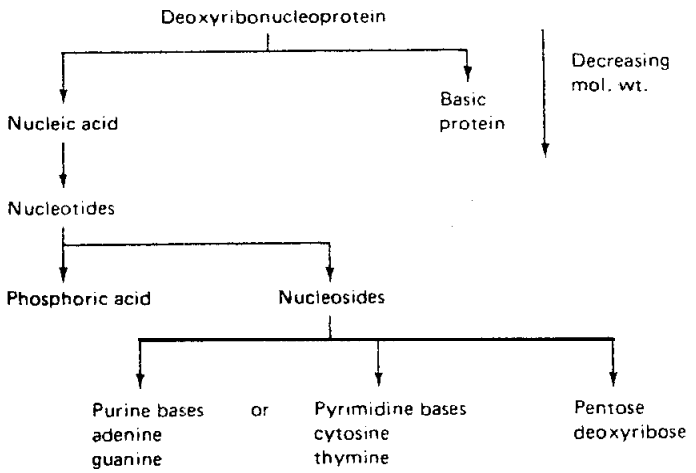
บทที่ 5
กรดนิวคลีอิค

กรดนิวคลีอิค (nucleic acids) เป็นโพลีเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ น้ำหนักโมเลกุลสูง มีประจุลบเนื่องจากหมู่ฟอสเฟต จับกับเบสิคโปรตีน ซึ่งมีประจุบวกอยู่ภายในเซลล์รวมเรียกว่านิวคลีโอโปรตีน แยกจากโปรตีนได้โดยทำปฏิกริยากับกรดหรือสารละลายเกลือที่ความเข้มข้นสูง ๆ กรดนิวคลีอิคแบ่งออกเป็นสองชนิด คือกรดไรโบนิวคลีอิค (ribonucleic acid หรือ RNA) และกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิค (deoxyribonucleic acid หรือ DNA)

เมื่อนำ DNA หรือ RNA ไปไฮโดรไลซ์ภายใต้สภาวะที่ควบคุมจะได้สารนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ของกรดนิวคลีอิค และเมื่อทำปฏิกริยาไฮโดรไลซีสต่อไปอีกจะได้นิวคลีโอไซด์และในที่สุดก็ได้ฟอสเฟต น้ำตาล เบสเพียวรีน (purine base) และเบสพิริมิดีน (pyrimidine base)

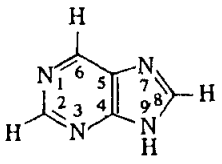


รูปที่ 5.1 แผนผังแสดงความสัมพันธ์ระหว่างนิวคลีโอโปรตีน และองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

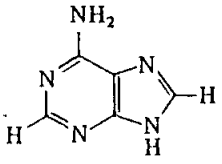
องค์ประกอบของ RNA คล้ายคลึงกับ DNA ยกเว้นน้ำตาลและเบส ใน RNA เป็นน้ำตาลไรโบสและเบสยูราซิล (uracil) ส่วนใน DNA เป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส และเบสไธมีน (thymine)

องค์ประกอบของกรดนิวคลีอิค

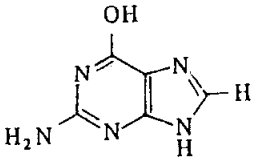
เบสเพียวรีน ได้แก่อะดีนีน (adenine) และกวานีน (quanine) ตำแหน่ง N^9 ของเพียวรีนจับกับตำแหน่งที่ 1′ ของน้ำตาลฟิวราโนส



Purine
(parent compound)

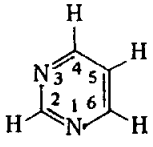


Adenine

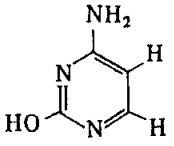


Guanine

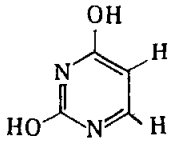
เบสพิริมิดีน ได้แก่ ไซโตซีน (cytosine) ไธมีน และยูราซิลตำแหน่ง N^1 ของ พิริมิดีนจับกับตำแหน่ง 1′ ของน้ำตาลฟิวราโนส



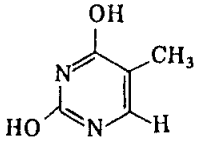
Pyrimidine
(parent compound)



Cytosine

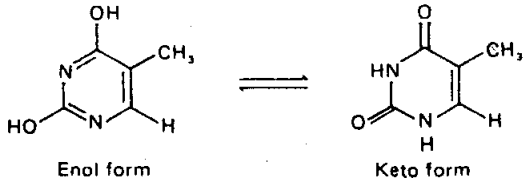


Uracil



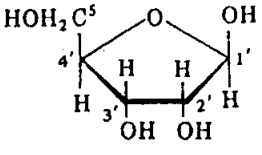
Thymine

ทั้งเบสเพียวรีนและเบสพิริมิดีน อาจจะอยู่ในรูปแบบอินอล (enol) หรือรูปแบบคีโต (keto)

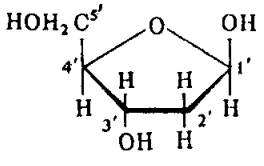


Enol form ⟺ Keto form

น้ำตาลเปนโตส ใน DNA คือดีออกซีไรโบส ส่วนใน RNA คือน้ำตาลไรโบส ต่างกันตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 การบอกตำแหน่งอะตอมต่าง ๆ ของน้ำตาลใช้ ตัวเลข 1′, 2′, 3′..... เพื่อให้ต่างจากตำแหน่ง 1, 2, 3,.....ของเบส

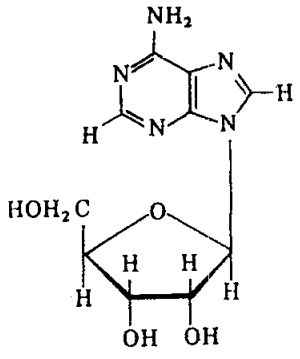


β-D-Ribofuranose

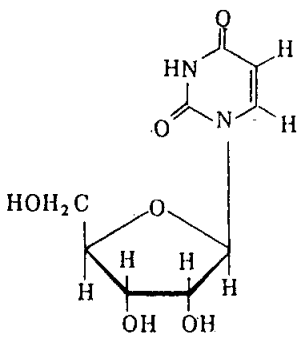


β-D-2-Deoxyribofuranose

นิวคลีโอไซด์ เป็นโมเลกุลเบสที่เกาะยึดอยู่กับน้ำตาล



Adenosine



Uridine

อะดีนีน+น้ำตาล = นิวคลีโอไซด์อะเดโนซีน (adenosine)
กวานีน+น้ำตาล = นิวคลีโอไซด์กวาโนซีน (quanosine)
ไซโตซีน+น้ำตาล = นิวคลีโอไซด์ไซติดีน (cytidine)
ยูราซิล+น้ำตาล = นิวคลีโอไซด์ยูริดีน (uridine)
ไธมีน+น้ำตาล = นิวคลีโอไซด์ไธมิดีน (thymidine)

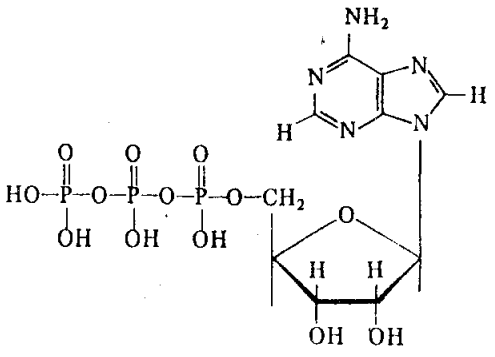
ใน t-RNA มีนิวคลีโอไซด์ที่แปลกออกไปคือ ซูโดยูริดีน (pseudouridine) โดยที่น้ำตาลจับกับเบสยูราซิลที่ตำแหน่งที่ 5 ไม่ใช่ตำแหน่งที่ 1 เหมือนนิวคลีโอไซด์ปกติ

