

分类号: _____

密级: _____

UDC: _____

编号: _____



中国科学院大学
University of Chinese Academy of Sciences

博士学位论文

衣藻鞭毛内运输蛋白 IFT46 基体定位机制的研究

**Study on the molecular mechanism of the basal body localization
of the intraflagellar transport protein IFT46 in *Chlamydomonas
reinhardtii***

姓 名: _____

指导教师: _____

中国科学院水生生物研究所

申请学位: 理学博士

学科专业: 遗传学

培养单位: 中国科学院水生生物研究所

授予单位: 中国科学院大学

二零一七年五月

**Study on the molecular mechanism of the basal body localization of
the intraflagellar transport protein IFT46 in *Chlamydomonas*
*reinhardtii***

By

**A Dissertation Submitted to
The University of Chinese Academy of Sciences
In partial fulfillment of the requirement
For the degree of
Doctor of Science**

Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences

May, 2017

作者声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。

本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

指导老师：_____（签名）

论文作者：_____（签名）

年 月 日

摘要

真核细胞利用不同的细胞器执行特定功能，其中之一是纤毛/鞭毛（可互换使用的术语）。纤毛是突出在绝大多数真核细胞表面的毛发状细胞器，由基体、轴丝、基质和纤毛膜组成，可执行运动、感受和信号转导功能。其结构和功能异常可导致纤毛病，如眼盲、耳聋、多指、内脏逆位和多囊肾等。

纤毛的组装、维持及参与信号转导功能依赖鞭毛内运输（intraflagellar transport, IFT）。IFT 是轴丝和纤毛膜之间的颗粒物沿轴丝作双向运动。正向 IFT 由 kinesin-2 驱动沿 B 管从鞭毛基部移动到顶端，反向 IFT 由 cytoplasmic dynein 2 或 dynein 1b 驱动沿 A 管从鞭毛顶端移动到基部。IFT 复合物至少由 22 种蛋白组成，这些蛋白组成 IFT-A、IFT-B1 和 IFT-B2 三个亚复合物。除定位在鞭毛内，IFT 蛋白还富集在基体周围参与货物的装卸及与分子马达的偶联。然而，作为鞭毛形成的关键初始步骤，IFT 蛋白基体定位的分子机制仍不明确。

本研究中我们对 IFT 复合物 B 中的一个亚基 IFT46 的基体定位机制进行了研究。首先，我们使用 C 端融合了黄色荧光蛋白的 IFT46 恢复了 *IFT46* 的缺失突变体 *ift46-1* 的表型。鞭毛长度、鞭毛率、IFT 运动速率和频率的测定结果表明 YFP 并没有影响 IFT46 的功能。共聚焦和全内反射荧光显微成像结果显示阴性对照 YFP 主要富集在细胞核周围，IFT46::YFP 聚集在基体周围且在鞭毛中呈点状分布。这与其他 IFT 蛋白的定位特征是一致的。随后我们通过在 *ift46-1* 中表达截短的 IFT46 鉴定了 IFT46 可能的基体定位序列 IFT46-C1（246-344 aa）。进一步研究发现 IFT46 的 C 端（246-321 aa, BBTS3）也能够将黄色荧光蛋白靶定到基体。同时我们还发现 BBTS3 也是 IFT46 定位到纤毛所必须的。BBTS3::YFP 能够通过与其他 IFT-B 亚基的相互作用组装到 IFT 复合物中并沿鞭毛作双向运动。这些结果表明 IFT46 的基体和纤毛定位需要 BBTS3 的参与。

上述结果暗示 IFT46 的基体和纤毛定位可能受 IFT 相关蛋白的影响。为确定这些蛋白，我们在 IFT 和分子马达的缺失突变体中表达 IFT46::YFP 并筛选出高表达藻株。活细胞成像和免疫荧光结果表明 IFT46 的基体定位依赖 IFT52，但不依赖 IFT122、IFT88、IFT81、FLA10 或 DHC1b。在 *bld1 IFT46::YFP* 中表达

IFT52::3HA 可恢复 IFT46 的基体定位。然而，在 *ift46-1* 中 IFT52::YFP 可定位在基体。这表明 IFT52 的基体定位不依赖 IFT46，IFT52 作用在 IFT46 的上游。进一步研究发现 IFT46 通过其 C 端与 IFT52 的 C 端相互作用而影响其定位。这一相互作用主要由 IFT46 第 285 位和 286 位的亮氨酸介导。这表明 IFT52 可结合并招募 IFT46。最后，我们发现将 IFT52 的 C 端异位表达在衣藻细胞核可使 IFT46 富集在细胞核。结合已有研究，我们的结果表明 IFT52 和 IFT46 可在胞质中预组装成亚复合物并通过囊泡介导或非囊泡介导的未知途径定位到基体。

我们的研究有助于最终阐明 IFT 蛋白基体定位以及与货物和分子马达相互作用的机制。这对解析纤毛的组装与解聚机理至关重要。同时，这些研究也对调控纤毛形成和纤毛功能，预防和治疗纤毛病具有重要的指导意义。

关键词：衣藻，鞭毛内运输，基体，定位序列

Abstract

Eukaryotic cells evolved different types of organelles that carry out specialized functions. One of them is the cilium, also known as flagellum (interchangeable terms), which is found on most eukaryotic cells. Cilia are hairlike microtubule-based organelles that protrude from the cell surface and are composed of the basal body, axoneme, ciliary matrix and ciliary membrane. Cilia primarily play two vital roles. One is to function as a cellular motor to move either the cell itself or surrounding liquids/particles. The other function of cilia is to serve as a hub for cellular signaling. Defects in ciliary structures and functions in humans lead to diseases commonly referred to as ‘ciliopathies’, such as blindness, deafness, hyperdactylism, heterotaxy and polycystic kidney disease.

The formation and maintenance of cilia, as well as ciliary signaling, depend on intraflagellar transport (IFT), a bidirectional movement of granular particles between the outer doublet microtubules and the flagellar membrane along the axoneme. The anterograde (base to tip) movement of IFT particles is powered by kinesin-2 along B-microtubules, while cytoplasmic dynein 2 or dynein 1b drives retrograde IFT (tip to base) along A-microtubules. More than 22 IFT proteins form at least three biochemically distinct complexes, namely IFT-A, IFT-B1 and IFT-B2. In addition to the dynamic movement of IFT in cilia, nearly all subunits of IFT complex, cargos and motor proteins are concentrated at the basal body where they upload, download or couple. However, the mechanism of the basal body localization of IFT subunits, which is one of the key steps in the initiation of ciliogenesis, remains largely unknown.

In this study, we explored the molecular mechanism of the basal body localization of IFT46. Firstly, we fused Citrine Yellow fluorescent protein (YFP) to the C-terminus of IFT46. When expressed in *ift46-1*, rescued strains have full-length flagella and swim normally. The average ciliary lengths and the percentages of ciliated cells of the rescued strains are akin to those of wild-type (WT) cells. The anterograde and retrograde transport velocities and frequencies of IFT46::YFP are similar to results

published previously. In summary, these data demonstrate that the 28 kDa YFP tag does not affect the function of IFT46. The confocal imaging results showed that the negative control, YFP, accumulates around the nuclei in *ift46-1 YFP*. IFT46::YFP accumulates at basal bodies and localizes in a dotted pattern along the flagella, just as other IFT subunits do. Moreover, the punctate pattern of IFT46::YFP along the flagella is more obvious when examined by total internal reflection fluorescence microscopy. To identify the targeting sequence in IFT46 responsible for its basal body localization, we generated and expressed a series of truncated IFT46 constructs fused with YFP in *ift46-1*. We found that IFT46-C1 may contain the basal body targeting sequence of IFT46. Further research showed that the C-terminus without the glycine-rich tail (246-321 aa, BBTs3) could also target YFPs to the basal body. Moreover, we found that BBTs3 can also target IFT46 to cilia. IFT46-C1 and BBTs3 are able to move along the axoneme, and are likely to be incorporated into IFT-B complexes as part of IFT46. These results demonstrate that the basal body and ciliary targeting of IFT46 require BBTs3.

We next determined whether the basal body localization of IFT46 depends on other IFT components. Accordingly, we expressed full-length IFT46::YFP and IFT46-C1::YFP in *bld1*, *ift88*, *fla10-2* and *dhc1b*. Positive transformants expressing IFT46::YFP or IFT46-C1::YFP were screened using western blotting with an antibody against GFP. We also examined the subcellular localization of IFT46 in *ift81-2* and *ift122-1* strains using immunostaining. The basal body localization of IFT46 is independent of IFT122, IFT88, IFT81, FLA10 or DHC1b. Surprisingly, the basal body localization of IFT46 depends upon IFT52, but not vice versa. IFT46::YFP and IFT46-C1::YFP were targeted to the basal body region in *bld1 IFT46::YFP IFT52::3HA* and *bld1 IFT46-C1::YFP IFT52::3HA*. These results further demonstrate that the basal body localization of IFT46 relies on IFT52. IFT46-C1 interacts with IFT52 through its C1 domain, which is mediated by the L285 and L286. That means IFT52 binds to and recruits IFT46 to the basal body region. Finally, we find that NLS-tagged IFT52C can recruit IFT46 to nuclei. Based on previous studies and our results here, we conclude that IFT52 and IFT46 are preassembled in the cytoplasm and are delivered to the basal body through vesicular

Abstract

transport or nonvesicle-mediated ways.

Our study here paves the way for the comprehensive deciphering of the mysteries of the basal body localization of IFT proteins. We also shed new light on the atlas of interactions between the IFT proteins, motors and cargos at the basal body. These progresses are of vital importance to resolve the mechanism of ciliary assembly and disassembly. Furthermore, to some extent, our study can guide the prevention and treatment of ciliopathies through the regulation of ciliogenesis and ciliary functions.

Key Words: *Chlamydomonas*, Intraflagellar transport, Basal body, Targeting sequence

目 录

摘要	I
Abstract.....	III
目 录	VII
第一章 引 言	1
第二章 文献综述	3
2.1 衣藻简介	3
2.1.1 衣藻的基本特征	3
2.1.2 衣藻作为模式生物的优势	4
2.2 鞭毛简介	7
2.2.1 鞭毛的结构	7
2.2.2 鞭毛的形成	11
2.2.3 鞭毛的解聚	13
2.2.4 鞭毛的功能	15
2.2.5 纤毛病	17
2.3 鞭毛内运输	19
2.3.1 鞭毛内运输的发现	19
2.3.2 鞭毛内运输复合物的组成	20
2.3.3 鞭毛内运输复合物的结构	22
2.4 纤毛蛋白定位相关研究	24
2.4.1 纤毛扩散屏障及纤毛孔复合物	24
2.4.1.1 纤毛扩散屏障	24
2.4.1.2 纤毛孔复合物	26
2.4.2 纤毛定位序列	29
2.4.2.1 RVxP 基序	30
2.4.2.2 FR 基序及 I3-CTS	31
2.4.2.3 核定位信号	32
2.4.2.4 类泛素化修饰	33
2.4.3 IFT 蛋白基体定位相关研究	33
2.4.3.1 调控 IFT 蛋白基体定位的蛋白质	33
2.4.3.2 IFT 蛋白基体定位相关模型	34
第三章 IFT46 定位在基体和纤毛	39
3.1 引言	39
3.2 材料与方法	39
3.2.1 本研究所用仪器、试剂、培养基及溶液	39
3.2.2 藻细胞株及菌株的培养	39
3.2.3 分子克隆	40
3.2.3.1 PCR 扩增	40

3.2.3.2 限制性酶切	40
3.2.3.3 琼脂糖凝胶中的 DNA 回收	41
3.2.3.4 DNA 片段的连接及 TA 克隆	42
3.2.3.5 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒快速转化	42
3.2.3.6 热激转化	43
3.2.3.7 阳性重组子筛选	43
3.2.3.8 质粒抽提	44
3.2.3.9 构建表达 IFT::YFP 的载体.....	45
3.2.4 衣藻电转化	46
3.2.4.1 质粒线性化	46
3.2.4.2 电转化	46
3.2.5 SDS-PAGE	47
3.2.5.1 蛋白抽提	47
3.2.5.2 蛋白定量	47
3.2.5.3 SDS-PAGE 步骤.....	48
3.2.6 免疫印迹	49
3.2.7 qRT-PCR 分析.....	50
3.2.7.1 RNA 提取及第一链 cDNA 合成	50
3.2.7.2 qRT-PCR	51
3.2.8 鞭毛长度及鞭毛率的测定	52
3.2.9 显微观察	52
3.2.9.1 共聚焦显微观察	52
3.2.9.2 TIRF显微观察	53
3.2.10 统计分析	53
3.3 结果	53
3.3.1 表达 IFT46::YFP 载体的构建	53
3.3.2 互补实验	54
3.3.3 <i>ift46-1</i> IFT46::YFP 表型鉴定	56
3.3.4 IFT46::YFP 的定位.....	58
3.4 讨论	58
3.5 小结	60
第四章 IFT46 基体和纤毛定位序列的鉴定	61
4.1 引言	61
4.2 材料与方法	61
4.2.1 本研究所用仪器、试剂、培养基及溶液	61
4.2.2 藻细胞株及菌株的培养	61
4.2.3 计算机辅助分析	62
4.2.4 分子克隆	62
4.2.4.1 重叠延伸 PCR.....	62
4.2.4.2 利用寡核苷酸退火合成双链 DNA	63
4.2.4.3 构建表达 IFT46 截短片段的载体	64

4.2.5 衣藻电转化	66
4.2.6 鞭毛提取	66
4.2.7 SDS-PAGE 及免疫印迹分析	67
4.2.8 显微观察	67
4.2.9 免疫共沉淀	67
4.2.10 蔗糖密度梯度离心	68
4.2.11 统计分析	68
4.3 结果	70
4.3.1 IFT46 主要由 α 螺旋组成	70
4.3.2 构建表达 IFT46 截短片段的载体	70
4.3.3 IFT46-C1 是 IFT46 的基体定位序列	70
4.3.4 构建表达 IFT46-C1 截短片段的载体	73
4.3.5 BBTS3 是 IFT46 的基体定位序列	73
4.3.6 IFT46-C1/BBTS3 是 IFT46 的纤毛定位序列	73
4.3.7 IFT46-C1 与其他 IFT-B 亚基相互作用	79
4.4 讨论	79
4.5 小结	83
第五章 IFT52 结合并招募 IFT46 至基体	85
5.1 引言	85
5.2 材料与方法	85
5.2.1 本研究所用仪器、试剂、培养基及溶液	85
5.2.2 藻细胞株及菌株的培养	85
5.2.3 计算机辅助分析	85
5.2.4 分子克隆	86
5.2.4.1 In-Fusion 同源重组克隆	86
5.2.4.2 定点突变	87
5.2.4.3 载体构建	87
5.2.5 衣藻电转化	89
5.2.6 autolysin 的制备	89
5.2.7 衣藻细胞核提取	90
5.2.8 SDS-PAGE 及免疫印迹分析	90
5.2.9 衣藻免疫荧光	91
5.2.10 免疫共沉淀	91
5.2.11 GST pull-down 分析	92
5.2.12 显微观察	92
5.2.13 统计分析	92
5.3 结果	94
5.3.1 IFT46 的基体定位不依赖 IFT122、IFT88、IFT81、FLA10 或 DHC1b	94
5.3.2 IFT46 的基体定位依赖 IFT52	94
5.3.3 IFT52 结合并招募 IFT46 至基体	97

5.3.4 构建表达 IFT52C::YFP::NLS 的载体	97
5.3.5 融合 NLS 标签的 IFT52C 可将 IFT46 招募到细胞核	99
5.4 讨论	101
5.5 小结	102
总 结	103
参考文献	105
附录A 本研究所用仪器信息.....	135
附录B 本研究所用试剂信息	139
附录C 本研究所用培养基	143
附录D 本研究所用溶液	147
附录E 本研究所用藻株	151
附录F 本研究所用质粒	155
附录G 本研究所用引物	157
附录H 本研究所用抗体	163
附录I 本研究所用部分载体的图谱	165
附录J 本研究中部分基因的核酸和蛋白序列	167
作者简历及攻读学位期间发表的学术论文与研究成果	169

第一章 引言

真核细胞利用不同的细胞器执行特定功能，其中之一是纤毛/鞭毛。纤毛是广泛存在于真核细胞表面的毛发状结构，它由基体、轴丝、基质和纤毛膜组成 (Mizuno et al., 2012; Satir and Christensen, 2007)。纤毛的功能可分为两大类 (Satir and Christensen, 2007)，其一是作为细胞的马达驱动细胞自身或周围的流体/颗粒物运动。另一类是参与细胞对胞内外环境的感知 (Ishikawa and Marshall, 2011; Mourao et al., 2016; Singla and Reiter, 2006; Wood and Rosenbaum, 2015)。人体纤毛结构或功能的缺陷可导致诸如多囊肾、眼盲、内脏逆位及骨骼异常等纤毛病 (Fliegauf et al., 2007; Gerdes et al., 2009; Hildebrandt et al., 2011; Hildebrandt and Zhou, 2007)。

纤毛的形成、维持及信号传导依赖鞭毛内运输 (intraflagellar transport, IFT) (Ishikawa and Marshall, 2011; Mourao et al., 2016; Pedersen and Rosenbaum, 2008; Scholey, 2003)。IFT 是轴丝和纤毛膜之间的颗粒物沿纤毛作双向运动 (Kozminski et al., 1993)。正向 IFT (从基部到顶部) 由 kinesin-2 驱动 (Kozminski et al., 1995; Miller et al., 2005; Ou et al., 2005; Pan et al., 2006; Snow et al., 2004; Walther et al., 1994)，反向 IFT (从顶部到基部) 则由胞质动力蛋白 2/1b 介导 (Hou et al., 2004; Pazour et al., 1999)。目前已经鉴定到的 IFT 蛋白有 22 个，这些蛋白形成了三个独特的复合物，它们分别是 IFT-A、IFT-B1 和 IFT-B2 (Taschner and Lorentzen, 2016; Taschner et al., 2016)。IFT 可以与它携载的货物一起形成周期性的 IFT 火车 (Lechtreck, 2015; Lechtreck et al., 2017; Pigino et al., 2009; Stepanek and Pigino, 2016; Vannuccini et al., 2016)。正向 IFT 火车长约 233 nm，沿二联管中的 B 管运动。反向 IFT 火车长约 209 nm，沿二联管中的 A 管运动 (Pigino et al., 2009; Stepanek and Pigino, 2016; Vannuccini et al., 2016)。此外，IFT 蛋白还参与其他生物学过程如囊泡分泌、细胞分裂、免疫突触及微管纳米管的形成等 (Baldari and Rosenbaum, 2010; Borovina and Ciruna, 2013; Fu et al., 2016; Griffiths et al., 2010; Inaba et al., 2015; Wood et al., 2012)。

纤毛内部无蛋白合成系统，大部分纤毛结构蛋白和信号分子必须在细胞体

中合成然后通过 IFT 运输到纤毛内部。因此，几乎所有的 IFT 蛋白和马达分子都富集在基体周围。IFT-B 蛋白和正向分子马达在基体呈半环三裂弧状，IFT-A 蛋白和反向分子马达则呈半环双裂弧分布 (Brown et al., 2015; Deane et al., 2001)。而且，IFT-B 和 IFT-A 蛋白之间存在部分共定位 (Brown et al., 2015)。然而，作为纤毛形成起始阶段的关键步骤，IFT 蛋白基体定位的分子机制尚不明确。由于 IFT 蛋白如 IFT46 在纤毛再生过程中定位在来源于反式高尔基体网络的囊泡上，Woods 等人认为 IFT 可能先加载在囊泡上并招募货物然后靶向运输到基体 (Wood and Rosenbaum, 2014)。然而这一观点有待进一步证实。许多纤毛蛋白（尤其是纤毛膜蛋白）含有纤毛定位序列（ciliary targeting sequences, CTSs）(Bhogaraju et al., 2013b; Malicki and Avidor-Reiss, 2014)。这些 CTSs 介导了目标蛋白的基体和纤毛定位。然而，CTSs 种类繁多，如 G 蛋白偶联受体第三个胞内环上的基序、Ax(S/A)xQ 基序、RVxP 基序、核定位信号（nuclear localization signal, NLS）以及 SUMOylation。这表明多种不同的运输系统参与了这一过程 (Bhogaraju et al., 2013b; Dishinger et al., 2010; Malicki and Avidor-Reiss, 2014; McIntyre et al., 2015)。尽管如此，IFT 蛋白中不存在已知的 CTSs。

已知某些蛋白如 BBS7、BBS8、C2cd3、CCDC41、OFD1、Rsg1 和 TTBK2 影响特定 IFT 蛋白的基体定位 (Blacque et al., 2004; Brooks and Wallingford, 2013; Goetz et al., 2012; Joo et al., 2013; Ye et al., 2014)。然而它们的功能不具有特异性 (Toriyama et al., 2016)。2016 年，研究人员发现包括 Jbts17、Intu、Fuz、Wdpcp 和 Rsg1 在内的纤毛形成与平面极性效应蛋白（ciliogenesis and planar polarity effectors, CPLANE）可将 IFT-A 的外周亚基招募到基体 (Brooks and Wallingford, 2012; Toriyama et al., 2016)。尽管 CPLANE 蛋白可能只是影响 IFT-A 外周亚基的组装或稳定性，这仍然是该领域的重大突破之一 (Toriyama et al., 2016)。

本研究中我们关注的是 IFT46 基体定位的分子机制。我们拟通过表达截短片段的方式鉴定 IFT46 的基体和纤毛定位序列，同时我们将通过一系列细胞、生化和遗传学研究与定位序列相互作用的蛋白。最终我们将初步探明 IFT46 基体定位的分子机制。这一研究有助于最终阐明 IFT 蛋白基体定位以及与货物相互作用的机制，同时对调控纤毛形成及纤毛功能也具有重要的指导意义。

第二章 文献综述

鞭毛/纤毛是一类突出在细胞表面的毛发状细胞器，广泛存在于真核细胞 (Fliegauf et al., 2007; Hildebrandt et al., 2011; Ishikawa and Marshall, 2011; Scholey, 2003)。鞭毛可执行运动、感受和信号传导等功能，其结构或功能异常将导致眼盲、耳聋、多囊肾、多囊肝、肥胖和癌症等纤毛病 (Fliegauf et al., 2007; Gerdes et al., 2009; Hildebrandt et al., 2011; Hildebrandt and Zhou, 2007)。纤毛的形成与解聚依赖鞭毛内运输复合物 (Bhogaraju et al., 2013b; Dentler, 2005; Engel et al., 2012; Morga and Bastin, 2013; Mourao et al., 2016; Pedersen and Rosenbaum, 2008; Scholey, 2003; Taschner and Lorentzen, 2016)，该复合物含有至少 22 个亚基 (Katoh et al., 2016; Taschner and Lorentzen, 2016; Taschner et al., 2016)。鞭毛内运输复合物相关基因的突变将导致细胞没有或仅有极短的鞭毛，研究这些蛋白的结构和功能显得极为重要。在鞭毛形成与解聚过程中，IFT 蛋白会富集在基体周围 (Brown et al., 2015; Toriyama et al., 2016)。然而其具体的分子机制尚不清楚。莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, 以下简称衣藻) 具有一对等长的鞭毛，是研究鞭毛相关问题的模式生物之一 (Goodenough, 1992; Harris, 2001)。本章将对衣藻、鞭毛的结构和功能、鞭毛内运输及蛋白纤毛定位机制等研究的进展进行综述。

2.1 衣藻简介

2.1.1 衣藻的基本特征

衣藻广泛分布在世界各地的泥土和淡水水体中 (Mussgnug, 2015)，它是一种单细胞真核绿藻，直径约 $10\text{ }\mu\text{m}$ ，素有“绿色酵母”之称 (Flowers et al., 2015; Goodenough, 1992; Rochaix, 1995)。整个衣藻细胞被富含羟脯氨酸的糖蛋白组成的细胞壁围绕 (Mussgnug, 2015)。细胞内部含一个大的杯状叶绿体，约占细胞总体积的 40% (图2.1)。在叶绿体中有一个主要由蛋白组成的淀粉核/蛋白核，其四周被淀粉颗粒环绕 (图2.1)。杯状叶绿体的凹陷处是衣藻的细胞核 (图2.1)。此外，衣藻细胞还有两根长度约 $10\text{-}12\text{ }\mu\text{m}$ 直径约 200 nm 的鞭毛和一个用于感光

的眼点 (Lechtreck, 2013) (图2.1)。衣藻叶绿体基因组富含 AT, 但衣藻核基因组富含 GC, 其平均 GC 含量为 64%, 基因编码区的 GC 含量高达 68% (Blaby et al., 2014; Grossman et al., 2007)。

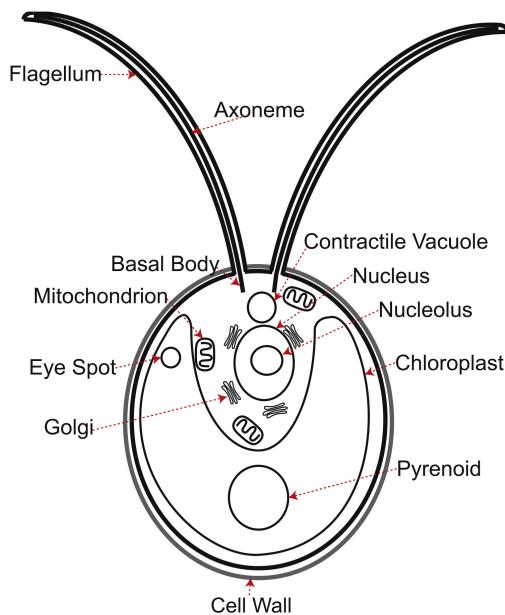


图 2.1 衣藻细胞结构示意图(Avasthi et al., 2014)。图中标记的是已经鉴定的常见细胞器。

Figure 2.1 Diagram of the cell structure of a *Chlamydomonas* cell (Avasthi et al., 2014). Prominent organelles identified are marked.

2.1.2 衣藻作为模式生物的优势

作为研究光合作用、油脂代谢、趋光性 (Kianianmomeni and Hallmann, 2014)、鞭毛的形成与解聚、鞭毛运动、蛋白质合成、细胞壁合成、配子形成、细胞周期调控、交配等过程的模式生物 (Flowers et al., 2015; Gallaher et al., 2015; Mussgnug, 2015), 衣藻具有以下特征和优势:

- ◆ 生长迅速, 倍增时间仅 8-12 小时(Blaby et al., 2014)。
- ◆ 培养简便, 成本低 (Flowers et al., 2015; Harris et al., 1989; Sager and Granick, 1953)。此外, 衣藻的细胞周期可以简单的通过调节光暗比进行同步 (Blaby et al., 2014; Hlavova et al., 2016)。
- ◆ 在光照条件下, 衣藻可进行光能自养。在黑暗条件下, 衣藻可在含醋酸根离子的培养基中通过化能异养生存 (Blaby et al., 2014; Flowers et al., 2015)。这种灵活的代谢特性使得研究人员可以筛选出无法进行光合作用的突变体进而对

光合作用相关基因进行研究 (Jinkerson and Jonikas, 2015)。

◆ 衣藻鞭毛与哺乳动物细胞上的鞭毛高度同源，这使得衣藻可以作为研究纤毛相关疾病的模式系统。而且衣藻鞭毛是非必须的，这使得研究人员可以分离出鞭毛结构和功能缺陷的突变体从而开展相关研究 (Blaby et al., 2014)。

◆ 因衣藻既可进行有性繁殖，又可进行无性繁殖，所以可对其进行经典遗传学分析 (Flowers et al., 2015; Kates and Jones, 1964) (图2.2)。衣藻的营养细胞是单倍体。在缺氮条件下，营养细胞可以形成单倍体配子 (Gallaher et al., 2015)。两种不同交配型的配子 (mt+, mt-) 可以结合形成二倍体合子 (图2.2)。合子细胞没有鞭毛，它是这种生物在泥土中休眠的形式。在光照条件下，合子细胞可进行减数分裂产生四个有鞭毛的营养细胞。但是在生长条件良好的情况下，减数分裂产生的四个子细胞在从母细胞壁中释放之前会进行二到三轮有丝分裂。这样母细胞壁中就可能出现 4、8、16 甚至更多子细胞 (Jinkerson and Jonikas, 2015)。

◆ 衣藻在营养生长阶段为单倍体，便于筛选突变体 (Avasthi and Marshall, 2013; Li et al., 2016)。突变后可立刻观察到表型而不需要进行杂交 (Jinkerson and Jonikas, 2015; Mussgnug, 2015)。

◆ 针对衣藻的转化技术已经非常成熟。利用基因枪、玻璃珠转化或者电转化可以将外源 DNA 导入到核基因组中 (Jinkerson and Jonikas, 2015; Kang et al., 2015; Mussgnug, 2015; Neupert et al., 2009; Yamano et al., 2013)。虽然是随机插入，但是插入位点的侧翼序列可以通过巢式 PCR 和二代测序进行鉴定 (Gonzalez-Ballester et al., 2011; Li et al., 2016; Primers, 2007; Zhang et al., 2014)。外源 DNA 也可通过同源重组定向插入到叶绿体和线粒体基因组中 (Kindle, 1990; Shimogawara et al., 1998)。此外，衣藻中可用的筛选标记也非常丰富，如巴龙霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、壮观霉素抗性基因、锌霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因和四环素抗性基因等 (Barahimipour et al., 2016; Cerutti et al., 1997; Garcia-Echauri and Cardineau, 2015; Mussgnug, 2015)。报告基因如氧气依赖的荧光蛋白 (Franklin et al., 2002; Fuhrmann et al., 1999; Hakkila et al., 2003; Harris et al., 2016; Heim et al., 1995; Lauersen et al., 2015; Onishi and Pringle, 2016; Ormo et al., 1996; Phillips, 2001; Prasher et al., 1992; Rasala et al., 2014; Shaner et al., 2013)

、黄素依赖的荧光蛋白 (Mukherjee et al., 2015)、荧光素酶 (Fuhrmann et al., 2004; Lauersen et al., 2013; Minko et al., 1999; Shao and Bock, 2008)、木聚糖酶 (Rasala et al., 2012)、芳基硫酸酯酶 ARS2 (Specht et al., 2014) 及各种细胞器靶向标记物也已被广泛使用 (Lauersen et al., 2015; Minko et al., 1999; Rasala et al., 2014)。

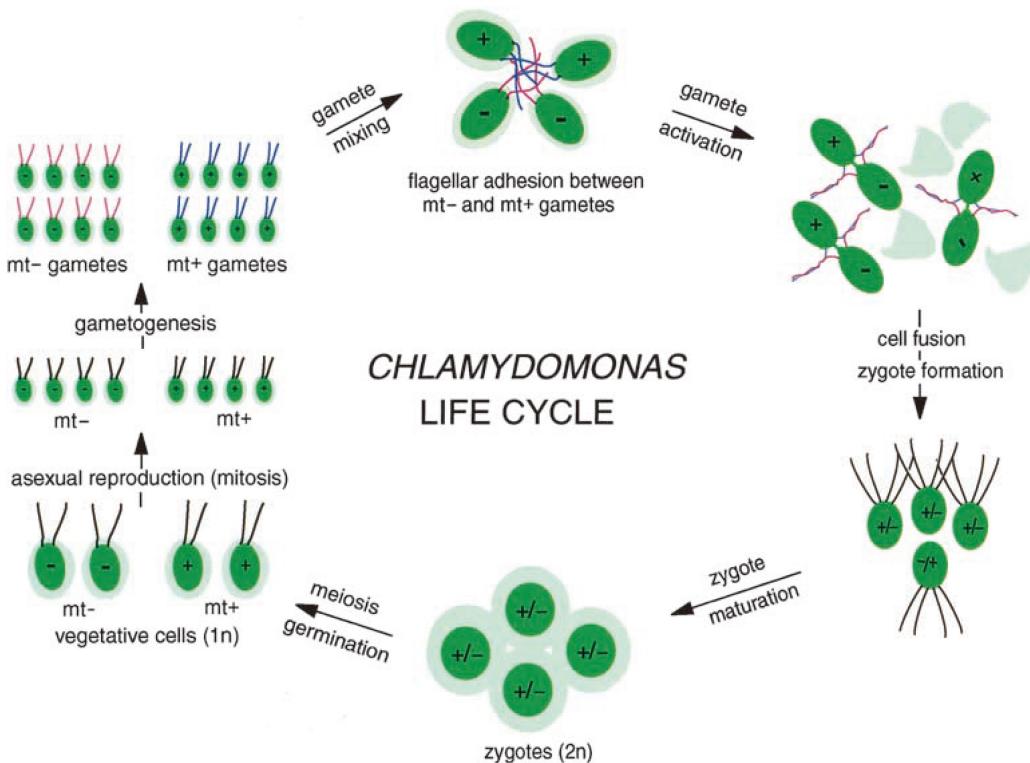


图 2.2 衣藻生活史示意图 (Zhao et al., 2001)。图中加号 (+) 代表正配子，减号 (-) 代表负配子。

Figure 2.2 Diagram of the *Chlamydomonas reinhardtii*'s life cycle (Zhao et al., 2001). Plus sign and minus sign represent mating type plus and minus respectively.

◆ RNA干扰已被广泛用于衣藻核基因的敲降 (Hu et al., 2014; Molnar et al., 2009; Schmollinger et al., 2010; Zhao et al., 2009)。Cre/loxP 系统也已开始在衣藻中应用 (Kasai and Harayama, 2016)。尽管效率有待提高，锌指核酶和 TALEs 已被用于衣藻核基因的编辑 (Jinkerson and Jonikas, 2015; Mussgnug, 2015)。近年来被广泛应用的基因魔剪 CRISPR/Cas9 也被用于衣藻研究，但这种方法在衣藻中的应用需要进一步开发 (Baek et al., 2016; Jiang et al., 2014; Lander et al., 2016; Shin et al., 2016)。

◆ 关于衣藻的遗传信息非常丰富¹，其核基因组、线粒体基因组和叶绿体基因组均以被测定 (Flowers et al., 2015; Gallaher et al., 2015; Grossman et al., 2003; Maul et al., 2002; Mussgnug, 2015)。衣藻核基因组含 17 条染色体 (Dutcher et al., 1991)，约 111.1 Mb，含 17741 个基因，叶绿体基因组约 203 kbp，含 99 个基因，线粒体基因组约 16 kb，含 8 个基因 (Jinkerson and Jonikas, 2015; Mussgnug, 2015)。此外还有大量的 EST 信息可供查询²。有可供使用的柯斯质粒和酵母人工染色体文库及 BAC 文库 (Blaby et al., 2014)。

◆ 衣藻存在碳浓缩机制，对相关基因的研究和利用有望增强C3植物的光合作用效率 (Atkinson et al., 2015; Grossman et al., 2007; Wang et al., 2011; Wang and Spalding, 2014)。此外，衣藻在缺氮条件下可以积累达细胞干重 20-30% 的三酰甘油，可用于制备生物柴油 (Ho et al., 2014)。衣藻在缺硫条件下可积累氢气，是生产这种清洁能源的理想生物反应器 (Ho et al., 2014)。

鉴于这些优势，利用衣藻作为模式生物进行的研究逐年增多。除了传统的基础研究，衣藻在生物能源、生物医药等新技术领域的研究和应用也逐渐成为热点 (Franklin and Mayfield, 2004; Fuhrmann et al., 2004; Gallaher et al., 2015; Kempinski et al., 2015; Lauersen et al., 2013; Leon-Banares et al., 2004; Mayfield et al., 2007; Wijffels and Barbosa, 2010)。在分子农业领域，经过遗传改造的衣藻已被用于生产哺乳动物血清淀粉蛋白、人抗体蛋白、人血管内皮生长因子、人乳头瘤病毒疫苗、HIV 抗原 P24 等生物制剂 (Barahimipour et al., 2016)。同时，衣藻在产氢和产油等方面的研究也正在如火如荼的开展 (Flowers et al., 2015; Gallaher et al., 2015; Greenly and Tester, 2015; Kempinski et al., 2015)。

2.2 鞭毛简介

2.2.1 鞭毛的结构

鞭毛从十九世纪末期被发现至今已有一百多年的历史，它们是一类保守的细胞器（图2.3）。除酵母和高等植物外，鞭毛存在于几乎所有真核细胞表面 (Brooks and Wallingford, 2014; Czarnecki and Shah, 2012; Fliegauf et al., 2007;

¹Chlamydomonas Resource Center, www.chlamycollection.org

²Chlamydomonas reinhardtii EST index, <http://est.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/>

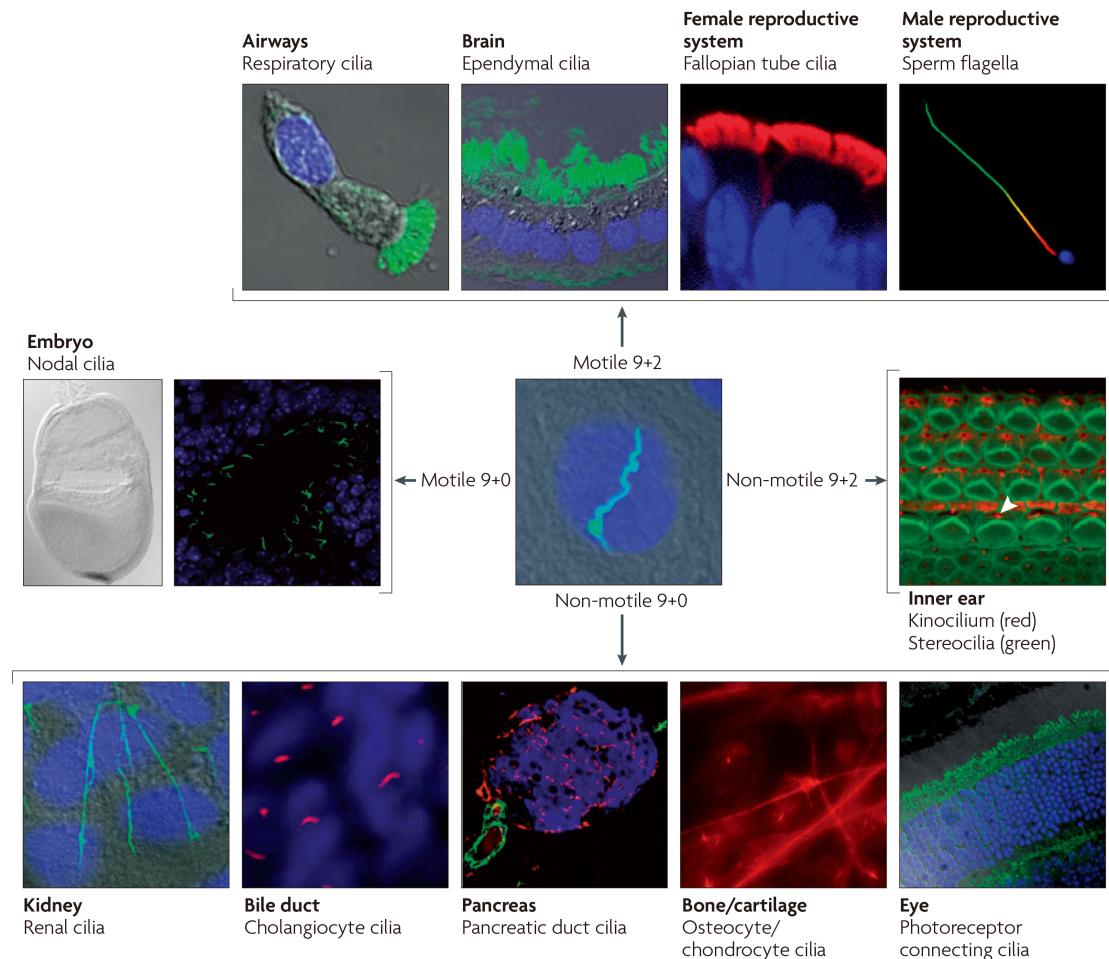


图 2.3 人体各种类型的细胞表面均有纤毛分布 (Fliegauf et al., 2007)。

Figure 2.3 Cilia extend from the surface of almost all cell types of the human body (Fliegauf et al., 2007).

Wheatley et al., 1996)。鞭毛的形态和结构具有多样性，但总体上可被分为运动纤毛（出现在少数类型细胞上，一般为多生）和初级纤毛（出现在多种类型细胞上，一般为单生）两大类 (Gibbons and Grimstone, 1960; Gluenz et al., 2010) (图2.3)。运动纤毛为 9+2 结构，初级纤毛为 9+0 结构。需要注意的是节点纤毛¹虽然为 9+0 结构，但可以借助 A 管上的动力臂进行运动 (Czarnecki and Shah, 2012) (图2.3)。在这两类纤毛中，运动纤毛一般出现在多纤毛细胞上且在进化上可能早于初级纤毛 (Warner et al., 2013)。鞭毛结构的这种保守性使得其直径维持在 160-280 nm 之间 (Huang et al., 2016)。其中纤毛基部偏粗，远端偏细 (Huang

¹nodal cilia

et al., 2016)。这一方面是因为基部存在突起（可能是将要分泌到环境中的囊泡），另一方面是因为微管二联管在远端变成单管 (Huang et al., 2016; Wang et al., 2014; Wood et al., 2013)。

基于鞭毛结构的保守性，这里我们主要介绍衣藻鞭毛的结构。正常的衣藻细胞有两根运动鞭毛，靠近眼点的称为顺式鞭毛¹，远离眼点的称为反式鞭毛²。衣藻鞭毛主要由基体、轴丝、过渡区、鞭毛颈（纤毛膜外部的蛋白鞘）和鞭毛膜组成 (Hilbert et al., 2016; Kitagawa et al., 2011)。基体为特化的中心粒（图2.4）。轴丝为 9+2 结构，外部九个二联管的 A 管上伸出外部动力臂³、内部动力臂⁴和放射辐条等结构（图2.4）。相邻二联管的 A 管和 B 管之间由连接蛋白连接 (Song et al., 2015)。ODA 和 IDA 与相邻二联管的 B 管相互作用，放射辐条则与环绕中央管的结构相互作用。从精细结构上来说，A 管和中央管都由 13 根原纤维组成，B 管则仅含十根原纤维。

ODA 为鞭毛的摆动提供动力，而 IDA 则是鞭毛产生正常的波形所必须的。前者结构简单，由三个动力蛋白重链⁵和两个中间链⁶及至少十个轻链⁷形成三头状复合物 (Fowkes and Mitchell, 1998)。IC 和 HC 之间存在相互作用，IC 是维持 HC 稳定所必须的。该复合物的一端与锚定复合物⁸结合，DC 含三个亚基，分别为 DC25、DC63 和 DC105 (Fowkes and Mitchell, 1998)。这种复合物在 A 管上每隔 24nm 出现一次 (Fowkes and Mitchell, 1998)。IDA 的结构则相对比较复杂。目前已鉴定到的 IDA 复合物可被归为三类亚型：I1、I2 和 I3。I1 和 I2 均为单头状结构。I3 则为双头状结构，它由两个 DHCs、三个 ICs 和三个 LCs 组成。IDA 在 A 管上出现的周期是 96 nm (Oda et al., 2014)，三种亚型复合物分别占据不同的位置 (Perrone et al., 1998)。轴丝的中心区域是由中央鞘包裹的两根中央管，它与外部二联管之间的连接由放射辐条实现。

过渡区指的是纤毛基体和轴丝之间的结构 (Czarnecki and Shah, 2012)。它由两部分组成：一是在三联管和二联管交界处从 B 管上突出的过渡纤维，它们形

¹cis flagellum

²trans flagellum

³ODA, outer dynein arm

⁴IDA, inner dynein arm

⁵DHC, dynein heavy chain; HC α 、HC β 和 HC γ

⁶IC, intermediate chain; IC78 和 IC70

⁷LC, light chain

⁸DC, docking complex

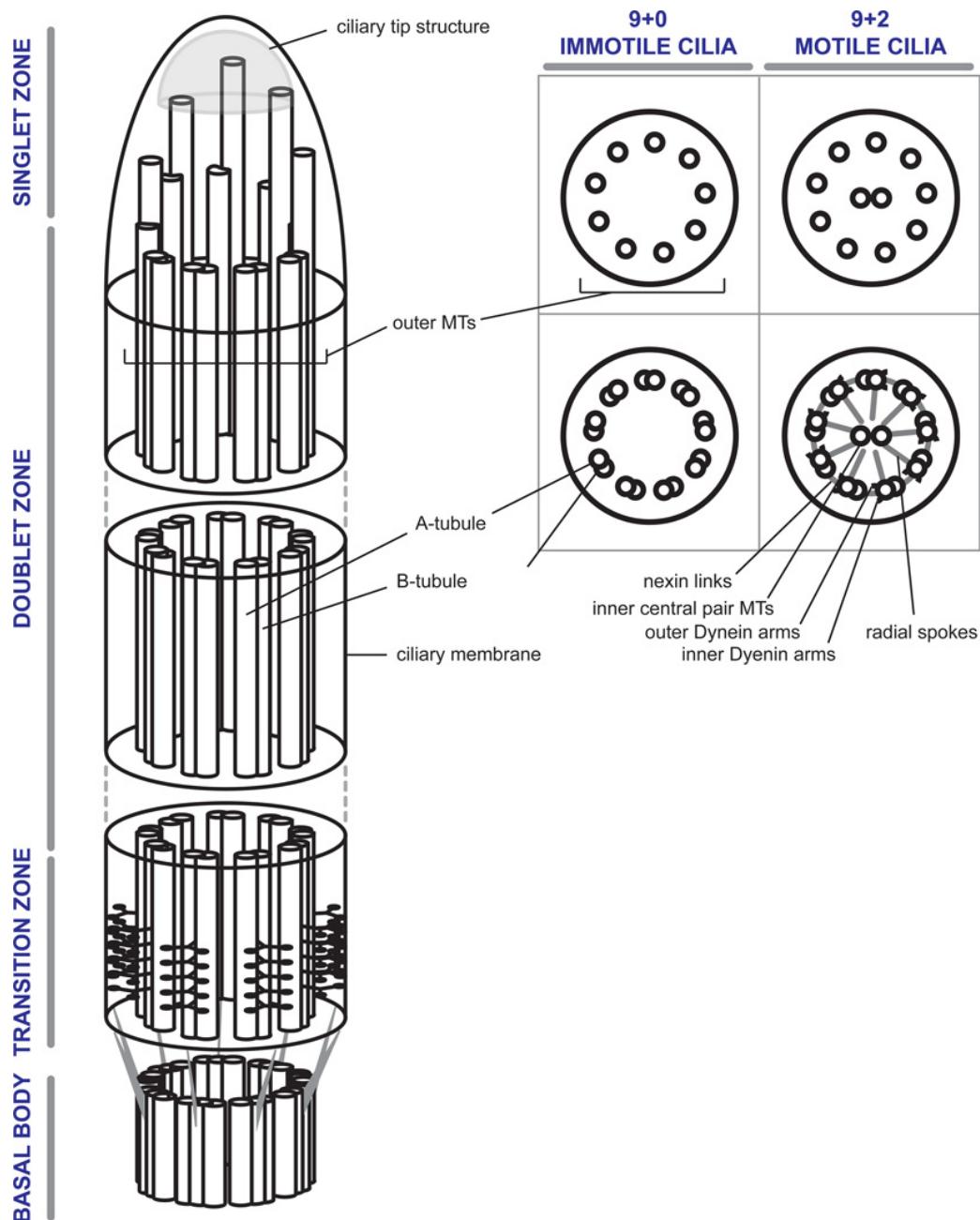


图 2.4 鞭毛结构模式图 (Czarnecki and Shah, 2012)。

Figure 2.4 Schematic representation of ciliary structure (Czarnecki and Shah, 2012).

成间隔 60 nm 左右的类似螺旋桨的结构（图2.4）。二是外部二联管和纤毛膜之间的 Y 形连接器 (Czarnecki and Shah, 2012)。其中后者有多层，它们是过渡区的主体 (图2.4)。在初级纤毛中，含Y形连接器的区域对应的纤毛膜上有整齐排列的突起颗粒，该区域也被称为纤毛颈 (Czarnecki and Shah, 2012)。实际上，衣藻鞭毛的过渡区还包括二联管中央空腔中的桶形结构、连接 A 管的星形纤维及纤毛膜和二联管之间的楔形结构 (Czarnecki and Shah, 2012)。

纤毛独特的生化组成表明存在特定的隔离机制对进入纤毛的跨膜和可溶性因子进行控制 (Ye et al., 2013)。越来越多的证据表明在纤毛过渡区中存在扩散屏障。在初级纤毛的纤毛膜和质膜间的扩散屏障包含胞裂蛋白¹ (Hu et al., 2010) 和 B9 复合物 (Chih et al., 2011)。而过渡区中可溶性蛋白的扩散屏障可能有着与核孔类似的结构 (Huang and Tsao, 2010; Kee et al., 2012)。然而, Breslow et al. (2013) 的结果表明这种扩散屏障既不同于神经元轴突起始端的肌动蛋白微丝屏障, 也不同于核孔。

鞭毛膜的外表面覆盖着由富含羟脯氨酸的糖蛋白组成的糖萼² (Pigino et al., 2009)。糖萼的功能之一是参与有性生殖过程 (Cooper et al., 1983)。鞭毛膜的脂成分与质膜的组成有显著差异, 前者富含胆固醇和鞘磷脂。它们是形成脂筏的主要成分 (Chavez et al., 2015; Garcia-Gonzalo et al., 2015)。最新的研究表明, 在 Inpp5e 的作用下, 纤毛膜富含 PI(4)P, 但其近端却富含 PI(4, 5)P₂ (Garcia-Gonzalo et al., 2015)。这种特殊的膜脂分布可影响纤毛膜蛋白 Gpr161 的定位进而调控 Hh 信号通路 (Chavez et al., 2015; Garcia-Gonzalo et al., 2015)。纤毛膜具有不对称性, 膜上的信号分子一般聚集形成独特的微结构域 (Nechipurenko et al., 2013)。

2.2.2 鞭毛的形成

纤毛的形成过程大体上可分为两类: 胞内途径和胞外途径 (Sorokin, 1968) (图2.5, 2.6)。两种途径形成的纤毛并无本质上的差异, 只是在形态上略有不同 (图2.5)。比如通过胞内途径形成的纤毛有纤毛袋³(Benmerah, 2013) 且绝大部分埋藏在细胞内, 而通过胞外途径形成的纤毛突出在细胞表面 (Mazo et al., 2016)。然而, 部分细胞天然能够形成两种类型的纤毛, 另一些细胞在外因的诱导下纤毛形成途径可发生转变 (Mazo et al., 2016)。比如在 RPE1 细胞中, 敲除 C-Nap1 和 CEP128 可使约 30% 的细胞形成表面纤毛 (Mazo et al., 2016)。

在胞内途径中, 来自高尔基体的囊泡首先被招募到母中心粒的远端, 随后轴丝延伸并挤压囊泡使其顶层膜与质膜融合, 纤毛得以突出在细胞表面 (Sorokin, 1962, 1968) (图2.6)。研究表明, 远端附属蛋白、Cby 及 Rab11/Rabin8/Rab8、

¹septin

²glycocalyx

³ciliary pocket

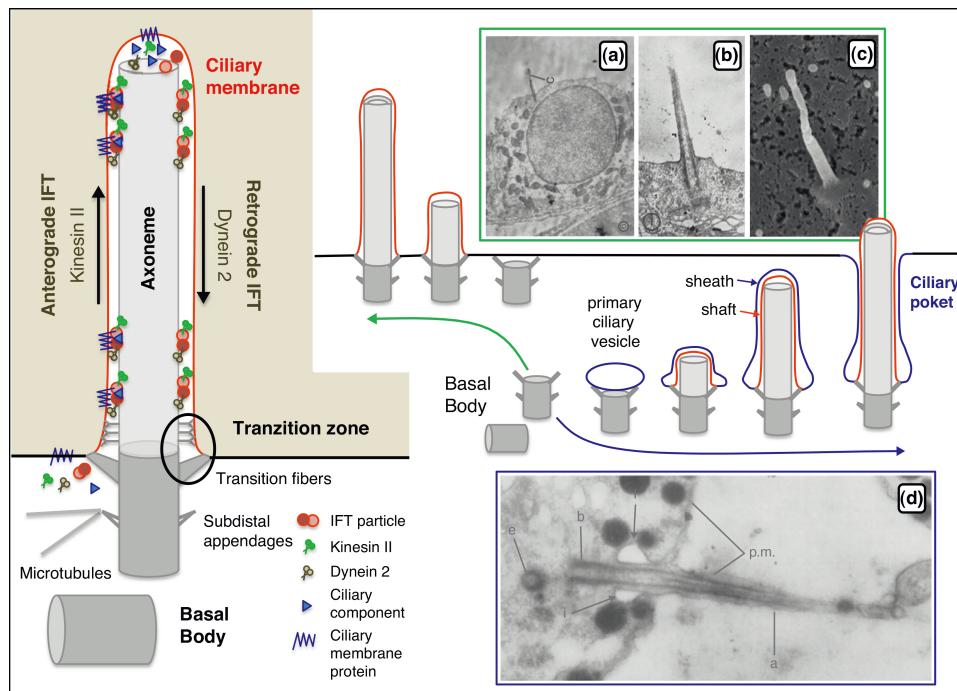


图 2.5 两种不同的初级纤毛形成途径 (Benmerah, 2013)。左侧显示的是纤毛和 IFT 的模式图，右侧显示的是初级纤毛形成的胞内途径和胞外途径。a 和 b 为通过胞外途径形成的初级纤毛的透射电镜照片，c 为通过胞外途径形成的初级纤毛的扫描电镜照片。d 为通过胞内途径形成的初级纤毛的透射电镜照片。

Figure 2.5 Two different primary ciliogenesis pathways (Benmerah, 2013). Left, scheme showing the organization of the primary cilium (PC) and the IFT. Right, description of the two primary ciliogenesis pathways. (a, b) TEM pictures showing longitudinal section of PC in kidney tubules epithelial cells. (c) Scanning EM picture showing a PC at the apical surface of IMCD3 kidney cells. (d) TEM picture showing a longitudinal section of a primary cilium in secretory cells of the mouse adenohypophysis.

