

2017 諾貝爾化學獎—— 捕捉生物分子的私密生活

獲頒 2017 年諾貝爾化學獎的 3 位科學家發展出低溫電子顯微鏡技術，
可以凍結活動中的生物分子並解析其立體結構，
這個技術把生物化學帶入一個新領域。

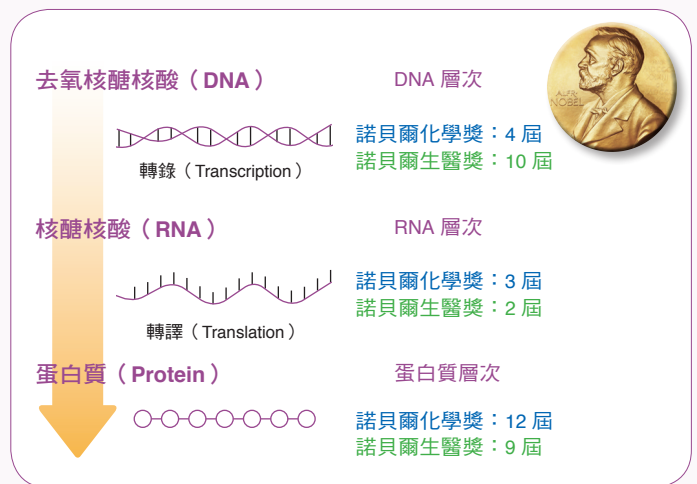
蕭世裕

探討生物分子立體結構

生物體的中心法則是把生物的密碼藏在去氧核糖核酸 (DNA) 裡面，經過轉錄的機制把這密碼複製到核糖核酸 (RNA) 中，再把它轉譯成蛋白質的胺基酸序列。蛋白質的種類繁多，而且每一種蛋白質功能各異，而這個功能往往與它的立體結構有密切的關係。

蛋白質的立體結構包括一級結構 (胺基酸的序列)、二級結構 (包括 α -螺旋體和 β -平面折疊體)、三級結構 (二級結構再經折疊而成)，有些蛋白質甚至含有兩個以上的蛋白質互相折疊作用而成，這就形成了蛋白質的四級結構。生物體內到底含有多少種蛋白質

呢？一個單細胞的大腸桿菌就含有 4 千種以上的蛋白質，多細胞人類的蛋白質更多達 7 萬種以上，生物體內複雜的工作絕大多數就是由這些蛋白質執行的。因此研究一個生物體的生命現象得先了解生物體中心法則的 3 個主角：去氧核糖核酸、核糖核酸以及蛋白質。



生物體的中心法則及歷屆諾貝爾獎獲獎分布情形

研究一個生物體的生命現象得先了解生物體中心法則的 3 個主角：
去氧核糖核酸、核糖核酸、蛋白質。

諾貝爾獎從 1901 年設立至今頒發給研究這 3 個領域的學者甚多。分析得獎者的領域以蛋白質的研究為最，2017 年獲頒諾貝爾化學獎的 3 位科學家 Jacques Dubochet（杜波克特）、Joachim Frank（法蘭克）和 Richard Henderson（韓得森）即是。他們發展出低溫顯微鏡技術，捕捉到在細胞膜或水溶液中活動的生物分子，包括蛋白質、核糖體（ribosome）、病毒等，並把其立體結構解析到原子層次。

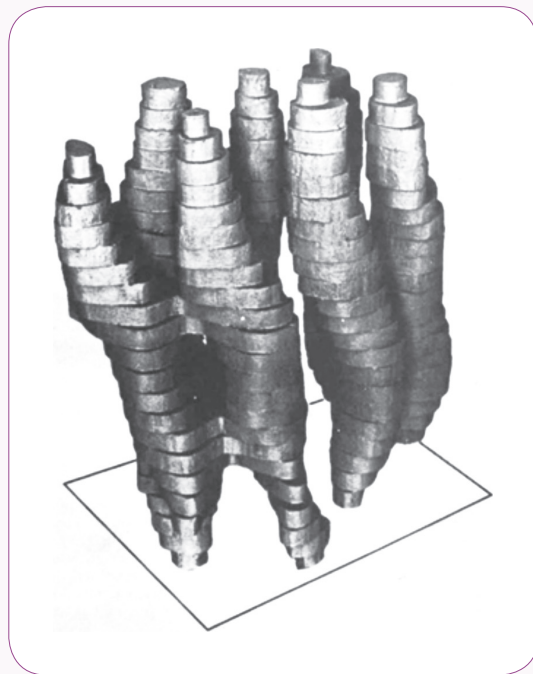
目前這個技術已廣泛使用，而且許多生物分子活動中的影像或立體結構也清楚地顯示出來。這不但幫助我們探討並了解這些生物分子的結構和功能，也讓我們能更深入地認識生物分子的祕密生活。

