

***Streptomyces*속 야생균주들이 생산하는 세포독성물질과 plasmid와의 연관성에 관한 연구**

김미용* · 신석우 · 최병돈 · 염 곤

단국대학교 미생물학과

Studies on the Relationship Between the Presence of Plasmids and the Tumor cell's Cytotoxicity Shown by the *Streptomyces* spp.

Mi Yong KIM*, Suck Woo SHIN, Boung Don CHOI and Kon RYEOM

Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan, Korea

(Received May 27, 1995; accepted June 7, 1995)

Abstract—We isolated *Streptomyces* spp. from Korean soil, which showed high cytotoxicity against tumor cell lines, L1210 and P388D1. Among 30 strains, three strains (DKM 104, DKM 128, DKM 409) were appeared to possess plasmid. Strain DKM 104 and DKM 128 had two CCC(Covalently Closed Circular) form plasmid, about 20 Kb in size and about 1 Kb compared with λ *Hind* III DNA size marker. And strain DKM 409 had three plasmids, among which two plasmid were CCC form about 1 Kb and about 20 Kb compared with same size marker. To find out whether plasmid involved in production of antitumor agent or not, we performed to curing experiment. Comparing cytotoxicity between culture filtrate of plasmid-containing strains and cured strains, we knew that only the cytotoxic activity of the strain DKM 128 was involved in plasmid.

Keywords □ *Streptomyces*, cytotoxicity, L1210, P388D₁, plasmid, curing

미생물이 지닌 다양하고 탁월한 물질 대사능력을 이용하고자 하는 연구는 응용 미생물학, 생화학, 약학 등 관련 분야의 획기적인 발전을 가져왔다. 미생물이 생산하는 이차 대사산물의 이용범위도 항균항생제 뿐만 아니라 항암제, 효소 저해제, 면역 조절제, 신경조절제, 등으로 다양해지고 있어 '항생물질'이라는 용어도 보다 광범위하게 적용 해석되고 있다.

항생물질을 생산하는 미생물 중 가장 많이 탐색되어 온 것이 방선균인데 특히 토양에서 분리된 방선균의 배양액은 매우 효과적이며 다양한 종양 세포 억제 인자를 함유하여 다양한 항암제로 사용가능한 물질을 생산한다고 보고되고 있다. 방선균과(Actinomycetes)의 90% 이상을 차지하는 방선균(*Streptomyces*)에는 수많은 plasmid나 phage의 존재가 보고되고 있고 이들은 cloning vector의 후보가 되어 유전자 재조합의 많은 방법에 응용되고 있다. 또한 *S. lividans*는 제한계를 갖지 않아 이

균주를 숙주로 하여 각종 방선균에서의 약제 내성 유전자와 유용 효소 유전자등이 cloning 되어질 수 있다. Plasmid가 관련된 항생물질을 예를들면 *S. kanamyceticus*로부터 kanamycin 전구체, 또 *S. venezuelae*로부터의 chloramphenicol 생산 등 많은 보고들이 있다. 또한 방선균에 대한 유전자 조작기술은 영국의 Hopwood 등에 의해 확립되어 지금까지 항생물질 생산에 관여하는 몇 개의 유전자가 cloning 되어 있고 앞으로도 그 수는 늘어날 것이다. 특히 cloning된 유전자를 multicopy의 plasmid vector에 연결하여 그 유전자량 효과에 의한 항생물질의 증산을 목표로 하고 있다. 이에 본 연구에서는 새로운 균주개발을 위한 첫 단계로 유용 방선균을 분리하여 이들로부터 plasmid를 분리하고자 하였고, 유용한 물질을 생산하는 gene이 plasmid에 존재하는지 등을 curing test로 알아보았고, plasmid의 profile은 two dimensional gel electrophoresis를 통해 plasmid의 수와 분리된 plasmid가 CCC(Covalently Closed Circular) form인지, OC(Open Circular) form인지, 또는 L(Linear) form인지

*To whom correspondence should be addressed.

를 살펴 보았다.

