

生物化學

生物化學基礎

Biochemistry Basics

細胞與分子

胺基酸

蛋白質

核 酸

酵 素

國立台灣大學 生化科技學系

莊 榮 輝

2007

BST

本講義的範圍，包含整個生物化學課程的最前面三分之一，其內容從概論的細胞與分子開始，經胺基酸與蛋白質，到最後的酵素；另外也加上基礎核酸的部分，可說是一部迷你生物化學。下表是本課程的目錄，包含兩大部分：(1) 上述各部份的文字講義、(2) 上課所用投影片。表中也把講義與 Lehninger 生化課本各章節間的關係做一比較，以供參考。

講義內容		Nelson & Cox (2005) <i>Principles of Biochemistry</i>	
文章	節 (投影片連結)	相對章名	說明
細胞與分子	1 生命源起	1 The foundation of biochemistry	
	2 細胞的生物化學	1 The foundation of biochemistry	
	3 細胞分子	2 Water	
胺基酸	1~3, 4	3 Amino acids, peptides, proteins	不含生化技術
蛋白質	1 蛋白質構造	4 The 3-D structure of proteins	
	一級構造		
	二級構造		
	三級構造		
	四級構造		
	2 蛋白質性質	5 Protein function	不含免疫學部份
核酸	1 分子構造	8 Nucleotides & nucleic acids	核酸構造
	2 功能性質		核酸化學
	3 研究技術	9 DNA-based information technology	
酵素	1 酵素印象	6 Enzymes (含部份 12 Biosignaling)	Introduction
	2 酵素命名及構成		Introduction
	3 酵素動力學		Kinetics
	4 酵素的抑制		Inhibition
	5 酵素的催化機制		Mechanism
	6 酵素活性的調節		Regulation
	7 細胞代謝與酵素調控		
	8 酵素在生物技術上的應用	9 DNA-based information technology	
課本請詳細閱讀，並且勤做練習題。			

以下為文字講義部份的目錄

細胞與分子

1 生命源起 1

組合式宇宙粒子 分子演化 原始細胞

2 細胞的生物化學 2

2.1 原核細胞 2

2.2 古生菌 2

2.3 真核細胞 2

細胞核 內質網 高爾基氏體 微體 細胞骨架系統 細胞膜 粒線體 葉綠體
造粉體 其他

3 細胞分子 4

3.1 水與 pH 4

3.2 細胞的組成分子 4

3.3 分子間的作用力 5

離子鍵 氫鍵 疏水性引力 凡得瓦爾力

問題集 6

胺基酸

1 胺基酸基本構造 7

2 胺基酸分類 7

二十種胺基酸的分類及性質 8

胺基酸分類模擬地下鐵道地圖 9

3 胜肽 9

4 胺基酸的離子性質 10

4.1 解離度 10

質子搶奪 Ampholyte 質子解離

各種胺基酸的解離基團及其 pK_a 10

4.2 等電點 10

弱酸如何作為緩衝分子？ 11

問題集 12

胺基酸與蛋白質的故事 (漫畫) 14

蛋白質

1 蛋白質構造 15

1.1 一級構造 15

1.2	二級構造	15
1.2.1	二級構造相當規律	15
	α螺旋 β長帶 其它螺旋構造	
1.2.2	連結性二級構造	16
	Turn 轉折 不規則形	
1.3	三級構造	16
1.3.1	三級構造的組成力量	16
1.3.2	三級構造的立體構成	17
1.3.3	三級構造的修飾	17
1.4	四級構造	17
2	蛋白質性質	18
2.1	變性及復性	18
2.2	蛋白質構形是活動的	18
2.3	蛋白質的專一性結合	18
	構形互補 二級鍵吸引力	
	□ 蛋白質間的專一性結合力量是如何構成的？	
3	蛋白質研究技術	19
3.1	蛋白質純化技術	19
	硫酸銨分劃法 膠體過濾法 離子交換法 親和層析法	
3.2	蛋白質性質與構造檢定	19
	蛋白質定量法 分子量測定法 等電點 胺基酸組成 蛋白質立體構造 質譜分析	
3.3	胺基酸序列決定法	20
3.3.1	傳統胺基酸定序法	20
3.3.2	cDNA 定序	20
3.3.3	以質譜儀定序	20
	問題集	21

核 酸

1	分子構造	23
	核苷酸 核酸 雙螺旋 三級構造 Palindrome 質體 RNA 基因表現	
2	功能性質	25
	參加重要生理功能 Central Dogma 變性與復性 鹼基組成的影響 雜合反應 Intron 與 exon	
3	研究技術	26
	核酸之純化 限制酶 核酸轉印法 基因操作 基因庫建構 PCR DNA 定序	

酵 素

- 1 酵素的命名 31
- 2 酵素的構成 32
 - 2.1 全酶 32
 - 2.2 輔酶 32
 - 2.2.1 輔助因子 32
 - 2.2.2 輔酶的作用 32
 - 2.2.3 輔助因子範例 33
 - 2.2.4 輔酶與 ribozyme 33
- 3 酵素動力學 34
 - 3.1 酵素催化反應 34
 - 3.2 酵素動力學 34
 - 3.2.1 基本概念 34
 - 酵素動力學大綱 35
 - 3.2.2 Michaelis-Menten 公式的推演 36
 - 3.2.3 Michaelis-Menten 公式的意義 36
 - 3.2.4 V_{\max} 及 K_m 的測定與意義 37
 - 3.2.4.1 V_{\max} 及 K_m 測定法 37
 - 直接作圖法 雙倒數作圖法 Eadie-Hofstee 作圖法
 - 3.2.4.2 K_m 的意義 37
 - 3.2.4.3 V_{\max} 的意義 38
 - 3.2.4.4 酵素活性定義 38
 - 3.3 雙基質反應 39
- 4 酵素的抑制 39
 - 4.1 酵素的抑制方式 39
 - 4.2 不可逆的抑制 40
 - 三種酵素抑制機制 41
- 5 酵素的催化機制 42
 - 5.1 酵素活性區 42
 - 5.2 協同式催化機制 42
 - Carboxypeptidase A 催化機制 42
 - 5.3 順序式催化機制 43
 - 5.4 酵素的專一性 44

5.4.1	專一性結合區	44
5.4.2	專一性結合力量	44
5.4.3	立體專一性	44
6	酵素活性的調節	45
	□ 酵素活性調節機制	45
6.1	蛋白質裂解	45
6.1.1	胰原或前驅體	45
6.1.2	蛋白酶	46
6.1.3	Ubiquitin-proteasome 降解路徑	46
6.2	磷酸化	47
6.3	非共價結合之信息傳導分子	47
6.3.1	cAMP	47
6.3.2	Calmodulin 攜鈣素	47
6.3.3	信息傳導路徑	47
6.4	異位酶	48
6.4.1	Aspartate transcarbamoylase (ATCase)	48
	□ 異位酶的 S 型曲線調控	49
6.4.2	異位酶的作用模型	49
7	細胞代謝與酵素調控	50
7.1	細胞代謝途徑	50
7.1.1	代謝調控原則	50
7.1.2	異化代謝途徑鳥瞰	50
7.1.3	糖類中心代謝途徑	50
7.2	代謝途徑中酵素的調控	51
7.2.1	基因表現的調控	51
7.2.2	酵素活性調節	51
7.2.3	激素調控	51
7.2.4	細胞空間的效用	52
7.3	研究酵素及代謝的材料	52
8	酵素在生物技術上的應用	53
8.1	酵素免疫分析法 (ELISA)	53
8.2	固定化酵素及酵素電極	53
8.3	蛋白質工程及人造酵素	53
8.4	Proteome 蛋白質體	54
8.4.1	Genome project 基因體計畫	54
8.4.2	Proteome 蛋白質體	54
	問題集	55

細胞與分子

Cell and Molecule

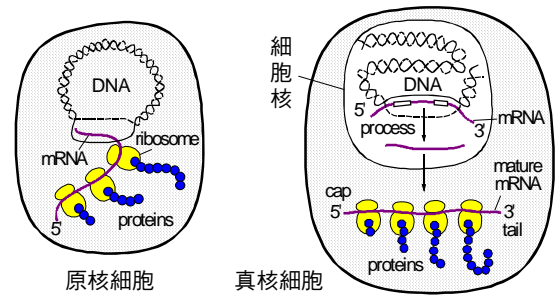


圖 1 原核細胞與真核細胞的比較

細胞是生命的單位，所有生物皆由細胞構成，探討生命現象可由研究細胞開始。最近數十年來注重分子層次的研究，特別是蛋白質、核酸、酵素等巨分子，是分子生物學的主流。生物依其複雜性，可分為單細胞與多細胞生物，後者由許多細胞共同組成個體，這些細胞各司不同功能以維個體生存，稱為分化；分化是細胞演化的重要關卡。就單一細胞來看，有較原始簡單的原核細胞 (prokaryote)，及較複雜的真核細胞 (eukaryote)，在構造與功能上有很大差異。

1 生命源起：

a. 組合式之宇宙粒子：

宇宙誕生後所生成的基本粒子，先組合成各種不同大小的元素，集合一些原子再組合成簡單的基本小分子。這些小分子在地球演化初期的巨大能量催化下，可生成胺基酸或核苷酸等單位小分子，後者再聚合成組合生命基礎的幾大類巨分子。

b. 巨分子演化：

巨分子中以核酸分子最為奇特，發展出複製自身分子的機制，同時兼有催化此複製機制的功能。而蛋白質因為其分子外形的多樣性，可能擁有更有效率的催化效果，並可經由核酸分子上的信息指導來合成，因此蛋白質與核酸共同演化成一組可以繁衍自身的共生聚合體系。

c. 原始細胞：

上述核酸與蛋白質的共生，在原始地球的資源漸漸不足後，可能再獲取一脂質薄膜包住此聚合體，以確保原料物質的掌控，以及分子自身的有效複製，成為原始的細胞形式。此一原始生命形態，具有完整且獨立的生命單位，可吸取外界的養料分子，並經由複製分裂而繁衍。

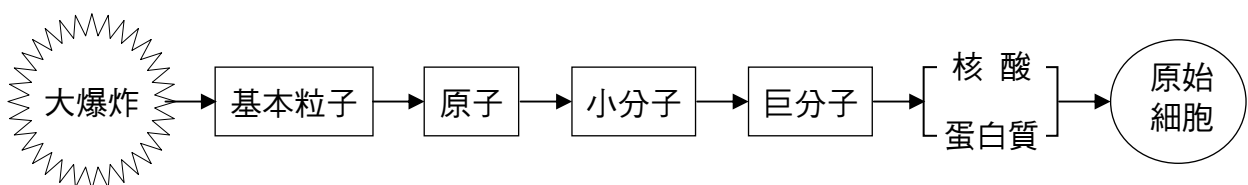


圖 2 由大爆炸到原始細胞的產生

2 細胞的生物化學：

以生物化學的觀點，複習細胞的重要活動。最近生命科學的趨勢，是以分子層次的觀察，研究細胞乃至於器官或生物整體的生理現象，就是 **molecular cell biology**。

2.1 原核細胞：

原核細胞的代表 大腸菌 (*E. coli*)，構造較為簡單，是分子生物學的主要研究對象。

- a. 細胞壁 (cell wall) 是由肽聚糖 (peptidoglycan) 構成，結構堅固，其功能有：
 - (1) 保護細胞；(2) 細胞內外物質及訊息的交通；(3) 抗原性及 (噬菌體) 接受體。
- b. 鞭毛 (flagella) 使細菌運動，而 纖毛 (pili) 為細菌交配時的管道。
- c. 細胞膜 (cell membrane) 控制細胞內外的選擇性交通，膜蛋白有重要功能。
- d. 細胞質 (cytoplasm) 散佈著各種分子，主要是可溶性酵素、核糖體 (ribosome) 等。
- e. 核區 (nuclear region) 不是真正的細胞核，散佈著遺傳物質 DNA，通常有一或數條 DNA 分子 (染色體)；細菌的細胞質中，另有環狀的質體 DNA (plasmid)，可作為基因操作的載體 (vector)，接入外來基因。

2.2 古生菌 (archaeobacteria)：

是一種介於原核與真核細胞間的細菌。古生菌與已知的原核細胞，在生化性質上有相當差異；喜好生長在極端的條件，極類似地球演化的早期狀態。可分為三大類：

- 1) Methanogens：甲烷菌極度厭氧，利用二氧化碳及氫氣產生甲烷。
- 2) Halophiles：嗜鹽菌，生長在如死海的高鹽濃度區。
- 3) Thermacidophiles：嗜酸熱菌，生長在火山口及溫泉帶，可耐酸至 pH 2。

2.3 真核細胞：

原核細胞與真核細胞的最大差異，在於後者有許多 胞器 (cellular organelles)，構造複雜；而最顯著的一個胞器，就是 細胞核 (nucleus)，原核細胞沒有細胞核。

a. 細胞核：

由雙層核膜包圍著，膜上有 核孔，核內有 核仁 (nucleolus)，核仁含大量 RNA，其餘的核質 (nucleoplasm) 部分則散佈著 染色質 (chromatin)，染色質含遺傳物質 DNA，在細胞分裂前，染色質會凝集成 染色體 (chromosome)。細胞核的形成，可能是由細胞的外膜向內皺縮，包圍住染色體後所造成的球狀體。

b. 內質網 (endoplasmic reticulum, ER)：

是細胞蛋白質的合成及輸送系統，依外形分為 RER (rough ER) 及 SER (smooth ER)；RER 在其膜上附著顆粒狀的 核糖體 (ribosome) 以合成蛋白質，蛋白質可通過內質網膜輸送到細胞外；不被送到胞外的蛋白質，則是散佈在細胞質中的游離核糖體負責製造。SER 表面光滑，沒有核糖體附著，可能與脂質的合成有關。

- c. 高爾基氏體 (Golgi body)：是細胞內蛋白質的集散地與加工場。
- 由內質網送過來的蛋白質集中於此，經分類與修飾後大部分被分泌出細胞外。
 - 不分泌出細胞的蛋白質，則集中後包裝成小球體，即為微體 (microbodies)。
 - 糖蛋白 (glycoprotein) 等在此修飾加上醣類，醣化需要酵素的催化。
- d. 微體 (microbodies)：有很多種類，都含某種劇烈的酵素，有特定的生化功能。
- (1) Lysosome (溶酶體) 含有溶菌酶 (lysozyme) 等多種水解酵素，以消化外來蛋白質、核酸、醣類等分子。植物細胞內的對等胞器為液泡，其體積很大。
 - (2) Peroxisome 含有觸酶 (catalase)，把有害細胞的 H_2O_2 分解成水。
 - (3) Glyoxosome 可把脂質轉化成醣類，也是植物特有胞器的一種。
- e. 細胞骨架系統 (cytoskeleton elements)：
- 由許多小管所交錯構成，用以支持細胞，並行細胞運動、胞內運輸及細胞分裂。
- f. 細胞膜 (cell membrane)：真核細胞最外層胞膜上附有許多蛋白質，有複雜的功能。
- (1) 細胞間辨認的特異性標記，如免疫學的各種 T 細胞上都有不同標記。
 - (2) 荷爾蒙受體，與其配體分子接觸後，可引發細胞內一連串信息傳導反應。
 - (3) 細胞內外離子的輸送幫浦，也都是由蛋白質所組成。
- g. 粒線體 (mitochondria)：是細胞產生能量的地方。
- (1) 由雙層膜組成，內層向細胞內伸展，皺褶成為瘡 (cristae)。瘡上有顆粒密佈，是藉呼吸鏈進行能量代謝的地方，可生成 ATP。
 - (2) 粒線體有自己的 DNA，也可以合成蛋白質，是細胞內的自治區；可能是行呼吸作用的原核細胞，在演化早期侵入的真核細胞後，留在宿主細胞中共生。
- h. 葉綠體 (chloroplast) 與造粉體 (amyloplast)：
- (1) 葉綠體進行光合作用捕捉太陽光能，與細胞壁、液泡及造粉體都是植物特有胞器。葉綠體是地球生物圈最關鍵的一環，缺少葉綠體將導致所有生物滅亡。
 - (2) 造粉體含有大量澱粉粒，與葉綠體都屬胞質體 (plastid)，二者是同源器官，都是由相同的前體 (原胞質體 proplastid) 演變而來，有的還可互相轉變。
 - (3) 胞質體也有自己的 DNA，可能是早期的原核光合菌，進入真核細胞後產生的共生系統。注意粒線體與胞質體這兩種共生胞器，都與能量的代謝有關。
- i. 其它：
- (1) 細胞外套 (cell coat) 只有部份動物細胞才有，會表現抗原性；癌細胞的細胞外套成分可以改變，以逃避免疫系統。
 - (2) 微粒體 (microsome) 是細胞打碎後，內質網破片形成的人為小球，並非胞器。
 - (3) 病毒無法歸類入任何一類生物，卻能在細胞中寄生繁衍；因病毒在各種細胞、甚至物種間游走，可夾帶部分染色體片段，可能對生物的演化有所影響。

3 細胞分子：

構成生物細胞的大部份分子都帶有電荷，有帶正電荷、有帶負電。許多分子上同時帶有正電及負電基團，具有兩性 (amphoteric) 性質；可計算其正、負電荷數目的多寡，決定淨電荷之正或負。而環境 H^+ 濃度 (pH) 的變化，會影響分子淨電荷的正負 (圖 3)。這種分子的帶電性質，及其因環境的變化，是決定分子構造與功能的重要因素。

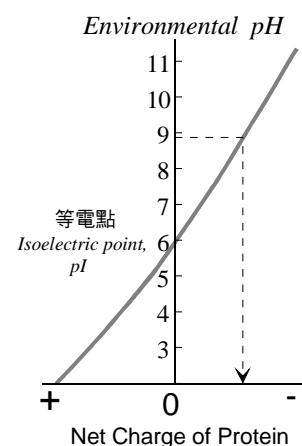
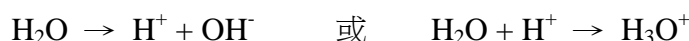


圖 3 環境 pH 的影響

3.1 水與 pH：

- a. 生物體內最多的分子是水，水雖然是有 H_2O 的分子式，但實際上大多以離子形態 (如下兩式)，或其他更複雜的構造存在 (水分子組成的冰晶格)。



- b. 細胞內 H^+ 的濃度，對維護生物體內的正常生理活性非常重要，其實用尺度就是 pH。任何生物體內或試管中的生化反應，必須保持恆定的 pH，因為環境 pH 會影響溶液中分子的帶電情形，進而影響其生化反應。
- c. 各種生化溶液，均得維持其 pH 的恆定，是為緩衝作用 (buffering)。緩衝液是因為其中含有緩衝分子，當溶液系統的 pH 改變時 (即其 H^+ 濃度改變)，緩衝分子可吸收或放出 H^+ ，如此可以調節溶液中的游離 H^+ 濃度，因而保持 pH 恆定。
- d. 水因為其分子的高度偶極化，因此有很高的介電常數 (dielectric constant)，會促進極性溶質分子溶入水中，稱為水合 (hydration)。只要是在水溶液中進行的反應，水合作用的影響即不可忽視。

3.2 細胞的組成分子：

生物體內許多重要的巨分子，都是由單位小分子所組成。古典生化注重上述分子的化學反應以及生理代謝。近代生化則以核酸、蛋白質及酵素為研究中心，現代則深入分子生物學層次，探討基因及其調節機制。

- a. 生物分子依其大小，可分為小分子及巨分子 (macromolecule)，巨分子都是由小分子的單元體 (monomer) 為堆積單位，一個個接起來。例如蛋白質是由胺基酸所組成。
- b. 常見的小分子有胺基酸、單醣、脂質、核苷酸等，都是體內分子的輸送形式；而大分子有蛋白質、多醣、核酸等，是功能、構造或貯藏形式。另有許多具有生物活性的小分子，如輔酶及維生素，其中以水分子含量最多，作用也最廣泛。
- c. 巨分子的序列是極為重要的，核酸的序列藏著遺傳信息，蛋白質的序列是取決於核酸的序列，而蛋白質的序列決定其構造與生理功能。因此，在巨分子的世界裡，序列幾乎決定一切；『自私的基因』一書指出，生物的繁衍只是在傳遞其所含的那段核酸 (gene)，甚或只是要傳遞核酸上面的序列信息而已 (meme)。

3.3 分子間的微弱作用力：

分子與分子之間，或者同一分子裡面，有多種非共價的作用力存在。這些微弱作用力是構成分子構形 (conformation) 及分子間親和力 (affinity) 的主要因素，統稱為二級鍵 (secondary bonds)。

- 離子鍵 (electrostatic bond)** 是正電荷與負電荷之間的吸引力，但容易因水合而破壞。
- 氫鍵 (hydrogen bond)** 乃因分子中的氫原子陰電性太弱而保不住電子，使得原子核裸露出來，而帶有正電荷，與帶負電荷的氧原子 (或氮原子) 之間，所生成的引力。
- 疏水性引力 (hydrophobic interaction)**：非極性分子具疏水性，兩個疏水性分子，因受環境極性水環境的排斥，分子間會生成非極性-非極性的疏水性引力。水溶液中的巨分子，其疏水性引力多發生在分子內部。
- 凡得瓦爾力 (van der Waals force)**：非極性或極性很弱的分子表面，其原子受到鄰近分子上面原子的影響 (吸引或排斥)，會產生局部且短暫的偶極，因而有微弱的引力，是為凡得瓦爾力。兩個原子的距離要適中，以求得最大的凡得瓦爾力，稱為該原子的凡得瓦爾半徑。兩分子之間因構形互補所生成的專一性吸引力，主要是由許多凡得瓦爾力所共同構成的。

