出单一目的条带。表明作者成功制备了高特异性、高灵敏度的兔抗莱茵衣藻ARL3蛋白多克隆抗体,且鉴定出一株*arl3*突变体,为进一步研究莱茵衣藻ARL3蛋白在纤毛内的功能提供了基础。

关键词:莱茵衣藻;多克隆抗体;ARL3;纤毛

Preparation of Polyclonal Antibodies Against the Small G Protein ARL3 and Identification of Its Mutants

ZHANG Chan[1,2] *ZHANG Ruikai*[1,2] *LIU Yanxia*[1,2] *FAN Zhenchuan*[1,2*]

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. International Scientific and Technological Institute of Health Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To investigate the function of ARL3 in ciliogenesis and ciliary signal transduction, the author generate a rabbit polyclonal antibody against *Chlamydomonas reinhardtii* ARL3 and to identify *arl3* mutants. The target gene, *arl3*, was obtained through gene cloning, and a prokaryotic expression vector, pET-28a(+)-*arl3*, was constructed for expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) to produce the fusion protein 6×His-ARL3. The purified target protein was used to immunize rabbits, resulting in the production of antiserum. The antiserum was subsequently purified using protein A and antigen-antibody, and Western blot was employed to detect the presence of the *Chlamydomonas reinhardtii* ARL3 antigen. Results indicated that the antiserum titer reached 1∶102 400, with the purified ARL3 antibody detecting a single specific band at a dilution of 1∶400. This confirms the successful preparation of a highly specific and sensitive rabbit polyclonal antibody against *Chlamydomonas reinhardtii* ARL3, as well as the identification of an *arl3* mutant. These findings provide a foundational basis for further investigation into the function of ARL3 protein within cilia.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*; polyclonal antibody; ARL3; cilia

纤毛是真核细胞表面的一种突起结构,它沿着微管轴丝外延并被一层薄膜覆盖。作为信号中枢系统的一部分,在细胞分离、组织分化和器官发育等生命活动中必不可少。然而,当纤毛组装有

基金项目:国家自然科学基金项目(32070698)。

通信作者:樊振川(1974—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事营养代谢型纤毛病方面的研究。E-mail: fanzhen@tust.edu.cn

收稿日期:2022-03-14 **修回日期:**2022-04-21

缺陷或其信号转导功能发生障碍，会引发一系列统称为“纤毛病”的遗传病，如梅克尔-格鲁伯综合征（MKS）、巴德毕氏综合征（BBS）和朱伯特综合征（JBTS）等，其临床症状包括视网膜炎、色素性视网膜病变、睫状骨软骨发育不良、神经发育障碍、肥胖综合征和肾囊性疾病等[1]。

纤毛的生成、组装及纤毛内参与信号转导的信号分子在纤毛内的动态平衡均依赖“纤毛内运输”（intraflagellar transport，IFT）[2]，即 IFT 火车（IFT train）和马达蛋白组成的分子纳米颗粒沿微管进行的双向运动。根据其生化特征，IFT 火车分为 IFT-A（6 个蛋白质组分）和 IFT-B（16 个蛋白质组分）复合物。而 IFT-B 根据其结合特征进一步分为 IFT-B1 和 IFT-B2 亚复合物。IFT 进程包括：由驱动蛋白 kinesin-2 与 IFT-B1 亚复合物偶联驱动的 IFT 火车自纤毛基部到纤毛顶端的正向运输，以及由胞质动力蛋白 cytoplasmic dynein 与 IFT-A 亚蛋白复合物偶联驱动的 IFT 火车自纤毛顶端到纤毛基部的反向运输[3]。在此过程中，由 8 个 BBS 蛋白（BBS1、BBS2、BBS4、BBS5、BBS7、BBS8、BBS9 和 BBS18）组成的复合物 BBSome 可作为 IFT 火车与纤毛膜信号分子间的衔接子，促使纤毛信号分子搭载 IFT 维持纤毛稳态[4-9]。

