RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 494 718**
(A n'utiliser que pour les commandes de reproduction).

A1

# DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21) N° **81 04977**

(54) **Nouveau plasmide essentiellement pur et son procédé de production.**

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). **C 12 N 15/00 // C 12 B 1/54.**

(22) Date de dépôt..... 12 mars 1981.
(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *EUA, 21 novembre 1980, n° 06/208 861.*

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 21 du 28-5-1982.

(71) Déposant : Société dite : THE UPJOHN COMPANY, résidant aux EUA.

(72) Invention de : Shiau-Ta Chung.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Rinuy, Santarelli,
14, av. de la Grande-Armée, 75017 Paris.

L'exploitation de vecteurs plasmidiques utiles à la génétique de recombinaison de l'ADN parmi les micro-organismes est bien connue. L'éditorial paru dans "Science", volume 196, Avril 1977, donne un bon aperçu des recherches sur l'ADN. Cet éditorial s'appuie sur plusieurs articles parus dans le même numéro de "Science".

Des travaux similaires sur l'ADN sont effectués sur des micro-organismes importants pour l'industrie, appartenant au genre Streptomyces. (M.J. Bibb, J.M. Ward et D.A. Hopwood, 1978, "Transformation of plasmid DNA into Streptomyces at high frequency", Nature 274, 398-400). Bien que des ADN plasmidiques aient été décelés chez divers streptomycètes (M.L.B. Huber et O. Godfrey, 1978, "A general method for lysis of Streptomyces species", Can. J. Microbiol. 24, 631-632), (H. Schrempf, H. Bujard, D.A. Hopwood et W. Goebel, 1975, "Isolation of covalently closed circular deoxyribonucleic acid from Streptomyces coelicolor A3(2)", J. Bacteriol., 121, 416-421), (H. Umezawa, 1977, "Microbial secondary metabolities with potential use in cancer treatment (Plasmid involvement in biosynthesis and compounds)", Biomedicine 26, 236-249), (V.S. Malik, 1977, "Preparative Method for the isolation of super-coiled DNA from a chloramphenicol producing Streptomycete", J. Antibiotics 30, 897-899), un seul plasmide de streptomycète a été isolé physiquement et caractérisé en détail dans la littérature (voir Schrempf, ci-dessus). L'existence d'autres plasmides dans le genre Streptomyces a été déduite des informations génétiques rapportées, comme indiqué ci-après :

(1) H. Akagawa, M. Okanishi et H. Umezawa, 1975, "A plasmid involved in chloramphenicol production in Streptomyces venezuelae : Evidence from genetic mapping", J. Gen. Microbiol. 90, 336-346.

(2) R.F. Freeman et D.A. Hopwood, 1978, "Unstable naturally occurring resistance to antibiotics in Streptomyces", J. Gen. Microbiol. 106, 377-381.

(3) E.J. Friend, M. Warren et D.A. Hopwood, 1978, "Genetic evidence for a plasmid controlling fertility in an industrial strain of Streptomyces rimosus", J. Gen. Microbiol. 106, 201-206.

(4) D.A. Hopwood et H.M. Wright, 1973, "A plasmid of Streptomyces coelicolor carrying a chromosomal locus and its inter-specific transfer", J. Gen. Microbiol. 79, 331-342.

(5) K. Hotta, Y. Okami et H. Umezawa, 1977, "Elimination of the ability of a kanamycin-producing strain to biosynthesize deoxystreptamine moiety by acriflavine", J. Antibiotics 30, 1146-1149.

(6) R. Kirby, L.F. Wright et D.A. Hopwood, 1975, "Plasmid-determined antibiotic synthesis and resistance in Streptomyces coelicolor", Nature 254, 265-267.

(7) R. Kirby et D.A. Hopwood, 1977, "Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCPI plasmid of Streptomyces coelicolor A3(2)", J. Gen. Microbiol. 98, 239-252.

(8) M. Okanishi, T. Ohta et H. Umezawa, 1969, "Possible control of formation of aerial mycelium and antibiotic production in Streptomyces by episomic factors", J. Antibiotics 33, 45-47.

Le plasmide pUC2 peut être obtenu à partir du micro-organisme Streptomyces fradiae, NRRL 12323 déposé le 14 Novembre 1980. Ce plasmide peut être extrait du micro-organisme en question par développement de la culture sur un milieu convenable, fragmentation du mycélium, incubation du mycélium fragmenté, récolte de la culture après une période convenable, puis lyse du mycélium. Il est possible d'isoler le plasmide pUC2 essentiellement pur de ce lysat. Les sensibilités du plasmide pUC2 à diverses endonucléases de restriction doivent permettre sa modification aisée et doivent faciliter son adaptation à plusieurs systèmes de vecteurs-hôtes.