下圖以基本的原子軌道的觀點，整理從原子組成簡單有機分子的過程。

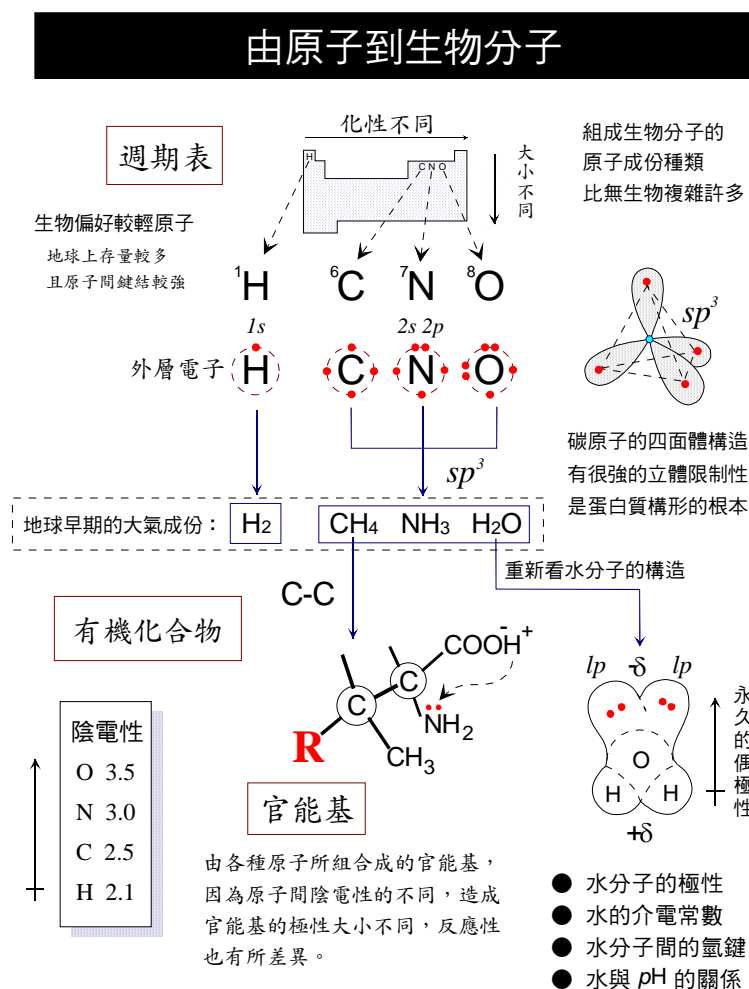


圖 4 由原子到有機分子的組合

問題集 (題目不一定有標準答案，甚至會引起很大的爭議，但這就是問題集之目的。)

1. Stanley Miller 把一些簡單的小分子放在一真空容器中，給予能量反應一週後，可以生成哪些物質？
2. 請以演化觀點說明細胞內粒線體的來源。
3. 請舉出五種生化的構造或分子，其中含有氫鍵。例如：蛋白質的 α helix
4. 分子的極性是如何產生的？為何極性分子只喜歡與極性分子結合？
5. 為何水分子有很強的極性？為何水分子有很強的介電常數？
6. 真核細胞 (eukaryotic cell) 與原核細胞 (prokaryotic cell) 有何異同處？
7. 為何細胞內的分子多由較輕的原子所構成？
8. 二級鍵雖然分成四種，但事實上都有相同的基本性質，請以電子的角度說明之。
9. 有機物幾乎是碳原子的天下，為何大自然會選擇碳？請從碳原子的電子軌道討論。
10. 何為陰電性？陰電性是如何造成的？陰電性對分子的性質有何影響？
11. 假如正如 Dawkins 『自私的基因』一書所言，生物只是在傳遞其細胞內的那段基因，甚至只是在傳遞基因的序列而已 (meme 的概念)，則生物的存在有何意義？
12. 一般相信地球演化之初為一 RNA 世界，請提出三個可能的證據。
13. 細胞內的各種巨分子歸納來說，有哪三種功能？請各舉例說明。
14. 為何強酸或強鹼不能作為緩衝分子？
15. 分子的兩性 amphoteric 性質是什麼？請列舉兩性分子說明之。
16. 為何生物細胞內的巨分子，一定要由單位小分子聚集而成，而不直接合成該巨分子？
17. 若真有外星生物，以分子層次來看，與地球生物差異有多少？會不會也用 A, T, C, G？
18. 是非選擇題 (答案寫在□內，是→○、非→×)
 - 1) 那些胞器具有雙層胞膜？
 細胞核 葉綠體 粒線體 造粉體 微體 (microbody)
 - 2) 在演化上是外來的胞器：
 細胞核 葉綠體 粒線體 質體 微小體 (microsome)
 - 3) 有關氫鍵的性質描述：
 氫鍵可在室溫中穩定鍵結 氫鍵要有氫原子居中架橋 非極性基團間也可生成氫鍵 氫鍵的形成方向性並不重要 氫鍵可看成微弱的離子鍵
 - 4) 有關二級鍵的性質描述：
 二級鍵的強度都很弱 凡得瓦爾力是最強的二級鍵 離子鍵在水溶液中不易形成 二級鍵造就了兩蛋白質分子間的專一性吸引力

胺基酸

Amino Acid

胺基酸是構成蛋白質的基本單位，而蛋白質是生物體內最重要的活性分子，其中擔任催化種種生理代謝反應的酵素，更是近代生物化學的研究中心。二十種性質各異的胺基酸，連接成多樣的蛋白質，且賦予蛋白質特定分子構形，使蛋白質分子能夠具有生化活性。

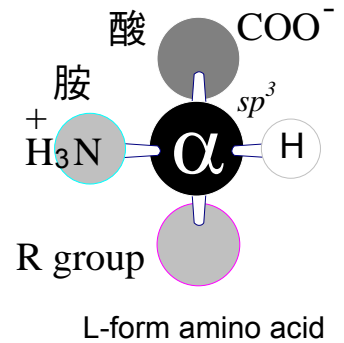


圖 1 胺基酸的基本構造

1 胺基酸基本構造：

胺基酸種類很多，但有共同的基本構造；先畫一個十字，如下述方法在四端加上四個化學基團即可。圖 1 為其基本構造，注意單醣也有類似的基本架構。

- a. 分子構造的中心為一碳原子，稱為 α 碳 (α carbon)。
- b. 接在 α 碳上，有一個胺基及一個酸基 (故名胺基酸)。
- c. 另有一氫原子及一基團 (R) 接在 α 碳上 (碳為 sp^3 軌道)。
- d. α 碳接了四個不同的基團，為不對稱碳，有光學異構物 (D/L)。通常細胞內代謝只使用 L 型胺基酸，但有些細菌細胞壁或抗生素上，有 D 型胺基酸。
- e. 隨 R 基團的不同，各胺基酸的性質互有差異，組成二十種常用胺基酸 (下頁表 1)。
 - ◆ 碳原子的 sp^3 軌道，是整個蛋白質構造化學的根本，請探討其組成及立體構型。
 - ◆ 辨別一個胺基酸時，請先抓出 α 碳，再以此為中心辨認胺基、酸基及 R 基團。當胺基酸組成蛋白質後，胺基與酸基都用來鍵結，連有 R 基團者即為 α 碳。

2 胺基酸分類：

胺基酸由其 R 基團的化學構造不同，可分為數大類。

- a. 胺基酸的基團形形色色，有大有小、有直鏈有環狀、有正有負也有不帶電。表 1 列出蛋白質所用的二十種胺基酸，是以 R 基團的化學構造來分組。
- b. R 基團也可以其極性大小來分類，代表它們親水性的強弱；可把胺基酸分為極性及非極性兩大類，極性者又分為酸性、中性、鹼性三類。
- c. 胺基酸本身的性質，以及所組成蛋白質分子的功能與性質，均決定於 R 基團的本質；這點在說明蛋白質的構造時，更是重要。
 - ◆ 把二十種胺基酸的構造多寫幾次，注意 R 基團的極性、大小與其特殊官能基。

表 1 二十種胺基酸的分類及性質：

分類	名稱	縮寫	R =	說明 ⁽¹⁾	
唯一對稱胺基酸	甘胺酸	Glycine	Gly G	-H (構造最簡單)	P/N
含飽和碳氫基團	丙胺酸	Alanine	Ala A	-CH ₃	N
	纈胺酸	Valine	Val V	-C(C)-C	N*
	白胺酸	Leucine	Leu L	-C-C(C)-C	N*
	異白胺酸	Isoleucine	Ile I	-C(C)-C-C	N*
含芳香基團	苯丙胺酸	Phenylalanine	Phe F	-C-[C ₆ H ₅]	N*
	酪胺酸	Tyrosine	Tyr Y	-C-[C ₆ H ₄]-OH	P
	色胺酸	Tryptophan	Trp W	-C-[indole]	N*
	組胺酸	Histidine	His H	-C-[imidazole]	P*
含額外酸基 (及其醯胺)	天冬胺酸	Aspartic acid	Asp D	-C-COOH	P
	天冬醯胺酸	(Asparagine)	Asn N	-C-CONH ₂	P
	麩胺酸	Glutamic acid	Glu E	-C-C-COOH	P
	麩醯胺酸	(Glutamine)	Gln Q	-C-C-CONH ₂	P
含額外胺基	離胺酸	Lysine	Lys K	-C-C-C-C-NH ₂	P*
	精胺酸	Arginine	Arg R	-C-C-C-[guanidine]	P*
含有醇基	絲胺酸	Serine	Ser S	-C-OH	P
	蘇胺酸	Threonine	Thr T	-C(OH)-C	P*
	OH-脯胺酸	Hydroxy Pro			P
含有硫	甲基胺酸	Methionine	Met M	-C-C-S-C	N*
	胱胺酸	Cysteine	Cys C	-C-SH	P
	雙胱胺酸 ⁽³⁾	Cystine		-C-S-S-C- 雙硫鍵	Cys-Cys ⁽²⁾
環狀的亞胺酸	脯胺酸 ⁽³⁾	Proline	Pro P	(imino acid)	N

(1) 打有 * 者是人類的必需胺基酸，須由外界攝取。N, non-polar; P, polar 極性。

(2) 兩分子胱胺酸 (Cys) 以雙硫鍵連成二元體 (雙胱胺酸)。

(3) 這兩個胺基酸對蛋白質的立體構造有很大的影響。

◆ 圖 2 是特地設計用來說明各胺基酸的構造關係，不是代謝途徑，請特別注意。圖中把各種胺基酸依其 R 基團的性質不同分類，並安排在台北市地下鐵的模擬地圖上，其中 Ala 是台北總站，因為其他的胺基酸都可由此分畫出來。中央線即為忠孝東路線，由飽和碳氫鏈的胺基酸所組成，與忠孝東路的商業機能有類比關係。

胺基酸分類模擬地下鐵道地圖

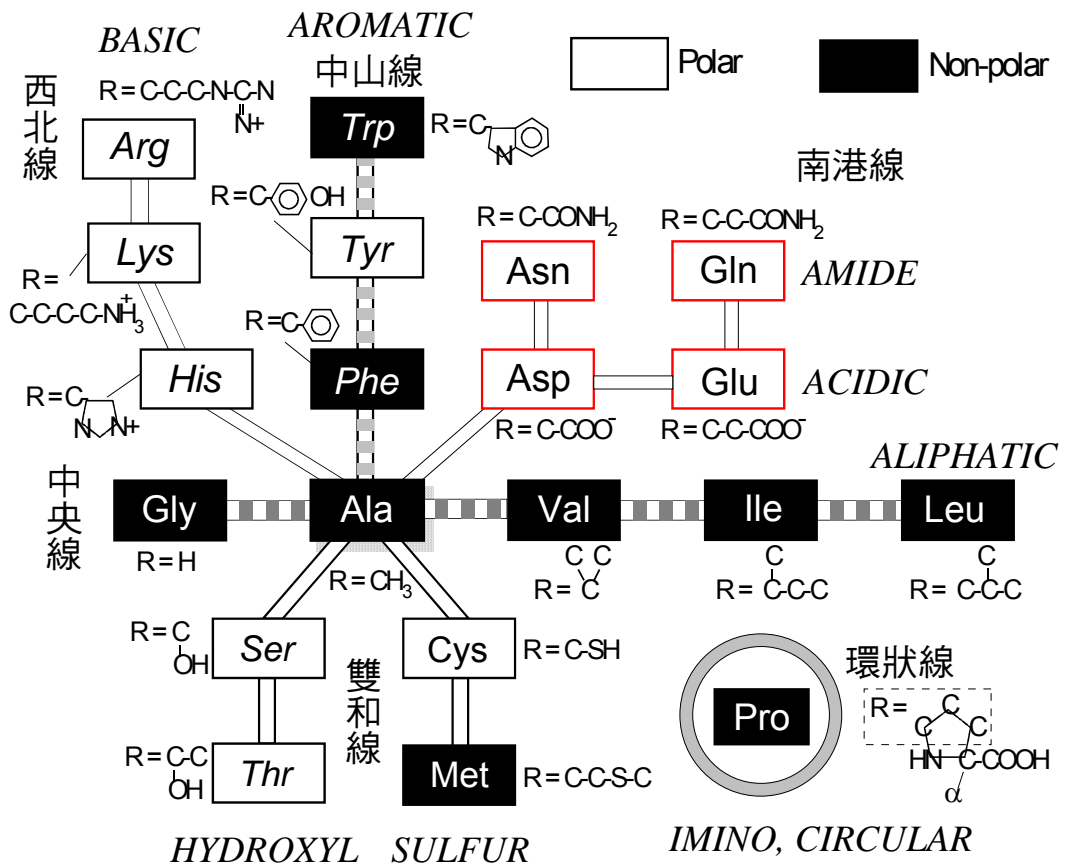


圖 2 各種胺基酸的分類

3 胜肽：

胜肽是較短的蛋白質，許多胜肽有重要的生物功能或活性。

- 胜鍵 (peptide bond) 是由一個胺基酸的酸基，與次一胺基酸的胺基，行脫水縮合反應而成的 C-N 鍵，具有雙鍵的性質，與相鄰總共六個原子在同一平面上，因此 C-N 鍵不能自由轉動。胜鍵是構成蛋白質架構的基本單位，非常重要，請注意研究其立體構成。
 - ◆ 練習畫出胜鍵的化學構造，注意胜鍵平面上各原子的相對位置，不要弄錯。
- 兩個胺基酸以胜鍵連成的二元體，稱之為 雙胜 (dipeptide)，三個胺基酸則以兩個胜鍵連成 三胜 (tripeptide)，許多胺基酸連成 多胜 (polypeptide)；再大的胜肽即為蛋白質。
- 某些胺基酸或胜肽具有較特殊的生理活性，如 味素 (Glu)、腦啡以及部份 荷爾蒙 等。

4 胺基酸的離子性質：

胺基酸多以離子狀態存在，且經常同時帶有正電及負電基團。

4.1 解離常數 (pK_a)：

質子是化學層次最小的粒子，很容易由一極性基團解離出來，在水溶液中無所不在；其解離難易可以解離常數 (pK_a) 表示，越小越容易解離，水的 pK_a 在 6~7 之間。

a. 質子搶奪：

氫原子若與陰電性大的原子 (如酸基 $-COOH$ 中的氧原子) 共價，則其電子易遭搶奪而使質子裸露 ($-COO^- H^+$)，進而解離出 H^+ 。質子易受帶有高電子密度的基團 (如 $-NH_2$) 所吸引，使後者成為一帶正電基團 ($-NH_3^+$)。

b. Ampholyte：

胺基酸的酸基易解離出質子 (成為帶負電基團 $-COO^-$)，而其胺基又會接受一質子 (成為 $-NH_3^+$)。如此一分子同時帶有正電與負電者，稱為 ampholyte (兩性離子)。

c. 質子解離：

質子解離程度決定於該水溶液的 pH，與其分子上解離基團 pK_a 的高低。 pK_a 的大小，顯示一個官能基容不容易放出 H^+ ，越小的越容易放出。圖 3 列出各種胺基酸的解離基團及其 pK_a ，請注意各種基團在不同的 pH 下解離。當環境的 pH 等於某基團的 pK_a 時，該基團恰有一半數目的分子解離 ($pH = pK_a + \log ([A^-]/[HA])$)，請見圖 4 說明。

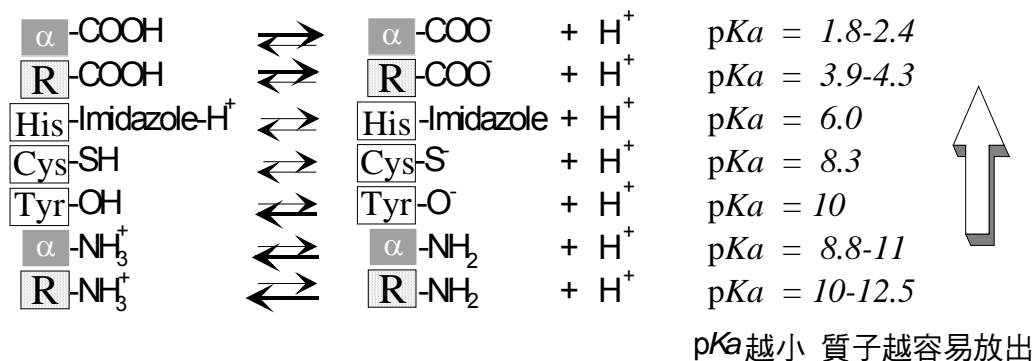


圖 3 各種胺基酸基團的解離及其 pK_a

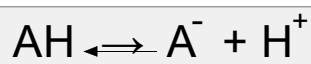
4.2 等電點 (pI)：

等電點是所有分子帶電性質的重要指標。

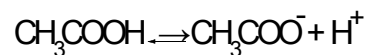
- 胺基酸 α 碳上的胺基及酸基各有一帶電基團，故有二 pK_a ，分別界定胺基及酸基的解離 pH。此二 pK_a 平均值即為該胺基酸的 pI (等電點)，即 $(pK_{a1} + pK_{a2}) \div 2 = pI$ 。
- 若環境的 pH 等於某胺基酸的 pI，則此胺基酸的淨電荷為零；因為在此 pH 下，剛好有一正電基團及一負電基團。Ampholytes 若剛好淨電荷為零，則其正、負電基團數目相等，特稱為 Zwitterion。

- c. 胺基酸的淨電荷是正或負，受環境的 pH 所控制；環境 pH > pI 帶負電，反之則帶正電。上一章圖 3 即說明此一影響，同時請注意，若環境的 pH 離該分子的 pI 越遠，則其所帶之正或負淨電荷越大。
- d. 某些胺基酸的 R 基團，有額外的帶電基團 (例如 Lys 另有一胺基)，則可有三個 pKa；即每個可解離出 H⁺ 或吸收 H⁺ 的官能基，都有一個 pKa。這三個 pKa 中，有兩個 pKa 的胺基酸各帶一個淨正電或淨負電，則這兩個 pKa 值的平均即為其 pI。
- ◆ 練習畫出額外帶有電荷胺基酸的 pKa 滴定曲線，並觀察其電荷改變情形。
- e. 多胜在某 pH 下的淨電荷，是所組成胺基酸所帶正、負電荷的總和。例如一條十胜所含的十個胺基酸 (AELKVGRRDV) 中，若有五個胺基酸為非極性，三個帶正電基團，兩個帶負電，則此十胜在中性 pH 下的淨電荷為一個正電荷。

弱酸如何做為緩衝分子？



例如 乙酸



◎ Ka 是平衡後兩邊的濃度比：

$$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{AH}]} = \frac{1}{10^5} \quad (\text{p}K_a = 5)$$

◎ Ka 平衡式做數學轉換：

- 一、兩邊取 log
- 二、移項取出 [H⁺]
- 三、定義 p 為 -log (pH = -log[H⁺])

H-H 公式 $\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$ 已解離
未解離

pH = 常數 pKa? ... 當 [A⁻] = [AH], log 1 = 0

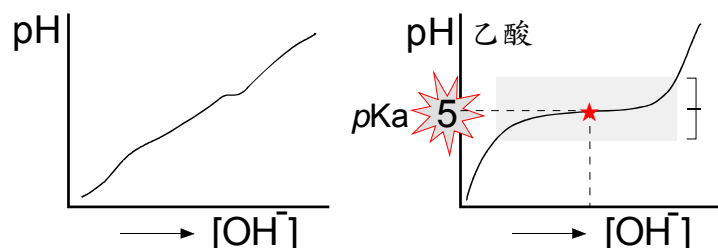


圖 4 以乙酸為例說明緩衝分子如何在其 pKa 發揮作用

乙酸根會吸收或放出一個質子，可以用解離常數 K_a 描述之；對 K_a 進行數學轉換可得 Henderson-Hasselbalch 公式，此式描述當 [A⁻] 等於 [AH] 時，環境的 pH 恰等於乙酸的 pKa (= 5)，有最大的緩衝效果。

問題集

- 請畫出一個胜肽鍵 peptide bond 的構造，並以點線標出 peptide 平面。
- 為何胜肽鍵平面不能自由轉動？
- Histidine 有三個可以解離的基團，其 pK_a 分別是 1.8, 6.0 及 9.2，請問其 pI 多少？
- 同上題，Histidine 能否用來作為中性 pH 的緩衝液之用？並請說明為何。
- 請依括號內的指示寫出下列各胺基酸有何特點或用途：
Glutamate (食品) Serine (轉譯後修飾) Tryptophan (藥品) Cysteine (蛋白質三級構造)
Proline (蛋白質二級構造)
- 以下兩段胜肽有何異同之處？並請問二者的滴定曲線會不會一樣？為什麼？
Ser-Glu-Gly-His-Ala Gly-His-Ala-Glu-Ser
- 請判斷並說明下列各題的真偽：
 - 胺基酸的 α 碳都是不對稱碳。
 - 下列胺基酸的 R 基團為非極性者：Ala, Val, Ile, Leu。
 - 下列胺基酸的 R 基團都帶有正電荷：Asp, Lys。
 - 下列胺基酸的 R 基團帶有硫原子或氧原子：Cys, Ser, Thr, Met。
 - 兩個胺基酸可以氫鍵連成雙胜。
 - 蛋白質分子是活動的，因兩個胜肽平面之間是單鍵。
 - 胺基酸分子所帶的電荷不會改變。
 - 胺基酸可作為緩衝液是因為其基團官能基是一種強酸。
 - 胺基酸在其等電點時沒有帶任何電荷在分子上。
 - His 上 imidazole pK_a 為 6.0，因此可作為細胞內的緩衝物質。
- 寫出含有硫原子的胺基酸：(英文全名) 1 _____ 2 _____
寫出含有芳香基團的胺基酸： 1 _____ 2 _____ 3 _____
寫出含有醇基的胺基酸： 1 _____ 2 _____ 3 _____
寫出含飽和碳氫鏈的胺基酸： 1 _____ 2 _____ 3 _____
寫出側鏈基團帶有 $-COOH$ 的兩種胺基酸： 1 _____ 2 _____
- 細胞的各種分子構造中，那些構造或分子含有氫鍵？例如： α helix，請再回答三個。
那些構造或分子含有疏水鍵？例如：細胞膜 (請再回答兩個)。
- 有一段 peptide 序列如下：Glu-Phe-Lys-His-Ile-Arg-Val
在 $pH = 1$ 時其淨電荷為 ____；在 $pH = 7$ 時淨電荷為 ____； $pH = 11$ 時淨電荷為 ____
- 請不要看書或講義，畫出上題胜肽的分子構造。(請先畫出胜肽骨架，再填上 R 基團)

12. 是非選擇題 (答案寫在□內，是→○、非→×)

1) 在中性 pH 溶液中，那些胺基酸可做為此 pH 的緩衝分子？

Val His Glu Trp

2) 在 pH 2 溶液中，那些胺基酸可做為此 pH 的緩衝分子？

Val His Glu Trp

3) 下列何者為兩性 (amphoteric) 化合物？

胺基酸 水分子 蛋白質 DNA 葡萄糖

4) 有關 pK_a 的性質描述：

解離常數 pK_a 是一平衡常數 pK_a 越高則質子越容易解離 $pK_a = 2$ 的基團在中性溶液下將會帶負電荷 分子所帶的電荷固定不變

5) 下述碳原子何者為不對稱碳？

CH_4 glutamic acid 的 α 碳 甘胺酸的 COOH 甘胺酸的 α 碳

6) 有關胜肽鍵的性質描述：

其前後八個原子成一平面 胜肽鍵有 π 電子共振 胜肽鍵可以自由轉動
 胜肽鍵是經加水反應生成的

13. 寫出三個具生理功能的胜肽： 1. _____ 2. _____ 3. _____

14. 當一個分子上的正電荷數目等於負電荷，此種離子狀態稱之為 _____；而此時的 pH 則為此分子之 _____。

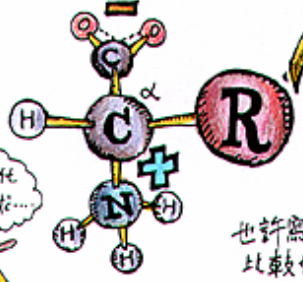
15. 若某一弱酸的解離常數 pK_a 為 5，若此弱酸被用來作為緩衝液分子，其適用範圍多少？

16. 胺基酸單位是以代謝路徑被合成出來的，而蛋白質是以 DNA 為信息經由 RNA，把胺基酸連接起來轉譯而得；那麼大約含有十個胺基酸的胜肽是如何合成出來的？

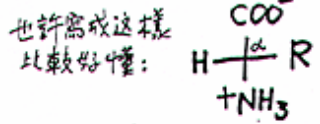
胺基酸與蛋白質的故事

May 1985, JIANG

1. 胺基酸的基本構造是這樣的:



假如生化像撞球...



