DOI:10.12441/spyswjs.20230913001 [文章编号] 1673-1689(2025)01-0099-08

莱茵衣藻TLP2多克隆抗体制备及其突变体鉴定

刘雁霞[1,2] 陶 冶[1,2] 张媛媛[1,2] 鲍冬雪[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】制备兔抗莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*,*C. reinhardtii*)类Tubby家族蛋白2(TLP2)多克隆抗体来鉴定莱茵衣藻*tlp2*突变体,研究莱茵衣藻TLP2的生物学功能。**【方法】**通过聚合酶链式反应(PCR)获得*tlp2*目的基因片段,构建原核表达载体pET-28a(+)-*tlp2*、pMAL-c2x-*tlp2*。将2种重组质粒通过化学转化的方法转至大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)BL21(DE3),经异丙基-*β*-*D*-硫代半乳糖苷(isopropyl *β*-*D*-thiogalactoside,IPTG)诱导表达融合蛋白6×His-TLP2及MBP-TLP2。将纯化后的6×His-TLP2融合蛋白免疫新西兰大白兔来获得抗血清。**【结果】**通过间接ELISA法测定抗血清效价达1∶51 200,对抗血清进行protein A和抗原抗体纯化,在1∶500的稀释条件下,蛋白质免疫印迹表明TLP2抗体能够特异性识别莱茵衣藻TLP2。**【结论】**作者制备出了高特异性、高灵敏度的兔抗莱茵衣藻TLP2多克隆抗体,并鉴定出一株*tlp2*突变体,可用于后续莱茵衣藻TLP2在纤毛生成和纤毛信号转导中的功能研究。

关键词:莱茵衣藻;TLP2;多克隆抗体;蛋白质纯化

Polyclonal Antibody Preparation and Mutant Identification of *Chlamydomonas reinhardtii* TLP2

LIU Yanxia[1,2] *TAO Ye*[1,2] *ZHANG Yuanyuan*[1,2] *BAO Dongxue*[1,2] *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 Base for 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 aimed to prepare rabbit anti-*Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) Tubby-like protein 2 (TLP2) polyclonal antibodies for the identification of *C. reinhardtii tlp2* mutants and to investigate the biological functions of TLP2 of *C. reinhardtii*. [**Method**] The *tlp2* gene fragment was obtained by polymerase chain reaction (PCR), and the prokaryotic expression vectors pET-28a(+)-*tlp2* and pMAL-c2x-*tlp2* were constructed. The two recombinant plasmids were transferred to *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3) by chemical transformation, and the expression of the fusion proteins 6×His-TLP2 and MBP-TLP2 was induced by isopropyl *β*-*D*-thiogalactoside (IPTG). New Zealand white rabbits were immunized with the purified 6×His-TLP2. [**Result**] The antiserum titer determined by indirect ELISA method reached 1:51 200. The antiserum was purified by protein A and antigen affinity chromatography. The TLP2 antibodies specifically recognized TLP2 of *C. reinhardtii* at a dilution factor of 1:500. [**Conclusion**] Highly specific and sensitive rabbit polyclonal antibodies against TLP2 of *C. reinhardtii* were prepared, and a *tlp2* mutant was identified. The mutant can be used for subsequent study on

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,主要从事纤毛信号转导及营养代谢型纤毛病致病机理研究。E-mail:fanzhen@tust.edu.cn

收稿日期:2023-09-13 **修回日期:**2023-11-13

the role of TLP2 of *C. reinhardtii* of in cilium formation and cilium signal transduction.
Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*; TLP2; polyclonal antibodies; protein purification

纤毛是突起于真核细胞表面并沿微管轴丝外延的感觉细胞器，纤毛作为信号中枢系统在细胞分离、组织分化和器官发育等生命活动中发挥重要作用[1]。纤毛功能的紊乱会导致纤毛病，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，其临床症状常表现为发育障碍多囊肾病、色素性视网膜炎、神经发育障碍、肥胖、雄性不育等[2-3]。而 Tubby 小鼠表现出的肥胖、视网膜变性等症状是典型的纤毛病症状，表明 Tubby 家族蛋白质极有可能在纤毛生成、纤毛信号转导等过程发挥重要作用。相关研究也表明，Tulp3 能够与纤毛内运输系统的 IFT-A 结合调控 GPCR 纤毛内稳态[4-7]。

