

芽孢杆菌高表达质粒的构建及其性质的研究

蒋如璋 乔明强

(南开大学生物系生物工程研究室, 天津)

以*B. subtilis*质粒pUB110为基础构建了双标记(Km^r、Cm^r)，多酶切点接头的表达质粒pNQ122和pNQ113系列。pNQ122的分子量为 3.2×10^6 道尔顿，其对Cm抗性水平和cat-86基因表达水平与质粒pPL600相同，pNQ113系列质粒分子量为 $3.1-4.1 \times 10^6$ 道尔顿。其对Cm抗性水平高于质粒pPL600，它们所携带的cat-86基因的表达水平无论在非诱导和诱导条件下都比pPL600高约5倍。无分解代谢阻遏现象，传代稳定，因而可以用作*Bacillus*属基因工程的载体。

关键词 芽孢杆菌；表达质粒；诱导性；葡萄糖效应

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)属革兰氏阳性细菌，无致病性，能合成多种有重要经济价值的胞外酶。因而，作为重组体PNA的受体系统，在许多方面优于大肠杆菌(*E. coli*)^[1]。为此，许多实验室对*B. subtilis*载体受体系统进行了广泛的研究^[2-4]。

本文报道了以cat-86结构基因^[5]为探测标记，组建和克隆多接头高表达质粒的过程，以及关于被克隆的启动区的特性的研究。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌株、质粒和噬菌体：本研究所用菌株、质粒和噬菌体见表1。

2. 培养基：LB培养基^[6]用于细菌培养及*E. coli*转化。Spizizen培养基^[7]用于*B. subtilis*感受态培养和转化。M培养基^[8]用于噬菌体SPPI的增殖。SMMP培养基和DM₂培养基^[9]用于*B. subtilis*原生质体转化。

3. 酶和试剂：限制性核酸内切酶、T4DNA连接酶购自华美生物工程公司或New England Biolabs公司。RNase和DNase购自Sigma公司。乙酰辅酶A购自Mannheim Boehringer Biochemica公司。5,5'-二巯基-2,2'-二硝基苯甲酸(DTNB)系中科院上海生化所产品。

(二) 方法

1. 遗传转化：*E. coli*转化按Maniatis^[6]法进行。*B. subtilis*感受态转化按Spizizen^[7]法。原生质体转化按Chang^[9]法。选择培养基一般含抗菌素的量为：Cm 20μg/ml，或Km 20μg/ml，或Ap 50μg/ml；DM₂培养基筛选Km^r转化子时，Km含量为1mg/ml；筛选Cm^r转化子时，Cm含量为20μg/ml或50μg/ml。

本文于1987年7月20日收到。

缩写词：Cm^r：氯霉素抗性，Ap^r：氨苄青霉素抗性，Km^r：卡那霉素抗性，CAT：氯霉素转乙酰基酶。

本工作系科学基金资助项目的一部分。

本工作承蒙南开大学生物系生物工程研究室的陈启民，耿运琪，倪津，孙庆，赵亚男，中心实验室的张丰德，王桂芬，刘桂琴，绘图室的王树荣；分子生物所刘权黎等老师给予了大力的支持和热情帮助，谨此深表衷心的感谢。

表1 菌株、质粒和噬菌体
Table 1 Strains, plasmids and bacteriophages

菌株和质粒 Strains and plasmids	基因型或表型 Genotype or phenotype	来 源 Source
<i>E. coli</i> LE392		南开大学生物系保藏
<i>B. licheniformis</i> ATCC 27811	wide type	The strain is deposited in Dept. of Biology, Univ. Nankai
<i>B. sphaericus</i> C ₃ -1	wide type	"
<i>Bacillus</i> sp. U ₂	"	"
<i>B. subtilis</i> AS _{1.1176}	str ⁻ aro amy	中科院微生物所
<i>B. amyloliquefaciens</i> AS _{1.1099}	wide type	Institute of Microbiology, Acad. Sinica
in <i>E. coli</i> JM83		
pUC12	Ap ^r	Dr. Messing [10]
pUC13	Ap ^r	"
in <i>B. subtilis</i> BR151		
pPL600	Cm ^r Km ^r	Dr. Lovett [5]
pPL601	Cm ^r Km ^r	"
pUB110	Km ^r	Dr. Dubnau [5]
in <i>B. subtilis</i> AS 1.1176		
pPL603	Cm ^r Km ^r	Dr. Lovett [5]
pNQ122	Cm ^r Km ^r	本作者构建
pNQ113 series	Cm ^r Km ^r	"
<i>B. subtilis</i> phage SPPI		中科院微生物所

