

## 효모, *Saccharomyces cerevisiae*의 GAP 유전자를 이용한 발현 벡터계의 개발

황용일\* · 서애란 · 심상국<sup>1</sup> · 정동효<sup>2</sup>

경남대학교 식품공학과, <sup>1</sup>동남보건전문대학 식품가공과, <sup>2</sup>중앙대학교 식품가공학과

### Construction of an Expression Vector System with the GAP Promoter in *Saccharomyces cerevisiae*

Hwang, Yong-Il\*, Ae-Ran Seo, Sang-Kook Shim<sup>1</sup> and Dong-Hyo Chung<sup>2</sup>

Department of Food Engineering, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Technology, Dongnam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Chungang University, Ansung 456-756, Korea

**Abstract** — The cloned glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAP) gene of *Saccharomyces cerevisiae* (Holland *et al.*, 1983) has been characterized. Based on the communication, we have also cloned 2.1 kb GAP DNA fragment and modified this fragment as a portable promoter. Two yeast expression vectors, one is YCp type vector being maintained at low copy number (1 or 2) and the other is YEp type vector at high copy number, have been constructed with the GAP promoter and the *PHO5'* gene as a reporter. Our plasmids were introduced into *S. cerevisiae* HY-1, which has been improved. The Trp<sup>+</sup> transformants expressed APase activity efficiently and showed high level of *PHO5'* transcripts.

오늘날 DNA 조작기술-유전자공학을 이용한 유용물질의 생산은 생물공학 중에서도 중요한 위치를 점하고 있다. 특히 고등생물 유래의 생리활성단백질을 세균에 의해 양산하기 위한 급속한 연구개발의 결과로서 insulin, growth hormone, interferon 등이 생산되어 의료에 이용되고 있다. 그러나 이러한 유용물질 생산을 위한 세균의 숙주계는 번역 후 수식 등의 processing 단계의 결여로 인한 활성단백질의 생성이 어려울 뿐만 아니라 생성된 이종단백질이 불용성 과립상태로 축적되어 숙주세포의 성장을 억제시키거나, 자기분해되는 등의 여러 문제점들을 노출시키고 있다. 따라서 고등생물유전자를 진핵세포에서 발현 증폭시키고 분비시킬 수 있는 숙주·벡터계의 개발은 세균을 숙주로 이용한 계에서 불가능한 고가의 고등생물 단백질 생산할 수 있다는 측면에서 의미가 있다.

유용물질생산을 위한 숙주로서의 효모(*Saccharomyces cerevisiae*, 이하 효모)는 단세포 진핵생물로서 배양조건과 증식속도, 유전정보의 축적, 외래유전자의 도입가능, 동물세포에서는 거의 불가능한 유기변이를 만들 수 있는 점과 진핵생물의 전자조절계, RNA의 splicing, 만들어진 단백질에 당쇄 첨가에 의한 활성화 등이 있고 막계가 발달되어 각종 막단백질의 합성이나 분비단백질의 생산이 용이한 점 등이 장점으로, 생성물질의 축적에 의한 숙주세포의 생육저해, 생체방어기에 의한 생성물의 분해 등을 해소할 수 있을 뿐 아니라 대량 연속배양이 가능하다. Hitzeman 등 (1)의 알코올탈수소효소 구조유전자의 프로모터를 이용한 외래유전자의 발현이나 phosphoglycerate kinase 유전자를 이용한  $\gamma$ -IFN의 생산(2),  $\alpha$ -mating factor 유전자의 프로모터를 이용한 성장인자의 발현(3) 등은 효모를 숙주로 하는 외래유전자의 효과적 발현의 예로 들 수 있다.

효모 건조세포의 단백질 중 5% 이상을 차지하는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAP-

**Key words:** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, oligodeoxyribonucleotide, colony hybridization

\*Corresponding author

DH)는 유사한 세개의 구조유전자(GAP)에 의해 code되는 isozyme으로(4, 5) 이러한 유전자들의 구조는 Holland 등(6)에 의하여 상세히 밝혀져 있으며, 이 효소의 mRNA는 전체 poly[A<sup>+</sup>] mRNA의 2~5%를 차지한다(7). 한편 고농도의 glucose 배지에서 배양하거나(8) 탄소원을 초산염 등에서 glucose로 전환함에 따라 활성이 200배 이상 증가한다(9). 그리고 세개의 유전자 중 plasmid pGAP491상의 유전자에서 대부분의 GAP-DH가 만들어진다(6).

본 실험에서 GAP promoter의 발현량의 측정을 위하여 reporter로 이용된 효모의 acid phosphatase (APase)는 PHO5 유전자의 산물로서(10) 이미 그 간편성은 알려져 있다.

