

《生物工程讲座》(III)

——基因工程的理论及应用

(二) 重组 DNA 技术和基因工程

郭礼和

(中国科学院上海细胞生物研究所)

DNA 双螺旋模型的提出意味着分子生物学的诞生,重组 DNA 技术的建立标志着遗传工程和生物工程的问世。可以说重组 DNA 技术对整个生物学研究的影响比起 DNA 双螺旋来说有过之而无不及。目前世界上从事生物学或医学研究的大多数实验室都在使用这项技术解决不同的生物学问题。许多人衡量一个生物学实验室是否先进总喜欢把是否运用重组 DNA 技术和基因工程作为一个重要标志。

一、重组 DNA 技术和基因工程概况

重组 DNA 技术和基因工程涉及的内容很广,不仅包括外源 DNA 和载体的重组,还应包括各种酶的分离、纯化、性质及其在重组技术中的应用;外源 DNA (包括基因)的分离、切割、重组、筛选、鉴定和分析;外源 RNA (包括 mRNA,病毒 RNA 或其它 RNA)转换成互补 DNA (cDNA);载体的选择,改造和构建;DNA 化学合成技术在重组 DNA 技术中的应用(包括基因的人工合成,基因的突变和改造,载体的构建,限制性内切酶人工接头,杂交用的探针,DNA 修补和结构分析所用的引物等等);核酸杂交技术;DNA 序列分析技术,受体菌或宿主细胞的筛选和改造,外源基因在宿主细胞内的表达,……等等。从广义上来讲基因工程研究的基本手段就是重组 DNA 技术。

由于篇幅限制,本文仅就重组 DNA 和基因工程一些基本技术给予描述。若要详细了解可参阅已经出版的书籍^[52,8,71,96,97]和发表的文章^[78,79,94]。

二、重组 DNA 和基因工程的基本技术

重组 DNA 基本技术和基因工程应包括下面五个步骤^[94]:

(一) DNA 的分离和专一性断裂

从病毒或噬菌体来的 DNA 分子一般大小为 10^3 — 10^5 碱基对(每个碱基对约 660 道尔顿),从细胞染色体上来的一般有 10^6 — 10^9 碱基对。这些 DNA 大分子的分离和纯化方法已有很多报道^[52,26,93]。若要将它们完整无缺地接到载体上去,然后转移到宿主菌内进行克隆,一般来说是不可能的。如果载体使用的是质粒,一般只能克隆 1.5×10^4 bp (碱基对)以下的 DNA 片段;如果载体使用的是 λ 噬菌体,一般克隆 1.5 — 2×10^4 bp 的 DNA 片段;如果是粘性质粒(cosmid)一般克隆 5×10^4 bp 以下的片段。

为了使大分子 DNA 能够克隆,将它们断裂成许多小片段就成为必不可少的前提了。用机械切割(例如超声波或应切力)可以达到 DNA 分子断裂的目的,但是这种断裂是随机的。现在一般用限制性内切酶^[46,68]切割 DNA 分子。识别 4 个碱基顺序的酶平均将 DNA 切割成 250 个碱基对大小的片段,识别 6 个碱基顺序的酶平均将 DNA 切割成 4000 个碱基对大小的片段,识别 8 个碱基顺序的酶平均将 DNA 切割成 64000 个碱基对大小的片段。上面所述的只是一个平均值,有时同一个酶对不同 DNA 分子切割的片段大小可能相差很大,在实验时要注意这一点。有些酶对识别位点的某个碱基甲基化很敏感,造成这些位点不能被

切开。利用这个性质可以使一些酶对 DNA 分子切割的片段变长。目前市场上可以买到一些专一性很强的甲基化酶用来修饰 DNA。使酶切片段变长的另一种方法就是控制酶和 DNA 分子的浓度比例和反应条件(温度和时间等)来达到,称此为部分酶解。

