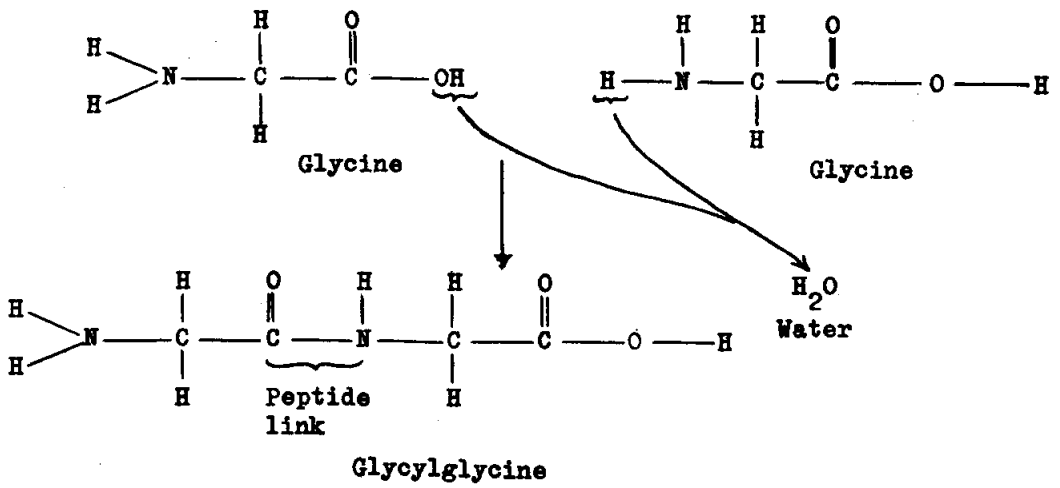
Proteins and RNA

ดังได้กล่าวมาแล้วว่าหน้าที่สำคัญอย่างหนึ่งของ **DNA** คือการสร้างโปรตีน เมื่อ **Watson-Crick** เสนอ **model** ของ **DNA** ขึ้นมา มันก็สามารถจะนำมาอธิบายถึงขบวนการสังเคราะห์โปรตีนได้ ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

โปรตีนจัดเป็นสารพวก **polymeric molecule** เช่นเดียวกับ **nucleic acid** คือเกิดจากการต่อกันของโมเลกุลเล็ก ๆ ของ **amino acids** โดยที่ **carboxyl group** ของ **amino acid** ตัวหนึ่งจะไปเชื่อมเข้ากับ **amino group** ของ **amino acid** อีกตัวหนึ่ง แล้วสูญเสียน้ำไปหนึ่งโมเลกุลเกิด **linkage** ของ **amide (-CONH-)** ขึ้น เรียกว่า **peptide bond** สวนเส้นสายยาว ๆ ที่เกิดจากการต่อกันของ **amino acids** ก็เรียกว่า **polypeptides** ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1-12



รูปที่ 1-12 การรวมกันของ **amino acids** เป็น **polypeptide**

ในการต่อกันของ **amino acids** แล้วเกิด **peptide bond** ขึ้นมาได้นั้น จะต้องมี **enzyme** ที่เรียกว่า **peptide polymerase** และสารพวก **nucleotide** ที่มี **triphosphate groups** เช่น **GTP (ATP)** ซึ่งเป็นตัวให้พลังงานเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ตามธรรมชาติแล้วจะมี **amino acids** อยู่ประมาณ 20 ชนิดด้วยกัน แต่เมื่อมันเข้ามาต่อกันหรือเรียงลำดับกันเกิดเป็นโปรตีนขึ้นมาแล้ว ลำดับการต่อกันจะทำให้โปรตีนแต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีววิทยาแตกต่างกันไป

จากการศึกษา activities ต่าง ๆ ของเซล พบว่ามันจะมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดระหว่างขบวนการสังเคราะห์โปรตีนและปริมาณของ RNA ในเซลนั้น เซลที่ไม่มีการสร้างโปรตีนหรือสร้างแต่เพียงเล็กน้อย เช่น เซลในหัวใจ กล้ามเนื้อ ไต จะมี RNA น้อย แต่ในเซลที่มีการสร้างโปรตีนมาก เช่น ในตับ ตับอ่อน (pancreas) จะมี RNA อยู่ใน nucleoli และ cytoplasm ในปริมาณมาก ดังนั้น RNA จึงเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนโดยตรง RNA ที่สำคัญมีอยู่สามชนิดด้วยกัน คือ

1. Ribosomal RNA (rRNA)
2. Transfer or soluble or adaptor RNA (tRNA)
3. Messenger RNA (mRNA)

rRNA จะพบอยู่รวมกับโปรตีนในโครงสร้างที่เรียกว่า ribosome และพบอยู่ใน cytoplasm rRNA จะมีอยู่ราว 85–90% ของ RNA ทั้งหมดในเซล เราสามารถจะจำแนกประเภทของ ribosomes ได้จากอัตราการตกตะกอนของมันหรือ sedimentation constants จากแรงเหวี่ยงใน ultracentrifuge มีหน่วยเป็น s = Svedberg unit เช่น ribosome ของ E. coli จะประกอบด้วยสอง subunits ที่มี sedimentation constants เป็น 30s และ 50s การรวมของ subunits เข้าด้วยกันจะทำให้ได้สารที่ซับซ้อนโตขึ้น เช่น

	Ribosomal subunits			Ribosome	Polysome
Ribosomes	30s	+	50s	⟶ 70s	⟶ 100s

[เป็น ribosomes ทั้งหมดแต่มีขนาดต่างกัน (rRNA + protein)]

เมื่อนำเอา rRNA ของ E. coli มาเข้าเครื่องเหวี่ยงก็จะแบ่งออกได้เป็นสองชนิดด้วยกัน คือ 16s และ 23s ribosomes ของ E. coli จะมี RNA อยู่ 60% และ protein อีก 40% ในเซลของพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ribosomes จะประกอบด้วย 40s และ 60s subunits และมีอัตราส่วนของ RNA ต่อโปรตีนเป็น 1:1 แต่ทว่า rRNA จะมีค่า sedimentation constants แตกต่างกันไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิต

Ribosomes เป็นบริเวณที่ทำการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งสามารถจะทำการพิสูจน์ได้โดยการ label amino acid ด้วยสารกัมมันตภาพรังสีในอาหารแล้วใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ เมื่อ amino acid เหล่านั้นเข้าไปในเซล เราก็ติดตามดูจะพบว่ามันจะไปเกาะอยู่ที่ ribosomes แล้วสารกัมมันตภาพรังสีจะค่อย ๆ หายไปจาก ribosomes ไปอยู่ในโปรตีนที่เพิ่งเกิดขึ้นใหม่จาก amino acid ดังกล่าว .

tRNA เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็ก ประกอบด้วย nucleotides ประมาณ 80 ตัว มีค่า sedimentation constants ราว 4s tRNA มีอยู่หลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการจับ amino acid ได้เฉพาะเพียงตัวเดียวเท่านั้น อย่างไรก็ดีแม้ว่าจะมี tRNA อยู่หลายตัว แต่มันจะมี end group อยู่เหมือนกันคือ

