

枯草芽孢杆菌生物素操纵元的初步改造

张西锋^{1,2}, 李万芬³, 袁新宇¹, 张炜炜¹, 刘 波¹, 王 俊¹, 杨明明¹

(1 武汉阳光广济医药开发有限公司, 湖北 武汉 430071;

2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 3 湖北工业大学 生物工程学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 为了克服生物素生物合成中的抑制作用, 提高生物素操纵元基因本底水平的表达, 分别构建了整合表达载体 *pGJj01* 和 *pGJj02*, 通过双交叉整合的方式先后将线性化的 *pGJj01* 和 *pGJj02* 整合到枯草芽孢杆菌 AS1094 的染色体上, 构建了枯草芽孢杆菌 GJ Z01, 用强启动子 P43-1 替换掉生物素操纵元自身的启动子 P_{biotin}, 并在 *bioB* 和 *bioI* 基因间加入强终止子和强启动子 P43-2。经 PCR 和 Southern 检测表明, 整合构建正确。试验可为下一步研究生物素操纵元基因表达提供良好的宿主菌素材。

[关键词] 枯草芽孢杆菌; 生物素; 同源重组

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0169-06

Pre-constructed of *Bacillus subtilis* biotin operon

ZHANG Xi-feng^{1,2}, LI Wan-fen³, YUAN Xin-yu¹, ZHANG Wei-wei¹, LIU Bo¹,
WANG Jun¹, YANG Ming-ming¹

(1 Company of Yangguang-Guangji Medical R & D Co. Lt, Wuhan, Hubei 430071, China; 2 College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3 College of Biotechnology, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068, China)

Abstract: In order to overcome the inhibition in biotin bio-synthesize and enhance biotin operon genes expression, two integrated expression vector *pGJj01* and *pGJj02* were lineared, and then integrated into *Bacillus subtilis* AS1094 to get *Bacillus subtilis* GJ Z01. Promoter of biotin operon was replaced by promoter 43-1 and the termination between *bioB* gene and *bioI* gene was reconstructed by strong promoter P43-2. GJ Z01 was detected through PCR and Southern blot. This research provides a basis for further study on biotin operon genes expression.

Key words: *B. subtilis*; biotin; integrate

枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性菌, 具有外分泌性强、细胞壁不含内毒素和良好的发酵性等特点, 已广泛用于生产工业酶制剂和表达外源基因。随着对枯草芽孢杆菌基因组测序的完成, 其应用将得到进一步提高。但枯草芽孢杆菌作为工业生产菌和蛋白表达的宿主菌仍存在问题, 如质粒不稳定、蛋白酶太多、蛋白酶对目的蛋白的降解以及宿主菌本身的自溶现象^[1]。同源重组整合可以使外源基因在宿主中进行稳定的复制和表达, 并可避免质粒的不稳

定性, 其在枯草芽孢杆菌中已得到广泛应用^[2-3]。

枯草芽孢杆菌生物素操纵元主要包括 7 个基因 (*bioW*, *bioA*, *bioF*, *bioD*, *bioB*, *bioI* 和 *orf2*), 总长度 7.5 kb, *bioA*、*bioF*、*bioD* 和 *bioB* 基因的 5 端与其前面基因的 3 均具有部分重叠, *bioI* 和 *orf2* 被一个不依赖 ρ 因子的终止子隔开, 各基因可编码生物素合成代谢所需的酶和前体物^[4-6]。生物素是枯草芽孢杆菌生长代谢的必要成分, 其合成代谢受到严格调控。以上各基因的转录均受到一个位于操纵元

* [收稿日期] 2006-06-13

[基金项目] 国家重点新产品计划项目[2003ED760039]

