

綜論 DNA 的生物物理研究

中央研究院 化學研究所
甘魯生

甲：引言

由於榮陽團隊宣佈第四號染色體千萬鹼基定序完成, DNA 與鹼基這兩個名詞被報章大幅報導, 引起了廣泛的注意. DNA 是由四種鹼基腺嘌呤 (A)、胸腺嘧啶 (T)、鳥糞嘌呤 (G) 及胞嘧啶 (C) 由五碳糖及磷酸連結成一條長鏈, 兩條 DNA 纏繞在一起而成染色體, 鹼基的順序承載所有的遺傳物質, 也就是一般所稱之基因. 人體有廿三對染色體, 大約共有十萬個基因(最新說法是只有四萬個), 每一基因可製成一個蛋白質(包括酵素). 蛋白質是營運生命的物質, 但是有些蛋白質在細胞數量太少, 或者在作用時才出現, 所以要發現細胞中所有的蛋白質是很困難的. 不過若能瞭解染色體鹼基順序, 就能找出所有的基因. 也就是找出了所有可能存在的蛋白質, 瞭解這些蛋白質的結構和功能, 可望找出生命的奧秘. 這是一個長遠的計畫.

近程的目標是改善生活的品質, 比如說是遠離疾病. 大體上說任何能改變蛋白質的生成和結構的物質都可統稱藥物或治療物質. 所以做為蛋白質源頭的 DNA 是理想的治療物質. 至目前為止可用在基因治療的核酸(包括 DNA)有

1. 反意義 RNA
2. 反意義基因

3. 核酸酵素(ribozyme)

有療效的寡核酸鏈(包括衍生鹼基)

1. 反意義寡核酸鏈
2. 核酸三螺旋
3. Aptamer

照說僅含四個鹼基的核酸的變化要遠比含二十個氨基酸的蛋白質為簡單. 但其實不然, 核酸結構隨其鹼基之順序而千變萬化. 上述之核酸有不同之功能就是因它們的結構不同. 所以生物物理對 DNA 之研究就在 DNA 之性質及結構. 希望藉這些基本知識可以設計出更有效的療效的核酸.

比如說要解決反意義寡核酸鏈要有幾個鹼基最為有效這個問題. 我們先考慮到人體的廿三對染色體大概有三十億的鹼基, 所以在統計上只要有十五或十六個鹼基的寡核酸鏈, 它的順序就能在人體中所有順序中發生一次. 由於我們有二十三對染色體, 所以最多有十四個鹼基就成了. 由這簡單的練習可知一個有效的反意義寡核酸鏈至少要有十四個鹼基才行.

那麼這十四個鹼基的成份是什麼才比較有效呢? 這要由鹼基對談起. 上述之四種鹼基分為兩組, 分別是嘌呤組的 A、G 與嘧啶組的 T、C, 這些鹼基位於 DNA 的兩股上, 會以 A—T, C—G 方式配對. 其中前者的穩定度為每對攝氏 2 度, 後者為 4 度. 換

句話說鹼基對的穩定並不相同的.人體的體溫為 37 度.所以穩定度在此之下的寡核酸鏈都不必考慮.這個問題可由下列方程式表示.

