

教学研究

蛋白质亚细胞定位实验课程在细胞生物学 实验教学中的应用

宋洁琼 包曙光 李鲁华 朱士锋 门淑珍*
(南开大学生命科学学院植物生物学和生态学系, 天津 300071)

摘要 蛋白质的亚细胞定位是功能基因组学的重要研究内容。瞬时表达是一种简单快速的研究蛋白质亚细胞定位的实验技术。该实验设计了适合为本科生开设的综合实验课程。该实验项目利用在烟草叶片中瞬时表达荧光蛋白研究蛋白质的亚细胞定位。该文对实验原理、方法及教学安排等进行了详细的介绍, 该实验设计为高校生物学实验教学提供了有价值的参考。

关键词 亚细胞定位; 瞬时表达; 烟草; 荧光蛋白

Determination of the Subcellular Localization of Proteins as An Experimental Course in Cell Biology

Song Jieqiong, Bao Shuguang, Li Luhua, Zhu Shifeng, Men Shuzhen*
(Department of Plant Biology and Ecology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Genome sequencing has resulted in the identification of a large number of genes with unknown function. Determination of the subcellular localization of the encoded proteins is crucial for identifying their function. Transient expression is a simple and fast technique to study the subcellular localization of proteins. Here, we present an experimental course suitable for undergraduate students. In this course, students will analyze the intracellular localization of fluorescent proteins transiently expressed in tobacco leaves. We describe the experimental principle, step-by-step protocol, and teaching arrangement in detail. This experiment provides valuable references for the experimental teaching for undergraduate students.

Keywords subcellular localization; transient expression; tobacco; fluorescent protein

细胞是生物体的基本结构和功能单元, 同时细胞也是一个复杂的系统, 在细胞内进行着许多生物化学过程。为了使这些生化过程有序和高效地进行, 真核生物体的细胞产生了区域化(compartmentation), 其中, 有许多具有被膜的细胞器。例如, 光合作用发生在叶绿体中, 而呼吸作用发生在线粒体中, 不同的

代谢过程是由不同细胞器中的酶或功能蛋白质所完成的^[1]。由此可见, 蛋白质的亚细胞定位(subcellular localization)是与其功能密切相关的, 对蛋白质功能的研究通常需要确定其亚细胞定位^[2]。为了更好地让本科生了解细胞生物学领域的基本研究方法, 我们设计了利用烟草叶片瞬时表达系统研究蛋白质亚细胞定

收稿日期: 2016-09-07 接受日期: 2017-01-04

国家自然科学基金(批准号: 31570247、91417308、31460453)和天津市自然科学基金(批准号: 14JCYBJC41200)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23500856, E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

Received: September 7, 2016 Accepted: January 4, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31570247, 91417308, 31460453) and the Natural Science Foundation of Tianjin (Grant No.14JCYBJC41200)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23500856, E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

网络出版时间: 2017-02-23 17:15:37 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170223.1715.012.html>

位的教学实验。一方面,该实验项目让学生熟练掌握瞬时表达技术和荧光显微镜的使用;另一方面,通过该实验项目的学习,培养学生的综合科研能力,为细胞生物学研究型人才的培养提供科研训练内容。