Le plasmide pUC2 est caractérisé par des tests normaux d'identification comprenant son poids moléculaire, d'environ 29,8 mégadaltons, un diagramme de restriction du type représenté sur la figure unique du dessin annexé et la présence de 1-2 éléments par cellule de S. fradiae NRRL 12323.

Le plasmide pUC2 est utile comme vecteur de clonage dans les travaux sur l'ADN dans lesquels des gènes désirés sont incorporés au plasmide, puis le plasmide est transformé en un hôte convenable.

La figure unique du dessin annexé reproduit le diagramme de clivage de pUC2 par les endonucléases de restriction. Le diagramme a été construit sur la base d'un poids moléculaire d'environ 29,8 ± 0,7 mégadaltons ou d'une longueur moléculaire d'environ 45,0 kilobases du plasmide pUC2. Les positions des divers sites de restriction sur le diagramme sont indiquées par les coordonnées en kilobases par rapport aux sites de restriction de Xba I établis à 0,0/45,0 kilobases. Les abréviations des endonucléases de restriction sont les suivantes : (1) Bgl II est un enzyme élaboré par Bacillus globigii ; (2) Hind III est un enzyme élaboré par Haemophilus influenzae ; et (3) Xba I est un enzyme élaboré par Xanthomonas badrii.

Micro-organisme

Le plasmide pUC2 peut être obtenu à partir de Streptomyces fradiae NRRL 12323. Cette culture biologiquement pure est disponible auprès de la collection permanente du Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, Etats-Unis d'Amérique.

Caractéristiques de pUC2

Poids moléculaire : environ 29,8 mégadaltons

Eléments par cellule : 1-2

Sensibilité aux endonucléases de restriction :

Le plasmide pUC2 a les sensibilités suivantes aux endonucléases de restriction (on se réfèrera à la figure unique du dessin annexé pour le diagramme de clivage de pUC2 par les endonucléases de restriction :

Sensibilités du plasmide aux endonucléases de restriction

| Nombre de sites de clivage | | Nombre de sites de clivage | |
|---|---|---|---|
| Enzyme | pUC2 | Enzyme | pUC2 |
| BamHI | 10 | Hind III | 2 |
| EcoRI | 0 | Kpn I | 10 |
| Pst I | ⩾ 11 | Xho I | 9 |
| Xba I | 2 | Sma I | ⩾ 12 |
| Bgl II | 4 | Bcl I | 5 |

Ces résultats ont été obtenus par digestion de l'ADN de pUC2 en présence d'un excès d'endonucléase de restriction. Le nombre de sites de restriction a été déterminé d'après le nombre de fragments pouvant être résolus dans des gels à 0,7 % ou 1,0 % d'agarose.

Le plasmide pUC2 peut être utilisé pour créer des plasmides de recombinaison qui peuvent être introduits dans des bactéries-hôtes par transformation. Le processus de création de plasmides de recombinaison est bien connu dans la pratique. Un tel processus consiste à cliver le plasmide-vecteur isolé, par exemple pUC2, en un ou plusieurs sites spécifiques au moyen d'une endonucléase de restriction, par exemple Hind III, Xba I, etc. Le plasmide, qui est une molécule circulaire d'ADN, est ainsi transformé en une molécule linéaire d'ADN par l'enzyme qui sectionne les deux chaînes de l'ADN en un site spécifique. Un autre ADN non-vecteur est clivé de la même façon par le même enzyme. Lors du mélange du vecteur linéaire ou de portions de ce vecteur et d'ADN non-vecteurs, leurs extrémités à une seule chaîne ou extrémités tronquées peuvent s'apparier l'une avec l'autre et, en présence d'un second enzyme appelé polynucléotide-ligase, elles peuvent s'attacher par covalence pour former un cercle unique d'ADN.

Le mode opératoire ci-dessus peut également être utilisé pour insérer un tronçon d'ADN d'un animal supérieur dans le plasmide pUC2. Par exemple, l'ADN qui code pour l'ARN de ribosome chez la grenouille peut être mélangé avec l'ADN de pUC2 qui a été clivé. Les molécules circulaires d'ADN résultantes sont formées du plasmide pUC2 avec un tronçon inséré d'ADNr de grenouille.

