

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2021.10093

未丽, 刘建利. 植物蛋白质亚细胞定位相关研究概述[J]. 植物科学学报, 2020, 39(1): 93~101

Wei L, Liu JL. Overview of research on protein subcellular localization in plants[J]. Plant Science Journal, 2020, 39(1): 93~101

植物蛋白质亚细胞定位相关研究概述

未丽^{1, 2}, 刘建利^{3*}

(1. 兰州大学草地农业科技学院, 草地农业生态系统国家重点实验室, 农业农村部草牧业创新重点实验室, 兰州 730020;
 2. 兰州大学草业科学国家级实验教学示范中心, 兰州 730020; 3. 北方民族大学生物科学与工程学院,
 国家民委生态系统建模和应用重点实验室, 银川 750021)

摘要: 蛋白质在植物细胞内的定位是了解蛋白质功能、基因调控和蛋白质-蛋白质相互作用的关键。近年来随着各种蛋白质亚细胞定位方法的快速发展和技术的不断提升, 蛋白质亚细胞定位实现了高通量、活体动态研究。本文总结了植物蛋白质亚细胞定位的常用技术, 以及常用细胞器特异性标记的研究进展, 并对此领域研究的发展前景做出了展望。

关键词: 蛋白质; 亚细胞定位; 细胞器标记物

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2021)01-0093-09

Overview of research on protein subcellular localization in plants

Wei Li^{1, 2}, Liu Jian-Li^{3*}

(1. College of Pastoral Agriculture Science and Technology, State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, Key Laboratory of Grassland Livestock Industry Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Grassland Science Education, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China; 3. College of Biological Sciences and Engineering, North Minzu University, Key Laboratory of Ecosystem Modeling and Application, State Ethnic Affairs Commission, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The localization of proteins in plant cells is the key to understanding protein function, gene regulation, and protein-protein interactions. In recent years, with the rapid development of various protein-subcellular localization methods and continuous improvement in technology, protein-subcellular localization has achieved high-throughput and *in vivo* dynamic research. In this paper, we summarize current research progress on the common techniques of plant protein subcellular localization and development of organelle-specific markers. We also present future perspectives in this research field.

Key words: Proteins; Subcellular localization; Organelle markers

蛋白质作为基因功能的主要执行者, 需要在正确的亚细胞区隔中定位方可正常发挥功能, 以维持生物体内多种复杂的生化过程有序高效进行, 保证生物体正常生命活动^[1]。因此, 蛋白质亚细胞定位(protein subcellular localization)与其功能密切相关, 是研究蛋白质生物学功能的基础, 对蛋白质组学具有重要的意义^[2]。近年来, 随着蛋白质

数据的快速增长和传统定位技术的优化, 蛋白质的定位不仅从单个蛋白质亚细胞定位发展到高通量地进行蛋白质亚细胞定位, 而且实现了从静态定位研究到活体动态研究的转变。同时对于植物内膜系统中, 应用靶向机制明确、特异性强、效果优良的细胞器特异性标记物, 对于验证新蛋白质的亚细胞定位, 解析其功能也至关重要。本文主要介绍植物蛋

收稿日期: 2020-07-02, 修回日期: 2020-10-19。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960346)。

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (31960346).

作者简介: 未丽(1980-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为植物逆境生理与遗传改良(E-mail: weili@lzu.edu.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: ljl7523@126.com)。

蛋白质亚细胞定位的常用技术，分析比较了每种技术在蛋白质定位研究方面的优势和局限性，并对其研究发展前景进行了展望。

1 植物蛋白质亚细胞定位常用技术

真核细胞由上千种蛋白质组成的复杂网络构成，不同的亚细胞腔室结构将不同相关功能的蛋白质分隔在不同区域，从而在特定的亚细胞定位中发挥最佳功能^[3]。除了采用直接实验技术对目标蛋白进行亚细胞定位外，自动化和高通量的生物信息学预测方法也提供了重要补充。

1.1 融合报告基因定位法

融合报告基因定位法是借助于检测融合蛋白中的报告基因表达产物来实现与之融合的目标蛋白定位。常用的报告基因有 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, *GUS*)基因、 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)基因、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, *GFP*)基因等。其中荧光融合蛋白定位法的应用最为广泛。目前其以简单、快捷、成本低廉和周期性短等优点，已成为确定包括植物在内的不同生物体活细胞中蛋白质亚细胞定位的主要方法^[2, 3]。

目前被广泛应用的能进行亚细胞定位的报告基因主要是 *GFP*。它能与多种不同的蛋白质 N 端或 C 端融合而保持天然蛋白的特性，因此是一种直观性很强的遗传荧光标记物。随后通过对野生型 *GFP* 进行点突变，形成了一系列具有不同发射光谱的 *GFP* 突变体(如 RFP、BFP、YFP 等)和荧光信号加强的增强型荧光蛋白(enhaned fluorescent proteins, EFPs)，为蛋白质亚细胞定位的研究提供了更多选择。研究表明，由 CaMV 35S 或 pUBQ10 常用组成型启动子驱动以荧光蛋白为基础的标记特定细胞结构的报告基因 *GFP* 已经可以定位到细胞核^[4]、线粒体^[5]、内质网^[6]等多种细胞器中。

