เอกสารคำสอน
วิชา
ชีววิทยาระดับโมเลกุลเบื้องต้น

มารินา เกตุทัต- คาร์นส์
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	
บทที่ 1 พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular Genetics)	1
บทที่ 2 กรดนิวคลีอิก (Nucleic acids)	15
บทที่ 3 กระบวนการถ่ายแบบ DNA (DNA Replication)	31
บทที่ 4 การถอดรหัส (Transcription)	52
บทที่ 5 การแปลรหัส (Translation)	68
บรรณานุกรม	89

สารบัญ

หน้า

คำนำ

บทที่ 1 พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular Genetics) 1

วิถีการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรม (Central Dogma) 1

DNA replication หรือ การถ่ายแบบ DNA 1

Transcription หรือ การถอดรหัส 4

Translation หรือ การแปลรหัส 4

RNA replication หรือ การถ่ายแบบ RNA 4

Reverse Transcription 4

กระบวนการซ่อมแซม DNA (DNA repair) 11

วิศวพันธุศาสตร์ (Genetic engineering) 12

บทที่ 2 กรดนิวคลีอิก (Nucleic acids) 15

กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) 15

กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) 15

น้ำตาลเพนโทส (Pentose) 15

เบสไนโตรเจน (Nitrogenous base) 16

นิวคลีโอไซด์ (Nucleoside) 17

ชนิดของนิวคลีโอไซด์ 17

การเรียกชื่อนิวคลีโอไซด์ 17

นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) 18

ชนิดของนิวคลีโอไทด์ 19

การเรียกชื่อมอโนนิวคลีโอไทด์ 20

นิวคลีโอไทด์ที่มีฟอสเฟตมากกว่า 1 หมู่ 20

ไซคลิกนิวคลีโอไทด์ (cyclicnucleotide) 20

พอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) 20

โครงสร้างทั่วไป 20

พันธะโคเวเลนต์ของสายพอลินิวคลีโอไทด์ 20

กรดดีออกซิไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid, DNA) 21

แหล่งที่พบ ขนาดและรูปร่างโมเลกุล 21

ลักษณะสำคัญของ DNA เกลียวคู่ 22

โครงสร้างเกลียวคู่แบบอื่น ๆ ของ DNA 25

โครงสร้างที่เกิดจากลำดับเบสพิเศษบนโมเลกุลของ DNA 25

หน้า

สมบัติของ DNA 27

สมบัติในการดูดกลืนแสงของ DNA 27

กรดไรโบนิวคลีอิก (Ribonucleic acid, RNA) 28

โครงสร้างทั่วไป ขนาดและรูปร่างของโมเลกุล 28

แหล่งที่พบและชนิดต่าง ๆ ของ RNA 28

โครโมโซม (Chromosome) 29

บทที่ 3 กระบวนการถ่ายแบบ DNA (DNA Replication) 31

เอนไซม์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายแบบ DNA 32

DNA polymerase I 33

DNA polymerase II 35

DNA polymerase III 35

ขั้นตอนการถ่ายแบบ DNA ใน *E. coli* 37

ขั้นตอนการเริ่มต้น (initiation step) 37

ขั้นตอนการสร้างสาย DNA (elongation step) 38

การสังเคราะห์ leading strand 41

การสังเคราะห์ lagging strand 43

ขั้นตอนสิ้นสุดการสร้างสาย DNA (termination step) 44

การถ่ายแบบ DNA ในยูคาริโอต 46

การซ่อมแซม DNA (DNA repair) 47

วิธีการซ่อมแซมโดยการตัดออก (excision repair) 48

วิธีการตัดเบสออก (base excision repair) 48

วิธีการตัดนิวคลีโอไทด์ออก (nucleotide excision repair) 48

วิธีการซ่อมโดยตรง (direct repair) 49

วิธีการซ่อมแบบมีการแลกเปลี่ยนส่วนของ DNA 51

บทที่ 4 การถอดรหัส (Transcription) 52

เอนไซม์ RNA polymerase 52

ขั้นตอนการถอดรหัสใน *E. coli* 54

ขั้นตอนการเริ่มต้น (Initiation) 56

ขั้นตอนสร้างสาย RNA (Elongation) 57

ขั้นตอนการสิ้นสุดการถอดรหัส (Termination) 59

กระบวนการถอดรหัสในยูคาริโอต 59

การตัดแต่งและดัดแปลง RNA หลังการถอดรหัส 59

หน้า

การเติม 5'-cap 60

การเติม 3'poly (A) tail 62

RNA splicing 64

กรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลง rRNA 64

กรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลง tRNA 67

บทที่ 5 การแปลรหัส (Translation) 68

รหัสพันธุกรรม (genetic code) 69

การจับจำเพาะระหว่าง mRNA และ tRNA 70

ไรโบโซมเป็นแหล่งสังเคราะห์โปรตีน 73

tRNA (transfer RNA) 74

การเชื่อมต่อกรดอะมิโนกับ tRNA จำเพาะ 76

ขั้นตอนการแปลรหัสใน *E.coli* 77

- ขั้นตอนการเริ่มต้น (chain initiation) 77
- ขั้นตอนการเพิ่มความยาวของสายเพปไทด์ (chain elongation) 79
- ขั้นตอนยุติการสร้าง (chain termination) 84

การดัดแปลงโมเลกุลภายหลังการแปลรหัส 85

- การตัดบางส่วนของโมเลกุลออก (Proteolytic Cleavage) 86
- การเติมโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต (glycosylation) 87
- การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond formation) 88
- การติดหมู่พรอสเทติก (attachment of prosthetic group) 88
- การเติมหมู่คาร์บอกซิล (carboxylation) 88
- การเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) 88
- การเติมหมู่เมทิล (methylation) 88
- การเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) 88

บรรณานุกรม 89

คำนำ

เอกสารคำสอนเล่มนี้จัดทำขึ้นเป็นครั้งแรก เมื่อได้รับการทาบทามจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ให้พัฒนากลุ่มสาระการเรียนรู้ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ เมื่อต้นปี พ.ศ. 2547 ซึ่งในกลุ่มสาระการเรียนรู้นี้มี ศ.ดร.อมเรศ ภูมิรัตน์ เป็นที่ปรึกษา และ รศ.ดร.ประสาทพร สมิตะมาน เป็นประธานกลุ่ม ดิฉันได้รับมอบหมายให้เป็นกรรมการและรับผิดชอบในการพัฒนาส่วนของ ชีววิทยาระดับโมเลกุล

จากนั้นได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง เพื่อใช้ประกอบการเรียนการสอนรายวิชาชีววิทยาระดับโมเลกุลทั้งในระดับปริญญาตรีและเป็นพื้นฐานสำหรับบัณฑิตศึกษาที่ยังขาดพื้นฐานทางด้านนี้

ดิฉันใคร่ขอขอบคุณนักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่าน ที่ได้ลงเรียนในรายวิชา 304512 ชีววิทยาระดับโมเลกุลของพืช ตั้งแต่ภาคการศึกษาที่ 3/2548-3/2550 ที่ได้ช่วยกันพัฒนาปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องของเอกสารคำสอนนี้ ขอขอบคุณผู้เขียนรูป และ website ต่างๆ ที่ได้ รังสรรค์ สื่อที่สวยงาม และแบ่งปันให้กับผู้ที่สนใจได้ศึกษาใช้ประโยชน์อย่างเสรี ทั้งนี้ดิฉันพยามยามที่จะแนบแหล่งที่มาของรูปภาพให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้

ดิฉันใคร่ขอขอบคุณ คุณอนันตศักดิ์ ลุนจันทา คุณเศกสิทธิ์ ชำนาญศิลป์ และคุณสุรชัย รัตนสุข ที่ได้ช่วยเหลือในหลายๆ ด้านจนทำให้เอกสารคำสอนนี้คลอดออกมาได้ ตั้งแต่ยุค 2547 จนถึงเล่มล่าสุดที่ได้ใช้งานในภาคการศึกษาที่ 3/2550 นี้

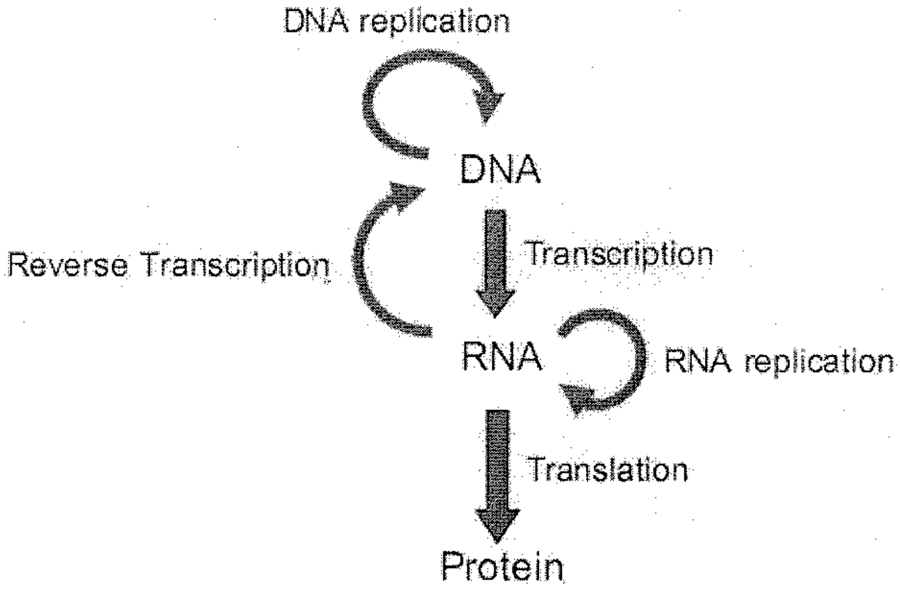
ดิฉันใคร่ขอขอบคุณ บิดา มารดา สามีและธิดาทั้งสอง ที่ให้ความรู้ คุณธรรม กำลังใจ และสอนความเป็น "ครู" ให้แก่ดิฉัน เสียดายที่บิดามิได้มีชีวิตอยู่จนเห็นเอกสารคำสอนนี้ออกมาเป็นรูปเป็นร่างสมบูรณ์ แต่ท่านก็ได้เคยอ่านมาแล้วในยุคแรกๆของเอกสารนี้ ในช่วงที่ท่านอยากจะเรียนรู้ศาสตร์ทางชีวะวิทยาระดับโมเลกุล

เอกสารคำสอนนี้จะสำเร็จลงไม่ได้หากปราศจากความช่วยเหลือจากทุกๆ ท่าน ที่ได้กล่าวถึงและไม่ได้กล่าวถึง อย่างไรก็ตาม หากมีความผิดพลาดประการใดในเอกสารคำสอนเล่มนี้ ดิฉันขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทที่ 1 พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular Genetics)

Molecular Genetics หรือ พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล คือ วิชาที่ศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล โดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับชีวโมเลกุลหลัก 3 ชนิด คือ DNA, RNA และ โปรตีน ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ "ข้อมูลพันธุกรรม" (genetic information) ถูกกำหนดด้วย DNA ยกเว้นในไวรัสบางชนิดที่มี RNA เป็นสารพันธุกรรม ข้อมูลพันธุกรรมที่เก็บใน DNA หรือ RNA เป็นตัวกำหนดลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตที่สามารถสืบทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ ในพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ลักษณะที่แสดงออกหมายถึงโปรตีน โดยวิถีการถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมจาก DNA ไปสิ้นสุดที่โปรตีนประกอบด้วย 3 กระบวนการหลัก คือ การถ่ายแบบ, การถอดรหัส และ การแปลรหัส แต่อย่างไรก็ตามวิถีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมทั้งหมดตั้งแต่ DNA ผ่าน RNA จนสิ้นสุดที่โปรตีน เรียกว่า "Central Dogma" โปรตีนซึ่งเป็นผลสุดท้ายของกระบวนการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจะเป็นตัวกำหนดลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่า phenotype เช่น สีผิวของมนุษย์ รูปร่างและสีของกลีบดอกไม้ สีขนของนก สีตาของแมลง เป็นต้น

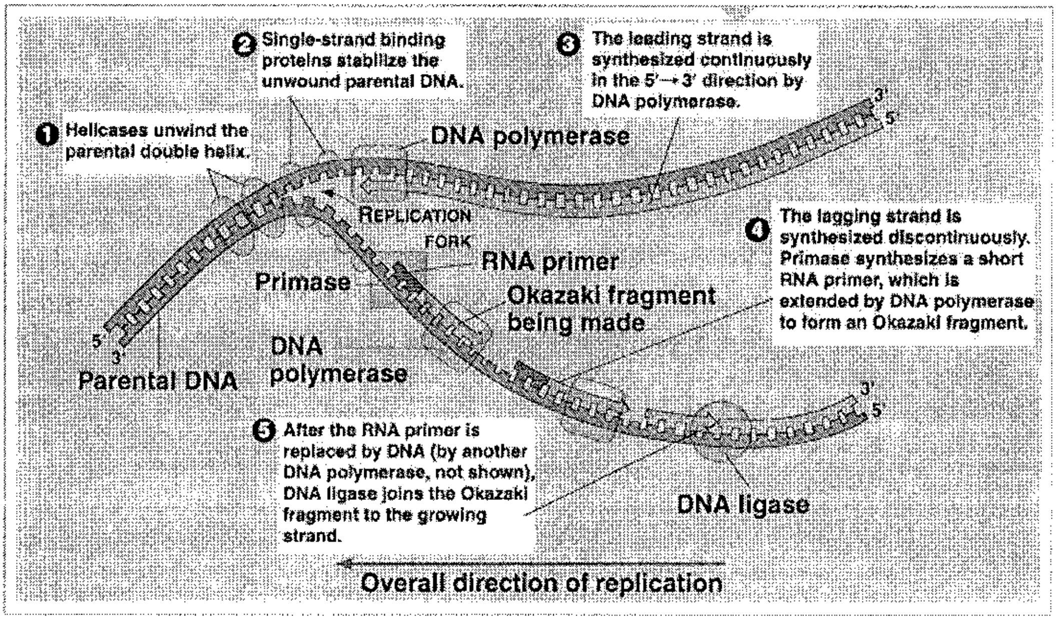


รูปที่ 1-1 Central Dogma (ที่มา: Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry 2 nd edition. 1993; หน้า 881)

วิถีการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรม Central Dogma ประกอบด้วย 5 กระบวนการ คือ

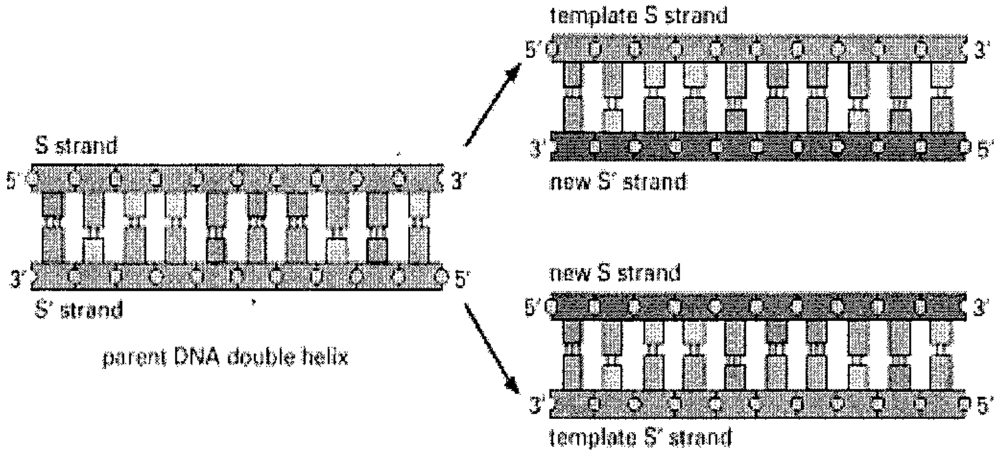
1.) DNA replication หรือ การถ่ายแบบ DNA คือ การจำลองตัวเองของ DNA โดยใช้ DNA เส้นเดิมเป็นแม่แบบ (template) ในการสังเคราะห์ DNA เส้นใหม่ที่เป็นเส้นคู่สม (complementary strand) ได้เส้น DNA เกลียวคู่ (double helix DNA) คู่ใหม่ที่ประกอบด้วย DNA เส้นแม่แบบกับ complementary strand ที่สร้างขึ้นใหม่ เรียกการสังเคราะห์แบบนี้ว่า "การสังเคราะห์แบบกึ่งอนุรักษ์" (semi-conservative)

ก)



http://library.thinkquest.org/04apr/00217/images/content/74-Summary-DNA-Replication.jpg

ข)

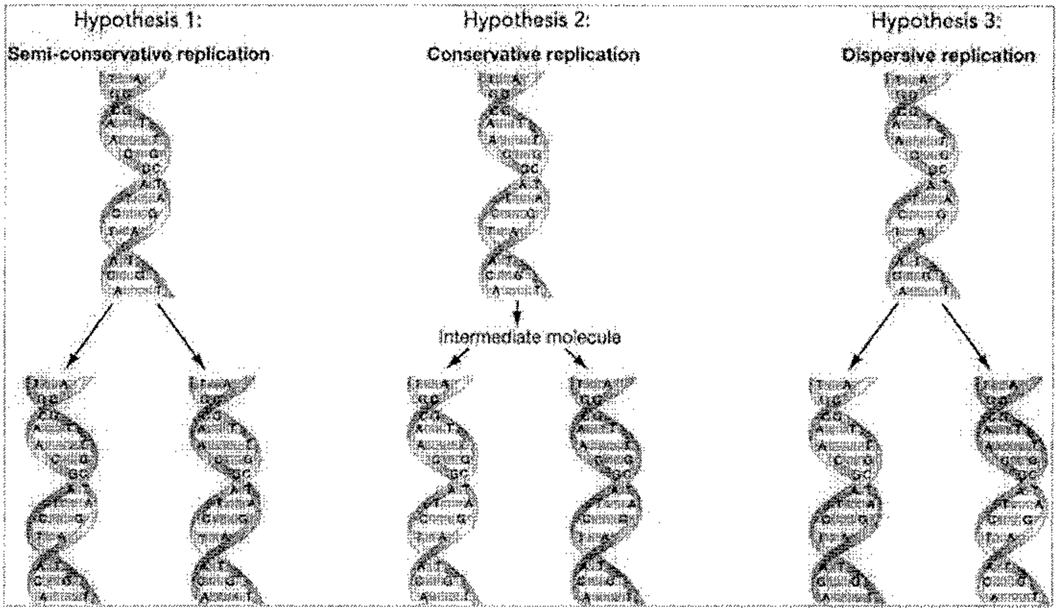


http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=template,dna&rid=mboc4.figgrp.604

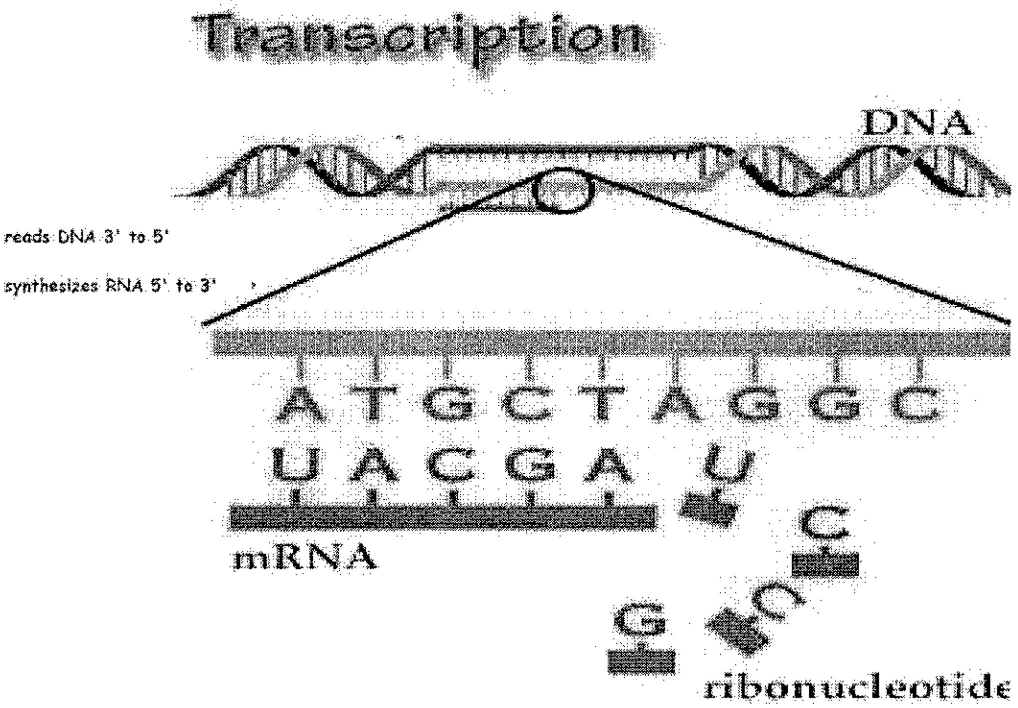
รูปที่ 1-2 การถ่ายแบบ DNA (DNA replication)

ก) ขั้นตอนในการถ่ายแบบ DNA

ข) ผลที่ได้จากการถ่ายแบบ DNA



รูปที่ 1-3 การถ่ายแบบ DNA เป็นแบบกึ่งอนุรักษ์ (semi-conservative)
fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/sf12x1.jpg



รูปที่ 1-4 การถอดรหัส (Transcription) http://gotoknow.org/file/tomkku/Transcription.JPG)

2.) <u>Transcription หรือ การถอดรหัส</u> คือ การสังเคราะห์ RNA โดยใช้ DNA เส้นใดเส้นหนึ่งเป็นแม่แบบ โดย RNA เส้นที่เกิดจะเป็นคู่สม (complementary) กับเส้น DNA แม่แบบ หลังจากนั้น RNA ต้นกำเนิดที่เกิดขึ้นจะถูกตัดแต่งและดัดแปลง เรียกกระบวนการนี้ว่า "posttranscriptional modification" ซึ่งกระบวนการนี้จะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิตและชนิดของ RNA

3.) <u>Translation หรือ การแปลรหัส</u> คือ การสังเคราะห์โปรตีน โดยมี RNA เป็นแม่แบบ รหัสพันธุกรรม (genetic code) ใน RNA ที่ถอดรหัสมาจาก DNA เป็นตัวกำหนดลำดับกรดอะมิโน (amino acid) ในโปรตีน เช่นเดียวกันกับกระบวนการถอดรหัส โปรตีนที่เกิดขึ้นใหม่นี้ จะถูกตัดแต่งและดัดแปลง (posttranslational modification) จากนั้นจะถูกส่งไปทำหน้าที่จำเพาะต่าง ๆ

4.) <u>RNA replication หรือ การถ่ายแบบ RNA</u> คือ การจำลองตัวเองของ RNA เกิดขึ้นเฉพาะกับไวรัสบางชนิดที่มี RNA เป็นสารพันธุกรรม โดยเอนไซม์ที่สำคัญ คือ RNA replicase ซึ่งจะมีความจำเพาะเฉพาะกับ RNA ของไวรัสนั้น ๆ เท่านั้น เอนไซม์นี้จะถูกสร้างขึ้นหลังจากที่ RNA ของไวรัสบุกรุกเข้าไปในเซลเจ้าบ้าน (host cell) โดยอาศัยโปรตีนและแฟกเตอร์ต่าง ๆ ของเซลเจ้าบ้าน กระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ ไม่ได้เป็นแบบ semi-conservative เหมือน DNA replication กลไกที่เกิดขึ้นมีความยุ่งยากและซับซ้อน ยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด

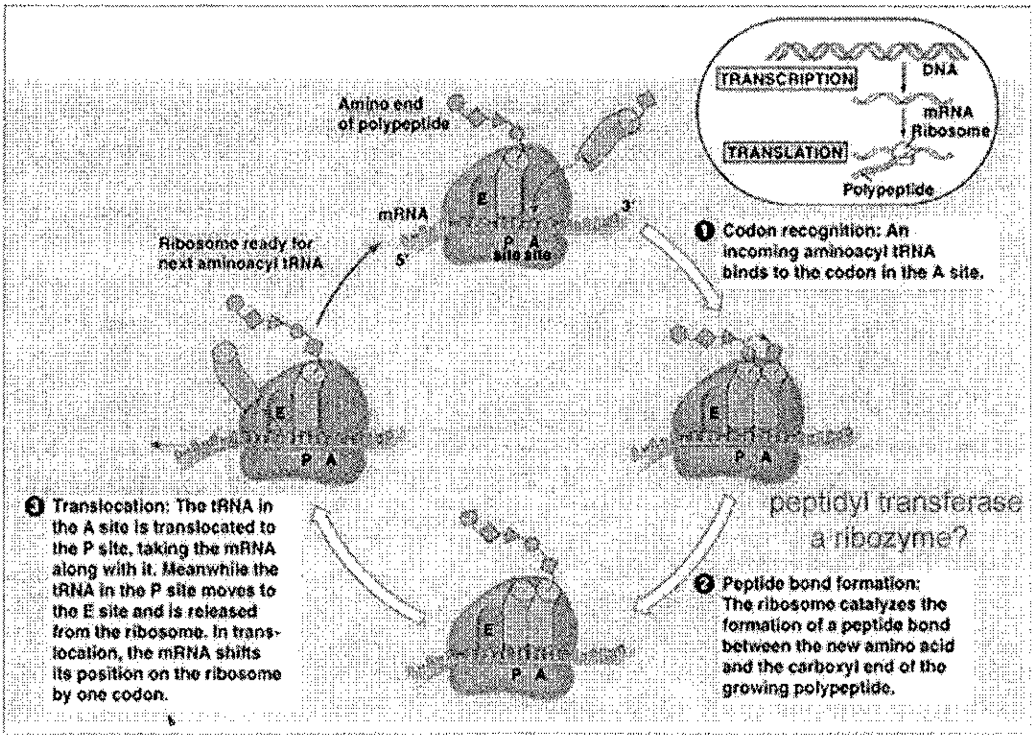
5.) <u>Reverse Transcription</u> คือ การสังเคราะห์ DNA โดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ ได้ DNA-RNA hybrid หลังจากนั้น RNA จะถูกย่อยสลายและในขณะเดียวกันก็มีการสร้าง DNA เข้าแทนที่สาย RNA ที่ถูกย่อยสลายไปทำให้เกิดเป็น DNA เกลียวคู่ที่สามารถเชื่อมต่อกับ DNA ของเซลเจ้าบ้านได้ โดยกระบวนการเหล่านี้มีเอนไซม์ reverse transcriptase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยา เช่นเดียวกับ RNA replication กระบวนการนี้เกิดขึ้นในไวรัสที่มี RNA เป็นสารพันธุกรรมและกลไกไม่เป็นแบบ semi-conservative

เนื่องจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งในเชิงขององค์ประกอบและชนิดของสารพันธุกรรม ดังนั้น สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจึงใช้วิธีการและขั้นตอนในกระบวนการทั้ง 5 ข้างต้นที่แตกต่างกันออกไป

การถ่ายทอดพันธุกรรมระดับโมเลกุลในเซลสิ่งมีชีวิตชั้นสูงหรือยูคาริโอต (Eukaryote) เซลสิ่งมีชีวิตชั้นสูงมีความสลับซับซ้อนกว่าเซลชนิดอื่น ๆ ในเซลชนิดนี้มีนิวเคลียสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่เก็บรักษาสารพันธุกรรมที่เรียกว่า "DNA" DNA ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจะถูกจัดเก็บอยู่ในรูปของโครโมโซม โครโมโซมเป็นโครง-สร้างพิเศษที่ประกอบด้วย DNA เส้นคู่ปลายเปิดพันอยู่กับโปรตีน Histone เพื่อเป็นการสะดวกในการจัดเก็บและแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมระดับโมเลกุล การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลในเซลสิ่งมีชีวิตชั้นสูงประกอบด้วยสามขั้นตอนหลัก คือ Replication, Transcription และ Translation

มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

มกราคม 2550

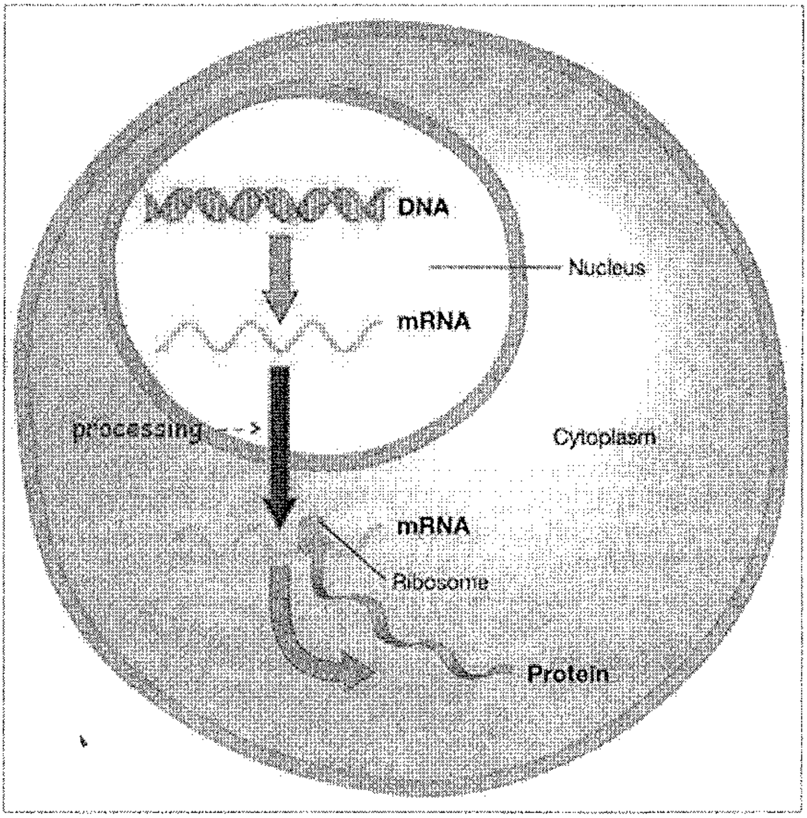


รูปที่ 1-5 การแปลรหัส (Translation)

(http://fajerpc.magnet.fsu.edu/Education/2010/Lectures/27_Protein_Synthesis_II.htm)

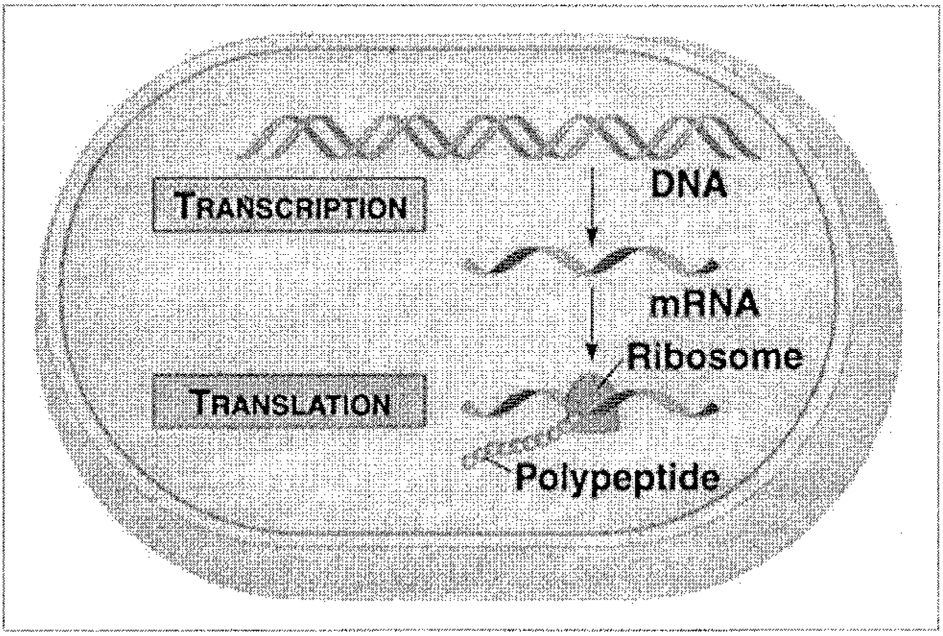
ตารางที่ 1-1 รหัสพันธุกรรม (genetic code) ใน RNA ที่เป็นตัวกำหนดลำดับกรดอะมิโน (amino acid) http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/sf11x10.jpg

First base	Second base: U	Second base: C	Second base: A	Second base: G	Third base
U	UUU, UUC – Phenyl-alanine UUA, UUG – Leucine	UCU, UCC, UCA, UCG – Serine	UAU, UAC – Tyrosine UAA Stop codon UAG Stop codon	UGU, UGC – Cysteine UGA Stop codon UGG Tryptophan	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG – Leucine	CCU, CCC, CCA, CCG – Proline	CAU, CAC – Histidine CAA, CAG – Glutamine	CGU, CGC, CGA, CGG – Arginine	U C A G
A	AUU, AUC, AUA – Isoleucine AUG Methionine start codon	ACU, ACC, ACA, ACG – Threonine	AAU, AAC – Asparagine AAA, AAG – Lysine	AGU, AGC – Serine AGA, AGG – Arginine	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG – Valine	GCU, GCC, GCA, GCG – Alanine	GAU, GAC – Aspartic acid GAA, GAG – Glutamic acid	GGU, GGC, GGA, GGG – Glycine	U C A G



รูปที่ 1-6 การถ่ายทอดพันธุกรรมระดับโมเลกุลในเซลสิ่งมีชีวิตชั้นสูงหรือยูคาริโอต (Eukaryote)

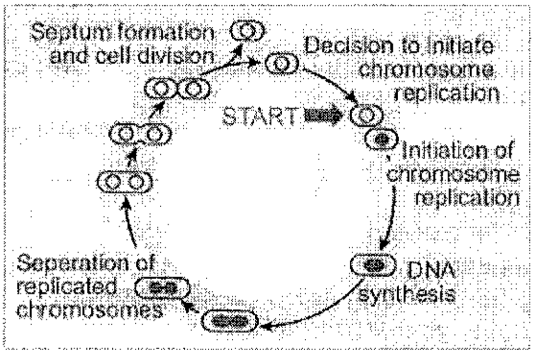
http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/sf11x6.jpg



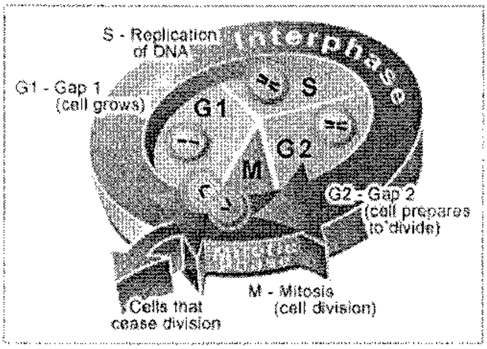
รูปที่ 1-7 การถ่ายทอดพันธุกรรมระดับโมเลกุลในเซลสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำหรือโปรคาริโอต (Prokaryote)

http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/17x2proc.jpg

ก)



ข)



รูปที่ 1-8 การเพิ่มจำนวนชุดของ DNA โดยกระบวนการถ่ายแบบ DNA ซึ่งเกิดขึ้นก่อนที่จะมีการแบ่งเซล

ก) Prokaryotic cell

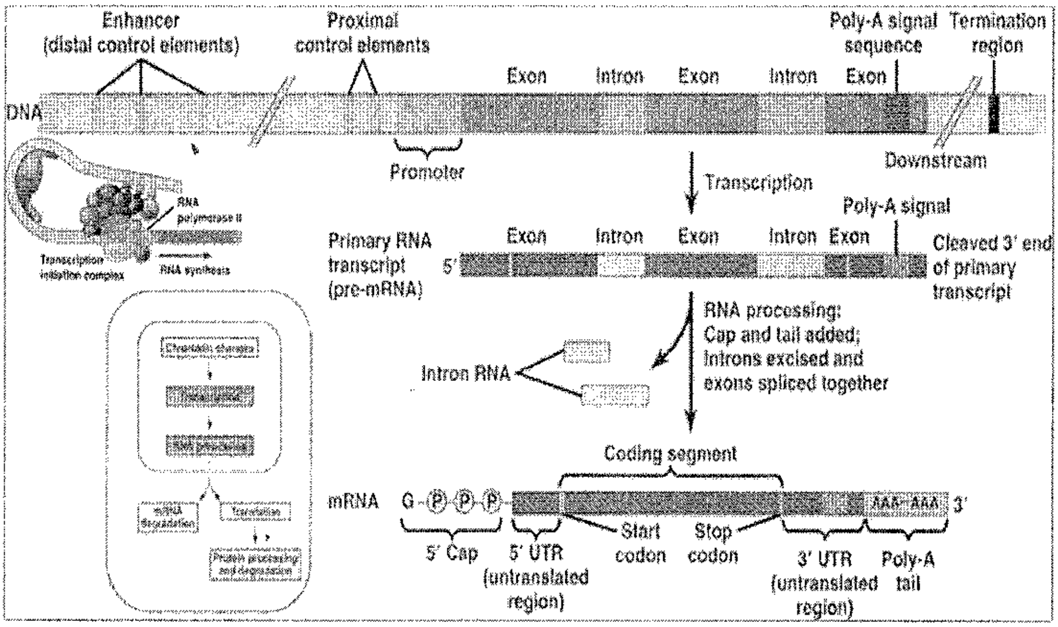
http://www.virtuallaboratory.net/Biofundamentals/lectureNotes/AllGraphics/BacterialCellCycle.jpg

ข) Eukaryotic cell

http://www.scq.ubc.ca/the-cell-cycle-a-universal-cellular-division-program/

1). Replication หรือ กระบวนการถ่ายแบบ DNA เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นก่อนที่จะมีการแบ่งเซล (cell division) เกิดขึ้นในนิวเคลียส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของ DNA ในการแบ่งเซลร่างกาย (mitosis) DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นจะถูกแบ่งไปยังเซลทั้งสองที่เกิดใหม่ ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมีการแบ่งเซลพิเศษ คือ การแบ่งเซลสืบพันธุ์ (meiosis) ทั้งเซลสืบพันธุ์เพศผู้ (เสปิร์ม, sperm) และเซลสืบพันธุ์เพศเมีย (ไข่, egg) เป็นเซลที่มีลักษณะทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลแตกต่างจากเซลร่างกาย (somatic cell) ของพ่อและแม่ โดยจะมีจำนวนชุด DNA หรือโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของเซลร่างกายพ่อแม่ นอกจากนี้ลำดับของ DNA ที่ทำหน้าที่ถ่ายทอดการแสดงออกของแต่ละยีนอาจมีความแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย อันเป็นผลมาจากกระบวนการ *Recombination* กระบวนการนี้เกิดขึ้นหลังจากที่การถ่ายแบบ DNA เสร็จสิ้น โครโมโซมที่เป็น homologous กันจะมาเข้าคู่และทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนลำดับ DNA บางส่วนของแต่ละยีนแบบกึ่งสุ่มและผสมผสาน เป็นผลทำให้โครโมโซมมีความแตกต่างกันในระดับโมเลกุล (DNA) 2). Transcription หรือ การถอดรหัส คือ กระบวนการสังเคราะห์ RNA โดยใช้ DNA เป็นแม่แบบกระบวนการนี้เกิดขึ้นภายในนิวเคลียส RNA ต้นกำเนิดที่เกิดขึ้นนี้จะยังไม่สามารถทำงานได้ จะต้องถูกตัดแต่งและดัดแปลงไปเป็น RNA ชนิดต่าง ๆ เสียก่อน เช่น mRNA, tRNA, rRNA ฯลฯ การตัดแต่งและดัดแปลง RNA ทั้งหมดเกิดขึ้นภายในนิวเคลียสเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ จากนั้นจึงถูกส่งไปทำหน้าที่ตามส่วนต่าง ๆ ภายในเซลซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ภายนอกนิวเคลียส 3). Translation หรือ การแปลรหัส กระบวนการนี้เป็นการแปลรหัสจาก mRNA ไปเป็นโปรตีน เกิดขึ้นใน cytoplasm ในยูคาริโอตการแปลรหัสกับการถอดรหัสบนสาย mRNA เดียวกันไม่สามารถเกิดขึ้นพร้อมกันได้ เนื่องจาก mRNA ถูกสร้างภายในนิวเคลียส แต่ Ribosome ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนปรากฎอยู่ที่ Cytoplasm ถึงแม้ว่า Ribosome จะถูกสร้างที่นิวคลีโอลัส (nucleolus) ภายในนิวเคลียส แต่เนื่องจาก Ribosome ส่วนใหญ่ที่สังเคราะห์เสร็จจะถูกส่งมาที่ cytoplasm อีก

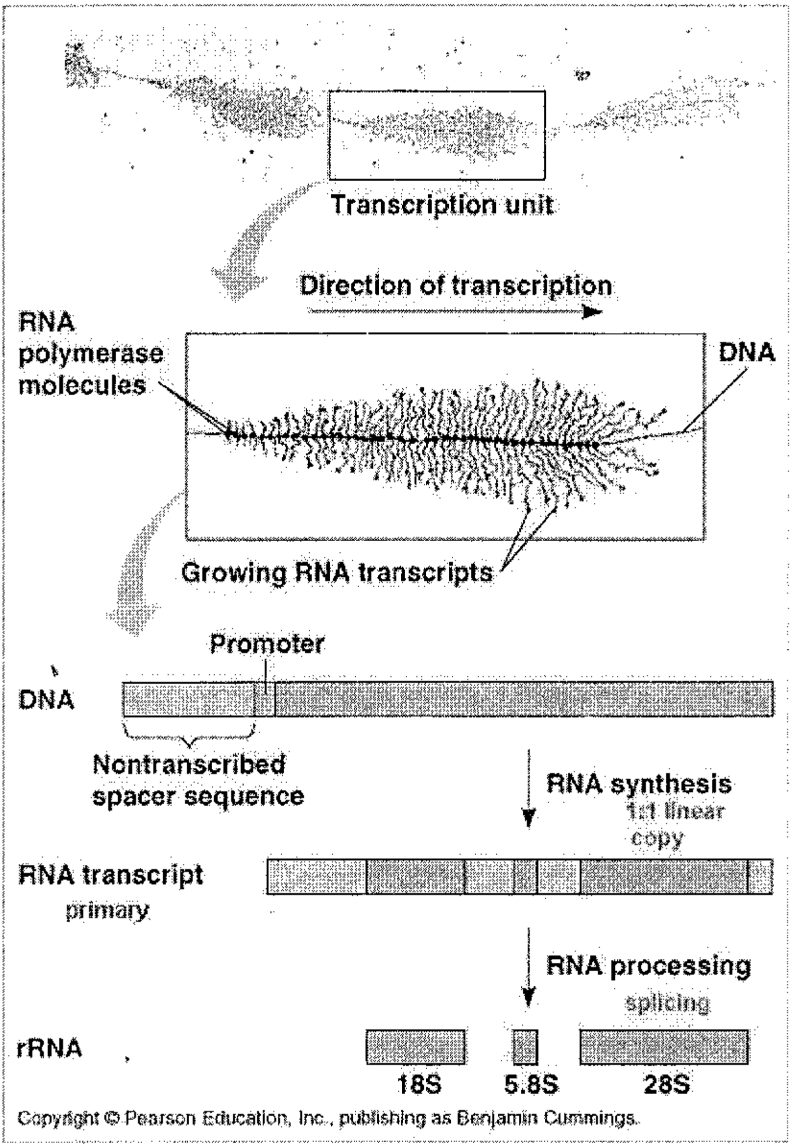
ทั้งองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน เช่น tRNA, กรดอะมิโน และปัจจัยสังเคราะห์ (factor) ต่าง ๆ ปรากฏอยู่ใน cytoplasm เช่นกัน การถ่ายทอดพันธุกรรมระดับโมเลกุลในเซลสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำหรือโปรคาริโอต (Prokaryote) มีความคล้ายคลึงกับยูคาริโอต กล่าวคือ ประกอบด้วยสามขั้นตอนหลัก คือ Replication, Transcription และ Translation เช่นกัน แต่เนื่องจากโปรคาริโอตมีความซับซ้อนน้อยกว่า ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ทำให้ Transcription และ Translation สามารถเกิดควบคู่ไปพร้อม ๆ กันได้ โครโมโซมของโปรคาริโอตและพลาสมิดมีลักษณะคล้ายกันคือเป็นแบบวงกลมปิดไม่พันอยู่กับ Histone ทำให้ Replication ของพันธุโมเลกุลทั้งสองมีความคล้ายกัน แต่แตกต่างจากโครโมโซมของยูคาริโอต ในสิ่งมีชีวิตที่ต่ำกว่าโปรคาริโอต เช่น ไวรัสมีโครงสร้างของอนุภาคที่ไม่ซับซ้อนอีกทั้งพันธุโมเลกุลมีเพียง DNA หรือ RNA เท่านั้น จึงเป็นเหตุให้วิถีการถ่ายทอดพันธุกรรมระดับโมเลกุล แตกต่างออกไปจากสิ่งมีชีวิตสองกลุ่มแรกดังได้กล่าวไว้ข้าวต้นเป็นอย่างมาก กล่าวคือ อาจเกิดขึ้นจากเพียงหนึ่งขั้นตอนหรือมากกว่าในวิถี Central dogma เช่น RNA replication, Reverse transcription ฯลฯ หรืออาจเกิดร่วมกับกลไกพิเศษบางอย่างเช่น Recombination ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ



โมเลกุลและปฏิสัมพันธ์กับเซลเจ้าบ้าน

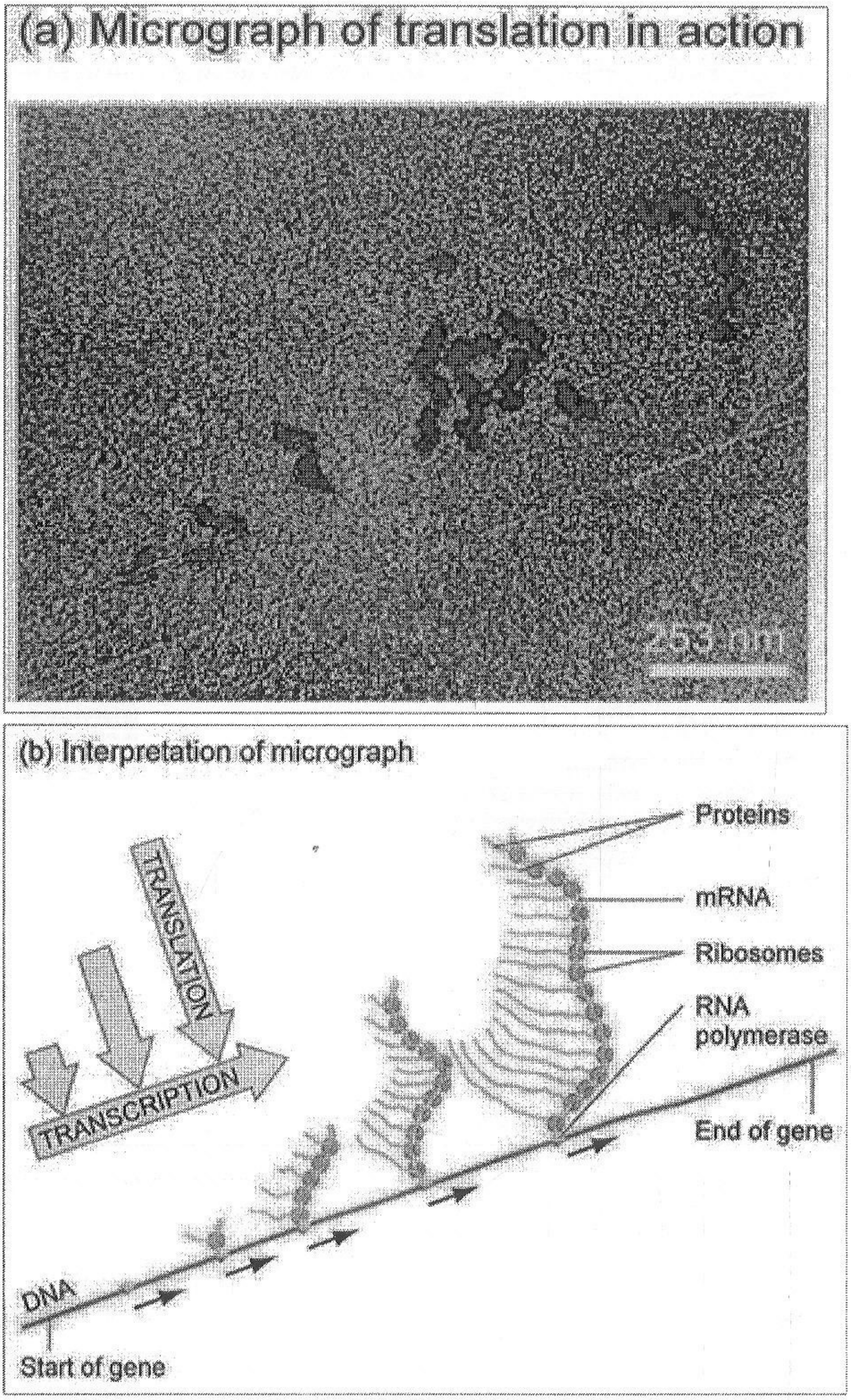
รูปที่ 1-9 ตัวอย่างกระบวนการตัดแต่งดัดแปลง RNA หลังการถอดรหัส ซึ่งต้องมีการเติม 5' Cap, 3' Poly-(A) tail และ splicing ซึ่งเป็นการตัดส่วนที่เรียกว่า intron (ซึ่งเป็นส่วนที่จะไม่ถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนและแทรกอยู่ระหว่าง Exon) ทิ้งไป และคงเหลือไว้เฉพาะส่วน Exon (ซึ่งเป็นส่วนที่จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีน) เพื่อให้ได้ mRNA ที่สมบูรณ์ โดยกระบวนการนี้เกิดขึ้นเฉพาะในยูคาริโอต

