DOI:10.12441/spyswjs.20231010004 [文章编号] 1673-1689(2025)06-0059-07

莱茵衣藻光敏通道蛋白质ChR1的原核表达纯化及多克隆抗体制备

王久荣[1] 薛 斌[2] 樊振川[1,3*]

(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. 浙江工业大学生物工程学院,浙江 310014; 3. 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:【目的】制备一支高特异性的莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*, *C. reinhardtii*)光敏通道蛋白质1(channelrhodopsin 1, ChR1)抗体,研究ChR1调控细胞趋/避光性的机制。**【方法】**构建重组表达载体pET-28a(+)-*chr1*并转入大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)BL21(DE3)感受态细胞,经IPTG诱导表达6×His∶∶ChR1融合蛋白,后经镍柱亲和纯化后免疫新西兰大白兔获得ChR1抗血清,利用protein A纯化对ChR1抗血清进行IgG亚型抗体富集获得ChR1抗体,免疫印迹检测ChR1抗体特异性,并通过免疫荧光确定ChR1在细胞中的定位。**【结果】**利用间接ELISA法测定ChR1的抗血清效价为1∶102 400;纯化获得的ChR1抗体通过免疫印迹检测到CC-125细胞中含有ChR1条带且无非特异性条带,表明抗体特异性高;免疫荧光试验结果显示,ChR1在细胞眼点位置有明显定位且无非特异性染色,表明制备的ChR1多克隆抗体适用于免疫荧光试验。**【结论】**作者成功实现了莱茵衣藻ChR1的原核表达纯化和多克隆抗体的制备,为ChR1在莱茵衣藻中的定位和调控趋/避光的分子机制研究奠定了重要基础。

关键词:莱茵衣藻;ChR1;原核表达;多克隆抗体

Prokaryotic Expression, Purification, and Polyclonal Antibody Preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* Channelrhodopsin 1

WANG Jiurong[1] *XUE Bin*[2] *FAN Zhenchuan*[1,3*]

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 3. National International Science and Technology Cooperation Institute of Health Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to prepare a highly specific antibody against channelrhodopsin-1 (ChR1) from *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) and investigate its regulatory mechanisms in cellular phototaxis and negative phototaxis. [**Method**] The recombinant expression vector pET-28a(+)-*chr1* was constructed and transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) competent cells. The expression of the fusion protein 6×His∶∶ChR1 was induced with IPTG, and the obtained protein was purified by nickel-affinity chromatography. The purified protein was used to immunize New Zealand white rabbits for the production of ChR1 antiserum. ChR1-specific IgG antibodies were enriched from the antiserum through protein A purification. The antibody specificity was assessed by immunoblotting, and the subcellular localization of ChR1 was analyzed by

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:2023-10-10 **修回日期:**2023-12-12

immunofluorescence. [**Result**] The results of indirect ELISA indicated that the ChR1 antiserum had a titer of 1∶102 400. Immunoblotting with the purified ChR1 antibody identified a distinct band corresponding to endogenous ChR1 in CC-125 cells, with no nonspecific band observed, thereby confirming the high specificity of the antibody. Immunofluorescence staining revealed clear localization of ChR1 at the eyespot and specific staining, demonstrating the suitability of the antibody for immunofluorescence assays. [**Conclusion**] The prokaryotic expression, purification, and polyclonal antibody preparation of ChR1 were achieved. This study lays a crucial foundation for delving into the localization of ChR1 in *C. reinhardtii* and the molecular regulatory mechanisms of ChR1 in phototaxis and negative phototaxis.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*; ChR1; prokaryotic expression; polyclonal antibody

人和脊椎动物眼睛的视紫红质是介导不同生物光信号感应和传导的关键受体[1-2]。在脊椎动物中，视紫红质受光激活引发G蛋白偶联的酶联反应，导致cGMP相关的阳离子通道关闭和cGMP的水解，最终形成膜电位差，从而将胞外光信号转化为胞内电信号。无脊椎动物的视紫红质同样可激活G蛋白，G蛋白进而激活磷脂酶C，最终激活瞬时受体电位通道，使Na^+/Ca^{2+}内流增强，形成膜电位差[3-4]。

