

莱茵衣藻 IFT20 的原核表达、纯化及多克隆抗体鉴定

贾瑞勤¹, 贾航², 郑学超², 薛斌^{2,3}, 樊振川^{*2,3}

(1. 天津科技大学 食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457; 2. 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457;

3. 天津科技大学 大健康生物技术国家国际科技合作基地, 天津 300457)

摘要: 莱茵衣藻鞭毛内运输 (intraflagellar transport, IFT) 蛋白 IFT20 是 IFT 蛋白复合物 B (IFT-B) 的组分之一。虽然 IFT20 参与调控细胞内大分子的胞内运输过程, 但其作为一个鞭毛蛋白在鞭毛内的详细功能仍有待研究。为了开发高特异性的莱茵衣藻 IFT20 兔源多克隆抗体, 作者首先在大肠杆菌中表达了 N 端 6×His 标签标记的 IFT20 融合蛋白 (6×His::IFT20), 并对其进行了镍柱纯化, 将纯化所得 6×His::IFT20 蛋白免疫新西兰大白兔。采集 3 次免疫后的抗血清, 利用间接 ELISA 法测定其效价为 1:102 400。利用 protein A 纯化珠对所得抗血清进行了 IgG 亚型抗体富集, 接着用大肠杆菌表达纯化所得 N 端 MBP 标签标记的 IFT20 (MBP::IFT20), 并对 IgG 抗血清进行抗原抗体亲和纯化。经对 CC-125 藻种全细胞蛋白质提取物进行免疫印迹法鉴定, 所得 IFT20 多克隆抗体特异性较高, 适合用于后续莱茵衣藻 IFT20 鞭毛内运输功能的研究。

关键词: 莱茵衣藻; 鞭毛内运输; IFT20; 多克隆抗体

中图分类号: Q 81 文章编号: 1673-1689(2023)11-0106-07 DOI: 10.12441/spyswjs.20210627001

Prokaryotic Expression, Purification, and Polyclonal Antibody Identification of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT20

JIA Ruiqin¹, JIA Hang², ZHENG Xuechao², XUE Bin^{2,3}, FAN Zhenchuan^{*2,3}

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

Abstract: Intraflagellar transport protein 20 (IFT20) of *Chlamydomonas reinhardtii* is a component of the intraflagellar transport complex B (IFT-B). IFT20 is known to be involved in regulating intracellular transport processes of macromolecules, but its detailed function as a flagellar protein in flagella remains to be investigated. This study aimed to develop highly specific polyclonal antibodies against *Chlamydomonas reinhardtii* IFT20 from rabbit serum to lay the foundation for further investigation into its flagellar function. To achieve this goal, the N-terminal 6×His-tagged IFT20 fusion protein (6×His::IFT20) was first expressed in *Escherichia coli*, and 6×His::IFT20 was purified by Ni-column. The purified 6×His::IFT20 was then applied to immunize the New Zealand white

收稿日期: 2021-06-27 修回日期: 2021-08-30

基金项目: 天津科技大学 2021 年度大学生创新创业训练计划项目 (202110057211)。

* 通信作者: 樊振川 (1974—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事营养代谢型纤毛病研究。E-mail: fanzhen@tust.edu.cn

rabbits. The antiserum was collected after three rounds of immunization, and the titer was determined to be 1:102 400 by an indirect ELISA method. Subsequently, the obtained anti-serum was purified using protein A purification beads to enrich the IgG subtype antibodies. Next, N-terminal MBP-tagged IFT20 (MBP::IFT20) expressed and purified from *Escherichia coli* was used for antigen-antibody affinity purification of IgG antiserum. The western blotting assay of whole cell protein extracts from CC-125 identified the high specificity of the obtained IFT20 polyclonal antibodies, making them suitable for future investigations on the flagellar function of IFT20 in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, intraflagellar transport, IFT20, polyclonal antibody

