

熱及金屬離子壓迫作用引發HsP70基因 在鏈黴菌及鼠神經膠瘤細胞中表現

高中組生物科第一名

台灣省立台中第一高級中學

作者：李冠林

指導教師：梁光裕

一、緒 論

關於熱壓迫蛋白的作用研究起源於 1962 年，由果蠅唾腺染色體“泡夫”(puff)而起。泡夫受熱、水楊酸鈉，或 Dinitrophenol(1)所引發，也受其它形式的壓迫而引發(1~4)，只需引發數分鐘，如此的DNA合成也在其他細胞和組織中發現(5~6)。在 1973 年，Tissiere(7)引用 SDS 蛋白凝膠電泳法以分子量分析泡夫所引發出的蛋白質問題，這是第一個熱壓迫蛋白的分析突破。

培養細胞時，若給予一個較高的溫度，他們即產生一些高保存的蛋白—HSPs(Heat Shock Proteins)這作用反應後來被以一個探求基因規律及調節的研究方向所定形，基因被選殖出來(8~12)，有了一個基因規範模式的組織(13~20)，並在染色質上的結構給定了形(21~24)，鑑定出它們的核酸序列和轉錄作用(25~29)。

到目前為止，hsp 基因群在分子生物層次上的研究，有相當大的進展。其中發現鎘、銅、鋅等金屬離子可以引發 HSPs 的產生(35~38)。其它的報告則顯示 HSPs 的產生是傾向將毒性傷害的因素去除或保護細胞免於毒性傷害(35)。hsp 基因群也被建立，單單 hsp 70 就可成爲一個基因家族(gene family)。

hsp 70 基因是一個進化表現的基因變化(30)，這種作用也成爲一個基因表現選擇的一個例子(31~32)。

1978 到 1979 年研究員發現熱和其他很多壓迫作用可以引發一些相似的蛋白蛋物，像培養酵母菌、鳥類細胞等(33~35)，我們已知一些熱壓迫基因以高比例地保存於進化過程中，一不論是蛋白結構

或核酸分析—這是相當重要的，一些研究顯示這些蛋白提供細胞對毒性壓迫的保護作用。

hsp 70是被廣為研究的基因。在不同的物體中，70基因核酸或蛋白胺基酸序列中，都可找到部分相同次序。大腸桿菌 HSP 70胺基酸序列與人類的 HSP 70比較，相似性可達50% (36)，所以推測 hsp 70在高等哺乳類動物細胞和低等諸生物中，均具有其相似性。

鏈黴菌能生產五千多種抗生素，在醱酵工業及醫藥界地位重要，且傳統的菌種篩選和突變種找尋已漸日暮途窮，益使鏈黴菌分子生物學的研究受到重視。目前國外對於鏈黴菌的研究專題除了抗生素基因的選殖改造之外 (37)，更有著重在基礎研究探討鏈黴菌的形態分化問題及基因表現之控制訊號等 (37~38)。

鏈黴菌 (*Streptomyces*) 是放射菌類 (*Actinomycetes*) 中，分化較為複雜的一株。鏈黴菌在分類上雖屬於原核生物的葛蘭氏陽性細菌，然而其許多生長分化的現象卻十分類似真核生物的真菌類，與屬於葛蘭氏陰性菌之大腸桿菌有相當的距離。例如其細胞基因組 (genome) 約 10^4 kb，為大腸桿菌 (*E. coli*) 及同具分化現象之枯草桿菌 (*Bacillus*) 的二倍多 (39)。

在 hsp 70基因的研究上，大致決定了 hsp 70基因群的相似性問題。各物種間 hsp 70基因與人類 hsp 70基因的相似程度高至低之次序同於由分化複雜性及功能專一性進行的物種高低等分類次序，愈高等則愈相近 (38~39)。如此，在鏈黴菌中找到與人類 hsp 基因的相似性是可能的；又各種壓迫引發蛋白的作用被研究於各物種間，迄今尚未見及關於鏈黴菌的報告；因此，在本研究中選擇了鏈黴菌做為主題對象，施以熱及銅、鋅、鎘等壓迫。

一般金屬離子的壓迫研究中，多發現對於肝、腎等細胞具有引發蛋白特殊增產的作用 (如：metallothioneins)，這種作用被科學界推論為在個體中，肝、腎細胞多可能接觸此類重金屬離子，故其分化趨向對重金屬離子作用下，某些基因有被引發表現的特性 (35)。

神經膠細胞則不屬此類，但金屬離子是否引發神經膠細胞表現出 HSP70的增產則未見此類報告。故本研究的第二材料對象則選擇神經

膠細胞株 Glioma cell F—98。由於此細胞乃鼠類，哺乳動物細胞，與鏈黴菌分化程度相差甚遠，故兩者間有其比較的價值。F—98是由 ENU(N-ethyl-N-nitrosouria) 透過胎盤誘發實驗鼠之神經膠質瘤經培養純化而得。

二、研究材料及方法

細胞系及細胞培養 (Cell Strains and Cultures)

F—98細胞：鼠神經膠瘤細胞 (Glioma F—98) 培養於 DMEM (Dulbecco's modi-fied Eagle medium，加入 10% FBS (fetal bovine serum)，抗生素 (penicillin 200 IU/ml，Streptomycin 200 mg/ml)，4 mM L-Glutamine。將細胞接種於培養瓶或培養皿，置於 10% Co₂，37°C 的培養箱。