限制性内切酶降解 DNA 片段因酶不同可以产生二种不同的末端:一种为平头(3'和5'端的两条互补链一样长),另一种为粘性末端(3'和5'端的两条互补链不一样长,有的酶切出是5'端突出,有的酶切出是3'端突出)。这些不同的末端可以通过化学合成的寡核苷酸接头进行变换^[1-3],也可以用胸腺末端转移酶在脱氧核苷三磷酸存在下加上寡核苷酸尾巴^[4,42]。变换酶切 DNA 片段的末端一般是为了方便 DNA 片段(包括载体)之间的体外重组。目前已经发现大约有 494 种限制性内切酶,至少存在 108 种不同的专一性^[60]。但是一般常用的载体单一切点不会超过 20 个,要将所有酶切 DNA 片段都能直接克隆,这是不可能的。只有对 DNA 片段的末端进行上述的变换或者利用不同酶产生相同粘性末端这一特性进行克隆^[29],例如载体上的 BamHI 位点除能克隆 BamHI 酶切 DNA 片段之外,还可克隆 Bgl II, Bcl I, Sau 3A 和 Xho II 的酶切片段;或者利用 S₁ 酶或聚合酶把片段的末端修平,才能达到各种酶切 DNA 片段都能克隆的目的。

(二) 将 DNA 片段连接到载体上去

通过(一)得到的 DNA 片段或者通过 RNA 合成的 cDNA 片段^[52,9,47,38,54],或者通过化学合成的 DNA 片段^[41],只有联接到载体(质粒,噬菌体或病毒)上才能转化宿主细胞进行克隆。这种联接需要 DNA 连接酶^[48,72]。联接产物很复杂,有片段或载体自身联接的产物(二聚体,三聚体等),也有片段和载体以各种方式联接。要想得到一种方式联接的产物,只有通过下面一步才能实现。

(三) 转化和筛选

第二步的联接产物虽然很复杂,但通过转化宿主菌^[11]和克隆筛选却能使不同联接产物得

到分离和纯化。虽然载体能与不同外源 DNA 片段联接或自身联接,但一般来说一个克隆只含有一种联接产物,其它的联接产物可以进入同一细胞,但都不能生存,因为载体不相容性造成的^[62]。所以从单个克隆株得到的转化子只可能是一种重组体。由于外源 DNA 片段没有宿主细胞的复制子,故外源片段自身联接的产物在宿主细胞内不能生存。相同载体自身联接的产物存在多个复制子,在宿主细胞内也不能生存。会有重复顺序(包括同一片段自身联接)重组体的转化子也是很难得到,尤其是含有反向重复顺序重组体的转化子,因为它们能在宿主菌内容易发生重组而被删去。有些外源 DNA 片段在宿主菌内表达成某一异性蛋白,如这种蛋白对细胞有毒性,这个重组体的转化子也不容易得到。有时需要将外源 DNA 片段切短才能克隆^[49]。

筛选转化子有许多方法,常用的有:1. 观察宿主菌的表型变化(例如片段的插入造成某个抗菌素的抗性消失或某个酶活性消失,有时也可引起宿主菌对某个抗菌素抗性或酶活性的表型出现)来筛选。2. 用同位素标记的核酸作探针进行菌落或噬斑杂交^[24,7]来筛选。3. 抽提转化子 DNA,用限制性内切酶酶解,进行凝胶电泳分离,根据酶解性质和片段大小来筛选。4. 利用被克隆的外源基因在遗传上互补宿主菌的缺陷^[79](例如营养缺陷型互补)来筛选。5. 用免疫方法探测外源基因在宿主菌内表达产物^[7,16,36,99]来筛选。6. 利用克隆的 DNA 库通过 DNA-RNA 杂交技术纯化特殊的 mRNA,然后在体外无细胞体系内将 mRNA 翻译成蛋白^[83],或注射到卵母细胞内翻译,翻译产物用免疫方法来鉴定。7. 在无细胞翻译体系中加入克隆的 DNA 库,通过 DNA-RNA 分子杂交使总 mRNA 中某一特定 mRNA 体外翻译受阻^[63]。