鞭毛是一种存在于大多数真核细胞表面的具有运动、感知和信号传导功能的细胞器。鞭毛由鞭毛轴丝、基体和鞭毛膜组成。根据鞭毛轴丝结构不同,将鞭毛分为 9+2 型运动纤毛(motile cilia)和 9+0 型原发性纤毛(primary cilia)2 种类型^[1]。由于鞭毛不具有蛋白质合成所需的细胞器(如核糖体等),因此鞭毛生成和维持所需的前体蛋白质和降解产物均需通过鞭毛内运输(intaflagellar transport, IFT)的方式输入和输出鞭毛^[2]。1993 年发现 IFT 存在于莱茵衣藻鞭毛中,其颗粒沿着鞭毛轴丝进行双向运输^[3]。IFT 颗粒从鞭毛基部到顶部的运输称之为正向运输,这一过程由驱动蛋白-2(Kinesin-2)驱动^[4];反之则称之为反向运输,由动力蛋白-1b(dynein-1b)驱动^[5]。目前已知 IFT 颗粒由 IFT-A 和 IFT-B 共 2 个蛋白质复合物组成,其中 IFT-A 含有 6 个蛋白质亚基,通过与动力蛋白-1b 偶联来调控 IFT 反向运输^[6]。而 IFT-B 则由 16 个蛋白质亚基组成,通过与驱动蛋白-2 偶联来调控 IFT 正向运输^[7]。此外,IFT-B 在生化功能关系上可进一步划分为 IFT-B1 和 IFT-B2 等 2 个亚蛋白质复合物^[8-9]。生化和遗传实验表明 IFT 对维持鞭毛生成和信号传导功能是必需的,鞭毛组装缺陷或信号功能缺失可引发一系列统称为纤毛病(ciliopathy)的先天性疾病,其中就包括 Bardet-Biedl 综合征^[10]、Joubert 综合征^[11]和 Meckel 综合征^[12]等。

IFT20 是 IFT-B 的一个组成成分,在具鞭毛生物中是高度进化保守的^[13]。研究表明,IFT20 蛋白缺失会导致小鼠视锥细胞鞭毛生物生成受阻,视紫红质无法运送到视锥细胞外节,导致其在细胞内节大量堆积而引发神经退行性病变^[14-15]。此外,IFT20 可以和精子鞭毛蛋白 2(SPEF2)相互作用,影响正常的生精导致雄性不孕^[16]。因此,研究 IFT20 的鞭毛生

物学功能及其异常表达引发相关疾病的分子机制对于预防、诊断和开发相关药物治疗这些疾病具有十分重要的意义。

莱茵衣藻是一种单细胞真核藻类,作为一种模式生物,莱茵衣藻已被广泛应用于鞭毛内运输、组装和功能的研究。因此,作者拟制备高特异性的莱茵衣藻 IFT20 蛋白多克隆抗体,为后续开展 IFT20 在莱茵衣藻鞭毛内的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料 大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达载体 pET-28a(+)和 pMAL-c2x、大肠杆菌 XL1-blue 和 BL21(DE3)菌株、莱茵衣藻野生型藻种 CC-125:均为作者所在实验室保存。

1.1.2 实验试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、RNase-M-MLV 酶、核酸和蛋白质标准品以及 TriZol 等:购于北京全式金生物有限公司;IPTG、卡那霉素、氨苄青霉素、PCR 产物纯化试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒等:Sangon Biotech 公司;质粒提取试剂盒:TIANGEN 公司;硝酸纤维素膜:美国 PALL 公司;Protein A Sepharose™ CL-4B、Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 和 Dextrin Sepharose™ High Performance 等:美国 GE Healthcare 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗:美国 Jackson 公司;ECL 发光液:德国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 莱茵衣藻总 RNA 提取 野生型莱茵衣藻 CC-125 细胞在-80℃冻存后置于研钵中,加入液氮将其研磨至粉末状后转移至 50 mL 离心管中。加入 1 mL Trizol 和 20 μL β-巯基乙醇后剧烈振荡,并于室温静置 10 min。加入 600 μL 氯仿-异戊醇(体积

