

紫花苜蓿叶酸合成关键酶GCHI和ADCS编码基因的克隆及分析

杨宝萍*, 郭欢*, 施颖, 冯文锦, 李婵, 包爱科**

兰州大学草地农业科技学院, 草地农业生态系统国家重点实验室, 兰州730020

摘要: GTP环化水解酶I (GCHI)与氨基脱氧分支酸合酶(ADCS)是植物叶酸合成途径的限速酶, 对叶酸的合成起着至关重要的作用。本研究利用cDNA末端快速扩增技术(RACE)结合逆转录PCR方法, 克隆获得了紫花苜蓿(*Medicago sativa*)的GCHI和ADCS编码基因, 分别命名为*MsGCHI*与*MsADCS*。序列分析结果表明, *MsGCHI*基因全长1 752 bp, 包含1 371 bp的开放阅读框(ORF), 编码456个氨基酸; *MsADCS*基因全长3 324 bp, ORF为2 613 bp, 编码870个氨基酸。经同源比对与进化树分析, *MsGCHI*和*MsADCS*基因编码的氨基酸与蒺藜苜蓿(*M. truncatula*)的MtGCHI和MtADCS氨基酸序列具有最高的同源性, 分别达到98%和96%, 与其他植物的氨基酸序列相似度也均在58%以上。实时定量荧光PCR分析结果表明, *MsGCHI*与*MsADCS*基因在紫花苜蓿的根、茎、叶中均有表达, 但在叶中的表达量都为最高。

关键词: 紫花苜蓿; 叶酸; GCHI; ADCS; 基因克隆

叶酸(folate)又称为维生素B₉, 是四氢叶酸及其衍生物的统称, 在生命活动中起着必不可少的作用。作为一碳单位的供体, 叶酸参与生物体内核苷酸、氨基酸、泛酸等重要物质的生物合成, 同时亦参与氨基酸代谢、甲硫氨酸循环等过程(张晓燕等2015; Desai等2016)。与植物和微生物不同, 人类(*Homo sapiens*)和其他哺乳动物自身不能合成叶酸, 需要从食物中摄取(Blancquaert等2013a, 2014)。已有研究表明, 在断奶仔猪(*Sus scrofa domestica*)饲料中添加叶酸可提高其生产性能和免疫机能, 并能增进其抗病毒能力, 提高饲料效率(高庆2011); 补充适量叶酸和维生素B₁₂亦可提高泌乳早期牛奶中乳糖和粗蛋白质含量, 增加产奶量(Preynat等2009)。

水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)等主要粮食作物中叶酸含量很低(Bekaert等2008; Blancquaert等2010)。相对而言, 大多畜禽饲料中虽含有较多的叶酸, 但随着畜牧业养殖集约化程度的提高以及畜禽饲养方式的改变, 饲料中所含叶酸已不能满足畜禽生产的需要(李树新和潘福星2010)。尽管可以通过人工合成叶酸及饲料添加剂等来改善叶酸摄入不足的问题, 但仍存在成本较高以及可能引起副作用等问题(Hubner等2007; Smith等2008)。因此, 若能通过生物强化提高作物或牧草中的叶酸含量, 将有望显著改善饲料的营养品质。目前, 叶酸的生物强化主要是通过过量表达叶酸生物合成中的某种或多种关键酶, 从而显著提高转基因植物中的叶酸合成效率(汪冉冉2013)。这方面的研究已在拟南芥

(*Arabidopsis thaliana*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、水稻、玉米等多种植物中实现(Hossain等2004; Storozhenko等2007; Naqvi等2009; Nunes等2009; Blancquaert等2015; Rivera等2016)。

叶酸分子由蝶呤、对氨基苯甲酸(*para*-aminobenzoic acid, pABA)以及谷氨酸三部分组成。植物中叶酸的合成涉及3个不同的亚细胞结构: 蝶呤分支在细胞质中进行, pABA分支在叶绿体中进行, 二者最终在线粒体中合成叶酸(Hanson和Gregory 2011; Dong等2014)。研究表明, GTP环化水解酶I (GTP cyclohydrolase I, GCHI)和氨基脱氧分支酸合酶(aminodeoxychorismate synthase, ADCS)分别是蝶呤分支和pABA分支的限速酶, 对叶酸的生物合成起着至关重要的作用(de la Garza等2007; 阚静等2009)。目前, GCHI的编码基因已在细菌、酵母等微生物(Katzenmeier等1990; He等2004)及大豆(*Glycine max*) (张春义等2013)等植物中被克隆, ADCS编码基因虽已在GenBank注册有诸多登记号, 但对于牧草中该基因的克隆至今未见相应文献。已有研究表明, 与野生型相比, 过量表达ADCS和GCHI的两种转基因番茄杂交所得的双基因共表达后代中叶酸含量比野生型提高了25倍(de la Garza等2007); 将拟南芥*AtGCHI*和*AtADCS*基因在

收稿 2017-03-16 修定 2017-05-05

资助 国家自然科学基金(31670405和31372360)和兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2016-4)。

* 并列第一作者。

** 通讯作者(E-mail: baoaik@lzu.edu.cn)。

水稻中共表达, 转基因株系的叶酸含量甚至比野生型提高了100倍(Storozhenko等2007), 是正常人群每日推荐摄入量的4倍之多(Hanson和Gregory 2011)。这说明通过在转基因植株中共表达GCHI和ADCS基因以实现叶酸生物合成途径的强化具有巨大的潜能。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)为多年生豆科植物, 是世界上分布最广、经济价值最高的重要牧草之一, 因其茎叶中富含粗蛋白、维生素、矿物质、多种氨基酸等, 营养价值高, 被誉为“牧草之王”(Bao等2016)。尤为重要的是, 紫花苜蓿的叶酸含量较多数牧草更为丰富(江栋材等2014; Saini等2016), 是研究植物中叶酸合成途径的理想材料。但关于紫花苜蓿中叶酸合成关键酶基因的克隆与分析尚未见报道。

因此, 本研究采用cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术, 结合PCR扩增技术, 对紫花苜蓿GCHI和ADCS编码基因进行克隆, 并分析其表达的组织特异性, 以期通过基因工程手段进一步提高紫花苜蓿等优良牧草及饲料作物的叶酸含量提供参考。

材料与方法

1 实验材料

本实验所用紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)品种为‘新疆大叶’。从孕蕾期植株上剪取长约10 cm的插条, 插入预先准备好的装有蛭石的塑料穴盘(5 cm×5 cm×5 cm)中, 每隔一天用1/2Hoagland营养液浇灌一次。1/2Hoagland营养液包括2 mmol·L⁻¹ KNO₃、0.5 mmol·L⁻¹ NH₄H₂PO₄、0.25 mmol·L⁻¹ MgSO₄、0.1 mmol·L⁻¹ Ca(NO₃)₂、0.5 mmol·L⁻¹ FeC₆H₅O₇、92 μmol·L⁻¹ H₃BO₃、18 μmol·L⁻¹ MnCl₂、1.6 μmol·L⁻¹ ZnSO₄、0.6 μmol·L⁻¹ CuSO₄、0.7 μmol·L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄。培养室昼温为(25±2)°C, 夜温为(23±2)°C, 光照时间为16 h·d⁻¹, 空气相对湿度约为70%, 光照强度约为800 μmol·m⁻²·s⁻¹。