莱茵衣藻拥有不同的感光和信号传导系统，是一种能在最佳光条件下进行光合作用的单细胞真核藻类微生物[5]。莱茵衣藻拥有8种细菌类型的视紫红质（Cop1/2/3/4/5/6/7/8）[6]，其中仅有Cop3和Cop4调控细胞的趋/避光性。同时，由于Cop3和Cop4是光诱导的离子通道受体，因此Cop3和Cop4也被命名为ChR1和ChR2，这2种光受体在细胞内的定位对于光信号感应和光应答至关重要[6-7]。莱茵衣藻纤毛是细胞感应外界刺激并进行趋/避光的传感器和运动器。莱茵衣藻利用ChR1和ChR2等阳离子通道蛋白质，特异性感应不同频率的光刺激并产生光电流，进而控制纤毛摆动进行趋/避光。

研究表明，光敏通道蛋白质定位在莱茵衣藻的眼点来感知光信号，并介导眼点和纤毛光电流，从而引起膜上钙通量的变化，导致细胞去极化并最终控制纤毛摆动模式[7]。后续研究表明ChR1不仅定位在眼点，而且定位在纤毛，因此推测莱茵衣藻光受体的感光和应答都集中在纤毛，这样可以使细胞对光的感知和应答更加高效。目前，国际上对莱茵衣藻光受体纤毛定位与细胞趋/避光现象之间的关系及其光受体纤毛内动态维持决定细胞趋/避光的光遗传学基础等重大基础科学问题的研究还较少，因此制备特异性优良的ChR1抗体可为深入研究ChR1在纤毛内的功能以及调控细胞趋/避光性的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 质粒与菌株

*E. coli*感受态细胞XL1-Blue、BL21（DE3）：北京全式金生物技术有限公司；野生型莱茵衣藻CC-125及原核表达载体pET-28a（+）、pGEX-2T：作者所在实验室保存；*chr1*突变体藻种：美国莱茵衣藻突变体库。

1.1.2 动物

新西兰雄性大白兔：3~4月龄，体质量2.0 kg左右，北京华大蛋白质研发中心有限公司。

1.1.3 试剂

Eastep Super总RNA提取试剂盒：普洛麦格（北京）生物技术有限公司；DNA胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒：生工生物工程（上海）股份有限公司；IPTG、卡那霉素、氨苄青霉素：北京索莱宝科技有限公司；DNA marker（分别为2 000、100 bp）、限制性核酸内切酶（*Eco*R Ⅰ、*Hin*d Ⅲ）、*pfu* DNA聚合酶、T4 DNA连接酶：北京全式金生物技术有限公司；质粒小提试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司；彩色预染蛋白质marker：美国Thermo Fisher Scientific公司；引物合成和基因测序：苏州安升达生物科技有限公司完成；其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增

总RNA提取方法参照Eastep Super总RNA提

取试剂盒说明书，将提取的总RNA反转录为cDNA。利用SWISS Model和DNAMAN对莱茵衣藻*chr1*基因进行核苷酸和氨基酸序列分析，预测跨膜区、亲疏水性及抗原识别位点，筛选ChR1的抗原表位区，将其第447到713个氨基酸作为设计序列。选取ChR1片段的cDNA长度为798 bp，分析其酶切位点后，在cDNA序列两端分别添加*Eco*R I与*Hin*d III酶切位点，由安升达生物科技有限公司合成引物。PCR扩增程序为：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性45 s，58 ℃退火45 s，72 ℃延伸1 min，25个循环；72 ℃终延伸10 min。PCR反应结束后采用0.8 g/dL的琼脂糖进行凝胶电泳，分析PCR产物。

1.2.2 原核重组表达载体的构建

将上述PCR获得的目的基因*chr1*与载体pET-28a(+)用*Eco*R I和*Hin*d III双酶切，使用胶回收产物试剂盒回收目的基因和载体，室温条件下使用T4 DNA连接酶，将目的基因和载体按照摩尔质量比3∶1连接15 min，同时用ddH_2O替代目的基因作为阴性对照组[8]；将2组连接体系分别转化到*E. coli* XL1-Blue感受态细胞，涂布于LB抗性平板(含100 μg/mL卡那霉素)上，37 ℃培养14~16 h后挑取单克隆抗体至相应的LB抗性液体培养基培养12 h，用质粒小提试剂盒提取后进行双酶切验证，若验证成功则送至安升达生物科技有限公司进行测序鉴定，将测序正确的质粒命名为pET-28a(+)-*chr1*。

