枯草芽孢杆菌 P_{spovG} 启动子改造与表征

张 琳[1,2]，刘 平[1,2]，王 阳[1,3]，堵国成[2,3]，康 振[*1,2,3]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 未来食品中心，江苏 无锡 214122）

摘要：枯草芽孢杆菌是重要的工业生产菌株，广泛应用于外源蛋白质的表达。目前在枯草芽孢杆菌中常见组成型启动子中，P_{spovG} 作为高强度组成型启动子在表达外源蛋白质时，具有表达量高、稳定性好和适用范围广等优势。作者首先对 P_{spovG} 上游序列截短，发现将启动子上游序列由原来的 251 个碱基缩短为 26 个，仍能保持启动子强度不降低，并确定了紧邻-35 元件上游的 3 个碱基“AGC”为影响启动子强度的关键碱基。其次对启动子的上游 A-T 富含区以及 spacer 区域的 G-C 富含区进行随机突变，证明了上游激活序列中 A-T 碱基的排列对启动子强度有重要影响，并得到了强度提高的突变体。最后通过将不同表达时期启动子的关键调控序列分别插入突变体的上下游，得到了启动子强度为原始启动子 135.1%的新型启动子 SP_{spovG}-P_{lytR}。本研究为枯草芽孢杆菌表达系统开发新型强组成型启动子提供了重要的参考。

关键词：枯草芽孢杆菌；启动子改造；P_{spovG} 启动子；关键调控序列

中图分类号：Q 814　**文章编号：**1673-1689(2022)05-0020-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.05.003

Engineering and Characterization of *Bacillus subtilis* P_{spovG} Promoter

ZHANG Lin[1,2]，*LIU Ping*[1,2]，*WANG Yang*[1,3]，*DU Guocheng*[2,3]，*KANG Zhen*[*1,2,3]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. The Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* is an important industrial production strain, widely used in the expression of foreign proteins. At present, among the common constitutive promoters in *Bacillus subtilis*, P_{spovG}, as a high-strength constitutive promoter, has the advantages of high expression, good stability and wide application when expressing foreign proteins. This study first truncated the upstream sequence of P_{spovG}, and the strength of the promoter was still maintained when the upstream sequence of promoter was shortened form the original 251 bases to 26. And the three bases 'AGC' adjacent to the upstream of element -35 was identified as the key bases affecting the promoter strength. Secondly, random mutations of the upstream A-T rich region of promoter and the G-C rich region of spacer region were conducted, which proved that the arrangement of the A-T bases in the

收稿日期：2021-03-02

基金项目：国家自然科学基金面上项目(31970085)；江苏省杰出青年基金项目(BK20200025)；国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-16)

*通信作者：康 振(1982—)，男，教授，博士，博士研究生导师，主要从事微生物合成生物学与代谢工程方面的研究。E-mail：zkang@jiangnan.edu.cn

upstream activation sequence had an important influence on the promoter strength, and a mutant with increased strength was obtained. Finally, a novel promoter SP_{spovG}-P_{lytR} with a promoter strength of 135.1% of the original promoter was obtained by inserting the key regulatory sequences of promoters at different expression periods into the upstream and downstream of mutant. This study provides an important reference for the development of new strong constitutive promoters for the *Bacillus subtilis* expression system.

Keywords: *Bacillus subtilis*, promoter modification, P_{spovG} promoter, key regulatory sequence

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)属于革兰氏阳性菌,因其不产生内毒素被美国食品药品监督管理局(FDA)认证为 GRAS 生物安全菌株[1],用于食品级蛋白质产品的生产。此外,*B. subtilis* 还具有遗传背景清晰、无致病性及异源蛋白质分泌表达能力强等优点,从而被广泛应用于工业酶制剂的生产以及代谢产物的合成[2]。枯草芽孢杆菌 α-淀粉酶和蛋白酶的使用可以使面团工艺性能和面包质量得到提高[3],果胶酶在果汁生产中可以促进果汁的澄清[4]。

