

莱茵衣藻 TCF20 的表达分析与多克隆抗体的制备

吴倩龙,刘思远,陈晓萍,张颖,冯雳*

江汉大学生命科学学院,湖北 武汉 430056

摘要: 在哺乳动物中,TCF20 作为转录因子参与细胞增殖和凋亡、免疫以及代谢等生理过程。近些年,还发现 TCF20 缺陷会导致神经祖细胞增殖和分化的异常,人或者小鼠 TCF20 缺陷表现为自闭症样神经发育障碍疾病,并且 TCF20 也成为相关疾病的基因筛查靶标。莱茵衣藻 TCF20 相关研究此前未见报道,且尚未有从纤毛调控的角度研究 TCF20 的功能和分子机制。为了深入探究模式藻莱茵衣藻 TCF20 对纤毛的作用,对其蛋白进行了同源性分析。利用莱茵衣藻 TCF20 的 cDNA 序列构建莱茵衣藻内源 TCF20 蛋白原核表达载体质粒 pGEX-6p-1-TCF20-GST,并转入到大肠杆菌 BL21(DE3)诱导表达,得到 55 kd 的含有 GST 标签的 TCF20-GST 的重组融合蛋白。将亲和纯化的重组蛋白免疫小鼠,采集第五次免疫后的血清,以间接 ELISA 法测定抗血清效价达到 1:512 000,利用蛋白免疫印迹检测制备的抗体,该抗体可以特异性识别莱茵衣藻内源 TCF20 蛋白,且 CrTCF20 主要定位在细胞质,细胞核有较弱定位。鞭毛再生过程中,TCF20 需从细胞质进入细胞核以发挥功能。结果表明,该实验成功制备 CrTCF20 蛋白多克隆抗体,为后续莱茵衣藻中 TCF20 的功能和机制的研究奠定了基础。

关键词: TCF20; 莱茵衣藻; 转录因子; 纤毛调控; 原核表达; 多克隆抗体

中图法分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2025)06-1010-08

Expression Analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* TCF20 and Preparation of Its Polyclonal Antibody

WU Qian-long, LIU Si-yuan, CHEN Xiao-ping, ZHANG Ying, FENG Li*

School of Life Sciences/Jiangnan University, Wuhan 430056, China

Abstract: In mammals, the transcription factor TCF20 participates in physiological processes including cell proliferation and apoptosis, immunity, and metabolism. Recent research has revealed that TCF20 deficiency leads to abnormal proliferation and differentiation of neural progenitor cells, with both human and murine models exhibiting autism-like neurodevelopmental disorders. Consequently, TCF20 has emerged as a genetic screening target for related disorders. To date, research on TCF20 in *Chlamydomonas reinhardtii* remains unexplored, particularly the function and molecular mechanism of TCF20 in ciliary regulation. To elucidate the role of CrTCF20 in cilia, we perform a protein homology analysis. Using the cDNA sequence of *Chlamydomonas reinhardtii* TCF20, this study constructs a prokaryotic expression vector plasmid(pGEX-6p-1-TCF20-GST) for the alga's endogenous TCF20 protein, transforms the plasmid into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for induced expression, and obtains a 55 kD recombinant fusion protein (TCF20-GST) with a GST tag. This study immunizes mice with the affinity-purified recombinant protein, collects the serum after the fifth immunization, and determines the antiserum titer to be 1: 512 000 via indirect ELISA. It uses Western blotting to detect the prepared antibody, which specifically recognizes the endogenous TCF20 protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. In addition, CrTCF20 is mainly localized in the cytoplasm with weak localization in the nucleus. During flagellar regeneration, TCF20 translocates from the cytoplasm to the nucleus to exert its function. These results show that this experiment successfully prepares the polyclonal antibody against CrTCF20 protein, laying a foundation for subsequent studies on the function and mechanism of TCF20 in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Keywords: TCF20; *Chlamydomonas reinhardtii*; transcription factor; ciliary regulation; prokaryotic expression; polyclonal antibody

转录因子 20(TCF20)作为转录因子调控基质金属蛋白酶 3(MMP3)^[1],也作为转录共激活因子增强转录因子如特异性蛋白 1(SP1)、ETS

变体转录因子(Ets1)、原癌基因蛋白(c-Jun)的转录活性^[2],还可以作为雌激素受体 α (ER α)的磷酸化丝氨酸特异性阻遏物^[3]。近些年,TCF20 缺

收稿日期: 2025-01-09

修回日期: 2025-11-13

基金项目: 国家重点研发计划(2020YFA0907400); 国家自然科学基金(32170702)

