

# 柠条锦鸡儿 *CkLEA1* 基因克隆及表达分析\*

杨 杞 尹佳佳 王 颖 王瑞刚 李国靖\*\*

(内蒙古农业大学生命科学院 呼和浩特 010018)

**摘要** 植物受到逆境胁迫后,大量逆境响应基因会被诱导表达,LEA 蛋白编码基因就是与植物抗旱、抗冷等非生物胁迫密切相关的一类基因。从已构建的柠条锦鸡儿干旱胁迫抑制性削减杂交文库中筛选到了一条 LEA 蛋白编码基因并进行了克隆。序列比对与系统进化分析显示该基因属于 *LEA3* 基因家族成员,命名为 *CkLEA1* (GenBank 登录号是 KC309408)。克隆得到该基因 gDNA 长 469bp,包含两个外显子和一个内含子;cDNA 长 357bp,包含 300bp 的开放阅读框,推导编码 99 个氨基酸的蛋白质。利用荧光定量 PCR 技术对 *CkLEA1* 基因在各种逆境胁迫条件的表达情况进行初步研究表明,*CkLEA1* 受干旱、ABA、冷、热、盐和碱等处理不同程度地诱导,推测其与柠条锦鸡儿响应逆境胁迫的机制有关。

**关键词** LEA 基因克隆 表达分析 柠条锦鸡儿

**中图分类号** Q782

植物在生长发育过程中,会不同程度地遭受干旱、冷冻、高温和盐碱等各种各样的非生物胁迫。为了应对这些不利环境,植物会表达一系列功能蛋白保护自身不受伤害,胚胎发育晚期蛋白 (late-embryogenesis-abundant protein, LEA 蛋白) 就是其中重要的一种。LEA 蛋白最早发现存在于棉花胚胎发育后期的子叶,此后在多种植物中都有发现并克隆了相关基因<sup>[1-2]</sup>。LEA 蛋白的分子量较低,大多在 10 ~ 30kDa 之间,一般具有高度亲水性和热稳定性<sup>[3]</sup>。随着对 LEA 蛋白研究的深入,研究者发现 LEA 蛋白参与到植物多种抗逆途径中,与植物对逆境的抵抗密切相关。ABA、干旱、高温、低温和高盐等条件都会诱导 LEA 蛋白编码基因的大量表达<sup>[4-7]</sup>,而且越来越多的转基因植物研究也表明过表达 LEA 蛋白可以提高植物的抗逆性<sup>[8-12]</sup>。LEA 蛋白是一个大的基因家族,并非是单一功能的一种蛋白,加之分类标准的不同,对 LEA 蛋白分类也不尽相同<sup>[2]</sup>。根据氨基酸序列的同源性和一些特殊的基序可将 LEA 蛋白分为 6 个家族<sup>[13]</sup>,很多研究者在此基础上进行了

进一步的分类研究。例如在模式植物拟南芥中,50 个 *LEA* 基因被分为 9 组<sup>[14]</sup>。李乐等<sup>[15]</sup>对豆科作物大豆的研究中,将大豆全基因组 *LEA* 基因家族进行全面分析后,36 个 *LEA* 基因成员被分成 8 个亚族,其中具有 *LEA3* 结构域的成员有 8 个。

柠条锦鸡儿 (*Caragana korshinskii* Kom.) 是生长于我国西北干旱荒漠地区的豆科锦鸡儿属灌木,在造林、饲用和工业等方面具有重要用途<sup>[16]</sup>。由于柠条锦鸡儿具有极强的抗逆性,因此对其抵抗逆分子机制的研究越来越受到重视,一些抗逆相关的基因逐渐被克隆并进行功能研究<sup>[17]</sup>。本研究在前期构建好的柠条锦鸡儿干旱胁迫下抑制性削减杂交文库中找到了一条 LEA 蛋白编码基因序列并进行表达研究,初步证明了该基因响应多种逆境胁迫,表明其可能参与到柠条锦鸡儿抗非生物胁迫的分子机制中。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及处理方法

