

대장균의 acetyl CoA carboxylase 유전자의 클로닝

박 완 · 송방호* · 홍순덕

경북대학교 미생물학과

*경북대학교 생물교육학과

(1986년 2월 21일 수리)

Cloning of Acetyl CoA Carboxylase (*fabE*) in *Escherichia coli*

Wan Park, Bang Ho Song* and Soon Duck Hong

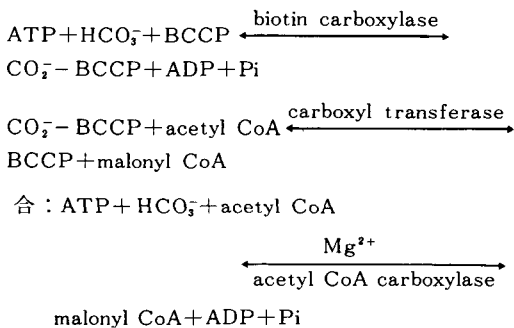
Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu, Korea

*Department of Biology, Kyungpook National University, Taegu, Korea

(Received February 21, 1986)

A defective lambda transducing phage carrying acetyl CoA carboxylase gene (*fabE*) from *Escherichia coli* chromosome (72 min on the current linkage map) has been isolated. A restriction map of the chromosomal region from defective transducing phage was established by digestion with combination of the restriction enzymes. No cleavage site for the enzyme *EcoRI* was found in this region. Restriction fragments were cloned from defective transducing phage into high copy number plasmid vector pACYC184 to generate hybrid plasmids which were capable of complementation of *fabE* temperature sensitive mutation. We show here that the *fabE* gene is located on a 3.4 megadalton *BamHI-Sall* fragment with a *HindIII* site, which lies within the 7.4 megadalton *BglII* fragment, by complementation analysis.

생물세포의 유지와 증식을 위한 필수적인 대사계 중의 하나인 지방산 생합성의 첫단계는 세포질내에서 acetyl CoA를 탄산화하여 malonyl CoA를 생성하는 acetyl CoA carboxylase 반응이다⁽¹⁾. 이 반응은 biotin의 탄산화반응과 biotin에 결합한 활성형 CO₂의 acetyl CoA로 전이하는 반응의 두단계로 이루어진다. 즉,



이 반응을 촉매하는 acetyl CoA carboxylase (EC 6.4.1.2)는 지방산 생합성의 율속단계를 지배하는 매우 복잡한 구조의 조절성 효소로서 대장균의 경우는 분자량 4만 4천의 biotin carboxyl carrier protein(BCCP : 분자량 2만 2천 subunit의 2량체), 9만 8천의 biotin carboxylase(분자량 5만 1천 subunit의 2량체) 및 13만 dalton의 carboxyl transferase(분자량 3만 5천과 3만 subunit의 4량체)의 3종의 단백질로 이루어져 있다⁽²⁻⁶⁾. 대장균에서는 acetyl CoA carboxylase의 유전자 *fabE* (fatty acid biosynthesis E)와 변이로, subunit BCCP의 안정성에 관계되는 온도감수성 변이주가 분리되어⁷ 염색체지도상⁸ 72분에 위치되어 있을뿐 유전자의 구조와 이들 유전자 산물의 생합성의 발현기작 및 조절양식등은 밝혀져 있지 않다. 이와같은 유전학적인 연구와 생화학적 연구가 함께 이루어짐으로써 지방산생합성과 같은 생체의 생명현상을 보다 더

분명히 밝혀 수 있다고 인식되고 있다. 유전자의 구조나 발현양식등의 유전자의 해석을 위한 방법으로써 유전자의 클로닝기법등은 유효한 연구수단이 되고 있다. 우리는 대장균 acetyl CoA carboxylase의 유전적 발현을 연구하기 위해서 먼저 그 유전자 *fab E*를 λ 형질도입 파아지를 이용한 생체내에서의 클로닝, 제한효소 지도 작성 및 high copy number plasmid pACYC 184에의 재클로닝을 보고하기로 한다.