BBSome、EHD1/3 等蛋白参与了这一过程 (Burke et al., 2014; Knodler et al., 2010; Lu et al., 2015; Nachury et al., 2007; Westlake et al., 2011; Zhang et al., 2012) (图2.6)。在中心粒向质膜下方迁移过程中，远端附属蛋白 CEP164 招募 Cby 形成环状结构，Cby 进而与 Rabin8 相互作用并促进 CEP164/Rabin8 复合物的形成，Rabin8 可招募并激活 Rab8 从而促进来自高尔基体的小囊泡在中心粒远端聚集并融合成大的纤毛囊泡 (Burke et al., 2014; Schmidt et al., 2012)。纤毛囊泡形成后，微管亲和性调控激酶 MARK4、中心粒蛋白 ODF2 (Kuhns et al., 2013)、Centrin2 (Prosser and Morrison, 2015) 和 TTBK2 (Tau tubulin kinase 2) (Goetz et al., 2012) 可以移

除轴丝延伸抑制复合物 Kif24/CP110/Cep97 (Kobayashi et al., 2011; Spektor et al., 2007; Tsang et al., 2008; Tsang and Dynlacht, 2013), 这使得轴丝向纤毛囊泡中延伸。最新的研究表明, 磷酸酶 INPP5E 和磷酸激酶 PIPK1 γ 这对催化互逆反应的蛋白可以通过控制基体中 PI(4)P 的浓度影响 TTBK2 的招募和 CP110 的移除 (Xu et al., 2016)。这是纤毛形成起始过程中重要的控制机制, 其他磷脂相关生化过程在纤毛形成中也可能发挥了重要作用 (Xu et al., 2016)。

胞外途径相对而言比较简单且研究较少。具体而言, 母中心粒通过过渡纤维直接锚定在质膜上, 轴丝的延伸使得纤毛突出到胞外环境 (图2.5)。衣藻鞭毛的形成过程类似于胞外途径, 不同之处在于其两个中心粒均能够作为基体形成鞭毛。

2.2.3 鞭毛的解聚

纤毛解聚发生在纤毛顶端, 解聚时纤毛组分被回收到细胞体中 (Liang et al., 2016; Marshall and Rosenbaum, 2001; Pan and Snell, 2005)。已知在三种情况下纤毛会发生解聚: 环境压力、细胞分化和细胞增殖 (Liang et al., 2016)。对哺乳动物细胞上的初级纤毛而言, 机械力和热激会导致纤毛解聚 (Liang et al., 2016)。对衣藻等原生动物而言, 渗透压和某些化学物质会导致纤毛解聚, 如氯化钠、ATP、GTP、焦磷酸钠和柠檬酸盐等 (Liang et al., 2016)。单细胞生物和哺乳动物细胞在细胞分化过程中均会发生纤毛解聚, 但其具体功能尚未研究透彻。由于纤毛的基体是由中心粒转变而来, 而中心粒在细胞增殖过程中需要形成纺锤体, 故绝大多数纤毛在细胞增殖过程中会发生解聚从而释放中心粒。已知的例外有果蝇的精母细胞, 其在减数分裂过程中依然保留纤毛 (Riparbelli et al., 2012)。已有研究表明, 大多数细胞在 G1, S 和 G2 期均有纤毛, 但在 M 期纤毛消失 (Liang et al., 2016)。鞭毛解聚可能在细胞 G1/S 转变过程中扮演重要角色 (Liang et al., 2016)。

纤毛是一种包含上千种蛋白的有复杂亚结构的细胞器 (Rohatgi and Snell, 2010), 解聚过程中发生的一系列生化反应将它们运回细胞体, 如微管的去乙酰化和解聚, 蛋白磷酸化、甲基化和泛素化等 (Hu et al., 2015a; Huang et al., 2009; Liang et al., 2016; Long et al., 2015; Meng and Pan, 2016)。一些保守的信号分子

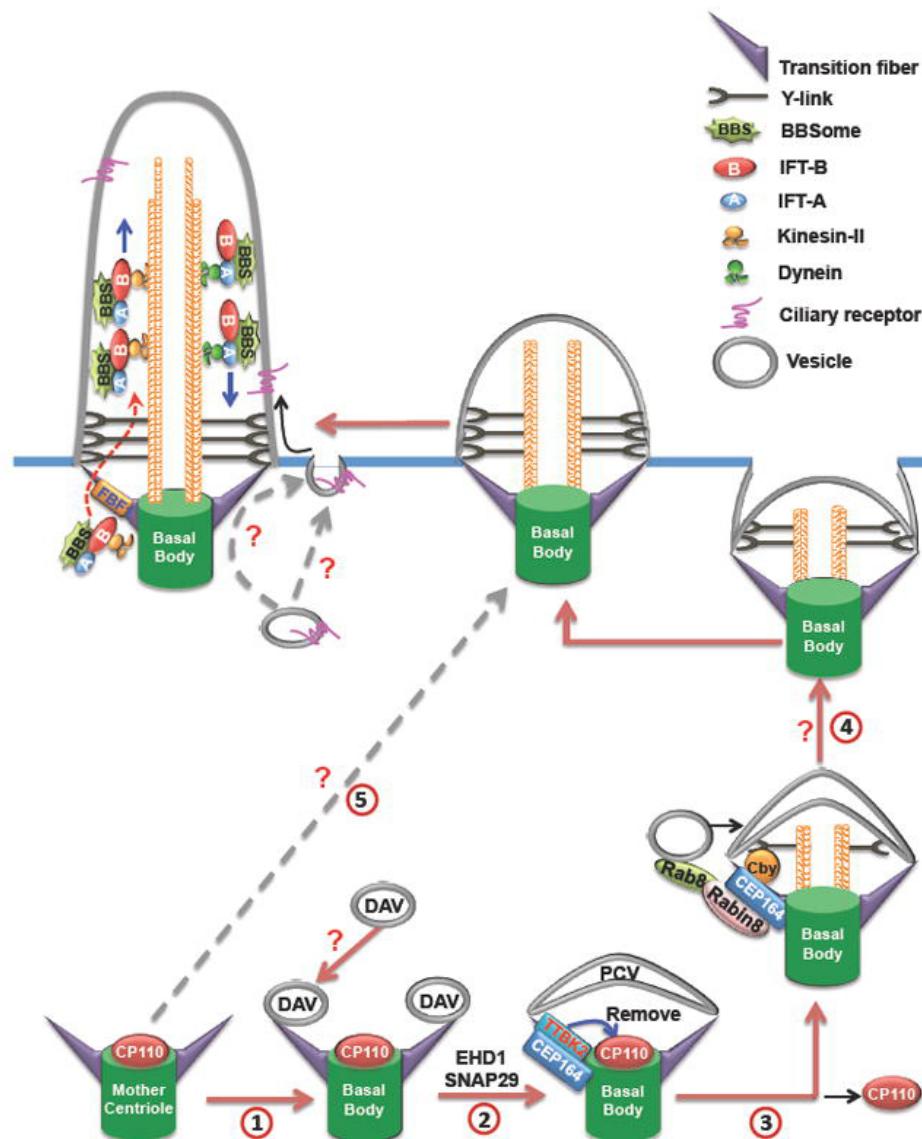


图 2.6 胞内途径初级纤毛形成过程示意图 (Wei et al., 2015)。TF 代表过渡纤维，TZ 代表过渡区，DA 代表远端附属物，DAV 代表远端附属囊泡，PCV 代表初级纤毛囊泡，问号代表未知途径。

Figure 2.6 Ciliogenesis of primary cilia through intracellular pathway (Wei et al., 2015). TFs, transition fibers; TZ, transition zone; DAs, distal appendages; DAVs, distal appendage vesicles; PCV, primary ciliary vesicle. Question mark represents unknown mechanism.

和信号通路参与了纤毛解聚过程，如钙离子、cAMP 和 aurora 激酶等 (Hu et al., 2015a,b; Liang et al., 2016; Meng and Pan, 2016)。此外，鞭毛可通过微泡将特定蛋白分泌到胞外 (Long et al., 2016; Wang and Barr, 2016; Wood and Rosenbaum, 2015)。研究表明鞭毛在解聚过程中微泡的分泌量增加 (Long et al., 2016)。抑制鞭毛的

微泡分泌可在一定程度上减缓鞭毛解聚过程 (Long et al., 2016)。这些结果表明鞭毛解聚过程部分鞭毛膜脂和膜蛋白可能以微泡的形式分泌到胞外 (Long et al., 2016)。

2.2.4 鞭毛的功能

鞭毛是细胞的运动器官之一，同时它也作为细胞天线参与信号传导与释放 (Marshall and Nonaka, 2006; Singla and Reiter, 2006)。

鞭毛的运动功能主要体现在三个方面：一是驱动细胞自身的运动。衣藻通过鞭毛进行的运动是其具有趋光性的原因之一 (Okita et al., 2005; Wakabayashi et al., 2011)。此外，鞭毛驱动的精子的运动是完成受精所必须的 (Turner, 2003)。二是通过周期性运动使细胞周围的液体发生移动。支气管内表皮细胞上的多纤毛通过运动可以清除痰液和细菌 (Marshall and Nonaka, 2006)。脊椎动物胚胎发育早期，胚结细胞表面的纤毛通过顺时针方向运动造成某些信号分子的极性分布从而决定体轴的方向 (Hirokawa et al., 2006)。此外，脑脊液的流动也依赖纤毛的运动。三是推动其他细胞发生移动。雌性输卵管表皮的纤毛通过运动促进卵子排出，这对完成受精是必须的。

鞭毛内富集了大量信号分子和受体，它们参与的信号传导，对机体的生存至关重要。如视觉、嗅觉、听觉及胚胎发育等 (Singla and Reiter, 2006)。以视觉为例，视网膜的核心视杆-视锥细胞的外节由异化的纤毛组成（图1.4），感光色素即位于其中 (Arden and Fox, 1979; Palczewski, 2006)。Sonic Hedgehog 和 Wnt 信号通路是调控动物发育的两条重要途径，它们都和纤毛有关 (Caspary et al., 2007; Dutta et al., 2015; Liu et al., 2014)。Hedgehog 信号通路的重要因子 Ptch1 及 Smo 在初级纤毛上起作用（图1.5），纤毛缺陷造成 Hedgehog 信号传导途径不能正常进行，从而影响动物的发育 (Jiang and Hui, 2008; Liu et al., 2014)。Inversin 是纤毛中调控动物内脏左右不对称的蛋白，研究表明它可能是经典和非经典 Wnt 信号传导途径相互转换的开关。

此外，单细胞的衣藻到高等哺乳动物细胞的纤毛均能够释放和结合胞外囊泡 (Wang and Barr, 2016; Wood and Rosenbaum, 2015)。胞外囊泡¹ 可被分为两类：

¹extracellular vesicles

外泌体¹和微泡² (Cocucci and Meldolesi, 2015; Gould and Raposo, 2013)。前者由多囊泡体³通过胞吐释放到胞外，后者由细胞膜或特化的细胞膜如纤毛膜、鞭毛膜和膜纳米管通过出芽形成 (Cocucci and Meldolesi, 2015; Gould and Raposo, 2013)。胞外囊泡中含有脂类、蛋白和核酸，能够进行短距离和长距离通讯，同时介导一系列的生理和病理过程 (Raposo and Stoorvogel, 2013; S et al., 2013)。

衣藻从纤毛顶端释放微泡，这些微泡中所含蛋白与交配及母细胞壁的降解有关 (Cao et al., 2015; Wang and Barr, 2016; Wood et al., 2013; Wood and Rosenbaum, 2015)。与纤毛膜相比，衣藻纤毛分泌的微泡富含蛋白酶、转运必需内体分选复合物蛋白⁴、小鸟昔三磷酸酶和泛素化蛋白 (Long et al., 2016)。布氏锥虫通过鞭毛分泌胞外囊泡传递血清抗性相关蛋白，这些囊泡同时能够与红血球融合导致贫血 (Szembruch et al., 2016a,b)。线虫可通过感受神经元纤毛释放胞外囊泡，这些囊泡的产生依赖鞭毛内运输且含有多囊蛋白 Polycystin-1⁵、Polycystin-2⁶、LOV-1 等 (Maguire et al., 2015; O'Hagan et al., 2014; Wang and Barr, 2016; Wang et al., 2014)。研究表明，这些胞外囊泡与线虫间的通讯和交配行为密切相关 (Maguire et al., 2015; O'Hagan et al., 2014; Wang and Barr, 2016; Wang et al., 2015, 2014)。哺乳动物的尿液中也含有胞外囊泡，其中一类富含 Polycystin-1/Polycystin-2/FCP/CD133，这类囊泡能够结合在胆管和肾脏表皮细胞的纤毛上 (Hogan et al., 2009)。神经上皮细胞是哺乳动物中枢神经系统发育早期的原祖细胞，其初级纤毛富含 prominin-1⁷ (Dubreuil et al., 2007)。这些纤毛可向神经管中分泌含 prominin-1 的微泡，这些微泡可调控神经上皮细胞的增殖与分化 (Dubreuil et al., 2007)。最新的研究表明初级纤毛形成和释放的微泡富含 G 蛋白偶联受体且受肌动蛋白网络的调控 (Nager et al., 2017)。这一过程在纤毛信号传导过程中发挥重要作用 (Nager et al., 2017)。

最后，纤毛还与细胞周期之间存在密切联系。细胞分裂后期，中心粒演变成基体，由基体的三联管延伸从而形成纤毛 (Wood et al., 2012)。在细胞分裂过程

¹exosome

²ectosome

³multivesicular body

⁴ESCRT, endosomal sorting complex required for transport

⁵PC1, products of *PKD1*

⁶PC2, products of *PKD2*

⁷also known as CD133

中，纤毛解聚消失。2016年，Bernabe-Rubio等人发现极性表皮细胞中的中间体残余在胞质分裂结束后逐步迁移到顶面(Bernabe-Rubio et al., 2016)。当中间体残余靠近中心体时可促进纤毛形成(Bernabe-Rubio et al., 2016)。总体来看，纤毛可能通过以下三个方面调控细胞分裂(Jackson, 2011; Plotnikova et al., 2009; Quarmby and Parker, 2005)。

- (1) 纤毛利用基体作为细胞分裂的机械限制因子；
- (2) 纤毛上存在信号受体或离子通道，当纤毛接受到外部信号时能够抑制或激活细胞分裂机制；
- (3) 纤毛在解聚过程中产生信号诱导细胞进入分裂过程。

在细胞间期，负责形成纺锤体的中心粒作为基体形成纤毛并被纤毛限制在质膜内侧(Pan and Snell, 2007)。在细胞分裂时，纤毛需要解聚释放中心粒以利于纺锤体的形成(Pan and Snell, 2007; Wood et al., 2012)；这同时有助于中心粒自由运动以保证纺锤体的取向，进而调控细胞的极性(Pan and Snell, 2007)。肾小管表皮细胞的纤毛作为机械力感应器感应肾小管中液体的流动，进而调控肾脏处于正常生理状态。在小鼠中，组织特异性的去除肾脏中的纤毛，造成细胞无限制的分裂，形成多个囊状结构，最终形成多囊肾(Watnick and Germino, 2003)。在人体中，囊状肾病也是由纤毛功能的缺陷造成的(Kim et al., 2014)。在肾小管上皮细胞的纤毛中PKD1和PKD2形成了感受机械力刺激的钙离子通道。尿液的流动导致纤毛弯曲进而造成钙离子通道打开，纤毛内钙离子浓度升高并扩散到细胞体。这种钙信号的变化可以调控细胞的分裂(Nauli et al., 2003)。钙离子在衣藻鞭毛中也发挥作用。衣藻鞭毛紧贴光滑表面时可发生滑行。此时尾端鞭毛内钙离子浓度增加，停滞在鞭毛上的IFT颗粒被反向运输回胞体(Collingridge et al., 2013)。这可以减少滑行时两根鞭毛发生对向运动造成的损耗(Collingridge et al., 2013)。然而最新的研究表明纤毛可能并非钙离子响应的机械力感受器(Delling et al., 2016)。纤毛在这些过程中扮演的角色有待进一步研究。

2.2.5 纤毛病

纤毛执行着重要的运动、感受、信号转导和分泌等功能，在发育过程中发挥重要作用(Bodle et al., 2013; Corbit et al., 2005; Diener et al., 2015; Huangfu et al.,

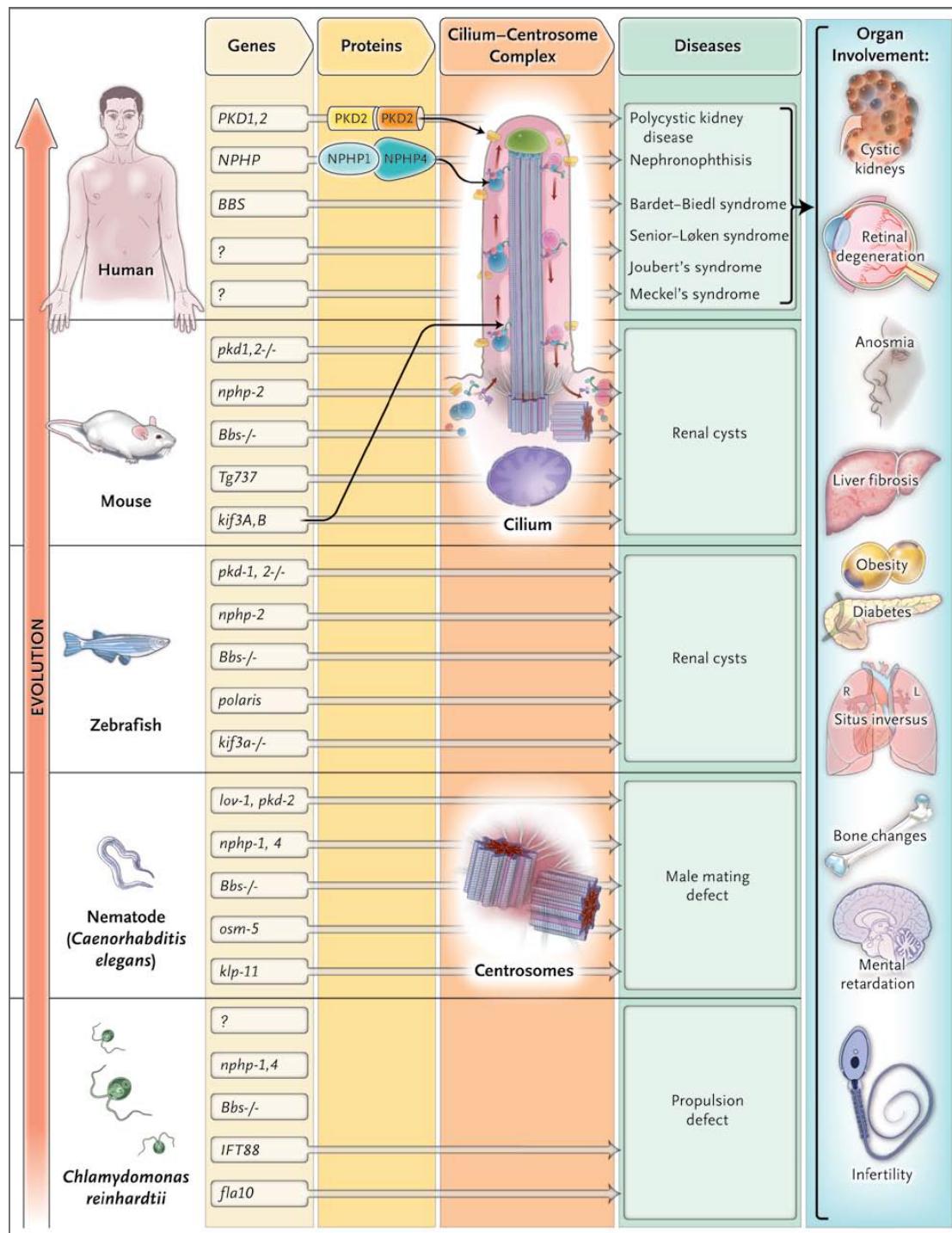


图 2.7 纤毛病及其相关基因 (Hildebrandt et al., 2011)。

Figure 2.7 Ciliopathies and related genes (Hildebrandt et al., 2011).

2003; Warner et al., 2013)。纤毛的形态和功能异常会导致多种纤毛病，从最早发

现的卡塔格内综合症¹ (Afzelius, 1976) 到初级纤毛运动障碍²、多囊肾病、肾衰竭 (Bizet et al., 2015)、先天性心脏病 (Narasimhan and Roy, 2015)、Meckel-Gruber 综合症 (Dowdle et al., 2011; Shaheen et al., 2011)、朱伯特综合症、巴比二氏综合症、比尔特-霍格-杜贝综合征、STAR 综合症 (Guen et al., 2016)、神经管缺陷、肝功能紊乱、内脏逆位、眼盲 (Bifari et al., 2015)、耳聋、肥胖 (Mukhopadhyay and Jackson, 2013; Omori et al., 2015)、癌症 (Seeger-Nukpezah et al., 2013) 及男性不育等 (Cardenas-Rodriguez et al., 2013; Hildebrandt et al., 2011; Hildebrandt and Zhou, 2007; Luijten et al., 2013; Tobin and Beales, 2009) (图2.7)。这是人们持续研究纤毛的主要原因之一。

目前，研究人员已经鉴定出许多纤毛病的致病基因 (Wheway et al., 2015) (图2.7)。这些基因的产物主要是 IFT 蛋白、组成过渡区的结构蛋白和纤毛相关信号通路中的功能蛋白 (Bifari et al., 2015; Czarnecki and Shah, 2012; Wheway et al., 2015) (图2.7)。目前的观测结果显示 IFT-B 主要与正向 IFT 相关，而 IFT-A 则主要与反向 IFT 相关。IFT-B 的缺陷一般导致没有或仅有极短的鞭毛，而 IFT-A 的缺陷一般引起鞭毛解聚障碍。理论上，IFT 复合物 B 中的亚基异常更容易导致纤毛病发生。然而这恰恰与研究人员累积的数据相反。IFT 复合物 A 中的亚基缺陷均能导致纤毛病 (Perrault et al., 2015)。然而 IFT 复合物 B 中仅 IFT172、IFT88、IFT81、IFT80、IFT54、IFT52 和 IFT27 在纤毛病患者中检测到突变且非常罕见 (Bifari et al., 2015; Bizet et al., 2015; Perrault et al., 2015; Zhang et al., 2016)。一种可能的解释是 IFT 复合物 B 中的亚基异常是胚胎致死性的 (Perrault et al., 2015)，我们观察到的现象只是幸存者偏差造成的 (Mangel and Samaniego, 1984)。

2.3 鞭毛内运输

2.3.1 鞭毛内运输的发现

1993 年，Kozminski 在 Joel Rosenbaum³ 的实验室利用微分干涉显微镜观察衣藻鞭毛时发现了一种不同于纤毛摆动的运动方式。他们发现一些颗粒状物质在沿鞭毛作双向运动并将这种现象命名为鞭毛内运输 (Kozminski et al., 1993)。

¹Kartagener's syndrome, KS

²primary ciliary dyskinesia

³https://en.wikipedia.org/wiki/Joel_Rosenbaum

IFT 的发现标志着纤毛研究中一个新领域的诞生 (Satir, 2017)。通过对鞭毛切片进行电镜观察，人们发现在鞭毛膜和外部二联管之间存在一些由电子致密颗粒线性排列组成的火车样结构 (Kozminski et al., 1993)。这些火车是执行鞭毛内运输的实体。

随后，Iomini 等发现正向 IFT 和反向 IFT 的运动速率和频率均有差异，据此他们提出了一个鞭毛内运输的循环模型。在该模型中，IFT 被分为四个阶段，第二和第四阶段分别对应正向 IFT 和反向 IFT。在第一和第三阶段，IFT 复合物在鞭毛基部和顶部发生重塑 (Iomini et al., 2001; Morga and Bastin, 2013)。

2.3.2 鞭毛内运输复合物的组成

Table 2.1 IFT 蛋白在几种模式生物中的名称 (Taschner and Lorentzen, 2016)。

Table 2.1 Nomenclature of IFT proteins in several model organisms (Taschner and Lorentzen, 2016).

Complex	General	Alternative name in other organisms (if different)				
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Danio rerio</i>	Mammals
IFT-B						
IFT-B1	IFT88	-	-	OSM-5	Polaris	Polaris/Tg737
	IFT81	-	-	-	-	-
	IFT74	-	-	-	-	-
	IFT70	FAP259	PIFTB2	DYF-1	Fleer	TTC30A/B
	IFT56	DYF-13	PIFTC3	DYF-13	-	TTC26
	IFT52	BLD1	-	OSM-5	-	NGD5
	IFT46	-	-	DYF-6	-	-
	IFT27	-	-	(Absent)	-	RabL4
	IFT25	FAP232	-	(Absent)	-	HSPB11
	IFT22	FAP9	-	IFTA-2	-	RabL5
IFT-B2	IFT172	-	-	OSM-1	-	SLB
	IFT80			CHE-2	-	WDR56
	IFT57	-	-	CHE-13	-	Hippi
	IFT54	FAP116	-	DYF-11	Elipsa	Traf3IP1/MIP-T3
	IFT38	FAP22	PIFTA1	DYF-3	Qilin	Cluap1
	IFT20	-	-	-	-	-
IFT-A						
Core	IFT144	-	-	DYF-2	-	WDR19
	IFT140	-	-	CHE-11	-	WDTC2
	IFT122	FAP80	-	DAF-10	-	WDR10
Noncore	IFT139	-	-	-	-	THM1/TTC21B
	IFT121	-	PIFTD4	IFTA-1	-	WDR35
	IFT43	-	-	-	-	C14ORF179

FLA, flagellar assembly;

CHE, chemosensory;

OSM, osmotic avoidance;

DYF, dye-filling;

DAF, dauer-formation;

1997 年, Piperno 和 Mead 鉴定了 IFT 复合物中的 13 种蛋白。1998 年, Cole 等鉴定了衣藻 IFT 复合物中的 15 种蛋白并依据它们的分子量大小分别命名为 p172、p144、p140、p139、p122、p88、p81、p80、p74、p72、p57/55、p52、p46、p27 和 p20 (Cole et al., 1998)。后来研究人员用 IFT 代替 p 来作为 IFT 蛋白的标准命名。同时, Cole 等还发现 IFT 复合物是由两个亚复合物组成并分别命名为复合物 A 和复合物 B (Cole et al., 1998)。

随后, 研究人员陆续鉴定出一些新的 IFT 蛋白。到目前为止, IFT 复合物 A 包含 IFT144、IFT140、IFT139、IFT122、IFT121 和 IFT43 六个亚基 (Behal and Cole, 2013; Behal et al., 2012)。IFT 复合物 B 包含 IFT172、IFT88、IFT81x2、IFT80、IFT74/72、IFT70、IFT57/55、IFT56、IFT54、IFT52、IFT46、IFT38、IFT27、IFT25、IFT22 和 IFT20 十六个亚基 (Behal and Cole, 2013; Behal et al., 2012; Taschner and Lorentzen, 2016; Taschner et al., 2016)。

IFT 蛋白是一类十分保守的蛋白, 在果蝇、线虫、布氏锥虫、斑马鱼和小鼠等纤毛生物中均能够找到它们的同源蛋白。目前已知的属于 IFT 复合物 A (550 kDa) 的蛋白有 6 个 (Morga and Bastin, 2013)。除 IFT43 外, 其余五个亚基的分子量都超过 120 kDa (Behal and Cole, 2013)。这使得对它们的研究变得相对困难。IFT 复合物 A 亚基的功能缺陷会导致鞭毛形态和功能异常, 如在鞭毛顶端形成突起 (由 IFT 复合物 B 的累积导致的)、形成短小的鞭毛, 部分情况下甚至没有鞭毛 (Behal et al., 2012)。

IFT 复合物 B (750 kDa) 由至少 16 种蛋白组成 (Morga and Bastin, 2013)。研究表明, 随着离子强度的增加, 某些亚基会从复合物 B 解离下来 (Behal and Cole, 2013)。研究人员据此将 IFT 复合物 B 分为核心复合物和外周亚基。然而, 后续研究表明外周亚基可以形成独立于核心复合物的稳定复合物。故而核心复合物被命名为 IFT-B1, 外周复合物被命名为 IFT-B2 (Taschner and Lorentzen, 2016; Taschner et al., 2016)。IFT-B1 包括 IFT88、IFT81、IFT74/72、IFT70、IFT56、IFT52、IFT46、IFT27、IFT25、IFT22 (Behal and Cole, 2013)。IFT-B2 包括 IFT172、IFT80、IFT57、IFT54、IFT38、IFT20 (Taschner et al., 2016)。需要指出的是, 这种分类与各个亚基在复合物 B 中所处的位置无关。IFT-B1 与 IFT-B2 之间的连接由 IFT88、IFT52N、IFT57 和 IFT38 介导 (Taschner et al.,

2016)。

2.3.3 鞭毛内运输复合物的结构

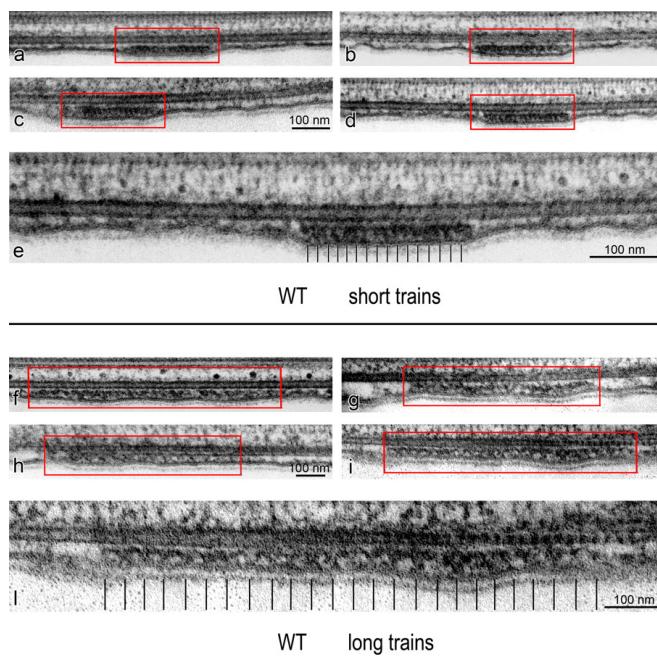


图 2.8 野生型衣藻鞭毛切片中的 IFT 火车 (Pigino et al., 2009)。

Figure 2.8 TEM micrographs of *in situ* IFT trains in flat-embedded flagella from wild-type cells of *Chlamydomonas reinhardtii* (Pigino et al., 2009).

IFT 复合物由 IFT-B1、IFT-B2 和 IFT-A 组成。其中 IFT-A 中的外周亚基介导了 IFT-A 核心复合物与 IFT-B 之间的相互作用 (Toriyama et al., 2016)。2009 年, Pietro Lupetti 及其同事发现正向 IFT 的长度为 700 ± 244 nm (Pigino et al., 2009) (图2.8)。这种长的 IFT 火车实际上由两列火车平行组成, 每列火车由颗粒状结构连接而成, 其周期约 40 nm (Pigino et al., 2009)。正向 IFT 沿 B 管运动 (Pigino et al., 2009; Stepanek and Pigino, 2016)。反向 IFT 的长度为 251 ± 45.1 nm, 周期为 16 nm, 其结构致密, 有极性 (Pigino et al., 2009) (图2.8)。进一步研究表明, 每一个微管二联管都是 IFT 的双向二车道铁轨 (Stepanek and Pigino, 2016)。正向 IFT 沿 B 管从鞭毛基部移动到顶端, 反向 IFT 沿 A 管从鞭毛顶端移动到基部 (Stepanek and Pigino, 2016)。这使得正向 IFT 和反向 IFT 在移动过程中不会出现碰撞。这一独特现象产生的原因可能是 IFT 分子马达可识别 A 管和 B 管上不同的翻译后修饰 (Stepanek and Pigino, 2016)。也可能是由于在纤毛

的基部和顶端存在特定机制可控制分子马达的轨道 (Stepanek and Pigino, 2016)。然而, Pietro Lupetti 领导的团队在 2016 发表的文章中修正了之前关于 IFT 火车的模型 (Vannuccini et al., 2016)。他们在测定鞭毛再生过程中两种火车的相对数量时发现短火车的数量随鞭毛长度的增加而增加 (Vannuccini et al., 2016)。进一步的观测结果显示存在另一种更“致密”的短火车且与 B 管的第七根原丝接触 (Vannuccini et al., 2016)。这表明存在两种类型的正向 IFT 火车且它们的相对数量随纤毛形成的进行而变化 (Vannuccini et al., 2016)。

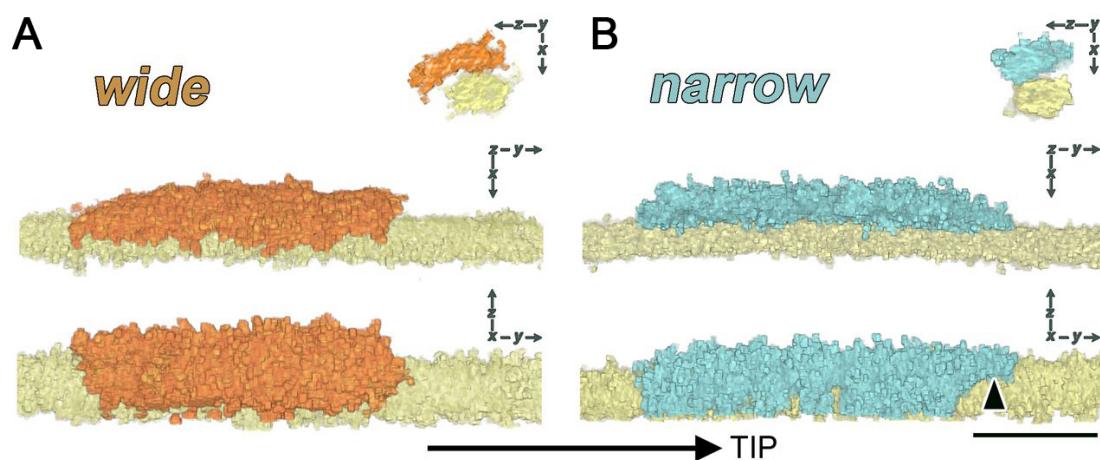


图 2.9 两种不同类型的短火车 (Vannuccini et al., 2016)。相比于较宽的一种 (A), 较窄的短火车 (B) 有一个指向鞭毛顶端的狭长凸起 (黑色三角)。标尺代表 100 nm。

Figure 2.9 The two subtypes of short IFT trains (Vannuccini et al., 2016). Compared with the wide short train (A), there is a slender projection pointing toward the flagellar tip (black triangle) in the narrow short train (B). Scale bar represents 100 nm.

IFT 火车由 IFT 复合物组成, IFT 复合物包含 IFT-B1、IFT-B2 和 IFT-A 三个亚复合物。在 IFT-B1 中, IFT88、IFT70、IFT52 和 IFT46 之间存在相互作用 (图 2.10A) (Taschner et al., 2014)。其中 IFT52/IFT46 两个亚基的 C 端紧密结合形成球形结构域与 IFT81/IFT74 相互作用 (图 2.10A) (Taschner et al., 2014)。后者的 C 端结合了 IFT27/IFT25, N 端则为微管蛋白结合位点 (Bhogaraju et al., 2013a, 2014; Kubo et al., 2016)。在早期的研究中, IFT 复合物 B 中的亚基被分为核心亚基和外周亚基。然而, 最新的研究表明这些外周亚基可以形成稳定的复合物 IFT-B2, 它与核心复合物 IFT-B1 之间的相互作用是由 IFT88/IFT57/IFT52/IFT38

介导（图 2.10B）(Taschner et al., 2016)。在 IFT-B2 中，IFT54 的 CH 结构域也可结合微管蛋白，而 IFT38 的 CH 结构域结合 IFT80，IFT57 的 CH 结构域则结合 IFT172 (Taschner et al., 2016)。尽管纤毛是十分保守的细胞器，不同物种中 IFT 的组成和结构可能存在微小的差异。在哺乳动物初级纤毛中，IFT56 与 IFT46 存在相互作用，而 IFT70 则仅与 IFT88/IFT52 相互作用（图 2.10C）(Katoh et al., 2016)。在外周亚基中，IFT57、IFT38 和 IFT20 有形成同源二聚体的趋势 (Katoh et al., 2016)。

已鉴定的 IFT 复合物 A 亚基仅有六个，其中 IFT144/IFT140/IFT122 被称为核心复合物，其余三个亚基则为外周亚基（图 2.11）。在核心复合物中，IFT122 是核心，而 IFT121 则是外周亚基的组织者 (Zhu et al., 2017)。IFT139 和 IFT43 与核心复合物的连接依赖 IFT121 与 IFT122 之间的相互作用（图 2.11）(Behal et al., 2012)。研究表明，IFT43 与 IFT121 的 C 端可以发生直接相互作用 (Behal et al., 2012)。然而，在整个细胞体中仅有部分 IFT43 与其他 IFT 复合物 A 的亚基聚合在一起，这表明 IFT43 可能还有其他未知的功能 (Behal et al., 2012; Zhu et al., 2017)。

2.4 纤毛蛋白定位相关研究

2.4.1 纤毛扩散屏障及纤毛孔复合物

2.4.1.1 纤毛扩散屏障

纤毛是突出在细胞表面的细胞器，其内部空间与胞质空间是一体的。胞质组分从胞浆进入纤毛是否受到限制是一个重要的问题。换句话说，是否存在纤毛扩散屏障或类似核孔复合物的控制物质进出纤毛的结构？

Calvert et al. (2010) 及其同事发现爪蟾感光细胞的连接纤毛（等同于常规纤毛的转变区）不能有效阻止绿色荧光蛋白在内节和外节之间扩散（图2.12）。进一步研究发现串联绿色荧光蛋白（2x和3x）也能够通过连接纤毛自由扩散 (Najafi et al., 2012)。据此，Calvert 等人认为纤毛基部不存在控制物质出入的扩散屏障（至少对小于 80 kD 的蛋白来说是这样）(Najafi et al., 2012)。

然而在哺乳动物细胞初级纤毛上的研究却得出了相反的结论。研究人员将

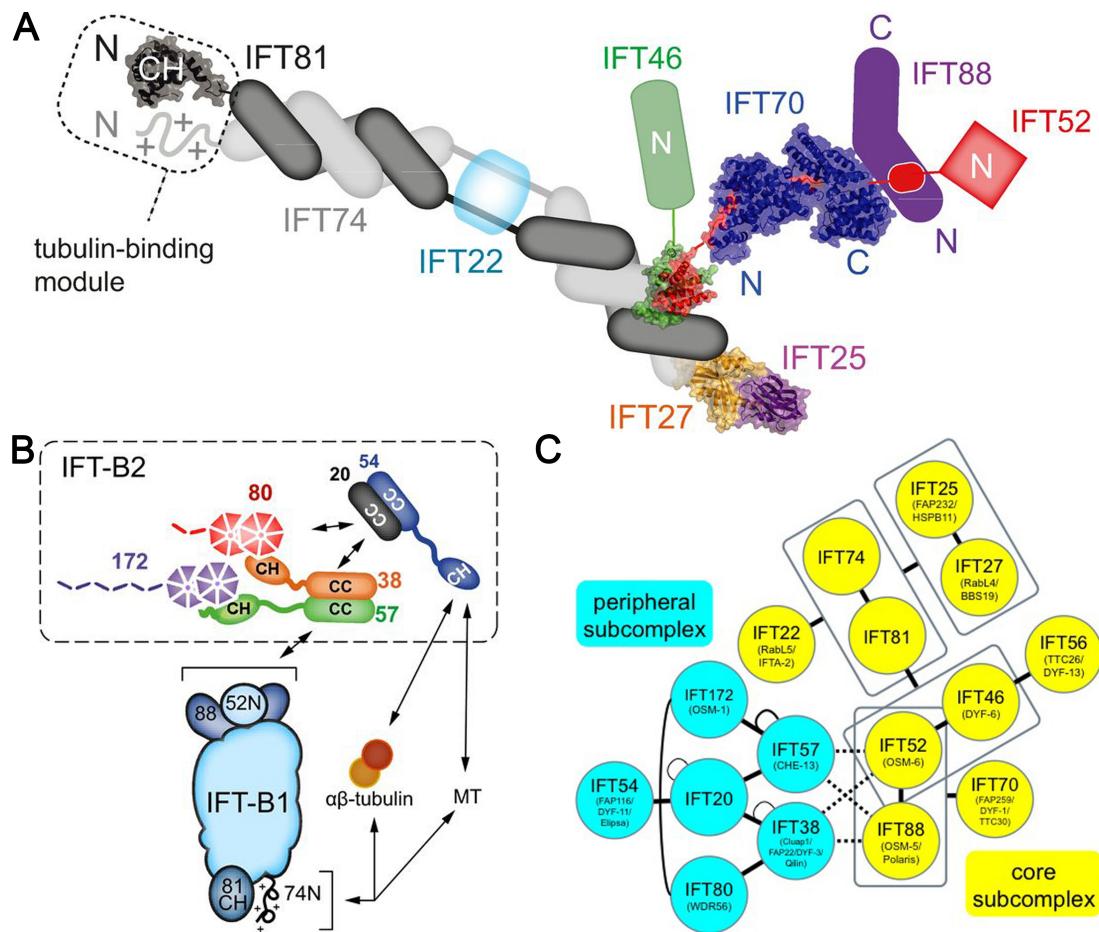


图 2.10 IFT 复合物 B 的整体构造。(A) 衣藻 IFT-B 核心复合物的构造 (Taschner et al., 2014)。(B) 衣藻 IFT-B1 与 IFT-B2 的构造 (Taschner et al., 2016)。(C) 哺乳动物初级纤毛 IFT-B 的整体构造 (Katoh et al., 2016)。

Figure 2.10 Architecture of the IFT-B complex. (A) Architecture of the core complex of IFT-B in *Chlamydomonas* flagella (Taschner et al., 2014). (B) Overall architecture of the IFT-B1 and IFT-B2 complex in *Chlamydomonas* flagella (Taschner et al., 2016). (C) A map of interactions among IFT-B subunits in mammalian cilia (Katoh et al., 2016).

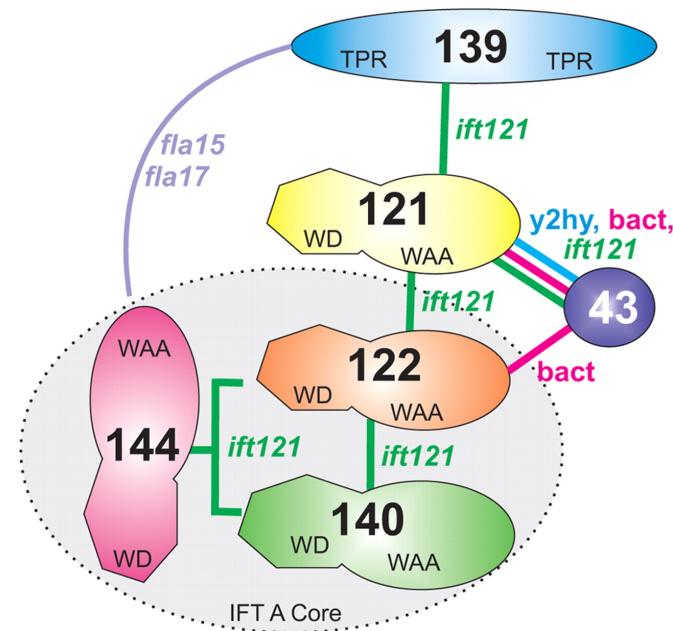


图 2.11 IFT 复合物 A 中各亚基之间的相互作用网络 (Behal et al., 2012)。

Figure 2.11 A map of interactions among IFT-B subunits (Behal et al., 2012).

不同分子量的荧光葡聚糖注射到细胞内并观察它们的运动 (Kee et al., 2012)。结果显示小于 10 kD 的荧光葡聚糖能够进入细胞核和纤毛，而 40-70 kD 的荧光葡聚糖却无法进入 (Kee et al., 2012)。使用荧光标记的可溶性蛋白进行的实验也获得了同样的结果 (Kee and Verhey, 2013)。这些研究表明大于 50 kD 的蛋白无法通过自由扩散进入纤毛，它们的运动受到纤毛扩散屏障的限制 (Kee and Verhey, 2013)。

这些矛盾出现的可能原因是由于在爪蟾中使用的串联绿色荧光蛋白是线性的，而在初级纤毛中使用的葡聚糖和可溶性蛋白是球形的 (Kee and Verhey, 2013)。这意味着纤毛扩散屏障对出入的蛋白的大小和空间结构均存在限制。这一假说已被相关研究证实 (Kee and Verhey, 2013)。总之，纤毛基部存在基于分子大小的扩散屏障，它能有效控制物质出入纤毛 (图2.12)。

2.4.1.2 纤毛孔复合物

纤毛扩散屏障的分子组成是什么呢？核孔蛋白是组成核孔复合物的一类蛋白，研究表明某些核孔蛋白定位在初级纤毛基部形成纤毛孔复合物 (ciliary pore complex, CPC) (Diener et al., 2015; Kee et al., 2012)。分子马达 KIF17 进入纤毛

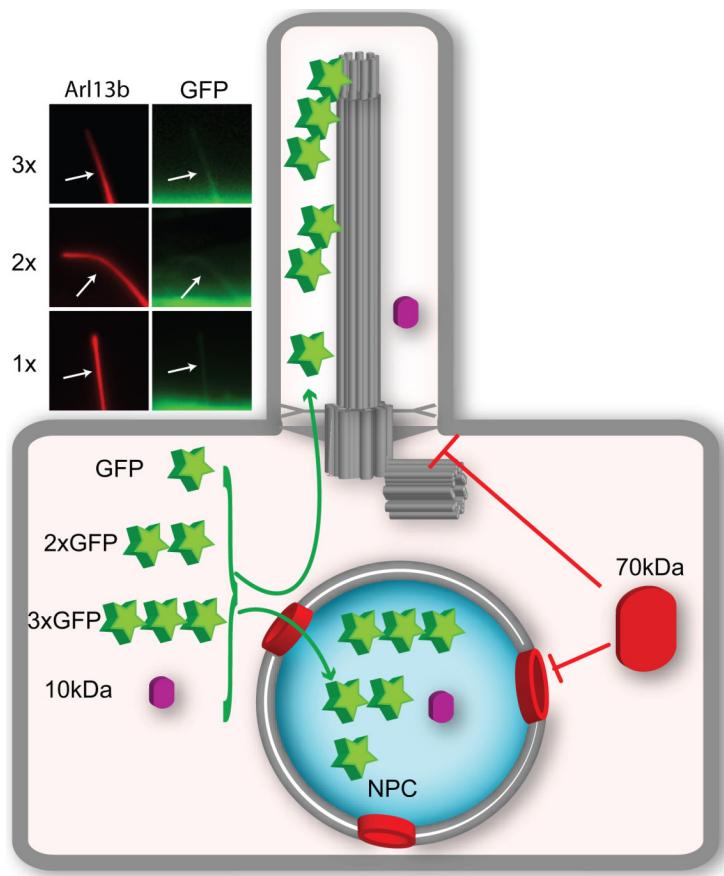


图 2.12 纤毛基部分子大小依赖的扩散屏障模型 (Kee and Verhey, 2013)。纤毛基部存在分子大小依赖的扩散屏障用于控制可溶性蛋白进入纤毛。10 kDa 的分子（紫色）能够自由出入纤毛和细胞核，但 70 kDa 的分子（红色）则受到限制。左上角插入的图片为 NIH3T3 细胞的纤毛，红色为纤毛标记物 Arl13b，绿色为 GFPs 或串联 GFPs。尽管 GFPs 和串联 GFPs 的分子量存在差异，但它们均能够进入纤毛。这可能是由于二者具有相似的分子直径。GFP 代表绿色荧光蛋白，NPC 代表核孔复合物。

Figure 2.12 Model of the size-dependent diffusion barrier at the base of the cilium (Kee and Verhey, 2013). The base of the cilium contains a size-dependent barrier to entry of soluble proteins. Molecules that are 10 kDa (purple) can enter both the cilium and nucleus but 70 kDa (red) molecules are restricted from both compartments. Insets shows fluorescence micrographs of the cilia of NIH3T3 cells co-expressing monomeric GFP (1x) or tandem (2x or 3x) GFPs together with Arl13b (red) to mark the ciliary compartment. Despite the difference in molecular weight, monomeric and tandem fluorescent protein constructs can enter the ciliary compartment, presumably due to their similar diameters. GFP, green fluorescent protein; NPC, nuclear pore complexes.

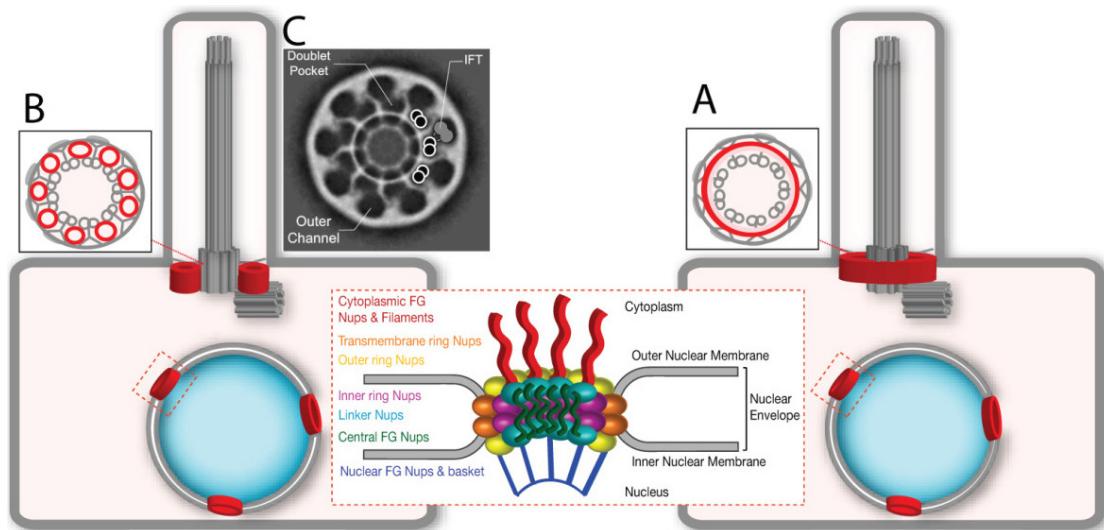


图 2.13 纤毛和细胞核中的核孔蛋白。核孔复合物由一系列的核孔蛋白组成，其中部分核孔蛋白也定位在纤毛基体形成纤毛孔复合物 (Kee and Verhey, 2013)。图中展示了纤毛孔复合物两种可能的结构。(A) 核孔蛋白在纤毛基部形成一个大的纤毛孔，轴丝从纤毛孔的中央突出延伸。(B) 核孔蛋白在 Y-links 之间形成九个纤毛孔。(C) 梨形四膜虫纤毛基体的电镜照片显示在轴丝外围有九个孔状结构 (Ounjai et al., 2013)。

Figure 2.13 Nucleoporins in cilia and nuclei. Nuclear pore complexes contain nucleoporin proteins that assemble into subcomplexes (Kee and Verhey, 2013). Some nucleoporin subcomplexes also localize to the transition zone where they are postulated to form a ciliary pore complex. Two possible structural configurations of the nucleoporins at the base of the cilium are presented. (A) Model in which nucleoporins assemble into one large pore at the base of the cilium with the axoneme protruding through the middle of the pore. (B) Model in which nucleoporins assemble into nine pores at the base of the cilium with each pore positioned between the Y-links. (C) Electron cryotomography analysis of isolated basal body structures from the protist *Tetrahymena pyriformis* indicates nine pore structures adjacent to the microtubule axonemes (Ounjai et al., 2013).

