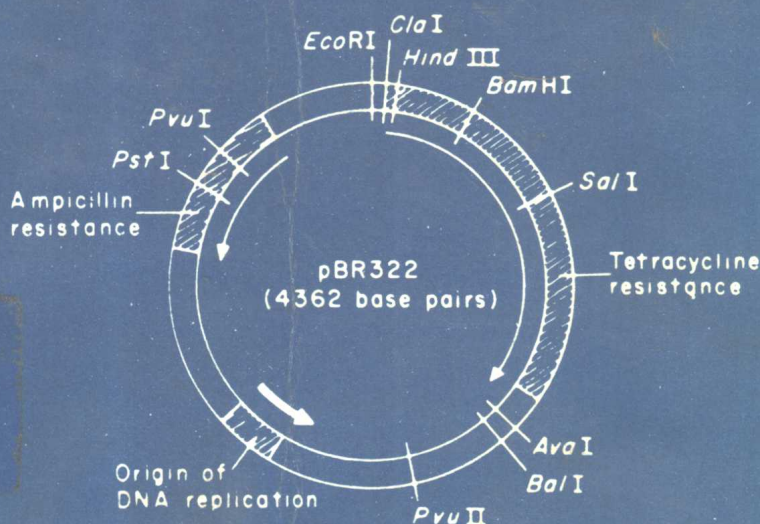


遺傳工程入門

(第二版)

曾義雄 編譯



藝軒圖書出版社印行

遺傳工程入門

(第二版)

曾義雄 編譯

藝軒圖書出版社印行

版權所有※翻印必究
著作權執照台內著字第 號

新聞局出版事業登記證

局版台業字第一六八七號

遺傳工程入門(第二版)

定價新台幣 二元整

編著者：曾 義 雄 編 譯

發行所：藝 軒 圖 書 出 版 社

臺北市羅斯福路4段50號2樓之2

電 話：三九六——七八二四

三九七——二六一二

發行人：彭 賽 運

總經理：藝軒圖書文具有限公司

臺北市羅斯福路三段316巷3號

電 話：三九六——七八二四

三九六——七八二五

郵政測撥：〇一〇六二九二一八

印刷所：永美美術印刷製版有限公司

臺北市莒光路一一一號

中華民國七十四年元月
中華民國七十六年六月再版

二版原序

自從筆者編寫本書第一版以來，基因操作方面已有若干新進展，凡此均已收入本版書中。大體而言，本書第一版頗受歡迎，因此吾人不擬改變編著本書之基本態度——提供基本原理之細節，俾非專家讀者也能了解現有文獻。筆者希望連專家都會覺得本書是有用的參考資料之來源；爲了達到此目的，筆者加編了一些附錄，詳列鑑識酶之切割部位以及一些常用選殖載體之鑑識圖譜。如同第一版序言所述，筆者假定讀者已具備基本分子生物學知識，但因本領域進步異常快速，乃更加擴大術語篇。

在第一版序言中，筆者曾謂「……筆者期望本書內容不致於太快過時，且其資料在未來的一段時日仍能提供基因操作之大要。」在這一方面，筆者自認成功，因爲除了一些例外的情形，第一版之內容仍屬正確。事實上，第一版之資料仍有幾個部份收入本版中。本版主要的改變有：選殖於植物之可能載體全章改寫，新添一章全部介紹 *Bacillus subtilis* 與酵母菌之選殖系統，以及最後一章詳述基因操作的新應用。作者既無意一再改寫本書，因此希望本書題材正趨於大定且其內容並不致過時。

最後，筆者要感謝 Alan Kingsman、Jan-Ingmar Flock、Bill Tacon、Roger Hull 與 Angus Hepburn 所提供的有益批評，使各章得以改進；其餘若仍有誤，責任應由筆者自負。最後，也要深謝 Carolyn Alderson、Dianne Simpson、