재료 및 방법

사용균주와 파아지 및 플라스미드

본 실험에 사용한 대장균의 균주와 파아지 및 플라스미드는 Table 1과 같다.

배지

세균의 배양에는 L-broth (Lennox broth⁽¹²⁾) 1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1% glucose, pH 7.0)를 사용했다. λ 파아지의 흡착 감염 및 λ 파아지의 역가를 검정할 경우는 Tryptone broth⁽¹³⁾ (1% Bactotryptone, 0.25% NaCl, 0.2% Maltose, 10 mM MgSO₄, pH 7.0)를 사용해 세균을 배양했다. 플라스미드의 선별에는 항생물질로써 chloramphenicol (25 μ g/ml) tetracycline (20 μ g/ml)과 kanamycin (50 μ g/ml)을 사용했다. 배지의 고화

에는 1.8% 한천을, 파아지의 역가 검정등에는 0.6% 상층한천을 사용했다.

λ 특수형질도입 파아지의 분리

Schrenk와 Weisberg의 방법⁽¹³⁾에 따라서 저빈도형질도입 파아지의 혼합용균액을 조제했다. 즉 1차 λ 파아지 부착부위가 결손된 균주 KS 302(*gal-att λ -bio*)⁴에 λ cI₈₅₇S_{am}7을 moi 10으로 감염시켜 한 평판에 수백 내지 수천개의 용원성 균주가 나오도록 L-broth 한천평판에 도말했다. 이때 λ 파아지의 흡착부위의 변이등으로 λ 파아지의 감염에 대해 저항성으로 된 균주가 용원성균주와 함께 집락을 형성하는 것을 막기 위해 흡착부위 변이균주에도 감염이 가능한 λ cI (*int*)⁴h 80 (10⁸ PFU/pate)을 동시에 도말했다. 이와같이하여 분리한 약 1만 株의 용원성균을 L-broth에 현탁하여 1 ml 당 10⁸개의 세포농도가 되게끔 용원성균의 혼합액을 만들었다. 이 혼합액을 30 $^{\circ}$ C에서 2~3세대 배양 후 42 $^{\circ}$ C에서 30분간 열처리에 의해 파아지를 유발시켰다. 그 후 다시 온도를 37 $^{\circ}$ C로 내려서 2~3시간 배양했다. 이것을 저속원심 집균하여 균을 100배 정도 농축하고 chloroform (0.05 ml/ml)을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 진탕하여 용균시켰다. 이 저빈도형질도입 파아지의 혼합용균액을 사용해 *fab E* 변이주 L8 (λ c⁺) 균주에 파아지를 흡착 감염시킨 후 온도감수성 변이가 회복되어 40 $^{\circ}$ C에서 생육이 가능한 균주를 선별하였다.

파아지 DNA의 조제

고빈도형질도입 파아지 용균액은 이중용원성균 L8 (λ , λ d *fab E* cI₈₅₇ S_{am}7)으로부터 mitomycin C로 파아지를 유발시켜 만들고 이 용균액으로부터 λ d *fab E*의 DNA를 조제했다. 37 $^{\circ}$ C L-broth에서 약 2~3 \times 10⁸ cell/ml까지 증식한 L8 (λ , λ d *fab E* cI₈₅₇ S_{am}7)을 mitomycin C (10 μ g/ml)으로 유발시켜 용균이 일어날 때까지 2~3시간 진탕한 후 1/100 용량의 chloroform을 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 진탕하여 완전히 용균시켰다. Yamamoto⁽¹⁴⁾ 등의 방법에 따라 10% polyethylene glycol 6000, 0.5 M NaCl의 존재하에서 4 $^{\circ}$ C 8000 \times g 원심에 의해 파아지입자를 침전 농축했다. 10 mM MgCl₂ 용액에 현탁한 파아지액에 DNase, RNase를 작용시킨 다음 EDTA (20 mM), protease K (50 μ g/ml), sodium dodecylsulfate (SDS 0.5%)를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리 후 페놀추출등을 거친 다음 에틸알코올로 DNA를 침전시켰다⁽¹⁵⁾. 침전을 TE 완충액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6)으로 1 ml 당 100~200 μ g DNA 농도가 되게끔 용해시켜 4 $^{\circ}$ C에 보존했다. 이 DNA 시료는 λ d *fab E* 형질도입 파아지와 λ hel-

Table 1. *E. coli*, phage strains and plasmids.