1.2.3 融合蛋白的表达及鉴定

将构建成功的原核表达载体pET-28a(+)-*chr1*转化至*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中，在含卡那霉素的抗性平板(LBK)上于37 ℃倒置培养14~16 h，次日挑取单克隆抗体至液体LBK培养基中，37 ℃、220 r/min条件下培养12 h后按体积比1∶20进行扩大培养，当菌液OD_{600}值至0.6~0.8后，添加IPTG至终浓度为200 mmol/L进行蛋白质诱导，在25 ℃、200 r/min条件下诱导8 h，表达融合蛋白6×His∶∶ChR1[9]。诱导完成后在4 ℃以8 000 r/min离心5 min，收集菌体，并用Tris-HCl缓冲液清洗菌体3次。加入裂解液(50 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl，pH 7.4)将菌体重悬，经高压破碎后获得菌体全蛋白质，在4 ℃以12 000 r/min离心15 min，收集上清液和沉淀，将蛋白质样品进行SDS-PAGE分析，经考马斯亮蓝染色后鉴定融合蛋白6×His∶∶ChR1的存在位置[10]。

1.2.4 融合蛋白的纯化

在收集到的沉淀中加入20 mL含1 mol/L尿素的Tris缓冲液(50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl，pH 8.0)，洗涤3次去除杂蛋白质，然后使用结合液(含20 mmol/L咪唑、8 mol/L尿素)将沉淀变性溶解。同时使用结合液对Ni Sepharose™ 6 Fast Flow蛋白质纯化柱进行预处理平衡，之后将含融合蛋白6×His∶∶ChR1的溶液过0.45 μm滤膜，随后加入纯化柱中，室温结合2 h。弃去流穿液，用结合液(含20 mmol/L咪唑、8 mol/L尿素)清洗杂蛋白质，用含500 mmol/L咪唑和8 mol/L尿素的洗脱液洗脱目的蛋白质，取样进行SDS-PAGE分析蛋白质纯度。

1.2.5 动物免疫

从新西兰雄性大白兔免疫前的耳静脉取阴性血清。取弗氏完全佐剂与纯化的蛋白质溶液各1 mL进行混合，并将混合液完全乳化至1 mL，然后注射到兔子背部皮下进行初次免疫[11]。初次免疫后使用弗氏不完全佐剂进行加强免疫，每2周进行一次，共4次。在最后一次免疫后，从耳动脉中采集100 μL血清，通过间接ELISA法测定抗血清效价。之后从家兔股动脉采血，将获得的血液进行血清分离，将血清冻存至−80 ℃冰箱。

1.2.6 抗血清效价的测定

采用间接ELISA法测定多克隆抗体效价[12]，将纯化后的6×His∶∶ChR1蛋白质在4 ℃包被过夜，用含50 g/L脱脂乳粉的封闭液进行封闭，用封闭液将抗血清按1∶200~1∶102 400的不同稀释比稀释后加入封闭的比色板中，室温孵育1 h，TBST漂洗3次后将辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体按照稀释比1∶20 000加入比色板中，用TMB显色，加入硫酸终止显色后，用酶标仪测定450 nm处的OD值。将最大OD值的一半对应的抗血清稀释倍数作为效价。

1.2.7 抗血清的纯化

将抗血清稀释于结合缓冲液（含 8 mmol/L NaH_2PO_4、12 mmol/L Na_2HPO_4，pH 7.0）中，并与 protein A Sepharose™ CL-4B[13]室温结合 1 h，漂洗 3 次后，使用洗脱缓冲液（0.1 mol/L 甘氨酸，pH 2.7）洗脱目的蛋白质。收集洗脱液后用 1 mol/L Tris-HCl（pH 9.0）将洗脱液 pH 调至中性，并将抗体质量浓度浓缩至 100 mg/mL，置于−80 ℃保存。

1.2.8 多克隆抗体特异性的检测

用免疫印迹法对多克隆抗体的特异性进行检测，取 20 μg 经过蛋白质定量处理的莱茵衣藻上清蛋白质[14]，使其与 5×上样缓冲液混匀后，沸水处理 5 min，进行 SDS-PAGE 分析，电泳完成后将蛋白质条带转移至 NC 膜上。用 50 g/L 的脱脂牛奶室温封闭 2 h，将经过 protein A 纯化的抗体按照体积比 1∶1 000 加入封闭液，室温孵育 1 h，使用 TBST 漂洗 3 次，每次 10 min，再将 HRP 标记的羊抗兔抗体与 50 g/L 的脱脂牛奶按照体积比 1∶10 000 混合并加入孵育盒中，室温孵育 1 h，TBST 漂洗 3 次，每次 10 min，最后加入 ECL 发光显色液显色曝光。

