

# 分子選殖

遺傳工程理論及實驗手冊

李國鏞 編譯  
張邦彥

藝軒圖書出版社印行

Q78  
39

# 分子選殖

## Molecular Cloning A Laboratory Manual

貴州大學圖書館

T. Maniatis

哈佛大學

E. F. Fritsch

密西根州立大學

J. Sambrook

冷泉灣實驗室

李國鏞

國立中興大學微生物學教授

張邦彥

台灣省菸酒公賣局菸葉試驗所技士

編譯

藝軒圖書出版社印行

版權所有※翻印必究

著作權執照臺內著字第 號

新聞局出版事業登記證

局版台業字第一六八七號

分子選殖（遺傳工程理論及實驗手冊）

特價新台幣 元整

編譯者：李 國 鏞 、 張 邦 彥

發行所：藝 軒 圖 書 出 版 社

發行人：彭 賽 蓮

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107

電 話：396-7824；396-7825

郵政劃撥：0106292-8

中 華 民 國 七 十 五 年 元 月 初 版

## 序 言

這本實驗手冊，在起初，僅為 1980 年冷泉灣實驗室 (Cold Spring Harbor Laboratory) 教授的眞核基因分子選殖 (Molecular Cloning of Eukaryotic Genes) 課程內容的綜合。書中所包涵的材料，在此前，雖然早已成為本實驗室中常用的方法，但是却散落在各工作人員的筆記簿中，未經整理。在 1981 年，我們決心合編一冊較完善且合乎時代需要的實驗課本。其目的不僅是為了冷泉灣教學之用，而且也是為日後出版工作鋪路。為此，我們在許多既有的資料中整理出一組「大家一致同意的實驗程序」，其在 1981 年課程進行之時，已經製成照像版，分贈各實驗室使用。在 1981 年底與 1982 年初的冬季，我們更進一步，將上述的照像版作相當程度的改寫，並且插入許多新的或者經過修改的程序，圖表與章節。

在撰寫此書之際，分子選殖的科技日新月異。新的技術不時問世，而既有的實驗方法則一再經過改良。我們課文的內容，雖然皆是已經一試再試而使用極為成功的資料，但是在此一日千里的科技發展趨勢下，殊難自謂無懈可擊，或臻完美的境界。有鑑於此，我們希望學者，先進，不吝賜教。如蒙厚賜，惠我新材料或者改進的技術，則感激萬分。

由於實驗程序的一再革新，使創始權的歸屬成為極其困難的問題。我們在課文適當的篇幅中，雖竭盡所能，力使各技術歸功於其最原始的創建人，但是在不少情況，苦於無法溯其泉源，致使許多貢獻理論，程序，與配方的學者，未獲應得的感謝。我們特於此向這些學人表示歉意及感激。本書之主要功能，在於編輯，鑑定，以及澄清目前在這個學術範疇內可用的資料。於是甚少涉及程序的修改以及創造的工作。正因為如此，本書決大多數的內容，均係取自他人設計的現成方法。一切的貢獻，所以均應歸功於這些方法的創造者。

在早先，我們的實驗課本，僅以分子選殖的初學者為對象。其內容也不免偏重最基本的學術材料。可是，在此修訂本中，我們已經將目前各實驗室需要的各分子選殖技術，詳加討論。因此，我們希望本書，對於初學者，以及有經驗的研究人員，均有所助益。

分子選殖學在書本上的理論，通常頗為簡明易懂。可是，若以實驗的方式將其付諸實現，則相當困難。大多數的程序均有不少的步驟，而其中任一步驟可能發生的問題，皆解決不易。有鑑於此，我們對於各程序的設計原理，應有所認識。於是，我們在課文中，特別提供一些對於解決問題有用的基本資料與文獻，作為讀者

參考之用。此外，我們也建議使用本書的研究人員，將諸程序的各步，加以切實的試驗，以證實其可用性。

這本手冊，若無我們實驗室中的同仁，以及其他許多學者的幫助與貢獻寶貴的意見，殊難有完成之日。我們於是特別在此感謝 John Fiddes, Mary-Jane Gething, David Goldberg, Steve Hughes, David Ish-Horowicz, Mike Mathews, Patty Reichel, Joe Sorge, Jim Stringer, Richard Treisman 及 Nigel Whittle 等人。此外，值得再三申謝的是，Arg Efstratiadis 對於本書第七章所提供有價值的討論與批評。Brian Seed 容許我們使用其未發表的重組法篩選集合庫的程序（第十章）及許多其他有用的建議。Doug Hanahan 在轉化作用方面給我們的指導（第八章）。Bryan Roberts 在雜合篩選法及反訊息 DNA 選殖法上所作的貢獻。Doug Melton 惠賜我們有關 *Xenopus* 卵母細胞注射的程序。Ronni Greene 在許多程序改進上所作的努力。Nina Irwin 對於菌體內真核蛋白質表現現有資料的收集與編排所給予富建議性的指點（第十二章）。Rich Roberts 提供我們有關 pBR322 DNA 序列電腦分析的資料。Barbara Bachmann 為書中所用大腸菌菌株的核對及改正所付出之辛勞，以及 Tom Broker, Louise Chow, Jeff Engler, Jim Garrels 等人為本手冊的封面封底製備優美的照像圖所奉獻的心力。