Les plasmides de recombinaison renfermant un élément génétique désiré, préparés en utilisant le plasmide pUC2, peuvent être introduits dans un organisme-hôte en vue de l'expression. Des exemples de gènes convenables qui peuvent être insérés dans des organismes-hôtes par le procédé décrit ci-dessus sont des gènes codant pour la somatostatine, la proinsuline de rat et les protéases.

L'utilité du plasmide pUC2 provient de son aptitude à se comporter comme un plasmide-vecteur chez des micro-organismes importants du point de vue industriel, par exemple du genre Streptomyces. Par conséquent, le clonage d'une information génétique provenant de Streptomyces dans le plasmide pUC2 constitue un moyen d'accroître la production de substances importantes du point de vue industriel par ces micro-organismes, par exemple des antibiotiques.

Cette approche est comparée au concept du clonage de gènes en vue de la production d'antibiotiques dans le système vecteur-hôte bien caractérisé d'Escherichia coli K-12. Le système de E. coli présente l'inconvénient que des gènes provenant de certains organismes Gram-positifs, par exemple du genre Bacillus, ne s'expriment pas correctement dans l'hôte E. coli Gram-négatif. De même, des plasmides provenant d'organismes Gram-négatifs ne subsistent pas dans des hôtes Gram-positifs, et l'information génétique du caractère Gram-négatif est ou bien médiocrement ou bien nullement exprimée dans des hôtes Gram-positifs. Cela démontre clairement l'avantage d'un système vecteur-hôte Gram-positif et plaide en faveur de l'utilité du plasmide pUC2 dans un tel système.

En général, l'utilisation d'un système vecteur-hôte pour former un produit étranger à celui de l'hôte nécessite l'introduction de gènes relatifs au processus entier de biosynthèse du produit dans l'hôte nouveau. Comme indiqué ci-dessus, cela peut engendrer des problèmes d'expression génétique, mais peut engendrer également des problèmes nouveaux et/ou accentués en ce qui concerne la fermentation des micro-organismes ainsi que l'extraction et la purification du produit. Une approche qui est peut-être encore plus utile

consiste à introduire un vecteur plasmidique, par exemple pUC2, dans un hôte qui élabore normalement le produit et à cloner sur ce plasmide les gènes relatifs à la biosynthèse du produit. Les problèmes de fermentation et les problèmes d'extraction et de purification du produit doivent tout au moins être minimisés. En outre, dans ce système de clonage, il peut ne pas être nécessaire de cloner et d'amplifier tous les gènes du processus de biosynthèse, mais plutôt de ne cloner que des gènes régulateurs ou des gènes qui codent pour les enzymes qui limitent la vitesse de biosynthèse du produit. Etant donné que le plasmide pUC2 est un plasmide de streptomycète, il convient très bien à de telles fins dans le genre Streptomyces. De plus, attendu que pUC2 est aussi un plasmide élaboré par un organisme Gram-positif, il peut servir de vecteur chez un certain nombre d'autres micro-organismes, par exemple des genres Bacillus, Arthrobacter, etc.

Streptomyces fradiae, NRRL 12323 peut être cultivé dans un milieu nutritif aqueux dans des conditions aérobies en immersion. L'organisme peut être cultivé dans un milieu nutritif contenant une source de carbone, par exemple un glucide assimilable, et une source d'azote, par exemple un composé azoté ou une matière protéinique assimilable. Des sources appréciées de carbone comprennent le glucose, la cassonade, le saccharose, le glycérol, l'amidon, l'amidon de maïs, le lactose, la dextrine, les mélasses, etc. Des sources appréciées d'azote comprennent l'extrait soluble de maïs, la levure, l'autolysat de levure de bière additionné de lait en poudre, la farine de soja, la farine de graines de cotonnier, la farine de maïs, le lait en poudre, le produit de digestion pancréatique de la caséine, la farine de poisson, les matières sèches de distillerie, les liqueurs peptonées animales, les déchets de viande et d'os, etc. On peut utiliser avantageusement des mélanges de ces sources de carbone et d'azote. Des métaux à l'état de traces, par exemple zinc, magnésium, manganèse, cobalt, fer, etc., n'ont pas à être ajoutés, du fait qu'on utilise de l'eau de ville et des ingrédients non purifiés comme composants du milieu avant la stérilisation de ce dernier.

