

## 番茄 *Lehsp23.8* 启动子的热诱导表达调控序列鉴定

伊淑莹<sup>1</sup>, 翟静<sup>1</sup>, 徐华<sup>2</sup>, 张媛英<sup>1</sup>

1 泰山医学院 基础医学部, 泰安 271000

2 泰安市中心医院高压氧科, 泰安 271000

**摘要:** 番茄线粒体小分子热激蛋白 (*Lehsp23.8*) 启动子是典型的热诱导启动子。为了研究热激条件下该启动子的调控序列, 本研究将不同长度的 *Lehsp23.8* 启动子序列与 *gus* 基因融合, 构建 5' 缺失植物表达载体。然后用农杆菌介导法转化烟草, PCR 及 Southern blotting 结果表明融合基因已经整合到烟草基因组中。GUS 组织化学染色结果表明: 不同长度 *Lehsp23.8* 启动子转基因植株热激处理后, 在幼苗根、茎、叶以及花和果实中均表现出 GUS 活性, 只是染色强弱有差异。叶片中 GUS 荧光活性测定结果表明: 在热激处理条件下, 565 bp 的 *Lehsp23.8* 启动子介导的 GUS 表达最强; 而 255 bp 的 *Lehsp23.8* 启动子介导的 GUS 表达最弱。说明 *Lehsp23.8* 启动子中 255 bp 的序列即能满足该启动子的热激表达, -565 bp~-255 bp 之间存在明显的增强子元件, 而-871 bp~-565 bp 之间的片段具有一定的抑制作用。

**关键词:** 番茄, 线粒体小分子热激蛋白, 启动子, 缺失, GUS

## Identification of the regulation elements in heat-inducible *Lehsp23.8* promoter

Shuying Yi<sup>1</sup>, Jing Zhai<sup>1</sup>, Hua Xu<sup>2</sup>, and Yuanying Zhang<sup>1</sup>

1 Department of Biochemistry, Taishan Medical College, Tai'an 271000, China

2 Department of Hyperbaric Oxygen, Tai'an Central Hospital, Tai'an 271000, China

**Abstract:** The promoter of mitochondria-localized small heat shock protein gene in *Lycopersicon esculentum* (*Lehsp23.8*) is characterized as strongly heat-inducible. In this study, to determine how the expression of *Lehsp23.8* is regulated, we conducted five expression vectors carrying the *gus* gene driven by the 5' deletion products of the *Lehsp23.8* promoter. The corresponding transgenic tobacco plants were generated via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Transgenic plants were identified by PCR and Southern blotting analysis. GUS activities under heat-shock conditions were characterized in transgenic tobacco plants. After heat shock, obvious GUS staining was detected in the leaves, shoots, roots, flowers and fruits of the transgenic tobacco plants. The result of fluorometric GUS assays in leaves showed that the heat-induced GUS activity of the 565 bp promoter was the strongest, while that of the 255 bp promoter was the lowest. Deletion analysis shows that the smallest promoter fragment (-255 bp to -23 bp) is sufficient for heat induction. It also indicates that the sequences between -255 bp and -565 bp serve as enhancers, while the sequences between -565 bp and -871 bp can repress the heat-induced activity of the *Lehsp23.8* promoter.

**Keywords:** tomato, mitochondria-localized *shsp*, promoter, deletion, GUS

生物体作为对环境胁迫的响应会迅速合成一些新的蛋白, 在高于正常生长温度 5°C 以上的热激条

Received: December 7, 2008; Accepted: March 27, 2009

Corresponding author: Shuying Yi. Tel: +86-538-6222050; E-mail: shuyingyi@yahoo.com.cn

件下, 生物体大部分正常蛋白质的合成和 mRNA 的转录被抑制, 同时迅速合成一些新的蛋白质称为热激蛋白(Heat shock protein, Hsp)<sup>[1]</sup>。

