



Taq Polymerase 제조와 그 응용에 관한 연구

A Study on Taq Polymerase and its Application

1990. 2

한국과학기술연구원
부설 유전공학센터

배 포 선

사 본 번 호	부 수	배 포 처
1/16 ~ 2/16	2	유전공학센터 연구관리과 영구보존용
3 / 16	1	유전공학센터 연구관리과 참고용
4/16 ~ 7/16	4	유전공학센터 연구관리과 보관용
8/16 ~ 10/16	3	유전공학센터 분자생물학연구실
11/16 ~ 16/16	(6)	기 타

T
KRIB
90-
17
c-2

GERI

제 출 문

한 국 과 학 기 술 연 구 원
부 설 유 전 공 학 센 터 소 장 귀 하

본 보고서를 "Taq polymerase 제조와 그 응용에 관한 연구" 과제의
최종보고서로 제출합니다.

1990 년 2 월

연구책임자 : 이대실 (분자생물학실 책임연구원)

연 구 원 ; 권석태 (" 선임연구원)

김상호 (소재개발실 ")

박종훈 (" 연 구 원)

요 약 문

1. 제 목

Taq polymerase 제조와 그 응용에 관한 연구

2. 연구개발의 목적 및 중요성

분자생물학 실험시 중요한 소재인 DNA polymerase 에는 E. coli DNA polymerase (Klenow fragment), reverse transcriptase, T7 DNA polymerase 등이 현재 많이 사용되어지고있다. 그러나, 이 효소들은 3'→5', 5'→3' exonuclease activity 를 갖고있고, heat-stable 하지않아 사용에 많은 제한점이 있다. 그러나 Taq (Thermus aquaticus) polymerase 는 이러한 단점들을 극복할 수있어서 최근에 중요한 실험소재로 등장하였다. 본 연구에서는 Thermophilic bacteria Thermus aquaticus YT-1 에서 이 효소를 분리 정제하고 이 효소를 이용한 기존의 분자생물학 실험연구 방법의 개선과 생화학 기능 연구를 하고저한다.

3. 연구개발의 내용 및 범위

가) 일본에서 균주 분양

일본으로부터 Thermus aquaticus YT-1, I. flavus AT-62,

Thermus thermophilus HB-27, Thermus thermophilus HB-8, Thermus caldophilus GK-24 등 다섯 종류의 균주 들을 분양받았다.

나) 세포배양

Thermus aquaticus YT-1 균주를 사면배지로부터 접종하여 70 °C, 24 시간 진탕배양하여 세포(8 g/l)를 수확하였다. 사용된 배양기는 고온에서 견딜수있는 특수제작한 제품을 사용하였다.

다) Enzyme extract 제조

수확한 세포를 완충용액에 녹여서 ultrasonication, ammonium sulfate precipitation 방법으로 enzyme extract 를 제조하였다.

라) 효소정제 및 여러효소의 활성도 측정

Ion exchange chromatography 와 affinity chromatography, 전기영동 방법으로 효소를 분리정제하였으며 정제된 효소의 Taq DNA polymerase, endonuclease, exonuclease, alkaline phosphatase assay 를 측정하였다.

마) 기존의 DNA polymerase 와의 상호비교

본 실험에서 분리정제한 효소와 CETUS 로부터 구입한 Ampli Taq Recombinant Taq DNA polymerase 를 이용하여 PCR 을 수행하여 생성된

산물을 비교분석하였다.

4. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 가) 기존의 DNA polymerase 들이 갖고있는 단점들을 극복할 수 있는 새로운 DNA polymerase 제조로 목적기초과학 및 유전공학연구의 활성화.
- 나) Gene amplification 에 활용.
- 다) 유전병의 조기진단.
- 라) 법의학적 연구에 이용.
- 마) Human Genome Sequencing 에 이용.

