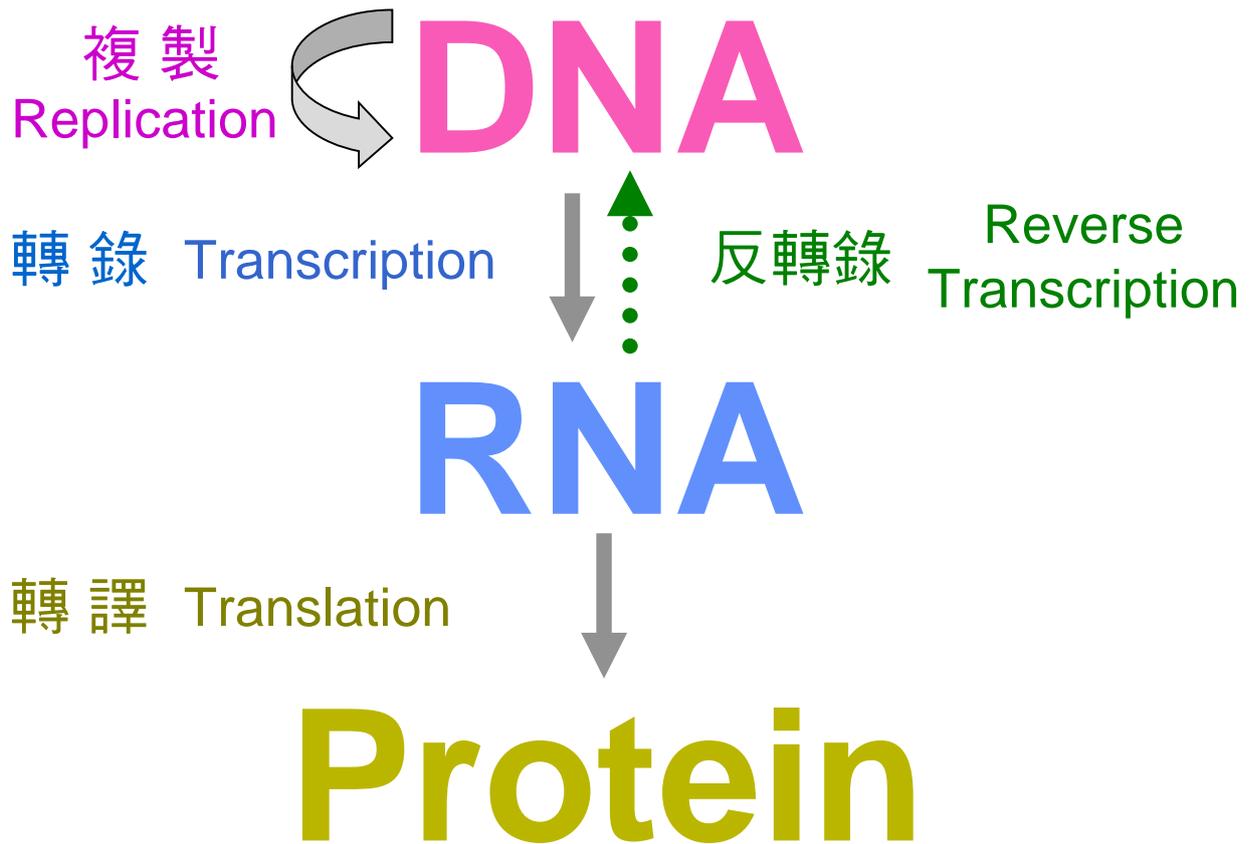


# Central Dogma



Juang RH (2007) BCbasics

**Central Dogma** 是生物界運作的中心基本法則，其重要角色就是核酸，包括 DNA 及 RNA。Central dogma 說明了遺傳信息由 DNA 流到 RNA 再到蛋白質的過程，而其運作機制與核酸的分子構造有極大的關係。分子生物學就是以分子的層次，探討整個 Central Dogma 的作用機制，當然比上圖要複雜很多。

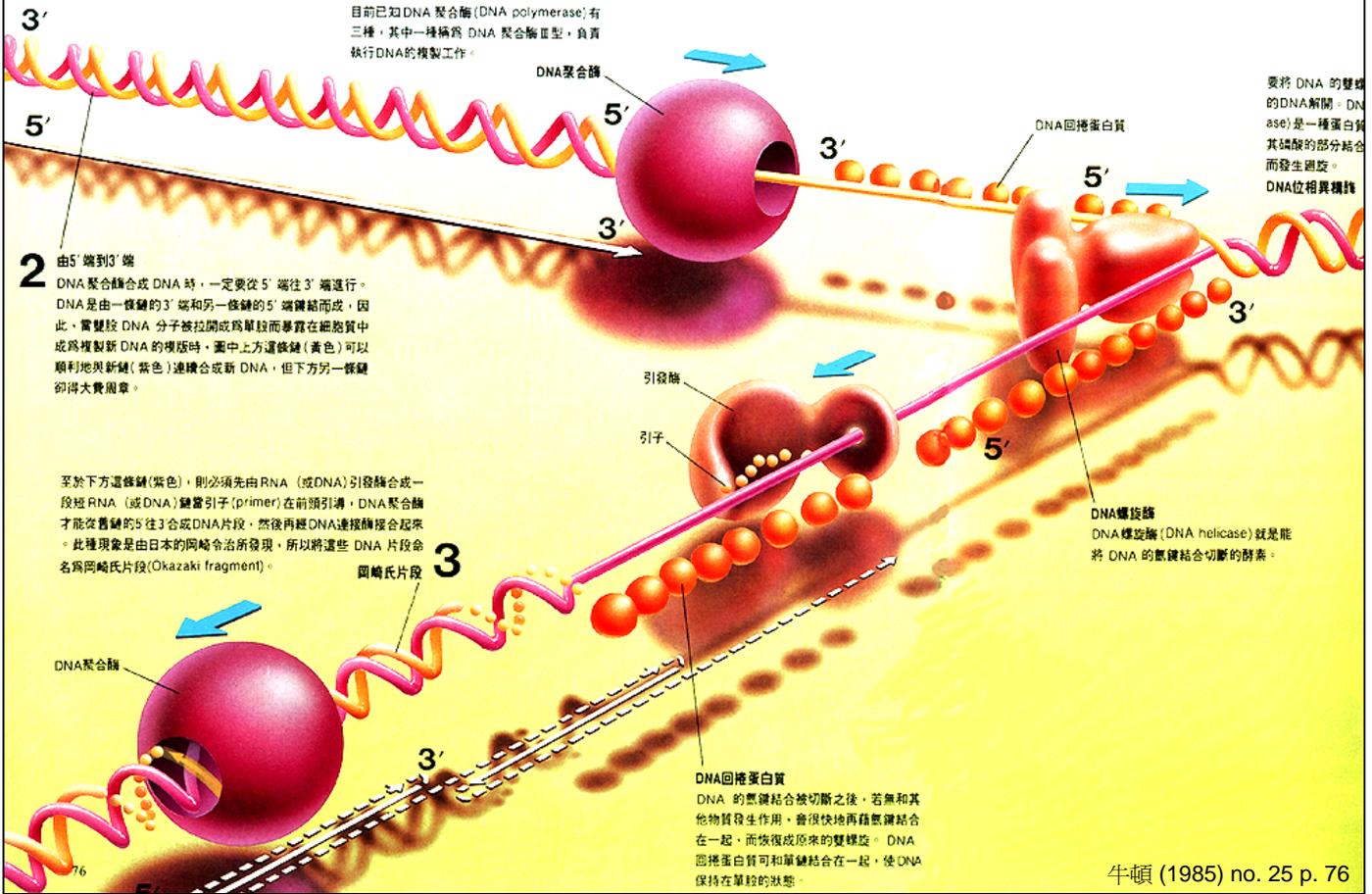
**問題：**反轉錄現象主要發生在病毒，很多病毒基因是 RNA，要反轉錄成 DNA，以便入侵細菌或動植物的染色體 DNA。這個事實，能否給你一些暗示，以便推得下面兩個假說：