比24:1),颠倒混匀后加入 90 μL 无水乙醇,静置 2 min。于 10 000 r/min 冷冻离心 15 min,吸取上清液,加入 2 倍体积的无水乙醇和 0.2 倍体积的醋酸钠,混匀后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min,接着于 10 000 r/min 冷冻离心 15 min。弃上清液,加入 2 mL 体积分数 75% 的乙醇,充分混匀后于 10 000 r/min 冷冻离心 8 min。弃上清液,在超净工作台中于室温干燥 5 min。加入 50 μL DEPC 水,吹匀溶解,测定所获总 RNA 浓度并验证。混匀 5 μL DNA 酶缓冲液,2 μL DNA 酶,0.5 μL RNA 酶抑制剂和 45 μL RNA 样品,将其在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中 30 min 以去除 DNA。最后用氯仿-异戊醇和水饱和酚抽提 3 次,最终获得莱茵衣藻总 RNA。

1.2.2 大肠杆菌表达载体 pET-28a (+)-*ift20* 和 pMAL-c2x-*ift20* 的构建 在 Phytozome v12.1 数据库中搜索 *ift20* 基因 cDNA 序列,设计含有 *EcoR* I 酶切位点的上游引物 IFT20-FOR 和含有 *Hind* III 酶切位点的下游引物 IFT20-REV,见表 1。以莱茵衣藻野生型藻种 CC-125 总 RNA 为模板进行反转录以生成 cDNA,并以此 cDNA 为模板进行 *ift22* cDNA 扩增。将 *ift22* cDNA 克隆至大肠杆菌表达载体 pET-28a(+)和 pMAL-c2x,所得重组表达载体命名为 pET-28a(+)-*ift20* 和 pMAL-c2x-*ift20*。

1.2.3 融合蛋白诱导表达 将重组表达载体 pET-28a (+)-*ift20* 和 pMAL-c2x-*ift20* 转入大肠杆菌 BL21(DE3)细胞并将细菌涂布于 LB 培养基平板。待转化子形成后,挑取单克隆细菌至 LB 液体培养基,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 于 220 r/min 培养过夜,而后将其以体积分数 5% 接种至 LB 液体培养基中继续培养。当 OD_{600} 达到 0.8~1.0 时,加入 0.2 mmol/L IPTG 诱导蛋白质进行表达,该过程在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 下进行 6~8 h。离心收集菌体后加入结合缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,pH 7.4,应用于 pET-28a(+)-*ift20* 体系;20 mmol/L Tris-HCl,200 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,pH 7.4,应用于 pMAL-c2x-*ift20* 体系),重悬菌体并进行超声破碎,对细菌破碎物进行 SDS-PAGE 电泳分析,分析融合蛋白质是否存在于上清液中。在融合蛋白质诱导表达过程中,所有培养基都需添加相应抗生素。

1.2.4 融合蛋白质纯化 重悬含有 pET-28a (+)-*ift20* 和 pMAL-c2x-*ift20* 的菌体于上述结合缓冲液中,超声破碎菌体后将上清液(重组蛋白 6 \times His::

IFT20 和 MBP::IFT20 均溶于上清液中)与 1 mL Ni SepharoseTM 6 Fast Flow (结合 6 \times His::IFT20)或 Dextrin SepharoseTM High Performance (结合 MBP::IFT20)填料混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用结合缓冲液漂洗填料 10 次,后用洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑,pH 7.4 或 20 mmol/L Tris-HCl,200 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,10 mmol/L 麦芽糖,pH 7.4)分别针对 6 \times His::IFT20 和 MBP::IFT20 进行洗脱,收集重组蛋白质并对其进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.5 动物免疫 将 6 \times His::IFT20 蛋白抗原(纯度大于 85%)送至北京华大蛋白质研发中心有限公司,选择新西兰大白兔为免疫动物进行抗血清生成。