[作者简介] 张西锋(1977 -), 男, 山东郓城人, 在读博士, 主要从事分子生物学研究。E-mail: zhangxf9465 @163.com

[通讯作者] 杨明明(1971 -), 男, 陕西汉中, 博士, 主要从事分子生物学与发酵工程研究。E-mail: ymm @nwsuaf.edu.cn

前部的 σ^A 启动子和与启动子相邻的调控片段的控制^[7-10]。在转录和表达中,生物素生物合成操纵元不同程度地受到调控蛋白 BirA 和外源生物素的负反馈调节,BirA 和外源生物素结合后形成的阻遏物作用于生物素操纵元的启动子而产生共抑制^[4,7-10]。

为了克服生物素生物合成中的抑制作用,提高生物素操纵元基因本底表达水平,本试验通过整合的方式用 P43 启动子^[11]替换掉生物素操纵元自身启动子 Pbiotin,并对 *bioB* 和 *bioI* 基因间的终止子进行了改造,以期生物素操纵元各基因的表达提供良好的宿主菌材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 枯草芽孢杆菌 AS1094 来自 CCSC(中国菌种保藏中心),*pBluS KM/ pBlu KSM* 为本室保存,*pE3-spec*、启动子探针型载体 *pGJ01* 和 *pGJ02* 均由本室构建,质粒 *pBES T501* (有硫酸

新霉素抗性基因)由 Linn T 博士提供。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、修饰酶、T₄DNA 连接酶、*LA Taq* 聚合酶及染色体基因组 DNA 提取试剂盒均购自 Promage。质粒 DNA 的提取和 DNA 的纯化回收试剂盒购自杭州维特洁公司。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备与转化 分别采用电穿孔转化法和化学转化法^[12-14]。

1.2.2 β -半乳糖苷酶活性的测定 β -半乳糖苷酶测定参照 Miller^[15]的方法并加以改进。按照公式,Miller(密勒)活性单位 = $(66.7 \times OD_{420} / OD_{595}) \times$ 稀释倍数,其中 OD_{420} 从反应混合物中读取, OD_{595} 表示菌液的细胞密度。 β -半乳糖苷酶酶活定义为:在 37℃条件下,1 mL 菌液每分钟的 OD_{420} 与 OD_{595} 的相对值为 1 密勒单位。

1.2.3 扩增各基因片段所需的引物和 PCR 反应条件 所需引物和 PCR 反应条件见详表 1 和表 2,PCR 反应共 35 个循环。

表 1 扩增各基因片段的引物

基因 Gene	序列 Nucleotide	克隆位点 Clone site
Pbiotin-up	5 ['] ATGTCGACA TGCTGGACAGGGAGCT-3 [']	Sal I
Pbiotin-down	5 ['] GCGAATTCCGCCCTTTCACTGATA-3 [']	EcoR I
<i>bio</i> -up	5 ['] ATAGAGCTCGATTTTCGGCGTTTGG-3 [']	Sac I
<i>bio</i> -down	5 ['] ATCCGCGGCA TATAGTCTAACGCAG-3 [']	Sac II
<i>Spec</i> -up	5 ['] ATACCGCGGAATGGCGA TTTTC-3 [']	Sac II
<i>Spec</i> -down	5 ['] AA GACTAGTTTGAAAAAA GTGTTTCCACCA-3 [']	SpeI
P43-1-up	5 ['] ATACTAGTGCA TGCA GGCCGGG-3 [']	SpeI
P43-1-down	5 ['] GGGAATTTCGTGTACATTCCTCTCTT-3 [']	EcoR I
<i>bioW</i> -up	5 ['] GGCGAATTCACAGAA TCTTGACAGG-3 [']	EcoR I
<i>bioW</i> -down	5 ['] GCGGTACCA TCAAA TCA TGATCATG-3 [']	Kpn I
<i>bioB</i> -up	5 ['] ATGGTACCA TGAA TCAA TGGA TGGAACTCG-3 [']	Kpn I
<i>bioB</i> -down	5 ['] ATGGGCCCTCA GCTTTTCGCACTT-3 [']	Apa I
TT-up	5 ['] ATGGGCCCCGGGACGTTCTTGC-3 [']	Apa I
TT-down	5 ['] GCGCCTCGAGGCTCAACTCCAAA-3 [']	XhoI
<i>neo</i> -up	5 ['] ATGCTGACGTCGA GATCA GGG-3 [']	Sal I
<i>neo</i> -down	5 ['] GGGCTCGAGAGATCAATTTCTGATA-3 [']	XhoI
P43-2-up	5 ['] AGTCGACCGTGCA TGCA GGCCGGGG-3 [']	Sal I
P43-2-down	5 ['] GGGGGATCCA TTCTCTCTTACCTACCTA T-3 [']	BamH I
<i>bioI</i> -up	5 ['] ATGGA TCCGTGACAA TTGATCGTC-3 [']	BamH I
<i>bioI</i> -down	5 ['] ATTCTAGAA TCTTATGTCCGGCGA TCG-3 [']	Xba I