莱茵衣藻是一种结构简单的真核单细胞具纤毛微藻，具有较强适应性和较快生长速度。其纤毛易于提取，且拥有大量的突变体，同时莱茵衣藻与哺乳动物细胞纤毛内运输系统高度保守，因此成为研究纤毛信号转导与纤毛组装的最佳生物[10]。作者所在课题组曾利用莱茵衣藻阐明了多种小 G 蛋白调控 BBSome 纤毛内运输的机理，如小 G 蛋白 BBS3 和 IFT22 协同调控 BBSome 定位于基体，进而保障 BBSome 纤毛内丰度，维持纤毛内稳态[10]；IFT27 调控 BBSome 纤毛顶部再组装过程[11]。Liang 等[12]利用莱茵衣藻阐明了马达蛋白磷酸化介导纤毛长度调控和组装的分子机理，为纤毛在运动和信号转导方面的研究提供了理论基础。

ARL3 属于 ARL 亚家族小 G 蛋白，在具纤毛物种中高度保守。研究发现，ARL3 在脊椎动物和人类细胞中有 3 种效应物，分别是磷酸二酯酶 6（PDE6D）、UNC119A/B 和 BARTL1[13-14]。这些效应物可在胞质内作为载体蛋白与不同酯修饰的纤毛跨膜信号蛋白的下游信号通路蛋白结合，并将其招募到纤毛过渡区。值得注意的是，小鼠视紫红质以及蠕虫和人多囊肾素 PKD-1 和 PKD-2 等跨膜信号蛋白的纤毛内稳态依赖于 ARL3[15-16]。这些跨膜信号蛋白通过 BBSome 与 IFT 偶联，从而实现其纤毛内稳态循环，因此 ARL3 极有可能通过调控 BBSome 纤毛内稳态来维持纤毛跨膜信号蛋白的纤毛内稳态。其他研究也表明，ARL3 蛋白突变会导致纤毛病的发生，证实了 ARL3 在免疫突触中的作用[17]，但其调控机制尚不清楚。作者利用莱茵衣藻为模式生物，制备了 ARL3 多克隆抗体，并对小 G 蛋白 ARL3 在纤毛内运输过程中的调控机制进行研究，以期理解相关营养代谢型疾病的发病机理，为诊断、治疗相关营养代谢型疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株及质粒

大肠杆菌（*E. coli*）XL1-blue、*E. coli* BL21（DE3）、pET-28a（+）载体：作者所在课题组保存；莱茵衣藻野生型藻种 CC-125 和 *arl3* 突变体（LMJ.RY0420.182282）：美国莱茵衣藻库（https://www.chlamycollection.org）。

1.1.2 试剂

T4 连接酶、限制性内切酶、*Pfu* DNA 聚合酶、DNA Marker：北京全式金生物技术有限公司；蛋白质 Marker：加拿大 Ferments 公司；质粒小提试剂盒：北京天根生化科技有限公司；Protein A Sepharose™ CL-4B、Ni Sepharose™ 6 FF：美国 GE Healthcare 公司；硝酸纤维素蛋白质印迹膜：北京索莱宝科技有限公司；荧光标识的羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗：美国 Sigma 公司；HRP 标识的羊抗兔/鼠抗体：美国 Jackson 公司；ECL 显色液：德国 Millipore 公司。

1.1.3 试验动物

采用新西兰雄性大白兔进行试验，8 周龄，体质量 1.5~2.0 kg，由北京华大蛋白公司提供动物免疫。

1.2 试验方法

1.2.1 构建重组质粒 pET-28a(+)-*arl3*

莱茵衣藻总 RNA 提取方法参照刘雁霞等[18]的方法，利用 Trizol 法提取莱茵衣藻总 RNA，并将其反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板，使用 *arl3* 引物进行 PCR 扩增，见表 1。将 pET-28a（+）表达载

表1　*arl3*扩增引物序列

Table 1　Sequences of the amplification for the gene of *arl3*

引物名称	引物序列（5′—3′）
ARL3-FOR	GGAATTCATGGGCCTCTTGTCGCTG
ARL3-REV	CCGCTCGAGTTACTTGACCTGCTTCATCAT

体及*arl3*目的片段分别使用*Eco*R I、*Xho* I进行双酶切，并回收线性载体和目的基因进行连接，转化至*E. coli* XL1，37 ℃培养12~16 h，挑取单克隆提取质粒进行双酶切验证并测序[19]。

