



吴委, 王作伟, 栗永英, 等. 拟南芥细胞分裂素受体 AHK3 亚细胞定位信号的研究[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(6): 64-71.

拟南芥细胞分裂素受体 AHK3 亚细胞定位信号的研究

吴 委¹, 王作伟¹, 栗永英¹, 甘 爽¹, 杜世平², 蔡 易¹, 郭晋雅¹
(1 四川农业大学 生命科学学院, 四川 雅安 625014; 2 四川农业大学 理学院, 四川 雅安 625014)

摘要:【目的】研究细胞分裂素受体在细胞内定位分布的具体信号及其机制。【方法】构建拟南芥细胞分裂素受体蛋白——组氨酸蛋白激酶 3(*Arabidopsis* histidine kinase 3, AHK3) 的一系列亚细胞定位相关表达载体, 转化到拟南芥原生质体细胞中进行瞬时表达后, 采用激光共聚焦显微镜观察研究 AHK3 的亚细胞定位信号。【结果】AHK3 定位于内质网 (Endoplasmic reticulum, ER); AHK3 的 N 端和 C 端均含有 ER 定位序列。【结论】AHK3 在 ER 中实现对细胞分裂素的感知及受体蛋白之间的相互应答, 并进行下游的信号转导; AHK3 含有多段 ER 驻留信号。

关键词: 拟南芥; 细胞分裂素; AHK3; 亚细胞定位; 内质网
中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2017)06-0064-08

Analysis of subcellular localization signals of *Arabidopsis* cytokinin receptor protein AHK3

WU Wei¹, WANG Zuowei¹, SU Yongying¹, GAN Shuang¹, DU Shiping², CAI Yi¹, GUO Jinya¹
(1 College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;
2 College of Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: 【Objective】To study the subcellular localization signals of cytokinin receptors and related mechanisms. 【Method】A series of expression vectors for subcellular localization of *Arabidopsis* histidine protein kinase 3 (AHK3), one of cytokinin receptor proteins in *Arabidopsis*, were constructed and transformed into *Arabidopsis* protoplast cells for transient expression. Laser confocal microscope was used to observe the subcellular localization of AHK3 protein. 【Result】AHK3 is localized in endoplasmic reticulum(ER). Both N and C terminals contain ER localization sequences. 【Conclusion】AHK3 carry out its functions in ER, such as perception of cytokinin, downstream signal transduction and interactions with other receptor proteins, and AHK3 contains multiple ER localization signals.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; cytokinin; AHK3; subcellular localization; endoplasmic reticulum

植物激素是由植物自身代谢所产生的一类有机分子, 是一类在极低浓度下就能产生明显生理效应的微量物质。它们可以从产生部位移动到作用部位, 参与植物发育和抗逆的生理过程, 在组织与器

官分化、开花与结实、成熟与衰老、休眠与萌发等发育过程中发挥重要的调控作用; 同时, 在逆境环境下参与调控植物的生理状态以获得更好的适应性^[1]。细胞分裂素 (Cytokinin, CTK) 作为重要的植物激素

之一, 于 20 世纪 50 年代被发现, 其在促进植物分生组织分化、调控顶端优势、微管组织分化、叶绿体分化、叶片衰老、生物和非生物胁迫反应等许多生理过程中行使功能^[2]。CTK 功能的实现, 有赖于相关信号受体的作用。因此, CTK 信号受体的种类、结构、功能及其信号传递的分子机制是目前 CTK 信号转导研究的重点之一^[2-3]。

拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 作为一种模式植物, 是研究 CTK 信号转导分子机制的理想材料。拟南芥属于十字花科拟南芥属植物, 具有个体小、生长周期短、自花授粉、基因组小等优点, 被广泛应用于植物遗传学、发育生物学、细胞生物学和分子生物学的研究^[4]。对拟南芥中 CTK 信号通路的研究发现, 植物体内细胞分裂素的信号传导机制是一种类似于细菌和真菌中双元组分系统的磷酸接力反应^[5]。通过细胞分裂素受体蛋白——拟南芥组氨酸蛋白激酶 2(*Arabidopsis* histidine kinase 2, AHK2)、拟南芥组氨酸蛋白激酶 3(*Arabidopsis* histidine kinase 3, AHK3) 和拟南芥组氨酸蛋白激酶 4(*Arabidopsis* histidine kinase 4, AHK4) 的细胞分裂素接受域 (Cy-clases/histidine kinases associated sensory extra-cellular, CHASE) 结合细胞分裂素后发生自体磷酸化, 并将磷酸基团由激酶区保守的组氨酸残基转移至信号接收区保守的天冬氨酸残基上; 随后, 天冬氨酸上的磷酸基团被传递到胞质中的磷酸转运蛋白 (*Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins, AHPs) 上; 磷酸化的 AHPs 进入细胞核并将磷酸基团转移到一系列反应调节因子 (*Arabidopsis* response regulators, ARR) 上, 从而调节下游的细胞分裂素反应, 产生一系列生理生化效应, 最终实现对植物生长发育的调控^[6-8]。