G.....RNA.....C-C-A

tRNA ทั้งหมดจะมีอยู่ราว 5% ของ RNA ในเซล ในการทำหน้าที่ของมันนั้น tRNA แต่ละตัวต่างก็จะไปจับ amino acid แล้วแยกกันไปที่ ribosome ต่างหากจากกัน โดยที่ amino acid จะเชื่อมเข้ากับส่วนปลายที่เป็น C-A group ของ tRNA เมื่อถูกนำไปที่ ribosomes แล้วจึงจะเชื่อมกันเป็น protein อีกที เนื่องจาก amino acid ในเซลจะมีอยู่ประมาณ 20 ชนิด tRNA ก็คงจะมีจำนวนเท่า ๆ กันด้วย

mRNA เป็น RNA อีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน โดยมันจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางระหว่างยีนส์ ซึ่งอยู่ใน nucleus และ ribosomes ซึ่งเป็นที่สร้างโปรตีนที่อยู่ใน cytoplasm mRNA จะทำหน้าที่นำคำสั่งหรือ genetic code ซึ่งเป็นลำดับของ bases จาก DNA ใน nucleus ออกไปสร้างโปรตีนใน cytoplasm โดยเหตุที่สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จะมีลำดับของ bases ที่แตกต่างกันไป ดังนั้น mRNA ของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นก็จะมีลำดับของ bases ที่แตกต่างกันด้วย mRNA ของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งก็จะต้องไปมีลำดับของ bases ไปเหมือนกับของ strand หนึ่งของ DNA ที่เป็น double helix ในสิ่งมีชีวิตนั้น หรือเรียกได้ว่า mRNA จะเป็น complementary กับอีก strand หนึ่งของ DNA ที่เป็น double helix แต่มีข้อแตกต่างอยู่อย่างหนึ่งคือใน mRNA จะมี Uracil แทนที่ Thymine ของ DNA

A T C G T A C G — one strand of DNA

↓ transcription

U A G C A U G C — mRNA

↓ translation

amino acid—— amino acid —— amino acid — protein

ในการที่จะพิสูจน์ว่า mRNA เป็น complementary copy กับ strand หนึ่งของ DNA นั้น เราสามารถจะทำได้โดยที่เราทราบว่า ถ้าหากนำ DNA โมเลกุลมาทำให้ร้อนขึ้นจนเกือบถึง 100°C จะทำให้ H-bond ถูกทำลายและทั้งสอง strands จะแยกออกจากกัน เรียกว่า DNA denaturation เมื่อลดอุณหภูมิลงทั้งสอง strands ก็จะกลับมาเชื่อมต่อเข้า

ด้วยกันด้วยลำดับของ bases และ H-bond ที่ถูกต้อง ดังนั้นถ้าหากเราแยกเอา single strand ของ DNA จากสิ่งมีชีวิตเดียวกันหรือสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันซึ่งมีลำดับของ bases เหมือนกันมาใส่ด้วยกัน มันก็ควรจะเชื่อมเข้าด้วยกันได้ นั่นก็หมายความว่าถ้าเราเอา single strand ของ DNA และ RNA มาใส่เข้าด้วยกันบางแล้วเกิด hybrid DNA/RNA ขึ้นมาได้ ก็แสดงว่าทั้ง DNA และ RNA นั้นจะต้องมีลำดับของ bases เป็น complementary ซึ่งกันและกันด้วย ซึ่งเราก็มีวิธีการที่จะใช้ตรวจดูว่ามี hybrid เกิดขึ้นหรือไม่ โดยการนำ radioactive isotopes คนละชนิดกันมา label DNA และ RNA แล้วติดตามดูผล

ในปี ค.ศ. 1961 Hall และ Spiegelman ได้ทำการทดลองพิสูจน์ว่า mRNA จะเป็น complementary กับ strand หนึ่งของ DNA โดยใช้ phage T2 ซึ่งมีทั้ง DNA และ RNA เขาใช้ radioactive phosphorus (P^{32}) label RNA และใช้ radioactive hydrogen (H^3) label DNA ซึ่งสารกัมมันตภาพรังสีทั้งสองชนิดจะปล่อยรังสีออกมาไม่เหมือนกัน ทำให้ติดตามผลได้ ถ้าหากเกิด hybrid ของ DNA/RNA ที่ label ไว้ก็จะทำให้พบ P^{32} และ H^3 อยู่ด้วยกัน เมื่อเขาปล่อยให้ T2 เข้าทำลายเซลของ E. coli แล้วสะกัดเอา mRNA ในเซลของ bacteria ออกมาใส่รวมกับ T2 DNA และ E. coli DNA พบว่ามันจะเกิด hybrid ได้เฉพาะกับ T2 DNA เท่านั้น แต่เมื่อทำการทดลองสะกัดเอา mRNA จาก E. coli ก่อนที่จะถูก T2 ทำลายมาใส่ใน T2 DNA และ E. coli DNA บางปรากฏว่ามันจะ hybridize ได้กับ E. coli DNA เท่านั้น

Before infection
- mRNA from E. coli + T2 DNA ⟶ no hybrid
- mRNA from E. coli + E. coli DNA ⟶ DNA/RNA hybrid

After infection
- mRNA from E. coli + T2 DNA ⟶ DNA/RNA hybrid
- mRNA from E. coli + E. coli DNA ⟶ no hybrid

จากการทดลองนี้ก็แสดงว่าลำดับของ base ใน mRNA ที่เกิดจาก virus ก็จะสอดคล้องกับลำดับของ bases ใน DNA virus และลำดับของ base ใน mRNA ของ bacteria ก็จะสอดคล้องกับลำดับของ DNA ของ bacteria เช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองต่าง ๆ จึงสรุปได้ว่า บทบาทของ DNA ในการสังเคราะห์โปรตีนนั้น ก็คือ transcription คือเพียงแต่สร้าง mRNA ขึ้นมา copy genetic code จากลำดับของ bases ใน DNA แล้วนำออกไปสร้างโปรตีนใน cytoplasm อีกที mRNA ทั้งหลายจะมีขนาดแตกต่างกันไปมาก ส่วนปริมาณของ mRNA จะมีอยู่ราว 5% ของ RNA ทั้งหมดในเซล

RNA Viruses

เท่าที่เรากล่าวมาถึง nucleic acid, replication และ transcription นั้น เราพูดถึงแต่ที่เกี่ยวข้องกับ DNA เป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจากสิ่งมีชีวิตแทบทั้งหมดรวมทั้งคนด้วยมีสารควบคุมกรรมพันธุ์เป็น DNA ในกรณีของ virus ที่มีแต่ RNA นั้น ขบวนการ replication และ transcription นั้นก็มีวิธีการเช่นเดียวกันกับของ DNA แต่ทว่าจะมี enzyme เกี่ยวข้องแตกต่างกัน โดย enzyme ที่ควบคุม RNA replication เรียกว่า replicase และ enzyme ที่ควบคุม RNA transcription เรียกว่า transcriptase

One Strand or Two ?

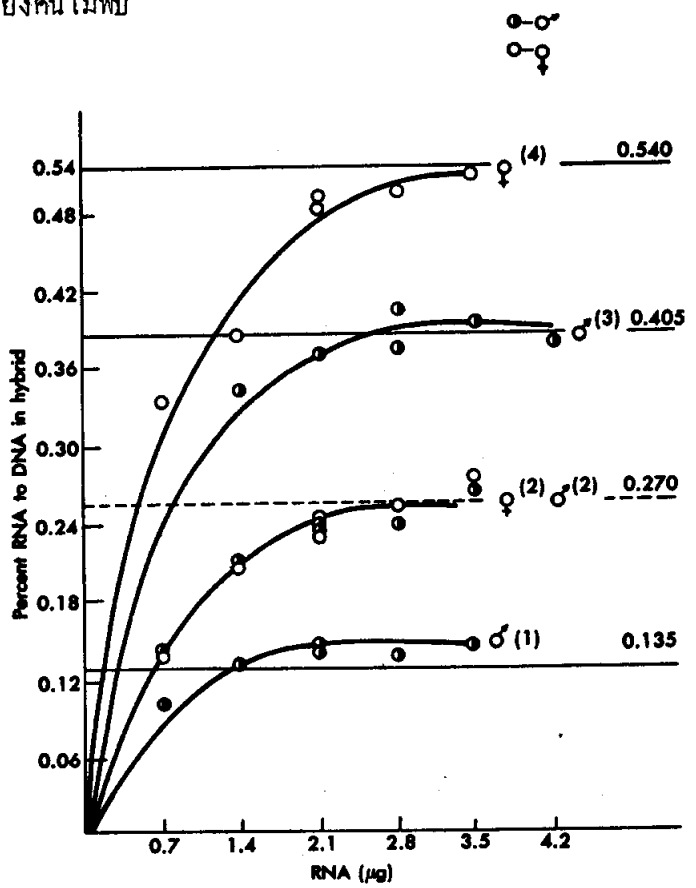
โดยเหตุที่ mRNA จะถูกสร้างขึ้นโดยการเป็น complementary กับ strand หนึ่งของ DNA จากการแยกตัวออกจากกันก่อน แล้วมี strand หนึ่งทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์สร้าง mRNA ขึ้นมา จึงมีปัญหาว่า strand อันใดอันหนึ่งเท่านั้นหรือทั้งสอง strands สามารถจะถ่ายทอด genetic code (transcribe) สร้าง mRNA ขึ้นมาได้ จากการทดลองก็พบว่าจะมี strand ของ DNA ที่เพิ่งเกิดขึ้นใหม่เพียง strand เดียวเท่านั้นที่จะทำหน้าที่สร้าง mRNA ขึ้นมา