表 2 扩增各基因的 PCR 反应条件

基因 Gene	变性 Denaturalize		复性 Anneal		延伸 Extend	
	温度/℃ Temperature	时间/s Time	温度/℃ Temperature	时间/s Time	温度/℃ Temperature	时间/s Time
Pbiotin	94	30	55	30	72	25
<i>bio</i>	94	30	60	30	72	45
<i>Spec</i>	94	30	58	30	72	70
P43-1	94	30	56	30	72	30
<i>bioW</i>	94	30	53	30	72	45
<i>bioB</i>	94	30	63	30	72	60
TT	94	30	63	30	72	20
<i>neo</i>	94	30	53	30	72	70
P43-2	94	30	60	30	72	30
<i>bioI</i>	94	30	60	30	72	60

1.2.4 枯草芽孢杆菌生物素操纵元启动子 *P*biotin 和启动子 *P*43-1、*P*43-2 的克隆及功能检测 枯草芽孢杆菌生物素操纵元基因自身的启动子 *P*biotin 为负控型启动子,启动子 *P*43 为组成型启动子^[7,11]。以枯草芽孢杆菌 AS1094 染色体 DNA 为模板,PCR 扩增启动子 *P*biotin、*P*43-1 和 *P*43-2。引物和 PCR 反应条件见表 1 和表 2。*P*biotin 和 *P*43-1 分别以 *Sal* I、*Eco*R I 和 *Spe*I、*Eco*R I 位点克隆到 *p*GJ01

上,构建了 *p* *P*biotin-*GJ*01 和 *p* *P*43-1-*GJ*01(图 1,图 2); *P*43-2 以 *Sal* I、*Bam*H I 位点克隆到 *p*GJ02 上,构建了 *p* *P*43-2-*GJ*02(图 3)。采用 1.2.1 的方法分别将质粒 *p* *P*biotin-*GJ*01、*p* *P*43-1-*GJ*01 和 *p* *P*43-2-*GJ*02 转化至枯草芽孢杆菌 AS1094。挑取单菌落于液体 LB 培养基发酵摇瓶中,在 37.0 °C、250 r/min 条件下培养,按不同时间段取样测定β-半乳糖苷酶(Bga)的酶活性。

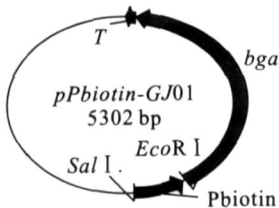


图 1 质粒 *p* *P*biotin-*GJ*01 的构建
Fig.1 Plasmid of *p* *P*biotin-*GJ*01

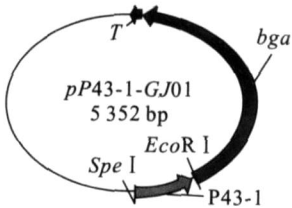


Fig.2 Plasmid of *p* *P*43-1-*GJ*01
图 3 质粒 *p* *P*43-2-*GJ*02 的构建

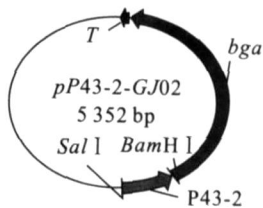


Fig.3 Plasmid of *p* *P*43-2-*GJ*02

1.2.5 整合表达载体 *p*GJj01 和 *p*GJj02 的构建
(1) *p*GJj01 的构建。*Bio*、*bio*W 和 *P*43-1 启动子来自枯草芽孢杆菌 AS1094, *spec* 抗性基因来自 *p*E3-*spec*。*bio* 和 *bio*W 分别作为上游和下游同源序列,先后以 *Eco*R I / *Kpn* I 位点、*Sac* I / *Sac* II 位点克隆