依赖这些核孔蛋白的作用 (Kee et al., 2012)。这表明纤毛扩散屏障和核孔共享某些分子组分。然而纤毛孔复合物在组成上与核孔复合物可能并非完全一致。这是因为某些关键的核孔蛋白并未出现在纤毛基部，比如核篮亚复合物中的负责细胞核特异性平台形成的核孔蛋白和将 NPC 锚定在核膜上的跨膜核孔蛋白 (Kee et al., 2012)。尽管后者的功能可以由纤毛基部的 NPHK/MKS 复合物执行 (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2012)，这些差异表明 CPC 可能使用了与 NPC 不完全相同的结构蛋白和控制机制 (Kee et al., 2012)。

关于 CPC 的另一个重要问题与其整体结构有关。每一个 NPC 都具有典型的 8 次旋转对称结构 (Alber et al., 2007)，而纤毛确是 9+(0) 或 9+(2) 结构 (Czarnecki and Shah, 2012)。由于我们对核孔蛋白如何在纤毛基部组装形成 CPC 一无所知，这种对称性的差异是否具有重要意义也不得而知 (Kee and Verhey, 2013)。一种可能性是核孔蛋白在纤毛基部形成一个大孔，轴丝从孔中穿过 (图2.13)。这样的纤毛孔具有 9 次旋转对称结构 (Kee and Verhey, 2013)。另一种可能性是在 Y 型连接结构中间有九个纤毛孔 (图2.13)，这样的纤毛孔将具有核孔的八次旋转对称结构 (Kee and Verhey, 2013)。以嗜热四膜虫纤毛为对象进行的研究支持后一种假说 (Ounjai et al., 2013)。研究人员在嗜热四膜虫鞭毛基体中观察到九个靠近轴丝二联管的孔状结构，其直径约 53 nm (Ounjai et al., 2013)。这与核孔的直径非常接近 (Beck et al., 2004)。此外，研究人员还从分离的基体中鉴定到参与核-胞质转运的蛋白如 Ran 和跨膜核孔蛋白 NDC-1 (Ounjai et al., 2013)。这些结果进一步表明 CPC 与 NPC 之间存在相似性。

2.4.2 纤毛定位序列

纤毛中的结构和功能蛋白如何被纤毛蛋白运输系统识别并招募到纤毛呢？对纤毛蛋白的研究显示存在特殊的信号序列即纤毛定位序列 (ciliary targeting sequence, CTS) 将它们靶定到纤毛 (Malicki and Avidor-Reiss, 2014)。在跨膜蛋白中，CTS 一般出现在膜的胞质侧（无论是在胞内囊泡还是在纤毛膜上）(Malicki and Avidor-Reiss, 2014)。CTS 一般在蛋白的 C 端，极少出现在 N 端，但有时会出现在多重跨膜蛋白的胞内环上 (Laird et al., 2015)。CTS 具有多样性，这意味着它们会与不同的运输系统互作 (Malicki and Avidor-Reiss, 2014)。研究表明，多个

信号通路参与了蛋白的纤毛定位。尽管到目前为止大多数 CTS 的结合对象仍然未知，但对纤毛定位序列的研究已经取得了一系列成果并将持续产生有价值的信息。

2.4.2.1 RVxP 基序

最常见的 CTS 是 RVxP 基序，目前只在跨膜蛋白和膜相关蛋白中鉴定到，比如 G 蛋白偶联受体、多囊蛋白 2、环核苷酸门控离子通道蛋白 CNGB1b、钠钾腺苷三磷酸酶和视黄醇脱氢酶等 (Geng et al., 2006; Jenkins et al., 2006; Laird et al., 2015; Michalakis et al., 2006)。其中多囊蛋白 2 的 RVxP 基序位于 N 端，包含该基序的 N 端可将人转铁蛋白受体 hTFR 定位到纤毛 (Geng et al., 2006)。

在实验条件下，RVxP 基序通常是蛋白靶定到纤毛所必须的，其突变可破坏蛋白的纤毛定位。以人视杆细胞视蛋白为例，其 RVxP 基序的突变可导致视网膜光受体细胞损伤，这是由视蛋白在细胞体中的异位累积导致的 (Tam et al., 2000)。然而，并非所有纤毛蛋白 C 端的 RVxP 基序都是有功能的。比如纤毛肌醇多聚磷酸磷酸酶 INPP5E 的 C 端 RVxP 基序突变并不影响其纤毛定位。

视蛋白的 RVxP 基序是其靶定到纤毛所必须的，但其他特征序列的存在也必不可少 (Tam et al., 2000)。视蛋白 C 端 44 个氨基酸残基组成的多肽（视蛋白 C44）含有 RVxP 基序，它可以将外源蛋白如 GFP 靶定到纤毛。这依赖视蛋白 C44 与膜相互作用，而这与两个相邻的半胱氨酸残基的棕榈酰化有关。它们的缺失将造成视蛋白无法定位到纤毛，且其表型比 RVxP 基序的突变导致的更严重。这些研究表明在光受体细胞中与膜相互作用对蛋白靶定到纤毛至关重要 (Laird et al., 2015)。多个研究小组通过蛋白质组学的方法鉴定了一些与视蛋白 C44 相互作用的蛋白。生化分析表明这些蛋白作用于视蛋白纤毛定位过程的不同阶段 (Laird et al., 2015; Tam et al., 2000)。其中鸟苷三磷酸酶 Arf4 可以结合视蛋白的 CTS 从而介导囊泡从 TGN 上出芽，这是视蛋白纤毛定位的起始过程。最新的研究表明 Arf4 可以增强 ASAP1 与 FR 模体的结合。这反过来可以起始 Rab11/Rabin8/Rab8 复合物的组装。后者可引发视蛋白转位到纤毛。酵母双杂交筛选显示视蛋白的 C 端与胞质动力蛋白存在直接相互作用，研究人员据此推测视蛋白的纤毛定位是依赖微管的。

嗅觉感受神经元纤毛上的环核苷酸门控离子通道蛋白 CNGB1b 的 C 端也含有 RVxP 基序 (Jenkins et al., 2006)。该蛋白对环核苷酸门控离子通道复合物的纤毛定位是必须的 (Jenkins et al., 2009; Michalakis et al., 2006)。进一步研究发现胞内分选蛋白 PACS-1 通过直接结合 CNGB1b 并决定其纤毛定位 (Jenkins et al., 2009)。二者的相互作用依赖丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 CK2 对它们的磷酸化修饰 (Jenkins et al., 2009)。

2.4.2.2 FR 基序及 I3-CTS

除了 RVxP 基序和棕榈酰化的残基外，视蛋白 C44 还含有 FR 基序（其功能暂时没有被证实）。该基序最早在线虫嗅觉 G 蛋白偶联受体 ODR-10 上发现 (Dwyer et al., 2001)，其他 G 蛋白偶联受体的 C 端也有该基序。它含有一个疏水氨基酸残基和一个碱性氨基酸残基。FR 基序的突变可导致 ODR-10 和 Smoothened (Smo) 无法靶定到纤毛 (Dwyer et al., 2001)。除 RVxP 基序外，许多 G 蛋白偶联受体在它们的第三个胞内环上有纤毛定位序列 (I3-CTS) (Berbari et al., 2008a)。比如生长抑素受体 SSTR3 在该区域含有 Ax[S/A]xQ 基序 (Berbari et al., 2008a)。大鼠中枢神经系统中的其他五个生长抑素受体没有该基序，它们也不定位在纤毛。结构域嵌合实验证明 I3-CTS 基序具有重要作用。含有 SSTR3 的 I3-CTS 的 SSTR5 可以定位到纤毛 (Berbari et al., 2008a)。Ax[S/A]xQ 基序的突变可破坏该嵌合蛋白的纤毛定位。同样的结论在血清素受体 HTR6 和黑色素浓集激素受体 MCHR1 上也得到证实 (Berbari et al., 2008a)。然而，并非所有的 I3-CTS 都具有关联。如神经肽 Y 受体 NPY2R 的两个 I3-CTS 与 SSTR3 的就没有相似性。

与视蛋白不同，GPCR 的纤毛定位依赖 I3-CTS，其功能的实现可能由 BBS 蛋白复合体介导 (Berbari et al., 2008b)。在小鼠中敲除 BBS2 和 BBS4 可破坏 SSTR3 和 MCHR1 的纤毛定位 (Berbari et al., 2008b)。同样，在培养的细胞中干扰 BBS3 和 BBS4 会影响含有 SSTR3 I3-CTS 的嵌合跨膜蛋白的纤毛定位 (Berbari et al., 2008b)。在蛋白相互作用的研究中，SSTR3 的 I3-CTS 可以“捕获”所有检测的 BBSSome 亚基，而多巴胺受体 1 则与 BBS5 存在直接相互作用 (Berbari et al., 2008b)。总而言之，I3-CTS 的功能可能是使 GPCR 与 BBS 蛋白形成的膜外壳连

成一体 (Berbari et al., 2008b)。

除 BBS 蛋白外，肥胖相关蛋白 TULP3 和 IFT 复合物 A 对 SSTR3 和 MCHR1 的纤毛定位也有贡献。TULP3 依赖其 N 端与 IFT 复合物 A 发生相互作用 (Mukhopadhyay et al., 2010)。而 IFT 复合物 A 和 TULP3 又反过来共同调控了 SSTR3 和 MCHR1 的纤毛定位 (Mukhopadhyay et al., 2010)。其中，TULP3 与 IFT 复合物 A 及磷脂酰肌醇的结合对调控功能的发挥是必须的 (Mukhopadhyay et al., 2010)。

理论上，不同纤毛定位序列通过不同的途径发挥作用。然而这些通路的上游可能是同种因子，比如肥胖相关蛋白 Tubby。尽管视蛋白和 GPCRs 的 CTS 存在差异，肥胖相关蛋白 Tubby 却对视蛋白、生长抑素受体 SSTR3 和黑色素浓集激素受体 MCHR1 的纤毛定位均起到调控作用 (Sun et al., 2012)。在 *tubby* 突变小鼠的视网膜中，视蛋白无法完全穿过连接纤毛到达外段 (Sun et al., 2012)。而 SSTR3 和 MCHR1 则无法正确定位到大脑神经元的初级纤毛中发挥功能 (Sun et al., 2012)。

2.4.2.3 核定位信号

研究表明纤毛扩散屏障与核孔复合物之间存在一定的相似性 (Huang and Tsao, 2010)。研究人员将这种类似核孔复合物的结构称之为纤毛孔复合物 (Kee and Verhey, 2013)。这意味着核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 及相关蛋白可能同时也参与蛋白的纤毛定位 (Huang and Tsao, 2010)。

KIF17 是一种正向 IFT 分子马达，正常情况下它定位在纤毛顶端。其 C 端的 CTS 是一连串碱性氨基酸残基组成的多肽，与经典核定位信号存在相似性 (Dishinger et al., 2010)。缺失该 CTS 的 KIF17 无法定位到纤毛。该 CTS 在单独表达的情况下可以定位在细胞核和纤毛。进一步的研究表明 KIF17 的 CTS 通过与 importin- β 2 相互作用发挥纤毛定位的功能 (Dishinger et al., 2010)。

视网膜色素 RP2 是一种脂锚定外周膜蛋白 (Hurd et al., 2011)。其氨基酸序列中含有经典及非经典 NLS。突变分析发现 RP2 的非经典 NLS 对其纤毛定位至关重要 (Hurd et al., 2011)。该非经典 NLS 通过结合 importin- β 2 介导 RP2 通过纤毛孔复合物 (Hurd et al., 2011)。电压门控性钾离子通道蛋白 Kv10.1 定位在中心

体和纤毛膜上调控纤毛解聚，其 C 端含有 NLS (Chen et al., 2011; Sanchez et al., 2016)。研究表明该 NLS 对 Kv10.1 的纤毛定位至关重要 (Sanchez et al., 2016)。此外，importin- β 1 被证明能够与纤毛膜蛋白 Crumbs 结合 (Fan et al., 2007)。然而它们之间的相互作用是否调控了 Crumbs 的纤毛定位还有待进一步研究 (Fan et al., 2007)。

2.4.2.4 类泛素化修饰

由于调控蛋白进入细胞核和纤毛的结构存在相似之处，控制蛋白入核的其他机制很可能在蛋白进入纤毛的过程中也发挥作用。类泛素化修饰 SUMOylation 是除 NLS 之外的一种广泛存在的控制蛋白入核的方式 (Chen et al., 2006; Zhang et al., 2002)。SUMO¹ 是一类重要的类泛素蛋白，其三维结构及生化修饰过程与泛素类似，但这两类蛋白质修饰的生物学意义却不尽相同 (Hay, 2005)。研究表明这种翻译后修饰在腺苷酸环化酶 AC3 进入纤毛的过程中发挥重要作用 (McIntyre et al., 2015)。腺苷酸环化酶 AC3 定位在神经元纤毛的膜上，常被用作神经元纤毛标记蛋白 (Bishop et al., 2007)。对 AC3 的生物信息学分析显示其含有保守的类泛素化基序 (McIntyre et al., 2015)。进一步研究表明 AC3 是类泛素化蛋白的底物 (McIntyre et al., 2015)。抑制类泛素化修饰系统不影响纤毛的形成与维持，但 AC3 无法定位在纤毛 (McIntyre et al., 2015)。同样的，类泛素化基序突变的 AC3 也无法定位到纤毛 (McIntyre et al., 2015)。这些结果表明类泛素化修饰对 AC3 的纤毛定位非常重要。然而将 AC3 的类泛素化基序连接到非纤毛蛋白 ANO1 上并不能使 ANO1 定位到纤毛 (McIntyre et al., 2015)。这表明类泛素化修饰是 AC3 定位到纤毛的必要但不充分条件。

2.4.3 IFT 蛋白基体定位相关研究

2.4.3.1 调控 IFT 蛋白基体定位的蛋白质

目前关于 IFT 蛋白基体定位机制的研究较少。大部分研究集中在 IFT20 上。然而，IFT20 大量聚集在高尔基体。该蛋白除参与纤毛的组装与解聚外还与蛋白转运等密切相关 (Follit et al., 2008, 2006)。因而相关研究可能无法拓展到其他 IFT 蛋白上。

¹small ubiquitin-related modifier

免疫共沉淀实验证明 IFT20 与 CCDC41 (Cep83) 之间存在相互作用, CCDC41 对 IFT20 被招募到中心体是必须的 (Joo et al., 2013)。此外, IFT20 离开顺式高尔基体膜囊受 VPS15 和 GM130 的调控 (Stoetzel et al., 2016)。VPS15 的突变导致 IFT20 无法有效从顺式高尔基体上释放从而造成纤毛变短 (Stoetzel et al., 2016)。然而, CCDC41 并没有参与 IFT88 富集在中心体的过程 (Joo et al., 2013)。由于 IFT20 和 CCDC41 参与纤毛囊泡的锚定而不是轴丝的延伸, 故 CCDC41 对 IFT 蛋白基体定位的调控可能不存在普遍性。与之类似, 另一个与初级纤毛囊泡形成有关的蛋白 EHD1 对 IFT20 被招募到母中心粒远端也可能没有普遍性 (Lu et al., 2015; Naslavsky and Caplan, 2011)。

在初级纤毛中, C2cd3 可以招募 CCDC41、Cep164、TTBK2、IFT88 和 IFT52 定位到母中心粒远端 (Cajanek and Nigg, 2014; Ye et al., 2014), 而 TTBK2 可以招募 IFT140 和 IFT88 定位到过渡区 (Goetz et al., 2012; Tsang and Dynlacht, 2013)。OFD1 也可以招募 IFT88 定位到基体 (Singla et al., 2010)。由于相关蛋白的抗体和突变体有限, 以上关于 IFT 蛋白基体定位的研究均比较零散。2016 年, Toriyama 及其同事发现纤毛病相关蛋白 Jbts17 (也被称为C5orf42) 定位在基体, 它可以招募 CPLANE (包括Intu、Rsg1、Wdpcp、Jbts17 和 Fuz) 的其他成员定位到基体 (Toriyama et al., 2016)。CPLANE 可以进一步招募 IFT 复合物 A 中的外周亚基定位到基体 (Toriyama et al., 2016)。2017 年, Yeyati 等人证明组蛋白赖氨酸去甲基化酶 KDM3A 可通过调控肌动蛋白细胞骨架间接影响 IFT 蛋白的基体和纤毛定位 (Yeyati et al., 2017)。然而, 目前还没有鉴定到直接影响 IFT-A 核心亚基以及 IFT-B 亚基基体定位的蛋白。

2.4.3.2 IFT 蛋白基体定位相关模型

纤毛内部无蛋白合成系统, 纤毛延伸过程中其所需的前体蛋白均来自细胞体。研究表明, 细胞体中存在纤毛前体蛋白的库 (Fowkes and Mitchell, 1998; Rosenbaum et al., 1969)。在衣藻中, 这个库足够形成两根长度减半的鞭毛 (Rosenbaum et al., 1969)。大部分纤毛蛋白在库中不是单个的存在, 而是预组装形成复合物, 如 ODA (Fowkes and Mitchell, 1998)、IDA (Piperno and Mead, 1997) 和 RS (Qin et al., 2004)。结合其他鞭毛蛋白基体定位机制的研究, “预组装-定位”

可能是鞭毛蛋白基体定位的主要模式。

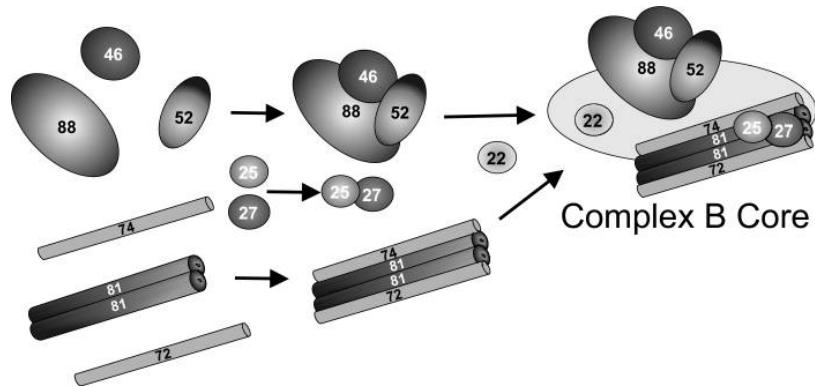


图 2.14 IFT-B 核心复合物体内组装的假想模型 (Lucker et al., 2010)。

Figure 2.14 Hypothetical model of *in vivo* assembly of the IFT complex B core (Lucker et al., 2010).

基于对 IFT 复合物各亚基生化、遗传、定位和相互作用等方面的研究, Lucker et al. (2010) 提出了 IFT 复合物 B 的层级组装模型 (图 2.14)。在该模型中, IFT88、IFT52 和 IFT46 形成异源三聚体, IFT81 和 IFT74/72 形成异源四聚体, IFT27 和 IFT25 形成异源二聚体。这三个独立的亚复合物与其他亚基相互作用形成 IFT 复合物 B 的核心复合物。外周亚基随后与该核心相互作用形成完整的 IFT 复合物 B (Lucker et al., 2010)。随后, Richey and Qin (2012) 基于对相关突变体进行的分析也提出了类似的模型 (图 2.15)。他们认为 IFT88、IFT70、IFT52 和 IFT46 形成异源四聚体。该异源四聚体随后结合 IFT27/IFT25 和 IFT81/IFT74。通过以上步骤形成的 IFT-B 核心复合物随后结合外周亚基形成完整的 IFT-B (Richey and Qin, 2012)。这两个模型虽然能够解释部分 IFT 基因突变体的表型差异, 但相关证据不够充分, 需要进一步验证和研究。

近年来, Esben Lorentzen 教授率领的团队陆续解析了 IFT-B 复合物中部亚基及其货物的晶体结构 (图 2.16), 如IFT25/27、IFT70/52、IFT52/46、IFT81/74/tubulin 和 IFT46/ODA16 (Bhogaraju et al., 2013a, 2011, 2014; Taschner et al., 2014, 2017)。同时他们还依据蛋白纯化结果将 IFT-B 分为 IFT-B1 和 IFT-B2 两个子复合物 (图 2.14) (Taschner et al., 2016)。这些研究虽然旨在解析 IFT-B 及其与分子马达和货物的整体结构, 但鉴于其与已知体内实验结果的高度吻合 (Ahmed et al., 2008; Craft et al., 2015; Kubo et al., 2016)。我们认为 IFT 复合物的晶

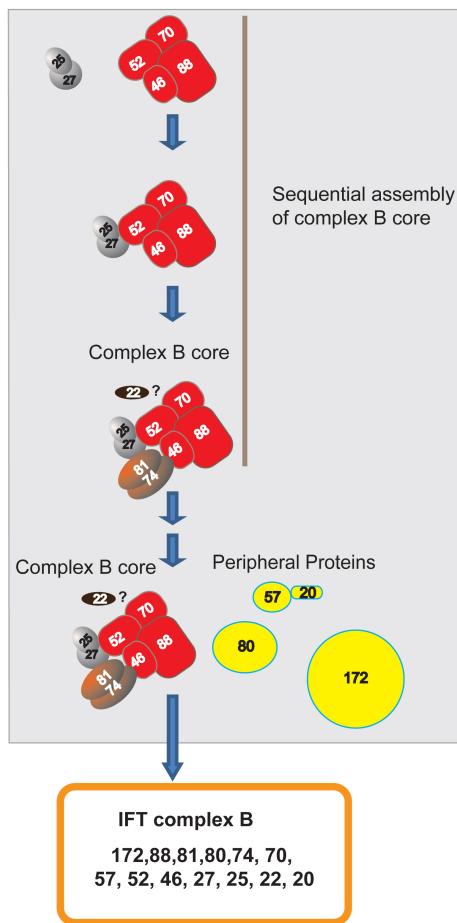


图 2.15 IFT-B 的层级组装和基体定位模型 (Richey and Qin, 2012)。

Figure 2.15 Sequential assembly and basal body localization of complex B (Richey and Qin, 2012).

体结构可在一定程度上指导对 IFT 蛋白基体定位的相关研究。然而，体内实验长期以来受到有限的突变体和抗体的制约。此外，研究多亚基复合物组装的方法和手段也很匮乏。

相比于 IFT-B 复合物中的亚基，对 IFT-A 复合物中亚基的基体定位相关研究较少。原因之一是 IFT-A 中的亚基分子量普遍较大。Brown et al. (2015) 发现 IFT-A 和 IFT-B 在野生型衣藻的基体共定位。然而，这种共定位在 *IFT74* 的缺失突变体 *ift74-2* 中消失。这一结果表明 IFT-A 和 IFT-B 通过独立的方式定位到基体。在已有的研究中，IFT-A 在 IFT-B 亚基的缺失突变体中能够正常定位到基体。反之，IFT-B 在 IFT-A 亚基的缺失突变体中也能够正常定位到基体 (Behal et al., 2012; Brown et al., 2015; Hou et al., 2007; Richey and Qin, 2012)。此外，前面提

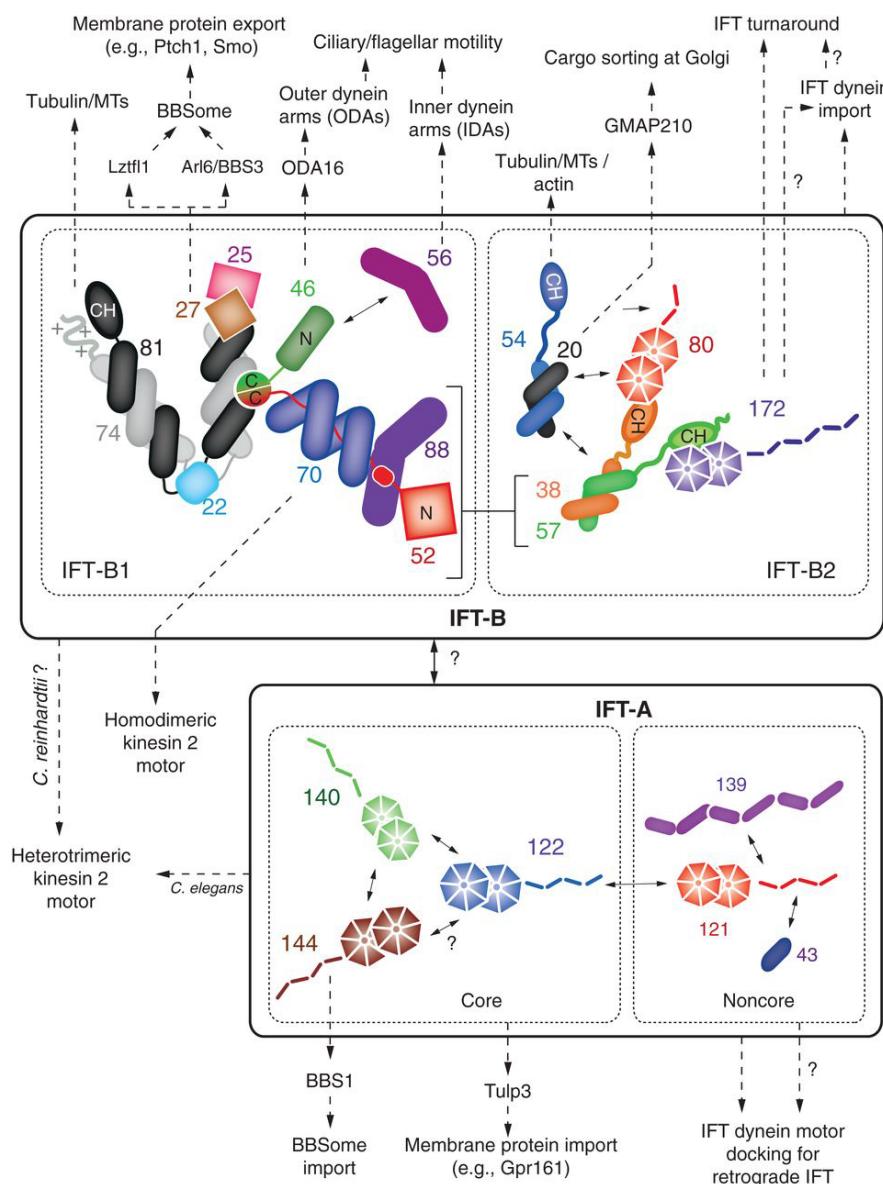


图 2.16 IFT 蛋白之间及 IFT 蛋白与分子马达或货物之间的相互作用 (Taschner and Lorentzen, 2016)。MT 为微管, *C. reinhardtii* 为莱茵衣藻, *C. elegans* 为线虫。

Figure 2.16 Interactions within IFT proteins and interaction between IFT proteins/complexes and ciliary motor/cargo proteins (Taschner and Lorentzen, 2016). MT, Microtubule; *C. reinhardtii*, *Chlamydomonas reinhardtii*; *C. elegans*, *Caenorhabditis elegans*.

到的 CPLANE 蛋白能够招募 IFT-A 外周亚基, 而非 IFT-A 核心亚基或 IFT-B 定位到基体 (Toriyama et al., 2016)。这些结果进一步验证了“预组装-定位”模型。

在未来的研究中, 我们需要确定到底哪些亚基和货物在定位到基体之前已经预组装成亚复合物 (Fu et al., 2016; Lechtreck, 2015; Lechtreck et al., 2017; Taschner and Lorentzen, 2016)。同时我们还需要探究这些亚复合物的组装次序。

这些研究有助于最终阐明 IFT 蛋白基体定位以及与货物相互作用的机制。这对解析纤毛的组装与解聚机理至关重要。同时，这些研究对调控纤毛形成及纤毛功能和纤毛病的预防与治疗也具有重要的指导意义。

第三章 IFT46 定位在基体和纤毛

3.1 引言

纤毛/鞭毛是一种保守的细胞器，广泛存在于真核细胞表面 (Fliegauf et al., 2007; Hildebrandt et al., 2011; Ishikawa and Marshall, 2011; Scholey, 2003)。纤毛的形成与维持依赖 IFT (Bhogaraju et al., 2013b; Dentler, 2005; Engel et al., 2012; Morga and Bastin, 2013; Mourao et al., 2016; Pedersen and Rosenbaum, 2008; Scholey, 2003; Taschner and Lorentzen, 2016)。IFT 是一个多亚基复合物，含有 IFT-A、IFT-B1 和 IFT-B2 三个子复合物 (Katoh et al., 2016; Taschner and Lorentzen, 2016; Taschner et al., 2016)。IFT 蛋白聚集在基体与货物组装形成 IFT 火车是纤毛形成的关键初始步骤 (Bhogaraju et al., 2014; Brown et al., 2015; Ishikawa and Marshall, 2011; Morga and Bastin, 2013)。然而，IFT 蛋白基体定位的分子机制仍不明确。本研究中我们选择 IFT-B1 中的一个亚基 IFT46 作为对象来研究其基体定位的分子机制。为此我们需要一种有效的途径来观察 IFT46 的亚细胞定位。本章我们将在 *IFT46* 的缺失突变体 *ift46-1* 中表达融合 YFP 标签的 IFT46 来观察其亚细胞定位 (Hou et al., 2007)。

3.2 材料与方法

3.2.1 本研究所用仪器、试剂、培养基及溶液

如未在正文中特别说明，本研究所用仪器、试剂、培养基及溶液信息均列于附录部分。其中，仪器信息列于第 135 页的附录 A，试剂信息列于第 139 页的附录 B，培养基信息列于第 143 页的附录 C，溶液信息列于第 147 页的附录 D。

3.2.2 藻细胞株及菌株的培养

本章实验所用藻株有 CC-125 和 *ift46-1* (Hou et al., 2007)。通过电转化、筛选获得的藻株列于第 151 页的附录 E。在没有特殊说明的情况下均使用 TAP 或 M1 培养基在本实验室培养室进行培养 (Harris et al., 1989; Sager and Granick, 1953)。

培养室条件设置为 22 °C，连续光照，光照强度为 25 μE·M⁻²·S⁻¹。

大肠埃希氏菌 DH5α 菌株由本实验室保存。在没有特殊说明的情况下均使用 LB 液体培养基或固体平板进行培养。前者置于 37 °C 恒温培养箱以 200 r/min 的转速进行培养，后者置于 37 °C 恒温培养箱静置培养。

3.2.3 分子克隆

3.2.3.1 PCR 扩增

表 3.1 常规 PCR 反应体系

Table 3.1 System of PCR reaction

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	体积或质量 (Volume or Mass)
1	10xBuffer II	5 μL
2	10xGC Enhancer	5 μL
3	2.5 M Betaine	10 μL
4	2.5 mM dNTP Mix	4 μL
5	10 mM Primer F	2 μL
6	10 mM Primer R	2 μL
7	Trans HiFi DNA Polymerase	1 μL
8	DNA Template	50 ng
9	ddH ₂ O	To 50 μL

表 3.2 常规 PCR 反应程序

Table 3.2 Program of PCR reaction

步骤 (Steps)	温度 (Temperature)	反应时间 (Reaction Time)
1	95 °C	5 min
2	95 °C	30 s
3	55 °C	30 s
4	72 °C	30 s
5	Go to #2	28-35 cycles
6	72 °C	10 min
7	10 °C	∞

常规 PCR 扩增使用全式金 HiFi DNA 聚合酶。反应体系如表 3.1 所示，反应程序如表 3.2 所示。引物设计使用 GeneTool Lite 或 Primer Premier 5，所有引物均在上海生工生物工程股份有限公司或武汉擎科伟业生物科技有限公司合成。

3.2.3.2 限制性酶切

限制性酶切使用快速限制性内切酶¹，按表 3.3 将试剂加入 PCR 管中，混匀

¹Fermentas FD Restriction Enzymes

后瞬时离心，37 °C 反应三十分钟后使用 0.7% 琼脂糖凝胶进行电泳，用溴化乙锭¹染色五分钟后于凝胶成像系统中观察并拍照保存结果。若需要回收目的条带则将对应的凝胶块切下，回收方法参考第 41 页 3.2.3.3 部分。

表 3.3 限制性酶切反应体系

Table 3.3 Restriction enzyme reaction system of DNA

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	体积 (Volume)
1	10x FD Green Buffer	2 μL
2	DNA	1 μg
3	FD Restriction enzyme 1	1 μL
4	FD Restriction enzyme 2	1 μL
5	ddH ₂ O	To 20 μL

3.2.3.3 琼脂糖凝胶中的 DNA 回收

使用 BioSpin DNA 胶回收试剂盒或 Omega 凝胶回收试剂盒对琼脂糖凝胶中的 DNA 进行回收，具体步骤如下。

- (1) 将含有目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶块切下并放入 2 mL 离心管中。
- (2) 按 1:3 的质量体积比加入 Extraction Buffer。
- (3) 于 55 °C 金属浴中温浴直至凝胶完全融化。整个孵育过程约需五到十分钟，在此过程中每隔两到三分钟混匀一次。
- (4) 可选步骤：按 1:1 的质量体积比加入异丙醇并混合均匀。对大于 120 bp 的DNA片段不需要加异丙醇。
- (5) 将混合液全部转移到 Spin Column 中于 6000 g 室温离心一分钟并弃去接液管中的液体。
- (6) 向 Spin Column 中加入 500 μL 的 Extraction Buffer，于 12000 g 室温离心一分钟并弃去接液管中的液体。
- (7) 向 Spin Column 中加入 750 μL 的 Wash Buffer，于 12000 g 离心一分钟并弃去接液管中的液体。
- (8) 再次于 12000 g 离心一分钟后将 Spin Column 转移到无菌的 1.5 mL 离心管中。
- (9) 向 Spin Column 中加 25 μL 的 Elution Buffer 并在室温静置一分钟

¹Ethidium bromide, EB

12000 g 室温离心一分钟。离心管中的液体中即含有目的 DNA 片段。

3.2.3.4 DNA 片段的连接及 TA 克隆

按表 3.4 在 PCR 管中加入试剂，混匀后低速离心至管底，16 °C 连接两小时或过夜。对于回收的 PCR 产物，若 DNA 聚合酶为 Taq 酶可直接与 pMD®18-T 载体进行 TA 克隆，反应体系如表 3.5 所示。反应体系中插入片段与载体骨架的摩尔比为 3-10:1。

表 3.4 连接反应体系

Table 3.4 Reaction system for ligation

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	体积 (Volume)
1	10xT4 DNA Ligase Buffer	1 μL
2	DNA fragment	5 μL
3	Plasmid	1 μL (约 50 ng)
4	T4 DNA Ligase	1 μL
5	ddH ₂ O	To 10 μL

表 3.5 TA 克隆反应体系

Table 3.5 Reaction system for TA cloning

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	体积 (Volume)
1	Solution I	10 μL
2	DNA fragment	3-9.5 μL
3	50 ng/μL pMD18-T vector	0.5 μL
4	ddH ₂ O	To 20 μL

3.2.3.5 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒快速转化

大肠杆菌感受态细胞的制备采用传统的 CaCl₂ 法 (Addison et al., 2004; Hanahan et al., 1991; Reusch et al., 1986)，具体制备方法如下。

(1) 取出 -80 °C 保存的 DH5α、DH10β 或其他菌种用接种环蘸取少量菌液，在无抗性的 LB 固体培养基平板上划线，将平板倒置于 37 °C 培养箱中培养过夜。

(2) 挑取一个单菌落接种至 5 mL 无抗性的 LB 液体培养基中，37 °C 震荡培养过夜。

(3) 取 2.5 mL 新鲜的菌液转接到 200 mL 无抗性的 LB 液体培养基中，37 °C 震荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4。

(4) 取出菌液于冰上静置三十分钟，使用 50 mL 离心管 4000 g 4 °C 离心十分钟，弃上清。

(5) 每根离心管中的细胞用 20 mL 预冷的 0.1 M CaCl₂ 重悬，4000g 4 °C 离心十分钟，弃上清。重复此步骤一次。

(6) 每根离心管中的细胞用 2 mL 预冷的 0.1 M CaCl₂ 重悬，合并悬液后加入甘油使其终浓度为 15%。轻轻混匀后分装至 1.5 mL 离心管中，每管 200 μL。立即将分装好的感受态细胞冻存在 -80 °C 冰箱中。

(7) 从离心管中取 10 μL 制备好的感受态细胞，加入 1 μL 质粒 DNA，冰上静置五分钟后加入 300 μL 无抗性的 LB 液体培养基，混匀后涂质粒 DNA 对应抗性的 LB 平板，倒置于 37 °C 培养箱中培养过夜。根据次日平板上单克隆的数量和所用质粒 DNA 的浓度来判断感受态细胞的质量。

3.2.3.6 热激转化

(1) 从 -80 °C 冰箱中取出制备好的 DH5α 或 DH10β 感受态细胞置于冰上静置待其解冻，将连接产物全部加入到 200 μL 感受态细胞中于冰上静置三分钟 (Addison et al., 2004; Hanahan et al., 1991; Reusch et al., 1986)。

(2) 42 °C 水浴热激九十秒并立即置于冰上静置三分钟。

(3) 加入 300 μL 无任何抗性的 LB 液体培养基，37 °C 摆床上慢速培养一小时。

(4) 将菌液均匀涂布在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基平板上，先在 37 °C 培养箱中正置培养二十分钟后倒置培养过夜。

3.2.3.7 阳性重组子筛选

(1) 准备 1.5 mL 离心管，向其中加入 1 mL 含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基，用牙签挑取单菌落置于离心管中，弃去牙签后盖上离心管盖。

(2) 将离心管置于 37 °C 摆床中培养过夜，丢弃培养基未变浑浊的离心管。

(3) 以 0.5 μL 各个菌落的培养物为模板，用对应的引物进行菌液 PCR 检测。PCR 反应体系及反应程序如表 3.6 和表 3.7 所示。

(4) 反应结束后取 PCR 产物使用 0.7% 琼脂糖凝胶进行电泳（含 EB），电

泳结束后在凝胶成像系统中观察并拍照。

(5) 取每种连接对应的三个阳性克隆送上海生工生物工程股份有限公司¹或武汉擎科伟业生物科技有限公司²测序检测是否存在突变。

表 3.6 菌液 PCR 反应体系

Table 3.6 System of bacteria liquid PCR reaction

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	体积 (Volume)
1	10xBuffer I	1 μL
2	2.5 mM dNTP Mix	1 μL
3	10 mM Primer F	0.5 μL
4	10 mM Primer R	0.5 μL
5	Taq DNA Polymerase	0.5 μL
6	Bacteria liquid	0.5 μL
7	ddH ₂ O	To 10 μL

表 3.7 菌液 PCR 反应程序

Table 3.7 Program of bacteria liquid PCR reaction

步骤 (Steps)	温度 (Temperature)	反应时间 (Reaction Time)
1	95 °C	5 min
2	95 °C	30 s
3	55 °C	30 s
4	72 °C	30 s
5	Go to #2	30 cycles
6	72 °C	10 min
7	10 °C	∞

3.2.3.8 质粒抽提

使用天根质粒小提试剂盒进行质粒提取，具体步骤如下。

(1) 向吸附柱 CP3 中加入 500 μL 平衡液 BL，12000 g 室温离心一分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

(2) 取 5-10 mL 过夜培养的菌液，12000 g 室温离心一分钟，尽量吸除上清。

(3) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μL 溶液 P1，使用移液器悬浮细菌沉淀。

(4) 向离心管中加入 250 μL 溶液 P2 温和的上下翻转六到八次使菌体充分裂解。

¹<http://www.sangon.com/>

²<http://www.tsingke.net/>

(5) 向离心管中加入 350 μL 溶液 P3，立即温和的上下翻转六到八次充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。13400 g 室温离心十分钟。

(6) 将上清转移到吸附柱 CP3 中，12000 g 室温离心一分钟，倒掉收集管中的废液后将吸附柱 CP3 放回收集管中。

(7) 向吸附柱 CP3 中加入 500 μL 去蛋白液 PD，12000 g 室温离心一分钟，倒掉收集管中的废液后将吸附柱 CP3 放回收集管中。

(8) 向吸附柱 CP3 中加入 600 μL 漂洗液 PW，12000 g 室温离心一分钟，倒掉收集管中的废液后将吸附柱 CP3 放回收集管中。重复该过程一次。

(9) 将吸附柱 CP3 放入收集管中，12000 g 室温离心两分钟以除去残余的漂洗液。将吸附柱 CP3 开盖置于室温放置三分钟以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

(10) 将吸附柱 CP3 置于干净的离心管中，向吸附膜中央滴加 50 μL 洗脱缓冲液 EB，室温放置两分钟后 12000 g 室温离心两分钟将质粒溶液收集到离心管中。

(11) 使用微量紫外分光光度计 (Quawell-Q5000) 测定 DNA 的浓度和纯度。−20 °C 保存质粒溶液。

3.2.3.9 构建表达 IFT::YFP 的载体

以 pGEM T Easy-IFT46 为模板，用引物 IFT46-F 和 IFT46-R 扩增 IFT46 的基因组 DNA (含启动子区)。将扩增产物克隆到 pMD 18-T 载体得到 pHK212。经测序验证，pHK212 中 IFT46 的编码序列不含碱基突变。pHK212 经 NdeI 和 EcoRV 双酶切后，IFT46 的基因组 DNA 被克隆到 NdeI/EcoRV 消化后的 pHK86 (Diener, 2009; Long and Huang, 2012)，由此获得可表达 IFT46::YFP 的 pHK214。yfp 的 DNA 和蛋白序列见第 167 页的附录 J。

为了构建仅表达 YFP 的载体作为阴性对照，我们以 pHK214 为模板，用引物 ACE-F 和 Pro-R 扩增了 IFT46 的启动子序列。将该序列用 NdeI 和 EcoRV 双酶切以后克隆到 NdeI/EcoRV 消化后的 pHK214 即得到仅表达 YFP 的 pHK281。

克隆所用载体以及构建的载体的详细信息见第 155 页的附录 F，克隆所用引物信息见第 157 页的附录 G。

3.2.4 衣藻电转化

衣藻电转化参考 Brown et al. (1991)、Hu et al. (2014) 和 Shimogawara et al. (1998) 的方法。具体步骤如下。

3.2.4.1 质粒线性化

使用 FD Nde I 单酶切电转化所需的质粒 DNA，方法参考第 40 页 3.2.3.2 部分的限制性酶切方法。酶切产物直接用 BioSpin 胶回收试剂盒回收，方法参考第 41 页 3.2.3.3 部分。

3.2.4.2 电转化

- (1) 用 TAP 培养基培养藻细胞至其浓度约为 4.0×10^6 cells/mL。
- (2) 将 75% 酒精中浸泡的 0.4 cm 电击杯取出用电吹风吹干并在超净工作台上紫外照射三十分钟。取 1 mL 藻细胞用血细胞计数板在普通光学显微镜下计数，计算其浓度，假设为 C。
- (3) 假设电转所需藻液体积为 V，其计算公式为 $V=5.0 \times 10^8/C$ 。其中电转化的平板数为十，包括九个实验组和一个阴性对照。将体积为 V 的藻液倒入多个 50 mL 离心管中，配平后 2000 g 室温离心三分钟收集藻细胞，弃上清后每个离心管用 20 mL 预冷的 1xTAPS 重悬，4 °C, 2000 g 离心三分钟后弃上清。
- (4) 向离心管中加入一定体积的预冷的 1xTAPS，浓缩的藻液终体积为 2.75 mL。
- (5) 将藻液按 250 μL 每管分装到电击杯中，向每个电击杯中加入 200 ng 线性化的 DNA。冰上静置十分钟。
- (6) 用吸水纸擦干电击杯表面的液体后用电转仪点击，参数设置如下：电压 800 V，电阻 1575 Ω，电容 50 μF。电击结束后再次置于冰上静置十分钟。
- (7) 取干净的 50 mL 离心管，各向其中加入 10 mL 1xTAPS，用移液器将电击杯中的藻液转移到离心管中，盖上盖子，用封口膜封口后在摇床上慢速弱光恢复过夜。
- (8) 取 20% 的淀粉溶液，涡旋混匀后 1000 g 室温离心一分钟弃上清，用 20 mL 的 1xTAPS 洗涤四次，最后用 1xTAPS（含 0.4% PEG6000）定容到 20

mL。

(9) 在每个带 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 巴龙霉素或 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素抗性的 TAP 平板上加 1 mL 洗涤过的 20% 淀粉溶液，轻轻旋转使淀粉均匀平铺在琼脂上。取过夜恢复的藻液 2000 g 室温离心三分钟，弃上清，用 500 μL 1xTAPS 重悬后用移液器转移到带淀粉的平板上，轻轻旋转使藻液均匀平铺在淀粉上。也可在 2 mL 离心管中将淀粉溶液和藻液混合均匀后铺在平板上。

(10) 打开平板的盖子在超净工作台吹干，整个过程需要约两小时。

(11) 用封口膜封口后在培养室倒置培养约一周，届时可见单个藻落长出。

3.2.5 SDS-PAGE

3.2.5.1 蛋白抽提

参考 Hu et al. (2014) 的方法。具体步骤如下。

(1) 在九十六孔板中用 200 μL M1 培养藻细胞两到三天。

(2) 将藻液转移到 1.5 mL 离心管中，16873 g 室温离心一分钟，弃上清置于冰上预冷。

(3) 用 1 M DTT 和 1 M 碳酸钠配置 SBA (1:1:8)，混匀后冰上预冷。若蛋白易于降解，可在 SBA 中加蛋白酶抑制剂。

(4) 向离心管中加入 30 μL SBA，涡旋十秒混匀后加入 20 μL SBB (5% SDS, 30% 蔗糖)。

(5) 涡旋震荡二十分钟后液氮冻融三次。冻融程序为液氮冻三分钟，30-40°C 温水解冻一分钟。冻融结束后 16873 g 4 °C 离心一分钟，将上清转移至无菌的 1.5 mL 离心管中。

3.2.5.2 蛋白定量

参考 Hu et al. (2014) 的方法。具体步骤如下。

(1) 取 5 μL 提取的蛋白溶液加入到 195 μL 去离子水中。对于标准曲线对应的离心管则加入不同体积的 5 mg/mL BSA 溶液。混匀后加入 800 μL 氨基黑溶液，涡旋混匀后 16873 g 室温离心十分钟，弃上清。

- (2) 向离心管中加入 1 mL 洗涤缓冲液，再次离心十分钟，弃上清。
- (3) 重复步骤 (3) 一次并用移液器吸走残余的液体，加入 1 mL 0.2 M 的 NaOH，混匀后取出 200 μL 加入到透明的九十六孔板中，用 620(8) nm 的带通滤光片测定其吸光光度值。
- (4) 根据 OD620 和所加入的 BSA 的质量用 Microsoft Excel 拟合标准曲线。
- (5) 将样品的 OD620 值代入标准曲线方程计算溶液中的蛋白浓度。

3.2.5.3 SDS-PAGE 步骤

表 3.8 SDS-PAGE 分离胶配方表

Table 3.8 SDS-PAGE formula of the separation gel

分离胶浓度 (Concentration)	7%	8%	10%	12%
去离子水	40 mL	38 mL	34 mL	30 mL
分离胶缓冲液	6 mL	6 mL	6 mL	6 mL
30% 凝胶贮液	14 mL	16 mL	20 mL	24 mL
10% 过硫酸铵	350 μL	350 μL	350 μL	350 μL
TEMED	35 μL	35 μL	35 μL	35 μL
分离范围	100-250 kDa	40-200 kDa	30-200 kDa	10-150 kDa

表 3.9 SDS-PAGE 浓缩胶配方表

Table 3.9 SDS-PAGE formula of the stacking gel

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	体积 (Volume)
1	去离子水	15 mL
2	浓缩胶缓冲液	2.4 mL
3	30% 凝胶贮液	6 mL
4	10% 过硫酸铵	200 μL
5	TEMED	20 μL

(1) 将玻璃板洗净后用电吹风吹干，组装好后配置分离胶，用移液器沿着边缘将分离胶加入到两层玻璃板之间。在分离胶上加 1 mL 去离子水或 0.5 mL 异丙醇压平。待分离胶凝固后倾出上层液体，用去离子水清洗三次后用来滤纸条吸走残留的水。配置上层浓缩胶并加在分离胶上，迅速插入梳子。待浓缩胶凝固后取下玻璃板清洗干净，4 °C 保存。分离胶的配方见表 3.8，浓缩胶的配方见表 3.9。

(2) 取蛋白样品按 1:1 体积比加入 5x 样品缓冲液，沸水煮十分钟后立即置于冰上冷却三分钟，瞬时离心后使用或 -20 °C 保存备用。

(3) 将玻璃板安装在电泳装置上，加入 1x 电泳缓冲液后拔掉梳子。按顺序加样，注意最大上样量为 20 μL 。在两侧的泳道加等体积的样品缓冲液，最后取 5 μL 蛋白 Marker 加在左侧第二个泳道。将电泳装置与电源连接，设定电源为恒压模式，80 V 电泳。待染料前端进入分离胶后将电压提高到 120 V，继续电泳直至染料前端到达分离胶底部，关闭电源。

(4) 取出凝胶置于考马斯亮蓝 G250 染色液中染色两小时或过夜。

(5) 回收染色液后用去离子水清洗凝胶三次，加入脱色液进行脱色，期间多次更换脱色液直至条带清晰。将凝胶夹在塑料薄膜中间置于扫描仪上进行成像。

3.2.6 免疫印迹

参考 Hu et al. (2014) 的方法。具体步骤如下。

(1) 蛋白样品经 10% SDS-PAGE 胶分离。

(2) 电泳结束后按照 Hofer 电泳转移系统的操作指南装配转膜三明治。将转膜系统与电源连接后恒流 300 mA 转膜三小时，使蛋白转移到 0.45 μm 的 NC 膜上。

(3) 取出 NC 膜用丽春红染色三分钟，用圆珠笔标记 Marker 和泳道并剪掉多余部分后用 TBST 溶液洗涤三次，每次五分钟。

(4) 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 NC 膜两小时或 4 °C 封闭过夜。

(5) 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释一抗 A21 (anti-GFP, 稀释比 1:1000) 或 A11 (anti- α -tubulin, 稀释比 1:200000)，室温孵育 NC 膜两小时或 4 °C 孵育过夜。抗体的详细信息参考第 163 页的附录 H。

(6) 回收一抗并加入终浓度为 5 mM 的叠氮化钠 4 °C 保存备用。TBST 溶液洗膜三次，每次十分钟。

(7) 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释二抗 A40 (HRP 标记羊抗鼠 IgG, 稀释比 1:5000)，室温孵育 NC 膜两小时。抗体的详细信息参考第 163 页的附录 H。

(8) 倒掉二抗孵育液并用 TBST 溶液洗膜三次，每次十分钟。

(9) 用吸水纸吸干 NC 膜表面的液体后将其置于含化学发光底物的塑料平皿中，左右摇动平皿使液体浸润整个 NC 膜。然后将膜夹在无色透明塑料薄膜中，在薄膜上方放置 X 光片，曝光一段时间后取出 X 光片浸入显影液中，随时观察显色情况。出现目的带后用自来水冲洗 X 光片终止反应并置于定影液中浸泡五分钟。X 光片用电吹风吹干后用扫描仪扫描存档。也可以直接使用水生生物研究所分析测试中心的分子成像仪进行成像，具体方法遵照该仪器的操作说明。

(10) 使用 Adobe PhotoShop CS6 对免疫印迹结果进行灰度分析，使用 Excel 对蛋白表达水平的变化进行计算，使用 GraphPad Prism 5 进行作图。

3.2.7 qRT-PCR 分析

3.2.7.1 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

表 3.10 消化 RNA 样品中的基因组 DNA 反应体系

Table 3.10 Reaction system for removal of genomic DNA from RNA preparations

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	质量或体积 (Mass or Volume)
1	RNA	2 μ g
2	10x Reaction Buffer with MgCl ₂	1 μ L
3	DNase I, Rnase-free	1 μ L
4	Water, nuclease-free	To 10 μ L

参考 Hu et al. (2014) 的方法。整个提取过程需要使用 RNase-free 的枪头且在洁净环境如超净工作台中进行。为了避免空气中的 RNase 降解样品中的 RNA，提取过程中需要使用酒精灯使局部区域内的 RNase 失活。

(1) 取对数生长期的藻细胞，测定细胞浓度后用 1.5 mL 离心管收集 1.0-2.0 \times 10⁷ 个细胞，加入 1 mL TRIzol 后用移液器吹打二十次。冰上静置五分钟。

(2) 加入 200 μ L 氯仿，剧烈震荡十五秒，冰上静置三分钟。

(3) 4 °C, 12000 g 离心十五分钟。将上层水相转移到新的 1.5 mL 离心管中，加入 500 μ L 异丙醇，颠倒混匀五次，冰上静置十分钟。

(4) 4 °C, 12000 g 离心十分钟，弃上清，此时管底有白色沉淀。用 1 mL 75% 酒精洗涤沉淀两次。

(5) 4 °C, 7500 g 离心五分钟，弃上清。打开管盖置于超净工作台中吹五分钟以去除残留的乙醇。

(6) 向每个离心管中加入 20 μL 含有 0.2 μL RNase 抑制剂的 RNase-free 水，冰上静置三分钟后测定 RNA 浓度。

(7) 取 2 μg RNA，按表 3.10 加入试剂后混匀离心，37 °C 反应三十分钟以消化 DNA。加入 1 μL 50 mM EDTA 后混匀，65 °C 反应十分钟以使 DNase I 失活。

(8) 使用 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 进行第一链 cDNA 合成，按表 3.11 加入试剂后混匀离心，42 °C 孵育六十分钟，70 °C 反应五分钟终止反应。

表 3.11 第一链 cDNA 合成反应体系

Table 3.11 Reaction system for first strand cDNA synthesis

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	质量或体积 (Mass or Volume)
1	Template RNA	2 μg
2	Primer	1 μL
3	Water, nuclease-free	To 12 μL
4	5x Reaction Buffer	4 μL
5	RiboLock Rnase Inhibitor	1 μL
6	10 mM dNTP Mix	2 μL
7	RevertAid M-MuLV RT	1 μL
8	Water, nuclease-free	To 10 μL

3.2.7.2 qRT-PCR

表 3.12 qRT-PCR 反应体系

Table 3.12 System of qRT-PCR reaction

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	体积 (Volume)
1	SYBR Green Mix	10 μL
2	Water, nuclease-free	8 μL
3	cDNA Template	1 μL
4	Primer-F	0.5 μL
5	Primer-R	0.5 μL

(1) 将反转录得到的 cDNA 稀释为约 20 ng/μL，按表 3.12 向特制的九十六孔板中加入试剂后混匀离心，盖上配套的薄膜后压紧，按表 3.13 的反应程序进行 qRT-PCR。反应结束后观察溶解曲线是否只有单峰，若有多峰或肩峰则该次

实验的数据无效，需要重新进行实验或重新设计引物。

(2) PCR 反应得到的阈值循环数通过 $2^{\Delta(-\Delta Ct)}$ 法进行计算，将至少三次生物学重复的平均值作为最终结果。

表 3.13 qRT-PCR 反应程序

Table 3.13 Program of qRT-PCR reaction

步骤 (Steps)	温度 (Temperature)	反应时间 (Reaction Time)	信号采集 (Scan)
1	95 °C	2 min	
2	95 °C	15 s	
3	60 °C	30 s	
4	72 °C	30 s	Yes
5	Go to #2	40 cycles	
6	95 °C	15 s	
7	60 °C	15 s	
8	60 °C	15 s	Yes

3.2.8 鞭毛长度及鞭毛率的测定

取生长良好的藻细胞 1 mL，用终浓度为 0.5% 的鲁戈氏液室温固定两分钟。使用尼康 Eclipse Ti 相差显微镜观察衣藻细胞并随机选择视野进行拍照。通过观察细胞有无鞭毛计算鞭毛率，同时用显微镜配套的软件测定衣藻鞭毛的长度。每个样品进行六次独立重复实验，每次至少观察一百个细胞来计算纤毛率，至少测定五十个细胞（一百根鞭毛）来计算纤毛长度。

3.2.9 显微观察

3.2.9.1 共聚焦显微观察

使用水生生物研究所分析测试中心的蔡司激光共聚焦显微镜 LSM710 对靶蛋白的定位进行观察。具体操作如下。

- (1) 制备玻片样品。
- (2) 将 63x 物镜 (Plan-APOCHROMAT 63x/1.40 Oil DIC M27) 移动到光路中，在物镜中央滴加镜油，将玻片置于物镜上方并使盖玻片向下。
- (3) 调整焦距直至藻细胞在目镜中可见，移动载物台寻找合适的视野。
- (4) 将显微镜切换到成像模式后拍照。显微镜的设置如下表 3.14 所示。

表 3.14 显微成像部分参数

Table 3.14 Parameters for live-cell imaging used in this study

通道 (Channel)	成像对象 (Objects)	激发光 (Excitation)	接收范围 (Acquisition)
通道一	黄色荧光蛋白	514 nm	519-560 nm
通道二	叶绿素	488 nm	660-680 nm

3.2.9.2 TIRF显微观察

载玻片和盖玻片使用 6 M 盐酸浸泡过夜后用去离子水洗涤三次，在超净工作台吹干后在 1 mg/mL 多聚赖氨酸溶液中浸泡过夜，去离子水洗涤三次后吹干。向盖玻中央滴加 10 μ L 衣藻培养物后静置五分钟，将载玻片覆盖在载玻片中央并吸走残余液体，最后用指甲油封片 (Dentler et al., 2009; Fuhrmann et al., 1999)。使用水生生物研究所分析测试中心的 Nikon Eclipse Ti 全内反射荧光显微镜（配备 Andor iXon3 EMCCD 和数值孔径为 1.49 的 100x 物镜）对 IFT 蛋白在鞭毛中定位进行观察，同时测定 IFT 的运动速率和频率。IFT 运动速率和频率的计算过程参考 Lechtreck (2013) 和 Dentler et al. (2009) 的方法。

3.2.10 统计分析

数据展示的格式为平均值±S.E.M. 或平均值±S.D.。使用独立样本 Student's t 检验或单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行组间差异比较分析。当 P 值小于 0.05 时认为差异具有显著性。* 代表 P 值小于 0.05, ** 代表 P 值小于 0.01, *** 代表 P 值小于 0.001。

3.3 结果

3.3.1 表达 IFT46::YFP 载体的构建

本章我们构建了能够表达 IFT46::YFP 的 pHK214 以及仅表达 YFP 的 pHK281。选择四个 pHK214 疑似阳性克隆（经菌液 PCR 验证）进行酶切，酶切产物的电泳结果显示仅 #38 号克隆在单酶切 (11 kbp) 和双酶切 (4.7 kbp/6.3 kbp) 时均有目的条带（图 3.1）。选择六个 pHK281 疑似阳性克隆进行同样的实验，结果显示其中四个为真阳性（图 3.1）。pHK214 及 pHK281 均经过测序验证，它们的编码序列中均不含有义突变。为了最大限度减少融合标签对 IFT46

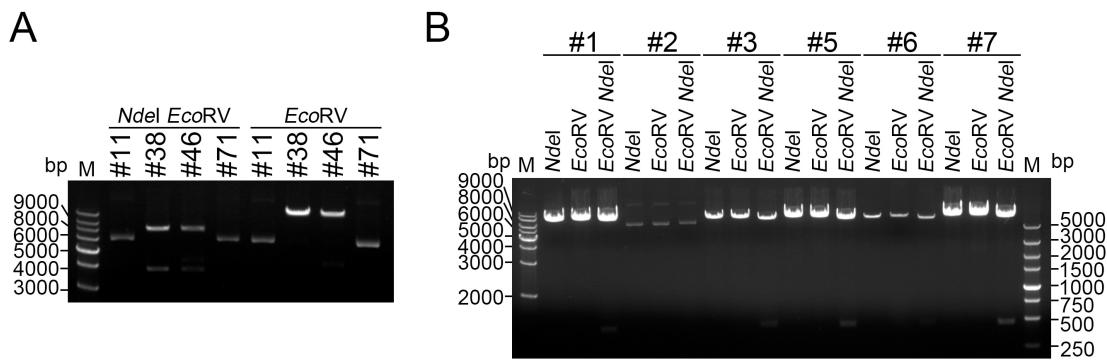


图 3.1 pHK214 及 pHK281 酶切产物电泳图。(A) 四个 pHK214 疑似阳性克隆经 *Nde*I、*Eco*RV 酶切后的电泳结果。其中 #38 号克隆为阳性。(B) 六个 pHK281 疑似阳性克隆经 *Eco*RV、*Nde*I 酶切后的电泳结果。其中 #1、#3、#5、#7 号克隆均为阳性。

Figure 3.1 Agarose gel electrophoresis of restriction enzymes-digested pHK214 or pHK281. (A) Agarose gel electrophoresis of four suspected positive clones of pHK214 (digested with *Nde*I and/or *Eco*RV). Clone #38 is positive according to the band size. (B) Agarose gel electrophoresis of six suspected positive clones of pHK281 (digested with *Nde*I and/or *Eco*RV). Clones #1, #3, #5, and #7 are all positive according to the band size.