大腸桿菌：將少量菌體接種入 L-broth 中，37°C 水浴隔夜培養 (39)。

鏈黴菌株：培養在固體培養基培養皿上以取孢子時，將少量孢子取下置於試管中，加入玻璃細珠強打，以均勻孢子，將孢子液塗於 YEME 或 TBS 固體培養基，28°C 培養。(YEME (40): Yeast extract, peptone, malt extract, D-glucose, Sucrose, MgCl₂·6H₂O, Glycine) TSB: Tryptic Soy Broth)，若為液體培養 (41)，則直接將孢子液注入液體培養基，置入鋼絲圈於 28°C 搖動培養。

壓迫作用施與 (Stress Methods)

熱壓迫：F—98細胞及鏈黴菌培養後期置於 42°C

金屬離子壓迫：鏈黴菌系已被測驗了金屬離子抑制生長曲線，由此曲線並參考液體培養結果決定以下濃度：銅離子、鋅離子 (CuSO₄, ZnSO₄) 均為 2mM，鎘離子 (CdSO₄) 0.05 mM。F—98細胞則視其最大容忍度決定：銅離子、鋅離子 0.1mM，鎘離子 0.01mM。

限制酶切割 DNA 作用 (Restriction Enzyme Digestion)

DNA 經過定量後，將 DNA、酵素、緩衝液依比例混合置 37°C 約兩小時。緩衝液之使用依酵素而有所不同，通常以下為配方：50mM tris-HCl (CPH 7.9)，10 mM MgCl₂, NaCl) 酵素作用後以 phenol/choro-

form 純化，並以 100% 酒精及醋酸鈉沈澱。以 70% 酒精輕輕洗去殘鹽，再將 DNA 溶於 TE 緩衝液 (42)。

DNA 電泳分離 (Agarose Gel Electrophoresis)

DNA 片斷採用 0.8% agarose / TAE 膠體分離 (TAE: 40 mM tris-acetate, 2mM EDTA)，在此前 DNA 樣品加入電泳色劑 (20% Ficoll, 0.15% bromphenol blue, 0.5% SDS)。電泳完畢以 0.5 mg/ml ethidium bromide (43) 染色，在 UV 下觀察。(44, 45)

核酸分析 (Nucleic Acid Analysis)

DNA (hsp70) 探針製備 (Probe Preparation)

自大腸菌中抽出的質體 DNA 經酵素 (Sst II, Hind III) 作用後，置於低熔點洋菜膠 (low melting point agarose gel) 進行電泳。染色後以長波 UV (350 nm) 觀察，並以刀片切下帶有 DNA 片段的部分；65°C 溶化此片段洋菜，加入 0.1 體積的 5 M NaCl 以 hot phenol / chloroform 純化。沈澱後保存在 TE 緩衝液中。

依 nick-translation (46) 的方法將 α -32p 標記此 DNA 片斷。以 E. coli DNA polymerase I, α -32p α ATP, DNase I 反應作用；經 column 分離純化作用，在液態放射計數器中進行測驗，決定 specific activity (more than 1×10^8 cpm/mg.)

DNA-DNA hybridization 混交法 (50) (Southern Hybridization) 經核酸鑿識酶切割好之 DNA 以洋菜膠電泳分離。再用 Southern blot 方法將 DNA 轉移固定於同大小之 nitrocellulose paper。接著作 DNA-DNA hybridization, nitrocellulose paper 須先將空白位置以 denatured calf-thymus DNA 補滿。hybridization 後之 nitrocellulose paper 再經洗滌、乾燥、壓片。

DNA-RNA Hybridization 混交法 (Northern Hybridization)

將 RNA 定量，於 1.5% agarose / 7% formaldehyde gel 電泳 (47, 48, 49)，以 Northern blot 的方式轉印至 nitrocellulose filter 上。以 nick-translation 將 32-P 標上 DNA 探針進行混交。之後乾燥、壓片。

核酸製備 (Nucleic Acid Preparation)

RNA 萃取神經膠細胞 RNA 是以guanidinium / CsCl (51) 方式。將細胞以橡皮片括下，PBS (phosphate buffered saline) 清洗後，以 lysis buffer 將細胞打破，每毫升中加入 1 克 CsCl (52 , 53)。以 guanidium isothiocyanate solution (50 % guanidium isothiocyanate / 1 % Sarkosyl 1 / 5 mM sodium citrate / 0.1 % Antifoam A / 0.7 % betamercaptoethanol)，當做 cesium chloride gradient。離心 35 K，16 小時，底部沈澱即為 RNA。水溶後以 chloroform: 1-butanol = 4 : 1 加比萃取，以 100 % 酒精沈澱溶於水，保存於 -70 °C。鏈黴菌 RNA 則使用 Streptomyces CsCl- banding 的方式。離心菌液，以 Kirby 液及冰冷玻璃珠打破菌體，加等積 phenol / chloroform 打勻，離心後取上清液以 isopropanol 沈澱，溶於 3ml 水，每 ml 加 CsCl 1 克。以 1.5ml, d = 1.702 的 CsCl 為 cushion buffer，35 K 離心 16 小時。同前法水溶 RNA 後，萃取、沈澱、保存於 -70 °C。