효모를 이용한 유용물질의 고발현을 전제로 효율적인 숙주·벡터계를 구축하기 위하여, 먼저 기존의 균주를 유전학적인 방법으로 적절한 숙주로 개량하였으며, 효과적인 외래유전자의 다량발현을 유도하기 위하여 상기 pGAP491상의 유전자의 프로모터부분을 포함하는 DNA 단편을 효모의 핵염색체 DNA에서 분리하여 적절히 변형시켰다. 효모 내에서의 GAP 프로모터의 발현은 발현벡터가 도입된 콜로니의 평판배지상에서의 효소생산 여부, 배양액 중의 APase 및  $\beta$ -galactosidase의 활성변화, 세포내 전사산물의 확인으로 효과적인 발현을 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주와 plasmid DNA

효모 KO-14D( $\alpha$  *pho3 pho5*)는 APase 생산불능 변이주로 이용되었으며, AH22(*a leu2 his4 can1*)는 GAP 프로모터 DNA 단편의 클로닝을 위하여 gene bank 제작용 염색체 DNA 분리원과 균주 개량용으로, D13-1A(*a trp1 his3*)와 DKD-5D(*a trp1 leu2 his3*)는 균주 개량용으로 이용되었다. 대장균 JA221, HB 101 및 JM109는 plasmid DNA와 gene bank의 제작과 대량회수에 이용되었다. 각종 plasmid DNA의 제작에는 다음의 plasmid들을 이용하였다; pUC9 (*Ap<sup>r</sup> lacZ'* 2.7 kb)(11), pVC727(*TRPI ARSI PHO5' CEN3 Ap<sup>r</sup>* 5.7 kb), pVC104(*TRPI 2 $\mu$ ori Ap<sup>r</sup>* 7.3 kb). 균주 개량용으로 이용된 효모와 plasmid pVC727 및 pVC104는 Oshima 연구실(Osaka Univ., Japan)에서

분양받은 것이다.

효모의 형질전환율과 안정성을 측정하기 위하여 사용된 세 종류의 plasmid는 YCp 형태(1~2 copies, stable; pYe30), YRp 형태(10~50, unstable; YRp 7), YEp 형태(50~100, stable; Yep13)로 숙주세포의 영양요구성에 맞추어 사용하였다.

### 배지

효모의 일반적인 배양을 위해서는 YPD 배지(2% glucose, 2% polypeptone, 1% yeast extract)를 사용하였다. 형질전환과 효소활성측정을 위한 전배양에는 SD 합성배지(20g의 glucose, 6.7g의 yeast nitrogen base(w/o amino acid))로, 효소활성측정을 위한 본 배양 및 plate상의 활성측정을 위해서는 Burkhold의 +P합성배지(12)를 사용하였다. 각 합성배지에는 효모의 영양요구성에 맞추어 아미노산과 핵산을 적당하게 첨가하였다.

대장균의 일반배양에는 L-broth를 사용하였으며, plasmid의 다량제시에는 M9배지를 이용하였으며, sodium ampicillin(50  $\mu$ g/ml)을 필요에 따라 첨가하였다(13). 평판배지는 상기 액체배지에 2%의 agar를 첨가하여 조제하였다.

### 유전학적 및 생화학적인 방법

균주개량을 위하여 잡종이배체의 조성은 mass mating법(14)을 이용하였으며, 포자의 분리나 ethyl methane-sulfonate(EMS)를 이용한 변이제 처리는 Sherman 등의 방법(15)의 변법으로 하였다. Plasmid의 안정성 측정은 형질전환체를 YPD 액체배지에 10세대 정도 배양한 후, SD 합성배지와 YPD 배지에서 자라난 균수를 비교하여 측정하였다.

APase 활성 측정은, 먼저, 평판배지상에 자라난 콜로니를 이용한 직접 염색법은 Toh-e와 Oshima법(16)을 이용하였으며, 배양세포의 현탁액을 이용한 측정법은 Toh-e 등의 방법(17)을 이용하였다. 효소 활성 단위는 기질로부터 1분간에 1  $\mu$ mol의 p-nitrophenol을 생산할 수 있는 효소의 양으로 나타내었다.

대장균의 형질전환은 Morrison의 방법(18)에 따라 하였으며, 효모의 형질전환은 Ito 등의 방법(19)의 변법으로 하였다. 제한효소의 처리, ligation, exonuclease 처리 등 DNA 분자의 조작은 Maniatis 등의 방법(13)을 따랐다.