到 *p* *Blu* *KSM* 上。为了便于筛选,在 *Sac* II / *Spe* I 位点引入了 *spec* 基因,最后在 *Spe* I / *Eco*R I 位点引入启动子 *P*43-1,即得到整合表达载体 *p*GJj01,其构建过程见图 4。

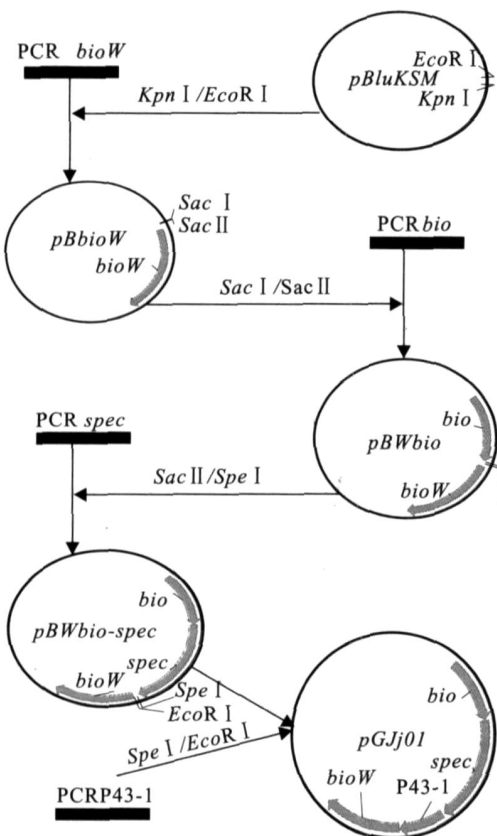


图 4 载体 *p*GJj01 的构建过程
Fig.4 Construction process of *GJ*j01

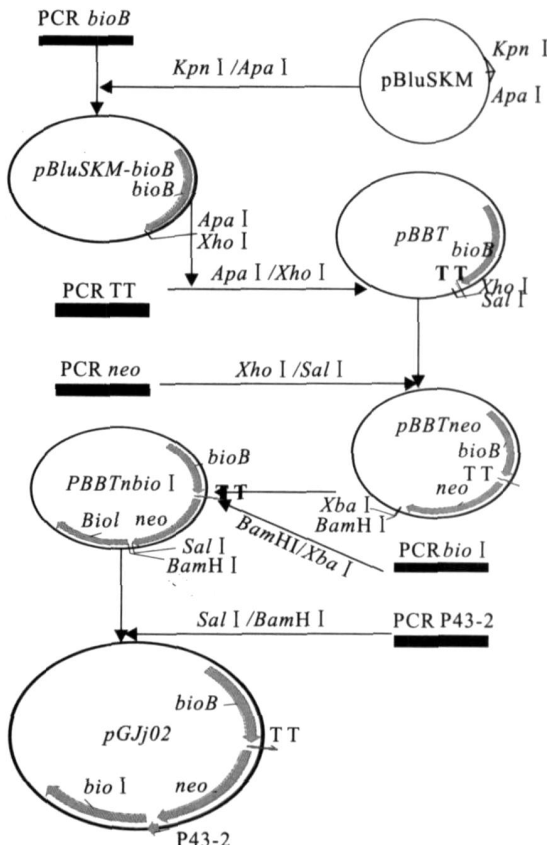


图 5 载体 *p*GJj02 的构建过程
Fig.5 Construction process of *GJ*j02

(2) *pGJj02* 的构建。*bioB*、*bioI* 基因和 P43-2 启动子来自枯草芽孢杆菌 AS1094,硫酸新霉素抗性基因来自 *pBES T501*,终止子 T 来自 *pA X01*。基因 *bioB* 和 *bioI* 分别为上游和下游同源序列,为了便于筛选,引入了硫酸新霉素抗性基因 *neo*。*bioB* 以 *KpnI/ApaI* 位点克隆到 *pBlus KM* 上得到 *pBlus KM-bioB*,终止子 T、*neo* 和基因 *bioI* 先后以 *ApaI/XhoI*、*XhoI/Sal I* 和 *BamH I/Xba I* 位点克隆到 *pBlus KM-bioB* 上,最后在 *Sal I/BamH I* 位点克隆入启动子 P43-2,即得到整合表达载体 *pGJj02*。

1.2.6 枯草芽孢杆菌 GJ Z01 的构建与检测 (1) 枯草芽孢杆菌 GJ Z01 的构建。分别通过 *Sac I* 位点和 *Xba I* 位点将 *pGJj01*、*pGJj02* 线性化。采用化学转化法分别将线性化的 *pGJj01* 和 *pGJj02*,通过

