

植物蛋白质的亚细胞定位研究进展

邢浩然, 刘丽娟, 刘国振

(河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071001)

摘要: 细胞是生命形式的基本组成单元, 各种蛋白质按照其功能有序地分布在细胞的每个分区中。植物细胞的主要分区包括细胞膜和其他内膜系统、细胞核、细胞质以及位于其中的线粒体、叶绿体、高尔基体和内质网等各种细胞器。植物蛋白质的亚细胞定位是功能基因组学的重要内容。主要的植物蛋白质亚细胞定位技术包括: 融合报告基因定位法、免疫组织化学定位法、蛋白质组学定位技术以及共分离标记酶辅助定位法, 而生物信息学预测也成为亚细胞定位研究的一种重要手段。高通量蛋白质亚细胞定位技术的发展和运用, 为构建定位数据库积累了数据。在模式植物拟南芥中, 有亚细胞定位信息的蛋白质已经超过 4 000 个。

关键词: 蛋白质; 亚细胞定位; 细胞分区; 蛋白质组学; 高通量

中图分类号: Q-1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2006)增刊-0001-06

Advancement of Protein Subcellular Localization in Plants

XING Hao_ran, LIU Li_juan, LIU Guo_zhen

(College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: Cell is the fundamental unit of living organism, proteins with different functions distributed in cellular compartments, including plasmollemma, nucleus, cytoplasm and organelles like mitochondria, chloroplast, Golgi, and endoplasmic reticulum etc. Protein subcellular localization is one of the key questions for functional genomics. The techniques used for subcellular localization of plants protein include fusion reporter gene localization, immunohistochemical localization, 2D combined with mass spectrometry, marker enzyme-assisted localization and bioinformatics prediction. The development and application of high-throughput protein subcellular localization technology stimulated the establishment of protein subcellular localization database. In model plant *Arabidopsis thaliana*, the number of proteins with localization data is over 4000.

Key words: Protein; Subcellular localization; Cellular compartment; Proteomics; High-throughput

拟南芥基因组^[1]和水稻基因组测序^[2]工作的完成, 全面揭开了植物蛋白质组学研究的序幕。全景式的蛋白质亚细胞定位、蛋白质与蛋白质相互作用以及蛋白质的动态变化等成为生物学家们关注的热点。其中, 蛋白质的亚细胞定位研究对于系统地理解植物形态建成、生长发育甚至逆境耐性等都是必不可少的环节, 也是功能基因组学的重要内容。植物基因的编码产物都是依据自身氨基酸序列所包含的定位信息, 由精确的制导机制定位到细胞的特定部位的^[3]。基因组测序结果表明, 植物中存在很多

蛋白质产物近似的基因家族, 其中 50% 以上的家族都有两个以上的成员^[1]。单从序列分析的角度很难对这些基因家族的蛋白质产物的功能进行区分, 甚至很自然地推测它们的功能是重复的, 但有证据表明, 它们的蛋白质产物因目的地不同, 而功能也不尽相同^[3]。在细胞特定部位存在的蛋白质亚组, 共同适应所在的环境, 共同作用而使所在部位的功能得以发挥。因此, 鉴定蛋白质亚组, 是全面理解细胞整体功能的重要环节。

随着多种蛋白质亚细胞定位技术的建立和发

收稿日期: 2006-04-20

基金项目: 国家自然科学基金(30328019, 30370872)

作者简介: 邢浩然(1978-), 男, 河北人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究; 刘国振为通讯作者。

展,现已实现了从单个蛋白质的亚细胞定位到高通量地进行蛋白质亚细胞定位的技术创新,并且从静态定位研究发展到活体动态研究。各种定位方法的综合运用已经积累了大量的亚细胞定位数据,使我们初步了解细胞内不同分区中蛋白质分布的大致轮廓成为可能。本文拟对植物蛋白质的亚细胞定位研究及其进展进行总结,并试图对相关研究进行展望。

