Molecular Biology

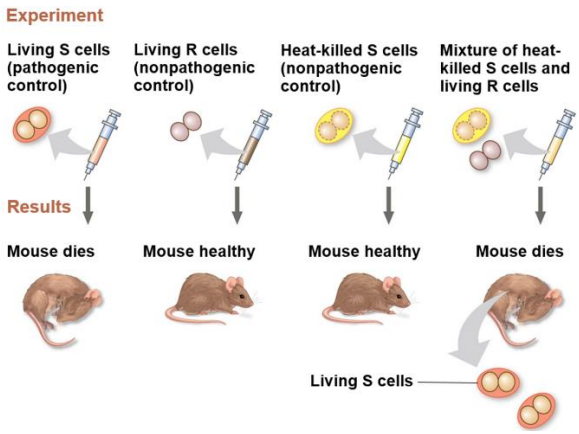
การค้นพบ DNA

หลังจากกลุ่มของ T.H. Morgan ค้นพบว่ายีนอยู่บนโครโมโซม ส่นประกอบสำคัญหลักที่อยู่บนโครโมโซม คือ โปรตีนและดีเอ็นเอกลายเป็นที่น่าสนใจว่าอะไรคือสารพันธุกรรม

การค้นพบสารพันธุกรรมได้รับประโยชน์อย่างมากจากการใช้ไวรัส

Frederik Griffith ทดลองในปี 1928 โดยใช้แบคทีเรียสองสายพันธุ์ แบบที่ก่อให้เกิดอันตรายและไม่ก่อให้เกิดอันตราย เขาฉีดแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ในหนูอย่างละกลุ่ม หนูที่ถูกฉีดด้วยแบคที่เรียที่ก่อให้เกิดอันตรายตาย ส่วนอีกกลุ่มไม่ตาย จากนั้นเขานำแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายไปทำให้ตายโดยใช้ความร้อนแล้วฉีดในหนู ปรากฏว่าหนูไม่ตาย หนูกลุ่มสุดท้ายถูกฉีดด้วยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่ทำให้ตายแล้วผสมกับแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่ยังไม่ตาย ปรากฏว่าหนูตาย (รูปที่ 1)

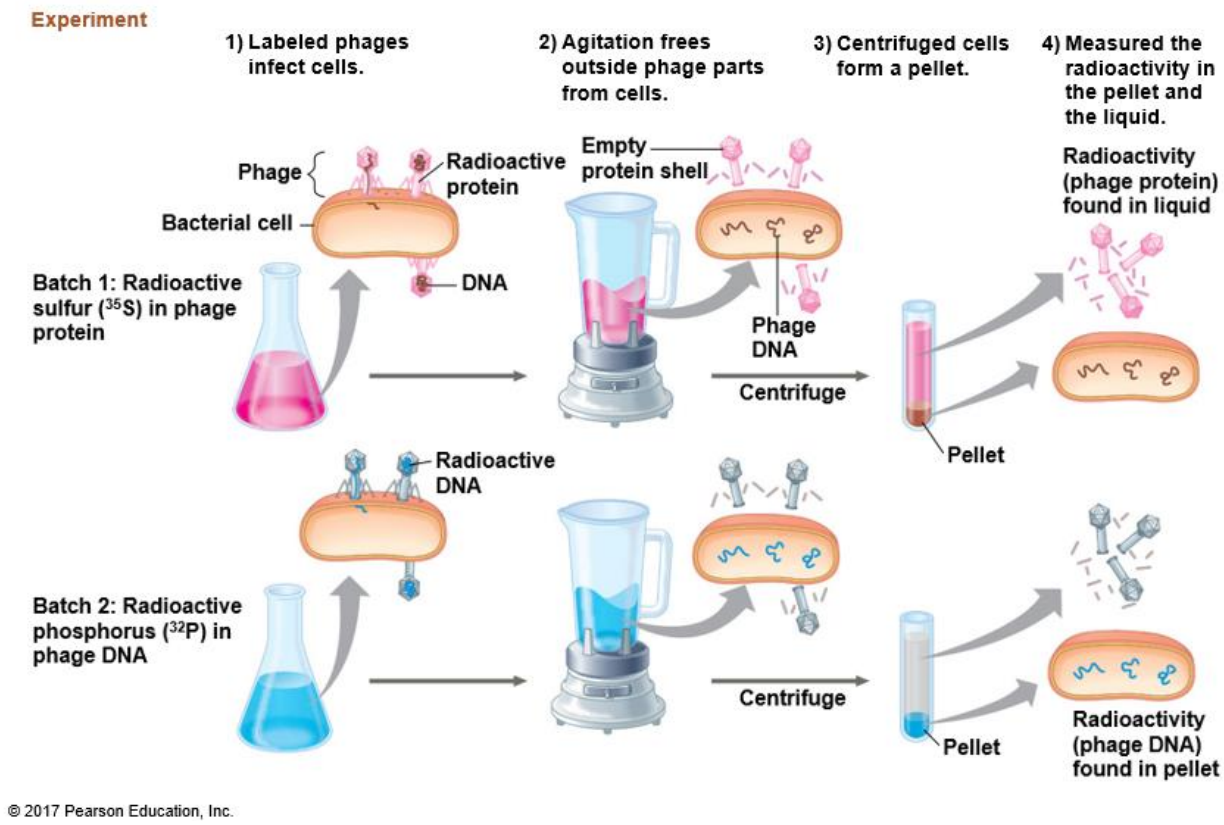
การทดลองนี้ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า Transformation ซึ่งหมายความว่าเปลี่ยนแปลงของ genotype และ phenotype ที่เกิดจากดีเอ็นเอแปลกปลอม