On peut faire incuber le milieu inoculé à toute température favorable à un développement satisfaisant du micro-organisme, par exemple entre environ 18 et 50°C et, de préférence, entre environ 20 et 37°C. Ordinairement, la croissance optimale du micro-organisme s'obtient en une période d'environ 3 à 15 jours. Le milieu reste normalement acide pendant le cycle de croissance. Le pH final dépend en partie des tampons qui sont éventuellement présents, et en partie du pH initial du milieu de culture.

Lorsque la culture est conduite dans des récipients et des cuves de grande capacité, il est préférable d'utiliser la forme végétative plutôt que la forme de spores du micro-organisme pour l'inoculation, de manière à éviter un retard prononcé dans le développement du micro-organisme et, par conséquent, l'utilisation inefficace de l'installation. Il est donc désirable de produire un inoculum végétatif dans une culture en bouillon nutritif par inoculation de ce bouillon de culture avec une portion aliquote d'un tampon de gélose additionné de sol, conservé en azote liquide, ou d'une culture inclinée. Lorsqu'un inoculum végétatif actif jeune a été ainsi obtenu, il est transféré dans des conditions aseptiques dans des récipients ou des cuves de grande capacité. Le milieu dans lequel l'inoculum végétatif est produit peut être le même que celui qui est utilisé pour le développement du micro-organisme ou peut en être différent, du moment que l'on obtient une bonne croissance du micro-organisme.

Le procédé et les produits de la présente invention sont illustrés par les exemples suivants, donnés à titre non limitatif. Tous les pourcentages sont exprimés en poids et toutes les proportions de mélange de solvants sont exprimées en volume, sauf spécification contraire.

Exemple 1

Isolement du plasmide pUC2 d'une culture biologiquement pure de Streptomyces fradiae, NRRL 12323

Les spores provenant d'une culture biologiquement pure de Streptomyces fradiae NRRL 12323 sont inoculées dans 10 ml du milieu ci-après contenant 1 % de glucose, 0,4 %

de peptone, 0,4 % d'extrait de levure, 0,05 % de $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 % de $KH_2PO_4$ et 0,4 % de $K_2HPO_4$.

Le milieu a été préalablement stérilisé dans une fiole d'Erlenmeyer de 50 ml. Après l'inoculation, on fait incuber la fiole à 32°C pendant environ 24 à 36 heures sur une secoueuse rotative "Gump" ou "New Brunswick" fonctionnant à 100-250 tr/min. Lorsque l'incubation est terminée, on transfère 0,5 ml de la culture dans 10 ml du milieu ci-dessus contenant 0,5 à 2,0 % en poids/volume de glycine, dans une fiole d'Erlenmeyer de 50 ml. L'addition de glycine facilite la lyse subséquente des cellules. On peut faire varier la quantité de glycine dans le milieu par des réglages usuels en vue de faciliter la lyse subséquente des cellules. On fait ensuite incuber la fiole pendant encore 24 à 36 heures à 32°C sur une secoueuse rotative "Gump" comme ci-dessus. Après cette incubation, les mycéliums sont séparés du bouillon par centrifugation à faible vitesse, par exemple à 6000 x g pendant 15 minutes à 4°C, puis décantation de la liqueur surnageante du culot mycélien.

La liqueur surnageante est jetée et le culot est remis en suspension dans 1,5 ml d'un tampon isotonique, par exemple le tampon TES (tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane (tris) 0,03 M, EDTA 0,005 M et NaCl 0,05 M ; pH = 8,0) contenant 20 % en poids/volume de saccharose. On ajoute ensuite 0,3 ml de lysozyme à 5 mg/ml et 0,15 ml de RNase à 1 mg/ml dans le même tampon et on fait incuber le mélange à 37°C pendant 30 minutes en agitant, le cas échéant. Ensuite, on ajoute 0,6 ml d'EDTA 0,25 M (pH = 8,0) et on fait incuber ce mélange pendant 15 minutes à 37°C. On ajoute ensuite 0,3 ml de pronase à 5 mg/ml et on fait incuber le mélange pendant 10 minutes à 37°C. La suspension cellulaire est ensuite lysée par l'addition de 3,0 ml de sarkosyle à 2 % dans le tampon TES, puis incubation de ce mélange à 37°C pendant 20-30 minutes. Le lysat est ensuite cisaillé par passage 5 à 10 fois à travers une seringue sacrifiable de 50 ml, non pourvue d'une aiguille.