在外源蛋白质的分泌表达过程中,启动子是影响蛋白质表达量的重要因素,*B. subtilis* 中使用的启动子按照诱导方式的不同可分为组成型和诱导型启动子[5]。目前常见的诱导型启动子有 P_{xyl}、P_{groE} 和P_{apas}。组成型启动子主要有 P_{43}、P_{spovG}、P_{veg}[6]、P_{ApeE}[7]和 P_{amy}。相比于诱导型启动子,组成型启动子表达目的基因时不需要添加诱导剂,可以降低生产的成本和染菌的风险。目前 *B. subtilis* 中使用的组成型启动子多为 P_{43} 启动子,然而 P_{43} 启动子并不能高效表达所有的蛋白质,Yu 等在表达 β-半乳糖苷酶时,发现 P_{ylb} 启动子的转录活性比 P_{43} 启动子高 8.2 倍[8]。Yang 等对 114 个内源启动子的表达时期和强度进行了鉴定,获得了 4 类不同表达时期的启动子[9]。其中,受 σ^H 因子调控的组成型启动子 P_{spovG} 在 37 ℃和 30 ℃下均表现出较强的转录活性,在角蛋白酶的表达中取得了良好的效果。Liu 等用枯草芽孢杆菌中 11 种单独的启动子表达支链淀粉酶(PUL),发现 P_{spovG} 有最高的表达强度[10]。Frisby 等鉴定了启动子 P_{spovG} 的一段上游激活序列(USA)对转录有重要作用[11]。对启动子序列进行分析并改造可以不同程度地提高蛋白质的表达。Guan 等对 P_{srfA} 启动子的-10、-16 和-35 区域进行了突变,在此基础上构建了杂合启动子 P_{srfA}-P_{HpaII} 并进行突变获得了新的启动子突变体,表达强度是未改造的 P_{srfA} 启动子的两倍,将其用于纳豆激酶(NK)和氨肽酶(AP)的表达,酶活均得到了提高[12]。Wang 等通过将 σ^H 和 σ^A 识别的保守序列进行组合,设计了新型启动子 PHA-1,其转录活性为常用 P_{43} 启动子的 18.6 倍[13]。作者对 P_{spovG} 启动子经过一系列的改造,包括上游序列的截短,随机突变和杂合启动子的构建,获得了强度为未改造的 135.1%的新启动子 SP_{spovG}-P_{lytR}。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株、质粒和培养基 菌株枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* WB600 和大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21:作者所在实验室保藏;质粒 P_{spovG}-BhepI 和 pUC19-*gfp*:作者所在实验室构建。

种子培养基为 LB(Luria-Bertani)培养基(组分 g/L):酵母粉 5.0,蛋白胨 10.0,NaCl 10.0;pH 7.0。摇瓶培养基为 TB(Terrific Broth)培养基(组分 g/L):酵母粉 24.0,蛋白胨 12.0,K_2HPO_3 12.6,KH_2PO_3 2.3,甘油 4.0。

1.1.2 主要仪器和试剂 PCR 仪:购自美国 Bio-Rad 公司;多功能酶标仪 Cytation3:购自美国 BIOTEK 公司;96 孔摇床:购自德国 Heidolph 公司;高速离心机:购自德国 Eppendorf 公司;DYY-60D 型电泳仪:购自北京六一生物科技有限公司;限制性内切酶、胶回收及柱纯化试剂盒:购于 Thermo 公司;高保真 DNA 聚合酶 Prime STAR:购于大连 TaKaRa 有限公司;SanPreP 柱式质粒小量抽提试剂盒、四环素、氨苄青霉素:购于生工生物工程(上海)股份有限公司;一步克隆试剂盒:购自南京 Vazyme 生物科技有限公司;胰蛋白胨和酵母粉:购于英国 Oxoid 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 表达质粒的构建 使用引物 GFP-F 和GFP-R,以质粒 pUC19-*gfp* 为模板扩增绿色荧光蛋白 GFP 序列,通过 Gibson 组装替换质粒 P_{spovG}-*BhepI*

中的 *BhepI* 基因,得到重组质粒 P_{spoG}–*gfp*。使用引物 D01–R 和 D01–F~D16–F，以质粒 P_{spoG}–*gfp* 为模板得到 P_{spoG} 启动子上游序列的截短突变体。分别使用引物 R1–F 和 R1–R、R24–F 和 R2–R、R3–F 和 R3–R、R24–F 和 R4–R，以质粒 P_{spoG}–D06–*gfp* 为模板得到 P_{spoG} 启动子的随机突变体。使用引物 P_{yqfD}–P_{spoG}–F 和 P_{yqfD}–P_{spoG}–R,以质粒 P_{spoG}–D06–R4–*gfp* 为模板得到质粒 P_{yqfD}–SP_{spoG},同样的方法得到其他 14 种杂合启动子。本研究所用 PCR 引物见表 1。