실험방법

아생균주의 분리 및 배양

1993년 6월부터 9월까지 전국 13개지역을 선정하여 토양시료를 채취하여 그 시료중 1g을 80°C에서 90분간 건조시킨후 멸균증류수 10 ml를 넣고 진탕교반후 상등액을 10^{-5} 까지 희석하여 starch-casein agar (starch 1%, casein 0.03%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%)에 접종하였다. 이때 시료에 존재하는 진균을 억제하기 위해 배지에 nystatin (50 μ g/ml)과 cyclohexamide (50 μ g/ml)을 첨가하였다. 접종시킨 배지를 28°C 항온기에서 7일에서 14일 동안 배양하여 균사의 모양과 색깔, 용해 색소 등을 비교하여 서로 다르다고 생각되는 균주를 순수 분리하였다. 또한 분리된 방선균은 YEME (yeast extract 0.4%, malt extract 1%, glucose 0.4%, agar 1.5%) 사면 배지에 접종, 배양한 후 4°C 냉장고에서 보관하면서 실험에 사용하였으며 spore solution을 만들어 냉동실에 보관하면서 사용하였다.

분리균주 배양액들의 세포 독성능 측정

본실험에서는 종양세포주인 L1210, P388D₁(Lymphocytic leukemia, Mouse)과 정상세포주인 Vero (Kidney, Africa Green Monkey)를 사용하였다. L1210과 P388D₁ 세포주는 한국 세포주은행으로부터 분양받았으며, Vero 세포주는 국립보건원에서 분양받아 배양해 온 것이다. Vero 세포주 배양 배지는 EMEM(Eagle's minimum essential medium), L1210과 P388D₁ 세포주 배양배지는 RPMI 1640을 사용하였으며 사용시에는 10% FBS (Fetal bovine serum)와 항생제로 antibiotic-antimycotic solution 0.1%를 첨가하였다. 선별된 균주들의 배양액에 대한 세포 독성능 측정은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]검정법을 응용하여 세포의 증식을 50% 억제할 수 있는 값 (IC_{50})으로 나타냈다.

유효 균주의 plasmid 확인

IC_{50} 값이 비교적 낮은 균주 30개를 선별하여 이들로부터 alkaline lysis에 의해 plasmid를 분리하고 Sambrook(1985)이 사용한 방법에 따라 전기영동을 실시하였다. 또한 2차원적 전기영동(two dimensional gel electrophoresis)을 실시하였는데 lane 1에는 plasmid DNA size marker인 λ Hind III, lane 2와 lane 3에는 같은 plasmid DNA sample을 loading한 후 1차 전기영동을 시켰다. 1차 전기영동이 끝난 후 lane 1, 2를 포함하는 agarose gel을 잘라내어 TAE buffer에 보관하고 나머지 gel은 70°C에서 10분간 증탕 가열로 plasmid DNA를 denaturation 시킨 다음, 냉각시켜 1차 전기영동방향에 대해서 수직 방향으로 2차 전기영동을 실시하였다.

Plasmid curing test

전체적인 실험과정은 Rhinwald(1973)방법을 변형시켜 사용하였다. Curing agent로는 novobiocin과 acridine orange을 사용하였고 Curing agent를 첨가시킨 YEME broth에 균주들을 접종, 배양하였다. 단계적으로 희석시킨 다음 YEME agar에 접종하여 28°C incubator 에서 3일 배양한 후 적당한 colony의 수가 배양된 plate로부터 plasmid가 없어진 균주를 효율적으로 확인하기 위해 항생제가 포함된 배지와 포함되지 않은 배지에 각각의 colony를 replica plating을 실시하였다. DKM 104 균주는 penicillin 1600 μ g/ml과 ampicillin 800 μ g/ml이 포함된 배지에, DKM 128 균주의 경우에는 penicillin 50 μ g/ml과 streptomycin 100 μ g/ml이 포함된 배지에, 그리고 DKM 409 균주는 penicillin과 ampicillin 400 μ g/ml이 포함된 plate에 curing agent 속에서 배양된 colony 각각을 replica plating하여 내성이 없어진 균주들을 찾아내었다. 여기서 찾아낸 균주를 YEME broth에 3일 배양 후 균체를 회수하여 alkaline lysis방법으로 plasmid 를 분리해 전기영동으로 최종적으로 plasmid가 curing 되었는지 확인하였다. Plasmid의 curing이 확인된 균주로부터 얻은 배양여액을 여과 멸균한 다음 다시 종양 세포주 L1210과 P388D₁, 그리고 정상세포주인 Vero에 대한 세포 독성능을 MTT 측정 방법으로 IC_{50} 값을 비교해 보아 curing에 대한 세포 독성능의 연관성을 살펴보았다.

