

遺傳工程手冊

高等細菌遺傳學

國立中興大學
微生物學教授
李國鏞譯

華香園出版社

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

遺傳工程手冊

高等細菌遺傳學

國立中興大學
微生物學教授
李 國 鏞 譯

斯坦福大學	Ronald W. Davis	合著
麻省理工學院	David Botstein	
猶他大學	John R. Roth	

華香園出版社

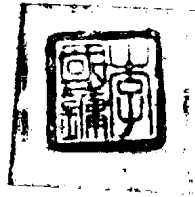
版 權 所 有

不 准 翻 印

中華民國七十三年九月出版

遺 傳 工 程 手 冊

高 等 細 菌 遺 傳 學



譯著者：李 國 鏞

發行人 施 弘 國

發行所 華香園出版社 (761-1001)
763-3000)

地 址 台北市松山路287巷11號四樓

特 價 國內新台幣 280元

劃 撥 0111000-0 華香園出版社帳戶

(前後爲“0”，中間三個“1”三個“0”)

A MANUAL FOR GENETIC ENGINEERING

Advanced Bacterial Genetics

Ronald W. Davis

Stanford University

David Botstein

Massachusetts Institute of Technology

John R. Roth

University of Utah

Cold Spring Harbor Laboratory
Cold Spring Harbor, New York 11724
1980



目 錄

序.....	1
緒言.....	4
菌株表.....	9
第一部份：實驗.....	15
1.分離有營養缺陷的 Tn <u>10</u> 插入突變種.....	16
2.位置於特定基因近旁的 Tn <u>10</u> 插入因子的分離方法.....	21
3. Tn <u>10</u> 所導致的缺失突變作用.....	26
4.局部致變作用.....	30
5.分離與刻畫由羥胺導致的 λ 點突變噬菌體.....	34
6. λ <u>amp</u> 噬菌體缺失突變種的分離.....	37
7.缺失突變的圖譜.....	39
8.利用互補作用篩選 λ <u>gt-his</u> 營養系.....	42
9.溶菌斑雜合法.....	47
10.膠體雜合法.....	51
11.利用電子顯微鏡觀察 DNA.....	53
12. λ 噬菌體內營養系 DNA 轉移至質體上的方法.....	55
13.利用 Tn <u>10</u> 引導 F' <u>ts lac</u> ⁺ 質體插入細菌的染色體中.....	57
第二部份：程序.....	61
1. 噬菌體溶菌斑的純化.....	62
I 菌株.....	62
II 下劃線法；上劃線法.....	62

III 挑選溶液斑·····	63
IV 測定噬菌體的數目·····	63
2. 噬菌體母液的製備·····	66
I 菌株·····	66
II 接種菌體與噬菌體於培養皿上的程序·····	66
III 收集噬菌體·····	66
3. 製備 P22 轉運噬菌體的簡易方法·····	69
4. 噬菌體的純化·····	71
I 利用 Beckman SW50.1 迴轉器進行氯化鈹階段密度梯度離心實驗·····	71
II 使用 SW50.1 迴轉器進行氯化鈹平衡密度梯度離心實驗·····	72
5. Tn10 的移位·····	75
I 製造 NK337 菌株的有瑕疵轉運噬菌體·····	75
II 添加 P22 的尾部於其頭部·····	76
III 移位因子的轉運·····	77
6. 由攜帶 Tn10 的菌株中篩選 Tet ^r 突變種·····	80
7. 利用紅色培養基測定攜帶 β -乳胺酶基因的 λ 噬菌體·····	82
8. 脛胺的致變作用·····	84
I 噬菌體或者營養系基因突變種的分離·····	84
II 利用噬菌體共同轉運的技術達成局部致變的效果·····	85
9. λ 缺失突變種的篩選·····	88
10. 在活體內進行噬菌體的重組與互補實驗·····	90
I 噬菌體標準的交配法·····	90
II 利用噬菌體的生長能力測定互補作用·····	91
III 利用斑點測驗法測定噬菌體 (λ 或者 P22) 突變種的互補作用·····	91
11. 抽取 λ 噬菌體 DNA·····	96
I 甲酰胺法·····	96
II λ DNA 的快速分離·····	98
III 利用可由溫度誘發噬菌體的 Sam7 潛溶菌製造 DNA·····	101