(http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.19.5.summary.jpg)



รูปที่ 1-10 ตัวอย่างกระบวนการตัดแต่งดัดแปลง RNA หลังการถอดรหัส โดยการ splicing หรือการตัดบางส่วนของ RNA ที่ได้จากการถอดรหัสใหม่ ๆ เพื่อให้ได้ rRNA ที่สมบูรณ์ เช่น 18S, 5.8S, และ 28S rRNA ซึ่งเป็น rRNA ในยูคาริโอต

(http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/19x2rRNA.jpg)



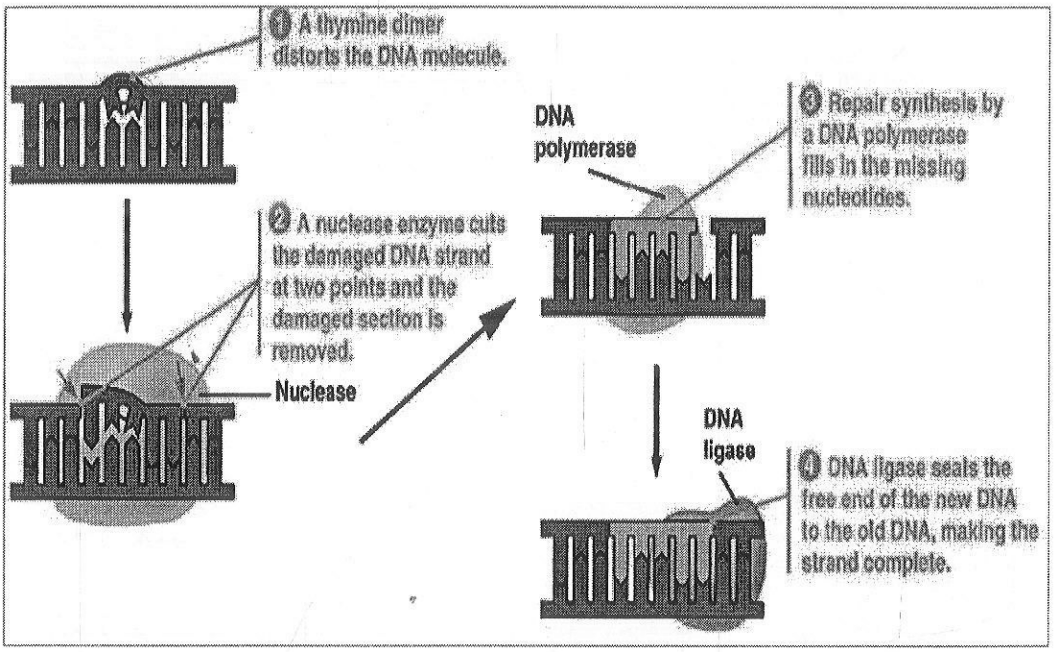
รูปที่ 1-11 กระบวนการถอดรหัส (Transcription) และ การแปลรหัส (Translation) ในโปรคาริโอต สามารถเกิดควบคู่ไปพร้อม ๆ กัน (Cotranscription-translation)

(http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/translationEM.htm)

มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

มกราคม 2550

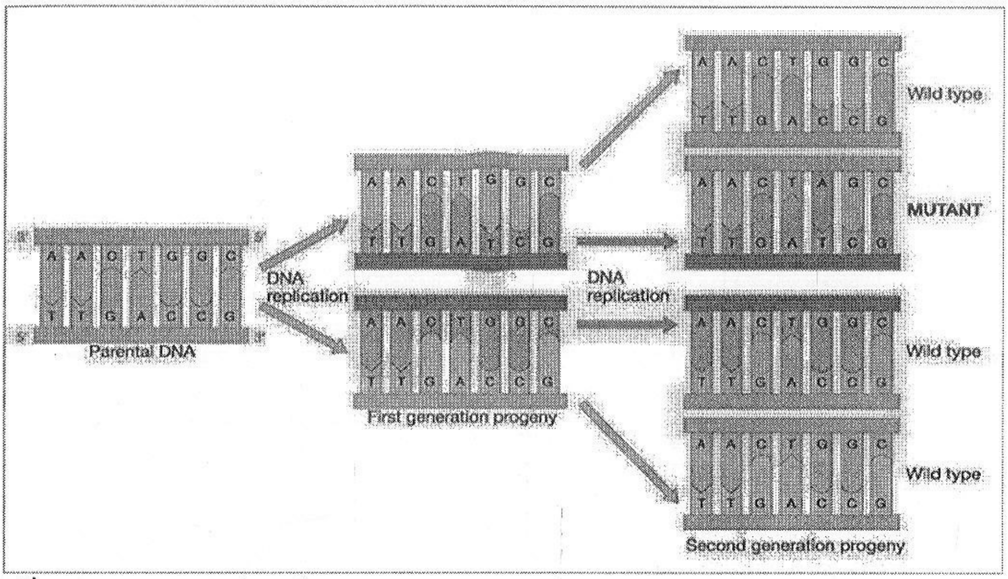
ความผิดพลาดในการสังเคราะห์ DNA ระหว่างการถ่ายทอดพันธุกรรมระดับโมเลกุลเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอตามธรรมชาติโดยความถี่การเกิดทุก ๆ หนึ่งแสนคู่เบส แต่ความผิดพลาดเหล่านั้นมักจะถูกแก้ไขโดย***กระบวนการซ่อมแซม DNA (DNA repair)*** แต่หากความผิดพลาดที่เกิดขึ้นนั้นหลุดรอดจากการแก้ไขก็จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของลำดับ DNA ซึ่งเรียกปรากฏการนี้ว่า***การกลายพันธ์***ระดับโมเลกุล *(Mutation)* การกลายพันธุ์อาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทั้งในแง่บวก หรือ ลบ เช่น การเปลี่ยนแปลงลำดับ DNA แล้วทำให้สิ่งมีชีวิตมีคุณสมบัติพิเศษที่ดีกว่าเดิมทำให้สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าก็จะเป็น



รูปที่ 1-12 ตัวอย่างกระบวนการซ่อมแซม DNA (DNA repair) ที่เกิดการกลายพันธ์แบบ Thymine Dimer http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.16.17.repair.jpg

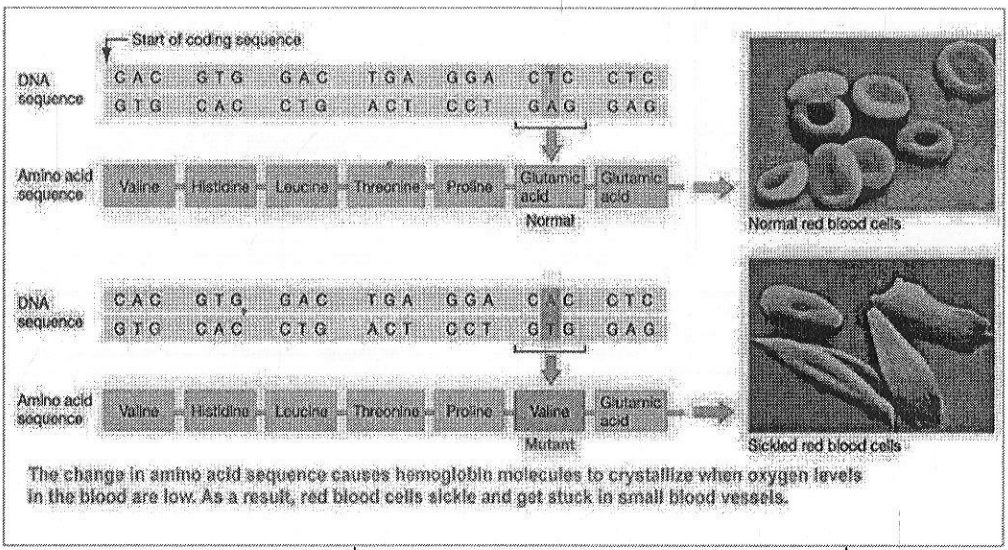
ผลบวกต่อสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จนในที่สุดอาจนำไปสู่การเกิดสปีชีส์ใหม่ (Speciation) และ วิวัฒนาการ (Evolution) ในที่สุด ในทางกลับกันหากการเปลี่ยนแปลงลำดับ DNA แล้วมีผลกระทบต่อการทำงานของยีนในแง่ลบ โดยอาจทำให้ยีนนั้นทำงานบกพร่องหรือไม่ทำงาน ก็จะทำให้สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เกิดความผิดปกติ เกิดเป็นโรคทางพันธุกรรม (Genetically disease) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของยีนที่กลายพันธุ์ โดยอาจมีตั้งแต่มีความผิดปกติเพียงเล็กน้อยแทบไม่ส่งผลกระทบต่อการดำเนินชีวิต หรืออาจมีความรุนแรงจนกระทั่งทำให้เสียชีวิตตั้งแต่กำเนิดหรือก่อนหน้านั้น แต่อย่างไรก็ตามบางครั้งการเปลี่ยนแปลงลำดับ DNA ก็ไม่ส่งผลใด ๆ ในระดับฟีโนไทป์ (Phenotype) ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลำดับ DNA นั้น ๆ ไม่มีผลต่อการแปลรหัส หรือไม่ได้อยู่ในส่วนของยีน ปัจจุบันนี้เราสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้รังสี เช่น X-ray หรือ UV หรือการใช้สารเคมี และเรายังสามารถตัดต่อ DNA เพื่อให้ได้สิ่งมีชีวิตที่มีคุณสมบัติในการสร้างผลผลิตที่มนุษย์ต้องการได้ โดยวิธีการหลังนี้เรียกว่า ***วิศวพันธุศาสตร์ / พันธุวิศวกรรม*** *(Genetic engineering)* สิ่งมีชีวิตที่

เกิดจากการกลายพันธุ์โดยวิธีนี้ เรียกว่า ***สิ่งมีชีวิตปรับปรุงพันธุกรรม*** *(Genetically Modified Organism, GMO)*



รูปที่ 1-13 การกลายพันธุ์ระดับยีน (Gene Mutation)

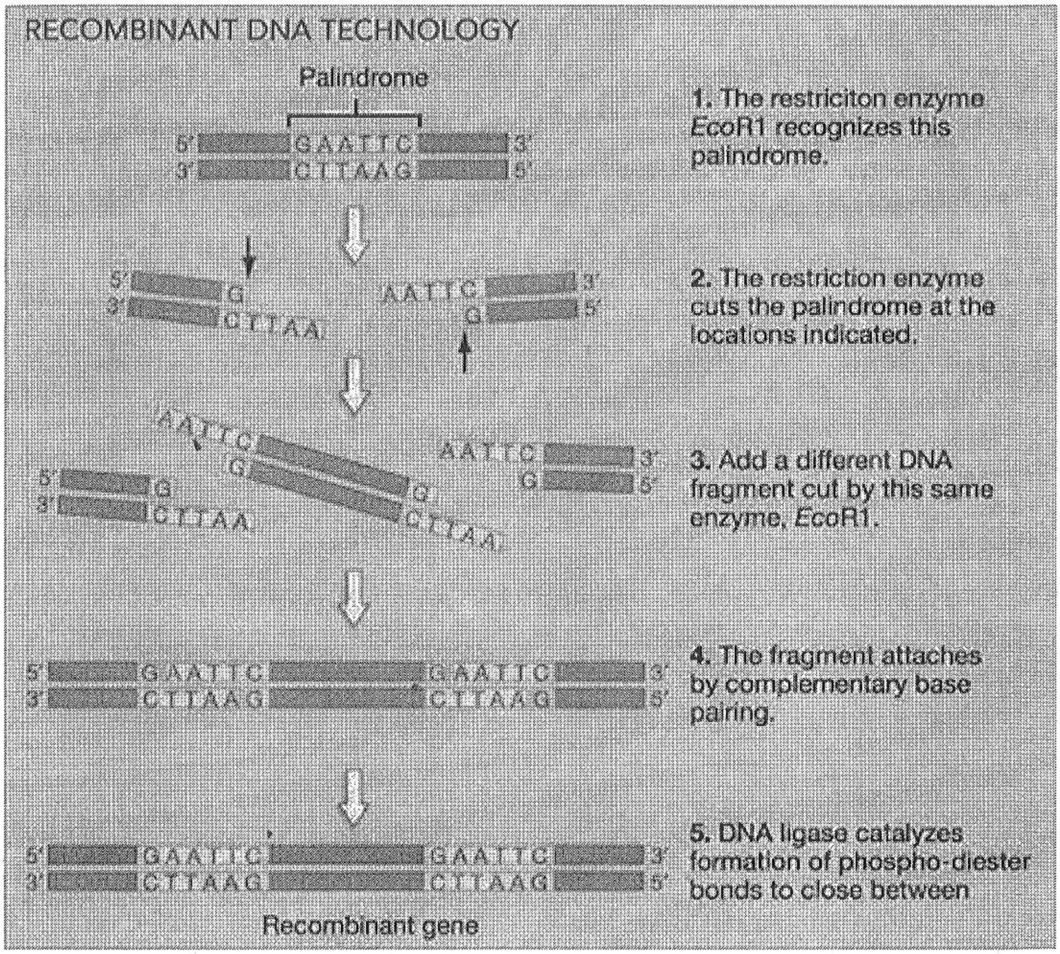
http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/sf12x15.jpg



รูปที่ 1-14 ตัวอย่างของความผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนของเซลเม็ดเลือดแดงที่ส่งผลในระดับฟีโนไทป์ คือ ทำให้กรดอะมิโนในโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ ซึ่งมีผลทำให้ฮีโมโกลบินในเลือดรวมกันเป็นก้อนและอุดตันเส้นเลือดเมื่อระดับอ๊อกซิเจนในเลือดต่ำ http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/sickle.htm

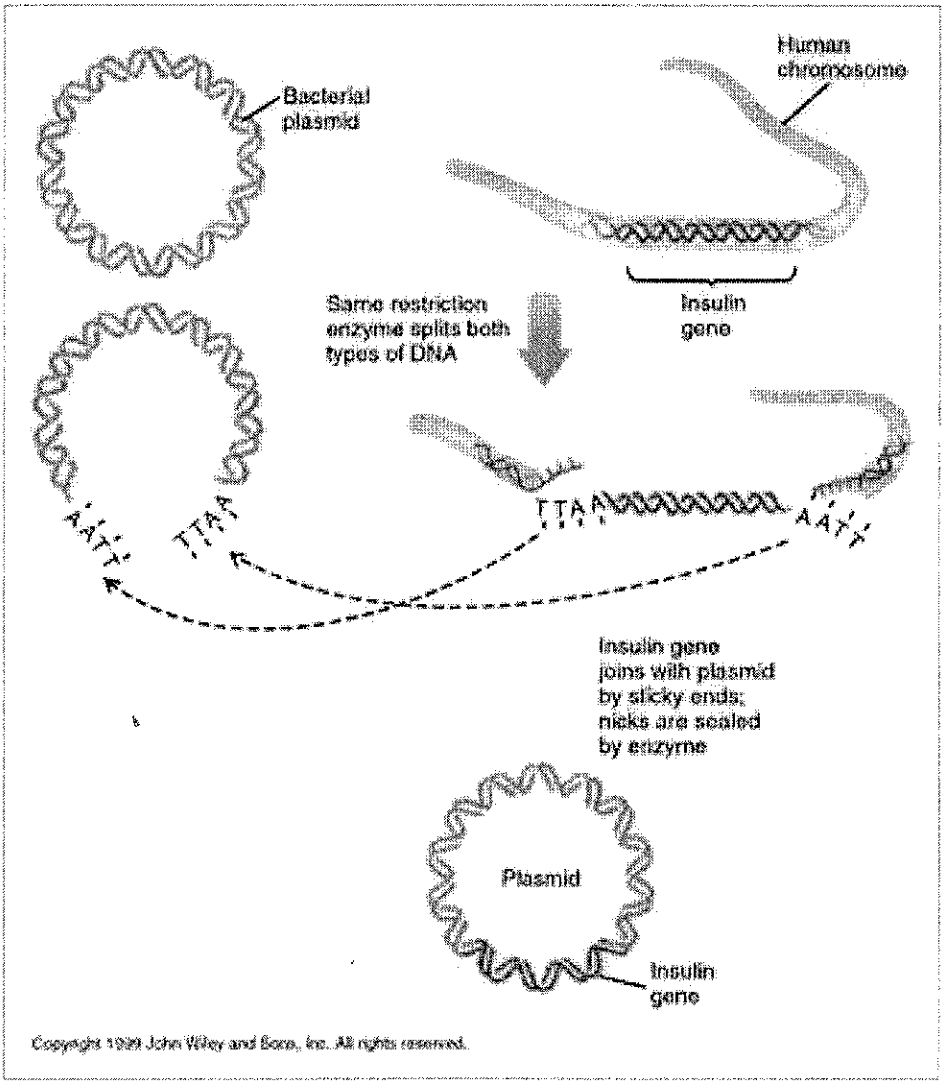
วิศวพันธุศาสตร์ *(Genetic engineering)* เป็นการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแบบจงใจเพื่อทำให้สิ่งมีชีวิตที่ได้จะมีคุณสมบัติตามต้องการ การทำวิศวพันธุศาสตร์เป็นกระบวนการที่ประยุกต์ใช้ความรู้และเทคนิคจาก *Recombinant DNA Technology* ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ใช้การจัดการและใช้ประโยชน์จากสารพันธุกรรม ประเภท DNA และ RNA นอกจากจะถูกใช้ในพันธุวิศวกรรม เทคโนโลยีนี้ยังถูกนำไปใช้ในการตรวจ

วิเคราะห์และวิจัยต่าง ๆ ในเชิงวิทยาศาสตร์ เช่น การตรวจทางนิติเวชวิทยาสมัยใหม่ การตรวจหาและจำแนกความหลากหลายทางชีววิทยา การทำลายพิมพ์ทาง DNA เป็นต้น



รูปที่ 1-15 ตัวอย่างของ Recombinant DNA Technology

http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/sf15x1box.jpg



รูปที่ 1-16 ตัวอย่างของการทำ genetic engineering โดยใช้วิธี Recombinant DNA Technology คือ การเติมยีนอินซูลิน (Insulin gene) เข้าไปในพลาสมิดของแบคทีเรีย (Bacterial plasmid) ทำให้ได้พลาสมิดของแบคทีเรียชุดใหม่ที่มียีนของอินซูลินด้วย (recombinant plasmid) เมื่อมีการถ่ายโอน (transform) พลาสมิดนี้เข้าไปในแบคทีเรีย จะทำให้แบคทีเรียนั้นสามารถสังเคราะห์โปรตีนอินซูลินได้ (ซึ่งแบคทีเรียปกติไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนนี้ได้) และแบคทีเรียนี้ถูกเรียกว่า สิ่งมีชีวิตปรับปรุงพันธุกรรม หรือ GMO เพราะแบคทีเรียนี้ถูกปรับปรุงพันธุกรรมให้สามารถสังเคราะห์โปรตีนอินซูลินได้

http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/splicing.jpg

บทที่ 2 กรดนิวคลีอิก (Nucleic acids)

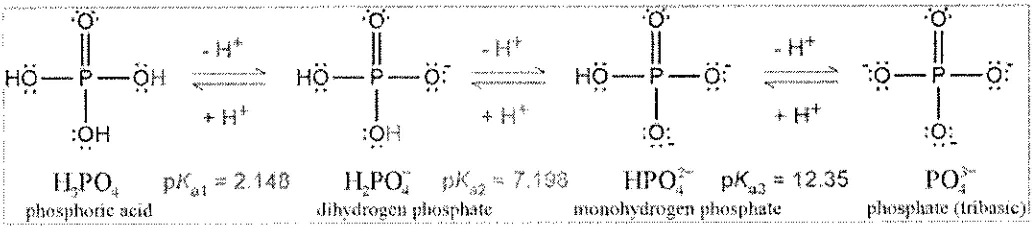
Miescher (ค.ศ. 1844 – 1895) นักเคมีชาวสวิส เป็นคนแรกที่ค้นพบกรดนิวคลีอิก โดยในปี ค.ศ. 1869 ขณะทำวิจัยอยู่ในประเทศเยอรมัน เขาได้ศึกษาเซลเม็ดเลือดขาวซึ่งได้จากหนองบนผ้าพันแผลที่ใช้แล้ว โดยนำเซลเม็ดเลือดขาวนี้มาทำให้แตกด้วยกรดเพื่อให้ได้นิวเคลียสออกมา จากนั้นจึงตกตะกอนด้วยด่างแล้วนำวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี จากการวิเคราะห์พบว่าประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน และฟอสฟอรัส คล้าย ๆ กับโปรตีน เพียงแต่สารนี้มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบมากเป็นพิเศษ Miescher เรียกสารชนิดใหม่นี้ตามแหล่งที่พบคือนิวเคลียสนี้ว่า "นิวคลีอิน" (nuclein) ต่อมาเมื่อพิสูจน์ได้ว่าสารนี้เป็นกรดชนิดหนึ่งจึงเรียกชื่อว่า "กรดนิวคลีอิก" (nucleic acid) นอกจากนี้ยังพบกรดนี้ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) และ ออร์แกเนลล์ (organelle) บางชนิดของเซลด้วย ภายหลังจากที่ได้มีการแยกกรดนิวคลีอิกออกมาแล้วเกือบ 80 ปี Watson และ Crick จึงค้นพบสูตรโครงสร้างโมเลกุล ส่วนหน้าที่ทางชีวภาพของกรดนิวคลีอิกนี้ คือ ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต เก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ หรือ คือสิ่งที่ Mendel เรียกว่า ยีน (gene) นั่นเอง

2.1) กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid)

กรดนิวคลีอิกนอกจากจะเป็นแมโครโมเลกุล (macromolecule) เช่นเดียวกันกับไกลโคเจนและโปรตีนแล้ว ยังเป็นสารประกอบพวกโพลีเมอร์ (polymer) เหมือนกันอีกด้วย กล่าวคือ กรดนิวคลีอิกเป็นโพลีเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) คือ ในโมเลกุลของมันประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์หลาย ๆ หน่วยต่อเข้าด้วยกันเป็นโพลี-นิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) นั่นเอง และไม่ว่าจะเป็นนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดใดก็ตาม เมื่อนำมาสลายให้เป็นโมเลกุลเล็กลงไปอีกจะได้ผลิตผล 3 ชนิด เป็นองค์ประกอบเสมอ คือ กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) น้ำตาลเพนโทส (Pentose) และ เบสไนโตรเจน (Nitrogenous base)

2.1.1) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid)

กรดฟอสฟอริกเป็นกรดอ่อน ในแต่ละโมเลกุลมี 3 โปรตอนซึ่งแตกตัวได้ที่ pH ต่างกัน ทำให้กรดนี้มีค่า pKa ได้ 3 ค่า ดังสมการต่อไปนี้

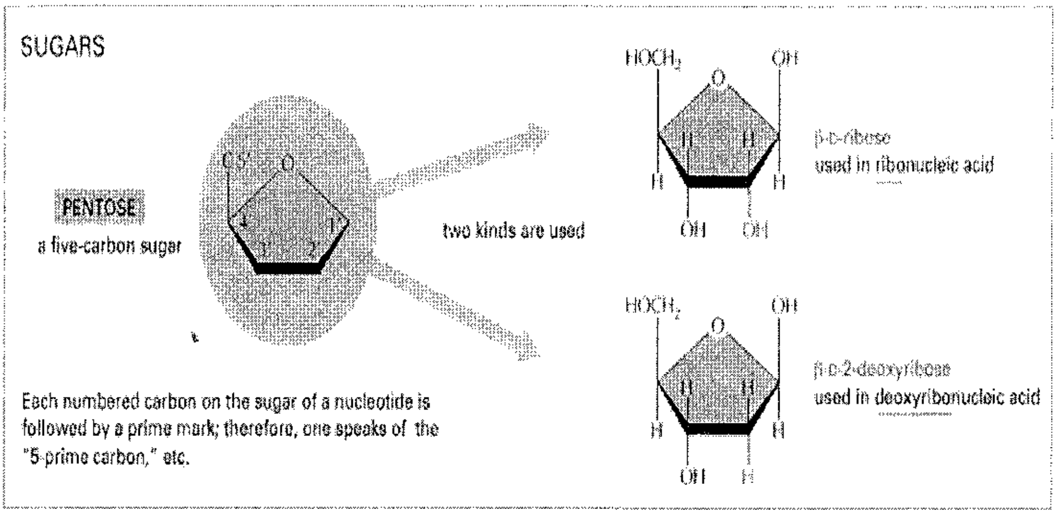


http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/biochem/P-index.cfm?definition=phosphate

ดังนั้น ในสภาพปกติของร่างกายซึ่งมี pH 7.4 กรดนี้จะอยู่ในรูป HPO_4^{2-} เป็นส่วนใหญ่ แต่กรดฟอสฟอริกที่เป็นส่วนประกอบในโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก สามารถแตกตัวให้เพียง 1 โปรตอนเท่านั้นเพราะอีก 2 โปรตอนถูกแทนที่โดยน้ำตาลแล้ว

2.1.2) น้ำตาลเพนโทส (Pentose)

น้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิกเป็นอัลโดเพนโทส (aldopentose) 2 ชนิด คือ D-ribose กับ D-2-deoxyribose โดยมีโครงร่างในรูปวงแหวนบีตาฟูแรโนส (β-furanose) เท่านั้น ในสภาวะปกติในโมเลกุลกรดนิวคลีอิกหนึ่ง ๆ จะพบน้ำตาลเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งในสองชนิดนี้เท่านั้น เราจะไม่พบน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในโมเลกุลเดียวกันโดยเด็ดขาด (ยกเว้นในการสังเคราะห์ lagging strand ในกระบวนการถ่ายแบบ DNA ซึ่งจะกล่าวต่อไป) ดังนั้นเราจึงสามารถแบ่งกรดนิวคลีอิกได้เป็น 2 ชนิดตามน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบในโมเลกุล คือ ชนิดที่มีน้ำตาลเป็นไรโบส เรียกว่า *" กรดไรโบสนิวคลีอิก (ribonucleic acid) "* หรือ *" RNA "* ส่วนชนิดที่มีน้ำตาลเป็นดีออกซิไรโบสเรียกว่า *" กรดดีออกซิไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid) "* หรือ *" DNA "*



รูปที่ 2-1 น้ำตาลที่เป็นส่วนประ-กอบของกรดนิวคลีอิกเป็นอัลโด-เพนโทส (aldopentose) 2 ชนิด คือ Ribose กับ 2-Deoxyribose http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=survey&rid=mboc4.box.217

*2.1.3) **เบสไนโตรเจน** (Nitrogenous base)*

เบสไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกมี 2 ชนิด คือ พิริมิดีน (pyrimidine) และ พิวรีน (purine)

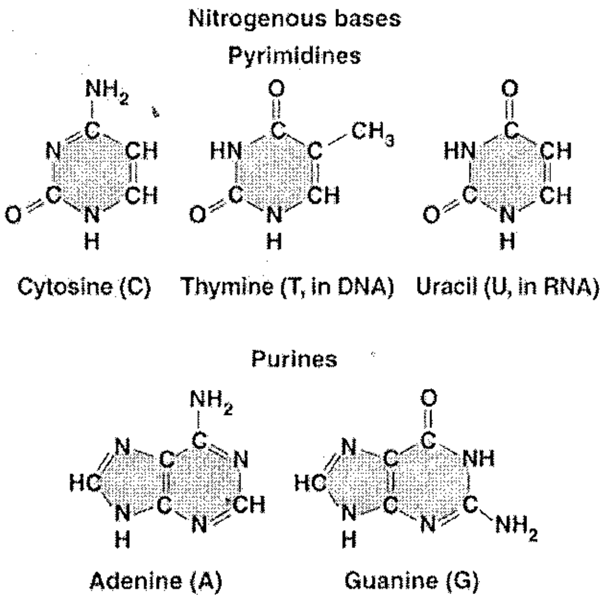
พิริมิดีน (pyrimidine) ประกอบด้วยคาร์บอน 4 อะตอมกับไนโตรเจนอีก 2 อะตอมจัดเรียงตัวกันเป็นวงแหวนรูปหกเหลี่ยม อนุพันธ์ของพิริมิดีนที่พบเป็นประจำในกรดนิวคลีอิกมี 3 ชนิด ได้แก่ ไซโทซีน (Cytosine, C) ซึ่งพบในทั้ง DNA และ RNA, ยูราซิล (Uracil, U) พบเฉพาะใน RNA, และ ไทมีน (Thymine, T) ซึ่งพบเฉพาะใน DNA เท่านั้น อนุพันธ์อื่น ๆ ที่อาจพบได้ เช่น 5-เมทิลไซโทซีน (5-methyl cytosine) ซึ่งพบได้ในพืชทั่ว ๆ ไป และ 5-ไฮดรอกซิเมทิลไซโทซีน (5-hydroxymethyl cytosine) ซึ่งพบใน DNA ของแบคทีเรียหลังจากที่ถูก infect ด้วย bacteriophage โดยเบสเหล่านี้ถูกเรียกว่า "เบสรอง" (minor base) หรือ "เบสชนิดที่พบได้ยาก" (rare base)

พิวรีน (purine) ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอมและไนโตรเจน 4 อะตอม จัดเรียงตัวกันเป็นวงแหวนรูปหกเหลี่ยมของพิริมิดีนและเชื่อมอยู่กับวงแหวนห้าเหลี่ยมของอิมิดาโซล (imidazole) อนุพันธ์ของพิวรีนที่พบเป็นองค์ประกอบในกรดนิวคลีอิกมี 2 ชนิด คือ อะดินีน (Adenine, A) และ กัวนีน (Guanine, G) ซึ่งพบทั้งสองในทั้ง DNA และ RNA ส่วนอนุพันธ์อื่น ๆ ที่พบได้ในตัวเรา ได้แก่ กรดยูริก (Uric acid), แซนทีน (Xanthine) และ

ไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) เป็นต้น นอกจากนี้ พวกสารอัลคาลอยด์ (Alkaloid) ที่พบในกาแฟ ชา และ โกโก้ เช่น แคฟเฟอีน (Caffeine) ทีโอฟิลลีน (Theophylline) และ ทีโอโบรมีน (Theobromine) ต่างก็เป็นอนุพันธ์ของพิวรีนเช่นกัน และยังพบ N^6-เมทิลอะดินีน (N^6-Methyladenine) ใน DNA ของแบคทีเรียอีกด้วย

2.2) นิวคลีโอไซด์ (Nucleoside)

นิวคลีโอไซด์ (nucleoside) เป็นสารประกอบที่เกิดจากน้ำตาลไรโบสหรือดีออกซีไรโบสจับอยู่กับเบสไนโตรเจนด้วยพันธะบีตาไกลโคไซด์ (β-glycosidic bond) ดังนั้นนิวคลีโอไซด์ก็คือสารประกอบพวกไกลโคไซด์นั่นเอง พันธะบีต้าไกลโคไซด์ในนิวคลีโอไทด์นี้เกิดขึ้นระหว่างอะตอม N_9 ของพิวรีนหรือ N_1ของพิริมิดีนกับอะตอม C_1 ของไรโบสหรือดีออกซีไรโบส เมื่อน้ำตาลและเบสรวมกันเป็นนิวคลีโอไซด์แล้ว การนับตำแหน่งของอะตอมต่าง ๆ ของเบสที่อยู่ในโมเลกุลของนิวคลีโอไซด์ยังคงเหมือนเดิม แต่ของน้ำตาลจะเปลี่ยนวิธีการเขียนตัวเลขเพื่อแสดงตำแหน่งจากเดิม 1, 2, 3, 4 และ 5 เป็น 1', 2', 3', 4' และ 5' ตามลำดับ



รูปที่ 2-2 เบสไนโตรเจน (Nitrogenous base)ที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกมี 2 ชนิด คือ พิริมิดีน (pyrimidine) และ พิวรีน (purine) (http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/c8.5x27b.bases.jpg)

2.2.1) ชนิดของนิวคลีโอไซด์

นิวคลีโอไซด์แบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ คือ ไรโบนิวคลีโอไซด์ (ribonucleoside) และ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ (deoxyribonucleoside) ถ้าพิจารณาชนิดของเบสด้วยแล้วจะสามารถแบ่งย่อยต่อไปได้อีกเป็น 4 ชนิด คือ พิวรีนไรโบนิวคลีโอไซด์ พิริมิดีนไรโบนิวคลีโอไซด์ พิวรีนดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ พิริมิดีนดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์

2.2.2) การเรียกชื่อนิวคลีโอไซด์

การเรียกชื่อนิวคลีโอไซด์มี 2 แบบ คือ แบบที่หนึ่ง เรียกชื่อของเบสและน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบและลงท้ายด้วยคำว่านิวคลีโอไซด์ เช่น อะดินีนไรโบนิวคลีโอไซด์ (adenine ribonucleoside) และไซโทซีนดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ (cytosine deoxyribonucleoside) เป็นต้น และแบบที่สอง เรียกชื่อโดยการแปลงไปจากชื่อเบสที่เป็นองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 2-1 โดยการเรียกชื่อตามแบบที่สองจะเป็นที่นิยมมากกว่า

ในธรรมชาติจะพบไรโบนิวคลีโอไซด์ของไทมีนเฉพาะใน transfer RNA (tRNA) เท่านั้น ฉะนั้นนิวคลีโอไซด์ของไทมีนจะหมายถึงเฉพาะดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ จึงไม่จำเป็นต้องเขียนคำว่า "ดีออกซี" นำหน้าเหมือนชนิดอื่น ๆ สำหรับนิวคลีโอไซด์ของไฮโปแซนทีนนั้นมีชื่อต่างไปจากเบสตัวอื่น ๆ คือ อิโนซีน (inosine)

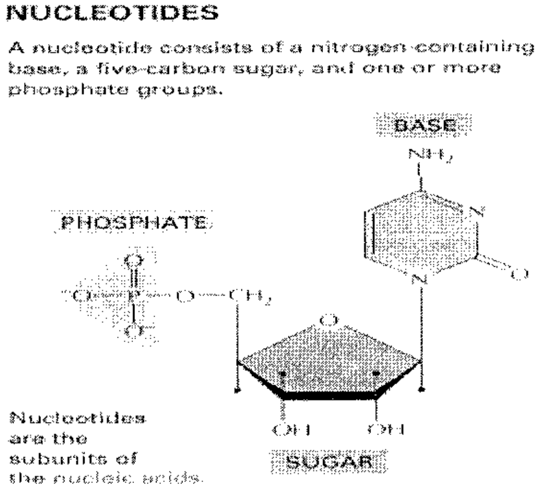
ตารางที่ 2-1 การเรียกชื่อนิวคลีโอไซด์

http://www.sc.chula.ac.th/courseware/2305262/context/text8/subtext8/body_subtext8.html

เบสพิวรีน หรือพิริมิดีน	ไรโบนิวคลีโอไซด์	ไรโบนิวคลีโอไทด์	ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์
Adenine	Adenosine	Adenylate (AMP)	Deoxyadenylate (dAMP)
Guanine	Guanosine	Guanylate (GMP)	Deoxyguanylate (dGMP)
Uracil	Uridine	Uridylate (UMP)	
Cytosine	Cytidine	Cytidylate (CMP)	Deoxycytidylate (dCMP)
Hypoxanthine	Inosine	Inosinate (IMP)	Deoxyinosinate (dIMP)
Xanthine	Xanthosine	Xanthylate (XMP)	Deoxyxanthylate (dXMP)
Thymine	Ribothymine	Ribothymidylate (TMP)	Deoxythymidylate (dTMP)

2.3) <u>นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide)</u>

นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เป็นเอสเทอร์ชนิดฟอสเฟต (phosphate ester) ของนิวคลีโอไซด์ กล่าวคือเป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นจากการที่น้ำตาลจับอยู่กับเบสด้วยพันธะไกลโคไซด์และจับอยู่กับหมู่ฟอตเฟสด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bond) จะเห็นได้ว่ามีหลายตำแหน่งในโมเลกุลของน้ำตาลที่สามารถเกิดพันธะเอสเทอร์กับกรดฟอสฟอริกได้ กล่าวคือ ถ้าน้ำตาลเป็นไรโบสจะเกิดได้ที่ 2' 3' และ 5' แต่ถ้าน้ำตาลเป็นดีออกซีไรโบสจะเกิดขึ้นได้เฉพาะที่ 3' และ 5' เท่านั้น อย่างไรก็ตาม นิวคลีโอไทด์ที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นชนิดที่มีหมู่ฟอสเฟตจับอยู่ที่ตำแหน่ง 5'



รูปที่ 2-3 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เกิดขึ้นจากการที่น้ำตาลจับอยู่กับเบสด้วยพันธะไกลโคไซด์และจับอยู่กับหมู่ฟอตเฟสด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bond)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=survey&rid=mboc4.box.217

2.3.1) ชนิดของนิวคลีโอไทด์

นิวคลีโอไทด์แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดตามน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ คือ ไรโบนิวคลีโอไทด์ (ribonucleotide) และ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxyribonucleotide) ทั้ง 2 ชนิดนี้ยังแบ่งย่อยออกไปตามชนิดของเบสเช่นเดียวกับนิวคลีโอไซด์ คือ เป็นพิวรีนไรโบนิวคลีโอไทด์และพิริมิดีนไรโบนิวคลีโอไทด์ ฯลฯ นิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาล, เบสและฟอสเฟตอย่างละ 1 โมเลกุล มีชื่อเรียกเฉพาะว่า มอโนนิวคลีโอไทด์ (mononucleotide) หรือ นิวคลีโอไซด์มอโนฟอสเฟต (nucleoside monophosphate, NMP) ตัวอย่างเช่น มอโนนิวคลีโอไทด์ที่มีฟอสเฟตอยู่ที่ตำแหน่ง 5' เรียก 5'-มอโนนิวคลีโอไทด์ หรือ นิวคลีโอไซด์-5'-มอโนฟอสเฟต (nucleoside-5'-monophosphate) เป็นต้น

2.3.2) การเรียกชื่อมอโนนิวคลีโอไทด์

มอโนนิวคลีโอไทด์มีชื่อเรียกได้ 2 แบบ คือ เรียกเป็นเอสเทอร์ชนิดฟอสเฟตของนิวคลีโอไซด์ กล่าวคือ เริ่มด้วยชื่อของนิวคลีโอไซด์ตามด้วยตำแหน่งของฟอสเฟต แล้วลงท้ายด้วยคำว่า "มอโนฟอสเฟต" อีกแบบหนึ่งนั้นเรียกเป็นชื่อกรดซึ่งแปลงไปจากชื่อนิวคลีโอไซด์ เนื่องจากสารนี้แสดงสมบัติเป็นกรดนั่นเอง

การเรียกชื่อย่อของ 5'-ไรโบนิวคลีโอไทด์ ไม่ต้องระบุตำแหน่งของหมู่ฟอสเฟตก็ได้ กล่าวคือ แทนที่จะเขียนเป็น 5'-AMP เราเขียนเป็น AMP ได้เลย แต่ถ้าเป็นนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีหมู่ฟอสเฟตเกาะที่ตำแหน่งอื่นนอกเหนือจากนี้ จะต้องระบุไว้ด้วย เช่น 3'-AMP และ 2'-AMP เป็นต้น

สำหรับการเรียกชื่อ 5'-ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์หรือดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์-5'-มอโนฟอสเฟตนั้นเหมือนกันกับการเรียกชื่อ 5'-ไรโบนิวคลีโอไทด์ทุกอย่าง เพียงแต่เติมคำว่า "ดีออกซี" เข้าไปข้างหน้าเท่านั้น เช่น ดีออกซีอะดีโนซีน-5'-โมโนฟอสเฟต ส่วนชื่อย่อก็เพียงแต่เติมอักษร "d" เข้าไปข้างหน้าของชื่อย่อไรโบนิวคลีโอไทด์เดิม เช่น dAMP และ dGMP เป็นต้น

ตารางที่ 2-2 การเรียกชื่อ 5'-ไรโบนิวคลีโอไทด์ (ในวงเล็บคือชื่อย่อ)
http://biochem.md.kku.ac.th/dmdocuments/nucleic_chemical-49-1-MD.ppt

Ribonucleoside	**Ribonucleotide**	
	ชื่อเอสเตอร์ชนิดฟอสเฟตของนิวคลีโอไซด์ (แบบที่ 1)	**ชื่อกรด (แบบที่ 2)**
Adenosine	Adenosine-5'-monophosphate (AMP)	Adenylic acid
Guanosine	Guanosine-5'-monophosphate (GMP)	Guanylic acid
Cytidine	Cytidine-5'-monophosphate (CMP)	Cytidylic acid
Uridine	Uridine-5'-monophosphate (UMP)	Uridylic acid
Inosine	Inosine-5'-monophosphate (IMP)	Inosinic acid

มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

มกราคม 2550

2.3.3) นิวคลีโอไทด์ที่มีฟอสเฟตมากกว่า 1 หมู่

มอโนนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์มอโนฟอสเฟต (NMP) ที่กล่าวมาแล้วนั้นอาจจะมีหมู่ฟอสเฟตเข้าไปต่อกับหมู่ฟอสเฟตเดิมอีก 1 หรือ 2 หมู่ได้ ทำให้ที่ตำแหน่ง 5' ของโมเลกุลมีหมู่ฟอสเฟตเป็น 2 (NDP) หรือ 3 (NTP) หมู่ได้ ตามลำดับ พันธะซึ่งเกิดระหว่างฟอสเฟตที่มาต่อเข้าไปใหม่มิใช่พันธะเอสเทอร์ แต่เป็นพันธะแอนไฮไดรด์ (anhydride bond) ซึ่งมีสมบัติพิเศษอยู่อย่างหนึ่ง คือ เมื่อถูกแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) จะให้พลังงานต่อโมลออกมามากกว่า 7 กิโลแคลอรี สารที่มีพันธะเช่นนี้อยู่ในโมเลกุล จัดเป็นสารประกอบที่มีพลังงานสูง (high-energy compound) ตัวอย่างของสารพวกนี้ที่สำคัญ คือ อะดีโนซีนไดฟอสเฟต (ADP) และ อะดิโนซีนไทรฟอสเฟต (ATP) เป็นต้น

2.3.4) ไซคลิกนิวคลีโอไทด์ (cyclicnucleotide)

สารประกอบพวก 5'-ไรโบนิวคลีโอไทด์ สามารถเกิดโครงสร้างรูปวงแหวนได้ (cyclicnucleotide) จากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลที่ว่างอยู่ของน้ำตาลกับหมู่ฟอสเฟตที่เกาะอยู่ที่ตำแหน่ง 5' ได้เป็นพันธะเอสเทอร์ใหม่ ตัวอย่างของสารพวกนี้ที่สำคัญ ได้แก่ 3',5' cyclic AMP (cAMP) และที่พบรองลงมาคือ 3',5' cyclic GMP (cGMP)

<u>**2.4) พอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide)**</u>

พอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์เป็นมอนอเมอร์ (monomer) ต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ ในธรรมชาติแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ ตามชนิดของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ชนิดแรกมีไรโบนิวคลีโอไทด์เป็นมอนอเมอร์ เรียกว่า พอลิไรโบนิวคลีโอไทด์ (polyribonucleotide) ซึ่งก็คือ RNA นั่นเอง อีกชนิดหนึ่งมีดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์เป็นมอนอเมอร์ เรียกว่า พอลิดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (polydeoxyribonucleotide) หรือ DNA

2.4.1) โครงสร้างทั่วไป

พอลินิวคลีโอไทด์เป็นสารที่มีลักษณะเป็นสายโซ่ ไม่มีการแตกแขนง อาจพบอยู่รวมกันมากกว่า 1 สายได้ โดยมากมักเป็นสายคู่ (double strand) สายนี้อาจจะเป็นสายยาวปลายเปิด (linear strand) หรือปลายทั้ง 2 ข้างเชื่อมต่อกันเป็นวงกลม (circular strand) เป็นปลายปิด ดังนั้น การบรรยายลักษณะทั่วไปของสารพวกนี้จึงมักจะระบุจำนวนสายและลักษณะปลายของสายว่าเป็นปลายเปิดหรือปิด เช่น เป็นสายเดี่ยวปลายเปิด (linear single strand) สายคู่ปลายปิด (circular double strand) หรือ สายคู่ปลายเปิด (linear double strand) เป็นต้น

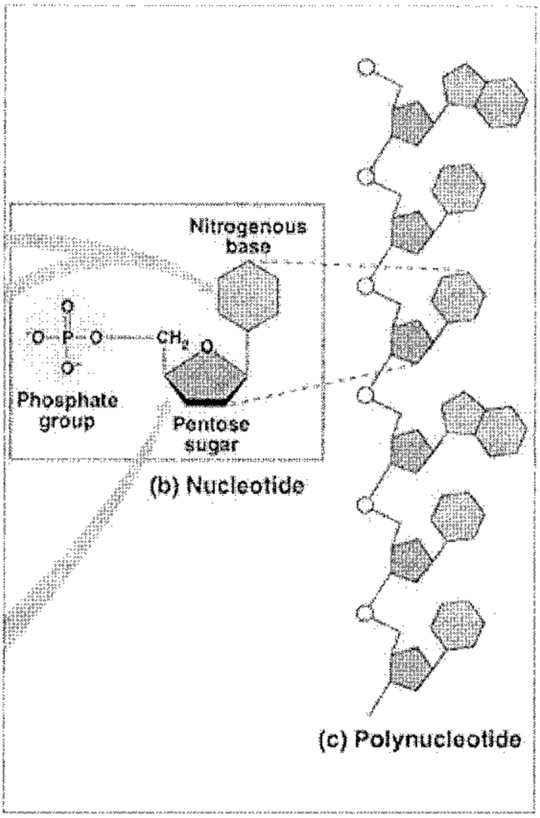
2.4.2) พันธะโคเวเลนต์ของสายพอลินิวคลีโอไทด์

มอนอนิวคลีโอไทด์แต่ละหน่วยในสายพอลินิวคลีโอไทด์ยึดติดกันด้วยพันธะเอสเทอร์ซึ่งเกิดจากหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง 5' ของนิวคลีโอไทด์หน่วยหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3' ของนิวคลีโอไทด์หน่วยถัดไป พันธะเคมีนี้จึงเรียกว่าพันธะ 3', 5' ฟอสโฟไดเอสเทอร์ (3', 5' phosphodiester bond) ถ้ามีมอนอนิวคลีโอไทด์ 2 หรือ 3 หน่วยเชื่อมติดกันด้วยพันธะเช่นนี้ เรียกว่า ไดนิวคลีโอไทด์ (dinucleotide) และ ไทรนิวคลีโอไทด์ (trinucleotide) ตามลำดับ

จากโครงสร้างของพอลินิวคลีโอไทด์ จะเห็นได้ว่าส่วนที่เป็นฟอสเฟตและน้ำตาลทำหน้าที่เปรียบเสมือนแกนหลัก (backbone) ของโมเลกุลและมีส่วนที่เป็นเบสยื่นออกไปจากแกนนี้ ฟอสเฟตที่อยู่ในแกนหลักของพอลิ

นิวคลีโอไทด์สามารถแตกตัวให้โปรตอนได้ทำให้เกิดประจุลบมากมายในโมเลกุล ลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของพอลินิวคลีโอไทด์ที่เป็นสายยาวก็คือ มีปลายทั้ง 2 ข้างไม่เหมือนกัน กล่าวคือ ปลายด้านหนึ่งที่ตำแหน่ง 5' ของนิวคลีโอไทด์จะมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ หรือมีหมู่ฟอสเฟตอิสระจับอยู่ เรียกปลายนี้ว่า ปลาย 5' (5'-end) ส่วนอีกปลายหนึ่งเรียกปลาย 3' (3'-end) เป็นปลายด้านที่ตำแหน่ง 3' ของนิวคลีโอไทด์มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระหรือมีหมู่ฟอสเฟตอิสระจับอยู่