本研究所用RNAPrep Pure Plant Kit试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, UNIQ-10柱式TRIzol总RNA抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司, Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase购自NEB(北京), rTaq DNA Polymerase、Pri-

meScript[™] 1st Strand cDNA合成试剂盒、pMD19-T载体及DNA Marker、PrimeScript[™] RT Master Mix (Perfect Real Time)反转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II荧光染料均购自宝生物工程(大连)有限公司, SMARTer[™] RACE cDNA Kit试剂盒购自美国Clontech公司, 菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α感受态细胞购自北京全式金生物(TransGen Biotech), StarPrep Gel Extraction Kit购自GenStar康润生物, 其他常规和生化试剂均为国产分析纯或进口产品。样品测序由苏州金唯智生物科技有限公司(GENEWIZ)完成。

2 *MsGCHI*与*MsADCS*基因全长cDNA的克隆

2.1 总RNA提取

剪取3周龄紫花苜蓿扦插苗的最上层幼嫩叶片, 用蒸馏水将其表面冲洗干净, 用滤纸吸干表面水分后立即装入1.5 mL RNA-free离心管中, 于液氮中速冻, 然后用研磨杵快速将组织磨至粉末状, 根据天根公司RNAPrep Pure Plant Kit试剂盒与生工的TRIzol试剂盒操作说明提取RNA, 并利用NanoDrop 1000核酸蛋白检测仪检测其浓度, 浓度大于300 ng·μL⁻¹并经凝胶电泳检测其完整性后即可用于后续实验。

2.2 *MsGCHI*与*MsADCS*基因核心片段克隆

按照PrimeScript[™] 1st Strand cDNA合成试剂盒操作说明反转录得到cDNA第一链。

利用DNAMAN 6.0软件, 根据大豆、绿豆(*Vigna radiata*)、蒺藜苜蓿(*M. truncatula*)等植物GCHI基因的保守氨基酸序列设计一对简并引物P1和P2(表1), 预测其产物长度为795 bp; 同样, 由大豆、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)、蔓花生(*Arachis duranensis*)等植物ADCS基因的保守氨基酸序列设计一对简并引物P3和P4(表1), 产物长度预计为680 bp。

*MsGCHI*基因利用rTaq DNA Polymerase建立20 μL扩增体系, PCR循环条件为: 94°C预变性2 min; 94°C变性30 s, 55°C退火50 s, 72°C延伸51 s, 30个循环; 72°C延伸10 min。*MsADCS*基因利用Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase建立20 μL扩增体系, PCR循环条件为: 98°C预变性30 s; 98°C变性10 s, 56°C退火30 s, 72°C延伸22 s, 30个循环; 72°C延伸10 min。

扩增产物均用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并按照StarPrep Gel Extraction Kit操作说明进行目

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')
P1	GRCTTCAAGAGCCTCARCGT
P2	CAWGTGTGACTWGCCTCWACA
P3	GCACGCTTYTCRTTYATGGG
P4	GGTGCYGGATTCTTTCTCT
P5	AGAACACCAGCTCATGTCAGA
P6	TTCGAAAACCCAGAACCAG
P7	AGCTTCTCCTCAGTATCATCCAAC
P8	GTAACCAACATATCCGCCGTG
P9	CTAATACGACTCACTATAGGGC
P10	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
P11	GAGGAAGGAGCTTAGAGGGACT
P12	CTCAATGGTGGGATAGCTTCTT
P13	TTGGATGATACTGAGGAGAAGC
P14	CTCACATAAGGCTGGTTTCGC
P15	GAGTCATGCATGCTTCCATTC
P16	CAACACCATCTGGCTTATATCC
P17	GTTGGATGATACTGAGGAGAAGC
P18	GCGAAACCAAGCCTTATGTGAG
P19	GTGGTGCCAAGAAGGTTGTTAT
P20	CTGGGAATGATGTTGAAGGAAG

的片断的回收和纯化。连入pMD19-T载体,并将连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆送去苏州金唯智测序。

2.3 *MsGCHI*与*MsADCS*基因5'端的克隆

依据SMARTer™ RACE cDNA Kit试剂盒说明书操作流程获得RACE所用cDNA模板。

根据已获得的*MsGCHI*与*MsADCS*基因核心片段序列,用DNAMAN 6.0和Primer 5.0软件设计*MsGCHI*基因5'端特异性巢式引物外侧P5和内侧P6(表1),*MsADCS*基因5'端特异性巢式引物外侧P7和内侧P8(表1)。RACE试剂盒自带巢式引物为外侧P9和内侧P10(表1)。扩增时首先以5'端RACE cDNA为模板,用引物P5、P7分别与P9进行扩增得到外侧PCR产物,以此为模板,再用引物P6、P8分别与P10进行扩增得到内侧PCR产物。PCR反应均采用Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase,体系为20 μ L。外侧PCR扩增反应程序:98°C 30 s; 98°C 10 s, 56°C 30 s, 72°C 63 s, 30个循环; 72°C延伸10 min。内侧PCR扩增反应程序:98°C 30 s; 98°C 10 s, 56°C 30 s, 72°C 57 s, 30个循环; 72°C延伸10 min。将扩增所得片段连接到pMD19-T载体上,并转化大肠杆菌进行测序。

2.4 *MsGCHI*与*MsADCS*基因3'端的克隆

由已获得的紫花苜蓿*MsGCHI*与*MsADCS*基因核心片段序列设计*MsGCHI*基因3'端特异性巢式引物外侧P11和内侧P12(表1),*MsADCS*基因3'端特异性巢式引物外侧P13和内侧P14(表1)。扩增时首先以3'端RACE cDNA为模板,用引物P11、P13分别与P9扩增得到外侧PCR产物,然后以此为模板,再用引物P12、P14分别与P10扩增得到内侧PCR产物。PCR反应均采用Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase,体系为20 μ L。外侧PCR扩增反应程序:98°C 30 s; 98°C 10 s, 56°C 30 s, 72°C 42 s, 30个循环; 72°C延伸10 min。内侧PCR扩增反应程序:98°C 30 s; 98°C 10 s, 56°C 30 s, 72°C 39 s, 30个循环; 72°C延伸10 min。将所得片段同样连接到pMD19-T载体上,转化大肠杆菌并测序。

3 *MsGCHI*与*MsADCS*基因序列的生物信息学分析

将测序结果在GenBank中进行序列BLAST比对,在DNAMAN、MEGA软件中进行序列拼接、同源性分析、氨基酸序列比对以及系统进化树分析。在ExPASy网(http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html)预测等电点(isoelectric point, pI)和分子量(molecular mass);通过SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测其信号肽情况;利用在线工具WoLF PSORT (<http://wolfsort.hgc.jp/>)预测其亚细胞定位情况;利用在线软件NCBI CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行蛋白质保守域预测。

4 *MsGCHI*与*MsADCS*基因的组织特异性分析

用蒸馏水将3周龄紫花苜蓿幼苗冲洗干净,取样分为根、茎、叶。总RNA提取同第1节所述。利用NanoDrop 1000核酸蛋白检测仪检测其质量与浓度,并按照PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)试剂盒操作说明将质量好的RNA反转录合成cDNA。

