DOI:10.12441/spyswjs.20230407004 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0063-08

莱茵衣藻ChR2多克隆抗体的制备

张媛媛[1,2] 刘雁霞[1,2] 樊振川[1,2,3*]

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院,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;3. 天津科技大学食品营养与安全国家重点实验室,天津 300457)

摘要:【目的】制备一支莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*,*C. reinhardtii*)光敏通道蛋白2(ChR2)多克隆抗体,研究ChR2在鞭毛内通过感应光信号来影响细胞趋光性的应答机制。**【方法】**将构建的表达载体pET-28a(+)-*chr2*转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)BL21(DE3)感受态细胞,诱导表达6×His-ChR2融合蛋白,用镍柱对其进行亲和纯化。以此融合蛋白作为抗原进行动物免疫,产生相应抗体,再采用Protien A处理抗血清,使得抗体富集,获得纯度较高的莱茵衣藻ChR2多克隆抗体。通过免疫印迹检测莱茵衣藻ChR2多克隆抗体的特异性,并通过免疫荧光试验来确定ChR2在鞭毛中的位置。**【结果】**6×His-ChR2融合蛋白纯化结果表明其纯度>85%;间接ELISA法检测莱茵衣藻ChR2多克隆抗体的效价为1∶25 600;在野生型莱茵衣藻CC-125细胞的全蛋白质提取物中出现了目的条带(相对分子质量93 000),而在突变型莱茵衣藻CC-5499(*chr1*和*chr2*双基因敲除的突变体)细胞的全蛋白质提取物中未出现目的条带,说明所得到的莱茵衣藻ChR2多克隆抗体特异性较高;ChR2定位于莱茵衣藻细胞的眼点和鞭毛。**【结论】**该研究为后续探索ChR2在鞭毛内通过感应光信号影响细胞趋光性的机制奠定了基础。

关键词:莱茵衣藻;ChR2;原核表达;多克隆抗体

Preparation of Polyclonal Antibodies Against *Chlamydomonas reinhardtii* ChR2

ZHANG Yuanyuan[1,3] *LIU Yanxia*[1,3] *FAN Zhenchuan*[1,2,3*]

(1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology,Tianjin 300457, China; 2. National International Science and Technology Cooperation Institute of Health Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 3. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: [**Objective**] This study prepared the polyclonal antibodies against *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) channelrhodopsin 2 (ChR2) to study the mechanism by which ChR2 in flagella guides cell phototaxis by sensing light signals. [**Method**] The constructed expression vector pET-28a(+)-*chr2* was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) competent cells to induce the expression of the 6×His-ChR2 fusion protein, which was then purified through a nickel column. The fusion protein was used as an antigen to immunize animals for the production of corresponding antibodies. The antiserum was treated with Protien A to enrich the antibodies, and thus high-purity polyclonal antibodies against *C. reinhardtii* ChR2 were obtained. Western blot was employed to assess the specificity of the prepared antibodies, and immunofluorescence was used to determine the localization of ChR2 in flagella. [**Result**] The purification results of the 6×His-ChR2 fusion protein demonstrated a purity exceeding 85% after purification. The indirect ELISA results showed that the titer of the

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32070698);国家自然科学基金青年基金项目(32200558)。

通信作者:樊振川(1974—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事鞭毛信号转导及营养代谢型鞭毛病致病机理研究。E-mail:fanzhen@tust.edu.cn

收稿日期:2023-04-07 **修回日期:**2023-07-25

polyclonal antibodies against *C. reinhardtii* ChR2 reached 1∶25 600. The target band (relative molecular mass 93 000) appeared in electrophoresis of the whole protein extract of wild-type *C. reinhardtii* CC-125 cells but did not appear in that of the whole protein extract of mutant *C. reinhardtii* CC-5499 (a mutant with knockout of both *chr1* and *chr2*) cells, indicating that the obtained polyclonal antibodies had high specificity. The localization of ChR2 was in the eyespots and flagella of *C. reinhardtii* cells. [**Conclusion**] The findings lay a foundation for subsequent studies on the mechanism by which ChR2 in flagella guides cell phototaxis by sensing light signals.
Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*; ChR2; prokaryotic expression; polyclonal antibody