Antibiotic Resistance Test

9가지 항생제를 각각의 희석용액에 녹여, 0.22 μ m membrane filter로 여과 멸균한 후 YEME 배지에 25~1600 mg/ml이 되도록 two fold dilution하여 agar plate를 만든 후 균주를 접종한 후 5일 동안 28°C 배양기에서 배양시킨 후 각각의 항생제에 대한 resistance의 여부를 살펴보았다.

Antimicrobial Activity Test

항균 활성을 보기 위하여 실험균으로써 Gram 양성 세균으로는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Gram 음성 세균으로는 *Escherichia coli* ATCC 11105, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 104 90, 그리고 진균으로는 *Candida albicans* ATCC 10231와 *Aspergillus niger* ATCC 32626를 사용하였다. 실험균은 전배양을 실시하였는데 세균은 nutrient broth를 사용하였고, *Candida albicans*와 *Aspergillus niger*는 sabouraud dextrose broth를 사용하였다. 세균은 37°C에서 18시간, 효모는 30°C에서 48시간 배양하였으며, *Aspergillus niger*는 spore solution (10⁶ml)을 준비하여 냉동실 (-20°C)에 보관한 것을 사용하였다. 전배양한 방선균들은 YEME broth에서 28°C, 200 rpm으로 7일간 배양했으며 그 배양여액은 0.22 μ m membrane filter로 여과 멸균 후 50 μ l를 paper disk (8 mm)에 흡수시켜 건조 후 배양된 실험균이 도말된 plate에 올려 놓았다. 세균을 도말한 plate는 18시간 배양하였고 효모와 진균은 24시간 배양하여 inhibition zone을 측정하였다.

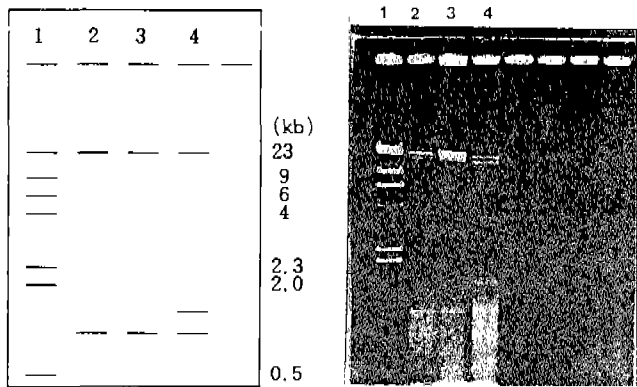


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of plasmids isolated from *Streptomyces* spp. lane 1, λ *Hind* III DNA size marker; 2, plasmid from strain DKM 104; 3, plasmid from strain DKM 128; 4, plasmid from strain DKM 409

실험결과

유효균주의 분리

순수 분리된 방선균을 대상으로 종양 세포주(L1210, P388D₁)와 정상세포주(Vero)에 대한 세포 독성능을 IC₅₀ 값으로 비교하여 세포 독성능이 비교적 높은 균주 30개를 선별하였다.(결과는 나타내지 않았음)

Plasmid의 분리 및 특징

선별된 30개 균주 각각에 대한 plasmid 유무를 alkaline lysis 방법으로 살펴 본 결과 세 균주 (DKM 104, DKM 128, DKM 409)만이 plasmid 를 갖고 있음이 확인 되었다(Fig. 1).