DNA 分子克隆一般都是先用大肠杆菌作宿主系统进行放大。但酵母^[37]和枯草杆菌^[50,27]也可用来作转化研究。

(四) 用物理图谱和 DNA 序列分析验证克隆的基因

使用几种限制性内切酶对克隆的 DNA 片段进行酶解分析,确定这些酶切位点在 DNA 分子上的分布,这就是物理图谱分析。目前测定物理图谱方法很多,但最常用的方法是 DNA 分子一端先用 ^{32}P 标记,然后用限制性内切酶进行部分酶解,通过电泳将不同长度的部分酶解片段按分子量大小分开。由于用放射自显影方法来观察片段长度,只有用 ^{32}P 标记了末端的片段才能从 X 光底片上观察到。被标记的一端是恒定的,片段长短变化由酶切位点离开标记一端的距离来决定。根据凝胶板上平行电泳的已知分子量片段所走的位置,可以计算出各种部分酶解片段的长度,从而定出某一个限制性内切酶的限制性图谱(物理图谱)^[80]。由于近年来 DNA 序列分析方法的发展^[97],一般 5Kb 长度以下的片段不需要进行物理图谱分析,可以直接进行 DNA 序列分析^[29,95,30]。DNA 的核苷酸排列顺序测定清楚之后,利用电子计算机可以把所有的限制性内切酶位点分布全部搞清楚。

一般来说物理图谱分析只能提供一个粗框框,因为有许多假基因(Pseudogene)和真基因在物理图谱上很相似。只有核苷酸排列顺序测定清楚之后,才能辨别真伪。DNA 分子一级结构的测定不仅对鉴定基因必不可少,而且也为了了解基因组合(gene organization)和分子水平的调控提供有价值的信息。DNA 序列决定蛋白质氨基酸序列,由于 DNA 序列测定速度大于蛋白质序列,目前已知的蛋白质序列主要是来自 DNA 序列的测定^[19]。

(五) 克隆基因的表达

已鉴定过的克隆基因一般有两种情况: 1. 基因不存在内含子(intron), DNA 上的氨基酸密码子是连续的,不被插入片段中断,这种基因经过体外改造可以在细菌或酵母内进行表达。2. 基因存在内含子,基因编码是间隔式的,这种基因只能在哺乳类细胞或其它高等真核细胞内表达,细菌不能对转录初级产物进行加工,去掉插入片段。酵母有些基因也有内含子,但酵母不能识别高等真核细胞的内含子,故而也

不能准确去掉插入片段。这种基因若想在细菌或酵母内表达,只能用它在基因的 cDNA 来实现。

关于外源基因引入酵母和高等动植物细胞、昆虫细胞^[46]以及用牛痘病毒作载体^[64,82]制备乙型肝炎、流感病毒疫苗和疱疹病毒疫苗都有详细报道和叙述。本文仅就外源基因在大肠杆菌内表达作一些概述。

外源基因在大肠杆菌内表达效率的高低主要取决于以下几个因素:

1. 基因在细胞内的拷贝数 主要由重组载体本身的拷贝数多少和稳定性来决定。载体在宿主菌内的拷贝数由多方面因素决定(包括宿主细胞本身)。一般来说载体的拷贝数可以通过载体复制子本身的突变^[4]或改变调控方式来实现^[29,84,90]。有些松弛型的质粒可以通过在培养基内加入蛋白合成抑制剂(如氯霉素)来扩增拷贝数,但这不能用于基因表达的研究,只能用于质粒的制备。拷贝数的增加也要有一定限制,不然宿主菌受不了,细胞不能生长。

2. 启动子(promoter) 这是染色体 DNA 上 RNA 聚合酶辨认和结合区域,一般位于结构基因的上游。不同生物体因 RNA 聚合酶不同,对启动子区域的核苷酸排列顺序要求不一样。一般来说真核生物的启动子不能被原核生物的 RNA 聚合酶所辨认和结合,虽然有些真核基因能在原核细胞内得到表达^[57,86]。从高等真核细胞来的基因(包括 cDNA)要想在原核细胞内(如大肠杆菌)或低等真核细胞内(如酵母)达到高效表达,必须事先将启动子变换(一般换成宿主细胞自身的启动子)。目前大肠杆菌将近 200 种启动子的 DNA 顺序已经搞清楚^[59],但常用于外源基因表达的主要有大肠杆菌的 lac 启动子^[66],大肠杆菌的 tap 启动子^[53,61],沙门氏菌的 trp 启动子^[64,56], λ 噬菌体 P_L 启动子^[73]和人工构建的 tac 启动子^[69]。这些启动子都存在 RNA 聚合酶的辨认区(有时称-35 区或 TTGACA 区)和结合区(有时称 Pribnow box 或-10 区或 TATAAT 区)。虽然启动子的 DNA 序列变化很大,但在这两个区域一般

