

## 专论与综述

## λgt11 克隆载体及其衍生物

马荣才 李季伦

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

基因的分离可以用核酸探针 (nucleic acid probe) 或抗体探针 (antibody probe), 抗体探针又称蛋白质探针可以用于直接分离产生目的蛋白的重组克隆, 不管蛋白质或基因序列是否已知。它已被越来越广泛地用于筛选基因或 cDNA 文库。这是因为: (1) 很多具有功能的蛋白质其基因结构是未知的; (2) 利用核酸探针往往需要合成多个片段才能正确筛选; (3) 抗体探针具有很高的专一性, 这是因为抗原-抗体反应取决于一定的抗原决定簇和蛋白质的整体结构。(4) 真核生物基因表达、调控的研究也广泛使用表达型载体。与质粒载体相比, 利用 λ 表达型载体克隆基因具有两个优点: (1) 通过体外包装, 感染大肠杆菌高效率引入重组 DNA 分子; (2) 可以获得很高的噬菌斑密度, 提高筛选效率。另外文库保存方便,

在 4℃ 冰箱内能保存 3—4 年。

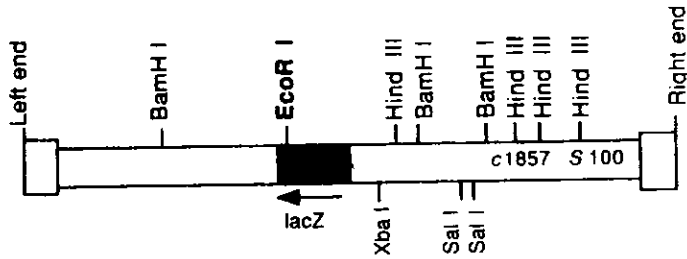
利用 λgt11 等载体及其各种宿主菌, 在过去的几年里已分离到了许多难于分离的基因, 它们是获得未知基因的基本途径。

## 1 λgt11 载体的特性

λgt11 载体是 1983 年构建的<sup>[1]</sup>, “gt” 是 “generalized transducer” (普遍型转导体) 的缩写。λgt11 的主要结构特性如表 1 和图 1 所示。λgt11 含有 *E. coli lacZ* 基因, 外源 DNA 插入的位置是 lacZ 基因内的单一 EcoRI 位点。这一位点位于 lacZ 基因的 3' 端终止密码子上游 53bp 处。λgt11 载体长 43.7kb, 能容纳 7.2bp 的外源 DNA。在 X-gal 平板上可以直接鉴别重组克隆。在设计 λgt11 载体时主要考虑到了下列问题<sup>[3]</sup>。

表 1 不同 λgt11 衍生载体的比较

结构与特性	λgt11	λ18-19	λ20-21	λ22-23
遗传特性				
琥珀突变	sam100	sam100	sam100	sam100
抑制基因	SuII 或 SuIII	SuII 或 SuIII	SuII 或 SuIII	SuII 或 SuIII
gam/red 状态	--	--	--	--
Chi 位点	无	可能	有	有
Spi 选择	能	不能	不能	不能
recA 中繁殖	能	不能	不能	不能
克隆位点	EcoRI	EcoRI SacI SalI XbaI	EcoRI SacI SalI XbaI	EcoRI NotI SacI SalI XbaI
左臂大小 (kb)	19.6	19.6	19.6	19.6
右臂大小 (kb)	24.1	23.6	23.1	23.1
插入片段 (kb)	0—7.2	0—7.7	0—8.2	0—8.2
非重组子	lac <sup>+</sup>	lac <sup>+</sup>	lac <sup>+</sup>	lac <sup>+</sup>
重组子	lac <sup>-</sup>	lac <sup>-</sup>	lac <sup>-</sup>	lac <sup>-</sup>
宿主				
繁殖噬菌体	Y1088	Y1088	Y1088	Y1088
筛选重组子	Y1090	Y1090	Y1090	Y1090

图1  $\lambda$ gt11的主要结构特征

1.1 外源 DNA 应具有合适的表达水平。将外源 DNA 与  $\beta$ -半乳糖苷酶基因融合就保证了外源 DNA 在 *E. coli* 中的有效表达。对于单独的 lacZ 来说,约细胞蛋白的 5% 是  $\beta$ -半乳糖苷酶。对  $\lambda$ gt11 融合蛋白,目前看来,可达细胞总蛋白 0.1—4%。