莱茵衣藻是一种有纤毛的单细胞真核生物，因具有适应性强、生长速度快、纤毛可再生、纤毛易分离提取、纤毛组装和稳态维持机制与哺乳动物细胞高度同源且保守性强等特征，成为研究纤毛组装与纤毛信号转导的良好模式生物[5-6]。莱茵衣藻的纤毛结构与精子细胞的纤毛结构相似，均为“9+2”型运动纤毛，且在莱茵衣藻内存在 Tulp2 的同源蛋白质 TLP2。因此以莱茵衣藻为模式生物，研究 TLP2 对纤毛生成和纤毛运动影响的分子机制，可阐明其导致哺乳动物不育的分子机制[7-8]。目前作者所在实验室利用莱茵衣藻为模式生物，阐明了纤毛内信号蛋白质依赖 IFT/BBS 信号通路维持纤毛稳态的分子机理，证实了利用莱茵衣藻纤毛进行生化研究、解析纤毛内蛋白质参与纤毛信号转导的可行性与独特性[9-15]。因此，作者以莱茵衣藻为模型，阐明 TLP2 在纤毛生成和信号转导中的功能，将有助于解释 Tulp2 在哺乳动物细胞中出现的相关纤毛病表型。

莱茵衣藻 TLP2 为哺乳动物细胞中 Tulp2 的同源蛋白质，属于 Tubby 家族蛋白质。Tubby 家族蛋白质最早发现于肥胖小鼠中，因其 C 末端含高度保守的 TUB 结构而命名，目前在动物细胞中已发现 5 个 Tubby 家族蛋白质，分别为 Tub、Tulp1、Tulp2、Tulp3 和 Tulp4[16]。Tubby 小鼠通常表现为成熟期肥胖和神经感觉缺陷，这些表型均为常见的纤毛病性状[17]。另外在哺乳动物中关于 Tulp2 的研究表明，其对精子细胞纤毛生成、分化和雄性生育至关重要，*tulp2* 基因敲除的小鼠会表现为少畸精子症或弱畸精子症，最终导致小鼠不育[18-20]。但由于哺乳动物细胞难以分离纤毛进行生化研究，因此目前尚不清楚 Tulp2 调控精子纤毛生成和精子细胞运动的分子机理。

作者利用 PCR 技术扩增莱茵衣藻 *tlp2* 基因片段，构建了原核表达载体 pET-28a(+)-*tlp2* 和 pMAL-c2x-*tlp2*，分别用于表达免疫原蛋白质 6×His-TLP2 和后期用于抗原抗体纯化的抗原蛋白质 MBP-TLP2，通过 Protein A 和抗原抗体纯化，制备高灵敏度和强特异性的莱茵衣藻 TLP2 多克隆抗体，用于后续研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌 DH5α 和 BL21（DE3）、原核表达载体 pET-28a(+)和 pMAL-c2x、莱茵衣藻 CC-125：作者所在实验室保存；*tlp2-713*（LMJ.RY0402.087713）：美国莱茵衣藻遗传中心（*Chlamydomonas* Genetic Center）。

Pfu DNA 聚合酶、DNA Marker、蛋白质 Marker、限制性内切酶、T4 连接酶、质粒小提试剂盒、PCR 产物回收试剂盒等：全式金（北京）生物公司；抗生素（卡那霉素、氨苄霉素）、诱导剂：北京索莱宝科技有限公司；亲和纯化填料、抗体纯化填料：美国 GE 公司；硝酸纤维素膜：美国 Millipore 公司；二抗：美国 Sigma 公司。

动物免疫过程由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成。

1.2 仪器与设备

PCR 仪：CFXConnect 型，美国伯乐公司；电泳仪：056 型，美国伯乐公司；凝胶成像仪：ChampGEL 5000 型，北京赛智创业科技有限公司；电子天平：STX222 型，奥豪斯仪器有限公司；化学转化仪：H2O3-100C 型，卡尤迪生物科技宜兴有限公司；高压破碎仪：HL2000 型，郑州科泰实验设备有限公司；pH 计：ABPH-FZH 型，奥豪斯仪器有限公司；台式离心机：TDL-40B 型，上海安亭科学仪器厂；恒温摇床：CHZY-78B 型，旻泉生物技术（上

海）有限公司；恒温培养箱：SPX-70BE型，旻泉生物技术（上海）有限公司；涡旋混匀仪：QL-901型，海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.3　方法

1.3.1　生物信息学分析

通过Phytozome（doe.gov）查找*tlp2*基因序列，并在DNAMAN分析其开放阅读框、编码蛋白质、蛋白质相对分子质量、等电点、亲疏水性及抗原表位，并用SWISS Model预测其蛋白质结构。

