DOI:10.12441/spyswjs.20240717006　　[文章编号] 1673-1689(2025)11-0023-07

莱茵衣藻RSP10的多克隆抗体制备及应用

卢　婵[1]　张媛媛[1]　陶　冶[1]　樊振川[2]　刘雁霞[1*]

（1. 天津科技大学食品科学与工程学院,天津 300457; 2. 浙江大学医学院第四附属医院,浙江 义乌 322000）

摘要:【目的】研究径向辐条蛋白RSP10如何完成纤毛组装,制备一种高特异性的RSP10多克隆抗体。**【方法】**首先构建原核表达载体pMal-C2X-*rsp10*,并在大肠杆菌BL21(DE3)中诱导表达MBP标签的RSP10,待融合蛋白纯化后切除MBP标签,免疫新西兰雄性大白兔获得抗血清,以间接ELISA法测定其效价。**【结果】**通过Protein A和抗原抗体纯化后,获得了特异性强、灵敏度高的兔抗莱茵衣藻RSP10抗体,通过免疫荧光检测其定位于细胞基体部位,进一步分离纤毛组分发现RSP10大量存在于纤毛轴丝中,少量存在于纤毛基质中。**【结论】**该试验为后续研究RSP复合物如何完成组装及其影响纤毛运动的深层分子机理提供了有力的数据支撑。

关键词:纤毛;RSP10;多克隆抗体;表达和纯化

Preparation and Application of a Polyclonal Antibody to *Chlamydomonas reinhardtii* RSP10

LU Chan[1]　*ZHANG Yuanyuan*[1]　*TAO Ye*[1]　*FAN Zhenchuan*[2]　*LIU Yanxia*[1*]

(1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. The Fourth Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Yiwu 322000, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to explore the cilium assembly of the radial spoke protein RSP10 and develop a highly specific polyclonal antibody to RSP10. [**Method**] Firstly, the prokaryotic expression vector pMal-C2X-*rsp10* was constructed, and the expression of MBP-labeled RSP10 was induced in *Escherichia coli* BL21 (DE3). After the fusion protein was purified, and the MBP label was excised. The obtained protein was used to immunize New Zealand male white rabbits, and the antibody titer in the anti-serum was determined by indirect ELISA. [**Result**] The rabbit anti-*Chlamydomonas reinhardtii* RSP10 antibody with high specificity and high sensitivity was obtained after purification of Protein A and antigen antibody. The immunofluorence assay showed that RSP10 was mainly located in the kinetosome. The isolation of ciliary components showed that a large amount of RSP10 was detected in the axial filament and a small amount in the matrix of cilia. [**Conclusion**] This finding provides strong data support for the subsequent study of the assembly of RSP complex and the molecular mechanism underpinning its influence on cilium movement.

Keywords: cilium; RSP10; polyclonal antibody; expression and purification

纤毛是从细胞基体部位突起的具有感知和运动功能的保守细胞器,由纤毛膜、纤毛基质和纤毛轴丝构成[1]。纤毛轴丝为特化的中心体所形成的细胞基体延伸而成,主要由微管组成,外周为9组二联体微管,中央为2根单体微管,根据纤毛轴丝的排列方式,可将其分为“9+2型”运动纤毛和“9+0型”原生纤毛。在运动纤毛中,连接动力蛋白臂的二联体微管可通过径向辐条(radial spoke)连接中央微管,使得信号分子从中央微管逐级传递至内外动力蛋白臂,引起纤毛应激反应产生局部弯曲,

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(32200558)。

通信作者:刘雁霞(1992—),女,博士,内聘副教授,硕士研究生导师,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:liuyanxia@tust.edu.cn

收稿日期:2024-07-17　**修回日期:**2024-09-30

带动纤毛运动[2]。纤毛轴丝组装异常将会导致纤毛运动障碍，引发一系列遗传异质性纤毛病，如原发性纤毛运动障碍（primary ciliary dyskinesia，PCD）[1]，其典型临床症状为体轴异常、内脏反转、男性不育等。因此，研究纤毛轴丝蛋白质如何组装进入纤毛对了解相关纤毛病的发病机理具有重要指导意义[3]。