我們在這裡也向參與 1980 年及 1981 年冷泉灣分子選殖課程的同學們表示謝意。他們都是很優秀的學習者，除了努力鑽研在此期間使用的實驗手冊之外，他們還貢獻了許多極其寶貴的建議。另外，我們非常感謝 Nancy Hopkins 為我們教授第一年的分子選殖實驗。她使我們深信，發行這種實驗課本的確有其必要與意義。以後，在 1981 年，Doug Engel 繼之執教此課。其對於實驗手冊內容的改進大有裨益。使這兩次實驗課程獲得圓滿地完成的功臣，尚有隨堂的助理人員，他們係負責 1980 年暑期的 Catherine O'Connell 與 Helen Doris Keller，以及 1981 年的 Susan Vande-Woude, Paul Bates 及 Michael Weiss。

此外，我們還應該感謝 Patti Barkley 與 Marilyn Goodwin 耐心而毫無怨尤的為我們連續地做文稿打字的工作。美術師 Fran Cefalu 與 Mike Ockler 專心且鏗而不捨地為我們趕製書中的插圖。Joan Ebert 為課文中文獻的增刪及組合所貢獻的心力。最後，我們感謝冷泉灣出版組主任，Nancy Ford，的鼓勵與支持。我們也感謝負責文稿付印工作及參與其他許多與本書出版有關事宜的 Doug Owen，若無其高超的耐力，技術及外交手腕，這手冊極難有完成的可能。

Tom Maniatis  
Ed Fritsch  
Joe Sambrook

# 目 錄

## 序 言

|       |                                |    |
|-------|--------------------------------|----|
| 第 一 章 | 媒介與宿主系統 .....                  | 1  |
| (壹)   | 質體 .....                       | 2  |
| 一     | 選殖 DNA 至質體中的方法 .....           | 10 |
| (貳)   | $\lambda$ 噬菌體 .....            | 15 |
| 一     | 溶裂循環 .....                     | 18 |
| 二     | 潛溶作用 .....                     | 21 |
| 三     | 製造 $\lambda$ 噬菌體媒介 .....       | 22 |
| 四     | 選擇適當的媒介 .....                  | 23 |
| 五     | $\lambda$ 媒介的遺傳圖 .....         | 24 |
| (叁)   | 凝聚質體 .....                     | 44 |
| (肆)   | 擁有單股核酸的噬菌體 .....               | 50 |
| (伍)   | 結論 .....                       | 51 |
| 第 二 章 | 菌株及噬菌體的繁殖與保存 .....             | 55 |
| 壹     | 菌落的純化程序 .....                  | 57 |
| 貳     | 菌株的生長，維持與保存 .....              | 59 |
| 叁     | $\lambda$ 噬菌體溶菌斑的純化程序 .....    | 61 |
| 肆     | 培養基與抗生素 .....                  | 65 |
| 第 三 章 | $\lambda$ 噬菌體及質體 DNA 的分離 ..... | 71 |
| 壹     | 大量 $\lambda$ 噬菌體的製備 .....      | 72 |
| (壹)   | 噬菌體的感染 .....                   | 72 |
| (貳)   | 噬菌體的誘發 .....                   | 73 |
| (叁)   | $\lambda$ 噬菌體的純化 .....         | 75 |
| (肆)   | $\lambda$ 噬菌體 DNA 的抽取 .....    | 79 |
| 貳     | 質體 DNA 大量分離法 .....             | 80 |
| (壹)   | 菌體的生長以及質體的繁殖 .....             | 81 |

