

qa-3 稀有密码子和 mRNA 结构改造及其在大肠杆菌中的高效表达 The Changes of Rare Codon and mRNA Structure Accelerate Expression of *qa-3* in *Escherichia coli*

刘礼兵¹, 刘 云¹, 何华庆², 李永辉¹, 徐琪寿^{*}

LIU Li-Bing¹, LIU Yun¹, HE Hua-Qing², LI Yong-Hui¹ and XU Qi-Shou^{1*}

1 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 100850

2 南昌大学生命科学院 南昌 330047

1 Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China

2 College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330047, China

摘 要 奎尼酸脱氢酶的高表达是奎尼酸生物合成的代谢工程研究的关键和基础。粗糙脉孢菌基因组中编码奎尼酸脱氢酶的基因 *qa-3* 在大肠杆菌中不表达, 根据大肠杆菌密码子使用频率分析 *qa-3* 基因, 发现有 27 个稀有密码子, 其中编码 Arg (R) 的有 8 个, 编码 Gly (G) 的有 9 个。编码精氨酸的 AGG (AGA) 两个稀有密码子紧密相连 (R 区), 另外还有个相对比较集中的 GGG 密集区 G 区。进一步通过计算机分析其 *qa-3* 基因 mRNA 二级结构, 发现改变 5' 和 3' 末端个别碱基对其二级结构的影响很大, 可以使 mRNA 的自由能由野生型的 -374.3 kJ/mol 降低到最小 -80.5 kJ/mol, 从而大大减少 mRNA 两端二级结构的产生, 而仅仅改变 R 区和 G 区的稀有密码子自由能变化很小。通过对该基因密码子改造和优化 5' 和 3' 末端对其 mRNA 二级结构的影响, 在大肠杆菌中表达真菌的基因 *qa-3*, 并测到了奎尼酸脱氢酶活性, 为构建产奎尼酸工程菌株奠定基础。

关键词 *qa-3*, 密码子, mRNA 二级结构, 奎尼酸脱氢酶

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)02-0198-06

Abstract The key and crucial step of metabolic engineering during quinic acid biosynthesis using shikimic acid pathway is high expression of quinate 5-dehydrogenase. The gene *qa-3* which code quinate 5-dehydrogenase from *Neurospora crassa* doesn't express in *Escherichia coli*. By contrast with codon usage in *Escherichia coli*, there are 27 rare codons in *qa-3*, including eight AGG/AGA (Arg) and nine GGG (Gly). Two AGG are joined together (called box R) and some GGG codons are relative concentrate (called box G). Along with the secondary structure of mRNA analysed in computer, the free energy of mRNA changes a lot from -374.3 kJ/mol to least -80.5 kJ/mol when some bases in the end of *qa-3* were transformed, and moreover, the change of free energy is quite small when only some bases in the box G and box R transformed. After the change of rare codon and optimization of some bases in the end, *qa-3* was expression in *E. coli* and also the enzyme activity of quinate 5-dehydrogenase can be surveyed accurately. All the work above benefit the further research on producing quinic acid engineering bacterium.

Key words *qa-3*, rare codon, secondary structure of mRNA, quinate 5-dehydrogenase

奎尼酸(quinic acid, QA)是一种具有极高价值的精细化工产品,在医药工业、食品工业、化工等行业均有较大的用途^[1]。本实验室在成功克隆与表达脱氢奎尼酸(DHQ)生物合成途径关键酶基因 *aroG*、*aroB* 的基础上^[2,3],应用代谢工程原理以葡萄糖为原料进行奎尼酸生物合成的研究。为了有效利用大肠杆菌莽草酸途径合成奎尼酸,必须导入异源奎尼酸脱氢酶(quinic acid 5-dehydrogenase, QDHase, EC1.1.1.24)的编码基因,构建一条新的代谢支路将碳源引向生成 QA 的方向,构建产奎尼酸工程菌株。