2. DNA 的提取: *B. subtilis* 质粒 DNA 的快速提取按 Gryczan [11] 法。大量制备按 Birnbiom [12] 法。*E. coli* 质粒 DNA 按 Silhavy [13] 法制备。噬菌体 SPPI DNA 的制备按 Montenegro [14] 法。细菌染色体 DNA 按 Palva [15] 制备。质粒和染色体 DNA 的琼脂糖凝胶电泳按 Maniatis [6], 以限制性内切酶 *EcoRI* 酶切的 SPPI DNA 作为分子量标准 [16]。

3. CAT 酶活性测定: CAT 酶活按 Shaw [17] 方法测定。1 酶活单位定为在 37°C 条件下, 10⁹ 细胞每分钟使 1 μmol 氯霉素乙酰化所需的酶量。

4. 质粒稳定性测定: 将携带质粒的 *B. subtilis* 过夜培养物, 按 10³ 细胞/ml 接种 50ml 新鲜 LB 培养基中。37°C 培养, 14h 后, 再稀释并按 10³ 细胞/ml 接种 50ml 新鲜 LB 培养基, 如此重复进行, 直至达 125

世代。取样稀释, 取 0.1ml 涂于不含抗菌素的 LB 平板上。37°C 过夜培养, 再随机挑取在 LB 平板生长的菌落分别点在含和不含 Cm (20 μg/ml) 平板上。质粒的稳定性表示为在含 Cm 平板上的菌落数占在不含抗菌素平板上的菌落数的比例。

结 果

(一) 质粒 pNQ122 的构建

为将 pUC13 的多酶切位点接头连接到 *B. subtilis* 质粒 pUB110 上, *E. coli* 质粒 pUC13 和质粒 pUB110 分别以 *Bam*HI 酶切, 经 T4DNA 连接酶连接, 并转化 *E. coli* LE392, 筛选 Ap^r Km^r 转化子。

提取带双标记的质粒 DNA 进行酶切鉴定。挑出与预期插入方向一致的质粒, 用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Pst*I 双酶切, 并

与*B. subtilis*质粒pPL601的 cat-86 结构基因(1.1kb的EcoRI-PstI酶切片段)连接。通过原生质体转化。引入 *B. subtilis* A S 1.1176中。筛选Cm^r转化子。携带Cm^r Km^r 双标记的质粒。经限制性核酸酶EcoRI, HindⅢ, BglⅡ, BamHI, 和PstI等酶切。经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 与预期质粒一致者。定名为质粒 pNQ122 (图1和图版 I - A)。分子量为 3.2×10^6 道尔顿。

由于质粒pPL601上cat-86结构基因不携带转录启动区, 因此pNQ122的cat-86基因的表达式决定于质粒 pUB110上的 pvuⅡ酶切点左侧启动区的功能^[6]。

(二) 质粒pNQ113系列的构建

1. 带多酶切位点接头的质粒的构建: *B. subtilis*质粒pPL603和 *E. coli* 质粒pUC12分别用限制性内切酶EcoRI 酶切, 经T4DNA连接酶连接后, 转化*E. coli*

LE392。在含Ap的选择培养基上筛选Ap^r转化子。然后, 检测出Ap^r Km^r 双标记的转化子。其中按预期经HindⅢ酶切产生 3.37kb和3.87Kb 两个片段的质粒被命名为pNQ111 (图2)。

质粒pNQ111经PstI酶切并自连后。通过原生质体转化引入 *B. subtilis* AS 1.1176, 筛选Km^r转化子。经验证, 不携带Ap^r的质粒, 定名为 pNQ112。这样就在无启动区的cat-86 结构基因的前面加上了多酶切点接头。*B. subtilis* AS 1.1176 (pNQ112) 只能抗 5μg/ml Cm。这就为进一步克隆高表达启动区提供了灵敏的探测标记。

2. 高表达启动区质粒的构建: 质粒 pNQ112经EcoRI酶切后, 与经EcoRI完全消化的来自不同种细菌或噬菌体的 DNA 片段随机连接。通过原生质体转化引入

表2 pNQ113系列质粒启动区片段来源
Table 2 Source of promoters for plasmid series of pNQ113

质粒 Plasmids	启动区片段来源 Source of promoter fragments
pNQ113-2,3,	<i>Bacillus</i> sp. U ₂
pNQ113-7,8,9,	<i>B. subtilis</i> phage SPPI
pNQ113-12,17,	<i>B. licheniformis</i> ATCC 27811
pNQ113-20,39,66,	<i>B. sphaericus</i> C ₃ -1
pNQ113-88,89,90,96,103,108,	<i>B. amyloliquefaciens</i> AS 1.1089

表3 pNQ113质粒中插入的启动区DNA片段的大小
Table 3 The size of inserted promoter fragment in pNQ113

