

# Thiết lập quy trình điện biến nạp cho *Bacillus subtilis* 1012 và WB800N

• Phạm Thị Mỹ Tiên

• Phan Thị Phượng Trang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

( Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2014, nhận đăng ngày 12 tháng 08 năm 2015)

## TÓM TẮT

*Bacillus subtilis* là chủng chủ biểu hiện mang nhiều ưu điểm nổi bật như không sinh độc tố, tiết được protein mục tiêu ra môi trường nuôi cấy, khoảng 60 % protein công nghiệp được sản xuất từ các chủng *Bacillus*. Để có thể sử dụng *B. subtilis* trong nghiên cứu và làm chủng chủ trong biểu hiện protein tái tổ hợp, các phương pháp về kỹ thuật di truyền cần được phát triển. Một trong các phương pháp mà nhiều nhà khoa học quan tâm là điện biến nạp để đưa DNA trực tiếp vào tế bào. Tuy nhiên một vấn đề gặp phải là hiệu suất biến nạp DNA vào *B. subtilis* còn thấp và không ổn định giữa các chủng khác nhau gây trở ngại cho các thao tác di truyền. *B. subtilis*

1012 và WB800N được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu cơ bản và làm chủng chủ biểu hiện protein tái tổ hợp trong thời gian gần đây, nhưng phương pháp điện biến nạp cho hai chủng này vẫn chưa được thiết lập. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng plasmid pHT10-gfp<sup>+</sup> để tiến hành thiết lập quy trình điện biến nạp cho các chủng *B. subtilis* 1012 và WB800N. Các kết quả về ảnh hưởng của thời điểm thu mẫu, nồng độ và thời gian ủ lysozyme, hiệu điện thế và lượng DNA sử dụng lên tần suất biến nạp đã được khảo sát trong nghiên cứu này để hình thành quy trình điện biến nạp.

**Từ khóa:** plasmid pHT, điện biến nạp, *Bacillus subtilis*, 1012, WB800N.

## MỞ ĐẦU

*B. subtilis* là vi sinh vật có nhiều ứng dụng quan trọng trong nghiên cứu và công nghệ sinh học [2, 9]. Đặc biệt hai chủng *B. subtilis* 1012 và WB800N thường được sử dụng trong các viện nghiên cứu, phòng thí nghiệm. Một bước cần thiết và quan trọng cho các thao tác di truyền trên chủng *B. subtilis* là biến nạp DNA vào tế bào [2, 11]. Có nhiều phương pháp chuyển DNA vào tế bào vi khuẩn như sử dụng deoxyribonucleate [10], biến nạp qua protoplast [3], hay xử lý với alkali [1]. Hạn chế của các phương pháp trên là hiệu suất biến nạp vẫn còn thấp và đòi hỏi một lượng DNA rất cao khoảng 10 µg cho một lần biến nạp. Trong số các

phương pháp biến nạp, điện biến nạp là kỹ thuật đơn giản và phổ biến cho nhiều loài vi khuẩn khác nhau và cho tần suất biến nạp cao [4]. Kỹ thuật này dùng thẩm điện để tạo các lỗ tạm thời trên màng và cho phép DNA tràn đi vào bên trong tế bào. Mặc dù điện biến nạp được áp dụng rộng rãi cho nhiều chủng vi sinh vật khác nhau nhưng việc sử dụng cho *B. subtilis* vẫn còn nhiều hạn chế. Nguyên nhân chính cho vấn đề này là quy trình điện biến nạp vào các chủng *B. subtilis* không ổn định giữa các chủng khác nhau. Để tạo tế bào khả năng biến nạp ở *B. subtilis* thường sử dụng sorbitol, manitol. Xue (1999) cải tiến phương pháp

