

## 降低 mRNA 翻译起始区的稳定性原核非融合表达 HAb18GEF

张思河 邢金良 姚西英 陈志南\*

(第四军医大学基础部细胞工程研究中心,西安 710032)

**摘 要** 为在大肠杆菌中非融合表达肝癌相关抗原 HAb18G 胞外区片段(HAb18GEF),将 HAb18GEF 基因的 cDNA 插入原核表达载体 pET21a+。通过计算机辅助设计,对重组的 HAb18GEF/pET21a+ 的 mRNA 翻译起始区(TIR)的二级结构和密码子偏性同时进行预测。结果发现其存在稳定的茎环结构和许多稀有密码子。通过优化二级结构和优化密码子偏性二种策略分别来降低 HAb18GEF/pET21a+ 的 mRNA 翻译起始区(TIR)的稳定性。在不改变氨基酸序列的前提下,利用密码子的简并性,通过非连续定点突变实现这两种优化。将突变前后的重组子经酶切鉴定和测序验证后,转化感受态 JM109-DE3 宿主菌后,随机挑菌 37℃ 下用 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE、间接 ELISA、Western blot 和细胞分级分离法分析这些重组子的诱导表达情况。RNA dot blot 对比分析优化前后目的基因 mRNA 的量。结果证明,成功地构建了 HAb18GEF/pET21a+ 及其二种优化突变体。仅优化 TIR 区二级结构或仅优化 TIR 区密码子偏性均能实现 HAb18GEF 蛋白的非融合表达,而未优化的重组子不表达任何 HAb18GEF。非融合表达产物在大肠杆菌中主要以包涵体形式存在,高达 29.3%。由于过表达和细胞渗漏,培养基和周质腔中也可检测到少许的 HAb18GEF。优化二级结构和优化密码子偏性二种策略的 HAb18GEF 的非融合表达量基本相同。优化前后 HAb18GEF 转录的 mRNA 量没有差别。这些结果表明,降低 mRNA 翻译起始区的稳定性可实现肝癌相关抗原 HAb18G 胞外区片段在大肠杆菌中的非融合表达。

**关键词** 翻译起始区, mRNA 二级结构, 密码子偏性, 非融合表达, HAb18G 胞外区

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)02-0175-06

肝癌相关抗原 HAb18G/CD147 是一种高度糖基化的单次跨膜蛋白。在不同种属和组织中, HAb18G/CD147 的蛋白分布和糖基化方式不尽相同<sup>[1-2]</sup>。研究表明, HAb18G/CD147 在恶性肿瘤的表达量明显高于正常组织,其可通过刺激肿瘤周围的基质细胞分泌 MMPs 和促进肿瘤血管生成,而在肿瘤的侵袭和转移中发挥重要作用<sup>[3-8]</sup>。另外, HAb18G/CD147 还是一个潜在的粘附分子,其可通过与 Integrin 家族  $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$  形成蛋白复合物,进而参与细胞与细胞、细胞与基质的粘附<sup>[9]</sup>。上述功能的发挥,很大程度上依赖于其胞外区片段的表达(extracellular fragment, EF)及糖基化修饰作用。我们实验室利用自制的单克隆抗体 HAb18 从人肝癌 cDNA 文库中筛选得到的其全长的 cDNA<sup>[10]</sup>。经分析表明,其基因编码 269 个氨基酸, N 端 21 个氨基酸为信号肽,中间 185 个氨基酸为胞外区,然后是 24 个氨基酸构成的穿膜区, C 端 39 个氨基酸为胞内

