หนึ่งอาจารย์หนึ่งผลงาน

ประจำปี 2545

เอกสารอบรมครูชีววิทยา 2545

พื้นฐานทางเคมีของชีวิต เซลล์ อณูพันธุศาสตร์ พันธุศาสตร์มนุษย์ และ พันธุศาสตร์วิวัฒนาการ

รองศาสตราจารย์ ดร. กรกช อินทราพิเชฐ

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
พื้นฐานทางเคมีของชีวิต	
องค์ประกอบและหลักการทางเคมีของชีวิต	1
องค์ประกอบของสสาร	2
ธรรมชาติของพันธะเคมี	5
ปฏิกิริยาเคมีในกระบวนการเมตาโบลิซึม	9
คุณสมบัติของน้ำ	11
กรด ด่างและบัฟเฟอร์	13
เคมีของชีวิต : สารประกอบอินทรีย์	
Carbon compound	17
รูปร่างและมิติของสารประกอบอินทรีย์	18
Function Groups of Organic Biochenmicals	21
การใช้สารประกอบอินทรีย์ของเซลล์	23
โมเลกุลของชีวิต	23
การจัดองค์กรของเซลล์	45
มโนคติสำคัญเกี่ยวกับเซลล์	46
ทฤษฎีเซลล์	46
เครื่องมือศึกษาเซลล์	46
Classification of Cells	49
Cell Structure and function of Eukaryotic Cells	51
Cell Organelles	55
Cell Wall	80
การขนส่งสารผ่านเซลล์เมมเบรน	82
พื้นฐานทางเคมีของพันธุกรรม	
วิวัฒนาการของของแนวคิดเกี่ยวกับ Genes	87
สารพันธุกรรม	88
การทำงานของสารพันธุกรรม	103
DNA Replication	104
Transcription	114
Translation and The Genetic Code	122
พันธุศาสตร์มนุษย์	131
พันธุศาสตร์ประชากร : พันธุศาสตร์วิวัฒนาการ	143
บรรณานุกรม	155

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พื้นฐานทางเคมีของชีวิต : อะตอมและโมเลกุล

Chemical Basis of Life : Atoms and Molecules

รองศาสตราจารย์ ดร. กรกช อินทราพิเชฐ

1. องค์ประกอบและหลักการทางเคมีของชีวิต – Composition and Chemical Principle of Lives

ถ้าสิ่งมีชีวิต (living organisms) ประกอบด้วยโมเลกุล แสดงว่าจริง ๆ แล้วสิ่งมีชีวิตก็คือ สิ่งไม่มีชีวิตโดยเนื้อแท้ (intrinsical inanimate) แล้วทำไมสิ่งมีชีวิตแตกต่างจากสิ่งไม่มีชีวิต ทั้งที่ประกอบด้วยโมเลกุลไม่มีชีวิตเช่นกัน นักปราชญ์ให้คำตอบว่า เพราะสิ่งมีชีวิตได้รับสิ่งมหัศจรรย์และกำลังแห่งชีวิตที่เรียกว่า "Vitalism" ซึ่งคำตอบนี้ไม่เป็นที่ยอมรับของวิทยาศาสตร์สมัยใหม่ที่ได้หาเหตุผล การทดลองเพื่ออธิบายปรากฏการณ์ธรรมชาติ การศึกษาเคมีของชีวิตจึงเป็นการศึกษาถึงการสะสมของโมเลกุลที่ไม่มีชีวิตแต่เป็นส่วนประกอบของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น โมเลกุลทั้งหลายมีปฏิสัมพันธ์กันเพื่อรักษาความมีชีวิตให้คงไว้และถ่ายทอดสถานภาพชีวิตต่อไป

Law of Chemistry

1. **Law of conservation of mass** : Mass ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ด้วยปฏิกิริยาปกติ นั่นคือ ถ้า atoms ถูกอนุรักษ์ไว้ mass ก็ต้องถูกอนุรักษ์ไว้เช่นกัน
2. **Law of constant composition** : Compound ใดๆ มีส่วนประกอบของ elements ในสัดส่วนคงที่เท่ากันโดย mass นั่นคือ ถ้าอัตราส่วน atoms ของ elements ใน compound คงที่ สัดส่วนของ mass ย่อมคงที่

โมเลกุลในสิ่งมีชีวิตก็ปฏิบัติตาม Laws of Chemistry ทั้งหมด เพียงแต่โมเลกุลเหล่านั้นมีปฏิสัมพันธ์ให้สอดคล้องกันอีกหลักการหนึ่งซึ่งเรียกโดยรวมว่า **"ความจริงแห่งโมเลกุลของสถานภาพความมีชีวิต Molecular Logic of the Living State"** หลักการนี้เป็นความสัมพันธ์ทางคุณลักษณะเฉพาะระหว่าง Nature, Function และ Interactions ของ **ชีวโมเลกุล - Biomolecules** ซึ่งก็คือโมเลกุลที่พบในสิ่งมีชีวิต

Molecular Logic of Living State มีดังนี้

1. สิ่งมีชีวิตทั้งหมดประกอบด้วย organic macromolecules ที่สร้างขึ้นตามแบบแผน สิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้ **"โมเลกุลโครงสร้างพื้นฐาน - building-block molecules"** ชนิดเดียวกัน เพียงแต่แต่ละ species มีชุดของ nucleic acids และ proteins ต่างกัน และ biomolecules ทั้งหมดมีหน้าที่เฉพาะเจาะจงในแต่ละเซลล์
2. สิ่งมีชีวิตสร้าง รักษาความซับซ้อน และ ใช้ พลังงานอิสระ - free energy จากสิ่งแวดล้อมอย่างมีเป้าหมาย มีโครงสร้าง และปล่อยพลังงานที่อยู่ในรูปของประโยชน์น้อยกว่าออก นั่นคือ สิ่งมีชีวิตแลกเปลี่ยนพลังงานและสสาร

3. สิ่งมีชีวิตเป็นเครื่องยนต์ทางเคมี ทำงานที่อุณหภูมิคงที่ แม้ว่าสิ่งมีชีวิตมีระบบเปลี่ยนพลังงาน แต่เป็นระบบที่สร้างจากโมเลกุลที่ค่อนข้างบอบบางและไม่เสถียร ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง กระแสไฟฟ้าสูง หรือความเป็นกรด-ด่างมากเกินไป

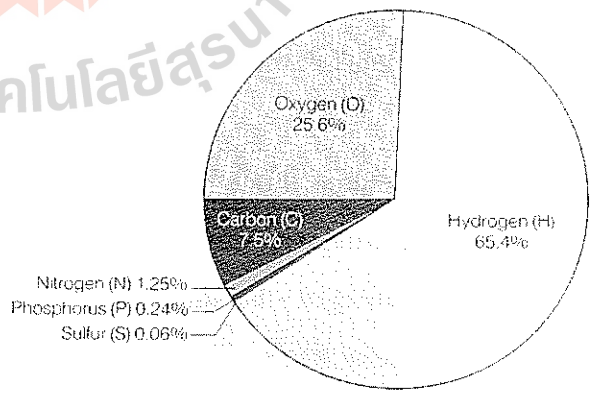
4. สิ่งมีชีวิตได้พลังงานทั้งโดยตรงและโดยอ้อมจากพลังงานดวงอาทิตย์ สิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ขึ้นต่อกันและกันโดยการแลกเปลี่ยนพลังงานและสสารจากสิ่งแวดล้อม นั่นคือความสัมพันธ์ระหว่าง CO_2, O_2, Photosynthesis และ Cellular respiration

5. สิ่งมีชีวิตเป็นเครื่องยนต์เคมีที่ควบคุมตัวเอง (Self-regulating chemical engines) ปรับปฏิบัติการบนพื้นฐานของเศรษฐกิจสูงสุด นั่นคือ กระบวนการสร้างและสลายของเซลล์ - cell metabolism จะถูกควบคุมอย่างสม่ำเสมอ เซลล์สังเคราะห์เอนไซม์เมื่อต้องการใช้อย่างเป็นขั้นตอนเท่านั้น จะไม่สร้างเก็บสะสมไว้ล่วงหน้า

6. สิ่งมีชีวิตมีข้อมูลพันธุกรรม (genetic information) ที่ถูกกำหนดให้เป็นรหัสในหน่วยของโมเลกุล หน่วยเหล่านั้นคือ nucleotides 4 ชนิดของ DNA / RNA

2. องค์ประกอบของสสาร - Organization of Matter

สสาร – Matter คือ วัตถุที่มีมวลและพื้นที่ เป็นได้ทั้งของแข็ง ของเหลว และแก๊ส สสารประกอบด้วย **ธาตุ – Element** ซึ่งไม่สามารถทำให้เป็นอย่างอื่นได้ด้วยวิธีธรรมดา บนโลกมีธาตุที่เกิดโดยธรรมชาติ 92 ชนิด แต่ในร่างกายของคนเราเกือบทั้งหมดประกอบขึ้นจาก ธาตุที่มากที่สุดเพียง 4 ชนิดคือ **Oxygen, Carbon, Hydrogen** และ **Nitrogen** และธาตุที่สิ่งมีชีวิตต้องการในปริมาณที่น้อยมาก คือ น้อยกว่า 0.01% เรียกว่า **Trace elements** เช่น Mg, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, และ I เป็นต้น (รูปที่ 1) ถ้าขาด trace elements อาจทำให้สิ่งมีชีวิตไม่เจริญเติบโตและถึงแก่ความตายได้



รูปที่ 1. ธาตุที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต และ Trace elements

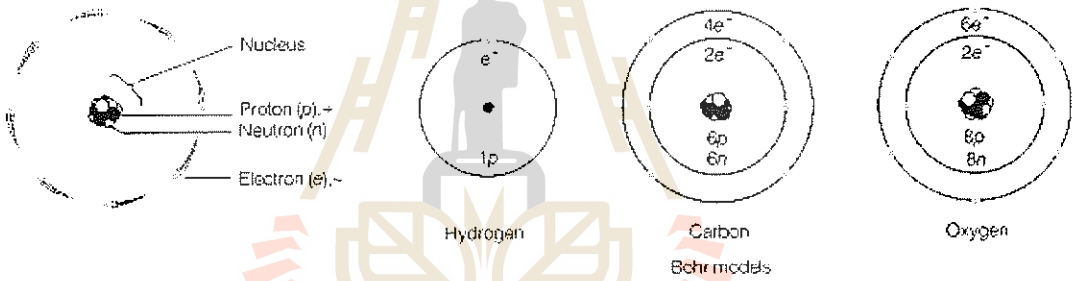
2.1 Structure ของ Atoms

อะตอมคือ หน่วยที่เล็กที่สุดของสสาร และเป็นลักษณะเฉพาะของธาตุ โมเลกุลคือ อะตอมที่ยึดติดกันตั้งแต่ 2 อะตอมหรือมากกว่าของธาตุชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน เช่น น้ำ ซึ่งเป็นสารประกอบ Compound น้ำจากแหล่งใด ๆ ก็เหมือนกันคือประกอบด้วย hydrogen 2 อะตอม และ oxygen 1 อะตอม ส่วน compound คือสารที่มีสัดส่วนที่ไม่เคยเปลี่ยนแปลงระหว่างธาตุ 2 ธาตุหรือมากกว่า

หน่วยโครงสร้างพื้นฐาน - Atomic Building Blocks

อะตอมประกอบขึ้นด้วย อนุภาค (Particle) อนุภาค คือหน่วยโครงสร้างพื้นฐาน (Building block) ของอะตอม อนุภาค มีอยู่ 3 ชนิดคือ

Proton	มี ประจุบวก	charged
Electron	มี ประจุลบ	
Neutron	ไม่มี ประจุ	non-charged



รูปที่ 2. ส่วนประกอบโครงสร้างของอะตอม และ อะตอมของ Hydrogen, Carbon, และ Oxygen

บริเวณกลางของอะตอมเรียกว่า นิวเคลียส (Nucleus) นิวเคลียสประกอบด้วย proton และ neutron ยกเว้น hydrogen ที่นิวเคลียสมีเฉพาะ proton ส่วน electron วิ่งเป็นวงรอบนิวเคลียส ซึ่งทำให้กินพื้นที่เกือบทั้งหมดของอะตอม (รูปที่ 2) เนื่องจากอะตอมมีหลาย proton และ electron ทำให้โดยรวมแล้วอะตอมไม่มีประจุ

Atomic Number และ Mass Number

Atomic number - เลขอะตอม คือ **จำนวน proton** ที่มีในนิวเคลียส ซึ่งแตกต่างกัน แล้วแต่ธาตุ เช่น Hydrogen atom มี atomic number เป็น 1 เพราะนิวเคลียสมีเพียง 1 proton และ
Carbon มี atomic number เป็น 6 เพราะในนิวเคลียสมี 6 protons เป็นต้น

Atomic mass – มวลอะตอม คือ **จำนวนของ proton รวมกับ neutron** ที่มีในนิวเคลียส เช่น Carbon มี atomic mass เท่ากับ 12 เพราะในนิวเคลียสมี 6 protons และ 6 neutrons

Relative mass - มวลสัมพัทธ์ของอะตอม หรือนิยมเรียกว่า **Atomic weight - น้ำหนักอะตอม** ซึ่งเป็นเทอมที่ไม่แน่นอน เพราะ mass อาจไม่เท่ากับ weight

การรู้ atomic number และ mass number จะบอกได้ว่า อะตอม เสีย หรือ รับ หรือ ใช้ electron ร่วมกันอย่างไร เพราะ electron activity เป็นพื้นฐานสำหรับองค์ประกอบของวัตถุและการไหลของพลังงาน (flow of energy) ในโลกของสิ่งมีชีวิต

2.2 Isotopes

Isotopes คือ รูปแบบของอะตอมที่เปลี่ยนไป (variant forms of atoms) อะตอมของธาตุใด ๆ ย่อมมีจำนวน proton และ electron เหมือนกัน แต่สามารถมี**จำนวน neutron ต่างกัน**ได้ อะตอมเช่นนี้เรียกว่า **Isotope** เช่น Carbon atom อาจเป็น

^{12}C : carbon 12 มี 6 protons 6 neutrons

^{13}C : carbon 13 มี 6 protons 7 neutrons

^{14}C : carbon 14 มี 6 protons 8 neutrons

isotopes ทั้งหมดทำปฏิกิริยากับอะตอมอื่นเหมือนกัน ดังนั้นเซลล์มีชีวิตสามารถใช้ Carbon isotope ใดก็ได้ใน metabolic reaction

Radioisotopes คือ อะตอม isotopes ที่ไม่เสถียร มีแนวโน้มที่จะแตกสลาย (decay) ให้เป็นอะตอมที่เสถียรกว่า **Radioactive - สารกัมมันตภาพรังสี** คือ radioisotopes ที่มีจำนวน protons และ neutrons ไม่เท่ากัน และปล่อย electrons และพลังงานออกมาโดยกระบวนการที่เกิดขึ้นเองเรียกว่า "**Radioactive decay**" จนได้ isotopes ใหม่ที่เสถียรและไม่เป็น radioactive อีกต่อไป ส่วนปรากฏการณ์ปล่อยพลังงานออกจาก radioisotopes เรียกว่า **"Radioactivity"** radioisotope แต่ละชนิดจะสลายไปเป็น isotope เฉพาะของอีกธาตุหนึ่ง เวลาที่ใช้ในการ**สลายไปได้ครึ่งหนึ่งของ Nucleus ของอะตอม เรียกว่า "Half-life"** ซึ่งไม่สามารถทำให้เปลี่ยนแปลงได้ด้วยปัจจัยใด ๆ เช่น อุณหภูมิ ความดัน ปฏิกิริยาเคมี หรือสิ่งแวดล้อม แต่**เกิดเองโดยธรรมชาติ**

1) Radioactive Dating

การใช้ประโยชน์จาก radioisotopes ในการหาอายุหินชั้นต่าง ๆ ของโลก โดยเปรียบเทียบปริมาณของ radioisotope หนึ่งกับปริมาณของ decay product ของ isotope นั้น เช่น **(1) Carbon dating**: อัตราส่วน (ratio) ของ ^{14}C ต่อ ^{12}C สามารถบอกอายุโดยประมาณของสิ่งมีชีวิตได้ เพราะ อัตราส่วนของ ^{14}C ต่อ ^{12}C ในสิ่ง

ตารางที่ 1. สารกัมมันตรังสี ช่วงเวลาครึ่งอายุและช่วงเวลาที่ใช้เป็นประโยชน์

Main Radioisotopes Used in Dating

Radioisotope (unstable)		Stable Product	Half-Life (years)	Useful Range (years)
^{87}rubidium	→	^{87}strontium	49 billion	100 million
^{232}thorium	→	^{208}lead	14 billion	200 million
^{238}uranium	→	^{206}lead	4.5 billion	100 million
^{40}potassium	→	^{40}argon	1.3 billion	100 million
^{235}uranium	→	^{207}lead	704 million	100,000
^{14}carbon	→	^{14}nitrogen	5,730	0–60,000

มีชีวิตคงที่ขณะสิ่งมีชีวิตตาย ไม่มีการรับ carbon เพิ่มเติมอีก ดังนั้นอัตราส่วนของ ^{14}C ต่อ ^{12}C ลดลง เนื่องจากเป็นการสลายของ ^{14}C ซึ่งมี half life 5,730 ปี carbon dating จึงใช้ประโยชน์ได้กับวัตถุอายุไม่มากกว่า 50,000 ปี **(2) Potassium – argon dating**:ใช้อายุของวัตถุอายุมากกว่า 50,000 ปี half life ของ ^{40}K เท่ากับ 1.3 พันล้าน (1.28×10^9) ปี ^{40}K สลายไปเป็น ^{40}Ar ซึ่งเสถียร และเนื่องจาก Ar เป็นแก๊สที่เกิดจากการหลอมเลวของหิน จึงจัดหัดให้อัตราส่วนของ ^{40}K ต่อ ^{40}Ar เป็นสูญ (0) เมื่อเริ่มต้น **(3) Uranium – lead dating**: ^{238}Uranium มี half-life 4.5 พันล้าน (billion - $x10^9$) ปี decay product คือ ^{206}Lead อัตราส่วนของ ^{238}Uranium ต่อ ^{206}Lead ใช้หาอายุของวัตถุที่มี ^{238}Uranium และหาช่วงอายุ ประมาณ 1,000,000 ปี

2) Tracking chemicals

ใช้ radioisotopes เป็นตัวติดตาม หรือ "Tracer" เพื่อติดตามวิถี หรือที่หมายของสารที่เข้าไปในเซลล์ ร่างกาย ระบบนิเวศ หรือ ระบบอื่น เช่น เซลล์สามารถใช้ isotope ใด ๆ ของ carbon ก็ได้ในปฏิกิริยาที่ต้องการ carbon นักวิจัยจึงใช้ ^{14}C ในการติดตาม carbon ที่พืชนำเข้าไปให้เป็น carbohydrates ใน photosynthesis หรือใช้ติดตามการใช้ธาตุอาหารและปุ๋ยของพืช ซึ่งอาจนำไปสู่การปรับปรุงผลผลิตของพืชได้ Radioisotope ^{123}Iodine ใช้ตรวจพยาธิสภาพของต่อม Thyroid ของคน เพราะเป็นต่อมเดียวที่จับ Iodine ได้ ตรวจพยาธิสภาพของต่อม Thyroid โดยฉีด ^{123}Iodine เข้าเส้นเลือด แล้ว scan ด้วยเครื่อง photographic imaging

3) Saving Lives - รังสีรักษา

ใช้ radioisotopes ในการแพทย์รังสี (nuclear medicine) เพื่อวินิจฉัยและรักษาโรค เช่น ใช้ ^{238}Plutonium เป็นพลังงานใน artificial pacemaker ใส่ในหัวใจของผู้ป่วยที่หัวใจเต้นไม่ปกติ โดยบรรจุ ^{238}Plutonium ในกล่องป้องกันไม่ให้รังสีทำลายเนื้อเยื่ออื่นของร่างกาย

Radiation therapy รักษามะเร็ง ใช้ ^{226}Radium หรือ ^{60}Cobalt ปล่อยพลังงานทำลายเซลล์มะเร็ง

3. ธรรมชาติของพันธะเคมี - Nature of Chemical Bonds

3.1 Compounds

Compounds คือ สารที่ประกอบขึ้นด้วย 2 ธาตุขึ้นไป โดยเป็นปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างอะตอมของธาตุ พันธะที่ยึดติดกันระหว่างอะตอมเรียกว่า **"Chemical bond"** เราใช้ Symbol แทนธาตุเมื่อเขียนสูตร Formula ซึ่งทำให้บอกส่วนประกอบของ compound ได้ เช่น น้ำ มีสูตรเป็น H_2O นั่นคือ H แทนอะตอม hydrogen และ O แทนอะตอม oxygen

3.2 Chemical bond

Chemical bond คือ พันธะยึดกันระหว่างโครงสร้าง electron ของอะตอม พันธะนี้สัมพันธ์กับพลังงาน พันธะเคมีส่วนมากเกิดขึ้น เมื่อ (1) สูญเสีย electron (2) รับ electron หรือ (3) ร่วมใช้ electron อย่างไรก็ตาม อะตอมหนึ่งจะทำพันธะกับอีกอะตอมหนึ่งได้ หรือไม่ขึ้นกับจำนวนของ electrons และการเรียงของ electrons

3.3 Electrons และ Energy levels

Electron เรียงในบริเวณรอบนิวเคลียสซึ่งเรียกว่า **"Orbital"** แต่ละ orbital บรรจุ electrons ได้มากที่สุด 2 electrons electrons ใน orbital ที่ใกล้นิวเคลียสมากที่สุด มีระดับพลังงานต่ำสุด (lowest energy level) electrons ใน orbital ที่ไกลออกไปจากนิวเคลียส มีระดับพลังงานสูงกว่า (higher energy level)

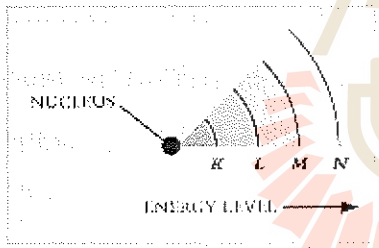
Orbitals ทั้งหมดเรียงกันเป็นอนุกรมของชั้น **"shell"** รอบนิวเคลียส (รูปที่ 3)

shell ที่ 1 (K) มี 1 orbital ซึ่งอยู่ใกล้นิวเคลียสมากที่สุด มี 2 electrons

shell ที่ 2 (L) ถัดออกมามี orbital ได้สูงสุด 4 orbitals จึงมีพื้นที่สำหรับ 8 electrons และ

shell ที่ 3 (M) ถัดออกมามี electrons เพิ่มขึ้นอีก

Hydrogen เป็นอะตอมที่ง่ายที่สุดมีเพียง 1 electron ใน shell ที่ 1 (K) และเป็น lone electron (มีเพียง 1 proton) รอบนิวเคลียส Sodium มี 11 electrons ใน shell ที่ 1 (K) มี 1 orbital บรรจุ 2 electrons ใน shell ที่ 2 (L) มี 4 orbitals บรรจุ 8 electrons ใน shell ที่ 3 (M) จึงมีเพียง 1 electron และเป็น lone electron ดังนั้นทั้ง Hydrogen และ Sodium จึงมีที่ว่าง **"Vacancy"** ใน orbital ของ shell นอกสุด อะตอมที่มี electron vacancy มีแนวโน้มที่จะทำปฏิกิริยากับอะตอมอื่น เช่น Hydrogen, Oxygen, Carbon และ Nitrogen ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในสิ่งมีชีวิต



รูปที่ 3. Orbital และ Shell ของอะตอม

ELEMENT	ATOMIC NUMBER	NUMBER OF ELECTRONS IN EACH ENERGY LEVEL		
		FIRST (K)	SECOND (L)	THIRD (M)
Hydrogen (H)	1	1	—	—
Helium (He)	2	2	—	—
Carbon (C)	6	2	4	—
Nitrogen (N)	7	2	5	—
Oxygen (O)	8	2	6	—
Neon (Ne)	10	2	8	—
Sodium (Na)	11	2	8	1
Phosphorus (P)	15	2	8	5
Sulfur (S)	16	2	8	6
Chlorine (Cl)	17	2	8	7

ตารางที่ 2. Atomic number และ electrons ใน energy levels

3.4 Bonds สำคัญใน Biological molecules

3.4.1 Ionic Bonding

พันธะที่เกิดจาก ions ที่มีประจุตรงข้ามกัน เมื่ออะตอมเสียหรือรับ electron ทำให้อะตอมมีประจุเป็นบวก หรือ ลบ สภาวะมีประจุของอะตอมเรียกว่า **Ion** อะตอมจะเสียหรือรับ electron เมื่อมีอีกอะตอมหนึ่งที่อยู่ใกล้พร้อมที่จะรับหรือให้ electron ทั้ง 2 อะตอมจึงเป็น ions ทั้ง 2 ions อาจแยกกันหรืออยู่ด้วยกันขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ถ้า 2 ions ซึ่งมีประจุตรงข้ามกันคงยึดติดกัน **พันธะที่ยึดติดกันด้วยประจุที่ต่างกันของ ions** เช่นนี้เรียกว่า **Ionic bond** เช่น NaCl เกิดจาก Na ให้ electron แก่ Cl ทำให้ Na กลายเป็น Na^+ ion ส่วน Cl ที่รับ electron ทำให้ Cl กลายเป็น Cl^- ion Na^+ ion และ Cl^- ion จึงคงยึดอยู่ด้วยกันด้วย ionic bond (รูปที่ 4)

รูปที่ 4. Ionic bond ในเกลือ NaCl (a), เมื่อทำปฏิกิริยากับ น้ำ (b) โมเลกุลน้ำจะล้อมรอบ Na^+ ion และ Cl^- ion (c)

3.4.2 Covalent Bonding

พันธะที่เกิดจากการร่วมใช้ electron(s) อะตอมหนึ่งไม่สามารถดึง electron จากอีกอะตอมหนึ่งได้อย่างสมบูรณ์ อะตอมทั้ง 2 จึงใช้ electron ร่วมกัน (sharing) ด้วย **"Covalent bond"** เราใช้ **เส้นขีด (-)** แทน covalent bend และใช้ 2 จุด (:) แทน shared electrons 1 คู่

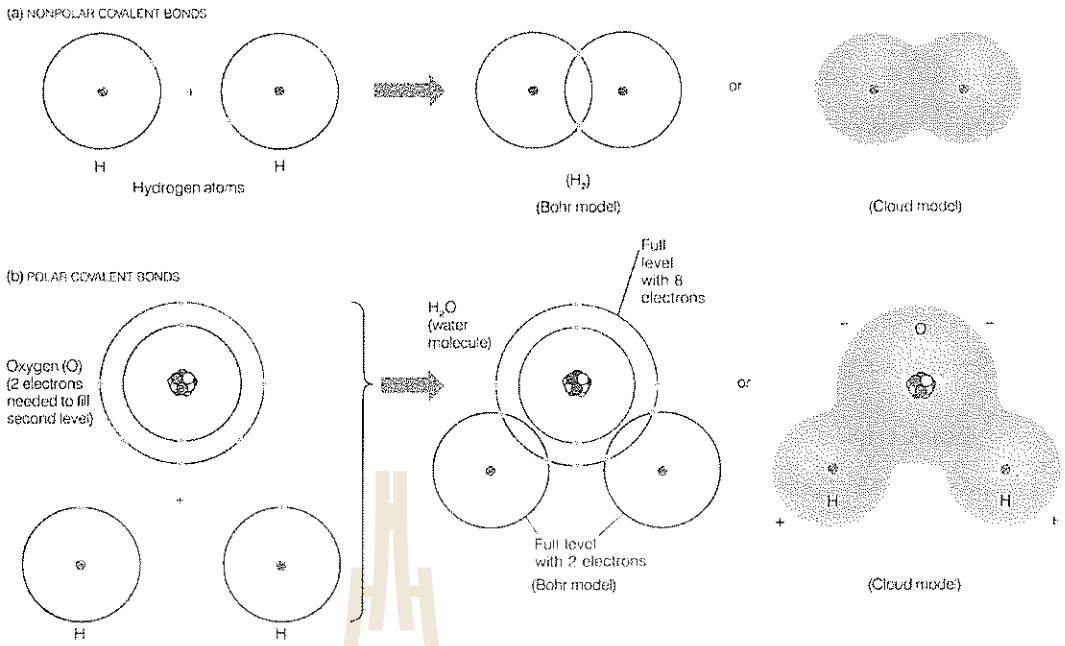
ถ้า 2 อะตอม ร่วมใช้ electrons 1 คู่ แทนด้วย 1 เส้น single bond เช่น H-H

ถ้า 2 อะตอม ร่วมใช้ electrons 2 คู่ แทนด้วย 2 เส้น double bond เช่น 0 = 0

ถ้า 2 อะตอม ร่วมใช้ electrons 3 คู่ แทนด้วย 3 เส้น triple bond เช่น N ≡ N

Covalent bonds เป็น Nonpolar หรือ Polar ก็ได้ ใน **nonpolar covalent bond** อะตอมทั้ง 2 ดึง shared electrons เท่ากัน นั่นคือ ไม่มีความแตกต่างระหว่าง 2 ขั้ว ของ bond เช่นโมเลกุล H_2 (รูปที่ 5) ส่วน **polar covalent bond** อะตอมทั้ง 2 มี electrons ไม่เท่ากัน (และมี protons ไม่เท่ากัน) ดึง shared electrons ไม่เท่ากัน อะตอมที่ดึง electrons ได้มากกว่าจึงค่อนข้างเป็นประจุลบ หรือ **"electronegative"** ในขณะที่อีกอะตอมมีประจุค่อนข้างเป็นบวก **"electropositive"** รวมแล้ว 2 อะตอมที่อยู่ด้วยกันแบบ polar covalent bond ไม่มี Net charge แต่ charge กระจายระหว่าง 2 ปลายของ bond ไม่เท่ากัน เช่น โมเลกุลของน้ำ H-O-H มี 2 polar covalent bonds เกิดจาก H ดึง electrons ได้น้อยกว่า O ซึ่งมี protons มากกว่า แม้ว่า H_2O ไม่มี net charge แต่ H_2O มีขั้ว - polarity น้ำจึงสามารถดึงอะตอมอื่นได้อย่างอ่อน ๆ แบบของการร่วมใช้ electrons (pattern of electron sharing)

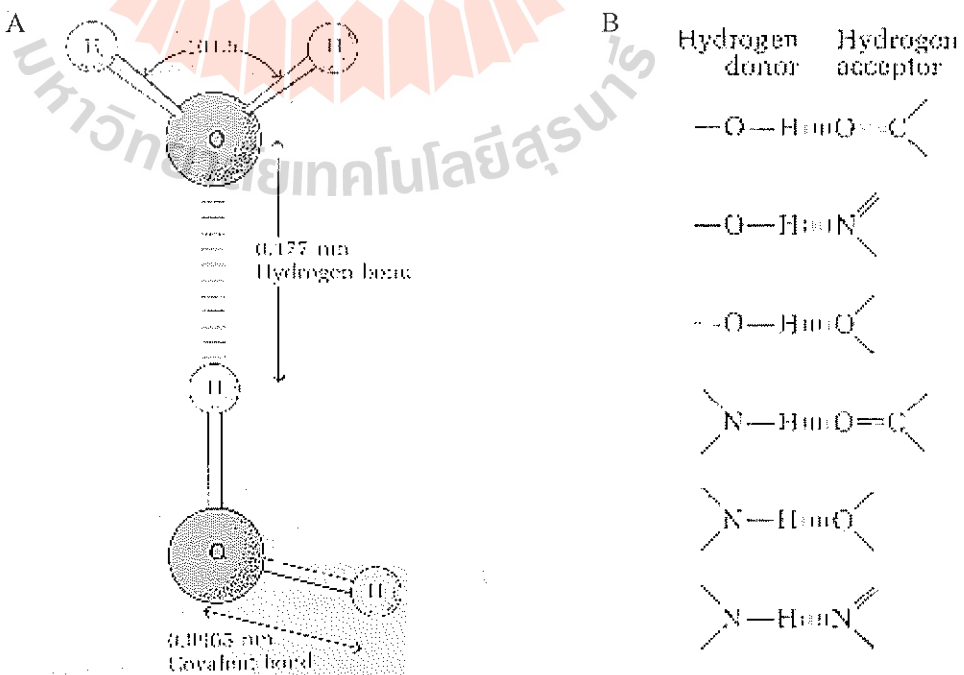
ใน covalent bond ยึดอะตอมให้อยู่ด้วยกันในลักษณะการจัดเรียงอะตอมอย่างเฉพาะในโมเลกุลของสาร นอกจากนี้ pattern เหล่านี้ยังรับผิดชอบต่อการดึงกันอย่างอ่อน (weak attraction) และผลักดันกันอย่างอ่อน (week repulsion) ระหว่างโมเลกุล แรงของพันธะเหล่านี้จึงสำคัญอย่างยิ่งต่อโครงสร้างและหน้าที่ของสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิต (biological molecules)



รูปที่ ๖. Covalent bonding แบบ nonpolar ของ H_2 (a) และ แบบ polar และ electric dipole ของน้ำ (b)

3.4.3 Hydrogen bonding

พันธะที่เกิดจากการจับกับ H อะตอม โดยอะตอมทำปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับ hydrogen ของอะตอมข้างเคียงซึ่งทำ polar covalent bond ในโมเลกุลอยู่แล้ว พันธะนี้เรียกว่า **"Hydrogen bond"** เพราะ hydrogen ใน covalent bond นั้นค่อนข้างเป็นประจุบวก จึงถูกดึงได้โดยประจุที่ค่อนข้างลบของอีกอะตอม hydrogen bond จึงเกิดระหว่าง H อะตอมกับอะตอมอื่นในโมเลกุลเดียวกัน หรือต่างโมเลกุล (รูปที่ 6) ก็ได้



รูปที่ 6. A, Hydrogen bonding, ระหว่างโมเลกุลของน้ำ และ B, Hydrogen bonding ระหว่างอะตอมต่าง ๆ

Hydrogen bond เกิดในชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เกิดระหว่าง 2 สายของโมเลกุล DNA แม้ว่าแต่ละ hydrogen bond มีพลังอ่อน ถูกแยกได้ง่าย แต่โดยรวมแล้ว hydrogen bond ซึ่งมีจำนวนมาก ทำให้โมเลกุล DNA เสถียรและสะดวกในการแยกหรือรวมกันคืนของสาย DNA ในระหว่างการจำลอง (Replication) และการถอดรหัส (Transcription) ในเซลล์มีชีวิตรวมทั้งการศึกษาวิจัยตัดต่อ DNA ในหลอดแก้ว (*in vitro*) จึงเกิดขึ้นได้

4. ปฏิกิริยาเคมีในกระบวนการเมตาโบลิซึม - Chemical Reactions in Metabolism

Metabolism เป็นความสามารถของเซลล์มีชีวิต ที่ (1) สกัด หรือ เปลี่ยนพลังงานจากสภาพแวดล้อม (2) ใช้พลังงานเพื่อคงสภาพของเซลล์ เซลล์เจริญเติบโตและสืบพันธุ์ หรือกล่าวโดยง่าย การถ่ายทอดพลังงานภายในเซลล์ก็คือ metabolism นั่นเอง

Metabolism ในเซลล์เป็นปฏิกิริยาเคมีที่ electrons ถูกถ่ายทอดจากโมเลกุลหนึ่งไปยังอีกโมเลกุลหนึ่ง เรียกปฏิกิริยาว่า **"Oxidation-Reduction Reactions หรือ Oxidoreductions หรือ Redox Reactions"**

Oxidation เป็นปฏิกิริยาสูญเสียหรือให้ electron

Reduction เป็นปฏิกิริยารับ electron

โมเลกุล ให้ electron หรือ **Electron donor เรียกว่า Reducing agent หรือ Reductant**

โมเลกุลรับ electron หรือ **Electron acceptor เรียกว่า Oxidizing agent หรือ Oxidant**

reductant และ oxidant ทำหน้าที่เป็นคู่ หรือเป็น **conjugate reductant – oxidant pair หรือ redox pair** ของ electron donor กับ electron acceptor (เหมือนกับ acid และ Base ทำหน้าที่เป็น conjugate acid-base pair ซึ่งเป็นคู่ของ proton donor กับ proton acceptor)

Acid base reaction : เขียนสมการ

$$\text{Proton donor} \rightleftharpoons H^{+} + \text{proton acceptor}$$

Redox reaction : เขียนสมการ

$$\text{Electron donor} \rightleftharpoons e^{-} + \text{electron acceptor}$$

เช่น $Fe^{2+} \rightleftharpoons e^{-} + Fe^{3++}$

Fe^{2+} เป็น electron donor / reducing agent / reductant

Fe^{3+} เป็น electron acceptor /oxidizing agent / oxidant

F^{2+} และ Fe^{3+} เป็น conjugate redox pair

Electrons ถูกถ่ายทอดจากโมเลกุลหนึ่งไปยังอีกโมเลกุลหนึ่งได้หลายวิธี

1. Electrons ถูกถ่ายทอดในรูปของ electron โดยตรง เช่น

Fe^{2+} - Fe^{3+} Redox pair ถ่ายทอด electron ให้ Cu^{+} - Cu^{2+} redox pair :

$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + Cu^{+}$$

2. Electrons ถูกถ่ายทอดในรูปของ hydrogen atoms (H) ซึ่งประกอบด้วย 1 proton (H^+) และ 1 single electron (e^-)

$$AH_2 \rightleftharpoons A + 2e^- + 2H^+$$

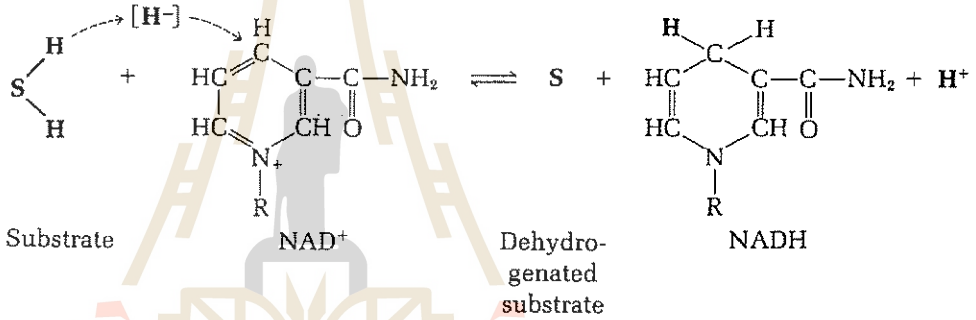
เมื่อ AH2 คือ hydrogen (หรือ electron) donor

A คือ hydrogen acceptor

AH2 – A คือ conjugate redox pair ซึ่งสามารถลด (reduce) electron acceptor ให้ B ได้โดยถ่ายจาก H atoms

$$AH_2 + B \rightarrow A + BH_2$$

3. Electrons ถูกถ่ายทอดจาก electron donor ให้ acceptor ที่อยู่ในรูปของ Hydride ion ($:H^-$) ซึ่งมี 2 electrons เช่นในกรณีของ NAD-linked dehydrogenase



รูปที่ 7. Electron donor ในรูปของ hydride ion

4. Electrons ถ่ายทอดเมื่อเกิดการรวมกันของ organic reductant กับ oxygen ให้ product ซึ่ง oxygen ทำ covalent bonding เช่น oxidation ของ hydrocarbon ให้เป็น alcohol

$$R-CH_3 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow R-CH_2-OH$$

hydrocarbon $R\text{-}CH_3$ เป็น electron donor

oxygen เป็น electron acceptor

Electron transfer ทั้ง 4 แบบเกิดขึ้นในเซลล์ อนุภาคหรืออะตอมที่เทียบเท่า electron (electron equivalent) ที่เกี่ยวข้องใน redox reaction เรียกว่า **Reducing equivalent** ซึ่งอาจอยู่ในรูปของ **Electron, Hydrogen atom, Hydride ion หรือที่เกิดในปฏิกิริยาที่มี Oxygen แล้วให้ oxygenated product** เช่นใน Mitochondrial electron transport จะเห็นว่า electrons ถูกถ่ายทอดหลายรูปแบบ เป็น hydride ions เป็น hydrogen atoms และเป็น electrons ในขั้นท้าย ๆ ของ cytochromes

ในโมเลกุลที่เป็นเชื้อเพลิงในเซลล์ ปกติปฏิกิริยาเป็น Enzymatic dehydrogenation ปฏิกิริยาแต่ละครั้ง โมเลกุลนี้จะสูญเสีย 2 reducing equivalents ให้แก่ oxygen ดังนั้น หน่วยของ biological oxidations จึงเป็น 1 คู่ของ reducing equivalents ผ่านจาก substrate ไปหา oxygen

5. คุณสมบัติของน้ำ - Properties of Water

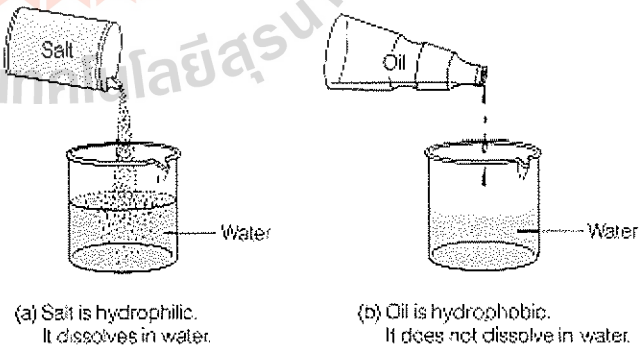
ชีวิตกำเนิดในน้ำ น้ำเป็น substance ที่มีมากที่สุดในระบบชีวิต ถึง 70% หรือมากกว่าของน้ำหนักตัว น้ำเป็นตัวกลางในการขนส่งสารอาหาร ปฏิกิริยาเอนไซม์ของเมตาโบลิซึม และขนส่งพลังงานเคมีที่เกิดขึ้นในเซลล์ ดังนั้นโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์จึงต้องปรับตัวให้เข้ากับคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำ คุณสมบัติหลักของน้ำมีดังนี้

1) ขั้ว (Polarity) ของโมเลกุลน้ำมีอิทธิพลต่อพฤติกรรมของสารอื่น

น้ำไม่มี net charge แต่การเรียงตัวของ electron และมุมของ bond ทำให้น้ำมีประจุที่กระจายไม่สม่ำเสมอ ได้เป็นขั้ว (polarity) ขั้วด้าน Oxygen เป็นลบเล็กน้อย และขั้วด้าน Hydrogen เป็นบวกเล็กน้อย โมเลกุลของน้ำจึงมี 2 ขั้ว หรือ **"Electric dipole"** คือมีประจุลบและบวกแยกกัน แต่รวมทั้งโมเลกุลเป็นกลาง (รูปที่ 5)

Polarity ทำให้โมเลกุลน้ำทำ Hydrogen bonds กับตัวเองหรือกับสาร polar อื่น เช่น น้ำตาล สารทั้งหลายที่จับกับน้ำ เรียกว่า **Hydrophilic** (แปลว่า รักน้ำ water loving)

Polarity ของน้ำผลักน้ำมัน (oil) และสาร nonpolar สารที่ไม่จับกับน้ำเรียกว่า **Hydrophobic** (กลัวน้ำ water dreading) ถ้าเขย่าขวดบรรจุน้ำและน้ำมัน hydrogen bond แตก น้ำมันแทนที่ bond น้ำจะผลักโมเลกุลน้ำมันออกและดันให้โมเลกุลน้ำมันรวมกันเป็นหยด (droplets) หรือเป็นแผ่นบาง (film) ที่ผิวของน้ำ ดังนั้น Hydrophobic reaction จึงช่วยทำให้เกิดชั้นแผ่นน้ำมัน ดังจะเห็นได้ใน cell membrane



รูปที่ 8. แสดงการละลายของสาร Hydrophilic และ Hydrophobic

2) น้ำมีอิทธิพลต่อการเสถียรของอุณหภูมิ (Temperature-stabilizing effects)

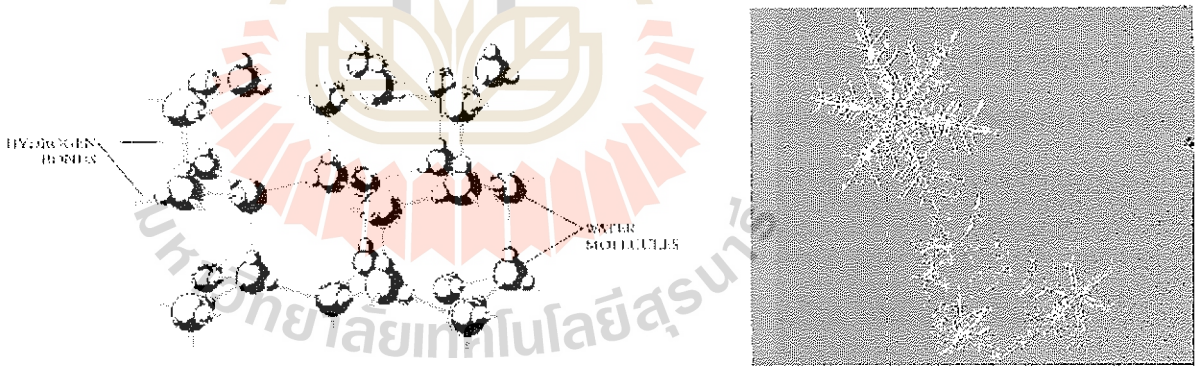
ชีวิตแรกเกิดในน้ำซึ่งเป็นของเหลว เช่นเดียวกันน้ำเกือบทั้งหมดในโลกอยู่ในรูปของเหลวซึ่งเป็นผลจาก hydrogen bonds ระหว่างโมเลกุลของน้ำ

โมเลกุลน้ำ หรือสารอื่นเคลื่อนที่สม่ำเสมอ แต่ถ้าใส่พลังงานเข้าไปทำให้โมเลกุลเคลื่อนที่เร็วขึ้น อุณหภูมิก็คือตัววัดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลน้ำเทียบกับของเหลวอื่น น้ำต้องการพลังงานความร้อนมาก ก่อนที่จะวัดอุณหภูมิที่เพิ่มได้ เพราะ hydrogen bonds ในน้ำดูดซับพลังงานส่วนมากที่ได้รับ ทำให้การเคลื่อนที่ของแต่ละโมเลกุลน้ำไม่เร็ว คุณสมบัตินี้ทำให้น้ำช่วยรักษาอุณหภูมิภายในเซลล์ให้คงที่ และต่อต้านต่อการเปลี่ยนอุณหภูมิซึ่งอาจขัดขวางปฏิกิริยาเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการมีชีวิต

เมื่อน้ำเป็นของเหลว hydrogen bonds จะสลายและสร้างขึ้นใหม่อยู่ตลอดเวลา แต่ระหว่างการระเหย พลังงานที่ใส่เข้าไปจะเปลี่ยนสถานะของน้ำเหลวให้เป็นแก๊ส (ไอ) เพราะพลังงานไปเพิ่มการเคลื่อนที่ของน้ำจนทำให้ hydrogen bonds สลายอย่างเดียวแต่ไม่ทำ bonds ใหม่

เมื่อน้ำระเหย น้ำที่ผิวระเหยหนีไปในอากาศ เกิดจากโมเลกุลน้ำแตกเป็นอิสระแยกออกจากกันเป็นจำนวนมาก โมเลกุลเหล่านั้นนำพลังงานไปด้วย เป็นผลให้อุณหภูมิผิวน้ำลดลง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เรารู้สึกเย็นลงเมื่อเราออกกำลังจนเหงื่อออกในวันอากาศร้อนแห้ง น้ำในเหงื่อซึ่งมีน้ำอยู่ถึง 99% จะระเหยออกทางผิวหนัง

ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0°C hydrogen bonds ทนต่อการแตกสลาย โดยยึดโมเลกุลของน้ำในรูปตาข่าย ทำให้น้ำเป็นน้ำแข็ง ระหว่างอากาศหนาวจัดจึงเกิดแผ่นน้ำแข็งบนสระน้ำ ทะเลสาบ และลำธาร เพราะน้ำแข็งมีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ แผ่นน้ำแข็งนี้จะกั้นความร้อนในน้ำส่วนล่างลงไป ช่วยป้องกันสิ่งมีชีวิตในน้ำจากการแข็งตัว

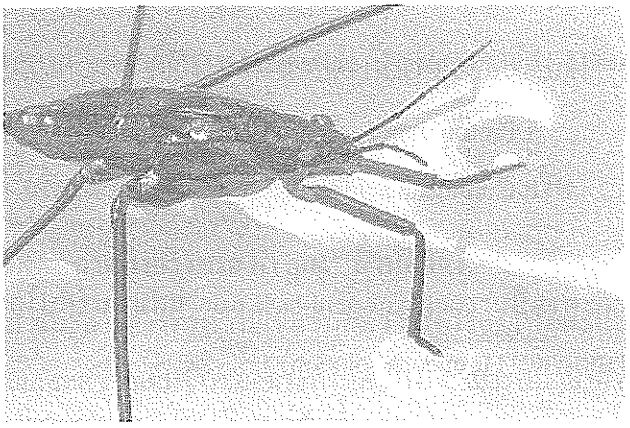


รูปที่ 9. โมเลกุลของน้ำในสถานะน้ำแข็งเป็นตาข่ายอย่างมีระเบียบ

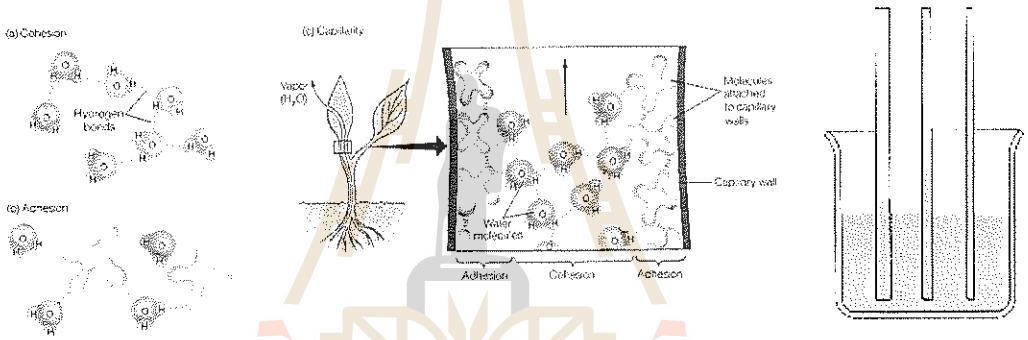
3) น้ำมีคุณสมบัติเกาะติดกัน (Cohesive properties)

แมลงมุมน้ำสามารถ เดิน หรืออาศัยอยู่บนผิวน้ำได้เพราะ hydrogen bonds เกาะติดกัน ต่อต้านต่อการแยกสลายภายใต้แรงตึง (tension) นั่นคือน้ำหนักของแมลงมุมน้ำจะยืดผิวน้ำออก ในขณะที่ผิวน้ำมี hydrogen bonds ดึงโมเลกุลน้ำที่อยู่นอกสุดเข้าด้านใน แรงตึงที่ผิวจึงเป็นผลจาการคงอยู่ของ hydrogen bonding

รูปที่ 10. แมลงมุมน้ำบนผิวน้ำ



ในพืชบก เซลล์เกาะติดกันเป็นท่อ น้ำขับเคลื่อนผ่านท่อจากรากถึงใบ เมื่อน้ำระเหยออกจากใบ hydrogen bonds จะดึงโมเลกุลน้ำขึ้นด้านบนเข้าไปในเซลล์ของใบอย่างต่อเนื่องเพราะโมเลกุลน้ำติดกัน (cohesion และ adhesion) และ ดึงกันเป็นสายต่อเนื่อง (capillary)



รูปที่ 10. Cohesion, adhesion และ capillary ของน้ำ

4) น้ำมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลาย (Solvent properties)

น้ำเป็นตัวทำละลาย (solvent) ที่ดีมาก โมเลกุลที่เป็นทั้ง ions และ polar ละลายได้ดีในน้ำ สารที่ถูกทำละลายเรียกว่า "Solutes" เช่น NaCl ซึ่ง Na^+ ions และ Cl^- ions ยึดจับกันด้วย ionic bond (electrostatic attraction) อย่างแข็งแรงเป็นผลึก เมื่อ NaCl ถูกน้ำ ขั้วของน้ำซึ่งเป็น dipole จะถูก Na^+ ions และ Cl^- ions ดึงอย่างแรง โดย Na^+ ions ดึงขั้วลบ (ด้าน oxygen atoms) และ Cl^- การดึงขั้วบวก (ด้าน hydrogen atoms) ทำให้ Na ions และ Cl^- ions แยกออกจากผลึกและถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลน้ำเป็น Hydrated Na^+ ions และ Hydrated Cl^- ions ได้เป็นสารละลาย (รูปที่ 4) **สารถูกทำละลายโดยล้อมรอบด้วยน้ำ "Hydration"** เกิดกับ solutes ในเซลล์ของเหลวในร่างกาย ใน sap ของพืช เป็นต้น

6. กรด ด่าง เกลือและบัฟเฟอร์ - Acid, Base, Salt, and Buffer

6.1 กรด-ด่าง

กรด (Acids) คือ proton donors และ ด่างคือ proton acceptors

เช่น $CH_3COOH \rightleftharpoons H^+ + CH_3COO^-$

Proton donor — Proton — Proton acceptor,

หรือ Conjugate acid — หรือ Conjugate base

กรด และด่างเป็น conjugate acid-base pair ที่สัมพันธ์กันโดยปฏิกิริยา ยกเว้น กรดมีแนวโน้มที่จะเสีย proton ในสารละลายน้ำ (aqueous solution)

สารละลายกรด เช่น น้ำมะนาว มี H^+ ions มากกว่า OH^- และ pH < 7 สารละลายด่าง เช่น ไข่ขาว มี H^- ions น้อยกว่า OH^- และ pH > 7 เมื่อเรากลืนอาหารผ่านเข้าไปในกระเพาะ เซลล์กระเพาะอาหารถูกกระตุ้นให้หลั่งกรดเกลือ (HCl) ออกมา ซึ่งแยกเป็น H^+ และ Cl^- กรดไปทำให้เอนไซม์ย่อยอาหารและช่วยฆ่าแบคทีเรียที่เข้าไปกับอาหาร แต่ถ้าเรากินอาหารมากเกินไปจะทำให้เซลล์สร้างและหลั่งกรดในกระเพาะมากเกินไป **"Acid stomach"** และถ้าเรากินยาลดกรด (antacid) เช่น นม magnesia เมื่อนม magnesia ละลาย จะปล่อย Mg^{2+} และ OH^- OH^- จะไปรวมกับ H^+ ซึ่งมีมากอยู่แล้วในน้ำย่อย ช่วยให้กรดในกระเพาะลดลง

6.2 เกลือ

เกลือ (Salts) ปกติกรดรวมกับด่างได้ ionic compound เรียกว่าเกลือ "Salt" เกลือละลายหรือเป็นผลึกขึ้นอยู่กับ pH เช่น เกลือ NaCl

$$HCl + NaOH \rightarrow NaCl + H_2O$$

(acid) (base) (salt)

$NaCl \rightarrow Na^+ + Cl^-$

เกลือหลายชนิดละลายอยู่ในรูปของ ions ซึ่ง ions เหล่านั้นทำหน้าที่สำคัญในเซลล์ช่วยรักษาสมดุลย์ acid-base ของร่างกาย

6.3 Buffer

Buffers คือ ระบบสารละลาย (ด้วยน้ำ) ของกรดอ่อนกับคู่ conjugate ที่ต้านต่อการเปลี่ยนแปลงที่ (ช่วง) pH ของระบบสารละลาย Buffer system ประกอบด้วยกรดอ่อน (proton donor) และ conjugate base (proton acceptor) ที่ความเข้มข้นของอิออนกรดเท่ากับความเข้มข้นของ conjugate base เช่น

กรด HA สูญเสีย proton H^+ และได้ conjugate A^- เราจะหาค่า Equilibrium constant K ได้ดังนี้

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

$$K' = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Equilibrium constants, K สำหรับปฏิกิริยาสลาย ions เรียกว่า **Ionization constant** หรือ **Dissociation constant** ค่า K' แสดงในรูปของ pK' ซึ่งได้จากสมการ

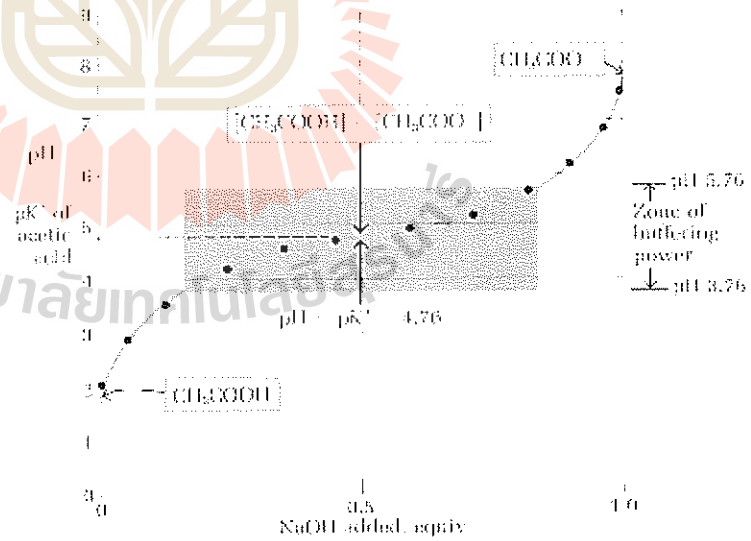
$$pK' = \log\frac{1}{K'} = -\log K'$$

p เป็น negative logarithm ทั้งใน pH และ pK' **กรดยิ่งแรงมาก ค่า pK' ยิ่งน้อยลง**

เมื่อทำ "Titration" กรดที่ไม่รู้ความเข้มข้นกับสารละลายด่างที่รู้ความเข้มข้นแล้ว ใส่ด่างลงไปทีละน้อยพร้อมวัด pH จนสารละลายกรดเป็นกลาง ปริมาณและความเข้มข้นของด่างที่ใส่ลงไป สามารถนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของกรดได้ นำค่า pH ของสารละลายกรดที่เปลี่ยนไปและปริมาณของด่างมา plot เป็น "Titration curve" ที่ **midpoint ของ titration** equivolume ของด่างที่ใส่จะเท่ากับ ½ ของกรดเมื่อเริ่มต้นที่ได้แตกตัว (dissociate) ไปแล้ว นั่นคือจุดที่ **[HA] = [A⁻] ความสัมพันธ์ (relationship) ของ equimola ของกรดกับด่าง ณ จุด midpoint นี้ก็คือ pH และ pH นี้จะเท่ากับ pK' ของกรด** (รูปที่ 11) ความสัมพันธ์นี้ใช้ได้กับ weak acid ทั้งหมด

จาก titration curve จะเห็นได้ว่า กรดอ่อน และ anion (-) ของกรดนั้นสามารถทำหน้าที่เป็น **"Buffer" ซึ่งก็คือบริเวณที่ pH เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเพิ่ม [A⁻] หรือ [H⁺] บริเวณนี้เรียกว่า "Buffering region"**

Buffer system จึงเป็นระบบป้องกันแรกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ในร่างกาย ใน mammal มี buffers 2 ระบบ คือ



รูปที่ 11. Titration curve ของ Acetic acid แสดง pH = pK' และ buffering zone

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1) Phosphate buffer system

Phosphate buffer system สำคัญใน Intracellular fluid ประกอบด้วย conjugate $H_2PO_4^-$ - HPO_4^-

$$H_2PO_4^- \rightleftharpoons H^+ + HPO_4^{2-}$$

(proton donor) (proton acceptor)

ระบบนี้ มีประสิทธิภาพใกล้ pH 6.86 (เพราะ pK' ของ $H_2PO_4^-$ = 6.86) ต่อต้านการเปลี่ยน pH ช่วง 6.1 – 7.4 ในขณะที่ intracellular fluid มี pH ช่วง 6.9 – 7.4

2) **Bicarbonate buffer system**

Bicarbonate buffer system สำคัญในเลือด ประกอบด้วย conjugate H_2CO_3 - HCO_3^-

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

(proton donor) (proton acceptor)

pH ของ bicarbonate buffer system ขึ้นกับความเข้มข้นของ H_2CO_3 และ HCO_3^- แต่ความเข้มข้นของ H_2CO_3 ขึ้นกับความเข้มข้นของ CO_2 ที่ละลายในเลือดซึ่งขึ้นกับ partial pressure ของ CO_2 ใน gas phase ดังนั้น pH ของ bicarbonate buffer ที่สัมผัสกับ gas phase จึงพิจารณาได้ จากความเข้มข้นของ HCO_3^- ใน aqueous phase และ partial pressure ของ CO_2 ใน gas phase ระบบนี้เป็น physiological buffer ที่มีประสิทธิภาพใกล้ pH 7.4

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เคมีของชีวิต : สารประกอบอินทรีย์

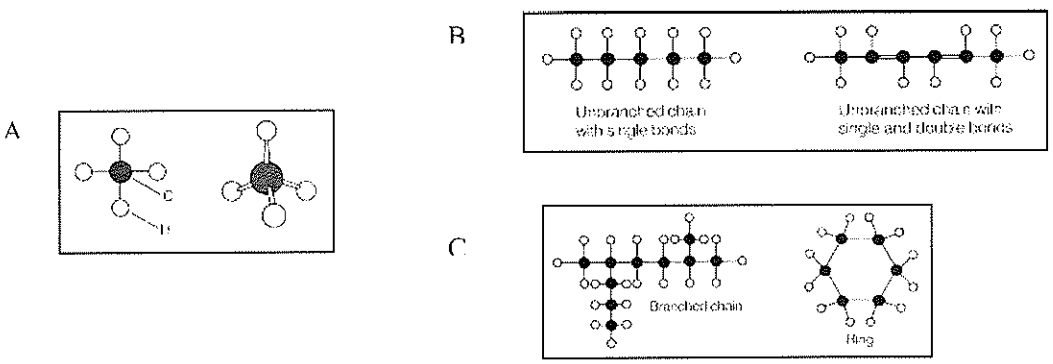
(Chemical Composition of Living Matter : Organic Compound)

รองศาสตราจารย์ ดร. กรกช อินทราพิเชฐ

เคมีของชีวิตวนเวียนอยู่กับธาตุ **Carbon** ซึ่งเป็นธาตุที่มีมากกว่าครึ่งหนึ่งของน้ำหนักแห้งของตัว carbon คล้าย hydrogen, oxygen และ nitrogen คือสามารถทำ "Covalent bonds" (bonds ที่เกิดจากการร่วมกันใช้ electron pairs) Hydrogen ต้องการ 1 electron, Oxygen ต้องการ 2, Nitrogen ต้องการ 3 และ Carbon ต้องการ 4 electrons เพื่อให้เต็ม shell ชั้นนอก ดังนั้น carbon atom สามารถร่วมใช้ electron ได้ 4 คู่

1. Carbon Compound

Carbon compound ร่วมใช้ electron เป็น **Single bond** ได้กับ hydrogen, oxygen หรือ nitrogen แต่ที่สำคัญในชีววิทยา คือ ความสามารถของ carbon atom ในการร่วมใช้ electron pairs กับ carbon atom ด้วยกันเอง เพื่อให้เกิด **"Carbon-carbon single bond"** ที่เสถียรมาก แต่ละ carbon atom สามารถทำ single bond กับ 1, 2, 3 หรือ 4 carbon atoms ก็ได้ ยิ่งกว่านั้น 2 carbon atoms สามารถร่วมใช้ electrons 2 คู่ด้วยกัน ได้เป็น **"Carbon-carbon double bond"** carbon atom ที่ต่อกันด้วย covalent bonds เช่นนี้ทำให้เกิดโครงสร้างหลายรูปแบบ เช่น linear chains, branched chains, cyclic และ cage-like structures (รูปที่ 12) แบบผสมของทั้งหมดได้เป็นแกนโครงสร้าง หรือ **แกนกระดูก- Backbone** ของโมเลกุลสารอินทรีย์ต่าง ๆ หลายชนิด โมเลกุลที่มี backbone เป็น carbon ต่อกันด้วย covalent bonds เรียกว่า สารประกอบอินทรีย์ **"Organic compound"** เนื่องจากชีวโมเลกุลเป็นสารประกอบ carbon เกือบทั้งหมด อาจเป็นได้ว่า ธาตุ carbon ทำ bonds ได้กว้างขวาง สารประกอบ carbon จึงถูกเลือกสำหรับเป็นโมเลกุลเครื่องจักรของเซลล์ระหว่างการกำเนิดและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต



รูปที่ 12. A: Carbon ทำ Covalent bonds ได้สูงสุด 4 bonds. B: Unbranched chains ที่มี Single bonds และ Double bonds. C: Branched chain และ Cyclic carbon compounds.

2. รูปร่างและมิติของสารประกอบอินทรีย์ - Shapes and Dimensions

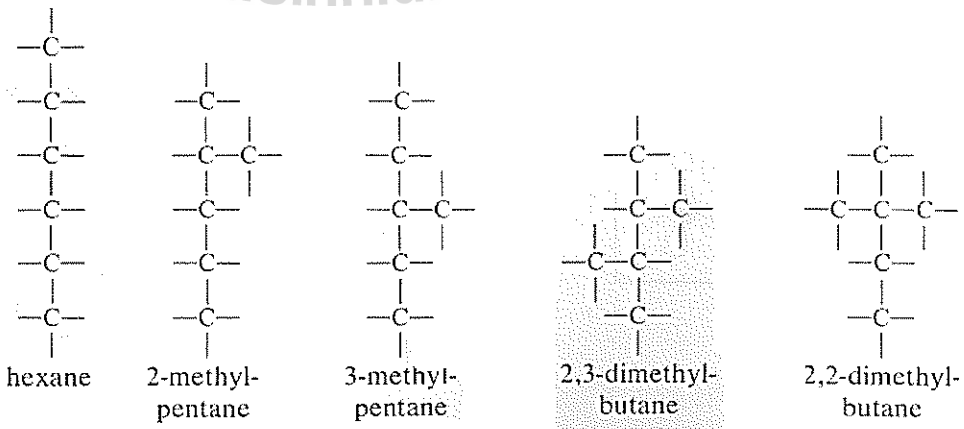
Covalent single bonds ทั้ง 4 bonds ของ carbon atoms วางเรียงเป็น 4 มุม (tetraheral) มุมละประมาณ 109.5° ระหว่าง 2 bonds มุมนี้อาจเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในสารประกอบอินทรีย์ที่ต่างกัน ด้วยคุณลักษณะนี้ สารประกอบอินทรีย์ของ carbon สามารถมีโครงสร้าง 3 มิติ (three-dimensional structure) ได้หลายแบบ แสดงให้เห็นถึงความซับซ้อนของโครงสร้างภายในเซลล์ ซึ่งมีสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้มุมของ single bond ยังสามารถหมุนได้อิสระรอบ carbon atom ยกเว้นที่มี group อื่นที่ยึดติดอยู่ใหญ่มากหรือมี charge มาก การหมุนอาจจำกัด ดังนั้นโมเลกุลสารอินทรีย์ที่มีหลาย single bonds จึงมีโครงสร้าง 3 มิติได้หลายแบบ ซึ่งเรียกว่า **"Conformation"** โครงสร้าง 3 มิตินี้ สำคัญมากในปฏิกิริยาระหว่าง catalytic site ของ enzyme กับ substrate ที่จะทำให้โมเลกุลทั้ง 2 เข้ากันได้พอดี นอกจากนี้ การจับกันของ hormone กับ receptor ที่ผิวของเซลล์ การสังเคราะห์ (replication) ของ DNA และกิจกรรมอื่น ๆ ของเซลล์เกิดขึ้นได้อย่างถูกต้องเพราะโครงสร้าง 3 มิติ (Conformation) จาก substituent groups หมุนได้อิสระรอบ single bonds ของ carbon atom นั่นเอง

2.1 Isomerism

Isomerism หมายถึง การที่สารประกอบที่มี molecular formula เหมือนกันและมี chemical bonds ชนิดเดียวกัน แต่มีโครงสร้างแตกต่างกันอย่างชัดเจน (iso = เหมือน, mer = หน่วยโมเลกุล เป็นจำนวนนับได้) สารเหล่านั้นมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีเป็นของตัวเอง สารประกอบที่มีสูตรโมเลกุลเหมือนกันแต่โครงสร้างโมเลกุลไม่เหมือนกันเช่นนี้ เรียกว่า **"Isomers"** isomerism เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สารประกอบอินทรีย์มีมากมายหลายชนิด

2.1.1 Structural Isomer

Isomer ที่เกิดจากโครงสร้างของสารประกอบอินทรีย์ที่มี carbon atom เป็น backbone carbon atom มี 4 bonds เมื่อจำนวนของ carbon atomsใน backbone เพิ่มมากขึ้น อะตอมจึงจับกันได้หลายแบบ สลับโครงสร้างที่ไม่เหมือนกัน (nonequivalent alternate structures) ได้หลายแบบ เช่น สารประกอบอินทรีย์ที่มี carbon 6 อะตอม มี molecular formula เดียว คือ C_6H_{14} (saturated hydrocarbon alkane) (รูปที่ 13)

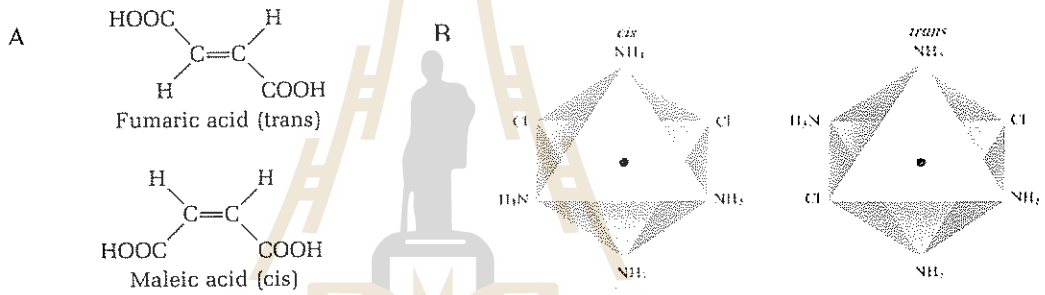


รูปที่ 13. Structural isomers ของ Alkane, C_6H_{14} สูตรโมเลกุลเดียว สำหรับทุกโครงสร้างของสาร

2.1.2 Geometric isomer หรือ *cis-trans* Isomer

Isomer ทางเรขาคณิต เกิดเมื่อ carbon atom 2 อะตอม ทำ double bond กัน ในแต่ละอะตอมมี 1 double bond และ 2 single bonds ทั้ง 3 bonds วางในแนวราบและทำมุม 120° ต่อกันและกัน double bond หมุนอิสระไม่ได้ ขณะที่ single bonds ของแต่ละ carbon atom ซึ่งมีอะตอม 2 กลุ่มที่เหมือนกันยึดติดอยู่ และ single bonds หมุนได้ ทำให้ (1) ถ้าอะตอม 2 กลุ่มอยู่ใกล้กัน หรือ **อยู่ด้านเดียวกันของ double bond ในแนวระนาบ** เรียก isomer นี้ว่า ***cis* form** (2) ถ้าอะตอม 2 กลุ่มอยู่ไกลกัน หรือ**อยู่คนละด้านของ double bond ในแนวระนาบ** เรียก isomer นี้ว่า ***trans* form** (รูปที่ 14)

Geometrical หรือ ***cis-trans* isomers** จึงเป็น **"Configuration"** ของโมเลกุลซึ่งต่างกันที่การจัดเรียงของ substituent groups เมื่อเทียบกับ double bonds ที่หมุนไม่ได้ *cis* และ *trans* isomers ไม่สามารถเปลี่ยนรูปแบบระหว่างกันและกันได้ ถ้าไม่แตก covalent bonds 1 หรือ 2 bonds เช่น Maleic acid (*cis*) กับ Fumaric acid (*trans*) ทั้ง 2 isomers นี้จึงสามารถแยกออกจากกันให้บริสุทธิ์ได้เป็นสารต่างชนิดกัน



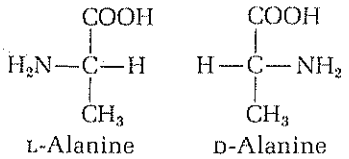
รูปที่ 14. Geometric isomer หรือ *cis-trans* isomer. A. Fumaric acid และ Maleic acid B. $[Pt(NH_3)_4Cl_2]Cl_2$

2.1.3 Enantiomers หรือ Optical Isomers

Isomer ที่เป็นภาพกระจกเงาของกันและกัน แต่ไม่สามารถวางซ้อนกันได้สนิท เกิดจากความแตกต่างของอะตอมหรือ functional (constituent) groups ที่จับอยู่กับ single bonds ทั้ง 4 ของ carbon และหมุนไม่ได้ในระนาบ โดยเอา carbon เป็นศูนย์กลาง isomers ทั้ง 2 มีความสัมพันธ์ต่อกันเหมือน **มือขวากับมือซ้าย ซึ่งไม่เคยวางซ้อนกันได้พอดี** หรือมือขวาใส่ถุงมือข้างซ้ายไม่ได้ isomers แบบนี้จึงเรียกว่า **D isomer และ L isomer** สารประกอบที่ให้ isomer แบบนี้ เรียกว่า **Chiral Compound** (Greek : chiros = hand) เช่น D-Alanine กับ L-Alanine ซึ่งเป็น amino acid ในโปรตีน และ D-Glyceraldehyde กับ L-Gluceraldehyde ของ carbohydrate (รูปที่ 15) **Enantiomers หรือ Optical isomers หรือ Stereoisomers** มีปฏิกิริยาเหมือนกันทุกประการ แต่ต่างกันทางคุณสมบัติทางกายภาพ คือความสามารถในการหมุนระนาบของ plane-polarized light ที่ต่างกัน (หมุนขวากับซ้าย) chiral molecules ในสิ่งมีชีวิต ปกติจะพบเพียง isomer ที่เป็นไปได้ isomer เดียวเท่า

นั้น chiral compound สร้างโดย enzymes ในลักษณะการสร้างให้ได้เพียง isomer เดียว เพราะโมเลกุลของ enzymes ก็เป็น chiral structures เช่นกัน

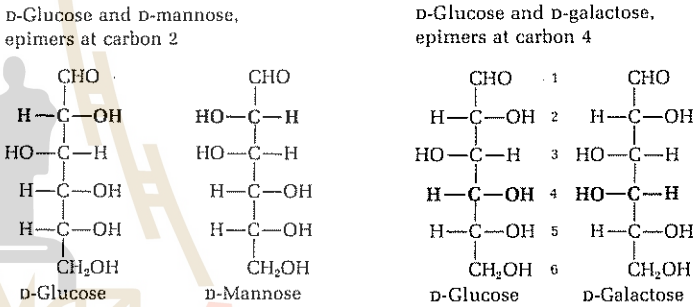
รูปที่ 15. Enantiomer หรือ Optical isomer ของ Alanine



2.1.4 Epimers

น้ำตาล 2 โมเลกุลแตกต่างกันเพียงโครงสร้างทางเลขาคณิต "Configuration" รอบ carbon atom เฉพาะอะตอมใดอะตอมหนึ่ง โมเลกุลทั้ง 2 เรียก **Epimers** เช่น (รูปที่ 16) D-Glucose เป็น epimer กับ D-Mannose โดยดูความแตกต่างที่ Carbon atom ที่ 2 และ D-Glucose เป็น epimer กับ D-Galactose โดยดูความแตกต่างที่ carbon atom ที่ 4

รูปที่ 16. Epimers ของ Glucose

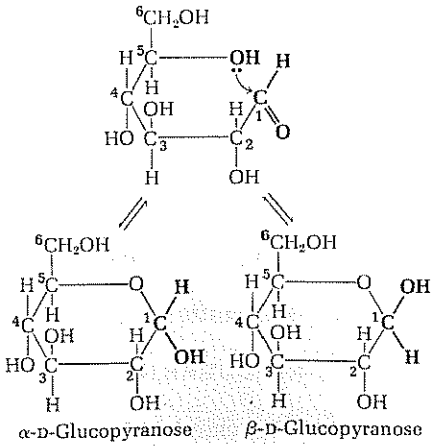


2.1.5 Anomers

Monosaccharide เป็น ring structure มี 2 isomers ที่คุณสมบัติต่างกันเล็กน้อย isomers ทั้ง 2 เกิดปฏิกิริยาระหว่าง aldehyde กับ alcohol ได้อนุพันธ์เรียกว่า **"Hemiacetal"** เป็น ring structure (pyranose) 2 forms คือ α และ β hemiacetal และ carbonyl carbon atom นี้เรียกว่า **Anomeric carbon** โดย α-form มี -OH อยู่ด้านล่าง และ β-form มี -OH อยู่ด้านบนของ anomeric carbon atom เช่น (รูปที่ 17)

α – D-Glucopyranose กับ β – D-Glucopyranose และ α – D-Fructofuranose กับ β – D-Fructofuranose

รูปที่ 17. Anomer. สอง forms ของ Glucopyranose.