của Vehmaanpera (1989) bằng cách thêm sorbitol và manitol vào môi trường điện biến nạp để tạo áp suất thẩm thấu làm tế bào co rút và giảm tính không thấm của màng [5]. Lysozyme là một enzyme có hoạt tính phân giải vách tế bào, việc khảo sát các nồng độ khác nhau của lysozyme nhằm tìm được nồng độ tối ưu chỉ thủy phân một phần vách tế bào mà không phá màng nhằm hỗ trợ cho DNA dễ dàng đi qua màng trong lúc thẩm điện là cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết lập quy trình điện biến nạp cho *B. subtilis* 1012, *B. Subtilis* WB800N và nâng cao tần suất biến nạp. Quy trình được xây dựng dựa vào phương pháp điện biến nạp cho các chủng *B. subtilis* của một số bài báo đã được công bố kết hợp với các khảo sát về ảnh hưởng của thời điểm thu mẫu, nồng độ và thời gian ủ lysozyme, hiệu điện thế biến nạp, và lượng DNA. Chúng tôi sử dụng plasmid là pHT10-gfp+ có mang gen kháng kháng sinh Cm (chloramphenicol) và gen chỉ thị gfp để xác định tần suất biến nạp.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng vi sinh vật và plasmid

Chủng *B. subtilis* 1012 (*leuA8 metB5 trpC2 hsdRMI*) [8] và *B. subtilis* WB800N (*nprE aprE epr bpr mpr :: ble nprB :: bsr .vpr wprA :: hyg cm :: neo; NeoR*)[6]. Plasmid pHT10-gfp+ [7] được sử dụng biến nạp vào hai chủng trên nhằm xác định tần suất biến nạp. Khuẩn lạc mang plasmid pHT10-gfp+ biểu hiện GFP cho màu xanh lục dưới đèn UV.

### Xây dựng đường cong tăng trưởng

Chủng *B. subtilis* được hoạt hóa qua đêm trong 5 mL môi trường LB (10 g trypton, 5 g cao nấm men, 5 g NaCl, dH<sub>2</sub>O vừa đủ 1 lít) được chuyển sang 200 mL LB có bổ sung 0,5 M sorbitol sao cho đo giá trị OD<sub>600</sub> ban đầu đạt 0,1. Chủng *B. subtilis* được nuôi cấy lắc ở 250 vòng/phút 37 °C và đo OD<sub>600</sub> sau mỗi giờ nuôi

cấy, xây dựng đường cong tăng trưởng cho hai chủng *B. subtilis* 1012 và WB800N. Xác định các pha tăng trưởng lag, log, ổn định và suy tàn của chúng.

### Tạo tế bào khả nạp

Hoạt hóa chủng *B. subtilis* qua đêm trong 5 mL LB. Sau đó cấy chuyển dịch nuôi cấy sang 200 mL LB có bổ sung 0,5 M sorbitol sao cho OD<sub>600</sub> ban đầu đạt mức 0,1; lắc ở 37 °C và tốc độ lắc 250 vòng/phút. Đo OD<sub>600</sub> sau mỗi giờ nuôi cấy, khi dịch nuôi cấy tế bào tăng trưởng vào giữa pha log bắt đầu thu dịch nuôi cấy tế bào, theo từng thời điểm khác nhau. Xử lý dịch tế bào với lysozyme 1 µg/mL trong 10 phút. Tiếp theo, ủ lạnh dịch nuôi cấy trong đá trong 5 phút và ly tâm thu sinh khối ở 6000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi. Bước rửa được lặp lại 3 lần sử dụng đệm EB (0,5 M sorbitol, 0,5 M manitol, 10 % glycerol) ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút [5]. Phân tán sinh khối tế bào lại trong EB với tỉ lệ pha loãng 1/40 và bảo quản ở -80 °C.

### Điện biến nạp plasmid vào tế bào khả nạp

Tế bào khả nạp được biến nạp pHT10-gfp+ bằng thẩm điện của máy điện biến nạp Micro Pulser Bio-Rad. Trộn 100 µL tế bào khả nạp với 1 µL plasmid 100 ng/µL, chuyển tế bào vào cuvette điện biến nạp 0,2 cm và giữ trong đá lạnh 5 phút. Sau đó tế bào được thẩm điện 25 µF, 200 Ω, 2,5 kV/cm khoảng 5 – 7 ms. Phục hồi tế bào trong 1 mL môi trường phục hồi LB bổ sung 0,5 M sorbitol, 0,38 M manitol, 10 % glycerol vào tế bào vừa được thẩm điện [5]. Tiếp theo dịch tế bào được lắc ở 37 °C, tốc độ lắc 250 vòng /phút trong 2 giờ. Toàn bộ tế bào được trải trên đĩa LB – Agar có bổ sung chloramphenicol, ủ đĩa ở 37 °C qua đêm. Những khuẩn lạc mọc được trên đĩa có kháng sinh chứng tỏ có mang plasmid. Đếm số khuẩn lạc mọc trên đĩa để tính hiệu suất biến nạp.