Strain	Relevant properties	Reference or source
<i>E. coli</i>		
KS 302	F ⁻ (<i>gal-attλ-bio</i>) ⁴ <i>sup 0 thi</i>	(9)
L 8	F ⁻ <i>fabE22 thi-1</i> <i>gltA5 ara-14 lacY1</i> <i>galK2 xyl-5 mtl-1</i> <i>tfr-5 tsx-57 str-20</i> λ	D. F. Silbert (7)
Ymel	F ⁺ <i>mel-1 supF</i>	K. Mizobuchi
K 802	<i>hsdR⁻ hsdM⁺ gal</i> <i>met supE</i>	W. B. Wood
λ phage		
λ papa		H. Uchida
λ cI		M. Matsushashi
λ vir		M. Matsushashi
λ cI ₈₅₇ S _{am} 7		K. Mizobuchi
λ cI (<i>int</i>) ⁴ h80		K. Yoda
λ d <i>fab E</i>		This paper
Plasmid		
pACYC 184	Cm ^r Tc ^r	(10)
pLG 339	Km ^r Tc ^r	B. G. Spratt (11)

per 파아지 DNA의 혼합용액이 된다.

플라스미드 DNA의 조제

Clewell과 Helinski⁽¹⁶⁾의 Brij-DIC (sodium deoxycholate) 법으로 cleared lysate를 조제하여 CsCl-EtBr 밀도 기울기 원심분리에 의해 플라스미드 DNA를 정제했다. Beckman SW 27 원심관중 약 30 ml의 cleared lysate 밑에 1 ml의 포화CsCl용액을 넣어 Beckman SW 27 rotor로 18,000 rpm 16시간 원심분리 후 원심관 하층 약 4~8 ml를 회수하여 젤리狀의 불용부분을 피펫으로 잘 현탁한다. EtBr (400 µg/ml), CsCl을 넣어 혼합하여 ρ = 1.55로 조정한 후 10,000 rpm 10분간 원심하여 상층의 불용물을 제거한 용액을 Beckman SW 50.1 rotor로 45,000 rpm 36시간 원심했다. 폐환상 DNA (cc DNA)의 부분을 분취하여 Isopropanol로 EtBr을 제거한 후 TE 완충액에 대하여 투석을 행한 후 4°C에 보존했다. 그러나 형질전환주의 플라스미드의 분리 동정에는 Holmes⁽¹⁷⁾등의 방법 또는 alkali-SDS 법⁽¹⁸⁾등의 간편법을 사용해 플라스미드를 세포 염색체 DNA로부터 분리했으며 필요에 따라 agarose gel 전기영동에 의해 정제하여 사용했다.

제한효소와 T4 DNA ligase의 반응

제한효소의 반응액 조성은 Maniatis⁽¹⁹⁾등의 방법에 따라 NaCl의 농도가 상이한 고(100 mM), 중(50 mM), 저(0 mM)의 3 종류의 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂의 완충액을 사용했다. Ligation⁽²⁰⁾은 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 6 mM KCl, 10 mM Dithiothreitol, 1 mM ATP, 말단기의 농도로 1~20 nM의 DNA 단편의 20 µl 반응용액에 T4 DNA ligase 0.5 unit를 더해 10°C에서 18~24시간 반응시킨 후 agarose gel 전기영동으로 ligation을 확인하였다.