Summary

A thermostable Taq DNA polymerase has been purified from the extreme thermophile Thermus aquaticus YT-1 through chromatographic methods. The mobility of the purified enzyme was corresponding to that of a polypeptide of 60-63 KDa on sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. The purified DNA polymerase has neither exonuclease (5'→3', 3'→5') nor endonuclease activities. The comparison of gene amplification by the purified Taq polymerase along with the authentic sample showed that the enzyme is functionally equivalent to the Ampli Taq enzyme provided by Perkin-Elmer Cetus.

목 차

제 1 장 서 론 -----	11
제 2 장 실험재료 및 실험방법 -----	13
1. 균주 -----	13
2. 배지 및 배양 -----	13
(1) 전 배양 배지 -----	13
(2) 본 배양 배지 -----	13
3. Crude extract 제조 -----	15
4. 단백질 정량 -----	15
5. 여러가지 효소의 활성도 측정 -----	15
(1) DNA polymerase 활성도 측정 -----	15
(2) Endonuclease assay -----	16
(3) Exonuclease assay -----	17
(4) Akaline phosphatase assay -----	17
(5) PCR test -----	18
6. Polyacrylamide gel electrophoresis -----	19
7. DNA polymerase 의 정제과정 -----	19
(1) Phospho-cellulose ion exchange chromatography -----	19
(2) DEAE-sepharose-CL-6B ion exchange chromatography -----	20
(3) DEAE-Sephacel ion exchange chromatography -----	20

8. Chemicals and reagents -----	21
제 3 장 결과 및 고찰 -----	22
제 4 장 결 론 -----	29
참 고 문 헌 -----	30

제 1 장 서 론

1969 년에 Brock and Freeze 에 의해 70 ° - 75 °C 에서 자라는 내열성 eubacterial 미생물인 Thermus aquaticus strain YT-1 을 보고한 이후로 1976 년에 Chien 등에 의해 분자량 63-68 KDa, specific activity, 2,000 - 8,000 unit/mg 를 나타내는 내열성 deoxyribonucleic acid (DNA) polymerase (EC 2.7.7.)가 분리정제되었다. 이 효소는 80 °C 에서 최적온도를 나타내며 , phosphomonoesterase, phosphodiesterase, exonuclease 활성은 나타나지 않았고, Mg²⁺ 이온이, 꼭 필요한 조효소로 알려졌다. 1980 년에는 Kaledin 등에 의해 내열성 DNA polymerase 가 분리정제되었는데 분자량 62 KDa 이었으며 Chien 등이 분리한 효소와 동일한 것으로 생각된다. 1989 년에는 Elie 등이 Sulfolobus acidocaldarius 균주로부터 분자량 100 KDa DNA polymerase 를 분리하였으며 55 °C - 85 °C 에서 내열성을 나타내었지만 그러나 87 °C 이상에서는 활성이 현저히 감소하여 유용한 분자생물학적 응용에 제한성이 있었다.

분리정제된 내열성 DNA polymerase (Taq pol) 는 DNA 단편을 증폭시키는 polymerase chain reaction (PCR) 방법에 아주 유용하게 이용되고 있으며, 최적온도가 75 °C 이므로 primer 가 template 에 결합이 잘되어 nonspecific 산물을 줄일 수가 있다. 또한 DNA 변성온도인 95 °C 에서도 효소활성이 유지되므로 Taq pol 효소를 공급할

필요가없다. 1989 년에 Lawyer 등은 대장균에 Taq DNA polymerase 를 cloning, 발현시키는데 성공하였으며 Taq pol 유전자 2499 염기쌍을 알아내었다. 발현된 효소의 분자량은 94 KDa 이었으며 E.coli polymerase I 과 비교해볼때 5'→3' exonuclease activity 에 관여하는 domain 으로 알려진 N - 말단 1/3 정도가 유사성을 보여주고있다. 높은 온도에서의 DNA 합성은 매우 흥미로우며, PCR 응용, DNA 서열분석, site specific mutagenesis, Taq pol 효소의 내열성과 구조적인 특징과의 연관성 등에 많은 연구가 진행되리라 생각된다. 본연구에서는 thermophilic bacteria Thermus aquaticus YT-1 에서 이 효소를 분리정제하고 이 효소를 이용한 관련 연구를 수행하였다.