IV λ DNA 的分股	102
12. 質體以及細菌 DNA 的分離	104
I 大腸菌質體 DNA 的大量分離	104
IIA 利用菌落或菌液快速地分離質體 DNA 或者質體及菌體 DNA 的程 序	107
IIB 快速分離 10ml 菌液所含的質體 DNA	109
13. 排除 DNA - CsCl 溶液中的 Ethidium Bromide	111
14. 製造 λ gt 的雜種	113
I DNA 的斷裂	113
II 利用 T4 DNA 接合酶使 DNA 共價連接	113
15. λ DNA 於活體外裝入噬菌體	116
I 裝入程序	116
II 含有熱誘發噬菌體的菌液的製備	116
16. 利用 λ DNA 轉化感染菌體	120
I 生長菌體	120
II 處理菌體	120
III DNA 的轉化感染	120
IV 菌體的貯存	121
17. 利用大腸菌質體為媒介製造營養系 DNA	123
18. 質體 DNA 的轉化作用	125
19. 雜種噬菌體在大腸菌體內的互補作用	127
I 利用雜種噬菌體溶裂菌體的現象測定互補作用	127
II 利用雜種噬菌體與帮手噬菌體雙重潛溶的現象測定互補作用	128
20. 瓊脂糖膠體電泳	132
I 瓊脂糖膠體	132
II 瓊脂糖膠體中 DNA 的染色	135
III 膠體中核酸的照像法	136
IV 乙二醛膠體	138

21. 轉移DNA於硝化纖維或者重氮化濾紙上的程序.....	140
I 轉移瓊脂糖膠體中的DNA至濾紙上的程序.....	140
II 轉移 λ 溶菌斑中的DNA至濾紙上的程序.....	142
III 轉移菌落中的DNA至濾紙上的程序.....	145
22. 裂口轉移法製造 α - ^{32}P -標誌的DNA.....	147
I 作用程序.....	147
II 去氧核糖核苷三磷酸鹽(dNTP).....	148
III 去氧核糖核酸酶.....	148
IV ^{32}P 併入DNA之程度的測定.....	148
V 輻射性DNA的回收.....	149
VI 一般要點.....	150
23. DNA或RNA在固體上的雜合作用.....	152
24. 固體上 ^{32}P 的自動輻射照像術.....	155
25. 回收瓊脂糖膠體上的DNA.....	156
I 玻璃纖維濾片回收法.....	156
II 碘化鉀銜定密度梯度回收法.....	158
III 利用電泳促成膠體與經基磷灰石間DNA的轉移.....	158
26. 利用Ethidium Bromide 迅速估計DNA濃度的方法.....	160
I 瓊脂糖培養皿法.....	160
II 圓環上覆蓋塑膠紙的方法.....	160
27. 製備DNA的電子顯微鏡樣品.....	161
I 水溶液程序.....	161
II 甲醯胺程序.....	162
28. 形成雙股雜合DNA的一般程序.....	164
I 雙股雜合DNA的製造.....	164
II 製備雙股雜合DNA的電子顯微鏡樣品.....	164
29. λ cI857 <u>Sam7</u> 滑溶菌株體內酶類的抽取與純化.....	166
I 一般程序.....	166

II 大腸菌 594 溶菌液中 DNA 聚合酶 I 的純化程序	167
III 純化大腸菌 E1150 溶菌液中的 T4 DNA 接合酶	169
第三部份：附錄	171
1. 培養基，藥物濃度與補充營養	172
I 培養基	172
II 藥物濃度	177
III 補充營養	177
2. 營養缺陷突變菌株的鑑定	179
3. 細菌，噬菌體與 DNA 的貯存方法	181
I 細菌及噬菌體的貯存	181
II 貯存的程序	181
III DNA 的貯存	182
4. 緩衝液以及其他溶液	184
I 緩衝液	185
II 其他溶液及濃度	186
5. 透析膜袋的清洗與處理	188
6. 度量衡	189
I 微升之量	189
II DNA 的溶點溫度	190
III 離心的速度與時間	191
IV 單位換算	192
7. 利用限制酶修剪 DNA	193
I 方法	193
II 各種限制酶的特性	194
8. λ 噬菌體攜帶細菌 DNA 的能力	197
9. λ 噬菌體與 pBR322 質體的遺傳結構圖以及限制酶作用的位置	198

