



解淀粉芽孢杆菌内源启动子的筛选及表达碱性果胶酶的应用研究

张莹, 韩晓静, 蔡逸安, 李登科, 李庆刚, 路福平, 李玉*

天津科技大学生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

张莹, 韩晓静, 蔡逸安, 李登科, 李庆刚, 路福平, 李玉. 解淀粉芽孢杆菌内源启动子的筛选及表达碱性果胶酶的应用研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1575-1586.

ZHANG Ying, HAN Xiaojing, CAI Yi'an, LI Dengke, LI Qinggang, LU Fuping, LI Yu. Screening of endogenous promoters of *Bacillus amyloliquefaciens* and application of them in the expression of alkaline pectinase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1575-1586.

摘要: 【目的】通过检测目的基因的转录水平和表达强度, 筛选来源于解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的内源启动子, 确定适合碱性果胶酶基因表达的强启动子, 并进一步对选用的强启动子进行分析。【方法】通过生物信息学手段对启动子片段进行预测与筛选, 采用相对荧光强度、酶活力等表征手段进行分析, 同时采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)技术检测不同启动子的转录水平。【结果】启动子 *PrapA*、*PmetE-1*、*Phin-1* 表达碱性果胶酶的活力分别是 *P43* 启动子的 9.8 倍、4.8 倍、3.0 倍, 筛选出的这 3 个强启动子为其他异源基因在解淀粉芽孢杆菌中的表达奠定了基础。【结论】通过生物信息学手段预测及筛选启动子, 筛选得到比较强的启动子 *PrapA*、*PmetE-1* 和 *Phin-1*, 有效提高了碱性果胶酶的表达量。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 启动子; 转录水平; 生物信息学; 碱性果胶酶

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2104002)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2104002).

*Corresponding author. Tel: +86-22-60601958, E-mail: liyu@tust.edu.cn

Received: 2022-09-06; Accepted: 2023-01-01; Published online: 2023-01-05

Screening of endogenous promoters of *Bacillus amyloliquefaciens* and application of them in the expression of alkaline pectinase

ZHANG Ying, HAN Xiaojing, CAI Yi'an, LI Dengke, LI Qinggang, LU Fuping, LI Yu*

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, School of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Objective] To screen out the strong promoters suitable for the expression of alkaline pectinase in *Bacillus amyloliquefaciens* based on the transcription level and expression of the target gene and further analyze the selected strong promoters. [Methods] The promoter fragments were predicted and screened out by bioinformatics tools on the basis of the relative fluorescence intensity and enzyme activity. Further, real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was carried out to determine the transcription levels of different promoters. [Results] The activities of *PrapA*, *PmetE-1*, and *Phin-1* expressing alkaline pectinase were 9.8, 4.8, and 3.0 times that of *P43* promoter, respectively. The three strong promoters screened out laid a foundation for the expression of other heterologous genes in *B. amyloliquefaciens*. [Conclusion] The strong promoters *PrapA*, *PmetE-1*, and *Phin-1* screened out in this study can effectively improve the expression of alkaline pectinase.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; promoter; transcriptional level; bioinformatics; alkaline pectinase

在微生物遗传系统中,启动子(promoter)具有十分重要的作用,利用启动子构建各种表达载体,可以在宿主中方便地表达外源基因,调控蛋白的表达水平,选用强启动子介导目的基因的表达是提高基因异源表达非常有效的方法^[1]。对于细菌来说,基因的表达调控主要体现在转录水平上,而启动子是转录调控的核心元件,决定了基因表达的强度和时机,也是影响外源蛋白高效表达的关键因素之一^[2]。

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是一种革兰氏阳性细菌,作为微生物细胞工厂,因其具有出色的胞外蛋白分泌能力和作为公认的安全菌株而备受青睐^[3],它不仅是多种酶制剂的生产菌,还能产生多种抗菌物质,广泛应

用于农业、工业食品和医药等行业中,是原核表达系统中分泌表达外源蛋白的理想宿主。然而,解淀粉芽孢杆菌中存在的限制修饰系统、质粒稳定性差、表达元件缺乏等问题严重限制了其在基因工程研究中的广泛应用,因此,在宿主菌株的改造^[4]、表达载体的构建以及培养基和发酵条件优化^[5]等方面都做了大量的工作以提升目标产物的产量。其中对于启动子的筛选和改造方面的研究,Alper等^[6]利用绿色荧光蛋白筛选出启动子强度跨度范围约196倍;Kosuri等^[7]通过绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)筛选标记来进行筛选,筛选出4个数量级强度变化的启动子;Nevoigt等^[8]利用易错PCR建立突变启动子文库,突变后活性是未

突变 TEF1 启动子活性的 8%–120%；在解淀粉芽孢杆菌中进行启动子^[9-10]的筛选显得尤为重要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) TCCC 111018 和载体 pLY-3 均为本实验室保藏。本研究中使用的所有菌株、质粒均列于表 1 中。

本研究中所用引物详细信息见表 2, 由天津金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.2 主要试剂和培养基及感受态的制备

质粒提取试剂盒、纯化试剂盒和切胶回收试剂盒, Omega 公司; 卡那霉素(kanamycin,

Kana)、阿拉伯糖(arabinose, Ara), 上海现代制药股份有限公司; DNA 聚合酶、限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司; GeneRuler 1 kb DNA Ladder 购自 Thermo 公司; RNA 提取试剂盒购自 TaKaRa 公司。