1 实验原理

蛋白质的亚细胞定位是与其功能密切相关的。例如,对基因表达进行调控的转录因子通常定位于细胞核中;参与细胞物质运输的转运蛋白通常定位于细胞膜;参与光合作用的蛋白质定位于叶绿体。因此,对目的蛋白质亚细胞定位的研究将有助于揭示其功能。蛋白质亚细胞定位的研究方法主要分为以下三种。(1)生物化学方法。该方法主要利用蔗糖密度梯度离心来收集组织悬液中各种细胞器,通过电泳分离和蛋白质免疫印迹杂交(Western blot)来确定目的蛋白质存在于哪种细胞器中^[3]。该方法在动物、植物和病毒的研究中有广泛的运用,但是该方法需要获得目的蛋白质的特异抗体,而且不同的生物样品对密度梯度材料的要求有很大差异。(2)蛋白质免疫荧光原位杂交。该方法主要通过抗原和抗体的特异反应,抗体识别并结合蛋白质分子表面的抗原决定簇,借助抗体上的荧光标记显示蛋白质的亚细胞定位^[4-5]。该方法同样依赖于目的蛋白质的特异抗体。(3)与荧光蛋白融合的方法。克隆所研究蛋白质的编码基因,进行植物表达载体的构建,将该基因序列与荧光蛋白[例如绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)、黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)或红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)等]的编码序列相融合,使两个基因融合成一个开放阅读框(open reading frame, ORF),从而使目的蛋白质和荧光蛋白质串联表达。将获得的融合基因的表达载体转化入植物细胞中,通过荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察荧光蛋白质的定位情况,从而确定目的蛋白质的亚细胞定位^[2]。该方法不需要目的蛋白质的特异抗体,但是需要进行基因克隆和表达载体构建。

在第三种方法中,既可以通过转基因获得稳定表达融合基因的转基因植株,然后进行荧光显微镜观察,也可以利用瞬时(transient)表达技术,将融合基因转到植物细胞中,使其在细胞内短暂的高表达,便于观察其胞内定位。瞬时表达技术简单、快速、不需要组织培养和再生,目前已广泛应用于蛋

白质亚细胞定位和蛋白质相互作用等研究^[6]。植物瞬时表达技术主要包括基因枪法^[7]、农杆菌渗透法(agrobacterial infiltration)^[8]、电击法^[9]、聚乙二醇(polyethylene glycon, PEG)法^[10]和植物病毒载体介导法^[11]。其中,农杆菌渗透法应用较为普遍,主要原因是该方法简便、高效、可靠、节省时间^[8,12]。该方法将含有目的基因的植物表达载体导入农杆菌中,培养和收集农杆菌细胞,注射烟草或者拟南芥等植株的叶片,让目的基因在叶片细胞中表达一定的时间后,取材进行显微镜观察或者进行蛋白质互作等后续实验^[8]。

本实验利用瞬时表达技术,将构建好的融合表达载体导入农杆菌中。通过农杆菌渗透法,将融合基因导入烟草叶片细胞中,使融合基因在烟草叶片细胞中表达,然后,利用激光共聚焦或荧光显微镜观察荧光蛋白质的亚细胞定位。

2 教学设计与安排

2.1 教学目的

开设本实验的目的是使本科生学习和掌握农杆菌渗透法,并利用该方法在烟草叶片中瞬时表达目的基因;掌握利用与荧光蛋白融合的方法研究蛋白质的亚细胞定位的实验技术,同时,在实验过程中熟悉和掌握荧光显微镜的使用方法。

2.2 教学重点与难点

本实验的教学重点是通过与荧光蛋白质融合的方法,研究蛋白质的亚细胞定位,系统地掌握瞬时表达技术的原理及利用农杆菌渗透法在烟草叶片中瞬时表达目的基因。教学难点在于利用荧光显微镜观察荧光蛋白质,熟练地掌握荧光显微镜的使用及运用相关的理论知识对观察的结果进行分析。

2.3 实验材料与设备

2.3.1 实验材料 3~4周苗龄的本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*),含有35S:EGFP(定位于胞质和核)、AKDE1-YFP(AKDE1:2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE E1,酮戊二酸脱氢酶,定位于线粒体)^[13]、PIP2A-RFP(PIP2A:PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2A,定位于细胞膜)^[2]和Px-RFP(在RFP的C-末端加了过氧化物酶体定位信号Ser-Lys-Leu,定位于过氧化物酶体)^[2,14]质粒的农杆菌菌株C58C1。上述质粒的抗性筛选标记均为卡那霉素。