1.3.2　*tlp2*基因克隆及载体构建

参照以往研究[21-22]，以作者所在实验室保存的莱茵衣藻cDNA为模板，参照生物信息学分析结果，设计一对引物（*tlp2*-F：CCGGATCCATGGTGGCCCCCTCGGACGGC；*tlp2*-R：GGAAGCTTTTACTTTGTGTCGGTGC）用于扩增*tlp2*基因序列，扩增程序为：98 ℃预变性10 min；98 ℃变性20 s，62 ℃退火20 s，72 ℃延伸1 min，32个循环；72 ℃终延伸15 min。将扩增的目的基因进行琼脂糖凝胶（1 g/dL）电泳鉴定。

将鉴定大小正确的目的基因通过琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后，使用限制性内切酶*Bam*H I和*Hin*d III切除目的基因与原核表达载体的黏性末端，通过T4 DNA连接酶在室温条件下连接1~2 h后转化DH5α。待长出转化子后，挑取至液体培养基（LBA或LBK，含氨苄或卡那抗性的LB培养基）中扩大培养，提取质粒，并通过双酶切验证目的基因是否成功连接至原核表达载体。当验证大小正确时，将质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序分析，将测序结果正确的质粒分别命名为pET-28a（+）-*tlp2*和pMAL-c2x-*tlp2*。

1.3.3　重组蛋白质的表达与纯化

参照以往研究[23-24]，将上述质粒转化至大肠杆菌BL21（DE3），待长出克隆后，挑取单克隆至LBA或LBK液体培养基中，在220 r/min、37 ℃条件下培养12~16 h，接着按体积比1∶20扩大培养至OD_{600}值为0.6，加入终浓度为0.2 mmol/L的IPTG，于25 ℃条件下培养6~8 h，诱导表达6×His-TLP2和MBP-TLP2重组蛋白质，于室温下、8 000 r/min离心收集菌体，每200 mL菌体收集1次。

使用PBS缓冲液清洗菌体2次，以去除残留的培养基，加入20 mL Tris-HCl缓冲液（50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl，pH 8.0），经高压破碎仪破碎1~2 min后，取200 μL破碎菌体作为诱导后全细胞样品，200 μL破碎菌体经12 000 r/min离心5 min，分别取上清液和沉淀进行SDS-PAGE分析[25]。

室温下以12 000 r/min离心15 min，收集含有目的蛋白质的上清液，将带His标签蛋白质的Ni Sepharose 6 Fast Flow填料和带MBP标签蛋白质的Dextrin MBP蛋白质纯化层析介质与其结合，结合条件为室温下、110 r/min离心1 h。用Tris-HCl缓冲液漂洗至无蛋白质后，继续使用低浓度（20 mmol/L）咪唑和低浓度（1 mmol/L）麦芽糖的Tris-HCl缓冲液漂洗至无蛋白质检出，最终使用含300 mmol/L咪唑和10 mmol/L麦芽糖的Tris-HCl缓冲液洗脱目的蛋白质。每次加入洗脱液后静止3 min，使其充分洗脱目的蛋白质。

1.3.4　动物免疫与效价检测

动物免疫过程由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成，免疫流程见表1。加强免疫2次后进行耳静脉采血，通过间接ELISA法测定抗血清效价，以PBS作为空白组，以免疫前血清作为阴性组。

1.3.5　莱茵衣藻TLP2多克隆抗体纯化

将抗血清于室温下、1 500 r/min离心，每管分装1 mL，于−80 ℃保存。取1 mL血清加入10 mL Tris-HCl缓冲液，过0.22 μm滤膜后与Protein A填料室温结合1 h，用Tris-HCl缓冲液漂洗至无蛋白质检出，最后用50 mmol/L Gly（pH 2.5）洗脱，用50 mmol/L Tris（pH 9.0）将洗脱的抗体pH调节至中性。

表1　免疫流程

Table 1　Immunization process

免疫次数	免疫原	免疫剂量	免疫途径
初次免疫（0 d）	6×His-TLP2重组蛋白质+弗氏完全佐剂	200 μg重组蛋白质	背部皮下多点注射
加强免疫（初免后10 d）	6×His-TLP2重组蛋白质+弗氏不完全佐剂	200 μg重组蛋白质	背部皮下多点注射
加强免疫（初免后20 d）	6×His-TLP2重组蛋白质+弗氏不完全佐剂	200 μg重组蛋白质	背部皮下多点注射
最终免疫（初免后30 d）	6×His-TLP2重组蛋白质+弗氏不完全佐剂	200 μg重组蛋白质	背部皮下多点注射