我還是不懂

R group 構造決定胺基酸的特性, 共有二十多種常見胺基酸。由 R group 分子的性質, 可分為 Polar 與 Non-polar, 其中 Polar 者又可分為 Basic, Neutral 及 Acidic。

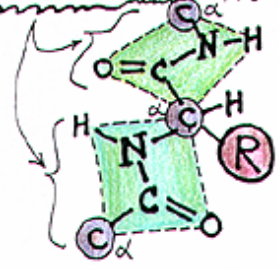
下面這張表是他們家族的系統表: (已有幾億年的歷史)

	Acidic	Neutral	Basic
Polar	Asp Glu	Asn, Gln Cys, Thr, Ser Tyr	His Lys Arg
Non-Polar	Phe, Pro, Met, Val, Leu, Ile Ile, Val, Thr, Ser, Ala, Gly, Tyr, Cys, Met, Phe, Pro, Leu, Ile		

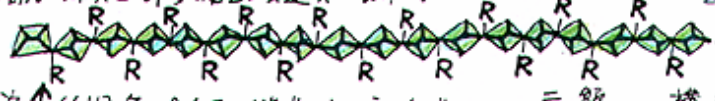
發辣!

2. 兩個胺基酸以 "Peptide bond" 結合成肽。

Peptide bond 的平面是不能扭曲的, 像這樣:



這兩個平面又因為 R group 的關係, 只能在一定範圍的角度的活動。所以當許多胺基酸連成一長串時:

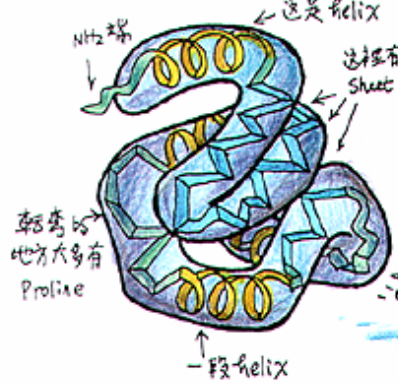


因為↑的關係, 含自動捲曲成一定的構造 (Secondary structure), 大略說來有: **Helix** 或 **Sheet** 兩種形式

3. 二級構造再捲曲成三級構造:

然後可能有四級構造:

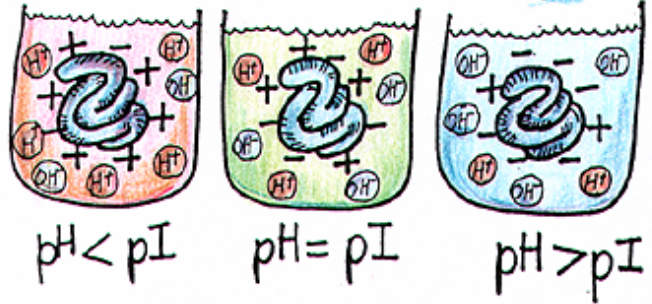
再來沒有了。不過最後的構造如何, 早就決定在一級構造上胺基酸的次序, 也就是決定於 R group 為何! 所以 R group 很重要, 但是... 不要忘了胺基酸次序是決定於 mRNA。mRNA 又決定於 DNA。所以你知誰是真正的大老闆了吧!



4. 有一個很重要的概念, 就是胺基酸或蛋白質的淨電荷是正是負, 完全決定於環境的 pH!

若環境的 pH > pI, 則其淨電荷為負。
若環境的 pH = pI, 則其淨電荷為零。
若環境的 pH < pI, 則其淨電荷為正。

什麼是 pI?



pI 就是使分子或離子的淨電荷為零的那個 pH。



都是基因惹的禍!

蛋白質

Protein

蛋白質具有各種催化及生理機能，是細胞的主要工作機器，其功能源自蛋白質分子所具有的特定構形，及因此所產生的催化活性。此種構形的形成，又因於組成蛋白質的胺基酸排列次序。各種大小的蛋白質有不同的胺基酸組成與排列，造就了多樣而多功的蛋白質繽紛世界。

1 蛋白質構造：

探究蛋白質構造可由胺基酸序列開始，循序依其複雜度分成四個層次。

1.1 一級構造：

像其它巨分子一樣，蛋白質鏈也是由小分子單位一個一個連接成的。

- a. 蛋白質的長條胺基酸序列，是為其 一級構造 (primary structure)。此一級構造的一端為 N-端 (-NH₂)，另一端為 C-端 (-COOH)，而以 H₂N-**C**-C-[N-**C**-C]_x-N-**C**-COOH 為骨架，其中黑體字 **C** 代表各胺基酸單位的 α 碳。蛋白質習慣上都由 N-端往 C-端念。

◆ 請練習畫出一長條胜肽的骨架，並任意加上各種胺基酸的基團。

- b. 一級構造是蛋白質最終 構形 的根本，各級構造的訊息都決定於胺基酸序列；而胺基酸序列是根據 DNA 的核苷酸序列轉譯而來，故最終信息是記憶在細胞核的核酸。
- c. 探討一級構造主要在分析該蛋白質之 胺基酸序列，近來胺基酸序列多由該蛋白質的 cDNA 以分子群殖 (cloning) 篩選出來，再經核酸定序後轉譯成胺基酸序列。
- d. 除了構造之外，一段固定的胺基酸序列可能有某種特定的生理功能，稱之為 **signal peptide** (信息序列)，同一 **signal** 可以在許多不同的蛋白質分子上重複出現。例如蛋白質在 C-端若有 Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) 的序列，就會被回收到內質網去。

1.2 二級構造：

蛋白質長鏈捲繞成堅固而規則的二級構造，是其最終構形的基礎單位。

1.2.1 二級構造相當規律：

胜鍵 的雙鍵性質形成 胜鍵平面，又因每個 α 碳上的 R 基團與前後相鄰基團的引力或斥力，使得兩相鄰胜鍵平面之間的轉動，限制在一定的角度範圍，而造成兩種相當規律的構形：α 螺旋 (α helix)、β 長帶 (β sheet)，是為 二級構造 (secondary structure)，它們的主要構成力量都是 氫鍵。氫鍵在細胞內的角色不但重要，而且分佈非常廣泛。

◆ 請練習畫出一個肽鍵，標出肽鍵平面以及上面的各個原子。

a. α 螺旋：每 3.6 個胺基酸捲繞一圈，成為右手旋的螺旋構造，但遇 Pro 則中止；由相鄰兩肽鍵平面所夾的角度，可以準確預測 α 螺旋或其它二級構造的生成 (Ramachandran Plot)。分子內氫鍵可在螺旋骨架間加上支架，更使得 α 螺旋成為圓筒狀，有堅固的構形，也是三級構造的主要組成單位。肌紅蛋白由八段長短不等的 α 螺旋所組成。

b. β 長帶：像彩帶的構形，多由數條彩帶組成，相鄰彩帶之間以氫鍵接合，編成一片堅固的盾形平面。依相鄰彩帶的 N→C 方向，可分為同向 (parallel) 及逆向 (antiparallel) 兩大類。 β 長帶多由 R 基團較小的胺基酸 (如 Ala, Gly, Ser) 組成。

◆ 請練習畫出上述的各種二級構造，注意其立體構形及氫鍵位置。

c. 其它螺旋構造：除了 α 螺旋外，也有其它方式的螺旋構造，但每一單位螺旋的胺基酸數目不同。當連續有數個 Pro (如 PVPAPIPP) 時，會捲成稱為 polyproline 的特殊螺旋，每三個胺基酸轉一圈，橫切面是一個正三角形。

1.2.2 連結性二級構造：

a. Turn 轉折：連接 α 螺旋或 β 長帶時，肽鏈需做劇烈的轉折，以接近 180 度的方式折返，這些轉折點通稱為 turns；其中 β turn 由四個胺基酸組成 (多含有 Gly) γ turn 則由三個胺基酸組成，且必須由一個 Pro 造成主要轉折。Turns 多分佈在蛋白質的表面，也很容易誘生抗體。

b. 不規則形：除上述構造外，尚有構形不規則的片段，稱為不規則形。而在蛋白質分子兩端附近，其活動性較大，形狀經常變化，則為任意形 (random coil)。

1.3 三級構造：

蛋白質的三級構造大致捲繞成球狀 (globular)，已是有特定構形的活性分子。

1.3.1 三級構造的組成力量：

a. 分子內的二級構造再相互組合，構成完整球狀的三級構造 (tertiary structure)；其構成的作用力有離子鍵、氫鍵、疏水鍵、金屬離子等作用力；其中疏水鍵對水溶性蛋白質三級構造之穩定性，貢獻很大。

b. 水溶性蛋白質的核心緊密，多由疏水性胺基酸組成。由於疏水性胺基酸為外界水環境所排斥，可以穩定地包埋在分子內部，維持蛋白質的完整三級構造。

c. 蛋白質分子內兩個 Cys 上的 -SH 可經氧化而成雙硫鍵 (-S-S-)，雙硫鍵可加強蛋白質的立體構造。在細胞中，雙硫鍵的形成可能需要靠酵素的催化。

1.3.2 三級構造的立體構成：

a. 某些二級構造經常會聚在一起，例如 $\alpha\alpha\alpha$, $\beta\alpha\beta$ 或 $\alpha_8\beta_8$ 筒狀構造等，而且經常

出現在不同蛋白質中，可視為一種二級構造的再現單位 (motif)。這些再現單位可能對蛋白質的構造及其功能，有某種特定的貢獻。

- b. 很多蛋白質在其三級構造中，可發現還會分成幾個獨立的小區域，每個區域稱為 domain (功能區塊)。較小的蛋白質通常只有一個 domain，大形蛋白質則含有兩個以上 domains。同一類似的 domain 可能經常重複出現在不同蛋白質，有其特定功能；domain 可能早期是獨立基因，後來因為基因之複製與組合，與其他功能的 domain 組成新的蛋白質。
- c. 建構蛋白質最終立體構形的藍圖，其資訊還是貯藏在一級構造的胺基酸序列當中；因此某些蛋白質 (例如 RNase) 在變性後，仍然可以回復原來的原態立體構形 (native)，稱為復性。
- d. 但並非所有的變性蛋白質都可如 RNase 般復性回原態分子，細胞內有一類巨大分子稱為 chaperonin，可以幫助蛋白質在轉譯時，正確地摺疊成原態分子。
- e. 若已知某蛋白質的胺基酸序列，則可以電腦運算預知 α 螺旋、 β 長帶或轉折等二級構造，相當準確。但更複雜的三級立體構造，目前則不容易預測準確。

1.3.3 三級構造的修飾：

- a. 很多蛋白質的基本三級構造，即為獨立而具有活性的分子；但有些則要再加上輔酶、輔因子 (如金屬離子) 或輔基 (prosthetic group, 例如肌紅蛋白中的 heme)。有些則要再修飾以糖分子成為醣蛋白 (glycoprotein)；脂蛋白 (lipoprotein) 要連接脂質。有更多要再與其它蛋白質結合，形成四級構造 (如四元體的 血紅蛋白)。
- b. 有些蛋白質的胺基酸長鏈，要先經過切斷或刪除部份胜肽後，才能有活性 (如胰島素)。胰島素是由一條基因轉譯出來的，切成三段後，其中兩段以雙硫鍵結合成具活性的三級構造，並非四級構造。這也是蛋白質活性的調控方式之一。

1.4 四級構造：

有些蛋白質再聚合成四級構造，以調節其自身的功能，或組成巨大的結構分子。

- a. 若數個相同或不同的三級構造分子，再結合成一較大的複合體，才能進行完整的活性功能，則稱為四級構造 (quaternary structure)。構成四級構造的每一單位分子，稱為次體 (subunit)，通常各次體之間是以二級鍵為主要結合力量。請注意，每單位次體都是由一個獨立的基因所轉錄、轉譯出來的。
- b. 若四級構造的任一次體與受質結合之後，會誘導增強其它次體與受質之結合能力，而加速反應，則稱為正協同作用 (positive cooperativity)，反之為負協同作用。四級構造在調控蛋白質的活性上非常重要，許多酵素是重要例子，但典型具四級構造且有複雜調控機制的血紅蛋白並非酵素。
- c. 病毒的蛋白質外殼，或動物的肌肉、毛髮、角質等，具有規律而巨大的構造組成。

2 蛋白質性質：

蛋白質要有正確的分子構形，才能有效執行其生理功能；構形或許是分子演化的基本驅策力，因為即使胺基酸序列不十分相似，同功能的蛋白質也可能有相同的構形（各種生物的血紅蛋白即為一例）。

2.1 變性及復性：

某些條件會破壞蛋白質分子各級構造，稱之為變性 (denaturation)，例如加熱、pH 太高或太低、尿素、界面活性劑、劇烈震盪等。變性的蛋白質大多會失去活性，當變性條件除去後，有些蛋白質會回復原來構形，並具原有活性，稱之為復性。

2.2 蛋白質構形是活動的：

蛋白質分子上的各部份結構並非固定不動，而是有相當的彈性與運動。尤其 domain 與 domain 之間，或者酵素催化區的開闔，都有相當大的活動幅度。這種活動會隨著溫度升高而上升，對蛋白質或酵素的活性及其調控有很大的影響。

2.3 蛋白質的專一性結合：

專一性在酵素的催化及細胞生理功能上，扮演重要角色。蛋白質與蛋白質之間，或與其它分子間，經常有專一性的結合，其構成原因如下：

- a. 構形互補 (conformational match)：兩分子之間的接合表面，若其形狀互補 (像拼圖積木)，則此接面衍生無數凡得瓦爾鍵結，產生可觀的吸引力量。
- b. 二級鍵吸引力 (interaction forces)：是在兩分子之結合面上，相對應胺基酸間產生吸引力量，多由二級鍵構成。圖 1 是一假想圖例，說明某酵素與其抑制因子間，如何進行專一性的結合。

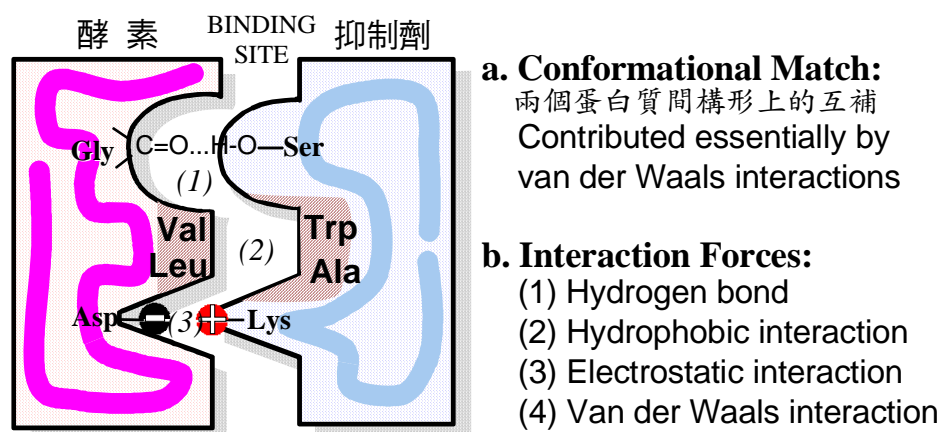


圖 1 蛋白質分子間的專一性結合力量是如何構成的？

3 蛋白質研究技術：

研究蛋白質通常要先純化得均質蛋白質，然後檢定其分子量、次體組成及等電點，最終則要定出蛋白質之胺基酸序列，或其立體三次元分子構造。

3.1 蛋白質純化技術：

利用蛋白質分子量不同、表面帶電性或極性區域大小等性質差異，可分離純化之。通常以能夠純化出大量均質蛋白質為目標，但最近的純化觀念已稍有改變，以二次元電泳(或加上轉印)，直接挖出單一色點的蛋白質，即可馬上付諸分析。

- a. **硫酸銨分劃法**：在蛋白質水溶液中加入硫酸銨等鹽類，會導致蛋白質因疏水性區域相吸引而聚集沉澱出來，稱為 **鹽析 (salting out)**；鹽析可大略地純化出蛋白質，並可以除去核酸、醣類或脂質等物質。
- b. **膠體過濾法 (gel filtration)**：依蛋白質分子量的大小不同，先後分離出來。
- c. **離子交換法 (ion exchange)**：各種蛋白質的帶電性強弱不同，與離子交換介質間吸引力的大小會有差異，可以此進行分離。請複習，蛋白質的帶電性，會因環境的 **pH** 不同而有改變。
- d. **親和層析法 (affinity chromatography)**：利用分子間專一的親和性，來吸引純化某蛋白質，最為直接；但並非所有蛋白質都能夠找到專一性的吸著劑。

3.2 蛋白質性質與構造檢定：

- a. **蛋白質定量法**：染料 **Coomassie Blue** 與蛋白質結合後，會由褐色變為藍色；由反應前後藍色吸光度的改變，與已知蛋白質的標準曲線比較，即可推知樣本中蛋白質的濃度，顏色越呈現藍色，表示蛋白質含量越高。一般稱之為 **Bradford method**。
- b. **分子量測定法**：可利用 **膠體過濾法**、**超高速離心法 (ultracentrifugation)** 或 **膠體電泳法 (gel electrophoresis)** 來測定蛋白質的原態分子量；**SDS 膠體電泳**則可測定次體分子量。電泳同時可以檢定蛋白質的純度如何，是解析力極佳的分析工具。
- c. **等電點 (pI)**：等電聚焦法 (**isoelectric focusing**) 類似膠體電泳，但可測得蛋白質的等電點。等電點是蛋白質帶電性質的重要指標，當環境的 **pH** 等於其等電點時，此蛋白質的淨電荷為零；大於其等電點時，淨電荷為負，反之則帶正電荷。
- d. **胺基酸組成**：蛋白質以鹽酸水解成游離胺基酸後，再以離子交換法 (**HPLC**) 分析各種胺基酸之含量，即可得知各種胺基酸的含量百分比。
- e. **蛋白質立體構造**：以 **X 光繞射法** 分析蛋白質結晶，可計算出分子的細微立體構造；近來也可應用 **核磁共振法 (nmr)** 測定水溶液中蛋白質的立體構造。
- f. **質譜分析**：目前的質譜儀分析技術，已能輕易處理分子量較大的蛋白質，定出蛋白質的精確分子量；也可以分析蛋白質所列解的片段，並推出其胺基酸序列(下頁)。

3.3 胺基酸序列決定法：

胺基酸的序列是一個蛋白質最根本的資料，只要定出其胺基酸序列，就可以推出相當多的生化性質。

3.3.1 傳統胺基酸定序法：

傳統的胺基酸定序方法，是直接檢定胜肽鏈上的胺基酸種類，如圖 2 的說明：

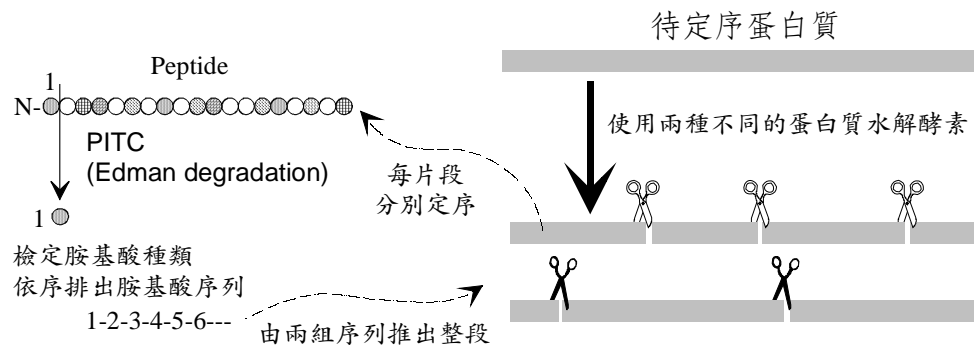


圖 2 蛋白質的胺基酸定序策略及 Edman degradation

PITC (phenylisothiocyanate) 對蛋白質的 N-端胺基酸進行修飾，產生 PTH-胺基酸，並由 N-端掉落，可經由 HPLC 檢定是何種胺基酸。