형질전환

Dagert와 Ehrlich의 방법⁽²¹⁾을 따랐다. 초기 대수증식기 (A₆₀₀ = 0.3)의 수용균을 집균하여 0~4°C의 50 mM CaCl₂ 용액으로 균체를 씻은 후 배양액의 1/10 부피의 50 mM CaCl₂ 용액에 현탁하여 0~4°C에서 1~24시간 방치하여 competent cell을 조제했다. Competent cell 0.3 ml에 플라스미드 또는 ligation 반응산물 2~10 µl (~100 ng DNA)를 가하여 30분간 빙냉중에 방치한 후 3 ml의 L-broth를 첨가해 30°C 또는 37°C에서 온화하게 진탕한 후 선택배지에 도말했다.

agarose gel 전기영동

DNA 단편의 부분정제 및 제한효소에 의해 분해된 DNA 단편의 크기의 측정에는 주로 0.7% agarose gel 전기영동으로 행하였으며 경우에 따라서 agar-

ose 농도를 가감하였다. 전기영동의 완충액은 89 mM Tris-borate pH 8.3, 2.5 mM EDTA 용액을 사용했다.

시약

chloramphenicol, tetracyclin은 sigma chemical 회사의 것을 kanamycin은 동아제약의 용성 황산 가나마이신을 사용했다. 각 제한효소, T4 DNA ligase는 宝酒造(株) 제품을 이용했다. 전기영동용 agarose는 Seakem agarose (ME), Marine Colloids, Inc.를 사용했다. 그 외 시약은 시판 특급시약을 구입 사용했다.

결과 및 고찰

λ d fab E 형질도입 파아지의 분리

염색체상의 1차 λ 부착부위 결손변이주 KS 302⁽⁹⁾ (gal-att λ -bio)⁴에 λ 파아지를 용원화시키면 염색체상에 다수 존재하는 2차 λ 부착부위중의 어느 한 곳에 용원화한다⁽²²⁾. 이 용원성균주 (lysogenic strain)로부터 λ 파아지를 유발하면 그 용원액 (lysate) 중에는 저빈도로 2차 λ 부착부위 근방의 대장균 DNA를 가진 형질도입 파아지가 포함되어 있다.

여러종류의 용원성균을 혼합해서 유발하면 그 용원액에는 여러종류의 형질도입 파아지가 존재하고

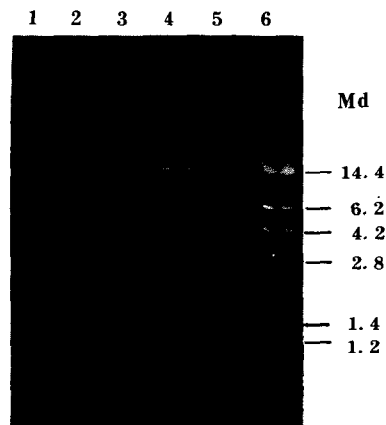


Fig. 1. Electrophoretic analysis of restriction enzyme digests of DNA from a mixture of the transducing and helper phage.

The sizes (in Md) of lambda Hind III fragments are indicated on the right. Lanes: 1, Sma I; 2, Kpn I; 3, Bam HI; 4, Eco RI; 5, Hind III; 6, Hind III digest of λc1857 Sam7. The arrow indicates the 20 Md Eco-RI chromosomal DNA fragment inserted in the defective transducing phage λd fab E.

있다(13). 이와같은 유발용균액 (lysate) 으로부터 *fab E* 변이주 L 8⁽⁷⁾(λ c⁺)에 *fab E*⁺형질도입을 행했다. 이 형질도입 실험에서 *fab E* 변이주 L 8을 야생형 λ c⁺로 용원화시켜 수용균으로 사용한 것은 *fab E* 변이가 온도감수성 변이기 때문이다(7). 즉 *fab E*⁺의 선택조건인 고온(40°C)에서 λ cI₈₅₇Sam 7 유래의 형질도입 파아지의 온도 유발을 막기 위한 것이다. 이 실험에서 *fab E*⁺로 된 형질도입주(40°C 생육가능)가 분리되었다. 이로 미루어 *fab E* 유전자 근방에도 λ 의 2차 부착부위의 존재를 생각할 수 있다. 이 *fab E*⁺형질도입주로부터 파아지를 유발시켜 파아지액을 만들었다(재료 및 방법). 이 파아지액으로 *fab E* 변이주 L 8에 형질도입을 행하면 2×10^{-4} td/P-FU(transducant/Plaque Forming Unit)의 빈도로 *fab E*⁺로 된 형질도입주가 분리되는 것으로 보아 이 파아지액은 *fab E*의 고빈도 형질도입액(high frequency transducing lysate, HFT)이라고 할 수 있다. 이 고빈도 형질도입액으로 세균의 용균에 관계하는 λ 파아지의 S 유전자의 amber 변이를 suppress할 수 있는 Ymel(*sup F*) 상에서 10개의 plaque를 분리하여 각각의 plaque로부터 파아지액을 만들어 *fab E* 변이주 L 8에 형질도입을 행했으나 그 어느 파아지액으로부터도 *fab E*⁺형질도입은 되지 않았다. 이 결과로 미루어 보아 우리가 분리한 *fab E*형질도입 파아지는 plaque 형성능의 결함파아지로 생각되며 λ d*fab E*로 부르기로 한다.

