KOREAN J. FOOD & NUTRITION
Vol. 5. No. 2. 77~83(1992)

전기천공법에 의한 *Bacillus brevis* P176-2의 형질전환

채 기 수 · 엄 경 일*
경남전문대학 식품영양과, 동아대학교 생물학과*

Transformation of *Bacillus brevis* P176-2 with Plasmid DNA by Electroporation

Ki-Su Chae, Kyung-Il Um*
Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam Junior College, Pusan 616-701, Korea
*Dept. of Biology, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea**

Abstract

The optimum conditions and mechanisms for the plasmid-mediated genetic transformation of intact cells of *Bacillus brevis* P176-2, an extracellular protein producing bacterium, by electroporation were investigated. It was found that pUB110 plasmid DNA can be introduced into intact bacterial cells by electroporation. The frequency of transformation by this electroporation system depended upon the initial electric field strength, the capacity of the electric discharge capacitor, growth stage, number of successive pulses and composition of electroporation buffer. It was effective for transformation that cells were harvested, washed and resuspended with HSM [7 mM HEPES(pH 7.4), 272 mM sucrose, 1 mM $MgCl_2$] electroporation buffer when cell growth was attained to 1.2 at OD_{660}. A maximum frequency of transformation of 2.40×10^4 transformants per μg plasmid DNA was obtained by two succesive pulses with an initial electric field strength of 12.5 kV/cm and with a capacitance of 7.3 μF.

Key words : *Bacillus brevis*, pUB110, plasmid DNA, transformation, electroporation

서 론

유전자 조작을 통하여 cloning한 유전자나 형질을 세포내로 도입하여 발현시키는 것은 유전공학에서 가장 중요한 일이며 그 방법으로는 형질전환, 접합, 형질도입 및 세포융합 등이 있다[1].

형질전환은 추출정제한 DNA(공여체 DNA)가 수용균 생세포로 도입되어 수용균 염색체와 상동적 재조합을 일으켜 새로운 형질이 발현되는 것으로 *Streptococcus pneumoniae*의 유전적 재조합 현상으로 처음 발견되었다. 이러한 현상은 *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis* 등 다른 Gram 양성균에서도 일어나며 특히 *B. subtilis* Marburg주에 대한 형질전환의 방법이나 기구가 잘 연구되어 있다[2].

Corresponding author : Ki-Su Chae

*B. subtilis*의 형질전환 능력은 균의 생리적 조건에 따라 다르나 영양제한의 특정조건하에서 배양하면 대수기를 지난 때부터 형질전환능을 발휘하게 되며 이와 같은 상태를 competence 상태라 한다[3]. 이 상태로 되면 세포는 일정한 길이의 직쇄상 이중사 DNA를 도입하여 단사 DNA를 만든 다음 수용균 염색체에 도입되어 상동부분과 heteroduplex를 형성하고 mismatch repair에 의해 재조합체를 만들어 형질전환이 일어난다[4].

그러나 대부분의 미생물은 외래의 DNA를 도입하는 competence 상태를 나타내지 않기 때문에 물리적, 화학적 또는 물리 화학적 처리에 의해 형질전환시키는 방법을 찾게 되었으며 *Escherichia coli*의 경우 저온에서 Ca^{2+} 처리법[5]과 Gram 양성균, 방선균, 효모 등의 경우에서와 같이 protoplast-PEG(polyethylene glycol) 처리법[6~8] 등이 개발되었다. 이러한 방법들은 유전공학에서 새로운 유전형질을 미생물에 도입하는 방법으로 많이 사용되고 있으나 그 과정이 복잡하고 까다로우며

protoplast화한 세포를 재생[9]하는데 있어서 효율이 낮은 점 등의 이유로 다른 방법을 찾게 되었다.