第 1 作者简介: 吴倩龙(1997-),男,硕士研究生,研究方向: 莱茵衣藻分子生物学。Email: 1269285437@qq.com

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail: fengli0702@jhun.edu.cn

陷被发现与神经发育障碍(NDD)、自闭症(ASD)、智力障碍(ID)耦合^[4-7]。在神经发育障碍相关的研究使这个基因被重新重视起来,作为一个重要的基因缺陷靶点报道在神经发育障碍相关疾病的医学临床报告中^[8,9],并且该缺陷可能导致肝纤维化^[10]、冠心病^[11]。*TCF20*位于人染色体22q13,此处染色体的缺陷常伴有智力缺陷和行为异常^[5]。小鼠中*TCF20*缺陷表现为神经祖细胞增殖受到促进,同时神经细胞分化受阻^[12]。*TCF20*缺陷还表现出和肝纤维化增加有关,并且会导致线粒体代谢的改变^[10]。*TCF20*编码的蛋白还与其他蛋白形成复合体共同调控神经发育^[13,14]。此前有文章报道,*TCF20*在植物、真菌或低等真核生物中未发现同源蛋白^[15],以前的研究也仅在动物模型中进行。利用莱茵衣藻基因组数据库 Phytozome,我们发现了*TCF20*的莱茵衣藻同源基因(Phytozome:Cre03.g174600),结合在衣藻上的一些前期实验,我们尝试在纤毛的方向对*TCF20*的分子机制作出一定解释。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是研究纤毛(莱茵衣藻中也称鞭毛)的模式生物,具有成本低、易培养、实验方法成熟的特点^[16]。纤毛组装的关键机制纤毛内运输(Intraflagellar transport, IFT)就是在莱茵衣藻中发现的^[17]。纤毛蛋白以囊泡的形式,从高尔基体运输到纤毛基体,纤毛蛋白和轴丝与IFT蛋白结合后,被运输到纤毛顶端帽状结构释放,IFT蛋白返回细胞体^[18,19]。纤毛具有重要的运动、分泌和感知的功能^[20],纤毛相关蛋白缺陷会影响纤毛功能的发挥,发生在人体可能导致严重的纤毛病^[21,22]。转录因子参与纤毛基因调控是纤毛研究的新方向,有文献报道XAP5在莱茵衣藻中作为转录因子,用于调控参与纤毛组装的基因^[23],*CrTCF20*的研究思路能以此为参考。*TCF20*调控莱茵衣藻的纤毛基因转录有重要的研究意义,可以从全新角度解释*TCF20*的分子机制,能够完善纤毛病和神经发育障碍的致病机制理论,为治疗这些疾病开辟新的方向。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和藻种

大肠杆菌感受态DH5 α 和BL21(DE3)购自南京诺唯赞,载体质粒pGEX-6p-1-GST和野生

型藻种21gr(CC-1690)均为本实验室保存。

1.2 主要试剂

限制性内切酶购于NEB公司,phanta酶和同源重组酶购于南京诺唯赞;DNA分子量Maker和山羊抗鼠抗体购于武汉爱博泰克,蛋白Maker购于武汉爱博泰克和赛默飞公司;蛋白纯化介质、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂均购于美国Sigma公司;NC膜和Elisa试剂盒购于北京索莱宝;测序、引物合成服务来自上海生工生物工程有限公司;其余试剂为国产分析纯。

1.3 实验动物

小鼠(Mus)10只,每只体重20-25 g,来自武汉大学实验动物中心。

1.4 pGEX-6p-1-GST-TCF20 原核表达载体的构建

以莱茵衣藻21gr cDNA为模板,根据*CrTCF20*(Phytozome:Cre03.g174600)序列设计上游引物ttccagggcccctgggatccATGGCATCGATCGAGCCA和下游引物ctcagatcgaccgggaattcTC AATGAGTGTGCGCCGG(小写序列为5'端添加的同源序列)对*CrTCF20*片段扩增;用限制性内切酶BamHI和EcoRI将回收的目的基因和pGEX-6P-1-GST载体双酶切,用同源重组酶将目的片段和载体连接,转化入大肠杆菌感受态细胞DH5 α ,挑取阳性单菌落并过夜培养,保存菌株后提质粒测序验证。