Relationship of DNA to rRNA and tRNA

ภายหลังที่พบแล้วว่า mRNA เป็น complementary ต่อ DNA ก็มีปัญหาต่อไปอีกว่า RNA อีกสองชนิดคือ rRNA และ tRNA เป็น complementary ต่อ DNA ด้วยหรือไม่ จึงมีการทดลองโดยการนำ rRNA สองพวกมา label ด้วย radioactive isotopes ต่างชนิดกัน คือ นำ 16s rRNA จาก bacteria ที่ RNA ถูก label โดย H^3 และนำ 23s rRNA จาก bacteria ที่ RNA ถูก label ด้วย P^{32} จากนั้นจะนำ rRNA อันใดอันหนึ่งจำนวนมากเกินพอไปใส่รวมกับ DNA จาก bacteria พวกเดียวกัน เพื่อให้เกิด hybridization จนกระทั่งไม่เกิดอีก จากนั้นจึงเอา rRNA อีกชนิดหนึ่งใส่ตามลงไปเพื่อจะดูว่าเกิด secondary hybridization หรือไม่ ปรากฏว่า rRNA ทั้งสองพวกจะเกิด hybridization ได้อย่างอิสระกับ DNA จึงสรุปได้ว่า rRNA ทั้งสองชนิดเป็น complementary กับ DNA แต่เกิดจากคนละลำดับหรือคนละตำแหน่งของ DNA โมเลกุล การทดลองกับ tRNA ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน คือมันจะเป็น complementary กับ DNA แต่เกิดจากลำดับที่แตกต่างกันออกไป

ในระยะแรก ๆ ที่มีการค้นคว้าเกี่ยวกับวิธีการสร้างโปรตีนในเซลนั้น มีผู้รายงานว่าใน nucleoli และ cytoplasm ของเซลที่ active ในการสร้างโปรตีนนั้นจะมี rRNA อยู่ในปริมาณมาก จึงสันนิษฐานว่าทั้ง nucleoli, rRNA และ protein synthesis จะต้องมีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างมาก

ในปี ค.ศ. 1965 Ritossa และ Spiegelman ได้รายงานผลการทดลองกับแมลงหวี่ Drosophila melanogaster โดยใช้เทคนิค DNA/RNA hybridization เขารายงานว่าในแมลงหวี่นั้น nucleoli จะอยู่ติดกับส่วนใดส่วนหนึ่งของ X chromosome ที่เรียกว่า nucleolar organizer region (NO) จากการผสมพันธุ์แมลงหวี่จะทำให้ได้แมลงหวี่ที่มี NO ตั้งแต่ 1–4 แห่ง เมื่อ label rRNA ของแมลงหวี่เหล่านั้นด้วย ratioactive isotopes แล้วแยกออกมา hybridize กับ DNA ที่ได้มาจากแมลงหวี่ที่มีจำนวน NO 1–4 ก็พบว่าปริมาณของ rRNA ที่จะ hybridize ได้กับ DNA หน่วยหนึ่งนั้น จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนของ NO (รูปที่ 1-13) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าส่วนที่เป็น NO ของ X chromosome จะเป็น DNA template สำหรับสร้าง rRNA ทั้งสอง components ส่วนบริเวณที่เป็นที่สร้างของ tRNA นั้นยังค้นไม่พบ



รูปที่ 1-13 ปริมาณของ RNA ที่ hybridize กับ DNA ที่มีจำนวน NO แตกต่างกัน เลขในวงเล็บคือจำนวน NO เลขทางขวามือคือเปอร์เซ็นต์ของ RNA ที่จุดอิ่มตัวของ DNA ส่วนจำนวนซ้ำในการคำนวณแสดงไว้โดยวงกลม

Protein Synthesis

เราจะเห็นว่าโปรตีนนั้นจะมีอยู่นับเป็นพันชนิด แต่มันจะมีสิ่งหนึ่งที่เหมือนกัน นั่นคือมันจะถูกสร้างขึ้นโดยคำสั่งที่แน่นอนจาก genetic code ของ DNA โดยที่ DNA แม้จะอยู่ใน nucleus ตลอดเวลา แต่มันจะออกคำสั่งผ่านทาง mRNA ซึ่งเวลามันสร้าง mRNA นั้น ทั้งสอง strands ของ DNA จะแยกออกจากกันเป็นบางส่วน แล้วสร้าง single strand ของ mRNA ที่เป็น complementary กับ strand หนึ่งของ DNA ขึ้นมา ในการถ่ายทอดคำสั่งหรือ transcription ของ genetic code จาก DNA ไปสู่ mRNA นั้นจะมี enzyme RNA polymerase ช่วยเหลือ เมื่อสร้าง mRNA เสร็จแล้วทั้งสอง strands ของ DNA จะกลับเชื่อมเข้าด้วยกันดังเดิม จากนั้น mRNA จะออกจาก nucleus ไปยัง cytoplasm ไปเชื่อมกับ ribosome ตรงบริเวณที่เป็น 30s subunit อยู่ชั่วคราว

