

Penicillin G acylase 遺傳子의 構造와 發現機作에 關한 研究

— 1. *E. coli* ATCC 11105 의 penicillin G acylase 遺傳子의 cloning —

金永昌 · 具龍範 · 吳尙鎮 · 姜炫三

(서울大學校 自然科學大學 微生物學科)

Studies on the structure and expression of the penicillin G acylase gene

— 1. Cloning of the penicillin G acylase gene of *E. coli* ATCC 11105 —

KIM, Young Chang, Yong Bum KOO, Sang Jin OH and Hyen Sam KANG

(Department of Microbiology, College of Natural sciences, Seoul National University)

ABSTRACT

The penicillin G acylase(*pga*) gene was cloned in the vector plasmid pKM 300(Ar^r , Tc^r , 6.33kb) for the study of the structure and expression of the *pga* gene. This recombinant plasmid pPAKS-1 DNA (24.5Kb) was cleaved into 2 fragments by restriction enzyme Eco R1, 1 fragment by BamH1, 4 fragments by Hind III, and 2 fragments by Pst I. The *pga* gene was located on the Eco R1 · Hind III-C fragment of pPAKS-1. The recombinant plasmids pPAKS-1 and pPAKS-2, in which the Hind III-B and Hind III-D fragments of pPAKS-1 are deleted, are characterized.

The results are summarized as follows:

1. Doubling times of bacterial strain bearing pPAKS-1 and pPAKS-2 are 90 and 60 minutes, respectively.
2. pPAKS-1 and pPAKS-2 are present at about 16~32 and 70 copies per cell, respectively.
3. The specific activities of penicillin G acylase in the strains bearing pPAKS-1 and pPAKS-2 are 0.66 and 5.5 units, respectively, which represent 2-fold and 20-fold higher enzyme activity compared to the wild type strain.
4. pPAKS-1 is very unstable, but pPAKS-2 is stable.

緒 論

Penicillin G acylase 의 penicillin G 를 加水分解하여 6-Aminopenicillanic acid(6-APA)와 phenylacetic acid 로 分解하는 酵素로서 이 때 生成된 6-APA 는 여러 種類의 penicillin 誘導體

를 合成하는 中間物質로 利用되고 있다. 6-APA 를 生産하는 方法에는 위에서 言及한 acylase 酵素를 利用한 微生物學的 轉換 方法외에 化學的 轉換方法이 있으며 化學的 方法은 複雜하고 더 우기 有毒한 中間 廢棄物을 生成하기 때문에 微生物學的 轉換方法이 더 바람직하다(Aharonowitz 와 Cohen, 1981). 특히 酵素 利用方法은 最近

급속히發展한 再組合 DNA 技術을 利用하여 acylase 역가가 높은 菌株을 開發한다면 훨씬 經濟的일 것이다. 이를 위해서는 acylase 遺傳자의 構造와 發現기작에 대한 分子遺傳學的 基礎 研究가 先行되어야 한다.

따라서 本 研究에서는 penicillin G acylase 遺傳자를 cloning 하여 얻은 再組合 plasmid 의 制限酵素 地圖, 遺傳자의 位置, 酵素 역가의 比較 및 再組合 plasmid 의 安定性 등을 調査하여 그 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 菌 株

Acylase를 生産하는 *E. coli* ATCC 11105와 6-APA의 bioassay에 使用한 指示菌 *Serratia marcescens* ATCC 27117은 American Type Culture Collection으로부터 購入하였다. vector plasmid pKM300의 宿主菌과 再組合 plasmid DNA의 transformation에 使用된 收容菌은 *E. coli* K12 strain HB101(pro^- , leu^- , thi^- , $lacY^-$, $hsd R^-$, $end A^-$, $rpsL$ 20, $ara-14$ gal/T2, $Xyl-5$, $mtl-1$, $sup E$ 44)이었다.