表 1　本研究所用 PCR 引物

Table 1　Primers used in this study

引物	引物序列(5′–3′)
GFP–F	GGAGGTGAAATGTACACATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAG
GFP–R	CATTCACAGTTCTCCGCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCC
D01–F	CGAGATCTTGTGTTGAAGTCGCG
D02–R	ATGAATCAAAAATTAATATTAGATGAAATTTTGAAGAACTCCCC
D02–F	GATCGAAGTTATTGCACTGGTGAAATAATAAGAAAAG
D03–F	CCGGGATCACTTTTTTATTTACCTTATGCC
D04–F	TAACTATATCCTATTTTTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGATTTC
D05–F	TCCTATTTTTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGATTTC
D06–F	TTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGATTTCAGAAAAAAT
D07–F	AAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGATTTCAGAAAAAATCG
D08–F	AATATTTTAAAAACGAGCAGGATTTCAGAAAAAATCG
D09–F	TATTTTAAAAACGAGCAGGATTTCAGAAAAAATCGTG
D10–F	TTTTAAAAACGAGCAGGATTTCAGAAAAAATCGTG
D11–F	TTAAAAACGAGCAGGATTTCAGAAAAAATCGT
D12–F	AAAAACGAGCAGGATTTCAGAAAAAATCG
D13–F	AAACGAGCAGGATTTCAGAAAAAATCGT
D14–F	CGAGCAGGATTTCAGAAAAAATCGTG
D15–F	AGCAGGATTTCAGAAAAAATCGTGGAATT
D16–F	AGGATTTCAGAAAAAATCGTGGAATTGATACAC
R1–F	GATTCATTTTCWWWWWWWWWWWWWWWWWWWAGCAGGATTTCAGAAAAAATCGTGGAAT
R1–R	AAAAATTAATATTAGATGAAATTTTGAAGAACTCCCCTGTC
R2–F	CAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGATTTWWWAAAAAATCGTGGAATTGATACACTAATGC
R2–R	AAATCCTGCTCGTTTTTAAAATATTTTTTG
R3–F	TAAAAACGAGCAGGATTTCAGAAAAAATWWWWGAATTGATACACTAATGCTTTTATATAGAAAGGAG
R3–R	ATTTTTTCTGAAATCCTGCTCGTTTTTA
P24–F	CAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGATTTWWWAAAAAATWWWWGAATTGATACACTAATGCTTTTATATAGAAAGGAG
P_{yqfD}–P_{spoG}–F	TCATACATATGAGATGAAAGGGGGTTCTTTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGAT
P_{yqfD}–P_{spoG}–R	TTTGAAAGGAGGTTCTAACACTTTATGAATCAAAAATTAATATTAGATGAAATTTTGAAGAAC
P_{spoG}–P_{yqfD}–F	TCATACATATGAGATGAAAGGGGGTTCTCTTTTATATAGAAAGGAGGTGAAATGTACAC
P_{spoG}–P_{yqfD}–R	TTTGAAAGGAGGTTCTAACACTTTCATTAGTGTATCAATTCTATTATTTTTTCTGAAATCC
P_{mngA}–P_{spoG}–F	CAAAGCATACATTCATAGAAGACTTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGAT
P_{mngA}–P_{spoG}–R	AAACGGGCATGAATGAATGAATGAATCAAAAATTAATATTAGATGAAATTTTGAAGAAC
P_{spoG}–P_{mngA}–F	CAAAGCATACATTCATAGAAGACCTTTTATATAGAAAGGAGGTGAAATGTACAC
P_{spoG}–P_{mngA} –R	AAACGGGCATGAATGAATGACATTAGTGTATCAATTCTATTATTTTTTCTGAAATCC
P_{menB}–P_{spoG}–F	GTTTATAATAGGTAAGGCAGGCCATTTGGACTGTTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGAT

续表 1

引物	Primer sequence (5′–3′)
P_{menB}–P_{spovG}–R	CTAATTTCAGAAATGAAAAAGAAACAAAGCATGAATCAAAAATTAATATTAGATGAAATTTTGAAGAAC
P_{spovG}–P_{menB}–F	GTTTATAATAGGTAAGGCAGGCCATTTGGACTGCTTTTATATAGAAAGGAGGTGAAATGTACAC
P_{spovG}–P_{menB}–R	CTAATTTCAGAAATGAAAAAGAAACAAAGCCATTAGTGTATCAATTCTATTATTTTTTCTGAAATCC
P_{valS}–P_{spovG}–F	CTTTTACTATAATAAAGAACATAAATAATTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGAT
P_{valS}–P_{spovG}–R	TGTTTTTGATTCGTCAATCATCTATGAATCAAAAATTAATATTAGATGAAATTTTGAAGAAC
P_{spovG}–P_{valS}–F	CTTTTACTATAATAAAGAACATAAATAACTTTTATATAGAAAGGAGGTGAAATGTACAC
P_{spovG}–P_{valS}–R	TGTTTTTGATTCGTCAATCATCTCATTAGTGTATCAATTCTATTATTTTTTCTGAAATCC
P_{abrB}–P_{spovG}–F	TTGGAAACCTTGTTATGCTATGAAGGTAAGGATTTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGAT
P_{abrB}–P_{spovG}–R	TAATCGTCAATCATTTTGTTTACTAATGAATCAAAAATTAATATTAGATGAAATTTTGAAGAAC
P_{spovG}–P_{abrB}–F	TTGGAAACCTTGTTATGCTATGAAGGTAAGGATCTTTTATATAGAAAGGAGGTGAAATGTACAC
P_{spovG}–P_{abrB}–R	TAATCGTCAATCATTTTGTTTACTACATTAGTGTATCAATTCTATTATTTTTTCTGAAATCC
P_{lytR}–P_{spovG}– F	TTTAACTCATAATGAAAGTAATTTTTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGAT
P_{lytR}–P_{spovG}–R	TTTCCAATAAATACAACTCTATGAATCAAAAATTAATATTAGATGAAATTTTGAAGAAC
P_{spovG}–P_{lytR}–F	TTTAACTCATAATGAAAGTAATTTCTTTTATATAGAAAGGAGGTGAAATGTACAC
P_{spovG}–P_{lytR}–R	TTTCCAATAAATACAACTCTCATTAGTGTATCAATTCTATTATTTTTTCTGAAATCC
P_{ftsZ}–P_{spovG}–F	GATATAACGAATATTTTCAATAAACATTTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGAT
P_{ftsZ}–P_{spovG}–R	CTATGTATATCCTCTTTTATATCATGAATCAAAAATTAATATTAGATGAAATTTTGAAGAAC
P_{spovG}–P_{ftsZ}– F	GATATAACGAATATTTTCAATAAACATCTTTTATATAGAAAGGAGGTGAAATGTACAC
P_{spovG}–P_{ftsZ}–F	CTATGTATATCCTCTTTTATATCCATTAGTGTATCAATTCTATTATTTTTTCTGAAATCC
P_{spovG}–P_{spovG}–F	GATTTCAGAAAAAATAATAGAATTGATACACTAATTTTCAAAAAATATTTTAAAAACGAGCAGGAT
P_{spovG}–P_{spovG}–R	CTGCTCGTTTTTAAAATATTTTTTGAAAATGAATCAAAAATTAATATTAGATGAAATTTTGAAGAAC

注:W 表示简并碱基 A/T。

1.2.2 荧光强度测定 将连接有绿色荧光蛋白 GFP 的重组菌接种至含有四环素的 LB 培养基中,培养 9 h 作为种子液,并以 1%的比例接种至含四环素的新鲜 TB 培养基中,培养容器均为 96 深孔板,每个孔的装液量为 1.5 mL。随后将 96 孔板在 25 ℃、220 r/min 下振荡培养 30 h,测定每个孔的荧光强度。

将发酵液在 10 000 r/min 下离心,弃上清液,用磷酸盐缓冲液(20 mmol/L 磷酸钾缓冲液,150 mmol/L NaCl,pH 7.4)洗涤两次并悬浮,将其转移到 96 孔板并稀释合适的倍数,使用多功能酶标仪进行 GFP 和生物量的测定。在激发波长为 490 nm、发射波长为 530 nm、增益值为 60 的条件下测定样品的相对荧光强度,在 600 nm 的波长下测定细胞光密度。

1.2.3 摇瓶培养方法 从平板上挑取测序正确的单菌落接种于含有 20 μg/mL 四环素的新鲜 LB 液体培养基中,37 ℃、220 r/min 过夜培养,按 1%的接种体积分数转接到 50 mL 含有四环素的新鲜 TB 培养基中,25 ℃下继续培养 30 h。

2 结果与分析

2.1 P_{spovG} 启动子结构与截短改造

在枯草芽孢杆菌基因组中,P_{spovG} 启动子位于 55 546~55 846 区域,其转录取决于基因 spoOA、spoOB 和 spoOH[14-15],并处于 *abrB* 基因的负调控之下[16]。从表达时期来看,它属于Ⅱ类启动子,受 σ^H 转录因子调控,在对数中期和稳定期持续表达基因[17]。启动子整体结构见图 1。上游序列由 251 个碱基组成,–35 区和–10 区由 14 个碱基组成的 spacer 区域连接,转录起始位点位于–10 区后 8 个碱基处,核糖体结合位点(RBS)由 5′UTR 区域的第 15~20 个碱基组成。

为了探究不同长度的上游序列对启动子强度的影响,获得最短上游序列,使用 GFP 绿色荧光蛋白为报告基因,将上游序列进行截短,获得了 16 种截短突变体,见图 2(a)。对其荧光强度进行分析,结果见图 2(b)。启动子截短后,D01~D06 的荧光强度较对照没有改变,这一结果表明,要维持一定启动子强度,保留–35 元件上游 26 个碱基即可,将启动