热激蛋白基因表达调控包括选择性转录和选择性翻译, 其中转录水平的调控是热激蛋白基因表达调控的主要方式<sup>[2]</sup>。在 *hsp* 基因转录中起调控作用的 DNA 序列, 称之为热激元件(Heat shock element, HSE), 真核生物 HSE 共有序列为 5'nGAAAn3'<sup>[3]</sup>, 植物中最适的 HSE 共有序列为 5'aGAAg3'。HSE 包括 TATA 盒近端 HSE 和 TATA 盒远端的 HSE。TATA 盒上游约 20 bp 处常存在 2 个部分重叠的 HSE。研究表明, 在远上游的不同位置也可能存在 HSE, 但远上游 HSE 的作用似乎较小<sup>[4]</sup>。

热激转录因子(Heat shock factor, HSF)本质上是具有转录调节活性的蛋白质, 在许多诱导条件下, 如高温、氧化胁迫、重金属、细菌感染等, HSF 获得 HSE 结合活性, 并介导热激蛋白基因的转录, 从而导致 Hsp 的积累<sup>[5,6]</sup>。HSF 活性的调节是热激基因表达转录调节的中心机制<sup>[4]</sup>。热激以前, HSF 处于钝化的单体状态; 热激时, HSF 发生从单体到三体的转变。HSF 的三体形式对 HSE 有高度的亲和性, 可结合到 HSE 上, 激活热激基因的转录<sup>[1,3]</sup>。

番茄线粒体小分子热激蛋白(LeHsp23.8)由核基因编码, 定位于线粒体基质中, 该基因是典型的热诱导基因<sup>[7]</sup>。目前已经分离了 *Lehsp23.8* 启动子, 研究表明 *Lehsp23.8* 启动子是热诱导强启动子, 在基因工程中具有广泛的应用前景<sup>[8]</sup>。为了进一步研究该启动子中不同序列在热激胁迫中所起的作用, 本试验对该启动子进行了 5'缺失突变分析。本研究构建了 5 个 *Lehsp23.8* 启动子的 5'-缺失表达载体, 并得到了转基因烟草株系, 通过检测报告基因 *gus* 的表达来检测各个启动子片段的热诱导活性, 从而对 *Lehsp23.8* 启动子的热诱导表达调控序列进行分析。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料

烟草 K<sub>326</sub>(*Nicotiana tabacum* L. c.v. K<sub>326</sub>)为本实验室保存。

#### 1.1.2 菌株和质粒

本研究所用的大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株为

XL1-Blue, 农杆菌菌株为 LBA4404。所用真核表达载体为 pBI101、pBI121, 均为本实验室保存。

#### 1.1.3 酶和生化试剂

DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶及其他工具酶、DNA Marker(DL 2000)、DNA 回收试剂盒等均购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); dNTP、X-Gluc、4-MU、4-MUG 等, 购自上海生工生物工程有限公司。

#### 1.1.4 PCR 扩增引物序列

本实验所需引物由上海生工生物工程有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 PCR 扩增引物序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Primers	Primer sequences (5'-3')
M4	AGAGGATCCAATAACTTGCCGATTGAG
T3Sal	ATTGTCGACAATTAACCTCACTAAAGGG
TMP/F1	CTAGTCGACATCATCTAGTTACTCTGG
TMP/F2	ATCGTCGACCCTTTTTGTAGGAAGCTTG
TMP/F3	TAAAGTCGACGTTTCTCGTGTGGATCG
TMP/F4	TAAAGTCGACAAACCCAGAAGCGTTATG
GUS/F	TCGATAACGTGCTGATGGTGC
GUS/R	ACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 不同长度 *Lehsp23.8* 启动子与 *gus* 融合植物表达载体的构建