### **Khảo sát những yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất điện biến nạp**

Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất biến nạp được khảo sát như sau:

Khảo sát ảnh hưởng của thời điểm thu mẫu: những giai đoạn tăng trưởng khác nhau của tế bào từ pha log đến pha cân bằng được thu nhận và tạo tế bào khả nạp với quy trình như trên.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ lysozyme: thu tế bào ở giai đoạn tăng trưởng thích hợp cho hiệu suất biến nạp cao đã khảo sát được sau đó xử lý lysozyme bằng cách bổ sung lysozyme vào dịch tế bào sao cho nồng độ cuối là 0,5; 1; 2; 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lắc ở 37 °C trong 10 phút. Tiếp tục làm theo quy trình tạo tế bào khả nạp như trên.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian ủ với lysozyme: chọn nồng độ lysozyme tối ưu khảo sát các khoảng thời gian ủ là 5, 10, 15 và 20 phút.

Khảo sát ảnh hưởng của hiệu điện thế: tế bào khả nạp được biến nạp với dãy hiệu điện thế từ 1,9; 2,1; 2,3; 2,5 kV/cm.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ plasmid: tạo tế bào khả nạp với quy trình đã chọn được thời

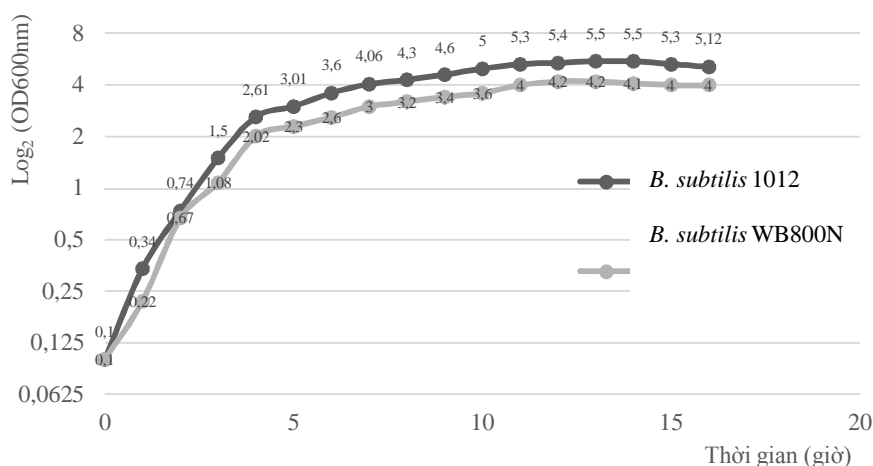
điểm thu mẫu và nồng độ lysozyme thích hợp nhất. Điện biến nạp với các nồng độ khác nhau của plasmid pHT10-*gfp*<sup>+</sup>: 0,05; 0,1; 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Khảo sát hiệu suất biến nạp với nhiều loại plasmid: những plasmid khác nhau được dùng biến nạp vào hai chủng *B. subtilis* 1012 và WB800N để đánh giá hiệu suất biến nạp tương ứng với từng loại plasmid khác nhau.

### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **Đường cong tăng trưởng**

Dựa vào đường cong tăng trưởng của *B. subtilis* 1012 và WB800N (Hình 1) nhận thấy trong khoảng 1 giờ đầu tế bào đang tăng trưởng ở pha tiềm tàng, từ 1 – 4 giờ tiếp theo tế bào vào pha log, từ 5 – 16 giờ tế bào vào pha ổn định và sau 16 giờ tế bào vào pha suy tàn. Đường cong tăng trưởng là cơ sở để xác định thời điểm thu mẫu thích hợp cho tính khả nạp của tế bào. Mỗi chủng vi khuẩn trong quá trình tăng trưởng sẽ có giai đoạn tế bào có khả năng khả nạp tốt nhất, giai đoạn này tùy thuộc vào đặc tính tăng trưởng của từng chủng.

