

本核心實驗的主角 - GUS 基因

台灣大學園藝學系 黃鵬林

本實驗課程的目標，係提供初學者基礎的生物技術觀念，並使初學者熟悉生物技術的基本操作。本課程於是設計一系列連貫性的實驗，並依操作技術的不同歸類在三個獨立的領域：其一為DNA，其二為RNA，其三為蛋白質。課程的架構，係使用同一個基因，先進行重組DNA的操作(第二章)，構築一個表現質體，再利用此表現質體表達出RNA，來進行北方雜合分析(第三章)，最後利用該表現質體來表現大量的蛋白質，於是可以進行蛋白質的純化與檢定(第四章)。為了讓初學者容易得到實驗結果，以建立初學者的信心與興趣，於是選擇大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 之 β -glucuronidase (GUS) 基因 (*uidA* 或稱 *gusA*) 作為本實驗課程的主角。該基因產物為GUS蛋白質，相當穩定而不易降解，並為一水解酵素，有簡易的測定方法；且可使用市售的基質 (substrate) 在原位 (*in situ*) 顯現出酵素的活性，以肉眼即可檢測其產物，非常便利。基因選定之後，我們於是構築了兩種質體(如表 0.1 所示)，包括 pBlueGus及其表現載體pQG11 (其構築流程顯示於圖 0.1)。簡而言之，首先利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 合成GUS基因，此基因長度為 1,807 bp，並於 5' 及 3' 端點分別接上 *Bam*HI及 *Hind*III限制酶的切割序列，然後分別使用pBluescript SK(-) 及pQE31 為載體及表現載體，經 *Bam*HI及 *Hind*III酶切之後，將GUS基因與pBluescript連接，或連接至pQE31 核糖體結合序列 (ribosome binding sequence) 以及連續六個組胺酸 (histidine) 解碼序列 (6xHis) 之下游。為了確保GUS基因的忠實度 (fidelity)，防止聚合酶連鎖反應合成基因片段出現失誤的可能性，於是在表現載體 pQG11 構築完成之後，利用所表現的蛋白質來測定酵素活性，所使用的檢測法是使用 *p*-nitrophenyl β -D-glucuronide為基質，經反應後於分光光度計測量 415 nm之吸光。如此，為了本課程所設計之實驗材料就準備就緒了。

參考文獻：

- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986) β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc Natl Acad Sci USA **83**: 8447-8451
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J **6**: 3901-3907

表 0.1 本課程所用之 GUS 基因構築一覽表

Name	Vector	Insert	Host	Selective antibiotics
pBlueGus	pBluescript SK (-) (2.97Kb)	GUS gene (1.8 Kb) <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	JM109	Amp
pQG11	pQE31 (3.46 Kb)	GUS gene (1.8 Kb) <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	JM109	Amp
pQG11	pQE31 (3.46 Kb)	GUS gene (1.8 Kb) <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	M15 [pREP4]	Amp/Kan

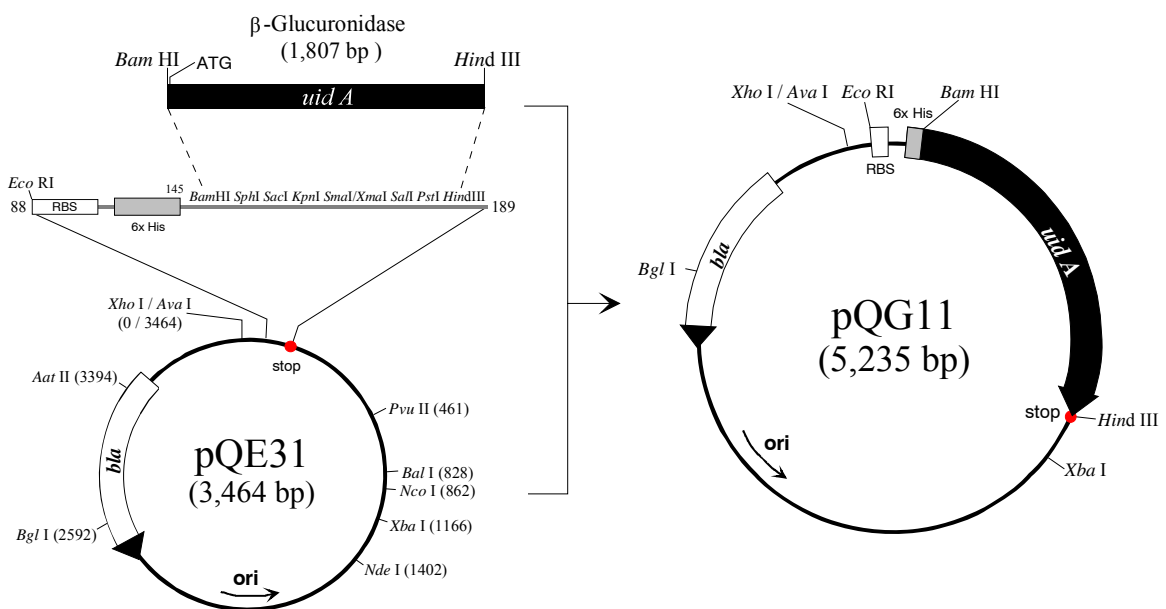


圖 0.1 pQG11 表現載體之構築