Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 17, No. 5, 447-453 (1989)

하폐수의 자연환경에서 R Plasmid와 재조합 유전자의 전이특성(Ⅰ)
—Km^rCm^r유전자의 클로닝—

김치경* · 이성기

충북대학교 자연대 미생물학과

Transfer of R Plasmids of Bacterial Isolates and Their Cloned R Genes in Natural Wastewater Environments (I)
—Cloning of Km^rCm^r Gene—

Kim, Chi-Kyung* and Sung-Gie Lee

Department of Microbiology, College of Natural Science, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

In order to study the transfer of antibiotics resistance genes of the genetically cloned bacteria in water environments, DK1 strain, which is resistant to kanamycin (Km), chloramphenicol (Cm), streptomycin (Sm), and sulfadiazine (Su), was selected from the Gram-negative bacterial isolates From wastewater. One of 4 plasmids harboured in the DK1 strain was found to possess Km^rCm^r gene and be about 68 kb in size, and it was designated as pDK101. The plasmid of pDK101 was also found to have 16, 32, and 6 restriction sites for *Eco*RI, *Pst*I, and *Sal*I, respectively. From the digestion fragments of pDK101 plasmid and pKT230 used as a vector by *Eco*RI restriction endonuclease, pDT309 and pDT529 were constructed as chimeric plasmids which possess Km^rCm^r gene and are 30.9 and 52.9 kb in size, respectively. When the chimeric plasmids were trasformed into *E. coli* C600 or *E. coli* HB101, transformants of DKC601, DKC602, DKH102, and DKH103 were obtained as cloned bacterial cells. The Km^rCm^r genes were well expressed in those cloned cells and the chimeric plasmids were clearly detected in the cloned cells of DKC601 and DKH103.

항생물질에 대한 세균의 내성의 전이는 plasmid에 존재하는 R factor에 기인된다는 것이 1964년에 Kimura 등(1)에 의하여 보고된 후, 이 R plasmid의 전이 문제는 보건학 및 환경생태학적으로 커다란 문제를 일으키게 되어 R plasmid의 분자생물학 및 유전학적인 연구가 여러 각도에서 이루어졌다. *Shigella sonnei*에서 밝혀진 R5 plasmid의 R factor는 *E. coli*에 전이된다고 보고했으며, 그 후 R 유전자의 전이에 관한 연구는 수많이 이루어졌으며 근래에 와서는 유전자 조작기법에 의하여 항생물질 내성유전자의 cloning 연구가 진행되고 있다.

Hass와 Davies(2)는 kanamycin 내성을 가진 *E. coli*에서 NR79 plasmid를 분리하여 vector로 사용한 pSF2124와 함께 *Eco*RI으로 처리한 후 recombiant plasmid를 만들어 *E. coli* C600에 conjugation 시킴으로써 aminoglycoside-6′-N-acetyltransferase 유전자를 cloning하였다. 또 Nakano 등(3)은 *Streptomyces kanamyceticus*의 Km^r유전자를 pIJ702 vector를 이용하여 *S. lividans*에 cloning하였다. 이와 같이 Km^r유전자의 cloning은 Gram 음성세균뿐 아니라 양성세균에서도 보고되었다. 그 반면 chloramphenicol 내성유전자에 대한 연구에 있어서도, Ehrlich(4,5), Lofdahl 등(6,7) 그리고 Gryczan 등(8)에 의하여 *Staphylococcus aureus*의 pC194 plasmid를 *Bacillus subtilis*에 cloning하였고, Dao와 Ferretti(9)는 *E. coli*의 pACYC184에 있는 Cm^r유전

Key words: R plasmid, Km^rCm^r gene, cloning of R genes
*Corresponding author

자를 pGB305와 ligation시켜 chimeric plasmid를 만들어 *Streptococcus sanguis*에 cloning함으로써, chloramphenicol 내성유전자의 복제와 발현 그리고 효율적인 cloning vector의 개발 등에 관하여 보고한 바 있다. 그러나 이와 같은 연구에서는 모두 실험실에 적응된 균주들을 사용하였으며, 그들이 가지고 있는 Km 또는 Cm에 대한 내성유전자를 cloning하고 그 발현을 실험하였다. 그러나 자연계에서 분리한 균주들의 항생물질 내성유전자에 대한 cloning과 그들이 자연의 수질환경에서 전이되는 특징은 체계적으로 검토된 바가 없었다.