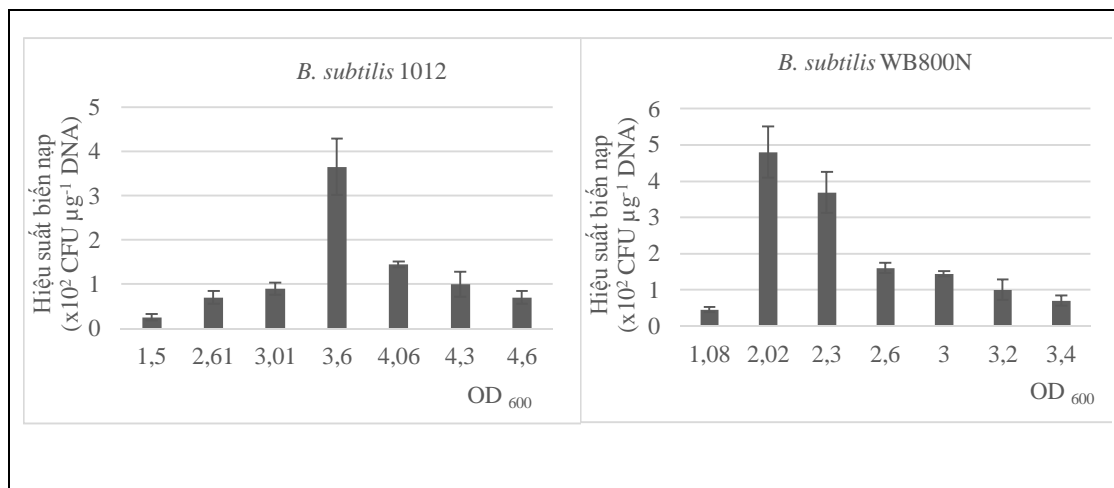


**Hình 1.** Đường cong tăng trưởng của *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N trong môi trường LB – 0,5 M sorbitol.

### Ảnh hưởng của thời điểm thu mẫu

Mẫu được thu khi sự tăng trưởng của tế bào vào pha log cho đến pha ổn định vì ở giai đoạn này tế bào có sức sống tốt thích hợp làm tế bào khả nạp cho điện biến nạp. Tiếp theo tiến hành các bước tạo tế bào khả nạp ở các thời điểm thu mẫu nêu trên. Giá trị OD<sub>600</sub> tương ứng với hiệu suất biến nạp của chủng *B. subtilis* 1012 và của chủng *B. subtilis* WB800N ở Hình 2. Hiệu suất biến nạp

tính bằng số khuẩn lạc trên  $\mu\text{g}$  DNA plasmid. Kết quả Hình 2 cho thấy ở các thời điểm của pha log tế bào đã bắt đầu khả nạp nhưng hiệu suất biến nạp rất thấp, hiệu suất bắt đầu tăng cao khi tế bào tăng trưởng vào pha ổn định và tối ưu nhất tại thời điểm đầu pha ổn định sau đó hiệu suất biến nạp giảm dần.



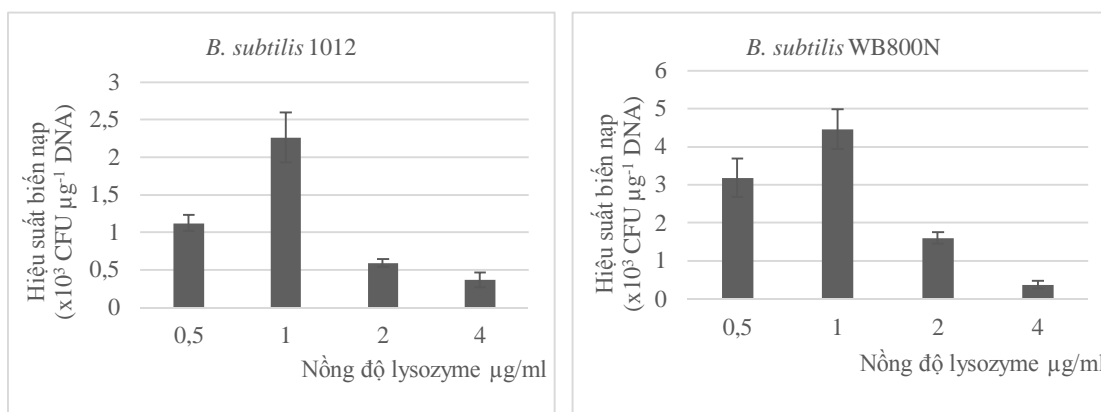
**Hình 2.** Hiệu suất biến nạp tại các thời điểm thu mẫu từ đầu pha log đến đầu pha ổn định của chủng *B. subtilis* 1012 và WB800N