RNA 萃取，大腸桿菌質體 DNA 萃取法依照 alkaline (54 , 55) lysis method 進行。F - 98 細胞 DNA 萃取的方式參照 "procedure"，細胞以 PBS 洗後，置於 NTE (10 mM NaCl / 20 mM Tris pH 8.0 / 10 mM EDTA pH 8.0) 最後濃度為準，加入 proteinase K 200 mg / ml, SDS 0.15M。以 phenol / chloroform 萃取，以 isopropanol 沈澱 (56)。鏈黴菌 DNA 萃取參考 Mintermann (1981) 及 Chater (1982) 的方法，再稍改進。5 克菌絲加入 10 ml TE，10 mg lysozyme, 37 °C 水浴 10 分鐘後，加入 20 % SDS 1 ml, 10 ml phenol 5M NaCl 1.5ml，離心後以 chloroform, isoamylalcohol (V / V = 24 : 1) RNase 加入達 30 mg / ml 50 °C 水浴 1 小時。再加入 protease K 達 100 mg / ml (NaCl 100 mM, SDS 0.4 %) 37 °C 水浴 1 小時，以 phenol / chloroform 純化。

活體放射標記 (In vivo isotop lablling)

F - 98 細胞在壓迫 60 分鐘後，將培養液換成 methionine-free 的培養液。1 小時後加入 35 S - Met 達 50 mCi / ml 培養 4 小時。

蛋白分析 (Protein Analysis)

蛋白樣品製備：鏈黴菌、F—98細胞內蛋白萃取乃將細胞以超音波(sonicator)打破，直接分析。鏈黴菌胞外蛋白則以5倍體積Aceton沈澱後分析。F—98放射標記者則以溫差致破法取得；將細胞凍存液氮，再回溫至37°C以致破裂。

SDS 膠體電泳(SDS PAGE)：蛋白樣品加入等量之樣品緩衝液，置沸水中3min，以12% SDS-polyacrylamide gel，於35mA 的電流下泳動約4小時，取出凝膠，coomassie brilliant blue 染色液染色，褪色。

三、結果與討論

由鏈黴菌的 SDS PAGE，熱作用或鎘離子壓迫後的樣品中出現了大量的70 kd蛋白；此蛋白於胞內、外均存在。熱壓迫作用樣品中，較其它樣品多了110,28Kd 的兩個蛋白，同樣存在胞內及胞外。一個40Kd 的蛋白出現在熱作用以外的各種培養方式，胞內外的樣品中。胞內23—25Kd 有個蛋白在銅、鋅、鎘三種處理中的表現量較熱作用或控制組都要少。鏈黴菌 TK 64 (lividans), An⁻⁵(antibioticus mel⁻) 對以上實驗皆有相同結果反應。

Glioma F—98 細胞的 SDS PAGE 結果，一個約70 Kd 的蛋白僅出現在熱作用的樣品中。而經放射標記後，更清楚地發現此70 Kd 的蛋白在熱作用樣品中，同樣在鋅、鎘的樣品中有少量表現。另有一個約75Kd 的蛋白出現在各樣品中，但以熱樣品中最多。此外，熱作用的樣品中較其他各樣品多出了三種蛋白：78，85，90 Kd。

以 hsp 70 基因探針對各株鏈黴菌及 Glioma F—98 進行 Southern hybridization，三株鏈黴菌及 Glioma F—98 的染色體 DNA 中，都存在有能與 hsp 70 (human, inducible) 相配對的序列片段。

三株鏈黴菌 DNA 切割後能與探針相配的片段位置分布 antibioticus，An⁻⁵ 兩者相同，TK 64 片段則稍小了約 0.3 kbp。Gliom F—98 片段分布與鏈黴菌比較就有顯著不同(參閱 Figure)。

進一步以 Northern hybridization 分析各樣品中 mRNA 的轉錄作用，鏈黴菌三株反應相同；在熱作用或鎘壓迫下，轉錄出能與 hsp 70

探針相配的 mRNA；對照組、銅、鋅壓迫作用則不見此 mRNA 的產生。Glioma F—98 則在熱、鋅、鎘壓迫下均有此 mRNA 的明顯表現；銅壓迫產生此 mRNA 的量相當低，以 laser densitometer 測驗膠片，銅壓迫所產生的此種 mRNA 的量僅有鋅或鎘處理的樣品的十分之一。

在鏈黴菌或 Glioma F—98 產生的“hsp 70—like gene”mRNA 的表現可以發現此基因（在 Streptomyces 及 Glioma 中此基因序列並不一定相同）對熱及金屬離子壓迫作用均有被引發轉錄的特性。但金屬離子作用下此 mRNA 產生量總低於熱作用的樣品，猜測熱作用還是此基因的主要誘因。熱、金屬壓迫均不利生長，至於是否都能引發“SOS”信號的產生，就待進一步研究。各種金屬離子在此 mRNA 的促發合成作用效果不一；鎘在各株材料中均可引發，鋅、銅在鏈黴菌株中不引發；而對 Glioma F—98 此 mRNA 的產生量為鎘多於鋅多於銅，此序列同於對三種金屬離子所做的毒性測驗（Figure 2~4，以鏈黴菌為對象）。毒性愈高，環境愈危險，此 hsp 70—like 基因轉錄也愈多。又此基因在一般狀態不表現，不良環境下由不同信號（熱、金屬離子）引起相同結果（此基因轉錄了），更可說明此基因的多元引發性。並得知要有刺激，此基因才表現，平常細胞是不需要此基因產物的。至於為何如此，也只有保護此細胞的說法可以解釋。以上數點與目前對 hsp 70 的作用機制瞭解——保護細胞，免於熱害或毒害——有相同的趨向。

