

番茄 *calnexin* 基因的克隆及胁迫表达分析

李明辉, 孙颖, 赵春梅, 孙爱清, 胡小然, 刘箭*

(山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要: Calnexin 是内质网中重要的类凝集素分子伴侣, 其主要作用是辅助糖基化蛋白的折叠和装配, 调节内质网中的 Ca^{2+} 稳态平衡和 Ca^{2+} 信号传导过程。从番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 的 cDNA 文库中克隆到 *calnexin* cDNA 全序列, 将其命名为 *Lecnx61.0*, 并以其 3' 端 DNA 片段为探针对番茄基因组进行 Southern 分析, 结果表明 *Lecnx61.0* 在该基因组中仅有一个拷贝; Northern 和 Western 分析表明, *Lecnx61.0* 的表达还受热激、冷害、盐害和内质网应激诱导剂衣霉素的诱导, 但对干旱胁迫没有明显的反应。LeCNX 61.0 蛋白对 Ca^{2+} 缺乏胁迫的响应呈现组织特异性, 但高浓度 Ca^{2+} 并不影响各组织中 LeCNX 61.0 蛋白的含量, 实验结果表明 LeCNX 61.0 蛋白可能在植物抵抗特定的环境胁迫中发挥作用。

关键词: Calnexin; 分子伴侣; Ca^{2+} 胁迫; 环境胁迫

中图分类号: Q74

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)02-0100-06

Cloning and Stress Expression Analysis of *Calnexin* in Tomato

LI Ming-Hui, SUN Ying, ZHAO Chun-Mei, SUN Ai-Qing, HU Xiao-Ran, LIU Jian*

(College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: Calnexin, an important lectin-like chaperone in endoplasm reticulum, can assist in protein folding and modulate Ca^{2+} homeostasis in cell. A cDNA of 1964 bp encoding a full-length *calnexin* was cloned from *Lycopersicon esculentum*, and designated as *Lecnx61.0*. A single copy of *Lecnx61.0* was found in tomato genomic DNA by Southern-blot analysis. The levels of mRNA and protein of *Lecnx61.0* were increased when plants were treated by heat shock, chilling shock, salinity stress and endoplasm reticulum stress, but *Lecnx61.0* had no obvious response to drought stress. The protein of LeCNX61.0 only in specific tissues made response to Ca^{2+} depletion. However, the expression of LeCNX61.0 was not induced by high concentration of Ca^{2+} . These results suggested that LeCNX61.0 might play an important role in stress tolerance.

Key words: Calnexin; Molecular chaperone; Ca^{2+} stress; Abiotic stress

内质网是真核生物膜蛋白和分泌蛋白合成的主要部位, 进入内质网中的蛋白一般需要经过化学修饰, 其中糖基化修饰最为常见, 而糖基化蛋白的折叠通常需要内质网中的类凝集素分子伴侣的协助, 类凝集素分子伴侣能专一地识别以 N-糖苷键连接的新生糖蛋白, 辅助它们进行折叠和装配。内质网中类凝集素分子伴侣家族主要包括跨膜蛋白 calnexin 和可溶性蛋白 calreticulin。Calnexin、calreticulin 和辅助分子伴侣 ERp57 共同组成内质网中专一的糖蛋白成熟系统, 即 calnexin 循环体系。Ellgaard 和 Frickel^[1]通过对基因敲除后的显性小鼠的研究, 发现 calnexin 循环系统几乎介入了所有的动物糖基蛋白的合成、折叠和成熟过程。Calnexin 是一种 I 型

跨膜蛋白, 其位于内质网腔内的部分与 calreticulin 在序列和空间结构上十分相似, 具有保守的寡糖链结合域和 Ca^{2+} 结合域。关于 calnexin 的最初报道是发现它参与 MHC I 分子的折叠和装配, 从而暗示了 calnexin 在细胞内的功能^[2]。进一步研究表明, Calnexin 参与 MHC II、红血球凝集素、泡状口腔炎病毒糖基蛋白、P-糖蛋白、T 细胞表面受体和乙酰胆碱受体等新合成的多种糖蛋白的折叠和装配过程^[3], 并且发现 calnexin 参与内质网中的质量控制过程, 确保只有正确折叠的糖蛋白才能转运出内质网。