1.2.2　融合蛋白的诱导、表达及纯化

将重组质粒pET-28a(+)-*arl3*转至感受态*E. coli* BL21（DE3）中，挑取单克隆至含100 μg/mL卡那霉素的液态LB中，于37 ℃培养过夜。次日扩大培养至OD_{600}值达0.8~1.0，加入0.2 mmol/L的IPTG，25 ℃诱导6~10 h，表达重组蛋白6×His-ARL3[20]，同时将不加IPTG诱导的样品设置为对照组[21]。诱导完成后于4 ℃、8 000 *g*条件下离心5 min并收集菌体，用PBS缓冲液洗涤2次，加入裂解液（50 mmol/L的Tris-HCl，500 mmol/L的NaCl，pH 7.4）高压破碎菌体细胞获得全蛋白质，经4 ℃、12 000 r/min离心15 min，收集上清液和沉淀，用质量浓度为12 g/dL的SDS-PAGE检测蛋白质组分[22]。

经鉴定发现6×His-ARL3在上清液中表达，因此取上清液加到Ni Sepharose™ 6 Fast Flow重力纯化柱中，于室温下摇床结合2 h。结合完毕后，使用Tris-HCl缓冲液（50 mmol/L的Tris-HCl，150 mmol/L的NaCl，pH 8.0）漂洗柱子，然后用含500 mmol/L咪唑的Tris-HCl缓冲液洗脱，将洗脱蛋白质置于−20 ℃冷冻保存。并对纯化蛋白质进行SDS-PAGE检测和纯度分析[23]。

1.2.3　动物免疫及效价测定

由北京华大蛋白公司提供动物免疫试验。首次免疫采用弗氏完全佐剂，每2周加强免疫1次，共加强免疫4次，加强免疫时使用弗氏不完全佐剂，免疫剂量及方法同首次免疫。

采用间接ELISA法检测抗血清的效价。首先用包被液将6×His-ARL3稀释至10 μg/mL，并以每孔100 μL的体积包被于酶标板中，在4 ℃下孵育12~16 h。然后用质量分数5%的脱脂牛奶封闭液将抗原在37 ℃下封闭1 h，弃去封闭液，用PBST清洗液洗板3次。加入PBS稀释后的抗血清，37 ℃孵育1 h。孵育结束后，用PBST清洗4次，加入HPR羊抗兔二抗，室温下孵育1 h。加入3’，3’，5’，5’-四甲基联苯胺（TMB）显色溶液，每孔加入100 μL，室温避光显色20 min[24]。最后加入0.5 mol/L的H_2SO_4终止反应，利用酶标仪测定其在450 nm处的吸光度（OD_{450}值），以PBS稀释液为空白对照进行调零，依次读取各孔OD值[25]。

1.2.4　多克隆抗体纯化

1 mL抗血清与9 mL结合缓冲液混合均匀后加到平衡好的重力柱中，室温下摇床结合2 h[26]。然后用结合缓冲液（12 mmol/L的$Na_2HPO_4·12H_2O$，8 mmol/L的$NaH_2PO_4·2H_2O$，pH 7.0）漂洗3次，之后用洗脱缓冲液（0.1 mol/L的Glycine，pH 2.7）对目的蛋白质进行洗脱，洗脱液收集在提前加入了中和缓冲液的EP管中，纯化后的抗体于−80 ℃冷冻保存[27]。

利用抗原抗体特异性结合进一步纯化抗血清，将经过纯化的6×His-ARL3进行SDS-PAGE凝胶电泳分离，随后将其转移至NC膜上。用丽春红染料对NC膜染色10 min，将含有目的蛋白质条带的部分剪碎，并用TBST溶液洗涤3次。使用质量分数5%的脱脂奶粉在4 ℃对其进行过夜封闭处理，之后加入经过Protein A纯化的抗血清，室温孵育1 h后用TBST漂洗，最后用洗脱液洗脱目的蛋白质，洗脱下来的目的蛋白质即为抗体，在4 ℃下可保存数天。如需长时间保存，可以添加体积分数30%甘油和质量分数0.01%的NaN_3作为保护剂，并置于−80 ℃冷冻保存[28]。

