

研究报告

PF40 的亚细胞定位研究

夏玉凤^{1,2)} 赵倩^{1)*} 于静娟¹⁾ 敖光明¹⁾⁽¹⁾中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; ⁽²⁾河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

摘要 *pf40* 基因是从谷子未成熟种子 cDNA 文库中获得的, 与水稻、拟南芥的离子通道蛋白同源性很高, 具有 8 个跨膜区. 该基因转入烟草, 可使烟草分枝增多, 将其转入谷子, 可使谷子分蘖增多. 构建 *pf40* 与绿色荧光蛋白 *gfp* 的融合基因, 转入烟草进行稳定表达, 通过荧光显微镜和激光共聚焦显微镜观察研究其亚细胞定位, 发现荧光主要集中在内质网. 将 *pf40* 不同缺失区段的 4 个片段与 *gfp* 构建融合基因, 转入烟草进行稳定表达, 发现 PF40 N 端 93 个氨基酸残基就能够使得 PF40 定位在内质网, C 端缺失没有影响蛋白质的亚细胞定位.

关键词 PF40/ 绿色荧光蛋白, 定位, 分枝, 内质网

学科分类号 Q7

真核细胞具有内膜系统, 有复杂的亚细胞结构. 除叶绿体, 线粒体能合成少量蛋白质外, 绝大部分蛋白质是在胞质或粗糙内质网合成, 运送到不同地点, 形成成熟蛋白, 行使功能. 翻译产物中很大一部分是以前体蛋白形式存在, 往往有蛋白质分子定位信号, 可引导蛋白质在胞内定位^[1].

蛋白质的亚细胞定位与其行使功能有密切联系. 人的 HKE4 是离子通道蛋白 ZIP 家族的 LZT 亚家族成员之一, 定位在内膜系统包括内质网. 推测它的作用可能是将 Zn^{2+} 从内质网输出到胞质, 调节 Zn^{2+} 在胞质和内质网之间的再分配^[2]. 然而大部分 LZT 家族成员 LIV1^[3], LZT-Hs4^[4]和其他 ZIP 通道蛋白 hZIP1^[5], hZIP2^[6]定位在质膜, 负责从外界环境向胞质输入 Zn^{2+} . 拟南芥的 AtMTP1 属于金属离子输出蛋白, 定位在液泡膜, 负责将细胞质中过多的 Zn^{2+} 运送入液泡, 保持细胞内 Zn^{2+} 平衡, 避免胞质 Zn^{2+} 积累过多而带来的伤害^[7]. 离子通道蛋白, 不论是定位在质膜还是在内膜系统, 对于调节胞内离子浓度的平衡都是很重要的.

pf40 是从谷子未成熟种子 cDNA 文库中得到的一个克隆. 在三大数据库 DDBJ、EMBL、GENBANK 中比对, 发现 PF40 与离子通道蛋白同源性很高. PF40 与水稻中编码一个推测的 Zn^{2+} 离子通道蛋白的 cDNA (基因登录号: XM464462.1) 核酸同源性为 84%, 两者蛋白质产物同源性为 85%; PF40 与拟南芥中编码一个 ZIP 家族的金属离子通道蛋白的 cDNA (基因登录号: NM 112979.2) 核酸同源性为 71%, 蛋白质产物同源性为 77%.

将 *pf40* 基因转入烟草可使烟草出现分枝, 并且这种表型变化能够遗传给下一代^[8]; 将其正义表达载体转入谷子使谷子分蘖增加, 而利用 RNAi 技术, 抑制 *pf40* 基因表达, 则谷子只有一个主茎, 不出现分蘖^[9]. 对于 PF40 引起分枝的分子机制还在研究.

多种软件分析表明, PF40 具有多个跨膜区域, 可能属膜蛋白. 我们将构建的 *pf40* 与绿色荧光蛋白 *gfp* 的融合基因, 由农杆菌介导转入烟草进行稳定表达, 通过荧光观察来确定其亚细胞定位.