1.2 外源 DNA 的表达应受到控制,这一点很重要。因为当外源蛋白对宿主细胞有害时,在积累足够的蛋白质抗原以前就会杀死细胞。这一问题通过下述方法得以解决。利用能够大量产生 lacZ 阻遏蛋白 (lacI) 的宿主细胞 (在 pBR322 衍生质粒 pMC9 上带有 lacI 基因) 在形成噬菌斑的最初几个小时内抑制 lacZ 融合蛋白的表达当噬菌斑周围的细胞密度足够高时,加入诱导物 IPTG 等使阻遏蛋白失活,诱导融合蛋白的表达。这样即使外源抗原对细胞有害也能达到可检测的水平。

除裂解功能外, $\lambda$ gt11 还含有溶源基因。从溶源状态向裂解生长的转换很容易由 c1857 控制。c1857 编码温度 (42°C) 敏感的 CI 阻遏蛋白。 $\lambda$ gt11 还含有裂解基因 S100 突变,这一突变对于蛋白质的产生是重要的。在不发生大量细胞裂解的情况下能积累大量的外源蛋白。在  $\lambda$ gt11 宿主细胞中存在 supF 突变,抑制 S100 突变,允许噬菌斑的形成。

1.3 在 *E. coli* 细胞中融合蛋白的稳定性。*E. coli* Lon 蛋白酶缺陷型 ( $\Delta$ lon) 提高了融合蛋白的稳定性。Lon 蛋白酶是一种热激蛋白,能降解高温时积累的其它蛋白质<sup>[4]</sup>。从下面的讨论可以看出抗原也能以非融合的形式表达。

$\lambda$ gt11 带有野生型的 gam red 基因型,抑制宿主 RecBCD 的作用,参与  $\lambda$  的滚环复制,在 recA 细胞中能生长。 $\lambda$ gt11 各种宿主细胞的表型如下:

(1) Y1088 [*SupF*hdsR<sup>-</sup> hsdM<sup>-</sup>  $\Delta$  lacU169proC<sub>2</sub>; Tn5 (pMC9)]

(2) Y1090 [*SupF*hdsR<sup>-</sup> hsdM<sup>-</sup>  $\Delta$  lacU169  $\Delta$  lontrp22<sub>2</sub>; Tn10 (pMC9)]

(3) Y1089 [ $\Delta$ lacU169  $\Delta$ lonhdsR<sup>-</sup> hsdM<sup>-</sup> hflAChr<sub>2</sub>; Tn10 (pMC9)]

(4) CAG456 [*lac* (am) *trp* (am) *pho* (am) *sup*<sup>+</sup> *rpsL*mol (am) *htpR*165]

