

# Ribosomal RNA와 M13 Probe에 의한 *Clostridium thermocellum* 균주들의 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 비교

이호섭 · 홍수형 · 하지홍  
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

## RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) by Ribosomal RNA and M13 Probes of *Clostridium thermocellum* Strains

Lee, Ho-Sup, Su-Hyung Hong and Ji-Hong Ha  
Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences,  
Kyung Pook National University, Taegu 702-701, Korea

**ABSTRACT:** The degree of the genetic variations among *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 and the wild type strains was investigated by the method of GC ratio, DNA-DNA hybridization and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) patterns by ribosomal RNA and M13 probe. GC ratio and DNA homology values of the three isolates were approximately equal to those of ATCC type strain. The RFLP patterns by the rRNA and M13 probe showed some differences among *C. thermocellum* ATCC 27405, wild type strains and *Clostridium thermohydrosulfuricum* ATCC 33223, indicating that the two probes can be useful in subspecies- and species-identification.

**KEY WORDS** □ *C. thermocellum*, RFLP pattern, Ribosomal RNA, M13 probe

고온 혐기성 세균인 *Clostridium thermocellum*은 섬유질 biomass로부터 에탄올을 직접 생산해낼 수 있는 중요한 미생물 자원이다. 이 균주의 산업적 이용 가능성은 에탄올에 대한 내성증가, 발효산물의 단일 화등에 의해 더욱 키질 수 있으므로 몇몇 연구자들에 의해 균주육종이 시도되고 있는데, 돌연변이에 의한 cellulase역가 증가가 보고 (Shinmyo 등, 1979)된 바 있으며, *Clostridium thermohydrosulfuricum*과의 세포융합에 의한 에탄올 생산증가와 발효산물의 변화 가능성이 연구되었다 (Ng 등, 1981). 그러나, 자연의 다양한 야생균주의 변이정도에 대한 연구의 중요성은 다소 도외시되어 온 것도 사실이다.

따라서, 본 연구는 본보에서 이미 보고된 (Lee 등 1991) *C. thermocellum* 야생균주들이 표준균주인 ATCC27405균주와 비교했을 때 나타난 당 이용성, 에탄올 저항성, 효소역가 차이등이 유전적 변이에 의한 것인지의 여부를 간접적으로나마 알아보기 위하여 몇가지 분자 유전학적인 방법을 적용하여 조사

하였다. 특히 high copy로 존재하면서 염기서열의 상동성을 유지하는 것으로 알려진 rRNA operon 및 주위 염기서열의 변이정도를 RFLP pattern비교로 조사함으로써 probe로서 rRNA가 동종 균주들간의 개체확인에 쓰일 수 있는지의 가능성을 검토하였다. 또한, eucaryote뿐만 아니라 procaryote에서도 개체 확인에 쓰일 수 있음이 보고된 (Ryskov 등, 1988) bacteriophage M13의 tandem repeat부위를 probe로 사용하여 분리균들의 개체확인에 적용해 보았다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 본보에서 보고된 (Lee 등, 1991) *Clostridium thermocellum* 야생균주 JH01, JH20, JH30을 사용하였고, 표준균주로써 type strain인 *C. thermocellum* ATCC 27405와 비교균주로 *Clostridium thermohydrosulfuricum* ACTT 33223, E.

*coli* HB101을 사용하였다. 생육배지로는 전보와 마찬가지로 cellobiose 탄소원의 CM3배지 (Weimer와 Zeikus, 1977)를 사용하여 60°C에서 장치 배양하였다. Chromosomal DNA의 분리 및 정제

*C. thermocellum*의 DNA분리는 Ng 등(1977)의 SDS-Pronase 방법에 따랐다. cellobiose탄소원의 배지 100 ml에 log phase후기까지 키운 균체들을 원심분리한 다음 lysis buffer (0.05 M Tris, 0.02 M EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0) 10 ml에 현탁시키고, pronase를 1.5 mg/ml되게 첨가하여 60°C에서 90분간 반응시켜 세포들을 완전히 용해시켰다. 이 lysate에 RNAase를 최종농도 10 µg/ml 되도록 첨가하고, 37°C에서 15분간 반응시킨 뒤 phenol-chloroform 방법 (Walker, 1984)으로 정제한 다음 2배 부피의 에탄올로 침전시키고, spool out하여 회수한 다음 건조시켜 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 녹인 후에 정량하여 사용하였다.

