



Corynebacteria-E. coli Shuttle Vector pKU 6의 分離 및 確認

許太麟·李珍雨·李世永

高麗大學校 農科大學 農化學科

(1984년 12월 14일 수리)

Isolation and Characterization of *Corynebacteria-E. coli* Shuttle Vector pKU 6 from Coryneform bacteria

Huh, Tae-Lin, Jin-Woo Lee and Se-Yong Lee

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea University, Seoul, Korea

(Received December 14, 1984)

ABSTRACT

To develop the host-vector system for industrial Coryneform bacteria that seemed to be the most suitable microorganisms for molecular breeding of genes involved in the production of amino acids, nucleotides, and other products of industrial interest, broad host range *E. coli* plasmid R 1162 DNA was transformed into *Brevibacterium ammoniagenes* and the plasmids pKU6 isolated from a transformant was physically characterized. All other plasmids from the transformed cells except pKU 6 existed as multimeric forms in *Brevibacterium ammoniagenes*. The plasmid DNA was retransformed into *Corynebacterium glutamicum* with a high frequency (1.32×10^{-1} per cell) and maintained stably both in *Brevibacterium ammoniagenes* and *Corynebacterium glutamicum* after 100 generations of cultures with 25~30 copy number per cell. The size of both plasmid pKU 6 and plasmid R 1162 were the same and restriction maps by *EcoR* I, *Ava* I, *Pst* I, *Pvu* II and *Hinc* II were also similar.

緒 論

Coryne형 박테리아에 속하는 *Brevibacterium* 와 *Corynebacterium* 들은 글루탐산을 생산하는菌株들로서 또한 라이신, 트립토판등의 여러가지 아미노산類와 核酸類등의 工業的 生産에 사용되는 産業的인 菌株들로서 널리 알려져있다. 産業的으로 利用되는 coryne형 박테리아들의 特性은 대부분 最終産物에 대한 feedback regulation 들이 除去되거나 아미노산 생성경로중 특정된 部位가 차단된 營養要求型 變異등, 여러 번이들이 蓄積된 상태의 菌株들이므로 變異株의 分離와 같은 재래식 菌株開發方法들은 그 限界에 도달해 있다. 그러므로 이런 限界性을 克服하기 위해서는 遺傳工學的인 方法을 도입할 必要가 있

으며 이를 수행하기 위해서는 먼저 클로닝벡터계 (cloning vector system)가 確立되어야 한다. 그러나 이런 coryne형 박테리아들이 産業的인 意義가 매우 重要한 菌株들임에도 불구하고 이들에 대한 分子生物學的, 遺傳學的인 研究는 거의 되어있지 않다. 다만 最近에 알려진 바에 의하면 몇몇 coryne형 박테리아는 자체내의 cryptic plasmid 들을 갖고 있으나(Sandoval *et al.*, 1984) 分離된 cryptic plasmid 들은 그 크기가 클로닝벡터로 使用하기에는 너무 커서 적당하지 않으며 (Katsumata *et al.*, 1984) 또한 크기가 작은 것들을 分離하였더라도 항생제 耐性 遺傳子와 같은 遺傳的 選別因子들을 갖고 있지 않아 직접 클로닝벡터로 使用하는데는 어려움이 따르고 있다.