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

E.coli DH5 α 、农杆菌 LBA4404、质粒 pBI121、pGEM-3Zf (+)、PF40 质粒由本室提供, pET-*actin-gfp* 质粒由中国农业大学生物学院刘国琴教授惠赠.

1.2 工具酶、试剂及生物材料

限制性内切酶 *Sma* I、*Kpn* I、*Sac* I、*Hind* III 购自 Promega 公司; Pfu DNA 聚合酶, T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 纤维素酶 R-10、果胶酶 Y-23、甘露醇购自鼎国公司; α -³²P-dCTP 购自亚辉生物公司; 尼龙膜购自 Amersham 公司; 山西烟 (*Nicotiana tabaccum*) 由本室提供.

* 通讯联系人.

Tel: 010-62733462, E-mail: zhaoqian@cau.edu.cn

收稿日期: 2005-05-25, 接受日期: 2005-06-09

1.3 引物设计合成

设计 PCR 引物, 引物中引入酶切位点.

用于扩增 *pf40* 基因不同长度片段的引物如下. F_1 (5'端自带 *Sma* I 酶切位点): ATCCCCCGGGC-TGCAGGAAT, F_2 (5'端带有 *Kpn* I 酶切位点): GCGGTACCAAAGTCTGGCTCTGGAATAA, F_3 (5'端带有 *Sma* I 酶切位点及起始码): TATACCCG-GGATGTCACCAGAAGCTGATCCAAG, F_4 (5'端带有 *Kpn* I 酶切位点): GCGGTACCAAATGC-CTTCCATTTGCTCT, F_5 (5'端带有 *Sma* I 酶切位点及起始码): TATACCCGGGATGTATATGGCA-GCAGGATCCGG, F_6 (5'端带有 *Kpn* I 酶切位点): GCGGTACCCAAGCTTATCTCCTTTGGTAGG.

用于扩增 *gfp* 基因的引物如下. G_1 (5'端带有 *Kpn* I 酶切位点): GCGGTACCATGAGTAAAGG-AGAAGAACT, G_2 (5'端带有 *Sac* I 酶切位点): GCGAGCTCTTATTTGTATAGTT.

1.4 融合基因构建及序列分析

使用 Pfu DNA 聚合酶, 分别以 PF40 质粒和 pET-actin-*gfp* 质粒为模板, 用引物 F_1 、 F_6 扩增出 *pf40*, 用引物 G_1 、 G_2 扩增出 *gfp* 基因. *Kpn* I 酶切 *pf40* 基因; *Kpn* I、*Sac* I 酶切 *gfp* 基因; 将两者克隆至 pGEM-3Zf(+)载体的 *Sma* I、*Sac* I 酶切位点, 得到重组质粒 3Z-*pf40-gfp*, 进行测序验证.

使用 Pfu DNA 聚合酶, 以 PF40 质粒为模板, 分别用 4 对引物 F_1 、 F_2 ; F_1 、 F_4 ; F_5 、 F_6 ; F_3 、 F_6 扩增得到 *pf40* 的 4 个缺失片段 *f12*、*f14*、*f56*、*f36*. 4 个片段分别用 *Kpn* I 酶切后克隆至 3Z-*pf40-gfp* 的 *Sma* I、*Kpn* I 酶切位点, 替换 *pf40* 基因, 得到的载体命名为 3Z-*f12-gfp*、3Z-*f14-gfp*、3Z-*f56-gfp*、3Z-*f36-gfp*, 进行测序验证.

1.5 表达载体构建

将 *Sma* I、*Sac* I 酶切质粒 3Z-*pf40-gfp*、3Z-*f12-gfp*、3Z-*f14-gfp*、3Z-*f56-gfp*、3Z-*f36-gfp* 得到的不同长度的融合基因, 克隆至 pBI121 的 *Sma* I、*Sac* I 酶切位点, 替换 *gus* 基因, 得到以 CaMV35S promoter 为启动子的表达载体 pBI-*pf40-gfp*、pBI-*f12-gfp*、pBI-*f14-gfp*、pBI-*f56-gfp*、pBI-*f36-gfp*.