#### GC ratio 및 DNA-DNA hybridization

각 균주들의 DNA를 1XSSC (0.15 M NaCl, 0.015 M trisodium citrate, pH 7.0) 용액으로 투석막에 24 시간동안 투석시키고, DNA농도를 50 µg/ml되도록 조절한 다음 water jacket이 부착된 UV/Vis-spectrophotometer (Shimadzu UV-265)에서 thermal melting curve를 얻어서 Tm값을 구한다음, Marmar와 Doty (1962)의 공식으로 계산하였다. DNA상동성실험은 표준균주의 DNA를 [ $\alpha^{32}$ P] dCTP (10<sup>6</sup> cpm/µg)로 labeling하여 sonication, denaturation시킨후 probe으로 사용하였고, hybridization은 동일한 방법으로 준비된 각 균주들의 DNA와 60°C에서 20시간 동안 반응시켰는데, probe와 competitor DNA의 농도가 1:1500이상이 되도록 하였다. Reassociated된 DNA의 분리는 0.14 M phosphate buffer (equimolar NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4% SDS)로 평형화시킨 hydroxyapatite에 hybridization mixture를 넣어 double-stranded DNA를 흡착시키고, 원심분리한 다음 다시 0.28 M phosphate buffer를 넣어 reassociated DNA를 elution하여 scintillation cocktail과 섞은 후에 radioactivity를 측정하였다 (Murray 등, 1981).

#### rRNA의 분리 및 <sup>32</sup>P-end labeled probe제조

Ribosomal RNA의 분리는 *C. thermocellum* 표준 균주로 부터 염색체 DNA 분리와 같은 방법으로 실시하였는데, RNAase에 의한 손실을 막기위하여 DEPC (diethyl-pyrocabonate)를 모든 용기에 0.1

%되게 처리한 다음 autoclave하여 사용하였다. 분리된 전체 핵산을 1.5% agarose gel에 전개시켜 투석막을 사용한 electroelution방법 (Maniatis 등, 1982)으로 16S와 23S rRNA를 각각 분리, 정제하였다. 각각의 16S와 23S rRNA를 최소량의 2차 증류수에 녹인다음 Maniatis등 (1982)의 방법에 따라 CIP (calf intestinal alkaline phosphatase)를 처리하여 5'-phosphate기를 제거한 후 [ $\gamma^{32}$ P] ATP (3000 Ci/mmol)를 T<sub>4</sub> kinase로 *in vitro* 5'-end labelling 하고, Sephadex G-50 minicolumn을 통과시켜 free [ $\gamma^{32}$ P] ATP를 제거한 다음 probe로 사용하였다.

#### Southern Blotting과 Hybridization

각 균주들의 DNA 8 µg 씩을 BamHI, EcoRI, HindIII 20 unit으로 자른뒤에 0.8% agarose gel상에 전개시킨 다음 Southern (1975)의 방법으로 blotting 하였다. Hybridization은 blotting된 filter가 들어있는 heat sealable 비닐백에 hybridization 용액 (50% formamide, 3×SSC, carrier yeast tRNA 100 µg/ml)을 0.1 ml/cm<sup>2</sup> 되도록 넣고, 42°C에서 20시간 동안 반응시켰다. 4×SSC 용액으로 68°C에서 30분씩 2회, 2×SSC 용액으로 상온에서 10분씩 3회 세척하고 intensifying screen을 덮어 X-ray film에 autoradiograph하였다.