Malcolm Davies 與 Len Bulmer 理稿及 Marilyn Nugent 校稿。

R. W. Old

S. B. Primrose

二版譯後

在譯者所接觸到有關遺傳工程的書籍當中，還沒有一本勝過本書。本書二版比一版更添加了不少資料，因此益見完善。譯者願意犧牲公餘休閒，勉力以赴，譯介二版即係因本書可以給讀者極大的幫助之故。

誠如作者在序中所述，本書題材已趨大定，因而不致太快過時。譯者願以一個實際工作人員的身份來為作者做見證，請讀者放心參考書中的基本原理及文獻。至於最新的發展可在附錄七所列書籍及期刊中找到，而一些新的應用情形則可閱讀如McGraw-Hill's Biotechnology Newswatch、Applied Genetic News、Biotechnology News、Biotechnology等報導性的雜誌。

民國七十三年七月十二日於
國立中興大學遺傳工程中心

譯者的話

近十年來，由於遺傳工程技術之應用，生物科學之進展日新月異。然而，相信有許多人仍然不了解什麼是遺傳工程。

譯者在五年前由於深感此一發展已成定局，乃極力涉獵最新書刊，嚐試引進此一新技術，以供解決一些基本研究上的問題。其間曾接觸到一些很有用的專著，供實驗上的摸索。但卻沒有一本是簡單扼要，且能深入淺出做通盤介紹的。後來，於六十九年夏天，趁國科會資助赴美參加美國微生物學會年會之便轉往拉格斯大學（Rutgers）進修三個月，臨回國前才在圖書館讀到此書之原文版。當時一讀，頗有愛不釋手的感覺。回國之後，正想匯款購買之際，藝軒的董水重先生卻適時送來此書，真是喜出望外。本書原版經譯者當作植物研究所分子生物學之教本後，愈覺其提綱挈領、深入淺出，值得廣為介紹。乃於去年暑假勉強抽空，譯成中文，以供需要的同好參考。

兩年來，由於政府及學界之重視，曾舉辦過數次有關遺傳工程原理及技術的研討會。而每次參加的人數都可以「爆滿」來形容，是非常可喜的現象。本校李校長崇道高瞻遠矚，到任以來也以遺傳工程為發展重點之一。去秋更命譯者籌組遺傳工程中心，以集中力量，加速發展。譯者遂譯本書且聊作本中心起步工作之一小部份，希望對遺傳工程在國內的發展能有一點小小的幫助。

最後，譯者不揣譾陋，意在拋磚引玉。雖奮力而為，疏誤之處必所難免，還望方家不吝指正。此外，書中有許多譯

名因無前例，只好自擬。若有不妥之處也請原諒。

七十二年元旦於
國立中興大學遺傳工程中心籌備處

一版原序

生物學之進展正當突飛猛晉，其速度之快有增無減。本書之題材——基因操作（或一般喜稱為遺傳工程者）即為其中之一。由於進步之異常快速，多數生物學家均感無法跟上現階段之發展。而且在這方面，俚語之隨意使用更已亂人頭緒。然而，正如同所有蓬勃之學門，交待清楚的專書總須待相當時日之後才能出現。筆者撰寫本書之目的，即在於填補此一真空。

現階段基因操作之基本技術，已達規模粗具之際，而正趨向於將其應用，以解決各種難題。因此，筆者擬致力者為提供讀者有關此等基本技術之細節，俾能了解現有文獻及未來之發展。本此初衷，筆者期望本書內容不致於太快過時，且其資料在未來的一段時日仍能提供基因操作之大要。

本書之內容取材於基因操作課程之二十個講義。該課程係供華維克大學（University of Warwick）之生物學、微生物學與生物化學攻讀學位之學生修習者。本書擬當作大學部高年級學生及生物學研究人員之導論；因此，筆者假定讀者業已具備基本分子生物學的知識。文獻之引用，目的在於指出本書題材之主流，以及將研究成果歸功於最早的研究者；而引用的日期也晚至1979年6月為止。然而，以本書之袖珍，實無法涉及每篇文章之細節。筆者對範例之選用係憑感覺，以最足以說明各該題目者為例；因此，希望此舉不致於開罪實驗結果未受到引用之作者。

最後，筆者樂意感謝Debbie Brown女士及Dianne Simp-

son 小姐將筆者的潦草字跡打字成稿，以及 Malcolm Davies
編輯及核對所有之參考文獻。

1979年 8 月

R. W. Old

S. B. Primrose

縮寫與換算比例

琥珀 (amber, 爲一種突變) = *am*

dihydrofolate reductase = DHFR

DNA 黏接酶基因 = *lig*

仟氮基 (kilobases) = kb

百萬道爾頓 (megadaltons) = Mdal.