以所克隆的 *Lehsp23.8* 启动子所在的质粒 TMP 为模板, 以引物 T3sal 和 M4、TMP/F1 和 M4、TMP/F2 和 M4、TMP/F3 和 M4、TMP/F4 和 M4 分别扩增启动子区域(-1915~-23 bp; -1327~-23 bp; -871~-23 bp; -565~-23 bp; -255~-23 bp; 以起始密码子 ATG 为起点推算)片段, 扩增产物经 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切后, 连入 pBI101 植物表达载体, 从而构建含不同长度 *Lehsp23.8* 启动子与 *gus* 融合基因的植物表达载体, 分别命名为 pTMP、pF1、pF2、pF3 和 pF4。对获得的阳性克隆进行 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定。

### 1.2.2 农杆菌介导的烟草遗传转化

利用冻融法将构建的植物表达载体转化农杆菌 LBA4404, 叶圆盘法<sup>[9]</sup>转化烟草 K<sub>326</sub>, 获得的转基因

烟草幼苗移至田间培育。同时,将 pBI101 和 pBI121 植物表达载体转烟草作为阴性和阳性对照。

### 1.2.3 转基因烟草的 PCR 及 Southern 杂交分析

对不同的转基因烟草独立转化系 CTAB 法提取叶片基因组 DNA, 使用 GUS/F 和 GUS/R 引物进行 PCR 检测。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55.5°C 退火 60 s, 72°C 延伸 90 s, 35 个循环; 72°C 后延伸 10 min。扩增出 864 bp 特异条带的植株即为阳性株, 可以用于后续的 GUS 酶活测定。

Southern 杂交分析: 取 10 μg 转基因烟草基因组 DNA, 用 *Hind* III 充分酶切后, 于 0.8% 的琼脂糖凝胶、5 V/cm 电压、0.5×TBE 缓冲液中稳压电泳 10~12 h。以引物 GUS/F 和 GUS/R 扩增 *gus* 基因 864 bp 片段, PCR 产物切胶回收后定量, 作为制备探针的模板。用 α-<sup>32</sup>P-dCTP 标记探针, 65°C 杂交过夜(杂交液组成为: 0.5 mol/L 磷酸缓冲液, 7% SDS, 10 mmol/L EDTA, 100 μg/mL 鲑精 DNA), 依次用 65°C 的 4×SSC/0.1% SDS、2×SSC/0.1% SDS 和 1×SSC/0.1% SDS 洗膜, 每次 10~15 min, X 光片曝光。

### 1.2.4 GUS 组织化学染色及荧光活性分析

GUS 组织化学染色方法参照 Jefferson 等<sup>[10]</sup>的方法。转基因烟草的花及果实及生长 25 d 的 T<sub>1</sub> 代幼苗经 39°C 热激处理 3 h 后, 放入盛有 X-gluc 反应液(50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0; 0.5 mmol/L K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]; 0.5 mmol/L K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]·3H<sub>2</sub>O; 10 mmol/L EDTA; 0.1% Triton X-100; 2 mmol/L X-gluc) 离心管中, 抽真空, 37°C 染色 16 h。组织用 70% 乙醇脱色, 然后观察拍照。

GUS 荧光分析参照文献<sup>[10]</sup>。称取 0.1 g 转基因植株的叶片, 加入 400 μL 酶提缓冲液(0.05 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液, 10 mmol/L β-巯基乙醇, 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% Sarcosyl) 在冰浴中磨成匀浆。4°C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清得 GUS 粗酶液。在 1 mL 预热的反应缓冲液(提取液中加入 1 mmol/L 4-MUG)加入 50 μL 上清, 混匀, 于 37°C 下保温 1 h 后取出 100 μL 加入到 900 μL 0.2 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 中终止反应, 用 FL-2500 荧光分光光度计测定 Ex365 nm/Em455 nm 荧光值。蛋白含量测定按 Bradford 方法<sup>[11]</sup>, GUS 活性单位用 pmol 4-MU/min/mg protein 来表示。

