

應用 分子生物學

Applied Molecular Biology

修訂版

李昭鎡 著

美國印地安那大學醫學院病理系教授

CATGCTTTACACTTTTATGCTTCCCGTCTCTATGTTGTGTGGAA
TTGATGCCAATTTCGCTTTTGCTTGTGATGATAATAGACAGGC
GTGTTGACATAAAATACCACTGGCGGTGAACTGAGCACA
GTGTTGACTATTTTACCTCTGGGGTCTTATGGTTTGCAT
TTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGAGCTATATGCTTACAT
TACACTTTACAGCGCGCGTCTTTGATAGAGCGCGCCG

藝軒圖書出版社

應用

分子生物學

Applied Molecular Biology

第三版

高等教育出版社

應用分子生物學

Applied Molecular Biology

修訂版

李昭鎰 著

作者簡介

學歷 輔仁大學生物系學士

台灣大學醫學院微生物研究所碩士

美國印地安那大學醫學院微生物及免疫研究所博士

經歷 美國紐約州冷泉港研究院博士後研究員

美國印地安那大學醫學院附屬醫院分子診斷室主任

現職 美國印地安那大學醫學院病理系教授

藝軒圖書出版社

國家圖書館出版品預行編目資料

應用分子生物學／李昭鉉著．--第一版修訂．

--臺北縣新店市：藝軒， 2008.02

面； 公分

ISBN 978-957-616-938-0（平裝）

1. 分子生物學

361.5

97003096

本書任何部份之文字或圖片，如未獲得本社書面同意，
不得以任何方式抄襲、節錄及翻印

新聞局出版事業登記證局版台業字第一六八七號

應用分子生物學(修訂版)

（平裝）特價新臺幣 600 元

著 者：李 昭 鉉

發行所：藝軒圖書出版社

發行人：彭 賽 蓮

總公司：台北縣新店市寶高路 7 巷 1 號 5 樓

電話：(02)2918-2288

傳真：(02)2917-2266

網址：www.yihscient.com.tw

E-mail:yihscient@ms17.hinet.net

總經銷：藝軒圖書文具有限公司

台北市羅斯福路三段 316 巷 3 號

（台大校門對面・捷運新店線公館站）

電話：(02)2367-6824

傳真：(02)2365-0346

郵政劃撥：0106292-8

台大醫學院展售處

台北市仁愛路台大醫學院聯教館醫工室 B1

電話：(02)2397-5070

台中門市

台中市北區五常街 178 號

（健行路 445 號宏總加州大樓）

電話：(04)2206-8119

傳真：(04)2206-8120

大夫書局

高雄市三民區十全一路 107 號

（高雄醫學大學正對面）

電話：(07)311-8228

本公司常年法律顧問／魏千峰、邱錦添律師

二〇〇七年七月第一版

二〇〇八年二月修訂版

ISBN 978-957-616-938-0

本書如有缺頁、破損或裝訂錯誤，請寄回本公司更換。

讀者訂購諮詢專線：(02) 2367-0122

序

李昭鉉教授曾於 2003 年 9 月至 12 月間，應國立陽明大學醫學院微生物暨免疫學研究所及台北榮民總醫院之邀請擔任訪問學者。此一講座是由教育部延攬國際傑出學者訪問教學計畫所推動，李教授為其中少數獲邀的學者。這段期間，李教授開授了兩個課程。一是「基礎及進階分子醫學」，來選課聽講者超過兩百位，我是其中之一。另一個課程是有 25 位博士班學生選修的「科學英文寫作技巧」。我對李昭鉉教授的印象，即來自於我在「基礎及進階分子醫學」上課時的觀察。

這是一門長達 13 週的課程，於每週六上午 8 時至 12 時上課，總共有 50 個小時的上課時數。原本，我只是抱著好奇的心態來參加，看看此課程究竟涵蓋了那些內容。然而自從聽了第一堂課後，便被他深入淺出的教學風範所吸引，清楚地告訴自己不許有任何理由缺課。當時由於身為醫學院院長以及教學研究部主任並兼新陳代謝科醫師，可用的時間非常有限。於是，便將非緊急的會議等行程取消，好騰出時間能完整地聽課。在這三個月期間，我僅僅缺席了兩次，雖然略感遺憾，但卻收穫極多。