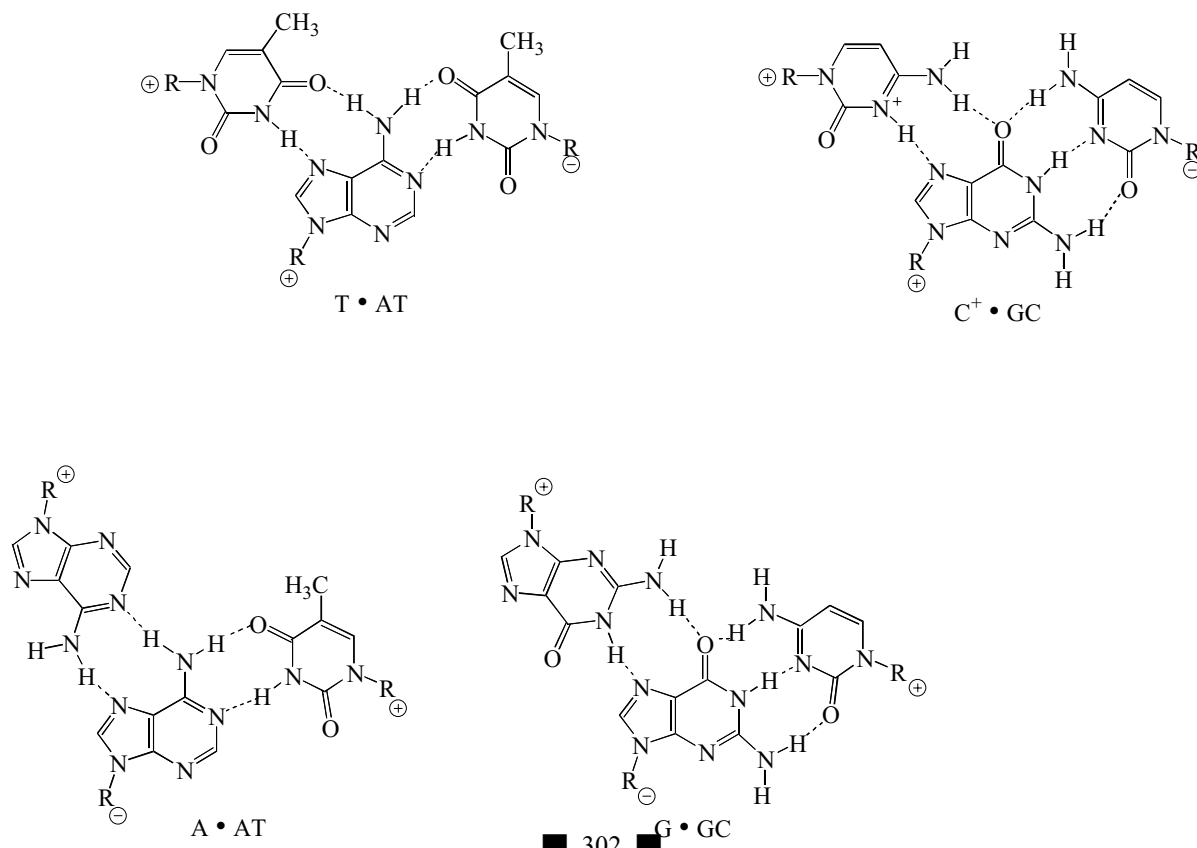
$4n + 2m > 37$, m 和 n 分別是 A-T 和 G-C 鹼基對數目經過簡單的運算可發現最大的 m 和最小的 n 都為 9 和 5.就是說全是 A-T 鹼基對的寡核酸鏈不是有效的.

由這兩個簡單的例子可看出生物物理在的研究在以基因治療為首的應用研究是不可缺的.