3. Function Groups of Organic Biochemicals

สารประกอบชีวอินทรีย์เกือบทั้งหมดเป็นอนุพันธ์ของ "Hydrocarbons" ซึ่งประกอบด้วย carbons และ hydrogens โดยมี carbon เป็น backbone เชื่อมต่อกันด้วย covalent bonds และ bonds ส่วนที่เชื่อมต่อกับ hydrogen backbone ของ hydrocarbons เสถียรมาก เพราะ carbon-carbon single bond และ carbon-carbon double bond ร่วมใช้ electrons pairs เท่ากัน ส่วน hydrogen atom 1 หรือ ≥ 1 อะตอม อาจถูกแทนที่ได้ด้วยกลุ่มหน้าที่ "**Functional group**" ทำให้ได้เป็น organic compounds กลุ่มต่าง ๆ (ตารางที่ 1) ตามคุณสมบัติของ functional group ซึ่งทั่วไปแล้วแบ่งได้เป็น

3.1.1.1 Alcohols : organic compounds ที่มี 1 หรือ ≥ 1 Hydroxyl group

3.1.1.2 Amines: organic compound ที่มี Amino group

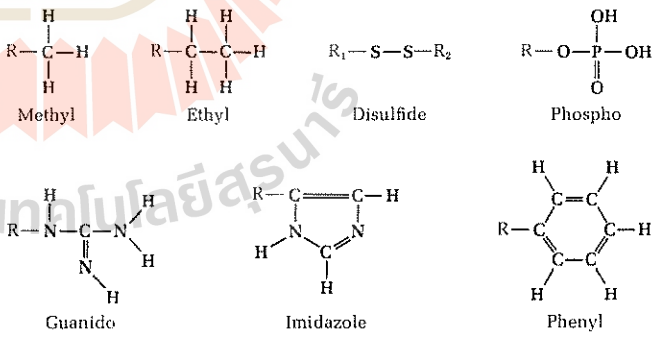
3.1.1.3 Ketones : organic compounds ที่มี Carbonyl groups

3.1.1.4 Acids : organic compounds ที่มี Carboxyl groups

และกลุ่มอื่น ๆ อีกดังตารางที่ 1 และ รูปที่ 18

ตารางที่ 1. Functional groups ของ Organic compounds.

Functional group	Structure	Family
Hydroxyl	$R_1—O—H$	Alcohols
Aldehyde	$R_1—C(=O)—H$	Aldehydes
Carbonyl	$R_1—C(=O)—R_2$	Ketones
Carboxyl	$R_1—C(=O)—OH$	Acids
Amino	$R_1—NH_2$	Amines
Amido	$R_1—C(=O)—NH_2$	Amides
Thiol	$R_1—S—H$	Thiols
Ester	$R_1—C(=O)—O—R_2$	Esters
Ether	$R_1—O—R_2$	Ethers



รูปที่ 18. Functional groups ที่พบใน Biomolecules

Functional group ของสารชีวอินทรีย์เหล่านี้ทำปฏิกิริยาเคมีได้ดีกว่า hydrocarbon backbone ซึ่งอิ่มตัวแล้ว และไม่ถูกกระทำโดยสารเคมี ส่วนให้ functional group สามารถเปลี่ยนแปลงการกระจายของ electrons และกระทำต่อรูปทรงเลขาคณิตของอะตอมข้างเคียงได้ functional group ในสารชีวอินทรีย์จึงให้ผลกระทบต่อปฏิกิริยาเคมีของสารอินทรีย์ทั้งโมเลกุล ดังเห็นได้จาก enzymes ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีของเซลล์มีชีวิต หน้าที่ของ

enzymes บอกได้จาก functional groups และคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาที่มีอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุล enzymes นั่นเอง

สารชีวโมเลกุลส่วนมากมี functional groups 2 หรือมากกว่า 2 functional groups เป็น "**Polyfunctional**" แต่ละ functional group มีคุณสมบัติและปฏิกิริยาของตนเอง เช่น "Amino acids" ซึ่งเป็น building blocks ของโปรตีน amino acids ประกอบด้วย อย่างน้อย 2 functional groups ที่ต่างกันคือ Amino groups และ Carboxyl group เช่น alanine และ simple sugar "Glucose" เป็นอีกตัวอย่างหนึ่งของ polyfunctional biomolecules glucose มี 2 functional groups คือ Hydroxyl group และ Aldehyde group จะเห็นได้ว่า functional group ของชีวโมเลกุลมีบทบาทสำคัญมากใน biological activities

4. การใช้สารประกอบอินทรีย์ของเซลล์ - How Cells Use Organic Compounds

Enzymes ซึ่งเป็นโปรตีนเร่งปฏิกิริยาเคมีของเมตาโบลิซึม โดยปฏิกิริยา 5 อย่าง ที่ทำให้ชีวโมเลกุลรวมกัน จัดเรียงใหม่ และแตกสลาย

4.1 Functional-group transfer : โมเลกุลหนึ่งให้ functional group แก่อีกโมเลกุลหนึ่ง ซึ่งเป็น acceptor

4.2 Electron transfer : electron หนึ่งหรือมากกว่าถูกเอาออกจากโมเลกุลหนึ่งให้อีกโมเลกุลหนึ่ง

4.3 Rearrangement : สลับ internal bonds เปลี่ยนสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งไปเป็นอีกชนิดหนึ่ง

4.4 Condensation : สองโมเลกุลรวมกันโดย covalent bonding ให้เป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น

4.5 Cleavage : แยกโมเลกุลให้เป็น 2 โมเลกุลที่เล็กกว่า

ตัวอย่างเช่น

(1) หลาย Condensation reactions ที่ enzyme เอา hydroxyl group ออกจากโมเลกุลหนึ่ง และเอาอะตอม hydrogen ออกจากอีกโมเลกุลหนึ่ง แล้วทำ covalent bond ระหว่าง 2 โมเลกุลนั้นได้เป็นโมเลกุลใหม่ ส่วน hydroxyl group และ hydrogen รวมกันกลายเป็นน้ำ ตัวอย่างนี้จะเห็นได้ในการรวมโมเลกุลของแป้ง และ polymer อื่น ๆ ด้วย condensation reactions ที่ซ้ำ ๆ กัน

"Polymer" โมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วย ตั้งแต่ 3 subunits ถึง ล้าน subunits ซึ่งเหมือนกันหรือไม่เหมือนกัน แต่ละ subunit เรียกว่า "Monomer"

(2) Cleavage reactions ซึ่งเรียกว่า "Hydrolysis" คล้ายกับการย้อนกลับของ condensation enzyme แตกแยก covalent bond ที่ functional group แยกโมเลกุลออกเป็น 2 ส่วน ในเวลาเดียวกัน -H และ -OH ซึ่งได้การแตกตัวของน้ำจับเข้าที่ exposed sites reaction แบบนี้พบทั่วไปในเซลล์ในการ hydrolyze (แยกโมเลกุลด้วยน้ำ) แป้งและ polymers อื่น ๆ ให้ได้เป็น subunits เช่น ให้เป็น building blocks หรือ energy sources.

5. โมเลกุลของชีวิต - Molecules of Life

ภายใต้เงื่อนไขทางภายภาพที่มีอยู่บนโลก มีเพียงเซลล์มีชีวิตเท่านั้นที่สามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์ Carbohydrate, Lipid, Protein และ Nucleic acid ซึ่งทั้งหมดเป็นคุณลักษณะทางโมเลกุลของชีวิต และหน้าที่

ของสารเหล่านี้ก็ต่างกัน เช่น เป็น energy packets, energy stores, structural materials, metabolic workers และ libraries ของข้อมูลพันธุกรรม (hereditary information)

5.1 Carbohydrate

Carbohydrate เป็นสารประกอบอินทรีย์ sugar ที่โมเลกุลประกอบขึ้นด้วย 1 หรือมากกว่า 1 หน่วย Carbohydrate เป็นชีวโมเลกุลที่มีมากที่สุด และเซลล์ใช้เป็น (1) โครงสร้าง (2) พลังงานที่ส่งถ่ายไปมา และ (3) พลังงานสะสม

5.1.1 Monosaccharide หรือ Simple Sugar

Monosaccharide น้ำตาลเชิงเดี่ยว (หน่วยเดียว) (saccharide = น้ำตาล) ในโมเลกุลมี 2 hydroxyl groups และ aldehyde หรือ ketone อีก 1 group simple sugar ส่วนมากมีรสหวาน ไม่มีสี เป็นผลึกแข็ง และละลายในน้ำ แต่ไม่ละลายใน nonpolar solvent

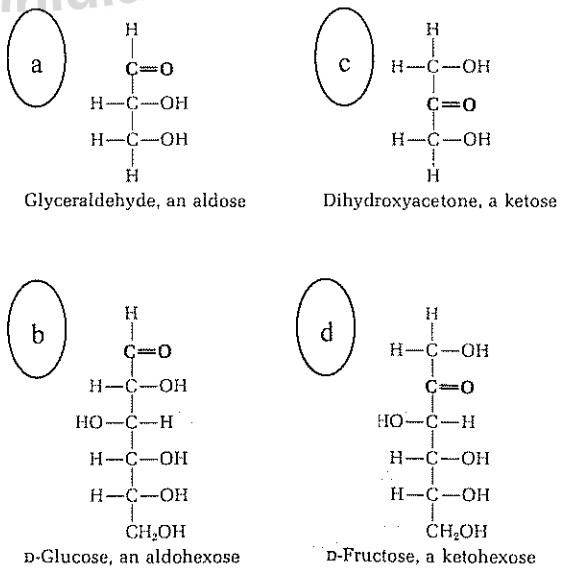
Manosaccharide มี backbone เป็น carbon 5 หรือ 6 อะตอม ซึ่งเมื่อละลายในของเหลวในร่างกาย หรือในเซลล์มีแนวโน้มเป็น ring structure ในธรรมชาติมีมากที่สุดคือ ribose และ deoxyribose ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ RNA และ DNA มี 5 carbon atoms ส่วน glucose มี 6 carbon atoms glucose เป็นแหล่งพลังงานหลักของสิ่งมีชีวิตส่วนมาก นอกจากนี้ glucose เป็นโมเลกุลเริ่มต้น (precursor) ของสารประกอบหลายชนิด และเป็น building blocks ของ carbohydrate ขนาดใหญ่กว่า สารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของ sugar monomer มี 3 ชนิด (1) Glycerol (sugar) เป็นส่วนประกอบของไขมัน

(2) Vitamin C (sugar acid) มีบทบาทในโภชนาการอาหาร (nutrition)

(3) Glucose-6-phosphate (sugar phosphate) เป็นสารตัวแรกที่เข้าไปในวิถีปฏิกิริยาหลักในเซลล์ รวมทั้งการหายใจแบบใช้ oxygen (aerobic respiration)

Monosaccharide มี 2 families คือ Aldose และ Ketose (รูปที่ 19)

Aldose เป็น monosaccharide ที่มี carbonyl group (C = O) อยู่ที่ปลายของ carbon chain



รูปที่ 19. Monosaccharides

C_3 : Aldose และ Ketose

C_6 : Aldohexose และ Ketohexose

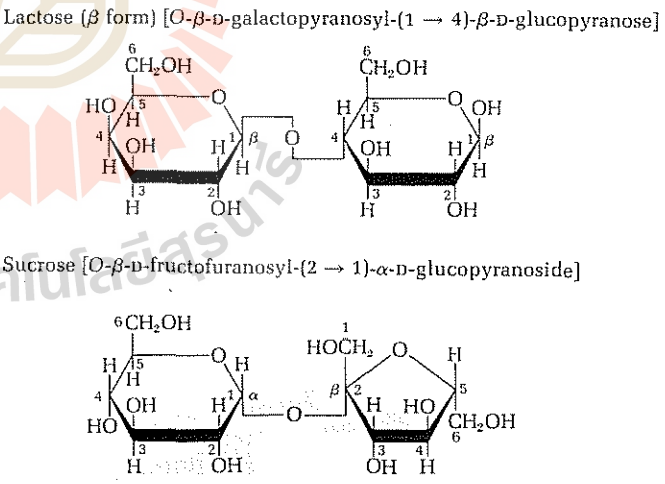
monosaccharide นี้เป็น aldehyde เช่น C_3: Glyceraldehyde ก็คือ Aldose (รูปที่ 19, a), C_6: D-Glucose ก็คือ Aldohexose (รูปที่ 19, b), D-Ribose ใน RNA และ 2-Deoxy-D-ribose ใน DNA

Ketose เป็น monosaccharide ที่มี carbonyl group อยู่ที่ตำแหน่งอื่นที่ไม่ใช่ปลายของ carbon chain เช่น C_3: Dihydroxyacetone (รูปที่ 19, c) ซึ่งก็คือ Ketose และ C_6: D-Fructose ก็คือ Ketohexose (รูปที่ 19, d)

Monosaccharides เป็น reducing agents สามารถ reduce oxidizing agents ได้ง่าย เช่น ferri-cyanide, hydrogen peroxide หรือ cupric ion โดยน้ำตาลถูก oxidized ที่ carbonyl group (ทบทวน : reducing agent เป็น electron donor และ oxidizing agent เป็น electron acceptor) glucose และน้ำตาลอื่นที่มีความสามารถเป็น reducing agent เรียกว่า **Reducing sugar** คุณสมบัตินี้ใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์น้ำตาล โดยวัดจากปริมาณของ oxidizing agent ซึ่งถูก reduced ด้วยน้ำตาล ใช้ประโยชน์วิเคราะห์หาปริมาณ glucose ในเลือดและในปัสสาวะเพื่อการวินิจฉัยโรคเบาหวาน "Diabetes millitus" ซึ่งน้ำตาลในเลือดมากเกินปกติจนร่างกายขับออกมากับปัสสาวะ

5.1.2 Oligosaccharide

Oligosaccharide เป็นน้ำตาลสั้น ๆ ของ 2 หรือมากกว่า 2 หน่วยน้ำตาล ถ้าประกอบด้วย 2 หน่วย เรียกว่า Disaccharide ซึ่งที่รู้จักกันดีคือ lactose (glucose-galactose), sucrose (glucose-fructose) maltose [glucose-glucose : glycosidic α (1 $\rightarrow$ 4) linkag] และ cellobiose [glucose-glucose : glycosidic β (1 $\rightarrow$ 4) linkage] (รูปที่ 20)



รูปที่ 20. Disaccharides, Lactose และ Sucrose

Lactose ในน้ำนมสัตว์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Lactase จากลำไส้เล็ก เอนไซม์ทำงาน (active) ในทารกที่กำลังดูดนม ส่วนมากในผู้ใหญ่ชาวตะวันออก อาหรับ ยิว อินเดีย ชาวเมดิเตอเรเนียน และชาวอัฟริกันส่วนมากเป็นชนเผ่าที่รับ lactose ไม่ได้ (lactose intolerance) เพราะขาดการสร้างเอนไซม์ lactase จะมีชาวยุโรปทางเหนือและอัฟริกัน บางเผ่าที่คงมี lactase ในวัยผู้ใหญ่ เมื่อ lactose ไม่ถูกย่อยจึงไม่ถูกดูดซึมเข้าเส้นเลือด เหลือตกค้างในกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดอาหารท้องเสียและปวดท้อง

Sucrose หรือ น้ำอ้อย - cane sugar สร้างโดยพืชหลายชนิด แต่สัตว์ชั้นสูงสร้างไม่ได้ (ตรงข้ามกับ lactose ที่พืชสร้างไม่ได้) พืชเปลี่ยน carbohydrate จากการสังเคราะห์แสงให้เป็น sucrose ที่ใบแล้วส่งไปยังส่วนอื่น ๆ ของพืช

เมล็ดพืชเมื่องอกครั้งแรก ต้นกล้าจะผลิต hydrolytic enzymes สลายแป้งซึ่งเก็บสะสมในเนื้อเยื่อภายในเมล็ดให้เป็น maltose ต้นกล้าใช้ maltose เป็นแหล่งพลังงานให้พืชเจริญโตได้เร็ว

5.1.3 Polysaccharide

Polysaccharide หรือ Glycan เป็นสายตรงหรือแตกแขนงของ monasaccharide chains ซึ่งแตกต่างกันขึ้นกับ monosaccharide units และ ความยาวของสายแตกแขนงมากน้อยเพียงใด (รูปที่ 21)

ถ้าประกอบขึ้นด้วย monomeric unit ชนิดเดียวเรียกว่า **Homopolysaccharide** เช่น Starch และ Cellulose มี D-glucose units ชนิดเดียว

ถ้าประกอบขึ้นด้วย monomeric units หลายชนิด เรียกว่า **Heteropolysaccharide** เช่น hyaluronic acid ของ connective tissue ซึ่งประกอบด้วย sugar units 2 ชนิดสลับกันคือ D-glucoronic acid และ N-acetyl-D-glucosamine

พืชเก็บน้ำตาลในรูปของแป้ง - starch สัตว์เก็บน้ำตาลในรูปของไกลโคเจน - glycogen

Starch : ประกอบด้วย glucose polymer 2 ชนิดคือ (1) **α-amylose** เป็นสายยาวและไม่แตกกิ่ง (long, unbranched chains) ของ D-glucose units และ (2) **amylopectin** เป็น highly branched chains ของ D-glucose ในโมเลกุลของ starch -OH group อยู่ด้านนอกของ chains ทำให้ถูก hydrolyzed ได้ง่าย เช่น ถ้าต้มมันจะได้ amylose แยกออกเป็นน้ำคล้ายนมสีค่อนข้างเหลือง ส่วนที่เหลือเป็น amylopectin

Glycogen : คล้าย amylopectin ในพืช แต่ branched มากกว่า และโมเลกุลอัดกันแน่นกว่า (รูปที่ 21) glycogen มีมากในตับถึง 7 % ของน้ำหนักเปียก และมีใน skeletal muscle ถ้าน้ำตาลในเลือดต่ำตับจะสลาย glycogen ให้เป็น glucose ปล่อยเข้าสู่เส้นเลือด และระหว่างการออกกำลังกล้ามเนื้อจะใช้ glycogen เพื่อให้พลังงานอย่างเร็ว

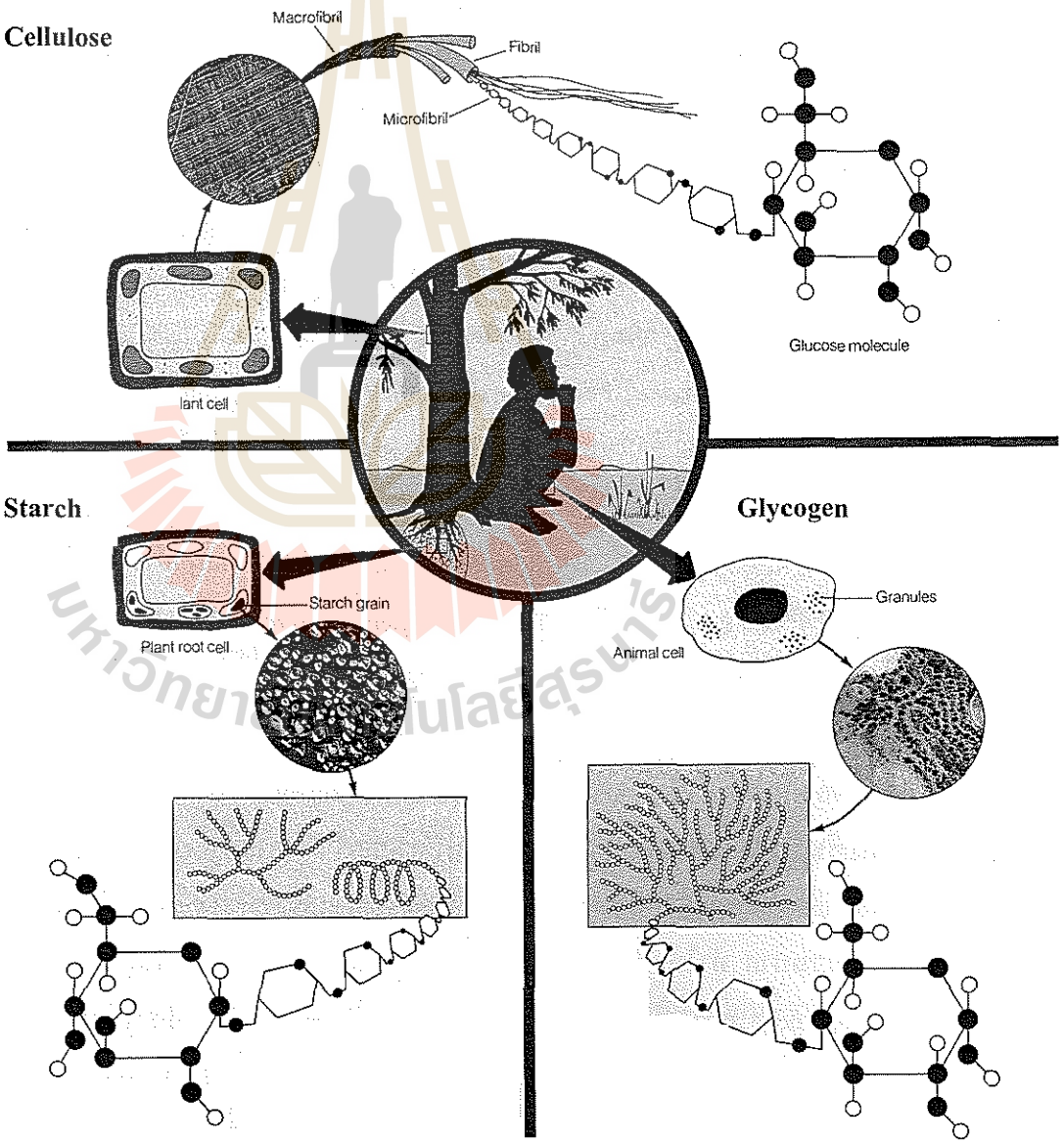
Cellulose: polymer ของ glucose เป็น extracellular structural elements ใน cell wall ของ unicellular microorganisms และพืชชั้นสูง cellulose เป็นเส้นใยที่เหนียวและไม่ละลายน้ำ cellulose chain โดย glucose ต่อกันเป็นสายตรงและ unbranched ด้วยพันธะ $\beta(1 \rightarrow 4)$ linkages และระหว่าง chain เรียงกันและยึดกันด้วย Hydrogen bonds จำนวนมาก ทำให้รวมกันเป็นมัดใหญ่แน่น และเหนียว เช่น ฝ้าย คือ cellulose ที่เกือบบริสุทธิ์ เนื้อไม้เป็น cellulose ที่ผสมกับ polymer อื่น สัตว์มีกระดูกสันหลังไม่มีเอนไซม์ย่อย cellulose ได้ เพราะ cellulose มี $\beta(1 \rightarrow 4)$ linkages แต่สัตว์สามารถใช้ cellulose เป็นพลังงานได้ ถ้าสัตว์นั้นมี microorganisms พวก termites ในกระเพาะอาหาร ช่วยสร้าง cellulase สลาย cellulose ให้เป็น glucose ก่อน

Chitin: เป็น exoskeleton ของสัตว์หลายชนิด เช่น แมลง กุ้ง ปู และ fungi ส่วนมาก chitin เป็น polymer

ของ N-acetyl-D-glucosamine ที่ต่อกันด้วย β linkage chitin ที่มี calcium carbonate จะแข็งเป็นเปลือกและกระดองสัตว์

Ligin : cellulose fibrils ที่มี polymer อื่นแทรกอยู่ด้วยช่วยให้กรอบโครงสร้าง (framework) ของเซลล์พืชแข็งแรงมาก ทนต่อแรงอัดได้ดี

โปรตีนและโมเลกุลขนาดใหญ่มักมี oligosaccharides ติดเป็น side chains 3 หรือมากกว่า 3 monomers เช่น **Glycoprotein** ซึ่งบางชนิดมีบทบาทสำคัญใน cell membrane และภูมิคุ้มกัน บางชนิดถูกหลั่งออกนอกเซลล์ เช่น **"Anti-freeze protein"** ช่วยลดจุดแข็งตัวของน้ำในเซลล์ให้ต่ำลง ไม่ให้น้ำในเซลล์เป็นน้ำแข็ง เช่นเดียวกับ NaCl ในเลือด anti-freeze protein รวมกับ NaCl ที่ความเข้มข้นสูงจะช่วยให้สัตว์ทนอุณหภูมิของขั้วโลกได้



รูปที่ 21. Polysaccharides: Cellulose, Starch และ Glycogen จากส่วนต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต

5.2 Lipid

Lipid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ละลายในน้ำ เป็นมัน และเป็นไข lipid เป็นชีวโมเลกุลอีกกลุ่มหนึ่งที่ สามารถแยกออกจากเซลล์และเนื้อเยื่อได้ด้วย nonpolar solvents สิ่งมีชีวิตใช้ lipid เป็นพลังงานสำรอง เป็นโครงสร้างของเยื่อชีวภาพ (biological membranes) เช่น cell membrane ซึ่งมีความสำคัญเป็นขอบเขตของเซลล์ ทำให้เซลล์จำกันได้ รวมกันเป็นเนื้อเยื่อ เป็นตัวรับ "receptor" รับฮอร์โมนและสัญญาณอื่นจากสิ่งแวดล้อม และเป็นที่อยู่ของเอนไซม์ที่สำคัญและระบบขนส่ง electrons ในการสร้างพลังงาน เช่น เยื่อใน mitochondria และ chloroplast lipid ที่มีมากที่สุดในสิ่งมีชีวิตคือ **Triacylglycerols** หรือ **Fats** lipid ส่วนมากมี Fatty acid เป็น building blocks lipid มีหลายชนิดแต่ละชนิดมีหน้าที่ต่างกัน

5.2.1 Fatty acid

Fatty acid เป็น long-chain organic acids มี backbone เป็นสายของ carbon atoms 4 ถึง 24 อะตอม ซึ่งเป็น nonpolar hydrocarbon "tail" ที่มี carboxyl group (-COOH) 1 กลุ่ม และที่เหลือเป็น hydrogen atoms

ถ้าสาย hydrocarbon มี carbon atoms ต่อกันด้วย single bonds ทั้งหมดเรียกว่า **"Saturated fatty acid"**

ถ้าสาย hydrocarbon มี carbon atoms ต่อกันด้วย single bonds และมี double bonds 1 หรือมากกว่า เรียกว่า **"Unsaturated fatty acid"** (ตารางที่ 2) ส่วนมากเกิดระหว่าง carbon atom 9 และ 10 ใช้สัญลักษณ์ Δ^9 ถ้า fatty acid มีหลาย double bonds เรียกว่า **Arachidonic acid**

ตารางที่ 2. Saturated fatty acids และ Unsaturated fatty acids

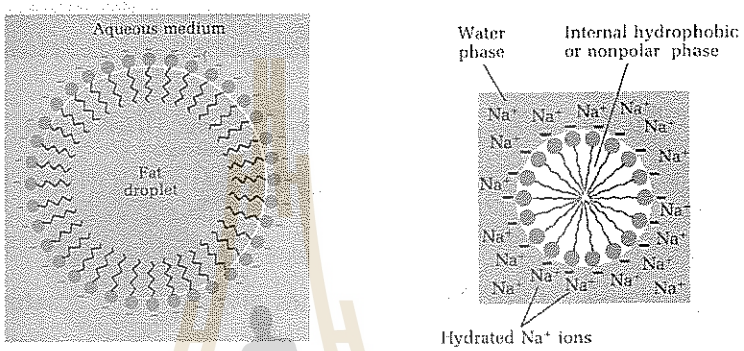
Structure	Systematic name	Common name
SATURATED FATTY ACIDS		
$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	*n*-Dodecanoic	Lauric
$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	*n*-Tetradecanoic	Myristic
$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	*n*-Hexadecanoic	Palmitic
$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	*n*-Octadecanoic	Stearic
$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	*n*-Eicosanoic	Arachidic
$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	*n*-Tetracosanoic	Lignoceric

Structure	Common name
UNSATURATED FATTY ACIDS	
$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Palmitoleic
$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Oleic
$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Linoleic
$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Linolenic
$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_3CH{=}CH(CH_2)_3COOH$	Arachidonic

Saturated fatty acid ใน substances เรียงกันแบบขนาน ทำให้ substance ค่อนข้างเป็นของแข็ง เช่น saturated fatty acids ที่มี 12-24 carbon atoms เป็นขี้ผึ้ง (wax)

Unsaturated fatty acid ตรงกันข้าม เป็นน้ำมัน (oily liquid) ที่อุณหภูมิร่างกาย

Fatty acids ไม่ละลายน้ำ แต่กระจายเป็นถุงไขมันทรงกลมเรียกว่า **"Micelles"** ใน NaOH หรือ KOH เจือจาง เปลี่ยน fatty acid ให้เป็นเกลือของ fatty acid เรียกว่า **Soap** hydrophobic tails ของ soap ยื่นเข้าไปในหยดไขมัน (grease droplets) และ polar head หรือ ionized carboxyl group ยื่นออกหาน้ำ ทำให้ได้ hydrophilic coat ล้อมรอบ grease droplets ปะปนอยู่ในน้ำ เป็น **Emulsion** (รูปที่ 22) สบู่ (soap) ที่มี Ca^{2+} และ Mg^{2+} มีความไม่ละลายน้ำสูงมาก ไม่กระจาย (emulsify) ไขมัน แต่ตกเป็นตะกอนขาว เช่น การใช้สบู่ซึ่งส่วนมากเป็น K^{+} soap กับน้ำกระด้างที่มีเกลือ Ca^{2+} และ Mg^{2+}

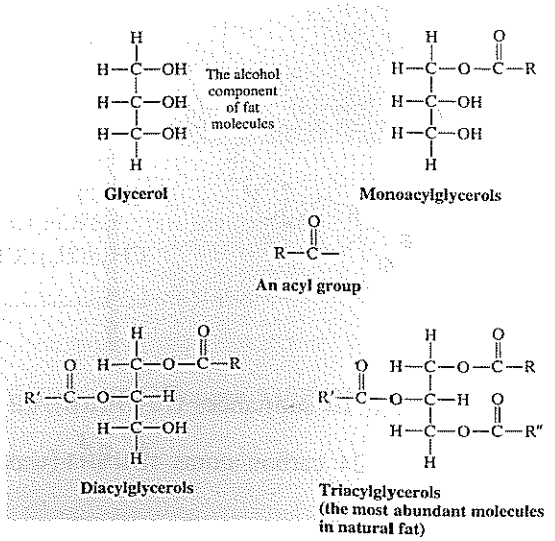


รูปที่ 22. ถุง Micelle ที่เกิดจากไขมันกระจายในน้ำ และ สบู่ (Soap)

5.2.2 Neutral Fats หรือ Triglycerides หรือ Triacylglycerols หรือ Fats

Neutral fats หรือ Triglyceride เป็น nonpolar และ hydrophobic เนื่องจากไม่มี charged หรือ polar functional groups เป็นส่วนประกอบหลักของ storage fats ในเซลล์พืชและสัตว์ แต่ไม่พบใน membranes เป็นฉนวน (insulator) ต่ออุณหภูมิต่ำ สัตว์เก็บ fats ไว้ใต้ผิวหนัง

Neutral fat โมเลกุลประกอบด้วย Fatty acid และ Glycerol ซึ่งเป็น backbone ของโมเลกุล ถ้า carbon atom ทั้ง 3 ตำแหน่งของ glycerol ถูกจับด้วย fatty acids ชนิดเดียวกัน เรียกว่า **Simple Triglyceride** (รูปที่ 23) ถ้าจับด้วย fatty acids 2 หรือมากกว่า 2 ชนิดที่แตกต่างกัน เรียกว่า **Mixed Triglyceride** (รูปที่ 24) fats ในธรรมชาติ เช่น น้ำมันมะกอก เนย และอาหารไขมันอื่นเป็น fat ผสม ระหว่าง simple และ mixed



รูปที่ 23. Neutral fats. Triglycerol (Triglyceride) เป็น Lipid ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ

triglyceride ที่มีความยาวและดีกรี saturation ของ fatty acids ต่าง ๆ กัน เช่น ไขมันวัวที่แข็งเป็นไขมีเฉพาะ saturated fatty acid น้ำมันมะกอกเป็นของเหลวมี unsaturated fatty acids ทั้ง 3 ตำแหน่งของ glycerol ส่วนเนยมีแบบผสมและ fatty acid chains ค่อนข้างสั้น เนยจึงมี melting point ต่ำ และนิ่มที่อุณหภูมิห้อง

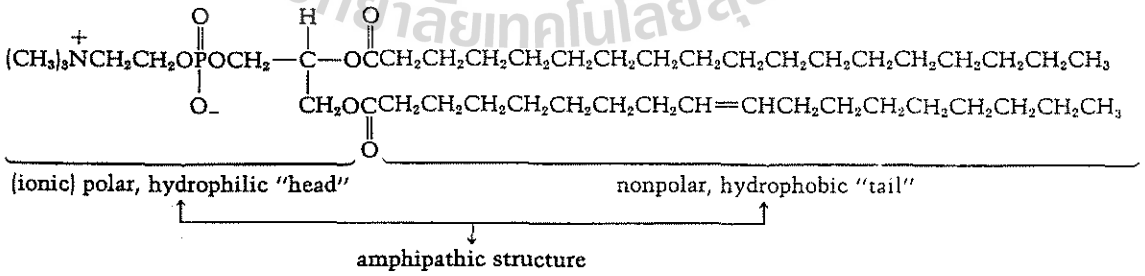
Neutral fat มี specific gravity ต่ำกว่าน้ำ น้ำมันจึงลอยอยู่เหนือน้ำ และ neutral fat ละลายใน nonpolar solvent เช่น chloroform, benzene หรือ ether จึงใช้สารทั้ง 3 ชนิดนี้สกัดไขมันจากเนื้อเยื่อ neutral fats ถูก hydrolyzed ได้ด้วยการต้มในกรด ด่าง หรือเอนไซม์ Lipase

Neutral fat ที่มี unsaturated fatty acid สูงมีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ถูกทำให้แข็งได้โดยใส่ hydrogen เข้าที่ double bonds เรียกว่า **Hydrogenation** เปลี่ยน double bonds ให้เป็น single bonds

เมื่อ neutral fats ที่มี unsaturated fatty acids สูง ถูกกับอากาศ มีแนวโน้มที่จะเกิดกระบวนการที่เรียกว่า **Autoxidation** โดย oxygen สามารถทำปฏิกิริยากับ double bonds ให้สารประกอบเชิงซ้อน ทำให้ fat มีรสและกลิ่นหื่นของ **Rancid fat** ถ้า autoxidation ตามด้วย polymerization ทำให้ rancid fat แข็ง เช่น น้ำมันพืชพวกป่านมี unsaturated fatty acids สูงมากใช้ในการทำสี (paint) ปกติ autoxidation ไม่เกิดในเซลล์ เพราะเซลล์มีสารยับยั้งคือ Vitamin E และ Ascorbic acid (Vitamin C) ยกเว้นโรคบางชนิดที่ทำให้เกิด lipid droplets ที่ไม่ปกติในเนื้อเยื่อบางแห่ง

5.2.3 Phospholipid

1) Phosphoglyceride เป็นส่วนประกอบหลักของเยื่อชีวภาพ (biological membranes) Phospholipid เป็น polar lipid หรือ membrane lipid กลุ่มหนึ่ง เพราะมีส่วนหัวของโมเลกุลเป็น polar มาก และมีส่วนหางเป็น hydrocarbon phospholipid โมเลกุลประกอบด้วย 3 ส่วน คือ (1) glycerol เป็น backbone, (2) 2 fatty acid chains เป็นส่วนหางซึ่งเป็นกลาง และ (3) phosphate group เป็นส่วนหัวซึ่งเป็น polar จากส่วนประกอบนี้อาจเรียก phospholipid ว่า **Phosphoglyceride fatty acid** phospholipid ที่พบมากมี 16 หรือ 18 carbon atoms ปกติ fatty acid สายหนึ่งเป็น saturated และอีกสายหนึ่งเป็น unsaturated (รูปที่ 24)



รูปที่ 24. โครงสร้างโมเลกุลของ Phosphoglyceride

Phospholipids เรียกชื่อตาม alcohols ที่ esterify ส่วนหัว phosphoric acid เช่น Phosphatidic acid ไม่มี alcohol บนหัว ชนิดนี้เกิดอิสระจำนวนไม่มาก

Phosphatidylethanolamine มี alcohol เป็น ethanolamine

Phosphatidylcholine มี alcohol เป็น choline

Phosphatidylserine มี hydroxyamino acid serine

Phosphatidylinositol มี inositol ซึ่งเป็น cyclic alcohol

Cardiolipin เป็น double phosphoglyceride พบใน inner membrane ของ mitochondria

Phospholipids เป็น **amphipathic** คือ โมเลกุลมี 2 groups แตกต่างกัน (1) **Hydrophilic head group** เป็น polar และมีประจุเป็นลบ (-) ที่ pH 7.0 (2) **Hydrophobic tail** เป็น nonpolar

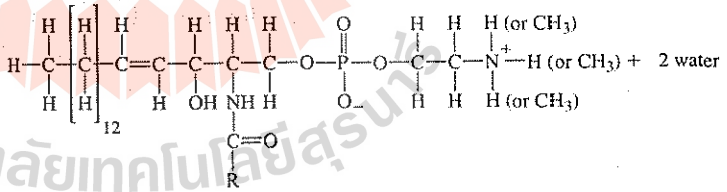
2) Sphingolipid

Sphingolipid เป็น membrane lipid ชนิดหนึ่ง โมเลกุลมี 2 ส่วน คือ polar head alcohol และ 2 nonpolar tails ของ 1 long-chain fatty acid และ 1 long-chain amino alcohol sphingosine แต่ไม่มี glycerol Sphingolipid แบ่งเป็น 3 กลุ่ม

(1) **Sphingomyelin** ที่ polar head group มี phosphocholine หรือ phosphoethanolamine เป็นส่วนประกอบสำคัญของ myelin sheath ที่ล้อมรอบเซลล์ประสาท (รูปที่ 25)

(2) **Cerebroside** ไม่มี phosphorus ที่ polar head เป็นกลางเพราะมีน้ำตาล 1 หรือมากกว่า 1 หน่วย จึงเป็น Glycolipid เรียกว่า **Glycosphingolipid** ส่วนมากเป็นส่วนประกอบของเซลล์ประสาทในสมอง

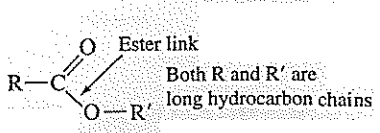
(3) **Gangioside** polar head มีน้ำตาลหลายหน่วย ที่ปลายของน้ำตาลหน่วยหนึ่ง หรือมากกว่า เป็น N-actylneuraminic acid หรือเรียกว่า **Sialic acid** พบมีมากถึง 6 % ใน gray matter ของสมอง และพบเป็น receptor site พิเศษบน membrane ของปลายประสาท (nerve endings) รับสาร neurotransmitter ระหว่างการส่งกระแสประสาท



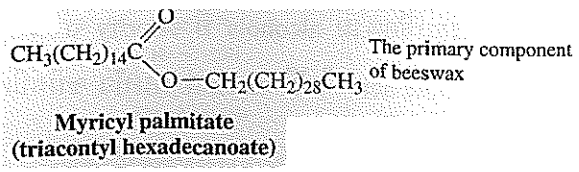
รูปที่ 25. Sphingomyelin

5.2.4 Wax

ขี้ผึ้ง - Wax เป็น esters ของ long-chain saturated และ unsaturated fatty acids ที่มี long-chain alcohols (รูปที่ 26) ใน vertebrate wax ถูกหลั่งออกมาจากต่อมผิวหนังเป็นเปลือกสำหรับป้องกัน ให้ผิวหนัง



รูปที่ 26. Wax

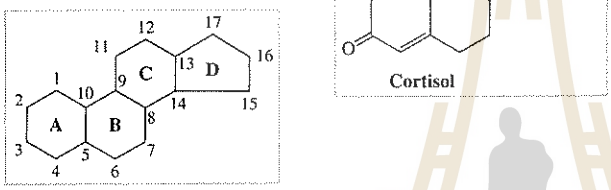


อ่อนนิ่ม ลื่นและกันน้ำ เช่น ขี้ผึ้งที่เคลือบ ผม ขนสัตว์ นกสร้างขี้ผึ้ง จาก preen glands ให้ขนไม่เปียกน้ำ ในพืชหลายชนิดที่ใบเคลือบด้วยขี้ผึ้งให้ใบเป็นมัน

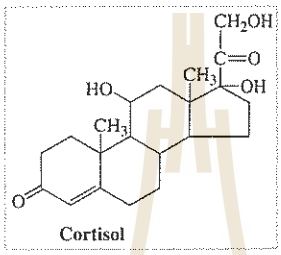
Wax สร้างและใช้ในสิ่งมีชีวิตในทะเลหลายชนิด โดยเฉพาะ plankton สะสม wax เป็นพลังงานสำรอง wax จึงเป็นอาหารหลักและพลังงานสำรองใน food chain ในมหาสมุทร

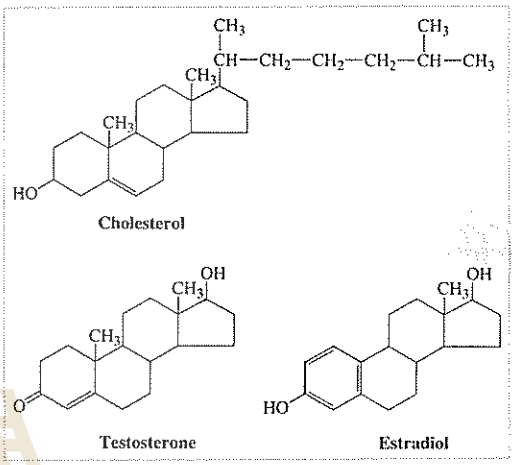
5.2.5 Steroid

Steroid เป็น complex fat-soluble lipid ที่ไม่มี fatty acid เป็นส่วนประกอบ โมเลกุลประกอบด้วย 4 rings เชื่อมติดกัน เป็น backbone (รูปที่ 27) steroid ที่มีมากคือ Sterols ซึ่งก็คือ steroid alcohol



Perhydrocyclopentanophenanthrene





รูปที่ 27. Perhydrocyclopentanophenanthrene ring system ของ Steroids และ Sterols บางชนิด

ในสัตว์ sterol ที่มีมากคือ Cholesterol ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญอีกอย่างของ plasma lipoproteins และของ outer cell membrane sterol เป็นสารเริ่มต้น (precursor) ของ steroid hormone เช่น testoterone และ estrogen นักกีฬาและนักเพาะกายบางคนใช้สาร steroids ที่คล้าย hormone เพื่อเพิ่มกล้ามเนื้อ แต่สารเหล่านี้จะให้ผลข้างเคียง ในผู้ชายทำให้เป็นสิว หัวล้าน testis เหี่ยว และเป็นหมัน ลดการผลิตปกติของ testosterone เป็นสาเหตุของโรคหัวใจ ทำลายไต และก่อมะเร็งในตับ testis และ prostate gland ในผู้หญิง ทำให้เสียงต่ำลึก ขนขึ้นที่หน้า menstrual cycle ผิดปกติ เต้านมเหี่ยว นอกจากนี้ cholesterol ยังเป็น precursor ของ bile salts ที่ช่วยย่อยไขมันในลำไส้เล็ก และเป็น precursor ของ Vitamin D ซึ่งมีบทบาทใน calcium และ phosphate metabolism

ใน cell membrane ของพืชมี sterol ชนิด Stigmasterol ซึ่งต่างจาก cholesterol ตรงที่มี double bond ระหว่าง carbon 22 และ 23

5.2.6 Lipoprotein

Lipid บางชนิดจับ protein โดยไม่มี covalent linkage เช่นในเลือด เรียกว่า Plasma lipoprotein ซึ่งโมเลกุลมีทั้ง polar lipids, triglycerides, cholesterol และ esters

Plasma lipoprotein มี 3 ชนิด

(1) Chylomicron เป็น droplet ของ triglyceride ที่เกือบบริสุทธิ์ เคลือบด้วย protein ได้จากอาหารไขมันที่ย่อยในลำไส้เล็ก

(2) Very-low-density lipoprotein (VLDL) ไขมันความหนาแน่นต่ำมาก

(3) High-density lipoprotein (HDL) ไขมันความหนาแน่นสูง

ถ้ามี VLDL สูง และ HDL ต่ำ เป็นสาเหตุสำคัญให้เกิดโรคหลอดเลือดอุดตัน - Atherosclerosis เลือดคลั่งในสมองและหัวใจ

5.3 Protein

Protein เป็นสารประกอบอินทรีย์โมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) ในสิ่งมีชีวิตมี protein มากกว่าครึ่งหนึ่งของน้ำหนักแห้ง และเป็น polymer ของ amino acids ซึ่งต่อกันด้วย peptide bonds protein ทำหน้าที่หลายอย่างในสิ่งมีชีวิต

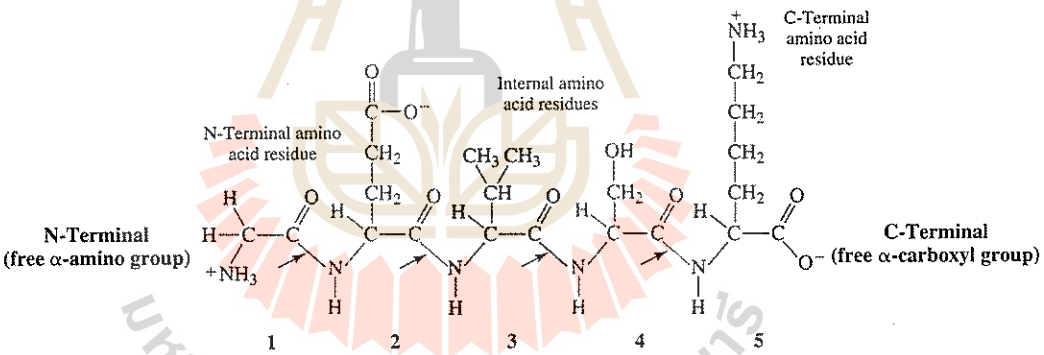
1) Enzymes เร่งปฏิกิริยาของสารอินทรีย์ enzymes มีกว่า 2000 ชนิด แต่ละชนิดเร่งปฏิกิริยาต่างกัน
2) Transport proteins ในเลือด เพื่อขนส่งโมเลกุล หรือ ions เฉพาะจากอวัยวะหนึ่งไปอีกอวัยวะหนึ่ง เช่น Hemoglobin ในเม็ดเลือดแดงทำหน้าที่นำ oxygen ที่ผ่านมาทางปอดส่งไปให้เนื้อเยื่อต่าง ๆ เพื่อใช้ในกระบวนการสร้างพลังงานในเซลล์ Lipoprotein นำไขมันจากตับไปให้อวัยวะอื่น และ protein ใน cell membrane ที่ขนส่ง glucose, amino acid และสารอาหารอื่น ๆ เข้าสู่เซลล์
3) Nutrient และ storage proteins โปรตีนในเมล็ดพืชเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของ embryo ovalbumin ในไข่ขาว casein ในน้ำนม และ Ferritin ในเนื้อเยื่อสัตว์เพื่อสะสมเหล็ก
4) Contractile หรือ Motile proteins โปรตีนที่ทำให้เซลล์และสิ่งมีชีวิตเคลื่อนไหวและเคลื่อนที่ หรือเปลี่ยนรูปร่าง เช่น Actin และ Myosin ใน contractile system ของ skeletal muscle และ nonmuscle cells หลายชนิด Tubulin ใน microtubules ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ flagella และ cilia และการเคลื่อนที่ของ organelles ภายในเซลล์
5) Structural proteins โปรตีนหลายชนิดเป็น filaments, cables หรือ sheets ค้ำจุนความแข็งแรงของโครงสร้างและป้องกัน เช่น Collagenใน tendons และกระดูกอ่อน (cartilage) หนังสัตว์ (leather) เป็น collagen เกือบบริสุทธิ์ Elastin ใน ligaments Keratin ใน ผม เล็บ และขนนก Fibroin ในใยแมงมุม
6) Defense proteins ทำหน้าที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอม หรือป้องกันจากบาดแผล เช่น Immunoglobulins หรือ Antibodies ใน vertebrates เพื่อตกตะกอนหรือ neutralize bacteria, viruses หรือ โปรตีนแปลกปลอม Fibrinogen และThrombin ทำให้เลือดแข็งตัวปิดปากแผลไม่เสียเลือด และ proteins ที่เป็นพิษ เช่น snake venom, bacterial toxins และ Ricin จากพืช
7) Regulatory proteins โปรตีนที่ช่วยควบคุมการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ เช่น hormones หลายชนิดเป็นโปรตีน Insulin ควบคุม metabolism ของน้ำตาล Growth hormone ควบคุมการเจริญ

เติบโต Parathyroid hormone ควบคุมการใช้ Ca^{2+} และการขนส่ง phosphate Repressors ควบคุม biosynthesis ของ enzymes ใน bacteria

8) Proteins อื่น ๆ ที่หน้าที่ค่อนข้างพิเศษ จัดประเภทไม่ได้ เช่น Monellin ในพืชชนิดหนึ่งใน Africa ให้รสหวานจัดมาก Antifreeze proteins ป้องกันไม่ให้เลือดเป็นน้ำแข็ง Resilin เป็นบานพับของปีกแมลง

5.3.1 Protein ประกอบด้วย Amino acids

โปรตีนที่กล่าวมาทั้งหมด แม้คุณสมบัติและหน้าที่แตกต่างกันมากมาย แต่ทั้งหมดสร้างจากโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกันคือจาก 20 amino acids (ตารางที่ 3) ระหว่าง 2 amino acids เชื่อมต่อกันด้วย Amide linkage เรียกว่า **Peptide bond** เมื่อหลายหน่วยต่อกัน แล้วสายรวม เรียกว่า **Polypeptide** (รูปที่ 28) แต่ละ amino acid ใน polypeptide ถูกเรียกว่า **Residue** (เพราะไม่ใช้ amino acid อีกต่อไป) ปลายของ polypeptide ด้านที่มี free α-amino group เรียกว่า **Amino terminal หรือ N terminal** ส่วนอีกปลายที่มี free carboxyl group เรียกว่า **Carboxyl terminal หรือ C terminal** ทุกโมเลกุลของโปรตีนใด ๆ จะมีส่วนประกอบของ amino acids, ลำดับของ amino acids และความยาวของสาย polypeptide เท่ากันทุกประการ



รูปที่ 28. Peptide bonds (ลูกศร) ระหว่าง amino acids

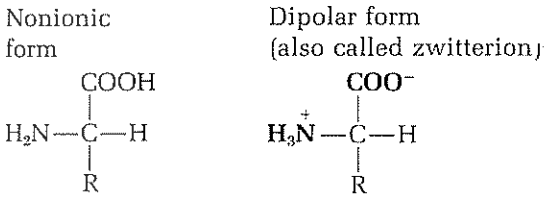
ตารางที่ 3. Amino acids, ย่อด้วยอักษร 3 ตัว และ ย่อด้วยอักษร 1 ตัว

Amino Acid	Three-Letter Abbreviation	One-Letter Abbreviation	Amino Acid	Three-Letter Abbreviation	One-Letter Abbreviation
Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Methionine	Met	M
Aspartic acid	Asp	D	Phenylalanine	Phe	F
Cysteine	Cys	C	Proline	Pro	P
Glutamic acid	Glu	E	Serine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Threonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

5.3.2 Amino acids เป็น Dipolar หรือ Zwitterion

ในสารละลายของน้ำ amino acid จะถูก ionized และสามารถเป็นได้ทั้งกรดหรือด่าง เพราะ amino acid มี amino group 1 group และ carboxyl group 1 group เมื่อถูก ionized ในน้ำจึงได้สารที่มี ion 2 ขั้ว เรียกว่า **Dipolar ion หรือ Zwitterion** (hybrid ion) แต่ทั้งโมเลกุลเป็นกลาง (รูปที่ 29) ในสถานภาพเป็นผลึกโปรตีน amino acids จึงจับยึดกันด้วย **Electrostatic force** ที่แข็งแรงมาก ระหว่างประจุบวกและประจุลบของ functional group ของโมเลกุลข้างเคียง คล้ายผลึกของ NaCl ที่จับกันด้วย ionic bond ผลึกของ amino acid จึงมีจุดหลอมเหลวสูงกว่าผลึกสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่มีขนาดเท่ากัน

รูปที่ 29. Dipolar ion หรือ Zwitterion ของ Amino acid ที่ Amino group และที่ Carboxyl group

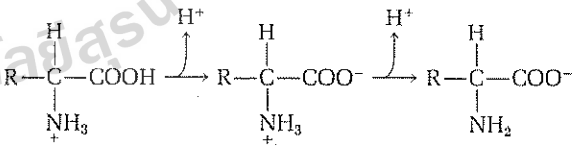


5.3.3 Amino acids เป็นได้ทั้ง Acids และ Bases

เมื่อละลายผลึก amino acids ในน้ำได้ dipolar ions ซึ่งอาจเป็น acid (proton donor) หรือ base (proton acceptor) สารที่มี 2 คุณสมบัติในโมเลกุลเดียวเช่นนี้ เรียกว่า **Amphoteric** หรือ **Ampholytes**

เมื่อ amino acids ถูก protonated อย่างเต็มที่ หรือทั้ง amino group และ carboxyl group รับ protons โมเลกุลในรูปแบบนี้ เรียกว่า **Diprotic acid** นั่นคือ ทั้ง 2 groups สามารถ ionize ให้ protons ได้เป็นกรด 2 ครั้ง (รูปที่ 30)

รูปที่ 30. Diprotic acid หรือ Ampholyte ของ Amino acid



5.3.4 Amino acids เป็น Buffers

Diprotic form ของ amino acid สามารถมี titration curve ได้ 2 ช่วง แต่ละช่วงคล้าย titration curve ของ monoprotic acid (ionize ให้ได้ 1 proton) เช่น กรดอ่อน

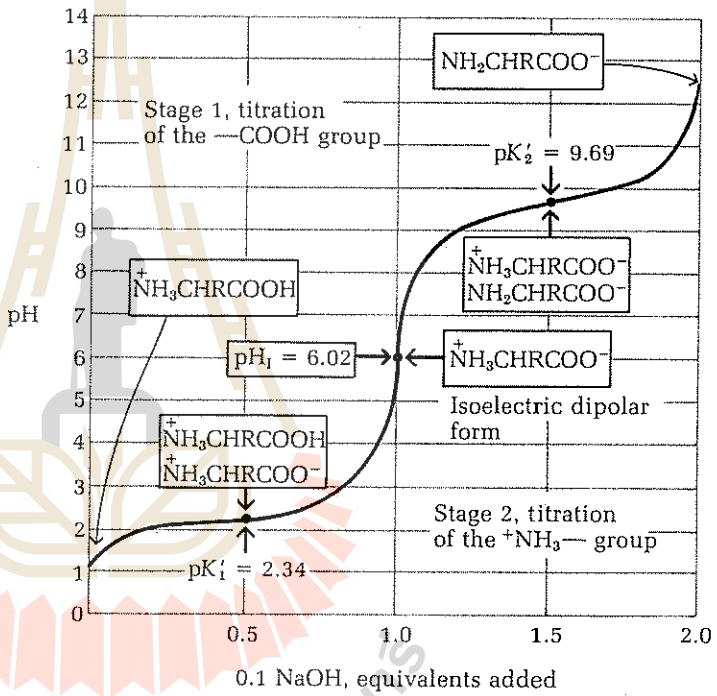
1) ในช่วงแรก carboxyl group เสีย proton เป็นตัวแรก

$$^{+}NH3-CHR-COOH \rightarrow {}^{+}NH3-CHR-COO^{-}+H^{+}$$

ที่ midpoint ของ curve ความเข้มข้นของ $^{+}NH_3$-CHR-COOH เท่ากับความเข้มข้นของ $^{+}NH_3$-CHR-COO และ ณ จุดนี้ pH = pK' จะได้ buffer zone ช่วงแรก ซึ่งเท่าช่วงของ pH นี้ เมื่อ titrate ต่อไปจะถึงจุดที่เสีย

proton ตัวแรกหมดพอดี จากนั้นเป็นการเริ่มเสีย proton ตัวที่ 2 ที่จุดนี้ pH เป็น pH ที่มี Dipolar ion คือ $^{+}NH_3$-CHR-COO^{-} จำนวนมาก (รูปที่ 31) หรือ amino acid ionized เต็มที่แล้ว แต่ไม่มี net charge โมเลกุลจึงไม่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า เรียก pH นี้ว่า **Isoelectric pH (pH_I)** หรือ **Isoelectric point (pI)** ประโยชน์ของ pI นำไปใช้ในการแยก amino acids ชนิดต่าง ๆ ออกจากกันได้

2) ในช่วงที่สอง เสีย proton ตัวที่สอง โดย proton ออกจาก NH_3-CHR-COO^{-} ที่ midpoint ที่สองนี้ ความเข้มข้นของ NH_3-CHR-COO^{-} เท่ากับความเข้มข้นของ NH_2-CHR-COO^{-} และ pH เท่ากับ pK' ซึ่งก็คือ buffer zone ที่สอง เมื่อ titration สมบูรณ์ ที่ pH สุดท้ายรูปแบบของ amino acid ที่มีมากที่สุด คือ NH_2-CHR-COO^{-}



รูปที่ 31. Titration curve ของ 0.1 M Alanine. PK'1 = 2.36 และ pK'2 = 9.69. Buffer zones อยู่ในช่วง 2 pK' นี้

อย่างไรก็ตาม ที่ pH's ทั้ง 2 buffer zones ของ amino acids ไม่เป็น buffer ที่ดี เพราะ pH ไม่ตรงกับ pH ของ intracellular fluid และเลือด ซึ่งคือ pH 7.4

5.3.5 Structures ของ Proteins

แม้ว่าโปรตีนทั้งหมดสร้างจาก amino acids มาตรฐาน ซึ่งมีทั้งหมด 20 amino acids แต่โปรตีนมีหน้าที่แตกต่างกัน เนื่องจากแต่ละชนิดมีลำดับ (Sequence) ของ amino acids ต่างกัน amino acids จึงเสมือนเป็นตัวอักษรของโปรตีน เมื่อจัดเรียงลำดับ amino acids ในจำนวนแตกต่างกันทำให้ได้โปรตีนหลากหลายชนิด ต่าง ๆ กัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

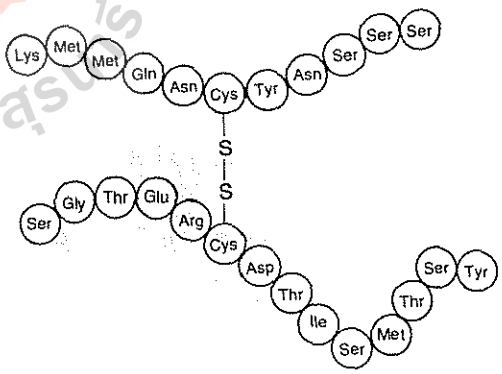
โปรตีน จำแนกตาม **รูปทรง** ได้เป็น 2 ชนิดใหญ่คือ (1) **Fibrous proteins** : polypeptide chains เรียงกันเป็นเส้นหรือเป็นแผ่นยาว (2) **Globular proteins** : polypeptide chains พับ ม้วนแน่นเข้าหากันเป็นทรงกลม (sphere หรือ globular)

โปรตีน จำแนกตาม **กลุ่มสารเคมีส่วนประกอบอื่น** ได้เป็น (1) **Simple proteins** : โปรตีนที่มีเฉพาะ amino acids เท่านั้น ไม่มีสารเคมีชนิดอื่นเป็นส่วนของโมเลกุล เช่น ribonuclease และ chymotrypsinogen (2) **Conjugated proteins** : มี non-amino acid เป็นส่วนประกอบด้วย ส่วนนี้เรียกว่า **Prosthetic group** กลุ่มนี้จำแนกออกตามชนิดของ prosthetic group ได้เป็น (i) **Lipoproteins** มี lipids ประกอบอยู่ด้วย (ii) **Glycoproteins** มี sugar group ประกอบ และ (iii) **Metalloproteins** มี metal เช่น iron, copper หรือ zinc ประกอบ ปกติ prosthetic มีบทบาทสำคัญในหน้าที่ของโปรตีน

โปรตีนจำแนกตาม **โครงสร้าง 3 มิติ** (conformation) ได้เป็น 4 ระดับ

1) Primary structure

โครงสร้างระดับที่หนึ่ง พิจารณาที่ backbone structure และ **ลำดับ - sequence ของ amino acid residues** ของโมเลกุล (รูปที่ 32) amino acids ทั้ง 20 สามารถเรียงเป็น sequence ต่างๆ ได้เป็นหลายพันแบบของโปรตีน ซึ่งเพียงพอสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่เคยมี กำลังมี และจะเกิดขึ้นใหม่บนโลก sequence ของ amino acids ใน polypeptide chain มีความสัมพันธ์กับ sequence ของ nucleotides ใน DNA เช่น Insulin เป็นโปรตีนชนิดแรกที่ถูก sequenced หาลำดับของ amino acids Insulin ประกอบด้วย 2 polypeptide chains คือ A (α) chain มี 21 amino acid residues และ B (β) chain มี 30 amino acid residues ทั้ง 2 chains ยึดติดกันด้วย disulfide (-S-S-) cross-linkages



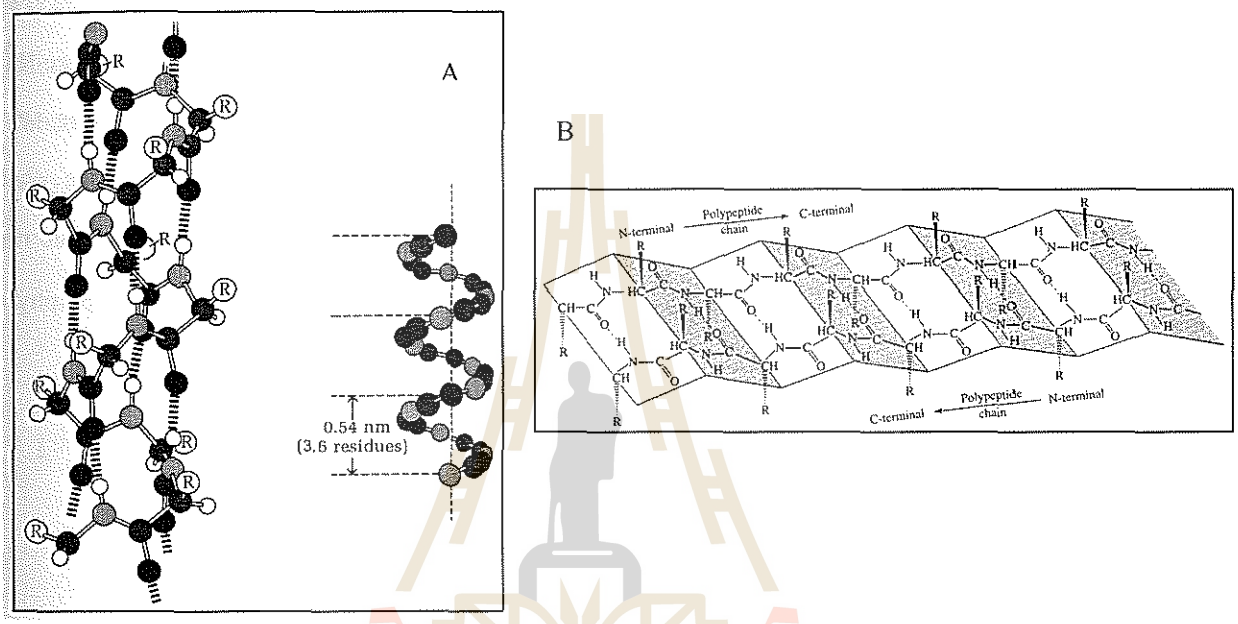
รูปที่ 32. Primary structures ของ 2 polypeptides ซึ่งจับกันด้วย Disulfide (-S-S-) linkage

โปรตีนที่ทำหน้าที่เหมือนกันในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เรียกว่า **Homologous proteins** เช่น hemoglobin หน้าที่ขนส่ง oxygen ใน vertebrate ต่าง ๆ homologous protein ปกติมีความยาวของ polypeptide chains เท่ากันหรือเกือบเท่ากัน amino acids residues ในหลายตำแหน่งเหมือนกัน เรียกว่า Invariant residues ตำแหน่งอื่น อาจไม่เหมือนกันเรียกว่า Variant residues ความเหมือนของ amino acid sequence เรียกว่า **Sequence homology** ซึ่งสามารถบอกถึงต้นกำเนิดทางวิวัฒนาการร่วมกัน (common evolutionary origin) ของสิ่งมีชีวิต

2) Secondary structure

โครงสร้างระดับที่สอง เป็นโครงสร้าง 3 มิติ เกิดจาก hydrogen bonding หรือ -S-S-cross-linkages ระหว่าง amino acid residues ที่อยู่ติดกันใน polypeptide chains ข้างเคียง ทำให้ได้รูปร่าง เป็นเกลียว หรือแผ่นพับเป็นจีบ เช่น Keratin, Collagen (รูปที่ 33) และ Elastin

Keratin เป็นโปรตีนของ เส้นไหม ใยแมงมุม เส้นผม ในเส้นผมมี Keratin 2 แบบ คือ (i) α-Keratin ในผมเส้นตรง และ (ii) β-Keratin ในผมเส้นหยิก



รูปที่ 33. Secondary structure ของ Protein. α - Helix (A) และ β - pleat (B).

α-Keratin ยึดได้ ประกอบขึ้นจากหลาย fibrils และแต่ละ fibril เป็นชุดของ α-helical polypeptide chains 3 สาย พันกันเป็นเกลียวคล้ายเส้นเชือก ทั้ง 3 สายยึดกันด้วย covalent cross links –S-S- ที่ cystine residues α-keratin ที่แข็งแรงและเหนียวที่สุด คือ กระดองเต่า ซึ่งมี cystine สูงมากถึง 18 %

β-Keratin ยืดไม่ได้ ประกอบขึ้นจาก polypeptides เหยียดออกเป็นแผ่นซิกแซกเรียงขนานกัน (β-pleat) แต่สายไม่ตรงกัน และระหว่างสาย ยึดกันด้วย hydrogen bonds (interchain hydrogen bonds) โดยไม่มี nydrogen bonds ภายในสาย (intrachain) และไม่มี –S-S cross-linkage ระหว่างสาย (รูปที่ 33, B)

การดัดผมตรงให้เป็นผมหยิก : α-Keratin ถูกความร้อนและชื้นจะยืดออกเป็น β-conformation แล้วทำให้เย็นจะกลับเป็น α-helical conformation คืน ได้ผมหยิกแต่ไม่ถาวรเหมือน β-Keratin ปกติ วิธีการโดยใช้น้ำยาดัดผมซึ่งเป็น Reducing agent ที่มี Thiol หรือ Sulfhydryl group (-SH) จะไปตัด disulfide cross-linkages โดย reduce **cystine residue** ให้เป็น 2 **cysteine** residues ในแต่ละสาย จากนั้นให้ความร้อนชื้นทำลาย hydrogen bonds ซึ่งทำให้ α-helix conformation ยืดออก จากนั้นเอา reducing agent ออก และใส่ oxidizing agent จะได้ disulfide bonds ใหม่เกิดขึ้นระหว่างคู่ของ cysteine residues ของสาย polypeptides ที่อยู่

ข้างกัน แต่ไม่ใช่คู่เก่าก่อนดัด แล้วล้างและให้ผมเย็นลง polypeptide chains จะกลับเป็น α-helix conformation ที่บิดม้วน เพราะ disulfide cross-linkages ใหม่ จะบิดม้วนบนมัด α-helical coils ในเส้นผม ทำให้ได้ผมหยิก

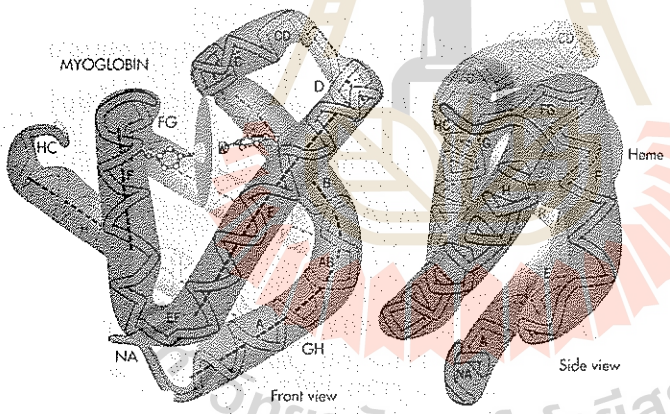
Collagen ใน tendon ประกอบขึ้นด้วย 3 polypeptide chains ใน α-helical form

Elastin ใน ligament ประกอบขึ้นด้วย α-helical polypeptide ช่วงสั้น ๆ ต่อกันด้วย lysine ให้เป็นสาย lysine จาก 4 สาย ยึดกันด้วย Desmosine residue ทำให้ elastin ถูกยืดออกได้ทุกทาง

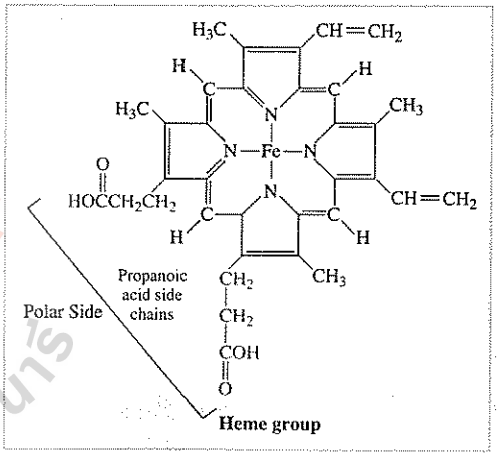
3) Tertiary structure

โครงสร้างระดับที่สาม เกิดจาก polypeptide chain **สายเดี่ยว** พับม้วนให้เป็น **globular structure** หรือ compact spherical โปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกันที่ single chain ซึ่งมีทั้ง α helix และ β structure เช่น **Myoglobin** (MW 16,700) (รูปที่ 34, A) และ **Cytochrome c** (MW 12,400) มี single polypeptide chain ม้วนพับไปมา และมี **Heme group** เป็นศูนย์กลาง (รูปที่ 34, B) heme group เป็น complex organic ring เรียกว่า Protoporphyrin ที่มี Fe^{2+} 1 atom ซึ่งมี 6 coordination bonds โดย 4 bonds จับกับ N ของ porphyrin ring, 1 bond จับกับ histidine residue และอีก 1 bond สำหรับไว้จับ Oxygen

A.



B.



