

## Molecular Biology

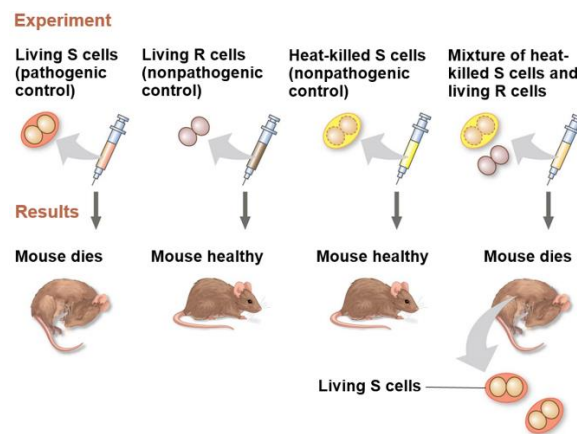
### การค้นพบ DNA

หลังจากกลุ่มของ T.H. Morgan ค้นพบว่ายีนอยู่บนโครโมโซม ส่วนประกอบสำคัญหลักที่อยู่บนโครโมโซม คือ โปรตีนและดีเอ็นเอกลายเป็นที่น่าสนใจว่าอะไรคือสารพันธุกรรม

การค้นพบสารพันธุกรรมได้รับประโยชน์อย่างมากจากการใช้ไวรัส

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

การทดลองนี้ทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า Transformation ซึ่งหมายความว่าเปลี่ยนแปลงของ genotype และ phenotype ที่เกิดจากดีเอ็นเอแปลกปลอม



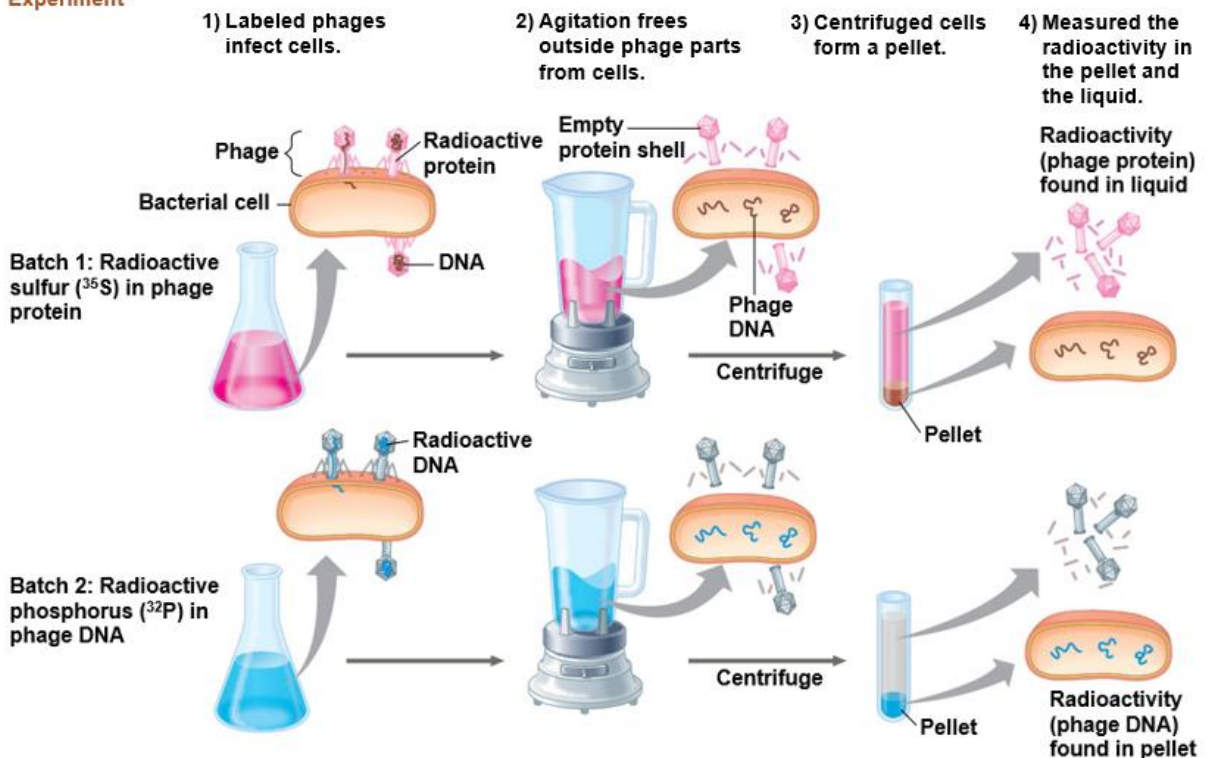
รูปที่ 1 การทดลองของ Griffith

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

ในปี 1952 Alfred Hershey และ Martha Chase ยืนยันว่าสารพันธุกรรมคือดีเอ็นเอ โดยใช้ bacteriophage (ในที่นี้ย่อว่าเฟจ) เขาใช้ส่วนประกอบของเฟจคือโปรตีนและดีเอ็นเอฉีดเข้าไปใน *E. coli* การหมุนเหวี่ยง (centrifugation) ทำให้ส่วนที่หนักกว่า เช่นแบคทีเรีย ตกลงด้านล่าง เกาะรวมกันเรียกว่า pellet ขณะที่ส่วนที่เบากว่าลอยอยู่ด้านบนซึ่งรวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบของเฟจ Hershey เมื่อวัดกัมมันตภาพรังสีพบว่าส่วนด้านบนมีส่วนประกอบของ  $^{35}\text{S}$