รูปที่ 2-4 พอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์เป็นมอนอเมอร์ (monomer) ต่อกันด้วยพันธะ 3', 5'-ฟอสโฟไดเอสเทอร์ (3', 5'-phosphodiester bond) http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c5x29nucleotides.jpg



2.5) <u>กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid, DNA)</u>

DNA เป็นพอลิเมอร์ของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 3', 5' –ฟอสโฟไดเอสเทอร์

2.5.1) แหล่งที่พบ ขนาดและรูปร่างโมเลกุล

DNA เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่มาก ที่พบในธรรมชาติอาจมีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 10^{12} ดาลตัน ขนาดและรูปร่างแตกต่างกันไปตามแหล่งที่พบ เช่น ในเซลของมนุษย์สามารถพบ DNA ได้ทั้งในนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย ซึ่ง DNA จากทั้งสองแหล่งนี้แตกต่างกันทั้งในลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ ขนาดและรูปร่าง สำหรับในพืชนอกจากจะพบ DNA ในนิวเคลียสแล้ว ยังพบ DNA ได้อีกในคลอโรพลาสต์ ในแบคทีเรียบางชนิด นอกจากจะพบ DNA ขนาดใหญ่ 1 โมเลกุลแล้วยังพบ DNA ขนาดเล็ก ๆ อีกหลายโมเลกุล เรียกว่า พลาสมิด (plasmid) นอกจากนี้โมเลกุลของ DNA (ยกเว้นในไวรัสบางชนิด) ยังเป็นแบบสายคู่ 2 สายพันกันเป็นเกลียว ปลายทั้ง 2 ด้านของเกลียวคู่นี้อาจเป็นปลายเปิดหรือปลายปิดก็ได้ เช่น ในกรณีของ DNA จากนิวเคลียสของเซลพวกยูคาริโอตจะเป็นสายคู่ปลายเปิด (Linear double strand DNA) ในขณะที่ DNA ในไมโทคอนเดรีย คลอโรพลาสต์ และแบคทีเรียจะเป็นสายคู่ปลายปิด (Circular double strand DNA) สำหรับ DNA จากคนที่

แสดงในตารางที่ 2-3 เป็น DNA ในนิวเคลียสและเป็นค่าเฉลี่ยโดยรวมของ DNA ที่มีในโครโมโซมทั้ง 23 คู่ โดยใน 1 โครโมโซมมี DNA 1 โมเลกุล ความจริงแล้ว DNA ในแต่ละโครโมโซมมีขนาดไม่เท่ากัน บางโครโมโซมมี DNA ขนาดใหญ่มาก โครโมโซมที่ใหญ่ที่สุดมีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 1.5×10^{11} ดาลตันและมีความยาวถึง 7.3 เซ็นติเมตร ส่วนโครโมโซมที่เล็กที่สุดประกอบด้วย DNA ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 3×10^{10} ดาลตันและมีความยาว 1.4 เซ็นติเมตร เมื่อรวมความยาวทั้ง 46 โครโมโซมใน 1 เซลของคนแล้วจะยาวประมาณ 2 เมตร ซึ่งต้องขดม้วนตัวไปมาจำนวนมากมายหลายรอบเพื่อให้สามารถบรรจุในนิวเคลียสที่มีขนาดเล็กเพียง 5 ไมโครเมตรได้ (เล็กกว่า DNA ถึง 4 แสนเท่า)

ตารางที่ 2-3 ขนาดและรูปร่างของ DNA จากแหล่งต่าง ๆ

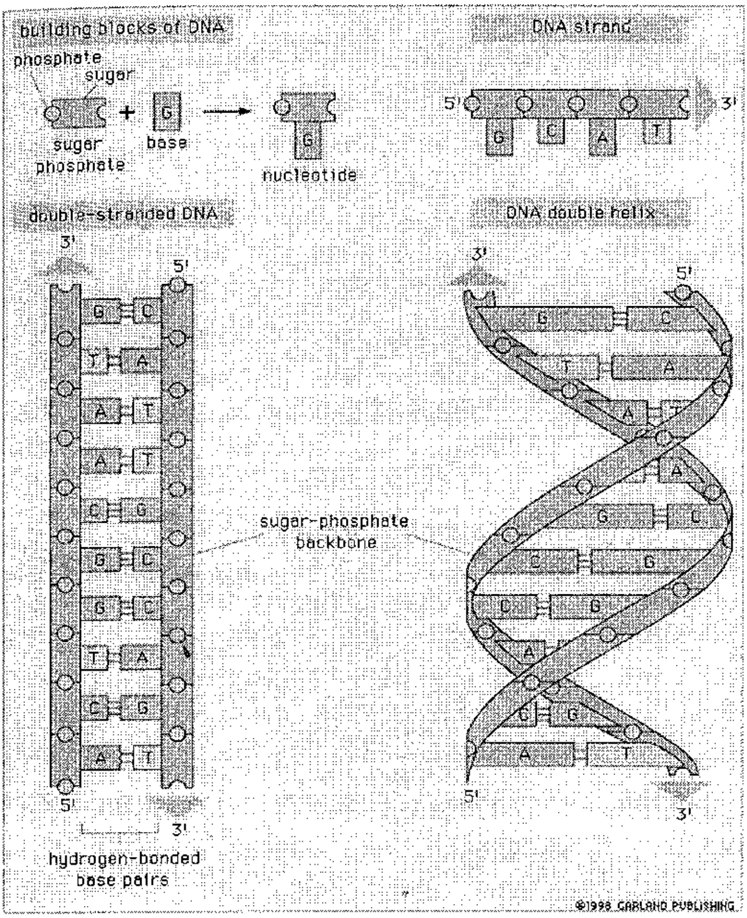
แหล่ง DNA	ขนาดของจีโนม (genome size)		รูปร่าง
	จำนวนคู่เบส* (x1000)	ความยาว (มิลลิเมตร)	
ไวรัส			
polyoma, SV 40	5.1	0.0017	สายคู่ปลายปิด
φX 174	5.4	0.0018	สายเดี่ยวปลายปิด
T2, T4	144	0.049	สายคู่ปลายเปิด
แบคทีเรีย			
Mycoplasma hominis	760	0.26	สายคู่ปลายปิด
Escherichia coli	4000	1.36	สายคู่ปลายเปิด
ยูคาริโอต			
ยีสต์	13,500 (7)**	4.6	สายคู่ปลายเปิด
คน	2,900,000 (23)**	990	สายคู่ปลายเปิด
South American Lungfish	102,000,000 (19)**	34,699	สายคู่ปลายเปิด

* 1 คู่เบสมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 660 ดาลตัน, 1000 คู่เบส คือ 1 กิโลเบส (Kilobase, Kb)

** จำนวนโครโมโซม haploid

2.5.2) ลักษณะสำคัญของ DNA เกลียวคู่

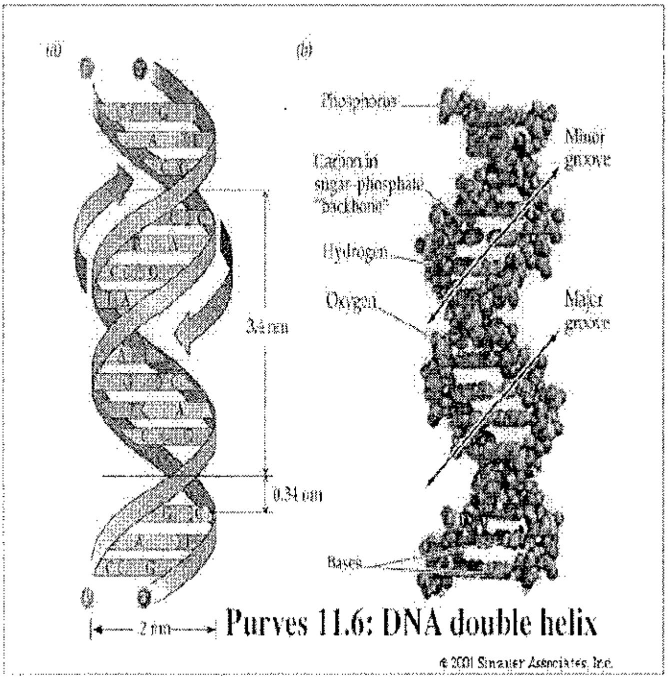
Watson และ Crick ค้นพบลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิของ DNA หรือ โครงสร้าง DNA เกลียวคู่ ลักษณะโดยสรุปของโครงสร้างทุติยภูมินี้ประกอบด้วย DNA 2 สายวางตัวในทิศทางตรงกันข้าม กล่าวคือ ถ้าสายหนึ่งวางตัวจากปลาย 5' ไป 3' (5' --> 3') อีกสายหนึ่งจะวางตัวจากปลาย 3' ไป 5' (3' --> 5') ทั้งสองสายจะเอาส่วนที่เป็นแกนหลัก (backbone) ไว้ด้านนอกและหันส่วนที่เป็นเบสเข้าไปไว้ตรงกลางระหว่างแกนหลักของทั้ง 2 สาย เบสของทั้ง 2 สายจะวางตัวอยู่ในระนาบเดียวกันและต้องเข้าคู่กัน ดังนี้คือ A จะเข้าคู่กับ T และ G จะเข้าคู่กับ C DNA ทั้ง 2 สายนี้จะพันกันเป็นเกลียววนขวาในลักษณะรอบแกนร่วมเดียวกันคล้ายกับบันไดเวียน จึงเรียกโครงสร้างแบบนี้ว่า "เกลียวคู่" รอบหนึ่ง ๆ ของเกลียวประกอบด้วยเบส 10 คู่และมีความยาวของเกลียวประมาณ 3.4 นาโนเมตร ดังนั้นเบสแต่ละคู่จะอยู่ห่างกัน 0.34 นาโนเมตร เกลียวนี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางหรืออีกนัยหนึ่งก็คือระยะห่างระหว่างแกนหลักของ DNA ทั้ง 2 สายเท่ากับ 2 นาโนเมตร การพันเป็นเกลียวคู่เช่นนี้จะก่อให้เกิดร่อง (groove) ในสาย DNA ซึ่งมี 2 ขนาด คือ ร่องขนาดเล็ก (minor groove) และร่องขนาดใหญ่ (major groove) พลังงานยึดเหนี่ยวสำคัญที่ทำให้โครงสร้างดังกล่าวเกิดจากพันธะ 2 แบบ คือ พันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่างเบสของ DNA ที่อยู่ต่างสายกัน (ระหว่าง A กับ T และ G กับ C) และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) ที่เกิดขึ้นระหว่างชั้นของเบสที่เรียงซ้อนกันอยู่ (overlapping หรือ stacking base)



รูปที่ 2-5 โครงสร้าง DNA เกลียวคู่ ประกอบด้วย DNA 2 สายวางตัวในทิศทางตรงกันข้าม กล่าวคือ ถ้าสายหนึ่งวางตัวจากปลาย 5' ไป 3' (5' --> 3') อีกสายหนึ่งจะวางตัวจากปลาย 3' ไป 5' (3' --> 5') ทั้งสองสายจะเอาส่วนที่เป็นแกนหลัก (backbone) ไว้ด้านนอกและหันส่วนที่เป็นเบสเข้าไปไว้ตรงกลางระหว่างแกนหลักของทั้ง 2 สาย เบสของทั้ง 2 สายจะวางตัวอยู่ในระนาบเดียวกันและต้องเข้าคู่กันด้วยพันธะไฮโดรเจน ดังนี้คือ A จะเข้าคู่กับ T ด้วยพันธะคู่ (double bond) และ G จะเข้าคู่กับ C ด้วยพันธะสาม (triple bond)

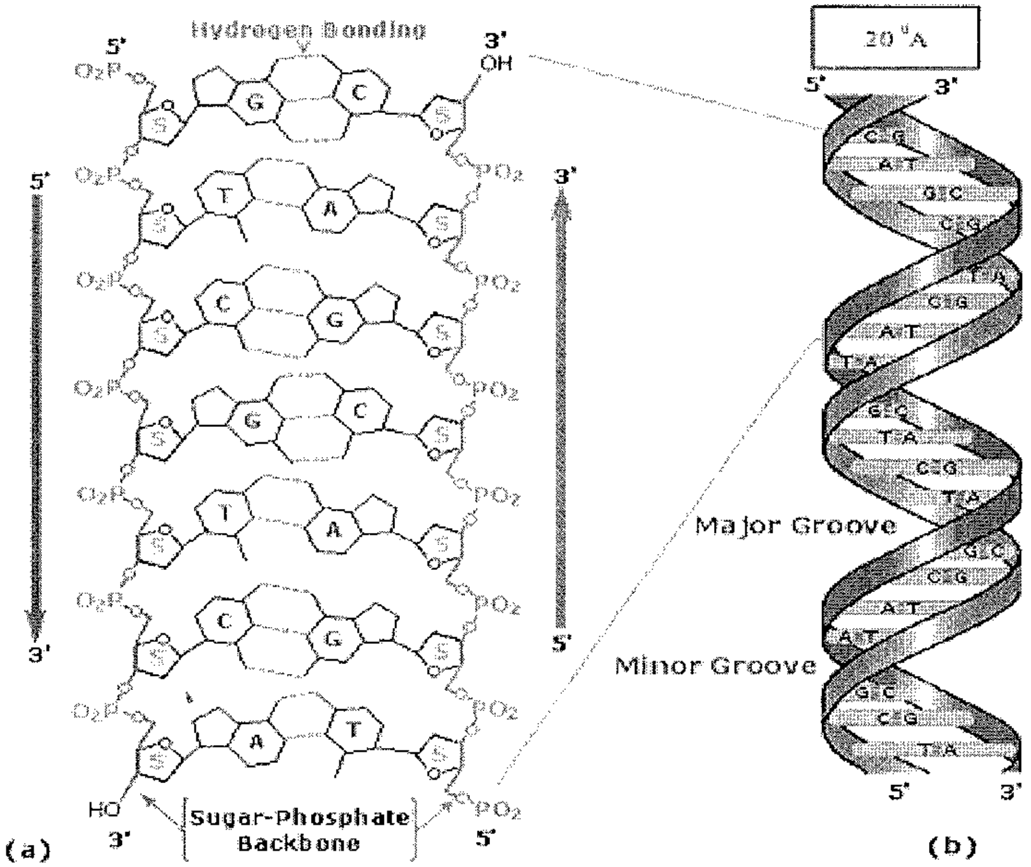
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=dna,building,blocks&rid=mboc4.figgrp.598

รูปที่ 2-6 DNA "เกลียวคู่" รอบหนึ่ง ๆ ของเกลียวประ-กอบด้วยเบส 10 คู่ และมีความยาวของเกลียว 3.4 นาโนเมตร ดังนั้นเบสแต่ละคู่จะอยู่ห่างกัน 0.34 นาโนเมตร เกลียวนี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 2 นาโนเมตร การพันเป็นเกลียวคู่เช่นนี้ก่อให้ เกิดร่อง (groove) ในสาย DNA ซึ่งมี 2 ขนาด คือ ร่องขนาดเล็ก (minor groove) และร่องขนาดใหญ่ (major groove)
http://www2.cedarcrest.edu/academic/bio/hale/bio121/Life7e-Fig-11-06-2.jpg



มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

มกราคม 2550



รูปที่ 2-7 การเข้าคู่กันของเบสและทิศทางการวางตัวของ DNA กล่าวคือ A จับกับ T และ G จับกับ C และทิศทางการวางตัวจะเป็นไปในทิศทางตรงกันข้ามหรือกลับขั้วกัน

http://www.forshang.org/009humanlifescience/dnastructurecs.jpg.

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า DNA เกลียวคู่ตามที่เสนอโดย Watson และ Crick นี้ เป็นโครงสร้างตามธรรมชาติของ DNA และเป็นโครงสร้างที่เสถียรที่สุดไม่สลายได้ง่าย ดังนั้นการอธิบายเกี่ยวกับปรากฏการณ์และการทำงานของ DNA ส่วนใหญ่จะใช้โครงสร้างเกลียวคู่เป็นหลัก สิ่งที่สำคัญที่ควรทราบเพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับ DNA คือ

การเข้าคู่กันของเบส (base pairing) และการเกิดพันธะไฮโดรเจนในโมเลกุล DNA เกลียวคู่นั้น เบสจะยื่นเข้าไปด้านในระหว่างแกนหลักของ DNA ทั้ง 2 สาย โดยอยู่ในลักษณะที่ตั้งฉากกับแกนหลัก และเพื่อจะให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสได้ดีที่สุด เบสของแต่ละสายจะต้องวางอยู่ในระนาบเดียวกันด้วย เรียกว่าการเข้าคู่กัน เนื่องจากเบสมีขนาดไม่เท่ากัน คือ เบสพิริมิดีน (T และ C) จะมีขนาดเล็กกว่าเบสพิวรีน (A และ G) ดังนั้น ถ้าจะเข้าคู่กันแล้วให้มีขนาดคู่เท่ากันไปตลอดโครงสร้างเกลียวคู่ของ DNA เบสพิริมิดีนจะต้องเข้าคู่กับเบสพิวรีนเสมอ ด้วยเหตุนี้ DNA ไม่ว่าจะมาจากสิ่งมีชีวิตชนิดใดก็ตาม ผลรวมของเบสพิวรีนจึงเท่ากับผลรวมของเบสพิริมิดีนเสมอ ซึ่งเป็นกฎเกณฑ์ที่ค้นพบโดย Chargaff นั่นเอง นอกจากนี้คู่เบสระหว่างพิวรีนและพิริมิดีนที่มาเข้าคู่กันนั้นจะต้องเป็น A กับ T และ G กับ C เสมอ สำหรับคู่ระหว่าง A กับ C หรือ T กับ G นั้นแม้จะเข้า

กันได้กับโครงสร้างเกลียวคู่แต่จะไม่เกิดพันธะไฮโดรเจนต่อกัน การจับคู่กันระหว่าง A กับ T จะสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ 2 พันธะ (double bond) และระหว่าง G กับ C เกิดได้ 3 พันธะ (triple bond) เบสที่จะเข้าคู่กันแล้วเกิดพันธะไฮโดรเจนดังกล่าวได้จะต้องมีโครงสร้างอยู่ในรูปคีโทหรืออะมิโนเทาโทเมอร์ ดังนั้นถ้าลำดับการเรียงตัวของเบสในสายหนึ่งเป็น –G-A-C-T ลำดับการเรียงตัวของเบสในอีกสายหนึ่งต้องเป็น –C-T-G-A เราเรียกการจับคู่เบสในลักษณะนี้ว่า "base complemetarity" ซึ่งหมายถึงการมีลำดับการเรียงตัวของเบสใน DNA 2 สายที่ต่างก็เป็นคู่สมของกันและกัน หรือ DNA สายหนึ่งเป็นสายคู่สม (complementary strand) ของอีกสายหนึ่งนั่นเอง หลักของการเข้าคู่กันของเบสเป็นกฎพื้นฐานของการทำหน้าที่เป็นแม่แบบ (template) ของ DNA ในการถ่ายแบบ DNA (DNA replication) และการถอดรหัส (Transcription)

ทิศทางการวางตัวของ DNA ทั้ง 2 สายในการประกอบกันเป็นเกลียวคู่นั้น DNA แต่ละสายที่เป็นคู่สมกันและกันจะต้องวางตัวในทิศทางตรงกันข้ามหรือกลับขั้วกัน เราเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า "opposite polarity" หรือ "antiparallel" หลักการวางตัวของสายพอลินิวคลีโอไทด์นี้ เป็นกฎพื้นฐานที่จะนำไปใช้ในการถ่ายแบบ DNA (DNA replication), การถอดรหัส (Transcription), และ การแปลรหัส (Translation) ด้วย

2.5.3) โครงสร้างเกลียวคู่แบบอื่น ๆ ของ DNA

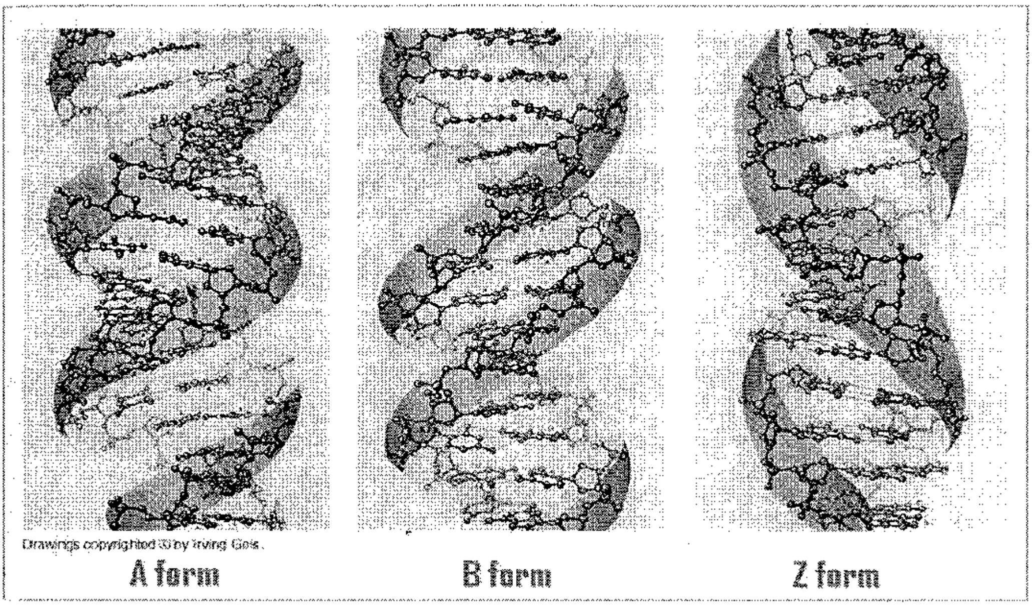
โครงสร้าง DNA แบบที่เสนอโดย Watson และ Crick นั้นเป็นโครงสร้างหลักซึ่งพบได้มากที่สุด และเรียกโครงสร้างแบบนี้ว่าโครงสร้างแบบ B ของ DNA (B form) แต่เมื่อพิจารณาลักษณะทางเคมีของน้ำตาลดีออกซิไรโบสกับฟอสเฟตซึ่งต่อกันเข้าเป็นแกนหลักของโครงสร้าง DNA นั้น จะเห็นว่าหลายพันธะในโครงสร้างนี้สามารถหมุนได้ ลักษณะเช่นนี้หากมีปัจจัยภายนอกบางอย่าง เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ สามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างเกลียวคู่ได้ อาจก่อให้เกิดการบิดงอ, การยืดออก, หรือ DNA เกลียวคู่แยกออกจากกัน เป็นต้น นั่นคือ โครงสร้างเกลียวคู่ของ DNA มีความยืดหยุ่นอย่างมากและการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ เหล่านี้พบได้เสมอในเซลสิ่งมีชีวิต

การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวข้างต้นสามารถก่อให้เกิดโครงสร้างเกลียบคู่แบบอื่น ๆ ได้อีก ซึ่งพบในบางส่วนของโมเลกุล DNA ที่สำคัญและรู้จักกันดีในปัจจุบันคือ โครงสร้างแบบ A (A form) และแบบ Z (Z form) โครงสร้างแบบ A จะพบได้บ่อยเป็นพิเศษเมื่อเตรียม DNA ในสารละลายที่ค่อนข้างขาดน้ำ โดย DNA จะมีลักษณะเป็นเกลียวคู่วนขวาเช่นเดียวกับ B form แต่ระยะห่างระหว่างเบสจะสั้นเพียง 0.23 นาโนเมตร (แทนที่จะเป็น 0.34 นาโนเมตร) และจำนวนเบสต่อรอบเกลียวจะเป็น 11 คู่แทนที่จะเป็น 10 คู่ รูปร่างเกลียวคู่จึงมีลักษณะหนากว่า B form ส่วนโครงสร้างเกลียวคู่แบบ Z form จะต่างไปจากแบบ B form และ A form อย่างมาก คือเป็นแบบเกลียวคู่วนซ้าย มีจำนวนเบสต่อรอบเกลียวสูงถึง 12 คู่และแต่ละคู่เบสห่างกัน 0.37 นาโนเมตร นอกจากนี้โครงสร้างแกนหลักของ DNA มีลักษณะโค้งงอไปมา โครงสร้าง A form จะมีจริงในเซลหรือไม่ยังไม่ทราบ แต่โครงสร้างแบบ Z นั้นพบหลักฐานว่ามีแน่นอน เชื่อว่าโครงสร้างพิเศษเหล่านี้คงมีบทบาทในกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีน

2.5.4) โครงสร้างที่เกิดจากลำดับเบสพิเศษบนโมเลกุลของ DNA

ในบางบริเวณบนโมเลกุล DNA จะมีลำดับเบสพิเศษซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างเฉพาะที่เกิดขึ้น เข้าใจว่าคงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมทาบอลิซึมของ DNA เช่น หากช่วงใดในโมเลกุล DNA มีเบส A อยู่ติดต่อกันตั้งแต่ 4 ตัวขึ้นไป จะทำให้การโค้งงอในโครงสร้างเกลียวคู่ได้ เช่น ถ้ามีเบส A ตัวติดต่อกันจะทำให้ DNA ส่วนนั้นโค้งงอได้มากถึง 18° ซึ่งเชื่อกันว่าน่าจะมีบทบาทสำคัญในการจับกับโปรตีนหรือเอนไซม์พิเศษบางอย่าง

แต่ลำดับเบสที่พบได้บ่อยกว่าคือลำดับเบสแบบ**พาลินโดรม** (palindrome) คำว่า "พาลินโดรม" นี้หมายถึง คำ, วลี หรือประโยคที่อ่านจากซ้ายไปขวาเหมือนกับเมื่ออ่านจากขวาไปซ้าย เช่น คำว่า "ROTATOR" ไม่ว่าจะอ่านจากซ้ายไปขวาหรือขวาไปซ้ายจะเป็นคำ ๆ เดียวกัน พาลินโดรมจึงเป็นคำที่นำมาประยุกต์ใช้เพื่อบอกว่าในแต่ละสายของ DNA เกลียวคู่นั้นมีลำดับเบสบางส่วนเหมือนกับแบบภาพเงาสะท้อนในกระจก ลักษณะเช่นนี้ทำให้ลำดับเบสภายใน DNA สายเดียวกันมีลักษณะเป็นคู่สมของกันและกัน และสามารถเข้าคู่ภายในสายเดียวกันได้ ทำให้เกิดโครงสร้างแบบไม้กางเขน (cruciform) หรือ บ่วง (loop) ขึ้น โครงสร้างแบบนี้น่าสนใจเพราะอาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมทาบอลิซึมของ DNA ปัจจุบันพบลำดับเบสแบบพาลินโดรมในโมเลกุล DNA หลายแห่งโดยเฉพาะส่วนที่จับกับโปรตีนจำเพาะ



รูปที่ 2-8 โครงสร้าง DNA เกลียวคู่แบบต่าง ๆ

http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/images/VVP/Ch23/23-2a.jpg

ตารางที่ 2-4 เปรียบเทียบโครงสร้าง DNA เกลียวคู่แบบต่าง ๆ

	A Form	B Form	Z Form
ทิศทางการหมุนของเกลียวคู่	ขวา	ขวา	ซ้าย
จำนวนคู่เบสต่อหนึ่งรอบเกลียว (*n*)	11	10	12 (6 ไดเมอร์)
การหมุนตัวของเกลียวต่อหนึ่งคู่เบส (=360°/*n*)	33°	36°	-60° ต่อไดเมอร์
			~ -30° ต่อไดเมอร์
ระยะห่างระหว่างเบสแต่ละคู่ (*h*)	0.255 nm	0.34 nm	0.37 nm
ความยาวของเกลียว (=*nh*)	2.8 nm	3.4 nm	4.5 nm

*2.5.5) **สมบัติของ DNA***

DNA มีสมบัติเฉพาะตัวหลายอย่าง แต่ที่จะกล่าวถึงในบทนี้เป็นสมบัติบางประการที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการศึกษาทางชีวเคมีของ DNA

การเป็นกรด (Acidity) DNA แสดงสมบัติเป็นกรดเนื่องจากมีหมู่ฟอสเฟตอยู่เป็นจำนวนมากในโมเลกุล และหมู่ฟอสเฟตนี้สามารถแตกตัวให้ประจุลบได้ที่ pH ของร่างกาย ดังนั้นจึงพบ DNA จับรวมอยู่กับสารอื่นที่มีประจุบวก เช่น Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} รวมทั้งโปรตีนที่มีฤทธิ์เป็นเบสและมีประจุบวก

ความหนืด (Viscosity) ความหนืดของสารละลายใดก็ตามขึ้นอยู่กับสมบัติของโมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบ สมบัติสำคัญของโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับความหนืด ได้แก่ ปริมาตร, รูปร่างและขนาด, ความกว้างและยาวของโมเลกุล พบว่าโมเลกุลที่มีลักษณะยาวรี (prolate) หรือ กลมแบน (oblate) จะมีความหนืดสูงกว่าโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม (globular) การที่โมเลกุลของ DNA มีลักษณะเป็นแท่ง (rod) คือ มีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างสูง และยังเป็นโมเลกุลที่มีประจุลบมากมายนี้ เมื่ออยู่ในน้ำจะทำให้ปริมาตรเพิ่มขึ้นจากเดิมกว่า 10,000 เท่า ซึ่งมีผลทำให้สารละลาย DNA มีความหนืดสูงมากแม้จะเจือจางแล้วก็ตาม ความหนืดของ DNA จะเปลี่ยนไปเมื่อรูปร่างของมันเปลี่ยนแปลง กล่าวคือ ถ้า DNA เกลียวคู่แยกตัวออกเป็นสายเดี่ยว ความหนืดจะลดลง และเมื่อสาย DNA ทั้งสองกลับมาจับกันเป็นเกลียวคู่อีก ความหนืดจะกลับเพิ่มขึ้นเช่นเดิม

การเสียสภาพและการกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติ (Denaturation and renaturation) การเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) หมายถึง การทำให้ DNA ทั้ง 2 สายในเกลียวคู่แยกตัวออกจากกันเป็นสายเดี่ยว ซึ่งจะทำให้ DNA สายเดี่ยวแต่ละสายขดม้วนตัวอย่างอิสระ (random coil) ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาตินี้มีหลายอย่าง เช่น ความร้อน, กรด, ด่าง, รังสีเอกซ์ และสารเคมีบางชนิด เช่น ยูเรีย เป็นต้น

หลังจากที่ DNA เกลียวคู่ถูกทำลายให้เสียสภาพธรรมชาติแล้ว และถ้าปรับสภาพแวดล้อมเสียใหม่ให้เหมาะสม DNA สายเดี่ยวจะสามารถกลับมาเข้าคู่กันและประกอบกันขึ้นเป็นเกลียวคู่ใหม่อีกครั้งหนึ่งได้ กระบวนการนี้เรียกว่า การกลับคืนสู่สภาพตามธรรมชาติ (renaturation หรือ annealing process) เช่น ถ้าให้ DNA เกลียวคู่เสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อนและปล่อยให้อุณหภูมิค่อย ๆ เย็นลง สาย DNA ทั้ง 2 จะกลับมาเข้าคู่กันใหม่เป็น DNA เกลียวคู่อีกได้

*2.5.6) **สมบัติในการดูดกลืนแสงของ DNA***

เนื่องจากเบสใน DNA สามารถดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และเนื่องจากปริมาณแสงที่ดูดกลืนเป็นปฏิภาคโดยตรงกับจำนวนเบสที่มีอยู่ เราจึงสามารถนำสมบัตินี้ไปใช้ในการตรวจสอบและหาปริมาณ DNA ได้ ตลอดจนนำไปใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการเสียและกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติของ DNA ทำให้เกิดปรากฏการณ์เกี่ยวกับการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ได้ 2 แบบ คือ ไฮโพโครมิซึม (hypochromism) และไฮเพอร์โครมิซึม (hyperchromism)

ไฮโพโครมิซึม (hypochromism) เป็นปรากฏการณ์ที่สารละลาย DNA ดูดกลืนแสงได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น กล่าวคือ น้อยกว่าค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณจากจำนวนเบสที่มีอยู่ในโมเลกุลของมัน ทั้งนี้เนื่องจาก DNA ที่อยู่ในสารละลายนั้นอยู่ในรูปเกลียวคู่ ซึ่งในโครงสร้างเช่นนี้จะมีการจัดเรียงตัวของเบสอย่างเป็นระเบียบโดยเบสจะเข้าไปอยู่ด้านในระหว่างแกนหลักของ DNA 2 สาย ทำให้เบสไม่สามารถดูดแสงได้ทุกตัวเนื่องจากถูกบังไว้ มีเบสเพียงบางส่วนเท่านั้นที่สามารถดูดแสงได้จึทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ลดลง

ไฮเพอร์โครมิซึม (hyperchromism) เป็นปรากฏการณ์ที่สารละลายของ DNA ซึ่งเดิมเคยดูดกลืนแสงได้น้อยกลับดูดกลืนแสงได้มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างแบบเกลียวคู่ ทำให้ DNA ทั้ง 2 สายหลุดออกจากกันเป็นสายเดียว เบสที่เคยถูกบังไว้ด้านในจะสัมผัสกับแสงได้ดีขึ้น ดังนั้นจำนวนเบสที่จะดูดกลืนแสงได้จึงมีมากขึ้นกว่าเดิมและทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของ DNA เพิ่มขึ้น

<u>2.6) **กรดไรโบนิวคลีอิก** (Ribonucleic acid, RNA)</u>

RNA เป็นพอลินิวคลีโอไทด์ที่ประกอบขึ้นด้วยไรโบนิวคลีโอไทด์หลาย ๆ หน่วยยึดต่อกันด้วยพันธะ 3',5'-ฟอสโฟไดเอสเทอร์ เช่นเดียวกันกับใน DNA

2.6.1) โครงสร้างทั่วไป ขนาดและรูปร่างของโมเลกุล

RNA ที่พบในเซลทั้งหมดเป็น RNA ชนิดสายเดี่ยว เฉพาะในไวรัสบางชนิดเท่านั้นที่อาจพบ RNA สายคู่ได้ RNA มีขนาดต่าง ๆ กัน บางโมเลกุลประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ไม่ถึง 100 หน่วยในขณะที่บางโมเลกุลอาจมีถึง 3,700 หน่วย ชนิดของเบสที่เป็นองค์ประกอบของ RNA ไม่แน่นอน และปริมาณของพิวรีนไม่จำเป็นต้องเท่ากับพิริมิดีนเหมือนกับใน DNA มักจะพบเบสที่แปลกหรือเบสชนิดพบได้ยากเป็นองค์ประกอบนอกเหนือจากเบส 4 ชนิดที่กล่าวมาแล้ว แม้ว่าจะเป็นสายเดี่ยว RNA อาจม้วนพับสายของมันเข้าหากันและพันกันเองเป็นรูปเกลียวได้ ระหว่างส่วนที่เป็นเกลียวจะมีส่วนที่เป็นสายตรงคั่นอยู่เป็นระยะ ๆ แรงยึดเหนี่ยวที่ทำให้เกิดรูปเกลียวคือ พันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสชนิดที่เป็นคู่สมของกันและกันเช่นเดียวกับใน DNA โดย A จะจับกับ U (U แทนที่ T ใน RNA) และ G ยังคงจับกับ C การเข้าคู่กันของเบสใน RNA นี้บางครั้งทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นบ่วงเหมือนกิ๊บติดผม (hairpin loop) พบว่าการเข้าคู่กันของเบสในสาย RNA ไม่ค่อยสมบูรณ์นัก เบสที่อยู่ตรงข้ามกันอาจจะไม่เป็นคู่สมของกันและกัน ดังนั้นเพื่อให้ส่วนอื่นสามารถเข้าคู่กันได้จึงอาจเกิดการโค้งเป็นวงได้

2.6.2) แหล่งที่พบและชนิดต่าง ๆ ของ RNA

ในเซลของยูคาริโอตจะพบ RNA ได้ทั้งในนิวเคลียส, ไซโทพลาสซึม และ ไมโทคอนเดรีย ในนิวเคลียสจะพบมากในบริเวณนิวคลีโอลัส ปริมาณ RNA ที่พบในนิวเคลียสนี้เป็นเพียงส่วนน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับปริมาณที่พบในไซโทพลาสซึม RNA ในไซโทพลาสซึมแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ mRNA (messenger RNA), rRNA (ribosomal RNA), และ tRNA (transfer RNA) ซึ่งจะกล่าวโดยละเอียดในบทที่ 4 และ 5 ต่อไป

mRNA (messenger RNA) พบทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม มีปริมาณน้อยกว่า RNA ชนิดอื่น คือ ประมาณร้อยละ 2 ของ RNA ทั้งหมด แต่ชนิดของ mRNA จะมีมากกว่า RNA ชนิดอื่น ๆ เช่น ใน 1 เซลของยูคาริโอตอาจพบ mRNA ได้ถึง 1 หมื่นชนิด ทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมจาก DNA เพื่อสร้างโปรตีนโปรตีนแต่ละชนิดจะมี mRNA เฉพาะตัวของมัน ขนาดของ mRNA จะไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับขนาดหรือข้อมูลของโปรตีนที่มันบรรจุไว้ สิ่งที่เป็นตัวกำหนดให้กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ มาเชื่อมต่อกันเกิดเป็นโปรตีนแต่ละชนิดนั้นก็คือ ลำดับเบสในโมเลกุลของ mRNA นั่นเอง mRNA ที่บรรจุรหัสในการสร้างโปรตีนเพียงชนิดเดียวเรียกว่า "monocistronic mRNA" ซึ่งพบในยูคาริโอต ส่วน mRNA ที่บรรจุรหัสสำหรับสร้างโปรตีนมากกว่า 1 ชนิด เรียกว่า "polycistronic mRNA" และพบในโปรคาริโอต

mRNA ของพวกโปรคาริโอตมีช่วงเวลาใช้งานหรือมีค่าครึ่งชีวิตสั้น (half life, $t_{1/2}$) แต่ในเซลยูคาริโอตจะอยู่ได้นานกว่าโดยไม่ถูกทำลายไปอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่าที่ปลาย 3' ของ mRNA ในพวกยูคาริโอตมีเบส A เรียงต่อซ้ำกันถึงประมาณ 20-200 หน่วย (polyadenilate) เรียกปลายด้านนี้ว่า "poly (A) tail" ส่วนที่ปลาย 5' จะมีนิวคลีโอไทด์เป็น 7-methyl-5'-guanosine triphosphate เรียกปลายด้านนี้ว่า "5'-cap" เพื่อทำให้

mRNA มีอายุการใช้งานนานขึ้น ไม่ถูกทำลายไปโดยเอนไซม์เสียก่อน นอกจากนี้ 5'-cap ยังเป็นจุดที่ไรโบโซมจดจำในการเริ่มต้นการสร้างโปรตีน (การแปลรหัส)

rRNA (ribosomal RNA) หมายถึง RNA ที่เป็นส่วนประกอบของไรโบโซม มีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 65 ของน้ำหนักไรโบโซม เป็น RNA ซึ่งมีปริมาณมากที่สุด คือ ประมาณร้อยละ 80 ของ RNA ทั้งหมดภายในเซล rRNA ที่พบในพืชและสัตว์ชั้นสูง(ยูคาริโอต)มี 4 ขนาด คือ 28S, 18S, 5.8S, และ 5S ส่วนในโปรคาริโอตมี 3 ขนาด คือ 23S, 16S, และ 5S ผลจากการศึกษาโดยวิธีไฮบริไดเซชัน แสดงให้เห็นว่า ในบางส่วนของ DNA จะมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับลำดับเบสใน rRNA ดังนั้น จึงเป็นหลักฐานอย่างหนึ่งที่บอกให้ทราบว่า ในการสังเคราะห์ rRNA นั้น ต้องมี DNA ในส่วนดังกล่าวเป็น แม่แบบแน่นอน หลักจากสังเคราะห์แล้ว rRNA จะออกไปในไซโทพลาสซึมและเข้ารวมกับโปรตีนเกิดเป็นไรโบโซม ทำหน้าที่เป็นแหล่งผลิตโปรตีน

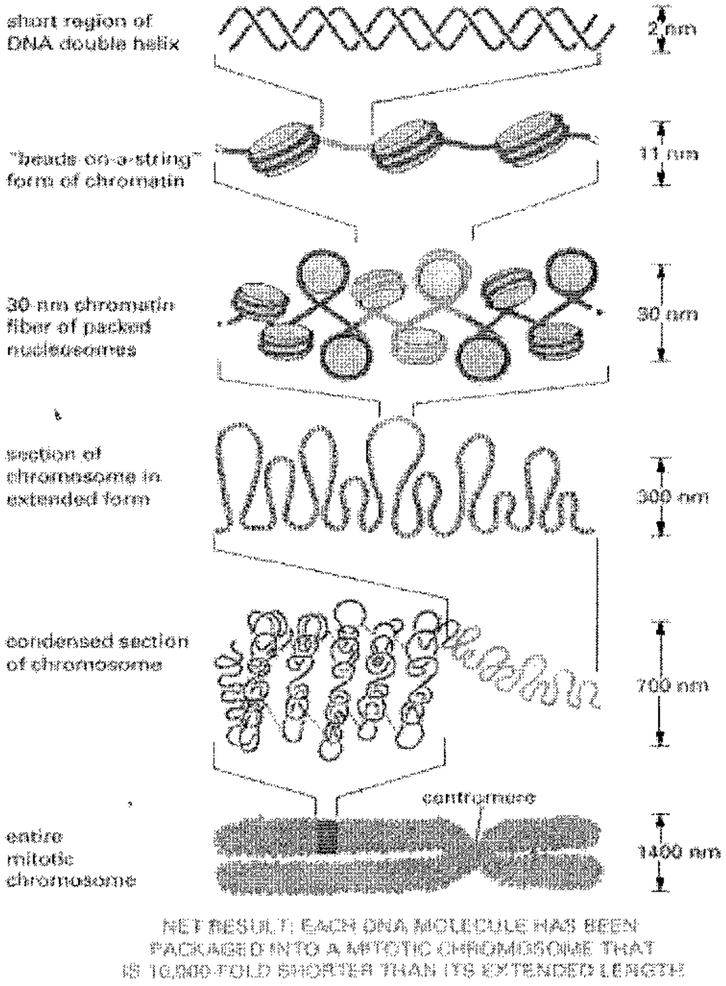
tRNA (transfer RNA) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *sRNA (soluble RNA)* เป็น RNA ที่สามารถอ่านรหัสชุดสามบน mRNA ได้ tRNA ทำหน้าที่เป็นตัวพากรดอะมิโนมายังไรโบโซมและ mRNA เพื่อประกอบกันเป็นสายพอลิเพปไทด์ได้อย่างถูกต้อง tRNA แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดอะมิโน คือ สามารถรับและพากรดอะมิโนไปได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น กรดอะมิโนหลักในธรรมชาติที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนนั้นมีเพียง 20 ชนิด แต่พบ tRNA ได้มากกว่า 20 ชนิด ซึ่งหมายความว่า กรดอะมิโนชนิดหนึ่ง ๆ อาจมี tRNA ได้มากกว่า 1 ชนิด โดยจะกล่าวในรายละเอียดของ tRNA ต่อไปในบทที่ 5

RNA ชนิดอื่น ๆ นอกจาก RNA 3 ชนิดดังกล่าวแล้ว ในเซลของพวกยูคาริโอตยังพบ RNA ได้อีก 3 ชนิด คือ ก.) *วิวิธพันธุ์ในนิวเคลียส (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA)* ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการตัดแต่งดัดแปลงจะได้ mRNA, ข.) *RNA เสถียรขนาดเล็ก* พบได้ทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม และพบรวมอยู่กับโปรตีน ทำหน้าที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน เช่น U7 ทำหน้าที่ในการสร้างปลาย 3' ของ mRNA สำหรับโปรตีนฮิสโตน (histone) ให้ถูกต้อง, U4 และ U6 อาจทำหน้าที่ในการเติม poly A ให้แก่ mRNA, U1 ทำหน้า ที่เป็นเอนไซม์ในการตัดต่อ hnRNA ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็น mRNA เป็นต้น เฉพาะกลุ่มที่อยู่ในนิวเคลียส เรียกว่า snRNA (small nuclear RNA) หรือ snurps (small nuclear ribonucleoprotein particles), ค.) *RNA ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial RNA)* และ RNA ในคลอโรพลาสต์ ในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ไม่เพียงแต่มี DNA เป็นของตัวเองเท่านั้น แต่ยังมีไรโบโซม, tRNA และ mRNA ของตัวเองอีกด้วย และเป็นคนละชนิดกับที่พบในไซโทพลาสซึม

2.7) โครโมโซม (Chromosome)

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน เซลของโปรคาริโอตมีเพียงโครโมโซมเดียว ซึ่งเป็น DNA เกลียวคู่แบบวงแหวนปิดเท่านั้น ส่วนในยูคาริโอตมีจำนวนโครโมโซมมากกว่า 1 และมีโครงสร้างสลับซับซ้อนมากกว่าของโปรคาริโอต โดยจะพบโครโมโซมอยู่ในนิวเคลียส และแต่ละโครโมโซมประกอบด้วย DNA เกลียวคู่ 1 โมเลกุลรวมอยู่กับโปรตีนมากมายหลายชนิด การจัดเรียงตัวของโมเลกุลและรูปร่างไม่คงที่จะเปลี่ยนไปเมื่อเซลเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ในช่วงวงจรชีวิตของเซล (cell cycle) โดยจะเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนมากที่สุดในระยะไมโทซิส (mitosis) ส่วนในระยะอินเทอร์เฟส (interphase) และ โพรเฟส (prophase) จะปรากฏเป็นเส้นใยโครมาติน (chromatin fiber)

การที่ DNA และโปรตีนอยู่รวมกันเกิดเป็นโครงสร้างซึ่งเรียกว่า โครมาติน นั้น พบว่ามีลักษณะคล้ายกับลูกปัดที่ร้อยอยู่ในเชือก (bead and string) กล่าวคือ ส่วนที่เป็นโปรตีน ซึ่งได้แก่ ฮิสโตน (histone) ชนิดต่าง ๆ นั้นจะรวมกันเป็นก้อนและมี DNA พันตัวรอบก้อนของฮิสโตนไว้คล้ายลูกปัด เราเรียกเฉพาะส่วนที่เป็นก้อนฮิสโตนและมี DNA พันรอบนี้ว่า "นิวคลีโอโซม" (nucleosome) เส้นใยของโครมาตินสามารถม้วนตัวเป็นวงหลาย ๆ วงและวงเหล่านี้ยึดอยู่ด้วยกันที่เซนโทรเมียร์ (centromere) ได้



รูปที่ 2-9 การจัดเรียงตัวของ DNA ในโครโมโซมของเซลยูคาริโอต
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=packing,chromatin&rid=mboc4.figgrp.679

บทที่ 3 กระบวนการถ่ายแบบ DNA (DNA Replication)

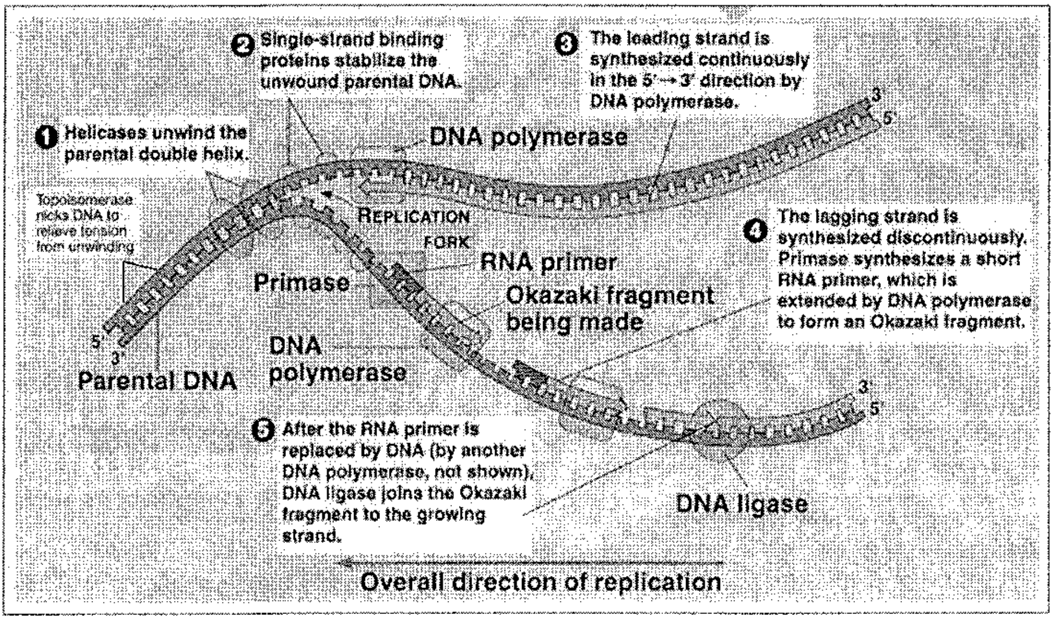
กระบวนการถ่ายแบบ DNA เป็นแบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative replication) กล่าวคือ สาย DNA แต่ละสายจะทำหน้าที่เป็นแม่แบบสำหรับสายใหม่ที่สร้างขึ้น เกิดเป็น DNA ใหม่ 2 โมเลกุลที่เหมือนกันและเหมือนกับโมเลกุลแม่แบบทุกประการ เอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการถ่ายแบบ DNA คือ DNA polymerase III มีหน้าที่สำคัญในการสร้างสาย DNA สายใหม่ DNA polymerase I มีหน้าที่ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสาย DNA ที่กำลังสร้างและมีหน้าที่ในการซ่อมแซม DNA ที่เสียหาย สำหรับหน้าที่ของ DNA polymerase II ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้ยังมีโปรตีนและเอนไซม์อีกหลายตัวที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ DNA กระบวนการถ่ายแบบ DNA ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดยังแตกต่างกันเล็กน้อยในรายละเอียด แต่โดยภาพรวมแล้วมีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคือเซลสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการที่สูงกว่าก็ย่อมจะมีความยุ่งยากสลับซับซ้อนในการถ่ายแบบ DNA มากกว่า

