慶北大農學誌(Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.) 5 : 52～58 (1987)

異種 Plasmid에 의한 *Saccharomyces cerevisiae*의 同時形質 轉換

姜秉兌 · 朴鍾聲 · 李麟九

慶北大學校 農科大學 農化學科

Cotransformation of *Saccharomyces cerevisiae* with Heterogenous Plasmids

Kang, Byung Tae · Park, Jong Sung · Rhee, In Koo

Dept. of Agricultural Chemistry Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

The yeast *S. cerevisiae* DBY747 was transformed with E. C - S. C shuttle vector YIp5, YEp13 and YRp7 by the method of spheroplast. The transformation frequency of YEp13 and YRp7 in *S. cerevisiae* DBY747 was 1.2×10^3 and 1.0×10^2 per 10μg of DNA, respectively. The transformants with YIp5 plasmid incapable of autonomous replication in *S. cerevisiae* were not detected in the condition of this experiment, but YIp5 plasmid expressed the gene carried on it when cotransformed with a helper plasmid such as YEp13 or YRp7 : autonomously replicating plasmid.

When plasmids were used in covalently closed circular form, cotransformation frequency of YIp5 - YEp13 and YIp5 - YRp7 was 210 and 95 per 10μg of DNA, respectively.

In cotransformation of linear plasmids, transformation frequency of the same cohesive ends was similar to that of noncomplementary cohesive ends. Transformants by the cotransformation with circular plasmids have been shown much higher frequency than with linear plasmids in *S. cerevisiae* DBY 747.

The mitotic segregation stability test suggested that the cotransformant of YIp5 - YEp13 was more stable than that of YIp5 - YRp7.

緖 論

酵母에서의 遺傳子 造作 技法은 最近에 잇달은 酵母의 形質轉換방법의 開發로 크게 발전하였다.

酵母의 原形質体를 利用한 形質轉換은 Hinnen[5]에 의해 1978年 開發된 이래 最近에는 lithium acetate 處理를 통하여 生細胞 自体를 形質轉換시키는 方法이 Ito[7]에 의해 報告된 바 있다. 또한 Struhl[16]은 酵母와 大腸菌 間에 形質轉換이 可能한 셔틀 벡터中 YIp 系列의 플라스미드는 酵母의 染色体 DNA와 같은 塩基配列 部位에 挿入되어 지지 않으면 複製를 할 수 없기 때문에 形

Table 1. The microbial strains and vectors used.

Strain and vector	Genotype or phenotype	Reference
S. cerevisiae		
DBY747	a, his3, leu2, ura3, trp1	
E. coli		
HB101	F^-, hsds20 (r^-, m^-), recA13, ara−14, lacY1, galk2, proA2, rpsL20 (Sm^r), xyl−5, mtl−1, supE44	Boyer and Roulland−Dussoix (1969)
C600	F^-, thi−1, thr−1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44	Appleyard (1954)
Plasmid		
YIp5	Amp^r, Tet^r, PyrF ; $Ura3^+$	Struhl (1979)
YEp13	Amp^r, Tet^r, LeuB ; $Leu2^+$	Broach (1979)
YRp7	Amp^r, Tet^r, TrpC ; $Trp1^+$	Struhl (1979)

質 發現 頻度가 매우 떨어진다. 1981年 Orrweaver[14]는 YIp5 플라스미드의 한 部位를 切斷하여 形質轉換시킨 結果 높은 頻度의 形質轉換体를 얻었다는 報告를 한 바 있으며, Suzuki[15]는 線狀의 YIp5플라스미드와 pJDB219플라스미드의 2μm DNA 部位만을 分離하여 同時形質轉換시켜 역시 높은 頻度의 形質轉換体를 얻었으며, 이들 結果를 土臺로 生体內 ligation 可能性을 主張하였다.

本 實驗에서는 YIp5플라스미드와 2μm DNA 部位를 가진 YEp13플라스미드, 또 자동복제배열부위(ARS)를 가진 YRp7플라스미드를 同時形質轉換시켜 YIp5플라스미드의 形質發現과 形質轉換体의 安定性을 알아 보았으며, 環狀플라스미드間의 形質轉換 頻度와 線狀플라스미드 間의 形質轉換 頻度를 比較 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 使用菌株 및 벡터 플라스미드

形質轉換에 使用된 受容細胞는 *S. cerevisiae* DBY747이며, 벡터 플라스미드는 YIp5, YEp13, YRp7을 각각 使用하였으며, 그 숙주세포는 大腸菌을 이용하였다(표 1).