用 *Sac* I 酶切 Pfu 扩增的 *gfp* 基因, 并克隆至 pBI121 的 *Sma* I、*Sac* I 酶切位点, 替换 *gus* 基因, 得到以 CaMV35S promoter 为启动子的表达载体 pBI-*gfp*.

1.6 农杆菌感受态制备、表达载体转入农杆菌及烟草转化

参考王关林等^[10]的方法.

1.7 DNA 印迹

参考 J.Sambrook 等^[11]的方法.

1.8 原生质体制备

将转基因烟草根尖伸长区以下区段切成小段, 置盛有 5 ml 酶解液 (0.4 mol/L 甘露醇, 2%纤维素酶, 0.2%果胶酶) 的小烧杯中, 并以 50 r/min 的转速慢速摇动 5 h, 以释放原生质体.

1.9 荧光观察

使用 Olympus B51 荧光显微镜, 488 nm 光激发, Olympus DP70 相机拍照. 激光共聚焦显微镜型号为 Zeiss model LSM510, 使用 505~550 nm 滤光片, 激发光 488 nm, 进行单层扫描, 或对多个焦平面进行扫描并使用 3D 重建功能进行处理.

2 结 果

2.1 转基因烟草 DNA 印迹检测

取 10 μ g 烟草基因组 DNA, 用 *Hind* III 彻底酶解, 以 *gfp* 基因的编码区片段标记探针, 对转 *pf40-gfp* 融合基因的再生烟草植株进行 DNA 印迹检测. 杂交结果见图 1. 结果显示, 目的基因已导入烟草并整合到烟草基因组中, 且整合位点各有不同, 说明各植株是由不同的转化事件产生 (图 1).

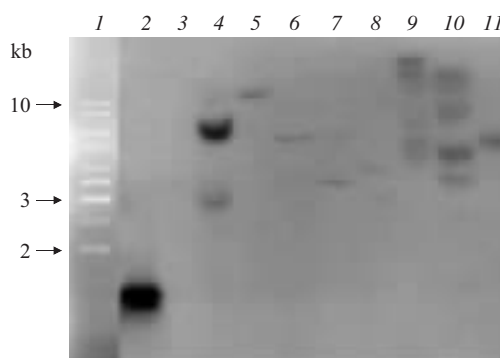


Fig. 1 Southern blot analysis of *pf40-gfp* fusion gene transgenic tobaccos

10 μ g of tobacco genomic DNA were digested with *Hind* III fractionated by electrophoresis on 0.8% agarose gel, transferred to a nylon membrane and hybridized with the ³²P-labelled 0.7 kb *gfp* gene. 1: 1 kb Ladder; 2: Positive control; 3: Control DNA from non-transformed tobacco; 4~11: Genomic DNA from fusion gene transformed plants.

2.2 转基因烟草的表型

在获得的 16 株转 *pf40-gfp* 的烟草中, 10 株发生表型改变, 在茎的基部出现一个分枝 (图 2c). 其

中 3 株荧光较强, 7 株荧光较弱. 在未出现分枝的 6 株烟草中, 均未检测到荧光. 由转基因烟草的 DNA 印迹结果 (图 1) 可知, 不同植株中基因整合位置不同, 各植株是由不同的转化事件产生的. 作为对照

的转 *gfp* 烟草, 其表型与未转基因的烟草表型一致, 只有一个主茎, 未出现分枝 (图 2a, b). 由此证明, *pf40* 基因的表达, 可能是引起烟草表型变化的原因.