RSP10是径向辐条头部蛋白质中RSP1、9、10中的一种，是引起原发性纤毛运动障碍的候选基因，其N端结构至少含有4个介导蛋白质与质膜结合的MORN结构域[2]。此外，其深层致病分子机制尚不清楚。莱茵衣藻是一种单细胞真核生物，顶端具有2根等长的运动纤毛，其纤毛结构与信号转导体系均与人类和哺乳动物细胞高度保守，且其培养周期短，遗传背景清楚，具有多种基因敲除突变体，纤毛易于大量分离提取纯化，成为研究纤毛生物生成和纤毛信号转导的良好模式生物。在利用莱茵衣藻为模式生物的结构生物学研究中，已解析出23种编码径向辐条的蛋白质，至少有12种在人体中高度保守，表明径向辐条在整个进化过程中是保守的，其中包含RSP10蛋白[2]。本研究拟对莱茵衣藻*rsp10*基因进行原核克隆和表达纯化，制备兔抗莱茵衣藻RSP10的多克隆抗体，为后续研究RSP10如何影响RSP复合物组装及其引发PCD的致病分子机制奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原核表达载体pMAL-C2X、大肠杆菌（*E. coli*）感受态细胞DH5α、BL21（DE3）、莱茵衣藻野生型藻种CC-5325：北京全式金生物技术有限公司；新西兰雄性大白兔：年龄13~17周，体质量1.5~2.0 kg，北京华大蛋白质研发中心有限公司；T4连接酶、限制性核酸内切酶（*Eco*R Ⅰ、*Hin*d Ⅲ）：上海翌圣莫纳生物科技股份有限公司；*pfu* DNA聚合酶：上海源叶生物科技有限公司；DNA标志物：艾科瑞生物科技有限公司；Eastep Super总RNA提取试剂盒：上海盛祺兆生物科技有限公司；蛋白质标志物：加拿大Ferments公司；质粒小提试剂盒：北京云肽生物科技有限公司；BIOWEST琼脂糖凝胶：上海贝晶生物技术有限公司；Protein A Sepharose™ CL-4B、Ni Sepharose™ 6 FF填料：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；荧光标识羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗：美国Sigma公司；HRP标识羊抗兔/鼠抗体：美国Jackson公司；ECL显色液：德国Millipore公司；其余试剂均为国产分析纯。

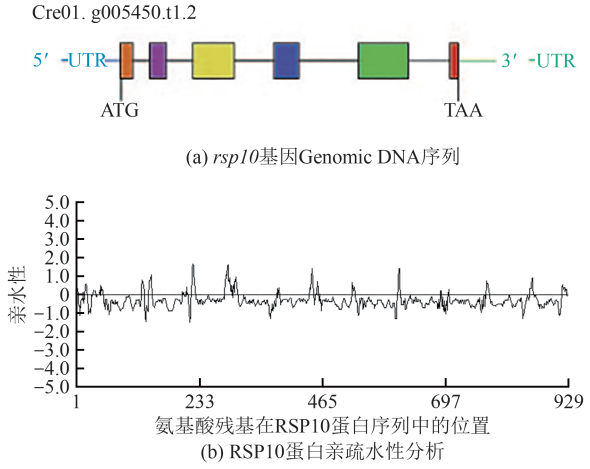
1.2 仪器与设备

PCR仪：HM-P16型，恒美电子科技公司；恒温培养箱：HYN-200B型，欧诺仪器仪表公司；立式摇床：ZWY-2102C型，上海智城分析仪器制造公司；小型冷冻离心机：5424R型，德国Eppendorf公司；小型台式离心机：5424型，德国Eppendorf公司；超高压破碎仪：AH-NANO型，郑州科泰实验设备有限公司；电泳仪：SE-300-10A-1.0型，天津伊诺白晶生物科技有限公司；转膜仪：PS300-B型，美国Heofer公司；增强型凝胶成像仪：ChampGE-500型，北京赛智创业科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 RSP10理化分析