## 2 结果与分析

**2.1 不同长度 *Lehsp23.8* 启动子与 *gus* 基因融合**  
使用 *Lehsp23.8* 启动子特异引物, 以该启动子所在的质粒 TMP 为模板, 进行常规 PCR, 扩增得到 5 个不同长度的启动子片段, 分别用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam* H I 酶切, 连入 pBI101 载体, 获得 1915、1327、871、565、255 bp 的 *Lehsp23.8* 启动子与 *gus* 基因融合的植物表达载体(pTMP、pF1、pF2、pF3 和 pF4), 构建策略如图 1A 所示。对获得的阳性克隆进行 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定, 结果均能切下相应大小的片段(图 1B)。

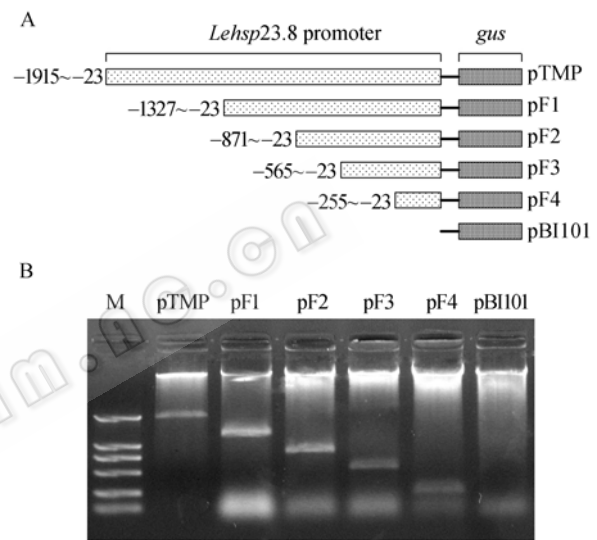


图 1 不同长度 *Lehsp23.8* 启动子与 *gus* 基因融合的示意图 (A) 及载体酶切鉴定 (B)

Fig. 1 Schematic structure of *gus* chimeric genes under the control of various fragments of the *Lehsp23.8* promoter (A) and the identification of the recombinant plasmids (B). M: DNA marker (DL 2000); The vectors pTMP, pF1, pF2, pF3, pF4 and pBI101 (negative control, lane 7) were digested with *Sal* I and *Bam* H I restriction enzymes. The 1915 bp of full-length *Lehsp23.8* promoter (Lane 2), the 1327 bp, the 871 bp, the 565 bp and the 255 bp of deletion products (Lane 3~6) were gained after digested respectively.

### 2.2 含不同长度 *Lehsp23.8* 启动子转基因烟草的获得

用农杆菌介导法转化烟草, 获得了含有不同长度 *Lehsp23.8* 启动子驱动 *gus* 表达(pTMP、pF1、pF2、pF3 和 pF4)的转化植株。每种载体都获得了来自独立转化事件的卡那霉素抗性植株 30 株以上(图 2)。使用 *gus* 基因特异引物对转基因植株进行 PCR 鉴定表明, 绝大部分转化株都能扩增出 864 bp 的特异条

带(图 3), 初步证明外源基因已经整合到烟草基因组中。为了进一步确定外源基因的整合情况, pTMP、pF1、pF2、pF3 和 pF4 五个载体的转基因植株中, 分别随机选择 2 个 PCR 鉴定为阳性的独立转化系提取基因组 DNA, 用 *Hind* III 消化后进行 Southern 杂交, 同时以未转基因植株和 pBI101 转基因植株作为阴性和阳性对照。探针为  $\alpha$ - $^{32}$ P 标记的 *gus* 特异片段。结果表明, 在所检测的转化系中, *gus* 基因已整合到烟草基因组中(图 4), 有的转化系整合了一个拷贝(泳道 2、3、4、9、10 和 12), 有的转化系整合了多个拷贝(泳道 5、6、7、8 和 11)。

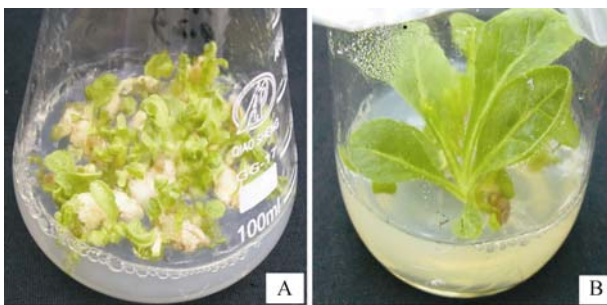


图2 转不同长度启动子::GUS融合基因烟草的抗性芽(A)及生根小苗(B)

Fig. 2 Resistant shoots (A) and seedlings (B) of tobacco plants transformed with the different length promoter fragments::GUS chimeric genes.