그러므로 본 연구에서는 자연계로부터 분리한 Gram 음성세균들과 함께 유전자 조작기법으로 제조한 균주에서 항생물질 내성유전자의 전이특성을 하폐수의 수질환경에서 비교하기 위하여 자연계 균주의 Km^rCm^r유전자를 클로닝하였다. 자연계로부터 분리한 균주에서 R plasmid를 검정한 후 제한효소에 의하여 pDK101 plasmid를 분석하고, Km^rCm^r유전자와 vector로 사용한 pKT230 plasmid를 재조합시켜 pDT309와 pDT529 등의 hybrid plasmid를 제조하였다. 그리고 이들 hybrid plasmid를 *E. coli* C600과 *E. coli* HB101에 transformation함으로써 kanamycin과 chloramphenicol의 내성을 cloned cell에서 발현시켰다.

재료 및 방법

시험균주 및 배양

본 실험에 사용된 균주는 청주공단 하폐수 및 무심천 하천수로부터 Standard Methods(10)에 따라 분리한 Gram 음성세균 중 DK1, MT1, MT2, MS1 균주를 선발하였고 이들로부터 pKT230 plasmid를 vector로 사용하여 Silhavy 등(11)의 방법에 따라 Km^rCm^r유전자의 재조합 균주로 DKC601, DKC602, DKH102, DKH03을 만들었다. 그들의 목록은 Table 1에서와 같다. 균주의 배양을 위해서 Luria-Bertani(LB) medium, xylose lysine deoxycholate (XLD) medium을 사용하였다.

항생물질의 MIC 검정

시험균주들에 대한 항생물질의 내성특성을 알기 위하여 Sigma Co.(St. Louis, Mo, USA)로부터 구입한 ampicilin(Ap), chloramphenicol(Cm), tetracycline(Tc), streptomycin(Sm), kanamycin(Km), sulfadiazine(Su), nalidixic acid(Nal)에 대한 최소 억제농도(MIC)를 Kim 등(12)의 보고에서 기술한 방법에 따라 측정하였다.

R plasmid의 분리 및 전기영동

자연계에서 분리된 균주를 포함하여 본 실험에 사용한 균주들의 plasmid는 Silhavy 등(11), Dillon 등(13), Perbal(14) 등의 방법을 병용하여 alkaline extraction 방법으로 추출하였다. 시험 세균을 하룻밤 배양하여 원심분리에 의하여 집균한 뒤 glucose-EDTA, NaOH-SDS, potassium acetate reagents 등(Sigma Co.)을 사용하여 세포를 파쇄시켰고 phenol-chloroform으로 처리하여 cell debris를 분리시켰다. 그리고 상층액을 취하여, −20℃에서 12시간 이상 isopropanol로 DNA를 침전시키고 그 다음 RNase와 proteinase K로 처리하여 plasmid DNA의 순도를 높였다. 이러한 plasmid는 0.7-1.2%의 agarose gel과 Tris-borate buffer에서 40-100 V의 전압을 사용하여 3-8시간 동안 전기영동을 하였다. 그리고 0.5 $\mu g/ml$의 ethidium bromide 용액으로 DNA를 염색한 후 관찰하였다.

제한효소 처리

DK1 균주에서 Km^rCm^r유전자를 가지고 있는 pDK101 plasmid와 *Pseudomonas putida*의 pKT230 plasmid를 순수 분리한 후 Maniatis 등(15)과 Perbal(14)의 방법을 병용하여 제한효소로 처리하였다. 멸균 증류수에 용해된 plasmid DNA에 reagent buffer 및 bovine serum albumin을 혼합한 후 15-60 unit의 *Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, *Sal*I (Promega Co., Madison, WI., USA)으로 30분-16시간 동안 반응시켰으며, DNA 시료의 digestion 상태는 전기영동 방법으로 확인하였다. Double digestion은 single digestion이 된 DNA 시료를 다시 phenol-chloroform으로 재추출하여 정제한 후 실시하였다.