Colony hybridization은 Maniatis 등의 방법(13)에 따랐으며, GAP 프로모터의 분리를 위하여 이용된 deoxyribonucleotide의 합성은 phosphoramitide법(20, 21)에 의하여 조제하였다. 효모의 mRNA 확인에서, 전체 RNA는 Jensen 등의 방법(22)에 따라 취득하였으며, poly[A<sup>+</sup>]RNA의 정제는 Schleif와 Wensink의 방법(23)으로 하였으며, poly[A<sup>+</sup>]RNA의 northern analysis는 Thomas의 방법(24)으로 행하였다.

## 결과 및 고찰

### APase 생산불능 균주 중에서 형질전환율이 높은 효모의 선별

물질생산을 위한 숙주효모세포로써는 안전성에 더하여 도입되는 plasmid 벡터에 따른 다양한 영양요구성 marker, 높은 형질전환율, 외래성 plasmid의 세포내 안정 유지 등이 요구된다. 그리하여, 양조효모에서 분리되어 유전적 성질 등이 잘 밝혀진 수종의 실험실 효모균주에서 세포융합을 통하여 적절한 숙주세포를 분리하기로 하였다. 먼저, 본 실험에서 발현량의 reporter로 이용되는 APase의 생산불능 변이주 KO-14D( $\alpha$  *pho3 pho5*)에서 출발하여, 다양한 영양요구성 marker를 지닌 세포를 얻기 위하여 KO-14D와 AH22( $\alpha$  *leu2 his4 can1*)와의 세포융합(교잡)에 의하여 잡종 이배체를 취득한 후, 사분자 분석 실험을 통하여 얻어진 segregant( $\alpha$  *pho3 pho5 leu2 can1*)와, 영양요구성 marker 도입 및 형질전환율을 향상시키기 위하여 Table 1에서와 같이 비교적 높은 형질전환율을 지닌 D13-1A( $\alpha$  *trp1 his3*)

와 교잡을 시켜 위와 동일한 방법으로 segregant( $\alpha$  *trp1 his3 leu2 can1 pho3 pho5*)를 얻었다. 위의 segregant와 높은 형질전환율과 비교적 높은 plasmid의 안정성을 지닌 것으로 알려진 DKD-5D( $\alpha$  *trp1 leu2 his3*)(Table 1)와 교잡을 통하여 잡종 이배체를 얻었다. 이 잡종 이배체를 변이제(EMS)로 통상의 처리시간보다 짧게 처리(10분)함으로써 세포의 생리에는 큰 변화를 초래하지 않게 하여 plasmid pYe30을 이용하여 처리된 잡종 이배체의 *trp1*을 상보하는 형질전환율이 향상된 균주를 선별하였다. 선별된 이배체를 사분자 분석법을 이용하여 형질전환율이 향상된 반수체세포인 segregant HY-1( $\alpha$  *trp1 his3 leu2 can1 pho3 pho5*)를 얻었다(Table 1). Table 1에서 각 균주의 형질전환율은 D13-1A에 1  $\mu$ g의 plasmid YRp7의 도입시 얻어진 평균 Trp<sup>+</sup> 형질전환체 470개를 기준으로 하여 백분율로 표시하였다. 균주간 영양요구성 marker의 차이로 인하여 세가지 형태의 plasmid(pYe30와 YRP7, *TRP1*; YEp13, *LEU2*)에 의한 직접적인 비교는 어려우나 HY-1은 YEp13으로 비교하면 AH22와는 약 8배 이상이 증가된 것을 알 수 있다. YCp 형태인 plasmid pYe30을 이용한 결과에서 보면 HY-1은 D13-1A, DKD-5D보다 각각 2배지 1.3배씩 증가한 것을 알 수 있다. YRp 형태의 plasmid인 YRp7에서도 이와 유사한 결과를 보였다. 그러나 각 plasmid의 안정성에 대해서는 교잡에 이용된 균주들과 비교해 보면 특이한 증가를 보이지 않았다(Table 1). 이는 개량주 HY-1이 여러 단계의 교잡과 변이유도에 의하여 형질전환에 용이한 균주로 개량됨을 뜻하나 도입된 외래성 plasmid의 안정성에 관한 형질의 변화는 없었음을 의미한다. 나아가, HY-1의 형질전환율이 DKD-5D보다 증가한 가능성으로서는 EMS 처리에 의하여 세포막계의 불안정이 야기되어 plasmid의 도입이 촉진되었으리라 추측되나 보다 상세한 유전학적인 해석이 요구된다.