이들 세 균주들에 대한 plasmid의 profile을 agarose gel electrophoresis를 통해 살펴 본 결과, DKM 104 균주와 DKM 128 균주에서는 두 개가 분리되었고, DKM 409 균주에서는 세 개의 plasmid가 분리되었으며, 2차 전기영동(two dimensional gel electrophoresis)을 실시하여 분리된 plasmid의 수를 확인할 수 있었는데(결과는 나타내지 않았음) λ *Hind* III DNA size marker와 비교해 본 결과 DKM 104 균주와 DKM 128균주는 약 20 Kb정도 크기를 가진 plasmid 1개와 약 1 Kb 정도의 크기를 가진 plasmid 1개가 분리 되었으며, DKM 409 균주는 약 20 Kb 1개, 1 Kb 정도의 크기를 갖는 plasmid 2개, 모두 세 개의 plasmid가 분리되었다. 또한 2차 전기영동을 실시하여 본 결과 우리가 분리한 plasmid는 모두 CCC (Covalently Closed Circular)형태를 갖고 있음을 알 수 있었다.

세포독성물질과 plasmid와의 연관성

세포독성물질을 생산하는 유전자와 plasmid와의 연관성을 알아보기 위해 curing test를 실시하였다. DKM 104, DKM 409 균주의 plasmid는 novobiocin으로 DKM 128 균주의 plasmid는 acridine orange로 plasmid가 curing 되었다.

Table I. Comparison of IC₅₀ between culture filtrates of plasmid-containing strains and cured strains with novobiocin, acridine orange.

Cell lines	IC ₅₀					
	Novobiocin				Acridine orange	
	DKM 104		DKM 128		DKM 409	
	P ^a	C ^b	P ^a	C ^b	P ^a	C ^b
L1210	+	+	++	+	+	+
P388D ₁	++	++	++	+	++	++
VERO	-	-	-	-	-	-

^aPlasmid-containing strain ^bPlasmid cured strain +; IC₅₀ between 10⁻¹ and 10⁻² dilution factor. ++; IC₅₀ between 10⁻² and 10⁻³ dilution factor.

Table II. The survival rate of cell lines against culture filtrates of plasmid- containing and cured strains with novobiocin, acridine orange by MTT assay

Dilution	Cell line	Strain					
		Novobiocin				Acridine orange	
		DKM 104		DKM 409		DKM 128	
	P ^a	C ^b	P ^a	C ^b	P ^a	C ^b	
10 ⁻⁴	L1210	94.42	87.62	92.73	95.45	95.93	85.41
	P388D ₁	95.42	90.15	95.21	93.27	97.48	96.10
	Vero	92.22	92.22	85.93	87.69	94.80	82.27
10 ⁻³	L1210	94.32	75.24	92.58	90.24	91.22	84.92
	P388D ₁	63.21	90.11	78.55	93.02	97.24	92.38
	Vero	92.21	92.60	85.16	86.27	93.68	85.00
10 ⁻²	L1210	60.11	60.21	82.33	52.42	24.39	82.38
	P388D ₁	14.38	35.53	47.66	76.27	20.40	90.00
	Vero	82.64	82.45	83.21	83.83	81.04	75.45
10 ⁻¹	L1210	30.28	44.16	23.16	32.15	23.58	44.40
	P388D ₁	6.02	24.43	9.42	30.24	13.27	50.27
	Vero	75.21	74.90	82.73	83.26	50.92	75.32

^aplasmid-containing strains ^bcured strains

각 균주들에 대한 MIC를 살펴본 결과 DKM 104균주는 80 μ g/ml, DKM 409균주는 107 μ g/ml였다. 먼저 DKM 104 균주에 대해 살펴보면, plasmid가 curing되기 전과 curing된 후를 비교해 볼 때 종양 세포주와 정상 세포주 모두에 대해서 IC₅₀값에 별 차이가 없었지만 전체적으로 회석 배수에 따라 점차 낮아지는 경향을 볼 수 있었다. DKM 409 균주를 살펴보면 plasmid curing에 의한 IC₅₀값의 변화는 없었으나 curing되기 전 배양액이 종양 세포주에 대한 세포 독성능이 회석 배수 10⁻¹와 10⁻²에서 거의 30% 미만의 생존율을 보인 반면 plasmid curing이 된 후 같은 회석 배수에서 30% 이상의 생존율을 나타내 약간의 차이를 보이고 있지만 plasmid와 세포독성물질 생성간의 연관성은 보이지 않았다. Acridine orange로 plasmid의 curing이 이루어진 DKM

Table III. Resistance of strains to various antibiotics.