2.3.2 实验仪器和用具 本实验所用仪器和用具: 荧光显微镜、植物光照培养箱、恒温摇床、离心机、超净工作台、高压灭菌锅、记号笔、接种环、微量移液器、吸头、注射器、载玻片、盖玻片、剪刀和镊子等。

2.4 教学安排

2.4.1 学时安排 本实验可分为以下5个阶段: (1) 配制YEP液体培养基及接种农杆菌(8学时); (2) 配制所需试剂、农杆菌扩大培养及测定*D*值(8学时); (3) 离心收集农杆菌细胞及重悬(6学时); (4) 渗透注射烟草叶片(6学时); (5) 教师讲解荧光显微镜的使用, 学生观察实验结果并拍照(16学时)。本实验安排48学时, 课前准备4学时, 由教师或助教完成。

2.4.2 课前准备 播种本氏烟草种子(实验前3~4周); 复苏农杆菌菌种(实验前3 d配制YEP固体培养基, 倒平板, 然后取冻存的菌种划线, 于28 °C培养箱中培养)。

2.4.3 实验分组 建议实验中每组2~4人, 每个小组可以注射不同的荧光蛋白, 组员之间协调配合, 共同合作完成实验流程, 共同观察实验结果并拍照, 积极参与讨论。

3 实验步骤

3.1 实验材料的准备(由指导教师或助教完成)

首先, 播种本氏烟草种子, 放在植物光照培养箱中培养。培养箱的温度设置为23 °C, 光周期为16 h光照/8 h黑暗, 光照强度约为12 000 lux。3~4周龄的烟草可用于实验。需要注意的是, 烟草的生长状态对实验的成功至关重要, 需培养出如图1中的健壮烟草植株。因此, 指导教师或助教需要精心照管所种植的烟草, 避免浇水过多或者过少。另外, 最好在2周龄时浇1次营养液(例如Hoagland营养液)。其次, 配制YEP固体培养基(添加相应的抗生素, 例如本实验所用的培养基需添加50 μg/mL利福平、50 μg/mL卡那霉素、50 μg/mL庆大霉素), 将保存在-80 °C冰箱中的上述农杆菌菌种用接种环在YEP固体平板上划线, 倒置放在28 °C生化培养箱中培养2~3 d, 培养期间要查看菌落生长情况。

3.2 实验试剂的配制方法

(1) YEP液体培养基(100 mL): 取酵母提取物1 g、蛋白胨1 g、NaCl 0.5 g, 用100 mL蒸馏水溶解并高压灭菌; (2) 抗生素: 50 mg/mL利福平(Rif)

储存液、50 mg/mL庆大霉素(Gentamycin)储存液、50 mg/mL卡那霉素(Kanamycin)储存液; (3) 农杆菌活化液: YEP液体培养基添加50 μg/mL利福平、50 μg/mL卡那霉素、50 μg/mL庆大霉素、10 mmol/L MES(pH5.7)、20 μmol/L乙酰丁香酮(acetosyringone, AS); (4) 农杆菌渗透缓冲液MMA: 10 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L MES(pH5.7)、150 μmol/L AS。

3.3 培养和活化农杆菌

在超净工作台中挑取单个农杆菌菌落, 接种于5 mL YEP液体培养基(含50 μg/mL利福平、50 μg/mL卡那霉素、50 μg/mL庆大霉素)中, 在28 °C恒温摇床中振荡培养2~3 d。培养期间要查看菌液的生长状态, 当菌液的*D*值在0.8~1.0时, 进行下一步操作。需要注意在接种后的试管上做好标记, 注明所接种的农杆菌含有的质粒种类。将上述培养好的菌液按1:100稀释(用农杆菌活化液稀释), 在28 °C恒温摇床中培养16~20 h, 直至*D*值在0.6~0.8之间。然后, 将农杆菌菌液收集到50 mL离心管中, 5 000 r/min离心10 min收集菌体。用农杆菌渗透缓冲液MMA[10 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L MES(pH5.7)、150 μmol/L AS]重悬菌体, 使菌液的*D*值约为1.0, 将上述重悬后的菌液在室温放置3 h后注射烟草叶片。