光信号的感应和传导是一个相对复杂的生理过程。在人和脊椎动物眼睛中的光感受细胞都具有特化的感光鞭毛，在这些感光鞭毛上存在视紫红质和视紫蓝质的光受体。ChR2在感应不同光强和波谱的光照刺激后，通过激活胞内的Gt-PDE-cGMP途径打开位于视觉细胞质膜表面的cGMP门控通道，形成膜电位差，从而将胞外光信号转化为胞内电信号，并通过视神经将该电信号传递到大脑视觉中枢，进行相应的生理应答[1-3]。与人和脊椎动物相比，低等生物如莱茵衣藻则拥有不同的感光和信号传导系统，这一套视觉系统可以使细胞在最佳的光条件下进行光合作用[4-5]。莱茵衣藻拥有8种不同细菌类型的视紫红质（Cop1、Cop2、Cop3、Cop4、Cop5、Cop6、Cop7、Cop8）[6]，其中仅有Cop3和Cop4调控细胞的趋光性。由于Cop3和Cop4是光诱导的离子通道受体，因此研究者又将Cop3和Cop4命名为光敏通道蛋白1（ChR1）和ChR2[7]。ChR2是一种7次跨膜的非选择性阳离子通道蛋白，对350~550 nm的光谱比较敏感，其中心敏感波长为470 nm，在470 nm光谱下，ChR2通过改变蛋白质分子构象形成非选择性的阳离子通道，从而使ChR2对Na^+、K^+、H^+、Ca^{2+}等阳离子有更好的通透性，其生理表征为改变细胞膜电位内正外负状态，改变细胞的膜电势产生感应电流[8-9]。

莱茵衣藻是以眼点为感光系统的单细胞真核生物，其利用眼点感光，通过鞭毛摆动进行趋弱避强[10]。自从ChR2被发现以来，莱茵衣藻光敏通道蛋白广泛用于光遗传学研究，并且以ChR2为基础，开发出ChR2（H134R）、ChETA、CoChR等多种光敏通道蛋白。虽然目前光遗传技术取得了较大突破，但仍有一些科学问题亟待解决：光照条件下，光敏蛋白质为何在神经元群体中的分布不均匀；光敏蛋白质的响应如何干扰周边的神经细胞；目前我国在微藻领域的技术水平能否支持对该类生物进行充分的基础生物学研究；光敏蛋白质的鞭毛定位是否为其趋光性机理的前提。因此，作者拟制备高纯度的莱茵衣藻ChR2多克隆抗体，为研究莱茵衣藻ChR2调控细胞趋光性的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 载体和菌株

野生型莱茵衣藻CC-125细胞、大肠杆菌XL1-blue、大肠杆菌BL21（DE3）、相关原核表达载体等：由作者所在实验室保存；突变型莱茵衣藻CC-5499（*chr1*和*chr2*双基因敲除的突变体）：莱茵衣藻资源中心。

1.1.2 试验试剂

分子生物学试验试剂：北京全式金生物技术股份有限公司；蛋白质纯化试剂：美国GE Healthcare公司；免疫印迹试验试剂：美国Sigma公司；免疫试验由华大（北京）蛋白质研发中心有限公司完成。

1.1.3 仪器与设备

电子天平：JA12002型，绍兴上虞艾科仪器设备有限公司；PCR仪：HM-P16型，山东恒美电子科技有限公司；超高压破碎仪：AH-NANO型，郑州科泰实验设备有限公司；蛋白质微量测定仪：Nano-600型，上海嘉鹏科技有限公司；水平电泳仪：BAYGENE型，美国Heofer公司；免疫印迹成像分析仪：ChampGE 5000型，北京赛智创业科技公司；垂直电泳仪：SE-300-10A-1.0型，天津伊诺白晶生物科技有限公司；湿电转膜仪：PS300-B型，美国Heofer公司。

1.2 方法

1.2.1 *chr2*基因序列分析及抗原识别位点预测

利用SWISS Model和DNAMAN对莱茵衣藻*chr2*基因进行核苷酸和氨基酸序列分析，预测其跨膜区、亲疏水性及抗原识别位点，筛选ChR1的抗原表位区。以莱茵衣藻cDNA为模板，采用PCR技术扩增筛选5′端和3′端中分别添加了*Bam*H I、*Hin*d III限制性核酸内切酶位点的抗原表位区。