Km^rCm^r유전자의 클로닝

항생물질 내성유전자를 클로닝하여 발현시키는 과정의 실험은 Nakano 등(3), Ohnuki 등(16), Matsuhashi 등(17), Silhavy 등(11)의 방법을 병용하였다. 먼저 Km^rCm^r유전자를 가지고 있는 pDK101 plasmid를 순수 분리하여 vector로 사용한 pKT230과 함께 *Eco*RI으로 digestion한 후, 70℃의 water bath에서 3분간 가열하여 제한효소의 기능을 inactivation시켰다. 그 다음 chloroform으로 추출하여 pDK101 DNA 절편과 pKT230 절편들을 1 : 1(v/v)의 비율로 혼합한 후, sodium acetate와 iso-

Table 1. MIC profiles of the bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains and plasmid	Sources	MIC of antibiotics						
		Ap	Cm	Km	Sm	Su	Tc	Nal
DK1 (*E. coli*)	Industrial wastewater	<3	12.5	1,500	200	200	<3.5	<3.5
MT1 (*Prov. rettseri*)	Moosimcheon water	2,500	60	<3	125	4,000	185	<3.5
MT2 (*E. coli*)	"	2,500	60	<3	125	4,000	185	<3.5
MS1 (*Pseudomonas* sp.)	"	250	<6	1,000	1,000	3,000	<6	<6
E. coli C600	Laboratory strain	25	<2.5	25	<2.5	50	<2.5	<2.5
E. coli HB101	"	<2.5	<2.5	<2.5	20	50	<2.5	<2.5
P. putida KT2440	"	400	100	400	25	0	0	50
E. coli DKC600	Genetically cloned	25	10	400	<2.5	100	<2.5	<2.5
E. coli DKC601	"	25	10	1,600	20	100	<2.5	<2.5
E. coli DKC602	"	25	<10	400	20	100	<2.5	<2.5
E. coli DKH102	"	<2.5	10	1,600	20	100	<2.5	<2.5
E. coli DKH103	"	<2.5	10	1,600	20	100	<2.5	<2.5
pDK101	*E. coli* DK1	0	12.5	1,500	0	0	0	0
pKT230	*P. putida* KT2440	0	0	1,600	50	0	0	0

propanol을 첨가하여 −70℃에서 10분간 침전시켰다. 그리고 정제된 DNA 시료에 ligase buffer 및 T4 DNA ligase, 0.5 mM ATP (Sigma Co.)를 혼합하여 16℃에서 16시간 동안 반응을 시켰다. Km^rCm^r plasmid의 절편이 ligation된 것을 전기영동 방법으로 확인한 다음, *E. coli* C600과 *E. coli* HB101 등의 competent cell에 Hanahan 등(18)의 방법으로 transformation을 하였다. Km^rCm^r의 유전자가 발현되는 cloned cell은 50 μg/ml의 Km, 10 μg/ml의 Cm, 그리고 50 μg/ml의 Su을 첨가한 LB 배지에서 counterselection 방법으로 선발하였다. 이와 같이 클로닝된 Km^rCm^r유전자들은 전기영동 방법으로 확인하였다.

결과 및 고찰

시험균주의 항생물질 내성과 R plasmid

자연계로부터 분리한 균주와 R 유전자의 cloning을 위하여 사용한 실험실 균주 그리고 그들이 가지고 있는 plasmid에 대한 항생물질의 내성 특성은 Table 1에서와 같다. DK1 균주는 Km, Cm, Sm, Su에 내성을 나타내고 4개의 plasmid를 가지고 있으나 open circular form이 생겨났다. Km과 Cm의 내성유전자는 약 68 kb의 pDK101 plasmid에 존재한다는 것이 DK1 균주와 *E. coli* C600 균주에서 얻은

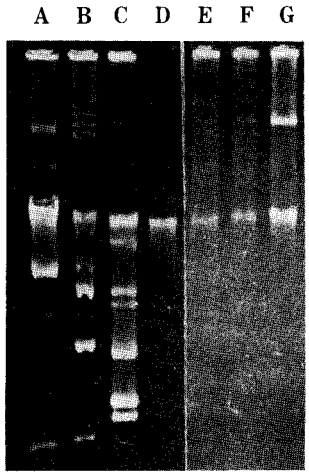

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of plasmids in the bacterial isolates and their transconjugants.
Lanes: A, MT1; B, MT2; C, DK1; D, MS1; E, *E. coli* C600; F and G, DKC600, transconjugant of DK1×*E. coli* C600.