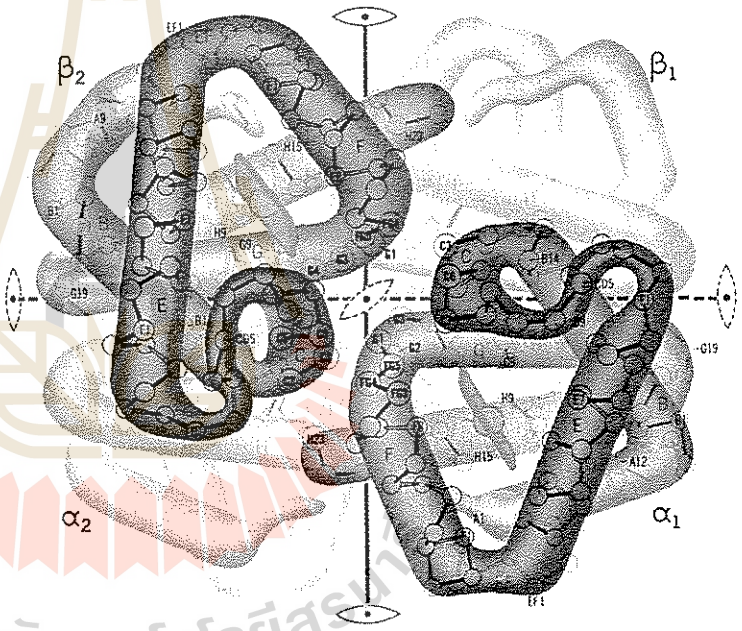
รูปที่ 34. Tertiary structure ของ Myoglobin (A) และ Heme group (B).

Lysosyme ในไข่ขาวและน้ำตาของคน ย่อย polysaccharide ใน cell wall ของ bacteria บางชนิด polypeptide chain พับจีบ โดยเอา hydrophobic R group อยู่ภายในก้อนโปรตีน และเอา hydrophilic R group ออกด้านนอก **Globular proteins** ทำให้เสียสภาพธรรมชาติได้ เรียกว่า **Denaturation** โดยทำลาย covalent bonds ใน polypeptide backbone ด้วยความร้อน หรือ pH ที่ไม่เหมาะสม ทำให้เสียหน้าที่ denatured globular proteins บางชนิดสามารถคืนสภาพธรรมชาติเดิมได้ เรียกว่า **Renaturation** ด้วยความเย็น และ pH ที่เหมาะสม บางชนิดคืนสภาพธรรมชาติไม่ได้ เช่น ไข่ขาวที่ต้มสุกแล้ว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4) Quaternary structure

โครงสร้างระดับที่สี่ ของ protein ที่มี **2 polypeptide chains** ขึ้นไป ซึ่งเรียกว่า **Oligomeric protein** โมเลกุลขนาดใหญ่และทำหน้าที่ซับซ้อนกว่า single-chain protein แต่ละ chain หรือ subunit อาจเหมือนหรือไม่เหมือนกัน แต่ละ subunit มีคุณสมบัติของ secondary และ tertiary structures ของตัวเอง subunits ทั้งหมด pack อยู่ด้วยกันให้ได้โครงสร้าง 3 มิติ ด้วยแรงผสมของ (1) noncovalent interaction หรือ hydrophobic interaction ระหว่าง hydrophobic R groups (2) electrostatic attractions ระหว่าง charged R groups ตรงกันข้าม (3) hydrogen bonding contact points ระหว่าง hydrophobic R groups ของ amino acid residues ของ subunits subunits ที่ไม่เหมือนกันมี hydrogen bonds มากกว่า subunits ที่เหมือนกัน เช่น Hemoglobin (รูปที่ 23) มี 4 subunits ($\alpha_1\beta_1$ และ $\alpha_2\beta_2$), enymes หลายชนิดใน metabolic pathway ของเซลล์ และ polymerase ซึ่งเป็น enzymes ในการสังเคราะห์ DNA และ RNA



รูปที่ 35. Quatenary structure ของ Hemoglobin

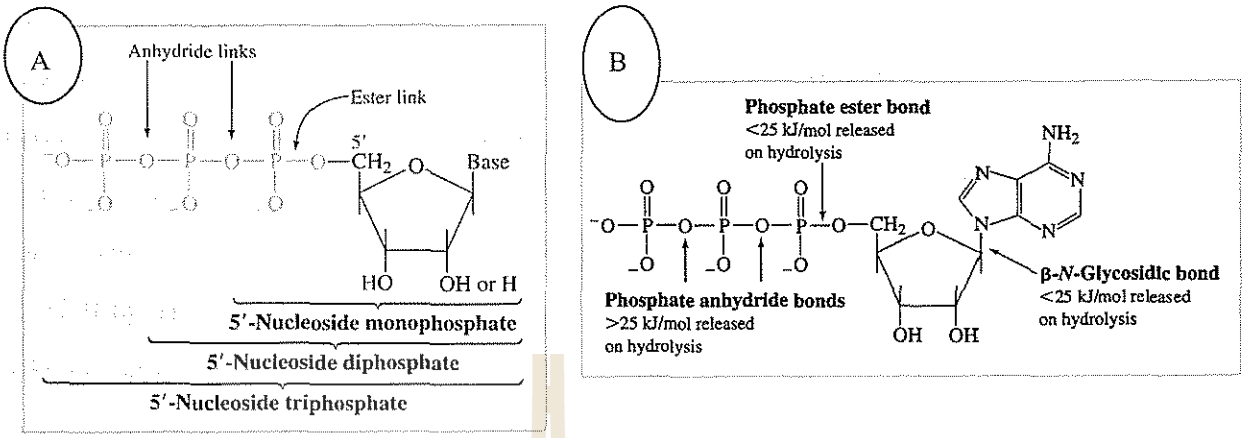
5.4 Nucleotides and Nucleic Acids

5.4.1 Nucleotides

Nucleotide เป็นสารอินทรีย์ขนาดเล็ก โมลกุลประกอบด้วย 3 ส่วนคือ (1) five-carbon sugar (pentose), (2) phosphate group และ (3) nitrogen-containing base น้ำตาล pentose เป็น ribose หรือ deoxyribose ส่วน base มี single-carbon ring หรือ double-carbon ring (รูปที่ 36 และ 39)

Nucleotide ที่มีบทบาทสำคัญใน metabolism ของสิ่งมีชีวิตคือ ATP หรือ Adenosine triphosphate (รูปที่ 36) และ NADPH หรือ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (รูปที่ 38) metabolism ปกติเซลล์ทำงานในหลักการให้ประหยัดสูงสุด อัตราการสร้างพลังงานซึ่งในรูปของ ATP และ NADPH โดย catabolism จะถูกควบคุมโดยความต้องการของเซลล์ เซลล์ใช้สารอาหารให้แค่เพียงพอกับอัตรา

การใช้พลังงานเท่านั้น เช่นเดียวกับการสร้าง building-block molecules และ macromolecules เซลล์สร้างเท่าที่ต้องการเท่านั้น



รูปที่ 36. A, โครงสร้างโมเลกุลของ Nucleoside แสดงพันธะ Anhydride link และ Ester link และ B, แสดงโครงสร้างของ Adenosine triphosphate (ATP)

ATP นำพลังงานจาก catabolic reactions ไปให้ anabolic reactions โมเลกุลของสารอาหาร เช่น glucose มี Potential energy มากเพราะดีกรีการจัดโครงสร้างของโมเลกุล เมื่อ glucose ถูก oxidized จะปล่อยพลังงานในรูปของความร้อนออกมาได้อย่างง่าย แม้ว่า heat energy เป็นประโยชน์ในการรักษาอุณหภูมิของร่างกาย แต่ไม่สามารถใช้ให้เกิด mechanical work เช่น การหดตัวของกล้ามเนื้อ และ chemical work เช่น การสังเคราะห์สารในเซลล์ นอกจากนี้ความร้อนสามารถทำงาน (work) ได้ที่ความดัน (pressure) คงที่ต่อเมื่อความร้อนสามารถไหลจากที่ร้อนกว่าไปหาที่เย็นกว่า ซึ่งเป็นไม่ได้ในเซลล์มีชีวิต เพราะเซลล์มีชีวิตเป็น Isothermal ความร้อนเท่ากันทั่วเซลล์ ดังนั้น free energy จำนวนมากที่ปล่อยออกมาจากการสลายน้ำตาล glucose จึงต้องถูกกักเก็บไว้ในรูปของ ATP โดย free energy ที่ปล่อยออกมาถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ ATP แบบควบคู่ (couple synthesis) จาก ADP และ inorganic phosphate ที่มีอยู่แล้วในเซลล์

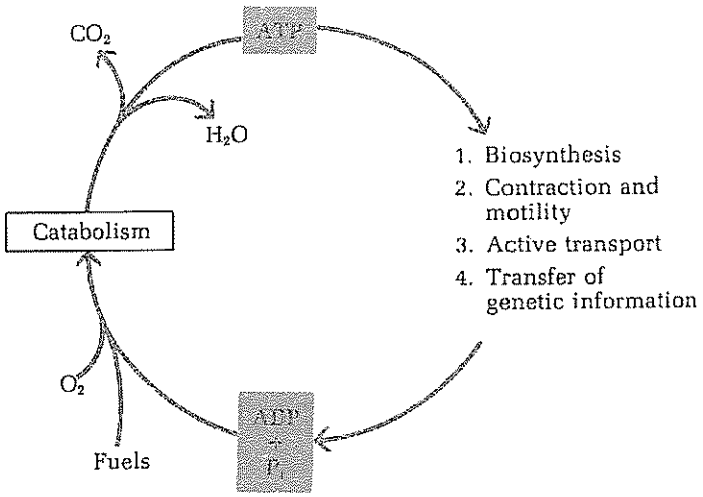
พลังงาน ATP สามารถทำงานให้กับเซลล์ได้ 4 อย่างคือ (1) Biosynthesis (2) Contraction และ motility (3) Active transport และ (4) Transfer ของ genetic information

(1) **Biosynthesis** : phosphate group ที่ปลายของ ATP จะถูกถ่ายย้ายด้วยเอนไซม์ไปให้ precursor ซึ่งเป็น building-block molecules ให้มีพลังงาน พร้อมที่จะรวมกันเป็น macromolecules

(2) **Contraction และ motility** : ATP เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหดตัวและเคลื่อนที่ของเซลล์

(3) **Active transport** : การขนส่งสารผ่าน membrane ไปยัง ด้านที่มีความเข้มข้นสูงกว่าอยู่แล้ว ต้องการพลังงานในการขับเคลื่อน

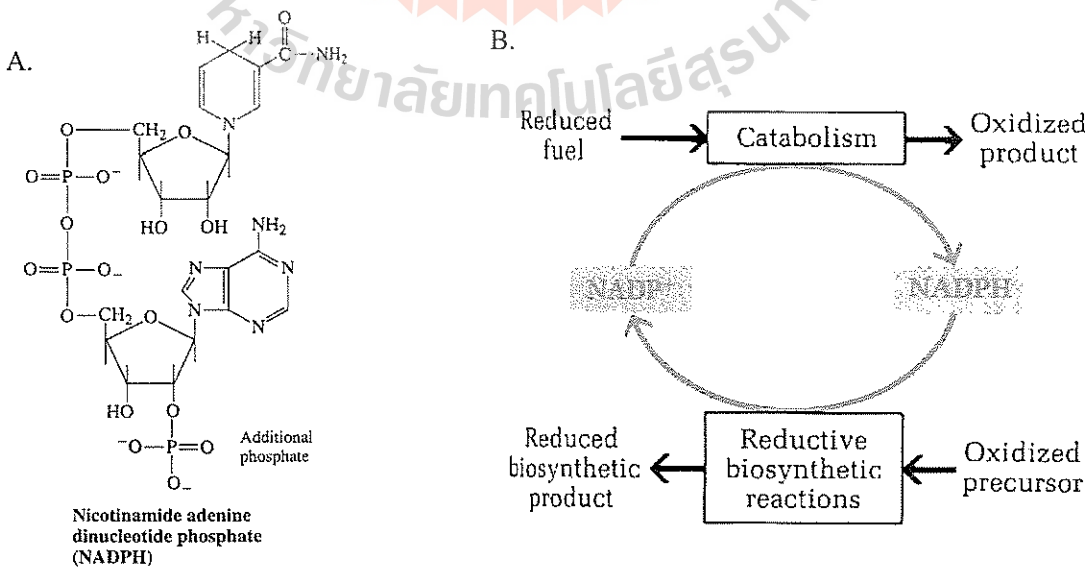
(4) **Transfer ของ genetic information** : พลังงาน ATP ใช้ในการถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรม เพื่อให้เกิดความถูกต้องแม่นยำในการถ่ายทอด เช่น การสังเคราะห์ DNA, RNA และ proteins



รูปที่37. การถ่ายทอดพลังงานของ ATP ในการทำงานใน

ATP ที่ถูกใช้ phosphate group ที่ปลายโมเลกุลแล้วจะกลายเป็น ADP ซึ่งจะหลุดออกจากระบบการทำงาน จากนั้น ADP จะถูก recharged กับ inorganic phosphate ในกระบวนควบคู่ให้เป็น ATP ซึ่งเรียกว่า **Coupling phosphorylation** ได้ใหม่ เมื่อเซลล์ต้องการพลังงาน

NADPH นำพลังงานในรูปของ Reducing power หรือ hydrogen atoms หรือ electrons เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ glucose จาก carbon dioxide ระหว่างการสังเคราะห์แสงของพืช หรือใช้ในสังเคราะห์ fatty acids จาก acetateในตับของสัตว์ reducing power ในรูปของ hydrogen atoms ต้องการในการเปลี่ยน double bond ให้เป็น single bonds High-energy hydrogen atomsได้จากปฏิกิริยาของ **dehydrogenase** เอนไซม์ที่ดึง hydrogen ออกจากโมเลกุลเชื้อเพลิงชีวภาพถ่ายไปให้ coenzyme **$NADP^+$** ซึ่งอยู่ใน oxidized form ได้เป็น reduced form หรือ hydrogen carrying form, NADPH เป็นตัว carrier ที่มี energy-rich electrons ที่จะถูกนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยา biosynthesis ที่ต้องการพลังงานต่อไป



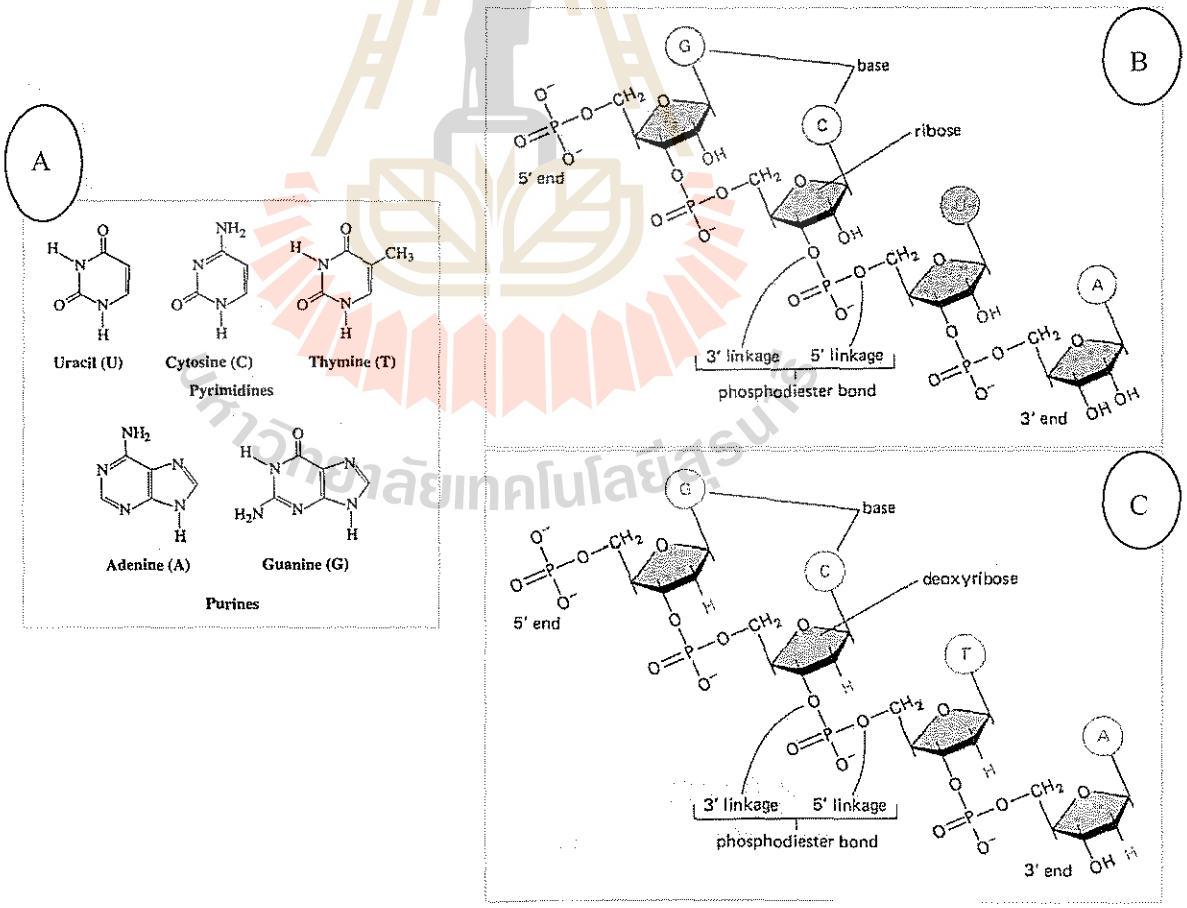
รูปที่ 38. โครงสร้างโมเลกุลของ NADPH (A) และ การถ่ายทอดพลังงานของ NADPH (B) ในเซลล์

5.4.2 Nucleic acids

Nucleic acids เป็นสาย polymer ของ nucleotides ทำหน้าที่เป็นเก็บและถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรม โมเลกุลของ nucleic acid ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

1) **Pentose** ของ nucleic acids มี 2 ชนิด คือ D-ribose ใน RNA และ 2'-doxy-D-ribose ใน DNA
2) **Nitrogen bases** เป็น heterocyclic compound มี 2 ชนิดหลัก คือ
   (i) **Pyrimidine** เป็น 1 ring compound ได้แก่ **Cytosine, Thymine** และ **Uracil**
   (ii) **Purine** มี 2 rings ได้แก่ **Adenine** และ **Guanine** (รูปที่ 39)
3) **Phosphate group** ส่วนที่ทำหน้าที่เสมือนเป็นสะพานเชื่อมระหว่างน้ำตาล pentose 2 units โดย Phosphodiester linkage ให้เป็น backbone ของ nucleic acids และ pentose เชื่อมต่อกับ base ด้วย N-glycosyl linkage (รูปที่ 36)

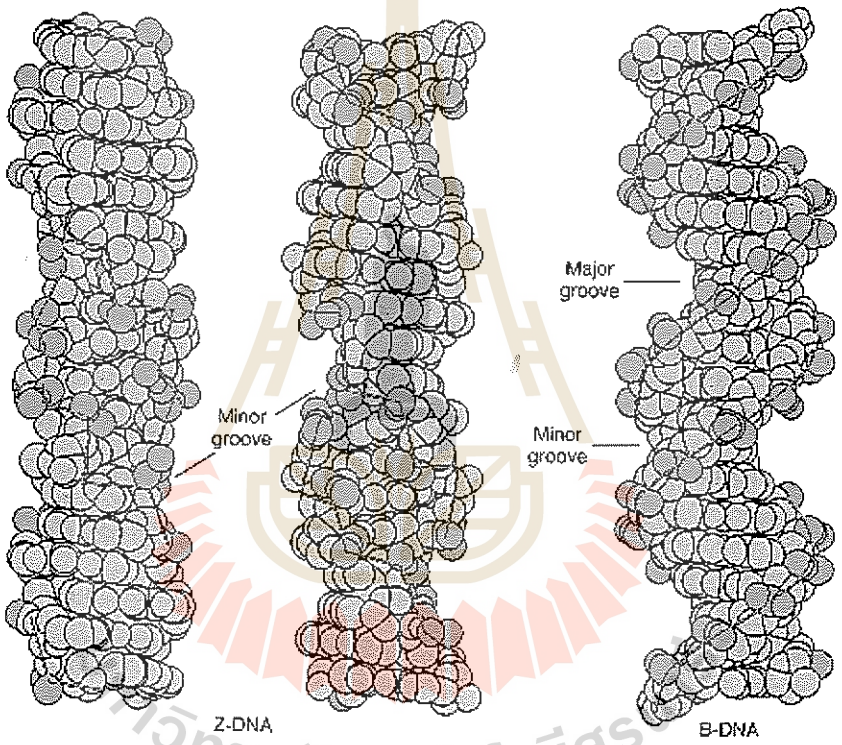
Ribonucleic acid (RNA) เป็น polymer ของ nucleotides สายเดียว น้ำตาล pentose เป็นชนิด D-Ribose และ base 4 bases คือ Cytosine, **Uracil**, Adenine และ Guanine RNA นอกจากเป็นข้อมูลพันธุกรรมแล้วยังทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในปฏิกิริยาตัดต่อ RNA เอง เรียกว่า **Ribozyme**



รูปที่ 39. A: Purine และ Pyrimidine bases. B: โครงสร้างโมเลกุลของ RNA และ C: โครงสร้างโมเลกุลของ DNA

Deoxyribonucleic acid (DNA) เป็น polymer ของ nucleotides **สายคู่** น้ำตาล pentose เป็นชนิด 2'-D-ribose และ base 4 ชนิดคือ Cytosine, **Thymine**, Adenine และ Guanine nucleotides 2 สายยึดกันด้วย hydrogen bonds ระหว่าง bases ของแต่ละสาย (C จับกับ G ด้วย 3 hydrogen bonds และ A จับกับ T ด้วย 2 hydrogen bonds) และ 2 สายนี้สลับปลายและขนานกันโดย ปลาย 5' สลับกับปลาย 3' หรือจับกันแบบ antiparallel เนื่องจากขนาดโมเลกุลของ bases ในกลุ่ม purine และ pyrimidine ไม่เท่ากัน เมื่อจับกันทำให้สาย nucleotides บิดเป็นเกลียวหมุนขวา ที่พบในเซลล์ส่วนมากเป็น DNA เกลียวหมุนขวาชนิด **B-form**

มี DNA บางช่วงโดยเฉพาะบริเวณควบคุมการทำงานของ genes (regulatory region) อาจพบ DNA ที่เกลียวหมุนซ้าย เรียกว่า **Z-form** เนื่องจากมีคู่ C-G มากเป็นพิเศษทำให้เกลียวหมุนซ้าย



รูปที่ 40. Z-DNA : ซึ่งเป็น DNA ในแบบหมุนซ้าย และ B-DNA : DNA ในแบบหมุนขวา

การจัดองค์กรของเซลล์

Cellular Organization

รองศาสตราจารย์ ดร. กรกช อินทราพิเชฐ

เซลล์ คือ หน่วยโครงสร้างและหน้าที่ (structural and functional unit) ที่เล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิต (organism) กิจกรรมภายในเซลล์เกิดขึ้นในมิติที่เล็กมาก เกิดในเซลล์เองหรือในห้องหรือช่องย่อยเล็กๆ (subcompartment) ภายในเซลล์ และเป็นปฏิกิริยาชีวเคมีในที่มีน้ำเป็นตัวกลางในสภาวะอุณหภูมิต่ำ และคงที่ เซลล์ไม่สามารถทนต่อสภาวะที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิ ความดัน กรด หรือสารที่มีพลังงานมากเกินไป เซลล์จึงมีความซับซ้อน (complex) และจัดองค์กรให้เป็นหน่วยงาน (organelles) และพื้นที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการดำรงชีวิต กระบวนการแห่งชีวิตจึงเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง ชีวเคมี กับมิติ โครงสร้าง และกิจกรรมของเซลล์

1. มโนคติสำคัญเกี่ยวกับเซลล์ (Key Concepts of Cells)

1. เซลล์เป็นหน่วยเล็กที่สุดที่ยังคงคุณลักษณะของชีวิต รวมทั้งมีองค์กรซับซ้อน กิจกรรมเมตาโบลิซึม และพฤติกรรมการสืบพันธุ์
2. เซลล์ทั้งหมดมีเยื่อ plasma membrane เป็นขอบเขตชั้นนอก กั้นเซลล์ออกจากส่วนที่ล้อมรอบ มีบริเวณของสารพันธุกรรม - DNA บริเวณภายในของเซลล์ หรือ cytoplasm มีการจัดองค์กรสำหรับสังเคราะห์พลังงาน สังเคราะห์โปรตีน การเคลื่อนที่ และกิจกรรมอื่นๆ ที่จำเป็นต้องการดำรงชีพ
3. เซลล์ชั้นสูง **Eukaryotic** มี Nucleus และห้อง (compartment) ที่ล้อมรอบด้วยเยื่อเซลล์ หรือก็คือ Organelles เพื่อแยกปฏิกิริยาเมตาโบลิซึมที่ต่างกันออกจากกัน และให้ปฏิกิริยาเกิดอย่างเป็นลำดับ เซลล์ชั้นต่ำ **Prokaryotic** ไม่มี nucleus แต่ข้อมูลพันธุกรรมอยู่เป็นบริเวณ nuclear body และไม่มี organelles ที่มีส่วนประกอบเป็น membrane

2. ทฤษฎีเซลล์ Cell theory

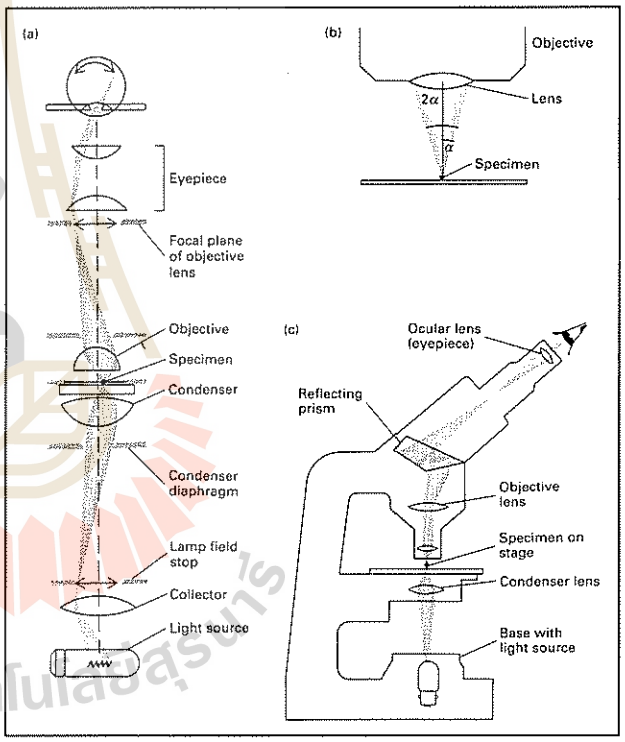
สิ่งมีชีวิต (organisms) ประกอบด้วยเซลล์อย่างน้อย 1 เซลล์ เซลล์จึงเป็นเอกลักษณ์ทางชีววิทยาที่เล็กที่สุดที่มีคุณลักษณะของชีวิต (life) เซลล์เดี่ยวสามารถดำรงชีพด้วยตนเองหรือมีศักยภาพที่จะดำรงชีวิตได้ เซลล์จัดระบบโครงสร้างในแบบเฉพาะที่แสดงพฤติกรรมเมตาโบลิซึม เซลล์รับความรู้สึก ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม และ ถ่ายทอดคำสั่ง DNA ให้เซลล์สืบพันธุ์ เซลล์ใหม่ไม่สามารถเกิดได้เอง แต่ได้จากการแบ่งตัวของเซลล์เดิมที่มีอยู่แล้ว ทั้งหมดที่กล่าวมารวมเป็น Cell theory ดังนี้

สิ่งมีชีวิตทั้งหมดประกอบด้วย 1 เซลล์ หรือมากกว่า
เซลล์เป็นหน่วยพื้นฐานของชีวิต
เซลล์ใหม่เกิดขึ้นได้จากเซลล์ที่มีอยู่แล้วเท่านั้น

3. เครื่องมือศึกษาเซลล์

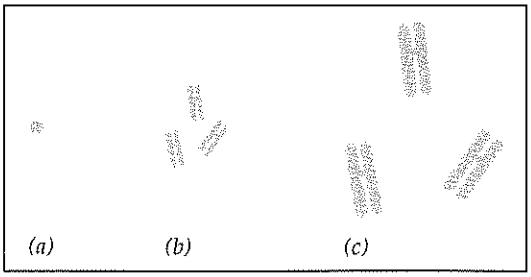
3.1 Light Microscope (LM)

กล้องจุลทรรศน์แสง ทำงานโดยการหักเหแสงผ่านศูนย์กลางของเลนซ์ เมื่อดูตัวอย่าง (specimen) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงแบบเลนซ์ประกอบ (compound light microscope) แสงที่ปล่อยจากแหล่งแสงถูกรวบรวม (focus) ด้วยเลนซ์ควบแสง (Condenser lens) มาที่ specimen แสงจาก specimen ถูกหักเหด้วยเลนซ์วัตถุ (Objective lens) ได้ภาพจริงขยายใหญ่ (enlarged real image) ภาพนี้จะถูกใช้เป็นวัตถุของเลนซ์อีกตัวคือ เลนซ์ใกล้ตา (Ocular lens) ให้ได้ภาพเสมือนขยายใหญ่ (enlarged virtual image) (ขยายครั้งที่ 2) และภาพนี้จะทำหน้าที่เป็นวัตถุของนัยตา ซึ่งจะทำให้เกิดภาพจริง (real image) ที่จอภาพของตา (retina) เมื่อปรับปุ่มโฟกัสของกล้อง ระยะทางที่สัมพันธ์กันระหว่าง specimen กับ objective lens ทำให้ภาพสุดท้ายถูกโฟกัสอย่างพอดีบนแผ่นเยื่อ retina (รูปที่ 1) โดยไม่คำนึงถึงระยะทางระหว่าง objective lens กับ ocular lens เพราะเป็นระยะกระบอกเลนซ์คงที่



รูปที่ 1. Optical pathway ใน compound microscope. (a) ทางเดินแสงจากแหล่งแสง (b) มุมของแสงที่ให้ผลต่อ resolution ของ objective lens (c) ทางเดินแสงใน moderm compound microscope.

กำลังขยาย - **Magnification** ของภาพคือกำลังขยายที่ได้จาก objective lens คูณกับ ocular lens ส่วนคุณภาพของภาพที่ทำให้สามารถเห็นแยกแยะส่วนต่าง ๆใน specimen ได้ชัดเจน เรียกว่า



รูปที่ 2. Magnification versus Resolution. ระหว่าง (a) ไป (b) เป็น Magnification และ Resolution แต่ ระหว่าง (b) ไป (c) เป็น Empty magnification

Resolution อาจเพิ่ม resolution ได้บ้างด้วยการเพิ่มกำลังขยายของ ocular lens ภายในขอบเขตที่ภาพเกิดได้บน retina แต่ก็ไม่ให้รายละเอียดเพิ่มเติมจากภาพที่ได้โดย objective lens ดังนั้นการเพิ่ม ocular lens จึงเป็นเพียง **Empty magnification** ซึ่งอาจบิดเบือนคุณภาพของภาพ (รูปที่ 2) resolution จึงเป็นคุณภาพทางแสง (optical quality) ของ objective lens คำนวณได้จาก

$$D = \frac{0.61\lambda}{n \sin\theta}$$

D = ระยะทางน้อยที่สุดที่ 2 จุด ใน specimen ถูกแยกออกจากกันให้เห็นได้ หรือ Resolving power

λ = wavelength ของแสง 527 nm

n = refractive index

θ = มุมแสงจาก specimen ถึงศูนย์กลาง lens

$n \sin\theta$ คือ Numerical aperture (N.A.) เพราะมุมกว้างที่สุด = 90 องศา และ $\sin 90 = 1$

Numerical Aperture คือ คุณภาพในการรวมแสงของ lens เป็นค่าคงที่ของแต่ละ lens ปกติใช้ค่าสูงสุด ซึ่งเท่ากับค่า refractive index เช่น อากาศ N.A. = 1 น้ำมัน N.A. = 1.5 ในการใช้กล้องมีกฎง่าย ๆ ว่า กำลังขยายที่ให้ผลดีควรเป็น 1000 เท่าของ numerical aperture ของ objective lens ที่ใช้ ถ้าเพิ่มกำลังขยายภาพมากกว่านี้จะได้เพียง empty magnification และยังได้คุณภาพของภาพที่ผิดเพี้ยนด้วย ค่า numerical aperture สูงได้ด้วยการใช้เลนส์ที่มี focal length สั้นซึ่งจะทำให้เลนซ์ถูกวางใกล้กับ specimen มาก ถ้าแทนค่าในสมการด้วยคลื่นแสงขั้นต่ำ และ numerical aperture สูงสุด จะได้ค่า Limit ของ resolution หรือ **Resolving Power**

Resolving Power $D = \frac{0.61 \times 527nm}{1.5} = \mathbf{212}\ nm$

$= 0.2\ \mu m$

Light microscope จึงมี Resolving power เพียงพอที่จะแยก organelles ขนาดใหญ่ในเซลล์ เช่น nucleus และ mitochondria ซึ่งมองไม่เป็นด้วยตาเปล่า ตาเปล่าของคนเรามี numerical aperture ประมาณ 0.004 ตาเปล่าจึงมี Resolving power เท่ากับ 0.1 mm

นอกจากนี้ ความบกพร่องของเลนซ์จะมีผลต่อ resolving power อย่างมาก เพื่อให้ objective lens มีค่า resolving power ที่ใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี objective lens จึงถูกสร้างจากชุดของเลนซ์ หลายเลนซ์ซ้อนกัน (complex series of lenses) แทนการใช้เลนซ์นูนอันเดียว (single convergent lens) เพื่อแก้ปัญหาความบกพร่องของเลนซ์ เลนซ์ชุดหนึ่งให้กำลังขยายตามความต้องการ ในขณะที่เลนซ์ชุดอื่นๆช่วยชดเชยความบกพร่องของเลนซ์ชุดแรกทำให้แก้ไขภาพทั้งหมดได้ถูกต้องดีขึ้น ในการใช้กล้องจุลทรรศน์ นอกจาก **Limit of Resolution** แล้วต้องคำนึงถึงความสามารถในการเห็น **Visibility** ด้วย ซึ่งปัจจัยนี้จะช่วยให้สังเกตเห็นวัตถุได้

อย่างแท้จริง นั่นคือเมื่อวัตถุอยู่ที่นั่นวัตถุจึงควรถูกมองเห็น เราสามารถเห็นภาพได้ เพราะวัตถุกระทบแสงต่างจากหลังฉาก (background) ของวัตถุนั้น หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง การมองเห็นก็คือความแตกต่างในการปรากฏระหว่างวัตถุกับหลังฉากของวัตถุ ซึ่งเรียกว่า **Contrast** จากนั้นแสงที่กระทบวัตถุจะสะท้อนเข้าตาเรา ทำให้เรามองเห็นวัตถุนั้นๆ ในกล้องจุลทรรศน์ วัตถุถูกวางระหว่างแหล่งของแสงกับตาเรา เราเห็นแสงที่สะท้อนจากวัตถุส่งเข้าตา แต่ถ้าวัตถุโปร่งแสงหรือกึ่งโปร่งแสง แสงทะลุวัตถุหมดหรือเกือบหมด ทำให้มองไม่เห็น จึงต้องย้อมสีวัตถุ เพื่อให้สีช่วยดูดซับแสงให้อยู่ในวัตถุทำให้เรามองเห็นวัตถุมีสีตามที่ย้อม

3.2 Transmission Electron Microscope (TEM)

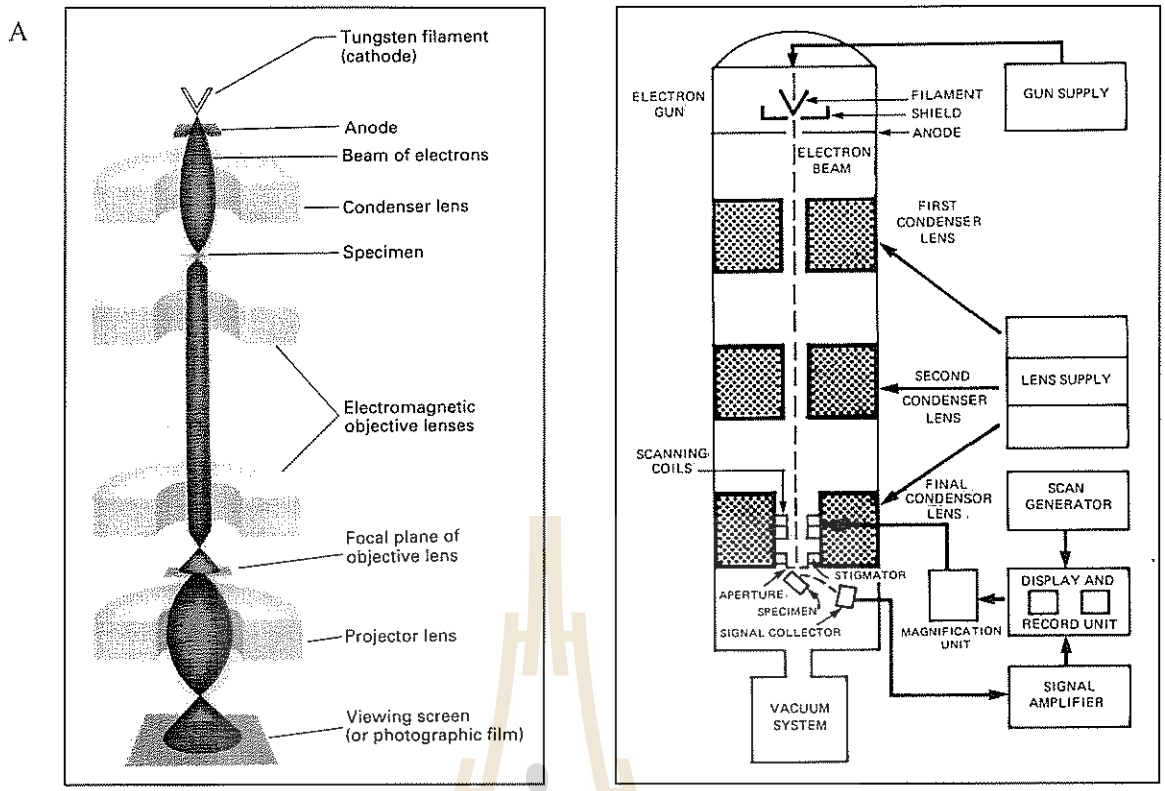
TEM เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบแสงผ่านใช้ศึกษาโครงสร้างภายในของเซลล์ โดยใช้ **Electrons** แทนแสง และใช้สนามแม่เหล็ก – **Magnetic fields** เป็นเลนซ์ electrons เป็นอนุภาคที่มีพฤติกรรมคล้ายคลื่น มีความยาวคลื่นประมาณ 0.005 nm หรือสั้นกว่าแสงที่เรามองเห็นประมาณ 100,000 เท่า electrons ถูกเร่งและถูกรวม (focus) ได้ และ electric charge ของ electrons แต่ละอนุภาคตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กซึ่งทำหน้าที่เป็นเลนซ์ สนามแม่เหล็กถ่าง electrons ไปตามวิถีที่กำหนดไว้ ซึ่งเป็นท่อสูญญากาศและส่ง electrons ไปยังจุด focus

แหล่งของ electrons คือ Tungsten filament เป็นขั้วลบ (cathode) tungsten filament ถูกทำให้ร้อนจะปล่อย electrons ออกมา electrons ถูกเร่งเป็นลำ หรือ beam ละเอียด ได้ด้วยกระแสไฟฟ้าแรงสูงที่ให้ระหว่างขั้วลบ (cathode) กับขั้วบวก (anode) และมี Condenser lens ทำหน้าที่ focus electrons beam ให้ตกบน specimen แล้วผ่านไป objective lens ได้ภาพจริง ซึ่งภาพนี้จะเป็นวัตถุของ ocular lens ให้ได้ภาพสุดท้ายของกล้อง (รูปที่ 3) กำลังขยายของภาพขึ้นกับกระแสไฟฟ้า (current) ที่ใช้ กำลังขยายอยู่ระหว่าง 1000 เท่า ถึง 250,000 เท่า แล้วแต่คุณภาพของกล้อง การเกิดภาพจาก electrons เกิดได้โดย electrons เมื่อกระทบ specimen แล้ว electrons กระจายจากส่วนต่างๆ ของ specimen ไม่ท่ากัน เพราะความหนาของส่วนประกอบภายใน specimen แตกต่างกัน เมื่อใช้ แผ่นฟิล์ม รับ electrons ปฏิกิริยาที่ electrons กระทำต่อสารที่เคลือบบนแผ่นฟิล์มจึงไม่เท่ากัน ทำให้ได้เป็นภาพของ specimen นั่นเอง ภาพจาก TEM เป็นภาพ 2 มิติ

Resolution power ของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนขึ้นกับ **Wavelength** ของ electrons ซึ่งขึ้นอยู่กับ voltage ที่ใช้เร่ง electrons ดังสมการ

$$\lambda = \sqrt{150/V}$$

TEM มาตรฐานใช้ voltage ระหว่าง 10,000 – 100,000 V เช่นที่ 60,000 V, λ เท่ากับ 0.05 A°, limit of resolution จะเท่ากับ 0.03 A° แต่เนื่องจากความบกพร่องของเลนซ์ resolution จะเหลืออยู่ระหว่าง 3 - 5 A° ซึ่งสามารถศึกษาส่วนประกอบของเซลล์ที่มีขนาด 10-15 A° ได้



รูปที่ 3. เปรียบเทียบแหล่ง ทางเดินและตำแหน่งภาพ ของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน TEM (a) และ SEM (b)

3.3 Scanning Electron Microscope (SEM)

SEM กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบแสงกวาดผ่าน ใช้ศึกษาผิวหรือรูปร่างของผิวของเซลล์หรือวัตถุทั้งชิ้น ส่วนประกอบและการทำงานของ SEM แตกต่างกับ TEM ใน SEM electrons ถูกเร่งให้เป็น beam ที่แคบ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 nm) ภาพที่เกิดขึ้นไม่ใช่ภาพโดยตรง ภาพเกิดจาก electrons 2 ชุด คือ (1) electrons ที่สะท้อนไปมาใน specimen แล้วออกจาก specimen หรือ (2) electrons ที่ออกจาก specimen หลังจาก specimen ถูกกระทบด้วย electrons จากชุดแรก แล้ว electrons (ทั้งสองชุด) ไปกระทบ **Detector** ที่วางอยู่ใกล้ ๆ ผิวของ specimen ให้จับสัญญาณของ electron beam แล้ว beam ถูกขยายให้สัญญาณสูงขึ้นและให้ไปตกบนจอ กลายเป็นภาพบนจอ (รูปที่ 3)

กำลังขยายของ SEM ได้ประมาณ 500 เท่าของ LM ภาพของ SEM เป็นภาพ 3 มิติ เหมาะในการศึกษาโครงสร้างชั้นนอกของเซลล์และ extracellular materials ที่มีปฏิสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อม

4. Classification of Cells

ภายหลังที่มีการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนศึกษาเซลล์อย่างกว้างขวาง ทำให้สามารถจำแนกเซลล์ออกได้เป็น 2 classes คือ **Prockaryotic cell** และ **Eukaryotic cell** ซึ่งแตกต่างกันโดยขนาดและชนิดของโครงสร้างภายในหรือของ organelles (ตารางที่ 1) การที่เซลล์สองกลุ่มมีแตกต่างกันแสดงถึงพื้นฐานของวิวัฒนาการของเซลล์ เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์เดี่ยว กำเนิดเมื่อ 3.8 พันล้านปีมาแล้ว เซลล์ชนิดแรกคือ

Prokaryotic cell ซึ่งมีลักษณะภายในง่าย ๆ ต่อมาวิวัฒนาการได้เปลี่ยนให้เซลล์ขนาดใหญ่ขึ้นและซับซ้อนมากขึ้นจนกลายเป็น Eukaryotic cell

ตารางที่ 1. COMPARISON OF CELL ORGANIZATION IN PROKARYOTES AND EUKARYOTES

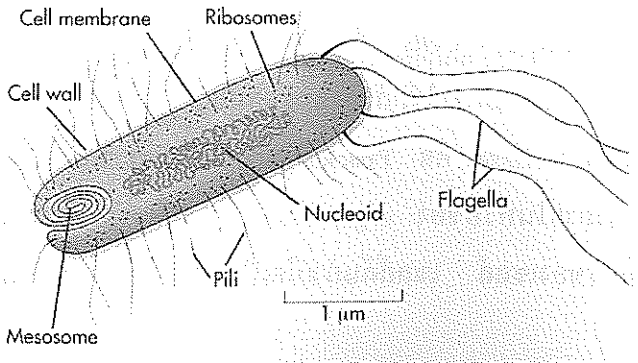
	Prokaryotic Cells *Bacteria, blue-green algae, and mycoplasm*	*Eukaryotic Cells* *Protozoa, other algae, metaphyta, and metazoa*
Nuclear Envelope	Absent	Present
DNA	Naked	Combined with Proteins
Chromosomes	Single	Multiple
Nucleolus	Absent	Present
Division	Amitosis	Mitosis or Meiosis
Ribosomes	70S (50S + 30S)*	80S (60S + 40S)*
Endomembranes	Absent	Present
Mitochondria	Respiratory and Photosynthetic Enzymes in the Plasma Membrane	Present
Chloroplast	Absent	Present in Plant Cells
Cell Wall	Non-cellulosic	Cellulosic, Only in Plants
Exocytosis and Endocytosis	Absent	Present
Locomotion	Single Fibril, Flagellum	Cilia and Flagella

S = Swedberg

4.1 Prokaryotic cells

Prokaryotic cells แปลว่า เซลล์ก่อนมีนิวเคลียส เซลล์มีลักษณะง่าย ๆ แต่มีความแตกต่างกันมากทางชีวเคมี เช่น bacteria ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ง่ายที่สุดในด้านโครงสร้างที่พบในธรรมชาติ มีรูปร่างทรงกลม (spherical) หรือแท่ง (rod-shaped) ความยาวหลายไมครอน (1 $\mu m = 10^{-6} m$) มีเปลือกเหนียวสำหรับป้องกันเซลล์ เรียกว่า ผนังเซลล์ "Cell wall" ใต้ cell wall มีเยื่อหุ้มเซลล์ เรียกว่า เยื่อเซลล์ "Cell membrane" หรือ "Plasma membrane" ซึ่งส่วนประกอบจะได้กล่าวถึงในหัวข้อ Cell wall ต่อไป ภายใน "Cytoplasm" ประกอบด้วย DNA, RNA, Proteins และโมเลกุลเล็ก ๆ จำนวนมาก DNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมมีเพียง 1 โมเลกุล หรือกล่าวได้ว่า prokaryotic cell มี chromosome 1 แท่ง หรือ 1 โมเลกุล DNA ไม่มีเยื่อห่อหุ้มให้อยู่เป็นขอบเขตที่แน่นอน บริเวณที่มีสารพันธุกรรม เรียกว่า **Nuclear body** หรือ **Nucleoid** เซลล์ไม่มี organelles ยกเว้น **Ribosomes** (รูปที่ 4)

เยื่อเซลล์ของ prokaryotic มีส่วนประกอบพื้นฐานเหมือนเซลล์ eukaryotic เนื่องจาก prokaryotes ไม่มี mitochondria หรือ chloroplast การสร้างพลังงาน ATP เกิดขึ้นที่ cell membrane

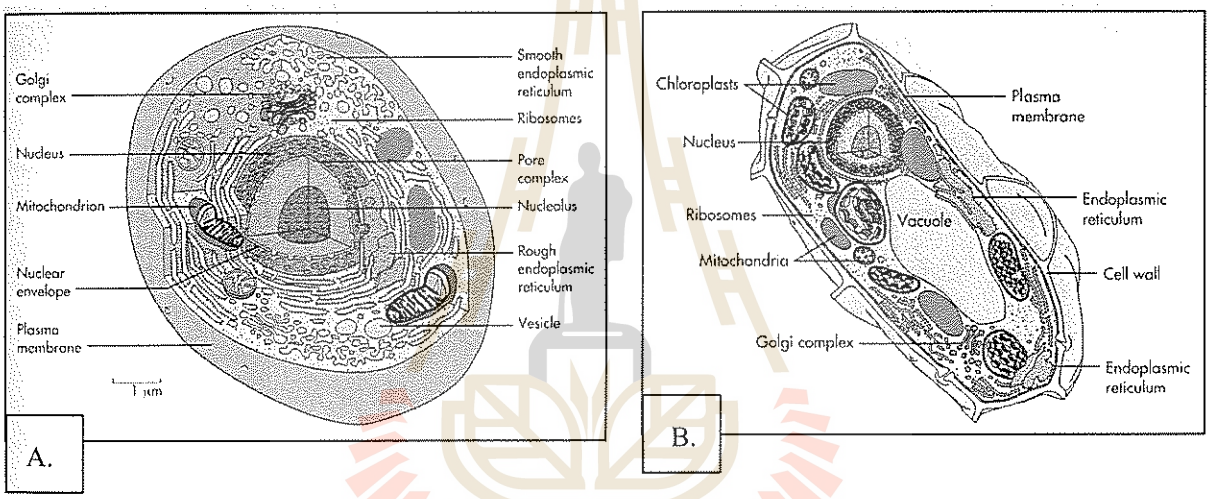


รูปที่ 4. Bacteria

ในธรรมชาติ bacteria มีอยู่หลายชนิด ขึ้นอยู่กับสภาพนิเวศ และส่วนประกอบทางชีวเคมีต่าง ๆ กัน Bacteria แบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1) Archaebacteria พบในบางแห่งเท่านั้น เช่น methanogens, halophiles, thermophiles, และ hyper-thermophiles และ 2) Eubacteria พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ และ สิ่งมีชีวิตอื่น เช่น mycoplasma, bacteria, และ cyanobacteria (blue-green algae)

4.2 Eukaryotic cells

Eukaryotic แปลว่า nucleus แท้จริง จัดเป็นเซลล์ชั้นสูง โครงสร้างและหน้าที่ซับซ้อนกว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 - 100 μm สารพันธุกรรมมีหลายโมเลกุล และมี nuclear envelope หุ้มแยกออกจาก cytoplasm เรียกว่า **Nucleus** ใน cytoplasm มี organelles ทั้งชนิดมีเยื่อเมมเบรนและชนิดไม่มีเยื่อเมมแบรน (รูปที่ 5)



รูปที่ 5. Animal cell (a) และ Plant cell (B).

Eukaryotic cells มีวิวัฒนาการมาจาก prokaryotic cells ภายหลังที่มี oxygen สะสมมากขึ้นในบรรยากาศของโลกแล้ว เชื่อว่า aerobic prokaryotes อยู่ร่วมกันแบบ **"Symbiosis"** เป็นเวลานานจนวิวัฒนาการกลายเป็น eukaryotic cells โดยเซลล์เล็กกว่ากลายเป็น mitochondria หรือ chloroplast eukaryotic cells จึงมีความซับซ้อนมากกว่า prokaryotic cells คือมี organelles ที่ชัดเจนและทำหน้าที่เฉพาะอย่าง ดังจะกล่าวต่อไป สิ่งมีชีวิตในกลุ่ม eukaryotic cells ได้แก่เซลล์ของ protist, fungi, algae, plants และ animals

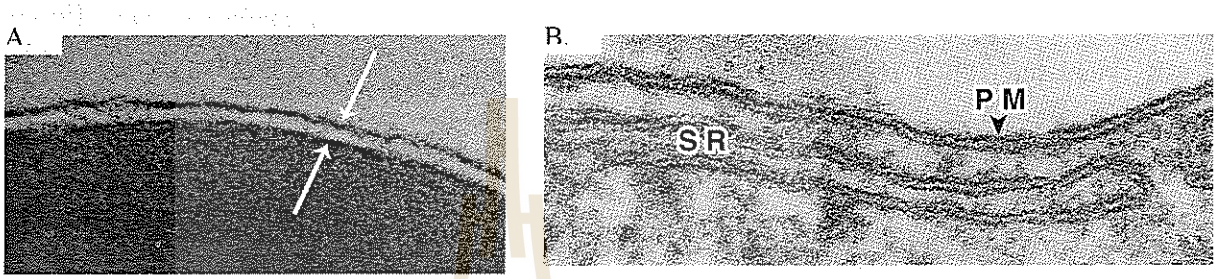
5. Cell Structure and Function ของ Eukaryotic Cells

5.1 เยื่อชีวภาพ - Biological membrane

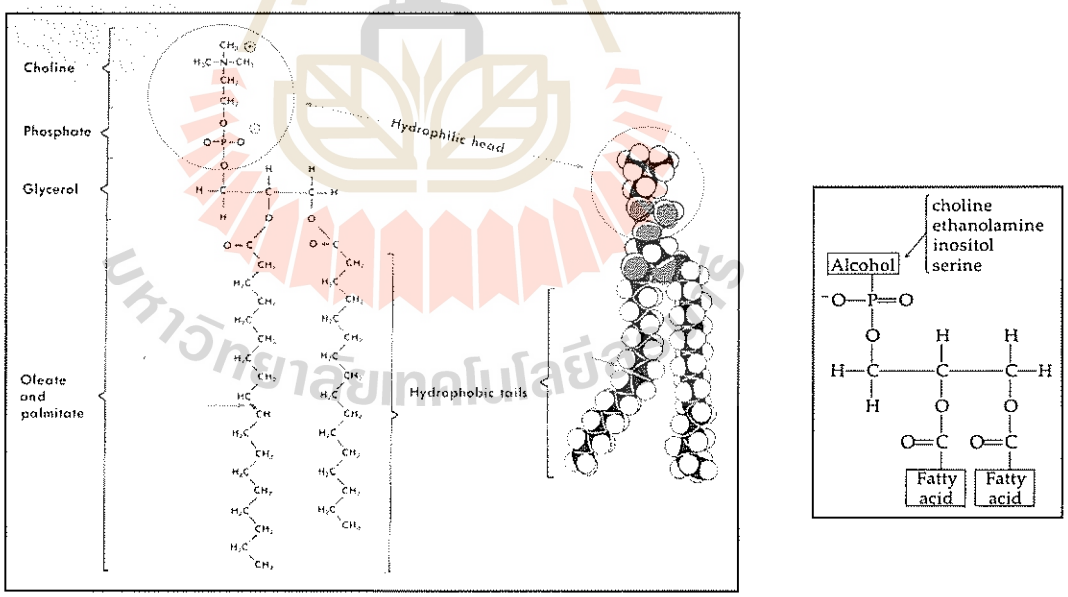
เยื่อชีวภาพ หมายถึง เยื่อที่ห่อหุ้ม protoplasm ของเซลล์ หรือ plasma membrane หรือ cell membrane และเยื่อของ organelles ที่เป็นถุงหรือช่องภายในเซลล์ ซึ่งทั้งหมดมีส่วนประกอบพื้นฐานหลักของโครงสร้างเหมือนกันคือ ประกอบด้วย lipids และ proteins

5.1.1 Membrane lipids

เยื่อชีวภาพมี lipid เป็นโครงสร้าง และเป็น lipid ชนิด phospholipid ซึ่งเป็น amphipathic กล่าวคือ ส่วนหัวมี **Phosphate** เป็น **Hydrophilic head group** และส่วนหางมีสายยาวของ **Fatty acid** เป็น **Hydrophobic tail** (รูปที่ 7) โมเลกุลของ phospholipid เรียงเป็น 2 แถวโดยเอา hydrophobic tails หันเข้าหากัน และเอาส่วน hydrophilic head ออกสู่ผิวทั้งสองด้าน ทำให้ได้เป็นแผ่นไขมัน 2 ชั้น หรือ **Lipid bilayer** ซึ่งเรียกว่า **Unit membrane** ความหนาของ bilayer แล้วแต่ชนิดของโครงสร้าง เช่น membrane ชั้นในของ mitchondria หนาประมาณ 50 A° และ plasma membrane หนาประมาณ 90 - 100 A° (รูปที่ 6)



รูปที่ 6. A: Electron micrograph ของ Lipid bilayer หรือ Unit membrane และ
B: Plasma membrane (PM) และ Smooth endoplasmic reticulum (SR)



รูปที่ 7. A: แสดง Amphipathic ของ Phospholipid (Phosphatidlycholine) และ
B: Phosphoglycerides ที่มี Head groups ต่าง ๆ แทน Alcohol

Membrane lipids มี 3 อย่างหลักคือ 1) phosphoglycerides, 2) sphingolipids และ 3) cholesterol

Phosphoglycerides มีมากที่สุดใน membrane ปกติ phosphoglycerides มี fatty acid สายหนึ่ง เป็น unsaturated และอีกสายหนึ่งเป็น saturated ส่วน phosphate ที่หัวโมเลกุล อาจมี group อื่นอีก (รูปที่ 7, B) เช่น choline เป็น phosphatidylcoline, ethanolamine เป็น phosphatidylethanolamine, serine เป็น phosphatidylserine หรือ inositol เป็น phosphatidylinositol ช่วยให้ส่วนหัวของโมเลกุลนี้มีประจุทำปฏิกิริยากับน้ำหรือเป็น water-soluble domain

Sphingolipides มี sphingosine จับกับ fatty acid ได้โมเลกุลที่เรียกว่า **Ceramide** ซึ่งมี group อื่นที่หัวได้เช่น phosphorylcholine เป็น sphingomyelin (ตารางที่ 2) ใน membrane ของเซลล์ประสาท sphingomyelin มี group carbohydrate ต่อได้เป็น Glycolipid ถ้ามี 1 simple sugar เรียกว่า Cerebroside ถ้าเป็น oligosaccharide เรียกว่า **Gangioside** เช่น Blood group antigens ของ ABO blood system พบว่าหนูเมาส์ที่ไม่มี galactocerebroside ทำให้กล้ามเนื้อสั่นและเป็นอัมพาต โดยทั่วไป glycolipids มีสำคัญต่อ cell growth, cell death, cell-cell interactions และ cell communication จากภายนอกสู่ภายในเซลล์ และยังเป็นที่จับของเชื้อโรคบางอย่างเมื่อเชื้อโรค infect เซลล์ เช่น cholera toxin และ influenza virus.

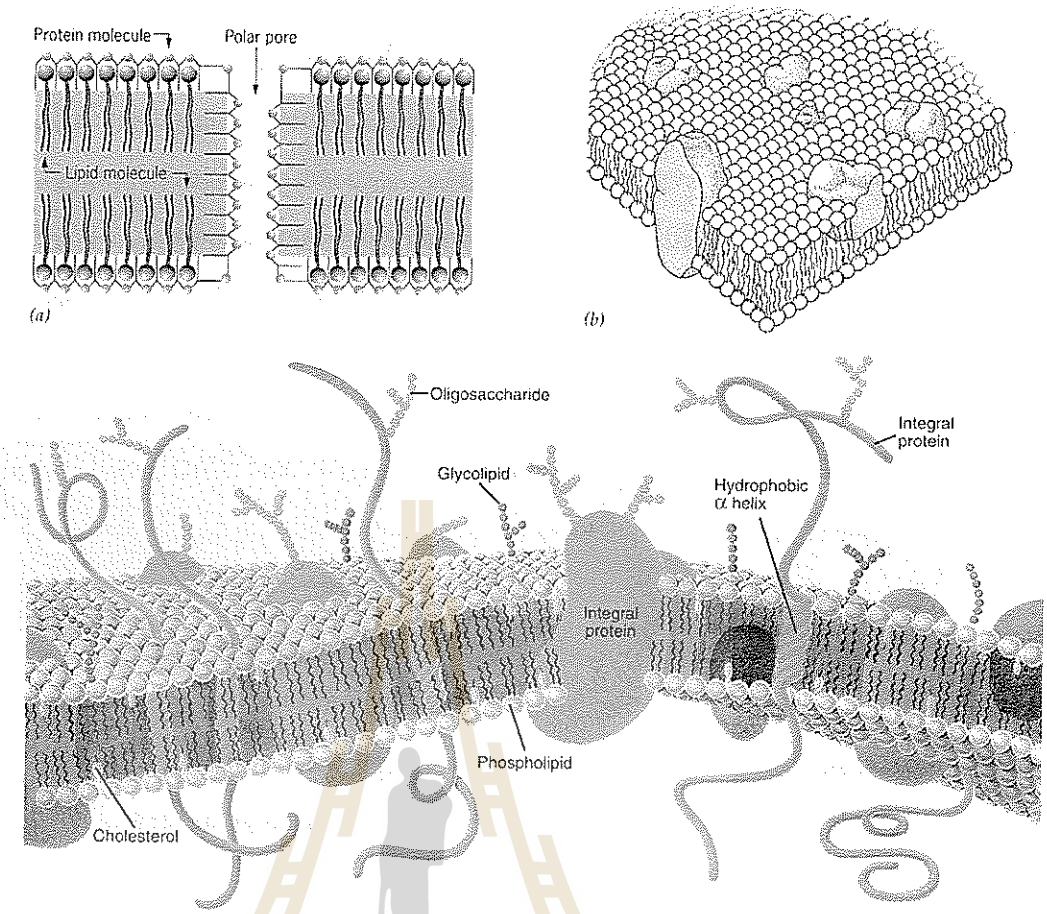
Cholesterol ใน cell membrane ของเซลล์สัตว์ ไม่พบในเซลล์พืชและ bacteria cholesterol เป็น amphipathic น้อย โมเลกุลเรียงตัว โดย hydrophilic hydroxyl group หันออกทางผิวเมมเบรน hydrophobic tail ยื่นเข้าภายใน lipid bilayer ส่วน rings ของ cholesterol มีลักษณะแบนและคงตัวทำให้ขัดขวางการเคลื่อนที่ของ fatty acid tails ของ phospholipids

ตารางที่ 2. Classification ของ Phophatides และ Glycolipids

Name	*Main Alcohol Component*	*Other Alcohol Components*	*P:N Ratio*
I. Glycerophosphatides			
1. Phosphatidic acids	Diglyceride (= glycerol diester)		1:0
2. Lecithins	Diglyceride (= glycerol diester)	Choline	1:1
3. Cephalins	Diglyceride (= glycerol diester)	Ethanolamine, serine	1:1
4. Inositides	Diglyceride (= glycerol diester)	Inositol	1:0
5. Plasmalogens ("acetyl phosphatides")	Glycerol ester and enol ether	Ethanolamine, choline	1:1
II. Sphingolipids			
1. Sphingomyelins	N-Acylsphingosine	Choline	1:2
2. Cerebrosides	N-Acylsphingosine	Galactose,† glucose†	0:1
3. Sulfatides	N-Acylsphingosine	Galactose†	(1 H_2SO_4)
4. Gangliosides	N-Acylsphingosine	Hexoses,† hexosamine,† neuraminic acid†	no P

5.1.2 Membrane proteins

ปริมาณและชนิดของ proteins ในเมมเบรนแล้วแต่ชนิดของเซลล์และ organelles โปรตีนเรียงตัวไม่สม่ำเสมอทำให้เมมเบรนมีลักษณะคล้ายก้อนวัตถุลอยในของเหลวซึ่งเรียกว่า **Fluid Mosaic Model** (รูปที่ 8) และตำแหน่งเฉพาะของโปรตีนสัมพันธ์กับ cytoplasm ทำให้ได้คุณสมบัติเฉพาะแตกต่างกัน เช่น



รูปที่ 8. โครงสร้างของ Biological membrane. (a) Lipid bilayer ที่มี protein-lined pore. (b) Fluid Mosaic Model. (c) Plasma membrane แสดง Phospholipid bilayer, Membrane proteins, Glycoproteins และ Glycolipids

โปรตีนที่ต้องมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์อื่น หรือ สารเคมีภายนอก (extracellular ligands) เช่น hormones โปรตีนเช่นนี้จะยื่นส่วนของโมเลกุลออกด้านนอกเซลล์ ส่วนโปรตีนที่ทำปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลใน cytoplasm เช่น G proteins หรือ protein kinases ซึ่งเป็นเอนไซม์ โปรตีนเช่นนี้จะยื่นส่วนโมเลกุลเข้าหา cytoplasm จากการจัดเรียงตัวของโมเลกุล membrane protein ถูกแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (รูปที่ 8)

1) **Integral protein (Intrinsic protein)** โปรตีนที่แทรกผ่าน lipid bilayer หรือเป็น Transmembrane proteins มีส่วนยื่นออกทั้งด้าน extracellular และ ด้าน cytoplasm เพราะส่วนนี้มี ionic และ polar amino acids มาก ส่วนที่ผ่าน membrane lipid เป็นส่วน hydrophobic มีความสำคัญต่อ dynamic property ของเมมเบรน

2) **Peripheral protein (Extrinsic protein)** โปรตีนที่วางตัวทั้งหมดอยู่ด้านนอกของ bilayer หรือบนผิวด้าน cytoplasm ยึดติดกับเมมเบรนด้วย noncovalent bonds (electrostatic bonds) กับ hydrophilic head groups หรือกับส่วน hydrophilic ของ integral proteins เช่น โปรตีนใน spectrin family ซึ่งเป็นเส้นใยตาข่าย

ค้ำจุนเมมเบรนด้านในยึดกับ integral proteins บางชนิดทำหน้าที่เป็น enzymes หรือ factors รับสัญญาณข้ามเมมเบรน

3) **Lipid-anchored protein** อยู่ด้านนอกของ lipid bilayer ด้าน extracellular หรือด้าน cytoplasm โมเลกุลทำ covalent bonds lipid ใน bilayer โปรตีนที่ติดอยู่ด้านนอกทำหน้าที่เป็น receptors, enzymes หรือ cell adhesion เช่น glycophosphatidylinositol ของเม็ดเลือดแดง ถ้าขาดไปจะทำให้เป็นเลือดแดงแตกง่าย โปรตีนที่ติดอยู่ด้านใน มี 2 ชนิดคือ Src และ Ras ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนเซลล์ปกติให้เป็นเซลล์มะเร็ง

Membrane มีลักษณะเป็นของเหลว Fluidity เป็นผลดีต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์และล้อมรอบปฏิกิริยาให้เกิดในบริเวณเฉพาะภายในเซลล์ หรือทำให้เกิดโครงสร้างพิเศษ เช่น ยึดเซลล์ให้ติดกัน (intercellular junction) จับแสง (light-capturing complex) และ เชื่อมต่อเส้นประสาท (synapses) นอกจากนี้ทำให้กระบวนการต่าง ๆ เป็นไปได้ เช่น cell movement, cell growth, secretion และ endocytosis fluidity ของเมมเบรนขึ้นกับปริมาณของ unsaturated fatty acids และความยาวของสาย fatty acids ถ้า unsaturated fatty acids มากจะลดจุดหลอมเหลวลง เช่นเดียวกับ fatty acids ที่สั้นกว่าก็จะลดจุดหลอมเหลวลงเช่นกัน ดังนั้นการปรับส่วนประกอบของ fatty acid จะทำให้รักษา fluidity ของเมมเบรน หรืออุณหภูมิภายในเซลล์ให้เซลล์ทำงานได้ปกติ เช่น ใน mammals ที่จำศีล สัตว์น้ำในที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงมากระหว่างกลางคืนกับกลางวัน พืชต่อต้านความหนาว หรือ bacteria ในน้ำพุร้อน

Surface-to-Volume Ratio

เซลล์ส่วนมากมีขนาดเล็กมาก ความสัมพันธ์ของ **Surface-to-Volume Ratio** จะเป็นปัจจัยจำกัดต่อการเพิ่มขนาดของเซลล์ ความสัมพันธ์นี้ก็คือ การเพิ่มปริมาตรเป็นกำลัง 3 ของเส้นผ่าศูนย์กลาง ส่วนการเพิ่มพื้นที่ผิวเป็นกำลัง 2 เมื่อเซลล์ขยายตัวเพิ่มเส้นผ่าศูนย์กลางเพียงเล็กน้อยจะเป็นผลให้เพิ่มปริมาตรมากกว่าการเพิ่มพื้นที่ผิว เซลล์ขนาดกลมใหญ่ การเคลื่อนที่ของสารอาหารและของเสียผ่าน cytoplasm จะไม่ดีเท่ากับเซลล์ขนาดเล็ก หรือเซลล์ที่ยาวและบาง หรือเซลล์ที่เมมเบรนพับม้วนไปมา เป็นการเพิ่มพื้นผิวต่อปริมาตร ดังนั้น เซลล์ขนาดเล็กกว่า หรือยืดออกพับจีบไปมา แต่สารผ่านข้ามเข้า-ออก ผิวเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่า เช่น สาหร่าย เซลล์ติดกันปลายต่อปลาย เพื่อให้แต่ละเซลล์สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรงได้มากกว่า ในพืชและสัตว์เซลล์จะอัดเบียดกันแน่นเป็นเนื้อเยื่อเพื่อให้การเคลื่อนที่ของสารผ่านเซลล์จำนวนมากเหล่านั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่า

6. Cell organelles

Organelles หมายถึง (เสมือนอวัยวะของเซลล์) ถุงหรือห้อง (compartment) ภายในเซลล์ที่มีเยื่อเมมเบรนหุ้ม และมีหน้าที่เกี่ยวกับ metabolism เฉพาะอย่าง ปฏิกิริยา metabolism ในเซลล์มีมาก ถ้าให้ปฏิกิริยาสังเคราะห์และปฏิกิริยาสลายเกิดพร้อมกันในสถานที่เดียวกัน เซลล์จะไม่ได้อะไรเลย แต่ถ้าให้การสังเคราะห์

และการสลายเกิดพร้อมกัน แต่แยกคนละสถานที่โดยทางกายภาพ ปฏิกิริยาทั้ง 2 กระบวนการจะเกิดอย่างเรียบร้อยและมีประสิทธิภาพดี เครื่องกั้นทางภายภาพก็คือ organelle membrane ซึ่งยังยอมให้ปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องสามารถเกิดได้ต่างเวลากันด้วย เช่น การสังเคราะห์และการเก็บใน organelle เดียวกัน

Eukaryotic cells มี organelles หลายชนิด แบ่ง organelles ได้เป็น 2 Classes คือ Class 1 organelles มีเยื่อเมมเบรน และ Class 2 organelles คล้าย bacteria

Class 1	**Class 2**
Endoplasmic reticulum	Mitochondria
Nucleus	Chloroplast
Golgi body	
Lysosome	
Microbody	

organelles ที่เด่นชัดที่สุดคือ Nucleus ซึ่งเป็นที่มาของคำว่า Eukaryotic

6.1 Nucleus

Nucleus เป็น organelle ที่บรรจุสารพันธุกรรม DNA nucleus แยกโมเลกุล DNA ออกจากเครื่องมือของเมตาโบลิซึม - complex metabolic machinery ใน cytoplasm ทำให้ง่ายในการเลือกโมเลกุล DNA และหุ้มให้เป็นสัดส่วนเมื่อมีการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้เมมเบรนชั้นนอกของ nucleus ยังทำหน้าที่เป็นสัญญาณสื่อสารและให้สารผ่านระหว่าง nuclear materials กับ cytoplasm

6.1.1 Nuclear envelope

Nucleus ล้อมรอบด้วย nuclear envelope ซึ่งเป็น double membrane system แต่ละชั้นของ nuclear envelope เป็น lipid bilayer และเชื่อมกันเป็นรูที่ซับซ้อนมาก (pore complex) รูปร่างเหมือนตะกร้า (basket-like) ที่มีรู (รูปที่ 9) รูทำหน้าที่ควบคุมการผ่านของสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น mRNA, tRNA และ ribosomal subunits จาก nucleus ออกสู่ cytoplasm

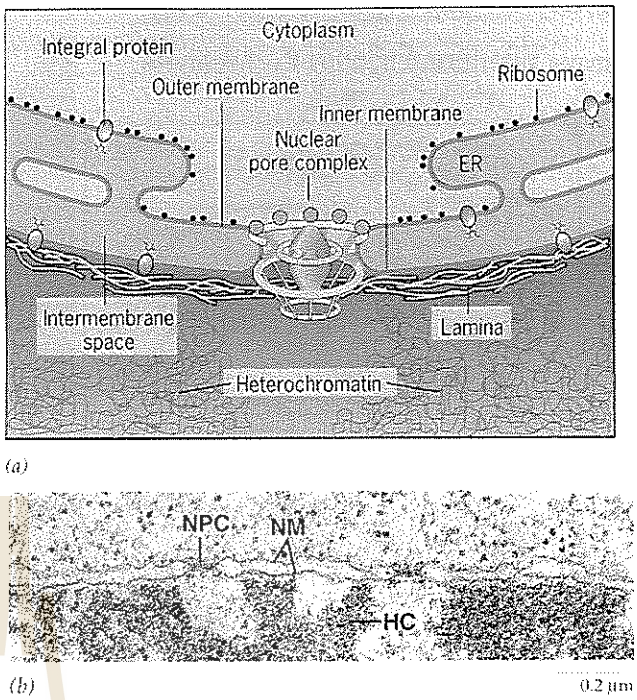
ผิวด้านในของ Inner membrane มีตาข่าย เรียกว่า **Nuclear lamina** เป็นที่ยึดเกาะของ chromatin ส่วนด้านนอกของ Outer membrane เป็นที่ยึดเกาะของ ribosome และต่อเนื่องกับ rough endoplasmic reticulum ภายใน nucleus มี

(1) Chromosomes ถ้ายืดออกเป็นเส้นใยของ nucleoprotein เรียกว่า **Chromatin**

(2) Nuclear matrix คือตาข่ายของสายใยโปรตีนขนาดเล็ก

(3) Nucleolus อาจมี 1 หรือมากกว่า มีหน้าที่ในการสังเคราะห์ ribosomal RNA ซึ่งรวมกับโปรตีนได้เป็น ribosome และ

(4) Nucleoplasm เป็นของเหลว



รูปที่ 9. (a) Nuclear pore complex และ (b) Electron micrograph ของ Nuclear membrane (NM)และ Nuclear pore complex (NPC)

6.1.2 Chromosomes

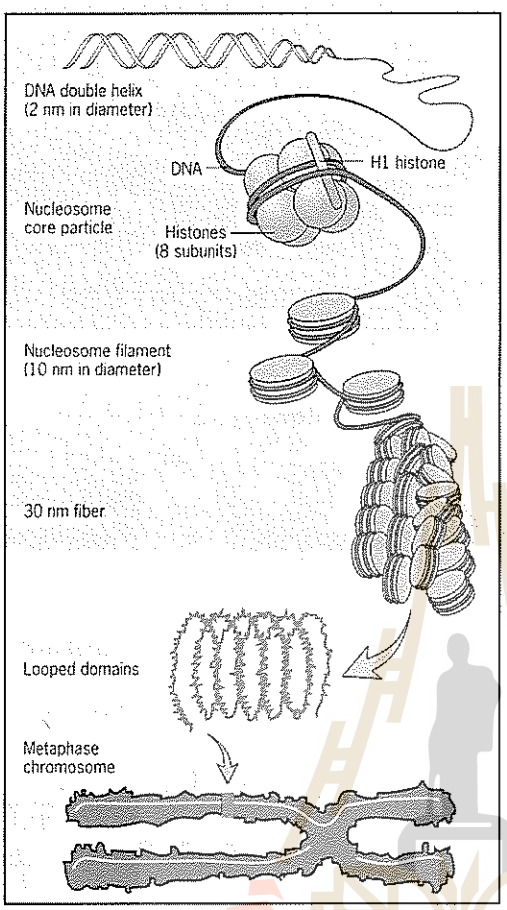
Chromosomes ปรากฏให้เห็นได้ชัดเจนก่อนเริ่ม mitosis และหายไปเมื่อการแบ่ง cell เสร็จแล้ว Chromosomes เหมือนเส้นใย ประกอบด้วย DNA และ proteins ซึ่งยึดติดอยู่ด้วยกันเรียกว่า Chromatin โปรตีนที่ประกอบอยู่กับ chromosomes มี 2 ชนิดหลักคือ (1) **Histones** เป็นโปรตีนหลัก และ (2) **Nonhistone** chromosomal proteins เหล่านี้มีหลายชนิด ทั้งเป็นโปรตีนโครงสร้าง เอนไซม์ และ โปรตีนควบคุมการทำงาน (regulatory proteins) DNA และ chromosomal proteins มีการจัดระดับการรวมกันเป็น chromosomes (chromosome organization) ที่ซับซ้อน DNA กับ histones รวมกันเป็น subunit เรียกว่า **Nucleosomes** ขนาด 10 nm หลาย ๆ nucleosome subunits ต่อกัน (รูปที่ 10)

ใน 1 nucleosome มี supercoiled DNA ประมาณ 146 base pairs พันรอบแกน histones ซึ่งมีรูปร่างเป็นแผ่นประกอบด้วย histone 8 โมเลกุล ระหว่าง 2 nucleosomes เป็น Linker DNA คือส่วนของ DNA ที่ไม่พันรอบโปรตีนยาวประมาณ 60 base pairs เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนฉครงสร้างนี้จะปรากฏเหมือนเม็ดลูกปัดที่ร้อยด้วยเชือก (**beads-on-a-string**)

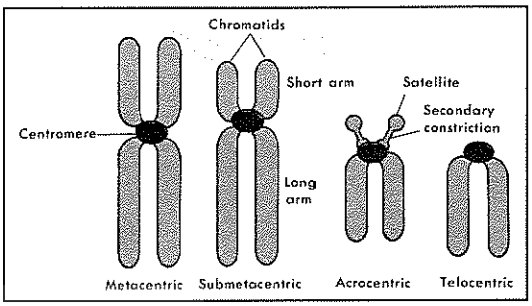
Nucleosome จะม้วนเป็นขด - solenoid 6 - 8 nucleosomes ต่อรอบ ได้โครงสร้างระดับใหญ่ขึ้นขนาด **30 nm - chromatin fiber** โดยมีโปรตีน **H1** ยึดระหว่าง nucleosomes ให้อยู่ด้วยกัน และ 30 – nm chromatin fiber ม้วนได้ขนาดใหญ่ขึ้นอีกเป็นช่วง ๆ หรือเป็น **Looped domains** และ looped domains พับจีบไปมาได้โครงสร้างใหญ่ขึ้นอีกเป็น **Chromosome** (รูปที่ 14)

Heterochromatin และ Euchromatin : หลัง mitosis chromatin ที่อัดแน่นในลักษณะ chromosomes ยืดออก เข้าสู่ระยะ interphase แต่มีประมาณ 10 % ของ chromatin ยังคงอัดแน่นตลอดช่วง interphase เรียก

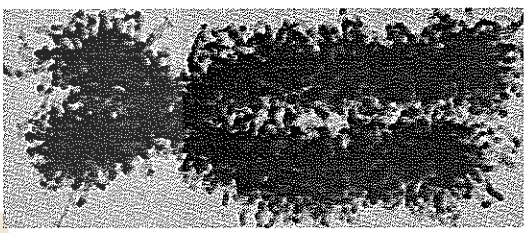
ว่า **Heterochromatin** chromatin เหล่านี้เห็นได้ที่บริเวณรอบนอก (peripheral) ของ nucleus ส่วน chromatin ที่ยืดออกแล้วเรียกว่า **Euchromatin**



Classification of Chromosomes



Electron Micrograph of a Chromosome

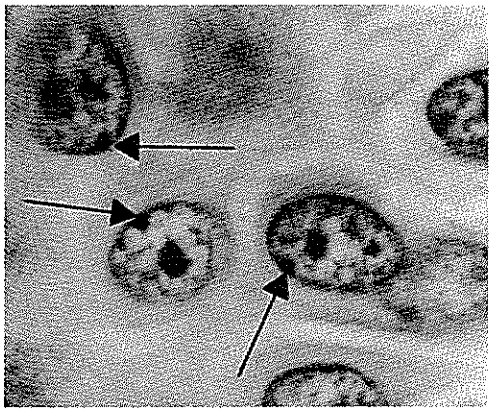
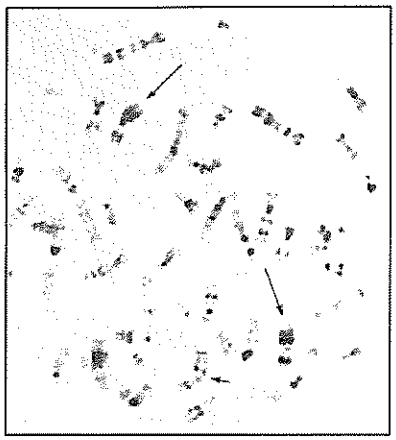


รูปที่ 10. Oraganization ของ Chromosome จาก DNA รวมกับ Proteins

Heterochromatin จะเห็นเป็นส่วนหรือบริเวณที่ย้อมติดสีเข้มจัด และเป็นส่วนที่มี transcription น้อยมาก หรือไม่มีเลย heterochromatin แบ่งเป็น 2 classes 1) **Constitutive heterochromatin** หมายถึง herterochromatin ที่อัดแน่นอย่างถาวร 2) **Facultative heterochromatin** หมายถึง heterochromatin ที่ อัดแน่นชั่วคราว

1) **Constitutive heterochromatin** ใน mammalian cells พบมีอยู่รอบ centromere ของแต่ละ chromosome และปลายแขนของ Y chromosome ในพืชพบที่ telomere ของ chromosome DNA ของ constitutive heterochromatin มี 2 - 3 genes เมื่อ genes ที่ปกติ active เคลื่อนย้ายเข้าไปใน heterochromatin genes เหล่านั้นมีแนวโน้มที่จะทำให้ ตัวเอง inactive ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า **Position effect**

2) **Facultative heterochromatin** จะ inactive เฉพาะช่วงหนึ่งของชีวิต เช่น ในเพศเมียมี 2 X chromosomes โดยที่ X chromosome หนึ่ง active และอีก X chromosome จะ inactive และอัดแน่นเป็น heterochromatin เรียกว่า **Barr body** ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างพัฒนาการของ embryo ระยะแรก (รูปที่ 11) ส่วนการกลับคืนสู่ euchromatin หรือ reactivation ของ heterochromatized X chromosome เกิดใน germ cells ก่อนจะเกิด meiosis เป็นผลให้ X chromosomes ทั้ง 2 active ในทุก gametes

(a)  (b) 

รูปที่ 11. Micrographs ของ Barr body ของ X Chromosomes, (a) : เซลล์ ที่มี XX chromosmes และ (b) : เซลล์ ที่มี XXX chromosmes.