|                              |                                                               |            |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------|
| (貳)                          | 菌體的收集與溶裂 .....                                                | 82         |
| (叁)                          | 利用 Cesium Chloride-Ethidium Bromide 密度梯度衡定離心的技術純化環狀 DNA ..... | 85         |
| (肆)                          | 質體 DNA 樣品中 RNA 的去除 .....                                      | 86         |
| <b>第 四 章 分子選殖必需的酶類 .....</b> |                                                               | <b>89</b>  |
| 壹                            | 限制酶 .....                                                     | 90         |
| (壹)                          | 同座限制酶 .....                                                   | 91         |
| (貳)                          | 甲基化作用 .....                                                   | 94         |
| (叁)                          | 利用限制酶分解 DNA .....                                             | 96         |
| 貳                            | 適用於分子選殖技術的他種酶類 .....                                          | 98         |
| (壹)                          | 大腸菌 DNA 聚合酶 I .....                                           | 98         |
| (貳)                          | 大腸菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段 .....                               | 103        |
| (叁)                          | T4 DNA 聚合酶 .....                                              | 107        |
| (肆)                          | 利用 T4 聚核苷酸激酶標誌 DNA 的 5' 末端 .....                              | 112        |
| (伍)                          | 轉錄 RNA 的 DNA 聚合酶 .....                                        | 117        |
| (陸)                          | DNA 脫磷酸作用 .....                                               | 122        |
| (柒)                          | Bal 31 核酸酶 .....                                              | 124        |
|                              | 核酸酶 S1 .....                                                  | 128        |
|                              | 綠豆核酸酶 .....                                                   | 129        |
|                              | 核糖核酸酶 .....                                                   | 129        |
|                              | 脫氧核糖核酸酶 I .....                                               | 130        |
|                              | 外核酸酶 VII .....                                                | 130        |
|                              | 外核酸酶 III .....                                                | 131        |
|                              | $\lambda$ 外核酸酶 .....                                          | 132        |
|                              | 聚 (A) 聚合酶 .....                                               | 133        |
|                              | T4 DNA 接合酶 .....                                              | 134        |
|                              | T4 RNA 接合酶 .....                                              | 135        |
|                              | Eco RI 修飾酶 .....                                              | 135        |
|                              | 末端脫氧核糖核苷酸轉移酶 .....                                            | 136        |
| <b>第 五 章 膠體電泳 .....</b>      |                                                               | <b>137</b> |
| 壹                            | 瓊脂糖膠體電泳 .....                                                 | 138        |
| (壹)                          | 膠體電泳器 .....                                                   | 140        |

|              |                                    |            |
|--------------|------------------------------------|------------|
| (貳)          | 緩衝液 .....                          | 140        |
| (叁)          | 瓊脂糖膠體的配製 .....                     | 143        |
| (肆)          | 瓊脂糖膠體中 DNA 的染色 .....               | 146        |
| (伍)          | 膠體的照像 .....                        | 147        |
| (陸)          | 迷你膠體 .....                         | 147        |
| (柒)          | 瓊脂糖膠體上 DNA 的回收 .....               | 149        |
| (捌)          | 鹼性瓊脂糖膠體 .....                      | 154        |
| 貳            | 聚丙烯醯胺膠體電泳 .....                    | 155        |
| (壹)          | 聚丙烯醯胺膠體的裝備方法 .....                 | 156        |
| (貳)          | DNA 自聚丙烯醯胺膠體上的回收 .....             | 160        |
| 叁            | DNA 分股用的膠體 .....                   | 160        |
| (壹)          | 利用聚丙烯醯胺膠體分離 DNA 的兩股 .....          | 161        |
| (貳)          | 利用瓊脂糖膠體分離 DNA 的兩股 .....            | 162        |
| (叁)          | 利用變性溶液與聚丙烯醯胺膠體電泳分離短小 DNA 的兩股 ..... | 164        |
| <b>第 六 章</b> | <b>真核細胞 m-RNA 的抽取，純化與分析 .....</b>  | <b>167</b> |
| (壹)          | 分離哺乳動物細胞中的 mRNA .....              | 170        |
| (貳)          | 細胞中全部 RNA 的分離法 .....               | 172        |
| (叁)          | 聚腺苷酸 RNA 的篩選 .....                 | 174        |
| (肆)          | RNA 的膠體電泳 .....                    | 176        |
| (伍)          | 利用核酸酶 S1 圖譜 RNA .....              | 182        |
| <b>第 七 章</b> | <b>反訊息 DNA 的合成及選殖 .....</b>        | <b>185</b> |
| 壹            | 反訊息 DNA 的合成 .....                  | 186        |
| (壹)          | 反訊息 DNA 第一股的製造 .....               | 186        |
| (貳)          | 反訊息 DNA 第二股的製造 .....               | 188        |
| (叁)          | 利用核酸酶 S1 切除反訊息 DNA 上的髮夾狀圓弧 .....   | 189        |
| 貳            | 雙股反訊息 DNA 的分子選殖 .....              | 190        |
| (壹)          | 含同種聚合物的尾端 .....                    | 190        |
| (貳)          | 人工製造的 DNA 接頭 .....                 | 192        |
| (叁)          | 選殖反訊息 DNA 的其他方法 .....              | 194        |
| 叁            | 反訊息 DNA 選殖的策略 .....                | 197        |
| (壹)          | 量多 mRNA 轉錄為反訊息 DNA .....           | 197        |
| (貳)          | 量少 mRNA 轉錄為反訊息 DNA .....           | 198        |