최근 시도되고 있는 새로운 형질전환법은 전기천공법(electroporation)이다. 이 방법은 생세포에 고전압의 pulse를 가하여 외막에 가역적인 구멍이 생기게 하여 인접한 세포와 융합을 촉진[10]하거나 구멍이 유지되는 동안에 높아진 투과성을 이용하여 세포 내외로 물질의 확산과 교환이 일어날 수 있게 하는 것[11]으로 기존의 방법에 비하여 과정이 간단하고 효율이 높으며 물리, 화학적인 처리가 어려운 세포에도 적용할 수 있는 등의 장점이 있어 동물세포[12, 13], 식물세포[14~18] 및 효모세포[19, 20]와 같은 진핵세포에 외래 DNA를 도입하는데 먼저 사용되었다. 이 방법을 세균세포[21~28]의 형질전환에도 적용하기 위하여 많은 노력을 기울인 결과 간단한 조작으로 기존의 다른 방법과 비슷한 형질전환율을 얻을 수 있으나 진핵세포에 비하여 상대적으로 작은 크기를 가진 세균세포에서 전기자극으로 투과성을 높이기 위해서는 더욱 강력한 전기 pulse가 필요하다고 한다[11, 26].

본 실험에서는 전장강도가 높고 지속시간이 긴 pulse를 발생할 수 있는 장치를 이용하여 균체외 단백질 생산균 *Bacillus brevis* P176-2 균주[29]를 pUB110 plasmid DNA[30]로 전기천공법에 의해 형질전환할 때의 mechanism과 효율성 및 최적조건을 연구하였으며 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 사용균주와 plasmid DNA

Plasmid DNA 공여균으로 *Bacillus subtilis* BD224 (*trp C*2, *thr*-5, *rec E*4)를 사용하였고 plasmid DNA 수용균으로 균체외단백질 생산균 *Bacillus brevis* P176-2균주를 사용하였다.

실험에 사용한 plasmid DNA는 pUB110(Km^r)이며, 이 plasmid를 가지고 있는 *Bacillus subtilis* BD224를 brain heart infusion(BHI) 배지에서 12시간 진탕배양한 후 Birnboim 등[31]의 방법으로 추출하였으며 electroelution법[32]으로 정제하여 사용하였다.

2. 전기천공장치

본 실험에 사용한 전기천공 장치는 稻葉 등[13] 및 五十嵐 등[33]의 것을 참고로 하여 고전압 pulse 발생장치를 제작하여 사용하였으며 capacitor의 조합에 따라 τ=0.05~2 ms, E_0=0~20 kV/cm의 감쇠파 pluse를 발생시킬 수 있었다. 균체와 plasmid DNA의 혼합액에 고전압의 pulse를 가하기 위한 전극(sample holder)은 Calvin 등[24]의 방법에 따라 제작한 것을 사용하였다.

3. 균체현탁액 조제

BHI 배지(Brain heart infusion broth)에 *B. brevis* P176-2 균주를 접종하고 37℃에서 18시간 진탕배양한 다음 0.2 ml를 미리 가온한 BHI배지 10 ml에 넣고 660 nm에서 흡광도가 1.0 정도(약 10^8 cells/ml) 되도록 배양한다. 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 수확하고 냉 electroporation buffer [EPB; 7 mM sodium phosphate, 1 mM $MgCl_2$, 272 mM sucrose(pH 7.4)]로 2회 세척한 다음 균체 pellte를 0.5 ml의 냉 electroporation buffer에 현탁하여 균체현탁액을 조제하였다.

4. 전기천공과 형질전환체 확인

균체현탁액 180 μl에 plasmid DNA 20 μl를 가하고 1분간 강하게 혼합한 다음 0℃에서 5분간 방치한다. 혼합액 20 μl를 미리 냉각시킨 sample holder에 넣고 고전압 전기 pulse를 가한 다음 바로 전량을 Eppendorf tube에 옮기고 0℃에서 10분간 방치한다. 이것을 10^6배까지 단계적 BHI배지로 희석한 다음 50 μg/ml의 kanamycin을 함유하는 BHI 한천평판배지에 0.1 ml씩 도말하고 37℃에서 24시간 배양한 다음 형성된 colony를 계수하여 kanamycine 내성 형질전환체의 CFU (colony forming unit)를 산출하였으며 생존율은 BHI 한천평판배지를 사용하여 전기 pulse를 가한 것과 가하지 않은 것의 CFU의 비율로 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 전장강도의 영향