利用抗原抗体特异性结合的原理，继续纯化经 Protein A 纯化过的抗体。将纯化后的 MBP-TLP2 重组蛋白质与活化的溴化氰填料室温结合 2~4 h，使用 Tris-HCl 缓冲液封闭未结合抗原的位点后，再用酸性溶液（50 mmol/L Gly、1 mol/L NaCl，pH 3.5）和碱性溶液（50 mmol/L Tris-HCl、1 mol/L NaCl，pH 8.0）交替漂洗填料 10 次。后续操作步骤类似于 Protein A 纯化，将洗脱的抗体使用 Tris-HCl 缓冲液补齐至 10 mL，与结合 MBP-TLP2 重组蛋白质的填料室温结合 1 h，漂洗后，使用 Gly 洗脱，并将洗脱的抗体调节至中性。使用超滤管将抗体浓缩至 1 mg/mL，加入质量分数 0.3% 的叠氮化钠和体积分数 30% 的甘油，每 200 μL 分装 1 管，于−80 ℃保存。

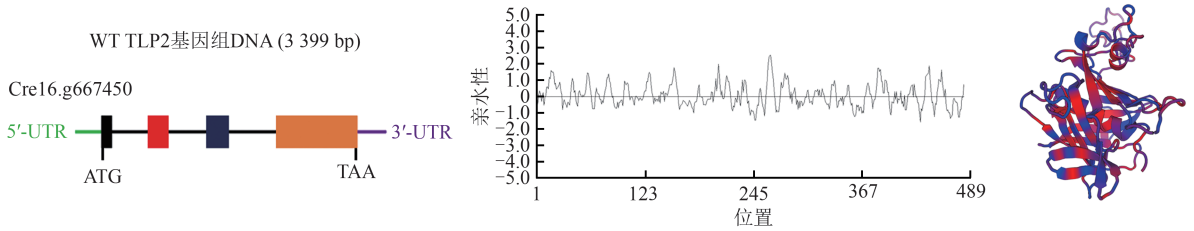
1.3.6 *tlp2* 突变体鉴定

取 1 mL 对数期的莱茵衣藻 CC-125 细胞和 LMJ.RY0402.087713 细胞，室温下以 2 500 r/min 离心 3 min，收集细胞，加入 108 μL 蛋白质提取液 A（10 mmol/L 碳酸钠）和 12 μL 的 DTT（1 mol/L），充分混匀后，加入 80 μL 蛋白质提取液 B（质量分数 5% 的 SDS，质量分数 30% 的蔗糖溶液），剧烈振荡 45 min 后，室温下以 12 000 r/min 离心 5 min，取上清液测定蛋白质质量浓度。取 20 μg 蛋白质进行 SDS-PAGE 分析，分别进行考马斯亮蓝染色和免疫印迹分析。将免疫印迹分析的样品转至硝酸纤维素膜，使用质量分数 10% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h，按照 1∶500 的稀释比加入经抗原抗体纯化后的莱茵衣藻 TLP2 多克隆抗体，室温孵育 2 h，使用 TBST 缓冲液清洗 3 次后，按照 1∶10 000 的稀释比加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗，室温孵育 1 h，使用 TBST 缓冲液清洗 3 次，在 ECL 显色液作用下自动曝光，使用 ImageJ 分析结果。

2 结果与讨论

2.1 *tlp2* 生物信息学分析

如图 1（a）所示，莱茵衣藻 *tlp2* 基因全长 3 399 bp，包含 4 个外显子区域，3 个内含子区域，其编码区域全长 1 476 bp，编码 491 个氨基酸。如图 1（b）所示，经 DNAMAN 分析，TLP2 蛋白质相对分子质量为 52 600，等电点为 8.93，含有 25 个抗原识别位点，亲水性较强，说明 TLP2 蛋白质可能以可溶性蛋白的形式存在于上清液中。经预测的莱茵衣藻 TLP2 蛋白质 C 端是由疏水性 α 螺旋和围绕其周围的 β 折叠构成的 β 桶形结构，与 Tubby 家族蛋白质高度相似，见图 1（c）。根据以上生物信息学分析，其 N 端 1~222 个氨基酸的 GC 占比（>65%）较高，且仅有 3 个较强的抗原识别位点，因此选取 TLP2 的第 222~485 个氨基酸制备多克隆抗体，其碱基序列为第 666 bp 到第 1 458 bp，总长 792 bp，编码 264 个氨基酸，预测蛋白质相对分子质量为 30 000。