Như vậy xác định được thời điểm thu mẫu thích hợp cho hai chủng *B. subtilis* 1012 và WB800N là vào khoảng cuối pha log và đầu pha ổn định. Vì hầu như vi khuẩn *Bacillus* nói chung đều có tính khả nạp cao ở giai đoạn tăng trưởng cuối pha log, khi đi vào pha ổn định bắt đầu giai đoạn tạo bào tử nên tính khả nạp sẽ giảm đi.

**Ảnh hưởng của lysozyme**

Trong thí nghiệm ảnh hưởng của lysozyme, chúng tôi thu dịch nuôi cấy tế bào ở giai đoạn tăng trưởng thích hợp cho hai chủng *B. subtilis* 1012 và WB800N là khoảng cuối pha log. Tiếp theo, tiến hành tạo tế bào khả nạp với quy trình như trên và xử lý với lysozyme ở 4 nồng độ khác nhau từ 0,5; 1; 2; 4 µg/mL.

Hiệu suất biến nạp ở cả hai chủng tăng dần theo nồng độ lysozyme từ 0,5 – 1 µg/mL và bắt đầu giảm hiệu suất ở nồng độ 2 µg/mL (Hình 3). Ở nồng độ 4 µg/mL hiệu suất biến nạp rất thấp, điều này cho thấy nồng độ lysozyme cao đã ly giải tế bào. Trong khoảng nồng độ từ 0,5 – 1 µg/mL lysozyme chỉ làm mỏng lớp vách tế bào tạo điều kiện thuận lợi cho DNA đi vào tế bào khi kích thích thẩm điện. Kết quả khảo sát cho thấy nồng độ lysozyme tối ưu để xử lý tế bào trong bước làm tế bào khả nạp là 1 µg/mL ở 37 °C trong 10 phút. Khoảng nồng độ lysozyme có thể xử lý để tạo tế bào khả nạp là từ 0,5 – 1 µg/mL.

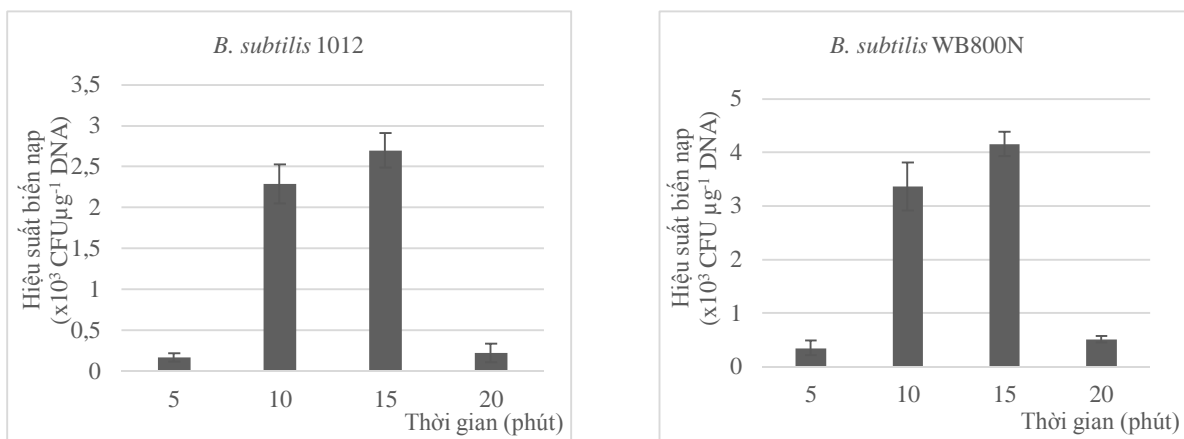


**Hình 3.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ lysozyme lên hiệu suất biến nạp.

**Ảnh hưởng thời gian ủ với lysozyme**

Sau khi chọn được nồng độ tối ưu cho xử lý tế bào chúng tôi tiếp tục khảo sát thời gian xử lý tế bào với lysozyme nồng độ 1 µg/mL. Thời gian khảo sát là 5, 10, 15, 20 phút. Kết quả thể hiện