利用SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒操作说明对各组织中的*MsGCHI*和*MsADCS*两基因的表达量进行实时荧光定量分析,以反转录cDNA为模板,以紫花苜蓿3-磷酸甘油醛脱氢酶基因*GPDH*为内参。*MsGCHI*、*MsADCS*和*MsGPDH*三个基因的实时定量上下游引物分别为P15、P16、P17、P18、P19、P20(表1),3次重复。用SPSS 16.0软件(SPSS Inc.)对数据进行单因素方差分析(one-way analysis of vari-

ance, one-way ANOVA), 用Duncan多重比较进行差异显著性分析, 最小差异显著性水平为 $P < 0.05$ 。

实验结果

1 *MsGCHI* 基因全长cDNA的克隆与序列分析

经简并引物扩增得到*MsGCHI*核心序列长度为801 bp的条带(图1-A), 测序后经BLAST比对确

认。以此序列为基础, 经RACE分别获得了758和1 062 bp的5'和3'端cDNA片段(图1-B和C)。利用DNAMAN软件将以上3段序列进行拼接, 得到*MsGCHI*全长cDNA序列, 其总长度为1 752 bp, 包含5'端非翻译区(untranslated region, UTR) 111 bp, 3'UTR 270 bp及开放阅读框(open reading frame, ORF) 1 371 bp, 共编码456个氨基酸(图2)。