Antibiotics strains	Concentration of antibiotics ($\mu\text{g/ml}$)						
	25	50	100	200	400	800	1600
Ap	DKM 104	+	+	+	+	+	-
	DKM 128	+	-	-	-	-	-
Gm	DKM 409	+	+	+	+	+	-
	DKM 104	-	-	-	-	-	-
Km	DKM 128	+	+	+	+	+	-
	DKM 409	+	+	+	-	-	-
	DKM 104	-	-	-	-	-	-
Sm	DKM 128	+	+	+	-	-	-
	DKM 409	+	+	-	-	-	-
	DKM 104	+	+	-	-	-	-
Cm	DKM 128	+	+	+	-	-	-
	DKM 409	+	+	-	-	-	-
	DKM 104	+	+	-	-	-	-
Pe	DKM 128	+	+	+	+	+	+
	DKM 409	+	+	-	-	-	-
	DKM 104	+	+	+	+	+	+
Tc	DKM 128	-	-	-	-	-	-
	DKM 409	+	+	+	+	-	-
Rf	DKM 128	-	-	-	-	-	-
	DKM 409	-	-	-	-	-	-
	DKM 104	-	-	-	-	-	-
Thio	DKM 128	-	-	-	-	-	-
	DKM 409	-	-	-	-	-	-
	DKM 104	-	-	-	-	-	-

Ap, Ampicillin; Gm, Gentamycin; Km, Kanamycin; Sm, Streptomycin; Cm, Chloramphenicol; Pe, Penicillin; Tc, Tetracycline; Rf, Rifampicin; Thio, Thiostrepton

128 균주에 대한 MIC는 $160 \mu\text{g/ml}$ 였고, plasmid와 세포 독성능과의 연관성을 살펴보면 DKM 128 균주는 curing에 의해 많은 변화를 보이고 있다. 즉, 중앙 세포주인 L1210, P388D₁과 정상세포주인 Vero에 대해 모두 IC₅₀ 값이 희석 배수 10^{-2} 와 10^{-3} 에서 보였지만 plasmid의 curing이 이루어진 후에는 세포 독성능을 거의 보이지 않아 세포 독성능과 plasmid와의 연관성을 보이고 있는 결과를 얻었다. 즉, DKM 128 균주만이 plasmid와 세포 독성능과 연관성을 보이고 있었다.(Table I, II)

여러가지 항생제에 대한 내성

DKM 104 균주는 penicillin과 ampicillin과 같은 β -lactam 계열의 항생제에 대해 강한 내성을 나타냈다. 특히 penicillin은 $1600 \mu\text{g/ml}$ 까지 내성을 나타내 매우 강한 내성을 보이고 있었지만 kanamycin 즉, aminoglycoside에는 내성이 전혀 없었으며, DKM 128 균주는 kanamycin을 제외한 항생제에는 내성이 거의 없었으며 DKM 409 균주는 ampicillin, gentamycin, penicillin에 대해 $400 \mu\text{g/ml}$ 까지 내성을 갖고 있어 다른 항생제에 비해 비교적

Table IV. Comparison of antimicrobial activity between culture filtrates of plasmid-containing and cured strains with novobiocin, acridine orange.

Test organism	Strain					
	Novobiocin		Acridine orange			
	DKM 104	DKM 409	DKM 128			
	P ^a	C ^b	P ^a	C ^b	P ^a	C ^b
Gram Positive						
<i>S. aureus</i>	+(16)	+(15)	+(11)	+(10)	+(12)	+(11)
<i>B. subtilis</i>	+(18)	+(15)	+(15)	+(12)	+(17)	-
Gram Negative						
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
Fungi						
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-

^aplasmid-containing strain ^bplasmid cured strain +: inhibition, -: no inhibition Numbers in parenthesis means inhibition zone diameter (mm)

높은 내성을 가지고 있었고 세 균주 모두 rifampicin과 thiostrepton에는 내성을 갖고 있지 않았다(Table III).