選修李教授這門課程的聽眾，背景非常多樣，包括生物化學、微生物學、藥理學、解剖學、生理學、內分泌學、神經生理學、生物醫學工程學、以及臨床醫學等學科。而且大家的程度也非常不一致，從大學生一直到學院院長都有。其中還包括許多教授、研究員、以及學科主任。事實上，聽眾群中不乏經驗豐富的分子生物學專家，但讓我感到驚奇的是，為了因應初學者，李教授雖由基本分子生物學的知識講起，卻能依舊讓這些專家們不會感到無聊。此外，李教授也善於在適當的時間點表現他的幽默，讓整個課程更生動而且有趣。

四個小時雖然很長，但每位學員都感到如沐春風意猶未盡，在每次課間休息時，李教授總是被許多學員圍著問問題，除了顯示大家對此課程的興趣與用心外，也證明課程內容之精彩。的確，李教授的課程內容包括許多實用的技術，以及榮總和陽明大學研究群目前正在使



用的最尖端技術。聽完李教授的課，不僅讓我對這些技術有清楚的了解，也更深入領會榮陽團隊的工作內涵。現在我能更快速及完整地參透科學文獻的核心，並且能更深入地審查研究計畫。

上過李教授課的同事及學生們，對他都有高度的評價及讚許。許多人告訴我，從未於這麼短的時間內學到如此多樣而且有用的內容，也從未聽過如此簡潔易懂的課程，有些還認為李教授是他們此生中最好的老師。有位學生說，自從高中畢業後就未曾去上過早晨 8 點開始的課，但卻不曾漏掉李教授任何一堂也是早晨 8 點開始的課。我的一位同仁告訴我，李教授的課是唯一能讓所有學生既滿意又喜愛的課程。這麼多懇切及正面的評價，顯示出李教授在分子生物學廣博深厚的知識、傑出的教學能力與技巧、以及令人非常佩服的專業修養。我衷心期盼李教授能長期成為我們榮陽團隊的一份子。

由於李教授的課大受歡迎，陽明大學與台北榮總於 1995 年 12 月再度邀請他來授課，此次來上課的人數更多，約為上次的兩倍，學生們對他的評價也與上次一樣好。這本“應用分子生物學”是根據他上課的內容所撰寫，這是一本我們期待已久的書，相信各位讀者朋友們也將跟我一樣讚賞此書！

何橈通

台北榮民總醫院教學研究部主任暨國立陽明大學前醫學院院長

推薦序

化解堅硬分生技術若繞指柔的一本好書

我與李昭鉉的結識，始於大學時代。昭鉉兄在台大唸研究所時，認識了他的夫人振華，而振華正是我太太佩文在高中時期最要好的同學。雖然我與昭鉉兄在唸書的時候，彼此都曾照面，但除振華與佩文較熟捻之外，我與昭鉉兄只能說有一面之緣。畢業後，昭鉉兄與振華一起出國，而我與佩文結婚，也因此每年在聖誕節時，看到她與昭鉉夫婦有卡片往來，互祝平安快樂。直到 1998 年夏天，有一次昭鉉兄到大陸講學，過境台灣順道拜訪我們，我們請他做了一場演講，從言談中，才發現昭鉉兄在分子生物學的造詣及才華，正是我輩最欠缺也最仰賴的部份。做為臨床外科醫師，於 1997 年授命負責長庚大學醫學院臨床醫學研究所，在高雄長庚醫院設立分班，最難安排的部份就是基礎醫學課程，原因是自己對這個領域一知半解，初時排課，只能拿別人的課表依樣畫葫蘆，但是怕誤人子弟的那種心虛與惶恐，他人很難體會。儘管猛啃分子與細胞生物學的教科書，但是對課文中許多名詞涵義及串連每個實驗步驟的原理，很難完全理解。