双交叉同源整合方式整合到枯草芽孢杆菌 AS1094 的染色体上,得到枯草芽孢杆菌 GJ Z01,其整合过程见图 6。

(2) GJ Z01 的 PCR 与 Southern blot 检测。用基因组提取试剂盒提取 GJ Z01 的染色体 DNA,并通过 PCR 与 Southern blot 进行检测。以 GJ Z01 基因组 DNA 为模板,分别以引物 P43-1-up/*bioA*-down、*bioσ* up/*bioA*-down、*Spec* up/*bioA*-down 和 *bioW*-up/*bioF*-down 进行 PCR 检测(引物 *bioA*-down: 5'-TCAATCTTCAAGGCTC-3')。将回收的目的片段与 *pGEM-T Easy Vector* 连接,转化至 DH5α,提取的质粒经酶切鉴定后测序。GJ Z01 基因组 DNA 经 *EcoR I* 限制性内切酶酶切后,分别以壮观霉素抗性基因 *spec* 和硫酸新霉素抗性基因 *neo* 为探针进行 Southern blot 检测。

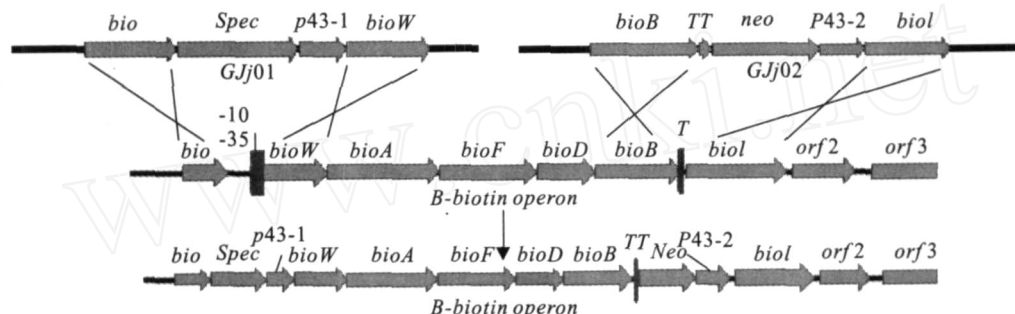


图 6 枯草芽孢杆菌 GJ Z01 的整合过程
Fig. 6 Integration process of *B. subtilis* GJ Z01

2 结果与分析

2.1 启动子 P_{bio}tin、P43-1 和 P43-2 的功能检测

质粒 *pP_{bio}tin GJ01*、*pP43-1-GJ01* 和 *pP43-2-GJ02* 酶切鉴定和测序结果表明克隆正确。 β -半乳糖苷酶(Bga)的酶活性检测结果见图 7。