#### M13 probe를 사용한 Southern hybridization

M13 replicative form DNA의 분리는 Maniatis등 (1982)의 alkaline lysis방법에 따랐다. 분리된 RF DNA를 ClaI로 절단하여 tandem repeat부위가 들어있는 2.8 kb 단편을 gene clean kit를 사용하여 정제 하였으며, nick translation kit를 사용하여 [ $\alpha^{32}$ P] dCTP로 labeling한 후 Sephadex G-50 minicolumn을 통과시켜 정제한 뒤에 probe으로 사용하였다. Hybridization용액 (Hucy와 Hall, 1989)은 20% formamide, 0.1% SDS, 5×SSPE, 5×Denhardt 용액, 0.5% powdered milk를 사용하였으며, 42°C에서 24시간 동안 prehybridization한 다음, 같은 온도에서 24시간동안 hybridization하였다. 이때 probe 농도는 50 µg/ml (10<sup>6</sup> cpm/µg)이었으며, 2×SSC, 0.1% SDS용액으로 42°C에서 1시간 동안 1회, 상온에서 10분간 2회 세척하여 autoradiograph하였다.

## 결과 및 고찰

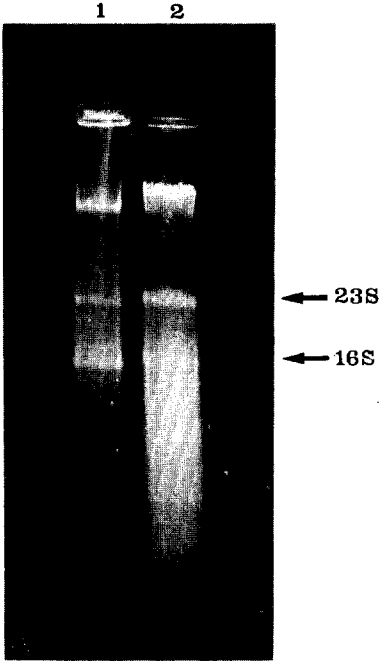
### GC ratio 및 DNA상동성

Table 1. Mol% of G+C ratio and DNA homology of the strains

	ATCC 27405	JH01	JH20	JH30	<i>C. ts</i> <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>
G+C content	38%	37%		38.3%		51%
DNA Homology <sup>b</sup>	100%	97.2%	97.5%	90.5%	32.1%	0%

<sup>a</sup> *C. thermohydrosulfuricum* ATCC 33223

<sup>b</sup> All hybridization reactions were carried out at 60°C for 20 hr.



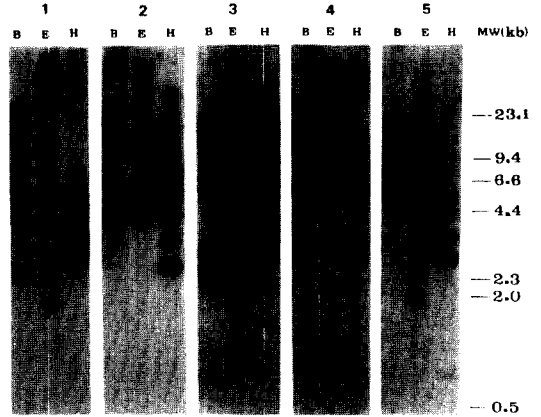
**Fig. 1.** 1.5% agarose gel electrophoresis of 16S and 23S rRNA. lane 1: *E. coli* HB101, lane 2: *C. thermocellum* ATCC 27405.

분리한 3균주의 분류학적인 위치와 유전자상의 상동성을 표준균주와 비교하기 위하여 GC ratio 및 전체 DNA 간의 상동성을 측정된 결과는 Table 1과 같다.

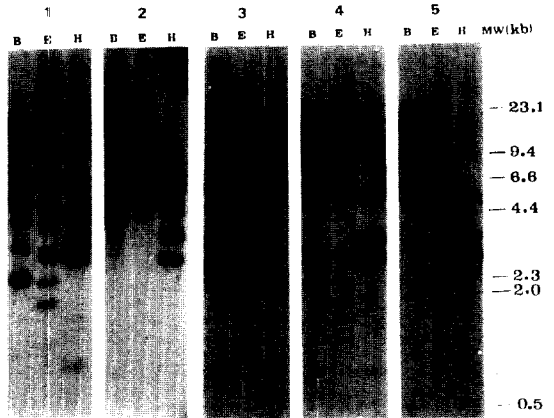
T<sub>m</sub>은 분리균주들 모두 85±0.5°C로서 약 37-38.3%의 GC ratio 값을 나타내었는데, 이 값은 표준균주에 대한 값과 거의 일치하였다. 표준균주의 전체 DNA를 probe으로 사용하여 측정된 DNA-DNA hybridization 결과는 분리균주들 모두 표준균주와 90% 이상의 높은 상동성을 보였는데, 이 중에서 특히 JH01, JO20은 97% 이상의 상동성이 있었으나, JH30은 90.5%였다. 비교균주로 사용한 *C. thermohydrosulfuricum*과는 32.1%의 낮은 상동성을 보였으며, *E. coli*와는 상동성이 전혀 없었다. 따라서, 국내에서 분리된 야생형 *C. thermocellum* 3균주는 균주간에 다소 차이는 있으나, 전체 DNA 염기배열에 있어서는 표준균주와 높은 상동성을 유지한다는 것이 판명되었다. *C. thermocellum*과 *C. thermohydrosulfuricum*의 rRNA에 의한 RFLP pattern 분석 및 비교