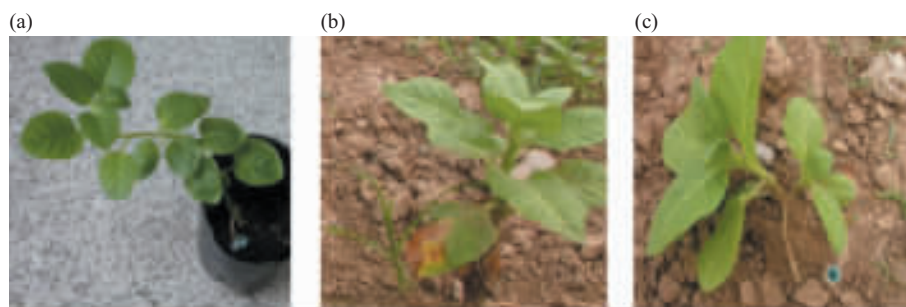


Fig. 2 Phenotype of transgenic tobacco

(a) Non transformed tobacco, (b) *gfp* Transgenic tobacco, (c) A branch appears in *pf40-gfp* transgenic tobacco.

2.3 转基因烟草的荧光检测

由于根部受叶绿体荧光干扰比较小, 所以取转基因烟草根尖进行观察. 将根尖用 2% 纤维素酶, 0.2% 果胶酶酶解 10 min 之后压片, 置荧光显微镜下以 488 nm 光激发进行荧光观察, 结果如图 3.

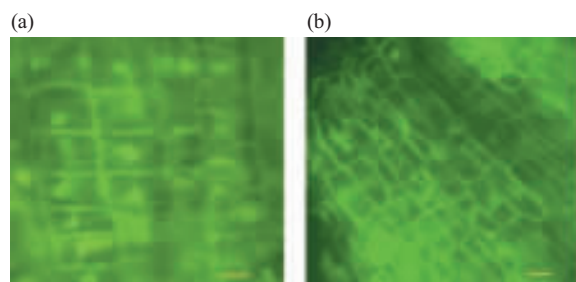


Fig. 3 Localization of GFP in tobacco roots

(a) Fluorescence visualization of *gfp* transgenic tobacco root. (b) Fluorescence visualization of *pf40-gfp* fusion gene transgenic tobacco root. scale bar = 20 μm.

由图 3 可见, 转基因烟草根尖有明显绿色荧光, 并且转 *gfp* 的烟草荧光与转融合基因烟草的荧光发光部位不同. 在转 *gfp* 的烟草细胞核内有明亮的绿色荧光, 胞质中也有明显荧光; 转融合基因烟草细胞, 其核中没有荧光, 围绕核的区域有明亮的圆环状绿色荧光. 为进一步了解荧光的亚细胞定位, 将根尖切成小段, 置酶解液中酶解 5 h, 得到原生质体. 对原生质体进行荧光观察 (图 4).

由图 4 可见转 *gfp* 基因烟草细胞, 胞质和细胞核有明显绿色荧光, 而转 *pf40-gfp* 融合基因的烟

草, 荧光发光部位明显不同, 在围绕核的内质网以及胞质网格状内质网上观察到明显绿色荧光, 表明 PF40 主要定位在内质网.