นิวคลีโอไทด์ หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2′, 3′ และ 5′ ของน้ำตาลไรโบส และหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3′ และ 5′ ของน้ำตาลดีออกซีไรโบสจะเกิดปฏิกริยาเอสเทอริฟิเคชั่นกับกรดฟอสฟอริคได้เป็นพันธะเอสเทอร์ ชื่อของนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์ยึดชื่อของเบสเป็นหลัก

นิวคลีโอไทด์ที่มีบทบาทสำคัญทางชีววิทยามากคือ adenosine di และ triphosphate (ADP และ ATP) quanosine di และ tri phosphate (GDP และ GTP) และ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)

ตารางที่ 6.1 การเรียกชื่อเบส, นิวคลีโอไซด์และนิวคลีโอไทด์

Base	Nucleoside	Nucleotide
Adenine	Adenosine	Adenylic acid
Guanine	Guanosine	Guanylic acid
Uracil	Uridine	Uridylic acid
Cytosine	Cytidine	Cytidylic acid
Thymine	Thymidine	Thymidylic acid



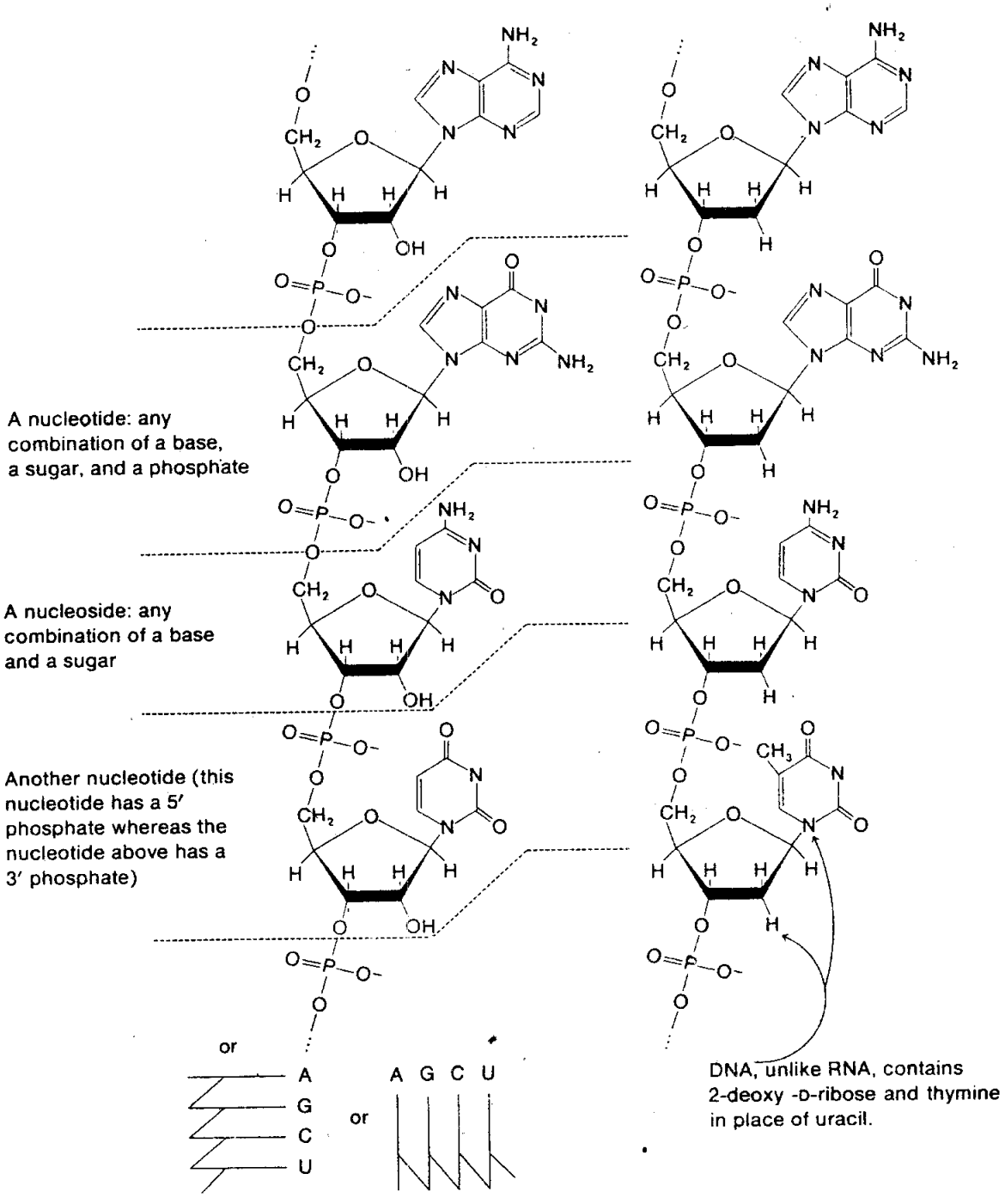
Adenosine triphosphate (ATP)