클로닝된 염색체 DNA의 제한효소지도

CsCl 밀도 기울기 원심분리법등에 의해 형질도입

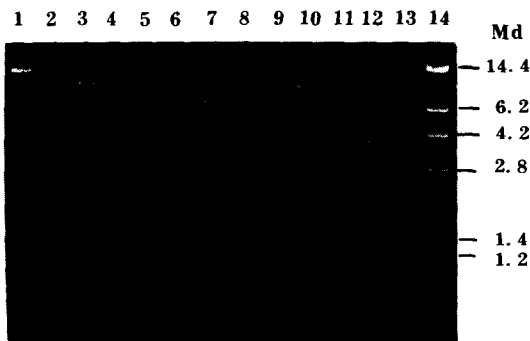


Fig. 2. Agarose gel(0.7%) electrophoretogram of restriction enzyme digests of 20 Md *EcoRI* fragment.

The sizes(in Md) of lambda *HindIII* fragments are indicated on the right. Lanes: 1, 14, *HindIII* digest of λ cI857Sam7; 2, *HindIII* + *Sma I*; 3, *HindIII*; 4, *Bgl II* + *BamHI* + *Sal I*; 5, *BamHI*; 6, 10, *Bgl II* + *BamHI*; 7, *Bgl II*; 8, *Sal I* + *BamHI*; 9, *Bgl II* + *Sal I*; 11, *Sma I* + *Sal I*; 12, *Sma I* + *BamHI*; 13, *Sma I* + *Bgl II*.

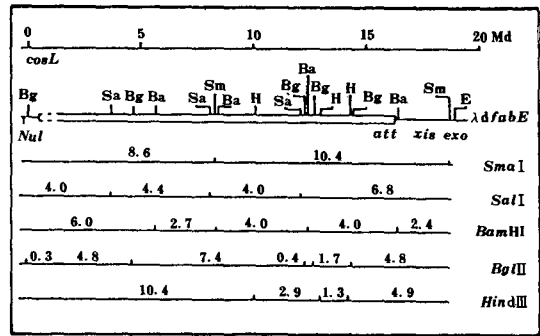


Fig. 3. Restriction map of the 20 Md *EcoRI* chromosomal DNA fragment inserted in the λ d*fab E*.

Abbreviations for restriction endonuclease cleavage sites; Ba, *BamHI*; Bg, *BglII*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; Sa, *SalI*; Sm, *SmaI*. The phage right arm and the remaining parts of left arm are shown by single lines. The chromosomal DNA extending from *att* into the phage left arm is shown within a box. The precise junction points between the left end of the chromosomal DNA and the remainder of the lambda left arm are unknown and are indicated approximately by broken lines.