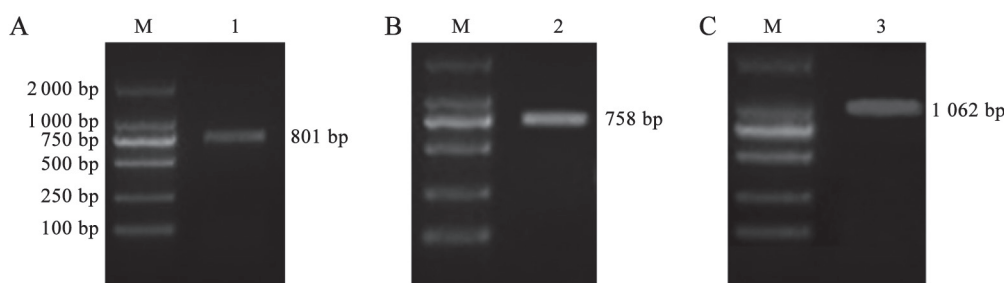


图1 *MsGCHI*基因cDNA序列的克隆结果

Fig.1 Cloning of *MsGCHI* cDNA fragment

A: 核心片段克隆; B: 5'端克隆; C: 3'端克隆。M: DL2000 marker; 1~3: 扩增产物; 图3同。

```

1 ACATGGGGATTTTCAGACGTGGGTGCTGCAAAATTCATCTTGGGGTGCATGTCACCOCTATACAATTTGAAGATTTGATTCGGTTTTTGTGGTTTTTGGTGTTCATGGGTTGTTAGATGATGCTGATTCAT
142 M G C L D D D G R F N
143 GTTGAGCTTGAATGGGAAGCAATGGGAAGGTTCCATTAAGATGCTGTAAGGTTTGTGATGGGTTCTCGGTGAAGATATTAAAGGAAGTATTAGAAAGACACCACTTCGTGTGGCAAGGCCTT
48 V E L E N G K N N G K E G S A I E D A Y K V L L M G L G E D I N R E G I R K T P L R V A K A L
283 CGTGAAGCAAAAGGTTACAGGCAAAAGGTGAAGGACATTTGAAAGTGCCTTATTCCTGAAGCTGGACTAGATAATAGAGTTGGCCATGCTGGTGGAGCAGGTGGACTTGTGATTAGAGATATTGACTTGT
95 R E G T K G Y R Q K Y K D I V E G A L F P E A G L D N R V G H A G G A G G L V I Y R D I D L F
424 TCCTATTGGGAGTCATGATGCTCCATCCAGGTCAAGTGTGATGTCGGTTCAGTTCGCTCCAGTGAAGAGTTGTTGGTTAAGCAAACTCTCCGGTGTGCTGATTTGCAAGGCGACTCAAGAGCTCAGCGT
142 S Y C E S C M L P F Q V K C H V G Y V P S S E R V V G L S K L S R V A D V F A K R L Q E P Q R
565 CTGCAAAATGAAGTTTGTCTGCTTTCATCATGGAATAAAGCCAGATGTTGCGTCACTCAATCAAGTACACACATCCACTTCCAGACGTAGAAATCAGTCTTCTCGACTCAAAACCAAGGATTTGTAAGATA
189 L A N E V C S A L H H G I K P D G V A V I L Q C T H I H F P D V E S V F L D S N H R Q G L V K I
706 CTGGTTCCGCTGTTCTGCGGTTTTGCAAAACAAGACGACGAGGAATGGACTGATTTCTTAGTCTCCCTCAAATTTAGAGGTATCAGATGGAAGAAATCAATTTAGAGGATCATGACATGAGCTGGTCTCTCT
236 L V S A G S G V F E N K N A D E W T D F F S L L K F R G I S M E K I N F R G S S D M S W C S S
847 CAATCCGCCAAATTTCTCCAAACCGGGCTGTCAACCTGCAATGGTCACTGCAATGAGTCAATTTAAATCTTTGGGAGGAGTCCACTGAGGAAAGGAGCTTAGAGGAACTCCAAGTATGTTGAAAGTGGTTG
283 Q S A K I S S K T G P V N P A M V T A V A S I I K S L G G D P L R K E L R G T P T R F V K W L
988 ATGAACITCAAACTGCAACTTTGACATGAATGATGTTTCTCAATGGTGGGATAGCTCTTTAAACACAAATAAGGAGGTTGAATGAATGACAAAGAAATATGTTCTGAGCTGAAGTATGATTTGGTACAA
330 M N F Q N C N F D M K L N G F L N G G I A S L N T N K E V E L N D K K I C S E L N L A F W S Q
1129 TGTGAGCAGCATTACTTCCATTTCAAGTGTGTTTCACATAGGTTACATCCTACATCAGATGGATTTAGTCTATTGAAAATCTCTTTACAATCGATAGTACATTTTACGGTTTCAAGCTTCAAGTTACAGGAGGCTT
377 C E H H L L P F H G V V H I G Y I L S D G F S P I G K S L L Q S I V H F Y G F K L Q V Q E R L
1270 ACCAGACATAGCTGAACAATTCGCGTGTGATAGTGGGATGATGATGTTGTTAGAGGCTAGCCACACATGATGATTTCTAGGGGATTTGAAAAGTTGGAAGTAGTACTGCAACTATGCTGTTTAGGACAG
424 T R Q I A E T I S P L I G G D V I V V E A S H T C M I S R G I E K F G S S T A T I A V L G Q
1411 TTTTCAACCGACCTTACAACAGGGCTTCCCTTCTGCAAGGTATTCAGTCTACATCTTCAGATCAATGATTTCTGTTTGAACCTGCTTGAATAATTTAGCACTAGCTCCAATTTTGTGATTTGAAAGTTCG
471 F S T D L T T R A S F L Q G I P S P T S S D Q *
1552 AAATTTGATTCAGTTACGTAGAATATAGCCAGAAATGCTTTATATGCTTCTATACCTCAATCCCTTGACAAAAGTTGGATTTATGATCTGCCAATTTGGCAGTAAACTGTTGATGTTACCTCAAAAGT
1693 ATTCTTGATCTGAGTTTTGAATTCCTATTACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图2 *MsGCHI*基因的核苷酸序列及编码氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and putative amino acid sequence of *MsGCHI*

浅色字代表起始密码子和终止密码子, “*”代表终止密码子, 图4同。

2 *MsADCS*基因全长cDNA的克隆与序列分析

通过*ADCS*基因简并引物扩增, 得到长度为701 bp的产物(图3-A), 经测序和BLAST比对, 确认为*MsADCS*核心片段序列。以此序列为基础, 经RACE分别获得1 793 bp的5'端和1 317 bp的3'端序列(图3-B和C)。通过对上述3段序列进行拼接, 得到*MsADCS*基因总长度为3 324 bp, 包含261 bp的

5'UTR和450 bp的3'UTR, ORF为2 613 bp, 共编码870个氨基酸(图4)。

3 *MsGCHI*与*MsADCS*氨基酸序列的同源性比较及保守域分析

将紫花苜蓿*MsGCHI*和*MsADCS*分别与其他植物GCHI和ADCS的氨基酸序列进行多重比对分析。结果显示, *MsGCHI*的氨基酸序列中, 第341与

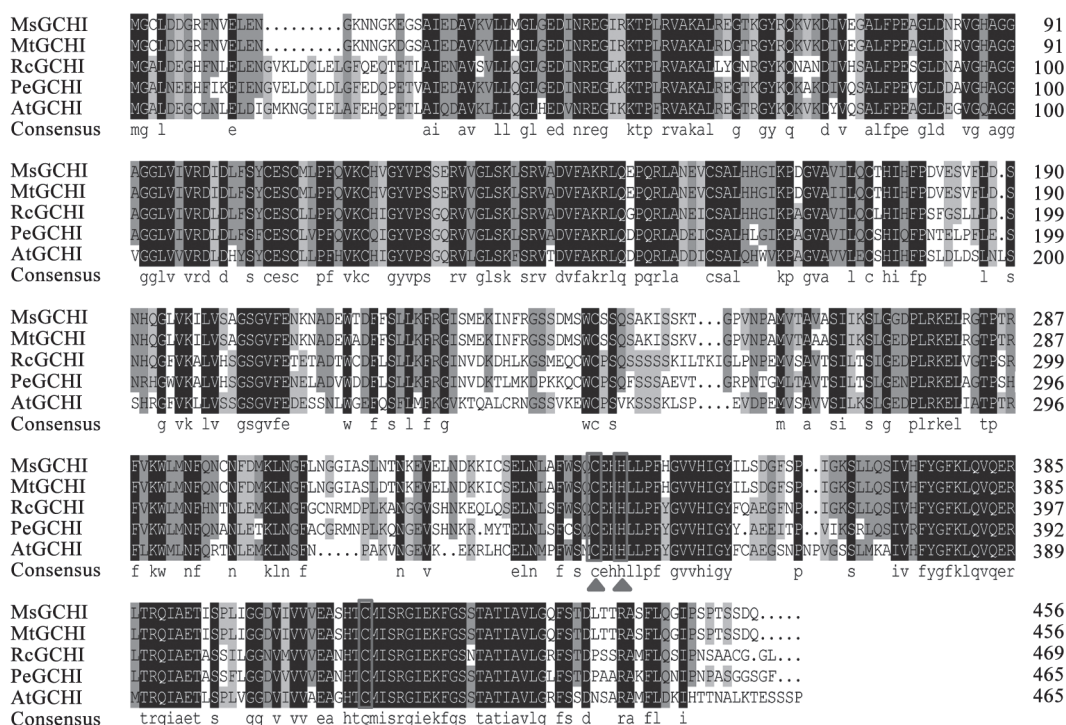


图5 MsGCHI与其他植物GCHI氨基酸序列多重比较

Fig.5 Amino acid sequence alignment of MsGCHI with other plant GCHIs

三角与方框表示保守氨基酸, Consensus表示氨基酸一致位置; 其他植物GCHI来源: 蒺藜苜蓿, MtGCHI; 蓖麻(*Ricinus communis*), RcGCHI; 胡杨(*Populus euphratica*), PeGCHI; 拟南芥, AtGCHI。图6同。

5 MsGCHI与MsADCS基因的生物信息学分析

利用在线软件ExPASy预测MsGCHI与MsADCS编码蛋白的pI与分子量。结果表明, MsGCHI基因编码蛋白分子量约为49.7 kDa, 理论pI为7.59; MsADCS基因编码蛋白分子量约为97.8 kDa, 理论pI为5.90。通过SignalP 4.1 Server预测信号肽的结果表明, MsGCHI与MsADCS基因编码蛋白均不包含信号肽。利用在线工具WoLF PSORT预测亚细胞定位情况, 结果表明, MsGCHI蛋白最可能定位于细胞质, 而MsADCS蛋白定位于叶绿体的可能性最大。

6 MsGCHI与MsADCS基因的表达模式分析

利用实时定量荧光PCR方法分别分析了MsGCHI与MsADCS基因在紫花苜蓿各组织中的表达情况。结果发现, MsGCHI与MsADCS基因在各器官中均有表达, 且都在叶片中表达量最高, MsGCHI基因在叶片中的表达量为根中的7倍、茎中的5倍(图10-A); MsADCS基因在叶中的表达量则分别为根和茎中的16倍和8倍(图10-B)。

讨论

