

鸟枪法筛选枯草芽孢杆菌基因强启动子 及对黄牛 GHRL 基因的表达

张爱玲^{1,2}, 张 丽^{1,3}, 杨明明¹, 张良志¹, 陈 宏^{1,4}

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;
2 华南农业大学 动物科学学院, 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广东 广州 510642;
3 广东海洋大学 农学院, 广东 湛江 524088; 4 徐州师范大学 细胞与分子生物学研究所, 江苏 徐州 221116)

摘要:利用鸟枪法通过大肠埃希菌-枯草芽孢杆菌启动子探针载体分离到枯草芽孢杆菌 168 菌株的 103 个基因启动子片段, 发现 1 个 672 bp 的启动子片段 P3.4.23, 能够在大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌高效启动报告基因 β -半乳糖苷酶的表达, 其酶活性分别达到 3 418、2 877 U/mL。相似性分析表明 P3.4.23 启动子片段具有枯草芽孢杆菌基因启动子的保守序列, 并确定其转录活性区域位于 5 ~ 333 bp, 为 *yxjE* 基因的调控序列。将黄牛 GHRL 基因导入到启动子亚克隆序列下游, 使该基因在枯草芽孢杆菌中得到了表达。

关键词:枯草芽孢杆菌; 大肠埃希菌; 启动子探针载体; GHRL 基因; 牛; 鸟枪法

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)03-0092-05

Isolation of One Strong Gene Promoter from *Bacillus subtilis* Through Shot-Gun Method and the Expression of Cattle GHRL Gene

ZHANG Ai-ling^{1,2}, ZHANG Li^{1,3}, YANG Ming-ming¹, ZHANG Liang-zhi¹, CHEN Hong^{1,4}

(1 Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2 Guangdong Provincial Key Lab of Agro-Animal Genomics and Molecular Breeding, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3 Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 4 Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: Through shot-gun method, one hundred and three DNA segments of promoter from genomic library of 168 *Bacillus subtilis* were detected with *Escherichia coli*-*B. subtilis* shuttle plasmid. The activities of the reporter gene of *bgaB* driven by one promoter fragment, P3.4.23, exhibited high expression strength both in *E. coli* and *B. subtilis*. The fragment was 672 bp long and stronger than P43 promoter. The activities of *bgaB* promoted by the fragment reached to 3 418 and 2 877 U/mL in *E. coli* and *B. subtilis*, respectively. The blasting result showed that the fragment had the conserved sequences of *B. subtilis* promoters. The putative promoter was sub-cloned and identified, which showed that its important region for transcription, 5 ~ 333 bp, is the regulatory region of *yxjE* gene. GHRL gene of cattle was driven by the sub-cloned promoter. The SDS-PAGE showed that GHRL gene was expressed in *B. subtilis*.

Key words: *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*; promoter probe vector; GHRL gene; cattle; shot-gun method

收稿日期: 2011-02-17

作者简介: 张爱玲(1977—), 女, 讲师, 博士; 通信作者: 陈 宏(1955—), 男, 教授, 博士, E-mail: hongchen1212@263.net

基金项目: 国家自然科学基金(30972080); 国家科技支撑计划项目(2008BADB2B03-19); 国家肉牛产业体系(CARS-38); 国家转基因专项(2009ZX08009-157B, 2008ZX08007-002, 2009ZX08007-005B-07); 中国博士后科学基金(20100480763)