1.2.5　免疫印迹法检测多克隆抗体的特异性

利用野生型衣藻蛋白质作为抗原来检测纯化后多克隆抗体的特异性。将培养至对数生长期的野生型CC-125藻种经特定处理，成功提取出鞭毛蛋白。取20 μg鞭毛蛋白，加入5×上样缓冲液，沸水浴5 min后于12 000 r/min离心5 min，上样后进行SDS-PAGE电泳分离。转至NC膜上牛奶封闭1 h，之后以1∶400的体积比加入纯化后的ARL3抗体进行孵育，二抗采用HRP标记的羊抗兔抗体，稀释体积比为1∶10 000，最后加入ECL电化学发光液进行曝光[20]。

1.2.6　莱茵衣藻全蛋白质定量

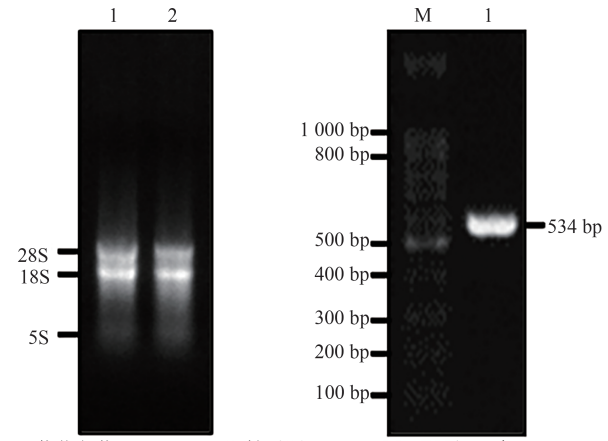
取1 mL培养至对数生长期的藻液，室温下于2 500 r/mim离心3 min并收集藻体。加入108 μL

蛋白质提取液A、80 μL蛋白质提取液B和12 μL的1 mol/L的DTT，涡旋振荡45 min使细胞裂解完全。之后于4 ℃、12 000 r/min下离心10 min，取5 μL上清液进行蛋白质定量试验，剩余上清液中加入50 μL的5×上样缓冲液，沸水浴5 min使蛋白质充分变性。上述5 μL上清液中加入195 μL去离子水、800 μL氨基黑蛋白质定量液，混合均匀后于4 ℃、12 000 r/min离心10 min，弃上清液。沉淀中加入1 mL蛋白质定量漂洗液充分振荡后于4 ℃、12 000 r/min离心10 min，弃上清液，漂洗2次。之后加入1 mL 0.2 mol/L的NaOH溶液振荡混匀，测定其OD_{615}值，以0.2 mol/L的NaOH溶液作为阴性对照。根据公式y=0.086 9x+0.007 4，算出样品溶液的质量浓度x，其中y为OD_{615}值，上样量为20 μg，计算上样体积。

2 结果与讨论

2.1 目的基因获取

从野生型莱茵衣藻CC-125中提取RNA，结果见图1(a)。提取的RNA完整性较好，且无DNA和蛋白质残留污染，因此可以对RNA进行反转录试验。以反转录获得的莱茵衣藻cDNA为模板进行PCR扩增，获得大小为534 bp的*arl3*基因，经质量浓度1 g/dL的琼脂糖凝胶分离，可见PCR产物条带单一，见图1(b)。说明提取的RNA质量良好，该cDNA可用于后续研究使用。利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的基因，进行后续试验。



1—莱茵衣藻CC-125 RNA阳性对照；2—本次莱茵衣藻CC-125 RNA提取物。(a) 莱茵衣藻CC-125 RNA提取

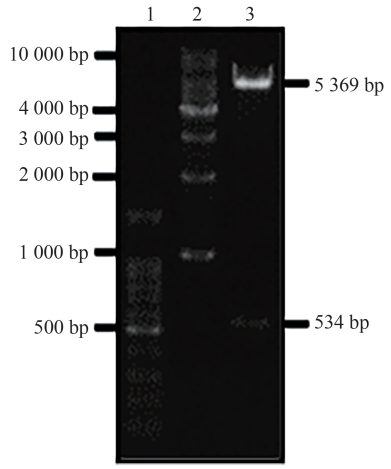
M—DNA marker；1—*arl3* PCR产物。(b) *arl3* PCR产物