제 2 장 실험재료 및 실험 방법

1. 균 주

본 실험에서 사용한 균주는 Thermus aquaticus YT-1 이었다.

2. 배지 및 배양

(1) 전 배양배지 : 0.4 % polypeptone, 0.2 % Yeast extract, 1 x basal salts (표 1), pH 7.5

(2) 본 배양배지 : 0.8 % polypeptone, 0.2 % yeast extract, 1 x basal salts, pH 7.5

사면배지로부터 Thermus aquaticus YT-1 균주 단일 clony 를 3 ml 의 전 배양배지에 접종하여 70 °C 에서 24 시간 진탕배양후 100 ml 전 배양배지에 접종하여 70 °C 에서 24 시간 진탕배양하였다.

표 1 10 x basal salts 의 조성표 (per liter)

nitrolotriactic acid	1 g
CaSO ₄ 2 H ₂ O	1.5 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	1.0 g
NaCl	0.08 g
KNO ₃	1.03 g
NaN ₃	6.89 g
FeCl ₃ solution (0.28 g/l)	10 ml
Nitsch's trace element solution	10 ml

* FeCl₃ solution 과 Nitsch's trace element 는
따로 멸균한다.

Nitsch's trace element solution (per liter)

H ₂ SO ₄	0.5 ml
MnSO ₄	2.2 g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0.5 g
H ₃ BO ₃	0.5 g
CuSO ₄	0.016 g
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.025 g
CoCl ₂ 6 H ₂ O	0.046 g

3. Crude extract 제조

배양한 배지를 원심분리 (Soval,GS-3 rotor, 4 °C, 7,000 r.p.m., 20 min) 하여 Thermus aquaticus YT-1 100 g 을 수확한 후 suspen 완충용액 (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM PMSF containing 1 mg/ml pepstatin P and trypsin inhibitor) 에 녹였다. 전체부피 300 ml 을 30 ml 씩 나누어 Ultrasonic homogenizer 를 이용하여 완전파쇄한후, Beckman high speed centrifuge 를 이용하여 원심분리 (SS-34 rotor, 17,300 x g, 1 hr, 4 °C) 하여 상층액 (Fraction I) 을 얻었다. 상층액은 (NH₄)₂SO₄ 80 % 포화시킨 다음 하루밤 동안 방치후 원심분리 (SS-34 rotor, 19,000 x g, 1 hr, 4 °C) 하여 ppt. 를 최소부피로 회수하여 100 volume 완충용액 A (20 mM KPi, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 5 % Glycerol, 0.01 M KCl, 0.01 M NaN₃) 에 대하여 4 시간씩 3 회 dialysis 하였다. Dalysate 를 원심분리하여 불용성 물질을 제거한후에 enzyme solution (Fraction II) 로 사용하였다.

4. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin 을 표준 단백질로 사용하였다.

5. 여러가지 효소의 활성도 측정

(1) DNA polymerase 활성도 측정

효소의 DNA polymerase 활성도 측정은 1.5 ml ependorf tube 를 사용하였다. 반응혼합물 (50 μ l) 은 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM β -mercaptoethanol, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 mM dATP, 200mM dGTP, 200 mM dCTP, [methyl, 1',2'- ³H] Thymidine 5'-triphosphate 48 mCi/mmol, 1.43 μ g activated calf thymus DNA 로 이루어져있다. 반응혼합물에 DNA polymerase 를 가한후 80 °C 에서 30 min 반응하여 ice bath 에서 5 분 동안 chilling 시켜서 반응을 정지시켰다. 50 μ l 의 시료를 DE-81 filter paper disk 에 점적시켜 재빨리 0.1 M sodium pyrophosphate 를 포함하는 ice-cold 10% TCA 용액을 떨어뜨린후 15 분 방치후 5% TCA 용액으로 10 ml 씻은후 70% EtOH 로 20 ml 씻어 말렸다. Acid-insoluble 물질에 incorporation 되는 [methyl,1',2'- ³H] dTTP 의 양을 Beckman LS 6800 liquid scintillation counting 을 이용하여 측정하였다. 효소의 1 unit 는 80 °C, 30 min 동안 10 nmol [³H] dTTP 가 acid-insoluble 물질로 incorporation 되게하는 효소의 양으로 정하였다.

