

Pseudomonas sp. 유래 Endo-1,4-β-Glucanase 및 β-1,4-Glucosidase 유전자의 안정성 개선

김양우 · 전성식 · 정영철¹ · 노종수² · 성낙계*

경상대학교 식품공학과, ¹진주전문대학 식품영양과, ²동의공업전문대학 환경공학과

Enhanced Stability of *Pseudomonas* sp. Endo-1,4-β-Glucanase and β-1,4-Glucosidase Gene

Yang-Woo Kim, Sung-Sik Chun, Young-Chul Chung¹,
Jong-Soo Roh² and Nack-Kie Sung*

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

¹Department of Food Nutrition, Chinju Junior College, Chinju, Korea

²Department of Environmental Technology, Donggeui Junior College, Busan 614-715, Korea

Abstract — To improve stability of recombinant DNA pLC1 encoding endoglucanase gene and pGL1 encoding β-glucosidase gene, DNA fragments of genes coding endoglucanase and β-glucosidase were cloned within the *recA* gene on a pDR1453, and the pDRE10 and pDRG20 of recombinant plasmids were integrated into the *recA* gene on the *E. coli* 1100 chromosomal DNAs. The stability of inheritance was completely maintained in *E. coli* 1100; Transformants *E. coli* 1100/pDRE10 and pDRG20 were expressed well by *recA* promoter and increased endoglucanase and β-glucosidase activities. This method can be used as a model to improve the stability of recombinant plasmid in large scale culture.

본 연구실에서 분리된 *Pseudomonas* sp. CYC10과 LBC505는 cellulose를 glucose, cellobiose 또는 oligosaccharide로 분해할 수 있는 endoglucanase, exoglucanase 및 β-glucosidase를 분비하는 균주로서 열안정성과 기질특이성 등의 특성은 섬유성 물질의 생물전환 공정에 이용할 수 있는 잇점이 있으나, 효소생성량이 제한되어 있어 산업적 응용에는 부적합하다.

따라서 *Pseudomonas* sp.로부터 endoglucanase 유전자(1)와 β-glucosidase 유전자(2)를 클로닝하여, 그 유전자의 염기서열을 기초로 강력한 promoter를 함유하고 있는 발현벡터의 이용 및 SD sequence를 site-directed mutagenesis로 변화시켜 효소생성능을 향상시켰다(3, 4).

그러나 숙주세포를 장기간 연속 제대배양 했을 때, 또는 연속배양하는 동안에 재조합 plasmid의 안정성이 저하되어 효소생성능이 감소되는 단점이 발견되었다. 숙주세포에 형질전환된 특정 유전자의 단백질 생산은 그 유전자의 발현량, 분비능 및 안전성에 의해

좌우된다(5-9).

뿐만 아니라 재조합 plasmid의 안정성은 유전자 산물의 생산성을 일정하게 유지시키는데 아주 중요한 역할을 하기 때문에(10) plasmid 안정성 개선을 위한 연구가 배양조건(11), 숙주-벡터체계(12), plasmid의 구조적(13) 및 segregation(14, 15)의 특성 그리고 숙주 염색체 DNA에의 삽입(16) 등을 통하여 진행되어 왔다.

따라서 본 연구는 이러한 문제점을 해결하고자 *Pseudomonas* sp. 유래의 endoglucanase 및 β-glucosidase를 강력한 promoter를 함유한 plasmid와 함께 숙주세포의 염색체 DNA에 재조합시켜 이들 안정성을 향상시키고, 또한 *E. coli* promoter인 *recA* promoter에 subcloning 하여 발현량 증대 실험을 행한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 plasmids

E. coli JM09(17)[*recA*1, *gyrA*96, *thi*2, *hsdR*17, *supE*44, *relA*1λ, (*lac*, *proAB*), (*F'*, *traD*36, *proAB*,

Key words: Stability, *Pseudomonas* sp. endoglucanase gene, β-glucosidase gene

*Corresponding author

lacI^qΔM15]] 및 *E. coli* 1100(18)(*recA*, *endI*)가 숙주세포로 사용되었다.

*E. coli*의 클로닝 vector로는 pUC19와 pDR1453(*tet^r*, *recA⁺*, *srl⁺*), 그리고 이미 본 연구실에서 구축된 재조합 plasmid인 pLC1(endoglucanase, 1)과 pGL1(β -glucosidase, 2)을 각각 이용하였다.

배지 및 배양

E. coli JM109는 LB배지(Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 5 g, per l)로 37°C에서 진탕 배양하였고, *E. coli* 1100은 pDR1453의 *srl⁺*-*recA⁺* 부위가 불안정하기 때문에 먼저 minimal 56 *srl* agar plate(KH_2PO_4 5.5 g, Na_2HPO_4 8.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 29 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g, D-sorbitol 2 g, D-biotin 1 mg, L-arginine 30 mg, L-lysine 30 mg, agar 20 g, per l)에서 2일 배양하여 생성된 colony를 K배지(KH_2PO_4 3 g, Na_2HPO_4 6 g, NH_4Cl 1 g, NaCl 0.5 g, 0.1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , D-sorbitol 4 g, D-biotin 1 mg, caseamino acid 10 g, tetracycline 50 mg, per l)에서 overnight culture 하였다. 이것을 다시 SLBH 배지(KH_2PO_4 2.9 g, K_2HPO_4 12.1 g, Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 20 g, NaCl 4.5 g, glycerol 3.8 ml, per l)로 $\text{O.D}_{590}=0.2\sim0.4$ 되게 희석하여, $\text{O.D}_{590}=5.0\sim8.0$ 되게 배양한 후 0.03N NaOH로 용해시킨 nalidixic acid를 0.5 mg/ml 되게 첨가하여 induction 시켰다(17).