โครงสร้างกรดนิวคลีอิค

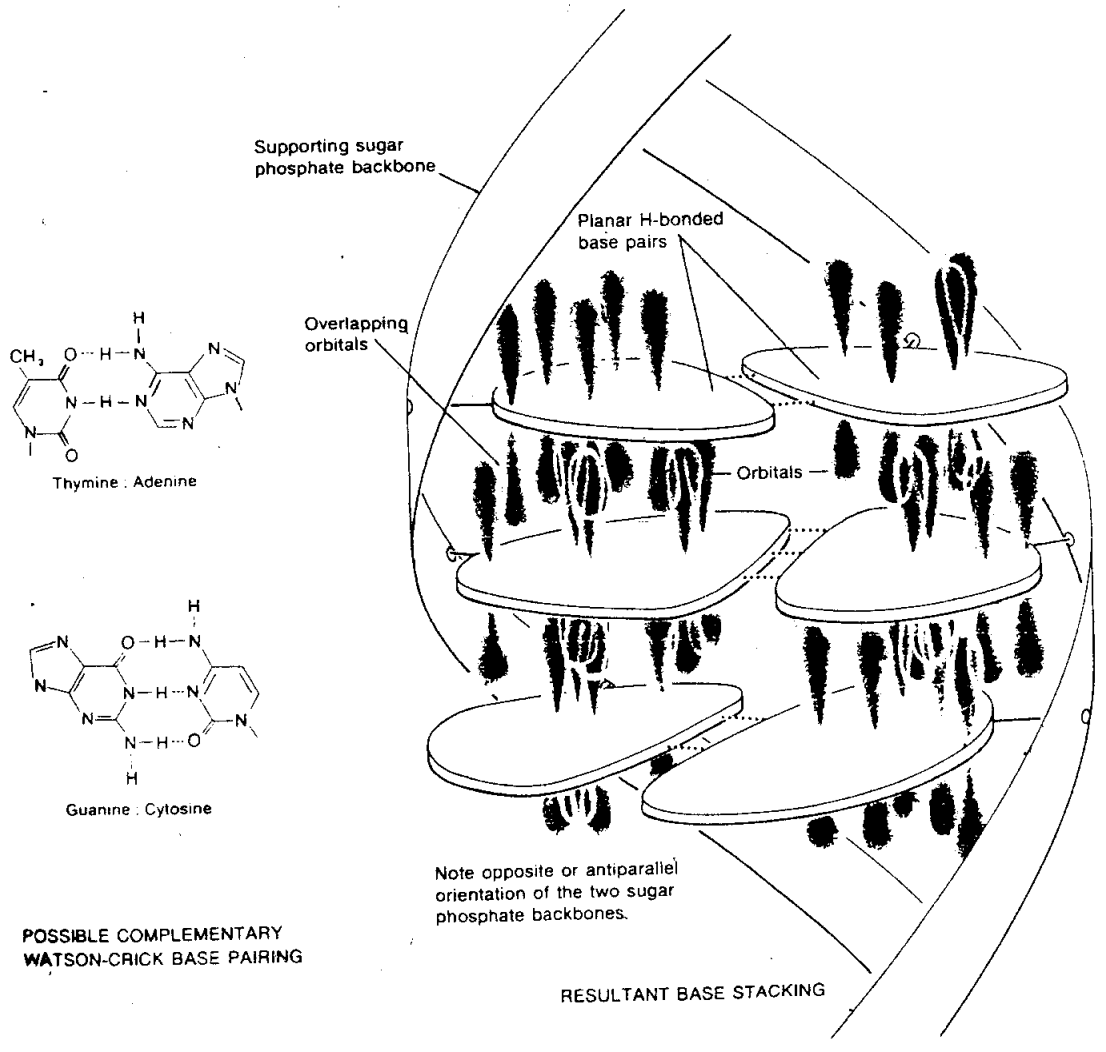
กรดนิวคลีอิคเป็นสารโมเลกุลใหญ่ ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์เป็นจำนวนมาก จึงเป็นการยุ่งยากและไม่สะดวกถ้าจะต้องเขียนรายละเอียดของแต่ละอะตอมเพื่อแสดงถึงโครงสร้างอันใหญ่โตเช่นนั้น นักชีวเคมีจึงได้คิดวิธีเขียนโครงสร้างที่จะบอกการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในกรดนิวคลีอิคแบบย่อขึ้นมาสองแบบ แบบแรกใช้อนุกรมเส้นตรงแสดงถึงน้ำตาลไรโบสหรือดีออกซีไรโบส เส้นทะแยงที่ลากจากภายในเส้นตรงเส้นหนึ่งหรือตำแหน่ง 3′ ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่ง ไปยังปลายของเส้นตรงอีกเส้นหนึ่งหรือตำแหน่งที่ 5′ ของน้ำตาลอีกโมเลกุลหนึ่งนั้นแทนพันธะ 3′, 5′ ฟอสโฟไดเอสเทอร์ ส่วนเบสนั้นเขียนบอกเป็นอักษรย่อโดยใช้อักษรตัวแรกของชื่อเต็ม เช่น A หมายถึงอะดินีน G หมายถึงกวานีน C หมายถึงไซโตซีน เป็นต้น การเขียนอีกแบบหนึ่งใช้อักษรตัวแรกของชื่อนิวคลีโอไซด์และตัว P ซึ่งหมายถึง ฟอสเฟต อักษร P อยู่หน้าชื่อนิวคลีโอไซด์ เช่น pA หมายถึง ฟอสเฟตอยู่ที่ตำแหน่งที่ 5′ ถ้าอักษร p อยู่หลังชื่อนิวคลีโอไซด์เช่น Ap หมายถึง ฟอสเฟตอยู่ที่ตำแหน่งที่ 3′ ตัวอย่างเช่น Ap Gp Cp Up (ดูรูปที่ 5.2)

คุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพของกรดนิวคลีอิคหลาย ๆ อย่างขึ้นอยู่กับโครงสร้างทุติยภูมิอันเนื่องมาจากการจับคู่ของ complementary nitrogen base ตามสมมุติฐานของ Watson-Crick อะดินีนจับคู่กับไธมีน กวานีนจับคู่กับไซโตซีน มีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสแต่ละคู่ A = T มีสองพันธะไฮโดรเจน G = C มีสามพันธะไฮโดรเจน ดังนั้นในโมเลกุลกรดนิวคลีอิคจะมีการจับคู่ของเบสซ้อนกันเป็นชั้น ๆ เต็มไปหมด เกิดการเข้าเหลื่อมซ้อนกันของออร์บิตอลและใช้ π อิเล็คตรอนร่วมกันระหว่างเบสแต่ละชั้น ทำให้กรดนิวคลีอิคเป็นโมเลกุลที่มีเสถียรภาพและอยู่ตัว (ดูรูปที่ 5.3)

โมเลกุล DNA มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double helix หรือ double-stranded) สายทั้งสองของ DNA มีทิศทางตรงกันข้าม (opposite หรือ antiparallel) ถ้าสายหนึ่งมีทิศทาง 5′→3′ อีกสายหนึ่ง

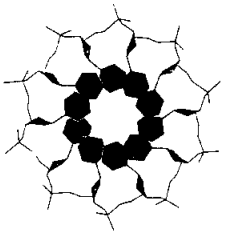


รูปที่ 5.2 โครงสร้างปฐมภูมิของ RNA (ซ้าย) และ DNA (ขวา) พร้อมทั้งการเขียนโครงสร้างแบบย่อ

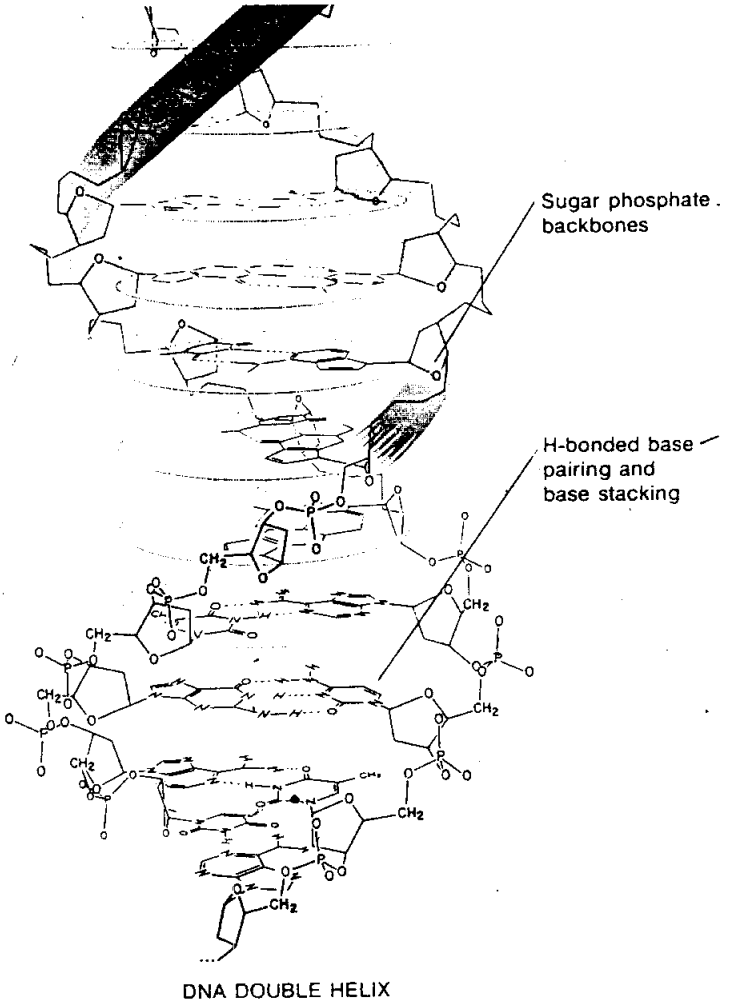


รูปที่ 5.3 แฟคเตอร์ต่าง ๆ ที่ช่วยค้ำจุนโครงสร้างทุติยภูมิของกรดนิวคลีอิค

ต้องมีทิศทาง 3′→5′ การซ้อนกันของเบสช่วยค้ำจุนโครงสร้างของแต่ละสาย พันธะไฮโดรเจนเนื่องจากการจับคู่ของไนโตรเจนเบสระหว่างสายทั้งสองช่วยค้ำจุนให้สองสายอยู่ด้วยกันในลักษณะของเกลียวคู่ เกลียวคู่นี้จะคลายออกเป็นสายเดี่ยวเมื่อนำไปต้มในสายละลายเกลือเจือจาง คุณสมบัติทางกายภาพของ DNA เช่นความหนืดขึ้นอยู่กับความยาวของโมเลกุลเป็นสำคัญ (ดูรูปที่ 5.5)