Northern hybridization 第一次壓片後另取一長壓片時間：三天，並無發現較原片多出的 mRNA 位置反應，所以推測在壓迫環境下引發多種 mRNA 的轉錄，這些 mRNA 的序列與 hsp 70—like mRNA 並無相配之密碼，蛋白結構相似的可能性也降低。

蛋白分析的結果中，70 Kd 蛋白的有無與 mRNA 的有無可以相配合；唯銅作用於 Glioma F—98 的樣品中並無發現蛋白的 70 Kd，其 hsp 70—like mRNA 合成量僅為鋅、銅合成量的十分之一。以 mRNA 太少致蛋白相對太少而看不見的猜測為正確可能性較大；銅抑制轉譯作用的可能性較小。另在鏈黴菌金屬壓迫試驗中，兩個約 25，40 Kd

的蛋白產量減少，是因為此蛋白較不重要，在受迫的緊急狀態下暫停生產；或重金屬抑制此蛋白合成過程或其 mRNA 合成過程中的某一環；或有其他因素，尚需進一步研究。（推測此二蛋白非 HSP25, HSP40）

不論鏈黴菌或 Glioma F-98 在熱作用下的樣品經分析的結果，多出來的蛋白種類總較其他壓迫作用為多，根據科學界目前的看法，這些蛋白即為 HSPs (heat-shock proteins)，各種分子量不同的熱壓迫蛋白。

進行蛋白分析時，鏈黴菌 *antibioticus* 的 *mel* 基因會產生 Tyrosinase 促化 tyrosine 為 melanin 而嚴重影響 PAGE 的結果分析（原因不明），故以 An-5 (*S. antibioticus mel*⁻) 的結果來討論 *S. antibioticus*。

做為探針的 *hsp70 gene* 是 human, inducible 的 cDNA。推測其配合性受真核細胞“DNA intron”的因素而在 Glioma F-98 受到影響。但 Southern hybridization 的結果中，鏈黴菌及 Glioma F-98 對此基因都有明顯的基因相似相配反應。由此，鏈黴菌的 *hsp 70-like* 基因有被選殖分析的價值。至於相似性的決定，則待選殖後定序才可確定。

進行 Southern hybridization 時，因考慮到哺乳動物細胞 DNA 全量約為鏈黴菌的 10^3 倍，故取 DNA 測驗時，Glioma F-98 DNA 全量置入為鏈黴菌的 10 倍，希望能加強 band 的強度。

Southern hybridization 的結果，三株鏈黴菌 DNA band 位置極為相似，*antibioticus* 與 An⁻⁵ 完全相同。由此知 An⁻⁵ 並沒有在 *hsp 70-like* 的部分發生突變。且在不同的鏈黴菌株中 (*lividans*, *antibioticus*)，*hsp 70-like* 基因切割處並無太大變化 (Restriction Fragment Length Polymorphism)，推斷此基因具有相當高的保守性 (conserve)。

在不同物種間 (human, mouse, *Streptomyces*)，*hsp 70 genes* 具有如此的相似性；由此，我們可以大致推想 *hsp 70* 的產物具有其一定程度的重要性。這有兩種猜測：第一、在最初生物演化過程中，此基

因即存在；後來分化為不同物種，但此基因仍為必要性基因，故一直被物種們保存下來，之後產生些許變化，而主要機制仍被保存下來。第二、不同物種間均需要如此的一種作用機制，所以往同一方向演化，產生結構相似的蛋白而致胺基酸、核酸序列趨向相似。以上說明了同工演化的可能性。