1 植物细胞的主要分区

植物细胞由细胞壁和被其包被的原生质体构成。原生质体则是由细胞膜、细胞质和细胞核组成,细胞质是由细胞基质和多种细胞器(线粒体、叶绿体、内质网、质膜、高尔基体、核糖体、液泡和过氧化物酶体等)构成,以上这些构成细胞的微小结构或分区统称为亚细胞结构。每个亚细胞结构中都分布着多种蛋白质,人们通过各种定位技术,对各亚细胞结构中蛋白质的分布情况了解地越来越多。质膜和细胞器内膜是一个蛋白质种类较多的区域,膜上的蛋白质主要有载体蛋白、与细胞活动相关的离子泵、通道蛋白和蛋白受体等,此外质膜上通常还分布着一些重要的酶以及一些与植物抗逆相关的蛋白质;线粒体是有氧呼吸的主要场所,自然含有与有氧呼吸相关的酶类为主的蛋白质;叶绿体是光合作用的场所,是光合作用所需酶类的主要存在部位;细胞核中也含有种类繁多的蛋白质,包括核定位信号相关的蛋白质和控制遗传信息复制、合成的酶等等;细菌、病毒感染的蛋白质在植物细胞中的分布相对分散,质膜、细胞质和多种细胞器上都有外源蛋白定位的报道。更为重要的是,植物细胞中蛋白质的分布不是一个简单的静态过程,而是不断受到代谢调控,时刻可能发生变化的动态过程。

2 蛋白质亚细胞定位的方法

目前研究植物蛋白质的亚细胞定位,已经具备了多种成熟的技术方法,主要总结如下。

2.1 融合报告基因定位法

将目的蛋白基因与易于检测的报告基因进行融合,构建融合基因表达载体,表达融合蛋白,然后借助于报告基因表达产物的特征来定位目的蛋白质。目前,报告基因就其表达产物而言,以绿色荧光蛋白(GFP)和 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)应用最为广泛。

GFP能自我催化形成发色结构并在蓝光激发下发出绿色荧光,所以可以与目标蛋白融合,作为荧光

标记分子,特异性地进行蛋白质的亚细胞定位。GFP能在蛋白质的N端或C端融合而保持其天然蛋白的特性,而且灵敏度高、对活细胞无毒害作用,所以广泛应用^[4,5];此外,GFP可以人工改造成具有更高的荧光强度和灵敏性的突变体,例如增强型GFP(EGFP)是将Ser65用Thr替代,Phe64用Leu替代,其荧光强度提高了35倍^[6];另外,GFP还改建成了能发射其它颜色荧光的突变体,例如,红色荧光蛋白(RFP)、黄色荧光蛋白(YFP)和蓝色荧光蛋白(BFP)以及它们的增强型ERFP、EYFP、EBFP等^[7,8],这些改造使荧光蛋白的应用更为广泛。

1987年GUS基因克隆后,很快就发展起以GUS作为基因标记的系统^[9]。GUS基因表达产物具有检测容易、灵敏度高、易于定量及定性分析的优点。由于在绝大多数植物的细胞内不存在内源的GUS活性,所以检测弱启动子驱动的GUS活性则更容易、更精确^[10]。基于GFP和GUS蛋白在N端或C端都可融合蛋白质的特点,Quaedvlieg等构建了具有GFP和GUS编码序列的双功能报道基因,它结合了GUS检测较灵敏和GFP可用于活体检测的优点^[11]。

融合报告基因定位法适用性强,容易操作,试验周期相对较短,可以应用于活体的实时定位和动态研究,灵敏度高,还可以实现高通量的蛋白质亚细胞定位。Escobar等将烟草随机文库与GFP编码序列融合在病毒载体上,通过病毒侵染烟草途径瞬时表达,高通量筛选融合蛋白(每天可以筛选数百个)并获取大量亚细胞定位数据,结果表明,在超过20 000次的筛选中获得了12个定位在质膜上的蛋白质以及其它的亚细胞定位^[12]。但是值得注意的是,该法采用外源导入系统进行定位,有时会受GFP融合蛋白的影响,定位结果可能与在体内条件下的蛋白质的分布有差异;另外,融合蛋白的过强或者过弱表达都可能会使定位结果不清,尤其对质膜等膜类蛋白的定位可能产生较大影响。