5.5 μF capacitor 용량에서 5~15 kV/cm의 전장강도를 가지는 pulse를 균체와 plasmid 혼합액에 가하여 본 균주의 형질전환에 전장강도가 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 전장강도가 10

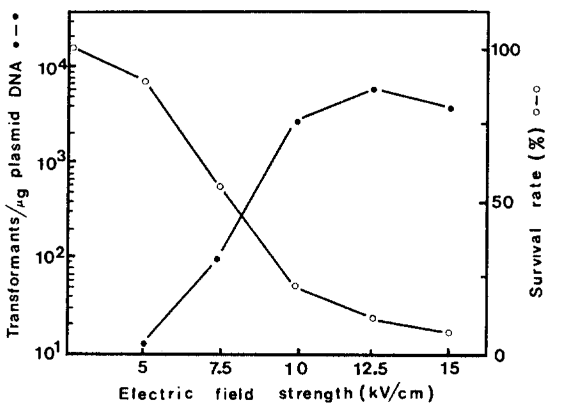

Fig. 1. Effect of initial electric field strength on the frequence of transformation of *Bacillus brevis* P176-2 with pUB110.
The single pulse was applied by an electric discharge method with a capacitance 5.5μF.

kV/cm 이상일 때 형질전환율이 높았으며 12.5kV/cm에서 최고의 형질전환율(3.20×10^3/μg plasmid DNA)을 보였다. 세포생존율은 전장강도가 증가할수록 감소되어 15kV/cm에서 3.5%의 생존율을 보였다.

본 실험에서 사용한 전기천공에 의한 형질전환법은 매우 간단하고 신속하여 16~24 시간내에 형질전환체 colony를 얻을 수 있었으며 *Escherichia coli*의 경우 $CaCl_2$ 처리[5], *Bacillus subtilis*의 경우 protoplast화한 세포를 PEG로 처리하여 형질전환시키는 방법[6, 7]을 대신할 수 있는 새로운 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다. 전기천공에 의한 형질전환에서 이론적으로 전장에 의한 막의 압축이 막의 탄성한계를 넘는 임계전장강도 이상의 고전압 pulse가 세포에 가해지면 국소적으로 막이 파괴되어 구멍이 생기고 DNA와 같은 고분자물질이 통과할 수 있는 투과성이 높은 상태로 된다.[33]. 그러므로 형질전환은 임계전장강도 이상의 고전압 pulse가 가해질 때 일어나며 효율은 구멍의 수, 크기, 지속시간 등에 의존한다. 본 연구에서 전장강도가 10kV/cm 이상에서 높은 형질전환율이 나타나는 것은 세균세포막 파괴임계전장강도가 세포의 크기에 따라 4℃에서 약 7~10kV/cm 정도로 계산되는 것과 관련이 있는 것으로 보인다[11]. 임계전장강도의 2배정도에 해당하는 15 kV/cm에서 형질전환이 낮아지는 것은 높은 전장강도에 의해 막이 비가역적으로 파괴되기 때문이라고 생각된다.

2. Pulse길이의 영향

세포에 가해지는 고전압 pulse의 지속시간이 형질전환율에 어떤 영향을 주는가를 12.5kV/cm의 전장강도에서 2.2~11μF의 capacitor 용량하에서 검토하였다. 그 결과는 Fig. 2에서와 같이 7.3μF의 capacitor가 나타내는 pulse 지속시간에서 가장 높은 형질전환율(1.26×10^4/μg plasmid DNA)이 나타내었다.

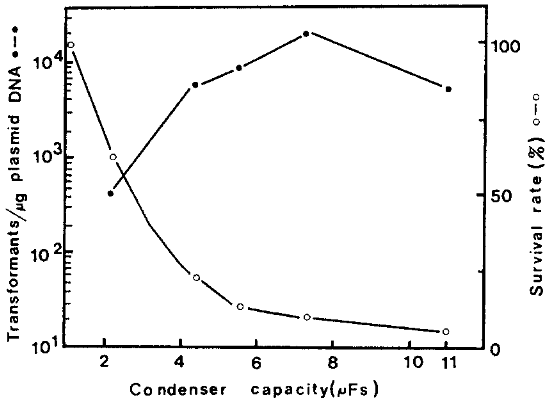

Fig. 2. Effect of discharge capacity on the frequence of transformation of *Bacillus brevis* P176-2 with pUB110.
The initial electric field strength of the single pulse was 12.5kV/cm.