近几年, 细胞分裂素受体蛋白激酶的结构功能、生化特性、亚细胞定位和信号转导模式的研究报道较多。早期的研究工作表明细胞分裂素受体定位在细胞质膜, Kim 等^[9]使用绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 标记 AHK3 转化原生质体后, 发现 AHK3 定位在细胞质膜上, 但 Dortay 等^[10]进一步研究发现细胞分裂素受体在植物细胞内有更多的分布位置, Caesar 等^[11]通过农杆菌介导的烟草叶片细胞的瞬时转化, 发现拟南芥 AHK3 定位于内质网 (Endoplasmic reticulum, ER), 并且与 AHK4 存在相互作用; 之后, Wulfetange 等^[12]在玉米的研究中也发现细胞分裂素受体主要定位在内质网中, 然而该定位不能解释外源添加的细胞分裂素如何调控植物的生理状态。此外, 前人研究还发现与细胞分裂素受体同为组氨酸激酶家族的 AHK1

蛋白定位于细胞质膜^[13]。那么, 决定细胞分裂素受体蛋白分布于内质网中的具体定位信号是什么? 细胞分裂素受体蛋白在内质网发挥功能的原因是什么? 这些问题尚不清楚。

本文通过构建 AHK3 基因部分结构缺失的表达载体, 并转化到拟南芥原生质体细胞中观察 AHK3 蛋白的亚细胞定位情况, 从而探究 AHK3 定位信号的分布特征, 可为进一步进行 AHK3 精确定位信号的分析以及 AHK3 参与细胞分裂素信号传导途径分子机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

以拟南芥 *Col-0* 野生型为试验材料, 种子购自 ABRC(*Arabidopsis* biological resource center)。材料培养条件如下: 温度 22 ℃, 湿度 60%, 光照度 6 000 lx, 培养基质为 Jiffy 泥炭土、珍珠岩和蛭石 (体积比为 1:1:1)。

相关分子生物学试剂均购于 NEB 公司, Trizol 购于 Invitrogen 公司, 重组酶和重组构建试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司, 质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒购于天根生物科技有限公司, 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司, 试验中所用其他试剂均为分析纯。

水稻分泌载体膜蛋白 1 (Secretory carrier membrane protein1, SCAMP1) 是一个具有多个跨膜域、定位于质膜的蛋白^[14-17]; 在烟草细胞中, SCAMP1 通过内质网-高尔基体 (Golgi)-反面高尔基体 (TGN)-质膜 (PM) 运输途径到达质膜^[18]。而钙联接蛋白 (Calnexin, CNX) 是一个高度保守的、定位于内质网的蛋白^[19]。ARA7 则是一个定位到内囊体的蛋白^[20]。因此, 本研究利用上述不同细胞器标记蛋白, 构建其与红色荧光蛋白 (Red fluorescent protein, RFP) 融合的瞬时表达载体, 用于亚细胞定位分析。质膜标记蛋白载体 SCAMP1-RFP、内质网标记蛋白载体 CNX-RFP、内囊体标记蛋白载体 ARA7-RFP, 均在前期构建保存^[21]。

1.2 基因克隆

选取 1 周龄拟南芥幼苗, 通过 Trizol 处理及苯酚-氯仿法提取组织总 RNA, 并采用反转录试剂盒 PrimeScript[®] RT reagent kit with gDNA Eraser 将其反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板 PCR 扩增获得 *AHK1*、*AHK3* 基因及相关结构域的序列, 反应体系和反应程序参照 NEB 公司 Q5 聚合酶说明书, 所用引物见表 1。

表 1 引物信息表
Tab. 1 Primer information

扩增片段名称	氨基酸位点	引物序列(5'→3')
<i>AHK3</i> (AT1G27320)		F:CGCGGATCCATGAGTCTGTTCCATGTGCTAGGGT R:CGAACTAGTTGATTCTGTATCTGAAGGCGAATTGAAAAAGCG
<i>AHK3NT</i>		F:CGCGGATCCATGAGTCTGTTCCATGTGCTAGGGT R:CGGGGTACCCGCGTCGACACTAACGGTTGCGTGGATTATATGTG
<i>AHK3CT</i>		F:CGCGTCGACCACGCAACCGTTAGTCGAATACACAAAG R:CGAACTAGTTGATTCTGTATCTGAAGGCGAATTGAAAAAGCG
<i>AHK1NT</i>		F:CGCGGATCCATGCGAGGAGATAGCTTCTCAATG R:CGCGTCGACCTTTGAAACTCCATTTGTGAGTATTAAAA
<i>AHK1NT</i>	1~194	F:CGCGGATCCATGCGAGGAGATAGCTTCTCA R:CTTGCGAGCTATTTCTGTAGTTTATGGTTATGG
<i>AHK1NT</i>	195~474	F:ACTTTAGCTCGAGAAATGGATTTGTCCAAGCT R:CGGGGTACCCTTTGAAACTCCATTTGTGAGT
<i>AHK3NT</i>	1~116	F:CGCGGATCCATGAGTCTGTTCCATGTGCTA R:ATCCATTTCTCGAGCTAAAGTACCAAAACGT
<i>AHK3NT</i>	117~420	F:AAACTACAGAAATAGCTCGCAAGCTATGGAGAA R:CGGGGTACCGGTTGCGTGGATTATATGTGCA
<i>AHK3CT</i>	421~728	F:ATGCGGGCAGCTTTTACTAGTCACGCAACCGTTAGTCGAATACAC R:AAATGTTTGAACGATACTAGTTTAAGCTGGTTCATCCCATTGGAAAAT
<i>AHK3CT</i>	729~1 036	F:ATGCGGGCAGCTTTTACTAGTGAAAGAAAGAATGACAACAACCAGC R:AAATGTTTGAACGATACTAGTTTATGATTCTGTATCTGAAGGCGAATTG
<i>SCAMP1</i>		F:CGCGGATCCATGGCGGGGCGCTACGACAGC R:CGCGTCGACAAAAGCTGCCCGCATAGCACCC