E. coli 형질전환체 분리를 위한 선택배지로는 MacConkey agar 배지가 사용되었다. 그리고 endoglucanase와 β -glucosidase 활성을 나타내는 형질전환체 분리시에는 0.5% CMC, 1% cellobiose가 함유된 LB 고체배지가 선택배지로 사용되었다. 본 실험에서 재조합된 plasmid를 분리할 때 ampicillin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 필요에 따라 각각 첨가하였다.

효소활성 측정

Endoglucanase와 β -glucosidase 활성측정은 전보(1, 2)에서 상술한 방법에 준하여 행하였다.

DNA 조작

염색체 DNA 및 plasmid의 분리, DNA 단편의 회수 및 연결, 형질전환체의 확인, 그리고 전기영동 및 형질전환은 전보(1, 2)와 동일하다.

Southern hybridization

Agarose gel 상의 DNA 단편의 nitrocellulose fil-

ter에 고정은 전보(1, 2)에 기술된 방법에 따라 행하였고, DNA hybridization은 Boehringer Mannheim사의 nonradio active immunoassay kit를 사용하여 수행하였다.

재조합 plasmid의 구축 및 염색체 DNA로의 도입

Pseudomonas sp. LBC505 유래의 endoglucanase 유전자(0.7 kb *HindIII* 단편)와 β -glucosidase 유전자(1.2 kb *E. coRI* 단편)를 pUC19에 클로닝 하여 얻어진 pLC1(1)과 pGL1(2)이 *E. coli* 1100 염색체 DNA의 도입에 필요한 재조합 plasmid 구축에 사용되었다(Fig. 1). 먼저 endoglucanase 유전자를 *recA* 유전자가 함유되어 있는 pDR1453(18)의 *recA* 유전자 부위에 삽입시키기 위하여 pDR1453을 *E. coRI*으로 분해시킨 후 Klenow fragment로 blunting 시켜 *HindIII* linker를 연결하였다. 이 단편에 pLC1의 *HindIII* 단편을 endoglucanase 유전자와 ligation 시켜 재조합 plasmid pDRE10을 구축하였다. pGL1에 삽입되어 있는 β -glucosidase 유전자를 *EcoRI*으로 분해시켜 단편을 회수한 다음 Klenow fragment로 blunting 시켜 *HindIII* linker를 ligation 시켰다. 이것을 *HindIII*로 다시 절단하여 상기의 방법에 의해 *HindIII*로 분해시킨 pDR1453에 ligation 시켜 재조합 plasmid pDRG20을 구축하였다. 구축되어진 재조합 plasmid pDRE10과 pDRG20을 각각 *E. coli* 1100에 형질전환시켜 염색체 DNA와 homologous recombination에 의해 삽입이