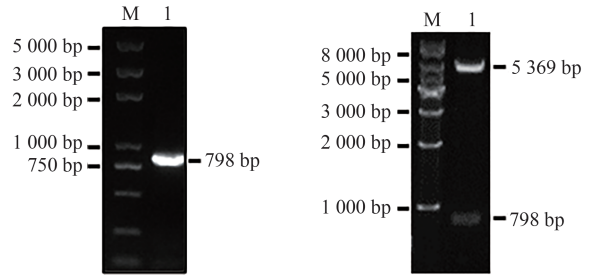
1.2.9 莱茵衣藻中 ChR1 的定位

通过免疫荧光试验对莱茵衣藻中的 ChR1 进行定位分析，取适量对数期莱茵衣藻细胞至离心管中，离心后加入 0.5 mmol/L 的 EGTA 溶液重悬后将细胞平铺在盖玻片上，将上述盖玻片浸泡至甲醇中对细胞形态进行固定处理，固定细胞 10 min，重复 2 次。用质量浓度为 50 g/L 的 BSA（含 3 g/L TritonX100、50 g/L 山羊血清）覆盖盖玻片，室温封闭 2 h。封闭完成后加入经 protein A 纯化的 ChR1 抗体（稀释比 1∶50）室温孵育 2 h，1×PBS 缓冲液清洗 3 min，重复 10 次，加入红色荧光标记的羊抗兔二抗，室温孵育 1 h 后使用指甲油封闭盖玻片，待晾干后置于倒置荧光显微镜拍摄图像。

2 结果与讨论

2.1 *E. coli* pET-28a(+)-*chr1* 原核表达载体的构建

设计并合成引物（F：CGGAATTCTTCGCGCGGCTGCCCGTGCCCTAC；R：CCCAAGCTTCAGGCGGTTGATCTCGCTCATC），以野生型莱茵衣藻 CC-125 的 cDNA 为模板[15]进行 PCR 扩增，获得大小为 798 bp 的 *chr1* 目的基因片段，如图 1（a）所示。经琼脂糖凝胶电泳分析后，PCR 产物片段大小正确且条带单一。将目的基因和 pET-28a（+）载体分别用 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ进行双酶切，双酶切后回收 pET-28a（+）载体和目的基因进行连接和转化，挑取单克隆抗体后提取质粒进行双酶切验证，结果见图 1（b）。双酶切后出现了 798 bp 的目的片段和 5 369 bp 的载体片段，与预期条带大小一致，将质粒进行测序验证。



M—DNA marker (100 bp)；1—*chr1*基因的PCR扩增产物。

M—DNA marker(1 000 bp)；1—pET-28a(+)-*chr1*经*Bam*Ⅰ和*Hin*d Ⅲ双酶切

(a) *chr1*基因PCR扩增产物　(b) pET-28a(+)-*chr1*质粒双酶切验证

图 1 *chr1* 基因的 PCR 扩增及重组质粒双酶切验证

Fig. 1 PCR amplification of *chr1* and recombinant expression plasmid verification by restriction enzyme digestion

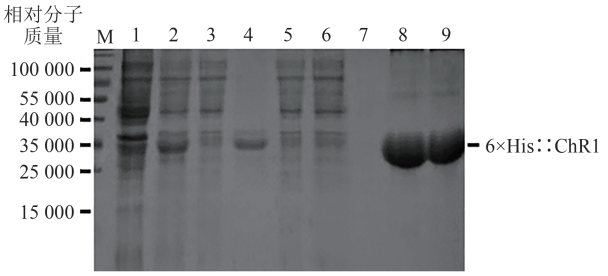
2.2 6×His∶∶ChR1 蛋白质诱导及表达

通过 DNAMAN 进行预测分析，6×His∶∶ChR1 的相对分子质量约为 29 000，经 IPTG 诱导后，*E. coli* BL21（DE3）会大量表达 6×His∶∶ChR1 蛋白质。收集菌体后将其进行高压破碎获得全蛋白质，低温离心后分离上清液及沉淀。分别将破碎的全蛋白质、上清液、沉淀进行 SDS-PAGE 分析，结果见图 2。目的蛋白质以包涵体的形式存在于细胞中，纯度大于 85%，蛋白质定量后其质量浓度为 2.5 mg/mL，符合免疫要求。将目的蛋白质送至北京华大蛋白质研发中心有限公司免疫新西兰大白兔。