1.2.2 原核表达载体pET-28a(+)-*chr2*的构建

将PCR扩增的*chr2*与原核表达载体pET-28a(+)分别使用*Bam*H I、*Hin*d III限制性核酸内切酶进行双酶切，用PCR产物纯化试剂盒回收目的基因[11-12]。在T4连接酶的作用下使目的基因与载体连接1 h。随后转化至大肠杆菌XL1-blue感受态细胞，均匀涂至LBK平板（含100 μg/mL卡那霉素的LB平板）中，于37 ℃下倒置培养14~16 h[13-14]。挑取单克隆菌株至LBK液体培养基中，过夜培养并收集菌体，提取质粒，用*Bam*H I、*Hin*d III限制性核酸内切酶对质粒进行双酶切验证，由苏州金唯智生物科技有限公司完成测序[15-16]。

1.2.3 重组蛋白诱导表达

参照作者所在课题组前期的研究[17-19]，按照1.2.2的方法处理测序正确的质粒pET-28a(+)-*chr2*，待长出阳性克隆后，转入LBK液体培养基中，培养至OD_{600}值为0.6~0.8，加入终浓度为0.2 mmol/L的IPTG诱导表达6×His-ChR2融合蛋白，于25 ℃、220 r/min条件下培养8~10 h[15,20]。8 000 r/min离心2 min收集菌体，4 ℃下用超高压破碎仪使菌体充分破碎。8 000 r/min离心10 min后，分别取少量上清液和沉淀样品进行SDS-PAGE分析，确定目的蛋白质是否表达及其水溶性[15,20]。

1.2.4 蛋白质纯化

参照作者所在课题组前期的研究[17-21]，将扩大培养后表达目的蛋白质的菌体加到结合液中[21]，高压破碎后收集沉淀（目的蛋白质以包涵体形式存在于沉淀中），用添加了1 mol/L尿素的结合液清洗沉淀2次，最后溶于8 mol/L尿素结合液中。用8 mol/L尿素结合液清洗Ni Sepharose™ 6 Fast Flow填料，平衡柱子。将溶解后的沉淀与填料混合均匀，于摇床上室温结合2 h。结合完毕后，先用8 mol/L尿素结合液漂洗，并用蛋白质微量测定仪测定漂洗液蛋白质质量浓度，直至无蛋白质洗出，用含20 mmol/L咪唑的漂洗液继续漂洗至蛋白质质量浓度为0。最后用含500 mmol/L咪唑的洗脱液洗脱目的蛋白质，收集并采用SDS-PAGE分析其纯度。

1.2.5 动物免疫

将纯化合格的蛋白质（纯度>85%，质量浓度>0.5 mg/mL）送至北京华大蛋白质研发中心有限公司进行动物免疫[18]。将2.0 kg的新西兰大白兔作为免疫动物，首次免疫前用体积分数75%的乙醇擦拭兔子耳部静脉，采集100~200 μL阴性血，全血室温静置30~120 min后，于1 500 r/min离心10 min，收集血清作为阴性对照。初期免疫时用质量分数0.9%的NaCl溶液将400 μg免疫原进行稀释（体积为200~500 μL），加入等体积的弗式完全佐剂混匀，形成油包水型乳化液，进行背部多点皮下注射。初免14 d后，取200 μg抗原进行第二次加强免疫，再经过14 d后进行第三次加强免疫。免疫完成后耳静脉采血测定效价，收集血清，分装后储存于−80 ℃冰箱。

1.2.6 ChR2多克隆抗体效价测定

采用间接ELISA法检测ChR2多克隆抗体的效价[19]。以6×His-ChR2融合蛋白作为包被抗原，用包被液（碳酸钠−碳酸氢钠缓冲液，pH 9.6）稀释抗原至终质量浓度为2 μg/mL，以100 μL/孔包被于酶标板中，4 ℃过夜后用PBS缓冲液清洗2次。用质量分数5%的脱脂牛奶室温封闭抗原1 h，用清洗液洗涤3次，加入抗血清作为一抗，室温孵化1 h，洗涤液清洗3次。加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔作为二抗，室温孵化30 min，洗涤液清洗3次，最后经3’，3’，5’，5’-四甲基联苯胺（TMB）显色，酶标仪检测其在450 nm处的OD值，最大OD值的1/2处所对应的稀释比为ChR2多克隆抗体的效价。