Ce lysat brut est ensuite mélangé avec un sel, par exemple le chlorure de césium (préféré) et le sulfate de

césium, ainsi que le colorant d'intercalation appelé bromure d'éthidium pour obtenir une solution de densité égale à 1,550. Cette solution est centrifugée à l'équilibre à 145 000 x g (centrifugation selon un gradient isopycnique de densité). L'ADN circulaire de plasmide fermé par covalence est alors visible dans le tube de la centrifugeuse avec un éclairage en lumière ultraviolette (320 nm) sous la forme d'une bande faiblement fluorescente au-dessous de la bande intensément fluorescente d'ADN chromosomique et plasmidique linéaires.

On prépare l'ADN plasmidique circulaire fermé par covalence en vue de sa caractérisation en le séparant des gradients isopycniques, en extrayant le bromure d'éthidium par deux traitements avec un tiers en volume d'alcool isopropylique, puis en dialysant la phase aqueuse vis-à-vis d'un tampon convenable, par exemple le tampon 0,1 X SSC (NaCl 0,015 M, $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ 0,0015 M ; pH = 7,4) pour obtenir le plasmide pUC2 essentiellement pur.

Méthodes de caractérisation de pUC2

La grandeur de pUC2 est déterminée par sédimentation dans des gradients neutres et alcalins de saccharose en utilisant comme indicateur interne un ADN plasmidique dont le poids moléculaire est égal à environ 28,0 mégadaltons et dont la valeur correspondante de sédimentation est d'environ 58S. D'après les gradients neutres de saccharose, on trouve une valeur de sédimentation de pUC2 de 64S. Le poids moléculaire de pUC2 est calculé d'après les équations de Hudson et collaborateurs (B. Hudson, D.A. Clayton et J. Vinograd, 1968, "Complex mitochondrial DNA", Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 435-442). Ce poids moléculaire concorde bien avec la valeur estimée d'après les gradients alcalins de saccharose.

On peut également estimer le poids moléculaire de pUC2 par l'examen au microscope électronique de molécules individuelles d'ADN (A.K. Kleinschmidt (1968), Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules, in "Method in Enzymology" (édité par S.P. Colowick et N.O. Kaplan), volume 128, pages 361-377, Academic Press, New

York). On trouve que le plasmide pUC1 a un contour de longueur moyenne égale à 15,2 ± 0,6 µm et un poids moléculaire correspondant de 29,8 ± 0,7 mégadaltons.

Le pourcentage d'ADN de plasmide dans Streptomyces fradiae NRRL 12323 a été déterminé par marquage de la culture à la (méthyl-$^{3}$H)thymidine, préparation de lysats bruts et centrifugation d'échantillons des lysats dans des gradients de densité chlorure de césium-bromure d'éthidium. Les gradients sont fractionnés, le comptage isotopique est effectué et le pourcentage de radio-activité dans la bande plasmidique est utilisé pour déterminer quantitativement l'ADN de plasmide et pour calculer le nombre d'éléments plasmidiques (R. Radloff, W. Bauer et J. Vinograd, 1967, "A dye-buoyant density method for detection and isolation of closed circular duplex DNA : The closed circular DNA in HeLa cells", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1514-1520).

Digestion par les endonucléases de restriction et électrophorèse sur gel d'agarose

Les endonucléases de restriction sont des préparations commerciales provenant des firmes Miles Laboratories et New England Biolabs. Les digestions enzymatiques ont été préparées conformément aux conditions spécifiées par les fabricants, en utilisant au moins deux fois la quantité nécessaire d'endonucléase.

Dans certains essais, l'ADN plasmidique a été digéré avec plus d'une endonucléase. Deux méthodes ont été utilisées dans ces essais. Dans la première méthode, l'ADN de plasmide a été digéré d'abord avec l'enzyme ayant les plus faibles besoins en force ionique, puis digéré avec l'enzyme ayant les plus forts besoins en force ionique après l'addition d'un volume égal de tampon 2X du second enzyme. Dans la seconde méthode, les fragments de restriction de l'un des produits de digestion enzymatique ont été isolés d'un gel préparatif d'agarose comme décrit par Tanaka et Weisblum (T. Tanaka et B. Weisblum, 1975, "Construction of a colicin E1-R factor composite plasmid in vitro : Means for amplification of deoxyribonucleic acid", J. Bacteriol. 121, 354-362). Les fragments de restriction isolés sont concentrés par précipi-

tation à l'éthanol, puis digérés avec d'autres enzymes de restriction. On a comparé des expériences de digestion double avec des expériences de digestion simple afin de s'assurer que des diagrammes anormaux de restriction n'étaient pas obtenus, c'est-à-dire qu'un clivage non spécifique de l'ADN par un enzyme n'apparaissait pas après modification de la force ionique du mélange en cours de digestion.