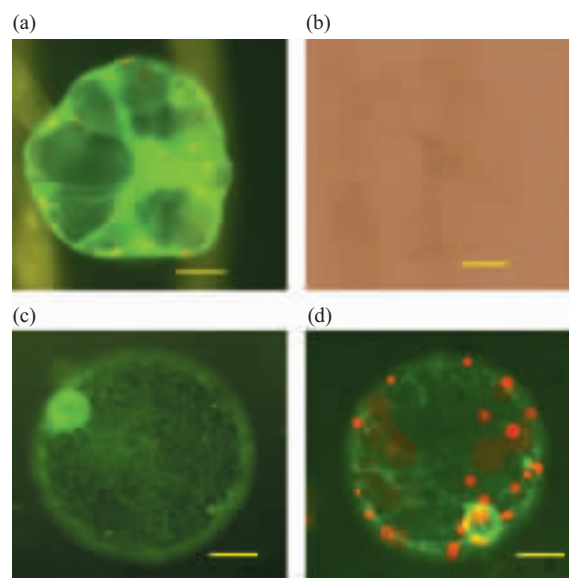


Fig. 4 Localization of GFP in root protoplasts

(a) Soluble GFP appears in the cytoplasm and nucleus. (b) Bright field image of *gfp* transgenic tobacco root protoplasts. (c), (d) PF40-GFP fusion protein fluorescence appears in the ER surrounding the nucleus and the cortical ER. The red dot in panel (d) are chloroplasts. Auto fluorescence of chloroplast is red. The transgenic tobaccos are planted in glass bottles so chloroplasts can form in roots under light. Scale bar = 20 μm.

2.4 PF40 不同区段与 GFP 的融合蛋白的亚细胞定位

典型的内质网定位信号为 KKXX-COOH,

K(H)DEL^[12]. PF40 没有典型的内质网定位信号. 为了寻找能够引导其定位的区段, 构建了 *pf40* 基因 4 个不同区段与 *gfp* 的融合基因.

将带有 *pf40* 缺失片段与 *gfp* 的融合基因的 4 个表达载体, 以冻融法转入农杆菌, 再通过叶盘法转入烟草. 用烟草的根及根细胞原生质体进行荧光检测. 发现 N 端分别缺失 93 个和 187 个氨基酸的 PF40 片段与 GFP 形成的融合蛋白 F36-GFP 和 F56-GFP 的荧光分布在细胞核和胞质中, 与转 *gfp*

植株的荧光位置一致, 说明 PF40 N 端缺失造成蛋白质不能正确定位在内质网上. 只有 N 端 93 个氨基酸的 PF40 片段与 GFP 形成的融合蛋白 F12-GFP (包含跨膜区 1~3)及 C 端缺失 90 个氨基酸的 PF40 片段与 GFP 形成的融合蛋白 F14-GFP (包含跨膜区 1~5)的荧光主要存在于内质网, 表明 PF40 的内质网定位信号存在于蛋白质的 N 端, 而 C 端缺失对其定位没有影响, N 端 93 个氨基酸能够引导蛋白质定位在内质网(图 5).