รูปที่ 1 การทดลองของ Griffith

จากนั้น Oswald, Maclyn, และ McCarty ค้นพบว่าสารที่ก่อให้เกิดการ transformation นั้นเกิดจากดีเอ็นเอ แต่นักวิทยาศาสตร์หลายคนยังไม่ได้เชื่อทั้งหมดเพราะข้อมูลเกี่ยวกับดีเอ็นเอในขณะนั้นมีน้อย ข้อมูลที่ได้ตามมาภายหลังได้มากจากไวรัส bacteriophage

ในปี 1952 Alfred Hershey และ Martha Chase ยืนยันว่าสารพันธุกรรมคือดีเอ็นเอ โดยใช้ bacteriophage (ในที่นี้ย่อว่าเฟจ)เขาใช้ส่วนประกอบของเฟจคือโปรตีนและดีเอ็นเอฉีดเข้าใน *E. coli* การหมุนเหวี่ยง (centrifugation) ทำให้ส่วนที่หนักกว่า เช่นแบคทีเรีย ตกลงด้านล่าง เกาะรวมกันเรียกว่า pellet ขณะที่ส่วนที่เบากว่าลอยอยู่ด้านบนซึ่งรวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบของเฟจ Hershey เมื่อวัดกัมมันตภาพรังสีพบว่าส่นด้านบนมีส่วนประกอบของ ^{35}S ในขณะที่ส่นด้านล่าง (pellet) มีส่นประกอบของ ^{32}P (รูปที่ 2) Hershey และ Chase จึงสรุปว่าดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรม ไม่ใช่โปรตีน



รูปที่ 2 การทดลองของ Hershey และ Chase

ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอเป็นพอลิเมอร์ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) ไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) และ หมู่ฟอสเฟต (phosphate group) ไนโตรจีนัสเบสมีสี่ชนิด คือ adenine (A), thymine (T), guanine (G), และ cytosine (C)

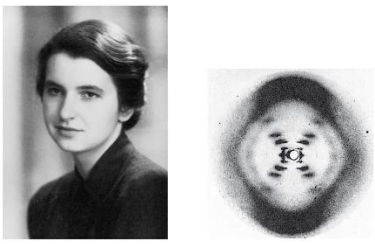
Erwin Chargaff เมื่อปี 1950 เสนอว่าส่นประกอบของดีเอ็นเอจะแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์ เขาเสนอกฎสองข้อคือ

1. ส่วนประกอบของเบสแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์
2. สัดส่วนของ A เท่ากับT และ G เท่ากับ C

โครงสร้างของดีเอ็นเอ

Maurice Wilkins และ Rosalind Franklin ใช้เทคนิค X-ray diffraction หาโครงสร้าง Franklinได้ถ่ายรูปดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้

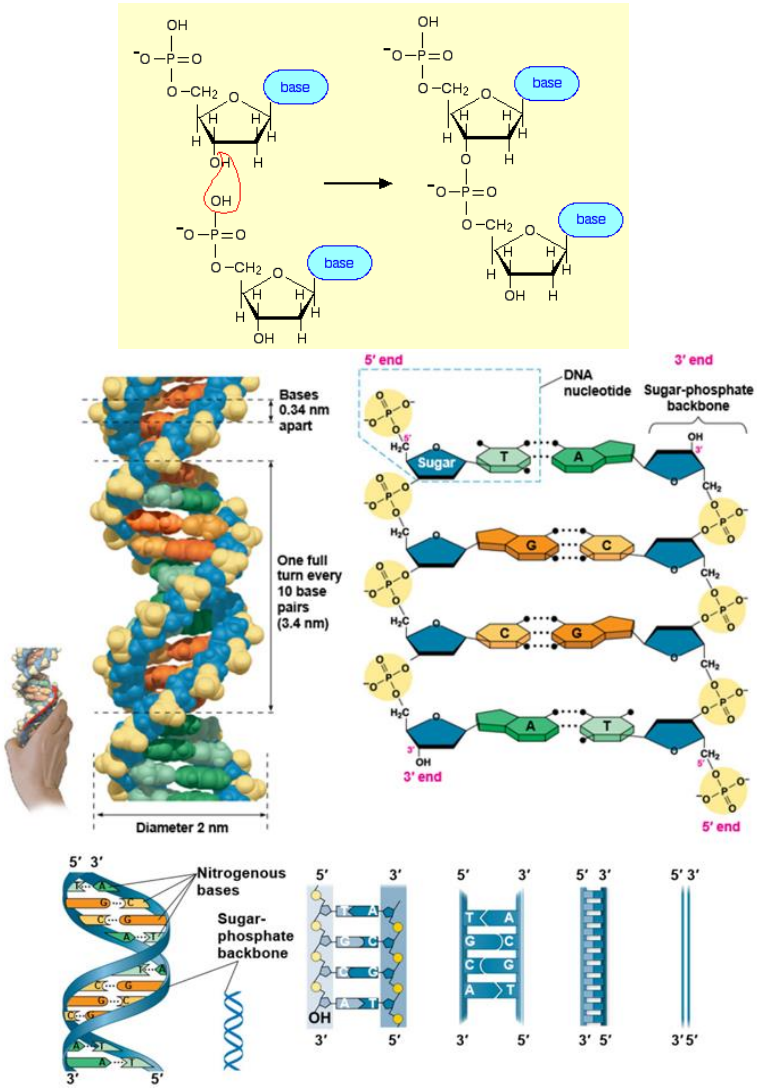
แฟรงคลิน X-ray ภาพ crystallographic ของดีเอ็นเอทำให้ Watson อนุมานว่าดีเอ็นเอเป็นขดลวด ภาพเอกซเรย์ยังช่วยให้วัตสันสามารถสรุปความกว้างของเกลียวและระยะห่างของฐานไนโตรเจนได้ รูปแบบในภาพแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลดีเอ็นเอถูกสร้างขึ้นจากสองเส้นขึ้นรูปเกลียวคู่