2.3 抗血清效价的检测

抗血清效价的检测参照文献[16-17]。用间接 ELISA 法检测抗血清的效价，将最大 OD 值的一半对应的抗血清稀释倍数作为效价。如图 3 所示，免疫所

得的抗血清效价为1∶102 400，达到取血标准[18]，可对动物进行采血处理，获得ChR1抗血清。



M—蛋白质marker；
1—诱导前全蛋白质；2—诱导后全蛋白质；
3—诱导后水溶性(上清液)蛋白质；
4—诱导后水不溶性(沉淀)蛋白质；
5—流穿液；6~7—漂洗液；
8~9—洗脱液。

图2　6×His∶∶ChR1蛋白质在*E. coli* BL21(DE3)中的表达及纯化

Fig. 2　Expression and purification of the protein 6×His∶∶ChR1 in *E. coli* BL21 (DE3)

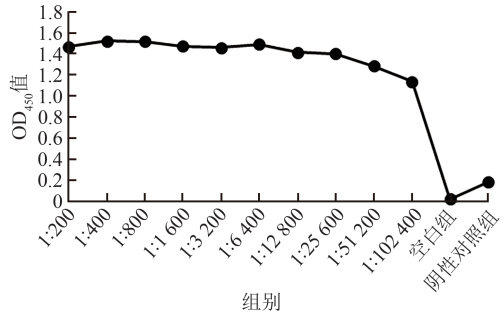


图3　间接ELISA法测定ChR1抗血清效价

Fig. 3　Determination of ChR1 antiserum titer by indirect ELISA

2.4　ChR1抗体纯化及特异性检测

免疫后得到的兔源抗血清中会含有多种抗体亚型，为了获得纯度更高的抗体，采用protein A亲和层析法纯化ChR1抗血清，并从野生型莱茵衣藻CC-125中提取全蛋白质，用纯化后的ChR1抗体与封闭液按照1∶1 000稀释后进行孵育，如图4所示，纯化后的ChR1抗体可以特异性结合并识别莱茵衣藻中的内源性ChR1蛋白质，在相对分子质量70 000处出现单一目的条带，特异性较强，因此纯化后的ChR1抗体可用于后续研究。

2.5　莱茵衣藻ChR1亚细胞定位

研究表明ChR1定位在眼点进行感光，随后将光信号转化为电信号，通过控制纤毛摆动的方式来实现细胞的趋/避光功能。作者通过免疫荧光

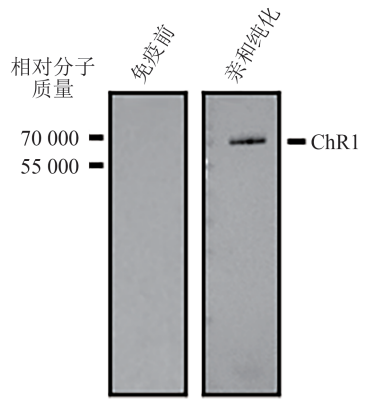


图4　免疫印迹技术检测抗体ChR1的特异性

Fig. 4　Specificity of the ChR1 antibody with immunoblotting

试验对野生型莱茵衣藻CC-125及*chr1*突变体藻种内的ChR1进行定位，结果如图5所示。ChR1抗体可与莱茵衣藻CC-125细胞中ChR1蛋白质特异性结合，在眼点区域有明显定位。而在*chr1*突变体藻种内，在眼点位置没有检测到ChR1且在其他部分未检测到任何荧光信号，进一步证实所制备的抗体具有较高的特异性和生物活性，不仅适用于蛋白质免疫印迹试验，也适用于免疫荧光试验。