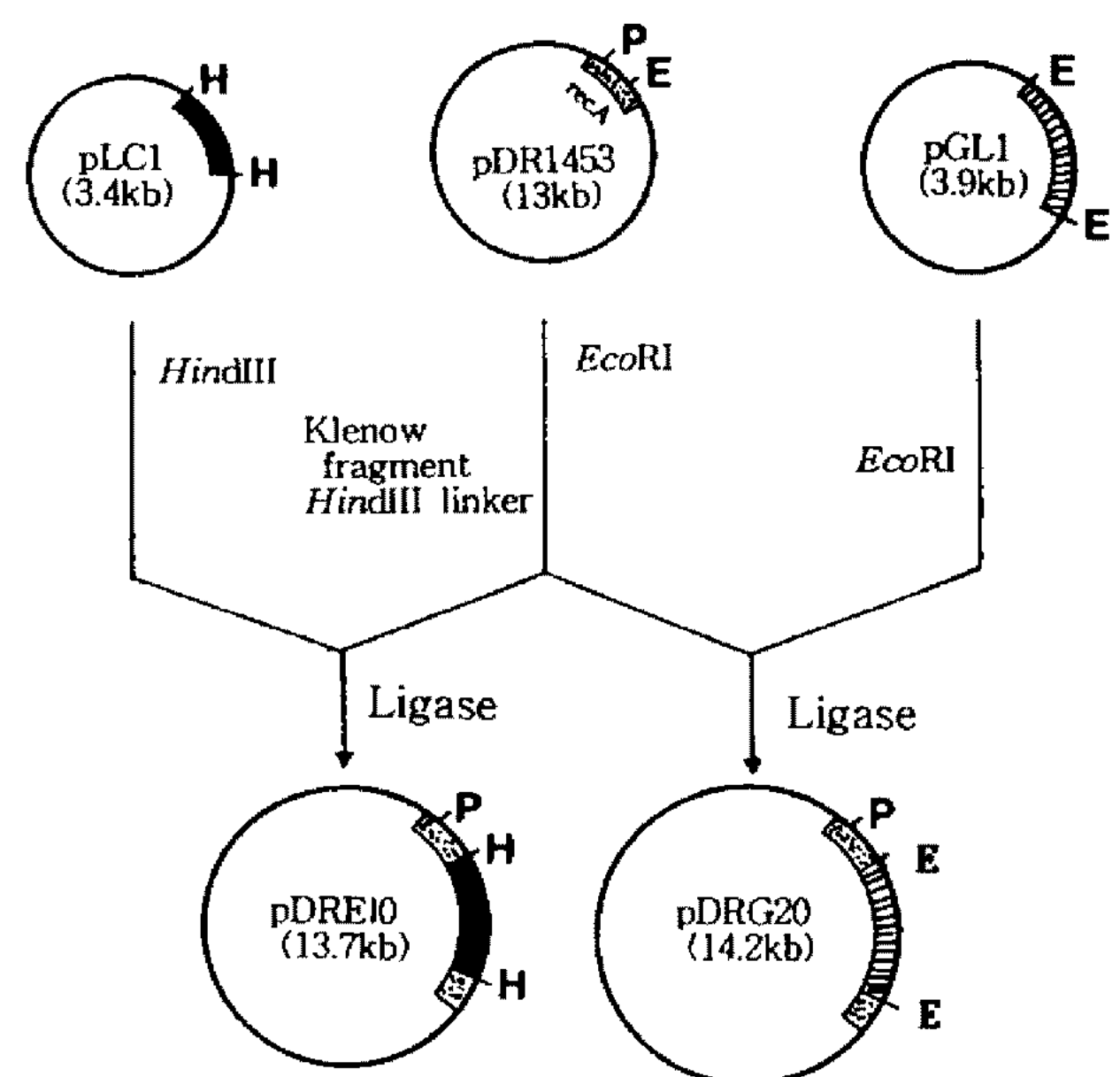


Fig. 1. Construction of recombinant plasmid pDRE10 and pDRG20.

Abbreviations are: H, *HindIII*; P, *PstI*; E, *EcoRI*.

일어나도록 하였다(16).

재조합 plasmid의 안정성 조사

E. coli 1100 염색체 DNA에 삽입된 재조합 plasmid인 pDRE10과 pDRG20의 안정성을 조사하기 위하여 대조구로서 pGL1과 pLC1을 함유하고 있는 *E. coli* JM109와 함께 liquid test(15)를 하였다. 즉 *E. coli* 1100과 JM109를 각각 minimal 56 srl 배지 및 LB 배지에서 약 100세대 동안 배양한 다음 minimal 56 srl과 LB 한천배지에 각각 도말한 다음 생성된 약 5,000개의 colony중에 500개를 항생제 함유 배지와 비함유 배지에 각각 이식하여 항생제 저항성 시험(pDRE10, pDRG20은 tetracycline, pLC1과 pGL1은 ampicillin)을 하였다. 이때 1세대는 대수증식기의 균을 기준으로 20~25분이었고, 4시간 배양 후 새로운 배지에 옮겨 연속 배양을 반복하였다.

결과 및 고찰

Endoglucanase 및 β -glucosidase 유전자의 *E. coli* 염색체 DNA로의 도입

E. coli 1100(*recA*, *endI*) 염색체 DNA에 0.7 kb endoglucanase와 1.2 kb β -glucosidase 유전자를 recombination 시키기 위하여 *recA* 유전자를 함유하고 있는 pDR1453에 ligation 시켰다. 즉 pDR1453의 *recA* 유전자에 존재하는 *EcoRI* 부위에 endoglucanase 유전자와 β -glucosidase 유전자를 삽입시켜 재조합 plasmid인 pDRE10과 pDRG20을 구축하였다(Fig. 1). 재조합된 plasmid의 전기영동상의 확인은 Fig. 2와 같다.