*C. thermocellum* 표준균주로 부터 분리한 rRNA의 전기영동 사진은 Fig. 1에, 각 균주들의 전체 DNA와 hybridization한 결과는 Fig. 2에 나타내었고, 이를 도식화한 band pattern은 Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 2에서 보는 것처럼 표준균주는 BamHI으로 잘랐을 경우에는 약 8개의 단편이 16S와 23S rRNA에 동시에 hybridization하였고, EcoRI으로 잘랐을 경



**Fig. 2(A).** Autoradiographs of Southern hybridization of *C. thermocellum* ATCC 27405 DNA (panel 1), *C. thermohydrosulfuricum* ATCC 33223 DNA (panel 2), JH01 DNA (panel 3), JH20 DNA (panel 4) and JH30 DNA (panel 5) with [<sup>32</sup>P]-labeled 16S rRNA of strain ATCC 27405. Lane B, E, H represent digests with BamHI, EcoRI, HindIII, respectively. Locations of the HindIII fragments of λ-DNA are given together with the molecular weights in kilobase pairs (kb).



**Fig. 2(B).** Autoradiographs of Southern hybridization of *C. thermocellum* ATCC 27405 DNA (panel 1), *C. thermohydrosulfuricum* ATCC 33223 DNA (panel 2), JH01 DNA (panel 3), JH20 DNA (panel 4) and JH30 DNA (panel 5) with [<sup>32</sup>P]-labeled 23S rRNA of strain ATCC 27405. Lane B, E, H represent digests with BamHI, EcoRI, HindIII, respectively.

우에는 약 12개의 단편이 hybridization하였다. HindIII의 경우에는 6개의 band들이 나타나 있다. 대부분의 band들이 16S와 23S rRNA에 동시에 hybridization되었는데, 이것은 16S와 23S rRNA 유

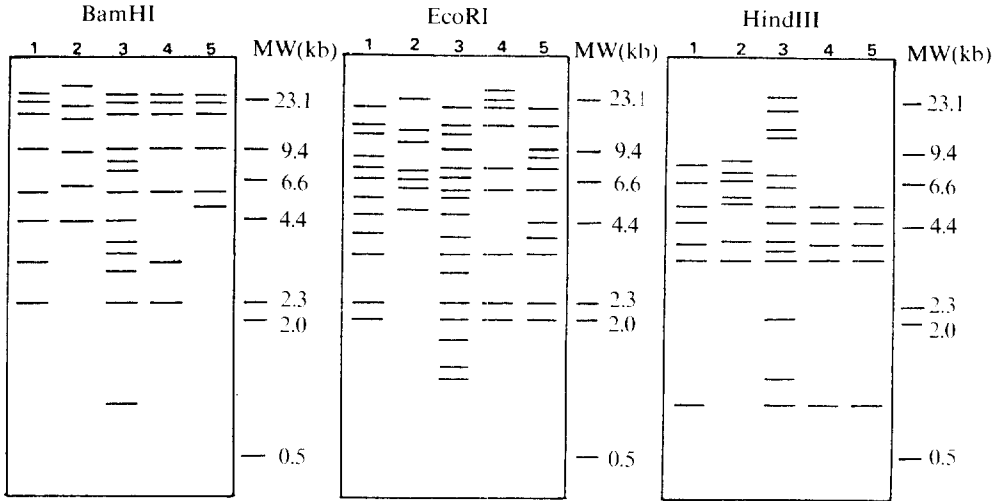


Fig. 3. Comparative schematic drawings of the hybridization pattern from Fig. 2, ordered for the different restriction endonucleases. Lane 1,2,3,4,5 represent DNAs of *C. thermocellum* ATCC 27405, *C. thermohydrosulfuricum* ATCC 33223, JH01, JH20 and JH30 respectively.