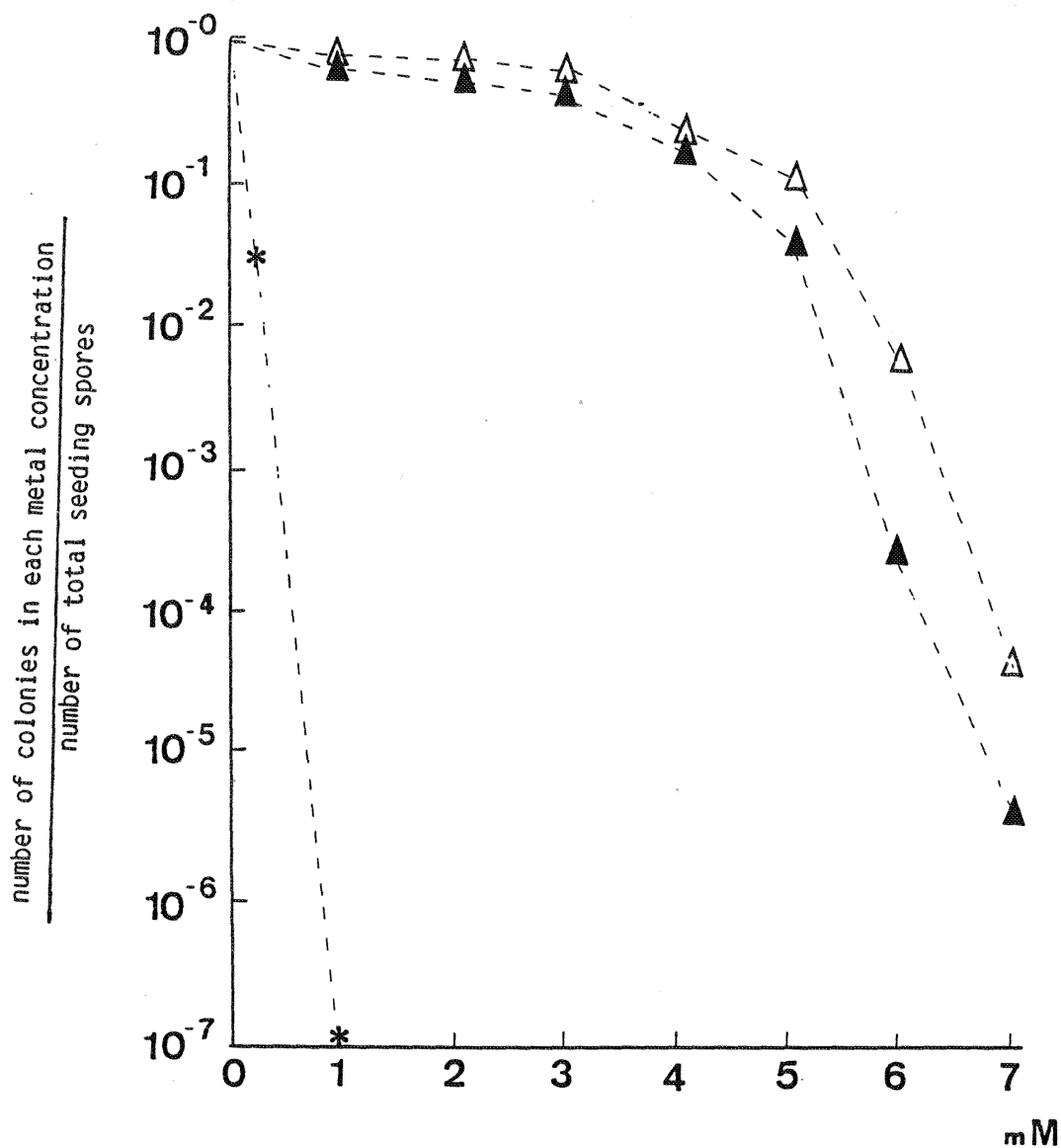


Figure 1.

Killing curve of TK64 (*Streptomyces lividans*) with metals.

The curve shows how the survival was of TK64 cultured with each concentration of metal. (Δ:copper, ▲:zinc, *:cadmium)