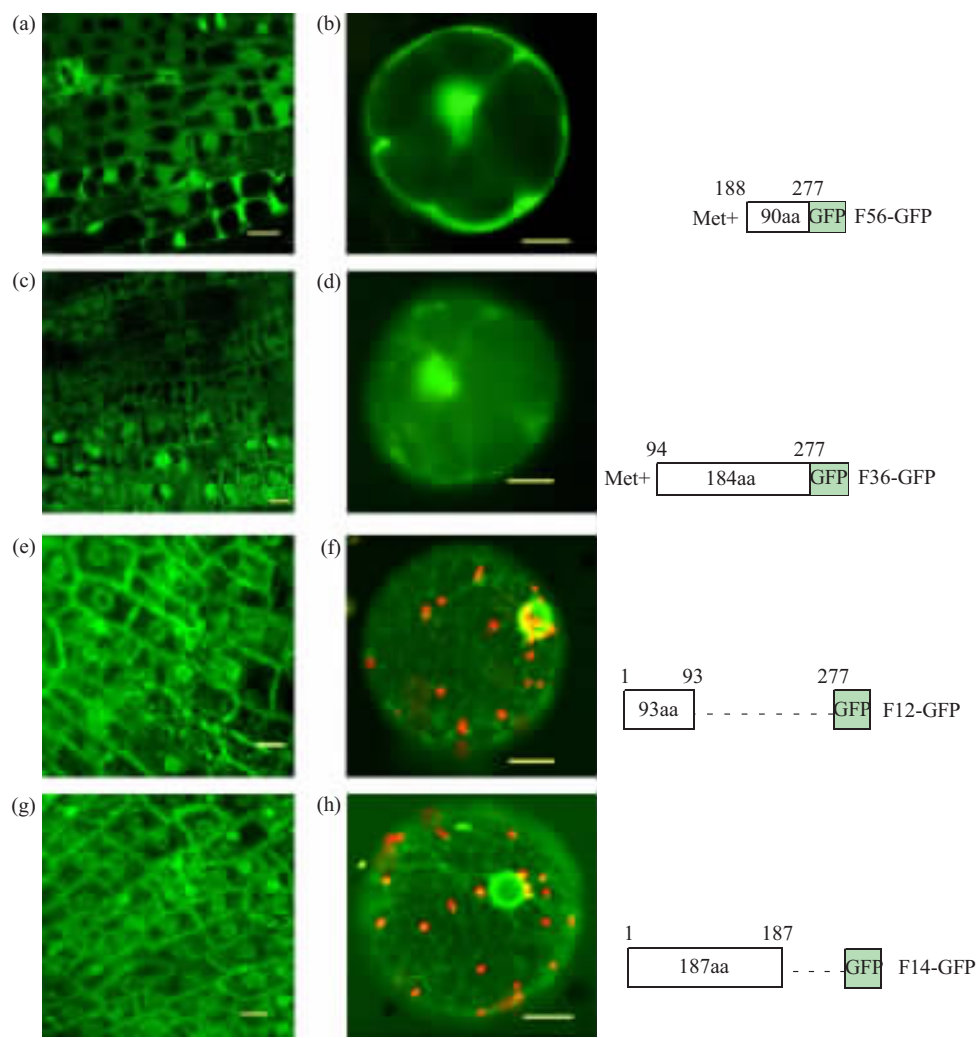


Fig. 5 Distribution of 4 truncated PF40 fragment: GFP in tobacco cells

(a),(b) F56-GFP fusion protein fluorescence appears in the cytoplasm and nucleus. (c),(d) F36-GFP fusion protein fluorescence appears in the cytoplasm and nucleus. (e),(f) F12-GFP fusion protein fluorescence appears in the ER surrounding the nucleus and the cortical ER. (g), (h) F14-GFP fusion protein fluorescence appears in the ER surrounding the nucleus and the cortical ER. ((a), (c), (e), (g): Root tip fluorescence detected by laser confocal microscope; (b), (d), (f), (h): Protoplast detected by fluorescence microscope. scale bar = 20 μm. Structure of the corresponding truncated fusion protein was displayed at the right.)

3 讨 论

蛋白质在细胞内的定位过程,涉及到大量的细胞生物学过程,是近年来分子生物学研究的一个热门领域,取得了很大进展.已报道的资料表明蛋白质定位方式有多种形式,有的依赖于一级结构序列,有的信号可能存在于高级结构^[13],有的蛋白质可与胞器内特定蛋白形成聚合体,协同滞留在胞器内^[14],有的定位信号与氨基酸的疏水性、酸碱性有关^[15].例如定位在过氧化物酶体的 Cat1(过氧化氢酶),C 端的 3 个氨基酸残基(QKL)可能是定位信号.仅这 3 个氨基酸残基还不能引导 GFP 定位到过氧化物酶体,然而 C 端 150 个氨基酸残基(含有 QKL)能够引导 GFP 进入过氧化物酶体.看来,QKL 上游序列对定位也起到很重要的作用^[16].人的 HKE4 有 8 个跨膜区,它定位于内膜系统包括内质网,它的几个缺失突变的蛋白质分别包括跨膜区 1、跨膜区 1~3、跨膜区 1~7,其亚细胞定位均与全蛋白质的定位一致,表明该蛋白质 C 端缺失对定位没有影响^[2].

本实验中 PF40 不同缺失片段的亚细胞定位显示:F12-GFP(包含跨膜区 1~3)和 F14-GFP(包含跨膜区 1~5)的荧光主要在内质网,而 F36-GFP 和 F56-GFP 的荧光在细胞核和细胞质,与转 *gfp* 植株的荧光位置一致,说明 PF40 C 端缺失对其定位没有影响,而 N 端缺失造成蛋白质定位迷失方向.跨膜区 1~3、跨膜区 1~5 都能引导蛋白质定位在内质网.这些与离子通道蛋白 HKE4 非常相似.