2.2 免疫组织化学定位法

免疫组织化学又称免疫细胞化学,是利用蛋白质特异的抗体检测目标蛋白质在细胞中的位置的方法。一般是将抗体进行标记后识别植物细胞切片中的目标蛋白质,然后借助光学显微镜或电子显微镜观察其所在位置,根据抗原抗体的结合部位确定目标蛋白的位置。这种亚细胞定位方法是把免疫反应的特异性、组织化学的可见性巧妙地结合起来,可以在细胞、亚细胞水平检测各种抗原物质,如多肽、酶、

激素、以及受体等。根据标记物的不同,免疫细胞化学技术可分为免疫荧光细胞化学技术、免疫酶细胞化学技术、免疫铁蛋白技术、免疫金-银细胞化学技术、亲和免疫细胞化学技术、免疫电子显微镜技术等。Nakashima 等采用免疫金细胞化学技术,将鱼尾菊的多聚半乳糖醛酸酶在亚细胞水平上定位到次生加厚壁、初生壁、高尔基体和囊泡中^[13]。

用免疫组化方法定位蛋白质的最重要的优点是体内定位系统,反映的是活体状态下目标蛋白质在植物细胞的位置,是最直接、准确的定位方法。但是,这种方法的先决条件是要求具备目标蛋白质的特异性的抗体,而这对绝大部分植物蛋白质来说都是很难具备的条件,另外,免疫组化方法实验周期长,效率低,技术依赖性强,难以实现高通量。

2.3 共分离标记酶辅助定位法

在细胞的特定部位,往往有某种蛋白质的高丰度表达或者特异性表达,其具有的酶活性可以作为鉴定该部位的特定标记,这种蛋白质也就成为这一部位的标记酶。当目标蛋白与标记酶共分离后,再用特异的标记抗体通过免疫印迹检测目标蛋白,从而进行目标蛋白的亚细胞定位。这种方法还往往用来检测细胞组分分离的效果。比如可以用 NADH:细胞色素 C 还原酶活性标记内质网,用对钼酸盐敏感的 ATP 酶活性标记质膜,用对硝酸盐敏感的 ATP 酶活性标记液泡膜以及用 UDP 酶活性来标记高尔基体等^[14, 15]。Shan 等对丁香假单胞杆菌番茄致病小种的 avrPto 无毒基因编码的 AvrPto 无毒蛋白进行了亚细胞定位研究,他们从诱导后的烟草中提取总

蛋白质组分,其中包含经诱导产生的 AvrPto 蛋白,超速离心分离质膜组分,用对钼酸盐敏感的 ATP 酶活性标记质膜,用特异性的 AvrPto 蛋白抗体进行免疫印迹检测,结果只能在质膜上或者包含质膜在内的组分中才能检测到 AvrPto 蛋白的存在,从而将其定位在烟草细胞的质膜上^[16]。

但是,这种方法一般要求用超速离心分离细胞组分,还要注意在分离过程中维持蛋白质的活性,所以对分离的要求较高,此外,有些部位很难找到合适的特异性标记酶,所以其应用受到很大的限制。