Pulse의 지속시간은 capacitor의 용량, sample holder 전극간의 거리와 면적 그리고 electroporation buffer의 조성에 따라 달라지며 capacitor의 용량이 클수록 pulse의 지속시간이 길어지고 구멍의 크기가 확대된다고 한다. 그러므로 임계전장강도 보다 높은 전장강도에서 pulse의 지속시간이 길어질수록 구멍의 회복에 걸리는 시간은 길어지게 되므로 plasmid DNA가 세포내로 도입될 수 있는 기회가 많아지게 되어 형질전환율이 증가된다. 그러나 구멍의 회복이 늦어질수록 세포의 증식능 회복도 크게 저하되어 생존율이 감소되므로 일정 이상의 pulse 지속시간은 형질전환율을 감소시키는 요인이 되는 것으로 생각된다.

3. 생육기간의 영향

고전압 pulse에 의한 형질전환에서 세포의 생육기간이 미치는 영향을 알아보기 위하여 660 nm에서 흡광도가 0.6에 도달한 때부터 1.5에 도달할 때까지 0.2씩 증가할 때 마다 균체를 수확하여 12.5 kV/cm, 7.3 μF의 pulse 조건하에서 조사하였다. 그 결과는 Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼 대수증식기 중기(中期)정도에서 가장 높은 형질전환율(2.04×10⁴/μg plasmid DNA)이 나타났다. 이러한 결과는 Calvin 등[24]과 Fiedler 등[26]의 보고에서도 볼 수 있는 것으로 葛西 등[11]은 세포의 생육기간에 따라 막의 구성성분이나 안정성이 변화하기 때문에 같은 조건의 pulse를 세포에 가하더라도 pulse에 의해 형성된 plasmid DNA 도입에 유효한 구멍의 수가 달라지므로 생육기간에 따라 형질전환율이 달라지는 것이라고 하였다.

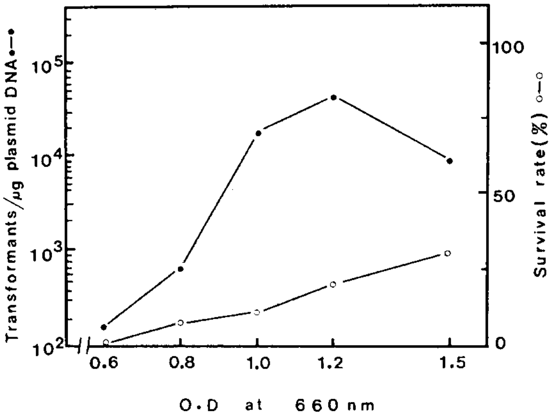

Fig. 3. Effect of growth stage on the frequence of transformation of *Bacillus brevis* P176-2 with pUB110.
The pulse of an initial electric field strength of 12.5 kV/cm with a capacitance of 7.3 μF was applied.

4. Pulse 회수(回數)의 영향

Condenser용량 7.3 μF, 전장강도 10 kV/cm 및 12.5 kV/cm의 pulse를 세포현탁액에 5초간격으로 3회까지 가하여 연속된 pulse의 영향을 조사하여 Table 1에 나타내었다. 전장강도 10 kV/cm의 pulse를 세포에 연속적으로 가하면 형질전환율이 증가하였으며 12.5 kV/cm의 전장강도에서는 2회까지는 증가하지만 3회 pulse를 가하면 감소하였고 세포생존율은 어느 경우든 감소하였다.

연속적으로 pulse를 가했을 때 낮은 전장강도에서는 연속적인 pulse에 의해 형성되는 구멍의 수와 크기가 증가되어 형질전환율이 높아지는 것으로 생각되며 높은 전장강도의 연속적인 pulse를 세포에 가할 때는 Joule 열에 의한 세포현탁액의 온도 상승과 광범위한 비가역적인 막파괴가 일어나기 때문에 생존 증식능이 감소하여 형질전환율이 낮아진다고 생각된다.