叶酸的生物强化主要是通过异源表达叶酸生物合成中的某种或多种酶(GCHI、ADCS、HPPK/DHPS)来实现的(汪冉冉2013; Blancquaert等2015)。其中GCHI参与GTP水解生成二氢新蝶呤三磷酸(dihydroneopterin triphosphate, DHNTP)和甲酸盐, ADCS参与分支酸氨化生成氨基脱氧分支酸(amino-deoxychorismate, ADC), 这两步反应是整个叶酸合成反应的主要限速步骤, 因此这两个酶的基因在叶酸生物强化中的应用最为广泛, 且效果显著(de la Garza等2007; 阚静等2009; Blancquaert等2013b)。

本研究从紫花苜蓿中克隆了编码GCHI和ADCS的全长cDNA, 经同源比对与进化树分析, MsGCHI和MsADCS基因编码的氨基酸分别与蒺藜苜蓿MtGCHI和MtADCS具有98%和96%的序列相似性, 与其他植物的GCHI或ADCS的氨基酸序列相似性也均在58%以上。保守域分析结果表明MsGCHI属于T-Fold超家族, MsADCS属于GAT 1和chorismate bind超家族。通过序列比对发现, Ms-

MsADCS	..NLSRLICPT...SEYKNVNSLLRSPSTARVSCFVKRD.....VGNRRDGNTRVHCQIMHDLRSEYKRRK...V...V...LQVGGVRLTLLIDNYE	86
MtADCS	..NMSLRLICPTSEAMQYKNVNPILLRSPSTRVSCFMKRN.....VGNRYDGNTRVHCQIMHDLRSEYKRRK...V...V...LQVGGVRLTLLIDNYE	89
RcADCS	..KIALCSSLDLANLSVQGLR..CNSGKSFVGVFVANNDYVQESYNS...NNGSKRMVAVSCHIMPGHLEGSFMGKRRFE...PESRKLPERLTLIDNYE	94
PeADCS	..VAICSSLSLELKNPFIEGTGKIATSKSLR...GYVAKNE.....KSCCNG...KVAVSSHIMPGHLEGSFMGKRRFE...PESOKMPEVRLTLLIDNYE	89
AtADCS	MNINFEFCSTSSSELSYPSENVLRFVSVASRLSPKWKKSFIIS.....LERSKTTKVLASRYVPGKLDLSVVKKSPRRREVEKLEGVRLTLLIDNYE	94
Consensus	m c r le kk l p f r tllidnyd	
MsADCS	SYTNIVQELSLINGVPPVVIQNDWWEELGYLYEENAFDNIVISPGGSEAFEDIGICQILRECRDIPILGVCLGHQALGYVGAQVWHASEPVH	186
MtADCS	SYTNIVQELSLINGVPPVVIQNDWWEELGYLYEENAFDNIVISPGGSEAFEDIGICQILRECRDIPILGVCLGHQALGYVGAQVWHASEPVH	189
RcADCS	SYTNIVQELSLVNGVPPVVKNDWWEVGHLYEENAFDNIVISPGGSEAFADIGICRILRECRDIPILGVCLGHQALGYVGAQVWHASEPVH	194
PeADCS	SYTNIVQELSLVNGVPPVVKNDWWEVGHLYEENAFDNIVISPGGSEAFADIGICRILRECRDIPILGVCLGHQALGYVGAQVWHASEPVH	189
AtADCS	SYTNIVQELSLINGVPPVVIQNDWWEVGHLYEENAFDNIVISPGGSEAFADIGICRILRECRDIPILGVCLGHQALGYVGAQVWHASEPVH	194
Consensus	syt niyq ls ngvppv nd wtw ylye afdniv spggsp c digicl l ecrdipilgvclghqalgyv ga vha epvh	
MsADCS	GRSEVEHNGCQLQCPSGRNSCFKVRYHSLVTSSELSLEVEHTEAWTSSR..LPIGSEVLDKY.NGHELOTDCTFLDSELPBAGNGSSSL.VDYG	283
MtADCS	GRSEVEHNGCQLQCPSGRNSCFKVRYHSLVTSSELSLEVEHTEAWTSSR..LPIGSEVLDKY.NGHELOTDCTFLDSELPBAGNGSSSL.VEYG	286
RcADCS	GRSEIEHNGCRDHNIPSGRNSCFKVRYHSLVTSSELSLEVEHTEAWTSSR..LPIGSEVLDKY.NGHELOTDCTFLDSELPBAGNGSSSL.FNYS	293
PeADCS	GRSEIEHNGCRDHNIPSGRNSCFKVRYHSLVTSSELSLEVEHTEAWTSSR..LPIGSEVLDKY.NGHELOTDCTFLDSELPBAGNGSSSL.FNYS	288
AtADCS	GRSEIEHNGCRDHNIPSGRNSCFKVRYHSLVTSSELSLEVEHTEAWTSSR..LPIGSEVLDKY.NGHELOTDCTFLDSELPBAGNGSSSL.FNYS	292
Consensus	gr s eh g lf ipsqr s fkvryhsl d lp l p awt t f s kncscvpvntgslngs vip..vseklsrshvpsshvn	
MsADCS	QTRNARVLMGVKHSRPHYCVQHPHESVATICHCRQIKNREIDDDWLRCE..ASYNKGRANSDBHAWSSSRVYRH....LVHN.....	365
MtADCS	QTRNARVLMGVKHSRPHYCVQHPHESVATICHCRQIKNREIDDDWLRCE..ASYNKGRANSDBHAWSSSRVYRH....LVHN.....	368
RcADCS	EVQSKKLMGIMHSRPHYCVQHPHESVATICHCRQIKNREIDDDWLRCE..SIFVNERNSFYTCLOVPADEIFGVFRRGVGNSDEDLPSRETSR	391
PeADCS	RMGGKLMGIMHSRPHYCVQHPHESVATICHCRQIKNREIDDDWLRCE..SIFVNERNSFYTCLOVPADEIFGVFRRGVGNSDEDLPSRETSR	388
AtADCS	GKQDRHLMGIMHSRPHYCVQHPHESVATICHCRQIKNREIDDDWLRCE..SIFVNERNSFYTCLOVPADEIFGVFRRGVGNSDEDLPSRETSR	390
Consensus	lmg hs phyg qfhpes at g q f nf t yw a qv a l	
MsADCSNTEVNYTLKWKRFDFHAGCGGAKSIFCQELG.QEAENTFWLDSSTIMGRARFSEMGCKGSLWKQLTFELSDC	442
MtADCSNTEVNYTLKWKRFDFHAGCGGAKSIFCQELG.QEAENTFWLDSSTIMGRARFSEMGCKGSLWKQLTFELSDC	445
RcADCS	RQQLGN.....IDVSSLLNFPESVGVKHLKWKRFDFHAGCGGAKSIFCQELG.QEAENTFWLDSSTIMGRARFSEMGCKGSLWKQLTFELSDC	486
PeADCS	RSQLGNANVNCLSISSALKFPESVINRHLKWKRFDFHAGCGGAKSIFCQELG.QEAENTFWLDSSTIMGRARFSEMGCKGSLWKQLTFELSDC	488
AtADCS	FSAKTNG....VDVDMVDSYKPHKLELWKRFDFHAGCGGAKSIFCQELG.QEAENTFWLDSSTIMGRARFSEMGCKGSLWKQLTFELSDC	485
Consensus	lkw k la gg if lfg tfwld ss r rfsfmj k g lw tf ls q	
MsADCS	SGSGGCGHLSLESEGSKVITIEEGCFYLNKELCYRYKDEVECLPFDHGGYVCGYDLEKCCVTC...HHSKIPDACEFFADNLVAIDRKN	542
MtADCS	SGSGGCGHLSLESEGSKVITIEEGCFYLNKELCYRYKDEVECLPFDHGGYVCGYDLEKCCVTC...HHSKIPDACEFFADNLVAIDRKN	545
RcADCS	SIMDFGGGYLSLEAAGSIRSVYKGFDFLNKELCYRYKDEVECLPFDHGGYVCGYDLEKCCVTC...HHSKIPDACEFFADNLVAIDRKN	586
PeADCS	SIMDFGGGYLSLEAAGSIRSVYKGFDFLNKELCYRYKDEVECLPFDHGGYVCGYDLEKCCVTC...HHSKIPDACEFFADNLVAIDRKN	588
AtADCS	SEVTSFHCHLIESSOSTEKFEGDFDFLNKELCYRYKDEVECLPFDHGGYVCGYDLEKCCVTC...HHSKIPDACEFFADNLVAIDRKN	585
Consensus	s k g l d le gfld l el s y e l p d f ggy g gy k e c g n hks p d a c f f a d n d h d	
MsADCS	DVWLLATHBESSISOWDDIEKLSITGSRVMDIEROYHPSFTFSHKAGAAEKSKEOYTRVKKCHNYRDGESYELCLTICIRKPFVLSLGLY	642
MtADCS	DVWLLATHBESSISOWDDIEKLSITGSRVMDIEROYHPSFTFSHKAGAAEKSKEOYTRVKKCHNYRDGESYELCLTICIRKPFVLSLGLY	645
RcADCS	DVWLLATHBESSISOWDDIEKLSITGSRVMDIEROYHPSFTFSHKAGAAEKSKEOYTRVKKCHNYRDGESYELCLTICIRKPFVLSLGLY	686
PeADCS	DVWLLATHBESSISOWDDIEKLSITGSRVMDIEROYHPSFTFSHKAGAAEKSKEOYTRVKKCHNYRDGESYELCLTICIRKPFVLSLGLY	688