รูปที่ 5.4 แผนภาพของสาย DNA หนึ่งสายในเกลียวคู่ DNA มองจากด้านบนลงไปตามแกนของเกลียว เบสอยู่ภายในน้ำตาลและฟอสเฟตอยู่ภายนอก



รูปที่ 5.5 เกลียวคู่ DNA (DNA double helix)

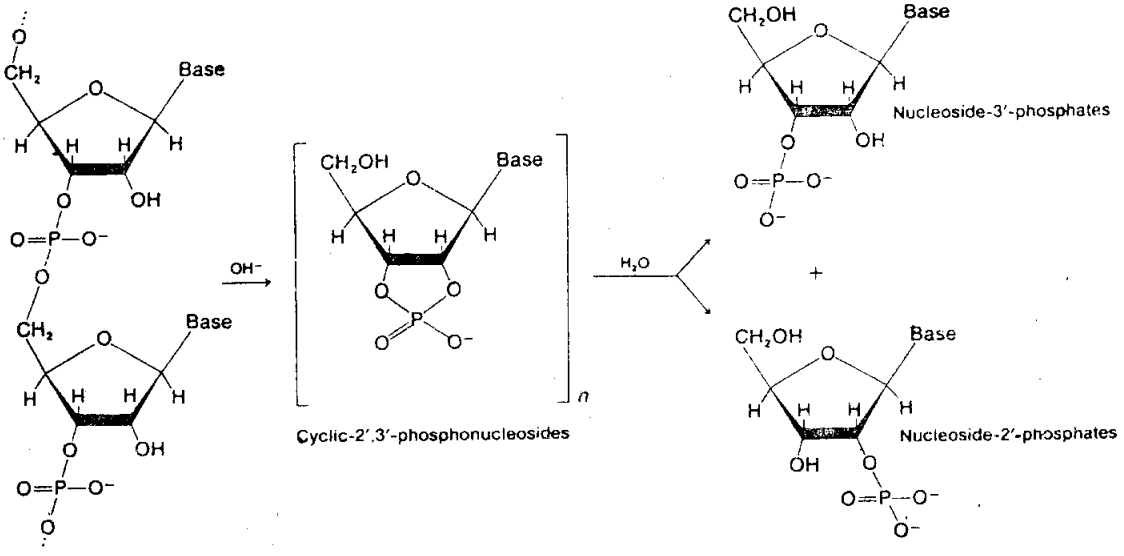
โมเลกุล RNA เป็นสายเดี่ยว พันธะไฮโดรเจนเนื่องจากการจับคู่ของไนโตรเจนเบสและการซ้อนกันของเบสเป็นชั้นจะเกิดขึ้นภายในโมเลกุลของสายเดี่ยวอันนั้น เช่นนี้ทำให้ได้โครงสร้างลักษณะเป็นบ่วง (loop) ขึ้นมา เวลาตกตะกอน RNA ออกมาจะเห็นว่า RNA มีลักษณะแบบอสัณฐาน (amorphous) มากกว่าที่จะเป็นเส้นใย (fibrous) แบบ DNA และความหนืดก็น้อยกว่า DNA

กรดนิวคลีอิคมีโครงสร้างตติยภูมิเช่นกัน แต่ยังไม่เป็นที่กระจ่างแจ้งนัก

คุณสมบัติทางเคมีของกรดนิวคลีอิค

1. เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นด่าง

พันธะ N-ไกลโคซิดิคระหว่างไนโตรเจนของเบสกับ C_1 ของน้ำตาลในโมเลกุล DNA RNA และพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของโมเลกุล DNA จะมีเสถียรภาพในสภาวะความเป็นด่างอย่างอ่อน แต่พันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของโมเลกุล RNA ทุกพันธะจะถูกย่อยสลายหมด ตัวอย่างเช่น เมื่อนำ RNA ไปทำปฏิกริยากับ 0.3 M KOH ที่ 37°ซ ภายในเวลา 1 ชั่วโมงพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์จะถูกสลายเป็นอินเตอร์มิเดียทไซคลิค-2′3′-ฟอสโฟนิวคลีโอไซด์ ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์กลายเป็นนิวคลีโอไซด์-3′-ฟอสเฟต และนิวคลีโอไซด์-2′-ฟอสเฟตภายในเวลา 12-18 ชั่วโมงต่อมา



รูปที่ 5.6 ปฏิกริยาไฮโดรไลซีสของ RNA ในสภาวะความเป็นด่าง

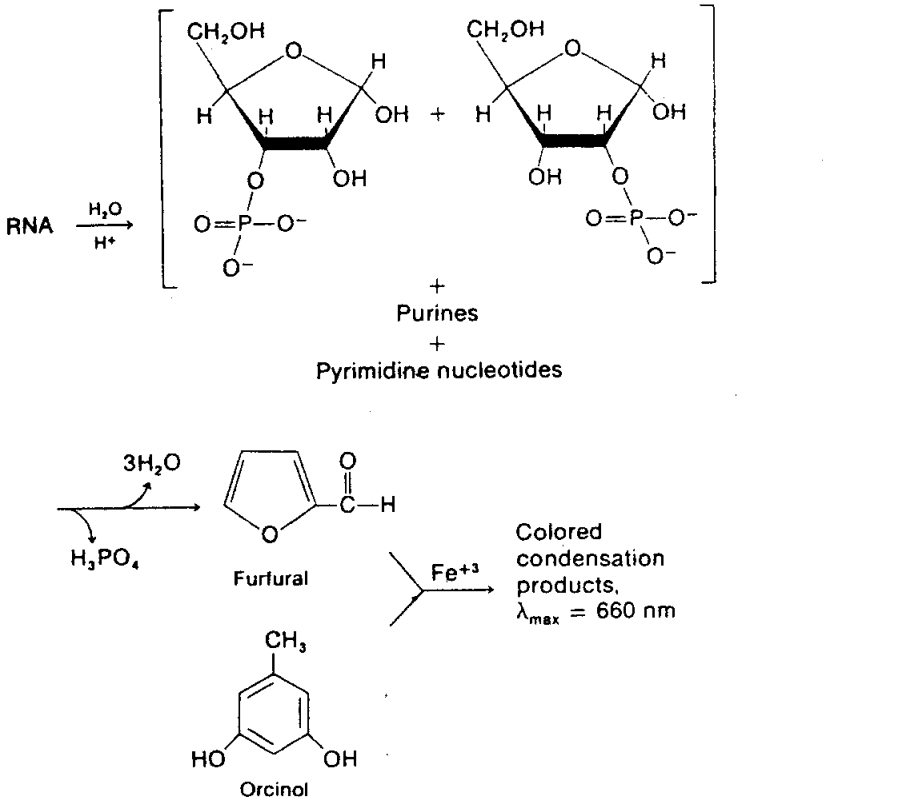
พันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของโมเลกุล DNA จะไม่ถูกทำลายในสารละลายด่าง ทั้งนี้เพราะตำแหน่งที่ 2′ ของน้ำตาลดีออกซีไรโบสไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งหมู่นี้จำเป็นมากต่อการเกิดไซคลิคอินเตอร์มิเดียท เสถียรภาพในสารละลายด่างที่แตกต่างกันระหว่าง DNA และ RNA นี้เป็นหลักการที่ใช้ในการหาปริมาณ DNA RNA และฟอสโฟโปรตีน

2. เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นกรด

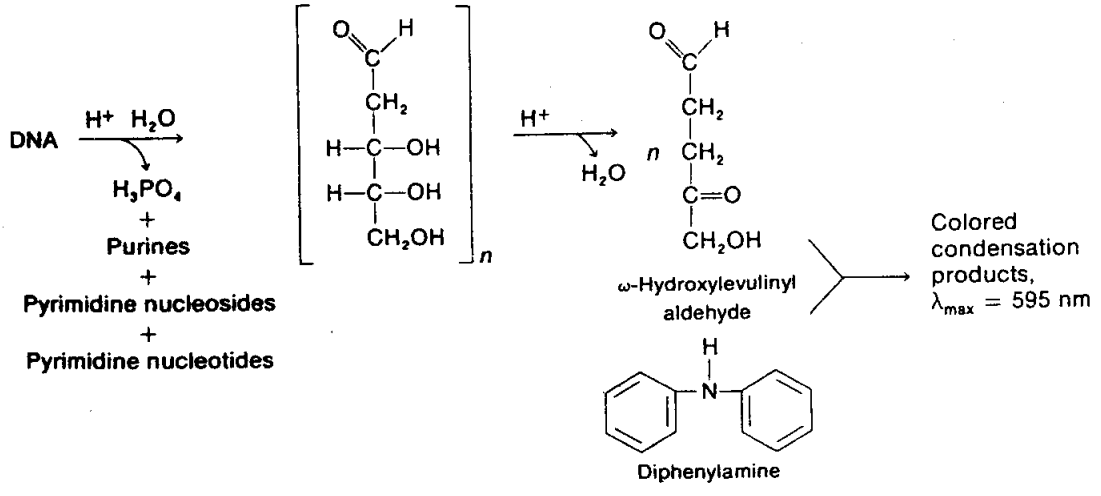
สภาวะความเป็นกรดอ่อนมากหรือกรดเจือจางที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่ามีผลต่อกรดนิวคลีอิคเล็กน้อยมาก ปกติการแยกกรดนิวคลีอิคหรือสารโมเลกุลขนาดใหญ่ก็มักจะใช้กรดเจือจางที่อุณหภูมิ 0-25°ซ ในการตกตะกอนอยู่แล้ว เช่นกรด CCl_3COOH, $HClO_4$, HCl เป็นต้น ที่สภาวะความเป็นกรดปานกลาง (หรือการอยู่ในกรดเจือจางนานเกินไป หรือการเพิ่มอุณหภูมิกรดเจือจางนั้น) จะทำให้เกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซีสที่พันธะ N-ไกลโคซิดิคของเบสเพียวรีน ทำให้เพียวรีนหลุดออกไปจากโมเลกุลกรดนิวคลีอิค เรียกว่าดีเพียวริเนชั่น (depurination) ตัวอย่างเช่น เมื่อใช้ 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 100°ซ ภายในเวลา 15 นาที เพียวรีนในโมเลกุล DNA และ RNA จะถูกไฮโดรไลซ์ออกจนหมด ถ้าสภาวะรุนแรงขึ้นไปกว่านี้ เช่น 2-6 N HCl อุณหภูมิ 100°ซ เป็นเวลาหลายชั่วโมง พันธะ N—ไกลโคซิดิคของพิริมิดีนเบสจะถูกไฮโดรไลซ์จนหมดเช่นกันเรียกว่า ดีพิริมิดีเนชั่น (depyrimidination) พันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์จะถูกทำลายบ้างขณะเกิดดีเพียวริเนชั่น แต่จะถูกทำลายมากขณะเกิดดีพิริมิดีเนชั่น

การหาปริมาณ DNA โดย diphenylamine test และการหาปริมาณ RNA โดย orcinol test อาศัยหลักการดังกล่าวนี้เช่นกัน ให้ RNA ทำปฏิกริยาในช่วงเวลาสั้น ๆ กับ 6-10 N HCl ที่ต้มเดือด จะเกิดการไฮโดรไลซีสที่เรียกว่า ดีเพียวริเนชั่น เกิดดีพิริมิดีเนชั่นบ้างเล็กน้อยประมาณ 5% จากนั้นมีการดึงน้ำออกจากโมเลกุลน้ำตาลไรโบสให้ได้สารเฟอฟิวรัล ซึ่งจะไปทำปฏิกริยากับ orcinol มีเฟอริคไอออนเป็นตัวเร่งได้ผลิตผลออกมาหลายอย่าง เห็นเป็นสีน้ำเงินขียว มีการดูดแสงมากสุดที่ 660 นาโนเมตร ทั้งหมดนี้เกิดขึ้นกับเพียวรีนนิวคลีโอไทด์ของ RNA เท่านั้น (ดูรูปที่ 5.7)

DNA ในสารละลายกรดจะเกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซีสดีเพียวริเนชั่นเช่นกัน ได้น้ำตาล 2′-ดีออกซีไรโบสที่มีโครงสร้างเป็นสายโซ่เปิด (open-chain) เมื่อมีการดึงน้ำออกไปจากโมเลกุลน้ำตาลจะให้ ω hydroxylevulinyl aldehyde ซึ่งจะไปคอนเดนซ์กับ diphenylamine ให้ผลิตผลหลายอย่าง เห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม การดูดแสงมากสุดที่ 595 นาโนเมตร ทั้งหมดที่กล่าวมานี้เกิดขึ้นเฉพาะกับเพียวรีนนิวคลีโอไทด์ของ DNA เท่านั้น



รูปที่ 5.7 ปฏิกริยา orcinol test สำหรับ RNA

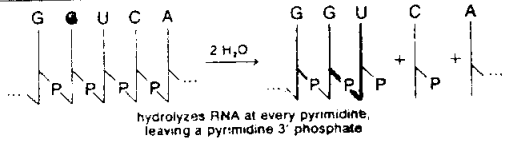
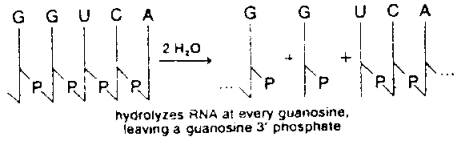
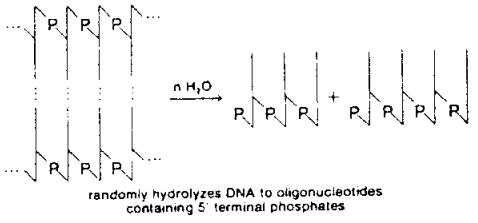
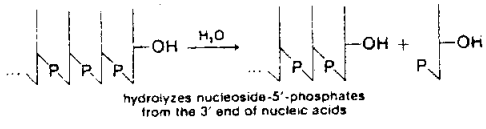
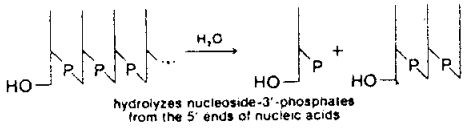
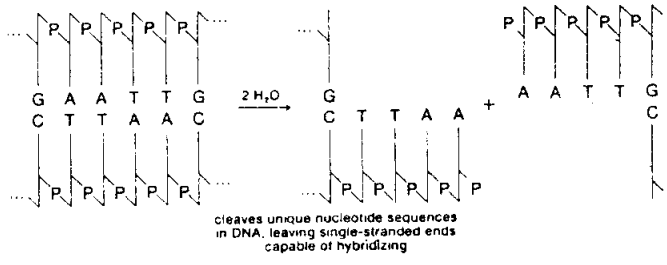


