

醫工導論

分子生物與醫學工程

莊曜宇

9/29/2005

綱要

- 基因(gene)簡史
- 分子生物簡介
- 分子生物技術

基因(gene)簡史綱要

- 孟德爾遺傳法則
- 人類基因體計畫
- DNA雙股螺旋結構
- 國內基因相關研究計畫

緒論 – 基因簡史

- 1865 孟德爾(Mendel): 遺傳的基本單位是「遺傳因子」
 - 直至1900年，孟德爾的研究始終不受注意
- 1909 約翰遜(Johannsen): 將孟德爾遺傳因子的概念正式定名「基因」(gene)
- 1944 發現基因是由去氧核糖核酸(DNA - Deoxyribonucleic Acid)組成
- 1953 James Watson and Francis Crick :提出基因結構為雙股螺旋(Double Helix) (後來得到諾貝爾獎)

緒論 – 基因簡史

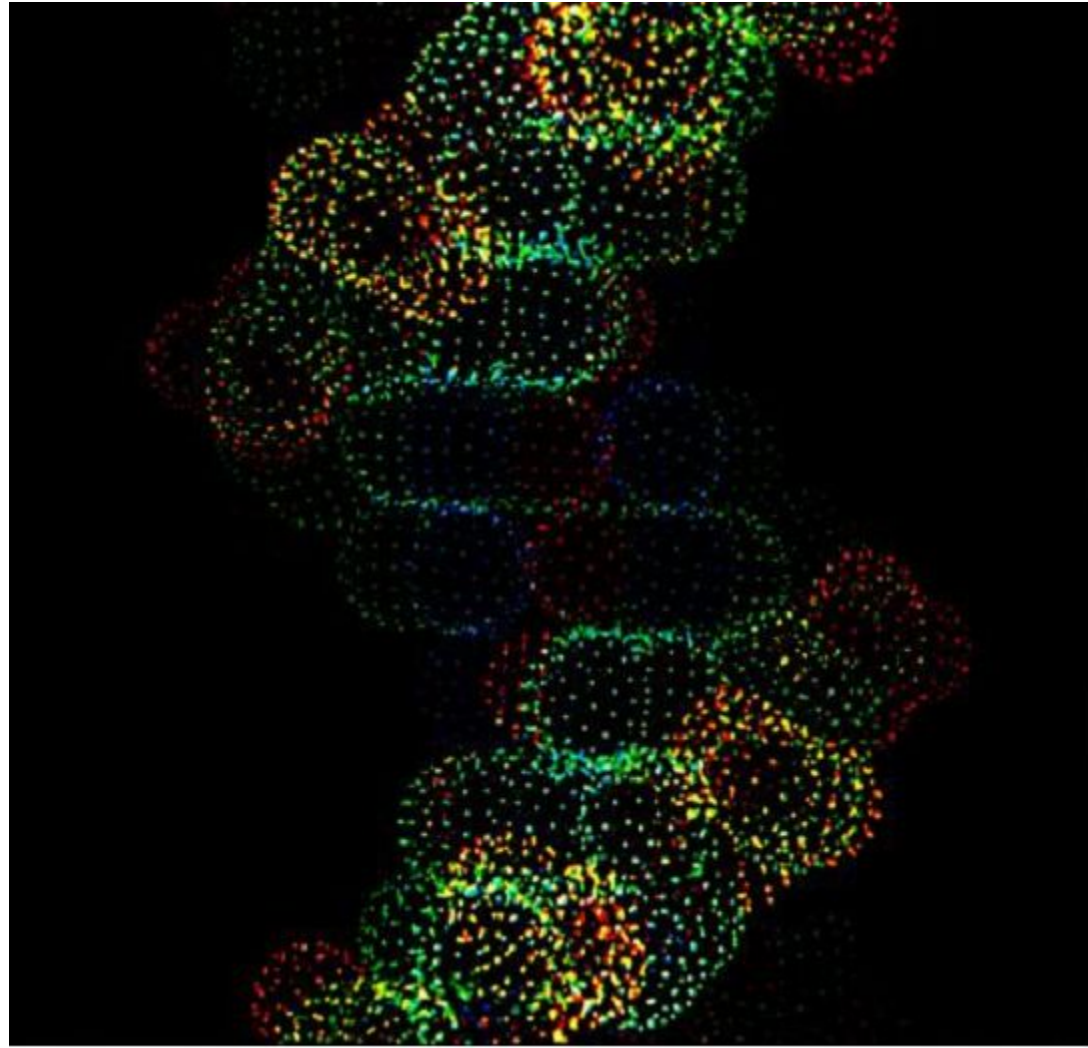
■ 科學史上最孤獨的天才-孟德爾

- 孟德爾發表論文(遺傳法則) 後，曾印製40份單行本分送世界各國權威，其中包括達爾文。然人們在達爾文藏書中找到孟德爾論文時，連頁並沒割開，因此達爾文可能連看都沒看過。
- 孟德爾的不幸乃是因其處於巨人達爾文的陰影之下。加上當時生物界認為對進化論(適者生存、自然淘汰)而言，物種間的雜交比物種內的雜交來得重要多了。
- 1900年三位科學家同時獨立地重新發現“孟德爾定律”(遺傳法則) ，孟德爾超前35年的科學才重新被研究。但這卻也悲哀地證明，孟德爾論文的出現與否，對生物學的研究沒有影響。

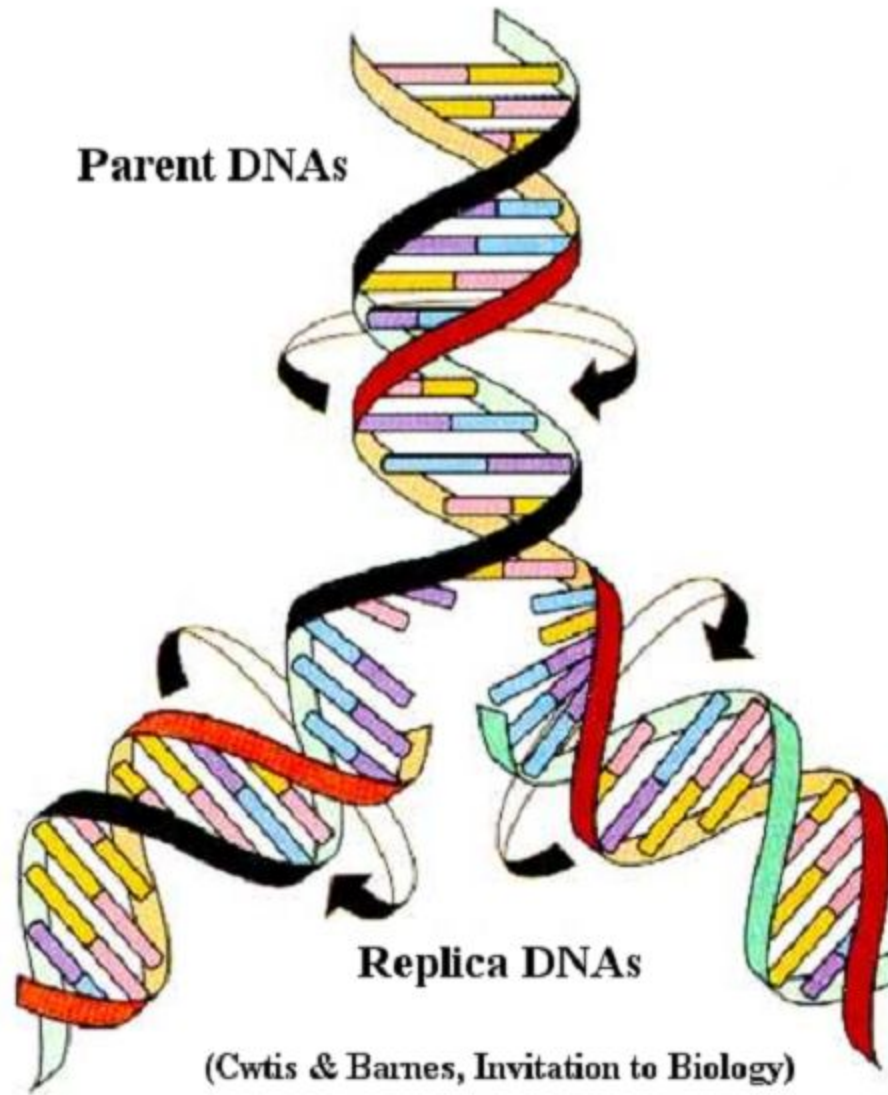
緒論 – 基因簡史

- 科學史上最孤獨的天才孟德爾失敗原因
 - 生不逢時，處於巨人達爾文進化論的陰影之下
 - 馬太效應，達爾文進化論太過成功使人們認為其遺傳理論泛生學說應不遑多讓，而孟德爾理論與之相悖，故不受重視。(馬太效應，意即錦上添花)
 - 不擅推銷，發表不受重視後，紫羅蘭、玉米、紫茉莉的實驗雖亦驗證其理論，但終生未再發表。
 - 使用統計，當時生物界不認為生物會與數學相關，也懶得去了解數字間的關係，孟德爾卻是首位使用統計數學的生物學家，一般生物學家難以理解。
 - 孟德爾臨死前數月曾說過：「我深信世界承認這工作成果已為期不遠了，雖說不遠、其實也不近...」。他逝世後又過了16年到1900年，其成就才被世人所接受。

DNA Double Helix (雙股螺旋)

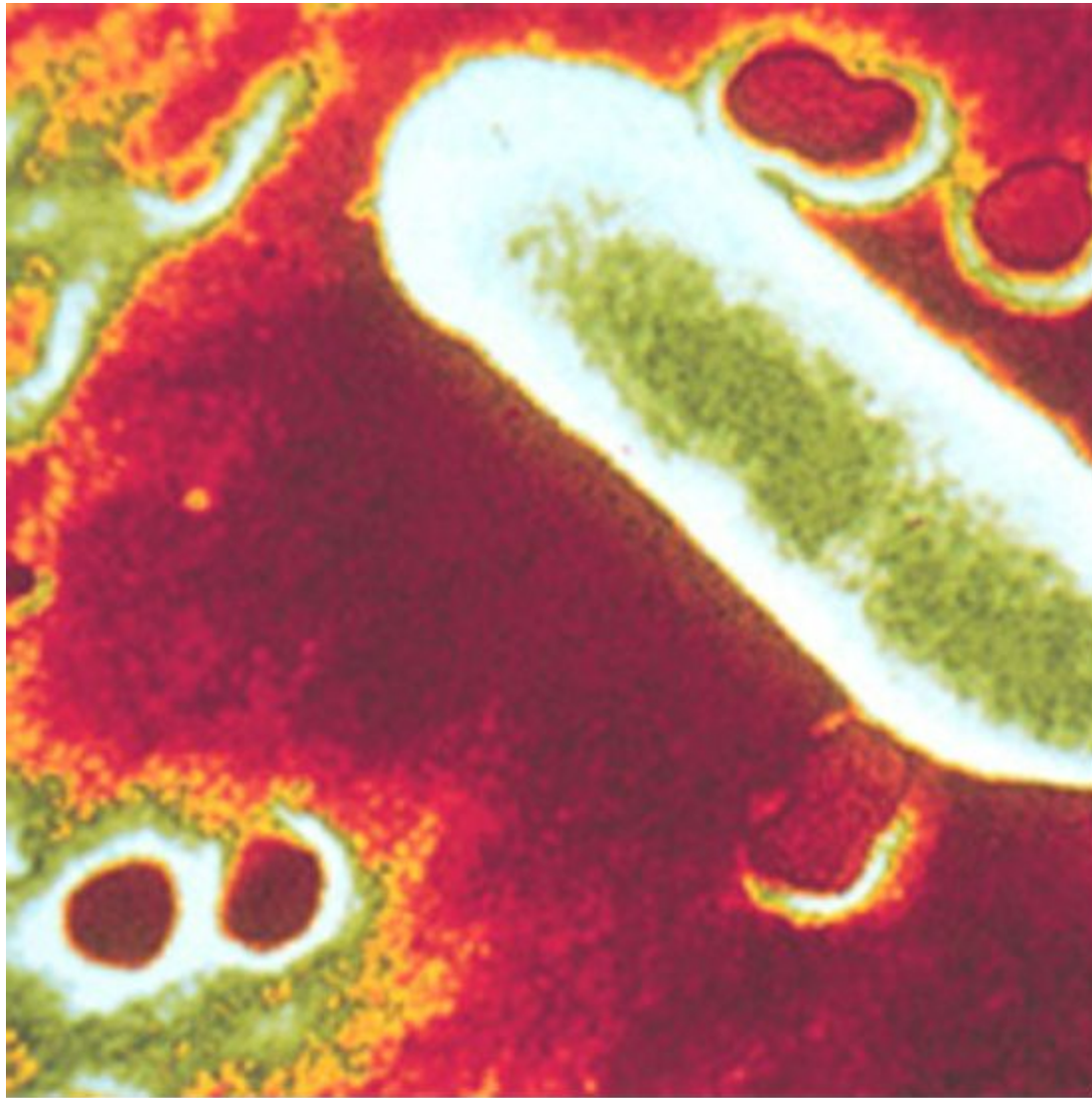


DNA Double Helix (雙股螺旋)