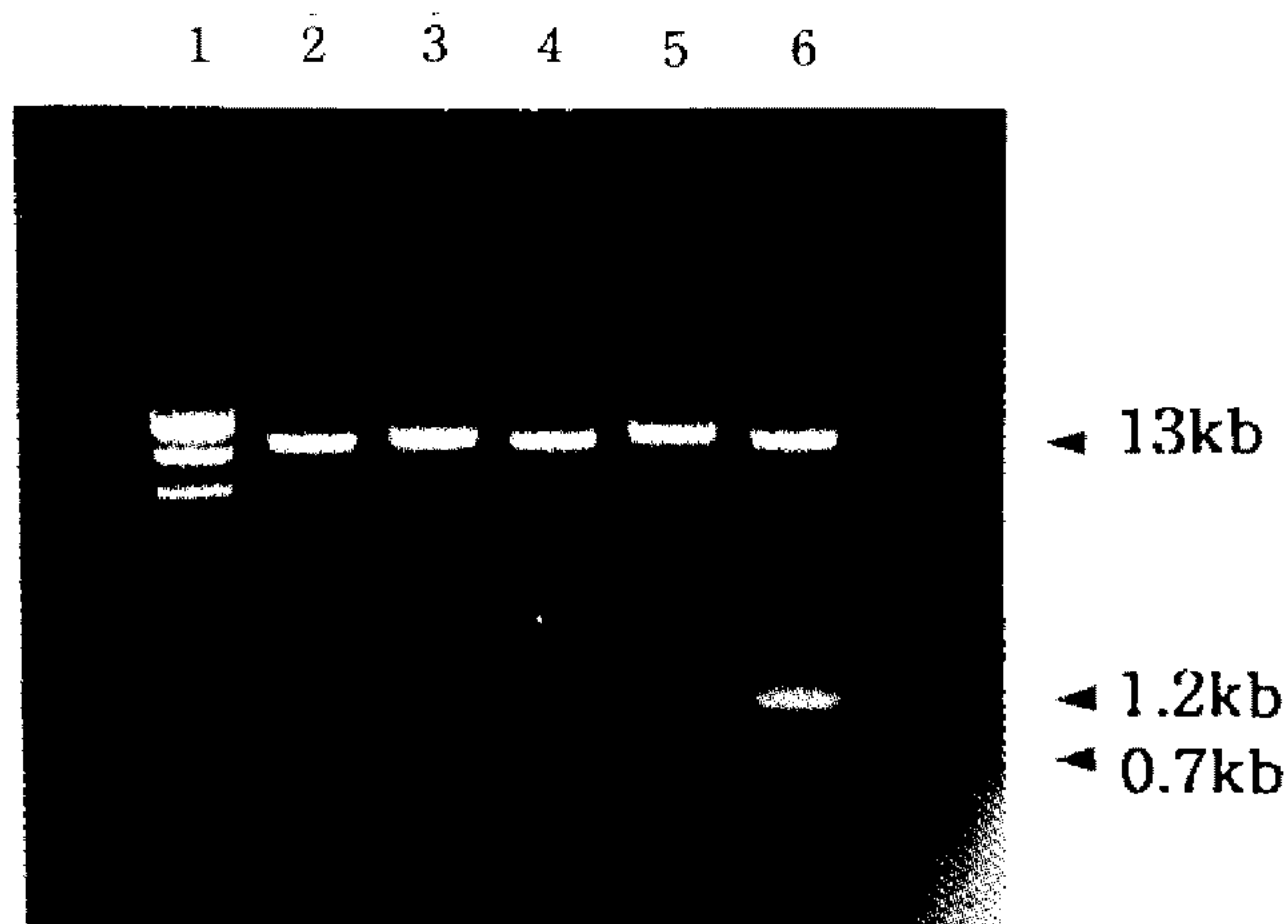


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pDRE10 and pDRG20.

Lane; 1, Size marker (*Hind*III-digested λ DNA); 2, *EcoRI*-digested pDR1453; 3, *Pst*I-digested pDRE10; 4, *Hind*III-digested pDRE10; 5, *Pst*I-digested pDRG20; 6, *Hind*III-digested pDRG20

재조합 plasmid pDRE10과 pDRG20을 숙주세포인 *E. coli* 1100에 형질전환시켜 염색체 DNA와 recombination 일어났는지에 대한 결과를 Southern hybridization으로 확인하였다(Fig. 3, 4).

Endoglucanase 유전자의 안정성 및 효소활성

E. coli 1100 염색체 DNA에 삽입된 endoglucanase 유전자의 안정성은 재료 및 방법에 기술된 방법으로 측정하여 약 100세대 후 plasmid의 안정성과 효소활성으로 조사하였다(Table 1). 이때 대조구로서 multicopy plasmid인 pUC19에 endoglucanase 유전자가 재조합된 pLC1(1)이 사용되었으며 pLC1은 IPTG(1 mM)로, pDRE10은 nalidixic acid(0.5 mg/ml)로 유도시켰고, 각 실험구는 동일 조건에서 5회 반복하였다.

Multicopy plasmid에 함유된 pLC1의 endoglucanase 유전자는 500개의 colony 가운데 4개에서 21개까지 ampicillin 저항성을 상실하였는데, 이들 세포의 70% 정도가 plasmid를 함유하고 있지 않았다. 이들 형질전환체가 생산하는 효소활성도 동일조건하에서 14.3U에서 20.1U까지 변화가 현저하였는데, 이는 plasmid 안정성과 연관성이 있었다.