2. 培 地

*E. coli*는 LB(Luria-Bertanii) 또는 M9 최소 培地에서 培養하였으며 *S. marcescens*는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5) 1l에 Bacto-peptone 6g, yeast extract 3g, beef extract 1.5g을 添加한 培地를 使用하였다. 6-APA의 bioassay에 使用한 over lay medium은 위 培地에 agar 6g과 3g/l의 penicillin G sodium(sigma)을 添加하여 使用하였다(Mayer 등, 1979; Mayer 등, 1980).

3. 酵素 및 反應條件

制限酵素 Eco RI, Hind III는 Bethesda Research Laboratories Inc.로부터 購入 使用하였으며 制限酵素 Bam HI는 Greene 등(1978)의 方法에 따라 *Bacillus amyloliquifaciens* H로부터, Sal I은 Arrand 등(1978)의 方法에 따라 *Streptomyces albus* G로부터 各各 分離, 精製하여 使用하였다. 制限遺菌 Pst I은 서정선 博士로부터 分譲받은 것과 *Providencia stuartii* 164로부터 Greene 등(1978)의 方法에 따라 分離精製한 것을 使用하

였다. T4 DNA ligase는 *E. coli* E 1150 菌株을 使用하여 Amagase와 Matsubara(1981)의 方法에 따라 分離精製하여 使用하였다. 各種 酵素의 反應條件은 Davis 등 (1980)의 方法을 使用하였다.

4. DNA의 抽出

plasmid DNA를 大量 抽出하기 위해서는 Clewell과 Helinski(1973)의 方法을 이용하였으며 *E. coli* DNA는 Bukhari 등(1981)의 方法으로 抽出 使用하였다. transformant를 再組合 plasmid DNA의 分子量을 기준하여 選別할 때는 cracking 方法(Bukhari 등, 1981)에 의해 抽出하였고, 制限酵素에 의한 分析을 必要로 하는 경우에는 "mini-prep" 方法(Klein 등, 1980)에 의해 抽出 使用하였다. 制限酵素 切片的 分子量을 測定하기 위한 標準 DNA로 使用한 박테리오파지 λ cl 857 Sam 7 DNA는 Davis 등(1980)의 方法에 따라 抽出하였다.

5. Transformation

收容菌 *E. coli* HB 101에 RbCl과 $CaCl_2$ 를 處理하여 competent cell을 만든 뒤 heat shock을 주는 Kushner(1978) 方法을 使用하였다.

6. Agarose gel 電氣泳動 및 制限酵素 切片的 分子量 測定

Agarose는 Sigma Type I 또는 Type II로 使用하였으며, 電氣泳動 緩衝溶液은 TBE(89mM Tris-Borate, 2.5mM EDTA, pH 8.3)를 使用하였다(Bukhari 등, 1981). Agarose의 濃도와 電氣泳動 條件은 각 그림에 表示된 대로 實施하였으며 電氣泳動 後 ethidium bromide 溶液($0.5\mu g/ml$)으로 染色하였다. Polaroid type 667 필름을 使用하여 UV 照射函(C-63, Mineralight, Transilluminator) 위에서 황색 filter를 附着한 MP-3 Land camera로 寫眞 撮影하였다. 制限酵素 切片的 分子量은 λ cl Sam 7 DNA의 Hind III 또는 Eco RI-Bam HI 切片的 分子量을 標準으로 하여 測定하였다(Southern, 1979).

7. 酵素역가의 測定

酵素역가의 測定은 Balasingham 등(1972)의 方法을 다음과 같이 修正 使用하였다. M9-glycerol 培地에서 OD 600이 0.7일 때 遠心分離하여 50mM potassium phosphate(pH 7.5) 緩衝溶液에 再分散시킨 後에 OD 600을 測定하고 同

緩衝溶液에 penicillin G를 100mg/ml 되도록 녹인 것을 同量 添加하여 섞은 후 37°C에서 反應시켰다. 一定時間(약 2時間) 反應後, 反應混合物의 7배에 該當하는 p-dimethylaminobenzaldehyde 溶液을 添加하여 發色 程度를 OD 415에서 測定하였다. specific activity는

$$\frac{\text{OD 415}}{\text{OD 600} \times \text{반응시간(h)}} \times 100 \text{ 으로}$$

定義하였다.