2. 培 地

숙주세포인 大腸菌 배양을 위해서는 완전배지인 LB를 使用하였으며, 受容細胞인 酵母의 경우 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose (YEPD) 배지에 배양하여 실험에 使用하였다.

形質轉換体의 선별배지로는 최소배지(YM)인 0.7% yeast nitrogen base 혹은 yeast nitrogen base(w/o), 2% glucose, 2% agar에 필요에 따라 아미노산(50μg/ml)과 塩基(20μg/ml)를 添加하여 使用하였다(표 2).

Table 2. Selection medium of yeast transformant

(unit : %)

Component	A	B	C	D	E
Yeast nitrogen base	0.7	0.7	−	0.7	−
Yeast nitrogen base (w/o)	−	−	0.7	−	0.7
Dextrose	2	2	2	2	2
L−Histidine	−	−	0.05	−	0.05
L−Leucine	0.05	−	0.05	−	0.05
Uracil	−	0.02	0.02	−	−
Bacto agar	2	2	2	2	2

* A ; YIp5, B ; YEp13, C ; YRp7,
D ; YIp5+YEp13, E ; YIp5+YRp7

3. 플라스미드 DNA 抽出 및 精製

*E. coli*로부터 플라스미드의 抽出은 Birnboim[3]이 使用한 方法을 약간 變形시켜 다음과 같이 행하였다. (Fig. 1)

LB 斜面培地에서 12時間 程度 培養한 菌株를 LB100ml가 담긴 진탕 플라스크에 한 白金耳 를 接種하여 37℃에서 後期代數增殖期($O.D_{600}$ = 2−3)까지 培養한 培養液을 遠心分離하여 集菌한 다음 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH8.0 (TE) 緩衝液으로 2回 洗滌하고 25mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50mM Glucose pH 8.0 (TEG) 緩衝

Culture broth (LB)
↓
Harvest and wash with TE buffer
↓
Suspend in 5ml of TEG buffer
| Add lysozyme to 2mg/ml
Incubate at 0℃ for 30min.
| Add 2V of 1% SDS−0.2N NaOH
Incubate at 0℃ for 5min.
| Add 1.5V of 5M KOAc (pH4.8)
Incubate at 0℃ for 60min.
↓
Centrifuge
↓
Supernatant
| Add 2V of EtOH
Incubate at −20℃ for 2hr.
↓
Centrifuge
↓
Precipitant
| Wash with 70% EtOH
Dry and dissolve in TE buffer

Fig. 1. Isolation of plasmid DNA in *E. coli*.

液 5ml에 현탁시킨 後 lysozyme을 ml當 2mg 되게 添加하여 0℃에서 30分間 放置한 다음 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) −0.2N NaOH 溶液을 2培 넣고 溶菌이 일어날때까지 잘 섞어 준다. 이 溶菌液을 0℃에서 5分間 放置하고 5M potassium acetate (pH4.8) 溶液을 1.5培 添加하여 천천히 反轉하며 섞어준 다음 0℃에서 1時間 放置한다. 이 溶液을 12,000rpm에서 20分間 遠心分離하여 上澄液을 다른 殺菌容器에 넣고 −20℃의 95% 에탄올을 2培 넣고 잘 섞어 준 다음 −20℃에서 2時間 程度 放置 分離하여 上澄液을 버린 後 沈澱物을 70% 에탄올로 1回 洗滌한 다음 眞空乾燥器에서 脫水處理 後 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0 (TE) 緩衝液 1ml 에 녹여 4℃ 냉장고에 保管하여 實驗에 使用하였다. 環狀플라스미드 DNA의 精製는 McDonell法[5] 에 준하여 電氣泳動 抽出法으로 행하였다.

4. 플라스미드 DNA의 切斷

셔틀 벡터 DNA를 線狀形으로 하기 위해 YEp13과 YRp7은 切斷部位가 하나인 BamHI (30U/μg)을 使用하였으며, YIp5는 同時形質轉換時 異質切斷部位間의 ligation을 보기위해 BamHI 혹은 SalI으로 각각 切斷하였다. 切斷은 37℃에서 3時間 反應시킨 後 65℃에서 15分間 處理하여 反應을 停止시킨 다음 페놀처리 후 使用하였다.

切斷 DNA는 0.7% agarose gel을 使用한 電氣泳動에 의해 確認하였다.