图1 目的基因的获取

Fig. 1 Acquisition of the target gene

2.2 重组表达载体的构建

采用*Eco*R Ⅰ和*Xho* Ⅰ限制性内切酶对pET-28a空载和*arl3* PCR产物进行双酶切，获得大小为5 369 bp的pET-28a(+)线性载体和*arl3*目的基因，连接后挑取单克隆细胞提取质粒，命名为pET-28a(+)-*arl3*，并采用*Eco*R Ⅰ和*Xho* Ⅰ限制性内切酶进行双酶切验证。结果显示，pET-28a(+)-*arl3*质粒被酶切为大小正确的两条片段，见图2。将重组表达载体送往苏州金唯智生物科技有限公司进行测序，确定为目标产物。



1—100 bp DNA标准品；2—1 000 bp DNA标准品；3—pET-28a(+)-*arl3*双酶切产物。

图2 重组质粒pET-28a(+)-*arl3*的*Eco*R Ⅰ和*Xho* Ⅰ双酶切验证

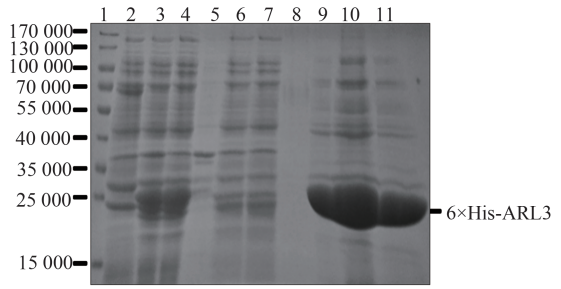
Fig. 2 *Eco*R Ⅰ and *Xho* Ⅰ double restriction digestion analysis of recombinant plasmid pET-28a(+)-*arl3*

2.3 融合蛋白诱导表达和纯化

经过DNAMAN软件的预测，ARL3蛋白质的相对分子质量为20 000。在IPTG的诱导下，BL21(DE3)菌株能够大量表达6×His-ARL3。收集菌株后经高压破碎获得全蛋白质，将全蛋白质进行低温高速离心，分离上清液和沉淀并进行SDS-PAGE凝胶电泳分析，结果见图3。在相对分子质量约20 000处有明显的蛋白质条带，与预期的目的蛋白质大小相符，且6×His-ARL3主要表达在上清液中。融合蛋白质经纯化后利用Image J软件进行纯度分析，其纯度高于85%，蛋白质总质量达3 mg，符合免疫要求，因此6×His-ARL3抗原可用于后续动物免疫试验。

2.4 抗血清效价的测定

抗血清检测参照作者所在课题组其他抗体制



1—蛋白质标准品；2—诱导前对照；3—诱导后全蛋白质；4—诱导后上清液；5—诱导后沉淀；6—漂洗液1；7—漂洗液2；8—漂洗液3；9—洗脱液1；10—洗脱液2；11—洗脱液3。

图3　SDS-PAGE检测目的蛋白质的表达与纯化

Fig. 3　Expression and purification detection of the target protein by SDS-PAGE

备中的抗血清检测方法[18,29]，当试验组血清OD_{450}值/阴性对照组血清OD_{450}值≥2.0时为阳性，其效价为最大OD值一半时所对应的抗血清稀释倍数[30-31]。抗血清效价测定结果见图4，最大OD值的一半处所对应的抗血清稀释倍数为102 400。因此，ARL3抗血清的效价为1∶102 400，达到取血标准，可对试验动物进行放血处理，获得ARL3抗血清。