|              |                                                           |            |
|--------------|-----------------------------------------------------------|------------|
| 肆            | 選殖反訊息 DNA 的程序 .....                                       | 203        |
| (壹)          | 雙股反訊息 DNA 的合成方法 .....                                     | 203        |
| (貳)          | 利用核酸酶 S1 分解反訊息雙股 DNA .....                                | 209        |
| (叁)          | 反訊息雙股 DNA 的選殖 .....                                       | 212        |
| (肆)          | 媒介 DNA 與反訊息雙股 DNA 的氮基冷卻配對 .....                           | 215        |
| (伍)          | 利用先後添加接頭的方式選殖反訊息雙股 DNA .....                              | 215        |
| <b>第 八 章</b> | <b>轉移質體及 <math>\lambda</math> 噬菌體 DNA 於大腸菌體內的技術 .....</b> | <b>219</b> |
| 壹            | 轉化質體 DNA 於大腸菌體內的程序 .....                                  | 220        |
| (壹)          | 使用氯化鈣的轉化程序 .....                                          | 221        |
| (貳)          | 使用氯化鈣與氯化銣的轉化程序 .....                                      | 222        |
| (叁)          | 使用大腸菌 x 1776 菌株的轉化程序 .....                                | 223        |
| 貳            | 在活體外裝填 $\lambda$ 噬菌體 DNA 的方法 .....                        | 225        |
| (壹)          | 潛溶性 $\lambda$ 噬菌體的保存與測定 .....                             | 227        |
| (貳)          | 製造裝填用噬菌體——程序 I .....                                      | 229        |
| (叁)          | 活體外裝填 DNA ——程序 I .....                                    | 230        |
| (肆)          | 製造裝填用噬菌體——程序 II .....                                     | 232        |
| (伍)          | 活體外裝填 DNA ——程序 II .....                                   | 234        |
| <b>第 九 章</b> | <b>建立基因組集合庫 .....</b>                                     | <b>237</b> |
| 壹            | 利用 $\lambda$ 噬菌體媒介建立基因組的集合庫 .....                         | 238        |
| (壹)          | 製造媒介 DNA .....                                            | 242        |
| (貳)          | 利用組織培養皿上的真核細胞分離高分子量的 DNA .....                            | 246        |
| (叁)          | 製備長度為 20 kb 的真核細胞 DNA .....                               | 248        |
| (肆)          | DNA 的接合與裝填 .....                                          | 252        |
| (伍)          | 集合庫中噬菌體的增數 .....                                          | 257        |
| 貳            | 利用凝聚質體建立基因組集合庫 .....                                      | 258        |
| (壹)          | 利用磷酸鹽酶處理的凝聚質體作為攜帶選殖 DNA 的媒介 .....                         | 259        |
| (貳)          | 利用兩種限制酶及磷酸鹽酶處理的凝聚質體作為攜帶選殖 DNA 的媒介 .....                   | 263        |
| (叁)          | 含有選殖 DNA 的集合庫的增數，貯存，以及篩選 .....                            | 267        |
| <b>第 十 章</b> | <b>含有重組 DNA 的純系的鑑定 .....</b>                              | <b>271</b> |
| 壹            | 菌落或溶菌斑的原位雜合 .....                                         | 273        |