1.2.6 抗血清效价检测 抗血清效价检测按文献[17]的间接 ELISA 法进行。具体而言,将 IFT20 包被抗原稀释至 10 $\mu\text{g/mL}$,并以 100 μL /孔包被于酶标板。用体积分数 5% 的脱脂牛奶封闭液对抗原室温封闭 1 h 后弃去。用 PBST 清洗液洗板 3 次,加入抗血清室温孵育 1 h。孵育结束后,用 PBST 清洗液洗板 4 次,加入酶标二抗室温孵育 30 min。最后加入 TMB(3',3',5',5'-四甲基联苯胺)溶液显色,利用酶标仪测定其在 OD_{450} 处的吸光值,效价定义为最大 OD 值一半时所对应的抗血清稀释倍数。

1.2.7 IgG 亚型抗体富集 IgG 亚型抗体富集参照文献[18]的方法。取一定量的抗血清和结合缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.0)混匀,将其转入装有 Protein A 纯化珠的纯化柱中,室温结合 1~2 h 后,用结合缓冲液漂洗 3 次。最后用酸性洗脱液(0.1 mol/L Glycine,pH 3.0)洗脱,中和后保存备用。

1.2.8 抗原抗体亲和纯化 抗原抗体亲和纯化参照文献[19]的方法。用 1 mmol/L HCl 溶胀 CNBr-activated Sepharose 4B 干粉,并用结合缓冲液(0.1 mol/L NaHCO_3 ,500 mmol/L NaCl,pH 8.3)将其 pH 值调至 8.3。将 MBP::IFT20 蛋白抗原溶于结合液中,与溶胀好的 CNBr-activated Sepharose 4B 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。离心后在 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液中室温静置 2~4 h。最后用 100 mmol/L Tris-HCl 和 0.5 mol/L NaCl 洗脱液(pH 8.5)与 50 mmol/L 甘氨酸和 1 mol/L NaCl 洗脱液(pH 3.5)交替洗脱至少 8 次。将偶联抗原的 CNBr-activated Sepharose 4B 与经 Protein A 富集后的抗体孵育,按照以上 IgG 亚型抗体富集的方法洗脱抗体,保存备用。

1.2.9 免疫印迹检测 免疫印迹检测参照文献[20]的方法进行。取 20 μg 莱茵衣藻野生型藻种 CC-125 的全细胞蛋白质提取物进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将分离好的蛋白质转移至硝酸纤维素膜,并利用体积分数 5% 的脱脂牛奶封闭液对其进行封闭,添加稀释后的纯化抗体室温孵育 1 h,用 TBST 漂洗液 (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 体积分数 0.05% Tween-20, pH 7.5) 漂洗 3 次。最后加入二抗室温孵育 1 h,用 TBST 对其漂洗 3 次后,用 ECL 化学发光显色液曝光。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌表达载体 pET-28a(+)-ift20 构建

以莱茵衣藻野生型藻种 CC-125 总 RNA 生成所得 cDNA 为模板,利用表 1 中所示上下游引物进行 PCR 扩增,获得大小为 400 bp 左右的 PCR 产物。该 cDNA 扩增产物经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后克隆至大肠杆菌表达载体 pET-28a(+),将连接产物转入大肠杆菌 XL1-blue 感受态细胞,随机挑取 2 个转化子提取质粒进行酶切验证,见图 1。结果表明,*EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切可以切出与载体和目的基因大小相符的 2 个片段。将酶切验证正确的质粒测序分析后命名为 pET-28a(+)-ift20。

表 1 IFT20 cDNA 扩增引物序列

Table 1 Primers for the amplification of IFT20 cDNA

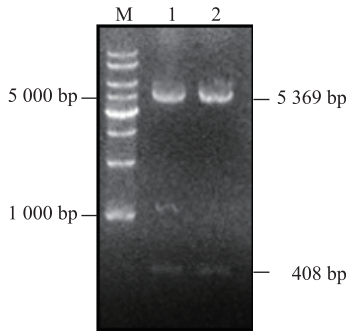
引物名称	引物序列
IFT20-FOR	5'-GGAATTCATGGACGCGGTAGATAGAGG-3'
IFT20-REV	5'-CCCAAGCTTTTACACGTAT GCCGCCCGGC-3'