就在昭鉉兄來訪後，我與當時在長庚大學負責醫學院及臨研所的李英雄教授商量，並獲得王清貞院長支持，在高雄長庚醫院舉辦分子生物學技術方面的研討會，正式邀請昭鉉兄於 1999 年 8 月擔任主講並親自主持研討會的實驗部分兩星期。本人也親聆所有的課程，因此受益匪淺，親身經歷昭鉉兄的課，就彷彿一夕之間打開了分子生物學的潘朵拉盒子，以前看不懂的名詞，說不清楚的步驟，豁然開朗。為什麼 PCR 要用 Taq DNA polymerase，為什麼每一步驟的溫度需要控制的那麼精準；也如同任督二脈在剎那間被打通一般，能夠切身感受到一窺分子生物學堂奧的妙不可言。

因此從 1999 年起，到去年止，我一共請昭鉉兄 5 次在高雄長庚醫院主講分生技術。造福的學員，不僅有醫師、研究生、研究助理、更不乏本身已是大學教授、學有專精之士。每次調查學員對李教授上課的滿意度，都在九成以上。多年來，一直有學員反映，希望李教授將



上課內容集結出書，一方面省得學員上課抄寫時分心；另一方面就是無論人的手有多快，記憶力有多好，老師所講的每一句，都能仔細聆聽、忠實記錄、並且不失原意的可以說是微乎其微。再者無緣參加研討會，但有心汲取分生技術所涉及原理的人更是不在少數。

這回昭鉉兄終於將他分子生物學的武林秘笈，公諸於世，並選擇在台灣出版，其回饋鄉里之用心，日月可鑑。而且雖說是他駕輕就熟的領域，卻仍費時三年半的準備時間，其謹慎小心、務實專業的進程，恰如昭鉉兄授課時不疾不徐、按部就班，但求每位學員都能理解並且跟上課程進度的心態。

這本“應用分子生物學”，書名看似普通，不過內容卻大有看頭，就像裝扮普通但氣宇不凡的的絕世英雄，具慧眼者不應錯過。無論讀者是否是行家，但凡對分子生物學涉及的技術細節有疑慮者，解藥可能就在這字裡行間，有待您細心品嚐與發掘。

莊錦豪

長庚大學臨床醫學研究所副所長

自序

本書的出版與我的研究與教學工作有密切的關係，我於 1980 年博士生第三年時進入分子生物學的領域，那時覺得分子生物學是我修過的課程中最有趣的學科，因此之後的博士後研究，我選擇了與分子生物學相關的研究課題。當時正逢台灣為了研發 B 型肝炎病毒疫苗，積極推動分子生物科技，並邀請多位旅美分子生物學專家回台舉辦研習會。1982 年教育部邀請當時美國 Uniformed Service University of the Health Sciences 的微生物系主任吳期平教授回來主持。這個研習會是由當時的陽明醫學院微生物及免疫學研究所所長張仲明教授主辦，台大醫學院、榮民總醫院、以及國科會協辦，共有 560 人報名參加，可謂盛況空前。此次研討會除了上課之外，還同時開了分子生物學與單株抗體技術兩個實驗班。分別在台大醫學院與陽明醫學院進行。其中分子生物技術的實驗課由吳期平教授親自主持，而單株抗體技術的教導則由吳教授的博士後研究員林敬清博士負責。林敬清博士當時是美國冷泉港研究所的資深研究員，而我是該所博士後研究員。林博士推薦我與吳教授的另一博士後研究員嚴卓然博士，一同協助吳教授教導最新分子生物學技術。我所負責的部份是 DNA 定序，因這是我當時每天在做的工作可說是駕輕就熟，但是吳教授要我給學員們上五堂不同的課，這可是我有生以來第一次正式上台講課。雖然課前花了很多時間準備，但在課程的內容與講課的技巧上，與吳期平教授相比，仍有天壤之別，當時對自己的表現並不滿意，到目前為止仍然耿耿於懷。吳教授的課程內容豐富，而且涵括很多不同的題材，他講課時絲絲入扣，非常精彩。我當時對吳教授真是佩服的五體投地，於是立志要以吳教授為榜樣，將來若有機會一定要做一位好老師。

1983 年我結束了冷泉港研究所的博士後研究工作，回到印地安那大學醫學院病理系當助理教授，當時全校連我總共只有六位分子生物學者。有鑑於分子生物技術的需求與日俱增，我決定開一個分子生物技術的課程，效法吳教授的教學精神與技巧，戰戰兢兢的準備教材及研擬教學的方法。1987 年第一次開課時共有 17 位研究生及 5 位教授參加，由於反應非常好，因此第二年再開課時人數就增加到 32 人。本來我只計劃開辦兩次，但沒想到第二年的課結束後沒幾天，就有數十