6.1.3 Nucleolus

Nucleolus เป็นก้อนทึบรูปร่างไม่สม่ำเสมอ เซลล์ส่วนมากมี 2 - 3 nucleoli ในเซลล์ไข่ของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำในระหว่างการพัฒนาอาจมีได้จำนวนมาก

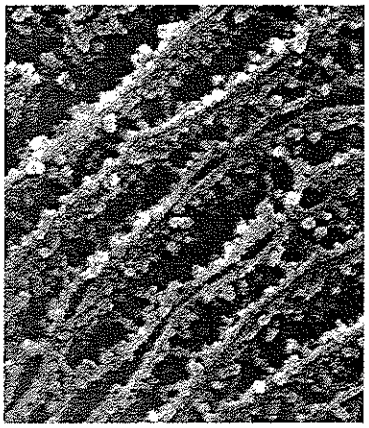
Nucleolus มี DNA และ rRNA และสารที่ใช้รวมตัวกันเป็น ribosomes ก่อนที่จะถูกส่งไปยัง cytoplasm

6.2 Endoplasmic reticulum

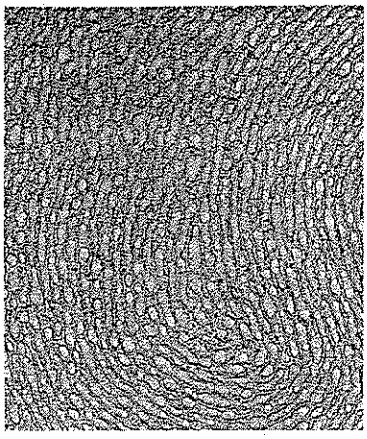
ระบบเมมเบรนภายในเซลล์เป็นระบบเครือข่ายของ organelles ที่มีพลวัต (dynamic) ส่งสารไปมาระหว่างจากส่วนหนึ่งของเซลล์ไปยังอีกส่วนหนึ่ง เช่น protein ถูกส่งจาก endoplasmic reticulum ไป Golgi complex แล้วหลุดออกมาเป็นถุงสำหรับส่งสาร (transport vesicle) ถุงนี้จะเคลื่อนที่ไปทั่ว cytoplasm ตามราง (track) และทิศทางของ microtubules ซึ่งเป็นโครงกระดูกของเซลล์ เมื่อถึงปลายทาง transport vesicle จะเชื่อมกับเมมเบรนของโครงสร้างที่รับเอาสาร เช่น plasma membrane, lysosome หรือ vacuole ของเซลล์พืช หรือส่งออกนอกเซลล์ ถ้าเป็นการหลั่งสารออกนอกเซลล์อย่างต่อเนื่อง เรียกว่า **Constitutive secretion** ถ้าการหลั่งสารออกนอกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้น เรียกว่า **Regulative secretion** ซึ่งแบบหลังนี้สารถูกสะสมเก็บไว้ในถุงเมมเบรนที่เรียกว่า **Secretory granules** เช่น digestive enzymes และ neurotransmitter วิถีการส่งสารออกเช่นนี้เรียกว่า **Secretory pathway** ในทางตรงข้ามการนำสารเข้าเซลล์ โดยสารเคลื่อนที่จากผิวเซลล์สู่ส่วนต่าง ๆ ใน cytoplasm เช่น endosomes และ lysosomes เรียกว่า **Endocytic pathway**

Endoplasmic reticulum (ER) แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ (1) **Rough endoplasmic reticulum (RER)** และ (2) **Smooth endoplasmic reticulum (SER)** ทั้งสองเป็นระบบเมมเบรนที่มีช่องภายใน ทำให้แยกของเหลวภายใน cytoplasm ออกเป็น 2 ห้อง (compartments) คือ (1) ส่วนที่อยู่ในช่องของ ER เรียกว่า Luminal space หรือ Cisternal space (2) ส่วนที่อยู่นอกช่องของ ER เรียกว่า Cytosolic space

(a)



(b)



รูปที่ 12. (a) : Scanning EM micrograph ของ Rough Endoplasmic Reticulum.
(b) : Transmission EM micrograph ของ Smooth Endoplasmic Reticulum.

Endoplasmic reticulum ทั้งสองชนิดแตกต่างกันที่การปรากฏมี Ribosomes เกาะที่ผิวเมมเบรนด้าน cytosolic space หรือไม่ RER มี ribosomes เกาะที่ผิว ในขณะที่ SER ไม่มี ribosomes (รูปที่ 12) เซลล์แต่ละชนิดมีปริมาณของ RER และ SER ไม่เท่ากันขึ้นกับกิจกรรมของเซลล์

Smooth Endoplasmic Reticulum (SER)

SER พัฒนามากในเซลล์หลายชนิด รวมทั้ง skeletal muscle, kidney tubules และ steroid-producing endocrine gland โปรตีนพิเศษของ SER แตกต่างกัน แล้วแต่หน้าที่ของ organelles SER มีหน้าที่ดังนี้

1) สังเคราะห์ steroid hormones ในเซลล์ของ endrocrine gland ในอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) และ adrenal cortex

2) สลายสารพิษ (detoxification) ในตับ โดยระบบเอนไซม์ Oxygenase ซึ่งรวมทั้ง Cytochrome P_{450} เอนไซม์ที่ไม่มี substrate เฉพาะ สามารถ oxidize สารที่เป็น hydrophobic ได้หลายพันชนิด โดยเปลี่ยนให้เป็นสาร hydrophilic ที่ถูกขับออกได้ง่าย แต่สารบางอย่างอาจถูกทำให้เป็นผลลบ เช่น สารประกอบ benzo [a] pyrene ซึ่งไม่ค่อยเป็นพิษ เกิดขึ้นเมื่อเนื้อถูกปิ้งจนเกรียมเป็นถ่าน สารนี้ถูกเปลี่ยนโดย detoxifying enzymes ของ SER ให้กลายเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens)

3) ปล่อย glucose จาก glucose-6-phosphate (G-6-P) ในเซลล์ตับด้วย enzyme glucose-6-phosphatase

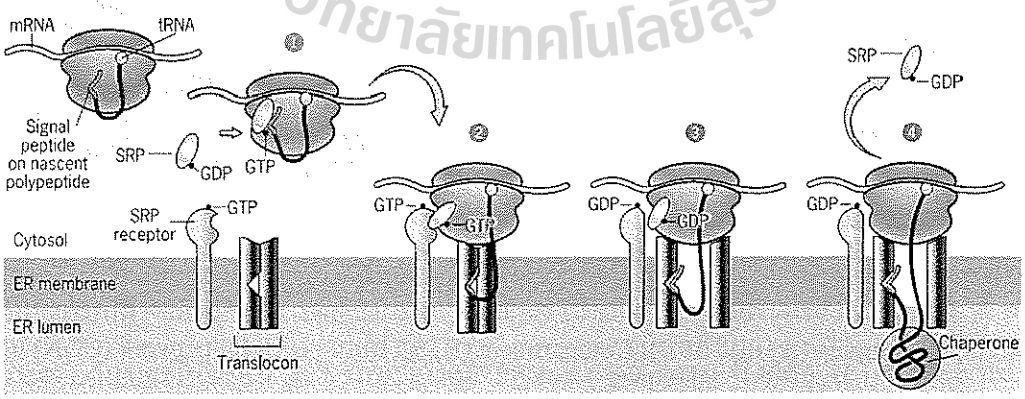
Glycogen จำนวนมากถูกเก็บเป็นเม็ด granules บนเมมเบรนด้านนอกของ SER เมื่อมีความต้องการพลังงานเกิดขึ้น enzyme phosphorylase จะเปลี่ยน glycogen ให้เป็น glucose-1-phosphate ซึ่งต่อมาถูกเปลี่ยนเป็น G-6-P ใน cytoplasm แต่ G-6-P ไม่สามารถออกจากเซลล์ตับได้ เพราะ plasma membrane impermeable ต่อ sugar phosphate เอนไซม์ glucose-6-phophatase ย่อย phosphate group ออก ได้โมเลกุล glucose ที่เคลื่อนที่เข้าไปในเลือดไปยังเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้

4) กักเก็บ Calcium ions ไว้ภายใน cisternal space ใน SER มี calcium-binding proteins ในความเข้มข้นสูง SER ทำหน้าที่ควบคุมการปล่อย calcium ไปกระตุ้นให้เซลล์บางชนิดตอบสนอง เช่น skeletal muscle

Rough Endoplasmic Reticum (RER)

ในเซลล์ที่สร้างสารคัดหลั่ง (secretion) เช่น เซลล์ตับอ่อน และ เซลล์ผนังทางเดินอาหาร เซลล์เหล่านี้จัดเรียงภายในเซลล์ให้เป็นขั้วที่ชัดเจน nucleus และแถบของ RER วางตัวอยู่ใกล้ฐานของเซลล์ใกล้กับเส้นเลือด ส่วน Golgi complex อยู่บริเวณกลางเซลล์ด้านบนของเซลล์อยู่ใกล้ท่อที่จะปล่อย sercretion ออกจากอวัยวะ และปลายด้านบนมี secretory granules ที่พร้อมจะถูกปล่อยออกเมื่อได้รับสัญญาณ การจัดขั้วของเซลล์สะท้อนให้เห็นถึงการไหลของผลผลิตของเซลล์จากแหล่งผลิตไปถึงจุดที่จะปล่อยออก แหล่งผลิต secretion ก็คือ RER ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนใน Ribosomes ที่เกาะ RER ด้าน cytosolic (รูปที่ 12) ได้แก่ (1) โปรตีนที่หลั่งออกจากเซลล์ (2) integral proteins สำหรับเมมเบรน (3) โปรตีนในรูปสารละลาย (soluble proteins) ภายในช่องของระบบ endomembrane ซึ่งได้แก่ ER, Golgi complex, lysosomes, endosomes, vesicles และ plant vacuoles

โปรตีนถูกสังเคราะห์ในที่ต่าง ๆ กันภายในเซลล์ได้เพราะ โปรตีนมี **Signal sequence** ประมาณ 20 amino acids ที่ปลาย N-terminal ทำหน้าที่กำกับให้ polypeptide และ ribosome ฝังติดกับ ER membrane เมื่อเริ่มสังเคราะห์ signal sequence ถูกจับด้วย **Signal recognition particle (SRP)** และ **SRP recptor** ที่อยู่ในเมมเบรนของ ER แล้ว polypeptide เคลื่อนเข้าไปใน cisternal space ของ ER การเคลื่อนที่ของโปรตีนผ่านเมมเบรนขณะที่ polypeptide กำลังถูกสังเคราะห์จัดเป็น **Cotranslation** จากนั้น signal sequence จะถูกตัดออกด้วย **signal peptidase** (รูปที่ 13) แล้ว carbohydrate ถูกเติมให้ protein ด้วยเอนไซม์ **glycosyltransferase** ได้เป็น glycoprotein (ในกรณี protein นั้นมี carbohydrate) เช่น integral proteins การใส่ carbohydrate เข้ากับโปรตีนเรียกว่า **Glycosylation**



รูปที่ 13. Schematic model ของ Signal hypothesis ในการสังเคราะห์โปรตีนใน RER.1) SRP จับ Ribosome และ Signal sequence, 2) Complex ของ 1 จับกับ SRP receptor และ ER membrane, 3) SRP ปล่อย receptor และ 4) polypeptide ถูกปล่อยเข้า lumen.

การสังเคราะห์ lipids ของเมมเบรนส่วนมากสังเคราะห์ใน endoplasmic reticulum ยกเว้น sphingomyeline และ glycolipids ที่การสังเคราะห์เริ่มใน ER แต่ไปเสร็จสมบูรณ์ใน Golgi complex

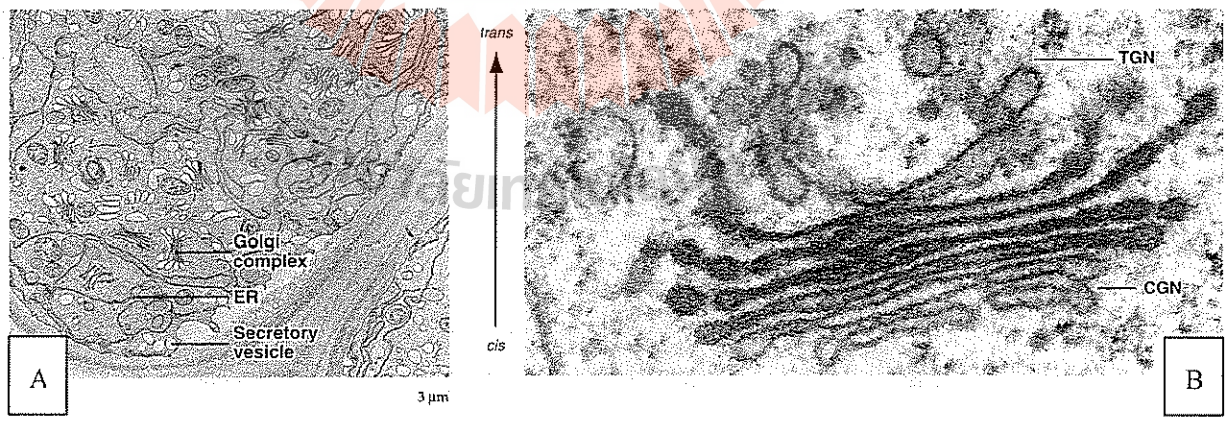
การสร้าง vesicle เพื่อการขนส่ง โปรตีนที่สังเคราะห์ได้แล้วใน cisterna ถูกเคลื่อนที่จากจุดสังเคราะห์ไปยังปลายของ RER ซึ่งปกติที่ปลาย RER เป็นแบบเรียบไม่มี ribosome ปลายของ RER หลุดออกเป็น vesicle แล้ว vesicle เคลื่อนที่ไปตามราง (track) ของ microtubules ไปยัง Golgi complex

สำหรับ polypeptides อื่นที่สังเคราะห์ใน ribosome อิสระที่ไม่ได้เกาะติด ER จะถูกปล่อยเข้า cytosol โดยตรงเพื่อเป็นโปรตีนใน cytoplasm หรือถูกส่งไปยังส่วนเป้าหมายต่อไป เช่น 1) โปรตีนที่คงอยู่ใน cytoplasm เช่น enzymes ในกระบวนการสลาย glucose ในระยะ glycolysis และ protein ที่เป็น cytoskeleton 2) peripheral proteins ของ plasma membrane ชั้นใน เช่น spectrins และ ankyrins 3) โปรตีนที่ถูกส่งต่อไปยัง nucleus 4) โปรตีนที่รวมเข้าไปใน peroxisomes, chloroplasts และ mitochondria

6.3 Golgi complex (Dictyosome)

Golgi complex ค้นพบโดย Camillo Golgi ซึ่งเป็นผลให้ Golgi ได้รับรางวัล Nobel Prize ในปี 1906

Golgi complex ในเซลล์พืชเรียกว่า Dictyosome มีลักษณะเป็นถุงแบน มีช่อง **Cisterna** ที่ขอบด้านข้างของถุงพองขยายออก ซึ่งสัมพันธ์กับถุง vesicle และท่อ tubules cisterna ขนาด 0.5 - 1.0 µm เรียงซ้อนกันเป็นตั้งคล้ายตั้งแพนเค้ก มีประมาณไม่น้อยกว่า 8 cisternae จำนวน Golgi complex ในแต่ละเซลล์อาจมี 2 - 3 จนถึงพันอันแล้วแต่ชนิดของเซลล์ Golgi complex แบ่งเป็น compartment ตามหน้าที่อย่างชัดเจน โดยเริ่มเรียงจากแนวแกนด้านใกล้ ER ไปหาด้านสุดท้ายของตั้ง (รูปที่ 14, A)



รูปที่ 14. Golgi complex (A) และ ระบบ Compartment (B) ซึ่งได้แก่ cis Golgi network (CGN) และ trans Golgi network (TGN)

Compartments บริเวณใกล้ ER tubules เรียกว่า **cis Golgi network (CGN)** เป็นเครือข่ายของท่อ ทำหน้าที่เป็นสถานีคัดเลือกโปรตีนที่จะส่งกลับไป ER และโปรตีนที่จะดำเนินการขั้นต่อไปใน Golgi complex

ส่วน compartments ด้านหลังถัดมาเรียกว่า **trans Golgi nework (TGN)** เป็นเครือข่ายของท่อ tubules และถุง vesicles (รูปที่ 14, B) ทำหน้าที่คัดเลือกโปรตีนและแยกใส่ให้ vesicles เพื่อส่งไป plasma membrane และ intracellular areas ต่าง ๆ ดังนั้น **Golgi complex ทำหน้าที่เป็นโรงงานแปรรูปโปรตีน (protein processing plant)** ที่สังเคราะห์ได้ใหม่ เช่น membrane proteins, secretory proteins และ lysosomal proteins ที่ออกมาจาก ER แล้วเข้าแปรรูป (modify) ใน Golgi complex

Golgi complex ยังเป็นที่สังเคราะห์ polysaccharides ชนิดเชิงซ้อน (complex) ให้กับเซลล์รวมทั้ง glycosaminoglycans ของ extracelluar matrix ของเซลล์สัตว์และ pectins และ hemicellulase ใน cell wall ของเซลล์พืช Golgi complex ทำหน้าที่ประกอบส่วน carbohydrate ของ glycoproteins และของ glycolipids เรียกว่า **Glycosylation** ลำดับของ sugar ที่เรียงกันเข้าเป็น polysaccharide ตัดสินโดยเอนไซม์ glycosyltrasferases เฉพาะ glycosylation ดำเนินการอย่างต่อเนื่องจนถึงด้านปลายของ Golgi complex

Golgi complex เป็นที่เติม phosphate (Phosphorylation) ให้กับโปรตีน เช่น lysosomal enzymes ถูก phosphorylated ด้าน CGN ของ Golgi complex แล้วส่งไป TGN ซึ่งมี mannose 6-phosphate receptor เป็นตัวจับเอนไซม์ แล้วเมมเบรนของ TGN แตกหน่อ (bud) ออกเป็น vesicle mannose 6-phosphate receptor แยกออกจาก lysosomal enzymes กลับไปยัง TGN และ vesicle กลายเป็น Lysosome ถ้า lysosomal enzymes ขาด mannose phosphate enzymes จะถูกส่งเข้า cytosol ไม่ส่งไป lysosome ทำให้ lysosome ขาด hydroytic enzymes การส่งโปรตีนอื่นที่แปรรูปเสร็จแล้วต้องการโปรตีนเฉพาะในเมมเบรนของ NTG เพื่อแตกหน่อออกเป็น target vesicles ที่ต้องการ

เมื่อการแปรรูปโปรตีนเสร็จสมบูรณ์ โปรตีนเหล่านั้นถูกหุ้มด้วยเมมเบรนและแตกเป็นหน่อ (bud) หลุดออกจาก Golgi complex เป็น vesicles เคลื่อนที่ไปตามรางของ microtubules ไปยังเป้าหมาย ในกรณี secretory vesicles การปล่อยส่วนสารคัดหลั่ง (secretion) ออกนอกเซลล์เกิดโดย **Exocytosis** เมมเบรนของ vesicles เคลื่อนไปติด plasma membrane แล้วรวมกัน (fusion) ทำให้ถุง vesicles เปิดออกและปล่อยส่วนประกอบภายในออกสู่ extracellular space

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.4 Lysosomes

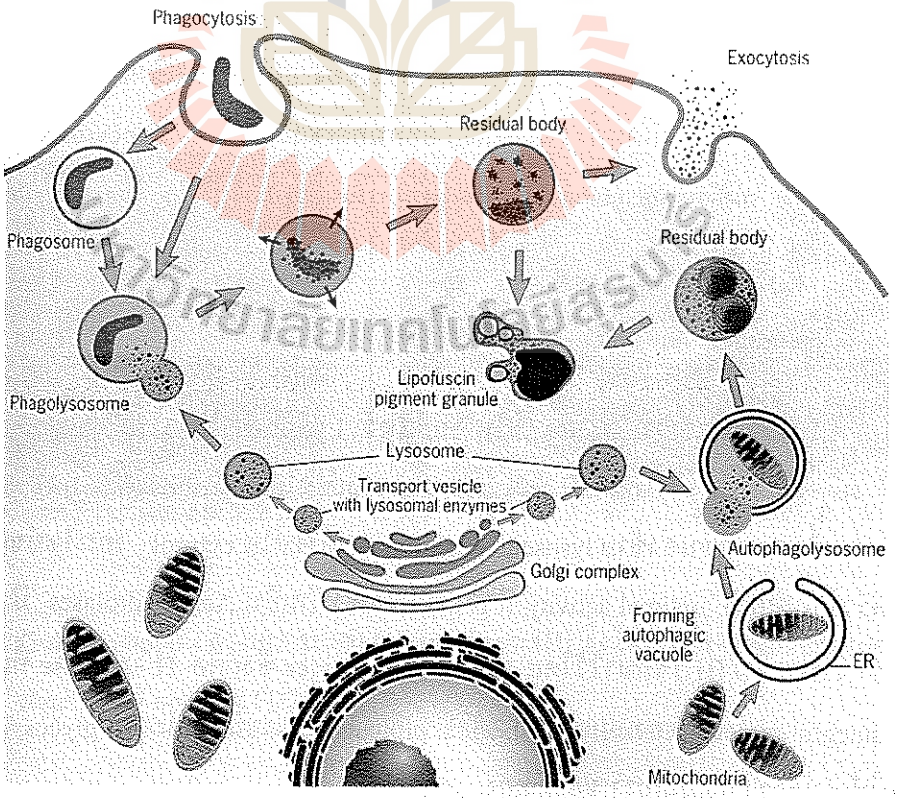
Lysosomes เป็น digestive organelles ในเซลล์สัตว์ Lysosomes ทั่วไปมี hydrolytic enzymes ประมาณ 50 ชนิด ผลิตใน RER lysosomal enzymes สามารถย่อย macromolecules ทุกชนิดในเซลล์ ให้ได้โมเลกุลขนาดเล็กลงที่สามารถขนส่งข้าม lysosomal membrane เข้าไปใน cytosol เอนไซม์ของ lysosome ทั้งหมดมีคุณสมบัติร่วมกันคือ มี optimal activity ที่ pH เป็นกรด หรือเป็น Acid hydrolases มี pH ประมาณ 4.6 ความเข้มข้นของโปรตอน (H^+) รักษาไว้โดย **Proton transporter ซึ่งก็คือ H^+-ATPase** ที่มีในเมมเบรนของ lysosomes integral proteins ของเมมเบรนมี acidic proteins หลายชนิด และถูก glycosylated สูงมาก อาจเพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์ย่อยเมมเบรนของตัวเอง

Lysosomes ลักษณะเป็นถุงหลายขนาดตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 - 50 nm ถึงใหญ่กว่า 1 μm Lysosomes มีหน้าที่ดังนี้ (รูปที่ 15)

1) ย่อยสลายสารที่เป็นก้อนที่เซลล์นำเข้าจาก extracellular environment โดยกระบวนการ **Phagocytosis** เช่น สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว (single-celled organism) ย่อยก้อนอาหาร แล้วปล่อยสารอาหารผ่านเมมเบรนไป cytosol macrophage และ neutrophils ของ mammals ย่อย microorganisms บางชนิดที่แปลกปลอมเข้าร่างกาย แต่ bacteria บางชนิดไม่ถูกย่อยด้วย lysosomal enzymes เช่น *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งทำให้เป็นวัณโรค เมื่อ macrophage กินเซลล์โดย phagocytosis แต่ phagocytotic vesicle ไม่รวมกับเมมเบรนของ lysosome bacteria นั้นจึงไม่ถูกย่อย แต่จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในเซลล์, *Coxiella burnetii* ที่ทำให้เป็นโรค Q fever มีความทนทานต่อกรดใน lysosomes, และ *Listeria monocytogenes* ที่ทำให้เกิดโรคไขสันหลังอักเสบ (meningitis) สามารถสร้าง phospholipase ทำลายเมมเบรนของ lysosome ทำให้เชื้อเล็ดลอดเข้า cytosol ได้

2) เกี่ยวกับ fertilization ที่หัวของ sperm มี lysosomal enzyme อัดกันแน่นเป็น **Acrosome** เมื่อ sperm เข้าผสมกับ egg เมมเบรนของ acrosome เชื่อมกับเมมเบรนของ egg จากนั้น enzymes ถูกปล่อยออกมาย่อยไข่ชั้นนอกให้เป็นช่องให้ sperm เจาะเข้าไปในไข่ได้

3) lysosomes มีความสำคัญในการหมุนเวียน (turnover) organelles ของเซลล์ นั่นคือ การทำลาย organelles ภายในเซลล์ของตัวเอง เรียกกระบวนการว่า **Autophagy** เช่น การย่อย mitochondria จำนวนของ autophagic vesicles ขึ้นกับสถานะของสรีระของเซลล์ ถ้าเซลล์ขาดสารอาหาร autophagic vesicles จะมากขึ้น แสดงว่าเซลล์ต้องการพลังงานในการดำรงชีพ โดยการกิน organelles ของตัวเอง



รูปที่ 15. Summary ของวิถี (pathways) ของ Lysosomal sysytem

4) ย่อยสารที่เป็นของเหลวที่เซลล์นำเข้าด้วยกระบวนการ **Endocytosis** สารที่นำโดยวิธีนี้เป็นสารที่มีปริมาณน้อย เช่น hormone, growth factors, enzymes และโปรตีนในเลือด (plasma proteins) ที่ cell membrane มี receptors สำหรับจับสารเหล่านี้เข้าสู่ภายในเซลล์ (การเข้าภายในเซลล์ เรียกว่า Capping) โดยเมมเบรนเว้าเข้าล้อมรอบสารที่จับอยู่กับ receptors ให้เป็นถุง endocytic vesicle แล้วส่ง endocytic vesicles ไปที่ **Endosomes** เพื่อแยกสารออกจาก receptors ซึ่งจะถูกส่งกลับไป cell membrane endosomes เคลื่อนที่เข้าไปรวมกับ lysosome เพื่อย่อยสารต่อไป

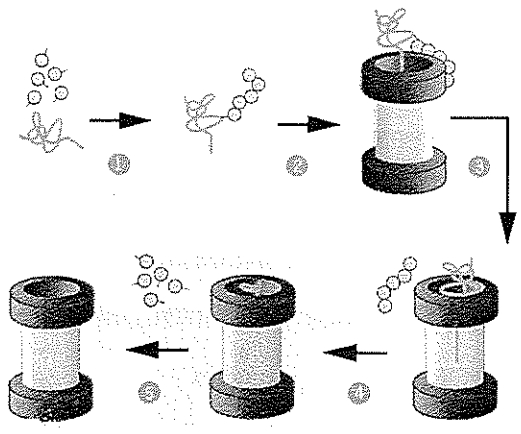
ในการย่อยสารจาก phagocytic vesicles และ autophagic vesicles ภายหลังการย่อยสมบูรณ์แล้ว lysosome ถูกเรียกชื่อใหม่ว่า **Residual body** ซึ่งอาจถูกกำจัดออกโดย exocytosis หรือคงอยู่ในเซลล์ขึ้นกับชนิดของเซลล์ ในกรณี residual body คงอยู่ในเซลล์จะเรียกว่า **Lipofuscin granules** จำนวนของ lipofuscin granules เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ที่มีอายุมากกว่า การสะสมของ lipofuscin granules บอกถึงกระบวนการแก่ (Aging process) ของเซลล์หรือ long-lived cells เช่น neurons ซึ่งปกติไม่มีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์

Lysosomes ที่ขาด hydrolytic enzymes จะทำให้เกิดโรคต่าง ๆ หลายชนิด แล้วแต่ชนิดของ enzymes ที่ขาด เช่น silicosis เกิดจากขาด enzymes ย่อยใยแก้ว

6.5 Proteasome

Proteasome เป็นโครงสร้างรูปถัง (barrel-shaped) ประกอบขึ้นด้วยโปรตีน 4 subunits คือ 2α และ 2β subunits โดย β subunits อยู่กลางรูปวงแหวนวางซ้อนกันเป็นถัง ปกปิดด้วย cap โปรตีนทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) proteasomes พบใน nucleus และใน cytoplasm ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่สร้างมาผิดปกติ หรือโปรตีนที่เซลล์ย่อยแล้วแต่ไม่ต้องการใช้อีกต่อไป โปรตีนเหล่านี้ lysosome ไม่สามารถย่อยได้ proteasomes ย่อยโปรตีนเหล่านี้เพื่อทำลาย เช่น โปรตีนที่หมดอายุใช้งานใน glycolysis, globin ของเซลล์เม็ดเลือดแดง โปรตีนใน DNA replication และ cell division

Proteasomes จะจับโปรตีนขนาดเล็กชื่อ **Ubiquitin** C-terminal ของ ubiquitin จับ lysine residue ของโปรตีนที่ต้องการทำลาย ubiquitin จับกับ cap ของ proteasomes cap ปล่อย ubiquitin ให้หลุดออกและยืด (unfold) target protein ออกเป็นเส้นตรง ให้ผ่านเส้นตรง polypeptide เข้าไปในช่องกลางของ proteasome ให้ย่อยเป็น peptides ขนาดเล็ก แล้วปล่อย peptides ออกส่งไป cytosol เพื่อย่อยให้เป็น amino acids ต่อไป



รูปที่ 16. Proteasome function. 1) Protein ที่จะถูกสลายจับกับ Ubiquitin, 2) Complex จับกับ Cap ของ Proteasome, 3) Ubiquitin ยืด protein ออกเป็นเส้นและ4) ใส่ในช่องกลางของ proteasome และ 5) β subunits ของ Ubiquitin สลาย protein เป็น amino acids

6.6 Vacuole ของเซลล์พืช

Vacuole ประกอบเป็นปริมาตรถึง 90 % ของพื้นที่เซลล์พืชส่วนมาก vacuole เป็นถุงเมมเบรนชั้นเดียว เรียกว่า **Tonoplast** ทำหน้าที่หลายอย่าง (1) เก็บสะสมสารชั่วคราว เช่น ions, sugar, amino acids, macromolecules, polysaccharide และสารพิษจากพืชเอง เช่น glycosides ที่มี cyanide, glucosinolates และ byproduct ของเมตาโบลิซึมที่พืชขับออกไม่ได้ เช่น digitalis (2) รักษา osmotic pressure ให้สูงไว้เพื่อให้เกิดแรงดันของเหลว **Turgor pressure** ผลักให้ cell membrane ออกด้านนอก ต้านกับ cell wall ทำให้ vacuole รักษารูปร่างของเซลล์พืช (3) Tonoplast มี active transport system ระบบที่สูบ ions เข้าไปใน vacuole เพื่อให้ความเข้มข้นของ ions สูงกว่าของของเหลวนอกเซลล์ ทำให้น้ำเข้าเซลล์โดย osmosis แรงของน้ำไม่เพียงแต่ค้ำจุนเนื้ออ่อนของพืชเท่านั้น แต่ยังทำให้ cell wall ยืดออกระหว่างเซลล์เจริญเติบโตด้วย (4) vacuoles เป็นที่ย่อยสารภายในเซลล์ แต่ไม่เหมือนใน lysosomes ซึ่งพืชไม่มี vacuoles มี Acid hydrolases vacuoles รักษา pH ให้ต่ำโดย H^+-ATPase ภายในเยื่อ tonoplast ทำหน้าที่สูบ H^+ เข้าไปใน vacuole

Proteins ใน vacuole ถูกสังเคราะห์และแปรรูปเช่นเดียวกับ lysosomes คือสังเคราะห์บน RER แล้วส่งไป Golgi complex เพื่อแยกชนิดและแปรรูปก่อนที่หลุดออกมาที่ vacuole ในเซลล์บางชนิดเช่น parenchyma ของเมล็ดที่กำลังพัฒนาจะเก็บ proteins ที่สร้างได้ใหม่ถึง 50 % ไว้ใน vacuole

6.7 Peroxisomes (Microbodies)

Peroxisomes เป็น vesicle ที่มีเมมเบรนชั้นเดียว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 – 1.0 μm ปกติมีผลึกของ oxidative enzymes peroxisomes ทำหน้าที่หลายอย่างมีเอนไซม์กว่า 50 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมที่แตกต่างกัน เช่น 1) Oxidation ของ very-long-chain fatty acids (24-26 cartons) 2) สังเคราะห์ cholesterol และ bile acid ในเซลล์ตับ และ 3) สังเคราะห์ plasmalogens ซึ่งเป็น phospholipids อย่างหนึ่งที่สำคัญในเนื้อเยื่อสมอง 4) เอนไซม์ luciferase ที่ทำให้เกิดแสงสว่างในแมลงหิ่งห้อย 5) สังเคราะห์และสลาย hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่เป็นพิษ hydrogen peroxide ผลิตโดย enzymes หลายชนิด รวมทั้ง urate oxidase, glycolate oxidase และ amino acid oxidases เอนไซม์เหล่านี้ใช้โมเลกุล oxygen oxidize substrate ให้ได้ H_2O_2 ซึ่งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ catalase ที่มีใน peroxisomes

Peroxisomes ในต้นกล้าพืชเป็นชนิดพิเศษเรียกว่า **Glyoxysome** ต้นกล้าขึ้นกับ fatty acids ที่สะสมไว้ให้พลังงานและสารที่ใช้ในเกิดพืชต้นใหม่ ในการงอกของต้นกล้า fatty acids ถูกเปลี่ยนให้เป็น glucose โดยวัฏจักร **Glyoxylate cycle** โดยขบวนของ enzymes ใน glyoxysome

ในการหายใจของพืช Photorespiration เอนไซม์ Rubisco เปลี่ยน Ribulos 1, 5-biphosphate กับ O_2 ให้เป็น 2-phosphoglycolate ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น glycolate ใน chloroplast glycolate ถูกส่งไปที่ peroxisome และส่งไป mitochondria จนในที่สุดได้ CO_2 ปล่อยออกมา

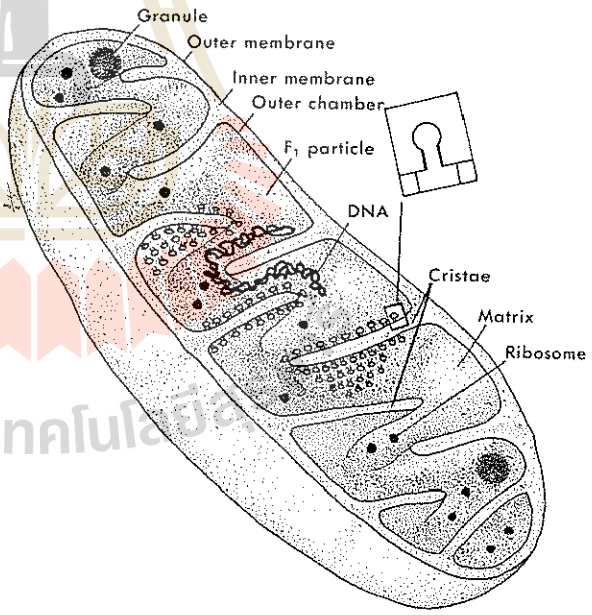
Peroxisomes เกิดจากการแบ่งตัวของ peroxisomes ที่มีอยู่เดิม ไม่ได้เกิดจากการแตกหน่อหลุดออกจาก RER และ Golgi complex

6.8 Mitochondria

Mitochondria ขนาดใหญ่พอที่จะเห็นได้ในกล้องจุลทรรศน์แสง mitochondria รูปร่างเหมือนไส้กรอก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 - 1.0 μm ยาว 1 - 4 μm และคล้าย bacteria มีหลักฐานทำให้เชื่อว่า mitochondria วิวัฒนาการมาจาก bacteria ที่อาศัยอยู่ในเซลล์อื่น ๆ mitochondria มีรูปร่างได้หลายแบบ ใน embryos ระยะแรกมี mitochondria รูปเกือบทรงกลม ใน fibroblast รูปยาวเหมือนเส้นด้าย รูปร่างและจำนวนของ mitochondria ขึ้นกับชนิดของเซลล์ ถ้าเซลล์ต้องการพลังงานมากเซลล์มี mitochondria มาก เช่น muscle cells, sperms, เซลล์ตับและเซลล์พืชทั่วไป

Mitochondria มีเมมเบรน 2 ชั้น (1) Outer membrane ล้อมรอบเป็นขอบเขตด้านนอก (2) Inner membrane ที่ซับซ้อน ยื่นลึกและม้วนไปมาภายในเรียกว่า **Cristae** (พหูพจน์ crista) ในเซลล์บางชนิด cristae อาจเป็นแผ่นกว้างตลอดเส้นผ่าศูนย์กลาง mitochondria ในเซลล์พืชส่วนมากมี cristae เป็นทรงกระบอก การม้วนไปมาของ cristae เป็นการเพิ่มพื้นที่สำหรับการหายใจของเซลล์แบบใช้ oxygen (รูปที่ 17)

เมมเบรนของ mitochondria จึงแบ่ง mitochondria ออกเป็น 2 ช่อง คือ (1) ระหว่างเมมเบรนชั้นนอกและชั้นในเรียกว่า **Intermembrane space** ซึ่งมีความสำคัญต่อเงื่อนไขของการหายใจของเซลล์ และ (2) ช่องภายในของ mitochondria เรียกว่า **Matrix** ภายใน matrix มีโปรตีนที่เป็นสารละลายอยู่ถึง 500 mg/ml เมมเบรนของ mitochondria ทั้ง 2 ชั้นมีคุณสมบัติแตกต่างกันมาก



รูปที่ 17. Mitochondria แสดงการจัดระบบ membrane ภายในและในกรอบสี่เหลี่ยม คือ ATPase ใน inner membrane

Outer membrane : มี lipid ประมาณ 50 % โดยน้ำหนักและมีเอนไซม์หลายชนิดสำหรับหลายกิจกรรมเช่น oxidation ของ epinephrine, degradation ของ tryptophan และทำให้สาย fatty acids ยาว เมมเบรนชั้นนี้เชื่อว่าเป็นเมมเบรนชั้นนอกซึ่งพบเป็นส่วนหนึ่งของ cell wall ของ bacteria outer membrane มี integral protein ชื่อ **Porins** ทำหน้าที่เป็นช่อง (channel) ขนาด 2 - 3 nm ซึ่งยอมให้สารโมเลกุลขนาด 5,000 daltons เช่น ATP, NAD, และ coenzyme ผ่าน เมื่อ channel เปิด

Inner membrane : มีลักษณะของ plasma membrane ของ bacteria เชื่อว่าเกิดขึ้นระหว่างวิวัฒนาการ มี polypeptides กว่า 100 ชนิด อัตราส่วนโปรตีนต่อลิปิดสูงกว่า 3:1 ซึ่งประมาณทุก 15 phospholipid มี 1 โปรตีน inner membrane ไม่มี cholesterol แต่มี phospholipid พิเศษมากคือ **Cardiolipin (diphosphatidylglycerol)** และมี porins เป็น channel เช่นเดียวกับเมมเบรนชั้นนอก สารโมเลกุลเล็กกว่า 1,000 daltons สามารถผ่านเข้า-ออกได้อิสระ ระหว่าง mitochondria กับ cytosol แต่ inner membrane ย่อมให้สารผ่านเข้า-ออกต่ำมาก (highly impermeable) โมเลกุลและ ions ทั้งหมดต้องการ transporters เฉพาะซึ่งอยู่ในเมมเบรนชั้นนี้เช่นกัน inner membrane มีชุดของ transport systems หลายอย่าง

Mitochondrial matrix : มีเอนไซม์หลายชนิด มี **ribosomes** ซึ่งขนาดเล็กกว่าที่พบใน cytosol และมี DNA แบบวงกลมเส้นคู่ **(double-stranded circular DNA)** หลายโมเลกุล mitochondria จึงมีสารพันธุกรรมของตัวเอง มีเครื่องมือสร้าง RNAs และ proteins ของตัวเอง แต่ DNA เป็น **nonchromosomal DNA** จึงมีคำสั่งให้ polypeptides จำนวนน้อย และเป็น proteins ของ inner membrane ทำให้ mitochondria ต้องนำ proteins เข้าจาก cytosol ด้วย พบว่า matrix ของ human mitochondrial DNA มีรหัสให้ 13 polypeptides, 2 ribosomal RNAs และ 22 tRNAs

Mitochondria เป็นorganelles ที่มีพลวัตเกิดขึ้นตลอดเวลา (dynamic organelle) เช่น เปลี่ยนรูปร่าง เคลื่อนที่ แตกกิ่งด้านข้าง และรวมกันเองได้

Oxidative metabolism ใน mitochondria : mitochondria เป็นศูนย์กลางของ oxidative metabolism ของเซลล์โดยเปลี่ยนผลผลิต catabolism ของ carbohydrate, fat และ protein ให้เป็นพลังงานเคมี เก็บไว้ในรูป ATP (รูปที่ 18)

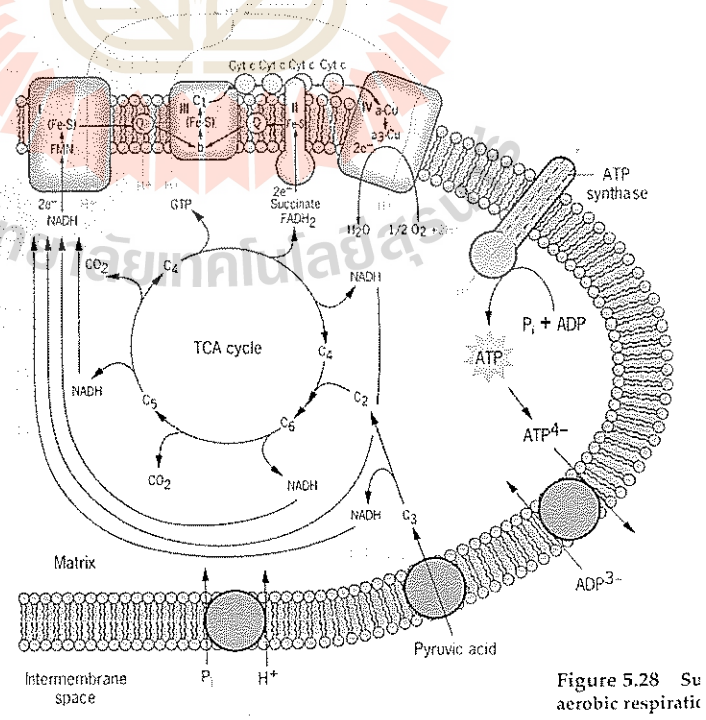


Figure 5.28 Su
aerobic respiratic

รูปที่ 18. Summary กิจกรรมหลัก ระหว่าง Aerobic respiration ใน Mitochondria

Carbohydrate catabolism ใน cytoplasm :ให้ผลผลิต 2 อย่างคือ Pyruvate และ NADH ทั้ง 2 สารนี้ถูกส่งข้าม inner membrane เข้า matrix Pyruvate ถูกเอา carboxyl group ออก แล้วรวมกับ coenzyme A เป็น Acetyl CoA acetyl CoA รวมกับ Oxaloacetate กลายเป็น Citrate จากนั้น Citrate ถูกนำเข้าสู่วัฏจักร Tricaboxylic acid (TCA cycle) (รูปที่ 18) ในวัฏจักร Carbon 2 อะตอมถูกปล่อยออกจาก citrate ในรูปของ CO_2 electrons เคลื่อนจาก substrates ไปยัง FAD และ NAD^+ ได้เป็น $FADH_2$ และ NADH electrons และ hydrogen atom จาก $FADH_2$ และ NADH ถูกส่งผ่านไปตามสารพาหะ electron (electron carriers) ที่จัดเป็นระบบเรียกว่า **Electron transport chain (ETC)** ไปให้ O_2 ซึ่งเป็นตัวรับ electrons ตัวสุดท้าย ระหว่างการถ่ายทอด electrons ไปตาม ETC พลังงานที่ปล่อยออกมาจะใช้ในการสูบ H^+ จาก matrix ไป intermembrane space ทำให้เกิด **Electrochemical gradient ของ H^+** ด้านนอก ด้านนอกนี้เป็นบวก (+) จึงมีศักย์ **Electric potential** สูงกว่า หรือมี H^+ มากกว่า H^+ จึงไหลกลับเข้า matrix ผ่านเอนไซม์ ATP synthase เอนไซม์ **ATP synthase ใช้ศักย์หรือพลังงานของ H^+ ที่ไหลกลับนี้ในการรวมระหว่าง ADP + Pi ให้เป็น ATP** กระบวนการสร้าง ATP (หรือเติม Pi) เรียกว่า **Phosphorylation** เนื่องจากการสร้าง ATP ใน mitochondria เป็นปฏิกิริยาที่เกิดควบคู่ไปกับการถ่ายทอด electrons ใน ETC จึงเรียกได้ว่าเป็น **Couple phosphorylation** ส่วนการถ่ายทอด electron ใน ETC เป็น oxidation-reduction reaction มีโมเลกุลพาหะคือ NAD (nicotinamide adenosine dinucleotide), Flavoproteins, Coenzyme Q และ Cytochromes (cyt b, cyt c, cyt c, cyt a และ cyt a_3) (รูปที่ 18)

Lipid catabolism : Fatty acid ถูกเปลี่ยนให้เป็น Acetyl CoA ใน cytoplasm จากนั้น acetyl CoA จึงถูกส่งเข้า TCA cycle ดำเนินการต่อไป

Protein catabolism: Proteins ถูกเปลี่ยนให้เป็น amino acids และ amino acids ถูกเปลี่ยนให้เป็น Acetyl CoA แล้วจึงถูกส่งเข้า TCA cycle ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.9 Chloroplasts

Choloplasts เป็น organelles พิเศษสำหรับเป็นสถานที่สังเคราะห์แสงของ eukaryotic cells chloroplasts มีมากใน mesophyll เซลล์ของใบบริเวณรอบ central vacuole รูปร่างรูปไข่หรือเป็นแผ่นจาน ขนาดกว้าง 2 - 4 μm ยาว 5 - 10 μm โดยทั่วไปมี 20 - 40 เม็ดต่อเซลล์ chloroplasts มีเมมเบรน 2 ชั้นแยกกันด้วยช่องแคบ ๆ คล้าย mitochondria

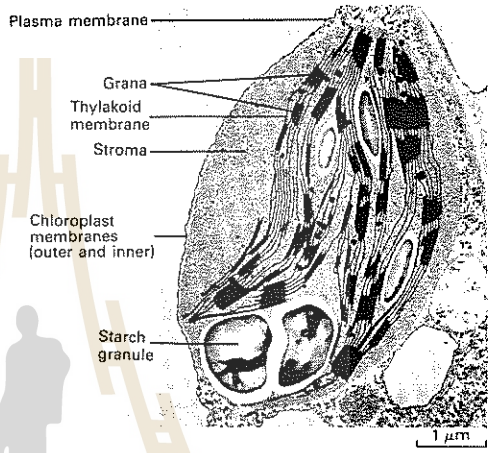
Outer membrane : มี porins ทำหน้าที่เป็นช่องให้สารถึงขนาด 10,000 daltons ผ่านได้ แต่

Inner membrane : ค่อนข้าง impermeable สารผ่านเข้า-ออกด้วย transporters หลายชนิด ภายใน chloroplasts มี internal membrane เป็นถุงแบน เรียกว่า **Thylakoid** หรือ **Grana thylakoid** และถุง thylakoids ตั้งวางเรียงซ้อนกันเป็นตั้ง เรียกว่า **Grana** ช่องในถุง thylakoids เรียกว่า **Lumen** พื้นที่ด้าน

นอก thylakoids รวมทั้งภายใน chloroplast เรียกว่า **Stroma** ส่วนเมมเบรนที่ยื่นออกจากและเชื่อมระหว่าง thylakoids ของอีก granum เรียกว่า **Stroma thylakoids** (รูปที่ 19)

Stroma ของ chloroplasts มี **double-stranded circular DNA** หลายโมเลกุลและมี ribosomes คล้ายของ prokaryote DNA มีคำสั่งพันธุกรรมได้ประมาณ 100 polypeptides ใช้สำหรับกระบวนการ replication, transcription และ translation ของสารพันธุกรรมใน chloroplasts โปรตีนอีก 90 % นำเข้าจาก cytosol

Membrane ของ thylakoids มี phospholipid น้อย แต่มี glycolipid ที่มี galactose (monogalactosyl diacylglycerol) สูง fatty acids ในโมเลกุลมีหลาย double bonds ทำให้เมมเบรนค่อนข้างเป็นของเหลวช่วยให้ง่ายต่อการ diffusion ของโปรตีนในเมมเบรนขณะเกิด photosynthesis

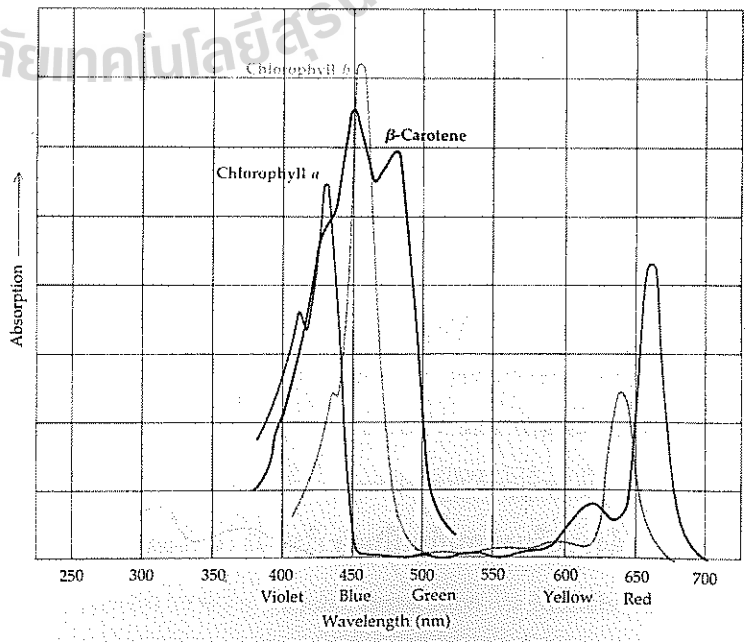


รูปที่ 19. Electron micrograph ของ Chloroplast

Chloroplasts ได้จากการแบ่งตัวเองของ chloroplasts ที่มีอยู่เดิม เชื่อว่า chloroplasts วิวัฒนาการจาก oxygen-producing photosynthetic prokaryotes (cyanobacteria) ที่อาศัยอยู่ใน nonphotosynthetic bacteria

ใน thylakoid membrane มีรงควัตถุดูดแสง (light-absorbing pigments) 2 กลุ่มใหญ่คือ Chlorophylls และ Accessory pigments

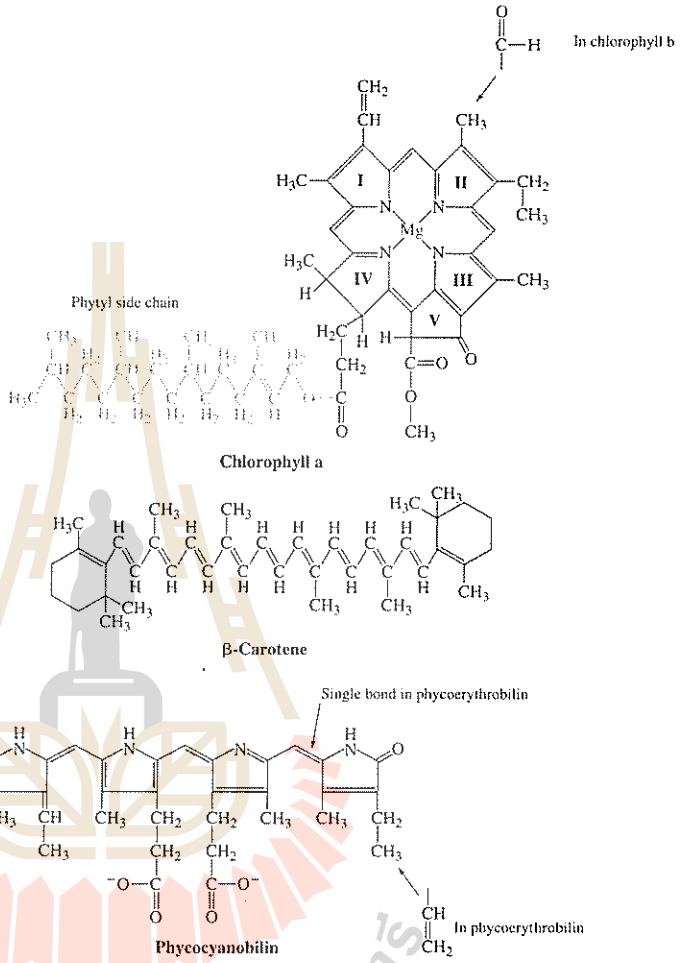
1) Chlorophylls ดูดแสงได้มากที่สุดในช่วงคลื่นสีน้ำเงิน wavelength 400 - 500 nm และช่วงคลื่นสีแดง wavelength 600 - 700 nm และปล่อยให้แสงช่วงคลื่นสีเขียว wavelegth 500 - 600 nm ผ่าน ทำให้เรา



รูปที่ 20. Absorption spectrum ของ pigments ในพืชชั้นสูง

เห็นใบไม้เป็นสีเขียวเพราะแสงสีเขียวเท่านั้นที่ทะลุใบไม้สะท้อนเข้าตาเรา (รูปที่ 20)

โครงสร้างโมเลกุล chlorophyll ประกอบด้วย 2 ส่วน (1) **Porphyrin ring** 5 rings โดยมี Mg^{2+} ยึดเป็นศูนย์กลาง ส่วนนี้ทำหน้าที่ดูดแสง (2) **Phytol tail** เป็นส่วน hydrophobic ฝังอยู่ใน hydrophobic ของเมมเบรน chlorophyll มี 2 ชนิดคือ chlorophyll a และ Chlorophyll b (รูปที่ 21)



รูปที่ 21. Photosynthetic pigments, Chlorophyll a, Chlorophyll b, β-Carotene และ Phycocyanobilin

2) Accessory pigments เป็น pigments ดูดแสงระดับที่ 2 รองจาก Chlorophylls ได้แก่

(1) **Carotenoids** ให้สีเหลือง ส้ม หรือ แดง หรือ ม่วง ที่สำคัญคือ **β-carotene** ซึ่งเป็น isoprenoid compound สีแดง เป็นสารกำเนิด (precursor) ของ vitamin A ในสัตว์

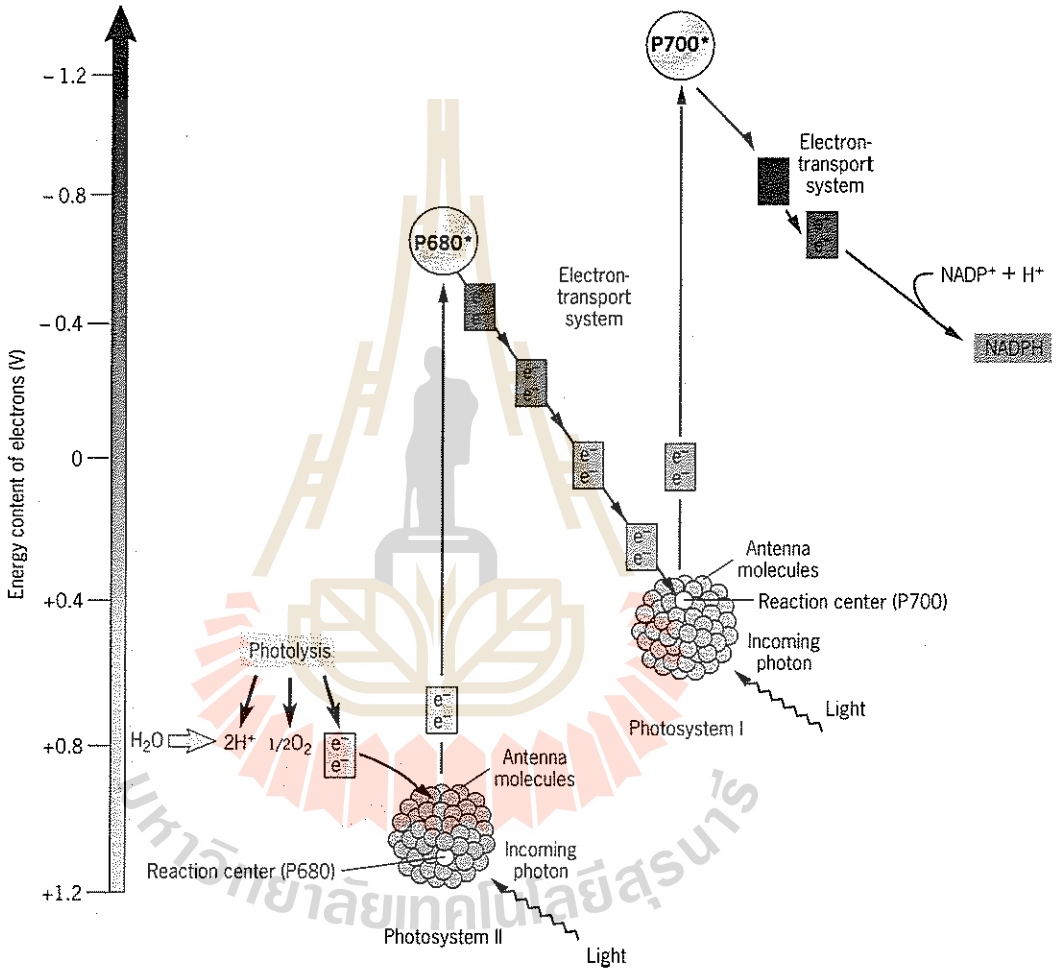
(2) **Xanthophyll** เป็น carotenoid สีเหลือง carotenoid pigment ทำหน้าที่ light receptors เสริม ช่วยดูดแสงช่วงที่ chlorophyll ไม่รับ และรับพลังงานที่มากเกินไปจากโมเลกุลของ chlorophyll ที่ถูก excited เป็นการป้องกันไม่ให้พลังงานทำลาย oxygen ให้เป็น oxygen free radicals ซึ่งเป็นอันตรายต่อ photosynthetic machinery

Chlorophyll และ carotenoid รวมกันเป็นกลุ่ม **Photosystem** ประกอบด้วย chlorophyll ประมาณ 200 โมเลกุล และ carotenoid ประมาณ 50 โมเลกุล ทำให้ photosystem สามารถดูดแสงได้ทั้ง visible spectrum และดูดได้ดีที่ช่วง **400 - 500 nm** และ **600 - 700 nm** pigments ทุกโมเลกุลดูด photons ได้ แต่จะมีเพียง

โมเลกุลเดียวที่สามารถเปลี่ยน light energy ให้เป็น chemical energy หรือเป็น energy – converting pigment molecule เรียกว่า **Photochemical reaction center** ซึ่งประกอบด้วย chlorophyll 1 โมเลกุลร่วมกับโปรตีนพิเศษ pigments อื่น ๆ ใน photosystem เรียกว่า **Harvesting** หรือ **Antenna molecules** ทำหน้าที่ดูด light energy อย่างเดียว แล้วส่งต่อไปยัง center Photosystem มี 2 ชนิด (รูปที่ 22) คือ

(1) **Photosystem I** ถูก exited ได้มากที่สุดที่แสง **700 nm มี chlorophy a มากกว่า** chlorophyll b

(2) **Photosystem II** ถูก exited ได้มากที่สุดที่ **680 nm มี chlorophyll b** มากกว่า chlorophyll a และอาจมี **chlorophyll c** ด้วย



รูปที่ 22. Photosystems, I และ II ใน Light-dependent reactions

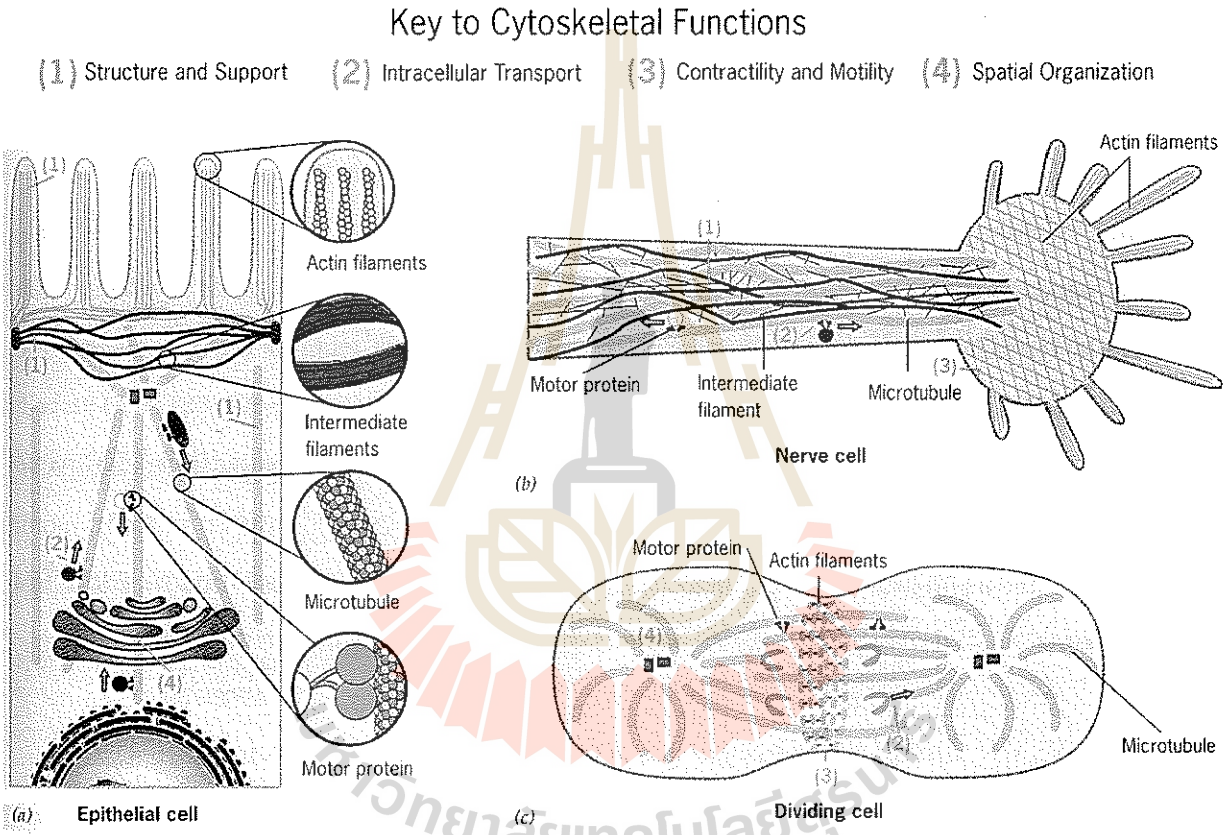
พืชชั้นสูงและ cyanobacteria มีทั้ง photosystem I และ II เป็นพวกที่สังเคราะห์แสง แล้วปล่อย oxygen แต่ photosynthetic bacteria ทั้งหมดมีเพียง photosystem I เป็นพวกที่สังเคราะห์แสงแล้วไม่ปล่อย oxygen หรือเรียกว่า **Red drop** เพราะดูดแสงที่ 700 nm ซึ่งอยู่ปลายสุดของสีแดงใน spectrum Photosynthetic bacteria ไม่มี chlorophasts แต่มี photosynthetic pigments เรียกว่า **Chromatophores** ซึ่งก็คือ โครงสร้างที่มี pigment ห่อหุ้มด้วย cell membrane ขณะเกิดการสังเคราะห์แสง พลังงานที่ pigments ดูดไว้จะถูกนำมาสร้าง ATP ด้วย เรียกว่า **Photophosphorylation**

6.10 Cytoskeleton

Cytoskeleton คือโครงร่างของ eukaryotic cells (รูปที่ 23) หน้าที่เทียบได้กับโครงกระดูกที่ค้ำจุดเนื้อเยื่อของร่างกายสิ่งมีชีวิต

Cytoskeleton ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเส้นใย 3 ชนิด (1) **Microtubules** เป็นท่อแข็ง (rigid tubes) ประกอบขึ้นจากโปรตีน **Tubulin**, (2) **Microtilament** เป็นเส้นใยตันและบาง (solid, thin filament) ประกอบขึ้นด้วยโปรตีน Actin และ (3) **Intermediate filaments** เหนียวคล้ายเชือก (tough, ropelike fiber) ประกอบขึ้นจากโปรตีนที่เหมือนๆ กันหลายชนิด

Cytoskeleton เป็นโครงสร้างที่ dynamic จัดเรียงตัวได้อย่างรวดเร็ว



รูปที่ 23. Structure และ Function ของ Cytoskeleton ใน (a) Epithelial cell, (b) Nerve cell และ (c) Dividing cell.