|             |                                                                              |            |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------|------------|
| (壹)         | 少量菌落的雜合 .....                                                                | 273        |
| (貳)         | 複印菌落於硝化纖維濾紙上的程序 .....                                                        | 276        |
| (叁)         | 利用雜合作用鑑定 $\lambda$ 噬菌體的溶菌斑 .....                                             | 278        |
| (肆)         | $\lambda$ 噬菌體溶菌斑在原位增數後再以雜合法鑑定的程序 .....                                       | 280        |
| (伍)         | 固定於濾片上的 DNA 或 RNA 與輻射性探測核酸雜合的程序 .....                                        | 281        |
| (陸)         | 複印有噬菌體溶菌斑或者細菌菌落的濾片與探測核酸雜合的程序 .....                                           | 283        |
| 貳           | 利用雜合篩選法鑑定含有反訊息 DNA 的菌落或噬菌體 .....                                             | 286        |
| (壹)         | 利用固定於硝化纖維濾片上的 DNA 從事雜合篩選 .....                                               | 286        |
| (貳)         | 利用雜合作用篩選的 RNA 在網織紅血球溶裂液中轉譯產生蛋白質 .....                                        | 295        |
| (叁)         | 注射 mRNA 於蛙卵細胞中以轉譯的方式產生蛋白質 .....                                              | 299        |
| 叁           | 利用探測 DNA 與特定序列的 DNA 在大腸菌體內重組的現象 篩選集<br>合庫中攜帶特殊外來 DNA 段落的 $\lambda$ 噬菌體 ..... | 302        |
| (壹)         | 重組篩選法的原理 .....                                                               | 302        |
| (貳)         | 篩選 $\pi$ VX 質體用的菌株 .....                                                     | 306        |
| (叁)         | $\pi$ VX 質體的製備 .....                                                         | 306        |
| (肆)         | 質體進入 W3110 $r^- m^+$ (P3) 菌株的轉化作用 .....                                      | 306        |
| (伍)         | 利用 $\lambda$ 噬菌體集合庫感染 W3110 $r^- m^+$ (P3) ( $\pi$ VX) 菌株 .....              | 307        |
| (陸)         | 鑑定噬菌體的阻遏基因 .....                                                             | 307        |
| (柒)         | 測試 $\pi$ VX 質體系統 .....                                                       | 307        |
| (捌)         | $\pi$ VX 系統的應用 .....                                                         | 310        |
| <b>第十一章</b> | <b>含重組 DNA 純系的分析 .....</b>                                                   | <b>313</b> |
| 壹           | $\lambda$ 噬菌體 DNA 或者質體 DNA 的快速分離 .....                                       | 314        |
| (壹)         | 質體 DNA 小規模快速的分離 .....                                                        | 314        |
| (貳)         | $\lambda$ 噬菌體 DNA 小規模快速的分離 .....                                             | 317        |
| 貳           | 建立 DNA 上限制座分布的圖形 .....                                                       | 319        |
| (壹)         | 單一或共同分解 .....                                                                | 320        |
| (貳)         | 依次分解 .....                                                                   | 321        |
| (叁)         | 局部分解 .....                                                                   | 323        |
| 叁           | Southern 轉移法 .....                                                           | 326        |
| (壹)         | 轉移瓊脂糖膠體中的 DNA 至硝化纖維濾紙上的程序 .....                                              | 327        |
| (貳)         | DNA 轉移至濾片上以後的雜合程序 .....                                                      | 329        |
| 肆           | 分殖小段 DNA 於質體媒介中的程序 .....                                                     | 331        |
| (壹)         | 具有凝聚末端的 DNA 的分殖法 .....                                                       | 332        |
| (貳)         | 利用人造接頭協助 DNA 的分殖工作 .....                                                     | 333        |

|             |                                           |            |
|-------------|-------------------------------------------|------------|
| (叁)         | 接合二齊尾 DNA 作為產生限制座的方法 .....                | 337        |
| (肆)         | 選殖步驟快速依次進行的方法 .....                       | 339        |
| <b>第十二章</b> | <b>能夠在大腸菌體內表現其所攜帶之選殖 DNA 的媒介質體 .....</b>  | <b>341</b> |
| 壹           | 促進因子 .....                                | 342        |
| (壹)         | 利用 $\lambda$ 噬菌體的 $P_L$ 促進因子的媒介質體 .....   | 343        |
| (貳)         | 其他的促進因子 .....                             | 347        |
| 貳           | 核糖體結合座 .....                              | 347        |
| 叁           | 真核細胞基因的表現 .....                           | 348        |
| (壹)         | 使選殖 DNA 產生非融合性真核細胞蛋白質的媒介 .....            | 348        |
| (貳)         | 使選殖 DNA 產生融合性真核細胞蛋白質的媒介 .....             | 355        |
| 肆           | 選殖基因的高度表現 .....                           | 366        |
| 伍           | 增加基因的數量 .....                             | 369        |
| 陸           | 摘要 .....                                  | 370        |
| <b>附 錄</b>  | <b>.....</b>                              | <b>373</b> |
| 壹           | 附錄 A：生化技術 .....                           | 374        |
| (壹)         | 玻璃及塑膠器皿 .....                             | 374        |
| (貳)         | 配製有機溶劑 .....                              | 375        |
| (叁)         | 液體培養基 .....                               | 376        |
| (肆)         | 含洋菜或者瓊脂糖的固體培養基 .....                      | 378        |
| (伍)         | 濃縮培養基 .....                               | 378        |
| (陸)         | 用於 $\lambda$ 噬菌體實驗的溶液 .....               | 378        |
| (柒)         | 抗生素 .....                                 | 379        |
| (捌)         | 緩衝液與其他溶液的配製 .....                         | 380        |
| (玖)         | 酶類 .....                                  | 385        |
| (拾)         | 限制酶分解程序必需的緩衝液 .....                       | 387        |
| (拾壹)        | 常用的電泳緩衝液 .....                            | 388        |
| (拾貳)        | 常用的裝填染料 .....                             | 389        |
| (拾叁)        | 透析膜袋的清洗 .....                             | 390        |
| (拾肆)        | 乙醇與水混合溶液中 $^{32}\text{P}$ -核苷酸的乾燥方法 ..... | 390        |
| (拾伍)        | 核酸的純化 .....                               | 391        |
| (拾陸)        | 核酸的濃縮 .....                               | 393        |
| (拾柒)        | Sephadex G-50 層析程序 .....                  | 395        |