(2) Endonuclease assay

효소용액 (1 unit) 을 1 μ g pUC 18 vector 에 가하여 반응혼합물(20 μ l) 을 만들어, 70 °C 에서 30 min 또는 24 시간 반응하여 1% agarose gel 에서 분석하였다.

(3) Exonuclease assay

1 μ g pUC 18 vector 를 제한효소 EcoR I 으로 자르고 효소용액 (1 unit) 을 가하여 반응혼합물을 만들어, 70 °C 에서 30 min 또는 24 시간 반응하여 1 % agarose gel 에서 분석하였다.

(4) Alkaline phosphate assay

100 mM Glycine 완충용액, pH 10.3, 6 mM PNPP (para nitrophenyl phosphate), 1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂ 로 이루어진 반응혼합물 1 ml 에 효소용액을 가한 다음 68 °C, 1 min 동안 반응하여 시간에 따른 OD 변화량으로 측정하였다.

(5) PCR test

1. Reaction mixture (100 μ l)

Template DNA	—————	1 μ g
Primer (I-21)	—————	1 μ M
(I-13)	—————	1 μ M
dATP	—————	300 μ M
dGTP	—————	300 μ M
dCTP	—————	300 μ M
dTTP	—————	300 μ M
1 % Gelatin	—————	0.01 %
KCl	—————	50 mM
Tris-Cl (pH 8.4)	—————	10 mM
MgCl ₂	—————	1.5 mM
Mineral oil	—————	100 μ l

2. PCR 수행

Cycle	Loops	Temp.	Time
1	34	95 °C	1:30
		55 °C	1:30
		72 °C	2:30
2	1	95 °C	1:30
		55 °C	1:30
		72 °C	2:30

3. Mineral oil 제거후 chloroform 처리

4. Phe/chloroform 처리

5. EtOH 침전

6. 2 % agarose gel 혹은 3 % Nusive gel electrophoresis 로 분석하였다.

6. Polyacrylamide gel electrophoresis

Disc - gels 은 Laemmli 의 방법을 수정하여 Mighty small II Kit 에 12 % acrylamide running gel 과 5 % acrylamide stacking gel 이 되도록 만든 vertical slab gel (7 x8 cm) 에 정제된 효소를 loading 하여, stacking 시에는 50 Volts 를 running 시에는 80 Volts 의 전류를 가하여 약 2.5 시간 동안 전개시켰다. 이때 사용된 완충용액은 Tris-glycin (pH 8.3, 25 mM) 이었다. 전개가 끝난후 coomassie brilliant blue R-250 이 들어있는 염색액에 2 시간 동안 담가서 염색시킨후 탈색액 (40 % methanol, 7 % acetic acid) 에서 탈색시킨후 순도를 확인하였다.

7. DNA polymerase 의 정제과정

모든 실험은 4 °C 에서 수행하였다.

(1) Phospho-cellulose ion exchange chromatography

완충용액 A 로 이미 평형화되어있는 phospho-cellulose column (41 x 30 cm) 에 Fraction II 를 loading 한 후에 동일 완충용액으로 단백질의 280 nm 에서 흡광도가 0.01 이 될 때까지 20 ml/hr 속도로 씻은후 활성을 나타내는 single peak 를 모아 Fraction III 로 사용하였다.