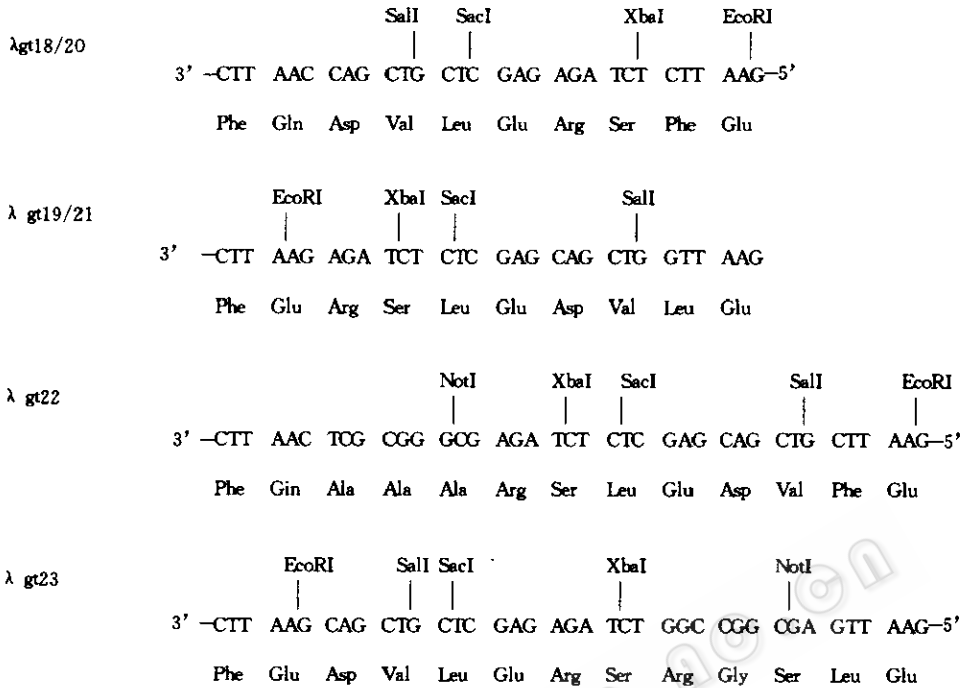
## 2 $\lambda$ gt11 衍生载体

由于  $\lambda$ gt11 只具有单一的 EcoRI 位点, Han 和 Rutter 等人在此基础上构建了一系列衍生载体 (图 2 和表 1)。

2.1  $\lambda$ gt18/19: 将  $\lambda$ gt11DNA 用 SalI 处理后,与一具有相同读框的带有 SalI 粘性末端但不能产生 SalI 位点的寡聚核苷酸 5'-TCGAGGCC-3' 3'-CCGGAGCT-5' 相连,然后在  $\lambda$ gt11 EcoRI 位点引入多聚接头<sup>[5]</sup>。

这一多聚接头含有 SacI, SalI, XbaI 和 EcoRI 的单一位点,但外源 DNA 只能克隆进入 EcoRI 和 SalI 位点内。 $\lambda$ gt19 中的多聚接头与  $\lambda$ gt18 中的方向相反。

由于上述改变, $\lambda$ gt18/19 成为 gam red 双突变体,产生很小的噬菌斑。经过连续 5 代繁殖后,能形成大噬菌斑,成为 Spi 突变并可能通过突变产生 Chi 位点,因此能在 P2 溶源菌和 recA<sup>+</sup> 细胞中生长。

图2  $\lambda$ gt18-23 lacZ基因内多聚接头的酶切位点

2.2  $\lambda$ gt20/21: 这些噬菌体载体含有4个克隆位点 EcoRI, SacI, SaII 和 XbaI<sup>[2]</sup>。为了构建这些载体首先将  $\lambda$ gt11 DNA 用 SaII 处理, 产生的 DNA 具有两个 SacI 位点: 一个位于 lacZ 编码区, 另一个位于  $\lambda$  右臂。用 SacI 部分消化后, 与一具有相同读框带有 SacI 粘性末端但不能产生 SacI 位点的寡聚核苷酸 5'-GGGCCAGCT-3' 3'-TCGACCCGG-5' 相连。重复这一过程一次, 筛选在 X-gal 平板上产生蓝色噬菌斑但对 SacI 有抗性的噬菌体。位于  $\lambda$  右臂的 XbaI 位点也通过相同的方法去除但使用不同的寡聚核苷酸:

5'-CTAGCAGCTGGTGGGA-3' 3'-GTCGAC-CACCTGATC-5'。

这一序列含有一个 Chi 位点。这些操作导致  $\lambda$ gt11 DNA 的 lacZ 右侧缺失 500bp。因此能够插入较大的 DNA 片段 (8.2kb)。改变的  $\lambda$ gt11 DNA 再用 EcoRI 切割, 然后与多聚接头连接, 使之具有上述4个克隆位点。 $\lambda$ gt11 中的多聚接头与  $\lambda$ gt20 中的方向相反。

2.3  $\lambda$ gt22/23: 这些载体具有5个克隆位点: NotI, XbaI, SacI, SaII, 和 EcoRI<sup>[6]</sup>。它们来自于  $\lambda$ gt20 DNA, 只是多聚接头不同。

上述载体都具有相同的基因型, 区别在于克隆位点不同。由于在 lacZ 编码区具有相对较长的多聚接头, 因此比  $\lambda$ gt11 需要较多的 (10倍以上) IPTG 和 X-gal 用于显色。虽然噬菌体的生长由于 Chi 序列的引入被大大改进, 但这些噬菌体在 Y1088 等平板上产生的噬菌斑只有  $\lambda$ gt11 的 1/2 大小。这并不影响用核酸探针或者抗体探针进行筛选。由于噬菌斑较小在 15cm 的平板上其密度可达到  $5 \times 10^5$  p. f. u.。这种生长延迟的主要缺点是噬菌体培养物的 DNA 产量低, 1 升 Y1088 裂解物约产生 1mg DNA。在表达 gam 基因宿主中可以改善它们的生长特性。