Table 1. Transformation efficiency of *S. cerevisiae* cells

Recipient strain	Plasmid	Transformation efficiency (%)	Holding Stability (%)
AH-22	YEp13	28	58
D13-1A	pYe30	84	61
	YRp7	100	29
DKD-5D	pYe30	132	60
	YRp7	176	30
HY-1	pYe30	176	60
	YRp7	220	30
	YEp13	242	60

### GAP 프로모터 DNA 단편의 분리 및 변형

GAP 프로모터의 기능을 지닌 DNA 단편을 분리하기 위하여 먼저, 분리원으로 효모 AH22로 정하여 염색체 DNA를 다량 정제하였다. gene bank는 정제된 염색체 DNA를 제한효소 *HindIII*로 완전분해하여 자당 농도 기울기 원심분리법을 이용하여 약





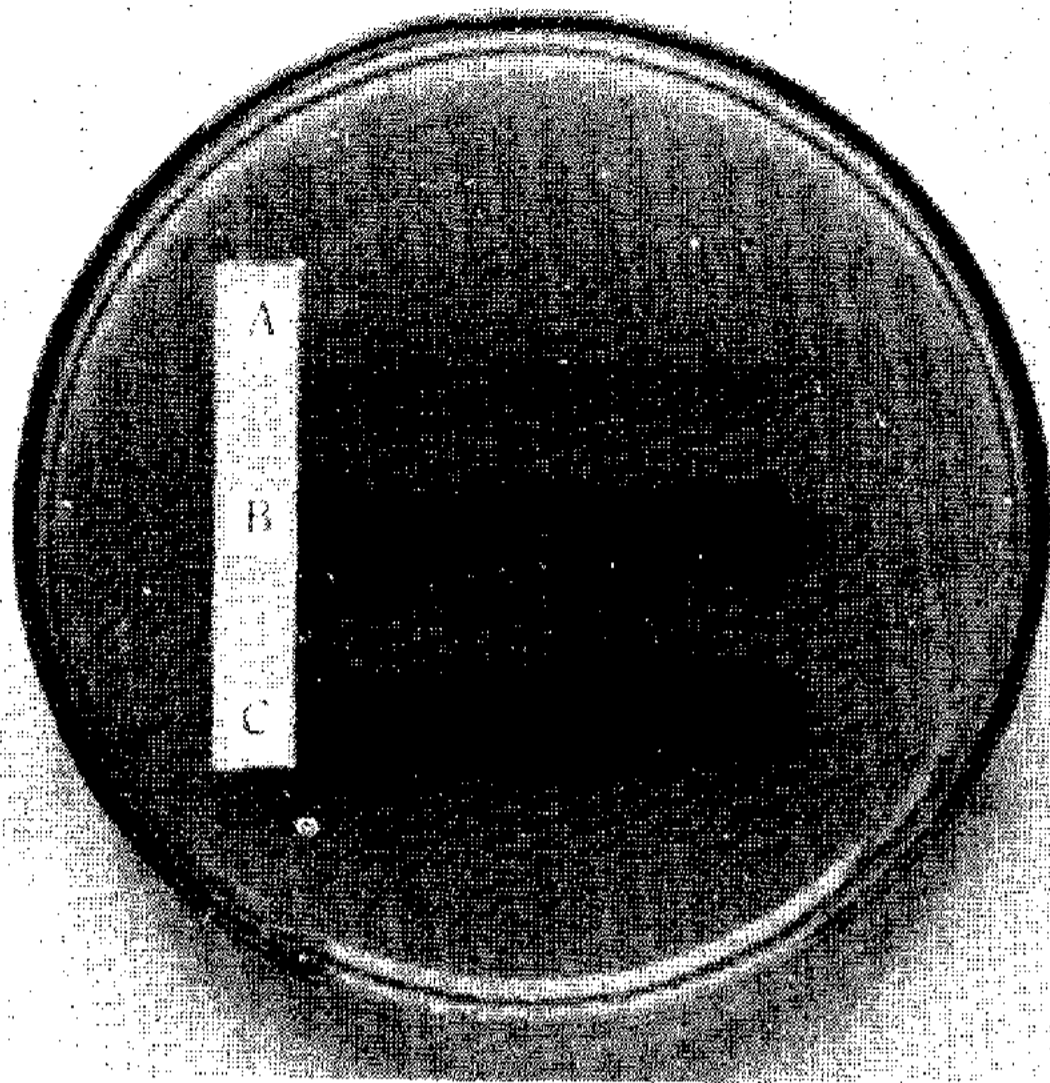


Fig. 3. Colorimetric assay of APase activity.

The colonies of A, B, and C are transformant of HY-1 harboring the plasmid pVC727, pHY101 and pHY103, respectively.