根据莱茵衣藻基因序列库phytozome中提供的基因序列，*rsp10*基因全序列为2 182 bp，包括6个外显子，5个内含子。cDNA序列为651 bp，如图1（a）所示。通过DNAMAN对RSP10蛋白进行亲疏水性分析，如图1（b）所示，该蛋白质含有大量疏水性氨基酸。



(a) *rsp10*基因Genomic DNA序列

(b) RSP10蛋白亲疏水性分析

图1 Rsp10理化分析

Fig. 1 Physicochemical analysis of Rsp10

1.3.2 重组质粒pMal-C2X-*rsp10*的构建

从莱茵衣藻库中（http://phytozome-next.jgi.doe.gov）获取*rps10*的编码基因序列，使用SnapGene分析酶切位点，在5′端和3′端分别添加*Bam*H Ⅰ

和 *Hin*d III 酶切位点设计引物（RSP10-FOR：5′-CGGGATCCATGGCTGACGACGAGCTTC-3′；RSP10-REV：5′-CCCAAGCTTTGCCACAGAGAACTCCTTGC-3′），由苏州安升达生物科技有限公司合成。莱茵衣藻总RNA提取方法参照文献[4]的方法，利用Trizol法提取莱茵衣藻总RNA，将其反转录为cDNA。以cDNA为模板，按95 ℃预变性5 min；95 ℃变性45 s，53 ℃退火45 s，72 ℃延伸1 min，循环30次；72 ℃终延伸10 min的PCR扩增程序扩增目的基因。将pMal-C2X表达载体及*rsp10*目的片段分别使用*Bam*H I、*Hin*d III进行双酶切，切胶回收酶切处理后的目的基因和载体，将目的基因和载体按照摩尔质量比3∶1用T4连接酶室温连接15 min，同时将目的基因用ddH_2O替代用作阴性对照组，转化至*E. coli* DH5*α*，37 ℃培养12~16 h，挑取单克隆提取质粒进行双酶切验证，并测序验证[5]。

1.3.3　融合蛋白的诱导、表达及纯化

将重组质粒pMal-C2X-*rsp10*转至*E. coli* BL21感受态细胞中，挑取单克隆至质量浓度为100 μg/mL卡那霉素的液体LB中，37 ℃培养过夜；次日扩大培养至OD_{600}值达0.8~1.0时，加入IPTG，至终浓度为0.2 mmol/L，25 ℃诱导6~10 h，表达重组蛋白MBP-RSP10[6]，以不加IPTG诱导的为对照组[7]；诱导完毕后，4 ℃、8 000 *g*离心5 min，收集菌体，用PBS缓冲液洗涤2次，加入裂解液（50 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl，pH 7.4）高压破碎菌体细胞获得全蛋白质，4 ℃、12 000 r/min离心15 min，收集上清液和沉淀，采用12 g/dL的胶检测蛋白质中组分[8-9]。经检测发现，在上清液中存在表达的MBP-RSP10蛋白，将其与MBP标签蛋白质高度交联纯化树脂于室温下摇床结合2 h；结合完毕后，使用Tris-HCl缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl，pH 8.0）漂洗柱子，用含浓度为10 mmol/L麦芽糖的Tris-HCl缓冲液洗脱，将洗脱蛋白质置于−20 ℃保存。对纯化蛋白质进行跑胶检测和纯度分析[10]，选择纯度高且水溶性好的蛋白质进行免疫试验。

1.3.4　动物免疫

经过严格的蛋白质纯化后，得到纯化质量浓度>500 μg/mL的蛋白质，将其提交给北京华大蛋白质研究中心有限公司。选用体质量约2 kg的新西兰雄性大白兔作为免疫动物。免疫前，从其耳静脉中取阴性血清。初次免疫时，选择400 μg纯化的MBP-RSP10融合蛋白的抗原，与等量的弗氏佐剂混匀，采用向新西兰雄性大白兔皮下注射的方式，使其体内产生免疫反应。为了加强免疫效果，大约14 d注射一次弗氏不完全佐剂加强免疫，共进行4次。免疫剂量及方法与首次免疫相同。最后一次免疫后，从其耳动脉中采集100 μL血清，通过间接ELISA法测其抗血清效价。若其抗血清效价>1∶51 200，于动物颈动脉取血，通过离心从血样中分离出抗血清，以供后续试验；若抗血清效价结果不符合要求，需要再次进行免疫处理，直至达到预期抗血清效价。将经过血清分离的家兔从股动脉采血，并于−80 ℃贮藏备用。