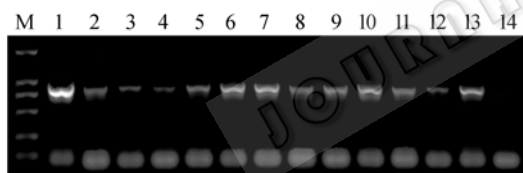


图3 不同长度 *Lehsp23.8* 启动子部分转基因烟草 PCR 鉴定结果

Fig. 3 PCR analysis of partial transgenic tobacco lines containing the different length promoter fragments::GUS chimeric genes. M: DNA marker (DL 2000); 1: pBI101 plasmid; 2-13: independent transformed tobacco plants; 14: untransformed plant.

### 2.3 含不同长度 *Lehsp23.8* 启动子转基因烟草的 GUS 组织化学染色

对 PCR 鉴定为阳性的转化株进一步进行 GUS 组织化学染色, 结果表明初步鉴定为阳性的转化株绝大多数可检测到热诱导的 GUS 表达。GUS 染色结果表明: 26°C 条件下生长的转化株幼苗、花及果实中均没有检测到 GUS 染色(图 5A、B 及 C)。热激处理后, 刚萌发的幼苗(7 d 左右)表现出极弱的 GUS

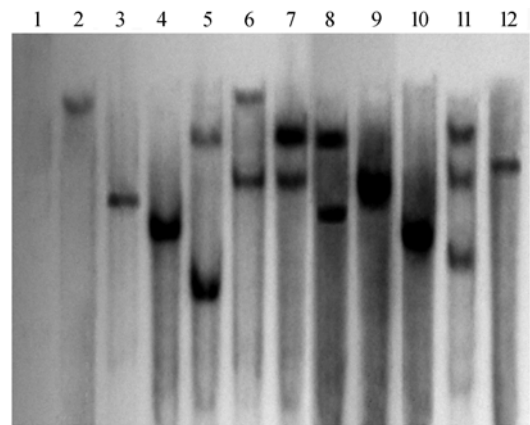


图4 部分烟草转化株系的 Southern 杂交鉴定

Fig. 4 Southern blotting analysis of some of the transgenic tobacco lines. 1: untransformed plant; 2,3: independent transformed tobacco plants of pTMP; 4,5: independent transformed tobacco plants of pF1; 6,7: independent transformed tobacco plants of pF2; 8,9: independent transformed tobacco plants of pF3; 10,11: independent transformed tobacco plants of pF4; 12: pBI101 transformed tobacco plant.