หน้าที่หลักโดยรวมของ Cytoskeleton

1. เป็นโครงนั่งร้าน (scaffold) ค้ำจุนโครงสร้าง ช่วยรักษารูปร่างของเซลล์ เช่น เซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดรูปทรงกลมเพราะ microtubules ที่เรียงเป็นรัศมีใน cytoplasm
2. เป็นกรอบภายในสำหรับจัดตำแหน่งของ organelles ภายในเซลล์ เช่น ในเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) แบ่งเซลล์ออกเป็นขั้วด้านบน (apical) และด้านฐาน (basal)

3. เป็นเครื่องจักรเคลื่อนย้ายสารและ organelles ภายในเซลล์ เช่น การเคลื่อนย้าย mRNA ไปยังส่วนเฉพาะภายในเซลล์ การเคลื่อนย้าย vesicles จาก ER ไป Golgi complex และ vesicles จาก Golgi complex ไปส่วนต่างๆ ของเซลล์ โดย microtubules ทำหน้าที่เป็นรางขนส่งของ
4. เป็นอุปกรณ์เคลื่อนย้ายเซลล์จากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง ทำให้สิ่งมีชีวิต หรือ เซลล์คืบคลานไปตามพื้นผิว substratum หรือว่ายในของเหลวได้ เช่น การเคลื่อนที่ของ เซลล์เม็ดเลือดขาว sperms และ fibroblasts
5. เป็นที่ยึดของ mRNAs และสารในกระบวนการ translation
6. เป็นเครื่องจักรที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ แยก chromosomes ออกจากกันและแบ่ง cytoplasm ออกให้ได้เป็นเซลล์ใหม่ 2 เซลล์

การทำงานของ cyloskeleton ต้องการ **Motor proteins** เคลื่อน (เดิน) ไปตามราง cytoskeleton มีการเปลี่ยน chemical cycle ของ motor proteins และ **ATP** ให้เป็น mechanical cycle ระหว่างที่ motor proteins เคลื่อนที่ไปในตำแหน่งติดกับ cytoskeleton polymer ปัจจุบันพบ motor proteins หลายชนิด แบ่งเป็นกลุ่มได้ 3 families คือ

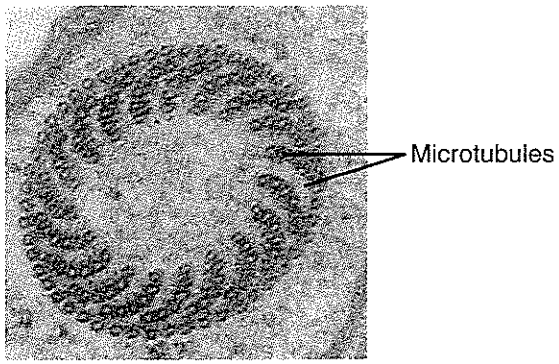
1) **Myosins** เคลื่อนที่ไปตาม microfilaments
2) **Kinesins** เคลื่อนที่ไปตาม microtubules และ
3) **Dyneins** เคลื่อนที่ไปตาม microtubules

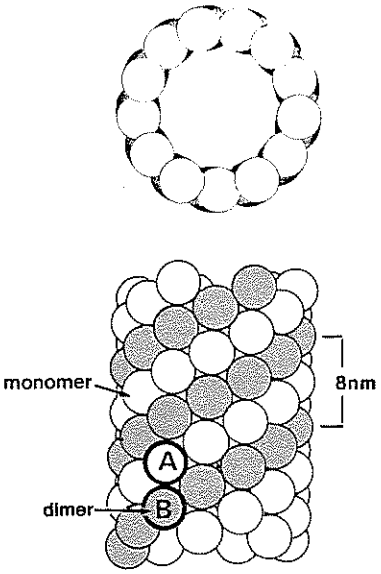
motor proteins ทั้งหมดเป็น **Mechanochemical transducers** เปลี่ยน chemical energy ที่เก็บไว้ใน ATP ให้เป็น mechanical energy ใช้ในการเคลื่อนย้ายสินค้าของเซลล์ (cellular cargo) ซึ่งถูกจับติดอยู่กับ motor proteins สินค้าของเซลล์ได้แก่ vesicles, mitochondria, lysosomes, chromosomes และ cytoskeletal filaments อื่นๆ

1) Microtubules

Microtubules พบใน Eukaryotic cells เกือบทุกชนิด microtubules เป็นท่อกลวงผนังหนา 5 nm เส้นผ่าศูนย์กลางผนังด้านนอก 24 nm ความยาวไม่แน่นอน ผนังประกอบขึ้นจาก globular protein เรียงขนานกันตามความยาวของผนัง ได้เป็นแถวตามแนวยาว แต่ละแถว เรียกว่า **Protofilaments** เมื่อมองด้านหน้าตัด microtubules ปรากฏให้เห็น 13 protofilaments เรียงเป็นวงกลมเป็นผนังของท่อ (รูปที่ 24)

ใน 1 Protofilament ประกอบด้วย building blocks ซึ่งเป็น globular protein ชื่อ **Tubulin** มี 2 ชนิด คือ α - tubulin และ β - tubulin ซึ่งมีรูปร่าง 3 มิติคล้ายกัน และเรียงสลับกัน โดยเรียงให้ α - tubulin อยู่ปลายด้านหนึ่งและ β - tubulin อยู่ปลายอีกด้านหนึ่ง นั่นคือ protofilaments ทั้ง 13 แท่ง เรียงให้ทุกปลายที่มีโมเลกุลเหมือนกันอยู่ด้านเดียวกัน ทำให้ microtubules เป็น polymer ที่มี polarity กำหนดให้ด้านหนึ่งเป็น **Plus end** (หรือ fast-growing) ซึ่งตรงกับปลาย β - tubulin และ ปลายนี้ชี้ออกตรงข้าม nucleus เช่นใน axon ของเซลล์ประสาท และอีกด้านกำหนดให้เป็น **Minus end** (หรือ slow growing) ตรงกับปลาย α - tubulin





รูปที่ 24. (a) Electron micrograph ของ Microtubule ใน tentacle ของ protist. (b) Molecular structure ของ microtubule A = α - subunit และ B = β - subunit.

Microtubules มีโปรตีนเสริมเรียกว่า **Microtubule associated proteins (MAPs)** MAPs เป็น globular proteins ที่มีส่วนหัวยึดกับด้านข้างของ microtubule ส่วนหางเป็นสายยื่นออกด้านนอกของ microtubules MAPs ทำให้ microtubules เสถียรและทำหน้าที่ควบคุมการใส่หรือเอา phosphate group ออกจาก amino acid บาง residues เช่น MAP ชื่อ *tau* ถ้ามี phosphorylation มากทำให้เกิดโรค Alzheimer's disease (AD) เพราะ hyperphospharylation ทำให้ microtubules ของเซลล์สมองผิดปกติพันกันยุ่งเหยิงเรียกว่า Neurofibrillary tangles เป็นผลให้คนไข้ตายได้

หน้าที่ของ Microtubules

1) เป็นโครงร่างภายในหรือเป็นนั่งร้านค้ำจุนตำแหน่งของ organelles หรือ internal organization ของเซลล์
2) เป็นส่วนเครื่องจักรโมเลกุลเคลื่อนย้ายสารและ organelles ภายในเซลล์
3) เป็นส่วนประกอบของ Cilia และ Flagella
4) เป็นส่วนประกอบสำคัญในการแยก chromosomes ระหว่างการแบ่งเซลล์แบบ mitosis และ meiosis

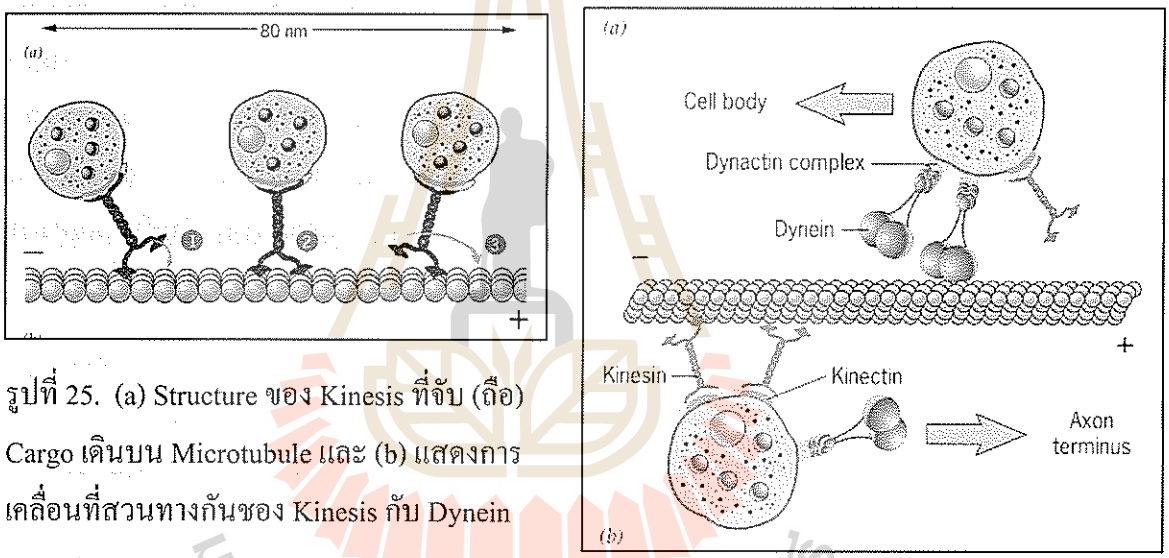
Microtubules เหนียวทนต่อแรงกดหรือการงอ จึงค้ำจุนเซลล์ได้เหมือนโครงเหล็กค้ำจุนอาคาร microtubules ค้ำจุนเซลล์ทรงสูงหรือยาวได้ดี เช่น เซลล์เยื่อบุผิวทรงสูง, ใยประสาท (Axons) ของเซลล์ประสาท และ Axopodia ของ heliozoan protists เป็นต้น ในเซลล์พืช microtublues อยู่ใต้ plasma membrane มีอิทธิพลต่อการเคลื่อนย้ายเอนไซม์ในการสังเคราะห์ cellulose

การประกอบกันของ tubulins ให้เป็น microtubules ถูกยับยั้งได้ด้วย **Nocodazole** หรือ **Colchicine** ทำให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นรูปกลมและ organelles กระจายออกจากกัน

Kinesin เป็น motor protein ขนาด 380 daltons สำหรับขนส่ง cargo บน microtubules ประกอบด้วย (1) 2 heavy chains พันกันเป็นก้าน มีด้านหัว 2 หัว จับหรือเดินบนราง microtubules ไปทาง Plus ด้านหาง 2 หางจับ cargo ที่จะขนส่งและ (2) 2 light chains (รูปที่ 25)

Dynein เป็น motor protein ของ microtubules ใน cilia และ flagella Dynein เป็นโปรตีนขนาดใหญ่มากๆ ประมาณ 1.5 ล้าน daltons ประกอบด้วย 2 heavy chains ที่เหมือนกันเป็นส่วนหัวและสายขนาดกลางและขนาดเล็กอีกจำนวนมาก Dyneins เดินบน microtubules ไปทาง Minus Dyneins ทำหน้าที่ 2 อย่าง (รูปที่ 25)

1) ให้แรงในการเคลื่อนที่ chromosomes ขณะ mitosis
2) ควบคุมปลาย Minus ให้ Golgi complex อยู่ในตำแหน่งและขนส่ง vesicles และ organelles ทั้ง cytoplasm จะเห็นได้ว่า kinesin และ dynein เดินทางสวนกันบนราง mitotubules

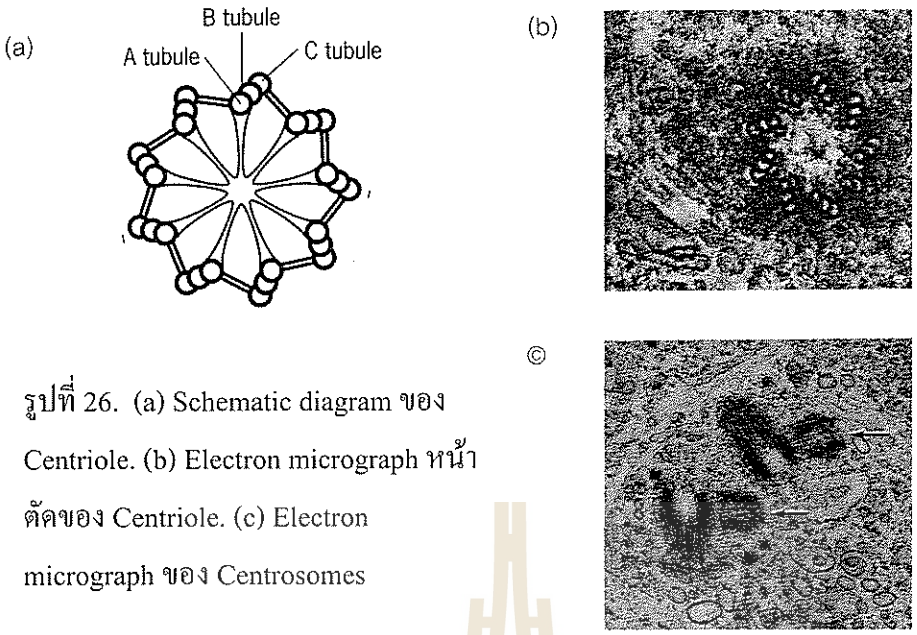


รูปที่ 25. (a) Structure ของ Kinesis ที่จับ (ถือ) Cargo เดินบน Microtubule และ (b) แสดงการเคลื่อนที่สวนทางกันของ Kinesis กับ Dynein บน Microtubule

Microtubule – Organizing Centers (MTOCs)

MTOC หมายถึง โครงสร้างที่เป็นศูนย์กลางสำหรับสร้าง microtubules (Nucleation) ที่ศึกษาพบแล้วคือ

1. **Centrosome** ในเซลล์สัตว์ centrosome ประกอบด้วยโครงสร้างรูปกระบอก 2 อัน แต่ละอันเรียกว่า **Centriole** เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 um ยาว 0.4 um ประกอบด้วย **9 fibrils** แต่ละ fibril ประกอบด้วย **3 microtubules A, B, และ C** เรียงติดกัน A tubule เท่านั้นที่เป็นท่อ microtubule ที่เป็นวงสมบูรณ์ A tubule ของทุก fibril เชื่อมเข้ากับศูนย์กลางของกระบอก centriole ด้วยก้าน **Radial spoke** ปกติ centriole พบเป็นคู่ ตั้งฉากกันและอยู่ใกล้ nucleus (รูปที่ 26) centrosome เป็นที่สร้าง microtubules ใหม่ ณ MTOC จากนั้น microtubules จึงยาวออก (Elongation) เซลล์สัตว์บางชนิด และเซลล์พืชทุกชนิดไม่มี centrosome



รูปที่ 26. (a) Schematic diagram ของ Centriole. (b) Electron micrograph หน้าตัดของ Centriole. (c) Electron micrograph ของ Centrosomes

2. **Basal body** เป็น MTOC ชนิดหนึ่ง อยู่ที่ฐานของ organelle ที่ยื่นออกไปจากเซลล์ เช่น cilia และ flagella basal body มีโครงสร้างเหมือน centrioles ทุกประการ

Cilia และ Flagella

Cilia และ flagella เป็น organelles ลักษณะคล้ายเส้นผมของ Eukaryotic cells เคลื่อนที่ได้ และ ยื่นออกจากผิวของเซลล์ cilia และ flagella เหมือนเป็น 2 versions ของโครงสร้างเดียวกัน

Cilia ขนาดสั้นและมีจำนวนมาก สำหรับการเคลื่อนที่เซลล์ และพัดโบกของเหลว หรือ ชิ้นของ (particles) บนผิวของเซลล์ เช่น ฝุ่นละอองในทางเดินหายใจ และ การเคลื่อนที่ของอาหารในทางเดินอาหาร

Flagella ขนาดยาวกว่า cilia มีเพียง 2 - 3 สายต่อเซลล์

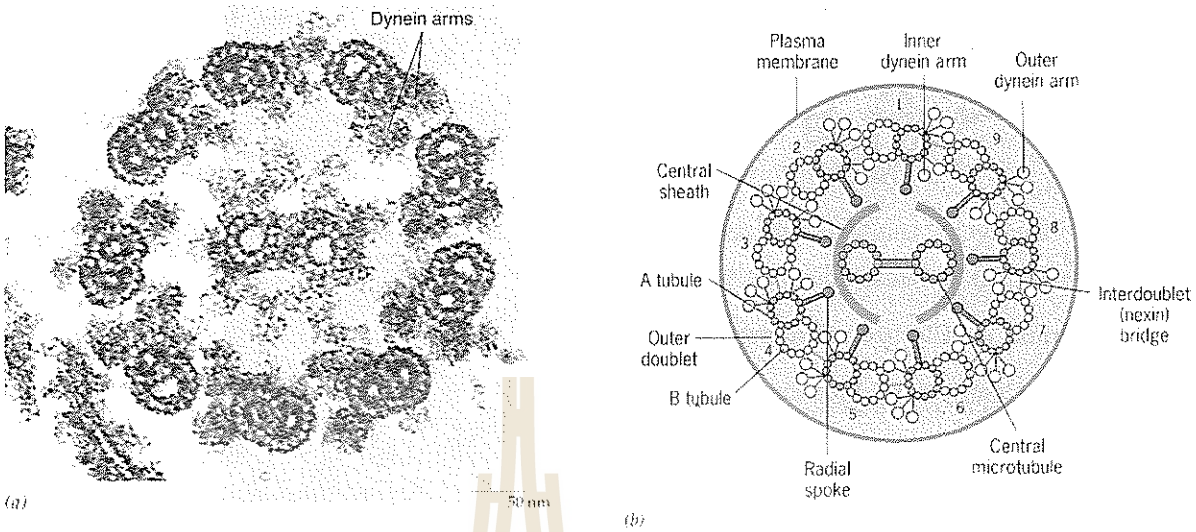
โครงสร้างของ cilia และ flagella เหมือนกันแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ

1) ส่วนที่ยื่นออกมาจากเซลล์โดยมีเมมเบรนยื่นตามออกมาด้วย เรียกว่า **Axoneme** และ

2) ส่วนฐานเป็นที่กำเนิดของ microtubules คือ **Basal body** หรือ **MTOC**

Axoneme มี microtubules เรียงตามยาวตลอด cilia หรือ flagella axoneme ประกอบด้วย microtubules 9 ชุด เรียงเป็นวงกลม ใน 1 ชุดมี 2 microtubules หรือ A และ B doublels ซึ่งติดกันเป็นท่อ ท่อ A เท่านั้นที่ครบวงสมบูรณ์ ส่วนท่อ B ไม่ครบวง และ บริเวณกลางของ axoneme มี microtubules ที่สมบูรณ์อีก 2 ท่อเป็น **Central tubules** โดยทั่วไปส่วนประกอบ microtubules ของ axoneme เขียนเป็น **สูตร 9 + 2 (9 Doublets + 2 Central tubules)** (รูปที่ 27) microtubules ทุกท่อมีขั้วเหมือนกันคือ Plus ยื่นออกและ Minus อยู่ที่ฐาน axoneme ของสัตว์บางชนิดเป็น **9 + 1** เช่น แมงดาทะเล ปู ปลาไหล และ

ชีปะขาว หนอนบางชนิดเป็น **9 + 0** ซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้ central tubules มี **Central sheath** คลุมป้องกัน และติดกับ A tubules ด้วยก้าน **Radial spokes** A และ B tubules ติดกันด้วย **Interdoublet bridge** ซึ่ง



รูปที่ 27. (a) Cross section ของ Sperm Axomene. (b) Schematic diagram ของ Axomene แสดงโครงสร้างส่วนประกอบของ Microtubules สูตร 9 + 2.

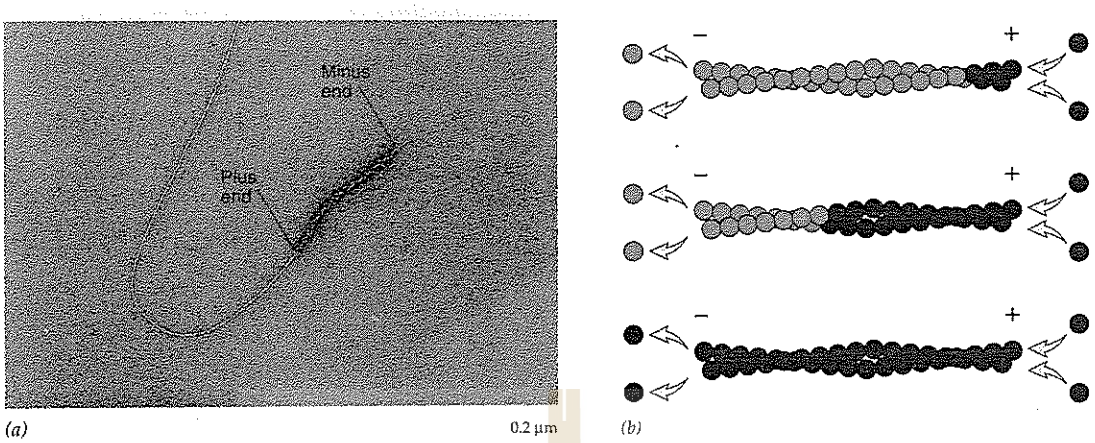
เป็นโปรตีนที่ยืดหยุ่นได้ชื่อ **Nexin** ที่ A tubules มี **Dynein arms** 2 ชุด เรียงทิศตามนาฬิกา (i) **Outer dynein arm** อยู่ด้านนอกของ nexin และ (ii) **Inner dynein arm** อยู่ด้านในของ nexin Dynein เป็น motor protein เปลี่ยนพลังงานของ ATP ให้เป็น mechanical energy ให้ cilia และ flagella เคลื่อนที่และ Dynein arms เดินบนผนังของ doublets ที่อยู่ติดกันทำให้เกิดการสไลด์ระหว่าง 2 doublets เป็นผลให้ cilia และ flagella โบกพัด เกิดการเคลื่อนที่

2) Microfilament

Microfilaments เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 nm ประกอบด้วย globular proteins ชื่อ **Actin** เมื่อมี ATP Actin รวมกันเป็นสาย polymer 2 สาย พันกันเป็น double helix เรียกว่า Actin filament หรือ Microfilaments หรือ F-Actin (รูปที่ 28) microfilaments มีหน้าที่ให้เซลล์เคลื่อนที่ เช่น การเคลื่อนที่ของเซลล์ตัวอ่อน (Embryo) ให้ไปพัฒนาการเจริญเป็นอวัยวะในที่ต่างๆ ของร่างกาย

Microfilaments ประกอบหรือแยกออกได้เป็น actin monomers การประกอบเป็น filaments ต้องการ ATPและประกอบเป็นขั้ว Plus และ Minus นั่นคือ action monomers ประกอบเข้าทางขั้ว Plus และออกจาก filament ทางขั้ว Minus ปกติในเซลล์มีการรักษาสมดุลยระหว่าง monomers กับ polymers เช่นเดียวกัน microtubules การประกอบ actin เป็นสาย polymer หรือ **Polymerization** ถูกยับยั้งได้ด้วยโปรตีน **Phalloidin** ซึ่งสกัดได้จากเห็ดพิษ ทำให้ microfilament ไม่มี dynamics และการสลายสาย

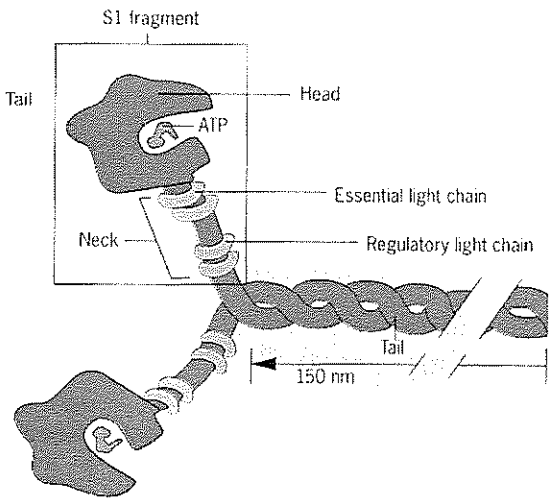
polymer หรือ **Depolymerization** ได้ด้วย **Cytochalasin** ซึ่งสกัดได้จากราเมือก ทำให้ทำลายส่วนของเซลล์ที่ยื่นออกเป็นขาเดิน **Filopodia** ที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ใน embryo



รูปที่ 28. Electron micrograph แสดงการประกอบของ Actin เป็น Microfilament

Microfilaments มี motor protein ชื่อ **Myosin** แต่การทำงานของ microfilaments ในบางกระบวนการเกิดจาก**แรงที่ได้จาก polymerization ของ actin** เอง โดยไม่ต้องมี motor protein เช่น การเคลื่อนที่ของหัว sperm ขณะเกิด fertilization หรือการผลักดัน bacteria ในเซลล์ phagocytes ยังมีกระบวนการทำงานของ microfilament ที่เกี่ยวข้องกับ myosin myosin เคลื่อนที่ไปทางขั้ว Plus ของ microfilaments หรือถ้า myosin ไม่เคลื่อนที่ แต่ทำให้ microfilaments เคลื่อนที่ เช่น ในเซลล์กล้ามเนื้อ myosin พบในเซลล์ eukaryotic หลายชนิดรวมทั้ง protists, เซลล์พืช เซลล์สัตว์ ทั้งเซลล์ muscle และเซลล์ nonmusele เช่น การคืบคลานของเซลล์

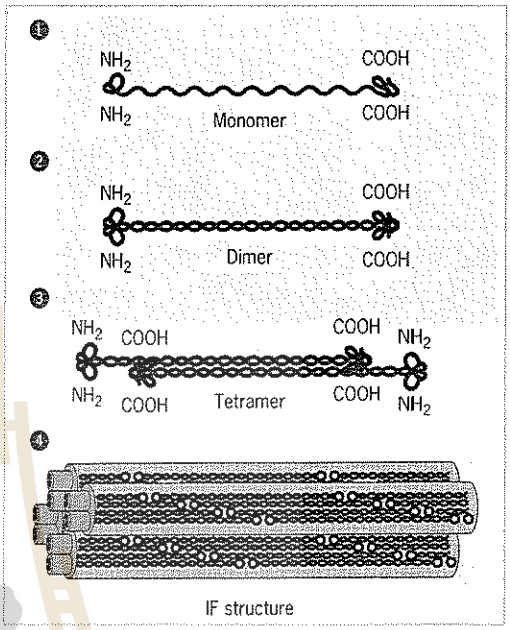
Myosin เป็นโปรตีนขนาดใหญ่โมเลกุลมี 3 ส่วน (1) หัว 1 คู่ เป็นโปรตีนทรง globular และเป็น catalytic site (2) ก้านคอ 1 คู่ เป็น α - helix แต่ละข้างมี 2 light chains (3) หาง ทรงแท่งของ α - helix 2 สายพันกันเป็นแท่งเกลียว (รูปที่ 29) ส่วนหัวเป็นส่วนที่จับ actin ของ microfilament ให้เคลื่อนที่โดยได้พลังงานจาก hydrolysis ของ ATP



รูปที่ 29. โครงสร้างโมเลกุลของ Myosin

3. Intermediate filament

Intermediate filaments เป็นใยตรงเรียบไม่แตกแขนง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 nm พบกระจายเป็นรัศมีใน cytoplasm ของเซลล์สัตว์หลายชนิด โมเลกุล intermediate filament มีโปรตีนหลาย group เพราะมี genes ควบคุมถึง 50 genes intermediate filaments เป็น polymer monomer ประกอบด้วย (1) ส่วนกลางเป็นแท่ง α - helix (2) ปลาย 2 ข้างของแท่งเป็น globular proteins การจัด (orientation) ให้เป็น filaments โดย 1) monomer 2 หน่วยพันกันเป็นเกลียวได้ dimer 2) 2 dimers เรียงขนาดกัน แต่สลับขั้วได้เป็น tetramer ซึ่งถือเป็น basic subunits (building blocks) ของ filaments 3) tetramers รวมกันเป็น filament (รูปที่ 30)



รูปที่ 30. Model การประกอบโมเลกุลของ Intermediate filament.

Intermediate filaments ทนต่อสารเคมีและแรง filaments ชนิดนี้จึงค่อนข้างเสถียร ไม่ค่อยมี polymerization และ depolymerization แต่ dynamic ของ filaments ที่พบได้ในเซลล์ที่เข้าและออกจาก mitosis intermediate filaments ถูก polymerized ตลอดช่วงการแบ่งเซลล์และแบ่ง cytoplasm intermediate filaments พบมากในเซลล์ของผิวหนังชั้นนอกรวมทั้งเซลล์ที่ตายแล้ว โดยรวมกับ keratin โปรตีนของผิวหนังชนิดหนึ่ง ทำให้ผิวหนังกั้นอากาศ น้ำ bacteria และสารเคมีหลายชนิดไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย

Cell wall

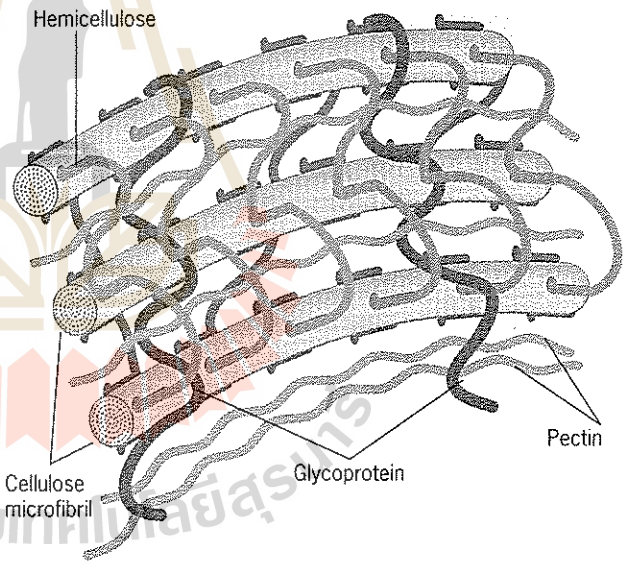
เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด ยกเว้นเซลล์สัตว์ มีเครื่องห่อหุ้มชั้นนอกเป็นการป้องกันอีกชั้นเพราะ plasma membrane ซึ่งหนาเพียงประมาณ 10 nm ให้การป้องกันขั้นต่ำเท่านั้น โปรโตซัว (protozoa) มีเปลือกชั้นนอก ส่วน bacteria, fungi, และพืชมี cell wall ที่เด่นชัด cell wall ทำหน้าที่สำคัญต่อชีวิตหลายอย่าง 1) ทำให้มีคุณลักษณะด้านรูปทรง 2) เป็นเครื่องกลค้ำจุนพื้นฐานทั้งตัว 3) ป้องกันเซลล์จากการถลอก การไหลเข้าและออกของน้ำจาก osmosis และ เชื้อโรค 4) ทำให้เซลล์มีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน (cell-cell interaction)

และ 5) เป็นกำแพงด่านแรกที่กันไม่ให้สารโมเลกุลขนาดใหญ่เข้าสู่ภายในเซลล์ แต่ย่อมให้สารโมเลกุลขนาดเล็กและอิออนผ่านเข้าออกได้อย่างรวดเร็ว

สามารถกำจัด cell wall ได้โดยย่อยด้วยเอนไซม์ เช่น Cellulase เซลล์ที่ปราศจาก cell wall เรียกว่า **Protoplast** ซึ่งมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมภายนอกอย่างมากเช่นใส่สาร hypotonic หรือกระทบอย่างแรง เซลล์จะแตกอย่างง่ายดาย ใช้ประโยชน์ protoplast ในการวิจัยระดับเซลล์หลายๆ ด้าน

Cell wall ของพืชเสมือนวัตถุประดิษฐ์ เช่น คอนกรีตหรือไฟเบอร์ก๊าซ เพราะมีเส้นใยอยู่ในเนื้อส่วนที่ไม่เป็นเส้นใย (matrix) cell wall ประกอบขึ้นด้วย **Cellulose** ที่จัดระเบียบเป็น **Microfibrils** แต่ละ microfibril ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 nm และประกอบด้วยมัด (bundles) ของ 40 - 60 โมเลกุล cellulose ซึ่งวางขนานกันและยึดติดกันด้วย hydrogen bonds เซลล์พืชหลายชนิด cell wall ที่มี microfibrils วางซ้อนกันเป็นชั้นแบบตั้งฉากกับชั้นที่อยู่ติดกัน

โมเลกุล cellulose polymerize ที่ผิวเซลล์โดยเอนไซม์ที่ฝังอยู่ใน plasma membrane แต่ตัวเนื้อพื้น (matrix) ของ cell wall ถูกสร้างภายใน cytoplasm บรรจุใน vesicles แล้วถูกส่งมาที่ผิวเซลล์ matrix ประกอบด้วย macromolecules อีก 2 ชนิด เพิ่มจาก cellulose (รูปที่ 31)

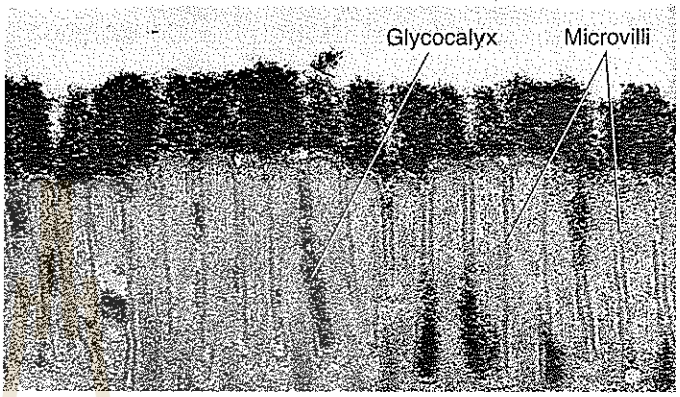


รูปที่ 31. ส่วนประกอบของ Cell wall. Cellulose Microfibril ทำ Cross link กับ Hemicellulose และ Pectin.

1) **Hemicellulose** เป็น polysaccharidis ที่แตกแขนง backbone คือ glucose และ side chains คือ xylose hemicellulose จับกับ cellulose microfibrils อย่างแข็งแรงเป็นเครือข่าย
2) **Pectins** เป็น polysaccharides ที่ประจุเป็นลบมี galacturonic acid pectin จับกับน้ำทำให้เป็นวุ้นระหว่าง cellulose microfibrils เมื่อพืชถูกโจมตีด้วยเชื้อโรค ชิ้นส่วนของ pectins จะถูกปล่อยออกมากระตุ้นให้เซลล์พืชป้องกันตัว pectins พบมากใน middle lamella ซึ่งเป็นชั้นอยู่ระหว่าง cell walls ติดกัน ทำหน้าที่เป็นซีเมนต์ยึดเซลล์ให้ติดกัน pectins บริสุทธิ์นำมาเป็นสินค้าก็คือวุ้นใน jam และ jelly

Glycocalyx

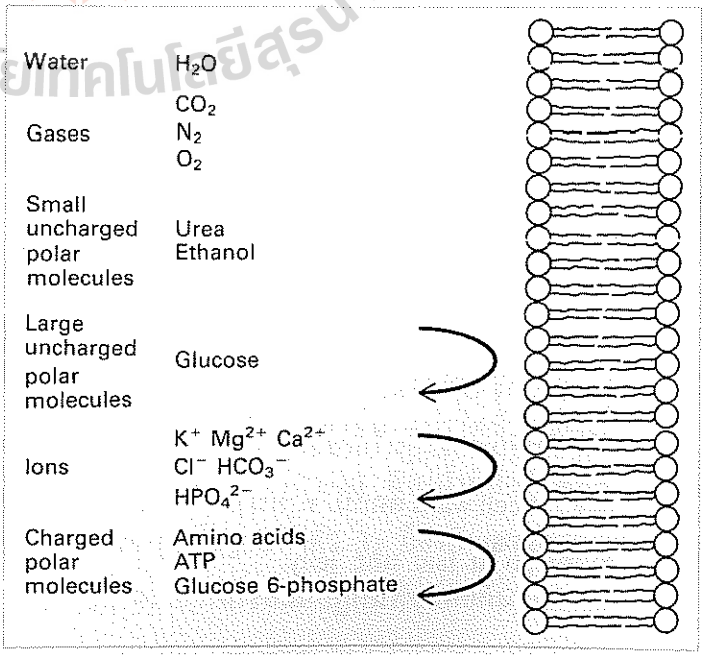
Glycocalyx คือ เปลือกหุ้มเซลล์สัตว์ ที่เซลล์สร้างและหลั่งออกมาผิวเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์เยื่อบุผิวในทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม glycocalyx เป็นตาข่าย glycoproteins ที่มี glycosidases และ peptidases ที่สามารถย่อย Oligosaccharides และ Peptides (รูปที่ 32) Glycocalyx ปกคลุมเป็นเปลือกเซลล์ด้านบนของ cell membrane ที่ยื่นออกมาเหมือนนิ้วมือ ซึ่งเรียกว่า **Microvilli** ของเซลล์บุผิวของทางเดินอาหาร



รูปที่ 32. Glycocalyx คลุม Epithelial cell ของ Intestine

การขนส่งสารผ่านเซลล์เมมเบรน (Transport Across Cell Membrane)

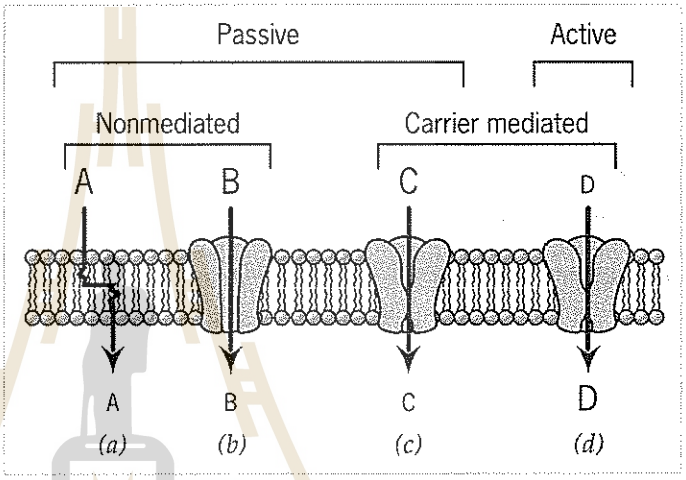
Plasma membrane เป็นกำแพงที่ยอมให้สารผ่านแบบเลือก (selective permeability) ระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อมภายนอกเพื่อให้สภาพแวดล้อมภายในคงที่ เช่นเดียวกัน organelles ภายในเซลล์ที่จะต้องรักษาสภาพภายในให้คงที่ และรักษาให้แตกต่างจาก cytosol ที่ล้อมรอบอยู่ เมมเบรนยอมให้สารโมเลกุลขนาดเล็กและไม่มีประจุผ่านได้โดยง่ายตามความเข้มข้น แต่เมมเบรนกั้นไม่ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่หรือมีประจุผ่านโดยง่ายยกเว้นต้องมีพลังงานผลักดัน (รูปที่ 33)



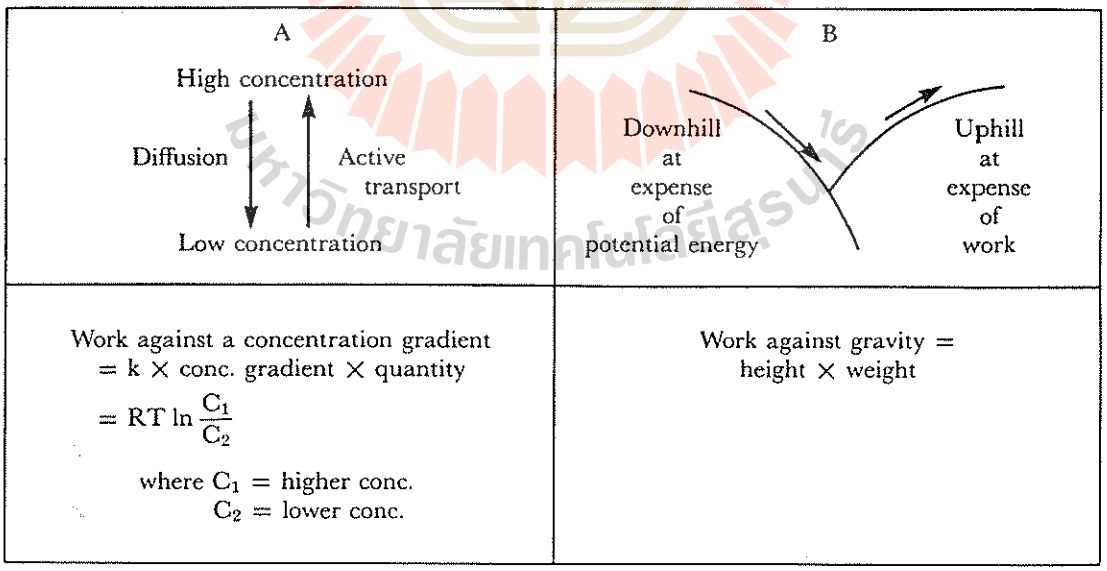
รูปที่ 33. Schematic diagram โดยรวมแสดง Permeability ของ Plasma membrane ที่มีต่อ น้ำ แก๊ส small หรือ uncharged molecule และ large หรือ charged molecules

หรือ กล่าวอีกนัยหนึ่งเมมเบรนมีคุณสมบัติ **Semipermeality** นั่นเอง เมื่อสองข้างของเมมเบรนมีสารละลายความเข้มข้นต่างกัน ด้านมีความเข้มข้นสูงเป็น **Hypertonic (hyperosmotic)** เทียบกับด้านมีความเข้มข้นต่ำกว่า ซึ่งเป็น **Hypotonic (hypoosmotic)**

Ions และโมเลกุลขนาดเล็กเคลื่อนผ่านเมมเบรนจากด้านที่มีความเข้มข้นสูงกว่าไปหาความเข้มข้นต่ำกว่า หรือ ศักย์ (ของประจุโดยรวม) ต่ำกว่า (chemical or electrochemical or potential gradients) โดยกระบวนการ **Passive transport** ions และโมเลกุลบางชนิดเคลื่อนที่ผ่านแมมเบรนจากด้านที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า หรือ ศักย์ต่ำกว่าไปหาด้านที่มีความเข้มข้น หรือศักย์สูงกว่า เป็นการเคลื่อนที่ที่ต้องการพลังงานจาก metabolism ในการขับเคลื่อน การเคลื่อนที่เช่นนี้เรียกว่า **Active transport** (รูปที่ 34และ 35)



รูปที่ 34. Basic Transport ข้าม Plasma membrane 4 แบบย่อย



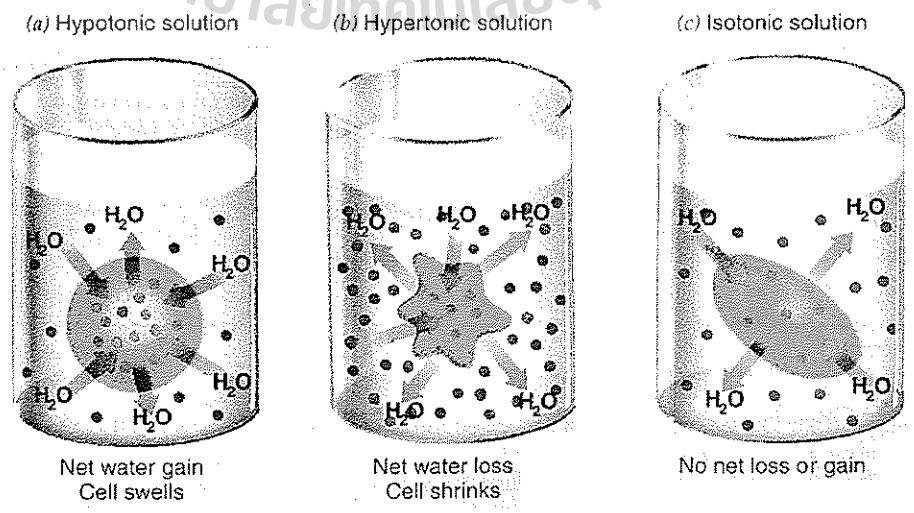
รูปที่ 35. Analogy ระหว่าง การเคลื่อนที่ "ตาม" Concentration gradient (ครึ่งซ้ายของ A) กับ Potential gradient (ครึ่งซ้ายของ B) ซึ่งเป็น "Passive transport" กับ การเคลื่อนที่ "ต้าน" Concentration และ Potential gradients (ครึ่งขวาของ A และ B) และ Works ของทั้งสองวิธี (กรอบล่าง)

1. Passive transport

การเคลื่อนที่ของสารไปที่ความเข้มข้นน้อยกว่าโดยไม่ใช้พลังงาน แยกประเภทการขนส่งได้อีกตามการมีโปรตีนขนส่ง (transport proteins) หรือไม่

1.1 Simple diffusion เป็น passive transport **ที่ไม่มี transport protein** ช่วยสารเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนจากความเข้มข้นสูงไปหาต่ำ กระบวนการเกิดขึ้นเองจากความแตกต่างของความเข้มข้นทั้ง 2 บริเวณนั้นหรือ 2 ด้านของเมมเบรน เพราะการเคลื่อนที่อย่างไม่เป็นระเบียบ (entropy) ของตัวถูกละลาย และแรงจากภายนอกทำให้เพิ่มความไม่มีระเบียบของโมเลกุลในสารละลาย การขนส่งแบบนี้เป็นการขนส่งสารโมเลกุลเล็กมาก เช่น O_2, CO_2, NO และน้ำ ในกรณีการเคลื่อนที่ของน้ำเป็นการเคลื่อนที่ตรงข้ามกับสารที่เป็นตัวถูกทำละลาย (solutes) น้ำเคลื่อนที่จากความเข้มข้นของตัวถูกทำละลายต่ำ (low solute concentration) (หรือมีน้ำมากกว่า) ผ่านเมมเบรนที่กั้นอยู่ไปหาความเข้มข้นของตัวถูกทำละลายสูง (high solute concentration) (หรือที่มีน้ำน้อยกว่า) กระบวนการนี้เรียกว่า **Osmosis**

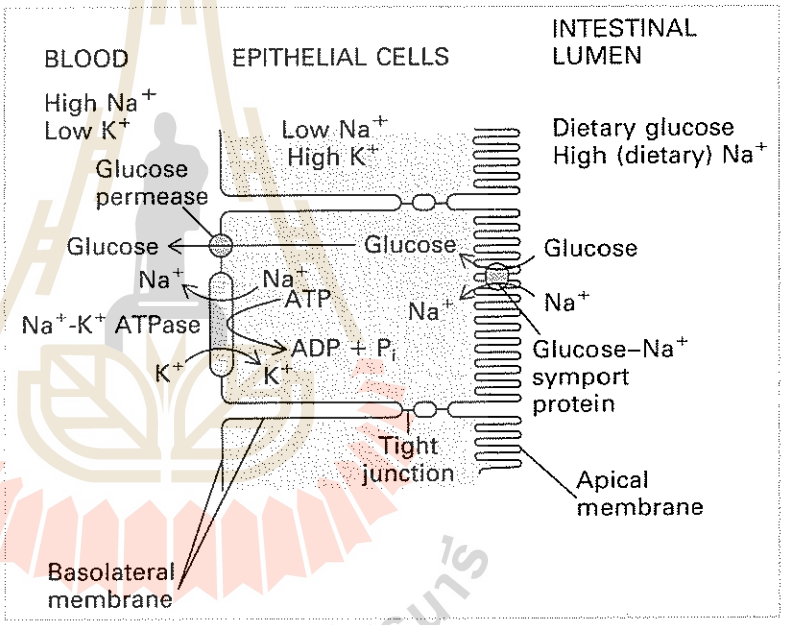
Osmosis หมายถึงการเคลื่อนที่ของน้ำผ่าน semipermeable membrane ระหว่าง 2 ด้านของเมมเบรน ด้านที่มี higher solute concentration เรียกว่า **Hypertonic (hyperosmotic)** ด้านที่มี lower solute concentration เรียกว่า **Hypotonic (hypoosmotic)** osmosis มีความสำคัญต่อหน้าที่ของเซลล์และร่างกายมาก เช่น ถ้าใส่เซลล์ใน hypotonic solution น้ำจะ osmosis เข้าเซลล์อย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์บวมเต่ง เพิ่ม **Osmotic pressure** ในเซลล์ (รูปที่ 36) ในทางตรงข้าม ถ้าใส่เซลล์ใน hypertonic solution น้ำจะ osmosis ออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์เหี่ยวย่น ลด osmotic pressure ในเซลล์ ดังนั้นปริมาตรของเซลล์จึงต้องควบคุมที่ความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของสารละลายภายในและภายนอกเซลล์ การบวมและการเหี่ยวของเซลล์เป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นชั่วคราว ภายใน 2-3 นาที เซลล์จะกลับสู่ภาวะปกติ โดย (1) ใน hypotonic medium เซลล์จะกำจัด ions (K^+ และ Cl^- เป็นหลัก) ทำให้ลด Osmotic pressure ภายในเซลล์ (2) ใน hypertonic medium เซลล์จะดึง ions (Na^+ และ Cl^- เป็นหลัก) จาก medium ถ้าความเข้มข้นของสาร (solutes) ภายในเซลล์ เท่ากับ สารในของเหลวภายนอกเซลล์ เรียกว่า **Isotonic (isosmotic)** จะไม่มีการเคลื่อนที่เข้า-ออกของน้ำ



รูปที่ 36. อิทธิพลของความแตกต่างในความเข้มข้นของสารละลาย (solutes) ที่อยู่ด้านตรงข้ามกับเมมเบรน

เซลล์ในทางเดินอาหารของสัตว์ ปกติขับน้ำออก แต่ถ้าเซลล์ดูดน้ำกลับแบบ osmosis จะทำให้เกิดท้องร่วง และทำให้ร่างกายขาดน้ำได้อย่างรวดเร็ว ในเซลล์พืชปกติเป็น hypertonic ถ้าน้ำเข้าเซลล์จะทำให้เซลล์เต่งเกิด **Turgor pressure** ดัน cell wall แต่ถ้าพืชอยู่ในสารละลายที่เข้มข้นกว่าพืชจะเสียน้ำออกจากเซลล์ทำให้พืชเหี่ยว

1.2 Facilitated diffusion เป็น passive transport ที่มีโปรตีนขนส่ง (facilitative transporter) อยู่ในเมมเบรนช่วย โปรตีนทำหน้าที่เหมือนเป็นสะพาน solute โมเลกุลในด้านที่มีความเข้มข้นสูงจับกับ transport protein และ transport protein จะปล่อย solute โมเลกุลสู่ด้านที่ความเข้มข้นต่ำกว่า การขนส่งแบบนี้มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่เข้าและออกของ polar solutes ได้แก่น้ำตาล glucose, amino acid, urea, และ ethanol เป็นต้น facilitative transporters ในเมมเบรนจะจับ solute เฉพาะเป็นอย่างๆ ไป เช่น glucose permease จับเฉพาะ glucose (รูปที่ 37)



รูปที่ 37. การนำเข้าของ Glucose จากทางเดินอาหารเข้าเซลล์ และจากเซลล์เข้าเลือด โดยอาศัย Symport protein และ Permease และ การ pump Na^+ - K^+ ด้วย ATP hydrolysis

2. Active transport

การเคลื่อนที่ของสารจากที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าผ่านเมมเบรนไปหาความเข้มข้นสูงกว่า ต้องใช้พลังงานจาก ATP จากเมตาโบลิซึม และมี Integral membrane proteins ในเมมเบรนเกี่ยวข้อง active transport มี 2 แบบ

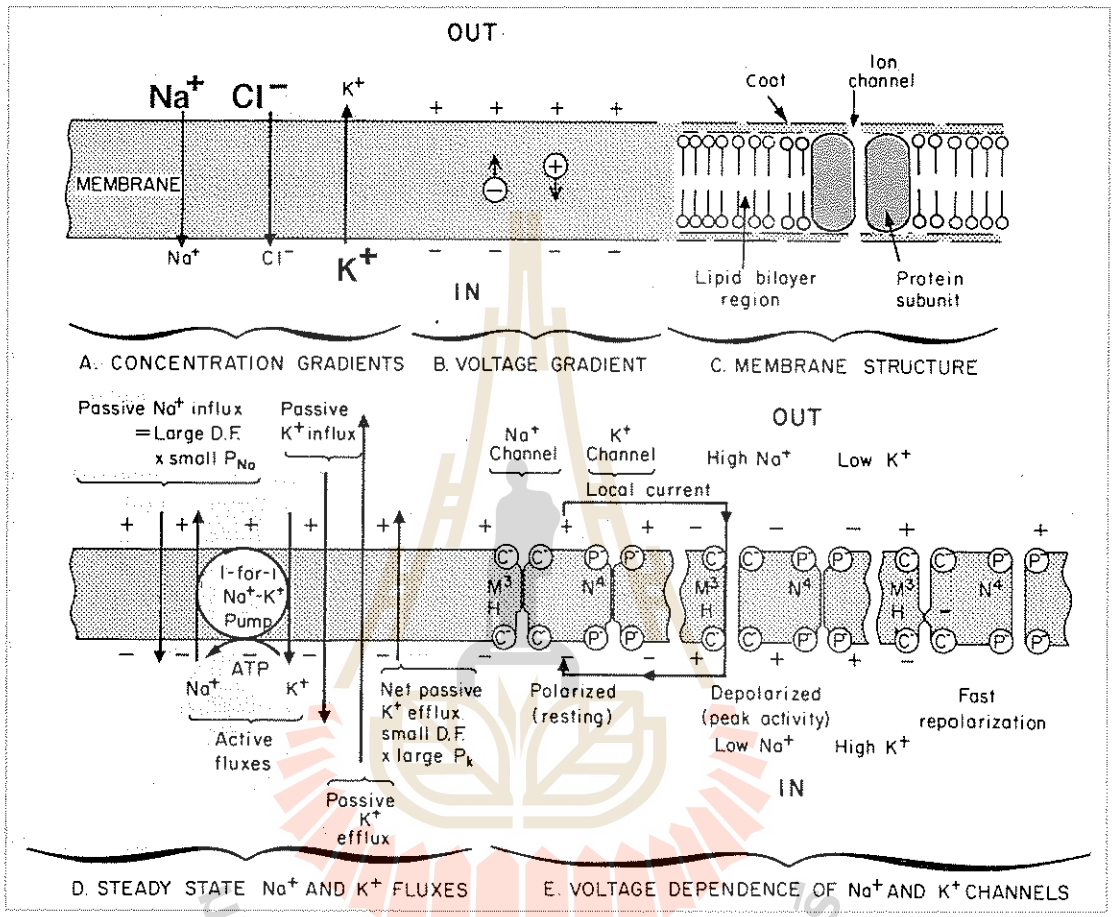
2.1 P-type active transport การขนส่งโดยใช้พลังงานและมี phosphorylation ของ transport protein เพื่อขนส่ง ions ผ่านไปด้านที่มีความเข้มข้นของ ions นั้นสูงกว่า โดยเอนไซม์ ATPase ทำหน้าที่ hydrolysis ATP ให้ปล่อยพลังงานออกจาก ATP ได้ ADP และ Pi (inorganic phosphate) และพลังงาน Pi จะถูกนำไปใส่ให้ amino acid ของ transport protein หรือเกิด Phosphorylation นั่นเอง ทำให้ phospherylated transport protein จับกับ ions ที่ต้องการส่งผ่านไปยังด้านที่มี ions นั้นเข้มข้นสูงอยู่แล้วได้ ส่วนพลังงานถูก

ใช้เป็น pump ดังนั้นการขนส่งแบบนี้จึงเป็นการเกิดควบคู่ ระหว่างขนส่ง ions กับ phosphorylation จากการสลาย ATP (ATP hydrolysis) (รูปที่ 37 และ 38) เช่น

Na^+/K^+ pump กับ Na^+/K^+ - ATPase ในเซลล์กล้ามเนื้อและในเซลล์ประสาท

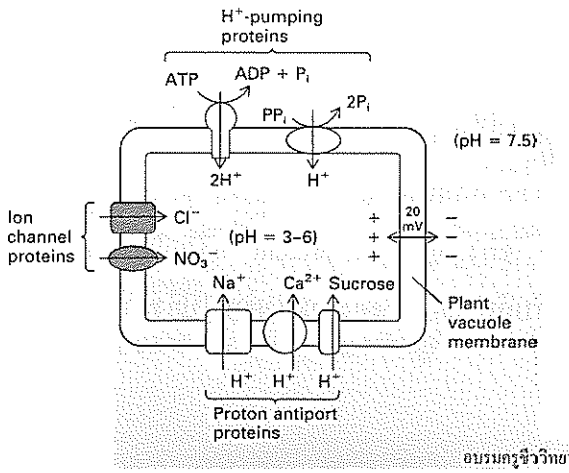
H^+ pump ในเซลล์พืชเพื่อรักษา pH ในเซลล์

Ca^{2+} pump กับ Ca^{2+} – ATPase ใน endoplasmic reticulum



รูปที่ 38. Diagram แสดง Transportation ของ Ions ข้าม Plasma membrane แบบต่างๆ

2.2 V-type active transport ขนส่ง ions ใช้พลังงานจาก ATP แต่ **ไม่มี** phosphorylation ของ transport protein (รูปที่ 38) เช่น H^+ pump ของ lysosome, secretary granules และ vacuole ของเซลล์พืช, เซลล์ในท่อไต



รูปที่ 39. V-type transport .

H^+ gradient เป็นพลังขับเคลื่อน proton ions (H^+ - pump)

พื้นฐานทางเคมีของพันธุกรรม

Chemical Basis of Genetics (Molecular Genetics)

รองศาสตราจารย์ ดร. กรกช อินทราพิเชฐ

วิวัฒนาการของแนวคิดเกี่ยวกับ genes (Evolution of the concept of the gene)

เป็นเวลาหลายพันปีที่มนุษย์แสวงหาคำตอบต่อคำถามเกี่ยวกับการถ่ายทอดพันธุกรรม จนกระทั่งเมื่อประมาณ 130 ปี กว่ามานี้จึงได้มีคำตอบเชิงวิทยาศาสตร์ที่เป็นไปได้ ในปี 1865 **Greger Johann Mendel** ได้รายงานการค้นพบของเขาอันเป็นกฎพื้นฐานของการถ่ายทอดพันธุกรรม Mendel เสนอว่าทุกเซลล์ มีสิ่งที่เรียกว่า **Factor** เป็นคู่ แต่ละคู่เป็นตัวกำหนดลักษณะเฉพาะ factors แยกคู่เมื่อมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และการแยกของแต่ละคู่ไม่ขึ้นกับคู่อื่น การค้นพบของ Mendel ไม่เป็นที่ยอมรับจนปี 1900 หลังจาก Mendel สิ้นชีวิตไปแล้ว การค้นพบของ Mendel จัดเป็นแก่นของพันธุศาสตร์สมัยเก่า หรือที่เรียกว่า **Classical Genetics** จนเมื่อการค้นพบรายละเอียดโครงสร้างของเซลล์และการแบ่งเซลล์ ในปี 1900 หลักการของ Mendel จึงได้ถูกตีความหมาย และเป็นจุดเริ่มต้นของพันธุศาสตร์สมัยใหม่ ที่เรียกว่า **Modern Genetics** การค้นพบและระบุว่า **DNA** (deoxyribonucleic acid) เป็น**สารเคมีพื้นฐานของพันธุกรรม** และหน่วยของพันธุกรรมบน DNA ซึ่งตรงกับ Factor ของ Mendel ปัจจุบันเรียกว่า **Gene** นอกจากนี้ พัฒนาการเทคโนโลยีระดับโมเลกุล ทำให้มนุษย์สามารถศึกษาและจัดการกับ genes จนเปิดเผยได้ว่า gene ทำงานอย่างไร ถูกควบคุมอย่างไร และความบกพร่องของ gene ถูกตรวจสอบ ปรับเปลี่ยน และแก้ไขได้ การเปิดเผยแนวคิดทางพันธุศาสตร์ทำให้เราสามารถตีความหมายพันธุกรรมได้มากมายหลายแง่ ตราบเท่าที่อัจฉริยะภาพของมนุษย์จะทำได้ พันธุศาสตร์จึงเป็นศาสตร์ที่มีพลวัต Dynamic Science

Modern genetics มีผลอย่างมากทางการแพทย์ ความเกี่ยวเนื่องของพันธุกรรมกับโรคได้เปิดเผยเป็นครั้งแรกโดย Sir Archibald Garrod ในปี 1902 ที่ศึกษาพบว่า ความบกพร่องของเมตาโมลิซึม สามารถถ่ายทอดภายในครอบครัว คือโรค Alkaptonuria ที่ขาด enzyme สำหรับเปลี่ยน Homogentisic acid หรือ Alkapton ให้เป็น Maleylacetoacetate ทำให้ homogentisic acid ซึ่งได้จากการสลาย amino acid phenylalanine ถูกสะสมในเซลล์ เนื้อเยื่อและขับออกมากับปัสสาวะ เมื่อ homogentisic acid ถูก oxidized ให้สารสีน้ำตาล-ดำ สะสมในกระดูกอ่อน หู จมูก ข้อต่อ และเนื้อเยื่ออื่น ๆ รวมทั้งในปัสสาวะก็เป็นสีดำ เมื่อถูก oxidized ด้วย oxygen และทำให้โรคข้ออักเสบตลอดชีวิต Garrod จึงเป็นคนแรกที่โยงความสัมพันธ์ระหว่าง gene และ gene product ซึ่งในกรณีนี้ คือโปรตีนที่เป็น enzyme นอกจากนี้ Garrod ได้ศึกษาอีกหลายโรคที่เกิดจากความบกพร่องทางพันธุกรรมทั้งการแยก gene ระหว่างการแบ่งเซลล์ และการกลายพันธุ์ มะเร็งก็เป็นโรคพันธุกรรมอย่างหนึ่งเช่นกัน เมื่อ genes ที่ควบคุมการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของเซลล์บกพร่องทำให้เซลล์ต้นกำเนิดกลายเป็นเซลล์มะเร็ง

เทคนิคของ modern genetics ให้ผลกระทบต่อเกษตรกรรมอย่างมาก เช่นการใส่ genes สำหรับต่อต้านแมลงและโรค เพื่อปรับคุณภาพของผลผลิต การทำให้พืชมี gene สำหรับตรึง nitrogen เพื่อลดการใช้ปุ๋ย

Human Genome Project เป็นโครงการนานาชาติ มีเป้าหมายเพื่อทำแผนที่และลำดับของ gene มนุษย์เพื่อสุขภาพ ให้มนุษย์เกิดมาไม่มีความบกพร่องทางพันธุกรรม มนุษย์มีโอกาสที่จะเป็นมะเร็ง โรคทางระบบประสาทและโรคพันธุกรรมอื่น ๆ โครงการได้รับการสนับสนุนกว่า 3 พันพันล้านเหรียญสหรัฐ แต่อย่างไรก็ตามมีปัญหาที่ซับซ้อนอยู่ที่ว่า สาธารณะสามารถที่จะรับข้อมูลพันธุกรรมได้อย่างไม่มีขอบเขตได้หรือไม่ และเป็นไปได้มากว่า การจ้างงานและการประกันสุขภาพของมนุษย์ในอนาคต จะขึ้นกับพื้นฐานข้อมูลของ DNA ของแต่ละบุคคล

สารพันธุกรรม (Genetic Material)

1. ประวัติการค้นพบสารพันธุกรรม

แนวคิดเกี่ยวกับ gene ได้รับการดัดแปลงภายหลังการค้นพบ Factor หรือ character ของ Mendel ที่ควบคุมลักษณะ Phenotype เฉพาะ เช่น สีดอกไม้ สีเมล็ด และรูปทรงของเมล็ด

Mendel : Constant Factors Controlling Phenotypic Traits

Characters หรือ **factors** ของ Mendel ซึ่งปัจจุบันเรียกว่า **Gene** ควบคุมลักษณะ **phenotypes** เฉพาะ และยังเป็นหน่วยพื้นฐานหน้าที่และเป็นหน่วยข้อมูลพันธุกรรมซึ่งยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง concept นี้ถูกต้องจนถึงปัจจุบัน แม้ว่าการค้นพบธรรมชาติของเคมีของข้อมูลพันธุกรรมจะถูกปรับปรุงแก้ไขมาตลอด วิถีที่ genes ควบคุม phenotype ของสิ่งมีชีวิตนั้นสลับซับซ้อน หลาย genes อาจให้อิทธิพลคล้ายกันต่อ phenotype เดียวกัน ทำให้ยากต่อการแยกแยะอิทธิพลของแต่ละ genes ใน nucleus ของสิ่งมีชีวิตมี genes แต่ genes ทั้งหมดไม่ได้ทำงานอย่างอิสระ phenotypes ของสิ่งมีชีวิตเป็นผลของการกระทำของ genes ทั้งหมดภายในขอบเขตจำกัดโดยสิ่งแวดล้อม แต่ละ gene มีอิทธิพลต่อประชากรที่มี gene นั้น ๆ อยู่ และแม้ว่าจะเป็น gene ขนาดเล็ก แต่ก็ให้อิทธิพลที่สะสมอยู่ใน biosphere ให้สิ่งมีชีวิต หรือ ประชากร หรือ สายพันธุ์ที่จะต่อสู้แก่งแย่งอาหารเพื่อความอยู่รอดใน biosphere

Garrod : One Mutant Gene - One Metabolic Block

Garrod ได้ศึกษาอีกหลายโรคที่เกี่ยวกับความบกพร่องของโมตาโมลิซึมในมนุษย์ เช่นคนเผือก Albinism และบันทึกไว้ใน Inborn Errors of Metabolism แม้ว่าการศึกษาผลกระทบของ recessive mutations ที่มีต่อวิถีของเมตตาโมลิซึมของ Alkaptonuria ยังไม่รู้ความเกียวเนื่องกับ gene จนกระทั่งเมื่อหลายปีมานี้ ความสัมพันธ์ระหว่าง gene กับ metabolism ของ Garrod จึงเป็น concept ที่รู้จักกันว่า **One Mutant Gene-One Metabolic Block**

Beadle และ Tatum : One Gene-One Enzyme

George Beadle และ Edward Tatum เพาะเลี้ยงราสีชมพู *Nenrospora crassa* ใน minimal medium ซึ่งประกอบด้วย (1) inorganic salts (2) simple sugar 1 ชนิด และ(3) biotin ซึ่งเป็นไวตามิน พบว่า Neurospora สามารถสร้างสารที่จำเป็น เช่น purines, pyrimidines, amino acids และ vitamins ได้ภายใต้การควบคุมของพันธุกรรม ถ้า genes ที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของปัจจัยการเจริญเติบโตเหล่านี้กลายพันธุ์ ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ต้องการปัจจัยการเจริญเติบโต (growth factor เช่น amino acid หรือ vitamin) เพิ่มเติม หรือเจริญได้ใน complete medium Beadle และ Tatum ได้วิเคราะห์หาความต้องการของ growth factor กับ mutant strains พบว่าแต่ละ mutation ขาด enzyme ไป 1 enzyme จึงได้ตั้ง concept **One Gene-One Enzyme** ขึ้น ในห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ก็ได้ผลเช่นกัน Beadle และ Tatum ได้รับ Nobel Prize ประจำปี 1958

One Gene - One Polypeptide

ต่อจากงานของ Beadle และ Tatum พบว่าเอนไซม์และโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) เป็นโมเลกุลที่มีหลายหน่วยที่ไม่เหมือนกัน (heteromultimeric) แต่ละหน่วยเป็น polypeptide ซึ่งควบคุมด้วย genes ที่แยกกัน เช่น (1) เอนไซม์ tryptophan syntheses จาก *E.coli* เป็น heterotetramer ประกอบด้วย 2 α polypeptides ควบคุมโดย *trp* A gne และ 2 β polypeptides ควบคุมด้วย *trp* β gene (2) hemoglobin ประกอบด้วย 2 α-globin polypeptides ควบคุมโดย Hb^A α gene บน chromosome 16 และ 2 β-globin polypeptides ควบคุมโดย Hb^A β gene บน chromesome 11 ดังนั้นต่อมา concept One gene-one enzyme จึงถูกเปลี่ยนเป็น **One Gene-One Polypeptide**

2. หน้าที่ของสารพันธุกรรม

ตั้งแต่ปี 1865 Mendel ได้แสดงให้เห็นว่า genes ถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรม หลายปีต่อมาได้มีการศึกษาแบบแผนของการถ่ายทอดอย่างจริงจัง ทั้งที่ยังไม่รู้ธรรมชาติระดับโมเลกุลของ genes แต่ก็แสดงให้เห็นว่าสารพันธุกรรมมีหน้าที่จำเป็น 3 ประการ คือ

1. **Genotype function** หรือ **Replication** สารพันธุกรรมต้องเก็บข้อมูลพันธุกรรมและถ่ายทอดข้อมูลจากพ่อ-แม่ไปให้ผู้สืบทอด (offspring) อย่างถูกต้องจากรุ่นหนึ่งไปให้อีกรุ่นหนึ่ง
2. **Phenotypic function** หรือ **Gene Expression** สารพันธุกรรมต้องควบคุมพัฒนาการของลักษณะ (phenotype) ของสิ่งมีชีวิต นั่นคือสารพันธุกรรมต้องบงการการเจริญเติบโตและความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตจากตัวอ่อนเซลล์เดียวไปจนถึงตัวเต็มวัย
3. **Evolutionary function** หรือ **Mutation** สารพันธุกรรมต้องมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อให้สิ่งมีชีวิตปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ถ้าไม่มี Mutation วิวัฒนาการไม่สามารถเกิดได้

การศึกษาพันธุศาสตร์ในช่วงต้น ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างแบบของการถ่ายทอดของ genes และพฤติกรรมของ chromosomes ระหว่างการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ เป็นหลักฐานสนับสนุนว่า genes อยู่บน chromosomes

Chromosome ประกอบด้วยสารอินทรีย์โมเลกุลขนาดใหญ่ 2 ชนิดคือ Nucleic acid และ Proteins Nucleic acid มี 2 ชนิด คือ (1) **Deoxyribonucleic acid (DNA)** และ (2) **Ribonucleic acid (RNA)** ในช่วง 1940-1950 การทดลองได้แสดงอย่างชัดเจนว่าข้อมูลพันธุกรรมถูกเก็บไว้ใน nucleic acids ไม่ใช่ proteins สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตส่วนมากเป็นรหัสในโครงสร้างของ DNA แต่มี virus บางชนิดที่สารพันธุกรรมเป็น RNA

3. การพิสูจน์ว่า ข้อมูลพันธุกรรม (Genetic information) ถูกเก็บไว้ใน DNA

หลักฐานโดยตรงหลายอย่างพิสูจน์ว่า DNA มีข้อมูลพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

1) DNA ส่วนมากอยู่ใน chromosomes ในขณะที่ RNA และโปรตีนมีมากใน cytoplasm
2) ความสัมพันธ์อย่างแน่นอนระหว่างปริมาณของ DNA ต่อเซลล์ และจำนวนชุดของ chromosome ต่อเซลล์ เช่นในสิ่งมีชีวิตพันธุ์เดียวกัน somatic cells มีชุด chromosomes เป็น diploid มีปริมาณ DNA เป็น 2 เท่าของ DNA ใน gamete cells ซึ่งเป็น haploid
3) DNA ในเซลล์ทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตใดๆ มีส่วนประกอบทางเคมีเหมือนกัน ในขณะที่ส่วนประกอบของ RNA และโปรตีนมีความแปรปรวนสูงในเซลล์ที่ต่างชนิดกัน
4) DNA เสถียรกว่า RNA และโปรตีน ซึ่งถูกสังเคราะห์และถูกทำลายค่อนข้างเร็วในสิ่งมีชีวิต RNA และ protein จึงไม่สามารถถ่ายทอดให้รุ่นต่อไปได้ ในขณะที่ความเสถียรของ DNA ทำให้ถ่ายทอดให้รุ่นต่อไปได้

การทดลองที่สำคัญ 2 การทดลองที่สรุปได้ว่า Genetic material คือ DNA ไม่ใช่ protein

3.1 Transforming principle

หมายถึงสารเคมีจาก bacteria *Streptococcus pneumonia* สายพันธุ์ (stereotype) หนึ่งถ่ายให้อีกสายพันธุ์หนึ่ง Robert Koch, 1880s พิสูจน์ได้ว่าแบคทีเรียเป็น species แต่ยังพิสูจน์ไม่ได้ว่าในแต่ละ species มีสายพันธุ์ย่อยออกไป จนปี 1928 Frederick Griffith ได้ค้นพบ **Bacterial Transformation**

3.1.1 การค้นพบ Bacterial transformation

Streptococcus pneumonia มี 3 stereotypes คือ Type I, II และ III แต่ละสายพันธุ์ต่างกันที่เปลือกหุ้มหรือ Capsule ซึ่งมีลักษณะเป็นเมือกประกอบด้วย polysaccharides ที่แตกต่างกัน สายพันธุ์ที่มี capsule ให้ colony แบบผิวเรียบให้ชื่อว่า **Smooth form** หรือ **S** เป็นสายพันธุ์ที่ให้พิษรุนแรง สายพันธุ์ที่ไม่มี capsule ให้ colony แบบผิวขรุขระให้ชื่อว่า **Rough form** หรือ **R** ไม่เป็นพิษ บางสายพันธุ์สามารถเปลี่ยน form ได้โดยธรรมชาติหรือการทดลอง Griffith พบว่าในน้ำลายคนไข้ที่หายจากเป็น pneumonia ปกติพบ R form ทั้งที่ติดเชื้อเป็น pneumonia Griffith จึงทำการทดลองอย่างเป็นลำดับโดยทำ Transformation ระหว่าง serotype Type III กับ Type II ซึ่งเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเป็นการเปลี่ยนทางพันธุกรรมมากกว่าทางสรีระ

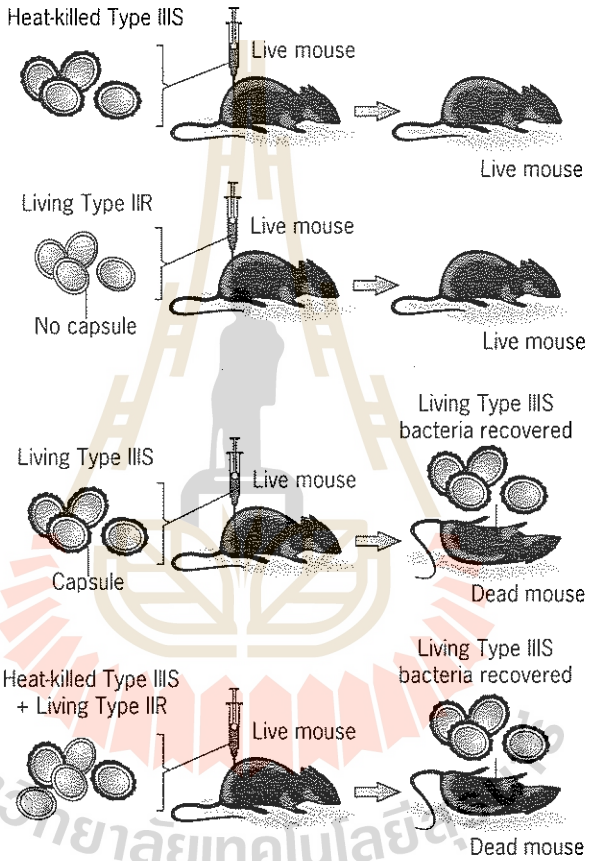
Transformation ของ Griffith's มี 4 ขั้นตอน

1) ฉีดหนูตัวที่ 1 ด้วย **smooth bacteria Type IIIS** ผลทำให้หนูเมาส์ เป็น pneumoniae ตาย

2) ฉีดหนูตัวสองด้วย **rough bacteria Type IIR** ผลหนูปกติไม่เป็นโรค

3) ฆ่าเชื้อ Type IIIS ด้วยความร้อนที่ 60° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ว ฉีดหนู ผลหนูเป็นปกติ เพราะ Type IIIS เป็นพิษรุนแรงเมื่อมีชีวิตเท่านั้น