柠条锦鸡儿种子采自内蒙古赤峰市,播种于装有蛭石的培养钵中,置于 25℃、16h 光照/8h 黑暗、光照强度 7 000 ~ 8 000 lux 的温室中进行培养。

取一个月苗龄小苗用于实验,选取长势一致的柠

收稿日期:2013-01-31 修回日期:2013-02-17

\* 国家“863”计划 (2011AA100203),教育部新世纪优秀人才支持计划 (ECNT-11-1020),教育部博士学科点基金博导类联合 (20111515110001)资助项目

\*\*通讯作者,电子信箱:liguojing@imau.edu.cn

条锦鸡儿小苗进行 DNA、RNA 的提取和胁迫处理。将培养钵置于 4℃ 和 45℃ 的培养箱中分别对小苗进行冷和高温胁迫处理。小心从蛭石中取出小苗,清水冲洗干净蛭石,尽量避免造成损伤,将小苗摆放于滤纸上进行干旱脱水处理;将小苗根部浸泡于 200mmol/L 的 NaCl 溶液进行盐胁迫处理;浸泡于 100 $\mu$ mol/L ABA 水溶液中进行激素处理;浸泡于 pH = 10 的水溶液 (NaOH 调 pH 值) 进行碱胁迫处理。以上处理时间点均为 0h, 0.5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 每个时间点取三株植物,每种处理重复三次。采集小苗地上部分,液氮速冻, -80℃ 冰箱保存用于 RNA 提取。

### 1.2 柠条锦鸡儿 DNA 的提取、总 RNA 提取及反转录

采用天根基因组提取试剂盒 (DP320) 进行柠条锦鸡儿 DNA 的提取,操作按说明书进行。

采用 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂提取柠条锦鸡儿小苗总 RNA,按说明书操作进行。用微量紫外检测仪 Beckman DU 800 对 RNA 进行浓度测定,1% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。选用电泳条带完整清晰且 260/230 比值 1.9-2.0 的 RNA,采用 RNA PCR kit (AMV ver. 3. 0, TaKaRa, Japan) 进行 cDNA 第一链的合成,按试剂盒说明书进行操作。

### 1.3 CkLEA1 全长 cDNA 和 gDNA 的克隆

根据实验室已构建的柠条锦鸡儿干旱胁迫 SSH 文库中获得的一条 LEA 基因序列,利用软件 Primer5 设计引物如下,下划线部分是酶切位点所在位置,正向 F-CkLEA1 所加酶切位点是 *Ava* I,反向 R-CkLEA1 所加酶切位点是 *Sal* I。

F-CkLEA1:GCCTCGAGTTCAAATCACTAATGGCTCG  
R-CkLEA1:GCGTCGACGTTTAAATAGAATGCAATATTTCTTA

分别以柠条锦鸡儿 gDNA 和 cDNA 为模板,F-CkLEA1 和 R-CkLEA1 为引物,利用高保真酶 PrimeSTAR (TaKaRa 公司) 进行 PCR 扩增。扩增条件:98℃ 预变性 3min,98℃ 变性 15s,58℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,72℃ 补充延伸 10min,35 个循环。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,切胶后用天根胶回收试剂盒 (DP209) 进行回收。胶回收产物连入平末端载体 pEASY-Blunt-T 载体 (全式金公司),转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态,菌落 PCR 及酶切挑选重组子,菌液送测序。

本实验所用引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,测序由华大基因研究中心 (BGI) 完成。

### 1.4 CkLEA1 基因的序列分析

利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 的 Blast 进行序列比对分析,CDD 分析保守区域,用 ORF finder 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析开放阅读框,Splice 分析内含子序列。Clustx 进行序列比对,并利用 Mega5 进行系统进化分析。利用 ExPASy (<http://www.expasy.org/proteomics>) 数据库中的 ProtParam 软件对推导氨基酸序列的分子量、理论等电点、氨基酸残基数等理化性质进行分析,利用 ProtScale 软件进行疏水性分析。大豆、苜蓿和拟南芥基因序列从植物基因组数据库 (<http://www.phytozome.com/>) 获得。