1.5 GST-TCF20融合蛋白的诱导表达与鉴定

将测序正确的重组质粒转化入大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3),挑取单菌落到装有2 mL液体LB培养基(含有50 μ g/mL的氨苄青霉素)的摇菌管中,37 $^{\circ}$ C、300 r/min培养4-5 h,取300 μ L到30 mL的LB液体培养基(含有50 μ g/mL的氨苄青霉素)培养至 OD_{600} 为0.4-0.6,加入90 μ L浓度0.3 mmol/L的IPTG诱导3 h,同时收取1 mL未加IPTG诱导的菌液。将诱导前后的菌液各收1 mL,6 000 r/min离心1 min,弃上清液,加入60-100 μ L的2 \times 蛋白上样缓冲液重悬菌体,煮样10 min后用10% SDS-PAGE检测。

1.6 GST-TCF20融合蛋白的纯化

选取成功诱导表达的菌株,将10 μ L菌液加到10 mL 50 ng/ μ L的氨苄青霉素抗性LB培养基

中过夜培养。过夜培养活化的菌液全部加到 1 L 氨苄青霉素 LB 培养基中, 37 °C, 200 r/min 培养 2.5 h 至 OD_{600} 为 0.6-0.8, 取诱导前菌液 1 mL, 6 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 加入 60-100 μ L 的 2 \times 蛋白上样缓冲液重悬菌体, 煮样 10 min; 同时, 加入 IPTG 诱导剂 3 mL, 在 16 °C, 200 r/min 的条件下诱导 16-24 h。

取 1 mL 诱导后菌液, 收集菌体用 30 mL 的 PBS 重悬菌体并超声破碎, 同时收集超声前, 超声后上清, 超声后沉淀菌样, 用 2 \times 蛋白上样缓冲液混合后, 煮样 10 min。超声后加入 3 mL 10% Triton-X100 和 30 μ L 的二硫苏糖醇(DTT, 1 mol/L), 冰上孵育 30 min。4 °C, 10 000 r/min 离心 20 min 菌液, 上清液再离心 1 次。上清液流经配置好的纯化柱, 以 1% Triton-X100 的 PBS 清洗纯化柱 4 次, 加 2 mL 洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.5, 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽) 孵育 10 min, 收集 0.5 mL 液体为蛋白 1, 再孵育 5 min 收集 0.5 mL 和 1 mL, 分别为蛋白 2 和 3。分别取 10 μ L 蛋白液加 60 μ L 2 \times 蛋白上样缓冲液, 沸水浴煮样 10 min。测蛋白浓度后, 分装液氮速冻后保存在 -80 °C 冰箱。

1.7 多克隆抗体的制备

取体重为 20~25 g 的小鼠, 观察其身体状态无异常备用。首次免疫以 PBS 稀释蛋白抗原(100 μ g) 至 0.1 mL, 加等体积的弗氏完全佐剂乳化混合, 共 0.2 mL 液体在小鼠背部皮下免疫; 分别在 22 d、36 d、50 d 加强免疫, 第 2 次和第 3 次免疫抗原量减半; 60 d 小鼠脱眼球取全血置 4 °C 冰箱过夜。离心分离血清, 免疫印迹检测抗血清特异性后, 用间接 Elisa 法测抗血清效价。

1.8 间接 ELISA 法检测多克隆抗体效价

用包被液稀释 CrTCF20 重组蛋白至 1 μ g/mL 作为包被抗原, 以 100 μ L/孔包被酶标板并 4 °C 过夜。用含有 0.05% Tween-20 的洗液洗涤 3 次, 每孔加入 200 μ L 的封闭液(含 5% BSA), 37 °C 孵育 2 h, 用洗液洗涤 3 次。待测抗血清作为一抗, 从 1:2 000 开始 2 倍稀释至 1:512 000, 并设置同等稀释度的阴性小鼠血清作为对照, 每孔 100 μ L, 在 37 °C 孵育 1 h, 用洗液洗涤 3 次后每孔加入 100 μ L 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠二抗(1:20 000 稀释), 37 °C

孵育 1 h, 用洗液洗涤 5 次。每孔加入 100 μ L TMB 显色剂, 37 °C 避光孵育 10 min, 每孔加入 50 μ L 终止液, 立即使用酶标仪测定 450 nm 波长下的吸光值。抗血清 OD_{450} 大于 0.1, 且与阴性对照血清 OD_{450} 的比值大于 2, 其对应的稀释倍数为抗体血清效价。

1.9 免疫印迹法检测多克隆抗体的特异性

提取 21gr 的全细胞蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 以 1:5 000 稀释纯化后的抗血清作为一抗, 室温或 4 °C 孵育 1 h, 用含 0.05% Tween-20 的 TPST 洗涤 3 次, 加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗室温或 4 °C 孵育 45 min, TBST 洗涤 3 次, 加 ECL 化学发光液曝光显影。