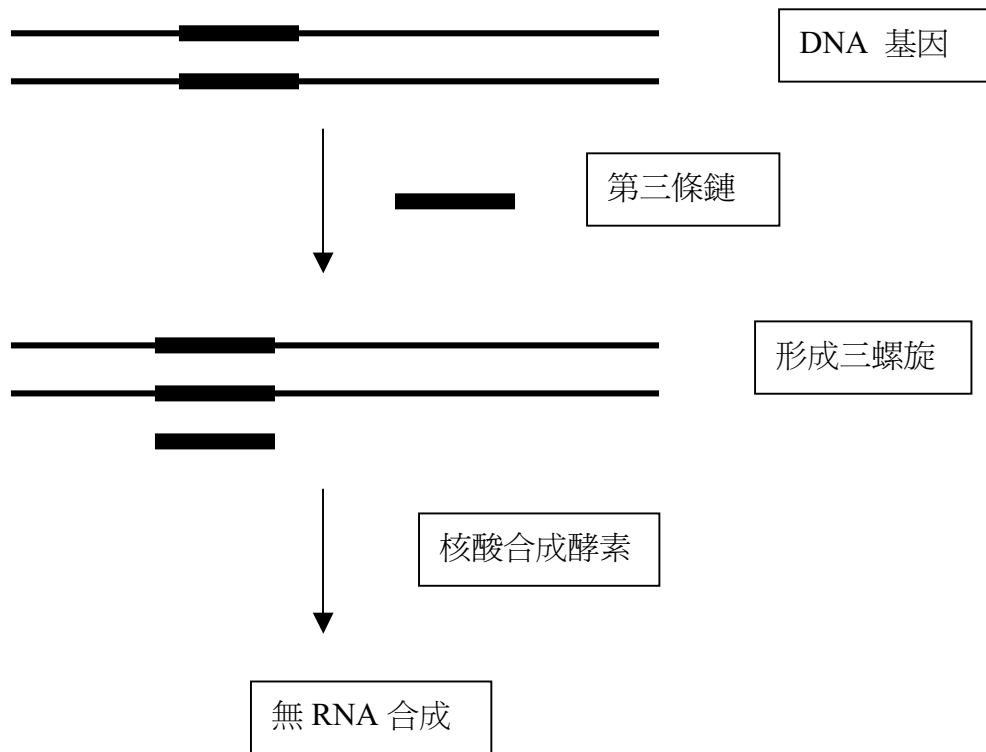
目前財團法人國家衛生院支持一項基因治療的研究團隊,所以我國有相當多的研究室致力於應用之研究,但相對的基礎研究比較少,據我所知有台北榮總的歐樂君及台大林淑萍研究反意義核酸,中興大學的周三和及張功耀研究 DNA 及 RNA 結構,中央研究院的鄭建中研究 DNA 和 RNA 與金屬離子之作用.我們實驗室則專攻 DNA 三螺旋.

顧名思義 DNA 三螺旋就是三條寡核酸鏈以氫鍵纏繞在一起,通常有嘧啶、嘧啶、嘧啶鹼基三組及如嘧啶、嘧啶、嘧啶鹼基三組(圖一),對於熟悉雙螺旋的人是相當顛覆的.其實早在 1957 年就有報導了.一直到 1980 年代的後期才獲得科學家的青睞,我們實驗室由 1990 年開始研究嘧啶、嘧啶、嘧啶型的螺旋三螺旋.它們提供了干擾 DNA 雙螺旋的方法,而且是可逆的.在應用上也比反意義核酸為廣.簡言之 DNA 三螺旋之應用有

- 1.反基因.如圖二所示這和反意義核酸的作用性質相似.但在細胞中通常基因只有一個,所以要比反意義核酸更符合經濟效應,應該更有效率.
- 2.干擾基因的運作.如圖三所示,在基因上有二個內切酵素的作用點, DNA 三螺旋之形成可選擇性



圖一 (上) 、 、 鹼基三組及(下) 、 、 鹼基三組. 請注意中間的鹼基是 .



圖二、轉錄之抑制. 粗線部份表示可形成三螺旋的順序.

的將其中一個切斷.

3. 探針之設計. 第三股寡 DNA 鏈可攜帶各種化學物質, 由鹼基順序可將之運送到基因之任何部位.
4. 反意義. 設計方式和反基因相反, 即探針是雙股 DNA. 它不但可和單股的 m-RNA 形成三螺旋, 也可以跨越 exon 和 intron 之銜接處. 三螺旋要比傳統的反意義用途更廣更多.