结构和功能的影响, pHK214 中含有一段编码连接短肽的序列。该序列编码的肽段为 DIGASGQQGASGA (Diener, 2009; Long and Huang, 2012), 这个连接短肽介于 IFT46 与 YFP 标签之间 (图 3.2)。

3.3.2 互补实验

IFT46 的缺失突变体 *ift46-1* 具有极短的不动鞭毛且能够表达 *IFT46* 的 5' 端 (Hou et al., 2007)。理论上, 互补之后的藻株将具有全长的鞭毛且能够正常游动 (Hou et al., 2007)。基于这一原理, 我们将 pHK214 转化到 *ift46-1* 中并使用巴龙霉素进行初步筛选 (图 3.3)。对于获取的单克隆, 我们用解剖镜从一百三十二个转化子中筛选到五十二个阳性克隆。

接下来我们使用反转录 PCR 来检测 *IFT46* 或 *IFT46::YFP* 的表达。RT-PCR 使用的四对引物分别对应 *IFT46::YFP* 的 N 端、中间段、C 端以及 *IFT46* 和 YFP 的连接部分 (图 3.2)。结果显示, *IFT46* 的中间段和 C 端仅在 CC-125 和 *ift46-1* *IFT46::YFP* 中表达, 而 YFP 仅在 *ift46-1* *IFT46::YFP* 中表达 (图 3.4A)。荧光定

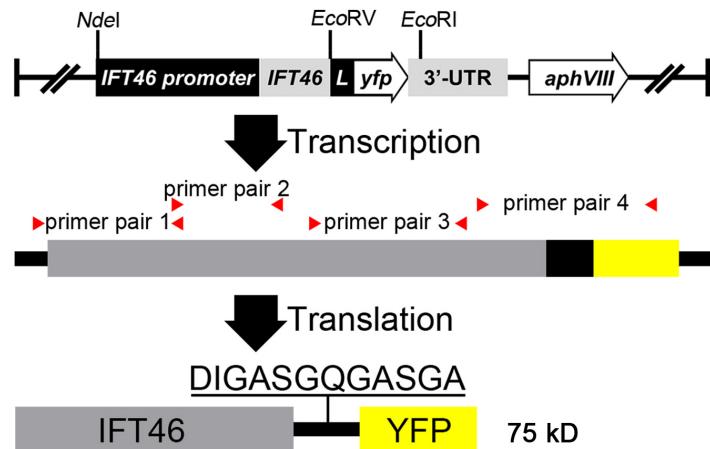


图 3.2 用于互补实验的载体示意图。该载体对应的转录本及蛋白产物的示意图依次列于下方。L 代表 IFT46 和 YFP 之间的连接短肽。红色三角形代表用于检测 *IFT46* 和 *IFT46-L-yfp* 的 mRNA 的引物对。

Figure 3.2 Schematic diagram of the construct used to rescue *ift46-1*. Its predicted transcript and corresponding protein in *Chlamydomonas* are also shown below. L: protein linker sequence. Red triangles represent primer pairs used to detect mRNA of *IFT46* and *IFT46-L-yfp*.

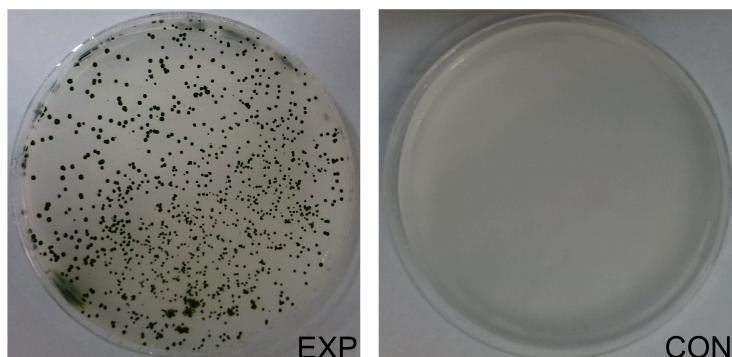


图 3.3 质粒 pHK214 电转化 *ift46-1* 后长出的转化子。

Figure 3.3 Transformants generated after electro-transformation of pHK214 to *ift46-1*.

量 PCR 的结果显示 *IFT46* 在野生型 CC-125 细胞和 *ift46-1* *IFT46::YFP* 中转录水平无显著差异（图3.4B）。

接下来我们在蛋白水平上检测了 *IFT46::YFP* 的表达情况。从阳性转化子中随机选择四株进行免疫印迹分析。使用抗 *IFT46* 或抗 GFP 的抗体，我们均检测到约 75 kDa 的目的条带，而 CC-125 细胞中仅有约 46 kDa 的条带（图3.4C）

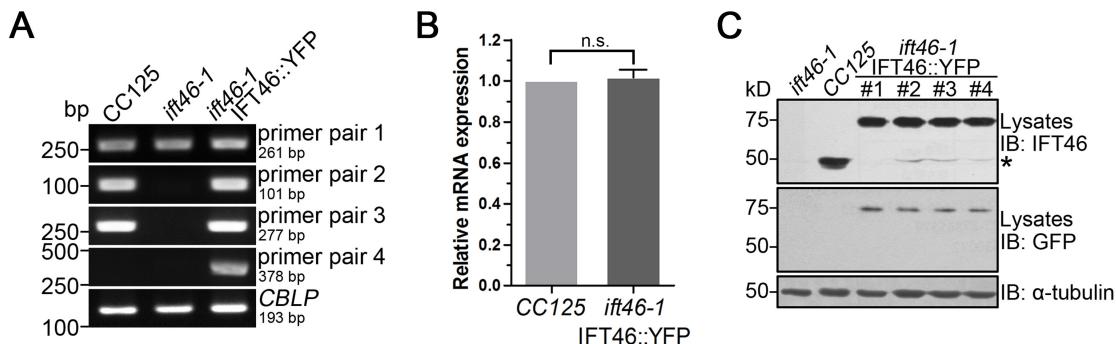


图 3.4 互补之后的藻株中 *IFT46::YFP* 在 mRNA 和蛋白水平的表达量。(A) 反转录 PCR 检测 CC-125, *ift46-1* 及 *ift46-1 IFT46::YFP* 中 *IFT46* 或 *IFT46::YFP* 的表达情况。内参为衣藻看家基因 *CBLP*。电泳图底部的数字代表泳道编号。(B) 使用实时荧光定量 PCR 检测 *IFT46* 在 *ift46-1 IFT46::YFP* 中的表达情况。图中展示的数据为依据 *IFT46* 在 CC-125 中的表达量标准化后的结果。n.s. 代表差异不具有显著性。(C) *ift46-1*, CC-125 以及 *ift46-1 IFT46::YFP* 全细胞裂解液免疫印迹分析。星号代表非特异性条带。IB 代表免疫印迹。

Figure 3.4 The expression of *IFT46::YFP* in the rescued strains in mRNA and protein level. (A) RT-PCR with cDNA templates from WT CC-125, *ift46-1*, and rescued cells *ift46-1 IFT46::YFP* using primers designed to amplify transcripts from the 5' (primer pair 1), middle (primer pair 2), 3' (primer pair 3) regions of *IFT46* gene and yfp gene (primer pair 4). Expression of *CBLP* was used as the internal control. Numbers at the bottom indicate separate lanes. (B) Quantification the expression level of *IFT46* in *ift46-1 IFT46::YFP* using real-time PCR ($n = 3$ samples for each group). values were normalized to the expression level of *IFT46* in WT CC-125 cells. n.s.: not significant. (C) Western blot analysis of whole cell lysates (5 μ g protein per lane) probed with antibodies raised against *IFT46*, GFP or α -tubulin. The asterisk indicates nonspecific bands. IB: immunoblot. Numbers at the bottom indicate separate lanes.

(Hou et al., 2007)。这表明阳性转化子中确实成功表达了 *IFT46::YFP*。此外, *ift46-1 IFT46::YFP* 中 *IFT46::YFP* 的表达水平与 CC-125 中 *IFT46* 无显著差异 (图 3.4C)。这些结果表明 *IFT46* 的内源性启动子能够有效驱动 *IFT46::YFP* 的表达。

3.3.3 *ift46-1 IFT46::YFP* 表型鉴定

为了评估融合 YFP 标签对 *IFT46* 功能的影响, 我们比较了 *ift46-1 IFT46::YFP* 和 CC-125 的鞭毛相关表型。*ift46-1 IFT46::YFP* 的平均鞭毛长度为 11.4 μ m, 这

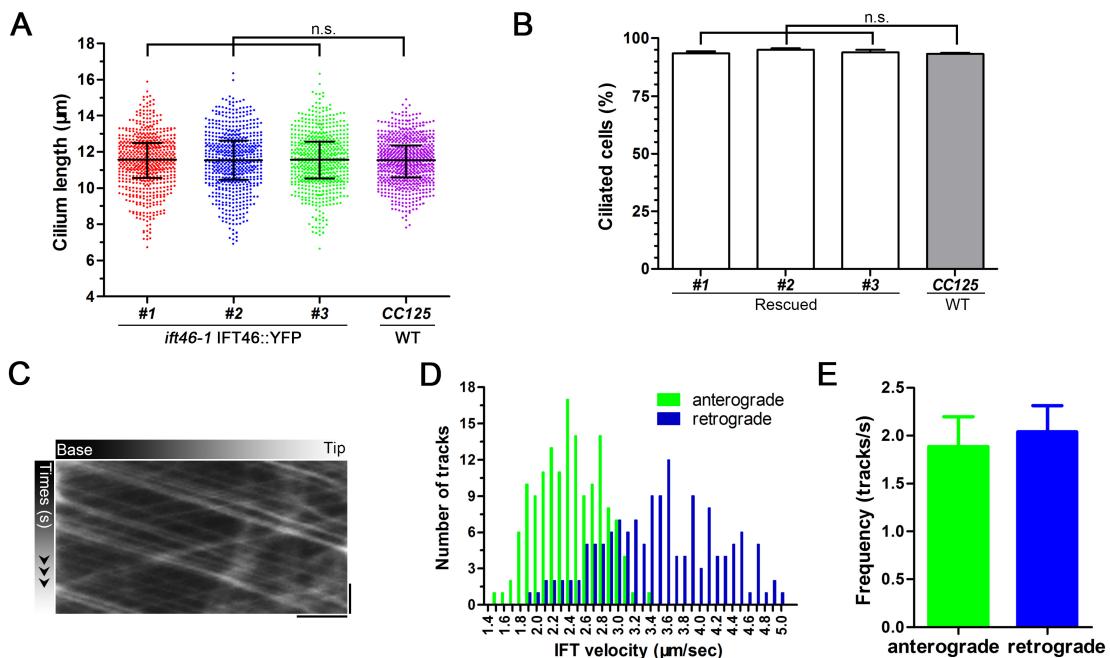


图 3.5 IFT46::YFP 能够挽救 *ift46-1* 的鞭毛缺陷表型。 (A) 互补之后的藻株 *ift46-1 IFT46::YFP* 的平均鞭毛长度与 CC-125 的平均鞭毛长度近似相等。线图的三条黑线从上到下分别代表上四分位数、中位数和下四分位数。圆点代表单个的数据。 n.s. 代表差异没有显著性。 (B) 互补之后的藻株 *ift46-1 IFT46::YFP* 与 CC-125 的鞭毛率近似相等。 n.s. 代表差异没有显著性。 (C) 基于 *ift46-1 IFT46::YFP* 的鞭毛内运输生成的一幅典型的IFT运动轨迹图。水平标尺代表 2 μm , 垂直标尺代表 2 s。 (D) *ift46-1 IFT46::YFP* 鞭毛内正向（绿色， $n=149$ ）和反向（蓝色， $n=145$ ）IFT 运动速率频数分布直方图。 (E) *ift46-1 IFT46::YFP* 鞭毛内正向（ $n=21$ ）和反向（ $n=20$ ）IFT 运动频率。

Figure 3.5 YFP-tagged IFT46 rescued the flagellar defects in *ift46-1*. (A) Flagella length of rescued strain *ift46-1 IFT46::YFP* is nearly identical to that of WT CC-125. Scatter plots show the median, the upper and the lower quartiles. Dots represent individual data points. n.s.: not significant. (B) Percentages of ciliated cells of WT CC-125 and the rescued strains *ift46-1 IFT46::YFP*. n.s.: not significant. (C) A typical kymograph generated from an image stack of flagella of *ift46-1 IFT46::YFP* showed anterograde and retrograde tracks. The horizontal axis matches the length of one flagellum while the vertical axis corresponds to the passed time. Horizontal scale bar: 2 μm ; vertical scale bar: 2 s. (D) Frequency distribution of anterograde IFT velocity (green bar, $n=149$) and retrograde IFT velocity (blue bar, $n=145$) of *ift46-1 IFT46::YFP*. (E) IFT frequencies obtained from kymographs of image stacks (for anterograde frequency, $n = 21$; for retrograde frequency, $n = 20$).

与 CC-125 细胞的平均鞭毛长度相当（图3.5A）。同时，它们的鞭毛率也没有显著差异，二者均为 93% 左右（图 3.5B）。使用全内反射荧光显微镜，我们观察并记录了 IFT46::YFP 在 *ift46-1* *IFT46::YFP* 的鞭毛内的运动状况。IFT46::YFP 的正向和反向运动速率分别为 $2.41 \mu\text{m/s}$ ($\text{S.D.} = 0.38, n = 149$) 和 $3.51 \mu\text{m/s}$ ($\text{S.D.} = 0.71, n = 145$)，这与以前报道的结果一致（图 3.5C, D）(Brown et al., 2015)。此外，IFT46::YFP 的正向频率为 1.88 tracks/s ($\text{S.D.} = 0.31, n = 21$)，这与 Brown 及其同事测定的结果一致（图 3.5E）(Brown et al., 2015)。IFT46::YFP 的反向频率为 2.04 tracks/s ($\text{S.D.} = 0.27, n = 20$)，这仅仅是 Brown 及其同事报道的数值的三分之二（图 3.5E）(Brown et al., 2015)。导致这一现象的可能原因是部分反向 IFT 在观察过程中被淬灭 (Dentler et al., 2009; Lechtreck, 2013, 2016)。总之，这些数据说明 28 kDa 的 YFP 标签不影响 IFT46 的运动和功能。

3.3.4 IFT46::YFP 的定位

融合 YFP 标签使得我们可以通过荧光显微镜观察 IFT46::YFP 的亚细胞定位。作为阴性对照，我们首先观察了 YFP 在 *ift46-1* *YFP* 中定位。结果显示 YFP 主要定位在胞质，尤其是细胞核周围，细胞核中仅有微弱的 YFP 信号（图 3.6A）。这一现象同时也在其他文献中被报道过 (Lauersen et al., 2015; Onishi and Pringle, 2016)。在 *ift46-1* *IFT46::YFP* 中，IFT46::YFP 聚集在基体且沿鞭毛呈点状分布（图 3.6A,B）(Brown et al., 2015; Deane et al., 2001; Hou et al., 2007)。这种点状分布使用全内反射荧光显微镜能够更清晰的观察到（图 3.6B）。由于这种定位模式与阴性对照相比完全不同，可以认为这种定位是 IFT46 特异性的。

3.4 讨论

本章我们通过在 *IFT46* 的缺失突变体 *ift46-1* 中表达 IFT46::YFP 来拯救其鞭毛缺失表型并观察 IFT46 的亚细胞定位。在已有的研究中，*IFT46* 的缺失突变体 *ift46-1* 可以通过导入外源表达的 IFT46 蛋白来恢复表型 (Lucker et al., 2010)，也可通过转化 *IFT46* 对应的基因组 DNA 片段来互补 (Hou et al., 2007)。本章我们在 *IFT46* 的启动子和编码序列之后融合了 *yfp* 基因 (Griesbeck et al., 2001)。实验证明这种方法也能够拯救 *IFT46* 的缺失突变体 *ift46-1*。IFT46::YFP 在 mRNA 和蛋

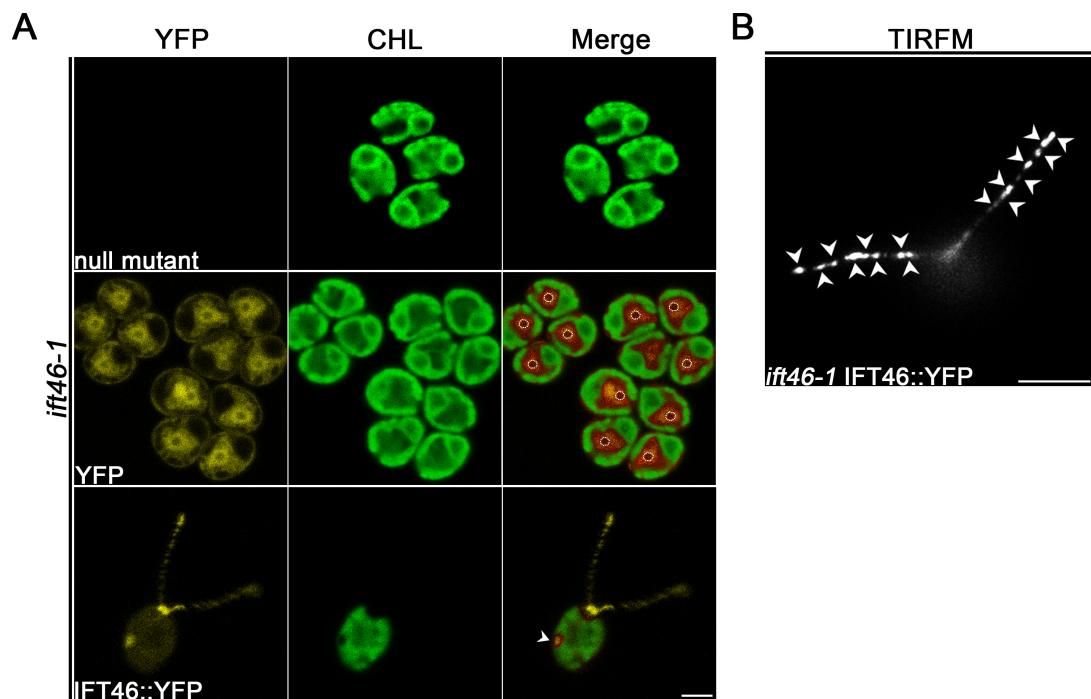


图 3.6 IFT46::YFP 定位在基体和鞭毛。 (A) *ift46-1*、*ift46-1* YFP 及 *ift46-1* IFT46::YFP 活细胞成像结果。白色虚线标记的是细胞核区域。白色箭头指向的是眼点，CHL 代表叶绿素，标尺代表 5 μm。 (B) *ift46-1* IFT46::YFP 鞭毛全内反射荧光显微成像结果。白色箭头标示的是 IFT 火车。标尺代表 5 μm。

Figure 3.6 YFP-tagged IFT46 localizes at the basal body and flagella. (A) Live cell imaging of non-transformed *ift46-1* cells and *ift46-1* expressing YFP or IFT46::YFP. White dashed circles mark the nucleus area. White arrow: eyespot; CHL: chlorophyll. Scale bar: 5 μ m. (B) TIRFM imaging of the flagella of *ift46-1* IFT46::YFP . White arrows mark IFT trains. Scale bar: 5 μ m.

水平上均与 CC-125 相似。后续的鞭毛相关表型测定结果也证明 YFP 标签并未影响 IFT46 的正常功能。

互补之后的藻株 *ift46-1* IFT46::YFP 的鞭毛长度、鞭毛率、IFT 运动速率及正向 IFT 运动频率均与 CC-125 或已报道结果无显著差异。然而其反向 IFT 运动频率仅为 Brown 等报道的数值的三分之二 (Brown et al., 2015)。一种可能的解释是，相比于正向 IFT，反向 IFT 往往更小且运动更快 (Lechtreck, 2013, 2016; Pigino et al., 2009; Stepanek and Pigino, 2016; Vannuccini et al., 2016)。这使得通过荧光成像来观察反向 IFT 变得相对困难，同时也更容易发生淬灭 (Dentler et al.,

2009; Lechtreck, 2013, 2016)。事实上，利用微分干涉相差显微镜测定的 IFT 运动频率大多比通过荧光成像测定的数值大 (Dentler et al., 2009; Lechtreck, 2013, 2016)。

荧光蛋白标签的存在使得我们能够通过荧光成像观察 IFT46 的亚细胞定位。作为阴性对照，我们在 *ift46-1* 中单独表达了 YFP。结果显示 YFP 主要定位在细胞质，尤其是细胞核周围。细胞核内部仅有微弱的 YFP 信号。这一现象同时也在其他研究中被观察到 (Lauersen et al., 2015; Onishi and Pringle, 2016)。理论上，28 kDa 的 YFP 能够从核孔通过自由扩散进入衣藻细胞核 (Breslow et al., 2013; Chih et al., 2011; Hu et al., 2010; Kee et al., 2012)。一种可能是 YFP 在 *IFT46* 内源性启动子的驱动下周期性表达 (Wood et al., 2012)，这使得大量的 YFP 无法及时扩散从而聚集在细胞核周围。然而使用衣藻看家基因启动子驱动的 YFP 也存在这种情况 (Lauersen et al., 2015; Onishi and Pringle, 2016)。这表明正常条件下 YFP 无法有效入核或被快速从核中运出。不管是何种情况，这可能与衣藻细胞核特殊的核孔结构及核转运机制有关。

3.5 小结

为了研究 IFT46 基体定位的分子机制，我们需要利用荧光蛋白标签快速有效的观察 IFT46 的亚细胞定位。本章我们利用 IFT46::YFP 成功恢复了 *IFT46* 的缺失突变体 *ift46-1* 的鞭毛相关表型。通过测定和观察互补之后的藻株 *ift46-1 IFT46::YFP* 的鞭毛相关表型我们证明荧光蛋白标签并不影响 IFT46 的功能和定位。同时我们也观察到 IFT46::YFP 主要定位在基体和鞭毛。

第四章 IFT46 基体和纤毛定位序列的鉴定

4.1 引言

许多纤毛蛋白，尤其是纤毛膜蛋白，包含纤毛定位序列 (Berbari et al., 2008a; Corbit et al., 2005; Dishinger et al., 2010; Hurd et al., 2011; McIntyre et al., 2015; Santos and Reiter, 2014)。这些纤毛定位序列介导了纤毛蛋白的基体和纤毛定位。然而，纤毛定位序列本身存在多样性 (Bhogaraju et al., 2013b; Malicki and Aridor-Reiss, 2014)。这表明多个不同的蛋白靶向系统参与了纤毛蛋白的基体和纤毛定位。已经鉴定的纤毛定位序列包括 GPCRs 的第三个胞内环、Ax(S/A)xQ、RVxP、核定位信号以及 SUMOylation 等 (Berbari et al., 2008a; Bhogaraju et al., 2013b; Corbit et al., 2005; Dishinger et al., 2010; Hurd et al., 2011; Malicki and Aridor-Reiss, 2014; McIntyre et al., 2015; Santos and Reiter, 2014)。然而在 IFT 蛋白尤其是 IFT46 中并未发现类似的定位序列。为此我们拟采用表达截短片段的方式来鉴定 IFT46 的基体和纤毛定位序列。

4.2 材料与方法

4.2.1 本研究所用仪器、试剂、培养基及溶液

如未在正文中特别说明，本研究所用仪器、试剂、培养基及溶液信息均列于附录部分。其中，仪器信息列于第 135 页的附录 A，试剂信息列于第 139 页的附录 B，培养基信息列于第 143 页的附录 C，溶液信息列于第 147 页的附录 D。

4.2.2 藻细胞株及菌株的培养

本章实验所用藻株有 CC-125 和 *ift46-1*。通过电转化、筛选获得的藻株列于第 151 页的附录 E。培养条件及方法参考第 39 页 3.2.2 部分。大肠埃希氏菌 DH5 α 菌株由本实验室保存。培养条件及方法参考第 39 页 3.2.2 部分。

4.2.3 计算机辅助分析

使用 PSIPRED¹ (Bryson et al., 2005; Buchan et al., 2013, 2010; Jones, 1999; McGuffin et al., 2000) 预测 IFT46 的二级结构和结构域边界。使用 GeneSilico Metadisorder (Kozlowski and Bujnicki, 2012) 预测 IFT46 的动态无序区。用 COILS Server (Lupas et al., 1991) 预测 IFT46 形成卷曲螺旋的概率。蛋白质理论分子量通过 Ex PASy² 中的 Compute pI/Mw³ 进行预测，其中“分辨率”选项设置为“平均”。

IFT46 的基因组 DNA 及蛋白序列均来源于 Joint Genome Institute Phytozome 12⁴ 中的 *Chlamydomonas reinhardtii* v5.5 数据库。团藻 (XP_002950030)、智人 (NP_001162089)、小鼠 (NP_076320)、秀丽隐杆线虫 (NP_001076770)、爪蟾 (NP_001090393)、黄牛 (NP_001068677)、家犬 (XP_536553)、大鼠 (NP_001019931)、鸡 (XP_417918)、斑马鱼 (XP_003199413)、紫海胆 (XP_795443)、日本血吸虫 (Q5DHJ5)、球石藻（颗石藻） (XP_005763582)、嗜热四膜虫 (XP_001017111) 以及蜜蜂 (XP_006565024) 的 IFT46 蛋白序列均来源于 NCBI⁵。用 Clustal W (Larkin et al., 2007) 对 IFT46 进行多重序列比对，比对后的序列在 CLC Sequence Viewer 7.7⁶ 中进行着色。

4.2.4 分子克隆

如未作特殊说明，分子克隆所用方法参考第 40 页 3.2.3 部分。

4.2.4.1 重叠延伸 PCR

为了使用 *IFT46* 自身的启动子表达 IFT46 的 C 端，我们需要使用重叠延伸 PCR (Bryksin and Matsumura, 2010; Quan and Tian, 2009, 2011)。其基本原理如图 4.1 所示：首先分别扩增片段 A 和片段 B，将回收得到的两个片段按 1:1 的摩尔比作为引物和模板加入到 PCR 体系中进行二次扩增。为了保证获得足够质量的片段 AB，这里至少需要加入 200 ng 的短片段 A。由于片段 A 和片段 B 含有重

¹<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

²Expert Protein Analysis System

³http://web.expasy.org/compute_pi/

⁴<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

⁵National Center for Biotechnology Information

⁶CLC bio, QIAGEN

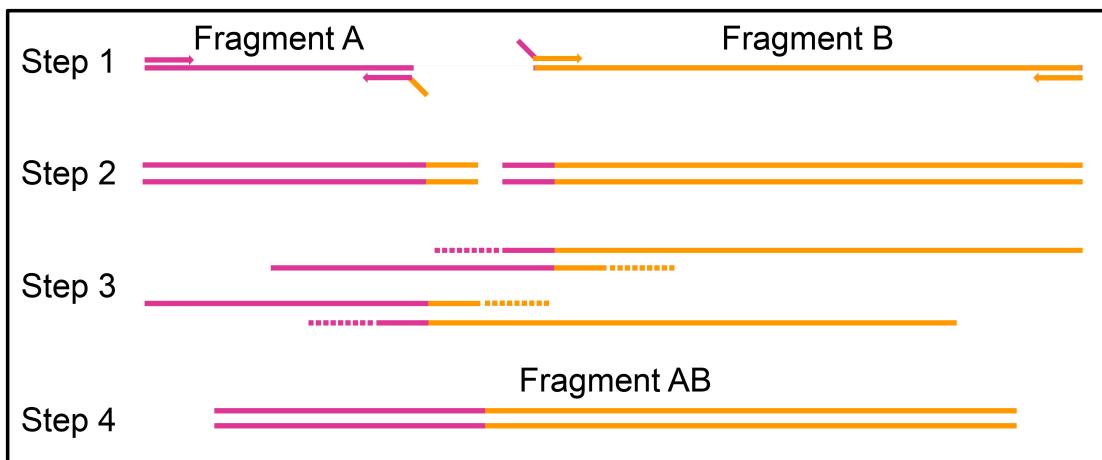


图 4.1 重叠延伸 PCR 的基本原理。第一步，独立扩增片段 A 和片段 B；第二步，电泳回收获得纯化的片段 A 和片段 B；第三步，片段 A 和片段 B 互为引物和模板进行重叠延伸扩增；第四步，电泳回收获得纯化的片段 AB。

Figure 4.1 Principle of splicing by overlap extension PCR. Step 1, amplify fragment A and B; Step 2, purify fragment A and B; Step 3, overlap extension PCR of fragment A and B; Step 4, purify fragment AB.

叠部分，二者在扩增过程中互为引物和模板。对扩增产物进行电泳并回收目的条带即可用于 TA 克隆。若片段 AB 两端带有酶切位点，可先用限制性内切酶进行切割。酶切产物经纯化后可用于连接反应。

4.2.4.2 利用寡核苷酸退火合成双链 DNA

为了快速经济的合成较短的双链 DNA，我们可以通过将寡核苷酸退火来实现 (Hu et al., 2014)。其基本原理如图 4.2 所示：将目标 DNA 截断为八个片段，片段之间存在至少 15 bp 的重叠区域。分别合成八个寡核苷酸片段并用去离子水溶解至终浓度为 100 mM。按表 4.1 加入试剂并利用 PCR 仪按表 4.2 进行反应。取反应产物进行电泳并回收目的条带即为所需要的双链 DNA。在实际操作过程中，寡核苷酸的条数不一定为八，只要保证单条引物的长度不操过 59 bp 且存在 15 bp 以上的重叠区域即可。此外，利用这种方法合成的双链 DNA 可以含平末端或粘性末端。这意味着合成产物不需要经过酶切步骤即可用于连接反应。

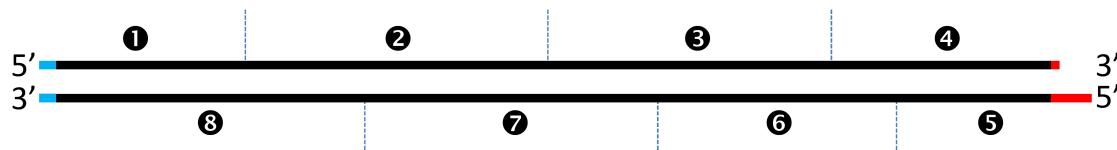


图 4.2 利用寡核苷酸退火合成双链 DNA 的原理示意图。数字代表不同的寡核苷酸，蓝色虚线代表截断位点。

Figure 4.2 Principle of rapid construction of double strand DNA using oligonucleotides. Numbers indicate different oligonucleotides. Blue dashed lines mark the truncated sites.

表 4.1 利用寡核苷酸退火合成双链 DNA 反应体系

Table 4.1 System of rapid construction of double strand DNA using oligonucleotides

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	体积 (Volume)
1	10xAnnealing buffer for DNA oligos	5 μ L
2	100 mM Oligo 1	5 μ L
3	100 mM Oligo 2	5 μ L
4	100 mM Oligo 3	5 μ L
5	100 mM Oligo 4	5 μ L
6	100 mM Oligo 5	5 μ L
7	100 mM Oligo 6	5 μ L
8	100 mM Oligo 7	5 μ L
9	100 mM Oligo 8	5 μ L
10	ddH ₂ O	To 50 μ L

表 4.2 利用寡核苷酸退火合成双链 DNA 反应程序

Table 4.2 Program of rapid construction of double strand DNA using oligonucleotides

步骤 (Steps)	温度 (Temperature)	反应时间 (Reaction Time)
1	94 °C	5 min
2	80 °C	10 min
3	75 °C	10 min
4	70 °C	10 min
5	65 °C	10 min
6	60 °C	10 min
7	55 °C	10 min
8	50 °C	10 min
9	40 °C	5 min
10	30 °C	5 min
11	20 °C	5 min
12	10 °C	∞

4.2.4.3 构建表达 IFT46 截短片段的载体

为了表达 IFT46 的截短片段，我们构建了 pHK231, pHK232, pHK233,

pHK243, pHK244 和 pHK245。这些载体在衣藻中分别表达 IFT46-N1, IFT46-N, IFT46 Δ C1, IFT46 Δ N1, IFT46-C 和 IFT46-C1。以 pGEM-T Easy-IFT46 为模板, 用引物 ACE-F 和 A-R 扩增获得 *IFT46-N1* 的编码序列, 扩增产物使用 *Nde*I 和 *Eco*RV 酶切后插入到 *Nde*I/*Eco*RV 消化后的 pHK86 中获得 pHK231。表达 IFT46-N (pHK232) 和 IFT46 Δ C1 (pHK233) 的载体使用类似的方法进行构建, 但使用的引物对分别为 ACE-F/C-R 和 ACE-F/E-R。为了获得能够表达 IFT46 Δ N1 的序列, 我们需要 *IFT46* 的启动子和 IFT46 Δ N1 的编码区两个元件。以 pGEM-T Easy-IFT46 为模板, 使用引物 ACE-F 和 B-R 进行扩增可获得 *IFT46* 的启动子序列, 使用引物 B-F 和 IFT46-R 进行扩增可获得 IFT46 Δ N1 的编码区序列。利用重叠延伸 PCR (参考第 62 页 4.2.4.1 部分) 将两个元件融合后用 *Nde*I 和 *Eco*RV 双酶切并连接到 *Nde*I/*Eco*RV 消化后的 pHK86 中, 由此获得表达 IFT46 Δ N1 的 pHK243。除引物不同外, pHK244 和 pHK245 的构建过程与 pHK243 类似。在 pHK244 的构建过程中, 使用引物对 ACE-F/D-R 扩增 *IFT46* 的启动子区, 使用引物对 D-F/IFT46-R 扩增 IFT46-C 的编码区。在 pHK245 的构建过程中, 使用引物对 ACE-F/F-R 扩增 *IFT46* 的启动子区, 使用引物对 F-F/IFT46-R 扩增 IFT46-C1 的编码区。

为了表达 IFT46-C1 的截短片段, 我们构建了 pHK308, pHK310, pHK309, pHK311, pHK312 和 pHK313。这些载体在衣藻中分别表达 BBTS1, BBTS2, BBTS3, BBTS4, BBTS5 和 BBTS6。以 pHK245 为模板, 用引物 BBTS-F/BBTS1-R 扩增获得 *BBTS1* 的编码序列, 扩增产物经 *Nde*I/*Eco*RV 酶切后克隆至 *Nde*I/*Eco*RV 消化的 pHK245, 由此获得表达 BBTS1 的 pHK308。pHK310 的构建过程与 pHK308 的构建方法类似, 不同之处在于使用了引物 BBTS-F 和 BBTS3-R。为了构建 pHK309, 我们需要 *IFT46* 的启动子和 *BBTS2* 的编码区两个元件。以 pHK245 为模板, 使用引物 BBTS-F 和 BBTS2-R 进行扩增可获得 *IFT46* 的启动子序列, 使用引物 BBTS2-F 和 IFT46-R 进行扩增可获得 *BBTS2* 的编码区序列。利用重叠延伸 PCR (参考第 62 页 4.2.4.1 部分) 将两个元件融合后用 *Nde*I 和 *Eco*RV 双酶切并连接到 *Nde*I/*Eco*RV 消化后的 pHK245 中, 由此获得表达 BBTS2 的 pHK309。pHK311、pHK312 和 pHK313 的构建过程与 pHK309 类似。在 pHK311 的构建过程中, 使用引物对 BBTS-F/BBTS4-R 扩增

IFT46 的启动子区，使用寡核苷酸 BBTS4-1、BBTS4-2、BBTS4-3、BBTS4-4 和 BBTS4-5 退火合成 *BBTS4* 的编码区（参考第 63 页 4.2.4.2 部分）。在 pHK312 的构建过程中，使用引物对 BBTS-F/BBTS5-R1 扩增 *IFT46* 的启动子区，使用引物对 BBTS5-F/BBTS5-R2 扩增 *BBTS5* 的编码区。在 pHK313 的构建过程中，使用引物对 BBTS-F/BBTS6-R 扩增 *IFT46* 的启动子区，使用寡核苷酸 BBTS6-6、BBTS6-7、BBTS4-2、BBTS4-3 和 BBTS4-5 退火合成 *BBTS6* 的编码区。

克隆所用载体以及构建的载体的详细信息见第 155 页的附录 F，克隆所用引物信息见第 157 页的附录 G。

4.2.5 衣藻电转化

参考第 46 页 3.2.4 部分。

4.2.6 鞭毛提取

参考 Behal and Cole (2013)、Cole et al. (1998)、Richey and Qin (2013) 和 Witman et al. (1972) 等人的方法并稍作修改，具体步骤如下。

- (1) 培养 100 mL 藻细胞至对数生长期。
- (2) 将 200 mL 藻液转接到 5L 液体 TAP 培养基中，曝气培养至细胞浓度达 5.0×10^7 cells/mL。3500 g 室温离心五分钟，弃上清，沉淀用 1 L 10 mM HEPES 重悬。
- (3) 将细胞悬液转入 1 L 烧杯中，300 rpm 搅拌光照培养两小时使其鞭毛恢复。3500 g 室温离心五分钟，弃上清，沉淀用 75 mL 10 mM HEPES 重悬。
- (4) pH shock (Hunter et al., 2016; Lefebvre, 1995)：用 0.5 M HAc 调节 pH 值至 4.5，等待三十秒待鞭毛脱落，立即用 0.5 M KOH 调节 pH 值至 7.2，显微镜观察鞭毛是否脱落。
- (5) 将悬液置于冰上，加入 30 mL 含 25% 蔗糖的 10 mM HEPES 混匀。
- (6) 将细胞悬液转移到 500 mL 离心瓶中，用带长针管的注射器向其底部缓慢注入 50 mL 含 25% 蔗糖的 10 mM HEPES，4 °C 2500 g 离心十分钟。将上清转移至 50 mL 离心管中，用注射器向离心管底部缓慢注入 5 mL 含 25% 蔗糖的 10 mM HEPES，4 °C 2500 g 离心十分钟。
- (7) 将上清转移至 50 mL 圆底离心管中，4 °C 10000 g 离心十分钟，在管

底可见乳白色沉淀即为提取出来的鞭毛，用100 μL 含蛋白酶抑制剂（Sigma-Aldrich, #P9599, U.S.）的1xHMDEK 溶解后 -80 °C 保存。

(8) 如需要分离轴丝或纤毛膜、基质蛋白，使用含 0.1% NP-40 和蛋白酶抑制剂的 1xHMDEK 溶解鞭毛沉淀，4 °C 反应三十分钟后 4 °C 16800 g 离心十分钟，沉淀即为轴丝蛋白，上清即为纤毛膜、基质蛋白。

4.2.7 SDS-PAGE 及免疫印迹分析

SDS-PAGE 参考第 47 页 3.2.5 部分。免疫印迹分析参考第 49 页 3.2.6 部分。检测所用抗体的信息见第 163 页的附录 H。

4.2.8 显微观察

显微观察及活细胞成像参考第 52 页 3.2.9 部分。

4.2.9 免疫共沉淀

参考 Richey and Qin (2013)、Fowkes and Mitchell (1998) 和 Silva et al. (2012) 的方法并稍作修改，具体步骤如下。

- (1) 培养 10 L 藻细胞，参考第 66 页 4.2.6 部分提取鞭毛。
- (2) 使用 500 μL 含有蛋白酶抑制剂的 1xHMDEK 重悬鞭毛沉淀，利用液氮和 30 °C 温水冻融三次释放可溶性蛋白。
- (3) 4 °C, 16800 g 离心十分钟，收集上清。
- (4) 4 °C, 100000 g 离心十分钟进一步除去不可溶蛋白。重复该过程一次。
- (5) 用 1xHMDEK 缓冲液洗涤蛋白 A 标记的琼脂糖珠¹三次，用含 3% BSA 的 1xHMDEK 缓冲液室温封闭琼脂糖珠一小时。
- (6) 取前面获得的纤毛膜/基质可溶性蛋白溶液 50 μL，加入 30 μL 抗 HA 抗体，混匀后冰上孵育两小时。对照组加等体积的鼠 IgG。
- (7) 取 20 μL 处理过的琼脂糖珠加入到混合液中，4 °C 旋转反应过夜。
- (8) 4 °C, 4000 g 离心一分钟收集琼脂糖珠，用 500 μL 含 0.05% NP-40 的 1xHMDEK 室温洗涤琼脂糖珠三次，每次三分钟。

¹protein A-sepharose from *Staphylococcus aureus*, Sigma P3391

(9) 4 °C, 4000 g 离心一分钟收集琼脂糖珠，加入 25 μL 的 2xLaemmli 上样缓冲液，沸水煮十分钟后立即置于冰上冷却。

(10) 4 °C, 4000 g 离心一分钟收集上清即可用于免疫印迹检测。

4.2.10 蔗糖密度梯度离心

参考 Fuhrmann et al. (1999)、Richey and Qin (2012)、Behal and Cole (2013) 和 Richey and Qin (2013) 的方法并稍做修改，具体步骤如下。

(1) 培养 20 L 藻并提取鞭毛，鞭毛的提取方法参考第 66 页 4.2.6 部分。向提取的鞭毛中加 200 μL 含有 0.5% NP-40 和蛋白酶抑制剂的 1xHEMDEK 使之溶解。液氮冻融两次。

(2) 涡旋反应十分钟后 4 °C, 16800 g 离心十分钟。

(3) 取上清 200 μL 再次离心，取上清 150 μL 再次离心得到 100 μL 上清。此步勿多取，否则样品中所含不可溶蛋白将影响密度梯度离心且离心后管底含有大量不贴壁沉淀影响分装。余下的上清可以用作免疫印迹分析时的阳性对照。

(4) 在 MLS50 专用离心管中制备 25%-20%-15%-10% 蔗糖梯度，每个梯度各 500 μL。制备方法为先铺高浓度蔗糖溶液，再依次铺低浓度蔗糖溶液。将离心管置于管套中盖上盖子，4 °C 静置过夜待其通过自由扩散产生连续梯度

(5) 在蔗糖上方沿管壁缓慢加入 100 μL 样品后用石蜡油补平至管口。为避免杂质对离心产生干扰，所用石蜡油需先经 0.22 μm 滤膜过滤。

(6) 4 °C, 200000 g 离心 4.5 个小时，取出离心管吸走石蜡油和样品层（样品层一般呈浅黄色）。用移液器每 80 μL 沿管壁取样，总计分装二十四管。

(7) 每管取 15 μL 样品加 5 μL 5xLoading buffer 在沸水中煮五分钟后立即置于冰上冷却三分钟。样品可立即用于 SDS-PAGE 和免疫印迹分析，也可置于 -20 °C 保存备用。

4.2.11 统计分析

参考第 53 页 3.2.10 部分。

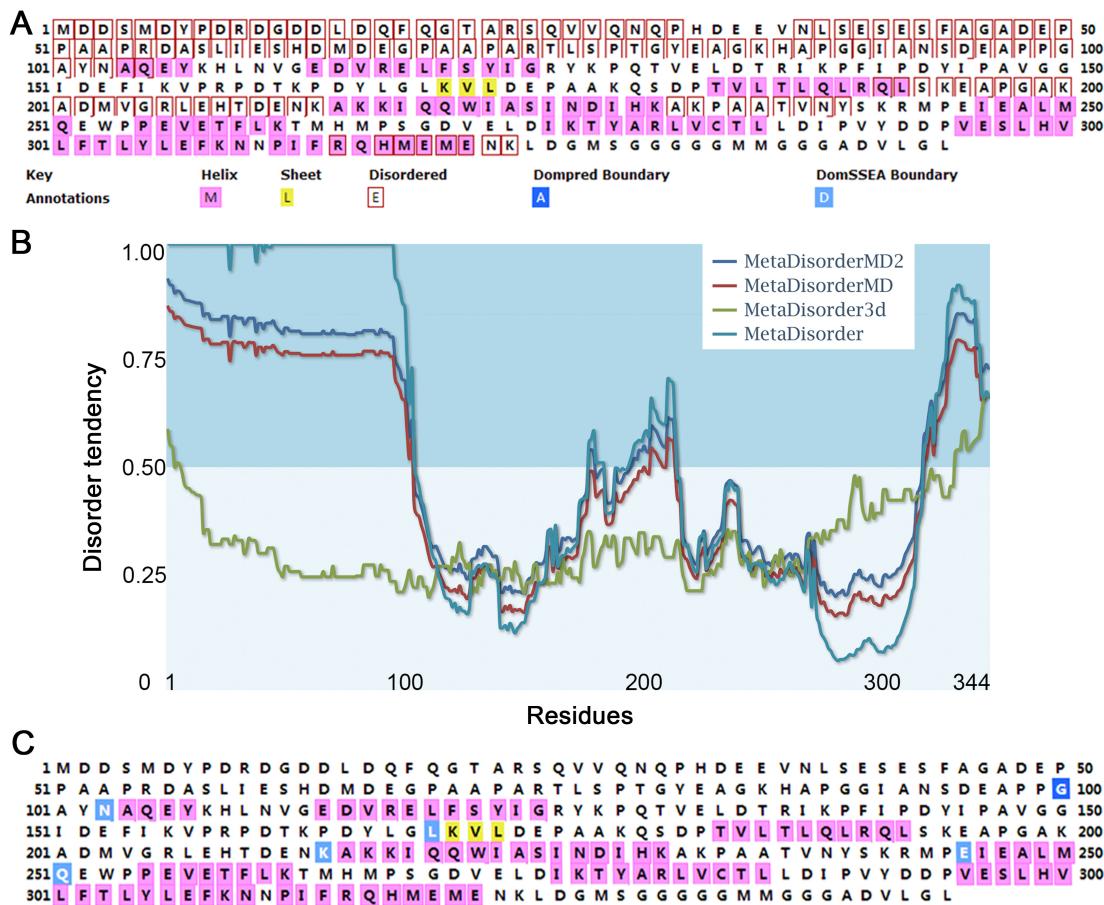


图 4.3 IFT46 二级结构和超二级结构预测。(A) IFT46 二级结构预测。各符号的含义列于图片下方。(B) 蛋白无序趋势预测显示 IFT46 的 N 端和 C 端为动态无序区。0.5 为动态无序的截断值。大于 0.5 的区域代表动态无序区，小于 0.5 的区域代表有序区。(C) 使用 PSIPRED DomPred 预测 IFT46 可能的结构域边界。图中深蓝色和浅蓝色方块标注的位点即为可能的结构域边界。

Figure 4.3 Advanced structure predictions of IFT46. (A) Secondary structure prediction of IFT46. Meanings of symbols were given below. (B) Protein disorder prediction indicates that the N-terminus and the C-terminus tail of IFT46 are largely disordered. The line at 0.5 (vertical axis) is the cutoff for disorder (> 0.5) and order (< 0.5) predictions. Curved lines with different colors represent results returned by four different meta method as shown. (C) Domain prediction of IFT46 using PSIPRED DomPred. Potential domain boundaries were shown in colored boxes. In detail, sites 100/103/169/214/245/251 are all potential domain boundaries.

4.3 结果

4.3.1 IFT46 主要由 α 融合组成

本章我们拟采用表达截短片段的方式来鉴定 IFT46 的基体和纤毛定位序列。为了寻找合适的截断位点，我们首先对 IFT46 的二级结构和超二级结构进行了分析。PSIPRED 的预测结果显示 IFT46 主要由 α 融合组成，其 N 端和 C 端为动态无序区（图 4.3A）。GeneSilico Metadisorder 的预测结果也显示 IFT46 的 N 端和 C 端为动态无序区的概率高于阈值（0.5）（图 4.3B）。为了确定 IFT46 的截断位点，我们利用 PSIPRED DomPred 预测了 IFT46 可能的结构域边界。预测结果显示第 100、103、169、214、245 和 251 号氨基酸残基均为可能的结构域边界（图 4.3C）。结合前面二级结构和动态无序区预测的结果，我们最终选定第 103 号、第 169 号和第 245 号氨基酸残基为下一步研究的截断位点（图 4.5A）。

4.3.2 构建表达 IFT46 截短片段的载体

根据前面的分析，我们选定第 103、169 和 245 号氨基酸残基为截断位点。为此我们构建了 pHK231、pHK232、pHK233、pHK 243、pHK244 和 pHK245。这些载体在衣藻中分别表达 IFT46-N1、IFT46-N、IFT46 Δ C1、IFT46 Δ N1、IFT46-C 和 IFT46-C1。如图 4.4 所示，所有载体均经酶切验证。比如 pHK231 和 pHK244，目的条带大小分别为 1.3 kbp 和 2.2 kbp。在实际电泳结果中它们的大小分别在 1.3 kbp 和 2.2 kbp 左右。选定酶切大小正确的克隆进行测序验证，没有发生错义突变的克隆即用于后续实验。

4.3.3 IFT46-C1 是 IFT46 的基体定位序列

将前面构建的载体转化至 *ift46-1* 中。由于没有任何片段能够拯救或部分拯救 *ift46-1* 的鞭毛缺失表型，我们使用抗 GFP 的抗体通过免疫印迹筛选出阳性克隆。免疫印迹结果显示所有融合蛋白均正常表达且分子量与预期大小一致（图 4.5B）。比如 IFT46-N::YFP 的理论分子量大小为 46.3 kDa，免疫印迹结果显示其分子量约 50 kDa 左右（图 4.5B 泳道 4）。

接下来我们利用激光共聚焦显微镜观察了 IFT46 的截短片段在细胞体中的定位。融合蛋白 IFT46-N1::YFP、IFT46-N::YFP 和 IFT46 Δ C1::YFP 没有聚集在基

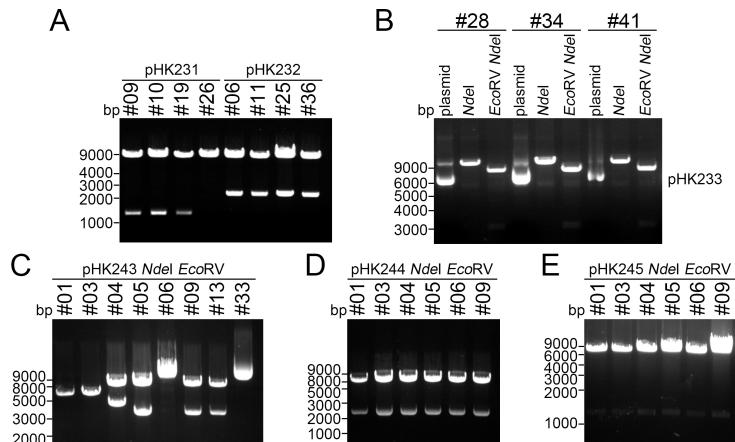


图 4.4 pHK231、pHK232、pHK233、pHK243、pHK244 和 pHK245 酶切产物电泳图。(A) 四个 pHK231 及四个 pHK232 疑似阳性克隆酶切后的电泳结果。(B) 三个 pHK233 疑似阳性克隆酶切后的电泳结果。(C) 八个 pHK243 疑似阳性克隆酶切后的电泳结果。(D) 六个 pHK244 疑似阳性克隆酶切后的电泳结果。(E) 六个 pHK245 疑似阳性克隆酶切后的电泳结果。所有质粒均用 *NdeI* 和 *EcoRV* 双酶切。这些载体双酶切后目的条带的理论大小依次为 1.3 kbp、2.2 kbp、3.2 kbp、3.1 kbp、2.2 kbp 和 1.3 kbp。

Figure 4.4 Agarose gel electrophoresis of restriction enzymes-digested pHK231, pHK232, pHK233, pHK243, pHK244, and pHK245. (A) Agarose gel electrophoresis of four suspected positive clones of pHK231 and pHK232. (B) Agarose gel electrophoresis of three suspected positive clones of pHK233. (C) Agarose gel electrophoresis of eight suspected positive clones of pHK243. (D) Agarose gel electrophoresis of six suspected positive clones of pHK244. (E) Agarose gel electrophoresis of six suspected positive clones of pHK245. All plasmids are digested with *NdeI* and *EcoRV*). In theory, the target band sizes of these plasmids are 1.3 kbp, 2.2 kbp, 3.2 kbp, 3.1 kbp, 2.2 kbp and 1.3 kbp, respectively.