1.10 细胞核粗分离

将 10% 的 NP40 加到蛋白提取液 A, 配制成终浓度 1% NP40 蛋白提取液 A(后称 1% NP40)。用 200 μ L 1% NP40 重悬液氮速冻的衣藻细胞, 冰上孵育 10 min, 吸取 100 μ L 液体作为全细胞样本, 剩余液体 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 吸取上清液为胞质和细胞膜, 沉淀用 100 μ L 1% NP40 重悬, 再次离心 10 min 弃上清, 沉淀为粗提细胞核, 加 100 μ L 1% NP40 重悬。将全细胞、胞质和细胞核样本加入等量 2 \times 蛋白上样缓冲液, 沸水浴煮样 10 min。

2 实验结果

2.1 转录因子 TCF20 分析

CrTCF20 (Phytozome: Cre03.g174600) 位于莱茵衣藻 3 号染色体, 基因序列全长 3 378 bp, CDS 区长度为 816 bp, 有 271 个氨基酸。

利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 检索了莱茵衣藻和其他物种的 TCF20 同源蛋白, 并进行蛋白质源性比对。如图 1A 和 B 所示, 莱茵衣藻 TCF20 与比对物种的 C 端 270 个氨基酸有较高源性, 同时都有一个保守的 PHD 结构域, 图 1C 展示了 CrTCF20 的结构域模式图 (SMART 绘制)。PHD (植物同源结构域) 含有锌指状基序, 存在于被认为参与染色质介导的转录调控的核蛋白中, 可能与蛋白质-蛋白质相互作用有关, 对于参与转录激活或抑制的多组分复合物的组装或活性很重要, 周等人的