区。胞外区 4 个半胱氨酸形成 2 个二硫键构成 IgSF 典型的半球型结构域。在获得该蛋白 cDNA 序列的基础上,我们曾成功地表达该蛋白于转染的 COS-7 及 CHO 细胞胞膜上。结果,瞬时表达的表达式虽较高,但转染效率只有 7%,而稳定表达筛选克隆的表达式要比瞬时表达低得多<sup>[11]</sup>。考虑到 HAb18GEF 的相对重要性及其糖基化效应尚不确定,因此宜用原核表达体系快速高效地大量表达,以进行深入的研究。我们已成功地将 HAb18GEF 与 GST 进行了原核融合表达<sup>[12]</sup>,但用所表达的融合蛋白淘筛噬菌体抗体库或筛选杂交瘤时存在假阳性富集或与 GST 交叉的现象,且融合的 GST 为下一步纯化工作也带来了干扰。为此,我们试图原核非融合表达 HAb18GEF,为进一步淘筛抗体库、筛选杂交瘤或研究 HAb18G/CD147 的其它功能和特性奠定纯的抗原基础。

我们曾多次尝试在不同的载体中非融合表达

收稿日期 2003-08-11, 修回日期 2003-12-08。

基金项目 国家 863 计划重点课题资助(No. 2001AA215101)

\* 通讯作者。 Tel 86-29-83374545 Fax 86-29-83293906 E-mail zhccerc@imm.ac.cn ©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

HAB18GEF,但均未成功。通过计算机辅助预测,发现构建的重组载体其 mRNA 的 TIR 存在稳定的二级结构。一般认为 mRNA 的 TIR 存在稳定的二级结构对翻译起始不利<sup>[13]</sup>。对于选定的表达载体和目的基因而言,SD 序列、起始密码子与 SD 的间距、目的基因氨基酸序列等影响翻译起始效率的一级结构因素已经优化或不能改变。要提高翻译起始效率,只有通过其 mRNA 二级结构的改变来实现。所以,我们在不改变氨基酸序列的前提下,利用密码子简并性同义突变 HAB18GEF 基因 5' 端的若干位点,降低其 mRNA 翻译起始区的稳定性,从而实现 HAB18GEF 蛋白的非融合表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 JM109-DE3 等为本室保存菌种。质粒 pBluescript ks( + / - )/HAB18G 由本室构建,内含 HAB18G 的全长 cDNA 编码序列。载体 pET21a + (5443bp) 购自 Novagen 公司。引物合成及测序由上海生工公司完成。限制性内切酶 *Nde* I, *Xho* I 等为 TaKaRa 公司产品。T4DNA 连接酶为 Biolabs 公司产品。Qiaquick® Plasmid Extraction Kit、Qiaquick® PCR Purification kit 和 Qiaquick® Gel Purification kit 均为 Qiagen 公司产品。IPTG 及 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自华美公司。抗人肝癌的鼠 HAB18 由本室自制。

### 1.2 方法

**1.2.1 mRNA 翻译起始区二级结构与密码子偏性分析** 取 -30 ~ +39 作为 TIR 分析范围,采用软件 DNASIS(2.5 版)预测外源基因 HAB18GEF 与 pET21a + 形成重组质粒可能的 TIR 二级结构。密码子偏性计算由 PCGENE 软件完成。

**1.2.2 寡核苷酸引物的设计与合成** 根据 TIR 二级结构及密码子偏性分析结果,利用密码子的简并性,在不改变表达产物氨基酸序列的前提下,非连续同义突变 HAB18GEF 的 TIR 区的若干位点,使其与表达载体重组后转录形成的 mRNA 的 TIR 区的自由能( $\Delta G$ )变小或全为大肠杆菌优势利用密码子。用 Premier 5.0 软件设计、优化引物并合成。

**1.2.3 重组表达质粒的构建与鉴定**:用 PCR 方法从质粒 pBluescript ks( + / - )/HAB18G 中扩增出突变(M)和未突变(N)的 HAB18G-EF, *Nde* I / *Xho* I 酶切回收纯化后连入 *Nde* I / *Xho* I 酶切纯化的 pET21a + 载体,酶切鉴定正确后,转化感受态 JM109-DE3 宿主菌。对重组克隆用 T7 引物进行正反向测序验证。