种子培养基(LB 培养基): 蛋白胨 1%, 酵母粉 0.5%, 氯化钠 1%, 初始 pH 值为 7.2–7.4。

解淀粉芽孢杆菌感受态的制备: LBS 培养基: 山梨醇 91.085 g/L, 氯化钠 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L; 细胞洗涤缓冲液: 山梨醇 91.085 g/L, 甘露醇 91.085 g/L, 10%甘油 100 mL; 细胞重悬缓冲液: 山梨醇 91.085 g/L, 甘露醇 91.085 g/L, 10%甘油 100 mL, 14% PEG-6000 140 g/L。

表 1 本研究中所使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in the study

Strain and plasmid	Characteristics	Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> JM109	Host for plasmid construction	Laboratory stock
<i>E. coli</i> EC135 pM.Bam	Host for plasmid-methylated modification	Laboratory stock
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TCCC 111018	Wild type strain	Laboratory stock
<i>B. amyloliquefaciens</i> TCCC 112212	Host of plasmid expression	Laboratory stock
Plasmids		
pLY-3-PEL	Construction of alkaline pectinase plasmids	Laboratory stock
pLY-3-GFP	Construction of green fluorescent protein granules	Laboratory stock

表 2 本研究中涉及的引物序列

Table 2 Primer sequences involved in this study

Primers	Sequences (5'→3')	TM
pLY-3-P43-F	<u>TTGATGTGATCATCCTGAGTGGATGATTATATTCCTTTTGA</u>	54
pLY-3-P43-R	<u>AGCTCCTCGCCCTTGCTATCACTTTATATTTACATAATCG</u>	53
pLY-3-PrapA-F	<u>TTGATGTGATCATCCCCCATTATCAAGAATATAAAGATG</u>	54
pLY-3-PrapA-R	<u>AGCTCCTCGCCCTTGTTTCATCCTCAATAAATCCCCCTTTT</u>	56
pLY-3-PmetE-1-F	<u>TTGATGTGATCATCCGGTTCTATTTGAGGGTGACAA</u>	54
pLY-3-PmetE-1-R	<u>AGCTCCTCGCCCTTGCCGGGTATCATAGGGC</u>	54
pLY-3-Phin-1-F	<u>TTGATGTGATCATCCTCTGTTCCAGTGTAAGCAATTC</u>	54
pLY-3-Phin-1-R	<u>AGCTCCTCGCCCTTGCTCGTTTTTGAGACAAGTCT</u>	54
pLY-3-F	CAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGG	67
pLY-3-R	GGATGATCACATCAAGCAGCGCAAATGCTCCCG	68

The single horizontal line in the table is the homologous arm sequence of the green fluorescent protein gene and the alkaline pectinase gene.

1.2 芽孢菌株的启动子预测和扩增

通过在线软件 iProEP (lin-group.cn/server/iproep/pages/predictor.php)、SoftBerry (linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb)、Promoter 2.0、Neural Network Promoter Prediction、BDGP (https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)等启动子预测软件对启动子进行预测分析,以解淀粉芽孢杆菌 TCCC 111018 基因组为模板进行 PCR 扩增芽孢杆菌启动子。PCR 反应体系为: ddH₂O 19 μ L, 上游引物(10 mmol/L) 2 μ L, 下游引物(10 mmol/L) 2 μ L, 模板(基因组 DNA) 2 μ L, Gold Star DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 25 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收 PCR 产物。选用启动子 P43 作为对照,利用相对荧光强度、酶活力等表征方法验证其他启动子的表达强度。

1.2.1 重组绿色荧光蛋白表达载体的构建

将获得的 45 个启动子整合到带有绿色荧光蛋白基因的质粒上,通过无缝克隆的方式进行连接,重组载体电转进解淀粉芽孢杆菌 TCCC 112212 感受态中,通过 Kana 抗性筛选转化子,提取质粒 DNA 进行 PCR 验证,并由苏州金唯智生物科技有限公司进行测序分析。

1.2.2 重组碱性果胶酶表达载体的构建

通过 PCR 扩增和 DNA 片段切胶回收,获得启动子的片段,通过无缝克隆的方式进行连接,重组载体连接产物电转进解淀粉芽孢杆菌 TCCC 112212 感受态中,通过 Kana 抗性筛选转化子,提取转化子质粒 DNA 进行验证,并由苏州金唯智生物科技有限公司进行测序分析。

1.2.3 解淀粉芽孢杆菌 TCCC 112212 感受态电转方法

(1) 挑取新活化的大肠杆菌 EC 135 单菌落

于 5 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养,提取质粒。(2) 将 15 μ L 质粒转接进入解淀粉芽孢杆菌 TCCC 112212 感受态中,将此混合物转移至准备好的电转杯中,在 2.5 kV 的电压下电击,使 DNA 进入到感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 复苏 3 h。(3) 取菌液涂布于含有 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 筛选平板,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h,筛选阳性转化子进行验证。

1.2.4 绿色荧光蛋白生长曲线以及荧光值的测定

将不同菌株在 LB 培养基中孔板发酵 60 h,使用酶标仪在 600 nm 的波长下测其吸光度值;发酵液在激发波长 488 nm,发射波长 523 nm 下进行荧光值的测定^[11-12]。