รูปที่ 3 Franklin และ ภาพ x-ray diffraction ของเธอ

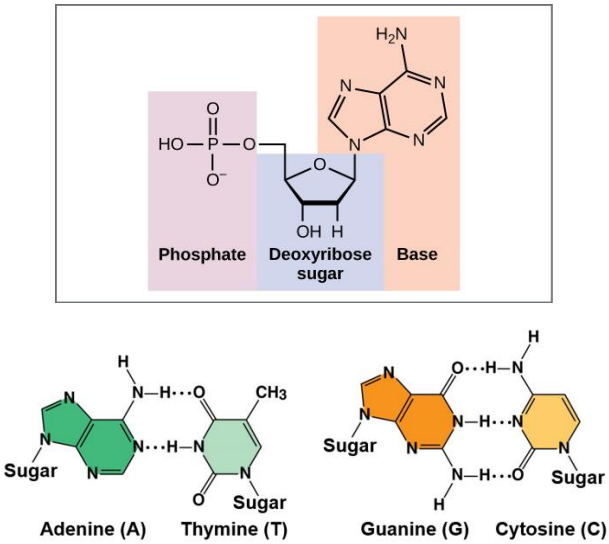
นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอเดียวกันเชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (Phosphodiester) ระหว่างคาร์บอนตัวที่สามบนน้ำตาลกับหมู่ฟอสเฟสที่เกาะที่น้ำตาลตัวที่ห้าของนิวคลีโอไทด์โมเลกุลถัดมา

เพื่อให้เข้าใจ double helix ให้นึกภาพเอามือขวาพันรอบโมเลกุลดีเอ็นเอที่แสดงในรูปโดยให้นิ้วหัวแม่มือชี้ขึ้น นึกภาพนิ้วเลื่อนไปตามด้านนอกของเกลียว มือของคุณควรเคลื่อนไปพร้อมกับเกลียวขึ้นไปในทิศทางที่นิ้วหัวแม่มือชี้



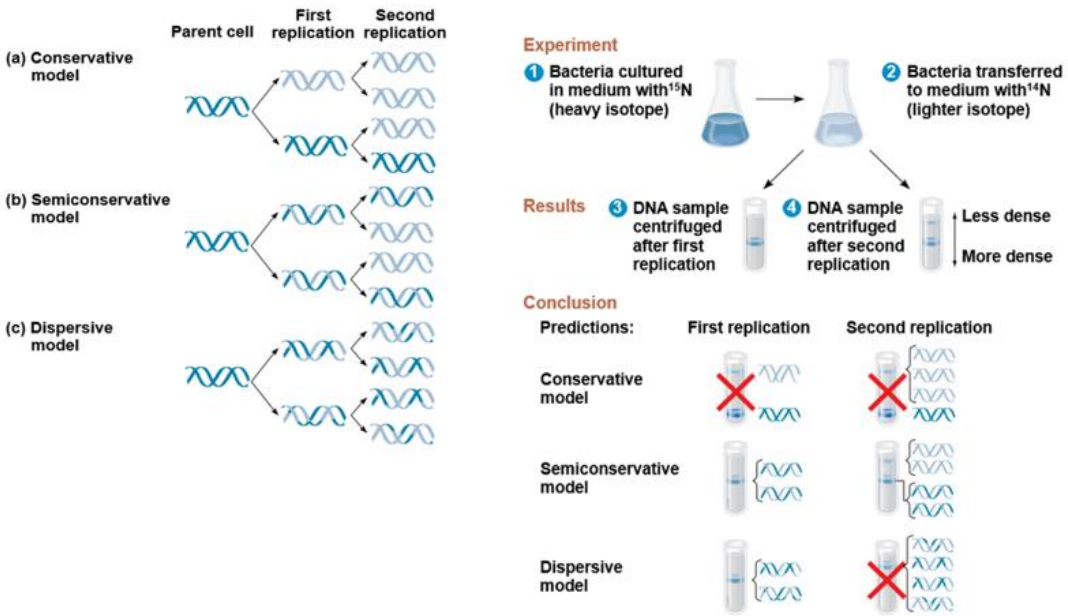
รูปที่ 4 3'-5'phosphodiester bond และโครงสร้างของดีเอ็นเอ

Watson และ Crick สร้างรูปแบบของเกลียวคู่เพื่อให้สอดคล้องกับภาพ X-ray และคุณสมบัติทางเคมีของดีเอ็นเอ แฟรงคลินได้ข้อสรุปว่ามี backbones สองสายอยู่ด้านนอก น้ำตาลฟอสเฟตกับไนโตรจีนัสเบสจับคู่ภายในโมเลกุลของ วัตสันสร้างแบบจำลองที่ backbones เป็นแบบ antiparallel (หน่วยย่อยของมันวิ่งไปในทิศทางตรงกันข้าม) เขาระบุว่า adenine (A) จับคู่กับ thymine (T) เท่านั้นและ guanine (G) จับคู่กับ cytosine (C) เท่านั้น แบบจำลองวัตสัน - คริกอธิบายกฎของ Chargaff ที่ระบุว่าในสิ่งมีชีวิตใด ๆ จำนวน A = T และจำนวน G = C