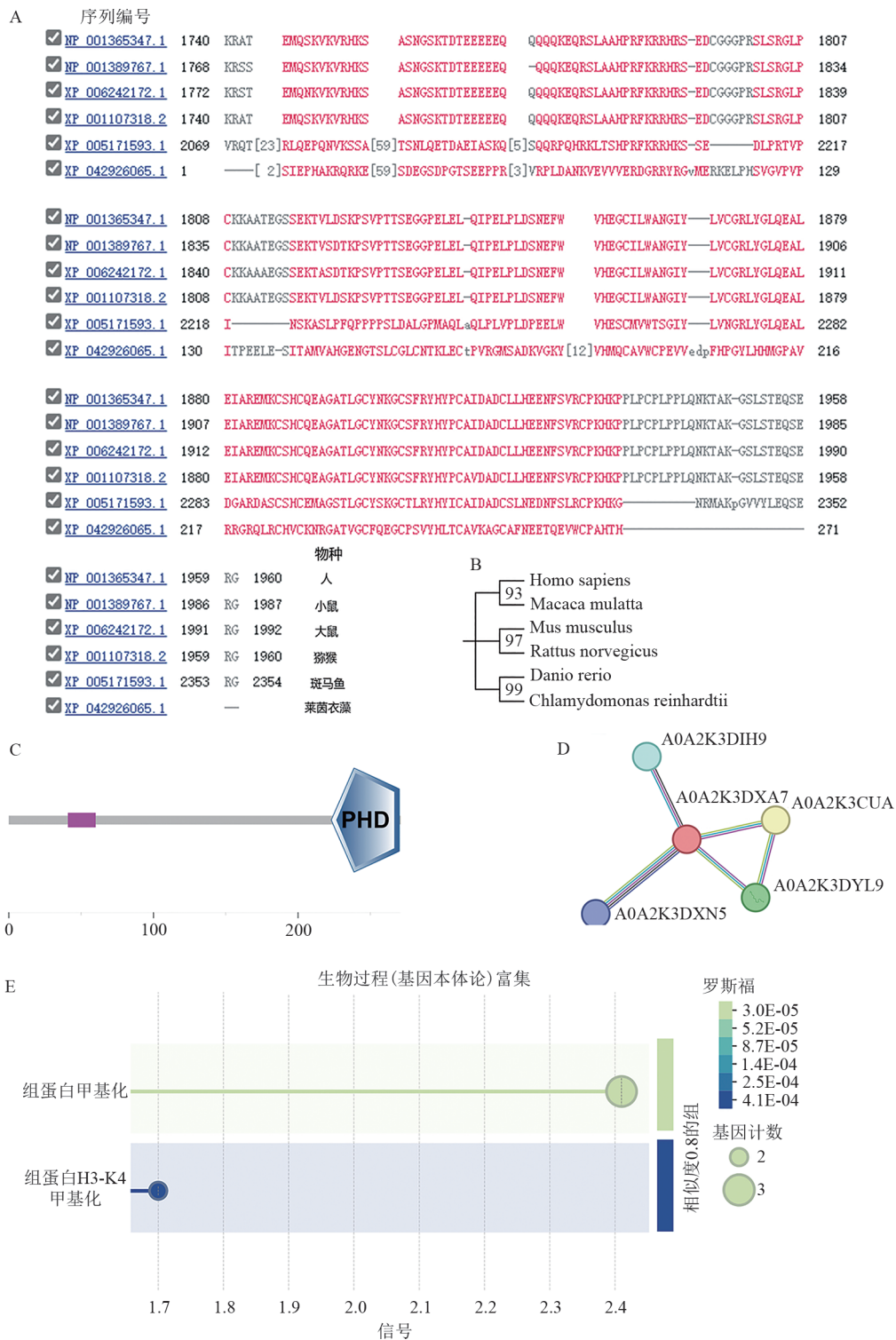


图 1 TCF20 蛋白同源比对和功能分析

Fig. 1 TCF20 protein homology alignment and functional analysis

注:A 衣藻 TCF20 与其他模式生物蛋白同源序列;B 根据同源序列构建的进化树,主枝数字为相似百分比;C 衣藻 TCF20 的 PHD 结构域模式图;D 预测的蛋白-蛋白相互作用网络;E 基因本体论预测的 TCF20 功能通路。2.2 pGEX-6p-1-GST-TCF20 原核表达载体的构建。

Note: A. Homologous protein sequences of Chlamydomonas reinhardtii TCF20 compared with those of other model organisms; B. Phylogenetic tree constructed based on homologous sequences, with similarity percentages (main branch values); C. Schematic representation of the PHD domain in Chlamydomonas TCF20; D. Predicted protein-protein interaction network; E. Functional pathways of TCF20 predicted by Gene Ontology (GO) analysis.

研究也验证了这个观点^[13], 猜测衣藻中 TCF20 的 PHD 结构域也有类似的功能。STRING 数据库给出了可能有蛋白结合的基因预测, GO 分析富集在组蛋白甲基化和组蛋白 H3-K4 甲基化两个通路, CrTCF20 可能以组蛋白甲基转移酶复合物的形式调控下游基因的转录激活或抑制。

2.2 pGEX-6p-1-GST-TCF20 原核表达载体的构建

图2A和B所示, PCR得到目的片段约800 bp, 空载体约5 000 bp; 目的片段与载体双酶切后同源重组并转入感受态细胞DH5 α , 送上海生工生物工程公司测序, 结果与CrTCF20的cDNA序列比对正确, 说明该原核表达载体构建成功。

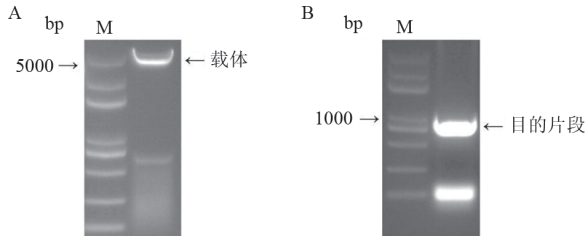


图2 原核表达载体构建

Fig. 2 Construction of prokaryotic expression vector

注: M为DNA Maker, 图A和B分别为载体与目的片段的琼脂糖凝胶电泳。

Note: M represents DNA Maker. Figures A and B are agarose gel electrophoresis of the vector and the target fragment, respectively.

2.3 GST-TCF20融合蛋白的诱导表达与鉴定

重组质粒转入BL21(DE3)感受态细胞内, 经IPTG诱导表达, GST-TCF20融合蛋白大小约为55 kd(图3), 符合预期, 超声破碎后主要分布在超声后上清液中。GST-TCF20融合蛋白纯化后, 质量浓度为1.5 mg/mL, 达到免疫要求。

2.4 CrTCF20抗血清的效价检测

利用间接ELISA法检测CrTCF20抗血清效价, 根据图4所示, CrTCF20抗血清最大稀释512 000倍, 其 OD_{450} 值为0.161 1, 且大于阴性对照(OD_{450} 值0.039 9)2倍, 因此本次CrTCF20抗血清效价为1:512 000。

2.5 CrTCF20抗血清的特异性检测

CrTCF20由272个氨基酸组成, 估算蛋白大小为30 kd。图5所示制备的CrTCF20抗血清经免疫印迹检测, 野生型21gr(cc-1690)泳道在37 kd有特异性条带, 符合预期, 表明抗血清可