1.2.5 碱性果胶酶酶活测定

将带有不同启动子的 pLY-3 质粒的碱性果胶酶整合菌株在发酵培养基中摇瓶发酵 60 h,取发酵上清液,采用以多聚半乳糖醛酸为底物、磷酸为终止液的酶活测定方式进行测定。反应体系中包括粗酶稀释液 20 μ L、含 0.2%聚半乳糖醛酸的甘氨酸-NaOH (0.2 mol/L)缓冲液(pH 9.0,含有 0.44 mmol/L 的 CaCl₂) 2 mL,以无活性的酶液作为空白对照,以含底物的缓冲溶液的加入启动酶促反应;反应条件为 45 $^{\circ}$ C 反应 15 min,用 3 mL 0.03 mol/L 的磷酸终止反应,在 235 nm 处测定其吸光度值。用与待测样平行的酶空白调零。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌启动子的筛选

在转录组测序(RNA-Seq)中,fpkm 是衡量基因表达量的指标,结合前期课题组测得的不同时期解淀粉芽孢杆菌 TCCC 111018 基因组的转录组数据,比较不同基因启动子的 fpkm 数值,从中挑选出 fpkm 数值在 10-9 000 之间的 45 个启动子片段,通过多个在线分析软件 iProEP、

SoftBerry 以及 BDGP 等对解淀粉芽孢杆菌 TCCC 111018 基因组中长度为 200 bp 左右的片段进行综合的预测分析, 最终通过在线软件 iProEP 确定启动子片段, 结果如图 1 所示, 预测筛选得到 45 个启动子片段, 从中筛选出强启动子。

2.2 不同启动子对绿色荧光蛋白基因表达强度的影响

检测不同时间发酵液中 600 nm 处的 OD 值

以及相应波长下的荧光值, 通过计算单位 OD_{600} 下的荧光强弱获得样本的相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI)^[13], 判断启动子的强弱。

由图 2A 可知, 筛选得到的 45 个启动子对绿色荧光蛋白的启动强度相差较大, 分别检测了 12–72 h 不同时间发酵液中 600 nm 处的 OD 值以及相应波长下的荧光值, 60 h 的相对荧光值达到最高, 因此选取 60 h 的相对荧光强度进行比较, 其中有 5 个启动子在 12–72 h 的相对

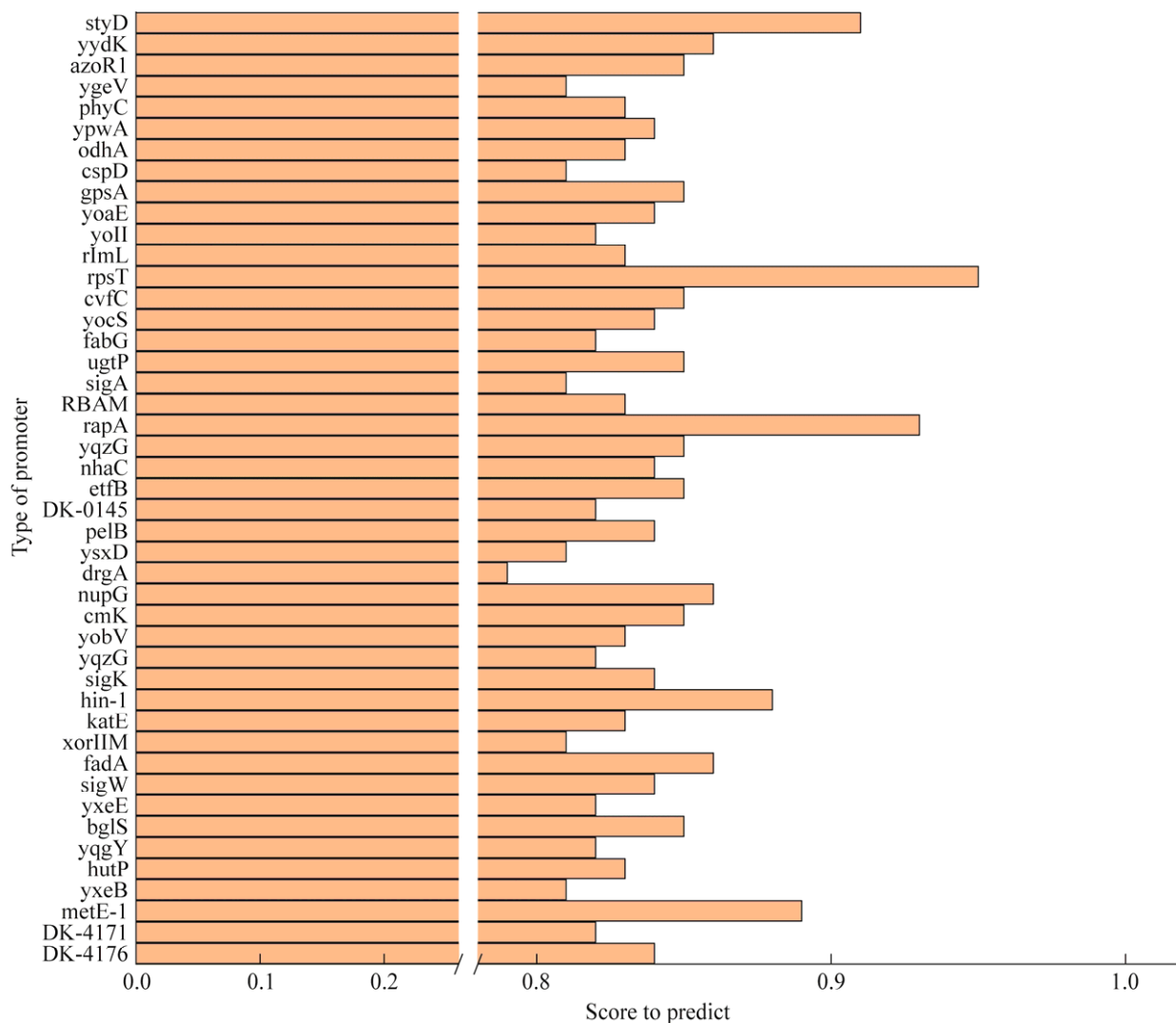


图 1 启动子预测结果

Figure 1 Promoter prediction results.