人來登記要上第三年的課，因此欲罷不能，這門課也就一直延續至今。平均每年都有 50 人以上來參加，所以到目前為止印地安那大學醫學院大約有 1000 人上過這門課，包括 3 位副院長、6 位系主任及 100 助理教授級以上的人士。總公司位在 Indianapolis 的禮來藥廠，也大約有 200 人來上過此課，其中包括一位副總裁及許多主管級的研究員。

除了 1982 年首次回台與吳教授合開分子生物學技術的課程之外，之後又於 1984、1986 及 1989 年，分別應中央研究院、國防醫學院、及台大醫學院之邀請回國講授最新分子生物學。高雄長庚醫院莊錦豪醫師，發現我每年在印地安那大學開的課，正是他所負責的臨床醫學研究所高雄分班所急需，希望我將在美國上的課，原封不動的搬到高雄長庚醫院，故於 1999 年再度回台授課。由於內容深獲學員的肯定，至今已持續連辦了 5 次。台北三軍總醫院的盧章智醫師也請我去開了三次課，國立陽明大學的胡小婷教授、吳肇卿所長以及台北榮民總醫院何饒通主任也邀請過我兩次。此外，我也在我的母校輔仁大學，以及中原大學與義守大學附設醫院，開授過同樣的課程。到目前為止，約略估計台灣至少有 2000 人曾接觸過我的課。這二十多年來不論在台灣或美國開課，都有很多人說我的課程內容非常豐富與實用，希望我能將之匯整成書並且出版，讓更多人受益，這是本書的緣起。

寫書的計劃雖然默記在心，無奈研究經費的申請及研究成果的發表，佔據了我所有的時間與精力，所以一直沒有動筆。雖然三總的盧章智醫師及輔大的楊美桂教授，曾嚐試依據我上課的筆記，希望能幫我整理編纂成書，可惜並未真正完成。一直到 2005 年 12 月，我在台北榮總開此課程時，胡小婷教授下定決心要幫我完成出書事宜，於是在每一堂課都做了非常詳細的筆記，然後以口述方式請她的學生林曜堂以中文輸入電腦而完成了初稿。那時正好我申請到一個相當大的 NIH RO1 研究計劃，精神與時間上的壓力頓時減輕不少，因此決定將此書完成。起初是以胡教授的初稿為基礎，進行內容的編輯與修改，但後來發現整體架構及文字都需做大幅度的調整，所以重新撰寫。因為我從未有出書的經驗，開始進行之後才體會到寫書的困難與繁瑣，但為了不辜負胡小婷等教授們的好意及辛苦的付出，不得不咬緊牙根將其完成。

旅居國外多年，算來我已有 30 年沒用過中文寫文章了，剛開始時

用字與遣詞都倍感吃力，好在有很多熱心朋友的相助，讓本書能順利完成。其中胡小婷教授，不但幫我完成初稿，也花了很多時間進行校正；楊美桂教授更是幫我字字斟酌，小心翼翼的檢視每個句子的結構，甚至幾乎將整本書重寫；再加上王紹鴻博士及潘逸萱博士的細心校對與更正，使本書得以如期付梓，我在此向他們致上最高及衷心的感謝。

分子生物學與其它學科一樣，包括的範圍很廣，分子生物技術的開發更是日新月異。本書所涵蓋的內容，偏重於每種分子生物技術之基本原理，期望提供讀者紮實的學理根據，並能舉一反三了解相關的課題，進而開發其它更新的技術。本書雖經仔細校對，但仍不免有遺漏與錯誤，希望各位讀者先進不吝批評與指正，使未來再版時能更臻完美。