注:下划线为酶切位点。

2.2 6 \times His::IFT20 重组蛋白诱导表达及纯化

将重组表达载体 pET-28a (+)-ift20 转化进入大肠杆菌 BL21(DE3),诱导表达融合蛋白 6 \times His::IFT20。将融合蛋白 6 \times His::IFT20 进行镍柱亲和纯化,而后对纯化产物进行 SDS-PAGE 电泳分析。如图 2 所示,6 \times His::IFT20 溶于菌体上清液中,以可溶性蛋白质的形式存在。灰度量化分析表明,纯化后的 6 \times His::IFT20 融合蛋白约占菌体上清液总蛋白质的 85%,符合免疫蛋白抗原纯度不低于 85% 的要求。收集大约 2.5 μg 的 6 \times His::IFT20 融合蛋白

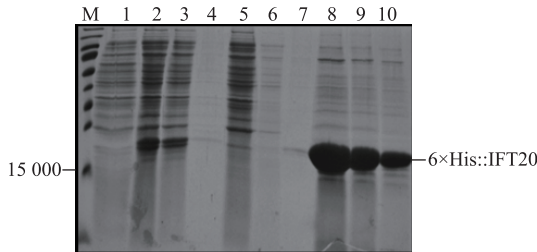
用于免疫新西兰大白兔。



M: 1 kb DNA 标准品; 1~2: 2 个转化子所提质粒的 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切产物。

图 1 重组质粒 pET-28a (+)-ift20 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切验证

Fig. 1 Double restriction digestion verification of the recombinant plasmid pET-28a(+)-ift20 by *EcoR* I and *Hind* III



M: 蛋白质标准物; 1: 诱导前全蛋白质; 2: 诱导后全蛋白质; 3: 诱导后水溶性(上清液)蛋白质; 4: 诱导后水不溶(沉淀)蛋白质; 5: 流穿液; 6~7: 漂洗液; 8~10: 洗脱液。

图 2 SDS-PAGE 检测 6 \times His::IFT20 融合蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达及后续纯化

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of 6 \times His::IFT20 fusion protein in *E. coli* BL21(DE3) and its subsequent purification

2.3 IFT20 抗血清效价检测

将 6 \times His::IFT20 融合蛋白送至北京华大蛋白质研发中心有限公司免疫新西兰大白兔 3 次,取耳静脉血进行间接 ELISA 法抗血清效价检测。如图 3 所示,最大 OD 值的一半数值处所对应的抗血清稀释倍数为 102 400。因此,所得 IFT20 抗血清效价为 1:102 400。

2.4 IFT20 抗体纯化及其特异性检测

2.4.1 IFT20 抗血清 IgG 富集 兔源抗血清中含有诸多抗体亚型,为获得高亲和性抗 IFT20 的 IgG 亚型抗体,我们利用 Protein A 纯化珠对 IFT20 抗血清

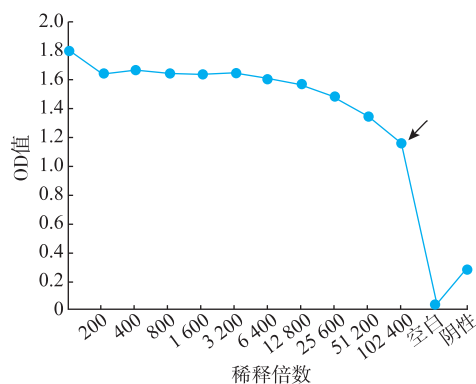
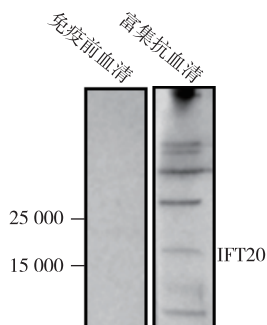


图3 间接ELISA法测定IFT20抗血清效价

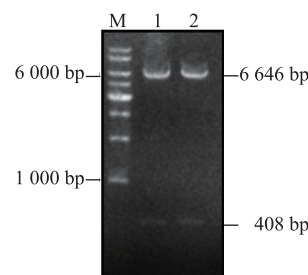
Fig. 3 Determination of anti-IFT20 polyclonal antiserum titer by indirect ELISA

