

## *Thermus thermophilus* HJ6 유래 내열성 DNA Polymerase의 유전자 클로닝 및 발현

서민호<sup>1</sup> · 김부경<sup>1</sup> · 곽평화<sup>1</sup> · 김한우<sup>3</sup> · 김연희<sup>1,2</sup> · 남수완<sup>1,2</sup> · 전송중<sup>1,2\*</sup>  
동의대학교 <sup>1</sup>생명공학과, <sup>2</sup>바이오물질제어학과, <sup>3</sup>산업기술종합연구소

**Gene Cloning and Expression of Thermostable DNA Polymerase from *Thermus thermophilus* HJ6.** Seo, Min-Ho<sup>1</sup>, Bu-Kyoung Kim<sup>1</sup>, Pyung-Hwa Kwak<sup>1</sup>, Han-Woo Kim<sup>3</sup>, Yeon-Hee Kim<sup>1,2</sup>, Soo-Wan Nam<sup>1,2</sup>, and Sung-Jong Jeon<sup>1,2\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Biotechnology & Bioengineering, <sup>2</sup>Department of Biomaterial Control (Brain Korea 21 program), Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, <sup>3</sup>Research Institute of Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Osaka 563-8577, Japan - The gene encoding *Thermus thermophilus* HJ6 DNA polymerase (Tod) was cloned and sequenced. The open reading frame (ORF) of the *Tod* gene was composed of 2,505 nucleotides and encoded a protein (843 amino acids) with a predicted molecular weight of 93,795 Da. The deduced amino acid sequence of *Tod* showed 98% and 86% identities to the *Thermus thermophilus* HB8 DNA pol and *Thermus aquaticus* DNA pol, respectively. The *Tod* gene was expressed under the control of the bacteriophage  $\lambda$  promoters PR and PL on the expression vector pJLA503 in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) codon plus. The expressed enzyme was purified by heat treatment, HiTrap<sup>TM</sup> Q column, and HiPrep<sup>TM</sup> Sephacryl S-200 HR 26/60 column chromatographies. The optimal temperature and pH for DNA polymerase activity were found to be 75~80°C and 9.0, respectively. The optimal concentrations of Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> were 2.5 mM and 1 mM, respectively. The enzyme activity was activated by divalent cations, and was inhibited by monovalent cations. The result of the PCR experiment with *Tod* DNA polymerase indicates that this enzyme might be useful in DNA amplification and PCR-based applications.

**Key words:** DNA polymerase, PCR, *Thermus thermophilus*, pJLA503

### 서 론

DNA polymerase는 그 기능상 모든 생물이 가지고 있는 것으로 생각되고 아미노산 서열이 밝혀짐에 따라 최근에는 family A, B, C, D, X의 5종류로 분류 되고 있다[1, 2]. 그 중 Family A는 대장균 DNA polymerase I으로 대표되는 Pol I family이고, B는 eukaryotic DNA polymerase  $\alpha$ 로 대표되는  $\alpha$ -family로 분류된다. Family C는 대장균 DNA polymerase III, D는 고세균 DNA polymerase II, X는 eukaryotic DNA polymerase  $\beta$ 와 Terminal transferase로 각각 대표된다. 같은 family에 속하는 것은 공통의 아미노산 서열을 가지고 있고 효소의 생화학적 성질, 예를 들면 DNA 합성속도, 합성되는 nucleotide의 수, 주형-primer 종류에 대한 선호성이나 저해제에 대한 감수성에 있어서 유사하다. 한편, Polymerase Chain Reaction (PCR)[13]에 사용할 수 있는 DNA polymerase의 절대 조건은 내열성이므로 호열성 세

균 및 초호열성 고세균이 가지고 있는 DNA polymerase가 대상이 되고, 진정세균 유래는 Pol I family에 속하고 고세균 유래는  $\alpha$ -family에 속한다[2].

내열성 DNA polymerase로 처음 특성이 밝혀진 Taq DNA polymerase[5]은 *Thermus aquaticus*로부터 분리되었고 이후 많은 *Thermus* 속 세균으로부터 Tfl polymerase[7], Tth polymerase[12], Tca polymerase[11], Tfi polymerase[6], Top polymerase[9] 등이 분리되어 PCR에 적용되고 있다. 현재 PCR을 사용하는 적용분야는 점점 증가하는 추세에 있어 그에 따른 다양한 종류의 내열성 DNA polymerase에 대한 요구도 커지고 있다.