- (1) 地球上最早出現的核酸，應該是 RNA 而非 DNA。
- (2) 若 (1) 所述為真，那麼 DNA 可能是如何出現的？

由 DNA 到 RNA 的 transcription 中文翻成轉錄，有抄錄的意思，非常傳真。也就是把 DNA 上的信息，一一抄錄成 RNA，就像『全錄』影印機一樣。但是由 RNA 到蛋白質是 translation，是一種『翻譯』的關係，有點像把英文翻成中文，乃兩種不同的語文。真是如此，蛋白質是以胺基酸單位一個一個接起來，不同於 DNA 或 RNA，後兩者是以 A, T (U), C, G 為字母。

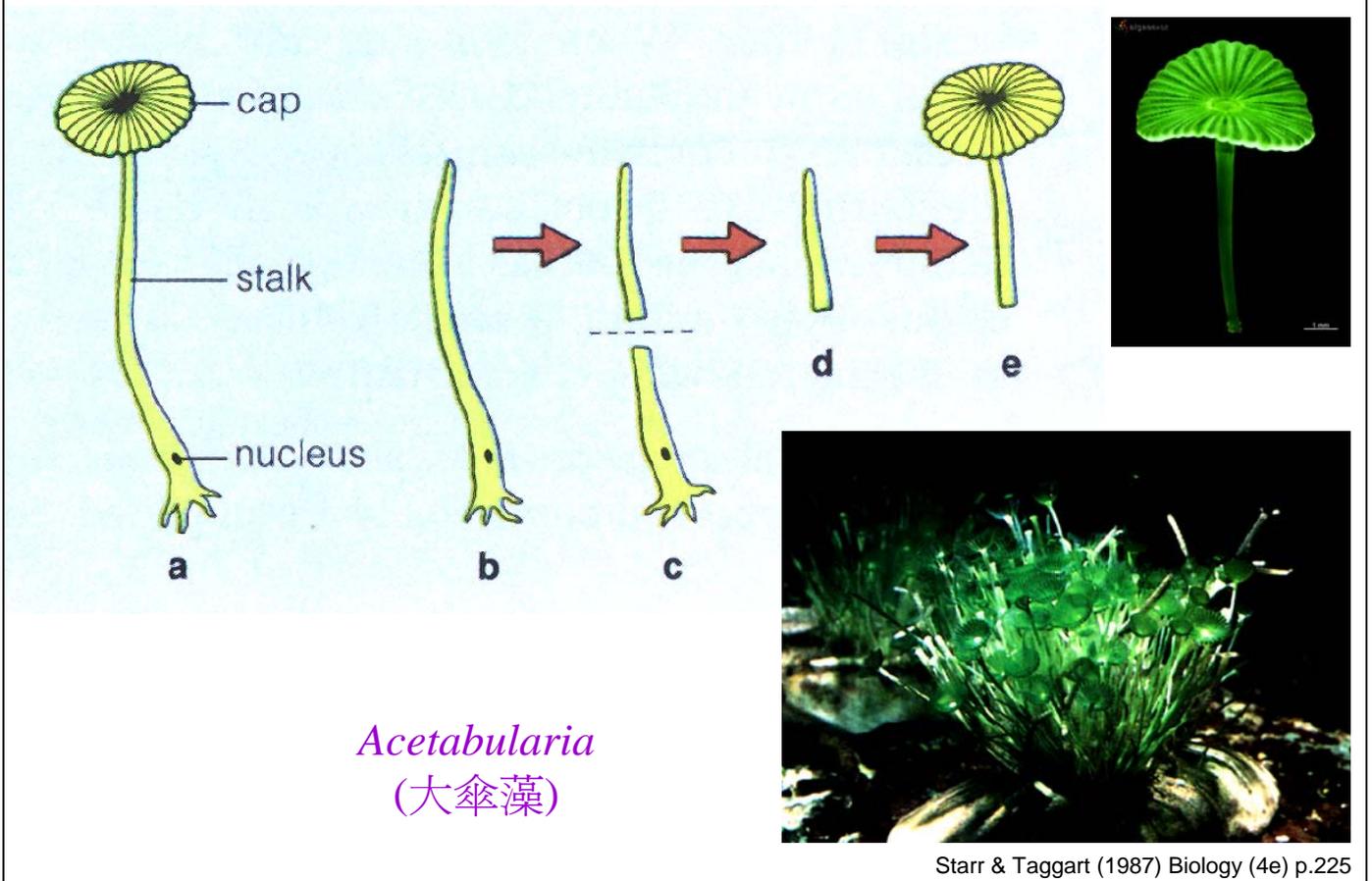
**問題：**因此，Central Dogma 好像有兩個層次，一個是以核酸序列為信息貯藏的工具，另外則是以蛋白質為功能或構造單位。以如此方式安排，有何重要意義？

# 核酸的複製



DNA 的雙股構造，不但能夠說明其複製的機制，也使其信息更能妥善保存；同時也能夠複製成各種 RNA，以便行使轉譯蛋白質的功能。這一切流程，都設計得極為巧妙，而且有效。

# mRNA 可獨立表現出蛋白質

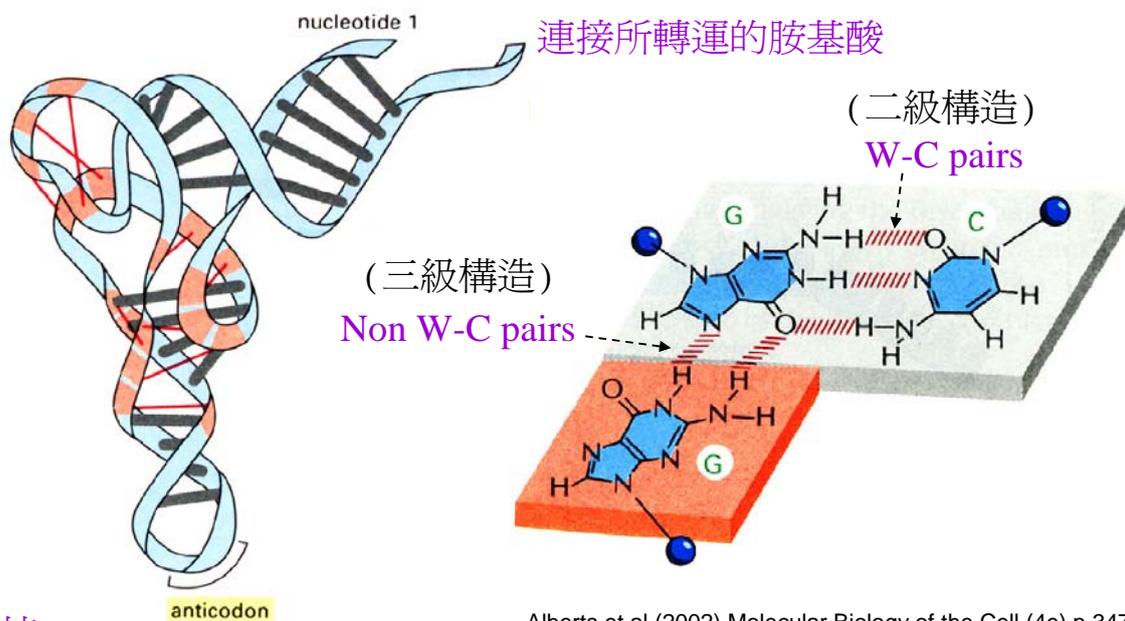


**RNA** 雖然也是核酸，但其構造與 DNA 有很大的不同，以致於其生理功能也有相當的差異。RNA 與 DNA 最大的不同點，在於 RNA 是單股分子，而且分子也比 DNA 小；因此 RNA 是從長條的 DNA 分子所拷貝下來的一小段功能單位，也帶有 DNA 上的密碼指令，並依此指令行事。主要的 RNA 有三大類，是為 mRNA, tRNA, rRNA 等，每個都與蛋白質的合成有關。