電子顯微鏡的發展歷史

古人常說「眼見為憑」，但自然界中有許多生物體雖是存在的，我們的肉眼卻看不到。17 世紀時，荷蘭生物學家虎克利用凸透鏡和一些簡單的設備做出一台顯微鏡。它的放大率雖然只有 40 倍，但已足以讓虎克觀察到單細胞的原生生物，如精子、細菌、紅血球等。

其後顯微鏡技術繼續改進，大幅改善了凸透鏡的品質及光源。目前光學顯微鏡的放大倍率已達 1,000X，解析能力是 200 nm。1920 年代，科學家甚至以加速的電子束取代可見光源，因為電子束移動時的波長比可見光短了 10 萬倍，使它的解析度大幅提高，不過聚集電子束的方式不是用凸透鏡，而是以磁場和電場來控制。此外，電子束經過的地方也須抽成真空，以減少氣體分子的干擾。

1931 年德國科學家盧斯卡（Ernst Ruska）成功地做出第一台電子顯微鏡，解析度達



韓得森於 1975 年發表第一個菌紫質的模型（圖片來源：Nature 257, 28-32, 1975）

100 nm，以這成就盧斯卡獲頒 1986 年的諾貝爾物理獎。時至今日，市面上使用的電子顯微鏡解析度更達 0.05 nm，放大倍率比光學顯微鏡高了 4,000 倍，比肉眼高了 4,000,000 倍。值得一提的是，解析度達到 0.05 nm 時，已經可以分辨出生物分子內原子間的影像了。

低溫電子顯微鏡的誕生

如同前面的介紹，以電子顯微鏡觀測時，樣品必須置於真空中且要能抵擋電子束的能量才可以獲得影像。這對於生物分子的樣品是個很大的挑戰，因為：第一，絕大多數的生物分子須存在於水溶液中，一旦置於真空環境中，水蒸發了，生物分子就會變質並喪失活性；第二，生物分子

大都由蛋白質、核糖核酸、去氧核糖核酸或脂肪分子組成，非常脆弱，無法抵擋高能量的電子束。

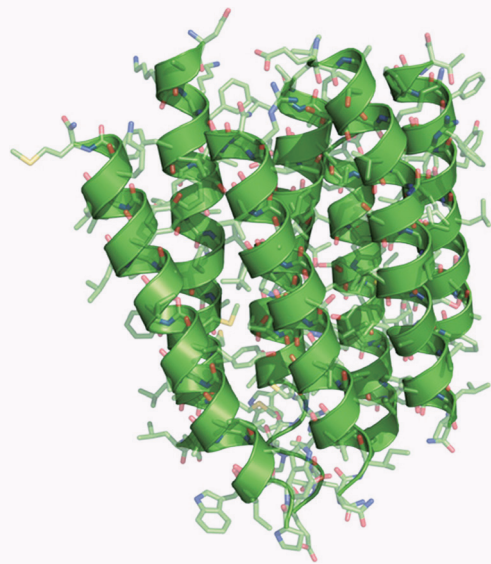
為了解決這兩個挑戰，韓得森選擇了一種來自光合菌的細胞膜蛋白質，稱為菌紫質（bacteriorhodopsin），做為研究的對象。由於菌紫質存在於細胞膜上，主要與脂肪為伍，這樣品置於真空中時，只需在表面加上一些葡萄糖溶液，就可以保護蛋白質不會乾掉變質。另外再使用較低能量的電子束穿過樣品，就可降低對樣品的破壞。利用這個方法，韓得森於 1975 年建構出第一個菌紫質的立體結構。影像的解析度是 0.7 nm，雖然不是很好，但已經可以看到菌紫質穿越細胞膜 7 次的結構。