质粒 Plasmid	插入片段大小 Size of inser. frag. (kb)	质粒大小 Size of the plasmid (kb)	质粒 Plasmid	插入片段大小 Size of inser. frag. (kb)	质粒大小 Size of the plasmid (kb)
pNQ113-2	0.52	5.12	pNQ113-39	1.25	5.85
pNQ113-3	0.10	4.70	pNQ113-66	0.65	5.25
pNQ113-7	0.90	5.60	pNQ113-88	1.10	5.70
pNQ113-8	0.80	5.40	pNQ113-89	1.12	5.72
pNQ113-9	0.44	5.04	pNQ113-90	0.22	4.82
pNQ113-12	0.88	5.48	pNQ113-96	0.20	4.80
pNQ113-17	0.22	4.82	pNQ113-103	0.88	5.48
pNQ113-20	1.70	6.30	pNQ113-108	0.88	5.48

B. subtilis A S 1.1176在含 50μg/ml Cm 的DM₃培养基平板上筛选携带 Cm^r 质粒

的转化子, 并定名这些质粒为 pNQ113系列质粒 (表2)。我们对其中16个质粒的

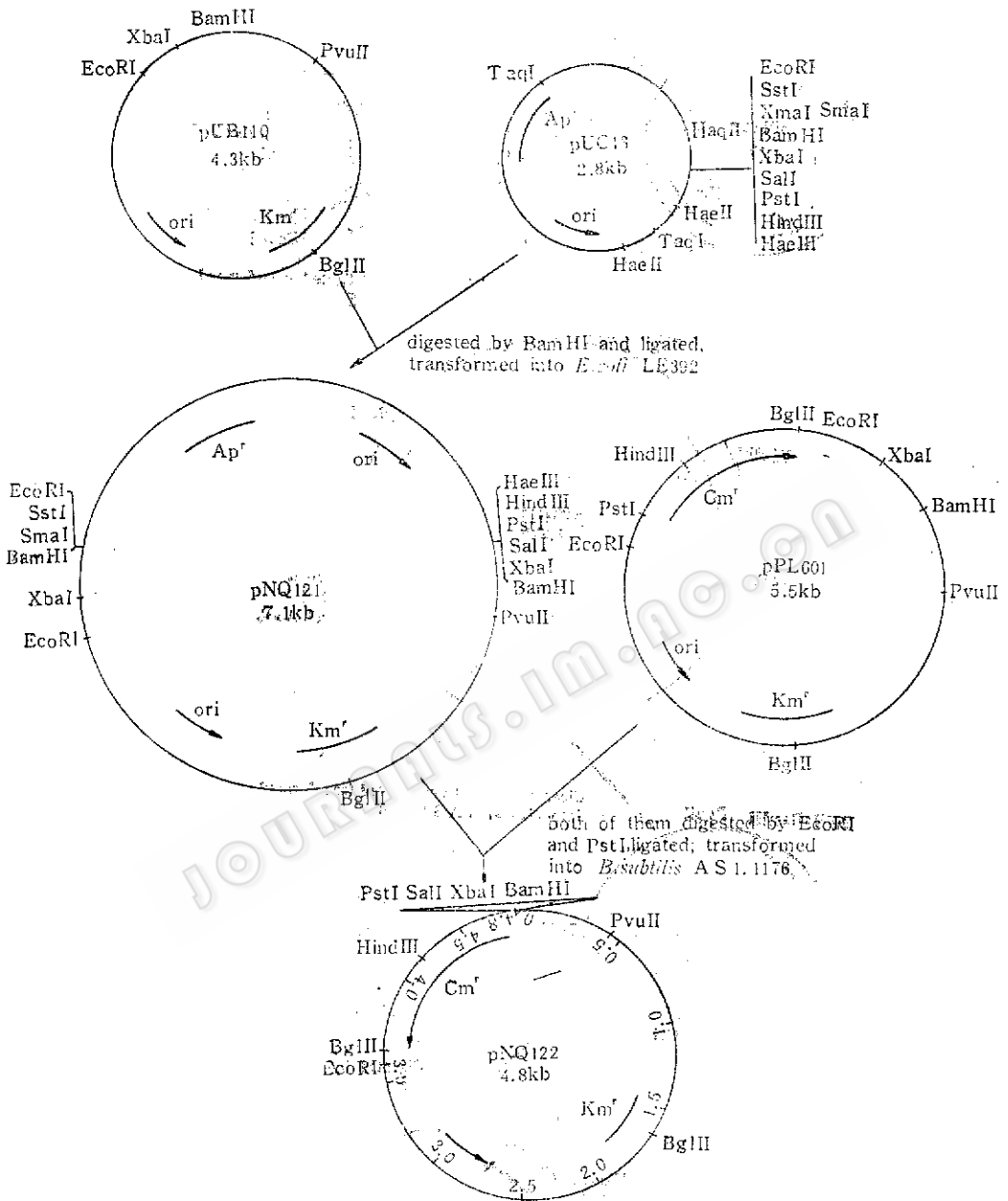


图1 质粒pNQ122的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pNQ122.