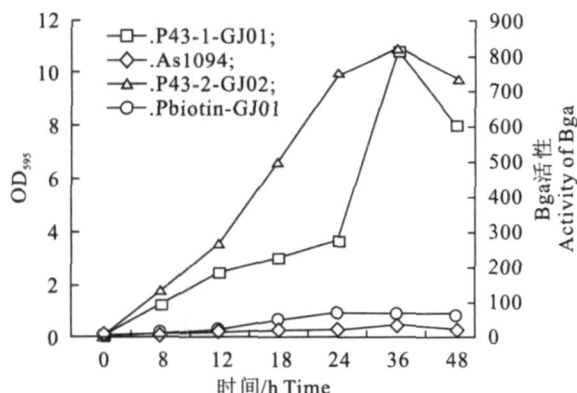


图 7 构建的 3 种质粒 β -半乳糖苷酶的酶活性曲线
Fig. 7 Activity curve of Bga of three constructed plasmid
图 7 表明, *pP_{bio}tin GJ01*、*pP43-1-GJ01* 和

pP43-2-GJ02 中 Bga 的最大酶活性分别为 50, 841.2 和 805.6 个密勒单位,表明 *P_{bio}tin* 为弱启动子,P43 为强启动子。

2.2 整合表达载体 *pGJj01* 和 *pGJj02* 的鉴定

pGJj01 和 *pGJj02* 的酶切鉴定结果见图 8。

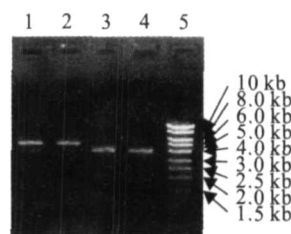


图 8 *pGJj01* 和 *pGJj02* 的酶切鉴定
1, 2. *GJj01/Sac II+ EcoR I*; 3, 4. *pGJj02/Xho I+ BamH I*;
5. SM0393 Marker
Fig. 8 Enzyme of *pGJj01* and *pGJj02*

图 8 表明, *pGJj01* 经 *Sac II/EcoR I* 酶切出 1.5 和 5.0 kb 的两条带; *pGJj02* 经 *Xho I/BamH I* 酶切出 2.0 和 4.2 kb 的两条带,与预期的结果相符。

2.3 枯草芽孢杆菌 GJ Z01 的 PCR 与 Southern blot 检测结果

由图 9 可知,以 GJ Z01 的染色体 DNA 为模板,枯草芽孢杆菌 AS1094 的生物素操纵子为对照, *bioW*-up/ *bioA*-down 为引物的 PCR 扩增目的条带大小多出 1.5 kb, *bioW*-up/ *bioI*-down 的 PCR 扩增的目的条带多出 1.6 kb,且测序结果表明整合正确。基因组 DNA 的 Southern blot 结果见图 10。图 10 表明,样品具有杂交信号,而对照无杂交信号,由此表明枯草芽孢杆菌 GJ Z01 的整合构建正确。

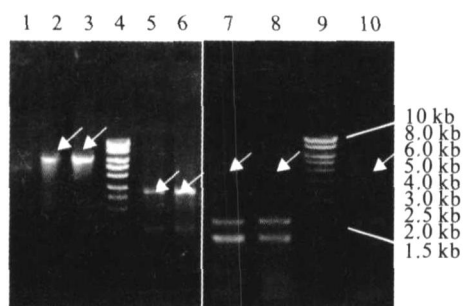


图 9 枯草芽孢杆菌 GJ Z01 的 PCR 检测

1. 以 AS1094 为模板的 *bioW*-up/ *bioI*-down 扩增产物;
- 2-10. 以 GJ Z01 染色体 DNA 为模板的 PCR 扩增产物;
- 2,3. 引物 *bioW*-up/ *bioI*-down 的扩增产物;4,9. SM0393 Marker;
- 5,6. 引物 P43-1-up/ *bioA*-down 的扩增产物;
- 7,8. 引物 *bioW*-up/ *bioA*-down 的扩增产物;
10. 引物 *Spec*-up/ *bioA*-down 的扩增产物;箭头示目的片段