파아지를 helper 파아지로부터 분리하여 그 DNA를 조제하여 염색체 유래의 DNA를 해석할 수도 있으나 본 실험에서는 형질도입 파아지와 helper 파아지의 혼합 DNA를 제한효소로 처리하여 agarose gel 전기영동에 의해서 염색체 DNA부분을 동정하고 이어서 제한효소 지도를 작성하였다. 고빈도 형질도입 파아지액으로부터 조제한 DNA를 제한효소 *HindIII*, *BamHI*, *SmaI*, *KpnI* 및 *EcoRI* 등으로 분해하여 생성된 단편들을 agarose gel 전기영동에 의해 분획했다. λ 부착부위(*att*) 우측에서 유래된 λ DNA 단편들은 뚜렷하게 보이지만 *att* 좌측의 단편들은 helper 파아지 유래의 DNA가 혼재하기 때문에 보이기는 하지만 약하며 저분자의 경우 거의 보이지 않게 되어 있다(Fig. 1). 이는 형질도입 파아지에 존재하는 염색체 유래의 DNA는 *att* 좌측의 파아지 DNA와 치환된 것을 나타내고 있다(Fig. 3 참조). 따라서 plaque 형성능을 상실한 λ d*gal* 형의 결함파아지 λ d*fab E*인 사실과 잘 부합된다. Fig. 1을 보면 *EcoRI*의 처리는 λ DNA로부터 생기는 단편이외에 약 20 megadalton(Md) 크기의 새로운 단편이 하나만 출현한다(이하 *EcoRI* 단편이라고 함). 이 *EcoRI* 단편은 λ d*fab E* DNA상의 *exo*座에 존재하는 *EcoRI* 절단부위로부터 좌측의 *cosL*까지의 단편으로 이 사이에 염색체 유래의 DNA를 *att* 좌측으로부터 가지고 있으며 염색체 DNA영역내에는

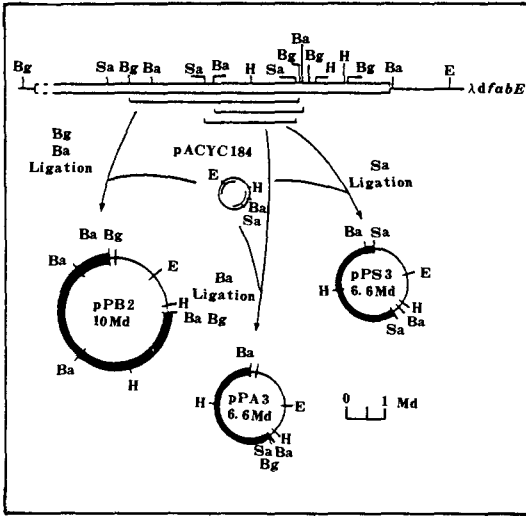


Fig. 4. Subcloning of the *fabE* gene.

fabE was subcloned from the defective transducing phage λ *dfabE* as described in the text. Solid blocks indicate chromosomal DNA. Abbreviations are described in the legend to Fig. 3. Ba/Bg is a hybrid *Bam*HI-*Bgl* II site.

*Eco*RI 절단부위가 없음을 알 수 있다 (Fig. 3 참조). 이 염색체 DNA의 제한효소 지도의 작성을 쉽게 하기 위하여 형질도입 파아지와 helper 파아지 DNA의 혼합물을 *Eco*RI로 분해하여 agarose gel 전기영동에 의해 *Eco*RI 단편을 부분정제⁽²³⁾하였다. 이 분획에는 helper 파아지 유래의 13.3 Md 크기의 단편이 소량 혼합되어 있었으나 그외의 단편은 제거할 수 있었다. *Eco*RI 단편을 수 종류의 제한효소의 단독 또는 혼합분해에 의해 생성된 단편의 크기를 agarose gel 전기영동상에서 분석함으로써 (Fig. 2 자료의 일부 제시) 작성한 제한효소 지도는 Fig. 3과 같다.