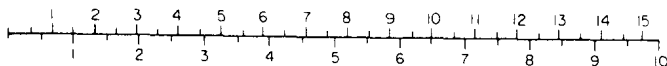
分子量 = mol. wt.

溶斑形成單位 (plaque-forming unit) = pfu

溫度敏感 (temperature-sensitive, 爲一種突變) = *ts*

複式DNA之氮基對與分子量間之換算比例

仟氮基對



百萬道爾頓

目 錄

第 一 章	導 論	1
第 二 章	切割及黏接 DNA 分子	15
第 三 章	質體當作選殖於大腸桿菌之載體	35
第 四 章	供選殖於大腸桿菌以外的微生物之質體載體	61
第 五 章	噬菌體與 Cosmid 載體	89
第 六 章	選殖的計策	113
第 七 章	重組體之選拔及特徵之記述	119
第 八 章	經選殖之 DNA 分子的表現	133
第 九 章	選殖於哺乳類細胞中	153
第 十 章	供選殖 DNA 於植物之可能載體	175
第十一章	重組 DNA 研究之牽連及應用	201
附 錄 一	基因操作使用之酵素	217
附 錄 二	常用鑑識內核酸酶類之性質	221
附 錄 三	由質體 pBR 322 之核苷次序所推演出來的有用資料	231
附 錄 四	λ 噬菌體之鑑識酶切割圖譜	237
附 錄 五	質體 pC194, pE 194 與 pUB 110 之切割圖譜	239
附 錄 六	M13 mp 7 RF DNA 之鑑識酶切割圖譜	241
附 錄 七	建議的讀物	243
術 語		245
參考文獻		253
索 引		269

第一章 導論

緒言【INTRODUCTION】

基因操作 (gene manipulation) 一詞對不同的人而言代表著不同的意義。有些人可能會把它看成一般以大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 為材料的遺傳學家所進行的遺傳實驗操作。但大部份的人則把它的範圍看得更廣些。事實上，在西方國家，基因操作有它明確的法定定義 (a precise legal definition)，由政府立法來管制它 (見第 10 章)。在英國，基因操作的定義是：在細胞外，利用任何可行的方法，將核酸分子嵌接 (insert) 至病毒、細菌之質體或其他載體 (vector) 上，而後將之納入 (incorporate) 於寄主細胞內，成為一新的 (原非自然存在的) 具遺傳能力之組合體，其後且能在寄主細胞內繼續繁殖。

此一定義為其他國家所引用後含意仍大同小異，亦為本書之主題。但為充分了解其定義起見，此處必須一述早期在這方面的實驗。

早期之實驗【The Early Experiments】

有些種別 (species) 的細菌能藉轉形作用* (transformation) 攝入 (uptake) 外加的 DNA。能被轉形之細菌品系 (

*動物細胞由正常生長突然轉變成癌細胞的生長方式稱為細胞轉形作用 (cell transformation)，此將於第 9 章提到，勿與此處之細菌細胞之轉形作用混為一談。

strain) 在攝入 DNA 時大多不在乎 DNA 是否來自於其近緣種別。因此，想將 DNA 送入細菌就比較容易。這類實驗中最早的記錄為 Abel & Trautner (1964) 所做，以 poxvirus 之 DNA 轉形 *Bacillus subtilis* 之勝任細胞 (competent cells) 後產生有感染力的 (infectious) 病毒後代。然而，據現有有關 poxvirus 繁殖情形的知識來看，此等實驗結果應屬訛差。

