

核 酸

● 分子構造：

核苷酸 核酸 雙螺旋 三級構造 Palindrome
質體 RNA 基因表現

● 功能性質：

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

➔ ● 研究技術： N4

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 定點突變 RFLP

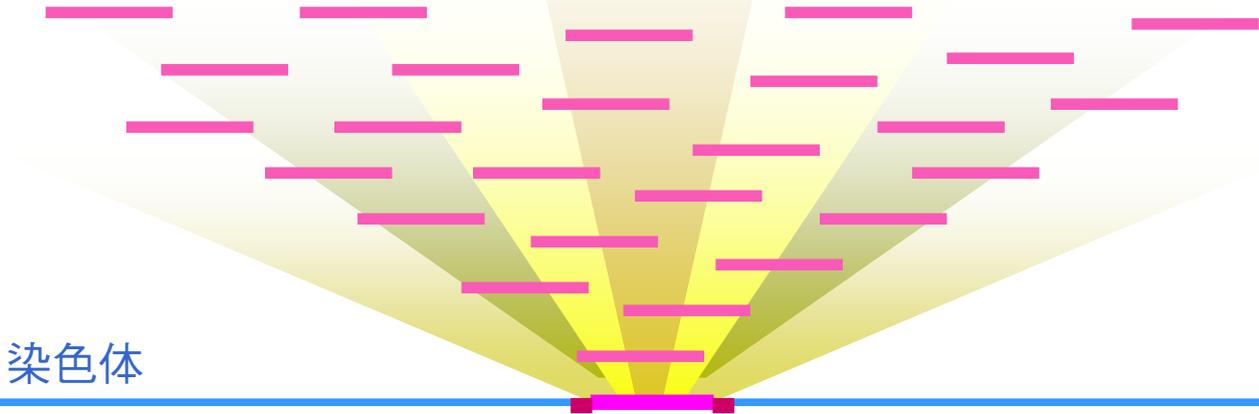
核酸 的研究技術，大多已散佈在上述構造與性質的說明中，因此只補充說明未提及的部分。以下整理這幾十年來，有關基因操作方面，在生物技術應用上的重大發展方向：

- (1) 基因轉殖生物體 (genetic modified organism, GMO)
- (2) 基因治療法 (gene therapy)
- (3) 生物個體複製 (somatic cell cloning)
- (4) 幹細胞分化及人造器官 (stem cell differentiation)
- (5) 基因體計畫 (genome projects)
- (6) 生物資訊學 (bioinformatics)
- (7) 蛋白質體研究 (proteomics)
- (8) 生物晶片 (biochips)

PCR 基因放大連鎖反應



Mullis (1993)



染色体

PCR 可以把 指定的基因片段 數量放大



生物親緣鑑定

Juang RH (2007) BCbasics

PCR 是聚合酶連鎖反應的縮寫，可以把指定的基因片段數量放大。但必須知道目標基因的起始及終結的部分序列，以便分別製得界定起點與終點的兩個引子。如此，聚合酶便會在兩個引子之間複製 DNA，所得到的複製品，可在變性後再度黏合引子，進行次番複製；如此來回重複多次，即可得到大量介於兩個引子之間的核酸片段。