본 연구에서는 온천수에서 분리한 호열성 *Thermus thermophilus* HJ6 균주로부터 DNA polymerase 유전자를 클로닝하고 염기서열을 결정하였다. 또한 온도 감수성 프로모터를 포함하는 pJLA503 벡터시스템[14]을 이용하여 isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG)와 같은 고가 유도기질의 사용 없이 재조합 DNA polymerase를 생산·정제하고 본 효소의 DNA 중합 활성을 분석하였다.

\*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2278, Fax: 82-51-890-2632

E-mail: jeon.sj@deu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 *Thermus thermophilus* HJ6 균주는 일본의 Arima 온천수에서 분리한 것을 사용하였다[8]. 분리균주 HJ6은 ATCC medium 697(8 g polypeptone, 4 g yeast extract, 4 g/L NaCl, pH 7.5)를 사용하여 80°C에서 배양하였다. 대장균 DH5 $\alpha$ 와 BL21(DE3) codon plus(Novagen, Inc., San Diego, CA, USA)는 각각 클로닝 및 발현을 위한 균주로 사용하였다. 플라스미드 pGEM-T vector(Promega, Madison, WI, USA)는 유전자 클로닝과 염기서열 분석을 위해 사용하였고, pJLA503 플라스미드는 일본 오사카대학 Kanaya 연구실에서 분양 받은 것으로 단백질 발현을 위해 사용하였다.

### 유전자 클로닝 및 염기서열 분석

*Thermus thermophilus* HJ6 균주의 염색체는 GeneAll<sup>R</sup> GENEx Genomic kit(GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. *T. thermophilus* HJ6 유래 DNA polymerase(Tod, Top Of DNA polymerase)의 유전자를 클로닝 하기 위하여 게놈 염기서열이 밝혀진 *Thermus thermophilus* HB8과 HB27의 DNA polymerase 유전자 염기서열을 바탕으로 각각 개시코돈의 상류와 종결코돈의 하류에 해당하는 두가지 primer(Primer 1: 5'-caggtggccctggagtagcatg-3', primer 2: 5'-tctaacggcaggcccccca-3')를 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. PCR은 Pfu DNA polymerase를 사용하여 약 2.5 kb의 DNA 단편을 증폭하였고 pGEM-T 벡터에 클로닝한 후, pGEMTOD라고 명명하였다. 클로닝 된 DNA 단편의 염기서열은 ABI Prism 3700 genetic analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA)를 사용하여 분석하였다.

### Tod DNA 중합효소 생산 및 정제

온도 감수성 프로모터(PR, PL)를 포함하는 발현 벡터 pJLA503[14]에 DNA polymerase 유전자를 클로닝하기 위하여 pGEMTOD plasmid를 주형으로 Primer 3(5'-ctggagtcatatggaggcgcatt-3', 밑줄은 *Nde* I 부위)과 Primer 4(5'-tggaattcctaacccttggcggaa-3', 밑줄은 *Eco* RI 부위)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 2.5 kb의 DNA 단편은 *Nde* I 과 *Eco* RI로 절단한 후 같은 효소로 절단한 pJLA503 벡터에 연결하고 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환 하였다. 클로닝 된 plasmid를 pJLATOD로 명명하고 *E. coli* BL21(DE3) codon plus에 다시 형질전환한 후 2  $\times$  YTA 배지(tryptone 16 g/L, yeast extract 10 g/L, NaCl 5 g/L, ampicillin 100  $\mu$ g/mL)에서 30°C로 20시간 전배양 하였다. 전배양액의 1%를 새로운 2  $\times$  YTA 배지에 접종한 후, 흡광도(A<sub>600</sub>)가 0.6이

되었을 때 42°C로 온도를 올려 5시간 동안 유도배양 하였다. 배양된 균체는 원심분리를 통하여 집균하고 buffer A(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM dithiothreitol)에 녹인 다음 초음파로 파쇄 하였다. 초음파 파쇄 후 세포추출물은 80°C에서 20분간 열처리한 후 원심분리 하여 상등액을 회수하였다. 상등액은 ÄKTAprime(GE Healthcare)을 이용하여 buffer A로 평형화시킨 HiTrap<sup>TM</sup> Q column(GE Healthcare)에 로딩한 후 0~1.0 M의 NaCl로 농도구배를 주어 결합된 단백질을 용출하였다. 용출된 핵분은 DNA 중합효소 활성을 측정 한 후 활성이 있는 핵분을 모아 Amicon(Milipore) filter로 농축한 다음 buffer B(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol)로 투석하였다. 투석액은 buffer B로 평형화된 HiPrep<sup>TM</sup> Sephacryl S-200 HR 26/60 column(GE Healthcare)에 로딩하고 buffer B를 이용하여 용출 하였다. 용출된 단백질의 정제도는 SDS-PAGE(10% acrylamide gel)를 통하여 확인하였고, 전기영동 밴드는 coomassie staining으로 확인하였다.