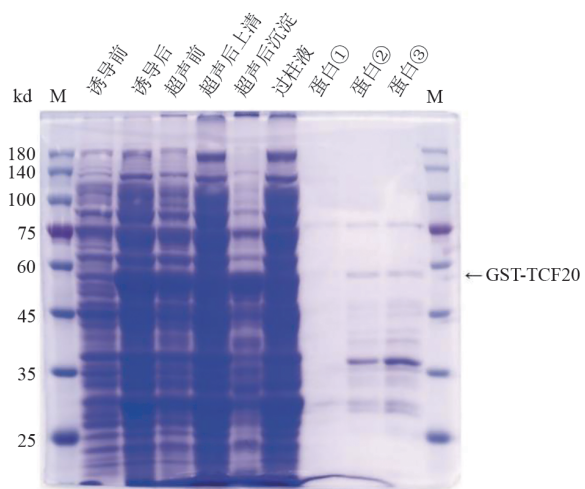


图3 融合蛋白诱导表达和纯化

Fig. 3 Induced expression and purification of the fusion protein

注: M为蛋白 Maker。

Note: M represents the protein marker.

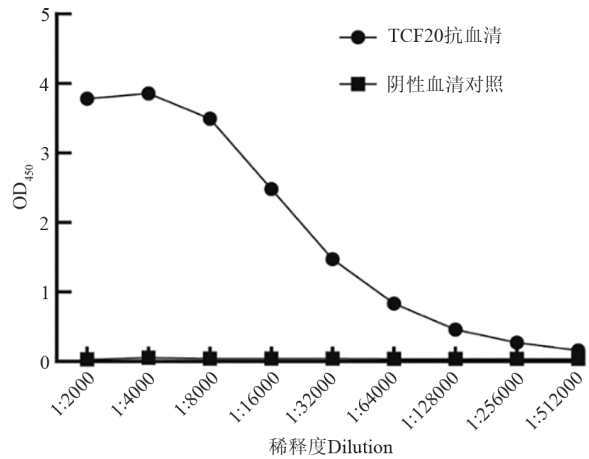


图4 间接ELISA检测抗血清效价

Fig. 4 Detection of antiserum titer by indirect ELISA

以与CrTCF20特异性结合, 可以用于后续实验。

2.6 TCF20在莱茵衣藻内的定位

以细胞核粗分离的方法提取野生型衣藻全细胞蛋白(WC)、胞质蛋白(C)、细胞核蛋白(N), 样品通过蛋白免疫印迹分别与TCF20抗血清、H3组蛋白抗体、CRD1抗体杂合。图5A结果显示, 提取的核蛋白无细胞质污染, TCF20主要分布在细胞质, 细胞核内有较弱条带, 可能是因为TCF20既作为转录因子也作为转录共激活因子, 当需要TCF20发挥作用时, 该蛋白再从细胞质转移到核内参与基因表达调控。衣藻鞭毛经pH Shock后会从基部脱落, 恢复正常环境pH鞭毛会

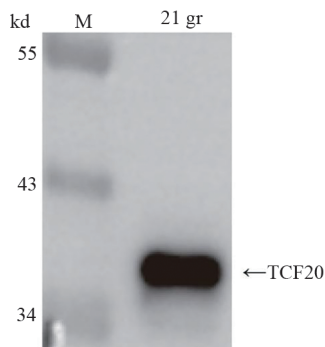


图5 抗体检测

Fig. 5 Detection of antibodies

注:21gr 是野生型衣藻, M 为蛋白 Marker。

Note: 21gr is the wild-type strain of *Chlamydomonas reinhardtii*; M represents the protein marker.