(2) DEAE-sepharose CL-6B ion exchange chromatography

완충용액 B (0.01 M KCl 완충용액, pH 7.5, 10 mM β -mercaptoethanol, 5 % glycerol) 로 이미 평형화되어있는 DEAE-Sepharose CL-6B column (41 x 18) 에 Fraction III 을 loading 한 후에 동일 완충용액으로 20 ml/hr 속도로 씻어준 후 0.1 - 0.6 M KCl linear gradient 를 수행하였다. Taq polymerase 활성부분을 모아 Fraction IV 로 사용하였다.

(3) DEAE-sephacel ion exchange chromatography

완충용액 (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 200 μ g/ml gelatin) 로 이미 평형화되어있는 DEAE-sephacel column (10 x 10 cm) 에 Fraction IV 를 loading 한 후에 동일 완충용액으로 10 ml/hr 속도로 씻어준 후 0.1 -0.3 M KCl linear gradient 를 수행하여 Taq pol 활성부분 (0.17 M KCl) 을 모았다.

8. Chemical and reagent

Activated calf thymus DNA, DEAE-sepharose-CL-6B resin 은 pharmacia 제품을 [methyl, 1', 2'- 3H] Thymidine 5'-triphosphate 는 amersham 제품을 그 외에 Deoxyribonucleotides, gelatin, DEAE-sephacel, Phospho-cellulose resin, 등은 sigma 제품을 사용하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

원하는 효소의 양을 분리정제하기 위하여 이미 언급한 바와 같이 세포 (8 g/l) 하여 100 g 의 세포를 이용하여 crude extract 를 제조하였다. suspension 완충용액에는 protease 로부터 효소를 보호하기 위하여 1 mM PMSF, 1 mg/ml pepstin P 와 trypsin inhibitor 를 첨가하였다. 300 ml crude extract 로부터 Tag pol 활성이 존재함을 확인한 후 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 80 % 시켜 ppt. 를 얻어서 최소부피로 녹인 용액을 dialysis 하여 dialysate 를 원심분리하면 불용성 물질이 침전물로 나타나며 상층액 (220 ml) 을 Phospho-cellulose column 에 loading 한 결과 washing 단계에서 활성이 나타났다. 완충용액의 용출속도는 시작할 때보다 상당히 느려지는데 그 이유로는 crude extract 에 포함된 DNA 등에 의한 complex 형성 때문이라고 생각된다. 계속해서 Fraction III 를 DEAE sepharose-CL-6B column 에 loading 하여 씻어준 후 0.1 -0.6 M KCl linear gradient 과정을 거쳐서 활성을 나타내는 부분 (0.15 M KCl) 을 모았다(그림 1). 용출속도는 20 ml/hr, fraction volume 은 8 ml/fraction 이었다.

Fraction IV 를 DEAE-sephacel column 에 loading 하여 washing, 0.1 - 0.3 M KCl linear gradient 과정을 거쳐서 활성을 나타내는 부분 (0.17 M KCl) 을 모았다(그림 2). 이때 사용한 완충용액 C (50 mM Tris-Cl,