### 프라이머와 PCR 조건

PCR에 사용한 프라이머는  $\lambda$ -phage DNA를 주형으로 하여 1, 2, 4, 6, 8 kb의 DNA단편을 증폭할 수 있게 설계되었다. 프라이머의 염기서열은 다음과 같다: primer 1(7131-7153) 5'-GATGAGTTCGTGTCCTCAACT-3'(forward); primer 2(8111-8130) 5'-GGCGTACCTTTGTCTCACGG-3'(reverse); primer 3(9111-9131) 5'-TAGCTGTCGTCATAGGACTC-3'(reverse); primer 4(11101-11120) 5'-CTTAACCAGTGC-GCTGAGTG-3'(reverse); primer 5(13121-13140) 5'-CCA-CATCCATACCGGGTTTC-3'(reverse); primer 6(15121-15130) 5'-CGGCGGTAAAGAATGATCCG-3'(reverse). PCR 혼합물(50  $\mu$ L)은 25 mM Tris-HCl(pH 9.0), 0.25 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% tween-20, 0.1  $\mu$ M  $\lambda$ -phage DNA, 2.5 pmol primers, 0.1  $\mu$ g Tod DNA polymerase를 포함한다. PCR 조건은 94°C, 5분간의 변성단계를 거쳐 94°C에서 1분, 64°C에서 1분, 72°C에서 1분간을 25회 반복 수행하고 72°C에서 5분간 마지막 신장반응을 수행하였다. 그리고 증폭하려는 DNA 단편의 길이에 따라 신장 반응 시간을 다르게 조절하였다. 증폭된 DNA 단편은 densitometry(Gel-Pro Analyzer 3.1, MediaCybernetics, MD, USA)를 사용하여 정량 분석하였다. Taq(Takara)와 pfu(Promega) DNA polymerase를 사용한 PCR은 제조사에서 제시된 방법에 따라 수행하였다. PCR 반응이 종료한 후 반응액과 동일 용량의 stop solution(60 mM EDTA and 60 mM NaOH)을 첨가하고 5  $\mu$ L의 샘플을 1.0% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr(ethidium bromide)로 염색하여 증폭된 밴드를 확인하였다.



*mophilus* HJ6의 염색체로부터 클로닝 한 유전자는 Pol I family에 속하는 DNA polymerase(Tod, Top Of DNA polymerase)(NCBI accession No. EU708319)를 암호화하는 것으로 예상되었다.