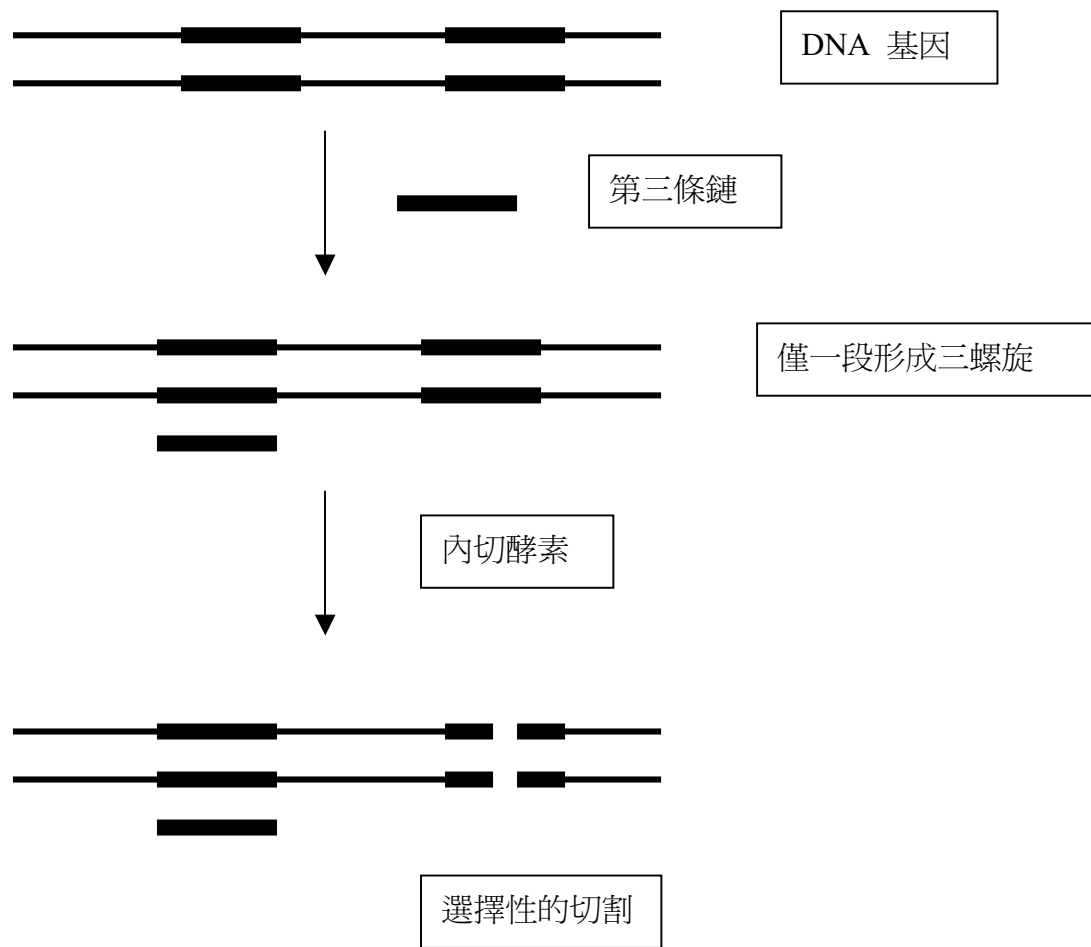
目前 DNA 三螺旋的基礎研究可分為四個方面.

1. 發展更安定的三螺旋, 瞭解它的性質及結構. 在應用上也可減少治療上用量.
2. 發展不受鹼基順序之三螺旋. 目前三螺旋之形成受鹼基之順序限制.

3. 發展可抗 DNA 分解酵素之三螺旋.
4. 發展可將探針載入細胞之化學物質.

乙：常用之研究方法

1. 紫外線光譜. 利用核酸鹼基 hypochromicity 之性質可測出三螺旋之形成之溫度, 所謂之熔點溫度是一半三螺旋一半非三螺旋之溫度, 它常被引用為三螺旋之穩定度的指標.
2. 圓二色光譜. 三螺旋有其特定之光譜可作為形成的指標.
3. 紅外線光譜. 由吸收峰的波長(或波數)可測得三螺旋之結構. 比如說若五碳醣之型構為 C2'-endo 的話則在 834 波數有一吸收峰. 此峰之出現表示核酸鏈中有 B-DNA 構型.