E. coli 1100의 염색체 DNA에 삽입된 pDRE10은 100세대 후의 5개 실험구 모두에서 100% plasmid

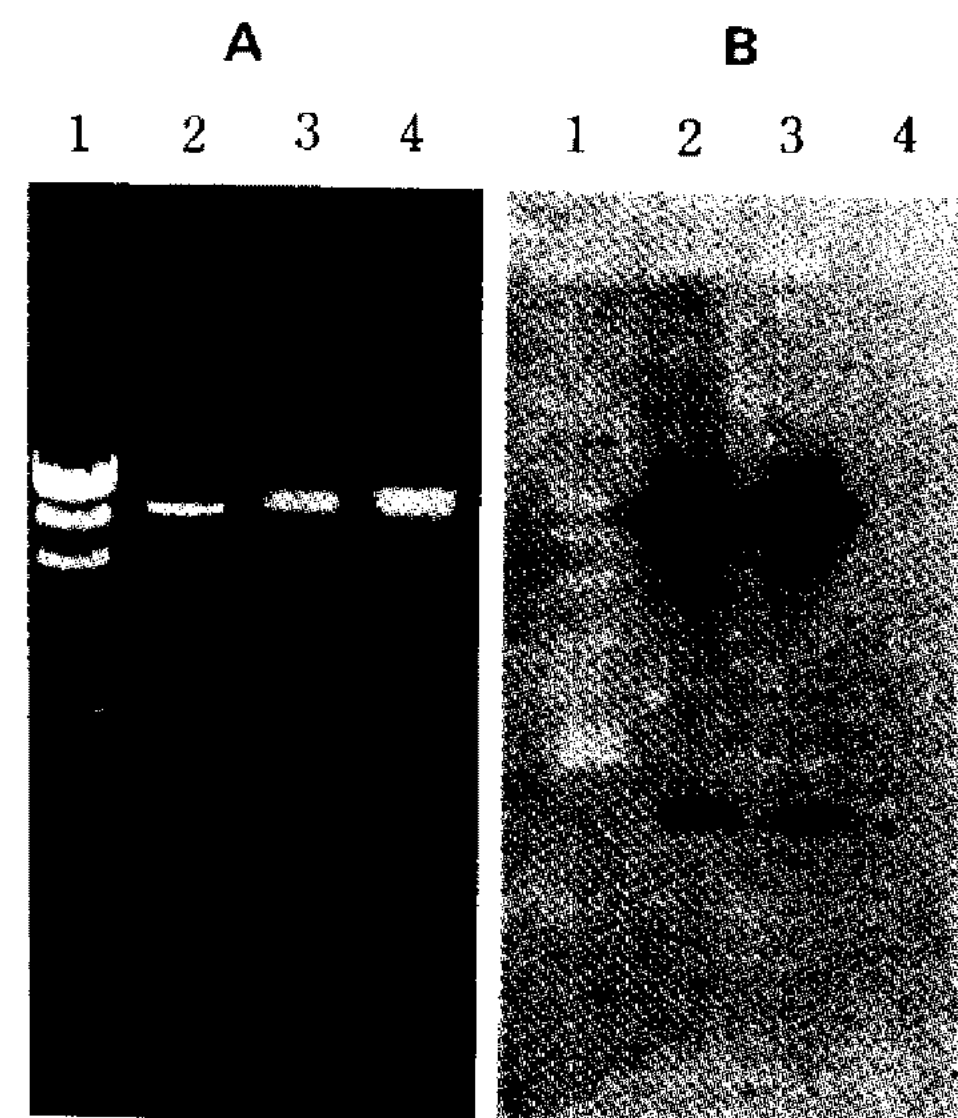


Fig. 3. Southern hybridization of plasmid pDRE10 and *E. coli* 1100 chromosomal DNAs.

A, Agarose (1%) gel electrophoresis of digests of various DNAs.

Lane; 1, Size marker (*Hind*III-digested λ DNA); 2, *Hind*III-digested pDRE10; 3, *Hind*III-digested *E. coli* 1100 transformant chromosomal DNA; 4, *Hind*III-digested *E. coli* 1100 native chromosomal DNA. B, Hybridization analysis of the Southern transfer of the DNAs from the gel A.