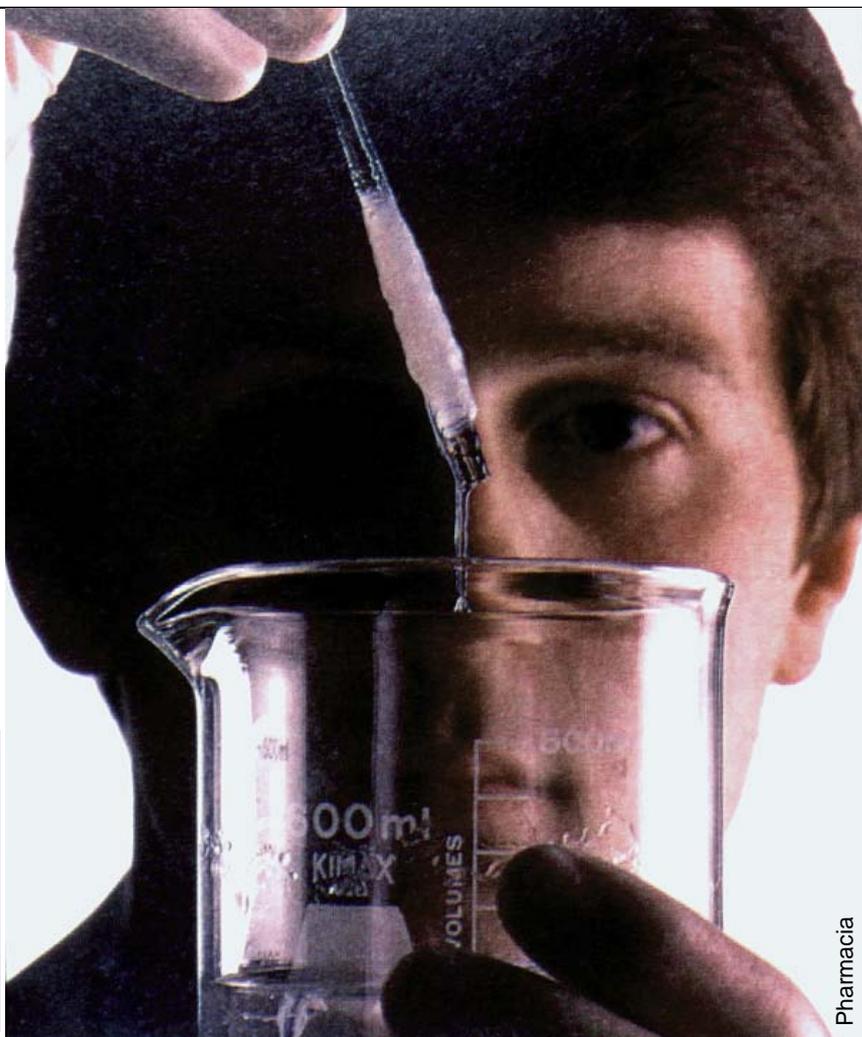
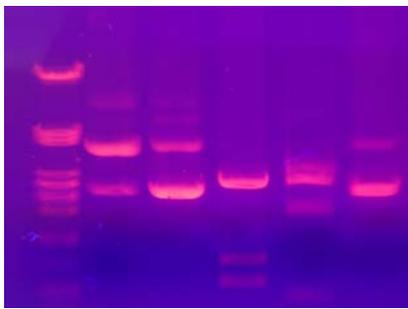
PCR 技術剛被發展出來的時候，居然不受重視，後來發現越來越多的重要應用；不但在研究上有貢獻，在分子診斷與法醫學上更是大放異彩。

■ 網頁動畫 <http://ccms.ntu.edu.tw/~juang/BCbasics/Animation2.htm#N28PCR>。

抽取核酸先用乙醇沉澱

- (1) 打破細胞
- (2) 加入乙醇
- (3) 以玻棒撈取 DNA
- (4) 乾燥後溶出 DNA
- (5) 以限制酶切開 DNA
- (6) 以電泳檢視