由于 SacI 和 NotI 两种内切酶在真核生物 DNA 中的切割频率小, 这些  $\lambda$ gt11 的衍生物特别适合于克隆全长的基因或 cDNA。另外由于它们具有两个以上的克隆位点能定向克隆

DNA。

### 3 用 $\lambda$ gt11 及其衍生载体构建 DNA 文库

上述载体特别是  $\lambda$ gt11 已广泛用于构建表达型 DNA 文库<sup>[7-18]</sup>。利用这些载体构建文库首先应该保证外源 DNA 在 *E. coli* 中正确表达。除用于原核生物基因组文库的构建外主要用于构建真核生物的 cDNA 文库。用  $\lambda$ gt11 构建 DNA 文库的一般过程借助于 EcoRI 接头(图 3)<sup>[3]</sup>。在接头与外源 DNA 连接之前需进行甲基化反应。连接反应需去除多余的接头。这是一个非常复杂的过程。通常使用

Sepharose CL-4B, Bio-Gel A-50 柱层析。利用精胺也能定量去除小的 DNA 片段<sup>[19]</sup>。

为了避免上述复杂的过程可以利用适配器(adaptor)使外源 DNA 与  $\lambda$ gt11 连接(图 4)<sup>[20]</sup>。适配器是一端为钝端另一端为粘性末端的双链 DNA 片段如 5' -pGCGG-OH-3' 3' HOCGCCTTAA-5'。这样将阻止适配器之间的自我连接。其钝端与 cDNA 连接后利用柱层析或 PEG 沉淀可以去除较小的适配器。然后将 cDNA-adaptor 连接物的粘性末端磷酸化即可与脱磷酸化的载体 DNA 连接。

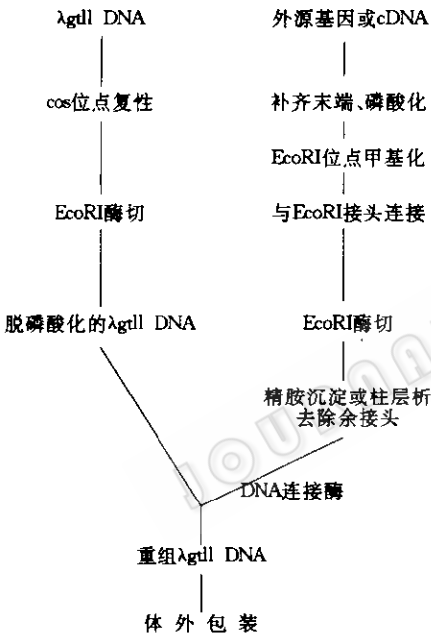


图 3 用  $\lambda$ gt11 构建 DNA 文库的一般过程

外源 DNA 与  $\lambda$ gt11 DNA 的连接还可以利用转换接头(conversion adaptor)(图 5)<sup>[21]</sup>,这是两端都为粘性末端的双链 DNA 片段,用转换接头构建  $\lambda$ gt11 DNA 文库的过程是:将一端带有 EcoRI 位点,另一端带有其它内切酶位点如 XbaI 的转换接头 HO-GATC---

---TTAA-OH

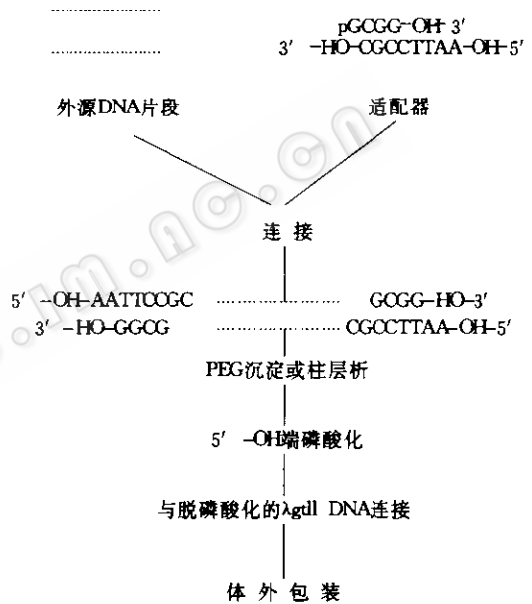


图 4 用适配器构建  $\lambda$ gt11 DNA 文库

与 XbaI 切割的外源 DNA 片段连接,外源 DNA 具有磷酸化粘性末端而转换接头的两端都未磷化从而保证了转换接头只与外源 DNA 连接。用 PEG 很容易将多余的转换接头去除。磷酸化后与  $\lambda$ gt11 DNA 连接即可构建 cDNA 文库。