1.2.7 ChR2多克隆抗体纯化

称取所需的Protein A Sepharose™ CL-4B干粉，加入蒸馏水使其溶胀（终质量浓度为0.25 g/mL），再用过量蒸馏水清洗3次。首先用结合缓冲液（50 mmol/L Tris−HCl，pH 7.0）平衡柱子，然后在

1 mL 抗血清中加入 10 mL 结合液进行稀释，过 0.45 μm 滤膜，并与填料结合，室温结合 1~2 h 后继续用结合液冲洗柱子，直至漂洗液中无蛋白质[15]。最后用酸性洗脱液（0.1 mol/L 甘氨酸，pH 2.7）冲洗柱子，收集洗脱下来的抗体，每 1 mL 抗体中加入 30 μL 中和液（1 mol/L Tris-HCl，pH 9.0），保存备用。

1.2.8 免疫印迹检测 ChR2 多克隆抗体

利用免疫印迹检测莱茵衣藻 ChR2 多克隆抗体的特异性。取 20 μL 野生型莱茵衣藻 CC-125 与突变型莱茵衣藻 CC-5499（*chr1* 和 *chr2* 双基因敲除的突变体）的细胞全蛋白质进行定量分析[22]。向 20 μL 细胞全蛋白质中加入 5×上样缓冲液，混匀，煮沸 5 min，进行 SDS-PAGE 分析，结束后转至醋酸纤维素薄膜上。用质量分数 10% 的脱脂奶粉封闭 2 h，按照体积比 1∶1 000 加入 ChR2 多克隆抗体孵育 1 h，TBST 缓冲液洗涤 3 次后，加入 HRP 标记的羊抗兔二抗孵育 1 h，再用 TBST 缓冲液洗涤 3 次，最后采用 ECL 显色曝光。

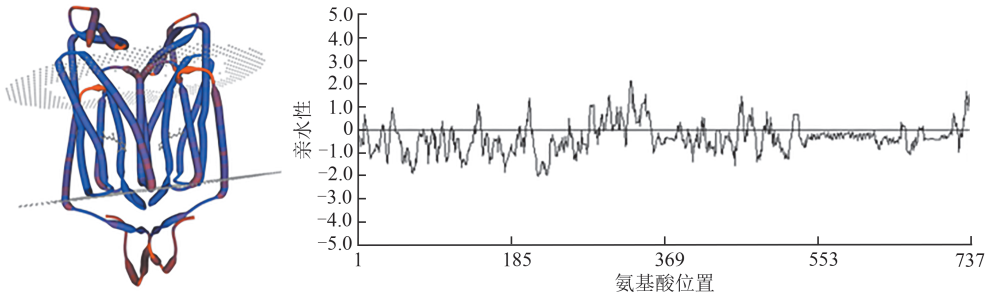
1.2.9 免疫荧光试验

通过免疫荧光法测定莱茵衣藻 ChR2 多克隆抗体的特异性[17,23-24]。取 30~50 μL 对数生长期的野生型莱茵衣藻 CC-125 细胞藻液，将细胞固定在盖玻片上，向盖玻片中滴加 25 μL 封闭液（体积分数 5% BSA、体积分数 10% 山羊血清、体积分数 0.3% Triton™X-100），25 ℃封闭 2 h。再加入 25 μL 稀释后的抗体，室温孵育 4 h 后用体积分数 50% 的 PBS 缓冲液（含有体积分数 0.2% 的 Tween-20）冲洗 10 次，每次 5 min，然后加入红外荧光素 Alexa Fluor 594 标记的羊抗兔二抗（稀释体积比为 1∶400），室温孵育 1 h 后再用体积分数 50% 的 PBS 缓冲液（含有体积分数 0.2% 的 Tween-20）冲洗 10 次，每次 5 min，最后一次用 ddH_2O 洗去盐分。清洗完毕后封片，避光干燥 2 h 以上使其凝固，用荧光显微镜拍照留存。

2 结果与讨论

2.1 原核表达载体 pET-28a(+)-*chr2* 的构建

利用 SWISS Model 和 DNAMAN 对莱茵衣藻 *chr2* 基因进行核苷酸和氨基酸序列分析。如图 1 所示，ChR2 为跨膜蛋白，因此表现出较强的疏水性。通过 DNAMAN 分析其抗原表位，共有 22 个较强的抗原识别位点，且 C 端抗原识别位点分布较多。因此结合以上序列分析结果，选择 C 端 325—733 的氨基酸制备多克隆抗体。