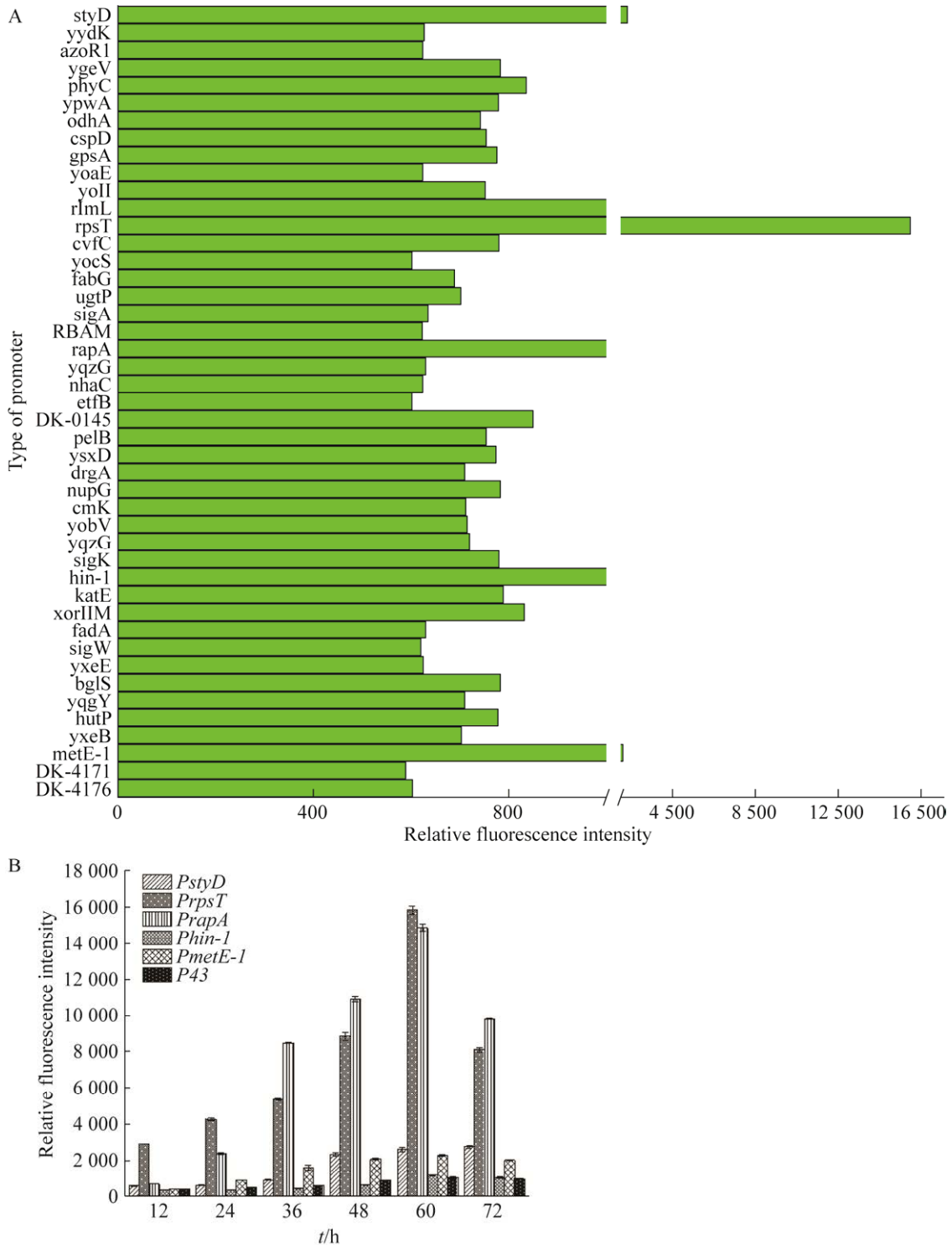


图 2 启动子对荧光蛋白的表达情况

Figure 2 Expression of green fluorescent protein by promoter. A: Expression of green fluorescent protein by different promoters. B: The expression of green fluorescent protein in six promoters at different times. The data are presented as mean±SD.

荧光强度均高于其他启动子, 故选取这 5 个启动子作为研究对象, 分别为启动子 *PrpsT*、*PrapA*、*PstyD*、*PmetE-1*、*Phin-1* 等。由于 *P43*^[14-15]是最常用且是目前公认比较强的组成型强启动子, 并且解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌的同源性很高, 因此选取 *P43* 做对照, 5 个启动子 *PrpsT*、*PrapA*、*PstyD*、*PmetE-1*、*Phin-1* 的相对荧光强度在 12–72 h 整个过程中均高于对照启动子 *P43* 的相对荧光强度(图 2B)。