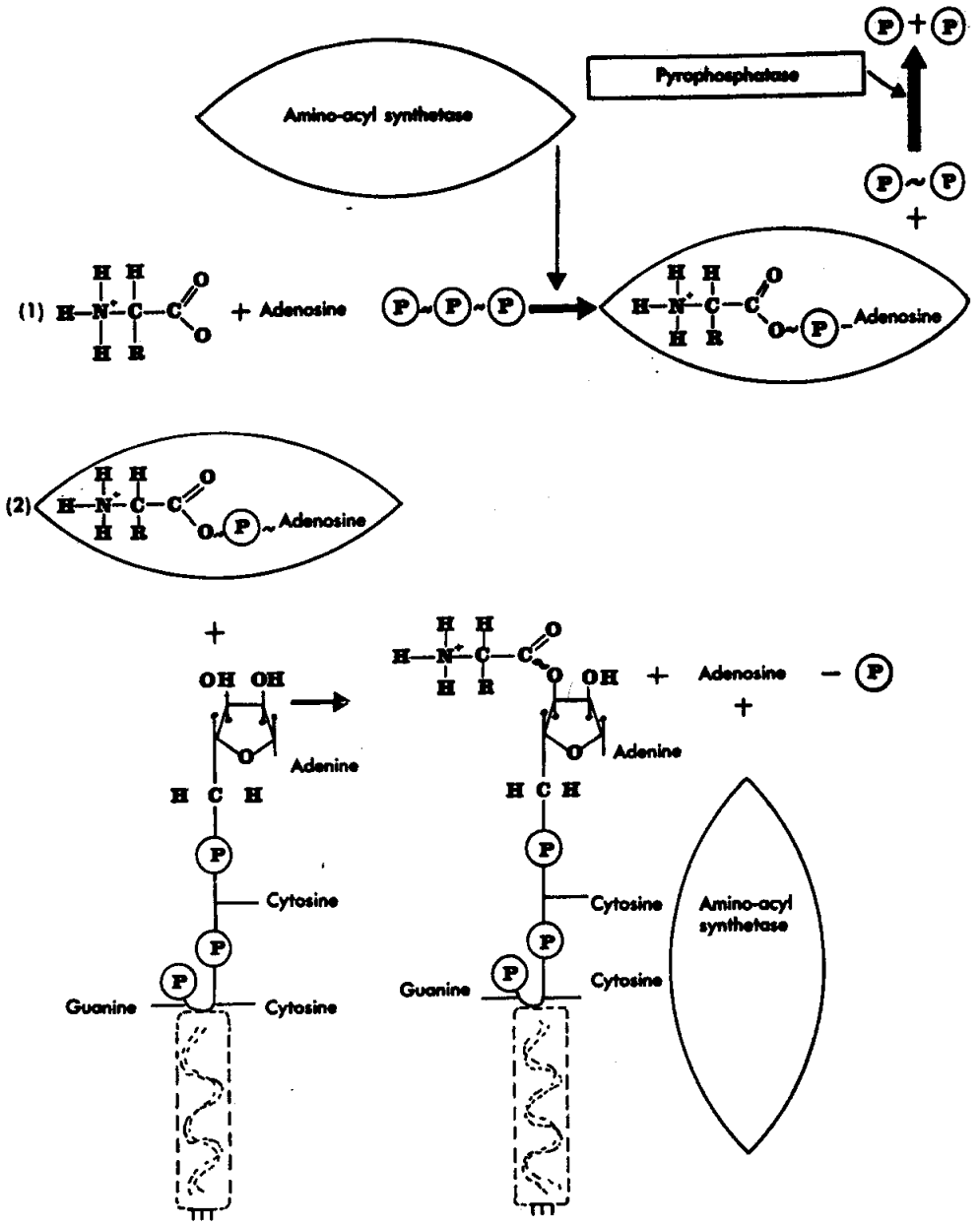
ภายใน cytoplasm ก็จะมี amino acid ชนิดต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นหรือที่ได้มาจากอาหารลอยอยู่มันจะเข้ารวมกับสาร ATP ซึ่งเป็นสารที่ให้พลังงานก่อน โดยมี amino -acyl RNA synthetase เป็น catalyst เนื่องจากว่า amino acid จะมีอยู่ 20 ชนิดด้วยกัน ดังนั้นแต่ละชนิดก็จะมี catalyst เฉพาะของมัน ผลที่ได้จากการรวมระหว่าง amino acid และ ATP จะเป็นสารประกอบ amino acid adenylate ซึ่งจะยังคงติดกับ catalyst อยู่และมีพลังงานพร้อมสำหรับปฏิกริยาขั้นต่อไป

$$\text{Amino acid + ATP} \xrightarrow[\text{catalyst or enzyme}]{\text{amino-acyl RNA synthetase}} \text{Amino acid adenylate(+ enzyme)}$$

ในขั้นต่อไป amino acid adenylate จะทำการถ่ายทอด amino acid ไปให้แก่ tRNA ที่เป็นคู่เฉพาะของมันโดยมี enzyme ตัวเดิมช่วย

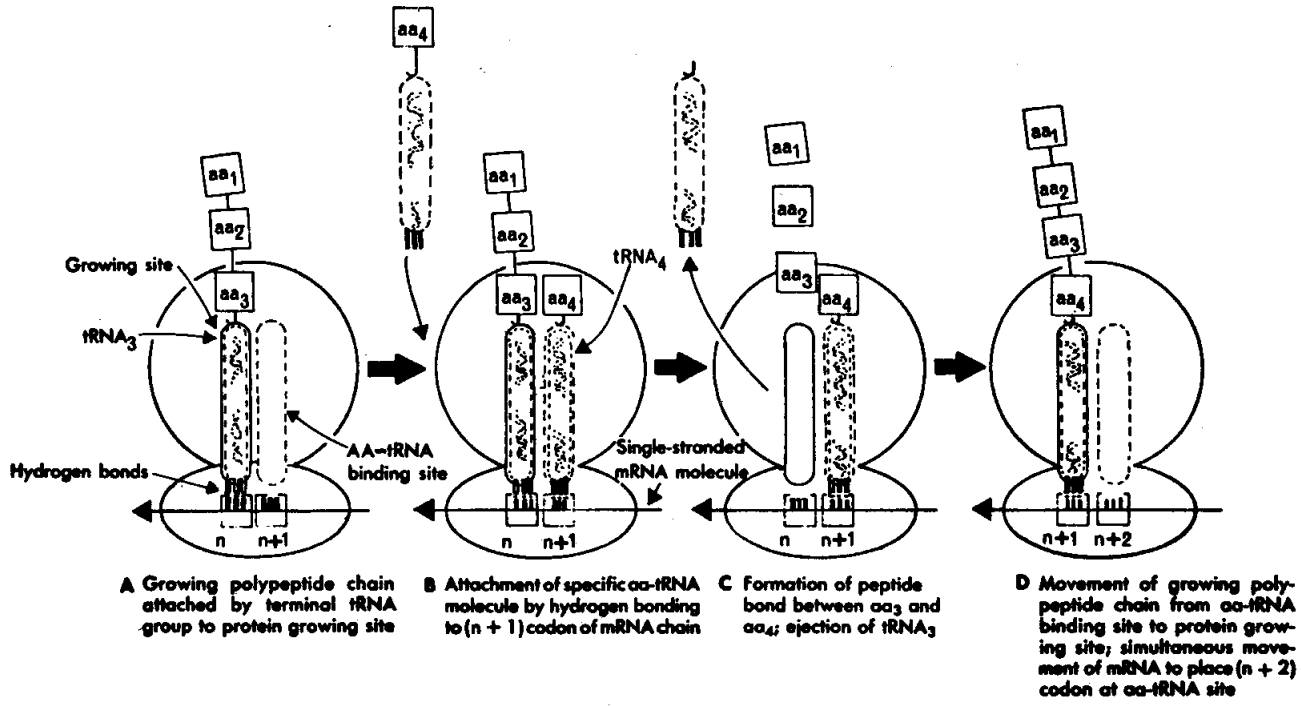
$$\text{Amino acid adenylate (+ enzyme) + tRNA} \longrightarrow \text{tRNA with amino acid}$$

จะเห็นได้ว่า ATP จะทำหน้าที่เป็นสารที่ให้พลังงานที่จำเป็นในการเชื่อม amino acid และ tRNA เข้าด้วยกัน ส่วน enzyme ที่มาช่วยให้ปฏิกริยาเกิดขึ้นนั้นจะต้องมีความเฉพาะเจาะจงกับ amino acid และ tRNA ด้วย ซึ่งก็หมายความว่า enzyme แต่ละตัวจะมี combining sites สองแห่งด้วยกัน แห่งหนึ่งเพื่อเชื่อมกับ amino acid ส่วนอีกแห่งหนึ่งนั้นจะเชื่อมกับ tRNA ที่เป็นคู่ของ amino acid แต่ละชนิด รูปที่ 1-14 แสดงปฏิกริยาทั้งสองขั้นตอนที่ amino acid จะเข้ารวมกับ tRNA



รูปที่ 1-14 แสดงการรวมระหว่าง amino acid เข้ากับ ATP และต่อมา amino acid จะถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ปลาย CCA ของ tRNA ที่เป็นคู่ของมัน