항균력과 plasmid와의 연관성

세 균주 모두 Gram positive (*B. subtilis*, *S. aureus*) 균주에 강한 항균력을 갖고 있었고 Gram negative 균주 (*E. coli*, *P. aeruginosa*)에는 항균력이 없었다. 또한 세 균주 모두 yeast, mold형 곰팡이에는 항진균력을 갖고 있지 않았다. 그리고 plasmid가 없어지기 전과 후의 균주가 나타내는 항균력에 있어서 차이를 가진 것은 DKM 128 균주였다. DKM 128 균주는 특히 *B. subtilis*에 있어서 plasmid가 있을 때는 inhibition zone이 17 mm로 강한 항균력을 갖고 있었지만 plasmid의 curing이 이루어진 후에는 inhibition zone이 전혀 나타나지 않는 현저한 차이를 보이고 있어 분리된 plasmid와 항균력과의 연관성을 보이고 있었다.(Table IV)

고 찰

순수 분리된 방선균을 대상으로 비교적 세포 독성능이 높은 균주 30개를 선별하여 각각에 대해 plasmid의 유무를 agarose gel electrophoresis를 통해 살펴본 결과 DKM 104, DKM128, DKM 409 균주만이 plasmid가 분리되고 이들 세 균주 (DKM 104, DKM 128, DKM 409)들에 대한 plasmid의 수와 형태는 2차 전기영동(two dimensional gel electrophoresis)을 통해 살펴본 결과, 이들 모두는 CCC(Covalently Closed Circular) 형태를 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 일반적으로, 분리된 하나의 plasmid band 안에는 3가지 형태의 plasmid-CCC (Covalently Closed Circular), OC(Open Circular), L(Li-

near)-form이 complex binding pattern으로 존재 할 가능성이 있기 때문에 이들을 분석하기 위해 2차 전기영동을 실시하였다. 즉, 첫 번째 전기영동에서는 한 개의 band를 보였는데 2차 전기영동을 하여 이 band에 여러 개의 band가 분리된다면 이 plasmid band에는 여러가지 형태의 plasmid가 존재한다고 생각할 수 있다. 또한 CCC DNA는 OC와 L형태의 DNA 보다 electrophoretic mobility가 높아 OC와 L 형태의 DNA 보다 빨리 이동한다고 보고되어져 있으며 본 실험결과에서, 우리가 분리한 plasmid는 대부분 CCC 형태를 갖고 있었고 대부분 방선균의 경우에 있어서 plasmid의 형태는 CCC 형태로 보고되어 있다. 이렇게 분리된 plasmid들이 세포독성물질과 연관성을 알아 보기 위해 실시한 방법이 curing test (Rhienwald, 1973)였다. 이때 사용한 curing agent는 novobiocin과 acridine orange로서, 이 agent들은 plasmid DNA의 replication을 우선적으로 저해시킨다고 알려져 있다. Plasmid를 갖고 있는 세 균주 중 DKM 104 균주와 DKM 409균주의 plasmid는 novobiocin으로 plasmid가 curing되었고, DKM 128 균주의 plasmid는 acridine orange로 curing되었다. Plasmid의 curing이 되기 전과 후의 종양 세포주와 정상 세포주에 대한 세포 독성능을 살펴본 결과 종양 세포독성물질 생산 인자와 plasmid와의 연관성을 보인 균주는 DKM 128 균주였다. 또한 방선균으로부터 유래된 종양 세포 억제 물질은 항균력이 있음이 보고되고 있으며 그 중에서도 Gram 양성 세균에 감수성이 있음이 보고되고 있다. 따라서 항균력 test는 종양세포 성장 억제 인자를 찾기 위한 전 작업으로 항균력을 갖는 방선균을 선별하는데도 유용하게 사용되고 있다. 이에, 선별된 세 균주(DKM 104, DKM 128, DKM 409)의 배양여액과 각각의 균주의 plasmid를 curing시켜 얻은 배양액과 비교해 본 결과 세포 독성능 차이를 살펴본 결과와 유사하게 DKM 128 균주에서만 항균력에 현저한 차이를 보이고 있었다. 현재까지 실험한 결과 DKM 128 균주의 plasmid가 curing된 균주로부터 얻은 배양여액이 plasmid의 curing이 이루어지기 전과 비교하였을때 종양 세포주에 대한 세포 독성능이 감소되는 변화를 일으켜 plasmid와 연관성을 보이고 있지만 이 연관성에 관한 확인 여부는 앞으로 여러가지 방법으로 즉, plasmid를 갖고 있지 않은 균주에 DKM 128 균주의 plasmid를 형질전환 시켜보아 세포독성물질을 생산하는 지 등과 같은 실험을 통해 plasmid와 세포독성물질 생산간의 연관성을 확신할 수 있겠다.