- 許多化學反應 (如 Edman degradation) 可由蛋白質的 N-端開始，依序一輪切下一個胺基酸，再檢定每輪切下的胺基酸為何，即可推得此蛋白質的胺基酸次序。
- 若蛋白質太長，則無法有效定序後面的胺基酸序列；要先用蛋白質水解酶把目標蛋白質切成小段，各小段分別定序，然後再組合成長鏈。
- 為了排列上述各小段胜肽的先後次序，要使用兩種不同的蛋白質水解酶，得到兩套不同長短的胜肽，分別定序後，比較各片段的重疊部分，即可判斷先後。

3.3.2 cDNA 定序：

以基因操作方法，選殖出目標酵素的 cDNA，並將其核酸序列定出，則可推出所對應的胺基酸序列。目前大都採用此種方法，比較方便。

3.3.3 以質譜儀定序：

質譜儀是利用分子的質量大小來檢定樣本，因此可以精確測出分子的質量。若把蛋白質在質譜儀中撞擊，產生一群具有各種不同長短的片段，每一片段都剛好少一個胺基酸，然後用質譜儀一一測出這些片段的分子量，由所得各種片段分子量的差別，就可推出相差胺基酸的種類，乃至整段胺基酸的序列。

問題集

1. 血紅蛋白 (hemoglobin) 為四元體，而肌紅蛋白 (myoglobin) 為單元體，請就兩者分子構造上的差異，說明其生理功能。
2. 請問有哪些方法可以定出蛋白質或胜肽的胺基酸序列？
3. 現在 DNA 操作技術很成熟，可以把蛋白質上的某胺基酸換成別種胺基酸。若有一個蛋白質，其分子上的某個 Leu 被換成 Val，並且某個 Lys 被換成 Arg，請問對這個蛋白質的活性影響大不大？
4. 疏水鍵 (hydrophobic interaction) 對蛋白質的構造有何重要貢獻？
5. 鐮形血球 (sickle cell) 是如何造成的？有沒有補救或醫治的方法？
6. 構成蛋白質各級構造的各种鍵結力量中，有哪些是共價鍵？
7. 尿素 (urea) 可以破壞蛋白質的構造，請解釋可能的原因。
8. 蛋白質為何需要組合若干個三級構造的單元體，以形成一個更複雜的四級構造？
9. 氫鍵是構成蛋白質二級構造的主要力量，三級構造的組成也含有氫鍵，請問這兩類氫鍵有何不同之處？
10. 有一段蛋白質的胺基酸序列如下，請預測這段蛋白質可能的構造特徵。

-LVRILNRILFFLWKTLTR-

11. 蛋白質構造中的 domain 是什麼？有何重要的功用？
12. 請判斷並說明下列各題的真偽：
 - a. 構成 α 螺旋及 β 長帶的主要力量都是氫鍵。
 - b. 氫鍵一定要以氫原子居中架橋。
 - c. 構成三級構造的主要力量是氫鍵、疏水鍵、雙硫鍵、離子鍵。
 - d. 構成四級構造的力量是雙硫鍵。
 - e. 蛋白質四級構造的存在，只是為了數個蛋白質分子可以聚集在一起。
 - f. Sanger 發明了 DNA 定序方法；而 Pauling 發現 double helix。
 - g. 每種蛋白質都有其特定構形，而構形是根基於其一級胺基酸序列。
 - h. 蛋白質的三級立體構造完全可以由一級構造推算得之。
 - i. 解讀蛋白質的胺基酸序列，可得知序列與分子功能間的對應關係。
 - j. 不規則 (irregular) 構造多在分子兩端，沒有固定形狀，有很大自由度。
 - k. 所有具有功能性的蛋白質都是由一條完整胺基酸長鏈所構成的。
 - l. 蛋白質長鏈上的 α 螺旋構造遇到 Pro 就會中止。
 - m. 各種生物血紅蛋白的胺基酸序列相同，因此其構形相似，都保有同樣運氧功能。

- n. 水溶性蛋白質的疏水性胺基酸大都在分子的內面，分子內部不可能有親水性的胺基酸，以防分子變性。
- o. 二級鍵的力量太弱，很難對分子間的專一性吸引力做出實質貢獻。
- p. Domain 可重複出現在不同分子構造，這是在基因層次已安排好的。
- q. 所有蛋白質在變性後，都可因變性原因的去除，而恢復原態，稱為復性。
- r. 加熱煮沸可以使蛋白質完全變性，包括雙硫鍵的斷裂。
- s. 尿素可致蛋白質變性的原因是破壞 α 螺旋的氫鍵。
- t. 一條 pI 為 5.2 的蛋白質，在細胞內可帶淨負電荷。

13. 是非選擇題 (答案寫在□內，是→○、非→×)

1) 有關 α helix 的性質：

- 我們可以由胺基酸的序列預測 α helix 的形成 是由 Watson 及 Crick 所發現
- 最常見的 α_{13} helix 是每 13 個胺基酸轉一圈 α helix 遇到 Pro 則中止

2) 蛋白質二級構造的成因：

- 胜肽鍵是平面構造 胜肽鍵前後 R 基團的大小限制 胜肽鍵的氫鍵吸引力
- 胜肽鍵前後 R 基團的電荷限制

3) 有關蛋白質四級構造的性質：

- 有些蛋白質沒有四級構造 四級構造是以共價鍵連結的 有四級構造的蛋白質都具有調節作用 血紅蛋白是同質四元體

4) 蛋白質的胺基酸序列：

- 可決定最後蛋白質的構形 可能由 DNA 的任何一股譯出 並不能顯示兩相關蛋白質間的演化關係之遠近

14. 構成蛋白質三級構造的力量： 1_____ 2_____ 3_____

15. 請寫出六個以上使蛋白質變性的方法。

16. 請說明以下人名：Sanger, Anfinsen, Pauling, Edman, Kendrew & Perutz

17. 鑲在細胞膜上的許多蛋白質，其構造都有相當的相似性，多數由若干條 α helix 來回穿梭細胞膜而組成的。請問為何多採用 α helix？

18. 在生物體內，兩個細胞之間經常要進行訊息的傳遞，例如兩個神經細胞之間，是以神經傳導物質做為神經衝動的傳遞媒介。除此之外，兩個細胞可以利用蛋白質做為細胞間連絡的傳遞物質；其信息的傳遞，是由一個細胞傳到另一個特定的目標細胞。而此等細胞之間，可能距離相當遠 (例如由腦部傳到胰臟)，也可能有直接的接觸 (如免疫細胞間的辨認)。請利用蛋白質構造的特性，說明這兩種具有專一性的細胞信息傳遞及接收方式，是如何達成的？

核 酸

Nucleic Acids

核酸是以核苷酸為單元所聚成的巨分子，是細胞內分子量最大的功能性分子，包括 DNA 及 RNA。其主要功能為遺傳訊息的貯存、傳遞與表現，是現代分子生物學的主角。

1 分子構造：核苷酸單位小分子組成的核酸巨分子有一定的分子構形

a. 核苷酸 (nucleotide) 由三部分構成：(磷酸)-^{5'}[五碳糖]^{1'}-{鹼基} (見圖 1)

核苷酸除去磷酸後成為核苷 (nucleoside)：[五碳糖]^{1'}-{鹼基}

- (1) 五碳糖 可以是核糖 (ribose) 或者是去氧核糖 (deoxyribose)，造成 DNA 與 RNA 的差別。
- (2) 鹼基 分成 purine (A, G) 及 pyrimidine (T, C, U) 兩大類，T 與 U 極相似。
- (3) 核苷的核糖 (五號碳上) 可接一至三個磷酸，成為核苷酸，如 AMP, ADP 或 dATP。

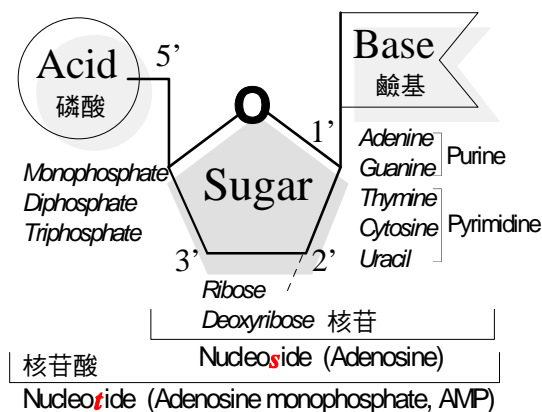


圖 1 核苷酸的分子組成

b. 核酸：

前一個核苷酸的 3'-OH 端，與次一核苷酸的 5'-磷酸反應，以磷酸二酯鍵結合，連接成巨分子核酸。其中五碳糖為核糖者，即為核糖核酸 RNA；若為

去氧核糖，則為去氧核糖核酸 DNA。一般而言 DNA 為雙股核酸長鏈，RNA 多為單股。DNA 分子中，A 的數目必等於 T；而 G 數等於 C，稱為 Chargaff 定律。

c. 雙螺旋 (double helix)：

DNA 分子由兩股核酸捲繞而成，磷酸脊骨露在外側，鹼基在內以 A=T 及 C≡G 配對，經由氫鍵結合，兩股並相互扭曲形成雙螺旋；自然界中多屬右手旋者。

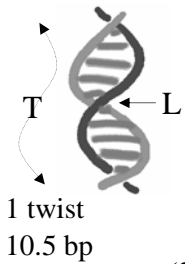
- (1) 雙螺旋的一股是 5'→3' 方向，另一股則以 3'→5' 方向與之互補。
- (2) 雙螺旋分子呈不對稱扭曲，因而產生有大的凹谷 (large groove, 右圖 L) 及較小的凹谷 (small groove, 右圖 s)；一個如此的扭曲單位，含有 10.5 鹼基對，其長度有 36 埃。一個螺旋單位若含有 10.5 鹼基對，則在結構上最穩定。
- (3) 磷酸脊骨在中性 pH 下，會帶有許多負電荷，導致兩股 DNA 相互排斥分離而變性，要加入鎂離子穩定之，因此 DNA 不能溶在純水中。真核細胞核中含帶有強正電性的組織蛋白 (histone)，與 DNA 結合成複雜結構，並中和掉核酸的負電荷。
- (4) DNA 分子因其含水的多寡，可分成 A 及 B 兩型，另有 Z 型 DNA 是實驗室的產物。



d. 三級構造：

DNA 的長條核苷酸序列為一級構造，雙螺旋為二級構造，雙股 DNA 分子可能會捲繞成超捲曲 (supercoiling) 三級構造；這些分級是為了說明方便，但超捲曲構造的確可以幫助大量的 DNA 擠進小小的細胞中，而且使 DNA 的立體構造有所變化。環狀的質體 DNA 有明顯的三級構造，以下以 105 bp 的環狀質體說明。請參閱 Voet et al. 所著 *Fundamental of Biochemistry* (1999) p.733, Figure 23-9，投影片講義也有此圖。

(1) Fig. 23-9 左圖：



雙螺旋 DNA 的兩股分子之間，以 10.5 對鹼基的長度為重覆單位，互相交叉一次，這樣的重覆單位稱為 twist (T)；因此 105 bp 長的 DNA，就有 10 個交叉處 (T)。而這兩股扭曲 DNA 的立體交叉處稱為 linking，其數目稱為 linking number (L)；普通的長條狀 DNA 每相互 twist 一次，自然就有一次 linking (左圖)，故 $T = L$ 。而 10 個 T 就有 10 個 L；故 $L = 10, T = 10$ ，但此種 DNA 是平攤的，沒有再次捲繞，以 W (writhing) = 0 表示。

(2) Fig. 23-9 上排中及右圖：

若把此段 DNA 頭尾相接捲繞成環狀，則因其分子內鍵角的緊張無法舒解，除非先解開一次扭曲 ($T = 9$)，否則不容易形成完整的環狀構造；但因為解開了一次扭曲，導致扭曲與交叉都少一次，故 $L = 9, T = 9$ ；而此環狀 DNA 還是平攤開的，故 $W = 0$ 。

(3) Fig. 23-9 下排中及右圖：

上述環狀 DNA 的 T 減為 9，比原來的 $T = 10$ 減少 1 (-1)；若此環狀 DNA 要保持原來的扭曲數目 T (10)，則此相差數目，必須用三級構造的超捲曲 (W) 來補足，以 $L = T + W$ 表之 ($W = -1$)；也就是說，若此環狀 DNA 沒有先解開一個扭曲，則必須整個環狀 DNA 逆向捲繞一次，以便彌補之。若 W 為正 (即 $L > T$)，則形成 positive supercoil，為左手旋超捲曲構造；若 W 為負值，則為右手旋 (negative supercoil)。

e. Palindrome：

是一段特殊的鹼基序列，其特徵是在同一股 DNA 上，其鹼基序頭尾互補，例如 GAATTC 為 *EcoRI* 限制酶 (restriction enzyme) 的辨認位置。這種互補排列可能在同一條分子內發生鹼基配對，而形成十字型 (cruciform) 的 DNA 三級構造，可做為蛋白質辨認 DNA，或與 DNA 結合的信號。也有利於打開 DNA (breathing)，方便上述蛋白質的辨認與結合。但蛋白質也可不打開雙股 DNA，直接辨認各種鹼基對的外側原子排列。

f. 質體 (plasmid)：

DNA 多存在細胞染色體上，但許多細菌的染色體外，也有一些獨立的小分子 DNA，稱為質體。質體是雙股環狀 DNA，常態以超捲曲的三級構造存在，帶有某些遺傳信息，可進出細菌菌體，是基因操作的重要載體 (vector)。

g. RNA：

RNA 分為信息 RNA (mRNA)、傳送 RNA (tRNA) 及核糖體 RNA (rRNA)，其活動全部與

蛋白質合成(轉譯 translation)有關。由於 RNA 為單股分子，長條狀的脊骨活動自由，且有複雜的分子內鍵結，故分子構形較為特殊而多樣，可能具有催化活性(ribozyme)。現今多認為地球上最早進行複製的巨分子可能是 RNA；但因為 RNA 分子構造不十分安定，後來便演化出 DNA 作為信息貯藏分子，因而造就了今日 Central Dogma 的主軸。

h. 基因表現：

一段基因的兩股 DNA 之中，只有其中之一可轉錄成 mRNA，這一股稱為 template 或 (-) strand，另一股則稱為 nontemplate 或 (+) strand。兩股都有可能被表現，其調控決定於此基因之前的 DNA 序列(promotor 或 enhancer 等)。而 anti-sense RNA 是以人為方法，故意使 (+) strand 轉錄出 RNA，在細胞中會與原來的 mRNA 雜合，抑制該基因的表現，特稱為 RNA 干擾 (RNA interference, RNAi)。

2 功能性質： DNA 最重要的功能之一就是複製自身的分子

a. 單位小分子可參加重要生理功能： 核苷酸除了組成核酸外，另有下列生理功能。

- (1) ATP (或 GTP 等三磷核苷酸) 是攜帶能量的分子。ATP 經常會活化許多代謝小分子，以進入特定的代謝途徑；例如 Glc-1-P 被 UTP 修飾為 UDP-glc，可參加肝糖合成。
- (2) 構成輔酶，是某些酵素不可缺的輔助因子；如 FAD, NAD⁺ 及 coenzyme A (CoA)。
- (3) cAMP 是傳遞細胞內外信息的分子，稱為 第二傳信者 (second messenger)。

b. Central Dogma：

Central Dogma 敘述 DNA → RNA → 蛋白質的流程，幾乎是所有生物體內生命現象運作的基本機制；同時 DNA 以複製來保持其自身的遺傳特性。蛋白質合成時，tRNA 攜帶胺基酸，在核糖體依 mRNA 的信息合成蛋白質。Central Dogma 以及基因表現的調節與控制(基因調控)，是分子生物學的探討內容。

c. 變性與復性：

DNA 的雙螺旋可因加熱而分開，稱之變性，變性後的 DNA 溶液對 260 nm 波長的吸收急劇增加，稱為 hyperchromism；是因為分子內的鹼基外露，而加強了吸光。若溶液的溫度再慢慢下降，則 DNA 會再回復雙螺旋的原態構造(anneal)；回復原態的步驟，要先形成一核心 nucleation (兩條單股 DNA 間的單點接觸配對)，再自發地進行 zippering (由前述已結成配對的核心開始，朝兩端如拉鍊般快速拉上)。

d. 鹼基組成的影響：

因 G≡C 之間有三個氫鍵，A=T 間只有兩個；因此 GC 含量多的 DNA，其變性溫度(T_m)較高，即較不易變性；其分子也較緊密，因而密度較大。此外，DNA 回復原態的時間，與其所含鹼基的種類、組成也都有關係。越複雜的 DNA，復性所需時間也越長；重複性高的 DNA 則較快；以上均可以 C₀t 作圖法來表示之。

e. 雜合反應：

若把兩種來源的單股 DNA 分子混合，則同質性高的 DNA 可以配對在一起，稱為混成或雜合 (hybridization)。DNA 與 RNA 之間，也可進行混成反應。

f. Intron 與 exon：

真核細胞的基因中，其 DNA 經常插有不表現的 DNA，稱為 intron，可能與基因的調節有關；而基因上可以表現的部分，最後轉錄成 mRNA，稱為 exon。某些 RNA 可自己進行其分子內 intron 的切除 (self splicing)，有類似酵素的功能。這種 RNA 的 processing (加工處理)，可能與基因表現的調控有關。

3 研究技術： 核酸操作及序列分析

a. 核酸之純化：

核酸難溶於醇類，可用乙醇或異丙醇沉澱之。洋菜電泳可依核酸分子量的大小不同，來分離各種長度的 DNA 片段。應用超高速離心，可分開 DNA 或 RNA 等分子密度不同的分子。DNA 分子通常都很長，實驗操作中容易拉斷，只能得到約 100 kb 長度者。RNA 分子較小不怕拉力，但容易受到 RNase 水解，而 RNase 很難除去。

b. 限制酶：

限制酶種類很多，可在 DNA 分子上的特定鹼基序列 (一般為四或六對鹼基) 切開核酸，而此種鹼基序列，一定是 palindrome。DNA 可以不對稱方式切開，得到末端不平整的 sticky ends (或 cohesive ends)；也可能平整地切成兩段，而得到鈍端 (blunt ends)。兩個相同的 sticky ends 可以 ligase (接合酶) 連接，這就是遺傳工程的基本操作。

c. 核酸轉印法：

DNA 經過限制酶處理，再以電泳分離後，可轉印到硝化纖維紙上；然後以標有放射性的小段 DNA 為探針，進行混成雜合反應，就可挑出其中具有互補關係的 DNA 片段。此項技術在核酸的檢定上很常見，稱為 Southern blotting；若用來檢定 RNA，則稱為 Northern blotting。探針可使用群殖或 PCR 得來的 DNA，或是化學合成之寡核苷酸片段 (約數十個核苷酸長度，見圖 2)。

d. 基因操作 (gene manipulation)：

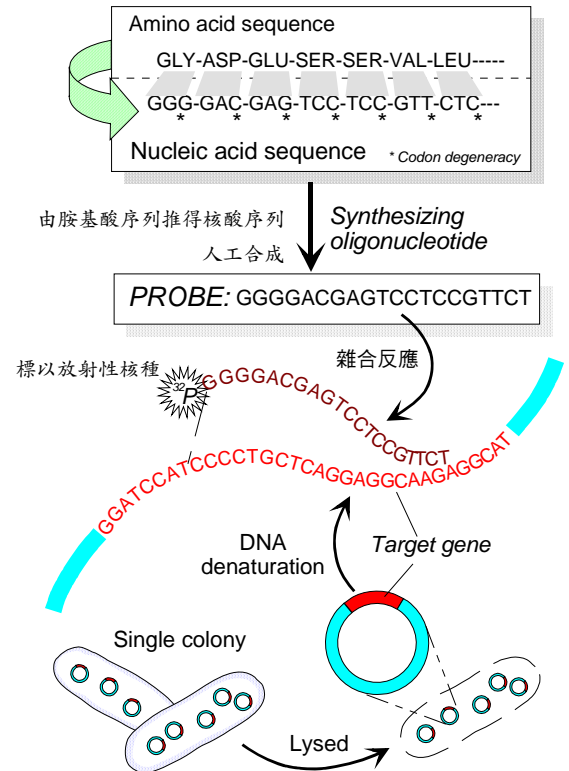


圖 2 核酸探針的設計及應用篩選

帶有遺傳信息的 DNA 分子，可用限制酶切開，再以接合酶 (ligase) 接到載體 (vector) 中；送入宿主菌後，即可大量群殖此段基因。基因群殖 (molecular cloning) 可放大、純化所要的 DNA，以獲得大量且長度、組成固定的基因，以進行此段 DNA 之定序或修飾，進而研究此基因的調控特性。甚可轉殖到其他生物體，以觀察其基因表現產物。

e. 基因庫建構：依 DNA 來源不同而有以下兩種方式

(1) cDNA 基因庫：

mRNA 帶有合成蛋白質的完整信息，以 reverse transcriptase 可逆向翻製成 DNA 分子，稱為 cDNA (complementary DNA) 不含 intron；全體 cDNA 再植入載體，送入宿主中，即得 cDNA 庫。但需注意，此種基因庫只代表正在表現中的基因，並不包括所有的基因。cDNA 可以表現出蛋白質，並以其專一性抗體篩選之。