เมื่อ amino acid เชื่อมเข้ากับ tRNA แล้ว มันจะถูกพาไปยัง mRNA ซึ่งเชื่อมอยู่กับ ribosome อยู่ก่อนแล้ว บน mRNA เราก็ทราบแล้วว่าจะมีลำดับของ nucleotide ที่จะสั่งให้สร้างโปรตีนจาก amino acid ชนิดต่าง ๆ ขึ้นมา ถ้าหากว่า tRNA ที่นำ amino acid มามีลำดับของ nucleotide ตรงกับจุดเริ่มต้นของ mRNA ทั้ง tRNA และ amino acid ที่มันพามาจะลอดเข้าไปอยู่ในส่วนที่เป็น 50s subunit ของ ribosome (ส่วนที่เป็น 30s subunit จะเชื่อมกับ mRNA) และ mRNA บริเวณของ ribosome ที่มันลอดเข้าไปอยู่นี้เรียกว่า growing site จากนั้น ribosome จะเคลื่อนไปตามความยาวของ mRNA ไปถึงลำดับของ nucleotide ถัดไปที่จะบอกว่า amino acid ตัวต่อไปคืออะไร จากจุดนี้ก็จะมี tRNA นำ amino acid ตัวที่ mRNA บงไว้มาให้แก่ ribosome ตรงบริเวณที่เรียกว่า binding site จากนั้น amino acid ทั้งสองตัวจะเชื่อมเข้าด้วยกันด้วย peptide bond และ tRNA ตัวแรกก็จะหลุดออกไปทำหน้าที่จับ amino acid ต่อไปอีก ส่วน tRNA ตัวที่สองที่ยังคงอยู่ใน ribosome ก็จะยังคงเชื่อมกับ amino acid ที่ต่อเข้าด้วยกันแล้วสองตัว จากนั้น tRNA ตัวที่สองก็จะเคลื่อนไปอยู่ที่ growing site และ tRNA ตัวที่สามก็จะพา amino acid ตัวที่สามมายัง binding site เพื่อต่อเข้ากับ polypeptide chain เป็นดังนี้เรื่อยไปจนกว่าจะได้ polypeptide chain ที่ยาวเป็นโปรตีนตามที่ mRNA ได้รับคำสั่งมา เมื่อเสร็จแล้ว tRNA ตัวสุดท้ายก็จะหลุดออกไป โปรตีนก็จะหลุดออกเป็นอิสระจาก ribosome จะเห็นได้ว่าในช่วงเวลาหนึ่ง ๆ นั้นจะมี tRNA ไปอยู่ด้วยกันใน ribosome ไม่เกินสองตัว ส่วนการที่ tRNA จะทำหน้าที่ในการนำ amino acid เข้ามาเชื่อมต่อกันให้ถูกต้องตามลำดับของ genetic code บน mRNA นั้น มันจะต้องมีที่สองแห่งที่เฉพาะเจาะจงในการทำหน้าที่ โดยแห่งหนึ่งมันจะใช้เชื่อมเข้ากับ amino acid ที่เป็นคู่ของมัน ส่วนอีกแห่งหนึ่งนั้นมันจะต้องสามารถจับได้กับกลุ่มของ nucleotides ที่เป็นชุด ๆ บน mRNA ได้ สันนิษฐานกันว่า tRNA จะมี nucleotides 3 ตัวด้วยกันที่เป็น complementary กับ nucleotides ของ mRNA ในการที่จะบงถึง amino acid ตัวใดตัวหนึ่งออกมา การสร้าง polypeptide chain ตาม genetic code ที่ mRNA นำมาจาก DNA ใน nucleus เรียกว่า translation ขบวนการสังเคราะห์โปรตีนได้แสดงไว้ในรูปที่ 1-15



รูปที่ 1-15 แสดงลำดับในการสร้าง polypeptide chain

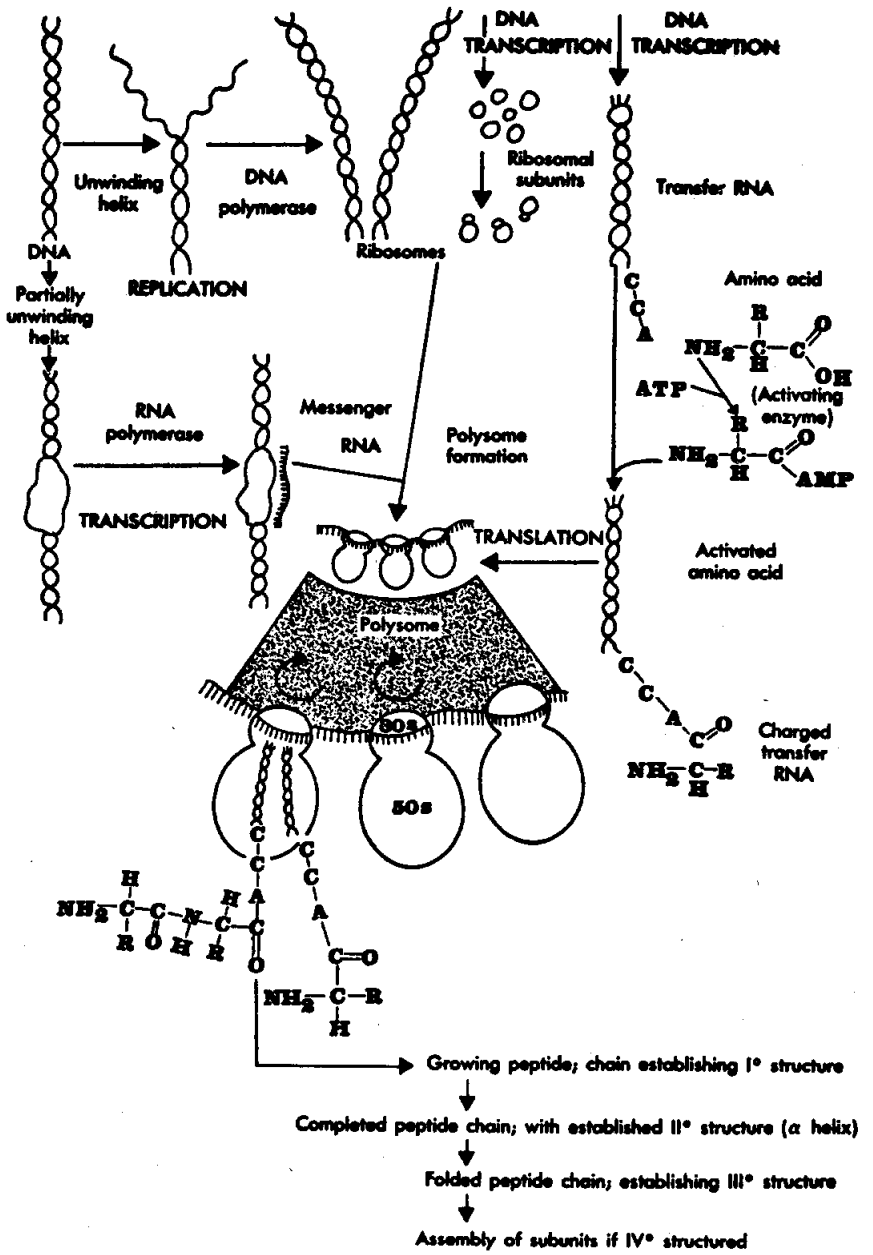
จากการศึกษาพบว่ามี amino acid เพียง 20 ชนิดเท่านั้น แต่จะมีโปรตีนจำนวนมากมายด้วยกัน ทั้งนี้เนื่องจากว่าในการสร้างโปรตีนขึ้นมาโดยการนำ amino acid มาต่อ ๆ เข้าด้วยกันนั้น จากจำนวน amino acid 20 ชนิด เราสามารถที่จะนำมาเรียงกันเป็น combination ต่าง ๆ ได้จำนวนนับไม่ถ้วน