一般的으로 Gram 양성균의 유전자들은 Gram

음성 균 내에서 잘 발현되나, Gram 음성균의 유전자들은 Gram 양성균 내에서 잘 발현되지 않는다고 알려져 있지만(Rubin *et al.*, 1980) Gram 음성균들인 *E. coli*들의 plasmid들은 그 종류들이 매우 다양하며 또한 여러 遺傳的 選別因子들을 갖고 있고, 制限酵素들의 作用部位가 다양하므로 만약, 잘 알려진 *E. coli* plasmid들의 遺傳的 特性을 coryne형 박테리아들 내에서 발현을 시킬 수 있다면 coryne형 박테리아의 클로닝벡터제를 確立하는데 많은 도움을 줄 것으로 생각된다. 그러므로 본 實驗에서는 *E. coli*와 coryne형 박테리아 사이의 shuttle vector를 開發하기 위하여 잘 알려진 *E. coli* plasmid들 중에서 형질전환이 될 수 있는 宿主의 영역이 비교적 넓고, incompatibility가 Q group에 屬하며, plasmid의 크기도 비교적 작은 8.9 kb로서 遺傳的 選別因子로서 스트렙토마이신(Sm)과 설푼산아미이드(Su)에 대한 耐性遺傳子를 갖고서 *E. coli* 세포내에서 40~60 copy 수를 갖는다고 알려진 R 1162 plasmid DNA(Barth *et al.*, 1974, Bagdasarian *et al.*, 1981, Lin *et al.*, 1984)를 *Brevibacterium ammoniagenes*와 *Corynebacterium glutamicum* 들 內로 형질전환을 시키고, 얻어진 형질전환체들중 *Brevibacterium ammoniagenes* IFO 12072 형질전환체내에서 R 1162 plasmid DNA의 單一體(monomer) 크기를 갖고 있는 plasmid DNA를 분리하여 plasmid pKU 6라 명명하였다. 이 plasmid pKU 6는 *E. coli*와 coryne형 박테리아에 모두 형질전환이 되어 양쪽의 형질전환체에서 모두 單一體로 존재하였으며 또한 Sm과 Su에 대한 耐性을 보여주어 *E. coli*와 coryne형 박테리아 사이의 shuttle vector로 使用할 수 있다고 밝혀졌기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

菌株 plasmid

菌株로는 아미노산의 工業的 生産에 使用되는 coryne형 박테리아들중 다섯 菌株를 R 1162 plasmid DNA와 pKU 6 plasmid DNA의 형질전환에 宿主로 使用하였다. *Brevibacterium ammoniagenes* IFO 12072는 일본 오사카대학 발

효공학과로부터, *Brevibacterium flavum* ATCC 21528, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13058과 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032는 American Type Culture Collection으로부터 입수하였으며 *Corynebacterium glutamicum* KUC 1121은 본 실험실에 보관되어 있던 菌株를 使用하였다. 또한 plasmid R 1162를 갖고 있는 *E. coli* C 600/R 1162 菌株는 일본 오사카대학 발효공학과로부터 제공 받았다.

培地

Coryne형 박테리아들의 保存 및 種培地에는 NB medium(0.5% NaCl; 0.8% nutrient broth, Difco)와 NB agar(1.8%)를 使用하였으며 MMYE medium[glucose, 20 g; (NH₄)₂SO₄, 10 g; urea, 3 g; yeast extract, 1 g; KH₂PO₄, 1 g; MgSO₄·7H₂O, 0.4 g; MnSO₄·4H₂O~6H₂O, 2 mg; FeSO₄·7H₂O, 2 mg; NaCl, 50 mg; biotin, 50 mg; thiamin, 200 mg; deionized water, 1 l, pH7.2]은 coryne형 박테리아들의 형질전환과 plasmid DNA의 分離를 위한 배양에 使用되었다. Coryne형 박테리아들의 형질전환과 plasmid DNA의 分離를 위해서 LF medium(2배 희석된 MMYE; sucrose, 0.41 M, MgCl₂, 0.01 M; lysozyme, 300 µg/ml)을 사용하여 protoplast의 형성을 시켰으며 protoplast의 재배지로는 RNB agar(disodium succinate, 0.5 M; NB agar)와 RNB soft agar(0.65%)가 使用되었다.

Coryne형 박테리아의 형질

一般的으로 coryne형 박테리아들에 대한 형질전환방법들이 확립되어 있지 않으므로 *Brevibacterium*의 형질전환은 Fig. 1과 같이 *Rhizobium meliloti*의 형질전환방법(Selvara *et al.*, 1981)을 일부 수정하여 使用하였고 *Corynebacterium*의 형질전환은 그림 2와 같이 *Pseudomonas putida*의 형질전환방법(Chakrabarty *et al.*, 1975)을 일부 수정하여 使用하였으며 두 方法 모두 protoplast 形成에 의한 형질전환을 시켰다.