8. Copy number의 測定

Plasmid의 copy數는 ³H-thymidine(10μci/ml)과 2'-deoxyadenosine(280μg/ml)을 添加한 M9-glycerol 培地를 使用하여 Womble等(1977)의 方法으로 測定하였다. 즉 染色體 當 copy數는 *E. coli* DNA의 分子量를 4,000 Kb로 하고 다음 公式에 의하여 측정하였다.

$$\text{copy 數} = \frac{\text{plasmid DNA의 cpm}}{\text{host DNA의 cpm}} \times \frac{\text{host DNA의 分子量}}{\text{plasmid DNA의 分子量}}$$

結果 및 考察

1. Penicillin G acylase 遺傳子의 cloning

Penicillin G acylase 遺傳子(이하 *pga* 유전자로 略함)를 cloning하기 위한 vector로서는 Fig.

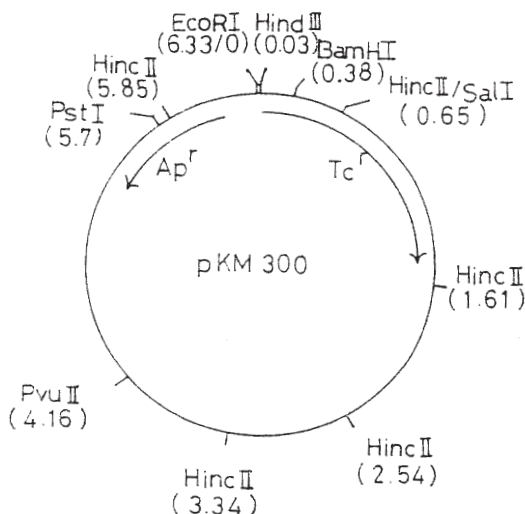


Fig. 1. The circular restriction map of vector plasmid pKM 300. The location of antibiotic resistance genes are indicated. The numbers refer to kilobase pairs.

1에서 보는 바와 같은 6.33 Kb의 *Ar^r*, *Tc^r* plasmid pKM 300을 使用하였다. pKM 300은 acylase 역가 測定에 妨害가 되는 β-lactamase 遺傳子를 갖고 있으므로 *pga* 遺傳子를 cloning하기 위하여 β-lactamase 遺傳子를 破壞하여야 한다. 또한 Mayer等(1979)과 Mayer(1980)의 報告에 의하면 *pga* 遺傳子에는 *Eco* RI과 *Pst* I 認識部

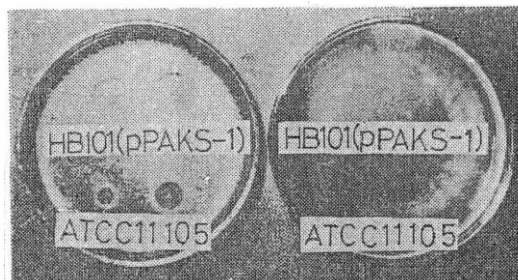


Fig. 2. Bioassay of penicillin G acylase activity of *E. coli* ATCC 11105 and HB101(pPAKS-1). Colonies were overlayed on 90mm plates with 5ml of soft agar containing 0.5ml of an overnight culture of *S. marcescens* per 100ml overlay medium with(A) and without(B) penicillin G. Zones of inhibition were measured after 15hrs growth at 37°C.

位가 없다는 것이 알려져 있다.