### 1.5 CkLEA1 基因的不同胁迫处理下的表达分析

利用克隆到的柠条锦鸡儿 *CkLEA1* 基因序列及 GenBank 公布的 actin (FJ485727) 序列设计荧光定量引物。

F-CkLEA1-rt:TAATGGCTCGCTCTTTTGCTAAC

R-CkLEA1-rt:ACCCCTTTCTCTTCCCCTGACT

F-ACT-rt:TGACAGGATGAGCAAGGAGA

R-ACT-rt:AAGCCTTCTGCCTCTGGT

使用 SYBR® Green I 荧光染料法,在 LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪上对柠条锦鸡儿幼苗胁迫处理下基因的转录表达水平进行分析。根据 SYBR® Premix Ex Taq™ TaKaRa 试剂盒说明书配制反应体系,每个反应三次重复。反应体系中含有 10 $\mu$ l SYBR® Premix Ex Taq™,引物各 1 $\mu$ l (5 $\mu$ mol/L),稀释的 cDNA 模板 5 $\mu$ l,灭菌水 3 $\mu$ l,总体积 20 $\mu$ l。反应程序为 95℃ 预变性 30s,95℃ 变性 5s,60℃ 退火 15s,72℃ 延伸 30s,40 个循环。反应结束后做溶解曲线分析。柠条锦鸡儿 actin 作为内参基因, $\Delta\Delta$ Ct 法分析数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 CkLEA1 基因克隆

分析显示干旱 SSH 文库中获得的 LEA 基因序列包括完整的开放阅读框和部分的 UTR 序列,因此设计引物对该基因序列的正确性进行克隆验证。利用引物 F-CkLEA1 和 R-CkLEA1,分别以柠条锦鸡儿 gDNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,电泳结果如图 1 所示。测序结果显示,去掉所加的酶切位点和保护碱基后,得到的基因 gDNA 序列长度为 469bp,cDNA 序列长度为 357bp,如图 2 所示,图中下划线部分是引物所在位置。

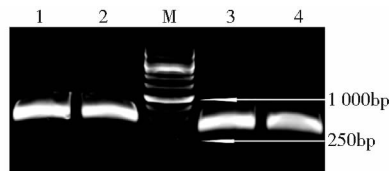


图1 *CkLEA1* 基因 gDNA 和 cDNA 序列 PCR 扩增结果

Fig.1 Gel electrophoresis of *CkLEA1* gDNA and cDNA PCR products

1、2:gDNA ;3、4:cDNA ;M :1kb DNA Ladder

2.2 *CkLEA1* 基因序列分析

克隆得到的柠条锦鸡儿 *LEA* 基因 cDNA 序列包括 300bp 的完整编码框,起始密码子 ATG,终止密码子 TAA,编码含 99 个氨基酸的蛋白质,如图 2 所示。将推导的氨基酸序列在NCBI进行Blast比对,结果显示该

蛋白具有 *LEA3* 蛋白家族成员共有的结构域,与沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus*) *LEA* 蛋白 (AAW31666.1)、花生 (*Arachis hypogaea*) *LEA* 蛋白 (ACF74336.1) 和烟草 (*Camellia sinensis*) *LEA5* 蛋白 (AAC06242.1) 氨基酸序列相似度分别达到 79%,63% 和 54%。这表明我们克隆到的基因属于柠条锦鸡儿 *LEA* 蛋白编码基因,命名为 *CkLEA1* 并提交到 GeneBank 数据库,登录号 KC309408。

*CkLEA1* 基因 gDNA 序列全长 469bp,除去内含子部分其余序列与 cDNA 序列完全一致。利用 NCBI 的 Splign 在线分析 *CkLEA* 基因的 gDNA 和 cDNA 序列,发现该基因含有两个长度分别为 74bp 和 226bp 的外显子,一个长度为 112bp 的内含子,如图 2 所示。内含子的 5'端碱基为 GT,3'端碱基为 AG,符合真核生物内含子的剪切规律。