Fig. 9 PCR confirmation of *B. subtilis* GJ Z01

1. Product of primers *bioW*-up/ *bioI*-down by using AS1094 genome DNA as template;2,3. Product of primers *bioW*-up/ *bioI*-down;
- 4,9. SM0393 Marker;5,6. Product of primers P43-1-up/ *bioA*-down;
- 7,8. Product of primers *bioW*-up/ *bioA*-down;10. Product of primers *Spec*-up/ *bioA*-down. Arrowheads are the destination

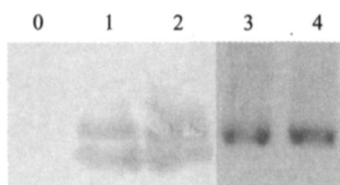


图 10 枯草芽孢杆菌 GJ Z01 的 Southern 检测

0. 对照;1,2. 以 *Neo* 为探针的杂交结果;
- 3,4. 以 *Spec* 为探针的杂交结果

Fig. 10 Southern blot of *B. subtilis* GJ Z01

0. The contrapose;1,2. Result of Southern blot by using *Neo* as probe;3,4. Result of Southern blot by using *Spec* as probe

3 讨论

在微生物的氨基酸或蛋白质合成代谢过程中,

为避免最终产物对宿主的毒性作用,产物合成都要受到正转录调控或负转录调控的严格控制^[16-18]。生物素的生物合成就存在严格的负反馈调控^[4,7-11],而为了得到大量的终产物,就必须对宿主进行改造。随着分子生物学技术的发展,采用整合的方式很容易在染色体水平上对基因或基因序列进行改造,以降低或消除负反馈作用^[4]。枯草芽孢杆菌的生物素生物合成负反馈作用位点位于操纵元的启动子上,为了消除此负反馈作用,本研究通过整合的方式,用 P43-1 启动子替换掉生物素操纵元自身的启动子 *P*biotin,以克服生物素合成中的抑制作用。P43 启动子为强启动子,可以提高生物素各基因的表达。基因 *bioB* 和 *bioI* 被不依赖 ρ 因子的弱终止子隔开, *bioI* 基因可能参与庚二酸前体物的合成^[7]。在本研究中,终止子被 *pA* X01 上的强终止子替换,并在其后添加了 P43-2 启动子以提高 *bioI* 等基因的表达。Perkins 等^[7]用 SP01-15 的启动子和经修饰的操纵子替代原养型菌株的启动子和操纵子,或去除 *bioI* 和 *orf2* 基因之间的不依赖 ρ 因子的终止子,得到菌株 BI303 和 BI304,相关基因型分别为 *P*₁₅ *bioW* *AFDB* (Δ *t*₁) *Iorf2* 和 *P*₁₅ *bioW* *AFDB* (Ω *P*₁₅) *Iorf2*,且全长基因的转录和表达能够提高生物素和维生素的产量。

同源整合方式分为单交叉同源整合和双交叉同源整合^[19]。单交叉同源整合必须是发生在质粒与染色体之间,否则会因染色体的断裂而导致宿主细胞死亡,其结果是在目的基因的两侧出现重复的 DNA 序列。双交叉同源整合不仅可以发生在质粒与染色体之间,而且可以在线性质粒与染色体之间及 DNA 片段与染色体之间,它是通过两段分别位于外源片段两侧的染色体同源序列和染色体上的目的基因断裂发生同源重组,其结果是同源序列之间的外源片段替换了染色体上的目的基因^[19-20]。本试验采用双交叉同源整合的方式,以 P43-1 启动子替换了生物素操纵元自身的启动子 *P*biotin,弱终止子被强终止子和 P43-2 启动子所替换。同源重组整合可以解决自主复制型质粒引起的不稳定问题,并使外源基因整合到染色体上以得到稳定表达。

[参考文献]

- [1] Janniére L, Breand C, Ehrlich S D. Structurally stable *B. subtilis* cloning vector[J]. *Gene*, 1996, 87: 53-61.
- [2] Ferrari E, Lewis P J. Improved plasmid vectors for the production of the production multiple fluorescent protein fusions in *B. subtilis* [J]. *Gene*, 2001, 264: 289-297.