2.4 蛋白质组学定位技术

蛋白质组学定位技术主要用双向电泳进行蛋白质的分离,然后用质谱技术鉴定蛋白质,如能预先对细胞组分进行筛分,则可以了解不同细胞组分中的蛋白质成分及丰度,这种方法也称为细胞器蛋白质组学(Cell_map proteomics)。Bhushan S. 等用质谱分析方法从高度纯化的拟南芥叶绿体组分中,证实了两个不同的降解前导肽的含锌水解蛋白酶的存在^[17]。随着质谱鉴别蛋白质技术的发展以及可用的基因组序列信息的增加,基于蛋白质组学的定位方法近年来发展很快,目前成为高通量鉴定方法的首选。但是,在双向电泳分离蛋白质的过程中,分离效果容易受高丰度蛋白的影响,而且由于质谱技术极高的分辨率和灵敏度,纯化后的亚细胞组分即使只有微量的混杂,也能被质谱分辨并误认为是亚细胞的组成部分。因此,如何提高纯化的质量仍是这种方法的一个关键,应用起来对技术条件的要求较高。

表 1 主要的蛋白质亚细胞定位预测软件和网站^[21, 22]

服务器 Sever	网 站 Website	特 征 Characteristic
iPSORT	(http://hypothesiscreator.net/iPSORT/)	根据 N ₁ 末端分拣信号
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/	根据各自靶标信号肽的差异
MitoProt	http://bioinformers.ebi.ac.uk/newsletter/archives/2/mitoprotii.html	根据线粒体和叶绿体信号肽的差异
Predotar	http://www.inra.fr/Internet/Produits/Predotar	根据线粒体和叶绿体信号肽的差异
NNPSL	http://predict.sanger.ac.uk/nnpsl	根据氨基酸组成
SubLoc	http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc	根据氨基酸组成
EukProL ProProL	http://tubic.tju.edu.cn/	根据包括氨基酸组成在内的更多信息
WoLF PSORT	(http://wolfsort.seq.cbrc.jp)	根据氨基酸组成和 iPSORT 等的特征
MITOPRED	(http://bioinformatics.albany.edu/~mitopred)	根据 N ₁ 末端和 C ₁ 末端氨基酸组成和线粒体特异 Pfam 域差异
MitoProtII	(http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html)	根据信号肽的差异等
PeroxP	(http://www.sbc.su.se/~obf/peroxi)	根据 C ₁ 末端三肽的差异和 TargetP 特征

2.5 生物信息学预测定位

随着生物信息学的发展,用计算机程序预测蛋白质亚细胞定位的系统也在逐步地建立。其主要原

理就是根据蛋白质的氨基酸序列特征以及亚细胞的特异结构特征,提取特征参数或描述符,通过算法比较查询序列中所包含的特征参数与各类被定位蛋白

质的相似度, 从而对蛋白质的亚细胞定位作出判断。这种生物信息学预测的技术手段, 可以帮助普通生物学工作者用于自己感兴趣的蛋白质的定位研究。Fujiwara 和 Asogawa 利用氨基酸的组成和序列信息, 进行植物或非植物蛋白质的亚细胞定位推测^[18]。Chou 和 Cai 则利用功能域和拟氨基酸杂交的方法来预测蛋白质的亚细胞定位^[19]。目前很多在线预测网站和生物预测软件已经在蛋白质的亚细胞定位中应用(表 1)。Esub8 是一种常用的预测蛋白质位置的极好的工具, 主要用来预测叶绿体、细胞质、细胞外、高尔基体、溶酶体、线粒体和过氧化物酶体 8 个亚细胞中定位的蛋白质^[20]。

从蛋白质的序列出发, 用计算机软件预测蛋白质的定位, 能够低成本、高通量地获取亚细胞定位信息, 作为试验定位的辅助分析手段。但绝大多数的程序预测均有局限, 如不能准确预测特定的细胞分区(如, 高尔基体、液泡和质膜, 预测的定位数据往往需要实验数据的验证。