奎尼酸脱氢酶的高表达是奎尼酸生物合成的代谢工程研究的关键和基础。陈梅芳等^[4]利用构巢曲霉, Frost 等^[5]利用肺炎克雷伯氏菌中的奎尼酸脱氢酶基因进行表达产生奎尼酸,产量低达不到工业化的要求。另外一个编码奎尼酸脱氢酶的基因 *qa-3*

是粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*) *qa* 基因家族中的成员之一^[6],是该菌奎尼酸代谢途径上的第一个关键酶,与另外两个酶一起催化奎尼酸代谢的起始反应。但 Michael 实验表明^[7],在大肠杆菌中没有观察到 *qa-3* 基因的表达。

根据 Sharp 统计的大肠杆菌密码子使用频率结果^[8],我们分析 *qa-3* 基因,有 27 个稀有密码子,有一个 AGC(AGA)密集区 R 区和一个 GGG 密集区 G 区(Fig.1)。进一步分析 mRNA 二级结构,发现 5'和 3'末端个别碱基的改变对其二级结构的影响很大,而仅仅中间突变末端碱基不变的 *qa-3* 基因与野生型自由能相差不大。因此,我们决定改变密码子密集区 R 区和 G 区的稀有密码子,通过改造密码子和优化 mRNA 二级结构,使粗糙脉孢菌编码 QDHase 基因 *qa-3* 在 *E. coli* 中表达并对其产物活性进行鉴定,为构建产奎尼酸工程菌株奠定基础。

1	ATG	<u>TCG</u>	<u>ACA</u>	GCA	ACC	ACC	ACA	ACA	TCA	GCG	ACG	ACG	ACG	ATG	<u>TCG</u>	GTC	GTC	CAG	<u>CCC</u>	<u>CGA</u>
61	CAG	CAA	GAG	CTC	CTT	CAC	CTC	ACC	AGC	ACA	<u>CCC</u>	GAC	ATC	ACC	<u>CCC</u>	TAC	ACC	<u>AGA</u>	CAT	<u>GCC</u>
121	TAT	CTC	TTC	GGC	CAG	AAA	CTC	GCG	GCC	TCC	ATG	TCC	CCT	CTC	CTC	CAC	TCC	ATC	GTT	TAC
181	TCC	CAC	CTC	TCT	CTC	AGC	TGG	GCC	CAA	CTT	CGT	CIT	GAC	TCC	<u>CCC</u>	TCT	<u>ATA</u>	CCA	CTC	TTC
241	CTC	CAG	CTG	GCC	CAG	CAC	CCA	GAC	TTC	TAC	GGC	GCC	TCA	GTG	ACC	ATG	CCT	CAC	AAA	GTG
301	GCC	ATC	ATC	CCG	CAC	CIT	GAC	CAC	CTG	ACT	<u>CCC</u>	GAA	TGT	CGC	GAC	GTC	GGC	GCC	TGC	AAT
361	ACC	<u>CTA</u>	TTT	CTC	AAA	ACC	GAC	CCA	GCC	ACC	GGC	CGT	CGC	CTG	TAC	TGC	GGC	GCC	AAC	ACC
421	GAC	GTG	ATT	GGC	GTG	CGC	GAG	AGC	TTC	GTT	CAA	AAT	GTG	TCT	GAC	<u>CCC</u>	GCT	<u>CGG</u>	GTA	TAC
481	GAG	AGC	<u>CGG</u>	CCG	GCA	CTG	GTA	ATT	GGC	GGC	GGC	GGC	GCG	GCG	<u>CGA</u>	TCA	GCC	GTG	TAC	GCG
541	CTG	CAC	AAG	TGG	CTC	GGC	GCG	ACG	GAC	ATC	TAC	CTC	GTG	AAC	<u>CGG</u>	GAC	AAG	AGC	GAG	GTG
601	GAC	GCG	GTG	ATT	GCC	GAA	TGC	ACG	GAG	CGC	<u>GGG</u>	TAC	GGC	GAT	CGC	CTG	GTG	CAT	GTG	GCG
G 区																				
661	AGC	GTG	GAG	CAG	GCT	GAA	GCC	CTG	GAG	<u>GGG</u>	<u>CCG</u>	<u>GGG</u>	<u>GCG</u>	<u>ATA</u>	GTC	GCT	TGC	ATT	CCG	GAT
721	TTC	CCG	CCT	AAG	ACG	GAG	AAG	GAG	ATG	<u>TTG</u>	<u>GTG</u>	<u>AGG</u>	<u>AGG</u>	<u>ATT</u>	GTC	GAG	ACG	TTC	TTG	ATG
R 区																				
781	AAG	GAG	GAG	AAG	GCT	GCT	GTG	CTG	GAG	ATG	TGC	TAT	AAC	CCT	AGC	CCG	TTT	ACC	GAG	TTG
841	<u>GGA</u>	GCG	TTG	GCG	GAG	CAC	GAG	<u>GGG</u>	TGG	CAG	GTT	ATC	CTG	GGC	ACG	GAG	GCT	TTG	ATC	TGG
901	CAG	<u>GGG</u>	ATT	GAG	CAG	GTA	TGT	ATC	CGT	CCT	GAG	CIT	ACA	TTG	TAC	TGT	<u>GGA</u>	<u>GGA</u>	CAA	CTC
961	AAC	TGA																		