Plasmid DNA의 分離

Coryne형 박테리아의 plasmid DNA는 SDS lysis method(Godson *et al.*, 1973)에 의해서 *E. coli* plasmid R 1162 DNA는 Kado(1981)등의 alkaline lysis method에 의해서 분리하였으며

Overnight culture of *Brevibacterium* in 10 ml NB broth at 30°C

↓

Dilute the overnight culture 1:100 with fresh MMYE broth and shaking culture at 30°C

↓

Penicillin G(0.3 u/ml) treatment at O.D₅₃₀=0.3-0.4 and shaking culture for 2 hrs more at 30°C

↓

Harvest the cells and resuspend into 1/2 volume of the original culture broth with lysis fluid

↓

Incubation without shaking for 4hrs at 37°C

↓

Wash with one volume of 0.3 M sucrose in 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, at 4°C

↓

Resuspend in 1 ml RNB broth at 4°C

↓

Add 50 μl of 50 μg/ml plasmid DNA to 0.2 ml of cell suspension

↓

Rapidly frozen in dry ice-ethanol bath for 5 min

↓

Incubate the mixture at 30°C for 1 hr

↓

Add 2 ml of RNB broth and incubate at 30°C for 1 hr

↓

Plate on RNB agar plate(50 μg/ml Sm, 25 μg/ml Su) with RNB softagar

Fig. 1. Transformation procedure of *Brevibacterium* spp.

Overnight culture of *Corynebacterium* in 10 ml NB broth at 37°C

↓

Dilute the overnight culture 1:100 with fresh MMYE broth and shaking culture at 37°C

↓

Penicillin G(0.3 unit/ml) treatment at O.D₅₃₀=0.3-0.4 and shaking culture for 2 hrs more at 37°C

↓

Harvest the cells and suspend into 1/2 volume of the original broth with lysis fluid

↓

Incubation without shaking for 4hrs at 37°C

↓

Wash cells with DF and sediment at 4°C for 20 min.

↓

Resuspend in 5 ml of 0.3 M sucrose in 0.1 M CaCl₂ and keep on ice for 20 min.

↓

Incubation on ice for 1 hr.

↓

Incubate the mixture for 2 min at 42°C

↓

Chill on ice and add 2 ml of RNB broth

↓

Incubate the mixture for 1 hr at 37°C

↓

Plate on RNB agar plate(50 μg/ml Sm, 25 μg/ml Su) with RNB soft agar

Fig. 2. Transformation procedure of *Corynebacterium* spp.

260 nm에서 흡광도를 측정 한 후 DNA 농도를 결정하고 4°C에 보관하며 필요시 꺼내 使用하였다.

制限酵素

Plasmid R 1162 DNA 와 plasmid pKU 6 DNA 사이의 制限酵素作用部位들을 비교하기 위하여 *Ava* I, *Hinc* II, *Pst* I, *EcoR* I 등의 制限酵素(B.R.L)들을 plasmid DNA 1 μg 당 8~10 unit 씩 作用시킨 후 DNA(B.R.L)를 *Hind* III (B.R.L)와 *Hae* III (B.R.L)로 동시절단하여 size marker로 사용하여 전기영동 하였다.

전기영동 및 사진

전기영동은 0.7% agarose gel 과 89 mM Tris-borate buffer 를 사용하여 2 v/cm의 constant voltage에서 12시간 gel 을 전개시키고 50 μg/ml 의 ethidium bromide 용액에서 30분간 DNA 를 염색시켜 UV filter 와 ethidium bromide 용 filter 가 부착된 Polaroid CU-5 camera 와 Polaroid film(Type 665)를 사용하여 UV transilluminator(TM 36, UV products)위에서 사진을 찍었다.

