

Bacillus Amyloliquefaciens의 Chromosomal DNA에 의한 E-Coli C-600의 형질조작

강 순 선

Transformation of Escherichia coli C-600 by Bacillus amyloliquefaciens Chromosomal DNA

Kang Soon-seon

Summary

1. The chromosomal DNA of *B. amyloliquefaciens* KA-63 excreting amylases, was isolated and purified by the Miura method.
2. The AP^{ase}-treated plasmid was prepared by treating with AP^{ase} the digested plasmid which was isolated and purified from *E. coli* C600 rk⁻ mk⁻ by the treatment of the restrict enzymes, Bam H1 and Hind III.
3. A hybrid plasmid was made by cloning a chromosomal DNA fragment with plasmid pBR322.
4. *E. coli* C-600 was transformed using as a recipient cell, and gene banked AP^r transformant and AP^r. TC^s transformant were screened out.
5. The electrophoresis result of the hybrid plasmid extracted from the transformants showed that one third of the total gave the higher bands than these from pBR322.
 - o AP^r. TC^s transformants cloned on the Bam H1 of pBR322 were 191, showing a low frequency.
 - o AP^r. TC^s transformants cloned on the Hind III of pBR322 were 2081, showing a high frequency.
 - o AP^r. TC^s transformants cloned on the Bam H1 of pJK523 were only 13, showing a rather low frequency.
 - o No transformant having the amylase activity was detected by the amylase test.

서 언

미생물이 외래의 DNA를 받아들이는 현상은 transduction, transfection, transformation, conjunctive transfer 등으로 분류할 수 있는데 최근에는 recombinant DNA를 이용하여 유전자 발현기구의 해석, 생리활성물질 및 유용 peptide 생산에 주로 transformation system이 시도 되고 있다.

Blobe¹⁾에 의하면 세포내에서 합성되는 분비단백질은 N말단에 20-30개의 Signal sequence라 하는 Hydrophobic한 Amino acids 잔기가 있어 그 부분이 Leader sequence가 되어 세포막을 통과하면서 Signal sequence는 소멸된다는 Signal 가설은 원시핵세포에서는 증명되어지지 않고 있다. 균체의 효소의 합성기구와 어떤 경위를 따라 배치 중에 분비되는가를 연구하기 위해선 α -amylase를 clone 시킨 DNA를 분리하여 그 염기배열을 해석하지 않으면 안된다.

* 이논문은 1983년도 문교부학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

최근 발전하여온 유전공학적 수법은 1970년 Mandel 등²⁾이 *Escherichia coli*가 인위적으로 형질전환 된다는 것을 발견한 이래 Taketo³⁾⁴⁾⁵⁾가 Bacteriophage transfection, Cosloy 등⁶⁾은 Auxotrophic 균주를 Prototrophic 균주로 유전적 형질전환 시키는 Genetic transformation에 대한 보고가 있다.

한편 1972년 Berg⁷⁾는 λ dgol⁺ Plasmid와 SV40 gene의 transformation, 1973년 Cohen¹²⁾가 항생제(kanamycin) 내성 유전자를 Marker로 이용, Plasmid PSC 101에 R6-5 DNA의 clone 화로 E-coli cell의 형질전환에 성공했다. 이후 Plasmid transformation에 관한 많은 연구⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾가 진행중에 있으며, 새로운 숙주개발과 효율을 높이는 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 *Bacillus amyloliquefaciens* KA-63균주에서 chromosomal DNA를 추출 정제하여, 제한 효소 처리로 얻은 DNA fragment와 E-coli C-600에서 Plasmid pBR322를 순수분리하여 특정한 제한 효소로 처리한 digested plasmid에서 작성한 Hybrid plasmid를 transformation 할 목적으로 E-coli C-600 균주 중에 증폭시킴으로서 chromosomal DNA를 pBR322 Vector에 clone 화로 gene bank 작성을 검토하므로써 유전자 조작 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens* KA-63와 *Escherichia coli* C-600(Table,1)이며, 기본생육배지는 Luria broth (이하 LB 배지 Table,2)를 사용하였다.