1.3.5　多克隆抗体的效价测定

采用间接ELISA法测定抗体效价[6,11]。用包被液将MBP-RSP10融合蛋白稀释至质量浓度10 μg/mL，于酶标板每个孔位中准确加入100 μL包被抗原。确保抗原与孔壁充分结合，以方便后续试验。室温下用5 g/dL的脱脂牛奶处理抗原进行1 h的孵育封闭处理，弃去牛奶，用PBST清洗液洗板3次，加入用PBS稀释后的抗血清称为一抗，37 ℃孵育1 h，再次进行3~5次洗板，用HRP标记的羊抗兔抗体为二抗，室温下孵育1 h以检测特定的目标抗原。每孔中加入100 μL的3’，3’，5’，5’-四甲基联苯胺（TMB）显色溶液，室温下避光显色20 min。加入50 μL 0.5 mol/L H_2SO_4终止液终止反应。利用酶标仪测定抗血清的OD_{450}值，利用PBS稀释液作空白对照并依次读取各孔OD_{450}值调零[12]。以最大OD_{450}值的1/2数值处对应的抗血清稀释倍数做为效价值。若阴性对照组即试验组抗血清的OD_{450}值≥2.1，则判断其为阳性，其最高稀释倍数为抗血清效价。结合该数据可计算并获得最终的效价[13]。

1.3.6　IgG亚型抗体富集及纯化

在Protein A Beads中加入结合缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.0）10~15 mL，平衡Protein A Beads 5~10 min，于平衡好的重力柱中加入混匀的1 mL抗血清和9 mL结合缓冲液，于摇床上室温结合2 h。用结合缓冲液（12 mmol/L $Na_2HPO_4·12H_2O$、8 mmol/L $NaH_2PO_4·2H_2O$，pH 7.0）漂洗至G-250不变色，用洗脱缓冲液（0.1 mol/L

Glycine，pH 2.7）对目的蛋白质进行洗脱，抗体在事先加入了中和缓冲液的EP管中收集洗脱，洗脱至G-250不变色，纯化后的抗体于−80 ℃冻存备用。

1.3.7 莱茵衣藻全蛋白质提取和定量

吸取1 mL培养至对数期的莱茵衣藻液体培养基藻液，2 500 r/min离心3 min，弃上清液，向沉淀中加入108 μL Protein A和12 μL 1 mol/L的DTT，4 ℃、1 200 r/min涡旋振荡20 min，加入80 μL Protein B，4 ℃、1 200 r/min涡旋振荡25 min，使细胞裂解完全。4 ℃、12 000 r/min离心10 min，取5 μL上清液进行蛋白质定量试验，加入50 μL 5×上样缓冲液至剩余上清液中，沸水浴5 min，使蛋白质充分变性。加入195 μL去离子水、800 μL氨基黑蛋白定量液至上述5 μL上清液中，混匀，4 ℃、12 000 r/min离心5 min，弃去上清液。加入0.8 mL蛋白质定量漂洗液充分振荡后，4 ℃、12 000 r/min离心5 min，弃去上清液，反复漂洗3次。加入1 mL浓度为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溶液作为空白对照。利用y=0.086 9x+0.007 4，算出样品溶液浓度，已知上样量为20 μg可求出上样体积。

1.3.8 免疫印迹法检测多克隆抗体的特异性

为了测定纯化后anti-RSP10的特异性，利用蛋白质免疫印迹法进行分析。取培养至对数期的莱茵衣藻野生型CC-5325藻中上清液蛋白质[14]进行蛋白质定量处理，取20 μL蛋白质与5×上样缓冲液混匀，沸水浴5 min，12 000 r/min离心5 min，上样，随后进行SDS-PAGE分析。将分离得到的蛋白质条带转移到硝酸纤维素膜（NC膜）上，加入10 mL 10 g/dL的脱脂奶粉，室温下封闭2 h。一抗以1∶500的稀释比加入抗原抗体纯化后的RSP10抗体，室温下孵育2 h，用TBST洗涤3次。二抗采用HRP标记的羊抗兔抗体，室温下孵育1 h，稀释比为1∶10 000，使用TBST进行3次洗涤。加入ECL发光显色液进行显色曝光。