เนื่องจากว่าโมเลกุลของ mRNA จะมีความสั้นยาวแตกต่างกันไปมาก ดังนั้นบางโมเลกุลอาจมี ribosome เพียงตัวเดียวมาทำหน้าที่ในการถอด code จากปลายหนึ่งของ mRNA ไปหาอีกปลายหนึ่งเป็น unidirectional สร้าง polypeptide chain หรือโปรตีนขึ้นมาตาม genetic code ของ mRNA ทุกประการ แต่ว่าบางโมเลกุลของ mRNA อาจมีความยาวมากจึงมี ribosomes หลาย ๆ ตัว กลุ่มเป็น polysome ขึ้นมาช่วยกันสร้าง polypeptide chains ขึ้นมาที่เดียวหลาย ๆ เส้นพร้อมกันก็ได้ นั่นก็หมายความว่า mRNA โมเลกุลหนึ่งจะทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนขึ้นมาได้หลายตัวพร้อมกัน โดย ribosome แต่ละตัวจะสร้างโปรตีนขึ้นมาจากแต่ละช่วงของ mRNA template ที่แยกกันต่างหาก

ความยาวของ polypeptide chain ที่สังเคราะห์ขึ้นมาแต่ละเส้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับช่วงของ message หรือ genetic code ของ mRNA ที่ ribosome แต่ละตัวจะถอดหรือแปลออกมา ใน E. coli ความยาวเฉลี่ยของ mRNA ประมาณ 900–1500 nucleotides ดังนั้นถ้าหากมี ribosome เพียงตัวเดียวมาทำหน้าที่ถอด code ตั้งแต่ต้นจนจบ ก็จะได้ความยาวของ polypeptide chain ที่ประกอบด้วย 300–500 amino acids (3 nucleotides ควบคุม amino acid หนึ่งชนิด)

ในด้านอายุของ mRNA ในการทำงานก็ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต ได้มีการทดลองหา half-life ของ mRNA โดยการนำเอาเซลไปใส่ในสาร Actinomycin D เพื่อยับยั้งการทำงานของ enzyme RNA polymerase ไม่ให้สราง mRNA ขึ้นมา ดังนั้นถ้าในเซลยังมีการสร้างโปรตีนขึ้นมาได้อยู่ ก็แสดงว่ามันจะต้องใช้ mRNA ของเก่าที่มีอยู่เพื่อสร้างโปรตีน ซึ่งเราสามารถจะตรวจดูได้ว่า mRNA จะคงอยู่ได้นานแค่ไหน ในการศึกษากับ bacteria พบว่า mRNA ของมันจะมีอายุสั้น จะมี half-life ราว 2 นาที ดังนั้นมันจะต้องมีการสร้าง mRNA ใหม่อยู่ตลอดเวลา ใน embryo ของลูกไก่ การสราง eye lens protein จะถูกควบคุมโดย mRNA สองชนิดที่มีอายุแตกต่างกัน ชนิดหนึ่งจะมี half-life 3 ชั่วโมง ส่วนอีกชนิดหนึ่งจะมี half-life มากกว่า 30 ชั่วโมง ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม mRNA ที่ควบคุมการสราง hemoglobin จะมีอายุการทำงานนานมาก สันนิษฐานว่าการที่จะมี mRNA ที่มีอายุยืนยาวปรากฏอยู่หรือไม่นั้นจะถูกกำหนดโดยความต้องการของเซลว่าจะมีความต้องการโปรตีน

ชนิดนั้น ๆ อยู่ตลอดเวลาหรือเพียงชั่วคราวเท่านั้น รูปที่ 1-16 แสดงให้เห็นถึงการสร้าง DNA ขึ้นมาจาก DNA template (replication) การสร้าง RNA จาก DNA template (transcription) และการสร้างโปรตีนที่กำหนดมาโดย mRNA (translation)



รูปที่ 1-16 แสดงขั้นตอนของ replication, transcription, and protein synthesis

Genetic Code

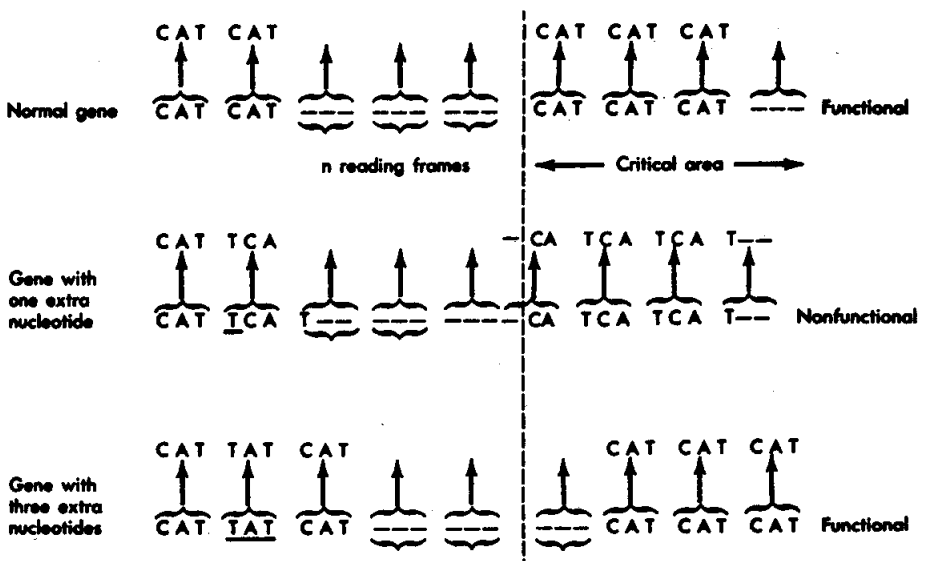
จากการค้นพบว่าทั้งโปรตีนและ **nucleic acid** ต่างก็มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน คือจะ เกิดจากโมเลกุลเล็ก ๆ มาต่อกันตามความยาว โดยโปรตีนจะ เกิดจากการต่อกันของ **amino acids** ส่วน **nucleic acid** เกิดจากการต่อกันของ **nucleotides** จึงทำให้มีการตั้งสมมุติฐานขึ้นมาว่าลำดับของ **amino acids** ในโปรตีนชนิดหนึ่งจะถูกกำหนดโดยลำดับของ **amino acids** ในยีนส์หนึ่งตัว เรา เรียกความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของโปรตีนและยีนส์แบบนี้ว่า **colinearity** ดังนั้นถ้า เราทำการ เปลี่ยนลำดับของ **nucleotides** ในยีนส์ ก็จะยังผลให้ลำดับของ **amino acid** ในโครงสร้างของโปรตีนต้อง เปลี่ยนแปลงไปด้วย จากข้อสมมุติฐานดังกล่าวก็แสดงว่าในการสร้างโปรตีนนั้น **DNA** จะถ่ายทอด **genetic code** ออกมาทาง **mRNA** ที่นี้ก็มีปัญหาว่ามันสร้าง **genetic code** ขึ้นมาได้อย่างไรจากจำนวน **nucleotides** ของ **mRNA** ที่มีอยู่เพียง 4 ตัว เท่านั้น (**A, U, G, C**) นำมา **code** ให้ได้ **amino acid** ถึง 20 ตัว ถ้าหากว่าการกำหนด **amino acid** หนึ่งตัว เกิดจากกลุ่มของ **nucleotide** หลายตัวด้วยกัน เรา เรียกกลุ่ม **nucleotide** นั้นว่าเป็นหนึ่ง <u>codon</u> เราจำเป็นจะต้องศึกษาว่าหนึ่ง **codon** นั้นเกิดจากกี่ **nucleotides** มารวมกันทำหน้าที่

ถ้า เราสมมุติว่า **genetic code** นั้นเป็นแบบ **singlet code** คือ 1 **codon** มี 1 **nucleotide** ทำหน้าที่ **code amino acid** ขึ้นมาหนึ่งชนิด เราก็จะได้ **amino acid** เพียง 4 ชนิดเท่านั้นตามจำนวน **nucleotides** ที่มีอยู่