ในขณะที่ส่วนด้านล่าง (pellet) มีส่วนประกอบของ  $^{32}\text{P}$  (รูปที่ 2) Hershey และ Chase จึงสรุปว่าดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรม ไม่ใช่โปรตีน

#### Experiment



© 2017 Pearson Education, Inc.

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)

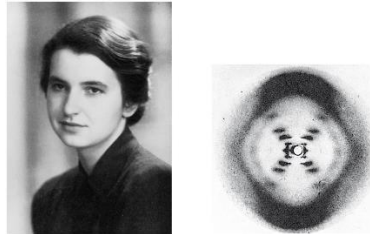
Erwin Chargaff เมื่อปี 1950 เสนอว่าส่วนประกอบของดีเอ็นเอจะแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์ เขาเสนอกฎสองข้อคือ

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

โครงสร้างของดีเอ็นเอ

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

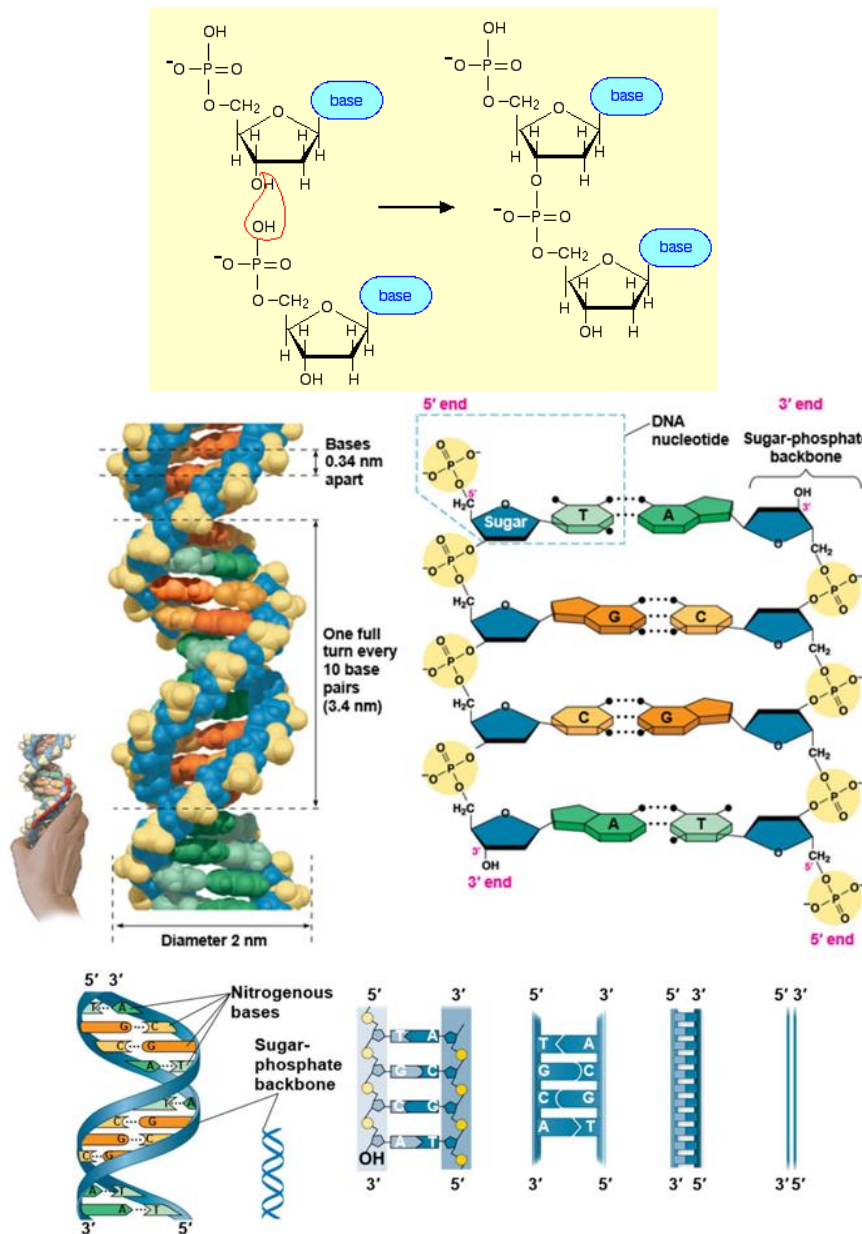
แฟรงคลิน X-ray ภาพ crystallographic ของดีเอ็นเอทำให้ Watson अनुमानว่าดีเอ็นเอเป็นขดลวด ภาพเอกซเรย์ยังช่วยให้วัตสันสามารถสรุปความกว้างของเกลียวและระยะห่างของฐานไนโตรเจนได้ รูปแบบในภาพแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลดีเอ็นเอถูกสร้างขึ้นจากสองเส้นขึ้นรูปเกลียวคู่