插入片段的大小做了比较。结果见表3和图版I-B。不同质粒携带的启动区片段最小为0.1kb, 最大的为1.7kb。

(三) 氯霉素抗性水平

按Williams^[5]的方法测定了本文组

建的表达质粒pNQ122和pNQ113系列质粒的Cm^r抗性水平(表4)。结果表明组建的所有表达质粒的抗性水平都不低于质粒pPL600, 其中最高的能抗Cm350μg/ml以上。

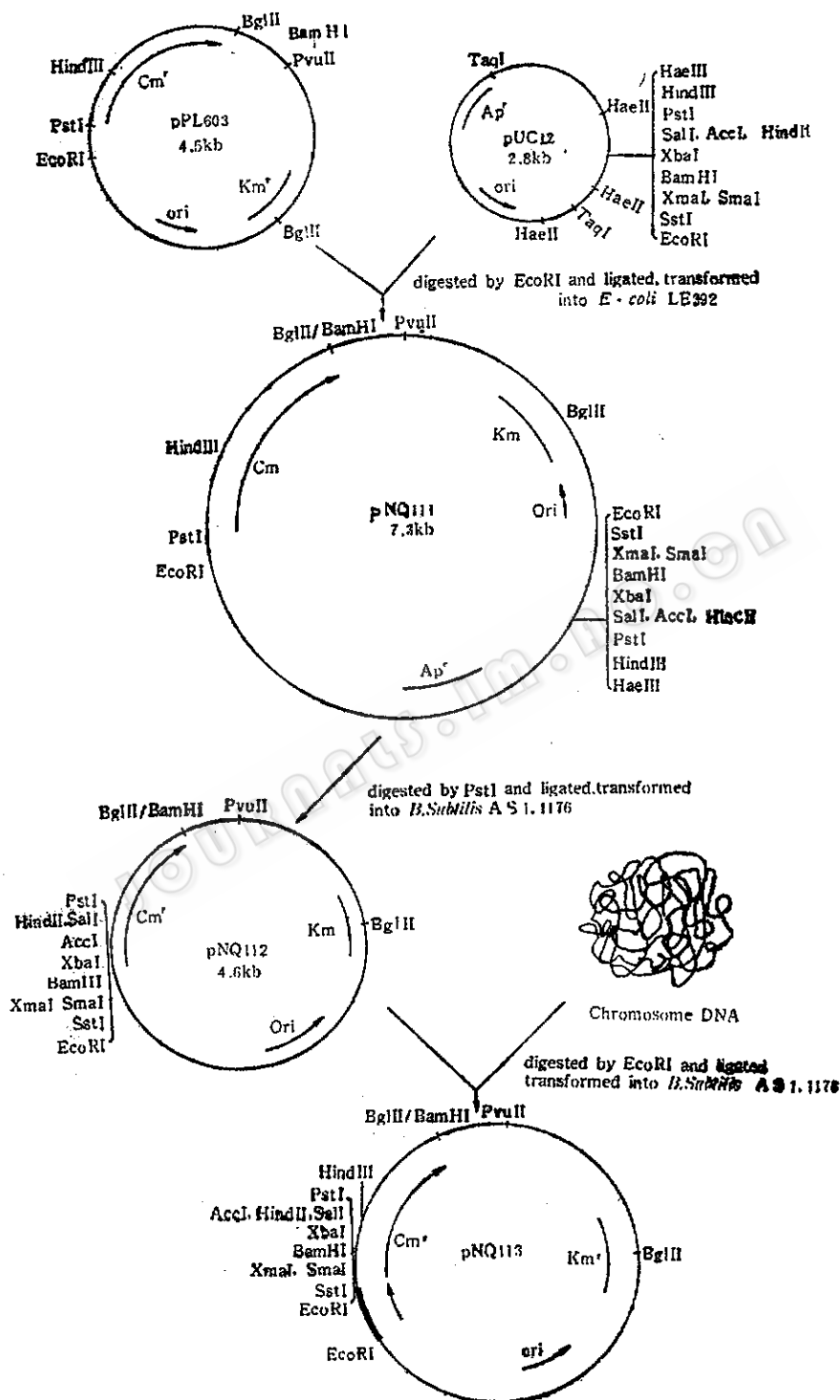


图 2 质粒pNQ113系列的构建

Fig. 2 Construction of plasmid series of pNQ113

表4 表达质粒的氯霉素抗性水平

Table 4 Resistant level of expression plasmids to Cm

质粒 Plasmid	氯霉素浓度 Concent. of chloramphenicol ($\mu\text{g/ml}$)							抗性水平 Resistant level
	50	100	150	200	250	300	350	
pNQ122	+	+	+	+	+			250
pNQ113-2	+	+	+	+				200
pNQ113-3	+	+	+	+				200
pNQ113-7	+	+	+	+				200
pNQ113-8	+	+	+	+				200
pNQ113-9	+	+	+	+	+			250
pNQ113-12	+	+	+	+				200
pNQ113-17	+	+	+	+	+			250
pNQ113-20	+	+	+	+	+			250
pNQ113-39	+	+	+	+	+			250
pNQ113-66 ^a	+	+	+	+	+	+	+	350
pNQ113-88	+	+	+	+	+			250
pNQ113-89 ^a	+	+	+	+	+	+	+	350
pNQ113-90	+	+	+	+	+			250
pNQ113-96	+	+	+	+	+	+		300
pNQ113-103	+	+	+	+	+			250
pNQ113-108	+	+	+	+	+			250
pPL600	+	+	+	+				200
pNQ112								5 $\mu\text{g/ml}$

注: a. 高于350 $\mu\text{g/ml}$, Cm未测 a. >350 $\mu\text{g/ml}$ Cm no detect

(四) cat-86基因的表达水平

接种携带待测质粒pNQ122和pNQ113系列质粒的*B. subtilis* AS 1.1176于不含Cm的LB培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养, 分别在早对数期($\text{OD}_{600} = 0.37-0.41$)、中对数期($\text{OD}_{600} = 0.79-0.81$)和晚对数期($\text{OD}_{600} = 1.0-1.05$)取样, 测定CAT酶活性。结果见表5。

在不加Cm的条件下, pNQ122携带的cat-86基因表达水平与对照pPL600的水平大致相同。而pNQ113系列质粒携带的cat-86基因表达水平都明显地高于pPL600。这说明这些被克隆的不同来源的启动区的表达能力远高于pPL600的启动区。

(五) Cm对cat-86基因的诱导