緒論 – 人類基因體計畫

- 1990 啓動人類基因體計畫 (Human Genome Project)
 - 以美、英、德、法、日、中國為首，共十八個國家參與序列解讀工作。
- 1995 流行性感冒嗜血桿菌(haemophilus influenzae)成為史上第一個被定序的有機生命體 (見下頁圖)



流行性感嗜血桿菌(*haemophilus influenzae*)

緒論 – 人類基因體計畫 (續)

- 1998 賽雷拉(CELERA)公司加入基因研究計畫
 - 賽雷拉公司加入後，利用快速DNA自動定序儀、使用電腦來辨識基因所在。定序期間電腦不斷利用既有法則做修正改進工作。
- 2000 人類DNA序列草圖完成
 - 因賽雷拉公司之加入、使得人類基因體草圖解序提早三年(原訂2003年完成)。

緒論 – 基因小常識

- 生物體內有多少個基因？
 - 人類約二萬至二萬五千個
 - 蛔蟲約一萬九千個
 - 酵母菌約六千個
 - 結核病菌約四千個
- 不同個體間的DNA差異有多大？
 - 人與人之間，差異約0.2%
 - 人與黑猩猩之間，差異約2%
- 我們尚不了解其作用的DNA，約佔97%

國科會國家型計畫

- 生技製藥
- 農業生物技術
- 防災
- 基因體醫學
- 奈米
- 晶片系統
- 電信
- 數位典藏
- 數位學習

兩兆雙星計畫

■ 兩兆產業

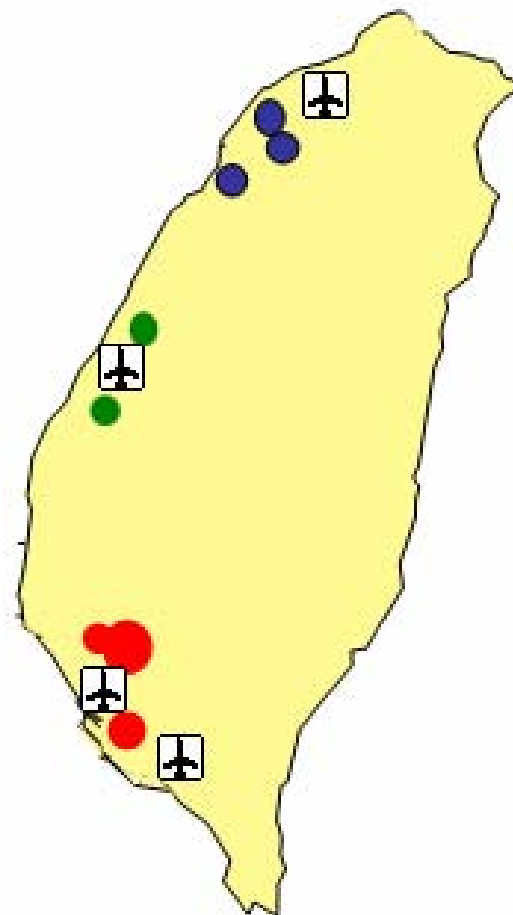
- 半導體：2006年 產值 新台幣1兆5千9百億
- 影像顯示(平面顯示面板及液晶顯示器)：2006年 產值 新台幣1兆3千7百億

■ 雙星產業

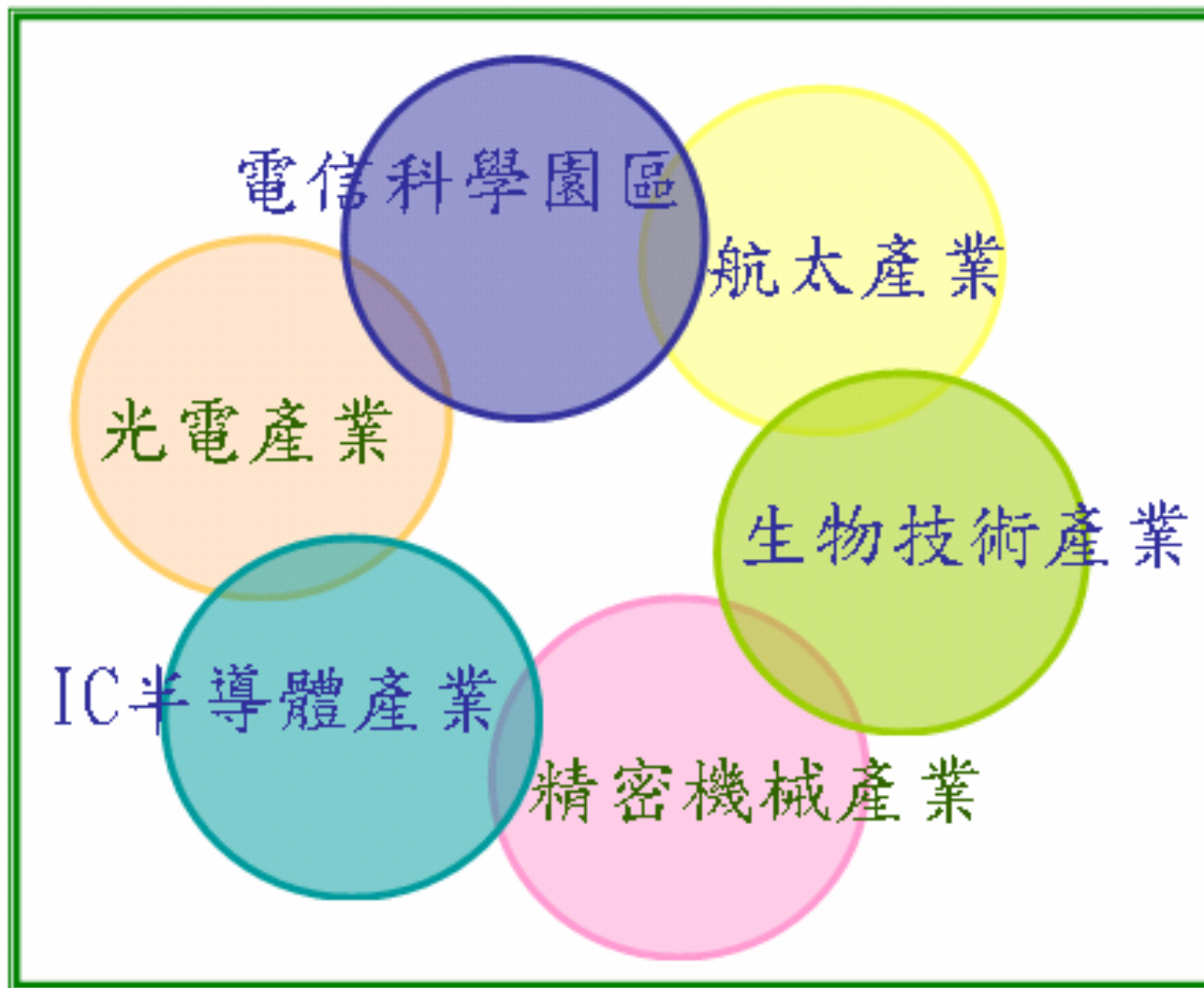
- 數位內容 (包含軟體、電子遊戲、媒體、出版、音樂、動畫、網路服務等)：2006年 產值 新台幣3千7百億
- 生物技術與製藥：2006年 產值 新台幣2千5百億

實現台灣科技島--科學園區

- 新竹園區聚落 合計約1100公頃
 - 新竹基地(1980)
 - 竹南基地(2000)
 - 銅鑼基地(2004)
- 臺南園區聚落 合計約1600公頃
 - 一期基地(1996)
 - 路竹基地(2001)
 - 二期基地(2002)
- 中部園區聚落 合計約400公頃
 - 台中基地(2003)
 - 雲林虎尾基地(2003)



高雄(路竹)園區之產業佈局



緒論 – 國內基因相關研究計畫

- 2000年國科會「生物資訊」跨領域研究
- 2000年五月台灣榮陽研究團隊完成人類第四號染色體千萬鹼基定序計畫，貢獻度為千分之三
- 2001年國科會國家型研究計畫
 - 基因體醫學國家型計畫
- 2001年國科會跨領域專題研究
 - 工程處：資訊科技
 - 生物處：生物資訊

緒論 – 基因研究展望與思考

- 利用基因研究能活到一千兩百歲？
- 生命之書幾許價？誰該擁有版權？
- 基因研究是否能訂做一個他／她？
- 基因研究衍生出科學與倫理之戰？
- 將來會為器官移植開設人類農場？
- 分子科技帶來的是頂點還是深淵？
- ...

分子生物簡介綱要

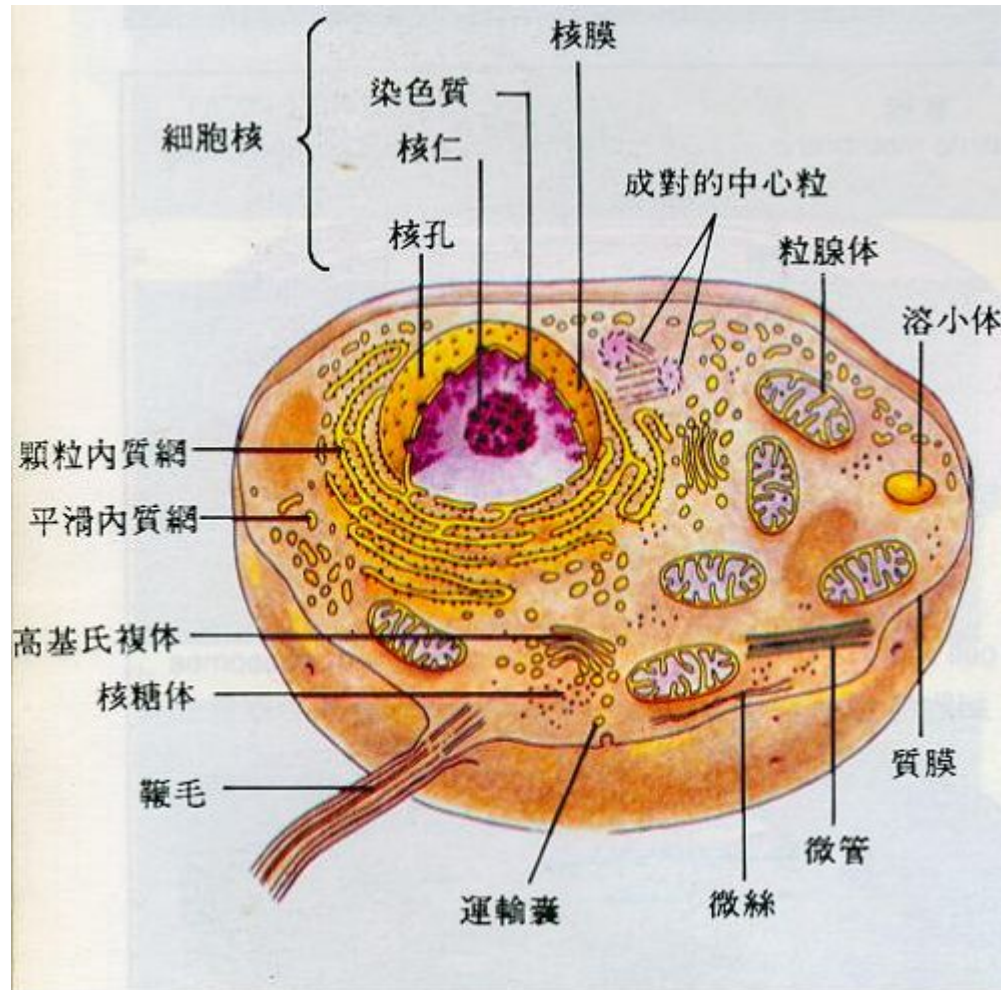
- DNA
- RNA
- 複製(Replication)、轉錄(Transcription)、轉譯(Translation)
- 蛋白質(Protein)、胺基酸
- 基因密碼