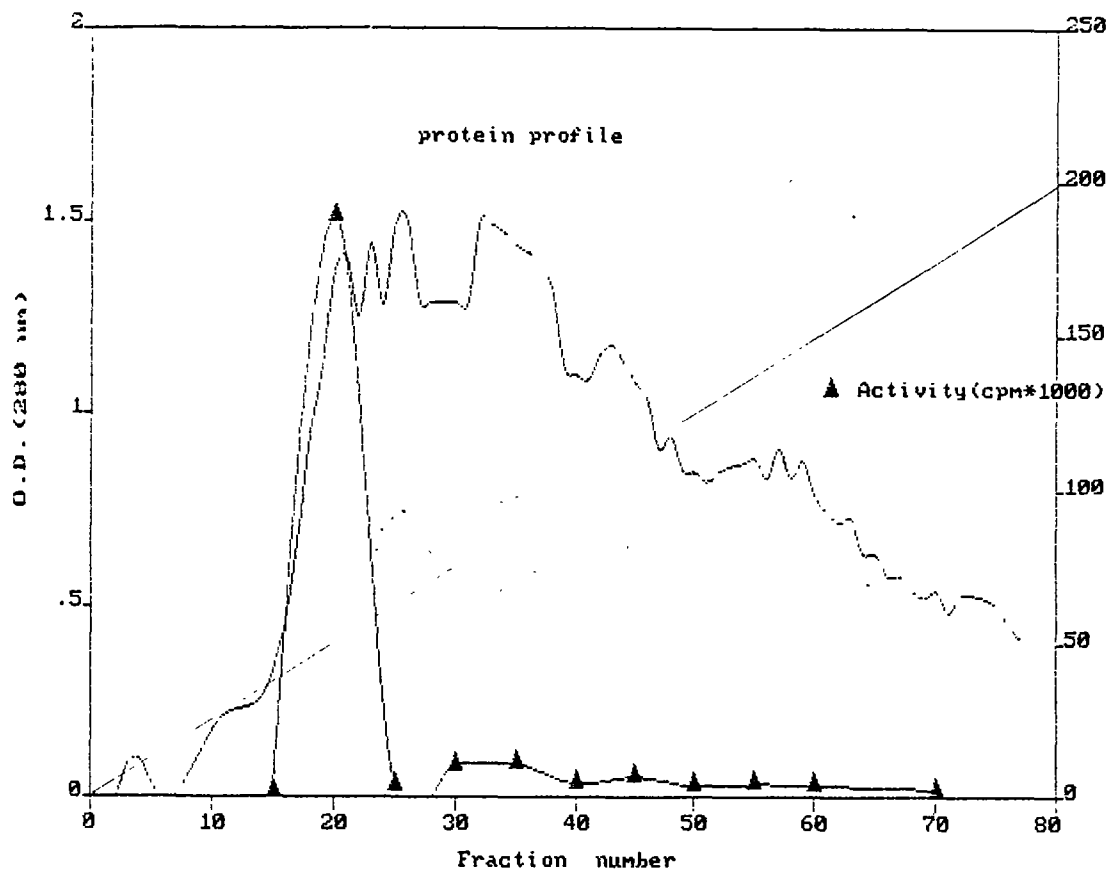


Fig 1. DEAE-sepharose CL-6B ion exchange chromatography. Column size : (41 - 18 cm), Buffer B : 0.01 M KCl, pH 7.5, 10 mM β -mercaptoethanol, 5 % glycerol, Flow rate : 20 ml/hr, (\blacktriangle - - - - \blacktriangle) : Protein profile, (- - - - -) : Enzyme activity, (- - - - -) : Linear gradient (0.1 - 0.6 M KCl)