IgG进行了富集,并对富集得到的IgG进行了免疫印迹检测。如图4所示,抗血清经Protein A富集后,可以识别莱茵衣藻野生型藻种CC-125全细胞蛋白质提取物中的内源IFT20蛋白质,但多条非特异性蛋白质条带仍然可见,需要对其进行进一步亲和纯化以提高IFT20抗体的特异性。

图4 免疫印迹法检测抗血清富集IgG识别IFT20的特异性
Fig. 4 Specificity of the antiserum-enriched IgG for recognizing IFT20 in immunoblotting assay

2.4.2 IFT20抗体亲和纯化 用EcoR I和Hind III对pET-28a(+)-ift20进行酶切获得ift20 cDNA,并将其克隆至大肠杆菌表达载体pMAL-c2x。将连接产物转入大肠杆菌XL1-blue细胞中,待平板长出转化子后,随机挑取2个转化子提取质粒进行酶切验证。如图5所示,重组载体经EcoR I和Hind III双酶切得到符合载体和目的基因大小的2个片段,将测序验证后的载体命名为pMAL-c2x-ift20。将pMAL-c2x-ift20转入大肠杆菌BL21(DE3)细胞,诱导表达融合蛋白MBP::IFT20并进行亲和纯化。如图6所示,MBP::IFT20融合蛋白为水溶性蛋白质,

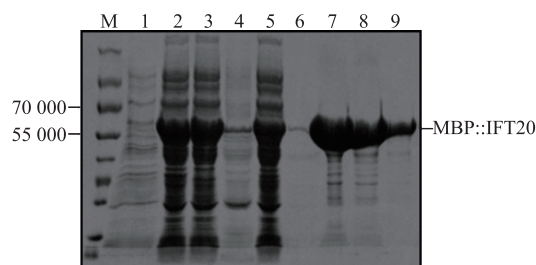
亲和纯化所得MBP::IFT20纯度约为93.5%。按1.2.8所述实验方法,将纯化后的MBP::IFT20融合蛋白与CNBr-activated Sepharose 4B偶联,然后按照1.2.8所述方法对抗IFT20 IgG进行抗原抗体亲和纯化,收集纯化后的抗体,保存备用。



M:1 kb DNA标准品;1~2:2个转化子所提质粒的EcoR I和Hind III双酶切产物。

图5 重组质粒pMAL-c2x-ift20的EcoR I和Hind III双酶切验证

Fig. 5 Double restriction digestion verification of the recombinant plasmid pMAL-c2x-ift20 by EcoR I and Hind III



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

图6 SDS-PAGE检测MBP::IFT20融合蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)中的表达及后续纯化

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the expression of MBP::IFT20 fusion protein in *E. coli* BL21(DE3) and its subsequent purification

2.4.3 IFT20抗体免疫印迹特异性检测 将纯化后的IFT20抗体稀释500倍,对莱茵衣藻野生型藻种CC-125的全细胞蛋白质提取物进行免疫印迹分析。如图7所示,纯化后的IFT20抗体可以特异性识别莱茵衣藻内源性IFT20蛋白。

2.5 讨论

研究莱茵衣藻IFT20在鞭毛组装中的功能需要一支高特异性识别内源IFT20蛋白的抗体。在大肠

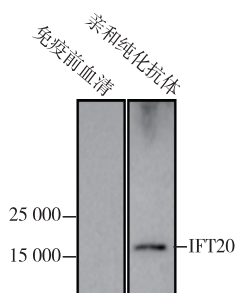


图7 免疫印迹法检测亲和纯化后 IFT20 抗体识别特异性
Fig. 7 Specificity of the affinity purified anti-IFT20 for recognizing IFT20 in immunoblotting assay