3 模式植物拟南芥蛋白质亚细胞定位现状

随着多个模式生物基因组测序工作的完成, 蛋白质组学研究全面展开。蛋白质亚细胞定位的信息急剧上升, 已经有多个专门汇集这些信息的数据库可供查阅。清华大学的 SPPIdb (Database of Subcellular Protein-Protein Interaction) 就收录了不同生物类型的蛋白质在细胞不同分区中的定位数据。截止到 2006 年 4 月, 植物中收录的非冗余蛋白质定位数目有将近 11 000^[23]。模式植物拟南芥中定位的蛋白质数目最多, 超过 4 000 个。

对于单个蛋白质定位或者多蛋白质共定位的研究, 用 GFP 融合标记技术是行之有效的。Michael 等将 GFP 与拟南芥的微丝结合蛋白的第二肌动蛋白结合域融合, 研究了拟南芥中肌动蛋白细胞骨架的动态特征, 证明了侧丝的迁移和滑动对肌动蛋白骨架的动态调整有重要影响^[24]。Lee 等在分离的拟南芥胞间连丝中, 发现了一个蛋白激酶(PAPK), 通过进一步的亚细胞定位分析, 证明该蛋白激酶与烟草花叶病毒运动蛋白在跨膜处共同富集, 这符合向胞间连丝运送的模式^[25]。

应用高通量 GFP 标签融合技术可以快速地进行蛋白质的规模化亚细胞定位。Cutler 等将拟南芥 cDNA 库的随机序列融合在 GFP 编码序列的 31 端, 经农杆菌介导的 5 700 个拟南芥转化株中, 约有 2%

在以过氧化物酶体为主的不同部位表达荧光, 从而可以帮助观察拟南芥的亚细胞结构^[26]。但是, 因这种随机融合蛋白技术会产生大量不表达的融合蛋白, 需要分离克隆并进行测序验证, 这样会使筛选的通量和速度降低。最近, 改进的技术策略是将 GFP 编码序列与基因组 DNA 或者开放式阅读框融合且保持读码框的一致, 很大程度上克服了随机融合的缺陷。Tian 等采用全长蛋白荧光标签(FTFLP)技术, 使用目的基因自身的启动子, 在近 1/3 的拟南芥编码未知功能蛋白质的基因中, 进行了表达模式的研究, 可以同时获得组织特异性表达和亚细胞定位结果, 最后分别将这些蛋白质定位在细胞壁、质膜、液泡膜、过氧化物酶体、细胞核等细胞的多个分区中^[27]。Olga 等也建立了高通量的亚细胞定位方法, 即借助高通量的克隆表达系统(GATEWAY), 将拟南芥基因组的不同开放阅读框与 GFP 基因融合, 经高效农杆菌介导转基因到拟南芥, 155 个融合蛋白质定位在细胞质、细胞核、核仁、细胞器及其内膜系统中^[28]。

用细胞器特异的实验方法能够鉴定特定位置的蛋白质, 这样就可以建立已知或未知蛋白质定位的目录。这种方法通常采用分离细胞组分、离心纯化细胞器或者细胞组分, 然后用质谱技术鉴定多肽^[29, 30]。

在拟南芥研究中, 有一系列关于亚细胞蛋白质组的深度报道。例如, 对叶绿体蛋白质组的定位结果做了系统研究^[31]。有两篇关于线粒体蛋白质组定位的深入研究^[32, 33], 最近, 利用液相色谱和串联质谱的蛋白质组学技术, 已经对拟南芥线粒体样品中的 400 多个非冗余蛋白质进行了分析^[34]。有三篇文献专门涉及核蛋白质组学^[35~37]。还有对绿色子叶^[38]和黄化子叶^[39]过氧化物酶体的蛋白质分析鉴定, 以及对拟南芥突变体的过氧化物酶体的研究^[40]等。此外还有细胞内膜系统蛋白质^[41]、细胞壁蛋白质组^[29]和非原质体蛋白质组^[42]的报道。