启动子 *PrpsT*、*PrapA*、*PstyD*、*PmetE-1*、*Phin-1* 的相对荧光强度较高, 可能与其 miRNA 二级折叠结构有关, 利用在线分析软件 RNA Folding Form 获得的 miRNA 二级结构图, 结果如图 3 所示。Xiao 等^[16]认为, 具有最佳稳定性的简单发夹和环上完全暴露的 SD 序列的二级结构有利于核糖体募集, 用以增强翻译起始。根据预测结果发现, 启动子 *PrapA*、*PstyD*、*PmetE-1* 的发卡结构较多, 有利于核糖体的募集从而增强了绿色荧光蛋白的表达, 启动子 *PrpsT*、*Phin-1* 的发卡结构虽然少, 但最小自由能低, 结构比较稳定, mRNA 不容易被降解, 因此可能是绿色荧光蛋白表达量高的原因。最小自由能^[17]的中心思想认为, RNA 的二级结构在最优化组合时, 通过分子动力学方法获取的各种茎环结构的总能量最小, 结构最稳定, 并且当自由能趋向最小的时候为 RNA 真实的二级结构, 此时也形成了 RNA 分子最稳定的状态。

2.3 五种启动子对绿色荧光蛋白基因转录水平的影响

采用 RT-qPCR 技术, 以解淀粉芽孢杆菌 TCCC 111018 的持家基因 *gap* 为内参, 通过 SYBR Green 模式的 RT-qPCR 测定不同启动子调控下的绿色荧光蛋白基因的转录水平^[18-19],

以解淀粉芽孢杆菌 TCCC 111018 16S rRNA 基因为内标, 按 Cham QTM Universal SYBR[®] qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行 RT-qPCR。反应程序如下: 预变性: 95 °C 30 s; 循环反应: 95 °C 5 s, 54 °C 20 s, 72 °C 30 s, 循环 40 次; 熔解曲线: 95 °C 15 s; 60 °C 60 s; 95 °C 15 s。探究不同启动子在 12 h 对应的目的基因的 mRNA 转录水平。对重组解淀粉芽孢杆菌系统的分泌表达做铺垫, 为筛选高效表达的重组菌株提供理论指导。RT-qPCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行定量分析, 测定不同启动子调控下的绿色荧光蛋白基因的转录水平, 结果如图 4 所示。在 12 h 时, 启动子 *PrapA*、*PrpsT*、*PstyD*、*PmetE-1*、*Phin-1* 在绿色荧光蛋白基因中的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值分别是启动子 *P43* 的 7.0 倍、2.8 倍、1.8 倍、3.7 倍、3.8 倍, 其 mRNA 的转录水平平均比 *P43* 高。

2.4 不同启动子对碱性果胶酶基因表达强度以及转录水平的影响

对绿色荧光蛋白基因中转录水平高的 3 种启动子的重组菌株进行发酵测试, 检测不同时间的上清液中碱性果胶酶的酶活, 分别在 12、24、36、48、60、72 h 对碱性果胶酶酶活进行测定。如图 5 所示, 发酵培养 60 h 时, 各重组菌发酵上清液中碱性果胶酶活性达到最高, 带有 *PrapA*、*PmetE-1*、*Phin-1* 启动子的重组菌株产碱性果胶酶活力是 *P43* 启动子的 9.8 倍、4.8 倍、3.0 倍。

采用 RT-qPCR 方式测定不同启动子调控下的碱性果胶酶基因的转录水平, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行定量和分析。结果如图 6 所示, 在 12 h 时, 启动子 *PrapA*、*PmetE-1*、*Phin-1* 在碱性果胶酶基因中的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 是启动子 *P43* 的 5.2 倍、1.5 倍、1.2 倍, 其 mRNA 的转录水平平均比 *P43* 高。