**1.2.4 目的基因的表达与活性分析** 将三种重组菌 30℃ 过夜培养并以 1 : 50 转接培养至  $OD_{600} = 0.6$  时 IPTG 诱导培养 12 h。取 1 mL 诱导物离心收集并沸水浴破菌,进行 12% SDS-PAGE。以 HAB18 为一抗,间接 ELISA 法测定各重组菌诱导后的培养上清和裂解液的结合活性。

**1.2.5 表达产物亚细胞定位及免疫学鉴定** 通过细胞分级分离法制备诱导的 HAB18GEF 重组表达菌的培养基上清、外周质、细胞质蛋白及包涵体蛋白,进行 12% SDS-PAGE 分析。对已定位的表达组分进行 Western blot 分析鉴定。

**1.2.6 mRNA 定量分析**:分别提取优化前后表达菌株诱导 12 h 后的总 RNA,等量转至硝酸纤维素膜,将 PCR 产物进行 <sup>32</sup>P 同位素标记后作探针与之杂交,再压片显影。

以上操作均按《分子克隆操作指南》第二版进行<sup>[14]</sup>。

## 2 结 果

### 2.1 PCR 引物的设计

设计合成 3 个 5' 端引物和 1 个未作突变的 3' 端引物(3'P-1)。3 个 5' 端引物中 2 个为突变引物(其中 5'P-2 为仅对 TIR 区二级结构进行优化,而 5'P-3 为仅对 TIR 区密码子进行优化),另 1 个为 5' 端未突变引物(5'P-1)。引物序列如下:

5'P-1: *Nde* I  
5'-GCGGAATTCATATCGCTGCCGGCACAGTCTTCACTACCGTAGAAGACCTT-3'

5'P-2: *Nde* I  
5'-GCGGAATTCATAATGCGACCTGCTACTGTTTTTCACTACCGTAGAAGATTGG-3'

5'P-3: *Nde* I  
5'-GCGGAATTCATAATGGCTGCTGCTACCGTTTTTACCACCGTTGAAGACCTG-3'

3'P-1: *Xho* I  
5'-CAATACTCGAGTTAGTGCCTGCCACCGGAGCG-3'

### 2.2 优化前后 mRNA 翻译起始区二级结构与密码子偏性分析

取 HAB18GEF/pET21a + 重组质粒的 -30 ~ +39 作为 TIR 区的分析范围,从一级结构比较看,无论 SD 序列还是 SD 与 AUG 之间距离,三种重组质粒均相同。优化前后的差别在于起始密码子 AUG 后有 7 或 9 个碱基不同,但所编码的氨基酸均相同,计算机预测 3 种重组质粒 TIR 可能的二级结构见图 1。优化前后的差别在于优化前的 TIR 区内存在二个明显的热力学稳定的茎环结构。未优化的 TIR 区生成自由能明显小于二级结构和密码子优化后的生成自由能。密码子偏性分析发现,优化前 TIR 区 AUG 后有

如下稀有密码子:GCC(丙氨酸,3位),ACA(苏氨酸,5位),GTC(缬氨酸,6位),CTC(亮氨酸,13位)。密码子优化后 TIR 区 AUG 后全为大肠杆菌最优势