检测荧光蛋白标记蛋白定位的常用策略是方便快速的瞬时表达系统和稳定遗传转化系统。其中瞬时表达系统主要有通过聚乙二醇(PEG)或电穿孔介导的原生质体瞬时表达、基因枪法介导的瞬时表达、农杆菌介导的瞬时表达等方法。与将基因整合到植物细胞染色体的稳定转化不同，转化基因的瞬时表达可以在相对较短的时间内实现，而不需

要传递给下一代。目前利用荧光蛋白标记蛋白定位瞬时表达系统已经常用于快速检测蛋白质在细胞中的分布，验证蛋白互作，揭示配体与受体的识别机理等。

荧光融合蛋白定位技术也存在其局限性。融合到目标蛋白质末端的荧光蛋白可能会干扰蛋白质亚细胞定位的细胞器特异性定位序列的信号，主要是定位在质体、内质网、线粒体、过氧化物酶体的蛋白^[7-9]。同时荧光蛋白还可以影响蛋白折叠和聚合，并导致蛋白质定位受阻^[10]。此外，融合蛋白过强或过弱表达也可造成定位错误、聚集、代谢紊乱等。同时植物细胞的细胞壁和质体等细胞成分的自发荧光干扰可能也是低丰度质膜蛋白定位中的难题^[11]。总的来说，需要仔细分析目标蛋白的序列特征，选择合适的荧光标记蛋白与之相连，使目标蛋白保持在正常表达水平，从而精确确定蛋白质定位模式。

1.2 免疫组织化学定位法

免疫组织化学法是将免疫反应的特异性与组织化学的可见性巧妙结合的蛋白质亚细胞定位常用方法。借助显微设备(包括荧光显微镜、电子显微镜)的显像和放大作用，在细胞、亚细胞水平检测各种抗原物质(如蛋白质、多肽、酶、激素、病原体以及受体等)的定位与分布。其中用于免疫组织化学法的免疫化学标记物由第一代荧光素、第二代同位素、第三代酶直至发展到第四代以免疫金颗粒为代表的非放射性金属颗粒。该技术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、准确的定位方法之一。但是，对于绝大部分植物蛋白质来说难以具备目标蛋白质的特异性抗体，从而使其应用受到限制。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。目前该技术主要用于细胞色素^[12]、果胶^[1]、氧化蛋白^[14]、硫转移酶^[15]、富含甘氨酸的蛋白^[16]等大分子及吲哚乙酸^[17]、赤霉素^[18]、脱落酸^[19]等生物活性小分子的研究。近年来也将其应用于重金属离子的定位，通过准确定位对阐明这些化合物在植物中的生理功能起着重要作用^[20]。免疫胶体金新型标记技术由于其免疫金不仅可以作为标记，而且不同颗粒大小的免疫金还可以作双重甚至多重标记，已成为对感兴趣的蛋白质进行亚细胞尺度上精确定位的首选方

法。目前在植物中主要应用于细胞表面和细胞内多糖、蛋白质、多肽、抗原、激素、核酸等生物大分子的精确定位，尤其应用在细胞壁结构蛋白质定位方面^[21]。

目前的趋势是传统的免疫荧光标记法更为研究人员广泛使用。免疫荧光标记法使用不同荧光标记的抗体来识别内源性蛋白质或者过表达带标签(tag)的蛋白质来显示其在亚细胞中的定位。鉴于很多时候研究的新基因编码蛋白往往没有可用的抗体，所以瞬时转染表达的带较小tag的融合蛋白法经常被用来检测两种蛋白的共定位情况。常用的小标签有HA、MYC、FLAG、V5、His等，它们分子量较小(一般不超过5 kD)，所以基本不会影响蛋白质在细胞中的亚细胞定位，而且都有相应的高质量商品化抗体能够高效特异地识别融合蛋白而被广泛应用。它们的融合方式也有多种选择，一般HA、MYC、V5、His在常用载体中被融合在C端，而FLAG被常用载体融合在N端。具体的融合方式还要根据不同蛋白质区段对细胞亚细胞定位的可能影响来选择。但在实验过程中，采用过表达标签抗体的方法虽然可以比较容易购买到商品化的抗体，但由于瞬时过表达的大量标签蛋白很容易聚集在内质网等蛋白加工修饰的亚细胞结构区域，同样会遇到不能在细胞中准确定位蛋白质的现象。

1.3 共分离标记酶辅助定位法

共分离标记酶辅助定位法是通过分离目标蛋白与细胞特定部位的标记酶后，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。目前，已鉴定的与线粒体结合的标记酶有细胞色素C氧化酶(cytochrome C oxidase, COX)^[22]；用作过氧化物酶体的标记酶有羟基丙酮酸还原酶(hydroxypyruvate reductase, HPR)、甘油酸激酶(glycerate kinase, GK)、过氧化氢酶(catalase, CAT)^[23, 24]；标记质膜的有胼胝质合酶(callose synthase, CalS)、5'核苷酸酶(5'-nucleotidase)^[25]；标记内质网的有葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G6Pase)、NADPH-细胞色素C还原酶(NADPH: cytochrome c reductase, CCR)^[23]；标记液泡膜的有液泡焦磷酸酶(vacuolar H⁺-pyrophosphatase, V-PPase)^[26]；高尔基体标志酶为糖基转移酶(glycosyltransferase,