Les échantillons digérés ont été appliqués sur des gels à 0,7-1 % d'agarose et ont été soumis à une électrophorèse pendant 2 heures avec application d'une tension constante de 10-15 volts par cm de hauteur de gel (P.A. Sharp, J. Sugden et J. Sambrook, 1973, "Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis", Biochemistry 12, 3055-3063). Les poids moléculaires des fragments de restriction ont été déterminés par rapport aux diagrammes normaux de migration de l'ADN du bactériophage lambda digéré avec l'enzyme EcoRI (R.B. Helling, H.M. Goodman et H.W. Boyer, 1974, "Analysis of endonuclease R.EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis", J. Virology 14, 1235-1244).

L'étude décrite dans le présent mémoire a été entièrement effectuée en conformité avec les prescriptions physiques et biologiques spécifiées dans "NIH Guidelines".

**REVENDICATIONS**

1. Le plasmide pUC2 essentiellement pur qui est caractérisé par un poids moléculaire d'environ 29,8 mégadaltons et par un diagramme de clivage par les endonucléases de restriction indiquées sur la figure unique du dessin annexé.

2. Procédé pour isoler le plasmide pUC2 essentiellement pur de Streptomyces fradiae NRRL 12323, caractérisé en ce qu'il consiste :

(a) à cultiver S. fradiae, NRRL 12323 sur un milieu qui convient à son développement jusqu'à ce qu'une croissance mycélienne suffisante ait été obtenue,

(b) à fragmenter le mycélium,

(c) à faire incuber le mycélium fragmenté dans un milieu de culture convenable comme ci-dessus,

(d) à récolter la culture après une période convenable,

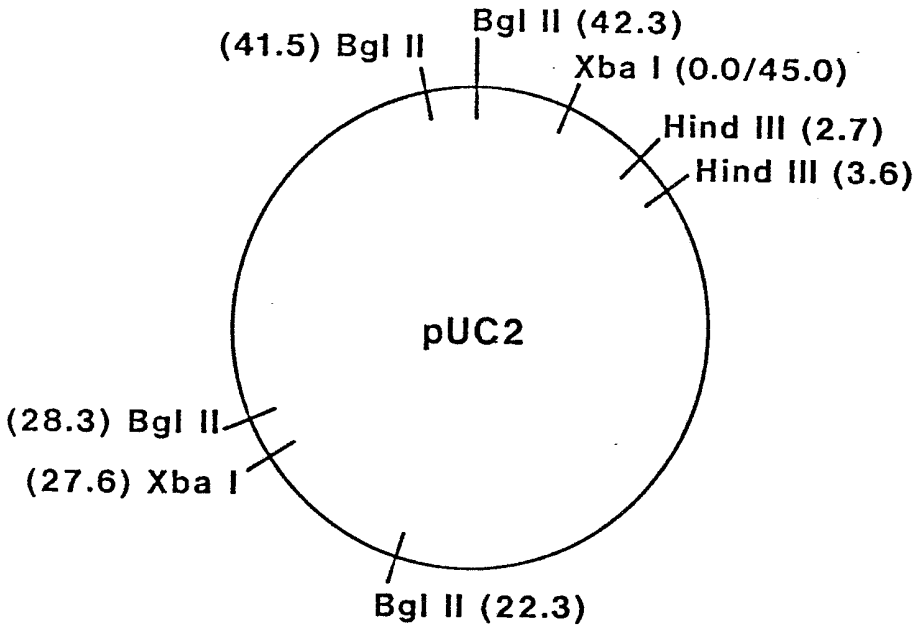
(e) à lyser le mycélium récolté, et

(f) à isoler du lysat le plasmide pUC2 essentiellement pur.

3. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver Streptomyces fradiae NRRL 12323 dans un milieu nutritif à une température d'environ 32°C pendant environ 24 à 36 heures.

4. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé en ce que le mycélium fragmenté est soumis à l'incubation dans un milieu de culture contenant de la glycine.

2494718


Bgl II (42.3)
(41.5) Bgl II
Xba I (0.0/45.0)
Hind III (2.7)
Hind III (3.6)
pUC2
(28.3) Bgl II
(27.6) Xba I
Bgl II (22.3)