3.4 注射烟草叶片

用10 mL的注射器吸取重悬好的农杆菌菌液, 然后将注射器的针头去掉, 在烟草叶片背面扎孔, 一只手托住烟草叶片, 另一只手推压注射器使菌液渗入小孔周围的烟草叶片组织。每个叶片选取3~5个区域注射(图1)(注意: 在烟草叶片背面进行注射; 推压注射器时不能用力过大, 以免菌液喷溅到脸上; 注射时最好戴口罩)。注射后的烟草放回光照培养箱中, 生长2 d左右, 进行荧光观察。

3.5 荧光显微镜观察和拍照

首先, 在注射孔周围剪取0.5~1 cm²大小的叶片组织, 避免剪到主叶脉。然后, 在载玻片中央滴一滴水, 用镊子将剪好的叶片组织放入水中(注意叶片背面朝上), 盖好盖玻片。然后, 在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察荧光蛋白的亚细胞定位, 并采集图片。

3.6 实验中需要注意的问题

为保证本实验的正常进行, 我们总结了本实验在具体实践中应注意的问题, 教师需要指导学生特

别注意以下几点: (1)渗透注射时要选取健壮的烟草植株, 苗龄不要超过4周; (2)选取幼嫩健壮的叶片进行渗透注射, 注射区选在叶脉间区域, 避开大的叶脉, 推压注射器时不要用力太大, 在此过程中要带上口罩, 以免菌液溅到脸上; (3)注射完每个叶片后, 要及时做好标记, 注明注射的农杆菌所含的质粒。



图1 渗透注射烟草叶片

Fig.1 Infiltration of tobacco leaf

4 结果

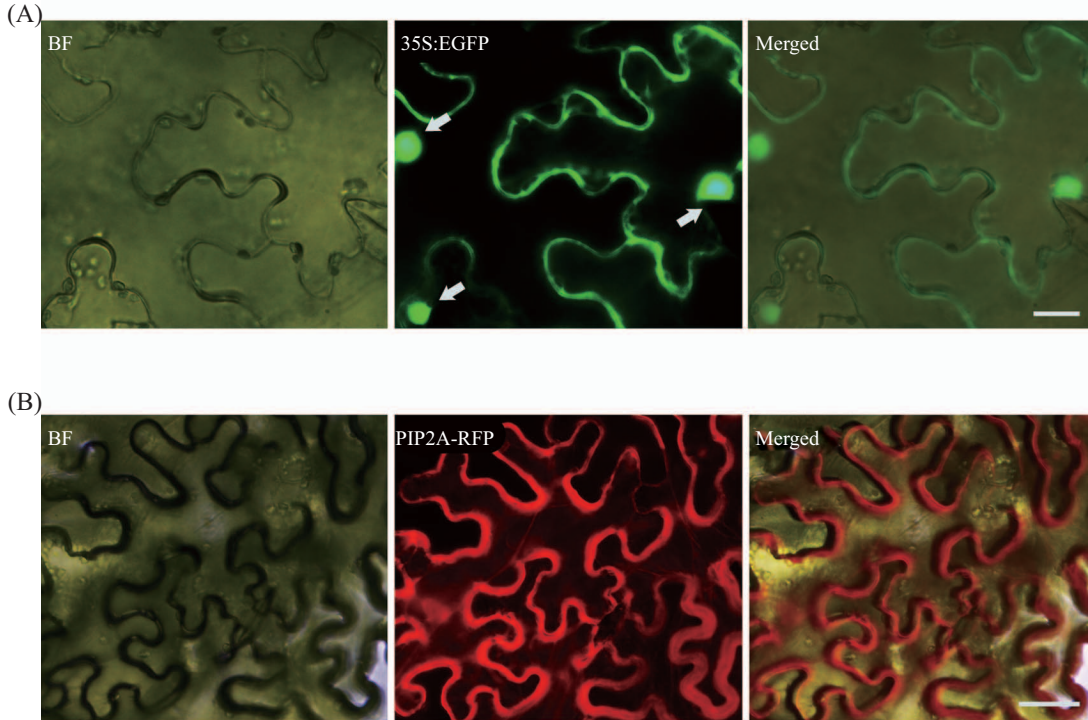
用含有35S:EGFP(图2A)、PIP2A-RFP(图2B)、AKDE1-YFP和Px-RFP(图3)质粒的农杆菌注射烟草叶片, 48 h后利用荧光显微镜进行观察, 结果如图2和图3所示。