(a) ChR2结构预测　(b) ChR2亲疏水性分析

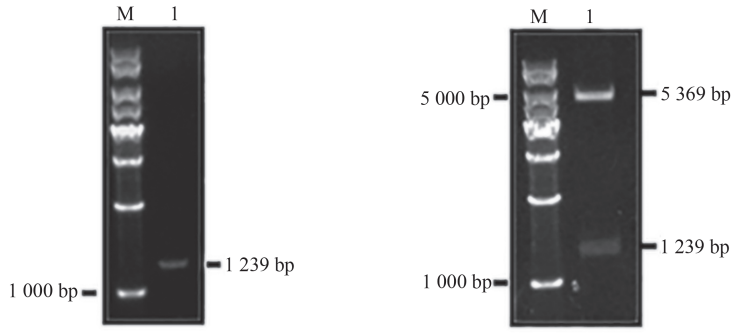
图 1 *chr2* 序列分析

Fig. 1 Analysis of *chr2* sequence

以莱茵衣藻 cDNA 为模板，设计并合成引物（F：GGAATTCATGCGCGACAAGATGAAGG；R：CCCAAGCTTTTAATTCTGCAGCATCTCCGC），用 25 μL PCR 体系扩增大小为 1 239 bp 的 *chr2* 目的基因，见图 2（a）。用 *Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ限制性核酸内切酶对 pET-28a（+）、*chr2* 基因进行双酶切，采用琼脂糖回收载体片段和目的基因。连接转化获得重组质粒，并将提取出的质粒进行双酶切验证。如图 2（b）所示，双酶切后得到大小为 5 369 bp 的载体条带及大小为 1 239 bp 的目的基因条带。将质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序，将测序正确的质粒命名为 pET-28a（+）-*chr2*。

2.2 6×His-ChR2 融合蛋白的纯化

6×His-ChR2 融合蛋白的表达情况见图 3，经过 DNAMAN 与 SDS-PAGE 分析，目的蛋白质相对



M—1 000 bp DNA marker；1—PCR产物。

(a) *chr2*的PCR产物验证

M—1 000 bp DNA标准品；1—转化子所提取质粒的*Bam*H I和*Hind* III双酶切产物。

(b) 重组质粒pET-28a(+)-*chr2*的*Bam*H I和*Hind* III双酶切验证

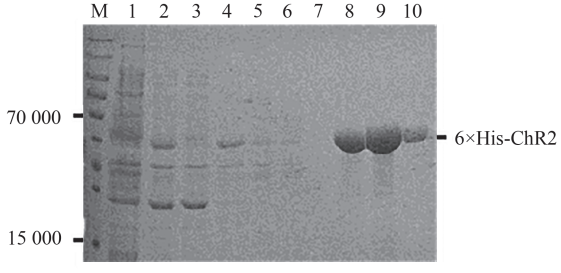
图2　pET-28a(+)-*chr2*原核表达载体的构建

Fig. 2　Construction of the prokaryotic expression vector pET-28a(+)-*chr2*

分子质量为53 000，并且以包涵体的形式存在于沉淀中。镍柱纯化6×His-ChR2融合蛋白后，6×His-ChR2融合蛋白质量浓度为2.5 mg/mL，纯度大于85%，符合免疫要求，可进行后续的免疫。

2.3　ChR2多克隆抗体效价的检测

用纯化后的6×His-ChR2融合蛋白免疫新西兰大白兔，免疫3次以后进行耳静脉采血，室温静置2 h后析出血清，用间接ELISA法测定其效价。ChR2多克隆抗体的效价为OD_{450}最大值的1/2处所对应的稀释比。如图4所示，ChR2多克隆抗体的效价为1∶25 600。