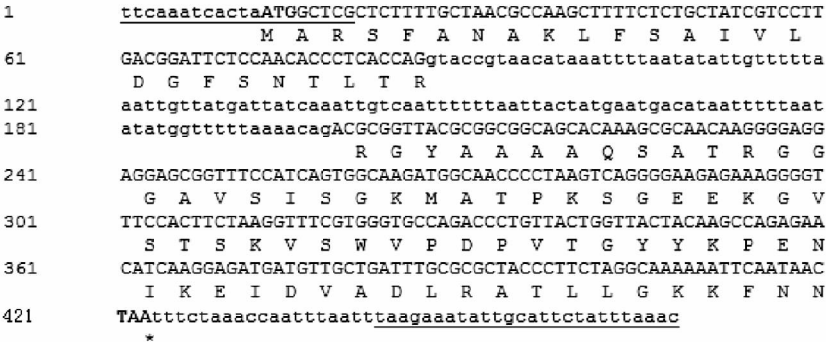


图2 *CkLEA1* 基因的 cDNA、gDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 cDNA and gDNA sequences and deduced amino acid sequence of *CkLEA1*

The bold letters shows ATG and TAA, the underline letters shows the primers, the capital letters shows the coding regions, the lowercase letters shows the non-coding regions

2.3 生物信息学分析

用 ExPASy 数据库的 ProtParam 程序进行预测,结果显示 *CkLEA1* 编码的蛋白分子量为 10.44kDa,等电点 9.85。二级结构预测发现,该蛋白二级结构的构成比例是  $\alpha$ -螺旋占 32.32%、 $\beta$ -折叠占 21.21%、无规则卷曲占 46.46%。

用 ProtScale 程序对 *CkLEA1* 编码的多肽链进行亲水性分析发现,位于第 12 位的丝氨酸 (Ser) 具有最高分值 2,疏水性最强;位于第 54 位的甘氨酸 (Gly) 具有最低分值 -2.078,亲水性最强。而整个多肽链中亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,预示着该蛋白整体上是亲水的,这与前人报道的 *LEA* 蛋白大多具有亲水性是一致的。

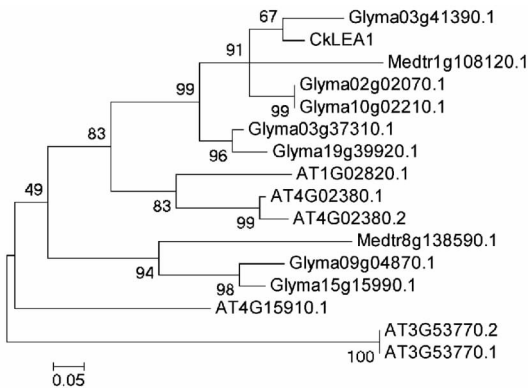


图3 *CkLEA1* 与其它植物 *LEA* 的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of *CkLEA1* and other known LEAs

CkLEA1 属于 LEA3 家族成员,而同属豆科的大豆 (*Glycine max*) 和模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 LEA3 家族成员的研究已经有一些报道,因此对 CkLEA1 与其它植物中已知的 LEA3 家族成员进行系统进化分析如图 3 所示。

从 Phytozome 数据库中找到 8 个大豆 LEA3 基因家族成员的氨基酸序列,这些基因分别是 *Glyma02g02070.1*, *Glyma03g37310.1*, *Glyma03g41390.1*, *Glyma09g04870.1*, *Glyma10g02210.1*, *Glyma15g15990.1*, *Glyma17g03040.1* 和 *Glyma19g39920.1*<sup>[14]</sup>。通过 Blast 找到与 CkLEA1 同源性最高的 2 个苜蓿 (*Medicago sativa*) LEA 基因与 5 个拟南芥中 LEA3 基因家族成员,分别是 *Medtr1g108120.1*, *Medtr8g138590.1*, *At1G02820.1*, *At4G02380.1*, *At4G02380.2*, *At4G15910.1* 和 *At3G53770.2*<sup>[13]</sup>。利用 MEGA5 构建系统进化树,如图 3 所示,CkLEA1 与 *Glyma03g41390.1* 被聚类在一起,序列