能量平衡一直以来是家畜育种过程中关注的重要问题之一,当动物机体处于精确的能量平衡时才能够保持很好的经济效益。因此,外源性的微生物制剂添加到饲料中来调节家畜的能量平衡已经成为一种经济的手段。枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 表达系统是继大肠埃希菌 *Escherichia coli* 之后的又一高效表达系统,被公认为是一种非常安全的生物(Generally regarded as safe organism, GRAS)表达系统,在工业上和生物技术领域得到了广泛应用^[1-2]。随着其基因组序列的测序完成^[3],对其编码基因和一些调控元件的功能研究已被引起重视。关于枯草芽孢杆菌启动子的研究也比较多,如 P43^[4] 启动子被认为是强启动子。GHRL (Ghrelin) 是近年来发现的哺乳动物内源性的生长激素释放激素受体(GHSR)的内源性配体,1999年首次在大鼠及人的胃中分离了这一多肽^[5],有人译为生长素。Arvat等^[6]报道正常人注射 GHRL 后会引引起饥饿反应,所以又有人称之为胃饥饿素。胃肠道和下丘脑产生的 GHRL 影响中枢对能量平衡和摄食的调节,动物饥饿时血液中 GHRL 增加,在促进摄食的同时减少体内脂肪的消耗,引起动物体质量增加。为了获得枯草芽孢杆菌基因强启动子,并实现目的蛋白 GHRL 基因在其中的高效表达,本研究通过鸟枪法从枯草芽孢杆菌 168 菌株中筛选到一强启动子,将 GHRL 基因置于启动子片段下游,构建了 GHRL 基因大肠埃希菌-枯草芽孢杆菌穿梭表达载体,使该基因在枯草芽孢杆菌中得到成功表达,获得生产 GHRL 目的蛋白的菌种,为黄牛增食欲 GHRL 枯草芽孢杆菌微生态制剂研究积累了资料。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠埃希菌 DH5 α 由陕西省农业分子生物学重点实验室保存;出发菌枯草芽孢杆菌 168 菌株购于武汉大学中国典型培养物保存中心;枯草芽孢杆菌受体菌 1A747 由俄亥俄州立大学杆菌保藏中心惠赠。启动子探针穿梭载体 pShuttleI、pGJ-bgaB 和 pLJ-2 主要载体均由武汉阳光广济公司构建保存。

1.2 培养物、酶和其他试剂

大肠埃希菌 DH5 α 、枯草芽孢杆菌 168 和 1A747 均在 37℃、LB 培养基进行培养。用于 1A747 电转化感受态细胞制备的 LBSP 培养基为:蛋白胨 10.0 g;酵母提取物 5.0 g;NaCl 5.0 g;蔗糖 85.6 g;KH₂PO₄ 1.9 g;K₂HPO₄ 8.2 g;去离子水定容至 1 000 mL。LB-SPG:LBSP 900 mL + 甘油 100 mL。溶菌酶 10 mg 溶于 100 mL 灭菌蒸馏水;Triton-X100 10 mL 溶于 90 mL

灭菌蒸馏水。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、去磷酸化酶为 TOYOBO 公司产品,氯霉素和壮观霉素为华美公司产品。X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D 半乳糖苷)为大连宝生物公司产品,ONPG(邻硝基苯基吡喃半乳糖苷)为 Sigma 公司产品,pGEM-T 克隆载体为 Promega 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。DNA 测序工作由北京奥科生物技术有限公司完成。

1.3 分子克隆技术

基本的分子克隆技术,如质粒提取、DNA 回收、DNA 酶切、DNA 连接、DH5 α 电感受态细胞制备及质粒电转化均按文献[7]进行。枯草芽孢杆菌感受态细胞制备按文献[8-9]进行。

1.4 引物设计与 PCR 扩增

黄牛 GHRL 基因序列为:上游引物 G-E-1, AT-GAATTCCCCGCCCCGTGGACC;下游引物 G-S-2, AT-GAGCTCTCACTCGTTAGCCAGGGTTTCTTCAG, 其中斜体为保护碱基,下划线分别为 EcoRI、SacI 限制性酶切位点,扩增片段大小为 363 bp。引物由上海生工公司合成。PCR 反应体系为 20 μ L:10 $\times$ PCR Buffer (Mg²⁺) 2.0 μ L;dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 0.4 μ L;上、下游引物各 0.4 μ L;TaqDNA 聚合酶 (2 U/ μ L) 0.3 μ L;DNA 模板 1.0 μ L;ddH₂O 15.5 μ L。PCR 反应程序为 95℃ 预变性 5 min 后,按 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共进行 30~35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