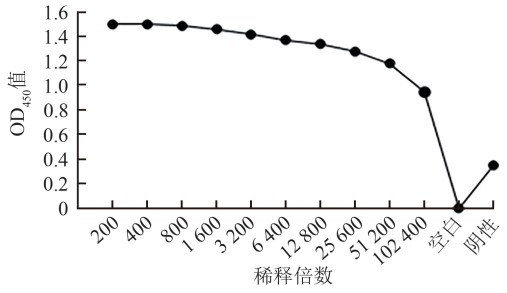


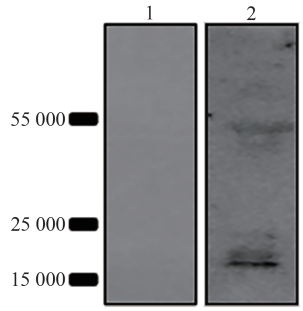
图4　间接ELISA法测定抗血清效价

Fig. 4　Determination of antiserum titer by indirect ELISA method

2.5　抗体特异性检测

2.5.1　抗血清Protein A纯化

抗血清中除了含有ARL3外还含有其他的杂蛋白质，因此需要对抗血清做进一步的纯化，以提高目的蛋白质纯度。Protein A作为亲和配基偶联到琼脂糖基质上，可与血清中抗体分子特异性结合。ARL3的抗血清经Protein A纯化后，通过蛋白质免疫印迹检测发现，抗血清中的ARL3抗体可以与野生型莱茵衣藻的内源ARL3结合。但由于免疫抗原存在多个抗原识别位点，因此产生的多克隆抗体可能存在非特异性检测条带。相对分子质量为55 000处存在非特异性条带，见图5。表明经Protein A纯化后的抗血清纯度仍不高，并没有形成预期的单一条带，需要进一步纯化。



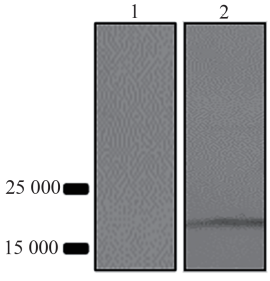
1—免疫前血清；2—纯化后抗体。

图5　蛋白质免疫印迹检测Protein A纯化后的ARL3抗体特异性

Fig. 5　Detection of anti-ARL3 antibody specificity after purification with Protein A by Western blot

2.5.2　抗原抗体亲和纯化

将6×His-ARL3作为抗原偶联至硝酸纤维素膜上，与经Protein A纯化后的ARL3抗血清结合，ARL3抗体可特异性结合6×His-ARL3抗原，而其他非特异性抗体均作为杂质被漂洗掉，达到再次纯化的目的。用Western blot再次检测野生型莱茵衣藻中内源ARL3抗体的特异性，在相对分子质量20 000处出现单一条带，见图6。表明ARL3经抗原抗体亲和纯化后具有较高的特异性，可用于后续研究。



1—免疫前血清；2—纯化后抗体。

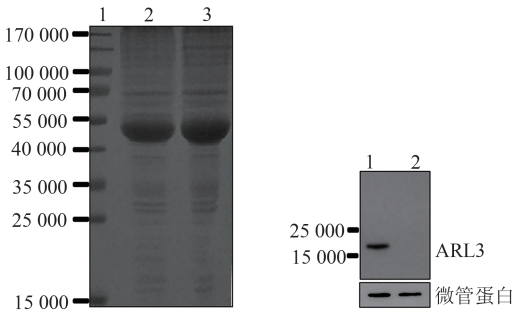
图6　蛋白质免疫印迹检测抗原抗体纯化后ARL3抗体特异性

Fig. 6　Detection of ARL3 antibody specificity after antigen-antibody purification by Western blot

2.6　*arl3*突变体鉴定

利用ARL3抗体从蛋白质水平检测衣藻突变体库中的LMJ.RY0420.182282是否为*arl3*完全突变体。处理过的莱茵衣藻CC-125样品和*arl3*样品的OD_{615}值分别为0.560、0.507，对应蛋白质质量浓度分别为6.359、5.740 mg/mL，分别上样20 μg进行SDS-PAGE凝胶电泳分析。经Image J蛋白质灰度分析后，确定两种蛋白质上样质量一致，见图7(a)。

通过Western blot检测ARL3抗体，CC-125藻种中可见ARL3特异性条带，而LMJ.RY0420.182282中无特异性条带，说明LMJ.RY0420.182282中不含ARL3，为*arl3*完全突变体，见图7(b)。



1—Protein marker；2—CC-125；3—LMJ.RY0420.182282。 1—CC-125；2—LMJ.RY0420.182282。

(a) SDS-PAGE凝胶电泳 (b) 蛋白质免疫印迹检测ARL3抗体

图7 *arl3*突变体鉴定

Fig. 7 Identification of *arl3* mutant

3 结论

作者利用基因克隆技术构建了带有His标签的蛋白质，并以此为免疫原，因His标签的相对分子质量仅为4 300，形成融合蛋白后不会对原蛋白质的结构造成破坏，且His-Tag的免疫原性较低，对目的蛋白质的特异性几乎没有影响。作为免疫抗原，其纯度越高，抗血清效价越高，6×His-ARL3融合蛋白在纯化之后纯度可达到85%以上，因此可进行动物免疫。抗血清经过proteinA、抗原抗体纯化后能够特异性检测莱茵衣藻ARL3，表明制备的ARL3抗体具有较高的特异性。

参考文献

[1] POWELL L，SAMARAKOON Y H，ISMAIL S，et al. ARL3，a small GTPase with a functionally conserved role in primary cilia and immune synapses[J]. Small GTPases，2021，12(3)：167-176.

