

分子遺傳學實驗

Experiments in Molecular Genetics

遺傳工程基礎讀物

Jeffrey H. Miller 著

李國鏞 編譯

國立中興大學微生物學教授

藝軒圖書出版社印行

分子遺傳學實驗

Experiments in Molecular Genetics

遺傳工程基礎讀物

Jeffrey H. Miller 著

李國鏞 編譯

國立中興大學微生物學教授

藝軒圖書出版社印行



版權所有※翻印必究

號 第 字 著 內 照 執 權 作 著

局版臺業字第一六八七號
分子遺傳學實驗

定價新臺幣

480

元

編譯者：李

國

鏞

發行人：彭

賽

蓮

發行所：藝軒圖書出版

社

總經理：藝軒圖書公司

臺北市羅斯福路三段316巷3號

電話：三九六一七八二四

三九六一七八二五

郵政劃撥：一〇六二九二

印刷所：吉豐印製有限公司

板橋市三民路二段正隆巷46弄7號

中華民國七十三年三月

目 錄

緒論

簡介 lac 基因體系	1
本書內容安排的方式與材料的應用	4
專用名詞	5
菌株種類一覽表	10
 第一章 初步實驗	 16
第一章簡介	17
實驗 1. 活菌數的測定：細菌生長曲線	21
2. 噬菌體的製備與溶菌斑的測定	28
3. 突變菌株生長於指示培養基上的反應	42
4. 複印接種法	52
 第二章 雌菌與雄菌的交配	 57
第二章簡介	59
實驗 5. 表體的傳遞——直接篩選法	87
6. 間歇交配程序以及基因傳遞的時間	92
7. 利用傳遞梯度現象測定標誌基因在大腸菌染色體上的位置	100
8. Hfr 菌株傳遞始點的測定	104
9. 利用菌體對噬菌體敏感的特性測定其攜帶性別因子的情形	106
10. F ⁻ 擬表型的製備	110

11. 使用吡啶橙去除大腸菌體內的表體	113
12. 重組能力有缺陷的菌株對於表體的傳遞與重組作用的影響	116
第三章 致變作用及突變種的分離	119
第三章簡介	120
實驗13. 紫外線的致變作用	133
14. 亞硝基胍的致變作用	137
15. 架構修改致變物的致變作用：ICR191	143
16. 2-氨基嘌呤與亞硝酸的致變作用	148
其他的致變物及其致變作用：乙基甲烷磺酸鹽，脛胺，5-溴尿嘧啶， 亞硫酸氫鈉，Mu-1 噬菌體	152
17. 回復突變的測定	155
18. 分離 lac 操縱基因群的溫度敏感突變菌株	160
19. 分離 Lac ⁻ 與 i ⁻ 的自發突變型菌株	161
20. Lac 突變菌株的互補試驗——同一基因內的互補作用	171
21. 圖譜 Lac ⁻ 突變種的細部遺傳結構	180
22-24. 簡介 蛋白質多肽鏈的終止，極性現象與阻遏現象	185
22. 無意義突變菌株的分離	191
23. 阻遏菌株的分離	199
24. 測定 lac 操縱基因群的極性突變種	209
第四章 菌株的改造	217
第四章簡介	218
表體的傳遞	

實驗25. F' 因子的傳遞——適用於無法篩選的雌菌的條件	219
26. F' 因子的傳遞——適用於無法去除雄菌的情況	223
27. 含有溫度敏感表體的菌株的製造	227
28. 一般性轉運：利用 P1 噬菌體作為菌株改造的工具	233
29. F' 因子為媒介的染色體傳遞	239
30.—32.簡介 基因的標縱	244
30. 利用 P2 噬菌體分離大腸菌的 His ⁻ 菌株	250
31. 利用 Trimethoprim 篩選 Thy ⁻ 菌株	254
32. 抵抗纈氨酸與抗生素的菌株的分離	257
A 抵抗纈氨酸的菌株	257
B 抵抗寧格蘭素的菌株	259
C 抵抗利法必素的菌株	261
D 抵抗氨基青黴素的菌株	262
其他用於篩選的標誌基因	263
營養缺陷突變種的篩選	
33. 利用青黴素與氨基青黴素分離營養缺陷突變種	274
其他增進菌體純一的方法	279
34. 溫度敏感致死突變種的分離與圖譜	281
35.—36.簡介 製造 Hfr 菌株	297
35. 篩選染色體上含 F 因子的菌株	301
36. 改變 F ⁻ 菌株為 Hfr 菌株	305
A 改變一支 F ⁻ 菌株為 Hfr H	305
B 改變一支 F ⁻ 菌株為 Hfr C (Cavalli) 菌株	309
37. F' 因子的形成：利用 Rec ⁻ 菌株分離攜帶大腸菌不同基因的 F' 因子	312
38. 利用同基因關係改造菌株	319