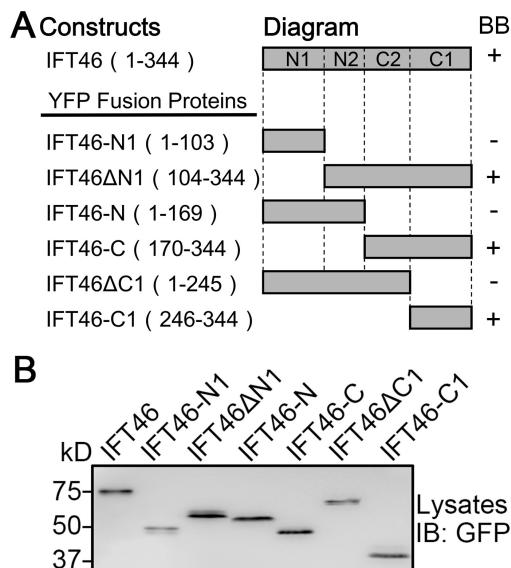


图 4.5 在 *ift46-1* 中表达 IFT46 的截短片段。(A) 全长和截短的 IFT46 的示意图。所有片段的 C 端均融合了黄色荧光蛋白。(B) 阳性克隆全细胞裂解液免疫印迹分析。图片底部的数字代表泳道编号。IB 代表免疫印迹。

Figure 4.5 Expression of truncated IFT46 in *ift46-1*. (A) Diagram of the full-length and the truncated IFT46 produced in this study. YFPs are fused to the C-termini of full-length and the truncated IFT46. (B) Immunoblots of whole-cell lysates (5 µg protein per lane) probed with anti-GFP antibody. Numbers at the bottom indicate separate lanes. IB: immunoblot.

体周围而是在细胞体中均匀分布（图 4.5A, 4.6A）。然而，IFT46 Δ N1::YFP、IFT46-C::YFP 和 IFT46-C1 确能够继续定位在基体（图 4.5A, 4.6A）。由于 IFT46 Δ N1::YFP、IFT46-C::YFP 和 IFT46-C1 均含有 C1 结构域，这表明 C1 结构域是 IFT46 的基体定位序列。

4.3.4 构建表达 IFT46-C1 截短片段的载体

由于绝大多数已知的定位序列均比 IFT46-C1（99个氨基酸残基）短 (Berbari et al., 2008a; Bhogaraju et al., 2013b; Dishinger et al., 2010; Hurd et al., 2011; Malicki and Avidor-Reiss, 2014; McIntyre et al., 2015; Santos and Reiter, 2014)，我们进一步将 IFT46-C1 截短为六个片段。为此我们构建了 pHK308、pHK310、pHK309、pHK311、pHK312 和 pHK313。这些载体在衣藻中分别表达 BBTS1、BBTS2、BBTS3、BBTS4、BBTS5、和 BBTS6。如图 4.7 所示，所有载体均经酶切验证。比如 pHK308 和 pHK313，目的条带大小分别约为 850 bp 和 900 bp。在实际电泳结果中它们的大小在 800-900 bp 之间。选定酶切大小正确的克隆进行测序验证，没有发生错义突变的克隆即用于后续实验。

4.3.5 BBTS3 是 IFT46 的基体定位序列

将前面构建的载体转化至 *ift46-1* 中，使用抗 GFP 的抗体通过免疫印迹筛选出阳性克隆（图 4.8B）。免疫印迹结果显示所有融合蛋白均正常表达且分子量与预期大小一致（图 4.8B）。取阳性克隆进行活细胞成像，结果显示 BBTS1::YFP、BBTS2::YFP、BBTS4::YFP、BBTS5::YFP 和 BBTS6::YFP 均无法继续定位在基体（图 4.6B），而 BBTS3::YFP 可继续在基体附近聚集（图 4.6B）。这些结果表明 BBTS3（76 个氨基酸残基）是我们目前鉴定到的最短的 IFT46 的基体定位序列。

4.3.6 IFT46-C1/BBTS3 是 IFT46 的纤毛定位序列

前面我们发现 IFT46-C1 和 BBTS3 是 IFT46 的基体定位序列（图 4.10）。接下来的问题是它们是否也是 IFT46 的纤毛定位序列。为了阐明这个问题，我们将全长 IFT46 和 IFT46 的截短片段表达在野生型 CC-125 细胞中。利用抗 GFP 的抗体我们通过免疫印迹筛选出阳性克隆（图 4.9A）。结果显示所有融合蛋白均正

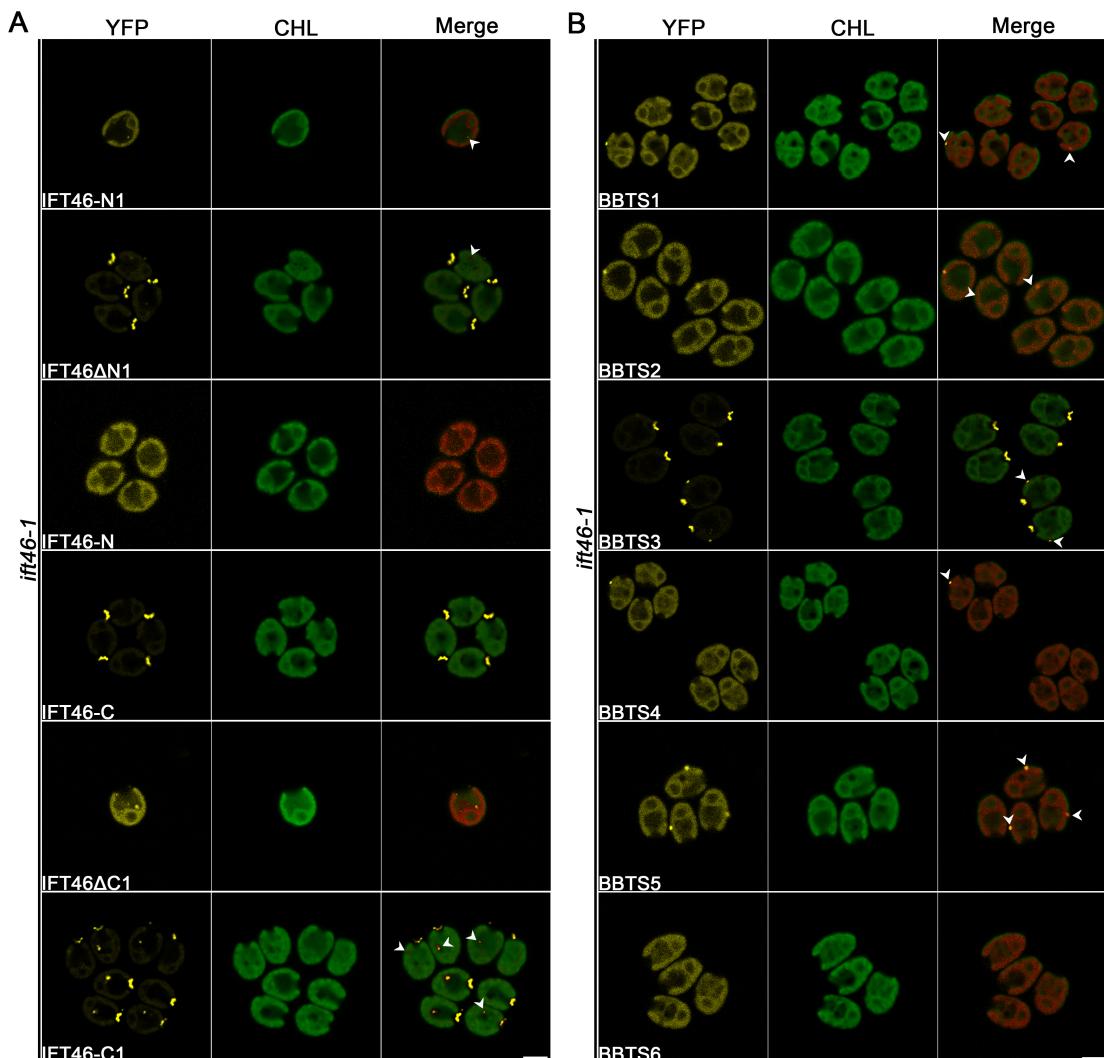


图 4.6 IFT46-C1 和 BBTS3 是 IFT46 的基体定位序列。(A) 表达IFT46-N1::YFP、IFT46 Δ N1::YFP、IFT46-N::YFP、IFT46-C::YFP、IFT46 Δ C1::YFP 或 IFT46-C1::YFP 的 *ift46-1* 的藻株的共聚焦成像结果。(B) 表达 BBTS1::YFP、BBTS2::YFP、BBTS3::YFP、BBTS4::YFP、BBTS5::YFP 或 BBTS6::YFP 的 *ift46-1* 藻株的共聚焦成像结果。在 A 和 B 中，白色箭头代表眼点，CHL 代表叶绿素，标尺代表 5 μm 。

Figure 4.6 IFT46-C1 and BBTS3 are the basal body targeting sequences of IFT46. (A) Confocal imaging of *ift46-1* expressing IFT46-N1::YFP, IFT46 Δ N1::YFP, IFT46-N::YFP, IFT46-C::YFP, IFT46 Δ C1::YFP or IFT46-C1::YFP separately. (B) Confocal imaging of *ift46-1* expressing BBTS1::YFP, BBTS2::YFP, BBTS3::YFP, BBTS4::YFP, BBTS5::YFP or BBTS6::YFP separately. In panel A and B, White arrows: eyespots; CHL: chlorophyll; Scale bars represent 5 μm .

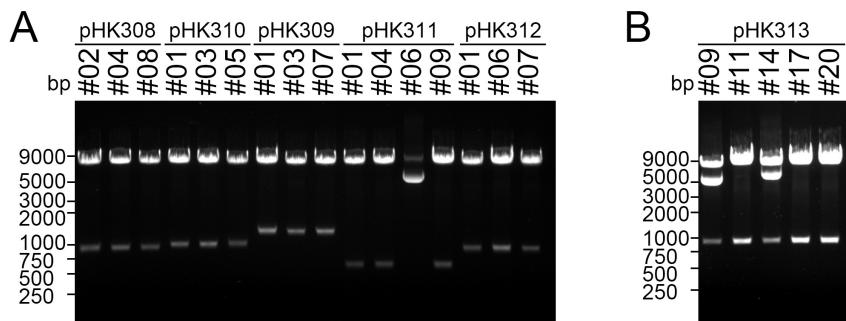


图 4.7 pHK308、pHK310、pHK309、pHK311、pHK312 和 pHK313 酶切产物电泳图。(A) 三个 pHK308，三个 pHK310，三个 pHK309，四个 pHK311 以及三个 pHK312 疑似阳性克隆经 *NdeI*、*EcoRV* 酶切后的电泳结果。这些载体双酶切后目的条带的理论大小依次为 850 bp、900 bp、1200 bp、550 bp 和 830 bp。其中 pHK311 的 #06 号克隆为阴性，其余所有克隆均为阳性。(B) 五个 pHK313 疑似阳性克隆经 *NdeI*、*EcoRV* 酶切后的电泳结果。其目的条带理论大小为 900 bp。结果显示 #11、#17 和 #20 号克隆为阳性。

Figure 4.7 Agarose gel electrophoresis of restriction enzymes-digested pHK308, pHK310, pHK309, pHK311, pHK312, and pHK313. (A) Agarose gel electrophoresis of suspected positive clones of pHK308, pHK310, pHK309, pHK311 and pHK312 (digested with *NdeI* and *EcoRV*). In theory, the target band sizes of these vectors are 850 bp, 900 bp, 1200 bp, 550 bp and 830 bp, respectively. Clone #06 of pHK311 is negative and all other clones are positive according to the band size. (B) Agarose gel electrophoresis of three suspected positive clones of pHK313 (digested with *NdeI* and/or *EcoRV*). The target band size is 900 bp. Clone #11, #17, and #20 of pHK313 are positive according to the band size.

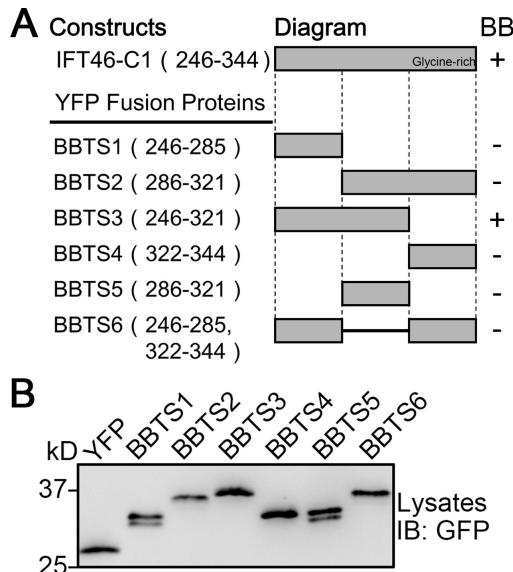


图 4.8 在 *ift46-1* 中表达 IFT46-C1 的截短片段。(A) 全长和截短的 IFT46-C1 的示意图。所有片段的 C 端均融合了黄色荧光蛋白。(B) 阳性克隆全细胞裂解液免疫印迹分析。图片底部的数字代表泳道编号。IB 代表免疫印迹。

Figure 4.8 Truncated IFT46-C1 expressed well in *ift46-1*. (A) Diagram of the full-length and the truncated IFT46-C1 produced in this study. YFPs are fused to the C-termini of full-length and the truncated IFT46-C1. (B) Immunoblots of whole-cell lysates (5 μg protein per lane) probed with anti-GFP antibody. Numbers at the bottom indicate separate lanes. IB: immunoblot.

常表达且分子量与预期大小一致（图 4.9A）。利用共聚焦成像，我们观察了这些融合蛋白的亚细胞定位。结果显示 IFT46::YFP、IFT46ΔN1::YFP、IFT46-C::YFP 和 IFT46-C1::YFP 主要定位在基体和鞭毛（图 4.10A）。然而，与在 *ift46-1* 中的结果一致，IFT46-N1::YFP、IFT46-N::YFP 和 IFT46ΔC1::YFP 无法定位在基体（图 4.10A）。有意思的是，通过免疫印迹我们能够在鞭毛中检测到所有的融合蛋白（图 4.9C）。由于共聚焦显微镜可能无法观察到鞭毛中微弱的荧光信号，我们借助全内反射荧光显微镜发现鞭毛中确实存在 IFT46-N1::YFP、IFT46-N::YFP 和 IFT46ΔC1::YFP 的微弱信号（图 4.10C）。这些荧光信号均匀分布且无法移动。由于这三个融合蛋白的分子量均小于 100 kDa，它们极有可能是通过自由扩散穿越转变区进入纤毛的 (Breslow et al., 2013; Chih et al., 2011; Hu et al., 2010; Kee et al., 2012)。以上结果再次证明 IFT46-C1 是 IFT46 的基体定位序列，同时也说明 IFT46-C1 是 IFT46 的纤毛定位序列。

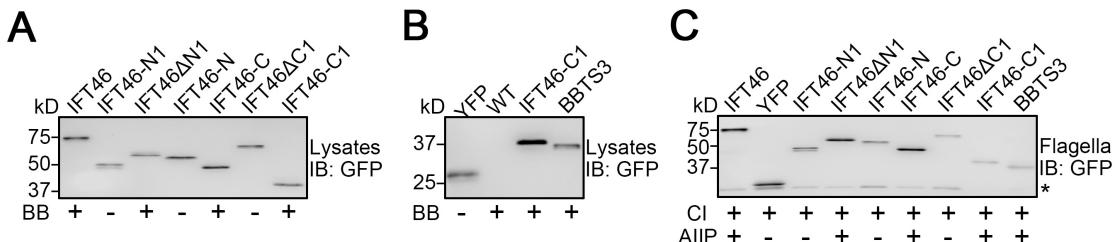


图 4.9 在 CC-125 中表达 IFT46 的截短片段。(A, B) 阳性克隆全细胞裂解液免疫印迹分析。WT 代表野生型 CC-125 细胞。BB 代表基体。加号代表对应的蛋白定位在基体，减号则相反。(C) 阳性克隆鞭毛膜/基质免疫印迹分析。CI 代表纤毛，AIIP 代表蛋白组装在 IFT 复合物中。加号代表对应的蛋白能够进入纤毛且组装在 IFT 复合物中。减号则相反。在 A、B 和 C 中，图片底部的数字代表泳道编号。IB 代表免疫印迹。

Figure 4.9 Expression of truncated IFT46 in CC-125. (A, B) Immunoblots of whole-cell lysates (5 μ g protein per lane) of CC-125 expressing indicated proteins probed with the anti-GFP antibody. WT: WT CC-125 cells; BB: the basal body. Plus signs mean the corresponding proteins localize in the basal body region. While minus signs indicate not. IB: immunoblot. Numbers at the bottom indicate lanes. (C) Immunoblot of flagellar membrane-plus-matrix fractions of CC-125 expressing indicated proteins probed with the indicated antibodies. CI: cilia; AIIP: assembled in IFT particles. Plus signs mean the corresponding proteins entered into cilia and assembled in IFT particle. While minus signs indicate not. IB: immunoblot. Numbers at the bottom indicate lanes.

由于 BBTS3 是我们目前鉴定到的最短的 IFT46 的基体定位序列，我们希望知道 BBTS3 是否也是 IFT46 的纤毛定位序列。然而，将 pHK309 转化至野生型 CC-125 细胞中，我们筛选了两百个转化子未能获得阳性克隆。这可能是由于 BBTS3 在 CC-125 中表达量低或不稳定造成的。由于我们能够获得 *ift46-1 BBTS3*，我们将 *IFT46* 的基因组 DNA 和 pHyg3 共转化至 *ift46-1 BBTS3* 从而得到 *ift46-1 BBTS3::YFP IFT46* (图 4.9B)。理论上，*ift46-1 BBTS3::YFP IFT46* 与 CC-125 BBTS3 相当。共聚焦和全内反射荧光显微成像结果显示 BBTS3 定位在基体和鞭毛且能够沿鞭毛作双向运动 (图 4.10B, C)。总之，BBTS3 是 IFT46 中已知最短的纤毛定位序列。

与 IFT46-C1 相比，BBTS3 缺少 C 端的甘氨酸尾巴，这段富含甘氨酸的肽段在其他物种的 IFT46 中并不存在 (图 4.11)。通过免疫印迹分析我们发现在有全

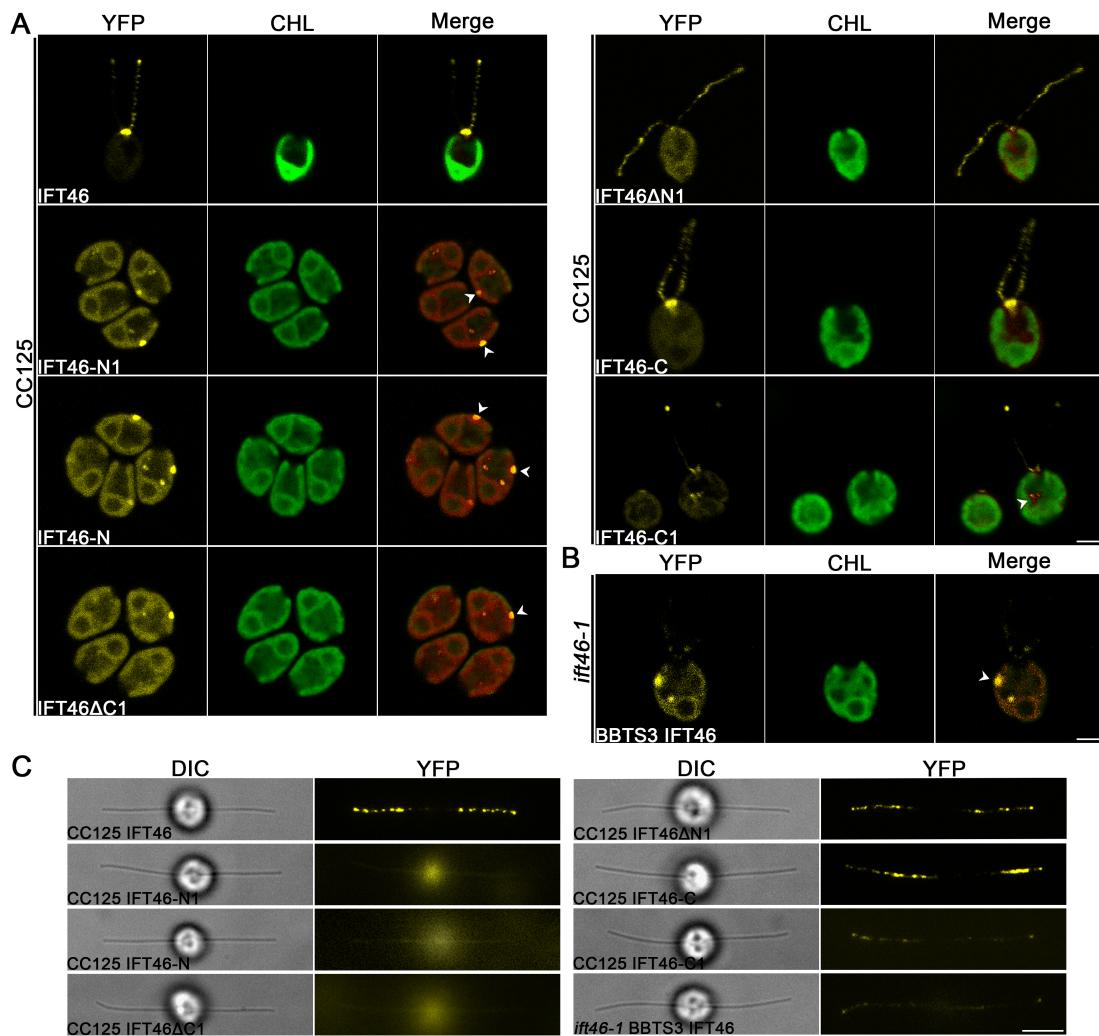


图 4.10 IFT46-C1 和 BBTS3 是 IFT46 的纤毛定位序列。(A) 表达 IFT46::YFP、IFT46-N1::YFP、IFT46ΔN1::YFP、IFT46-N::YFP、IFT46-C::YFP、IFT46ΔC1::YFP 或 IFT46-C1::YFP 的 CC-125 藻株的共聚焦成像结果。(B) 表达 BBTS3::YFP 和 IFT46 的 *ift46-1* 藻株的共聚焦成像结果。在 A 和 B 中白色箭头代表眼点。(C) A 和 B 中藻株的鞭毛的全内反射荧光显微成像结果。左侧为微分干涉成像图片。在 A-C 中，标尺代表 5 μm。

Figure 4.10 IFT46-C1 and BBTS3 are the ciliary targeting sequences of IFT46. (A) Confocal imaging of CC-125 expressing IFT46::YFP, IFT46-N1::YFP, IFT46ΔN1::YFP, IFT46-N::YFP, IFT46-C::YFP, IFT46ΔC1::YFP, IFT46-C1::YFP separately. White arrows: eyespots; CHL: chlorophyll. (B) Confocal imaging of *ift46-1* expressing BBTS3::YFP and IFT46. White arrows: eyespots; CHL: chlorophyll. (C) TIRFM imaging of the flagella of the strains listed in A and B. Differential interference contrast images are shown on the left. CHL: chlorophyll. In panel A-C, scale bars represent 5 μm.

长 IFT46 存在的情况下，IFT46-C1 的表达水平下降至 30%（图 4.12A, B）。在有全长 IFT46 存在的情况下，BBTS3 的表达水平与 IFT46-C1 相当（图 4.12C, D）。然而，相比于 IFT46-C1，BBTS3 在全长 IFT46 存在的情况下稳定性更差。在阳性克隆传代的过程中该蛋白更容易丢失或沉默。这表明莱茵衣藻 IFT46 中的甘氨酸尾巴可能有助于提高其稳定性。由于这一原因，我们选用 IFT46-C1 进行后续实验。

4.3.7 IFT46-C1 与其他 IFT-B 亚基相互作用

IFT46-C1 和 BBTS3 能够进入鞭毛且沿轴丝双向运动，这表明它们可能与全长 IFT46 一样能够组装到 IFT-B 复合物中 (Fan et al., 2010; Lucke et al., 2005, 2010; Taschner et al., 2011, 2014)。为了证实这一点，我们分离了 CC-125 *IFT46-C1::YFP* 的鞭毛并获得其鞭毛膜/基质部分。通过免疫共沉淀实验我们发现，与全长 IFT46 一样，IFT46-C1 能够与 IFT81、IFT74/72 和 IFT52 形成复合物（图 4.13A）。蔗糖密度梯度离心的结果也显示 IFT46-C1 能够与 IFT-B 复合物中的 IFT81 形成复合物（图 4.13A）。以上结果表明 IFT46-C1 能够通过与其他 IFT-B 亚基互作组装到 IFT-B 复合物中。

4.4 讨论

本章我们通过在 *IFT46* 的缺失突变体 *ift46-1* 和野生型 CC-125 细胞中表达 IFT46 的截短片段成功鉴定到 IFT46 的基体和纤毛定位序列。IFT46-C1 可被认为是 IFT46 的基体和纤毛定位序列，因为它满足下列标准。一，IFT46-C1 是 IFT46 基体定位所必须的。当 IFT46-C1 被删除的时候，IFT46ΔC1 无法定位在基体和鞭毛（图 4.6）。二，IFT46-C1 能够将与鞭毛无关的蛋白 YFP 靶向至基体和纤毛（图 4.6）。以上事实表明，IFT46-C1 是 IFT46 基体和纤毛定位的充分必要条件。然而，与其他定位序列相比（如 GPCRs 的第三个胞内、Ax(S/A)xQ、RVxP、核定位信号以及 SUMOylation 等），IFT46-C1 的长度明显偏大 (Berbari et al., 2008a; Bhogaraju et al., 2013b; Dishinger et al., 2010; Hurd et al., 2011; Malicki and Avidor-Reiss, 2014; McIntyre et al., 2015; Santos and Reiter, 2014)。这表明参与 IFT46 基体定位的蛋白运输系统不是这些已知途径。考虑到 IFT46-C1 和 BBTS3

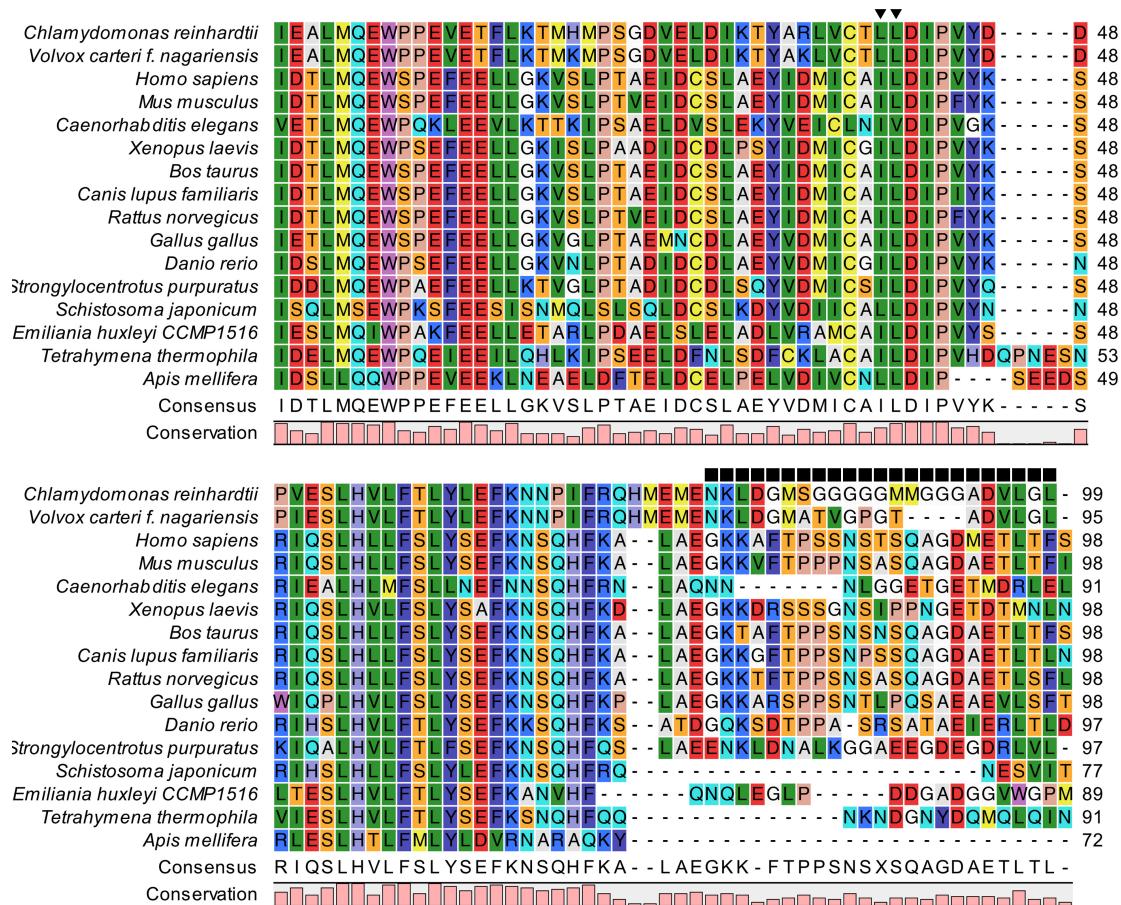


图 4.11 IFT46-C1 在进化上高度保守。来自不同物种（衣藻、团藻、智人、小鼠、秀丽隐杆线虫、爪蟾、黄牛、家犬、大鼠、鸡、斑马鱼、紫海胆、日本血吸虫、球石藻（颗石藻）、嗜热四膜虫以及蜜蜂）的 IFT46-C1 的多重序列比对结果显示 IFT46 的 C 端在进化上高度保守。黑色三角形代表选定的用于定点突变的两个亮氨酸残基。黑色正方形代表衣藻 IFT46 特有的富含甘氨酸的尾巴。一致序列和代表保守程度的图形显示在序列下方。

Figure 4.11 IFT46-C1 is highly conserved in evolution. The amino acid sequences of IFT46-C1 from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri f. nagariensis*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Bos taurus*, *Canis lupus familiaris*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Danio rerio*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Schistosoma japonicum*, *Emiliania huxleyi CCMP1516*, *Tetrahymena thermophila*, and *Apis mellifera* were aligned. The black triangles mark the two critical hydrophobic leucines we chosen for mutagenesis. The black squares mark the glycine-rich tail of CrIFT46. The consensus sequence and the graph showing percentages of conservation are given at the bottom.

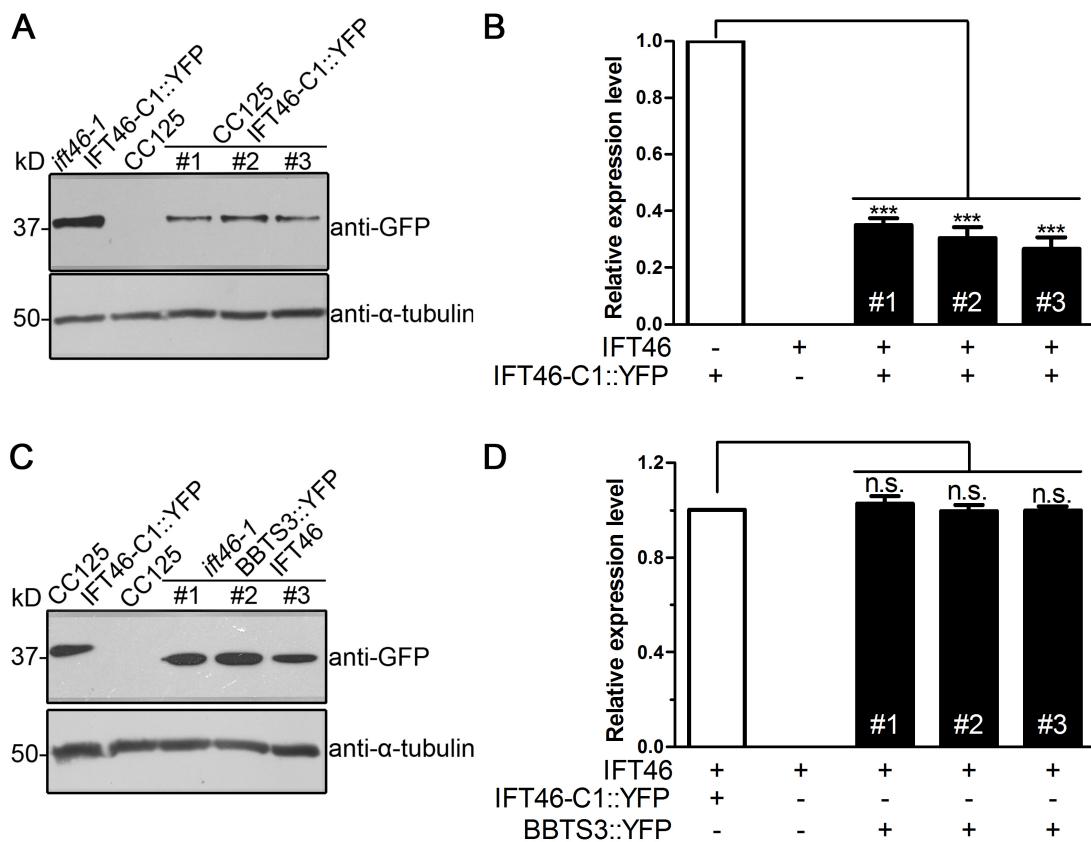


图 4.12 IFT46-C1 和 BBTS3 在全长 IFT46 存在的条件下表达水平的变化。(A) *ift46-1 IFT46-C1::YFP*、CC-125 和 CC-125 *IFT46-C1::YFP* 全细胞裂解液免疫印迹分析。(B) IFT46-C1::YFP 在 CC-125 和 *ift46-1* 中的相对表达水平。(C) CC-125 *IFT46-C1::YFP*、CC-125 和 *ift46-1 BBTS3::YFP IFT46* 全细胞裂解液免疫印迹分析。(D) BBTS3::YFP 在 *ift46-1 BBTS3::YFP IFT46* 中与 IFT46-C1::YFP 在 CC-125 中表达水平的比较。

Figure 4.12 The expression level of IFT46-C1 and BBTS3 in the presence of full-length IFT46. (A) Western blots of whole-cell lysates (3 μ g protein per lane) of *ift46-1 IFT46-C1::YFP*, CC-125, and CC-125 *IFT46-C1::YFP* probed with the indicated antibodies. (B) Relative expression level of IFT46-C1::YFP in CC-125 in three transformants compared to the expression level of IFT46-C1::YFP in *ift46-1*. (C) Western blots of whole-cell lysates (3 μ g protein per lane) of CC-125 *IFT46-C1::YFP*, CC-125, and *ift46-1 BBTS3::YFP IFT46* probed with the indicated antibodies. (D) Relative expression level of BBTS3::YFP in *ift46-1 BBTS3::YFP IFT46* in three transformants compared to the expression level of IFT46-C1::YFP in CC-125.

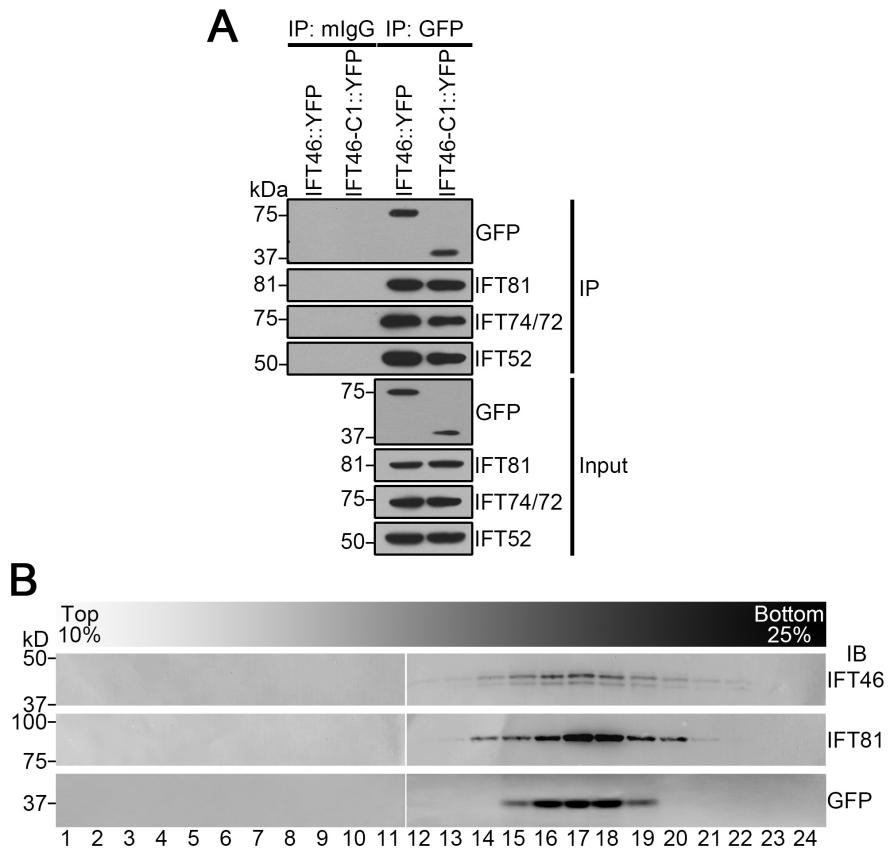


图 4.13 IFT46-C1 组装在IFT复合物中。(A) 以 *ift46-1 IFT46::YFP* 和 CC-125 *IFT46-C1::YFP* 和鞭毛膜/基质为材料, 使用抗 GFP 的抗体免疫沉淀带 YFP 标签的 IFT46-C1。使用抗 IFT81、IFT74/72 和 IFT52 的抗体进行检测。mIgG 代表鼠 IgG。(B) 使用蔗糖密度梯度离心对 CC-125 *IFT46-C1::YFP* 的鞭毛膜/基质部分进行分析。图中抗 IFT46 的抗体检测到两条带是磷酸化造成的。IB 代表免疫印迹。图片下方的数字为组分编号。

Figure 4.13 IFT46-C1 is assembled into IFT machinery. (A) Anti-GFP antibody was used to immunoprecipitate YFP-tagged IFT46-C1 from the flagellar membrane-plus-matrix of *ift46-1 IFT46::YFP* and CC-125 *IFT46-C1::YFP*. Immunoblots of the precipitate were probed with antibodies against IFT81, IFT74/72 and IFT52. mIgG: mouse IgG; IP: immunoprecipitation. Numbers at the bottom indicate lanes. (B) Flagellar membrane-plus-matrix of CC-125 *IFT46-C1::YFP* was separated by sucrose density gradient centrifugation and analyzed by immunoblots probed with antibodies as indicated. IFT46 migrates as doublet bands due to phosphorylation. IB: immunoblot. Numbers at the bottom indicate fractions.

能够进入纤毛且沿轴丝做双向运动, IFT46-C1 或 BBTS3 可能通过与其他IFT亚基形成复合物完成基体和纤毛定位。

我们同时发现 IFT46-C1 和 BBTS3 均为 IFT46 的基体和纤毛定位序列（图 4.6、4.10）。在全长 IFT46 存在的条件下, IFT46-C1 和 BBTS3 的表达量均下降至原来的 30%（图 4.12）。然而, 在全长 IFT46 存在的情况下, BBTS3 在传代过程中更容易丢失或沉默。考虑到 BBTS3 仅比 IFT46-C1 少一段甘氨酸尾巴（图 4.5），我们推测 IFT46 的甘氨酸尾巴可能有助于维持其稳定。IFT46 的甘氨酸尾巴为动态无序区，其N端也为动态无序结构（图 4.3）。研究表明 IFT46 的 N 端可增强 IFT46 与 ODA16 之间的相互作用 (Ahmed et al., 2008; Ahmed and Mitchell, 2005; Hou et al., 2007; Taschner et al., 2011)。因此, IFT46 的甘氨酸尾巴可能通过增强 IFT46 与其他蛋白如 IFT52 之间的相互作用来提高其稳定性。

4.5 小结

通过表达截短片段的方式我们发现 IFT46-C1 和 BBTS3 是 IFT46 的基体定位序列, 同时它们也是 IFT46 的纤毛定位序列。此外我们还发现 IFT46-C1 可通过与 IFT-B 复合物中的其他亚基相互作用形成复合物。这暗示我们 IFT46 的基体和纤毛定位可能与其他 IFT 亚基有关。

第五章 IFT52 结合并招募 IFT46 至基体

5.1 引言

在前一章的研究中我们鉴定到了 IFT46 的基体和纤毛定位序列。同时我们发现其定位序列能够与其他 IFT 蛋白相互作用形成复合物从而沿轴丝做双向运动。这暗示我们 IFT46 是在其他 IFT 相关蛋白的帮助下定位到基体。为了找到 IFT46 的上游运载蛋白，我们拟在 IFT 相关蛋白的缺失突变体中表达 IFT46 或 IFT46-C1。如果 IFT46 的基体定位不依赖某个 IFT 蛋白，那么 IFT46 应该能够继续定位在基体。否则 IFT46 将无法成功定位在基体。

5.2 材料与方法

5.2.1 本研究所用仪器、试剂、培养基及溶液

如未在正文中特别说明，本研究所用仪器、试剂、培养基及溶液信息均列于附录部分。其中，仪器信息列于第 135 页的附录 A，试剂信息列于第 139 页的附录 B，培养基信息列于第 143 页的附录 C，溶液信息列于第 147 页的附录 D。

5.2.2 藻细胞株及菌株的培养

本章实验所用藻株有 CC-125、*ift46-1*、*bld1*、*ift122-1*、*ift88 null*、*ift81-2*、*dhc1b null* 和 *fla10-2*。其中 *ift122-1* 和 *ift81-2* 由清华大学的潘俊敏教授馈赠。通过电转化、筛选获得的藻株列于第 151 页的附录 E。培养条件及方法参考第 39 页 3.2.2 部分。大肠埃希氏菌 DH5 α 菌株由本实验室保存。培养条件及方法参考第 39 页 3.2.2 部分。

5.2.3 计算机辅助分析

IFT52 的基因组 DNA 及蛋白序列均来源于 Joint Genome Institute Phytozome 12¹ 中的 *Chlamydomonas reinhardtii* 5.5 数据库。嗜热四膜虫 TtIFT52C/46C 的晶

¹<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

体结构文件下载自 RCSB Protein Data Bank¹ (ID: 4UZZ) (Taschner et al., 2014)。衣藻 CrIFT52C/46C 的三维结构根据 TtIFT52C/46C 的晶体结构利用 Phyre2 进行模拟产生 (Kelley et al., 2015)。获得的结构文件用 Protein Workshop (Moreland et al., 2005; Xu and Zhang, 2009) 进行观察并找出 IFT52C 和 IFT46C 结合界面上关键的疏水残基用于定点突变。

5.2.4 分子克隆

如未作特殊说明，分子克隆所用方法参考第 40 页 3.2.3 部分和第 62 页 4.2.4 部分。

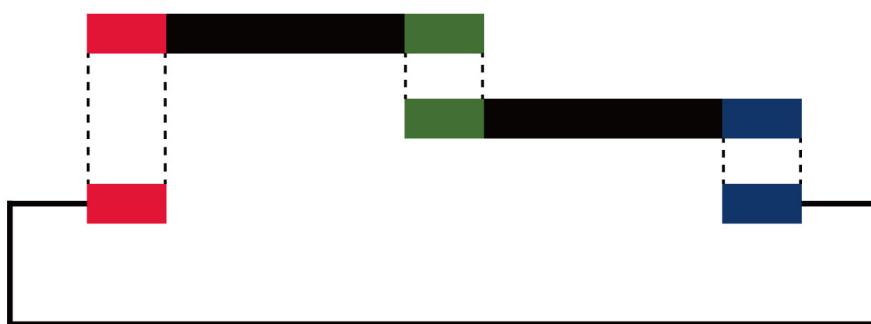


图 5.1 In-Fusion 同源重组克隆方法示意图。通过 PCR 获得的 DNA 片段和线性化载体被 In-Fusion 重组酶融合成完整载体。图中彩色方框代表重叠的 15 bp 片段。

Figure 5.1 Schematic diagram of In-Fusion HD cloning method. PCR-generated sequences and linearized vector are fused together by In-Fusion enzyme. Colored boxes at ends of DNA fragments are 15 bp overlap.

5.2.4.1 In-Fusion 同源重组克隆

In-Fusion 同源重组克隆的原理如图 5.1 所示 (Gibson et al., 2009; Marsischky and LaBaer, 2004)。使用 In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Cat#639636)，按表 5.1 加入各试剂后混匀，瞬时离心后 50 °C 反应三十分钟，冰上静置一分钟。将所有的反应产物用于热激转化，转化方法参考第 43 页 3.2.3.6 部分。从平板上挑二十四个单克隆至含有 1 mL LB 液体培养基（含 100 µg/mL 氨苄青霉素）的 2 mL 离心管中，37 °C 培养过夜后进行菌液 PCR 鉴定，引物为 IFT52seq-F 和 IFT52seq-R。选择三个阳性克隆扩大培养抽提质粒进行酶切验证。

¹<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

表 5.1 In-Fusion 同源重组克隆反应体系

Table 5.1 Reaction system for In-Fusion cloning

编号 (Number)	试剂 (Reagents)	质量或体积 (Mass or Volume)
1	IFT52 promoter	100 ng
2	IFT52C	100 ng
3	<i>NdeI SdaI</i> digested pHK470	50 ng
4	5x In-Fusion Enzyme Premix	1 μ L
5	ddH ₂ O	To 5 μ L

5.2.4.2 定点突变

使用全式金点突变试剂盒进行定点突变，基本原理如图 5.2 所示 (Higuchi et al., 1988; Ko and Ma, 2005; Zheng et al., 2004)。具体步骤如下。

- (1) 使用 GeneTool Lite 设计引物 SDM-F 和 SDM-R。
- (2) 使用下列体系进行 PCR 扩增：质粒模板，5 ng；10 μ M SDM-F，1 μ L；10 μ M SDM-R，1 μ L；2xTransStart FastPfu PCR SuperMix，25 μ L；ddH₂O，至 50 μ L。其中质粒模板必须来源于非甲基化缺陷型菌株，如实验室常用的 DH5 α 和 DH10 β 。PCR 反应程序如下：95 °C 预变性五分钟；95 °C，二十秒；60 °C，二十秒；72 °C，两分钟；循环二十次；72 °C 补时延伸十分钟。
- (3) 向 PCR 产物中加入 1 μ L DMT 酶，混匀后瞬时离心，37 °C 孵育一小时。
- (4) 取 5 μ L DMT 酶消化产物加入到 50 μ L 感受态细胞中进行热激转化，具体步骤参考第 43 页 3.2.3.6 部分。
- (5) 取 200 μ L 菌液均匀的涂在抗性平板上，在 37 °C 培养箱中过夜培养。
- (6) 挑取单克隆接种到含 1 mL LB 培养基（含 100 μ g/mL 的氨苄青霉素）的 1.5 mL 离心管中培养过夜，取 100 μ L 菌液测序。选择突变成功的单克隆抽提质粒进行后续实验。

5.2.4.3 载体构建

为了拯救 *IFT52* 的缺失突变体 *bldI*，我们构建了 pHK250（表达 *IFT52::YFP* 和巴龙霉素抗性基因）、pHK268（表达 *IFT52::YFP* 和潮霉素抗性基因）和 pHK409（表达 *IFT52::3HA* 和巴龙霉素抗性基因）。以 CC-503 的基因组 DNA 为模板，用引物 *IFT52A-F* 和 *IFT52B-R* 扩增 *IFT52* 的基因组 DNA。扩增产物经

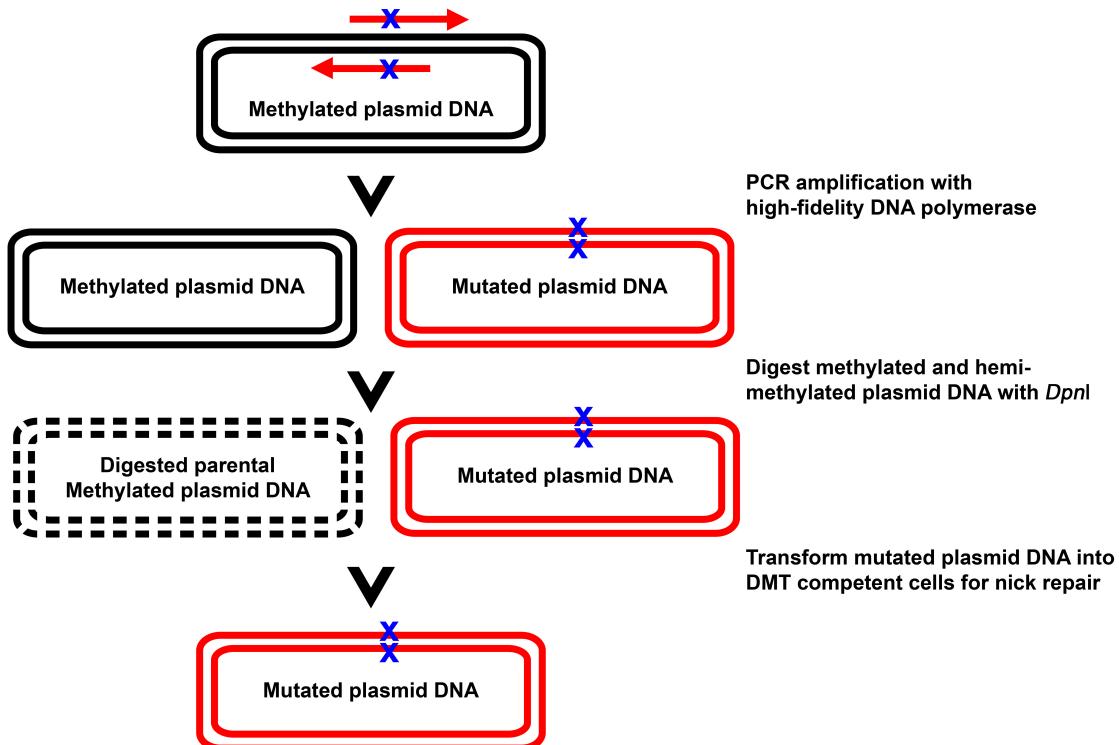


图 5.2 定点突变原理示意图。首先利用重叠引物通过反向 PCR 扩增获得带突变的质粒。然后用 *Dpn*I 消化甲基化和半甲基化的模板。最后将消化后的产物转化至 DMT 感受态细胞中完成缺口修复。

Figure 5.2 Overview of the TRANS Fast Site-directed Mutagenesis System. The first step is to obtain mutated plasmid DNA using overlapped primers through reverse PCR. Then, the methylated and semi-methylated plasmid DNA in the amplification products are digested with *Dpn*I. Finally, digested-products are transformed into DMT competent cells for nick repair.

