

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。

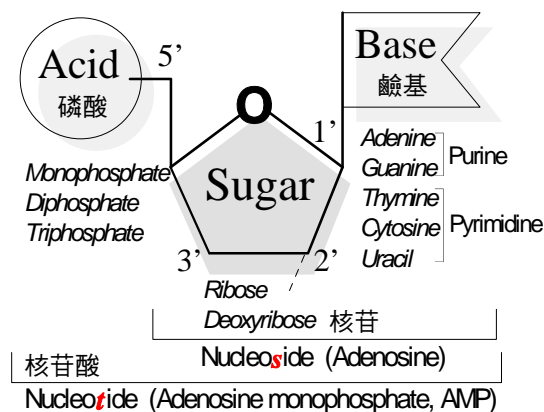


圖 1 核苷酸的分子組成

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。

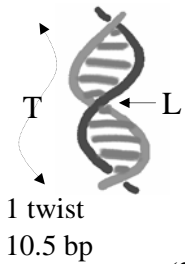
(4) DNA 分子因其含水的多寡，可分成 A 及 B 兩型，另有 Z 型 DNA 是實驗室的產物。



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)：

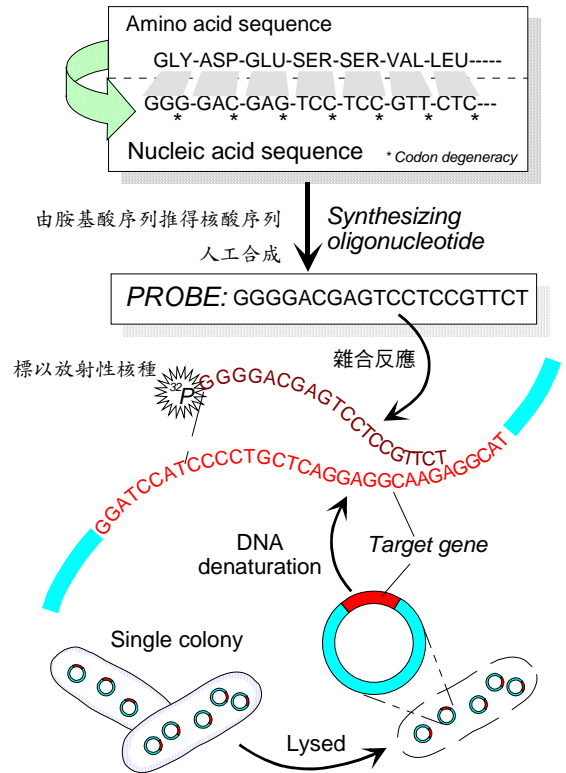


圖 2 核酸探針的設計及應用篩選

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。

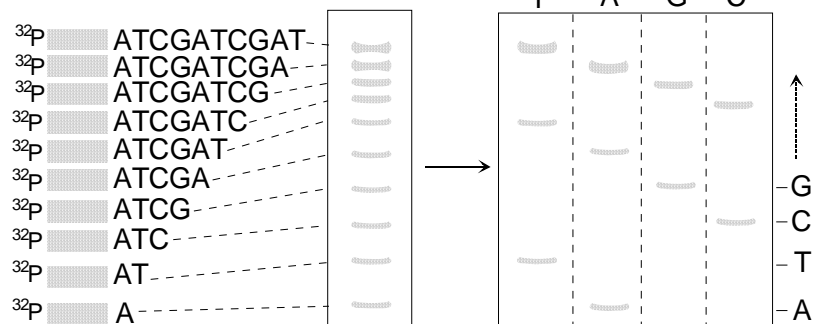
h. 定點突變 (site-directed mutagenesis) :

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。

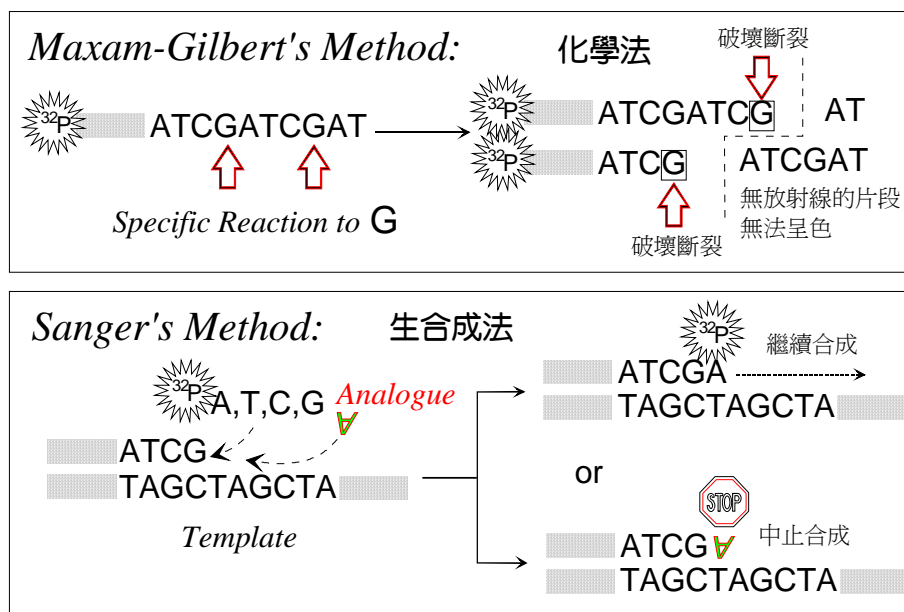


圖 3 核酸定序的原理及兩種定序方法的設計

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？