接下來的幾年，隨著電子顯微鏡鏡片品質的提升，和利用液態氮冷凍樣品以降低電子束的破壞，韓得森於 1990 年又發表了解析度達到原子等級的菌紫質結構。他向世人證明除 X-ray 晶體繞射技術外，低溫電子顯微鏡也可解析蛋白質的 3D 立體結構。

X-ray 晶體繞射技術 vs. 低溫電子顯微鏡技術

X-ray 晶體繞射技術已廣泛應用於生物分子 3D 立體結構的解析，使用這個技術時須先把測試的蛋白質分離純化出來，接著在溫和的條件下讓蛋白質結晶，再把蛋白質晶體置入 X-ray 儀器中以獲得繞射影像圖譜。這個方法的優點是解析度很高，可以達到原子的層級，缺點是必須先獲得蛋白質晶體才能進一步測試其結構。

反觀利用低溫電子顯微鏡分析菌紫質的結構時，只要使它在細胞膜上整齊堆疊就可以了，不需要先取得菌紫質的結晶體。接下來韓得森希望把這個技術推廣到那些



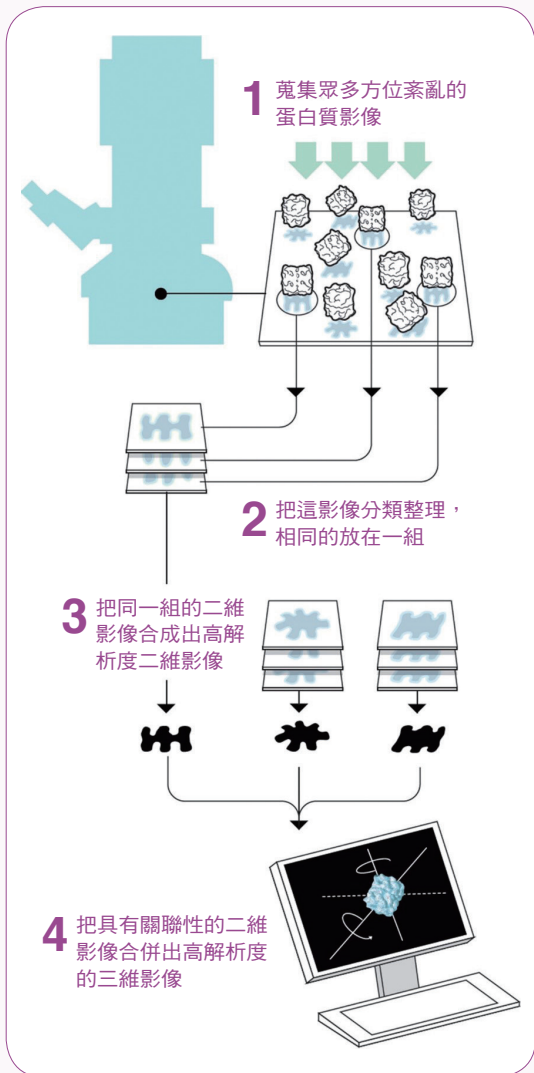
韓得森於 1990 年發表解析度已達原子層級的菌紫質結構（圖片來源：2017 年諾貝爾化學獎新聞稿）

隨機分散在水溶液中的蛋白質或其他生物分子，這又是一個很大的挑戰，因為這些蛋白質或生物分子在水溶液中是以散亂方向排列的，如何才能在眾多的二維圖像中整理分析出三維的高解析度影像呢？