*Nde*I/*Eco*RV 双酶切后连接到 *Nde*I/*Eco*RV 消化后的 pHK86 或 pHK266，分别获得 pHK250 和 pHK268。为了在 IFT52 的 C 端融合 3xHA 标签，使用寡核苷酸 HA1、HA2、HA3 和 HA4 退火合成 3xHA 的核酸序列并连接到 *Eco*RV/*Eco*RI 消化后的 pHK250，由此获得表达 IFT52::3HA 的 pHK409（参考第 63 页 4.2.4.2 部分）。

使用 *Nde*I/*Eco*RV 将 IFT46-C1 的编码序列从 pHK245 上切割下来并将其连接到 *Nde*I/*Eco*RV 消化后的 pHK266 中，由此获得表达 IFT46-C1 和潮霉素抗性基因的 pHK242。为了破坏 IFT46-C1 和 IFT52 之间的相互作用，我们使用引物 SDM-F 和 SDM-R 对 pHK242 进行了定点突变（参考第 87 页 5.2.4.2 部分）。由此产生的载体 pHK267 可表达 IFT46-C1^{L285E/L286E}::YFP。

为了构建表达 YFP::NLS 的 pHK464，我们利用 *EcoRV/EcoRI* 双酶切将 pHK469 上的第二个 *yfp* 基因切除并插入 4xSV40 NLS。4xSV40 NLS 是通过五条寡核苷酸 4xNLS-1F、4xNLS-2R、4xNLS-3F、4xNLS-4R 和 4xNLS-5R 退火产生的。以 pHK464 为模板，用引物 NLS-F 和 NLS-R 扩增 *yfp*-NLS 序列。扩增产物经 *SmaI/EcoRI* 双酶切后连接到经 *EcoRV/EcoRI* 消化后的 pHK409 中，由此获得 pHK470。为了构建表达 IFT52C::YFP::NLS 的 pHK473，我们以 pHK470 为模板，利用引物 IFT52C-F 和 IFT52C-R 进行扩增，扩增产物经纯化后利用 In-Fusion 方法重组克隆（参考第 86 页 5.2.4.1 部分）。

5.2.5 衣藻电转化

参考第 46 页 3.2.4 部分。

5.2.6 autolysin 的制备

参考 *Chlamydomonas Resource Center*¹ 上提供的关于 autolysin 制备的方法（Preparation of Gamete Autolysin²）并稍作修改，具体步骤如下。

(1) 将 CC-125 (mt+) 和 CC-124 (mt-) 分别从 TAP 平板上转接至含 150 mL TAP 培养基的三角瓶内，震荡培养至细胞浓度约 3.0×10^6 cells/mL。

(2) 将上一步活化的细胞分别转移至含有 500 mL TAP 培养基的三角瓶内，震荡培养至细胞浓度约 3.0×10^6 cells/mL。

(3) 1500 g 离心五分钟，弃上清。沉淀用 500 mL M-N 培养基重悬后再次离心弃上清。用 1 L M-N 培养基重悬后分装至两个 2 L 的三角瓶中，此时藻细胞浓度应接近 1.0×10^6 cells/mL。

(4) 连续光照震荡培养 18-19 小时诱导配子形成。后期定时取 700 μ L 不同交配型的细胞，混匀后离心并用 70 μ L M-N 重悬，三十分钟后镜检观察交配情况。

(5) 若交配效率大于百分之八十则 20 °C，1600 g 离心五分钟收集细胞，细胞沉淀用 50 mL M-N 重悬，此时细胞密度约 4.0×10^7 cells/mL。

¹<http://www.chlamycollection.org/>

²<http://www.chlamycollection.org/methods/preparation-of-gamete-autolysin/>

(6) 震荡培养六十分钟左右使鞭毛恢复。若鞭毛率高于百分之五十则可进行交配。

(7) 将等量不同交配型的配子细胞混合后强光低速震荡孵育三十分钟。交配过程中配子细胞会释放 autolysin。

(8) 20 °C, 3500 g 离心七分钟, 将上清转移到 50 mL 离心管中, 9000 g 离心十五分钟, 取上清用 0.45 μm 滤器过滤除菌并于 -20 °C 保存备用。

5.2.7 衣藻细胞核提取

使用植物叶片细胞核提取试剂盒并参考 Winck et al. (2011) 的方法进行衣藻细胞核提取, 具体步骤如下。

(1) 培养 250 mL 藻细胞至对数早期 (细胞浓度约 6.0×10^6 cells/mL), 4 °C, 3500 g 离心两分钟收集藻细胞。用 50 mL autolysin 处理细胞六十分钟后离心回收 autolysin, 沉淀用 5 mL 1xNIB 溶液洗涤一次。再次离心弃上清, 沉淀用 600 μL 1xNIB 溶液重悬。衣藻 autolysin 的制备方法参考第 89 页 5.2.6 部分。

(2) 将悬液转移到用液氮预冷的研钵中研磨成黄绿色粉末。

(3) 将粉末转移到 50 mL 圆底离心管中, 加入 10 mL 1xNIBA 溶液, 混匀后冰上静置十分钟。

(4) 使用水平转头离心机 4 °C, 1260 g 离心十分钟, 弃上清。

(5) 用 10 mL 含 1% Triton X-100 的 1xNIBA 重悬沉淀, 用移液管吹打混匀后瞬时离心, 冰上静置十分钟。使用水平转头离心机 4 °C, 1000 g 离心三十分钟, 弃上清。

(6) 取沉淀重复裂解一次, 离心弃上清。

(7) 用 1 mL 1xNIBA 重悬沉淀并转移到 2 mL 离心管中, 4 °C, 600 g 离心十分钟, 弃上清。重复洗涤一次即得到乳白色细胞核沉淀。

(8) 用 50 μL 保存液重悬沉淀并置于 -80 °C 保存。

5.2.8 SDS-PAGE 及免疫印迹分析

SDS-PAGE 参考第 47 页 3.2.5 部分。免疫印迹分析参考第 49 页 3.2.6 部分。检测所用抗体的信息见第 163 页的附录 H。

5.2.9 衣藻免疫荧光

衣藻的免疫荧光参考已有方法 (Deane et al., 2001; Kusnier et al., 2006; LeDizet and Piperno, 1986; Wood et al., 2012; Wykoff et al., 1999) 并稍作修改，具体步骤如下。检测所用抗体的信息见第 163 页的附录 H。

(1) 将盖玻片置于无水乙醇中浸泡过夜，取出后室温晾干并置于 0.1% 聚乙烯亚胺¹中浸泡两分钟，室温晾干备用。

(2) 取 1 mL 处于对数生长期的藻细胞（细胞密度约 4.0×10^6 cells/mL），3000 g 室温离心一分钟，弃上清。

(3) 沉淀用 1 mL 新鲜 TAP 培养基重悬，室温静置两分钟后离心弃上清。

(4) 沉淀用 100 μ L PBS 缓冲液重悬后备用。

(5) 取 50 μ L 藻液滴加在盖玻片中央，室温静置十分钟使藻细胞沉降吸附在盖玻片上。

(6) 将盖玻片置于 -20 °C 甲醇中浸泡十分钟后室温晾干五分钟，用 PBS 缓冲液浸泡三次，每次五分钟。

(7) 向盖玻片中央滴加 200 μ L 山羊血清封闭液室温封闭一小时。

(8) 移除封闭液，使用含有一抗的山羊血清封闭液 4 °C 孵育过夜。

(9) 移除一抗孵育液，使用含 0.5% 吐温 20 的 PBS 缓冲液洗涤三次，每次十分钟。

(10) 使用含有二抗的山羊血清封闭液室温孵育一小时。

(11) 移除二抗孵育液，使用含 0.5% 吐温 20 的 PBS 缓冲液洗涤三次，每次十分钟。最后用去离子水洗涤一次后彻底移除盖玻片上的液体。加 5 μ L 抗荧光淬灭剂后将盖玻片覆盖在载玻片上并移除气泡。使用无色指甲油封闭四周。

(12) 将制备的玻片置于暗盒中干燥两小时以上。若不立即进行显微观察可置于 4 °C 长期保存。

5.2.10 免疫共沉淀

免疫共沉淀参考第 67 页 4.2.9 部分。

¹Polyethyleneimine, PEI

5.2.11 GST pull-down分析

本实验由德国马普生化所的 Esben Lorentzen 教授（现在奥胡斯大学分子生物与遗传系）实验室完成，以下为简要的实验步骤。

(1) 将 CrIFT46（包括野生型和突变型）和 CrIFT52C 单独或同时转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中。

(2) 挑取单克隆在 LB 液体培养基中培养至 OD₆₀₀ 为 1，此过程中保持培养温度为 37 °C。

(3) 将培养温度调整到 18 °C，向培养基中加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG 诱导蛋白表达。维持该条件培养过夜。

(4) 取 100 μL 培养液室温 25000 g 离心 3 分钟，沉淀用 50 μL 的 1xSDS 上样缓冲液重悬后沸水煮十分钟。裂解液室温 25000 g 离心十分钟，上清即为大肠杆菌全细胞裂解液。

(5) 将其余的细胞沉淀用裂解液重悬，细胞悬液于 4 °C 25000 g 离心三十分钟，收集上清用于 GST pull-down 分析。

(6) 取上一步中的上清与 GSH-resin 于 4 °C 孵育两小时，用裂解液洗涤珠子两次，然后用含 20 mM 还原型谷胱甘肽的裂解液将珠子上结合的蛋白洗脱下来。

(7) 将大肠杆菌裂解液及 GST pull-down 分析实验中的洗脱液用 SDS-PAGE 进行分析。

5.2.12 显微观察

显微观察及活细胞成像参考第 52 页 3.2.9 部分。

5.2.13 统计分析

参考第 53 页 3.2.10 部分。

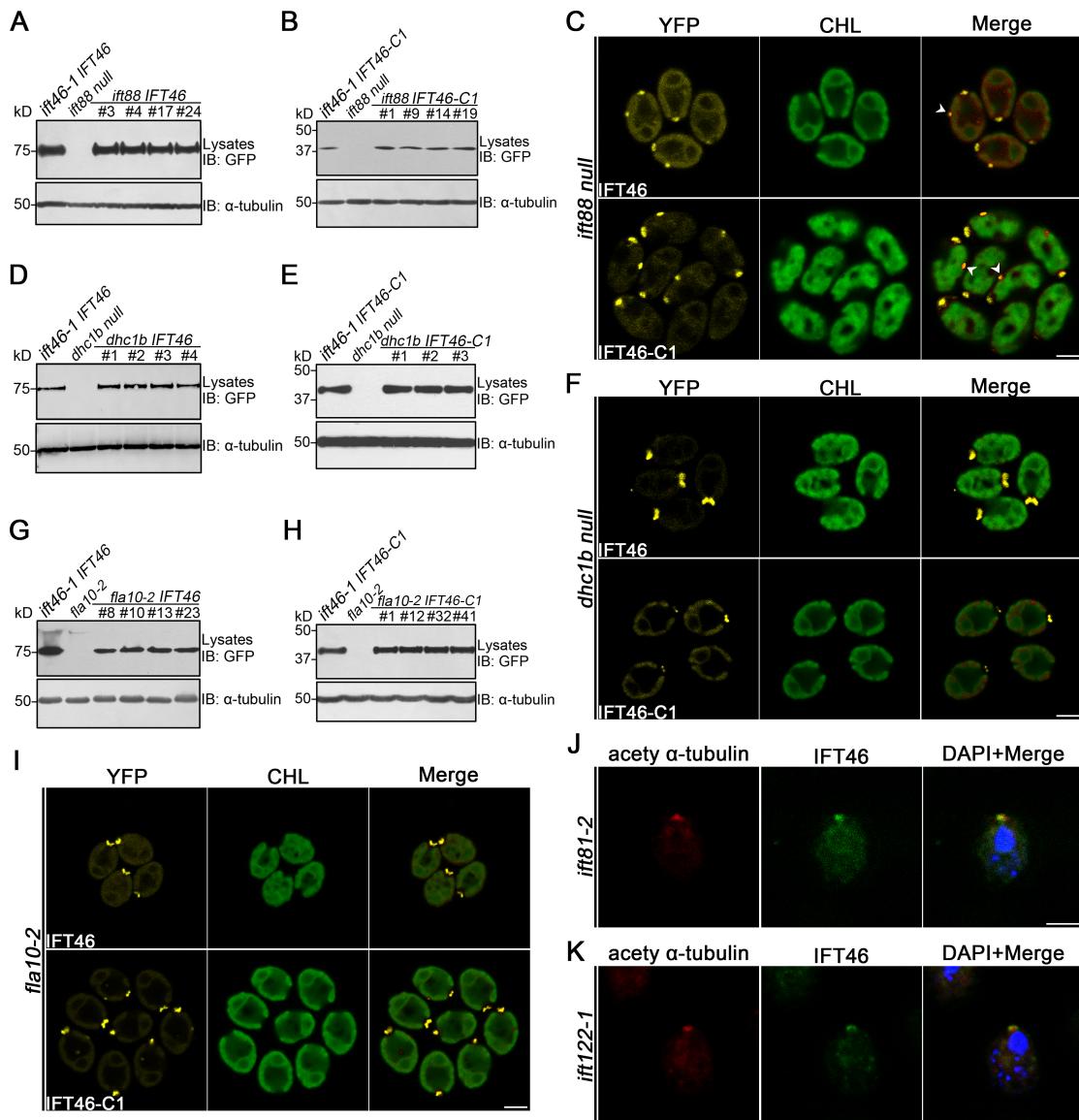


图 5.3 IFT46 的基体定位不依赖 IFT122, IFT88, IFT81, FLA10 或 DHC1b。(A, B, D, E, G, H) 全细胞裂解物免疫印迹分析。(C, F, I) 藻株的共聚焦成像分析。白色箭头示眼点。(J, K) 藻株 *ift81-2* (J) 和 *ift122-1* (K) 的免疫荧光成像。红色为乙酰化 α -tubulin, 绿色为 IFT46, 蓝色为标示细胞核的 DAPI。在 A、B、D、E、G 和 H 中, 每个泳道的上样量为 5 μg。CHL 代表叶绿色。IB 代表免疫印迹; 图片下方的数字为泳道编号。在 C、F、I、J 和 K 中, 标尺代表 5 μm。

Figure 5.3 The basal body localization of IFT46 is independent of IFT122, IFT88, IFT81, FLA10 or DHC1b. (A, B, D, E, G, H) Western blots of whole-cell lysates of indicated strains. (C, F, I) Confocal imaging of indicated strains. White arrows mark the eyespots. (J, K) Immunofluorescence microscopy of *ift81-2* (J) and *ift122-1* (K) using anti-acetylated α -tubulin antibody (red), anti-IFT46 antibody (green) and DAPI (blue). In A, B, D, E, G, and H, five micrograms of protein were loaded into each lane. Numbers on the bottom indicate lanes. IB means immunoblot. In C, F, I, J, and K, scale bars represent 5 μ m. CHL means chlorophyll.

5.3 结果

5.3.1 IFT46 的基体定位不依赖 IFT122、IFT88、IFT81、FLA10 或 DHC1b

根据已发表的结果，我们知道 IFT46 至少与 ODA16、IFT88、IFT81、IFT74、IFT70 和 IFT52 存在相互作用 (Fan et al., 2010; Lucker et al., 2005, 2010; Taschner et al., 2011, 2014)。我们的问题是 IFT46 的基体定位是否依赖其他 IFT 组分。为解决这一问题，我们拟在 IFT 相关的缺失突变体中表达 IFT46::YFP 或 IFT46-C1::YFP。如果 IFT46 的基体定位依赖某个组分，那么 IFT46::YFP 或 IFT46-C1::YFP 将无法继续定位在基体。

据此，我们在 *ift88*、*fla10-2* 和 *dhc1b* 中表达了 IFT46::YFP 或 IFT46-C1::YFP (图 5.3A, B, D, E, G, H)。这些藻株分别是 IFT88、FLA10 和 DHC1b 的缺失突变体。使用抗 GFP 的抗体通过免疫印迹我们筛选到了阳性克隆 (图 5.3A, B, D, E, G, H)。同时我们也通过免疫荧光观察了 IFT46 在 *ift81-2* 和 *ift122-1* 中的亚细胞定位 (图 5.3J, K)。观察结果显示，IFT46::YFP 或 IFT46-C1::YFP 仍然定位在 *ift88*、*fla10-2* 或 *dhc1b* 的基体 (图 5.3C, F, I)。这表明 IFT46 的基体定位不依赖 IFT88、FLA10 或 DHC1b。在 *ift81-2* 或 *ift122-1* 中，IFT46 与乙酰化 α 微管蛋白共定位，后者主要定位在突变体的基体和短小鞭毛中 (图 5.3J, K)。这些结果意味着 IFT46 的基体定位在 *ift81-2* 或 *ift122-1* 中并未受到影响，其基体定位也不依赖 IFT81 或 IFT122。

5.3.2 IFT46 的基体定位依赖 IFT52

同样的，我们也在 *IFT52* 的缺失突变体 *bld1* 中表达了 IFT46 或 IFT46-C1 (图 5.4A, B)。对阳性克隆的观察结果显示 IFT46 无法继续定位在 *bld1* 的基体周围 (图 5.4C)。IFT52 处于 IFT-B 复合物的核心，它与 IFT-B1 和 IFT-B2 的多个亚基之间均存在相互作用 (Katoh et al., 2016; Lucker et al., 2005, 2010; Taschner et al., 2011, 2014, 2016)。IFT52 的缺失可导致 IFT-B 其他亚基的表达量下降 (Brazelton et al., 2001; Collet et al., 1998; Deane et al., 2001; Zhang et al., 2016)。然而，IFT46 或 IFT46-C1 无法定位在 *bld1* 的基体不太可能是由表达量下降造成的。因为我们观察的阳性克隆是通过免疫印迹筛选到的高表达株 (图 5.4A, B)。总之，IFT46 的基体定位依赖 IFT52。

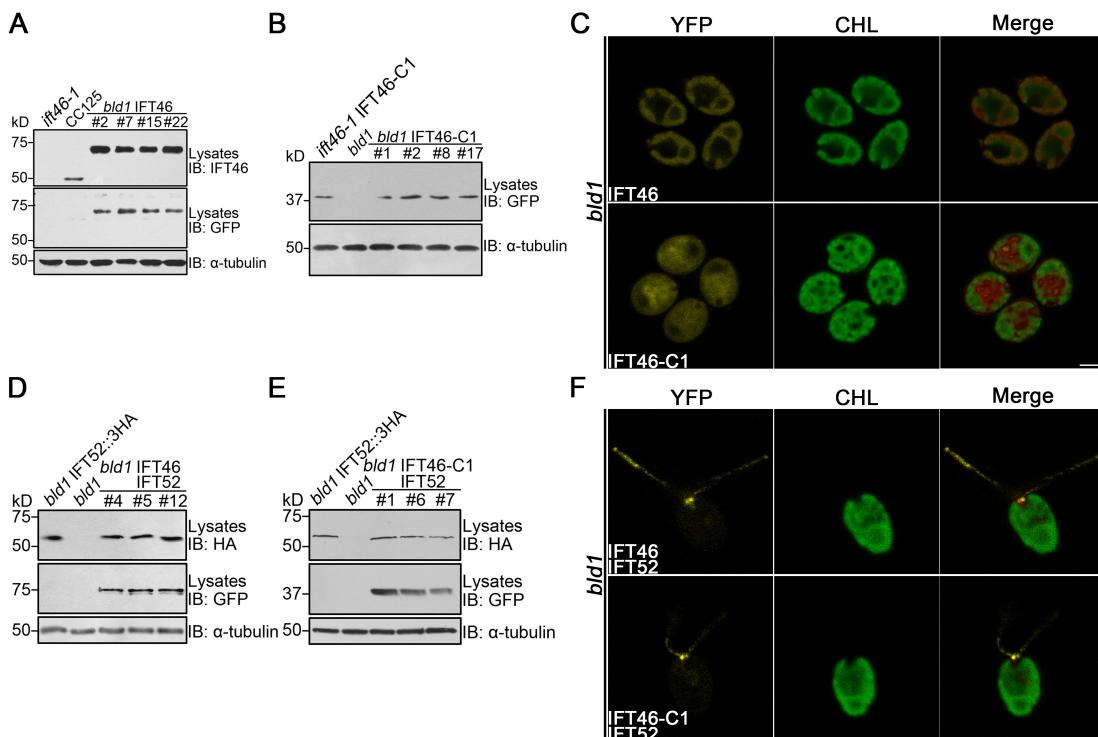


图 5.4 IFT46 的基体定位依赖 IFT52。(A) *bld1*, CC-125 和 *bld1 IFT46::YFP* 全细胞裂解物免疫印迹分析。IB 代表免疫印迹。(B) *ift46-1 IFT46-C1::YFP*, *bld1* 和 *bld1 IFT46-C1::YFP* 全细胞裂解物免疫印迹分析。IB 代表免疫印迹。(C) 表达 IFT46::YFP 或 IFT46-C1::YFP 的 *bld1* 藻株的共聚焦成像分析。(D) *bld1 IFT52::3HA*, *bld1* 和 *bld1 IFT46::YFP IFT52::3HA* 全细胞裂解物免疫印迹分析。IB 代表免疫印迹。(E) *bld1 IFT52::3HA*, *bld1* 和 *bld1 IFT46-C1::YFP IFT52::3HA* 全细胞裂解物免疫印迹分析。IB 代表免疫印迹。(F) 表达 IFT46::YFP IFT52::3HA 或 IFT46-C1::YFP IFT52::3HA 的 *bld1* 藻株的共聚焦成像分析。在 A、B、D 和 E 中，每个泳道的上样量为 5 μg。在 C 和 F 中标尺代表 5 μm。

Figure 5.4 The basal body localization of IFT46 depends on IFT52. (A) Western blots of whole-cell lysates of *bld1*, CC-125, and *bld1 IFT46::YFP* probed with the anti-GFP antibody and anti-α-tubulin antibody. IB: immunoblot. (B) Western blots of whole-cell lysates of *ift46-1 IFT46-C1::YFP*, *bld1*, and *bld1 IFT46-C1::YFP* probed with the indicated antibodies. IB: immunoblot. (C) Confocal imaging of *bld1* expressing IFT46::YFP or IFT46-C1::YFP. (D) Western blots of whole-cell lysates of *bld1 IFT52::3HA*, *bld1*, and *bld1 IFT46::YFP IFT52::3HA* probed with the indicated antibodies. IB: immunoblot. (E) Western blots of whole-cell lysates of *bld1 IFT52::3HA*, *bld1*, and *bld1 IFT46-C1::YFP IFT52::3HA* probed with the indicated antibodies. IB: immunoblot. (F) Confocal imaging of *bld1* expressing IFT46::YFP IFT52::3HA or IFT46-C1::YFP IFT52::3HA. In panel A, B, D, and E, five micrograms of protein were loaded per lane. In panel C and F, CHL means chlorophyll. Scale bars represent 5 μm.

如果 IFT52 的缺失能够破坏 IFT46 的基体定位，那么理论上重新表达 IFT52 应该能够恢复 IFT46 的基体定位。为了验证这一点，我们在 *bld1 IFT46::YFP* 或 *bld1 IFT46-C1::YFP* 中表达了 IFT52::3HA（图5.4C, D）。通过对筛选到的阳性克隆进行共聚焦成像，我们发现在 *bld1 IFT46::YFP IFT52::3HA* 或 *bld1 IFT46-C1::YFP IFT52::3HA* 中 IFT46 又重新定位到了基体（图5.4E）。这些结果进一步说明 IFT46 的基体定位确实依赖 IFT52。

然而，IFT46 的基体定位依赖 IFT52 还是存在两种可能性。一种是二者的依赖是相互的，它们共同作用从而靶向基体。另一种是 IFT52 作用在 IFT46 的上游，IFT52 将 IFT46 招募到基体。为了排除其中一种可能性，我们在 *IFT46* 的缺失突变体 *ift46-1* 中表达了 IFT52::YFP（图5.5A）。使用抗 GFP 的抗体通过免疫印迹我们筛选到了阳性克隆。活细胞成像结果显示 IFT52 能够正常定位到 *ift46-1* 的基体（图 5.5B）。这表明 IFT52 的基体定位并不依赖 IFT46，IFT52 作用在 IFT46 的上游。

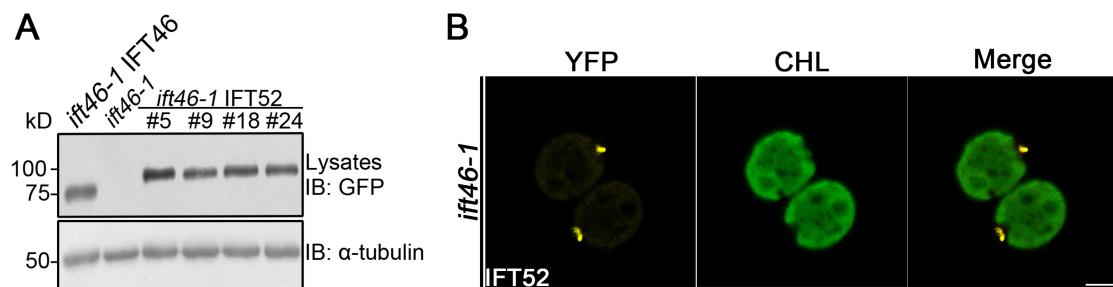


图 5.5 IFT52 的基体定位不依赖 IFT46。（A）*ift46-1 IFT46::YFP*, *ift46-1* 和 *ift46-1 IFT52::YFP* 全细胞裂解物免疫印迹分析。每个泳道的上样量为 5 μg。IB 代表免疫印迹；图片下方的数字为泳道编号。（B）表达 IFT52::YFP 的 *ift46-1* 藻株的共聚焦成像分析。标尺代表 5 μm。

Figure 5.5 The basal body localization of IFT52 does not depend on IFT46. (A) Western blots of whole-cell lysates of *ift46-1 IFT46::YFP*, *ift46-1*, and *ift46-1 IFT52::YFP* probed with the indicated antibodies. Five micrograms of protein were loaded per lane. IB means immunoblot. Numbers at the bottom indicate lanes. (B) Confocal imaging of *ift46-1* expressing IFT52::YFP. CHL means chlorophyll. Scale bar represents 5 μm.

5.3.3 IFT52 结合并招募 IFT46 至基体

IFT52 和 IFT46 之间的相互作用已经在体外实验中得到验证 (Katoh et al., 2016; Lucke et al., 2005, 2010; Taschner et al., 2011, 2014, 2016)。这里我们发现 IFT46 的基体定位依赖 IFT52。因而我们猜测二者之间的相互作用可能介导了 IFT46 的基体定位。使用抗 HA 的抗体对 *bld1 IFT46-C1::YFP IFT52::3HA* 的全细胞裂解液进行免疫共沉淀分析, 结果显示 IFT46 或 IFT46-C1 富集在沉淀物中 (图5.6A)。这表明 IFT46-C1 与全长 IFT46 一样也能够与 IFT52 相互作用。

为了进一步测试 IFT52 与 IFT46 之间的相互作用是否是 IFT46 基体定位所必须的, 我们将 IFT46-C1 上的两个关键的疏水亮氨酸突变为谷氨酸 (图 5.6B)。这两个亮氨酸在进化上高度保守 (图 4.11)。从 CrIFT52C/46C 的晶体结构 (依据 TtIFT52C/46C 的晶体结构模拟产生) 上可以看到二者位于 IFT52C 和 IFT46C 的结合界面上 (图 5.6C) (Taschner et al., 2014)。将 IFT52C 与突变后的 IFT46 共表达在大肠杆菌中, 结果显示 $IFT46^{L285E/L286E}$ 无法继续结合 IFT52C (图 5.6D)。与野生型 IFT46-C1 相比, 表达在 *ift46-1* 中的 $IFT46^{L285E/L286E}$ 的表达量下降至约 32% (图 5.6E, F)。由于 $IFT46^{L285E/L286E}$ 无法与 IFT52 相互作用形成复合物, 这种表达量的下降很可能是由于游离的 $IFT46^{L285E/L286E}$ 被降解造成的。如图 5.6G 所示, IFT46-C1 中第 285 和 286 号残基的突变破坏了其基体定位。由于 IFT46-C1 和 BPTS3 在表达量下降至约 30% 时仍然能够定位到基体 (图 4.12, 4.10), IFT46-C1 $^{L285E/L286E}$ 的基体定位消失应该不是由于表达量下降造成的。这些结果表明 IFT46-C1 与 IFT52 之间的相互作用对 IFT46 的基体定位至关重要。IFT52 结合并招募 IFT46 至基体。

5.3.4 构建表达 IFT52C::YFP::NLS 的载体

IFT46-C1 是 IFT46 的基体和纤毛定位序列。IFT52 结合并招募 IFT46 至基体。根据已有的报道我们还知道衣藻中部分 IFT46 与胞质囊泡关联并被转运到基体 (Wood and Rosenbaum, 2014)。然而, 关于 IFT46 基体定位的分子机制仍然存在两种可能性。一种是 IFT52 和 IFT46 独立定位基体并在基体中发生相互作用形成复合物。另一种是新合成的 IFT46 和 IFT52 在胞质中预组装成亚复合物并定位到基体。这两种途径的关键差别在于 IFT46 和 IFT52 发生相互作用形成

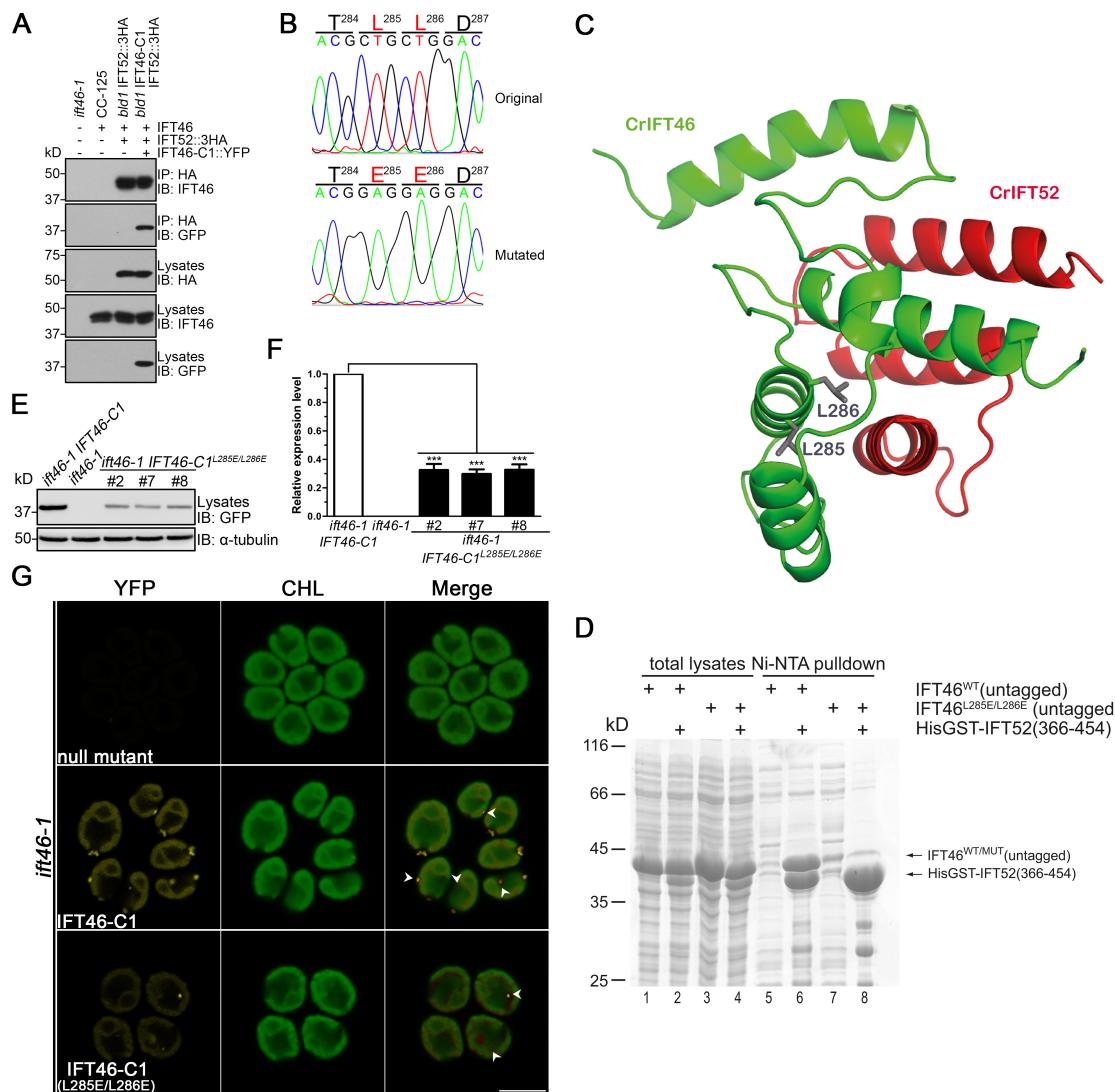


图 5.6 IFT52 结合并招募 IFT46 至基体。 (A) 使用抗 HA 的抗体针对 CC-125, *bld1* *IFT52::3HA* 和 *bld1* *IFT46-C1* *IFT52::3HA* 全细胞裂解液进行免疫共沉淀分析。 (B) IFT46 定点突变位点及突变方式示意图。 (C) 基于 TtIFT52C/46C 的晶体结构模拟的 CrIFT52C/46C 的晶体结构。 (D) Pull-down 分析显示 GST-IFT52C 与 IFT46^{WT} 相互作用，但不与 IFT46^{L285E/L286E} 相互作用。 (E) 全细胞裂解物免疫印迹分析。 (F) IFT46-C1^{L285E/L286E} 相对于 IFT46-C1 表达量显著下降。 (G) 藻株的共聚焦成像分析。白色箭头表示眼点。CHL 代表叶绿素。标尺代表 10 μm。

Figure 5.6 IFT52 binds and recruits IFT46 to the basal body. (A) Anti-HA antibody was used to immunoprecipitate HA-tagged IFT52. (B) Schematic diagram of site-directed mutagenesis of IFT46 gene. (C) The crystal structure of CrIFT52C/46C modeled based on TtIFT52C/46C. The two residues for mutagenesis were highlighted as grey sticks. (D) Pull-down of His-tagged GST-IFT52(366-454) with untagged IFT46^{WT} or IFT46^{L285E/L286E}. (E) Western blots of whole-cell lysates (3 μg protein per lane) of indicated strains. (F) Relative expression level of IFT46-C1^{L285E/L286E} compared to the expression level of IFT46-C1. (G) Confocal imaging of indicated strains. White arrows, eyespots; CHL, chlorophyll; Scale bar, 10 μm.

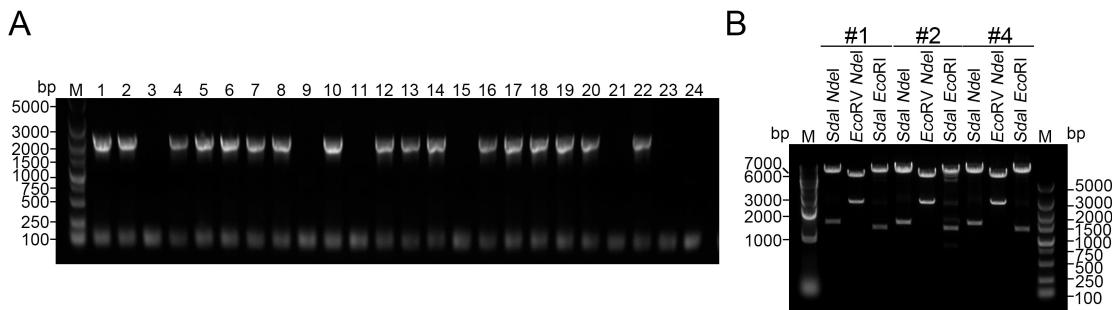


图 5.7 构建表达 IFT52C::YFP::NLS 的载体 pHK473。(A) 菌液 PCR 筛选阳性克隆后的电泳结果。(B) 对图 A 中的三个阳性克隆进行酶切验证。

Figure 5.7 The construction of pHK473 which can express IFT52C::YFP::NLS. (A) agarose gel electrophoresis of bacteria colony polymerase chain reaction product to screen positive clones. (B) Agarose gel electrophoresis of restriction enzyme digestion product of three representative positive clones.

复合物的位置。在第一种途径中，二者在基体发生相互作用。而在第二种途径中二者在胞质或 TGN 中形成亚复合物。为了排除其中一种可能性，我们拟将 IFT52C 异位表达在衣藻细胞核并检查 IFT46 是否跟随 IFT52C 富集在细胞核。

为了构建表达 IFT52C::YFP::NLS 的 pHK473，我们以 pHK470 为模板，利用引物 IFT52C-F 和 IFT52C-R 进行扩增，扩增产物经纯化后利用 In-Fusion 方法重组克隆。随机挑选二十四个单克隆进行菌液 PCR 检测，电泳结果显示其中十七个克隆可扩增出目的条带（图 5.7A）。从这十七个疑似阳性克隆中选择三个扩大培养，抽提质粒进行酶切验证。电泳结果显示 #1 号和 #4 号克隆为阳性（图 5.7B）。选定酶切大小正确的克隆进行测序验证，没有发生错义突变的 #4 号克隆用于后续实验。

5.3.5 融合 NLS 标签的 IFT52C 可将 IFT46 招募到细胞核

在植物、动物和病毒中存在多种核定位信号 (Kalderon et al., 1984; Kropat et al., 2005; Lange et al., 2007; Rasala et al., 2014)。然而关于核定位信号在衣藻中的报道并不多 (Lauersen et al., 2015; Rasala et al., 2014)。本实验室前期的工作表明 4xSV40 NLS 能够有效的将 YFP 带至衣藻细胞核 (Wan et al., unpublished data)。为简便起见，后文所称 NLS 均指的是 4xSV40 NLS。根据已有报道，IFT52 通过

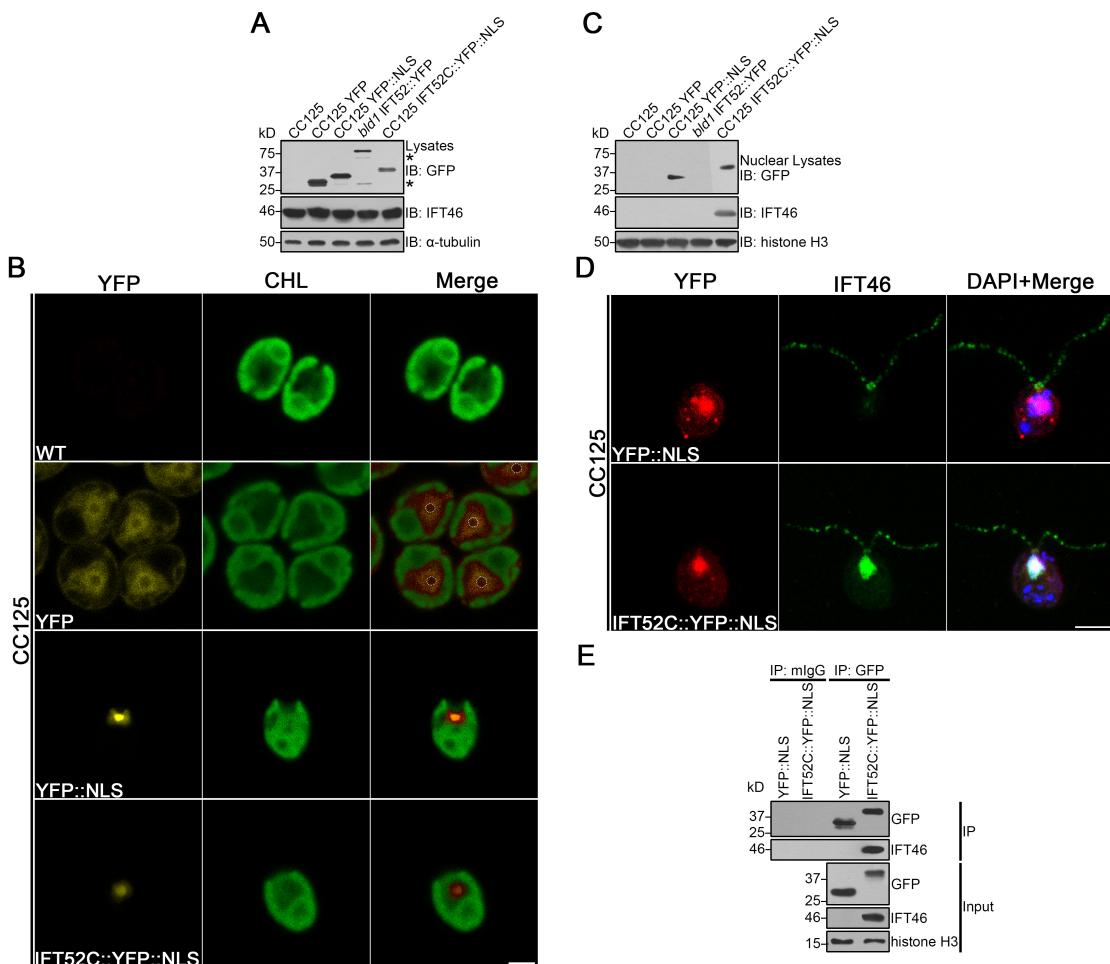


图 5.8 带 NLS 标签的 IFT52C 可将 IFT46 招募至细胞核。(A) 全细胞裂解物免疫印迹分析。(B) 表达 YFP, YFP::NLS 和 IFT52C::YFP::NLS 的 CC-125 藻株的共聚焦成像分析。(C) CC-125, CC-125 YFP, CC-125 YFP::NLS, bld1 IFT52::YFP 和 CC-125 IFT52C::YFP::NLS 核裂解物免疫印迹分析。(D) 藻株 CC-125 YFP::NLS 和 CC-125 IFT52C::YFP::NLS 免疫荧光成像。红色为 YFP::NLS 或 IFT52C::YFP::NLS, 绿色为 IFT46, 蓝色为标示细胞核的 DAPI。(E) 使用抗 GFP 的抗体针对带 YFP 标签的 IFT52C::YFP::NLS 对 CC-125 IFT52C::YFP::NLS 细胞核裂解液进行免疫共沉淀分析。沉淀产物使用图示抗体进行检测。

Figure 5.8 NLS-tagged IFT52C recruits IFT46 to nuclei. (A) Western blots of whole-cell lysates (5 µg protein per lane) of indicated strains. (B) Live cell imaging of CC-125 and CC-125 expressing YFP, YFP::NLS and IFT52C::YFP::NLS. CHL, chlorophyll. (C) Western blots of nuclear lysates (2 µg protein per lane) of indicated strains. (D) Immunofluorescence microscopy of CC-125 YFP::NLS and CC-125 IFT52C::YFP::NLS using anti-GFP antibody (red), anti-IFT46 antibody (green) and 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue). (E) Anti-GFP antibody was used to immunoprecipitate IFT52C::YFP::NLS from the nuclei of CC-125 IFT52C::YFP::NLS. mIgG, IgG; IB, immunoblot; Scale bars, 5 µm. Numbers at the bottom indicate lanes.

其 C 端与 IFT46 相互作用 (Katoh et al., 2016; Lucke et al., 2005, 2010; Taschner et al., 2011, 2014, 2016)。此外，在 MDCK 细胞中过表达 MmIFT52C 对初级纤毛的形成具有极强的显性负效应 (Taschner et al., 2014)。这可能是由其他 IFT-B 蛋白的错误定位导致的 (Taschner et al., 2014)。以上事实表明将 NLS 融合在 IFT52C 上来研究 IFT 蛋白的定位非常合适。

在野生型 CC-125 细胞中，我们使用抗 GFP 的抗体通过免疫印迹筛选出表达 IFT52C::YFP::NLS 的阳性克隆 (图 5.9A)。通过共聚焦显微成像我们发现 IFT52C::YFP::NLS 能够有效定位到衣藻细胞核 (图 5.9B)。对 CC-125 *IFT52C::YFP::NLS* 的细胞核的裂解液进行免疫印迹分析也证实 IFT52C::YFP::NLS 确实成功在核内表达 (图 5.9C)。与此同时，我们在 CC-125 *IFT52C::YFP::NLS* 的细胞核中也检测到了 IFT46 (图 5.9C)。免疫荧光实验的结果显示 IFT46 除定位在基体和鞭毛外，在基体下方还与 DAPI 共定位 (图 5.9D)。这表明 IFT46 跟随 IFT52C 进入了细胞核。使用抗 GFP 的抗体对 CC-125 *IFT52C::YFP::NLS* 的核裂解液进行免疫共沉淀，结果显示 IFT52C 与 IFT46 均富集在沉淀物中 (图 5.9E)。这些数据表明 IFT46 能够被融合了 NLS 标签的 IFT52C 招募到细胞核。这意味着二者在细胞质中已经预组装成亚复合物。

5.4 讨论

IFT46 的 C 端是 IFT46 的基体和纤毛定位序列。IFT52 结合并招募 IFT46 至基体。同时 IFT46 能够被含 NLS 标签的 IFT52C 招募到细胞核。这表明 IFT46 和 IFT52 是在胞质或 TGN 中预组装而非在基体中才组装。在衣藻鞭毛再生过程中，IFT46 出现在来自 TGN 的囊泡上 (Wood and Rosenbaum, 2014)。因而有可能 IFT46 和 IFT52 是在 TGN 中预组装并通过囊泡介导的途径定位到基体。然而，在 IFT 蛋白中仅 IFT20 曾被观察到定位在高尔基体，大部分 IFT 蛋白均与膜没有关联 (Follit et al., 2006; Richey and Qin, 2012)。因此我们无法排除这样一种可能性，即预组装的 IFT46 和 IFT52 通过非囊泡介导的途径定位到基体。

前面我们已经证明 IFT46-C1 是 IFT46 的基体定位序列。这里我们发现 IFT46-C1 直接与 IFT52 相互作用 (图 5.6)。通过突变 IFT46-C1 上的关键残基来破坏 IFT46-C1 与 IFT52 之间的相互作用可阻断 IFT46-C1 的基体定位 (图 5.6)。

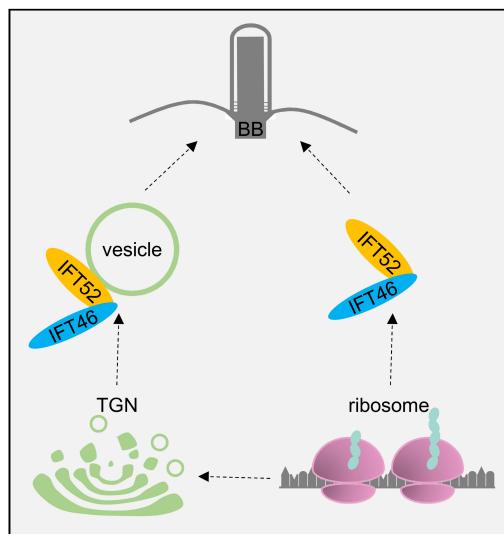


图 5.9 IFT46 基体定位的模型。核糖体上合成的 IFT46 和 IFT52 在胞质或高尔基体上预组装成亚复合物并经过囊泡或非囊泡介导的途径定位到基体。TGN 为反式高尔基体网络，BB 为基体。

Figure 5.9 Model for basal body localization of IFT46. Preassembled IFT52/46 subcomplex is targeted to basal body region through the vesicle-mediated or non-vesicle-mediated ways. TGN, trans-Golgi network; BB, basal body.

这表明 IFT52 直接介导了 IFT46 的基体定位。然而，IFT46 的相互作用对象仍然是一个 IFT 蛋白，IFT52。这使得 IFT46-C1 有别于其他的经典定位序列 (Berbari et al., 2008a; Bhogaraju et al., 2013b; Dishinger et al., 2010; Hurd et al., 2011; Malicki and Avidor-Reiss, 2014; McIntyre et al., 2015; Santos and Reiter, 2014)。在接下来的工作中我们需要在 IFT52 或其他上游 IFT 蛋白中鉴定到 IFT 蛋白通用的定位序列。

5.5 小结

通过在 IFT 相关蛋白的缺失突变体中表达 IFT46 或 IFT46-C1，我们发现 IFT46 的基体定位不依赖 IFT122、IFT88、IFT81、FLA10 或 DHC1b，但是依赖 IFT52。同时 IFT52 的基体定位并不依赖 IFT46。这说明 IFT52 作用在 IFT46 的上游。进一步研究发现 IFT52 能够结合并招募 IFT46 至基体。通过在细胞核中表达 IFT52C，我们成功将 IFT46 招募到细胞核。这些结果表明 IFT46 和 IFT52 在细胞质或 TGN 中预组装成亚复合物然后定位到基体。

总 结

纤毛/鞭毛是一种保守的细胞器，其结构和功能异常会导致纤毛病。纤毛的形成与维持依赖 IFT，而 IFT 蛋白聚集在基体是纤毛形成的关键初始步骤。本论文以衣藻 IFT-B 复合物中的一个亚基 IFT46 为对象对其基体定位的分子机制进行了研究，主要结果及结论如下：

一、利用 IFT46::YFP 可恢复 *IFT46* 的缺失突变体 *ift46-1* 的表型。互补后的藻株 *ift46-1 IFT46::YFP* 的鞭毛相关表型与野生型细胞无显著差异。这些结果表明融合黄色荧光蛋白 YFP 不影响 IFT46 的功能。

二、YFP 蛋白单独表达时主要定位在胞质，尤其是细胞核周围，核内 YFP 蛋白含量较低。而 IFT46::YFP 主要定位在基体，在鞭毛中呈点状分布且能双向运动。

三、通过在 *ift46-1* 和 CC-125 中表达 IFT46 的截短片段，我们发现 IFT46-C1 和 BBS3 是 IFT46 的基体和纤毛定位序列。

四、IFT46-C1 可与 IFT-B 复合物中的其他亚基相互作用从而沿轴丝双向运动。

五、IFT46 的基体定位不依赖 IFT122、IFT88、IFT81、FLA10 或 DHC1b。但是其基体定位依赖 IFT52。然而，IFT52 的基体定位并不依赖 IFT46，这表明 IFT52 作用在 IFT46 的上游。通过生化和细胞生物学手段，我们发现 IFT52 能够结合并招募 IFT46 至基体。破坏 IFT52 与 IFT46 之间的相互作用可导致 IFT46-C1 无法继续定位在基体。

六、带 NLS 标签的 IFT52C 可将 IFT46 招募到细胞核，这表明 IFT52 和 IFT46 的预组装发生在胞质或高尔基体而非基体。

这些结果使我们对 IFT46 基体定位的机制有了更深入的了解，为全面研究 IFT 蛋白基体定位的机制及 IFT 蛋白与分子马达和货物相互作用奠定了良好的基础，具有重要的理论意义。长远来看，IFT 蛋白基体定位机制的解析有助于调控纤毛的组装与解聚，对纤毛病的预防和治疗具有积极作用。本研究的创新之处有以下三点：

通过表达截短片段的方式首次鉴定了一个 IFT 蛋白的基体/纤毛定位序列。

利用体内实验首次证明 IFT52 和 IFT46 之间的相互作用介导了 IFT46 的基体定位。

利用体内方法初步证明 IFT52 和 IFT46 的预组装位置在细胞质而非基体。

这里我们鉴定了 IFT46 的基体和纤毛定位序列，然后后续实验表明其上游运载蛋白是 IFT52，这意味着我们鉴定到的并非经典的定位序列。后续研究应该从 IFT52 或其他上游 IFT 蛋白中的鉴定到 IFT 蛋白通用的定位序列及其相关运载因子。此外，将 IFT 蛋白在胞质尤其是高尔基体上预组装成亚复合物然后转运到基体可能是普遍存在的模式。在后续研究中应逐步理清 IFT 蛋白的预组装网络并弄清鞭毛货物是否也参与预组装。

参考文献

- [1] Addison C.J., Chu S.H., Reusch R.N., Polyhydroxybutyrate-enhanced transformation of log-phase *Escherichia coli* [J]. *Biotechniques*, 2004, 37(3): 376–8, 380, 382.
- [2] Afzelius B.A., A human syndrome caused by immotile cilia [J]. *Science*, 1976, 193(4250): 317–319.
- [3] Ahmed N.T., Gao C., Lucker B.F., Cole D.G., Mitchell D.R., ODA16 aids axonemal outer row dynein assembly through an interaction with the intraflagellar transport machinery [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2008, 183(2): 313–322.
- [4] Ahmed N.T., Mitchell D.R., ODA16p, a *Chlamydomonas* flagellar protein needed for dynein assembly [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(10): 5004–5012.
- [5] Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L.M., Zhang W., Kipper J., Devos D., Suprapto A., Karni-Schmidt O., Williams R., Chait B.T., Sali A., Rout M.P., The molecular architecture of the nuclear pore complex [J]. *Nature*, 2007, 450(7170): 695–701.
- [6] Arden G.B., Fox B., Increased incidence of abnormal nasal cilia in patients with retinitis pigmentosa [J]. *Nature*, 1979, 279(5713): 534–536.
- [7] Atkinson N., Feike D., Mackinder L.C., Meyer M.T., Griffiths H., Jonikas M.C., Smith A.M., McCormick A.J., Introducing an algal carbon-concentrating mechanism into higher plants: location and incorporation of key components [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 14(5): 1302–1315.
- [8] Avasthi P., Marshall W.F., Chemical screening methods for flagellar phenotypes in *Chlamydomonas* [J]. *Methods in Enzymology*, 2013, 525: 351–369.
- [9] Avasthi P., Onishi M., Karpiak J., Yamamoto R., Mackinder L., Jonikas M.C., Sale W.S., Shoichet B., Pringle J.R., Marshall W.F., Actin is required for IFT regulation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Current Biology*, 2014, 24(17): 2025–2032.
- [10] Baek K., Kim D.H., Jeong J., Sim S.J., Melis A., Kim J.S., Jin E., Bae S., DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30620.
- [11] Baldari C.T., Rosenbaum J., Intraflagellar transport: it's not just for cilia anymore [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22(1): 75–80.

- [12] Barahimipour R., Neupert J., Bock R., Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga *Chlamydomonas*: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker [J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 90(4-5): 403–418.
- [13] Beck M., Forster F., Ecke M., Plitzko J.M., Melchior F., Gerisch G., Baumeister W., Medalia O., Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography [J]. *Science*, 2004, 306(5700): 1387–1390.
- [14] Behal R.H., Cole D.G., Analysis of interactions between intraflagellar transport proteins [J]. *Methods in Enzymology*, 2013, 524: 171–194.
- [15] Behal R.H., Miller M.S., Qin H., Lucke B.F., Jones A., Cole D.G., Subunit interactions and organization of the *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport complex A proteins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(15): 11689–703.
- [16] Benmerah A., The ciliary pocket [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2013, 25(1): 78–84.
- [17] Berbari N.F., Johnson A.D., Lewis J.S., Askwith C.C., Mykytyn K., Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008a, 19(4): 1540–1547.
- [18] Berbari N.F., Lewis J.S., Bishop G.A., Askwith C.C., Mykytyn K., Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008b, 105(11): 4242–4246.
- [19] Bernabe-Rubio M., Andres G., Casares-Arias J., Fernandez-Barrera J., Rangel L., Reglero-Real N., Gershlick D.C., Fernandez J.J., Millan J., Correas I., Miguez D.G., Alonso M.A., Novel role for the midbody in primary ciliogenesis by polarized epithelial cells [J]. *Journal of Cell Biology*, 2016, 214(3): 259–273.
- [20] Bhogaraju S., Cajanek L., Fort C., Blisnick T., Weber K., Taschner M., Mizuno N., Lamla S., Bastin P., Nigg E.A., Lorentzen E., Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81 [J]. *Science*, 2013a, 341(6149): 1009–1012.
- [21] Bhogaraju S., Engel B.D., Lorentzen E., Intraflagellar transport complex structure and cargo interactions [J]. *Cilia*, 2013b, 2: 10.
- [22] Bhogaraju S., Taschner M., Morawetz M., Basquin C., Lorentzen E., Crystal structure of the intraflagellar transport complex 25/27 [J]. *The EMBO Journal*, 2011, 30(10): 1907–1918.