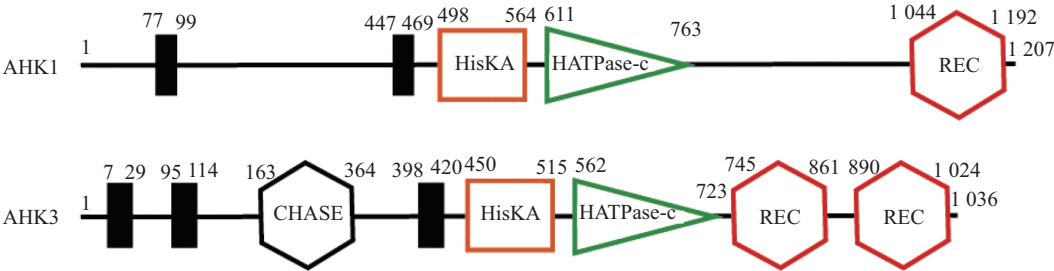
1.3 载体构建

以 HBT95::GFP 载体为骨架,使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 重组构建试剂盒,进行 AHK3 亚细胞定位相关 GFP 融合瞬时超表达载体的构建。通过 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart>) 和 TMHMM Server 2.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 预测 AHK1 和 AHK3 的蛋白质结构域(图 1)。根据上述预测的结构域,设计 AHK3 亚细胞定位相关 GFP 融合瞬时

表达载体的构建策略(图 2)。通过 Primer premier 5.0 设计 *AHK1*、*AHK3* 和 *SCAMP1* 基因及相关结构域序列的引物,引物信息及序列如表 1 所示。

1.4 原生质体瞬时表达及亚细胞定位观察

采用氯化铯密度梯度离心的方法^[22]提取上述质粒。从 4 周龄的拟南芥叶片中提取原生质体,通过 PEG 介导的方法^[23],将制备好的质粒转化到原生质体细胞中瞬时表达,培养 12 h 后,参照文献^[24]的方法使用激光共聚焦显微镜观察 AHK3 相关融合