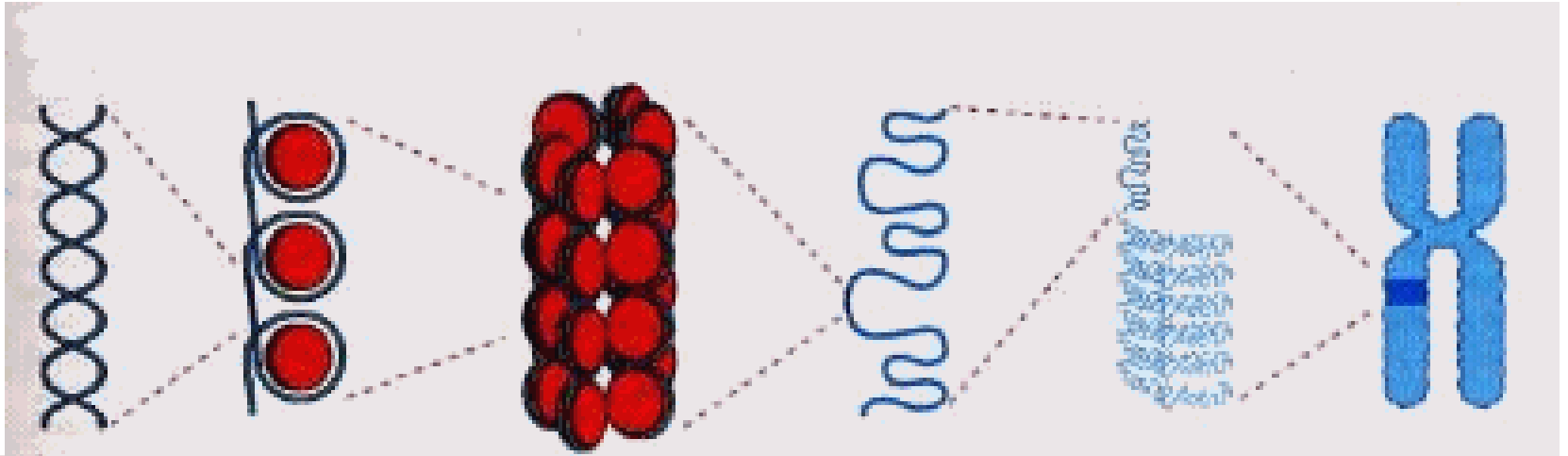
分子生物簡介 – 核酸的發現

- 核酸的發現是從傷口的膿汁而來的
 - 核酸物質在1869年，被米謝(Miescher)所發現。他從醫院患者繃帶收集膿汁並作研究。選擇膿汁的理由是因為膿汁裡包含大量與細菌作戰而死的白血球。其體積遠比一般細胞大，易於觀察研究。經其萃取白血球細胞核內物質後得到含磷酸且易染於鹼性色素之物質。因為來自細胞核，故命名核酸。
 - 同時期孟德爾亦發現遺傳法則並預知遺傳物質的存在。可惜在孟德爾的遺傳因子(基因)被證明為核酸之時，時光已經又過了80年。

分子生物簡介 – DNA位置

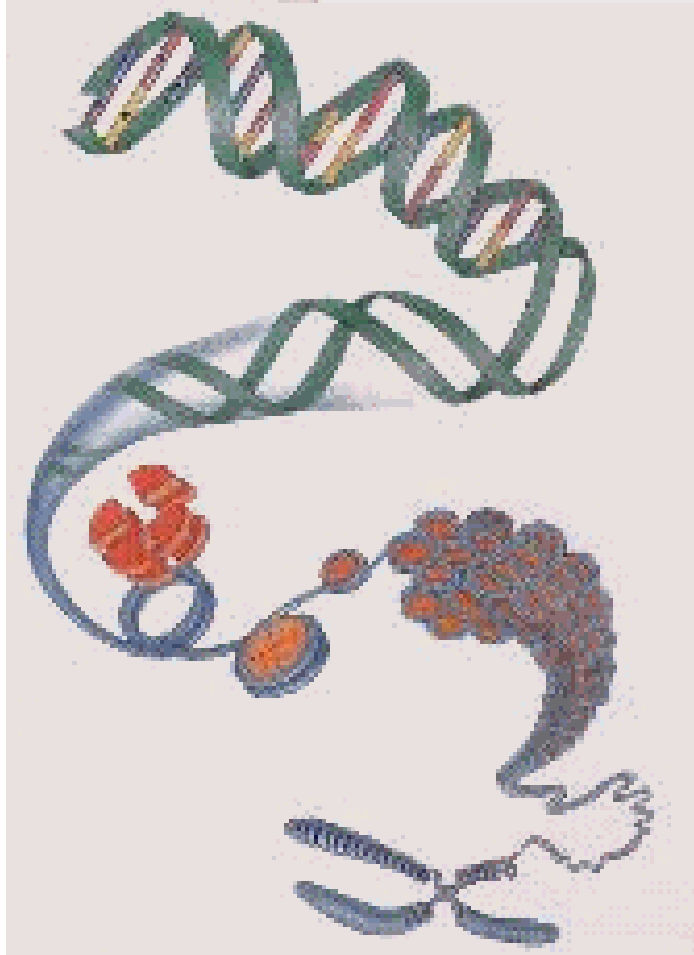
- DNA位於細胞核內之「核仁」





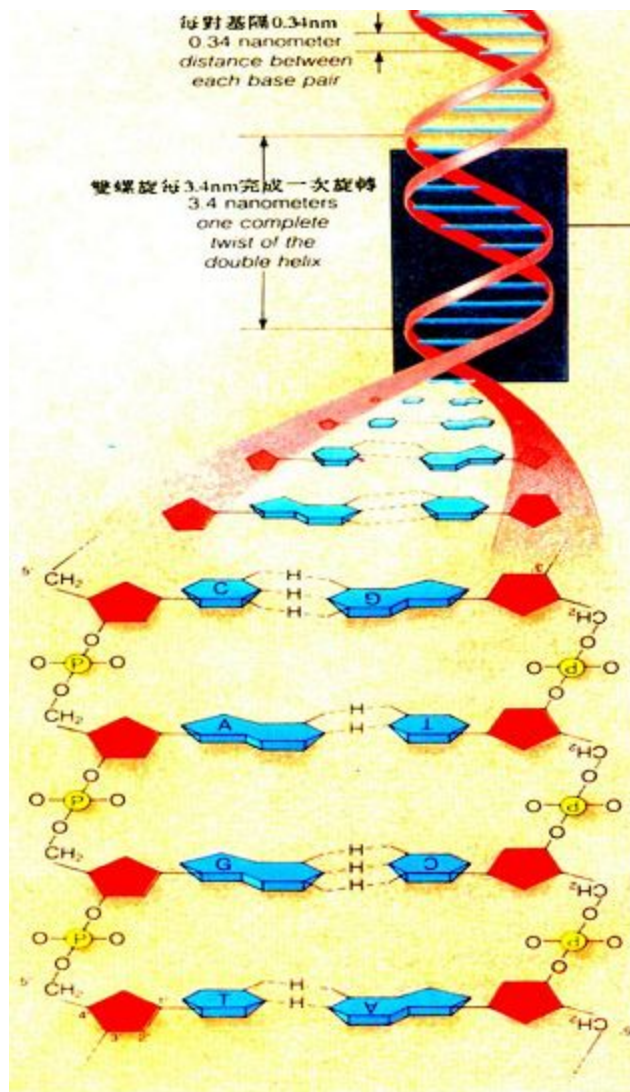
↑染色體層次圖(由左至右)

←染色體結構圖(由上至下)



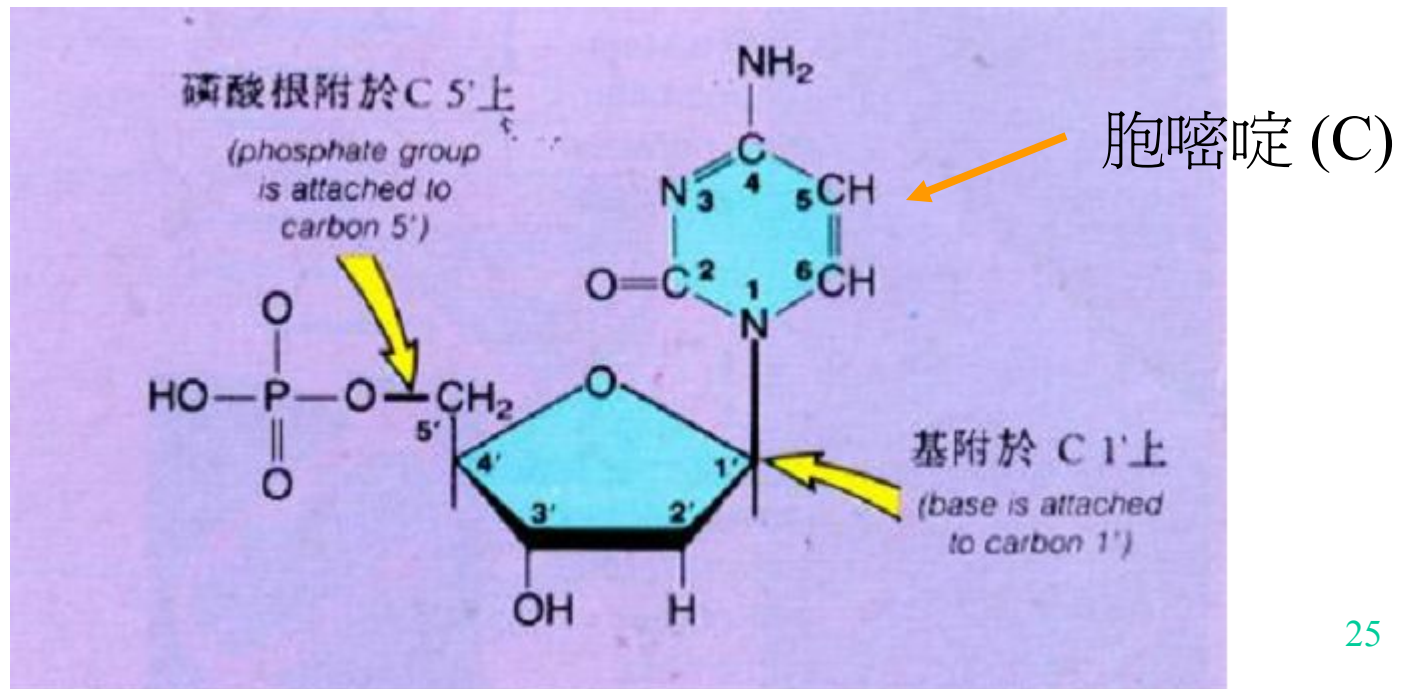
染色體的股線緊密折疊，一般認為染色體是由很長的 **DNA雙螺旋鏈** 盤捲在組織蛋白質 (histone) 分子上，像珠子串在一條線上的形式形成**染色質 (chromatin)**。例如，一條人類染色體之DNA平均長度為50mm。DNA分子繞組織蛋白質分子結合成為**核體 (nucleosome) 單位**，核體單位折疊緊縮形成**染色質纖維 (chromatin fiber)**，染色質纖維高度折疊形成**染色體的延伸部份**，而纏繞又折疊形成**染色體的緊縮部份**。