4) ผสม heat-killed Type IIIS กับ living Type IIR แล้วฉีดหนูผลหนูเป็น pneumonia ตาย เมื่อแยกหา bacteria พบว่า มี Type IIIS bacteria ที่มีชีวิตจำนวนมาก ทั้งที่ bacteria มีชีวิตที่ฉีดให้หนูมีเฉพาะ Type IIR forms เท่านั้นที่มีชีวิต (รูปที่ 1)



รูปที่ 1. Griffith's discovery : การค้นพบ Transformation ใน *Diplococcus pneumoniae*

3.1.2 **Transforming principle** คือ Genetic Material แสดงว่า ส่วนประกอบอย่างหนึ่งของ heat-killed Type IIIS bacteria ไปเปลี่ยน Type IIR ให้เป็น IIIS stereotype ไม่ใช่ Type IIR เปลี่ยนเป็น Type IIIS ด้วยตัวเอง เพราะเมื่อแยกชนิด bacteria แล้วไม่พบ Type IIR ในหนูที่ตาย ส่วนประกอบที่รับผิดชอบในการแปลงหรือ **Transformation คือ transforming principle** ไม่ใช่ส่วนเปลือก (capsular polysaccharide) ของ bacteria เพราะ heat-killed Type IIIS เซลล์ตายแล้วไม่สร้าง material ห่อหุ้ม living cells จึงต้องเป็น transforming principle เท่านั้นที่ถูกชักนำเข้าสู่ Type IIR bacteria เซลล์ใหม่ แล้วบังคับให้เซลล์ใหม่สร้าง capsular polysaccharides กลายเป็น Type IIIS stereotype อย่างถาวร ดังนั้น **Transforming principle ต้องเป็น genetic material**

3.1.3 Transforming principle คือ DNA แต่ Griffith ไม่ได้วิเคราะห์หา transforming principle ด้วยตนเอง ต่อมา Osward Avery, Colin Machead และ Maclyn McCarty, 1944 ได้กรอง transforming principle จาก heat-killed Type IIIS แล้วแยกวิเคราะห์ ย่อยส่วนประกอบโดย

1) ใช้เอนไซน์ Protease ย่อย โปรตีนทั้งหมด
2) ใช้เอนไซม์ Ribonuclease ย่อย RNA
3) ใช้เอนไซม์ IIIS enzyme ย่อย polysaceharide
4) ใช้เอนไซม์ Deoxyribonuclease ย่อย DNA

แล้วนำส่วนที่ย่อยแล้วตรวจหาว่ามี transforming principle เหลืออยู่หรือไม่ ด้วยการฉีดหนูอีกชุดหนึ่ง พบว่าส่วนที่ย่อยด้วย IIIS enzyme, protease และ ribonuclease ยังสามารถ transform R cells ให้เป็น S cells ทำให้หนูตายแต่ ส่วนที่ย่อยด้วย deoxyribonuclease ไม่สามารถ transform ได้ แสดงว่า transforming principle ต้องเป็น DNA ต่อมา McCarty ได้แยก DNA จาก heat-killed S cells ให้บริสุทธิ์ เป็นการยืนยันว่า transforming principle และ DNA คือสิ่งเดียวกัน และเป็น Genetic Material

3.2 Bacteriophage genes เป็น DNA

1951-52 เป็นเวลา 7 ปี หลังการตีพิมพ์ผลงานของ Avery และ คณะ ได้มีการทดลองเพื่อหาคุณสมบัติทางเคมีของ genetic material โดยใช้ไวรัสที่สามารถทำลาย bacteria ได้ซึ่งเรียกว่า **Bacteriophage** หรือ **Phage**

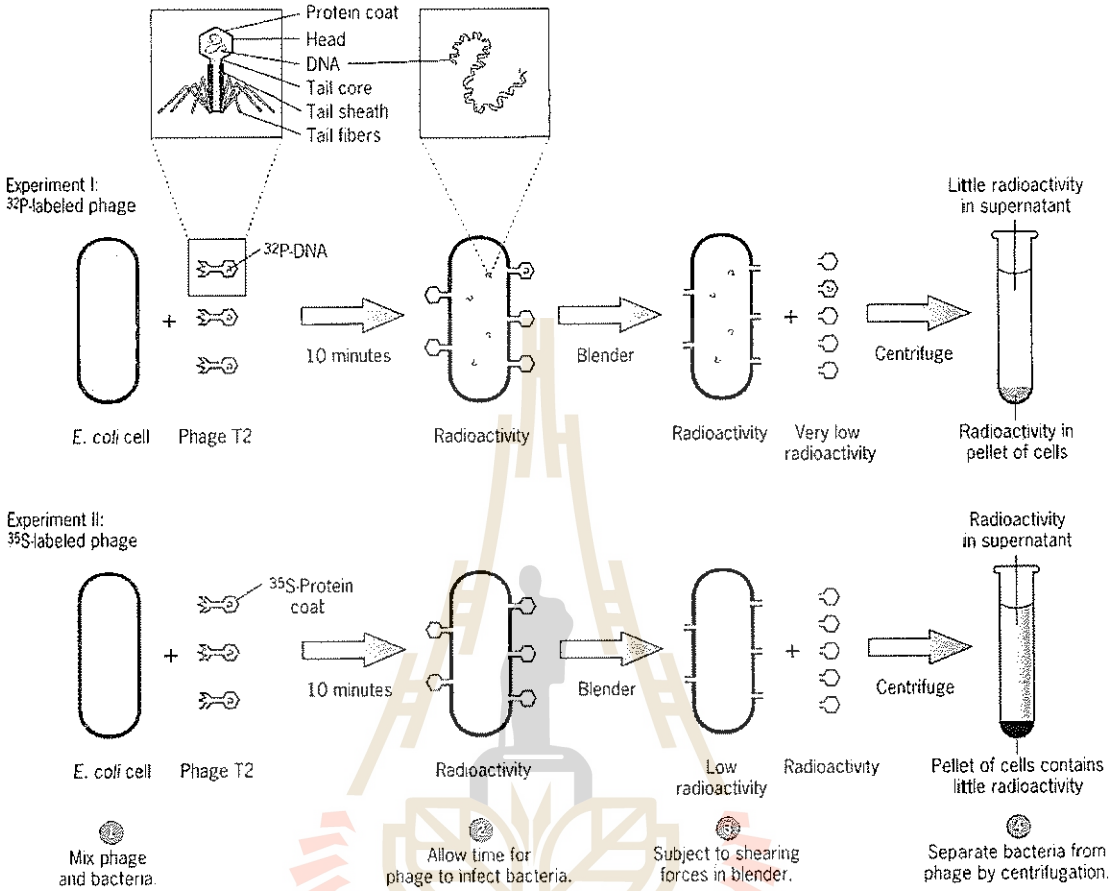
Hershey และ Chase. 1952 ใช้ **Bacteriophage T2** แสดงให้เห็นว่า DNA เข้าไปในเซลล์ *E. coli* โดยทิ้งโปรตีนซึ่งเป็นเปลือกนอกทั้งหมดไว้นอกเซลล์ แสดงว่าข้อมูลพันธุกรรมซึ่งก็คือ DNA เท่านั้นที่จำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส การทดลองนี้เรียกว่า **Hershey-Chase experiment** หลักการทดลองมาจากความรู้ที่ว่า DNA มี phosphorus แต่ไม่มี sulfur ในขณะที่โปรตีนมี sulfur แต่ไม่มี phosphorus Hershey และ Chase ได้ติดฉลาก DNA และ Protein ด้วย สารรังสีแยกกัน (รูปที่ 2) ดังนี้

1) ติดฉลาก DNA โดยเลี้ยง T2 phage ในอาหารที่มี ^{32}P
2) ติดฉลาก protein ซึ่งเป็นเปลือกของ phage โดยเลี้ยง T2 phage ในอาหารที่มี ^{35}S

การทดลองที่ 1. นำ ^{35}S-T2 phage ผสมกับ *E. coli* 2-3 นาที ซึ่งเพียงพอให้ phage เข้าไปใน bacteria (infect) และ phage เพิ่มจำนวนได้ จากนั้นกวนใน Waring blender เพื่อให้ phage หลุดออกจากเซลล์ bacteria แต่ไม่ทำลาย phage แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำ (low-speed centrifuge) เพื่อแยก bacteria ซึ่งหนักกว่าและมี phage DNA ภายในตกลงส่วนล่างของหลอด ส่วน phage ที่เหลือแต่เปลือกโปรตีนเบากว่า ลอยอยู่ในของเหลวด้านบน เมื่อแยก bacteria ไปตรวจไม่พบ DNA ที่ติดฉลาก ^{35}S

การทดลองที่ 2. นำ ^{32}P-T2 phage ผสมกับ *E. coli* และดำเนินการเช่นกัน ภายหลังปั่นแยก bacteria และ phage แล้วไปตรวจพบว่า bacteria มี ^{32}P-DNA แสดงว่า DNA ของไวรัสเท่านั้นที่เข้าไปในเซลล์ bacteria

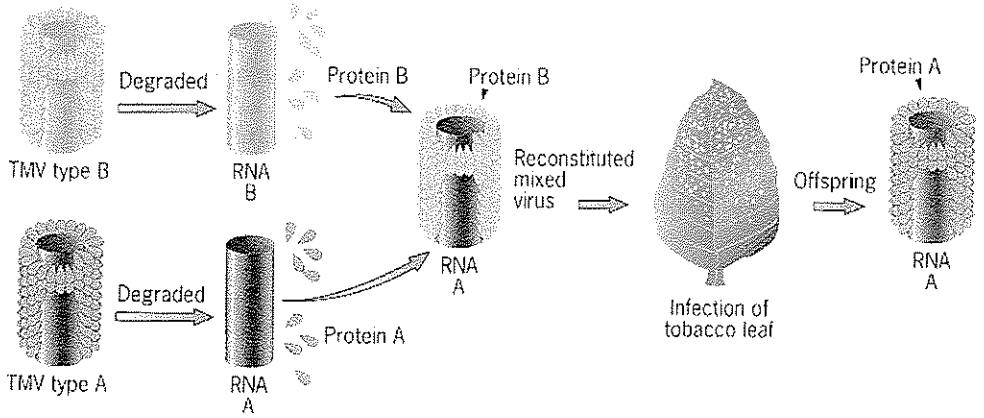
และ DNA เป็นข้อมูลพันธุกรรมไม่ใช่โปรตีน ดังนั้น genes ของ bacteriophage คือ DNA อย่างไรก็ตามแม้ว่าไวรัสเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่ปกติ เพราะไม่ถูกประเมินเป็น real organism เช่นคน โดยทั่วไปจึงเป็นที่ยอมรับว่า DNA คือสารพันธุกรรม ยกเว้นไวรัสบางชนิดที่มีสาร พันธุกรรมเป็น RNA



รูปที่ 2. Hershey–Chase experiment แสดงว่า genetic information ของ bacteriophage T2 อยู่ใน DNA

4. การพิสูจน์ว่า RNA เก็บข้อมูลพันธุกรรมในไวรัสบางชนิด

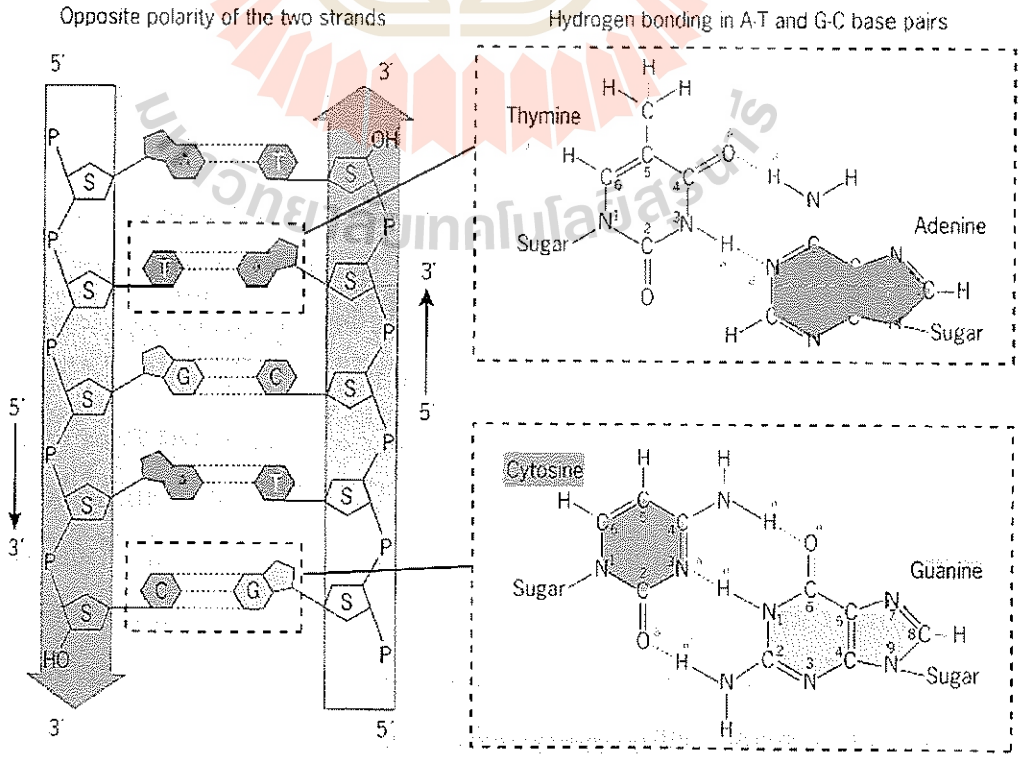
ไวรัสจำนวนมากถูกจำแนกและศึกษาพบว่าหลายชนิดประกอบขึ้นด้วย RNA และโปรตีนโดยไม่มี DNA เลย ไวรัสเหล่านั้นเหมือนสิ่งมีชีวิต (organisms) ทั่วไปที่เก็บข้อมูลพันธุกรรม (genetic information) ใน nucleic acids ไม่ใช่โปรตีนทั้งที่ไวรัสพวกนี้มี nucleic acid เป็น RNA การทดลองที่พิสูจน์ว่า RNA เป็นสารพันธุกรรม (genetic material) ของ RNA virus คือ **Reconstitution experiment** ของ Heinz Fraenkel-Conrat และคณะ โดยใช้ไวรัสยาสูบ **Tobacco mosaic virus (TMV)** ซึ่งเป็นไวรัสขนาดเล็กมี RNA โมเลกุลเดียว ผสม protein จากไวรัสสลายพันธุ์หนึ่งกับ RNA จากอีกสายพันธุ์หนึ่ง และทำสลับกันด้วยภายใต้เงื่อนไขที่สามารถทำให้โปรตีนกับ RNA รวมกันได้อย่างสมบูรณ์จากนั้นนำ reconstituted mixed viruses ป้ายใส่ในยาสูบให้เพิ่มจำนวน แล้วแยกมาวิเคราะห์หา gene และ phenotype ของไวรัส (รูปที่ 3) ปรากฏว่าได้เหมือน RNA ของสายพันธุ์แม่ที่นำ RNA มาทุกครั้ง แสดงว่าข้อมูลพันธุกรรมของ TMV คือ RNA ไม่ใช่ protein



รูปที่ 3. การแสดงว่า RNA เป็น genetic information ของ tobacco mosaic virus ไม่ใช่ protein

5. ธรรมชาติทางเคมีของ DNA และ RNA (Chemical Nature of DNA and RNA)

Nucleic acids เป็น macromolecules ประกอบด้วยหน่วยซ้ำ ๆ ของ nucleotides แต่ละ nucleotide ประกอบด้วย (1) Phosphate group (2) น้ำตาล carbon 5 อะตอมหรือ pentose. (3) cyclic nitrogen-containing bases ใน DNA น้ำตาลเป็นชนิด 2-deoxyribose จึงเรียก nucleic acid ชนิดนี้ว่า Deoxyribonucleic acid ส่วน ใน RNA น้ำตาลเป็น ribose จึงเรียกว่า Ribonucleic acid เบสปกติที่พบมี 4 ชนิดใน DNA มี Adenine (A), Guanine (G), **Thymine (T)** และ Cytosine (C) แต่ใน RNA มี Adenine, Guanine, Cytosine และ **Uracil (U)** Adenine และ Guanine เป็น double-ring base เรียกว่า **Purine** ส่วน Cytosine, Thymine และ Uracil เป็น single-ring base เรียกว่า **Pyrimidine** (ทบทวนจากพื้นฐานเคมี : สารอินทรีย์) ดังนั้นทั้ง DNA และ RNA ต้องมี nucleotides แตกต่างกัน 4 ชนิด โดยมี Purine nucleotide 2 ชนิด และ pyrimidine



รูปที่ 4. ส่วนประกอบของ DNA และ การจับ Hydrogen bonding ของสองสายซึ่งเป็น Antiparallel

nucleotide 2 ชนิด nucleotides ทั้ง 4 ชนิดต่อกันเป็นโมเลกุลสายยาวสายเดียว (Single-stranded molecule) ในกรณีของ RNA ส่วน DNA เป็นโมเลกุลสองสาย (double- stranded molecule) (รูปที่ 4)

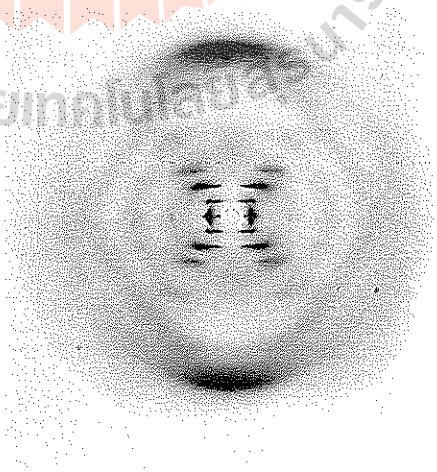
5.1 โครงสร้างของ DNA Double Helix

โครงสร้างที่ถูกต้องของ DNA จากการอนุมาน (deduce) ของ Watson และ Click ใน ปี 1953 ว่าเป็นเกลียวคู่ หรือ Double helix โดยมีหลักฐานสำคัญ 2 อย่าง คือ

1) จากการค้นพบของ Chargaff ซึ่งพบว่า DNA มีความเข้มข้นของ Thymine เท่ากับความเข้มข้นของ Adenine และความเข้มข้นของ Cytosine เท่ากับความเข้มข้นของ Guanine แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่าง Thymine กับ Adenine และ Cytosine กับ Guanine ใน DNA คงที่ และความเข้มข้นทั้งหมดของ pyrimidine (T + C) เท่ากับความเข้มข้นทั้งหมดของ Purine (A + G) แต่ในทางตรงข้าม อัตราส่วน [T + A] / [C + G] เปลี่ยนแปลงมากใน DNA ของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน อัตราส่วนนี้เรียกว่า **Chargaff's ratio**
2) X-ray ของผลึก DNA บริสุทธิ์ รังสี X ที่รวบส่งผ่านโมเลกุลของสารบริสุทธิ์จะหักเห โดยอะตอมของโมเลกุลในแบบแผนเฉพาะ เรียกว่า **Diffraction pattern** ใช้เป็นข้อมูลองค์ประกอบของโมเลกุล X-ray diffraction pattern สามารถบันทึกได้บนแผ่นฟิล์ม X-ray (รูปที่ 5)

Watson และ Click ใช้ข้อมูลภาพ **X-ray crystallography** ของ DNA ซึ่งทำไว้แล้วโดย **Wilkins, Franklin และคณะ** ซึ่งแสดงว่า DNA มีลำดับการเรียงโมเลกุลซับซ้อนสูงมาก มีโครงสร้างเป็น 2 สายที่มีส่วนประกอบซ้ำ ๆ มีช่องว่างทุกระยะ 0.34 manometer (1 nm = 10^{-9} meter) ตามแนวแกนของโมเลกุล

ข้อมูลส่วนประกอบทางเคมีของ Chargaff, X-ray diffraction ของ Wilkin และ Franklin และการวินิจฉัยจากรูปแบบโครงสร้าง Watson และ Click ได้เสนอว่า DNA เป็น**เกลียวคู่หมุนขวา** (right-handed double helix) โดย 2 polynucleotide chains หมุนพันกันแบบบันไดเวียน แต่ละ polynucleotide ประกอบด้วย

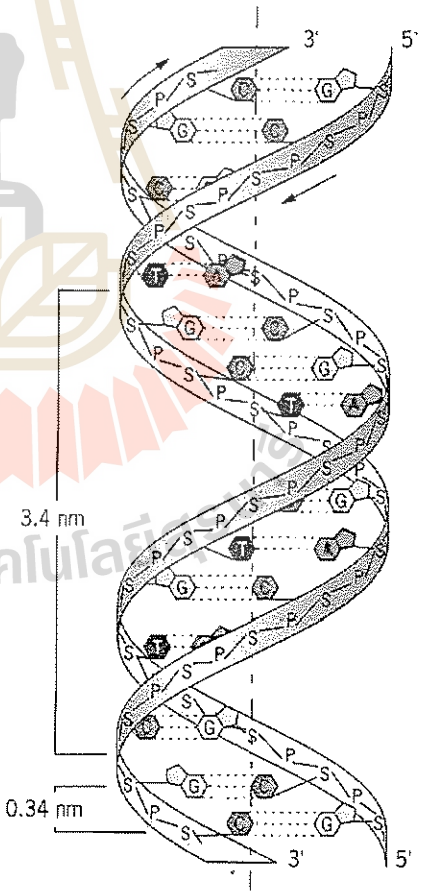


รูปที่ 5. X-ray diffraction pattern ของ DNA

nucleotides เรียงลำดับ ต่อกันด้วย **phosphodiester bonds** ระหว่าง deoxyribose 2 polynucleotides ยึดกัน configuration ด้วย hydrogen bonding ระหว่าง bases ของสายตรงข้าม bases ได้เป็นรูป helical จึงซ้อนกัน

เป็นตั้งระหว่าง 2 สายและตั้งฉากกับแนวแกนของโมเลกุลเหมือนขั้นของบันไดเวียน (รูปที่ 6) คู่ของ base จับกันจำเพาะมาก Adenine จับคู่กับ Thymine เสมอ และ Guanine จับคู่กับ Cytosine เสมอ ดังนั้นทุกคู่ base ต้องมี 1 purine และ 1 pyrimidine จับกันด้วย hydrogen bonds โดย Adenine กับ Thymine จับกันด้วย 2 hydrogen bonds และ Guanine กับ Cytosine จับกันด้วย 3 hydrogen bonds ซึ่งการจับกันของ bases เช่นนี้เป็นโครงสร้างปกติทั่วไปของ DNA ดังนั้น ถ้ารู้ลำดับของ bases สายหนึ่งก็จะรู้ลำดับของ bases อีกสายหนึ่งได้ 2 สายของ DNA double helix จึงเป็นคู่สม (**Complementary**) กัน คุณสมบัติของ Complementary ทำให้ DNA มีความเฉพาะ และเหมาะในการเก็บข้อมูล และส่งข้อมูลถ่ายพันธุกรรมจากรุ่นหนึ่งไปอีกรุ่นหนึ่ง **Sugar-phosphate backbone** ของสายคู่สมกลับขั้วกันเป็น **Antiparallel** ใน 1 เกลียว ความยาว 34 nm มี bases 10 คู่ หมุนครบ 1 รอบ หรือ 360°

Phosphodiester bond จับระหว่าง 3′ carbon ของ nucleotide หนึ่งกับ 5′ carbon ของอีก nucleotide ที่อยู่ติดกัน (รูปที่ 6) ขั้วของ complementary strands มีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการ DNA Replication, Transcription และ Recombination



รูปที่ 6. Double helix ของ DNA

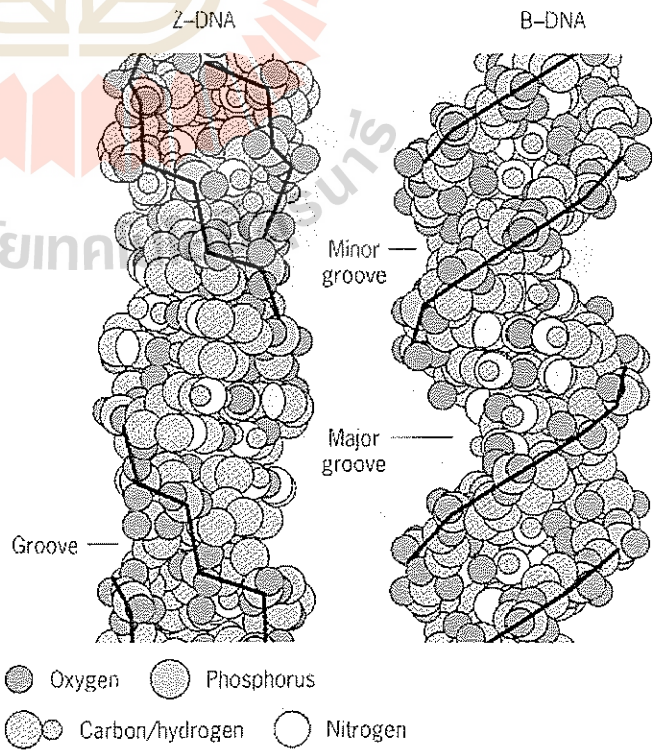
ความเสถียรของ DNA double helix เป็นผลจาก hydrogen bonds ระหว่างคู่เบส และ hydrophobic bonding ระหว่างคู่เบสที่ตั้งซ้อนกัน เพราะด้านระนาบของคู่เบสค่อนข้างเป็น nonpolar และมีแนวโน้มเป็น hydrophobic ทำให้โมเลกุล DNA เสถียรใน aqueous protoplasm ในเซลล์มีชีวิต พื้นที่ว่างระหว่างเกลียว

DNA มี 2 ร่อง (grooves) คือ major groove และ minor groove ซึ่งมีความสำคัญต่อการจับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ DNA (gene regulation factors)

5.2 DNA Double Helix แบบต่าง ๆ

โครงสร้างของ DNA double helix ตามแบบของ Watson-Crick model เป็นโครงสร้างแบบทั่วไป เรียกว่า **B-DNA** เป็นโครงสร้าง 3 มิติ (conformation) ของ DNA ภายใต้สภาพสรีระวิทยาที่เป็นสารละลาย (ด้วย) น้ำและความเข้มข้นของเกลือต่ำ แต่ยังมี DNA ใน conformation อื่นได้อีก เพราะโมเลกุล DNA ค่อนข้างเปลี่ยน conformation ได้ตามสภาพแวดล้อม ตัวอย่างเช่น

1) B-DNA โดยธรรมชาติจริง B-DNA มี 10.4 คู่ nucleotides ต่อรอบ เส้นผ่าศูนย์กลางของ helix 1.9 nm
2) A-DNA เมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น หรือมีน้ำมากขึ้น double helix DNA จะสั้นกว่าและหนากว่า มี 11 คู่ nucleotides เส้นผ่าศูนย์กลางของ helix 23 nm Major groove แคบและลึก Minor groove กว้างและตื้น A-DNA เกือบไม่เคยปรากฏในสิ่งมีชีวิตจริง (*in vivo*) ยกเว้น เมื่อ DNA จับกับ RNA เป็น heteroduplex หรือ RNA - RNA duplex ใน *in vivo*
3) Z-DNA บางช่วงของ DNA ปรากฏว่า sugar-phosphate backbone เป็นเกลี่ยวหมุนซ้าย หรือเป็น zigzag จาก X-ray diffraction พบว่า Z-DNA มี G:C มากและคู่เบส G:C สลับกับคู่เบส C:G ทำให้เกลี่ยว DNA หมุนซ้าย ใน 1 เกลียวมีคู่เบส 12 คู่ เส้นผ่าศูนย์กลางเกลียว 1.8 nm และมี groove เดียวลึก การปรากฏการมีจริงของ Z-DNA ใน living cells พบน้อยมากในบริเวณควบคุมการแสดงออกของข้อมูลพันธุกรรม (รูปที่ 7)

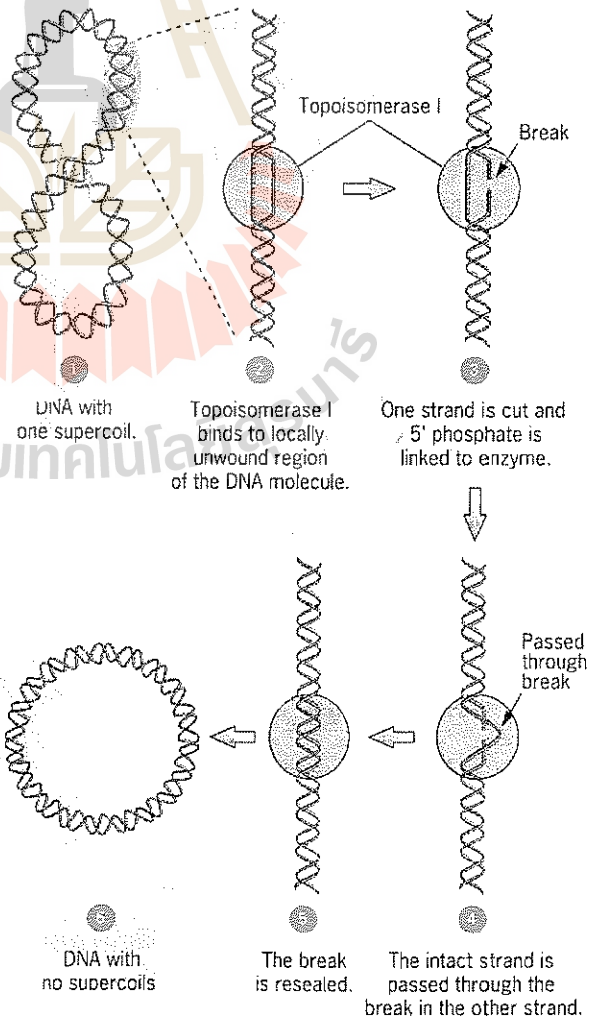


รูปที่ 7. Z-DNA ซึ่งเกลียวหมุนซ้าย และ B-DNA ซึ่งเกลียวหมุนขวา

3) โครงสร้าง DNA แบบ Negative Supercoils ใน *In Vivo*

อีกโครงสร้างหนึ่งของ DNA ที่สำคัญในเซลล์มีชีวิตคือ เกลียวที่บิดมากเป็นพิเศษของ DNA เป็น **Supercoiled DNA** เกิดได้เมื่อตัดสาย DNA สายหนึ่งหรือทั้งสองสาย เมื่อกำหนดให้ปลายของสายที่หนึ่งอยู่คงที่ สายที่สองจะพันรอบสายที่หนึ่ง การทำเกลี่ยวมากพิเศษเช่นนี้ ที่เรียกว่า **Supercoiling** เกิดกับโมเลกุล DNA ที่มีปลายใดปลายหนึ่งคงที่เท่านั้น ทำให้ DNA หดเป็นขดม้วนแน่นเหมือนสายโทรศัพท์แบบขดม้วน หรือการบิดของยางวงกลม (rubber band) เอนไซม์ที่สำคัญใน DNA replication และกระบวนการอื่น ๆ สามารถทำให้เกิด supercoiling หรือคลาย supercoiling (รูปที่ 8) เช่น DNA ที่เป็นแบบวงกลม (circular DNA) ใน prokaryotic chromosome, mitochondrial chromosome ถ้าเกิดใน DNA แบบเส้น (Linear DNA) ใน eukaryotic chromosome จะเป็นช่วงหรือปลายของ DNA ใน circular DNA ถ้าให้ปลายอิสระหมุนรอบ complementary strand ไปทางขวาจะได้ **Positive supercoil** หรือ **Overwound** DNA ถ้าหมุนรอบไปทางซ้ายจะได้ **Negative supercoil** หรือ **Underwound** DNA

DNA โมเลกุลในสิ่งมีชีวิตทั้งหมด รวมทั้งไวรัส ใน *in vivo* และขณะที่ Chromosomes กำลังทำงานในหลายหน้าที่ เช่น replication, recombination, gene expression และ regulation ของ gene expression จะปรากฏเป็น **Negative supercoiling** จัดเป็น secondary coiling เอนไซม์ที่ทำให้เกิด supercoiling คือ



รูปที่ 8. Supercoiling และการแก้ไขโดย Topoisomerase

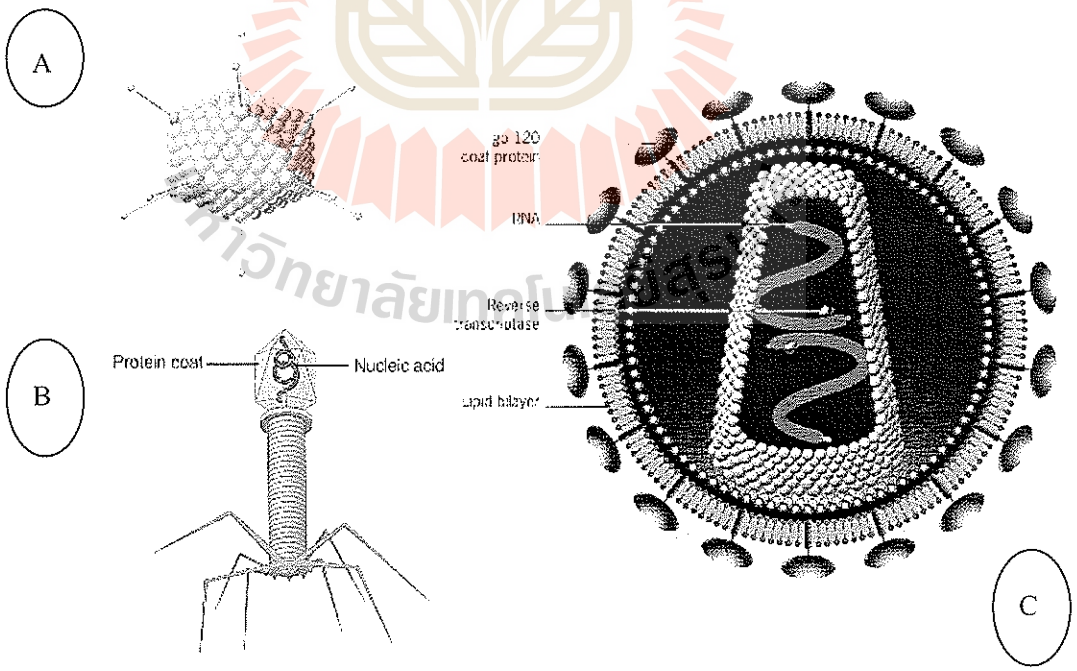
Topoisomerase เป็นเอนไซม์เปลี่ยนรูปแบบ **Topolagy** ของ DNA โมเลกุล เช่น topoisomerase ชื่อ **DNA gyrase** ทำให้เกิด negative supercoiling ระหว่าง replication ทั้งใน prokaryotic และ eukaryotic ใน *E. coli* DNA gyrase ถูกยับยั้งได้ด้วย novobiocin และ nalidixic acid ทำให้ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ใน bacteria

6. Chosomosome Structure ใน Prokaryotes

ข้อมูลของ DNA ส่วนมากได้จากการศึกษาใน prokaryotes เพราะมีความซับซ้อนน้อยกว่า eukaryotes prokaryotes และ viruses เป็น Monoploid มี genes เพียงชุดเดียว (1 set ของ gene หรือ 1 copy ของ genome) เก็บไว้ใน **Chromosome เดียวหรือมี Nueleic acid โมเลกุลเดียว**

ในกรณีของ virus ซึ่งเป็น nonliving particle แต่ มี Supramolecules ที่รวมกันแล้วสามารถจำลองตัวเองได้ (self replication) เพราะ virus มี nucleic acids ที่ล้อมรอบด้วยเปลือกป้องกัน ที่เรียกว่า Capcid ซึ่งเป็นโปรตีน (รูปที่ 9) virusปรากฏ ใน 2 สถานภาพ คือ

1) ถ้าอยู่นอกเซลล์มีชีวิต สถานภาพเป็น Nonliving particle เรียกว่า **Virion** ซึ่งเป็นสถานภาพที่มีขนาด รูปร่างและส่วนประกอบปกติ หรือ virion ก็คือ mature virus นั่นเอง
2) ถ้าอยู่ในเซลล์มีชีวิต เป็น intracellular parasite มีเฉพาะ nucleic acids เท่านั้น และ จะเอา genetic information ของตัวไป take over และ เปลี่ยน กิจกรรมปกติของ host cells ให้มาสังเคราะห์ทุกอย่างเพื่อเพิ่มจำนวนลูก virus ในสถานภาพ virion (progeny virion) ซึ่งจะระเบิดเซลล์ออกมา

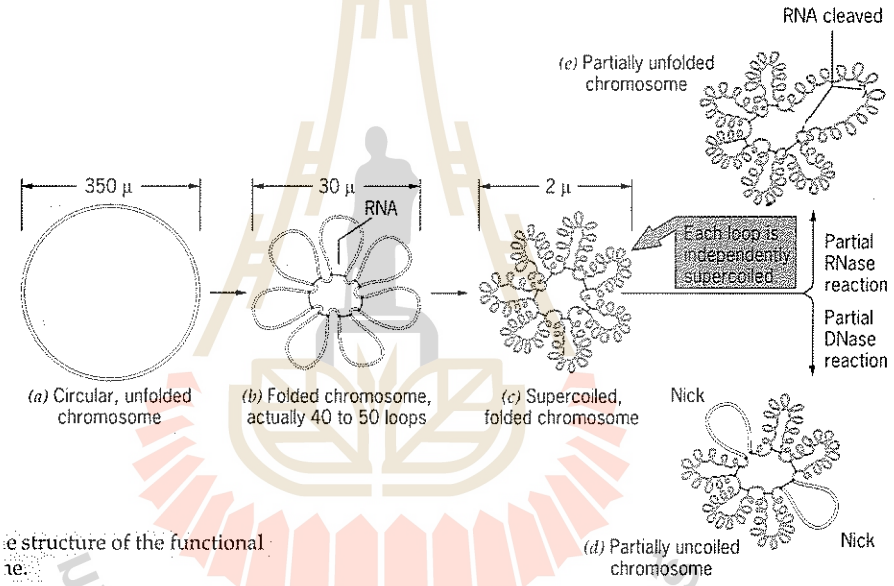


รูปที่ 9. Viral structures. A, adenovirus; B, T-even bacteriophage และ C, human immunodeficiency virus (HIV)

RNA virus ที่เล็กที่สุดมีเพียง 3 genes, ได้แก่ bacteriophage MS2 ประกอบด้วย 3569 nucleotides และมี 4 genes ส่วน DNA virus ที่เล็กที่สุดมี 9-11 genes เช่น bacteriophage ϕX174 ประกอบด้วย 5386 nucleotides มี 11 genes *E. coli* มี 2500-3500 genes ใน DNA 1 โมเลกุล

Prokaryotic Chromosomes เป็น DNA โมเลกุลเปลือย (naked DNA molecule) คือไม่มีดปรตีนเป็รส่วนประกอบ รูปร่างคล้ายของ mitotic หรือ meiotic metaphase chromosomes เพียงเล็กน้อย

Chromosome ของ *E. coli* ยาวประมาณ 1100 um เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 um (รูปที่ 10) ลักษณะพับจีบเรียกว่า **Folded genome** ภายใน folded genome DNA จัดเป็นส่วนหรือพู (domain หรือ loop) ประมาณ 50-100 domains มี RNA เป็นตัว connector แต่ละ domain เป็น negative supercoil อิสระ ถ้าย่อย RNA connector ด้วย RNase จะลดจำนวน domains ลง แต่ไม่กระทบต่อ supercoiling ของ Domain แต่ถ้าย่อยด้วย DNase จะทำให้ supercoiling ของ domain คลายออกเป็น Relaxed domain



รูปที่ 10. Chromosome ของ *E. coli*

7. Chromosome Structure ใน Eukaryotes

Eukaryotic genomes มีความซับซ้อนมากกว่า prokaryotic genomes eukaryotes ส่วนมากเป็น Haploid หรือ Diploid หรือเป็น Polyploid ในพืชบางชนิด eukaryotes มี genes ประมาณ 2-25 เท่าของ *E. coli* แต่มี DNA มากกว่าอีกหลายเท่าและมี DNA ส่วนเกินที่ไม่ใช่ genes ด้วย

Chromosome ของคนแห่งที่ใหญ่ที่สุด มี DNA ยาว 85 mm (85,000 um) ในระยะ Mitotic metaphase จะขดแน่นเหลือเพียง 0.5 um

เมื่อแยก chromatin จาก nucleus ระยะ interphase วิเคราะห์พบว่า chromatin ประกอบด้วย DNA และ Protein เป็นส่วนใหญ่มี RNA เพียงเล็กน้อย โปรตีนแยกได้เป็น 2 ชนิด

(1) **Basic protein** มีประจุเป็นบวกที่ pH เป็นกลางเรียกว่า **Histones**

(2) **Acidic protein** มีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลางมีหลายชนิดรวมเรียกว่า **Nonhistone chromosomal proteins**

Histones มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างของ chromatin และการห่อตัวของ DNA (DNA packaging) ใน eukaryotes เท่ากับปริมาตรของ DNA Histones มีทั้งหมด 5 ชนิดคือ H1, H2a, H2b, H3 และ H4 พบในเซลล์ทุกชนิดยกเว้น sperm ซึ่งเป็นเซลล์เพียงบางชนิดที่มี Protamines แทน histones histones ทั้ง 5 ชนิด มีในอัตราส่วน 1 H1 : 2 H2a : 2H2b : 2H3 : 2H4

DNA packaging ใน eukaryotic chromosome มี 3 ขั้นตอน

1. **Nucleosomes** โดย Robert Kornberg, 1975

DNA ช่วงความยาว 146 base pairs พันรอบแก่นกลางซึ่งเป็น histones 2 โมเลกุลได้ 1 3/4 รอบ แกนกลาง histones มี 2 โมเลกุล แต่ละโมเลกุลมี H2a, H2b, H3 และ H4 อย่างละ 1 หน่วย รวมเป็นแกนกลาง 8 หน่วยหรือ **Core Octamer** และมี H1 ยึดสาย DNA ด้านนอกระหว่าง DNA 2 รอบ (รูปที่ 11) หรือประมาณ 166 base pairs ทำให้ได้โครงสร้าง DNA ช่วงนี้เป็นรูปกลมเรียกว่า **Nucleosome** ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 nm nucleosome เรียงกันเป็นเม็ดเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเหมือนสายลูกปัด bead-on-a-string ระหว่างเม็ด nucleosome เป็น linker DNA ความยาวตั้งแต่ 8 base pairs จนถึง 114 base pairs แล้วแต่ species โดยทั่วไปถ้าย่อย linker DNA แต่ละข้างจะได้ชิ้น (fragment) ของ DNA 200 base pairs Nucleosomes ลดความยาวของ DNA ลงได้ประมาณ 6 เท่า

2. **Solenoid model** โดย Aaron Klug, 1980

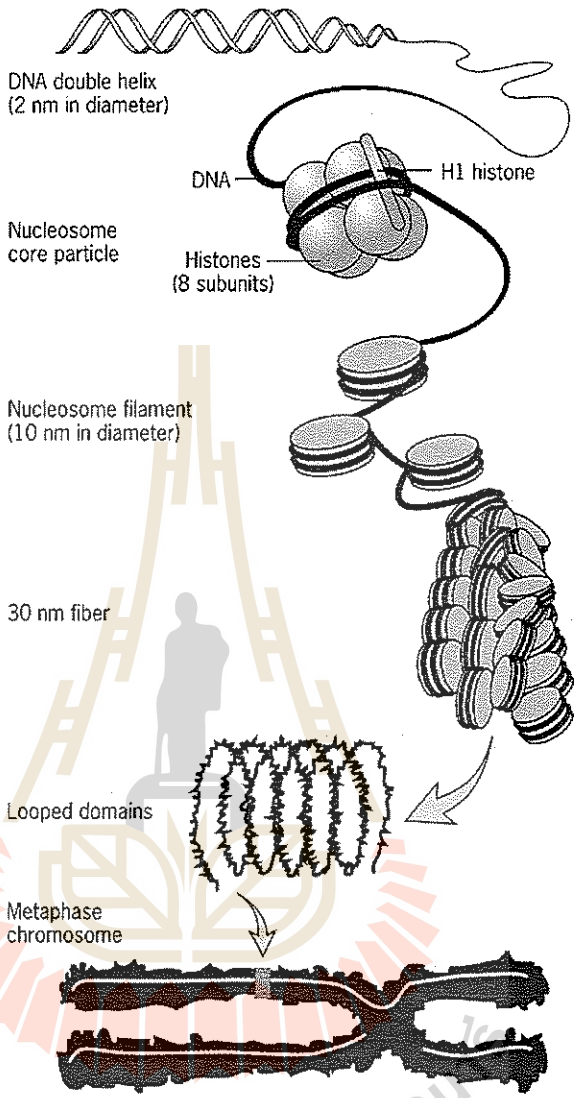
Nucleosome fiber ขนาด 10 nm พันกันให้ขดม้วนมากขึ้นได้โครงสร้างคล้าย **Solenoid** ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 nm Solenoid หรือ 30-nm chromatin fiber ลดความยาวของ beads-on-a-string ลงประมาณ 7 เท่า

3. **Metaphase chromosomes**

30-nm chromatin fiber จัดเรียงเป็น supereoiled loops (คล้าย bacterial nucleotide) เป็นรัศมีออกจากแกนกลางซึ่งเป็น nonhistone proteins ทำหน้าที่เป็นเหมือนร้านก่อสร้าง (scaffold) ยึด 30-nm chromatin fibers ให้ อัดแน่นเป็น **Metaphase chromosomes** ในแต่ละ supercoiled loop มี DNA 85 metaphase chromosome เป็นองค์กรระดับสูงสุด ขนาดกว้างประมาณ 0.5 - 0.75 um

แต่ละ chromosome มีเพียง DNA โมเลกุลเดียว โดยมีหลักฐานสนับสนุนจากการศึกษา Lampbrush chromosome ที่ปรากฏใน prophase I ใน Oogenesis ของ amphibians lampbrush chromosomes ขนาดยาว 800 um เป็นคู่ เพราะได้จาก duplication ของ homologous chromosome แต่ละ lampbrush chromosome มีบริเวณตอนกลาง และมี loop ด้านข้างแยกออกเป็นคู่จำนวนมาก เมื่อย่อยด้วย RNase และ protease ได้ filament ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 nm ใน loop ด้านข้างซึ่งใกล้เคียงกับเส้นผ่าศูนย์กลางของ DNA double helix ซึ่งเท่ากับ 1.9 nm แต่ถ้าย่อยด้วย DNAase แกนกลางและ loop ด้านข้างคงอยู่เป็นปกติ

นอกจากนี้ยังมีหลักฐานสนับสนุนจาก Polytene chromosome ซึ่งเป็น chromosome ขนาดใหญ่จากเซลล์ต่อมน้ำลายของแมลงหวี่

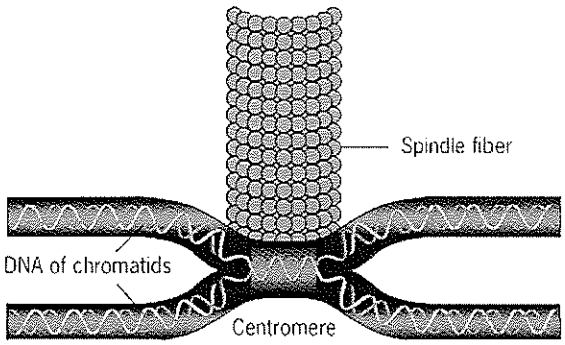


รูปที่ 11. Organization ของ Eukaryotic chromosome

Centromeres

Centromeres ของ metaphase chromosome คือ เป็นบริเวณคอดรัด (constricted region) ของ chromosome เป็นที่จับของ spindle fibers (รูปที่ 12) chromosome ที่ centromere ยังไม่ duplicate เป็น 2 ส่วน ของ chromatids การแบ่ง centromere ให้เป็น 2 functional centromeres เป็นขั้นตอนในการเปลี่ยนจาก metaphase ไป anaphase และ functional centromere ต้องมีใน daughter chromosome เพื่อไม่ให้เกิด Nondisjunction chromosome ที่ไม่มี centromere ปกติจะหายไปได้ระหว่างการแบ่งเซลล์ทั้งแบบ mitosis และ meiosis

รูปที่ 12. Centromere



Telomeres

Telomeres คือปลายของ eukaryotic chromosomes มีคุณสมบัติเฉพาะอย่างน้อย 3 อย่าง

1) ป้องไม่ให้ DNase ย่อยปลายของ linear DNA โมเลกุล
2) ป้องกันการเชื่อมกันของปลาย chromosome กับ DNA โมเลกุลอื่น
3) ช่วยในการ replication ปลายของ DNA โดยไม่ให้มีการสูญเสียส่วนของ DNA

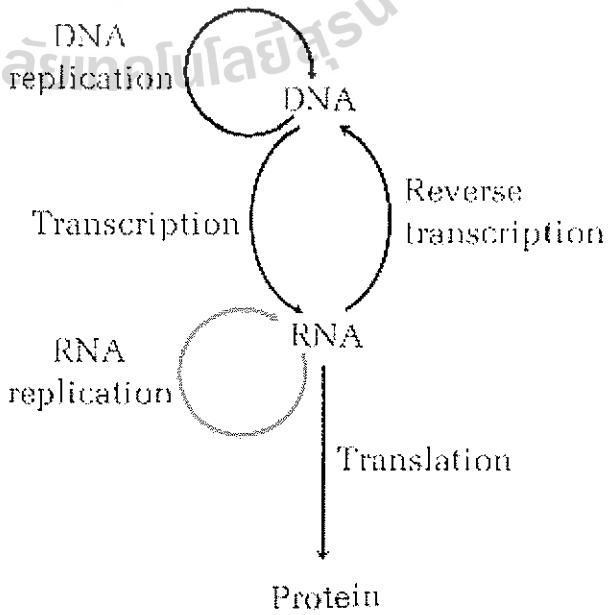
Telomere ที่ไม่สมบูรณ์เป็นปัจจัยหนึ่งของโรคทางพันธุกรรม

การทำงานของ สารพันธุกรรม หรือ

Central Dogma of Molecular Biology

การไหลของข้อมูลพันธุกรรม (genetic information flow) หรือ เป็นการทำงานของสารพันธุกรรม เรียกว่า **Central Dogma** (รูปที่ 13) ซึ่งประกอบด้วย

1) **DNA replication** การไหลจาก DNA ไป DNA ระหว่างการถ่ายทอดพันธุกรรมจากรุ่นหนึ่งไปอีกรุ่นหนึ่ง
2) **Gene expression** การไหลจาก DNA ไป Protein ระหว่างการแสดงออกของลักษณะ (phenotype)



รูปที่ 13. Central Dogma หรือ การไหลของข้อมูลพันธุกรรม (Genetic information)

ในสิ่งมีชีวิต การแสดงออกของข้อมูลพันธุกรรม (genetic expression) จาก DNA ถึง protein มี 2 ขั้นตอน

(i) **Transcription** การถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมจาก DNA ไป RNA และ

(ii) **Translation** การถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมจาก RNA ไป Protein

ในกรณีของ RNA genome ของ virus มีการถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมไหลจาก RNA ไป DNA เรียกว่า Reverse transcription ซึ่งการถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมจาก DNA ไปหา RNA บางครั้งจะกลับไปกลับมาได้ (reversible) แต่การถ่ายทอดข้อมูลพันธุกรรมจาก RNA ไปหา Protein กลับไปกลับมาไม่ได้ (irreversible)

DNA Replication หรือ DNA synthesis

มนุษย์กำเนิดจากเซลล์เดียว ขนาดเล็ก ๆ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1 mm จากเซลล์เดียวเพิ่มจำนวนให้ได้เป็นหลายร้อยพันล้าน (billion) เซลล์ระหว่างพัฒนาการของตัวอ่อน เมื่อโตเต็มวัยมนุษย์มี 65 ล้านล้าน (65 trillion) เซลล์ แต่ละเซลล์มี 30,000 – 50,000 genes (จาก Human Genome Project) ถ้า genes ทั้งหมดนี้ในทุกเซลล์เหมือนกันทุกประการ แสดงว่ากระบวนการจำลอง (duplication) genes จะต้องถูกต้องแม่นยำมาก นั่นคือ haploid genome ของมนุษย์ซึ่งมี DNA ประมาณ 3×10^9 bp จะต้องถูก duplicated ในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้ง และการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งต้องมีการสังเคราะห์ DNA (DNA Replication) เกิดขึ้น

1. Semi-conservative replication

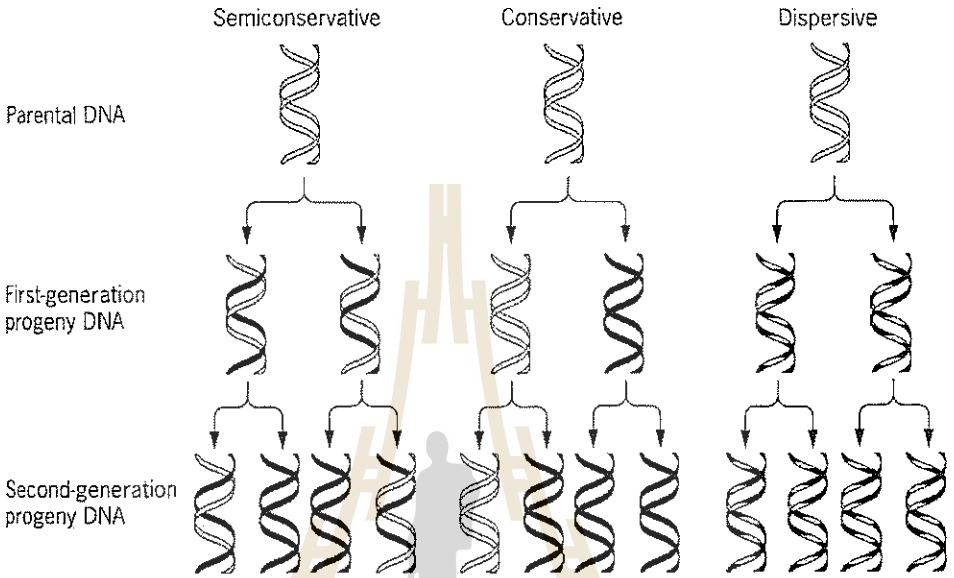
Watson–Click model ของ DNA แสดงว่า polynucleotides ทั้ง 2 สาย ของ DNA สามารถเป็นแม่แบบ (template) สำหรับสังเคราะห์ DNA ได้ แต่ในช่วงต้น 1950s นักพันธุศาสตร์โมเลกุลยังไม่สามารถบอกได้ว่า แบบของการสังเคราะห์ DNA จะเป็นอย่างไร แบบของการสังเคราะห์ที่น่าจะเป็นได้มีอยู่ 3 แบบ (รูปที่ 14) คือ

1) **Semi-conservative replication** คือ replication ที่ให้โมเลกุลของ daughter DNA มี polynucleotides สายหนึ่งได้จาก parent และอีกสายสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่

2) **Conservative replication** คือ replication ที่ให้โมเลกุลของ daughter DNA โมเลกุลหนึ่งได้จาก polynucleotides จาก parent ทั้ง 2 สาย และ daughter DNA อีกโมเลกุลเป็น polynucleotides ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ทั้ง 2 สาย

3) **Dispersion replication** คือ replication ที่แต่ละ daughter DNA ได้บางส่วนจาก polynucleotide ของ parent ปะปนบางส่วนกับ polynucleotide ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่

Semi–conservative replication เป็นแบบที่เป็นไปได้มากที่สุดและสอดคล้องกับแนวคิดของ Watson และ Click มีการทดลองที่ยืนยัน replication แบบนี้ในปี 1958 โดย Mathew Meselson และ Franklin Stahl เรียกว่า **Meselson–Stahl experiment**



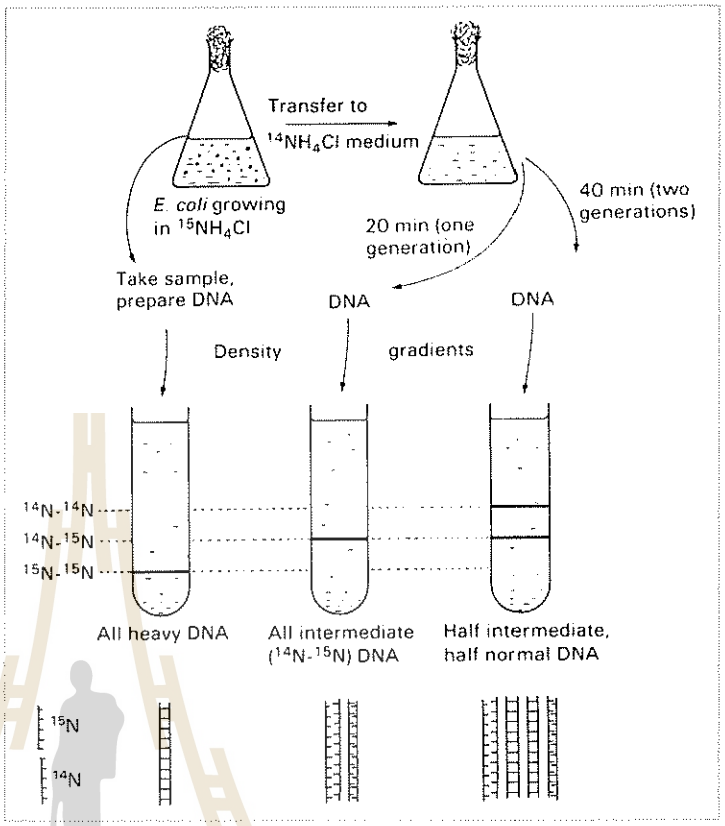
รูปที่ 14. Replication ของ DNA 3 แบบ

2. Meselson–Stahl experiment

Isotopes ของ nitrogen มีอยู่หลาย isotopes ^{14}N เป็น normal isotope มีทั่วไปในสิ่งแวดล้อมน้ำหนักอะตอม 14,008 ^{15}N เป็น isotope ที่เกิดขึ้นไม่มากน้ำหนักอะตอมมากกว่า จึงเป็น heavy nitrogen ทำให้แยก isotopes ทั้งสองออกจากกันได้ Meselson และ Stahl ได้พิสูจน์ semi-conservative replication (รูปที่ 15) โดย

1) เลี้ยง *E. coli* ในอาหารที่มี $^{15}NH_4Cl$
2) ปั่นเหวี่ยง culture ด้วยความเร็วต่ำ แยก bacteria ออกจากอาหารจะได้ *E. coli* ที่ DNA มี ^{15}N
3) นำ *E. coli* ไปเลี้ยงในอาหารที่มี $^{14}NH_4Cl$ ปล่อยให้เซลล์แบ่งตัว 1 รอบ ประมาณ 20 นาที
4) แยกเซลล์สกัด DNA และแยก DNA ให้บริสุทธิ์ด้วยการปั่นเหวี่ยง โดย density gradient centrifugation ซึ่งแยกสารออกตามความหนาแน่นหรือน้ำหนัก แยก ^{15}N-DNA และ ^{14}N-DNA ออกจากกันเพราะน้ำหนักโมเลกุลไม่เท่ากัน ผลการแบ่งเซลล์ของ *E. coli* 1 รอบ พบว่าปริมาณของ ^{15}N-DNA เท่ากับปริมาณของ ^{14}N-DNA การ replication ของ DNA นี้อาจเป็นแบบ Semi – conservative หรือ Dispersive เพราะ DNA รุ่นลูกเป็น hybrid ระหว่าง ^{15}N และ ^{14}N-polynucleotides เ
5) ลี้ยงให้ *E. coli* แบ่งเซลล์รอบที่ 2 แล้ววิเคราะห์แยก DNA อีกครั้งได้ DNA รุ่นหลานที่มีเฉพาะ

^{14}N-polynueleotides ที่เบากว่าเกิดขึ้น ผลการทดลองทั้งหมดพบว่า สอดคล้องกับ Serni-conservative replication อย่างเดียว



รูปที่ 15. Meselson – Stahl Experiment พิสูจน์ว่า DNA replication เป็นแบบ Semi-conservative

3. Mechanism of DNA replication

3.1 Origin of Replication

Replication ของ DNA เริ่มที่ base pair ตำแหน่งเฉพาะที่เรียกว่า Replication origin เมื่อ base pair แยกออกจากกัน polynucleotide สายใหม่เริ่มสังเคราะห์บริเวณที่ เรียกว่า **Replication fork** การสังเคราะห์ดำเนินต่อไปตามสาย DNA แม่แบบ ถ้าดำเนินไปทางเดียวเรียกว่า **Unidirectional replication** หรือ ถ้าดำเนินไป 2 ทางเรียกว่า **Bidirectional replication** ใน bacterial และ viral chromosomes มี origin เดียว ส่วน eukaryotic chromosomes มีหลาย origin แต่ละ origin ควบคุม replication เป็นช่วง ๆ หรือหน่วย เรียกว่า **Replicon** ดังนั้น prokaryotic chromosomes มี replicon เดียว แต่ eukaryotic chromosomes มีหลาย replicons

3.1.1 Enzynes และ Proteins ใน DNA replication

การสังเคราะห์ DNA มีกลไกซับซ้อนหลายขั้นตอน มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องหลายเอนไซม์

1) **DNA polymerase**

เอนไซม์ที่สามารถสังเคราะห์ **DNA polynucleotides** ใหม่ คือ DNA polymerase แต่เอนไซม์นี้ไม่สามารถเริ่มการสังเคราะห์ได้ DNA โดยลำพัง แม่แบบ (template) ต้องมี **Primer ซึ่งเป็น RNA** เตรียมไว้ให้ก่อน DNA polymerase จึงใส่ nucleotide ต่อเข้าไป ลำดับของ polynucleotides ใหม่ขึ้นกับลำดับของ

DNA template การต่อ nucleotides หรือ **DNA polymerization** ของเอนไซม์เกิดในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ เสนอ DNA polymerase ทำงานได้หลายอย่าง

(i) polymerase activity ต่อ nucleotides บน DNA template

(ii) exonuclease ย่อยแยก nucleotides ที่ปลายของ polynucleotide

(iii) endomuclease ย่อยแยก nucleotides ภายใน polynucleotide

DNA polymerases ใน *E. coli* มี 3 ชนิด คือ DNA polymerase I, II และ III

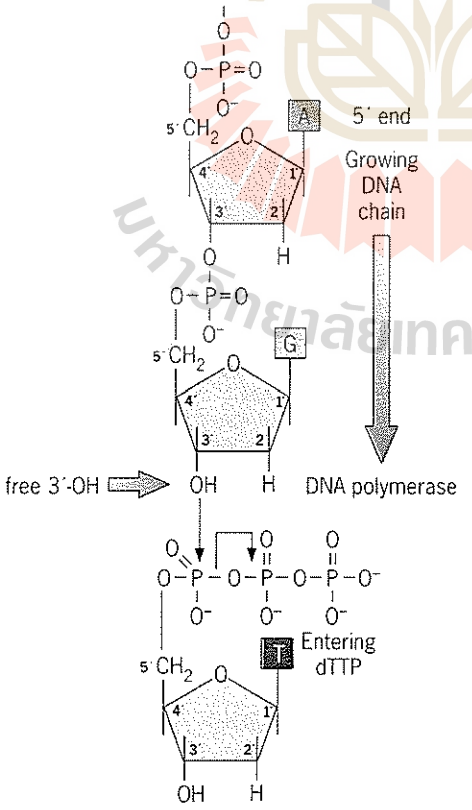
DNA polymerase I มี 3 activities คือ (1) $5' \rightarrow 3'$ polymerase activity, (2) $5' \rightarrow 3'$ exonuclease activity และ (3) $3' \rightarrow 5$ exonuclease activity

DNA polymerase II เป็น DNA repair enzyme มี (1) $5' \rightarrow 3'$ polymerase activity (2) $3' \rightarrow 5$ exonuclease activity

DNA polymerase III มี activity เหมือน DNA polymerase II

DNA polymerase ใน eukaryotes ซับซ้อนมากกว่า ปัจจุบันจำแนกได้แล้ว 5 ชนิด คือ DNA polymerase I: β, γ, δ; III และ ε(II) บางชนิดไม่มี $3' \rightarrow 5$ exonuclease activity

DNA polymerase α และ δ สำหรับ replication ของ nuclear DNA DNA polymerase γ สำหรับ replication ของ mitochondria DNA ส่วน DNA polymerase β และ ε เป็น repair enzymes สำหรับ nuclear DNA



รูปที่ 16. ปฏิกิริยาของ DNA polymerase I ต่อ nucleotide เข้า primerที่ 3'-OH ทำให้ การ replication เดินหน้าแบบ 5' →

DNA polymerases ทั้งหมดมีปฏิกิริยาพื้นฐานเหมือนกันคือ จับที่ปลายอิสระ (free) $3'-OH$ ของ primer และเอา $5'$ nucleoside triphosphate precursor ต่อเข้า (รูปที่ 16) จึงเหลือปลาย $3'-OH$ ว่างไว้เสมอ ทำให้สาย DNA ยาวออกทาง $5' \rightarrow 3'$ direction

2) **Primase**

DNA polymerase ต้องการ free $3'-OH$ บน nucleotide ที่มีอยู่แล้วหรือของ Primer บน DNA template จึงเริ่ม replication ได้ จึงต้องมีเอนไซม์สังเคราะห์ Primer ซึ่งเป็น RNA ช่วง สั้น ๆ ขึ้นมาก่อนบน DNA template ณ origin of replication เอนไซม์นี้เรียกว่า **DNA Primase** ซึ่งเป็น **RNA polymerase** สังเคราะห์ RNA primer ขึ้นมาทำ hydrogen bond กับแม่แบบเป็น RNA-DNA hybrid ให้เริ่ม replication

3) **DNA Ligase**

บนแม่แบบ DNA สาย lagging strand $5' \rightarrow 3'$ การสังเคราะห์เป็นแบบไม่ต่อเนื่องได้ช่วงหรือ fragment สั้น ๆ ที่เรียกว่า **Okazaki fragments** ซึ่งจะต้องถูกต่อให้เป็นสายที่สมบูรณ์ด้วย DNA ligase นอกจากมีบทบาทใน replication แล้ว DNA ligase ยังทำหน้าที่ในการซ่อมแซม (DNA repair) และใน DNA recombination ด้วย

4) **DNA helicase**

ทำหน้าที่คลายเกลียว (unwinding process) DNA double helix ก่อนที่ทั้ง 2 สายจะแยกออกกันเป็นแม่แบบ

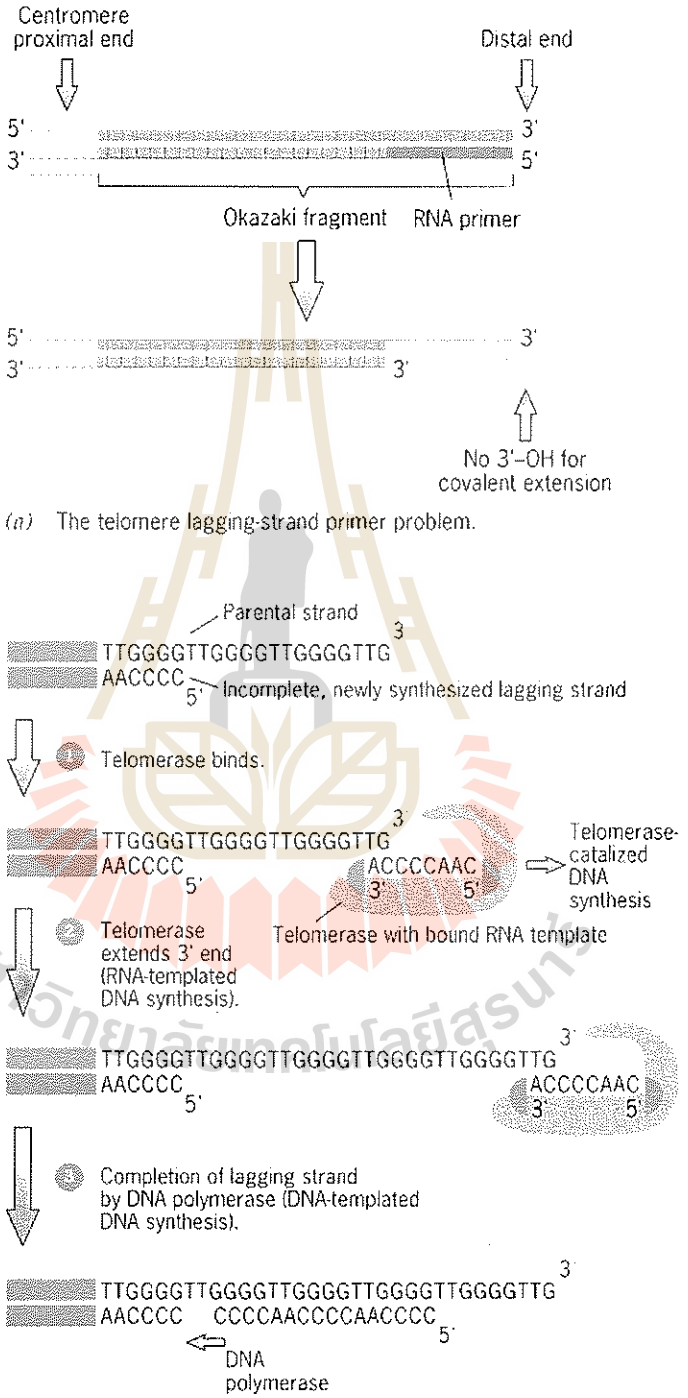
5) **DNA topoisomerase**

ทำหน้าที่คลายเกลียวที่มากเกินไป Supercoiling ที่เกิดขึ้นจากการคลายเกลียว (unwinding) ของ DNA แม่แบบsupercoiling จะทำให้ double helix พันกันยุ่งโดยรูดไปข้างหน้าของ unwinding DNA topoisomerase ใน bacteria มี 2 ชนิด (i) DNA topoisomerase I ตัด (nick) DNA สายเดียว (ii) DNA topoisomerase II หรือ DNA gyrase ตัด DNA 2 สาย

6) **Telomerase**

ที่ปลายของ linear chromosome หรือ **Telomere** ถูกใช้เป็นที่สร้าง RNA primers เมื่อการสังเคราะห์ DNA เสร็จแล้ว RNA primer ถูกตัดออกทำให้ DNA polynucleotide สายใหม่สั้นกว่าสายแม่แบบ และปลายเป็น $5'$ ปลายของสายแม่แบบหรือ telomere ยาวกว่าเป็นปลาย $3'$ telomere มี sequence **GGGTTG** ซ้ำ ๆ (repeat) (รูปที่ 17) กันหลายครั้งเรียกว่า **Tandem** **Telomerase** จำ G-rich sequence ของ telemere ได้ และ telomerase มีสาย RNA แม่แบบในตัว (built-in) telomerase จะต่อ repeat sequence เข้าที่ telemere บนสายแม่แบบหลายครั้งเพื่อเป็น template (ที่เพิ่มขึ้นมาอีก) ให้ DNA polymerase ใส่

deoxynucleotides ต่อเข้าสายลูก โดยใช้ปลาย free-3′ RNA ของ telomerase ทำให้ได้ polynucleotides ที่สมบูรณ์ทั้ง 2 สาย ถ้า telomere ของ DNA หรือ chromosomes สั้นกว่าปกติ จะมีผลกระทบร้ายแรงเข้าไปใน genes ภายใน chromosomes ทำให้เป็นโรคทางพันธุกรรม หรือตายได้ หรือเกิดแก่ก่อนวัย (premature aging) เรียกว่า **Progerias**



รูปที่ 17. Telomerase แก้ปัญหาที่ terminal primer

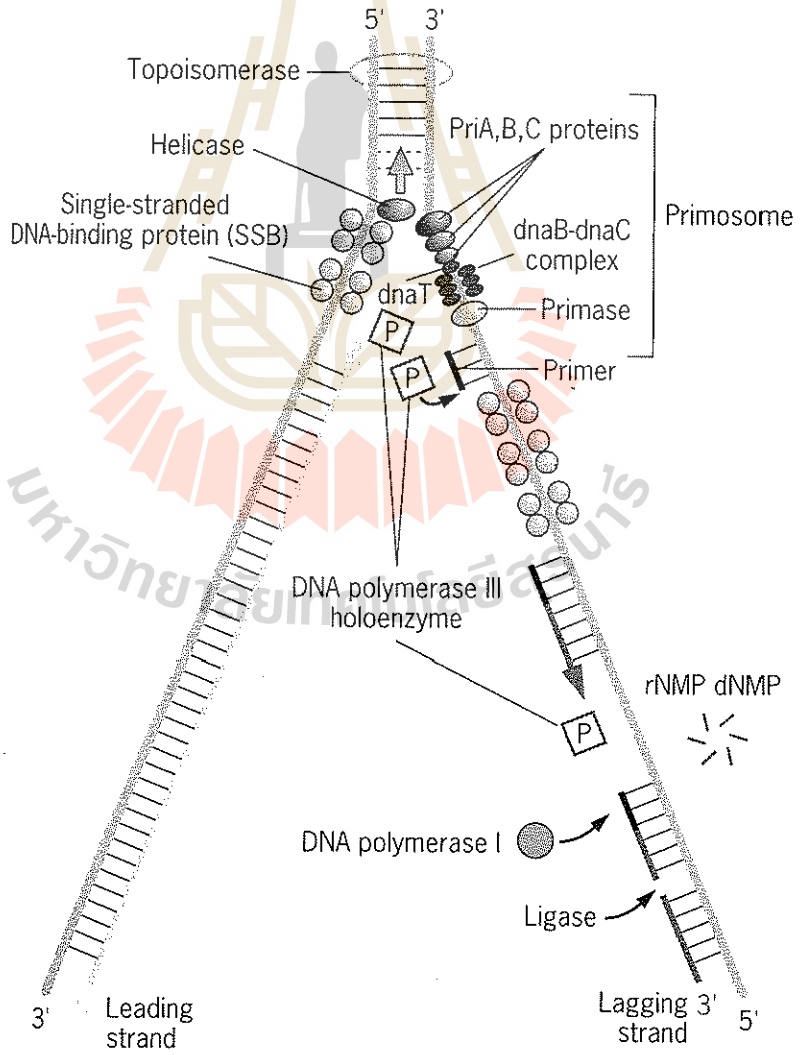
7) **DNA-Binding proteins**

ทันทีที่ Helicase แยก base pairing ระหว่าง polynucleotides 2 สายออกจากกันเป็นสายเดี่ยวก็มีโปรตีน Single-strand binding proteins (SSB proteins) มาเคลือบครั้งละ monomer ตามหลัง helicase เพื่อป้องกันไม่ให้ DNA 2 สายจับและพันกันคืนหรือป้องกัน nucleotides ภายในสายเดียวกัน จับกันเองเป็น intrastrand hairpin ซึ่งมีผลทำให้ DNA polymerize เข้าทำงานที่ template ไม่ได้