รูปที่ 3 Franklin และ ภาพ x-ray diffraction ของเธอ

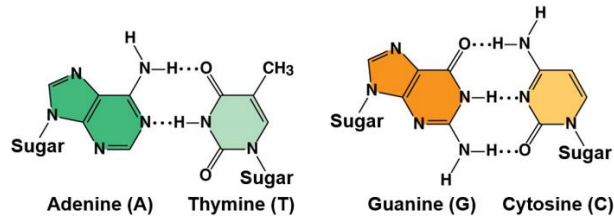
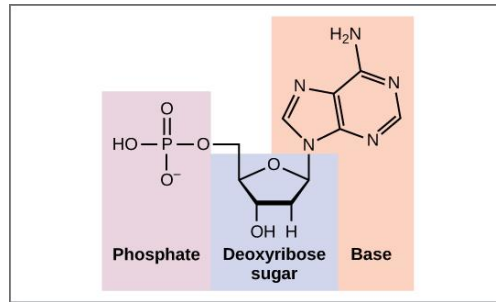
นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอเดียวกันเชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (Phosphodiester) ระหว่างคาร์บอนตัวที่สามบนน้ำตาลกับหมู่ฟอสเฟสที่เกาะที่น้ำตาลตัวที่ห้าของนิวคลีโอไทด์โมเลกุลถัดมา

เพื่อให้เข้าใจ double helix ให้นักภาพเอามือขวาพันรอบโมเลกุลดีเอ็นเอที่แสดงในรูปโดยให้นิ้วหัวแม่มือชี้ขึ้น นักภาพนิ้วเลื้อยไปตามด้านนอกของเกลียว มือของคุณควรเคลื่อนไปพร้อมกับเกลียวขึ้นไปในทิศทางที่นิ้วหัวแม่มือชี้



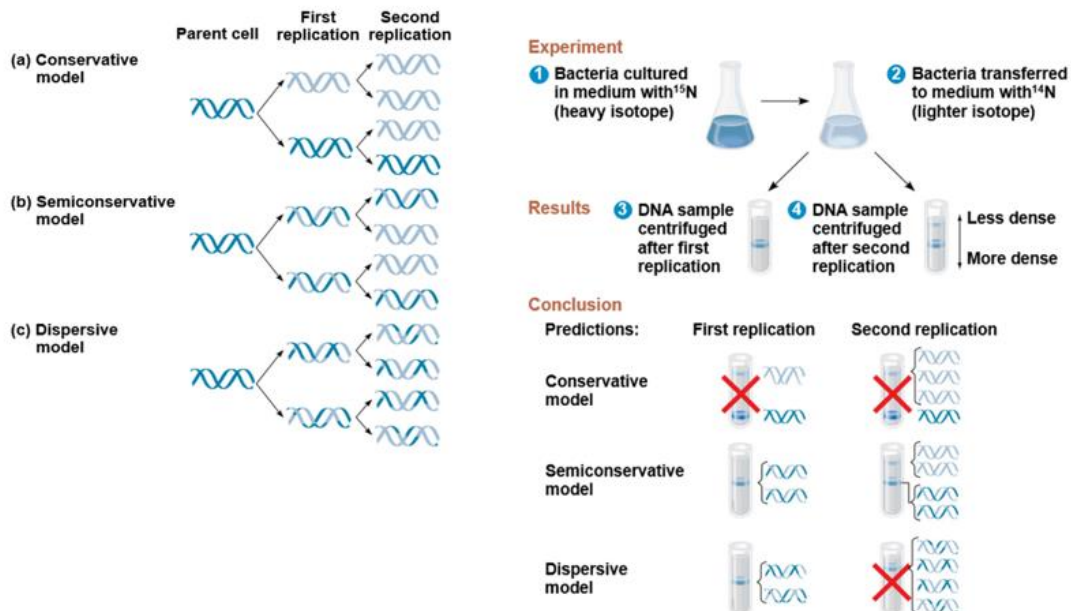
รูปที่ 4 3'-5'phosphodiester bond และโครงสร้างของดีเอ็นเอ