图 1 *qa-3* 基因的核苷酸序列

Fig. 1 The nucleotide sequence of *qa-3* gene

The under line show rare codons; the codons in box are going to be mutated.

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)购自中科院微生物所菌种保藏中心。大肠杆菌 31884 和表达载体 pBV220 为本室保存。重组质粒 pBVqa3, pBVqa3R, pBVqa3G, pBVqa3RG, pBVqa3RC^m 及其 31884 工程菌由本室构建。

1.2 酶及其它生化试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Ex-Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;KOD-Plus DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司。大肠杆菌 DH5 α 感受态、DNA 柱式胶回收试剂盒购、DNA Marker 购自天为时代公司。

1.3 粗糙脉孢菌基因组 DNA 的制备

按文献[9]方法进行。

1.4 稀有密码子突变引物设计及扩增

根据文献 6 报道的基因序列设计 *qa-3* 正常扩增引物。拟突变的稀有密码子在 *qa-3* 基因上的碱基位置分别是 6, 9, 690, 696, 702, 749, 753, 754, 756, 757, 759, 803, 951, 954 分别对应的突变结果如下(括号中的为突变后的密码子):TCG(TCT), ACA(ACC), GGC(GGT), GGC(GGT), ATA(ATC), TTG(CTG), GTG(GTT), AGG(CGT), AGG(CGT), ATC(ATC), GGA(GGT), GGA(GGT)。设计 *qa-3* 正常引物 P1 和 P2, R 区突变引物 R1 和 R2, G 区突变引物 G1 和 G2 两端突变引物 P3 和 P4(见表 1)。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequence used for the PCR amplification

Code	Primer sequence
P1	5'-GGGGAATTCATGTCGACAGCAACCACCACAACAT-3'
P2	5'-GGGGGATCCTCAGTTGAGTTGCTCCACAGT-3'
R1	5'-CTGGTTGCTCGTATCGTCGAGACGTTG-3'
R2	5'-GATACGACGAACCAGCATCTCTTCTC-3'
G1	5'-GGTCCGGTGCGATCGTCGCTTGCAATCC-3'
G2	5'-GATCGCACCCGACCTCCAGCCCTTCA-3'
P3	5'-GGGAATTCATGACGACAGCAACCACCACAA-3'
P4	5'-GGGGATCCTCAGTTGAGTTGACCACCACAGTACAA-3'