Table 2. Size of DNA fragments hybridized by 23S rRNA probe

Endonuclease	Strain	Fragment length (kbp)
BamHI	ATCC 27405	23.4, 21.0, 18.6, 9.4, 5.6, 4.3, 3.3, 2.3
	JH01	23.4, 21.0, 18.6, 9.4, 8.3, 7.5, 5.6, 4.3, 3.6, 3.1, 3.0, 2.3, 1.0
	JH20	23.4, 21.0, 18.6, 9.4, 5.6, 3.3, 2.3
	JH30	23.4, 21.0, 18.6, 9.4, 5.6, 5.0
	<i>C. ts</i>	25.2, 19.7, 18.5, 9.3, 6.0, 4.3
EcoRI	ATCC 27405	18.8, 15.0, 12.0, 8.6, 7.5, 6.7, 5.3, 4.3, 4.0, 3.1, 2.3, 2.0
	JH01	18.8, 15.0, 12.0, 9.4, 7.5, 6.7, 5.5, 5.3, 4.3, 3.8, 3.1, 3.0, 2.3, 2.0, 1.7, 1.4, 1.3
	JH20	24.6, 22.0, 18.8, 15.0, 7.5, 5.5, 3.1, 2.3, 2.0
	JH30	18.8, 15.0, 9.4, 8.6, 7.5, 5.5, 4.4, 3.8, 3.1, 2.3, 2.0
HindIII	ATCC 27405	23.0, 13.5, 10.3, 7.3, 6.5, 5.7, 4.8
	JH01	8.0, 6.7, 5.2, 4.5, 3.6, 3.1, 1.1
	JH20	23.4, 18.8, 15.0, 14.0, 7.5, 6.2, 5.2, 4.5, 3.8, 3.6, 3.1, 2.1, 1.5, 1.1
	JH30	5.2, 4.5, 3.6, 3.1, 1.1
	<i>C. ts</i>	5.2, 4.5, 3.6, 3.1, 1.1
	<i>C. ts</i>	9.1, 7.7, 6.9, 5.8, 5.3, 3.8, 3.1

"*C. thermohydrosulfuricum* ATCC 33223

전자가 매우 가깝게 연결되어 있으며, interspace에 제한효소 절단 부위가 없음을 나타낸다 (Jarsh 등, 1983).

또한, 분자량이 16S와 23S rRNA 유전자를 합친 것보다 큰 band들이 대부분이기 때문에 나타난 복잡한 band양상은 각 rRNA operon간의 flanking 부위에서의 제한효소 인식부위가 다르기 때문에 나타난 것으로 생각된다. 16S와 23S rRNA 유전자가 연결되어 있다는 가정을 기초로 하여 EcoRI 분해양상을 해석해보면 *C. thermocellum* 표준균주의 rRNA 유전자

copy수는 최소한 12개 정도이고 band강도를 봐서는 그 이상이 될 수도 있을 것으로 추측된다.

한편, *C. thermohydrosulfuricum*의 band양상은 *C. thermocellum* 표준균주보다는 단순하게 나타났다. 16S와 23S rRNA에 동시에 hybridization된 band들이 대부분인 것은 *C. thermocellum*과 마찬가지로 16S와 23S rRNA 유전자가 연결하고 있으며, interspace에 절단부위가 없음을 보여 주고 있으나 (Jarsh 등, 1983), HindIII 분해양상으로 해석해 볼때, *C. thermohydrosulfuricum*의 rRNA 유전자의 copy는

**Table 3.** Similarities of RFLP patterns between pairs of strains<sup>a</sup>

Endonuclease	Source of DNAs					<i>C. ts</i> <sup>b</sup>
	ATCC 27405	JH01	JH20	JH30		
BamHI	f	6	11	5	4	5
	x		0.42	0.83	0.43	0.11
EcoRI	f	12	17	7	10	6
	x		0.53	0.46	0.47	0
HindIII	f	6	13	5	5	7
	x		0.33	0.71	0.71	0.08
	x		0.43	0.67	0.54	0.06

<sup>a</sup> Only DNA fragments between 20 kb and 0.6 kb were considered.