따라서 *pga* 遺傳子를 cloning하기 위해서 *E. coli* ATCC 11105 DNA와 vector pKM 300 DNA를 各其 制限酵素 *Eco* RI과 *Pst* I으로 二重處理한 뒤 T4 DNA ligase로 再結合하였다. 再組合 plasmid DNA를 acylase 역가가 없는 *E. coli* HB 101 宿主에 導入하여 L-tet(25μg/ml) 배지에 塗抹하였다. 여기서 자란 *Tc^r* transformant는 15,763個로서 이 중에 外部 DNA가 插入된 *Aps Tc^r* clone은 4,041個이었다. 이들에 대해 acylase 역가를 調査한 結果 Fig. 2와 같이 *serratia*에 대해 阻止環(inhibition zone)을 나타내는 1개의 positive clone을 얻었다. 이 阻止環이 acylase에 의해 penicillin으로부터 생긴 6-APA에 의한 것인지 아니면 다른 生長 抑制物質 때문인지를 確認하기 위하여 penicillin G를 添加하지 않은 培地를 使用하여 實驗한 結果 指示菌에 대해 生長 抑制效果를 나타내지 않았다 (Fig. 2). 따라서 이 clone은 *pga* 遺傳子를 갖고 있는 것으로 思料되며 이를 酵素역가 測定을 통하여 確認하였다 (Fig. 8). 이 penicillin G acylase 遺傳子가 clo-

ning 된 24.5Kb의 再組合 plasmid를 pPAKS-1이라 명명하였다.

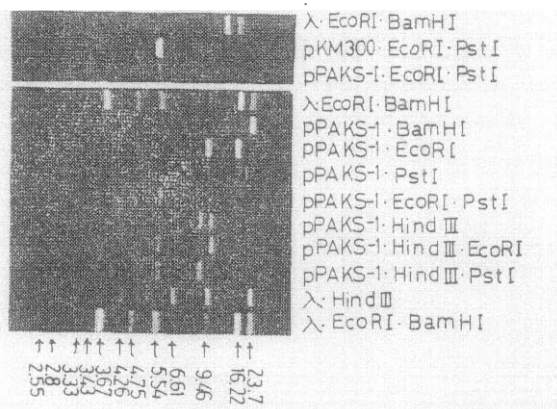


Fig. 3. Agarose gel(0.7%) electrophoresis of pPAKS-1 DNA digested with restriction endonucleases. The gel was run at 25V for 15hrs. The gel was stained and photographed as described in the material and method. Molecular weight estimates are based in the eleven λ cl857 Sam 7 fragments generated by the EcoRI and BamHI endonucleases(16.22, 5.54, 4.75, 3.67, 3.43, 3.33, 2.55, 1.87, and 1.18Kb) and the seven λ cl857 Sam 7 fragments generated by the Hind III endonuclease(23.7, 9.46, 6.61, 4.26, 2.26, 1.98, and 0.58Kb, Southern, 1979).

2. 再組合 plasmid pPAKS-1의 制限酵素地圖

再組合 plasmid pPAKS-1의 制限酵素地圖는 한 酵素 또는 두 가지 酵素로 혼합 處理하여 얻은 切片의 크기를 算出하여 vector 部位에 알려진 制限酵素 位置를 起點으로 計算 作成하였다. plasmid pPAKS-1의 各種 制限酵素 切片의 電氣泳動 寫眞은 Fig. 3과 같으며 圓形地圖는 Fig. 4와 같다. pPAKS-1 DNA는 Bam HI 認識部位가 1군데, Eco RI, Pst I 認識部位가 2군데, Hind III 認識部位가 4군데임을 確認하였다. Bam HI 認識部位는 vector pKM 300 部分에 하나만 存在하며 Pst I 認識部位는 vector와 導入된 DNA가 連結된 部位에 하나가 存在하며 다른 하나는 이로부터 3.99Kb 떨어진 位置에 存在한다. Eco RI 認識部位도 vector와 導入된 DNA가 連結된 部位에 하나가 存在하며 다른 하나는 이로부터 15.4Kb 떨어진 位置에 存在한다. Hind III 認識部位 중 하나는 vector 部分에 存在하며 나머지 3개는 9.65, 18.3, 21.0Kb 位置에 存在한다.

3. pPAKS-1 plasmid DNA上的 pga 遺傳子位置

penicillin G acylase의 分子량은 約 70Kd이며 1% SDS gel에서 20.5Kd subunit로 解離됨으로(Mayer 등, 1979; Mayer 등, 1980) 대략 遺傳子の 크기는 1.89~0.56Kb 程度로 推定된다. pPAKS-1의 導入된 DNA 部分은 18.8Kb 인데 이 중에서 pga 遺傳子 位置를 밝혀내고 더욱 安定되고 역가 높은 菌株를 選別하기 위하여 缺失에 의해 작아진 誘導體들을 製造하였다.