以粗糙脉孢菌基因组 DNA 为模板,用引物 P1 和 P2 扩增出了 *qa-3* 基因,连接到 pBV220 载体上,得到质粒 pBV_{qa3},经过酶切鉴定,送北京三博远志公司测序。以 pBV_{qa3} 为模板,用引物 R1 和 P2 扩增 215bp 的小片段, R2 和 P1 扩增 763bp 的大片段。将此两片段混合,加入 dNTP, KOD-Plus, buffer, 在 97℃ 预变性 1min 后,于以下条件进行 5 个循环: 95℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 2min。5 个循环结束后,向反应体系中加入引物 P1 和 P2,在同样条件下再进行 30 个循环。电泳回收 PCR 产物 *qa3R*。以 pBV_{qa3} 为模板, G1 和 P2 扩增 278bp 的小片段, G2 和 P1 扩增 703bp 的大片段,将此两片段混合按照同样的步骤得到 PCR 产物 *qa3G*。将 PCR 产物酶切,回收之后连接到同样双酶切的 pBV220 载体上分别得到 pBV_{qa3R} 和 pBV_{qa3G}。将经过酶切鉴定的重组子,送公司测序。以 pBV_{qa3R}(或者 pBV_{qa3G})为模板, G1 和 P2 扩增 278bp 的小片段, G2 和 P1 扩增 703bp 的大片段,将此两片段混合按照同样的步骤得到 PCR 产物 *qa3RG* 和质粒 pBV_{qa3RG}。以 pBV_{qa3RG} 为模板,用 P3 和 P4 扩增得到 PCR 产物 *qa3RG^m*,连接到载体 pBV220 上得到 pBV_{qa3RG^m}。

1.5 *qa-3* 和 *qa-3* 突变的诱导表达

挑取含表达重组质粒的 DH5 α 单菌落接种到 LB

液体培养基中, 30℃ 振摇培养过夜后,次日按 1% 接种到 5mL LB 液体培养基中, 30℃ 振摇培养 2~3h 至 OD_{600} 约为 0.5~0.6 时,立即移至 42℃,热诱导 5h 后,取 1mL 菌液 SDS-PAGE 检测(凝胶浓度为 15%、考马斯亮蓝染色),薄层扫描测定表达产物占菌体总蛋白的百分比。

1.6 奎尼酸脱氢酶粗酶液的制备

挑取含表达重组质粒的 DH5 α 单菌落接种到 LB 液体培养基中, 30℃ 振摇培养过夜后,次日按 1% 接种到含 50mL LB 液体培养基的 250mL 三角瓶中, 30℃ 培养至 OD_{600} 达到 0.6 时,置于 42℃。诱导培养 5h 后, 4℃ 离心收集菌体。用 0.1mol/L, pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 遍,按 1g 湿菌 5mL 缓冲液的比例悬浮于含有 0.1mol/L Tris-HCl, 0.05mol/L NaCl, 0.2% β -巯基乙醇的缓冲液中,悬液在冰浴中超声破碎 200W,超声 2s,间隔 2s,60 次。破碎液 4℃、12000r/min 离心 10min,上清即为粗酶液,用于酶活性测定。

1.7 奎尼酸脱氢酶生物学活性分析及蛋白质含量测定

参考文献 10 的方法,略有改动。QDHase 活性分析(QA to DHQ)在 0.1mol/L 甘氨酸缓冲液(pH 9.8)中进行,1mL 反应体系中含有 2mmol/L NAD, 1.4mmol/L β -巯基乙醇, 20mmol/L QA,加入 100 μ L 酶粗提液, 30℃ 反应 10min,沸水浴 5min, 12000r/min 离心 1~2min,测定 340nm 处光吸收值。总蛋白质含量的测定采用微孔板 BCA 法,操作按 Pierce 公司产品说明书进行。