trên Hình 4 cho thấy trong khoảng thời gian ủ từ 10 – 15 phút hiệu suất biến nạp cao. Ủ trong khoảng 5 phút là quá ngắn và 20 phút là quá dài cho quá trình hoạt động của lysozyme để xử lý vách tế bào do đó hiệu suất biến nạp rất thấp.



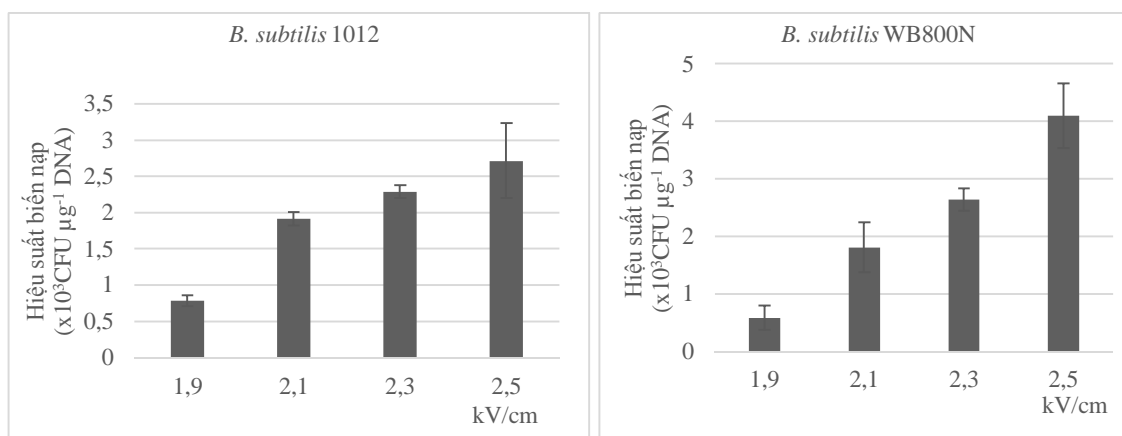
**Hình 4.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian ủ với lysozyme lên hiệu suất biến nạp

Với kết quả trên chúng tôi chọn được khoảng thời gian thích hợp cho xử lý tế bào với nồng độ lysozyme là 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  là 15 phút.

#### Ảnh hưởng của hiệu điện thế

Hiệu suất biến nạp thay đổi theo hiệu điện thế. Hiệu suất của cả hai chủng tăng dần theo dãy

hiệu điện thế từ 1,9 – 2,5 kV/cm (Hình 5). Giá trị hiệu điện thế 2,5 kV/cm cho hiệu suất biến nạp cao nhất ở cả hai chủng. Thâm điện tạo các lỗ tạm thời trên màng giúp DNA plasmid đi vào trong tế bào, thâm điện với hiệu điện thế cao giúp DNA vào tế bào dễ dàng hơn.