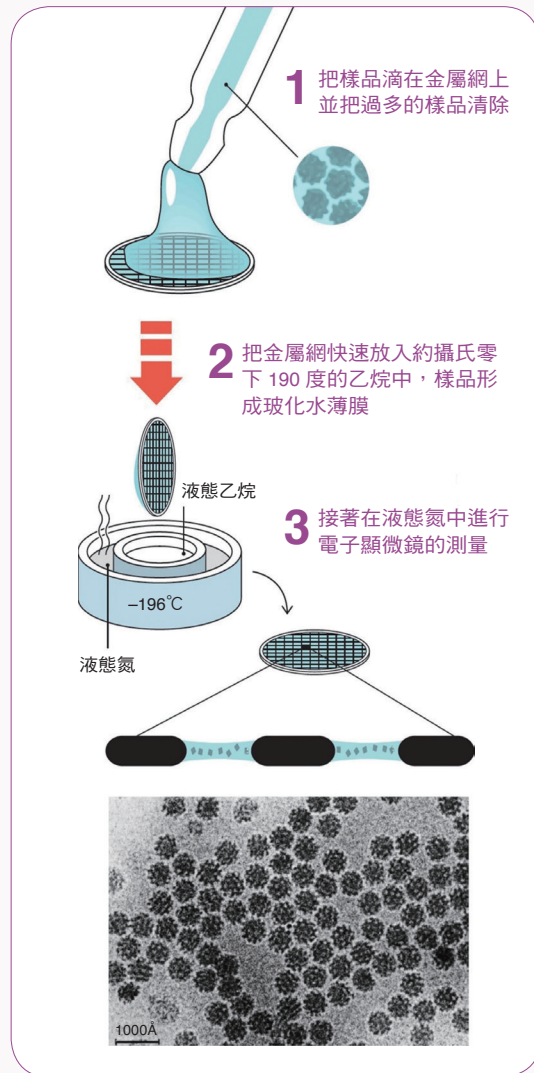
分析眾多影像的方法

1975 年法蘭克提出一個理論來解決這個問題，並花了十多年證實這個理論。簡單地說，他開發出一種數學方法，可以利用電腦分析以電子顯微鏡所獲得的眾多方位紊亂的蛋白質影像，把相同的影像放在一組，並合成高解析度的二維影像，然後以電腦計算這些不同二維影像間的關聯性後，再合併出高解析度的三維影像。

1980 年代中期，法蘭克發表了這影像分析方法，並利用它做出核糖體表面模型。核糖體是細胞內的蛋白質合成機器，2009 年諾貝爾化學獎頒給 3 位科學家（尤娜斯、史泰茲、拉馬克里斯南）就是表彰他們對核糖體結構和功能研究的卓越貢獻。



法蘭克發表的影像分析步驟（圖片來源：2017年諾貝爾化學獎新聞稿）

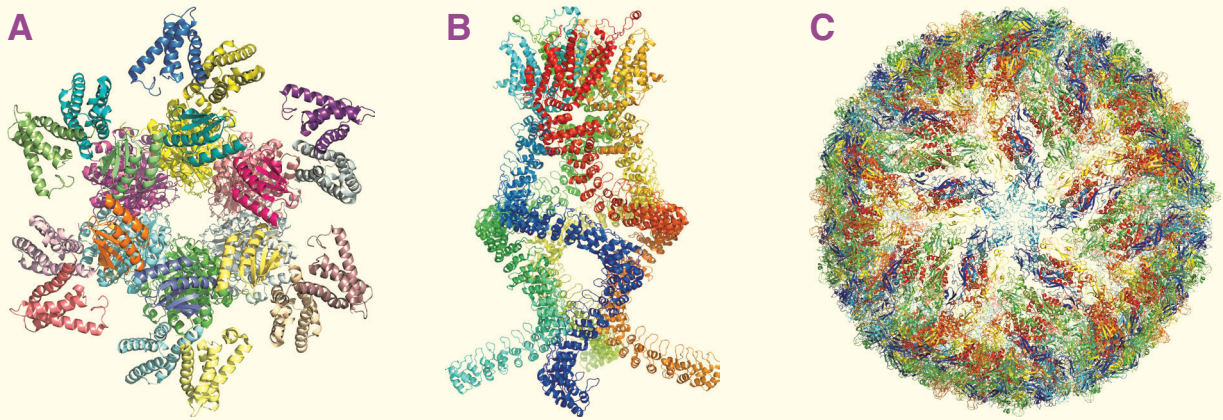


杜波克特發表製作玻化水的步驟和捕捉到玻化水中病毒的影像（圖片來源：2017年諾貝爾化學獎新聞稿，病毒圖片刊登於 Nature 308, 32-36, 1984）

應用玻化水技術提升影像對比

1975年韓得森利用葡萄糖溶液保護細胞膜上的菌紫質，以避免其脫水而變質，可是這個方法不能應用於水溶液中的生物分子。於是其他研究人員只好把樣品置入液態氮中使其快速冷凍形成冰晶，藉冰晶的保護避免生物分子脫水，也降低其受到電子束的