Calnexin 除了辅助糖蛋白的折叠和装配外, 还参与调节细胞内的 Ca^{2+} 稳态平衡和 Ca^{2+} 信号传导过程。Roderick 等发现在非洲爪蟾卵母细胞中 calnexin

收稿日期: 2005-09-27, 修回日期: 2005-12-22。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270132)。

作者简介: 李明辉(1980-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为植物基因工程。

* 通讯作者(E-mail: ljlsd@beelink.com)。

能与 SERCA2b 结合并调节 Ca^{2+} 的吸收过程^[4]。Calnexin 也可以辅助 IP₃ 受体的折叠,可能在 Ca^{2+} 的释放过程中具有一定作用^[5]。 Ca^{2+} 载体 A23187 使裂殖酵母的内质网中产生 Ca^{2+} 亏缺时,可诱导 *calnexin1* 基因的表达^[6]。植物细胞中也存在类凝集素分子伴侣 *calnexin*,目前还不清楚植物 *calnexin* 的表达是否受 Ca^{2+} 亏缺的影响。

Calnexin 基因的表达还受环境胁迫影响,热胁迫可诱导裂殖酵母中 *calnexin1* 基因的表达^[6];衣霉素可以抑制糖蛋白的糖基化过程,从而使内质网中聚集大量的未折叠蛋白使细胞产生内质网胁迫反应,有资料表明内质网胁迫条件下裂殖酵母 *calnexin1* 基因和拟南芥中 *cnx1* 基因的表达上升^[7];但是关于植物类凝集素分子伴侣 *calnexin* 基因对其他逆境胁迫的反应还未见报道。

笔者对番茄 *calnexin* cDNA (*Lecnx61.0*) 的分子克隆以及 *Lecnx61.0* 对 Ca^{2+} 胁迫、环境胁迫和内质网应激的响应情况进行了研究,以期了解 LeCNX61.0 蛋白在植物逆境胁迫过程中的变化情况。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理方法

1.1.1 植物材料

番茄 (*Lycopersicon esculentum*) (中蔬 4 号,中国农业科学院提供)植株在温室中培养,生长条件为:昼夜温度 28℃ : 20℃、光周期 14 h : 10 h (光照:黑暗)、相对湿度约为 40%:60% (白天:黑暗)。

1.1.2 胁迫处理方法

生长 40 d 的番茄植株分别进行高温、低温、盐和渗透胁迫处理。高温处理是将番茄植株置于 34、36、38、40、42℃ 和 44℃ 的光照培养箱中处理 3 h,对照为 28℃ 处理 3 h;低温处理是将番茄植株置于 4℃ 的光照培养箱中冷处理 6、12、24、48 h 和 72 h,对照为 28℃;盐胁迫处理是用含 NaCl 的 Hoagland 营养液浇灌番茄植株,浓度每天递增 50 mmol/L 达终浓度(0、50、100、200 mmol/L 和 300 mmol/L)持续处理 3 d;渗透胁迫处理是用含 PEG 的 Hoagland 营养液浇灌番茄植株,浓度每隔一天递增 10% 达终浓度(0、10%、20%、30% 和 40%),分别持续处理 2 d。

番茄种子在液体 MS 培养基中振荡培养 10 d,至番茄幼苗刚刚产生第一片真叶时进行如下处理: CaCl_2 处理和 EGTA 处理是将番茄幼苗分别浸泡在 0、10、50 mmol/L 和 100 mmol/L 的 CaCl_2 溶液中和 0、5、25 mmol/L 和 50 mmol/L 的 EGTA 溶液中,振

荡 12 h,取子叶或幼根提取蛋白;衣霉素处理是将番茄幼苗浸泡在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 衣霉素溶液中,振荡 1、2、6、12 h,取整株幼苗提取蛋白。

1.2 番茄分子伴侣 *calnexin* 基因的分子克隆

利用番茄 cDNA 噬菌粒文库^[8]转染 SOLR 细胞,挑取单克隆测序,对 1000 个 EST 数据进行分析后获得一个类似 *calnexin* cDNA 的片断,以此片断为探针,经随机引物法用 α -³²P-dCTP 标记探针,筛选 cDNA 文库,获得阳性克隆,方法参照文献[9]进行,提取阳性克隆的质粒送交上海生工生物工程有限公司进行测序,获得全长的番茄 *calnexin* cDNA。