(a) *tlp2*基因序列分析　(b) TLP2亲疏水性分析　(c) TLP2蛋白质结构预测

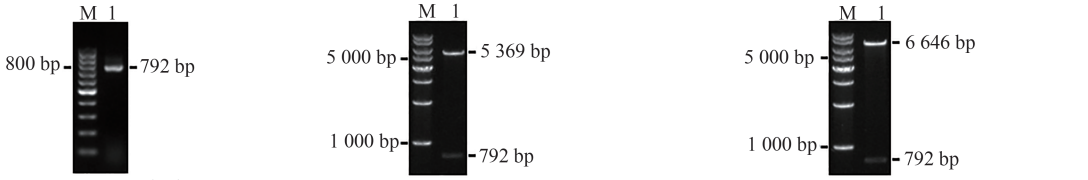
图 1 *tlp2* 生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatic analysis of *tlp2*

2.2 *tlp2* 基因克隆及载体构建

通过 RT-PCR 参照上述方法扩增获得 792 bp 的目的条带，用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行鉴定。如图 2（a）所示，在 800 bp 处有单一目的条带，表明成功获得目的基因。将剩余 PCR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒回收后，连同载体按照上述载体构建的方法进行双酶切、连接、转化、扩大试验，最后提取质粒进行双酶切验证。如图 2（b）~（c）所示，pET-28a（+）-*tlp2* 经 *Bam*H I 和 *Hin*d III 双酶切后，在琼脂糖凝胶上显示为 5 369 bp 的载体片段和 792 bp 的目的基因片段，pMAL-c2x-*tlp2* 为 6 646 bp 的载体片段和 792 bp 的目的基因片段，均与理论值一致。将酶切验证正确的质粒送至安升达（天津）生物科技有限公

司进行测序，测序结果无误，可进行蛋白质诱导、表达与纯化。



M—100 bp DNA标志物；1—*tlp*2 PCR产物。(a) *tlp*2 PCR产物

M—1 000 bp DNA标志物；1—pET-28a(+)-*tlp*2双酶切后的载体与目的基因。(b) pET-28a(+)-*tlp*2双酶切验证

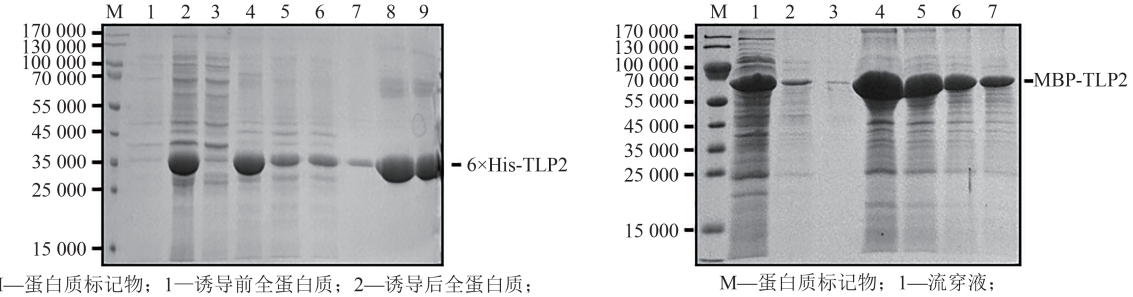
M—1 000 bp DNA标志物；1—pMAL-c2x-*tlp*2双酶切后的载体与目的基因。(c) pMAL-c2x-*tlp*2双酶切验证

图2　原核表达载体构建

Fig. 2　Construction of prokaryotic expression vectors

2.3　TLP2重组蛋白质表达与纯化

由pET-28a(+)-*tlp2*原核表达载体表达的6×His-TLP2重组蛋白质预测的相对分子质量约为34 000，由pMAL-c2x-*tlp2*原核表达载体表达的MBP-TLP2重组蛋白质预测的相对分子质量约为70 000。参照上述诱导、表达与纯化的方法，在IPTG终浓度为0.2 mmol/L时，25 ℃下对菌体诱导8 h，并高压破碎。由图3可知，重组蛋白质6×His-TLP2主要以包涵体形式存在于沉淀中，实际表达蛋白质的相对分子质量与预测值34 000一致，经亲和层析纯化后，通过ImageJ分析蛋白质纯度达94.8%，符合免疫原≥85%的免疫要求。因His标签相对分子质量仅为4 300，形成融合蛋白质后不会对原蛋白质结构造成破坏，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，且免疫原蛋白质的纯度越高，后期产生的抗血清质量越高，6×His-TLP2融合蛋白质在纯化之后纯度可达94.8%，因此将6×His-TLP2作为免疫原进行后续免疫试验。而MBP-TLP2主要以可溶性蛋白的形式存在于上清液中，其表达后实际蛋白质相对分子质量约70 000，与理论值一致，但经亲和层析后其纯度仅为78%，未达到免疫标准，因此将MBP-TLP2作为后续抗原，用于纯化抗血清。