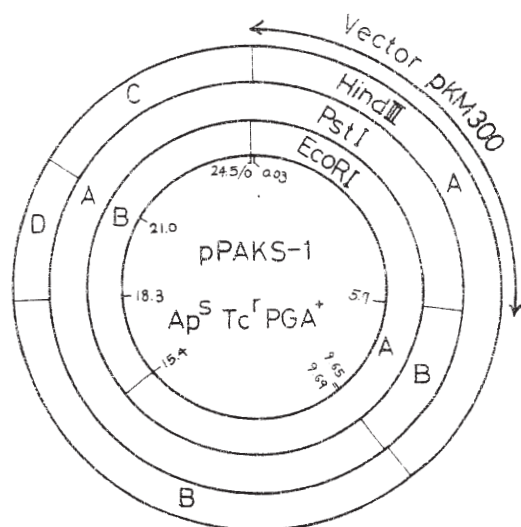


Fig. 4. The circular restriction map of pPAKS-1. The relative position of restriction fragments are indicated. The region originated from vector pKM 300 DNA is also indicated. The numbers refer to kilobase pairs. pPAKS-1: p; plasmid, PA; Penicillin Acylase, KS; Kang Hyen Sam

4개의 認識部位가 存在하는 Hind III는 不完全 處理하였고 Eco RI과 Pst I은 完全히 處理한 後 이들을 各各 分子內 結合이 잘 일어나는 條件으로 再結合하여 얻은 transformant 들을 cracking 및 "mini-prep" DNA의 制限酵素 分析을 통하여 pPAKS-2, pPAKS-15 pPAKS-16, pPAKS-17을 選別하였다(Fig. 5). pPAKS-2는 Hind III-B 및 Hind III-D 切片들이 缺失되었으나 acylase 酵素역가는 繼續 나타내었고(Fig. 6), PstI-B 切片이 缺失된 pPAKS-15도 acylase 酵素역가를 나타내었다. 따라서 vector인 pKM 300 部分을 除外하면 pga 遺傳子は Eco RI, Hind III-C 切片에 存在함을 알 수 있다. 이를 뒷받침하는 것은 Eco-

1. Hind III -C 切片을 包含하는 Eco RI-B 切片이 缺失된 pPAKS-17 과 EcoRI-B 切片과 PstI-B 切片이 동시에 缺失된 pPAKS-16 은 acylase 酵素活性가 喪失된다는 事實이다. 以上の 遺傳子地圖을 살펴 보면 pga 遺傳子は *E. coli* DNA 의

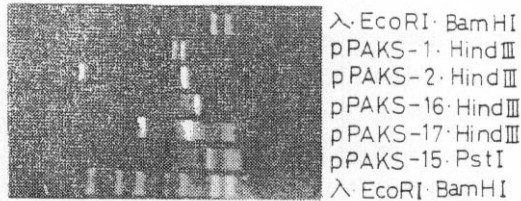


Fig. 5. Agarose gel(0.7%) electrophoresis of DNA from various pPAKS-1 derivatives digested with restriction endonucleases (Conditions are same as those given in the legend to Fig. 3).

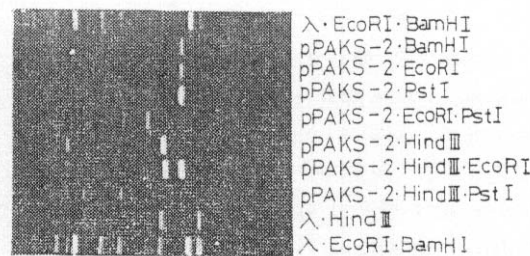


Fig. 6. Agarose gel(0.7%) electrophoresis of pPAKS-2 DNA digested with restriction endonucleases (Conditions are the same as those given in the legend to Fig. 3). The largest band present in the HindIII-EcoRI digests of pPAKS-2 is due to the partial digestions.