[2] 樊振川，孙维越，刘雁霞，等. 一种莱茵衣藻纤毛内运送蛋白IFT38的多克隆抗体、应用和方法：CN113278069B[P]. 2022-12-13.

[3] LECHTRECK K F. IFT-cargo interactions and protein transport in cilia[J]. Trends in Biochemical Sciences，2015，40(12)：765-778.

[4] EGUETHER T，SAN AGUSTIN J T，KEADY B T，et al. IFT27 links the BBSome to IFT for maintenance of the ciliary signaling compartment[J]. Devopmental Cell，2014，31(3)：279-290.

[5] JIN H，WHITE S R，SHIDA T，et al. The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia[J]. Cell，2010，141(7)：1208-1219.

[6] LECHTRECK K F，JOHNSON E C，SAKAI T，et al. The *Chlamydomonas reinhardtii* BBSome is an IFT cargo required for export of specific signaling proteins from flagella[J]. Journal of Cell Biology，2009，187(7)：1117-1132.

[7] SHINDE S R，NAGER A R，NACHURY M V. Ubiquitin chains earmark GPCRs for BBSome-mediated removal from cilia[J]. Journal of Cell Biology，2020，219(12)：e202003020.

[8] YE F，NAGER A R，NACHURY M V. BBSome trains remove activated GPCRs from cilia by enabling passage through the transition zone[J]. Journal of Cell Biology，2018，217(5)：1847-1868.

[9] LOKTEV A V，ZHANG Q，BECK J S，et al. A BBSome subunit links ciliogenesis，microtubule stability，and acetylation[J]. Devopmental Cell，2008，15(6)：854-865.

[10] XUE B，LIU Y X，DONG B，et al. Intraflagellar transport protein RABL5/IFT22 recruits the BBSome to the basal body through the GTPase ARL6/BBS3[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2020，117(5)：2496-2505.

[11] SUN W Y，XUE B，LIU Y X，et al. Chlamydomonas LZTFL1 mediates phototaxis *via* controlling BBSome recruitment to the basal body and its reassembly at the ciliary tip[J]. Proceeding of the Natinal Academy of Sciences，2021，118(35)：e2101590118.

[12] LIANG Y，ZHU X，WU Q，et al. Ciliary length sensing regulates IFT entry *via* changes in FLA8/KIF3B phosphorylation to control ciliary assembly[J]. Current Biology，2018，28(15)：2429-2435.

[13] LOKAJ M，KOSLING S K，KOERNER C，et al. The interaction of CCDC104/BARTL1 with Arl3 and implications for ciliary function[J]. Structure，2015，23(11)：2122-2132.

[14] ISMAIL S A，CHEN Y X，MIERTZSCHKE M，et al. Structural basis for Arl3-specific release of myristoylated ciliary cargo from UNC119 [J]. The EMBO Journal，2012，31(20)：4085-4094.

[15] HANKE-GOGOKHIA C，WU Z J，GERSTNER C D，et al. Arf-like protein 3（ARL3）regulates protein trafficking and ciliogenesis in mouse photoreceptors[J]. The Journal of Biological Chemistry，2016，291(13)：7142-7155.

[16] WRIGHT K J，BAYE L M，OLIVIER-MASON A，et al. An ARL3-UNC119-RP2 GTPase cycle targets myristoylated NPHP3 to the primary cilium[J]. Genes & Development，

2011，25（22）：2347-2360.

[17] GRIFFITHS G M，TSUN A，STINCHCOMBE J C. The immunological synapse：a focal point for endocytosis and exocytosis[J]. The Journal of Cell Biology，2010，189（3）：399-406.