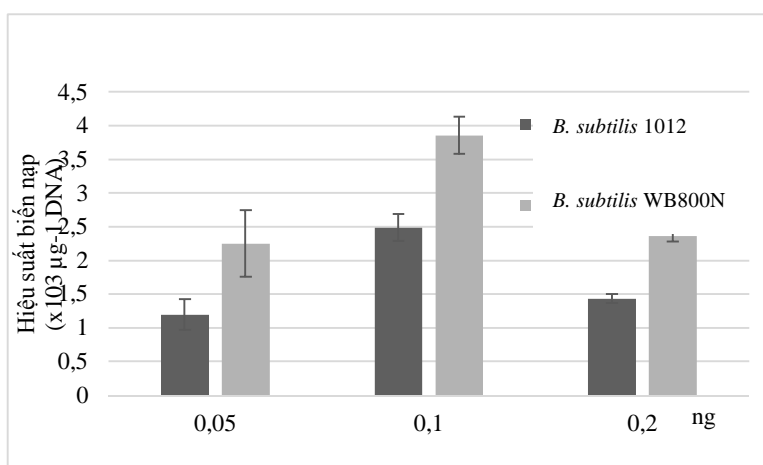


**Hình 5.** Hiệu suất biến nạp của *B. subtilis* 1012 và WB800N tương ứng với dãy hiệu điện thế từ 1,9 – 2,5 kV/cm.

#### Ảnh hưởng của nồng độ plasmid

Để xác định sự ảnh hưởng của nồng độ plasmid lên tần suất biến nạp, các nồng độ plasmid với các nồng độ 0,05; 0,1; 0,2  $\mu\text{g}$  được biến nạp vào tế bào khả nạp và hiệu suất tương ứng với nồng độ plasmid như trên được thể hiện trên Hình 6. Hiệu suất biến nạp tính theo số khuẩn lạc/ $\mu\text{g}$  plasmid. Hiệu suất biến nạp khá cao khi nồng độ sử dụng biến nạp rất thấp. Cụ thể là với nồng độ plasmid là 0,05  $\mu\text{g}$  hiệu suất đạt  $1,2 \times 10^3$  đối với *B. subtilis* 1012 và  $2,25 \times 10^3$  đối với *B. subtilis* WB800N. Song song với điện biến nạp, chúng tôi cũng thực hiện việc biến nạp theo

phương pháp tự nhiên sử dụng phương pháp đã được mô tả [12] cùng với plasmid pHT01-*gfp*+. Kết quả cho thấy, phương pháp điện biến nạp cho kết quả hiệu suất biến nạp cao hơn phương pháp thông thường vì phương pháp thông thường cần lượng plasmid khoảng 10  $\mu\text{g}$  để biến nạp vào *B. subtilis* nên tần suất biến nạp thấp chỉ khoảng 3 – 5 khuẩn lạc/ $\mu\text{g}$  DNA. Kết quả này rất khả quan cho việc ứng dụng quy trình tạo đồng plasmid trực tiếp vào trong *B. subtilis* mà không thông qua bước đồng hóa trung gian trên *E. coli*.



**Hình 6.** Hiệu suất biến nạp theo nồng độ plasmid của hai chủng *B. subtilis* 1012 và WB800N.

### Hoàn thiện qui trình tạo tế bào khả nạp và điện biến nạp

Dựa vào các kết quả khảo sát ở trên, chúng tôi hoàn thiện qui trình điện biến nạp cho hai chủng *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N như sau: tế bào được tăng trưởng trong môi trường LB có 0,5 M sorbitol, thời điểm thu mẫu tạo tế bào khả nạp khoảng cuối pha log, đầu pha ổn định. Dịch nuôi cấy tế bào được xử lý lysozyme với nồng độ cuối 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bằng cách lắc 250 vòng/phút ở 37 °C trong 15 phút, rửa tế bào với đệm EB chứa 0,5 M sorbitol; 0,5 M manitol, 10 % glycerol, lặp lại

bước rửa 3 lần. Giữ tế bào trong đệm EB trên ở -80 °C. Plasmid dùng cho biến nạp là 0,1  $\mu\text{g}$  plasmid/100  $\mu\text{L}$  tế bào khả nạp thẩm điện ở 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ , 2,5 kV/cm trong 5 giây, phục hồi tế bào bằng 1 mL môi trường LB có bổ sung 0,5 M sorbitol, 0,38 M manitol, lắc 250 vòng/ phút trong 2 giờ ở 37 °C, trải tế bào lên đĩa LB –Agar có kháng sinh thích hợp, ủ 37 °C qua đêm.

Để kiểm chứng qui trình được thiết lập ở trên, chúng tôi đã tiến hành biến nạp các plasmid khác nhau và 2 loại tế bào khả nạp được chuẩn bị theo qui trình trên, kết quả cho thấy tất cả các

plasmid đều được biến nạp vào các chủng chủ *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N. Kết quả này đã khẳng định tính ổn định của qui trình được thiết lập cho cả hai chủng này.

Tuy hiệu suất biến nạp trong nghiên cứu này còn chưa cao ( $10^3$  CFU/ $\mu$ g DNA) như những nghiên cứu trên các chủng *B. subtilis* khác đã được công bố ( $10^5$  CFU/ $\mu$ g DNA) [5], nhưng qui trình được thiết lập này sẽ làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trên *B. subtilis* 1012, *B. subtilis* WB800N và các chủng *B. subtilis* khác.

## KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết lập được qui trình điện biến nạp khá ổn định cho *B. subtilis* 1012 và *B. subtilis* WB800N. Nồng độ plasmid sử dụng 0,1  $\mu$ g, hiệu suất biến nạp ( $10^3$  CFU/ $\mu$ g DNA). Kết quả này làm cơ sở cho quy trình dòng hoa bằng cách biến nạp trực tiếp các sản phẩm nổi vào trong *B. subtilis* mà không cần qua bước tạo dòng qua trung gian *E. coli*.

# Establishment of electroporation protocol for *Bacillus subtilis* 1012 and WB800N

- Phạm Thi My Tien
- Phan Thi Phuong Trang

University of Science, VNU-HCM

## ABSTRACT

*Bacillus subtilis* has been developed as an attractive expression host because of many advantages. For examples, it is non-pathogenic and allows secretion of functional extracellular proteins directly into the culture medium; about 60 % of industrial enzymes available produced by *Bacillus* species. To use *B. subtilis* strain for research and as host strain for expression of recombinant protein, bacterial genetic methods should be developed. Electroporation to transfer directly DNA into *B. subtilis* is one of the methods that draw a lot of attention of scientists. A problem encountered in the

methods that draw a lot of attention of scientists. A problem encountered in the electroporation of DNA into *B. subtilis* is that an established protocol for one strain can hardly be used for another strain. *B. subtilis* 1012 and WB800N have recently been used as expression hosts for expression of recombinant proteins, but electroporation method has not been established. In this study, we use a pHT plasmid to establish an electroporation protocol for *B. subtilis* 1012 and WB800N. The influence of sampling time, concentration and time for incubating with lysozyme, voltage on the transformation was investigated to establish the protocol.

**Keywords:** plasmid pHT, electroporation, *Bacillus subtilis*, 1012, WB800N.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. T. Ano, A. Kobayashi, M. Shoda, Transformation of *Bacillus subtilis* with the treatment by alkali cations. *Biotechnology Letters*, 12, 2, 99–104 (1990).
- [2]. A. Brans, P. Filée, A. Chevigné, A. Claessens, B. Joris, New integrative method to generate *Bacillus subtilis* recombinant strains free of selection markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 12, 7241–7250 (2004).
- [3]. S. Chang, S.N. Cohen, High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Molecular & General Genetics: MGG*, 168, 1, 111–115 (1979).
- [4]. R.C. Kuhad, R. Gupta, A. Singh, Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research.*, 1–10 (2011).
- [5]. Y.P. Lu, C. Zhang, F.X. Lv, X.M. Bie, Z.X. Lu, Study on the electro-transformation conditions of improving transformation efficiency for *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 55, 1, 9–14 (2012).
- [6]. Nguyen, H.D., Phan, T.T.P, Schumann, W., Analysis and application of *Bacillus subtilis* sortases to anchor recombinant proteins on the cell wall. *AMB Express*, 1, 1, 22 (2011).
- [7]. Nguyen, H.D, Phan, T.T.P. and Schumann, W., Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, 55, 2, 89–93 (2007).
- [8]. H. Saito, T. Shibata, T. Ando, Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg. *Molecular & General Genetics: MGG*170, 2, 117–122 (1979).
- [9]. M. Schallmeyer, A. Singh, O.P. Ward, Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 1, 1–17 (2004).
- [10]. J. Spizizen, Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44, 10, 1072–1078 (1958).
- [11]. A.L. Zhang, H. Liu, M.M. Yang, Y. Gong, S. Chen, H. Assay and characterization of a strong promoter element from *B. subtilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 1, 90–95 (2007).
- [12]. [http://www.mobitec.com/cms/products/bio/04\\_vector\\_sys/bacillus\\_subtilis\\_expression.html?pdf=Bacillus\\_subtilis\\_Expression\\_Vectors-Handbook](http://www.mobitec.com/cms/products/bio/04_vector_sys/bacillus_subtilis_expression.html?pdf=Bacillus_subtilis_Expression_Vectors-Handbook).