GTs)^[27]。但这种方法一般要求用超速离心分离细胞组分，且在分离过程中需维持蛋白质的活性，对分离的要求较高。同时受难以找到合适的特异性标记酶的限制，所以其应用受限。

1.4 蛋白质组学定位技术

蛋白质组学定位技术是利用细胞分馏、双向凝胶电泳分离和质谱技术鉴定相结合纯化亚细胞区隔中的多肽，从而得到高通量的数据集。随着各种高通量的蛋白质组技术日益成熟，蛋白质组学研究的不断细化和深入，亚细胞水平的蛋白质组成为当前蛋白组学研究的热点之一。越来越多的植物亚细胞蛋白质组学被建立，如细胞壁蛋白质组^[28, 29]、质膜蛋白质组^[30, 31]、线粒体蛋白质组^[32]、质体小球蛋白质组^[33]、液泡蛋白质组^[34]、过氧化物酶体蛋白质组^[35, 36]、内质网蛋白质组^[37]、叶绿体蛋白质组^[38]等。近年来，亚细胞蛋白质组学取得了长足的进展，虽然已在不同的亚细胞间隔中发现了大量的蛋白，但特异性蛋白的总数远远少于预期，这表明对于低丰度和新蛋白需要改进分离和检测方法。对不同组织、器官、发育阶段以及对各种胁迫响应中蛋白质亚细胞间隔的准确描述仍然具有挑战性^[39]。

1.5 生物信息学预测定位

随着基因组和蛋白质组学的迅速发展，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做出判断。已经通过对大规模的实验数据分析和提取生物学信息构建了多种蛋白质亚细胞定位数据库，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广泛应用(表1)，预测定位的蛋白质多达4000余种。由于很多实验数据表明30%以上的蛋白质可以同时定位于多个亚细胞位置或者在多个亚细胞间转移，研究也由对蛋白质亚细胞进行单位点预测转变为多位点预测。因此，运用生物信息学手段进行多位点蛋白质亚细胞定位预测是目前研究的热门方向。采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，作为实验定位的辅助分析手段。但绝大多数的程序预测均有局限，预测的定位数据最终需要实验结果的验证。

表1 分析预测植物蛋白质亚细胞定位数据库
Table 1 Analysis and prediction of plant protein subcellular localization database

服务器 Web server	网址 Website	特征 Characteristic	参考文献 Reference
BaCello	http://www.biocomp.unibo.it/bacello/	用于分泌途径、细胞质、细胞核、线粒体和叶绿体的亚细胞定位预测	[40]
CCTOP	http://cctop.enzim.ttk.mta.hu	基于 web 的应用程序, 提供跨膜拓扑结构预测	[41]
ChloroP	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/	叶绿体转运肽的预测	[42]
DeepLoc	http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/	一种使用深度神经网络预测蛋白质亚细胞定位的算法	[43]
DeepSig	http://gpcr.biocomp.unibo.it/predictors/	基于深度学习方法的信号肽检测和裂解位点预测的改进方法	[44]
eSLDB	http://gpcr2.biocomp.unibo.it/esldb/	真核生物蛋白质亚细胞定位数据库	[45]
LOCALIZER	http://localizer.csiro.au/	第一种能够准确预测病原体效应蛋白和植物蛋白在叶绿体、线粒体或细胞核定位预测	[46]
LOCtarget	https://www.rostlab.org/services/LOCtarget/	结构基因组学目标数据库	[47]
LocTree3	http://www.rostlab.org/services/locree3	该服务器可接受从单个蛋白质序列到整个蛋白质组数据, 从而预测蛋白质亚细胞定位	[48]
MEMSAT-SVM	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	一种基于支持向量机(SVM)的 TM 蛋白质拓扑预测器, 集成了信号肽和重螺旋预测	[49]
mGOASVM	http://bioinfo.eie.polyu.edu.hk/mGoASvmServer/mGOASVM_Plant.html	预测多位点蛋白的亚细胞定位	[50]
NLSdb	https://rostlab.org/services/nlsdb/	核定位信号及核蛋白数据库	[51]
OCTOPUS	http://octopus.cbr.su.se/	膜蛋白拓扑和信号肽的预测	[52]
PA-Sub	http://www.cs.ualberta.ca/~bioinfo/PA	蛋白质组分析特定亚细胞定位服务器	[53]
PredictNLS	https://rostlab.org/owiki/index.php/PredictNLS	核定位信号分析工具	[54]
PrediSi	http://www.predisi.de	信号肽及其裂解位置的预测	[55]
Predotar	http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html	一种快速筛选蛋白质组 N 端靶向序列的工具	[56]
Proteome Analyst	https://webdocs.cs.ualberta.ca/~bioinfo/PA/Sub/index.html	基于 SWISS-PROT 预测蛋白质的亚细胞定位	[53]
PSORT	http://www.psort.org/psortb/	基于氨基酸组成, N 端目标序列信息和基序的用于亚细胞定位预测的计算机程序	[57]
SignalP 5.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	信号肽分析和定位预测	[58]
Signal-3L 2.0	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-3L/	利用残差域交叉层次特征, 提高蛋白质信号肽预测的层次混合模型	[59]
SCAMPI	http://scampi.bioinfo.se/	新的预测因子可以预测包含大的非膜结构域的膜蛋白的拓扑结构	[60]
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/	基于 N 端信号肽序列的真核生物蛋白质亚细胞定位预测	[61]
TOPCONS	http://topcons.net/	用于膜蛋白拓扑结构和信号肽预测的服务器	[62]