黑色方块:跨膜域;CHASE:受体接收域;HisKA:组氨酸磷酸化结构域;HATPase-c:组氨酸激酶域;REC:磷酸接受域;上方的数字表示氨基酸位点。

图 1 AHK1 与 AHK3 的结构

Fig. 1 Structures of AHK1 and AHK3

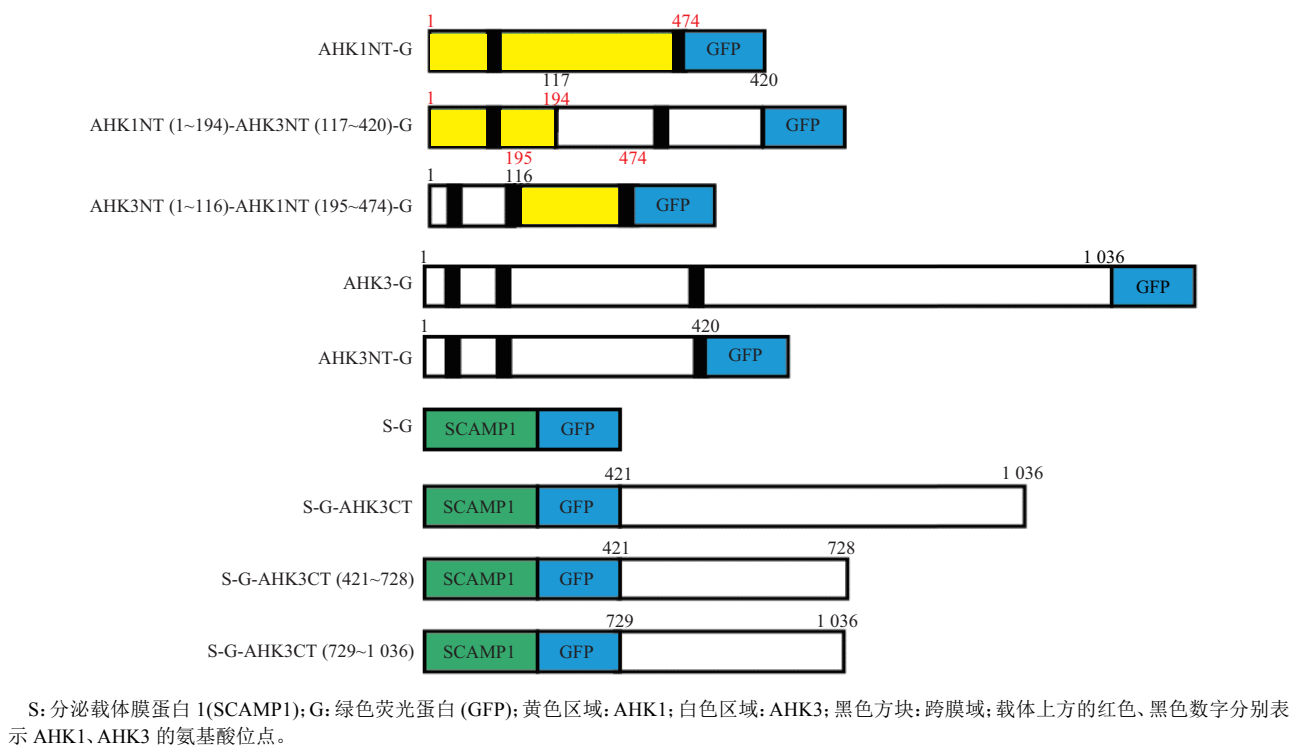


图 2 载体构建模式图
Fig. 2 Pattern of vector construction

蛋白的亚细胞定位分布。

1.5 数据处理

使用 Photoshop CS4 进行图片处理和 Adobe Illustrator CS6 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 AHK3 定位于内质网

为确定 AHK3 的亚细胞定位情况, 本研究构建了 AHK3-GFP 融合蛋白表达载体 HBT95::AHK3-GFP, 并将不同细胞器标记蛋白 (SCAMP1、CNX、ARA7) 与红色荧光蛋白 (RFP) 融合的表达载体 CNX-RFP、SCAMP1-RFP、ARA7-RFP 分别与 AHK3-GFP 一起共转化到拟南芥原生质体细胞中瞬时表达, 通过激光共聚焦显微镜观察绿色荧光信号 (指示 AHK3-GFP 融合蛋白所在位置) 和红色荧光信号 (指示不同细胞器标记蛋白-RFP 融合蛋白所在位置) 在细胞内的分布情况, 分析 AHK3 的亚细胞定位特征。研究发现, AHK3-GFP 和 ER 标记蛋白 CNX-RFP 的信号能够完全重叠 (图 3A), 而 AHK3-GFP 与质膜标记蛋白 SCAMP1-RFP 及液泡标记蛋白 ARA7-RFP 的信号不能完全重叠 (图 3B、3C); 值得注意的是, 当荧光信号较弱的时候, 由于提高了激光强度和传感器的灵敏度, 拍摄 GFP 或 RFP 的荧光信号时, 会受到叶绿体自发荧光的干扰, 因

此我们单独采集了叶绿体的荧光信号作为参考。如图 3B 所示, SCAMP1-GFP 正常是定位在细胞质膜, 但是由于在叶肉原生质体中的表达较弱, 采集 SCAMP1-RFP 信号时同时采集到了叶绿体的自发荧光。上述结果证明, AHK3 定位于 ER 中。

2.2 AHK3NT 和 AHK3CT 均含有 ER 定位序列

明确了 AHK3 定位于 ER, 但其定位相关机理仍然未知, 因此, 对 AHK3 的定位序列进行了进一步研究: 通过分别构建 AHK3 N 端 (AHK3NT) 与 C 端 (AHK3CT) 缺失的 GFP 融合瞬时表达载体, 在原生质体中瞬时表达后, 观察其亚细胞定位情况, 探索 AHK3 中的 ER 定位信号。首先, 我们构建了 AHK3NT-GFP 表达载体, 通过与 CNX-RFP 共定位分析, 发现 GFP 与 RFP 信号重叠 (图 4A), 说明 AHK3 的 N 端含有 ER 定位信号。之后, 构建了 SCAMP1-GFP 表达载体, 通过与 SCAMP1-RFP 共定位分析, 发现 SCAMP1-GFP 定位于质膜 (图 4B); 而在 SCAMP1-GFP 之后融合 AHK3CT 进一步构建成 SCAMP1-GFP-AHK3CT 表达载体, 并与 CNX-RFP 进行共定位分析后, 发现 GFP 和位于 ER 的 RFP 信号完全重叠 (图 4C), 不能与定位于质膜的 RFP 信号重叠 (图 4D), 说明 AHK3CT 中的定位信号改变了原来定位于质膜的 SCAMP1-GFP 信号, AHK3CT 将 GFP 信号驻留在了 ER 中, 上述结