M—蛋白质标准物；1—诱导前全蛋白质；2—诱导后全蛋白质；3—诱导后上清液；4—诱导后沉淀；5—流穿液；6~7—漂洗液；8~10—洗脱液。

图3　6×His-ChR2融合蛋白表达及纯化

Fig. 3　Expression and purification of 6×His-ChR2 fusion protein

2.4　IgG抗体富集及莱茵衣藻ChR2多克隆抗体特异性检测

免疫后得到的抗血清中含有多种成分，如抗体IgA、IgG、IgM等，以及其他生长因子和激素等，

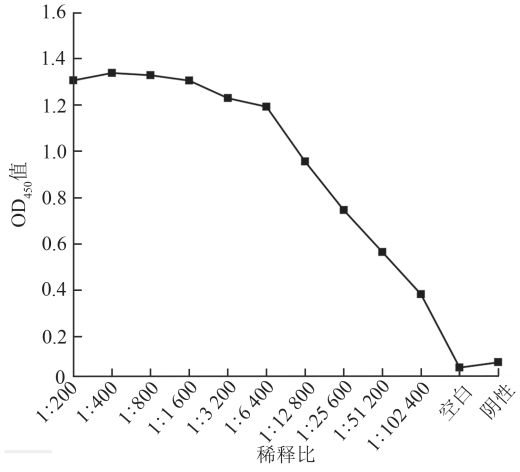
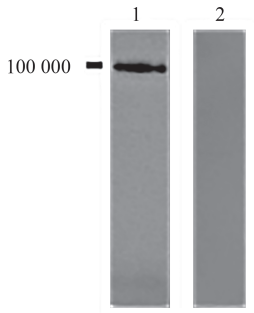


图4　间接ELISA法测定莱茵衣藻ChR2多克隆抗体的效价

Fig. 4　Polyclonal antibodies against *C. reinhardtii* ChR2 titer determined by indirect ELISA

因此需要进一步处理来提高抗体的纯度和特异性。用能特异性与人和哺乳动物抗体（主要是IgG）结合的Protien A纯化抗血清，用富集的ChR2多克隆抗体对野生型莱茵衣藻CC-125和突变型莱茵衣藻CC-5499（*chr1*和*chr2*双基因敲除的突变体）的全细胞蛋白质提取物进行免疫印迹分析。如图5所示，ChR2抗血清经过Protien A富集后，能够识别野生型莱茵衣藻CC-125全细胞蛋白质提取物中的内源性ChR2，在93 000处出现目的条带；突变型莱茵衣藻CC-5499由于缺失*chr2*基因，无法表达ChR2，与抗体无法结合，所以未出现目的条带。结果表明，经过Protien A纯化后的ChR2多克隆抗体经免疫印迹检测显示无杂带且目的条带清晰，表明所制备的莱茵衣藻ChR2多克隆抗体

纯度较高、特异性较强，因此不需要再进行抗原抗体纯化，可用于ChR2的后续功能研究。



1—CC-125；2—CC-5499。

图 5　免疫印迹法检测抗血清富集 IgG 识别 ChR2 的特异性

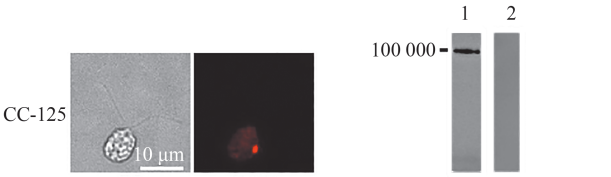
Fig. 5　Western blot of the specificity of the antiserum-enriched IgG for recognizing ChR2

为了检测所制备莱茵衣藻ChR2多克隆抗体的稳定性，对纯化后的抗体采用了3种储存方式：将纯化后的抗体置于4 ℃短时间（1周）保存；将抗体冻干，以固体粉末储存于−80 ℃；直接将抗体储存于−80℃。对不同储存方式下的抗体进行免疫印迹检测，并未表现出显著性差异，均能检测到目的蛋白质，说明莱茵衣藻ChR2多克隆抗体具有较强的稳定性。此外，使用该抗体进行了多次免疫印迹检测，检测结果均保持一致，在100 000处出现特异性条带，表明该抗体具有较高特异性，且试验数据具有可重复性。当使用该抗体分别检测全细胞和纤毛蛋白质（蛋白质总量均为20 μg）时，在同样的抗体稀释体积比（1∶1 000）下，全细胞样品最终的目的蛋白质显示时间显著少于纤毛样品的显示时间。因此，ChR2在纤毛内的丰度可能较低，后续开展功能研究时应注意避免由于表达量低导致的试验失败。此外，在后期使用过程中，抗体制备人员与抗体使用人员间仍存在差异，但根据多克隆抗体制备及使用经验，严格遵守试验方法、熟练掌握试验技能可使这种因人员差异而导致的结果差异降至可控范围内。