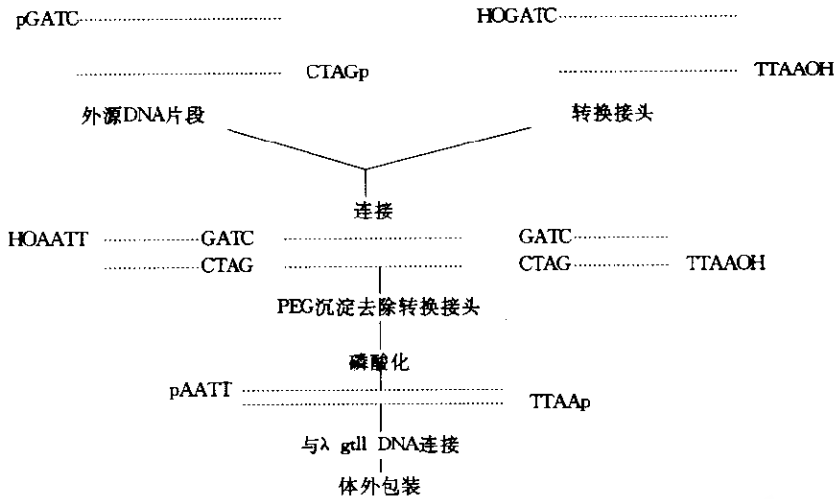


图5 利用转换接头构建λgt11 DNA文库

上述各种文库的构建过程中,外源DNA插入到λgt11 EcoRI位点能以两种不同的方向进行。如果使外源DNA以特定的方向插入就可以使其表达的可能性提高一倍,减少所需要的重组子数。这就要求载体DNA上具有两种或更多的克隆位点。λgt18-23系列载体即具有这一重要特性。利用λgt22定向克隆cDNA的主要过程如下页图6所示<sup>[2]</sup>。

引物接头(primer adaptor)是在NotI识别序列一端连接寡聚dT引物。既具有适配器结构又起到引物的作用。

从上述的λgt22 cDNA文库分离的重组λgt22 DNA是在体外合成有义和反义RNA的有效底物。如果克隆的cDNA两端连接T7或SP6启动子,那么在体外分别利用T7或SP6RNA聚合酶,就可以大量合成有义和反义mRNA。如果这些扩增的互补RNA来源于两个cDNA文库,一个是从不表达目的蛋白的组织构建的,另一个是从表达目的蛋白组织构建的,这些RNA就可以用于构建一个相减文库(subtractive library)或用于制备探针。

#### 4 λgt11, λgt18-23重组DNA文库的筛选和鉴定

利用抗体探针筛选λgt11, λgt18-23重

组DNA文库的主要步骤如下页图7所示。将文库在Y1088中扩增后,在Y1090噬菌斑平板上覆盖IPTG饱和的硝酸纤维素膜使重组克隆表达。揭去膜后,加入抗血清杂交。再用酶标记或同位素标记的二抗杂交,挑出阳性克隆。

成功免疫筛选的两个重要因素就是重组DNA文库和抗体探针。构建基因组文库还是cDNA文库取决于重组DNA文库中某一特殊编码序列出现的频率。除原核生物和低等真核生物外某一蛋白质编码序列在cDNA文库中的频率要高于基因组文库。另外接近全长的cDNA能提供大部分抗原决定簇,更适合进行免疫筛选。

然而λgt11等cDNA文库中经常只含有外源某一基因的3'一部分序列(因为以融合蛋白形式表达)。获得该序列后还必须以此作为核酸探针进一步分离全长的cDNA序列。利用基因组文库就能避免这一繁琐过程。对于那些基因组大小与果蝇相当( $1.8 \times 10^8$ bp)的生物都可以用λgt11等载体构建基因组文库进行免疫筛选。