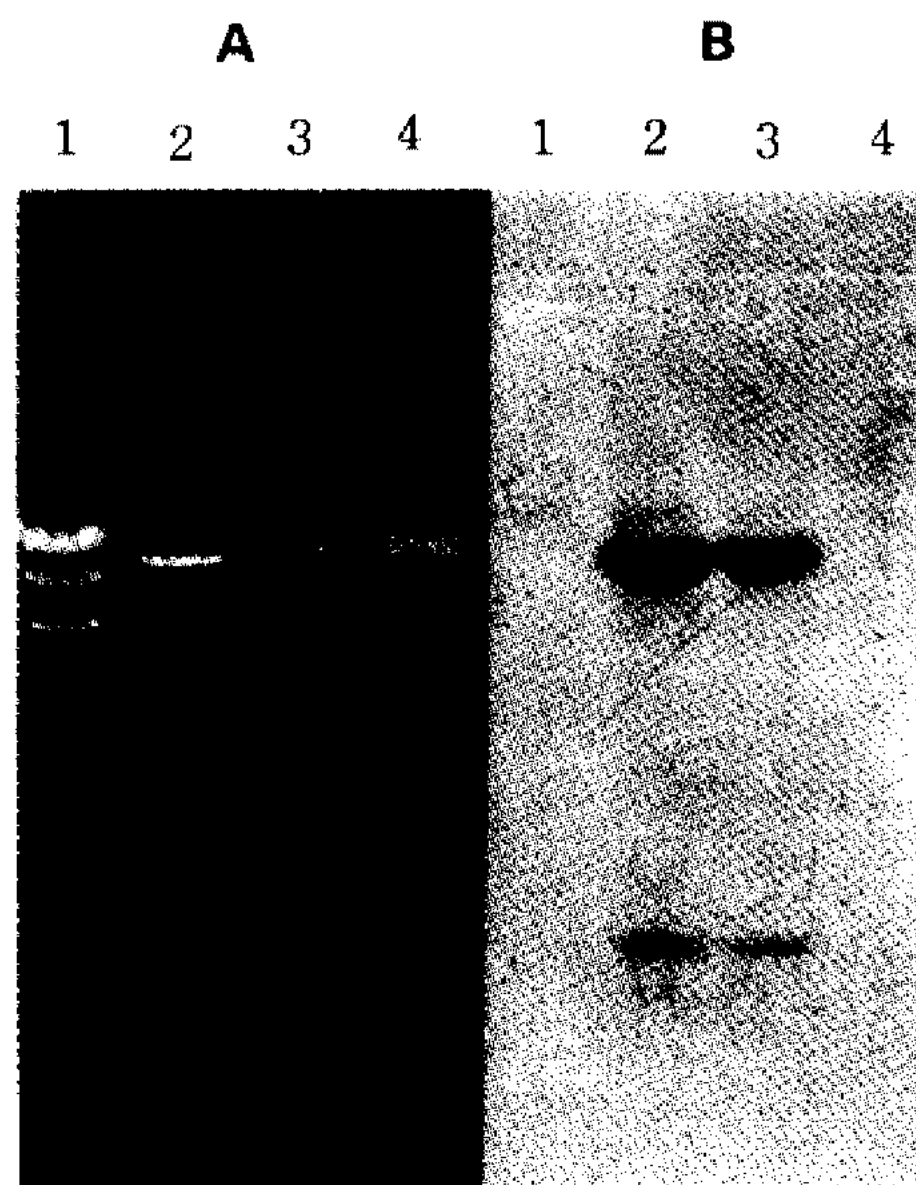


Fig. 4. Southern hybridization of plasmid pDRG20 and *E. coli* 1100 chromosomal DNAs.

A, Agarose (1%) gel electrophoresis of digests of various DNAs.

Lane; 1, Size marker (*Hind*III-digested λDNA); 2, *Hind*III-digested pDRG20; 3, *Hind*III-digested *E. coli* 1100 transformant chromosomal DNA; 4, *Hind*III-digested *E. coli* 1100 native chromosomal DNA. B, Hybridization analysis of the Southern transfer of the DNAs from the gel A.

Table 1. Stability and endoglucanase activity of plasmid pDRE10 and pLC1^a

Plasmid (Host)	Experiment	Plasmid stability ^b (%)	Endoglucanase activity (U) ^c
pLC1 (<i>E. coli</i> JM109)	1	99.4	20.1
	2	99.2	19.1
	3	98.4	17.2
	4	98.6	16.9
	5	96.7	14.3
Average (exps. 1~5)		98.46	17.52
pDRE10 (<i>E. coli</i> 1100)	1	100	14.2
	2	100	13.9
	3	100	14.1
	4	100	14.0
	5	100	14.4
Average (exps. 1~5)		100	14.12

^apLC1 is recombinant plasmid contained endoglucanase gene cloned in pUC19.

^bThe stability of a recombinant plasmid was determined as the ratio of antibiotic resistant cells to antibiotic sensitive cells.

^cEndoglucanase activity was assayed in intracellular and extracellular fractions.

안정성이 확인되었고 또한 효소활성도 13.9~14.4 μ로 거의 일정하게 검출되었다.

재조합 plasmid에 의한 대량의 물질 생산시에 plasmid 손실 cell의 출현은 주로 plasmid의 불안정성 즉, 세포분열시 segregation 불안정성과 plasmid의 자체 변화에 의해 야기되고 또한 이 cell은 plasmid 함유 cell에 비하여 생육속도가 빠르기 때문에 생산성을 크게 감소시킨다(12, 20). 그리고 안정성이 낮은 재조합 plasmid는 균주보관 및 종배양액 조제에 시간과 기술 그리고 특별한 선별 배지가 요구되는 단점이 지적되고 있다(16). 따라서 대량배양시 지속적이고 재현성이 높은 plasmid가 요구되는데 본 실험에서 염색체 DNA에 도입된 재조합 plasmid는 효소활성에 있어서는 multicopy plasmid보다 약간 낮으나 100% plasmid 안정성이 보장되므로 대량생산에 하나의 model이 될 수 있을 것으로 사료된다.

β-Glucosidase 유전자의 안정성 및 효소활성

β-Glucosidase 유전자를 함유하고 있는 형질전환체

Table 2. Stability and β-glucosidase activity of plasmid pDRG20 and pGL1^a

Plasmid (Host)	Experiment	Plasmid stability (%) ^b	β-Glucosidase activity (U) ^c
pGL1 (<i>E. coli</i> JM109)	1	98.4	12.4
	2	99.2	13.8
	3	98.6	12.7
	4	97.2	11.2
	5	96.8	10.4
Average (exps. 1~5)		98.04	12.1
pDRG20 (<i>E. coli</i> 1100)	1	100	10.2
	2	100	10.8
	3	100	10.6
	4	100	10.6
	5	100	10.4
Average (exps. 1~5)		100	10.52

^apGL1 is recombinant plasmid contained β-glucosidase gene cloned in pUC19.

^bThe stability of a recombinant plasmid was determined as the ratio of antibiotic resistant cells to antibiotic sensitive cells.

^cβ-Glucosidase activity was assayed in intracellular and extracellular fractions.

Transformants *E. coli* JM109/ pGL1 and *E. coli* 1100 /pDRG20 were grown for about 2 days in L broth and SLBH medium, respectively.