รูปที่ 5 โครงสร้างของการจับกันของเบส

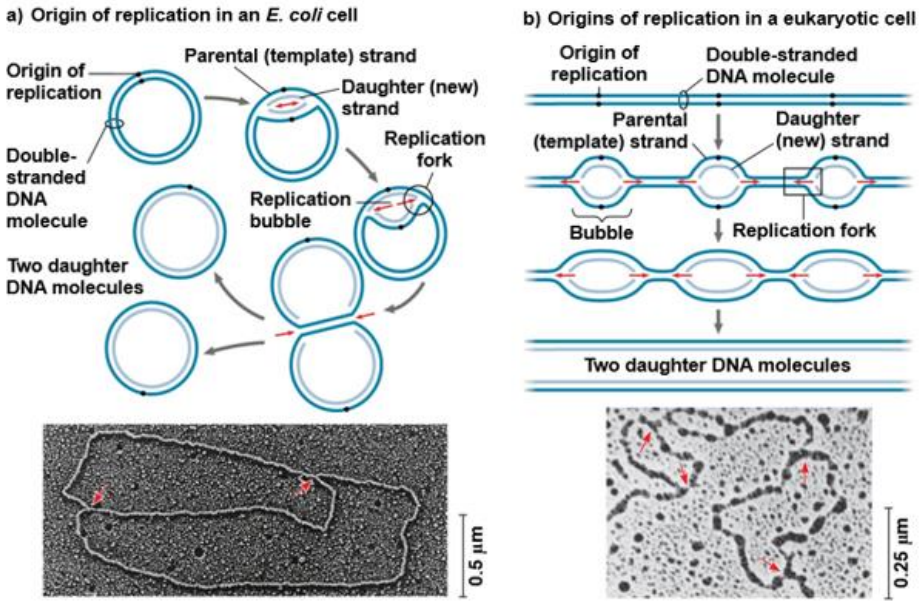
เนื่องจากทั้งสองเส้นของดีเอ็นเอจะประกอบแต่ละกลุ่มสาระการทำหน้าที่เป็นแม่แบบสำหรับการสร้างสายใหม่ในการเพิ่มจำนวน ในขณะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโมเลกุลสายเดิมจะคลายออกและสายใหม่สองเส้นถูกสร้างขึ้นตามกฎการจับคู่พื้นฐาน รูปแบบการจำลองแบบsemiconservativeของวัตสันและคริกระบุว่าโมเลกุลดีเอ็นเอใหม่แต่ละตัวจะมีสายเก่าหนึ่งเส้นและอีกหนึ่งเส้นที่สร้างขึ้นใหม่



รูปที่ 6 โมเดลของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและการทดลองของ Meselson และ Stahl

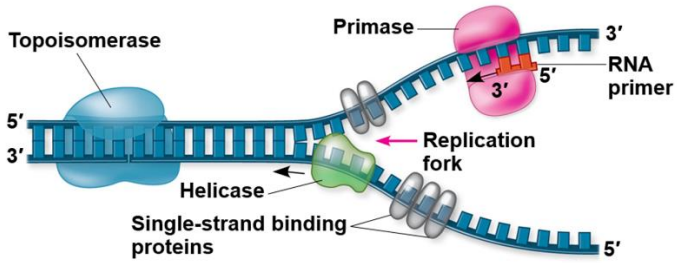
DNA replication การจำลองแบบดีเอ็นเอ

DNA replication เริ่มที่จุดเฉพาะที่เรียกว่า origin of replication สองสายดีเอ็นเอจะถูกแยกออก เปิดการจำลองแบบ “bubble” ซึ่งในโครโมโซมของพวก eukaryotic อาจมีหลายร้อยหรือหลายพัน origin of replication การเพิ่มจำนวนนี้เกิดขึ้นในทั้งสองทิศทางจากแต่ละจุดจนกว่าจะคัดลอกโมเลกุลทั้งหมด



รูปที่ 7 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอใน prokaryotes และ eukaryotes

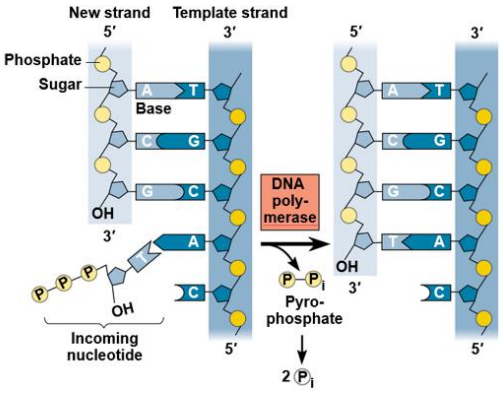
ปลายของแต่ละ replication bubble จะเรียกว่า replication fork มีลักษณะคล้ายรูปตัววาย ซึ่งเป็นบริเวณที่ดีเอ็นเอสายใหม่จะถูกสร้างขึ้น เอนไซม์ helicase มีหน้าที่คลายเกลียวดีเอ็นเอที่บริเวณreplication forkนี้ โปรตีน Single strand binding proteins จะเข้ามาจับและช่วยรักษาให้สายดีเอ็นเอที่ถูกคลายออกคงตัวอยู่ได้ เอนไซม์ Topoisomerase คลายเกลียวบริเวณที่เป็นเกลียวซ้อนเกลียวของดีเอ็นเอ