- [23] Bhogaraju S., Weber K., Engel B.D., Lechtreck K., Lorentzen E., Getting tubulin to the tip of the cilium: One IFT train, many different tubulin cargo-binding sites? [J]. *BioEssays*, 2014, 36(5): 463–467.
- [24] Bifari I.N., Elkhamary S.M., Bolz H.J., Khan A.O., The ophthalmic phenotype of IFT140-related ciliopathy ranges from isolated to syndromic congenital retinal dystrophy [J]. *British Journal of Ophthalmology*, 2015, 100(6): 829–833.
- [25] Bishop G.A., Berbari N.F., Lewis J., Mykytyn K., Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain [J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2007, 505(5): 562–571.
- [26] Bizet A.A., Becker-Heck A., Ryan R., Weber K., Filhol E., Krug P., Halbritter J., Delous M., Lasbennes M.C., Linghu B., Oakeley E.J., Zarhrate M., Nitschke P., Garfa-Traore M., Serluca F., Yang F., Bouwmeester T., Pinson L., Cassuto E., Dubot P., Elshakhs N.A., Sahel J.A., Salomon R., Drummond I.A., Gubler M.C., Antignac C., Chibout S., Szustakowski J.D., Hildebrandt F., Lorentzen E., Sailer A.W., Benmerah A., Saint-Mezard P., Saunier S., Mutations in TRAF3IP1/IFT54 reveal a new role for IFT proteins in microtubule stabilization [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8666.
- [27] Blaby I.K., Blaby-Haas C.E., Tourasse N., Hom E.F., Lopez D., Aksoy M., Grossman A., Umen J., Dutcher S., Porter M., King S., Witman G.B., Stanke M., Harris E.H., Goodstein D., Grimwood J., Schmutz J., Vallon O., Merchant S.S., Prochnik S., The *Chlamydomonas* genome project: a decade on [J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(10): 672–680.
- [28] Blacque O.E., Reardon M.J., Li C., McCarthy J., Mahjoub M.R., Ansley S.J., Badano J.L., Mah A.K., Beales P.L., Davidson W.S., Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport [J]. *Genes & Development*, 2004, 18(13): 1630–1642.
- [29] Bodle J.C., Rubenstein C.D., Phillips M.E., Bernacki S.H., Qi J., Banes A.J., Loba E.G., Primary cilia: the chemical antenna regulating human adipose-derived stem cell osteogenesis [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e62554.
- [30] Borovina A., Ciruna B., IFT88 plays a cilia-and PCP-independent role in controlling oriented cell divisions during vertebrate embryonic development [J]. *Cell Reports*, 2013, 5(1): 7.
- [31] Brazelton W.J., Amundsen C.D., Silflow C.D., Lefebvre P.A., The *bld1* mutation identifies the *Chlamydomonas osm-6* homolog as a gene required for flagellar assembly [J]. *Current Biology*, 2001, 11(20): 1591–1594.

- [32] Breslow D.K., Koslover E.F., Seydel F., Spakowitz A.J., Nachury M.V., An *in vitro* assay for entry into cilia reveals unique properties of the soluble diffusion barrier [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 203(1): 129–147.
- [33] Brooks E., Wallingford J., Multiciliated Cells [J]. *Current Biology*, 2014, 24(19): R973–R982.
- [34] Brooks E.R., Wallingford J.B., Control of vertebrate intraflagellar transport by the planar cell polarity effector Fuz [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2012, 198(1): 37–45.
- [35] Brooks E.R., Wallingford J.B., The small GTPase Rsg1 is important for the cytoplasmic localization and axonemal dynamics of intraflagellar transport proteins [J]. *Cilia*, 2013, 2(1): 13.
- [36] Brown J.M., Cochran D.A., Craige B., Kubo T., Witman G.B., Assembly of IFT trains at the ciliary base depends on IFT74 [J]. *Current Biology*, 2015, 25(12): 1583–1593.
- [37] Brown L.E., Sprecher S.L., Keller L.R., Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(4): 2328–32.
- [38] Bryksin A.V., Matsumura I., Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids [J]. *Biotechniques*, 2010, 48(6): 463–465.
- [39] Bryson K., McGuffin L.J., Marsden R.L., Ward J.J., Sodhi J.S., Jones D.T., Protein structure prediction servers at University College London [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(Web Server issue): W36–38.
- [40] Buchan D.W., Minneci F., Nugent T.C., Bryson K., Jones D.T., Scalable web services for the PSIPRED protein analysis workbench [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(Web Server issue): W349–357.
- [41] Buchan D.W., Ward S.M., Lobley A.E., Nugent T.C., Bryson K., Jones D.T., Protein annotation and modelling servers at University College London [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(Web Server issue): W563–568.
- [42] Burke M.C., Li F.Q., Cyge B., Arashiro T., Brechbuhl H.M., Chen X., Siller S.S., Weiss M.A., O’Connell C.B., Love D., Westlake C.J., Reynolds S.D., Kuriyama R., Takemaru K., Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2014, 207(1): 123–37.
- [43] Cajanek L., Nigg E.A., Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting Tau tubulin kinase 2 to the mother centriole [J]. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(28): E2841–50.

- [44] Calvert P.D., Schiesser W.E., Pugh E. N. J., Diffusion of a soluble protein, photoactivatable GFP, through a sensory cilium [J]. *Journal of General Physiology*, 2010, 135(3): 173–196.
- [45] Cao M., Ning J., Hernandez-Lara C.I., Belzile O., Wang Q., Dutcher S.K., Liu Y., Snell W.J., Uni-directional ciliary membrane protein trafficking by a cytoplasmic retrograde IFT motor and ciliary ectosome shedding [J]. *Elife*, 2015, 4.
- [46] Cardenas-Rodriguez M., Osborn D.P., Irigoín F., Graña M., Romero H., Beales P.L., Badano J.L., Characterization of CCDC28B reveals its role in ciliogenesis and provides insight to understand its modifier effect on Bardet–Biedl syndrome [J]. *Human Genetics*, 2013, 132(1): 91–105.
- [47] Caspary T., Larkins C.E., Anderson K.V., The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture [J]. *Developmental Cell*, 2007, 12(5): 767–778.
- [48] Cerutti H., Johnson A.M., Gillham N.W., Boynton J.E., A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: integration into the nuclear genome and gene expression [J]. *Genetics*, 1997, 145(1): 97–110.
- [49] Chavez M., Ena S., Van Sande J., de Kerchove d'Exaerde A., Schurmans S., Schiffmann S.N., Modulation of ciliary phosphoinositide content regulates trafficking and sonic hedgehog signaling output [J]. *Developmental Cell*, 2015, 34(3): 338–350.
- [50] Chen A., Wang P.Y., Yang Y.C., Huang Y.H., Yeh J.J., Chou Y.H., Cheng J.T., Hong Y.R., Li S.S., SUMO regulates the cytoplasmonuclear transport of its target protein Daxx [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006, 98(4): 895–911.
- [51] Chen Y., Sanchez A., Rubio M.E., Kohl T., Pardo L.A., Stuhmer W., Functional K(v)10.1 channels localize to the inner nuclear membrane [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e19257.
- [52] Chih B., Liu P., Chinn Y., Chalouni C., Komuves L.G., Hass P.E., Sandoval W., Peterson A.S., A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain [J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 14(1): 61–72.
- [53] Cocucci E., Meldolesi J., Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles [J]. *Trends in Cell Biology*, 2015, 25(6): 364–372.
- [54] Cole D.G., Diener D.R., Himelblau A.L., Beech P.L., Fuster J.C., Rosenbaum J.L., *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1998, 141(4): 993–1008.

- [55] Collet J., Spike C.A., Lundquist E.A., Shaw J.E., Herman R.K., Analysis of *osm-6*, a gene that affects sensory cilium structure and sensory neuron function in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1998, 148(1): 187–200.
- [56] Collingridge P., Brownlee C., Wheeler G.L., Compartmentalized calcium signaling in cilia regulates intraflagellar transport. *Current Biology*, 2013, 23(22): 2311–2318.
- [57] Cooper J.B., Adair W.S., Mecham R.P., Heuser J.E., *Chlamydomonas* agglutinin is a hydroxyproline-rich glycoprotein [J]. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 1983, 80(19): 5898–5901.
- [58] Corbit K.C., Aanstad P., Singla V., Norman A.R., Stainier D.Y., Reiter J.F., Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium [J]. *Nature*, 2005, 437(7061): 1018–1021.
- [59] Craft J.M., Harris J.A., Hyman S., Kner P., Lechtreck K.F., Tubulin transport by IFT is upregulated during ciliary growth by a cilium-autonomous mechanism [J]. *Journal of Cell Biology*, 2015, 208(2): 223–37.
- [60] Czarnecki P.G., Shah J.V., The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine [J]. *Trends in Cell Biology*, 2012, 22(4): 201–210.
- [61] Deane J.A., Cole D.G., Seeley E.S., Diener D.R., Rosenbaum J.L., Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles [J]. *Current Biology*, 2001, 11(20): 1586–1590.
- [62] Delling M., Indzhykulian A.A., Liu X., Li Y., Xie T., Corey D.P., Clapham D.E., Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors [J]. *Nature*, 2016, 531(7596): 656–660.
- [63] Dentler W., Intraflagellar transport (IFT) during assembly and disassembly of *Chlamydomonas* flagella [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2005, 170(4): 649–659.
- [64] Dentler W., Vanderwaal K., Porter M.E., Recording and analyzing IFT in *Chlamydomonas* flagella [J]. *Methods in Cell Biology*, 2009, 93: 145–155.
- [65] Diener D., Analysis of cargo transport by IFT and GFP imaging of IFT in *Chlamydomonas* [J]. *Methods in Cell Biology*, 2009, 93: 111–119.
- [66] Diener D.R., Lupetti P., Rosenbaum J.L., Proteomic analysis of isolated ciliary transition zones reveals the presence of ESCRT proteins [J]. *Current Biology*, 2015, 25(3): 379–384.
- [67] Dishinger J.F., Kee H.L., Jenkins P.M., Fan S., Hurd T.W., Hammond J.W., Truong Y.N., Margolis B., Martens J.R., Verhey K.J., Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin-beta2 and RanGTP [J]. *Nature cell biology*, 2010, 12(7): 703–710.

- [68] Dowdle W.E., Robinson J.F., Kneist A., Sirerol-Piquer M.S., Frints S.G., Corbit K.C., Zaghloul N.A., van Lijnschoten G., Mulders L., Verver D.E., Disruption of a ciliary B9 protein complex causes Meckel syndrome [J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2011, 89(1): 94–110.
- [69] Dubreuil V., Marzesco A.M., Corbeil D., Huttner W.B., Wilsch-Brauninger M., Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1 [J]. *Journal of Cell Biology*, 2007, 176(4): 483–495.
- [70] Dutcher S.K., Power J., Galloway R.E., Porter M.E., Reappraisal of the genetic map of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Journal of Heredity*, 1991, 82(4): 295–301.
- [71] Dutta S., Sriskanda S., Boobalan E., Alur R.P., Elkahloun A., Brooks B.P., *nlz1* is required for cilia formation in zebrafish embryogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2015, 406(2): 203–211.
- [72] Dwyer N.D., Adler C.E., Crump J.G., L'Etoile N.D., Bargmann C.I., Polarized dendritic transport and the AP-1 μ1 clathrin adaptor UNC-101 localize odorant receptors to olfactory cilia [J]. *Neuron*, 2001, 31(2): 277–287.
- [73] Engel B.D., Ishikawa H., Wemmer K.A., Geimer S., Wakabayashi K.i., Hirono M., Craige B., Pazour G.J., Witman G.B., Kamiya R., The role of retrograde intraflagellar transport in flagellar assembly, maintenance, and function [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2012, 199(1): 151–167.
- [74] Fan S., Fogg V., Wang Q., Chen X.W., Liu C.J., Margolis B., A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via importin beta interactions [J]. *Journal of Cell Biology*, 2007, 178(3): 387–398.
- [75] Fan Z.C., Behal R.H., Geimer S., Wang Z., Williamson S.M., Zhang H., Cole D.G., Qin H., *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.
- [76] Fliegauf M., Benzing T., Omran H., When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(11): 880–893.
- [77] Flowers J.M., Hazzouri K.M., Pham G.M., Rosas U., Bahmani T., Khraiwesh B., Nelson D.R., Jijakli K., Abdrabu R., Harris E.H., Lefebvre P.A., Hom E.F., Salehi-Ashtiani K., Purugganan M.D., Whole-Genome Resequencing Reveals Extensive Natural Variation in the Model Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(9): 2353–2369.
- [78] Follit J.A., San Agustin J.T., Xu F., Jonassen J.A., Samtani R., Lo C.W., Pazour G.J., The Golgin GMAP210/TRIP11 anchors IFT20 to the Golgi complex [J]. *PLoS Genetics*, 2008, 4(12): e1000315.

- [79] Follit J.A., Tuft R.A., Fogarty K.E., Pazour G.J., The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2006, 17(9): 3781–3792.
- [80] Fowkes M.E., Mitchell D.R., The role of preassembled cytoplasmic complexes in assembly of flagellar dynein subunits [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1998, 9(9): 2337–2347.
- [81] Franklin S., Ngo B., Efuet E., Mayfield S.P., Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast [J]. *Plant Journal*, 2002, 30(6): 733–744.
- [82] Franklin S.E., Mayfield S.P., Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(2): 159–165.
- [83] Fu W., Wang L., Kim S., Li J., Dynlacht B.D., Role for the IFT-A complex in selective transport to the primary cilium [J]. *Cell Reports*, 2016, 17(6): 1505—1517.
- [84] Fuhrmann M., Hausherr A., Ferbitz L., Schodl T., Heitzer M., Hegemann P., Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(6): 869–881.
- [85] Fuhrmann M., Oertel W., Hegemann P., A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *The Plant Journal*, 1999, 19(3): 353–361.
- [86] Gallaher S.D., Fitz-Gibbon S.T., Glaesener A.G., Pellegrini M., Merchant S.S., *Chlamydomonas* genome resource for laboratory strains reveals a mosaic of sequence variation, identifies true strain histories, and enables strain-specific studies [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(9): 2335–2352.
- [87] Garcia-Echauri S.A., Cardineau G.A., TETX: a novel nuclear selection marker for *Chlamydomonas reinhardtii* transformation [J]. *Plant Methods*, 2015, 11: 27.
- [88] Garcia-Gonzalo F.R., Phua S.C., Roberson E.C., Garcia G. r., Abedin M., Schurmans S., Inoue T., Reiter J.F., Phosphoinositides regulate ciliary protein trafficking to modulate hedgehog signaling [J]. *Developmental Cell*, 2015, 34(4): 400–409.
- [89] Garcia-Gonzalo F.R., Reiter J.F., Scoring a backstage pass: mechanisms of ciliogenesis and ciliary access [J]. *Journal of Cell Biology*, 2012, 197(6): 697–709.
- [90] Geng L., Okuhara D., Yu Z., Tian X., Cai Y., Shibasaki S., Somlo S., Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif [J]. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(Pt 7): 1383–1395.
- [91] Gerdes J.M., Davis E.E., Katsanis N., The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease [J]. *Cell*, 2009, 137(1): 32–45.

- [92] Gibbons I., Grimstone A., On flagellar structure in certain flagellates [J]. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1960, 7(4): 697–716.
- [93] Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C. A. r., Smith H.O., Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343–345.
- [94] Gluenz E., Höög J.L., Smith A.E., Dawe H.R., Shaw M.K., Gull K., Beyond 9 + 0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans [J]. *The FASEB Journal*, 2010, 24(9): 3117–3121.
- [95] Goetz S.C., Liem K. F. J., Anderson K.V., The spinocerebellar ataxia-associated gene *Tau tubulin kinase 2* controls the initiation of ciliogenesis [J]. *Cell*, 2012, 151(4): 847–858.
- [96] Gonzalez-Ballester D., Pootakham W., Mus F., Yang W., Catalanotti C., Magneschi L., de Montaigu A., Higuera J.J., Prior M., Galvan A., Fernandez E., Grossman A.R., Reverse genetics in *Chlamydomonas*: a platform for isolating insertional mutants [J]. *Plant Methods*, 2011, 7: 24.
- [97] Goodenough U.W., Green yeast [J]. *Cell*, 1992, 70(4): 533.
- [98] Gould S.J., Raposo G., As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles [J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2013, 2: 20389.
- [99] Greenly J.M., Tester J.W., Ultrasonic cavitation for disruption of microalgae [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 184: 276–279.
- [100] Griesbeck O., Baird G.S., Campbell R.E., Zacharias D.A., Tsien R.Y., Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(31): 29188–29194.
- [101] 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.
- [102] Grossman A.R., Croft M., Gladyshev V.N., Merchant S.S., Posewitz M.C., Prochnik S., Spalding M.H., Novel metabolism in *Chlamydomonas* through the lens of genomics [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(2): 190–198.
- [103] Grossman A.R., Harris E.E., Hauser C., Lefebvre P.A., Martinez D., Rokhsar D., Shrager J., Silflow C.D., Stern D., Vallon O., Zhang Z., *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics [J]. *Eukaryotic Cell*, 2003, 2(6): 1137–1150.
- [104] Guen V.J., Gamble C., Perez D.E., Bourassa S., Zappel H., Gartner J., Lees J.A., Colas P., STAR syndrome-associated CDK10/Cyclin M regulates actin network architecture and ciliogenesis [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(5): 678–688.

- [105] Hakkila K., Maksimow M., Rosengren A., Karp M., Virta M., Monitoring promoter activity in a single bacterial cell by using green and red fluorescent proteins [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 54(1): 75–79.
- [106] Hanahan D., Jessee J., Bloom F.R., Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria [J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 204: 63–113.
- [107] Harris E.H., *Chlamydomonas* as a model organism [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52: 363–406.
- [108] Harris E.H., Stern D.B., Witman G., The *Chlamydomonas* sourcebook [M]. San Diego: Academic Press, 1989.
- [109] Harris J.A., Liu Y., Yang P., Kner P., Lechtreck K.F., Single-particle imaging reveals intraflagellar transport-independent transport and accumulation of EB1 in *Chlamydomonas* flagella [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 27(2): 295–307.
- [110] Hay R.T., SUMO: a history of modification [J]. *Molecular Cell*, 2005, 18(1): 1–12.
- [111] Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y., Improved green fluorescence [J]. *Nature*, 1995, 373(6516): 663–664.
- [112] Higuchi R., Krummel B., Saiki R.K., A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(15): 7351–7367.
- [113] Hilbert M., Noga A., Frey D., Hamel V., Guichard P., Kraatz S.H., Pfreundschuh M., Hosner S., Fluckiger I., Jaussi R., Wieser M.M., Thieltges K.M., Deupi X., Muller D.J., Kammerer R.A., Gonczy P., Hirono M., Steinmetz M.O., SAS-6 engineering reveals interdependence between cartwheel and microtubules in determining centriole architecture [J]. *Nature Cell Biology*, 2016, 18(4): 393–403.
- [114] Hildebrandt F., Benzing T., Katsanis N., Ciliopathies [J]. *New England Journal of Medicine*, 2011, 364(16): 1533–1543.
- [115] Hildebrandt F., Zhou W., Nephronophthisis-associated ciliopathies [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007, 18(6): 1855–1871.
- [116] Hirokawa N., Tanaka Y., Okada Y., Takeda S., Nodal flow and the generation of left-right asymmetry [J]. *Cell*, 2006, 125(1): 33–45.
- [117] Hlavova M., Vitova M., Bisova K., Synchronization of green algae by light and dark regimes for cell cycle and cell division studies [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1370: 3–16.

- [118] Ho S.H., Ye X., Hasunuma T., Chang J.S., Kondo A., Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae—a critical review [J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(8): 1448–1459.
- [119] Hogan M.C., Manganelli L., Woppard J.R., Masyuk A.I., Masyuk T.V., Tammachote R., Huang B.Q., Leontovich A.A., Beito T.G., Madden B.J., Charlesworth M.C., Torres V.E., LaRusso N.F., Harris P.C., Ward C.J., Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009, 20(2): 278–288.
- [120] Hou Y., Pazour G.J., Witman G.B., A dynein light intermediate chain, D1bLIC, is required for retrograde intraflagellar transport [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15(10): 4382–4394.
- [121] Hou Y., Qin H., Follit J.A., Pazour G.J., Rosenbaum J.L., Witman G.B., Functional analysis of an individual IFT protein: IFT46 is required for transport of outer dynein arms into flagella [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2007, 176(5): 653–665.
- [122] Hu J., Deng X., Shao N., Wang G., Huang K., Rapid construction and screening of artificial microRNA systems in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *The Plant Journal*, 2014, 79(6): 1052–1064.
- [123] Hu Q., Milenkovic L., Jin H., Scott M.P., Nachury M.V., Spiliotis E.T., Nelson W.J., A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution [J]. *Science*, 2010, 329(5990): 436–439.
- [124] Hu Z., Liang Y., He W., Pan J., Cilia disassembly with two distinct phases of regulation [J]. *Cell Reports*, 2015a.
- [125] Hu Z., Liang Y., Meng D., Wang L., Pan J., Microtubule-depolymerizing kinesins in the regulation of assembly, disassembly, and length of cilia and flagella [J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2015b, 317: 241–265.
- [126] Huang F., Sirinakis G., Allgeyer E.S., Schroeder L.K., Duim W.C., Kromann E.B., Phan T., Rivera-Molina F.E., Myers J.R., Irnov I., Lessard M., Zhang Y., Handel M.A., Jacobs-Wagner C., Lusk C.P., Rothman J.E., Toomre D., Booth M.J., Bewersdorf J., Ultra-High Resolution 3D Imaging of Whole Cells [J]. *Cell*, 2016, 166(4): 1028–1040.
- [127] Huang K., Diener D.R., Rosenbaum J.L., The ubiquitin conjugation system is involved in the disassembly of cilia and flagella [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2009, 186(4): 601–613.
- [128] Huang K., Tsao C.C., Importin- β 2: a key to two gates? [J]. *Protein & cell*, 2010, 1(9): 791–792.

- [129] Huangfu D., Liu A., Rakeman A.S., Murcia N.S., Niswander L., Anderson K.V., Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins [J]. *Nature*, 2003, 426(6962): 83–87.
- [130] Hunter E.L., Sale W.S., Alford L.M., Analysis of Axonemal Assembly During Ciliary Regeneration in *Chlamydomonas* [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1454: 237–243.
- [131] Hurd T.W., Fan S., Margolis B.L., Localization of retinitis pigmentosa 2 to cilia is regulated by Importin β 2 [J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(Pt 5): 718–726.
- [132] Inaba M., Buszczak M., Yamashita Y.M., Nanotubes mediate niche-stem-cell signalling in the *Drosophila testis* [J]. *Nature*, 2015, 523(7560): 329–32.
- [133] Iomini C., Babaev-Khaimov V., Sassaroli M., Piperno G., Protein particles in *Chlamydomonas* flagella undergo a transport cycle consisting of four phases [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 153(1): 13–24.
- [134] Ishikawa H., Marshall W.F., Ciliogenesis: building the cell's antenna [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12(4): 222–234.
- [135] Jackson P.K., Do cilia put brakes on the cell cycle? [J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(4): 340—342.
- [136] Jenkins P.M., Hurd T.W., Zhang L., McEwen D.P., Brown R.L., Margolis B., Verhey K.J., Martens J.R., Ciliary targeting of olfactory CNG channels requires the CNGB1b subunit and the kinesin-2 motor protein, KIF17 [J]. *Current Biology*, 2006, 16(12): 1211–1216.
- [137] Jenkins P.M., Zhang L., Thomas G., Martens J.R., PACS-1 mediates phosphorylation-dependent ciliary trafficking of the cyclic-nucleotide-gated channel in olfactory sensory neurons [J]. *Journal of Neuroscience*, 2009, 29(34): 10541–10551.
- [138] Jiang J., Hui C.c., Hedgehog signaling in development and cancer [J]. *Developmental Cell*, 2008, 15(6): 801–812.
- [139] Jiang W., Brueggeman A.J., Horken K.M., Plucinak T.M., Weeks D.P., Successful transient expression of Cas9/sgRNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2014, 13(11): 1465–1469.
- [140] Jinkerson R.E., Jonikas M.C., Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome [J]. *The Plant Journal*, 2015, 82(3): 393–412.
- [141] Jones D.T., Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 292(2): 195–202.

- [142] Joo K., Kim C.G., Lee M.S., Moon H.Y., Lee S.H., Kim M.J., Kweon H.S., Park W.Y., Kim C.H., Gleeson J.G., Kim J., CCDC41 is required for ciliary vesicle docking to the mother centriole [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(15): 5987–5992.
- [143] Kalderon D., Roberts B.L., Richardson W.D., Smith A.E., A short amino acid sequence able to specify nuclear location [J]. *Cell*, 1984, 39(3 Pt 2): 499–509.
- [144] Kang S., Kim K.H., Kim Y.C., A novel electroporation system for efficient molecular delivery into *Chlamydomonas reinhardtii* with a 3-dimensional microelectrode [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15835.
- [145] Kasai Y., Harayama S., Construction of marker-free transgenic strains of *Chlamydomonas reinhardtii* using a Cre/loxP-mediated recombinase system [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(8): e0161733.
- [146] Kates J.R., Jones R.F., The control of gametic differentiation in liquid cultures of *Chlamydomonas* [J]. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1964, 63(2): 157–164.
- [147] Katoh Y., Terada M., Nishijima Y., Takei R., Nozaki S., Hamada H., Nakayama K., Overall architecture of the intraflagellar transport (IFT)-B complex containing Cluap1/IFT38 as an essential component of the IFT-B peripheral subcomplex [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(21): 10962–10975.
- [148] Kee H.L., Dishinger J.F., Blasius T.L., Liu C.J., Margolis B., Verhey K.J., A size-exclusion permeability barrier and nucleoporins characterize a ciliary pore complex that regulates transport into cilia [J]. *Nature Cell Biology*, 2012, 14(4): 431–437.
- [149] Kee H.L., Verhey K.J., Molecular connections between nuclear and ciliary import processes [J]. *Cilia*, 2013, 2(1): 11.
- [150] Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J., The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis [J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845–858.
- [151] Kempinski C., Jiang Z., Bell S., Chappell J., Metabolic engineering of higher plants and algae for isoprenoid production [J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2015, 148: 161–199.
- [152] Kianianmomeni A., Hallmann A., Algal photoreceptors: *in vivo* functions and potential applications [J]. *Planta*, 2014, 239(1): 1–26.
- [153] Kim H., Xu H., Yao Q., Li W., Huang Q., Outeda P., Cebotaru V., Chiaravalli M., Boletta A., Piontek K., Germino G.G., Weinman E.J., Watnick T., Qian F., Ciliary membrane proteins traffic

- through the Golgi via a Rabep1/GGA1/Arl3-dependent mechanism [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5482.
- [154] Kindle K.L., High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(3): 1228–1232.
- [155] Kitagawa D., Vakonakis I., Olieric N., Hilbert M., Keller D., Olieric V., Bortfeld M., Erat M.C., Fluckiger I., Gonczy P., Steinmetz M.O., Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles [J]. *Cell*, 2011, 144(3): 364–375.
- [156] Knodler A., Feng S., Zhang J., Zhang X., Das A., Peranen J., Guo W., Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(14): 6346–6351.
- [157] Ko J.K., Ma J., A rapid and efficient PCR-based mutagenesis method applicable to cell physiology study [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2005, 288(6): C1273–1278.
- [158] Kobayashi T., Tsang W.Y., Li J., Lane W., Dynlacht B.D., Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis [J]. *Cell*, 2011, 145(6): 914–925.
- [159] Kozlowski L.P., Bujnicki J.M., MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins [J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 111.
- [160] Kozminski K.G., Beech P.L., Rosenbaum J.L., The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1995, 131(6): 1517–1527.
- [161] Kozminski K.G., Johnson K.A., Forscher P., Rosenbaum J.L., A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(12): 5519–5523.
- [162] Kropat J., Tottey S., Birkenbihl R.P., Depege N., Huijser P., Merchant S., A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(51): 18730–18735.
- [163] Kubo T., Brown J.M., Bellve K., Craige B., Craft J.M., Fogarty K., Lechtreck K.F., Witman G.B., Together, the IFT81 and IFT74 N-termini form the main module for intraflagellar transport of tubulin [J]. *Journal of Cell Science*, 2016, 129(10): 2106–2119.

- [164] Kuhns S., Schmidt K.N., Reymann J., Gilbert D.F., Neuner A., Hub B., Carvalho R., Wiedemann P., Zentgraf H., Erfle H., The microtubule affinity regulating kinase MARK4 promotes axoneme extension during early ciliogenesis [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 200(4): 505–522.
- [165] Kusnier C., Cardenas C., Hidalgo J., Jaimovich E., Single-channel recording of inositol trisphosphate receptor in the isolated nucleus of a muscle cell line [J]. *Biological Research*, 2006, 39(3): 541–553.
- [166] Laird J.G., Pan Y., Modestou M., Yamaguchi D.M., Song H., Sokolov M., Baker S.A., Identification of a VxP targeting signal in the flagellar Na⁺/K⁺-ATPase [J]. *Traffic*, 2015, 16(12): 1239–1253.
- [167] Lander N., Chiurillo M.A., Docampo R., Genome editing by CRISPR/Cas9: a game change in the genetic manipulation of protists [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2016, 63(5): 679–690.
- [168] Lange A., Mills R.E., Lange C.J., Stewart M., Devine S.E., Corbett A.H., Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(8): 5101–5105.
- [169] Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G., Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947–2948.
- [170] Lauersen K.J., Berger H., Mussgnug J.H., Kruse O., Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 167(2): 101–110.
- [171] Lauersen K.J., Kruse O., Mussgnug J.H., Targeted expression of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii* with a versatile, modular vector toolkit [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(8): 3491–3503.
- [172] Lechtreck K.F., *In vivo* imaging of IFT in *Chlamydomonas* flagella [J]. *Methods in Enzymology*, 2013, 524: 265.
- [173] Lechtreck K.F., IFT-cargo interactions and protein transport in cilia [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2015, 40(12): 765–778.
- [174] Lechtreck K.F., Methods for Studying Movement of Molecules Within Cilia [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1454: 83–96.
- [175] Lechtreck K.F., Van De Weghe J.C., Harris J.A., Liu P., Protein transport in growing and steady-state cilia [J]. *Traffic*, 2017, 18(5): 277–286.

- [176] LeDizet M., Piperno G., Cytoplasmic microtubules containing acetylated alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*: spatial arrangement and properties [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1986, 103(1): 13–22.
- [177] Lefebvre P.A., Flagellar amputation and regeneration in *Chlamydomonas* [J]. *Cilia and Flagella*, 1995, 47: 3–7.
- [178] Leon-Banares R., Gonzalez-Ballester D., Galvan A., Fernandez E., Transgenic microalgae as green cell-factories [J]. *TRENDS in Biotechnology*, 2004, 22(1): 45–52.
- [179] Li X., Zhang R., Patena W., Gang S.S., Blum S.R., Ivanova N., Yue R., Robertson J.M., Lefebvre P.A., Fitz-Gibbon S.T., Grossman A.R., Jonikas M.C., An indexed, mapped mutant library enables reverse genetics studies of biological processes in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Cell*, 2016, 28(2): 367–387.
- [180] Liang Y., Meng D., Zhu B., Pan J., Mechanism of ciliary disassembly [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(9): 1787–1802.
- [181] Liu Y.C., Couzens A.L., Deshwar A.R., LD B.M.C., Zhang X., Puviindran V., Scott I.C., Gingras A.C., Hui C.C., Angers S., The PPFIA1-PP2A protein complex promotes trafficking of Kif7 to the ciliary tip and Hedgehog signaling [J]. *Science Signaling*, 2014, 7(355): ra117.
- [182] Long H., Huang K., Analysis of flagellar protein ubiquitination [J]. *Methods in Enzymology*, 2012, 524: 59–73.
- [183] Long H., Wang Q., Huang K., Ciliary/Flagellar protein ubiquitination [J]. *Cells*, 2015, 4(3): 474–82.
- [184] Long H., Zhang F., Xu N., Liu G., Diener D.R., Rosenbaum J.L., Huang K., Comparative analysis of ciliary membranes and ectosomes [J]. *Current Biology*, 2016, 26(24): 3327–3335.
- [185] Lu Q., Insinna C., Ott C., Stauffer J., Pintado P.A., Rahajeng J., Baxa U., Walia V., Cuenca A., Hwang Y.S., Daar I.O., Lopes S., Lippincott-Schwartz J., Jackson P.K., Caplan S., Westlake C.J., Early steps in primary cilium assembly require EHD1/EHD3-dependent ciliary vesicle formation [J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(3): 228–240.
- [186] Lucke B.F., Behal R.H., Qin H., Siron L.C., Taggart W.D., Rosenbaum J.L., Cole D.G., Characterization of the intraflagellar transport complex B core: direct interaction of the IFT81 and IFT74/72 subunits [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(30): 27688–27696.
- [187] Lucke B.F., Miller M.S., Dziedzic S.A., Blackmarr P.T., Cole D.G., Direct interactions of intraflagellar transport complex B proteins IFT88, IFT52, and IFT46 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(28): 21508–21518.

- [188] Luijten M.N., Basten S.G., Claessens T., Vernooij M., Scott C.L., Janssen R., Easton J.A., Kamps M.A., Vreeburg M., Broers J.L., Birt-Hogg-Dube syndrome is a novel ciliopathy [J]. *Human Molecular Genetics*, 2013, 22(21): 4383–4397.
- [189] Lupas A., Van Dyke M., Stock J., Predicting coiled coils from protein sequences [J]. *Science*, 1991, 252(5009): 1162–1164.
- [190] Maguire J.E., Silva M., Nguyen K.C.Q., Hellen E., Kern A.D., Hall D.H., Barr M.M., Myristoylated CIL-7 regulates ciliary extracellular vesicle biogenesis [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2015, 26(15): 2823–2832.
- [191] Malicki J., Avidor-Reiss T., From the cytoplasm into the cilium: bon voyage [J]. *Organogenesis*, 2014, 10(1): 138–157.
- [192] Mangel M., Samaniego F.J., Abraham Wald's work on aircraft survivability [J]. *Journal of the American Statistical Association*, 1984, 79(386): 259–267.
- [193] Marshall W.F., Nonaka S., Cilia: tuning in to the cell's antenna [J]. *Current Biology*, 2006, 16(15): R604–R614.
- [194] Marshall W.F., Rosenbaum J.L., Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control [J]. *Journal of Cell Biology*, 2001, 155(3): 405–414.
- [195] Marsischky G., LaBaer J., Many paths to many clones: a comparative look at high-throughput cloning methods [J]. *Genome Research*, 2004, 14(10B): 2020–2028.
- [196] Maul J.E., Lilly J.W., Cui L., dePamphilis C.W., Miller W., Harris E.H., Stern D.B., The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(11): 2659–2679.
- [197] Mayfield S.P., Manuell A.L., Chen S., Wu J., Tran M., Siefker D., Muto M., Marin-Navarro J., *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(2): 126–133.
- [198] Mazo G., Soplop N., Wang W.J., Uryu K., Tsou M.B., Spatial control of primary ciliogenesis by subdistal appendages alters sensation-associated properties of cilia [J]. *Developmental Cell*, 2016, 39(4): 424–437.
- [199] McGuffin L.J., Bryson K., Jones D.T., The PSIPRED protein structure prediction server [J]. *Bioinformatics*, 2000, 16(4): 404–405.

- [200] McIntyre J.C., Joiner A.M., Zhang L., Iniguez-Lluhi J., Martens J.R., SUMOylation regulates ciliary localization of olfactory signaling proteins [J]. *Journal of Cell Science*, 2015, 128(10): 1934–1945.
- [201] Meng D., Pan J., A NIMA-related kinase, CNK4, regulates ciliary stability and length [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 27(5): 838–847.
- [202] Michalakis S., Reisert J., Geiger H., Wetzel C., Zong X., Bradley J., Spehr M., Hutt S., Gerstner A., Pfeifer A., Hatt H., Yau K.W., Biel M., Loss of CNGB1 protein leads to olfactory dysfunction and subciliary cyclic nucleotide-gated channel trapping [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(46): 35156–35166.
- [203] Miller M.S., Esparza J.M., Lippa A.M., Lux F.G., Cole D.G., Dutcher S.K., Mutant kinesin-2 motor subunits increase chromosome loss [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(8): 3810–3820.
- [204] Minko I., Holloway S.P., Nikaido S., Carter M., Odom O.W., Johnson C.H., Herrin D.L., *Renilla* luciferase as a vital reporter for chloroplast gene expression in *Chlamydomonas* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1999, 262(3): 421–425.
- [205] Mizuno N., Taschner M., Engel B.D., Lorentzen E., Structural studies of ciliary components [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 422(2): 163–180.
- [206] Molnar A., Bassett A., Thuenemann E., Schwach F., Karkare S., Ossowski S., Weigel D., Baulcombe D., Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Journal*, 2009, 58(1): 165–174.
- [207] Moreland J.L., Gramada A., Buzko O.V., Zhang Q., Bourne P.E., The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications [J]. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6: 21.
- [208] Morga B., Bastin P., Getting to the heart of intraflagellar transport using *Trypanosoma* and *Chlamydomonas* models: the strength is in their differences [J]. *Cilia*, 2013, 2(1): 16.
- [209] Mourao A., Christensen S.T., Lorentzen E., The intraflagellar transport machinery in ciliary signaling [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, 41: 98–108.
- [210] Mukherjee A., Weyant K.B., Agrawal U., Walker J., Cann I.K., Schroeder C.M., Engineering and characterization of new LOV-based fluorescent proteins from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Vaucheria frigida* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(4): 371–377.
- [211] Mukhopadhyay S., Jackson P.K., Cilia, tubby mice, and obesity [J]. *Cilia*, 2013, 2(1): 1.

- [212] Mukhopadhyay S., Wen X., Chih B., Nelson C.D., Lane W.S., Scales S.J., Jackson P.K., TULP3 bridges the IFT-A complex and membrane phosphoinositides to promote trafficking of G protein-coupled receptors into primary cilia [J]. *Genes and Development*, 2010, 24(19): 2180–2193.
- [213] Mussgnug J.H., Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(13): 5407–5418.
- [214] Nachury M.V., Loktev A.V., Zhang Q., Westlake C.J., Peranen J., Merdes A., Slusarski D.C., Scheller R.H., Bazan J.F., Sheffield V.C., Jackson P.K., A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis [J]. *Cell*, 2007, 129(6): 1201–1213.
- [215] Nager A.R., Goldstein J.S., Herranz-Perez V., Portran D., Ye F., Garcia-Verdugo J.M., Nachury M.V., An actin network dispatches ciliary GPCRs into extracellular vesicles to modulate signaling [J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 252–263.e14.
- [216] Najafi M., Maza N.A., Calvert P.D., Steric volume exclusion sets soluble protein concentrations in photoreceptor sensory cilia [J]. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(1): 203–208.
- [217] Narasimhan V., Roy S., Cilia: organelles at the heart of heart disease [J]. *Current Biology*, 2015, 25(13): R559–562.
- [218] Naslavsky N., Caplan S., EHD proteins: key conductors of endocytic transport [J]. *Trends in Cell Biology*, 2011, 21(2): 122–131.
- [219] Nauli S.M., Alenghat F.J., Luo Y., Williams E., Vassilev P., Li X., Elia A.E., Lu W., Brown E.M., Quinn S.J., Ingber D.E., Zhou J., Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells [J]. *Nature Genetics*, 2003, 33(2): 129–137.
- [220] Nechipurenko I.V., Doroquez D.B., Sengupta P., Primary cilia and dendritic spines: different but similar signaling compartments [J]. *Molecules and Cells*, 2013: 1–16.
- [221] Neupert J., Karcher D., Bock R., Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes [J]. *Plant Journal*, 2009, 57(6): 1140–1150.
- [222] Oda T., Yanagisawa H., Kamiya R., Kikkawa M., A molecular ruler determines the repeat length in eukaryotic cilia and flagella [J]. *Science*, 2014, 346(6211): 857–860.
- [223] O'Hagan R., Wang J., Barr M.M., Mating behavior, male sensory cilia, and polycystins in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2014, 33: 25–33.

- [224] Okita N., Isogai N., Hirono M., Kamiya R., Yoshimura K., Phototactic activity in *Chlamydomonas* ‘non-phototactic’ mutants deficient in Ca²⁺-dependent control of flagellar dominance or in inner-arm dynein [J]. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(3): 529–537.
- [225] Omori Y., Chaya T., Yoshida S., Irie S., Tsujii T., Furukawa T., Identification of G protein-coupled receptors (GPCRs) in primary cilia and their possible involvement in body weight control [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(6): e0128422.
- [226] Onishi M., Pringle J.R., Robust transgene expression from bicistronic mRNA in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2016, 6(12): 4115–4125.
- [227] Ormo M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J., Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein [J]. *Science*, 1996, 273(5280): 1392–1395.
- [228] Ou G., Blacque O.E., Snow J.J., Leroux M.R., Scholey J.M., Functional coordination of intraflagellar transport motors [J]. *Nature*, 2005, 436(7050): 583–587.
- [229] Ounjai P., Kim K.D., Liu H., Dong M., Tauscher A.N., Witkowska H.E., Downing K.H., Architectural insights into a ciliary partition [J]. *Current Biology*, 2013, 23(4): 339–344.
- [230] Palczewski K., G protein-coupled receptor rhodopsin [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2006, 75: 743.
- [231] Pan J., Snell W., The primary cilium: keeper of the key to cell division [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1255–1257.
- [232] Pan J., Snell W.J., *Chlamydomonas* shortens its flagella by activating axonemal disassembly, stimulating IFT particle trafficking, and blocking anterograde cargo loading [J]. *Developmental Cell*, 2005, 9(3): 431–438.
- [233] Pan X., Ou G., Civelekoglu-Scholey G., Blacque O.E., Endres N.F., Tao L., Mogilner A., Leroux M.R., Vale R.D., Scholey J.M., Mechanism of transport of IFT particles in *C. elegans* cilia by the concerted action of kinesin-II and OSM-3 motors [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2006, 174(7): 1035–1045.
- [234] Pazour G.J., Dickert B.L., Witman G.B., The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 144(3): 473–481.
- [235] Pedersen L.B., Rosenbaum J.L., Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2008, 85: 23–61.
- [236] Perrault I., Halbritter J., Porath J.D., Gerard X., Braun D.A., Gee H.Y., Fathy H.M., Saunier S., Cormier-Daire V., Thomas S., Attie-Bitach T., Boddaert N., Taschner M., Schueler M., Lorentzen E., Lifton R.P., Lawson J.A., Garfa-Traore M., Otto E.A., Bastin P., Caillaud C., Kaplan J., Rozet

- J.M., Hildebrandt F., IFT81, encoding an IFT-B core protein, as a very rare cause of a ciliopathy phenotype [J]. *Journal of Medical Genetics*, 2015, 52(10): 657–665.
- [237] Perrone C.A., Yang P., O’ Toole E., Sale W.S., Porter M.E., The *Chlamydomonas* IDA7 locus encodes a 140-kDa dynein intermediate chain required to assemble the I1 inner arm complex [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1998, 9(12): 3351–3365.
- [238] Phillips G.J., Green fluorescent protein—a bright idea for the study of bacterial protein localization [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 204(1): 9–18.
- [239] Pigino G., Geimer S., Lanzavecchia S., Paccagnini E., Cantele F., Diener D.R., Rosenbaum J.L., Lupetti P., Electron-tomographic analysis of intraflagellar transport particle trains *in situ* [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2009, 187(1): 135–148.
- [240] Piperno G., Mead K., Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of *Chlamydomonas* flagella [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(9): 4457–4462.
- [241] Plotnikova O.V., Pugacheva E.N., Golemis E.A., Primary cilia and the cell cycle [J]. *Methods in Cell Biology*, 2009, 94: 137—160.
- [242] Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J., Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein [J]. *Gene*, 1992, 111(2): 229–233.
- [243] Primers P., High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. *Biotechniques*, 2007, 43: 649–656.
- [244] Prosser S.L., Morrison C.G., Centrin2 regulates CP110 removal in primary cilium formation [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2015, 208(6): 693–701.
- [245] Qin H., Diener D.R., Geimer S., Cole D.G., Rosenbaum J.L., Intraflagellar transport (IFT) cargo IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2004, 164(2): 255–266.
- [246] Quan J., Tian J., Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(7): e6441.
- [247] Quan J., Tian J., Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries [J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(2): 242–251.
- [248] Quarmby L.M., Parker J.D., Cilia and the cell cycle? [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2005, 169(5): 707–710.
- [249] Raposo G., Stoorvogel W., Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends [J]. *Journal of Cell Biology*, 2013, 200(4): 373–383.

- [250] Rasala B.A., Chao S.S., Pier M., Barrera D.J., Mayfield S.P., Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e94028.
- [251] Rasala B.A., Lee P.A., Shen Z., Briggs S.P., Mendez M., Mayfield S.P., Robust expression and secretion of xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e43349.
- [252] Reusch R.N., Hiske T.W., Sadoff H.L., Poly-beta-hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformability in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1986, 168(2): 553–562.
- [253] Richey E., Qin H., Isolation of intraflagellar transport particle proteins from *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Methods in Enzymology*, 2013, 524: 1–17.
- [254] Richey E.A., Qin H., Dissecting the sequential assembly and localization of intraflagellar transport particle complex B in *Chlamydomonas* [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e43118.
- [255] Riparbelli M.G., Callaini G., Megraw T.L., Assembly and persistence of primary cilia in dividing *Drosophila* spermatocytes [J]. *Developmental Cell*, 2012, 23(2): 425–432.
- [256] Rochaix J., *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast [J]. *Annual Review of Genetics*, 1995, 29(1): 209–230.
- [257] Rohatgi R., Snell W.J., The ciliary membrane [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22(4): 541–546.
- [258] Rosenbaum J.L., Moulder J.E., Ringo D.L., Flagellar elongation and shortening in *Chlamydomonas*. The use of cycloheximide and colchicine to study the synthesis and assembly of flagellar proteins [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1969, 41(2): 600–619.
- [259] S E.L.A., Mager I., Breakefield X.O., Wood M.J., Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013, 12(5): 347–357.
- [260] Sager R., Granick S., Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1953, 56(5): 831–838.
- [261] Sanchez A., Urrego D., Pardo L.A., Cyclic expression of the voltage-gated potassium channel KV10.1 promotes disassembly of the primary cilium [J]. *EMBO Reports*, 2016, 17(5): 708–723.
- [262] Santos N., Reiter J.F., A central region of Gli2 regulates its localization to the primary cilium and transcriptional activity [J]. *Journal of Cell Science*, 2014, 127(Pt 7): 1500–1510.
- [263] Satir P., CILIA: before and after [J]. *Cilia*, 2017, 6: 1.
- [264] Satir P., Christensen S.T., Overview of structure and function of mammalian cilia [J]. *Annual Review of Physiology*, 2007, 69: 377–400.

- [265] Schmidt K.N., Kuhns S., Neuner A., Hub B., Zentgraf H., Pereira G., Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2012, 199(7): 1083–1101.
- [266] Schmollinger S., Strenkert D., Schroda M., An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance [J]. *Current Genetics*, 2010, 56(4): 383–389.
- [267] Scholey J.M., Intraflagellar transport [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2003, 19: 423–443.
- [268] Seeger-Nukpezah T., Little J.L., Serzhanova V., Golemis E.A., Cilia and cilia-associated proteins in cancer [J]. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2013, 10(3-4): e135–e142.
- [269] Shaheen R., Faqeih E., Seidahmed M.Z., Sunker A., Alali F.E., Khadijah A., Alkuraya F.S., A TCTN2 mutation defines a novel Meckel Gruber syndrome locus [J]. *Human mutation*, 2011, 32(6): 573–578.
- [270] Shaner N.C., Lambert G.G., Chammas A., Ni Y., Cranfill P.J., Baird M.A., Sell B.R., Allen J.R., Day R.N., Israelsson M., Davidson M.W., Wang J., A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum* [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(5): 407–409.
- [271] Shao N., Bock R., A codon-optimized luciferase from *Gaussia princeps* facilitates the *in vivo* monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Current Genetics*, 2008, 53(6): 381–388.
- [272] Shimogawara K., Fujiwara S., Grossman A., Usuda H., High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation [J]. *Genetics*, 1998, 148(4): 1821–1828.
- [273] Shin S.E., Lim J.M., Koh H.G., Kim E.K., Kang N.K., Jeon S., Kwon S., Shin W.S., Lee B., Hwangbo K., Kim J., Ye S.H., Yun J.Y., Seo H., Oh H.M., Kim K.J., Kim J.S., Jeong W.J., Chang Y.K., Jeong B.R., CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27810.
- [274] Silva D.A., Huang X., Behal R.H., Cole D.G., Qin H., The RABL5 homolog IFT22 regulates the cellular pool size and the amount of IFT particles partitioned to the flagellar compartment in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Cytoskeleton*, 2012, 69(1): 33–48.
- [275] Singla V., Reiter J.F., The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle [J]. *Science*, 2006, 313(5787): 629–633.

- [276] Singla V., Romaguera-Ros M., Garcia-Verdugo J.M., Reiter J.F., Ofd1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles [J]. *Developmental Cell*, 2010, 18(3): 410–424.
- [277] Snow J.J., Ou G., Gunnarson A.L., Walker M.R.S., Zhou H.M., Brust-Mascher I., Scholey J.M., Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on *C. elegans* neurons [J]. *Nature Cell Biology*, 2004, 6(11): 1109–1113.
- [278] Song K., Awata J., Tritschler D., Bower R., Witman G.B., Porter M.E., Nicastro D., *In situ* localization of N and C termini of subunits of the flagellar nexin-dynein regulatory complex (N-DRC) using SNAP tag and cryo-electron tomography [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(9): 5341–5353.
- [279] Sorokin S., Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells [J]. *Journal of Cell Biology*, 1962, 15: 363–377.
- [280] Sorokin S.P., Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs [J]. *Journal of Cell Science*, 1968, 3(2): 207–230.
- [281] Specht E.A., Nour-Eldin H.H., Hoang K.T., Mayfield S.P., An improved ARS2-derived nuclear reporter enhances the efficiency and ease of genetic engineering in *Chlamydomonas* [J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 10(3): 473–479.
- [282] Spektor A., Tsang W.Y., Khoo D., Dynlacht B.D., Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program [J]. *Cell*, 2007, 130(4): 678–690.
- [283] Stepanek L., Pigino G., Microtubule doublets are double-track railways for intraflagellar transport trains [J]. *Science*, 2016, 352(6286): 721–724.
- [284] Stoetzel C., Bar S., De Craene J.O., Scheidecker S., Etard C., Chicher J., Reck J.R., Perrault I., Geoffroy V., Chennen K., Strahle U., Hammann P., Friant S., Dollfus H., A mutation in *VPS15 (PIK3R4)* causes a ciliopathy and affects IFT20 release from the *cis*-Golgi [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13586.
- [285] Sun X., Haley J., Bulgakov O.V., Cai X., McGinnis J., Li T., Tubby is required for trafficking G protein-coupled receptors to neuronal cilia [J]. *Cilia*, 2012, 1(1): 21.
- [286] Szempruch A.J., Dennison L., Kieft R., Harrington J.M., Hajduk S.L., Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016a, 14(11): 669–675.

- [287] Szempruch A.J., Sykes S.E., Kieft R., Dennison L., Becker A.C., Gartrell A., Martin W.J., Nakayasu E.S., Almeida I.C., Hajduk S.L., Harrington J.M., Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia [J]. *Cell*, 2016b, 164(1-2): 246–257.
- [288] Tam B.M., Moritz O.L., Hurd L.B., Papermaster D.S., Identification of an outer segment targeting signal in the COOH terminus of rhodopsin using transgenic *Xenopus laevis* [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2000, 151(7): 1369–1380.
- [289] Taschner M., Bhogaraju S., Vetter M., Morawetz M., Lorentzen E., Biochemical mapping of interactions within the intraflagellar transport (IFT) B core complex IFT52 binds directly to four other IFT-B subunits [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(30): 26344–26352.
- [290] Taschner M., Kotsis F., Braeuer P., Kuehn E.W., Lorentzen E., Crystal structures of IFT70/52 and IFT52/46 provide insight into intraflagellar transport B core complex assembly [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2014, 207(2): 269–282.
- [291] Taschner M., Lorentzen E., The intraflagellar transport machinery [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(10): a028092.
- [292] Taschner M., Mourão A., Awasthi M., Basquin J., Lorentzen E., Structural basis of outer dynein arm intraflagellar transport by the transport adaptor protein ODA16 and the intraflagellar transport protein IFT46 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017: In press.
- [293] Taschner M., Weber K., Mourao A., Vetter M., Awasthi M., Stiegler M., Bhogaraju S., Lorentzen E., Intraflagellar transport proteins 172, 80, 57, 54, 38, and 20 form a stable tubulin-binding IFT-B2 complex [J]. *The EMBO Journal*, 2016, 35(7): 773–790.
- [294] Tobin J.L., Beales P.L., The nonmotile ciliopathies [J]. *Genetics in Medicine*, 2009, 11(6): 386–402.
- [295] Toriyama M., Lee C., Taylor S.P., Duran I., Cohn D.H., Bruel A.L., Tabler J.M., Drew K., Kelly M.R., Kim S., Park T.J., Braun D.A., Pierquin G., Biver A., Wagner K., Malfroot A., Panigrahi I., Franco B., Al-Lami H.A., Yeung Y., Choi Y.J., Duffourd Y., Faivre L., Riviere J.B., Chen J., Liu K.J., Marcotte E.M., Hildebrandt F., Thauvin-Robinet C., Krakow D., Jackson P.K., Wallingford J.B., The ciliopathy-associated CPLANE proteins direct basal body recruitment of intraflagellar transport machinery [J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(6): 648–656.
- [296] Tsang W.Y., Bossard C., Khanna H., Peranen J., Swaroop A., Malhotra V., Dynlacht B.D., CP110 suppresses primary cilia formation through its interaction with CEP290, a protein deficient in human ciliary disease [J]. *Developmental Cell*, 2008, 15(2): 187–197.