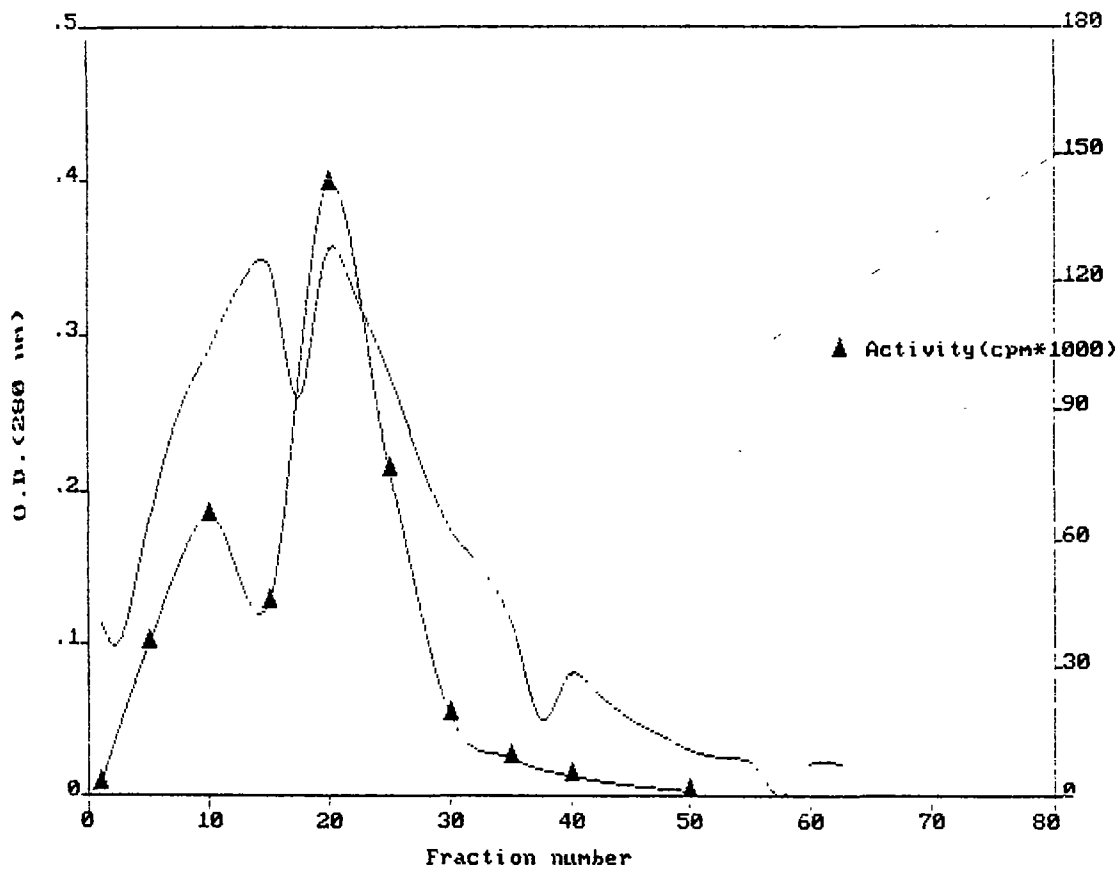


Fig 2. DEAE-sephacel ion exchange chromatography. Column size : 10 x 10 cm, Buffer C : 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 200 μ g/ml gelatin, Flow rate : 10 ml/ hr, (-----) : Protein profile, (\blacktriangle ----- \blacktriangle) : Enzyme activity, (- - - - -) : Linear gradient (0.1 - 0.3 M KCl)

pH 7.5, 1mM DTT, 0.5 mM EDTA, 200 μ g/ml gelatin) 에는 gelatin 이 포함되어있는 데 이것이 없으면 효소의 활성도가 급격히 감소하게되며 triton X 100 을 사용해도되며 BSA 의 경우는 최종과정에서 제거가 어려워 정제도를 알수없는 단점이있다.

위와 같이하여 분리한 효소의 yield 는 28 % 로 비교적 높게 나타났으며 정제과정을 요약하면 표 2 와 같다.

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg)	Activity (unit)	Yield (%)	S.P.	Purification
crude	300	10,200	12,702	100	1.25	1
80 %	220	5,940	9,831	77	1.66	1.33
PC	300	288	5,045	40	17.5	14
CL-6B	25	26	4,501	35	1,701	136.8
Sephacel	15	1.6	3,609	28	2,256	1,410

분리한 효소의 순수도를 알아보기의하여 SDS - polyacrylamide gel electrophoresis 를 수행하였으며 그림 3 에서 그 결과를 보여주고있다. Crude, 80 % (NH₄)₂SO₄ lane 에서 band 가 고르지 못한 이유는 정제과정

동안에 장시간 보관하여 protease 의 공격을 받았기 때문인 것으로
생각되며 효소의 분자량은 60 -63 KDa 정도였다. Polymerase Chain
Reaction (PCR) 의한 gene amplification 과정은 template DNA 로 pIBA
를 사용하였는 데 정제된 효소를 사용한 결과가 그림 4 에 나타나있다.
PCR 산물을 보면 구입한 효소와 정제된 효소 두가지 모두 양호한
amplification 이 이루어졌음을 알 수있다.