cat-86基因表达在翻译水平上受Cm诱导调控的。其诱导性决定于cat-86结构基因起始密码子前的144碱基顺序^[18,19]。

所有的pNQ113系列质粒都保留着这一DNA顺序。因此预期也应保留这一特性。为证实这一点, 取高表达质粒之一, pNQ113-96做了诱导性测验。结果见图3。在含5 $\mu\text{g/ml}$ Cm的LB培养基中, pNQ113-96的cat-86基因的表达水平较无Cm诱导时高3倍。与pPL600的cat-86基因表达特性一致。

(六) 葡萄糖对cat-86基因表达的影响

为进一步了解pNQ113系列质粒启动区的性质, 挑选其中5个质粒, 测定了葡萄糖对它们携带的cat-86基因表达的影响。将携带不同质粒的*B. subtilis* AS 1.1176过夜培养物按1%转接新鲜LB和含0.5%葡萄糖的LB培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至中对数期($\text{OD}_{600} = 0.79-0.81$)取样, 测定CAT酶活(表6)。

表5 在非诱导条件下pNQ113系列和pNQ122质粒携带cat-86基因的CAT酶活性
Table 5 CAT specified activity of cat-86 gene carried by plasmid series of pNQ113 and pNQ122 under noninducible condition

质 粒 Plasmid	CAT酶活CAT Spe. act. ($\mu\text{mol}/10^9\text{cell}$) $\times 10^{-3}$		
	早对数期 Early log. phase	中对数期 Mid. log. phase	晚对数期 Late log. phase
pNQ122	4.7(1.9) ^a	14.2(1.2)	16.2(1.4)
pNQ113-2	6.7(2.7)	71.0(6)	64.1(5)
pNQ113-3	11.2(4.5)	60.0(5)	61.0(5)
pNQ113-7	6.7(2.7)	71.2(6)	29.6(2.5)
pNQ113-8	7.9(3.2)	32.9(2.8)	55.8(4.7)
pNQ113-9	20.9(8.4)	70.5(6)	71.3(6)
pNQ113-12	21.6(8.6)	87.5(7)	71.7(6)
pNQ113-17	17.8(7.1)	78.2(6.5)	59.6(5)
pNQ113-20	8.4(3.4)	17.6(1.5)	20.1(1.7)
pNQ113-39	ND	60.6(5)	27.3(2.3)
pNQ113-66	ND	73.2(6)	75.0(6.3)
pNQ113-88	29.6(11.8)	41.3(3.4)	36.6(3.1)
pNQ113-89	ND	104.5(8.7)	70.9(6)
pNQ113-90	10.9(4.4)	65.3(5.4)	62.5(5.3)
pNQ113-96	34.3(13.7)	65.2(5.4)	68.1(5.7)
pNQ113-103	13.1(5.2)	85.1(7.1)	65.9(5.5)
pNQ113-108	8.3(3.3)	70.3(5.8)	65.2(5.5)
pPL600	2.5(1)	12.0(1)	12.3(1)
<i>B. subtilis</i> AS ₁ 1176	0.2(0.1)	1.1(0.1)	1.2(0.1)