รูปที่ 8 บริเวณ replication fork

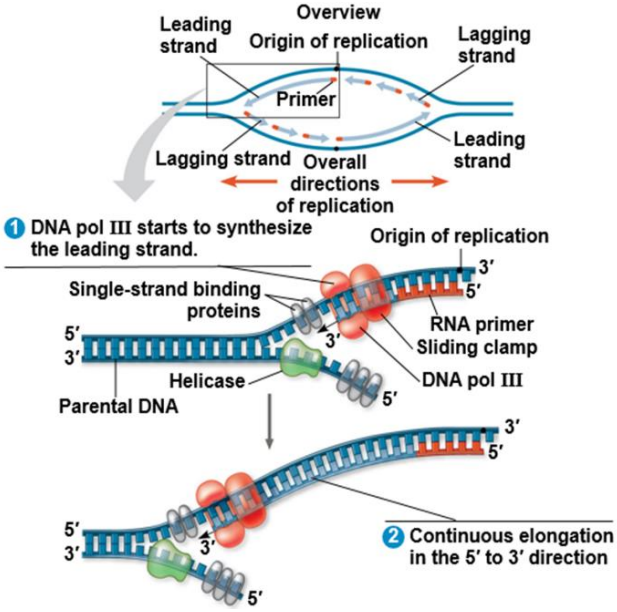
เอนไซม์ DNA polymerases จำเป็นต้องใช้ primer เพื่อจะได้เติมเบสให้กับดีเอ็นเอสายใหม่ primers นี้ถูกสร้างด้วยเอนไซม์primase เอนไซม์นี้จะสร้าง RNA primers ประมาณ 5-10 เบสก่อน ที่ปลายด้าน 3' จะเป็นบริเวณที่ให้เริ่มต้นการสร้างสายใหม่

เอนไซม์ DNA polymerase นี้มีหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เริ่มบริเวณreplication fork เอนไซม์นี่ส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้ primer และสายดีเอ็นเอที่เป็น template การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีอัตราโดยประมาณที่500นิวคลีโอไทด์ต่อวินาทีในแบคทีเรียและ 50 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาทีในคน แต่ละนิวคลีโอไทด์จะถูกต่อเข้าไปในสายดีเอ็นเอสายใหม่นี้คือ nucleoside triphosphate เมื่อ nucleoside triphosphate มาต่อกันจะเสียหมู่ฟอสเฟตออกไปสองหมู่



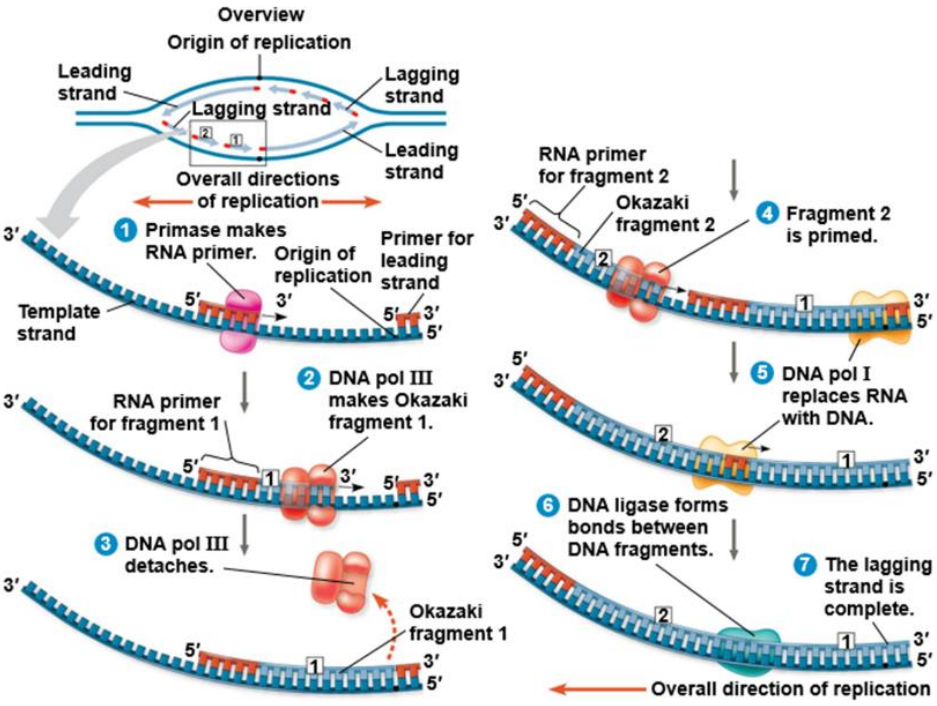
รูปที่ 9 Dephosphorylation

DNA polymeraseจะต่อนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย3' เท่านั้น นั่นคือสายดีเอ็นเอสายใหม่จะถูกสร้างจาก 5' ไป 3'



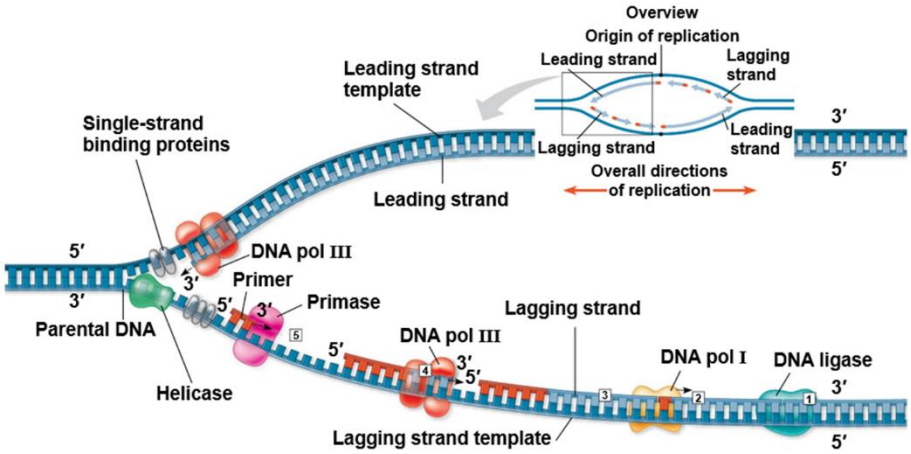
รูปที่ 10 DNA replication ของ leading strand