利用密码子。仅优化 TIR 区二级结构后既无稀有密码子,也无优势利用密码子。

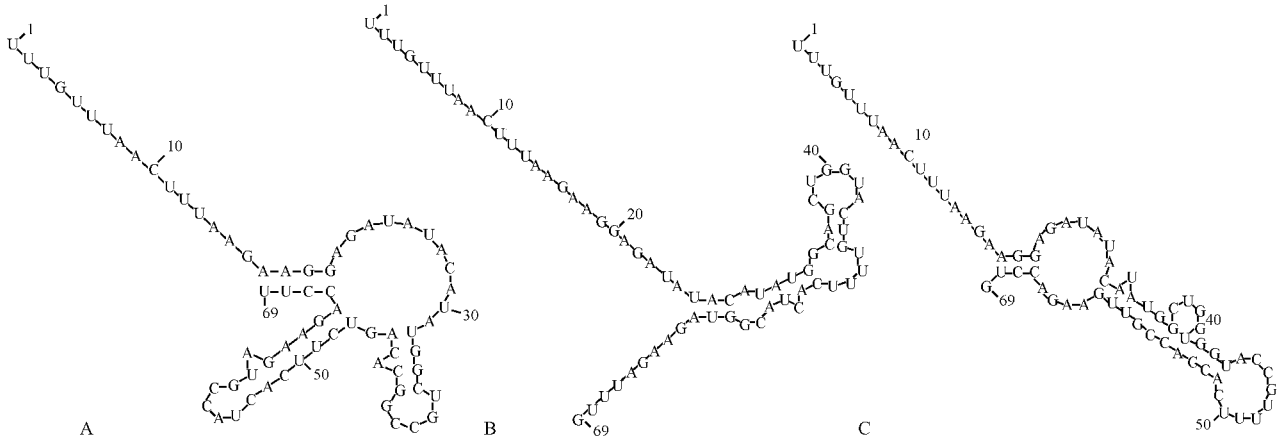


图1 HAB18GEF/pET21a+ 重组载体翻译起始区优化前后的二级结构分析

Fig.1 Secondary structure analysis of three TIRs in HAB18GEF/pET21a+

A: Non-optimized TIR,  $\Delta G = -64.4$  kJ/mol; B: TIR optimized only in secondary structure,  $\Delta G = -11.7$  kJ/mol; C: TIR optimized only in codon,  $\Delta G = -41.8$  kJ/mol

### 2.3 重组克隆的构建与鉴定

重组质粒的构建流程略。酶切后三种重组质粒进行琼脂糖凝胶电泳结果表明, HAB18GEF cDNA 片段已正确插入 pET21a+ 载体中的相应酶切位点(图2), 大小为 560bp 左右。用 T7 promoter primer 和 T7 terminator primer 对转化重组菌的插入片段进行正、反向测序表明, 三种目的片段已正确插入, 插入片段序列与设计序列一致, 无任何设计外意外突变(测序结果省略)。

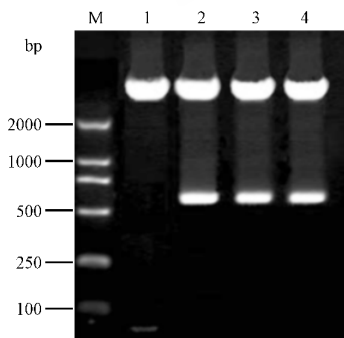


图2 HAB18GEF/pET21a+ 重组载体优化前后限制性酶切鉴定

Fig.2 Restriction enzymatic analysis of three recombinant

prokaryotic expression vector HAB18GEF/pET21a+

M: Marker DL-2000; 1: pET21a+ /NdeI + XhoI; 2: NdeI + XhoI /

HAB18GEF/pET21a+ (non-optimized TIR); 3: NdeI + XhoI / HAB18GEF/

pET21a+ (TIR optimized only in secondary structure);

4: NdeI + XhoI / HAB18GEF/pET21a+ (TIR optimized only in codon)

### 2.4 目的基因的表达与活性分析

SDS-PAGE 图谱显示, 在 IPTG 诱导下, TIR 区二

级结构或密码子优化的两种重组克隆在 30℃ 培养 12h 后均出现 20kD 左右的蛋白质带, 而 TIR 区未优化的重组克隆未见此蛋白带(图3)。经密度扫描分析, 表达蛋白可达总菌体蛋白的 17.8% ~ 29.3%。仅优化 TIR 区二级结构的重组克隆比仅优化 TIR 区密码子的重组克隆表达的蛋白量多(前者平均为 26%, 后者平均为 18%)。间接 ELISA 的结果显示(图4), 优化的重组克隆菌的培养基上清与 HAB18 呈弱阳性结合, 其菌体裂解液与 HAB18 呈强阳性结合, 而未优化的重组克隆菌的培养基上清与菌体裂解液均不和 HAB18 结合。