ถ้าหากเป็นแบบ **doublet code** คือ 1 **codon** มี 2 **nucleotides** ทำหน้าที่ **code amino acid** ได้หนึ่งชนิด ก็จะได้ **amino acid** ทั้งหมด 16 ชนิดด้วยกัน (4 x 4) ซึ่งไม่เพียงพอกับจำนวน **amino acid** ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ

ถ้าหากเป็นแบบ **triplet code** คือ 1 **codon** มี 3 **nucleotides** ทำหน้าที่ **code amino acid** ได้หนึ่งชนิด ก็จะได้ถึง 64 **codons** ด้วยกัน (4 x 4 x 4) ซึ่งมากกว่าจำนวน **amino acid** ที่มีอยู่เพียง 20 ชนิดเท่านั้น แต่อย่างไรก็ดี **triplet code** ก็ได้รับความสนใจมากว่านาจะเป็นไปได้ในการทำหน้าที่ **code amino acid** ทั้ง 20 ชนิดขึ้นมา และโดยเหตุที่จำนวน **codons** มันมีมากกว่าจำนวน **amino acids** จึงสันนิษฐานว่า **genetic code** มันอาจจะเสื่อมหรือ **degenerate** ได้ นั่นคือ **amino acid** บางชนิดอาจถูก **code** ขึ้นมาโดย **codon** มากกว่าหนึ่ง (หลาย **codons code amino acid** ตัวเดียวกัน)

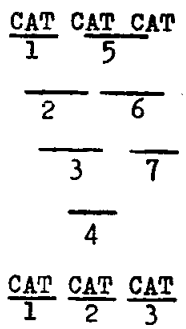
ได้มีการทดลองเพื่อที่จะสนับสนุนข้อสมมติฐานที่ว่า codon เกิดจาก triplet code โดยการทดลองกับ bacteriophage T4 ที่ชอบทำลาย E. coli phage พวกนี้สามารถที่จะตรวจดูลำดับของ nucleotide ของมันได้ มีการแยกเอา T4 บางพวกที่มีความแตกต่างไปจากพวกปกติในด้านจำนวนของ nucleotides ที่มีอยู่ในส่วนใดส่วนหนึ่งของ DNA พบว่าพวกที่มี nucleotides เพิ่มขึ้นจากปกติหนึ่งหรือสองอัน ไม่สามารถจะทำงานอย่างปกติได้ แต่ในพวกที่มี nucleotides เพิ่มขึ้นมาสามอันจะสามารถทำหน้าที่ได้อย่างปกติ เชื่อว่าการที่มันจะทำงานได้อย่างปกตินั้นมันจะต้องสร้าง specific protein ขึ้นมา เมื่อมีการเพิ่ม nucleotide หนึ่งหรือสองอันเข้าไปใน DNA ของ virus จะทำให้มันไม่สามารถสร้างโปรตีนที่ต้องการ เนื่องจากมีการอ่าน code ที่ผิดปกติเกิดขึ้น แต่เมื่อเพิ่ม nucleotides เข้าไปสามอันด้วยกัน จะทำให้การถอด code จาก mRNA กลับคืนมาได้อีกจึงสามารถสร้างโปรตีนที่จำเป็นได้ อย่างไรก็ตามการที่มี nucleotides สามอันแปลกปลอมเข้าไปใน genetic message ก็จะทำให้ยีนส์ที่ครอบคลุม nucleotides บริเวณนั้นอยู่ เสียหายหรือทำหน้าที่ไม่ได้เหมือนกัน แต่เนื่องจากบริเวณนั้นอาจไม่สำคัญมากนักไม่มีผลกระทบกระเทือนต่อโปรตีนที่มันจะสร้างขึ้น เมื่อส่วนที่เหลือของ genetic code ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญถูกอ่านในลำดับที่ปกติสร้างโปรตีนที่จำเป็นขึ้นมาได้ จึงทำให้มันทำงานได้ดังเดิม ผลการทดลองได้แสดงไว้ในรูปที่ 1-17



รูปที่ 1-17 การเปลี่ยนแปลงของ nucleotide และการอ่าน triplet code ถ้าเพิ่ม nucleotide เข้าไปหนึ่งอันจะทำให้การอ่าน code ผิดหมด แต่ถ้าเพิ่ม nucleotide เข้าไปสามอัน จะทำให้อ่าน code ได้ถูกต้องตามเดิม

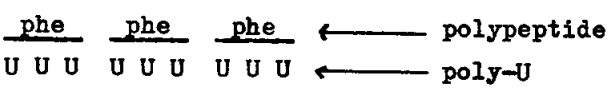
ผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันว่า codon หนึ่ง ๆ นั้นจะประกอบด้วย 3 nucleotides การอ่านจะอ่านออกมาทีละ 3

ในการอ่าน genetic code นั้น เราอาจจะสงสัยว่ามันอ่านแบบ overlapping หรือ nonoverlapping



ผลจากการทดลองยืนยันว่า genetic code จะเป็นแบบ nonoverlapping จะอ่านไปทีละสามต่อเนื่องกันไป โดยไม่มีการเว้น nucleotide ตัวใดตัวหนึ่ง

ในการศึกษาเพื่อที่จะตรวจดูว่า triplet อันไหนที่จะทำหน้าที่ code amino acid ชนิดไหนนั้น จำเป็นที่จะต้องสังเคราะห์ mRNA ต่าง ๆ ขึ้นมาให้ได้ ซึ่งในปี ค.ศ. 1955 Ochoa ก็ค้นพบวิธีการสังเคราะห์ RNA ขึ้นมาได้ หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1961 Nirenberg และ Matthaei ก็ได้ใช้วิธีการดังกล่าวสังเคราะห์ polyuridylic acid (poly-U) ซึ่งเป็น RNA ที่เกิดจาก nucleotides ที่มี base uracil ล้วน ๆ มาต่อกัน จากนั้นจึงนำ poly-U ไปใส่รวมกับ amino acid ชนิดต่าง ๆ ในขบวนการสังเคราะห์โปรตีน เพื่อจะดูว่า mRNA ดังกล่าวสามารถจะทำให้ amino acid ชนิดไหนบ้างมาต่อกันขึ้นเป็นโปรตีน ผลปรากฏว่าจะเกิด polypeptide ขึ้นมาจากการต่อกันของ amino acid ชนิดเดียวเท่านั้น คือ phenylalanine ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า code สำหรับ phenylalanine ก็คือ UUU



หลังจากนั้นก็มีการทดลองคล้าย ๆ กันติดตามมา พบว่า triplet code สำหรับ amino acid ชนิดอื่น คือ

AAA - lysine

CCC - proline

GGG - glycine

ต่อมาก็สามารถจะทำการสังเคราะห์ RNA ขึ้นได้จาก bases หลาย ๆ ชนิด ทำให้สร้าง mRNA ที่มี nucleotides ต่างชนิดขึ้นได้ เช่น ในการสร้าง polyribonucleotides จากการผสม 5U:1A ซึ่งจากอัตราส่วนของ nucleotides สองชนิดนี้ เราสามารถจะได้ triplets ใน combination ต่าง ๆ ได้ดังนี้ UUU = 125 (มาจาก $\frac{5}{6} \times \frac{5}{6} \times \frac{5}{6} = \frac{125}{216}$), UUA = UAU = AUU = 25, AAU = AUA = UAA = 5, AAA = 1 ซึ่งจากผลการทดลองปรากฏว่าใน polypeptide ที่สังเคราะห์ขึ้นมาจะมีอัตราส่วนของ phenylalanine:tyrosine:asparagine:lysine = 125:25:5:1 เพราะฉะนั้น เมื่อเราทราบจากผลการทดลองก่อน ๆ แล้วว่า code ของ phenylalanine และ lysine คือ UUU และ AAA ดังนั้น tyrosine จะต้องมี code เป็น UUA หรือ UAU หรือ AUU ตัวใดตัวหนึ่ง และ code ของ asparagine ก็ควรจะเป็น AAU หรือ AUA หรือ UAA ตัวใดตัวหนึ่งเช่นเดียวกัน แต่ความรู้เหล่านี้ก็ยังไม่เป็นการเพียงพอ เนื่องจากว่าเรายังไม่สามารถจะพิสูจน์ได้ว่า ถ้ามี nucleotides ต่างชนิดกันมารวมกัน code amino acid ชนิดหนึ่งแล้ว combination ไหนแน่ที่ทำหน้าที่ code amino acid ตัวนั้น ไม่เหมือนกับกรณีที่ code เกิดจาก nucleotide เพียงชนิดเดียว เช่น ในกรณีของ asparagine มี code 3 ตัวที่จะเป็นไปได้คือ AAU, AUA และ UAA แต่เราก็ไม่รู้ว่าจะเป็นตัวไหนแน่