2 常用细胞器标记物

基于荧光蛋白 (fluorescent proteins, FPs) 与已确定的靶向蛋白或基序的融合, 已经成功构建了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana* L.)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.)、玉米 (*Zea mays*

L.) 和水稻 (*Oryza sativa* L.) 等植物的荧光细胞器标记系, 它们为确认目标蛋白质的亚细胞定位提供了极好的工具。其中来自 SV40 的核定位信号 (NLS) 使 FPs 能够定位于细胞核。过氧化物酶体靶信号 1 (PTS1) C 端的 Ser-Lys-Leu 氨基酸残基是将 FPs 靶向过氧化物酶体的必要和充分条件^[63]。烟草 F1-ATP 合成酶的 β 亚基的前 66 个氨基酸组

成了线粒体的转运肽，融合到 GFP 的 N 端则定位在线粒体基。Rubisco 激活酶 RecA 的 N 端转运肽被融合到 FPs 的 N 端，用于靶向质体间质^[64]。除了目标序列与 FPs 融合用于特定细胞器的定位外，在特定的细胞器中鉴定出多种蛋白质，也被用作细胞器标记。但是其中一些被鉴定的标记蛋白不具体，证据不充分，特别是靶向机制不明确。下面我们将在植物内膜系统中对已被很好识别并广泛应用的细胞器标记做一总结。

2.1 内质网标记物

内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 是细胞内的一个精细的膜系统，专门负责蛋白质的转运、折叠和组装，是细胞内重要的运输和贮藏系统。一些内质网分子伴侣，如免疫球蛋白重链结合蛋白 BiP/GRP78^[65]、钙网蛋白^[66]、钙联蛋白^[67] 及蛋白质二硫键异构酶等内质网蛋白的 C 端均含有内质网滞留信号 K/HDEL 基序(赖氨酸/组氨酸-天门冬氨酸-谷氨酰胺-亮氨酸)，并通过与内部的内质网 K/HDEL 受体发生相互作用将其维持在内质网中。当 K/HDEL 融合到 GFP 的 C 端时，绿色荧光蛋白被保留在 ER 中。因此 XFP-HDEL 现已被广泛用作 ER 荧光标记物。

2.2 高尔基体标记物

高尔基体在蛋白质的加工、修饰和运输过程中起着重要的作用。高尔基体具有 3 个功能区隔：顺面高尔基网、中间高尔基网和反面高尔基网。在植物中发现参与 N-连接寡糖糖基化修饰途径中的糖苷酶和糖基转移酶已被证明定位于高尔基体。大豆 α -1,2 甘露糖苷酶 (ManI) 和植物 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 (GnT) 与 GFP 融合并转化烟草后，发现其定位在顺面高尔基网^[68]。N-多糖 GFP 标记 β -1,2 木糖基转移酶 (XyT) 与高尔基体堆叠相关，并优先位于烟草 BY-2 细胞 (bright yellow 2 cells) 的内腔^[69]。此外，GDP-甘露糖转运蛋白 1 (GONST1-YFP) 在 BY-2 悬浮细胞中的表达也被用作反面高尔基网标记物^[70]。还发现了与上述高尔基标记物性质不同的高尔基驻留蛋白。AT-CASP 是公认的高尔基基质蛋白。在 BY-2 细胞中，AtCASP 定位于顺面高尔基网和部分重叠的反面高尔基网之间的中间池，表明 AtCASP 在中间高尔基网中富集^[71]。*RER1B* 是酵母 *Rer1p* 的同源基因，它负责将一部分 ER 膜蛋白从高尔基体中运送至 ER 中，并定位

于顺面高尔基网^[72]。拟南芥高尔基体定位内膜蛋白 12 (EMP12) 已被发现。GFP-EMP12 融合蛋白被定位于顺面高尔基网^[73]。最后，通过对拟南芥中可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (SNARE) 分子的系统分析，发现了 9 种高尔基定位蛋白，其中 SYP31、SYP32 或 MEMB12 与 XFP 融合已被广泛用作高尔基特异性标记物^[74]。然而，需要进一步确定以上 3 种蛋白质在高尔基体中的精确功能区隔。最近，Parsons 等^[75] 通过质谱法确定了高尔基池的常驻蛋白的定位，并提出跨膜区域的序列特征。

2.3 液泡标记物

液泡作为植物细胞内最大的细胞器在植物的生长发育过程中行使多种重要功能。根据其功能分为贮藏型液泡 (PSVs) 和溶解型液泡 (LVs)。在蛋白质降解方面，植物 LVs 的功能与酵母液泡或动物溶酶体颇为相似，并且具有酸性 pH 值；而 PSVs 是植物细胞在中性 pH 环境下储存蛋白质的唯一选择^[76]。