알기 위하여 두 종류(YCp, YEp 형태)의 벡터 plasmid를 제작하기로 하였다. GAP 프로모터의 발현량의 측정을 위하여 먼저 효모내에서 안정하게 유지되는 YCp 형태의 plasmid pVC727을 이용하였다. pVC727은 GAP 프로모터의 발현량 측정을 위한 reporter로 이용되는 APase의 구조유전자 PHO5의 프로모터 부분을 제거한 DNA 단편(PHO5')이 있으며, PHO5의 5'상류에 제한효소 BamHI-EcoRI 부위가 있어(Fig. 2), 먼저 BamHI과 EcoRI으로 절단한 후 0.9 kb의 BamHI-EcoRI GAP 프로모터 단편을 삽입하여 벡터 pHY101을 제작하였다. YEp 형태의 발현 벡터의 제작은 YEp 형태의 plasmid pVC104를 이용하여 BamHI과 EcoRV로 분해하여 약 0.2 kb의 단편을 제거한 후 PHO5'를 포함하는 2.8 kb의 BamHI-AccII의 단편을 pVC727에서 분리하여 연결시켜 vector pQ를 제작하였다(Fig. 2). vector pQ의 PHO5'의 5' 상류 BamHI-EcoRI 부위에 상기의 방법으로 GAP 프로모터를 도입하여 벡터 pHY103을 제작하여(Fig. 2), GAP 프로모터에 의한 발현량 측정에 이용하였다.

#### GAP 프로모터에 의한 APase의 활성 측정

본 실험에서 개량된 효모균주 HY-1을 숙주로 하고 벡터 pHY101 및 pHY103을 이용하여 Trp<sup>+</sup> 형질전환체를 취득하여 GAP 프로모터의 발현량을