分子生物簡介 – DNA雙股螺旋

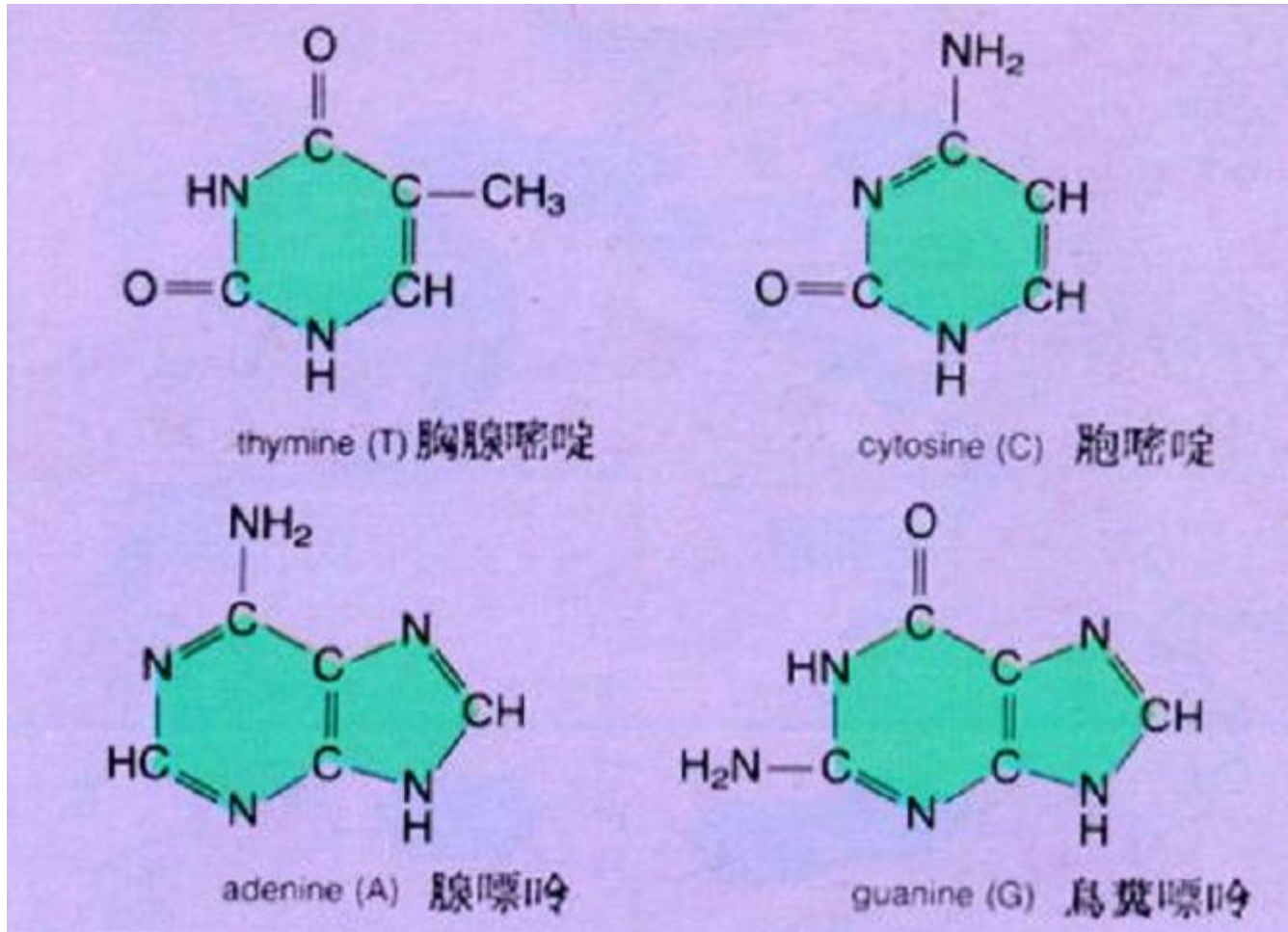


分子生物簡介 – 核甘酸

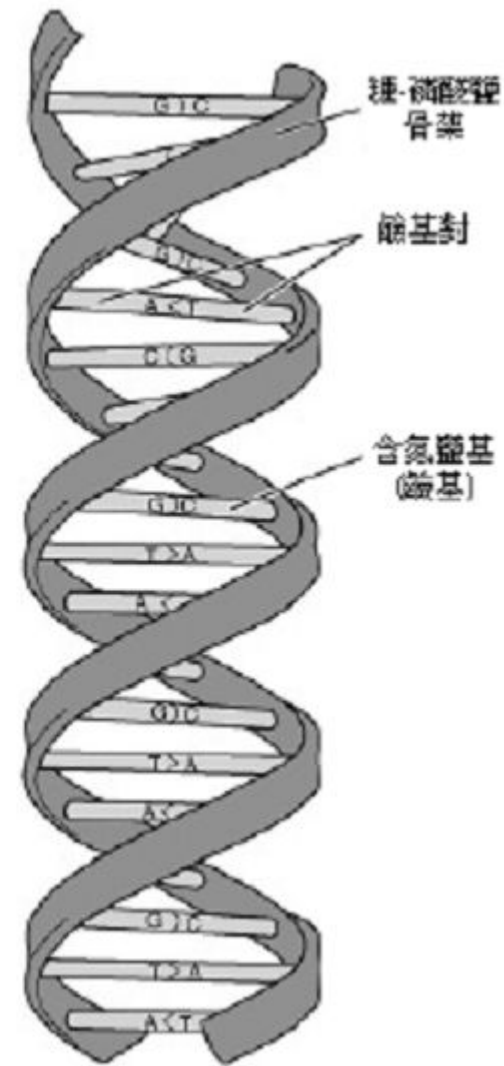
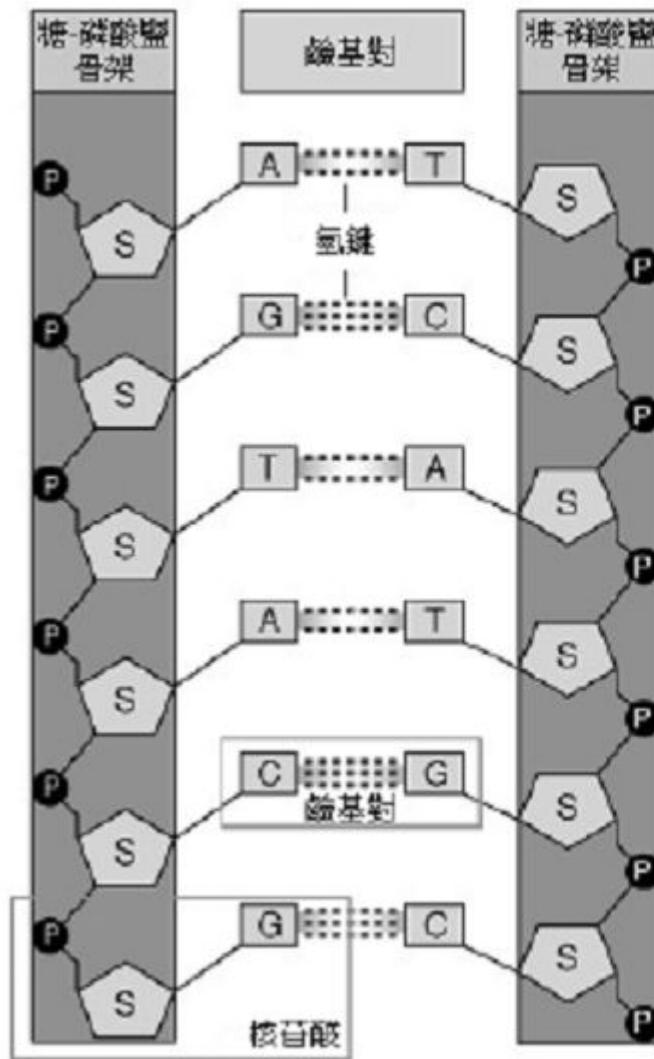
- 核甘酸(Nucleotide)為核酸分子構成單元
- 核甘酸包含：
 - 五碳糖(去氧核糖, deoxyribose)
 - 磷酸基(phosphate group)
 - 含氮鹼基之一(A、G、C、T、U)