第五章 噬菌體的轉運作用以及專屬性轉運噬菌體的分離	325
第五章簡介	326
實驗39. 專屬性轉運噬菌體的製造	329
實驗40.—41.簡介 遷移細菌的基因到噬菌體原接觸點的鄰近位置	339
實驗40. lac基因段落的移位	341
40.A 篩選DNA上含有F' lac的菌株	344
40.B 發生於ton B 基因的移位作用	348
41.A 遷移 λ DNA至細菌染色體上的新位置	351
41.B 綴合兩個基因的融合表體的篩選方法	361
42.A 篩選lac與trp操縱基因群融合的菌株	365
42.B 製備trp-lac融合菌株的trp R ⁻ 衍生菌株	376
第六章 λ h80d lac DNA的轉化作用與lac攜訊RNA的測定	381
實驗43. λ h80d lac 噬菌體的製備與 λ h80d lac DNA的轉化作用	382
44.—47.簡介	391
44. 自IPTG誘致的菌體分離活體內標誌的輻射性核糖核酸	393
45. λ plac DNA的分股	396
46. lac mRNA與 λ plac5 DNA的雜合	405
47. 測定lac mRNA的沉降常數	412
第七章 lac 操縱基因群諸酶的測定	417
第七章簡介	418

實驗48. β - 半乳糖苷酶的測定	419
49. 誘致 β - 半乳糖苷酶的時間過程	424
50. lac透膜酶的測定	428
51. 利用壓抑體與誘致物結合的方法測定 lac壓抑體	431
52. 利用壓抑體與操作基因結合的方法測定 lac壓抑體	435
53. 乙醯移轉酶的測定	440
54. α 互補作用的測定	443
 第八章 蛋白質的純化	 446
 第八章簡介	 447
實驗55. lac壓抑體的純化	456
56. 測定 lac壓抑體與 IPTG 的結合常數	467
57. β - 半乳糖苷酶的純化	471
 第九章 環狀 AMP, 異化代謝壓抑作用以及無細胞體系的酶合成	 480
 第九章簡介	 481
實驗58. 環狀 AMP 與異化代謝的壓抑作用	488
59. 對異化代謝物敏感的操縱基因群其無表現因子之突變種的篩選方法	491
60. 利用無細胞系統合成 β - 半乳糖苷酶	496
61. 無細胞系統的異化代謝壓抑作用	504
62. 無細胞系統合成 β - 半乳糖苷酶時的壓抑作用	506

附錄

附錄 I	公式與培養基配方	509
II	菌體交配中斷器的應用	516
III	大腸菌的遺傳結構圖	519
IV	基因圖譜的一般策略：圖譜吡多醇二生化合成基因的策略	531
V	λ 噬菌體的遺傳因子	535
VI	利用濾片法測定 lac 壓抑體	538
VII	可自大腸菌 K12 菌株體內篩選而得的 F' 因子	540
VIII	實驗物品供應公司與地址	541

簡介lac 基因體系

結構基因 (structure genes)

在大腸菌 (*E. coli*) 的染色體上，有三個連結在一起的基因形成乳糖 (lactose) 操縱基因群 (operon)。這三個基因中的兩個，控制菌體對於乳糖的利用。其中 *z* 基因控制 β -半乳糖苷酶的結構 (β -galactoside structure) (圖 1)，這種酵素專司乳糖分解為葡萄糖 (glucose) 與半乳糖 (galactose) 的職務。另外一個 *y* 基因，則指示透膜酶 (permease) 的合成，此後者負責體外乳糖向菌體內的運送工作。lac 體系的第三個基因是 *a* 基因，它的產物是硫代半乳糖苷乙酰移轉酶 (thiogalactoside transacetylase)。這個酵素既不影響乳糖的代謝又與菌體的生長無關，因此它在菌體內 (*in vivo*) 的功能迄今無法確定。上述的三個酵素的合成，均由同一的攜訊核糖核酸 (messenger-RNA, mRNA