比对结果显示二者蛋白序列相似度 76.9%。此外, *Medtr1g108120.1*, *Glyma10g02210.1*, *Glyma02g02070.1* 与它们聚类在同一支上,与 CkLEA1 的蛋白序列相似度分别是 52.9%, 73.7% 和 72.7%。这些基因在数据库中的注释显示它们都与植物响应逆境胁迫有关,但是具体的生物学功能仍不明确。拟南芥中 LEA3 基因有着相对较多的研究,例如与 CkLEA1 同在一个大分枝上的 *At1g02820.1* 是受到非生物胁迫诱导的, *At4g02380* 和 *At4g15910* 是组成型表达的, *At3g53770* 则是在种子内表达的<sup>[18]</sup>,这表明可能并非所有的 LEA3 家族成员都参与植物抵抗非生物胁迫的过程,而是有着不完全一致的功能。

## 2.4 表达分析

利用荧光定量 PCR 技术对 CkLEA1 基因在不同胁迫下的表达进行分析,结果显示 CkLEA1 在各种胁迫条件下都有不同程度的诱导表达,如图 4 所示。

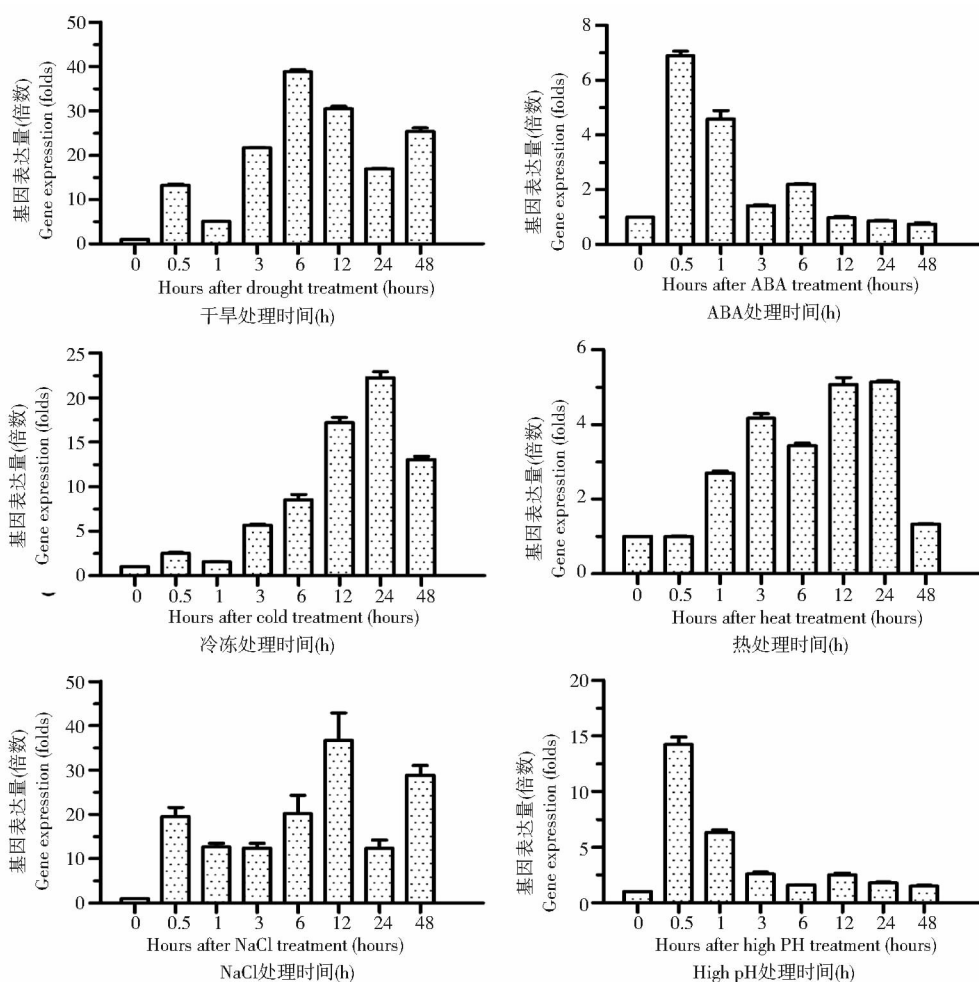


图 4 qRT-PCR 检测各种胁迫下 CkLEA1 基因的表达

Fig. 4 The expression of CkLEA1 under different stresses by qRT-PCR

由图中可以看出, 干旱处理 0.5h *CkLEA1* 的表达水平就明显上升, 到 6h 达到未处理时的 40 倍左右, 并且一直到 48h 仍保持高水平的表达。ABA 处理后, *CkLEA1* 在 0.5h 达到最高表达水平, 此后逐渐下降, 12h 恢复到了未处理时的水平。4℃ 的冷处理下, *CkLEA1* 基因表达量随着时间逐渐升高并在 24h 达到最高表达水平。45℃ 热处理时, *CkLEA1* 表达略有上升, 从 1h 起表达量持续保持高于未处理时表达量 3~5 倍的水平。NaCl 处理后, *CkLEA1* 的表达同样被迅速诱导, 0.5h 就已经是未处理时的 20 倍, 并且一直到 48h 时都保持着高水平的表达。