注^a: 括号中的数字示相对于质粒pPL600提高的倍数

表6 葡萄糖对cat-86基因表达的影响
Table 6 Glucose effect on expression of the gene cat-86

Plasmid	CAT酶活CAT Spe. act. ($\mu\text{mol}/10^9\text{cell}$) $\times 10^{-3}$	
	LB + 0.5% 葡萄糖 LB + 0.5% glucose	LB培养基 LB medium
pNQ113-8	36.12	32.92
pNQ113-9	81.32	70.54
pNQ113-17	81.99	78.19
pNQ113-88	49.67	41.25
pNQ113-96	89.39	65.25
pPL600	12.38	11.99

表7 质粒pNQ113在*B. subtilis*中的传代稳定性
Table 7 Stability of plasmid pNQ113 from generation to generation in *B. subtilis* AS 1.1176

质 粒 Plasmid	插入片段的大小 Insertion fragment size(kb)	影印平板上的菌落数 Colonies on replica plates		B/A(%)
		LB medium (A)	LB + Cm medium (B)	
pNQ113-86	0.7	200	200	100
pNQ113-89	1.12	200	200	100
pNQ113-96	0.2	200	200	100
pPL600	0.0	200	199	99.5

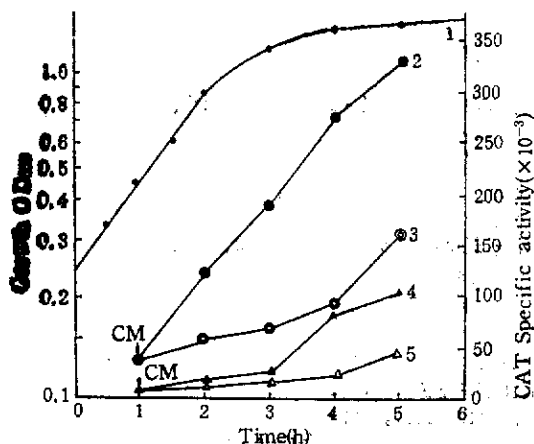


图3 质粒pNQ113-96和pPL600的Cm诱导曲线

Fig. 3 Curves of inducibility of plasmid pNQ113-96 and pPL600 induced by chloramphenicol

1. 枯草芽孢杆菌AS1.1176生长曲线
2. pNQ113-96, 在5µg/ml Cm诱导条件下CAT酶活
3. pNQ113-96, 非诱导条件下的CAT酶活
4. pPL600, 在5µg/ml Cm诱导条件下CAT酶活
5. pPL600, 非诱导条件下的CAT酶活
1. Growth curve of *B. subtilis* AS 1.1176
2. pNQ113-96, CAT specified activity under inducible condition with 5µg/ml Cm.
3. pNQ113-96, CAT specified activity under noninducible condition.
4. pPL600, CAT specified activity under inducible condition with 5µg/ml Cm
5. pPL600, CAT specified activity under noninducible condition.

可见, 葡萄糖对cat-86基因表达无阻遏效应, 这说明所检测的启动区都是非分解代谢途径有关的基因的启动区。

(七) 质粒的稳定性

外源DNA片段的插入, 常影响质粒的稳定性, 从而直接影响质粒的应用。为进一步了解pNQ113系列高表达质粒在*B. subtilis* AS 1.1176中的稳定性, 测定了3个Cm抗性水平高, 而插入片段大小不同的质粒在无选择压力的条件下传125世代后的稳定性(表7)。上述三个质粒在*B. subtilis* AS 1.1176中是稳定的。