2. 사용 plasmid

본 연구에 사용된 Plasmid는 pBR322, pJK523 (pBR322와 pC221과의 hybrid plasmid) 2종이다.

3. DNA의 agarose 전기영동

Table, 3과 같은 구성의 gel를 100℃에서 녹여 Toyo 전기영동장치 SPG-1400의 plate에 넣어 실온에서 2시간 정치후 gel를 조제했다. 시료(Table,4)를 50 μ l charge하여 28V 정전압 16시간, 때로는

Table 1. *Escherichia Coli* strains used.

Strains	Chromosomal marker*	Plasmid marker*
E-Coli C 600	rk ⁻ ,mk ⁻ ,thr-1, leu-6	Am ^r ,Tc ^s
	thi-1, sup ^{E44} ,lacY1, tonA21	

* Abbreviation of antibiotics
Am: Ampicillin
Tc: Tetracycline

Table 2. Composition of culture medium.

L - Broth	
Bacto trypton(Difco)	10 g
yeast Extract(")	5 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
L - Trp	50 mg
L - Cys HCl	72.6 mg
Deionized water	1 l

100V 4시간 영동하였으며 전기영동 완충액은 0.02M acetate 완충액을 사용하였다.

4. Chromosomal DNA 조제

Amyloliquefaciens KA-63균주에서 Saito-Miura 등¹²⁾의 방법에 따랐다.

5. Plasmid pBR322 분리 및 정제

E-coli C-600의 plasmid pBR322를 분리 하기

Table 3. Composition of agarose gel.

Tris - CH ₃ COOH (PH8.0)	40 mM
EDTA	2 "
CH ₃ COONa	20 "
Agarose (Bio-rad)	1 %

Table 4. Composition of sample.

Sucrose	50 %
Na ₂ EDTA	50 mM 30 μ l
BPB	0.5 %
Ethidium bromide (1.43 mg/ml)	20 μ l
DNA Sample	50 μ l

위해서 3 l의 Sakagugi flask에 1 l의 LB 배지를 넣고 전 배양액 2%를 접종하여 약 65 시간 배양 O.D 660에서 1.0일때 chloramphenical(170 μ g/ml)를 가하여 계속 16 시간 배양하여 집균하였다. 균체를 생리 식염수(0.15M NaCl)로 3회 세척한 다음 0.15M NaCl, 0.1 M EDTA Buffer(pH 8.0)에 Lysozme (1mg/ml)을 현탁시킨 것을 가하여, 0℃에서 30 분간 용균시켰다. SDS를 1% 용량이 되게 가하여 40,000 \times g에서 30 분간 원심분리하여, CSC1 밀도구배 원심 분리¹⁸⁾에 따라 그 상등액(cleared lysate) 4.76 ml에 CSC1 5g, Ethidium bromide(4.67mg/ml)을 0.5 ml 가하여 18℃에서 36,000 \times g, 40 시간 원심분리로서 plasmid fraction을 추출하였다.

Plasmid를 정제하기 위해서 iso-amylalcohol 1/3 용량을 가하고 아주 약한 교반으로 Ethidium bromide를 추출 제거한 다음 남은 수분층은 0.1 SSC로 10 시간 투석으로 완전히 정제하였다.

6. Hybrid plasmid 작성

1) Chromosomal DNA fragment 조제

B. amylolyquefaciens 균주에서 추출한 chromosomal DNA를 제한효소 BglII(Takara 1 unit / μ g

DNA)를 가하여 35℃에서 2.5 시간 incubation하여 65℃에서 30분 incubation으로 효소를 실행시켰다.