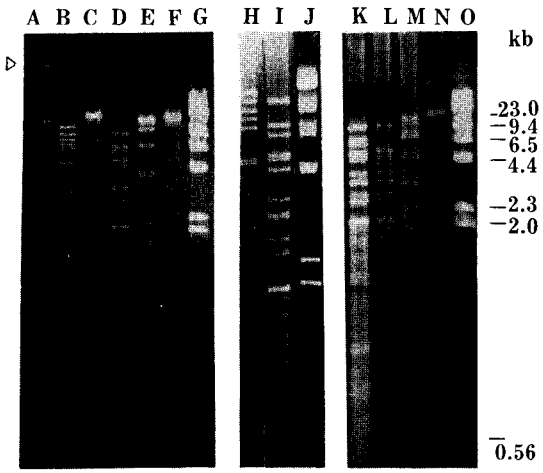

Fig. 2 Restriction enzyme digests of the Km^{r}Cm^r pDK101 plasmids.

Lanes: A, undigested DKC600; B and H, *Eco*RI; C, *Bam*HI; D, I, and K, *Pst*I; E and N, *Sal*I; F, *Hind*III; G, J and O, λ DNA-*Hind*III; L, *Sal*I and *Pst*I; M, *Sal*I and *Eco*RI. Arrow indicates the position of pDK101.

transconjugant인 DKC600(lane F와 G)을 전기영동한 Fig.1에서 확인되었다.

DK1 균주와 conjugation시킨 *E. coli* C600이나 *E. coli* HB101 균주는 모두 본 실험에서 검정한 항생물질에 대하여 민감성을 나타내고 vector로 사용한 pKT 230 plasmid는 Km과 Sm에 내성유전자를 가지고 있으나 그 host 세균인 *P. putida* KT 2440은 Ap와 Cm에 대한 내성유전자를 chromosome에 가지고 있었다. MT1(Ap^{r}Cm^{r}Sm^{r}Su^{r}Tc), MT2(Ap^{r}Cm^{r}Sm^{r}Su^{r}Tc^r) 그리고 MS1(Ap^{r}Km^{r}Sm^{r}Su^r) 균주에서는 Fig.1에서와 같이 각각 5, 6 그리고 2개씩 plasmid를 가지고 있으나 각 유전자의 위치는 아직 확인되지 못했다. 자연계에서 분리된 이들 균주들은 Ap, Km, Su에 특히 높은 내성을 나타냈던 것은 Kim과 Lee(12)의 논문에서도 지적한 바와 같이 항생물질의 남용 가능성이 높은 도시의 하수에서 분리되었기 때문이라 생각된다.

pDK101 plasmid의 제한효소 분석

pDK101 균주가 가지고 있는 Km과 Cm에 대한 내성유전자가 pDK101 plasmid에 있는 것이 확인되어 이 pDK101 plasmid를 순수 분리하여 *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I, *Sal*I, *Hind*III 등의 제한효소로 single 또는 double digestion을 한 후 각 절편을 전기영동한 결과는 Fig.2와 같다. pDK101 plasmid를 *Bam*HI과 *Hind*III로 각각 처리했을 때(Lane C와 F)에 절편이 전혀 나타나지 않았다. 이는 이들 제한효소의 인식부위가 없거나 어떠한 원인으로 효소의 작용이 저해받은 것이 아닌가 생각된다. 그러나 *Eco*RI, *Pst*I 그리고 *Sal*I에 의해서는 각각 16, 32 그리고 6개의 절편이 생성되었고 이들은 크기별로 분석한 결과는 Table 2에서와 같다. 이와 같이

Table 2. Fragments of the Km^{r}Cm^r-pDK101 plasmid after digestion with restriction endonuclease.