제한효소 단편의 재클로닝과 *fabE* 유전자의 영역 약 20 Md의 *Eco*RI 단편을 *Bgl* II, *Bam*HI, *Sal* I, *Hind*III 등으로 분해한 후 각 제한효소 단편들을 고복제수 및 저복제수 플라스미드 벡터 pACYC 184 (Cm^r, Tc^r), pLG 339 (Km^r, Tc^r)의 tetracycline 유전자 (Tc^r) 내의 각각의 제한효소부위 (*Bgl* II 단편의 경우는 *Bam*HI 부위를 이용)에 재클로닝을 시도했다. 즉 *Eco*RI 단편과 플라스미드 벡터를 각 조합의 제한효소로 처리하여 T4 DNA ligase로 연결한 후 수용균 K 802 또는 *fabE* 변이주 L 8에 형질전환시켜 pACYC184를 벡터로 한 경우 Cm^r Tc^s, pLG 339를 벡터로 한 경우 Km^r Tc^s의 형질전환주를 선발했다. K 802를 수용균으로하여 분리한 재조합 플라스미드는 다시 *fabE* 변이주 L 8에 재차 형

질전환을 행한 후 40°C에서의 생육의 회복에 의해 상보성 (플라스미드상의 유전자에 의한 표현형질의 회복)을 판정함으로써 *fabE*의 클로닝 및 그 유전자의 영역을 동정하였다. 그 결과 *fabE* 변이를 회복할 수 있는 세 종류의 재조합 플라스미드 pPB2, pPA 3와 pPS 3를 분리할 수 있었다 (Fig. 4). 또한 pPB 2의 7.4 Md의 *Bgl* II 단편과 pPA 3와 pPS3의 4.0 Md의 *Bam*HI 단편 및 *Sal* I 단편이 각각 역방향으로 삽입된 각각의 재조합 플라스미드 pPB 13과 pPA 5 및 pPS 9들도 L 8의 *fabE* 변이에 대한 상보성을 나타내었다 (자료 생략). 이 사실은 7.4 Md의 *Bgl* II 단편은 물론 *Bam*HI-Sal I 단편내에 *fabE*의 유전자 및 특자의 promoter의 존재를 시사해주고 있다. 이 결과를 종합해 보면 Fig. 5에서 보는 것처럼 *fabE* 유전자의 위치는 7.4 Md *Bgl* II 단편상의 *Hind*III의 절단부위를 가진 3.4 Md *Bam*HI-Sal I 단편내에 존재하고 있음을 알 수 있다. 본 실험에서는 acetyl CoA carboxylase 복합체중의 BCCP subunit의 변이주로 생각되는 L 8⁽⁷⁾을 수용균으로해서 수용균의 온도감수성 변이의 회복을 기준으로 *fabE*의 클로닝을 진행해 왔다. 대장균 acetyl CoA carboxylase 복합체의 subunit의 분자량⁽⁴⁾으로부터 유전자의 크기를 계산해 보면 최소 약 3 Md의 DNA 영역이 필요한 정도이므로 본 실험에서 분리한 *fabE* 유전자의 크기로 보아서는 BCCP 유전자를 비롯한 나머지 전 subunit의 유전자가 포함되어 있을 가능성은 크다고 생각되나 acetyl CoA carboxylase 복합체의 전 subunit의 유전자가 클로닝되었는지는 알 수 없다. 이는 L 8의 *fabE* 변이에 대해 상보성이 없는 나머지 단편을 가진 재조합 플라스미드가 acetyl CoA carboxylase 복합체의 다른 subunit의 유전자를 가지고 있을 가능성도 배제

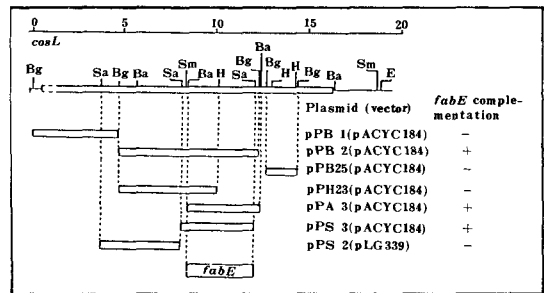


Fig. 5. Mapping of *fabE* locus by complementation analysis with hybrid plasmid.

The complementation of *fabE* mutation was confirmed by the rescue of growth of L 8 (*fabE*) on L-broth agar plate at 40°C.

할 수 없기 때문이다. acetyl CoA carboxylase 복합체의 유전자의 조직이나 구조, 유전자 발현의 조절양식등을 밝히기 위해서는 나머지 subunit의 변이주의 분리 및 그에 따른 상보성 실험등의 연구가 앞으로 더욱 더 요구된다.