Plasmid copy 수의 측정

Coryne 형 박테리아 형질전환체들 내에 存在

Dilute the overnight culture of the transformant to 20 ml with fresh MMYE broth

↓

Add 0.5 ml of 100 μCi/ml [³H]-Thymidine at A₅₃₀=0.4

↓

Add 0.3 unit/ml of penicillin G at the conc. of 1×10⁸ cells/ml

↓

Centrifuge at 12,000 rpm(Beckman JA-20 rotor) for 10 min at 4°C and resuspend the cell into lysis fluid

↓

Centrifuge at 12,000 rpm(Becman JA-20 rotor) for 10 min at 4°C

↓

Wash with 10 mM Tris-EDTA buffer(pH 8.0)

↓

Resuspend the cell in 2 ml of 10% sucrose containing 50 mM Tris(pH 8.0) and 1.6 ml of 0.2 M EDTA and keep in ice for 15 min.

↓

Add 0.4 ml of 10% SDS and 1 ml of 1 mg/ml pronase and incubate for 4 hours at 37°C

↓

Add 10 mM Tris-EDTA buffer(pH 8.0) to make a total volume of 9.5 ml and add 9.5g of solid CsCl and 0.2ml of 20 mg/ml ethidium bromide solution

↓

Centrifuge at 45,000 rpm for 47 hours at 20°C

↓

Fractionate and precipitate the DNA with 5% TCA solution containing 50 μg/ml of thymidine

↓

Filter precipitates with glass fiber filter

↓

Dry filter and scintillation counting

Fig. 3. The procedure of measurement of plasmid copy number.

하는 plasmid pKU 6의 copy 수를 측정하기 위하여 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13058/pKU 6를 [³H]-Thymidine(Amersham)이 포함된 MMYE 배지에서 培養한후 Crosa (1981) 등의 방법을 利用하여 (Fig. 3) plasmid copy 수를 결정하였다.

結果 및 考察

Coryne형 박테리아들에 대한 *E. coli* plasmid R 1162의 형질전환

E. coli plasmid R 1162를 coryne형 박테리아들인 *Brevibacterium ammoniagenes* IFO 12072, *Brevibacterium flavum* ATCC 21528들에 Fig. 1과 같은 방법을 사용하여, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13058, *Corynebacterium glutamicum* KUC 1121들에 Fig. 2와 같은 방법을 사용하여 형질전환을 시도한 결과 再生 protoplast 세포당 형질전환빈도는 *B. flavum* ATCC 21528이 2.8×10^{-4} /cell로 가장 낮게 나타났으며, *C. glutamicum* KUC 1121이 3.12×10^{-4} /cell로 가장 높게 나타나 plasmid R 1162 DNA는 coryne형 박테리아로 형질전환이 되는 것으로 나타났다(Table 1). 얻어진 형질전환체들을

Table 1. Transformation frequency of coryneform bacteria

Strain	Plasmid	
	R 1162	pKU 6
<i>B. ammoniagenes</i> IFO 12072	4.4×10^{-4}	3.75×10^{-4}
<i>B. flavum</i> ATCC 21528	2.8×10^{-4}	4×10^{-4}
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13058	7.14×10^{-5}	6.25×10^{-3}
<i>C. glutamicum</i> KUC 1121	3.12×10^{-4}	1.32×10^{-1}
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	—	3.75×10^{-2}

모두 용균한후 agarose gel 전기영동을 하여서 형질전환된 plasmid R 1162 DNA의 크기와 형태를 조사하였을때 *B. ammoniagenes* IFO 12072의 형질전환체들은 모두 chromosomal DNA보다 더 이동속도가 느리게 나타난 DNA를 갖고 있었으나(Fig. 4), 이들중 한 형질전환체는 plasmid R 1162 DNA와 같은 이동속도를 갖는 DNA를 갖고 있었다(Fig. 4, Lane 9). 이 결과에서 plasmid R 1162 DNA는 coryne형 박테리아에 형질전환되어 그 크기가 대부분 커져서 重合體(multimer)의 형태로 변형되어 클로닝벡터