M—蛋白质标记物；1—诱导前全蛋白质；2—诱导后全蛋白质；3—诱导后上清液蛋白质；4—诱导后沉淀蛋白质；5—流穿液；6~7—漂洗液；8~9—洗脱液。(a) 重组蛋白质6×His-TLP2表达与纯化

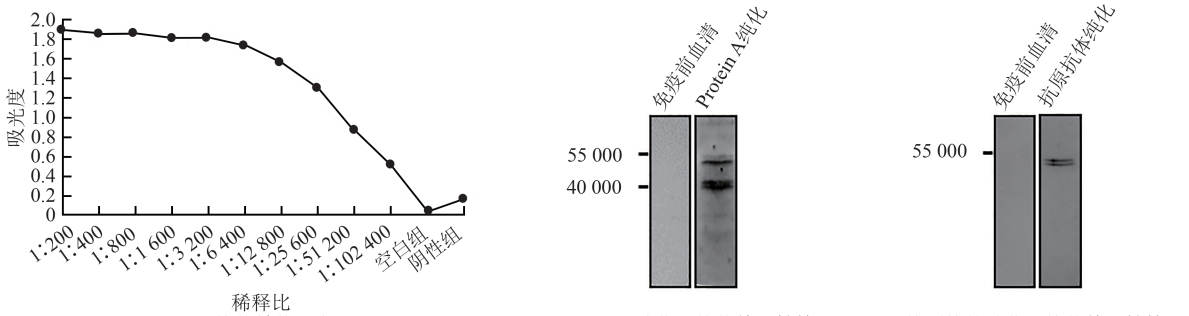
M—蛋白质标记物；1—流穿液；2~3—漂洗液；4~7—洗脱液。(b) 重组蛋白质MBP-TLP2表达与纯化

图3　重组蛋白质表达与纯化

Fig. 3　Expression and purification of recombinant proteins

2.4　抗血清效价及抗体灵敏度与特异性检测

通过间接ELISA法检测抗血清效价[26-28]，1/2平台期所对应的抗血清稀释倍数为该抗血清的效价。如图4(a)所示，TLP2抗血清效价为1∶51 200。通过Protein A和抗原抗体纯化后，利用莱茵衣藻CC-125细胞体蛋白质检测抗体的灵敏度与特异性。如图4(b)所示，经Protein A纯化后的抗血清在相对分子质量55 000以下出现目的蛋白质条带，但在相对分子质量40 000处仍有非特异性条带。如图4(c)所示，经Protein A和抗原抗体纯化后的抗体，仅在相对分子质量55 000以下出现单一目的蛋白质条带，表明通过2步纯化后，获得了特异性强、灵敏度高的莱茵衣藻TLP2多克隆抗体。



(a) 抗体效价测定　(b) Protein A纯化后抗体特异性检测　(c) 抗原抗体纯化后抗体特异性检测

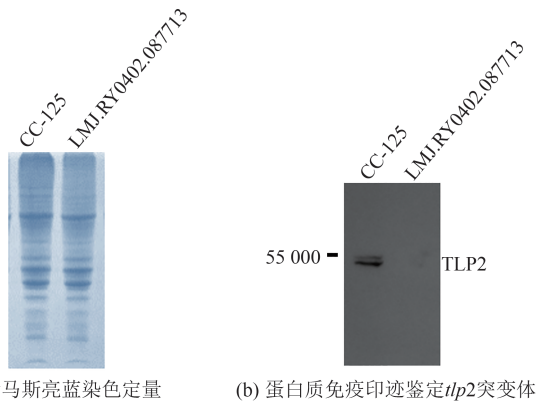
图 4　抗体效价及特异性检测

Fig. 4　Titer and specificity of antibodies

2.5　*tlp2* 突变体鉴定

为研究 TLP2 对纤毛功能的影响，于莱茵衣藻资源中心购买 *tlp2* 突变体（编号：LMJ.RY0402.087713），用制备的莱茵衣藻 TLP2 多克隆抗体鉴定 TLP2 是否表达。提取莱茵衣藻 CC-125 和 LMJ.RY0402.087713细胞蛋白质，其质量浓度分别为 2.0、2.5 mg/mL，各取 20 μg 蛋白质进行 SDS-PAGE 分析，通过考马斯亮蓝染色分析蛋白质上样量是否一致，经 Image J 分析确定两者蛋白质上样量一致，见图 5(a)。用 TLP2 抗体检测 CC-125 细胞和 LMJ.RY0402.087713 突变体时，CC-125 细胞中在相对分子质量 55 000 处出现目的条带，而 LMJ.RY0402.087713 突变体中无特异性条带，见图 5(b)。说明该突变体为 *tlp2* 完全突变体，随后将其命名为 *tlp2-713*，用于莱茵衣藻 TLP2 对纤毛生成和运动的调控功能研究。