<sup>b</sup> *C. thermohydrosulfuricum* ATCC 33223

f = number of resolvable fragments

x = probability that fragments in the strain ATCC 27405 are also present in the chosen strain

x = mean probability on three endonuclease

최소한 7개 이상이 될 것으로 추측된다.

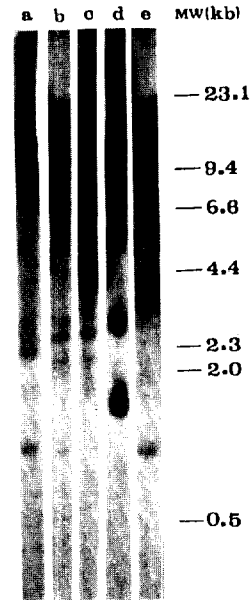
또한, 나타난 band pattern이 *C. thermocellum* 표준균주와 비교하여 완전히 다르며, Signal 강도도 상이한 것으로 봐서 *M. intercellulare*와 *M. phlei*의 경우(Bercovicz 등, 1986)처럼 rRNA 유전자의 copy 수와 그 flanking 부위의 염기서열은 이종간에선 완전히 상이하다는 것을 암시하고 있다. 또한, Table 3의 probability값이 *C. thermocellum* 균주들에 비하여 크게 낮은 것을 볼때, rRNA가 probe로써 종 간의 개체확인에 쓰일 수 있음을 나타내주고 있다.

***C. thermocellum* 야생균주들의 rRNA에 의한 RFLP pattern 비교**

JH01균주의 RFLP는 복잡한 양상을 보여주고 있는데, 표준균주와 비교하여 볼때에 BamHI과 EcoRI 부위의 몇 개의 단편들과 HindIII부위의 5.2 kb 위쪽의 단편들이 표준균주와 다른 것으로 봐서 JH01에는 flanking부위의 제한효소 인식부위가 표준균주와 다른 rRNA operon들이 다수 존재하고 있는 것으로 믿어진다. Table 3에 보는 것과 같이 표준균주와 JH01의 rRNA 유전자 부위의 상동성은 3가지 제한효소에 대하여 분리균주중에서 가장 낮은 probability값을 나타내었는데, 이것은 앞의 전체 DNA 상동성 실험 결과와는 잘 일치하지 않았다.

JH20과 JH30의 RFLP pattern은 Fig. 2와 같이 서로 비슷한 양상을 보였는데, HindIII부위는 서로 동일하였다. 이들 band pattern은 표준균주와 JH01보다는 band수와 signal강도에 있어서 단순한 양상을 보였는데, 이것은 JH20과 JH30균주에서는 제한효소 인식부위가 동일한 operon이 다수 존재하고 있음을 시사하고 있다. JH20은 Table 3에서와 같이 BamHI에 대한 인식부위가 표준균주와 상당히 흡사한 것으로 나타났으며, probability값도 다른 두 균주보다 높은 것으로 봐서 분리된 3균주중에서 rRNA operon의 제한효소 인식부위가 표준균주와 가장 높은 상동성을 유지하는 것으로 생각된다.

JH30균주의 경우 RFLP양상은 JH20균주와 비슷



**Fig. 4.** Autoradiograph of Southern hybridization of *Pst*I digested *C. thermocellum* ATCC 27405 DNA (lane a) JH20 DNA (lane b), JH30 DNA (lane c), *C. thermohydrosulfuricum* ATCC 33223 DNA (lane d) and *E. coli* HB101 DNA (lane e) with M13 probe.

Locations of the HindIII fragments of  $\lambda$ -DNA are given together with molecular weights in kilobase pairs (kb).