上圖以一種特殊的單細胞植物為例，說明即使在隔離開 DNA 的情況下，由該 DNA 所指導做出來的 mRNA，也能夠完全地把遺傳指令忠實執行。難怪 DNA 在 mRNA 完成任務後就馬上銷毀之，而且有打不死的 RNase 去追殺細胞內外的游離 RNA，以免 RNA 上面的信息流出細胞外。

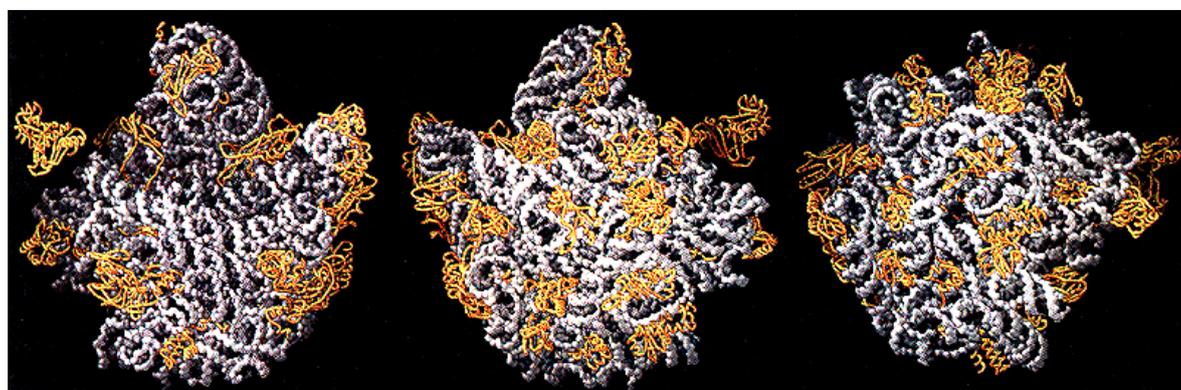
# RNA 具有固定構形

核糖體催化蛋白質合成



Alberts et al (2002) Molecular Biology of the Cell (4e) p.347

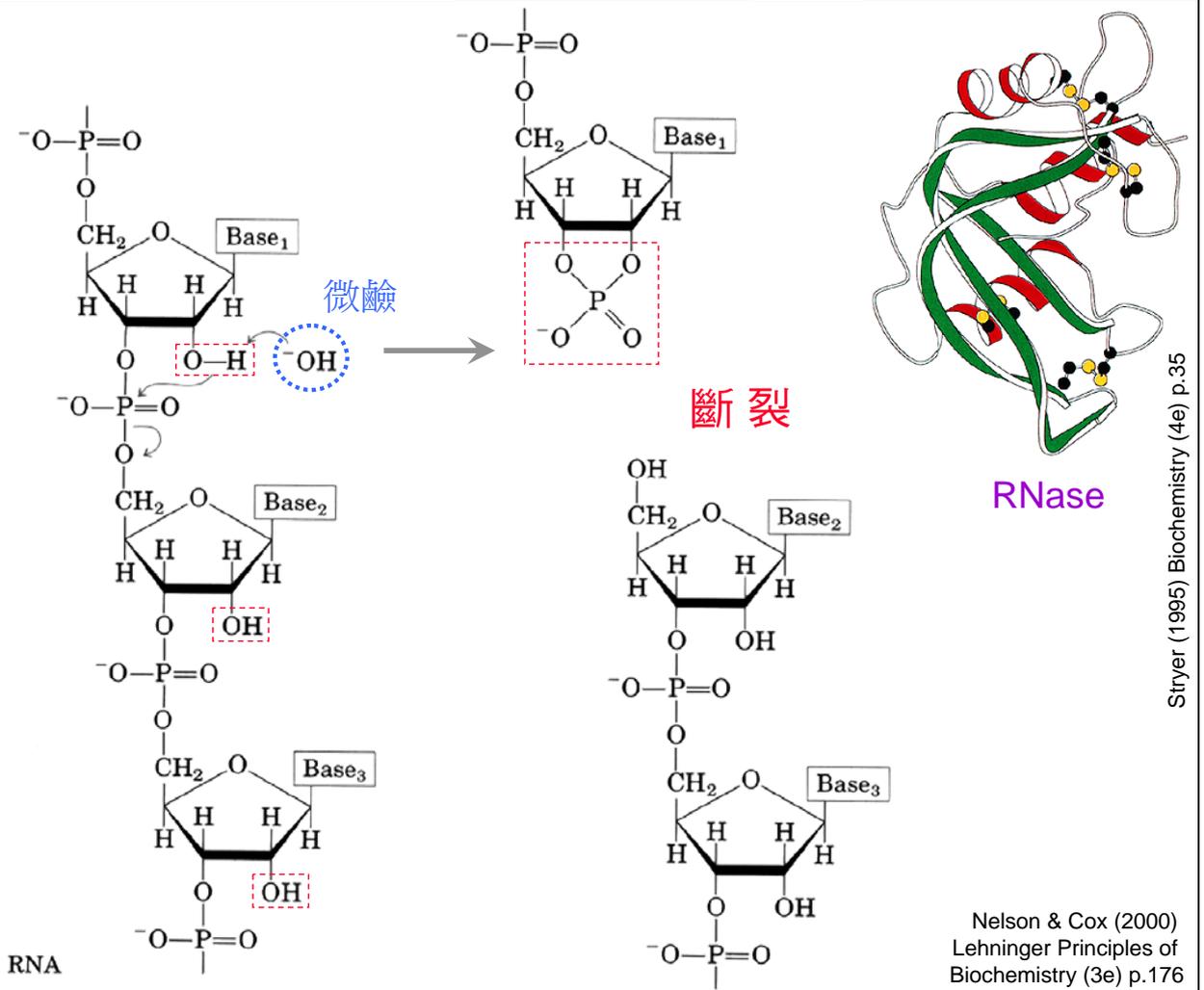
Alberts et al (1994) Molecular Biology of the Cell (3e) p.107



**DNA** 是雙股核酸，而且其分子量非常巨大，因此無法自由捲繞成特定構形，都只是形成長長的雙螺旋，或捲成超捲曲構造，也可以再度纏繞組成染色體的構造。而 RNA 分子內的鹼基，除了正常的 Watson-Crick 配對以外，還有非 W-C 配對的鍵結，這樣使 RNA 得以形成種種構形，以配合某種特定的催化反應。核糖體由許多分子的 RNA 及蛋白質共同組成，這些 RNA 都是 ribozyme，可協助轉譯蛋白質的功能。