在基因组文库中,某一特殊基因与lacZ

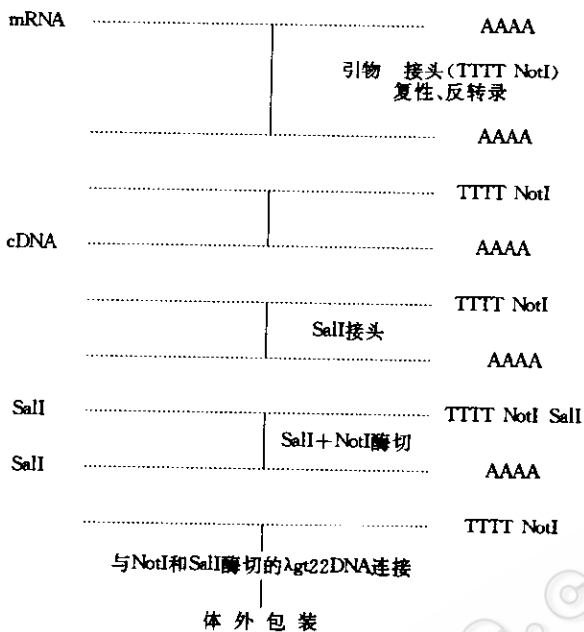


图6 λgt22中的定向克隆

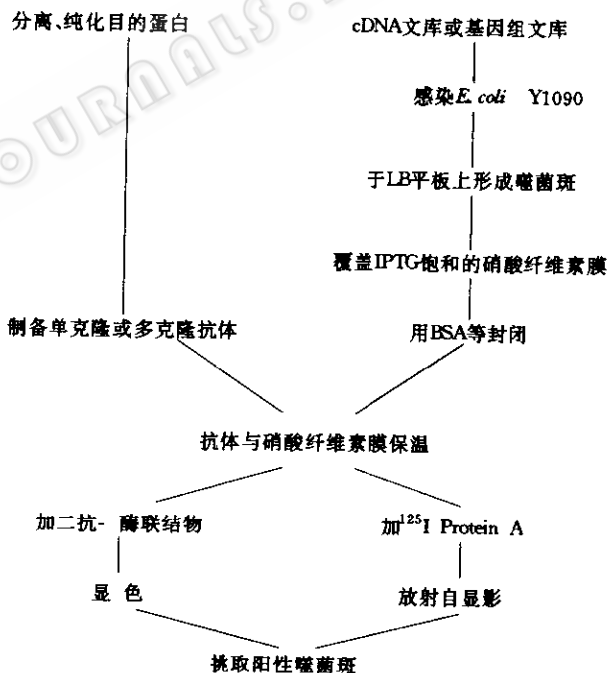


图7 利用抗体探针筛选λgt11, λgt 18—23重组DNA文库的主要步骤

融合的可能性取决于基因的长度和基因组的大小。例如一个 1.5kb 的酵母基因(酵母基因组大小为 14000kb)的任一部分与 lacZ 融合的频率为 1/9333,而且融合产物的 1/6 才具有正确的定向和读框。因此在  $5.6 \times 10^4$  的重组子中只有一个能发生正确的融合。靠近 N-端蛋白质编码序列的融合将比 C-端融合编码更多的抗原决定簇。另外检测基因组文库中某一基因的频率还受到内含子的影响。

$\lambda$ gt11 等文库的一个有趣特征是并不是所有分离的重组子都编码  $\beta$ -半乳糖苷酶融合蛋白,特别是在基因组文库<sup>[22]</sup>。对于酵母菌利用免疫筛选从基因组文库分离的基因中约 50% 都不是融合性表达。在某些情况下这些基因的表达是依赖于 lacZ 的而且可能是利用 lacZ 启动子。另一些情况下某些基因的表达独立于 lacZ,外源插入序列在 *E. coli* 中能进行转录和翻译。表达方式也影响从基因组文库分离某一基因的频率。

如上所述,表达型文库如果外源 DNA 是以两种相反的方向随机插入载体的,那么只有 1/2 的克隆具有正确的阅读方向。而且其中只有 1/3 具有正确的读框。这样用抗体探针筛选以融合蛋白形式进行正确表达的 DNA 克隆的机率比用核酸探针筛选低 5—10 倍。