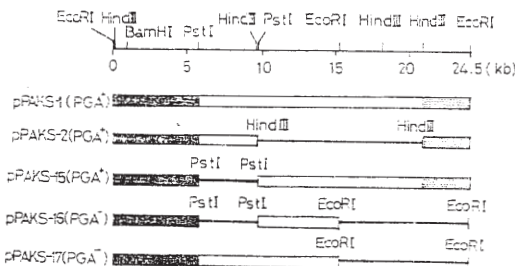


Fig. 7. The linear restriction maps of pPAKS-1 and its derivatives. The top line is a scale in Kilobase pairs. Boxes with complete shading show the segments originating from vector pKM 300. Open boxes show the cloned segments. Dotted boxes show the penicillin G acylase gene. Deletions of restriction fragments from the pPAKS-1 are indicated by a solid line.

Eco RI 切片(9.1Kb) 內에 存在하며 이 切片중에서 3.5Kb 의 EcoRI·Hind III 切片에 存在함을 알 수 있다. (Fig. 7). 이것은 Mayer 等(1979) 과 Mayer 等(1980)이 pga 遺傳子가 Eco RI·Pst I 切片內에 存在한다는 報告와는 差異가 있다. 이 結果는 Mayer 等(1979)이 最初 cloning 할 때 制限酵素 Hind III 를 使用하였고 따라서 Hind III 切片들 間에는 再排列이 생길 수 있기 때문에 Eco RI·PstI 切片을 이룬 3개의 Hind III 切片은 서로 隣接되어 있는 것이 아닐 可能性이 많다. 따라서 Mayer 等(1979)이 subcloning 한 Eco R·IPst I 切片은 實際로 *E. coli* DNA 上에는 存在치 않는 것으로 思料된다.

4. 酵素역가와 copy number

E. coli ATCC 11105, pPAKS-1, pPAKS-2 사의 酵素역가는 Fig. 8에 나타난 바와 같다. pPAKS-1 은 *E. coli* ATCC 11105 보다 약 2.4

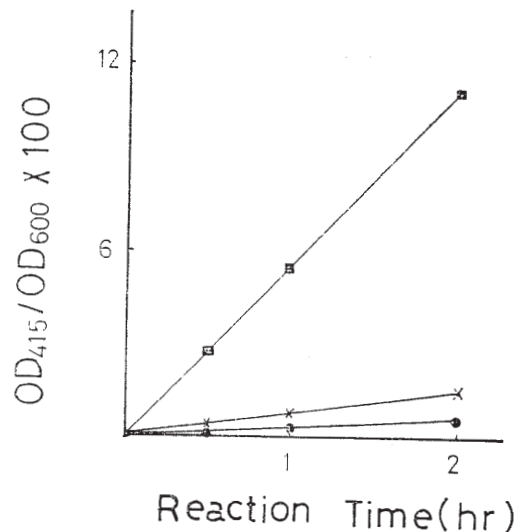


Fig. 8. Penicillin G acylase activities of *E. coli* ATCC 11105 (●-○), HB101(pPAKS-1) (×-×), and HB101(pPAKS-2) (■-■). Enzyme activity was measured as described in the materials and methods.

배의 增加를 보였고 pPAKS-2 는 *E. coli* ATCC 11105 보다 약 20배의 增加를 보였다. 이러한 酵素역가의 增加는 copy number 增加에 의한 遺傳子 數의 增加와 成長速度 增加 및 遺傳子 發現의 側面에서 볼 수 있다. pPAKS-1과 pPAKS-2 의 copy number 測定結果는 Fig. 9와 Table 1에서 나타난 바와 같이 染色體 當 copy number

에는 큰 차이가 없으나 成長速度(doubling time)에 있어서 큰 차이가 있었다. 成長速度는 한 개의 細胞內에 存在하는 染色體의 平均數에 影響을 주는 바, *E. coli*의 경우 doubling time이