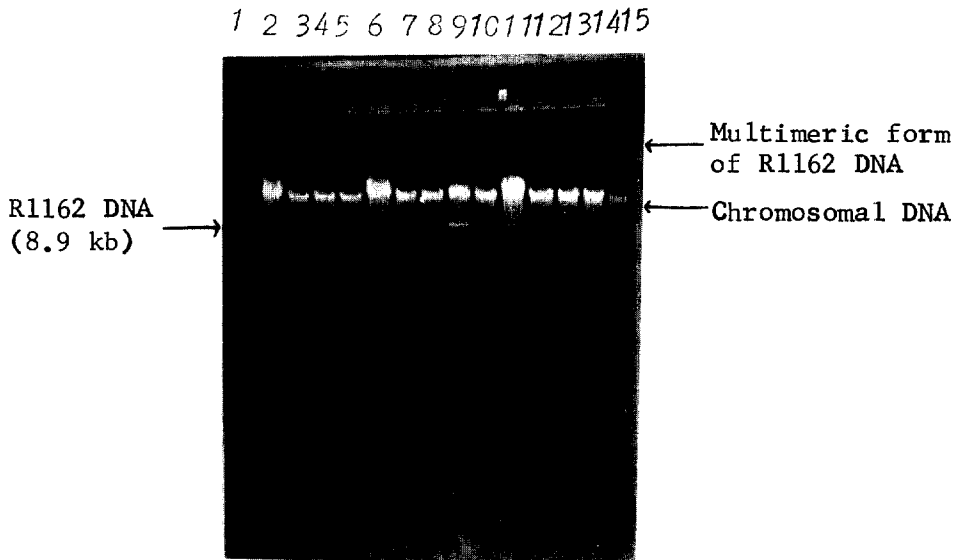


Fig. 4. Agarose gel patterns of transformed plasmid R 1162 DNA in *Brevibacterium ammoniagenes* IFO 12072

Lane 1: *E. coli* plasmid R 1162 DNA

Lane 2~15: plasmid R1162 DNA in the transformants of *Brevibacterium ammoniagenes*

로 사용하기에 적당치 않았으나 單一體(monomer)의 형태를 갖고 있는 Fig. 4, Lane 9의 plasmid DNA는 클로닝벡터로 사용이 가능하였으므로 순수분리하여 plasmid pKU 6라 명명하고 coryne형 박테리아들에 재형질전환을 시켰다.

Coryne형 박테리아들에 대한 plasmid pKU 6 DNA의 형질전환

plasmid pKU 6 DNA를 coryne형 박테리아들에 재형질전환을 하였을때 재생 protoplast 세포당 얻어진 형질전환의 빈도는 *C. glutamicum* KUC 1121이 $1.32 \times 10^{-1}/\text{cell}$ 로 가장 높게 나타났으며, *B. ammoniagenes* IFO 12072가 $3.75 \times 10^{-4}/\text{cell}$ 의 순서로 나타났다(Table 1). 얻어진 결과에서 일반적으로 plasmid pKU 6는 plasmid R 1162 보다 높은 빈도로 coryne형 박테리아들내로 형질전환이 되었으며, 또한 *Brevibacterium ammoniagenes*들 보다는 *Corynebacterium glutamicum*들에 더 높은 빈도로 형질전환이 되었다.

형질전환체들의 抗生劑 耐性

Plasmid R 1162 DNA가 형질전환된 *E. coli* C 600/R 1162 형질전환체는 plasmid R 1162의 유전적 選別因子인 Sm과 Su에 대한 耐性을 각기 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 와 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 보여주었으나, coryne형 박테리아들의 plasmid R 1162와 plasmid pKU 6 형질전환체들은 Sm과 Su에 대해 모두 500

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지의 농도에 대한 耐性을 보여주어, *E. coli*에서 보다는 클로닝벡터의 遺傳的 選別因子의 發現이 더 잘되는 것으로 나타났다. 이런 결과는 *E. coli* plasmid의 遺傳的 選別因子들인 kanamycin, tetracycline 그리고 chloramphenicol의 耐性因子들이 *Corynebacterium glutamicum* 내에서 발견되었다는 Ozaki(1984)등의 최근 발표가 뒷받침한다.