I	λ 遺傳結構圖與 λ 媒介噬菌體	198
圖 1	λ 遺傳結構圖	200
圖 2 — 3	限制酶的限制座	201
圖 4	λ gt1— λ B DNA 上的 <u>EcoRI</u> 限制座	203
圖 5	λ gt4 DNA 上的 <u>EcoRI</u> 限制座	204
圖 6	λ gt5— <u>lac5</u> DNA 上的 <u>EcoRI</u> 限制座	205
圖 7	λ gt7— <u>ara6</u> DNA 上的 <u>EcoRI</u> 限制座	206
圖 8	λ 607 DNA 上的 <u>EcoRI</u> 限制座	207
圖 9	λ sep 6— <u>lac 5</u> DNA 上的 <u>EcoRI</u> 限制座	208
圖 10	Charon 4 DNA 上的 <u>EcoRI</u> 限制座	209
圖 11	λ 590 DNA 上的 <u>Hind III</u> 限制座	210
圖 12	λ 760 DNA 上的 <u>Hind III</u> 限制座	211
圖 13	λ gt30—Ec6 DNA 上的 <u>Sal I</u> 與 <u>Xho I</u> 限制座	212
圖 14	λ gt40 DNA 上的 <u>Sst I</u> 限制座	213
II	PBR 322 的遺傳結構圖	214
圖 15	PBR 322 的遺傳結構圖	215
10.	組氨酸操縱基因群的缺失突變圖	216
11.	用於主培養皿製備的格子紙規格	217

序

在最近的五年中，分子遺傳學發生了一次革命性的大改變。導致這種革命性改變的三大要素為基因分離與操縱方法的建立，通稱為重組DNA(recombinant DNA)技術，以及移位抗藥因子(translocatable drug-resistance elements; transposons)的發現與利用。本實驗課本，旨在闡明這兩種新技術的應用，且以簡明的文字與恰當的安排，使任何具有細菌遺傳知識的分子生物學者，均能明瞭其內容。一般而言，本書是八年前出版的彌勒氏「分子遺傳學實驗」一書(J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, 1972)的延續(但並非其代替物)。上書所涵蓋的基本操作技術，在使用本課文前，讀者應該已有相當程度的瞭解。本實驗所採用的內容，也無一處重複上書所載的範疇。

企圖應用現代遺傳學的方法〔尤其是分子營養系培養的技術(molecular cloning)〕於其研究範圍的工作人員，其必然會遭遇到的問題，是如何獲得大量的細菌與噬菌體遺傳的基本知識與技術。我們希望經由本實驗課本(或者經由採用本課本的大學)，能使讀者對於這些必要的資料，有深一層的接觸與認識。

課本的基本結構，係供應同學們三週高級細菌遺傳學的課程。事實上，這種進度已經在冷泉灣實驗室(Cold Spring Harbor Laboratory)實行四年之久。本書在使用方面，我們可以預見能滿足數種不同的需要。其一，依據出版前各方索取散裝文獻的份數，使我們感覺到，它可用於研究實驗室作為實驗步驟的綱要。其二，我們希望本書可用作大學中研究所的實驗教材。在使用時，我們不難想見(事實上我們也如此建議)，校方會將本書與上述彌勒氏的課本的內容，作適當的挑選與合併。

使用 *Salmonella typhimurium* 為主要體材，是本書的獨特風格。此雖然反映著者的興趣與專長，但是也是為了教學的利益。*Salmonella* 與 *Escherichia coli* 的遺傳結構，在原則上甚為相似。可是，在移位因子的操縱上(

尤其是利用噬菌體轉運)，前者較後者為簡便。此外，更重要的是，在 *E. coli* 體內培養 *Salmonella* 基因的營養系，是各種分子營養系技術合理的模式。

Salmonella 的基因可望在 *E. coli* 體內（猶如某些酵母的基因）發生功能，但是由於二者 DNA 的同源關係（homology）並非十分密切，因此營養系基因與母體 DNA 間因同源關係所造成的重組問題也不很嚴重。目前許多的實驗，已能清晰地顯示，培養於 *E. coli* 體內的營養系基因，如利用遺傳操縱的程序，在活體外（*in vitro*）加以改變，此基因其後在 *E. coli* 體內的表現，可作為其在原來母體中基因的結構與功能分析的資料。因此，將 DNA 重組技術，適用於一種原本具有易於操縱的基因的生物如 *Salmonella* 確實大幅地強調了它既有的優點。

我們在此特別感謝 Peter Wensink 與 Jeffrey Miller，在冷泉灣實驗室，協助我們教授本書的前身，為本書之日後付梓鋪路。此外，本書如果沒有下列各位助理，在每個暑期辛勤的工作，也無完成的可能，因此也特於此表示謝忱。諸位助理的大名為：

John Carlson, Forrest Chumley, Peter Gergen, Mark Johnston, Douglas Koshland, Steven Lam, Barbara Meyer, Paul Riggs, Mark Rose, Tom St. John, Stewart Scherer, Molly Schmid, Dan Stinchcomb, and Fred Winston.