2) Digested plasmid 조제

E-coli C-600 균주에서 분리한 plasmid pBR322에 Bam HI Buffer 1/4량과 제한효소 BamHI(1 unit / μ g DNA)을 가하여 37℃에서 2.5 시간 incubation 하였으며 65℃에서 30분간 incubation으로 효소 실행시켰다. 이 digested plasmid에 Alkaline phosphatase (이하 APase; Sigma No 19C. 00451, 0.1 unit / μ g DNA)를 가하여 25mM Tris Buffer(pH 8.0)에서 2 시간 투석한 다음 65℃에서 30분 incubation 했다. 25 mM Tris Buffer(pH 8.0)에 포화시킨 phenol을 가하여 2,000 \times g로 원심분리하여 추출하고 3회 반복했다.

상층의 수분층은 4량의 ethanol을 가하여 -20℃로 40분간 급냉시켜 10,000 \times g로 원심분리로 얻어진 침전물에 재차 ethanol을 가하여 원심분리하여 회수된 침전물을 0.1 \times SSC로 용해시킨 것을 APase treated plasmid로 하였다.

3) Ligated plasmid 작성

APase treated plasmid와 chromosomal DNA fragment를 Hybriding 용액에 (Tris Buffer pH 7.5 50mM, MgCl₂ 10mM, ATP 1mM, DTT 10mM) 혼합하여 조성하고, T₄ DNA Ligase(Takara No 101, 0.05 unit / μ g DNA)를 가한 다음, 4℃에서 40시간 정치하므로써 ligation 시켰다. 65℃에서 10분 처리로 효소를 실행시켰다.

7. Transformation

Transformation는 Nogard의 방법⁴⁾에 따랐다. recipient cell로는 E-coli C-600 rk⁻mk⁻ 균주를 이용하였다.

30℃에서 16시간 전배양한 균액 1%를 접종하여, O.D 660치가 0.3될때까지 약 1.5 시간 배양한 균체를 4℃로 급냉후 원심분리(10,000 \times g, 10min)하

여 집균하였으며, 0.1M MgCl₂ 세척용액에 현탁시켜 원심분리하여 얻은 세척균체를, 0.1M CaCl₂에 현탁시킨 것을 0℃, 1시간 정치한 후 원심분리로 얻은 CaCl₂ 처리균체를 0.1M CaCl₂ 함유한 15% glycerol 용액에 재현탁시킨 것을 recipient cells로 하였다. 이 E-coli C-600 rk⁻mk⁻ 현탁액에 ligated plasmid 1/15 량을 첨가 1℃ 1시간 정치한 후 42℃에서 3분간 heat shock 한 것을 배양하므로써 transformation 시켰다. 배양방법은 LB배지를 9량 첨가하여 37℃에서 2시간 진탕배양으로 형질발현 (phenotypic lag) 시킨 다음 Ampicillin(이하 AP, Meiji Seika, 50 μg/ml)을 첨가한 LB plate(1.2% Agar)에 도말하여 34℃에서 13시간 배양했다. AP resistant(이하 AP^r) transformant의 colony를 screening 하여 AP 첨가된 LB plate와 AP 및 Tetracycline(이하 TC, Sigma, 30 μg/ml)을 함유한 LB plate 각각에 replica 시켜 34℃에서 13시간 배양하므로써 AP^r TC Sensitive(이하 TC^s) transformant의 colony를 screening 하였다.

B. amyloliquefaciens chromosomal DNA의 cloning에 의한 AP^r transformant 조작순서는 Fig.1과 같다. 형질전환 빈도는 1 μg DNA에 대한 형질전환 colony 수로 하였다.

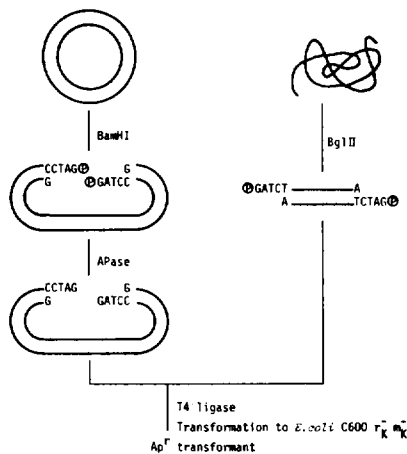


Fig 1. Procedure of cloning of *B. amyloliquefaciens* DNA.

결과 및 고찰

1. Transformation 빈도

조제한 plasmid pBR322 및 pJK523 각각에 *B. amyloliquefaciens*의 Chromosomal DNA를 조합시킨 hybrid plasmid의 transformation 빈도는 Table.5와 같다.

Table 5. Frequency of transformation of hybrid plasmid.

Plasmid	Restriction enzyme	Transformants per μg DNA
pBR322/chromosome	Bam HI/Bgl II	300
pBR322	None	2 × 10 ⁶
pBR322/chromosome	Hind III	1 × 10 ⁷
pJK523/chromosome	Bam HI/Bgl II	14
pJK523	None	2 × 10 ⁴

제한효소로 처리하지 않은 pBR322를 transformation 시키면 2 × 10⁶ 개/μg DNA의 AP^r transformant가 출현되지만, pBR322의 BamHI 절단부위에 Bgl II로 처리한 chromosomal DNA 단편이 cloning된 AP^r transformant 300개/μg DNA의 출현은 저빈도(1.5 × 10⁻⁴)였다. 마찬가지로 Shuttle Vector인 pJK523을 transformation 시는 2 × 10⁴개/μg DNA의 transformant가 출현되나, pJK523의 BamHI 절단부위에 Bgl II로 처리된 chromosomal DNA 단편이 cloning된 것은 14개/μg DNA가 출현되는 저빈도(0.7 × 10⁻³)였다.

pBR322에서는, Hind III 절단부위에 Hind III로 처리된 chromosomal DNA 단편이 cloning된 transformant가 1 × 10⁷개/μg DNA 고빈도로 출현하였다.

pJK523 및 pBR322에 cloning된 hybrid plasmid

를 E-coli C-600에 transformation하여 Screening된 AP^rTC^s transformants를 분리 배양하여 간편법¹⁵⁾에 따라 cleared lysates를 제조하여 agarose 전기영동을 행한 결과 transformant 내에 pJK523 plasmid DNA가 존재함을 확인할 수 있었으며, Hind III, EcoRI, BamHI을 각각 처리한 pJK523 plasmid DNA를 reference DNA인 λ-Hind III와 함께 전기영동을 하여 DNA band를 비교하였다.(Fig. 2)

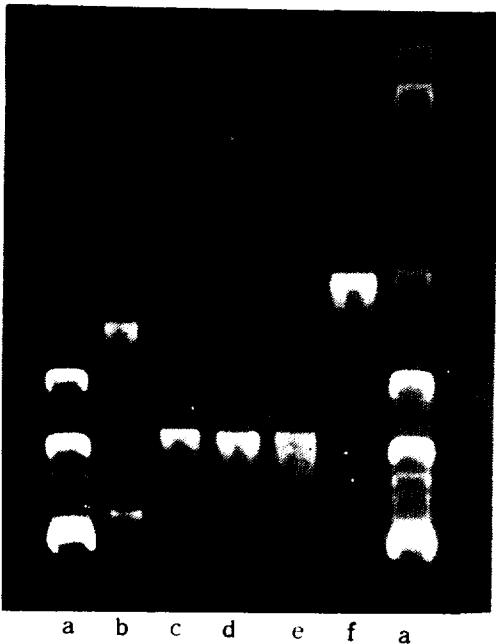


Fig.2. Agarose gel electrophoresis of pJK523 plasmid DNA digested with restriction Enzyme (EcoRI, Hind III, BamHI.)

- lane a; DNA(digested with Hind III)
- lane b; standand pJK523
- lane c; transformant (digested BamHI-10A)
- lane d; transformant (digested BamHI)
- lane e; transformant (digested Hind III)
- lane f; transformant (digested EcoRI)

2. Transformant Number

E-coli C-600에 transformation한 transformant의 AP^r 및 TC^s 출현빈도를, AP^r transformant의 수와 AP^rTC^s transformant 출현빈도를 비교하였다. (Table,6).

Table 6. Number of transformants.

Plasmid	Restriction enzyme	Transformants Ap ^r TC ^s /Ap ^r
pBR322/chromosome	Bam HI/Bgl II	191/736
"	Hind III	2081/2375
pJK523/chromosome	Bam HI/Bgl II	13/50

pBR322의 BamHI 부위에 Bgl II로 처리된 chromosomal DNA 단편이 cloning된 AP^rtransformant 736개 중 TC^s transformant는 191개 출현하였다.

pJK523에서는 BamHI 부위에 Bgl II로 처리 chromosomal DNA 단편이 cloning된 AP^rtransformant 출현빈도는 50개이며, TC^stransformant는 13개 밖에 screening할 수 없었다.

pBR322에서는 Hind III 부위에 Hind III 처리 chromosomal DNA 단편을 cloning한 것은 AP^rtransformant 2375개가 출현하였으며 TC^s transformant는 2081개로 대부분 출현하였다. 1μg DNA에 대한 transformant의 출현빈도와 AP^r transformant에 대한 AP^rTC^s transformant 출현수의 결과에서, pBR322를 Hind III로 절단한 부위에 Hind III 처리 DNA 단편이 cloning 빈도는 증가함은 물론 transformant 출현수도 증가하였다.

Bgl II 처리 DNA 단편의 cloning 빈도(transformants/viable cell)는 1981년 Bergman 등¹⁶⁾은 calcium 이온의 존재하에서 heat shock 처리에 의해 DNA가 DNase에 저항성을 갖게 되었다고 보고한 것으로 보아 형질전환빈도는 증가하는 것으로 생각되었으나 transformant 수 자체는 감소하였다.

3. Transformant의 plasmid 전기영동

AP^rTC^s transformant에서 추출한 DNA를 정제하여 전기영동한 결과는 Fig.3과 같다.



Fig.3. Agarose gel electrophoresis of pBR322 plasmid DNA digested with BamHI.

Lane a,b: Standard pBR322
Lane c-M : transformant

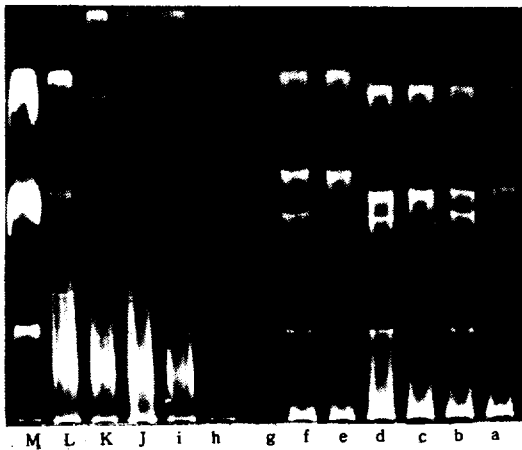


Fig.4. Agarose gel electrophoresis of pBR322 or pJK523 plasmid DNA digested with Hind III or BamHI.

Lane h-L: transformant (pBR322, digested Hind III / Hind III fragment)
Lane a, c, e: transformant (pJK523, digested BamHI / Bgl II fragment)
Lane g: Standard pJK523
Lane M: Standard pBR322
Lane b, d, f: transformant (a x pJK523, c x pJK523, e x pJK523)

Lane a,b는 Plasmid pBR322이고, lane c~m에서 pBR322의 band 보다 크다고 확인된 것은 transformant 11주중 3주 (lane e,g,h) 뿐이다. 나머지는 pBR322와 같은 정도이다. 그 이유로는 pBR322를 제한효소 BamHI으로 digestion 처리 및 Apase 처리시에 말단의 cohesive end가 손상을 받아 ligation 하거나, 아주 적은 chromosomal DNA가 cloning 되어 ligation 되므로서 gene 발현이 안된 것으로 해석되지만 확인할 수가 없었다.

Fig. 4에서는 Plasmid pBR322의 Hind III 부위에 동일제한효소인 Hind III로 처리된 chromosomal DNA fragment를 cloning 시킨 plasmid를 AP^r TC^r transformant에서 추출 정제한 DNA를 전기영동한 pattern이 lane h-L이다. Lane m는 plasmid pBR322이다. Band 크기가 pBR322 (lane m)보다 적고 전기영동 pattern이 전연 변하지 않은 것은 Hind III 처리로선 plasmid가 절단되지 않은 것을 알 수 있다. Plasmid pJK523 경우는 BamHI 부위에 Bgl II 처리 chromosomal DNA 단편을 cloning 한 plasmid를 함유한 AP^r TC^r transformant (lane a, c, e)에서 추출한 plasmid를 전기영동한 것이다. Lane g는 Plasmid pJK523이다. Lane b, d, f는 a, c, e의 각각의 transformant plasmid와 plasmid pJK523을 혼합하여 전기영동한 pattern으로 각각의 band를 확인할 수가 있었다. Lane L만의 band의 크기가 h~k보다 크지만 기준의 pBR322보다 band가 적은 것은, Hind III 부위가 deletion 되어 소멸된 것으로 해석된다.

pJK523의 BamHI 부위에 Bgl II 처리 chromosomal DNA 단편을 cloning 시킨 plasmid를 transformation 하면 AP^r transformant 출현이 저빈도였다. 이는 ligation이 잘 이루어지지 않은 것으로 해석되어 금후 ligation 적정조건을 검토할 과제이다.

4. Amylase test

Clone 된 유전자의 성질발현을 조사하기 위해서 AP^r TC^r transformant의 amylase 활성을 측정하였다.

B. amyloliquefaciens KA-63 균주를 배양하여 그 상등액을 희석하여 amylase test suspension을 가한후 37℃에서 24시간 반응시켜 O.D 620에서 측정하였다.(Table, 7)

Assay of α-amylase activity

Cells	
freeze and thawing	
lysozyme-Triton X-100 treatment	
"Amylase test" suspension	
incubated 37℃ for 3 days	
Bcillus sup. dilution ratio	O.D ₆₂₀ (24hr)
7 × 10 ⁶	0.006
7 × 10 ⁵	0.006
7 × 10 ⁴	0.224
7 × 10 ³	2.66
7 × 10 ²	10.6

Table 7. Detection of α-amylase activity of B. amyloliquefaciens by using Amylase test.

이 방법으로 B. amyloliquefaciens KA-63 균주의 amylase 생산정도를 검출할 수 있었다. Screening된 AP^rTC^s transformant의 amylase 활성을 측정할 결과 활성을 검출할 수가 없었다.

Maniatis 등²⁰⁾은 clone된 유전자의 발현을 강력하게 조절하는 것은 clone된 유전자 생성물에 의한 숙주세포대사에 간섭이나, 해독효과가 절대적이라고 보고하고 있다.

Goldberg 등²⁰⁻²³⁾은 숙주세포는 최적이지 아닌 환경 곧 물리적이거나 영양조건이 좋지 않을때 많은 단백질 분해효소를 생산한다고 하였고, Itaka²¹⁾는 이러한 환경조건은 plasmid 불안정성, 생산효소의 불안정성을 가져온다고 하고 있어 clone된 gene 발현은 promoter의 조절에 의한 것으로 분자 수준에서의 해석이 요구된다.

적 요

1. Amylase를 분비하는 B. amyloliquefaciens KA-63 균주의 chromosomal DNA를 Saito-Miura 방법으로 순수분리 정제하였다.

2. E-coli C-600 rk⁻mk⁻ 균주에서 Plasmid pBR322를 추출 정제하고 제한효소 BamHI 및 Hind III로 처리한 digested plasmid를 얻고, APase를 처리하여 APase treated plasmid를 조제했다.

3. Chromosomal DNA 단편을 plasmid pBR322에 cloning시켜 Hybrid plasmid를 작성했다.

4. E-coli C-600 rk⁻mk⁻ 균주를 recipient cell로 하여 transformation시켰으며, gene bank된 AP^r transformant 및 AP^rTC^s transformant를 screening했다.