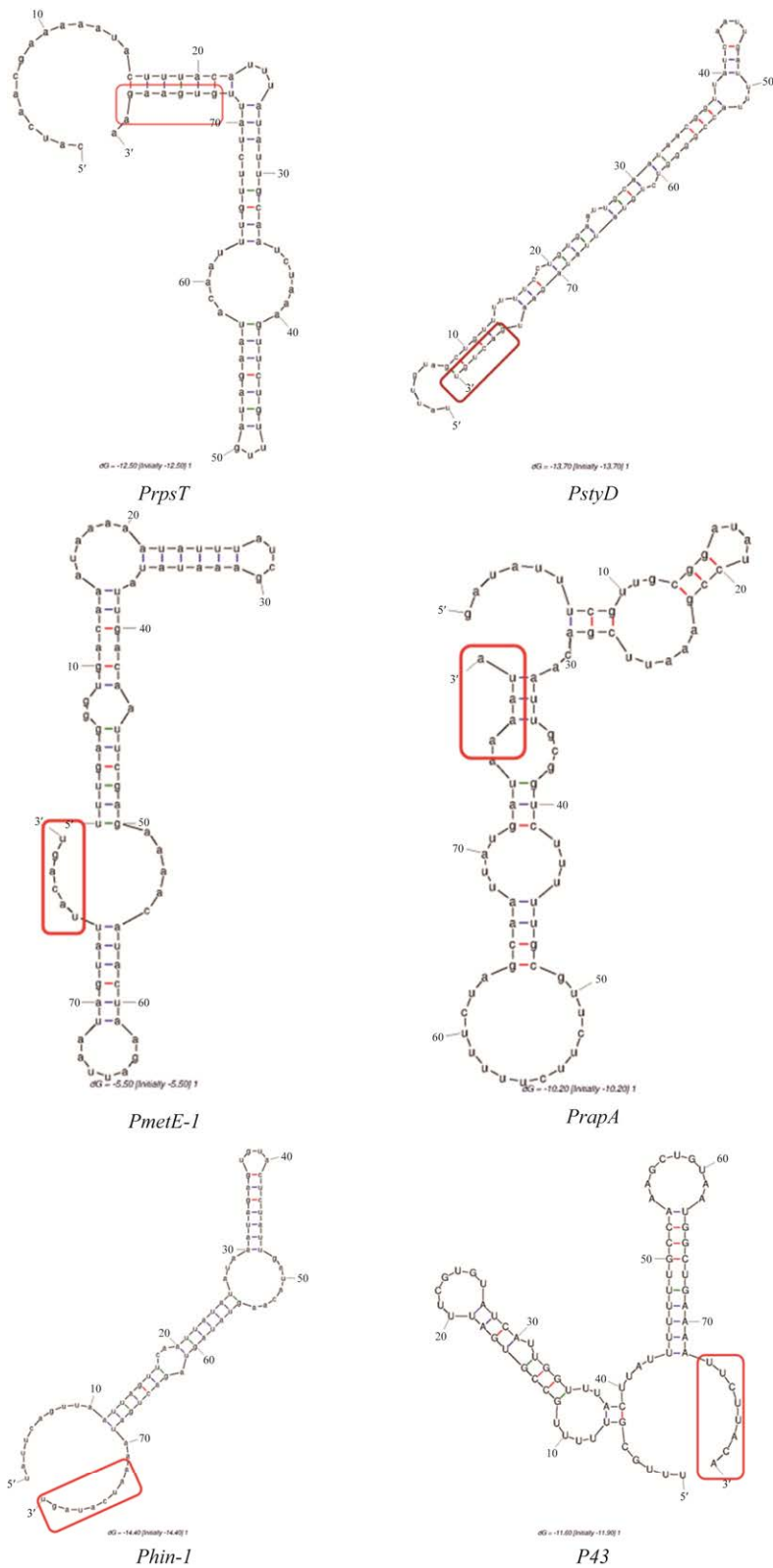


图 3 不同启动子的 miRNA 二级结构折叠图

Figure 3 Fold diagram of miRNA secondary structure of different promoters.

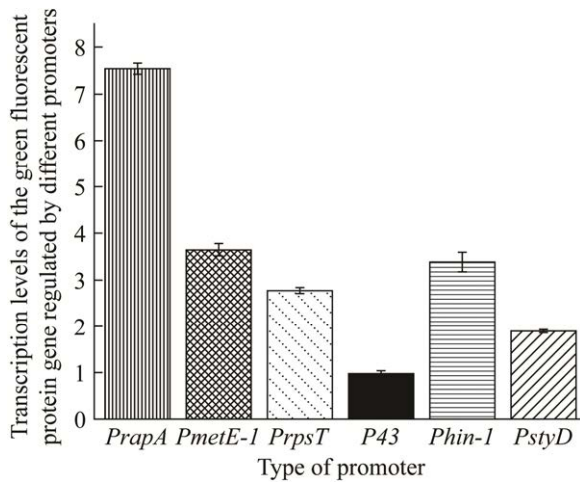


图 4 不同启动子调控下的绿色荧光蛋白基因的转录水平

Figure 4 Transcription levels of the green fluorescent protein gene regulated by different promoters. The data are presented as mean±SD.

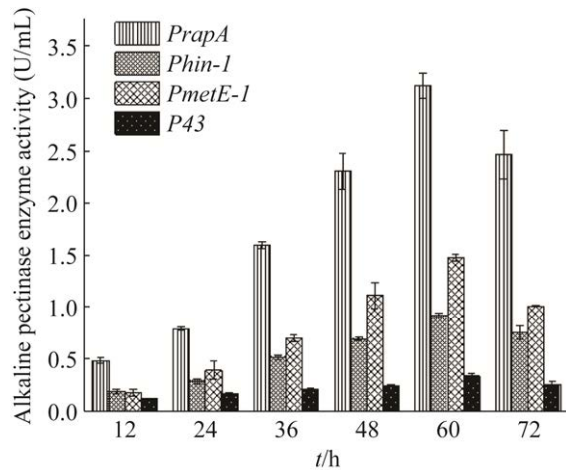


图 5 四种启动子在不同时间对碱性果胶酶的表达活性

Figure 5 Expression activities of the four promoters on basic pectinase at different times. The data are presented as mean±SD.

3 讨论与结论

根据转录水平的检测结果, *PrapA*、*PmetE-1* 和 *Phin-1* 这 3 个启动子表达绿色荧光蛋白基因和碱性果胶酶基因的转录水平均高于 *P43*, 启

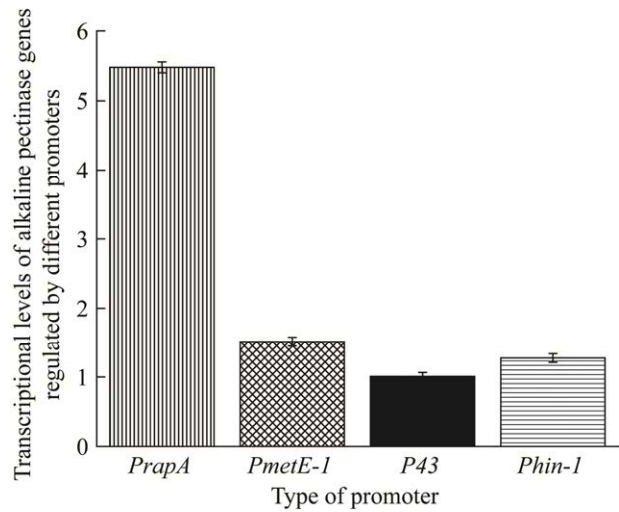


图 6 不同启动子调控下的碱性果胶酶基因的转录水平

Figure 6 Transcriptional levels of alkaline pectinase genes regulated by different promoters. The data are presented as mean±SD.