1.3.9 莱茵衣藻纤毛提取及组分分离

将莱茵衣藻接种至TAP液体培养基上，光照条件下曝气培养3~5 d，通过收藻、酸激、差速离心的方法提取莱茵衣藻纤毛，将其分离成膜、轴丝、基质3部分。取莱茵衣藻提取的纤毛样品，加入200 μL HMDEK缓冲液与200 μL质量分数0.1%的NP-40、2 μL PMSF、0.5 μL 4种蛋白酶抑制剂混匀，利用液氮迅速冷冻1 min，于冰上充分解冻，重复上述步骤4~5次，使纤毛和膜之间的基质充分溶出。12 000 r/min离心5 min，上清液标记为基质组分（matrix），沉淀用HMDEK缓冲液混匀，12 000 r/min离心5 min，漂洗3次，加入200 μL HMDEK缓冲液、1 μL质量分数0.5%的NP-40，混匀，于冰上溶解20~30 min，使鞭毛膜蛋白质溶解。12 000 r/min离心5 min，上清液标记为膜组分（membrance），沉淀用HMDEK缓冲液混匀，12 000 r/min离心5 min，漂洗3次，再次收集沉淀，标记为轴丝部分（axoneme）。将上述3部分样品进行Western blotting检测。

1.3.10 RSP10蛋白在莱茵衣藻中的定位

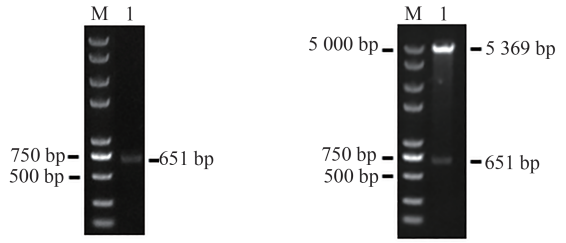
取生长至对数期的莱茵衣藻CC-125细胞至1.5 mL离心管，1 800 r/min离心1 min，弃上清液后加入0.5 mmol/L EGTA溶液（200 μL）重悬，将细胞平铺至经质量分数0.1%聚乙烯亚胺（PEI）处理后的盖玻片上，将细胞置于2 mL预冷的甲醇中，−20 ℃固定细胞10 min，重复此步骤2次，以达到去除叶绿素的目的。室温下用质量浓度5 g/dL的BSA（含质量浓度0.3 g/dL Triton×100和质量浓度5 g/dL的羊血清）封闭液封闭2 h。加入经Protein A纯化的RSP10抗体（1∶50稀释）室温孵育2 h，PBS缓冲液洗涤（3 min，15次），随后加入带有荧光标记的羊抗兔二抗，室温孵育1 h，再次用PBS缓冲液洗涤（3 min，15次）后进行封片，于荧光显微镜下观察。

2 结果与讨论

2.1 大肠杆菌pMal-C2X-*rsp10*原核表达载体的构建

由图2（a）可知，在750 bp下获得单一条带，与*rsp10*基因的预期值651 bp大小相符，经PCR产物快速回收后，将目的基因和pMal-C2X载体分别进行双酶切、连接，将连接产物转入*E. coli* DH5*α*，挑取单克隆提取质粒后采用*Bam*H I和*Hin*d III进行双酶切验证，结果如图2（b）所示，在5 000、750 bp处分别获得双酶切后的单一条带，与pMal-C2X载体和目的基因*rsp10*大小相符，将双酶切正确的质粒送至苏州安升达生物科技有限公司进行测序，与莱茵衣藻库中*rsp10*序列进行对比，经序列正