圖三、酵素作用之干涉。粗線部份表示可形成三螺旋的順序。

- 4.核磁共振圖譜.可測得三螺旋在水溶液中之結構.其缺點是試料用量較多(毫克),分子量不能太大.
- 5.X-光繞射.可測得固態三螺旋之結構.缺點是要先有結晶.
- 6.有機合成.所需之核酸鹼基衍生物若無法購得則需合成取得.

丙：結果

- 1.最短的 DNA 三螺旋 5'-AGAGAG + 5'
TCTCTCTTTTCTCTCT

要完成甲項下四個目的要先完成一個可供試驗的模型.先決條件是容易合成,穩定性高和成本低.上述之三螺旋僅含六個鹼基三組(圖四),它的熔點溫度由攝氏 30 到 46 度,視所含鹽的濃度而定.更可貴的是將上述之模型修改,我們發現只有五個鹼基三組也能形成核酸三螺旋(圖四),不過它的熔點溫度較低(17 至 26 度).所以五個鹼基三組比六個鹼基三組約低了 20 度,它提供了一個理想測試可形成鹼基三組的衍生物(註一).

- 2.鹼基三組之穩定度.

5' -T C⁺ T C⁺ T C⁺ T T (胡各斯汀(H)鏈)

5' -A G A G A G | (華森(W)鏈)

3' -T C T C T C T T (克立克(C)鏈)

5' -T C⁺ T C⁺ T C⁺ T T (胡各斯汀(H)鏈)

5' -A G A C A G | (華森(W)鏈)

3' -T C T C T C T T (克立克(C)鏈)

圖四 最短的 DNA 三螺旋. 它有一個 5'-AGAGAG 的華森鏈及一 5'-TCTCTCTTTCTCTCT 探針. 探針包含了克立克鏈及胡各斯汀鏈, 它彎回來和華森鏈形成三螺旋, 僅有三個 TAT 及三個 C⁺GC 鹼基三組(上). 若將華森鏈換成 5'-AGACAG, 則形成只有五個鹼基三組的三螺旋(下).

嘧啶、嘌呤、嘧啶鹼基三組有 TAT 及 C⁺GC 兩種(圖一). 它們穩定度可由特殊設計的三螺旋順序中測得, 比如說有一條三螺旋含有十六個 TAT 在 0.1 M 氯化鈉下之熔點溫度為 24 度, 那麼每一 TAT 的貢獻為 1.5 度. 含四個 TAT 及四個 C⁺GC 之三螺旋在同一條件下是 40 度, 那麼一個 C⁺GC, 有 8.5 度. 所以 C⁺GC 鹼基三組要比 TAT 穩定得多(註二).

3. 開發在中性溶液中形成 DNA 三螺旋.

C⁺GC 鹼基三組雖然穩定, 但要在弱酸狀況下才行. 要解除這一情況有求於胞嘧啶衍生物. 最先用到的是甲基胞嘧啶(mC). 甲基胞嘧啶的 pKa 比胞嘧啶要高, 所以在中性中質子化也比較容易. 比如說將圖四中的 C 換成 mC 之後在含

1.0M 氯化鈉中性溶液中熔點為 30 度. 雖然還不夠高, 但已提供了一個研究的方向(註三).

Pseudoisocytidine 之開發. Pseudoisocytidine 也是一種胞嘧啶的衍生物. 它不必質子化就可形成如圖一中之嘧啶、嘌呤、嘧啶鹼基三組(圖五). 我們的研究發現 Pseudoisocytidine 確可以取代胞嘧啶能在中性溶液中形成三螺旋(註四).

要將 pseudoisocytidine 嵌入寡 DNA 鏈中要先製備 pseudoisocytidine phosphoramidite synthon. 此物質是 DNA 合成儀的原料. 我們實驗室大概是全世界唯一擁有製造 pseudoisocytidine phosphoramidite synthon 的技術和成品.