형질전환체들의 生長速度와 plasmid들의 安定性

*Brevibacterium ammoniagenes*에 plasmid pKU 6 DNA가 형질전환된 형질전환체는 숙주 세포보다 生長速度가 약간 느리게 나타났으나, *Corynebacterium glutamicum*에 plasmid pKU 6 DNA가 형질전환된 형질전환체는 오히려 숙주세포보다 生長速度가 더 빠른 것으로 나타났다. 또한 plasmid pKU 6가 형질전환된 *B. ammoniagenes*와 *C. glutamicum*의 형질전환체들은 NB medium에서 100세대동안 培養후에도 plasmid pKU 6의 遺傳的 選別因子들인 Sm과 Su에 대한 耐性을 모두 보여주어 숙주세포내에서 plasmid pKU 6가 매우 安定하게 존재함을 알 수 있었다.

Plasmid copy 수의 측정

Coryne형 박테리아 내의 plasmid pKU 6의 copy 수를 측정하기 위하여 Fig. 3과 같은 방법으로, *B. ammoniagenes* IFO 12072형질전환체

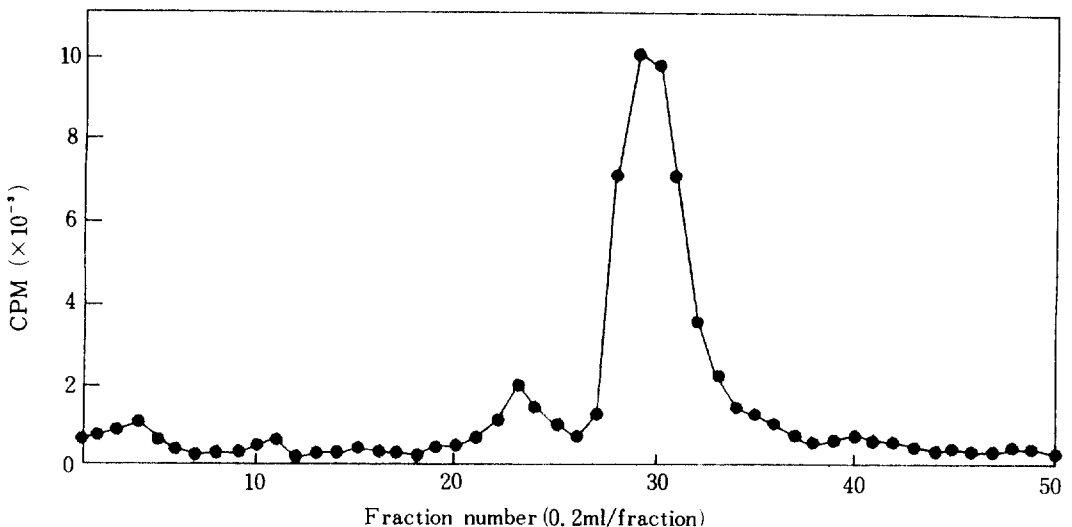


Fig. 5. Distribution of radioactivity after fractionation of $[^3\text{H}]$ -labeled DNA. $[^3\text{H}]$ -labeled DNA was prepared from a cleared lysate. 10 ml of the cleared lysate was prepared from *Corynebacterium glutamicum* grown in MMYE minimal medium containing $[^3\text{H}]$ -thymidine ($5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$)

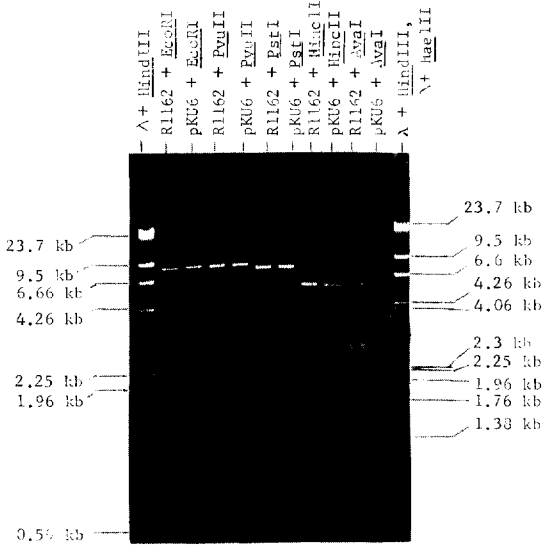


Fig. 6. Restriction patterns of plasmid R 1162 and pKU 6 DNA.