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

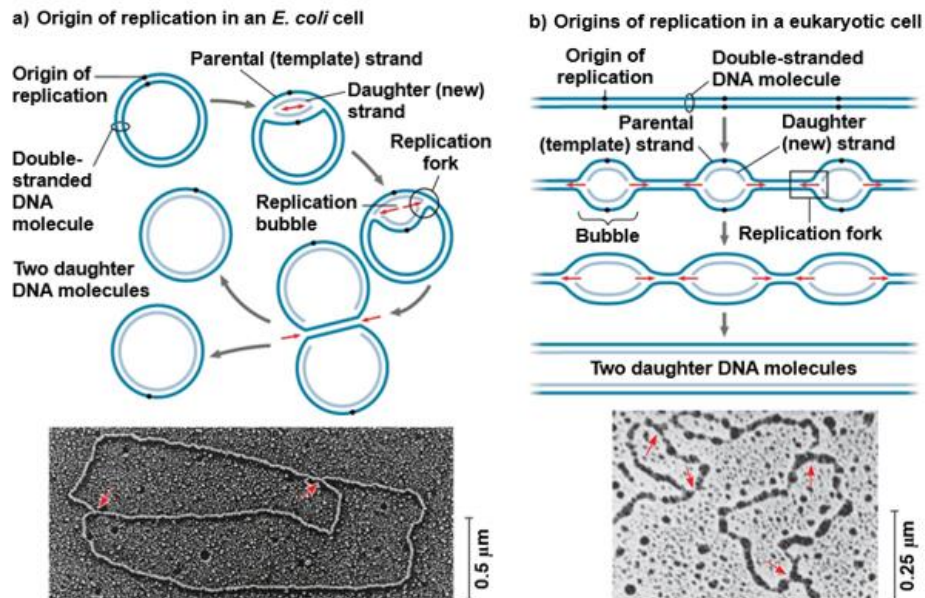
เนื่องจากทั้งสองเส้นของดีเอ็นเอจะประกอบแต่ละกลุ่มสวาระการทำหน้าที่เป็นแม่แบบสำหรับการสร้างสายใหม่ในการเพิ่มจำนวน ในขณะที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโมเลกุลสายเดิมจะคลายออกและสายใหม่สองเส้นถูกสร้างขึ้นตามกฎการจับคู่พื้นฐาน รูปแบบการจำลองแบบsemiconservativeของวัตสันและคริกระบุว่าโมเลกุลดีเอ็นเอใหม่แต่ละตัวจะมีสายเก่าหนึ่งเส้นและอีกหนึ่งเส้นที่สร้างขึ้นใหม่



รูปที่ 6 โมเดลของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและการทดลองของ Meselson และ Stahl

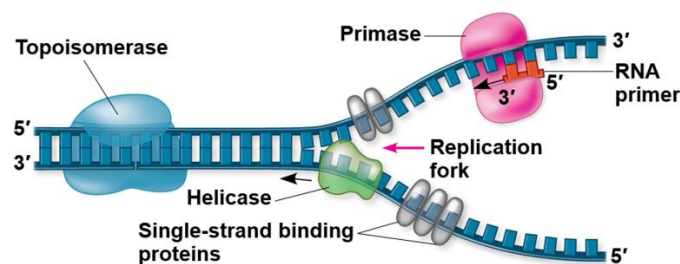
**DNA replication** การจำลองแบบดีเอ็นเอ

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 มีหน้าที่คลายเกลียวดีเอ็นเอที่บริเวณ replication fork นี้ โปรตีน single strand binding proteins จะเข้ามาจับและช่วยรักษาให้สายดีเอ็นเอที่ถูกคลายออกคงตัวอยู่ได้ เอนไซม์ topoisomerase คลายเกลียวบริเวณที่เป็นเกลียวซ้อนเกลียวของดีเอ็นเอ