2.5　ChR2在莱茵衣藻中的定位

为了研究ChR2在莱茵衣藻鞭毛内的功能，首先需要明确ChR2能否定位于鞭毛。通过免疫荧光和免疫印迹分析来确定ChR2在细胞鞭毛中的定位，也可进一步确定该抗体是否具有生物活性。按照1.2.9的方法，利用纯化的莱茵衣藻ChR2多克隆抗体对野生型莱茵衣藻CC-125进行免疫染色，因为荧光素发出的信号可以在荧光显微镜下检测到，所以可通过荧光信号来检测ChR2多克隆抗体与ChR2的结合情况。如图6（a）所示。ChR2的抗体可以与野生型莱茵衣藻CC-125藻种中的ChR2发生特异性结合，且结合处主要位于莱茵衣藻的眼点处，证明了所制备的莱茵衣藻ChR2多克隆抗体具有较高的特异性与生物活性。

但对于ChR2在鞭毛内的定位，并不能通过免疫荧光得到验证。如图6（a）所示，鞭毛内ChR2的荧光强度极低。考虑到鞭毛内ChR2本身丰度较低的原因，通过分离莱茵衣藻CC-125和CC-5499鞭毛蛋白，对其进行免疫印迹分析。如图6（b）所示，在野生型莱茵衣藻CC-125细胞的鞭毛样品中能够检测到ChR2，而在突变型莱茵衣藻CC-5499中未发现目的蛋白质，表明了ChR2能够进入鞭毛。



(a) 免疫荧光　1—CC-125；2—CC-5499。(b) 免疫印迹

图 6　免疫荧光和免疫印迹检测 ChR2 在莱茵衣藻鞭毛中的定位

Fig. 6　Immunofluorescence and Western blot detection of ChR2 localization in *C. reinhardtii* flagella

3　结论

目前，以ChR1和ChR2等光敏蛋白质为基础，衍生出对光产生应答的细胞控制器，促进了光遗传学的诞生，并在基础研究和医学领域中有较大的应用潜力。ChR2作为光诱导的离子通道受体，对光信号感应和光应答至关重要，莱茵衣藻是研究鞭毛信号转导和细胞趋光性的模式生物，但对于ChR2在鞭毛的定位以及如何调控细胞趋光性尚不明确。因此，该研究采用经典的多克隆抗体制备方法，通过基因克隆构建pET-28a（+）-*chr2*表达载体，转入大肠杆菌BL21（DE3）中，经IPTG诱导6×His-ChR2融合蛋白，通过尿素溶解沉淀纯化后获得高纯度的

抗原蛋白（6×His-ChR2），以该融合蛋白免疫新西兰大白兔获得抗血清，抗血清经Protien A富集制备高纯度、高特异性的莱茵衣藻ChR2多克隆抗体。利用该抗体对野生型莱茵衣藻CC-125藻种进行免疫荧光染色，进一步明确了ChR2定位于莱茵衣藻眼点和鞭毛，再次验证了所制备的ChR2多克隆抗体具有较高的特异性和生物活性，也可用于后续的免疫印迹及免疫荧光分析，为后续ChR2在光遗传学领域的应用奠定了基础。

参考文献

[1] BERTHOLD P，TSUNODA S P，ERNST O P，et al. Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization[J]. The Plant Cell，2008，20（6）：1665-1677.

[2] NAGEL G，OLLIG D，FUHRMANN M，et al. Channelrhodopsin-1：a light-gated proton channel in green algae[J]. Science，2002，296（5577）：2395-2398.

[3] SINESHCHEKOV O A，JUNG K H，SPUDICH J L. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. PNAS，2002，99（13）：8689-8694.

[4] DEININGER W，KRÖGER P，HEGEMANN U，et al. Chlamyrhodopsin represents a new type of sensory photoreceptor[J]. EMBO Journal，1995，14（23）：5849-5858.

[5] INAGUMA A，TSUKAMOTO H，KATO H E，et al. Chimeras of channelrhodopsin-1 and -2 from *Chlamydomonas reinhardtii* exhibit distinctive light-induced structural changes from channelrhodopsin-2 [J]. Journal of Biological Chemistry，2015，290（18）：11623-11634.