图 1　P_{spovG} 启动子的整体结构

Fig. 1　Overall structure of P_{spovG} promoter

子原来 251 个碱基的上游序列缩短为 26 个。有报道指出,位于维持启动子的最佳转录需要依赖一段上游激活序列（UAS），该序列位于−35 元件上游 5 个碱基处[11]。本研究中 D07~D13 突变体对这段序列进行了逐步删除,发现荧光强度逐渐下降,这一结果与文献报道一致。而把上游区域的序列全部截短,即突变体 D16 荧光强度骤降到 4.5×10^3,只有原始菌株(3.7×10^4) 的 12%。这一结果表明,−35 区域上游的 3 个碱基“AGC”为影响启动子强度的关键碱基。有研究报道,Cheng 等以 GFP 为报告基因,对 PsrfA 启动子转录起始位点上游一段冗长的区域(−607~−40)进行截短,研究这段区域对于启动子强度的影响[18]。共构建了 4 株突变体,结果发现将 −136~−76 位碱基截短后，荧光强度降低为原来的 50%以下，表明此段区域对维持启动子转录活性有重要影响,启动的上游序列中存在对转录活性影响较大的碱基序列。

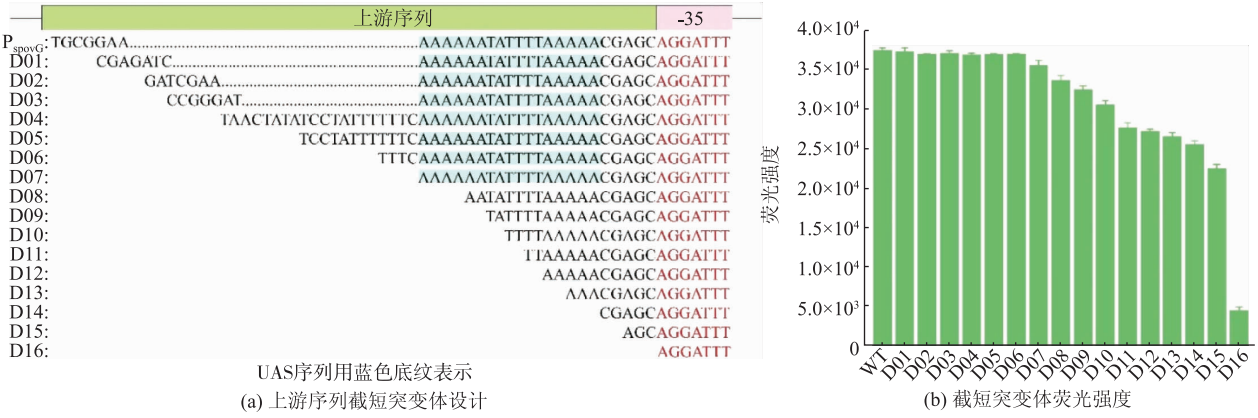


图 2　上游序列截短突变体设计与荧光表达强度

Fig. 2　Upstream sequence truncation mutants design and fluorescence expression intensity

2.2　随机突变提高启动子的转录活性

启动子−35 区域上游较高 AT 含量可以增强 RNA 聚合酶的 UP 元件与 α 亚基之间的相互作用,从而刺激启动子的结合和转录[19]。为了考察上游序列中 A−T 的排列对转录活性的影响，将 A−T 富含区进行随机突变。此外将 Spacer 区域的 CG 富含区分别进行随机突变为 AT,共进行了 4 轮随机突变,见图 3。

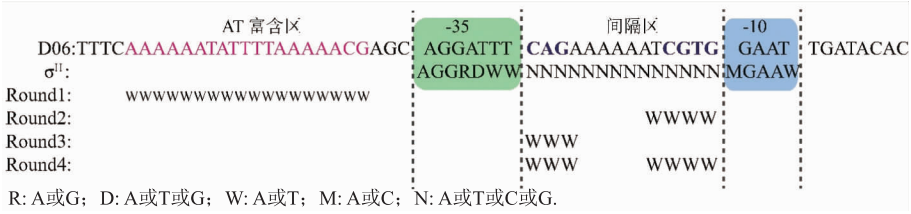
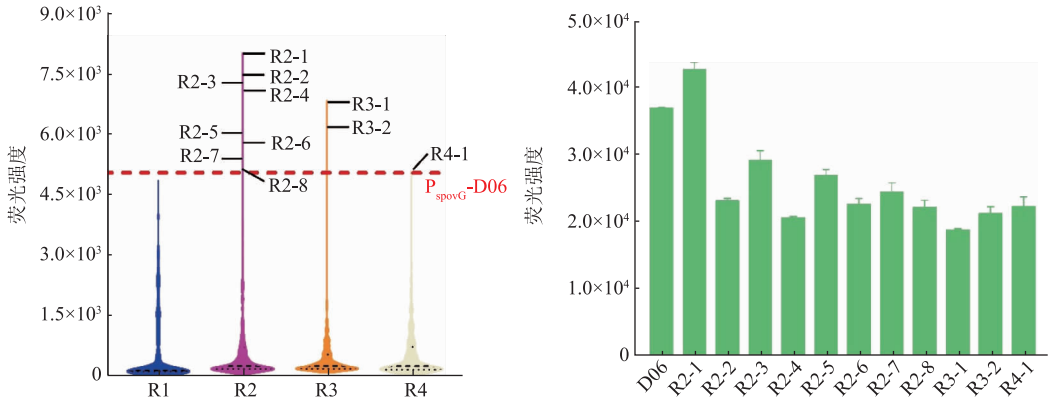