通过传统的单一蛋白质的定位策略、新近发展的高通量定位策略以及生物信息学软件的预测, 积累了大量的模式植物拟南芥蛋白质的亚细胞定位数据。Joshua^[43]等对 4 418 个拟南芥蛋白质的亚细胞定位数据进行了汇总和分析, 形成了针对单一植物的最大的蛋白质亚细胞定位数据库(表 2)。今后, 这些蛋白质的亚细胞定位信息将会为基因组学和蛋白质组学研究提供重要资源。

表 2 模式植物(拟南芥)非冗余蛋白质亚细胞定位数据表

Tab.2 The pattern plant (*Arabidopsis thaliana*)' s non_redundant protein subcellular localization data

分区	MS	FP	SP	Any One	MS- FP	MS- SP	FP- SP	All Three	Total
Mitochondria	547	73	227	726	16	99	11	5	1 704
Plastid	1 017	118	323	1 240	23	173	30	8	2 016
Nucleus	367	320	551	1 100	75	18	50	5	2 486
PM	534	84	117	670	19	44	7	5	1 480
Vacuole	378	43	42	424	16	17	13	7	940
Peroxisome	28	47	11	77	1	6	2	0	172
Golgi		27	41				10		78
ER		39	43				3		85
Cytosol		154	248				12		414
Extracellular		18	214				4		236
Cytoskeleton		24	2				0		26
Cell plate		10	6				0		16
Unclear		101	238						339

FP, Fluorescent protein_derived set, 荧光蛋白定位的一类; MS, Mass spectrometry proteomics_derived set, 质谱定位的一类; SP, Swiss_Prot database_derived set, 根据 Swiss_Prot 数据库定位的一类; Any One, 非冗余蛋白质的数目, 来自以上任意一种类型; Two_way (MS_FP, MS_SP, FP_SP) 和 three_way (MS_FP_SP), 通过括号中所列的实验类型鉴定的蛋白质; PM, plasma membrane, 质膜; ER, Endoplasmic Reticulum, 内质网

需要指出的是, 上表中各分区的所列蛋白质总数为 9 992, 远大于实际进行定位的蛋白质的数目(4 418), 这是因为一个蛋白质往往可以定位到几个细胞分区中的缘故。

4 蛋白质分区定位研究展望

蛋白质的亚细胞定位与其功能发挥密切相关。细胞功能的行使是由需要特定空间分布的蛋白质—蛋白质之间的相互作用、蛋白质修饰和含量的动态变化等的调控活动来体现的。因而, 活体中蛋白质动态变化的研究和定量分析, 将成为蛋白质组学研究的新的挑战。最近有人开始尝试用荧光共振能量转移(FRET)的显微测量技术来研究活细胞蛋白质的空间分布, 包括对共定位于活细胞特定部位的蛋白质相互作用的研究, 以此实时跟踪特定蛋白在细胞生长、分裂、分化过程中的表达和调控机制等^[44, 45]。

蛋白质是生物功能的直接体现者, 有序分布和动态调控的蛋白质是保证生命个体正常生长、发育的前提, 所以了解这些过程的蛋白质亚细胞定位及其变化就是了解生命过程, 可以想象, 这将是一件十分繁重的工作。获知各个时间点的蛋白质的结构组成、修饰加工、转运定位、蛋白质与蛋白质相互作用等内容, 对于三维地了解基因的功能, 解释复杂的生命现象具有极其重要的意义, 这就意味着要在整体、动态、网络的水平上对蛋白质进行研究。

植物生长发育, 要适应生长阶段的变化, 并且能够抵抗不良环境, 这些过程的分子生物学和生物化学的基础就是蛋白质组。同一生物个体在不同细胞

中所含蛋白质的种类和数量不是均一的, 而是动态的, 不断变化的, 即使是同一种细胞, 在不同时期或不同环境条件下, 其蛋白质组分也在不断地发生着变化。来自模式植物拟南芥的蛋白质亚细胞定位研究积累了大量的数据, 同时所建立和采用的技术策略为相关研究打下了基础, 水稻的细胞分区和蛋白质组亚细胞定位也已经展开^[15], 相信在不久的将来, 这些蛋白质亚细胞定位的数据能为我们理解重要农作物的抗逆、高产机理提供帮助。

参考文献:

[1] Kaul S, Koo H L, Jenkins J, *et al*. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature*, 2000, 408: 796– 815.