- [3] Kaltwasser ,Wiegert M T ,Schumann W. Construction and amplification of epitope and green fluorescent protein-tagging integration vectors for *Bacillus subtilis* [J]. Apple Environ Microbiology ,2002 ,68 :2624-2628.
- [4] Bower S ,Perkins J B ,Yocum R R ,et al ,Cloning ,sequencing , and characterization of the *B. subtilis* biotin biosynthetic operon[J]. Journal of *Bacteriology* , 1996 ,178 :4122-4130.
- [5] Anthony J. The *E. coli* biotin biosynthetic enzyme sequence predicted from the nucleotide sequence of the biotin operon [J]. The Journal of Biological Chemistry , 1988 , 263 (36) : 19577-19585.
- [6] Shaw N M ,Lehner B ,Fuhrmann M ,et al ,Biotin production under limiting growth conditions by *Agrobacterium*/ *Rhizobium* HK4 transformed with a modified *E. coli* bio operon[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology ,1999 , 22 :590-599.
- [7] Perkins J B ,Bower S ,Howitt C L. Identification and characterization of transcripts from the biotin biosynthetic operon *B. subtilis*[J]. Journal of *Bacteriology* , 1996 ,178 (21) : 6361-6365.
- [8] Beckett D ,Matthews B W , *E. coli* repressor of biotin biosynthesis[J]. Methods Enzymol ,1997 ,279 :362-376.
- [9] Howard P K ,Shaw J ,Otsuka A J. Nucleotide sequence of the *birA* gene encoding the biotin operon repressor and biotin holoenzyme synthetase functions of *E. coli* [J]. Gene ,1985 ,35 : 321-331.
- [10] Speck D ,Ohsawa I ,Gloeckler R ,et al. Isolation of *Bacillus sphaericus* biotin synthesis control mutants: evidence for transcriptional regulation of biotin genes[J]. Gene ,1991 ,108 (1) :39-45.
- [11] Wang P Z ,Doi R H. Overlapping promoters transcribed by *B. subtilis* and RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases[J]. The Journal of Biological Chemistry , 1988 ,259 (13) :8619-8625.
- [12] 萨姆布鲁克 J ,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南:下册[M]. 3 版. 黄培堂,等译. 北京:科学出版社,2002 :1719.
- [13] Yuan G ,Wong S L. Regulation of *groE* expression in *B. subtilis*: the involvement of the σ^A -like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE) [J]. Journal of Bacteriology ,1995 ,177 :5427-5433.
- [14] Wilson G A ,Young F E. Transformation and transfection in lysogenic strains of *B. subtilis*: Evidence for selective induction of prophage in competent cells[J]. Journal of Bacteriology ,1975 ,121 (1) :296-304.
- [15] Miller J. Experiments in molecular genetics[M]. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1972.
- [16] Jacob F ,Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins[J]. Journal of Molecular Biology ,1961 ,3 : 318-356.
- [17] Raibaud O ,Schwartz M. Positive control of transcription initiation in Bacteria[J]. Ann Rev Genetics ,1984 ,18 :173-206.
- [18] De Crombrughe B. Cyclic AMP receptor protein:role in transcription activation[J]. Science ,1984 ,224 :831-838.
- [19] Young M. The mechanism of insertion of a segment of heterologous DNA into the chromosome of *B. subtilis* [J]. Journal of Genetic Microbiology ,1983 ,129 :1497-1512.
- [20] Young M. Gene amplification in *B. subtilis*[J]. Journal of Genetic Microbiology ,1984 ,130 :1613-1621.