Culture broth (YEPD)
↓
Harvest and wash with dd H_2O
↓
Suspend in pretreatment buffer
↓
Incubate at RT for 20min
↓
Centrifuge
↓
Suspend in 5ml of SCE buffer
| Add zymolase 6000 to 0.2mg/ml
Incubate at 37℃ for 2hr.
↓
Wash with 1M sorbitol
↓
Suspend in 1ml of 1M sorbitol − 100mM $CaCl_2$
| Add plasmid DNA
Incubate at RT for 15min.
| Add 10V of 20% PEG 4000 − 10mM $CaCl_2$ − 10mM Tris−HCl (pH8.0)
Incubate at RT for 15min.
↓
Centrifuge
↓
Suspend in 0.1ml of 1M sorbitol − 100mM $CaCl_2$
| Add 50μl of YEPD
Incubate at 30℃ for 30min.
↓
Dilute with 1M sorbitol
↓
Mix with 7ml YM (1M sorbitol, 3% agar) at 45℃
↓
Pour on selective medium plate
↓
Incubate at 30℃ for 3 − 4 days

Fig. 2. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* (Spheroplast method)

5. 形質轉換

酵母의 形質轉換은 Beggs와 Hinnen의 原形質体 形質轉換法[1,6]을 약간 變化시켜 다음과 같이 行하였다 (Fig. 2).

YEPD培地 20ml에서 12時間 程度 種培養한 培養液을 100μl취하여 YEPD培地 20ml에 接種한 다음 30℃에서 12−14時間 程度 ($O.D_{610}$ = 3 ~ 4) 진탕 培養한다.

培養液은 遠心分離하여 集菌한 後, 殺菌 蒸溜

Table 3. Transformation by vector plasmids DNA in *Saccharomyces cerevisiae* DBY747.

Plasmid	Selective marker	Transformant /10 μg DNA	
		BamHI-digested linear plasmid	Covalently closed circular plasmid
YIp5	Ura$^+$	0	0
YEp13	Leu$^+$	1.2×10^3	7.3×10^3
YRp7	Trp$^+$	1×10^2	3.6×10^3

水로 2回 洗滌한 다음 前處理 緩衝液(0.2%β-mercaptoethanol, 0.05M EDTA, pH8.0)으로 細胞數가 ml當 1×10^8개 되도록 현탁시켜 室温에서 20分間 放置하였다. 이 현탁액을 遠心分離하여 沈澱物을 1M sorbitol-10mMEDTA-0.1Msodium citrate(pH5.8)緩衝液 5ml에 현탁시킨 後 zymolyase 6000을 ml當 0.2mg되게 添加한 다음 37℃에서 2時間 放置하여 原形質体를 만들었다. 이때 原形質体 形成 有無는 현탁액 小量을 蒸溜水가 담긴 容器에 넣고 1% SDS 溶液 한 방울을 떨구었을때 溶液이 맑아지는 것으로 알 수 있다.

原形質体는 3,000rpm에서 10分間 遠心分離하여 集菌한 後 1M sorbitol로 2回 程度 洗滌하여 잔류 효소를 제거하고 1M sorbitol-100mM CaCl, 1ml에 현탁시킨 다음 벡터 플라스미드를 넣고 室温에 15分間 放置하였다. 여기에 세포와 DNA 혼합액의 10배의 20% polyethylene glycol 4000-10mM $CaCl_2$-10mM Tris-HCl(pH8.0)溶液을 添加한 다음 다시 温室에 15分間 放置하였다. 이것을 遠心分離하여 菌体를 1M sorbitol-100 mM $CaCl_2$ 0.1ml에 현탁시킨 다음 50μl의 YEPD 배지를 添加 後 30℃에 30分間 放置하여 安定化시켰다. 이 溶液을 1M sorbitol에 적당히 稀釋하여 45℃의 YM(3%한천 含有)培地 7ml에 잘 섞은 後 YM평판배지에 부어 30℃에서 3~4日間 放置하여 colony를 觀察하였다.

6. 形質轉換株의 安定性

形質轉換株의 細胞分裂 後의 安定性을 알아보기 위해 YM평판培地에 자란 菌体中, colony size가 큰 균체를 선별하여 YM培地에 接種한 다음 30℃에서 12時間 程度 培養 後 培養液 100μl를 다시 YEPD 培地에 接種, 30℃에서 48時間 培養(10世代)하여, 배양액을 적당히 희석한 후 YEPD와 YM 平板培地에 도말하여 菌体의 數를 觀察, 比較하였다.