3.1.2 เหตุการณ์ที่ Replication Fork และ Replication

กระบวนการ replication ซับซ้อนและ replication มีลำดับการประสานงานกันที่สูงมาก การศึกษากลไกได้จากการวิจัยของ molecular biologist จำนวนมากในห้องปฏิบัติการทั่วโลกและใช้เวลาหลายปี กระบวนการมีดังนี้

1) แยก parent double helix ที่ Origin of replication โดยเอนไซม์ helices แยก base pairing ของ parent double helix ออกจากกันพร้อมกับ SSB proteins เข้ามาจับ single stranded DNA บริเวณที่กลายเป็น Replication fork (รูปที่ 18)



รูปที่ 18. เหตุการณ์ที่ Replication fork ใน *E.coli*

2) Single stranded DNA ทั้ง 2 สาย ทำหน้าที่เป็นแม่แบบให้ DNA polymerase III สังเคราะห์ DNA สายใหม่บนแม่แบบทั้ง 2 สาย คือ

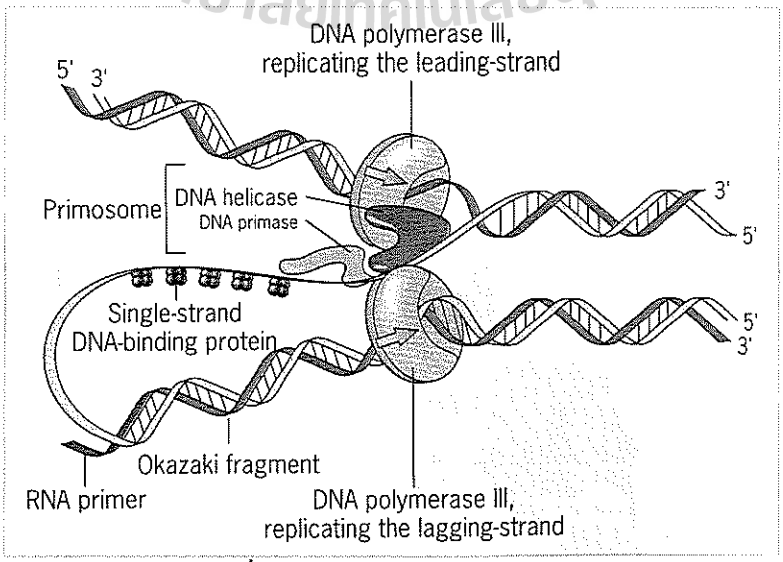
(i) แม่แบบสาย $3'-5'$ เรียกว่า **Leading–strand template** เพราะ replication ได้อย่างต่อเนื่อง เป็น **Continuous replication**

(ii) แม่แบบสาย $5'-3'$ เรียกว่า **Lagging–strand template** เพราะ replication ได้ไม่ต่อเนื่องจาก เป็น **Discontinuous replication**

3) Priming เนื่องจาก DNA polymerase สังเคราะห์ DNA ในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ เท่านั้น และเริ่มสังเคราะห์เองไม่ได้ แต่ต้องการปลายอิสระของ 3' – OH ของ nucleotide ที่มีอยู่ก่อนแล้วเพื่อนำ $5'-P$ ของ nucleotide ใหม่เข้ามาต่อ จึงต้องมี priming ก่อนโดย **DNA primase สร้าง RNA primer** ขึ้นมาก่อนเพื่อได้ free $3'-OH$ ของ RNA primer แล้ว DNA polymerase จึงใช้ free $3'-OH$ นี้สังเคราะห์ DNA ต่อไป DNA primase รวมกับ helicase เรียกว่า **Primosome**

4) DNA polymerization เมื่อได้ RNA primer (6 – 30 nucleotides) DNA polymerase III สังเคราะห์ DNA อย่างต่อเนื่องบน Leading strand แต่บนสาย Lagging strand มีการสังเคราะห์ polynucleotide $5' \rightarrow 3'$ ช่วงสั้นเรียกว่า **Okazaki fragments** ประมาณ 100-1000 nucleotides ขึ้นมาก่อน RNA primers สลายออกภายหลังเหลือเป็นช่องว่างบนแม่แบบ จากนั้น DNA polymerase I จะนำ deoxyribonucleotides ใส่เข้าไปแทนที่ RNA primers และช่องว่างที่เหลือจะถูกปิดด้วย DNA ligase (รูปที่ 18) ซึ่งต่อระหว่าง Okazaki fragments สุดท้ายได้สาย polynucleotide ใหม่อย่างต่อเนื่องสมบูรณ์

Replication fork เคลื่อนที่ไปตาม double helix สายแม่แบบทั้ง 2 สาย อุปกรณ์ที่ครบสมบูรณ์ในการ replication เคลื่อนที่ไปพร้อมกับ replication fork ทั้งหมดเรียกว่า **Replisome** (รูปที่ 19) ดังนั้น Replisome จึงประกอบด้วย DNA polymerase III holoenzyme, leading strand, lagging strand และ Primosome DNA polymerase III holoenzyme หมายถึง เอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์อยู่บนทั้งสาย leading strand และ lagging strand บนสาย lagging strand เข้าใจว่า DNA polymerase III วงกลับมาทำวงกับ primosome



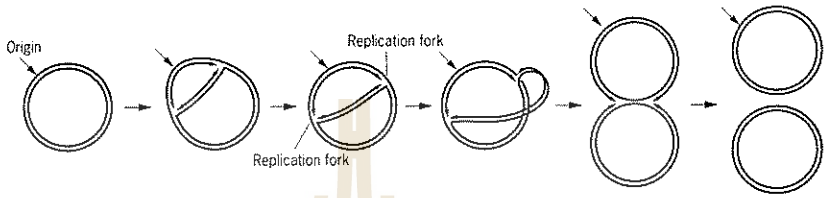
รูปที่ 19. Replisome ของ *E.coli*

4. Replication ของ Circular DNA (Prokaryotes & Mitochondria)

Circular DNA ใน prokaryote มีเพียง 1 origin of replication การสังเคราะห์อาจเกิดได้ 2 แบบ

4.1 Theta – form (θ – form)

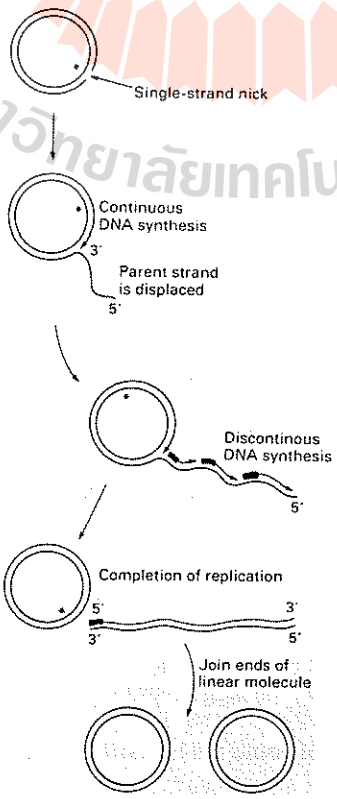
จาก Origin of replication ได้เป็น 2 replication forks การสังเคราะห์ดำเนินการออกทั้ง 2 ข้างของ forks หรือเป็น bi-directional replication ระหว่างการสังเคราะห์ได้ช่วงหนึ่งของเหตุการณ์เป็นรูป θ-form (รูปที่ 20) ซึ่งสังเกตได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM การสังเคราะห์ DNA แบบนี้พบใน bacteria ส่วนมากและ ใน DNA viruses



รูปที่ 20. Theta form of replication ใน prokaryote

4.2 Rolling Circle Replication

เริ่มด้วยการตัด (nick) ที่ strand หนึ่งของ parent DNA ที่ปลาย 3'- OH ซึ่งเป็นอิสระอยู่ DNA polymerase จะต่อ deoxynucleotides เข้าไปกับแม่แบบอีกสายตรงข้ามที่ไม่ถูก nick และคงเป็น circular replication ของสายนี้เป็นแบบ continuous ส่วนสาย 5′ end ที่ถูกแทนที่จะกลิ้งออกมา (rolled off) และเป็นแม่แบบอีกสายให้สังเคราะห์แบบ discontinuous (รูปที่ 21) replication หยุดเมื่อครบรอบ duplex จากนั้นสาย lagging strand ถูกตัดออก แล้วต่อกัน (ligation) เป็น circular molecule หรือ replication ดำเนินต่อไปอีก



รูปที่ 21. Rolling circle mechanism ของ replication ใน bacteriophage

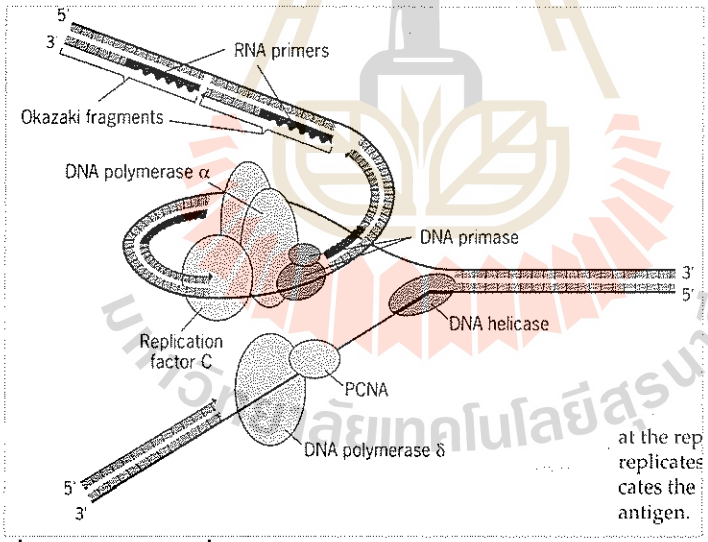
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หลาย ๆ รอบก็ได้ และถ้าเกิดอย่างเร็วมากทำให้ได้อนุกรมของ genome หลาย copy ต่อๆ กัน แต่ละ copy ของ genome จะถูกตัดและเชื่อมต่อเป็น circular molecules ใหม่ภายหลัง replication แบบนี้พบใน phage หลายชนิด Rolling circle mechanism of replication

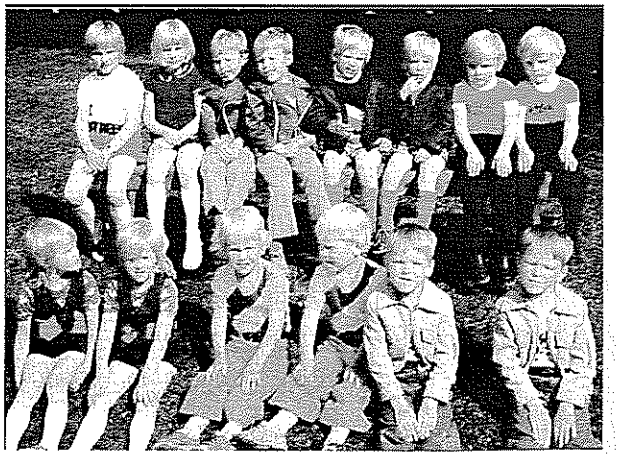
Prepriming replication ใน *E. coli* ริ่มต้นที่ Origin of replication ซึ่งมี sequence เฉพาะที่ยอมให้ strands แยกกัน Prepriming proteins หลายชนิดมี DnaA, DnaB (DNA helicase), DnaC, DnaT, DnaJ, DnaK, PriA. PriB, PriC, HU, DNA gyrase และ SSB prepriming proteins โดยเฉพาะอย่างยิ่ง DnaA แยก strands ออกเป็น Replication bubble

4.3 Replication ใน Eukaryotes

Replication ของ eukaryotes มีกลไกพื้นฐานเหมือน prokaryotes แต่มีความแตกต่างหลายประการ คือ Okazaki fragment สั้นกว่า, มี multiple origins of replication เกิด replication พร้อมกันได้หลายจุด เพราะ DNA โมเลกุลใหญ่กว่าของ prokaryotes มากหรือมี **multiple replicons** ใน 1 chromosome, **template 2 สายใช้ DNA polymerase แยกกัน คือ leading strarid ใช้ DNA polymerase δ ส่วน lagging strand ใช้ DNA polymerase α** (คล้าย DNA polymerase III) (รูปที่ 22) และ nucleosome duplication โดยมีส่วนเก่าครึ่งหนึ่งและส่วนใหม่ครึ่งหนึ่



รูปที่ 22. เหตุการณ์ที่ Replication fork ใน replication ของ eukaryote



Transcription การถอดรหัส DNA

กระบวนการสังเคราะห์ RNA เรียกว่า **Transcription** เป็นขั้นตอนแรกของการแสดงออกของ Gene (Gene Expression) คือสายแม่แบบ DNA ของ geneนั้น ถูกถอดรหัส หรือ การสังเคราะห์ RNA ซึ่งเป็น complementary strand ของ gene และ RNA ที่สังเคราะห์ได้เรียกว่า **Transcript** หรือ **การสังเคราะห์** RNA **เป็นกระบวนการสร้าง** polymer (polymerization) **ของ** Ribonucleotide subunits **โดยเอนไซม์** RNA polymerase **และมีแม่แบบคือ** DNA **ของ** genes ดังปฏิกิริยา

$$n(RTP) \xrightarrow[\text{RNA polymerase}]{\text{DNA template}} (RMP)_n + n(PP)$$

เมื่อ n = จำนวน mole ของ ribonucleotide triphosphate (RTP)

RMP = ribonucleotide monophosphate

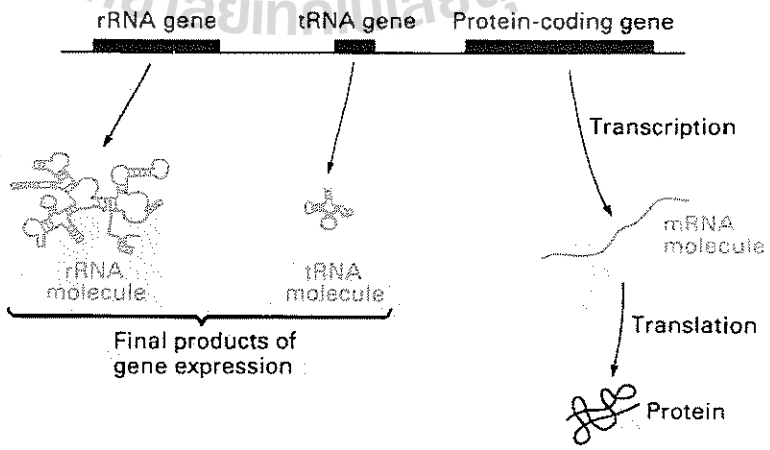
PP = pyrophosphate

RNA ทั้งหมดเป็น polynucleotide สายเดี่ยว มี 4 ชนิดคือ

(1) Messenger RNA (mRNA) เป็นตัวกลาง (intermediary) นำข้อมูลพันธุกรรมจาก DNA ในรูปของรหัส Codons ซึ่งจะแปลในการสังเคราะห์โปรตีนต่อไปใน translation (รูปที่ 23)

(2) Transfer RNA (tRNA) เป็นตัวต่อ (adaptor) ระหว่าง amino acids กับ codons ใน mRNA

(3) Ribosomal RNA (rRNA) เป็นส่วนประกอบของ Ribosome ซึ่งเป็นโรงงานสังเคราะห์โปรตีนหรือแปลรหัสของ nucleotides ที่อยู่บน mRNA ให้เป็นลำดับของ amino acids ของ polypeptides หรือ proteins



รูปที่ 23. RNA 3 ชนิดหลักที่เป็นผลผลิตของ Transcription

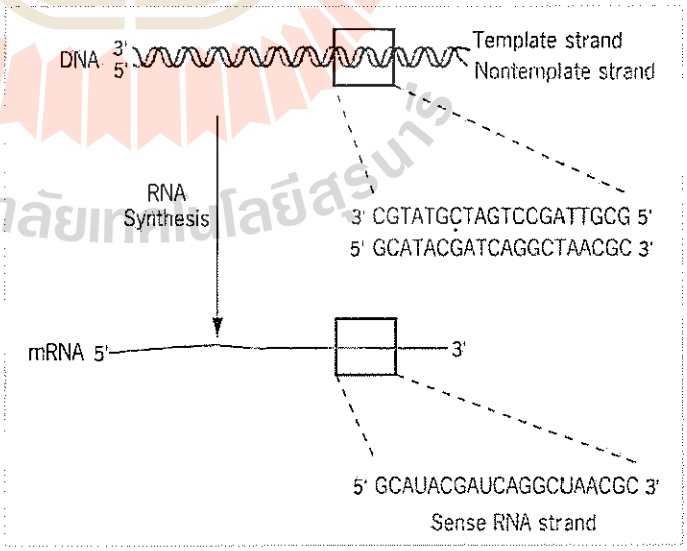
(1) Small Nuclear RNA (snPNA) เป็นส่วนประกอบของ Spliceosome ซึ่งเป็นอุปกรณ์ หรือเอนไซม์ตัด Introns ซึ่งเป็น nucleotides ของ genes (ขณะเป็น premature mRNA ที่สังเคราะห์ได้ใหม่) ส่วนที่ไม่มีความหมายเป็นรหัส codon ออก และ ต่อชิ้นส่วนที่เป็นรหัส หรือ Exon เข้าด้วยกันให้ได้เป็นสาย mature mRNA ที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์โปรตีน (translation) snRNA จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Ribozyme เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์

1. ลักษณะทั่วไปของ RNA synthesis

กลไกการสังเคราะห์ RNA คล้ายกับการสังเคราะห์ DNA มาก ยกเว้น (1) สารตั้งต้น (precursor) เป็น ribonucleotide triphosphates 4 ชนิด คือ ATP, GTP, CTP และ UTP (2) DNA template สายเดียวในช่วงที่กำหนดให้เท่านั้นเป็นแม่แบบ และ (3) สาย RNA polynucleotide เริ่มได้โดยไม่ต้องการ primer

การสังเคราะห์ RNA เกิดในช่วงของ DNA ที่คลายเกลียวแล้ว ซึ่งมีลักษณะโป่งพอง บางครั้งเรียกว่า Transcription bubble RNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นคู่สม (complementary) กับ DNA template ดังนั้นสาย RNA จึงเหมือนสาย DNA nontemplate strand ทุกประการ ยกเว้น Uridine แทน Thymidines (รูปที่ 24) ถ้า RNA เป็น mRNA ก็จะบอกให้รู้ถึง amino acids ใน protein ที่เป็นผลผลิตของ gene นั้น ๆ รายละเอียดเฉพาะ (specification) ของ amino acids ในรูปแบบของ nucleotide 3 ตัว เรียกว่า Codon mRNA จึงถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Sense RNA เพราะลำดับ nucleotide ของ mRNA มีความหมาย (make sense) และถ้ามี RNA ใด ๆ ที่เป็น complementary กับ mRNA ได้ RNA สายนั้นถูกเรียกว่า Antisense

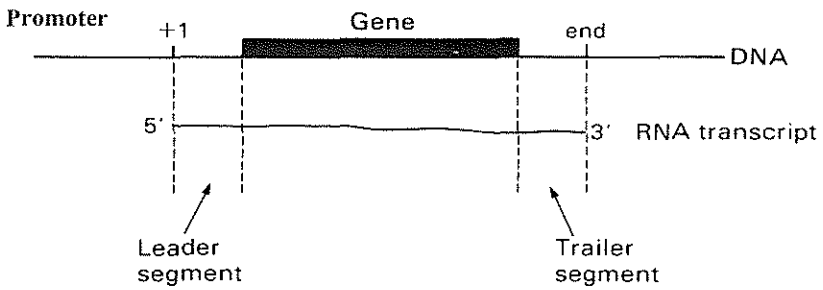
RNA Transcription ดำเนินในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ เช่นเดียวกับ replication ปฏิกิริยา transcription



รูปที่ 24. RNA synthesis ใช้ DNA สายเดียวเป็น template

เกิดโดยเอนไซม์ RNA polymerases นั้น ในการเริ่มต้น transcription gene (บน DNA) ต้องเตรียม nucleotides ไว้ช่วงหนึ่งเป็นลำดับเฉพาะ ไว้ให้ RNA polymerase จับก่อน เพื่อให้เอนไซม์นี้ตรวจหาตำแหน่งที่จะใส่ nucleotide ตัวแรก ของ RNA ที่ต้องการสังเคราะห์ ลำดับ nucleotides เหล่านี้ เรียกว่า

romoters (รูปที่ 25) ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกของ gene (Gene expression) ส่วนหนึ่งจึงอยู่ที่ promoter นี้



รูปที่ 25. ไดอะแกรม ของ gene และ promoter

Prokaryote มี RNA polymerase เพียงชนิดเดียว แต่ eukaryote มี RNA polymerase 3 ชนิด สำหรับสังเคราะห์ RNA เฉพาะอย่าง

2. กระบวนการ RNA synthesis

ช่วงของ DNA ที่ถูกถอดรหัส (transcripted) ให้ RNA เรียกว่า Transcription unit แต่ละ unit ความยาวอาจเท่ากับ gene เดียว หรืออาจเท่ากับหลาย ๆ genes ต่อเนื่องกัน transcript ขนาดใหญ่มีหลาย coding sequences ของหลาย ๆ genes พบได้ทั่วไปใน bacteria

กระบวนการของ transcription แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ

(1) Initiation การเริ่มต้นของสาย RNA ใหม่

(2) Elongation การเจริญยาวออกของสาย RNA และ

(3) Termination การหยุดหรือจบการสังเคราะห์และปล่อย RNA ที่สังเคราะห์ได้ใหม่ออกจากแม่แบบ

ในการอธิบาย transcription ปกติใช้ศัพท์ เพื่อบอกตำแหน่งและทิศทางบนสายแม่แบบการทำงานของเอนไซม์ โดยเทียบเอาจุดเริ่มต้นของ nucleotide ตัวแรก (start point) เป็นหลักจึงใช้ศัพท์กำหนดทิศทางดังนี้คำว่า upstream บอกตำแหน่งของ nucleotides จาก start point ไปทางปลาย 5′ และ คำว่า downstream บอกตำแหน่งของ nucleotides ไปทางปลาย 3′ จาก start point และยังบอกทิศทางของ genes บน DNA ซึ่งสัมพันธ์กับ transcript ด้วย

2.1 Transcription ใน prokaryotes

RNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีหลายหน่วย ทั้งโมเลกุลของ RNA polymerase เรียกว่า Holoenzyme ซึ่งมี 2 ส่วนคือ Core enzyme และ Sigma factor 1) Core enzyme ประกอบด้วย 4

หน่วยย่อย $\alpha_2\beta\beta'$ β มีตำแหน่งให้ ribonucleotide triphosphate จับ β′ มีตำแหน่งจับกับ DNA template ส่วน α ทำหน้าที่รวมหน่วยย่อยทั้งหมดเข้าด้วยกัน 2) σ sigma factor มีหน้าที่เฉพาะ initiation เท่านั้น sigma factor จึงทำหน้าที่จำและจับ transcription initiation หรือ Promoter ถ้าปราศจาก sigma factor holoenzyme จะเริ่มต้น transcription ได้ แต่ตำแหน่งไม่ถูกต้อง

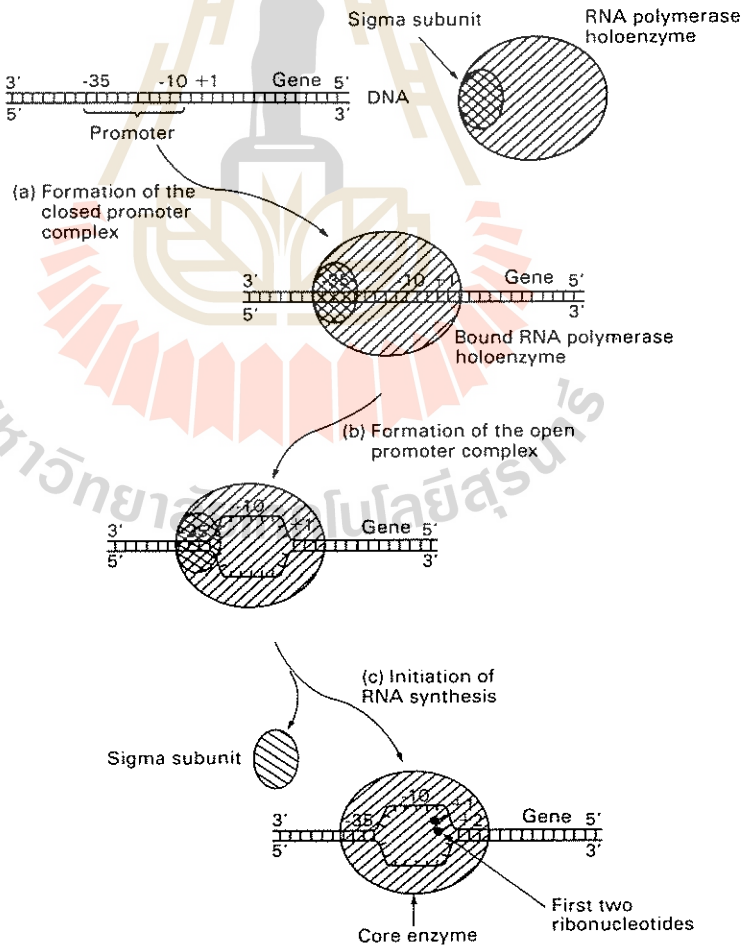
2.1.1 Initiation **ของสาย** RNA

การเริ่มต้นสังเคราะห์สาย RNA มี 3 ขั้นตอนคือ

(1) RNA polymerase holoenzyme จับ Promoter บน DNA Promoter ซึ่งเป็นบริเวณควบคุมการเริ่มต้นของ transcription

(2) RNA polymerase คลายเกลียว DNA ใช้สายหนึ่งของ DNA เป็น template และ RNA polymerase หาตำแหน่งที่ถูกต้องสำหรับใส่ ribonucleotides 2-3 residues แรก

(4) สร้าง Phosphodiester bonds ระหว่าง 2-3 ribonncleotides ชุดแรกเริ่มสาย RNA เมื่อเริ่มได้แล้ว sigma factor หลุดออก คงเหลือแต่ core enzyme ทำหน้าที่ต่อไป



รูปที่ 26. การเริ่ม RNA transciption ใน prokaryote

Sigma factor เป็นตัวจัดให้ RNA polymerase จับกับ promoter ใน 2 บริเวณคือที่ -10 sequence และ -35 sequence (รูปที่ 26) ซึ่งส่วนมาก sequence ทั้ง 2 นี้พบเหมือนกันหรือต่างกันเพียงเล็กน้อย ใน prokaryote ทุกชนิด nucleotide sequence ที่พบอนุรักษ์ไว้เช่นนี้ เรียกว่า Consensus sequence หรือ **ลำดับประชามติ** เช่น

-10 sequence **บนสาย** non-template **มี** consensus **คือ** TATAAT ช่วยในการหา unwinding DNA จำเป็นในการเริ่มสาย RNA และ

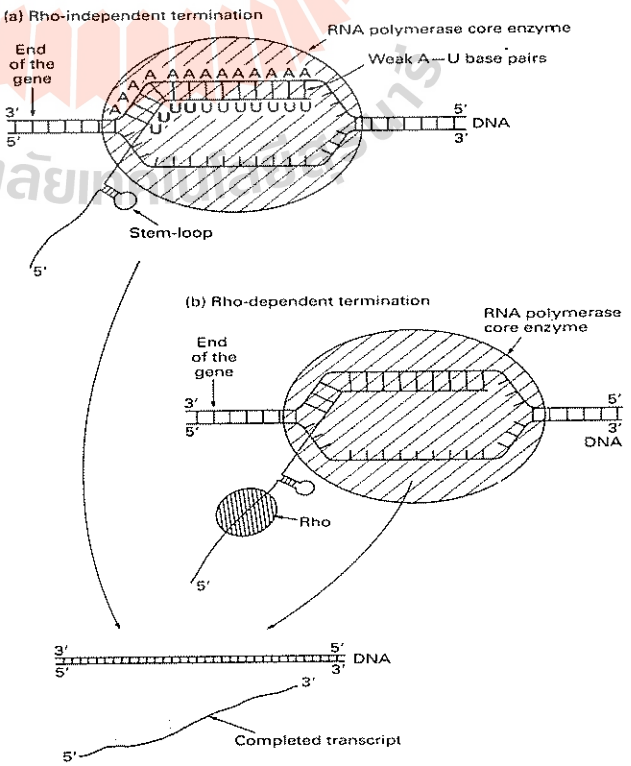
-35 sequence **ที่** sigma **จำได้และจับก่อนจึงเรียกว่า** Recognition sequence **มี** consensus **คือ** TTGACA

2.1.2 Elongation ของสาย RNA

RNA polymerase core enzyme ภายหลังที่ sigma factor หลุดออกแล้วทำหน้าที่ต่อ ribenucleotides ให้กับสาย RNA ที่เริ่มไว้แล้ว RNA polymerase ทำหน้าที่คลายเกลียวแยก DNA และรวมทำเกลียวคืน การคลายเกลียวทำไปล่วงหน้าของ polymerization site สาย RNA ที่สังเคราะห์ได้คงทำ complement จับกับ DNA template ชั่วคราวประมาณ 3 base pairs เมื่อสาย RNA ยาวออกไปด้านหน้าของการสังเคราะห์ คงยังจับกับ DNA ส่วนทางด้านหลัง RNA หลุดออกจาก DNA และ DNA คืนเกลียวกลับเป็น duplex ตามไปเรื่อย ๆ

2.1.3 Termination ของสาย RNA

การหยุดสร้าง RNA เกิดเมื่อ RNA polymerase เคลื่อนที่ไปถึง Termination signal หรือ

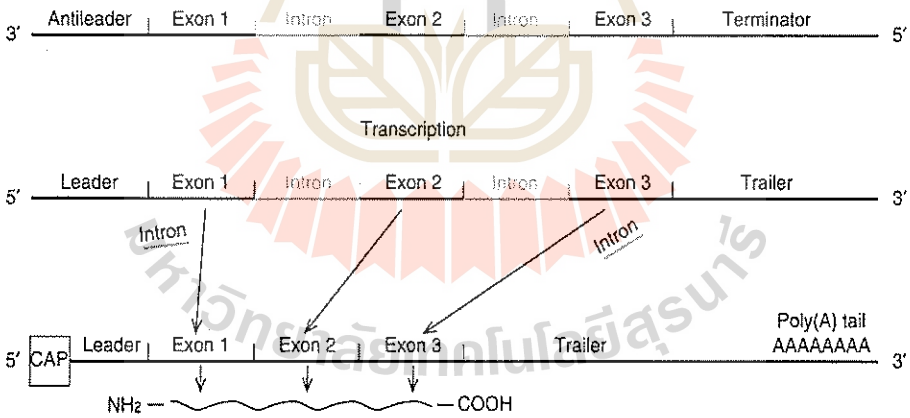


รูปที่ 27. Termination ของ RNA transcription ใน prokaryote

Transcription terminator ซึ่งก็คือ sequence บน DNA นั่นเอง สารอุปกรณ์การสังเคราะห์ทั้งหมดแยกออกจากกัน Terminator มี 2 แบบ (รูปที่ 27) คือ 1) Rho – dependent terminator ต้องการโปรตีน ชื่อ Rho (ρ) ยับยั้งการทำงานของ RNA polymerase ที่ terminator 2) Rho – independent terminator ไม่ต้องการโปรตีน แต่ที่ terminator มี G : C มาก ตามด้วย A : T อีกประมาณ 6 หรือมากกว่า 6 คู่ G : C sequence ซึ่งขณะเกิด transcription เป็น single stranded DNA จะวกกลับทำ complement กับตัวเองได้เป็นรูปกิ๊ฟหนีบผม (hairpin) ไปขัดขวางการทำงานของ RNA polymerase ทำให้ transcription หยุด RNA transcript และ ปัจจัยทั้งหมดแยกออกจาก DNA และ แยกออกจากกัน

3. Transcription ใน Eukaryotes

กระบวนการโดยทั่วไปคล้ายกันเพียงแต่ซับซ้อนกว่าเล็กน้อย transcription ของ eukaryotes เกิดใน nucleus RNAs ที่ได้จะถูกส่งไป cytoplasm ภายหลัง ใน prokaryote mRNAs สายเดียวแต่มีต่อ exons เข้าด้วยกัน ได้เป็น mature RNA coding regions ของ 2 หรือมากกว่า 2 genes จึงเป็น multigenic eukaryotes ส่วนมาก RNA transcript มี coding region ของ gene เดียวเป็น monogenic RNA polymerase ของ eukaryote มี 3 ชนิดและ RNA transcript ที่สังเคราะห์ได้ครั้งแรก (primary RNA transcript) เรียกว่า Heterogeneous nuclear RNA (hnRNA) ในกรณีของ mRNA ถูกแปรรูป (processing) 3 อย่างก่อนถูกส่งเข้า cytoplasm คือ



รูปที่ 28. Transcription ใน eukaryote มีการแปรรูปของ RNA transcription (hnRNA) โดย capping ที่ปลาย 5’ , polyadenylation ที่ปลาย 3, และ splicing ตัด introns ออก

1) เติม 7-Methyl guanosine cap เข้าที่ 5′ end ของ primary transcript เรียกว่า 5′cap
2) เติม Poly (A) (base A จำนวนมาก) เข้าที่ 3′ end transcript เรียกว่า 3' Poly (A) tail ยาวประมาณ 20-200 bases
3) ตัดลำดับที่ไม่เป็นรหัสพันธุกรรม ซึ่งเรียกว่า Intron ออกและต่อ ลำดับที่เป็นรหัสพันธุกรรมซึ่งเรียกว่า Exon เข้าด้วยกันเป็นสายเดียว (รูปที่ 28)

RNA polymerase ใน eukaryotes มี 3 ชนิด ทำหน้าที่สังเคราะห์ RNA ต่างชนิดกัน RNA polyamerase I ใน nucleolus สังเคราะห์ rRNA ยกเว้น 5S rRNA

RNA polymerase II ใน nucleus สังเคราะห์ hnRNA (pre-mRNA)

RNA polymerase III ใน nucleus สังเคราะห์ tRNA, 5S rRNA และ small nuclear RNA (snRNA)

3.1 Initiation ของสาย RNA

RNA polymerase ของ eukaryote เริ่มสังเคราะห์ RNA ด้วยตนเองไม่ได้แต่ต้องการ proteins เรียกว่า Transcription factors ช่วยในการเริ่มต้น Transcription factor จับกับบริเวณ promoter ใน DNA ก่อนเพื่อคลายเกลียว แล้ว RNA polymerase จึงเข้าไปจับที่ recognition sites ที่อยู่ upstream ก่อนจุด transcription start point promoter ของ eukaryote เป็น cis-action elements คือเป็น sequence ในสาย DNA ที่ไม่ใช่ template

Recognition sites หรือ consensus sequences ได้แก่

TATA box มี sequence คือ TATAAAA อยู่ประมาณ base ที่ –30

CAAT box มี sequence GGCCAATCT อยู่ใกล้ตำแหน่งที่ -80

GC box มี 2 boxes ของ sequence GGGCGG อยู่ประมาณ -50 และ -100

Octamer box มี sequence ATTTGCAT อยู่ประมาณ -130

โดยทั่วไป promoter ที่มีประสิทธิภาพจะมีอย่างน้อย 1 recognition sites แต่จะไม่พบมีrecognition sites ทั้งหมดใน 1 promoter

RNA polymerase ทั้ง 3 ชนิดมี transcription factors แตกต่างกัน

RNA polymerase II ซึ่งสังเคราะห์ mRNA ต้องการ TFIID, TFIIB, TFIIF, TFIIE, TFIIH และ TFIIJ ทั้งนี้ TFIIF ทำหน้าที่คลายเกลียว DNA และ TFIIH ทำหน้าที่ phosphorylate RNA polymerase II เป็นผลให้ TFIIF หลุดออกแล้ว RNA polymerase II เคลื่อนที่ไป start point เริ่ม initiation ได้

RNA polymerase I และ III ใช้ Transcription factor เหมือน polymerase II และมีพิเศษของแต่ละ enzyme พบว่าบาง genes มี promoter ของ polymerase III มีส่วนอยู่ใน downstream จาก start point

3.2 Elongation ของสาย RNA

เมื่อ RNA polymerase เริ่ม initiation complex ได้ก็สังเคราะห์ต่อสาย RNA โดยวิธีเหมือนใน prokaryote กลไกที่แท้จริงยังไม่รู้ เพราะโครงสร้างของ eukaryotic RNA polymerase ยังไม่รู้ เมื่อ elongation ไปแล้วในช่วงต้น 5′ end ของ pre-mRNA จะถูก capping ใส่ 7-methyl guanosine (รูปที่ 28) 7-MG cap มีความสำคัญต่อ protein factors ที่เกี่ยวข้องกับ initiation ในกระบวยการ translation และ cap ป้องกันไม่ให้สาย RNA ถูกย่อยโดย nuclease

3.3 Termination **ของสาย** RNA

การหยุดสังเคราะห์ RNA โดย RNA polymerase II ใน eukaryote เป็นการตัด primary transcript ด้วย endonuclease มากกว่าการหยุดสังเคราะห์ การตัดเกิดได้หลายจุดระหว่าง 1000 – 2000 bases ปลายที่ถูกตัดเป็น 3′ end ปกติการตัดเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 11 – 30 base downstream และมี conserved sequence หรือ consensus AAUAAA หลังจากสาย pre-RNA หลุดออกมาจะถูกต่อหางด้วย poly (A) polymerase ซึ่งจับกับ consensus AAUAAA ใส่ adenine เข้าไป กระบวนการเรียกว่า Polyadenylation (รูปที่ 28)

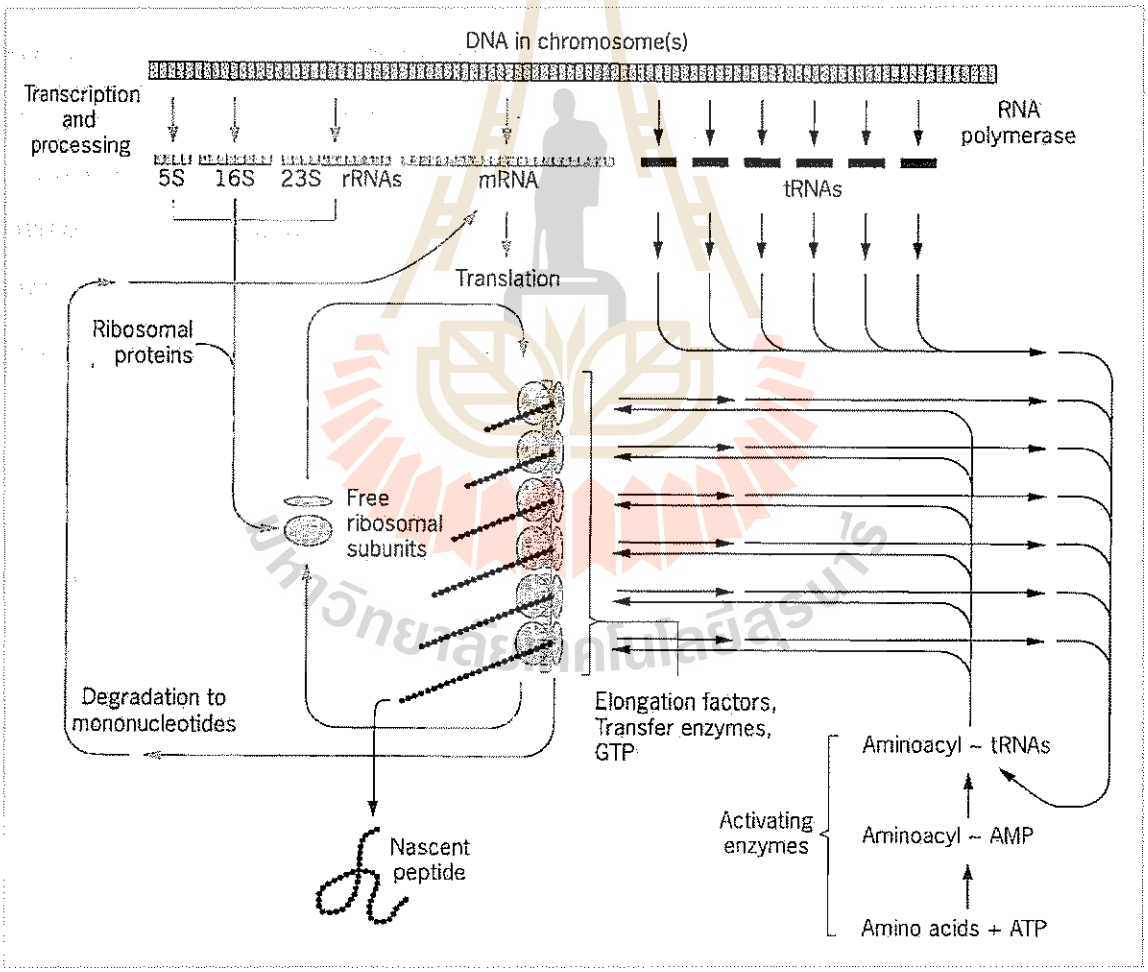
termination ของ RNA polymerase I ต้องการ terminator protein ช่วย

termination ของ RNA polymerase III คล้ายกับ rho– independent terminator ใน *E. coli* แต่กลไกที่แท้จริงยังไม่รู้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

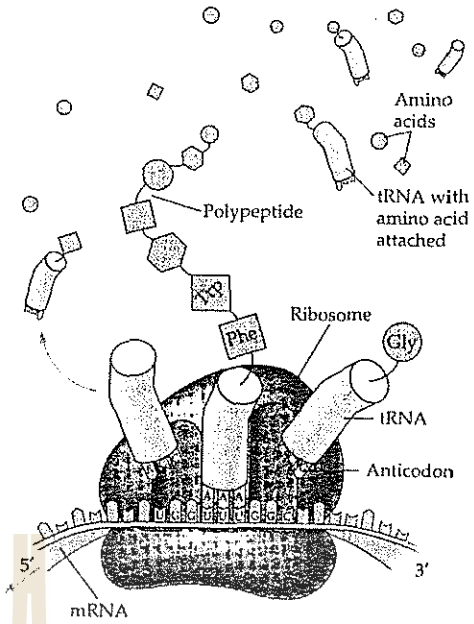
Translation and the Genetic Code

การแสดงออกของ genes (Gene expression) ขั้นแรกคือการถอดรหัสหรือ Transcription เป็นการถ่ายข้อมูลพันธุกรรมที่เก็บไว้ใน genes ให้ตัวกลางคือ messenger RNA ที่นำข้อมูลไปยังสถานที่สังเคราะห์ polypeptides ใน cytoplasm ขั้นที่สองคือ การแปลรหัสหรือ Translation เป็นการถ่าย ข้อมูลใน mRNA ให้เป็นลำดับของ amino acids ของ polypeptide อันเป็นผลผลิตของ genes (รูปที่ 29) Translation เกิดใน ribosomes และใน cytoplasm กระบวนการเกี่ยวข้องกับ RNA ทั้ง 3 คือ (รูปที่ 30) 1) mRNA นำข้อมูลพันธุกรรมในรูปของรหัส amino acids เรียกว่า **Genetic code หรือ Codon** โดยมี 2) tRNA ทำหน้าที่เป็น adaptor นำ amino acids เข้ามาต่อกันให้ตรงกับลำดับของ nucleotide ของรหัสพันธุกรรมที่กำหนดไว้ใน mRNA รหัสพันธุกรรม 3) rRNA รวมกับ ribosomal protein กลายเป็น Ribosome ทำหน้าที่เป็นสถานที่สังเคราะห์โปรตีน



รูปที่ 29. ไดอะแกรมรวมแสดงความสัมพันธ์ต่อเนื่องระหว่าง Trancription และ Translation ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์ RNA ทั้ง 3 ชนิด จาก DNA และ RNA ทั้งหมดทำงานร่วมกันในการสังเคราะห์โปรตีน

รูปที่ 30. ไดอะแกรมแสดงหลักการของ Translation ที่ RNA ทั้ง 3 ชนิด ทำงานร่วมกัน



1. Genetic Code

Genetic code ประกอบด้วย 3 nucleotides ต่อ 1 code หรือ Triplet code เรียกว่า Codon (ตารางที่ 1) 1 code มีความหมายเท่ากับ 1 amino acid ในสาย polypeptide genetic code ไม่อ่านทับ

ตารางที่ 1. Genetic Codes

The Genetic Code[a]

First (5') letter	Second letter U	Second letter C	Second letter A	Second letter G	Third (3') letter
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Try	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Try	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Ochre (terminator)	UGA Opal (terminator)	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Amber (terminator)	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met (initiator)	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

= Polypeptide chain initiation codon

= Polypeptide chain termination codon

[a]Each triplet nucleotide sequence or codon refers to the nucleotide sequence in **mRNA** (not DNA) that specifies the incorporation of the indicated amino acid or polypeptide chain termination.

ซ้อนกัน (nonoverlapping) และไม่มีการเว้นวรรค (comma free) amino acid 1 ตัว อาจมีได้มากกว่า 1 codon หรือเป็น multiple codons ปกติ codons เหล่านี้แตกต่างกัน nucleotide เดียว

Genetic code ทั้งหมดมี 64 codons ซึ่ง 61 codons มีความหมายสำหรับ 20 amino acids 1 start codon คือ AUG และ 3 stop codons คือ UAA เรียกว่า Ochre, UAG เรียกว่า Amber และ UGA เรียกว่า Opal ซึ่งกำหนดให้หยุดการสังเคราะห์โปรตีน codons ที่เรียงต่อๆ กันทั้งหมดของ gene ใดๆ เรียกว่า Reading frame ดังนั้น mRNA ก็คือ template ของ polypeptide นั่นเอง

2. Transfer RNA

tRNA โมเลกุลขนาดใหญ่ รูป 3 มิติ เป็น clover leaf structure (คล้ายใบผักแว่น) มีส่วนที่สำคัญ คือ 1) anticodon sequence 3 bases ซึ่งจับกับ codon ได้อย่างถูกต้อง 2) มี recognition site สำหรับ aminoacyl – tRNA synthetase เพื่อจับกับ amino acids ที่ถูกต้อง (รูปที่ 31 และ 33) จับกับตำแหน่งที่ถูกต้องบน ribosome amino acid จะถูกทำให้มีพลังสูงก่อนด้วย ATP แล้วจึงจับกับ tRNA ได้

amino acid + ATP

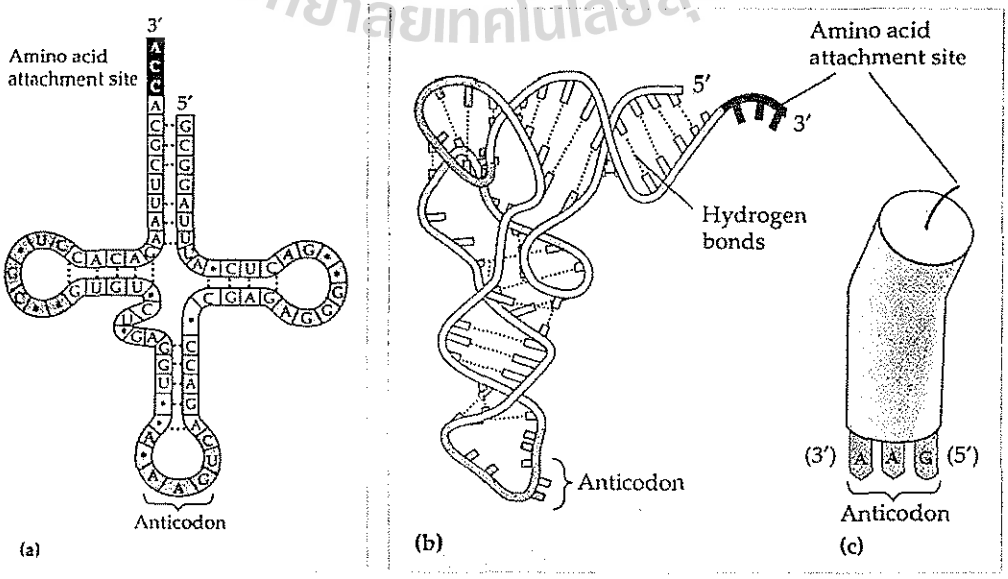
aminoacyl – tRNA synthetase

amino acid ~ AMP + P ~ P

amino acid ~ AMP + tRNA

aminoacyl – tRNA synthetase

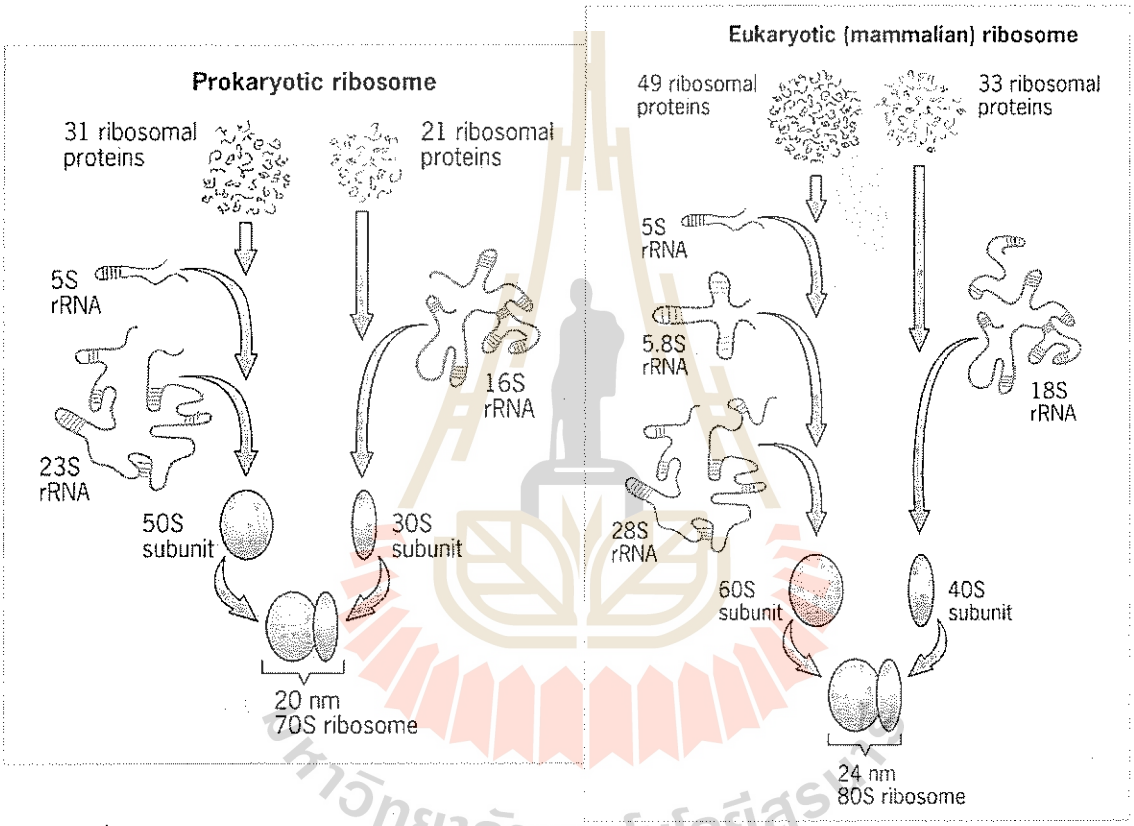
amino acid ~ tRNA + AMP



รูปที่ 31. Molecular model ของ tRNA (a,และ b) และ anticodon (c)

3. Ribosome

Ribosome เป็นสถานที่ของการสังเคราะห์ polypeptide ribosome ประกอบด้วย RNA และ protein มี 2 หน่วยย่อย (subunits) คือ small subunit และ large subunit ribosome ของ prokaryote **ขนาด 30S และ 50S** ส่วนของ eukaryote **ขนาด 40S และ 60S** ribosome ของ prokaryote กับของ eukaryote แตกต่างกันทั้งน้ำหนักและ ขนาดและจำนวนของ rRNA (รูปที่ 32) ทั้ง 2 subunits แยกออกจากกับหลัง translation บน mRNA สมบูรณ์แล้วและรวมกันใหม่เมื่อเริ่ม translation ribosome มีความกว้างบรรจุได้ 3 tRNA หรือ 3 sites คือ (1) Aminoacyl site, (2) Peptidyl site และ (3) Exit site (รูปที่ 33)



รูปที่ 32. เปรียบเทียบส่วนประกอบ ของ Prokaryotic ribosome และ Eukaryotic ribosome

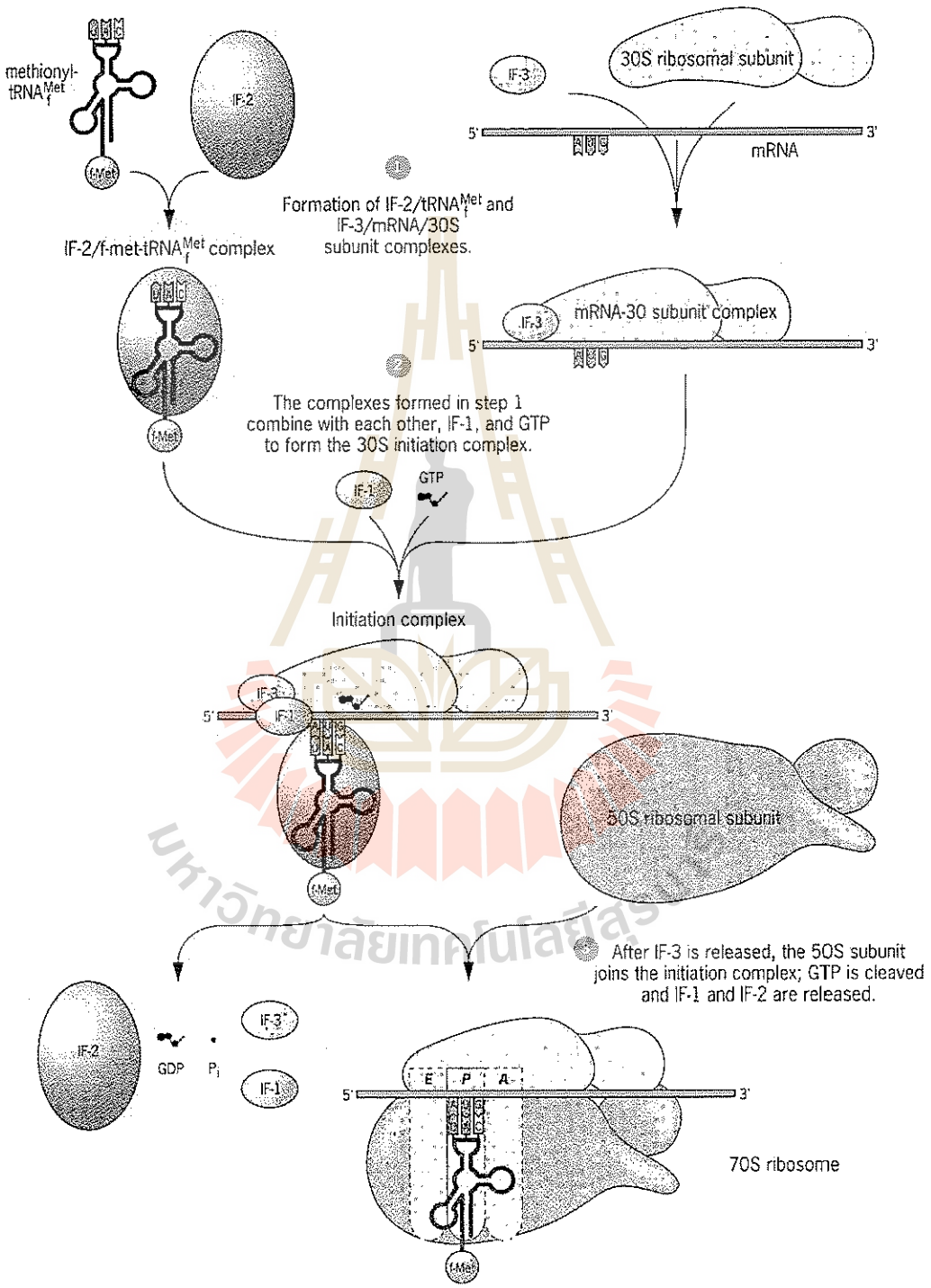
3. Translation process

แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน 1) polypeptide chain initiation 2) chain elongation และ 3) chain termination Initiation ใน prokaryotes และ eukaryotes กระบวนการคล้ายกันต่างกันบ้างที่ปัจจัย (factors) ในกระบวนการ

3.1 Initiation ใน prokaryote

กระบวนการเริ่มด้วย (1) 30S subunit ของ ribosome จับกับ 5′ end ของ mRNA ที่บริเวณก่อน start codon (AUG) ประมาณ 7 nucleotides บริเวณนี้เรียกว่า Shine–Dalgarno sequence (2) tRNA ตัวแรกนำ amino acid methionine ซึ่งมี formyl group หรือ methionyl-Met tRNA เข้าไปใน

ribosome จับกับ codon AUG ของ mRNA ซึ่งตรง Psite ใน ribosome แล้ว (3) 50S subunit ของ ribosome เข้ามาจับกับ 30S subunit (รูปที่ 33) กระบวนการนี้มี initiation factors 3 factors คือ IF–1, IF–2 และ IF–3 initiation ก็สมบูรณ์ เมื่อเริ่มได้ aminoacyl–tRNA ตัวที่ 2 เข้ามาที่ A site amino acids ทั้ง 2 จับกันด้วย peptide bond แล้ว amino acid ตัวแรกหลุดออกจาก tRNA ตัวแรก และ tRNA นี้ออก



จาก ribosome ที่ E site

รูปที่ 33. Initiatioon ของ translation ใน *E. coli* aminoacyl-tRNA ตัวแรก เข้าจับ codon

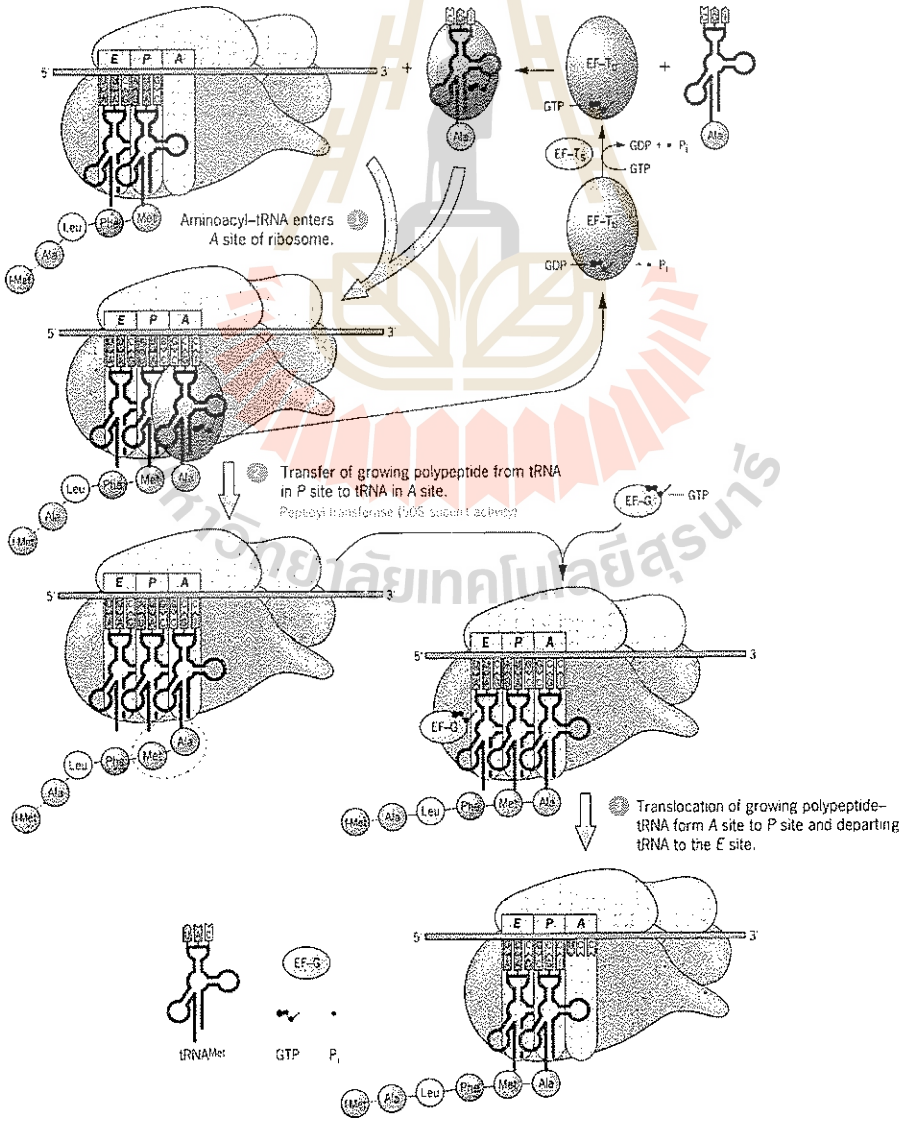
ที่ P site ของ ribosome

3.2 Initiation ใน eukaryote

(1) mRNA มีตำแหน่งที่ให้ 40S subunit จับก่อน start codon ที่ 7-methyl guanosine cap ของ 5′ end ของ mRNA และมี protein จับที่ cap (CBP) ส่วน amino acid ตัวแรกคือ methionine หรือ methionyl– RNA-Met ที่**ไม่มี** formyl group เข้าที่ P site initiation factors จับกับ CBP แล้ว initiation complex ทั้งหมดนี้เคลื่อนที่ $5' \rightarrow 3'$ เพื่อdกวาดหา (scan) หา AUG codon เมื่อพบ AUG แล้ว 60S subunit เข้าจับกับ methionyl-tRNA / mRNA / 40S subunit complex ได้การ initiation สมบูรณ์แล้ว aminoacyl – tRNA ตัวที่ 2 จึงนำ amino acid ตัวที่ 2 เข้าที่ A site

4. Elangation

ใน prokaryote และ eukaryote เหมือนกัน เป็นการนำ amino acid เข้าไปต่อเพิ่มความยาวแก่สาย polypeptide มี 3 ขั้นตอนคือ



รูปที่ 34. Elongation ของ polypeptide ใน *E. coli*

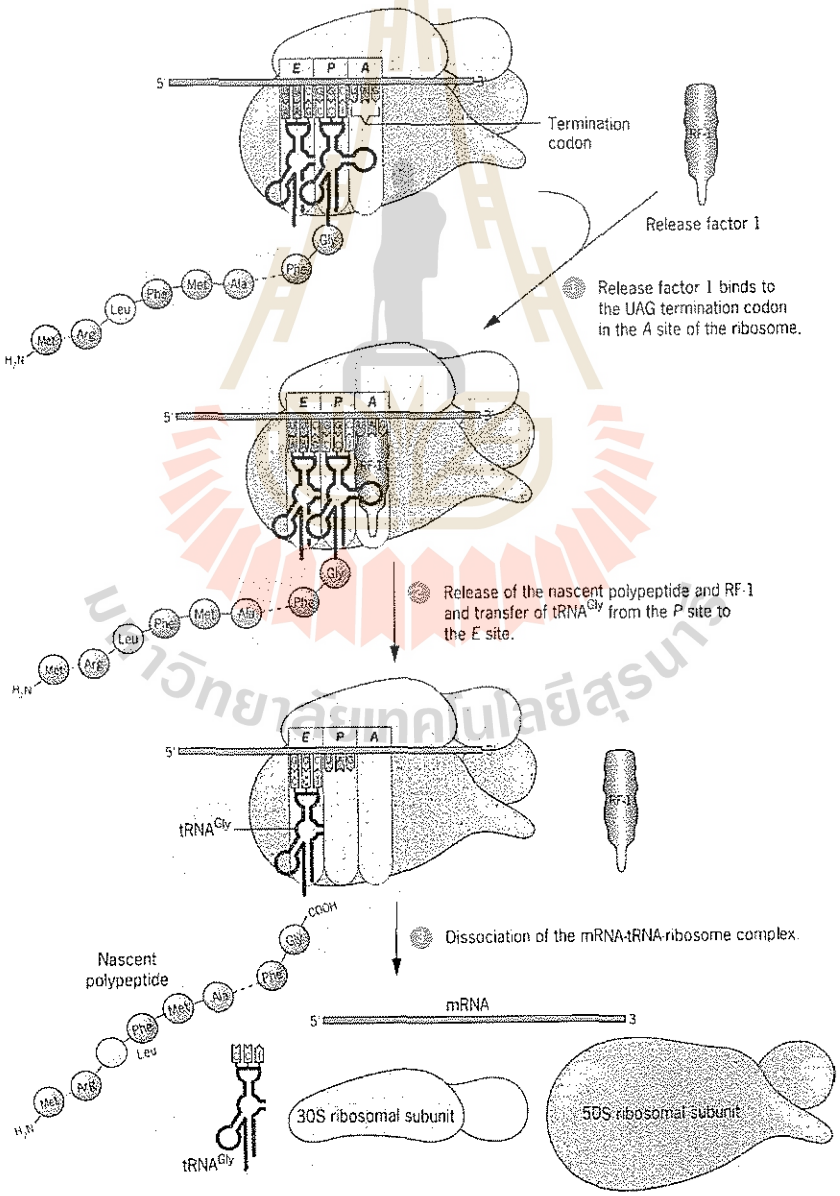
1) aminoacyl – tRNA เข้าที่ A site ของ ribosome ต้องการ elongation factor EF-Tu GTP

2) ถ่าย polypeptide chain ที่มีอยู่แล้วจาก tRNA ใน P site ให้ tRNA ใน A site และ polypeptide ทำ peptide bond กับ amino acid ใหม่ โดย peptidyl transferase

3) ribosome เคลื่อนที่ไปบน mRNA ครั้งละ1codon ในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ การเคลื่อนที่เรียกว่า Translocation ขั้นตอนนี้ต้องการ elongation factor G (EF – G) (รูปที่ 34) ขั้นตอนทั้งสามนี้เกิดขึ้นซ้ำ ๆ ได้ polypeptide ของ protein ตามที่ codons กำหนดไว้ใน reading frame

4. Termination

Polypeptide chain elongation หยุดเมื่อ ribosome เคลื่อนที่มาถึง stop codons ซึ่งไม่มี tRNA



รูปที่ 35. Termination ของ translation. Releasing factor จับที่ stop codon เป็นผลให้

อุปกรณ์ในการสังเคราะห์โปรตีนแลกออกจากกัน สิ้นสุดกระบวนการ

ปกติจำ codons เหล่านี้ได้ แต่มีโปรตีนเรียกว่า Release factors (RFs) เท่านั้นที่จับกับ stop codons ได้ (รูปที่ 35) ใน prokaryotes มี RF–1 (UAA และ UAG) และ RF–2 (UAA และ UGA)

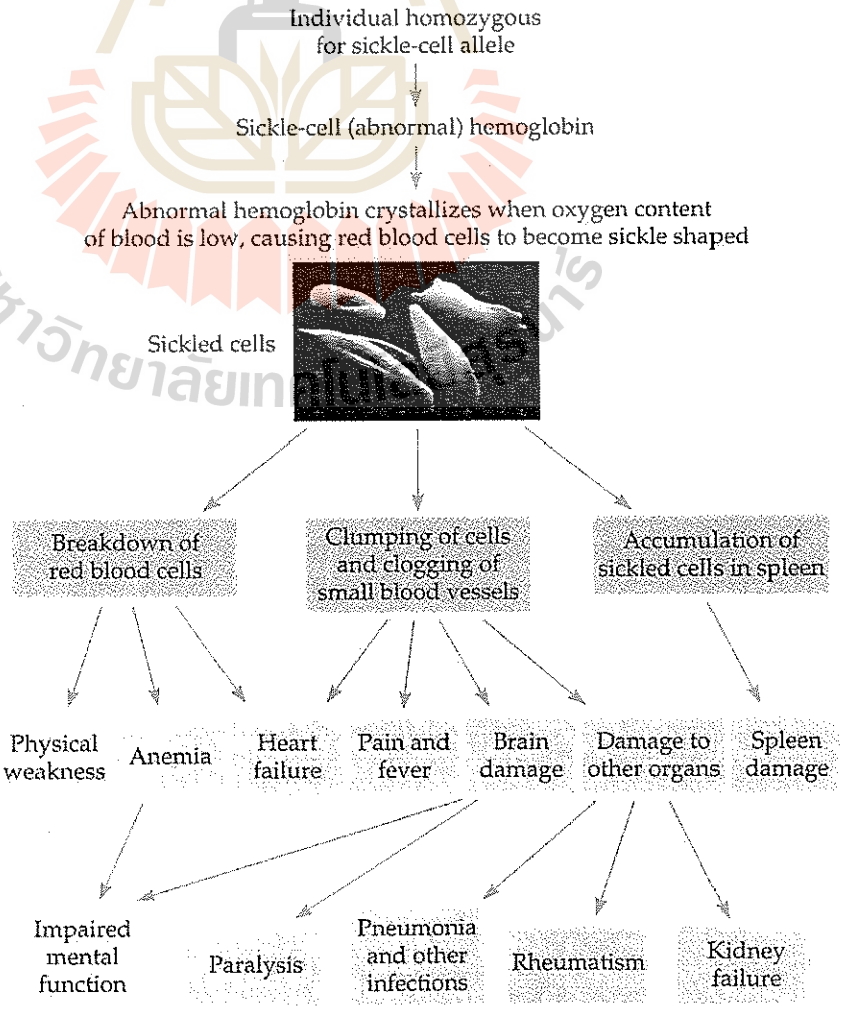
ใน eukaryotes มี eRF สำหรับทั้ง 3 stop codons เข้าไปจับที่ stop codon ซึ่งตรงกับ A site เป็นผลให้ polypeptide ถูกปล่อยออกจาก tRNA ที่ P site แล้ว tRNA เคลื่อนไป E site ออกจากกระบวนการ ส่วน mRNA และ ribosome แยกออกจากกัน และ ribosome แยก subunit ออกจากกัน การสังเคราะห์ก็เสร็จสิ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พันธุศาสตร์มนุษย์ : Human Genetics

Gene Action : From Genotype to Phenotype

ตั้งแต่ศตวรรษที่ 12 นักพันธุศาสตร์ได้ความคิดเกี่ยวกับ genes ทำให้เกิด phenotypes โดยที่ยังไม่รู้เคมีและหน้าที่ของ gene การวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า genes ไม่ได้แสดงออกโดยลำพัง บางครั้งแสดงออกร่วมกับ genes อื่นและบาง gene เพียง gene เดียว แต่มีอิทธิพลต่อหลาย ๆ ลักษณะของสิ่งมีชีวิตทั้งตัว เรียกว่า **Pleiotropic effects** เช่น Phenylketonuria (PKU) เกิดจาก recessive gene ที่อยู่บน autosome ทำให้สลาย phenylalanine ให้เป็น tyrosine ไม่ได้ phenylalanine สะสมในเลือดและปัสสาวะ ส่งผลกระทบต่อระบบประสาท ในทารกทำให้สมองไม่พัฒนา ปัญญาอ่อน เนื่องจากโรค PKU สามารถวินิจฉัยได้หลังเด็กแรกเกิด ถ้าให้อาหารที่มี phenylalanine ต่ำหลังเด็กเกิด จะช่วยป้องกันได้ และอีกตัวอย่างที่เป็นรู้จักกันดี คือ โรคโลหิตจาง Sickle cell anemia (recessive disorder) เกิดจากความผิดปกติของ hemoglobin เนื่องจาก **Gene Mutation** เปลี่ยน base pair เพียง 1 bp. ใน β−chain ของ hemoglobin ทำให้ amino acid ตัวที่ 6 เปลี่ยนจาก glutamic acid เป็น valine ทำให้การจับ oxygen ของ hemoglobin ของเซลล์เม็ดเลือดได้น้อยกว่าปกติ เมื่อขาด oxygen hemoglobin จะตกผลึก ทำให้เซลล์เม็ดเลือดบิดเป็นรูปเคียว (sickle) อาการของ sickle cell anemia ให้ผลร้ายกับทุกอวัยวะของร่างกายเพราะเซลล์ขาด oxygen (รูปที่ 36)



รูปที่ 36. Pleiotropic effects ของ Sickle cell anemia

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Environmental effects ต่อ Gene Expression

สิ่งแวดล้อมทางชีวภาพและทางกายภาพมีปฏิสัมพันธ์กับ gene เช่น อุณหภูมิสูงเกินไปทำให้แมลงหวี่ที่กลายพันธุ์ตาย สีของขนที่เข้มตามปลายเท้า (extremity) หู และ จมูก แมวไทย (Siamese cat) และกระต่าย Himalayan เนื่องจาก alleles ควบคุมการผลิตสีทำงานในอุณหภูมิต่ำ รังสี UV ทำให้เซลล์กลายเป็นเนื้องอก และมะเร็ง hormones มีอิทธิลพต่อการแสดงออกของเพศ (secondary sex characteristics)

ลักณะบางอย่างเกิดจาก gene(s) บน Autosome

Pattern baldness ซึ่ง gene ควบคุมอยู่บน **autosome** การแสดงออกของศรีษะล้านแตกต่างกันระหว่างเพศ ในเพศชายที่เป็น homozygous (BB) และ heterozygous (Bb) จะแสดงบริเวณหัวล้านเมื่ออายุไม่มาก แต่ในเพศหญิงเฉพาะที่เป็น homozygous เท่านั้นที่มีแนวโน้มจะแสดงหัวล้านกลางศรีษะ (รูปที่ 37) เพราะในเพศชายมี testosterone กระตุ้นการแสดงของ gene หัวล้าน แต่ในเพศหญิงมี testosterone น้อยกว่ามาก โอกาสที่จะหัวล้านจึงมีน้อยกว่า pattern baldness จึงเป็น sex influenced phenotype ที่แสดงว่า biological factor (hormone) สามารถควบคุม expression ของ genes