|       |                                  |     |
|-------|----------------------------------|-----|
| (拾捌)  | DNA 及 RNA 的定量 .....              | 398 |
| (拾玖)  | 自動輻射照像術 .....                    | 400 |
| (貳拾)  | 測量核酸的輻射活性 .....                  | 402 |
| (貳拾壹) | 剪接質體成長短不一的段落作為分子量比較的標誌 .....     | 403 |
| (貳拾貳) | Maxam-Gilbert 的 DNA 序列分析技術 ..... | 404 |
| 貳     | 附錄 B : pBR322 .....              | 408 |
| (壹)   | pBR322 的核苷酸序列 .....              | 408 |
| (貳)   | pBR322 上的限制座 .....               | 417 |
| (叁)   | pBR322 DNA 上含有限制座的段落 .....       | 422 |
| 叁     | 附錄 C : 常用的細菌菌株 .....             | 433 |
| 參考文獻  | .....                            | 437 |
| 索引    | .....                            | 451 |

## 第一章

---

# 媒介與宿主系統

---

能夠在大腸菌 (*Escherichia coli*) 體內建立純系 (clone) 與從事繁殖的外來 DNA 計有四種：質體 (plasmids),  $\lambda$  噬菌體 (bacteriophage  $\lambda$ ), 凝聚質體 (cosmids) 與 M13 噬菌體。這些媒介 (vectors), 雖然在大小與結構方面有很大的差異, 但是都具有下列共同的特性：

- 1 它們能夠在大腸菌體內自行複製〔即均為複製體 (replicon)〕。縱使與外來 DNA 以共鍵連接, 也不例外。
- 2 它們極易與細菌的核酸分離與純化。
- 3 它們都含有一段與自行複製無關的 DNA。外來的 DNA, 如果插入這個區域, 則能與這些媒介的本身一樣地獲得複製與繁殖。

上述每一種媒介, 均各有其獨特的生物特性, 因此也有不同的實驗用途。在本章中, 我們將要闡明這些選殖媒介 (cloning vector) 的性質, 並且討論它們適用於分子選殖 (molecular cloning) 方面的一些原則事項。

### (壹) 質體

質體 (plasmid) 存在於許多細菌體中, 其為細菌染色體以外的遺傳因子。它們均為雙股 (double-stranded), 圓環狀 (closed circular) 的 DNA 分子, 大小自 1 千氮基 (kb; kilobase pairs) 至大於 200 千氮基不等。質體常帶有能產生酶類的基因, 後者在某些場合, 有利於攜帶的菌體。其表現於外的部份特性〔即表型 (phenotype)〕, 開列如下：抵抗抗生素, 產生抗生素, 分解複雜的有機物質, 製造大腸菌溶菌素 (colicins), 製造內毒素 (enterotoxins) 與合成限制酶 (restriction enzymes) 及修飾酶 (modification enzymes)。

在自然界, 許多質體係藉類似細菌接合交配 (conjugation) 的方式傳入菌體。但是, 在實驗室中, 它們則以一種稱為轉化作用 (transformation) 的人工程序, 傳遞入菌體中。在此後者, 我們利用質體帶入的表型特性 (例如抵抗抗生素的能力), 篩選轉化成功的菌株。

於一般情況, 複製質體 DNA 所需的各種酶類, 即為複製細菌染色體所需的酶類。但是, 有些質體 DNA 的複製, 受到較「嚴格的控制」(“stringent control”)。在些狀態, 質體 DNA 的複製與菌體 DNA 的複製相一致, 因此在一個菌體中, 僅有一個或者數個質體的存在 (參看 Novick et al. 1976 年之綜合文獻)。在「鬆弛的控制」系統 (“relaxed control”), 一菌體中則有 10 — 200 個質體之多。於此, 更值得一提的, 「鬆弛」的質體, 於菌體蛋白質合成程序停止後, 可增至每一菌體數千個之衆。當蛋白質合成終止時〔例如使用氯黴素 (chloramphenicol) 處理菌體 (Clewell 1972)〕, 菌體 DNA 與嚴格質體 DNA 的複製均告停頓,