7. 使用試藥 및 酵素

本 實驗에 使用된 試藥은 SDS(Sigma Co.), PEG 4000(Fluka Co.)의 特級을 使用하였다.

日本 生化學 工業社의 lysozyme과 Kirin Brewery社의 zymolyase 6000을 使用하였다. BamHI, SalI은 Boehringer社의 것을 使用하였으며, 그外 모든 試藥은 市販特級을 使用하였다.

結果 및 考察

1. 각 벡터 플라스미드의 形質轉換

YIp5플라스미드를 SalI 혹은 BamHI으로 pBR322部位로 切斷하여 受容細胞에 形質轉換 시켰을때 YM培地上에 形質轉換体가 發現되지 않았다. 環狀플라스미드를 形質轉換시킨 培地에서는 약한 Ura$^+$形質轉換体가 나타났으나, 그 成長 程度가 느렸고, 完全 培地上에서 1世代 培養 後 Ura$^+$表現形을 쉽게 상실하였다(표3).

2μm DNA의 複製 起點과 ARS遺傳子를 각각 가지고 있는 YEp13플라스미드와 YRp7 플라스미드의 環狀 플라스미드를 形質轉換시킨 結果, DNA 10μg當 7,300個 및 3,600個의 形質轉換体가 각각 얻어졌다. 이 벡터 플라스미드들을 BamHI으로 切斷하여 線狀플라스미드로 만든 다음, 形質轉換시켰을때 그 頻度는 각각 DNA 10μg 當 1,200個 및 100個의 形質轉換体가 나타났다(표3).

이러한 結果로 보아 線狀플라스미드가 形質轉換 頻度는 떨어지나 Orrweaver[14] 나 Suzuki[15]의 주장과 같이 세포내에서 self-ligation에 의해

Table 4. Cotransformation by a mixture of covalently closed circular plasmids in *S. cerevisiae* DBY747.

Plasmid	Selective marker	Transformant / 10 μg DNA
YIp5+YEp13	Ura^+, Leu^+	210
YIp5+YRp7	Ura^+, Trp^+	95

Table 5. Cotransformation by the mixture of BamHI-digested linear plasmids in *S. cerevisiae* DBY747

Plasmid	Selective marker	Transformant / 10 μg DNA
YIp5+YEp13	Ura^+, Leu^+	20
YIp5+YRp7	Ura^+, Trp^+	15

環狀 플라스미드化 되는 것으로 推定된다.

2. 環狀 플라스미드間의 同時形質轉換

앞서의 結果에서 보듯이 YIp5플라스미드는 酵母에서의 複製 起點을 가지고 있지 않기 때문에 受容細胞인 酵母의 染色体 遺傳子와 塩基 配列이 一致하는 部位에 挿入되어 染色体 複製 起點을 利用하여야 複製될 수 있다. 그런데 YIp5 플라스미드와 YEp13 플라스미드를 同時形質轉換 시켰을 때 Ura^+, Leu^+形質轉換体가 DNA 10μg當 210個의 頻度로 나타났다(표 4).

이때 菌体의 크기는 完全 培地에서 자란 것과 같은 크기였다. 이러한 形質轉換体의 細胞分裂時 安定性을 조사해본 結果 10世代 後에도 매우 安定한 것과 不安定한 것이 多様하게 나타났다(표 7). 異種의 플라스미드의 同時形質轉換에 있어서 比較的 安定한 YEp13플라스미드가 YIp5 플라스미드의 形質轉換을 도와주는 helper 역할을 하는 것으로 생각된다.

두개의 環狀 플라스미드가 細胞內에서 어떤 形態를 취하여 形質 發現을 나타내는지 正確한 기작은 불분명하나 YIp5 플라스미드가 受容 細胞의 染色体 遺傳子內에 挿入되거나, YEp13의 pBR322部位와 homologous recombination이 일어나는 것으로 기대된다.

YIp5플라스미드를 YRp7 플라스미드와 同時形質轉換 시켰을때 그 形質轉換 頻度는 YEp13 플라스미드와의 形質轉換 頻度보다 낮을 뿐만 아니라, 安定性 또한 매우 낮아 10世代 이후에는 대부분이 segregation되었다(표 7). 이 역시 YIp5 플라스미드와 YRp7플라스미드 사이에 homologous recombination이 일어나는 것으로 생각되며, 安定性이 낮은 것은 YRp7 플라스미드의 ARS 遺傳子가 複製時 stringent control을 받으며 細胞分裂時 segregation율이 높다는 Struhl[15] 의 結果와 같은 이유인 때문인 것이다.