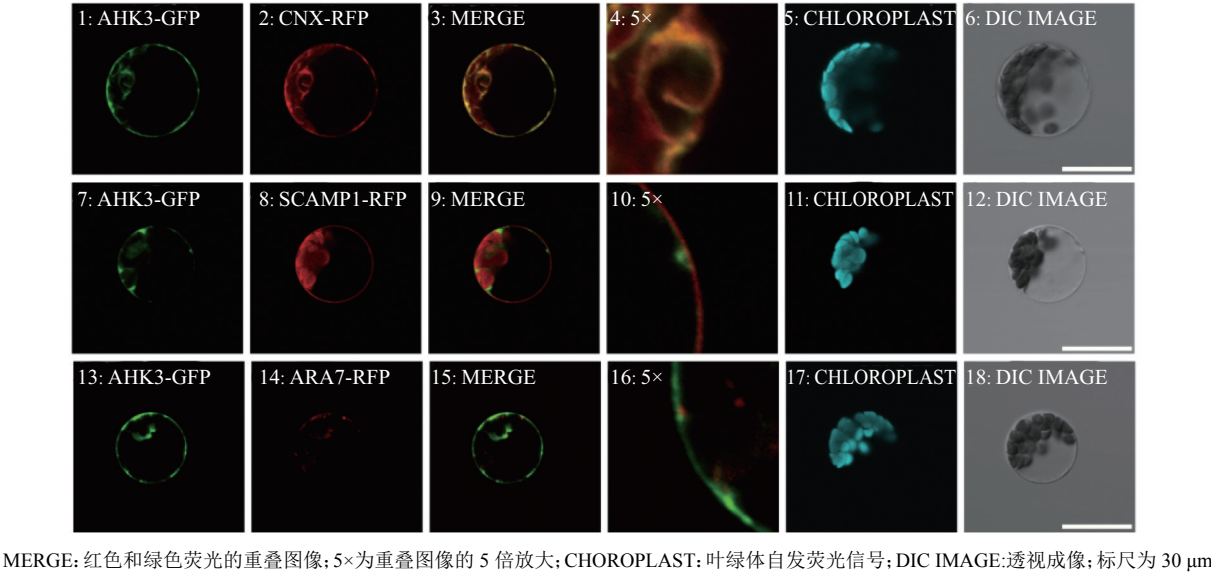


图 3 AHK3 的亚细胞定位
Fig. 3 The subcellular localization of AHK3

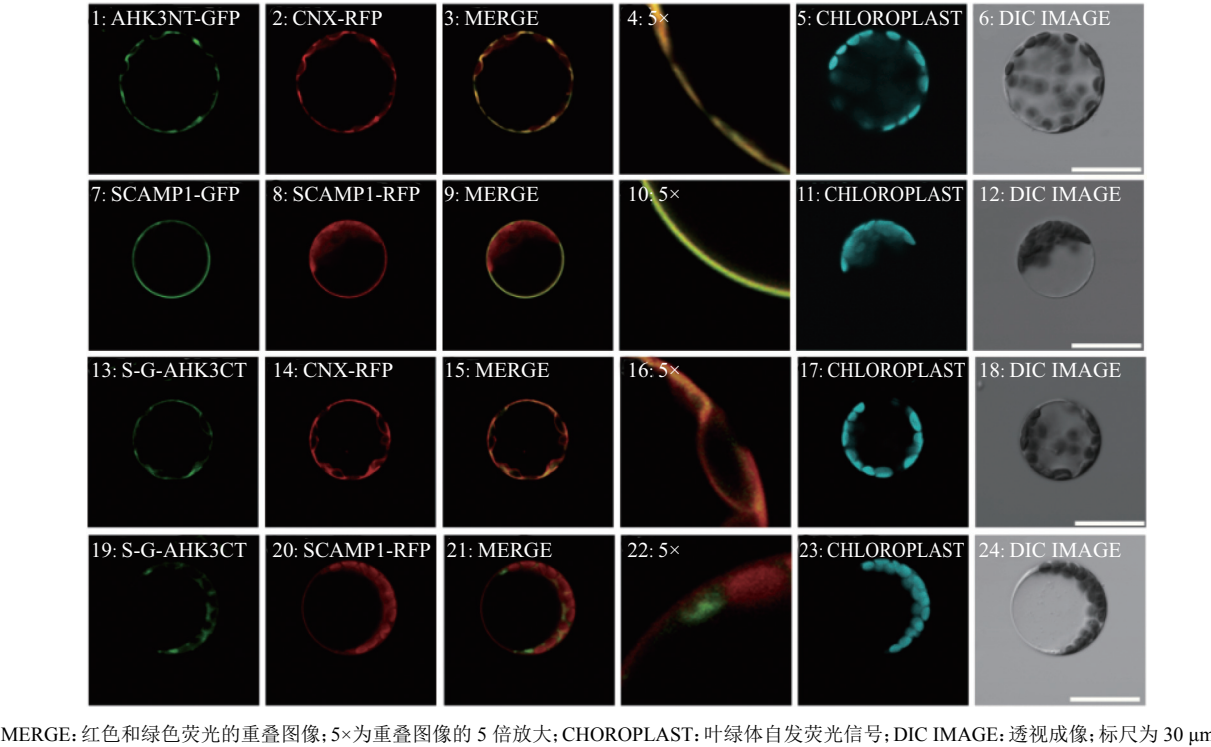


图 4 AHK3 的 N 端和 C 端的亚细胞定位
Fig. 4 The subcellular localizations of N and C terminals of AHK3