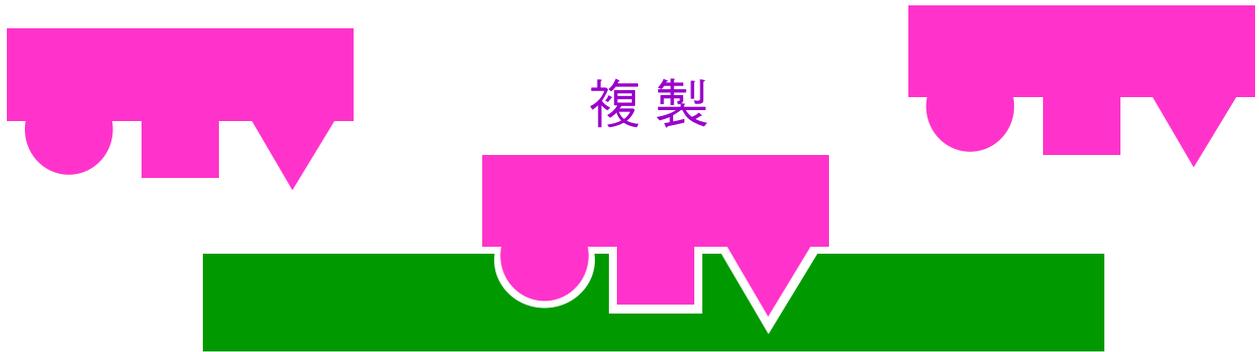
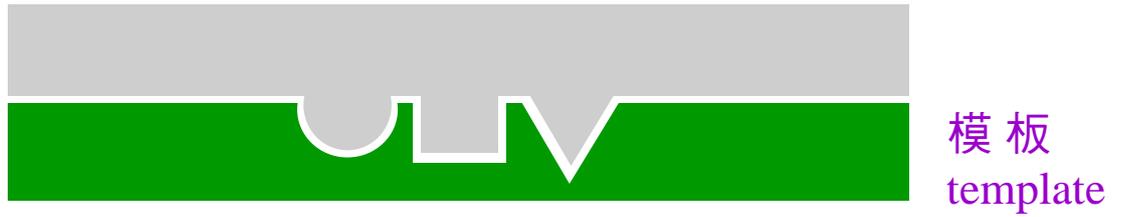
所有的 RNA 真的是鞠躬盡瘁，努力地為細胞製造蛋白質，然而五十年來分子生物學的光芒都給 DNA 搶去。

# RNA 很容易被水解而斷裂



**RNA** 在其核糖分子的 2' 位置上，比 DNA 多了一個氧原子，亦即其 2' 位置為 -OH 官能基，因此在微鹼情況下，OH<sup>-</sup> 會攻擊此醇基，導致 3' 上面磷酸鍵的斷裂，因而瓦解 RNA 分子。所以 RNA 分子比起 DNA 不穩定，容易被破壞掉；同時無所不在的 RNase 也隨時在細胞內外等著水解 RNA，因此 RNA 的半衰期比較短 (尤其是 mRNA)。