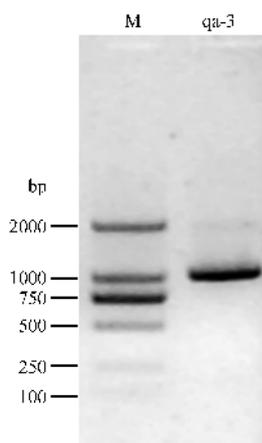
2 结果

2.1 *qa-3* 基因的扩增

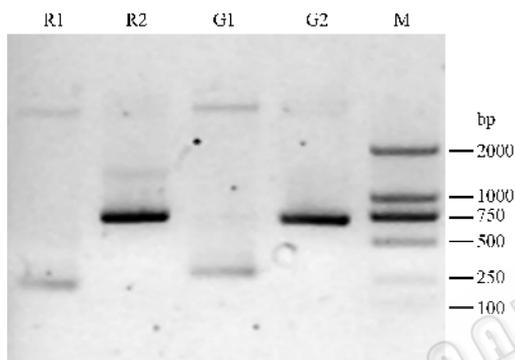
从粗糙脉孢菌中提取基因组 DNA,以该基因组 DNA 为模板,用引物 P1 和 P2 扩增出了 *qa-3* 基因(Fig. 2),加上两端酶切位点全长 986bp,经过 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切,连接到同样双酶切 pBV220 空载体上,得到质粒 pBV_{qa3}。*qa-3* 基因测序结果与 GenBank 比对 99.3%,与报道的序列一致(测序结果未列出)。

2.2 *qa-3* 基因的突变

以 pBV_{qa3} 为模板,用引物 R1 和 P2 扩增 215bp 的小片段, R2 和 P1 扩增 763bp 的大片段(Fig. 3),将两种片段混合,加入 dNTP, KOD-Plus, KOD-Plus buffer, 在 97℃ 预变性 1min 后,于以下条件进行 5 个循环: 95℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 2min。5 个循环结束

图 2 *qa-3* 基因的扩增Fig.2 Amplification of *qa-3* gene

M :DNA Marker D2000.

图 3 *qa-3* 基因突变过程中的大片段和小片段Fig.3 Big fragment and small fragment of mutating *qa-3* gene

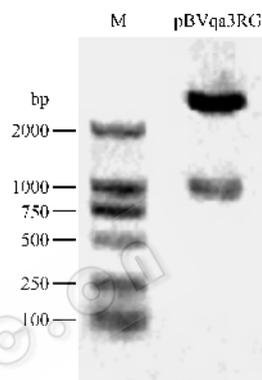
R1 :small fragment of mutating box R ; R2 :big fragment of mutating box R ; G1 :small fragment of mutating box G ; G2 :big fragment of mutating box G ; M :DNA Marker D2000.

后,向反应体系中加入两端引物 P1 和 P2,在同样条件下再进行 30 个循环。电泳回收 PCR 产物 *qa3R*。以 *pBVqa3* 为模板, G1 和 P2 扩增 278bp 的小片段, G2 和 P1 扩增 703bp 的大片段(Fig. 3),将此两片段混合按照同样的步骤得到 PCR 产物 *qa3G*。分别将 PCR 产物酶切,回收之后连接到同样双酶切的 *pBV220* 载体上分别得到 *pBVqa3R* 和 *pBVqa3G*。将经过酶切鉴定的重组子,送三博公司测序。以 *pBVqa3R*(或者 *pBVqa3G*)为模板, G1 和 P2 扩增 278bp 的小片段, G2 和 P1 扩增 703bp 的大片段,将此两片段混合按照同样的循环扩增步骤得到 PCR 产物 *qa3RG* 和质粒 *pBVqa3RG*。以经过酶切(Fig. 4)和测序鉴定的 *pBVqa3RG* 为模板,用引物 P3 和 P4 扩增得到 PCR 产物 *qa3RG^m*,连接到载体 *pBV220* 上得到 *pBVqa3RG^m*。测序结果表明突变位点正确(测序结果未列出)。突变策略示意图及结果见