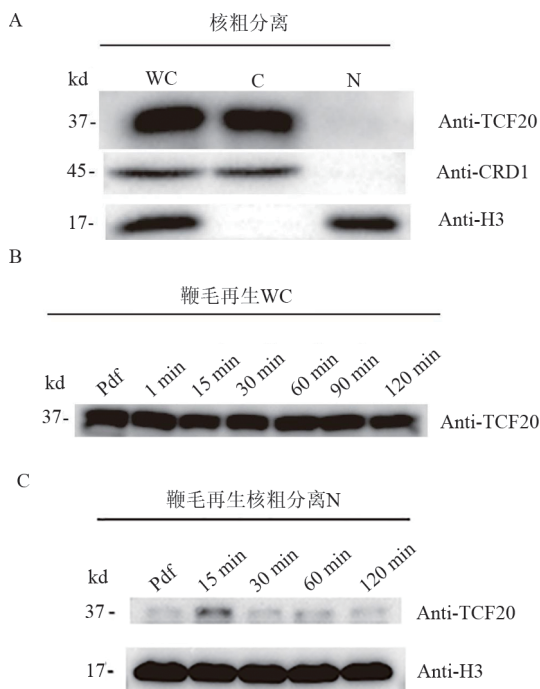


图6 莱茵衣藻中 TCF20 的表达模式

Fig. 6 Expression pattern of TCF20 in *Chlamydomonas reinhardtii*

注:CRD1 为叶绿体基因,此处作为细胞质的内参,组蛋白 H3 作为细胞核内参,两组内参结果说明了细胞核与细胞质成功分离,提取的细胞核蛋白无细胞质污染。

Note: CRD1 is a chloroplast gene used here as a cytoplasmic reference, while histone H3 serves as a nuclear reference. The results of these two internal controls confirm the successful separation of nuclei from cytoplasm, demonstrating that the extracted nuclear proteins are free from cytoplasmic contamination.

重新生长至全长,这个过程称为鞭毛脱落再生,一些纤毛相关蛋白的表达水平在这个过程中会发生变化^[23]。由图 5B 和 C 显示再生过程中 TCF20 蛋白全细胞表达水平比较稳定,但核内水

平有变化,鞭毛再生过程的前期核内水平提高,然后逐渐恢复到正常水平,说明 TCF20 在鞭毛再生过程中进入细胞核发挥转录因子的功能。

3 讨论

TCF20 最开始被发现与一些炎症因子、细胞增殖和凋亡以及肿瘤相关基因的调控有关^[15],最近 5~10 年被发现与神经发育障碍等疾病耦合,TCF20 的研究重新得到了重视,相关疾病患者的医学临床报告报道了不同类型的 TCF20 基因缺陷^[5,7,9]。有研究对 TCF20 缺陷造成神经发育障碍的分子机制作出了一定解释^[12,13],但陆续发现如肝纤维化、冠心病等不同类型的疾病与 TCF20 缺陷有关^[10,11,24],所以需要更多的研究来阐明其功能和分子机制。哺乳动物的大部分细胞类型都有纤毛,纤毛功能缺陷会导致各种疾病的产生^[21]。纤毛基体是中心体的同源物,纤毛的延伸和解聚常与与细胞周期相关,当细胞增殖时细胞会吸收纤毛,基体转换成中心体;细胞分裂后,纤毛又重新生长^[18]。TCF20 可以调控细胞增殖,而莱茵衣藻是研究纤毛的模式生物,并且在衣藻的基因组数据库发现了 TCF20 同源基因,我们尝试以莱茵衣藻为对象,从纤毛的角度解释 TCF20 的功能和分子机制。

我们的结果显示,莱茵衣藻中确实有稳定的内源 TCF20 表达;而在小鼠中,神经元细胞发育早期 TCF20 高度表达,在成熟期表达平稳^[13]。鞭毛再生过程中,TCF20 从细胞质进入核发挥功能,并且随着鞭毛生长完成,TCF20 核内表达量逐渐降低至鞭毛脱落前的水平,也暗示了 TCF20 可能是一个纤毛相关蛋白,参与莱茵衣藻的纤毛调控。TCF20 进入细胞核后可能通过与组蛋白结合,并结合到下游基因特点区域诱导转录激活。纤毛脱落的信号,是如何改变 TCF20 的表达模式,这个过程是否伴随着 TCF20 的特定结构域的激活(比如 NLS 结构域),以及 PHD 结构域在其中起到什么样的功能都是后续研究的方向。未来可以构建莱茵衣藻的 TCF20 缺陷突变体,从转录调控的角度深入 TCF20 的功能和机制。这项研究旨在解决真核单细胞藻类在 TCF20 相关研究的空白,为 TCF20 的致病机制提供新的理论。

4 结论

本研究以莱茵衣藻中的同源基因 *TCF20* 的基因序列构建原核表达载体 pGEX-6p-1-GST-TCF20, 转化 BL21(DE3) 后诱导表达并纯化融合蛋白 GST-TCF20, 免疫小鼠后得到特异性强的 CrTCF20 多克隆抗体。实验表明, 抗血清能特异性检测到莱茵衣藻的内源表达的 TCF20, 制备的 TCF20 抗体特异性较高。细胞核粗分离的免疫印迹也表明, TCF20 通过进入莱茵衣藻细胞核发挥作用。该抗血清可以用于后续莱茵衣藻 TCF20 的功能和作用机制的研究, 为莱茵衣藻转录因子研究提供了研究材料。