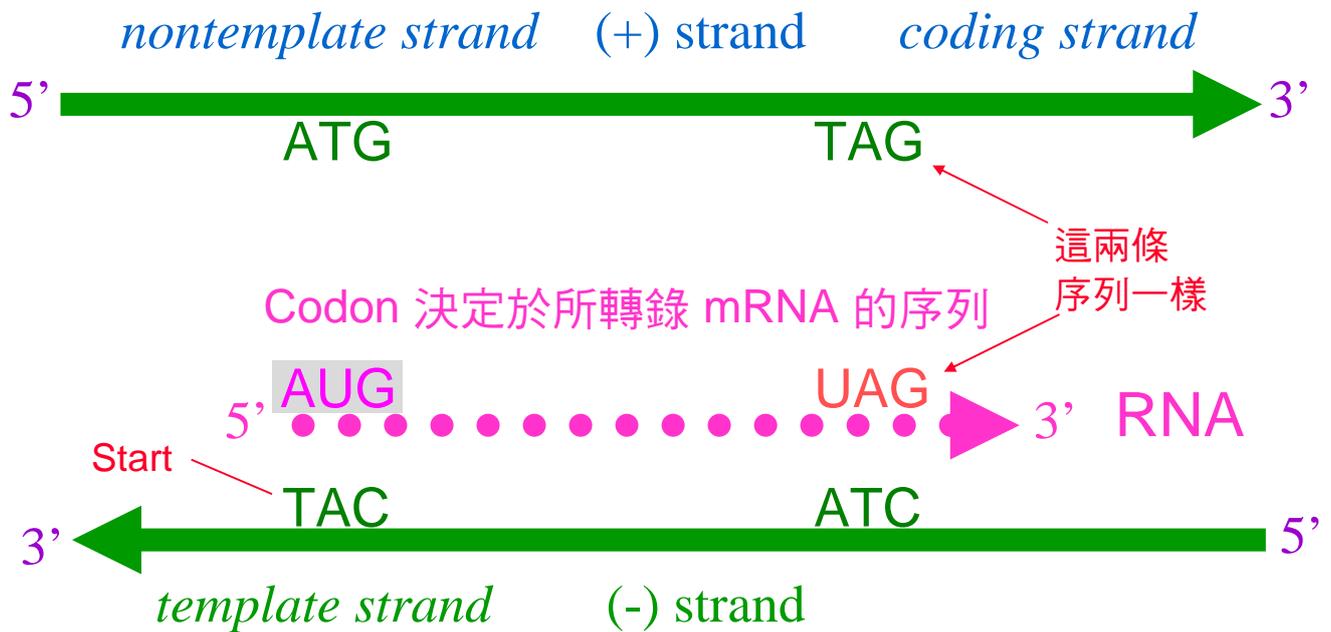
# 有一面模板即可大量生產複製品



Juang RH (2007) BCbasics

**DNA** 的一股像是一個模板，打開這個模板後，就可以大量複製出互補的形狀出來。而這個模板平時不用時，還會有一個與其互補的蓋子保護，以免模板損壞。

# 可轉錄 RNA 那段 DNA 稱 template (-) 股



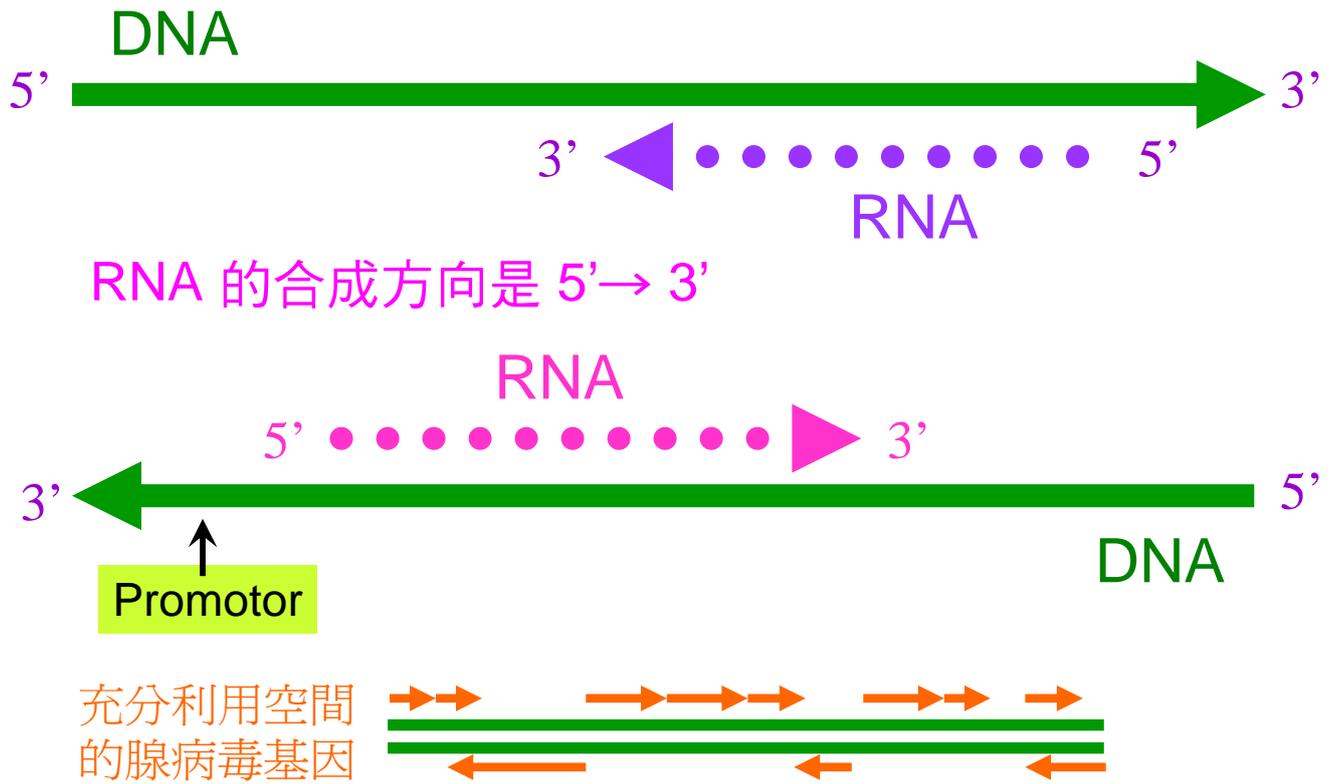
Juang RH (2007) BCbasics

**兩股** DNA 中只有一股能轉錄出 RNA，稱為 *template strand* 或 (-) strand；另一股則稱 *nontemplate strand*, (+) strand 或 *coding strand*。兩股上的核酸序列，都可能成為 *template*，決定於 3' 端上游是否有轉錄起始的信號。

RNA 的轉錄合成，一定是從 RNA 的 5' 端向 3' 端複製，而模板 DNA 則是由 DNA 的 3' 向 5' 方向讀取密碼。這些方向性一定要徹底瞭解，並且最好記得很清楚，因為分子生物學將由這些反應開始。

同時，我們一般所知的遺傳密碼 (*codon*)，是根據所合成 mRNA 編的；也就是說 mRNA 上面的序列就是遺傳密碼。而 mRNA 的序列是與 *nontemplate* (+) 相同的，而與 *template* (-) 互補。

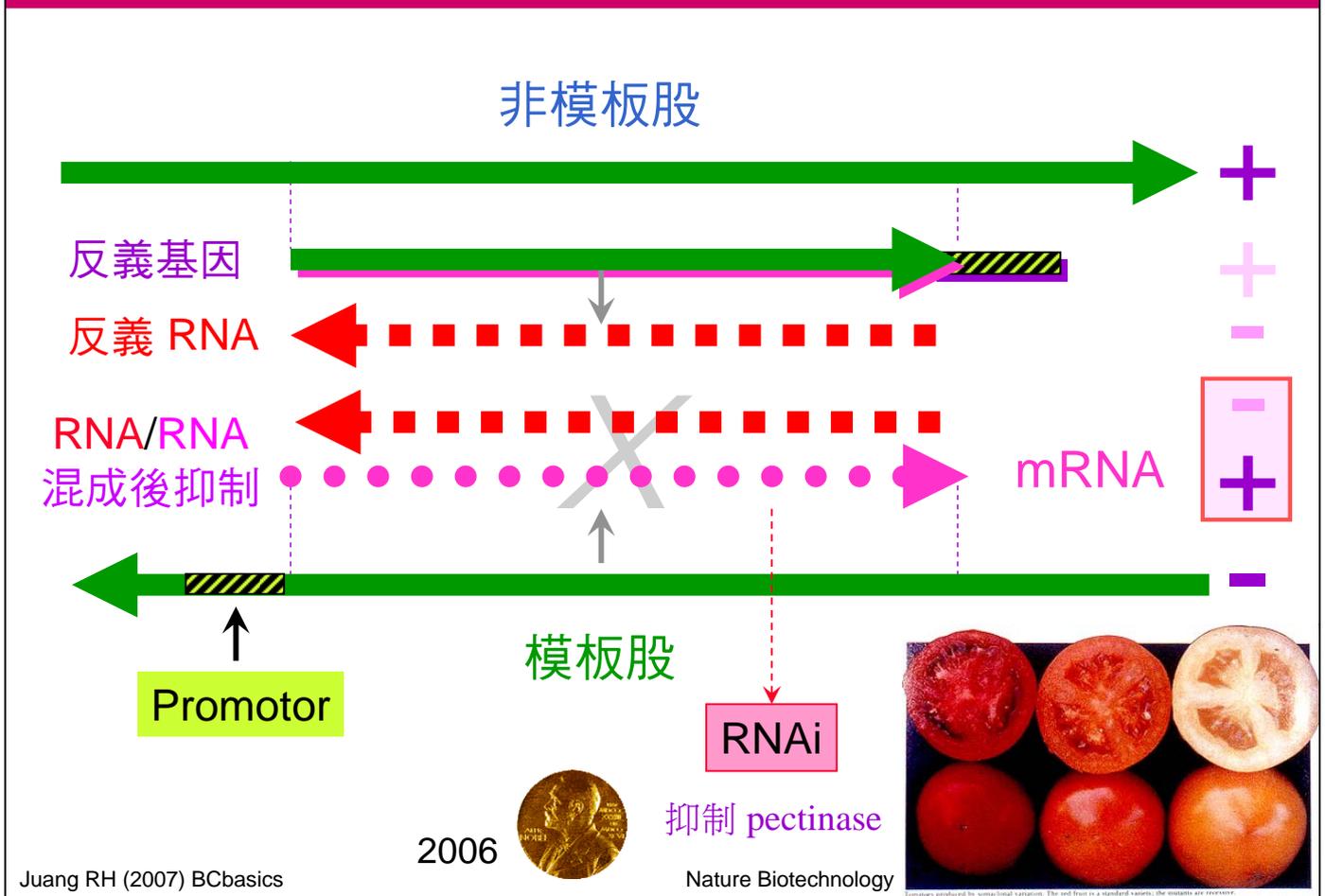
# 兩股 DNA 都可能轉錄出 RNA



Juang RH (2007) BCbasics

**雖然** 只有一股 DNA 是 template，但是兩股 DNA 的任何一股都有可能成為 template，甚至可能互相重疊。但同一條 DNA 上的所有 templates，其閱讀方向都一樣，RNA 都由 5' 端向 3' 端複製。每一個基因的前面，都有 promotor 序列，作為開始轉錄的信號。