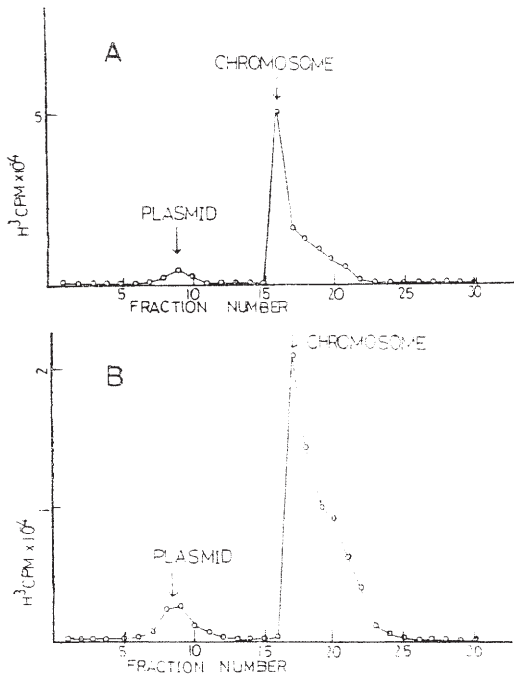


Fig. 9. CsCl-EtBr density gradient profiles of DNA from pPAKS-1 clone(A) and pPAKS-2 clone (B). Copy number per chromosome was calculated as described in the Materials and Methods.

50분이면 한 개의 細胞內에 平均 3.75 ± 0.3 개의 染色體가 存在하게 되며, doubling time이 90분이면 細胞 當 1~2개의 染色體가 存在하는 것으로 생각된다(Clewell, 1972). 따라서 pPAKS-1

과 pPAKS-2는 染色體 當 copy number에 있어서는 큰 차이가 없으나 細胞當 copy number에는 상당한 차이가 있다. 그러나 copy number 증가와 酵素 生産이 正比例하지는 않았다. 이것은 pPAKS-2의 製造過程에서 plasmid上的 어떤 變化가 遺傳子 發現에 影響을 미친 것으로 생각되나 더 研究되어야 할 問題이다.

5. 再組合 plasmid의 安定性

pPAKS-1 및 pPAKS-2 菌株을 LB 培地에서 약 15時間 培養한 後 신선한 LB 培地에 再接種하여 37°C 에서 진탕培養하였다. 이 培養液을 生理食鹽水로 稀釋한 後 LA 培地에 $10^2 \sim 10^3$ colony가 생기도록 塗抹하여 37°C 恒溫器에서 약 15時間 培養하였다. 이 때 생긴 colony를 LA 培地와 L-tet 培地에 各 各 이쑤시개로 옮겨서 tetracycline에 대한 耐性を 調査하였다. 그 結果 pPAKS-1은 약 14.8%의 colony가 自發적으로 tetracycline sensitive로 變하였으며 이들 自發적인 Tc^s strain은 acylase 酵素역가와 plasmid가 同時に 喪失되었다. 따라서 plasmid pPAKS-1은 매우 不安定하다고 判斷되며 이는 分子量이 24.5Kb로 매우 크기 때문인 것으로 생각된다. 反面에 13.5Kb인 pPAKS-2는 檢定한 81개 colony가 모두 tetracycline에 저항성을 나타내며(Tc^r), 再組合 plasmid가 대단히 安定하다고 생각된다.

謝 辭

本 研究는 大字文化福祉財團 및 文教部研究費의 補助로 수행되었으며 本 研究에 많은 도움을 주신 遺傳學 敎室 여러분께 감사를 드린다.

Table 1. Growth rate, copy number, and enzyme activity of pPAKS-1 and pPAKS-2 clones.

Strain	Molecular weight of plasmid(Kb)	Doubling time(min)	Copy No. per chromosome	Copy number chromosomal equivalent per cell	Copy No. per cell	Specific activity(unit)
ATCC 11105	—	50	—	—	—	0.28
HB101(pPAKS-1)	24.5	90	15.8	1~2	15.8~31.6	0.66
HB101(pPAKS-2)	13.15	50	17.5	3.75 ± 0.3	70	5.5

摘 要

Penicillin G acylase(*pga*) 遺傳子의 構造와 發現機作에 관한 分子遺傳學的 기초研究와 高역가 菌株의 開發을 위한 遺傳工學的 研究를 目的으로 *Escherichiacoli* ATCC 11105로부터 *pga* 遺傳子를 vector, plasmid pKM 300