Wikipedia

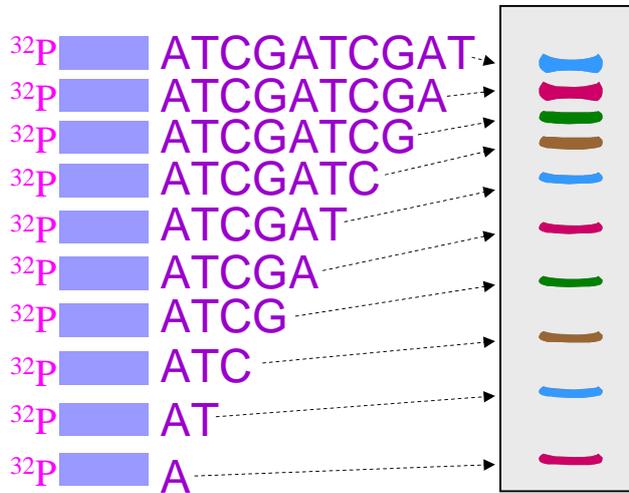


Pharmacia

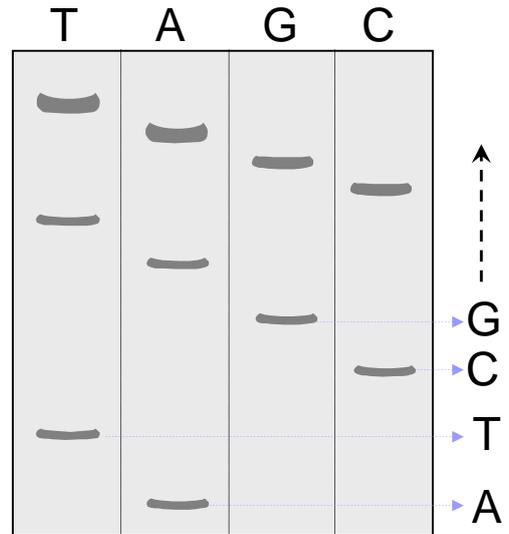
核酸 的純化方法相當固定，除了因材料不同所可能導致的特殊抽取問題外，處理核酸的方法大致都相同。所有核酸都可以被乙醇沈澱，但其中只有 DNA 因其分子很長，可以使用玻璃棒撈取之，乾燥後再以緩衝液溶出，就可以得到粗的 DNA 材料。利用限制酶可以把 DNA 切成特定片段，再以電泳檢視。不同種類的 DNA 在抽出後進行限制酶水解，所得到片段的電泳圖譜，大概都不會相同，是一種重要的生物鑑定方法。

核酸定序原理

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：



Polyacrylamide Gel Electrophoresis



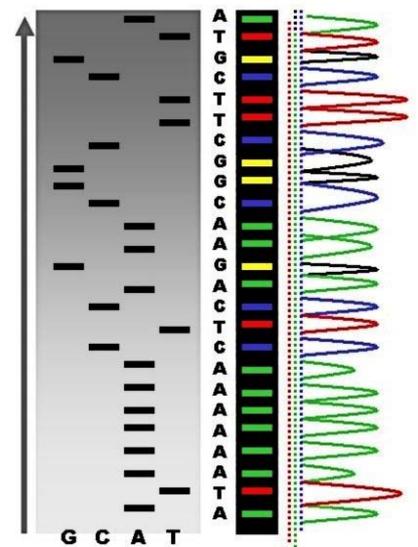
但這樣的圖譜不能判別出各核酸端點的核苷酸種類

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。

Juang RH (2007) BCbasics

核酸 定序方法的關鍵方法，在於如何製得一系列的核酸片段，而這些片段各中止於不同的鹼基位置；一個鹼基的差異，即可用電泳分析出來（上圖左）。其次，要把具有相同尾端鹼基的片段提出來（例如 T），放在一起進行電泳，則分別有 A, T, C, G 四條電泳（上圖右）。比較這樣的四條電泳圖譜，依序判讀色帶出現的先後，即可推出序列。有兩種方法可製備一系列長度不同的核酸片段，請見下一頁。

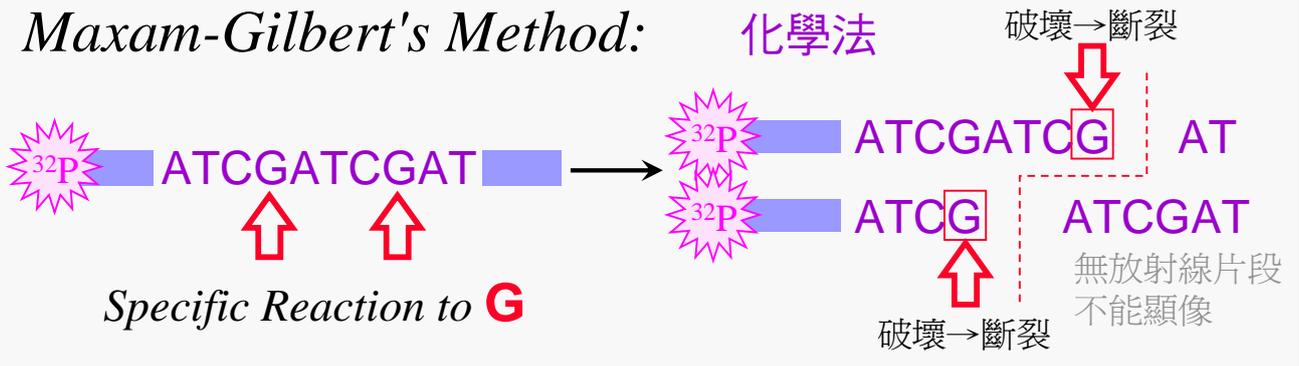
目前大多定序工作已經自動化，並且利用新的螢光標示物質，以及靈敏螢光檢測器，可以直接以顏色辨認鹼基的種類。另外，也改用毛細管電泳或 HPLC 進行核酸片段的分離，使得定序的進行更為快速而精確，請看下右圖以彩色標示如此分離出來的片段，馬上可以唸出核酸序列 (Wikipedia)。