# Antisense RNA 可抑制特定基因的表現

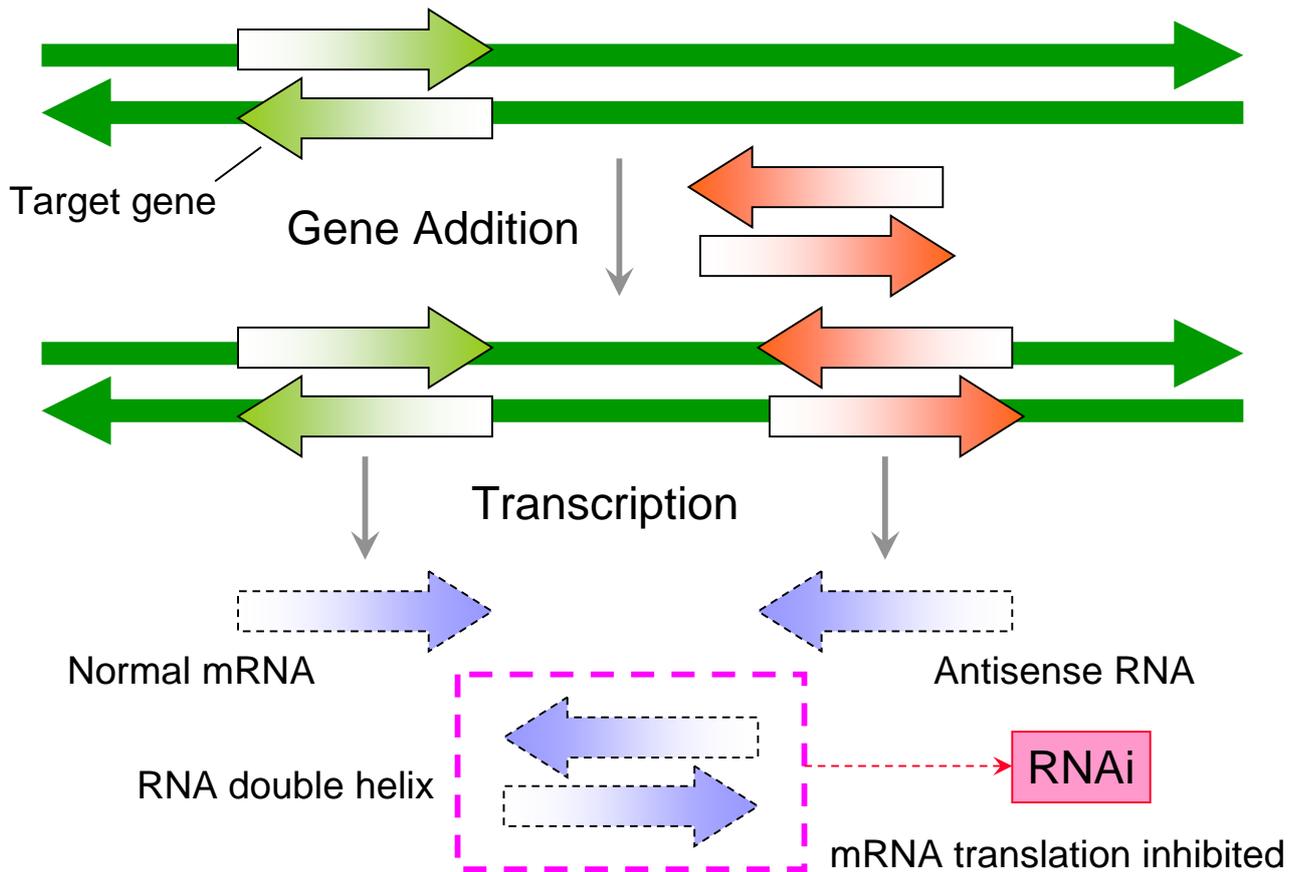


**雖然** 只有 template strand 可以轉譯出 RNA，但也可以用人工的手法，把 nontemplate strand 選殖出來，並且送入細胞中表現。則所轉錄出來的 antisense RNA，將會與正常的 mRNA 互補，形成 RNA/RNA 雜合分子，因而抑制了該基因的表現。

RNA/RNA 雜合分子在細胞內無法久留，並經由一個機制誘生 RNase，把這段雙股 RNA 切成大約 23 鹼基對的片段，因而抑制了該基因的表現，誘發 RNAi (interference)。上述的 RNase 以及所切下來的單股 23 鹼基片段，還會繼續連結在一起，並且由那段有 23 個鹼基的片段做引導 (報馬仔)，繼續去找其他具有互補序列的單股或雙股 RNA，然後降解之 (真是趕盡殺絕)。這樣的過程，還可以有放大的機制，使得清除效果擴大。

RNAi 可能是細胞用來抵抗外來的 RNA 病毒，以免受病毒之害；或者要消除細胞內自行生出的一些雙股 RNA，以免這些 RNA 的遺傳信息干擾細胞運作。

# 反義基因的利用



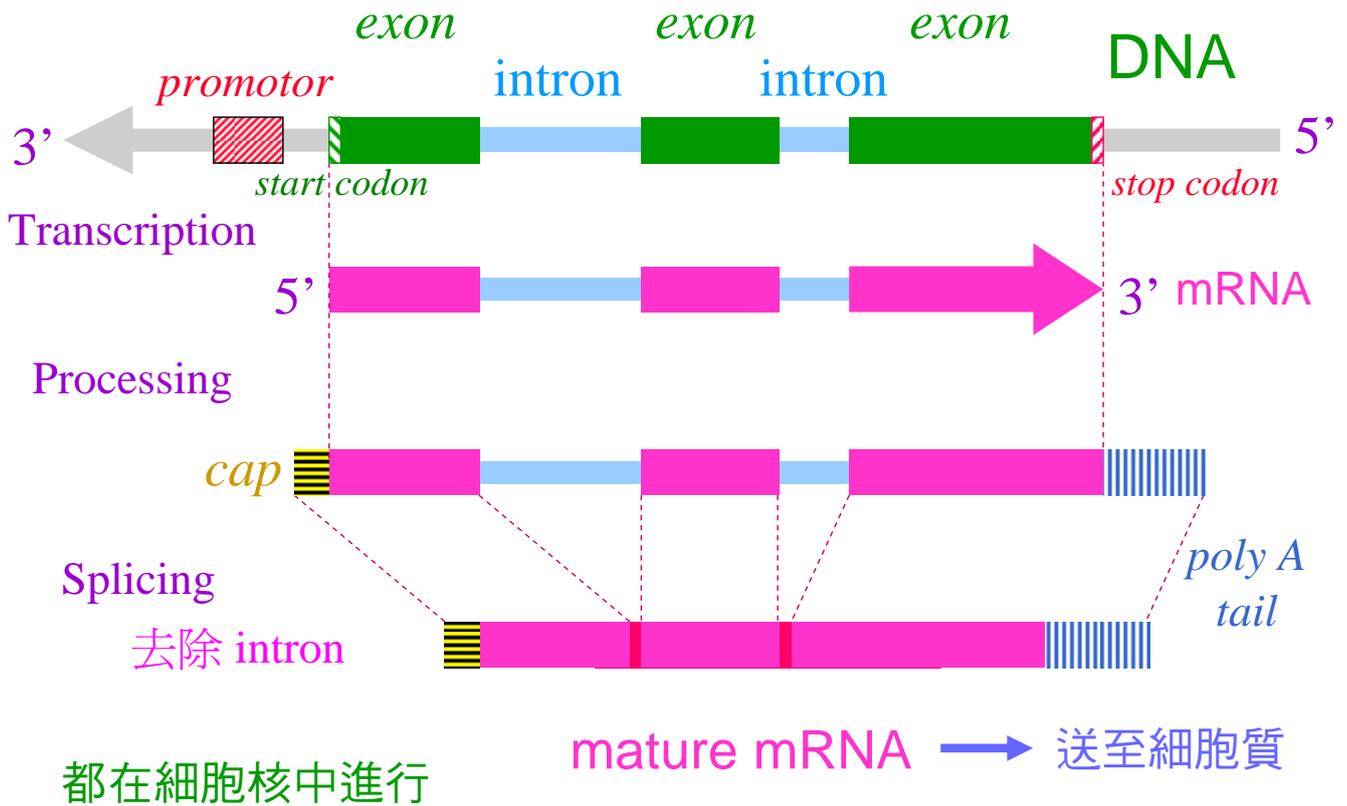
Adapted from Alberts et al (2002) Molecular Biology of the Cell (4e) p.537