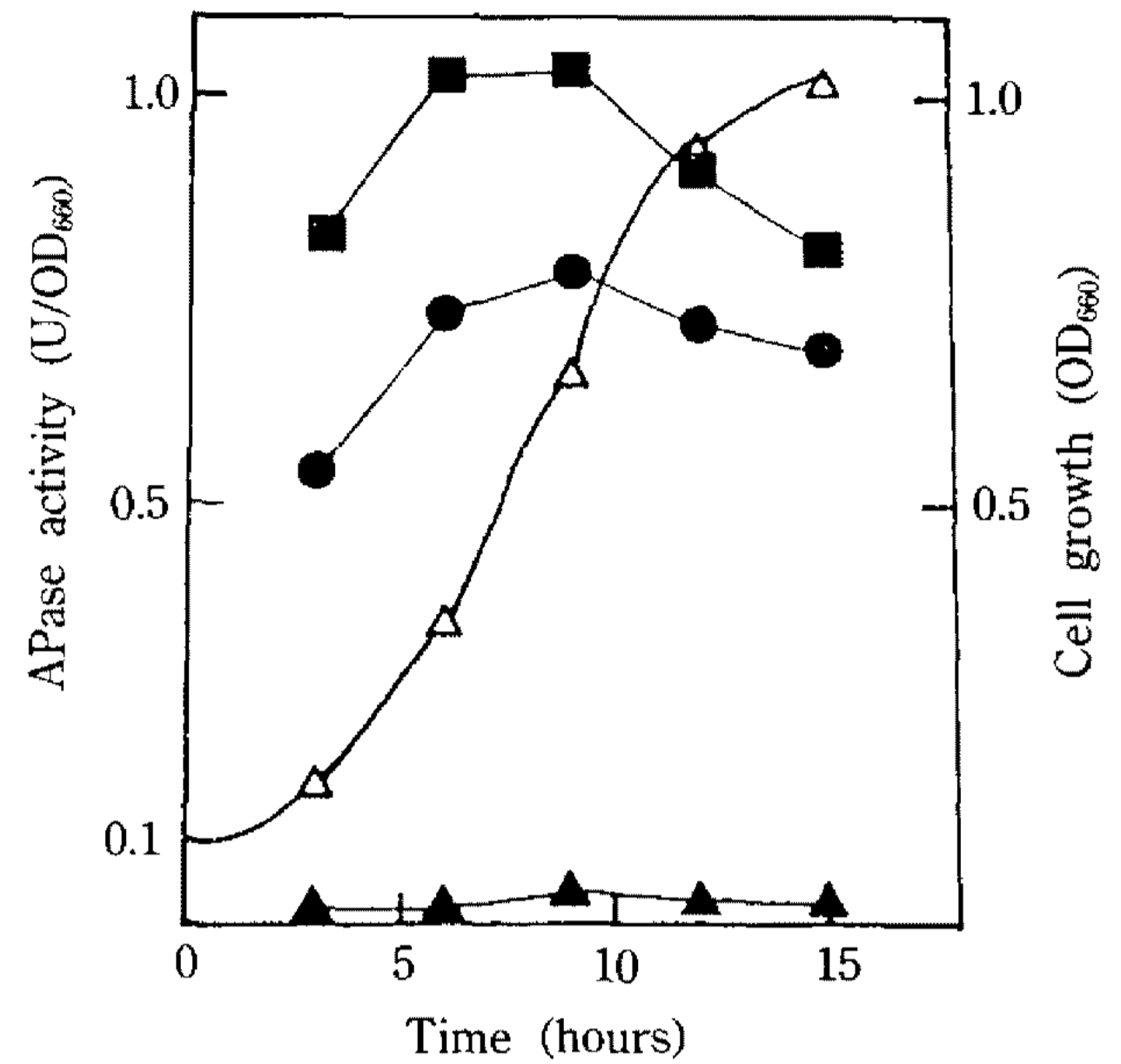


Fig. 4. APase production of the yeast transformants harboring the expression vectors.

Growth condition and preparation of cell suspension for assay of APase activity are well described in the text. Symbols of square, circle and triangle represent APase activity of the transformant harboring plasmid pVC727, pHY101 and pHY103, respectively. Open triangle shows the growth of these transformants.

측정하였다. GAP 프로모터가 없는 벡터 pVC727을 가진 형질전환체를 control로 이용하였다. 얻어진 Trp<sup>+</sup> 형질전환체를 이용하여 먼저 평판배지상에서 자라난 각 콜로니의 APase 활성을 직접 염색법에 의하여 관찰하였다. Fig. 3의 control(A)에서는 전혀 APase의 활성이 감지되지 않았으나, GAP 프로모터를 지닌 콜로니(B, C)는 적색으로 변하였으며 특히, YEp 형태의 벡터를 지닌 콜로니(C)는 농적색으로 콜로니(B)와 비교하여 다량의 APase가 생산된 것을 알 수 있다. 그리하여 이들 각 콜로니의 GAP 프로모터에 의한 APase 생산의 경시적인 변화를 측정하였다(Fig. 4). 각각의 벡터를 지닌 Trp<sup>+</sup> 형질전환체의 +P 합성 액체배지에서의 증식은 APase 생산량에 상관없이 유사한 증식속도를 보였다. 그러나 GAP 프로모터의 발현에 의한 APase의 생산은 control에서는 거의 감지되지 않는 반면 pHY101 및 pHY103에서는 경시적으로 높은 활성을 보였으며 증식속도와 비례하였다(Fig. 4). 이는 GAP 유전자 본래의 성질과 관련한 것으로 생각된다. 본 배양 후 9시간 경과시 최고치의 활성에 도달하였으며 pHY103 (1.03 U)는 pHY101(0.78 U)보다 약 1.3배의 높은