รูปที่ 5.8 ปฏิกริยา diphenylamine test สำหรับ DNA

3. ปฏิกริยาการย่อยสลายโดยเอ็นไซม์

กรดนิวคลีอิคถูกย่อยสลายได้โดยเอ็นไซม์ nuclease

ตารางที่ 5.2 ซับสเตรทจำเพาะของเอ็นไซม์ nuclease ทั้งหลาย

Enzyme	Type	Action
Pancreatic ribonuclease (RNase)	Endonuclease on single-stranded RNA	
Takadiastase (T_1)	Endonuclease on single-stranded RNA	
Pancreatic deoxyribonuclease (DNase)	Endonuclease on double- and single-stranded DNA	
Venom phosphodiesterase	3′ Exonuclease on DNA or RNA with 3′ OH	
Spleen phosphodiesterase	5′ Exonuclease on DNA or RNA with 5′ OH	
Restriction endonuclease	Double-stranded endonucleases that cleave unique nucleotide sequences of DNA.	

เอ็นไซม์ nuclease มีอยู่ในเนื้อเยื่อทุกชนิด การเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่ตัดออกมาไว้นานเกินไป กรดนิวคลีอิคภายในเนื้อเยื่อนั้นจะถูกย่อยสลายโดยเอ็นไซม์ nuclease ดังนั้นในการแยกและสกัดกรดนิวคลีอิคมักจะต้องใช้ตัวยับยั้งเพื่อไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ หรือใช้สารทำลายสภาพธรรมชาติโปรตีนตั้งแต่ขั้นตอนเริ่มแรกของวิธีการแยกและสกัดกรดนิวคลีอิค

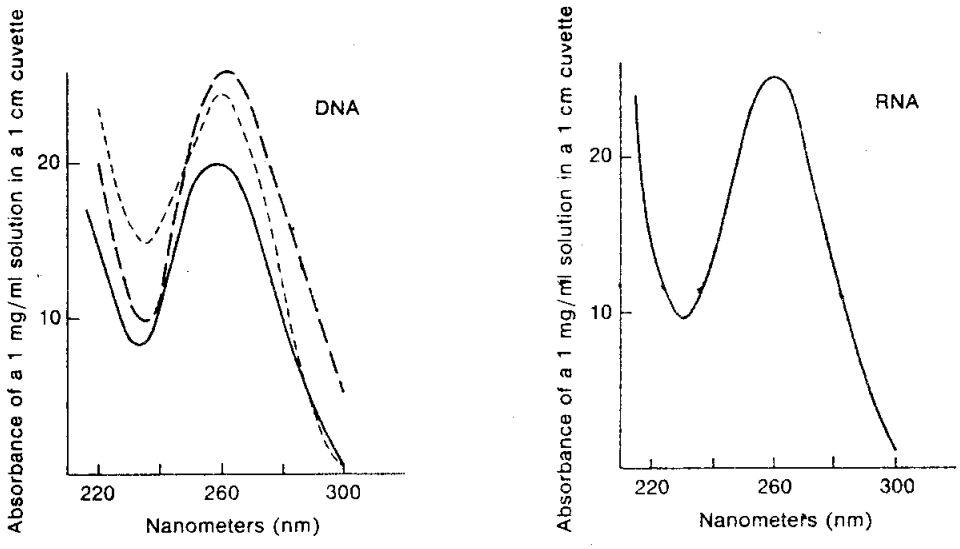
คุณสมบัติทางกายภาพของกรดนิวคลีอิค

1. คุณสมบัติการดูดแสงในช่วง UV

ไนโตรเจนเบสในโมเลกุลของนิวคลีโอไซด์ นิวคลีโอไทด์ และกรดนิวคลีอิคสามารถดูดแสงได้ในช่วง UV และให้สเปคตรัมที่มีแบบแผนจำเพาะ คุณสมบัติการดูดแสงนี้จะเปลี่ยนไปเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงpH ผลรวมของสเปคตรัมของไนโตรเจนเบสจะให้เป็นสเปคตรัมของกรดนิวคลีอิคออกมา การดูดแสงมากสุดที่ 260 นาโนเมตร การดูดแสงที่ 260 นาโนเมตรแปรตามความเข้มข้นกรดนิวคลีอิค สารละลายกรดนิวคลีอิคในสภาพโครงสร้างปฐมภูมิ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มล. ที่ pH เป็นกลาง ในคิวเวตต์ 1 ซม. ให้ค่าการดูดแสงเท่ากับ 25 ถ้าเป็นสารละลายกรดนิวคลีอิคในสภาพโครงสร้างทุติยภูมิ มีการจับคู่ของเบสและเบสซ้อนกันเป็นชั้น ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มล. ที่ pH เป็นกลาง ในคิวเวตต์ 1 ซม. ให้ค่าการดูดแสงลดลงเหลือ 20 การดูดแสงจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของกรดนิวคลีอิค จะเห็นได้จากการทำลายสภาพธรรมชาติกรดนิวคลีอิค สูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิ ทำให้การดูดแสงในช่วง UV ที่ 260 นาโนเมตรเพิ่มขึ้น ปรากฏการณ์นี้จัดเป็น "hyperchromic effect ตรงกันข้ามหากว่ากรดนิวคลีอิคสามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ (renaturation) การดูดแสงที่ 260 นาโนเมตร ก็จะลดน้อยลงไปจัดเป็น "hypochromic effect" (ดูรูปที่ 5.9)

2. คุณสมบัติในการไฮบริไดเซชั่น (hybridization)

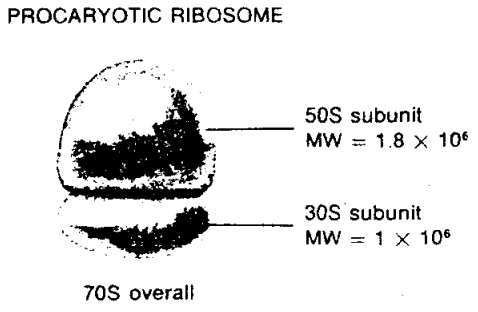
โครงสร้างทุติยภูมิของกรดนิวคลีอิคจะถูกทำลายในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างมากจนเกินไป เกลียวคู่ DNA ซึ่งมีเบสซ้อนกันและมีการจับคู่ของเบสในแต่ละสายด้วยพันธะไฮโดรเจนจะแยกจากกันออกเป็นสายเดี่ยว เมื่อความเข้มข้นของไอออนต่าง ๆ, pH และอุณหภูมิพอเหมาะ สายเดี่ยว DNA จะกลับเข้าไปรวมกันใหม่ ไฮบริไดซ์กับสายอื่นที่มี Complementary nitrogen base ได้ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ไฮบริไดเซชั่น