图 6^[11]。

2.3 全菌蛋白的 SDS-PAGE

按方法 1.5 进行热诱导表达, SDS-PAGE 检测经热诱导后的全菌体裂解物,显示含有经过突变 *pBVqa3RG^m* 的 *DH5 α* 菌在分子量约 35kD 处有一新增特异蛋白带,与预期的 QDHase 分子量大小一致,对照组 *pBVqa3* 和空载体则没有此带(Fig. 5)。薄层扫描结果显示, *pBVqa3RG^m/DH5 α* 全菌体裂解物中目的蛋白(QDHase)的表达量占菌体蛋白总量的 23.8%。

图 4 *pBVqa3RG* 的 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切鉴定Fig.4 *EcoR* I and *BamH* I restriction analysis of recombinant plasmid *pBVqa3RG*

M :DNA marker D2000.

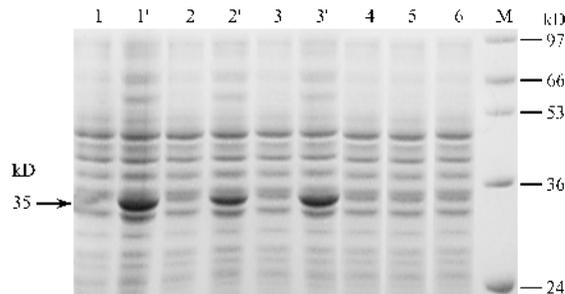


图 5 蛋白表达 SDS-PAGE 电泳

Fig.5 15% SDS-PAGE analysis of total cell proteins

1, 2, 3 : *pBVqa3RG^m/DH5 α* before induction ; 1', 2', 3' : *pBVqa3RG^m/DH5 α* after induction ; 4 : *pBVqa3* before induction ; 5 : *pBVqa3* after induction ; 6 : *pBV220/DH5 α* ; M :Marker.

2.4 表达产物奎尼酸脱氢酶的酶活测定

根据本实验的要求只需要测定全细胞裂解液中奎尼酸脱氢酶活性即可。按照方法 1.6 和 1.7 制备奎尼酸脱氢酶的粗酶液,测定总蛋白的含量和酶活性,同时以含空载体的 *pBV220/DH5 α* 菌体裂解物上清 QDHase 酶活性设定为 1,结果表明 *pBVqa3/DH5 α* 粗提物酶活性没有明显提高, *pBVqa3RG^m/DH5 α* 粗提物酶活性提高了 7.3 倍(Table 2)。

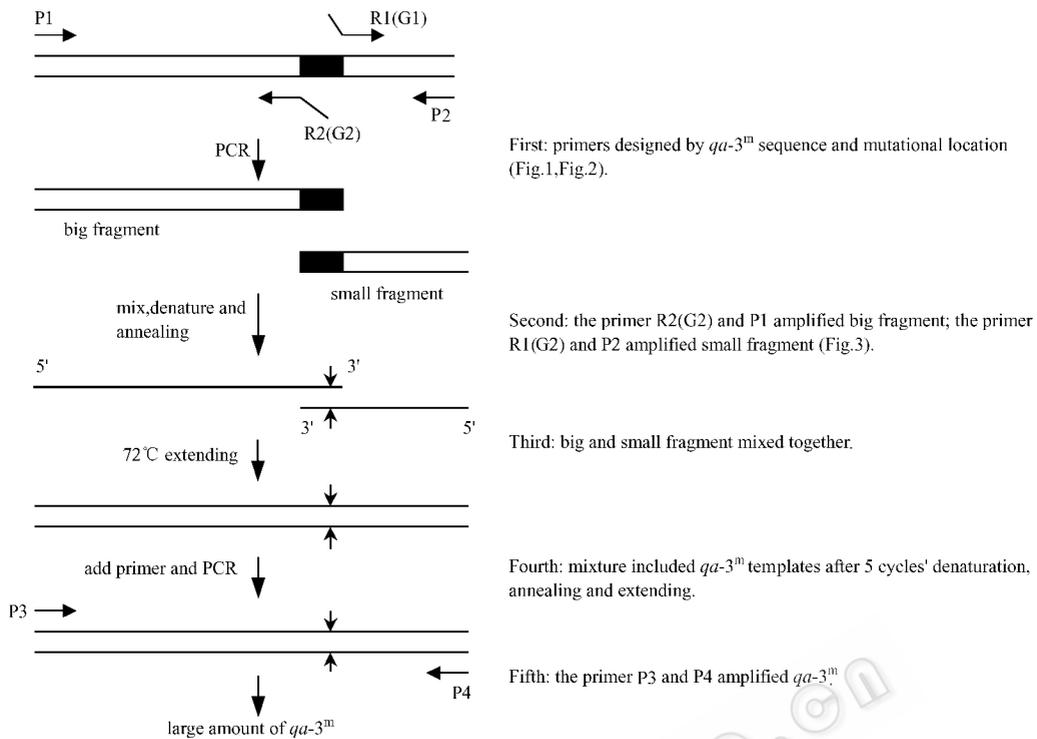
图6 $qa-3$ 基因突变策略示意图Fig.6 Strategy of mutation of $qa-3$ gene