Fragment No.	Fragment size (kb)		
	*Eco*RI	*Pst*I	*Sal*I
1	11.0	9.5	22.5
2	9.5	7.0	21.0
3	8.0	6.8	10.8
4	7.3	4.8	8.2
5	7.0	4.4	4.0
6	4.7	2.8	1.3
7	4.0	2.4	
8	2.6	2.2	
9	2.5	2.18	
10	2.3	2.08	
11	2.2	2.06	
12	2.1	2.05	
13	1.4	2.04	
14	1.35	1.35	
15	1.24	1.30	
16	1.20	1.25	
17		1.24	
18		1.20	
19		1.15	
20		1.12	
21		0.92	
22		0.90	
23		0.86	
24		0.84	
25		0.80	
26		0.76	
27		0.68	
28		0.66	
29		0.64	
30		0.62	
31		0.61	
32		0.59	
Total	68.44	67.80	67.80

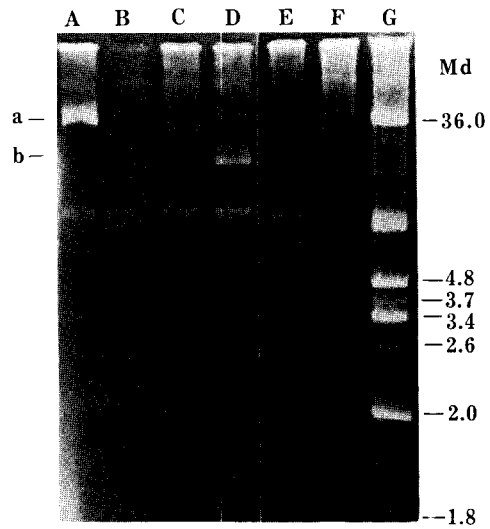

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of vector and hybrid plasmids of the cloned cells.
Lanes: A, DKC601; B, DKC602; C, DKH102; D, DKH103; E, *E. coli* C600; F, *E. coli* HB101; G, *E. coli* V517; a and b, positions of pDT529 and pDT309, respectively.

pDK101 plasmid는 제한효소에 의한 분석결과 Km과 Cm의 내성유전자를 가지고 있는 약 68 kb의 크기이며 *Eco*RI, *Pst*I, *Sal*I의 인식부위를 가지고 있었다.

Kim 등(12)이 자연계에서 분리한 균주에서는 그들이 가지고 있는 9 kb 크기의 $Ap^rCm^rTc^r$ plasmid는 F factor가 없었는데 비해서, 본 연구에서 분석한 pDK101은 68 kb의 plasmid로서 항생제 내성유전자 이외에 transfer origin도 가지고 있어 conjugation을 잘 유도하는 F factor(2, 19)가 있는 것으로 생각된다. 또 transfer origin(*ori*T)를 포함하는 plasmid RK2를 Km에 내성을 띠는 Tn5에 cloning하고 이를 *E. coli*의 chromosome에 삽입시켰을 때 Tn5에 있는 Km 내성은 RK2의 도움으로 Gram 음성세균들 사이에 널리 전이되었다고 Yakobson과 Guiney(20)는 보고했다. 본 연구에서도 빈도는 낮지만 시험한 균주에서 모두 Km^rCm^r유전자의 전이가 일어난 것은 pDK101이 F factor를 가지고 있다는 증거라 할 수 있다.

Km^rCm^r유전자의 cloning

DK1 균주에서 kanamycin과 chloramphenicol 내성유전자를 가지고 있는 pDK101 plasmid에서 Km^r Cm^r유전자의 위치를 파악하고 이들 유전자를 cloning하기 위하여, pDK101과 vector로 이용한 pKT230 plasmid을 *Eco*RI으로 처리한 절편들로부

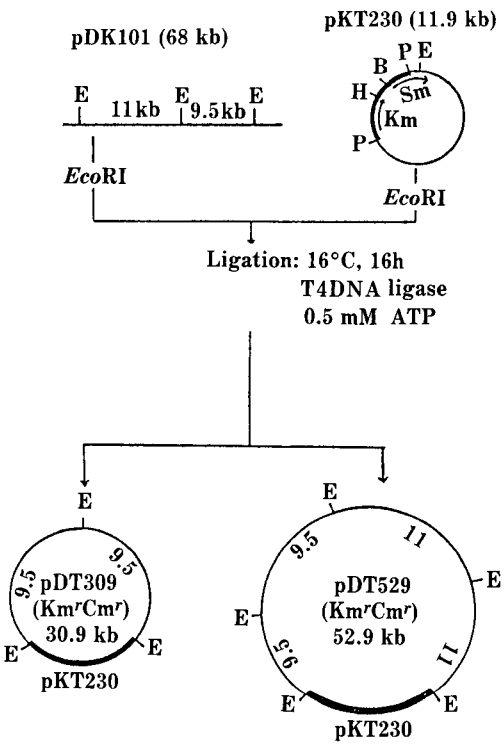

Fig. 4. Construction steps of the hybrid plasmids pDT309 and pDT529, showing resistance to kanamycin and chloramphenicol.
Restriction sites are as follows: *Eco*RI (E), *Pst*I (P), *Bam*HI (B), *Hind*III (H).