1.5 β -半乳糖苷酶蛋白活性的测定

参照文献[10]方法进行。挑取单菌落,置于盛有 30 mL 液体 LB 培养基的 250 mL 三角瓶,培养至需要的时间,测定菌液的 595 nm 处光密度;同时收集 1 mL 菌液,离心弃去上清,将菌体溶于 Z-缓冲液 (Na₂HPO₄ · 7H₂O, 60 mmol/L; NaH₂PO₄, 40 mmol/L; KCl, 10 mmol/L; MgSO₄ · 7H₂O, 1 mmol/L; β -巯基乙醇, 50 mmol/L), 加入溶菌酶 60 μ L 和 TritonX-100 30 μ L, 37℃ 作用 30 min, 随后与 ONPG 55℃ 水浴反应 15 min, 加入 Na₂CO₃ 终止反应,测定此时溶液 420 nm 处光密度。酶活计算公式 = $66.7 \times D_{420\text{ nm}} / D_{595\text{ nm}} \times$ 稀释倍数。其中 $D_{595\text{ nm}}$ 的范围为 0.10~0.65, $D_{420\text{ nm}}$ 的范围为 0.1~0.8。

1.6 载体构建与 SDS-PAGE 检测

本研究所用到的质粒及其特征见表 1。将枯草芽孢杆菌 168 菌株基因组 Sau 3AI 酶切片段与探针载体 pShuttleI 连接,转化大肠埃希菌后获得枯草芽孢杆菌基因启动子文库,鉴定后得到 pSI3423 质粒。pYG78 的构建见文献[11]。

表 1 质粒及其特征

Tab. 1 The plasmids used in this study

质粒	质粒特征
pShuttleI	Cm ^R (氯霉素抗性)和 Spec ^R (壮观霉素抗性), bgaB 前面无启动子,但有核糖体结合位点
pSI3423	Cm ^R 和 Spec ^R , P3. 4. 23 启动子片段置于 bgaB 基因上游
pGJ-bgaB	Cm ^R 和 Spec ^R , P43 启动子置于 bgaB 上游
pLJ-2	Cm ^R , bgaB 前面无启动子
pYG78	Cm ^R , pLJ-2 骨架, bgaB 前面为亚克隆启动子,有 yxiE 启动子本身 RBS
pYG-Gh	Cm ^R , pLJ-2 骨架,亚克隆启动子下游为 GHRL 基因

在前期黄牛 GHRL 基因克隆和生物活性鉴定的基础上^[12],以构建的 GHRL 大肠埃希菌高效表达载体 pGh-32 作为模板,用引物 G-E-1 和 G-S-2 扩增获得 GHRL 基因片段,将之与 T 克隆载体连接,构建中间载体 pGh-B-T,然后用 *EcoRI* 和 *SacI* 双酶切 pGh-B-T,获得带有粘性末端的 GHRL 基因片段;同时用 *EcoRI* 和 *SacI* 双酶切带有较强启动子的载体 pYG-78 (骨架来自 pLJ-2),切去 bgaB 基因,回收载体骨架.将 GHRL 基因片段与 pYG-78 载体回收骨架进行连接,构建 pYG-Gh 载体,电转化 1A747 感受态细胞:将质粒 4~10 μL 置入到 0.2 mm 电转杯中,设置 2 500 V、5 ms,然后电击转化入制备好的感受态细胞中.在 1 mL 的 LBSPG 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上培养 1 h,离心收集菌体涂板过夜培养.挑取菌落经测序鉴定正确后,在 LB 液体培养基中扩大培养,进行 SDS-PAGE 检测.