不同类型液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic proteins, TIPs) 可作为区分植物细胞中两种液泡的标志蛋白。利用抗体标记， α -TIP 和 δ -TIP 特异性定位在 PSVs 液泡膜，而 γ -TIP 仅发现在 LVs 的液泡膜上^[77]。此外，在拟南芥和烟草叶组织原生质体中的研究发现， α -TIP 以独立于高尔基体的方式从内质网转运至 PSVs 液泡膜^[78]。一些 SNARE 蛋白，如 VAMP711 和 AtVam3/SYP22 通过荧光电子显微镜观察发现定位于 LVs 液泡膜。在拟南芥中通过表达 GFP-VAMP711 和 GFP-SYP22 的 LVs 液泡膜标记物，用于研究拟南芥的液泡动力学^[79]。此外，质子泵 VHA-a2-GFP、VHA-a3-GFP 和 VHP1-GFP 在 LVs 液泡膜上优先显示荧光^[80]。据报道，拟南芥液泡膜转运蛋白 1 (AtVIT1) 通过 dileucine motif 介导其 LVs 型液泡膜靶向性^[81]。

2.4 细胞质膜标记物

细胞质膜 (plasma membrane, PM) 在控制细胞内外物质交换，参与能量、信息传递，维持细胞内环境相对稳定及调节细胞生命活动中起重要作用。目前的研究发现，植物细胞质膜蛋白，如生长素极性定位的输出载体 PIN 蛋白、生长素输入载体 AUX1 蛋白、硼转运蛋白 BOR1、油菜素内酯受体蛋白 BRI1、跨膜受体激酶 FLS2、水通道蛋白 PIP1-2、

低温诱导蛋白6A(LTI6A)都是通过与FPs融合，在免疫荧光和免疫电子显微镜下观察定位在PM^[82]。

2.5 其它常用细胞器标记物

细胞色素C氧化酶(COX)是线粒体内膜上的蛋白复合体，它参与ATP合成过程中所必须的质子转运及将氧气催化为水。大多数COX亚基都可以作为很好的线粒体标记物^[64]。同时在糖酵解第一个步骤中发挥作用的己糖激酶被认为是线粒体外膜的常用标记物。过氧化物酶体是进行诸如脂肪酸β-氧化等氧化反应及预防过氧化物的结构。其中过氧化物酶体标记酶CAT、过氧化物酶体膜受体Fox2p和Fox5p以及过氧化物酶体生成蛋白(PEX)均被认为是其常用标记物^[83]。蛋白酶体是多蛋白复合物，其功能是通过蛋白水解来降解蛋白。蛋白酶体中20S蛋白酶体亚基、26S蛋白酶体亚基、26S蛋白酶体非ATP酶调节亚基(Rpn2)及26S蛋白酶调节亚基7(Cim5)都是常用的蛋白酶体标记物^[84]。组蛋白2B(H2B)与GFP融合后瞬时转化烟草，在其表皮细胞的细胞核产生绿色荧光，因此H2B也被用于植物细胞核标记物。

3 展望

细胞行使功能需要由特定空间分布蛋白质种类、含量、修饰的动态变化来调控生物过程，因此亚细胞定位是影响蛋白质在细胞内生理功能的关键，蛋白质亚细胞定位分析常被用作基因功能研究的实验方法，对于确定一个未知基因编码蛋白的功能提供重要的参考信息。近年来，植物亚细胞蛋白质组定位研究有了长足发展。有报道采用荧光共振能量转移(FRET)显微镜测量技术来对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进行了研究，以此实时跟踪特定蛋白质在细胞生长发育过程中的表达、调控机制等^[85, 86]。随着各种实验定位手段与生物信息学预测相互验证与促进，蛋白质亚细胞定位数据不断积累完善，为深入阐明蛋白质的功能提供重要依据。

细胞器标记是细胞生物学中最基本的工具之一，特别是在活细胞中应用的细胞器标记。它们通常被用来跟踪相应细胞器的动态，或用于确定生物大分子的亚细胞定位。其中荧光蛋白的快速发展推动了荧光蛋白标记在活体细胞成像中的广泛应用。因此，也成为细胞生物学研究者的首选工具，通过

荧光蛋白成像来确定蛋白质定位中发挥着重要作用。但潜在的风险是荧光蛋白标记可能会干扰目标蛋白的胞内运输，从而影响蛋白质的精确定位。目前还没有一种可靠的设计原则来确定蛋白质的靶向特异性。同时每个细胞器可视化的荧光细胞器标记可以作为蛋白质在亚细胞水平上定位的标准，对于确定未知蛋白的正确定位提供了参照。特别是对于定位在植物质体、过氧化物酶体、线粒体和高尔基体的点状荧光分布模式的蛋白质精确定位具有重要作用。因此，获得植物主要细胞器有效的荧光蛋白为基础的标记物将是一个漫长的过程，一旦建立可靠有效的细胞器标记体系将为相关研究人员节约大量时间，从而促进本领域的快速发展。