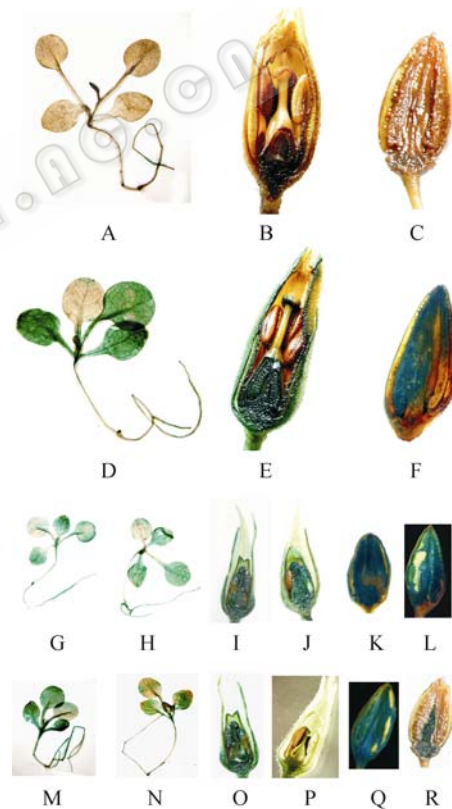


图5 含不同长度启动子转基因烟草幼苗、花和果实中的 GUS 组织化学染色

Fig. 5 Histochemical localization of GUS activity in the seedlings, flowers and fruits of transgenic tobacco lines. (A) Non-treated 25 d old transgenic seedling. (B) Non-treated flower. (C) non-treated fruit. (D, G, H, M, N) Heat-shocked 25 d old transgenic seedling of pTMP, pF1, pF2, pF3 and pF4. (E, I, J, O, P) Heat-shocked flowers of pTMP, pF1, pF2, pF3 and pF4 transgenic plants. (F, K, L, Q, R) Heat-shocked fruits of pTMP, pF1, pF2, pF3 and pF4 transgenic plants.

组织化学染色(结果未显示),而在萌发 25 d 左右的幼苗根、茎、叶中均检测到明显的 GUS 组织化学染色(图 5D、G、H、M 及 N);子房、柱头、花瓣和花萼均表现出热诱导的 GUS 活性(图 5E、I、J、O 及 P),其中子房中表达最强,而在未切开的花柱及花药中未检测到热诱导的 GUS 染色(图 5E),切开后花柱及花药也能够检测到蓝色(图 5I、J、O 及 P);另外,在转基因烟草果实中也检测到明显的热诱导 GUS 表达(图 5F、K、L、Q 及 R)。不同长度启动子转化株系在热胁迫条件下的 GUS 染色模式类似,只是染色强弱有差异,pF4 转基因株系的各个组织部位的染色都明显弱于其他长度启动子转基因株系(图 5N、P 及 R)。

#### 2.4 不同长度 *Lehsp23.8* 启动子对热激反应的转录调节

为了进一步研究 *Lehsp23.8* 启动子不同区段所起的调控作用,对不同长度启动子转化株系在热胁迫条件下的 GUS 荧光活性进行了测定。

从 pTMP、pF1、pF2、pF3 和 pF4 转基因烟草中各选取约 30 个  $T_0$  代独立转化系 39°C 热激处理 3 h,检测叶片中 GUS 酶活性的变化趋势。常温条件下各个转化株系均没有检测到 GUS 活性;在 39°C 热激处理条件下,565 bp 的 *Lehsp23.8* 启动子介导的 GUS 热诱导表达是最强的,略低于 35S 启动子介导的 GUS 表达;1915 bp、1327 bp、871 bp 的 *Lehsp23.8* 启动子介导的 GUS 热诱导表达强度类似,但弱于

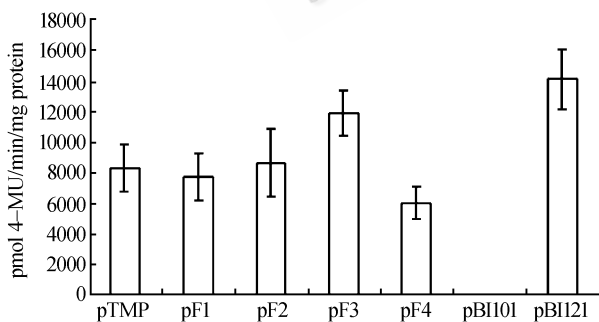


图 6 热胁迫下含不同长度 *Lehsp23.8* 启动子转基因烟草的 GUS 活性变化

Fig. 6 GUS activity in tobacco plants transformed with the different length *Lehsp23.8* promoter responding to heat stress. Transgenic plants (pTMP, pF1, pF2, pF3, pF4, pBI101, pBI121) were subjected to heat treatments. Fluorometric GUS assays of leaves from each plant were performed in triplicate and mean values were calculated for each treatment. Errors bars represent the standard deviations of about 30 independent transgenic tobacco lines.