### 2.5 表达产物亚细胞定位及免疫学鉴定

对细胞分级分离得到的二种优化重组菌的各组分的 SDS-PAGE 表明(图6), 表达的 HAB18GEF 蛋白在细菌胞内主要以大量的包涵体形式存在, 极少量存在于周质腔中(这可能是少量渗出, 也可能是分级分离不彻底的原因)。对包涵体组分的 Western blot 分析表明(图6), HAB18GEF/pET21a+ /JM109-DE3 表达的 20kD 蛋白质能与 HAB18 单抗结合并显色, 结合前面 DNA 测序结果, 可以肯定此 20kD 蛋白质为 HAB18GEF。

### 2.6 RNA dot blot 分析

RNA dot blot 的结果表明, HAB18GEF 未优化与优化的相应 mRNA 的量无明显差别, 优化 TIR 区二级结构与优化 TIR 区密码子相应的 mRNA 的量无明显差别(图7)。

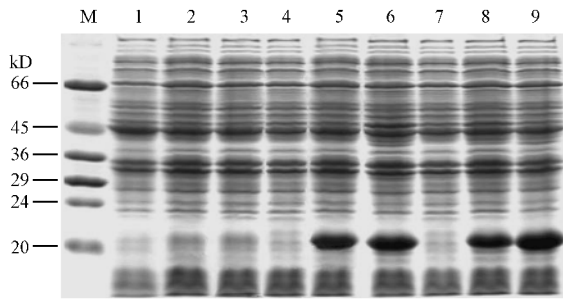


图 3 HAbI8GEF/pET21a+ 重组克隆优化前后 SDS-PAGE 电泳比较分析

Fig.3 Comparison of the expression of three recombinant HAbI8GEF/pET21a+ clones by SDS-PAGE analysis

M : protein weight marker ; 1 ,2 ,3 clones : non-optimized TIR ; 4 ,5 ,6 clones : TIR optimized only in codon ; 7 ,8 ,9 clones : TIR optimized only in secondary structure ; 1 ,4 ,7 clones : no induction

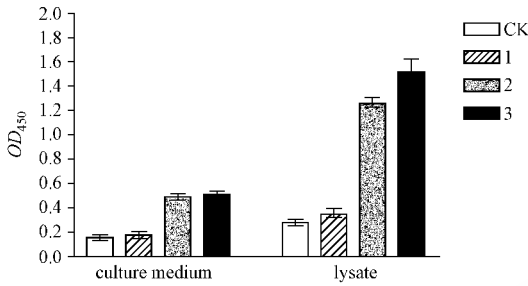


图 4 间接 ELISA 测定 HAbI8GEF/pET21a+ 重组克隆菌表达产物的结合活性

Fig.4 Indirect ELISA of the expression products of the recombinant HAbI8GEF/pET21a+ clones

1 : non-optimized clones ; 2 : clones optimized only in codon ; 3 : clones optimized only in secondary structure ; CK JM109-DE3 clone

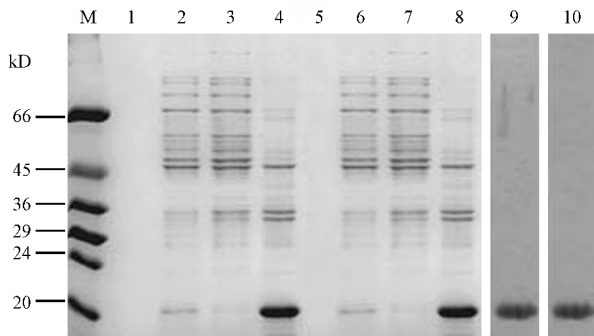


图 5 重组克隆菌表达产物 HAbI8GEF 的亚细胞定位 SDS-PAGE 与 Western blot 分析

Fig.5 SDS-PAGE and Western blot analysis of the intracellular distribution of the expressed HAbI8GEF in recombinant clone