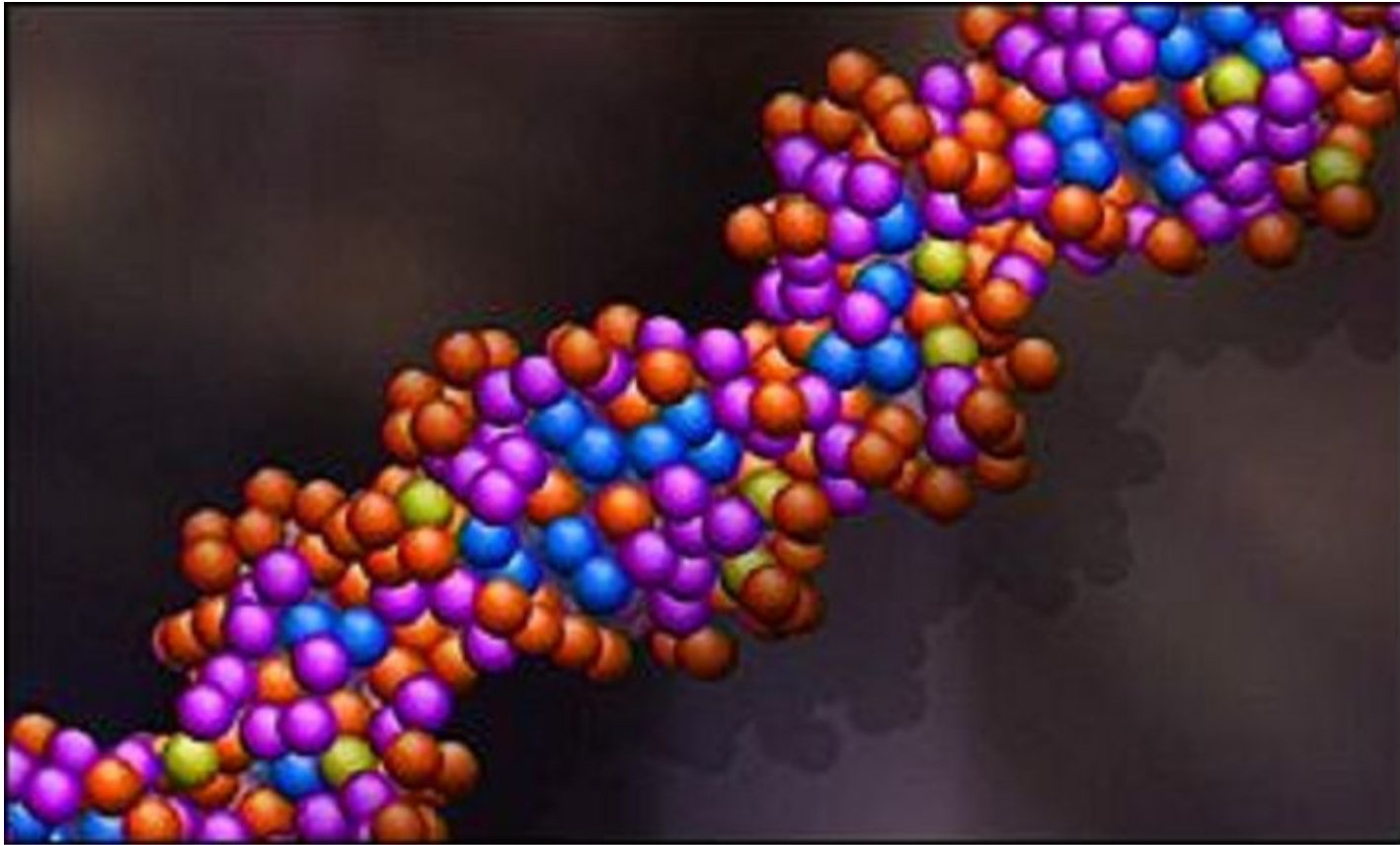
分子生物簡介 – DNA四種含氮鹼基



分子生物簡介 – DNA序列形狀



分子生物簡介– DNA 序列



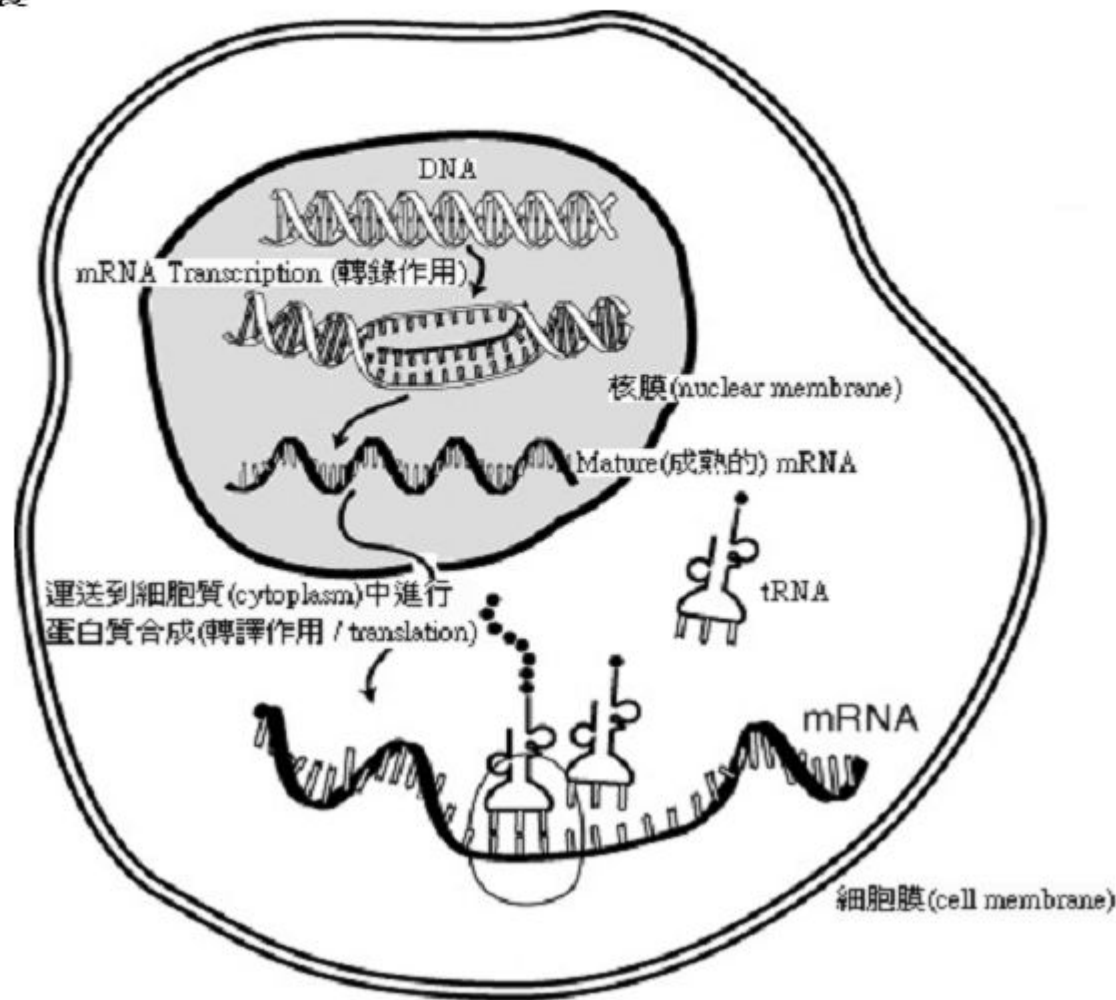
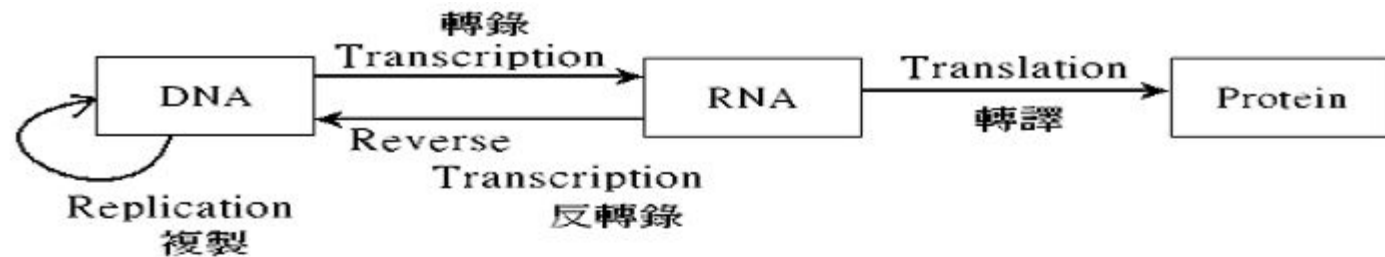
分子生物簡介 – DNA與RNA

- 核苷酸 (Nucleotide) :
 - 腺嘌呤 (adenine, A)
 - 鳥糞嘌呤 (guanine, G)
 - 胞嘧啶 (cytosine, C)
 - 胸腺嘧啶 (thymine, T)
 - 尿嘧啶 (uracil, U)
- 去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA)
 - {A, G, C, T} (鹼基配對: G≡C, A=T)
- 核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA)
 - {A, G, C, U} (鹼基配對: G≡C, A=U, G-U)

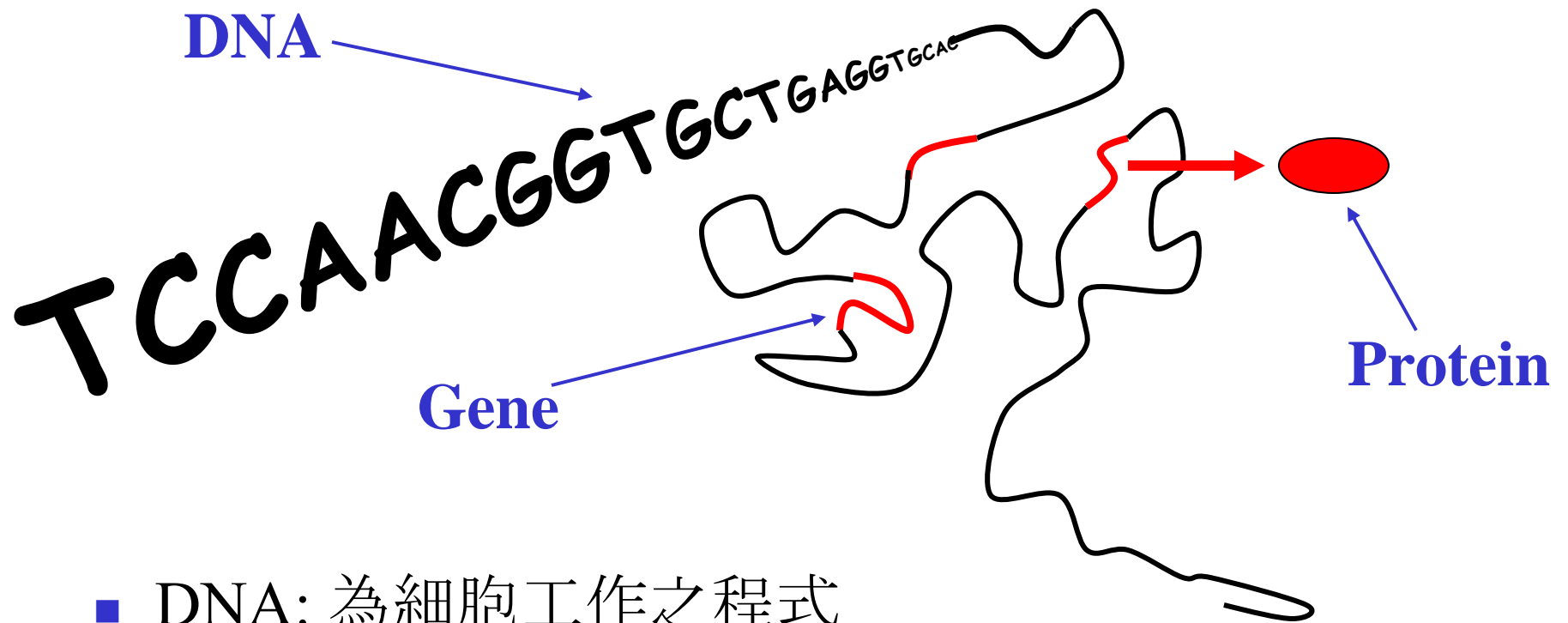
分子生物簡介 – DNA的長度

- 人類 DNA 總長度大約是 3×10^9 (30億) 鹼基對 (base pairs)
- 其中只有約1%~1.5%鹼基對有發揮作用
- 人類基因個數:二萬至二萬五千個間
 - 此結果乃是來自人類基因體計畫
 - 原先預期約十萬個

分子生物簡介 – 轉錄與轉譯作用

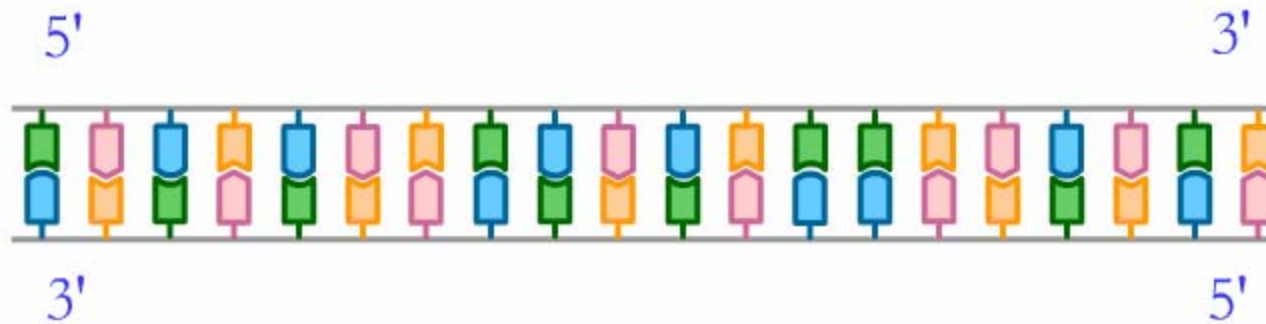


DNA、基因(Gene)、蛋白質(Protein)



- DNA: 為細胞工作之程式
- 蛋白質: 執行細胞賦予之工作(程式)