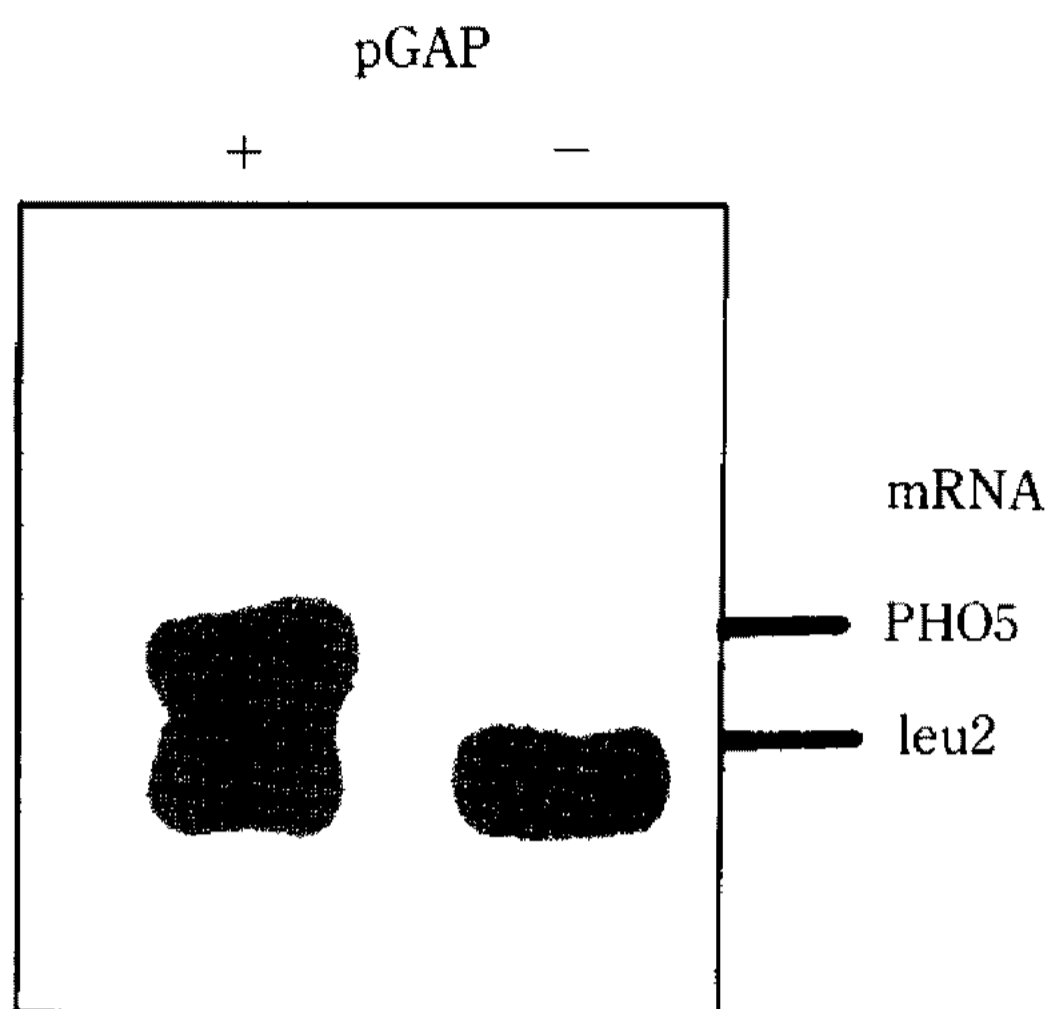


Fig. 5. Transcription of the yeast transformant harboring the expression vector.

Procedures of preparation of yeast poly[A<sup>+</sup>]RNA and Northern analysis are detailed in the text. PHO5 and leu2 mean the position of cellular transcript on the gel, respectively. Symbols of (+) and (-) represent the transcript of the transformant harboring plasmid pHY101 and pVC727, respectively.

활성을 보였다. 그러나 plasmid의 세포내 copy수를 비교하면 수십배 이상의 차이가 예상된다. 실제치와 예상치의 차이가 일어나는 가능성으로는, 세포가 정상적으로 생리기능을 유지하기 위하여 생육에 필요 이상의 산물의 과잉축적을 피하기 위하여 전사단계 내지는 번역단계에서 산물의 생산을 억제하는 방어계의 작용가능성, 한편으로는 GAP 프로모터의 발현에 필요한 positive factor의 양이 세포내에 한정되어 있어 숫적으로 늘어난 모든 GAP 프로모터를 전부 발현시키기에는 부족한 점 등을 들 수 있다. 두번째 가능성은, PHO5를 YEp 형태의 벡터에 도입하여 발현시킬 때 positive factor인 PHO4를 동시에 copy수를 증가시켜야 정상적인 발현이 일어나는 것이 관측되었다. 첫번째 가능성에 대해서는, 이종산물의 대장균 등에서의 대량생산시 흔히 일어나는 현상으로 각 단계에 대한 분자생물학적인 해석이 요구된다. 한편, GAP 프로모터에 의한 이종산물의 생산 가능성을 검토하기 위하여, GAP 프로모터에 번역 개시점을 지닌 대장균의  $\beta$ -galactosidase의 구조유전자 *lacZ'*를 연결시켜 YCp 형태의 벡터상에서 GAP 프로모터에 의한  $\beta$ -galactosidase의 효소활성을 측정된 결과, 307 U/mg protein의 높은 발현량을 보였다.

### PHO5' 전사산물에 의한 GAP 프로모터의 전사 효율 측정

GAP 프로모터에 의한 PHO5' 전사가 세포내에서 정상적으로 일어나는지의 여부를 관측하기 위하여 세포내 leu2의 전사산물을 기준으로 pVC727 및 pHY101를 지닌 clone의 PHO5' 및 leu2의 mRNA량을 비교하였다. 각각의 clone에서 정제한 poly[A<sup>+</sup>]RNA를 전기영동 후, PHO5' 및 LEU2의 구조유전자의 일부를 <sup>32</sup>P로 표지하여 probe로 이용하여 각각의 전사산물을 조사한 결과, Fig. 5에서 GAP 프로모터를 지닌 pHY101에서는 다량의 PHO5' 전사산물이 관측되었으나 pVC727에서는 관측되지 않았다. 본래 낮은 활성을 보이는 leu2의 전사산물이 GAP 프로모터에 의한 PHO5' 전사산물과 비교할 때 큰 차이를 보이지 않는 것은 leu2의 probe를 PHO5'보다 50배 이상의 것을 사용하여 결과를 관측하기 쉽게 하였기 때문이다.