- [297] Tsang W.Y., Dynlacht B.D., CP110 and its network of partners coordinately regulate cilia assembly [J]. *Cilia*, 2013, 2(1): 9.
- [298] Turner R.M., Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? [J]. *Journal of Andrology*, 2003, 24(6): 790–803.
- [299] Vannuccini E., Paccagnini E., Cantele F., Gentile M., Dini D., Fino F., Diener D., Mencarelli C., Lupetti P., Two classes of short intraflagellar transport train with different 3D structures are present in *Chlamydomonas* flagella [J]. *Journal of Cell Science*, 2016, 129(10): 2064–2074.
- [300] Wakabayashi K.i., Misawa Y., Mochiji S., Kamiya R., Reduction-oxidation poise regulates the sign of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(27): 11280–11284.
- [301] Walther Z., Vashishta M., Hall J.L., The *Chlamydomonas FLA10* gene encodes a novel kinesin-homologous protein [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1994, 126(1): 175–188.
- [302] Wang J., Barr M.M., Ciliary extracellular vesicles: txt msg organelles [J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2016, 36(3): 449–457.
- [303] Wang J., Kaletsky R., Silva M., Williams A., Haas L.A., Androwski R.J., Landis J.N., Patrick C., Rashid A., Santiago-Martinez D., Gravato-Nobre M., Hodgkin J., Hall D.H., Murphy C.T., Barr M.M., Cell-specific transcriptional profiling of ciliated sensory neurons reveals regulators of behavior and extracellular vesicle biogenesis [J]. *Current Biology*, 2015, 25(24): 3232–3238.
- [304] Wang J., Silva M., Haas L.A., Morsci N.S., Nguyen K.C., Hall D.H., Barr M.M., *C. elegans* ciliated sensory neurons release extracellular vesicles that function in animal communication [J]. *Current Biology*, 2014, 24(5): 519–525.
- [305] Wang Y., Duanmu D., Spalding M.H., Carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*: inorganic carbon transport and CO₂ recapture [J]. *Photosynthesis Research*, 2011, 109(1-3): 115–122.
- [306] Wang Y., Spalding M.H., Acclimation to very-low CO₂: contribution of LCIB and LCIA to inorganic carbon uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(4): 2040–2050.
- [307] Warner J.F., McCarthy A.M., Morris R.L., McClay D.R., Hedgehog signaling requires motile cilia in the sea urchin [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 31(1): 18–22.
- [308] Watnick T., Germino G., From cilia to cyst [J]. *Nature Genetics*, 2003, 34(4): 355–356.
- [309] Wei Q., Ling K., Hu J., The essential roles of transition fibers in the context of cilia [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 35: 98–105.

- [310] Westlake C.J., Baye L.M., Nachury M.V., Wright K.J., Ervin K.E., Phu L., Chalouni C., Beck J.S., Kirkpatrick D.S., Slusarski D.C., Sheffield V.C., Scheller R.H., Jackson P.K., Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPPII) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(7): 2759–2764.
- [311] Wheatley D.N., Wang A.M., Strugnell G.E., Expression of primary cilia in mammalian cells [J]. *Cell Biology International*, 1996, 20(1): 73–81.
- [312] Wheway G., Schmidts M., Mans D.A., Szymanska K., Nguyen T.M., Racher H., Phelps I.G., Toedt G., Kennedy J., Wunderlich K.A., Sorusch N., Abdelhamed Z.A., Natarajan S., Herridge W., van Reeuwijk J., Horn N., Boldt K., Parry D.A., Letteboer S.J., Roosing S., Adams M., Bell S.M., Bond J., Higgins J., Morrison E.E., Tomlinson D.C., Slaats G.G., van Dam T.J., Huang L., Kessler K., Giessl A., Logan C.V., Boyle E.A., Shendure J., Anazi S., Aldahmesh M., Al Hazzaa S., Hegele R.A., Ober C., Frosk P., Mhanni A.A., Chodirker B.N., Chudley A.E., Lamont R., Bernier F.P., Beaulieu C.L., Gordon P., Pon R.T., Donahue C., Barkovich A.J., Wolf L., Toomes C., Thiel C.T., Boycott K.M., McKibbin M., Inglehearn C.F., Stewart F., Omran H., Huynen M.A., Sergouniotis P.I., Alkuraya F.S., Parboosingh J.S., Innes A.M., Willoughby C.E., Giles R.H., Webster A.R., Ueffing M., Blacque O., Gleeson J.G., Wolfrum U., Beales P.L., Gibson T., Doherty D., Mitchison H.M., Roepman R., Johnson C.A., An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes [J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(8): 1074–1087.
- [313] Wijffels R.H., Barbosa M.J., An outlook on microalgal biofuels [J]. *Science*, 2010, 329(5993): 796–799.
- [314] Winck F.V., Kwasniewski M., Wienkoop S., Mueller-Roeber B., An optimized method for the isolation of nuclei from *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 2011, 47(2): 333–340.
- [315] Witman G.B., Carlson K., Berliner J., Rosenbaum J.L., *Chlamydomonas* flagella. I. Isolation and electrophoretic analysis of microtubules, matrix, membranes, and mastigonemes [J]. *Journal of Cell Biology*, 1972, 54(3): 507–539.
- [316] Wood C.R., Huang K., Diener D.R., Rosenbaum J.L., The cilium secretes bioactive ectosomes [J]. *Current Biology*, 2013, 23(10): 906–911.
- [317] Wood C.R., Rosenbaum J.L., Proteins of the ciliary axoneme are found on cytoplasmic membrane vesicles during growth of cilia [J]. *Current Biology*, 2014, 24(10): 1114–1120.

- [318] Wood C.R., Rosenbaum J.L., Ciliary ectosomes: transmissions from the cell's antenna [J]. *Trends in Cell Biology*, 2015, 25(5): 276–285.
- [319] Wood C.R., Wang Z., Diener D., Zones J.M., Rosenbaum J., Umen J.G., IFT proteins accumulate during cell division and localize to the cleavage furrow in *Chlamydomonas* [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e30729.
- [320] Wykoff D.D., Grossman A.R., Weeks D.P., Usuda H., Shimogawara K., Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas* [J]. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(26): 15336–15341.
- [321] Xu D., Zhang Y., Generating triangulated macromolecular surfaces by euclidean distance transform [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(12): e8140.
- [322] Xu Q., Zhang Y., Wei Q., Huang Y., Hu J., Ling K., Phosphatidylinositol phosphate kinase PIPK γ and phosphatase INPP5E coordinate initiation of ciliogenesis [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10777.
- [323] Yamano T., Iguchi H., Fukuzawa H., Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(6): 691–694.
- [324] Ye F., Breslow D.K., Koslover E.F., Spakowitz A.J., Nelson W.J., Nachury M.V., Single molecule imaging reveals a major role for diffusion in the exploration of ciliary space by signaling receptors [J]. *Elife*, 2013, 2: e00654.
- [325] Ye X., Zeng H., Ning G., Reiter J.F., Liu A., C2cd3 is critical for centriolar distal appendage assembly and ciliary vesicle docking in mammals [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(6): 2164–2169.
- [326] Yeyati P.L., Schiller R., Mali G., Kasioulis I., Kawamura A., Adams I.R., Playfoot C., Gilbert N., van Heyningen V., Wills J., von Kriegsheim A., Finch A., Sakai J., Schofield C.J., Jackson I.J., Mill P., KDM3A coordinates actin dynamics with intraflagellar transport to regulate cilia stability [J]. *Journal of Cell Biology*, 2017: In press.
- [327] Zhang H., Saitoh H., Matunis M.J., Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(18): 6498–6508.
- [328] Zhang J., Naslavsky N., Caplan S., Rabs and EHDs: alternate modes for traffic control [J]. *Bioscience Reports*, 2012, 32(1): 17–23.

- [329] Zhang R., Patena W., Armbruster U., Gang S.S., Blum S.R., Jonikas M.C., High-throughput genotyping of green algal mutants reveals random distribution of mutagenic insertion sites and endonucleolytic cleavage of transforming DNA [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(4): 1398–1409.
- [330] Zhang W., Taylor S.P., Nevarez L., Lachman R.S., Nickerson D.A., Bamshad M., Krakow D., Cohn D.H., IFT52 mutations destabilize anterograde complex assembly, disrupt ciliogenesis and result in short rib polydactyly syndrome [J]. *Human Molecular Genetics*, 2016, pii: ddw241.
- [331] Zhao H., Lu M., Singh R., Snell W.J., Ectopic expression of a Chlamydomonas mt+-specific homeodomain protein in mt- gametes initiates zygote development without gamete fusion [J]. *Genes and Development*, 2001, 15(20): 2767–2777.
- [332] Zhao T., Wang W., Bai X., Qi Y., Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas* [J]. *Plant Journal*, 2009, 58(1): 157–164.
- [333] Zheng L., Baumann U., Reymond J.L., An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(14): e115.
- [334] Zhu B., Zhu X., Wang L., Liang Y., Feng Q., Pan J., Functional exploration of the IFT-A complex in intraflagellar transport and ciliogenesis [J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(2): e1006627.

附录A 本研究所用仪器信息

表A1 本研究所用仪器信息。

Table A1 List of instruments used in this study.

Instrument Name	Type	Manufacturer
Air dry oven	XMTD-8222	JINGHONG
Analog Orbital Shaker	SK-O180-E	SCILOGEX
Analytical balance	AUY120	SHIMADZU
Automatic ice maker	XB70	GRANT
Centrifuge	5418	Eppendorf
Centrifuge	5424	Eppendorf
Centrifuge	5424R	Eppendorf
Centrifuge	Allegra 25R	Beckman Coulter
Centrifuge	Avanti J-26XP	Beckman Coulter
Centrifuge	Avanti J-E	Beckman Coulter
Centrifuge	Optima L-100XP	Beckman Coulter
Centrifuge	Optima MAX-XP	Beckman Coulter
Centrifuge	Optima XPN-100	Beckman Coulter
Electro cell manipulator	ECM630	BTX
Clean bench	SW-CJ-2FD	AIRTECH
Clean bench	SW-CJ-2G	AIRTECH
Digital Sonifier	100-132-890R	BRANSON
Constant temperature incubator	DNP-9082BS-III	Shanghai CIMO
Electronic balance	JY	Shanghai Puchun
Electrophoresis system	HE-120	Tanon
FACS	FACSAria III	BD
Fluorescence Inverse Microscope	Eclipse Ti	Nikon
Fluorescence Spectrometer	QM-4CW	Photon Technology

接下页

接上页

Instrument Name	Type	Manufacturer
Fume hood	FGG1500	KEBEI Technology
Gel Image System	Tanon 1600	Tanon
High-Pressure Steam Sterilization Pot	MLS-3780	SANYO
High-Pressure Cracker	JN-02C	JNBIO
Illumination incubator	GXZ	JIANGNAN Instrument
Illumination incubator	PGX-330A-12H	Ningbo Laifu
ImageQuant	LAS4000 mini	GE
Laser jet multifunction printer	M2727nf	HP
Laser Scanning Microscope	NOL-LSM710	ZEISS
Laser Scanning Microscope	TCS SP8	Leica
Lateral flow pump	HL-2	Shanghai Huxi
Light microscope	CX21	Olympus
Liquid nitrogen container	Biorack 3000	Statebourne
Magnetic stirrer	HJ-3	Guohua
Microwave Oven	M1	Midea
Mini-PROTEAN tetra cell	165-8000EDU	Bio-Rad
Mini Transfer Tank Combination Package	326223	Hoefer
Multi-mode microplate reader	FilterMax F5	Molecular Devices
Multi-mode microplate reader	SpectraMax M5	Molecular Devices
Multiple Gel Casters	SE215	Hoefer
Pipetman	P	Gilson
pH meter	FiveEasy	Mettler Toledo
PowerPac Basic power supply	164-5050	Bio-Rad
Real-Time PCR System	7900HT	Applied Biosystems
Real-Time PCR System	CFX Connect	Bio-Rad
Real-Time PCR System	LightCycler 280II	Roche
Refrigerator	DW-25L262	Qingdao Haier
Refrigerator	DW-YL270	Meiling Cryogenic Technology

接下页

接上页

Instrument Name	Type	Manufacturer
Refrigerator	HYC-326A	Qingdao Haier
Refrigerator	YC-300L	Meiling Cryogenic Technology
Rolling incubator	QB-128	Kylin-Bell
Scanner	CanoScan 9000F	Canon
Shaker incubator	HYQ-60	Wuhan Huicheng
Shaker incubator	SKY-111C	SUKUN
Smart thermostatic bath	SC-15	Ningbo Xinzhi
Spectrophotometer	NANODROP 8000	Thermo Scientific
Table Shaker	SK-0180-E	SCILOGEX
Thermal cycler	LifePro	BIOER TECHNOLOGY
Thermal cycler	ProFlex	Applied Biosystems
Thermal cycler	Veriti 96 well	Applied Biosystems
Thermostatic bath	SDC-6	Ningbo Xinzhi
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	170-3940	Bio-Rad
Ultra-pure water system	RO DI	Shanghai Hetai
Ultrasonic Cell Processor Soundproof Box	NO	KESHENG
UV-Vis Spectrophotometer	Q5000	Quawell
Water Bath Shaker	ZWY-110X50	Shanghai Zhicheng
Zoom stereomicroscope	SMZ1500	Nikon

附录B 本研究所用试剂信息

表B1 本研究所用试剂信息。

Table B1 List of reagents used in this study.

Reagent Name	Catalog Number	Verder
4%多聚甲醛	AR-0211	鼎国昌盛生物技术有限责任公司
Agar	V900500	Vetec
Agarose	G-10	BIOWEST
Agarose	R9012LE	TSINGKE
Alkaline Phosphatase	M0290S	NEB
DNA 胶回收试剂盒	AP-GX-50	Axygen
DNA 胶回收试剂盒	BSC02M1	BioSpin
DNA 胶回收试剂盒	D2500-02	Omega
FD <i>AanI</i>	FD2064	Thermo Scientific
FD <i>BamHI</i>	FD0054	Thermo Scientific
FD <i>BcuI</i>	FD1253	Thermo Scientific
FD <i>BshTI</i>	FD1464	Thermo Scientific
FD <i>EcoRI</i>	FD0274	Thermo Scientific
FD <i>EcoRV</i>	FD0303	Thermo Scientific
FD <i>HindIII</i>	FD0504	Thermo Scientific
FD <i>KpnI</i>	FD0524	Thermo Scientific
FD <i>MunI</i>	FD0753	Thermo Scientific
FD <i>NcoI</i>	FD0573	Thermo Scientific
FD <i>NdeI</i>	FD0583	Thermo Scientific
FD <i>NheI</i>	FD0973	Thermo Scientific
FD <i>NotI</i>	FD0593	Thermo Scientific
FD <i>PaeI</i>	FD0604	Thermo Scientific
FD <i>PmlI</i>	FD0364	Thermo Scientific

接下页

接上页

Reagent Name	Catalog Number	Verder
FD <i>Pst</i> I	FD0614	Thermo Scientific
FD <i>Sac</i> I	FD1133	Thermo Scientific
FD <i>Sal</i> I	FD0644	Thermo Scientific
FD <i>Scal</i> I	FD0434	Thermo Scientific
FD <i>Sda</i> I	FD1194	Thermo Scientific
FD <i>Sgs</i> I	FD1894	Thermo Scientific
FD <i>Sma</i> I	FD0663	Thermo Scientific
FD <i>Stu</i> I	FD0424	Thermo Scientific
FD <i>Xba</i> I	FD0684	Thermo Scientific
FD <i>Xho</i> I	FD0694	Thermo Scientific
FD <i>Xma</i> JI	FD1564	Thermo Scientific
Glycine	Amresco 0167	BIOSHARP
Glycine	G7126	Sigma
Glycine	V900144	Vetec
HEPES	H3375	Sigma
HiFi DNA 聚合酶	AP131	TRANS
IPTG	Amresco 0487	BIOSHARP
Klenow Fragment	EP0054	Thermo Scientific
KOD DNA 聚合酶	KOD-101	TOYOBO
KOD-Plus DNA 聚合酶	KOD-201	TOYOBO
KOD-Plus-Neo	KOD-401	TOYOBO
LA Taq	RR042A	TaKaRa
Phusion DNA 聚合酶	F530S	Thermo Scientific
Phusion DNA 聚合酶	M0530S	NEB
pMD®18-T	D103A	TaKaRa
SYBR Green	QPK-201	TOYOBO
T4 DNA Ligase	M0202S	New England Biolabs
Tris-base	Amresco 0497	BIOSHARP

接下页

接上页

Reagent Name	Catalog Number	Verder
TRIzol	15596-026	Invitrogen
氨苄青霉素	Amresco 0339	BIOSHARP
巴龙霉素	P5057	Sigma
潮霉素 B	V900372	Vetec
点突变试剂盒	FM111	TRANS
反转录试剂盒	K1622	Thermo Scientific
考马斯亮蓝 G-250	Amresco 0615	BIOSHARP
抗荧光淬灭封片液	P0126	上海碧云天生物技术有限公司
质粒小提试剂盒	D6948-01	Omega
质粒小提试剂盒	DP01-300	GeneMark
质粒小提试剂盒	DP103	天根生化科技（北京）有限公司
植物细胞核提取试剂盒	CELLYTPN1	Sigma

附录C 本研究所用培养基

表 C1 TAP培养基配方
Table C1 Formulation of the TAP medium

母液	体积或质量
100xTris*	10 mL
100xTAP salts**	10 mL
Phosphate salts**	1 mL
Trace metals**	1 mL
Glacial acetic acid	1 mL
Agar (for solid medium only)	15 g
ddH ₂ O	To 1 L

*Dissolve 24.2g Tris in 100 mL water.

**See below for detailed information.

表 C2 100xTAP salts配方
Table C2 Formulation of 100xTAP salts used for the TAP medium

试剂	质量或体积
NH ₄ Cl	37.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 g
CaCl ₂ ·H ₂ O	5 g
ddH ₂ O	To 1 L

表 C3 Phosphate salts配方
Table C3 Formulation of Phosphate salts used for the TAP medium

试剂	质量或体积
K ₂ HPO ₄	54 g
KH ₂ PO ₄	27 g
ddH ₂ O	To 500 mL

*Dissolve each compound in the volume of water indicated. The EDTA disodium salt should be dissolved in boiling water, and the FeSO₄ should be prepared last to avoid oxidation. Mix all solutions except EDTA disodium salt. Bring this mixture to boil and add EDTA disodium salt solution. The mixture should turn green. When everything is dissolved, cool to 70 °C. Keeping temperature at 70 °C, adjust the pH to 6.7 with

表 C4 Trace metals配方*

Table C4 Formulation of Trace metals used for the TAP medium

试剂	质量	去离子水体积
EDTA disodium salt	50 g	250 mL
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22 g	100 mL
H ₃ BO ₃	11.4 g	200 mL
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5.06 g	50 mL
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.61 g	50 mL
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57 g	50 mL
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.1 g	50 mL
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.99 g	50 mL

50 mL KOH (20%). Remember to standardize the pH meter with buffer at the same temperature. Do not use NaOH to adjust the pH value. Bring the final solution to 1 liter. It should be clear green initially. Stopper the flask with a cotton plug and let it stand for 1-2 weeks, shaking it once a day. The solution should eventually turn purple and leave a rust-brown precipitate, which can be removed by filtering through two layers of Whatman #1 filter paper, repeating the filtration if necessary until the solution is clear. It can be stored refrigerated or frozen in convenient aliquots.

表 C5 MI培养基配方*

Table C5 Formulation of the MI medium

母液	浓度	体积或质量
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O	500 g/L	1 mL
FeCl ₃ ·6H ₂ O	10 g/L	1 mL
CaCl ₂ ·2H ₂ O	53 g/L	1 mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	300 g/L	1 mL
NH ₄ NO ₃	450 g/L	1 mL
K ₂ HPO ₄	200 g/L	0.5 mL
KH ₂ PO ₄	200 g/L	0.5 mL
Trace elements	No	1 mL
H ₃ BO ₃	1 g/L	No
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/L	No
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.3 g/L	No
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2 g/L	No
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.2 g/L	No
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.04 g/L	No
Agar (for solid medium only)	No	15 g
ddH ₂ O	No	To 1 L

*Adjust pH value to 6.9 before bring the final solution to 1 L.

表 C6 LB培养基配方
Table C6 Formulation of the LB medium

试剂	质量或体积
Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
Agar (for solid medium only)	15 g
ddH ₂ O	To 1 L

表 C7 培养基中各种抗生素的浓度
Table C7 The concentration of antibiotics used in various media in this study.

抗生素	母液浓度	工作液浓度	100 mL使用量
氨苄青霉素	100 mg/mL	100 µg/mL	100 µL
巴龙霉素	10 mg/mL	10 µg/mL	100 µL
潮霉素B	50 mg/mL	12.5 µg/mL	25 µL
盐酸博来霉素	100 mg/mL	2.5 µg/mL	2.5 µL

附录D 本研究所用溶液

- ✿ 1xAnnealing buffer for DNA oligos: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl (pH 8.0) 或 100 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 7.5)。注意这里是 1x 的浓度，配置时请根据需要加倍。也可以直接使用 HiFi (TRANSGEN) 中的 10xBuffer II。
- ✿ 1x 电泳缓冲液 (1 L): 取 100 mL 10xTris-甘氨酸缓冲液，加入 10 mL 10%SDS 后用去离子水定容至 1 L，混匀后室温保存。
- ✿ 1x BSN 转膜缓冲液 (1 L): 取 5.82 g Tris、2.93 g 甘氨酸和 0.375 g SDS 溶解在 500 mL 去离子水中，加入 200 mL 甲醇后定容至 1 L。可先配置母液，实际使用时再稀释。
- ✿ 1xHMDEK: 20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT。
- ✿ 100 mM IPTG: 取 2.4 g¹ IPTG 溶解在 100 mL 水中，使用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌，分装后 -20 °C 保存备用。
- ✿ 10% SDS (W/V) (50 mL): 取 5 g SDS，加入 30 mL 去离子水后在微波炉中用小火加热溶解，定容至 50 mL 后混匀，室温保存。
- ✿ 1xTAE: 取 20 mL 的 50xTAE 缓冲液，加去离子水混匀后定容至 1 L。
- ✿ 1xTAPS (0.4% PEG6000) :取 0.4 g PEG6000 溶解在 90 mL TAP 中，用 0.22 μm 的滤器过滤到无菌的蓝盖瓶中，加入 10 mL 的 10xTAPS 后混匀室温保存。
- ✿ 1xTAPS: 取 10 mL 的 10xTAPS 加入到 90 mL TAP 中，混匀后室温保存。
- ✿ 10xTAPS: 取 10.93 g D-Sorbitol 溶解在 100 mL TAP 中，用 0.22 μm 的滤器过

¹ 使用 GraphPad 的 Molarity Calculator (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/Molarityform.cfm>) 计算所需的质量。

滤到无菌的蓝盖瓶中，室温保存。

- ✿ 10% 过硫酸铵溶液 (W/V) (10 mL): 取 1 g 过硫酸铵用少量去离子溶解后定容到 10 mL，用 1.5 mL 离心管 500 μ L 分装后于 4 °C 保存。
- ✿ 10x 丽春红染色液: 取 2 g 丽春红 S、30 g 三氯乙酸和 30 g 碘基水杨酸，加少量去离子水溶解后定容至 100 mL，混匀后室温保存。使用前用水稀释十倍。
- ✿ 10xTBS: 取 87.6 g NaCl、30 g Tris 和 2 g KCl，加 950 mL 去离子水溶解后用浓盐酸调 pH 值为 8.0，去离子水定容至 1 L，混匀后室温保存。
- ✿ 10xTris-甘氨酸缓冲液 (2 L): 取 Tris 60.58 g，甘氨酸 288.4 g，用少量去离子水溶解后定容至 2 L，混匀后室温保存。
- ✿ 2xLaemmli 上样缓冲液: 取 4 mL 10%SDS (W/V)，2 mL 甘油，1.2 mL 1 M Tris-Cl (pH 6.8) 混匀，加入溴酚蓝粉末至其终浓度为 0.02% (W/V)，最后用去离子水定容至 10 mL。混匀后室温保存。
- ✿ 20% 淀粉溶液: 取 4 g 淀粉加入到 50 mL 离心管中，加入 20 mL 无水乙醇，涡旋混匀后 1000 g 室温离心一分钟弃上清。用 20 mL 无菌水洗涤两次，最后用 70% 酒精定容到 20 mL。
- ✿ 20% 吐温 20: 取 20 mL 吐温 20 加入 80 mL 去离子水，混匀后室温保存。
- ✿ 20 mg/mL X-gal: 使用 DMF¹ 配制 X-gal，分装后 -20 °C 保存备用。
- ✿ 30% 凝胶贮液 (W/V) (Acr·Bis, 291): Bio-Rad 原液。该试剂有一定毒性，使用时请注意防护。
- ✿ 5x样品缓冲液 (50 mL): 3 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)，25 mL 50% 甘油，10 mL 10% SDS，2.5 mL β -巯基乙醇，5 mL 1% 溴酚蓝，4.5 mL 去离子水。混匀后 4 °C 保存。

¹Dimethylformamide, 二甲基甲酰胺

- ✿ 50xTAE：称取 Tris base 242 g、Na₂EDTA·2H₂O 37.2 g，加入 800 mL 的去离子水充分搅拌溶解。加入 57.1 mL 的冰醋酸并充分混匀。加去离子水定容至 1 L，室温保存备用。
- ✿ 氨基黑溶液：取 0.5 g 氨基黑 10B，加入 100 mL 洗涤缓冲液，混匀后过滤两次，最后用洗涤缓冲液定容到 100 mL。
- ✿ 分离胶缓冲液 (pH 8.8)：取 Tris 181.65 g，加入少量去离子水溶解后再加水至总体积约 950 mL，用浓盐酸调 pH 值为 8.8 后定容至 1 L，室温保存。
- ✿ GST pull-down 裂解液：50 mM Phosphate buffer pH 7.5，150 mM NaCl，10% glycerol
- ✿ 考马斯亮蓝 G250 染色液 (1 L)：取 100 mg 考马斯亮蓝 G250 溶解在少量去离子水中，缓慢加入 250 mL 异丙醇并搅拌，加入 100 mL 冰醋酸搅拌混匀后用去离子水定容至 1 L。混匀后用普通滤纸过滤室温保存。
- ✿ Kodak RP X-OMAT 显影液：取 500 mL A 液，各加入 20 mL B 液和 C 液，用去离子水定容至 1.5 L，混匀后用棕色试剂瓶分装 4 °C 保存。
- ✿ Millipore 化学发光 HRP 底物：使用前取等体积的两种试剂混匀。
- ✿ 浓缩胶缓冲液 (pH 6.8)：取 Tris 181.65 g，加入少量去离子水溶解后再加水至总体积约 950 mL，用浓盐酸调 pH 值为 6.8 后定容至 1 L，室温保存。
- ✿ RNaseA (1 μg/μL)：取 35 mg RNaseA 粉末加入至含 3.2 mL 的 0.01 M 醋酸钠 (pH 5.3) 的 5 mL 离心管内。沸水煮十五分钟，室温静置冷却。加入 0.1 倍体积即 0.32 mL 的 Tris-Cl (1 M, pH 8.0) 调 pH 至 7.4。−20 °C 保存备用。
- ✿ SBA 溶液：取 1 M DTT 和 1 M 碳酸钠各 100 μL 至洁净的 2 mL 离心管内，加入 800 μL 双蒸水和 17 μL 的 100x 蛋白酶抑制剂，混匀后立即使用。
- ✿ SBB 溶液：取 5 g SDS 粉末，30 g 蔗糖，加水溶解并定容至 100 mL。如 SDS 不能立即溶解可室温静置过夜再定容。

- ✿ 山羊血清封闭液：5% BSA，1% cold water fish gelatin，10% 山羊血清
- ✿ TBST 溶液：取 100 mL 10xTBS，加入 2.5 mL 20% 吐温 20，用去离子水定容至 1 L，混匀后室温保存。
- ✿ TEMED（四乙基乙二胺）：原液。该试剂易燃，有腐蚀性和强神经毒性，操作时请穿实验服并佩戴一次性口罩和手套在通风橱中进行。使用结束后请及时盖紧瓶盖并放回 4 °C 冰箱。
- ✿ 脱色液（1 L）：冰醋酸 100 mL，乙醇 50 mL，去离子水定容至 1 L，混匀后室温保存。
- ✿ 洗涤缓冲液：取甲醇 450 mL，加入 50 mL 冰醋酸混匀后室温保存。
- ✿ 医用 X 光胶片定影液：按照产品的操作说明依次将两种粉末溶解在去离子水中并定容至 3.5 L，混匀后用棕色试剂瓶分装 4 °C 保存。
- ✿ 转膜缓冲液：取 100 mL 10xTris-甘氨酸缓冲液，加入 200 mL 无水乙醇，用去离子水定容至 1 L，混匀后室温保存。

附录E 本研究所用藻株

表E1 本研究所用藻株。

Table E1 *Chlamydomonas* strains used in this study.

Strain Name	Number	Description	Source
<i>bld1</i>	HS60	the null mutant of <i>IFT52</i>	CRC ^a
<i>bld1 IFT46</i>	HS265	expressing IFT46::YFP by transforming pHK214 in <i>bld1</i>	this study
<i>bld1 IFT46 IFT52</i>	HS266	expressing IFT46::YFP IFT52::3HA by transforming pHK266 and pHK409 in <i>bld1</i>	this study
<i>bld1 IFT46-C1</i>	HS267	expressing IFT46-C1::YFP by transforming pHK245 in <i>bld1</i>	this study
<i>bld1 IFT46-C1 IFT52</i>	HS268	expressing IFT46-C1::YFP IFT52::3HA by transforming pHK242 and pHK409 in <i>bld1</i>	this study
CC125	HS2	wild-type	CRC
CC125 <i>IFT46</i>	HS251	expressing IFT46::YFP by transforming pHK214 in CC125	this study
CC125 <i>IFT46-C</i>	HS252	expressing IFT46-C::YFP by transforming pHK244 in CC125	this study
CC125 <i>IFT46-C1</i>	HS253	expressing IFT46-C1::YFP by transforming pHK245 in CC125	this study
CC125 <i>IFT46-N</i>	HS254	expressing IFT46-N::YFP by transforming pHK232 in CC125	this study
CC125 <i>IFT46-N1</i>	HS255	expressing IFT46-N1::YFP by transforming pHK231 in CC125	this study

接下页

接上页

Strain Name	Number	Description	Source
CC125 <i>IFT46ΔC1</i>	HS256	expressing IFT46 Δ C1::YFP by transforming pHK233 in CC125	this study
CC125 <i>IFT46ΔN1</i>	HS257	expressing IFT46 Δ N1::YFP by transforming pHK243 in CC125	this study
CC125 <i>IFT52C::YFP::NLS</i>	HS291	expressing IFT52C::YFP::NLS by transforming pHK473 in CC125	this study
CC125 <i>YFP</i>	HS258	expressing YFP by transforming pHK281 in CC125	this study
CC125 <i>YFP::NLS</i>	HS292	expressing YFP::NLS by transforming pHK464 in CC125	this study
<i>dhc1b</i>	HS15	the null mutant of <i>DHC1b</i>	CRC
<i>dhc1b IFT46</i>	HS245	expressing IFT46::YFP by transforming pHK214 in <i>dhc1b</i>	this study
<i>dhc1b IFT46-C1</i>	HS246	expressing IFT46-C1::YFP by transforming pHK245 in <i>dhc1b</i>	this study
<i>fla10-2</i>	HS54	the null mutant of <i>FLA10</i>	CRC
<i>fla10 IFT46</i>	HS248	expressing IFT46::YFP by transforming pHK214 in <i>fla10</i>	this study
<i>fla10 IFT46-C1</i>	HS249	expressing IFT46-C1::YFP by transforming pHK245 in <i>fla10</i>	this study
<i>ift122-1</i>	HS263	the null mutant of <i>IFT122</i>	Junmin Pan
<i>ift46-1</i>	HS44	the null mutant of <i>IFT46</i>	CRC
<i>ift46-1 BPTS1</i>	HS277	expressing BPTS1::YFP by transforming pHK308 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 BPTS2</i>	HS278	expressing BPTS2::YFP by transforming pHK309 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 BPTS3</i>	HS279	expressing BPTS3::YFP by transforming pHK310 in <i>ift46-1</i>	this study

接下页

接上页

Strain Name	Number	Description	Source
<i>ift46-1 BBTS3 IFT46</i>	HS284	expressing BBTS3::YFP IFT46 by transforming pHK310, pGEM-T Easy-IFT46 and pHyg3 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 BBTS4</i>	HS280	expressing BBTS4::YFP by transforming pHK311 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 BBTS5</i>	HS281	expressing BBTS5::YFP by transforming pHK312 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 BBTS6</i>	HS282	expressing BBTS6::YFP by transforming pHK313 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 IFT46</i>	HS262	expressing IFT46::YFP by transforming pHK214 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 IFT46-C</i>	HS271	expressing IFT46-C::YFP by transforming pHK244 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 IFT46-C1</i>	HS272	expressing IFT46-C1::YFP by transforming pHK245 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 IFT46-C1L285E/L286E</i>	HS285	expressing IFT46-C1 ^{L285E/L286E} ::YFP by transforming pHK267 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 IFT46-N</i>	HS273	expressing IFT46-N::YFP by transforming pHK232 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 IFT46-N1</i>	HS274	expressing IFT46-N1::YFP by transforming pHK231 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 IFT46ΔC1</i>	HS275	expressing IFT46ΔC1::YFP by transforming pHK245 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 IFT46ΔN1</i>	HS276	expressing IFT46ΔN1::YFP by transforming pHK243 in <i>ift46-1</i>	this study
<i>ift46-1 IFT52</i>	HS269	expressing IFT52::YFP by transforming pHK268 in <i>ift46-1</i>	this study

接下页

[接上页](#)

Strain Name	Number	Description	Source
<i>ift46-1 YFP</i>	HS283	expressing YFP by transforming this study pHK281 in <i>ift46-1</i>	
<i>ift81-2</i>	HS264	the null mutant of <i>IFT81</i>	Junmin Pan
<i>ift88</i>	HS4	the null mutant of <i>IFT88</i>	CRC
<i>ift88 IFT46</i>	HS259	expressing IFT46::YFP by transforming this study pHK214 in <i>ift88</i>	
<i>ift88 IFT46-C1</i>	HS260	expressing IFT46-C1::YFP by transforming pHK245 in <i>ift88</i>	this study

^aCRC, *Chlamydomonas* Resource Center

附录F 本研究所用质粒

表 F1 本研究所用质粒
Table F1 Plasmids used in this study

Plasmid Number	Relevant Genotype or usage^a	Source
pGEM-T Easy-IFT46	PIFT46, AMP ^R	Dr. Joel Rosenbaum
pHK212	PIFT46::YFP, AMP ^R	this study
pHK214	PIFT46::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK231	PIFT46-N1::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK232	PIFT46-N::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK233	PIFT46ΔC1::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK242	PIFT46-C1::YFP, AMP ^R HYG ^R	this study
pHK243	PIFT46ΔN1::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK244	PIFT46-C::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK245	PIFT46-C1::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK265	AMP ^R HYG ^R	this study
pHK266	PIFT46::YFP, AMP ^R HYG ^R	this study
pHK267	PIFT46-C1 ^{L285E/L286E} ::YFP, AMP ^R HYG ^R	this study
pHK268	PIFT52::YFP, AMP ^R HYG ^R	this study
pHK281	pYFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK308	pBBTS1::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK309	pBBTS2::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK310	pBBTS3::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK311	pBBTS4::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK312	pBBTS5::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK313	pBBTS6::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK409	PIFT52::3HA, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK464	pYFP::NLS, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK473	PIFT52C::YFP::NLS, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK86	PGFP-YFP, AMP ^R PRM ^R	(Long and Huang, 2012)
pHK87	PGFP-CFP, AMP ^R PRM ^R	(Long and Huang, 2012)
pHK250	PIFT52::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK469	pYFP::YFP, AMP ^R PRM ^R	this study
pHK470	PIFT52::YFP::NLS, AMP ^R PRM ^R	this study
pHyg3	HYG ^R	Dr. Wolfgang Mages
pMD18-T	for TA cloning, AMP ^R	TaKaRa Bio Inc.

^aAMP^R, ampicillin resistance;

PRM^R, paromomycin resistance;

HYG^R, hygromycin B resistance

附录G 本研究所用引物

表G1 本研究所用引物。

Table G1 Primers used in this study.

Primers Name	Primer Sequence (5' to 3')	Description
4xNLS-1F	ATCGACCCCAAGAAGAAC GCAAGGT	oligonucleotide, to anneal to synthesize 4xNLS
4xNLS-2R	CCTTGCCTTCTTCTTGGGG TCCACCTTGCGCTTCTTCTT GGGGTCGAT	oligonucleotide, to anneal to synthesize 4xNLS
4xNLS-3F	GGACCCCAAGAAGAACGC AAGGTGGACCCCAAGAAGA AGCGCAAGGTGGACCCCAA GAAGAAGCGCAAGGTGTAAG	oligonucleotide, to anneal to synthesize 4xNLS
4xNLS-4R	CACCTTGCCTTCTTCTTGG GGTCCA	oligonucleotide, to anneal to synthesize 4xNLS
4xNLS-5R	AATTCTTACACCTTGCGCTT CTTCTTGGGTC	oligonucleotide, to anneal to synthesize 4xNLS
ACE-F	GGAATTCC<u>CATATGTGTG</u>CTC CAATGACCAAAGAGAT	forward, to amplify the promoter of <i>IFT46</i> containing <i>NdeI</i> cutting site (in bold and underlined)
A-R	ATAGATATCGTTGTAAGCAC CCGGCGGT	reverse, to amplify <i>IFT46-N1</i> containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)
BBTS1-R	ATAGATATCCAGCGTGCACA CCAGCCGG	reverse, to amplify <i>BBTS1</i> containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)

接下页

接上页

Primers Name	Primer Sequence (5' to 3')	Description
BBTS2-F	ATAGGAGCAAGCAGCAGCCA TGCTGGACATTCCCGTGTAC GACGA	forward, to amplify <i>BBTS2</i>
BBTS2-R	TCGTCGTACACGGGAATGTC CAGCATGGCTGCTGCTTGCT CCTAT	reverse, to amplify the promoter, 5'-UTR and the start codon of <i>IFT46</i>
BBTS3-R	ATAG<u>ATAT</u>CCTCCATCTCCA TGTGCTGCCTGTC	reverse, to amplify <i>BBTS3</i> containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)
BBTS4-1	ATAGGAGCAAGCAGCAGCC ATGAACAAGCTGGA	oligonucleotide, to anneal to synthesize <i>BBTS4</i>
BBTS4-2	CGGCATGTCGGCGGGCGGC GGCGGCATGATGGGC	oligonucleotide, to anneal to synthesize <i>BBTS4</i>
BBTS4-3	GGCGGCGCGGATGTGCTGG GCTT<u>GGATAT</u>CTAT	oligonucleotide, to anneal to synthesize <i>BBTS4</i> containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)
BBTS4-4	CGCCGCCCGACATGCCGTCC AGCTTGTTCATGGCTGCTGC TTGCTCCTAT	oligonucleotide, to anneal to synthesize <i>BBTS4</i>
BBTS4-5	ATAG<u>ATAT</u>CCAAGCCCAGCA CATCCCGCGCCGCCGCCATC ATGCCGCCGC	oligonucleotide, to anneal to synthesize <i>BBTS4</i> containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)
BBTS4-R	CGACATGCCGTCCAGCTTGT TCATGGCTGCTGCTTGCTCC TAT	reverse, to amplify the promoter, 5'-UTR and the start codon of <i>IFT46</i>
BBTS5-F	ATAGGAGCAAGCAGCAGCCA TGCTGGACATTCCCGTGTAC GACGA	forward, to amplify <i>BBTS5</i>

接下页

接上页

Primers Name	Primer Sequence (5' to 3')	Description
BBTS5-R1	TCGTCGTACACGGGAATGT CCAGCATGGCTGCTGCTTGC TCCTAT	reverse, to amplify the promoter, 5'-UTR and the start codon of <i>IFT46</i>
BBTS5-R2	ATAGATATC CCTCCATCTCCA TGTGCTGCCTGTC	reverse, to amplify <i>BBTS5</i> containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)
BBTS6-6	CCGGCTGGTGTGCACGCTGA ACAAGCTGGA	oligonucleotide, to anneal to synthesize <i>BBTS6</i>
BBTS6-7	CGCCGCCGACATGCCGTCC AGCTTGTTCAGCGTGCACAC CAGCCGG	oligonucleotide, to anneal to synthesize <i>BBTS6</i>
BBTS6-R	CGACATGCCGTCCAGCTTGT TCAGCGTGCACACCAGCCGG	reverse, to amplify the promoter, 5'-UTR and the start codon of <i>IFT46</i>
BBTS-F	GGAATTCC CATATGTGTGCTC CAATG	forward, to amplify the promoter of <i>IFT46</i> containing <i>NdeI</i> cutting site (in bold and underlined)
B-F	CAAGCAGCAGCCATGGCACA GGTCCGTGGTTGCGATG	forward, to amplify <i>IFT46ΔN1</i>
B-R	CCCACGGACCTGTGCCATGG CTGCTGCTTGCTCCTA	reverse, to amplify the promoter and 5' -UTR of <i>IFT46</i>
CBLP-F	TGCTGTGGGACCTGGCTGA	forward, for quantitative real-time PCR of <i>CBLP</i>
CBLP-R	GCCTTCTTGCTGGTGATGTTG	reverse, for quantitative real-time PCR of <i>CBLP</i>
C-R	ATAGATATCG AGCCCCAGGT AGTCGGG	reverse, to amplify <i>IFT46-N</i> containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)

接下页

接上页

Primers Name	Primer Sequence (5' to 3')	Description
D-F	CAAGCAGCAGCCATGAAGGT GCGGGGGGAGGGGGG	forward, to amplify <i>IFT46-C</i>
D-R	CTCCCCCGCACCTTCATGG CTGCTGCTTGCTCCTAT	reverse, to amplify the promoter and 5' -UTR of <i>IFT46</i>
E-R	ATAGATAT CCTCTGGCATGC GCTTGCTGTA	reverse, to amplify <i>IFT46ΔC1</i> con- taining <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)
F-F	CAAGCAGCAGCCATGATCGA GGCGCTGATGCAGGAGTG	forward, to amplify <i>IFT46-C1</i>
F-R	CATCAGCGCCTCGATCATGG CTGCTGCTTGCTCCTAT	reverse, to amplify the promoter and 5' -UTR of <i>IFT46</i>
HA-1	ATCTACCCCTACGACGTGCC CGACTACGCCTACCCCTACGAC	oligonucleotide, to anneal to synthe- size 3xHA
HA-2	GTGCCCGACTACGCCTACCC CTACGACGTGCCCGACTACG CCG	oligonucleotide, to anneal to synthe- size 3xHA
HA-3	TAGGCGTAGTCGGGCACGTC GTAGGGGTAGGCGTAGTCGG GCACGTCGTAGGGTAGAT	oligonucleotide, to anneal to synthe- size 3xHA
HA-4	AATTGGCGTAGTCGGGCAC GTCGTAGGGG	oligonucleotide, to anneal to synthe- size 3xHA
IFT46-11	ATGGATGACTCTATGGACTA CCCTGAC	forward (<i>primer pair 1</i>), for RT-PCR of <i>IFT46</i> (Hou et al, 2007)
IFT46-2	GTGCTTCCAGCCTCATAGC	reverse (<i>primer pair 1</i>), for RT-PCR of <i>IFT46</i> (Hou et al, 2007)
IFT46-28	GCTTGTACTCCTGTGCGTTG	reverse (<i>primer pair 2</i>), for RT-PCR and quantitative real-time PCR of <i>IFT46</i> (Hou et al, 2007)

接下页

接上页

Primers Name	Primer Sequence (5' to 3')	Description
IFT46-29	TACCTGGAGTTCAAGAACAA CC	forward (<i>primer pair 4</i>), for RT-PCR of <i>IFT46</i>
IFT46-3	GCCCTTCATCCCTGACTACA	forward (<i>primer pair 3</i>), for RT-PCR of <i>IFT46</i> (Hou et al, 2007)
IFT46-30	GTAGCGGGCGAAGCACAT	reverse (<i>primer pair 4</i>), for RT-PCR of <i>IFT46</i>
IFT46-4	CTTGTGGATGTCGTTGATGG	reverse (<i>primer pair 3</i>), for RT-PCR of <i>IFT46</i> (Hou et al, 2007)
IFT46-9	ACTCTCACCAACGGGCTATG	forward (<i>primer pair 2</i>), for RT-PCR and quantitative real-time PCR of <i>IFT46</i> (Hou et al, 2007)
IFT46-F	GGAATT<u>CCATAT</u>GTGTGCTC CAATGACCAAAGAGATAGGA CAT	forward, to amplify <i>IFT46</i> containing <i>NdeI</i> cutting site (in bold and underlined)
IFT46-R	ATAG<u>ATAT</u>CCAAGCCCAGCA CATCCGCGC	reverse, to amplify <i>IFT46</i> containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and ununderlined)
IFT52A-F	GGAATT<u>CCATAT</u>GCATATGC TGGGCTGCGGC	forward, to amplify genomic DNA of <i>IFT52</i> containing <i>NdeI</i> cutting site (in bold and underlined)
IFT52B-R	TTT<u>GATAT</u>CCAGCTCGAACT GGTCGCCGAACT	reverse, to amplify genomic DNA of <i>IFT52</i> containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)
IFT52C-F	GAGCTACTAACAGCCATGG CGCTGGGCTGTTGACCTG	forward, to amplify <i>IFT52C</i> for In-Fusion HD cloning
IFT52C-R	AGGTCGAACAGCCCCAGCGC CATGGCTGTTAAGTAGCTCT CAG	reverse, to amplify <i>IFT52C</i> for In-Fusion HD cloning

接下页

接上页

Primers Name	Primer Sequence (5' to 3')	Description
NLS-F	<u>CCCGGGGGCGCCTCCGGCC</u> AGGGCGCCTCCGGCGCGATG GCCAAGGGCGAGGAGCTGTT	forward, to amplify <i>yfp-NLS</i> containing <i>SmaI</i> cutting site (in bold and underlined)
NLS-R	<u>GAATTCTTACACCTTGCGCT</u> TCTTCTTG	reverse, to amplify <i>yfp-NLS</i> containing <i>EcoRI</i> cutting site (in bold and underlined)
Pro-R	<u>ACTGATATCCATGGCTGCTG</u> CTTGCTCCTA	reverse, to amplify the promoter, 5'-UTR and the start codon of <i>IFT46</i> containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)
SDM-F	GTGTGCACGGAGGAGGACAT TCCC	forward, for site-directed mutagenesis of <i>IFT46</i>
SDM-R	CTCCTCCGTGCACACCAGCC GGGCG	reverse, for site-directed mutagenesis of <i>IFT46</i>
YFP-F	<u>CATATGATGGCCAAGGGCGA</u> GGA	forward, to amplify <i>yfp</i> gene containing <i>NdeI</i> cutting site (in bold and underlined)
YFP-R	<u>GATATCCTGTACAGCTCGT</u> CCATGC	reverse, to amplify <i>yfp</i> gene containing <i>EcoRV</i> cutting site (in bold and underlined)

附录H 本研究所用抗体

表 H1 本研究所用抗体。
Table H1 Antibodies used in this study.

Immunogen	Biological source	Dilution Factor	Note and Source
acetylated α -tubulin	mouse	1:1000	Sigma, #T6793
GFP	mouse	1:1000	Roche, #11814460001
GFP	mouse	1:5000	Abmart, #M20004
HA	rabbit	1:5000	Roche, #11867423001
histone H3	rabbit	1:5000	Agrisera, #AS10710 Prepared by Genscript using the N-terminal
IFT46	rabbit	1:5000	20 amino-acids peptide and purified using the same peptide
IFT52	rabbit	1:250	(Deane et al, 2001)
IFT74	rabbit	1:2500	(Qin et al, 2004)
IFT81	mouse	1:250	(Lucker et al, 2005)
mIgG	goat	1:500	Alexa Fluor 488 conjugated, Life technologies, A-11029
mIgG	goat	1:5000	HRP conjugated, Sigma-Aldrich, #A4416
rIgG	goat	1:500	Alexa Fluor 594 conjugated, Life technologies, #A-11037
rIgG	goat	1:5000	HRP conjugated, Life technologies, #G21234
rIgG	goat	1:5000	HRP conjugated, Sigma-Aldrich, #6154
α -tubulin	mouse	1:200000	Sigma-Aldrich, #T9026

附录I 本研究所用部分载体的图谱

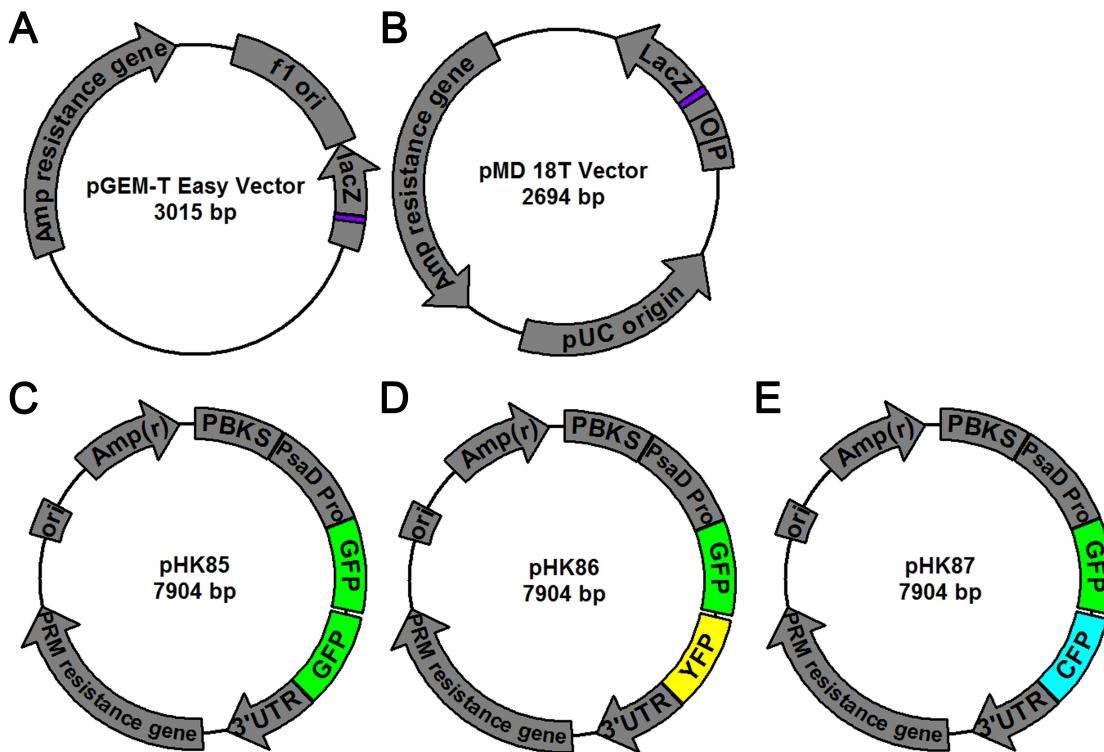


图 I1 本研究所用部分载体的图谱。(A) pGEM-T Easy 的载体图谱。(B) pMD 18T 的载体图谱。(C) pHK85 的载体图谱。(D) pHK86 的载体图谱。(E) pHK87 的载体图谱。在 C、D 和 E 中，GFP 代表绿色荧光蛋白，YFP 代表黄色荧光蛋白，CFP 代表青色荧光蛋白。在所有载体图谱中，Amp 代表氨苄青霉素，PRM 代表巴龙霉素，r 代表这是一个对应抗生素的抗性基因。

Figure I1 Plasmid map of some vectors constructed in this study. (A) The plasmid map of pGEM-T Easy. (B) The plasmid map of pMD 18T. (C) The plasmid map of pHK85. (D) The plasmid map of pHK86. (E) The plasmid map of pHK87. In panel C, D, and E, GFP is the green fluorescent protein. YFP represents yellow fluorescent protein. CFP indicates cyan fluorescent protein. In all panels, Amp means Ampicillin. PRM is the abbreviation of paromomycin. The letter r means it is a antibiotic resistance gene.

附录J 本研究中部分基因的核酸和蛋白序列

>The DNA sequence of *yfp* used in this study

```
ATGGCCAAGGGCGAGGAGCTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCG  
ACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA  
GCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGA  
CCACCTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACT  
TCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGCCAGGAGCGCACCATCTTCAAGGACGAC  
GGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACCCTGGTAACCGCATCG  
AGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA  
CTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC  
TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTGCCGACCAACTACCAAGCAGAAC  
ACCCCCATCGCGACGGCCCGTGTGCTGCCGACAACCAACTACCTGAGCTACCAGTCCGCC  
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGCCTGCTGGAGTTGACCGCCG  
CCGGGATCACTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
```

>The protein sequence of YFP used in this study

```
MAKGEELFTGVVPILVLDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTFGY  
GLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDF  
KEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVL  
LPDNHYLSYQSALKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK*
```


作者简历及攻读学位期间发表的学术论文与研究成果

Journal of Cell Science (IF5 = 5.496) 1篇，第一作者。