李 昭 鉉

美國印第安那大學醫學院病理系

2007 年 6 月

目次

第一章 核酸之構造及性質	1
第一節 核酸	2
第二節 鹼基	2
第三節 核苷	3
第四節 核苷酸	4
第五節 DNA 與 RNA 的構造	6
第六節 DNA 與 RNA 的物理性質	10
本章總結	14
第二章 複製、轉錄及轉譯	17
第一節 簡介	18
第二節 DNA 複製	18
第三節 轉錄	19
第四節 Pre-mRNA 的 capping	20
第五節 Pre-mRNA 的剪接	22
第六節 Pre-mRNA 3' 端的改造	27
第七節 轉譯	28
第八節 轉譯之調控	31
第九節 核糖體	32
第十節 原核細胞的轉譯	34
第十一節 真核細胞之轉譯起始	37
第十二節 IRES	39
本章總結	40
第三章 DNA 與 RNA 的分離與純化	47
第一節 質體 DNA 的分離	48
第二節 染色體 DNA 的分離	51
第三節 DNA 的定性及定量	52
第四節 RNA 的分離	52
第五節 Poly-A ⁺ mRNA 之萃取	54
本章總結	55
第四章 酵素	59
第一節 酵素的種類	60
第二節 限制酵素的發現	61
第三節 限制酵素的分類	62
第四節 限制酵素的命名	64

第五節	經限制酵素切割後的 DNA 末端	64
第六節	影響限制酵素活性的因素	65
第七節	常用的限制酵素	66
第八節	Isoschizomers	68
第九節	甲基化酵素	69
第十節	作用於甲基化 DNA 的限制酵素	70
第十一節	其他降解酵素	71
第十二節	RNA 聚合酶	73
第十三節	DNA 聚合酶	73
第十四節	修飾酵素	74
本章總結		76
第 五 章	啟動子及操控子	81
第一節	啟動子	82
第二節	轉錄終止子的特性	84
第三節	真核生物基因的轉錄	85
第四節	影響轉錄之要素	87
第五節	操作元	88
第六節	乳糖操作元	88
第七節	乳糖操作元的抑制	89
第八節	乳糖操作元的活化	91
本章總結		92
第 六 章	電泳	99
第一節	電泳的種類及應用	100
第二節	RNA 電泳	100
第三節	電泳膠的解析度	101
第四節	脈衝電泳法	101
第五節	脈衝電泳所用 DNA 的製備	102
第六節	影響脈衝電泳之變因	103
本章總結		104
第 七 章	基因選殖	107
第一節	選殖載體之要件	108
第二節	pBR322 及 pUC19 載體	108
第三節	DNA 片段及載體的製備	111
第四節	DNA 之定量與定性	112

第五節	DNA 片段與載體的比例	112
第六節	離心透析法	113
第七節	轉型作用	114
第八節	轉型菌之篩選	115
第九節	DNA 片段與載體的連接	116
第十節	避免載體自接的方法	121
第十一節	加尾、轉接頭及連接頭的應用	121
第十二節	大腸桿菌的基因型	122
	本章總結	126

第 八 章 DNA 交互配對反應 131

第一節	DNA 交互配對之定義與應用	132
第二節	南方轉漬法	134
第三節	探針的標記	135
第四節	RNA 探針之製備	136
第五節	非放射性探針	138
第六節	交互配對反應的前處理	143
第七節	交互配對的困難度	143
第八節	北方轉漬法	144
第九節	探針的來源	144
	本章總結	147

第 九 章 基因庫 153

第一節	基因庫的定義及種類	154
第二節	Lambda 噬菌體的生活史	155
第三節	Lambda 載體的種類	157
第四節	Lambda 噬菌體基因轉錄調控機制	158
第五節	Lambda 潛溶菌的誘導	160
第六節	決定 Lambda 進入溶菌狀態或潛伏狀態的因素	162
第七節	產生透明溶菌斑的 Lambda 變種	163
第八節	λ gt10 的特性及應用	163
第九節	λ gt11 的特性及應用	164
第十節	一般性及特定性的轉殖媒介	165
第十一節	自 cDNA 基因庫分離特定的基因	166
第十二節	cDNA 的合成	166
第十三節	單一方向 cDNA 的選殖	170