3. 線狀 플라스미드間의 同時形質轉換

1) 同一制限酵素로 切斷한 플라스미드의 同時形質轉換

BamHI으로 각 플라스미드의 pBR322 部位를 切斷하여 同時形質轉換시킨 結果는 표 5와 같다.

YIp5 플라스미드와 YEp13 플라스미드의 同時形質轉換 結果 그 頻度는 環狀 플라스미드間의 形質轉換 頻度보다 낮았으나 조사한 形質 轉換体의 대부분이 10世代가 지나서도 매우 安定하게 나타났다(표 4, 표 5, 표 7-1).

이는 Suzuki[16] 의 結果와 一致하는 安定性을 보여 주었다. 形質轉換 頻度가 낮은 것은 菌株의 차이 때문인 것으로 생각된다. 形質轉換体의 높은 安定性으로 보아 YIp5 플라스미드와 YEp13플라스미드가 染色体 遺傳子에 挿入되었거나, self-ligation된 것으로 생각된다. 그리고 YIp5플라스미드와 YRp7 플라스미드의 形質轉換의 경우에 있어서는 그 頻度가 낮을 뿐 아니라 安定性도 매우 낮아 10世代 後 Ura^+, Trp^+表現形 대부분을 상실하였다(표 4, 표 5, 표 7-2).

2) 다른 制限酵素로 切斷한 플라스미드間의 形質轉換

YIp5플라스미드를 SalI으로 切斷하고 YEp13 플라스미드와 YRp7 플라스미드를 BamHI으로 切斷하여 同時形質轉換시킨 結果 末端의 塩基配列이 非相補的인 線狀 플라스미드間의 形質轉換 頻度가 相補的인 末端을 가진 플라스미드間의 形質轉換 頻度와 비슷하였다(표 6).

Suzuki[16] 는 非相補的인 말단을 가진 두개의 線狀 플라스미드는 세포內 exonuclease에 의해 末端部位가 切斷되어 flush end化 되어 self-ligation되기 때문에 形質轉換 頻度가 同一 末端플라스미드間의 形質轉換 頻度보다 낮다고 했다.

Table 6. Cotransformation by the mixture of SalI-digested linear YIp5 and BamHI-digested linear plasmids in *S. cerevisiae* DBY747

Plasmid	Selective marker	Transformant / 10 μg DNA
YIp5+YEp13	Ura^+, Leu^+	60
YIp5+YRp7	Ura^+, Trp^+	85

그러나 本 實驗에서 非相補的인 末端을 가진 두 종의 線狀플라스미드의 同時形質轉換 頻度와 同一末端을 가진 두 플라스미드간의 同時形質轉換 頻度가 큰 차이가 없는 것은 菌株가 다르기 때문인 것으로 생각된다.

YIp5플라스미드와 YEp13플라스미드의 非相補的 末端間의 形質轉換에 의한 形質轉換体의 安定性은 同一 末端部位間의 形質轉換体 보다 낮았다 (표 7-1). 이는 flush end 間의 self-ligation 結果 結合部位가 약해 segregation된 것으로 推定된다. 그리고 YIp5플라스미드와 YRp7 플라스미드의 경우 同한 制限酵素로 切斷한 플라스미드간의 形質轉換의 경우와 같이 安定性이 매우 낮았다 (표 7-2).

Table 7. Mitotic segregation-stability of cotransformant after ten generation.

1) YIp5 +YEp13

DNA fragment / Stability	CCC-CCC	BamHI-BamHI	SalI-BamHI
> 70%	5/15	3/4	4/14
40-69%	2/15	0/4	0/14
<39%	8/15	1/4	10/14

2) YIp5 +YRp7

DNA fragment / Stability	CCC-CCC	BamHI-BamHI	SalI-BamHI
> 70%	0/4	0/1	0/25
40-69%	0/4	0/1	0/25
<39%	4/4	1/1	25/25

摘 要

酵母와 大腸菌의 셔틀 벡터인 YIp5, YRp7, YEp13플라스미드를 *S. cerevisiae* DBY747을 受容細胞로 하여 原形質体 方法에 의해 形質轉換시킨 結果, YIp5플라스미드는 形質轉換体가 나타나지 않았으며, YEp13플라스미드는 DNA 10μg 當 1.2×10^3, YRp7은 1×10^3個의 形質轉換体를 얻었다.