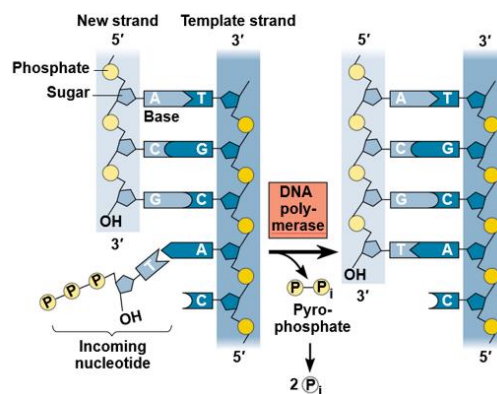


รูปที่ 8 บริเวณ replication fork



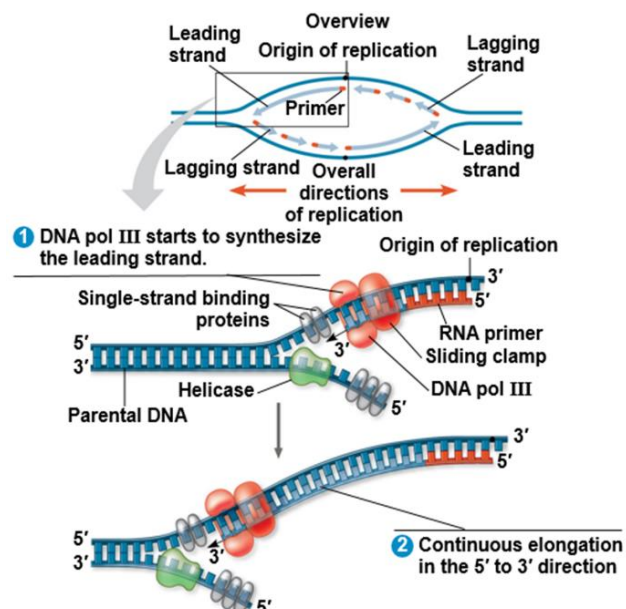
เอนไซม์ DNA polymerases จำเป็นต้องใช้ primer เพื่อจะได้เติมเบสให้กับดีเอ็นเอสายใหม่ primers นี้ถูกสร้างด้วยเอนไซม์ primase เอนไซม์นี้จะสร้าง RNA primers ประมาณ 5-10 เบสก่อน ที่ปลายด้าน 3' จะเป็นบริเวณที่ให้เริ่มต้นการสร้างสายใหม่

เอนไซม์ DNA polymerase นี้มีหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เริ่มบริเวณ replication fork เอนไซม์นี้ส่วนใหญ่จำเป็นต้องใช้ primer และสายดีเอ็นเอที่เป็น template การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีอัตราโดยประมาณที่ 500 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาทีในแบคทีเรียและ 50 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาทีในคน แต่ละนิวคลีโอไทด์จะถูกต่อเข้าไปในสายดีเอ็นเอสายใหม่นี้คือ nucleoside triphosphate เมื่อ nucleoside triphosphate มาต่อกันจะเสียหมู่ฟอสเฟตออกไปสองหมู่



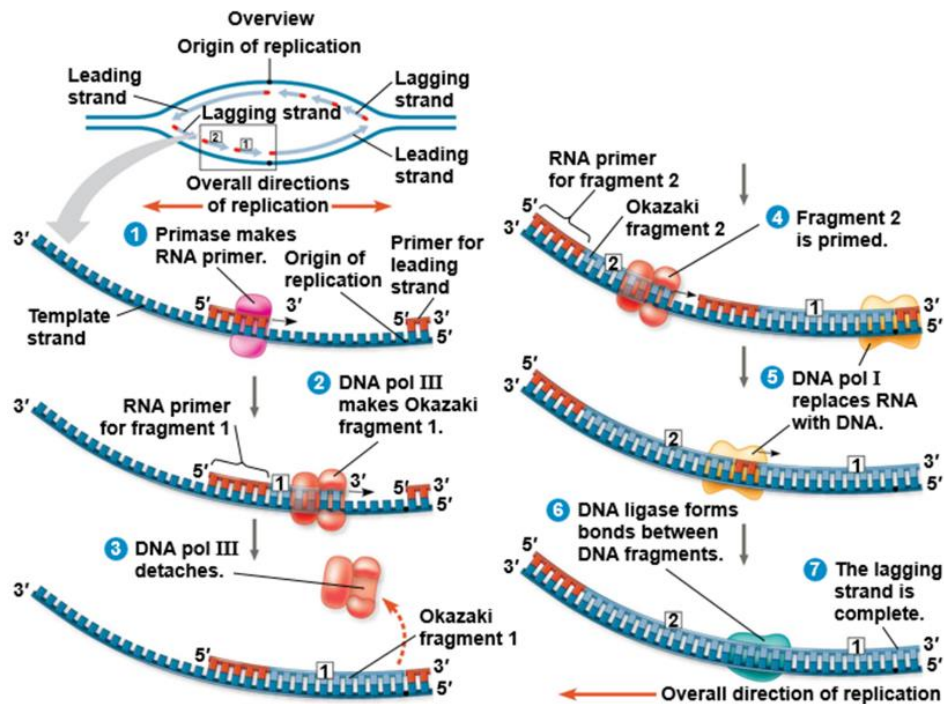
รูปที่ 9 Dephosphorylation

DNA polymerase จะต่อนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' เท่านั้น นั่นคือสายดีเอ็นเอสายใหม่จะถูกสร้างจาก 5' ไป 3'