โดยทั่วไปการถ่ายแบบ DNA หรือการสังเคราะห์ DNA จะเกิดขึ้นเมื่อมีการแบ่งเซล ปัจจุบันแม้ว่าความรู้เกี่ยวกับการถ่ายแบบ DNA จะเพิ่มขึ้นมากแล้วก็ตาม แต่ก็ยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายเกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์ DNA ทุกขั้นตอนได้ กลไกของการถ่ายแบบ DNA ค่อนข้างจะซับซ้อน มีเอนไซม์และโปรตีนหลายชนิดมาเกี่ยวข้องในกระบวนการ DNA ของเซลยูคาริโอตจะอยู่รวมกับโปรตีนฮิสโตนในรูปของโครโมโซม ไม่ได้อยู่ค่อนข้างเป็นอิสระเหมือนของโปรคาริโอต ดังนั้นการศึกษาการถ่ายแบบ DNA ในเซลยูคาริโอตจึงทำได้ยากกว่าของเซลโปรคาริโอต ด้วยเหตุนี้ความรู้ส่วนใหญ่เกี่ยวกับการถ่ายแบบ DNA จึงได้มาจากการศึกษาในเซลโปรคาริโอต โดยเฉพาะในแบคทีเรีย *E. coli*

การถ่ายแบบ DNA ใน *E. coli* ซึ่งเป็นเซลสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ (Prokaryote) มีโครงสร้างของเซลและโครโมโซมแบบง่าย ๆ เริ่มขึ้นที่จุดเริ่มต้นจำเพาะ (Origin of Replication, OriC) ซึ่งมีเพียง 1 จุด ที่บริเวณนี้ DNA แม่แบบมีการคลายเกลียวแยกสายออกจากกัน เอนไซม์ helicase ทำหน้าที่คลายเกลียว DNA ไปทั้ง 2 ทิศทางจากจุดเริ่มต้น การสร้างสาย DNA สายใหม่จะเริ่มด้วยการสร้างสาย RNA primer สั้น ๆ ขึ้นก่อนโดยเอนไซม์ primase จากนั้น DNA สายใหม่จะถูกสร้างต่อจาก RNA primer นี้อีกทีโดยเอนไซม์ DNA polymerase III ในทิศทาง 5' --> 3' เสมอและสวนทิศกับแม่แบบ การสร้าง DNA สายใหม่เกิดขึ้นใน 2 ลักษณะ คือ สายหนึ่งจะถูกสร้างขึ้นต่อเนื่องกันไปเป็นสายยาว เรียกว่า leading strand และสร้างไปในทิศทางเดียวกับการเคลื่อนของจุดแยกสาย ส่วนอีกสายจะถูกสร้างขึ้นในลักษณะเป็นเส้นสั้น ๆ ไม่ต่อเนื่องเรียกว่า lagging strand และมีทิศทางตรงข้ามกับการเคลื่อนของจุดแยกสาย (replication fork) เส้นสั้น ๆ เหล่านี้เรียกว่า Okazaki fragment (ตามชื่อนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นผู้ค้นพบ คือ Reiji Okazaki และคณะ) RNA primer ติดอยู่ที่ปลาย 5' ของสาย DNA ที่สังเคราะห์ใหม่ จะถูกแทนที่ด้วย DNA โดยเอนไซม์ polymerase I เส้น RNA จะถูกตัดออกทีละเบสและแทนที่ด้วย DNA จากปลาย 5' จนกระทั่งสิ้นสุดที่ปลายด้าน 3' ของ RNA สุดท้ายสาย DNA เส้นสั้น ๆ ที่ถูกสร้างแทนที่ RNA primer ก็จะถูกเชื่อมต่อกันเป็น DNA สายยาวโดยเอนไซม์ DNA ligase เมื่อสิ้นสุดกระบวนการถ่ายแบบ DNA แล้วจะได้ DNA เกลียวคู่ 2 คู่ แต่ละคู่ประกอบด้วยสายแม่แบบ 1 สาย และสายที่สร้างขึ้นใหม่ 1 สาย DNA เกลียวคู่ที่เกิดใหม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือน DNA โมเลกุลแม่แบบทุกประการ

มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

มกราคม 2550



รูปที่ 3-1 ตำแหน่งและหน้าที่ของโปรตีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายแบบ DNA
http://library.thinkquest.org/04apr/00217/images/content/74-Summary-DNA-Replication.jpg

3.1) <u>เอนไซม์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายแบบ DNA</u>

ก. *helix-destabilizing protein* **หรือ** *helicase* ทำหน้าที่สลายพันธะไฮโดรเจนแยกเกลียวคู่ออกจากกัน โดยอาศัยพลังงานจากการสลาย ATP

ข. *single strand DNA binding protein (SSB* **หรือ** *DBP)* จะจับกับ DNA สายเดี่ยวที่แยกจากกัน ป้องกันไม่ให้กลับมาพันกันเป็นเกลียวคู่อีกและป้องกัน DNA สายเดี่ยวดังกล่าวไม่ให้ถูกย่อยโดยเอนไซม์ nuclease

ค. *DNA gyrase* **หรือ** *topoisomerase* ทำหน้าที่คลายเกลียวเหนือจุดแยก (replication fork) โดยการตัด DNA สายใดสายหนึ่งออกได้แล้วจึงต่อกลับใหม่

ง. *primase* เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ RNA ขึ้น เพื่อใช้เป็น primer สำหรับการจำลองตัวของ DNA เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ DNA (DNA polymerase) ไม่สามารถจะเริ่มสังเคราะห์โดยตัวเองได้ primer ที่อยู่รวมกันที่จุดแยก เรียกว่าเป็น primosome

จ. *DNA polymerase* เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ DNA โดยนำเอานิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ามาต่อที่ปลาย3'-(OH) ของสายที่มีอยู่เดิมทำให้ DNA สายใหม่ยาวขึ้นในทิศทาง 5' ไป 3'

ฉ. *DNA ligase* เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เชื่อมโมเลกุลของ DNA ในระหว่างที่มีการจำลองตัว ซ่อมแซม และการเรียงตัวใหม่ของ DNA

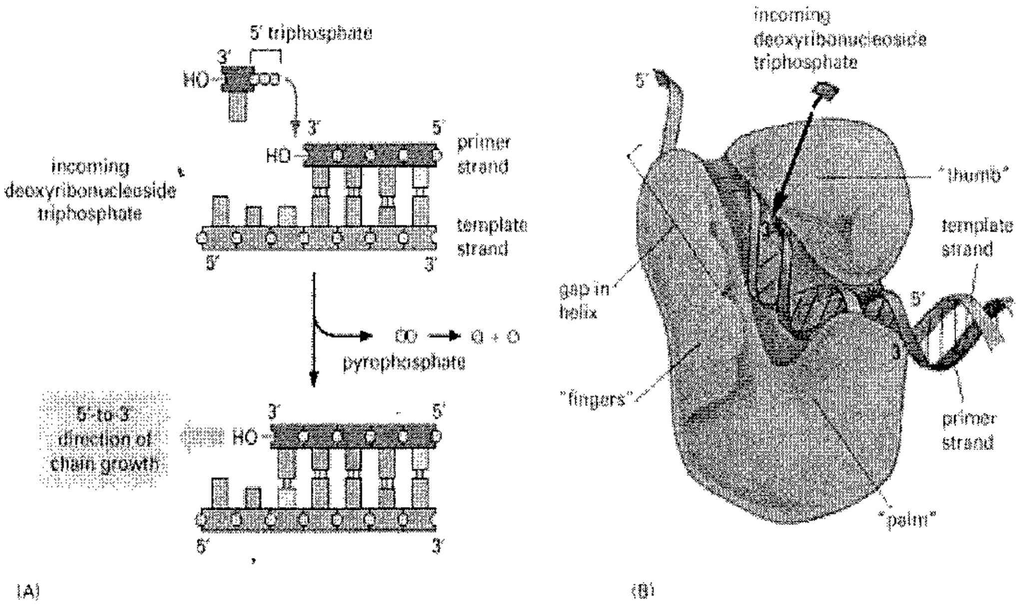
<u>เอนไซม์ DNA polymerase</u>

เอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ DNA คือ DNA polymerase ใน *E. coli* มีเอนไซม์ DNA polymerase อยู่ 3 ชนิด

1). *DNA polymerase I* ค้นพบโดย A. Kornberg ในปี ค.ศ. 1955 ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์เพียงสายเดียว (น้ำหนักโมเลกุล 103,000 ดาลตัน) แต่สามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 แบบด้วยกัน (เตือนจิต คำพิทักษ์, ปิติ ธุวจิตต์ และธีระวรรธน์ ขันทอง. 2543 : 103) คือ เป็นเอนไซม์สังเคราะห์สายพอลิเมอร์ของ DNA (polymerase activity) และเป็นเอนไซม์ตัดสายกรดนิวคลีอิก (nuclease activity) ได้ทั้งจากปลาย 3' (3' --> 5') และปลาย 5' (5' --> 3') Polymerase activity คือหน้าที่สร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ (dNTP) แต่ละหน่วยที่เติมให้แก่สาย RNA primer ในขั้นตอนเริ่มต้นของการสร้างสาย DNA ทั้ง Leading strand และ Lagging strand ดังปฏิกิริยาข้างล่างนี้

$$\text{DNA หรือ RNA primer} + \text{dNTP} \xrightarrow{Mg^{2+}} (\text{dNMP})_{n+1} + \text{PPi}$$

Lengthened DNA

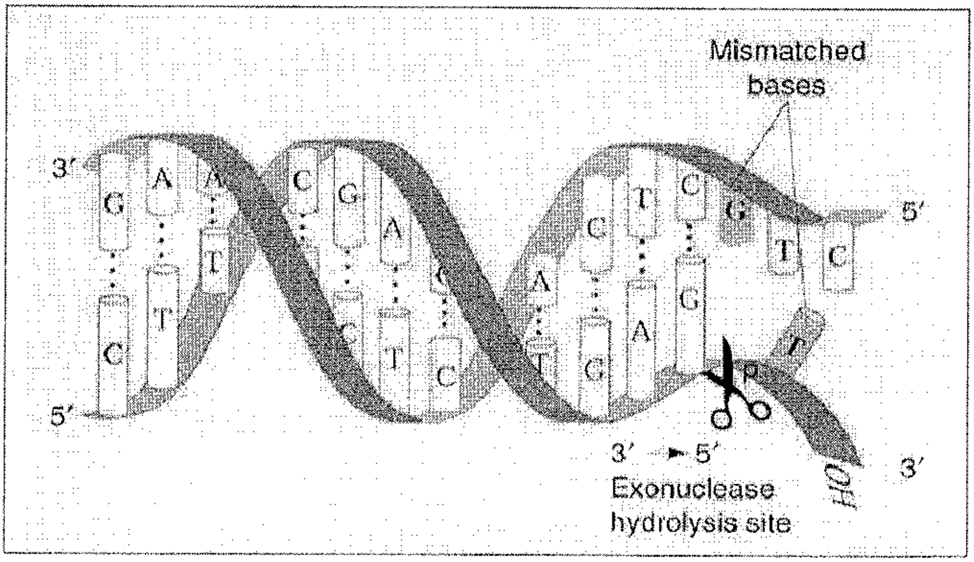


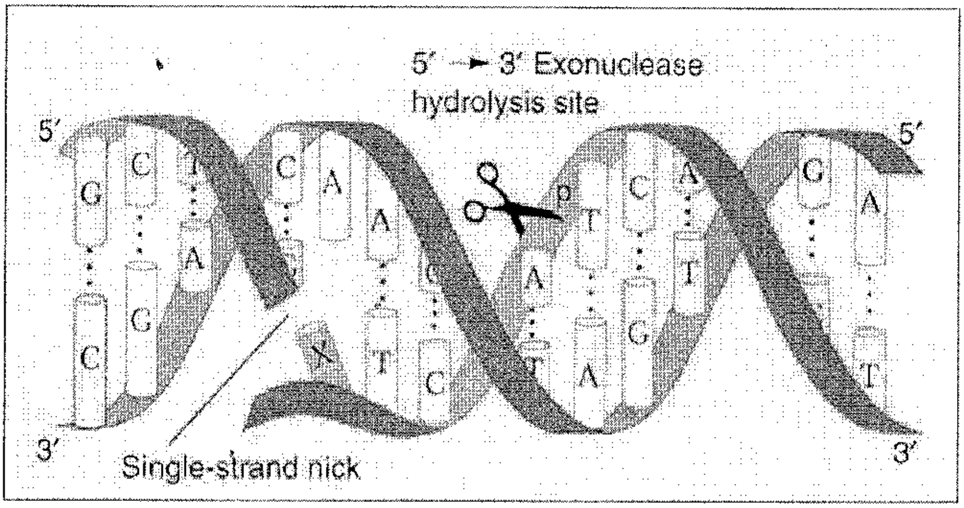
รูปที่ 3-2 Polymerase activity

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=dna,catalyzed&rid=mboc4.figgrp.758

dNTP จะถูกเติมทางปลาย 3'-OH ของสาย RNA primer หรือ DNA เท่านั้น โดยจะเกิดพันธะระหว่าง 5'-α-P ของ dNTP และ 3'-OH ที่ปลายสาย RNA primer หรือ DNAพร้อมกับมีไพโรฟอสเฟต (PPi) ถูกปล่อยออกมา ทำให้ DNA สายใหม่ยาวออกในทิศทางจาก 5' --> 3' นอกจากสาย RNA primer แล้ว เอนไซม์ DNA polymerase I ยังต้องการแม่แบบ (Template) เป็นตัวกำหนดการเลือก dNTP ที่จะนำเข้ามาต่อใน DNA สายใหม่ตามกฎการจับคู่ของเบส ดังนั้น DNA สายใหม่ที่สร้างขึ้นจะมีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์เป็น

ก)





ข)

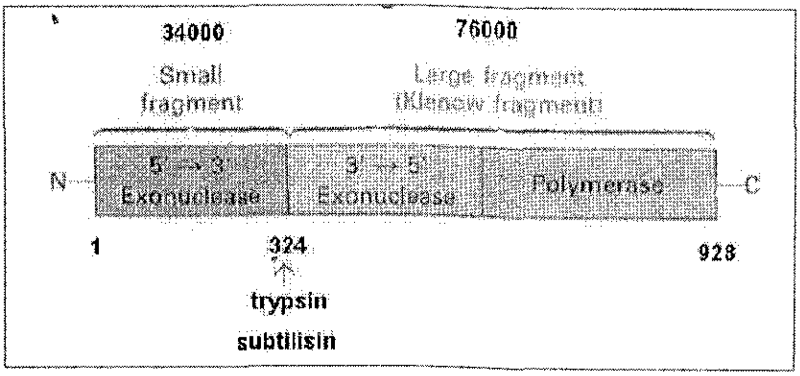
รูปที่ 3-3 ก) 3' --> 5' Exonuclease activity

http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/images/VVP/Ch24/24-7.jpg

ข) 5' --> 3' Exonuclease activity

http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/images/VVP/Ch24/24-8.jpg

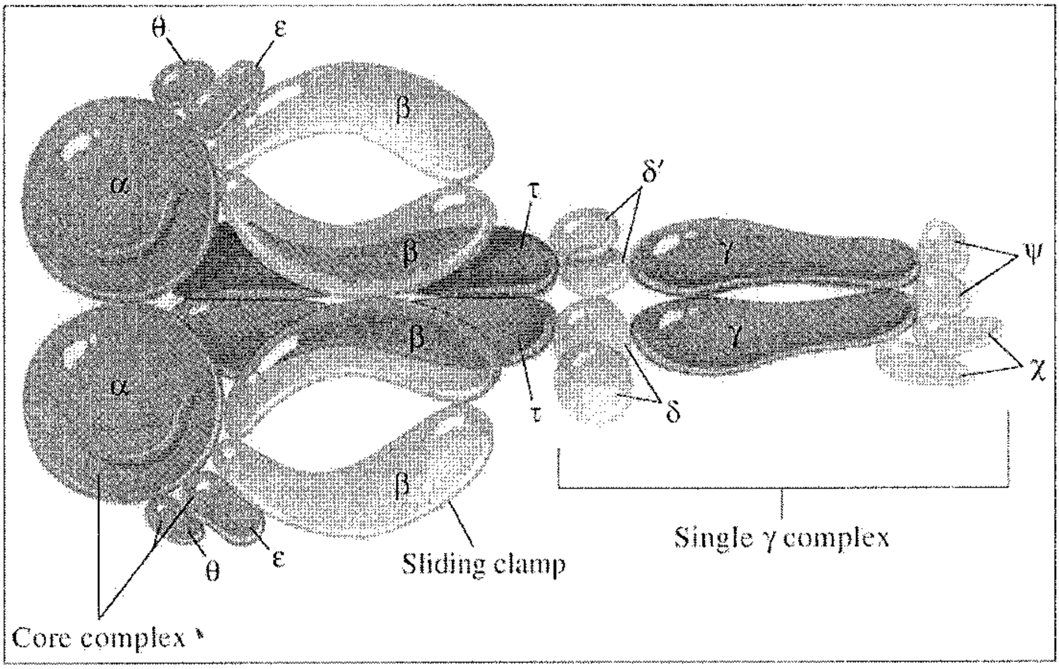
คู่สมกับสาย DNA แม่แบบ ซับสเตรตของเอนไซม์ DNA polymerase I คือ สาย RNA primer และ dNTP ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dGTP, dCTP, dTTP โดยมี Mg2+ เป็นโคแฟกเตอร์ 3'--> 5' exonuclease activity คือ หน้าที่ตัดนิวคลีโอไทด์ทีละหน่วยออกจากปลาย 3' ของสาย DNA ส่วนใหญ่จะทำหน้าที่กำจัดนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่ที่เข้าคู่กันอย่างไม่ถูกต้องออกไป ดังนั้น 3' --> 5' exonuclease activity ของเอนไซม์ DNA polymerase I จึงทำหน้าที่เป็นตัวตรวจสอบความถูกต้องเพื่อให้สาย DNA ที่สร้างขึ้นใหม่มีความถูกต้องมากที่สุด บางครั้งจึงเรียกว่า "proof reading activity" 5'--> 3' exonuclease activity ทำหน้าที่ตัดเอานิวคลีโอไทด์ออกจากปลาย 5' ของสาย DNA อาจจะตัดเพียงหน่วยเดียวหรือหลายหน่วยก็ได้ มีบทบาทสำคัญในการตัดเอา RNA primer ที่เกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์ DNA ออกไป และมีความสำคัญในกลไกการซ่อมแซมสาย DNA อีกด้วย บางครั้งจึงเรียกว่า "excision-repair activity" เอนไซม์ DNA polymerase I จะถูกแยกเป็น 2 ส่วนเมื่อถูกสลายด้วยเอนไซม์ protease คือ ส่วนที่มีขนาดเล็กซึ่งมี 5' --> 3' exonuclease activity และส่วนที่เหลือซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าที่เรียกว่า large หรือ Klenow fragment ซึ่งมีทั้ง polymerase activity และ 3'-->5' exonuclease activity อยู่รวมกัน



รูปที่ 3-4 DNA polymerase I เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ (103,000 ดาลตัน) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 928 ตัว เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส จะแบ่งเป็น 2 โมเลกุล คือ Small fragment ที่มี 5' --> 3' exonuclease activity และ Klenow fragment ที่มี polymerase และ 3' --> 5' exonuclease activity http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/images/Stryer/Stryer_F31-26_mod.jpg

2). *DNA polymerase II* (น้ำหนักโมเลกุล 88,000 ดาลตัน) ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบกันดี แต่เข้าใจว่าเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซม DNA อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันว่า เอนไซม์นี้มี polymerase activity และ 3'-->5' exonuclease activity แต่ไม่มี 5'-->3' exonuclease activity

3). *DNA polymerase III* (น้ำหนักโมเลกุล 830,000 ดาลตัน) มี polymerase activity และ 3'-->5' exonuclease activity แต่ไม่มี 5'-->3' exonuclease activity (ค้นพบโดย T. Kornberg บุตรชายของ A. Kornberg) เป็นเอนไซม์ ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ DNA ที่เกิดขึ้นภายในเซลโดยตรง ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วยทำงานร่วมกันจึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า DNA polymerase III holoenzyme หรือ DNA polymerase III complex



รูปที่ 3-5 DNA polymerase III holoenzyme http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/DNAPol-holo.jpg

ตารางที่ 3-1 Subunits ของ DNA polymerase III holoenzyme

Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd edition. 2000; หน้า 941

ชื่อหน่วยย่อย	จำนวนหน่วยย่อยต่อ holoenzyme	น้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อย	ชื่อยีน	หน้าที่ของหน่วยย่อย	
α	2	132,000	*polC* (*dnaE*)	Polymerization activity	Core Polymerase
ϵ	2	27,000	*dnaQ*(*mutD*)	3′→5′ Proofreading exonuclease	
θ	2	10,000	*holE*		
τ	2	71,000	*dnaX*	Stable template binding; core enzyme dimerization	
γ	2	52,000	*DnaX**	Clamp-loading complex that loads β subunits on lagging strand at each Okazaki fragment	
δ	1	35,000	*HolA*		
δ′	1	33,000	*HolB*		
χ	1	15,000	*holC*		
ψ	1	12,000	*holD*		
β	4	37,000	*dnaN*	DNA clamp required for optimal processivity	

ตารางที่ 3-2 ตารางเปรียบเทียบ DNA polymerase ของแบคทีเรีย *E. coli*

(ที่มา: Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd edition. 2000; หน้า 939 และ Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry 3rd edition. 2000; หน้า 892)

	เอนไซม์ DNA Polymerase		
	I	II	III
ยีน (structural gene)*	*polA*	*polB*	*polC* (*dnaE*)
จำนวนหน่วยย่อย (subunits)	1	≥ 4	≥ 10
น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight; dalton)	103,000	88,000$^{\Psi}$	830,000
$3' \rightarrow 5'$ Exonuclease (proofreading)	มี	มี	มี
$5' \rightarrow 3'$ Exonuclease	มี	ไม่มี	ไม่มี
อัตราการสังเคราะห์ DNA หรือ Polymerization rate (นิวคลีโอไทด์ / วินาที)	16-20	40	250-1000
Processivity (จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่นำเข้าไปต่อได้ก่อนที่เอนไซม์จะหลุดจากสาย DNA)	3-200	1,500	≥500,000
หน้าที่ในเซลล์ (biological function)	ซ่อมแซมDNA (DNA repair) และ กำจัด RNA primer	อาจเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซม DNA แบบ SOS DNA Repair	เพิ่มความยาวของสาย DNA ในกระบวนการถ่ายแบบ DNA

*สำหรับเอนไซม์ที่มีหน่วยย่อยมากกว่า 1 หน่วยย่อย ชื่อยีนที่แสดงไว้ในตารางเป็นชื่อยีนสำหรับสังเคราะห์เฉพาะหน่วยย่อยที่มี polymerase activity เท่านั้น ส่วน *dnaE* เป็นชื่อเดิมของยีน *polC*

$^{\Psi}$เป็นน้ำหนักโมเลกุลสำหรับหน่วยย่อยที่มี polymerase activity เท่านั้น โดยเอนไซม์ DNA polymerase II มีหน่วยย่อยหลายหน่วยที่เหมือนกับหน่วยย่อยของเอนไซม์ DNA polymerase III ซึ่งได้แก่ หน่วยย่อย β หน่วยย่อย γ หน่วยย่อย δ หน่วยย่อย δ' หน่วยย่อย χ และ หน่วยย่อย ψ

3.2) <u>ขั้นตอนการถ่ายแบบ DNA ใน *E. coli*</u>

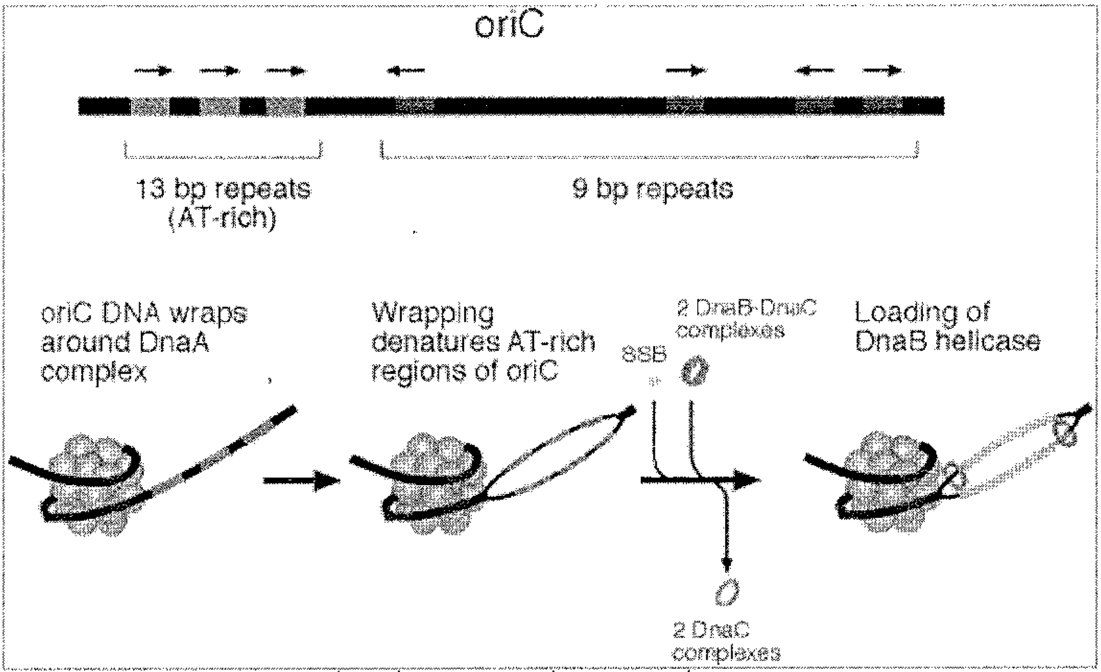
การถ่ายแบบ DNA เกิดขึ้นภายในเซลค่อนข้างซับซ้อน DNA polymerase โปรตีนและเอนไซม์ หลายอย่างทำงานร่วมกัน รวมเรียกว่า "DNA Replicase System" หรือ "<u>Replisome</u>" ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการเริ่มต้น (initiation step) ขั้นตอนการสร้างสาย DNA (elongation step) และ ขั้นตอนการสิ้นสุดการสร้าง (termination step)

*(3.2.1) **ขั้นตอนการเริ่มต้น** (initiation step)*

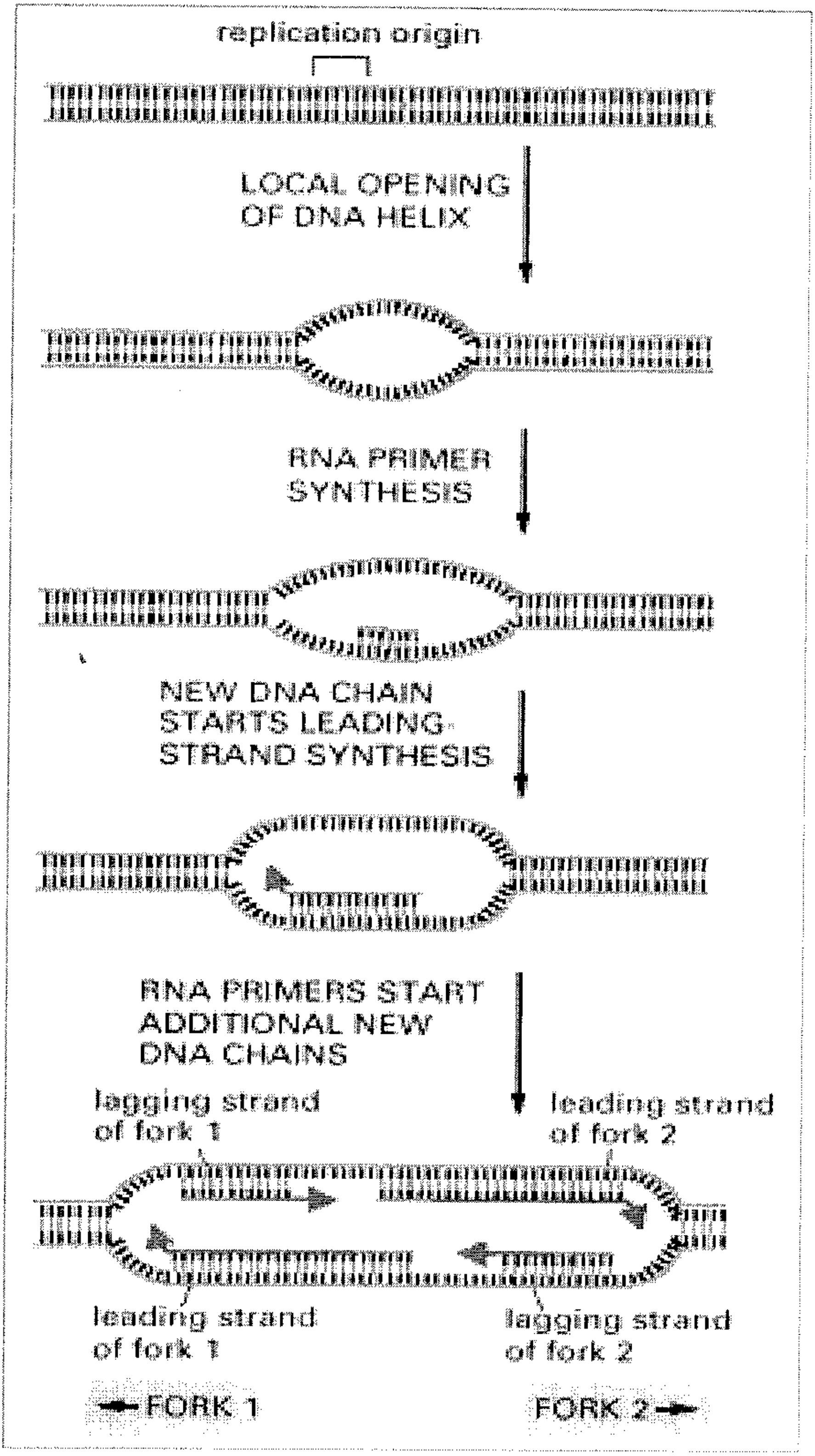
การถ่ายแบบ DNA จะเริ่มต้นที่บริเวณจำเพาะซึ่งเรียกว่า จุดเริ่มต้น (origin of replication) ใน DNA ของ *E. coli* มีจุดเริ่มต้นเพียงจุดเดียว เรียกว่า *oriC* บริเวณนี้มีความยาวประมาณ 245 คู่เบส ในขั้นตอนเริ่มต้นนี้ต้องมีโปรตีนหรือเอนไซม์อย่างน้อย 8 ชนิด โปรตีนตัวสำคัญที่ทำหน้าที่ที่จุดเริ่มต้น คือ โปรตีน DnaA ซึ่งจับตรงบริเวณจุดเริ่มต้นและทำให้เกลียวคู่เปิดออก จากนั้นโปรตีน DnaB ซึ่งเป็นเอนไซม์ helicase ชนิดหนึ่ง จะเข้าจับตรงบริเวณเกลียวคู่ที่เปิดออก ทำหน้าที่คลายเกลียวแยกสาย DNA ออกจากกัน การแยกสาย DNA เกิดขึ้นทั้งสองทิศทาง (bidirection) ของจุดเริ่มต้น ทำให้มีจุดแยกสาย (replication fork) 2 ตำแหน่ง การทำงานของโปรตีน DnaA และ DnaB ต้องการพลังงานจาก ATP หลังจากเกิดการแยกสายแล้วจะมีโปรตีนที่เรียกว่า single-strand DNA-binding protein (SSB, DBP) จำนวนมากมาจับกับ DNA สายเดี่ยวแต่ละสายเพื่อป้องกันไม่ให้ DNA สายเดี่ยวนี้ไปรวมกันเป็นเกลียวคู่ได้อีก ถึงขั้นตอนนี้ จะมีส่วนของ DNA ที่เป็นสายเดี่ยวสองสายซึ่งพร้อมที่จะทำหน้าที่เป็นแม่แบบ

*(3.2.2) **ขั้นตอนการสร้างสาย** DNA (elongation step)*

ขั้นตอนนี้เป็นการสร้าง DNA สายใหม่ในรูปของ leading strand และ lagging strand ที่บริเวณจุดแยกสายมีเอนไซม์และโปรตีนหลายตัวทำงานร่วมกันในการสร้างสาย DNA เมื่อ DNA เกลียวคู่แยกออกจากกันโดยเอนไซม์ helicase แล้ว ส่วนที่อยู่เหนือจุดแยกสายจะขดม้วนตัวและพันกันแน่นขึ้น (super-coiling) ทำ

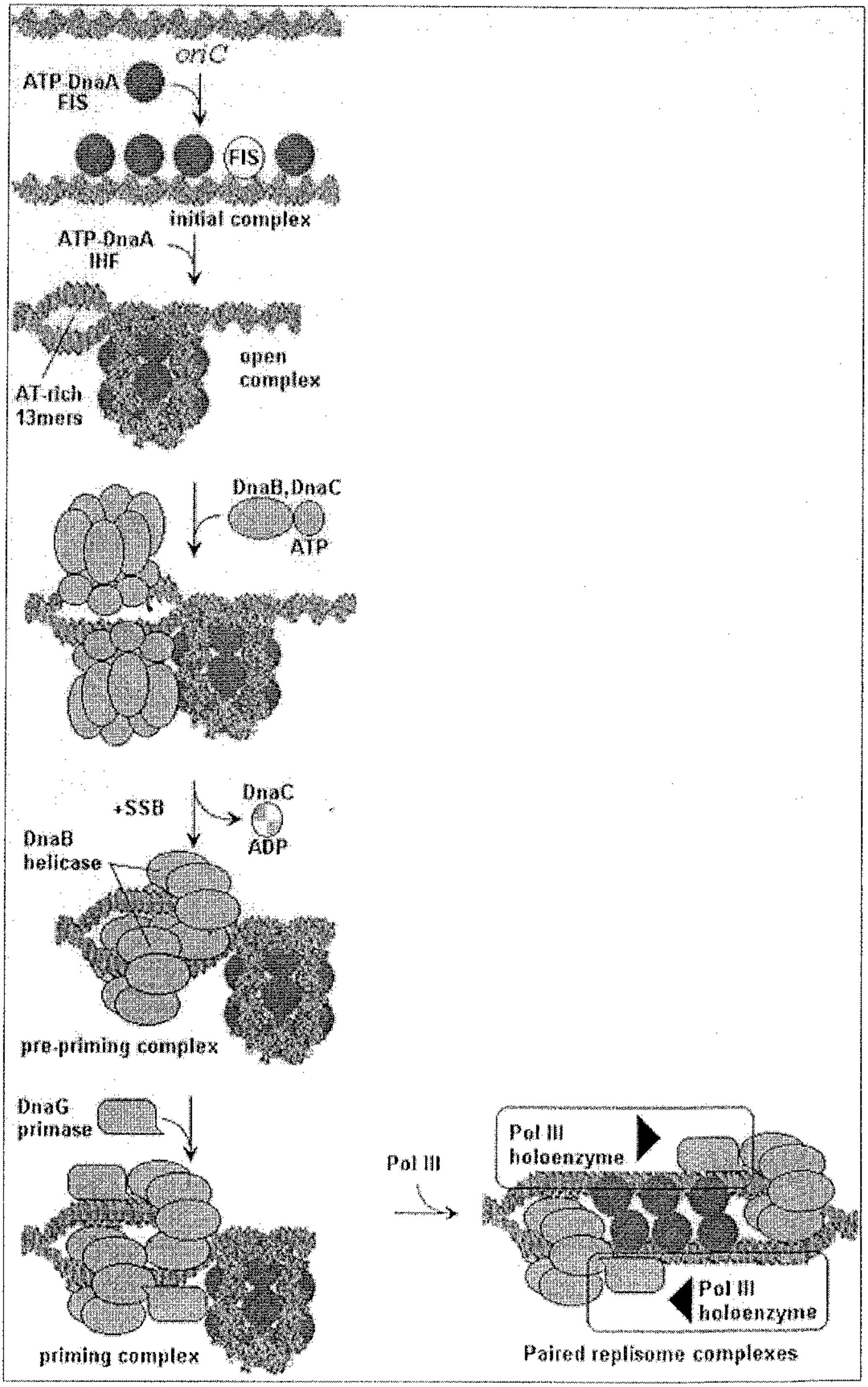


รูปที่ 3-6 การถ่ายแบบ DNA จะเริ่มต้นที่บริเวณจำเพาะซึ่งเรียกว่า จุดเริ่มต้น (origin of replication) ใน DNA ของ *E. coli* มีจุดเริ่มต้นเพียงจุดเดียว เรียกว่า *oriC* บริเวณนี้มีความยาวประมาณ 245 คู่เบส http://mol-biol4masters.org/Prokaryotic_DNA_Replication3-E_coli_DNA_Replication_files/image002.gif



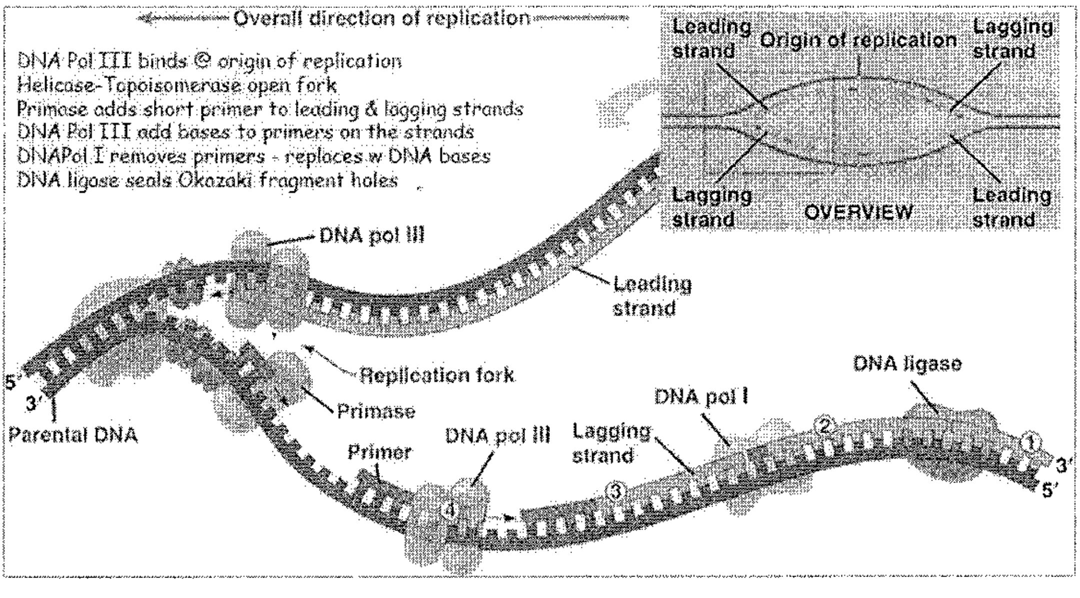
รูปที่ 3-7 Replication bubble

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=replication,bubble&rid=mboc4.figgrp.797



รูปที่ 3-8 การเริ่มต้นการเกิดกระบวนการถ่ายแบบ DNA (replication initiation) (Klug และ Cumming, 1994)

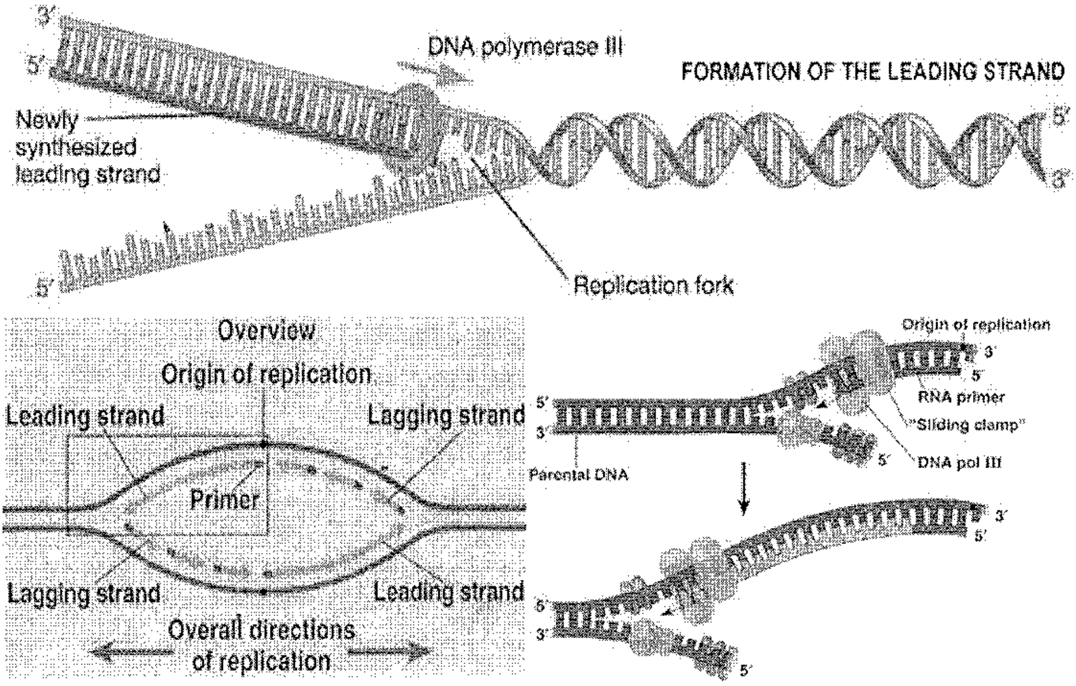
เกิดการบิดงอ (twist) ของสาย DNA ตามหลักทางฟิสิกส์ ทำให้เอนไซม์ helicase ไม่สามารถเคลื่อนตัวเพื่อแยกสาย DNA แม่แบบต่อไปได้ เพื่อแก้ปัญหานี้ จะมีเอนไซม์ชนิดหนึ่ง คือ DNA gyrase หรือ DNA topoisomerase II ทำหน้าที่คลายการบิดงอนี้โดยการตัดสาย DNA แม่แบบ ทั้งสองสายเพื่อให้เกลียว DNA ที่พันกันอยู่แน่นคลายตัวออก จากนั้น enzyme ตัวเดียวกันนี้ จะเชื่อมส่วนที่ตัดขาดออกจากกันให้เข้ามาต่อกันเป็นเกลียวคู่ดังเดิม ใน *E. coli* การสังเคราะห์ leading และ lagging strand สามารถดำเนินไปพร้อมกันได้ โดย DNA สายแม่แบบของ lagging strand ส่วนที่อยู่ใกล้จุดแยกมีการม้วนตัวเป็นวง ทำให้การจัดตัวของแม่แบบในส่วนนี้มีทิศทางไปในทางเดียวกันกับสายแม่แบบของ leading strand ทำให้เอนไซม์ DNA polymerase III ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ทำหน้าที่สร้าง DNA สายใหม่ทั้ง 2 สายไปพร้อม ๆ กัน โดยแต่ละหน่วยย่อยทำหน้าที่สร้าง DNA แต่ละสาย เอนไซม์ DNA polymerase III จะทำงานร่วมไปกับ primosome และ โปรตีนอื่น ๆ ตรงบริเวณจุดแยกสาย ขณะที่ primosome เคลื่อนตัวไปเรื่อย ๆ DNA แม่แบบของ lagging strand ที่ม้วนเป็นวง ก็เลื่อนตามไปเรื่อย ๆ เช่นกัน จนกระทั่ง DNA เส้นสั้น ๆ ที่สร้างขึ้นใหม่ขยายยาวออกไปชิดกับเส้นที่อยู่ข้างหน้า ณ จุดนี้ เอนไซม์ DNA polymerase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ lagging strand จะแยกตัวออกจากสายแม่แบบและกลับไปจับสาย DNA แม่แบบอีก ตรงบริเวณที่ RNA primer เส้นใหม่ถูกสร้างขึ้น และเริ่มการสังเคราะห์ okazaki fragment เส้นใหม่ต่อไป การทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase III ทั้ง 2 หน่วยย่อยนี้จะดำเนินร่วมกันไป ทำให้ DNA สายใหม่ทั้งแบบ lagging และ leading strand ถูกสร้างขึ้นพร้อม ๆ กัน



รูปที่ 3-9 ขั้นตอนการสร้างสาย DNA ในการเกิดกระบวนการถ่ายแบบ DNA (replication elongation)
http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.16.16.overall.jpg

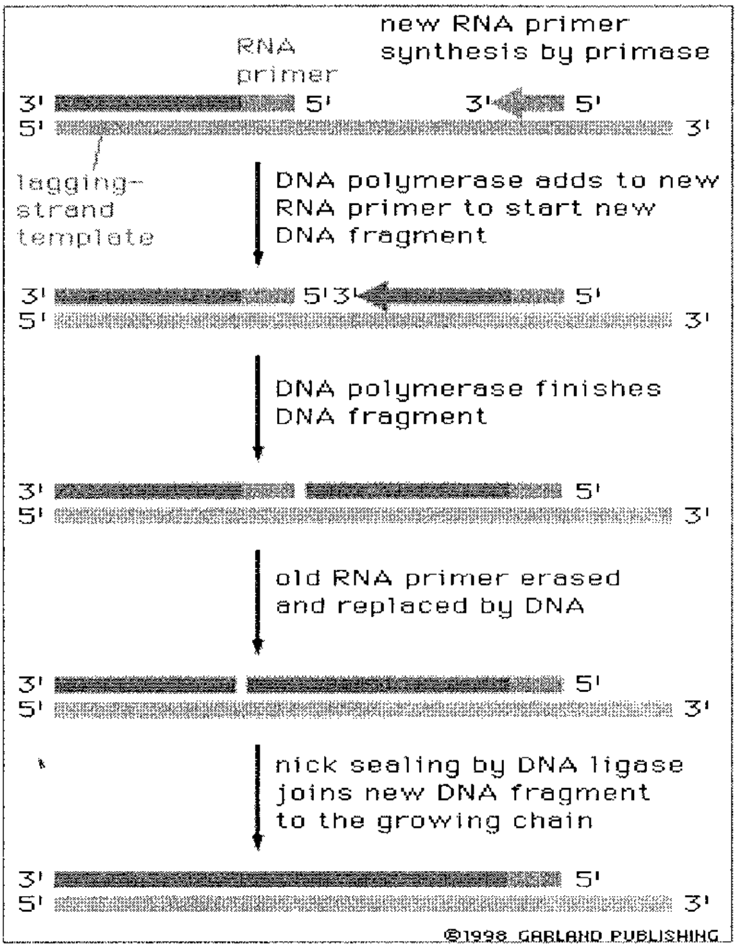
การสังเคราะห์ leading strand เริ่มต้นด้วยการสร้าง RNA สายสั้น ๆ ตรงบริเวณจุดเริ่มต้น RNA สายสั้น ๆ นี้มีความยาวประมาณ 10 – 60 nucleotides เรียกว่า RNA primer ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นของการสร้าง DNA สายใหม่ เอนไซม์ที่ใช้สร้าง RNA primer มีชื่อว่า primase ซึ่งเป็น RNA polymerase ชนิดหนึ่ง enzyme

primase จะเชื่อมต่อ ribonucleotide แต่ละหน่วยเป็นสาย polymer ของ ribonucleotide การเรียงลำดับของ ribonucleotide ของ primer จะเป็นคู่สมกับลำดับ nucleotide ของสาย DNA แม่แบบ และสาย primer จะถูกสร้างในทิศทาง 5' --> 3' ด้วยเช่นกัน ดังนั้น RNA primer จึงมีปลาย 3'-OH เป็นตัวรับ nucleotide ที่เติมเข้ามาใหม่ DNA polymerase จะทำงานหลังจากที่ DNA แม่แบบและสาย primer จับคู่กัน DNA สายใหม่จะถูกสร้างต่อจาก RNA primer โดยมีเอนไซม์ DNA polymerase III ทำหน้าที่เติม deoxyribonucleoside triphosphate เข้าที่ปลาย 3' ของสาย primer การสังเคราะห์ leading strand จะดำเนินไปอย่างต่อเนื่องและเพิ่มความยาวของ DNA สายใหม่ไปตามการเคลื่อนตัวของจุดแยกสาย การสร้าง DNA สายใหม่จะเป็นไปในทิศทาง 5' --> 3' เสมอและสวนทิศกับสาย DNA แม่แบบส่วนเอนไซม์ DNA polymerase III ซึ่งทำหน้าที่สร้างสาย DNA สายใหม่จะเคลื่อนตัวไปตามทิศทาง 3' --> 5' บนสาย DNA แม่แบบและเคลื่อนตัวตามจุดแยกสาย