表2 奎尼酸脱氢酶活性测定

Table 2 Analysis quinate 5-dehydrogenase activity

Extract	Specific activity	Relative activity
pBV220/DH5 α	6.1	1.0
DH5 α	5.5	0.9
pBVqa3/DH5 α	7.3	1.2
pBVqa3RG ^m /DH5 α	44.5	7.3

3 讨论

粗糙脉孢菌的 $qa-3$ 基因在大肠杆菌中不表达^[7],我们在 pBV220、pET22b +、pBvtac、pTrec99a 等不同载体上的实验也同时表明,该基因在大肠杆菌中不表达。虽然影响外源基因在大肠杆菌中表达的因素有很多,但是密码子的选用和 mRNA 的一、二级结构是影响表达的重要因素。由于遗传密码子的简并性,每一个氨基酸都由多种密码子来编码。然而,大肠杆菌对编码同一氨基酸的各种密码子使用频率并不相同,甚至相差很大^[12]。稀有密码子的存在大大降低了蛋白质合成的速率,使蛋白表达量降低,甚至使蛋白合成中途停止^[13,14]。

在众多稀有密码子当中,编码精氨酸的 AGG 和 AGA 是使用频率最低的两种。当有两个 AGA 相距很近时,严重影响翻译进程^[15]。在 $qa-3$ 基因 322 个密码子中,有 27 个稀有密码子,其中编码 Arg(R)的

有 8 个,编码 Gly(G)的有 9 个,编码 Pro(P)的有 6 个。两个相对比较集中的稀有密码子 AGG(AGA)密集区 R 区和 GGG 密集区 G 区,尤其是两个编码精氨酸的 AGG 紧密相连,估计这种排列方式可能会妨碍 $qa-3$ 基因的表达。本文对 $qa-3$ 基因突变位点的选择正基于此。如果用大肠杆菌中使用频率较高的 GTT,GGT,ATC,CTG,CGT,ATC 代替 AGG,ATA,TTG,ATT,GGG,GTG 可能会大大改善表达效果。

5'端改变的两个碱基分别在两个不同的密码子中,这两个密码子并不属于稀有密码子,3'端改变的两个碱基是 Gly 的稀有密码子,这几个密码子的改变导致了 mRNA 二级结构的自由能发生了很大的变化。通过计算机分析 mRNA 二级结构,发现 5'和 3'末端对其二级结构的影响很大,改变密码子从而减少 mRNA 两端二级结构的产生,可以使 $qa-3$ mRNA 的自由能由野生型的 -374.3 kJ/mol 降低到最小 -80.5 kJ/mol,而仅仅中间突变末端碱基不变的 $qa-3$ 基因与野生型自由能相差不大。