有很多實驗室報告過以動、植物細胞攝取外加 DNA 的實驗，且其方式大同小異。大多係以經放射標幟 (labelled) 之細菌或病毒 DNA 供予動、植物細胞。而前者之浮力密度 (buoyant density) 有異於後者之 DNA。如果具前者密度之 DNA，經過一段時間後仍然存在，即表示其至少以部份完整的方式持續存在於寄主細胞內。有時，會觀察到放射性出現在相當於寄主 DNA 之浮力密度中。此種情形可能代表有少量外加 DNA 已整合 (integration) 於寄主染色體上，但更合理的解釋可能應是外加 DNA 已被寄主細胞分解而其產物被納入 (incorporated) 寄主染色體內。

以真核細胞攝取 DNA 的實驗大部份源於 Ledoux 之實驗室 (Ledoux & Huart 1968, Ledoux *et al.* 1971)。早期他們把大麥種子去殼，表面消毒，自距胚較遠的一端切下 1 mm 厚，然後與由細菌 *Micrococcus lysodeikticus* 抽取之標幟 DNA 一起浸泡，經 72 小時之後，再將其取出，抽出其 DNA，發現有密度為 1.712 g/cm^3 之 DNA。此類 DNA 之密度有異於大麥 DNA 之 1.702 g/cm^3 及 *M. lysodeikticus* DNA 之 1.731 g/cm^3 。之後把此 DNA 以超音波打碎，分離到二種不同密度之 DNA，分別相當於大麥及 *M. lysodeikticus* DNA 之密度，顯示此雜體 DNA (hybrid DNA) 曾以共價鍵相連接。利用 *Arabidopsis thaliana* (

一種小雜草) 幼苗組織供作寄主之類似實驗中，處理後所得之 F_1 子代具中庸密度之 DNA，若再以更多 *M. lysodeikticus* DNA 處理，會造成比 F_1 密度更高之 DNA。此種 DNA 密度增加之情形可藉逐代重複處理而得到浮力密度越來越高之 DNA (圖 1.1)。而在各次攝入處理後，再以超音波處理，又可得到相當於原寄主及外加 DNA 密度之 DNA。

有許多人曾試圖重複 Ledoux 等人之實驗，但大多無法成功。例如 Kleinhofs 等人 (1975) 利用生長的植物為寄主細胞時即無法觀察到密度大小居中 (intermediate) 的 DNA 峯，但若在實驗中遭受細菌污染者，則反而能觀察到，因此，外加 DNA 似並未真正進入到寄主細胞之染色體中。在 Ledoux 等人的實驗中，最大的難題在於追蹤外來 DNA 的去向。顯然，利用密度梯度離心 (density gradient centrifugation) 並無法得到理想的結果。目前已有更靈敏的方法 (例如南方吸漬法，見第 8 頁)，大大地促進了這一方面的發展。