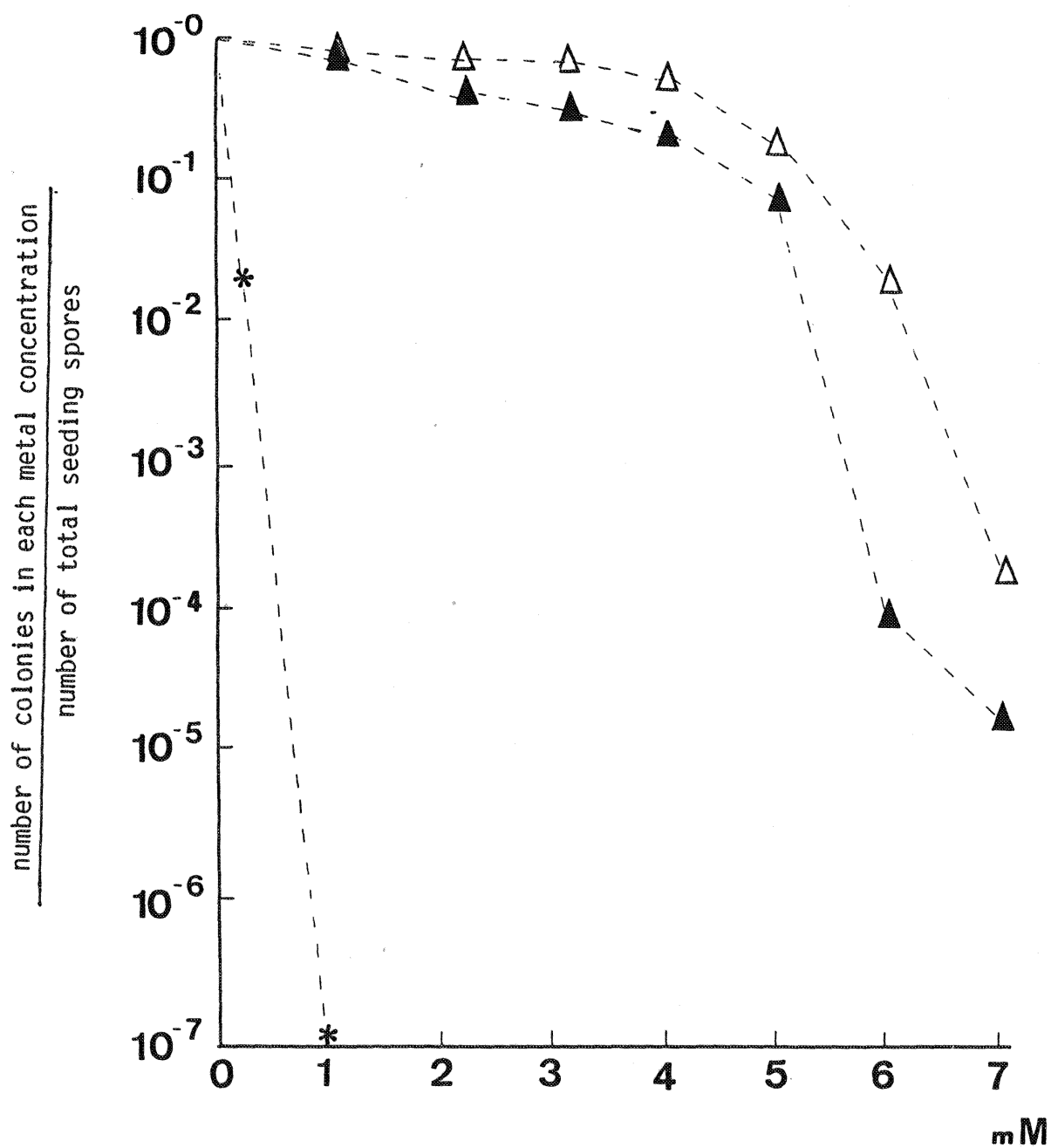


Figure 2.

Killing curve of *S. antibioticus mel⁺*

The curve showed how the survival was of *S. antibioticus* cultured with each concentration of metal. (Δ: copper, ▲: zinc, *: cadmium)

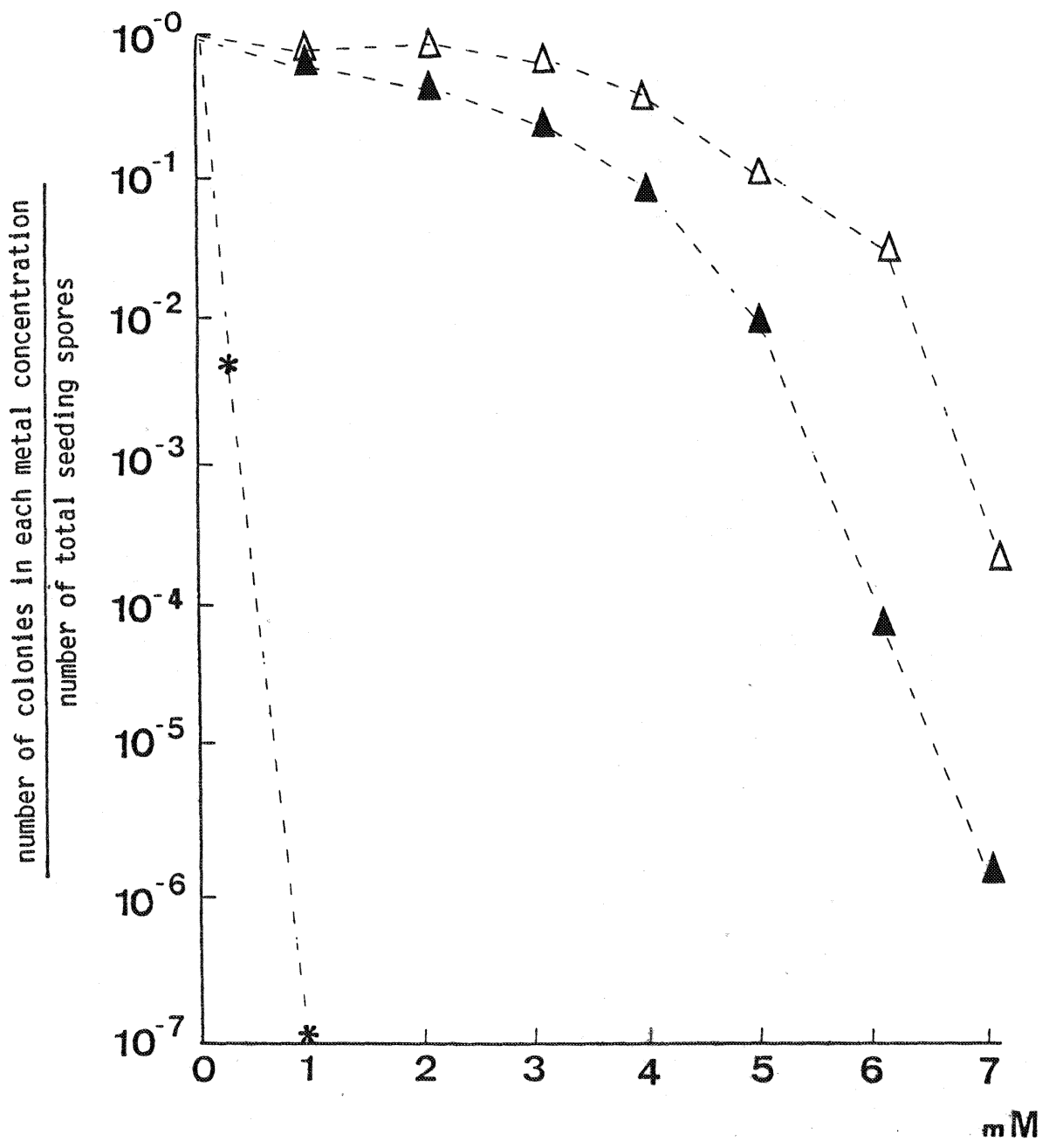


Figure 3.