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌基因启动子文库构建和 P3. 4. 23 启动子的分离与克隆

用 *Sau3A*I 限制性内切酶对 168 菌株的基因组

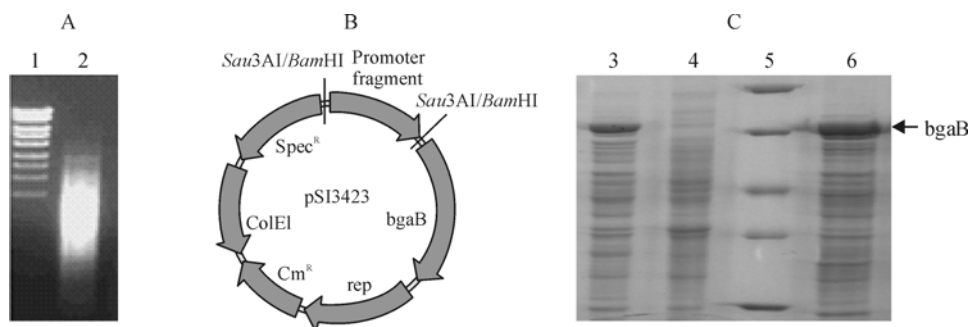
DNA 进行不完全酶切,使酶切片段集中在 0.1~3.0 kb 之间(见图 1A).启动子探针载体 pShuttleI 携带 bgaB(β -半乳糖苷酶基因),该报告基因前面有核糖体结合位点,但无启动子,用 *Bam* HI 酶将载体完全酶切,并做去磷酸化处理,利用 *Sau3A*I 与 *Bam*HI 酶为同尾酶的性质,与上述基因组酶切片段以适当比例连接,电转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,并将转化后的细胞涂在氯霉素和壮观霉素双抗性平板上,同时涂 X-gal,所出现的蓝色克隆即为枯草芽孢杆菌基因启动子文库,阳性质粒结构见图 1B.

首先在氯霉素和壮观霉素双抗性 LB 平板上共得到 103 个大肠埃希菌蓝色克隆,挑取单菌落振荡培养,测定 24 h 酶活,启动子探针载体 pShuttleI 作为阴性对照,获得 5 个酶活在 3 000~4 000 U/mL 的克隆,10 个 2 000~3 000 U/mL 的克隆,1 000~2 000 U/mL 的克隆有 32 个,1 000 U/mL 以下的 55 个.将酶活在 3 000 U/以上的 5 个质粒转化 1A747 感受态细胞,对这 5 个克隆测定 24 h 酶活,pGJ-bgaB 作为阳性对照,仅发现 pSI3423 启动子在枯草芽孢杆菌中酶活值保持较高,见表 2.为了进一步验证 P3. 4. 23 DNA 片段具有转录活性,将其在枯草芽孢杆菌对 bgaB 的表达情况进行了 SDS-PAGE(见图 1C),该片段能够高效启动 bgaB 基因的表达,蛋白质相对分子质量接近 70 000,与预期大小一致.

表 2 P3. 4. 23 在大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌中启动 bgaB 的活性比较

Tab. 2 Comparison of bgaB activities driven by P3. 4. 23 in *E. coli* and *B. subtilis*

	U/mL		
受体菌	pSI3423	pShuttleI	pGJ-bgaB
DH5 α	3 417	0	
1A747	2 877	0	1 457



1: #SM393 marker, 从上到下为 10.0、8.0、6.0、5.0、4.0、3.0、2.5、2.0、1.5 kb; 2: 168 菌基因组 *Sau3A*I 酶切片段; 3: pGJ-bgaB (阳性对照); 4: pShuttleI (阴性对照); 5: 蛋白质相对分子质量标准, 从上到下为 116 000、66 200、45 000、35 000、25 000; 6: pSI3423. A: 枯草芽孢杆菌 168 菌基因组 *Sau3A*I 酶切图; B: pSI3423 质粒示意图; C: bgaB 的 SDS-PAGE (pSI3423).