确比对后即说明质粒构建成功，将其命名为pMal-C2X-*rsp10*。



(a) *rsp10*基因PCR扩增产物　　(b) pMal-C2X-*rsp10*双酶切验证

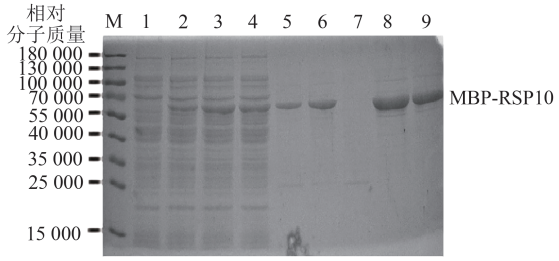
M—DNA标准品；1—pMal-C2X-*rsp10*双酶切后载体和目的基因。

图2　*rsp10*基因PCR扩增及重组质粒双酶切验证

Fig. 2　PCR amplification of *rsp10* gene and recombinant expression plasmid verification by restriction enzyme digestion

2.2　MBP-RSP10重组蛋白质诱导、表达及纯化

通过SnapGene软件预测分析，测定RSP10的相对分子质量约为24 000。将pMal-C2X-*rsp10*转入大肠杆菌BL21（DE3）进行诱导后收菌高压破碎，获得全细胞蛋白质，4 ℃下高速离心，分离上清液与沉淀，将全蛋白质、上清液和沉淀进行SDS-PAGE分析，结果如图3所示。由图3可知，在相对分子质量25 000处有明显的经诱导后的蛋白质条带，且与预期目的蛋白质大小相符，表明有大量MBP-RSP10融合蛋白表达。



M—蛋白质标准物；1—诱导前全蛋白质；2—诱导后全蛋白质；3—全细胞；4—诱导后上清液；5—诱导后沉淀；6—流穿液；7—漂洗液；8~9—洗脱液。

图3　SDS-PAGE检测MBP-RSP10融合蛋白在大肠杆菌BL21（DE3）中的表达及纯化

Fig. 3　SDS-PAGE of the expression and purification of the fusion protein MBP-RSP10 in *Escherichia coli* BL21（DE3）

由图3可知，上清液和沉淀中均有大量融合蛋白表达，由于上清液中的蛋白质相较于沉淀中的蛋白质二级结构相对简单，后期可获得活性更高的抗血清，因此以纯化上清液中的可溶性蛋白质作为免疫抗原。纯化结果如图2所示，经Image J分析其纯度>85%，质量浓度为3 mg/mL，完全可以满足免疫需求。考虑到MBP标签蛋白质远大于目的蛋白质，因此将满足免疫要求的抗原利用肠激酶进行标签切割处理后送至北京华大蛋白质研发中心有限公司进行免疫。