我们检测到转 *pf40-gfp* 融合基因的烟草,荧光主要集中在内质网.缺失实验表明,PF40 蛋白的定位区段存在于 N 端的 93 个氨基酸区段,不具有典型的内质网定位信号 KKXX-COOH、K(H)DEL.是否表明定位在内质网上蛋白质的定位信号具有多样性以及采取什么方式定位在内质网膜上有待进一步研究.

植物分枝的形成是一个受多种因素(如基因型、激素、环境和营养条件等)影响的复杂的生物学现象.近年来人们通过对突变体的研究,在调控分枝形成的分子机制方面取得一些突破性进展.目前已经发现的与侧枝形成有关的很多基因属于转录调控因子^[17-19],如 GRAS 家族的 MOC1,通过影响下游的两个基因 *OSH1* 和 *OsTB1* 的表达而影响水稻分蘖^[17].另外,高等植物侧枝的发生都与植物激素有一定的关系,如拟南芥的 AXR1 通过参与激

素的信号感受和转导而影响分枝^[20].

在拟南芥发现的 IAR1,与金属离子通道蛋白家族在序列和结构上很相似.IAR1 编码 469 个氨基酸,具有 7 个跨膜区.推测 IAR1 定位在内质网,负责将 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 从内质网运送到细胞质.拟南芥 *iar1* 突变体对 IAA-Ala 的敏感性大为降低,其根的伸长不被高浓度的 IAA-Ala 抑制.这可能是因为 *iar1* 突变体中,IAR1 丧失功能,造成内质网中 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度较高,导致 IAA-Ala 水解酶活性被抑制,不能水解 IAA-Ala 为游离的 IAA,从而表现出对 IAA-Ala 的抗性^[21].IAR1 可能是通过调节胞内离子的分配从而影响激素代谢.

我们的研究表明,PF40 蛋白定位在内质网上,有 8 个跨膜区,与 Zn^{2+} 离子通道蛋白相似性很高.结合 PF40 的结构与离子通道蛋白相似性很高且定位在内质网上,推测 PF40 的功能可能是参与离子运输.根据报道, Zn^{2+} 对植物的许多生化过程有影响,比如:细胞色素、核苷酸的合成,IAA 的合成,酶的激活等. Zn^{2+} 缺乏会使水稻分蘖减少(<http://www.knowledgebank.irri.org>).在转 *pf40* 基因的烟草和谷子中,激素含量发生改变,生长素/细胞分裂素比值降低,并且 PF40 能够引起分枝^[8,9].PF40 蛋白是否作为离子通道蛋白影响金属离子的平衡导致激素比例的变化,从而影响到植物的分枝,目前还在研究中,有待进一步的实验结果.

致谢 感谢刘国琴教授惠赠质粒 pET-*actin-gfp*,给予本实验室的大力支持.

参 考 文 献

- 1 朱 桢.植物细胞内靶向蛋白的定位.植物生理学通讯,1995,31 (1): 65~73
Zhu Z. Plant Physiology Communications, 1995, 31 (1): 65~73
- 2 Taylor K M, Morgan H E, Joeson A, *et al.* Structure-function analysis of HKE4, a member of the new LIV-1 subfamily of zinc transporters. Biochem J, 2004, 377 (Pt1): 131~139
- 3 Taylor K M, Morgan H E, Joeson A, *et al.* Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. Biochem J, 2003, 375 (Pt1): 51~59
- 4 Taylor K M, Nicholson R I. The LZT proteins. the LIV-1 subfamily of zinc transporters. Biochem Biophys Acta Biomembranes, 2003, 1611 (1~2): 16~30
- 5 Gaither L A, Eide D J. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. J Biol Chem, 2001, 276 (25): 22258~22264
- 6 Gaither L A, Eide D J. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. J Biol Chem, 2000, 275 (8): 5560~5564