比较保守。人工构建的 *tac* 启动子就是利用 *trp* 启动子的一35区和 *lac* 启动子的一10区构建而成^[3]。

重组基因在宿主细胞内的拷贝数多少和使用启动子的强弱均可决定基因的高低转录水平,但不代表基因在细胞内的表达效率。因为表达效率的高低还取决于翻译水平和蛋白质产物在细胞内的稳定性。*mRNA* 和核糖体结合位点(SD序列),起始密码 AUG 附近的核苷酸结构和顺序以及 *mRNA* 中的简并密码子选用频率等因素决定翻译水平高低,翻译产物——蛋白质对宿主细胞的影响和在细胞内存在的方式以及宿主细胞对异源蛋白的水解能力差异,这些因素是决定表达产物在宿主细胞内的稳定性,从而影响表达产率。下面仅就这些因素作一些简要说明。

3. *mRNA* 与核糖体结合的位点(也称 SD 序列)和起始密码子 AUG 周围的核苷酸组成和顺序对翻译水平的影响。在 *mRNA* 5' 端区域于起始密码与 AUG 前面约 9 个核苷酸处存在一段序列(约 4—10 个核苷酸),它同 *mRNA* 与核糖体小亚基上的 16s RNA 3' 端区域结合有关^[75],这个现象是由夏因(Shine)和达尔加诺(Dalgarno)俩人首先发现的,故而有时称这段为 SD 序列。由于 *mRNA* 首先以这段序列与核糖体结合,所以离这段序列约 9 个核苷酸距离的起始密码子 AUG 能与占据核糖体大亚基 A 位(氨基酸接受位点)的 N-甲酰甲硫氨酰 tRNA 相结合,形成蛋白质合成起始复合物。这种起始复合物形成速度是决定翻译效率的因素之一^[89]。起始密码子与 SD 序列之间的距离不能太长也不能太短^[19]。在 SD 序列和 AUG 附近的核苷酸组成和排列顺序对翻译效率影响也很大^[19,40,39,12,51,34,44],有时可以相差两个数量级。

4. 关于基因内的简并密码子选用频率对翻译效率的影响目前积累的资料较少,有待进一步研究。有人分析了不同基因的密码子选用频率与细胞内同功异种 tRNA 浓度之间的关系^[43,6],也有人研究密码子-反密码子相互作用的能量关系^[25,17]。同一氨基酸的密码子可能有

2—6 种,但在某一特定细胞内存在的同功异种 tRNA 在浓度上差别很大,故对同一氨基酸密码子的选择可能存在很大差异,这就可能造成外源基因在不同宿主细胞内表达效率有所差异。从目前统计资料来看,简并密码子选用频率与基因本身有关,而与基因大小无关^[92]。一般来说动物的三字密码子大多以 C 或 G 结尾;动物病毒大多数以 U 或 A 结尾;单链 DNA 噬菌体大多以 U 结尾,单链 RNA 噬菌体大多以 C 结尾;双链 DNA 噬菌体和细菌的基因比较复杂,不同基因对密码子的偏爱不同。从统计学来看 4 种核苷酸结尾的几率差不多。到目前还未发现外源基因因密码子的选择差别造成不能在大肠杆菌内表达的例子,但对表达效率的影响没有明确实验结果。如果化学合成的基因想在大肠杆菌内表达,一般都是选用噬菌体的简并密码子^[41]。