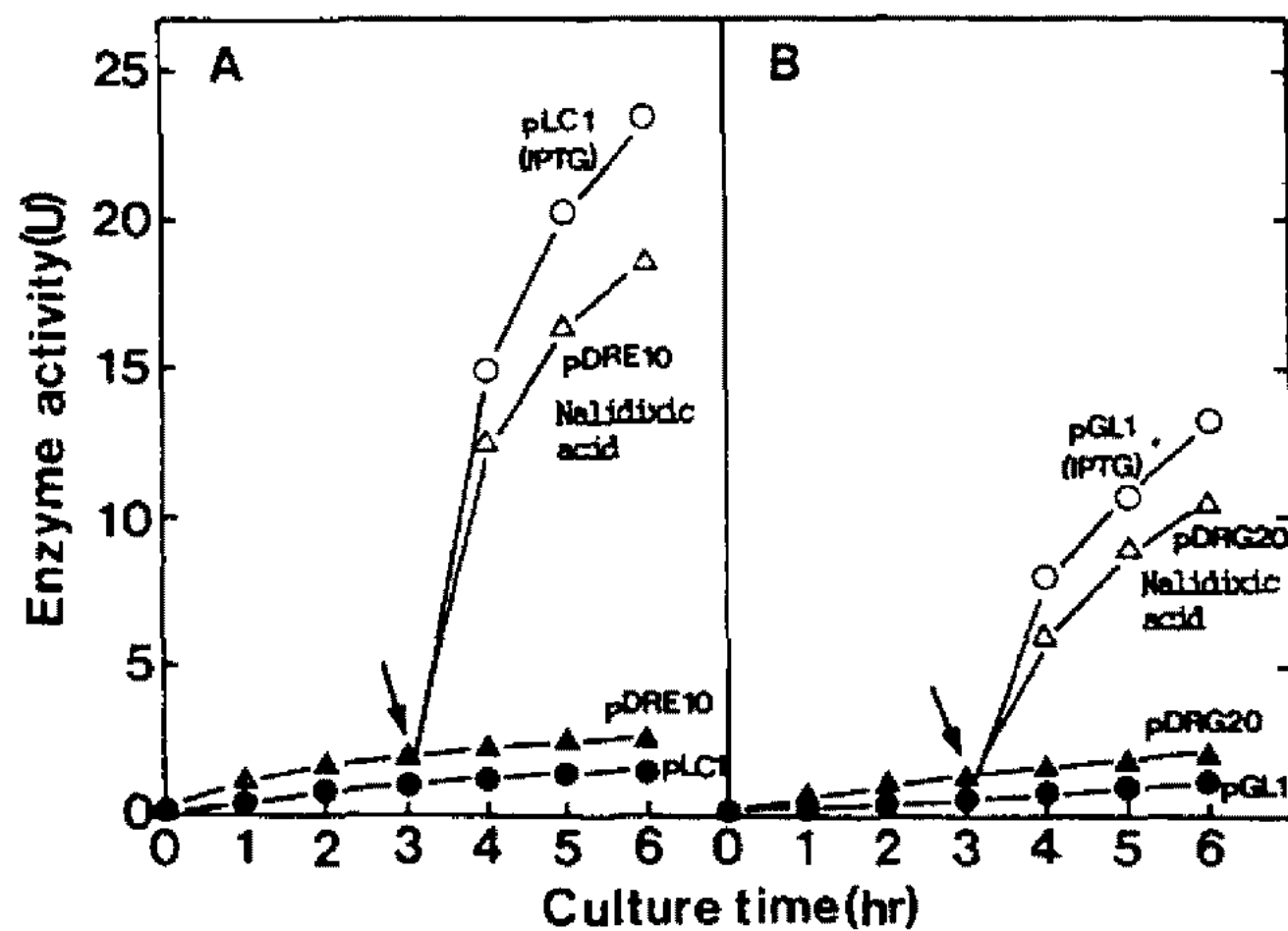


Fig. 5. Induction of endoglucanase (A) and β -glucosidase (B) expression in *E. coli* 1100 and *E. coli* JM109. A: Endoglucanase activities of induced (○: pLC1, IPTG, △: pDRE10, nalidixic acid) uninduced (●: pLC1, ▲: pDRE10), B: β -Glucosidase activity of induced (○: pGL1, IPTG, △: pDRG20, nalidixic acid) and uninduced (●: pGL1, ▲: pDRG20)

E. coli 1100/pDRG20의 안정성도 pDRE10에서와 동일한 방법으로 조사하였으며, 대조구로는 pUC19에 β -glucosidase 유전자가 도입된 pGL1(2)이 사용되었다.

Table 2에서 보는 바와 같이 endoglucanase 유전자와 유사하게 multicopy plasmid에 함유된 pGL1의 불안정성이 관찰되었으며, 이때 효소활성도 약간의 차이를 보였다. *E. coli* 1100 염색체 DNA에 도입된 pDRG20은 100% plasmid 안정성과 거의 일정한 효소생성이 확인되었으며, 이것은 endoglucanase 유전자에서 나타난 결과와 거의 일치된 경향을 보였다.

재조합 plasmid의 효소유도

형질전환체 *E. coli*/pDRE10, pDRG20을 SLBH 배지에 접종하여 배양 3시간 후 ($OD_{590}=5.0\sim 8.0$) nalidixic acid로 유도하여 *recA* promoter에 의해 발현된 endoglucanase와 β -glucosidase 활성을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다.

이때 pLC1과 pGL1이 대조구로 사용되었으며, *E. coli* JM109에 형질전환된 재조합체를 LB 배지에서 배양 3시간 후에 IPTG로 유도되었다.

pDRE10과 pDRG20의 형질전환체를 nalidixic acid로 유도시키면 endoglucanase와 β -glucosidase 활성이 10배 이상 증가하나, IPTG로 유도된 pLC1과 pGL1에 비하면 다소 낮게 나타났다.