成功的筛选还依赖于抗体的性质。在 Western 杂交中产生较强信号的抗体也适于免疫筛选。单克隆抗体和多克隆抗体都可以使用。多克隆抗体的优点是能识别多种抗原决定簇,因此提高了筛选的频率。但是某一抗原决定簇也可以为多种蛋白质拥有,这将导致假阳性克隆的分离。在进行免疫筛选时一般使用多克隆抗体或几种识别不同抗原决定簇的单克隆抗体。

抗体的质量是筛选  $\lambda$ gt11 等文库的关键因素之一。某一抗体制备物是否适合筛选依赖于抗体的效价和结合专一性。显然高效价和高亲和性的抗体是必需的。外源基因在 *E. coli* 中表达后可能会由于缺少真核生物中的翻译后修饰作用使抗原抗体识别受到影响。另外在抗

原固定在杂交膜上的过程中,抗原的构象可能发生改变。为此可以先利用 Western 杂交进行分析。大多数抗血清的粗提物含有能与 *E. coli* 细胞蛋白结合的 IgG 组分,特别是用福氏佐剂抗体时,因此还需要进行抗体纯化。一个方便有效的方法是假筛选(pseudoscreening),即将非重组的噬菌体平板上的 *E. coli* 和噬菌体蛋白转移到杂交膜上反复吸附抗血清 3—5 次。另外在抗体时应使用其它佐剂<sup>[23]</sup>。

免疫筛选分离基因最困难的工作就是确定所筛选的克隆是否真正含有所需基因。常用的方法如下:

(1) 利用阳性克隆亲和纯化抗体<sup>[22]</sup>。从阳性克隆产生的蛋白质可用于亲和纯化抗血清。然后再用亲和纯化的抗体与纯化的蛋白质(目的蛋白)或蛋白质粗提物杂交。这将决定分离的克隆是否含有与目的蛋白同源的抗原决定簇。当原来的抗血清不是纯化蛋白质制备时这一方法特别有用。(2) 基因表达。分离到的完整基因可以在 *E. coli* 或其它生物中进行过量表达,以检测基因的活性<sup>[24—25]</sup>。(3) DNA 序列分析。在  $\lambda$ gt11 等载体上能直接进行序列分析。与蛋白质的序列或部分序列对照后即可确定基因的本质。

## 5 重组蛋白质制备

$\lambda$ gt11 和  $\lambda$ gt18—23 重组蛋白可以从 *E. coli* Y1089 或 CAG456 细胞中制备。Y1089 具有的相关特征是: lacI 质粒、 $\Delta$ lon 突变和高频溶源化(hlf)突变。hfl 突变使  $\lambda$  能以很高的频率(10—70%)整合到染色体上。另外 Y1089 菌株不带有抑制基因,使得重组蛋白能积累到很高的水平而不发生细胞裂解。CAG456 也不会被  $\lambda$ gt11 裂解。它含有 htpR 突变。htpR 编码热激  $\sigma$  因子,htpR 突变使得细胞表现出温度敏感生长并抑制热激蛋白(其中许多为蛋白酶)的合成,在 37 和 30°C 下都表现出蛋白酶缺陷型<sup>[26]</sup>。对两种酶母  $\lambda$ gt11 重组子进行比较发现,在 CAG456 细胞中两种重组蛋白的产量都比 Y1089 中的高 10—100 倍。但是不同的融合蛋白的稳定性由于 *E. coli* 菌株的不同而

变化很大。

制备融合蛋白时,防止它的降解是至关重要的。这要求:(1)迅速收集细胞;(2)使用蛋白酶抑制剂如PMSF等;(3)选择合适的细胞破碎方法。

### 6 λgt11 及其衍生物的其它应用

6.1 配基作图 (epitope mapping): λgt11 已被用于定位某一蛋白质抗原决定簇的界限<sup>[27]</sup>。基本步骤是:(1)分离该抗原的完整基因,并测定其DNA序列和蛋白质序列;(2)构建含有这一基因的多个片段的λgt11次级文库(sublibrary);(3)利用单克隆抗体检测配基编码序列的表达;(4)分离和精确测定克隆DNA片段的序列。比较各种阳性克隆的共同序列就可以定位配基编码区。