[2] Goff SA, Ricke D, Lan T H, *et al*. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) [J]. *Science*, 2002, 296: 92– 100.

[3] Emanuelsson O, von Heijne G. Prediction of organellar targeting signals[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1541: 114– 119.

[4] Sullivan K F, Kay S A. Green fluorescent proteins[J]. *Methods in Cell Biology*, 1998, 58: 386.

[5] Abelson J, Simon M. Green fluorescent protein[J]. *Methods in Enzymology*, 1999, 302: 449.

[6] Cinelli R A, Ferrari A, Pellegrini V, *et al*. The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single molecule level[J]. *Photochem Photobiol*, 2000, 71(6): 771– 776.

[7] Hadjantonakis A K, Nagy A. The color of mice: in the light of GFP_variant reporters[J]. *Histochem Cell Biol*, 2001, 115(1): 49 – 58.

[8] Lansford R, Bearman G, Fraser S E. Resolution of multiple green fluorescent protein color variants and dyes using two-photon microscopy and imaging spectroscopy[J]. *J Biomed*, 2001, 6 (3): 311– 318.

[9] Goldenkova I V, Musiihuk K A, Piruzian E S. Bifunctional reporter genes: construction and expression in prokaryotic and eukaryotic cells[J]. *Mol Biol*, 2003, 37(2): 356– 364.