但是鬆弛質體的DNA則繼續繁殖。

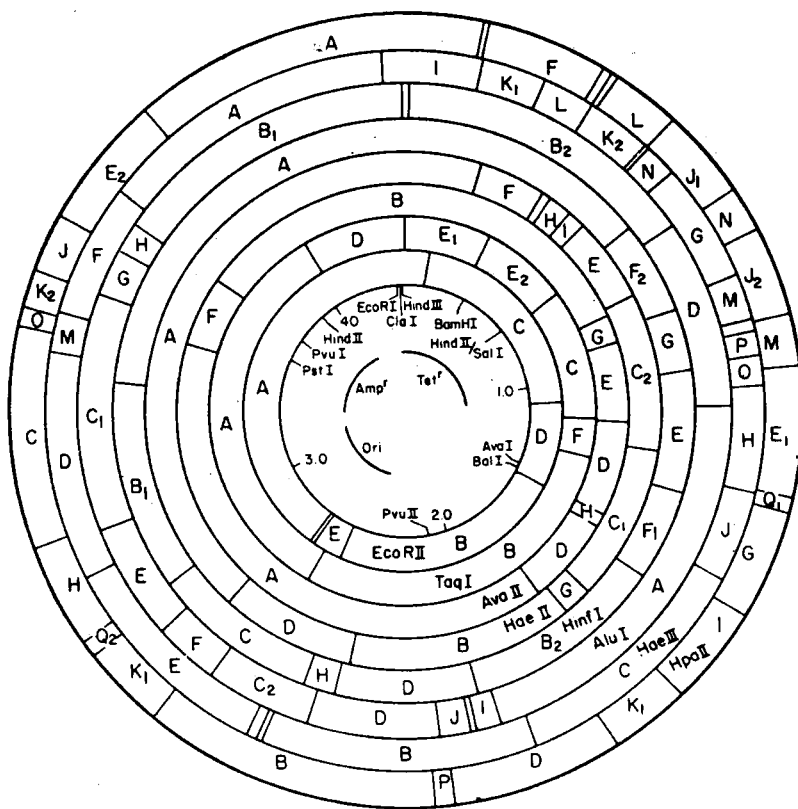
一種有用的選殖質體，必須具備數種特性。其體積應相當地小，而複製數量，宜依鬆弛方式儘可能地多。此外，這種質體尚須帶有一個或者多個可篩選的標誌基因（selectable markers），俾便在轉化程序或者在菌體生長時，作為辨認的工具。最後，不可或缺者，為其DNA上必須具有一處限制酶可辨認（即能剪開）的所在。該部位應該與質體的複製無關，但最好為篩選基因的一部份。因此，當外來的DNA插入時，便會導致此篩選基因的非活化（inactivate），於是成為證實外來基因插入與其座落有力的指標。

在下面，我們將要敘述多種合乎上述條件而用途甚廣的選殖媒介（參看Bolivar and Backman 1979及Bernard and Helinski 1980的綜合報告）。在其中，最受研究者歡迎的當推pBR322，其為一種具有鬆弛控制體系，且帶有抵抗氨苄基青黴素（ampicillin-resistance）與抵抗四環黴素（tetracycline-resistance）的基因，以及可為許多限制酶辨認的限制座（restriction sites）的質體（Bolivar et al. 1977）（參看圖1-A）。pBR322的全部氮基序列（nucleotide sequence）已經由學者研究透徹（Sutcliffe 1978），且載於本書的附錄B中。

最近，學者製成兩種pBR322的衍生質體，其能在菌體內產生更多的質體數目。其中pAT153（Twigg and Sherratt 1980），係質體的HaeIIB與G DNA段落經過缺失突變（deletion）的結果（A. Cowie與E. Ruley惠賜的未發表資料）。此二DNA段落控制質體製造的數目（參看圖1-B）。經過改造以後，其所合成的質體數量，較原來pBR322超過1.5至3.0倍。另外一種稱為pXf3的衍生質體（D. Hanahan未發表之資料），其體積較pAT153為更小（參看圖1-B）。

體積小的質體，在實驗時有多種的優點：其DNA易於操縱而不會導致損害，同時其限制座的分佈狀態〔或稱限制圖（restriction map）〕也比較簡單。除此之外，體積小的質體通常產量較高，因此其帶入菌體中的外來DNA的序列，也較易以輻射性探測DNA（radiolabeled probes），利用雜合（hybridization）的技術測得。不過小質體也不無缺點。以pXf3為例，缺少原來存在於pBR322與pAT153的BamI及AvaI限制座，減少了其在選殖上的用途。這些失去的功能，可藉添加聚合接頭（polylinker）於其DNA上，以資補救。聚合接頭是一段含有密集的多種限制酶限制座的DNA。在本章的圖1-C，顯示plink322質體（B. Seed未發表之文獻）攜帶聚合接頭的圖解說明。

在本章的其他篇幅，我們備有pBR322以外的一些質體的圖解。它們雖然不如pBR322，以及其衍生質體那麼使用得普遍，但是它們都各有其特殊的功用。例如pMK16（圖1-C）在其DNA上的抵抗康黴素（kanamycin-resistance）基因中，含有單一的SmaI與XhoI限制座。pKC7與pACYC184（圖1-D）在抵抗氯黴素基因中含有選殖座。較大型的pCR1（11.4 kb）與pSC101（9.9 kb；圖1-E



pBR322

長度：4.3 kb

複製體：Col E1，relaxed

篩選標誌基因：Amp<sup>r</sup>，Tet<sup>r</sup>

單獨限制座：*Ava* I, *Pst* I, *Bam* HI, *Pvu* II, *Cla* I, *Sal* I, *Eco* RI, *Hind* III

插入非活化的基因:  $\text{Amp}^r - \text{Pst I}$

Tet<sup>r</sup>-*Bam*HI, *Hind* III (variable), *Sal* I

引用文献: Bolivar *et al.* (1977); Sutcliffe (1978, 1979).