M : protein weight marker ; 1 - 4 : components of clones optimized only in secondary structure ; 5 - 8 : components of clones optimized only in codon ; 1 ,5 : culture medium ; 2 ,6 : intermembrane space protein ; 3 ,7 : cytoplasm protein ; 4 ,8 : inclusion body & membrane protein ; 9 : Western blot staining of inclusion body in induced clones optimized only in secondary structure ; 10 : Western blot staining of inclusion body in induced clones optimized only in codon

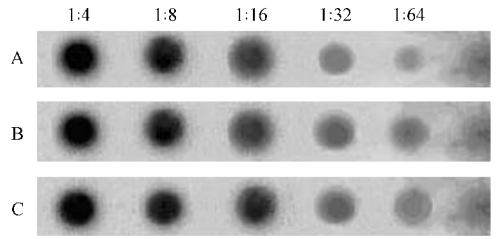


图 6 RNA dot blot 分析重组克隆菌转录 HAbI8GEF mRNA 的量

Fig.6 Amount of HAbI8GEF mRNA determined by RNA dot blot A : non-optimized mRNA ; B : mRNA optimized only in secondary structure ; C : mRNA optimized only in codon ; ( 1 : 4 - 1 : 64 ) : available dilution

### 3 讨 论

外源基因在大肠杆菌中的表达水平受启动子强度、载体性质、表达类型、RNA 二级结构、密码子偏性、终止密码等多种因素影响。通常选用的高效表达载体已具有强的启动子、强的 SD 序列及合适的 SD 与 AUG 间隔。由于在原核系统中转录与翻译是偶联的，故没有必要考虑整体二级结构、密码子偏性与高(低)表达的关系。通过外源基因与载体连接处的二级结构、密码子偏性的分析发现，具有以上优势的表达载体常常却会因翻译起始区(TIR)二级结构或稀有密码子的影响，使其表达受到抑制<sup>[13]</sup>。降低 TIR 二级结构的自由能或同义突变稀有密码子为优势密码子往往可以提高翻译起始效率，从而有利于外源基因的表达<sup>[15,16]</sup>。

然而，预测 TIR 二级结构，不仅要遵循热力学能量最低原理，还涉及确定 TIR 的具体范围。所取 TIR 范围不同(有时仅相差几个核苷酸)，其二级结构也完全不同。Ganoza<sup>[17]</sup>的统计结果表明，5' 翻译起始的信息都位于起始密码子上、下游各 35 碱基范围内。李伍举等<sup>[18]</sup>的统计结果表明，外源基因 5' 端 -30 ~ +39 区的二级结构自由能与表达水平具有显著的相关性，考虑到不同表达载体与不同外源基因因此范围并非绝对一致，但也不会相差太大，在排除其它因素的基础上，我们选取了 -30 ~ +39 区作为软件预测 HAbI8GEF/pET21a+ 的翻译起始区。结果发现，其翻译起始区存在着稳定、复杂的茎环结构(图 1)，且 AUG 后有连续的稀有密码子出现。这极可能是实验伊始我们多次将 HAbI8G-EF 基因插入 pET21a+ 载体转化后并无表达的原因。为此，我们采取了两种不同的策略来优化 HAbI8GEF/pET21a+ TIR 区，一种是仅对 TIR 区的二级结构进行优化而