参考文献：

- [1] Lunn JE. Compartmentation in plant metabolism[J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(1): 35–47.
- [2] Tanz SK, Castleden I, Small ID, Millar AH. Fluorescent protein tagging as a tool to define the subcellular distribution of proteins in plant[J]. *Front Plant Sci*, 2013, 24(4): 214.
- [3] Dangol S, Singh R, Chen Y, Jwa N. Visualization of multi-colored *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Oryza sativa*[J]. *Mol Cells*, 2017, 40(11): 828–836.
- [4] Naohiro K, Dominique P, Eric L. Spectral profiling for the simultaneous observation of four distinct fluorescent proteins and detection of protein-protein interaction via fluorescence resonance energy transfer in tobacco leaf nuclei [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(3): 931–942.
- [5] Kohler RH, Zipfer WR, Webb WW, Hanson MR. The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria *in vivo*[J]. *Plant J*, 1997, 11(3): 613–621.
- [6] Mankin SL, Thompson WF. New green fluorescent protein genes for plant transformation: intron-containing, ER localized, and soluble-modified[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2001, 19: 13–26.
- [7] Sedbrook JC, Carroll KL, Hung KF, Masson PH, Somerville CR. The *Arabidopsis* SKU5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(7): 1635–1648.
- [8] Gardiner JC, Taylor NG, Turner SR. Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1740–1748.
- [9] Tian G, Mohanty A, Chary SN, Li S, Paap B, Drakakaki G, et al. High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products in planta [J]. *Plant Physiol*, http://www.plantscience.cn

- 2004, 135(1): 25–38.
- [10] Thomas CL, Maule AJ. Limitations on the use of fused green fluorescent protein to investigate structure-function relationships for the cauliflower mosaic virus movement protein[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt7): 1851–1855.
- [11] DeBlasio SL, Sylvester AW, Jackson D. Illuminating plant biology: using fluorescent proteins for high-throughput analysis of protein localization and function in plants[J]. *Brief Funct Genomics*, 2010, 9(2): 129–138.
- [12] Griesen D, Su D, Berczi A, Asard H. Localization of an ascorbate-reducible cytochrome b561 in the plant tonoplast[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(2): 726–734.
- [13] Hao H, Chen T, Fan L, Li R, Wang X. 2, 6-dichlorobenzonitrile causes multiple effects on pollen tube growth beyond altering cellulose synthesis in *Pinus bungeana* Zucc. [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76660.
- [14] Astruc T, Marinova P, Labas R, Gatellier P, Santé-Lhouet V. Detection and localization of oxidized proteins in muscle cells by fluorescence microscopy [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(23): 9554–9558.
- [15] Bauer M, Dietrich C, Nowak K, Sierralta WD, Papenbrock J. Intracellular localization of *Arabidopsis* sulfurtransferases [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(2): 916–926.
- [16] Ueki S, Citovsky V. Identification of an interactor of cadmium ion-induced glycine-rich protein involved in regulation of callose levels in plant vasculature [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(34): 12089–12094.
- [17] Hou Z, Huang WD. Immunohistochemical localization of IAA and ABP1 in strawberry shoot apices during floral induction[J]. *Planta*, 2005, 222(4): 678–687.
- [18] Xu RY, Niimi Y, Kojima K. Exogenous GA3 overcomes bud deterioration in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) bulbs during dry storage by promoting endogenous IAA activity in the internodes[J]. *Plant Growth Regul*, 2007, 52: 1–8.
- [19] Peng YB, Zou C, Wang DH, Gong HQ, Xu ZH, Bai SN. Preferential localization of abscisic acid in primordial and nursing cells of reproductive organs of *Arabidopsis* and cucumber[J]. *New Phytol*, 2006, 170(3): 459–466.
- [20] Gao W, Nan T, Tan G, Zhao H, Tan W, et al. Cellular and subcellular immunohistochemical localization and quantification of cadmium ions in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0123779.
- [21] Douchiche O, Driouich A, Morvan C. Spatial regulation of cell-wall structure in response to heavy metal stress: cadmium-induced alteration of the methyl-esterification pattern of homogalacturonans[J]. *Ann Bot*, 2010, 105: 481–491.
- [22] Tanaka N, Fujita M, Handa H, Murayama S, Uemura M, et al. Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartment[J]. *Mol Genet Genomics*, 2004, 271(5): 566–576.
- [23] Titus DE, Hondred D, Becker WM. Purification and characterization of hydroxypyruvate reductase from cucumber cotyledons[J]. *Plant Physiol*, 1983, 72(2): 402–408.
- [24] Fürtauer L, Küstner L, Weckwerth W, Heyer AG, Nägele T. Resolving subcellular plant metabolism [J]. *Plant J*, 2019, 100(3): 438–455.
- [25] Aidemark M, Andersson C, Rasmusson AG, Widell S. Regulation of callose synthase activity in situ in alamethicin-permeabilized *Arabidopsis* and tobacco suspension cells[J]. *BMC Plant Biol*, 2009, 9(27): 1186–1471.
- [26] Maeshima M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465: 37–51.
- [27] Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(13): 7248–7256.
- [28] Kong FJ, Oyanagi A, Komatsu S. Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804(1): 124–136.
- [29] Francin-Allami M, Merah K, Albenne C, Rogniaux H, Pavlovic M, et al. Cell wall proteomic of *Brachypodium distachyon* grains: a focus on cell wall remodeling proteins [J]. *Proteomics*, 2015, 15(13): 2296–2306.
- [30] Bernfur K, Larsson O, Larsson C, Gustavsson N. Relative abundance of integral plasma membrane proteins in *Arabidopsis* leaf and root tissue determined by metabolic labeling and mass spectrometry[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71206.
- [31] 张丽军, 谢锦云, 李选文, 梁宋平. 真核细胞质膜蛋白质组研究进展[J]. 生命科学, 2005, 17(5): 398–403.
Zhang LJ, Xie JY, Li XW, Liang SP. Progress in proteomic research of eukaryotic cell plasma membrane[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2005, 17(5): 398–403.
- [32] Taylor NL, Heazlewood JL, Millar AH. The *Arabidopsis thaliana* 2-D gel mitochondrial proteome: refining the value of reference maps for assessing protein abundance, contaminants and post-translational modifications [J]. *Proteomics*, 2011, 11(9): 1720–1733.
- [33] Lundquist PK, Poliakov A, Bhuiyan NH, Zyballov B, Sun Q, Wijk KJV. The functional network of the *Arabidopsis* plastoglobule proteome based on quantitative proteomics and genome-wide coexpression analysis [J]. *Plant Physiol*, 2012, 158(3): 1172–1192.
- [34] Jaquinod M, Villiers F, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, et al. A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(3): 394–412.
- [35] Reumann S, Babujee L, Ma C, Wienkoop S, Siemsen T, et al. Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways,