1.3 Southern 和 Northern 分析

以番茄成熟叶片为实验材料,用 CTAB 法提取基因组 DNA^[10],然后分别用 *EcoR I*, *EcoR V* 和 *Hind III* 完全酶切。选取 *Lecnx61.0* 基因 3' 端 502 bp (1 106 ~ 1 608 bp, 是 *Lecnx61.0* 基因的高变区) 的 DNA 片断,用(α -³²P-dCTP 标记探针,在高度严谨的条件下(65℃ 杂交过夜,0.1 × SSC/0.1 × SDS, 68℃ 洗膜)进行 Southern 杂交^[9]。用异硫氰酸胍法提取番茄成熟叶片的总 RNA^[10],参照 Southern 探针制备方法和高度严谨杂交条件,进行 Northern 杂交。

1.4 番茄 LeCNX61.0 抗体的制备和 Western 分析

以 *Lecnx61.0* cDNA 为模板,利用 PCR 扩增 *Lecnx61.0* 的 C 端特异区(编码 LeCNX61.0 蛋白的 Ile³⁶⁷ 至 Arg⁵³² 区间的肽链,为 LeCNX61.0 蛋白的特异区,以此保证抗体的特异性)。PCR 用的正向引物为 5' TCGGATCCATTGGCATTGAGATC 3' (下划线部分为 *BamH I* 位点),反向引物为 5' AGGAATTCGACGAGGAGCAGCAC 3' (下划线部分为 *EcoR I* 位点)。扩增后获得 502 bp DNA 片断,该片断经 *BamH I* 和 *EcoR I* 双酶切后,与 pGEX-6P-3 载体连接,重组表达载体转入 DE3 菌株,利用 0.1 mmol/L IPTG 诱导蛋白质表达,表达的 GST-LeCNX61.0 融合蛋白经过谷胱甘肽 S-转移酶(GST)亲和纯化后用作抗原,免疫新西兰兔,直至获得抗血清。

低温下,用缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L PMSF)研磨植物样品,提取蛋白,蛋白样品用 Bradford 法定量^[11],取等量的样品用于 Western 分析。

2 实验结果

2.1 LeCNX61.0 的分子结构特征

利用简并引物进行 PCR 扩增获得一个约 600 bp 的 cDNA 片断,利用此 cDNA 片断作为探针,筛选

cDNA文库,从阳性克隆中获得1964 bp的*calnexin* cDNA全序(图1),该cDNA含有1617 bp开放读码框,由此读码框推导出的多肽含538个氨基酸残基,计算分子量为61.0 kD,命名为*LeCnx61.0*(Genbank



两箭头之间为*LeCnx61.0* cDNA的序列全长。单下划线是预测的LeCNX61.0蛋白信号肽部分;双下划线是预测的

LeCNX61.0蛋白的跨膜区。*代表终止子。

The sequence between the arrows is the total length of *LeCnx61.0* cDNA. The single underline and the double underline indicated a signal peptide and a membrane-spanning domain, respectively. * is corresponding to stop codon.

图1 *LeCnx61.0*基因的核酸序列和氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *LeCnx61.0* gene

号:AB218598)。Southern分析表明*LeCnx61.0*基因在番茄基因组中仅有一个拷贝(图2)。通过在线P-sort软件预测LeCNX61.0的N端含有27个氨基酸组成的信号肽序列(图1单下划线部分);C端有大约50个亲水性氨基酸,靠近C端的460~481多肽区为疏水区,推测为LeCNX61.0的跨膜区(图1双下划线部分);LeCNX61.0的C末端序列为RRPRRDN,该序列与大豆Cnalnexin的C末端RRPRRET序列、拟南芥Cnalnexin的C末端RQPRRDN序列,以及人Cnalnexin的C末端RKPRRE序列(人的Cnalnexin蛋白滞留在内质网中所



H;Hind III ; EI;Eco RI ;EV;Eco RV

探针所对应的*LeCnx61.0*序列中具有一个Eco RV限制性内切酶位点。There is a site of EcoRV restriction enzyme in *LeCnx61.0* according to the probe