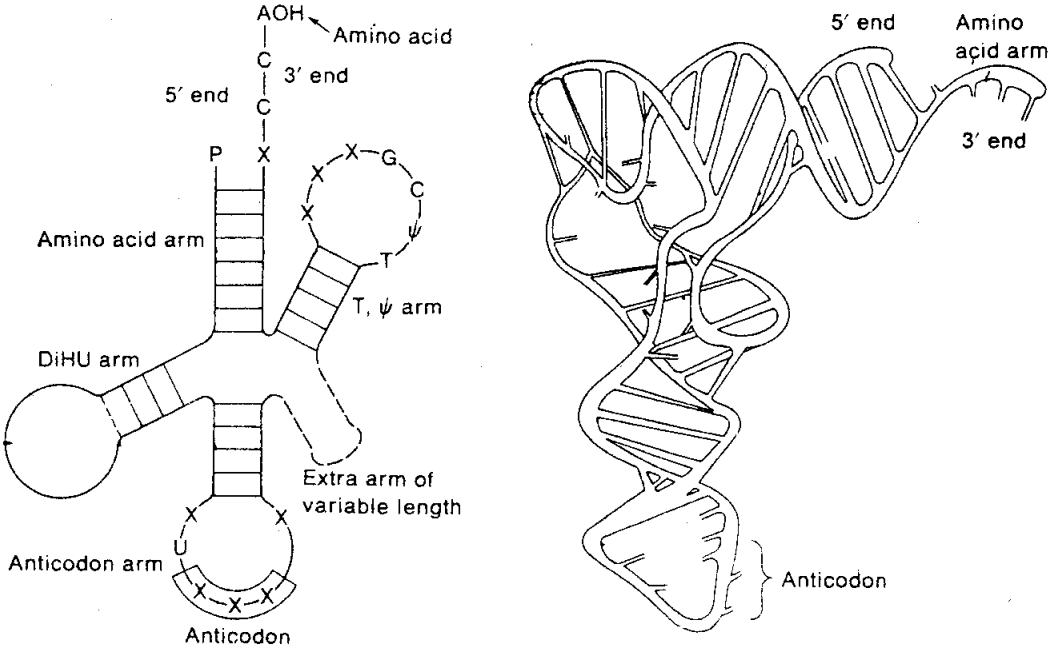
รูปที่ 5.9 UV-สเปคตรัมของ DNA ที่ pH 7.0 (————), pH 1.0 (– – —), pH 13.0 (--------), และ UV-สเปคตรัมของ RNA

บทบาทของกรดนิวคลีอิคในทางชีววิทยา

DNA เป็นสารที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรม ในสัตว์ชั้นสูง DNA จะจับกับโปรตีนเป็นนิวคลีโอโปรตีนอยู่ในโครโมโซม (chromosome) ปริมาณ DNA ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีค่าคงที่ DNA ส่วนใหญ่เกิดขึ้นภายในนิวเคลียส มีบ้างที่อยู่ในไมโตคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ โมเลกุล DNA จะเป็นแม่พิมพ์ (template) ในการคัดลอกแบบ (replication) ทำให้มีการสังเคราะห์ DNA โมเลกุลใหม่ที่มีข้อมูลทางพันธุกรรมเหมือนแม่พิมพ์อันเดิม วิธีการนี้เป็นขั้นตอนที่สั้นแต่ซับซ้อนพอสมควร อาศัยการทำงานของโปรตีนและเอ็นไซม์ต่าง ๆ มากมาย การเรียงตัวของเบสในโมเลกุล DNA ในนิวเคลียสจะเป็นตัวกำหนดการสังเคราะห์โปรตีนในไซโตปลาสมของเซลล์ การเรียงตัวของเบสสามตัวติดต่อกันโดยไม่เหลื่อมซ้อนกันของ DNA เป็นรหัสพันธุกรรม (genetic code) ที่เรียกว่ารหัสตติยะ (triplet code) รหัสนี้จำเพาะสำหรับการสังเคราะห์กรดอะมิโนแต่ละตัว กรดอะมิโนหนึ่ง ๆ อาจจะมีรหัสตติยะได้มากกว่าหนึ่งรหัส ข้อมูลทางพันธุกรรมบนโมเลกุล DNA ถูกส่งผ่านออกมายังไซโตปลาสมโดยการถอดรหัส (transcription) เป็นโมเลกุล "RNA สื่อสาร" หรือ m-RNA ดังนั้นการเรียงตัวของเบสบน m-RNA จะ complement กับการเรียงตัวของเบสบนโมเลกุล DNA m-RNA, t-RNA และ r-RNA จะร่วมมือกันในการสังเคราะห์โปรตีน



รูปที่ 5.10 โพรแคริโอติคไรโบโซม (บน) และยูแคริโอติคไรโบโซม (ล่าง)



รูปที่ 5.11 โครงสร้าง t-RNA ซึ่งมี 4-5 แขน (ซ้าย) และโครงสร้างสามมิติเป็นรูปตัว L (ขวา)

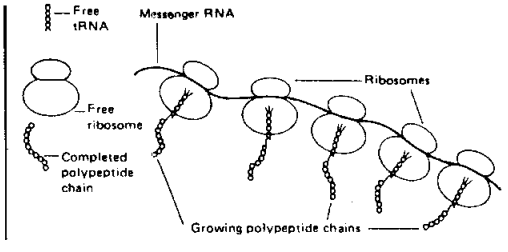
RNA ส่วนใหญ่อยู่ในไซโตปลาสม มีอยู่ในไมโตคอนเดรียและในนิวเคลียสบ้างเล็กน้อย RNA ของสัตว์ชั้นสูงแบ่งออกเป็นสามชนิดคือ messenger RNA (m-RNA) ribosomal RNA (r-RNA) และ transfer RNA (t-RNA)

m-RNA ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาในนิวเคลียสแล้วส่งผ่านออกมายังไซโตปลาสม รวมตัวกับไรโบโซมและ t-RNA เพื่อทำการสังเคราะห์โปรตีน ขั้นตอนนี้เป็นการแปลรหัส (translation) m-RNA ไม่ค่อยเสถียรเหมือน RNA ชนิดอื่น รหัสตติยะบน m-RNA เรียกว่า โคดอน (codon)

r-RNA ไรโบโซมเป็นอนุภาคเล็ก ๆ ภายในเซลล์ ประกอบด้วยโปรตีน 60% และ RNA 40% ยูแคริโอติคเซลล์ (eukaryotic cell) มี 80s ไรโบโซมซึ่งประกอบด้วยสองหน่วยย่อยคือ หน่วยย่อย 60 s-ไรโบโซม และ 40 s-ไรโบโซม ในโพรแคริโอติคเซลล์ (prokaryotic cell) มี 70 s-ไรโบโซม ซึ่งประกอบด้วยสองหน่วยย่อยคือ หน่วยย่อย 50 s-ไรโบโซม และ 30 s-ไรโบโซม ไรโบโซมจะจับอยู่บนสาย m-RNA เต็มไปหมด มองดูคล้ายลูกปัดที่ร้อยอยู่บนเส้นด้าย เรียกว่า โพลีโซม (polysome) (ดูรูปที่ 5.10 และรูปที่ 5.12)

t-RNA น้ำหนักโมเลกุลต่ำ กรดอะมิโนหนึ่ง ๆ มี t-RNA ที่จำเพาะตัว รหัสตติยะบนโมเลกุล t-RNA เรียกว่าแอนไตโคดอน (anti-codon) เป็นส่วนที่จะไปจับกับโคดอนบน m-RNA t-RNA ทุกโมเลกุลจะมีการเรียงตัวของเบสสามตัวสุดท้ายตรงปลายโมเลกุลเหมือนกันหมดเป็น CCA Aหรือเบสอะดินีนตัวสุดท้ายจะเป็นตัวจับกับกรดอะมิโนที่จำเพาะ (ดูรูปที่ 5.11)