AtADCS	DVWLLATHBESSISOWDDIEKLSITGSRVMDIEROYHPSFTFSHKAGAAEKSKEOYTRVKKCHNYRDGESYELCLTICIRKPFVLSLGLY	685
Consensus	y e l d e k l l i q s f s e q y v c y i d g e s y e l c l t i c i r k p f v l s l g l y	
MsADCS	LHLRBNPAPYAAALNFKPELCTCCSSIEKRLDRSDMLEKPIKGTARGAHEEDKQLKLIQISEKQAEANLMIVDLLRNDLGRVCEGSDVVEH	742
MtADCS	LHLRBNPAPYAAALNFKPELCTCCSSIEKRLDRSDMLEKPIKGTARGAHEEDKQLKLIQISEKQAEANLMIVDLLRNDLGRVCEGSDVVEH	745
RcADCS	LHLRBNPAPYAAALNFKPELCTCCSSIEKRLDRSDMLEKPIKGTARGAHEEDKQLKLIQISEKQAEANLMIVDLLRNDLGRVCEGSDVVEH	786
PeADCS	LHLRBNPAPYAAALNFKPELCTCCSSIEKRLDRSDMLEKPIKGTARGAHEEDKQLKLIQISEKQAEANLMIVDLLRNDLGRVCEGSDVVEH	788
AtADCS	LHLRBNPAPYAAALNFKPELCTCCSSIEKRLDRSDMLEKPIKGTARGAHEEDKQLKLIQISEKQAEANLMIVDLLRNDLGRVCEGSDVVEH	785
Consensus	lhre npapyaalnf l c s s p e r f l d r l e a k p i g t a r g t e d l k l l s e k q a e n l m i v d l l r n d l g r v c e g s d v v e h	
MsADCS	LMVQSMVTVHTMVSTIRGRKSDISAVCVAAAFPGGSMITGAPKLSVBLDSLESRCYSGCLGFYSYNTFDLNIIVIRTVIHEGEASIGAGGA	842
MtADCS	LMVQSMVTVHTMVSTIRGRKSDISAVCVAAAFPGGSMITGAPKLSVBLDSLESRCYSGCLGFYSYNTFDLNIIVIRTVIHEGEASIGAGGA	845
RcADCS	LMVQSMVTVHTMVSTIRGRKSDISAVCVAAAFPGGSMITGAPKLSVBLDSLESRCYSGCLGFYSYNTFDLNIIVIRTVIHEGEASIGAGGA	886
PeADCS	LMVQSMVTVHTMVSTIRGRKSDISAVCVAAAFPGGSMITGAPKLSVBLDSLESRCYSGCLGFYSYNTFDLNIIVIRTVIHEGEASIGAGGA	888
AtADCS	LMVQSMVTVHTMVSTIRGRKSDISAVCVAAAFPGGSMITGAPKLSVBLDSLESRCYSGCLGFYSYNTFDLNIIVIRTVIHEGEASIGAGGA	885
Consensus	lm v y tvh tmvstirg k v cv aafpggsmtgapklrs v e l d s l e s r c y s g c l g f y s y n t f d l n i i v i r t v i h e g e a s i g a g g a	
MsADCS	VALSNPEDEMBEMLIKTRAPANTVIDYE.....	870
MtADCS	VALSNPEDEMBEMLIKTRAPANTVIDYE.....	873
RcADCS	VALSNPEDEMBEMLIKTRAPANTVIDYE.....	914
PeADCS	VALSNPEDEMBEMLIKTRAPANTVIDYE.....	916
AtADCS	VALSNPEDEMBEMLIKTRAPANTVIDYE.....	918
Consensus	vals pede em lk apa v	

图6 MsADCS与其他植物ADCS氨基酸序列多重比较

Fig.6 Amino acid sequence alignment of MsADCS with other plant ADCS

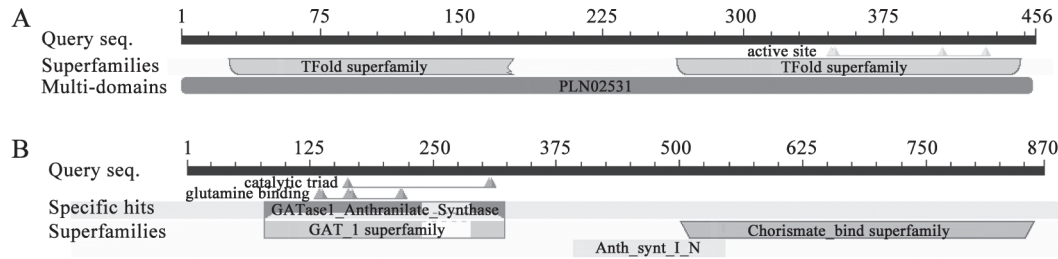


图7 MsGCHI (A)和MsADCS (B)的蛋白保守域预测

Fig.7 Conserved domain prediction of MsGCHI (A) and MsADCS (B)

“Query seq.”表示查询序列，“Superfamilies”表示超家族，“Multi-domains”表示多重区域，“Specific hits”表示特殊位点，“active site”表示激活位点，“TFold superfamily”表示tunnelling fold超家族，“catalytic triad”表示催化三联体，“glutamine binding”表示谷氨酰胺结合，“GATase1-Anthranilate_Synthase”表示谷氨酸氨基转移酶与邻氨基苯甲酸合酶，“GAT_1 superfamily”表示谷氨酸氨基转移酶超家族，“Chorismate_bind superfamily”表示chorismate bind超家族。

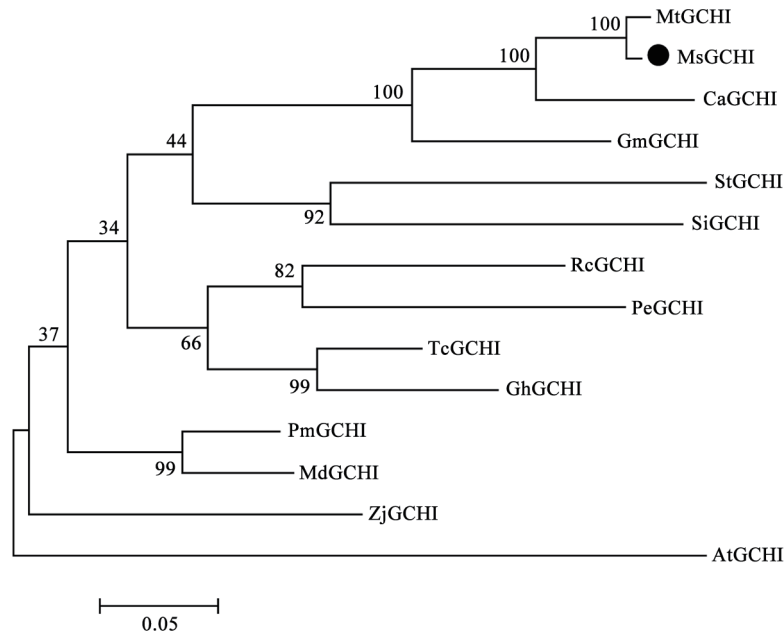


图8 MsGCHI与其他植物GCHI氨基酸序列同源性分析

Fig.8 Amino acid sequence homology analysis of MsGCHI with other plant GCHIs

图中比例尺表示每个氨基酸位点的碱基替换率为0.05; 进化树中每个节点上显示的步长值表示进化树分析验证中该树枝可信度的百分比; 图9同。其他植物GCHI来源: 蒺藜苜蓿, MsGCHI; 鹰嘴豆, CaGCHI; 大豆, GmGCHI; 马铃薯(*Solanum tuberosum*), StGCHI; 芝麻(*Sesamum indicum*), SiGCHI; 蓖麻, RcGCHI; 胡杨, PeGCHI; 可可(*Theobroma cacao*), TcGCHI; 梅(*Prunus mume*), PmGCHI; 苹果(*Malus × domestica*), MdGCHI; 枣(*Ziziphus jujuba*), ZjGCHI; 拟南芥, AtGCHI。

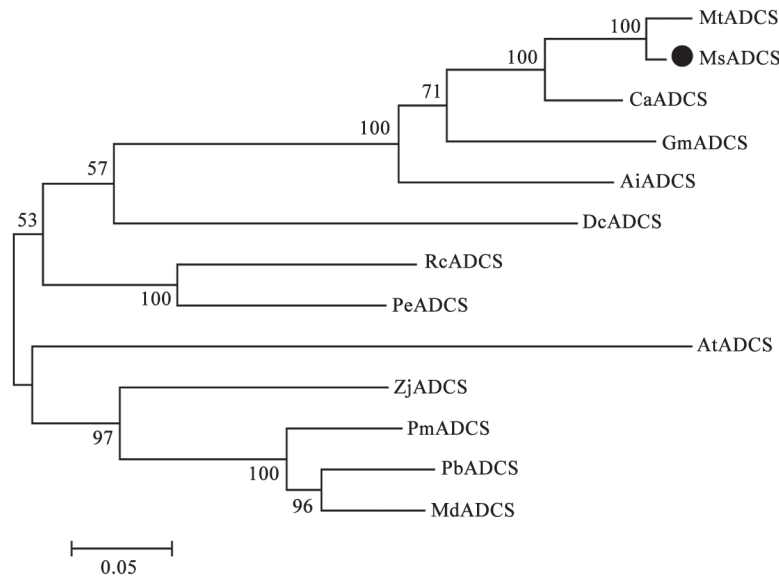


图9 MsADCS与其他植物ADCS氨基酸序列同源性分析

Fig.9 Amino acid sequence homology analysis of MsADCS with other plant ADCSs

其他植物ADCS来源: 蒺藜苜蓿, MsADCS; 鹰嘴豆, CaADCS; 大豆, GmADCS; 落花生(*Arachis ipaensis*), AiADCS; 胡萝卜(*Daucus carota*), DcADCS; 蓖麻, RcADCS; 胡杨, PeADCS; 枣, ZjADCS; 梅, PmADCS; 白梨(*Pyrus × bretschneideri*), PbADCS; 苹果, MdADCS; 拟南芥, AtADCS。

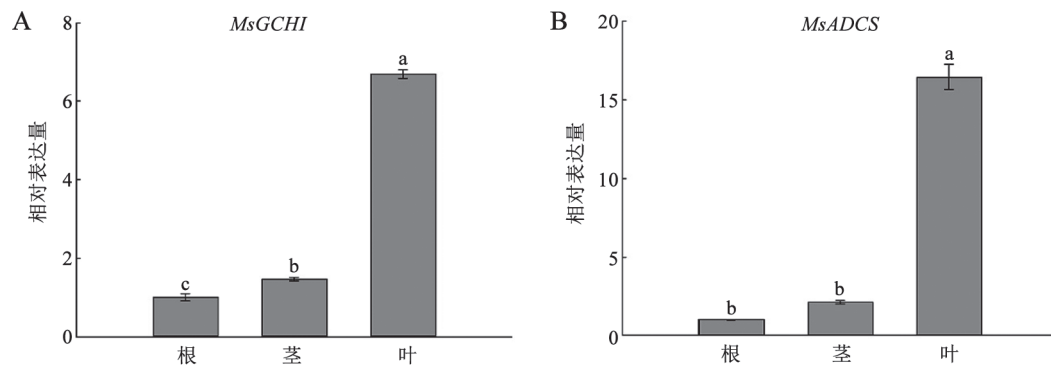


图10 *MsGCHI* (A)与*MsADCS* (B)基因的组织表达特性

Fig. 10 Tissue-specific expression patterns of *MsGCHI* (A) and *MsADCS* (B)

单个图中各柱形上用不同小写字母标识表示数据间差异显著($P < 0.05$)。

*GCHI*基因编码氨基酸序列的第341与412位为半胱氨酸残基,第344位为组氨酸残基,与其他植物*GCHI*的保守氨基酸位点一致,是GTP反应的关键位点。GTP中嘌呤的水解反应是由组氨酸对碱基的N-7质子化作用开始的,而半胱氨酸则参与嘌呤C-8的亲核反应(Basset等2002; Kümpornsin等2014)。*MsADCS*基因编码氨基酸的第672位为谷氨酸残基,第689位为赖氨酸,与其他植物*ADCS*的保守氨基酸位点一致。这两个氨基酸残基是分支酸反应的关键位点,赖氨酸参与分支酸C-2的亲核反应,谷氨酸则参与其C-4羟基基团的断裂(Bozzo等2008; Camara等2011)。综上可推测,本研究克隆的*MsGCHI*和*MsADCS*基因序列是正确的。

表达模式分析表明,*MsGCHI*与*MsADCS*基因在紫花苜蓿各器官中均有表达,但在叶片中的表达量均显著高于根和茎。这说明紫花苜蓿合成的叶酸集中于地上部分,既便于家畜采食获取充足的养分,又有利于人工刈割带来更高的经济效益。有研究表明,在植物器官分化过程中,叶酸总是优先在快速分裂的组织以及参与光合的叶片中合成,这是因为叶酸在植物中的生物合成可能受光合作用以及光呼吸所诱导,导致光合叶片中的叶酸合成与积累较其他组织有所提高(Jabrin等2003; Blancquaert等2010)。

综上所述,本研究成功克隆了紫花苜蓿叶酸合成关键酶基因*MsGCHI*与*MsADCS*,为通过异源表达*GCHI*与*ADCS*以实现其他植物中的叶酸强化提供参考。这将有助于缓解当前人类食物和动物饲料中叶酸缺乏的现状。

参考文献