터 chimeric plasmid를 제조하였다. 이들 hybrid plasmid를 *E. coli* C600과 *E. coli* HB101에 transformation시켜 Km과 Cm은 hybrid plasmid의 selective marker로 그리고 Su는 competant cell의 seletion marker로 첨가한 LB 고체 배지에서 Km^r Cm^r의 cloned cell을 선발하였다. 그 결과는 Fig. 3에서와 같이 DKC601, DKC602, DKH102 그리고 DKH103의 cloned cell에서 모두 Km과 Cm의 내성이 발현되었으나 DKC602(Lane B)와 DKH102 (Lane C)에서는 전이된 hybrid plasmid를 전기영동사진에서 확인하기 어려웠다. 그러나 DKC601에서는 pDT529가 전이된 것을 Lane A의 <표식 a>에서 hybrid plasmid를 확인할 수 있었고, DKH103에서는 pDT309의 hybrid plasmid가 전이된 것을 Lane D의 <표식 b>에서 확인할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 DK1 균주의 Km^rCm^r유전자가 *E. coli* C600과 *E. coli* HB101에 cloning되어 그 내성이 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, hybrid plasmid의 형성방법은 Fig.4에서와 같이 추정할 수

있었다. pDT309의 hybrid plasmid는 *Eco*RI으로 절개되어 Sm 유전자가 inactivation 된(20) pKT230에 *Eco*RI으로 절단된 pDK101의 9.5 kb 크기의 절편 두 개가 ligation 되어 만들어졌으며, pDT529는 pKT230에 9.5 kb와 11 kb 크기의 절편이 각각 2개씩이 ligation 되어 제조된 것임을 Fig.3의 전기영동 사진에서 확인할 수 있었다.

Dao와 Ferretti(9)의 보고에서는 *E. coli*의 pACYC184(Cm^{r}Tc^r)와 streptococci의 PGB305 (Em^r) plasmid로부터 제조한 chimeric plasmid인 pSA3은 여러가지 제한효소의 인식부위를 갖고 있는데 *Eco*RI이나 *Sal*I으로 *E. coli*에 cloning했을 때에는 Cm에 대한 내성이 없어졌고 *Bam*HI으로 cloning했을 때에는 Tc에 대한 내성이 없어졌다. 그러나 본 실험에서는 *Eco*RI으로 Km^{r}이나 Cm^{r}유전자를 cloning할 때 이들 내성의 상실은 없었다. 오히려 DKC601, DKH102 그리고 DKH103에서는 Km에 대한 저항성이 높아졌다. 이것은 *Streptomyces kanamyceticus*의 Km^{r}유전자를 pIS702 vector에 재조합시킨 pMCP5 plasmid는 *S. lividans*를 비롯한 다른 균주에 전이될 때 Km에 대하여 훨씬 높은 내성을 띈다고 Nakano 등이 보고한 내용(3)으로 뒷받침된다.

그러나 chloramphenicol 내성 세균들은 Shaw 등(21)이 보고한 바와 같이 chloramphenicol acetyltransferase(CAT) 생산균으로서 CAT의 구조 유전자는 그 DNA의 염기서열이 Cm^r transposon인 Tn9과 같다는 것이 알려져 있고, *Staphylococcus aureus*의 pC194 plasmid에서는 CAT 구조 유전자의 크기가 promoter와 함께 1,035 nucleotide로 이루어져 있는 것이 Horinouchi와 Weisblum(22)에 의하여 확인되었지만, 본 연구의 DK1과 MT1, MT2 균주가 가지고 있는 Cm^{r}유전자에 대한 특성은 더 연구할 과제라 생각된다.