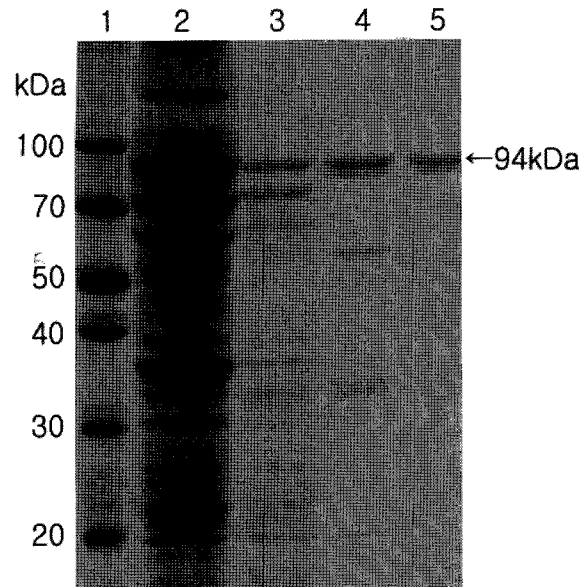
#### Tod DNA polymerase의 생산

온도 감수성 프로모터(Tandem promoter)를 포함하는 pJLA503 벡터시스템을 이용하여 Tod 유전자를 클로닝하고 plasmid pJLATOD로 명명하였다. 여기서 효소 생산을 위한 숙주균으로는 *E. coli* BL21(DE3) codon plus 균주를 사용하였다. Tod 유전자에는 대장균에서 잘 사용되지 않는 rare codon을 다수 가지고 있기 때문에 rare tRNA 합성효소가 보강된 codon plus 균주를 사용하였다. Plasmid pJLATOD로 *E. coli* BL21(DE3) codon plus를 형질전환하고 30°C에서 배양하여 세포성장이 600 nm에서 흡광도가 0.5~0.6에 도달하였을 때 온도를 42°C로 올려 단백질의 생산을 유도하였다. 배양한 세포를 초음파로 파쇄하고 80°C에서 20분간 열처리한 후, HiTrap™ Q 컬럼 및 HiPrep™ Sephacryl S-200 컬럼으로 정제하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 약 94 kDa 부위에서 DNA polymerase의 밴드가 확인되었다(Fig. 2). 이 밴드의 분자량은 DNA polymerase의 아미노산 서열에서 계산된 분자량과도 잘 일치하였다.

#### Tod DNA polymerase의 생화학적 특징

Tod polymerase를 PCR에 적용하기 위하여 재료 및 방법에서 언급한 바와 같이 주형인  $\lambda$ -phage 및 primer 1과 2를 사용하여 DNA 중합 활성을 측정하였다. Tod polymerase의 pH 의존성은 pH 7.5~10.0의 범위에서 측정하였다. Buffer로는 50 mM Tris-HCl(pH 7.5~9.0)과 50 mM Glycine-NaOH(pH 9.0~10.5)을 사용하여 활성을 측정한 결과, 본 효소의 최적 pH는 9.0을 나타내었다(Fig. 3A). 이것은 다른 PCR 상업용 효소인 Taq polymerase, Vent polymerase, pfu polymerase의 최적 pH(pH 8.5~9.0)와 비슷한 양상을 나타내었다. Tod polymerase의 온도 의존성은 50~90°C 범위에서 측정된 결과, 최적 온도는 75~80°C를 나타내었고(Fig. 3B) 85°C 이상에서는 활성을 보이지 않았다.

Tod polymerase의 2가 양이온에 대한 영향을 검토하기 위해  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ 를 사용하였다.  $Mg^{2+}$ 과  $Mn^{2+}$ 에 대한 최적 농도는 각각 2.5 mM과 1 mM로 나타났다. 또한 2가 양이온이 없는 조건에서는 활성을 나타내지 않아서 본 효소의 DNA 합성 반응에는 2가 양이온을 반드시 요구하는 것으로 나타났다.  $Mg^{2+}$ 에 의한 Tod polymerase의 활성은 다른 DNA polymerase의  $Mg^{2+}$  이온에 대한 효과와 일치하였다[4].  $Mn^{2+}$ 에 대한 Tod polymerase의 최대 활성은  $Mg^{2+}$ 에 대한 최대 활성과 비슷하여 대부분의 DNA polymerase가  $Mn^{2+}$ 에 대한 낮은 활성을 나타내는 것과 비교하여 상이한 결과를 나타냈다(Fig. 3C)[3, 4]. Tod polymerase의 KCl 농도에