ลักษณะที่เป็น antiparallel ของดีเอ็นเอนี้ทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีกระบวนการต่างกันเล็กน้อย สายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่สายหนึ่งจะถูกสร้างได้ต่อเนื่องจาก 5' ไป 3' ซึ่งเรียกว่า leading strand แต่อีกสายจะถูกสร้างทีละน้อยจากปลาย 5' ไป 3' เช่นกัน เรียกว่า lagging strand ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ถูกสร้างบนสายlagging strandนี้จะเป็นช่วงสั้นๆเรียกว่า Okazaki fragments ซึ่งจะถูกเชื่อมเข้าด้วยในภายหลังด้วยเอนไซม์ DNA ligase

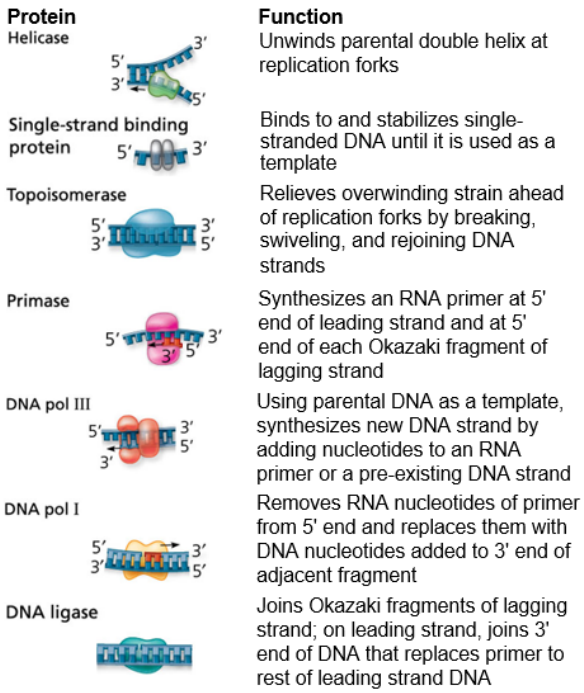


รูปที่ 11 การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่บน lagging strand

สรุปกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ DNA replication

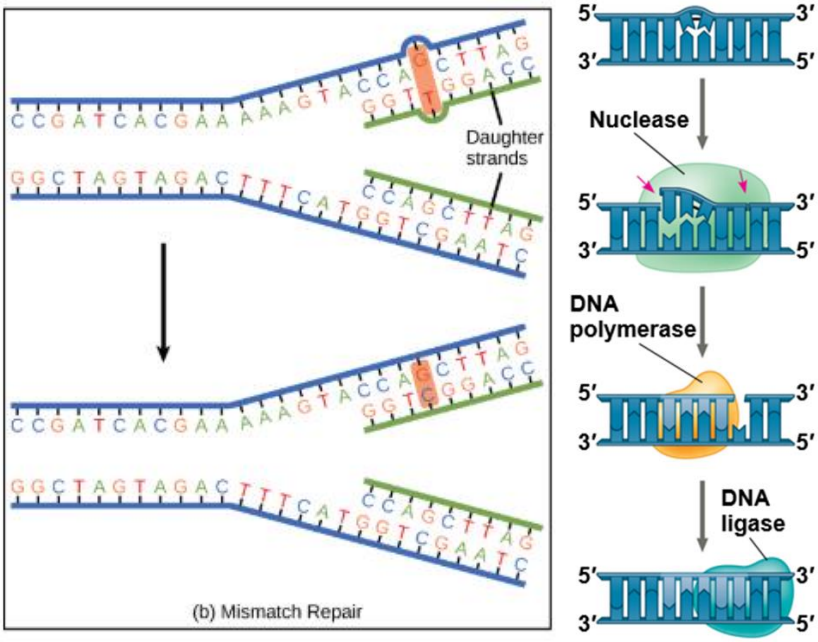


รูปที่ 12 การจำลองดีเอ็นเอ



รูปที่ 13 เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ

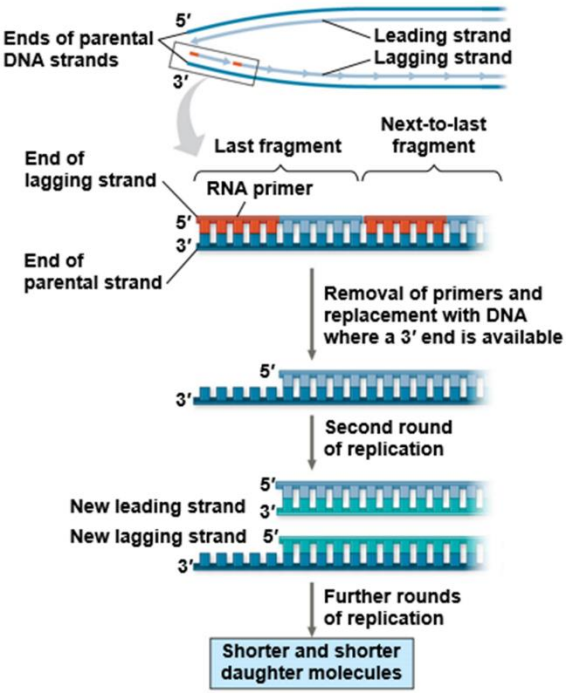
ดีเอ็นเอที่ถูกสร้างใหม่จะถูกตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยเอนไซม์ DNA polymerase เปลี่ยนเบสที่ไม่ถูกต้องออกแล้วเอาเบสที่ถูกต้องใส่เข้าไป ดีเอ็นเอสามารถถูกทำลายด้วยสารเคมีหรือทางกายภาพเช่นรังสีเอ็กซ์หรือควันบุหรี่ การเปลี่ยนแปลงสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว นิวคลีโอไทด์สามารถถูกตัดออกเพื่อเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไปแทนที่ด้วยเอนไซม์ nuclease