用含有AtBAG5-EGFP(定位于线粒体)^[15]和线粒体标志物CD3-991^[2]质粒的农杆菌共同注射烟草叶片, 48 h后利用激光共聚焦显微镜进行扫描。结果显示, AtBAG5-EGFP信号(绿色)与线粒体标志物CD3-991的信号(红色)重叠为黄色, 说明二者共定位(图4A)。用含有NUP1-EGFP(定位于核膜)^[16-17]质粒的农杆菌注射烟草叶片, 48 h后利用细胞核的染料4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)进行染色, 然后利用激光共聚焦显微镜进行扫描。结果显示, NUP1-EGFP信号(绿色)位于细胞核信号(蓝色)的外围, 表明NUP1-EGFP定位于核膜(图4B)。

5 讨论

5.1 开设该实验项目的意义

在生物体内, 蛋白质被运输到各个特定的细胞

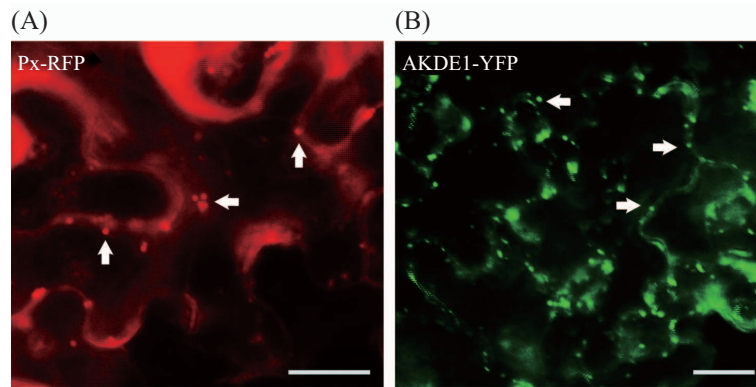


A: 增强型绿色荧光蛋白(EGFP)信号, GFP定位于胞质和细胞核(箭头指示细胞核), 标尺=20 μm ; B: 红色荧光蛋白(PIP2A-RFP)信号, PIP2A-RFP信号定位于细胞膜, 标尺=50 μm 。BF代表明场。

A: enhanced green fluorescent protein (EGFP) signal, GFP located in the cytoplasm and nucleus (arrows indicate nucleus), scale bar=20 μm ; B: red fluorescent protein (PIP2A-RFP) signal, PIP2A-RFP located in plasma membrane, Scale bar=50 μm . BF represents the bright field.