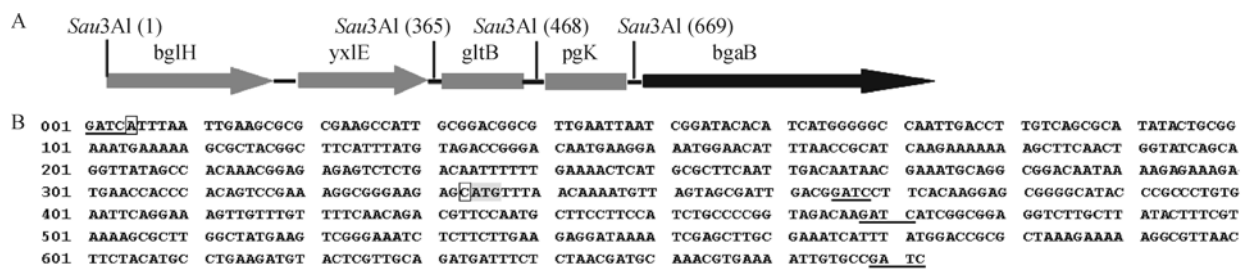
图 1 pSI3423 质粒构建与驱动 bgaB 基因表达

Fig. 1 The construction of pSI3423 and the expression of bgaB

2.2 P3.4.23 测序结果与分析

对 pSI3423 进行了测序分析,并与枯草芽孢杆菌基因组序列进行比对,如图 2 所示.该片段长 672 bp,涉及 bglH、yxiE、gltB 和 pgK4 个基因.从结果得知,1~241 bp 为 bglH 基因的部分编码区;334~336 bp 处 ATG 为 yxiE 基因的起始密码子,334~367 bp 为该基因的部分编码区,而 366~474 bp 为 gltB 基因的部分编码区,467~672 bp 则为 pgk 基因的部分编码区.其中,yxiE 和 gltB 基因、gltB 和 pgK 基因有碱基重叠,而且 365~369、477~480 和 668~672 bp 处均有 *Sau3AI* 限制性酶切位点,但在染色体上并没有

按这样的顺序排列,则可知:yxiE、gltB 和 pgK 3 个基因部分编码区存在多个 *Sau3AI* 酶切位点,在被 *Sau3AI* 酶切后,在 T4 DNA 连接酶的作用下随机连接构成一个融合基因.4 个基因中,bglH 基因可能与 β -葡萄糖苷酶基因有关,gltB 基因可能参与谷氨酸盐的合成,pgK 基因可能与糖酵解作用有关,编码磷酸甘油酯激酶,而 yxiE 基因功能未知.对 P3.4.23 启动子片段进行亚克隆,构建 pYG78,并进行转录活性分析后^[12],发现其转录活性部位为 5~333 bp,推测活性部位为 yxiE 基因的表达调控序列.



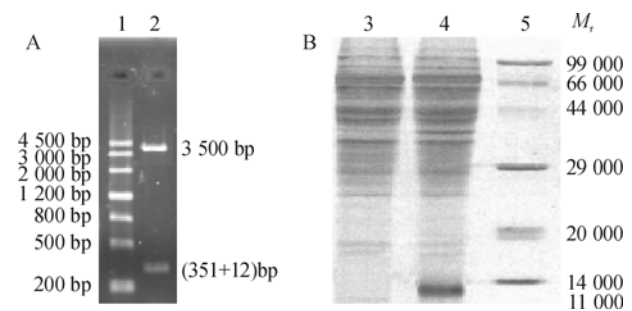
A: P3.4.23 结构示意图,其中 bglH 为该基因的部分 3' 编码区;yxiE 为该基因的 5' 编码区;gltB 为 gltB 部分编码区;pgK 为 pgK 基因的部分编码区. B: P3.4.23 启动子序列,下划线为 *Sau3AI* 酶切位点;方框为启动子活性部位起止位置;阴影部分为 yxiE 基因起始密码子.