이런 결과는 multicopy plasmid인 pLC1과 pGL1에 비하여 pDRE10과 pDRG20은 이 염색체 DNA와 *recA*

promoter에 의존하는 발현체계의 상이함에 기인되는 것으로 추정된다(12, 16, 20).

요 약

이미 분리된 *Pseudomonas* 유래 endoglucanase와 β -glucosidase 유전자의 안정성을 개선하기 위하여 plasmid pDR1453에 존재하는 *recA* promoter의 downstream에 endoglucanase와 β -glucosidase 유전자를 각각 subcloning 하여 재조합 plasmid pDRE10과 pDRG20을 구축하였다. 이 재조합체를 *E. coli* 1100의 염색체 DNA 상에 존재하는 *recA* gene에 도입시켜 plasmid 안정성을 항생물질 저항성으로 조사하였을 때 안정성은 완전히 증가하였음이 확인되었다.

또한 pDRE10과 pDRG20을 함유하고 있는 형질전환체 *E. coli* 1100은 *recA* promoter에 의해 발현이 용이하였고 nalidixic acid의 유도로 각각 endoglucanase와 β -glucosidase 생성을 촉진시켰다.

염색체 DNA에 재조합 plasmid의 도입으로 인한 plasmid 안정성 및 효소활성 개선은 대량배양에 의한 물질생산에 하나의 모델로서 사용할 수 있을 것으로 예상된다.

참고문헌

1. Chung, Y.C., Y.W. Kim, S.K. Kang, J.S. Rho and N.K. Sung. 1990. Molecular cloning and expression of cellulase gene of *Pseudomonas* sp. in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18** (6): 633-639.
2. Kim, Y.W., S.S. Chun, S.J. Kim, Y.C. Chung and N.K. Sung. 1993. Cloning and expression of β -1,4-glucosidase gene from *Pseudomonas* sp. in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**(2): 113-118.
3. Chun, S.S., Y.W. Kim, Y.C. Chung, K.S. Kim and N.K. Sung. 1995. High-level expression of *Pseudomonas* sp. LBC505 endoglucanase gene in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol. Biotech.* **5**: 14-17.
4. Chung, Y.C., K.S. Kim, Y.W. Kim, S.S. Chun and N.K. Sung. 1995. Overproduction of *Pseudomonas* sp. LBC505 endoglucanase in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Microbiol. Biotech.* **5**: 18-21.
5. O'Neill, G.P., D.G. Kilburn, R.A.J. Warren and R.C. Miller. 1986. Overproduction from a cellulase gene with a high guanosine-plus-cytosine content in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 737-743.
6. Schwarz, W.H., S. Schimming and W.L. Staudenbauer. 1987. High-level expression of *Clostridium*

- thermocellum* cellulase genes in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 50-56.
7. Siegel, R. and D.Y. Ryu. 1985. Kinetic study of instability of recombinant plasmid pPLc23 *trpA*I in *Escherichia coli* using two-stage continuous culture system. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 28-29.
 8. Gentz, R., A. Langner, A.C.Y. Chang, S.N. Cohen and H. Bujard. 1981. Cloning and analysis of strong promoter is made possible by the downstream placement of RNA termination signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**(8): 4936-4940.
 9. Shibui, T., M. Uchida-Kamizono and Y. Teranishi. 1988. A method for overproduction of a protein of a target gene in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* **52**(9): 2231-2241.
 10. Caulcott, C.A., A. Dunn, H.A. Robertson, N.S. Cooper, M.E. Brown and P.M. Rhodes. 1987. Investigation of the effect of growth environment on the stability of low-copy-number plasmid in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1881-1889.
 11. Immanaka, T. and S. Aiba. 1981. A perspective on the application of genetic engineering: Stability of recombinant plasmid. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **369**: 1-14.
 12. Kumar, P.K.R., H.E. Maschke, K. Friebs and K. Schugerl. 1991. Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. *Trends Biotech.* **9**: 279-284.
 13. Shoham, Y. and A.L. Demain. 1991. Kinetics of loss of a recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*. *Biotech. Bioeng.* **37**: 927-935.
 14. Lee, J.H., J.D. Jang and K.J. Lee. 1992. Segregational instability of a recombinant plasmid pDML6 in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol. Biotech.* **2**: 129-134.
 15. Nordstrom, K., S. Molin and K. Aagaard-Kansen. 1984. Maintenance of bacterial plasmid: Comparison of theoretical calculations and experiments with plasmid RI in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 1-7.
 16. Makino, S., T. Sato, T. Shibata and T. Ando. 1986. Large scale production of a polypeptide by the recombinant DNA technique: A strain with a gene for the polypeptide on a multicopy plasmid and a strain with the gene on the chromosome. *Agric. Biol. Chem.* **50**(2): 501-504.
 17. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. **33**: 103-119.
 18. Sancar, A. and W.D. Rupp. 1979. Physical map of the *recA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 3144-3148.
 19. Shibata, T., L. Osber and C.M. Radding. 1983. Purification of *recA* protein from *Escherichia coli*. *Methods In Enzymol.* **100**: 197-218.
 20. Summers, D.K. 1991. The kinetics of plasmid loss. *Trends Biotech.*, **9**.

(Received 7 April 1995)