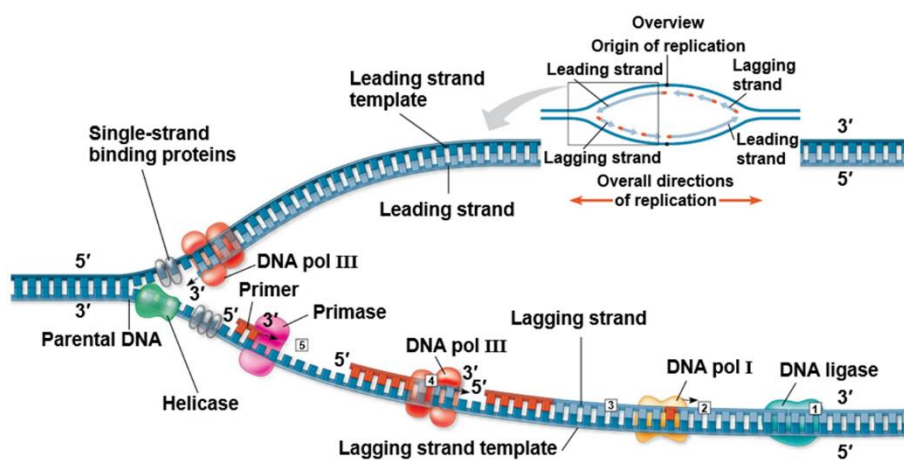
รูปที่ 10 DNA replication ของ leading strand

ลักษณะที่เป็น antiparallel ของดีเอ็นเอนี้ทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีกระบวนการต่างกันเล็กน้อย สายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่สายหนึ่งจะถูกสร้างได้ต่อเนื่องจาก 5' ไป 3' ซึ่งเรียกว่า leading strand แต่อีกสายจะถูกสร้างทีละน้อยจากปลาย 5' ไป 3' เช่นกัน เรียกว่า lagging strand ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ถูกสร้างบนสาย lagging strand นี้จะเป็นช่วงสั้นๆ เรียกว่า Okazaki fragments ซึ่งจะถูกเชื่อมเข้าด้วยกันภายหลังด้วยเอนไซม์ DNA ligase



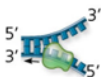






รูปที่ 11 การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่บน lagging strand

## สรุปกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ DNA replication



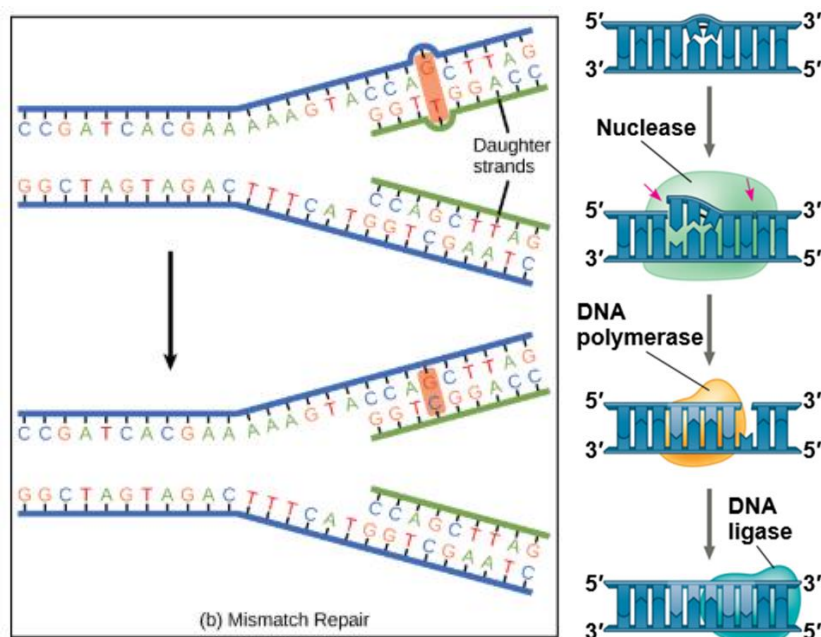
รูปที่ 12 การจำลองดีเอ็นเอ



<b>Protein</b> Helicase		<b>Function</b> Unwinds parental double helix at replication forks
Single-strand binding protein		Binds to and stabilizes single-stranded DNA until it is used as a template
Topoisomerase		Relieves overwinding strain ahead of replication forks by breaking, swiveling, and rejoining DNA strands
Primase		Synthesizes an RNA primer at 5' end of leading strand and at 5' end of each Okazaki fragment of lagging strand
DNA pol III		Using parental DNA as a template, synthesizes new DNA strand by adding nucleotides to an RNA primer or a pre-existing DNA strand
DNA pol I		Removes RNA nucleotides of primer from 5' end and replaces them with DNA nucleotides added to 3' end of adjacent fragment
DNA ligase		Joins Okazaki fragments of lagging strand; on leading strand, joins 3' end of DNA that replaces primer to rest of leading strand DNA