รูปที่ 3-10 การสังเคราะห์ leading strand

http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/leading.htm



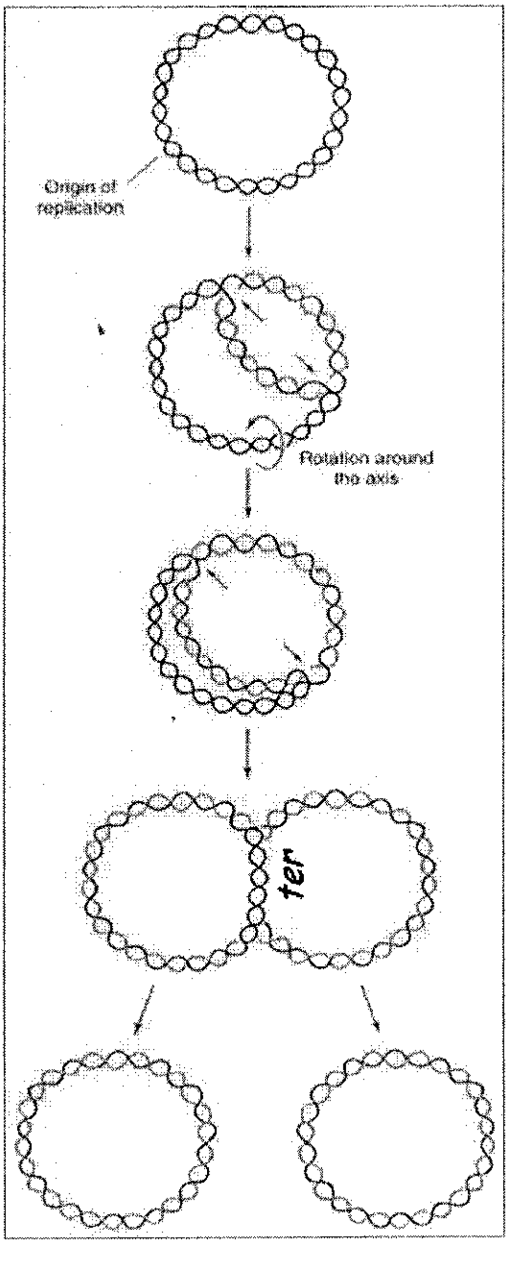
รูปที่ 3-11 การสังเคราะห์ lagging strand
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=synthesis,one&rid=mboc4.figgrp.772

การสังเคราะห์ lagging strand มีความยุ่งยากซับซ้อนมากกว่า มีการสร้าง DNA เส้นสั้น ๆ นอกจากจะใช้เอนไซม์ DNA polymerase III แล้ว ยังต้องอาศัยโปรตีนจำเพาะอีกหลายชนิดทำหน้าที่ร่วมกัน เรียกกลุ่มโปรตีนนี้ว่า ไพรโมโซม(primosome) ซึ่งมีเอนไซม์ primase และ helicase รวมอยู่ด้วย primosome จะเคลื่อนที่ไปตามทิศทาง 3' --> 5' ของสาย DNA ที่เป็นแม่แบบของ lagging strand และตามการเคลื่อนที่ของจุดแยกสาย ขณะที่ primosome เคลื่อนตัวไป จะควบคุมให้เอนไซม์ primase สร้าง RNA primer เป็นเส้นสั้น ๆ เป็นระยะ ๆ ตำแหน่งของ primer ที่สร้างขึ้นจะถูกควบคุมให้สัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ของจุดแยกสาย จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase III ก็จะสร้างสาย DNA ต่อจาก primer โดยมีความยาวประมาณ 1,000 – 2,000 nucleotide DNA สายสั้น ๆ ที่มี RNA primer อยู่ที่ปลาย 5' เหล่านี้ เรียกว่า สายโอคาซากิ (okazaki fragment) หลังจากที่ Okazaki fragment ถูกสร้างขึ้นแล้ว RNA primer จะถูกทำลายโดยปฏิกิริยา 5'-->3' exonuclease ของเอนไซม์ DNA polymerase I ซึ่งทำหน้าที่ตัด ribonucleotide ของสาย primer ออกจากปลาย 5' ทีละหน่วย ในขณะเดียวกัน DNA polymerase I ตัวเดียวกันนี้ จะใช้ปฏิกิริยา polymerase ทำการเติม deoxyribonucleoside triphosphate เข้าที่ปลาย 3' ของ DNA ที่ยาวต่อออกมาอยู่ชิดกับปลาย 5' ของสาย DNA ที่ RNA primer ถูกตัดไป จากนั้นเอนไซม์ DNA ligase จะทำหน้าที่เชื่อมต่อช่องว่างระหว่างสาย DNA เล็ก ๆ เหล่านั้น โดยเกิดพันธะ phosphodiester bond ระหว่างหมู่ OH ที่ปลาย 3' ของ DNA สายหนึ่งกับหมู่ phosphate ของ

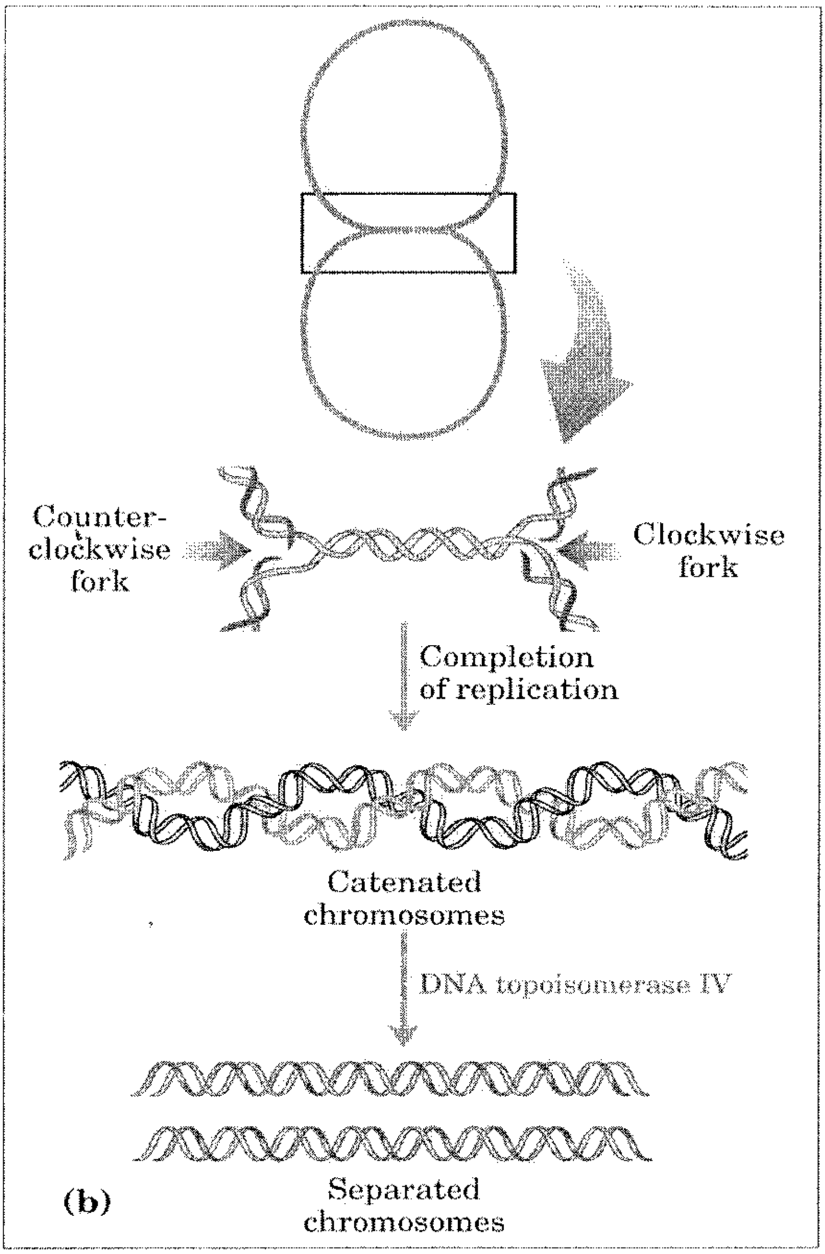
สาย DNA อีกสายหนึ่งที่อยู่ติดกัน สำหรับ *E. coli* ปฏิกิริยานี้ต้องการ NAD^{+} เป็นแหล่งที่ให้พลังงาน ส่วนในยูคาริโอต ใช้ ATP เป็นแหล่งที่ให้พลังงาน

*(3.2.3) **ขั้นตอนสิ้นสุดการสร้างสาย** DNA (termination step)*

โครโมโซมของ *E. coli* มีลักษณะเป็นวงปิด ดังนั้นเมื่อจุดแยกสายทั้งสองเคลื่อนมาพบกันจึงเป็นการสิ้นสุดการสังเคราะห์ DNA กลไกที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้ยังไม่ทราบกันดี ดังนั้นเมื่อสิ้นสุดการถ่ายแบบ DNA แล้วจะได้ DNA เกลียวคู่ 2 คู่ แต่ละคู่ ประกอบด้วยสาย DNA แม่แบบ 1 สาย และสาย DNA ที่สร้างขึ้นใหม่ 1 สาย DNA เกลียวคู่ที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะมีลำดับ nucleotide เหมือนกับคู่ DNA เดิมทุกประการ



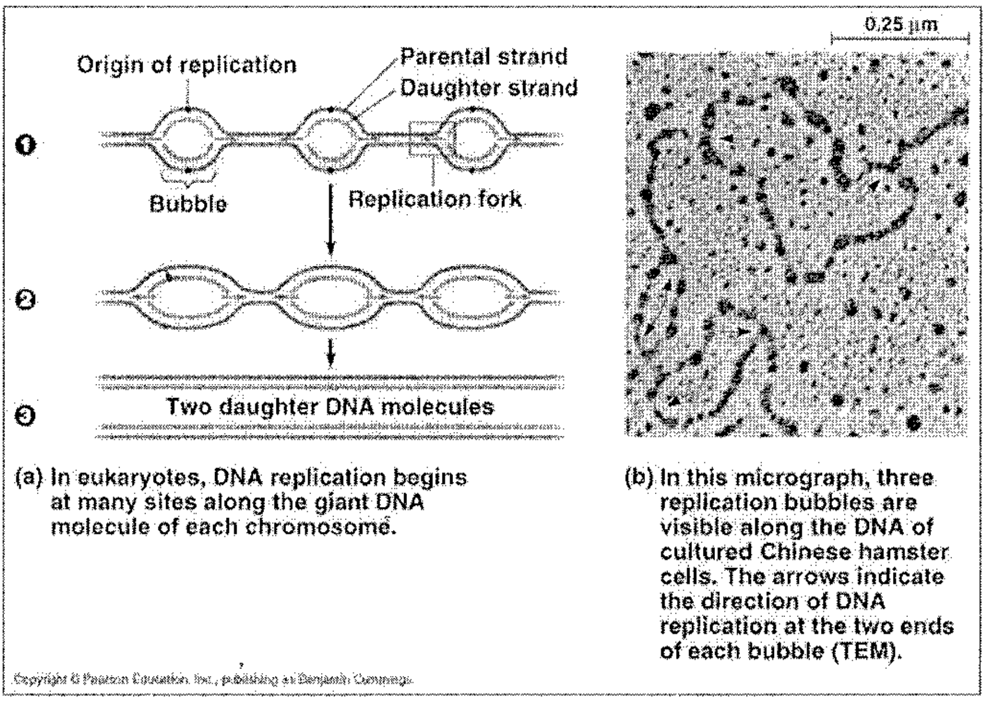
รูปที่ 3-12 การสิ้นสุดการสร้างสาย DNA ในกระบวนการถ่ายแบบ DNA (replication termination)



รูปที่ 3-12 การสิ้นสุดการสร้างสาย DNA ในกระบวนการถ่ายแบบ DNA (replication termination) ต้องการการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase ในการแยกสาย DNA เกลียวคู่สองสายออกจากกัน

3.3) การถ่ายแบบ DNA ในยูคาริโอต

DNA ของยูคาริโอตมีขนาดใหญ่กว่า DNA ของโปรคาริโอต และไม่อยู่เป็นอิสระเหมือนของโปรคาริโอต แต่จะรวมอยู่กับโปรตีน histone และโปรตีนอื่น ๆ ภายใน nucleus ซึ่งมีเยื่อหุ้มห่ออยู่ ดังนั้นกลไกการถ่ายแบบ DNA ในยูคาริโอต จึงซับซ้อนมากกว่าในโปรคาริโอต อย่างไรก็ตาม มีหลักการที่คล้ายคลึงกัน การถ่ายแบบ DNA ในยูคาริโอตเป็นแบบ semiconservative replication และเกิดขึ้นทั้งสองทิศทางเช่นเดียวกับโปรคาริโอต เนื่องจาก DNA ของยูคาริโอต มีความยาวมาก จุดเริ่มต้นของการถ่ายแบบ DNA จึงมีหลายจุดและการสร้างสาย DNA เกิดขึ้นพร้อมกันหลาย ๆ ที่ ทั้งนี้เพื่อให้กระบวนการถ่ายแบบ DNA เสร็จสิ้นภายในระยะเวลาอันสั้น ตัวอย่างเช่น อัตราการเคลื่อนที่ของจุดแยกในยูคาริโอต เกิดขึ้นประมาณ 10 nucleotide ต่อ วินาที ซึ่งช้ากว่าในโปรคาริโอต ประมาณ 10 เท่า ด้วยอัตรานี้ หากการถ่ายแบบ DNA เกิดขึ้น



รูปที่ 3-13 จุดเริ่มต้นของการถ่ายแบบ DNA ในเซลยูคาริโอตมีหลายจุดและการสร้างสาย DNA เกิดขึ้นพร้อมกันหลาย ๆ ที่ (http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c16x10replication-origins.jpg)

ในโครโมโซมของคนเริ่มจากจุดเริ่มเพียงจุดเดียว จะใช้เวลามากกว่า 500 ชั่วโมง แต่ถ้าเริ่มจากจุดเริ่มหลาย ๆ จุดพร้อมกันและดำเนินไปสองทิศทาง การถ่ายแบบ DNA จะสิ้นสุดภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมง ในยูคาริโอตมีเอนไซม์ DNA polymerase อยู่หลายชนิด คือ DNA polymerase α, β, γ, δ และ ε เอนไซม์ DNA polymerase ชนิด α มีความสำคัญในการถ่ายแบบ DNA ที่อยู่ใน chromosome ภายใน nucleus โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ DNA polymerase δ เอนไซม์ DNA polymerase α นี้จะมีปฏิกิริยาของเอนไซม์ primase อยู่ด้วย จึงอาจทำหน้าที่สังเคราะห์ lagging strand เอนไซม์ DNA polymerase δ มีปฏิกิริยา 3' --> 5' exonuclease จะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ leading strand เอนไซม์ DNA polymerase β ไม่มีบทบาทในการถ่ายแบบ DNA แต่จะมีบทบาทในการซ่อมแซม DNA นอกจากนี้ในยูคาริโอตยังมีโปรตีนและเอนไซม์อีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องในการ-

ถ่ายแบบ DNA ได้แก่ DNA ligase, DNA topoisomerase เป็นต้น DNA ในโครโมโซมของยูคาริโอตจะอยู่รวมกับโปรตีน histone เมื่อมีการสังเคราะห์ DNA ชุดใหม่ ก็ต้องมีการสังเคราะห์โปรตีน histone ชุดใหม่ด้วย หลังจากกระบวนการถ่ายแบบ DNA สิ้นสุดลงแล้วพบว่า โปรตีน histone ชุดเดิมจะอยู่รวมกับ DNA เกลียวคู่ที่มี leading strand เป็นองค์ประกอบ ส่วนโปรตีน histone ชุดใหม่จะจับกับ DNA เกลียวคู่ที่มี lagging strand เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 3-3 Eukaryotic DNA polymerase

The Biochemical Properties of Eukaryotic DNA Polymerases

	α	δ	ϵ	β	γ
Mass (kD)					
Native	>250	170	256	36–38	160–300
Catalytic core	165–180	125	215	36–38	125
Other subunits	70, 50, 60	48	55	None	35, 47
Location	Nucleus	Nucleus	Nucleus	Nucleus	Mitochondria
Associated functions					
3' → 5' exonuclease	No	Yes	Yes	No	Yes
Primase	Yes	No	No	No	No
Properties					
Processivity	Low	High	High	Low	High
Fidelity	High	High	High	Low	High
Replication	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Repair	No	?	Yes	Yes	No

3.4) **การซ่อมแซม** DNA (DNA repair)

DNA เป็นโมเลกุลที่เกิดความเสียหายได้ง่ายโดยสารเคมีหรือรังสีต่าง ๆ ผลที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้เรียกว่า "การกลายพันธ์" (mutation) การกลายพันธ์อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงตัวเดียวหรือหลายตัวก็ได้ การกลายพันธ์ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มักจะเป็นอันตรายต่อเซล อาจทำให้เซลนั้นเสียหน้าที่ไปหรืออาจทำให้เซลตายได้ จากการศึกษาพบว่าการกลายพันธ์มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งและโรคทางพันธุกรรมอื่น ๆ อีกหลายโรค และยังได้มีการค้นพบอีกว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของสารก่อมะเร็ง (carcinogen) เป็นสารก่อการกลายพันธ์ (mutagen) ด้วย ดังนั้นเพื่อป้องกันอันตรายร้ายแรงที่จะเกิดขึ้นกับเซล เซลจำเป็นต้องมีวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการแก้ไขความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลของ DNA ถ้าความผิดปกตินั้นไม่สามารถแก้ไขได้และถูกถ่ายทอดไปยังเซลรุ่นลูกหลาน ก็จะทำให้เกิดอันตรายต่อเซลรุ่นลูกหลานต่อ ๆ ไปได้ กลไกหรือวิธีการที่เซลใช้แก้ไขความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลของ DNA เรียกว่า การซ่อมแซม DNA (DNA repair) ปกติแล้วในจีโนม (genome) หนึ่ง ๆ ของเซลสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะพบร่องรอยความผิดปกติ (lesion) เกิดขึ้นเป็นพัน ๆ แห่งภายในเวลา 24 ชั่วโมง แต่อาศัยกลไกการซ่อมแซม DNA นี้ทำให้เหลือความความผิดปกติอยู่เพียง 1 ใน 1000 ที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น DNA เป็นโมเลกุลที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตจึงต้องรักษาโมเลกุลให้คงสภาพเดิม ไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงหรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ดังนั้นถ้าไม่มีกลไกการซ่อมแซม DNA ก็จะทำให้สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ดำรงอยู่ได้ยาก การซ่อมแซม DNA มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะวิธีการใหญ่ ๆ 3 วิธี ได้แก่ การ

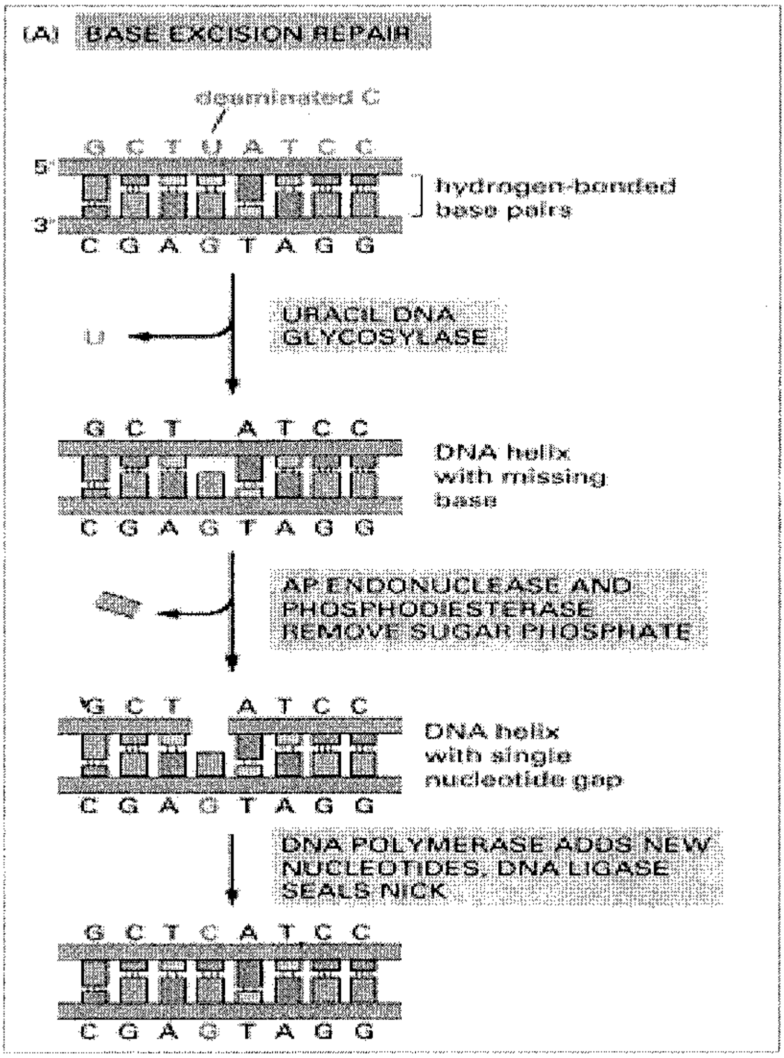
ซ่อมโดยการตัดออก (excision repair) การซ่อม โดยตรง (direct repair) และการซ่อมแบบมีการแลกเปลี่ยนส่วนของ DNA (recombination repair)

(3.4.1) วิธีการซ่อมแซมโดยการตัดออก (excision repair)

วิธีการนี้ใช้ในการกำจัดเอานิวคลีโอไทด์ที่ผิดปกติออกไป และนำเอานิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องมาใส่แทนที่ แบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ การตัดเบสออก (base excision repair) และการตัดนิวคลีโอไทด์ออก (nucleotide excision repair) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของความผิดปกติ อย่างไรก็ตามหลักการทั่วไปของกลไกการซ่อมแซมทั้ง 2 วิธีนี้คล้ายคลึงกัน

วิธีการตัดเบสออก (base excision repair) จะเกิดในกรณีที่มีความผิดปกติเกิดขึ้นกับเบสตัวใดตัวหนึ่ง อาจจะมีเบสพิวรีนตัวหนึ่งหลุดออกไป (depurination) ทำให้เรียกตำแหน่งนั้นว่า apurinic site หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบส เช่น เบสไซโทซีน (C) ถูกสลายเอาหมู่อะมิโนออกไป (deamination) ทำให้เปลี่ยนเป็นเบสยูราซิล (U) ซึ่งไม่ใช่เบสที่เป็นคู่สมปกติของ DNA เซลจะมีเอนไซม์ที่เรียกว่า DNA glycosylase ซึ่งมีความจำเพาะและมีความจำเพาะเฉพาะต่อซับสเตรต ทำหน้าที่ตัดพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ซึ่งยึดระหว่างเบสและโมเลกุลของน้ำตาล ในกรณีที่เป็นเบสยูราซิล เอนไซม์ uracil DNA glycosylase หรือ uracil N-glycosidase จะทำหน้าที่ตัดเอาเบสยูราซิลออกไป ทำให้ตำแหน่งนั้นไม่มีเบสพิริมิดีนอยู่ เรียกว่า apyrimidinic site เมื่อมี apurinic site หรือ apyrimidinic site ซึ่งเรียกรวม ๆ ว่า AP site เกิดขึ้น จะมีเอนไซม์ที่เรียกว่า AP endonuclease ทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์บริเวณใกล้กับ AP site ทางด้านปลาย 5' จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase I จะใช้ปฏิกิริยา 5' --> 3' exonuclease ตัดเอา DNA ส่วนที่มีความผิดปกติออกไป ขณะเดียวกัน DNA polymerase I ชนิดเดียวกันนี้ จะใช้ปฏิกิริยา polymerase เติมนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องเข้าไปแทนที่ สุดท้ายเอนไซม์ DNA ligase ทำหน้าที่เชื่อมสาย DNA ส่วนที่ซ่อมแซมขึ้นใหม่กับ DNA สายเดิม

ส่วนวิธี**การตัดนิวคลีโอไทด์ออก** (nucleotide excision repair) จะเกิดในกรณีที่รอยความผิดปกติมีขนาดใหญ่ กล่าวคือ ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 ตัวขึ้นไป ทำให้โมเลกุลของ DNA บริเวณนั้นเกิดการบิดเบี้ยว (distortion) ใน *E. coli* มีเอนไซม์ endonuclease ชนิดพิเศษประกอบด้วยโปรตีนหลายหน่วยทำงานร่วมกัน เรียกว่า ABC excinuclease เข้าไปจับกับสาย DNA บริเวณที่มีรอยความผิดปกติ และทำหน้าที่ตัดสาย DNA 2 แห่ง คือ ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์พันธะที่ 8 ห่างจากรอยความผิดปกติไปทางด้านปลาย 5' และตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์พันธะที่ 4 หรือที่ 5 ห่างจากรอยความผิดปกติไปทางด้านปลาย 3' ทำให้ชิ้น DNA ส่วนที่มีรอยความผิดปกติหลุดออกไป จากนั้น DNA polymerase I จะเติมนิวคลีโอไทด์ตัวที่ถูกต้องเข้าไปในช่องว่างที่เกิดขึ้น และสุดท้าย DNA ligase จะเป็นตัวเชื่อมสาย DNA ให้เป็นสายเดียวกัน



รูปที่ 3-14 วิธีการซ่อมแซมโดยการตัดเบสออก (base excision repair)

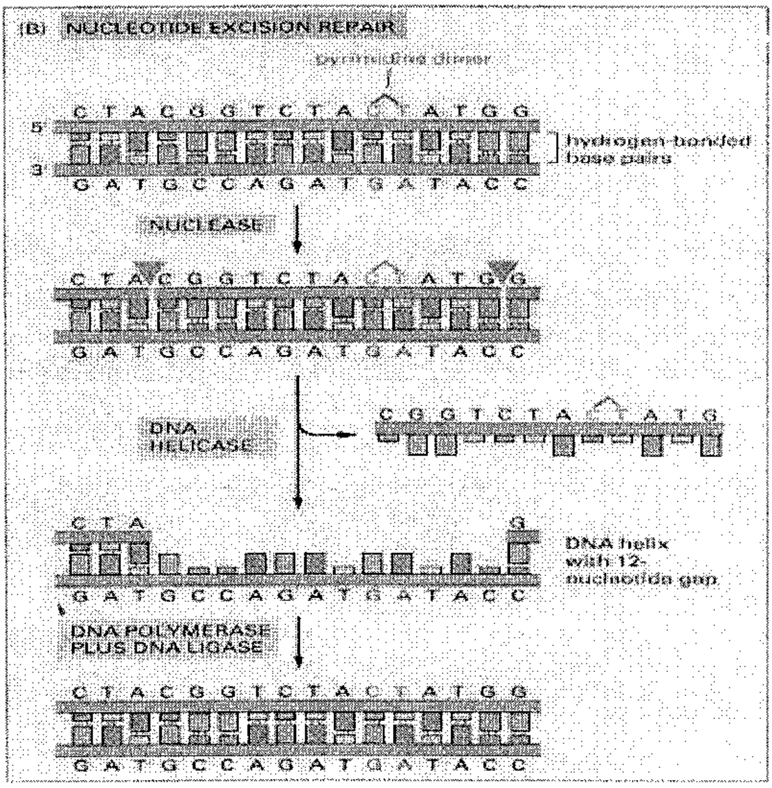
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=two,major,comparison&rid=mboc4.figgrp.836

(3.4.2) วิธีการซ่อมโดยตรง (direct repair)

เป็นการซ่อมแซมความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับนิวคลีโอไทด์ของสาย DNA โดยไม่จำเป็นต้องตัดนิวคลีโอไทด์ที่ผิดปกติออกไป กลไกการซ่อมแซม DNA แบบนี้ที่รู้จักกันดี "โฟโตรีแอกทิเวชั่น" (photoreactivation) ของไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ซึ่งเกิดจากรังสีอัลตราไวโอเลตทำให้เบสไทมีน 2 ตัวบนสาย DNA ซึ่งอยู่ใกล้กันเกิดพันธะโคเวเลนท์ยึดกันไว้ การซ่อมแซมโดยวิธีนี้อาศัยเอนไซม์ photolyase ซึ่งจะทำลายพันธะที่ยึดระหว่างเบสไทมีนทั้งสองนั้นไว้ โดยมีแสงในช่วงคลื่นมองเห็น (visible light) เป็นตัวกระตุ้น

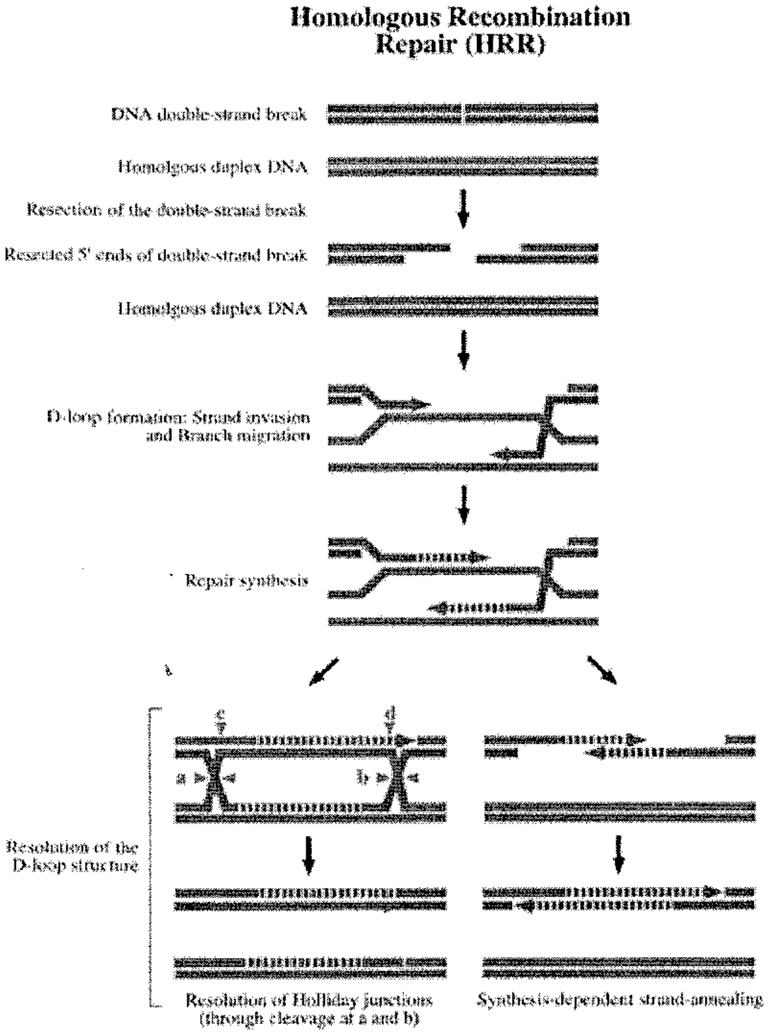
อีกตัวอย่างหนึ่งของวิธีการซ่อมโดยตรง คือ การซ่อมแซม O^6-methylguanine ความผิดปกตินี้พบได้บ่อยและมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สูง เนื่องจาก O^6-methylguanine มักจะจับคู่กับเบสไทมีนแทนที่จะจับกับเบสไซโทซีนในระหว่างที่มีการถ่ายแบบ DNA ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในลำดับเบสของ DNA และเกิดการกลายพันธุ์ขึ้น เอนไซม์ guanine alkyltransferase จะย้ายเอาหมู่เมทิลออกจาก O^6-methylguanine และเติมให้แก่กรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์อยู่ในสภาพที่ไม่ทำงาน ดังนั้นในการดึงเอา

หมู่อัลคิล (alkyl group) ออกจากเบสครั้งหนึ่ง ๆ จะทำ ให้เสียเอนไซม์ไป 1 โมเลกุลเนื่องจากทำให้เอนไซม์นั้นเสียสภาพไป



รูปที่ 3-15 วิธีการซ่อมแซมโดยการตัดนิวคลีโอไทด์ออก (nucleotide excision repair)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=two,major,comparison&rid=mboc4.figgrp.836



รูปที่ 3-16 วิธีการซ่อมแซมแบบมีการแลกเปลี่ยนส่วนของ DNA (recombi-nation repair) http://www.reactome.org/figures/HRR_full.jpg

***(3.4.3) วิธีการซ่อมแบบมีการแลกเปลี่ยนส่วนของ** DNA (recombination repair)*

วิธีนี้บางทีเรียกว่า "post-replication repair" ซึ่งใช้ในกรณีที่ยังมีรอยความผิดปกติบนสาย DNA แม่แบบในขณะที่เกิดกระบวนการถ่ายแบบ DNA ทำให้การสร้าง DNA สายใหม่หยุดบริเวณที่มีรอยความผิดปกติและข้ามบริเวณนี้ไป จากนั้นจึงเริ่มต้นการสร้างขึ้นใหม่ เป็นผลให้มีช่องว่างเกิดขึ้นในสาย DNA ที่ถูกสร้างขึ้น จากนั้นจะมีการแลกเปลี่ยนส่วนของสาย DNA (DNA strand exchange) เพื่อปิดช่องว่างนี้ โดยการนำส่วนของ DNA จากสายเดิมซึ่งเป็นคู่สาย (sister strand) ของ DNA แม่แบบเดิมให้กับ DNA สายใหม่ ซึ่งจะทำให้เกิดช่องว่างขึ้นใน DNA สายเดิม ซึ่งช่องว่างนี้จะถูกเติมเต็มโดยเอนไซม์ DNA polymerase และ DNA ligase ใน *E. coli* ต้องการ RecA protein ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนส่วนของสาย DNA ดังกล่าว สำหรับรอยความผิดปกติที่ยังคงอยู่บนสาย DNA แม่แบบเดิมจะถูกซ่อมแซมโดยวิธีการซ่อมโดยการตัดออก (excision repair) ต่อไป

บทที่ 4 การถอดรหัส (Transcription)

กระบวนการถอดรหัสเป็นขั้นตอนหนึ่งในวิถี Central Dogma ซึ่งเป็นวิถีหลักในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมระดับโมเลกุล กระบวนการนี้เป็นการสร้างสาย RNA โดยใช้ DNA เป็นแม่แบบ กล่าวคือ RNA จะถอดรหัสข้อมูลทางพันธุกรรมจากลำดับ DNA ไปสู่ลำดับ RNA สาย RNA ที่ถูกสร้างขึ้นจะมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสของสาย DNA แม่แบบ ยกเว้นในสาย RNA จะมีเบส U แทนที่เบส T เอนไซม์ที่ใช้ในการถอดรหัสคือ RNA polymerase การทำงานของ RNA polymerase ต้องการสาย DNA แม่แบบ ไม่ต้องการสาย primer กระบวนการถอดรหัสตามธรรมชาติเกิดขึ้นในโปรคาริโอตและยูคาริโอต โดยขั้นตอนการเกิดมีความคล้ายคลึงกันมาก ความแตกต่างกันที่เด่นชัด คือ กระบวนการถอดรหัสในโปรคาริโอตเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม ส่วนกระบวนการถอดรหัสในยูคาริโอตเกิดขึ้นในนิวเคลียส เป็นผลทำให้การถอดรหัสและการแปลรหัสเกิดขึ้นพร้อมกันได้ในโปรคาริโอต ซึ่งเรียกว่า “Cotranscription-translation” แต่กระบวนการนี้ไม่สามารถเกิดขึ้นพร้อมกันในยูคาริโอตได้ ในแบคทีเรีย *E. coli* มี RNA polymerase เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ RNA ทุกชนิด ส่วนในยูคาริโอตมีเอนไซม์ RNA polymerase หลายชนิด แต่ละชนิดสามารถทำหน้าที่สังเคราะห์ RNA ต่างชนิดกัน

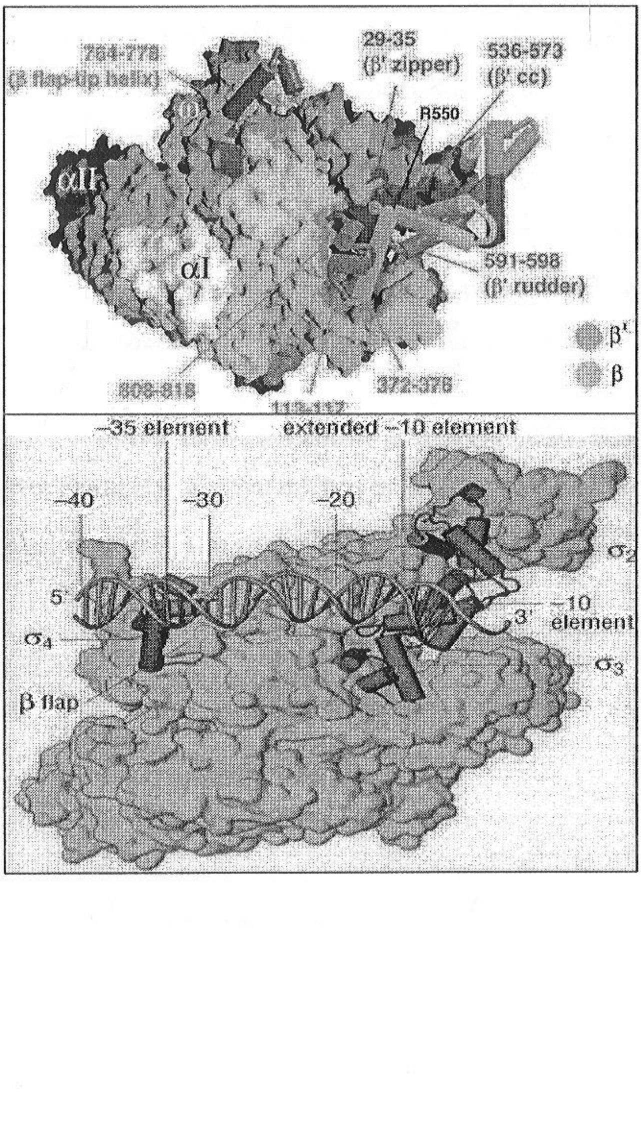
ขั้นตอนเริ่มต้นการถอดรหัสใน *E. coli* เริ่มต้นด้วยเอนไซม์ RNA polymerase จับกับโมเลกุล DNA ที่บริเวณ promoter ทำให้ DNA เกลียวคู่บริเวณนั้นแยกออกจากกัน จากนั้นเอนไซม์จึงจับแน่นกับสาย DNA แม่แบบและทำการสร้างสาย RNA ซึ่งเริ่มตรงจุดเริ่มต้น ในขั้นตอนสร้างสาย RNA Ribonucleotidetriphosphate แต่ละหน่วยเข้ามาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ phosphodiester ขณะกำลังทำหน้าที่สร้างสาย RNA ให้ยาวออกไปเรื่อย ๆ ในทิศทาง 5' --> 3' เอนไซม์ RNA polymerase จะเคลื่อนตัวไปตามสาย DNA แม่แบบ ในทิศทาง 3' --> 5' การสร้างสาย RNA จะหยุดเมื่อเอนไซม์เคลื่อนตัวมาถึงบริเวณที่เป็นจุดยุติ เอนไซม์และสาย RNA ที่สร้างขึ้นใหม่จะแยกตัวหลุดออกจากสายแม่แบบ การสิ้นสุดการสังเคราะห์ RNA ใน *E. coli* มี 2 แบบ คือ แบบที่ต้องอาศัย Rho factor (ρ-dependent) และ แบบที่ไม่ต้องอาศัย Rho factor (ρ-independent) แต่อาศัยโครงสร้างที่มีลักษณะเหมือนกิ๊บติดผม (hairpin structure) ซึ่งเกิดจากลำดับเบสจำเพาะ (inverted repeat) ที่ด้านปลาย 3' ของสายที่กำลังสร้าง ทำให้เอนไซม์ RNA polymerase หยุดการทำงานและหลุดออกจากสาย DNA แม่แบบ

4.1) <u>เอนไซม์ RNA polymerase</u>

เอนไซม์ที่ใช้ในการถอดรหัส คือ RNA polymerase ทำหน้าที่สร้างสาย RNA โดยการนำเอาไรโบนิวคลีโอไทด์ (ribonucleotide) มาต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคล้ายกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase กล่าวคือ ไรโบนิวคลีโอไซด์ไทรฟอสเฟต (ribonucleosidetriphosphate, NTP) ตัวใหม่จะถูกเติมเข้าที่ปลาย 3'-OH ของสาย RNA ที่กำลังสร้าง ดังนั้นทิศทางการสร้างสาย RNA จึงเป็น 5' --> 3' เช่นเดียวกับการสร้าง DNA ซับสเตรต (substrate) ของเอนไซม์ RNA polymerase คือ ribonucleosidetriphosphate ทั้ง 4 ชนิด คือ ATP, GTP, CTP และ UTP ซึ่งเขียนเป็นปฏิกิริยาได้ดังนี้

$$\underset{\text{RNA}}{(NMP)_n} + NTP \rightarrow \underset{\text{Lengthened RNA}}{(NMP)_{n+1}} + PPi$$

การทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase ต้องการ DNA เพียงสายเดียวเป็นแม่แบบและ ไม่สามารถใช้ DNA ทั้งสองสาย ณ บริเวณเดียวกันของโมเลกุลเป็นแม่แบบพร้อมกันได้ ลำดับเบสของสาย RNA ที่สร้างขึ้นจะเป็นคู่สม (complementary) กับลำดับเบสของสาย DNA แม่แบบ โดยทุกตำแหน่งที่เป็น A บนสาย DNA แม่แบบจะเป็น U บนสาย RNA DNA สายที่ทำหน้าที่เป็นแม่แบบ เรียกว่า “template strand” หรือ “nonsense strand” ส่วนสายที่ไม่ได้ทำหน้าที่เป็นแม่แบบ เรียกว่า “nontemplate strand” หรือ “coding strand” หรือ “sense strand” เนื่องจากจะมีลำดับเบสเหมือนกับสาย RNA ที่สังเคราะห์ขึ้น ต่างกันที่ RNA จะมีเบส U แทนที่เบส T ข้อแตกต่างของเอนไซม์ RNA polymerase จาก DNA polymerase อีกประการหนึ่ง คือ เอนไซม์ RNA polymerase ไม่ต้องการ primer ในการเริ่มต้น การสังเคราะห์ เอนไซม์นี้สามารถเริ่มการสังเคราะห์สาย RNA ได้โดยตรงโดยการนำไรโบนิวคลีโอไทด์ (ribonuclotide) 2 หน่วยแรกเข้ามาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ phosphodiester ซึ่งเป็นการเริ่มต้นการสังเคราะห์สาย RNA



รูปที่ 4-1 RNA polymerase holoenzyme ของ *E. coli* **บน**: โครงสร้าง X-ray จาก Katsuhiko S. Murakami, Shoko Masuda, and Seth A. Darst (2002), Structural Basis of Transcription Initiation: RNA Polymerase Holoenzyme at 4 Å Resolution, Science 296: 1280-1284., **ล่าง**: model แสดง subunits และ การจับ promoter ของ RNA polymerase holoenzyme(http://www.new-science-press.com/samples/SIGMAFACTORS/figure/F3)

ตารางที่ 4-1 Subunits ของ RNA polymerase holoenzyme ในแบคทีเรีย *E. coli*

Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry 3rd edition, 2000; หน้า 988

หน่วยย่อย	น้ำหนักโมเลกุล (dalton)	จำนวนหน่วยย่อยต่อ 1 โมเลกุลของเอนไซม์	หน้าที่
α	36,500	2	เริ่มต้นการสังเคราะห์ RNA โดยจับกับโปรตีนควบคุม (regulatory proteins) และส่วนของ DNA ที่อยู่หน้าตำแหน่งโปรโมเตอร์ (upstream promoter elements)
β	151,000	1	เริ่มต้นการสังเคราะห์ RNA และเพิ่มความยาวของสาย RNA
β'	155,000	1	จับกับ DNA
σ	70,000*	1	จดจำตำแหน่งโปรโมเตอร์
ω	11,000	1	ยังไม่ทราบหน้าที่

* นอกจากหน่วยย่อย σ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 70-kDa ยังมีหน่วยย่อย σ อีกหลายชนิดซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไป

เนื่องจากเอนไซม์ RNA polymerase ไม่มีทั้งปฏิกิริยา 3' --> 5' exonuclease และ 5' --> 3' exonuclease ดังนั้น ความผิดพลาดในการเติม nucleotide ในสาย RNA จึงเกิดขึ้นได้สูง แต่เนื่องจากมี การสังเคราะห์ RNA เป็นจำนวนมากจากยีนเดียวกัน และ RNA ในเซลมีการสลายและสร้างทดแทน อยู่เสมอ ดังนั้นความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในสายของ RNA จึงมีผลเสียหายต่อเซลน้อยกว่าความผิดพลาด ที่เกิดขึ้นกับ DNA

ในโปรคาริโอต เช่น *E. coli* มี RNA polymerase เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ใช้สำหรับสังเคราะห์ RNA ทุกชนิด เอนไซม์นี้ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 5 สาย คือ $\alpha_2\beta\beta'$(ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์หลัก (core enzyme) และระยะเริ่มแรกของการถอดรหัสจะมีโปรตีนอีกชนิดหนึ่ง คือ σ factor (sigma factor) จับกับเอนไซม์หลักเพียงช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เราเรียกเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยทั้ง 6 หน่วยนี้ ว่า "holoenzyme" (รูปที่ 4-1)

ในยูคาริโอต มีเอนไซม์ RNA polymerase ในนิวเคลียสอยู่ 3 ชนิด แต่ละชนิดทำหน้าที่สังเคราะห์ RNA ต่างชนิดกัน ได้แก่ เอนไซม์ RNA polymerase I ใช้ในการสังเคราะห์ rRNA, เอนไซม์ RNA polymerase II ใช้ในการสังเคราะห์ mRNA และ เอนไซม์ RNA polymerase III ใช้สังเคราะห์ tRNA และ 5S rRNA และ RNA ขนาดเล็กอีกหลายชนิด นอกจากเอนไซม์ 3 ชนิดนี้แล้วในยูคาริโอต ยังพบเอนไซม์ RNA polymerase ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และคลอโรพลาสต์ในพืชด้วย โครงสร้างของเอนไซม์ RNA polymerase ของยูคาริโอต ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วยมากกว่าในโปรคาริโอต

4.2) <u>ขั้นตอนการถอดรหัสใน *E. coli*</u>

(4.2.1) ขั้นตอนการเริ่มต้น (Initiation)

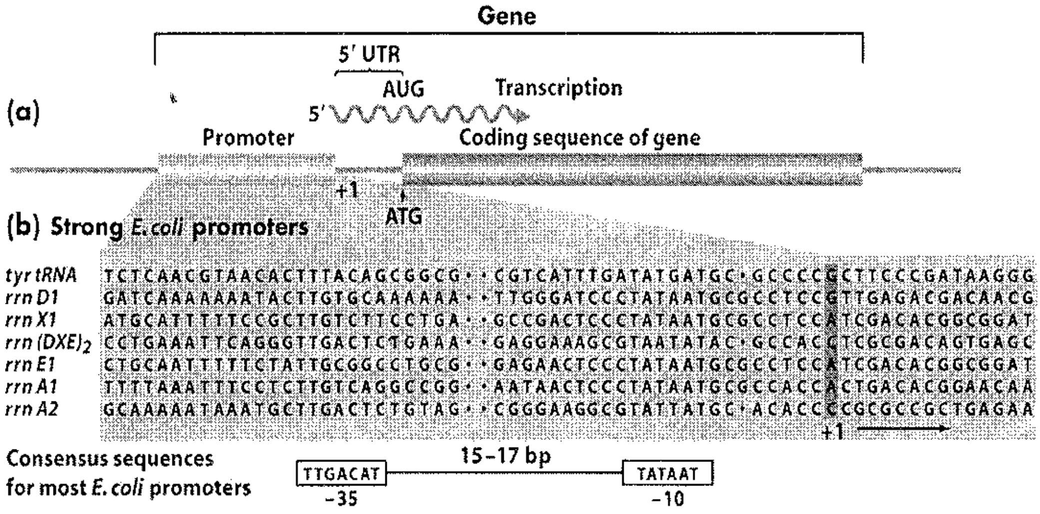
เอนไซม์ RNA polymerase holoenzyme จะเข้าจับกับโมเลกุลของ DNA ตรงบริเวณจำเพาะที่เรียกว่า promoter ซึ่งอยู่ใกล้กับจุดเริ่มต้นของการสร้างสาย RNA promoter เป็นตัวบ่งชี้ให้เอนไซม์ RNA polymerase