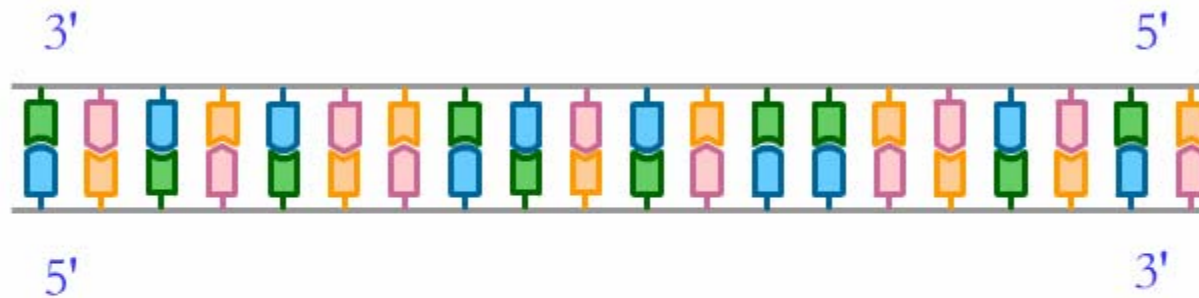
DNA的複製(Replication)--動畫



1. 雙股DNA。

PLAY STOP ◀ ▶

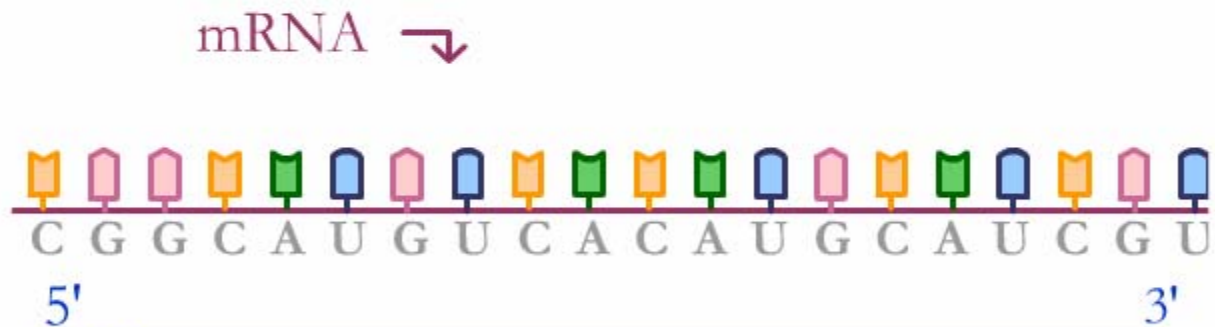
DNA → RNA 轉錄(Transcription) — 動畫



1. 雙股DNA。

PLAY STOP ◀ ▶

RNA → 蛋白質 轉譯(Translation) — 動畫



1. 蛋白質合成是由mRNA當作模板，依據mRNA上所攜帶的密碼子來合成。

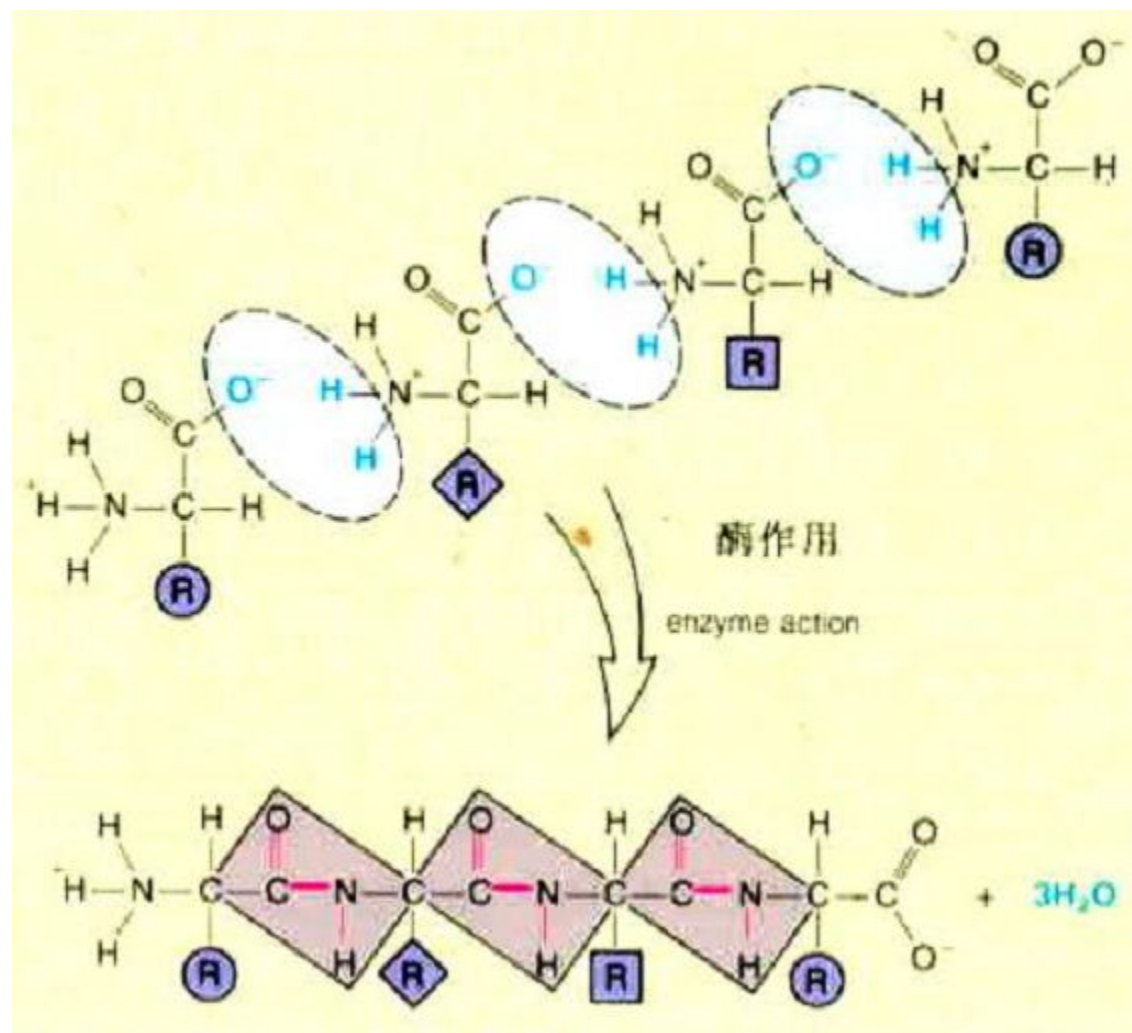
PLAY STOP ◀ ▶

蛋白質(Protein)的組成

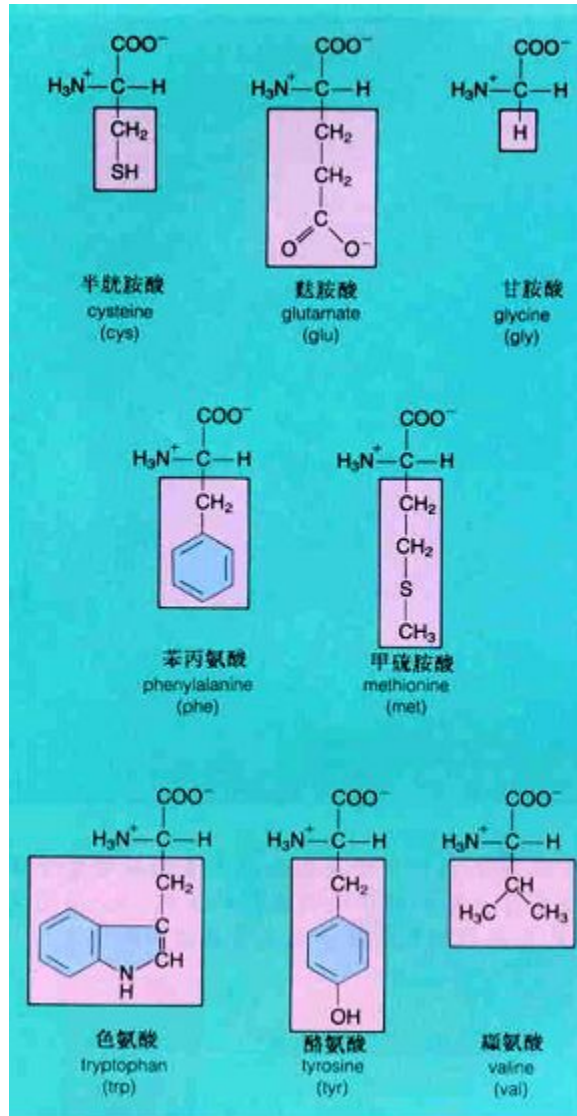
胺基酸(Amino Acid)為蛋白質的基本單位, 共20種

Amino acid	Three-letter code	One-letter code
Alanine	ALA	A
Arginine	ARG	R
Aspartic Acid	ASP	D
Asparagine	ASN	N
Cysteine	CYS	C
Glutamic Acid	GLU	E
Glutamine	GLN	Q
Glycine	GLY	G
Histidine	HIS	H
Isoleucine	ILE	I
Leucine	LEU	L
Lysine	LYS	K
Methionine	MET	M
Phenylalanine	PHE	F
Proline	PRO	P
Serine	SER	S
Threonine	THR	T
Tryptophan	TRP	W
Tyrosine	TYR	Y
Valine	VAL	V

蛋白質分子形狀



胺基酸分子形狀



胺基酸的組成-基因密碼

每三個核甘酸(codon, 基因密碼)對應至一種胺基酸。

		Second Position of Codon					
		U	C	A	G		
F i r s t P o s i t i o n	U	UUU Phe [F]	UCU Ser [S]	UAU Tyr [Y]	UGU Cys [C]	U C A G U C A G U C A G U C A G	T h i r d P o s i t i o n
		UUC Phe [F]	UCC Ser [S]	UAC Tyr [Y]	UGC Cys [C]		
		UUA Leu [L]	UCA Ser [S]	UAA Ter [end]	UGA Ter [end]		
		UUG Leu [L]	UCG Ser [S]	UAG Ter [end]	UGG Trp [W]		
	C	CUU Leu [L]	CCU Pro [P]	CAU His [H]	CGU Arg [R]		
		CUC Leu [L]	CCC Pro [P]	CAC His [H]	CGC Arg [R]		
		CUA Leu [L]	CCA Pro [P]	CAA Gln [Q]	CGA Arg [R]		
		CUG Leu [L]	CCG Pro [P]	CAG Gln [Q]	CGG Arg [R]		
	A	AUU Ile [I]	ACU Thr [T]	AAU Asn [N]	AGU Ser [S]		
		AUC Ile [I]	ACC Thr [T]	AAC Asn [N]	AGC Ser [S]		
		AUA Ile [I]	ACA Thr [T]	AAA Lys [K]	AGA Arg [R]		
		AUG Met [M]	ACG Thr [T]	AAG Lys [K]	AGG Arg [R]		
	G	GUU Val [V]	GCU Ala [A]	GAU Asp [D]	GGU Gly [G]		
		GUC Val [V]	GCC Ala [A]	GAC Asp [D]	GGC Gly [G]		
		GUA Val [V]	GCA Ala [A]	GAA Glu [E]	GGA Gly [G]		
		GUG Val [V]	GCG Ala [A]	GAG Glu [E]	GGG Gly [G]		

AUG is also the “start” codon.