รูปที่ 13 เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ

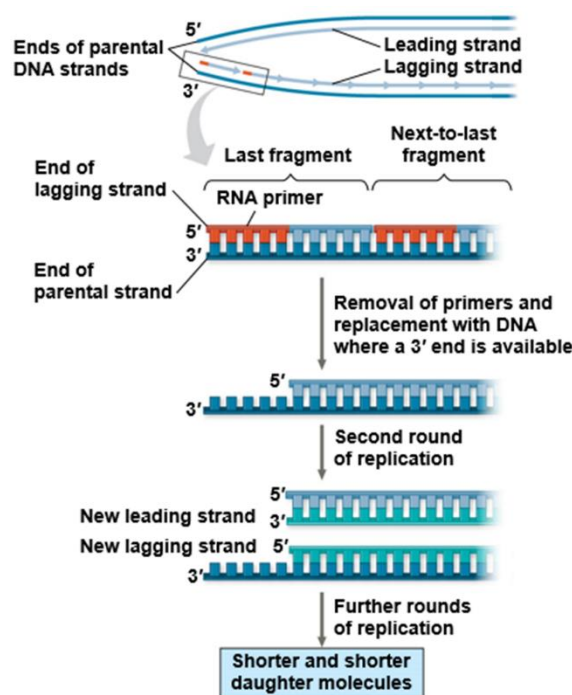
ดีเอ็นเอที่ถูกสร้างใหม่จะถูกตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยเอนไซม์ DNA polymerase เปลี่ยนเบสที่ไม่ถูกต้องออกแล้วเอาเบสที่ถูกต้องใส่เข้าไป ดีเอ็นเอสามารถถูกทำลายด้วยสารเคมีหรือทางกายภาพเช่นรังสีเอกซ์หรือควันทะลุ การเปลี่ยนแปลงสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว นิวคลีโอไทด์สามารถถูกตัดออกเพื่อเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าไปแทนที่ด้วยเอนไซม์ nuclease



รูปที่ 14 การตัดนิวคลีโอไทด์ออกแล้วแทนที่ด้วยนิวคลีโอไทด์ใหม่

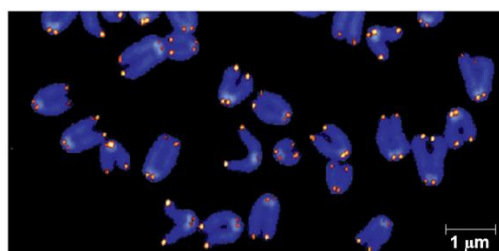
อัตราความผิดพลาดหลังจากการถูกตรวจสอบ (proofreading) ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase นั้นมีค่าต่ำมากแต่ไม่ได้แปลว่าจะไม่มีความผิดพลาดเลย ลำดับเบส(sequence)ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอาจอยู่ถาวรและถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ การเปลี่ยนแปลง(mutations)นี้เป็นสาเหตุของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่การคัดเลือกโดยธรรมชาติ(natural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

การจำลองดีเอ็นเอจาก 5' ไป 3' นั้นทำให้ไม่มีทางที่จะมีการจำลองปลาย 5' ได้ครบถ้วน ทำให้ปลาย 5' นั้นสั้นลงทุกครั้งที่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ปัญหานี้เกิดขึ้นใน eukaryotes แต่ไม่ใช่ใน prokaryotes เพราะในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้มีโครโมโซมเป็นวงกลม



รูปที่ 15 การสั้นลงของปลาย 5'