参考文献

- [1] Sanz L, Moscat J, Diaz-Meco M T. Molecular characterization of a novel transcription factor that controls stromelysin expression[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(6): 3164-3170.
- [2] Sjøttem E, Rekdal C, Svineng G, et al. The ePHD protein SPBP interacts with TopBP1 and together they co-operate to stimulate Ets1-mediated transcription [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(19): 6648-6662.
- [3] Gburcik V, Bot N, Maggolini M, et al. SPBP is a phosphoserine-specific repressor of estrogen receptor alpha[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(9): 3421-3430.
- [4] Smeland O B, Frei O, Kauppi K, et al. Identification of genetic loci jointly influencing schizophrenia risk and the cognitive traits of verbal-numerical reasoning, reaction time, and general cognitive function[J]. *JAMA Psychiatry*, 2017, 74(10): 1065-1075.
- [5] Schäfgen J, Cremer K, Becker J, et al. De novo nonsense and frameshift variants of TCF20 in individuals with intellectual disability and postnatal overgrowth[J]. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 2016, 24(12): 1739-1745.
- [6] Babbs C, Lloyd D, Pagnamenta A T, et al. De novo and rare inherited mutations implicate the transcriptional coregulator TCF20/SPBP in autism spectrum disorder [J]. *Journal of Medical Genetics*, 2014, 51(11): 737-747.
- [7] Vetrini F, Mckee S, Rosenfeld J A, et al. De novo and inherited TCF20 pathogenic variants are associated with intellectual disability, dysmorphic features, hypotonia, and neurological impairments with similarities to Smith-Magenis syndrome[J]. *Genome Medicine*, 2019, 11(1): 12.
- [8] Baldan F, Demori E, Gnan C, et al. Chromoanagenesis of chromosome 22 in a subject with obesity and borderline cognitive performance [J]. *Gene*, 2025, 933: 148956.
- [9] Lévy J, Cogan G, Maruai A, et al. Rare and de novo duplications containing TCF20 are associated with a neurodevelopmental disorder [J]. *Clinical Genetics*, 2022, 101(3): 364-370.
- [10] Córdoba-Jover B, Ribera J, Portolés I, et al. Tcf20 Deficiency is associated with increased liver fibrogenesis and alterations in mitochondrial metabolism in mice and humans[J]. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 2023, 43(8): 1822-1836.
- [11] Zhang W, Wan P, Zhang M, et al. Association between CYP2D7 and TCF20 polymorphisms and coronary heart disease [J]. *Cardiovascular Toxicology*, 2024, 24(10): 1037-1046.
- [12] Feng C, Zhao J Y, Ji F, et al. TCF20 dysfunction leads to cortical neurogenesis defects and autistic-like behaviors in mice[J]. *EMBO Reports*, 2020, 21(8): e49239.
- [13] Zhou J, Hamdan H, Yalamanchili H K, et al. Disruption of MeCP2-TCF20 complex underlies distinct neurodevelopmental disorders[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(4): e2119078119.
- [14] Eberl H C, Spruijt C G, Kelstrup C D, et al. A map of general and specialized chromatin readers in mouse tissues generated by label-free interaction proteomics [J]. *Molecular Cell*, 2013, 49(2): 368-378.
- [15] Darvekar S, Rekdal C, Johansen T, et al. A phylogenetic study of SPBP and RAI1: Evolutionary conservation of chromatin binding modules [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78907.
- [16] 冯 雳, 卢 静, 魏思雯, 等. 莱茵衣藻 LRR-1 蛋白多克隆抗体的制备与鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2024, 43(05): 297-302.
- [17] 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.
- [18] Wingfield J L, Lechtreck K F. Chlamydomonas basal bodies as flagella organizing centers[J]. *Cells*, 2018, 7(7): 79.

- [19] Brown J M, Cochran D A, Craige B, et al. Assembly of IFT trains at the ciliary base depends on IFT74[J]. *Current Biology* : CB, 2015, 25(12): 1583-1593.
- [20] Long H, Huang K Y. Transport of Ciliary Membrane Proteins[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2019, 7: 381.
- [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(09):849-856.
- [22] Takeuchi K, Abo M, Date H, et al. Practical guide for the diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2024, 51(3): 553-568.
- [23] Li L L, Tian G M, Peng H, et al. New class of transcription factors controls flagellar assembly by recruiting RNA Polymerase II in *Chlamydomonas*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(17): 4435-4440.
- [24] Kang C W, Oh J H, Wang E K, et al. Excess endocrine growth hormone in acromegaly promotes the aggressiveness and metastasis of triple-negative breast cancer[J]. *Iscience*, 2024, 27(7): PP110137.