图 2 P3.4.23 启动子片段结构示意图与序列分析

Fig. 2 The map and sequence of inserted fragment upstream the bgaB of pSI3423 (P3.4.23)

2.3 黄牛 GHRL 基因大肠埃希菌-枯草芽孢杆菌高效表达载体 pYG-Gh 的构建

用黄牛 GHRL 基因将 pYG78 载体中 bgaB 基因置换出来,构建了 GHRL 基因大肠埃希菌-枯草芽孢杆菌高效表达载体 pYG-Gh,并转化枯草芽孢杆菌.该载体的 *EcoRI*、*SacI* 双酶切检测结果与菌体上清 SDS-PAGE 检测见图 3, GHRL 蛋白大小约为 11 000.



1: DNA marker; 2: pYG-Gh 双酶切结果; 3: 1A747 菌; 4: pYG-Gh; 5: 蛋白质相对分子质量标准.

A: pYG-Gh 载体 *EcoRI*、*SacI* 酶切结果; B: *B. subtilis* 1A747 中 GHRL 蛋白 SDS-PAGE 检测.

图 3 pYG-Gh 酶切检测与 GHRL 蛋白 SDS-PAGE

Fig. 3 The digestion of pYG-Gh and detection of GHRL protein by SDS-PAGE in *B. subtilis* 1A747

3 讨论

枯草芽孢杆菌在表达和分泌活性蛋白方面明显优于大肠埃希菌,实践证明,它能够表达多种可溶的且具有生物活性的蛋白质,是外源基因最具潜力的安全表达宿主之一,因此直接在枯草芽孢杆菌菌株中筛选基因强启动子具有非常重要的意义.

大肠埃希菌为革兰阴性菌,而枯草芽孢杆菌为革兰阳性菌,大肠埃希菌除了个别基因启动子外一般不能直接在枯草芽孢杆菌中表达,而枯草芽孢杆菌的基因启动子则可以在大肠埃希菌中表达.这是因为枯草芽孢杆菌 16S rRNA 的 3' 端序列与大肠埃希菌是不相同的,但枯草芽孢杆菌仍与大肠埃希菌存在一些相似性,如枯草芽孢杆菌功能广泛的 rpoD 基因编码的 σ^{43} 因子,与大肠埃希菌 rpoD 基因编码的 σ^{70} 因子表现为很大的相似性,尤其是 C 末端的 2/3 序列,这为成功构建大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌穿梭载体提供了基础^[13]. 本研究所获得的启动子片段在大肠埃希菌中和枯草芽孢杆菌中的强度是不一样的,除了拷贝数的影响外,最可能的因素就是 2 种宿主菌各自的 RNA 聚合酶识别因子对启动子的识别程度不一样. P3.4.23 启动子在大肠埃希菌中的强度较高于在枯草芽孢杆菌中的强度,也可能存在上

述的原因,不过这还需要做进一步的研究。

序列分析表明 P3.4.23 启动子主要起作用的是 yxiE 基因的 5'侧翼区,或者说是该基因的启动子区,而 gltB、pgk 基因的部分编码区只是随机连接到了 P3.4.23 启动子 DNA 片段上,对于该启动子的功能不是必需的。Wilfrid 等^[14]曾经对枯草芽孢杆菌噬菌体 ϕ^{29} 的 3 个启动子分析,发现存在 UP 元件(上游序列),并且一个上游元件距离 -35 区长度较一般的 UP 元件要远,这为深入研究枯草芽孢杆菌基因启动子提供了思路。P3.4.23 是否存在远上游序列,还需要进一步研究。

bgaB 基因作为报告基因已经得到了广泛的应用^[15]。本研究采用的探针载体上 bgaB 基因没有自己的启动子。将基因组 DNA 用 *Sau3AI* 酶切后,当具有启动子功能的 DNA 片段插入到该基因前面的 *Bam* HI 酶切位点时,就会启动该基因的表达,生成的 bgaB 蛋白能与 X-gal 反应生成蓝色的底物。这种蓝色成为筛选启动子的很方便的标记。此外,酶活性高低直接反映了启动子的强弱,比采用抗菌素基因作为报告基因具有更准确的优点,因为后者还存在抗菌素浓度增加能引起质粒拷贝数增加的可能性,不能准确反映启动子的强弱程度。如潘皎等^[16]利用启动子探针型载体,使用抗生素作为报告基因从枯草芽孢杆菌 WB600 菌株中分离到了 3 个基因启动子片段,其中 1 个可在 2 种菌中启动其他基因的表达,但是不能确定质粒拷贝数是不是随着抗性浓度的增加并导致报告基因表达量的增加。