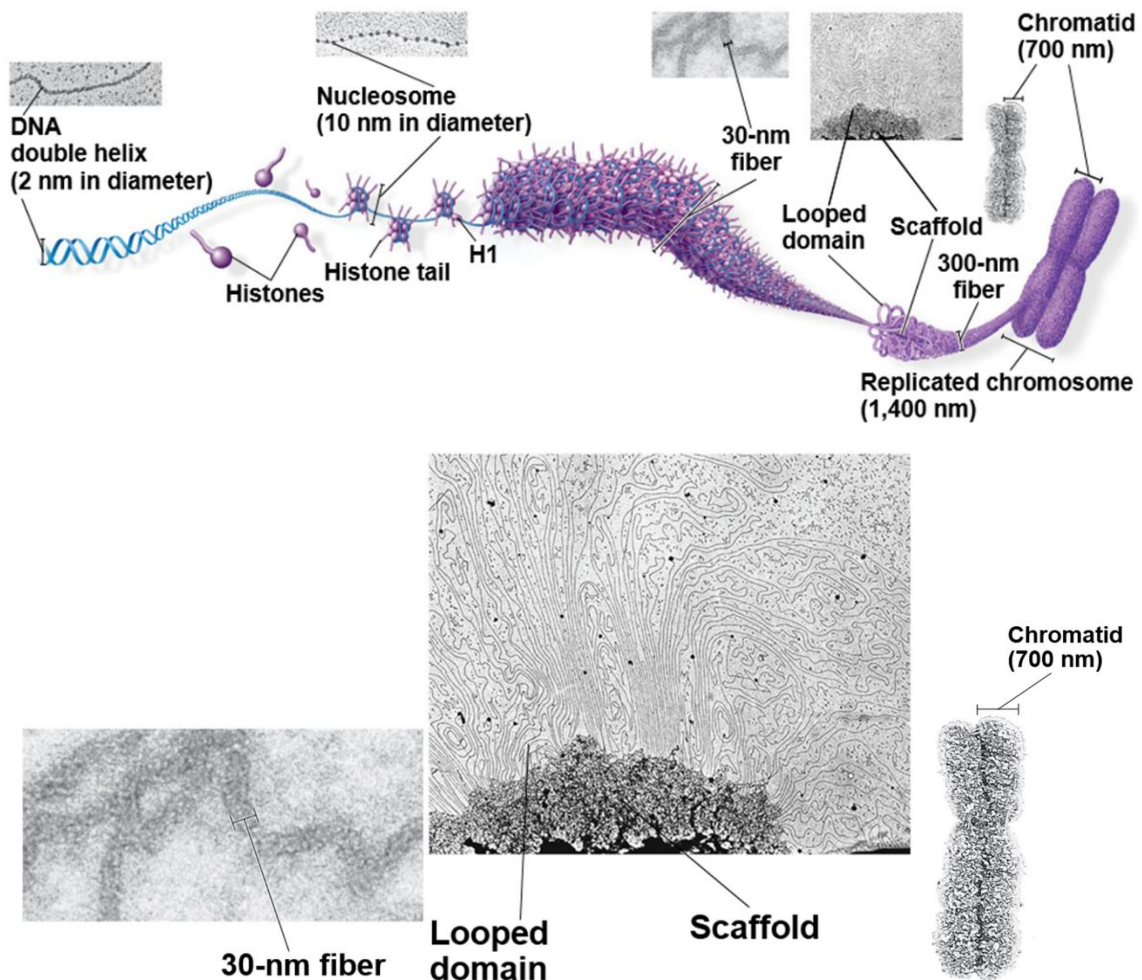
ในโครโมโซมของ eukaryotes จะมีส่วนปลายที่เรียกว่า telomeres ปลาย telomeres นี้ไม่ได้ช่วยป้องกันการสั้นลงของดีเอ็นเอแต่ช่วยให้ยีนที่อยู่บนดีเอ็นเอโดยเฉพาะยีนที่อยู่ใกล้ๆ ปลายไม่ถูกตัดสั้นลงเร็วกว่าที่ควร การสั้นลงของปลาย telomeres นี้มีความสัมพันธ์กับอายุ เอนไซม์ telomerase ช่วยในการสร้างปลาย telomeres ในเซลล์สืบพันธุ์



## รูปที่ 16 โครโมโซมและtelomeres (สีแดง)

โครโมโซมแบบที่เรียกว่าเป็นแบบเกลียวคู่ รูปร่างเป็นวงมีโปรตีนเกาะอยู่บ้าง ในแบบที่เรียกว่าดีเอ็นเอเป็นแบบsupercoiled และพบได้ในบริเวณของเซลล์ที่เรียกว่านิวคลีออยด์

โครโมโซมยูคาริโอตมีโมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นแบบเส้น มีโปรตีนเกาะจำนวนมาก ในเซลล์ยูคาริโอตดีเอ็นเอจะรวมเข้ากับโปรตีนรวมเรียกว่าโครมาติน โปรตีนที่เรียกว่าฮิสโตนมีหน้าที่แรกในการบรรจุในโครมาติน โครมาตินเมื่อทางออกคล้ายดูคล้ายสายลูกปัด (beads on a string) แต่ละ“ลูกปัด” จะเป็น nucleosome nucleosomeเป็นหน่วยพื้นฐานของการบรรจุดีเอ็นเอ แต่ละnucleosomeประกอบด้วยโปรตีนฮิสโตนสี่ชนิด ชนิดละสองโมเลกุลทำให้ในหนึ่ง nucleosomeมีฮิสโตนทั้งสี่เส้นแปดโมเลกุล ปลายทางของโปรตีนฮิสโตนจะยื่นออกมาจากnucleosome ที่ปลายทางของฮิสโตนนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการแสดงออกของยีน



## รูปที่ 17 การบรรจุโครมาตินในeukaryotes

โครโมโซมประกอบด้วยโมเลกุลของดีเอ็นเอที่อัดไปด้วยโปรตีน

โครมาตินมีการเปลี่ยนแปลงไปตามวัฏจักรของเซลล์ ในการแบ่งเซลล์ระยะinterphaseเส้นใยโครมาตินจะมีขนาดยาวๆ10นาโนเมตร และบางส่วนมีขนาดยาวๆ30นาโนเมตรโดยการม้วนขดกันของเส้นใยโครมาติน ส่วนของโครมาตินที่มีการอัดกันอย่างหลวมๆเรียกว่าeuchromatin โครมาตินในช่วงinterphase (centromeres และ telomeres) บางส่วนจะอัดกันแน่นเรียกว่าheterochromatin 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	
<i>E. Coil</i>	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'

ข้อใดต่อไปนี้เป็นจับคู่เอนไซม์จำลองดีเอ็นเอกับหน้าที่ได้อย่างถูกต้อง

- A. Topoisomerases ทำงานนำหน้าreplication forkเพื่อป้องกัน supercoiling
- B. DNA polymerase อันแยกสายDNAที่replication 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=4jtmOZalvS0>

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