를 [H^3]-thymidine 이 함유된 MMYE medium 에서 培養한 후 세포를 용균하여 EtBr-CsCl density gradient 에 의한 chromosomal DNA 와 plasmid DNA 양을 비교추정하여 plasmid pKU 6의 copy 수를 추정하였다. Fig. 5에서 plasmid 의 peak 는 fraction 21~26사이에서 나타났으며, chromosome 은 fraction No. 27~34사이에서 나타나 그 면적의 비가 약 1대 25로 얻어져 coryne 형 박테리아의 chromosome 크기를 대략 6,000 Kb(Sandoval *et al.*, 1984)라고 가정할때 *B. ammoniagenes* IFO 12072내의 plasmid pKU 6의 copy 수는 25~30개로 보여져 plasmid R 1162가 *E. coli* 내에서 존재할때의 copy 수인 40~60개(Barth 와 Grinter, 1974)의 절반정도로 나타났다.

Plasmid pKU 6 DNA 의 制限酵素 作用部位

Plasmid pKU 6 DNA 의 制限酵素 作用部位들을 確認하기 위하여 plasmid R 1162 DNA 에 그 作用部位들을 갖고 있는 制限酵素 *Ava* I, *Eco* R I, *Hinc* II, *Pst* I 그리고 *Pvu* II를 작용시

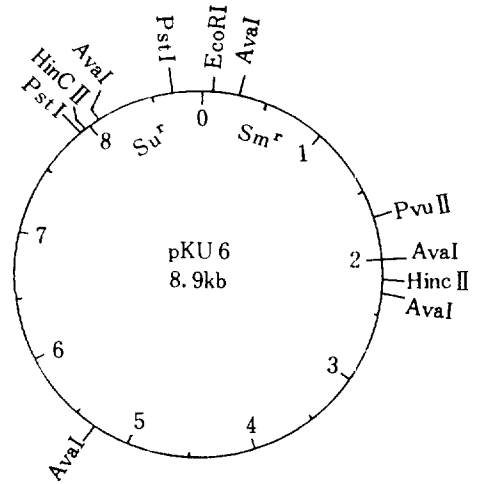


Fig. 7. Restriction pattern maps of plasmid pKU 6. Abbreviations: Su^r, Sm^r, resistance to sulfonamide and streptomycin, respectively.

켜 作用部位의 차이점을 보았다. Fig. 6에서 나타난 것과 같이 plasmid pKU 6 DNA 와 plasmid R 1162 DNA 모두 *Eco*R I 과 *Pvu* II 에 의해서 1조각, *Pst* I 에 의해서 2조각, *Hinc* II 에 의해서 3조각 그리고 *Ava* I 에 의해서 4조각으로 나타나(Fig. 6) 사용된 制限酵素의 作用部位들의 유전자염기배열에는 변화가 일어나지 않았으므로 이들을 plasmid pKU 6에 外部遺傳子의 삽입部位로 利用할 수 있는 것으로 나타났다.

이상의 얻어진 結果로 볼때 얻어진 plasmid pKU 6 는 coryne 형 박테리아 내에서 8.9 Kb 의 크기를 갖고 單一體(monomer)의 형태로 存在할 수 있으며 또한 Sm 과 Su 에 대한 耐性을 나타내어 遺傳的 選別因子들의 발현이 정상적으로 나타나고, plasmid 가 숙주세포 내에서 100세대 배양후에도 25~30개 정도의 copy 수를 갖고 안정성있게 숙주세포속에서 유지되며 外部遺傳子들을 삽입할 수 있는, *Eco*R I, *Pvu* II, *Pst* I, *Hinc* II 그리고 *Ava* I 등의 制限酵素 作用部位들을 갖고 있으므로 coryne 형 박테리아의 클로닝벡터로 사용하기에 충분하다고 생각된다. pKU 6 DNA 의 제한효소 지도는 Fig. 7에서 보여 주는 바와 같다.