图2 定位于胞质和核以及细胞膜的荧光蛋白

Fig.2 Fluorescent proteins localized in cytosol and nucleus, and plasma membrane

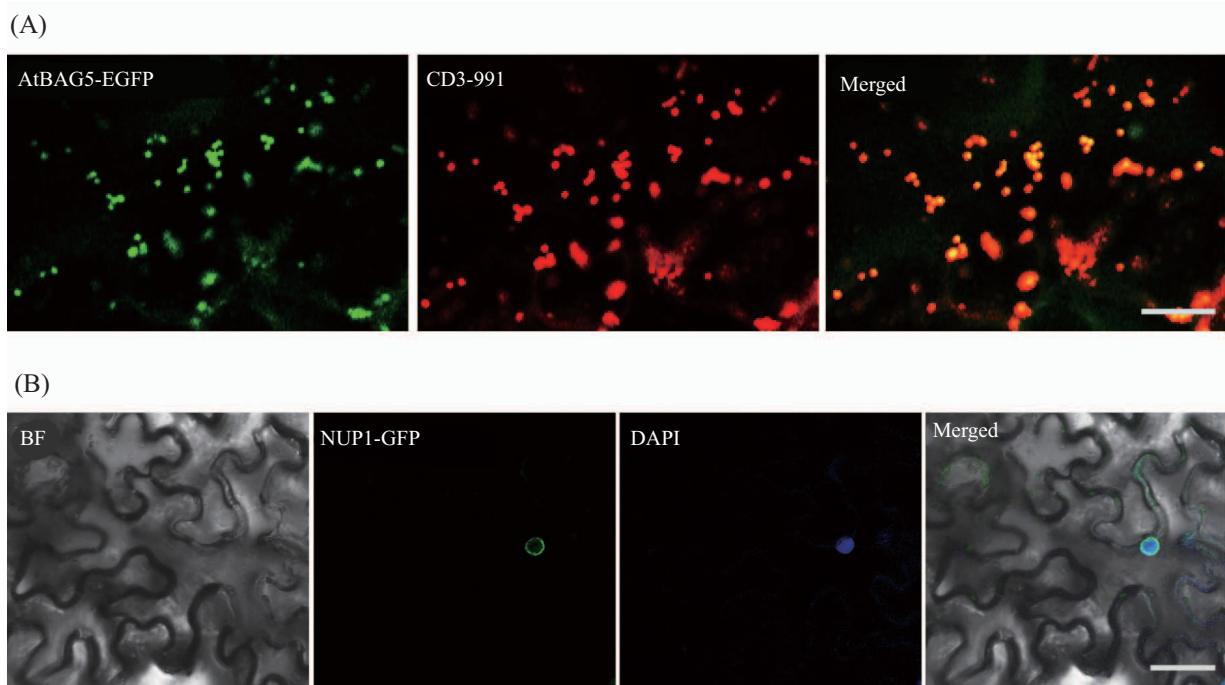


A: 红色荧光蛋白(Px-RFP)信号, Px-RFP定位于过氧化物酶体(图中如箭头所指的点状结构), 标尺=20 μm; B: 黄色荧光蛋白(AKDE1-YFP)信号, AKDE1-YFP定位于线粒体(图中如箭头所指的点状结构), 标尺=20 μm。

A: red fluorescent protein (Px-RFP) signal, Px-RFP located in the peroxisome (dot structures), scale bar=20 μm; B: yellow fluorescent protein (AKDE1-YFP) signal, AKDE1-YFP located in the mitochondria (dot structures), scale bar=20 μm.

图3 定位于过氧化物酶体和线粒体的荧光蛋白

Fig.3 Fluorescent proteins localized in peroxisome and mitochondria



A: AtBAG5-EGFP与线粒体标志物CD3-991共定位, 标尺=10 μm; B: NUP1-GFP定位于核膜, 标尺=50 μm。

A: co-localization of AtBAG5-EGFP and the mitochondrial marker CD3-991, scale bar=10 μm; B: NUP1-GFP localizes to nuclear envelope, scale bar=50 μm.

图4 激光共聚焦显微镜扫描的亚细胞定位图像

Fig.4 Subcellular localization photos taken by confocal laser scanning microscope

器或者亚细胞结构中参与细胞的生命活动, 蛋白质在细胞中的正确定位是其行使生物学功能的前提。因此, 分析蛋白质的亚细胞定位有助于研究功能未知蛋白质的功能, 同时可以根据蛋白质亚细胞定位的信息, 预测蛋白质之间的相互作用。该实验课程将植物瞬时表达技术与荧光或激光共聚焦显微镜技术相结合, 可以在有限的课时安排中使本科生获得