다른 연구자들이 보고[21~28]한 바에 의하면 전기천공법으로 완전한 세포를 형질전환시켰을 때 형질전환율은 $1.5\times10^3 \sim 8.1\times10^4$/μg DNA 정도로 나타났다. 사용한 세균과 plasmid의 종류가 다르기 때문에 정확하게

Table 1. Effect of number of successive pulses on the frequence of transformation of *Bacillus brevis* P176-2 with pUB110

Electric field strength (kV/cm)	Number of pulses¹⁾	Transformation frequence (×10⁴ transformants/μg DNA)	Survival rate(%)
10.0	1	0.42	20.8
	2	0.86	14.5
	3	1.07	9.1
12.5	1	1.84	11.2
	2	2.40	6.4
	3	2.34	3.7

1) The pulses of an initial field strength of 10.0 or 12.5 kV/cm with a capacitance of 7.3 μF were successively applied at an interval of 5sec from 1 to 3 times.

Table 2. Effect of various electroporation buffer on the frequence of transformation of *Bacillus brevis* P176-2 with pUB110

Electroporation buffer	Transformation frequence ($\times 10^4$ transformants / μg DNA)	Survival rate (%)
PSM1[a)]	1.64	10.4
PSM2[b)]	1.17	9.4
HSM[c)]	2.32	15.7
TB[d)]	0.92	6.8
SMM[e)]	2.05	12.2

a) PSM1 : 7mM phosphate buffer(pH 7.4), 272mM sucrose, 1mM $MgCl_2$[22)]
b) PSM2 : 5mM phosphate buffer(pH 7.4), 500mM sucrose, 1mM $MgCl_2$[25)]
c) HSM : 7mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid(HEPES), 272mM sucrose, 1mM $MgCl_2$ (pH 7.4)[21)]
d TB : 10% glycerol, 0.2mM K_2HPO_4(pH 7.5)[24)]
e) SMM : 500mM sucrose, 0.01mM maleic acid, 0.01mM $MgCl_2$[27)]

비교하기는 어려우나 본 연구의 결과에서 나타난 2.40×10⁴ / μg DNA의 형질전환율은 매우 양호한 것이라고 생각된다.

5. Elecroporation buffer 조성의 영향

五十嵐 등[32)]에 의하면 전기천공법으로 형질전환할 때 electroporation buffer의 조성은 pulse의 지속시간, 전기전도도, 막의 안정성 및 복원성 등에 영향을 주기 때문에 형질전환에 영향을 미친다고 한다. 그래서 Chassy 등[21)], Aukrust 등[22)], Calvin 등[24)], Powell 등[25)] 그리고 Kusaoke 등[27)]이 사용한 electroporation buffer를 조제하여 세포를 세척하고 현탁하여 capacitor용량 7.3μF, 12.5kV/cm의 전장강도를 가지는 pulse로 시험하였다. 그 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 HSM [7mM HEPES(pH 7.4), 272mM sucrose, 1mM $MgCl_2$]을 사용할 때 가장 높은 형질전환율과 세포 생존율을 보였다.

6. Plasmid 농도의 영향

세포현탁액에 plasmid DNA를 1~100μg/ml 가하여 plasmid의 농도가 형질전환에 미치는 영향을 12.5 kV/cm, 7.3μF의 pulse 조건하에서 알아 보았다. 그 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 plasmid 농도가 높아짐에 따라 어느 정도까지는 직선적으로 형질전환율이