Killing curve of *S. antibioticus mel⁻* (An-5)

The curve showed how the survival was of An-5 cultured with each concentration of metal. (Δ: copper, ▲: zinc, *: cadmium)

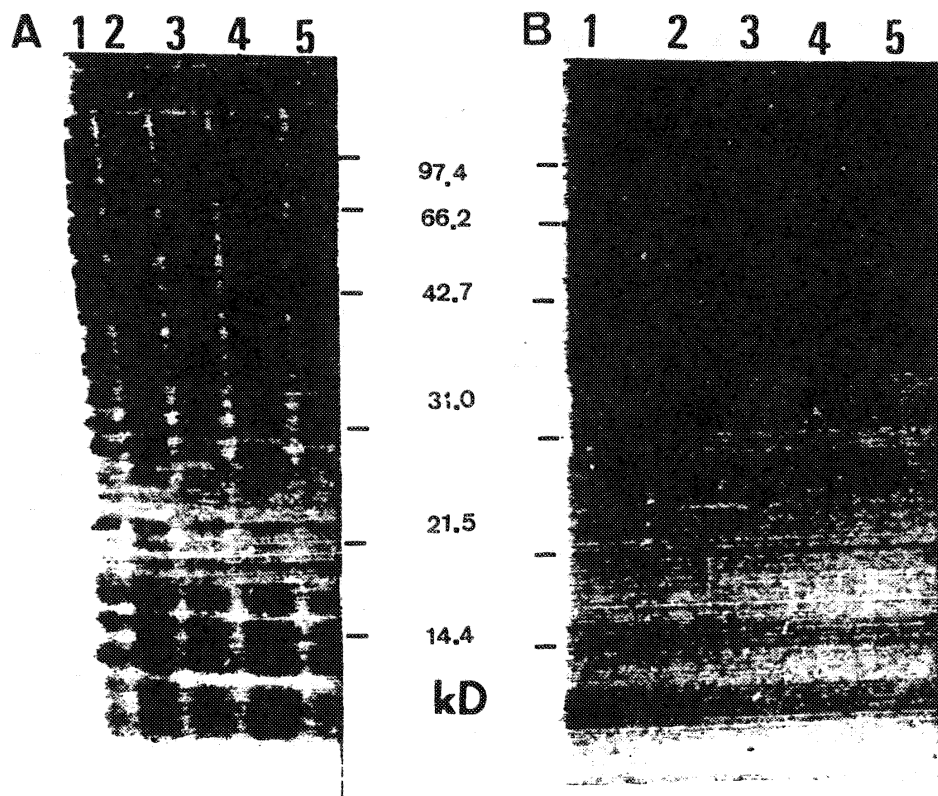


Figure 4.

Protein analysis of antibioticus cultured with metal.

The PAGE was a 12.5% SDS-poly-acrylamide gel. Gel was stained with coomassie brilliant blue. pictures: A, intracellular proteins; B, extracellular proteins. lanes: 1, control; 2, under heat-shock; 3, cultured with copper 2mM; 4, cultured with zinc 2mM; 5, cultured with cadmium 0.05mM. When the strain was cultured under heat-shock, 28, 70, 110kd proteins were induced; 40kd protein was repressed (lane 2). When the strain was cultured with metals (copper, zinc, cadmium), a protein about 25kd was repressed.

四、參考資料

1. Ritossa, F. 1962. *Experientia* 18:571-73
2. Berendes, H. D. 1968 *Chromosoma* 24:418-37
3. Ashburner, M. 1970. *Chromosoma* 31:356-76
4. Leenders, H. J. Berendes, H. D. 1972. *Chromosoma* 37:434-44
5. Ritossa, F. M. 1964. *Exp. Cell Res.* 36:515-23
6. Berendes, H. D. 1965. *Dev. Biol.* 11:371-84
7. Don, S. J. Research of Oncogenes in Glioma (master thesis of National Yang-Ming Medical College Institute of Biochemistry).
8. Linvak, K. J., Freund, R., Schweber, M., Wensink P. C., Meseison, M. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5613
9. Schedl, P., Artavanis-Tsakonas, S., Steward, R., Gehring, W. J., Mirault, M. E., et al. 1978. *Cell* 14:921-29
10. Craig, E. A., McCarthy, B. J., Wadsworth, S. C. 1979. *Cell* 16:575-88
11. Moran, L., Mirault, M. E. Lis, J., Schedl, P., Artavanis-Tsakonas, S., Gejromg. W. J. 1979. *Cell* 17:1-8
12. Artavamos-Tsakonas, S., Schedl, P., Mirault, M. E. Moran, L., Lis, J. 1979. *Cell* 17:9-18
13. Holmgren, R. K., Livak, K., Morimoto, R., Freund, R., Meselson, M. 1979. *Cell* 18:1359-70
14. Ish-Horowitz, D., Holden, J., Gehring, W. J. 1977. *Cell* 12:643-52
15. Ish-Horowitz, D., Pinchin, S. M. Schedl, P., Artavanis-Tsakonas, S., Mirault, M. E. 1979. *Cell* 18:1351-58
16. Mirault, M. E., Goldschmidt-Cleermont, M., Artavanis-Tsakonas, S., Schedl, P. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5254-58