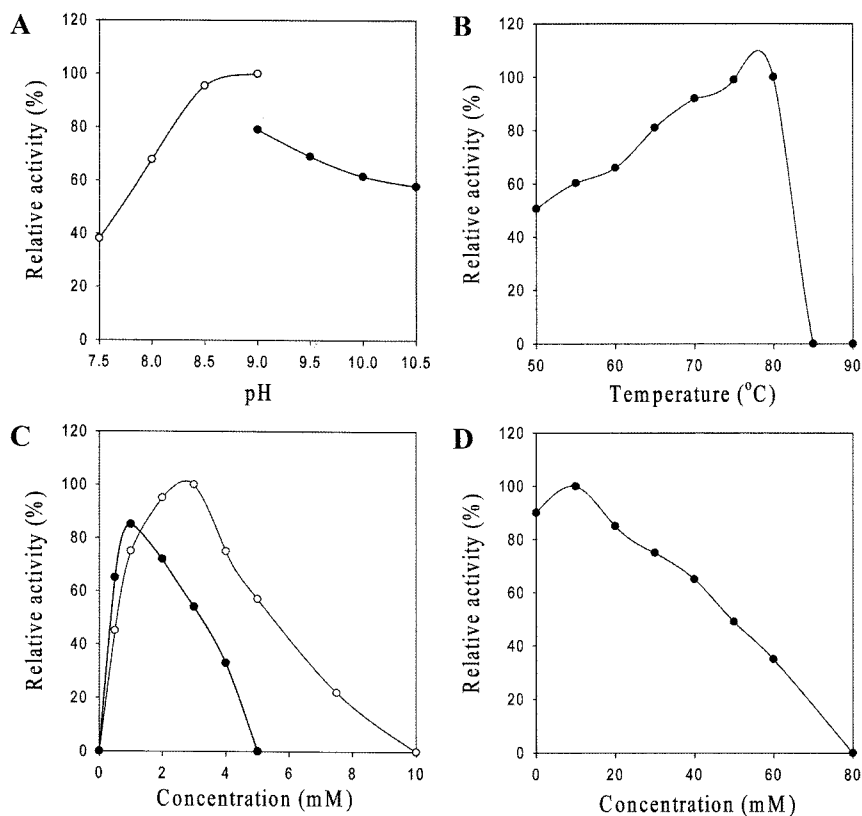


**Fig. 2. Purification of recombinant Tod DNA polymerase.** Lane 1, molecular mass marker; lane 2, crude extract induced cells; lane 3, supernatant of crude extract after heat treatment at 80°C for 20 min; lane 4, Hitrap Q column peak fractions; lane 5, Sephacryl S-200 HR 26/60 column peak fractions. The gel was stained with coomassie brilliant blue.

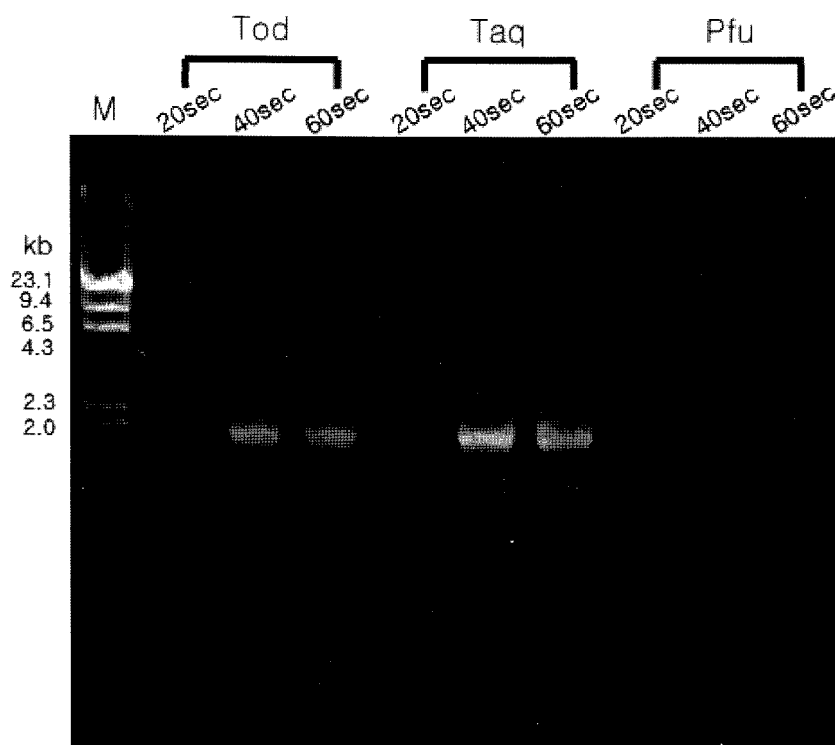
대한 영향도 검토되었다. KCl에 대해서는 낮은 농도에서는 효소활성에 큰 영향을 미치지 않았지만 10 mM 이상의 농도에서 점차 활성이 감소하여 80 mM 이상에서는 효소 활성이 완전히 저해되었다(Fig. 3D). 이것은 PCR 반응에 KCl의 첨가가 필수적인 Taq 및 Tca DNA polymerase[11]과는 대조적인 반면, Tfi DNA polymerase[3]과는 비슷한 결과를 나타냈다. 이상의 결과에서 PCR 반응을 위한 Tod polymerase의 최적 buffer 조성은 50 mM Tris/HCl(pH 9.0), 2.5 mM  $MgCl_2$ , 0.01% tween-20(반응 촉진제)로 확인되었다.