摘 要

아미노산, 核酸등의 工業的인 生産에 利用되는 産業的인 菌株들인 coryne형 박테리아들의 分子育種에 必要한 클로닝벡터(cloning vector)의 開發을 위하여 넓은 宿主영역을 갖고 있는 *E. coli* plasmid R 1162 DNA를 *Brevibacterium ammoniagenes*와 *Corynebacterium glutamicum* 등의 coryne형 박테리아들에 형질전환을 하여 얻어진 형질전환체들 내의 plasmid들을 조사한 결과, *Brevibacterium ammoniagenes* IFO12072형질전환체中 한菌株에서만 單一體(monomer)형태의 plasmid를 발견하여 순수분리하고 plasmid pKU 6라 命名하였다.

plasmid pKU 6 DNA는 *Brevibacterium ammoniagenes*와 *Corynebacterium glutamicum*들에 재생 protoplast 당 $3.75 \times 10^{-4}/\text{cell}$ - $1.32 \times 10^{-1}/\text{cell}$ 의 높은 빈도로 재형질전환이 되었으며 *Brevibacterium ammoniagenes*와 *Corynebacterium glutamicum*의 형질전환체들 내에서 25~30개의 plasmid copy 수를 갖고서 100세대동안 안정성있게 유지되었다. 또한 外部遺傳子 삽입부위로 利用될 수 있는 *EcoR* I, *Pvu* II, *Pst* I, *Hinc* II 그리고 *Ava* I 등의 制限酵素 作用部位들도 갖고 있어서, coryne형 박테리아들의 클로닝벡터(cloning vector)로 사용할 수 있다고 밝혀졌다.

參 考 文 獻

- Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Rückert, F.C. H. Franklin, M.M. Bagdasarian, J. Frey, and K.N. Timmis, 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors, II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, **16**:237-247.
- Birnboim, H.C., and J. Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**:1513.
- Transformation of *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli* with plasmidlinked drug-resistance factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**(9):3647-3651.
- Crosa, J.H., and Stanley Falkow, 1981. Plasmids. American Society for Microbiology Ed. Manual of Methods for General Bacteriology. p. 275.
- Godson, N.G., and D. Vapnek, 1973. A simple method of preparing large amounts of $\phi \times 174$ RFI supercoiled DNA. *Biochim. Biophys. Acta.*, **299**:516.
- Kado, C.I., and S.T. Liu, 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. of Bacteriol.*, **145**(3):1365-1373.
- Katsumata, Ryoichi, Akio Ozaki, Tetsuo Oka, and Akira Furuya, 1984. Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. of Bacteriol.* **159**(1):306-311.
- Lin, Lung-shen, and Richard J. Meyer, 1984. Nucleotide sequence and functional properties of DNA encoding incompatibility in the broad host-range plasmid R116. *Mol. Gen. Genet.*, **194**:423-431.
- Ozaki, Akio, Ryoichi Katsumata, Tetsuo Oka, and Akira Furuya, 1984. Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.*, **196**:175-178.
- Rubin, E.M., Wilson, G.A. and Young, F.E., 1980. Expression of thymidylate synthesis activity in *Bacillus subtilis* upon integration of a cloned gene from *Escherichia coli*. *Gene*, **10**:227-235.
- Sandavol, H., A. Aguilar, C. Paniagua, and J.F. Martin, 1984. Isolation and physical characterization of plasmid pCCI from *Corynebacterium callunae* and construction of hybrid derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**:409-413.
- Selvara, J.G., and V.N. Lyer, 1981. Genetic transformation of *Rhizobium meliloti* by plasmid DNA. *Gene*, **15**:279-283.