杆菌中表达了 N 端 6×His 标签标记的莱茵衣藻 IFT20 融合蛋白 6×His::IFT20, 经镍柱纯化后获得纯度约 85% 的 6×His::IFT20 融合蛋白, 以该融合蛋白为抗原免疫新西兰大白兔获得 IFT20 抗血清。然而, 用 Protein A 富集的 IFT20 IgG 对莱茵衣藻野生型藻种 CC-125 全细胞蛋白质提取物中的 IFT20 内源蛋白识别特异性较差, 究其原因可能是该抗体的非特异性交叉识别比较严重, 反映在免疫印迹上就是非特异性蛋白质杂带过多。这可能是纯化后的 6×His::IFT20 融合蛋白抗原中依然存有非融合蛋白质组分, 影响了动物免疫效果, 但也可能是兔源抗体的特点, 其抗血清本身特异性较差。为了进一步提高 IFT20 抗体的特异性, 对 Protein A 富集的 IgG

进行了抗原抗体亲和纯化, 免疫印迹检测发现二次纯化的 IFT20 抗体能特异性识别莱茵衣藻内源性 IFT20 蛋白。因此, 二次纯化策略将采用一种标准程序用来开发后续莱茵衣藻兔源多克隆抗体。在后续抗体测试中, 我们将利用该 IFT20 抗体对莱茵衣藻细胞进行免疫荧光染色及免疫共沉淀分析, 探索其在这 2 种类型的实验中应用的可能性。