#### Tod DNA polymerase의 PCR 적용

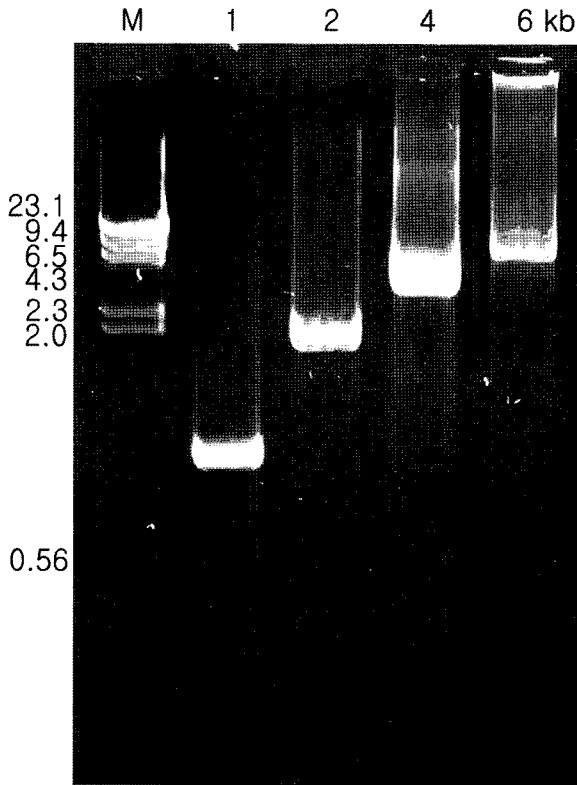
Tod polymerase의 DNA 신장 능력을 기존의 시판중인 Taq 및 Pfu polymerase와 함께 비교하기 위하여,  $\lambda$ -phage DNA를 주형으로 하고 각각 20초, 40초, 60초의 다른 신장 조건에서 PCR을 수행하였다. 그 결과 Pfu polymerase는 60초의 신장 시간에서 아주 적은 양의 DNA 단편이 확인되었고, Tod와 Taq polymerase는 40초와 60초의 신장조건에서 비슷한 양으로 증폭된 DNA 단편이 확인되었다(Fig. 4). 따라서 Tod polymerase의 DNA 신장활성은 Pfu 보다는 높고 Taq와는 비슷한 결과를 나타내었다. Tod polymerase를 long PCR에 적용하기 위하여  $\lambda$ -phage를 주형으로 하고 각각 1, 2, 4, 6, 8 kb의 단편을 PCR로 증폭하였다. 그 결과 Tod polymerase는 1, 2, 4, 6 kb의 DNA 단편은 증폭한(Fig. 5) 반면, 8 kb의 단편은 증폭하지 않았다(data not shown). 일반적으로 PCR에 널리 사용되는 Pol I family의 Taq poly-



**Fig. 3. Properties of Tod DNA polymerase.** (A) Effect of pH on the Tod DNA polymerase activity: Tris-HCl (open circles), Glycine-NaOH (closed circles). (B) Effect of temperature on the Tod DNA polymerase activity. (C) Effect of divalent cations, Mg<sup>2+</sup> (open circles) and Mn<sup>2+</sup> (closed circles) on the Tod DNA polymerase activity. (D) Effect of KCl on the Tod DNA polymerase activity.



**Fig. 4. Comparison of PCR elongation rates of Tod, Taq, and Pfu DNA polymerases.** M,  $\lambda$  Hind III DNA molecular size maker; elongation times used for PCR amplification are indicated at the top.



**Fig. 5. Application of Tod DNA polymerase in long PCR.** M,  $\lambda$  Hind III DNA molecular size maker; target lengths of 1 kb, 2 kb, 4 kb, and 6 kb were marked.

merase는 개량된 PCR 조건에서 24 kb까지 DNA 증폭이 가능한 것으로 보고되었고[10],  $\alpha$ -family의 Pfu polymerase는 실제로 증폭할 수 있는 길이가 2 kb 이하로 알려져 있다.