因此,欲使 $qa-3$ 基因高效表达,在优化该基因中稀有密码子的使用基础上减少 mRNA 5'和 3'末端二级结构的产生是一条可以尝试的途径。本项工作结果证实了我们的设想。

菌体自身不具有生成 QA 的能力,而异源基因编码的 QDHase 在 *E. coli* 中表达,可催化中间代谢产物 DHQ 转化成 QA,这对于利用 *E. coli* 莽草酸途径将碳源物质如葡萄糖或木糖发酵生产奎尼酸至关重要。本实验在 *E. coli* 中表达了具有催化活性的奎尼酸脱氢酶,并证实其有较高的酶活性,这为进一步构建不同种属多基因串联表达重组子,生物合成奎尼酸打下良好的基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Rao AVR, Chakraborty TK, Sankaranayanan D *et al.* Studies directed towards the synthesis of immuno- suppressive agent FK506 : synthesis of the entire TOP-HALF. *Tetrahedron Letters*, 1991, **32** (4):547 - 550
- [2] Chang HB(常会波), Liu Y(刘云), Wu JX(吴建新) *et al.* Cloning and expression of *aroB* gene encoding dehydroquinase synthase in *Escherichia coli*. *Buletinl Academic Military Medical Science(军事医学科学院院刊)*, 2004, **28**(4) 326 - 332
- [3] Liu Y(刘云), Wang SC(王世春), Zhang XQ(张学清) *et al.* Co-expression of the key enzymes for phenylalanine production in *E. coli*. *Journal of Microbiology(微生物学杂志)*, 2000, **4** :7 - 10
- [4] Chen MF(陈梅芳), Liu Y(刘云), Xu QS(徐琪寿). Clone and expression in *E. coli* of the quinate dehydrogenase *qutB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Letters in Biotechnology(生物技术通讯)*, 2002, **13**(6) 430 - 432
- [5] Frost JW, Draths KM, Ward TC. Synthesis of quinic acid from glucose. *United States Patent*, 5798236, 1998
- [6] Geever RF, Huiet L, Baum JA *et al.* Sequence, organization and regulation of the *qa* gene cluster of *Neurospora crassa*. *Journal Molecular Biology*, 1989, **207**(1): 15 - 34
- [7] Michael S, Mary EC, Christine CD *et al.* Clone the quinic acid (*qa*) gene cluster from *Neurospora crassa* : identification of recombinant plasmids containing both *qa-2*⁺ and *qa-3*⁺. *Gene*, 1981, **14** 23 - 32
- [8] Sharp PM, Li WH. Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for ' rare ' codons. *Nucleic Acids Research*. 1986, **14**(19): 7737 - 7749
- [9] Borgia PT, Eagleton LE, Miao YH. DNA preparations from *Aspergillus* and other filamentous fungi. *Biotechniques*, 1994, **17** (3): 430 - 432
- [10] Kang X, Scheibe R. Purification and characterization of the quinate : oxidoreductase from phaseolus Mungo sprouts. *Phytochemistry*, 1993, **33**(4): 769 - 773
- [11] Shi CH(时成波), Lu AG(吕安国), Wu WK(吴文芳) *et al.* The changes of rare cordons increase expression leve of SEA. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2002, **18**(4):477 - 480
- [12] Sharp PM, Devine KM. Codon usage and gene expression level in *Dictyostelium discoideum* : highly expressed genes do prefer ' optimal codons. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**(13): 5029 - 5039
- [13] Brinkmann U, Mattes RE, Bucke LP. *High-lever expression of recombinant genes in E. coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene*, 1989, **85**(1): 109 - 114
- [14] Robinson M, Lilley R, Little S *et al.* Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 1984, **12**(17): 6663 - 6671
- [15] Spanjaard RA, van Duijn J. Translation of the sequence AGG-AGG yields 50% ribosomal frameshift. *Process National Academic Science USA*, 1988, **85**(21): 7967 - 7971