第十四節	Lambda 噬菌體的組裝	171
第十五節	試管內 Lambda 噬菌體的組裝	173
第十六節	選擇性 cDNA 基因庫的建立	174
第十七節	cDNA 基因庫內特定基因的篩選	174
本章總結		175
第 十 章	限制酶切點定位	179
第一節	重組載體的檢定	180
第二節	限制酶切點定位	181
本章總結		185
第十一章	DNA 定序	187
第一節	DNA 定序之原理	188
第二節	Maxam and Gilbert 定序法	188
第三節	Sanger 定序法	191
第四節	Sanger 定序法新合成 DNA 的標記	193
第五節	M13 噬菌體的特性	195
第六節	M13 載體的發展史	197
第七節	Phagemid 的發展史	199
第八節	定序常遇到之問題	202
第九節	循環定序法	203
第十節	自動定序法	204
第十一節	活體內切出系統	204
本章總結		207
第十二章	選殖載體	211
第一節	載體攜帶 DNA 片段的限度	212
第二節	EMBL3 及 EMBL4 載體	212
第三節	Cosmid 載體	214
第四節	酵母菌人工染色體載體	216
第五節	細菌人工染色體載體	222
第六節	P1 噬菌體載體	223
本章總結		226
第十三章	聚合酶連鎖反應	231
第一節	PCR 的發明及其原理	232
第二節	PCR 引子的設計	234

第三節	PCR 的種類	238
第四節	PCR 反應之污染問題	240
第五節	PCR 反應的對照組	241
第六節	避免非特異性 PCR 反應的方法	241
第七節	PCR 之應用	242
第八節	PCR 產物之選殖	245
第九節	PCR 適用的 DNA 聚合酶	247
第十節	其他的擴增方法	247
本章總結		255

第十四章 蛋白質的表現

第一節	利用大腸桿菌製造外來蛋白質之優點與難處	261
第二節	可被誘導之啟動子	262
第三節	融合蛋白質	263
第四節	重組蛋白質的純化	263
第五節	附加部份的切除	265
第六節	轉譯框架的維持	266
第七節	表現質體的製作	268
第八節	基因表現之測定	270
第九節	利用 Phage display 製造抗體	271
第十節	真核基因表現系統	277
第十一節	在哺乳類細胞表現蛋白質的調控	283
第十二節	重組載體送入細胞的方法	286
第十三節	Gateway 選殖系統	287
本章總結		290

第十五章 基因突變

第一節	基因突變的方法	298
第二節	以限制酶進行基因的突變	298
第三節	單個鹼基的突變	299
第四節	以 PCR 方法改變基因	301
第五節	改良的 PCR 基因突變法	304
第六節	相似序列重組	307
第七節	利用相似序列重組插入一段 DNA 以破壞基因	308
第八節	單端及雙端的相似序列重組	310
第九節	利用相似序列重組刪除一段 DNA 以破壞基因	311

第十節 利用相似序列重組進行基因替換·····	312
本章總結·····	314
第十六章 病毒載體 ·····	317
第一節 構成病毒載體的要件·····	318
第二節 反轉錄病毒載體·····	318
第三節 腺病毒載體·····	325
第四節 腺病毒附屬病毒載體·····	328
第五節 單純疱疹病毒載體·····	330
本章總結·····	332
第十七章 常用的尖端技術 ·····	337
第一節 Nuclear run-on assay ·····	338
第二節 報導基因試驗 Reporter assay ·····	338
第三節 Electrophoresis mobility shift assay ·····	339
第四節 DNase I footprinting ·····	339
第五節 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) ·····	341
第六節 Two-hybrid 系統·····	342
第七節 Three hybrid 系統 ·····	345
第八節 轉錄起始點的判定·····	347
第九節 S1 nuclease analysis ·····	349
第十節 RNase A protection assay ·····	349
第十一節 Single strand conformation polymorphism (SSCP) ·····	350
第十二節 Heteroduplex assay ·····	350
第十三節 Denatured gradient gel electrophoresis (DGGE) ·····	350
第十四節 Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) or arbitrary primed PCR (AP-PCR) ·····	351
第十五節 Amplified fragment length polymorphism (AFLP) ·····	351
第十六節 mRNA differential display ·····	354
第十七節 DNA microarray ·····	354
第十八節 Serial analysis of gene expression (SAGE) ·····	355
第十九節 Massively parallel signature sequencing (MPSS) ·····	357
第二十節 Total gene expression analysis ·····	363
第二十一節 Representational difference analysis (RDA) ·····	365
第二十二節 Pyrosequencing ·····	367
本章總結·····	369
索引 ·····	375