5. 翻译产物——蛋白质在细胞内的稳定性,大肠杆菌内的正常蛋白绝大多数是稳定的^[20,58]。但是一些反常蛋白(例如嘌呤霉素多肽片段等)是非常不稳定的^[20,21,49]。真核基因在原核细胞内的表达产物一般都不稳定,尤其分子量较小的蛋白(例如促生长激素释放抑制因子^[41]、胰岛素^[21]和胰岛素原^[89]等)。大肠杆菌内存在一个专门降解反常和异源蛋白的水解系统^[66,67]。这个系统中有个称为 *E. coli* Lon 的蛋白水解酶,它与 DNA 结合,水解活力不依赖于 ATP,显然与反常和异源蛋白的降解有关,尽管这种作用机制还不清楚。不同菌种对反常或异源蛋白的水解能力有很大差别,同一基因在不同菌种内表达效率可达到数量级的差别,所以,适当选择受体菌是一件很重要的工作。有些基因在宿主细胞内产生的蛋白对细胞有毒害,造成这些基因很难克隆^[8,15,45],有些基因抑制细菌生长^[69],有些克隆基因高效表达会损害细胞^[48]。

为了克服上述问题,通常采用以下手段:

(1) 使用可调节的启动子,使克隆的基因在细菌开始生长时暂不表达,待细胞长到足够数量时加诱导剂,使启动子启动,进行转录。目

前常用的启动子 lac, trp 和 P_L 都是可以诱导调节的。也可以通过载体拷贝数的控制(从而控制外源基因拷贝数)来调节基因表达的水平。开始生长的细胞所含的载体拷贝数很低,当长到足够数量时细胞内载体的拷贝数就大量扩增,外源基因拷贝数同时增加。由于提高拷贝数,外源基因转录产物相应增加,表达效率也会提高。目前最常用的载体称为复制失控的质粒(runaway-replication plasmid)^[91,97]。细菌在 30°C 生长时这些质粒只有 15—20 拷贝,生长温度高于 35°C 以后,质粒复制失去控制,拷贝数可达到 100 以上。

(2) 引进某些基因到宿主菌内可以稳定异源蛋白而不被降解。T₄ 噬菌体有一个 pin(proteolysis inhibition, 即蛋白水解抑制作用)基因可以抑制大肠杆菌对外源蛋白的水解活性^[76]。如果将 pin 基因和人的 β-干扰素基因同时克隆在一个宿主菌内,β-干扰素表达水平会比对照高 4—8 倍^[77]。

(3) 蛋白如果能分泌到细胞外面,可以避免水解,因而表达产物的产率会大大增加。一般分泌蛋白在 N 端都有一段疏水性多肽(常为 20—30 个氨基酸残基的肽),在分泌过程中会被细胞除去,这段肽统称为信号肽。胰岛素原无论带有细菌的信号肽或真核细胞的信号肽都能分泌到大肠杆菌细胞外面^[87],能够分泌的胰岛素比不能分泌的蛋白稳定性要高 10 倍^[88]。有些基因产物能够帮助蛋白质分泌。日本理化研究所的 Horikoshi 在杆菌 170 中发现一个基因,如果插到质粒 pMB9 上,它能使 90% 以上的胰岛素,干扰素或生长激素蛋白产物分泌到培养基内。如果没有同时克隆这个基因,大约 80% 的产物留在细菌内不能分泌出来。

(4) 表达产物如果以融合蛋白形式留在宿主菌内,可以减少降解速度。小分子蛋白产物在细胞内易被降解这一点在前面已经讲过了。若想用大肠杆菌来生产象胰岛素这样一类小分子,除用分泌方法外,只能将这些蛋白(或多肽)基因与宿主细胞的一些基因(不一定是完整的)联接在一起,在细菌内表达为融合蛋白。目前

常用的主要有 lac 系统^[66]和 trp 系统^[61]。lac 系统原编码 1023 个氨基酸的 β-半乳糖苷酶,但在基因 3' 端区域有一个 EcoRI 切点,故许多人利用这个切点将外源基因(如促生长激素释放抑制因子^[41],胰岛素^[22]和前胰岛素原^[96]等)插入此处,形成的融合蛋白,其中 β-半乳糖苷酶部分有 1007 个氨基酸残基。在吴瑞教授指导下我们研究了不同长度的 β-半乳糖苷酶部分对融合蛋白产率的影响^[31],发现融合蛋白的稳定性并不取决于 β-半乳糖苷酶部分的长度,短的有时产率反而高。最近纳兰(Narang)实验室也证明了这一点。