[18] 刘雁霞，樊振川. 莱茵衣藻LZTFL1蛋白的多克隆抗体制备及应用[J]. 中国生物工程杂志，2017，37（11）：109-115.
LIU Y X，FAN Z C. Polyclonal antibody preparation and application of *C. reinhardtii* LZTFL1 protein[J]. China Biotechnology，2017，37（11）：109-115.（in Chinese）

[19] 田伟. 莱茵衣藻纤毛内蛋白IFT139的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备[D]. 天津：天津科技大学，2016.

[20] 薛斌，王高飞，潘强，等. 莱茵衣藻IFT22蛋白的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 中国细胞生物学学报，2018，40（11）：1915-1921.
XUE B，WANG G F，PAN Q，et al. Prokaryotic expression，purification and polyclonal antibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT22 protein [J]. Chinese Journal of Cell Biology，2018，40（11）：1915-1921.（in Chinese）

[21] 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[J]. 生物工程学报，2016，32（8）：1124-1132.
REN H Y，DONG B，FAN Z C，et al. Prokaryotic expression and purification of *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport protein 46（IFT46）and preparation of polyclonal antibody[J]. Chinese Journal of Biotechnology，2016，32（8）：1124-1132.（in Chinese）

[22] 王晶. 小G蛋白BBS3b的原核表达纯化及其多克隆抗体的制备[D]. 天津：天津科技大学，2018.

[23] 刘雁霞，刘思佳，王慧，等. 莱茵衣藻BBS1蛋白的原核表达、纯化及其多克隆抗体制备[J]. 天津科技大学学报，2019，34（6）：31-34.
LIU Y X，LIU S J，WANG H，et al. Prokaryotic expression，purification and polyclonal antibody preparation of *C. reinhardtii* BBS1 protein[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology，2019，34（6）：31-34.（in Chinese）

[24] 韩鹏飞，闫珍，樊振川. 莱茵衣藻纤毛内运送蛋白IFT57抗原的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 食品与生物技术学报，2019，38（11）：108-114.
HAN P F，YAN Z，FAN Z C. Prokaryotic expression and purification of *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport protein 57（IFT57）antigen and preparation of polyclonal antibody[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2019，38（11）：108-114.（in Chinese）

[25] 董彬，吴松，程荣强，等. 莱茵衣藻BBSome蛋白BBS2原核表达、纯化和多克隆抗体的制备及鉴定[J]. 食品与生物技术学报，2019，38（2）：145-152.
DONG B，WU S，CHENG R Q，et al. Prokaryotic expression，purification，polyclonal antibody preparation and identification of the *Chlamydomonas reinhardtii* BBSome protein BBS2[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2019，38（2）：145-152.（in Chinese）

[26] 王震，董彬，樊振川，等. 莱茵衣藻IFT25的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 食品与生物技术学报，2018，37（9）：903-908.
WANG Z，DONG B，FAN Z C，et al. Prokaryotic expression and purification of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT25 in *Escherichia coli* and preparation of polyclonal antibody [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2018，37（9）：903-908.（in Chinese）

[27] 李桂新，孙长凯，程桂芝，等. 应用Protein A亲和层析法制备及纯化R1 JHL单克隆抗体[J]. 大连医科大学学报，2008，30（2）：188-190.
LI G X，SUN C K，CHENG G Z，et al. Preparation and purification of mouse monoclonal antibody against NMDAR1 by ProteinA-Sepharose CL-4B affinity chromatography [J]. Journal of Dalian Medical University，2008，30（2）：188-190.（in Chinese）

[28] 骆爱玲，梁峥，Maurice S B Ku. 用硝酸纤维素膜亲和法纯化抗体[J]. 植物学报，1997，39（6）：534-536.
LUO A L，LIANG Z，KU M S B. A method for purification of antibodies with protein immobilized on nitrocellulose membrane [J]. Acta Botanica Sinica，1997，39（6）：534-536.（in Chinese）

[29] 任海月. 莱茵衣藻IFT46的原核表达纯化及其多克隆抗体的制备[D]. 天津：天津科技大学，2016.

[30] JIANG W W，LIU X L，WU D，et al. A simple，rapid one-step ELISA using antibody-antibody complex [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry，2015，62（1）：126-131.

[31] LIMSUWANCHOTE S，WUNGSINTAWEEKUL 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.

（责任编辑：刘冬梅）