动子的启动强度主要取决于启动子的结构, Gonzales 等^[20]认为-10 区对启动子的转录效率影响较大; Chen 等^[21]认为-10 区在转录过程中发挥着关键的作用, 因此利用在线软件 WebLogo 对启动子 *PrapA*、*PmetE-1*、*Phin-1* 的保守序列进行预测分析。如图 7 所示, 对启动子进行多序列比对, 发现启动子的-10 区保守性较强, 并且 3 种启动子的-10 区的序列基本为 TANAAT (N 代表碱基对 A/T/C/G), 与-10 区保守序列 TATAAT 有一个碱基对的不同, 可能是 3 种启动子的表达强度均高于启动子 *P43* 的原因之一。

启动子的表达强度还体现在 2 个保守序列之间的间隔长度。一般来说, 2 个保守区序列-35 区和-10 区间隔 16-18 bp 时启动活性最强^[22], *PrapA*、*PmetE-1*、*Phin-1* 两个保守序列之间的间距分别是 15、16、17 bp, 而启动子 *P43* 两个保守序列之间的间距是 13 bp, 未在启动活性最强的范围之内, 这可能是 *P43* 比其他

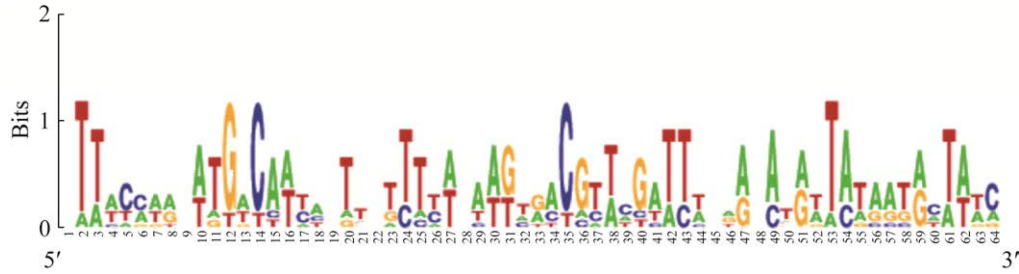


图 7 三个启动子的多序列比对

Figure 7 Multiple sequence alignment of three promoters.

3 个启动子活性较弱的一部分原因；转录水平较高的启动子的序列保守性更强，-10 区的上游存在一个 TG 基序 (TRTG) 影响启动子活性，称为 -15 区^[23-24]。由表 3 可知，启动子 *PrapA* 含有 -15 区，并且 -15 区的序列完全符合强启动子的序列特征，这可能是启动活性最高的原因。

转录调控因子在启动子的转录调控以及启动子的活性中具有重要的意义，Slamti 等提出启动子 *PsrfA* 的转录起始位点下游含有一个启动子抑制因子 CodY^[25] 的结合位点，当抑制因子与结合位点结合时会影响启动子的转录活性，从而影响目的蛋白的表达水平；启动子 *PkasO*^[26] 受 2 个调控因子 ScbR 和 ScbR2 严格调控后才进行基因表达，经过改造后获得更强的启动子，因此，启动子的转录活性也受转录调控因子影响^[27]。*PrapA* 有 3 个转录调控因子结

合位点，一个 RNA 聚合酶 σ 因子 rpoD17，一个是 purR 对嘌呤生物合成途径具有转录调节作用，还有一个是正调节蛋白 ompR，促进双向转录。*Phin-1* 有 2 个全局调控因子 crp，它能够调控其他 20 多种转录调控因子的表达从而间接调控下游基因的表达；*PmetE-1* 有 2 个 RNA 聚合酶 σ 因子 rpoD18、rpoD15 促进转录；*P43* 只有 1 个正调节蛋白 ompR，促进双向转录，这可能是 *PrapA* 启动活性最高，且表达碱性果胶酶的活力也最高的原因。

本研究从解淀粉芽孢杆菌基因组中筛选获得新型启动子，以绿色荧光蛋白基因作为报告基因进行筛选，通过检测带有绿色荧光蛋白基因的不同启动子的转录水平，确定 5 个不同的新型启动子，然后以碱性果胶酶基因作为报告基因，对转录水平及其表达活性进行测定。结果显示，*PrapA*、*PmetE-1*、*Phin-1* 表达碱性果胶酶的活力分别是对照启动子 *P43* 的 9.8 倍、4.8 倍、3.0 倍，筛选出的启动子 *PrapA*、*PmetE-1*、*Phin-1* 为解淀粉芽孢杆菌表达系统中异源基因的高效表达奠定基础。

表 3 解淀粉芽孢杆菌较强启动子的 -10 区和 -35 区序列分析

Table 3 Sequence analysis of -10 region and -35 region of strong promoter of *Bacillus amyloliquefaciens*

Name	-35 region	-10 region	-15 region
<i>PrapA</i>	TTCTTT	TAAAAT	TATG
<i>PmetE-1</i>	TTGACA	TAAGAT	-
<i>Phin-1</i>	TTGATA	TAAAAT	-
<i>P43</i>	TTGCCA	GAAAAT	-

—: The promoter does not exist in the -10 region.