รูปที่ 14 การตัดนิวคลีโอไทด์ออกแล้วแทนที่ด้วยนิวคลีโอไทด์ใหม่

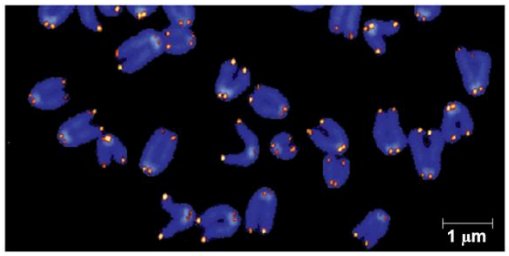
อัตราความผิดพลาดหลังจากการถูกตรวจสอบ (proofreading) ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase นั้นมีค่าต่ำมากแต่ไม่ได้แปลว่าจะไม่ความผิดพลาดเลย ลำดับเบส (sequence) ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอาจอยู่ถาวรและถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ การเปลี่ยนแปลง (mutations) นี้เป็นสาเหตุของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) ใช้ซึ่งอาจทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่ขึ้นได้

การจำลองดีเอ็นเอจาก 5' ไป 3' นั้นทำให้ไม่มีทางที่จะมีการจำลองปลาย 5' ได้ครบถ้วน ทำให้ปลาย 5' นี่สั้นลงทุกครั้งที่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ปัญหานี้เกิดขึ้นใน eukayotes แต่ไม่ใช่ใน prokaryotes เพราะในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้มีโครโมโซมเป็นวงกลม



รูปที่ 15 การสั้นลงของปลาย5´

ในโครโมโซมของ eukaryotes จะมีส่วนปลายที่เรียกว่า telomeres ปลาย telomeresนี้ ไม่ได้ช่วยป้องกันการสั้นของดีเอ็นเอ แต่ช่วยให้ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอโดยเฉพาะยีนที่อยู่ใกล้ ๆ ปลายไม่ถูกตัดสั้นลงเร็วกว่าที่ควร การสั้นลงของปลาย terlomeres นี้มีความสัมพันธ์กับอายุ เอนไซม์ telomerase ช่วยในการสร้างปลาย telomeres ในเซลล์สืบพันธุ์

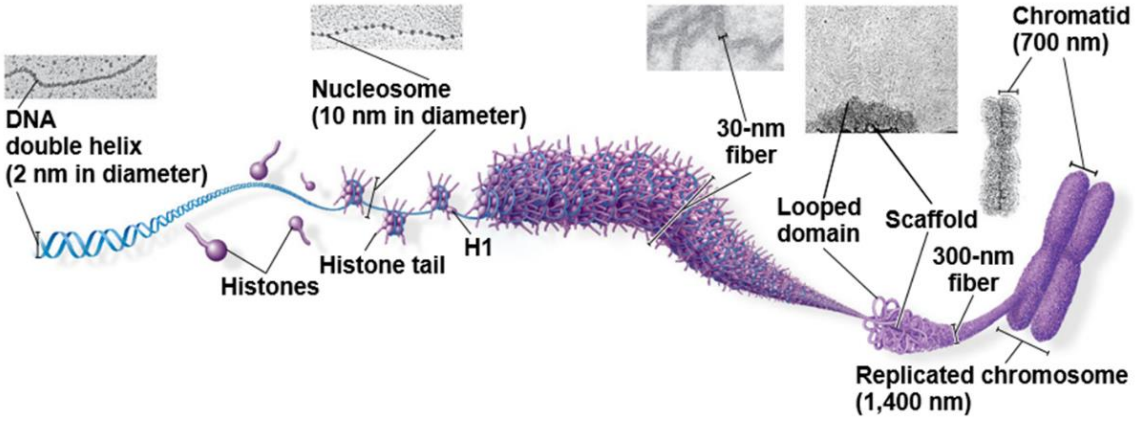


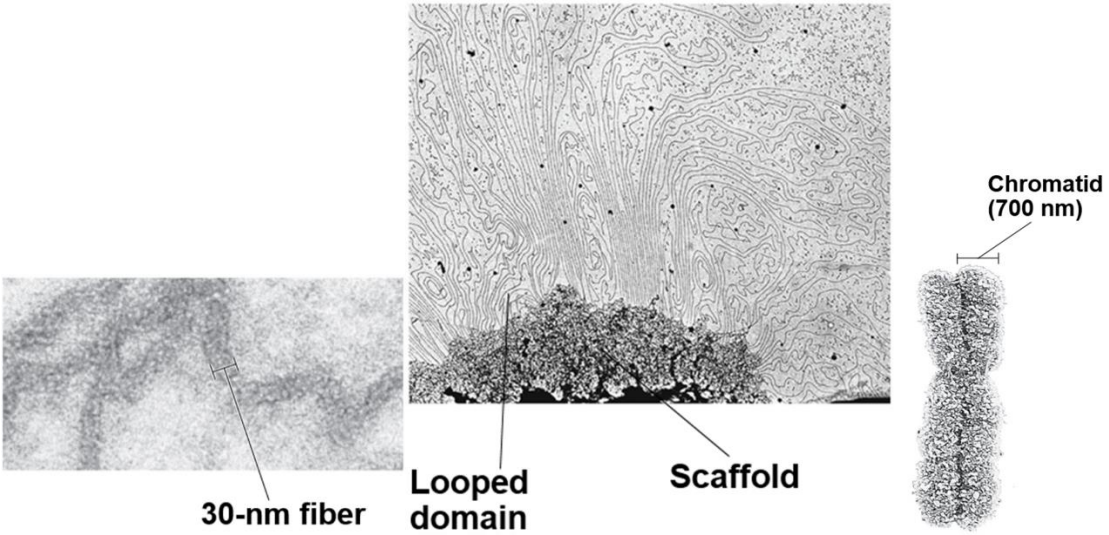
รูปที่ 16 โครโมโซมและtelomeres (สีแดง)