讨 论

在诱导条件下, cat-86基因表达水平的提高决定于Cm在翻译水平上的诱导作用^[18,19]。cat-86基因的可诱导性是一个很重要的特性, 我们可按实验要求, 使被克隆的基因的表达表现为诱导型, 既将外源结构基因克隆在质粒pNQ113的cat-86基因内的HindⅢ切点上(融合蛋白)。这样可通过在培养基内加与不加Cm, 人为地控制被克隆基因的表达水平, 也可使外源基因成为高表达型的, 既将外源结构基因克隆在多酶切点接头的任何切点上。pNQ122和pNQ113两者表达水平的差异, 说明这些质粒有可能适合于不同表达水平的克隆需要。这样可防止某些被克隆基因由于过高表达对受体菌带来的危害, 因而扩大了应用范围。质粒pNQ122已成功地应用于热稳定α-淀粉酶基因克隆的载体, 使α-淀粉酶基因在*B. subtilis*中得到表达^[20]。

枯草杆菌有较高的胞外蛋白酶活性, 因而外源基因产物易被降解, 难以达到高产的目的。为了解决这一问题, 已有人专门分离*B. subtilis*碱性蛋白酶和中性蛋白酶双重缺陷型, 而使外源基因产物的产量大大提高^[21]。另一方面, 已知*B. subtilis*蛋白酶是受分解代谢阻遏的诱导酶系, 当它含葡萄糖的培养基中生长时, 蛋白酶基因便不表达或表达水平极低, 使外源基因产物产量增加。质粒pNQ113中的外源启动区的转录活性不受葡萄糖效应的影响, 所以即使以野生型*B. subtilis*为基因克隆受体菌株, 预期也可达到外源基因高表达的效果。

参 考 文 献

- [1] Dubnau, D.A.: In "molecular Biology of *Bacilli*", Vol. I, Acad. Press, New York, 1982.
- [2] Ehrlich, S.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:1680—1682, 1977.
- [3] Gryczan, T.J. et al.: *J. Bact.*, 134:318—329, 1978.
- [4] Colletti, E. and Tomas, S.: *Plasmid*, 16:1—14, 1986.
- [5] Williams, D.M. et al.: *J. Bact.*, 146:1162—1165, 1981.
- [6] Maniatis, T. et al.: In *Molecular Cloning* Cold Spring Harbor Lab., New York, 1982.
- [7] Spizizian, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 44:1072—1078, 1958.
- [8] Kawamura, F. et al.: *Gene*, 5:87—91, 1979.
- [9] Chang, S.: *M.G.G.*, 168:111—115, 1979.
- [10] Messing, J. et al.: *Nucl. Acid Res.*, 9:93—103, 1982.
- [11] Gryczan, T.J. and Dubnau, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1428—1432.
- [12] Birboim, H.C. and Doly, J.: *Nucl. Acid Res.*, 7:1513—1522, 1979.
- [13] Silhavy, T.J. et al.: In "Experiments with Gene Fusion" Cold Spring Harbor Lab, New York, 1984.
- [14] Montengro, M.A. et al.: *M.G.G.*, 149:131—134, 1976.
- [15] Palve, I.: *Gene*, 19:81—87, 1982.
- [16] Ratchiff, W. et al.: *M.G.G.*, 168:165—172, 1979.
- [17] Shaw W.V.: *Methods in Enzymol.* Academic Press, Vol. 43, pp.737—755, 1975.
- [18] Hoshino, T. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44(11):2601—2603, 1980.
- [19] Mongkolsuk, S. et al.: *J. Bact.*, 155:1399—1406, 1983.
- [20] 蒋如璋等: 遗传学报, 14 (5): 323—331, 1987.
- [21] Wong, S-L. et al.: *J. Bact.*, 168:1005—1009, 1986.