(2) 染色體基因庫 (genomic bank)：

染色體 DNA 以限制酵素切成隨意片段後，植入載體，再送入宿主建庫。此基因庫可能含有所有的基因，包括正在表現的，與休眠中的基因；也包含 intron，以及基因上游的調控區域 (如 promotor, enhancer 等)。通常要使用噬菌體為載體，以便容納較大的 DNA 片段。

f. PCR (polymerase chain reaction)：

以任何 DNA (或 RNA) 為模版，加入兩段 primers 寡核苷酸，此二 primers 分別界定目標基因的起點與終點，用 DNA polymerase 往復進行複製此二 primers 之間的 DNA，則可大量合成得此段目標基因。應用此法，可以直接群殖某特定基因，而不需先行建立基因庫，但需選擇正確的 primers。

g. DNA 定序：以下兩種方法目前以 Sanger 法較常用 (見圖 3)

(1) Maxam-Gilbert 法：

以四種化學反應分別對四種鹼基作用，每一反應只對單一鹼基進行修飾，而在該鹼基的地方斷開，得到一系列長度不同的核酸片段。電泳可依照這些 DNA 片段的大小，在膠體中排開，即可依序判讀 DNA 分子上核苷酸的序列；比較如此的四組鹼基序列電泳，即可組合成整段 DNA。

(2) Sanger 法：

以樣本 DNA 為模板，使用 DNA polymerase 進行試管中 DNA 生合成。四個反應中，每個反應各缺單一種核苷酸，而代以其類似物 (analogue)，則部分合成反應會停在該類似物的核苷酸處，造成各種長短不一的 DNA 片段，以電泳分離如上，即可組合判讀 DNA 的序列。

上述兩種方法，均以 ^{32}P 標示在核酸分子上，以便顯像各不同長度的核酸片段；現在已經可以使用不同的螢光染劑，標示在四種核苷酸上，直接以顏色判讀序列。

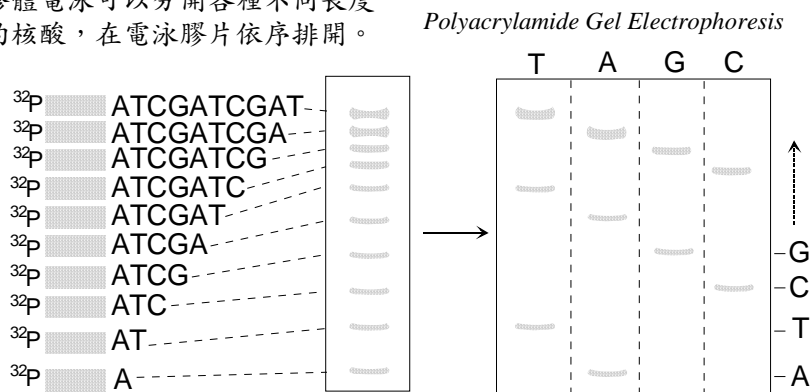
h. 定點突變 (site-directed mutagenesis) :

利用分子群殖的方法，可以改變基因上某一特定鹼基，植入載體後，在宿主中表現。檢定轉譯所得之突變蛋白質，可獲知此特定胺基酸之改變，對蛋白質或酵素功能的影響。

i. RFLP (restriction fragment length polymorphism) :

同種生物個體間的基因組成雖大致相同，但有微小差異，稱為多形性 (polymorphism)。這種 DNA 分子上的差異，可以用限制酶檢定出來，DNA 會被水解成不同長度的片段；進行電泳後，將 DNA 轉印到紙上，再以探針偵測，比較所得圖型的異同，便可得知個體間基因親緣關係的遠近。

膠體電泳可以分開各種不同長度的核酸，在電泳膠片依序排開。



但這樣的圖譜不能判讀出端點的核苷酸種類

若能把尾端核苷酸相同的片段提出，跑在同一行，則比較這樣的四行，即可讀出序列。

有兩種方法，可以做出這四群特定的核酸片段，每群由一個反應所完成，同一個反應所得的各條片段，都有相同的 3'-端，但長度由長到短都有。

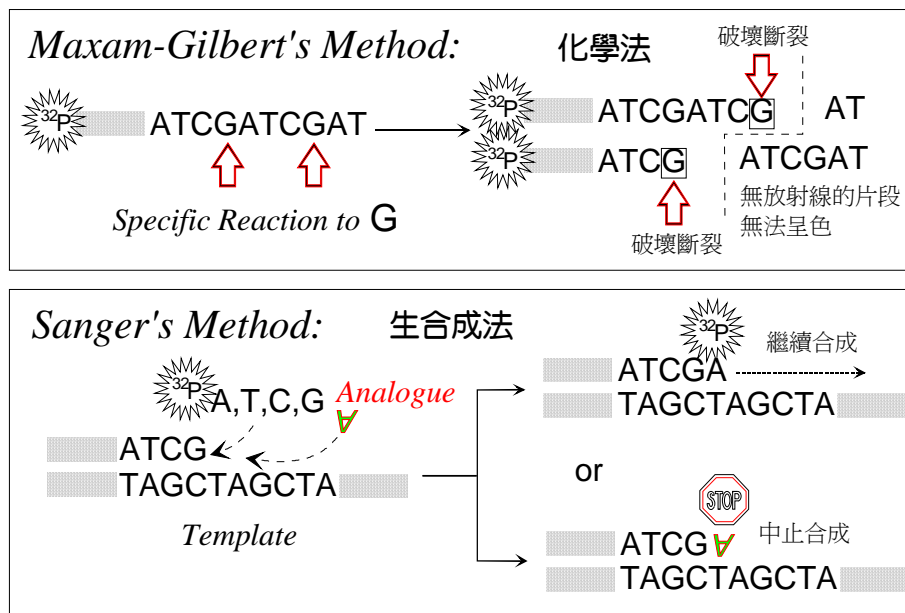


圖 3 核酸定序的原理及兩種定序方法的設計

問題集

1. 以化學觀點而言 DNA 分子比 RNA 穩定，請說明為何？在演化上有何目的？
2. 何為 Human Genome Project？此大計畫對人類或科學研究，有何目的或影響？
3. 何為 palindromic sequence？這種序列在分子的立體構造上，有何特點及作用？
4. 下列核酸序列中，有無具有意義的序列？請畫底線標出，並加說明之。

5'-AGGAGGATATACATGCAGAGTAACTC-3'

5. 限制酶 Bam HI 作用在 G↓GATCC 序列，Bgl II 則作用在 A↓GATCT 序列 (箭頭表示切開的位置)；分別由這兩種限制酶所切得的核酸片段，混在一起後，能否用 ligase 接在一起？若可以連接，則連接完成後可以用哪一種限制酶再度切開？
6. 以對水溶解度的大小，排列以下各種核酸物質 (由大到小)：

Adenine (腺嘌呤), Adenosine (腺嘌呤核苷), Adenosine monophosphate (AMP),
Adenosine triphosphate (ATP), Deoxyadenosine (並說明其溶解度差異的原因)
7. 細胞內的很多反應需要蛋白質與 DNA 分子間的專一性確認與結合，如限制酶可確認特定的鹽基序列；但 DNA 是兩股互相纏繞的雙螺旋，鹽基都深埋在分子內部。請問蛋白質是如何來確認 DNA 分子上的鹽基序列？請回答兩種以上的確認方法。
8. 在純化 DNA 時，最大的污染來自 RNA 及多醣類，尤其是後者很難去除之。
 - a. 如何由 DNA 中去除 RNA？請舉三個方法。
 - b. 為何多醣類很難與 DNA 分開？請以分子構造觀點說明之。
 - c. 如何去除雜夾在 DNA 中的多醣類？
9. 有關 DNA 的雙螺旋構造：
 - a. 其分子構造中的那些因素，分別可以穩定或破壞其雙螺旋的安定性？
 - b. 為何 DNA 雙螺旋構造無法像蛋白質一樣，生成具有固定構形的分子？
 - c. DNA 分子也有的三級構造 (如 supercoiling)，有何生理上的功能或意義？
10. 通常在用乙醇進行 DNA 沈澱時，要把溶液的酸鹼度調低，並且加入鎂離子。請問此種處理，有何作用？請就 DNA 的分子構造說明之。
11. 基因操作技術中，genomic bank 與 cDNA bank 在建庫的方法上及其應用上，各有不同之處，請說明之。
12. Central Dogma 說明遺傳信息 DNA → RNA → Protein 的流程，而這三種分子均為巨分子 (macromolecule)，都是由單位小分子所組成的。
 - a. 你認為地球上第一個出現的巨分子可能為何者？
 - b. 舉出有那些實驗或結果，可證實你的觀點 (可自行設計實驗)。

13. DNA 的雙螺旋鍊構造中，其外側為兩條帶有很強負電的磷酸脊骨，鹽基在內側以 A=T 及 C≡G 的方式配對。這樣的構造，使得 DNA 分子在低離子濃度的水溶液中，很容易變性 (denatured)。
- 請說明上述導致變性的原因。
 - DNA 變性後會有 hyperchromic effect 發生，請說明此現象。
 - 在試管中的實驗操作，要如何避免上述之變性發生？
14. DNA 及 RNA 為兩種遺傳上重要的大分子，其分子構造的最大差別在於核糖分子上的一個氧原子 (2'-OH)。在二級構造上，一為單股分子，另一為雙螺旋構造。因這兩點差異，導致二者在功能及性質上有截然不同的表現，請分別說明之。
15. DNA 分子上有兩股核酸序列，在進行轉錄 (transcription) 時，是使用哪一股為模版？其決定機制如何？
16. 核酸轉譯的起始密碼只有一種，即為 AUG，可轉譯為 Met，亦即所有轉譯得蛋白質的開頭一定是 Met；但我們已發現，一般蛋白質的起頭不一定是 Met，請問為何會有這樣的結果？並說明這種現象在細胞生理上的意義。
17. 進行基因操作時，若要把一段核酸送入宿主細胞時，一定要使用質體或噬菌體作為載體 (vector)；請以質體為例，說明載體的功能。
18. 請解釋何為 intron 何為 exon？較原始的原核細胞並無 intron，請問 intron 及 exon 可能是如何演化而來的？
19. DNA 或 RNA 等核酸構造，也會捲曲成複雜的三級構造，請舉出三例。
- 例如：質體 DNA 的 supercoil 構造
20. DNA 分子中 G 與 C 含量的多寡，會影響 DNA 的哪些分子性質？請舉三例。
21. 已知某真核細胞內的一段 RNA 序列為 -AAUAGGUACC-，則負責轉錄出此段 RNA 的 sense DNA 序列為何？請寫出兩種可能序列。
22. 為何 RNA 的半衰期大都很短？請分別就其化學性質及細胞生理學討論之。
23. 請就以下各性質，分別說明能否把 DNA 及 RNA 分離開來？
- (a) 分子量 (b) 分子密度 (c) pI (d) 對醇類的溶解度
24. 某些 RNA 具有酵素的作用，稱為 ribozyme。請問這些 RNA 分子如何會有催化的能力？
25. 當你得到某生物染色體全部基因的核酸序列 (genome) 後，你可以做什麼事？

酵 素

Enzyme

Enzyme 一字源自希臘文，原意為“in yeast”；描述在酵母菌中，含有某種神奇的催化活力，可以把糖轉變為酒精，故名為酵素。Sumner 在 1926 年首先結晶出尿素酶(urease)，並證實酵素為一種蛋白質。一般而言，酵素具有下列特性：

- a. 酵素可催化生化反應，增加其反應速率，是最有效率的催化劑。
- b. 酵素種類非常多，每一種都能催化所賦與的專一性反應，不相關酵素不易干擾；不過，可能會有酵素間的協同或抑制作用。
- c. 酵素的催化反應是可調節的，反應可受許多因子影響而加快或減緩。
- d. 通常酵素為蛋白質，但部份 RNA 也具專一性的催化能力(ribozyme)。

總之，生物體藉著種種酵素的催化作用與調節，才能有效地完成他所需要的許多生理活動。若細胞內的酵素活動受到抑制或干擾，整個生物體就可能出現異狀，甚至死亡。

1 酵素的命名：

酵素的命名，有一定規則可循。

- a. 最初酵素命名並無法定的規則，但大都附有 -in 或 -zyme 等字尾，例如 trypsin, renin 及 lysozyme 等；後來漸以該酵素催化的反應加上 -ase 字尾為名，再冠上此反應的反應物，如 histidine decarboxylase (反應物 + 反應 -ase)。
- b. 1965 年命名系統化，把所有酵素依催化反應分成六大類，以四組數字名之 (IUBMB 系統)；例如 histidine carboxylase 為 EC 4.1.1.22：

Main Class :	4	Lyases	分裂 C-C, C-O, C-N 鍵
Subclass :	4.1	C-C lyase	分裂 C-C 鍵
Sub-subclass :	4.1.1	Carboxylase	分裂 C-COO 鍵
序列號碼 :	22	第 22 個 4.1.1	分裂組胺酸的 C-COO 鍵

- c. IUBMB 系統所分的六個 Main Classes：

(1) Oxidoreductase	氧化還原酶	電子或質子轉移
(2) Transferase	轉移酶	官能基團的轉移
(3) Hydrolase	水解酶	加水或脫水分子
(4) Lyase	裂解酶	共價鍵生成或裂解
(5) Isomerase	異構酶	同一分子內基團之轉移
(6) Ligase	連接酶	消耗 ATP 生成分子間新鍵

2 酵素的構成：

酵素主要由蛋白質所構成，不過許多酵素還需加上其它物質；有些 RNA 也具有催化的能力，在分子演化上可能是最早出現在地球上的巨分子。

2.1 全酶：

全酶是具有完整分子構造及催化能力的酵素。

- a. 一般酵素由蛋白質構成，但某些酵素為糖蛋白或脂蛋白，有些還要加上輔助因子 (cofactor, coenzyme)，才成為功能完全的酵素 (全酶 holoenzyme)；若全酶失去了輔助因子，剩下的部份稱為 apoenzyme：



- b. 全酶分子可能只含一條多肽，也可能含有數條多肽，並以雙硫鍵連接在一起 (如 chymotrypsin)；有的可由數個相同或不同的次體 (subunit) 組成。肝糖磷解酶為同質二元體 (dimer)；而血紅蛋白 (hemoglobin) 是 $\alpha_2\beta_2$ 的四元體形式，但並非酵素。多元體蛋白質可能具有異位調節功能 (allosteric effect)，即任何一個次體改變，會影響其它各個次體的活性。

2.2 輔酶：

一些非蛋白質的小分子會加入酵素構造中，以幫助催化反應進行。因為二十種胺基酸的官能基中，具有強荷電性者不到五個，而酵素活性區經常需要更強的官能基來引發催化反應，部份酵素因此納入非蛋白質的輔助因子參與其構造，作為催化的重要反應基團。

2.2.1 輔助因子：

包含金屬離子以及小分子的有機物質 (輔酶)。

- a. 金屬離子：如 Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , K^+ ，以離子鍵結合在 His, Cys, Glu 等胺基酸；細胞多使用較輕的金屬，重金屬多有害處。
- b. 有機小分子：分子構造較複雜而多樣，通稱為輔酶 (coenzyme)，在哺乳類中多由維生素代謝而來，而哺乳類無法自行合成維生素。如維生素 B 群、葉酸 (folic acid)、菸鹼酸 (niacin)。

2.2.2 輔酶的作用：

輔酶的構造與其功能極為重要，請注意每一種輔酶的特定作用機制。

- a. 加入酵素分子，誘使改變其立體構形，而使得酵素與基質的結合更有利反應。
- b. 輔酶可作為另一基質來參與反應，但反應後輔酶構造不變。通常輔酶作為某特定基團的轉移，可供給或接受基團 (如 $-\text{CH}_3$, $-\text{CO}_2$, $-\text{NH}_2$) 或者電子，這類輔酶最為常見。

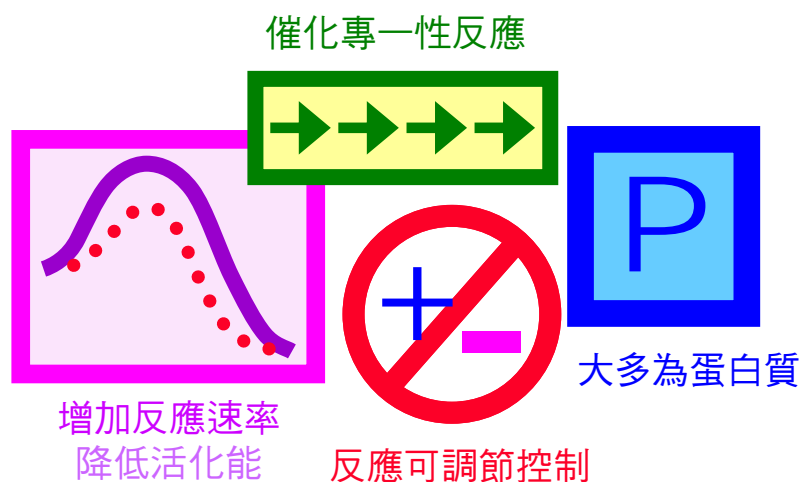
- c. 提供一個強力的反應基團，吸引基質快速參加反應；例如維生素 B₁ (thiamine)，有許多維生素都是輔酶。

2.2.3 輔助因子範例：

- ◆ 請自行參考課本，研習以下各類酵素及輔酶的作用及構造。
- a. 各種去氫酶 (dehydrogenase) 以輔酶 NAD⁺/NADH 轉運 氫負離子 (hydride, H⁻)；要研究 alcohol dehydrogenase 以及 glyceraldehyde-3-P dehydrogenase 的作用模式，同時也請瞭解 NAD⁺/NADH 及氫負離子的構造。
- b. Carboxypeptidase 分子需要一個鋅離子維持分子構形 (induced fit)，同時也參與催化反應，可以抓住基質胜肽，並活化水分子。
- c. Glutamate transaminase 使用輔酶 pyridoxal phosphate 轉運胺基。
- d. Catalase 分子上有一 Fe²⁺ 作為電子暫存區，可以把 H₂O₂ 還原成水分子；而血紅蛋白也有 Fe²⁺，因此可有類似的催化作用，但效率低很多，因為其鐵離子氧化成 Fe³⁺ 後無法很快轉變回來。

2.2.4 輔酶與 ribozyme：

- a. 輔酶的構造透露了遠古 RNA 分子的催化秘密：許多輔酶的構造中都有核苷酸參與，可能是用來與遠古催化性 RNA 分子結合，以幫助 RNA 的催化反應。因為 ribozyme 雖然有分子構形，但缺乏催化所需的強烈官能基團，有如今日的蛋白質酵素與其輔酶一般。
- b. 因為 ribozyme 具有催化能力，本身又帶有遺傳訊息，加上輔酶的幫助，相信地球上最早出現的巨分子，可能是 RNA；這些事實也暗示，最早的催化性蛋白質是如何產生的。



酵素印象：反應速率、專一性、可調節、蛋白質

3 酵素動力學：

動力學可以公式說明酵素對基質分子的催化行為。

3.1 酵素催化反應：

酵素提供基質一個穩定的空間，有利於穩定其過渡狀態，並快速轉變成為生成物。

a. 反應物 (A, B) 轉變成生成物 (A-B) 途中，有過渡狀態 [A...B] 生成：



b. 過渡狀態 (transition state) 的位能較高，其生成需要耗費能量，稱為活化能 (activation energy, E_{act})；經由酵素的催化，可降低反應活化能，使反應速率加快，但不影響反應的平衡方向。

c. 一些過渡狀態的類似物 (analog) 會佔住酵素活性區，但無法完成反應，即成為抑制劑。若把這種過渡狀態的類似物做為抗原，免疫動物後所產生的抗體，可能有類似酵素的催化作用，但催化速率很低，稱為 abzyme (catalytic antibody)。

d. 酵素降低活化能的機制有以下幾點，都是因於活性區的特殊立體構造所致：

- (1) 酵素活性區專一性地與基質結合，提供最適的空間排列，以便穩定過渡狀態。
- (2) 活性區通常為一凹陷口袋，隔開外界的水環境，減低水分子的干擾。
- (3) 活性區附近的某些胺基酸可提供活性官能基 (通常帶有電荷) 直接參與反應。
- (4) 很多酵素含有輔酶或輔因子，輔助反應 (見上節)。

◆ 次頁圖 1 的 **酵素動力學大綱** 以流程圖方式，列出酵素動力學的主要探討項目；當研讀動力學部分時，請隨時依章節號碼參閱本圖。(圖中酵素的漫畫造型取自 Gonick, L. & Wheelis, M. 所著 *The Cartoon Guide to Genetics*, 有中譯版)

3.2 酵素動力學：

動力學是如何進行的？先改變基質濃度，再看酵素的活性如何變化。

3.2.1 基本概念：

酵素動力學的形成，是根基於『過渡狀態濃度恆定』的基本概念。早在 1913 年，Michaelis 及 Menten 就以轉化酶 (invertase) 系統為研究對象，發現有關酵素與基質反應的一些行為模式，他們提出：

- a. **Steady state 理論**：酵素催化時，基質先與酵素結合，生成過渡狀態，再轉變成為產物。而酵素與基質的結合是可逆的 ($E + S \rightleftharpoons ES$)；而當反應達穩定狀態 (steady state) 時，其中的 [ES] 濃度不變 (因為 ES 生成量等於其消失量)。
- b. **酵素行為的數學描述**：反應速率 (v) 與酵素或基質的關係，可以數學式表示；在

固定的酵素量下，反應速率 v 與基質濃度 $[S]$ 成雙曲線關係(但只有一股)，可用公式表之，即 Michaelis-Menten (M-M) 動力學公式。

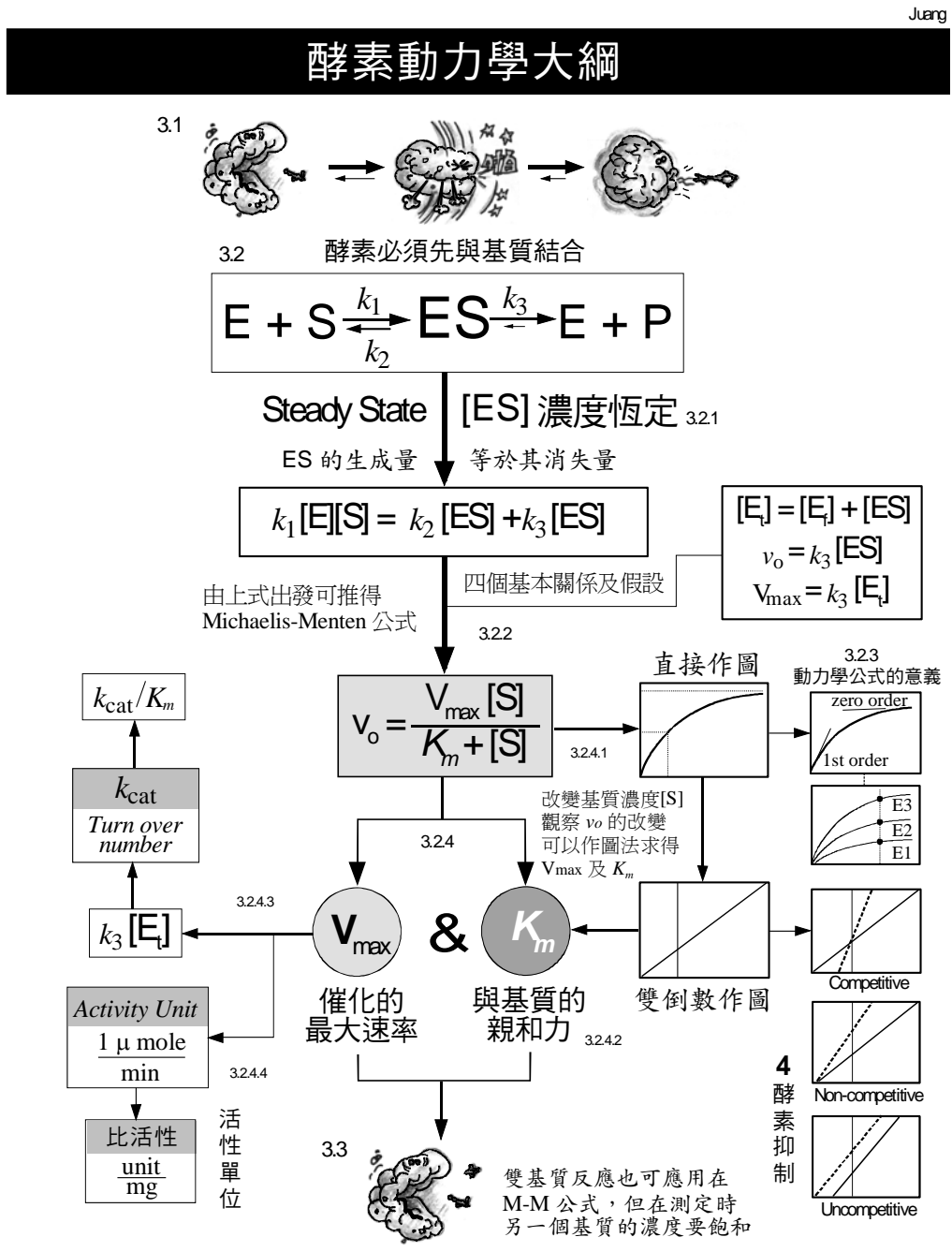


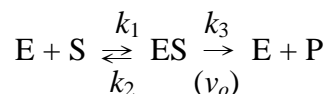
圖 1 酵素動力學公式的推演及其應用

酵素漫畫造型取自 Gonick, L. & Wheelis, M. *The Cartoon Guide to Genetics*.