- 7 Kobae Y, Uemura T, Sato M H, *et al.* Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol*, 2004, **45** (12): 1749~1758
- 8 冯晓燕. 谷子中与顶端优势相关基因 PF40 的克隆及功能研究: [学位论文]. 北京: 中国农业大学生物学院, 2002
Feng X Y. Cloning and characterization of the millet (*Setaria italica*) gene PF40 involved in plant apical dominance: [Ph.D dissertation]. Beijing: College of Biology, China Agricultural University, 2004
- 9 刘颖慧. 谷子中 PF40 基因功能的研究: [学位论文]. 北京: 中国农业大学生物学院, 2004
Liu Y H. Function Analysis of PF40 gene in millet (*Tetaria italica*): [Ph.D dissertation]. Beijing: College of Biology, China Agricultural University, 2004
- 10 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998
WANG G L, Fang H J. Principle and Technology of Plant Gene Engineering. Beijing, Science Press, 1998
- 11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 474~489
- 12 Napier Richard M, Fowke Larry C, Hawes C, *et al.* Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, 1992, **102**(Pt2): 261~271
- 13 Saalbach G, Jung R, Kunze G, *et al.* Different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals. *The Plant Cell*, 1991, **3** (7): 695~708
- 14 Chrispeels M J, Short R N. Peptide domains target protein to plant vacuoles. *Cell*, 1992, **68** (4): 613~616
- 15 von Heijne G. Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol*, 1986, **189** (1): 239~242
- 16 Kamigaki A, Mano S, Terauchi K, *et al.* Identification of peroxisomal targeting signal of pumpkin catalase and the binding analysis with PTS1 receptor. *Plant Journal*, 2003, **33** (1): 161~175
- 17 Li X Y, Qian Q, Fu Z M, *et al.* Control of tillering in rice. *Nature*, 2003, **422** (6932): 618~621
- 18 Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, *et al.* The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (1): 290~295
- 19 Keishi Komatsu, Masahiko Maekawa, Shin Ujiie, *et al.* LAX and SPA: Major regulators of shoot branching in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (20): 11765~11770
- 20 Romano C P, Robson P R H, Smith H, *et al.* Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: hypocotyls elongation phenotype and interactions with the hy6-1 hypocotyl elongation and axr1 auxin-resistant mutants. *Plant Mol Biol*, 1995, **27** (6): 1071~1083
- 21 Jamie L, Luise R E, David N C, *et al.* Cloning and characterization of IAR1, a gene required for Auxin conjugate sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2000, **12** (12): 2395~2408

Study of Subcellular Localization of PF40

XIA Yu-Feng^{1,2)}, ZHAO Qian^{1)*}, YU Jing-Juan¹⁾, AO Guang-Ming¹⁾

⁽¹⁾State Key Laboratory of Agrobiotechnology China Agricultural University, Beijing 100094, China;

⁽²⁾College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract *pf40* is obtained from millet immature seeds cDNA library. It has high similarity with metal transporter family by blasting in DDBJ, GENBANK, EMBL. It is predicted that PF40 is included in ZIP family. Software analysis indicates that PF40 is a membrane protein. But which membrane system it localized in is unclear. A full PF40 cDNA fused at the 5' end of the green fluorescent protein (GFP) coding sequence was introduced and stably expressed in tobacco by agrobacterium-mediated transformation. The subcellular localization of GFP was analyzed by fluorescence microscope and laser confocal microscope. The fluorescence of PF40-GFP fusion protein was detected mainly in the ER, demonstrating that PF40 was mainly localized in the ER. 4 truncated *pf40* fragments were fused with *gfp*. The truncated fusion genes also were introduced and stably expressed in tobacco. N-terminal amino acid region can locate the protein in the ER.

Key words PF40/GFP, localization, branching, ER

*Corresponding author. Tel: 86-10-62733333, E-mail: tweiyei@sohu.com

Received: May 25, 2005 Accepted: June 9, 2005