而在碱性条件下, *CkLEA1* 在 0.5h 达到最高表达水平后就迅速下调, 3h 后基本回落到未处理时的表达量。这些结果显示 *CkLEA1* 在与拟南芥的 *Atlg02820.1* 一样, 在干旱等非生物胁迫下被强烈诱导, 可能参与了柠条锦鸡儿抵抗非生物胁迫的分子机制。

### 3 讨 论

漫长的进化过程中, 柠条锦鸡儿适应了干旱、极端温度、高盐碱和贫瘠等各种不利的生长环境, 具有很强的抗逆性。生理、形态及解剖结构的研究表明柠条锦鸡儿高度适应不良环境<sup>[19-20]</sup>。从柠条锦鸡儿中克隆参与抗逆的相关基因并进行功能分析, 有利于帮助我们从小分子机制上进一步了解其抗逆机理。本研究克隆了柠条锦鸡儿的一个 LEA 蛋白编码基因, Blast 结果和系统进化分析显示该基因属于 *LEA3* 基因家族成员, 命名为 *CkLEA1*。大豆中 8 个 *LEA3* 家族成员结构简单, 只含有 1 个 LEA 结构域, 分子量分布范围是 9.77~12.28kDa, 等电点范围是 9.7~10.41<sup>[14]</sup>。我们克隆到的 *CkLEA1* 这些特点与大豆 *LEA3* 家族成员基本一致, 分子量为 10.44kDa, 等电点 9.85。通过对 *CkLEA1* 基因的 gDNA 和 cDNA 序列分析发现该基因具有两个外显子, 一个内含子, 而李乐等对大豆 8 个 *LEA3* 基因的研究显示其中 7 个基因同样具有一个内含子, 仅一个不含内含子<sup>[14]</sup>。这些结果说明在豆科植物中, *LEA3* 家族的基因结构相对保守, 不同家族成员之间并没有太大变化, 而拟南芥中 *LEA3* 基因结构之间差别比较大<sup>[14]</sup>。LEA 蛋白的亲水性往往在对植物的保护中起着重要作用<sup>[3]</sup>, 对 *CkLEA1* 疏水性的预测表明该蛋白中亲水性的氨基酸残基远多于疏水性残基, 整体上属于亲水蛋白, 同样符合了这一规律, 这种亲水性可以降低植物细胞受到渗透胁迫时带来的危害, 从而使植物抗逆性增强。