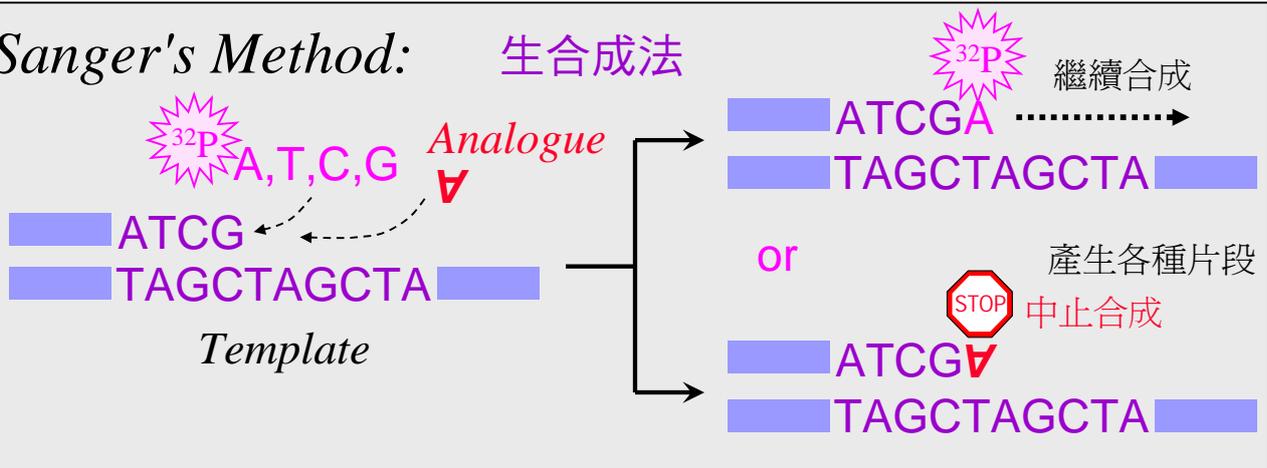
N4-4

做出不同長短核酸的方法

Maxam-Gilbert's Method:



Sanger's Method:



Juang RH (2007) BCbasics

(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；比較如此四組鹼基序列電泳，即可組合成整段 DNA。

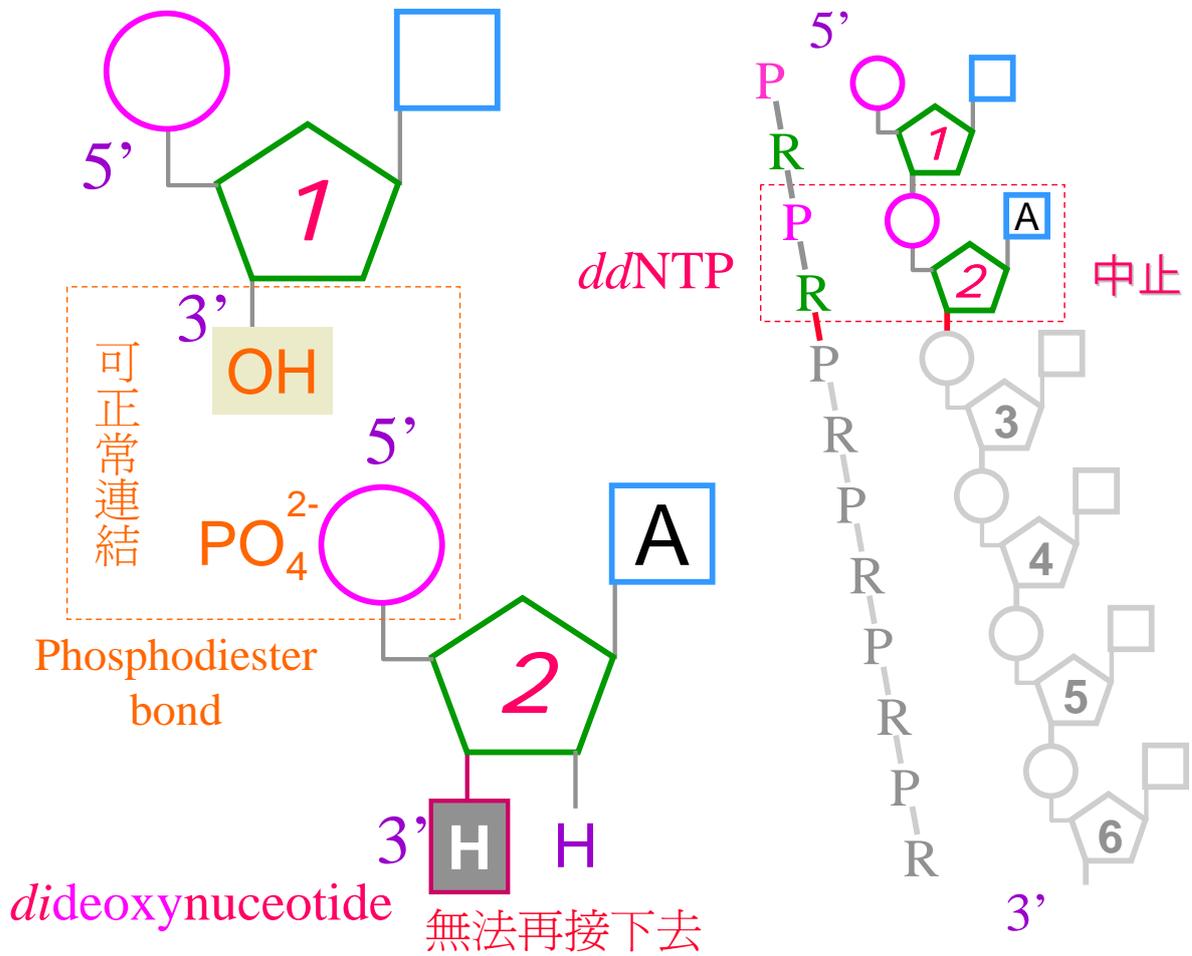
事實上第一步只有兩種反應，分別對 purine 與 pyrimidine 反應，然後再利用其他方法分辨 A, G (或 C, T)。

(2) Sanger 法：

以樣本 DNA 為模板，使用 DNA polymerase 進行試管中 DNA 生合成。有四個反應，每個反應各缺乏一種核苷酸，而代以其類似物 (analogue)，可以被接納進入反應，但是無法繼續下一個反應，因此合成會停在該類似物的核苷酸處，因而造成各種長短不一的 DNA 片段，以電泳分離如上頁，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。