很好的实验结果, 使同学们直观地观察到蛋白质的亚细胞定位情况。该实验项目的开展旨在使同学们了解研究蛋白质亚细胞定位的方法, 同时也让同学们对瞬时表达技术有一定的认识。通过该实验课程的学习, 学生应该能够独立完成所需试剂的配制、农杆菌的培养和烟草叶片的渗透注射, 熟练掌握荧光显微镜的使用方法, 拍摄到质量较好的荧光照片,

并能规范地展示实验结果。

5.2 实验安排

本文的通讯作者已在本校的生物学综合实验教学中连续3年开设该实验课程,取得了很好的效果。该实验课课时安排为48学时,每年都能顺利完成,每个实验小组都顺利注射了烟草叶片,成功表达了荧光蛋白,并获得了很好的荧光显微镜照片。该实验项目包括植物瞬时表达技术与荧光显微镜观察等细胞生物学的基本技术手段,这些技术所涉及的相关实验在部分的高校已有开展,并且也具备一定的实验条件。课前由教师或助教播种烟草、活化菌种为实验做好准备,实验试剂配制及实验所需器皿的灭菌由学生完成,课堂中提出的思考题由教师和学生共同完成。

如果需要缩减课时,农杆菌的YEP液体培养、离心收集菌体及重悬等(即3.4.1学时安排部分的1~3部分)实验步骤可由指导教师或者助教完成,学生完成烟草叶片的注射和显微镜观察实验。

如果将本实验作为拓展训练项目或者科研训练项目开展,除了以上的实验安排之外,可以将基因克隆、植物表达载体构建和农杆菌的转化等实验纳入其中。有条件的学校可使用激光共聚焦显微镜观察荧光蛋白的亚细胞定位和共定位。激光共聚焦显微镜分辨率高,可以更加清晰地呈现蛋白质的定位情况。

5.3 实验教学中的注意事项

在农杆菌培养和离心收集农杆菌细胞时,提醒学生收集对数生长期的农杆菌;重悬菌体时 D 值不能太低, D 值太低影响荧光蛋白的瞬时表达效率,这两点容易被学生忽视。在烟草叶片注射过程中,选取幼嫩健壮的叶片注射,但是也不能选择太幼小的还未伸展的叶片。注射区域选在叶脉间区域,避开大的叶脉。注意提醒学生注射完每个叶片后要及时做好标记,注明注射的农杆菌所含的质粒。这一点也是学生在独立操作过程中易于疏忽的地方,常常将所注射的菌种弄混,在荧光显微镜观察时产生困惑。使用荧光显微镜观察荧光蛋白是该实验课程的重点也是难点,实验时可先由指导教师找到有荧光的叶片区域,并让每个同学观察荧光情况,然后指导教师需要给学生演示如何拍照并讲解拍照的参数等,最后由同学们独立完成操作。

5.4 实验教学效果

该实验课程已经在本校开展多年,通过学生的

课堂反应和对实验报告的分析发现,不同的农杆菌菌株和烟草的生长状态会直接影响荧光蛋白瞬时表达的效率;注射时农杆菌的浓度和菌的活力也会对瞬时表达的效率产生影响。因此,在进行预备实验时指导教师或助教应该对教研室的农杆菌菌株进行比较,选择瞬间表达效率高的菌株;同时,精心种植本氏烟草,为学生准备长势良好的实验材料。实验教学时应该提醒学生注意收集对数生长期的农杆菌,重悬菌体时 D 值不能太低。在烟草叶片注射过程中,由于叶片选取的位置不同,学生注射时力度不同,也会影响转化的效率。因此,注射前指导教师要边讲解边示范。显微镜的使用是学生在该实验课程中的难点,需要学生熟练的掌握。从学生的问卷调查中发现,在开展本实验课程之前,学生对本实验课的相关理论知识的了解程度一般,通过该课程的学习,学生都很好地掌握了实验中涉及的理论知识和相关技术。通过该实验课程的学习,学生了解了研究蛋白质亚细胞定位的方法,理解了如何将目的基因与易于检测的报告基因融合,构建融合基因表达载体,表达融合蛋白,然后,借助于报告基因的表达产物的特征来定位目的蛋白。同时,在实验操作过程中,学生也知道收集对数生长期的农杆菌,熟练地掌握烟草叶片的注射方法及独立的完成荧光显微镜的操作。学生建议老师在本实验课程基础上进行一定的拓展,多讲解一些前沿知识,建议多些独立操作的时间。总体来看,课堂效果较好、课时安排比较合理、学生容易掌握,通过该实验课程的学习,学生能够独立地完成操作。