3.2.2 Michaelis-Menten 公式的推演：

由四個基本設定開始，可一步一步推得 M-M 動力學公式。

a. 酵素 E 與基質 S 反應如下，各步驟反應速率由常數 k_1, k_2, k_3 表示：



b. 導 M-M 公式前的四個基本關係及假設：

(1) 因 [ES] 不變，故 ES 的消耗量等於生成量：

$$k_2 [ES] + k_3 [ES] = k_1 [E][S] \quad \text{(I)}$$

(2) 總酵素濃度 $[E_t] =$ 單獨存在者 $[E_f] +$ 酵德基質複合體 $[ES]$ (II)

(3) 反應初速 (v_o) 是由後半分解反應 (k_3) 所決定： $v_o = k_3 [ES]$ (III)

(4) 最大反應速率 (V_{max}) 是假設所有酵素均轉變成 $[ES]$ ，

$$\text{故上式可改寫為：} \quad V_{max} = k_3 [E_t] \quad \text{(IV)}$$

c. 基於上述條件，可推 M-M 公式如下：

(1) 整理 (I) 可得： $(k_2 + k_3) [ES] = k_1 [E][S]$ 移出 [ES]

$$\text{故 } [ES] = \frac{k_1}{k_2 + k_3} [E][S]; \text{ 另設 } \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \text{ 則 } [ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad \text{定義 } K_m$$

(2) 由 (III) 得 $[ES] = \frac{v_o}{k_3}$ ，故 $\frac{v_o}{k_3} = \frac{[E][S]}{K_m}$ 即 $v_o = \frac{k_3 [E][S]}{K_m}$ (V) 由 [ES] 導入 v_o

(3) 由 (II) 得 $[E_f] = [E_t] - [ES]$ ，而 $[E_f]$ 可視為 $[E]$ ，故：分解 [E]

$[E] = [E_t] - [ES]$ 代入 (V) 得：

$$v_o = \frac{k_3 ([E_t] - [ES])[S]}{K_m} = \frac{k_3 [E_t][S] - k_3 [ES][S]}{K_m}$$

(4) 把 (III) $v_o = k_3 [ES]$ 及 (IV) $V_{max} = k_3 [E_t]$ 代入得：轉換得 V_{max} 及 v_o

$$v_o = \frac{V_{max} [S] - v_o [S]}{K_m} \rightarrow v_o K_m = V_{max} [S] - v_o [S] \text{ 移項}$$

$$\rightarrow v_o K_m + v_o [S] = V_{max} [S] \quad \text{(VI)}$$

提出 v_o

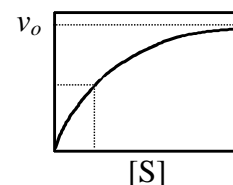
整理 (VI) 集中 v_o 即得 M-M 公式：

$$v_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

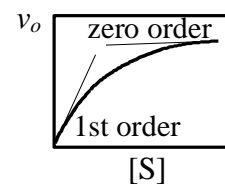
3.2.3 Michaelis-Menten 公式的意義：

M-M 公式可以求得 V_{max} 及 K_m ，求得 V_{max} 及 K_m 有何意義？

a. M-M 公式是雙曲線公式。若固定酵素量，改變其基質量 $[S]$ ，則



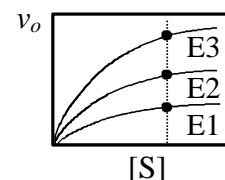
可得到不同的反應初速 v_o ，再以 $[S]$ 為 x 軸， v_o 為 y 軸作圖，可得到一股雙曲線，其漸近點為 V_{max} 。



- b. 低濃度 $[S]$ 時反應速率 v_o 與 $[S]$ 成正比，即 $v_o \sim [S]^1$ ，是為一級反應 (first order reaction)；當 $[S]$ 增大， v_o 接近漸近線時， v_o 的改變很小，不受 $[S]$ 變化的影響，即 $v_o \sim [S]^0$ ，稱為零級反應 (zero order)。

- c. 若基質量 $[S]$ 也固定，則 M-M 公式變為：

$$v_o = \frac{V_{max} (\text{常數 } [S])}{(\text{常數 } K_m) + (\text{常數 } [S])} \sim V_{max} (\text{常數})$$



由 (IV) $V_{max} = k_3 [E_t]$ ，故 $v_o \sim [E_t]$ ，即反應速率與酵素量成正比。

- d. 事實上 $ES \rightarrow E + P$ 的反應為可逆，但此逆反應可忽略，因 M-M 公式的測定，是反應初期所測的反應初速 (v_o)，此時生成物 $[P]$ 的濃度很低，逆反應幾乎無從發生。

◆ 練習以紙筆自行推演 M-M 公式及上述各種情況下的變化。

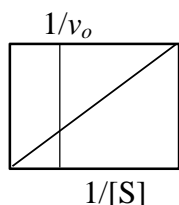
3.2.4 V_{max} 及 K_m 的測定與意義：

V_{max} 及 K_m 是每一個酵素極重要的性質指標，可以顯示其催化特性。

3.2.4.1 V_{max} 及 K_m 測定法：

步驟相當單純，但隨著各種酵素活性測定方法的難易有別。動力學實驗的基本資料，為在一系列 $[S]$ 濃度下所測得的反應初速 (v_o)，依法作圖即可求出 V_{max} 及 K_m 。有以下數種作圖求法：

- a. 直接作圖法：是最基本的數據作圖。以 $[S]$ 為橫軸 v_o 為縱軸，所得漸近線的最高處為 V_{max} ， K_m 為 50% V_{max} 時的 $[S]$ 。



- b. Lineweaver-Burk 雙倒數作圖法：是最常用的作圖方式。因直接作圖法只能以漸近估計求得 V_{max} ，若 x 及 y 軸分別改為 $1/[S]$ 及 $1/v_o$ ，則可作出一條直線來，由 x 軸上的交點求出 $1/K_m$ ，由 y 軸交點求出 $1/V_{max}$ 。

◆ 循一實例練習畫出動力學測定的直接作圖及其雙倒數作圖。並請注意 V_{max} 及 K_m 的單位是什麼，為何會得到此種單位？

- c. Eadie-Hofstee 作圖法：雙倒數圖的直線，在接近 y 軸處，打點太密，求得直線稍有困難。若分別以 $v_o/[S]$ 及 v_o 為 x, y 軸，亦可畫出直線，且各點的分佈較平均。

3.2.4.2 K_m 的意義：

K_m 是酵素與基質間親和力的指標， K_m 越大親和力越小。

- a. 當反應速率為 50% V_{max} 時， $v_o = \frac{1}{2} V_{max}$ ，代入 M-M 公式，則得：

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}, \text{ 整理得 } K_m = [S] \text{ (只在 } v_o = \frac{1}{2}V_{\max} \text{ 條件下)}$$

因此 K_m 的意義表示，要達到一半最高催化速率時 $[S]$ 所需濃度。

- b. 若某酵素的 K_m 越低，則表示它要接近 V_{\max} 所需的基質濃度越低。若一酵素有數種基質，各有不同的 K_m ，則 K_m 越低的基質，表示它與酵素的親和力越大，催化反應愈容易進行。 K_m 與 $[S]$ 一樣是濃度單位 (mM 或 μM)。
- c. 酵素的 K_m 值可看成在一般細胞內，該酵素基質的大約濃度。

3.2.4.3 V_{\max} 的意義：

請確實瞭解 $V_{\max} = k_3 [E_t]$ 的意義 (公式 IV)。

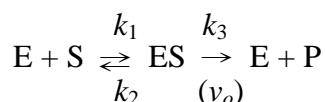
- a. 在足夠的基質濃度下，一定量的酵素所能催化的最高反應速率，即為其 V_{\max} ；要讓一個酵素達致其 V_{\max} ，就要把基質量調至最高濃度。在比較不同酵素的 V_{\max} 活性時，注意要以同樣莫耳數的酵素分子為基準。
- b. 單位時間內每莫耳酵素所能催化的基質數 (莫耳數)，稱為 **turn over number** 或 **molecular activity**，一般酵素約在 0.1~10,000 間 (每秒)，有大有小不等。這是當基質量極大於 K_m 時 ($[S] \gg K_m$)，反應推向右邊， $E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$ ，其 k_3 成為決定因素，即為 **turn over number**，特標記為 k_{cat} 。
- c. 當基質量遠小於 K_m 時 ($K_m \gg [S]$) 則 $[E_t] = [E]$ 而 $K_m + [S] = K_m$ ，則可以由 M-M 公式導得：

$$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{k_3 [E_t][S]}{K_m + [S]} = \frac{k_3 [E][S]}{K_m} = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} [E][S]$$

反應速率成為 **second order**，由 $[E]$ 及 $[S]$ 兩項因素決定之。

而 k_{cat}/K_m 常數的大小則為重要指標，同時顯示酵素的催化效率及專一性。

- d. 瞭解上述的 K_m 與 V_{\max} 後，重新回顧最早的酵素與基質反應式：



若把此式分成兩半，前半是 $E + S \rightarrow ES$ 由 k_1 與 k_2 主導；後半 $ES \rightarrow E + P$ 由 k_3 主導。顯然 V_{\max} 是由後半反應決定 (記得 $V_{\max} = k_3 [E_t]$)，而 K_m 則大體上由前半反應所定。因此，整個酵素反應，是由這兩半反應所共同組成，前半以 K_m 來決定酵素與基質的親和度，後半以生成物的產生來決定最高反應速率。注意 K_m 的定義是 $(k_2+k_3) \div k_1$ ，故後半反應還是對 K_m 有影響。

3.2.4.4 酵素活性定義：

有兩種表示酵素活性的方式，請注意其定義不同，不要混淆。

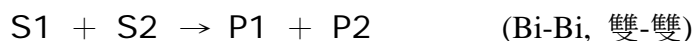
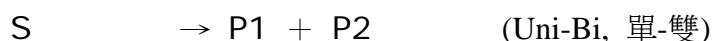
- a. **活性單位**：酵素活性的表示方法通常使用 **活性單位 (unit)**；即酵素每分鐘若催化 1 μmole 基質的活性，即定義為 1 單位活性；注意同一種酵素可能

會有不同定義方式的活性單位。

- b. 比活性：每單位重量蛋白質 (mg) 中所含的酵素活性 (unit)，稱為比活性 (specific activity, unit/mg)；因酵素為活性分子，有時會失去活性，雖然蛋白質仍在，但比活性會下降。

3.3 雙基質反應：

- a. 上述 $S \rightarrow P$ 催化反應，只有一種基質及一種生成物，稱為 Uni-Uni 反應。但事實上大多數酵素反應，有一個以上的基質，也可能有數個生成物，為多基質反應。例如：



- b. 雙基質反應仍可適用於 M-M 公式，但兩種基質的 K_m 要分別測定；測 S_1 的時候，反應中的 S_2 濃度要飽和 (使 S_2 成為非主導因子)，反之亦然。

- c. Bi-Bi 反應中基質 (S_1, S_2) 及生成物 (P_1, P_2) 的進出次序有數種情形：

- (1) **Random**：基質進入活性區並沒有一定次序，但兩個基質都要結合到酵素後，才會開始進行反應。
- (2) **Ordered sequential**：基質依固定次序進入，然後生成物再依序出來。
- (3) **Ordered ping-pong**：依 [S_1 進, P_1 出; S_2 進, P_2 出] 次序，像是兩個 Uni-Uni 組成的；也像是打乒乓球一樣地一來一往。



4 酵素的抑制：

酵素活性的抑制，也是一個重要的調控方式。

4.1 酵素的抑制方式：

- a. 抑制劑與酵素結合而導致抑制作用，這種結合是可逆或不可逆反應都有。
- b. 很多生理或藥理上的作用，都是源自於抑制劑對酵素的作用，而使酵素的活性降低，或者完全失去活性。如消炎的磺胺藥，即是一種細菌酵素基質 (PABA) 的類似物，可抑制細菌葉酸的合成，因而抑制細菌生長。
- c. 抑制劑與酵素產生非共價性結合，然後可以阻礙基質進入酵素活性區，或者改變酵素構形而使其失活。
- d. 抑制酵素的機制，依抑制劑 [I] 與酵素 [E] 的結合方式，可以分成三種：Competitive, non-competitive 及 uncompetitive (請見下頁圖 2 整理)；由抑制劑對酵素動力學曲線所造成的影響，即可得知是何種抑制方式。

4.2 不可逆的抑制：

不可逆性抑制劑會對酵素活性區上的主要胺基酸做共價性修飾，因此酵素活性通常被嚴重破壞，便無上述三種動力學抑制方式。

- a. 青黴素 (penicillin) 喬裝成基質，可與細菌的一種酵素發生不可逆的結合，此酵素乃細菌細胞壁生合成的重要酵素，細菌無法正常生成細胞壁而死亡。有點像是分子版的『木馬屠城記』。
- b. 重金屬： Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} 及砷化物等重金屬，非專一性地與 [E] 或 [ES] 結合，取代原來酵素所需的金屬，而使酵素失去活性。
- c. 化學修飾劑：某些化合物可以專一性地修飾特定胺基酸，除了可做為專一性抑制劑外，也可用來檢定酵素活性區中，具有催化反應的胺基酸為何者(表 1)。

表 1 若干蛋白酶的抑制劑及其作用機制：

抑制劑	全名	作用基團	目標酵素例
PCMB	<i>p</i> -chloro-mercuribenzoate	Cys -SH	Papain
DIFP	diisopropyl-fluorophosphat	Ser -OH	Ser proteases
TPCK	tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone	Ser -OH	chymotrypsin
TLCK	tosyl-L-lysine chloromethyl ketone	Ser -OH	Trypsin

◆ 日本真理教所用的沙林毒氣 (Sarin) 是一類似 DIFP 的抑制劑。

d. 蛋白酶及其抑制劑：蛋白酶廣泛存在於細胞，有其專一性抑制劑可控制其生理活性，二者互相拮抗形成調節控制網。目前極被重視的 HIV 蛋白酶及其人工抑制劑，在醫藥研究上有很大的作用及影響。

◆ 有關蛋白酶的分類，請見 6.1.2 一節。

三種酵素抑制機制

	▶ Competitive	□ Non-competitive	◻ Uncompetitive
圖解	<p>基質 (S) 和抑制劑 (I) 競爭酶的結合位點 (E)。</p>	<p>抑制劑 (I) 結合在酶 (E) 的另外一個位點，與基質 (S) 的結合位點不同。</p>	<p>抑制劑 (I) 只能與酶-基質複合物 (ES) 結合。</p>
抑制機理及說明	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I \rightleftharpoons EI$ <p>[I] 只與自由的 [E] 結合，會與 [S] 競爭； [S] ↑ 可克服 [I] 的抑制。</p>	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I \rightleftharpoons EI$ $+ I \rightleftharpoons EIS$ <p>[I] 可與自由的 [E] 或已佔據有 [S] 的 [ES] 結合。 [S] ↑ 不能克服 [I] 的抑制。</p>	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I \rightleftharpoons ESI$ <p>[I] 只能與 [ES] 結合， [S] ↑ 反而有利 [I] 的抑制。</p>
直接作圖	<p>V_{max} 不變；K_m 變大</p>	<p>V_{max} 變小；K_m 不變</p>	<p>V_{max} 及 K_m 均變小</p>
雙倒數作圖	<p>交於 Y 軸</p>	<p>交於 X 軸</p>	<p>兩條平行線</p>

圖 2 各種酵素抑制反應的機制及其動力學行為

5 酵素的催化機制：

酵素的催化機制可以化學反應逐步推得，與分子的構造也有相當大的關係。

5.1 酵素活性區 (active site)：

催化反應都在活性區內進行，活性區可提供有利催化的環境。

a. 活性區：是酵素與其基質 (或輔酶) 的結合區，並在此進行催化反應。活性區通常是一凹陷袋狀構造，水分子不易進入袋中。活性區內的胺基酸，只有那些具反應性基團 (reactive group) 者，才直接參與催化；但各種胺基酸都有可能參與結合基質。

b. 酵素催化的化學機制，通常是以下面三種基本方式進行反應：

(1) **Bond strain**：基質結合到酵素後，酵素的構形扭曲，使基質分子內某共價鍵受力斷裂。

(2) **Acid-base**：利用活性區內胺基酸殘基或輔酶，可以放出或接受質子 (或電子) 的特性，對基質進行質子或電子的轉送。

(3) **Orientation**：活性區可提供基質適當的排列空間，使有利於反應進行。

以上三種方式或可同時發生，為協同式 (concerted set)；亦可先後依序發生，稱順序式 (sequential mechanism)。以下兩個重要例子都是蛋白酶。

5.2 協同式催化機制：

以 carboxypeptidase A (CPA, 羧肽酶) 為模型酵素說明 (圖 3)。

a. CPA 的分子量 34 kD，含 307 個胺基酸，有一雙硫鍵，及一個鋅離子，是一種金屬蛋白酶。CPA 可由胜肽的 C-端，依序切下外側胺基酸 (外切酶)，當胺基酸的 R 基團為非極性者，較有利反應進行；而 carboxypeptidase B (CPB) 只切 C-端為 Lys 或 Arg 者，二者專一性不同。

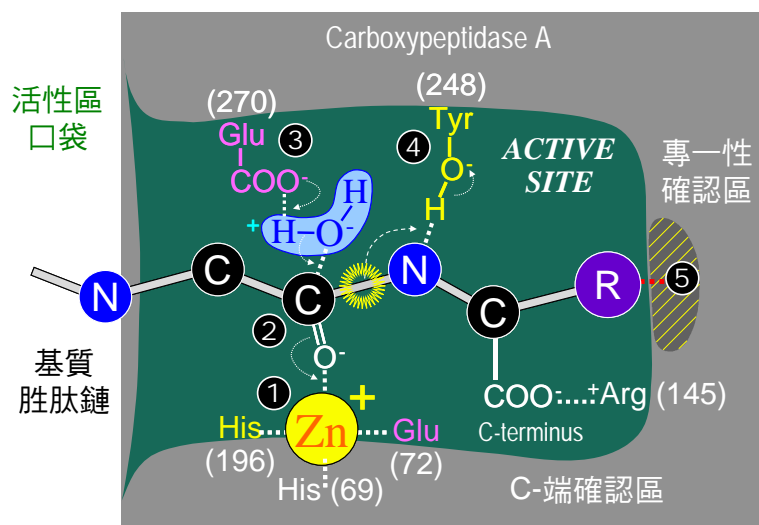


圖 3 Carboxypeptidase A 的催化機制

b. CPA 的詳細催化機制如圖 3 所示，並加說明於下：

- ① Zn^{2+} 離子乃重要輔助因子，可吸住基質胜肽鏈上的 carbonyl 基，增強其極性，使②碳帶正電。
- ③ Glu270 吸住水分子，放出 OH^- 攻擊 C^+ ②，產生新的 C-OH 鍵。
- ④ Tyr248-OH 上的質子，與氮 lone pair 電子產生新鍵，原來的胜鍵斷裂。
- ⑤ 附近的胺基酸與基質 C-端的 R 基團，有專一性的結合，以辨別基質的極性；同時 Arg145 與基質 C-端的 -COOH 結合，確定基質蛋白質是以 C-端進入活性區。