很多研究都表明 LEA 蛋白与植物的抗逆性相关, 但 LEA 蛋白种类繁多、结构各异, 因此研究者对 LEA 蛋白的具体生物学功能并不十分了解。虽然 LEA 蛋白的抗旱机制还不清楚, 但大量实验已经证明 LEA 蛋白与植物抗旱能力相关<sup>[21]</sup>。转基因植物中表达来自于大麦、小麦、雪山离子芥和大豆等的 LEA 基因, 都会不同程度的提高植物抗旱、抗盐或抗寒的能力<sup>[12, 18]</sup>。*CkLEA1* 基因是从干旱胁迫下的 SSH 文库中筛选出来的, 因此推测其可能与柠条锦鸡儿渗透胁迫下的抗逆机制有关, 特别是与植物抗旱性密切相关。为了验证这一设想, 通过荧光定量 PCR 技术检测了 *CkLEA1* 在干旱等不同逆境胁迫下的表达情况。结果显示 *CkLEA1* 在各种逆境胁迫下都被不同程度地诱导, 其中干旱、冷冻和高盐对该基因的诱导最为显著, 达到未处理时表达水平的 20~40 倍。这说明 *CkLEA1* 基因在植物对这三种逆境的抵抗可能起着更为主要的作用。因此, *CkLEA1* 基因在农业生物技术中可能存在着一定的应用价值。当然, *CkLEA1* 基因是否能提高植物的抗逆境能力还需要获得转基因过表达材料才能进一步验证, 这部分工作目前正在进行中。本文对 *CkLEA1* 基因的克隆和表达模式研究将有助于我们理解该蛋白参与柠条锦鸡儿抵抗逆境的具体机理。

### 参考文献

- [1] Dure III L, Greenway S C, Galau G A. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, 1981, 20 (14): 4162-4168.
- [2] 李剑, 赵常玉, 张富生, 等. LEA 蛋白与植物抗逆性. *植物生理学报*, 2011, 46(11): 1101-1108.  
Li J, Zhao C Y, Zhang F S H, et al. LEA protein and plant stress tolerance. *Plant Physiology Communications*, 2011, 46 (11): 1101-1108.
- [3] Dure III L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal*, 1993, 3(3): 363-369.
- [4] Ried J L, Walker-Simmons M. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant physiology*, 1993, 102 (1): 125-131.
- [5] Dalal M, Tayal D, Chinnusamy V, et al. Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *Journal of biotechnology*, 2009, 139 (2): 137-145.