冷泉灣實驗室的職員們都很熱心與樂於幫助。尤其是在有困難的時刻，他們為我們解決了許多問題。其中，Ray Gesteland，以及後來 Jim Hicks，貢獻獨多，特此感謝。Ann Bushnell 教導同學們使用顯微鏡，Ann Strathern 組合菌株，Nancy Ford 與她的同事耐心地為我們整理本書的文稿，以及 Nadine Dumser 與 Marie Moschitta 為我們編輯及準備付印的最後手續與事宜，均功不可沒，專此申謝。

Alexander Kohn 容許我們使用一些他所持有的卡通圖畫於書本中，我們也在此向他致謝。這些原用以裝飾 Davenport 實驗室牆壁富創造性的圖畫，多年來一直為師生們增添不少樂趣。我們現在將它們分插在書中的各章節間，以供讀者欣賞。圖畫下方的文字，係由 Wacław Szybalski 惠賜。

我們也感謝下列的各公司，免費提供同學們實驗所需的材料：

Bethesda Research Laboratories; Inc., Rockville, Maryland; Boehringer-Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana; New England Biolabs, Beverly, Massachusetts; New England Nuclear, Boston, Massachusetts; and Schleicher and Schuell, Keene, New Hampshire.

最後，我們感謝 Jim Watson 在細菌遺傳學方面給我們的協助。這種學問，在現代分子生物學上繼續扮演著極其重要的角色。

R.W. Davis

D. Botstein

J.R. Roth

緒言

課文的組織與內容

本書共分為實驗，程序與附錄三部份。實驗部份包括十三個彼此關連的實驗，且以通俗的言辭描述其設計，原理以及為達到特定目的而備的方法。程序部份詳述實驗的各步驟。在有的時候，一個實驗還可能牽涉到幾個不同的程序。附錄的功用在於提供上述實驗與程序相關的參考資料。實驗與程序均有其討論的片段，在此後者，又包涵實驗的說明，理論及對進一步實驗與控制所必需的建議。

本書實驗的設計，在一般情況，力求解釋清晰與彼此關連。例如實驗7所建立的遺傳缺失突變圖（deletion map），係利用實驗8，9與12的內容，和實驗10完整的實際遺傳圖（physical map）比較而得。課文中的實驗，在操作上，並無一定的先後順序。在冷泉灣實驗室（Cold Spring Harbor Laboratory），這些實驗，以同時進行的方式，於三星期內全部完成。

雖然所有的程序都是為了配合實驗的需要，但是它們仍然能夠獨立存在，而且可以作為許多其他研究方面的用途。因此，在編寫程序一節時，我們儘可能保持其獨立性，使其能夠自給自足。課文纂寫的格式（physical format）着重實驗時使用的方便，例如，我們將操作步驟與理論分離，然後把理論納入討論部份，而將操作步驟歸於程序部份，其目的在於使本書的程序，除了適用於一般的實驗之外，同時有助於研究室工作的進展。

我們在課本中還列出實驗與程序有關的各種菌株。在某些場合〔例如在 λ 媒介（vector）體內建立營養系（clone）〕，我們為同一的步驟提供多種可資選擇的菌種，而實驗的本身則只有一支菌株的需求。上述各種菌株與噬菌體，均可自冷泉灣實驗室，以整套出售的方式，購得。

實驗的安全措施與限制規定

課文中大部份的實驗，都以 *Salmonella typhimurium* 為對象。 *S.*

typhimurium strain LT2（實驗菌株的主要來源），雖然是一支能夠導致吾人腹瀉的病菌的後代，但是經過實驗室多年的培養之後，已經失去致人於病的能力。該菌在實驗室長期使用的期間，迄無引起人體疾病的前例，而其類似的菌株（例如 LT7 與 1559）感染工作人員的事件則每有所聞。LT2 感染白鼠的能力也有相當程度的減弱，不過大量的菌體仍可致後者於死命。