破壞。但冰晶會干擾電子束並降低影像的解析度，於是杜波克特想到一個讓水快速冷卻但不會形成冰晶的方法，那就是形成玻化水（vitrified water）。相對於冰晶是水分子以有次序的結晶方式排列，玻化水內的水分子則是以無次序的狀態排列。



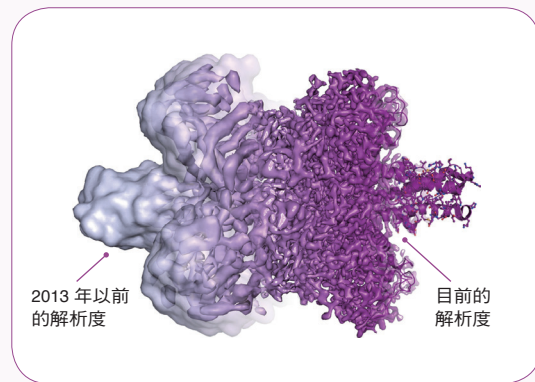
【利用低溫電子顯微鏡技術解析】

A：一個控制晝夜節律的蛋白質錯合物、B：一個能感應壓力變化的蛋白質錯合物、C：茲卡（Zika）病毒。
（圖片來源：2017 年諾貝爾化學獎新聞稿）

杜波克特的方法是，首先把水溶液的樣品滴到一片金屬網上，使它形成薄膜後把過多的樣品移除，再把這金屬網快速置入攝氏零下 190 度的液態乙烷中。這時樣品中的水溶液會形成玻化水而不是冰晶，接著在攝氏零下 196 度液態氮中收集與分析電子顯微鏡的影像。由於玻化水是以無次序的方式排列，因此電子束會被均勻地繞射而在影像中產生均勻的背景，如此就可以很清楚地區分出樣品中生物分子的影像。1984 年杜波克特就利用這技術發表了許多病毒的影像，讓世人可以一窺世界上最小生物的倩影。

從團塊學到結構生物學

從 1975 年韓得森利用電子顯微鏡捕捉到第一個生物分子菌紫質的影像後，他就深信這個方法有朝一日可以像 X-ray 繞射技術一樣解析出生物分子的立體結構。雖然當時他捕捉到的菌紫質影像就像是 7 條麵糰捏出來的模型，只能看出這個蛋白質穿



低溫電子顯微鏡的解析度大幅提升，從 2013 年以前團塊學的解析度到現今的原子層級解析度。
（圖片來源：2017 年諾貝爾化學獎新聞稿）

透細胞膜 7 次及外觀的形狀，並無法看到胺基酸層次甚至原子層次的結構。

相同地，法蘭克在 1991 年利用杜波克特製造玻化水的方法製備核醣體，樣品經低溫電子顯微鏡收集影像後，再用他發明的影像分析方法合併出第一張電子顯微鏡版的核醣體模型，當時也只能看出核醣體的外型及表面的起伏。

低溫電子顯微鏡技術已經可以輕鬆地看到生物分子的原子層次結構，
並廣泛用來解析各種蛋白質和病毒的結構。

低溫電子顯微鏡捕捉到的影像是生物分子即時的活動照片，而不僅是排列整齊的晶體照片。

但低溫電子顯微鏡技術在韓得森、法蘭克和杜波克特 3 個人從不同的角度改善，以及其他研究人員在低溫顯微鏡硬體方面的改進，包括聚焦鏡片，捕捉影像的螢幕等。目前的技術已經可以輕鬆地看到這些生物分子的原子層次結構，並廣泛用來解析各種蛋白質和病毒的結構。

由於低溫電子顯微鏡技術所需的樣品處理方法很簡單，因此可以應用到絕大多數的生物分子，例如在水溶液中或在細胞膜上的生物分子、細菌、病毒等。雖然 X-ray 繞射技術也可以做這些解析，但它需先經過結晶的步驟，才得以進行後續的工作。

更重要的是，低溫電子顯微鏡捕捉到的影像是生物分子即時的活動照片，而不僅是排列整齊的晶體照片。顯然地，這個技術讓我們得以窺視這些生物分子在細胞或生物體內的真實生活，或許也可以讓我們了解生物體的奧祕。

蕭世裕
成功大學化學系