- and defense mechanisms [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(10): 3170–3193.
- [36] Reumann S, Quan S, Aung K, Yang P, Manandhar-Shrestha K, et al. In-depth proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes combined with *in vivo* subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150(1): 125–143.
- [37] Barba-Espín G, Dedvisitsakul P, Hägglund P, Svensson B, Finnie C. Gibberellic acid-induced aleurone layers responding to heat shock or tunicamycin provide insight into the N-glycoproteome, protein secretion, and endoplasmic reticulum stress [J]. *Plant Physiol*, 2014, 164(2): 951–965.
- [38] Behrens C, Blume C, Senkler M, Eubel H, Peterhansel C, Braun HP. The ‘protein complex proteome’ of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Proteomics*, 2013, 91: 73–83.
- [39] Wang X, Komatsu S. Plant subcellular proteomics: application for exploring optimal cell function in soybean [J]. *J Proteomics*, 2016, 143: 45–56.
- [40] Pierleoni A, Martelli PL, Fariselli P, Casadio R. BaCeLo: a balanced subcellular localization predictor [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(14): e408–e416.
- [41] Dobson L, Reményi I, Tusnády GE. CCTOP: a consensus constrained TOPology prediction web server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(W1): W408–W412.
- [42] Emanuelsson O, Nielsen H, Heijne GV. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites [J]. *Protein Sci*, 1999, 8(5): 978–984.
- [43] Almagro Armenteros JJ, Sønderby C, Sønderby SK, Nielsen H, Winther O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning [J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(21): 3387–3395.
- [44] Savojardo C, Martelli PL, Fariselli P, Casadio R. DeepSig: deep learning improves signal peptide detection in protein [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(10): 1690–1696.
- [45] Pierleoni A, Martelli PL, Fariselli P, Casadio R. eSLDB: eukaryotic subcellular localization database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Database issue): D208–D212.
- [46] Sperschneider J, Catanzariti AM, DeBoer K, Petre B, Gardiner DM, et al. LOCALIZER: subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell [J]. *Sci Rep*, 2017, 16(7): 44598.
- [47] Nair R, Rost B. LOCnet and LOCtarget: sub-cellular localization for structural genomics targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: W517–W521.
- [48] Goldberg T, Hecht M, Hamp T, Karl T, Yachdav G, et al. LocTree3 prediction of localization [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: W350–W355.
- [49] Nugent T, Jones DT. Transmembrane protein topology prediction using support vector machines [J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10: 159.
- [50] Wan S, Mak MW, Kung SY. mGOASVM: multi-label protein subcellular localization based on gene ontology and support vector machines [J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 290.
- [51] Bernhofer M, Goldberg T, Wolf S, Ahmed M, Zaugg J, et al. NLSdb-major update for database of nuclear localization signals and nuclear export signals [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(1): 503–508.
- [52] Wiklund H, Elofsson A, Notes A. OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(15): 1662–1668.
- [53] Lu Z, Szafron D, Greiner R, Lu P, Wishart DS, et al. Predicting subcellular localization of protein using machine-learned classifiers [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(4): 547–556.
- [54] Cokol M, Nair R, Rost B. Finding nuclear localization signals [J]. *EMBO Rep*, 2000, 1(5): 411–415.
- [55] Hiller K, Grote A, Scheer M, Münch R, Jahn D. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: W375–W379.
- [56] Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C. Predotar: a tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences [J]. *Proteomics*, 2004, 4(6): 1581–1590.
- [57] Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(13): 1608–1615.
- [58] Almagro Armententeros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, et al. SignalP 5.0 improve signal peptide predictions using deep neural networks [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(4): 420–423.
- [59] Zhang YZ, Shen HB. Signal-3L 2.0: A hierarchical mixture model for enhancing protein signal peptide prediction by incorporating residue-domain cross-level features [J]. *J Chem Inf Model*, 2017, 57(4): 988–999.
- [60] Peters C, Tsirigos KD, Shu N, Elofsson A. Improved topology prediction using the terminal hydrophobic helices rule [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(8): 1158–1162.
- [61] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence [J]. *J Mol Biol*, 2000, 300(4): 1005–1016.
- [62] Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Käll L, Elofsson A. The TOPCONS web server for consensus prediction of mem-