**可以** 用人為的方式，把一段基因以相反的方向，硬插入這段基因的下游，則可表現出與正常 mRNA 序列剛好互補的 anti-sense RNA，兩段 RNA 可以互補結合，因而抑制了該基因的表現。

若在試管中置備如此的 RNA double helix (dsRNA)，再注入細胞中，則也會對目標基因產生更強的抑制作用，就是 RNAi。Nature 電子期刊有非常詳細的動畫，說明 RNAi 的前因後果，可由生化網頁連結進入。

[Lau NC, Bartel DP (2003 九月) RNAi - 神秘的基因糾察隊。科學人 19: 48~56]

# 真核細胞的 Intron 與 Exon



Juang RH (2007) BCbasics

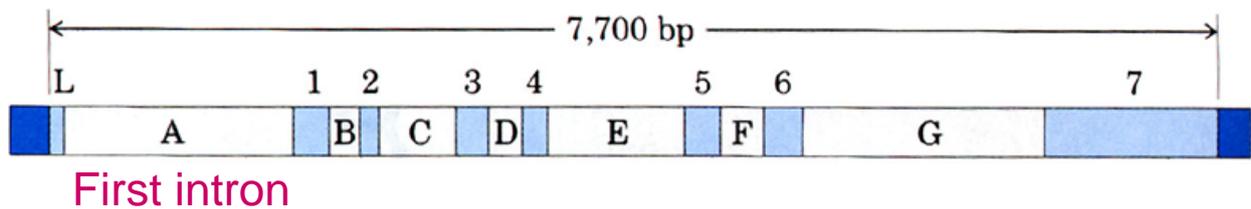
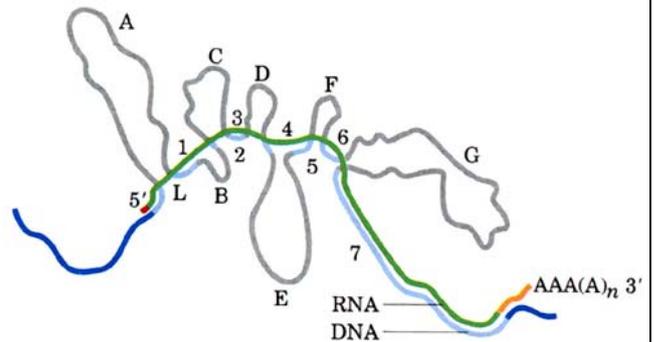
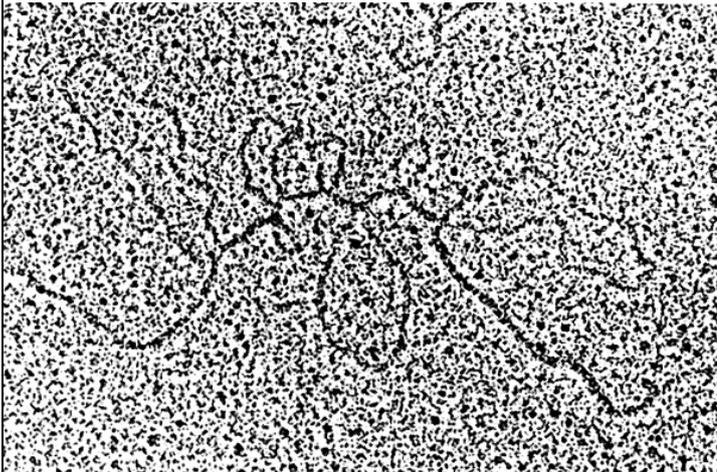
**真核細胞** 的基因構造有一點與原核細胞差別很大，就是其基因當中，插入有將來不會被表現出來的片段，稱為 intron。當轉錄 RNA 時，這些 intron 也會如數被合成出來，形成初生 RNA，後者先經 capping 及 polyA tail 的頭尾修飾，再以 spliceosome 切出 intron，得到成熟 mRNA，送出細胞核，以便在細胞質中轉譯蛋白質。

目前還不確知為何有 intron 的存在，但若以遺傳工程手法去除 intron，則此基因可能無法正常在原來的細胞核中表現。

# 周芷發現 Intron

Roberts, Sharp (1993)

[周芷]



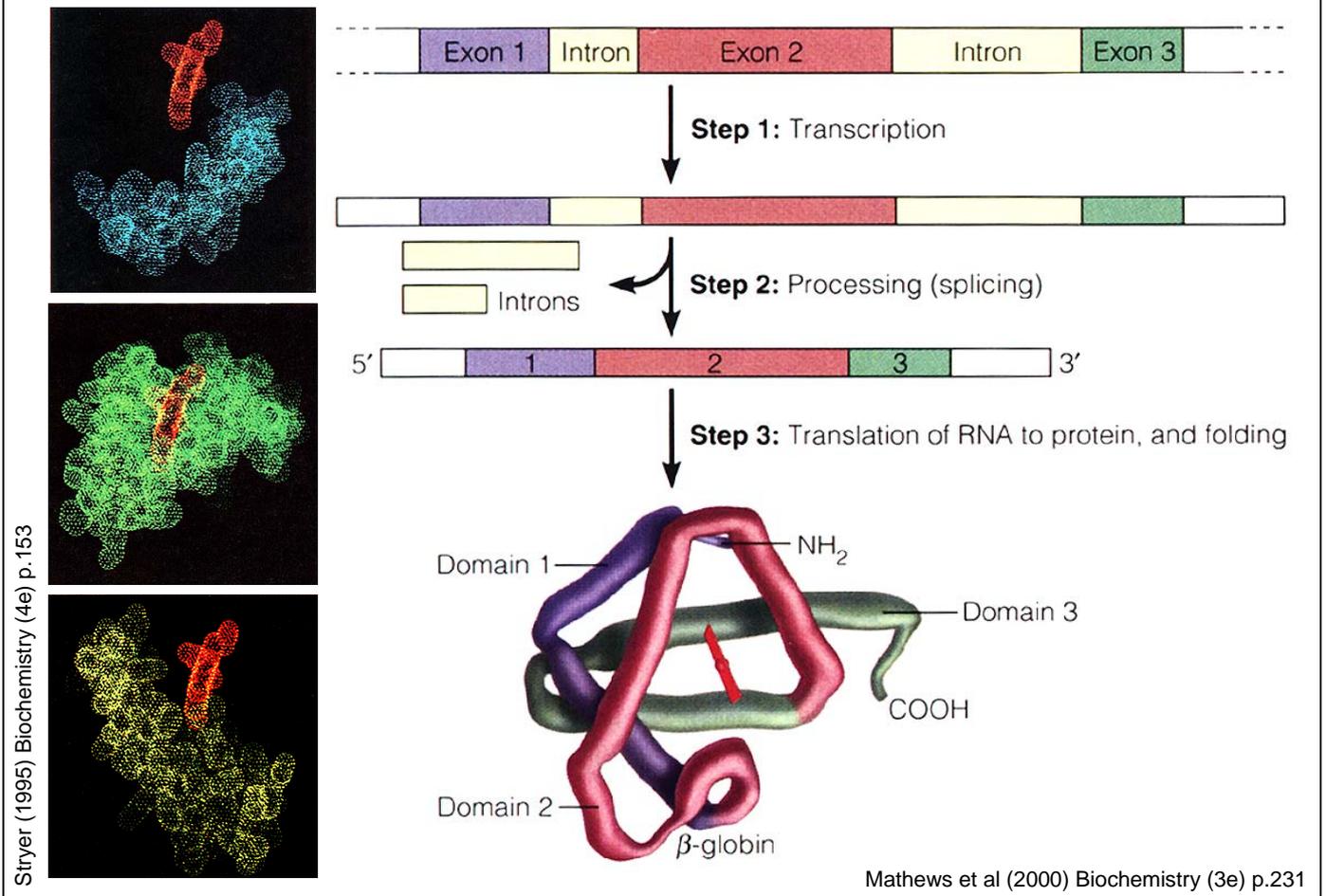
Nelson & Cox (2000) Lehninger Principles of Biochemistry (3e) p.992