胺基酸小常識

- 必需胺基酸：人體無法合成，必須靠食物來攝取的胺基酸。
- 非必需胺基酸：人體可以利用其它的物質來合成的胺基酸。

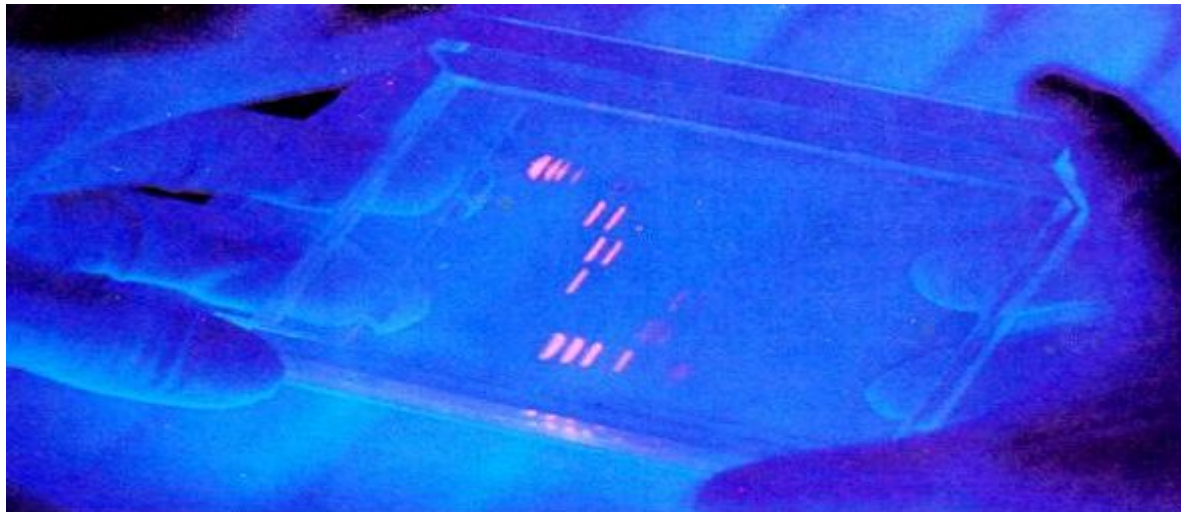
必需胺基酸	非必需胺基酸
Valine	Glycine
Leucine	Alanine
Isoleucine	Alanine
Threonine	Cysteine
Methionine	Proline
Phenylalanine	Tyrosine
Tryptophan	Aspartic acid
Histidine	Glutamic acid
Lysine	Asparagine
Arginine	Asparagine

分子生物技術綱要

- 電泳法(electrophoresis, EP)
- PCR (Polymerase Chain Reaction, 聚合酶鏈鎖反應)放大技術
- 墨點技術
 - 南方墨點(Southern blotting)
 - 北方墨點(Northern blotting)
 - 西方墨點(Western blotting)

分子生物技術—電泳法

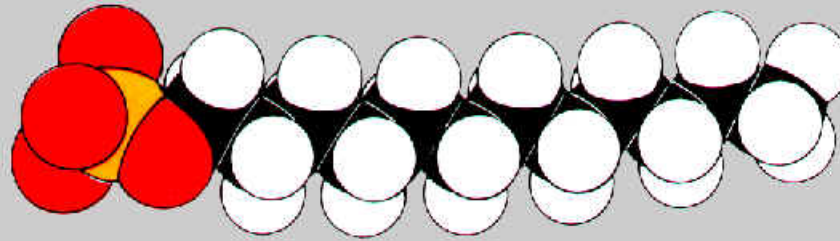
- 電泳法(electrophoresis, EP) – 分子量測定技術
 - 分子愈大、泳動愈慢；帶電愈大、泳動愈快
 - 利用SDS陰離子介面活性劑中和其電量，使其泳動速度單純由分子大小決定
 - 將之與蛋白質標準溶液(protein marker)同跑電泳、比較其相對位置即可測知分子量大小



■ 電泳膠體系統的組成：

電泳系統		緩衝液	pH	膠體濃度
1	上層 (負極) 緩衝液	Tris-glycine	8.3	-
2	樣本溶液	Tris-glycine	8.3	-
3	膠體	聚焦膠體	6.9	5%
4		分離膠體	8.3	5 - 20%
5	下層 (正極) 緩衝液	Tris-glycine	8.3	-

■ SDS (sodium dodecyl sulfate)



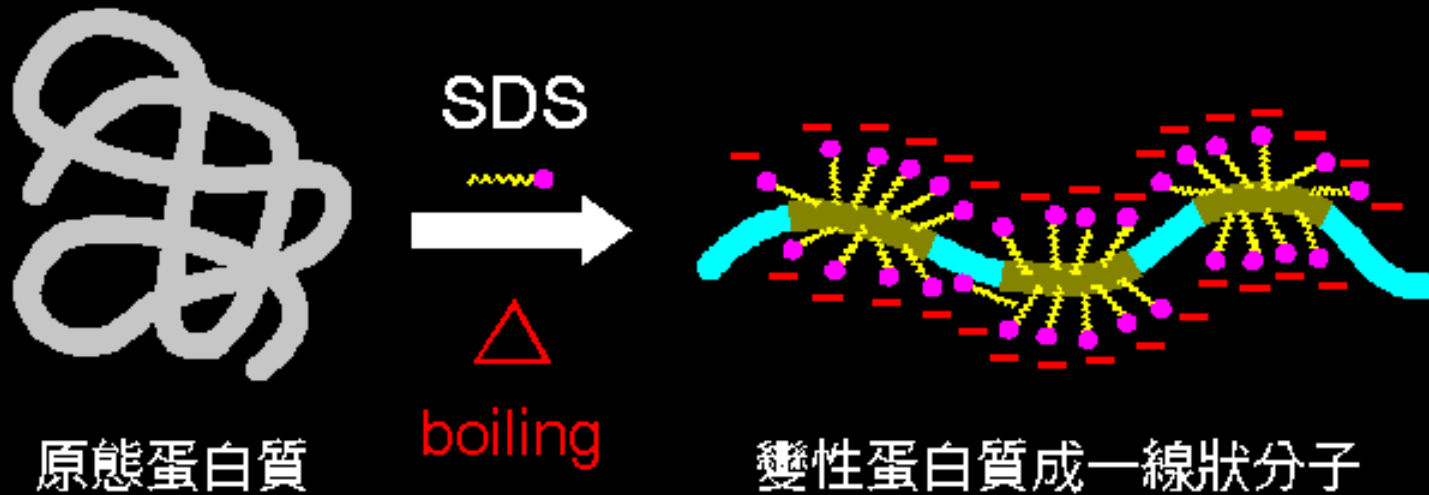
極性頭部

非極性尾巴

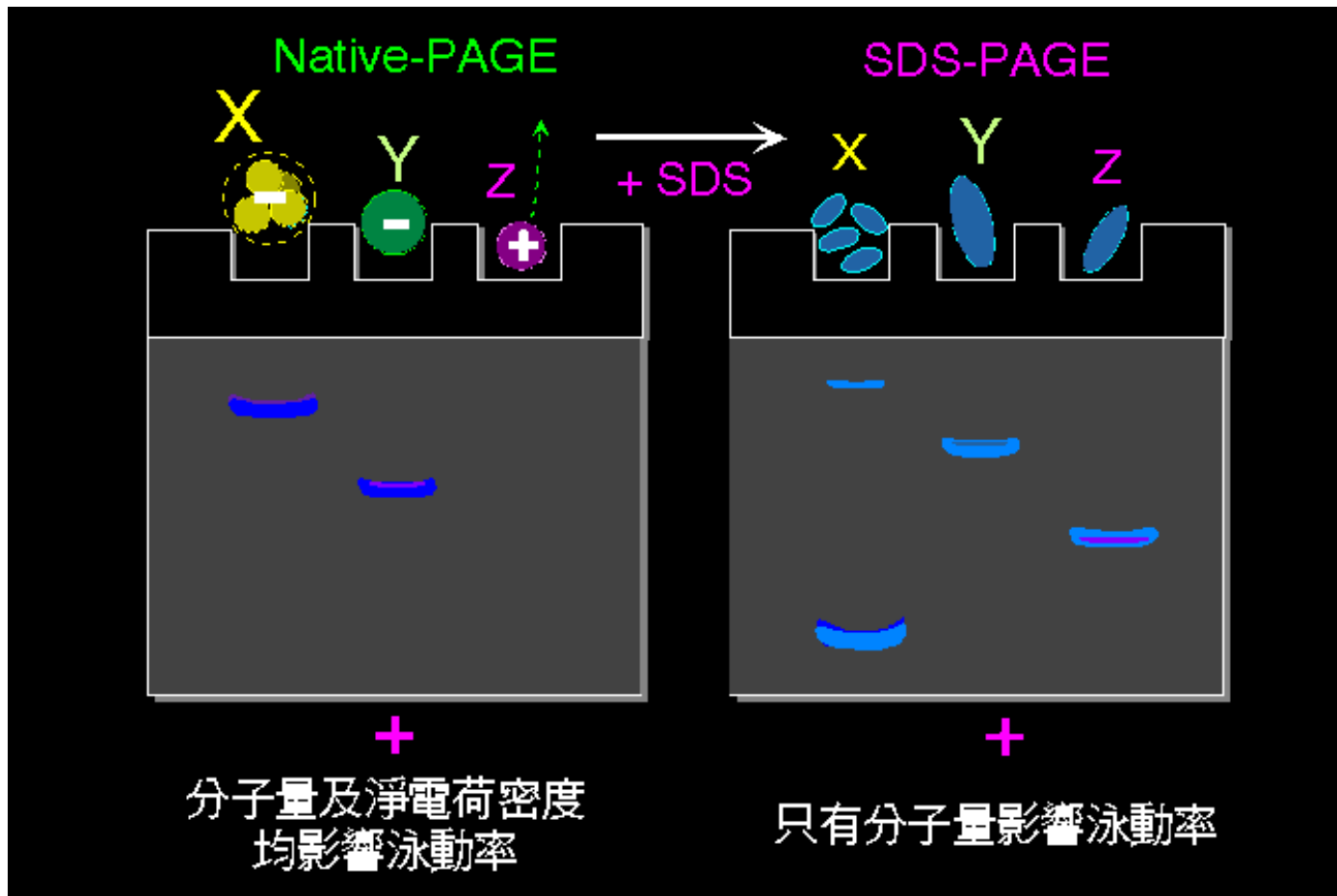
SDS 有一個極性頭部 (**sodium dodecyl sulfate**, 硫酸十二酯鈉) 與一條非極性尾巴。

因此 SDS 可以介入極性與非極性基團之間，是一種界面活性劑，就是俗稱的清潔劑。SDS 可以把非極性尾巴鑲入蛋白質三級構造的內部，而以其極性頭部與外界的水分子結合，因而使得蛋白質變性。

■ SDS 在蛋白質表面均勻附上一層負電荷：



理論上 SDS 是很均勻的吸附到蛋白質上，因此不管原來蛋白質分子的大小，每種蛋白質分子上所吸附的負電荷密度是相同的。



蛋白質 Z 在左邊的 native-PAGE 中無法向下泳動，但在右邊的 SDS-PAGE 則可以依其分子量正確泳動；因此一般使用上，SDS-PAGE 的應用較廣泛。在 SDS-PAGE 下，雖然 X 分子被解構成單元體，因此分子量由 160 kD 變成 40 kD；但若在較為溫和的樣本處理條件下，有可能看到未完全解構的 160 kD 蛋白質色帶⁴⁶。

DNA 定序(Sequencing)

- 給予DNA 序列:

TGC**A**CTTG**A**CGC**A**TGCT

A 之後斷開 (可能於任意位置) :