ตารางที่ 4-2 RNA polymerase ในยูคาริโอต ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ RNA ต่างชนิดกัน

Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Biochemistry 3rd edition. 2000; หน้า 1086

ชนิดของ RNA polymerase	ตำแหน่งที่พบในเซลล์	ชนิดของ RNA ที่สังเคราะห์
RNA polymerase I	นิวเคลียส (นิวคลีโอลัส)	Pre-rRNA (ไม่รวม 5S RNA)
RNA polymerase II	นิวเคลียส	Pre-mRNA และ small nuclear RNAs บางชนิด
RNA polymerase III	นิวเคลียส	Pre-tRNA 5S rRNA และ small RNAs ชนิดอื่นๆ
Mitochondrial RNA polymerase[a]	ไมโทคอนเดรีย	Mitochonorial RNA
Chloroplast RNA polymerase[a]	คลอโรพลาสต์	Chloroplast RNA

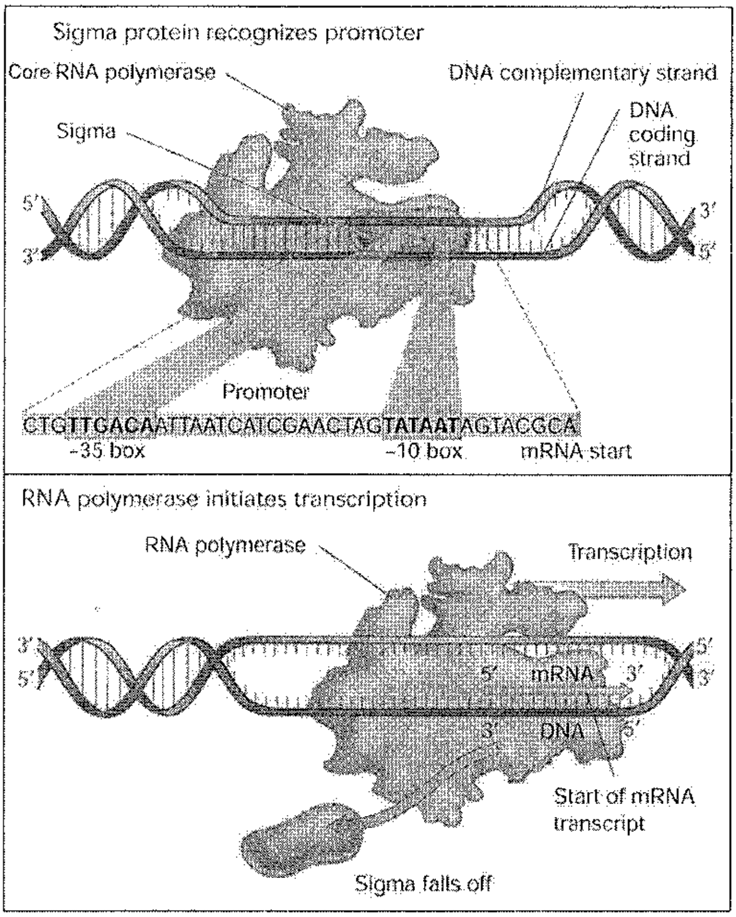
[a] มีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ RNA polymerase ของโปรคาริโอตอย่างมาก



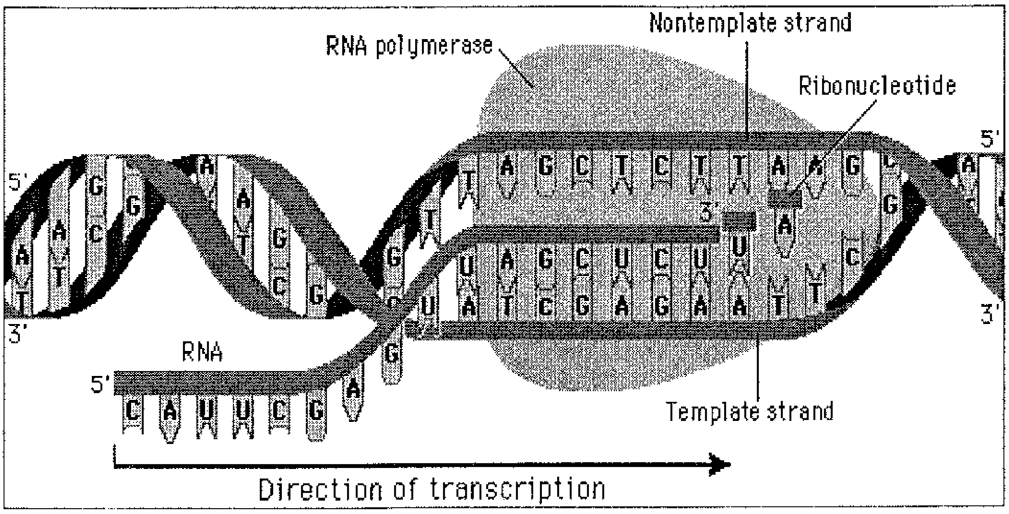
รูปที่ 4-2 Promoter เป็นตัวบ่งชี้ให้เอนไซม์ RNA polymerase เข้าจับในการเริ่มต้นกระบวนการถอดรหัส (transcription start site) ในโปรคาริโอตมีลำดับเบสจำเพาะอยู่ 2 แห่ง แห่งหนึ่งอยู่ก่อนจุดเริ่มต้นประมาณ 10 คู่เบส ซึ่งเรียกว่า "Pribnow box" และอีกแห่งหนึ่งอยู่ก่อนหน้าจุดเริ่มต้นประมาณ 35 คู่เบส เรียกว่า "-35 region" http://cropandsoil.oregonstate.edu/classes/css430/lecture%209-07/figure-08-08.JPG

เริ่มต้นกระบวนการถอดรหัสที่จุดเริ่มต้น (transcription start site) บริเวณ promoter จะมีลำดับ nucleotide ที่จำเพาะซึ่งในโปรคาริโอตมีลำดับเบสจำเพาะอยู่ 2 แห่ง แห่งหนึ่งอยู่ก่อนจุดเริ่มต้น (upstream, ไปทางด้านปลาย 5' ของ coding strand) ประมาณ 10 คู่เบส เรียกว่า "Pribnow box" ซึ่งมีลำดับเบสเป็น TATAAT อีกแห่งหนึ่งอยู่ก่อนหน้าจุดเริ่มต้นประมาณ 35 คู่เบส เรียกว่า "-35 region" ซึ่งมีลำดับเบสเป็น TTGACA โปรตีน σ ใน holoenzyme ทำหน้าที่นำเอนไซม์ให้เข้าจับที่บริเวณ promoter จากนั้น DNA เกลียว

คู่บริเวณนั้นจะแยกสายออกจากกันเป็นระยะทางสั้น ๆ ประมาณ 17 คู่เบส เอนไซม์ RNA polymerase จะจับแน่นกับสาย DNA แม่แบบ และสร้างพันธะ phosphodiester ระหว่าง ribonucleoside triphosphate (NTP) 2 ตัวแรก ที่เข้ามา โดย NTP ตัวแรกของสาย RNA จะเป็นพิวรีน คือ ATP หรือ GTP เสมอ ซึ่งเข้ามาจับคู่กับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมของสาย DNA แม่แบบตรงจุดเริ่มต้น NTP ตัวต่อไปที่เข้ามาจะจับกับนิวคลีโอไทด์บนสาย DNA แม่แบบตัวถัดไปและเกิดพันธะ phosphodiester กับ 3'-OH ของ NTP ตัวแรก ดังนั้น ที่ปลาย 5' ของสาย RNA ที่สร้างขึ้นใหม่จะมีหมู่ phosphate 3 หมู่ เกาะติดอยู่เสมอ



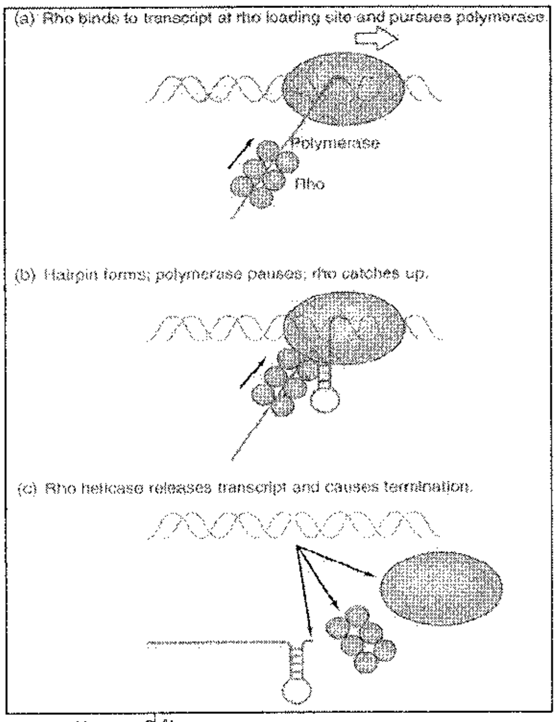
รูปที่ 4-3 การเริ่มต้นการถอดรหัส (Transcription Initiation) **บน**: เอนไซม์ RNA polymerase holoenzyme จะเข้าจับกับโมเลกุลของ DNA ตรงบริเวณจำเพาะที่เรียกว่า promoter ซึ่งอยู่ใกล้กับจุดเริ่มต้นของการสร้างสาย RNA, **ล่าง**: DNA เกลียวคู่บริเวณนั้นจะแยกสายออกจากกันเป็นระยะทางสั้น ๆ ประมาณ 17 คู่เบส เมื่อสาย RNA มีความยาว 7-10 นิวคลีโอไทด์และโปรตีน σ จะแยกตัวออกจาก holoenzyme เหลือเฉพาะเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่สร้างสาย RNA ต่อไป http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/sf13x5a.jpg,http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/sf13x5b.jpg



รูปที่ 4-4 ในขั้นตอนสร้างสาย RNA (Transcription elongation) RNA polymerase จะเคลื่อนตัวไปตามสาย DNA แม่แบบในทิศทาง 3' --> 5' ส่วนสาย RNA จะขยายยาวออกในทิศทาง 5' --> 3' และหลังจากที่สาย RNA แยกตัวออกจากสาย DNA แม่แบบแล้ว ส่วนของ DNA ที่เป็นแม่แบบจะจับกับสาย DNA ที่เป็นคู่สมและกลับคืนสู่สภาพเกลียวคู่ดังเดิม http://prs-sun-107-nyeh-peshr-hme0-39.digisle.net/science/biology_place/biocoach/images/transcription/startrans.gif

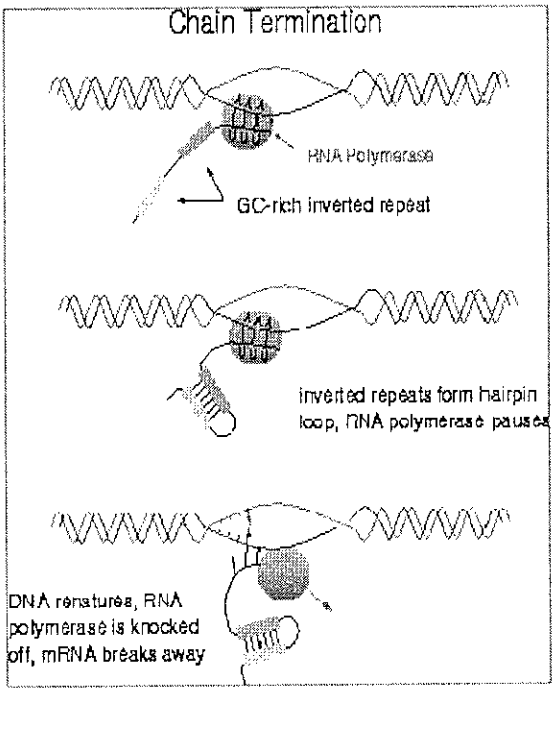
*(4.2.2) **ขั้นตอนสร้างสาย** RNA (Elongation)*

เกิดขึ้นหลังจากพันธะ phophodiester พันธะแรกถูกสร้างขึ้น เอนไซม์ RNA polymerase จะเคลื่อนตัวไปตามสาย DNA แม่แบบ ในทิศทาง 3' --> 5' เพื่อทำหน้าที่สร้างพันธะ phosphodiester ต่อไปเรื่อย ๆ ในขณะที่ ribonucleotide ตัวใหม่ถูกเติมเข้าไปที่ปลาย 3' ของสาย RNA ที่กำลังสร้าง ดังนั้น สาย RNA จะขยายยาวออกในทิศทาง 5' --> 3' เมื่อสาย RNA มีความยาว 7-10 นิวคลีโอไทด์ โปรตีน σ จะแยกตัวออกจาก holoenzyme เหลือเฉพาะเอนไซม์หลัก (core enzyme) ที่ทำหน้าที่สร้างสาย RNA ต่อไป โปรตีน σ ที่แยกตัวออกไปสามารถที่จะไปรวมกับเอนไซม์หลักตัวอื่น ๆ ได้อีก และทำหน้าที่เริ่มการสร้าง RNA โมเลกุลใหม่ต่อไป ในขณะที่การสร้างสาย RNA กำลังดำเนินอยู่ เอนไซม์ RNA polymerase จะเคลื่อนตัวไปเรื่อย ๆ บนสาย DNA แม่แบบ และ ทำให้เกิดการแยกสายของ DNA ในบริเวณที่เอนไซม์เคลื่อนตัวผ่าน เมื่อสาย RNA ที่ถูกสร้างขึ้นมีความยาวพอควรแล้ว ส่วนของสาย RNA ที่อยู่ด้านปลาย 5' ก็จะแยกตัวหลุดออกจากสาย DNA แม่แบบ เหลือเฉพาะส่วนปลาย 3' ของ สาย RNA เท่านั้น ที่ยังคงจับกับสาย DNA แม่แบบเพื่อให้เอนไซม์ RNA polymerase เติมนิวคลีโอไทด์และเพิ่มความยาวของสาย RNA ต่อไป หลังจากที่สาย RNA แยกตัวออกจากสาย DNA แม่แบบแล้ว ส่วนของ DNA ที่เป็นแม่แบบจะจับกับสาย DNA ที่เป็นคู่สมและกลับคืนสู่สภาพเกลียวคู่ดังเดิม



รูปที่ 4-5 การสิ้นสุดการถอดรหัสแบบที่ต้องการ ρ factor (rho-dependent termination) โดย ρ factor จะเข้าจับกับ RNA สายที่กำลังสร้างตรงบริเวณใกล้กับจุดยุติ และเคลื่อนตัวไปตามสาย RNA จนถึงจุดยุติทำให้เอนไซม์ RNA polymerase หยุดการสังเคราะห์ RNA

http://cms.daegu.ac.kr/sgpark/molecular%20biology/NMMKX018.GIF



รูปที่ 4-6 การสิ้นสุดการถอดรหัสแบบที่ไม่ต้องการ ρ factor (rho-independent termination) บริเวณที่ห่างจากปลาย 3' ของสาย RNA ที่กำลังสร้างขึ้นประมาณ 15-20 นิว-คลีโอไทด์ มีโครงสร้างลักษณะ hairpin structure ประกอบด้วยเบส G และ C เป็นส่วนใหญ่ และต่อจากโครงสร้างนี้ทางด้านปลาย 3' จะพบเบส U เรียงกันประมาณ 4-8 หน่วย โครงสร้างลักษณะนี้ทำให้เอนไซม์ RNA polymerase หยุดทำงานและทำให้สาย RNA แยกออกจากสาย DNA แม่แบบ ประกอบกับการจับคู่ระหว่างเบส U ของสาย RNA กับลำดับเบส A ของ DNA แม่แบบทำให้สาย RNA ที่สร้างขึ้นหลุดออกจาก DNA แม่แบบ

http://www.stat.berkeley.edu/users/terry/Classes/s260.1998/Week12/week12/img5.gif

(4.2.3) ขั้นตอนการสิ้นสุดการถอดรหัส (Termination)

เมื่อเอนไซม์ RNA polymerase เคลื่อนตัวมาถึงบริเวณที่เป็นจุดยุติ (termination site) ก็จะหยุดการเติมนิวคลีโอไทด์ให้แก่สาย RNA ที่กำลังสร้าง เอนไซม์และสาย RNA จะแยกตัวหลุดออกจากสาย DNA แม่แบบ ใน *E. coli* การสิ้นสุดการสังเคราะห์สาย RNA มี 2 แบบ คือ แบบที่ต้องการโปรตีน ρ (rho factor หรือ rho-dependent) และ แบบที่ไม่ต้องการโปรตีน ρ (หรือ rho-independent)

แบบที่ต้องการ ρ factor (rho-dependent) ต้องอาศัยโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า ρ factor เชื่อกันว่า ρ factor เข้าจับกับ RNA สายที่กำลังสร้างตรงบริเวณใกล้กับจุดยุติ และเคลื่อนตัวไปตามสาย RNA จนถึงจุดยุติทำให้เอนไซม์ RNA polymerase หยุดการสังเคราะห์ RNA ρ factor มีปฏิกิริยาของเอนไซม์ ATP-dependent RNA-DNA helicase ซึ่งอาจจะช่วยในการแยกสาย RNA ออกจากสาย DNA แม่แบบ และในขณะเดียวกันก็ช่วยให้เอนไซม์ RNA polymerase หลุดออกจาก DNA แม่แบบ อย่างไรก็ตาม กลไกการทำงานของ ρ factor ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันอย่างแน่ชัด

แบบที่ไม่ต้องการ ρ factor (rho-independent) พบว่าบริเวณที่ห่างจากปลาย 3' ของสาย RNA ที่กำลังสร้างขึ้นประมาณ 15-20 นิวคลีโอไทด์ มีโครงสร้างลักษณะเหมือนกิ๊บติดผม (hairpin structure) ประกอบด้วยเบส G และ C เป็นส่วนใหญ่ และต่อจากโครงสร้างนี้ทางด้านปลาย 3' จะพบเบส U เรียงกันประมาณ 4-8 หน่วย เชื่อกันว่าการเกิดโครงสร้างลักษณะนี้ ทำให้เอนไซม์ RNA polymerase หยุดทำงานและทำให้สาย RNA แยกออกจากสาย DNA แม่แบบได้ง่ายขึ้น ประกอบกับการจับคู่ระหว่างเบส U ของสาย RNA กับลำดับเบส A ของ DNA แม่แบบนั้นเป็นส่วนที่จับกันไม่แน่น ซึ่งเป็นผลทำให้สาย RNA ที่สร้างขึ้นหลุดออกจาก DNA แม่แบบได้ง่ายขึ้น

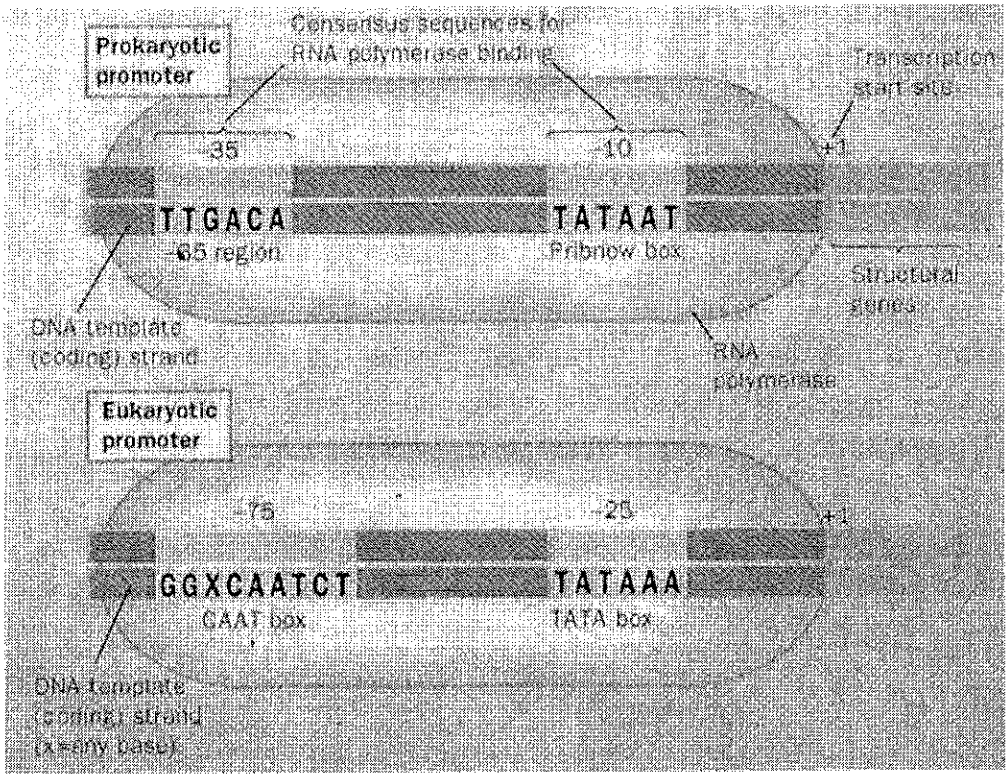
4.3) <u>กระบวนการถอดรหัสในยูคาริโอต</u>

กระบวนการถ่ายแบบ RNA ในยูคาริโอตคล้ายคลึงกับโปรคาริโอต แต่มีความซับซ้อนมากกว่าและต้องการปัจจัยการถอดรหัส (transcription factor) เป็นจำนวนมาก ในยูคาริโอตยังมีเอนไซม์ RNA polymerase 3 ชนิด แต่ละชนิดมีหน้าที่จำเพาะและจับกับ promoter ซึ่งมีความหลากหลายและมีจำนวนมาก สำหรับเบสของ promoter ที่พบในยูคาริโอตส่วนใหญ่จะคล้ายคลึงกัน ที่น่าสนใจและที่แตกต่าง จาก promoter ของเอนไซม์ RNA polymerase อื่น ๆ ก็คือ promoter ของเอนไซม์ RNA polymerase III จะอยู่ถัดไปทางด้านหลังของจุดเริ่มต้น (downstream) ของสาย RNA กล่าวคือ จะอยู่ในส่วนของยีนที่ถูกถอดรหัสนั่นเอง สำหรับรายละเอียดเกี่ยวกับการเริ่มต้นและการสิ้นสุดการสังเคราะห์ RNA ในยูคาริโอต จำเป็นต้องใช้โปรตีนแฟคเตอร์ต่าง ๆ เข้าร่วมมากมาย โปรตีนเหล่านี้เป็นกลุ่มของโปรตีนพวกที่เรียกว่า Transcription factors ในขั้นตอนเริ่มแรกจะต้องมีแฟกเตอร์ถอดรหัส (transcription factor) ช่วยในการจับจำเพาะระหว่างเอนไซม์กับ promoter มากกว่า 30 ชนิด สำหรับขั้นตอนการสิ้นสุดการถอดรหัส ในปัจจุบันเข้าใจว่ามีกลไกคล้ายกับการสิ้นสุดการถอดรหัสแบบที่ไม่ต้องการ Rho factor (Rho-independent) ในโปรคาริโอต

<u>4.4) การตัดแต่งและดัดแปลง RNA หลังการถอดรหัส (Posttranscriptional Modification)</u>

RNA ชิ้นต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่อยู่ภายในเซลส่วนใหญ่แล้วไม่ใช่ RNA ที่เป็นผลผลิตโดยตรงจากกระบวนการถอดรหัส กล่าวคือ สาย RNA ที่ผ่านกระบวนการถอดรหัสส่วนใหญ่แล้ว จะต้องผ่านกรรมวิธีการตัด

แต่งก่อนที่จะไปทำหน้าที่ภายในเซล ยกเว้น mRNA ของโปรคาริโอตเท่านั้นที่ไม่ต้องผ่านกรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลงหลังการถอดรหัส mRNA ของโปรคาริโอตสามารถทำหน้าที่เป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนได้ทันทีที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นหรือบางครั้งยังสังเคราะห์ไม่เสร็จด้วยซ้ำไป RNA ทุกชนิดของยูคาริโอตจะต้องผ่านกรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลงหลังการถอดรหัส โดยจะเกิดขึ้นภายในนิวเคลียสก่อนจะถูกส่งต่อเพื่อการแปลรหัสในไซโตพลาสซึม มีการเติม 5' cap, 3' poly A-tail และการตัดส่วนที่เป็น intron ทิ้ง (RNA splicing) โดยกระบวนการเหล่านี้อาจเกิดขึ้นทันทีในระหว่างการสังเคราะห์สาย RNA หรือหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการถอดรหัสหรือเกิดขึ้นระหว่างการเคลื่อนย้าย RNA จากนิวเคลียสไปสู่ไซโตพลาสซึม ส่วนการตัดแต่ง rRNA และ tRNA เกิดขึ้นทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต

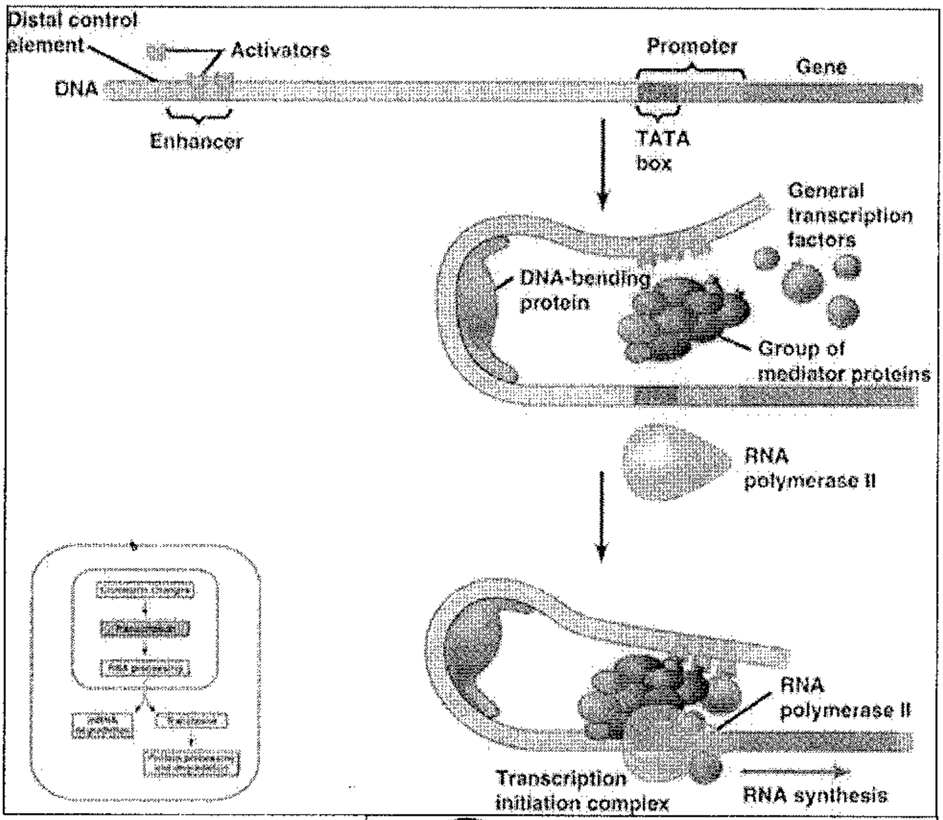


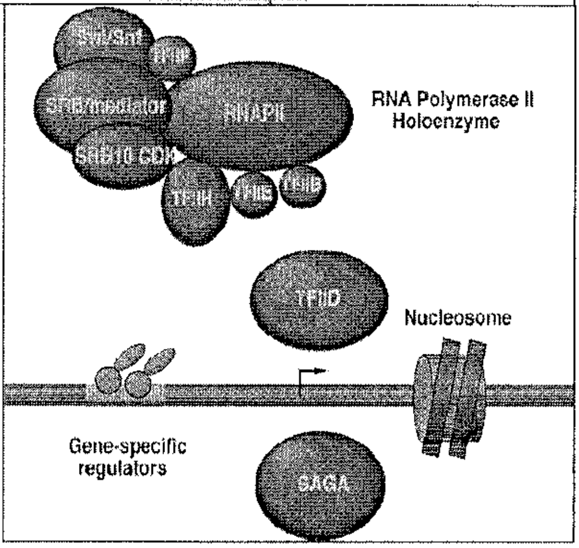
รูปที่ 4-7 เปรียบเทียบ promoter ในโปรคาริโอตและยูคาริโอต

4.4.1) การเติม 5'-cap

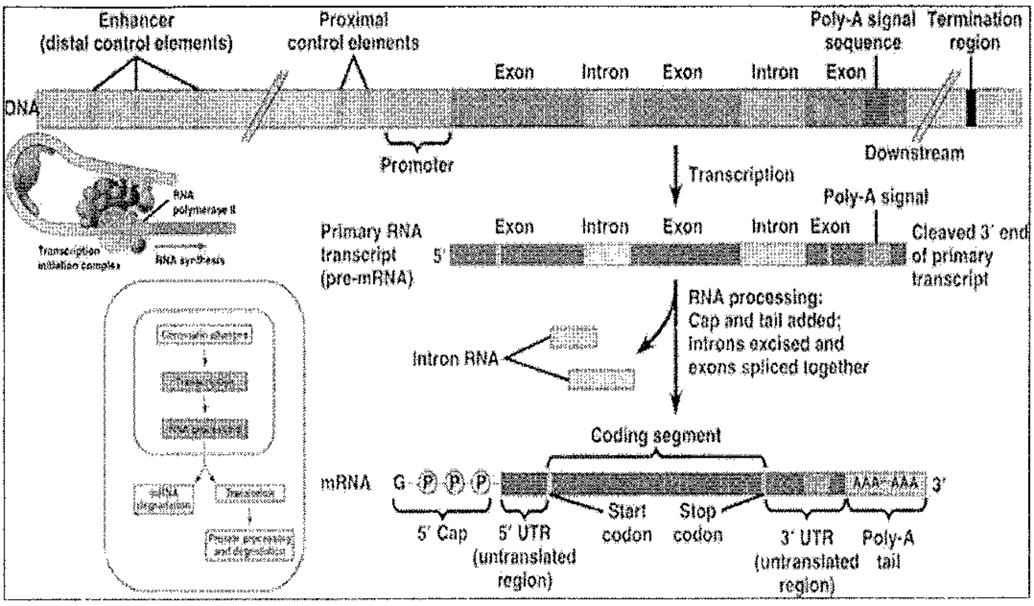
ในกระบวนการตัดแต่งดัดแปลงโมเลกุลต้นกำเนิดของ mRNA ของยูคาริโอตนอกจาก RNA splicing แล้ว ยังพบว่าที่ปลายทั้งสองด้านของโมเลกุลมีการเติมนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเข้าไป โดยที่ปลาย 5' จะพบว่ามี 7-methyl-guanosine เชื่อมต่อกับนิวคลีโอไทด์ตัวแรกของสาย RNA ด้วยพันธะ 5'-5' triphosphate เรียกโครงสร้างนี้ว่า 5'-cap-7-methyl guanosine เกิดจากโมเลกุลของ GTP เข้าไปเชื่อมต่อกับปลาย 5' ของ mRNA ต้นกำเนิด และต่อจากนั้นจะมีการเติมหมู่เมทิล (methylation) เข้าที่ตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน นอกจากนี้ยัง

อาจพบว่าที่ 2'-OH ของนิวคลีโอไทด์ตัวแรกเพียงตัวเดียว หรือของทั้งตัวแรกและตัวที่สอง ซึ่งอยู่ถัดจาก 7-methyl-guanosine จะถูกเติมหมู่เมทิลเข้าไป ดังนั้นโครงสร้าง 5'-cap จึงมี 3 รูปแบบ ดังรูป 4-10 การเกิด 5'-cap จะเริ่มขึ้นในขณะที่กระบวนการถอดรหัสกำลังดำเนินอยู่ หรือ อาจเกิดขึ้นทันทีเมื่อการถอดรหัสสิ้นสุดลงก็ได้





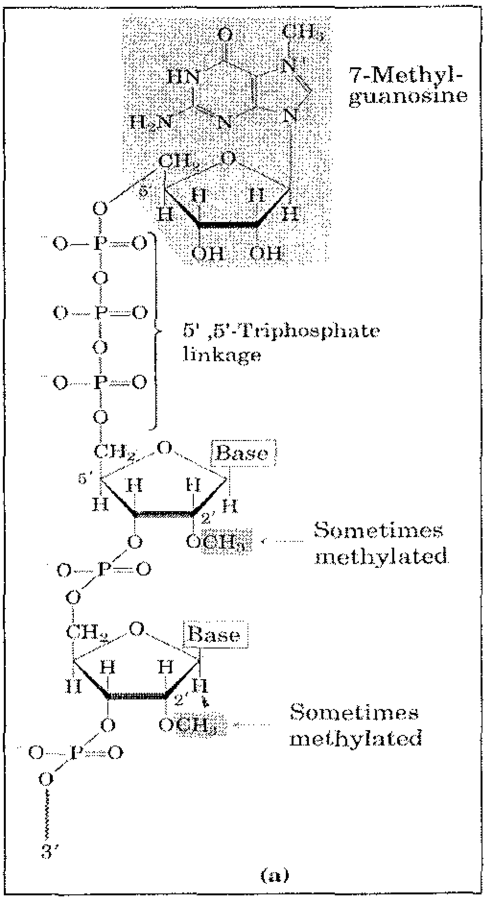
รูปที่ 4-8 กระบวนการถ่ายแบบ RNA ในยูคาริโอตคล้ายคลึงกับโปคาริโอต แต่มีความซับซ้อนมากกว่าและต้องการปัจจัยการถอดรหัส (transcription factor) เป็นจำนวนมาก http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.19.6.activators.jpg,http://bp3.blogger.com/_2MdvP3R23jU/Ro41t08E56I/AAAAAAAAACs/rrOExcFPOIo/s1600-h/RNAPolyIINteractive.gif



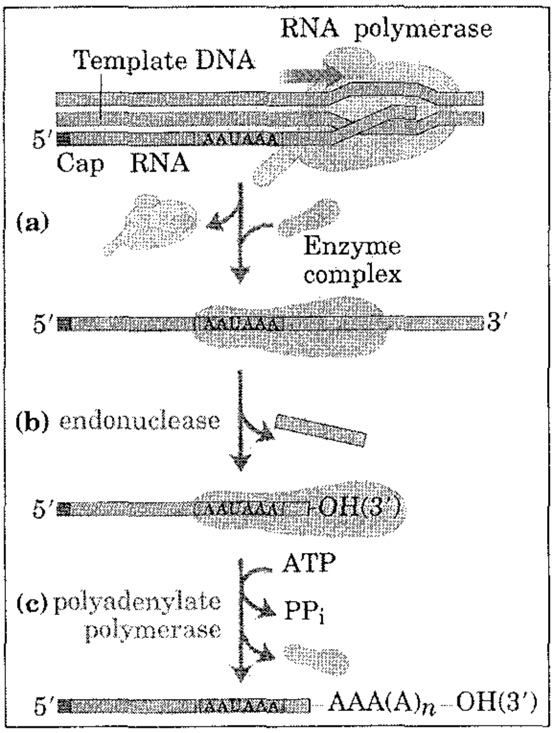
รูปที่ 4-9 RNA ทุกชนิดของยูคาริโอตจะต้องผ่านกรรมวิธีการตัดแต่งหลังการถอดรหัส โดยจะเกิดขึ้นภายในนิวเคลียสก่อนจะถูกส่งต่อเพื่อการแปลรหัสในไซโตพลาสซึม มีการเติม 5' cap, 3' poly (A) tail และการตัดส่วนที่เป็น intron ทิ้ง (RNA splicing) โดยกระบวนการเหล่านี้อาจเกิดขึ้นทันทีในระหว่างหรือหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการถอดรหัสหรือเกิดขึ้นในระหว่างการเคลื่อนย้าย RNA จากนิวเคลียสไปสู่ไซโตพลาสซึม http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.19.5.summary.jpg

4.4.2) การเติม 3'poly (A) tail

ที่ปลาย 3' ของ mRNA พบว่ามีลำดับเบสอะดีนีนอยู่ประมาณ 20-250 หน่วย เรียกส่วนนี้ว่า 3' poly-(A) tail mRNA ส่วนใหญ่ของเซลสัตว์จะมี poly A tail อยู่ ยกเว้น mRNA ของโปรตีน histone สำหรับ poly (A) tail นี้ไม่ได้เกิดจากการเติม poly (A) เข้าที่ปลาย 3' ของโมเลกุลต้นกำเนิดโดยตรง แต่จะมีเอนไซม์ riboendo-nuclease ที่จำเพาะตัด hnRNA ตรงตำแหน่งที่จะมีการเติม poly (A) (cleavage signal) โดยที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์นี้คือ AAUAAA ซึ่งอยู่ประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ก่อนจุดตัดของเอนไซม์ เมื่อเอนไซม์ตัดแล้วจะทำให้เกิดเป็นปลาย 3'-OH จากนั้นเอนไซม์ polyadenylate polymerase จะเติม poly A เข้าที่ปลาย 3'-OH นี้ การเติม poly A จะเกิดขึ้นหลังจากการเติม 5'-cap และก่อนที่จะเกิดการ splicing ปัจจุบันเราทราบว่าหน้าที่ของ 5'-cap และ 3'-tail เพียงบางส่วนเท่านั้น เข้าใจว่าทั้ง 5'-cap และ 3'-tail มีบทบาทป้องกัน mRNA ไม่ให้ถูกทำลายได้ง่าย นอกจากนี้ 5'-cap อาจจะมีส่วนช่วยในการจับกันระหว่าง mRNA กับ ribosome เพื่อเริ่มต้นกระบวนการแปลรหัส



รูปที่ 4-10 ที่ปลาย 5' ของ mRNA จะมีการเติม 7-methyl-guanosine เชื่อมต่อกับ nucleotide ตัวแรกของสาย RNA ด้วยพันธะ 5'-5' triphosphate เรียกโครงสร้างนี้ว่า 5'-cap-7-methyl guanosine เกิดจากโมเลกุลของ GTP เข้าไปเชื่อมต่อกับปลาย 5' ของ mRNA ต้นกำเนิด และต่อจากนั้นมีการเติมหมู่เมทิล (methylation) เข้าที่ตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน นอกจากนี้ยังอาจพบว่าที่ 2'-OH ของ nucleotide ตัวแรกเพียงตัวเดียว หรือของทั้งตัวแรกและตัวที่สองถัดจาก 7-methyl-guanosine จะถูกเติมหมู่เมทิลเข้าไป *การเกิด 5'-cap* จะเริ่มขึ้นในขณะที่กระบวนการถอดรหัสกำลังดำเนินอยู่ หรือ อาจเกิดขึ้นทันทีเมื่อการถอดรหัสสิ้นสุดลงก็ได้ http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/111300/26_18a.GIF



รูปที่ 4-11 การเติม poly (A) tail นี้ไม่ได้เกิดจากการเติม poly (A) เข้าที่ปลาย 3' ของโมเลกุลต้นกำเนิดโดยตรง แต่จะมีเอนไซม์ riboendonuclease ที่จำเพาะตัด hnRNA ตรงตำแหน่งที่จะมี*การเติม poly (A) (cleavage signal)* โดยที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์นี้คือ AAUAAA ซึ่งอยู่ประมาณ 20-30 เบสก่อนจุดตัดของเอนไซม์ เมื่อเอนไซม์ตัดแล้วจะทำให้เกิดเป็นปลาย 3'-OH จากนั้นเอนไซม์ polyadenylate polymerase จะเติม poly A เข้าที่ปลาย 3'-OH นี้ http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/111300/26_19.GIF

4.4.3) RNA splicing

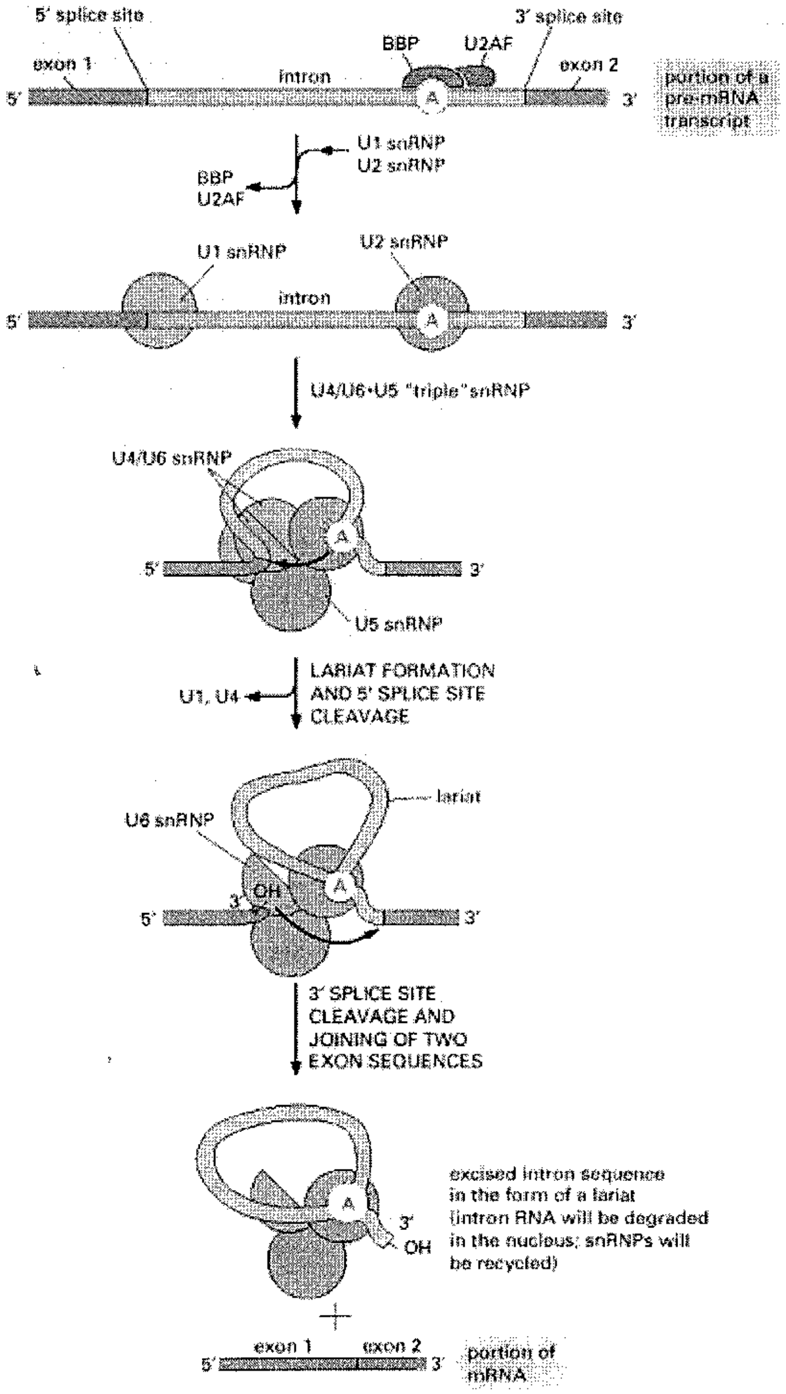
โมเลกุลต้นกำเนิดของ RNA ส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่กว่าที่ควรจะเป็น ต่อมาจะถูกตัดให้เป็นโมเลกุลขนาดที่ต้องการโดยเอนไซม์ endonuclease ที่จำเพาะ RNA ที่ผ่านกรรมวิธีการตัด-แต่งมากที่สุด คือ mRNA ของยูคาริโอต โมเลกุลต้นกำเนิดของ mRNA ที่เรียกว่า heterogeneous nuclear RNA (hnRNA) นั้น ถ่ายแบบมาจากยีนเพียงยีนเดียว แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนนั้นไม่ได้ถูกแปลรหัสเป็นสาย polypeptide ยีนหนึ่ง ๆ จะประกอบด้วยส่วนที่ถูกแปลรหัส (coding sequence) ที่เรียกว่า เอกซอน (exon) และส่วนที่ไม่ได้ถูกแปลรหัส เรียกว่า อินทรอน (intron) ซึ่งแทรกขั้นอยู่ระหว่างเอกซอน จึงเรียกว่าส่วน อินทรอนนี้ว่า "intervenning sequence" ยีนหนึ่ง ๆ จะมีเอกซอนและอินทรอนได้หลายแห่งอยู่ในโมเลกุลของ RNA ต้นกำเนิด จากการศึกษา พบว่า อินทรอนจะถูกตัดออกไปจาก RNA ต้นกำเนิด และส่วนเอกซอนจะถูกนำมาเชื่อมต่อกันเพื่อเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป กรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลง RNA ในลักษณะนี้ เรียกว่า RNA splicing กระบวนการนี้ต้องการอนุภาคเล็ก ๆ ที่เรียกว่า small nuclear ribonucleoprotein praticles (snRNP หรือ "snurps") ซึ่งประกอบด้วย RNA ขนาดเล็กที่พบในนิวเคลียส (small nuclear RNA, snRNA) กับโปรตีนจำเพาะที่ทำหน้าที่ตัด-แต่ง RNA ต้นกำเนิด โดย U1 snRNP จะจับกับ 5' splice site และ U2 snRNA จับกับ intron เพื่อกระตุ้น (activate) เบส A (adenosine) นอกจากนี้ ยังอาศัย snRNP อื่น ๆ อีกหลายชนิด ในการเกิด RNA splicing การศึกษากลไก RNA splicing เหล่านี้ทำให้เกิดการค้นพบสิ่งที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งทางด้านชีวเคมี กล่าวคือ พบว่า กรรมวิธีการตัด-แต่ง RNA บางชนิดเกิดจากปฏิกิริยาของ RNA ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เอง *และเรียก RNA ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ว่า ไรโบไซม์ (ribozyme)*

ยีนส่วนใหญ่ของยูคาริโอตที่ทำหน้าที่เป็นยีนโครงสร้าง (structural gene) กล่าวคือ เป็นยีนที่กำหนดแบบของการสร้างโปรตีนและ RNA ทุกชนิด (ไม่ว่าจะเป็น mRNA tRNA หรือ rRNA) จะมีอินทรอนอยู่ (ยกเว้นยีนของโปรตีน histone) อินทรอนไม่ได้พบจำกัดเฉพาะในยูคาริโอต ปัจจุบันพบว่าบางยีนในโปรคาริโอตมีอินทรอนอยู่เช่นกัน แต่พบเป็นจำนวนน้อยมาก อินทรอนจำแนกออกเป็นหลายกลุ่ม การตัด-ต่ออินทรอนแต่ละกลุ่มมีกลไกที่แตกต่างกัน บางกลุ่มต้องการ snRNP เช่น การตัดต่อของ hnRNA ที่ได้กล่าวไปแล้ว บางกลุ่มเกิดขึ้นเอง (self-splicing) ไม่มีโปรตีนหรือเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง โดยการตัดต่อเกิดจากปฏิกิริยาของ RNA โมเลกุลต้นกำเนิด หรือ ribozyme นั่นเอง เช่น โมเลกุลต้นกำเนิดของ rRNA ส่วนบางกลุ่มก็ต้องการ ATP หรือ GTP ในการตัดต่อ เช่น โมเลกุลต้นกำเนิดของ tRNA