图 3　随机突变示意图

Fig. 3　Random mutation diagram

共筛选了 2 500 株菌,由图 4(a)可知,绝大部分突变体的荧光强度都显著降低，仅有 11 个突变体荧光强度有所增强，对这 11 个突变体进行摇瓶验证，见图 4（b)。发现仅有 Round2 改造，即将 spacer 区域中的 GC 突变为 AT 时,突变体(R2−1)荧光强度由原来的 3.7×10^4 增加到 4.3×10^4，提高了

16.2%,将其命名为 SP_{spovG}。序列比对发现,原来的碱基 CGTG 突变为 AATA,表明将 spacer 序列中 G–C 突变为 A–T 对启动子强度有重要影响。此外,在 Round1 改造中,所有突变体的荧光强度均低于对照,这一结果表明,启动子上游序列 AT 富含区的碱基排列顺序同样对启动子强度有重要影响。这一结果表明,启动子的上游序列 A–T 富含区碱基的排列已是最佳序列。对于启动子元件进行随机突变提高转录强度是一种常见的改造手段,Han 等通过对来自枯草芽孢杆菌的天然启动子 P_{srfA} 中–35 区域和–10 区域的中间序列进行随机突变,得到了 GFP 表达强度提高 3.7 倍的新型启动子 P_{BH4}[20]。



(a) 随机突变结果　　(b) 摇瓶验证

图 4　随机突变筛选及摇瓶验证

Fig. 4　Random mutation screening and shake flask verification

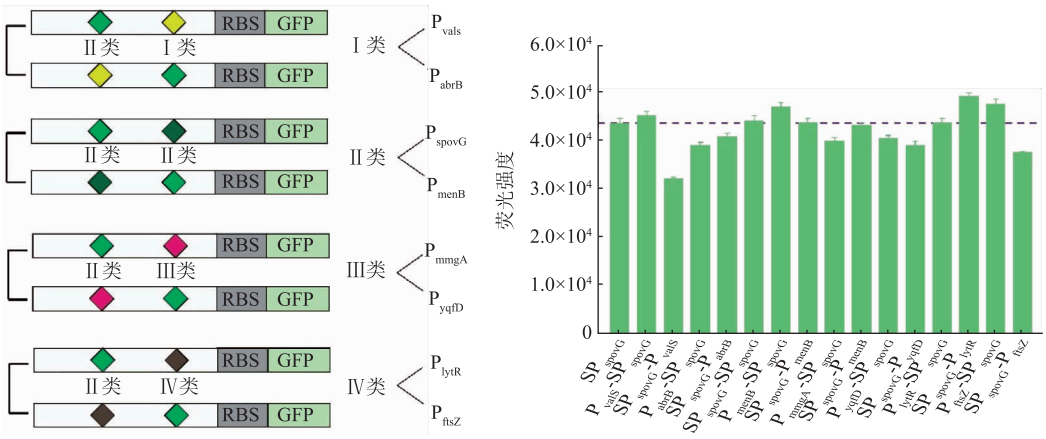
2.3　杂合启动子构建

自然界中,除了单个启动子作用于一个基因的情况,还存在复合启动子作用于同一个基因的情况,如双启动子或者重叠启动子等。目前双启动子或多启动子进行外源基因高效表达已见报道,复合启动子可以给 RNA 聚合酶提供更多的结合位点,相较于单个启动子对基因表达水平的调控有明显提高[21]。