图2 *LeCnx61.0*的Southern分析

Fig. 2 Southern blot analysis of *LeCnx61.0*

需的序列)类似,推测是番茄LeCNX61.0蛋白的内质网滞留信号。BLASTX同源性分析表明,LeC-

NX61.0 与已报道的大豆 calnexin 序列同源性最高，蛋白水平上的同源性达 73%，与拟南芥的 CNX1 同源性为 66%，与人的 calnexin 同源性为 41%。对人裂殖酵母、番茄和拟南芥的 calnexin 氨基酸序列

进行保守性分析,发现LcCNX61.0的N端部分相当保守(图3),包含3个Ca²⁺结合基序(I-DPD/EA-KPEDWDD/E)(图3中前3个方框),和4个寡糖结合链区(GXWXXPXIXNP序列)(图3中后4个方框)

前3个方框表示预测的 Ca^{2+} 结合位点,后3个方框表示预测的类凝集素结合位点,*表示终止子

The first three boxes indicated Ca^{2+} -binding sites and the following four boxes were predicated for lectin-binding sites. * is corresponding to stopcodon.

图 3 L_eCNX61-9 氨基酸序列的保守性分析

Fig. 3 Alignment of amino acid sequences of calnexins from *L. esculentum* (LE, AB218598), *A. thaliana* (AT, NM_125573), *H. sapiens* (HS, NM_001746), *S. pombe* (SP, NM_001019043).

框), LeCNX61.0 具有 calnexin 蛋白的典型分子特征。

2.2 环境胁迫对 Lecur61-0 转录水平的影响

40 d 龄的番茄植株经 4℃ 处理 24 h、38℃ 处理 3 h、300 mmol/L NaCl 处理 3 d 以及 40% PEG 处理 2 d, 提取番茄叶片总 RNA 进行 Northern 分析, 结果表明热和盐胁迫诱导 *Lecnx61.0* mRNA 的累积, 但 *Lecnx61.0* 对于旱胁迫反应不明显(图 4)。

2.3 环境胁迫对*Lecn6l-0*基因蛋白水平的影响

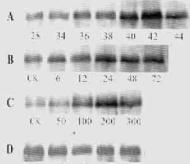
Lecnx61.0 基因在蛋白水平上对环境胁迫的反应与 mRNA 水平上的反应一致, 但是不如转录水平。

CK. 对照; Cold. 4℃冷处理 24 h; NaCl. 300 mmol/L NaCl 处理 3 d; Drought. 40% PEG 处理 2 d; Heat. 38℃热处理 3 h
 CK. Control; Cold. Tomato plant treated at 4℃ for 24 h; NaCl. Plant treated with 300 mmol/L NaCl for 3 d; Drought. Plant treated with 40% PEG for 2 d; Heat. Plant treated at 38℃ for 3 h

图 4 冷胁迫、盐胁迫、干旱胁迫和热胁迫条件下 *Lecanorula* 的转录分析

Fig. 4 Tie transcript levels of *Lecna61.0* under various stress conditions. 20 µg of total RNA were loaded in each lane for Northern analysis.

上的变化明显。经 Western 分析表明,热激处理时 36℃是 LeCNX61.0 热激反应的阈值,处理温度达到 42℃时 LeCNX61.0 的蛋白表达最高,当温度继续升高达到 44℃时,LeCNX61.0 的累积量有所下降(图 5:A)。LeCNX61.0 不但被高温诱导,也被低温诱导,4℃冷处理导致 LeCNX61.0 的蛋白含量逐步上升,经 24 h 低温处理,LeCNX61.0 累积量达到高峰(图 5:B)。LeCNX61.0 的表达也被盐胁迫诱导,当处理盐浓度升高到 100 mmol/L 时,LeCNX61.0 蛋白含量明显上升,盐处理浓度达到 200 mmol/L 时,LeCNX61.0 含量最高,但盐浓度升高到 300 mmol/L 时,LeCNX61.0 含量开始下降,但相对含量仍然高于对照(图 5:C)。为查清盐诱导 LeCNX61.0 是由于离子毒害还是渗透胁迫,作者分析了 PEG 处理后 LeCNX61.0 的表达,结果表明 LeCNX61.0 不受渗透胁迫诱导(图 5:D),盐诱导 LeCNX61.0 表达的起因可能是离子胁迫。