요 약

항생물질 내성유전자를 유전자 조작기법으로 재조합시켜 만든 세균에서 그 유전자들이 전이되는 특성을 하폐수의 자연환경에서 연구하기 위하여, 자연계로부터 분리한 Gram 음성세균 중에서 kanamycin (Km), chloramphenicol(Cm), streptomycin(Sm), sulfadiazine(Su)에 내성을 띄는 균주로 DK1을 선발하였다. DK1 균주는 4개의 plasmid를 가지고 있으나 그 중 크기가 약 68 kb인 pDK101 plasmid에 Km^{r}Cm^{r}유전자를 가지고 있었다. 이 pDK101 plasmid에는 *Eco*RI site가 16개, *Pst*I site가 32개, *Sal*I site가 6개씩 있었다. pDK101 plasmid와 vector로 사용한 pKT230을 *Eco*RI으로 처리하여 얻은 절편들로부터 Km^{r}Cm^{r}유전자를 가지는 pDT309와 pDT529 등의 chimeric plasmid를 제조하였다. 이들을 다시 *E. coli* C600과 *E. coli* HB101에 형질전환 시킴으로써, DKC601, DKC602, DKH102 그리고 DKH103 등의 재조합 균주를 얻었다. 이들 재조합 균주에서는 모두 Km^{r}Cm^{r}유전자가 잘 발현되었으며, 그 중 DKC601과 DKH103에서는 각각 pDT529와 pDT309의 chimeric plasmid가 포함되어 있는 것이 전기영동 방법으로 명확히 확인되었다.

사 사

본 연구는 1987년도 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비의 일부에 의하여 이루어졌음.

참고문헌

1. Kimura, S., T. Mizuno, A. Akiba, I. Sasakawa and K. Ikemura: *Med. Biol.* **68,** 61(1964).
2. Hass, M.J. and J. Davies: *Plasmid,* **3,** 260 (1980).
3. Nakano, M.M., H. Mashiko and H. Ogawara: *J. Bacteriol.* **157,** 79(1984).
4. Ehrlich, S.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **74,** 1680 (1977).
5. Ehrlich, S.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **75,** 1433 (1978).
6. Loefdahl, S., J. Sjöström and L. Phillipson: *Gene,* **3,** 149 (1978).
7. Loefdahl, S., J. Sjöström and L. Phillipson: *Gene,* **3,** 161 (1978).
8. Gryczan, T., A.G. Shivakumar and D. Dubnau: *J. Bacteriol.,* **141,** 246 (1980).
9. Dao, M.L. and J.J. Ferretti: *Appl. Environ. Microbiol.,* **49,** 115 (1985).
10. American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater, APHA, Washington, D.C., 16th ed, (1985).
11. Silhavy, T.J., M.L. Berman and L.W. Enquist: Experiments with gene fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1984).
12. Kim, C.K., S.G. Lee and Y.C. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.,* **14,** 245 (1986).
13. Dillon, J.R., A. Nasim and E.R. Nestmann: Recombinant DNA methodology, John Wiley and Sons, Inc.,

Canada (1985).
14. Perbal, B.: A practical guide to molecular cloning, John Wiley & Sons, Inc., Canada, 2nd ed, (1988).
15. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982).
16. Ohnuki, T., T. Katoh, T. Imanaka and S. Aiba: *J. Bacteriol.*, **161,** 1010 (1985).
17. Matsuhashi, M., M.D. Song, F. Ishino, M. Wachi, M. Doi, M. Inoue, K. Ubukata, N. Yamshita and M. Konno: *J. Bacteriol.*, **167,** 975 (1986).
18. Hanahan, D.: *J. Mol. Biol.*, **166,** 557-580 (1983).
19. Lee, S.G. and C.K. Kim: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., **17**(5), **454 (1989).**
20. Yakobson, E.A. and D.G. Guiney, Jr.: *J. Bacteriol.*, **160,** 451 (1984).
21. Shaw, W.V., L.C. Packman, B.D. Burleigh, A. Dell, H.R. Morris and B.S. Hartley: *Nature*, **282,** 20 (1979).
22. Horinouchi, S. and B. Weisblum: *J. Bacteriol.*, **150,** 815 (1982).

(Received August 14, 1989)