P_{spovG} 启动子属于Ⅱ类启动子,在对数中期和稳定期表达。除此之外,枯草芽孢杆菌还存在其他 3 类启动子,分别是对数期表达的Ⅰ类启动子,持续型表达的Ⅲ类启动子和稳定期表达的Ⅳ类启动子。为了考察将不同时期表达转录活性的启动子的关键调控序列组合在一起对启动子强度的影响,选取已证明过的Ⅰ类、Ⅲ类、Ⅳ类中两种高强度的启动子[9]关键调控序列,分别插入到 SP_{spovG} 启动子的上下游,上游的插入位点为 SP_{spovG} 启动子上游序列最前端,下游的插入位点为 SP_{spovG} 启动子转录起始位点后 3 个碱基处,得到 15 种(P_{valS}–SP_{spovG}、SP_{spovG}–P_{valS}、P_{abrB} –SP_{spovG}、SP_{spovG} –P_{abrB}、SP_{spovG} –SP_{spovG}、P_{menB} –SP_{spovG}、SP_{spovG} –P_{menB}、P_{mngA} –SP_{spovG}、SP_{spovG} –P_{mngA}、P_{yqfD} –SP_{spovG}、SP_{spovG}–P_{yqfD}、P_{lytR}–SP_{spovG}、SP_{spovG}–P_{lytR}、P_{ftsZ}–SP_{spovG}、SP_{spovG}–P_{ftsZ})杂合启动子,见图 5(a),荧光强度结果见图 5(b)。杂合启动子 SP_{spovG}–P_{lytR} 的相对荧光强度最高,达到 5.0×10^4,是对照(4.3×10^4)的 116.2%,P_{valS}–SP_{spovG}、P_{menB}–SP_{spovG} 和 P_{ftsZ}–SP_{spovG} 的荧光强度分别是 4.6×10^4、4.8×10^4 和 4.7×10^4,是对照 SP_{spovG} 启动子的 106.9%、111.6%和 109.3%。Zhang 等构建了用于表达 β–环糊精糖基转移酶的复合启动子 P_{HpaII}–P_{amyQ},表达量是单启动子 P_{amyQ} 表达系统表达量的 1.3 倍[22]。

3　结　语

枯草芽孢杆菌作为 FDA 认证的食品安全菌株已被广泛应用于外源蛋白质的分泌表达。作为调控基因表达的关键元件,目前在枯草芽孢杆菌中广泛使用的组成型 P_{43} 启动子并不适用于所有的外源蛋白质表达,要提高外源蛋白质表达需要找到与之匹配的强启动子。已有研究表明,通过定点突变、区段操作以及随机突变等可以提高启动子的表达强度[23–24]。P_{spovG} 启动子是枯草芽孢杆菌中受 σ^H 转录因子调控的,在对数期和稳定期都可以持续表达基因的组成型启动子。作者截短上游序列,发现将上游序列由原来的 251 个碱基缩短为 26 个碱基并不影响启动子强度,由此确定了最短上游序列,并鉴定了影响启动子强度的 3 个关键碱基,即紧邻–35 元件的



(a) 杂合启动子组合　　(b) 杂合启动子表达荧光强度表征

图 5　杂合启动子组合设计与表达荧光强度表征

Fig. 5　Hybrid promoters combination design and expression intensity characterization

3 个上游碱基“AGC”。通过 4 轮随机突变,验证了上游激活序列中 A–T 碱基的排列顺序对启动子强度有重要影响,并通过将 spacer 区域中的 G–C 碱基突变为 A–T 得到了启动子强度提高的突变体 SP_{spovG},继续将不同时期表达的启动子的关键调控序列插入 SP_{spovG} 启动子的上下游，获得了表达强度提高的 4 种新型启动子 SP_{spovG}–P_{lytR}、P_{menB}–SP_{spovG}、P_{ftsZ}–SP_{spovG} 和 P_{vals}–SP_{spovG}，强度分别是未改造的 135.1%，129.7%,127.0%和 124.3%。本研究对枯草芽孢杆菌新型强启动子的开发具有重要参考意义。

参考文献:

[1] WESTERS L,WESTERS H,QUAX W J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins:a biotechnological approach to optimize the host organism[J]. **Biochimica Et Biophysica Acta**,2004,1694(1-3):299-310.

[2] JIN P,KANG Z,YUAN P H,et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168[J]. **Metabolic Engineering**,2016,35:21-30.

[3] PAVITHRA S,RAMESH R,AARTHY M,et al. Starchy substrates for production and characterization of *Bacillus* subtilisamylase and its efficacy in detergent and breadmaking formulations[J]. **Starch–Stärke**,2014,66(11-12):976-984.

[4] ZHANG J,KANG Z,LING Z,et al. High-level extracellular production of alkaline polygalacturonate lyase in *Bacillus subtilis* with optimized regulatory elements[J]. **Bioresource Technology**,2013,146:543-548.

[5] NGUYEN H D,NGUYEN Q A,FERREIRA R C,et al. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability[J]. **Plasmid**,2005,54(3):241-248.

[6] WILLENBACHER J,MOHR T,HENKEL M,et al. Substitution of the native *srfA* promoter by constitutive Pveg in two *B. subtilis* strains and evaluation of the effect on surfactin production[J]. **Journal of Biotechnology**,2016,224:14-17.

[7] WANG Y,LIU Y,WANG Z,et al. Influence of promoter and signal peptide on the expression of pullulanase in *Bacillus subtilis* [J]. **Biotechnology Letters**,2014,36(9):1783-1789.