6.2 转换子诱变 (transposon mutagenesis): 抗原决定簇作图的另一个方法是利用转座子诱变<sup>[22]</sup>。首先构建微型 Tn10 转座子,它含有 70bp 的 Tn10 末端序列, *E. coli* 选择性标记 tetR、kanR 和 supF, 以及酵母选择性标记 URA43, TRP1。它位于高拷贝 pBR322 型质粒上,其宿主细胞 BNN114 过量产生 Tn10 转座酶。将 λgt11 在 BNN114 中繁殖后通过选择转座事件,可以很容易构建转 2 子插入文库(library of transposon insertion)。然后用多克隆或单克隆抗体探针检查转座子插入对抗原表达水平的影响。Tn10 转座子插入到编码片段中间时,将阻断下游抗原的表达,利用转座子插入位置与其对免疫筛选信号影响的相关性,可定位抗原编码区。无论重组克隆是否合成β-半乳糖苷酶融合蛋白,这一方法都能用于定位抗原编码片段。

这一微型转座子能对酵母克隆进行迅速诱变,定位编码区。通过一步基因转位,突变的基因可被用于替换基因组拷贝。由于它们既可用于 *E. coli* 中的转座子诱变也可用于酵母基因组序列的转换,这些转座子被称为转换子(transposon)。

6.3 DNA 结合蛋白的分离:以已知的 DNA 片段作探针与 λgt11 表达型文库杂交可以分离

到 DNA 结合蛋白的基因<sup>[28]</sup>,并可用于制备 DNA 结合蛋白。这一方法又被称为 Southern-Western 杂交。

我国具有丰富的生物资源,许多重要遗传性状的基因等待人们去分离鉴定。λgt11 等载体在这方面显然具有重要的应用。

### 参 考 文 献

- [1] Yang R A, Davis R W: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983. **80**: 1194-1198.
- [2] Han J H, Rutter W J. in Genetic Engineering: principles and methods, Vol. 10, J K Setlow ed. Plenum Publishing, New York, 1988. 195-219.
- [3] Huynh T V, et al. In DNA Cloning, A practical approach, D. Glover ed. Vol. 1, IRL Press, 1985. 49-78.
- [4] Lindquist S, Craig E A. Ann. Rev. Genet., 1988. **22**: 631-677.
- [5] Han J. H., et al. Biochemistry, 1987. **26**: 1617-1625.
- [6] Han J H, Rutter W J. Nucl. Acids Res., 15: 6305, 1987.
- [7] Payne G S, Schekman R. Science, 1985. **230**: 1009-1074.
- [8] Kemp D J, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983. **80**: 3787-3791.
- [9] Masumura T, et al. Mol. Gen. Genet., 1990. **221**: 1-7.
- [10] Mason H S, et al. Plant Mol. Biol., 1988. **11**: 845-856.
- [11] Tepperman J, et al. Plant Mol. Biol., 1987. **11**: 871-872.
- [12] Ollive M R, et al. Plant Mol. Biol., 1989. **12**: 525-538.
- [13] Shotwell M A, et al. Plant Physiol., 1988. **87**: 698-704.
- [14] Landu N R, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984. **81**: 5836-5840.
- [15] Young R A, et al. proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985. **82**: 2583-2587.
- [16] Young R A, et al. Science, 1983. **222**: 778-782.
- [17] Fonzo N D, et al. Mol. Gen. Genet., 1988. **212**: 481-487.
- [18] 卢孟柱,等:高技术新技术农业应用研究,中国科学技术出版社,1990,222-225.
- [19] Hoopes B C, McClure W R. Nucl. Acids Res., 1981. **9**: 5493-5504.
- [20] Ray W, et al. in Meth. Enzym., Vol. 152, Berger



- S L and Kimmel A R, Acad. Press, Inc. 1987. 343—349.
- [21] Stover C K, *et al.* Anal. Biol., 1987. **163**: 398—407.
- [22] Snyder M, *et al.* in Meth. Enzym., Vol. 154, Ray Wu and Grossman L, Acad. Press, Inc., 1987. 107—129.
- [23] Maniatis T, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Lab., Cold Spring Harbour, New York, 1989.
- [24] Goto T, Wang J C. Cell, 1984. **36**: 1073—1080.
- [25] Johnson L M, *et al.* Cell, 1985. **43**: 369—377.
- [26] Baker T A, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984. **81**: 6779—6783.
- [27] Mustafa A S, *et al.* Nature, 1986. **319**: 63—66.
- [28] Tabata T, *et al.* Science, 1989. **245**: 965—967.