17. Wadsworth, S., Craig, E. A., McCarthy, B. J. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 2134-37
18. Craig, E. A., McCarthy, B. J. 1980. Nucleic Acids Res. 8 : 4441-57
19. Corces, V., Holmgren, R., Freund, R., Morimoto, R., Meselson, M. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 5390-93
20. Voellmy, R., Goldschmidt-Clermont, M., Southgate, R., Tissieres, A., Levis, R., Gehring, W. J. 1981. Cell 23:261-70
21. Wu, C., Bingham, P. M., Livak, K. J., Holmgren, R., Elgin, S. C. R. 1979. Cell 16:797-806
22. Wu, C. Wong, Y. C., Elgin, S. C. R. 1979. Cell 16:807-14
23. Wu, C. 1980. Nature 286:854-60
24. Keene, M. A., Corces, V., Lowenhaupt, K., Elgin, S. C. R. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 143-46
25. Paker, C. S., Topol, J. 1984. Cell 36:357-69
26. Paker, C. S., Topol, J. 1984. Cell 37:253-62
27. Wu, C. 1980. Nature 286:854-60
28. Wu, C. 1984. Nature 309:229-41
29. Wu, C. 1985. Nature 317:84-87
30. Brown, A. J. L., Ish-Horowicz, D. 1981. Nature 290:677-82
31. Storti, R. V., Scott, M. P., Rich, A., Pardue, M. L. 1980. Cell 4:395-404
32. Lindquist, S. 1981. Nature 293:311-14
33. Kekky, P. M., Schlesinger, M. J. 1982. Cell 15:1277-86
34. McAlister, L., Strausberg, A., Finkelstein, D. B. 1979. Curr. Genet. 1:63-74
35. Miller, M. J., Xuong, N. H., Geiduschek, E. P. 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5222-26
36. Guttman, S. D., Gorovskiy, M. A. 1979. Cell 17:305-17
37. Margoshes, M., Vallee, B. L. 1957. J. Am. Chem. Soc.

79:4813-14

38. Kagi, J. H. R., Vallee, B. L. 1960. *J. Biol. Chem.* 235: 3460-65
39. Miller, J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Gold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
40. Hopwood, D. A.; M. J. Bibb; K. F. Chater ; J. Kieser, C. J. Bruton; H. M. Kieser ; D. J. Lydiate; C. P. Smith ; J. M. Ward and H. Schrempf (1985) *Genetic Manipulation of Streptomyces-A Laboratory Manual*. the John Innes Foundation, Norwich.
41. Cundliffe, E. (1978) *Mechanism of Resistance to Thiostrepton in the Producing-Organism S. azureus*. *Nature* 272:792-795
42. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston et al, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York
43. Sharp, P.A., B. Sugden, and J. Sambrook. (1973). *Biochem.* 12:3055-3063
44. Helling, R. B., H.M. Goodman, and H. W. Boyer. (1974). *J. Virol.* 14:1235-1244
45. Jones, R. (1984). *Molecular biology of nitrogen fixation in Azotobacter chroococcum*. (Thesis) University of Sussex, U.K.
46. Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. 1977. *Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I*. *J. Mol. Biol.*, 113:237-251
47. T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook (1982). " *Molecular cloning* " Cold Spring Harbor Laboratory.
48. D. A. Hopwood, M, J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J.

- Bruton, H. M. Kieser, D. J. (1985) "Genetic Manipulation of *Streptomyces*" The John Innes Foundation, Norwich.
49. Bengtke Jaurin and Stanley N. Cohen (1984) "Streptomyces lividans RNA Polymerase Recognized and Uses *Escherichia coli* Transcriptional Signals" *Gene* 28:83-91
50. Southern, E. 1975, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517
51. Glisin, V., Crkvenjakov, R. & Byus, C. 1974. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*, 13 : 2633 see 49
see 50
52. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. (1980) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
53. Birnboim, H. C. and J. Doly. (1979). *Nuc. Ac. Res.* 7:1513-1521
54. Koshy, R., Manspas, P., Muller, R., Hofschneider, P. H. 1981. Detection of hepatitis B virus-specific DNA in the genome of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis tissues. *J. Gen. Virol.*, 57:95-102
55. Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, and H. Schrempf. 1985. *Genetic manipulation of Streptomyces-A laboratory manual*. The John Innes foundation, Norwich, England.
56. Hunter, I. S. 1985. Gene cloning in *Streptomyces*. in "DNA Cloning Volume II-a practical approach". edited by D. M. Glover. pp. 19-44.
57. Brosius, J. 1984. Plasmid vector for the selection of

promoters. *Gene*. 27:151-160.

58. Chater, K. F., D. A. Hopwood, T. Kieser, and C. J. Tompson. 1982. Gene cloning in *Streptomyces*. *Curr. Top. Microbiol, Imm.* 96:69-95.

評 語

本件作品為使用最新穎之研究方法如膠過濾 DNA•DNA 新交法（蘭氏法）及 DNA•RNA（新交法）等證明經熱或重金屬處理鏈黴菌珠式鼠神經膠瘤細胞，證明有熱休克蛋白質七十之產生，其研究成果豐碩，頗有創意並具學術價值。