) 轉錄 (transcribe)，因此構成一個操縱基因群 (operon)。有關這些酵素的詳細測定程序，請參閱本書第七章的內容。

壓抑體—操作基因的控制作用 (repressor-operator control)

lac mRNA 的合成，受到一種叫做壓抑體 (repressor) 蛋白質分子的管制。lac 壓抑體係 *i* 基因的產物，它在活化狀態 (active form) 能夠吸附於 DNA lac 操作基因 (operator, *O*) 的位置，因而阻止了 lac mRNA 的形成。這種阻礙現象，我們稱之謂 lac 操縱基因群的「壓抑」狀態 ("repressed")。lac 壓抑體會因為突變 (mutation)，或者與小分子作可回復性 (reversible) 的結合，而呈現非活化的現象 (inactivated)。在這個時候，壓抑體便與 DNA 分離而導致 lac mRNA 的形成與酵素的轉錄。這種現象我們稱之謂 lac 操縱基因群酵素的「誘致」 ("induced") 作用。乳糖的許多衍生物 (derivatives)，例如人工製造的 IPTG (isopropylthiogalactoside)，能夠與壓抑體結合而改變

圖 1. β -半乳糖苷酶分解乳糖為葡萄糖與半乳糖。

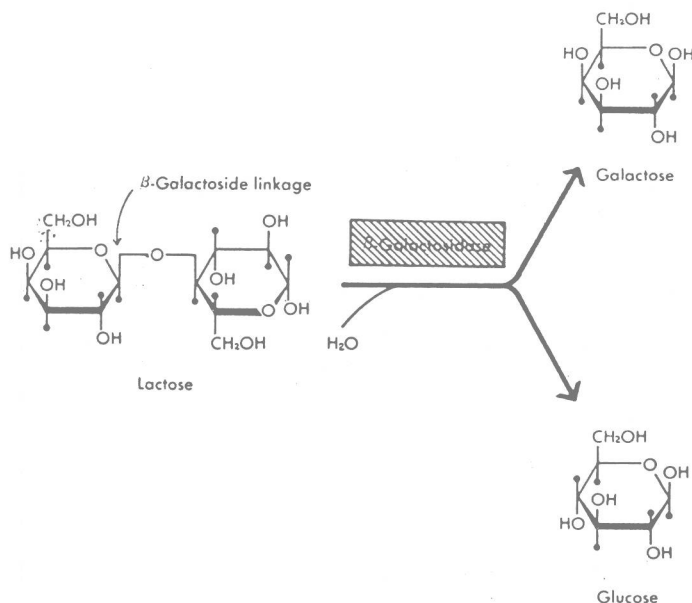


Figure 1. Cleavage of lactose by β -galactosidase. (Reprinted with permission from J. D. Watson, *Molecular Biology of the Gene*, 2nd Ed., W. A. Benjamin, Inc., New York.)

了後者吸附於DNA上的能力。這些物質於是都是「誘致物」("inducers")。IPTG 雖然能夠誘引酵素的產生，但是它的本身並不會被菌體所利用，因此它只能說是一種廣用的「徒勞無功的誘致物」(gratuitous inducer)。

菌體 i 基因突變的結果，會產生有瑕疵的 (defective) 壓抑體。這種壓抑體，不論有無誘致物的出現，都不能吸附於DNA上，致使 lac 酵素在菌體中得到全部的誘致與固有性 (constitutive) 的存在。不過這類的突變，大都屬於隱性 (recessive) 的類型，在有正常 i 基因 (i^+) 同時出現的場合，即 i^-/i^+ 二倍體 (diploid) 存在的情形，酵素的合成便轉為「誘致性」(inducible) (或非固有性，nonconstitutive) 的形態。不過有些 i 基因突變的結果，使 i^- 成為「反式—顯性」("trans-dominant") 的現象。在這種 i^- 基因存在的地方，縱使有 i^+ 出現形成 i^-/i^+ 二倍體，酵素的合成並不因此受到完全的抑制，於是成為局部固有性 (partially constitutive) 的局面。另外還有一種 i 基因的突

變，它使得基因成為 i^s 。 i^s 所產生的壓抑體，在結合誘致物之處，有了重大的改變，以致不能與乳糖或者 IPTG 發生誘致的後果。這種突變，使菌株失去合成 lac 酵素的能力而成為 Lac^- 的菌體。當 i^s 與 i^+ 同時存在的時候， i^s 為顯性而不受 i^+ 的改變。DNA 上的操作基因 (o) 亦會發生突變，稱為 o^c 突變。 o^c 突變也使有關的操縱基因群所控制的酵素成為局部固有性。由於其影響力只及於二倍體中同一 DNA 上的基因，因此特別命名為「順式—顯性」(cis-dominant) (以與上述反式—顯性影響二倍體中另一 DNA 上的基因情形有所區別)。關於突變基因的二倍體分析法其較詳盡的資料，載於實驗 20。