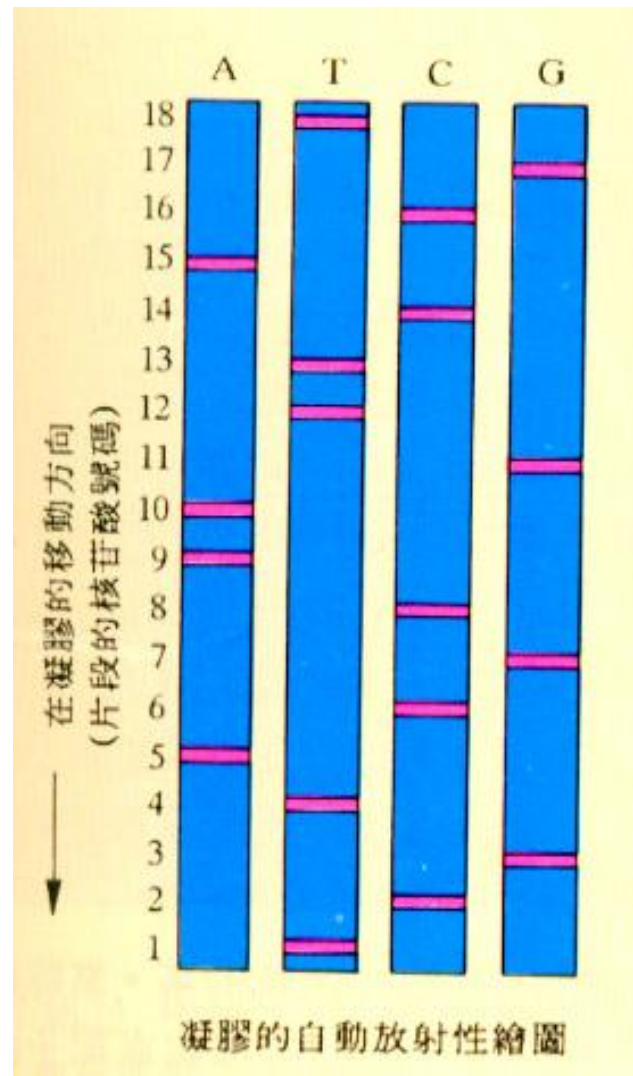
ATGCT 長=5

ACGCATGCT 長=9

AACGCATGCT 長=10

ACTTGAACGCATGCT 長=15

DNA 定序(Sequencing)結果

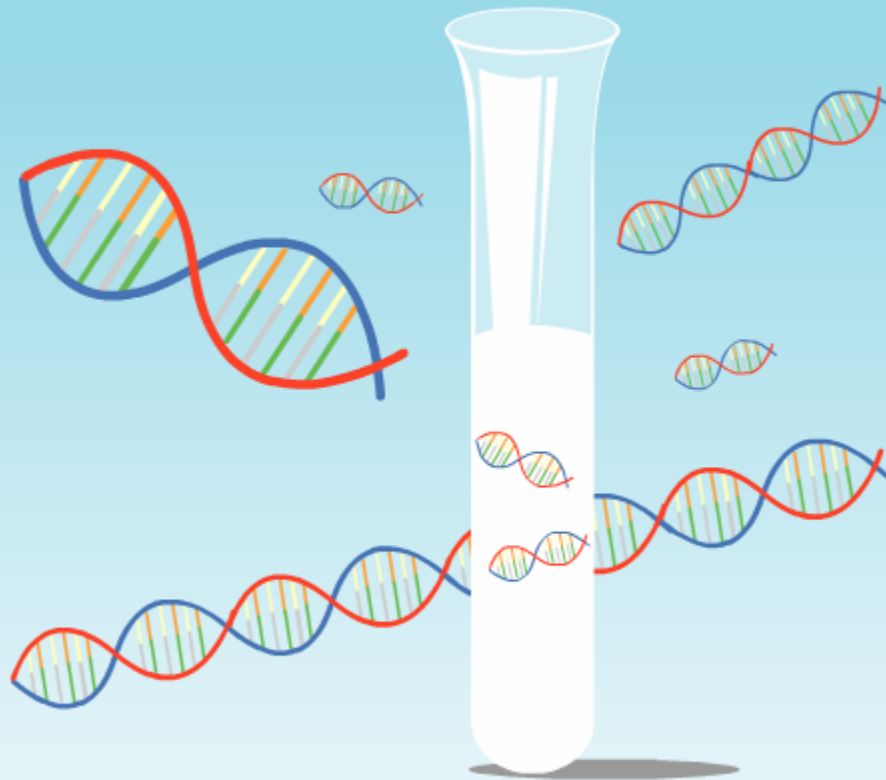


分子生物技術-PCR

- PCR(Polymerase Chain Reaction)放大技術- DNA複製技術
 - DNA雙股螺旋達一定熱度以上時即會分開成為單鏈
 - 此時加入引子(primer)，其自動與分開之單鏈結合並以其為模版進行複製
 - 降低溫度使其恢復為原先之雙股螺旋結構
 - 重覆上述三個步驟，就可依指數成長速度大量複製DNA
- 我們以Flash動畫說明其進行步驟，如下：

PCR放大過程—動畫

PCR的原理



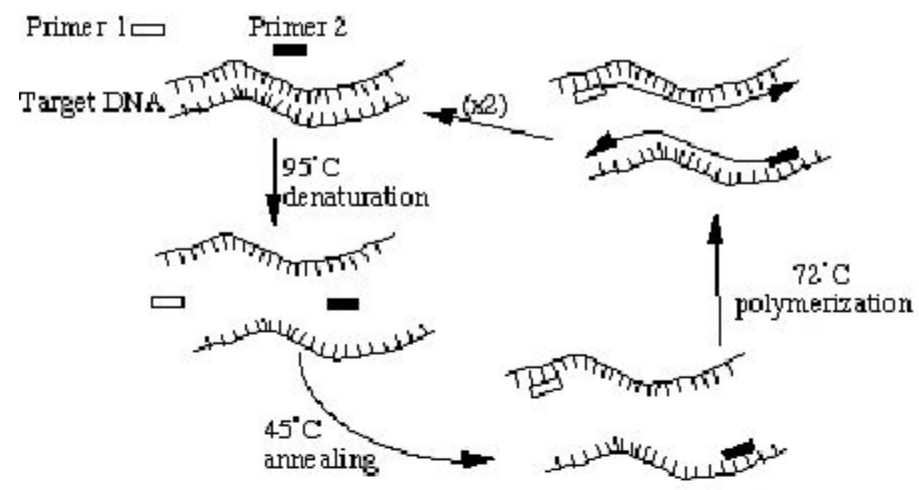
如何以PCR來
大量複製一段
特定的DNA?

下一頁 / Next



重新開始 / Replay

← PCR 流程簡圖

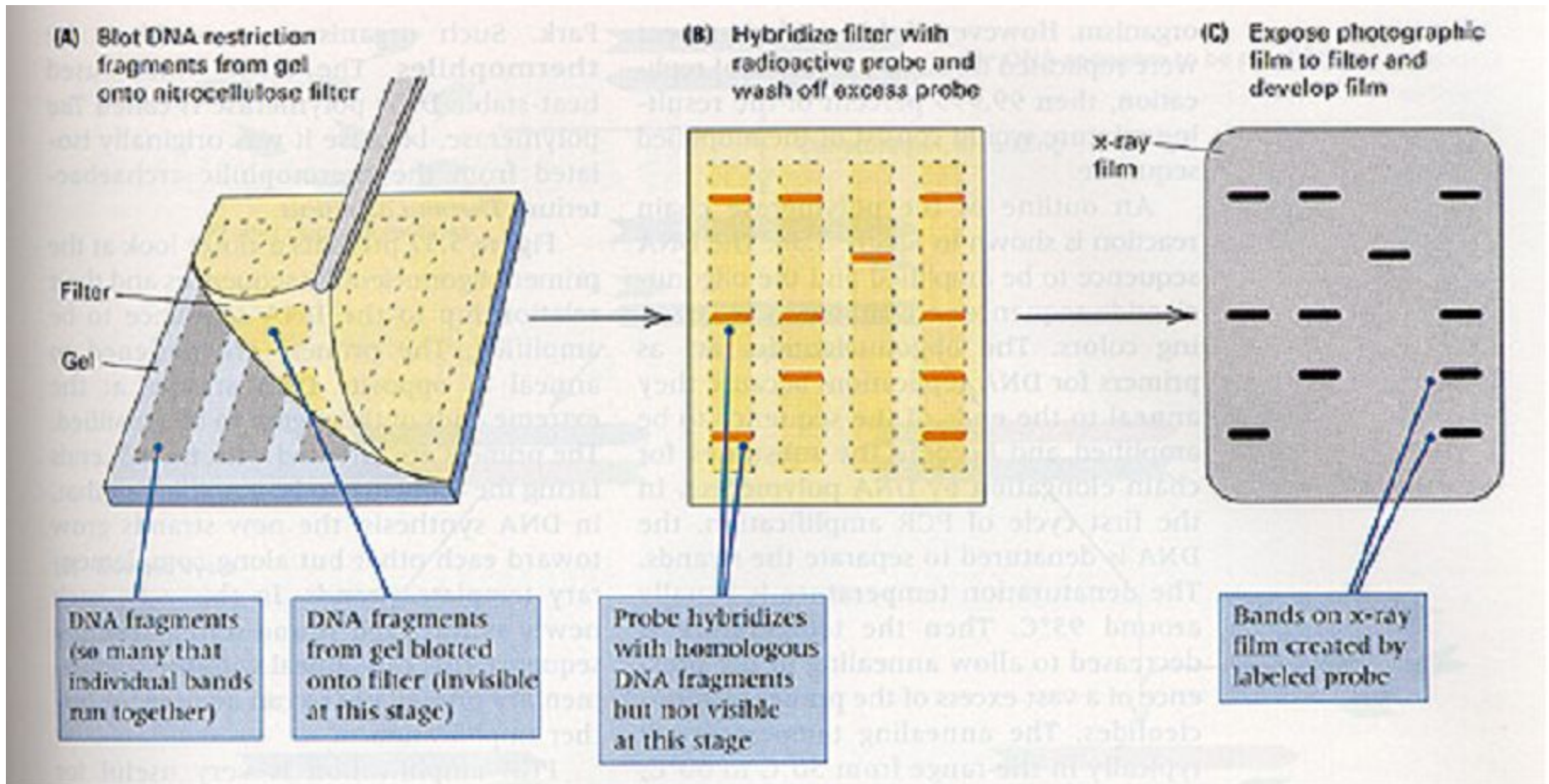


PCR 機器 →



分子生物技術 – 墨點技術

- 南方墨點(Southern Blot)、北方墨點(Northern Blot)、西方墨點(Western Blot) – 基因變異檢測技術
 - 先使用電泳法將大分子切開成小分子並予以分離
 - 將小分子轉印(blotting)至濾膜上
 - 用標記之探針(probes)與之進行雜交(hybridization)
 - 辨識雜交後之資訊，即可對有興趣的序列進行鑑定或分離



A. 電泳法後，將結果轉錄至濾膜上

B. 使用探針在膜上進行雜交

C. 辨識雜交結果，並對有興趣部份進行鑑定或分離

分子生物技術 – 墨點技術之異同

- 南方墨點法(Southern blotting)
 - 使用於DNA方面
- 北方墨點法(Northern blotting)
 - 使用於RNA方面
- 西方墨點法(免疫墨點法, Western blotting)
 - 使用於蛋白質方面
- 三者的使用流程及概念大致皆相同, 不同的是實驗材料有異。

南方墨點法(使用於DNA)

- Step 1: 將DNA片段先藉瓊脂凝膠電泳分開。
- Step 2: 藉“轉印 (blotting)”法將之轉移到一個硝酸纖維素濾膜上。
- Step 3: 採用放射性標記核酸探針 (radioactively labeled nucleic acid probes) 與之進行雜交 (hybridization) 。
- Step 4: 對感興趣的核酸序列進行鑑定或分離。

北方墨點法(使用於RNA)

- 進行步驟：
 - Step 1:使用凝膠電泳分離出RNA。
 - Step 2:轉移到其他的高分子擔體上固定。
 - Step 3:用標記之DNA探針雜交。
 - Step 4:對所要研究的RNA進行鑑定。
- 此方式的困難點在於RNA的處理較為費事。但藉由此方法，我們可以得到基因轉錄表現的第一手資訊。

西方墨點法(使用於蛋白質)

- 別名免疫墨點法，主要用於偵測抗原及研究抗體、抗原間的特異性。
- 進行步驟：
 - Step 1: 抗原蛋白質膠體電泳分析。
 - Step 2: 將分離的polypeptides轉移至轉移膜(membrane)上。
 - Step 3: 將膜上非特異性的結合位置覆蓋住。
 - Step 4: 加入抗體反應。
 - Step 5: 偵測

西方墨點的應用-檢測玉米是否基因改造-動畫

ELISA的原理

基因改造

非基因改造



如何以**ELISA**
來檢測這顆玉米
是否為基因改造
作物？

下一頁 / Next



重新開始 / Replay