A:不同温度热激 3 h,28℃为常温对照;B:4℃冷处理不同时间(h),CK 为常温对照;C:不同浓度的 NaCl (mmol/L)处理 3 d;D:不同浓度的 PEG(%,W/W)处理 2 d。A 和 B 取叶片提取蛋白;C 和 D 取根尖提取蛋白
A: Plant treated different temperature for 3 h, 28°C; control; B: Plant treated at 4°C for different hours, CK: control; C: Plant treated with 50~300 mmol/L NaCl for 3 d; D: Plant treated with 10%~40% PEG (W/W) for 2 d. The protein samples of A and B were extracted from leaves, but these of C and D were from roots

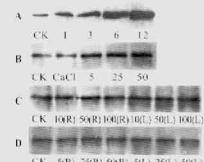
图 5 各种环境胁迫条件下 LeCNX61.0 蛋白的 Western 分析

Fig. 5 Western blot analysis of LeCNX61.0 under abiotic stress condition

2.4 LeCNX61.0 蛋白对衣霉素、 CaCl_2 和 EGTA 处理的响应

取 MS 液体培养 10 d 的番茄幼苗浸泡在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 衣霉素溶液中,振荡培养不同时间,提取幼苗总蛋白进行 Western blot 分析,结果表明 LeCNX61.0 受衣霉素诱导,而且随着时间的延长 LeCNX61.0 的蛋白含量不断增多(图 6:A)。

取 MS 液体培养 10 d 的番茄幼苗浸泡在不同浓度的 CaCl_2 和 EGTA 溶液中,振荡培养 12 h, 提取蛋



A:5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 衣霉素处理不同时间(h),取整株番茄幼苗提取蛋白;B:50 mmol/L CaCl_2 和不同浓度 EGTA(5, 25, 50 mmol/L)振荡培养番茄幼苗 12 h,取 2 mm 长的根尖提取蛋白;C:不同浓度 CaCl_2 (mmol/L) 中振荡处理番茄幼苗 12 h,取子叶(L)和 2 mm 长根尖后的幼根(R)提取蛋白;D:不同浓度 EGTA (mmol/L) 中振荡处理番茄幼苗 12 h,取子叶(L)和 2 mm 长根尖后的幼根(R)提取蛋白
A: Seedling treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tunicamycin for different hours. The protein samples were extracted from the whole tomato seedling; B: Seedling treated with 50 mmol/L CaCl_2 or different concentrations of EGTA(5, 25, 50 mmol/L) for 12 h. The protein samples were extracted from root tips of 2 mm long; C: Seedling treated with different concentrations of CaCl_2 (mmol/L) for 12 h; D: Seedling treated with different concentrations of EGTA (mmol/L) for 12 h. The protein samples for C and D were extracted from cotyledons(L) and the roots excluding root tips of 2 mm long(R)

图 6 衣霉素、 CaCl_2 和 EGTA 对 LeCNX61.0 表达的影响

Fig. 6 The effects of tunicamycin, CaCl_2 and EGTA on the expression of LeCNX61.0

白进行 Western blot 分析,结果表明 EGTA 处理时,诱导 2 mm 长的根尖组织中 LeCNX61.0 表达上升(图 6:B),但自根尖 2 mm 长后的根中和子叶中 LeCNX61.0 的含量几乎没有变化(图 6:C,D)。

3 讨论

Calnexin 位于内质网腔内的部分具有保守的凝集素结合域和多肽结合域;并具有富含脯氨酸的保守区,此保守区是重要的 Ca^{2+} 结合域,而且是结合二硫键异构酶 ERp57 所必须的^[12]。所以 LeCNX61.0 内质网的腔内部分在物种之间相当保守是与它的功能区位于此部分有关(图 3)。

逆境胁迫时,内质网内出现大量未折叠的蛋白,出现内质网胁迫现象,诱发内质网中的一系列反应,其中包括未折叠蛋白反应(unfold protein response, UPR),UPR 会诱导内质网中的 Calnexin、Calreticulin、BiP 和 PDI 等大量分子伴侣和辅助折叠因子的表达上调,帮助内质网中聚集的蛋白进行正确折叠^[13]。衣霉素可以阻止糖蛋白的糖基化,是典型的 UPR 诱导剂,我们用衣霉素处理番茄幼苗后,LeCNX61.0 的蛋白含量逐渐上升(图 6:A),这与拟南芥中 cnx1 基因受衣霉素诱导的报道一致^[7]。环境