不考虑密码子偏性,另一种则相反,仅对 TIR 区密码子进行优化。结果发现,两者都能使 HAb18GEF 高效表达,但前一策略的表达量更高。RNA dot blot 显示两者转录的 mRNA 量相同,这说明表达量的差别主要是翻译效率不同所致。进一步分析发现,仅对 TIR 区密码子进行优化,实际上同时也降低了其二级结构的稳定性( $\Delta G$  由  $-64.4$  kJ/mol 降为  $-41.8$  kJ/mol),但降低的幅度没有前一策略( $\Delta G$  由  $-64.4$  kJ/mol 降为  $-11.7$  kJ/mol)大,这可能是其表达量相对较低的原因。一般认为,稀有密码子对翻译效率的影响与它们的分布状态密切相关,当稀有密码子在 mRNA 链中呈非连续分布则对翻译效率无明显影响<sup>[19]</sup>。我们注意到,在仅对 TIR 区的二级结构进行优化的同时,也改变了原来 TIR 区连续性稀有密码子的分布。由于 mRNA 的 TIR 是由载体的一部分和外源基因 5'端转录本共同组成,任何一部分核苷酸的改变都将导致其 TIR 二级结构稳定性随之发生改变,而二级结构的不稳定往往利于核糖体的接近和结合<sup>[16 20]</sup>,从而促进翻译的起始。所以,本实验的两种优化策略都可解释为是通过降低 TIR 区的稳定性来实现 HAb18GEF 蛋白的非融合表达。

## REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Kanekura T, Miyauchi T, Tashiro M *et al.*. Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences. *Cell Struct Funct*, 1991, **16**(1): 23-30

[ 2 ] Fadool JM, Linsler PJ. Differential glycosylation of the 5A11/HI7 antigen by neural retina and epithelial tissues in the chicken. *J Neurochem*, 1993, **60**(4): 1354-1364

[ 3 ] Duan XI(段旭东), Ma HX(马海昕), Chen ZN(陈志南). The expression and significance of human hepatoma associated antigen HAb18G mRNA and its protein product in liver cancer. *Tumor(肿瘤)*, 2002, **22**(4): 301-302

[ 4 ] Wang XH(王贤辉), Chen ZN(陈志南), He SY(贺书云). Relationship of HAb18G and MMP-2 expression with human hepatocarcinoma cell differentiation. *Chinese Journal of Clinical Hepatology(临床肝胆病杂志)*, 2002, **18**(1): 55-56

[ 5 ] Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res*, 2001, **61**(5): 2276-2281

[ 6 ] Jiang JL, Zhou Q, Yu MK *et al.*. The involvement of HAb18G/CD147 in regulation of store-operated calcium entry and metastasis of human hepatoma cells. *J Biol Chem*, 2001, **276**(50): 46870-46877

[ 7 ] Li Y, Shang P, Qian AR *et al.*. Inhibitory effects of antisense RNA

of HAb18G/CD147 on invasion of hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Gastroenterol*, 2003, **9**(10): 2174-2177

- [ 8 ] Guo HM, Zucker S, Martin K *et al.*. Stimulation of matrix metal proteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 1997, **272**(1): 24-27
- [ 9 ] Berditchevski F, Chang S, Bodorova J *et al.*. Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J Biol Chem*, 1997, **272**(46): 29174-29180
- [ 10 ] Chen ZN(陈志南), Yang Z(杨志), Mi L(米力) *et al.*. Structure and function analysis of hepatoma associated antigen HAb18G. *Journal of Cell Molecular Immunology(细胞与分子免疫学杂志)*, 1999, **15**(1): 34
- [ 11 ] Xing JL(邢金良), Chen ZN(陈志南), Huang BC(黄宝成) *et al.*. The construction and expression of eukaryotic expression vector containing hepatoma associated antigen HAb18G. *Journal of Cell Molecular Immunology(细胞与分子免疫学杂志)*, 2000, **16**(4): 342-345
- [ 12 ] Xing JL(邢金良), Wang YQ(王永庆), Yang XM(杨向民) *et al.*. Prokaryotic expression and immunological analysis of the extracellular domain of hepatoma associated antigen HAb18G. *Journal of the Fourth Military Medical University(第四军医大学学报)*, 2003, **24**(12): 1057-1060
- [ 13 ] SchuLz VP, Reznikoff WS. In vitro secondary structure analysis of mRNA from LacZ translation initiation mutants. *J Mol Bio*, 1990, **211**: 427-445
- [ 14 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 15 ] De smit MH, Van Duin J. Control of translation by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*: a quantitative analysis of literature data. *J Mol Biol*, 1994, **244**: 144-150
- [ 16 ] Wikstrom PM, Lind LK. Importance of mRNA folding and start codon accessibility in the expression of gene in a ribosomal protein operon of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1992, **224**: 949-966
- [ 17 ] Ganoza Mc, Kofoid EC, Marliere P *et al.*. Potential secondary structure at translation initiation sites. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**: 345-360
- [ 18 ] Li WJ(李伍举), Wu J(吴加金). Quantitative analysis on expression level of foreign gene in pBV220 vector. *Chinese Journal of Virology(病毒学报)*, 1997, **13**(2): 126-133
- [ 19 ] Rosenberg AH, Goldman E, Dunn JJ *et al.*. Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli* demonstrated with a versatile codon test system. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 716-722
- [ 20 ] Komitzer D, Teff D, Altuvia S *et al.*. Genetic analysis of bacteriophage cIII gene mRNA structural requirements for translation initiation. *J Bacteriol*, 1989, **171**(5): 2563-2572