요 약

대장균 염색체의 acetyl CoA carboxylase (*fab E*) 영역(염색체 지도상 72분 영역)의 유전자를 가진 결합형질도입 파아지를 분리했다. 이 형질도입 파아지로부터 20 Md의 염색체 유래의 DNA를 분리하여 제한효소 지도를 작성했으며 이 영역에는 제한효소 *Eco* RI의 절단부위는 없었다. 형질도입 파아지 DNA의 제한효소 분해산물들은 pACYC 184 플라스미드 벡터에 재클로닝하여 *fab E*의 온도감수성 변이를 회복할 수 있는 수 종류의 플라스미드를 분리했다. 이들 플라스미드를 분석하여 *fab E* 유전자는 7.4 Md *Bgl* II 단편상의 *Hind* III의 절단부위를 가진 3.4 Md *Bam* HI - *Sal* I 단편내에 존재함을 밝혔다.

사 사

이 논문은 1985년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었으며, 관계자에게 사의를 표하는 바입니다. 그리고 본 연구를 할 동안 많은 격려를 해주신 본대학교 유전공학 연구소 소장 서정훈 박사께 깊은 감사를 올리며 또한 유익한 토론을 해주신 본대학교 농화학과 이인구 박사께 감사를 드립니다.

참고문헌

- Volpe, J.J. and P.R. Vagelos: *Annu. Rev. Biochem.* **42**, 21-60 (1973).
- Alberts, A.W., S.G. Gordon and P.R. Vagelos: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 1259-1263 (1971).
- Fall, R.R. and P.R. Vagelos: *J. Biol. Chem.* **247**, 8005-8015 (1972).
- Guchhait, R.B., S.E. Polakis, P. Dimroth, E. Stoll, J. Moss and M.D. Lane: *J. Biol. Chem.* **249**, 6633-6645(1974).
- Guchhait, R.B., S.E. Polakis, D. Hollis, C. Fenselau and M.D. Lane: *J. Biol. Chem.* **249**, 6646-6656(1974).
- Polakis, S.E., R.B. Guchhait, E.E. Zwergel and M.D. Lane: *J. Biol. Chem.* **249**, 6657-6667 (1974).
- Silbert, D.F., T. Pohlman and A. Chapman: *J. Bacteriol.* **126**, 1351-1354 (1976).
- Bachmann, B.J.: *Microbiol. Rev.* **47**, 180-230 (1983).
- Shimada, K., R. Weisberg and M. Gottesman: *J. Mol. Biol.* **80**, 297-314 (1973).
- Chang, A.C.Y. and S.N. Cohen: *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156 (1978).
- Stoker, N.G., N.F. Fairweather and B.G. Spratt: *Gene* **18**, 335-341 (1982).
- Lennox, E.S. *Virology* **1**, 190-206 (1955).
- Sherenk, W. J. and R.A. Weisberg: *Molec. Gen. Genet.* **137**, 101-107 (1975).
- Yamamoto, K.R., B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Lawhorne and G. Treiber: *Virology* **40**, 734-744 (1970).
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, C.S.H., N.Y. page 85 (1982).
- Clewell, D.B. and D.R. Helinski: *Biochemistry* **9**, 4428-4439 (1970).
- Holmes, D.S. and M. Quigley: *Anal. Biochem.* **114**, 193-197 (1981).
- Birnboim, H.C. and J. Doly: *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523 (1979).
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, C.S.H., N.Y. page 104 (1982).
- Weiss, B., A. Jacquemin-Sablon, T.R. Live, G.C. Fareed and C.C. Richardson: *J. Biol. Chem.* **243**, 4543-4555 (1968).
- Dagert, M. and S.D. Ehrlich: *Gene* **6**, 23-28 (1979).
- Shimada, K., R. Weisberg and M. Gottesman: *J. Mol. Biol.* **63**, 483-503 (1972).
- Yang, R.C.A., J. Lis and R. Wu: *Methods Enzymol.* **68**, 176-181 (1979).