因此，所有實驗的程序，都必須依照細菌學的要求，謹慎地執行。培養的細菌，以及與細菌接觸的玻璃器皿，必須在清洗前殺菌。廢料（如培養皿），也必須在丟棄前殺菌或者焚化。用吸管以口吸移稀釋的菌液，雖然不在禁止之例，但是還是避免用口吸取任何菌液，或者噬菌體的溶菌液為宜。

S. typhimurium，猶如 *E. coli*，是衆所周知能夠產生 DNA 重組菌（recombinants）的微生物。正因為如此，美國國家衛生局（National Institute of Health）特別為此訂定了重組 DNA 研究事宜的管制條例（Recombinant DNA Research Guidelines）。但是本書課文中部份的 DNA 重組實驗，依其性質，不在上述條例限制的範圍，因此沒有特別設防的必要。儘管如此，我們仍然以處理 *Salmonella* 般的審慎態度對待實驗中產生的重組菌。

課本中的實驗，如果需使用 *Salmonella* 以外的菌株，作為 DNA 重組的來源，我們在實驗前，必須參考上述美國國家衛生局（NIH）的規定，以確定使用的菌株是否需要額外的防患措施。我們使用於 DNA 重組實驗的細菌，都是 *E. coli* K12 的衍生菌株，其不為 NIH 列為禁用者，僅需於實驗時作 P1 程度的管制即可。

菌株與突變種的命名

在今天，我們已經有一種為 *E. coli* 和 *Salmonella* 的遺傳菌種（genetic stocks）命名的一貫系統。此系統由 Demerec 等人創建（1966），稍後 Campbell 與其同仁（1976）以及 Chumley 等氏（1979），為插入 DNA 的因子修改且增加了上述系統命名的符號與法則。Bachman 與 Low（1980）則為 *E. coli* 的突變種的代表符號，以及其在遺傳圖上的位置，做成摘要

，而 Sanderson 與 Hartman (1978) 為 *S. typhimurium* 做了類似的貢獻。命名的基本原則：每一支菌株，不論突變基因的多寡，均給予一個菌種編號 (stock number)。此編號即代表一特定菌株。在實際上，菌株編號通常由兩個大寫字母 (代表其實驗室)，和此菌在實驗室中收存時排列的次序號碼表示。例如 TR248 * 是一支含有 hisC527 與 cysA1349 兩種突變基因的菌株，其為 John Roth 的實驗室所有。新的菌株，在命名時，必須利用兩個此前未經使用的英文字母的組合，作為代號。

*譯者註：TR 為實驗室編號，而 248 為排列次序號碼。

每一個突變基因座 (locus) 以三個斜體的英文字母表示 (如果不用斜體，則在字母下畫一橫線)。此三字母代表基因的大概表型特性 (phenotype) 或者分離的方法。〔例如影響組氨酸 (histidine) 生化合成的突變種以 his 為代號，即為一例〕。在上述基因座中之單一基因，或者影響此生化機能之單一基因，我們在上述三字母後加一個大寫的斜體字母。〔例如，在組氨酸生化合成途徑中，控制轉氨酶 (transaminase) 產生的 hisC 基因〕。

基因座中的各單一突變，依其次序，以數字表示。每一個基因座都各自有其數字之序列，置於代表基因座的三個字母的後端。(例如，hisC527 係指影響 hisC 基因的一個突變。其他的 his 基因座中的突變，不論其影響者為此基因座中之何基因，都不能再使用 527 這組數字)。

在課本中，我們時常要標明菌株的表型 (phenotype) 特性，以與菌株的基因型 (genotype) 有所區別。表型簡化的表示方法，是利用非斜體的英文字母，而其第一個字母必須大寫。〔例如，TR251 菌株，其基因型為 (hisC 527 cys A 1349 sup D)，是一支 his C 與 cys A 基因的突變種。但是其表型則為 Cys⁺His⁺，是野生種 (wild type) 的形態。這是因為這支菌株另外帶有一個 sup D 阻遏基因 (suppressor) 的緣故，此後者阻遏菌株內在的 his C 與 cys A 突變，而使其呈現 His⁺Cys⁺ 野生種的外在特性〕。

為了移位因子 (transposable elements) 的命名，我們需有額外的符號與表示方法。其中關係插入突變 (insertion mutations) 的部份，我們沿用三個字母連接一組數字的命名法如前述。但是對於插入的物質，我們另外用