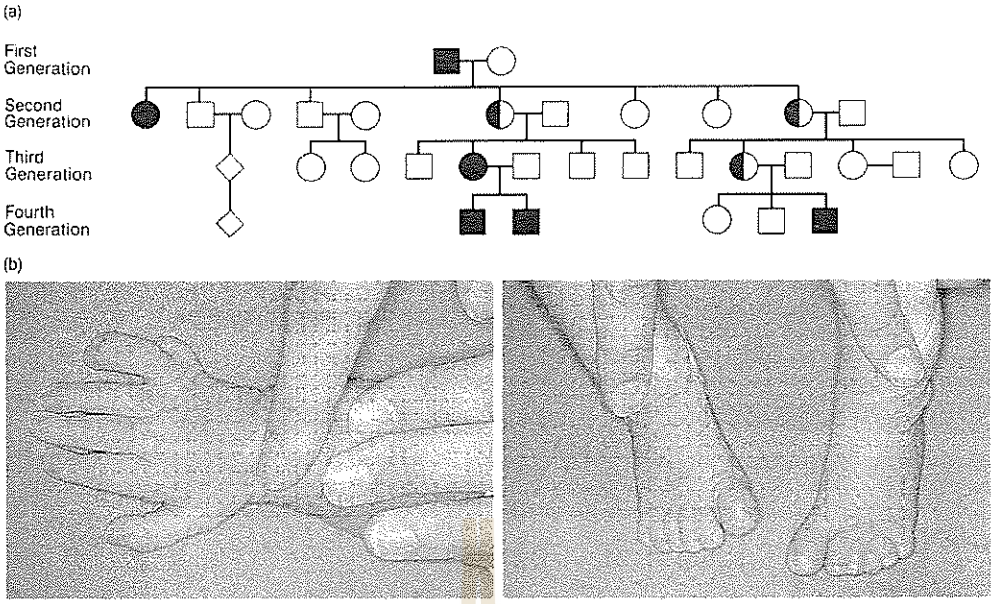
รูปที่ 37. ชายที่มีศรีษะล้านก่อนวัยจะเริ่มเกิดที่กลางศรีษะก่อน

Penetrance และ Expressivity

คนไม่แสดง phenotype ทั้งที่มี genotype นั้นๆ อยู่ นั่นคือ phenotype นั่นแสดง Incomplete penetrance (gene แสดงออกไม่สมบูรณ์) เช่น ลักษณะมีนิ้วมือและนิ้วเท้ามากกว่าปกติ Polydactyly การไม่แสดงออกมาของ genotype (dominant disorder) จะทำให้เกิดปัญหาในการวิเคราะห์ pedigree ของวงศ์ตระกูล (รูปที่38)

Expressivity

การแสดงของ phenotype ที่ไม่สม่ำเสมอระหว่างบุคคล ถ้าการแสดงออกที่ไม่สม่ำเสมอมีมากหลายรูปแบบเรียกว่า **variable expressivity** เช่น ลักษณะลูกตาของแมลงหวี่มีทั้งใหญ่ เล็ก หรือ เป็นพ



รูปที่ 38. Polydactyly การแสดงออกของนิ้วที่มากกว่าปกติ และ pedigree

Incomplete penetrance และ variable expressively แสดงให้เห็นถึงวิถีระหว่าง genotype กับ phenotype มีการปรับเปลี่ยน (modulation) พบว่าสาเหตุของ modulation มาจาก environmental factors และบางส่วนจาก factors ในพันธุ์กรรมเอง

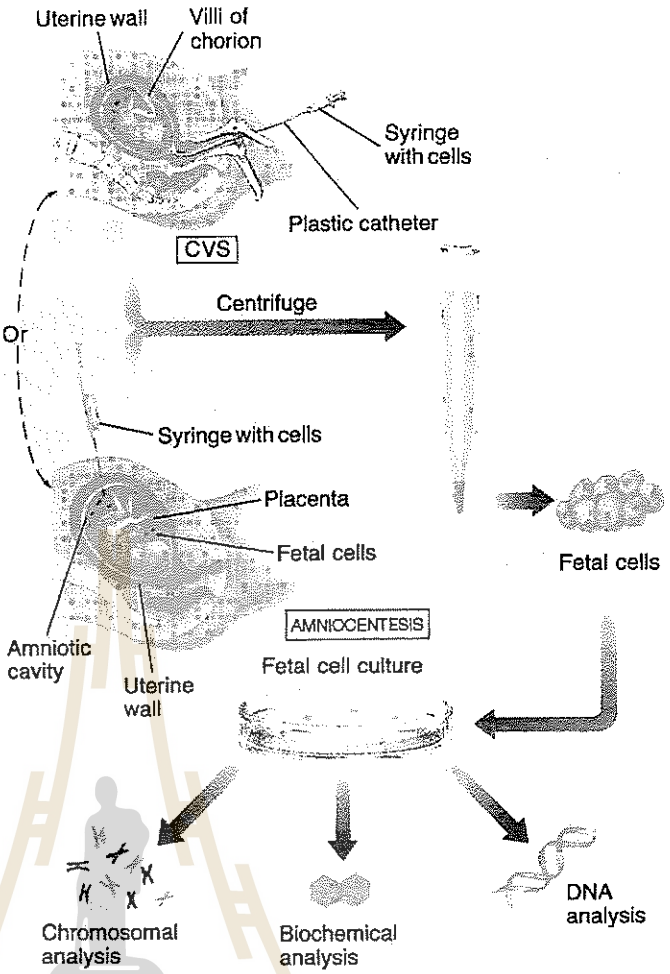
ความผิดปกติของ chromosome number ใน Human

ความผิดปกติทางพันธุกรรมของคนสามารถตรวจหาจากเซลล์ของตัวอ่อน (fetal cells) ในครรภ์ของมารดา ได้ 2 วิธี คือ

1) **Amniocentesis หรือ chorionic biopsy**: โดยการใช้เข็ม hypodermic syringe ดูดของเหลวจากถุงน้ำคร่ำ (Amnionic fluid) ใน ถุง (amnionicsac) หลัง 15 สัปดาห์ของการตั้งครรภ์ เซลล์ที่ได้คือ fetal cells ที่หลุดออกมาจากตัวอ่อน จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์หาความผิดปกติของพันธุกรรม
2) **Chorionic villus sampling (CVS)** : โดยการดูด (aspiration) เอาเนื้อเยื่อระหว่างผนังมดลูกกับส่วนที่เรียกว่า **Chorionic villi** เป็นเนื้อเยื่อที่กำลังพัฒนาซึ่งต่อไปจะพัฒนาเป็นรก (placenta) วิธีนี้ทำขณะตั้งครรภ์ได้ 10-11 สัปดาห์ก่อนที่รกจะพัฒนา (รูปที่ 39)

Fetal cells ที่ดูดออกมาได้นำไปวิเคราะห์หา chromosome abnormality, metabolic deficiency, และ defective alleles

(1) Detection of chromosomal abnormality: เนื่องจากผู้หญิงตั้งครรภ์เมื่ออายุมากมีโอกาสที่ให้ลูกเป็น Down syndrome จึงต้องตรวจหา chromosome 21 ที่เกินมา หาความผิดปกติของ chromosome อื่นได้ด้วย โดย Karyotype analysis (รูปที่ 40)



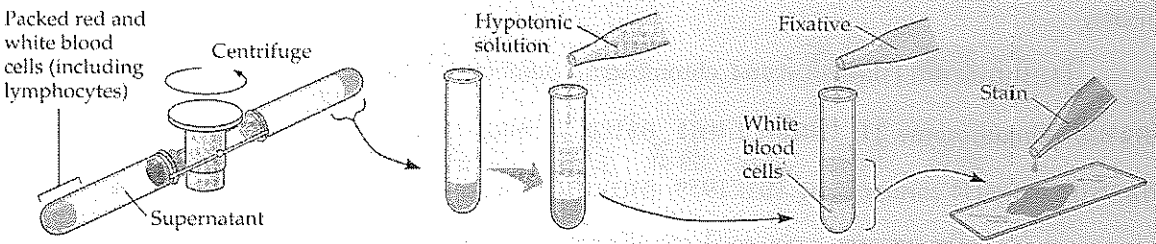
รูปที่ 39. Amniocentesis ดูดน้ำคร่ำจากถุงเพื่อนำเซลล์ fetal cells มาวิเคราะห์หา genetic disorder ของเด็กในครรภ์

(2) Detection of metabolic deficiency: ตรวจหามากกว่า 200 genes ที่กระทบต่อกระบวนการ metabolism ถ้า fetal cells ขาด enzyme อย่างใดอย่างหนึ่งไป แสดงว่าเกิด deficiency ของ enzyme นั้นๆ และแสดงอาการของโรคพันธุกรรม (ตารางที่ 2)

(3) Detection of defective alleles: ใช้ Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis ตรวจหา DNA ที่อาจมีความผิดปกติที่ไม่สามารถตรวจหาได้ด้วยกล้องจุลทัศน์ หรือโดยวิธีทางชีวเคมี เช่น Sickle cell anemia, cystic fibrosis และ Huntington's disease เป็นต้น (ตารางที่ 2)

Karyotyping analysis: เป็นการแสดงลำดับของ chromosomes ของแต่ละบุคคล ใช้บอกความผิดปกติที่เกิดขึ้นได้ ปกติเตรียม karyotype จากเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocytes เพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ใช้สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์และให้เซลล์หยุดในระยะ metaphase จากนั้นใส่ hypotonic solution ให้เซลล์เม็ดเลือดบวมแตกและ chromosomes กระจายออกจากกัน แล้วจัดเรียงลำดับของ chromosomes จะได้ karyotype

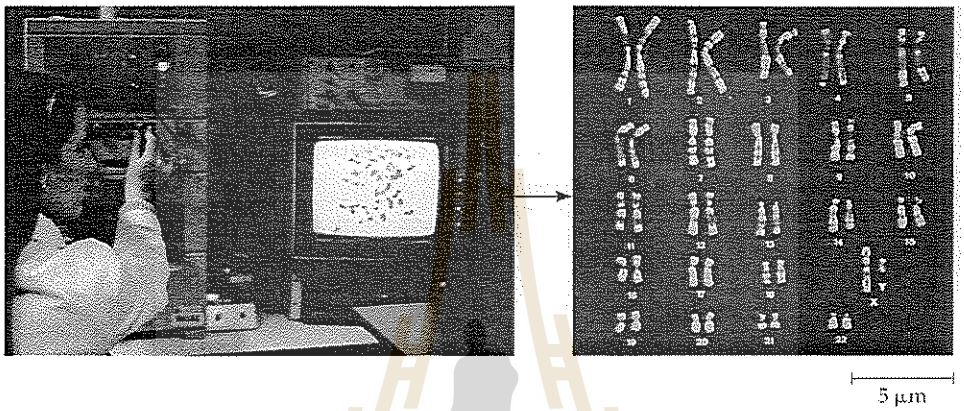
แบบแผนของจำนวน chromosomes, ขนาด, รูปร่าง, จำนวน และ แบบของแถบบนแท่ง chromosomes ของสิ่งมีชีวิตใด ๆ เรียกว่า **Karyotype** ในคนที่มี chromosome set สมบูรณ์ปกติเรียกว่า **Euploid** แต่ในคนที่มี chromosome เฉพาะแท่งใดแท่งหนึ่งหรือชิ้นส่วนของแท่งใดแท่งหนึ่ง น้อยกว่าหรือมากกว่าปกติเรียกว่า **Aneuploid** หรือเป็น **specific genetic imbalance** ทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรม



❶ The blood culture is centrifuged to sediment the blood cells.

❷ The supernatant fluid is discarded, and a hypotonic solution is mixed with the cells. The white blood cells swell and their chromosomes spread out. The red blood cells burst.

❸ Another centrifugation step sediments the white blood cells. After the fluid is poured off, a fixative (preservative) is mixed with the cells. A drop of the cell suspension in fixative is spread on a microscope slide, dried, and stained.

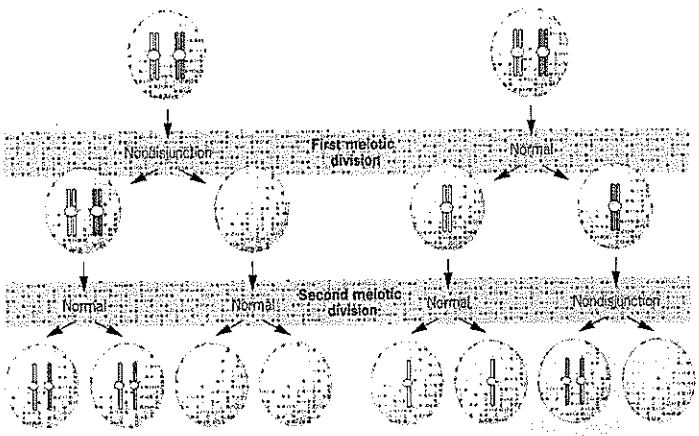


❹ The slide is viewed with a microscope, and the chromosomes are photographed. The photograph is entered into a computer, and the chromosomes are electronically rearranged into pairs according to size and shape.

❺ The resulting display is the karyotype.

รูปที่ 40. การวิเคราะห์ตรวจหาลักษณะของ chromosome โดย Karyotyping analysis

Genetic imbalance พันธุกรรมไม่สมดุลย์เกิดจากการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์แบบ meiosis ผิดปกติ ทำให้ homologous chromosomes ไม่แยกออกจากกันหรือ **Nondisjunction** (รูปที่ 41 และตารางที่ 3) ในระยะ meiosis II ได้ gametes ที่มี chromosome ขาดไปเรียก **Monosomy**และ gametes ที่มี chromosomes เกินมาเรียก **Trisomy**



รูปที่ 41. แสดงโอกาสเกิด Nondisjunction ของ chromosomes

Trisomy

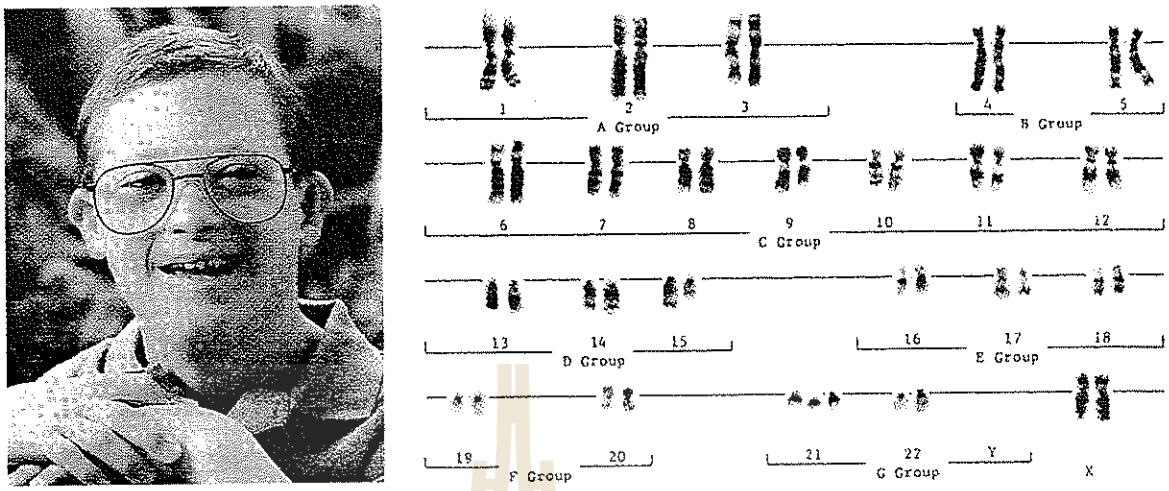
โรคที่เกิดจากความผิดปกติของ chromosome number ที่รู้จักกันดีที่สุดในคนคือ **Down syndrome** เกิดจากมี **chromosome 21 เพิ่มอีก 1 แท่ง** อธิบายไว้โดยแพทย์ชาวอังกฤษ Langdon Down ปี 1866 แต่ศึกษาพบสาเหตุทาง chromosome ในปี 1959 คนที่เป็น Down syndrome มี chromosomes ทั้งหมด 47 แท่ง เขียน karyotype เป็น **47, XX, + 21** (รูปที่ 42) เกิดจาก nondisjunction ในพ่อหรือแม่ แต่ส่วนมากเกิดในแม่ โดยเฉพาะแม่ที่อายุมากกว่า 25 ปี เริ่มพบมีความถี่ของ nondisjunction เพิ่มขึ้นโอกาสจึงเป็น 1 ใน 1500 ถ้าแม่อายุ 40 ขึ้นไปโอกาสเป็น 1 ใน 100 เพราะในคนเพศหญิง meiosis เริ่มกระบวนการตั้งแต่เป็นตัวอ่อน (fetus) และการแบ่งสมบูรณ์หลัง fertilization เล็กน้อย ระหว่างก่อน fertilization ไข่จะหยุดใน prophase I

ตารางที่ 2. โรคพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของ Chromosomes และ Genes ที่ควบคุม metabolism

GENETIC DISORDERS

Genetic Disorder	*Cause*	*Nature of Illness*	*Incidence*	*Inheritance*
Down syndrome	Extra chromosome number 21	mental retardation, body alterations	1 in 800	sporadic
Klinefelter's syndrome	Male with extra X chromosome	abnormal sexual differentiation	1 in 2,000	sporadic
Cystic fibrosis	Abnormal chloride transport	complications of thickened mucus	1 in 2,500 Caucasians	autosomal recessive
Huntington's disease	Unknown	progressive neurological degeneration	1 in 2,500	autosomal dominant
Duchenne muscular dystrophy	Deficient muscle protein dystrophin	progressive muscle degeneration	1 in 7,000 males	X-linked
Sickle-cell anemia	Abnormal beta-globin	weakness, pain, impaired circulation	1 in 625; mostly black	autosomal recessive
Hemophilia	Deficiency in one of a number of clotting factors	uncontrolled bleeding	1 in 10,000 males	X-linked
Phenylketonuria	Deficiency in enzyme phenylalanine hydroxylase	mental retardation	1 in 15,000	autosomal recessive
Tay-Sachs	Deficiency in enzyme acetylhexosaminidase	deposition of fatty materials in brain; infant death	1 in 3,000 Ashkenazic Jews	autosomal recessive
Lesch-Nyhan syndrome	Deficiency in enzyme HGPRT	mental retardation, self-mutilation	1 in 100,000 males	X-linked
Galactosemia	Deficiency in enzyme galactose transferase	mental retardation, digestive problems	1 in 60,000	autosomal recessive
Xeroderma pigmentosum	Deficiency in a UV repair enzyme	sensitivity to sunlight, cancer	1 in 250,000	autosomal recessive
Severe combined immunodeficiency (SCID)	Deficiency in enzyme adenosine deaminase, or others	absence of immune defenses	extremely rare	autosomal recessive
Ehlers-Danlos syndrome	Deficiency in collagen hydroxylating enzyme	abnormal connective tissues, joint problems	1 in 100,000	autosomal recessive
Familial hypercholesterolemia	Deficiency in LDL receptors	cardiovascular disease	1 in 100,000	autosomal recessive

ช่วงที่หยุด chromosomes อาจแยกคู่ยิ่งเวลาหยุดนาน โอกาสแยกคู่ยิ่งมากเป็นผลให้ chromosome nondisjunction ดังนั้นหญิงที่อายุมากจึงมีโอกาสผลิต aneuploid eggs มากกว่าหญิงอายุน้อย



(a) (b)

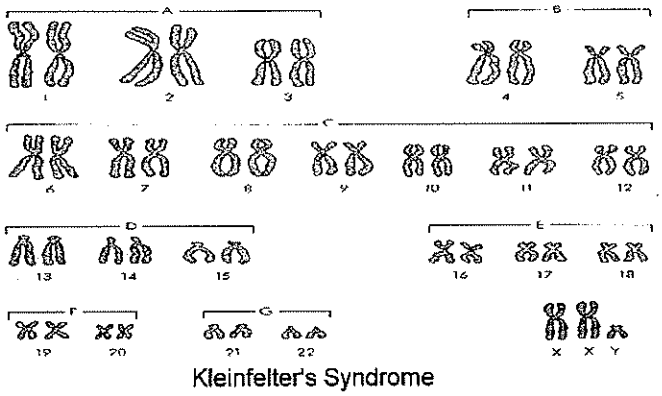
รูปที่ 42. Down syndrome และ Karyotype ของผู้ป่วย

ตารางที่ 3. ลักษณะของ phenotypes ที่เกิดจาก chromosome nondisjunction

Aneuploidy Resulting from Nondisjunction in Human Beings

Karyotype	*Chromosome Formula*	*Clinical Syndrome*	*Estimated Frequency At Birth*	*Phenotype*
47,+21	2*n*+1	Down	1/700	Short, broad hands with palmar crease, short stature, hyperflexibility of joints, mental retardation, broad head with round face, open mouth with large tongue, epicanthal fold.
47,+13	2*n*+1	Patau	1/20,000	Mental deficiency and deafness, minor muscle seizures, cleft lip and/or palate, cardiac anomalies, posterior heel prominence.
47,+18	2*n*+1	Edward	1/8000	Congenital malformation of many organs, low-set, malformed ears, receding mandible, small mouth and nose with general elfin appearance, mental deficiency, horseshoe or double kidney, short sternum, 90 percent die within first six months after birth.
45,X	2*n*−1	Turner	1/2500 female births	Female with retarded sexual development, usually sterile, short stature, webbing of skin in neck region, cardiovascular abnormalities, hearing impairment.
47,XXY 48,XXXY 48,XXYY 49,XXXXY 50,XXXXXY	2*n*+1 2*n*+2 2*n*+2 2*n*+3 2*n*+4	Klinefelter	1/500 male births	Male, subfertile with small testes, developed breasts, feminine-pitched voice, long limbs, knock knees.
47,XXX	2*n*+1	Triplo-X	1/700	Female with usually normal genitalia and limited fertility, slight mental retardation.

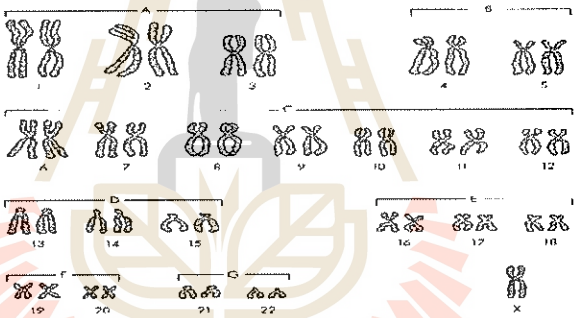
นอกจากนี้ Trisomy เกิดขึ้นกับ sex chromosomes ได้ด้วย เช่น **47, XXY** เป็นโรค **Klinefelter** (รูปที่ 43) และ **47, XXX** เป็นโรค **Triplo-X** (ตารางที่ 3)



รูปที่ 43. Karyotype ของ Kleinfelter syndrome ลักษณะ มีอวัยวะเพศชาย แต่มีลักษณะบางอย่างของเพศหญิง

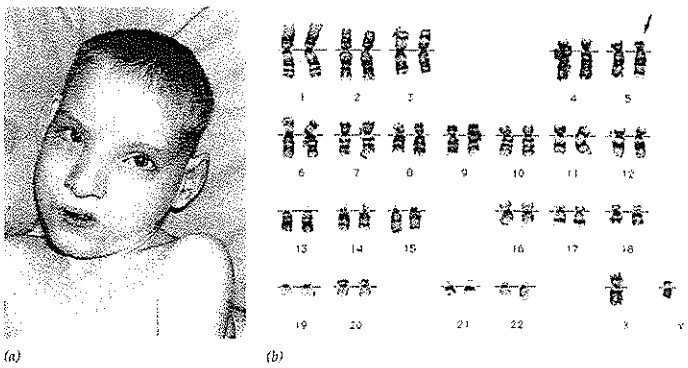
Monosomy

Chromosome ขาดหายไป karyotype เป็น **45, X** เป็นโรค **Turner syndrome** (รูปที่ 44) คนที่เป็นโรคนี้เป็นหมันมีหนอกคอ การได้ยินเสียงและเส้นเลือดหัวใจผิดปกติ การสูญเสีย sex chromosome อาจเกิดจากไข่หรือ sperm ไม่มี sex chromosome หรือสูญเสีย sex chromosome ใน mitosis หลัง fertilization แล้ว ในกรณีหลังนี้เป็น **Somatic mosaics** ความผิดปกติจาก Deletion และ Duplication ของ chromosome segments



รูปที่ 44. Karyotype ของ Turner's syndrome

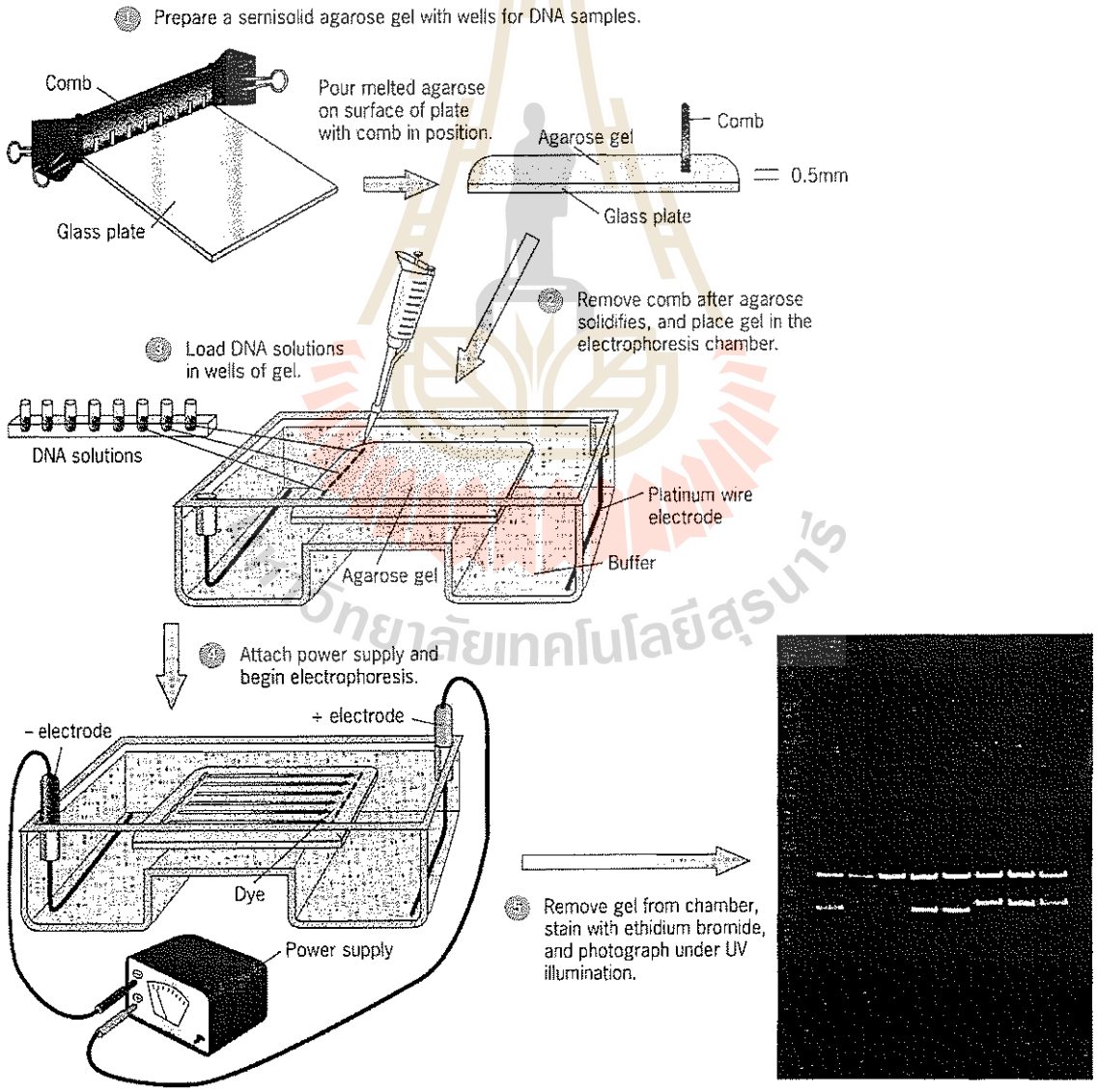
ถ้าสูญเสียชิ้นส่วนของ chromosome หรือ Deletion ทำให้ genome เป็น **Hypoploid** แต่ถ้าชิ้นส่วน chromosome เพิ่มขึ้นหรือ Duplication ทำให้ genome เป็น **Hyperploid** ทั้ง 2 สาเหตุ ทำให้ phenotype ผิดปกติ เช่นโรค **Cri-du-chat syndrome** เกิดจาก short arm ของ chromosome 5 delete karyotype เป็น 46 (5p-) มีอาการระบบประสาทร่างกายผิดปกติอย่างรุนแรง เพดานปากเหมือนแมว ร้องเสียงเหมือนแมว (รูปที่ 45) ส่วน duplication ของ chromosome segment ยังไม่พบตัวอย่างในคน



รูปที่ 45. เด็ก Cri-du-chat (a) และ Karyotype (b) ของผู้ป่วยลูกศรแสดง deletion ของ short arm ของ chromosome 5

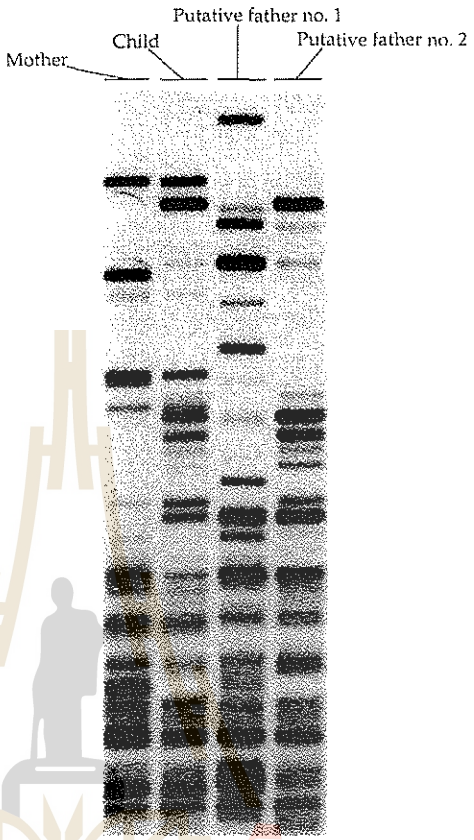
Molecular Biology ของ Human genetics

ลักษณะทางกายภาพของคน เช่นรูปร่าง หน้าตา สีตา สีผม เพียงผิวเผินอาจมีส่วนคล้ายกันมาก แต่ในสารพันธุกรรมของแต่ละบุคคลมีลักษณะเฉพาะตัว ไม่เหมือนคนอื่น ยกเว้นแฝดเหมือน (identical twins) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง DNA ที่ไม่มีความสำคัญในการแสดงออก หรือ ไม่เป็นรหัสของ reading frame หรือ **exon** ที่กำหนดชนิดของ amino acids ของ polypeptide หรือ protein เบสที่อยู่ข้างหรือระหว่าง exons หรือก็คือ **intron** มีลำดับเบสซ้ำๆ กัน (repeat) และแตกต่างกันระหว่างแต่ละบุคคล หรือเป็น **Polymorphism** ลำดับเบสของ DNA ส่วนนี้จึงถูกนำมาเป็นลายพิมพ์แยกและชี้บ่งแต่ละบุคคลได้ ลายพิมพ์ DNA นี้เรียกว่า **DNA Fingerprinting** เมื่อนำ DNA ที่มีลำดับเบสเหล่านี้มาย่อยด้วยเอนไซม์เฉพาะ **Restriction endonuclease** ได้ชิ้นส่วน **Fragments** ของ DNA ความยาว **Length** ต่างๆ กัน แล้วแยกชิ้นส่วนของ DNA ในสนามไฟฟ้าที่มีวุ้นเป็นวัตถุรองรับ (Gel electrophoresis – รูปที่ 46) จะแถบของชิ้นส่วน DNA แยกออกจากกันตามขนาดใหญ่หรือเล็ก



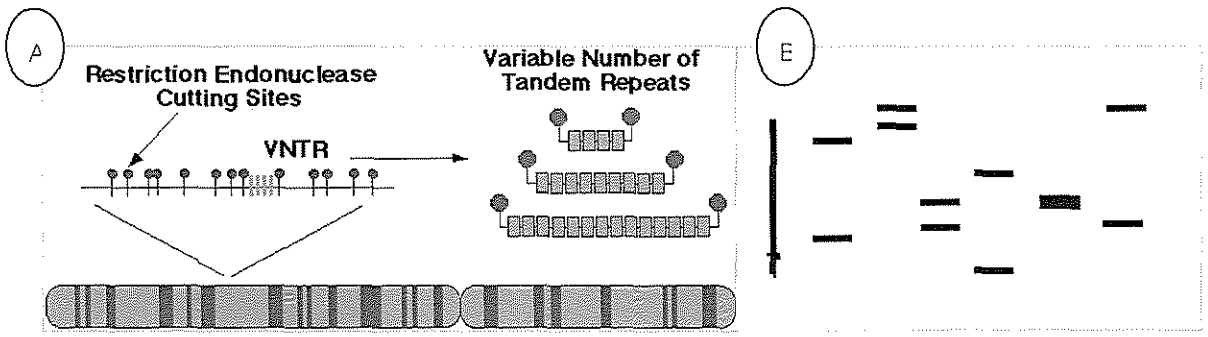
รูปที่ 46. DNA gel electrophoresis.

จากหลักการแยกอิสระและถ่ายทอดพันธุกรรม ลูกได้รับพันธุกรรมจาก พ่อและแม่ อย่างละครึ่ง DNA fingerprinting จึงสามารถชี้บอกความเป็น พ่อ-แม่-ลูก (รูปที่ 46) ใช้ DNA fingerprints เป็นหลักฐานในการพิจารณาคดีฟ้องเรียกร้องความเป็นพ่อ-แม่-ลูกได้



รูปที่ 47. DNA fingerprints ของ แม่ เด็ก และผู้สงสัยว่าจะเป็นพ่อของเด็ก

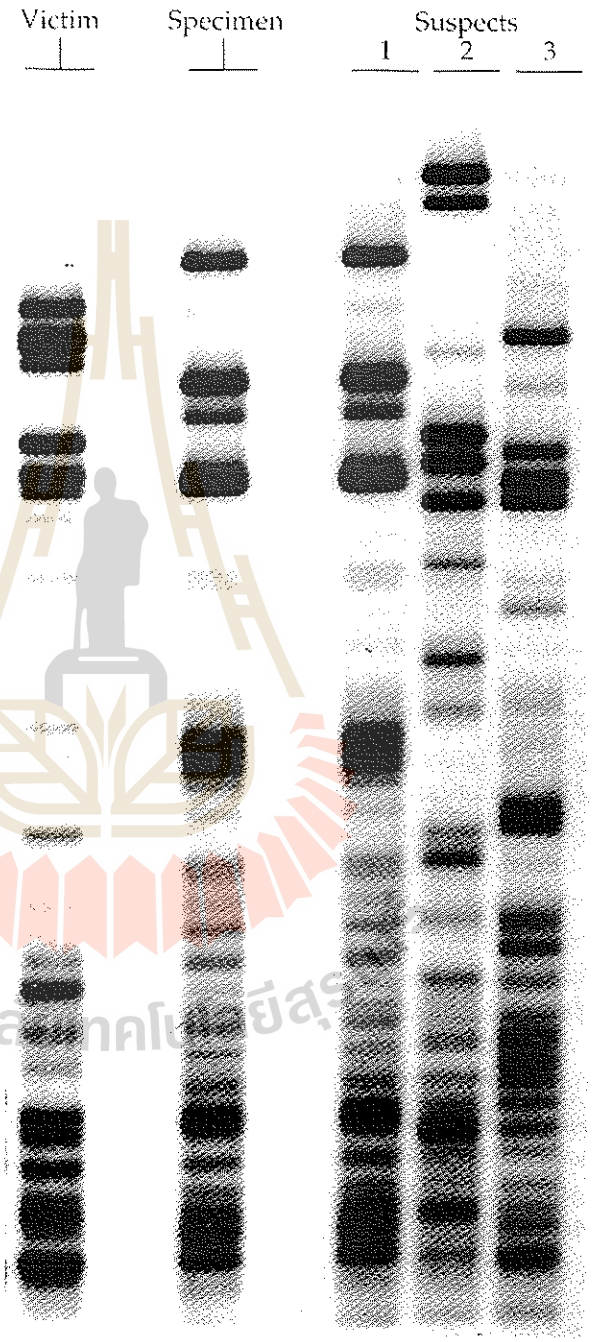
นอกจากนี้ polymorphism ใน introns ของ แต่ละ gene หรือ allele / locus ลำดับเบสที่ซ้ำกัน **Repeat** เหล่านั้นมีขนาดต่างๆ กัน **Variable** จำนวนมาก **Number** ไม่เท่ากันในแต่ละคน และ repeat เหล่านี้เรียงจากหัวไปหางอย่างต่อเนื่อง **Tandem** กระจายอยู่ทั่วไปใน genome ของคน เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กของ DNA จึงเรียกว่า **Variable Number Tandem Repeart** หรือ VNTR ซึ่ง VNTRs ของแต่ละคนไม่เหมือนกัน เมื่อตัด VNRT ด้วย restriction enzyme ใดๆ จะได้ชิ้นชิ้นของ VNRT เหมือนกันทุกประการ (รูปที่ 48)



รูปที่ 48. Variable Number Tandem Repeats (VNTRs) ที่ถูกตัดด้วย restriction endonuclease (A) และ VNTRs ที่แยกบน DNA gel electrophoresis (B)

VNTRs จึงใช้หา DNA fingerprints ระบุแยกบุคคล หรือสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวได้ละเอียดถูกต้องกว่า

DNA fingerprinting ใช้ประโยชน์ในงาน**นิติเวช** (Forensic) หาผู้ทำผิดจากผู้ต้องสงสัย (รูปที่ 49)



รูปที่ 49. DNA fingerprints
จากกรณีอาชญากรรม

Population Gentics

ตอน

"Microevolution"

1

Evolution : วิวัฒนาการ

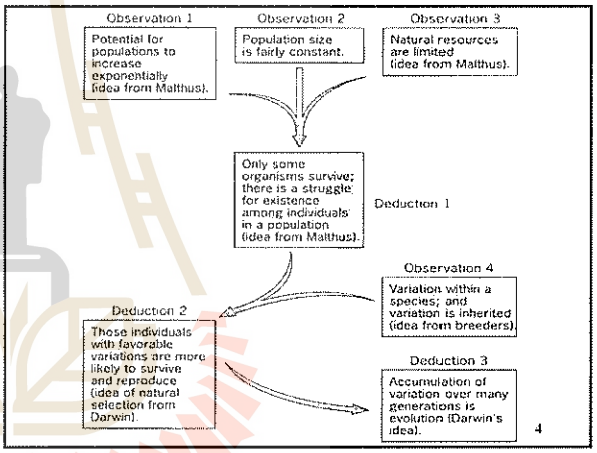
- The processes that have transformed life on earth from its earliest forms to the diversity that characterizes it today
- กระบวนการเปลี่ยนรูปแบบของสิ่งมีชีวิตบนโลก จากรูปแบบกำเนิดครั้งแรก จนถึงลักษณะความหลากหลายในปัจจุบัน

2

Darwin's Theory of Evolution

- ประชากรมีแนวโน้มจะเพิ่มจำนวนแบบ Exponential แต่ไม่เป็นเช่นนั้น เพราะ resources มีจำกัด
- resources ที่จำกัด ทำให้เกิดการแข่งขัน (competition)
- เป็นผลให้แต่ละคน (individual) ในประชากรที่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย จะรอดชีวิตและสืบพันธุ์
- เวลาผ่านไป Genetic composition ของประชากรที่เปลี่ยนแบบ (variant) ง่าย จะแทนที่ variant ที่เปลี่ยนยาก
- เนื่องจากเงื่อนไขนิเวศของโลกเปลี่ยน ประชากรจึงมีลักษณะปรับเปลี่ยน (Adaptive features) ต่างจากประชากรบรรพบุรุษ
- การสะสม variations หลายๆ รุ่น ก็คือ Evolution

3



4

Population Genetics

- ศึกษา Frequency ของ Alleles & Genotypes ใน populations หรือ ศึกษา Genetic Structure
- Genetic makeup ของ population ที่เปลี่ยนไป ก็คือ Microevolution หรือ

Evolution ที่เกิดในระดับที่เล็กที่สุด

5

Theory of Population Genetics

- ความสัมพันธ์ระหว่าง การเปลี่ยน Allele frequency กับ Genotype frequency ภายใต้เงื่อนไข Random mating ซึ่งก็คือ

"Hardy-Weinberg Principle of Genetic Equilibrium"

- Hardy-Weinberg Principle ใช้ได้กับ
  - locus ที่มี 2 alleles
  - locus ที่มี multiple alleles
  - X-linked locus

6

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Genetic Variation

- ความแตกต่างในการจับคู่ (combination) ของ alleles ที่มีใน individuals ทั้งหมดของ population หรือใน gene pool ของ population ความแตกต่างของ gene / allele frequency ทำให้เกิด variation ใน characters ของ population
  - Morphology รูปร่างลักษณะ
  - Physiology หน้าที่การทำงานของสรีระ
  - Behavior นิสัย พฤติกรรม
- ⇒Raw material of evolution

7

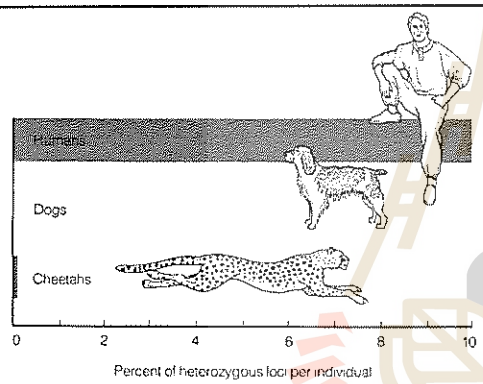
- ลักษณะ (trait) ระหว่าง individuals จึงไม่เหมือนกัน
- Genetic variation ระหว่าง species ดูจาก frequency ของ Heterozygosity - 2 alleles ที่ไม่เหมือนกัน เช่น

Cheetahs - 100,000 genes มี variation 0.067 %

Dogs - 100,000 genes มี variation 5 %

Human - 100,000 genes มี variation 10 %

8



9

Genetic frequencies

1. Phenotype frequency
2. Genotype frequency
3. Allele frequency / gene frequency

10

Genotype frequency

- Genotype frequency ของ gene ใดๆใน population รวมกันเป็น 1

$AA + Aa + aa = 1$

- การกระจายของ Genotype เป็น binomial

$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$

เมื่อ p = frequency of allele A

q = frequency of allele a

11

Allele frequency หรือ Gene frequency

- แตกต่างกัน แล้วแต่เผ่าพันธุ์
- Gene บน locus ใดๆ อาจเป็น A หรือ a
- สัดส่วนของ alleles A และ a รวมกันเป็น 1

$p + q = 1$

$p + q = p^2 + 2pq + q^2 = 1$

ถ้า p = q โอกาสสูญพันธุ์น้อย

ถ้า allele คงที่ - No Evolution

ถ้า allele เปลี่ยน - Evolution

12

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Genetic Equilibrium

- In the absence of any outside forces, the frequency of each allele in a population will not change as generations pass.
- กรณีที่ไม่มีแรงกระทบใดๆ จากภายนอก Frequency ของ แต่ละ Allele ใน population ใดๆ จะไม่เปลี่ยนแปลง แม้ หลาย generation ผ่านไป

13

The Hardy-Weinberg Principle of Genetic Equilibrium

- G.H. Hardy เป็น Mathematician, 1908
  - F_2 Phenotype ratio จะเท่ากับ 3 : 1 ได้
  - เมื่อ frequency ของ dominant allele และ frequency ของ recessive allele ต้องเท่ากับ 0.5
- Wilhelm Weinberg เป็น Physician, 1908
- ประยุกต์ Mendelian principle กับคน ได้ผลวิเคราะห์เหมือน Hardy

14

Hardy-Weinberg Principle (ต่อ)

- ภายใต้ assumption :
- population สมาชิกของ population มี random mating ในการผลิตรุ่นต่อไป
- assumption นี้สามารถใช้ Alleles ใน population คาดคะเน หา frequency ของ genotypes ใน population นั้นได้
- Relationship ระหว่าง genotype frequency และ allele frequency จะคงที่ตราบเท่าที่ population มี random mating

15

- สมมุติใน population มี segregation ของ gene 1 คู่ A และ a
- Frequency ของ A = p
- Frequency ของ A = q
  - Probability ที่จะผลิต zygote AA = $p \times p = p^2$
  - Probability ที่จะผลิต zygote aa = $q \times q = q^2$
  - Probability ที่จะผลิต zygote Aa = $p \times q = 2pq$ (เหตุการณ์ 2 ครั้ง)
  - f ของ AA, Aa, และ aa หาได้จาก p^2, 2pq และ q^2 ตามลำดับ

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

16

- Hardy-Weinberg genotype frequencies ซึ่งคือ p^2, 2pq และ q^2 บางครั้งเรียกว่า Equilibrium of Genotype Frequencies

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

$$p + q = 1$$

17

ตัวอย่าง Hypothetical population หนึ่ง :

1000 คน มีลักษณะแยกเป็น AA = 490, Aa = 420 และ aa = 90

Allele frequency:

- frequency ของ A = (2 x 490 + 420) / 2000 = 0.70 = p
- frequency ของ a = (2 x 90 + 420) / 2000 = 0.30 = q
- p + q = 0.70 + 0.30 = 1

Genotype frequency:

- AA : p^2 = 0.49
- Aa : 2pq = 0.42
- aa : q^2 = 0.09

18

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- ประชากรจริง จะพบ Genotype เป็น Hardy-Weinberg frequency หรือใกล้เคียง เช่น
- MN blood types ของประชากร คน

Genotype	L^ML^M	L^ML^N	L^NL^N	Total
Observed no.	1787	3039	1303	6129
Frequency of L^M	= (2 x 1787 + 3039) / 12258 = 0.5395 = p			
Frequency of L^N	= (2 x 1303 + 3039) / 12258 = 0.4605 = q			
Hardy-Weinberg genotype frequency	p^2 = 0.2911	2pq = 0.4968	q^2 = 0.2121	
Hardy-Weinberg genotype no. (predict)	1784.2	3044.8	1300	

19

- Chromosome rearrangement of *Drosophila tropicalis* : A และ D

Genotype	AA	AD	DD	Total
Observation no.	3	134	3	140
Frequency of A	= (2 x3 + 134) / 280 = 0.5 = p			
Frequency of D	= (2 x 3 + 134) / 280 = 0.5 = q			
Hardy-Weinberg genotype frequency	p^2 = 0.25	2pq = 0.50	q^2 = 0.25	
Hardy-Weinberg genotype no. (predict)	35	70	35	

แสดงว่า heterozygous (AD) มีโอกาสมากที่จะ survive เป็น larva และ natural selection ได้เปลี่ยน frequency ของ genotypes ระหว่างพัฒนาการของตัวอ่อน

20

ABO human blood groups ของประชากร 500 คน

- 3 alleles: I^A, I^B และ I^O หรือ A, B, และ O
- 4 phenotypes: A, B, AB และ O
- 6 genotypes: AA, AO, BB, BO, AB, และ OO

A : 195 B : 70 AB : 25 O : 210

p = A frequency, q = B frequency, r = O frequency

Genotype frequency = $(p + q + r)^2$

$p^2 + 2pr + r^2 + 2pq + 2qr + q^2 = 1$

21

$p^2 + 2pr + r^2 + 2pq + 2qr + q^2$

Genotyps	AA AO	OO	AB	BB BO
Phenotypes	A	O	AB	B
Phenotype frequencies	195/500 = 0.39	210/500 = 0.42	25/500 = 0.05	70/500 = 0.14

O allele fr. $= r^2 = 0.42$ --> $r = \sqrt{0.42} = 0.65$

fr. ของ A และ O phenotypes $= p^2 + 2pr + r^2 = (p + r)^2$

$(p + r)^2 = 0.39 + 0.42 = 0.81$

$p + r = 0.9$ --> $p = 0.9 - 0.65 = 0.25$

22

- เนื่องจาก $p + q + r = 1$ ----> $q = 1 - (0.25 + 0.65) = 0.1$
- Hardy-Weinberg genotype frequencies หาได้จาก allele frequencies ดังนี้

AA: $p^2 = (0.25^2)(500 = 30$ AA
AO: $2pr = (2)(0.25)(0.65)(500) = 165$ AO } 195 A
AB: $2pq = (2)(0.25)(0.10)(500) = 25$ AB
OO: $r^2 = (0.65^2)(500) = 210$ OO
BO: $2qr = (2)(0.10)(0.65)(500) = 65$ BO } 70 B
BB: $q^2 = (0.10^2)(500) = 5$ BB

แสดง population อยู่ใน equilibrium

23

Hardy-Weinberg Equilibrium หรือ Genetic Equilibrium

Frequency ของ population' gene pool คงที่ โดย 5 เงื่อนไขในอุดมคติ (ideal conditions)

1. Very large population : ไม่มี effects จาก random changes ใน allele frequency
2. Isolation จาก population อื่น : ไม่มี gene flow หรือ migration --> no new alleles in หรือ no existing alleles leave population
3. No mutation : ไม่ การเปลี่ยนให้ได้ allele ใน population
4. Random mating ของ genotypes
5. No natural selection : Equal chance ที่จะ survival และถ่ายทอดทุก genetic trait และ ทุกคน เท่ากัน

24

Microevolution

Generation-to-generation change in a population's allele frequency or genotype frequency

25

Factors สาเหตุเปลี่ยน Gene Frequency in Population หรือ สาเหตุของ Microevolution

1. Mutation
2. Gene Flow
3. Genetic Drift
4. Natural Selection
5. Nonrandom mating

26

1. Mutation

การกลายพันธุ์ หรือ การผ่าเหล่า

เปลี่ยน allele หนึ่ง ไปเป็น allele ใหม่

27

Mutation

- การเปลี่ยนใน DNA ที่ถ่ายทอดได้
  - เปลี่ยน การแสดงออกของ gene --> เปลี่ยน phenotype
  - เพิ่ม หรือ ลด allele (chromosome rearrangement) ใน gene pool ของ ประชากร ทำให้มีผลต่อ Evolution
- Mutation เกิดได้เองในทุกเซลล์ของร่างกาย
- Mutation ที่เกิดใน germ cells ทำให้เกิด Evolutionary change เพราะ gametes ถ่ายทอด mutation นั้นไปให้รุ่นต่อไป
- โอกาส 1 ใน ล้าน ที่จะได้ gene ใหม่

28

- เป็นการเกิด allele ใหม่ใน gene pool กลายเป็น evolutionary force ผลักดันให้เกิด Evolution
- เมื่อเกิด mutation จะให้ผลแตกต่างกันแล้วแต่ environment
  - เสียหาย (harmful mutation)
  - เป็นประโยชน์ (beneficial mutation)
  - เป็นกลาง (neutral mutation)
- เช่น แมลงต่อต้านสารฆ่าแมลง (pesticide) เช่น DDT ทำให้เกิด mutation ได้ pesticide resistant genes

29

- Harmful mutation:
  - Gene(s) บางอย่างจะถูกเอาออกจาก gene pool เพราะทำให้แมลงตาย หรือตัวอ่อนไม่พัฒนา
  - Mutated gene(s) บางอย่างจะถูกปกปิดด้วย dominant allele
- Beneficial mutation / Neutral mutation
  - Resistant ต่อ DDT เพราะ ไม่เคยมี resistant allele มาก่อนใน population ของแมลง

30

2. Gene Flow

การเปลี่ยน allele frequencies
เนื่องจาก การเคลื่อนย้าย เข้า-ออก ของ
สมาชิก

31

Gene flow

เป็นการไหลของ gene โดยทางกายภาพ

- immigration
  - เพิ่ม alleles ใหม่
  - เปลี่ยน/เพิ่ม allele frequency เดิม
- emigration
  - เอา alleles ออก
  - เปลี่ยน/ลด allele frequency เดิม

32

ต.ย. : การแพร่กระจายของ Resistant gene ต่อแมลง

- แมลงที่มี resistance เคลื่อนย้ายจาก population หนึ่ง ไปอยู่ใน population ใหม่
  - ทำให้เกิดการกระจายของ resistant allele ไปยังพื้นที่ภูมิศาสตร์ใหม่
  - เป็นการเพิ่ม allele ใหม่เข้า gene pool ของ population ใหม่
  - เกิด interbreeding กับสมาชิกใน population ใหม่
  - ทั้งสองอย่างทำให้ allele frequency ของ population เปลี่ยน

33

ต.ย. : การกระจายของโรค Cystic Fibrosis ใน USA

- เมือกในระบบหายใจมาก ขัดขวางการเคลื่อนที่ของน้ำ ทำให้น้ำในร่างกายลดลง
- Allele ของ cystic fibrosis พบว่ามาจากคนเพียงคนเดียวจากยุโรปเหนือ
- กระจายอย่างรวดเร็วใน Caucasian population ในช่วงกว่า 100 ปีที่ผ่านมา ทำให้เปลี่ยน genetic composition ของ human population ใน U.S.A.
- ข้อดีของ Cystic fibrosis คือ มีความต้านทานต่อ cholera ที่ทำให้เกิดท้องเสีย

34

- อิทธิพล Gene flow สำคัญ 3 อย่าง

1. ช่วยกระจาย alleles ที่ดีกว่าให้ทั่วถึงใน species
2. ช่วยรักษา Organisms ทั้งหมดให้คงไว้ในพื้นที่กว้างมาก ให้คงไว้เป็น species เดียวกัน ป้องกัน / เปลี่ยน Allele frequency ระหว่างของ Species เดียวกันไม่มี Species ใหม่
3. migration ของกลุ่มขนาดเล็กเกิด Isolation evolution ได้

35

3. Genetic Drift

การเปลี่ยน Allele frequency
อย่างคาดหมายไม่ได้
เนื่องจากประชากรขนาดเล็ก

36

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Genetic drift หรือ Sewall Wright Effect

- ภัยธรรมชาติทำให้ลดขนาดประชากรลง เช่น ภูมิอากาศ, โรคระบาด หรือถูกล่าจำนวนมาก
- สมาชิกกลุ่มนี้ไม่สืบพันธุ์มาหลาย generations บางส่วนเจ็บป่วย และตายไป หรือ ประชากรขนาดเล็กเสมอ
- Inbreeding ในกลุ่มสมาชิก
- ขาดการติดต่อกับกลุ่มเดิม
- สะสมความแตกต่างที่มีให้แยกออกจากกัน

37

Genetic Drift เกิดจาก 2 กรณี

3.1 Founder effects

3.2 Bottlenecks

38

3.1 Founder effects

- อิทธิพลของผู้ก่อตั้งต่อ population ขนาดเล็กที่แยกออกไปตั้ง population ใหม่ใน habitat ใหม่
- เริ่มตั้งประชากรใหม่ด้วยสมาชิกจำนวนน้อย
  - Gene pool มาจาก original founders
  - Inbreeding
  - Genes ใน founders มีอิทธิพลต่อ gene pool ของรุ่นต่อๆมา
  - Genes ผิดปกติจะปรากฏ จนกว่า population ใหญ่มากพอ genes ผิดปกติจึงจะลดลง
- กรณีเด่นชัดคือ การตั้ง population ใหม่โดย single pregnant animal หรือ single plant seed

39

ตัวอย่าง Founder effect

Amish ชนกลุ่มน้อยใน U.S.A. 1720 ย้ายจาก Switzerland มา 30 คนสมาชิกคนหนึ่งนำ 1 Recessive allele ลักษณะ Dwarfism และ Polydactylism (Ellis-van Creveld syndrome)

ตัวอย่าง Bottlenecks

- Elephant seals ขั้วโลกเหนือ ก่อน 1900 ถูกล่าเป็นอาหารจนเหลือ 30,000 ตัว
  - สูญเสีย genes จำนวนมาก
  - 24 genes ไม่มี variation เลย

40

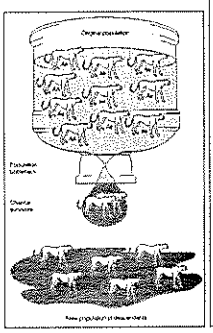
3.2 Bottlenecks

ภัยธรรมชาติ ทำให้มีประชากรจำนวนน้อยรอดชีวิต หรือรอดคอขวด (bottlenecks)

- ผู้รอดชีวิตเริ่มตั้งประชากรใหม่จากสมาชิกจำนวนน้อย
- Gene pool จึงมาจากสมาชิกที่รอด
- Inbreeding
- Gene ที่รอดมีอิทธิพลต่อ gene pool ของรุ่นต่อๆมา

41

ตัวอย่าง Bottlenecks



เสือ Cheetah

10,000 ปีมาแล้วเกิด bottleneck

- ปัจจุบัน inbreeding, ไวต่อโรค, และอัตราการสืบพันธุ์ต่ำ (มีโอกาสสูญพันธุ์ - endangered species)

Elephant seals ขั้วโลกเหนือ

ก่อน 1900 ถูกล่าเป็นอาหารจน

- เหลือ 30,000 ตัว ทำให้สูญเสีย genes จำนวนมาก ศึกษาพบ 24 genes และไม่มี variation เลย

42

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลของ Genetic drift

- เกิด Genetic divergence ระหว่าง populations
- ทำให้ allele หายไปจากประชากร
- ผลโดยรวมจะกระทบต่อ ลักษณะ(phenotype) ที่ gene นี้นำอยู่ ตราบเท่าที่ประชากรขนาดเล็ก
- ถ้าประชากรขนาดเล็ก (มาก) gene frequency ไม่เปลี่ยน ในที่สุดเกิด Genetic equilibrium

43

4. Natural Selection

สิ่งมีชีวิตถูกเลือก

โดย Environmental pressures หรือ

โดย chances ที่จะได้เป็น parents ของรุ่นต่อไป

44

The Theory of Natural Selection

45

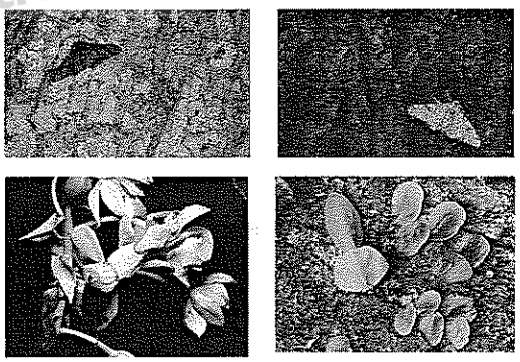
The Theory of Natural Selection

- เป็นแรงหลักที่เปลี่ยน allele frequencyและ ทำให้เกิด evolutionary change
- Genetic composition ของ population เปลี่ยนเมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยน นั่นคือ สิ่งมีชีวิตผลิตลูกหลานมากเมื่อสิ่งแวดล้อมสนับสนุน (Fitness = จำนวนเหลือของลูกของ genotype ใดๆ หรือ Fitness หมายถึง ความสามารถของ phenotype ที่จะให้ genes แก่รุ่นต่อไป)
- ผลของ natural selection คือ Adaptation ของประชากรต่อสิ่งแวดล้อม = Mechanism of Adaptive Evolution

46

- Darwin พบ natural selection 2 แบบ
  - Physical environment: organism ต่อสู้กับสภาพแวดล้อมที่ไม่ดีโดยขึ้นกับ population --> environment เป็นตัวตัดสิน survival และ reproduction (Frequency-independent fitness) เช่น พืชในทะเลทราย
  - Competition: การแข่งขันระหว่าง frequency ของ phenotype จะมีผลต่อส่วนประกอบของ population (Frequency-dependent fitness) เช่น mimicry ของผีเสื้อต่างชนิดกัน (viceroy mimics monarch) เพื่อป้องกันการกินของนก และ camouflage ของผีเสื้อ *Biston betularia* ที่มี industrial melanism

47



48

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Genetic variation เป็น substrate สำหรับ Natural selection

- Variation ระหว่าง populations:
  - Variation ระหว่าง populations อาจไม่ชัดเจน โดยเฉพาะ human populations
  - เป็นผลจาก geographical variation
- Variation ภายใน population: ส่วนมากเป็น variation เชิงปริมาณ (quantitative) ที่ควบคุมด้วยหลาย genes
  - ลักษณะแตกต่างมากได้จากผลการเพิ่มการแสดงออกของ genes ทำให้เกิด polymorphism

49

อิทธิพลของ Natural Selection

- ผลต่อ genetic composition ของ population โดยอ้อมจาก phenotype ซึ่งเป็นผลผลิต ของ genes เหล่านั้น --> phenotype นั้น รอดชีวิต ตาย สืบพันธุ์ หรือ ไม่มีลูกหลาน ---> นั่นคือ phenotype กระทบต่อ genotype
- ไม่ทำให้เกิด genotype & phenotype ใหม่
  - ไม่เปลี่ยน gene frequency
  - ไม่มี genetic divergence ระหว่าง population

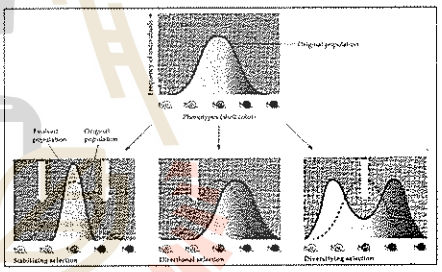
50

Types ของ Natural selection

1) Stabilizing selection : เลือกอนุรักษ์ลักษณะที่ร่วมส่วนกลาง - optimal phenotypes ซึ่งเป็น heterozygote เช่น เด็กแรกเกิดน้ำหนัก 7 - 8 - 9 ปอนด์, sickle cell anemia Hb^A/Hb^A - Hb^A/Hb^S - Hb^S/Hb^S
2) Directional selection : เลือก phenotype ข้างใดข้างหนึ่งตามสิ่งแวดล้อม --> เปลี่ยน phenotypes เช่น camouflage ของผีเสื้อ lichen, brain ขนาดใหญ่, พืชรากมาก
3) Disruptive selection : ผลิต phenotype แบบต่างๆ จากเดิม phenotype ช่วงกลางค่อยเลือนหายไป เช่น ความสูง

51

Natural selection & Adaptation



Modes of Natural selection

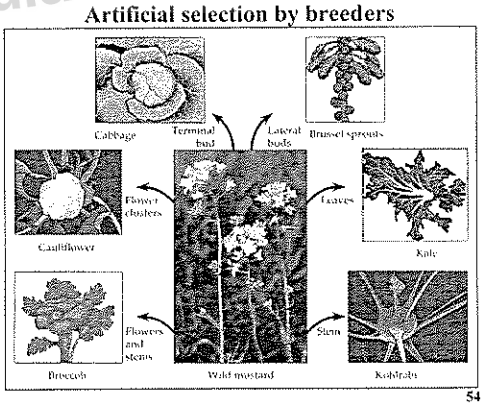
52

Balancing Selection : Maintaining Genetic Variation

- Genetic variation ถูกรักษาไว้ต่อต้าน natural selection หรือ การเสีย variant alleles
- ผลให้เกิด Balanced polymorphism
- มี 2 แบบ
  1. Heterozygote advantage : hybrid vigor เช่น heterozygote ของ sickle cell allele, sweet corn
  2. Frequency-dependent selection : fitness ของ genotype ในประชากรเปลี่ยนตาม frequency เช่น สิ่งมีชีวิตมี phenotype ที่ less common จะมีโอกาสรอดเพื่อสืบพันธุ์มากกว่า เช่น หอยที่ลักษณะไม่เด่น จะถูกกินน้อย

53

Artificial selection by breeders



54

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. Nonrandom Mating

สิ่งมีชีวิตแต่ละตัวเลือกผสมพันธุ์

บนพื้นฐานของ Phenotypes

55

Nonrandom Mating

- เกิดจาก ปัจจัยหลายอย่าง ส่วนมากเกิดจาก
  - ความชอบในการเลือกคู่
  - population ขนาดเล็ก ไม่มีโอกาสอื่น จึงต้องเลือก mate กับญาติใกล้ชิด

5.1 Sexual selection:

- บางลักษณะเพิ่มโอกาสในการสืบพันธุ์
- เช่น หางของนกยูง เขาขนาดใหญ่ของกวาง แม้ว่าจะเป็นจุดด้อยในการหาอาหาร แต่ก็สามารถถ่ายทอด gene ให้รุ่นต่อไปได้

56

- Sexual selection ในสัตว์ มักนำไปสู่การเกิด Sexual dimorphism ทำให้แตกต่างระหว่าง male กับ female
- Female's reproductive success มีความจำกัดที่จำนวนของไข่ ที่จะผลิตได้ตลอดชีวิต
- Male's reproductive success มีความจำกัดที่จำนวนของ female ที่จะสามารถผสมได้
- female จึงเป็นผู้เลือก และ male ก็พัฒนาลักษณะต่อสู้และข่มขู่
- Natural selection จึงมักเลือกลักษณะของ male ที่ female ชอบ

57

Sexual selection

58

5.2 Inbreeding:

- ส่วนมาก allele ไม่ดีที่เกิดจาก mutation จะเป็น recessive และมีจำนวนน้อยใน population
- Organism ที่มาจากบรรพบุรุษร่วมกัน โอกาสมากที่จะมี recessive allele เดียวกัน
- ถ้าผสมกันเอง Inbreeding โอกาสผลิตลูกที่มี phenotype ผิดปกติยิ่งมาก
- ลูกจะเป็นหมัน และตาย ทำให้ genes ทั้งหมดของลูกหายไปจาก gene pool

59

- Inbreeding ทำให้เพิ่มโอกาสตายจากพันธุกรรมบกพร่อง ทำให้ population เสีย variability
- เมื่อ environment เปลี่ยน population ไม่มี variability เพียงพอที่จะ adapt ทำให้สูญพันธุ์
- population เล็กยิ่งถูกกระทบมาก เช่น
  - เสือ cheetah ปัจจุบันเหลือ 20,000 ตัว
  - ลูกเสือ cheetah ไวต่อโรค ตัวผู้ผลิต sperm น้อยและรูปร่างผิดปกติ
  - พบว่า genes สำหรับ proteins 50 ชนิดจากเลือด ไม่มี variation เป็น homozygous ทั้งหมด
  - genes เหมือนกันมากจนไม่มีการปฏิเสธต่อการถ่ายปลูกเนื้อเยื่อ

60

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Molecular Evolution

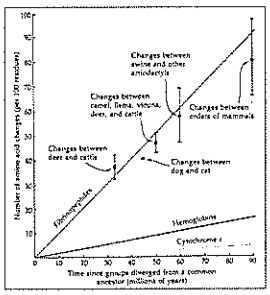
61

Molecular Clocks

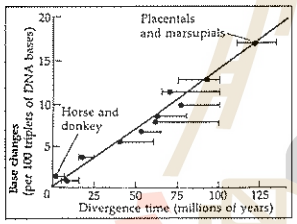
- Characteristics ของ organism ต่างกันที่ส่วนของ พันธุกรรม
  - nucleic sequences ของ DNA
  - amino acid sequences ของ proteins
- ถ้ามี common ancestor แสดง homologous molecular information
- DNA และ proteins สะสมในอัตราคงที่ จนถึงช่วงเปลี่ยนชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น คนกับ apes ใช้เวลา 5 ล้านปี
- เวลาที่ molecular genetics เปลี่ยนเรียกว่า Molecular clocks

62

Molecular Clocks in Evolution



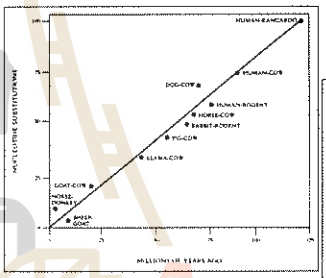
Amino acid change



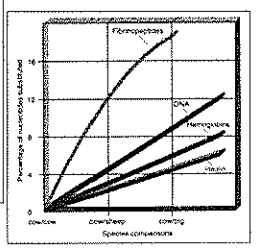
DNA base change

63

Nucleotide substitution ระหว่าง spp



Nucleotide substitution กับ เวลา



64

Evolution of α-globin polypeptide of hemoglobin

No. amino acid (different from human)	Organism	Years (million)
79	Shark	440
68	Carp	400
62	Newt	350
27	Kangaroo	135
17	Cow	70
0	Human	0.4

65

เมื่อขึ้นชื่อว่าเป็น "ครู"

การสอน ไม่เรียวราญ
ดุด่า เด็กรุกชน
สั่งสอน พูดดีดี
ใหม่แปลก แทรกเอาไว้
จู้จี้ สาวพัด
ผิดหวัง ฤาขื่นขม
เกรี้ยวกราด ว้าด วิ้ว โว้ย
เบื่อวิ ธีการเรียน
พูดมา ถูกหรือไม่
ขึ้นชื่อ ว่าเป็นครู

นักเรียนนั้น รำคาญสิ้น
นั่นแหละจน ทางแก้ไข
นักเรียนนี้ ย่อมเข้าใจ
ครูแจ่มใส นักเรียนชม
นั่นจัดว่า "เจ้าอารมณ์"
จากบ้านระ บายนักเรียน
...เด็กโอดโอย ไม่ใคร่เรียน
วิธีสอน ของคุณครู
จงทำใจ ลองคิดดู
อย่าให้ใคร ต้องได้สอน....
อัจฉริยะ สะท้านจักรวาล

66

ความรู้คู่คุณธรรม

เมื่อความรู้ ยอดเยี่ยม สูงเทียมเมฆ
แต่คุณธรรม ต่ำเลว ยอดหญ้านั่น
อาจเสกสร้าง มิจฉา สารพัน
เพราะจิตฉัน ไร้อาย ในโลกา

แม้คุณธรรม สูงเยี่ยม ฉีงเทียมเมฆ
แต่ความรู้ ต่ำเลว เพียงยอดหญ้า
ย่อมเป็นเหยื่อ ทรชน จนอุรา
ด้วยปัญญา อ่อนด้อย น่าน้อยใจ

หากความรู้ สูงล้ำ คุณธรรมเกิศ
แสนประเสริฐ ถอปริศจ วินิจฉัย
จะพัฒนา ประชาราษฎร์ ทั้งชาติไทย
ต้องฝึกให้ ความรู้ คู่คุณธรรม

ศาสตราจารย์อำไพ คุ่งวิศกุล

ฉลาดมาก วินาศมาก
ฉลาดลึก วินาศลึก

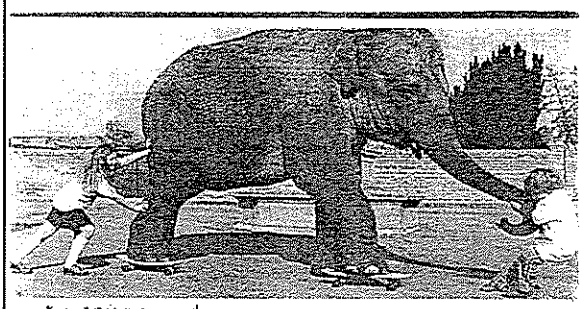
คนฉลาด
ถ้าควบคุมความฉลาดไว้ไม่ได้
ก็กลายเป็นความวินาศ

ยิ่งฉลาดมาก ยิ่งต้องระวังตัว
ถ้าฉลาดมาก ก็วินาศมาก
ฉลาดลึก ก็วินาศลึก

ยิ่งฉลาด
ยิ่งหาทางออก(แก้ตัว)ให้กิเลสแก่ง

พุทธทาสภิกขุ

67



งานหนัก ! - ไม่ใช่กำลังแต่สมุดนะนี่ย

68

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม :

Bohinski, R. C. 1976. *Modern Concepts in Biochemistry*. 2nd . Allyn and Bacon, Inc., Boston. 594 pp.

Brown, T.L. 1968. *General Chemistry*. 2nd. Charles Merrill Publishing Company, Columbus Ohio. 663 pp.

Brown, T.A. 1992. *Genetics : A Molecular Approach*. 2nd. Chapman & Hall.London.465 pp.

Campbell, N.A., Reece, J.B. and Mitchell, L.G. 1999. *Biology*. 4th ed. Addison-Wesley. Menlo Park, California. 1175 pp.

Darnell, J., Lodish, H., and Baltimore, D.1990. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Ink., New York. 1105 pp.

De Robertis, E.D.P. and DeRobertis, E.M.F. 1980. *Cell and Molecular Biology*. Saunders College, Philadelphia. 647 pp.

Karp. G.1999. *Cell and Molecular Biology : Concepts and Experiments*. 2 nd. John Wiley & Sons, Inc., New York. 816 pp.

Lehninger, A.L. 1982. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc., New York. 1011 pp.

Masteron, W.L. and Slowinski, E.J. 1977. *Chemical Principles*. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 636 pp.

Postlethwait, J.H. and Hopson, J.L. 1989. *The Nature of Life*. McGraw-Hill Publishing Company, New York. 820 pp.

Purves, W.K. and Orians, G.H. 1987. *Life: The Science of Biology*. Sinauer associates Inc. Sunderland. 1271 pp.

Ritter, P. 1996. *Biochemistry: A Foundation*. Brooks/Cole Publishing Company, Washington. 822 pp.

Rothwell, N.V. 1993. *Understanding Genetics : A Molecular Approach*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 656 pp.

Snustad, D.P., Simmons, M.J., and Jenkins. 1997. *Principles of Genetics*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 829 pp.

Starr, C. and Taggart, R. 1995. *Biology: The Unity and Diversity of Life*. Wadsworth Publishing Company, Belmont. 898 pp.

Wessells, N.K. and Hopson, J.L. 1988. *Biology*. Random House, New York. 1251 pp.

Weaver, R.F. and Hedrich, P.W. 1992. *Genetics*.WCB Wm.C. Brown Puvlishers. Dubuque, IA. 649 pp.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี