Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 14, No. 2, 125 - 131(1986)

진핵생물 유전자 조작을 위한 효모 vector계 이용에 관한 기초연구

- 생효모 형질전환 최적조건과 숙주별 plasmid안정성에 관하여 -

기우경 · 조성환 · 김범규 · 조무제*

경상대학교 농과대학 식품공학과 *농화학과

(1986년 1월 16일 수리)

Development of Yeast-Vector System for Eukaryotic Gene Cloning

- Optimum Condition for Intact Yeast Cell Transformation and Plasmid Stability in the Transformants -

Woo Kyung Ki, Sung Hwan Cho, Beom Kyu Kim and Moo Je Cho*

Department of Food Science & Technology and Agricultural Chemistry*,
College of Agriculture, Gyeongsang National University, Chinju 620, Korea

(Received January 16, 1986)

In order to obtain the optimum conditions for intact yeast cell transformation in the various yeast host-vector systems, 3 yeast plasmid vectors, YRp7, YEp13 and YIp5 were introduced into 5 yeast hosts, *Saccaromyces cerevisiae* D13-1A, DKD-5D, DBY-746, MC-16 and S2022D with various transformation conditions, and plasmid stabilities in all the transformants were also observed. The highest transformation frequencies in all the host-vector system were obtained in the 16 hour cultured cell (5.4×10^6 - 2.4×10^8 cells/ml) treated with 0.1–0.2 M lithium chloride in 0.1 M tris-HCl (pH 7.6), 35% polyethylene glycol 4000, and heat-shocked at 42°C for 5 minutes after 60 minutes of induction. The intact cell transformation got more transformation frequency in DKD-5D (YRp7) and DBY-746 (YEp13) than protoplast transformation, but reverse tendency was observed in DKD-5D (YEp13) and D13-1A (YRp7). The transformants, D13-1A (YRp7) and DKD-5D (YRp7) were very unstable in selective medium, with 80 to 85% of the transformants losing the plasmid after 70 generations, but the transformants, DKD-5D (YEp13) and DBY-746 (YEp13) were quite stable, with 35% of the transformants losing the plasmid.

효모는 분자유전학적 연구가 비교적 많이 이루어진 진핵생물[1]로서 다른 진핵생물로 부터 도입된 유전자의 splicing이 정상적으로 일어나는 예[2,3]가 있을 뿐만 아니라 세포내에서 합성된 물질들을 세포 밖으로 분비하는 기작도 고등생물과 유사하다[4]. 따라서 최근 여러종류의 유용유전자들을 효모숙주에 도입, 발현시킴[5,6,7,8,9,10]과 동시에 secretion vector를 개발[3,11,12,13]하여 발현된 유전자산물을 배양기질내로 분비시켜 수율을 증가 시키려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 효모는 대장균에 비하여 숙주로서의 여러가지 장점들을 갖고 있기 때문에 여러가지 목적에 부합되는 다양한 효모숙주 개발[5,12,14]과 아울러 효모숙주에 효율적으로 사용할 수 있는 vector[2,3,4,5,6,10] 개량도 여러 측면에서 시도되고 있다.

효모의 형질전환은 최근까지 protoplast 형질전환

Key word: Yeast transformation, Plasmid stability

법을 이용하였으나 Ito등[15]이 1가 금속이온을 처리하여 competent cell을 만들어 생효모 형질전환시키는데 성공함으로써 보다 간편한 생효모 형질전환법을 선호하게 되었다. 그러나 생효모 형질전환법이 protoplast 형질전환법에 비하여 형질전환효율이 낮아 아직까지 protoplast 형질전환법을 사용하는 경우가 많다. 따라서 본 실험에서는 5종류의 효모숙주와 3종의 효모 vector를 사용하여 생효모 형질전환 최적조건을 검토함과 아울러 각 형질전환체내에서의 도입된 plasmid의 안정성을 실험하였다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

사용균주 및 plasmid들의 특성은 Table 1과 같다.

plasmid DNA의 정제

plasmid YEp13과 YIp5는 *E. coli* C600, YRp7는 *E. coli* trpC 9830에서 증폭시켜 Birnboim 등[16]의 방법으로 alkali-SDS 처리로 얻은 DNA를 Colman등[17]의 hydroxyapatite chromatography 법으로 정제하여 사용하였다.

효모의 형질전환

protoplast 형질전환은 Hinnen등[18]의 방법에 준하였다. 즉 5 ml의 효모배양 세포에 5μg의 zymolyase-200T를 처리하여 얻은 protoplast를 Rodriguez등[19]의 방법에 따라 세척한 후 10 mM $CaCl_2$ 함유 1.2M sorbotol에 현탁시키고 100μl의 protoplast 현탁액에 plasmid DNA 2μg을 가한후 1 ml의 20% polyethylene glycol 4000 (10mM Tris-Hcl, pH 7.6, 10 mM $CaCl_2$)을 첨가하여 형질전환시켰다. lithium 염에 의한 생효모 형질전환은 Ito[15]등의 방법에 준하며 0.1M lithium 용액에 1시간 처리하여 competent cell을 만들어 효모세포 10^7 cell에 대하여 약 2μg의 plasmid DNA를 가하고 PEG (polyethylene glycol 4,000 최종농도 35%)를 첨가한 후 42℃에서 5분간 열처리하여 형질전환시켰다. 형질전환체의 확인은 각 plasmid에 의하여 상보될수 있는 영양물질만을 첨가하지 않은 SD배지 (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids, 2% glucose, pH 5.3)에서 자라는 colony로서 확인하였다. 또한 이들 형질전환체들의 보다 정확한 확인을 위하여 형질전환된 효모로부터 Rodriguez법[19]으로 plasmid DNA를 분리한 후 이것으로 *E. coli* HB101에 형질전환하여 증폭시켜 전기영동 함으로써 확인하였다.

효모숙주에 도입된 plasmid vector의 안정성

Saccharomyces cerevisiae D13-1A 및 DKD-5D는 YRp7으로 DKD-5D 및 MC-16은 YEp13으로 각각 생효모 형질전환시켜 4종의 형질전환체들을 얻었다. 이중 YEp13 형질전환체들은 SD-leucine배지에 YRp7 형질전환체들은 SD-tryptophane배지에 배양한 후 1%배양균 현탁액을 동일배지에서 10세대 (doubling time은 DKD-5D가 120분, D13-1A는 100분)마다 다시 새로운 배지에 접종하여 70세대까지 배양하면서 이들 각 형질전환체들에서의 도입된 plasmid vector의 안정성을 조사하였다. 이때 안정성은 각 숙주에 따른 영양요구 물질을 전부 첨가한 SD 한천배지에서 나타나는 각 형질전환체의 수를 100%로 하여 배양 과정중에 plasmid를 유실한 형질전환체의 비를 나타내기 위하여 상기 배지를 조제할때 YRp7의 형질전환체일 경우 tryptophan만을 첨가하지 않고 YEp13의 형질전환체일 경우 leucine만을 첨가하지 않고 SD 한천배지에 나타나는 colony수의 비로서 나타내었다.

Table 1. Yeast strains and plasmid used

	Characteristics	Source or Reference
Plasmid vectors		
YRp 7	5.7kb, tet^r, amp^r, trp 1	Ito et al. (1983)[15]
YEp 13	10.7kb, tet^r, amp^r, leu 2	Broach (1983)[12]
YIp 5	5.4kb, tet^r, amp^r, ura 3	Struhl et al. (1979)[24]
Saccharomyces cerevisiae		
D13-1A	Mat a, his 3-532, trp 1, gal 2	Ito et al. (1983)[15]
DKD-5D	Mat a, leu 2-3, leu 2-112, his 3, trp 1	Y. Oshima Osaka University Osaka, Japan.
MC-16	Mat α, leu 2-3, his 4-712, ade 2-1 lys 2-1, suf 2	Beggs (1978)[25]
DBY-746	Mat α, leu 2-3, his 3, trp 1-289, ura 3-52	Yeast Genetic Center, Univ. of California Berkely, CA., U.S.A.
S2022D	Mat α, leu 1, trp 5, ade 6, ura 3, gal 2	Yeast Genetic Center Univ. of California Berkely, CA., U.S.A.

Table 2. Transformation frequency of protoplast cell and intact yeast cell treated with lithium salt.

Strains and plasmid	Transformation frequency*		
	LiCl	Li-acetate	Protoplast
S. cerevisiae DKD-5D (YRp 7)	1250	1213	100
S. cerevisiae D13-1A (YRp 7)	630	750	990
S. cerevisiae MC-16 (YEp 13)	791	321	661
S. cerevisiae DKD-5D (YEp 13)	890	501	1090
S. cerevisiae DBY-746 (YEp 13)	1028	153	110

*Number of transformants by ca. 2μg of plasmid DNA

결과 및 고찰

생효모 형질전환과 protoplast 형질전환

효모 숙주세포에 흔히 사용되는 plasmid vector인 YRp7과 YEp13을 hydroxyapatite로 정제하여 전자는 효모숙주 *Saccharomyces cerevisiae* DKD-5D 및 D13-1A의 형질전환에, 후자는 *Saccharomyces cerevisiae* MC-16, DKD-5D 및 DBY-746의 형질전환에 사용하였으며 이들 각 숙주 vector계간의 형질전환빈도를 생효모 형질전환법과 protoplast 형질전환법으로 서로 비교하였다 (Table 2).

Table 2에서 보는 바와 같이 YRp7이나 YEp13에서 공히 숙주간에 형질전환빈도에서 큰 차이를 보였으며 또한 사용하는 숙주-vector계에 따라 lithium염 처리에 의한 생효모 형질전환법과 protoplast 형질전환법사이에 큰 차이를 보였다. 즉 YRp7에 의한 형질전환의 경우 DKD-5D숙주에는 생효모 형질전환법이 protoplast 형질전환법의 약 10배에 달하는 형질전환빈도를 보인 반면 D13-1A 숙주에서는 오히려 protoplast 형질전환법이 높은 빈도를 나타내었다. YEp 13 plasmid의 경우는 DBY-746숙주에는 생효모형질전환법이 protoplast 형질전환법에 비하여 높은 빈도로 형질전환됨이 관찰되었다. 생효모형질전환에서는 lithium chloride처리가 lithium acetate처리보다 모든 숙주 vector계에서 공히 우수하였다. Ito등[18]에 의하면 효모를 competent cell화 시키는데는 lithium외에도 cesium염등 다른 1가 이온도 효과가 있어 plasmid의 종류에 따라서는 약 10배 정도의 형질전환 빈도 차이가 있다고 보고 하고 있다. 본 실험의 결과 효모의 형질전환에는 사용하는 vector 및 숙주의 차이에 따라 protoplast 형질전환법을 택할것이냐 아니면 생효모 형질전환법을 택해야 할것이냐를 결정하여야 할 것으로 생각된다.

생효모 형질전환의 최적조건

앞서 언급한 바와 같이 Ito[15]등에 의하여 개발된 생효모 형질전환법은 종전의 protoplast 형질전환

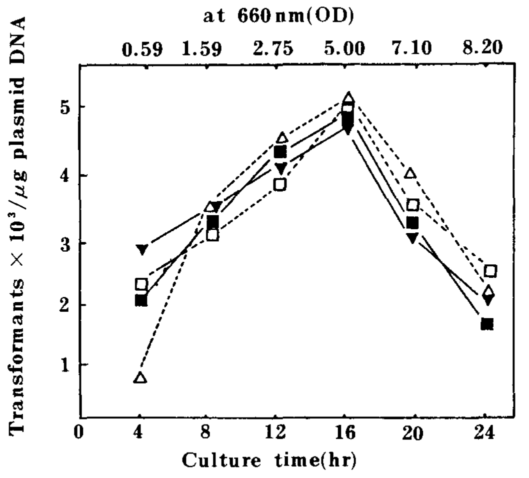

Fig. 1. Effect of culture time on transformation of intact yeast cells

▼, *S. cerevisiae* D13-1A (YRp 7); □, *S. cerevisiae* DKD-5D (YRp 7); △, *S. cerevisiae* MC-16 (YEp13); ■, *S. cerevisiae* DKD-5D (YEp 13)
Other conditions for transformation were described in the text.

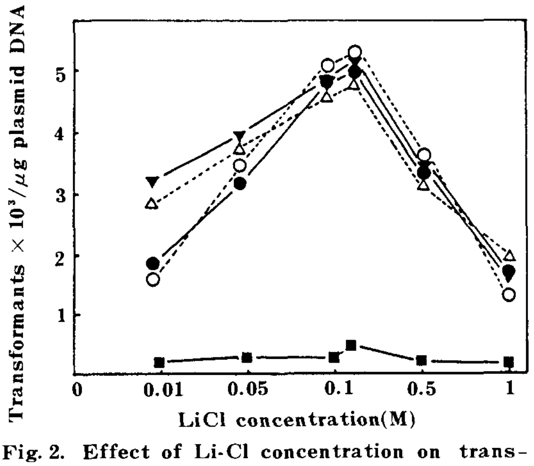

Fig. 2. Effect of Li-Cl concentration on transformation of intact yeast cells.

△, *S. cerevisiae* D13-1A (YRp 7); ○, *S. cerevisiae* DKD-5D (YRp 7); ▼, *S. cerevisiae* MC-16 (YEp 13); ●, *S. cerevisisiae* DKD-5D (YEp 13) ■, *S. cerevisiae* DBY-746 (YIp 5)
Other conditions for transformation were described in the text.

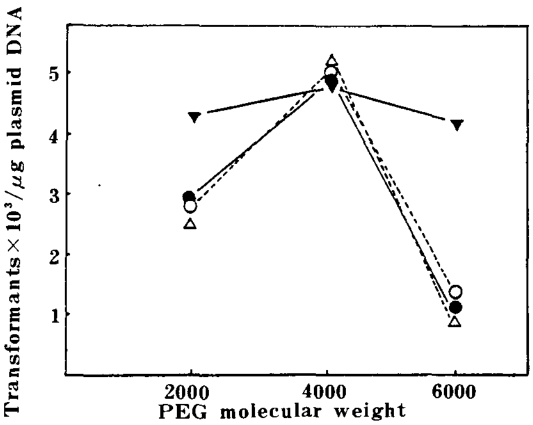

Fig. 3. Effect of PEG molecular weight on transformation of intact yeast cells.

△, *S. cerevisiae* D13-1A(YRp 7); ▼, *S. cerevisiae* MC-16(YEp 13); ○, *S. cerevisiae* DKD-5D(YRp 7); ●, *S. cerevisiae* DKD-5D (YEp 13)
Other conditions for transformation were described in the text.

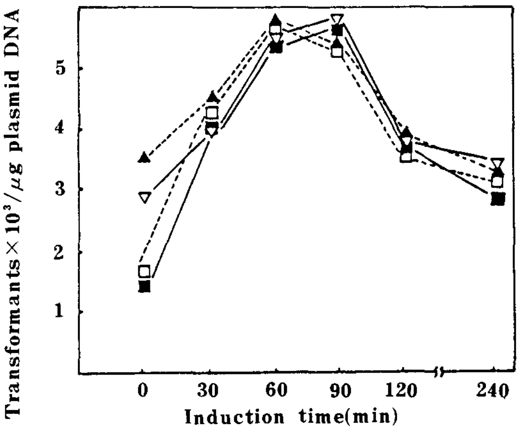

Fig. 5. Effect of induction time on transformation of intact yeast cells.

▲, *S. cerevisiae* D13-1A(YRp 7); □, *S. cerevisiae* DKD-5D(YRp 7); ▽, *S. cerevisiae* MC-16(YEp 13); ■, *S. cerevisiae* DKD-5D (YEp 13)
Other conditions for transformation were described in the text.

법에 비하여 시간적, 경제적 잇점을 가짐으로 많이 이용되고 있다. 따라서 각 숙주-vector 계에 따른 생효모 형질전환의 최적조건을 알기 위하여 앞 실험에서 사용한 *S. cerevisiae* D13-1A, DKD-5D, MC-16 및 DBY-746 숙주와 YBp 7 및 YEp 13 vector를 사용하여 숙주세포의 생육시기, lithium chloride의 농도, PEG의 농도 및 분자량, 열처리 효과, 사용 buffer의 종류 및 pH, induction time의

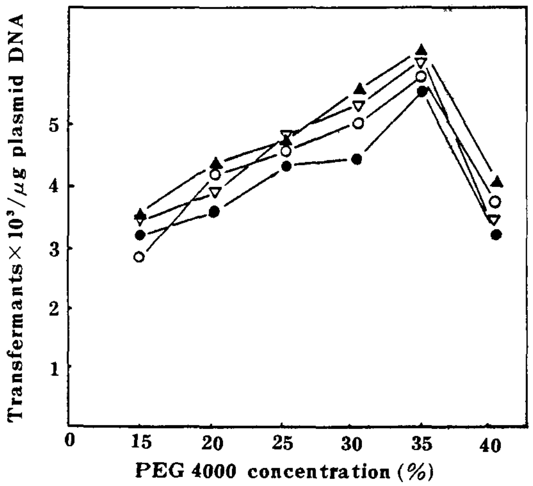

Fig. 4. Effect of PEG 4000 concentration on transformation of intact yeast cells.

▽, *S. cerevisiae* D13-1A(YRp 7); ○, *S. cerevisiae* DKD-5D(YRp 7); ▲, *S. cerevisiae* MC-16(YEp 13); ●, *Scerevisiae* DKD-5D (YEp 13)
Other conditions for transformation were described in the text.

차이등에 따른 형질전환빈도의 차이를 실험하였다. 효모의 생육시기별 형질전환빈도는 Fig. 1과 같다. *S. cerevisiae* DKD-5D(YRp 7), DKD-5D(YEp 13), MC-16(YEp 13) 및 D13-1A(YRp 7)등 실험된 모든 숙주 vector계에서 공히 숙주배양시간 16시간 (5.4×10^6~2.4×10^8 cells/ml) 내외에서 가장 높은 빈도수를 보였다. lithium chloride 농도에 따른 형질전환빈도(Fig. 2)를 보면 D13-1A(YRp 7), MC-16(YEp 13), DKD-5D(YRp 7)및 DKD-5D(YEp 13)에서는 공히 lithium chloride 농도 0.1~0.2M이 최적이었으며 이때 형질전환빈도는 5×10^3/10μg plasmid DNA정도였다. 한편 DBY-746(YIp 5)의 경우에는 0.01M에서 1M까지 어떤 농도에서도 거의 competent cell화 되지 않음을 보여 숙주에 따라 lithium 염처리에 의한 생효모형질전환이 불가능함을 알 수 있었다. PEG 분자량이 형질전환빈도에 미치는 영향은 (Fig. 3) 실험된 모든 숙주-vector계에서 공히 PEG 4000이 가장 효율적이었으나 MC-16의 경우는 PEG 2000에서 6000까지 분자량의 차이에 따라 큰 차이가 없음이 특징적이었다. 또한 PEG 농도의 영향(Fig. 4)을 보면 모든 경우에 공히 35%에서 가장 높은 형질전환빈도를 보였으며 40% 이상에서는 그 효율이 급격히 저하되는 경향을 보였다. LiCl를 처리한 후(30℃에서 1시간) plasmid DNA를 넣고 다시 PEG 4000을 35%되게 가한 다음 30℃에서 일정시간 동안 방치한 후 다시 열처리를 하게 되는데 이 기간을 induction time이라 하고 induction time의 길이에 따라 형질전환빈도에 큰

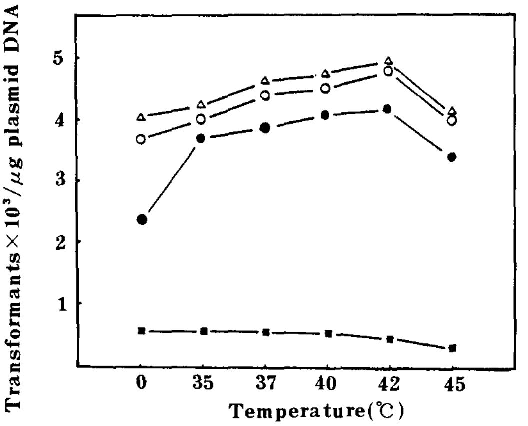

Fig. 6. Effect of heat shock on transformation of intact yeast cells.

△, *S. cerevisiae* D13-1A (YRp 7) ; ○, *S. cerevisiae* DKD-5D(YRp 7);●, *S. cerevisiae* DKD-5D(YEp 13) ■, *S. cerevisiae* DBY-746 (YEp 13)
Other conditions for transformation were described in the text.

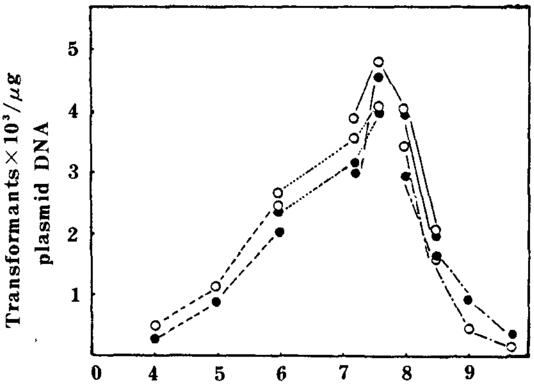

Fig. 7. Effect of pH and buffers on transformation of intact yeast, DKD-5D.

○, *S. cerevisiae* DKD-5D(YRp 7);● ;*S. cerevisiae* DKD-5D (YEp 13) ;----, 0. 1M acetate buffer;·····, 0. 1M citrate buffer —·—, 0.1M diethanolamine-HCl buffer ——, 0. 1M tris-HCl buffer
Other conditions for transformation were described in the text.

차이가 있음이 발견되었다(Fig. 5).

Fig. 5 에서 보는 바와 같이 모든 경우에 공히 약 60분~90분 정도의 induction 후에 열처리를 하는 것이 최고의 빈도를 보였으며 PEG 첨가후 바로 열처리 할 경우는 최고치의 25%(DKD-5D) 에서 70 %(MC-16) 까지의 범위로서 숙주간에 큰 차이를 보였다. PEG 첨가후 60분간의 induction time 이 지난 후 0 ℃에서 45℃ 까지 열처리 효과를 시험해본 결과(Fig. 6) DKD-5D (YRp7), DKD-5D (YEp13), D13-1A (YRp 7)에서 공히 42℃에서 5 분간 열처리하는 것이 가장 형질전환 빈도가 높았다.

LiCl처리시 buffer의 종류 및 pH가 형질전환빈도에 미치는 영향은 Fig. 7 및 8 과 같다. 본 실험에서 사용한 숙주-vector 계에서는 공히 0. 1M tris-HCl (pH 7. 6)가 가장 높은 빈도를 보였으며 숙주 및 vector 간에는 큰 차이가 없었다. Ito[15] 에 의하면 *S. cerevisiae* D13-1A에 YRp 7으로 Li-acetate 법으로 형질전환시켰을 때 10μg plasmid DNA 당 4000~5000개의 transformants를 얻는데 반하여 YEp 6 로 형질전환시켰을 때는 50개의 transformants밖에 얻지 못했다. 한편 LiCl 법에서는 YRp7의 transformants가 2000~3000개 얻었다고 하나 LiCl 및 Li-acetate 법에 대한 명확한 결론을 내리지 않았다.

본 실험에서 얻은 결과에서도 숙주와 vector의 종류에 따라 형질전환 빈도에서 큰 차이가 있음을 미루어 볼 때 LiCl 법에 의한 효모의 형질전환시에는 숙주의 특성을 고려하여야 할 것으로 생각된다.

효모 숙주별 vector의 안정성

유용한 효모 vector가 되기 위해서는 숙주 세포내로 도입된 plasmid의 안정성이 높고 copy수가 많은 것이 바람직하다[2,7,20,21].

본 실험에서는 4 종류의 효모 숙주에 2종류의 plasmid vector를 도입하여 얻은 5 종류의 transfor-

Table 3. Stability of plasmids in transformants cultured in selective medium

Transformants	Plasmid stability after each generations*						
	10	20	30	40	50	60	70
S. cerevisiae D13-1A (YRp 7)	78. 0	66. 0	53. 9	45. 3	40. 6	30. 0	19. 0
S. cerevisiae DKD- 5 D (YRp 7)	76. 0	63. 0	60. 0	52. 0	43. 0	25. 7	16. 0
S. cerevisiae DKD- 5 D (YEp 13)	94. 9	92. 0	87. 0	80. 0	73. 0	65. 0	64. 0
S. cerevisiae DBY-746 (YEp 13)	92. 9	91. 0	82. 3	73. 0	71. 0	72. 0	64. 9
S. cerevisiae MC-16 (YEp 13)	92. 4	87. 7	81. 0	72. 0	66. 5	55. 0	45. 0

*Stability was expressed in percentage of cells harboring plasmid phenotype to total cells and selective medium consist of SD medium with all required nutrients except complementary nutrient to plasmid

Table 4. Stability of plasmids in transformants cultured in nonselective medium

Transformants	Plasmid stability after each generations*						
	10	20	30	40	50	60	70
S. cerevisiae D13-1A (YRp 7)	70.0	61.4	44.6	41.4	33.3	24.7	11.6
S. cerevisiae DKD-5D (YRp 7)	71.0	53.0	40.5	29.6	25.0	18.5	6.0
S. cerevisiae DKD-5D (YEp 13)	93.8	89.6	81.0	75.0	72.0	71.0	62.0
S. cerevisiae DBY-746 (YEp 13)	90.4	80.0	76.0	65.0	62.7	61.0	55.2
S. cerevisiae MC-16 (YEp 13)	88.5	83.2	75.0	62.3	61.0	49.0	35.0

*Stability was expressed in percentage of cells harboring plasmid phenotype and nonselective medium was SD medium supplemented with all nutrients

mants 즉 D13-1A (YRp7), DKD-5D (YRp7), DKD-5D(YEp13), DBY746 (YEp13) 및 MC-16 (YEp13)를 선택배지 (Table 3) 및 비선택배지 (Table 4)에서 각각 70세대간 배양하면서 각 숙주별 도입된 plasmid의 안정성을 실험하였다. Table 4 에서 보는 바와 같이 도입된 plasmid로 상보될 수 있는 영양소를 첨가하지 않은 선택배지에서 배양할 경우 D13-1A (YRp7)와 DKD-5D (YRp7)에서는 70세대 후 80~85%가 plasmid를 유실하였으나, DKD-5D (YEp13)이나 DBY-746 (YEp13)는 35% 정도 밖에 유실되지 않았다. 이와같은 결과로 미루어 볼 때 YRp7에 비하여 YEp13이 훨씬 안정함을 알 수 있으며 이미 보고된 바와 같다[5,22,23] 한편 MC-16 (YEp13)의 경우는 70세대후에 약 55%가 유실되었는데 이 결과는 Futcher[22]등이 보고한 91% 유실에 비하면 훨씬 안정하였다. 이와같이 본 실험에서 사용한 MC-16숙주에서의 plasmid 안정성이 높은 것은 2 μm DNA가 관찰되지 않는 것으로 보아 Cir$^+$에서 Cir$^-$로 변이[2,3,7]가 일어난 것으로 추정되나 이의 확인을 위해서는 더 많은 검토가 필요한 것으로 생각된다. 한편 도입된 plasmid로 상보될 수 있는 영양소도 첨가된 비선택배지에서는 선택배지에 비하여 다소 불안정하였으나 각 숙주-vector 계에서 공히 선택배지에서와 비슷한 경향을 보였다.

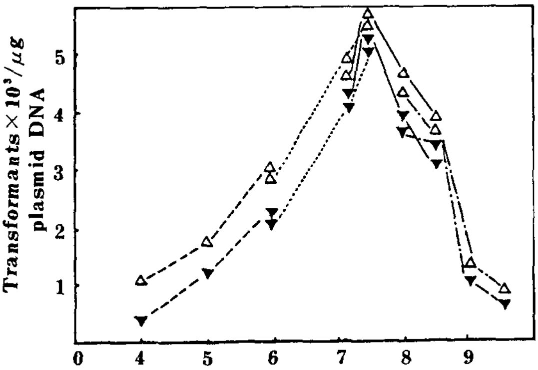

Fig. 8. Effect of pH and buffers on transformation of intact yeast, D13-1A and MC-16.

△, *S. cerevisiae* D13-1A (YRp7); ▲, *S. cerevisiae* MC-16 (YEp13); ······, 0.1M macvalline buffer; ——, 0.1M tris-HCl buffer; -----, 0.1M sodium acetate buffer; —·—, 0.1M diethanolamine-HCl buffer
Other conditions for transformation were described in the text.

요 약

각 효모 숙주 및 vector에 따라 lithium염 처리에 의한 생효모형질전환 최적 조건을 얻기 위하여 5종의 효모 숙주 (*S. cerevisiae* D13-1A, DKD-5D, DBY-746, MC-16 및 S2022D)에 3종의 효모 plasmid vector (YRp7, YEp13 및 YIp5)의 형질전환 실험과 아울러 이들 각 형질전환체내에서 도입된 plasmid들의 안정성을 조사하였다. lithium 염의 경우 LiCl가 Li-acetate에 비하여 좋은 효과를 보였으며 LiCl 처리에 의한 최적 형질전환 조건은 각 숙주-vector 계에 있어서 공히 균체 배양 시간은 16시간 (5.4×10^6~2.4×10^8 cells/ml) 내외, LiCl의 농도는 0.1~0.2M, PEG (4000)의 농도는 35%, induction 시간은 60분 내외, 열처리는 42℃에서 5분간, LiCl 처리 buffer는 0.1M tris-HCl (pH 7.6)에서 가장 높은 형질전환 빈도를 보였다. 한편 protoplast 형질전환법과 형질전환빈도를 비교해 본 결과 DKD-5D (YEp13)과 D13-1A (YRp7)의 경우는 protoplast법이 DKD-5D (YRp7), 및 DBY-746 (YEp13)에서는 LiCl 처리법이 형질전환 빈도가 높았으며 MC-16 (YEp13)의 경우는 양방법에서 공히 비교적 낮은 빈도를 보였다. 각 형질전환체내에서의 도입된 plasmid의 안정성은 선택배지에서 배양했을 경우 YRp7이 D13-1A및 DKD-5D 숙주에서 70세대후에는 80~85%가 유실되었으나 YEp

13은 DKD-5D 및 DBY-746에서 35%밖에 유실되지 않았으며 MC-16숙주에서는 55% 유실로서 비교적 안정하였다. 또한 비선택배지에 배양시에는 선택배지에 배양했을 경우 보다 안정성이 다소 낮았으나 같은 경향은 보였다.

사 사

본 연구는 1984년 문교부 학술연구 지원금에 의해 수행되었으며 이에 깊은 사의를 표하는 바입니다.

참고문헌

1. Strathern, J.N., E.W. Jones and L.R. Broach: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Cold Spring Harbor Lab. (1982).
2. 東江昭夫：遺伝子 組換え実用化 技術(テクノミステム), 4, 124-143(1981)
3. Roggen, R., B. Kustermann-Kuhn and C.P. Hollenberg: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U.S.A), **78,** 4466 (1981)
4. Peter, N., F. Susan and S. Randy: *Cell,* **25,** 461 (1981)
5. 村上清史：眞核細胞の自己増殖性 プラスミト, 蛋自質核酸 酵素, 28(12), 1500(1983)
6. Hinnen, A. and B. Meyhack: The 4th TOYOBO Foundation Symposium Molecular Breeding of Microorganisms, 40-45 (1985).
7. Esser, K.: Molecular Breeding of Microorganisms The 4th TOYOBO Foundation Symposium, 59-61 (1985).
8. 東江昭夫：化学と生物, 21(5), 183(1983)
9. Hitzeman, R. and C. Chan: Abstract of papers presented at the 1985 meeting on Molecular Biology of Yeast, Cold Spring Harbor Lab., 62 (1985)
10. Broach, J.R., Y.Y. Li, L.C. Chenwu and J. Makkun: Experimental manipulation of gene expression, Academic Press, 83-117 (1983).
11. Schenberg-Francino, A.C., S.A. Filho, E.V. Galembeck and J.B. Faria: Abstracts of papers presented at the 1985 meeting on Molecular Biology of Yeast, Cold Spring Harbor Lab., 65 (1985)
12. Broach, J.R.: Methods in Enzymology (Wu, R., L. Grossman and K. Moldave, ed.). Academic Press Inc., Vol. 101, 307 (1983).
13. Ying, T. and D. kuang: Abstracts of papers presented at the 1985 meeting on Molecular Biology of Yeast, Cold Spring Harbor Lab., 68 (1985)
14. Carl, M. and R.W. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci* (U.S.A), **80,** 228 (1983)
15. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murada and A. Kimura: *J. Bacteriol,* **153** 163 (1983)
16. Birnboim, M.D. and J. Doly: *Nucl. Acid Res.,* **7,** 1513 (1979)
17. Colman, A., M.J. Byers, S.B. Primose and A. Lyons: *Eur. J. Biochem.,* **91,** 303 (1978)
18. Hinnen, A., J.B. Hicks and G.R. Fink: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U.S.A), **75,** 1929 (1979)
19. Rodringuez, R.L. and R.C. Trait: Recombinant DNA Techniques, Addison-Wesley Publishing Company, Inc. (1983)
20. Erhart, E.and C.P. Hollenberg: *J. Bacteriol.,* **156,** 625 (1983)
21. Esser, K.: Molecular Breeding of Microorganisms The TOYOBO Biotechnology Foundation Symposium, 59 (1985)
22. Futcher, A.B.and B.S. Cox: *J. Bacteriol.,* **157,** 287 (1984)
23. Hsu, W.H., P.T. Magee, B.B. Magee and C.A. Reddy: *J. Bacteriol.,* **154,** 1033 (1983)
24. Struhl, K., D.T. Stinchcomb, S. Scherer and R.W. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U.S.A), **76,** 1035 (1979)
25. Beggs, J.D.: *Nature,* **275,** 104 (1978)