4.4.4) กรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลง rRNA

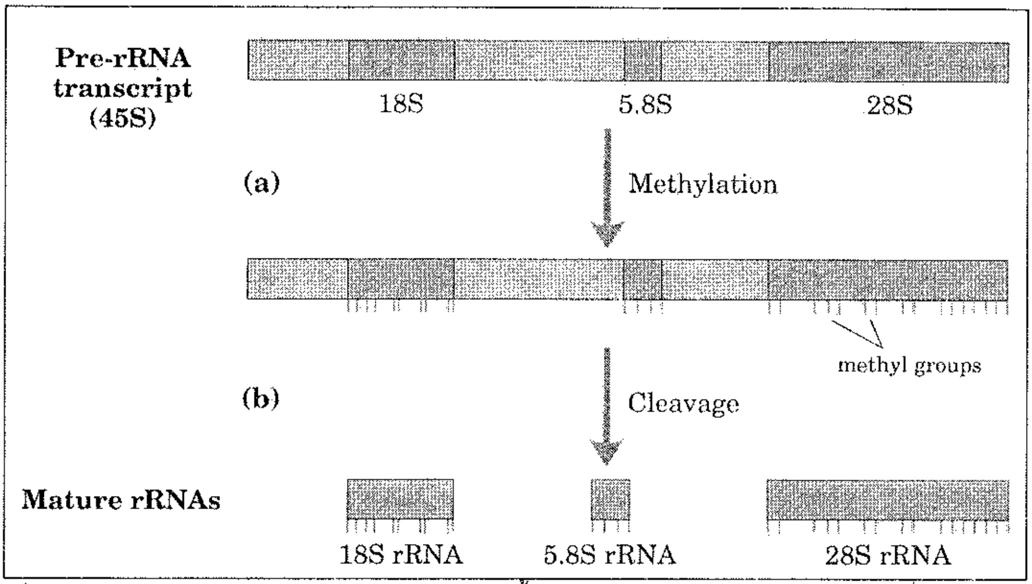
rRNA ทั้งของโปรคาริโอตและยูคาริโอต มีการเปลี่ยนแปลงมาจากโมเลกุลต้นกำเนิดซึ่งเรียกว่า preribosomal RNA ด้วยกรรมวิธีที่เหมือนกัน โดยจะมีการเติมหมู่เมทิลเข้าที่เบสหลายตำแหน่ง จากนั้นจึงมีการตัดโดยเอนไซม์ endonuclease ที่จำเพาะ ใน *E. coli* พบว่า rRNA ชนิด 23S, 16S และ 5S เป็นผลผลิตจาก 30S preribosomal RNA โมเลกุลเดียว นอกจาก rRNA ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวแล้ว ผลิตอีกชนิดหนึ่งที่ได้จาก 30S preribosomal RNA คือ tRNA นั่นคือ ภายในยีนของ 30S preribosomal RNA มีส่วนที่เป็นยีนของ tRNA อยู่ด้วย สำหรับ proribosomal RNA ในยูคาริโอตมีขนาด 45S ให้ผลผลิตเป็น rRNA ชนิด 28S, 18S และ 5.8S ไม่พบว่ามียีนของ tRNA อยู่ภายในโมเลกุล แต่พบส่วนที่เป็นอินทรอนอยู่ พบว่ากระบวนการตัดแต่งดัดแปลง preribosomal RNA ในยูคาริโอตเกิดขึ้นในนิวคลีโอลัส (nucleolus)

มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
มกราคม 2550

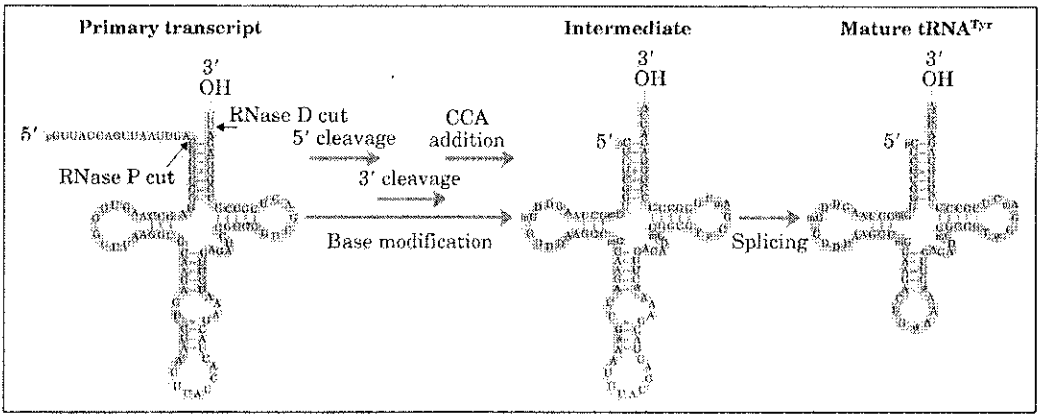


รูปที่ 4-12 การเกิด RNA splicing ที่ต้องการ snRNP U1 SnRNP จะจับกับ 5' splice site และ U2 snRNA จับกับ intron เพื่อ activate เบส A (adenosine) นอกจากนี้ยังอาศัย snRNP อื่น ๆ อีกหลายชนิด

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=rna%20splicing&rid=mboc4.figgrp.1020



รูปที่ 4-13 กรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลง rRNA rRNA ทั้งของโปรคาริโอตและยูคาริโอต มีการเปลี่ยนแปลงมาจากโมเลกุลต้นกำเนิดซึ่งเรียกว่า preribosomal RNA ด้วยกรรมวิธีที่เหมือนกัน โดยจะมีการเติมหมู่เมทิลเข้าที่เบสหลายตำแหน่ง จากนั้นจึงมีการตัดโดยเอนไซม์ endonuclease ที่จำเพาะ (Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd edition. 2000; หน้า 1001)



รูปที่ 4-14 กรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลง tRNA โดยจะถูกตัดออกโดยเอนไซม์ ribonuclease P (Rnase P) ที่ปลาย 5' และ โดยเอนไซม์ ribonuclease D (Rnase D) ที่ปลาย 3', การเติมลำดับ nucleotide CCA เข้าที่ปลาย 3' ของ tRNA, การดัดแปลงเบสในโมเลกุล (base modification), tRNA บาง โมเลกุลของยูคาริโอตมีส่วนของอินทรอนอยู่ ซึ่งจะต้องถูกตัดออกไป (splicing) (Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd edition. 2000; หน้า 1002)

4.4.4) กรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลง tRNA

นอกจาก tRNA ที่เป็นผลผลิตของ preribosomal RNA ในโปรคาริโอตดังกล่าวข้างต้นแล้ว tRNA ชนิดอื่น ๆ จะเป็นผลผลิตที่ได้มาจากโมเลกุลต้นกำเนิดของ tRNA ขนาดใหญ่ ในโปรคาริโอต RNA โมเลกุลต้นกำเนิดหนึ่งโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่เป็น tRNA 2 - 7 โมเลกุล อาจจะเป็น tRNA ต่างชนิด หรือ ชนิดซ้ำ ๆ กันก็ได้ ส่วนที่เป็น tRNA จะถูกตัดออกโดยเอนไซม์ ribonuclease P (Rnase P) ที่ปลาย 5' และ โดยเอนไซม์ ribonuclease D (Rnase D) ที่ปลาย 3' ต่อจากนั้นเป็นการเติมลำดับ nucleotide CCA เข้าที่ปลาย 3' ของ tRNA ที่ไม่มีลำดับ nucleotide ดังกล่าวอยู่ แต่ tRNA บางชนิดจะมีลำดับ nucleotide CCA ที่ปลาย 3' อยู่เรียบร้อยแล้ว ดังนั้น จึงพบลำดับ nucleotide CCA ที่ปลาย 3' ของ tRNA ทุกชนิด

เอนไซม์ Rnase P เป็นไรโบนิวคลีโอโปรตีน (ribonucleoprotein enzyme) ประกอบด้วย โปรตีน และ RNA จากการศึกษาการทำงาน Rnase P ใน *E. coli* พบว่า องค์ประกอบที่เป็น RNA ซึ่งเรียกว่า M1 RNA นั้นจำเป็น สำหรับการทำงานของเอนไซม์ และสามารถทำปฏิกิริยาได้ แม้ว่าจะแยกเอาองค์ประกอบส่วนที่เป็นโปรตีนออกไป การค้นพบนี้ช่วยสนับสนุนว่า RNA สามารถทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ได้

นอกจากการตัดและเติมบางส่วนของโมเลกุลแล้ว ยังพบว่า มีการดัดแปลงเกิดขึ้นในเบสจำนวนมากในโมเลกุล (base modification) ซึ่งเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ เช่น การเติมหมู่เมทิลเข้าที่หมู่บางตัว มีการเปลี่ยนแปลงของยูริดีนบางตัวไปเป็น ซูโดยูริดีน (pseudouridine), ไดไฮโดยูริดีน(dihydrouridine) หรือ ไรโบไทมิดีน (ribothymidine) เป็นต้น

โมเลกุลต้นกำเนิดของ tRNA ในยูคาริโอตมีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยส่วนที่เป็น tRNA อาจจะมีเพียงหนึ่งแห่งหรือมากกว่า กรรมวิธีการดัดแปลงโมเลกุลต้นกำเนิด เหมือนกับที่เกิดในโปรคาริโอต ยกเว้น tRNA บางโมเลกุลของยูคาริโอตมีส่วนของอินทรอนอยู่ ซึ่งจะต้องถูกตัดออกไป กรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลง RNA ต่าง ๆ ในยูคาริโอตที่ได้กล่าวไว้แล้วนั้นเกิดขึ้นในนิวเคลียส หรืออาจจะเกิดขึ้นในระหว่างการลำเลียงโมเลกุลของ RNA ออกจากนิวเคลียสเข้าไปในไซโตพลาซึม กรรมวิธีการตัดแต่งดัดแปลง RNA เหล่านี้ จะทำให้โมเลกุลของ RNA ชนิดต่าง ๆ อยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำงานเมื่ออยู่ในไซโตพลาซึม นอกจากนี้ยังช่วยให้โมเลกุลของ RNA บางชนิดไม่ถูกทำลายได้ง่ายโดยเอนไซม์พวก nuclease อีกด้วย

บทที่ 5 การแปลรหัส (Translation)

การสังเคราะห์โปรตีนหรือการแปลรหัส (translation) เป็นการแปลข้อมูลพันธุกรรม (genetic information) ซึ่งอยู่ในรูปของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mRNA ไปเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน การแปลรหัสพันธุกรรมจะเริ่มจากปลาย 5' ของ mRNA ไปยังปลาย 3' และโปรตีนจะถูกสร้างขึ้นโดยเริ่มจากปลายอะมิโน (N) ไปยังปลายคาร์บอกซิล (C) mRNA ของโปรคาริโอตมักจะประกอบด้วย ส่วนที่สามารถแปลรหัส (coding sequence) เป็นสายโพลีเพปไทด์ได้หลายชนิด เรียก mRNA แบบนี้ว่า *พอลิซิสทรอนิก (polycistronic mRNA)* โดยแต่ละส่วนนั้นจะมีรหัสเริ่มต้นและรหัสยุติของตัวเอง ส่วน mRNA ของยูคาริโอตประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งจะถูกแปลรหัสเป็นสายพอลิเพปไตด์เพียงชนิดเดียวเท่านั้น เรียก mRNA แบบนี้ว่า *มอโนซิสทรอนิก (monocistronic mRNA)*

รหัสสำหรับกรดอะมิโนของโปรตีนประกอบด้วยเบส 3 หน่วยเรียงติดกัน เรียกว่า โคดอน (codon) รหัสทั้งหมดมี 64 รหัส (นิวคลีโอไทด์มี 4 ตัว คือ A, C, G, U และรหัสสำหรับกรดอะมิโนแต่ละตัวประกอบไปด้วย 3 นิวคลีโอไทด์ จึงมีทั้งหมด $4^3 = 64$ รหัส) แต่มีเพียง 61 รหัสเท่านั้นที่เป็นรหัสของกรดอะมิโน 20 ตัว อีก 3 รหัสเป็นรหัสยุติ (stop codon) รหัสพันธุกรรมเป็นรหัสสากล รหัสแต่ละตัวสื่อความหมายเป็นกรดอะมิโนชนิดเดียวกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ยกเว้นบางรหัสในไมโตคอนเดรียที่สื่อความหมายต่างออกไป การแปลรหัสพันธุกรรมจาก mRNA ไปเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนต้องอาศัยการจับคู่อย่างจำเพาะระหว่างโคดอนของ mRNA กับแอนทิโคดอนของ tRNA ซึ่ง tRNA นั้นจะเป็นตัวพากรดอะมิโนที่ถูกต้องเข้ามา

กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในโปรคาริโอตและยูคาริโอตมีหลักการใหญ่ ๆ คล้ายกัน คือ ต้องการไรโบโซม, mRNA, tRNA, และ โปรตีนแฟกเตอร์อื่น ๆ อีกหลายตัวซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป กรดอะมิโนที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ต้องมี tRNA เป็นตัวพาไปยังไรโบโซม สายโปรตีนถูกสร้างจากปลาย N ไปยังปลาย C กรดอะมิโนตัวแรกที่ปลาย N คือ เมไทโอนีน (Met) ในโปรคาริโอตเป็น fMet ขั้นตอนเริ่มต้นเป็นการสร้าง 70S initiation complex เพื่อพร้อมที่จะสร้างสายโพลิเพปไตด์ต่อไป ประกอบด้วยไรโบโซมขนาด 70S จับกับ mRNA และมี aminoacyl tRNA ตัวแรกจับอยู่ที่ตำแหน่ง P-site ของไรโบโซม ขั้นต่อไปเป็นการสร้างสายโพลีเพปไทด์ เอนไซม์ peptidyltransferase ทำหน้าที่สร้างพันธะเพปไทด์ยึดระหว่างกรดอะมิโนแต่ละตัวที่เติมเข้าไปในรูปของ aminoacyl-tRNA เมื่อไรโบโซมหมุนเคลื่อนตัวไปถึงรหัสยุติก็ถึงขั้นตอนสิ้นสุดการสร้างโพลีเพปไทด์ โดยการสังเคราะห์โปรตีนของโปรคาริโอตและยูคาริโอตเกิดขึ้นในไซโทซอล mRNA ของยูคาริโอตที่สร้างเสร็จแล้วและพร้อมที่จะทำหน้าที่ (mature mRNA) จะถูกส่งผ่านเยื่อหุ้มนิวเคลียสออกไปยังไซโทพลาสซึมก่อน จากนั้นจึงเริ่มการสังเคราะห์โปรตีน แต่เนื่องจากเซลโปรคาริโอตไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ดังนั้นขณะที่กระบวนการสังเคราะห์ mRNA กำลังดำเนินอยู่ กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนก็จะเริ่มขึ้นตามไปด้วย นั่นคือกระบวนการถอดหรัสและแปลรหัสจะเกิดขึ้นไปพร้อม ๆ กัน (Cotranscription-translation) กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนเป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานมาก และ GTP เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ

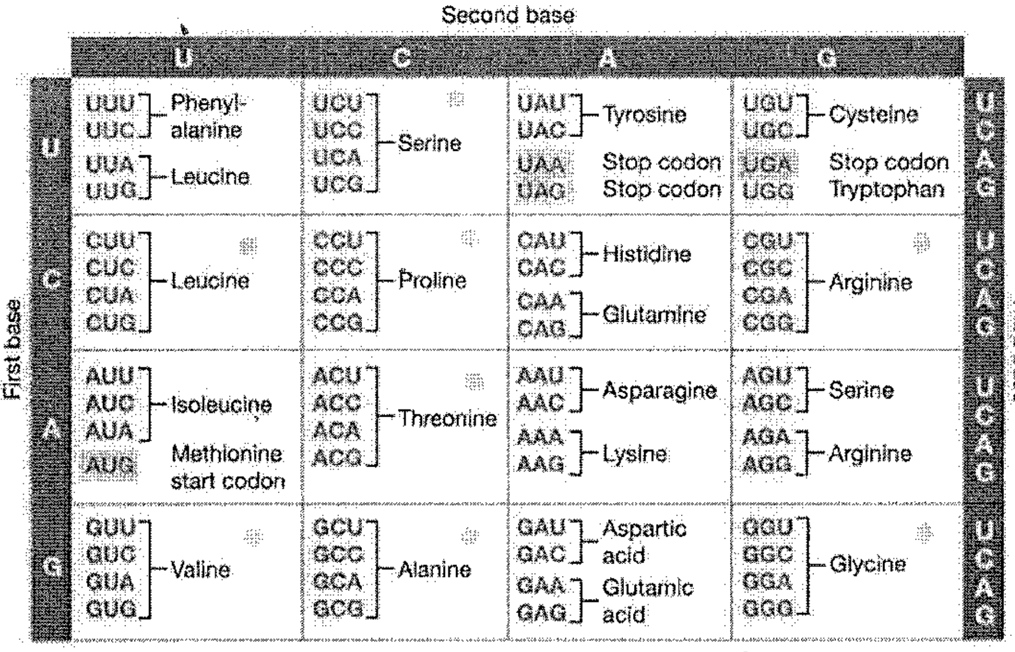
การดัดแปลงโมเลกุลภายหลังการแปลรหัสอาจจะเกิดขึ้นในขณะที่กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนยังดำเนินอยู่ หรือเกิดขึ้นหลังจากกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนสิ้นสุดลงแล้ว กรรมวิธีการดัดแปลงโมเลกุลมีหลายรูปแบบ มีการขดม้วนตัวของโมเลกุล มีการตัดบางส่วนของโมเลกุลออก มีการเติมโมเลกุลบางชนิดให้กับ

โมเลกุลของโปรตีนรวมทั้งการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ ยาปฏิชีวนะหลายชนิดและสารชีวพิษบางอย่างออกฤทธิ์โดยการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน บางชนิดยับยั้งในโปรคาริโอต และบางชนิดยับยั้งในยูคาริโอต

5.1) <u>**รหัสพันธุกรรม** (genetic code)</u>

การแปลรหัสจากลำดับเบสบนสาย mRNA ไปเป็นลำดับกรดอะมิโนบนสายโพลีเพปไทด์นั้นต้องอาศัยรหัสพันธุกรรม (genetic code) ซึ่งเปรียบเสมือนพจนานุกรมสำหรับใช้สื่อความหมายระหว่างลำดับเบสใน mRNA กับลำดับกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ จากการศึกษาพบว่ากรดอะมิโนหนึ่งตัวต้องใช้เบส 3 หน่วยที่เรียงติดกันเป็นตัวกำหนด เรียกเบส 3 หน่วยนี้ว่า *รหัสชุดสาม (triplet code)* หรือ โคดอน ซึ่งมีทั้งหมด 64 โคดอน หรือ 64 รหัส แต่มีเพียง 61 โคดอนเท่านั้นที่เป็นรหัสของกรดอะมิโน 20 ชนิด ดังนั้นกรดอะมิโน 1 ชนิดสามารถที่จะมีรหัสมากกว่า 1 รหัสได้ เช่น กรดอะมิโนลิวซีน (leucine) มี 6 รหัส, กรดอะมิโนอะลานีน (alanine) มี 4 รหัส เป็นต้น ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า "degeneracy of the genetic code" ในกรณีที่กรดอะมิโนชนิดหนึ่งมี

ตารางที่ 5-1 รหัสชุดสาม (triplet code) http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/sf11x10.jpg



Second base

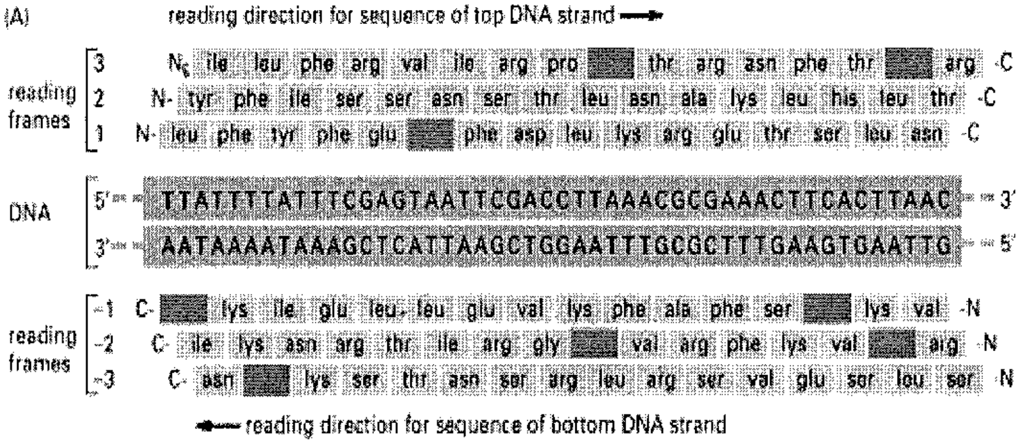
First base	U	C	A	G	Third base
U	UUU, UUC – Phenyl-alanine UUA, UUG – Leucine	UCU, UCC, UCA, UCG – Serine	UAU, UAC – Tyrosine UAA Stop codon UAG Stop codon	UGU, UGC – Cysteine UGA Stop codon UGG Tryptophan	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG – Leucine	CCU, CCC, CCA, CCG – Proline	CAU, CAC – Histidine CAA, CAG – Glutamine	CGU, CGC, CGA, CGG – Arginine	U C A G
A	AUU, AUC, AUA – Isoleucine AUG Methionine start codon	ACU, ACC, ACA, ACG – Threonine	AAU, AAC – Asparagine AAA, AAG – Lysine	AGU, AGC – Serine AGA, AGG – Arginine	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG – Valine	GCU, GCC, GCA, GCG – Alanine	GAU, GAC – Aspartic acid GAA, GAG – Glutamic acid	GGU, GGC, GGA, GGG – Glycine	U C A G

รหัสมากกว่า 1 รหัสจะสังเกตได้ว่าส่วนใหญ่มีความแตกต่างกันที่เบสตัวที่ 3 ดังนั้นเบส 2 ตัวแรกของรหัสจะเป็นตัวบ่งบอกความจำเพาะว่าเป็นรหัสของกรออะมิโนชนิดใด มีกรดอะมิโนอยู่ 2 ชนิด คือ เมไทโอนีน (methionine) หรือ Met และ ทริปโทแฟน (tryptophan) ที่มีเพียง 1 รหัส สำหรับรหัสที่เหลืออีก 3 รหัส คือ UAA, UAG, และ UGA ไม่ได้เป็นรหัสสำหรับกรดอะมิโนชนิดใดเลย แต่เป็น "รหัสยุติ" (termination codon หรือ stop codon) ทำหน้าที่เป็นสัญญาณหยุดการสร้างโปรตีน

รหัสที่เป็นสัญญาณเริ่มต้น (initiation codon) ของการสร้างสายพอลิเพปไทด์ทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต คือ AUG ซึ่งเป็นรหัสของกรดอะมิโน Met นั่นเอง ดังนั้นสายพอลิเพปไทด์ที่พึ่งถูกสร้างขึ้นจะมีกรดอะมิ

โน Met อยู่ที่ปลาย N (ในแบคทีเรียจะเป็น N-formylmethionine, fMet) แต่ในบางกรณีซึ่งพบได้น้อยและพบเฉพาะในโปรคาริโอต พบว่า รหัส GUG (ซึ่งปกติเป็นรหัสของกรดอะมิโนเวลีน, valine) สามารถทำหน้าที่เป็นรหัสเริ่มต้นได้เช่นกัน โดยทำหน้าที่เป็นรหัสของกรดอะมิโน Met ตัวเริ่มต้นที่ปลาย N เดิมเชื่อกันว่ารหัสแต่ละตัวในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นโปรคาริโอตหรือยูคาริโอตจะสื่อความหมายเป็นกรดอะมิโนชนิดเดียวกัน นั่นคือ รหัสพันธุกรรมเป็น "รหัสสากล" (universal code) แต่ต่อมาพบว่ามีรหัสบางตัวสื่อความหมายที่ต่างจากรหัสพันธุกรรมสากล

การแปลรหัสพันธุกรรมจาก mRNA นั้น รหัสจะถูกอ่านอย่างต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ทีละ 3 เบส (reading frame) โดยไม่มีการเว้นวรรคหรือข้ามเบสตัวใดตัวหนึ่ง เรียกการอ่านรหัสแบบนี้ว่า "commaless" สำหรับพอลิเพปไทด์สายหนึ่ง ๆ การอ่านรหัสชุดสามจะเริ่มจากรหัสเริ่มต้นและสิ้นสุดที่รหัสยุติ หากมีการเลื่อนตำแหน่งการอ่านเบสในรหัสชุดสามไป 1 หรือ 3 เบส จะทำให้การอ่านรหัสอื่น ๆ ในสายเคลื่อนตามไปด้วย เรียกว่า เกิด frame shift เป็นผลให้สายพอลิเพปไทด์ที่ได้มีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างไปจากเดิม แม้ว่าลำดับเบสบนสาย mRNA จะเหมือนเดิมก็ตาม



รูปที่ 5-1 Reading frame ที่แตกต่างกันบนสาย mRNA

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=region,finding&rid=mboc4.figgrp.1587

5.2) <u>การจับจำเพาะระหว่าง mRNA (โคดอน) และ tRNA (แอนทิโคดอน)</u>

ในการแปลรหัสพันธุกรรมจาก mRNA นั้น ต้องอาศัยการจับคู่กันระหว่างเบสส่วนที่เรียกว่า แอนทิโคดอน ของ mRNA จากการศึกษาพบว่าเบสตัวที่ 3 และ ตัวที่ 2 (นับจาก 5' --> 3') ของแอนทิโคดอนจะจับคู่อย่างจำเพาะกับเบสตัวที่ 1 และตัวที่ 2 (นับจาก 5' --> 3') ของโคดอน ตามลำดับ โดยเป็นไปตามหลักการจับคู่ของเบสแบบ Watson-Crick คือ A จับคู่กับ T และ G จับคู่กับ C ส่วนการจับคู่ของเบสตัวที่ 1 ของแอนทิโคดอนกับเบสตัวที่ 3 ของโคดอนนั้น ไม่จำเป็นต้องเป็นไปตามกฎการจับคู่แบบ Watson-Crick เสมอไป ดังนั้นจึงเรียกตำแหน่งของเบสตัวแรกของแอนทิโคดอนนี้ว่า "wobble position" เช่น ถ้าเบสตัวแรกของแอนทิโคดอนเป็น G นอกจากจะจับคู่กับเบส C ปกติแล้ว ยังสามารถจับคู่กับเบส U ได้ด้วย เป็นต้น

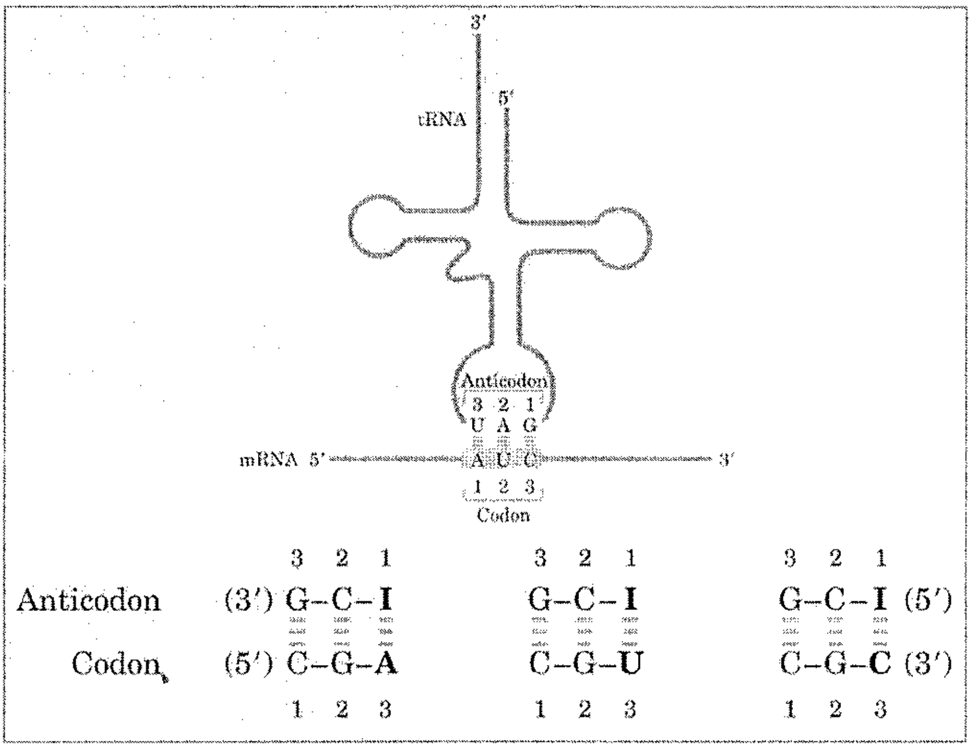
จากหลักฐานต่าง ๆ Crick ได้ตั้งสมมติฐานที่เรียกว่า "wobble hypothesis" ขึ้น ซึ่งกล่าวว่า

1. เบสตัวที่ 1 และ 2 ของโคดอนใน mRNA จะจับคู่กับเบสตัวที่ 3 และ 2 ของแอนทิโคดอนใน tRNA เป็นไปตามหลักการจับคู่ของเบสแบบ Watson-Crick
2. เบสตัวแรก (wobble position) ของแอนทิโคดอนจะเป็นตัวกำหนดว่า tRNA นั้นสามารถอ่านรหัสใน mRNA ได้มากกว่า 1 รหัสหรือไม่ ซึ่งรหัสเหล่านั้นจะสื่อความหมายให้เป็นกรดอะมิโนชนิดเดียวกัน
3. ในการอ่านรหัสตัวใดตัวหนึ่งอาจใช้ tRNA มากกว่า 1 ชนิด และ tRNA เหล่านี้จะเป็นตัวพากรดอะมิโนชนิดเดียวกัน

ตารางที่ 5-2 รหัสบางตัวที่สื่อความหมายต่างจากรหัสพันธุกรรมสากล

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	รหัส (codon)	เมื่อแปลรหัสตามรหัสพันธุกรรมสากล	การแปลรหัสที่เกิดขึ้นจริง
ในจีโนมของไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial genomes)			
สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammals)	UGA	Stop	Trp
	AGA, AGG	Arg	Stop
	AUA	Ile	Met
แมลงหวี่ (*Drodophila*)	UGA	Stop	Trp
	AGA	Arg	Ser
	AUA	Ile	Met
ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisoae*)	UGA	Stop	Trp
	CUN	Leu	Thr
	AUA	Ile	Met
เห็ดรา (Fungi)	UGA	Stop	Trp
ข้าวโพด (Maize)	CGG	Arg	Trp
ในนิวเคลียสและจีโนมของโปรคาริโอต (Nuclear and Prokaryotic genomes)			
โปรโตซัวบางชนิด (several protozoa)	UAA, UAG	Stop	Gln
Candida cylindracea	CUG	Leu	Ser
Micrococcus sp.	AGA	Arg	Stop
	AUA	Ile	Stop
Euplotes sp.	UGA	Stop	Cys
Mycoplasma sp.	UGA	Stop	Trp
	CGG	Arg	Stop
Context-dependent codon reassignment			
ชนิดต่าง ๆ (various)	UGA	Stop	Selenocysteine

N หมายถึง นิวคลีโอไทด์ชนิดใดก็ได้ (A, U, G, C)



รูปที่ 5-2 การจับกันของ codon บนสาย mRNA กับ anticodon บน tRNA ซึ่งเป็นไปตาม wobble hypothesis (Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd edition. 2000; หน้า 1028)

ตารางที่ 5-3 เบสตัวแรก (wobble position) ของแอนทิโคดอนจะเป็นตัวกำหนดว่า tRNA นั้นสามารถอ่านรหัสใน mRNA ได้มากกว่า 1 รหัสหรือไม่ ซึ่งรหัสเหล่านั้นจะสื่อความหมายให้เป็นกรดอะมิโนชนิดเดียวกัน http://www.champa.kku.ac.th/thanaset/DNAsyn4.pdf

เบสที่ wobble position (เบสตำแหน่งที่ 1 ของ anticodon)	เบสที่ตำแหน่งที่ 3 ของ codon
A	U
C	G
G	C หรือ U
U	A หรือ G
I*	A, C หรือ U

I* ย่อมาจากนิวคลีโอไทด์ inosinate ซึ่งมีเบส hypoxanthine เป็นองค์ประกอบ

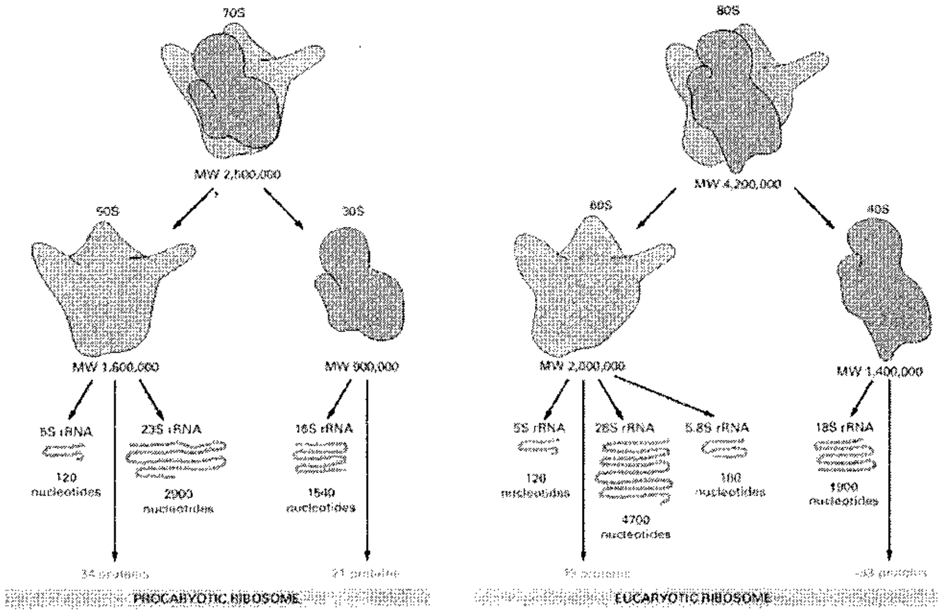
มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
มกราคม 2550

5.3) **ไรโบโซมเป็นแหล่งสังเคราะห์โปรตีน**

องค์ประกอบที่สำคัญมากอีกอย่างหนึ่งในการสังเคราะห์โปรตีน คือ ไรโบโซม ภายในไซโทพลาสซึมของเซลโปรคาริโอตและยูคาริโอตมีไรโบโซมอยู่จำนวนมากมาย ในเซลของยูคาริโอตจะพบไรโบโซมทั้งที่อยู่เป็นอิสระและที่เกาะติดอยู่กับเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ซึ่งเรียกว่า RER (rough endoplasmic reticulum) หนึ่งไรโบโซมประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) คือ หน่วยย่อยขนาดใหญ่และหน่วยย่อยขนาดเล็ก แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วย rRNA และโปรตีนชนิดต่าง ๆ ขนาดของหน่วยย่อยแต่ละหน่วย รวมทั้งจำนวนชนิดของโปรตีนและของ rRNA จะแตกต่างกันระหว่างไรโบโซมของโปรคาริโอตและยูคาริโอต

บนไรโบโซมมีตำแหน่งที่ tRNA สามารถจับได้อยู่ 3 บริเวณ คือ P-site (Peptidyl site), A-site (Aminoacyl site) และ E-site (Exit-site) ตำแหน่ง P-site เป็นที่จับของ tRNA ซึ่งมีสายเพปไทด์เกาะอยู่ (Peptidyl tRNA) ส่วน A-site เป็นตำแหน่งที่จับของ tRNA ซึ่งมีกรดอะมิโนเกาะอยู่ (Aminoacyl tRNA) และ E-site เป็นตำแหน่งทางออกของ tRNA ที่มาจาก P-site (Exit-site) โดยอาศัยไรโบโซมทั้งหน่วยเล็กและหน่วยใหญ่ประกอบกันขึ้นเป็นบริเวณดังกล่าว

ไรโบโซมเปรียบเสมือนเป็นโรงงานสำหรับสังเคราะห์โปรตีน กล่าวคือ mRNA และ aminoacyl-tRNA จะไปที่ไรโบโซมเพื่อสร้างสายพอลิเพปไทด์ที่นั่น โดยใช้เพียง 1 ไรโบโซม ต่อ 1 สายพอลิเพปไทด์ อย่างไรก็ตามมักพบว่าบน mRNA สายเดียวกันจะมีหลาย ๆ ไรโบโซมจับอยู่เรียกว่า *พอลิโซม (polysome)* ซึ่งไรโบโซมเหล่านี้จะมีสายพอลิเพปไทด์ขนาดแตกต่างกันติดอยู่ โดยไรโบโซมที่อยู่ใกล้ปลาย 5' ของ mRNA มากที่สุดจะมีสายพอลิเพปไทด์สั้นที่สุดติดอยู่ ส่วนสายที่อยู่ใกล้ปลาย 3' ของ mRNA มากที่สุดจะมีสายพอลิเพปไทด์ยาวที่สุดติดอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากการอ่านรหัสบน mRNA เริ่มจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' นั่นเอง

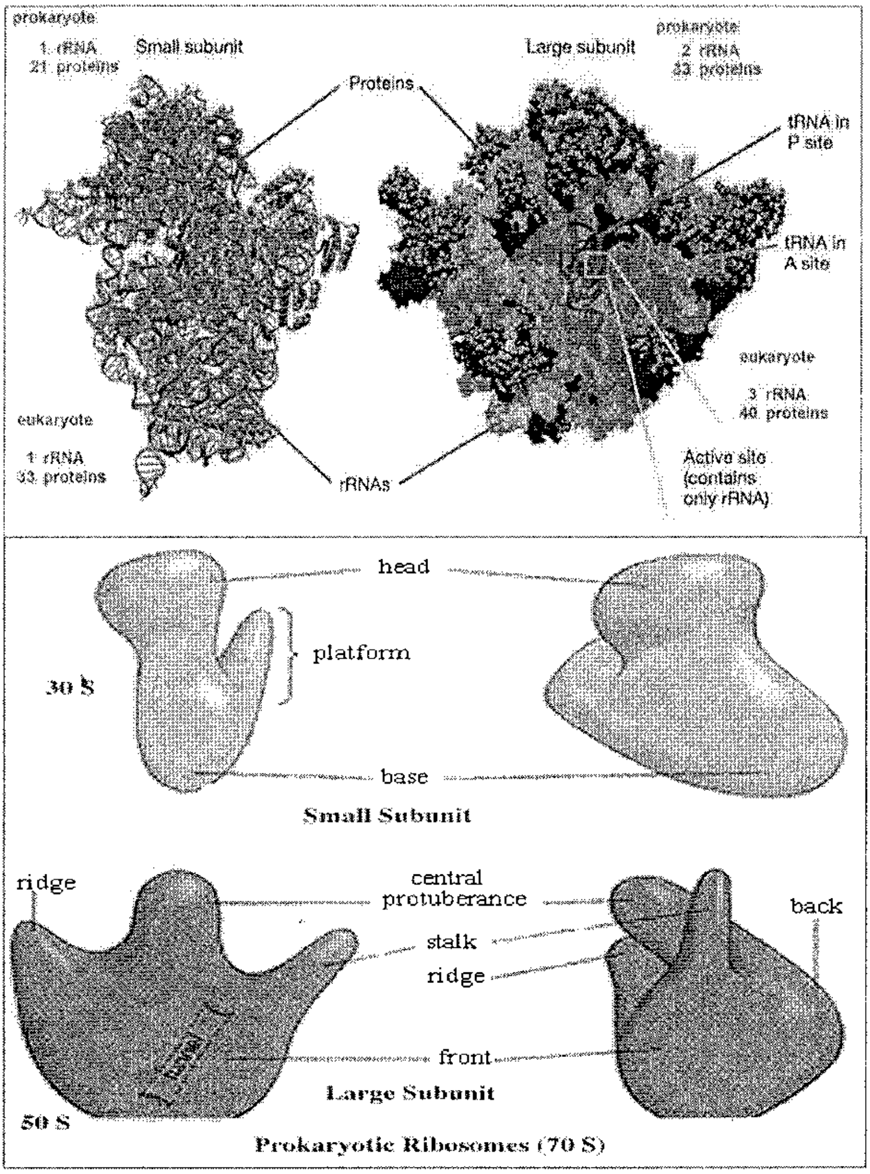


รูปที่ 5-3 หนึ่งไรโบโซมประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) คือ หน่วยย่อยขนาดใหญ่และหน่วยย่อยขนาดเล็ก แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วย rRNA และโปรตีนชนิดต่าง ๆ ขนาดของหน่วยย่อยแต่ละหน่วย รวมทั้งจำนวนชนิดของโปรตีนและ rRNA จะแตกต่างกันระหว่างไรโบโซมของโปรคาริโอตและยูคาริโอต

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=structure,comparison&rid=mboc4.figgrp.1073

มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

มกราคม 2550



รูปที่ 5-4 บริเวณที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ในโครงสร้างของไรโบโซม (**บน**: โครงสร้าง X-ray, **ล่าง**: โครงสร้างแบบง่าย)
http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/cells/sf13x20.jpg,
http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2002/ribosome01.gif

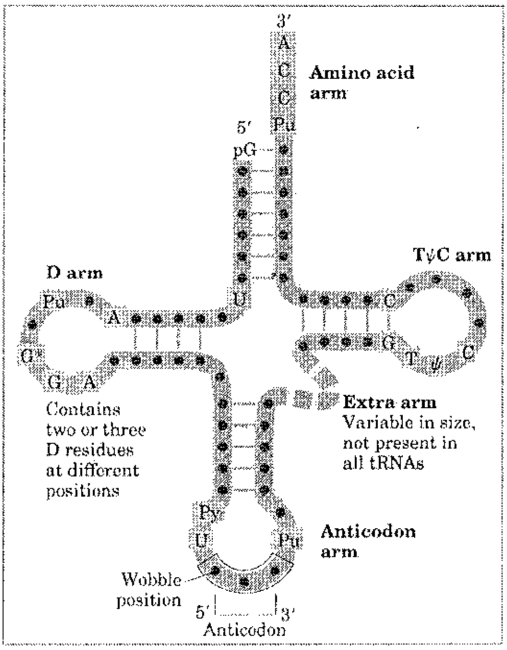
5.4) tRNA (transfer RNA)

tRNA เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *sRNA (soluble RNA)* เป็น RNA ที่สามารถอ่านรหัสชุดสามบน mRNA ได้ tRNA ทำหน้าที่เป็นตัวพากรดอะมิโนมายังไรโบโซมเพื่อประกอบกันเป็นสายพอลิเพปไทด์ได้อย่างถูกต้อง tRNA แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดอะมิโน คือ สามารถรับและพากรดอะมิโนไปได้เพียงชนิดเดียว

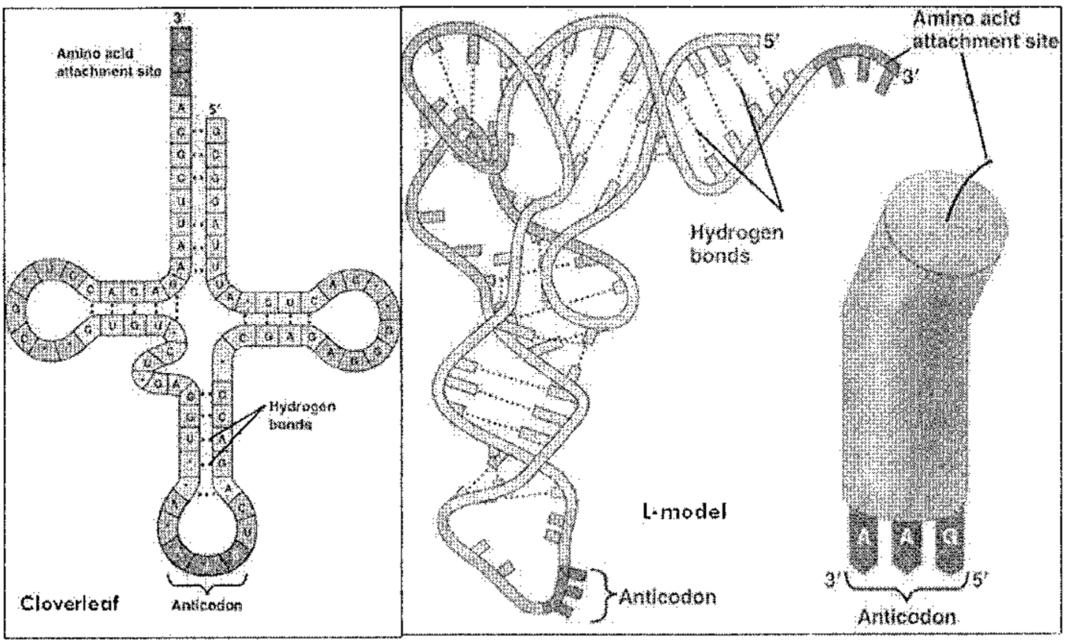
เท่านั้น กรดอะมิโนในธรรมชาติที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนนั้นมีเพียง 20 ชนิด แต่พบ tRNA ได้มากกว่า 20 ชนิด ซึ่งหมายความว่า กรดอะมิโนชนิดหนึ่ง ๆ อาจมี tRNA ได้มากกว่า 1 ชนิด

tRNA เป็น RNA ที่มีขนาดเล็กที่สุด ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 75-90 หน่วย มีค่าสัมประสิทธิ์การตกทับถมเป็นตะกอนเท่ากับ 4S มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 250,000 ดาลตัน มักจะพบเบสที่เป็นชนิดหายากได้บ่อยกว่า RNA ชนิดอื่น ๆ เช่น ซูโดยูราซิล (pseudouracil, ψ), ไดไฮโดรยูราซิล (dihydrouracil, DHU), และ อิโนซีน (Inosine) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไซด์ของไฮโปแซนทีน เป็นต้น

เมื่อพิจารณาลำดับเบสในโมเลกุลของ tRNA พบว่า บางส่วนเป็นคู่สมของกันและกัน ดังนั้นจึงทำให้โครงสร้างของ tRNA เกิดเป็นเกลียวคู่ขึ้นในบางส่วนของโมเลกุล และทำให้ส่วนที่เหลือบางส่วนเกิดเป็นวงขึ้นและมองดูเหมือนใบกานพลู (clover leaf) วงที่เกิดขึ้นมี 4 วง มักเรียกชื่อตามลักษณะของเบสที่พบในวงนั้น ๆ หรือตามหน้าที่ของวง เช่น วง D หรือ DHU เป็นวงที่หนึ่ง (I) เพราะมักพบเบสรอง DHU ในวงนี้เสมอ, วงที่สอง (II) เรียกว่า วงแอนติโคดอน (anticodon loop) เพราะเป็นส่วนที่จะให้อ่านรหัสโดยการเข้าไปรวมกับรหัสชุดสามของ mRNA, วงที่สาม (III) เรียกว่า วงพิเศษ (extra or variable loop) เพราะมีส่วนประกอบที่ไม่แน่นอน และ วงที่สี่ (IV) เรียกว่า วงซูโดยูริดีน เพราะมักพบเบสหายากชนิด ψ อยู่ในวงนี้ หรือเรียกว่า วง TψC ตามชนิดเบสที่เป็นส่วนประกอบ ในธรรมชาติ tRNA ยังอาจขดม้วนตัวไปได้อีกจนมีลักษณะโครงสร้างคล้ายรูปตัว L ที่ปลาย 3' ของ tRNA ทุกชนิด (เป็นปลายที่จับกับกรดอะมิโน) จะมีลำดับการเรียงตัวของเบสเป็น –C-C-A ส่วนที่ปลาย 5' ของ tRNA ส่วนใหญ่ก็จะเป็น pG



รูปที่ 5-5 ส่วนต่าง ๆ ของ tRNA (Nelson and Cox, 2000)



รูปที่ 5-6 tRNA (a) coverleaf model (secondary structure) (b) L-model (Tertiary structure) (c) ภาพอย่างง่ายแสดงส่วนเชื่อมต่อกรดอะมิโนและ anticodon
http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/tRNA.htm

5.5) <u>การเชื่อมต่อกรดอะมิโนกับ tRNA จำเพาะ</u>

กรดอะมิโนที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนต้องมี tRNA เป็นตัวพาไปยังไรโบโซม ดังนั้นจึงต้องเชื่อมต่อกรดอะมิโนแต่ละตัวเข้ากับ tRNA ที่จำเพาะในรูปของ aminoacyl-tRNA ก่อน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ aminoacyl-tRNA synthetase ที่จำเพาะ กรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีเอนไซม์เฉพาะตัว ดังนั้นจะต้องมีเอนไซม์จำเพาะอย่างน้อย 20 ชนิดที่จะนำเอากรดอะมิโนแต่ละตัวมาเชื่อมต่อกับ tRNA ที่เข้าคู่ได้กับกรดอะมิโนนั้น ๆ ในกรณีของกรดอะมิโนที่สามารถเข้าคู่กับ tRNA ได้มากกว่า 1 ชนิด พบว่าการเชื่อมต่อกรดอะมิโนชนิดนั้นกับ tRNA ทุกชนิดที่เข้าคู่กันได้จะใช้เอนไซม์ aminoacyl-tRNA synthetase ตัวเดียวกัน ดังนั้นความถูกต้องของลำดับของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นจึงขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์ aminoacyl-tRNA synthetase ที่มีต่อกรดอะมิโนและ tRNA ที่เข้าคู่กันได้ โดยการเรียกชื่อเอนไซม์นั้นขึ้นอยู่กับกรดอะมิโนที่เฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์นั้น ๆ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ tRNA กับกรดอะมิโนเมไทโอนีน (Met) จะเรียกว่า Methionyl-tRNA synthetase