- [ 6 ] 刘金仙, 阙友雄, 郭晋隆, 等. 甘蔗胚胎晚期丰富蛋白基因 cDNA 全长克隆及表达特性. 农业生物技术学报, 2009, 17(5): 836-842.
- Liu J X, Que Y X, Guo J L, et al. Molecular cloning of *Sugarcane* late-embryogenesis-abundant protein gene (LEA) and its expression character. Journal of Agricultural Biotechnology, 2009, 17(5): 836-842.
- [ 7 ] Gal T Z, Glazer I, Koltai H. An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. FEBS letters, 2004, 577(1): 21-26.
- [ 8 ] Zhao X, Zhan L P, Zou X Z. Improvement of cold tolerance of the half-high bush *Northland blueberry* by transformation with the LEA gene from *Tamarix androssowii*. Plant Growth Regulation, 2011, 63(1): 13-22.
- [ 9 ] 裴金玲, 杨红兰, 李春平, 等. 转晚期胚胎发生丰富蛋白 (LEA) 基因棉花及抗旱性分析. 分子植物育种, 2012, 10(3): 331-337.
- Pei J L, Yang H L, Li C H P, et al. Transgenic cotton with late embryogenesis abundant protein (LEA) gene and its drought tolerance. Molecular Plant Breeding, 2012, 10(3): 331-337.
- [ 10 ] Wang L, Li X, Chen S, et al. Enhanced drought tolerance in transgenic *Leymus chinensis* plants with constitutively expressed wheat TaLEA 3. Biotechnology letters, 2009, 31(2): 313-319.
- [ 11 ] Xiao B, Huang Y, Tang N, et al. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(1): 35-46.
- [ 12 ] 俞嘉宁, 山仑. LEA 蛋白与植物的抗旱性. 中国生物工程杂志. 2002, 22(2): 10-14.
- Yu J N, Shan L. The relationship of LEA protein to drought tolerance in plants. China Biotechnology, 2002, 22(2): 10-14.
- [ 13 ] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual review of plant biology, 1996, 47(1): 377-403.
- [ 14 ] Bies-Etheve N, Gaubier-Comella P, Debures A, et al. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol, 2008, 67(1-2): 107-124.
- [ 15 ] 李乐, 许红亮, 杨兴露, 等. 大豆 LEA 基因家族全基因组鉴定, 分类和表达. 中国农业科学, 2011, 44(19): 3945-3954.
- Li L, Xu H L, Yang X L, et al. Genome-wide identification, classification and expression analysis of *LEA* gene family in soybean. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(19): 3945-3954.
- [ 16 ] 刘龙会, 古松, 郭亚娇, 等. 柠条锦鸡儿小孢子发生和雄配子体发育. 西北植物学报, 2012, 32(1): 81-84.
- Liu L H, Gu S, Guo Y J, et al. Microsporogenesis and male gametophyte development of *Caragana korshinskii* Kom.. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2012, 32(1): 81-84.
- [ 17 ] Wang X, Chen X, Liu Y, et al. CkDREB gene in *Caragana korshinskii* is involved in the regulation of stress response to multiple abiotic stresses as an AP2/EREBP transcription factor. Molecular biology reports, 2011, 38(4): 2801-2811.
- [ 18 ] 陈雷, 李磊, 李金花, 等. 植物 LEA 蛋白及其功能. 中国农学通报, 2009, 25(24): 143-146.
- Chen L, Li L, Li J H, et al. Plant LEA proteins and their functions. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(24): 143-146.
- [ 19 ] 杨九艳, 杨劼, 杨明博, 等. 五种锦鸡儿属植物渗透调节物质的变化. 内蒙古大学学报 (自然科学版), 2005, 36(6): 677-682.
- Yang J Y, Yang J, Yang M B, et al. Changes of osmotic adjustment solute content of the 5 species in *Caragana Genus*. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis NeiMongol, 2005, 36(6): 677-682.
- [ 20 ] 韩刚, 李少雄, 徐鹏, 等. 6 种灌木叶片解剖结构的抗旱性分析. 西北林学院学报, 2006, 21(4): 43-46.
- Han G, Li S X, Xu P, et al. Analysis of drought resistance on anatomical structure of leave of six species of shrubs. Journal of Northwest Forestry University, 2006, 21(4): 43-46.
- [ 21 ] 刘昀, 刘国宝, 李冉辉, 等. 胚胎晚期富集蛋白与生物的干旱胁迫耐受性. 生物工程学报, 2010, 26(5): 569-575.
- Liu Y, Liu G B, Li R H, et al. Functions of late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerance of organisms. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(5): 569-575.

## Cloning and Expression Analysis of *CkLEA1* Gene in *Caragana korshinskii* Kom

YANG Qi YIN Jia-jia WANG Yin WANG Rui-gang LI Guo-jing

( College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China )

**Abstract** Under stress conditions, a lot of genes responsive to stress will be induced in plants. Late-embryogenesis-abundant proteins (LEA protein) belong to an important protein family related to drought, cold and other abiotic stress. An LEA encoding gene was isolated from the suppression subtractive hybridization (SSH) library of *Caragana korshinskii* Kom. under drought stress. Sequence and phylogenetic analysis indicated that it belongs to the LEA3 gene family, and was named *CkLEA1* ( GenBank accession no. KC309408 ). The full length gDNA of *CkLEA1* was 496bp, contained two exons and one intron. The full length cDNA was 357bp, and the protein deduced from this cDNA comprised 99 amino acids. Real-time quantitative PCR analysis showed the transcript of *CkLEA1* was induced under different stresses, including drought, cold, heat, salt, ABA and high pH. These results indicate that *CkLEA1* might be involved in the stress response of *Caragana korshinskii* Kom.

**Key words** LEA Gene clone Expression analysis *Caragana korshinskii* Kom