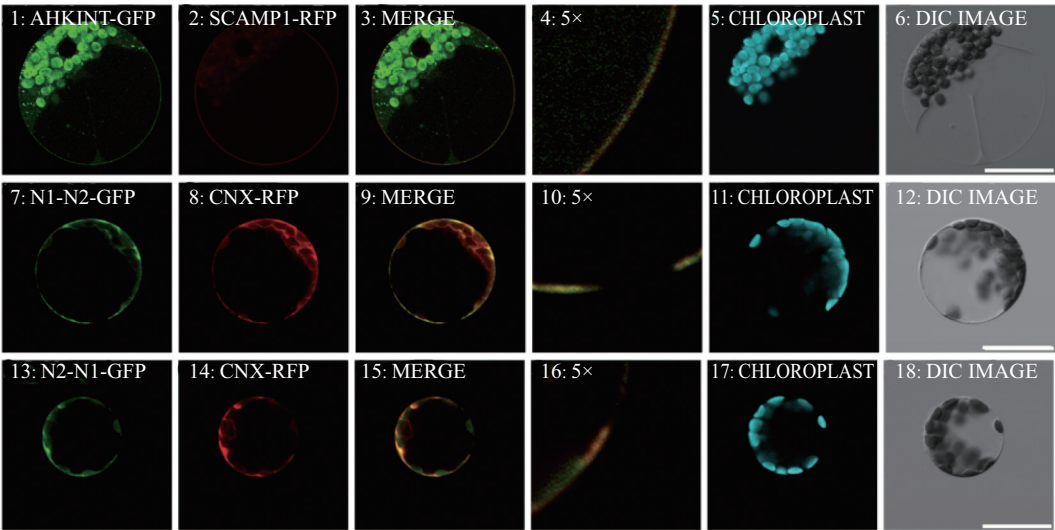
果表明 AHK3 的 C 端也含有较强的 ER 驻留信号。

2.3 AHK3NT 的 ER 定位信号可能位于跨膜域中

为了进一步分析 AHK3 N 端的内质网定位信号的具体位置,本研究根据 AHK3NT 中前 2 个跨膜域所在的位置将 AHK3NT 拆分为 2 段,并且与已知定位于质膜的 AHK1NT 的前后 2 段结构域进行融合,构建 AHK1NT(1~194)-AHK3NT(117~

420)-GFP 和 AHK3NT (1~116)-AHK1NT(195~474)-GFP 嵌合表达载体,同时构建了 AHK1NT-GFP 表达载体。通过亚细胞定位分析,发现 AHK1-GFP 部分定位于质膜 (图 5A),而分别嵌合了 AHK3NT 前后 2 段跨膜域的融合蛋白都定位于内质网 (图 5B、5C)。上述结果说明:AHK3NT 前后 2 段结构区域中均含有 ER 定位信号,使得原来分布于质膜的

<http://xuebao.scau.edu.cn>



N1-N2-GFP 为载体 AHK1NT(1~194)-AHK3NT(117~420)-GFP 的简写; N2-N1-GFP 为 AHK3N(1~116)-AHK1NT(195~474)-GFP 的简写; MERGE: 红色和绿色荧光的重叠图像; 5×为重叠图像的 5 倍放大; CHOROPLAST: 叶绿体自发荧光信号; DIC IMAGE: 透视成像; 标尺为 30 μm。

图 5 AHK3 的 N 端亚细胞定位信号分析

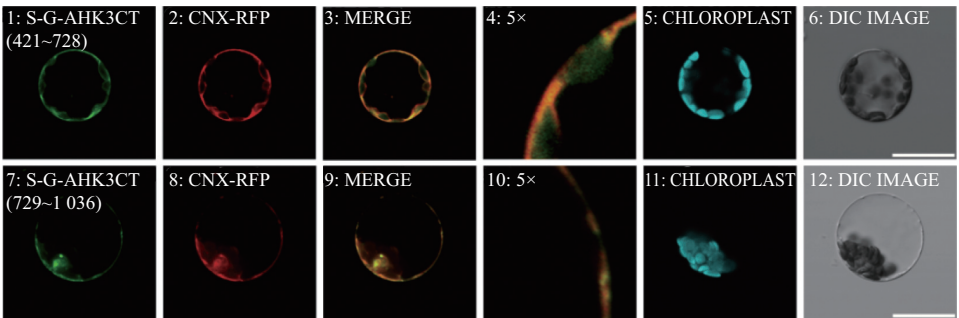
Fig. 5 The subcellular localization signals of N terminal of AHK3

AHK1NT 被定位在 ER 中; 而 AHK3NT 中的 ER 定位信号可能位于跨膜域中。

2.4 AHK3CT 有多段 ER 定位信号

为了进一步分析 AHK3CT 中的 ER 定位信号, 我们根据 AHK3CT 的结构, 将 AHK3CT 也分成 2 段, 前段为 AHK3CT 第 421~728 位氨基酸, 后段为 AHK3CT 第 729~1 036 位氨基酸, 分别与已知定