에 cloning 하였다. 이 再組合 plasmid pPAKS-1 은 24.5Kb 로서 制限酵素 Eco RI, Bam HI, Hind III, Pst I 인식部位가 各各 2, 1, 4, 2군데 存在하며 pga 遺傳子는 Eco RI·Hind III -C 切片上에 位置하였다.

pPAK-1 과 Hind III-B 및 Hind III-D 切片이 缺失된 誘導體 pPAKS-2 (13.15Kb)의 特性을 比較檢討한 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. Doubling time 은 각기 90分, 60 으로서 pPAKS-2 가 짧았다.
2. copy 수는 각기 16~32, 70 으로서 pPAKS-2 가 약 2~4배 增加되었다.
3. 菌酵역가는 각기 0.66, 5.5 unit 로서 pPAKS-2 가 pPAKS-1 보다 9배 정도 높았다. 그리고 pPAKS-2 의 酵素역가는 wild type 인 *E. coli* ATCC 11105 에 비하면 약 20배 增加되었다.
4. pPAKS-1 은 매우 不安定한데 反하여 pPAKS-2 는 安定하였다.

引用 文 獻

1. Aharonowitz, Y., and G. Cohen, 1981. The microbiological production of pharmaceuticals. *Sci. Am.* **245**, 141~152.
2. Amagase, S., and K. Matsubara, 1981. Purification of ligase. *Protein Nucleic acid Enzyme* **26**, 563~568.
3. Arrand, J.R., P.A. Myers, and R.J. Roberts, 1978. A new restriction endonuclease from *Streptomyces albus* G. *J. Mol. Biol.* **118**, 127~135.
4. Balasingham, K., D. Warburton, P. Dunnill, and M.D. Lilly, 1972. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **276**, 250~256.
5. Bukhari, A.I., J. Sambrook, R.M. Harshey, R. Greene, and A. Skalka, 1981. Laboratory Manual for a Practical Course on Recombinant DNA Techniques. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
6. Clewell, D.B., 1972. Nature of Col EI plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.* **110**, 667~676.
7. Clewell, D.B., and D.R. Helinski, 1969. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**, 1159~1166.
8. Davis, R.W., D. Botstein, and J.R.R. th, 1980. A Manual for Genetic Engineering: Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
9. Greene, P.J., H.L. Heyneker, F. Bolivar, R.L. Rodriguez, M.C. Betlach, A.A. Covarrubias, K. Backman, D.J. Russel, R. Tait, and H.W. Boyer, 1978. A general method for the purification of restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* **5**, 2373~2380.
10. Klein, R.D., E. Selsing, and R.D. Wells, 1980. A rapid microscale technique for isolation of recombinant plasmid DNA suitable for restriction enzyme analysis. *Plasmid* **3**, 88~91.
11. Kushner, S.R., 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids. In Genetic Engineering, H.W. Boyer and S. Nicosia(Eds.), Vol. 2, p. 17~24. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
12. Mayer, H., J. Collins, and F. Wagner, 1979. Cloning of the penicillin G acylase gene of *Escherichia coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids. In Plasmid of Medical, Environmental and Commercial Importance, K.N. Timmis and A. Pühler(Eds.) p. 459~570. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

13. Mayer, H., J. Collins, and F. Wagner, 1980. Cloning of the penicillin G acylase gene of *Escherichia coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids. *Proceedings of Enzyme Engineering* 5, 61~69.
14. Southern, E., 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. *In* *Methods in Enzymology*, R. Wu(Ed.), Vol. 68, p.152~176. Academic Press, New York.
15. Womble, D.D., D.P. Taylor, and R.H. Rownd, 1977. Method for obtaining more accurate covalently closed circular plasmid-to-chromosome ratios from bacterial lysates by dye-buoyant density centrifugation. *J. Bacteriol.* 130, 148~153.

※ 본 研究는 대우재 단과 문교부 研究支援으로 수행되었음.