- Bao AK, Du BQ, Touil L, Kang P, Wang QL, Wang SM (2016). Co-expression of tonoplast cation/ H^+ antiporter and H^+ -pyrophosphatase from xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* improves alfalfa plant growth under salinity, drought and field conditions. *Plant Biotechnol J*, 14 (3): 964–975
- Basset G, Quinlivan EP, Ziemak MJ, de la Garza RD, Fischer M, Schiffmann S, Bacher A, Gregory III JF, Hanson AD (2002). Folate synthesis in plants: the first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (19): 12489–12494
- Bekaert S, Storozhenko S, Mehrshahi P, Bennett MJ, Lambert W, Gregory III JF, Schubert K, Hugenholtz J, Van Der Straeten D, Hanson AD (2008). Folate biofortification in food plants. *Trends Plant Sci*, 13: 28–35
- Blancquaert D, De Steur H, Gellynck X, Van Der Straeten D (2014). Present and future of folate biofortification of crop plants. *J Exp Bot*, 65 (4): 895–906
- Blancquaert D, Storozhenko S, Loizeau K, De Steur H, De Brouwer V, Viaene J, Ravanel S, Rébeillé F, Lambert W, Van Der Straeten D (2010). Foliates and folic acid: from fundamental research toward sustainable health. *Crit Rev Plant Sci*, 29: 14–35
- Blancquaert D, Storozhenko S, Van Daele J, Stove C, Visser RG, Lambert W, Van Der Straeten D (2013b). Enhancing pterin and *para*-aminobenzoate content is not sufficient to successfully biofortify potato tubers and *Arabidopsis thaliana* plants with folate. *J Exp Bot*, 64 (12): 3899–3909
- Blancquaert D, Van Daele J, Storozhenko S, Stove C, Lambert W, Van Der Straeten D (2013a). Rice folate enhancement through metabolic engineering has an impact on rice seed metabolism, but does not affect the expression of the endogenous folate biosynthesis genes. *Plant Mol Biol*, 83 (4–5): 329–349
- Blancquaert D, Van Daele J, Strobbé S, Kiekens F, Storozhenko S, De Steur H, Gellynck X, Lambert W, Stove C, Van Der Straeten D (2015). Improving folate (vitamin B_9) stability in biofortified rice through metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 33 (10): 1076–1080

- Bozzo GG, Basset GJ, Naponelli V, Noiriell A, Gregory III JF, Hanson AD (2008). Characterization of the folate salvage enzyme *p*-aminobenzoylglutamate hydrolase in plants. *Phytochemistry*, 69 (1): 29–37
- Camara D, Richefeu-Contesto C, Gambonnet B, Dumas R, Rébeillé F (2011). The synthesis of pABA: Coupling between the glutamine amidotransferase and aminodeoxychorismate synthase domains of the bifunctional aminodeoxychorismate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys*, 505: 83–90
- de la Garza RID, Gregory III JF, Hanson AD (2007). Folate biofortification of tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (10): 4218–4222
- Desai A, Sequeira JM, Quadros EV (2016). The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. *Biochimie*, 126: 31–42
- Dong W, Cheng ZJ, Lei CL, Wang XL, Wang JL, Wang J, Wu FQ, Zhang X, Guo XP, Zhai HQ, et al (2014). Overexpression of folate biosynthesis genes in rice (*Oryza sativa* L.) and evaluation of their impact on seed folate content. *Plant Foods Hum Nutr*, 69 (4): 379–385
- Gao Q (2011). Effects of dietary supplementation with folic acid on growth performance and immune function in weanling pig (PhD thesis). Chengdu: Sichuan Agricultural University (in Chinese with English abstract) [高庆(2011). 饲料添加叶酸对断奶仔猪生产性能和免疫功能的影响研究(博士论文). 成都: 四川农业大学]
- Hanson AD, Gregory III JF (2011). Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 62: 105–125
- He A, Simpson DR, Daniels L, Rosazza JPN (2004). Cloning, expression, purification, and characterization of *Nocardia* sp. GTP cyclohydrolase I. *Protein Expr Purif*, 35 (2): 171–180
- Hossain T, Rosenberg I, Selhub J, Kishore G, Beachy R, Schubert K (2004). Enhancement of folates in plants through metabolic engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (14): 5158–5163
- Hubner RA, Houlston RD, Muir KR (2007). Head to Head: Should folic acid fortification be mandatory? No. *BMJ*, 334 (7606): 1253
- Jabrin S, Ravel S, Gambonnet B, Douce R, Rébeillé F (2003). One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiol*, 131 (3): 1431–1439
- Jiang DC, Han J, Ju XJ, Yang HM (2014). *China Feed*, (7): 29–31 (in Chinese with English abstract) [江栋材, 韩娟, 巨晓军, 杨海明 (2014). 叶酸在畜禽生产中的应用研究进展. *中国饲料*, (7): 29–31]
- Kan J, Li L, Xu JY (2009). Research progress in folic acid biosynthesis and its metabolic engineering. *Chin J Biochem Pharm*, 30 (4): 284–286 (in Chinese) [阚静, 李莉, 许激扬(2009). 叶酸的生物合成及其代谢工程研究进展. *中国生化药物杂志*, 30 (4): 284–286]