- brane protein topology and signal peptides [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: W401–W407.
- [63] Abe S, Nagai T, Masukawa M, Okumoto K, Homma Y, et al. Localization of protein kinase NDR2 to peroxisomes and its role in Ciliogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292 (10): 4089–4098.
- [64] Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, et al. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites [J]. *Science*, 1997, 275 (5305): 1485–1489.
- [65] Lee MH, Min MK, Lee YJ, Jin JB, Shin DH, et al. ADP-ribosylation factor 1 of *Arabidopsis* plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1507–1520.
- [66] Brandizzi F, Hanton S, DaSilva LLP, Boevink P, Evans D, et al. ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants [J]. *Plant J*, 2003, 34(3): 269–281.
- [67] Irons SL, Evans DE, Brandizzi F. The first 238 amino acids of the human lamin B receptor are targeted to the nuclear envelope in plants [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54 (384): 943–950.
- [68] Saint-Jore-Dupa C, Nebenführ A, Boulafous A, Follett-Gueye ML, Plasson C, et al. Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 3182–3200.
- [69] Ito Y, Uemura T, Nakano A. The Golgi entry core compartment functions as a COPII-independent scaffold for ER-to-Golgi transport in plant cells [J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(2): jcs203893.
- [70] Baldwin TC, Handford MG, Yuseff M, Orellana A, Dupree P. Identification and characterization of GONST1, a Golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(10): 2283–2295.
- [71] Renna L, Hanton SL, Stefano G, Bortolotti L, Misra V, Brandizzi F. Identification and characterization of AtCASP, a plant transmembrane Golgi matrix protein [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 58(1): 109–122.
- [72] Sato K, Nishikawa S, Nakano A. Membrane protein retrieval from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum (ER): characterization of the RER1 gene product as a component involved in ER localization of Sec12p [J]. *Mol Biol Cell*, 1995, 6(11): 1459–1477.
- [73] Leung KP, Luo M, Gao C, Zeng Y, Zhao Q, et al. *Arabidopsis* ENDOMEMBRANE PROTEIN 12 contributes to the endoplasmic reticulum stress response by regulating K/HDEL receptor trafficking [J]. *Plant Cell*, 2019, 31(7): 1669.
- [74] Wang T, Li L, Hong W. SNARE protein in membrane trafficking [J]. *Traffic*, 2017, 18(12): 767–775.
- [75] Parsons HT, Stevens TJ, McFarlane HE, Vidal-Melgosa S, Griss J, et al. Separating Golgi proteins from *cis* to *trans* reveals underlying properties of cisternal localization [J]. *Plant Cell*, 2019, 31(9): 2010–2034.
- [76] Feeney M, Frigerio L, Kohalmi SE, Cui Y, Menassa R. Reprogramming cells to study vacuolar development [J]. *Front Plant Sci*, 2013, 3(4): 493.
- [77] Gattolin S, Sorieul M, Frigerio L. Mapping of tonoplast intrinsic proteins in maturing and germinating *Arabidopsis* seeds reveals dual localization of embryonic TIPs to the tonoplast and plasma membrane [J]. *Mol Plant*, 2011, 4 (1): 180–189.
- [78] Sato MH, Nakamura N, Ohsumi Y, Kouchi H, Kondo M, et al. The *AtVAM3* encodes a syntaxin-related molecule implicated in the vacuolar assembly in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(39): 24530–24535.
- [79] Uemura T, Yoshimura SH, Takeyasu K, Sato MH. Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein [J]. *Genes Cells*, 2002, 7(7): 743–753.
- [80] Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(3): 715–730.
- [81] Wang X, Cai Y, Wang H, Zeng Y, Zhuang X, Li B, et al. Trans-Golgi network-located AP1 gamma adaptins mediate dileucine motif-directed vacuolar targeting in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(10): 4102–4118.
- [82] Robinson DG, Jiang L, Schumacher K. The endosomal system of plants: charting new and familiar territories [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(4): 1482–1492.
- [83] Rymer Ł, Kempinski B, Chelstowska A, Skoneczny M. The budding yeast Pex5p receptor directs Fox2 and Cta1p into peroxisomes via its N-terminal region near the FxxxW domain [J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(17): jcs216986.
- [84] Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, Olanow CW, Kordower JH. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions [J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 35(3): 385–398.
- [85] Okamoto K, Sako Y. Recent advances in FRET for the study of protein interactions and dynamics [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 46: 16–23.
- [86] Deal J, Pleshinger DJ, Johnson SC, Leavesley SJ, Rich TC. Milestones in the development and implementation of FRET-based sensors of intracellular signals: a biological perspective of the history of FRET [J]. *Cell Signal*, 2020, 75: 109769.

(责任编辑: 周媛)