促進基因； 環狀 AMP 控制體系

lac 操縱基因群，以及另外的幾個操縱基因群，都受到環狀 AMP 控制體系 (cyclic AMP regulated system) 的牽制。當環狀 AMP 出現時，一種與其配合的蛋白質因子 (CAP) 便會活化 lac 操縱基因群，使後者作最高度的 mRNA 轉錄與嗣後酵素的形成。在沒有環狀 AMP 或者上述蛋白質因子存在的情況，lac 酵素的產生便大為降減。這種管制系統將於本書第九章中詳細討論。

在 lac 操縱基因群的前端，我們可以發現一個部位，稱謂促進基因 (promoter, p,) 的區域，它是決定基因開始轉錄的地點。促進基因的點突變 (point mutation) 會嚴重的影響 lac 酵素的合成。

圖 2. lac 操縱基因群的組成份子。

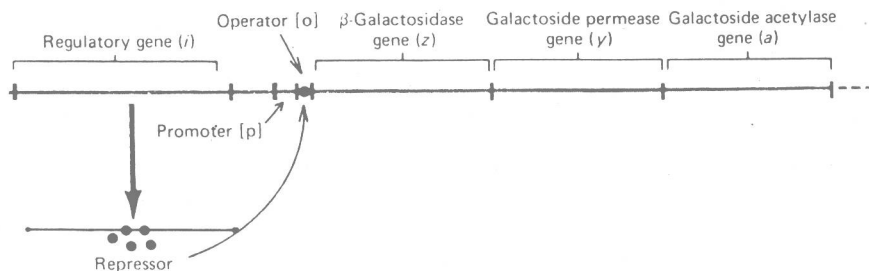


Figure 2. Genetic elements of the lac operon.

Reference

For detailed reading on the *lac* system, we refer the reader to
The Lactose Operon, J. R. Beckwith and D. Zipser, ed., Cold Spring Harbor
Laboratory, 1970.

本書內容安排的方式與材料的應用

課文中每一個實驗都依照理論介紹，所需菌株，實驗方法與實驗材料的先後順序敘述。在菌株這一項，我們不但提供各種備用菌株的基因型 (genotype)，並且還註明與實驗有關連的重要特性。

每一個實驗所需要的器材，除了有特別的規定之外，均為一人或者兩人一組的份量。

在方法與材料項目，我們為了避免重複地使用「殺菌」的字樣，在課文中，殺菌兩字於是甚少提及。但是所有應用於細菌培養與操作的器材 (試管、牙籤、絨布)，除非有特別註明，在使用前都必須先經殺菌的過程。在書後的附錄 (Appendix) 裡，我們備有液體與固體培養基的配方與製備的方法。LB 在一般情形是高營養成分的培養基，而磷酸鹽緩衝劑 (phosphate buffer)，稱謂 medium A 或 $1 \times A$ ，則是標準的低養分培養基，後者經常為液體，但是於加入洋菜 (agar) 以後便成為固體的培養基 (見書後附錄)。書中所提到的試管有兩種，其中 16-18 mm $\times$ 150 mm 規格的一種，我們稱之謂「試管」，另外較小的 13 mm $\times$ 75 mm 的一種，我們稱之謂「小試管」。對於新鮮的飽和 (saturated) 菌液，我們稱之為「過夜菌液」 (overnight culture)，或者簡稱為「過夜」 (overnight)。對於新鮮而正在快速成長的對數期 (log phase) 菌液，我們稱之為指數菌液 (exponential culture)。

專用名詞

基因型與表型

在介紹菌株的時候，我們必須區別它們的基因型 (genotype) 與表型 (phenotype)。基因型是菌株內在基因的組合，而表型是菌株外部可以觀察的特性。這兩種現象的表示方法，我們採納 Demerec et al (1966) 大多數的建議，決定沿用 Taylor 在 1970 年發表有關遺傳基因座 (loci) 的符號。這個體系，以三個斜體英文字母代表一個遺傳基因座，例如 lac 或者 met 各自代表一個基因座。這些基因座的細部，再以單一大寫的英文字母予以區分，例如 met A 與 met B 為 met 基因座中的兩個不同部份。基因座中如有突變 (mutation) 的現象，我們則用阿拉伯數字標明，例如 met 1，met A 2，met A 3 為 met 與 met A 基因部份的各種突變形式。