2.3　RSP10抗血清效价分析

由图4可知，试验免疫所得的抗血清效价为1∶102 400，达到取血标准[7]。因此，进行采血处理获得抗莱茵衣藻RSP10的兔血清。

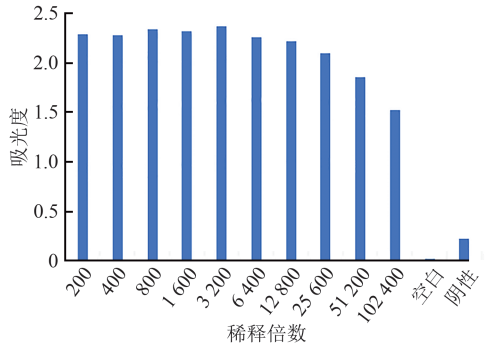


图4　间接ELISA法测定RSP10抗血清效价

Fig. 4　RSP10 antiserum titer determined by ELISA

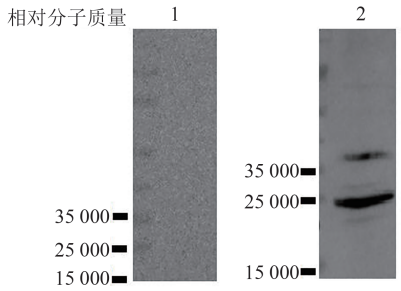
2.4　RSP10抗体Protein A纯化及特异性分析

免疫后得到的兔源抗血清除RSP10抗体外，还有IgG、IgM、IgA、IgE和IgD等其他抗体，为了获得纯度更高的RSP10抗体，需要对抗血清进行纯化以去除杂蛋白质，提高目的蛋白质纯度。提取莱茵衣藻野生型CC-5325全细胞蛋白质并进行蛋白质定量后，取20 μg进行SDS-PAGE，按照1∶1 000比例利用纯化后的RSP10抗体孵育并进行蛋白质免疫印迹检测，免疫前血清作为阴性对照，结果如图5所示。由图5可知，抗血清中的RSP10抗体可以在相对分子质量25 000处特异性识别野生型莱茵衣藻中的内源RSP10蛋白，表明抗血清中有大量抗莱茵衣藻RSP10的抗体产生。在目的条带上方相对分子质量约35 000处存在非特异性条带，说明经过Protein A纯化后特异性较低，可进一步通过抗原抗体纯化抗体。

2.5　抗原抗体纯化及特异性检测

将MBP-RSP10作为抗原偶联至硝酸纤维素膜，与经Protein A纯化后的RSP10抗血清结合，利

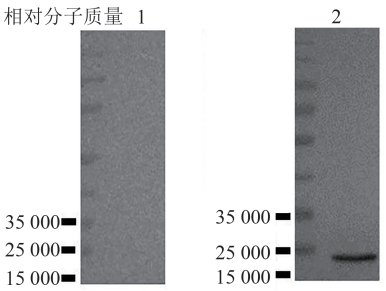
用抗原抗体特异性结合的原理使RSP10抗体特异性结合MBP-RSP10抗原，非特异性的抗体不会被结合，从而可以被漂洗弃去。由图6可知，RSP10抗体可以在相对分子质量25 000处特异性识别野生型莱茵衣藻中的内源RSP10蛋白，且条带单一，说明RSP10抗体经抗原抗体纯化后，具有较高的特异性，可以用于后续试验。



1—免疫前血清；2—Protein A纯化后。

图 5 Western blotting检测Protein A纯化后RSP10抗体特异性

Fig. 5 Western blotting for examination of the specificity of the anti-RSP10 antibody after purification of Protein A



1—免疫前血清；2—抗原抗体纯化后。

图 6 Western blotting检测抗原抗体纯化后RSP10抗体特异性

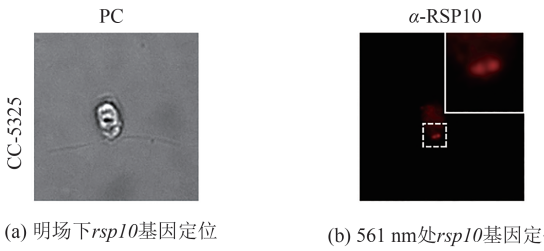
Fig. 6 Western blotting for examination of the specificity of the purified anti-RSP10 antibody

2.6 RSP10在莱茵衣藻细胞中的定位

由图7可知，RSP10在莱茵衣藻细胞基体中富集，但纤毛内可能丰度相对较低，无法通过显微成像显示，因此通过提取分离纤毛样品进一步验证其在纤毛内的分布。

2.7 RSP10在纤毛内的分布

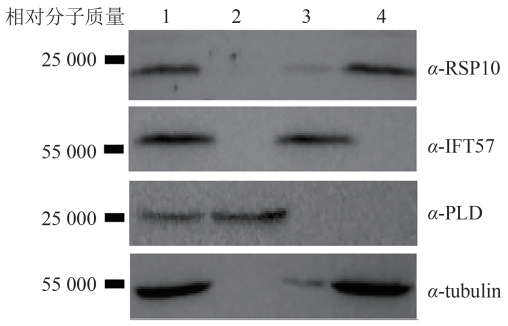
利用RSP10抗体可特异性验证莱茵衣藻RSP10在纤毛内的存在区间，有助于后续深层挖掘RSP10在纤毛内的组装和稳态维持机理[15]。由图8可知，RSP10蛋白主要存在于纤毛轴丝内，但有少量存在于纤毛基质中，IFT57为纤毛基质蛋白质标志物，PLD为纤毛膜蛋白质标志物，α-tubulin为纤毛轴丝蛋白质标志物。