胁迫也可诱导内质网内积累大量的未折叠蛋白,环境胁迫时诱导 *Lcnenx61.0* 基因的表达可能与胁迫诱导了未折叠蛋白反应有关。盐胁迫对 LeCNX61.0 蛋白的诱导十分明显(图 5:C),但 LeCNX61.0 蛋白对 PEG 导致的水分胁迫没有明显的反应(图 5:D),猜测 LeCNX61.0 被盐胁迫诱导可能起源于离子毒害。

内质网中的 Ca^{2+} 缺乏会导致错误折叠蛋白的积累,使内质网产生 UPR 反应,即导致内质网中分子伴侣的表达水平上升^[14]。作者用 EGTA 处理番茄幼苗时,在 2 mm 长的根尖组织中,LeCNX61.0 蛋白的表达强度随 EGTA 浓度升高而上升(图 6:B),这与动物及微生物细胞中 Ca^{2+} 损耗可诱导内质网中分子伴侣表达上升的结果相一致,但对番茄子叶和自根尖 2 mm 长后的幼根而言,LeCNX61.0 蛋白含量不受 EGTA 处理的影响(图 6:C,D),此现象可能是在 2 mm 长的根尖组织中,细胞中没有液泡或液泡较小,此时的细胞中内质网是主要的 Ca^{2+} 库(类似与不含液泡的动物细胞),随着细胞的成熟,液泡逐渐成为植物细胞重要的 Ca^{2+} 库,中央大液泡可能会阻止细胞中产生 Ca^{2+} 的吸收和释放而形成的 Ca^{2+} 波动^[15],维持细胞内 Ca^{2+} 的稳态平衡。

综上所述, *Lcnenx61.0* 基因胁迫诱导模式的多样性,推测 LeCNX61.0 蛋白可能在植物抵抗特定的环境胁迫过程中发挥作用,但 LeCNX61.0 在逆境胁迫中的具体功能还不清楚,这有待于通过过量表达、反义表达或突变等方式进行进一步研究。

参考文献:

- [1] Ellgaard L, Frickel E M. Calnexin, Calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2003, **39**: 223–247.
- [2] Bergeron J J, Brenner M B, Thomas D Y, Williams D B. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1994, **19**: 124–128.
- [3] Popov M, Reithmeier R A. Calnexin interaction with N-Glycosylation mutants of a polytopic membrane glycoprotein, the human erythrocyte anion exchanger [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (25): 17 635–17 642.
- [4] Roderick H L, Lechleiter J D, Camacho P. Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca^{2+} oscillations via an interaction with SERCA2b [J]. *J Cell Biol*, 2000, **149**: 1 235–1 248.
- [5] Joseph S K, Boehning D, Bokkala S, Watkins R, Widjaja J. Biosynthesis of inositol triphosphate receptors: selective association with the molecular chaperone calnexin [J]. *Biochem J*, 1999, **342**: 153–161.
- [6] Jannatipour M, Rokeach L A. The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 4 845–4 853.
- [7] Koizumi N, Martinez l M, Kimata Y, Kohno K, Sano H, Chrispeels M J. Molecular characterization of two *Arabidopsis* Irel homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases [J]. *Plant Physiol*, 2001, **127**: 949–962.
- [8] Liu J, Shono M. Molecular cloning of mitochondria and endoplasmic reticulum localized small heat shock protein from tomato [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, **2**: 138–145.
- [9] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Dellaporta S, Wood J, Hicks J B. A plant DNA minipreparation: Version II [J]. *Plant Mol Biol*, 1983, Rep1(4):19.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.
- [12] Leach M R, Cohen-Doyle M F, Thomas D Y, Williams D B. Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and Calreticulin [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 29 686–29 697.
- [13] Martinez l M, Chrispeels M J. Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes [J]. *Plant Cell*, 2003, **15**: 561–576.
- [14] Lodish H F, Kong N, Wikstrom L. Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 12 753–12 760.
- [15] Malhó R, Moutinho A, Luit A V. Spatial characteristics of calcium signalling: the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signaling [J]. *Phil Trans R Soc Lond*, 1998, **353**: 1 463–1 473.