CONSTRUCTION AND PROPERTIES OF EXPRESSION PLASMID IN *BACILLUS*

Jiang Ruzhang

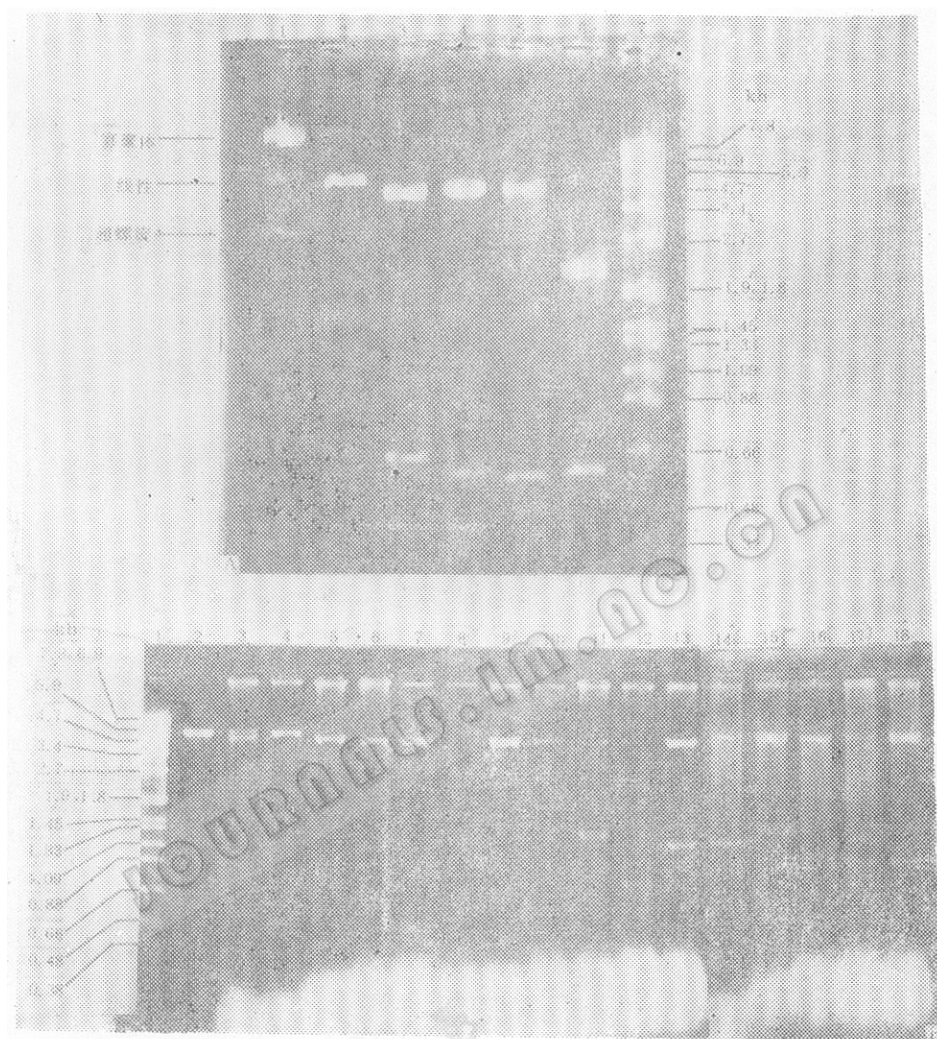
Qiao Mingqiang

(Lab. for Biotechnology, Dept. of Biology, Univ. of Nankai, Tianjin)

Expression plasmid pNQ122 (M.W. 3.2×10^6 dalton) and a series of plasmid pNQ113 (M.W. $3.1—4.1 \times 10^6$ dalton) which with two selection marker and multi-clonning sites were constructed. Resistant level of pNQ122 for Cm and expression level of cat-86 gene in the host strain *B. subtilis* AS 1.1176 are similar to that of pPL600. Resistant level of plasmid series of pNQ113 for Cm is higher than that of pPL600. And expression level of cat-86 gene of plasmid series of pNQ113 is 5 folds as high as that of pPL600 under both of inducible or non-inducible conditions. The cat-86 gene expression of pNQ113 is shown that they have no catabolic repression. And these plasmid can transfer stably from generation to generation in *B. subtilis*.

Key words

Bacillus; expression plasmid; inducibility; glucose effect



A. 质粒pNQ122琼脂糖凝胶电泳分析

Electrophoretic analysis of plasmid pNQ122 on agarose gel

- | | |
|------------------------------|------------------------------------|
| 1. pNQ122 DNA, uncut | 2. Hind III 4.8(kb) |
| 3. Hind III/EcoRI 4.15, 0.65 | 4. Hind III/Pst I 4.2, 0.6 |
| 5. Hind III/BamHI 4.2, 0.6 | 6. Hind III/Bgl II 2.15, 2.05, 0.6 |
| 7. SPPI DNA/EcoRI | |

B. 质粒pNQ123系列经EcoRI酶切琼脂糖凝胶电泳分析

Electrophoretic analysis of plasmid series of pNQ113 digested by EcoRI

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| 1. SPPI DNA/EcoRI | 10. pNQ113-20 DNA/EcoRI |
| 2. pNQ122 DNA, uncut | 11. pNQ113-39 DNA/EcoRI |
| 3. pNQ113-2 DNA/EcoRI | 12. pNQ113-66 DNA/EcoRI |
| 4. pNQ113-3 DNA/EcoRI | 13. pNQ113-88 DNA/EcoRI |
| 5. pNQ113-7 DNA/EcoRI | 14. pNQ113-89 DNA/EcoRI |
| 6. pNQ113-8 DNA/EcoRI | 15. pNQ113-90 DNA/EcoRI |
| 7. pNQ113-9 DNA/EcoRI | 16. pNQ113-96 DNA/EcoRI |
| 8. pNQ113-12 DNA/EcoRI | 17. pNQ113-163 DNA/EcoRI |
| 9. pNQ113-17 DNA/EcoRI | 18. pNQ113-108 DNA/EcoRI |