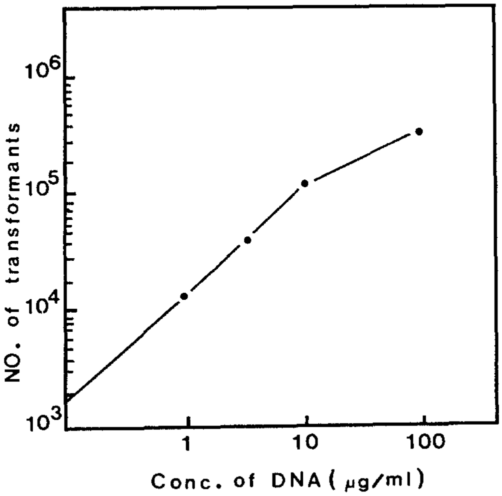

Fig. 4. Effect of plasmid DNA concentration on the frequence of transformation of *Bacillus brevis* P176-2 with pUB110.
The pulse of an initial electric field strength of 12.5kV/cm with a capacitance of 7.3μF was applied.

높아지나 고농도로 되면 형질전환율이 첨가량만큼 증가하지 않음을 볼 수 있었다. 이러한 현상은 주어진 조건하에서 세포막에 형성된 DNA가 통과할 수 있는 유효한 구멍의 수와 plasmid DNA 농도와의 차이에 의해 일어

난 것으로 생각된다. 그러나 높은 plasmid DNA 농도하에서 형질전환율을 높이기 위하여 더욱 높은 전장강도와 지속시간을 가지는 강력한 pulse를 세포에 가하여 세포막에 많은 구멍을 형성시켰더라도 Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 일정 이상의 전장강도와 pulse의 지속시간은 막을 비가역적으로 파괴시켜 생존율의 감소를 가져오게 되므로 실제의 형질전환율은 감소되리라고 생각된다.

적 요

균체외단백질 생산균 *Bacillus brevis* P176-2 균주를 pUB110 plasmid DNA로 전기천공법에 의한 형질전환을 시도하여 본 방법의 유효성과 최적조건을 검토하였다.

본 실험에 사용한 전기천공 장치로 전장강도 12.5 kV/cm, capacitor 용량 7.3 μF의 조건하에서 고전압 pulse를 세포에 가했을 때 가장 높은 형질전환율(1.26×10⁴/μg plasmid DNA)을 나타내었으며 세포 생존율은 10% 정도이었다. 세포의 생육도가 OD_{660}에서 약 1.2정도로 증식하였을 때 세포를 수확하여 형질전환시키는 것이 가장 좋았으며 그 이상의 생육도에서는 세포의 생존율은 증가되지만 형질전환율은 낮아졌다. 전장강도 12.5 kV/cm, capacitor용량 7.3 μF 조건의 pulse를 세포에 2회 연속적으로 가할 때 최대의 형질전환율(2.40×10^4/μg plasmid DNA)을 보였다. 세포의 생존과 pulse의 지속시간에 영향을 주는 electroporation buffer는 7 mM HEPES(pH 7.4), 272 mM sucrose 및 1 mM $MgCl_2$을 함유하는 buffer를 사용하여 세포를 수확하고 현탁하여 형질전환할 때 형질전환율과 세포 생존율이 가장 높았다. 세포현탁액에 첨가되는 plasmid DNA의 농도가 10 μg/ml일 때 까지는 농도에 비례하여 형질전환율이 높아졌으나 그 이상의 농도에서는 비례하지 않았다.

참고문헌

1. 木住雅彦, 堀內忠郎 : 應用分子遺傳學, 講談社, 東京, p.74-80(1986)
2. 石川辰夫, 高橋秀夫, 柳田友道 : 微生物科學 第 5卷 遺傳, 學會出版センタ-, 東京, p.11-15(1985)
3. Bott, K.F. and Wilson, G.A. : Metabolic and nutritional factors influencing the development of competence for transfection of *Bacillus subtilis*, *Bacteriol. Rev.*, **32**, 370(1968)
4. Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E. : Mechanism of intergrating foreign DNA during transformation of *Bacillus subtilis*, *Proc. Natl. Acad. USA*, **75**, 3664(1978)
5. Mandel, M. and Higa, A. : Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, *J. Mol. Biol.*, **53**, 159(1970)
6. Chang, S. and Cohen, S.N. : High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA, *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111(1979)
7. Akamatsu, T. and Sekiguchi, J. : Transformation of *Bacillus* protoplast by plasmid pTP4 DNA, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1617(1982)
8. Beggs, J.D. : Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid, *Nature*, **275**, 104(1978)
9. Bourne, N. and Dancer, B.N. : Regeneration of protoplasts of *Bacillus subtilis* 168 and closely related strains, *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 251(1986)
10. Zimmermann, U. : Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena, *Biochem. Biophysi. Acta*, **694**, 227(1982)
11. 葛西道生, 稻葉浩子 : 高電壓パルスによる細胞穿孔のメカニズム, 蛋白質 核酸 酵素, **31**, 1591(1986)
12. Potter, H., Weir, L. and Leder, P. : Enhancer-dependent expression of immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 7161(1984)
13. 稻葉浩子, 葛西道生, 佐藤弘毅 : 電氣穿孔法による哺乳類細胞への遺傳子導入, 蛋白質 核酸 酵素, **32**, 10(1987)
14. Mehrle, W., Zimmermann, U. and Hampp, R. : Evidence for asymmetrical uptake of fluor-