โครโมโซมแบคทีเรียเป็นแบบเกลียวคู่ รูปร่างเป็นวงมีโปรตีนเกาะอยู่บ้าง ในแบคทีเรียดีเอ็นเอเป็นแบบ supercoiled และพบได้ในบริเวณของเซลล์ที่เรียกว่านิวคลีออยด์

โครโมโซมยูคาริโอตมีโมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นแบบเส้น มีโปรตีนเกาะจำนวนมาก ในเซลล์ยูคาริโอตดีเอ็นเอจะรวมเข้ากับโปรตีนรวมเรียกว่าโครมาติน โปรตีนที่เรียกว่าฮิสโตนมีหน้าที่แรกในการบรรจุในโครมาติน โครมาตินเมื่อกางออกคล้ายดูคล้ายสายลูกปัด (beads on a string) แต่ละ“ลูกปัด” จะเป็น nucleosome nucleosome เป็นหน่วยพื้นฐานของการบรรจุดีเอ็นเอ แต่ละ nucleosome ประกอบด้วยโปรตีนฮิสโตนสี่ชนิด ชนิดละสองโมเลกุลทำให้ในหนึ่งnucleosomeมีฮิสโตนทั้งสิ้นแปด

โมเลกุล ปลายหางของโปรตีนฮิสโตนจะยื่นออกมาจาก nucleosome ที่ปลายหางของฮิสโตนนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการแสดงออกของยีน





รูปที่ 17 การบรรจุโครมาตินในeukaryotes

โครโมโซมประกอบด้วยโมเลกุลของดีเอ็นเอที่อัดไปด้วยโปรตีน

โครมาตินมีการเปลี่ยนแปลงไปตามวัฏจักรของเซลล์ ในการแบ่งเซลล์ระยะinterphaseเส้นใยโครมาตินจะมีขนาดราว ๆ 10 นาโนเมตร และบางส่วนมีขนาดราว ๆ 30 นาโนเมตรโดยการม้วนขดกันของเส้นใยโครมาติน ส่วนของโครมาตินที่มีการอัดกันอย่างหลวม ๆ เรียกว่า euchromatin โครมาตินในช่วง interphase (centromeres และ telomeres) บางส่วนจะอัดกันแน่นเรียกว่า heterochromatin heterochromatinที่อัดกันอย่างหนาแน่นทำให้เซลล์แสดงข้อมูลทางพันธุกรรมที่อยู่ในบริเวณเหล่านี้ได้ยาก

แบบฝึกหัด

Source of DNA	Base Percentage Adenine	Base Percentage Guanine	Base Percentage Cytosine	Base Percentage Thymine
Sea urchin	**32.8**	**17.7**	**17.3**	**32.1**
Salmon	**29.7**	**20.8**	**20.4**	**29.1**
Wheat	**28.1**	**21.8**	**22.7**	
E. Coil	**24.7**	**26.0**		
Human	**30.4**			**30.1**
Ox	**29.0**			
Average %				

Hershey and Chase ยืนยันว่า DNA เป็นสารพันธุกรรมด้วยการทดลองใด

A. DNA linkage mapping
B. Transformation of DNA in Streptococcus pneumoniae
C. X-ray crystallography of DNA molecules
D. Radio-labelling DNA and protein

Template strandของสายดีเอ็นเอมีลำดับเบสเป็น 3´'TAGGCATTGCA 5 'สายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจากเทมเพลตนี้คืออะไร?

A. 5' ATCCGTAACGT 3'
B. 5' AUCCGUAACGU 3'
C. 5' TAGGCATTGCA 3'
D. 5' TGCAATGCCTA 3'

ข้อใดต่อไปนี้จับคู่เอนไซม์จำลองดีเอ็นเอกับหน้าที่ได้อย่างถูกต้อง

A. Topoisomerases ทำงานนำหน้าreplication forkเพื่อป้องกัน supercoiling
B. DNA polymerase ฉันแยกสายDNAที่replication fork
C. Helicase เชื่อมระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ
D. DNA primase เพิ่มไพรเมอร์โดยการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ให้กับ 3'

อ่านเพิ่มเติม

Concepts of Biology on OpenStax. https://openstax.org/books/concepts-biology/pages/9-introduction

Discovery of DNA on Khan academy. https://www.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-discovery-and-structure/a/classic-experiments-dna-as-the-genetic-material

Watson, J. D., and F. H. C. Crick. "Molecular Structure of Nucleic Acids." *Nature* 1953 Apr 25; 171 (4356): 737–8.

Molecular Visualizations of DNA. https://www.wehi.edu.au/wehi-tv/molecular-visualisations-dna

DNA replication. https://www.youtube.com/watch?v=4jtmOZaIvS0

The Central Dogma of Biology. https://www.youtube.com/watch?v=9kOGOY7vthk