- Katzenmeier G, Schmid C, Bacher A (1990). Cloning and expression of the putative gene coding for GTP cyclohydrolase I from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 54 (1–3): 231–234
- Kümpornsin K, Kotanan N, Chobson P, Kochakarn T, Jirawatcharadech P, Jaru-ampornpan P, Yuthavong Y, Chookajorn T (2014). Biochemical and functional characterization of *Plasmodium falciparum* GTP cyclohydrolase I. *Malar J*, 13: 150
- Li SX, Pan FX (2010). New technique for producing animal feed additive folacin. *Hebei J Ind Sci Tech*, 27 (5): 309–310 (in Chinese with English abstract) [李树新, 潘福星(2010). 饲料添加剂叶酸生产新工艺. *河北工业科技*, 27 (5): 309–310]
- Naqvi S, Zhu C, Farre G, Ramessar K, Bassie L, Breitenbach J, Perez Conesa D, Ros G, Sandmann G, Capell T, et al (2009). Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (19): 7762–7767
- Nunes ACS, Kalkmann DC, Aragão FJL (2009). Folate biofortification of lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene. *Transgenic Res*, 18 (5): 661–667
- Preynat A, Lapierre H, Thivierge MC, Palin MF, Matte JJ, Desrochers A, Girard CL (2009). Influence of methionine supply on the response of lactational performance of dairy cows to supplementary folic acid and vitamin B₁₂. *J Dairy Sci*, 92 (4): 1685–1695
- Rivera NGR, Garcia-Salinas C, Aragão FJL, de la Garza RID (2016). Metabolic engineering of folate and its precursors in Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biotechnol J*, 14 (10): 2021–2032
- Saini RK, Nile SH, Keum YS (2016). Foliates: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability. *Food Res Int*, 89: 1–13
- Smith AD, Kim YI, Refsum H (2008). Is folic acid good for everyone? *Am J Clin Nutr*, 87 (3): 517–533
- Storozhenko S, De Brouwer V, Volckaert M, Navarrete O, Blancquaert D, Zhang GF, Lambert W, Van Der Straeten D (2007). Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 25 (11): 1277–1279
- Wang R (2013). The study on enhancing content in plants by overexpression of *GCHI* and *ADCS* genes (Marster's thesis). Lanzhou: Lanzhou University (in Chinese with English abstract) [汪冉冉 (2013). 过量表达 *GCHI* 和 *ADCS* 基因对提高植物叶酸含量的研究(硕士论文). 兰州: 兰州大学]
- Zhang C, Liang Q, Fan Y (2013). Applications of GTPCHI, a key enzyme for folate synthesis in soybean, and its gene. CN 102373185 A (in Chinese) [张春义, 梁秋菊, 范云六(2013). 大豆叶酸合成关键酶GTPCHI及其基因和应用. CN 102373185 A]
- Zhang X, Hao M, Zhao W (2015). Research progress of relationship between folic acid and cervical cancer. *Chin J Obs Gyne Pediatr-Elec*, (5): 656–659 (in Chinese with English abstract) [张晓燕, 赫敏, 赵卫红(2015). 叶酸与宫颈癌关系的研究进展. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, (5): 656–659]

Cloning and analysis of genes encoding key enzymes GCHI and ADCS in folate biosynthesis from *Medicago sativa*

YANG Bao-Ping*, GUO Huan*, SHI Ying, FENG Wen-Jin, LI Chan, BAO Ai-Ke**

State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

Abstract: GTP cyclohydrolase I (GCHI) and aminodeoxychorismate synthase (ADCS) are the rate-limiting enzymes and play vital roles in the biosynthesis process of folate. In this study, the genes encoding GCHI and ADCS were isolated from alfalfa (*Medicago sativa*) by reverse transcription PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods, and were named as *MsGCHI* and *MsADCS*, respectively. *MsGCHI* and *MsADCS* contain the open reading frame (ORF) of 1 371 and 2 613 bp, which encode 456 and 870 amino acid residues, respectively. The putative amino acid sequences of *MsGCHI* and *MsADCS* shared more than 58% amino acid sequence similarity with homologous proteins in other plant species, and especially, the highest amino acid sequence similarity of 98% and 96% with MtGCHI and MtADCS from *M. truncatula*, respectively. The expression pattern analysis indicated that *MsGCHI* and *MsADCS* exhibited significant higher levels of expression in leaf, though they also express in root and stem.

Key words: *Medicago sativa*; folate; GCHI; ADCS; gene clone

Received 2017-03-16 Accepted 2017-05-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31670405 and 31372360), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No. lzujbky-2016-4).

*Co-first authors.

**Corresponding author (E-mail: baoaik@lzu.edu.cn).