이상의 결과에서 Tod polymerase는 기존에 널리 시판중인 Taq polymerase와 비슷한 신장활성을 나타내었고 6 kb의 긴 DNA 단편을 증폭할 수 있기 때문에 분자생물학, DNA 진단, DNA 지문검사 등에서 PCR 반응에 적용 가능성이 높다고 할 수 있다. 또한 Tod DNA polymerase는 2가 양이온 및 KCl 농도와 같은 PCR 조건에서 다른 내열성 DNA polymerase와는 다른 생화학적 특성을 나타내기 때문에 기존의 내열성 DNA polymerase에 의해 잘 증폭되지 않는 PCR 샘플에 사용 가능할 지도 모른다. 현재, 다양한 샘플에 대한 PCR 조건을 검토 중에 있다.

## 요 약

PCR법을 이용하여 *Thermus thermophilus* HJ6 유래 DNA polymerase(Tod) 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석한 결과, ORF는 2,505개의 뉴클레오타이드로 구성되고 834개의 아미노산을 암호화하였다. 아마노산 서열을 바탕으로 상동성을 분석한 결과, *Thermus thermophilus* HB8 유래 DNA polymerase와 98%, *Thermus aquaticus* 유래 DNA poly-

merase와 86%의 identity를 나타내었다. 이 유전자를 박테리 오파지  $\lambda$  유래 온도감수성 프로모터(PR, PL)를 포함하는 pJLA503 벡터를 이용하여 대장균에서 발현하였다. 발현된 효소는 열처리, HiTrap<sup>TM</sup> Q column과 HiPrep<sup>TM</sup> Sephacryl S-200 HR 26/60 column으로 정제하여 94 kDa의 단백질을 얻을 수 있었다. 정제된 효소의 DNA 증합 활성에 대한 최적온도는 75~80°C이고 최적 pH가 9.0이었다. Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>에 대한 최적 농도는 각각 2.5 mM과 1 mM이었고 효소활성은 2가 양이온의 존재 하에서는 활성화 되지만 1가 양이온에서는 저해되었다. Tod DNA 증합효소를 이용한 PCR 실험결과, Tod DNA 증합효소는 DNA 증폭 및 PCR 관련 기술에 응용 가능할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2007학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(과제번호 2007AA199).

## REFERENCES

- Braithwaite, D. K. and J. Ito. 1993. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic. Acids. Res.* **21**: 787-802.
- Cann, I. K. and Y. Ishino. 1999. Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics.* **152**: 1249-1267.
- Choi, J. J., S. E. Jung, H. K. Kim, and S. T. Kwon. 1999. Purification and properties of *Thermus filiformis* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Biotech. Appl. Biochem.* **30**: 19-25.
- Choi, J. J. and S. T. Kwon. 2004. Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase from hyperthermophilic bacterium *Aquifex pyrophilus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 1022-1030.
- Chien, A., D. B. Edgar, and J. M. Trela. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**: 1550-1557.
- Jung, S. E., J. J. Choi, H. K. Kim, and S. T. Kwon. 1997. Cloning and analysis of the DNA polymerase-encoding gene from *Thermus filiformis*. *Mol. Cells.* **7**: 769-776.
- Kaledin, A. S., A. G. Sliusarenko, and S. I. Gorodetskii. 1981. Isolation and properties of DNA-polymerase from the extreme thermophilic bacterium *Thermus flavus*. *Biokhimiia.* **46**: 1576-1584.
- Kim, H. J., H. W. Kim, and S. J. Jeon. 2008. Gene cloning and expression of Trehalose synthase from *Thermus thermophilus* HJ6. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 182-188.
- Kim, J. S., S. Koh, J. J. Kim, S. T. Kwon, and D. S. Lee. 1998. Top DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB27: gene cloning, sequence determination, and physico-

- chemical properties. *Mol. Cells.* **8**: 157-161.
10. Lee, H., K. N. Kim, and Y. Kee Chae. 2007. Reevaluating the capability of Taq DNA polymerase: long PCR amplification. *Protein Pept. Lett.* **14**: 321-323.
  11. Park, J. H., J. S. Kim, S. T. Kwon, and D. S. Lee. 1993. Purification and characterization of *Thermus caldophilus* GK24 DNA polymerase. *Eur. J. Biochem.* **214**: 135-140.
  12. Rüttimann, C. M. Cotorás, J. Zaldívar, and R. Vicuña. 1985. DNA polymerases from the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB8. *Eur. J. Biochem.* **149**: 41-46.
  13. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**: 487-491.
  14. Schauder, B., H. Blocker, R. Frank, and J. E. McCarthy. 1987. Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli* atpE translational initiation region. *Gene* **52**: 279-283.

(Received Jan. 13, 2009/Accepted Feb. 28, 2009)