## Non-fused Expression of HAb18GEF by Reducing Stability of Translational Initiation Region in mRNA

ZHANG Si-He XING Jin-Liang YAO Xi-Ying CHEN Zhi-Nan

( Cell Engineering Research Center , Fourth Military Medical University , Xi 'an 710032 , China )

**Abstract** To express the extracellular fragment of hepatoma associated antigen HAb18G( HAb18GEF ) in *E. coli* efficiently in a non-fusing way , the cDNA of HAb18GEF gene was inserted into prokaryotic expression vector pET21a + . The secondary structure and codon adaptation of translational initiation region( TIR , from -30 to + 39 ) in mRNA of recombinant vector HAb18GEF/pET21a + was predicted simultaneously by computer-aided design. Stable Stem-Loop structures and many low-usage codons were detected in mRNA-TIR of non-optimized recombinant HAb18GEF/pET21a + vector. The stability of mRNA-TIR in recombinant HAb18GEF/pET21a + vector was reduced with following methods :( 1 ) optimization of secondary structure ( 2 ) optimization of codon adaptation. These optimization were realized by non-continual site-directed mutagenesis without changing any amino acid sequence in TIR. After being checked through restriction endonuclease digestion and confirmed through nucleotide sequencing , the pre-optimized and post-optimized recombinant vectors were transformed into competent *E. coli* JM109-DE3. The resulted recombinant clones were selected randomly and induced by IPTG at 37°C . The induced production of these recombinants was analyzed by SDS-PAGE , indirect ELISA , Western blot , and cell fractionation assay. The amount of HAb18GEF mRNA was also detected by RNA dot blot between pre-optimized recombinant and post-optimized recombinant. The results revealed that recombinant non-fused vectors HAb18GEF/pET21a + were successfully constructed and optimized in the secondary structure and codon adaptation of TIR respectively. The HAb18GEF was expressed efficiently in a non-fusing way in recombinant *E. coli* by secondary structure optimization or codon adaptation optimization. Whereas , no expression of HAb18GEF was detected in pre-optimized recombinants. The non-fused expression products-HAb18GEF , mainly as inclusion body in *E. coli* , yielded highly above 29.3% . A trait of expression HAb18GEF was also detected both in intermembrane space and in culture medium due to over-expression and cell leakage. Difference in non-fused expression level of HAb18GEF between secondary structure optimization and codon adaptation optimization was negligible. No difference in amount of transcribed mRNA of HAb18GEF between the pre-optimized and the post-optimized recombinants was detected. To sum up , it 's feasible to express hepatoma associated antigen HAb18GEF in a non-fusing way by reducing the stability of TIR in mRNA.

**Key words** translational initiation region ( TIR ) , mRNA secondary structure , codon adaptation , HAb18GEF , non-fused expression

Received : 08-11-2003

This work was supported by National " 863 " Project of China ( No. 2001AA215101 ).

\* Corresponding author. Tel 86-29-83374545 ; Fax 86-29-83293906 ; E-mail: zheerc2@fmmu.edu.cn <http://journals.im.ac.cn>