枯草芽孢杆菌 168 菌株和 1A747 菌株是非致病菌,没有内毒素产生,对人畜无害,所以它是构建 GHRL 基因产物的微生态制剂的首选宿主菌。前期克隆了 GHRL 基因并实现了在大肠埃希菌的表达和生物学活性鉴定^[12],在此基础上把 GHRL 基因构建到大肠埃希菌-枯草芽孢杆菌穿梭表达载体中,置于经过改造的基因强启动子下游,实现了在枯草芽孢杆菌的表达,且与在大肠埃希菌一样为可溶性表达。GHRL 基因初步在枯草芽孢杆菌中得到了表达,但是枯草芽孢杆菌表达系统也有自身的一些缺陷,如质粒的不稳定性影响枯草芽孢杆菌表达系统的应用。如果能够将强启动子与目的基因整合到枯草芽孢杆菌的基因组染色体上,则可以避免质粒的不稳定性。本研究首先尝试分离枯草芽孢杆菌基因强启动子并实现 GHRL 基因在该菌中的表达,为制备 GHRL 微生态制剂打下了基础。

参考文献:

[1] KIERS J L, VAN LAEKEN A E, ROMBOUTS F M, et al.

In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 60: 163-169.

- [2] SCHALLMEY M, SINGH A, WARD O P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production [J]. Canada Journal Microbiology, 2004, 50: 1-17.
- [3] KUNST F, OGASAWARA N, MOSZER I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* [J]. Nature, 1997, 390: 249-256.
- [4] ZHANG Xiao-zhou, CUI Zhong-li, HONG Qing, et al. High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71: 4101-4103.
- [5] KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, et al. GHRL is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. Nature, 1999, 402: 656-660.
- [6] ARVAT E, VITO L D, BROGLIO F, et al. Preliminary evidence that GHRL, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans [J]. J Endocrinol Invest, 2000, 23: 493-495.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] YANG Ming-ming, ZHANG Wei-wei, ZHANG Xi-feng, et al. Construction and characterization of a novel maltose inducible expression vector in *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology Letter, 2006, 28: 1713-1718.
- [9] BRON S. Plasmids [M]//HARWOOD C R, CUTTING S M. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. New York: John Wiley & Sons, 1990: 156.
- [10] MEIJER W J J, SALAS M. Molecular biological methods for *Bacillus* [J]. Genetic Analysis, 1990, 7: 27-74.
- [11] ZHANG Ai-ling, LIU Hui, YANG Ming-ming, et al. Assay and characterization of a strong promoter element from *B. subtilis* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 354: 90-95.
- [12] 张爱玲, 张丽, 陈宏, 等. 黄牛 GHRL 基因的克隆、表达及生物学活性检测 [J]. 生物工程学报, 2009, 25 (1): 17-23.
- [13] 李育阳. 基因表达技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] WILFRID J J, MARGARITA S. Relevance of UP elements for three strong *Bacillus subtilis* phage $\phi 29$ promoter [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32 (3): 1166-1176.
- [15] TANGNEY M, MITCHELL W J, DOLBERG-RASMUSSEN M. Development of a shuttle vector for screening of strong promoter sequences [J]. Biotechnology Technology, 1999, 13: 141-144.
- [16] 潘皎, 张义正. 枯草芽孢杆菌基因启动子的分离与鉴定 [J]. 微生物学报, 2004, 44 (4): 457-460.

【责任编辑 柴 焰】