ในปี ค.ศ. 1964 Nirenberg ก็ได้ค้นพบวิธีการที่จะใช้พิสูจน์ได้ โดยเขาใช้ความรู้จากที่ว่า tRNA จะมีความเฉพาะเจาะจงในการที่จะเชื่อมกับ ribosome-mRNA complex แม้ว่า mRNA จะสั้นมากและเกิดจาก codon ที่มี nucleotides เพียงสามตัวเท่านั้นก็ตาม (single trinucleotide) ซึ่งจากวิธีการทางเคมีสามารถจะสร้าง mRNA ขึ้นได้จาก nucleotides สามตัวที่เรารู้ลำดับได้อย่างแน่นอน เขาจึงทำการทดลองโดยใช้ filter พิเศษที่สามารถจะปล่อยให้ tRNA โมเลกุลผ่านไปได้ เพราะเป็นโมเลกุลเล็กแต่จะกรอง ribosomes ซึ่งเป็นโมเลกุลใหญ่ไว้ เขาจึงนำ tRNA ไป charge เข้ากับ amino acid ที่เป็นคู่ของมันซึ่ง label แล้วด้วย radioactive isotopes แยกกันเป็นคู่ ๆ ไป และอีกด้านหนึ่งก็นำ mRNA ที่รู้ลำดับของ nucleotides ทั้งสามตัวแน่นอนมาทำให้มันรวมกับ ribosome จากนั้นก็นำ tRNA แต่ละชนิดที่จับกับ amino acid แล้วเอาไปใส่รวมกับ ribosome + mRNA ทำการ incubate จากนั้นก็นำไปผ่าน filter ถ้าหากว่า radioactive amino acid มันลอดผ่าน filter ไปก็แสดงว่า tRNA ที่นำมันไปนั้นไม่ได้เกาะกับ ribosome เนื่องจากมี code ไม่ตรงกับของ mRNA แต่ถ้าหาก amino acid มันเกิดไปติดอยู่กับ filter ก็แสดงว่าลำดับของ trinucleotide ของ mRNA นั้นเป็น code

ของ amino acid ดังกล่าว เขาใช้วิธีการดังกล่าวนี้ทดสอบกับ amino acid ทีละชนิด จนครบทั้ง 20 ชนิด (ตารางที่ 1-1) กับ triplet code ทั้ง 64 combinations จนทำให้เรารู้ได้ว่า codons ต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่ในการ code amino acid ชนิดต่าง ๆ นั้นมีอะไรบ้างดังได้แสดงไว้แล้วในตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1-1 Amino acids 20 ชนิด ที่พบในโปรตีนทั้งหมด

Amino acid	Abbreviation
Alanine	Ala
Arginine	Arg
Asparagine	AspN
Aspartic acid	Asp
Cysteine	Cys
Glutamic acid	Glu
Glutamine	GluN
Glycine	Gly
Histidine	His
Isoleucine	Ileu
Leucine	Leu
Lysine	Lys
Methionine	Met
Phenylalanine	Phe
Proline	Pro
Serine	Ser
Threonine	Thr
Tryptophan	Tryp
Tyrosine	Tyr
Valine	Val

ตารางที่ 1-2 Genetic code ซึ่งประกอบด้วย 64 triplet combinations และชนิดของ amino acids ที่จะเกิดขึ้นจาก codons เหล่านั้น

First letter	Second letter: U	Second letter: C	Second letter: A	Second letter: G	Third letter
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Ochre (terminator)	UGA (terminator)	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Amber (terminator)	UGG Tryp	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 GluN	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG GluN	CGG Arg	G
A	AUU Ileu	ACU Thr	AAU AapN	AGU Ser	U
	AUC Ileu	ACC Thr	AAC AapN	AGC Ser	C
	AUA Ileu	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

ต่อมามีการทดลองใช้ mRNA ที่มี nucleotide เพียงหนึ่งหรือสองตัวบ้าง ก็ปรากฏว่าไม่มีการจับระหว่าง tRNA กับ ribosome เลย ดังนั้นจึงเป็นการพิสูจน์ยืนยันอีกทางหนึ่งว่า code ต่าง ๆ นั้นมันเป็น triplet

จากตารางที่ 1-2 จะเห็นว่ามี 3 codons คือ UAA, UAG, และ UGA ที่ไม่ได้ทำหน้าที่ code amino acid ชนิดไหนเลย จึงเรียกว่า nonsense codons หรือ terminators หรือ stop การที่มันได้ชื่อว่า terminators หรือ stop ก็เนื่องจากว่าถ้ามันไปปรากฏอยู่ใน mRNA ตอนไหนมันจะหยุดการสร้าง polypeptide ทันที แม้ว่ามันจะยังสร้างไม่เสร็จตามลำดับของ nucleotides ใน mRNA เลยก็ตาม

จากตารางที่ 1-2 จะพบว่า amino acid เกือบทั้งหมดจะมี codons อย่างน้อยสองตัว และบางชนิดก็มีได้มากถึงหกตัว การที่มี codons หลาย ๆ ตัวมาทำหน้าที่ code amino acid ตัวเดียวกันเรียกว่า code degeneracy ส่วน codon AUG นั้นเข้าใจว่านอกจากจะ code methionine แล้วยังทำหน้าที่เป็น initiator หรือจุดเริ่มต้นของ message ในการสร้าง protein ด้วย ซึ่งเข้าใจว่านอกจาก codon นี้แล้วยังอาจมีตัวอื่นๆ อีกด้วย

เมื่อเราทราบถึง code ของ amino acid ต่าง ๆ แล้ว ก็มีปัญหาติดตามมาอีกว่า ในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันนั้น codon ชนิดเดียวกันสามารถจะทำหน้าที่ code amino acid ชนิดเดียวกันได้หรือไม่ เช่น codon ชนิดหนึ่งที่ code amino acid ชนิดหนึ่งใน bacteria จะสามารถ code amino acid ชนิดเดียวกันนั้นในคนได้หรือไม่ คำตอบก็คือมันสามารถจะ code amino acid ได้เหมือน ๆ กัน จากการทดลองใน bacteria โดยใช้ ribosome + tRNA + poly-U จะได้ polyphenylalanine ขึ้นมา และเมื่อทดลองกับกระต่ายก็ได้ผลเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นยังพบอีกว่า ถ้านำ mRNA จากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งไปใส่ในระบบสังเคราะห์โปรตีนของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง พบว่ามันสามารถจะสร้างโปรตีนขึ้นมาได้ตาม mRNA ที่ไม่ใช่ของมันได้

สรุปแล้ว codon ของ amino acid จะเป็น triplet การถอด code จะเป็นแบบ nonoverlapping ซึ่งจะมีการอ่านต่อเนื่องกันไปเป็นลำดับ โดยไม่มีการเว้น base ชนิดหนึ่งชนิดใด