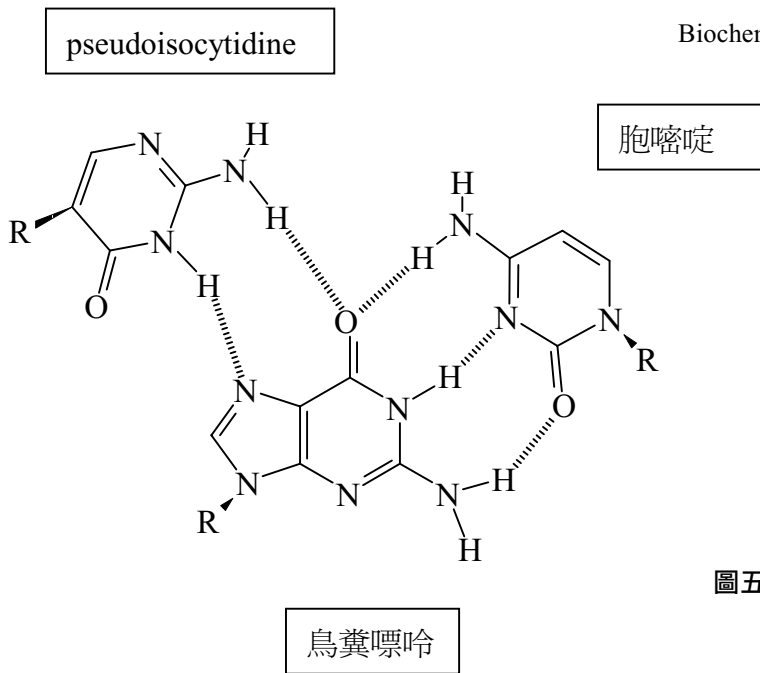
4. 三螺旋的結構

由圖一、四及五所示, 鹼基三組中間的那條

總是嘍呤,稱之為華森(W)鏈,和它成 DNA 雙螺旋的嘍啶鏈稱之為克立克(C)鏈.第三條鏈可為嘍呤,也可為嘍啶,我們稱之為胡各斯汀(H)鏈.在嘍啶、嘍呤、嘍啶三螺旋中,H 鏈之極性是和 W 鏈是一致.但在嘍呤、嘍呤、嘍啶三螺旋中,H 鏈之極性是和 W 鏈是相反的.H 鏈是藏 W-C 雙螺旋的大溝中.由紅外線光譜的數據顯示 W-C 雙螺旋是 B-DNA 構造,W-H 雙螺旋則是 A 和 B-DNA 之混合(註五).核磁共振圖譜之研究也得到同樣的結論.

5.利用磷酸根上之衍生物 Methylphosphonate 來抗 DNA 分解酵素

作為探針的 H-鏈常為細胞內 DNA 分解酵素分解而降低了效果.如果將磷酸根轉換為 methylphosphonate 則可避免.根據我們的研究發現含 methylphosphonate 之寡 DNA 鏈確可形成三螺旋(註六).



圖五、pseudoisocytidine、G、C 鹼基三組. 請注意無需質子化作用.

丁：結論

DNA 的結構隨鹼基順序而千變萬化,它的每一個環節都可以作為藥物.核酸三螺旋提供了一個直接干涉基因的方法.至今還有許多問題沒有答案,是一個值得開發的學門.

戊：參考資料

註一：J. Biomol. Str. Dyn., 1995, **12**, 1235-1245; 化學, 1996, **54**, 24-32.
 註二：J. Chin. Chem. Soc., 1994, **41**, 865-869.
 註三：Anti-Cancer Drug Design, 1994, **9**, 1-8; J. Biomol. Str. Dyn., 1997, **14**, 485-493.
 註四：J. Am. Chem. Soc., 1991, **113**, 4032-4033; J. Org. Chem., 1992, **57**, 3225-3230; J. Chin. Chem. Soc., 1997, **44**, 601-607.
 註五：J. Mol. Str. 1995, **372**, 241-247.
 註六：Biochemistry, 1991, **30**, 1650-1655; Biochemistry, 1996, **35**, 5495-5508.