**第一次** 發現基因並非連續，是生化科技系前身農化系系友周芷用電子顯微鏡觀察到的。她把某基因與其 cDNA 混合，則兩者的相似序列可以互相雜合，但卻發現在原來的基因上，有些『多出來』的核酸片段，整個露在外頭，無法與 cDNA 雜合。

周芷的老闆 Roberts 起先不相信，以為實驗有問題，後來證實真核細胞的基因中，的確含有一些不會表現的片段，稱之為 intron (內隱子)；而那些會表現出來的片段，稱為 exon (外顯子)。Roberts 因此獲得諾貝爾獎，而周芷卻無緣，說來實在有點不太公平。

■ 更詳細的報導可以參考中研院網頁 <http://www.sinica.edu.tw/as/weekly/83/478/person.txt>，或由生化科技系首頁連結。

# 肌紅蛋白由三個 Exons 所組成

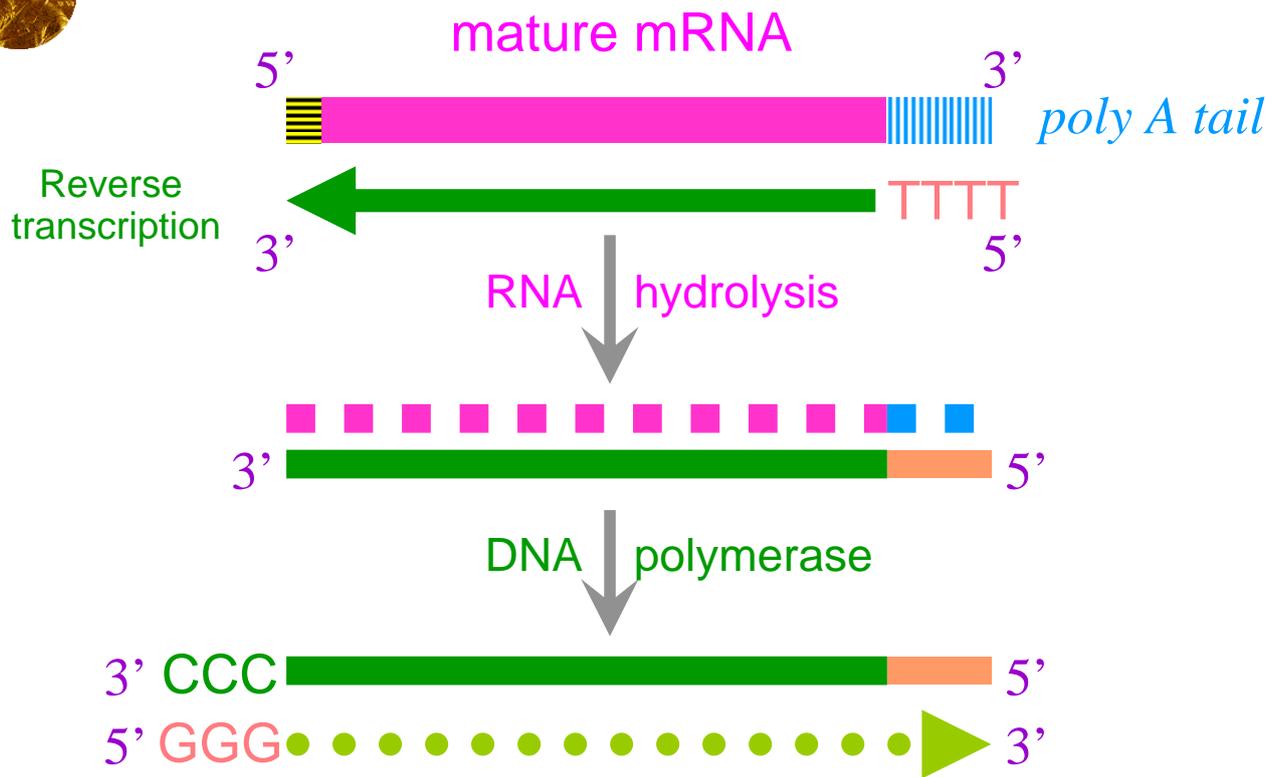


**上圖** 以肌紅蛋白 Mb 為例，說明 exon 與所表現蛋白質的關係。Mb 基因由三個 exons 所組成，其中第二部份所表現的蛋白質，便是與 heme 結合的區塊；很可能在幾億年前，就是由這一個區塊來負責攜帶 heme，然後在演化過程中，先後加入第一及第三部份。用基因操作的方法，可以把第二個 exon 單獨分出來表現，發現也有結合 heme 的能力。

# cDNA 由 mRNA 反轉錄合成



Baltimore, Dulbecco, Temin (1975)



Juang RH (2007) BCbasics

**成熟**的 mRNA 是去除 intron 的修飾後基因，含有完整的基因信息；因此若以 mRNA 為模板，經反轉錄所得到的 DNA，稱之為互補 DNA (cDNA)。cDNA 可以殖入載體，並且大量表現之；以某細胞全部 mRNA 所得的 cDNA 庫，含有該細胞正在表現中的基因。cDNA 選殖株可以表現蛋白質，因此可以用抗體篩選之。

# 兩種基因庫：cDNA 基因庫 vs 染色體基因庫

表現中基因

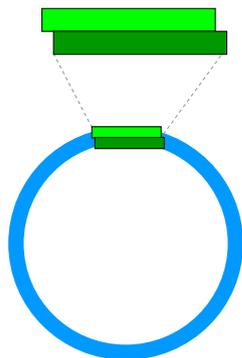
mRNA



Reverse transcription



cDNA 完整基因



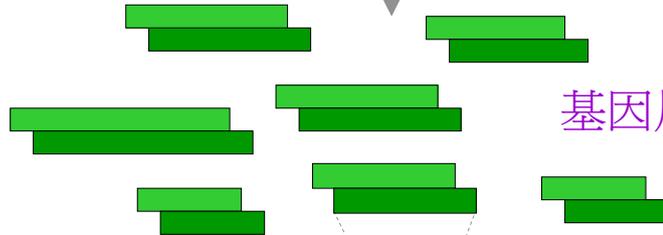
使用質體為載體

全體基因

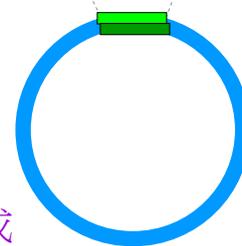
染色體 DNA



Restriction digestion



基因片段



使用質體或  
噬菌體為載體

基因庫較小  
基因庫較大

Juang RH (2007) BCbasics

**基因庫** 的建構依基因來源的不同而有兩種方法：其一是由 mRNA 反轉錄所得的 cDNA 來建庫 (上圖左)，另一則由全部染色體 DNA 的限制酶片段來建庫 (上圖右)。兩者在基因庫的大小與用途上，有相當差別，要依使用目的做適當選擇。許多常用的生物或細胞，都有已經建立好的基因庫出售，只要買回來篩選，即可得到所要的基因。當然，自己必須準備好適當的探針，以便準確挑選。

上圖雖然都使用質體當作載體 (vector)，但是染色體基因庫中所攜帶的核酸片段都很大，因此多改用 噬菌體 基因，可以容納較長的片段。

N2-16