5.3 順序式催化機制：

以 chymotrypsin (CT, 胰凝乳蛋白酶) 為代表，請找出課本的相關圖片。

- a. 分子構造：CT 的分子量為 25 kD，含三條胜肽，由兩個雙硫鍵連接，是轉譯後修飾的產物；剛轉譯出來的完整胜肽鏈沒有活性，要在接近 N-端的 Arg15 與 Ile16 之間先斷開後，CT 才能活化。
- b. 催化活性：CT 可水解胜肽鏈上面的芳香族胺基酸 (Tyr, Phe, Trp) 或 Met (具較大非極性基團者)，切開這些胺基酸 C-側的胜鍵，是一種內切酶。
- c. 活性區：CT 大部分的極性胺基酸都露在分子外表，只有三個在活性區內，對催化反應扮重要角色 (Ser195, His57, Asp102)。三者以『電荷接力』形成高反應性 Ser，其 Ser195-OH 基上的 H^+ 被鄰近的 His57 吸收，生成具有高反應性的 $-O^-$ 。

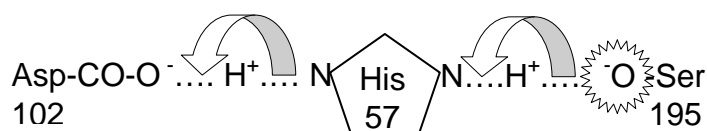


圖 4 Ser 蛋白酶催化區上由三個胺基酸所構成的電荷接力

- d. 催化機制：Ser 上的高反應性 $-O^-$ 會攻擊基質胜肽上的 carbonyl 碳 (帶微正電)，形成新的 C-O 鍵 (acylation 步驟)，同時斷開基質的胜鍵，先釋出一段 C-側的胜肽；然後加水分解，破壞此 C-O 鍵 (deacylation 步驟)，釋出另一段 N-側胜肽。以上兩個步驟，依次順序發生。
- e. 穩定過渡狀態：除了 catalytic triad 可以有效催化之外，活性區也可穩定催化反應的中間過渡狀態。過渡狀態有相當高的負電荷，因此以活性區附近的 Gly193 及 Ser195 本身的 -N-H 與之產生氫鍵而中和之。
- f. Ser 蛋白酶家族：這種以 Ser 為催化主力的蛋白酶很多，統稱為 serine 型蛋白酶；除了 chymotrypsin 外，尚有許多如 trypsin (胰蛋白酶)、elastase (彈性蛋白酶)。它們的催化機制相似，整體構形相當類似，且都有 [Ser-His-Asp] 接力形式的催化機構。但對基質的專一性不同，trypsin 的基質為鹼性胺基酸 (Lys, Arg)，elastase 則只切 R 基團較小且不帶電荷者。

5.4 酵素的專一性：

酵素只與特定的基質結合，有很高的專一性，這是酵素重要特性之一。

5.4.1 專一性結合區：

大部份酵素的活性區即有專一性辨識與結合基質能力，但 CT 另有一基質的辨識區位在其活性區附近。

- 上述各 Ser 型蛋白酶的活性區除了有 [Ser-His-Asp] 催化中心外，附近還有一個袋狀的基質結合區，可以辨別基質的種類 (驗明正身)，以便與正確的胺基酸結合。
- 這種專一性結合是靠結合區上胺基酸 R 基團的形狀、大小、極性或電荷等性質的契合，以二級鍵結合。例如 chymotrypsin 的結合區多含非極性的胺基酸，故只能與非極性的芳香族胺基酸結合，催化這類胺基酸的水解。改變結合區的重要胺基酸，可能改變專一性 (*Science*, 1992, 255: 1249)。

5.4.2 專一性結合力量：

有兩大類構成因素，一是形狀的互補，另一是吸引力量。

- 分子間 **構形互補**：有如『鎖頭與鑰匙 lock & key』在形狀上的契合；而蛋白質分子有彈性，與基質結合可誘生更契合的構形，稱為 **induced fit**。因構形互補而吸引的主要力量來自凡得瓦爾力，如圖 5 中 A 與 B 之間的契合。
- 酵素與基質間會產生 **吸引力量**，是由兩者間的若干二級鍵所共同組成。

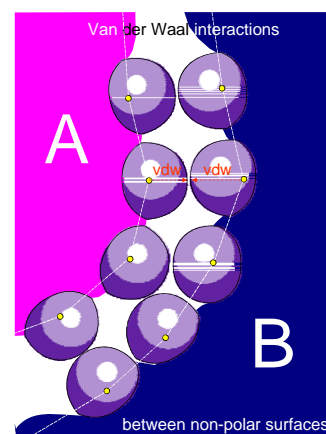
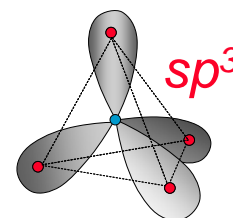


圖 5 兩分子間構形互補

5.4.3 立體專一性：

酵素分子如何辨認立體異構物？碳的原子軌道是根本原因。

- 酵素可辨認基質的 **立體不對稱性**，只能對某一種立體異構物有催化反應 (如 L 或 D 型胺基酸之一)，而生成物也只有對應的立體異構物之一。
- 如圖 6 把基質分子中不對稱碳 (sp^3) 四個鍵結中的一點 (A) 固定，再以酵素的專一性結合面接觸並確認 B-C-D 三點，就能分辨另一異構物的差異 (例如 B-D-C) 而排斥之 (從 A 點往下看即可分出差異，如圖 7)。



碳原子的四面體構造有很強的立體限制性是蛋白質構形的根本

圖 6 碳原子四面體

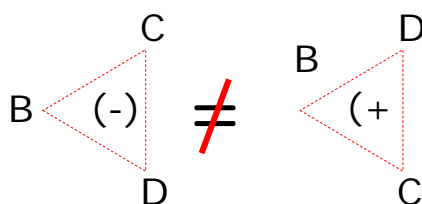


圖 7 不對稱碳鍵結排列的差異

6 酵素活性的調節：

酵素活性的調節，對細胞生理極為重要，因為細胞並不一定期望某酵素一直保持在活性狀態。對酵素分子的共價或非共價性修飾，其調節活性的效果最為直接而迅速；有些是可逆反應，也有部分是不可逆。以下面四種方式 (6.1~6.4)，再加上抑制劑的使用，細胞就可以自由控制酵素活性的高低。

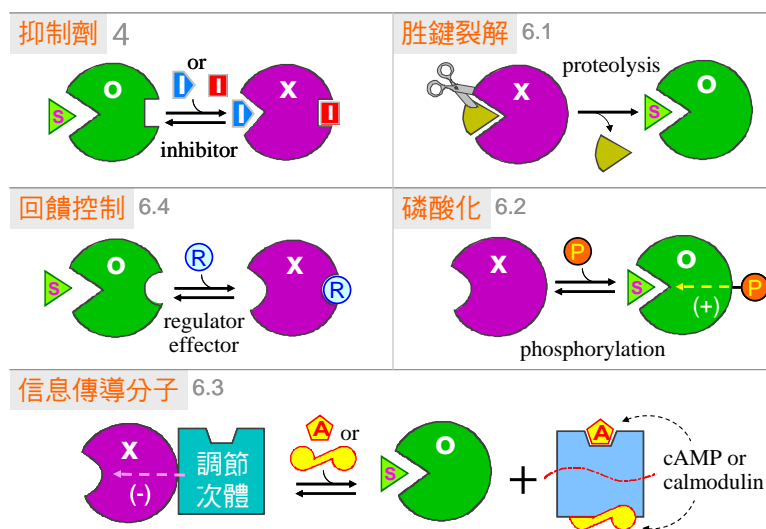


圖 8 酵素活性的調節控制方式 (上面的數字代表各說明章節)

6.1 蛋白質裂解：

不只是酵素，很多蛋白質都是利用降解來調節其活性或功能。

6.1.1 酶原或前驅體：

以蛋白質的裂解來調節酵素活性，該酵素在裂解後得以活化；也可以把完成任務後的蛋白質分解掉，以免繼續進行著生理作用。

- a. 許多酵素 (或蛋白質) 剛由 mRNA 轉譯成蛋白質時，分子量較大而不具活性，稱為酶原 (zymogen)；在蛋白質則稱前驅體 (precursor)。酶原或前驅體須經蛋白酶切開，或除去部分肽基，才能成為具有活性的分子。請研究下面數例，注意胰島素及腦啡是荷爾蒙而非酵素，而打有 * 號者乃表示具有活性者：

(1) 凝血酶：Prothrombin → Thrombin* → [凝血反應]

凝血對生物體是一件很嚴重的事，血液不能在血管內任意凝固，但若一旦受傷又得馬上凝血。因此細胞對誘發凝血的過程，控制得非常嚴格，是以一種『梯瀑 cascade』的方式，把一個信息漸次放大。而在放大過程中有許多管制點，可避免因假警報誤導致凝血。上面的凝血酶 (thrombin) 生成是最後一步，凝血酶可立即誘發凝血蛋白聚合成凝血塊。

(2) 胰島素：Preproinsulin → Proinsulin → Insulin*

剛轉譯出來的 preproinsulin 在分子摺疊好以後，要切除 N-端的一段肽基成

為 proinsulin，然後再切除中央的一段 C 胜肽後，才会有活性。

(3) 腦啡：先合成一長條八元體的前驅體，再以一種類似 trypsin 的蛋白酶裂解成單位腦啡，因此其產生也受到蛋白酶的控制。

b. 許多破壞性強的酵素 (如蛋白酶) 先以酶原形式合成出來，以免在到達作用目標前破壞其它蛋白質；或以胞器或細胞膜隔離，稱區隔化 (compartmentation)。

Chymotrypsinogen \rightarrow π -Chymotrypsin* \rightarrow α -Chymotrypsin*

Chymotrypsinogen 分子的斷裂會使其構形改變，露出新的 N-端 Ile16，這個新的 $-\text{NH}_3^+$ 會吸引 Asp194 的酸基，進而固定隔壁的 Ser195，使其就定位，得以被轉換成活性基團，同時打開專一性結合區，轉變成為活性型。

c. 這種酶原裂解的活化方式是不可逆的，因為被切掉的片段無法接回；因此細胞以抑制劑 (inhibitor) 來控制此類酵素。Trypsin 及其抑制劑為一範例，trypsin 被切開活化之後，只能用其專一性抑制劑去控制 (或者乾脆摧毀之)。

6.1.2 蛋白酶：

越來越多的研究發現，蛋白酶在細胞內具有重要的生理功能。

a. 依催化機制可分成四類：(1) 金屬蛋白酶、(2) Serine 蛋白酶 (3) Cysteine (或 thio) 蛋白酶、(4) Aspartyl (或 acid) 蛋白酶。

b. 同一族的蛋白酶序列都有類似的胺基酸序列及構形，尤其在活性區的保守性胺基酸幾乎不會改變 (如 Ser 蛋白酶的 catalytic triad)；但其它序列則因趨異演化而衍生出許多具有不同專一性的蛋白酶；構造完全無關的 acetylcholinesterase，則因趨同演化而生成具有類似 catalytic triad 的 ester 水解能力。

c. 類似核酸的 intron 與 exon，蛋白質也有自我剪接的現象，稱 intein 與 extein，是轉譯後的修飾作用；但此現象並不是很普遍。

6.1.3 Ubiquitin-Proteasome 降解路徑：

細胞內蛋白質的降解，可能是一種調節性的生理作用；最近發現很多蛋白質，都要先標上 ubiquitin 後，才以 proteasome 來進行修飾或者降解。

a. Ubiquitin (泛素)：

廣泛分布在動植物細胞中，同質性高而分子量小 (含七十多個胺基酸)，可以連到目標蛋白質分子的 Lys 胺基，作為被降解的標記 (ubiquitination)。目標蛋白質的胺基酸序列上，通常在近 N-端有一特定信號序列 (destruction box)。

b. Proteasome (蛋白酶體)：

是由很多較小單位分子所組成的巨大分子，主體看來像是四個甜甜圈疊在一起，中央的孔洞可以容納目標蛋白質，並將其分解成胜肽片段；目標蛋白質大都要先標有 ubiquitin，水解後 ubiquitin 可以回收再利用。

Signal → Receptor → Transducer → Effector enzyme → Effector → Effect
 對應的分子如下例：

Glucagon → Receptor → G-protein → Adenylate cyclase → cAMP → Kinase

這種傳導途徑有兩個特點，是細胞生理極為重要的手段：

a. 放大作用 (amplification)：

上述一層一層的傳導過程中，有些是酵素 (如 cyclase, kiase)。而一個酵素分子若經活化，代表著將有大量的基質會被催化成生成物，而生成物會再傳導給下一步反應，信息因此而被放大。這種方式，非常像真空管的電流放大作用，也是上述 cascade 梯瀑式放大的一種。

b. 彈性模組 (flexibility)：

信息傳導的每一步代表一個層次，而每個層次可由數種不同模組所組成，因此可以有多樣化的彈性組合，以因應不同細胞的獨特需要。

6.4 異位酶 (allosteric enzyme)：

有些酵素的活性，會被它下游的產物所調節，是為 迴饋控制 (feedback) 現象；這類酵素的分子上，除了有活性區可與其基質結合外，還有可與其下游產物結合的位置，稱為 調節區 (regulatory site)，這種酵素則稱為 異位酶。

6.4.1 Aspartate transcarbamoylase (ATCase)：

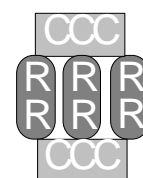
ATCase 是典型的異位酶。

a. 迴饋控制：ATCase 催化 aspartate 與 carbamoyl-P 連結成 carbamoyl aspartate 的反應，後者經代謝後生成 CTP；CTP 則回頭與 ATCase 上的 調節區 結合，反而抑制 ATCase 的活性 (負迴饋)。由於 ATCase 是這個反應鏈的起始酵素，控制 ATCase 即可控制整條代謝路徑。

b. 四級構造：ATCase 是由兩組 催化次體 (catalytic subunit, CCC) 以及三組 調節次體 (regulatory subunits, RR) 組成；每組催化次體由三條蛋白質組成 (C, 34 kD)，每組調節次體由兩條蛋白質組成 (R, 17 kD)：

$$2 \times (CCC) + 3 \times (RR) = C_6R_6$$

每一調節次體有一 效應物結合區，每一催化次體有一 基質結合區。



c. S 型曲線：ATCase 的動力學結果顯示，以 v_o 對基質 [Asp] 濃度直接作圖，可得一 S 型曲線 (sigmoidal curve)，而非典型的 M-M 單股雙曲線 (見圖 9)。這是 合作式 (cooperative) 的 協力現象，表示基質與酵素之任何一個次體結合後，可誘導改變酵素的分子構形，促進其它次體與基質間的結合能力 (positive homotropic effect)。

- d. 分子開關：此 S 曲線有一轉折點，基質在達到這個基質濃度後，酵素反應速率急速上升。可以將此轉折點看做酵素對其環境基質濃度的感應點，當基質濃度低於轉折點時酵素不太活動；而達到轉折點時，酵素便很快起動達到 V_{max} (圖 9 下圖誇張為虛線，以突顯此轉折點)。
- e. 協力現象：若反應加入 CTP，則圖 9 上圖的 S 型曲線下移(但 V_{max} 不變)，表示 CTP 會降低 ATCase 的活性 (negative heterotropic)；而 ATP 則反可增強 ATCase 活性 (positive heterotropic)，但原 S 型曲線則變成一般的 M-M 雙曲線，協力現象消失。
- f. 效應物：ATP 與 CTP 均可影響此異位酶的活性，二者都是其代謝相關產物，稱為效應物 (effector)；兩者在構造上與基質 Asp 均不相像，故並非活性區的競爭者，而是結合在分子的其他位置 (異位調節區)，結合後會影響酵素的分子構形，使酵素與基質的親和力下降，因而降低活性；而 ATP 與 CTP 乃互相競爭此一調節區。

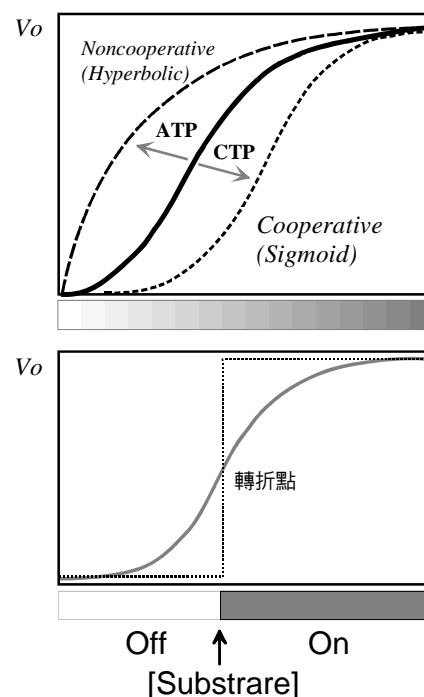


圖 9 異位酶的動力學表現

6.4.2 異位酶的作用模型：

當異位酶受到效應物的影響時，其分子可能會有不同的反應行為。

- a. 異位作用：基質 (或效應物) 與異位酶的一個次體結合後，會使原來的 T (tense) 型次體，變成較易接受基質的 R (relaxed) 型，然後繼續影響其他次體的結合能力。有兩種方式：
- (1) **Concerted 協同式**：酵素的每個次體，在結合前後一起呈現 T 或 R 型，保持對稱性；若酵素為二元體，則為 RR 或 TT，而無 RT 型。效應物的結合也是同樣情形，抑制劑會使酵素固定在 TT 型，活化劑使成為 RR 型；在被效應物結合後，都失去了協力現象。
 - (2) **Sequential 順序式**：酵素的每個次體各自與基質 (或效應物) 結合後，個別由 T 型轉成 R 型，並不影響其他次體的構形 (仍為 T 型，但對其他次體與基質的親和力，可能有正或負面影響)。依基質加入順序，分子構形變化為 TT→RT→RR。
- b. 兩種效應方式：基質與異位酶的結合，可能是協同式效應；即一個次體與基質結合後，誘導所有次體都轉成 R 型，使其他次體的活性區更易接受基質。如此影響其他次體上同種結合區者 (活性區→活性區) 稱 **homotropic (同質效應)**。而效應物與異位酶的結合多為順序式，且會影響其他次體與基質的結合能力；此種不同種結合區之間相互影響 (調節區→活性區) 則稱 **heterotropic (異質效應)**。

7 細胞代謝與酵素調控：

酵素與細胞代謝極為密切，因為所有的代謝路徑，全是由酵素與其基質所組成的；此外，還要加上對酵素活性的調節控制，以便使得細胞正常運作。近來基因體學與蛋白質體學的蓬勃發展，使得細胞代謝與調控方面的研究，有了全新的角度與工具。

7.1 細胞代謝途徑：

細胞經同化作用合成所需分子，由異化代謝消耗分子、取得能量，全由酵素所控制。

7.1.1 代謝調控原則：

控制酵素即可控制代謝路徑，控制代謝的大原則如下各點。

- a. 一個基因一個酵素：細胞的代謝途徑極為複雜，但並非細胞所有的代謝路徑都在進行；而進行中的每一步代謝，都由某一種酵素負責催化反應。
- b. 速率決定步驟：因此控制該酵素的活性或生成量，即可控制該步驟反應的快慢；若此反應為某一系列代謝路徑的速率決定步驟 (rate-limiting step)，則可控制這整條代謝途徑。
- c. 可逆或不可逆：大部份酵素反應是可逆的，有時為了使反應保持在某一方向，則成為不可逆反應；不可逆反應大多與消耗 ATP 的反應耦合。
- d. 代謝路徑可互通：許多代謝路徑間若有共同的中間物，則可互通，也可能有旁支或小路相連；因此若某條重要路徑失效，細胞通常不會立刻死亡，而會互補保持一種動態的穩定狀況。

7.1.2 異化代謝途徑鳥瞰：

以生物分子而言，異化代謝路徑可分成三個層次，有計畫地把巨分子逐步分解，最後得到能量；其中最主要的是一條糖解作用 (glycolysis)。

- a. Stage 1: 巨分子 (蛋白質、多糖、脂質) 消化成單位小分子 (胺基酸、單糖、脂肪酸)，可說就是消化作用。
- b. Stage 2: 單位小分子再分解成更小的 acetyl CoA，初步得到一部份的能量。
- c. Stage 3: Acetyl CoA 經過氧化磷酸化反應得到大量能量，分解成 CO₂ 及水。

7.1.3 糖類中心代謝途徑：

由糖解作用到氧化磷酸化反應，是細胞最主要的一條代謝大道；學習細胞的代謝途徑，可以此為中心，其它各類大小分子的代謝都可匯入此中心。

- a. 糖解作用：把葡萄糖分解成 pyruvate → acetyl CoA (代謝分子的焦點)。
- b. 檸檬酸循環：在粒線體中把 acetyl CoA 再分解成 CO₂，產生 NADH。
- c. 氧化磷酸化反應：NADH 轉換成 ATP 並生成水。

7.2 代謝途徑中酵素的調控：

細胞如何控制代謝途徑上的各種酵素？可以針對酵素本身進行修飾，或者控制其基因表現。而荷爾蒙或細胞激素，是在細胞間傳遞長短程控制指令的信息分子。

7.2.1 基因表現的調控：

酵素在不同細胞內的表現量可能不同，同一細胞內的各種酵素量也不同。

- a. 酵素的生合成受到其基因的控制 (DNA→mRNA→protein)，因此基因的開或關，或其表現程度，會影響該酵素在細胞內的量，進而影響該酵素所控制的代謝反應，是為基因表現 (gene expression)。一個表現中的基因，應該有大量 mRNA 轉錄出來，但有大量 mRNA 卻不一定產生大量酵素。
- b. 一條代謝路徑的起始基質，可能誘導關鍵酵素基因的表現，稱為 induction；此代謝的最終產物，也可能抑制酵素表現，稱為 repression。基因操縱子 (operon) 即是一例，乳糖能夠去除 repressor 與 lac operon 之結合，而使基因開動。