3 结 语

鞭毛是一种特异化细胞天线, 在细胞分裂、发育以及分化中均起着重要作用^[21]。鞭毛组装依赖 IFT 这一双向运输机制来完成。在这一过程中, IFT-A 蛋白复合物单一组分蛋白质缺失将破坏 IFT-A 稳定性, 进而影响 IFT 反向运输, 从而形成膨大的缺陷鞭毛^[22]。大部分 IFT-B 蛋白复合物单一组分如 IFT38^[23]、IFT46^[24]和 IFT54^[7]等缺失则只影响 IFT 正向运输, 最终导致鞭毛组装缺陷。少数 IFT-B 蛋白复合物单一组分如 IFT22^[20]、IFT25^[25]和 IFT27^[26]的缺失并不影响 IFT 正向运输, 因此不会影响鞭毛组装。目前已知 IFT54 缺失破坏了 IFT20 的稳定性^[27], 而 IFT20 缺失则可导致鞭毛组装受阻^[28]。这说明 IFT20 与其他大部分 IFT-B 单一组分蛋白质一样, 在鞭毛组装中起着重要作用。到目前为止, IFT20 调控鞭毛组装的分子机制仍不清晰, 其功能有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ELEY L, YATES L M, GOODSHIP J A. Cilia and disease[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2005, 15(3): 308-314.
- [2] WEBB S, MUKHOPADHYAY A G, ROBERTS A J. Intraflagellar transport trains and motors: insights from structure[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2020, 107: 82-90.
- [3] KOZMINSKI K G, JOHNSON K A, FORSCHER P, et al. 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.
- [4] COLE D G, DIENER D R, HIMELBLAU A L, et al. *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.
- [5] PAZOUR G J, WILKERSON C G, WITMAN G B. A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport(IFT)[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1998, 141(4): 979-992.
- [6] HOU Y Q, 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.
- [7] ZHU X, WANG J L, LI S F, et al. IFT54 directly interacts with kinesin-II and IFT dynein to regulate anterograde intraflagellar transport[J]. *The EMBO Journal*, 2021, 40(5): e105781.
- [8] LUCKER B F, BEHAL R H, QIN H M, et al. Characterization of the intraflagellar transport complex B core: direct interaction of the IFT81 and IFT74/72 subunits[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(30): 27688-27696.
- [9] TASCHNER M, WEBER K, MOURÃO A, et al. 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.
- [10] FORSYTHE E, BEALES P L. Bardet-biedl syndrome[J]. **European Journal of Human Genetics**, 2013, 21(1):8-13.
- [11] LUO M N, LIN Z S, ZHU T, et al. Disrupted intraflagellar transport due to IFT74 variants causes Joubert syndrome[J]. **Genetics in Medicine**, 2021, 23(6):1041-1049.
- [12] RADHAKRISHNAN P, NAYAK S S, SHUKLA A, et al. Meckel syndrome: clinical and mutation profile in six fetuses [J]. **Clinical Genetics**, 2019, 96(6):560-565.
- [13] ZHOU M H, LIN Y, ZHANG Z G. Intraflagellar transport 20; new target for the treatment of ciliopathies [J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research**, 2020, 1867(7):118641.
- [14] KEADY B T, LE Y Z, PAZOUR G J. IFT20 is required for opsin trafficking and photoreceptor outer segment development[J]. **Molecular Biology of the Cell**, 2011, 22(7):921-930.
- [15] CROUSE J A, LOPES V S, SANAGUSTIN J T, et al. Distinct functions for IFT140 and IFT20 in opsin transport [J]. **Cytoskeleton**, 2014, 71(5):302-310.
- [16] SIRONEN A, HANSEN J, THOMSEN B, et al. Expression of SPEF₂ during mouse spermatogenesis and identification of IFT20 as an interacting protein[J]. **Biology of Reproduction**, 2010, 82(3):580-590.
- [17] 董彬, 王震, 刘雁霞, 等. 莱茵衣藻纤毛内运送蛋白 IFT70 的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(9):924-930.
- DONG B, WANG Z, LIU Y X, et al. Prokaryotic expression and purification of *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport protein 70 and preparation of its polyclonal antibody[J]. **Chinese Journal of Biologicals**, 2017, 30(9):924-930. (in Chinese)
- [18] 刘雁霞, 刘思佳, 王慧, 等. 莱茵衣藻 BBS1 蛋白的原核表达、纯化及其多克隆抗体制备[J]. 天津科技大学学报, 2019, 34(6):31-34.
- LIU Y X, LIU S J, WANG H, et al. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of *C. reinhardtii* BBS1 protein[J]. **Journal of Tianjin University of Science & Technology**, 2019, 34(6):31-34. (in Chinese)
- [19] 薛斌, 王高飞, 潘强, 等. 莱茵衣藻 IFT22 蛋白的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(11):1915-1921.
- XUE B, WANG G F, PAN Q, et al. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT22 protein[J]. **Chinese Journal of Cell Biology**, 2018, 40(11):1915-1921. (in Chinese)
- [20] XUE B, LIU Y X, DONG B, et al. Intraflagellar transport protein RABL5/IFT22 recruits the BBSome to the basal body through the GTPase ARL6/BBS3[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2020, 117(5):2496-2505.
- [21] 曹木青, 潘俊敏. 纤毛及纤毛相关疾病研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(9):6-13.
- CAO M Q, PAN J M. *Cilia* and ciliopathies[J]. **Chinese Journal of Cell Biology**, 2012, 34(9):6-13. (in Chinese)
- [22] ZHU B, ZHU X, WANG L M, et al. Functional exploration of the IFT-a complex in intraflagellar transport and ciliogenesis[J]. **PLoS Genetics**, 2017, 13(2):e1006627.
- [23] LEE C, WALLINGFORD J B, GROSS J M. Cluap1 is essential for ciliogenesis and photoreceptor maintenance in the vertebrate eye[J]. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 2014, 55(7):4585-4592.
- [24] HOU Y Q, QIN H M, FOLLIT J A, et al. 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.
- [25] DONG B, WU S, WANG J, et al. *Chlamydomonas* IFT25 is dispensable for flagellar assembly but required to export the BBSome from flagella[J]. **Biology Open**, 2017, 6(11):1680-1691.
- [26] EGUETHER T, SAN AGUSTIN J T, KEADY B T, et al. IFT27 links the BBSome to IFT for maintenance of the ciliary signaling compartment[J]. **Developmental Cell**, 2014, 31(3):279-290.
- [27] ZHU X, LIANG Y W, GAO F, et al. IFT54 regulates IFT20 stability but is not essential for tubulin transport during ciliogenesis[J]. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2017, 74(18):3425-3437.
- [28] ZHANG Z G, LI W, ZHANG Y, et al. Intraflagellar transport protein IFT20 is essential for male fertility and spermiogenesis in mice[J]. **Molecular Biology of the Cell**, 2016, 27(23):3705-3716.