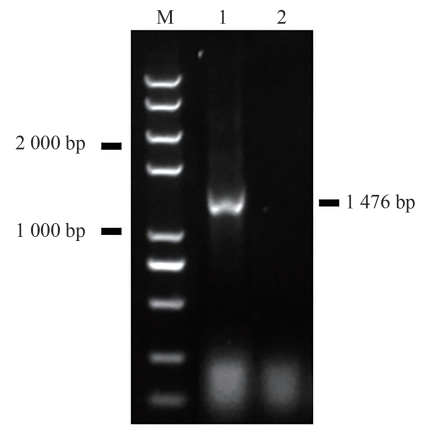
此外，提取莱茵衣藻 CC-125 和 LMJ.RY0402.087713细胞总 RNA，并进行体外转录为 cDNA，以此为模板使用引物（F：5′-ATGGCCAAGCTCATTAAG-3′；R：5′-TTACAACGCGTAGCACAG-3′）进行 PCR 验证，从基因水平鉴定 *tlp2-713* 是否能够转录。如图 6 所示，当以莱茵衣藻 CC-125 的 cDNA 为模板时，在约 1 500 bp 处有明显单一条带（泳道 1），而以莱茵衣藻 LMJ.RY0402.087713 的 cDNA 为模板的 PCR 产物中，无目的条带（泳道 2），说明突变体转录异常，最终导致其无法翻译为正确的 TLP2 蛋白质。



(a) 考马斯亮蓝染色定量　(b) 蛋白质免疫印迹鉴定 *tlp2* 突变体

图 5　*tlp2* 突变体鉴定

Fig. 5　Identification of *tlp2* mutant



M—2 000 bp DNA标志物；
1—以莱茵衣藻CC-125 cDNA为模板扩增*tlp2*基因；
2—以莱茵衣藻*tlp2-713*为模板扩增*tlp2*基因。

图 6　基因水平鉴定 *tlp2* 突变体

Fig. 6　Identification of *tlp2* mutant at the gene level

3　结论

为了研究 TLP2 在纤毛中的调控机制，作者利用原核表达系统成功表达了不同标签标记的 TLP2 融合蛋白，使用 6×His-TLP2 进行免疫，使用 MBP-TLP2 进行抗原抗体纯化，成功制备了特异性强、灵敏度高的兔抗莱茵衣藻 TLP2 多克隆抗

体，并成功鉴定出一株*tlp2*突变体，后续可对该突变体进行表型、分子和生化分析，从分子水平上阐明莱茵衣藻中TLP2在纤毛生成和信号转导中的功能，有助于解释Tulp2在哺乳动物细胞中所出现的相关纤毛病表型。

参考文献

[1] SNELL W J. The role of cilia and flagella in cell interactions[J]. The Journal of Protozoology，1984，31(1)：12-16.

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

[3] JIN H，NACHURY M V. The BBSome[J]. Current Biology，2009，19(12)：472-473.

[4] MUKHOPADHYAY S，WEN X H，CHIH B，et al. TULP3 bridges the IFT-A complex and membrane phosphoinositides to promote trafficking of G protein-coupled receptors into primary cilia[J]. Genes & Development，2010，24(19)：2180-2193.

[5] PATTERSON V L，DAMRAU C，PAUDYAL A，et al. Mouse *hitchhiker* mutants have spina bifida，dorso-ventral patterning defects and polydactyly：identification of Tulp3 as a novel negative regulator of the Sonic hedgehog pathway[J]. Human Molecular Genetics，2009，18(10)：1719-1739.

[6] NORMAN R X，KO H W，HUANG V，et al. Tubby-like protein 3（TULP3）regulates patterning in the mouse embryo through inhibition of Hedgehog signaling[J]. Human Molecular Genetics，2009，18(10)：1740-1754.

[7] IKEDA A，IKEDA S，GRIDLEY T，et al. Neural tube defects and neuroepithelial cell death in *Tulp3* knockout mice[J]. Human Molecular Genetics，2001，10(12)：1325-1334.

[8] LECHTRECK K F，WITMAN G B. *Chlamydomonas reinhardtii* hydin is a central pair protein required for flagellar motility[J]. Journal of Cell Biology，2007，176(4)：473-482.