YIp5플라스미드와 YEp13플라스미드, 그리고 YIp5플라스미드와 YRp7플라스미드를 環狀플라스미드 狀態로 同時形質轉換 시켰을 때 각각 DNA 10μg當 210 및 95個의 形質轉換体를 얻었으며, 同一 部位 또는 다른 部位를 切斷한 線狀플라스크를 앞서와 같이 同時形質轉換 시켰을때, 서로 비슷하게 DNA 10μg當 15~85個의 形質轉換体를 얻을 수 있었다.

이러한 結果에서 볼때 受容細胞를 *S. cerevisiae* DBY747로한 同時形質轉換에서 環狀플라스미드間의 形質轉換이 線狀플라스미드間의 形質轉換보다 頻度가 높으며 線狀플라스미드間의 形質轉換에서 末端 部位의 相異함이 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

形質轉換体의 安定性에 있어서는 YIp5플라스미드와 YEp13 플라스미드間의 形質轉換体가 YIp 5 플라스미드와 YRp7플라스미드間의 形質轉換体에 比해 安定하게 나타났는데, 이는 stringent control을 받는 ARS 遺傳子를 가진 YRp7플라스미드보다 2μm DNA 複製 起點을 가진 YEp13플라스미드의 복제수(copy number)가 많기 때문인 것으로 생각된다.

引 用 文 献

1. Beggs, J. D. : 1978, Transformation of yeasts by a replicating hybrid plasmid, Nature, 275 : 104-109.
2. Birnboim, H. C., J. Doly : 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, Nucleic Acid Research, 7 : 1513-1523.
3. Broach, J. R., J. N. Strathern and J.B.

Hicks : 1979, Transformation in yeast ; Development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene, Gene, 8 : 121 - 133.

4. Clancy, S., C. Mann, R. W. Davis and M. P. Calos : 1984, Deletion of plasmid sequences during *S. cerevisiae* transformation, J. Bacteriol., 159 : 1065 - 1067.
5. Erhart, E., C. P. Hollenberg : 1983, The presence of a defective LEU2 gene on 2μ DNA recombinant plasmids of *S. cerevisiae* is responsible for curing and high copy number, J. Bacteriol., 156 : 625 - 635.
6. Gerbaud, C., P. Fournier, H. Blanc, M. Algle, H. Heslot and M. Guerineau:1979, High frequency of yeast transformation by plasmid carrying part or entire 2μm yeast plasmid, Gene 5 : 223 - 253.
7. Gunge, N., A. Tamaru, F. Ozawa and K. Sakaguchi : 1981, Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid associated killer character, J. Bacteriol., 145 : 382 - 390.
8. Hinnen, A., J. B. Hicks, G. R. Fink : 1978, Transformation of yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 : 1929 - 1933.
9. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura : 1983, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, J. Bacteriol., 153 : 163 - 168.
10. Johnston, J., F. Hilger and R. Mortmer : 1981, Variation in frequency of transformation by plasmid YRp7 in *S. cerevisiae*, Gene, 16 : 325 - 329.
11. Kunes, S., D. Botstein and M. S. Fox : 1985, Transformation of yeast with linearized plasmid DNA ; Formation of inverted dimers and recombinant plasmid products, J. Mol. Biol., 184 : 375 - 387.
12. Livingston, D. M., H. L. Klein : 1977, Deoxyribonucleic acid sequence organization of a yeast plasmid, J. Bacteriol., 129 :472 - 481.
13. McDonell, M. W., M. N. Simon and F. W. Studier : 1977, Analysis of restriction fragment of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels, J. Mol. Biol., 110 : 119.
14. Orrweaver, T. L., J. W. Szostak and R. J. Rothstein : 1981, Yeast transformation ; A model system for the study of recombination, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 6354 - 6358.
15. Sakai, K., J. Sakaguchi and Yamamoto : 1984, High frequency cotransformation by copolymerization of plasmids in the fission yeast, Mol. Cell. Biol., 4 : 651-686.
16. Struhl, K., D. T. Stinchcomb and R. W. Davis : 1979, Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator, Nature, 282 : 39 - 43.
17. Stinchcomb, D. T., M. Thomas, J. Kelly, E. Selker and R. W. Davis : 1980, Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 4559 - 4563.
18. Suzuki, K., Y. Imai, I. Yamashita and S. Fukui : 1983, In vivo ligation of linear DNA molecules to circular form in the yeast, J. Bacteriol., 155 : 747 - 754.