[8] YU X,XU J,LIU X,et al. Identification of a highly efficient stationary phase promoter in *Bacillus subtilis*[J]. **Scientific Reports**,2015,5:18405.

[9] YANG S,DU G,CHEN J,et al. Characterization and application of endogenous phase-dependent promoters in *Bacillus subtilis* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2017,101(10):4151-4161.

[10] LIU X,WANG H,WANG B,et al. Efficient production of extracellular pullulanase in *Bacillus subtilis* ATCC6051 using the host strain construction and promoter optimization expression system[J]. **Microbial Cell Factories**,2018,17(1):163.

[11] FRISBY D,ZUBER P. Analysis of the upstream activating sequence and site of carbon and nitrogen source repression in the promoter of an early-induced sporulation gene of *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Bacteriology**,1991,173(23):7557-7564.

[12] GUAN C,CUI W,CHENG J,et al. Development of an efficient autoinducible expression system by promoter engineering in

Bacillus subtilis[J]. **Microbial Cell Factories**,2016,15:66.

[13] WANG Y,SHI Y,HU L,et al. Engineering strong and stress-responsive promoters in *Bacillus subtilis* by interlocking sigma factor binding motifs[J]. **Synthetic and Systems Biotechnology**,2019,4(4):197-203.

[14] OLLINGTON J F,HALDENWANG W G,HUYNH T V,et al. Developmentally regulated transcription in a cloned segment of the *Bacillus subtilis* chromosome[J]. **Journal of Bacteriology**,1981,147(2):432-442.

[15] ZUBER P,LOSICK R. Use of a *lacZ* fusion to study the role of the *spoO* genes of *Bacillus subtilis* in developmental regulation[J]. **Cell**,1983,35(1):275-283.

[16] ROBERTSON J B,GOCHT M,MARAHIEL M A,et al. AbrB,a regulator of gene expression in *Bacillus*,interacts with the transcription initiation regions of a sporulation gene and an antibiotic biosynthesis gene[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,1989,86(21):8457-8461.

[17] CARTER H L,MORAN C P,JR. New RNA polymerase sigma factor under spo0 control in *Bacillus subtilis*[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,1986,83(24):9438-9442.

[18] CHENG J,GUAN C,CUI W,et al. Enhancement of a high efficient autoinducible expression system in *Bacillus subtilis* by promoter engineering[J]. **Protein Expression and Purification**,2016,127:81-87.

[19] SAUER C,VER LOREN VAN THEMAAT E,BOENDER L G M,et al. Exploring the nonconserved sequence space of synthetic expression modules in *Bacillus subtilis*[J]. **ACS Synthetic Biology**,2018,7(7):1773-1784.

[20] HAN L,CUI W,SUO F,et al. Development of a novel strategy for robust synthetic bacterial promoters based on a stepwise evolution targeting the spacer region of the core promoter in *Bacillus subtilis*[J]. **Microbial Cell Factories**,2019,18(1):96.

[21] GUAN C,CUI W,CHENG J,et al. Construction of a highly active secretory expression system via an engineered dual promoter and a highly efficient signal peptide in *Bacillus subtilis*[J]. **Nature Biotechnology**,2016,33(3):372-379.

[22] ZHANG K,SU L,DUAN X,et al. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system[J]. **Microbial Cell Factories**,2017,16(1):32.

[23] 孙先花,苏小运. 丝状真菌启动子的基因工程改造进展[J]. 广西科学,2017,24(1):73~76.

[24] XIAO J,PENG B,SU Z,et al. Facilitating protein expression with portable 5'-UTR secondary structures in *Bacillus licheniformis* [J]. **ACS Synthetic Biology**,2020,9(5):1051-1058.

科 技 信 息

加拿大将纤维素和微晶纤维素的使用范围扩大到类似奶酪的植物基产品

2022 年 3 月 1 日,加拿大卫生部发布 NOM/ADM-0180 号文件,将纤维素(Cellulose)和微晶纤维素(Microcrystalline Cellulose)的使用范围扩大到磨碎、切碎、切块或切丁的非乳制品(即植物基)奶酪风味制品中,同时修订允许的抗结剂列表,并于 2022 年 3 月 1 日起生效。

纤维素和微晶纤维素已经被批准作为抗结剂用于切块、切丁、磨碎或切碎的切达干酪及其他标准化奶酪品种,以及非标准化的切块、切丁、磨碎或切碎的奶酪制品。

[信息来源]江苏省技术性贸易措施公平贸易工作站.加拿大将纤维素和微晶纤维素的使用范围扩大到类似奶酪的植物基产品[EB/OL]. (2022-3-18).http://www.tbtguide.com/