### 요 약

효모에서 대량의 물질생산계를 구축하기 위하여 먼저 여러 종류의 벡터의 이용이 가능한 다양한 영양요구성 marker를 지니며 형질전환율이 향상된 효모숙주를 선별 개량하였다. 벡터의 제작에 사용되는 프로모터로는, 효모의 여러 유전자 중에서 그 활성이 매우 높은 해당계의 효소 GAP-DH의 구조유전자 GAP를 이용하기로 하여, 효모염색체 DNA 중에서 GAP 프로모터를 분리하여 이용하기 쉽게 변형하였다. 분리된 GAP promoter의 기능을 검토하기 위하여, reporter로 APase의 구조유전자 PHO5'를 이용하여 세포내의 copy수가 상이한 발현 벡터를 제작하여 GAP 프로모터에 의한 APase의 활성 및 전사산물을 측정된 결과, 정상적인 전사가 이루어졌으며, 효소활성도 높게 나타났으며, 벡터의 copy수에 의한 효소활성의 차이도 감지되었다. 이러한 결과로부터 GAP 프로모터를 이용한 발현계의 구축에 의하여 다량으로 이종 유전자 산물의 생산이 가능한 물질 생산계를 구축할 수 있었다.

### 감사의 말

본 연구는 1989년도 문교부 학술연구 조성비 지

원에 의하여 수행되었으며 지원에 대하여 감사의 뜻을 포함합니다.

### 참고문헌

1. Holland, J.P., L. Labieniec, C. Swimmer and M.J. Holland: *J. Biol. Chem.*, **258**, 5291 (1983)
2. Hitzeman, R.A., F.E. Hagie, H.L. Levine, D.V. Goeddel, G. Amerer and B.D. Dall: *Nature*, **293**, 717 (1981)
3. Derynck, R., A. Singh and D.V. Goeddel: *Nucl. Acids Res.*, **11**, 1819 (1983)
4. Bayne, M.L., J. Applebaum, G.G. Chicchi, N.S. Hayes, B.G. Green and M.A. Cascieri: *Gene*, **66**, 235 (1988)
5. Krebs, E.G.: *J. Biol. Chem.*, **200**, 471 (1953)
6. Holland, M.J. and J.P. Holland: *J. Biol. Chem.*, **254**, 5466 (1979)
7. Holland, M.J. and J.P. Holland: *Biochemistry*, **17**, 4900 (1978)
8. Hommes, F.A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **114**, 231 (1966)
9. Maitra, P.K. and Z. Lobo: *J. Biol. Chem.*, **246**, 475 (1971)
10. Toh-e, A. and Y. Osima: *J. Bacteriol.*, **113**, 727 (1974)
11. Messing, J. and J. Vieira: *Methods Enzymol.*, **101**, 20 (1983)
12. Burkholder, P.R.: *Amer. J. Bot.*, **30**, 206 (1943)
13. Maniatis, E.F. Fresh and J. Sambrook: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 97 (1982)
14. Lindegren, C.C. and G. Lindegren: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **29**, 306 (1943)
15. Sherman, F., G.R. Fink and J.B. Hicks: *Methods in yeast genetics* (1982)
16. Toh-e, A., and Y. Oshima: *J. Bacteriol.*, **120**, 608 (1974)
17. Toh-e, A., Y. Ueda, S. Kakimoto and Y. Oshima: *J. Bacteriol.*, **113**, 727 (1973)
18. Morrison, D.A.: *J. Bacteriol.*, **132**, 349 (1977)
19. Ito, H., Y. Hukuda, K. Murata and A. Kimura: *J. Bacteriol.*, **153**, 163 (1983)
20. Beaucage, S.L. and M.H. Caruthers: *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1859 (1981)
21. Caruthers, M.H., S.L. Beaucage, C. Becker, W. Efcavitch, E.F. Fisher, G. Galluppi, R. Goldman, P. Dehaseth, F. Martin, M. Matteucci and Y. Stabinsky: *Genetic Engineering*, **4**, 1 (1982)
22. Jensen, R., Jr. G.F. Sprague and I. Herskowitz.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3035 (1983)
23. Schleif, R.F. and P.C. Wensink: *Practical methods in molecular biology*. Springer-Verlag, New York, 168 (1981)
24. Thomas, P.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5201 (1980)

(Received August 21, 1991)