- [10] Martis J, Tague B W. Comparing the utility of h₂glucuronidase and green fluorescent protein for detection of weak promoter activity in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Mol Biol Reporter*, 2000, 18: 319–330.
- [11] Quaedvlieg N E, Schlaman H R, Admiraal P C, *et al.* Fusions between green fluorescent protein and beta₂glucuronidase as sensitive and vital bifunctional reporters in plants[J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 38(5): 861–873.
- [12] Escobar N M, Haupt S, Thow G, *et al.* High-throughput viral expression of cDNA₂green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(7): 1507–1523.
- [13] Nakashima J, Endo S, Fukuda H. Immunocytochemical localization of polygalacturonase during tracheary element differentiation in *Zinnia elegans*[J]. *Planta*, 2004, 218(5): 729–739.
- [14] Brummell D A, Catala C, Lashbrook C C, *et al.* A membrane-anchored E₂type endo₁, 4₂beta₂glucanase is localized on Golgi and plasma membranes of higher plants[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(9): 4794–4799.
- [15] Tanaka N, Fujita M, Handa H, *et al.* Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments[J]. *Mol Genet Genomics*, 2004, 271(5): 566–576.
- [16] Shan L, Thara V K, Martin G B, *et al.* The pseudomonas AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(12): 2323–2338.
- [17] Bhushan S, Stahl A, Nilsson S, *et al.* Catalysis, subcellular localization, expression and evolution of the targeting peptides degrading protease, AtPreP2, 2005, 46(6): 985–996.
- [18] Fujiwara Y, Asogawa M. Prediction of subcellular localizations using amino acid composition and order[J]. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform*, 2001, 12: 103–112.
- [19] Chou K C, Cai Y D. Predicting subcellular localization of proteins by hybridizing functional domain composition and pseudo₂ amino acid composition[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 91(6): 1197–203.
- [20] Cui Q, Jiang T, Liu B, *et al.* Esub8: a novel tool to predict protein subcellular localizations in eukaryotic organisms[J]. *BMC Bioinformatics*, 2004, 5: 66.
- [21] Feng Zhi Ping. An overview on predicting the subcellular location of a protein[J]. *In Silico Biol*, 2002, 2(3): 291–303.
- [22] Donnes P, Hoglund A. Predicting protein subcellular localization: past, present, and future[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2004, 2(4): 209–215.
- [23] <http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/~shenj/c/SPPI/Document.htm#statist2>
- [24] Michael B Sheahan, Chris J Rose, David W McCurdy. A Green Fluorescent Protein Fusion to Actin Binding Domain 2 of *Arabidopsis* Fimbrin Highlights New Features of a Dynamic Actin Cytoskeleton in Live Plant Cell[J]. *Plant physiology*, 2004, 136(4): 3968–3977.
- [25] Lee J Y, Taoka K, Yoo B C, *et al.* Plasmodesma-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non₂cell-autonomous proteins[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(10): 2817–2831.
- [26] Cutler S R, Ehrhardt D W, Griffiths J S, *et al.* Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(7): 3718–3723.
- [27] Tian G W, Mohanty A, Chary S N. High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products in planta[J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(1): 25–38.
- [28] Koroleva O A, Tomlinson M L, Leader D, *et al.* High-throughput protein localization in *Arabidopsis* using *Agrobacterium*-mediated transient expression of GFP–ORF fusions[J]. *The Plant Journal*, 2005, 41(1): 162–174.
- [29] Komatsu S, Kojima K, Suzuki K, *et al.* Rice Proteome Database based on two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: its status in 2003[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: D388–D392.
- [30] Millar A H. Location, location, location: surveying the intracellular real estate with proteomics in plants[J]. *Funct Plant Biol*, 2004, 31: 563–571.
- [31] Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions[J]. *Curr Biol*, 2004, 14: 354–362.
- [32] Herald V L, Heazlewood J L, Day D A, *et al.* Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria[J]. *FEBS Lett*, 2003, 537: 96–100.
- [33] Millar A H, Heazlewood J L. Genomic and proteomic analysis of mitochondrial carrier proteins in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2003, 131: 443–453.
- [34] Heazlewood J L, Tonti-Filippini J S, Gout A M, *et al.* Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs and points to plant specific mitochondrial proteins[J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 241–256.
- [35] Bae M S, Cho E J, Choi E Y, *et al.* Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress[J]. *Plant J*, 2003, 36: 652–663.
- [36] Calikowski T T, Meulia T, Meier I. A proteomic study of the *Arabidopsis* nuclear matrix[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90: 361–378.
- [37] Pendle A F, Clark G P, Boon R, *et al.* Proteomic analysis of the *Arabidopsis* nucleolus suggests novel nucleolar functions[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 260–269.
- [38] Fukao Y, Hayashi M, Nishimura M. Proteomic analysis of leaf peroxisomal proteins in greening cotyledons of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 689–696.
- [39] Fukao Y, Hayashi M, Hara Nishimura I, *et al.* Novel glyoxysomal protein kinase, GPK1, identified by proteomic analysis of glyoxysomes in etiolated cotyledons of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 1002–1012.
- [40] Mano S, Nishimura M. Plant peroxisomes[J]. *Vitam Horm*, 2005, 72: 111–154.
- [41] Alexandersson E, Saalbach G, Larsson C, *et al.* *Arabidopsis* plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking[J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 1543–1556.
- [42] Haslam R P, Downie A L, Raveton M, *et al.* The assessment of enriched apoplastic extracts using proteomic approaches[J]. *Ann Appl Biol*, 2003, 143: 81–91.
- [43] Joshua L Heazlewood, Julian Tonti-Filippini, Robert E. Verboom, *et al.* Combining Experimental and Predicted Datasets for Determination of the Subcellular Location of Proteins in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139: 598–609.
- [44] Heijnen H F, Waaijenborg S, Crapo J D, *et al.* Colocalization of eNOS and the catalytic subunit of PKA in endothelial cell junctions: a clue for regulated NO production[J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(10): 1277–1285.
- [45] Voss T C, Demarco I A, Day R N. Quantitative imaging of protein interactions in the cell nucleus[J]. *Biotechniques*, 2005, 38(3): 413–424.