7.2.2 酵素活性調節：

已在上一節詳述，再整理成共價及非共價修飾兩大類。是針對酵素分子所進行蛋白質層次的修飾調控，與上述之基因調控方式不同。

a. 非共價修飾：

使用 cAMP 或正負迴饋的效應物等方式，以非共價方式修飾酵素活性，此多為可逆性的調控。勿把異位酶與上述操縱子的調控方式混為一談，兩者都可被基質活化，但前者是修飾酵素本身，而後者是影響基因的表現。

b. 共價修飾：

以磷酸化或蛋白質水解的方式，來增強或降低酵素活性。多為 cascade (梯瀑) 式的連鎖代謝反應，cascade 連鎖反應會放大 (amplify) 某條代謝路徑的活性。除了正向的以生合成增加酵素量之外，蛋白質的降解也是一項重要的調控方式，並以蛋白酶或 ubiquitin 配合 proteasome 進行降解，以除去此酵素。

7.2.3 激素調控：

細胞與細胞之間如何傳遞信息？這是一個極有趣而且重要的問題。

- a. 賀爾蒙 (如 insulin) 傳遞長程生理指令，經由血液傳送並與目標細胞接觸，結合到細胞膜上的接受器 (receptor)，可引發一系列的信息傳導反應，把『啟動』的指令傳入細胞內，藉著蛋白質激酶或磷酸酶等，活化某些關鍵酵素，開始進行該細胞所預設的功能 (如分解肝糖)，以應身體所需。
- b. 細胞激素則多在免疫細胞之間傳遞短程的信息，可刺激局部的細胞增生；也是利用信息傳導路徑，來啟動細胞內的各種生理功能。

7.2.4 細胞空間的效用：

利用酵素或基質在空間上的隔離或聚集，是一有效控制方法。

- a. **胞器隔離**：真核細胞內有許多隔間 (compartmentation)，形成其胞器的隔離空間；在胞器內可聚集較濃的特定酵素及基質，以便有效進行催化反應，或避免有害的副作用。例如葡萄糖中心代謝途徑中，檸檬酸循環及氧化磷酸化反應是在粒線體中進行的。
- b. **酵素複合體**：幾個連續反應的酵素，可組合在一起成為複合體；則某酵素的生成物，可馬上被下一個酵服用為反應物，降低擴散碰撞所需時間。例如葡萄糖中心代謝途徑中的 pyruvate dehydrogenase (催化 pyruvate → acetyl CoA) 是由三種酵素組成的複合體。
- c. **膜上酵素群**：一群連續反應的酵素，也可以一起附在細胞膜上，除了可加速反應速率外，其作用也可能與細胞膜有關。例如 葡萄糖中心代謝途徑中，氧化磷酸化反應酵素群是附在粒線體的內層膜上，並利用膜內外的質子濃度差異來產生 ATP。

7.3 研究酵素及代謝的材料：

酵素材料的來源或取得，依其不同目的可有數個層次。

- a. 通常我們必需純化出均質酵素 (homogeneous enzyme)，以針對某一特定酵素進行研究，因此蛋白質純化技術在生化研究上極為重要，請複習這些純化及檢定方法。
 - b. 但複雜的生化反應，並非單一純質酵素所能達成，因此可分離出某種特定細胞，或者將細胞打破所得之溶胞液 (cell-free lysate)，作為研究酵素或代謝反應的材料。動物細胞大多可以建立細胞培養株，某些植物也可以癒創組織 (callus) 培養細胞。若研究需要利用特定的胞器 (organelle)，則可由細胞的溶胞液經超高速離心法取得。
 - c. 有時需要以整個生物體 (whole organism)，或其部份器官 (organ) 來進行實驗，以便觀察巨觀的反應。反應可能相當複雜，因此以放射線物質或用專一性抗體來追蹤，是較清楚、可信的方法。
 - d. 不論何種層次的研究，都需要注意目標酵素是在那一個生長時期，或是那一種器官內表現的。例如：抽取檸檬酸循環的某些酵素，可以先分離出粒線體來。
 - e. 生物化學研究大多是以分離純化的酵素來進行，要小心求證所獲得的結果，是否確實為自然的生理現象，而非僅是試管中的假象。一切觀察均得回歸整體性的細胞生理，否則難有重大意義。
- ◆ 有關酵素純化與分析方法，在生物化學實驗課程中，應該已有部分基本操作；若有更詳盡的技術引導，請參考研究所課程的『酵素化學實驗』。

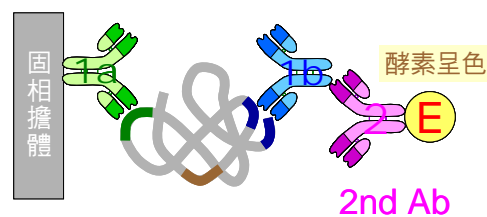
8 酵素在生物技術上的應用：

酵素在現代生物技術的研究或應用上，是一個非常重要的範疇。雖然基因群殖等分子生物的研究蓬勃，但基因表現的產物仍是蛋白質或酵素。另外，在基因操作所應用到的核酸剪接工具，則全部是酵素。以下列舉目前生物技術研究常見的一些應用。

8.1 酵素免疫分析法 (ELISA)：

目前最大的生物技術應用之一。抗體可用來偵測其專一性抗原，而將抗體連接以酵素，可做為追蹤或定量的標幟。通常把免疫試劑之一的抗體固定在某固定相 (solid phase)，以利沖洗分離，稱為 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)。其應用的方式很多，下面是稱為 三明治法 的反應方式，是最直接的方法，可用來偵測樣本中的抗原量。其中抗原 (★) 為待檢樣品，須為多價抗原。

固 定 相 ★
 -抗體 1 (兔)...[抗原]...抗體 2 (羊)...[二次抗體 (豬抗羊)-酵素]



8.2 固定化酵素及酵素電極：

酵素經固定後有許多好處，以及更廣泛的應用。

a. 用物理或化學方法把酵素固定到固相擔體上，比一般使用的溶態酵素有以下優點：

- (1) 酵素可回收重複使用，較為經濟，而且不會污染樣本。
- (2) 酵素的穩定性提高，可能較耐熱或極端的 pH。
- (3) 固相與液相的分離方便，使用上速度快而分離完全，有助於自動化。
- (4) 許多酵素是附在細胞膜上，固定化酵素可模擬細胞內酵素的實際環境。

b. 利用上述酵素的固定化，把酵素固定在半透性薄膜上，連接到電極，偵測反應進行的結果 (例如 pH 的改變)，可作為酵素反應的自動化偵測工具。

圖 10 ELISA 三明治法

8.3 蛋白質工程及人造酵素：

以基因重組或其它方法，可以大量生產某種酵素，也能改變酵素的催化特性。

a. 分子群殖 molecular cloning：

cDNA 包含完整的蛋白質轉譯訊息，若把某蛋白的 cDNA 插在表現载体中 (如某質體)，則宿主可能表現此段轉殖基因，而生合成此蛋白質。若在此 DNA 接上另一種已知的酵素基因 (如 luciferase, GFP 或 GUS)，則表現出來的蛋白質是二者的連結體，稱為融合蛋白質 (fusion protein)；而此酵素活性可做為追蹤之用，稱為 reporter。

b. 蛋白質工程：

若能改變酵素活性區的胺基酸，則可能改變酵素活性，或是其專一性。通常先研究並預測改變其活性區某胺基酸後，可能引起的變化，再以人工定點突變 (site-directed mutagenesis) 改變某核苷酸，然後以分子群殖表現，並檢測突變蛋白質的活性。

c. 人造酵素：

酵素的活性區通常包含數個極性胺基酸，若在人造的分子骨架上，模仿活性區的幾何位置，接上這些胺基酸，則可能得到具有催化作用的人造分子。

d. Abzyme (催化性抗體)：

若得知酵素催化反應過程中，其基質轉換為產物的過渡狀態物質，以過渡狀態或其類似物作為抗原進行免疫，則所得到的抗體，可能具有催化能力。但其催化效率，遠不及自然酵素。最主要原因在於酵素的催化區是一凹陷口袋，可隔離外界干擾，提供最佳環境穩定過渡狀態；而 abzyme 的結合區較淺，無法十分有效地隔離並穩定過渡狀態 (*Nature* 1996, 383: 23-24)。

8.4 Proteome 蛋白質體：

分子生物學革新了整個生物學的觀念，也將會改變生物化學中酵素的研究方法。

8.4.1 Genome project 基因體計畫：

跨世紀的大事件之一，人類已解讀出自身染色體內所有 DNA 的序列，此一大計畫即為人類基因體計畫 (Human Genome Project)，由發現 DNA 雙螺旋的 J.D. Watson 主導。其他一些重要動植物或微生物，目前有很多也已解讀完成，例如水稻、小鼠、果蠅、線蟲等。

8.4.2 Proteomics 蛋白質體學：

- a. 一旦解出某種生物的染色體 DNA 序列，接著有許多工作可以進行，其中最有用的是，可以馬上把這些序列翻成表現出來的蛋白質，如此我們就可以得知某生物細胞內，可能含有的全體蛋白質，稱之為蛋白質體 (proteome)。
- b. 這種研究方式，與傳統的生物化學或生理學有相當不同，要靠龐大的資料庫，與演算能力強大的電腦軟體，是生物資訊學 (bioinformatics) 的主要特點。
- c. 生物細胞內的蛋白質體，有一大部份是酵素，由細胞所含有的酵素種類，即可導出該細胞可能有的代謝途徑；由這些代謝途徑，就可推測該細胞是如何運作。如此研究整體細胞的代謝路徑，可以叫做代謝體學 (metabolomics)。
- d. 若再加上基因體、蛋白質體的觀念，利用計算機的強大比對、統整、模擬能力，一起來看看整體生物的運作，甚至多個生物體之間的關係，則衍生出一個新的學問稱為系統生物學 (systems biology)。

問題集

1. Hemoglobin 並非酵素，但為何也會有部份裂解雙氧水 H_2O_2 的作用？
2. 為何 RNA 可能具有催化的能力？
3. Carboxypeptidase A 分子的活性區需要一個 Zn 離子，請問此金屬離子有何作用？
4. 寫出下列各輔酶所能轉移的基團：ATP, Coenzyme A, NADPH, Thiamine
5. 釀酒的時候，為何要把酒甕封起來？
6. Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase 含有兩個 domains，請說明它們各有何種作用？
7. 有些酵素經過磷酸化後反而失去活性，請問其機制或原因何在？
8. 酵素活性區的構形與下列三者何者較能互補？請說明為何？

基質 生成物 過渡狀態

9. 請寫出 Michaelis-Menten 公式，並說明其意義。
10. 說明為何 k_3 就是 turnover number？
11. 檢討一個酵素的催化活性，採用 k_{cat}/k_m 有何好處？
12. 寫出下列各種酵素抑制劑的作用機制：
 - a) Penicillin
 - b) Sarin
 - c) Sulfa drug
 - d) Heavy metal
13. 為何 chymotrypsinogen 分子要先經過裂解後，才會變成活性型？
14. Chymotrypsin 如何穩定所催化基質的中間過渡狀態？
15. Chymotrypsin 的 His57 對其催化機制有何貢獻？His57 如何受到環境 pH 的影響？
16. 已知 DPF (diisopropyl phosphofluoridate) 是 Ser protease 的專一性抑制劑，請問如何證明 DPF 是攻擊酵素的活性區？
17. 大部份的 proteases 似乎都有相類似的水解機制，請說明此一核心機制。
18. 許多 proteases 的抑制劑本身都是蛋白質，請問為何這種蛋白質抑制劑不會被 protease 所水解，反而能夠抑制之？
19. 請任舉三種細胞生理上的現象，都是因於蛋白質裂解所造成的結果？

例如：Chymotrypsinogen 的活化
20. 如何以非共價鍵方式來調節肝醣磷解酶的活性？
21. 請問為何異位酶 (allosteric enzyme) 的動力學作圖可得到一條 S 型曲線？並說明此 S 型曲線有何意義。
22. 許多生理反應都以梯瀑式 cascade 方式進行，請問會產生何種重大的效應？
23. 為何維持正確的酸鹼度 pH，對某些酵素的活性非常重要？有無酵素不受 pH 影響？

24. 請寫出四種以上的蛋白質性質差異，可利用來作為蛋白質純化的依據。

例如：分子量的大小不同

25. 抗體與其抗原極類似酵素及基質，有很強的專一性，但並無酵素的催化作用；而 catalytic antibody (或 abzyme) 為特別設計產生的抗體，可使抗體具有催化的性質。若有反應如： $A + B \rightarrow A-B$ ，而你要設計能催化此反應的抗體 (A 與 B 均為小分子)。

- a) 你將以何種分子為抗原？詳細說明原因。(hint: 為何酵素具有催化能力?)
- b) 在進行免疫時，應當注意那些事項？

26. 請判斷下列各題的真偽：(並說明原因)

- 1) 酵素都是由蛋白質所構成的。
- 2) 金屬離子在酵素分子中，只有幫助維持構形，不直接參與催化反應。
- 3) V_{max} 大，表示此酵素與基質的親和力越大。
- 4) 酵素分子中的胺基酸，可直接參與催化反應的，都是一些極性不太強的胺基酸。
- 5) K_m 的單位是 濃度/時間。
- 6) 抑制劑 (inhibitor) 與 負效應物 (negative effector) 都可影響酵素活性，其差別在於後者一定是細胞的代謝產物，前者不然。
- 7) 分析酵素活性時，基質濃度不能太高 (差不多是 K_m 的程度即可)，以免干擾反應。
- 8) $k_3 = k_{cat} = \text{turnover number}$
- 9) K_m 可看成 [ES] 的生成速率常數。
- 10) Ser proteases 都有由 Asp-His-Ser 組成的 triad，可產生一具高反應性的 $-O^-$ 基。
- 11) 一般酵素的活性區與專一性辨認區都不在同一位置，以便增加專一性。
- 12) 兩個蛋白質間的專一性結合，其構形的互補是重要條件之一，乃因於凡得瓦爾力。
- 13) 酵素的活性區多為一凹陷口袋，是因為要隔離影響催化反應的干擾因子。
- 14) 酵素的抑制劑對人類都有害，在環境或醫藥使用上應完全避免之。
- 15) 與磷酸化一樣，AMP 對肝糖磷解酶的調控，也是改變該酵素的分子構形。
- 16) 蛋白質激酶 (protein kinase) 的催化反應本身都是可逆的，因此蛋白質的磷酸化可以其逆反應來去除之。
- 17) 酵素只能增加其催化反應的反應速率。
- 18) 多元體酵素的的存在是為了活性之調控。
- 19) 只要含有二十種基本胺基酸基團，蛋白質就可以完全發揮酵素的催化機制。
- 20) 酵素催化反應進行的過程中，酵素與基質或產物之間，都不能有共價鍵生成，這才能稱為催化。
- 21) 所有具有完整功能的酵素都是由一條完整蛋白質長鏈所構成的。

- 22) 若某酵素的動力學試驗得到一 S 型曲線，表示此酵素為多元體的四級構造。
- 23) 很多生物都含有血紅蛋白 (hemoglobin)，其胺基酸序列同質性很高，因此其構形相似，都保有相同的運氧功能。
- 24) 水溶性蛋白質的疏水性胺基酸大都在分子的裡面，故酵素分子內部不可以有親水性胺基酸，以防止分子變性。
- 25) 剛轉譯出來的完整 chymotrypsin，其催化活性很低，是因為無法穩定過渡狀態。
- 26) 蛋白酶催化過程中，所形成過渡狀態有過多正電荷，要用氧原子上的電子中和之。
- 27) 尿素 (urea) 可導致酵素變性的原因是破壞 α 螺旋的氫鍵。
- 28) 基因的開關可以控制其蛋白質產物的表現，因此一旦某基因被大量轉錄成 mRNA 後，即可預測下游蛋白質將會大增。
- 29) 以下配對都是專一性吸引力所造成：酵素-基質、酵素-輔酶、荷爾蒙-受體。
- 30) RNA 可形成分子構形，而 DNA 則無；這是因為 DNA 為雙股螺旋所致。
- 31) RNA 可形成分子構形，而 DNA 則無；是因為 RNA 可形成 非 Watson-Crick 配對。
- 32) 為何酵素的反應速率要看 k_3 ？($v_o = k_3 [ES]$) 是因為 k_1 太大、而 k_2 太小。
- 33) Steady state 理論是說，酵素在一定時間內會達到一平衡穩定的反應速率。
- 34) 青黴素是一種 serine protease 的抑制劑。
- 35) 磺胺藥是細菌代謝途徑的可逆型競爭性抑制劑，因此只能抑菌不能殺菌。
- 36) 電泳及離子交換法都是利用蛋白質分子極性的不同來進行分離純化的。
- 37) 葡萄糖要經磷酸化後才進入糖解代謝途，是因為要防止葡萄糖分子跑掉，因為磷酸化後的分子不易通過細胞膜。
- 38) 以誘生抗體所製備得的 abzyme，可催化所指定的反應，其效率更優於傳統酵素。
- 39) 同一 domain 可重複出現在不同酵素分子上，這是在基因層次已安排好的。
- 40) Carboxypeptidase A 是一種外切酶，可切除蛋白質 C-端的非極性胺基酸，它可以與 α -COOH 結合來辨識是否為 C-端。

27. 是非選擇題 (答案寫在□內，是→○、非→×)

1) 酵素催化反應具有那些特性？

- 可降低反應的活化能 可以改變反應的平衡方向 反應前後酵素之化性沒有改變 其催化速率是可以被改變的

2) RNA 為何會有特定構形？

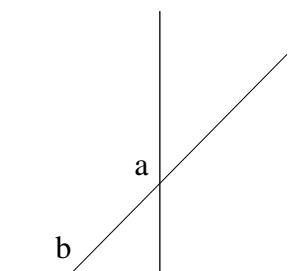
- RNA 為單股長鏈分子 RNA 有 Watson-Crick pairing RNA 有非 W-C 的 pairing 氫鍵是主要貢獻力量 RNA 分子中有核糖的 2'-OH

3) 以下分子何者不是酵素？

- Insulin Thrombin Fibrin Hemoglobin Calmodulin

- 4) 有額外反應性基團的胺基酸：
 Val His Glu Pro
- 5) NADH 分子中含有那些構造？
 去氧核糖 磷酸 Adenine Hydride Nicotinamide
- 6) 輔酶的作用或性質為：
 穩定酵素構形 參與反應基團的轉移 很多含有去氧核糖核苷部份
 可提供一強力反應基團
- 7) 有關 K_m 的敘述何者為真？
 K_m 的單位是 mM/sec $K_m = k_2 \div (k_1 + k_3)$ K_m 越大表示對基質結合力強
 K_m 隨著酵素的濃度變化而變 K_m 與 ES 的生成無關
- 8) 有關 k_{cat} 的敘述何者為真？
 k_{cat} 的單位是 sec^{-1} k_{cat} 就是 k_3 k_{cat} 隨著酵素的濃度變化而變 k_{cat} 與 ES 的生成無關
- 9) 可構成兩個分子間的專一性吸引力的力量有那些：
 氫鍵 疏水鍵 雙硫鍵 凡得瓦爾力 離子鍵 分子間構形互補
- 10) 何者為 Ser protease 家族？
 Subtilisin 凝血因子 VIII Acetylcholinesterase Elastase Thrombin
- 11) 何者為酵素的不可逆抑制劑？
 Penicillin PCMB DFP EDTA 磺胺藥 cAMP
- 12) 改變下列那個胺基酸後會影響 chymotrypsin 的活性：
 Asp102 His57 Ser14 Ile16 C-terminal
- 13) 有關立體專一性何者為真？
 碳原子的 sp^3 軌道是主因 自然界中多使用 L-胺基酸 單糖分子並無立體異構物
 酵素可分辨基質立體異構物
- 14) 有關肝糖磷解酶的調節方式：
 可經磷酸化使酵素活性上升 cAMP 是 (+) 異位調節因子 ATP 是其競爭性抑制劑
 磷酸化會使其構形改變
- 15) 有關異位酶的作用方式：
 可能受其上游代謝物所抑制 其動力學行為呈一 S 型曲線 其 effector 的作用區即活性區
 異位酶不一定要有四級構造
28. 酵素動力學可以下式開始： $E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$ ，請以公式或文字，說明由此式所衍生出來的四個基本觀察。
29. 胜肽鏈上可被 trypsin 專一性水解的胺基酸有哪兩種？

30. 請舉出六種以上可以使酵素失去活性的方法。
31. 請寫出蛋白質上可被磷酸化的胺基酸種類，及其被磷酸化位置。
32. 右圖為某酵素的雙倒數動力學作圖，請依指示回答問題：



- a) 請標示橫座標及縱座標及其單位。
- b) 標明圖中 a 及 b 點各為何？
- c) 若有一競爭性抑制劑 X，請在圖中畫出可能的抑制情形。

33. 依下列性質，請各至少出一種方法可以純化酵素：

- a) 依分子大小不同 _____
- b) 依分子電荷不同 _____
- c) 依分子極性不同 _____

34. 請簡單解釋以下名詞：Abzyme, Metabolomics, Ribozyme, Proteasome, Specific activity

35. 異位酶是否一定要具有四級構造？請詳細說明。

36. 為何輔酶多屬維生素？

37. 以人工定點突變可以改變酵素的重要胺基酸，進而改變酵素的催會特性，但是通常改變出來的新酵素，活性都較原來的酵素差，請問為何如此？若果真如此，則此種定點突變修改酵素的方法，有何實際用途？

38. 生物細胞中，許多生理功能有『放大 amplification』的作用，例如信息傳導中的關鍵酵素 (cyclase, kinase)，請再舉出數例。

39. 同上題，但並非屬生物細胞，而是人為的實驗方法中，有哪些是具有放大功能的？

40. 單醣分子可以說是一種多醇醛，在一條碳鏈上連接以醇基，並在一端接有一醛基 (如葡萄糖)。在生物細胞內，以此種分子作為能量的貯存與攜帶；而地球把更多的能量藏在如汽油等的飽和碳氫化合物內 (如己烷)。事實上後者含有更高的能量，是較好的能量貯藏分子。請問細胞為何使用糖類分子，而非飽和碳氫化合物？請以單醣的分子構造與特徵，說明其原因。