การทำงานของเอนไซม์ aminoacyl tRNA synthetase เหล่านี้ ต้องการ Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ และต้องใช้ปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นการรวมกันระหว่างกรดอะมิโน, เอนไซม์ และ ATP ได้เป็นโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่ enzyme-(aminoacyl-AMP) complex ซึ่งเป็นสารอินเทอร์มีเดียตที่มีพลังงานแฝงอยู่ในโมเลกุล (energy-rich molecule) กับไพโรฟอสเฟต (PPi) ซึ่งจะถูกสลายต่อไปได้เป็นฟอสเฟตอิสระ (Pi) 2 หมู่ ขั้นต่อไปเป็นการย้ายกรดอะมิโนจาก enzyme-(aminoacyl-AMP) complex ไปเชื่อมติดกับปลาย 3' ของ tRNA โดยเกิดพันธะเพปไทด์ขึ้นระหว่างหมู่ -COOH ของกรดอะมิโนกับหมู่ 3'-OH ของนิวคลีโอไทด์

AMP ตัวสุดท้ายที่ปลาย 3' ของ tRNA ได้เป็น aminoacyl-tRNA ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกรดอะมิโนเข้ากับ tRNA ต้องอาศัยพลังงานจาก ATP ดังปฏิกิริยาข้างล่างนี้

Amino acid + enzyme +ATP --> enzyme-(aminoacyl-AMP) + PPi

tRNA + enzyme-(aminoacyl-AMP) --> aminoacyl-tRNA + AMP + enzyme

สรุปปฏิกิริยารวม คือ

Amino acid + tRNA + ATP --> aminoacyl-tRNA + AMP + 2Pi

tRNA ที่จำเพาะสำหรับกรดอะมิโนตัวใดจะมีชื่อย่อของกรดอะมิโนชนิดนั้นเขียนกำกับอยู่ด้วย เช่น tRNA ที่จำเพาะกับกรดอะมิโน Met จะเขียนเป็น $tRNA^{Met}$ และถ้ามีกรดอะมิโน Met เชื่อมติดอยู่ก็ เรียกว่า methionyl-tRNA และเขียนเป็น $Met\text{-}tRNA^{Met}$

5.6) **<u>ขั้นตอนการแปลรหัสใน</u>** <u>*E.coli*</u>

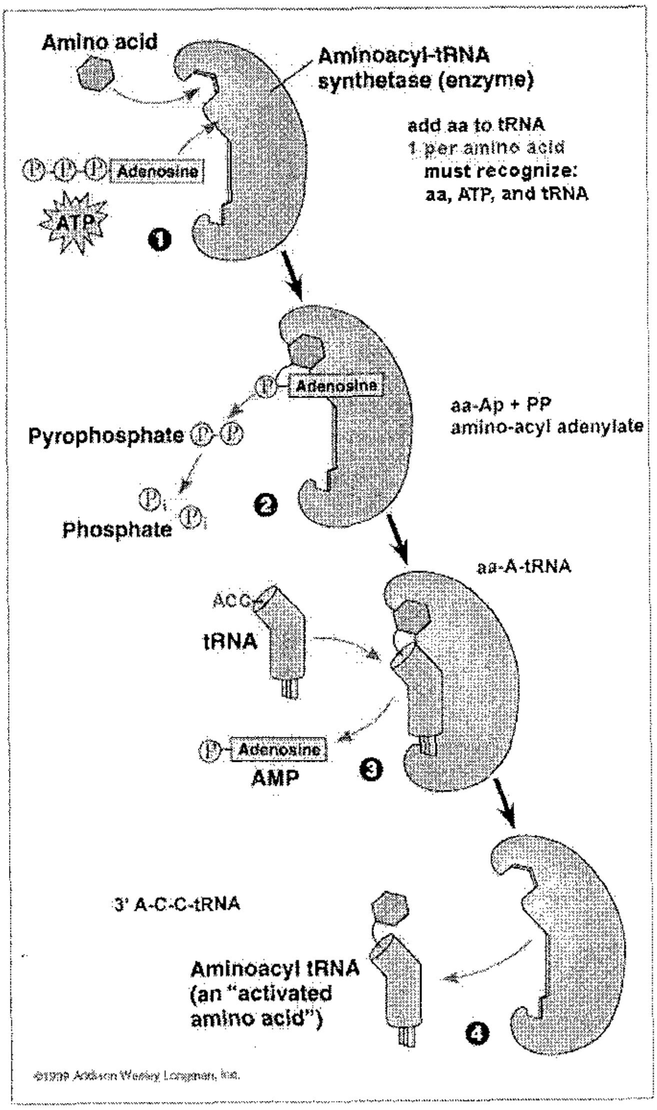
ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนส่วนใหญ่ได้มาจากการศึกษาแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน *E.coli* ดังนั้นในที่นี้จึงอาศัยความรู้ที่ได้จากการสังเคราะห์โปรตีนใน *E. coli* เป็นตัวอย่าง กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอตประกอบด้วยขั้นตอนใหญ่ ๆ ทั้งหมด 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนเริ่มต้น (chain initiation), ขั้นตอนการเพิ่มความยาวของสายพอลิเพปไทด์ (chain elongation) และ ขั้นตอนการยุติการสร้าง (chain termination)

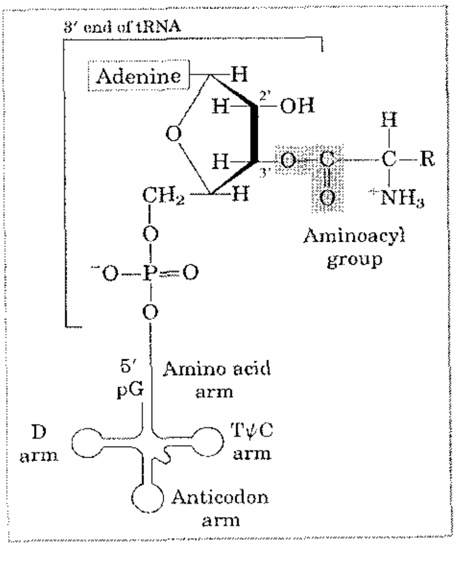
(5.6.1) ***ขั้นตอนการเริ่มต้น*** *(chain initiation)*

การสังเคราะห์โปรตีนจะเริ่มจากปลาย N ไปยังปลาย C ของสายพอลิเพปไทด์ ในโปรคาริโอต กรดอะมิโนตัวแรกที่ปลาย N คือ N-formylmethionine (fMet) แต่ในสายพอลิเพปไทด์หรือโปรตีนที่ทำหน้าที่ภายในเซลส่วนใหญ่มักจะไม่พบ fMet ที่ปลาย N เนื่องจาก fMet จะถูกกำจัดออกโดยกระบวนการดัดแปลงโมเลกุลภายหลังการแปลรหัส (posttranslational modification) ใน *E.coli* มี tRNA ซึ่งเป็นตัวพากรดอะมิโน Met อยู่ 2 ชนิด ชนิดหนึ่งจำเพาะกับกรดอะมิโน Met ตัวเริ่มต้น คือ $tRNA_i^{Met}$ อีกชนิดหนึ่งจำเพาะสำหรับกรดอะมิโน Met ซึ่งอยู่ภายในสายพอลิเพปไทด์ คือ $tRNA^{Met}$ การเปลี่ยน Met เป็น fMet จะเกิดขึ้นหลังจากที่กรดอะมิโน Met เข้าไปเกาะกับ $tRNA_i^{Met}$ แล้ว จากนั้นจึงเกิดการเติมหมู่ฟอร์มิล (formulation) เข้าที่หมู่อะมิโนของ Met โดยเอนไซม์ transformylase ได้เป็น $fMet\text{-}tRNA_i^{fMet}$ สารที่ให้หมู่ ฟอร์มิล คือ N^{10}-formyl-tetrahydrofolate สำหรับ Met ที่เกาะกับ $tRNA^{Met}$ จะไม่เกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอร์มิล ในยูคาริโอตไม่มีเอนไซม์ที่จะเปลี่ยน Met ไปเป็น fMet ดังนั้นกรดอะมิโนตัวแรกที่ปลาย N จึงเป็น Met ไม่ใช่ fMet

สิ่งที่ต้องการในขั้นตอนเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีน คือ ไรโบโซมทั้งหน่วยย่อย 30S และ 50S, mRNA, $fMet\text{-}tRNA_i^{fMet}$, GTP, Mg^{2+} และ แฟกเตอร์เริ่มต้น (initiation factor) 3 ตัว คือ IF-1, IF-2, IF-3 โดยเริ่มแรก IF-3 จะจับกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม เพื่อป้องกันไม่ให้หน่วยย่อย 30S และ 50S ของไรโบโซมเข้า

รูปที่ 5-7 ตัวอย่างการเชื่อมต่อกรดอะมิโนกับ tRNA จำเพาะ ในรูปของ aminoacyl-tRNA โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ aminoacyl-tRNA synthetase ที่จำเพาะต่อกรดอะมิโนแต่ละชนิด http://fajerpc.magnet.fsu.edu/Education/2010/Lectures/27_Protein_Synthesis_II.htm





รูปที่ 5-8 โครงสร้างทั่ว ๆ ไปของ aminoacyl-tRNA (Nelson and Cox, 2000)

มาริน่า เกตุทัต-คาร์นส์

มกราคม 2550

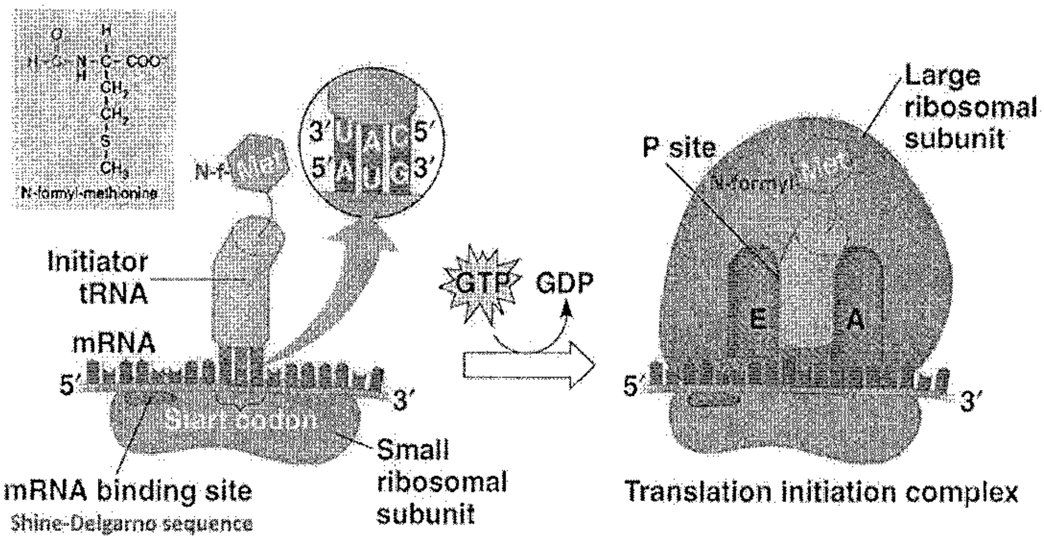
มารวมกัน และช่วยให้หน่วยย่อย 30S เข้าจับกับ mRNA ได้ โดยบริเวณที่ mRNA จับกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม เรียกว่า "Shine-Dalgarno sequence" ซึ่งมีลำดับเบสที่จำเพาะและประกอบด้วยเบสพิวรีน (purine, A และ G) ประมาณ 6-9 เบส บริเวณดังกล่าวอยู่ห่างจากรหัสเริ่มต้น (AUG หรือ GUG) ไปทางด้านปลาย 5' ของสาย mRNA ประมาณ 10 เบส ลำดับเบสของ mRNA ส่วนนี้จะจับคู่จำเพาะกับลำดับเบสด้านปลาย 3' ของ 16S rRNA ในหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม ทำให้โคดอนเริ่มต้น AUG อยู่ตรงกับตำแหน่ง P-site ของไรโบโซมพอดี จากนั้น IF-2 ซึ่งจับอยู่แล้วกับ GTP และ fMet-$tRNA_i^{fMet}$ จะเป็นตัวนำ fMet-$tRNA_i^{fMet}$ เข้าจับที่ P-site บนไรโบโซม โดยมีแอนทิโคดอน (anticodon) ของ fMet-$tRNA_i^{fMet}$ จับคู่กับโคดอน AUG ของ mRNA โมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้ เรียกว่า 30S initiation complex สำหรับ IF-1 เป็นตัวช่วยให้ IF-2 และ IF-3 ทำงานได้สมบูรณ์ขึ้น

ขั้นต่อไปหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซมจะเข้ามารวมกับ 30S initiation complex (ปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้ใช้พลังงานที่ได้จากการสลายของ GTP ซึ่งรวมอยู่กับ IF-2) จากนั้น แฟกเตอร์เริ่มต้นทั้ง 3 จะหลุดออกจากไรโบโซม โมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นใหม่ เรียกว่า 70S initiation complex ประกอบด้วยไรโบโซมขนาด 70S จับอยู่กับ mRNA และมี fMet-$tRNA_i^{fMet}$ จับอยู่ตรงตำแหน่ง P-site ของไรโบโซม ส่วนตำแหน่ง A-site จะว่าง เพื่อให้ aminoacyl-tRNA ตัวต่อไปเข้าจับ ถึงตอนนี้ 70S initiation complex ก็จะพร้อมที่จะสร้างสายพอลิเพปไทด์ต่อไป

สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนในยูคาริโอตนั้นขั้นตอนเริ่มต้นนี้ต้องการแฟกเตอร์เริ่มต้นอย่างน้อย 9 ตัว และใช้สัญลักษณ์ eIF แทนแฟกเตอร์เริ่มต้นเหล่านี้

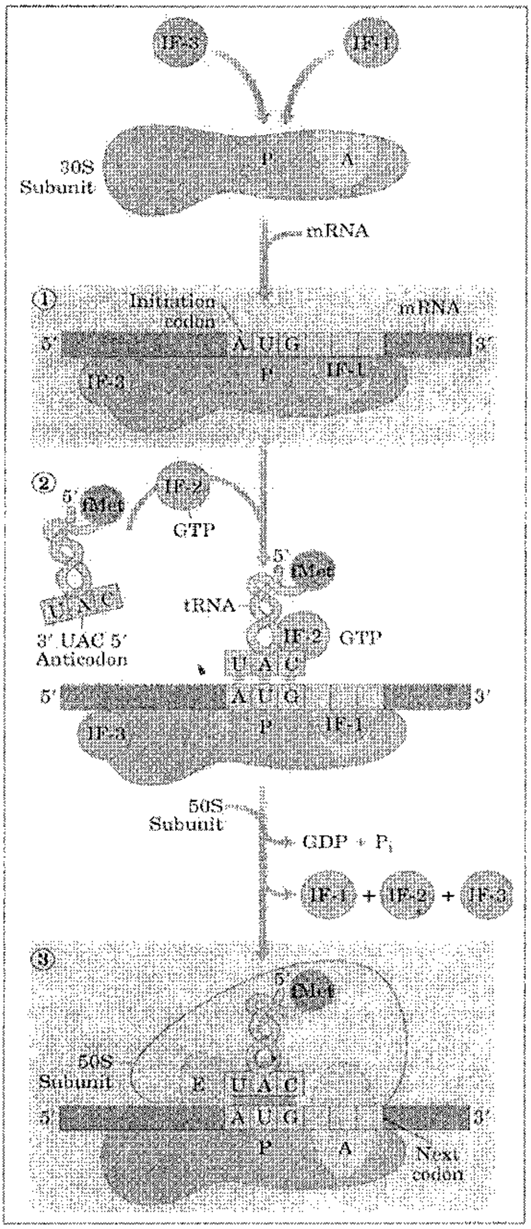
(5.6.2) ***ขั้นตอนการเพิ่มความยาวของสายเพปไทด์*** *(chain elongation)*
การเติมกรดอะมิโนเพื่อให้ได้สายพอลิเพปไทด์ที่ยาวขึ้นนั้น เริ่มจาก aminoacyl-tRNA ตัวที่สองเข้าจับที่ตำแหน่ง A-site ของไรโบโซม ขั้นตอนนี้ต้องอาศัยการทำงานของแฟกเตอร์เพิ่มความยาว (elongation factor) 2 ตัว คือ EF-Tu (Tu) และ EF-Ts (Ts) และพลังงานจาก GTP โดยโมเลกุลเชิงซ้อน Tu-GTP complex จะเข้ารวมกับ aminoacyl-tRNA ทำให้ aminoacyl-tRNA เข้าจับกับไรโบโซมที่ A-site ได้ ขณะเดียวกันก็มีการสลาย GTP และทำให้ Tu-GDP complex หลุดออกจากไรโบโซม เซลสามารถนำ EF-Tu กลับมาใช้ใหม่ได้อีก โดยที่ Ts จะเข้ามารวมกับ Tu-GDP complex เกิดเป็น Tu-Ts complex และทำให้ GDP หลุดออก GTP โมเลกุลใหม่จะเข้าจับกับ Tu-Ts complex และทำให้ Ts หลุดออก จะได้ Tu-GTP complex ซึ่งสามารถนำเอา aminoacyl-tRNA ตัวใหม่เข้าสู่ A-site บนไรโบโซมได้

เมื่อ aminoacyl-tRNA เข้าสู่ A-site เรียบร้อยแล้ว ขั้นต่อไปเป็นการสร้างพันธะเพปไทด์พันธะแรกระหว่าง fMet ซึ่งเกาะอยู่กับ tRNA ที่ P-site กับกรดอะมิโนตัวที่สองซึ่งเกาะอยู่กับ tRNA ที่ A-site โดยการย้าย fMet จาก fMet-$tRNA_i^{fMet}$ ไปต่อกับกรดอะมิโนตัวที่สองบน aminoacyl-tRNA และเกิดพันธะเพปไทด์ระหว่างหมู่ –COOH ของ fMet กับหมู่ α–NH_2 ของกรดอะมิโนตัวที่สอง เกิดเป็น dipeptidyl-tRNA ที่ A-site เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาสร้างพันธะเพปไทด์ คือ peptidyltransferase ซึ่งอยู่ในไรโบโซมหน่วยย่อย 50S ต่อมาใน ปี ค.ศ. 1992 พบว่าชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยานี้ คือ ไรโบไซม์ (ribozyme) ซึ่งเป็นส่วน 23S rRNA ของไรโบโซมหน่วยย่อย 50S ไม่ใช่ส่วนที่เป็นโปรตีนอย่างที่เคยเข้าใจกัน

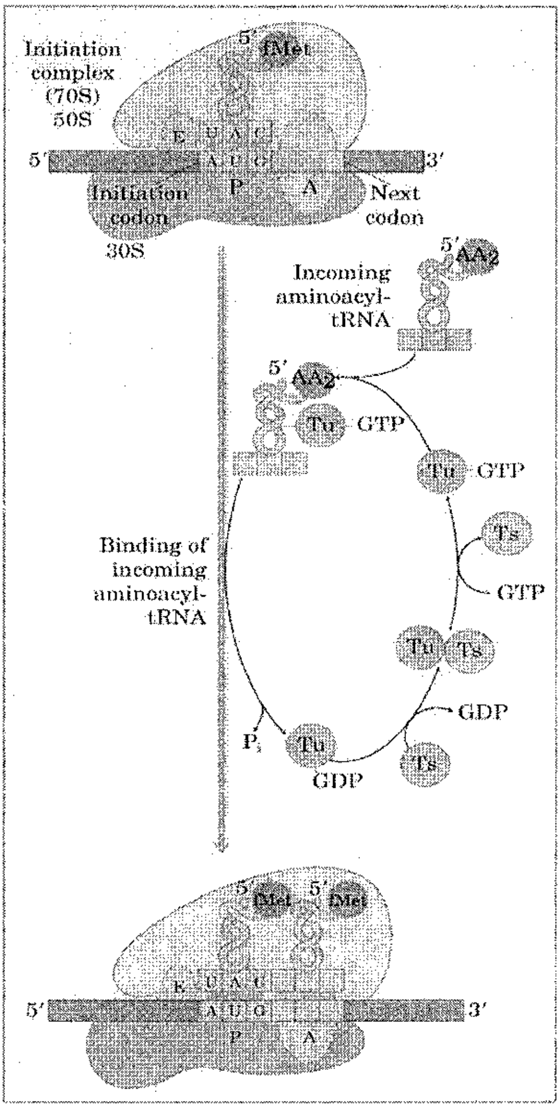


รูปที่ 5-9 ขั้นตอนการเริ่มต้นการแปลรหัส (translation initiation) หน่วยย่อย 30S ของไรโบโซมจะเข้าจับ mRNA บริเวณที่เรียกว่า "Shine-Dalgarno sequence" ซึ่งมีลำดับเบสที่จำเพาะและประกอบด้วยเบสพิวรีน (purine, A และ G) ประมาณ 6-9 เบส บริเวณดังกล่าวอยู่ห่างจากรหัสเริ่มต้น (AUG หรือ GUG) ไปทางด้านปลาย 5' ของสาย mRNA ประมาณ 10 เบส ลำดับเบสของ mRNA ส่วนนี้จะจับคู่จำเพาะกับลำดับเบสด้านปลาย 3' ของ 16S rRNA ในหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม หลังจากนั้นหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซมจะเข้ามารวมกับ 30S initiation complex และเริ่มต้นการแปลรหัส

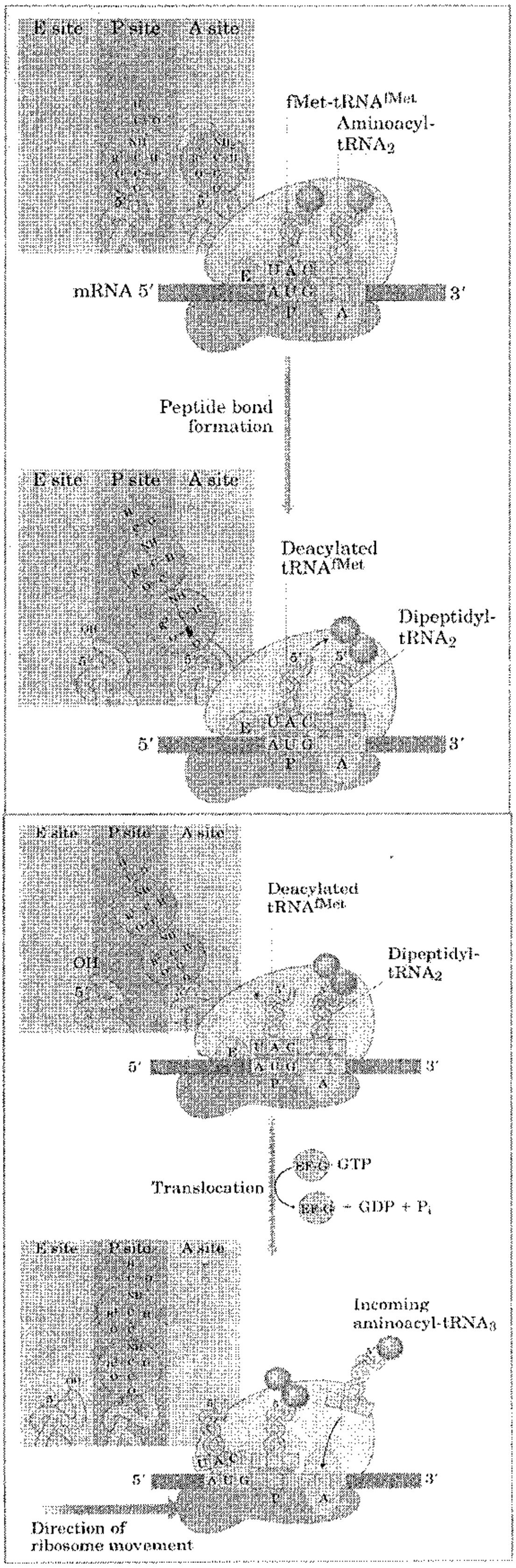
http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c8.17x17.initiation.jpg



รูปที่ 5-10 สิ่งที่ต้องการในขั้นตอนเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีน คือ ไรโบโซมทั้งหน่วยย่อย 30S และ 50S, mRNA, fMet-$tRNA_i^{fMet}$, GTP, Mg^{2+} และแฟกเตอร์เริ่มต้น (initiation factor) 3 ตัว คือ IF-1, IF-2, IF-3 โดยเริ่มแรก IF-3 จะจับกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม เพื่อป้องกันไม่ให้หน่วยย่อย 30S และ 50S ของไรโบโซมเข้ามารวมกัน และช่วยให้หน่วยย่อย 30S เข้าจับกับ mRNA ได้ จากนั้น IF-2 ซึ่งจับอยู่แล้วกับ GTP และ fMet-$tRNA_i^{fMet}$ จะเป็นตัวนำ fMet-$tRNA_i^{fMet}$ เข้าจับที่ P-site บนไรโบโซม โมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้ เรียกว่า 30S initiation complex ขั้นต่อไปหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซมจะเข้ามารวมกับ 30S initiation complex จากนั้น แฟกเตอร์เริ่มต้นทั้ง 3 จะหลุดออกจากไรโบโซม โมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นใหม่ เรียกว่า 70S initiation complex ประกอบด้วยไรโบโซมขนาด 70S จับอยู่กับ mRNA และมี fMet-$tRNA_i^{fMet}$ จับอยู่ตรงตำแหน่ง P-site ของไรโบโซม ส่วนตำแหน่ง A-site จะว่าง เพื่อให้ aminoacyl-tRNA ตัวต่อไปเข้าจับ ถึงตอนนี้ 70S initiation complex ก็จะพร้อมที่จะสร้างสายพอลิเพปไทด์ต่อไป (Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3 rd edition. 2000; หน้า 1045)



รูปที่ 5-11 *การจับของ aminoacyl-tRNA ตัวที่สองที่ตำแหน่ง A-site* ขั้นตอนการเพิ่มความยาวของสายเพปไทด์ (translation elongation) นี้ต้องอาศัยการทำงานของ elongation factor 2 ตัว คือ EF-Tu (Tu) และ EF-Ts (Ts) และพลังงานจาก GTP โดยโมเลกุลเชิงซ้อน Tu-GTP complex จะเข้ารวมกับ aminoacyl-tRNA ทำให้ aminoacyl-tRNA เข้าจับกับไรโบโซมที่ A-site ได้ ขณะเดียวกันก็มีการสลาย GTP และทำให้ Tu-GDP complex หลุดออกจากไรโบโซม เซลสามารถนำ EF-Tu กลับมาใช้ใหม่ได้อีก โดยที่ Ts จะเข้ามารวมกับ Tu-GDP complex เกิดเป็น Tu-Ts complex และทำให้ GDP หลุดออก GTP โมเลกุลใหม่จะเข้าจับกับ Tu-Ts complex และทำให้ Ts หลุดออก จะได้ Tu-GTP complex ซึ่งสามารถนำเอา aminoacyl-tRNA ตัวใหม่เข้าสู่ A-site บนไรโบโซมได้ (Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3 rd edition. 2000; หน้า 1047)



รูปที่ 5-12 บน: *การสร้างพันธะเพปไทด์พันธะแรก* เมื่อ aminoacyl-tRNA เข้าสู่ A-site เรียบร้อยแล้ว ขั้นต่อไปเป็นการสร้างพันธะเพปไทด์พันธะแรกระหว่าง fMet ซึ่งเกาะอยู่กับ tRNA ที่ P-site กับกรดอะมิโนตัวที่สองซึ่งเกาะอยู่กับ tRNA ที่ A-site เร่งปฏิกิริยาสร้างพันธะเพปไทด์โดย peptidyltransferase ซึ่งอยู่ในไรโบโซมหน่วยย่อย 50S ซึ่งเป็นไรโบไซม์ (ribozyme)

ล่าง: *translocation* ไรโบโซมจะหมุนเคลื่อนตัวไปทางด้านปลาย 3' ของ mRNA เป็นระยะทาง 1 codon มีผลทำให้ peptidyl-tRNA เปลี่ยนไปอยู่ที่ P-site และ tRNA อิสระ (uncharged tRNA) หลุดออกจากไรโบโซม ส่วนตำแหน่ง A-site จะว่างเพื่อรับ aminoacyl-tRNA ตัวถัดไปเข้ามา โดยใน *E. coli* กระบวนการ translocation นี้ต้องอาศัยการทำงานของ EF-G (ซึ่งคือ translocase) และพลังงานที่ได้จากการสลาย GTP (Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3 rd edition. 2000; หน้า 1049)

มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
มกราคม 2550

เมื่อถึงตอนนี้จะมี dipeptidyl-tRNA จับอยู่ที่ตำแหน่ง A-site และมี tRNA อิสระซึ่งไม่มีกรดอะมิโนเกาะที่เรียกว่า uncharged tRNA จับอยู่ที่ตำแหน่ง P-site ต่อจากนั้นจะมีการหมุนเคลื่อนตัวของไรโบโซม ไปทางด้านปลาย 3' ของ mRNA เป็นระยะทาง 1 โคดอน (codon) การเคลื่อนที่อย่างสัมพันธ์กันระหว่างไรโบโซมและ mRNA นี้เรียกว่า "translocation" มีผลทำให้ peptidyl-tRNA เปลี่ยนไปอยู่ที่ P-site และ tRNA อิสระ (uncharged tRNA) หลุดออกจากไรโบโซม ส่วนตำแหน่ง A-site จะว่างเพื่อรับ aminoacyl-tRNA ตัวถัดไปเข้ามา ใน *E. coli* กระบวนการ translocation นี้ต้องอาศัยการทำงานของ EF-G (เรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเอนไซม์ translocase) และพลังงานที่ได้จากการสลาย GTP ถึงตอนนี้ไรโบโซมซึ่งมี dipeptide-tRNA อยู่ที่ตำแหน่ง P-site ก็พร้อมที่จะให้กรดอะมิโนที่สามเข้ามาเชื่อมต่อเป็นสายเพปไทด์ โดยใช้กระบวนการเดียวกันกับที่นำกรดอะมิโนตัวที่สองเข้ามา พันธะเพปไทด์ที่เกิดขึ้นใหม่จะเกิดขึ้นโดยหมู่ –COOH (carboxyl) ของกรดอะมิโนตัวที่เข้ามาใหม่ นั่นคือ สายพอลิเพปไทด์จะถูกสร้างจากปลาย N ไปยัง C

สรุปในขั้นตอนการสร้างสายพอลิเพปไทด์ให้ยาวออกไปนี้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนย่อยด้วยกัน คือ การเข้าจับของ aminoacyl-tRNA ตัวใหม่ที่ตำแหน่ง A-site, การสร้างพันธะเพปไทด์ และการเกิด translocation ทั้ง 3 ขั้นตอนย่อยนี้จะเกิดซ้ำอีกเมื่อมีกรดอะมิโนตัวใหม่เข้ามา และจะเกิดซ้ำเช่นนี้เรื่อยไปจนกว่าไรโบโซมจะเคลื่อนตัวไปถึงรหัสยุติบน mRNA

*(5.6.3) **ขั้นตอนยุติการสร้าง** (chain termination)*

การสร้างสายพอลิเพปไทด์จะยุติเมื่อไรโบโซมเคลื่อนตัวไปถึงรหัสยุติตัวใดตัวหนึ่ง (UAA, UAG หรือ UGA) ในขั้นตอนนี้ต้องอาศัยการทำงานของแฟกเตอร์ปลดปล่อย (release factors, RF) 3 ตัว คือ RF-1, RF-2, RF-3 และ GTP RF-1 จะจับกับโคดอน UAA และ UAG, RF-2 จะจับกับโคดอน UAA และ UGA ส่วน RF-3 จะไม่จับกับโคดอนตัวใดทั้งสิ้น แต่จะรวมกับ GTP เพื่อช่วยการทำงานของ RF-1 และ RF-2 ในยูคาริโอตมี RF เพียงตัวเดียว คือ eRF ซึ่งสามารถจับกับโคดอนยุติได้ทั้ง 3 ตัว

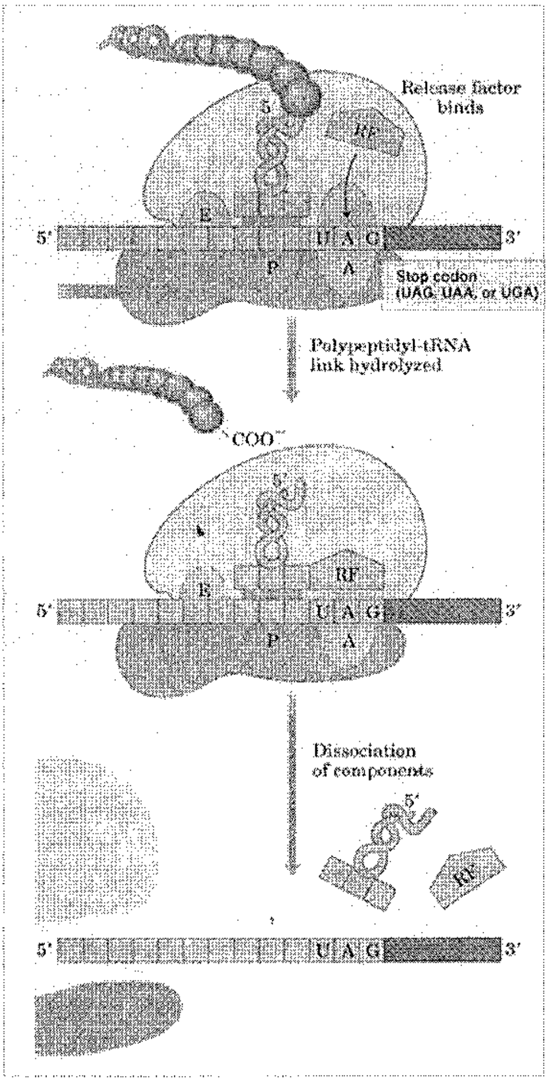
การที่ RF เข้าจับกับโคดอนยุติจะทำให้เอนไซม์ peptidyltransferase เร่งปฏิกิริยาสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างสายพอลิเพปไทด์กับ tRNA ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง P-site ทำให้สายพอลิเพปไทด์หลุดเป็นอิสระจาก tRNA และหลุดออกจากไรโบโซม ในขณะเดียวกัน RF, tRNA และ mRNA ก็จะหลุดออกจากไรโบโซม ส่วนหน่วยย่อย 30S และ 50S ของไรโบโซมก็จะแยกตัวออกจากกัน องค์ประกอบต่าง ๆ เหล่านี้จะถูกนำกลับมาใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนใหม่ได้อีก

กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนเป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานมาก การเติมกรดอะมิโนแต่ละตัวแต่ละตัวเข้าไปในสายพอลิเพปไทด์ที่กำลังสร้าง ต้องการพลังงานจากการสลายพันธะที่ให้พลังงานสูง (high-energy bond) อย่างน้อย 4 พันธะ โดยพลังงานจากการสลาย 2 พันธะของ ATP จะถูกใช้ในขั้นตอนการเชื่อมต่อกรดอะมิโนกับ tRNA, พลังงานจากการสลาย 1 พันธะของ GTP ใช้ในขั้นตอนเริ่มแรกของการเพิ่มความยาว และพลังงานที่ได้จากการสลายอีก 1 พันธะของ GTP ถูกใช้ในขั้นตอนการหมุนเคลื่อนตัวของไรโบโซมและ mRNA

5.7) <u>การดัดแปลงโมเลกุลภายหลังการแปลรหัส (Posttranslational modification)</u>

มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
มกราคม 2550

สายโพลิเพปไทด์ที่สังเคราะห์จากกระบวนการแปลรหัสส่วนใหญ่จะต้องผ่านกรรมวิธีการดัดแปลง (Posttranslational modification) เพื่อให้ได้โปรตีนที่ทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ (mature proteins) การดัดแปลงโมเลกุลอาจเกิดขึ้นในขณะที่กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนกำลังดำเนินอยู่ หรือเกิดขึ้นภายหลังการสังเคราะห์



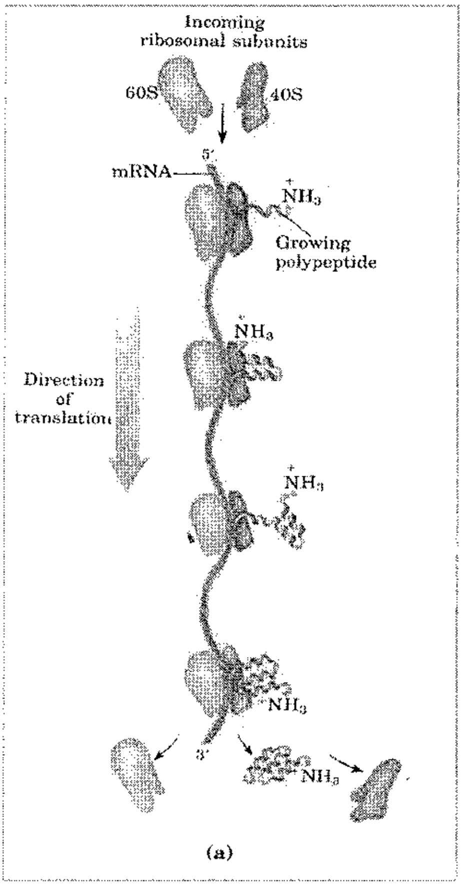
รูปที่ 5-13 การยุติการแปลรหัส (translation termination) เมื่อไรโบโซมเคลื่อนตัวไปถึงรหัสยุติตัวใดตัวหนึ่ง (UAA, UAG หรือ UGA) RF จะเข้าจับกับโคดอนยุติทำให้เอนไซม์ peptidyltransferase เร่งปฏิกิริยาสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างสายพอลิเพปไทด์กับ tRNA ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง P-site ทำให้สายพอลิเพปไทด์หลุดเป็นอิสระจาก tRNA และหลุดออกจากไรโบโซม RF, tRNA และ mRNA ก็จะหลุดออกจากไรโบโซม ส่วนหน่วยย่อย 30S และ 50S ของไรโบโซมก็จะแยกตัวออกจากกัน (Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd edition. 2000; หน้า 1050)

โปรตีนสิ้นสุดลงแล้ว การดัดแปลงที่เกิดขึ้นมีทั้งการตัดบางส่วนทิ้งไปหรือเติมบางอย่างให้กับโมเลกุล มีการขดม้วนตัวของโมเลกุล (folding) ให้มีโครงสร้างสามมิติที่เหมาะสม อาจจะรวมกันเองหรือรวมกับโมเลกุลอื่นให้เป็นโมเลกุลใหญ่เพื่อที่จะสามารถทำงานได้ การดัดแปลงต่าง ๆ เหล่านี้เป็นลักษณะเฉพาะตัวของโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งบางครั้งหากเกิดความผิดปกติในกระบวนการดัดแปลงโมเลกุลหลังการแปลรหัส โปรตีนผลิตผลที่ได้อาจทำงานได้ไม่เต็มที่ หรือทำงานไม่ได้เลย

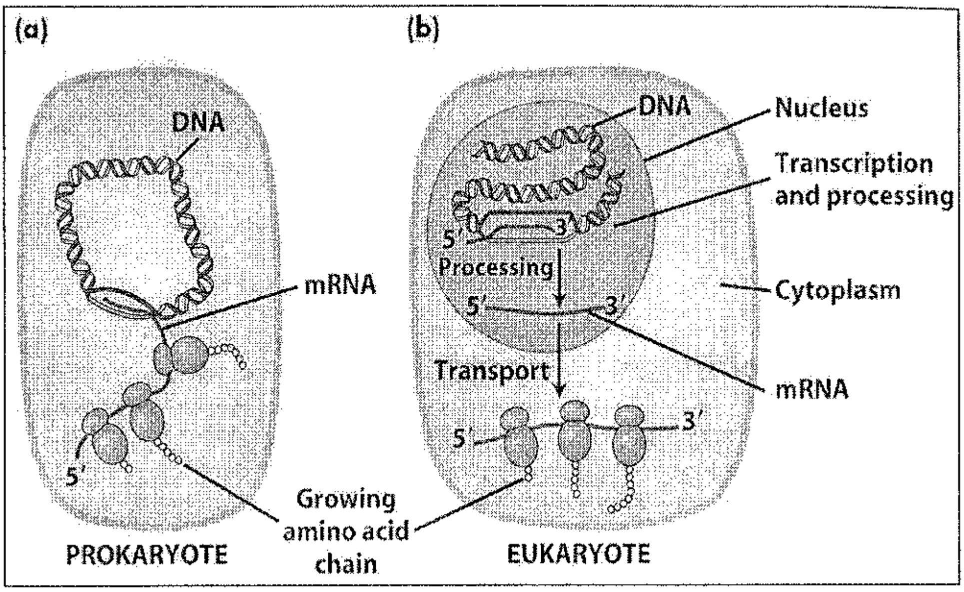
*(5.7.1) **การตัดบางส่วนของโมเลกุลออก** (Proteolytic Cleavage)*

ในขั้นตอนการเริ่มต้นการแปลรหัสในโปรคาริโอต กรดอะมิโนตัวแรกของสายเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นจะเป็น fMet เสมอ ซึ่งจะต้องถูกตัดออกไปในระหว่างที่กระบวนการแปลรหัสดำเนินไปได้ระยะหนึ่ง หรือในบาง

กรณีสายโพลิเพปไทด์ที่สร้างเสร็จจะถูกตัดเอากรดอะมิโน 2-3 หน่วยทางด้านปลาย N หรือทางด้านปลาย C ทิ้งไป โปรตีนที่ได้จากกระบวนการแปลรหัสส่วนใหญ่จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งต่อมาจะถูกตัดบางส่วนออกไปเพื่อให้โปรตีนนั้นสามารถทำหน้าที่ได้ เช่น ฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาในรูปพรีโปรอินซูลิน



รูปที่ 5-14 การแปลรหัสโดยไรโบโซมในโปรคาริโอต เกิดขึ้นได้หลายอันพร้อมกันบนสาย mRNA สายเดียวกัน ซึ่งเรียกว่า "Polyribosome" (Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 3 rd edition. 2000; หน้า 1052)



รูปที่ 5-15 การแปลรหัสในโปรคาริโอต สามารถเกิดขึ้นได้ในขณะที่กระบวนการการถอดรหัสกำลังดำเนินอยู่ ซึ่งเรียกว่า "Cotranscription-translation"(preproinsulin) ที่มีขนาด 84 กรดอะมิโนก่อน จากนั้นจะผ่านขั้นตอนการตัดส่วน C chain ที่มี 33 กรดอะมิโนของโมเลกุลต้นกำเนิดออกไปทำให้ได้โมเลกุลอินซูลิน http://cropandsoil.oregonstate.edu/classes/css430/lecture%209-07/figure-08-01.JPG

โปรตีนที่สร้างขึ้นเพื่อส่งออกนอกเซลล์หรือส่งออกไปอยู่บริเวณจำเพาะบางแห่งภายในเซลล์ จะมีส่วนที่เป็นสัญญาณที่เรียกว่า "signal sequence" อยู่ที่ปลาย N โดยส่วนนี้จะประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เป็นส่วนใหญ่ ทำหน้าที่เป็นสัญญาณหรือเป็นตัวบ่งชี้ว่าโปรตีนนี้จะต้องถูกส่งออกไปอยู่ในที่จำเพาะ ในขณะที่กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนกำลังดำเนินอยู่ ส่วนที่เป็นสัญญาณนี้จะถูกตัดออกโดยเอนไซม์ peptidase ที่จำเพาะ ซึ่งอยู่ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) เมื่อการสังเคราะห์สิ้นสุดลง โปรตีนที่ได้จะถูกส่งผ่านกอลจิคอมเพล็กซ์ (Golgi complex) เพื่อไปยังสถานที่ปลายทางที่โปรตีนนั้นควรอยู่ ซึ่งอาจจะภายนอกเซล์หรือที่ออร์แกเนลอื่นภายในเซลล์

*(5.7.2) **การเติมโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต** (glycosylation)*

ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) เกิดจากการเติมสายคาร์โบไฮเดรตลงบนโมเลกุลของโปรตีน กรดอะมิโนในโปรตีนที่เป็นตัวเชื่อมต่อกับสายคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แอสพาราจีน (asparagine) เซอรีน (serine) และ ทรีโอนีน (threonine) การเติมสายคาร์โบไฮเดรตนี้ต้องอาศัยการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ glycosyltransferase ซึ่งพบอยู่ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ส่วนใหญ่ของคาร์โบไฮเดรตที่ถูกนำมาเติม ได้แก่ แมนโนส (mannose) กลูโคส (glucose) กาแลกโทส (galactose) ไซโลส (xylose) N-acetylglucosamine และ N-acetylneuramimic หรือกรดเซียริก (sialic acid) เป็นต้น

*(5.7.3) **การเกิดพันธะไดซัลไฟด์** (disulfide bond formation)*

โปรตีนที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) อยู่หลายหน่วยในสายโพลิเพปไทด์ หลังจากถูกสร้างขึ้นมาแล้ว มักจะมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) เกิดขึ้นระหว่างหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (-SH) ของกรดอะมิโนซิสเทอีน ตัวอย่างเช่น ฮอร์โมนอินซูลิน เป็นต้น

*(5.7.4) **การติดหมู่พรอสเทติก** (attachment of prosthetic group)*

โปรตีนบางอย่างจะทำหน้าที่ได้สมบูรณ์ก็ต่อเมื่อมีสารประกอบบางชนิดที่ไม่ใช่โปรตีน ที่เรียกว่า หมู่พรอสเทติก รวมอยู่ในโมเลกุล ถ้าโปรตีนขาดหมู่เหล่านี้แล้วจะทำงานไม่ได้ ยกตัวอย่างเช่น ฮีม (heme) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮโมโกลบิน (hemoglobin) และไซโตโครม (cytochrome) เป็นต้น

*(5.7.5) **การเติมหมู่คาร์บอกซิล** (carboxylation)*

การเติมหมู่คาร์บอกซิลให้กับหมู่องค์ประกอบของกรดอะมิโนบางตัวในโปรตีนบางชนิด จะทำให้โปรตีนนั้นสามารถทำงานได้ เช่น การเติมหมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่ง γ ของกรดอะมิโนกลูทามิก (glutamic acid) ในโปรตีนโปรทรอมบิน (prothrombin) และปัจจัยแข็งตัวของเลือด (blood clotting factor) บางตัว จะทำให้โปรตีนเหล่านี้สามารถทำหน้าที่จับกับ Ca^{2+} ได้

*(5.7.6) **การเติมหมู่ฟอสเฟต** (phosphorylation)*

ปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับกรดอะมิโนบางตัวในสายพอลิเพปไทด์ โดยเอนไซม์ protein kinase เป็นกระบวนการหนึ่งที่เซลล์ใช้ควบคุมหรือกำหนดการทำงานของโปรตีน กรดอะมิโนที่มักจะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต ได้แก่ เซอรีน (serine) ทรีโอนีน (threonine) และ ไทโรซีน (tyrosine)

*(5.7.7) **การเติมหมู่เมทิล** (methylation)*

กรดอะมิโนไลซีน (lysine) และกรดกลูทามิก (glutamic acid) ของโปรตีนบางชนิดจะถูกเติมหมู่เมทิล 1 – 2 หมู่ เช่น โมโนเมทิลไลซีน (monomethyl lysine) และไดเมทิลไลซีน (dimethyl lysine) ที่พบในไซโทโครมซี (cytochrome c) เป็นต้น

*(5.7.8) **การเติมหมู่ไฮดรอกซิล** (hydroxylation)*

กรดอะมิโนโพรลีน (proline) และ ไลซีน (lysine) หลายหน่วยในสายคอลลาเจนจะถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิล เป็น ไฮดรอกซิโพรลีน (hydroxyproline) และ ไฮดรอกซิไลซีน (hydroxylysine) ตามลำดับ

บรรณานุกรม

1. Adams, R. L. P The biochemistry of the nucleic acids , London ; Chapman & Hall, c1992
2. Alberts, Bruce Molecular biology of the cell New York : Garland Science, c2002
3. Becker, Wayne M., Deamer, D. W. The world of the cell Redwood City, C.A. : Benjamin/Cummings Pub., c1991
4. Dow, J. A. T., Lackie, J. M., Blackshaw, S. E The dictionary of cell and molecular biology San Diego, Calif. : Academic, c1999
5. Hartl, Daniel L., Jones, Elizabeth W Genetics : analysis of genes and genomes Sudbury, Mass. : Jones and Bartlett Publishers, c2001
6. Hartwell, Leland Genetics : from genes to genomes Boston : McGraw-Hill, c2000
7. Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM. Principles of Biochemistry. 2nd edition. Irving Place, New York: Worth pub1ishers, 1993.
8. Lewin B. Gene VII. New York; Oxford University Press Inc., 2000.
9. Mathews CK, Van Holde KE, and Ahern KG. Biochemistry. 3rd edition. Sanfrancisco, California: Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, 2000.
10. Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles oBiochemistry. 3rd edition. New York: Worth pub1ishers,2000.
11. Plummer, David T. Biochemistry, the chemistry of life London ; Mcgraw-Hill, c1989
12. Voet D and Voet JG. Biochemistry. 3rd edition. Wiley International edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. Inc. , 2004
13. Walsh, Gary Proteins : biochemistry and biotechnology Chichester ; New York : J. Wiley, c2002