1) pBR322의 BamHI 부위에 cloning된 AP^rTC^s transformant 191개로 저빈도 출현되었으며,

2) pBR322의 Hind III 부위에 cloning된 AP^rTC^s transformant 2081개로 고빈도로 출현했다.

3) pJK523의 BamHI 부위에 cloning된 AP^rTC^s transformant는 13개로 극히 저빈도였다.

Amylase test에서는 amylase 활성을 가진 것은 검출할 수 없었다.

5. Transformant에서 추출된 Hybrid plasmid를 전기영동한 결과 처리 않된 pBR322보다 큰 band를 함유한 것은 1/3정도의 pattern으로 극히 낮았다.

사 사

본실험을 실시하는 동안 시종 격려와 지도를 하여주신 Dep. of Ferm. technology, Faculty of Eng., Osaka Univ., Dr. Okada Hiro Suke 교수께 충심으로 감사드립니다.

引用文献

- 1) Blobel, G., and Sabatini, D.D.; *Biomembranes*, 2, 193(1971)
- 2) Mandel, M., and A. Higa; *J. Mol. Biol.*, 53, 159-162(1970)
- 3) Taketo, T.; *J. Biochem.* 72, 973-979(1972)
- 4) Taketo, A.; *J. Biochem.* 75, 895-904(1974)
- 5) Taketo, A., and S. Kuno.; *J. Biochem.* 75, 59-67(1974)
- 6) Cosloy, S.D., and M. Oishi; *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 84-87(1973)
- 7) Jakckson, D.A., Symons, H.H., and Berg. p.; *proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 2904(1972)
- 8) Lederberg, E.M., and S.N.; *J. Bactiol.*, 119, 1072-1074(1974)
- 9) Keretschmer, D.J., A.C.Y Chang, and S.N. Cohen; *J. Bacteriol.*, 124, 225-231(1975)
- 10) Strike, P.G.O. Humpherys, and R.J. Roberts; *J. Bacteriol.*, 138, 1033-1035(1979)
- 11) Jones, I.M., S.B. Primrose, A. Robinson, and D.C. Ellwood; *J. Bacteriol.*, 146, 841-846(1981)
- 12) Miura, K.; *Methods in Enzymology*, ed. by Grossman, L., Moldare, K., Vol12, Parta, 543 Acad. Press. New York, (1967)
- 13) Yoneda, Y., Graham. S., and young, F.E; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 1556(1979)
- 14) Nogard, M.V., K. Keen, J.J. Monaban; *Gene*, 3, 279-292(1978)
- 15) Birnboim, H.C., and Doly, J.; *Nucleic Acids Research*. 7, 1513(1979)
- 16) Bergmans, H.E.N., I.M. Van Die, and W.P.M. Hoesktra; *J. Bacteriol.*, 146, 546-570(1981)
- 17) Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W. and Helling, R.B.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70, 3240(1973)
- 18) C.L. Davern; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 55, 792(1966)
- 19) Maniatis, T., E.F. Fritsch; and J. Sambrook. *Molecular cloning; Lab. Manual*, cold spring Harbor Laboratory, New York (1982)
- 20) Gokdbery, A.L. and A.C. st. John.; *Annu. Rev. Biochem.*, 45, 747-803(1976)
- 21) Itakara, K.T., Hirose, R. Crea, A.D. Riggs, L.L. Heyneker, F. Bolivar and H.W. Boyer.; *Science*. 198, 1056-1063(1977)
- 22) FASTER, T.H., and B.J. Brace. *Natl. Acad. Sci. USA*. 75, 5936-5940 (1978)
- 23) Goeddel, D.V., H.L. Heyneker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakara, D.G. Yansura, M.J. Ross, G. Miozzari, R. Crea and P.H. Seeberg.; *Nature*, 281, 544-548(1979)
- 24) Halleweell, R.A. and S. Emtege.; *Gene*. 9, 27-47(1980)