位于质膜的 SCAMP1-GFP 融合, 构建了 S-G-AHK3CT(421~728) 和 S-G-AHK3CT (729~1 036) 嵌合表达载体, 经过亚细胞定位分析, 发现 S-G-AHK3CT(421~728) 和 S-G-AHK3CT(729~1 036) 嵌合蛋白都定位于 ER(图 6A、6B)。上述结果说明: AHK3CT 前后 2 段序列中均含有 ER 定位信号。



MERGE: 红色和绿色荧光的重叠图像; 5×为重叠图像的 5 倍放大; CHOROPLAST: 叶绿体自发荧光信号; DIC IMAGE: 透视成像; 标尺为 30 μm。

图 6 AHK3 的 C 端亚细胞定位信号分析

Fig. 6 The subcellular localization signals of C terminal of AHK3

3 讨论与结论

在 Caesar 等^[11]发现 AHK3 定位于内质网的试验中, 其通过农杆菌注射烟草叶片瞬时表达, 将 AHK3 的 GFP 融合蛋白载体与细胞器标记蛋白载体共转化, 观察 AHK3 的定位, 证明了 AHK3 定位于内质网, 但是未对 AHK3 的定位机理进行进一步的分析。经过本研究对 AHK3 亚细胞定位的研究, 再次证明了 AHK3 定位于内质网, 并且初步探索了 AHK3 的具体定位信号。

在细胞中, 蛋白空间位置的分布主要通过其定位序列来实现, 按照组成蛋白的氨基酸顺序来分, 定位序列可能在 N 端, 也可能在 C 端; 按照空间分布位置来分, 定位序列可能在膜外、膜内或跨膜域中。例如: BP-80 是一种蛋白相对分子质量为 80 000, 定位于液泡的 I 型蛋白, 它的跨膜域和 C 端对其液泡定位具有非常重要的作用^[25-26]; 而内膜蛋白 (EMP12) 的 C 端中有 ER 输出信号和高尔基定位信号^[27]。因此, 本研究根据 AHK3 的结构域特征对 AHK3 全序列进行了拆分, 并分别与已知定位于质膜的 SCAMP1

和 AHK1NT 进行融合共定位分析,发现 AHK3 蛋白序列使原本定位于质膜的 SCAMP1 和 AHK1NT 发生了改变,定位到了 ER,说明 AHK3 中含有多段可将其定位到内质网中信号区域,并且, AHK3 的 N 端和 C 端都含有直接定位于 ER 的信号序列;在对 AHK3 N 端定位序列进一步的探索中,发现其中的跨膜域可能是其 ER 定位信号。在前人的报道中,蛋白质 C 端 ER 定位序列的研究比较清楚,如内质网腔定位信号 HDEL 或者 KDEL^[28],内质网膜定位信号 KKXX(K 为赖氨酸, X 为任意氨基酸)^[29],作用原理如下:KKXX 序列通过与 COPI 作用使蛋白从高尔基体回流到 ER,从而使蛋白定位于 ER 中^[30-32]。本文将 AHK3CT 分段与 SCAMP1-GFP 融合进行定位研究试验,结果发现 AHK3CT 的前后 2 段序列都有 ER 定位信号。因此,我们对 AHK3 的蛋白序列进行了分析,发现在 AHK3 的 C 端含有多个 KKXX 信号序列,其分布于 AHK3CT 的前后两端,该定位序列可能决定了 AHK3CT 的 ER 定位,该推断还需以后进一步的研究来证明。

在 AHK3 的结构域中,感知细胞分裂素的 CHASE 结构域不能在细胞质中发挥作用,只能在 ER 基质中发挥功能^[3],而 C 端则是在细胞质中发挥信号转导的作用。本研究证明 AHK3 中含有多段 ER 定位信号序列,其可以确保 AHK3 在 ER 中行使功能,有利于细胞分裂素受体信号接收和传递功能的顺利实现。因此,定位于 ER 的 AHK3 受体可能在细胞分裂素的感知、下游的信号转导及受体蛋白的互作应答中具有重要的功能。

通过本研究发现, AHK3 定位于 ER, 并且 AHK3 中含有多段 ER 定位信号, ER 定位序列可能位于 AHK3 N 端前后 2 段跨膜域和 C 端中;该研究结果为进一步对 AHK3 进行精细定位信号分析以及 AHK3 在细胞分裂素信号传导途径中的功能研究奠定了基础。

参考文献:

[1] 李合生. 现代植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2012: 217.

[2] KIEBER J J, SCHALLER G E. The perception of cytokinin: A story 50 years in the making[J]. Plant Physiol, 2010, 154(2): 487-492.

[3] SHI X, RASHOTTEA M. Advances in upstream players of cytokininphosphorelay: Receptors and histidine phosphotransfer proteins[J]. Plant Cell Rep, 2012, 31(5): 789-799.

[4] 翟中和, 王喜忠, 丁孝明. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2011: 50.

[5] INOUE T, HIGUCHI M, HASHIMOTO Y, et al. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*[J]. Nature, 2001, 409(6823): 1060-1063.