5.5 本实验的推广与应用

(1)实验条件:要求具备植物培养箱或者培养室、农杆菌培养条件及荧光显微镜。

(2)教师的要求:实验教师需要熟练掌握农杆菌渗透方法,熟练掌握荧光显微镜的基本操作。

(3)可在细胞生物学实验教学、植物生物技术实验教学、综合实验或者科研训练课程中开设。

参考文献 (References)

- 1 Lunn JE. Compartmentation in plant metabolism. *J Exp Bot* 2007; 58(1): 35-47.
- 2 Nelson BK, Cai X, Nebenführ A. A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J* 2007; 51(6):1126-36.
- 3 Miernyk JA, Thelen JJ. Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J* 2008; 53(4): 597-609.

- 4 Sauer M, Paciorek T, Benková E, Friml J. Immunocytochemical techniques for whole-mount in situ protein localization in plants. *Nat Protoc* 2006; 1(1): 98-103.
- 5 Men S, Boutté Y, Ikeda Y, Li X, Palme K, Stierhof YD, *et al.* Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol* 2008; 10(2): 237-44.
- 6 Lalonde S, Ehrhardt DW, Loqué D, Chen J, Rhee SY, Frommer WB. Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: Latest techniques and current limitations. *Plant J* 2008; 53(4): 610-35.
- 7 Klein RM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Biotechnology* 1992; 24: 384-6.
- 8 Rossi L, Escudero J, Hohn B, Tinland B. Efficient and sensitive assay for T-DNA-dependent transient gene expression. *Plant Mol Biol Rep* 1993; 11(11): 220-9.
- 9 Lindsey K, Jones MG. Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cells of sugarbeet. *Plant Mol Biol* 1987; 10(1): 43-52.
- 10 Maas C, Werr W. Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transduction into plant protoplasts. *Plant Cell Rep* 1989; 8(3): 148-51.
- 11 Fischer R, Vaquero-Martin C, Sack M, Drossard J, Emans N, Commandeur U. Towards molecular farming in the future: Transient protein expression in the plants. *Biotechnol Appl Biochem* 1999; 30: 113-6.
- 12 Pitzschke A. *Tropaeolum* tops tobacco-simple and efficient transgene expression in the order brassicales. *PLoS One* 2013; 8(9): e73355.
- 13 Mehlmer N, Parvin N, Hurst CH, Knight MR, Teige M, Vothknecht UC. A toolset of aequorin expression vectors for *in Planta* studies of subcellular calcium concentrations in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 2012; 63(4): 1751-61.
- 14 von Arnim AG, Deng XW, Stacey MG. Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* 1998; 221(1): 35-43.
- 15 Li L, Xing Y, Chang D, Fang S, Cui B, Li Q, *et al.* CaM/BAG5/Hsc70 signaling complex dynamically regulates leaf senescence. *Sci Rep* 2016; 6: 31889.
- 16 Tamura K, Fukao Y, Iwamoto M, Haraguchi T, Hara-Nishimura I. Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2010; 22(12): 4084-97.
- 17 Lu Q, Tang X, Tian G, Wang F, Liu K, Nguyen V, *et al.* *Arabidopsis* homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: Components and anchoring nucleoporin. *Plant J* 2010; 61(2): 259-70.