[9] KOZMINSKI K G，DIENER D R，ROSENBAUM J L. High level expression of nonacetylatable α-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Cell Motility and the Cytoskeleton，1993，25(2)：158-170.

[10] LIU Y X，ZHANG R K，FAN Z C. RABL4/IFT27 in a nucleotide-independent manner promotes phospholipase D ciliary retrieval *via* facilitating BBSome reassembly at the ciliary tip[J]. Journal of Cellular Physiology，2023，238(3)：549-565.

[11] LIU Y X，LI W J，ZHANG R K，et al. Unraveling the intricate cargo-BBSome coupling mechanism at the ciliary tip[J]. PNAS，2023，120(13)：e2218819120.

[12] LIU Y X，SUN W Y，XUE B，et al. ARL3 mediates BBSome ciliary turnover by promoting its outward movement across the transition zone[J]. Journal of Cell Biology，2022，221(10)：e202111076.

[13] DAI J，ZHANG G，ALKHOFASH R A，et al. Loss of ARL13 impedes BBSome-dependent cargo export from *Chlamydomonas* cilia[J]. Journal of Cell Biology，2022，221(10)：e202201050.

[14] 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]. PNAS，2021，118(35)：e2101590118.

[15] LIU Y X，XUE B，SUN W Y，et al. Bardet-biedl syndrome 3 protein promotes ciliary exit of the signaling protein phospholipase D *via* the BBSome[J]. eLife，2021，10：e59119.

[16] 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]. PNAS，2020，117(5)：2496-2505.

[17] NORTH M A，NAGGERT J K，YAN Y，et al. Molecular characterization of *TUB*，*TULP1*，and *TULP2* members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases[J]. PNAS，1997，94(7)：3128-3133.

[18] OYAMA Y，MIYATA H，SHIMADA K，et al. TULP2 deletion mice exhibit abnormal outer dense fiber structure and male infertility[J]. Reproductive Medicine and Biology，2022，21(1)：e12467.

[19] ZHENG M M，CHEN X，CUI Y Q，et al. TULP2，a new RNA-binding protein，is required for mouse spermatid differentiation and male fertility[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology，2021，9：623738.

[20] COUTTON C，VARGAS A S，AMIRI-YEKTA A，et al. Mutations in *CFAP43* and *CFAP44* cause male infertility and flagellum defects in *Trypanosoma* and human[J]. Nature Communications，2018，9(1)：686.

[21] 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)

[22] 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)

[23] 周佳兰，孙维越，Hadiatullah Hadiatullah，等. 莱茵衣藻BBSome组分蛋白BBS4的原核表达、纯化及其多克隆抗体制备[J]. 国际药学研究杂志，2019，46(6)：434-440.
ZHOU J L，SUN W Y，HADIATULLAH H，et al. Prokaryotic expression，purification and polyclonal antibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* BBSome component protein BBS4[J]. Journal of International Pharmaceutical Research，2019，46(6)：434-440.(in Chinese)

[24] 刘雁霞，李少杰，樊振川. 粗糙脉孢菌ERG-11蛋白抗原的原核表达、纯化及其多克隆抗体制备[J]. 生物技术通报，2017，33(9)：216-222.
LIU Y X，LI S J，FAN Z C. Prokaryotic expression，purification and polyclonal antibody preparation of *Neurospora crassa* ERG-11 protein antigen [J]. Biotechnology Bulletin，2017，33(9)：216-222.(in Chinese)

[25] 田苗苗，郭佳婧，刘娟，等. 大肠杆菌表达类黄酮O-甲基转移酶合成槲皮素甲基化衍生物[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(7)：111-119.
TIAN M M，GUOJIA J，LIU J，et al. Synthesis of quercetin methylated derivatives by expression of FOMT in *Escherichia coli*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(7)：111-119.(in Chinese)

[26] 李青，周正雄，堵国成，等. C4ST-1在大肠杆菌中的可溶性表达[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(6)：68-75.
LI Q，ZHOU Z X，DU G C，et al. Soluble expression of C4ST-1 in *Escherichia coli*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(6)：68-75.(in Chinese)

[27] 贾瑞勤，贾航，郑学超，等. 莱茵衣藻IFT20的原核表达、纯化及多克隆抗体鉴定[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(11)：106-112.
JIA R Q，JIA H，ZHENG X C，et al. Prokaryotic expression，purification，and polyclonal antibody identification of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT20[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(11)：106-112.(in Chinese)

[28] 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)

（责任编辑：闫林红）