参考文献

- [1] PHAN TT, NGUYEN HD, SCHUMANN W. Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter

- elements[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 157(1): 167-172.
- [2] KEASLING JD. Synthetic biology for synthetic chemistry[J]. *ACS Chemical Biology*, 2008, 3(1): 64-76.
- [3] BAWEIA M, TIWARI R, SINGH PK, NAIN L, SHUKLA P. An alkaline protease from *B. pumilus* MP 27: functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1195.
- [4] 冯俊. 代谢工程改造解淀粉芽孢杆菌提高 γ -PGA 产量[D]. 天津: 南开大学博士学位论文, 2016. FENG J. Metabolic engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* to improve γ -PGA yield[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Nankai University, 2016 (in Chinese).
- [5] 乔香君, 吴影, 赵丽娜, 古绍彬. 解淀粉芽孢杆菌 BA118 高密度发酵工艺研究[J]. *农产品加工*, 2022(11): 51-57. QIAO XJ, WU Y, ZHAO LN, GU SB. Optimization of high density fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens* BA118[J]. *Farm Products Processing*, 2022(11): 51-57 (in Chinese).
- [6] ALPER H, FISCHER C, NEVOIGT E, STEPHANOPOULOS G. Tuning genetic control through promoter engineering[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(36): 12678-12683.
- [7] KOSURI S, GOODMAN DB, CAMBRAY G, MUTALIK VK, GAO Y, ARKIN AP, ENDY D, CHURCH GM. Composability of regulatory sequences controlling transcription and translation in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(34): 14024-14029.
- [8] NEVOIGT E, KOHNKE J, FISCHER CR, ALPER H, STAHL U, STEPHANOPOULOS G. Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5266-5273.
- [9] SHARMA KM, KUMAR R, VATS S. Production, partial purification and characterization of alkaline protease from *B. aryabhattai* K3[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2014, 38(2): 290-298.
- [10] SUSEELA L, ANIALI CH, MURALIDHAR P. Enhanced production of alkaline protease by *Aspergillus niger* DEF 1 isolated from dairy form effluent and determination of its fibrinolytic ability[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2017, 11(11): 440-449.
- [11] 汪恒英, 周守标, 常志州, 马艳, 秦卫华. 绿色荧光蛋白(GFP)研究进展[J]. *生物技术*, 2004, 14(3): 70-72. WANG HY, ZHOU SB, CHANG ZZ, MA Y, QIN WH. Researching progress of green fluorescent protein[J]. *Biotechnology*, 2004, 14(3): 70-72 (in Chinese).
- [12] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression[M]. *Entropy*: Basel, Switzerland, 1994, 263(5148): 802-805.
- [13] 蔡叶申, 张天一, 鲍凌志, 马洁, 陈少鹏. 基于 CadR 的镉生物传感器的构建与优化[J]. *环境工程技术学报*, 2022. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5972.X.20220518.1108.006.html>. CAI YS, ZHANG TY, BAO LZ, MA J, CHEN SP. Construction and optimization of cadmium biosensor based on CadR[J]. *Journal of Environmental Engineering Technology*, 2022. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5972.X.20220518.1108.006.html> (in Chinese).
- [14] ZHANG XZ, CUI ZL, HONG Q, LI SP. High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 4101-4103.
- [15] YE R, KIM JH, KIM BG, SZARKA S, SIHOTA E, WONG SL. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 62(1): 87-96.
- [16] XIAO J, PENG B, SU Z, LIU A, HU Y, NOMURA CT, CHEN S, WANG Q. Facilitating protein expression with portable 5'-UTR secondary structures in *Bacillus licheniformis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(5): 1051-1058.
- [17] LORENZ R, WOLFINGER MT, TANZER A, HOFACKER IL. Predicting RNA secondary structures from sequence and probing data[J]. *Methods*: San Diego, Calif, 2016, 103: 86-98.
- [18] LIU X, YANG H, ZHENG J, YE Y, PAN L. Identification of strong promoters based on the transcriptome of *Bacillus licheniformis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(6): 873-881.
- [19] MENG FQ, ZHU XY, NIE T, LU FX, BIE XM, LU YJ, TROUTH F, LU ZX. Enhanced expression of pullulanase in *B. subtilis* by new strong promoters mined from transcriptome data, both alone and in combination[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018.

- [20] GONZALES M, SAVIOLA B. Mutational analysis of the -10 region from the *Mycobacterium tuberculosis lipF* promoter[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(6): 1225-1229.
- [21] CHEN G, KUMAR A, WYMAN TH, JR CPM. Spo0A-dependent activation of an extended -10 region promoter in *B. subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(4): 1411-1418.
- [22] SONG Y, NIKOLOFF JM, ZHANG D. Improving protein production on the level of regulation of both expression and secretion pathways in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(7): 963-977.
- [23] HELMANN JD. Compilation and analysis of *B. subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(13): 2351-2360.
- [24] GUAN C, CUI W, CHENG J, ZHOU L, LIU Z, ZHOU Z. Development of an efficient autoinducible expression system by promoter engineering in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 66.
- [25] SLAMTI L, LEMY C, HENRY C, GUILLOT A, HUILLET E, LERECLUS D. CodY regulates the activity of the virulence quorum sensor PlcR by controlling the import of the signaling peptide PapR in *Bacillus thuringiensis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1501.
- [26] WANG W, LI X, WANG J, XIANG S, FENG X, YANG K. An engineered strong promoter for *Streptomyces*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(14): 4484-4492.
- [27] DENG C, WU Y, LV X, LI J, LIU Y, DU G, CHEN J, LIU L. Refactoring transcription factors for metabolic engineering[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 57: 107935.