escent dyes through electro-permeabilized membranes of *Avena* mesophyll protoplasts, *FEBS Lett.*, **185**, 89(1985)

15. Fromm, M.E., Taylor, L.P. and Walbot, V.: Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 5824(1985)
16. Fromm, M.E., Taylor, L.P. and Walbot, V.: Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation, *Nature*, **319**, 791 (1986)
17. Riggs, C.D. and Bates, G.W.: Stable transformation of tabacco by electroporation: Evidence for plasmid concatenation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **83**, 5602(1986)
18. Okada, K., Nagata, T. and Takebe, I.: Introduction of functional RNA into plant protoplsts by electroporation, *Plant Cell Physiol.*, **27**, 619(1986)
19. Karube, I., Tamiya, E. and Matsuoka, H.: Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse, *FEBS Lett.*, **182**, 90(1985)
20. Hashimoto, H., Morikawa, H., Yamada, Y. and Kimura, A.: A novel method for transformation of intact yeast cells by electro-injection of plsmid DNA, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 336(1985)
21. Chassy, B.M. and Flickinger, J.L.: Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation, *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**, 173(1987)
22. Aukrust, T. and Nes, I.F.: Transformation of *Lactobacillus plantarum* with the plasmid pJV1 by electroporation, *FEMS Microbiol. Lett.*, **52**, 127(1988)
23. Allen, S.P. and Blaschek, H.P.: Electroporation-induced transformation of intact cells of *Clostridium perfringens Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2322(1988)
24. Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C.: High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation, *J. Bacteriol.*, **170**, 2796(1988)
25. Powell, I.B., Achen, M.G., Hiller, A.J. and Davidson, B.E.: A simple and rapid method for genetic transformation of lactic Streptococci by electroporation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 655(1988)
26. Fiedler, S. and Wirth, R.: Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation, *Anal. Biochem.*, **170**, 38(1988)
27. Kusaoke, H., Y. Hayashi, Kadowaki, Y. and Kimoto, H.: Optimum conditions for electric pulse-mediated gene transfer to *Bacillus subtilis* cells, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2441(1989)
28. Belliveau, B.H. and Trevors, J.T.: Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by electroporation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1649(1989)
29. 채기수, 엄경일: 균체외단백질 생산균 *Bacillus brevis* P176-2 균주의 동정과 배양조건, 東亞大學校 大學院 論文集, **16**, 373(1991)
30. Gryczan, T.J., Contente, S. and Dubnau, D.: Characterization of *Staphylococcus aureus* plasmids introduced by transformation into *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **134**, 318(1978)
31. Birnboim, H.C. and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513(1979)
32. Yang, R.C.A., Lis, J. and Wu, R.: Elution of DNA from agarose gels after electrophoresis, in *Methods in enzymology* Vol. 68, Wu R.(ed.), Academic press, New York, p.176-182(1979)
33. 五十嵐徹也, 稻葉浩子, 葛西道生: 電氣穿孔法, 遺傳子研究法 III, 高浪滿, 西村暹, 村松正實 編, 東京化學同人, 東京, p. 163-169(1987)

(1992년 9월 23일 수리)