하지만 JH20의 EcoRI부위의 18.8 kb 이상의 DNA 단편들은 존재하지 않고, 8.6 kb 단편이 존재하고 있으며, 표준균주와는 JH20다음으로 상동성이 높았다. 결국, 분리된 균주들은 전체 DNA상의 상동성 정도는 표준균주와 서로 유사하지만, rRNA operon의 제한효소 인식부위와 같은 특정한 유전자들의 염기서열에

변화가 어느정도 인정되는 야생 변이균주들이었다. 그리고, 이상의 결과들은 rRNA probe이 유전적 배경이 다소 다른 동종내 균주들간 개체확인에 이용될 수 있음을 보여주고 있다.

#### M13 Probe에 의한 PFLP pattern 비교

M13 probe를 사용하여 나타난 각 균주들의 RFLP양상은 Fig. 4와 같다. *C. thermocellum*의 경우 분자량이 20 kb보다 작은 band들이 10-20개 정도씩 나타났다. 이들 band들 중

동종에 속하는 표준균주와 분리 야생주들 간에는 약 5-8개 band들이 차이가 있으나 이종인 *C. thermohydrosulfuricum*이나 이속인 *E. coli*와는 같은 band가 거의 없는 것으로 나타났다. 이같은 결과는 M13 probe가 *C. thermocellum*의 경우 동종내 subspecies를 구분할 수 있는 좋은 지표가 될 수 있으며 종과 속이 다른 균주들간의 확인에도 쓰일 수 있음을 보여주고 있다.

## 적 요

분리된 *C. thermocellum* 야생균주들과 ATCC 표준균주 사이의 염기서열의 변이 정도를 GC ratio, DNA 상동성, ribosomal RNA와 M13 probe에 의해 나타난 RFLP pattern 양상으로 조사하여 보았다. GC ratio와 DNA 상동성 수치는 분리 균들이 ATCC 표준균주와 전체 유전자 상에 있어서 거의 동일하다는 것을 보여주었으나, 이들 probe에 의한 RFLP pattern은 종내 균주들 간에 정도차가 다른 염기배열상의 변이가 있음을 확인시켜 주었다. 또한 이 probe들은 *C. thermocellum*의 경우 subspecies구분에 좋은 지표가 될 수 있음을 보여주었다.

## 사 사

본 연구는 1990년도 한국과학재단 학술연구 조성비에 의해 수행된 것입니다.

## REFERENCES

- Bercovier, H., O. Kafri and S. Sela, 1986. *Mycobacteria* possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **136**, 1136-1141.
- Huey, B. and J. Hall, 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.*, **171**, 2528-2532.
- Jarsh, M., A. Altebuchner and A. Bock, 1983. Physical organization of two genes for ribosomal RNA in *Methanococcus vannielii*. *Mol. Gen. Genet.*, **187**, 41-46.
- Lee, H.S., B.I. Choi, Y.-H. Lee, Y.B. Park and J. H. Ha, 1991. Isolation of *Clostridium thermocellum* strains producing high activity of cellulase. *Kor. J. Microbiol.*, **29**, 184-188.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1982. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Marmar, J. and P. Doty, 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.*, **5**, 109-118.
- Murray, G., C. Nester, K. Wood and M. Philips, 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*, ASM, p. 1-52.
- Ng, T.K., A. Bon-Bassat and J.G. Zeikus, 1981. Ethanol production by thermophilic bacteria: Fermentation of cellulosic substrates by coculture of *Clostridium thermocellum* and *clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1337-1343.
- Ng, T.K., P.J. Weimer and J.G. Zeikus, 1977. Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.*, **114**, 1-7.
- Ryskov, A.P., A.G. Jincharadze, M.I. Prosnjak, P. L. Ivanov and S.A. Limborska, 1988. M13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. *FEBS Lett.*, **233**, 388-392.
- Shimyo, A., D.V. Garcia-Martinez and A.L. Demain, 1979. Studies on the extracellular cellulolytic enzyme complex produced by *Clostridium thermocellum*. *J. Appl. Biochem.*, **1**, 202-209.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
- Weimer, P.J. and J.G. Zeikus, 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 289-297.
- Walker, J.M., 1984. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2, Humana Press. Clifton, New Jersey. pp. 197-199.

(Received May 14, 1991)

(Accepted June 15, 1991)