参 考 文 献

- [1] Bahe C. P. et al. 1976 *Gene* 1: 81
- [2] ————— et al. 1978 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 695
- [3] ————— et al. 1984 *Biochemical and Biophysical Studies of Proteins and Nucleic Acids* (Lo, T. B., Liu, T. Y. and Li, C. H. eds.), Elsevier, New York 183
- [4] Bittner M. et al. 1981 *Gene* 15: 319
- [5] Benton W. D. et al. 1977 *Science* 196: 180
- [6] Berger E. M. 1978 *J. Mol. Evol.* 10: 319
- [7] Broome S. et al. 1978 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2746
- [8] Brown W. M. et al. 1976 *Cell* 7: 517
- [9] Casdollar L. W. et al. 1982 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7644
- [10] Charette M. F. et al. 1981 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4728
- [11] Cohen S. N. et al. 1973 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240
- [12] De Boer H. A. et al. 1983 *DNA* 2: 231
- [13] ————— et al. 1983 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21
- [14] Deng G. et al. 1981 *Nucleic Acids Res.* 9: 4173
- [15] Drouin J. 1980 *J. Mol. Biol.* 140: 15
- [16] Erlich H. A. et al. 1978 *Cell* 13: 681
- [17] Fiers W. et al. 1979 *Nature* 277: 328
- [18] Gellert M. 1967 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57: 148
- [19] Gheysen D. et al. 1982 *Gene* 17: 55
- [20] Goldberg A. L. et al. 1976 *Annu. Rev. Biochem.* 45: 747
- [21] Goldschmidt R. 1970 *Nature* 228: 1151
- [22] Goeddel D. V. et al. 1973 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 105
- [23] Gottesman S. et al. 1978 *J. Bacteriol.* 133: 844
- [24] Grunstein M. et al. 1975 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3961
- [25] Grosjean H. et al. 1978 *J. Mol. Evol.* 12:

- [26] Grossman L. et al. 1980 *Methods in Enzymology* **65**: Nucleic Acids. Academic Press, New York
- [27] Gray O. et al. 1981 *J. Bacteriology* **145**: 422
- [28] Gubler U. et al. 1983 *Gene* **25**: 263
- [29] Guo L.-H. et al. 1983 *Methods in Enzymology* **100**: 60
- [30] ——— et al. 1983 *Nucleic Acids Res.* **11**: 5521
- [31] ——— et al. 1984 *Gene* **29**: 251
- [32] ——— et al. 1984 *Biochemical and Biophysical Studies of Proteins and Nucleic Acids* (edited by Lo, T. B., Liu, T. Y. and Li, C. H.), Elsevier, New York, 169
- [33] Hallewell R. A. et al. 1980 *Gene* **9**: 27
- [34] Hall M. N. et al. 1982 *Nature* **295**: 616
- [35] Hawley D. K. et al. 1983 *Nucleic Acids Res.* **11**: 2237
- [36] Helfman D. M. et al. 1983 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 31
- [37] Hinnen A. et al. 1978 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 1929
- [38] Huang P. C. et al. 1982 *Genetic Engineering Techniques: Recent Developments*, Academic Press, New York
- [39] Hui A. et al. 1984 *The EMBO Journal* **3**: 623
- [40] Iserentant D. et al. 1980 *Gene* **9**: 1
- [41] Itkura K. et al. 1977 *Science* **198**: 1056
- [42] Jackson D. A. et al. 1972 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2940
- [43] Kafatos F. C. et al. 1977 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5618
- [44] Kastelein R. A. et al. 1983 *Gene* **23**: 245
- [45] Kearsley S. E. et al. 1980 *Gene* **12**: 249
- [46] Kelley T. J. et al. 1970 *J. Mol. Biol.* **51**: 393
- [47] Land H. et al. 1983 *Methods in Enzymology* **100**: 285
- [48] Little J. W. 1979 *Mol. Gen. Genet.* **162**: 51
- [49] Lin, S. et al. 1972 *J. Biol. Chem.* **247**: 2205
- [50] Lovett P. S. et al. 1979 *Methods in Enzymology* **68**: 342
- [51] Matteucci M. D. et al. 1983 *Nucleic Acids Res.* **11**: 3113
- [52] Maniatis T. et al. 1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory
- [53] Martial, J. A. et al. 1979 *Science* **205**: 602
- [54] McClements W. et al. 1981 *Genetic Engineering* (Edited by Setlow, J. K. and Hollaender, A.), **3**: 89. Plenum Publishing Corporation, New York
- [55] Mizzer D. L. et al. 1977 *Biochemistry* **16**: 1031
- [56] Miojjari G. F. et al. 1978 *Nature* **276**: 684
- [57] Morrow J. F. et al. 1974 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1743
- [58] Mount D. N. 1980 *Annu. Rev. Genet.* **14**: 279
- [59] Morrow J. F. 1979 *Methods in Enzymology* **68**: 3
- [60] Mew England Biolabs 1985—1986 *Catalog* **64**
- [61] Nichols B. P. et al. 1983 *Methods in Enzymology* **101**: 155
- [62] Nivoick R. P. 1980 *Scientific American* **243**: 102
- [63] Paterson B. M. et al. 1977 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4370
- [64] Paoletti E. et al. 1984 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 193
- [65] Pine M. J. 1970 *J. Bacteriol* **103**: 207
- [66] Polisky B. et al. 1976 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 3900
- [67] Remaut E. et al. 1983 *Gene* **22**: 103
- [68] Roberts R. J. 1979 *Methods in Enzymology* **68**: 27
- [69] Rose J. K. et al. 1981 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 66: 70:
- [70] Schell M. A. et al. 1979 *Gene* **5**: 291
- [71] Scott W. A. et al. 1979 *Molecular Cloning of Recombinant DNA Miami Winter Symp.* **13**: Academic Press, New York
- [72] Sgaramella V. et al. 1972 *J. Mol. Biol.* **72**: 493
- [73] Shimatake H. et al. 1981 *Nature* **292**: 128
- [74] Shineberg B. et al. 1973 *J. Bacteriol* **116**: 1469
- [75] Shine J. et al. 1974 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1342
- [76] Simon L. D. et al. 1978 *Nature* **275**: 424
- [77] ——— et al. 1983 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 2059
- [78] Sinsheimer R. L. 1977 *Ann. Rev. Biochem.* **46**: 415
- [79] Skalka A. et al. 1976 *Gene* **1**: 65
- [80] Smith H. O. et al. 1976 *Nucleic Acids Res.* **3**: 2387
- [81] Smith G. E. et al. 1983 *Mol. Cel. Biology* **3**: 2156.
- [82] ——— L. et al. 1984 *Nature* **302**: 490
- [83] Sobel M. E. et al. 1978 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 5846
- [84] Soberon X. et al. 1980 *Gene* **9**: 287
- [85] Stormo G. D. et al. 1982 *Nucleic Acids Res.* **10**: 2971
- [86] Struhl K. et al. 1976 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1471
- [87] Talmadge K. et al. 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 3369
- [88] Talmadge K. et al. 1982 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1830
- [89] Tait R. C. et al. 1976 *ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology* **5**: 507
- [90] Twigg A. J. et al. 1980 *Nature* **283**: 216
- [91] Uhlin B. E. et al. 1979 *Gene* **6**: 91
- [92] Wain-Hobson S. et al. 1981 *Gene* **13**: 355
- [93] Wu R. 1978 *Ann. Rev. Biochem.* **47**: 607
- [94] Wu R. Guo L.-H. et al. 1982 *Genetic Engineering Techniques Recent Developments*, Academic Press, New York **3**
- [95] ——— et al. 1983 *Transaction New York Academy of Sciences* **253**
- [96] Wu R. ed. 1979 *Methods in Enzymology* **68**: Recombinant DNA, Academic Press, New York
- [97] Wu R. et al. 1983 *Methods in Enzymology*. **100**: Recombinant DNA Academic Press, New York.