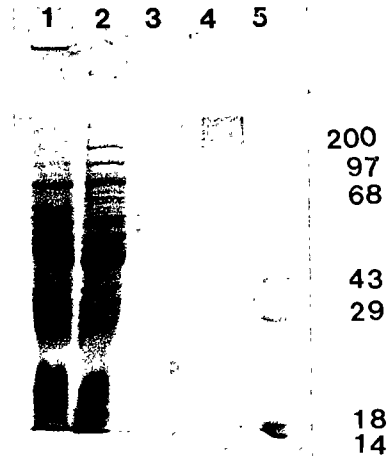


Fig 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of enzymatic fractions of the purification. The fractions were run on a 12 % acrylamide slab gel. Lane 1, crude ; lane 2, 80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; lane 3, DEAE-sepharose CL-6B ; lane 4, DEAE-sephacel ; lane 5, Marker (200, 97, 68, 43, 29, 18, 14 kDa)



Fig 4. 2 % Agarose gel electrophoresis of assay mixtures. Lane 1, pIBA net form ; lane 2, 123 bp ; lane 3, PCR product.

제 4 장 결 론

본 연구과제에서 분리정제한 Taq DNA polymerase 는 nuclease 활성이 없고 gene amplification 에도 이상이 없기 때문에 관련된 연구수행에 아무런 연구 수행이 없으리라 생각된다. 앞으로의 과제는 다량의 효소를 분리하여 분자생물학 실험에의 응용가 효소 자체에 관련된 여러가지 생화학적 기능연구가 이루어져야 하겠다. 본 실험실에서는 다량의 효소분리를 위하여 gene cloning 및 발현 연구가 계속해서 수행되어지고있다.

참 고 문 헌

1. Andrew, p. (1965) *Biochem. J.*, 96, 595
2. Brock, T. D. (1969) *J. Bacterial.*, 98, 289
3. Catteral, J. F.(1977) *J. Bacterial.*, 129, 1110-1120
4. Chien, A. (1976) *J. Bacterial.*, 127, 1550-1557
5. Davis, B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-416
6. Fabri, M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 435, 228-235
7. Hiroko. K. (1989) *Gene*, 76, 161-166
8. Innis, M. A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 9436-9440
9. Kaledin, A. S. (1980) *Biokhimiya*, 45, 644-651
10. Kaledin, A. S. (1981) *Biokhmia*, 46, 1576-1584
11. Kaledin, A. S. (1982) *Biokhmia*, 47, 1785-1791
12. Karkas, J. P. (1973) *Pro. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70, 3834-3838
13. Klimczak, L. J. (1985) *Ncleic Acids Res.*, 13, 5269-5282
14. Kornberg, T. (1974) *Enzymes*, 10, 119-144
15. Kwon, S. T. (1988) *Eur. J. Biochem.*, 171, 441-447
16. Lowry, O. H. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275
17. Lawyer, F. C. (1989) *J. Biol. Chem. .*, 264, 6427-6437
18. Litman, R.M.(1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 6222-6233

19. Loeb, L. A. (1969) *Exp. Cell Res.*, 57, 298-310
20. Loeb, L. A. (1969) *J. Biol. Chem.*, 144, 1672-1681
21. Lowry, O. H. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275
22. Mendelman, M. V. (1989) *J. Biol. Chem.*, (in press)
23. Mullis, K. B. (1987) *Methods in enzymology*, 155, 335-350
24. Petruska, J. (1988) *Biochemistry*, 27, 2988
25. Porro, M. (1982) *Analytical Biochemistry*, 127, 316-321
26. Reuben, r. (1974) *J. Virol.*, 14, 1104-1107
27. Rossi, M. (1986) *System. Appl. Microbiol.*, 7, 337-341
28. Saiki, R. D. (1985) *Science*, 230, 1350-1354
29. Saiki, Rcharf, S. J. (1986) *Science*, 233, 1076-1078
32. Sedwick, W. P. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 5026-5033
33. Stenesh, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.*, 272, 167-178
34. Tindall, K. R. (1988) *Biochemistry*, 27, 6008-6013
35. Wickner, R. B. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 489-497