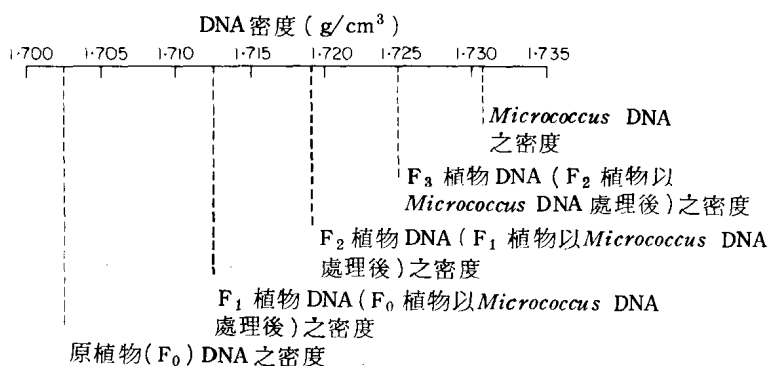


圖 1.1 *Arabidopsis thaliana* 與 *Micrococcus lysodeikticus* 雜交後代之 DNA 密度。見文中細節。

基因轉移【Transgenesis】

基因轉移 (transgenesis) 一詞係 Doy 等人 (1973) 首創，用以描述轉導噬菌體 (transducing phages) 把細菌之基因轉入真核細胞之過程。有四個研究群的人曾經報告過此類實驗：Merril 等人 (1971) 取半乳糖血症 (galactosaemia) 病人之成纖維細胞 (fibroblast) (半乳糖血症係因缺乏 galactose - 1 - phosphate uridyl transferase 而起)，將之以 λ gal^{T+} 或 λ gal^{T-} 感染 (T 表 transferase)。然後藉偵測噬菌體 RNA (phage-specific RNA) 之合成及 galactose - 1 - phosphate uridyl transferase 活性來找到已受轉移成功之細胞。結果，經四、五天之後，在全部有標幟的 RNA 中有 0.2 % 可與 λ DNA 行雜交；未經感染之細胞中則僅達 0.005 %。Horst 等人 (1975) 將取之於全身性 gangliosidosis (由於嚴重缺乏半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 引起) 的病人體之皮膚成纖維細胞 (skin fibroblast) 的培養細胞 (cultured cells) 作為接受者，與 λ plac 噬菌體或 λ plac DNA 一起反應。結果，以 λ plac 噬菌體作為贈予者時，在 19 個處理中有 3 個得到半乳糖苷酶活性的提升；而以 λ plac DNA 為贈予者時，則在 16 個處理中有 4 個得到酵素活性的升高。而後者之提升比前者要高出許多。此等新合成之半乳糖苷酶在免疫及生理化學性質上與 *E. coli* 之半乳糖苷酶並無差異。Doy 等人 (1973) 曾用 ϕ 80 lac⁺ 與 λ gal⁺ 噬菌體處理 *Lycopersicon esculentum* (蕃茄) 與 *Arabidopsis thaliana* 之單倍體的癒傷細胞 (callus)。此等細胞可在含葡萄糖或蔗糖之培養基中生長，但若代之以乳糖或半乳糖作為唯一碳源時則使細胞死亡。但經過適當的噬菌體處理後，却使之能生長，雖則生長比正常者緩慢得多。

。此種生長能力能經續代培養 (subculturing) 而維持不斷，且經免疫法鑑定其確含細菌之酵素。Johnson (1973) 在差不多同時以噬菌體 λ lac 處理 *Acer pseudoplatanus* (大楓樹) 之懸浮培養細胞，使其能利用乳糖而緩慢生長；而未經處理或以 λ^+ 處理者則無法生長，終至慢慢死亡。不過，他們無法偵測到細菌之酵素或以電泳分析證實實驗結果的正確性。

由於此等實驗如此引人興趣，確實需要更多的證據來證明基因轉移 (transgenesis) 確為一真實的現象。也許確有些什麼因素存在讓上述的實驗觀察到一些結果。不過，基因轉移純為一過時的風尚，因為此類之基因操作實缺乏其他系統所能提供之潛力以作大量處理 (見第 3、4 及 5 章)。茲將其原因敘述如下。

基本之困難【The Basic Problem】

雖然有許多人曾試圖將外來 DNA 轉入原核或真核細胞內 (除了上述基因轉移實驗之外)，但很少成功。即使外加 DNA 真被細胞攝入，仍有二個基本原因使其失敗。第一，如僅以基因之有無表現來斷定攝入與否，則失敗可能係因未曾正確行轉錄 (transcription) 或轉譯 (translation)。第二，外來 DNA 進入細胞後可能無法在其內保存下去。此點更為重要。因為外來 DNA 如能納入到細胞之基因體 (genome) 上則困難便不存在。然而，只有兩個已經確立的此類例子：質體 (plasmid) DNA 之整合 (integrate) 於酵母之基因體中 (Hinnen *et al.* 1978, Struhl *et al.* 1979, 見第 80 頁) 以及鼯鼠 (mouse) 細胞以質體及噬菌體 DNA 行共同轉形 (co-transformation) (Wigler *et al.* 1979, 見第 167 頁)。

。其中使 DNA 整合之機轉迄仍未明。如果外來 DNA 未克服