生合成核酸定序法的反應

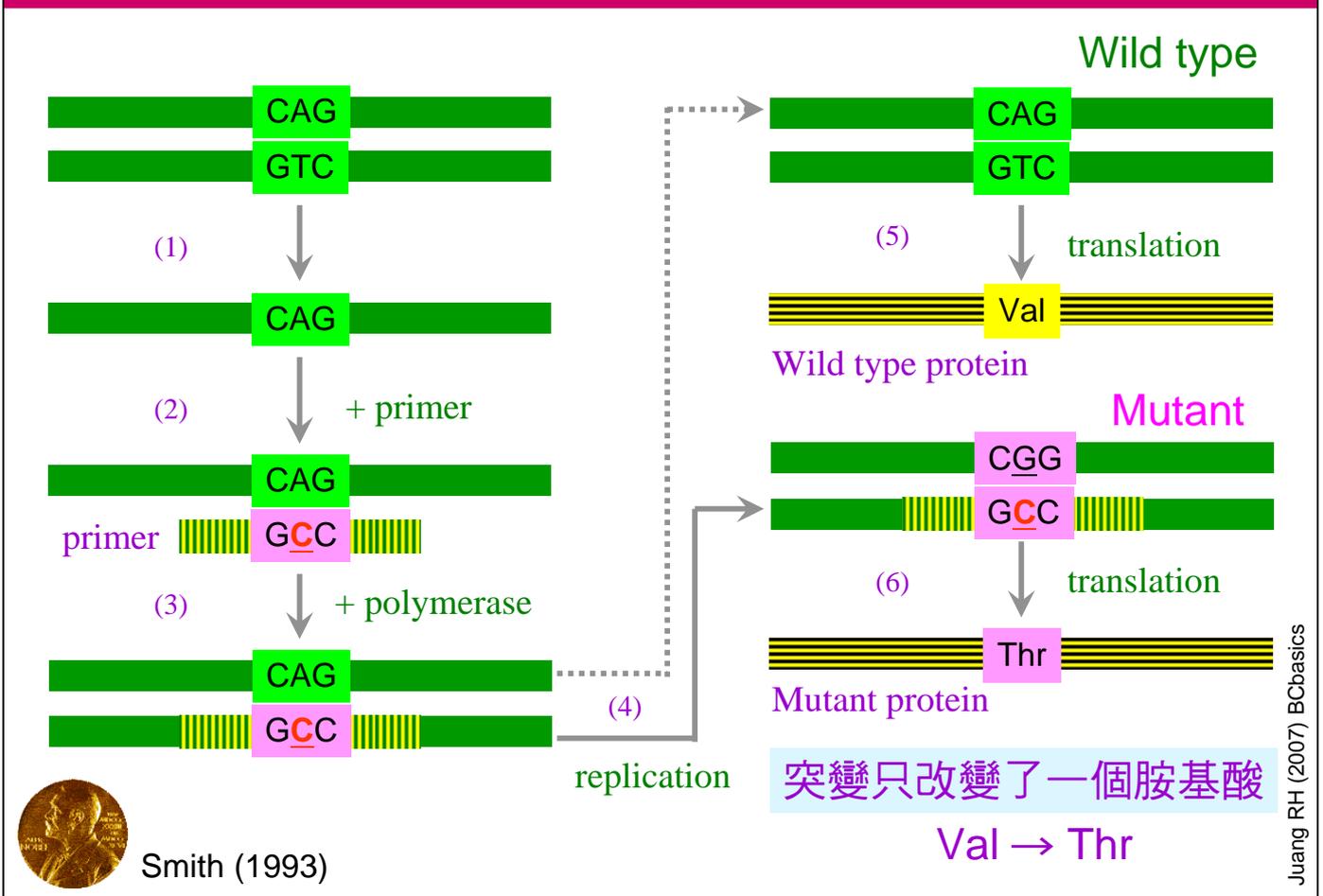


Juang RH (2007) BCbasics

目前 都用 Sanger 的生合成法，以目標核酸為模板，加入四種核苷酸及 polymerase，複製該段核酸；但除了所加的四種核苷酸外，額外加入其中任一種核苷酸的雙去氧衍生物（類似物 dideoxynucleotide），合成反應可能止於這種核苷酸的位置，因而可得到各種長短不同的片段，再以電泳依序排列出來。