在遺傳方面，我們利用加號 (+) 代表野生種 (wild-type) 的形態，例如 met A 基因的野生型，我們以「met A⁺」或者「+」標明。但是在課文中於介紹菌株遺傳特性的時候，我們不準備把野生種的基因一一予以枚舉，僅就它們的突變型詳細開列。基因的突變型有些學者用減號 (-) 表示，例如以 trp⁻，his⁻，met A⁻ 代表這三個基因座上的突變狀態。在本書，除了 lac 體系用減號表明突變型以外，其餘的基因突變均不援用這種習慣，因此上述 trp，his 與 met A 的突變體僅以 trp，his 與 met A 表示。

F' 因子 (F'-factor)，或者專屬性轉運噬菌體 (specialized transducing phage) 所攜帶細菌基因的表示方式，也援用以上的規定，即野生型用 (+) 表示。因此，F' lac⁺ pro A⁺，B⁺ 代表 F' 因子所攜帶細菌的 lac 與 pro A，B 均為野生型，而 F' lac Z pro A⁺，B⁺ 代表 F' 因子攜帶的 pro A，B 為野生種，但是 lac 體系的 z 基因則為突變型。

菌株的表型可以用文字說明，或者用符號表示。在用符號的場合，我們也以英

文字母代表，但是它們不能用斜體字母，而且第一個字母必須要大寫。例如 Lac^- 代表菌株不能利用培養基中的乳糖（lactose）為唯一的碳源的意思，而 Met^- 代表菌株不能在無蛋氨酸（methionine）的培養基中生長等等。在表 1 中，我們可以找到許多實驗時必須使用菌株的基因型與表型的符號。有興趣的讀者，還可以在附錄 III (Appendix III) 與 Taylor 在 1970 發表的文獻中，獲得更多的資料。

阻遏基因

在表示阻遏基因（suppressors）的基因型與表型的時候，我們常常會覺得有一點兒難以分辨。這是因為在基因型方面，一個沒有阻遏基因的野生種菌株，我們以 sup^+ 表示，而以 sup^- 代表有阻遏基因的菌株。但是在表型方面，沒有阻遏基因的野生種係用 Su^- 的符號標明，因此有阻遏基因的菌株便成為 Su^+ 。為了避免混亂的發生，我們在表示一種菌株的基因型的時候，儘可能地不用 sup^+ ， sup^- 的符號，而代之以 $sup D$ ， $sup E$ 等符號。在這裡， sup 後面的大寫英文字母，各自代表一種阻遏基因，它因此與表型號誌後面的阿拉伯數字，例如 $Su 1$ 代表有阻遏特性的菌株的方法，頗易分辨。表 22A 詳載大腸菌各種阻遏基因的符號以供讀者參考。

表 1 本書中所載的各種基因型與表型符號

遺 傳 基 因 座 (<i>Genetic locus</i>)	表 型 符 號 (<i>Phenotype symbol</i>)	受 影 響 的 表 型 特 徵 (<i>Phenotypic trait affected</i>)
<i>ampA</i>	<i>Pen^r</i> , <i>Pen^s</i>	對青黴素或者氨苄基青黴素的抵抗性或者敏感性
<i>ara</i>	<i>Ara</i>	利用阿戊糖的能力
<i>arg</i>	<i>Arg</i>	對精氨酸的需求
<i>att λ</i>		λ 噬菌體併入細菌 DNA 之處所
<i>att ϕ 80</i>		ϕ80 噬菌體併入細菌 DNA 之處所
<i>cys B</i>	<i>Cys</i>	對半胱氨酸的需求
<i>gal</i>	<i>Gal</i>	利用半乳糖的能力
<i>his</i>	<i>His</i>	對組氨酸的需求
<i>ilv</i>	<i>Ilv</i>	對異白氨酸與結氨酸的需求