(a) 明场下*rsp10*基因定位　(b) 561 nm处*rsp10*基因定位

图 7 免疫荧光检测RSP10在莱茵衣藻纤毛中的定位

Fig. 7 Localization of RSP10 in *Chlamydomonas reinhardtii* cilia by immunofluorescence



1—纤毛；2—纤毛膜；3—纤毛基质；4—纤毛轴丝。

图 8 Western blotting检测RSP10在纤毛内的存在区间

Fig. 8 Localization of RSP10 in *Chlamydomonas reinhardtii* cilia by Western blotting

由于RSP10为轴丝蛋白质的主要组成部分，因此其完成组装后大量定位于纤毛轴丝以维持纤毛的基本骨架结构，而基质中的RSP10蛋白极有可能为后续探究RSP复合物如何组装和维持稳态的突破，比如RSP10是否作为纤毛内的货物蛋白质通过偶联轴丝蛋白质适配器搭载至IFT列车通过IFT运输进入纤毛，在基质完成组装后整合至纤毛轴丝以维持纤毛正常的骨架结构。总之，基于对RSP10抗体的初步应用探索，将为后续RSP复合物在纤毛内组装及其影响纤毛运动的深层分子机理探究提供了有力的数据和材料支撑。

3 结论

研究了RSP10对纤毛运动的影响，从而制备了强特异性、高灵敏度的RSP10多克隆抗体，不仅为后续揭示其影响纤毛运动的深层分子机理奠定基础，更有助于推动对原发性纤毛运动障碍（PCD）的致病机制研究。研究通过基因克隆技术构建了带有MBP促溶标签的融合蛋白，并将切除标签后的

RSP10作为免疫原进行动物免疫，抗血清经过Protein A和抗原抗体纯化后能够特异性识别莱茵衣藻内源RSP10，说明研究制备的RSP10抗体具有较强的特异性。且免疫荧光结果显示，RSP10大量富集在细胞基体部位，但是否定位于纤毛内并未有充足证据证实。因此，利用该抗体进行初步应用，发现了纤毛基质中尚有RSP10存在。

参考文献

[1] ABBASI F，MIYATA H，SHIMADA K，et al. Radial spoke head 6 homolog a is required for sperm flagellum formation and male fertility in mice[J]. Journal of Cell Science，2018，131(19)：jcs221648.

[2] YANG P F，DIENER D R，YANG C，et al. Radial spoke proteins of *Chlamydomonas* flagella[J]. Journal of Cell Science，2006，119(6)：1165-1174.

[3] LEIGH M W，PITTMAN J E，CARSON J L，et al. Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome[J]. Genetics in Medicine，2009，11(7)：473-487.

[4] 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)

[5] 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.

[6] 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)

[7] 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)

[8] 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.

[9] 韩岳峰，焦明，马慧君，等. 鼠李糖乳杆菌细菌素WO-A/2的表达及其抗菌特性[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(5)：19-25.
HAN Y F，JIAO M，MA H J，et al. Expression and antibacterial properties of bacteriocin WO-A/2 from *Lactobacillus rhamnosus*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(5)：19-25.(in Chinese)

[10] 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)

[11] 杨敏仪，罗雯倩，贾荣业，等. 基于多克隆抗体的糠氨酸ic-ELISA检测方法的建立[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(5)：138-145.
YANG M Y，LUO W Q，JIA R Y，et al. Development of ic-ELISA for furosine detection based on polyclonal antibodies[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(5)：138-145.(in Chinese)

[12] 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)

[13] 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 NMDAR[1] by Protein A-Sepharose CL-4B affinity chromatography [J]. Journal of Dalian Medical University，2008，30(2)：188-190.(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 polyclonalantibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* BBS8[J]. Acta Hydrobiologica Sinica，2022，46(9)：1319-1324.(in Chinese)

[15] 李盼，曾祥权，李倩倩，等. 块菌多糖的提取、结构、功能及应用研究进展[J]. 食品与机械，2024，40(2)：213-220.
LI P，ZENG X Q，LI Q Q，et al. Research progress on extraction，structural，functional properties and applications of *Tuber polysaccharides*[J]. Food & Machinery，2024，40(2)：213-220.(in Chinese)