此外，通过免疫印迹试验对野生型莱茵衣藻CC-125及*chr1*突变体藻种的纤毛蛋白质进行检测，结果如图6所示。野生型莱茵衣藻CC-125中

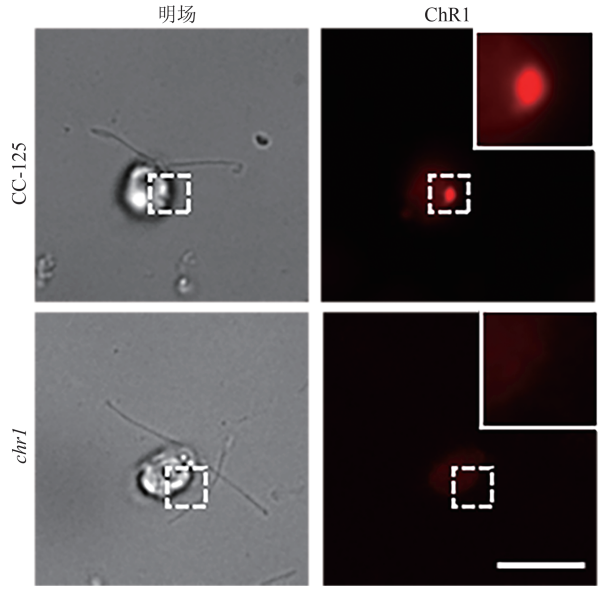


图5　免疫荧光技术检测ChR1在莱茵衣藻中的定位

Fig. 5　Immunofluorescence detection of ChR1 localization in *C. reinhardtii*

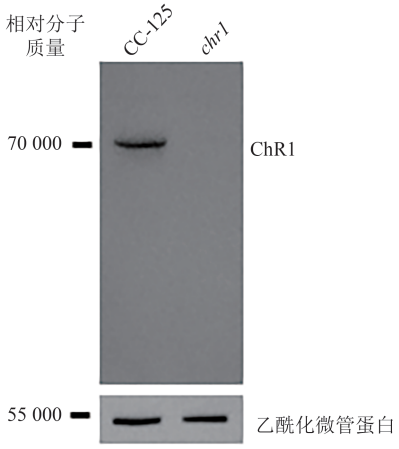


图 6 免疫印迹技术检测 ChR1 蛋白质在莱茵衣藻纤毛中的定位

Fig. 6 Immunoblotting of ChR1 localization in *C. reinhardtii* cilia

的 ChR1 能够定位于纤毛，而在 *chr1* 突变体藻种中，未检测到 ChR1 的定位，该结果可对后续分析 ChR1 在纤毛内的功能及其调控细胞趋/避光性的分子机制提供有力的数据支撑。

3 结论

莱茵衣藻是单细胞绿藻，通过趋弱光或避强光的生理反应使细胞在最佳光照条件下进行光合作用。ChR1 和 ChR2 是莱茵衣藻的 2 个离子通道型受体，其对细胞的趋/避光性具有重要的调控作用。

作者利用基因克隆技术构建了 C 端带有 His 标签的融合蛋白 6×His∷ChR1。结果表明，6×His∷ChR1 以包涵体的形式存在于细胞内，后通过尿素溶解、镍柱亲和纯化后得到纯度 85% 以上的 6×His∷ChR1，并以此为免疫原进行动物免疫。ChR1 抗血清经过 protein A 亲和层析法纯化后，采用免疫印迹技术检测野生型莱茵衣藻 CC-125 中 ChR1 的表达量，结果表明，ChR1 抗体能够特异性识别莱茵衣藻中的 ChR1 蛋白质，且具有良好的特异性和灵敏性。免疫荧光试验表明，ChR1 位于莱茵衣藻 CC-125 的眼点位置，特异性较强，可用于 ChR1 在莱茵衣藻细胞中的定位研究。另外，作者成功制备了高灵敏性和特异性的 ChR1 多克隆抗体，为后续研究 ChR1 在纤毛内的功能以及如何调控细胞趋/避光性的分子机制提供了支撑。

参考文献

[1] ARMITAGE J P. Behavioral responses in bacteria[J]. Annual Review of Physiology, 1992, 54: 683-714.

[2] KRÖGER P, HEGEMANN P. Photophobic responses and phototaxis in *Chlamydomonas* are triggered by a single rhodopsin photoreceptor[J]. FEBS Letters, 1994, 341(1): 5-9.

[3] KATERIYA S, NAGEL G, BAMBERG E, et al. "Vision" in single-celled algae[J]. News in Physiological Sciences, 2004, 19: 133-137.

[4] BÖHM M, BONESS D, FANTISCH E, et al. Channelrhodopsin-1 phosphorylation changes with phototactic behavior and responds to physiological stimuli in *Chlamydomonas*[J]. The Plant Cell, 2019, 31(4): 886-910.

[5] 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.

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

[7] AWASTHI M, RANJAN P, SHARMA K, et al. The trafficking of bacterial type rhodopsins into the *Chlamydomonas* eyespot and flagella is IFT mediated[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 34646.

[8] 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)

[9] 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)

[10] KOENEKOOP R K. The major gene for bardet-biedl syndrome is *BBS1*[J]. Ophthalmic Genetics, 2003, 24(2): 127.

[11] 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）

[12] 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）

[13] 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）

[14] 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）

[15] 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）

[16] 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）

[17] 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）

[18] 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）

（责任编辑：史润东东）