[6] WAKABAYASHI K I，ISU A，UEKI N. Channelrhodopsin-dependent photo-behavioral responses in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology，2021，1293：21-33.

[7] HARDIE R C，FRANZE K. Photomechanical responses in *Drosophila* photoreceptors[J]. Science，2012，338（6104）：260-263.

[8] KATERIYA S，NAGEL G，BAMBERG E，et al.“Vision” in single-celled algae [J]. Physiology，2004，19（3）：133-137.

[9] VANGORDON M R，PRIGNANO L A，DEMPSKI R E，et al. Channelrhodopsin C1C2：photocycle kinetics and interactions near the central gate[J]. Biophysical Journal，2021，120（9）：1835-1845.

[10] UEKI N，IDE T，MOCHIJI S，et al. Eyespot-dependent determination of the phototactic sign in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. PNAS，2016，113（19）：5299-5304.

[11] 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）

[12] 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）

[13] 李婷，李欢，陈海英，等. 鲫鱼MBSP的原核表达、纯化及其多克隆抗体制备[J]. 食品与生物技术学报，2017，36（8）：877-883.
LI T，LI H，CHEN H Y，et al. Prokaryotic expression，purification of myofibril-bound serine proteinase from crucian carp（*Carassius auratus*）and preparation of its polyclonal antibody[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2017，36（8）：877-883.（in Chinese）

[14] 殷方荣，翟李欣，田乔鹏，等. 贝莱斯芽孢杆菌角蛋白酶的克隆表达、纯化及酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报，2023，42（6）：57-66.
YIN F R，ZHAI L X，TIAN Q P，et al. Gene cloning，expression，purification，and enzymatic properties study of keratinase from *Bacillus velezensis*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42（6）：57-66.（in Chinese）

[15] 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）：31-34，47.
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）：31-34，47.（in Chinese）

[16] 张莉，姜媛媛，张健，等. 牛凝乳酶全长cDNA的克隆及其原核表达载体的构建[J]. 食品与生物技术学报，2010，29（2）：271-275.
ZHANG L，JIANG Y Y，ZHANG J，et al. Cloning and

prokaryotic expression vector construction of bovine chymosin[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2010,29(2):271-275.(in Chinese)

[17] 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)

[18] 王晶,樊振川. 小G蛋白BBS3b的原核表达纯化及其多克隆抗体制备[J]. 生物技术,2017,27(4):364-369,329.
WANG J, FAN Z C. Prokaryotic expression and purification of a small GTPase BBS3b in *Escherichia coli* and preparation of polyclonal antibody [J]. Biotechnology,2017,27(4):364-369,329.(in Chinese)

[19] 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)

[20] 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)

[21] 李文娟,贾航,薛斌,等. 莱茵衣藻BBS8蛋白的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备[J]. 水生生物学报,2022,46(9):1319-1324.
LI W J, JIA H, XUE B, et al. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* BBS8[J]. Acta Hydrobiologica Sinica,2022,46(9):1319-1324.(in Chinese)

[22] 董彬,吴松,王晶,等. 莱茵衣藻纤毛内运送蛋白IFT27的原核表达、纯化及多克隆抗体制备[J]. 生物技术,2016,26(6):532-538.
DONG B, WU S, WANG J, et al. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of the *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport protein (IFT27)[J]. Biotechnology, 2016, 26(6): 532-538.(in Chinese)

[23] 董彬,王震,刘雁霞,等. 莱茵衣藻纤毛内运送蛋白IFT70的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 中国生物制品学杂志,2017,30(9):924-930.
DONG B, WANG Z, LIU Y X, et al. Prokaryotic expression and purification of *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport protein 70 and preparation of its polyclonal antibody[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2017,30(9):924-930.(in Chinese)

[24] FAN Z C, BEHAL R H, GEIMER S, et al. Chlamydomonas IFT70/CrDYF-1 is a core component of IFT particle complex B and is required for flagellar assembly[J]. Molecular Biology of the Cell, 2010, 21(15):2696-2706.

[25] GOGLIA A G, TOETTCHER J E. A bright future: optogenetics to dissect the spatiotemporal control of cell behavior [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2019,48:106-113.

（责任编辑：闫林红）