565 bp 启动子;而 255 bp 的 *Lehsp23.8* 启动子介导的 GUS 热诱导表达最弱;不含启动子片段的 pBI101 转基因植株未检测到 GUS 表达(图 6)。启动子缺失分析表明,*Lehsp23.8* 启动子中 255 bp 的序列即能满足该启动子的热激表达,-565 bp~-255 bp 之间的片段具有明显的增强作用,而-871 bp~-565 bp 之间的片段具有一定的抑制作用。

### 3 讨论

大量研究表明,在许多热激蛋白基因的启动子区域都含有保守的 HSE 元件,这是热激基因热诱导转录所需要的<sup>[3]</sup>。*hsp* 基因表达的调节是由保守的 HSF 介导,在热激条件下,真核生物中存在的 HSF 发生三聚化,可以高亲和力地与 HSE 结合,从而激活热激基因的转录<sup>[1,3]</sup>。GUS 组织化学染色表明,携带 pTMP 载体的转基因烟草的根、茎、叶、花和果中均表现出强烈的热诱导的 GUS 活性(图 5)。*Lehsp23.8* 启动子缺失分析表明,不含启动子片段的 pBI101 转基因植株未检测到 GUS 表达,而 255 bp 启动子片段即可驱动 GUS 热诱导表达(图 6)。说明 *Lehsp23.8* 启动子中 255 bp 的序列即能满足该启动子的热激表达,可能是其中含有的 5 组 HSE(HSE1-5)对该启动子的热诱导活性起关键性作用;1915 bp、1327 bp、871 bp 启动子介导 GUS 热诱导表达强度类似,但弱于 565 bp 启动子,正如文献所述,远上游 HSE 的作用似乎较小<sup>[4]</sup>,*Lehsp23.8* 启动子-871 bp~-1915 bp 之间的 2 组 HSE(HSE6-7)对该启动子的热诱导活性并不起增强作用(图 6)。

565 bp 的 *Lehsp23.8* 启动子介导的 GUS 热诱导表达是最强的,显著高于 255 bp 的启动子,而-565 bp~-255 bp 之间不含热激元件,但发现了大量 AT-rich 区。AT-rich 基序普遍存在于植物各类启动子中<sup>[12]</sup>。研究表明,*GmHsp17.3-B* 基因上游的 AT-rich 区(-81 bp~-306 bp)具有类似增强子的功能<sup>[13]</sup>。豌豆质体蓝素基因 *petE* 启动子 268 bp AT-rich 正调控区可以在两种不同转基因植物的不同组织中作为同源或异源启动子基因表达增强子起作用<sup>[14]</sup>。Hoffmann 等<sup>[15]</sup>在研究豌豆线粒体 *apt9* 启动子时发现,改变 AT-rich 基序的 3 个碱基将导致启动子的活性降低 70%。由此推测 565 bp 的 *Lehsp23.8* 启动子热激表达强度明显高于 255 bp 启动子可能是由于大量

AT-rich 区的作用。许多研究表明, AT-rich 序列是 HMG 蛋白的结合位点, 在许多植物基因中观察到 HMG 蛋白与 AT-rich 元件的类似结合<sup>[12,16]</sup>, 水稻 HMG-I/Y 蛋白结合于燕麦光敏色素 A3 基因启动子的 AT-rich 正调控区, 暗示了 HMG-I/Y 蛋白的转录调节作用<sup>[17]</sup>。Czarnecka 等<sup>[18]</sup>证明核蛋白与大豆 *GmHsp17.5-E* 启动子中分散的 AT-rich 区具有结合活性。这些 AT-rich 区与 HMGs 和 ATBFs 结合, 或许通过与核支架蛋白相互作用而提高转录水平<sup>[19,20]</sup>。本研究中, -565 bp~-255 bp 之间的哪个 AT-rich 元件对于热激条件下 *Lehsp23.8* 的强表达起关键作用, 以及是否是通过 AT-rich 序列与 HMG 蛋白的相互作用来实现的有待于进一步的研究。