備註：pBR322是質體選殖媒介中最多能者。其核苷酸序列已經學者徹底的研究與瞭解（Sutcliffe 1979）。

圖 1-A

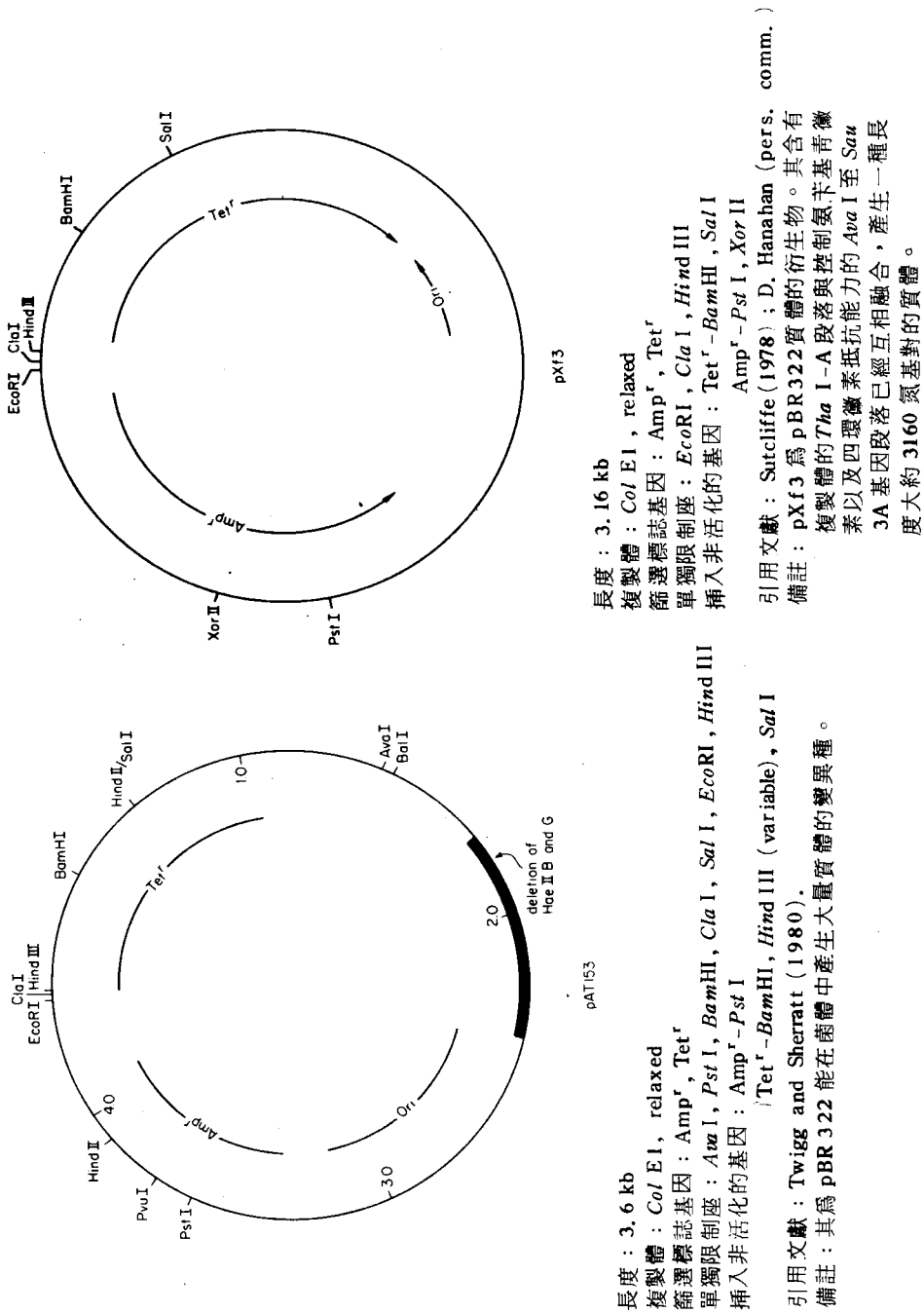


圖 1-B