問題： 現在有很多人要想出更方便的核酸定序方法，你能否也設計一些？

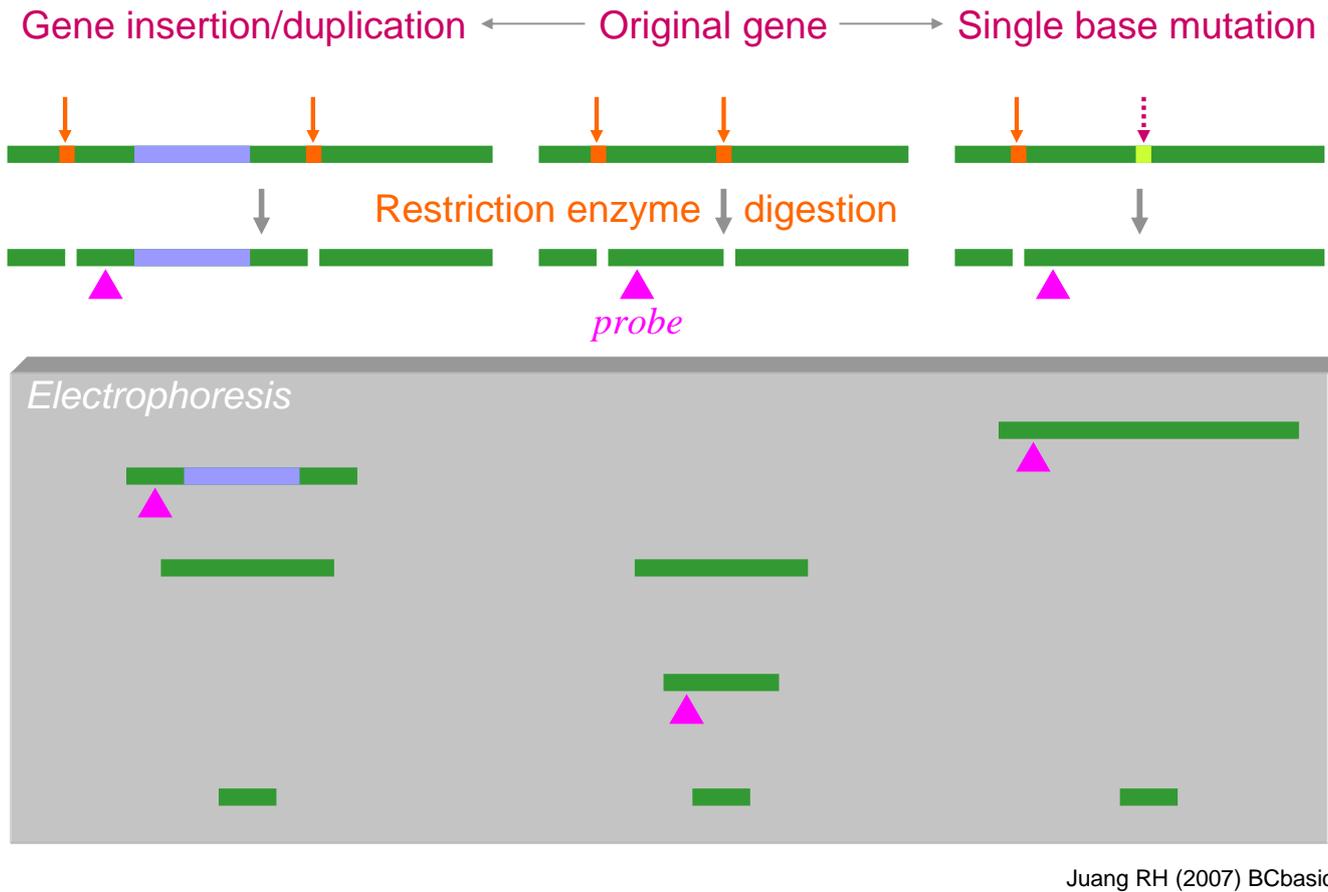
Site-directed mutagenesis 定點突變



定點突變 是使用人工合成的引子，先與目標基因雜合 (2)，而此引子的核苷酸序列與目標基因互補，但其上有一個核苷酸變異 (GTC→GCC)。然後補滿雙股核酸 (3)，再把此混成基因轉殖進入宿主，則宿主菌的複製系統將會因複製而產生兩種質體 (4)，其一為原來的野生型，轉譯可得原來的蛋白質 (5)；另一則為突變型，轉譯則得到突變的蛋白質，但只改變了一個指定位置的胺基酸 (6)。

問題： 定點突變在研究 (1) 蛋白質構造或者 (2) 酵素催化反應，非常有用。你能否舉出一些可能的應用實例？

RFLP 限制酶圖譜多形性



限制酶圖譜多形性 (Restriction fragment length polymorphism) 可用來檢定兩種生物或個體在分子演化上的親疏關係。雖然同一群族內的每個個體，其基因組成大同小異，但是個體間仍然會有微小的差異，也就是說其基因序列並不完全相同，稱為多形性。而基因序列的不同，也會使得限制酶所能辨認的位置，可能有所差別；因此兩個個體的相對應基因，若以同一限制酶水解，就可能切出不同的片段出來。

生物染色體的核酸序列經常會有變異，很多都是發生在單一個鹼基，稱為 **single nucleotide polymorphism (SNP)**。人類染色體中每 100~300 個鹼基，就可能有一個 SNP。這些單點變異可能根本不會影響到後來表現出來的蛋白質 (為什麼?)，但也有可能是某些疾病的根源。(右圖 Wikipedia)

那麼，人類基因計畫所定出來基因序列，到底是一個人的？或者是許多人的？據主持該計畫的 Venter 說，賽拉雷是取用五、六名匿名自願者的基因，進行選殖定序，其中也可能包括他自己的基因。