## REFERENCES

- [1] Baniwal SK, Bharti K, Chan KY, *et al.* Heat stress response in plants: A complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci*, 2004, **29**(4): 471-487.
- [2] Nover L, Bharti K, Döring P, *et al.* *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chap*, 2001, **6**(3): 177-189.
- [3] Miller G, Mittler R. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann Bot (Lond)*, 2006, **98**: 279-288.
- [4] Li B, Liu HT, Sun DY, *et al.* Signal transduction mechanism of plant heat shock response. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2002, **28**(1): 1-10.  
李冰, 刘宏涛, 孙大业, 等. 植物热激反应的信号转导机理. *植物生理与分子生物学学报*, 2002, **28**(1): 1-10.
- [5] Swindell WR, Huebner M, Weber AP. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 2007, **8**: 125.
- [6] Rizhsky L, Liang H, Shuman J, *et al.* When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol*, 2004, **134**: 1683-1696.
- [7] Liu J, Shono M. Molecular cloning the gene of small heat shock protein in the mitochondria and endoplasmic reticulum of tomato. *Acta Bot Sin*, 2001, **43**(2): 138-145.
- [8] Yi SY, Sun AQ, Sun Y, *et al.* Differential regulation of *Lehsp23.8* in tomato plants: Analysis of a multiple stress-inducible promoter. *Plant Sci*, 2006, **171**(3): 398-407.
- [9] Jin TE, Kim IG, Kim WS, *et al.* Expression of chromium (VI) reductase gene of heavy metal reducing bacteria in tobacco plants. *J Plant Biotechnol*, 2001, **3**: 13-17.
- [10] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, **6**(13): 3901-3907.
- [11] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (7): 248-254.
- [12] Klosterman SJ, Hadwiger LA. Plant HMG proteins bearing the AT-hook motif. *Plant Sci*, 2002, **162**(6): 855-866.
- [13] Baumann G, Raschke E, Bevan M, *et al.* Functional analysis of sequences required for transcriptional activation of a soybean heat shock gene in transgenic tobacco plants. *EMBO J*, 1987, **6**(5): 1161-1166.
- [14] Sandhu JS, Webster CI, Gray JC. A/T-rich sequences act as quantitative enhancers of gene expression in transgenic tobacco and potato plants. *Plant Mol Biol*, 1998, **37**(5): 885-896.
- [15] Hoffmann M, Binder S. Functional importance of nucleotide identities within the pea *atp9* promoter sequence. *J Mol Biol*, 2002, **320**(5): 943-950.
- [16] Launholt D, Merkle T, Houben A, *et al.* *Arabidopsis* chromatin-associated HMGA and HMGB use different nuclear targeting signals and display highly dynamic localization within the nucleus. *Plant Cell*, 2006, **18**(11): 2904-2918.
- [17] Nieto-Sotelo J, Ichida A, Quail PH. PF1: An A-T hook containing DNA binding protein from rice that interacts with a functionally defined d(AT)-rich element in the oat phytochrome A3 gene promoter. *Plant Cell*, 1994, **6**: 287-301.
- [18] Czarnecka E, Ingersoll JC, Gurley WB. AT-rich promoter elements of soybean heat shock gene *GmHsp17.5E* bind two distinct sets of nuclear proteins *in vitro*. *Plant Mol Biol*, 1992, **19**(6): 985-1000.
- [19] Czarnecka-Verner E, Dulce-Barros M, Gurley WB. Regulation of the Heat Shock Gene Expression. In: Stress-induced Gene Expression in Plants, Basra AS Ed. Philadelphia: Harwood Academy Publication, 1994: 131-161.
- [20] Catez F, Yang H, Tracey KJ, *et al.* Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(10): 4321-4328.