<i>lac</i>	<i>Lac</i>	利用乳糖的能力
<i>leu</i>	<i>Leu</i>	對白氨酸的需求
<i>mal A, B</i> *	<i>Mal</i> (λ^r)	利用麥芽糖的能力 (抵抗 λ 噬菌體的能力)
<i>met</i>	<i>Met</i>	對蛋氨酸的需求
<i>mtl</i>	<i>Mtl</i>	利用 D-甘露糖醇的能力
<i>nal</i>	<i>Nal^r, Nal^s</i>	對寧格蘭素的抵抗或者敏感性
<i>pro</i>	<i>Pro</i>	對脯氨酸的需求
<i>pur E</i>	<i>Ade, Pur</i>	對腺嘌呤的需求
<i>pyr C,F</i>	<i>Ura, Pyr</i>	對尿嘧啶的需求
<i>rec A, B, C</i>	<i>Rec</i>	對紫外線的敏感性，以及遺傳重組的能力。
<i>rif</i>	<i>Rif^r, Rif^s</i>	RNA聚合酶對於利法必素的抵抗性或者敏感性
<i>spc</i>	<i>Spc^r, Spc^s</i>	對斯比定諾黴素的抵抗性或者敏感性
<i>str A</i>	<i>Str^r, Str^d, Str^s</i>	對鏈黴素的抵抗性、依賴性、或者敏感性
<i>sup</i>	<i>Su</i>	無意義突變的阻遏體。關於阻遏體更詳盡的資料，請參看實驗22—24簡介
<i>thi</i>	<i>B1</i>	對硫胺素的需求
<i>thr</i>	<i>Thr</i>	對蘇氨酸的需求
<i>ton A</i>	<i>T1, 5^r, T1, 5^s</i>	對 T1, T5 與 ϕ 80 噬菌體的抵抗性或者敏感性
<i>ton B</i>	<i>T1^r, T1^s</i>	對 T1, ϕ 80 與大腸菌溶菌素 B, I, V 的抵抗性或者敏感性，Fe 的搬運
<i>trp</i>	<i>Trp</i>	對色氨酸的需求
<i>tsx</i>	<i>T6</i>	對 T6 噬菌體的抵抗性或者敏感性
<i>xyl</i>	<i>Xyl</i>	利用木糖的能力

* 有抵抗 λ 噬菌體能力的菌體，係 *mal A* 或者 *mal B* 基因突變的結果。

表型符號用以表示菌體與菌株的特性，而基因型的符號則用以表示單一的基因，一組的基因，或者特別的對偶基因 (*allele*)。

性別因子 (F factor)

依照 Demerec et al 的建議我們可以使用下列遺傳學的符號表示細菌的性別 (參閱第二章內容) :

- F⁻ 不攜帶性別因子, F⁺ 的菌株。
- F⁺ 攜帶性別因子的菌株, F 在菌體中處於獨立而能自行複製的狀態。
- F' 攜帶性別因子的菌株, F 因子上含有可確認的細菌染色體。
- Hfr 攜帶性別因子的菌株, F 因子與細菌的染色體合併為一。

噬菌體原——抗藥作用

我們用括弧 () 表示噬菌體原 (prophage) 基因型的符號, 因此 (λ) 為細菌的染色體帶有 λ 噬菌體 (phage) 的遺傳組織的意思。我們用 s 或 r 表示一種菌株表型對某種物體的敏感性或抵抗能力, 例如 Str^r 代表一種菌株對於鏈黴素 (streptomycin) 有抵抗能力, 而 Str^s 則表示一種菌株對於鏈黴素顯示敏感性。在課文中, 如果沒有其他特別的規定, Str^r 代表菌株能夠抵抗 200 μ g/ml 的鏈黴素。Rif^r 代表菌株能夠抵抗 100 μ g/ml 的利法必素 (rifampicin), 與 Nal^r 為菌株能夠抵抗 20 μ g/ml 的寧格蘭素 (nalidixic acid) 。

lac體系的專用名詞

lac 體系使用的符號與 Demerec 等人以及 Taylor 所主張的法則不相一致。它不承襲三個英文字母表示基因型的規定, 而以單一的英文字母, 例如 i, o, z, y, a 等作為代替。這種表示的方法, 雖然很容易轉變為 Demerec et al 的符號系統, 但是由於極大量的文獻已經長久地採用這種體制, 我們覺得還是不予改變為宜。此外, lac 體系, 在許多場合, 還有簡單明瞭的長處, 為 Demerec 等氏的方法所不及。例如 lac 體系的二倍體 (diploid), i^s/i^{-d}, 依照 Demerec 的規定應該是 lac 1694 / lac 124。這裡用 1694 代表 i^s 與用 124 代表 i^{-d}, 它們遠不