[6] SUZUKI T, MIWA K, ISHIKAWA K, et al. The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins[J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42(2): 107-113.

[7] UEGUCHI C, KOIZUMI H, SUZUKI T, et al. Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42(2): 231-235.

[8] WERNER T, SCHMÜLLING T. Cytokinin action in plant development[J]. Curr Opin Plant Biol, 2009, 12(5): 527-538.

[9] KIM H J, RYU H, HONG S H, et al. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*[J]. P Natl Acad Sci USA, 2006, 103(3): 814-819.

[10] DORTAY H, GRUHN N, PFEIFER A, et al. Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*[J]. J Proteome Res, 2008, 7(9): 3649-3660.

[11] CAESAR K, THAMM A M, WITTHÖFT J, et al. Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum[J]. J Exp Bot, 2011, 62(15): 5571-5580.

[12] WULFETANGE K, LOMIN S N, ROMANOV G A, et al. The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum[J]. Plant Physiol, 2011, 156(4): 1808-1818.

[13] MÜLLER B, SHEEN J. Advances in cytokinin signaling[J]. Science, 2007, 318(5847): 68-69.

[14] LAM S K, CAI Y, HILLMER S, et al. SCAMPs highlight the developing cell plate during cytokinesis in tobacco BY-2 cells[J]. Plant Physiol, 2008, 147(4): 1637-1645.

[15] LAM S K, CAI Y, TSE Y C, et al. BFA-induced compartments from the Golgi apparatus and trans-Golgi network/early endosome are distinct in plant cells[J]. Plant J, 2009, 60(5): 865-881.

[16] LAM S K, SIU C L, HILLMER S, et al. Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-Golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells[J]. Plant Cell, 2007, 19(1): 296-319.

[17] LAM S K, TSE Y C, ROBINSON D G, et al. Tracking down the elusive early endosome[J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(11): 497-505.

[18] LIU D Y T, SMITH P M C, BARTON D A, et al. Characterisation of *Arabidopsis* calnexin 1 and calnexin 2 in the endoplasmic reticulum and at plasmodesmata [J]. Protoplasma, 2017, 254(1): 125-136.

[19] GELDNER N, DÉNERVAUD-TENDON V, HYMAN D L, et al. Rapid, combinatorial analysis of membrane com-

- partments in intact plants with a multicolor marker set[J]. Plant J, 2009, 59(1): 169-178.
- [20] JIANG L, ROGERS J C. Integral membrane protein sorting to vacuoles in plant cells: Evidence for two pathways[J]. J Cell Biol, 1998, 143(5): 1183-1199.
- [21] CAI Y, JIA T, LAM S K, et al. Multiple cytosolic and transmembrane determinants are required for the trafficking of SCAMP1 via an ER-Golgi-TGN-PM pathway[J]. Plant J, 2011, 65(6): 882-896.
- [22] DURANTE M, COVI A, BARSANTI L. Heterogeneity of HeLa cell DNA as evidenced by CsCl density gradient centrifugation[J]. Cmls-Cell Mol Life S, 1977, 33(9): 1158-1159.
- [23] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. Nat Protoc, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [24] ELGASS K, CAESAR K, SCHLEIFENBAUM F, et al. Novel application of fluorescence lifetime and fluorescence microscopy enables quantitative access to subcellular dynamics in plant cells[J]. PLoS One, 2009, 4(5): 2095-2118.
- [25] TSE Y C, LO S W, HILLMER S, et al. Dynamic response of prevacuolar compartments to Brefeldin A in plant cells[J]. Plant Physiol, 2007, 142(4): 1442-1459.
- [26] ROBINSON D G, JIANG L, SCHUMACHER K. The endosomal system of plants: Charting new and familiar territories[J]. Plant Physiol, 2008, 147(4): 1482-1492.
- [27] GAO C, YU C K, QU S, et al. The Golgi-localized *Arabidopsis* endomembrane protein12 contains both endoplasmic reticulum export and Golgi retention signals at its C terminus[J]. Plant Cell, 2012, 24(5): 2086-2104.
- [28] WANG H, SHAO Y, ZHANG W, et al. Molecular characterization of two novel molecular chaperones in bacterial-challenged *Apostichopus japonicus*[J]. Gene, 2015, 570(1): 141-149.
- [29] COSSON P, LETOURNEUR F. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs[J]. Science, 1994, 263(5153): 1629-1631.
- [30] SCHRÖDER S, SCHIMMÖLLER F, SINGER-KRÜGER B, et al. The Golgi-localization of yeast Emp47p depends on its di-lysine motif but is not affected by the ret1-1 mutation in alpha-COP[J]. J Cell Biol, 1995, 131(4): 310-315.
- [31] HARTER C, WIELAND F T. A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatamer[J]. P Natl Acad Sci USA, 1998, 95(20): 11649-11654.
- [32] GOMEZ M, SCALES S J, KREIS T E, et al. Membrane recruitment of coatamer and binding to dilysine signals are separate events[J]. J Biol Chem, 2000, 275(37): 29162-29169.

【责任编辑 庄 延】