참고문헌

- 김창진 (1993). 미생물 생태연구실. 생명공학 동향. 83-89.
- 김수기 (1991). *Streptomyces* 배양 여과액내의 종양세포 성장억제인자의 분리 및 특성. 연세의대 학위논문집. 22-48.
- 장일무, 김제훈, 한대석 (1983). 한국산 생약의 약리작용 및 독성연구(제4보), 생약학회지. **13**, 62-69.
- 한윤정, 염 곤 (1992). 세균이 생산하는 항진균물질에 관한 연구. 석사학위 논문. 단국대학교
- 홍범수, 염 곤 (1993). 국내 토양에서 분리한 방선균의 항균력 및 암 세포주 성장 억제능에 관하여. 석사학위 논문. 단국대학교
- Akagawa, H., M., Okanishi. and H., Umezawa (1975). A plasmid involved in chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae* evidence from genetic mapping. *J. Gen. Microbiol.* **90**, 336-346.
- Carmichael, J., W. G., Degraff, A. F., Gazdar, J. D., Minna. and J. B. Mitchell (1987). Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay. *Cancer Research* **47**, 936-942.
- Dominic, A., Scudiero, H. S., Robert, D. H., Paul, A., Monks. and S. Tierney (1981). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* **48**, 4827-4833.
- Fegiria, L., Ruban and R. H. Neubauer (1987). Semiautomated colorimetric assay for *in vitro* screening of anticancer compound. *Cancer Treatment Report* **71**, 12
- Freshney, R. I., (1987). Culture of animal cells. In a manual of basic technique. second edition. 74-75.
- Giancarlo, L. and P., Francesco (1987). Antibiotics an integrated view. *Spinger-Verlag. New York Heidelberg Berlin.*
- Hintermann, G. H., M., Fischer, R., Cramer, and R., Hutter (1981). Simple procedure for distinguish CCC, OC, and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid* **5**, 371-373.
- Hopwood, D. A., M. J., Bibb, K. F., Chater, and T., Kieser (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces* a laboratory manual. *The John Innes Foundation.*
- Hotta, K., Y., Okamio and H., Umezawa, (1977). Elimination of ability of a kanamycin-producing strain to biosynthesize deoxystreptamine moiety by acriflavin. *J. Antibiotics* **30**, 1146-1149.
- Nordstrom, K. and K. G. Eriksson-Greenberg, AmpB, a locus affecting episomally and chromosomally mediated resistance to ampicillin and chloramphenicol. *Genet. Res.* **12**, 157-168.
- Rhienwald, J. G., A. M., Chakrabarty and I. C., Gunsalus (1973). A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proc. Nat. Acad. Science* **70**, 885-889, U.S.A.
- Robert, E., Schwarts, R. A., Giacobbe, J. A., Bland, and R. L. Monaghan (1988). L-671, new antifungal agent. *J. Antibiotics* **42**, 163-168.
- Sambrook, F. M. (1989). Molecular cloning a laboratory manual.
- Tobias K. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**, 19-36.