การสังเคราะห์โปรตีนนั้น เริ่มต้นด้วย m-RNA ไปจับกับไรโบโซมแล้ว t-RNA_1 ซึ่งเบสอะดินีนตรงปลายโมเลกุลจับกับกรดอะมิโน$_1$ จะใช้แอนไตโคดอนจับกับโคดอนของ m-RNA t-RNA_2 จะพากรดอะมิโน$_2$ มาจับกับโคดอนถัดไปของ m-RNA จากนั้นกรดอะมิโน$_1$ จะจับกับกรดอะมิโน$_2$ ด้วยพันธะเปปไทด์ เมื่อได้ไดเปปไทด์ t-RNA_1 จะหลุดไป แล้วไรโบโซมก็เคลื่อนไปที่ตำแหน่งโคดอนถัดไปของ m-RNA รอให้ t-RNA_3 พากรดอะมิโนจำเพาะตัวที่ 3 เข้าไปต่อเป็นไตรเปปไทด์ เป็นเช่นนี้ไปจนกระทั่งได้สายเปปไทด์ที่สมบูรณ์



รูปที่ 5.12 แผนภาพการสังเคราะห์เปปไทด์บนหนึ่งโพลีโซม

ตามจริงแล้วการสังเคราะห์โปรตีนมีความยุ่งยากและซับซ้อนกว่านี้ ต้องการพลังงานและแฟคเตอร์ต่าง ๆ อีกมากแต่จะไม่ขอกล่าวรายละเอียด

การทดลอง

การทดลองที่ 5:1 การสกัด RNA จากยีสต์

หลักการ สารละลายฟีนอลเข้มข้นจะทำลายพันธะไฮโดรเจนและสภาพธรรมชาติโปรตีน ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกออก นำสารแขวนลอยขุ่นซึ่งประกอบด้วยฟีนอล น้ำ เศษเล็กเศษน้อย ของเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงให้แยกออกเป็นสองชั้น ชั้นล่างมีฟีนอล DNA และโปรตีนที่สูญเสียธรรมชาติแล้วจับอยู่กับ DNA ชั้นบนซึ่งใสกว่ามี RNA โพลีแซคคาไรด์ (ซึ่งสารทั้งสองนี้ละลายน้ำ) และสารโพลาร์โมเลกุลเล็ก ๆ เช่น กรดอะมิโน, นิวคลีโอไทด์ เป็นต้น บางครั้งจะเห็นโปรตีนที่สูญเสียสภาพธรรมชาติเป็นแผ่นบางอยู่ระหว่างชั้นน้ำและชั้นของฟีนอล เมื่อแยกชั้นน้ำออกแล้วอาจจะสกัดด้วยฟีนอลอีกครั้งหนึ่งเพื่อตกตะกอนโปรตีนให้หมด นำไปหมุนเหวี่ยง ของเหลวที่ได้นำไปเติมอัลกอฮอลล์เพื่อตกตะกอนสารโมเลกุลใหญ่เช่น RNA และโพลีแซคคาไรด์ออกมาคงเหลือโมเลกุลเล็ก ๆ อยู่ในสารละลาย crude RNA ที่ได้นำไปเติมสารละลาย sodium หรือ Potassium acetate เพื่อละลายนอน - ไอออนิคโพลีแซคคาไรด์และสารไอออนิคโมเลกุลเล็ก ๆ รวมทั้ง RNA ที่โมเลกุลเล็ก ๆ ด้วย เช่น t-RNA และ 5 s RNA สารละลายเกลือนี้จะไม่ละลายสารโมเลกุลใหญ่โพลีแอนไอออนิค RNA เช่น ไรโบโซม หรือ m-RNA ขจัดน้ำและ sodium acetate ให้หมดไปโดยการล้างด้วยอัลกอฮอลล์อีกครั้งหนึ่งแล้วทำให้แห้งก็จะได้ r-RNA และ m-RNA

สารเคมี ผงยีสต์แห้ง

สารละลายฟีนอล 900 กรัม/ลิตร

สารละลาย potassium acetate 200 กรัม/ลิตร pH 5

เอธานอล (absolute ethanol)

ไดเอธิลอีเธอร์

อ่างน้ำอุณหภูมิ 37°ซ

เครื่องคนชนิดใช้แท่งแม่เหล็ก

อ่างน้ำแข็ง

วิธีการ แช่ผงยีสต์แห้ง 30 กรัมในน้ำอุณหภูมิ 37°ซ 120 มล. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีแล้วเติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 160 มล. (ระวังสารกัดมือ) คนให้ทั่วด้วยเครื่องคนชนิดใช้แท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3000 g 15 นาทีในที่เย็นเพื่อให้เกิดการแยกชั้น ใช้ปาสเจอร์ปิเปตต์ดูดชั้นน้ำข้างบนออกไปทำการหมุนเวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 5 นาทีในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมความเย็นได้เพื่อตกตะกอนโปรตีน เติมสารละลาย potassium acetate ลงไปคำนวณว่าความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20 กรัม/ลิตร แล้วตกตะกอน RNA ด้วยเอธานอลเย็นปริมาตร

สองเท่าของสารละลาย แช่อ่างน้ำแข็งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อให้ RNA ตกตะกอน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2000 g เป็นเวลา 5 นาทีในเครื่องหมุนเหวี่ยงอันเดิม ล้าง RNA ที่ได้ด้วยเอธานอล : น้ำ (3 : 1) ตามด้วยเอธานอลและอีเธอร์ตามลำดับ ทำให้แห้งแล้วนำไปชั่ง

การทดลองที่ 5.2 การหาเบสองค์ประกอบของ RNA

หลักการ ปฏิกริยาไฮโดรไลซีสของ RNA หรือ DNA ด้วย 72% perchloric acid เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะให้เบสต่าง ๆ วิธีการนี้ไธมีนเบสจะถูกทำลายไป นำไฮโดรไลเซทที่ได้ไปแยกโดยวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟีและส่องดูจุดต่าง ๆ บนกระดาษด้วยแสง UV

สารเคมี RNA

perchloric acid 72%

สารละลายเบสมาตรฐานความเข้มข้น 5 mM (อะดีนีน กวานีน ไซโตซีน และยูราซิล)

HCl 0.1 M

HCl เข้มข้น

ไอโซโปรปานอล

เครื่องมือการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี

สารผสมตัวทำละลายไอโซโปรปานอล : น้ำ : HCl เข้มข้น (130 : 37 : 33)

อ่างน้ำเดือด

หลอดแสง UV

UV-สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีการ ผสม RNA 100 มิลลิกรัมกับ perchloric acid 72% 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วางลูกหินไว้ตรงปากหลอดเพื่อกันการระเหย ปฏิกริยานี้จะต้องทำในตู้ควันและมีฉากป้องกันอย่างดีเนื่องจากอาจมีการระเบิดได้ ระวังอย่าต้มจนแห้ง

ทำหลอดให้เย็นลง เติมน้ำ 1 มล. นำไปหมุนเวี่ยงเอาส่วนใสไปทำเปเปอร์โครมาโตกราฟีแบบ descending โดยใช้กระดาษโครมาโตกราฟีวัตต์แมนเบอร์ 1 (ใช้เวลาประมาณ 12-15 ชั่วโมง) สารละลายเบสมาตรฐานต่าง ๆ ต้องทำไปพร้อมกันภายใต้สภาวะเดียวกัน นำแผ่นโครมาโตแกรมที่ได้ไปทำให้แห้งแล้วส่องดูจุดต่าง ๆ ด้วยแสง UV ใช้ดินสอวงตำแหน่งของจุดไว้วัดระยะทางการเคลื่อนที่เพื่อคำนวณหาค่า R_f ตัดกระดาษโครมาโตกราฟีตรงตำแหน่งที่วงไว้มาแช่ใน 0.1 M HCl 5 มล. ทิ้งไว้ค้างคืน นำสารละลายนี้ไปวัดการดูดแสงที่ 260 นาโนเมตร หาความเข้มข้นของเบสจากค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดแสงในตารางที่ให้ (ดูตัวอย่างการคำนวณหน้า 157)

เบส	สารละลายมาตรฐาน			สารละลายที่ได้จากการสลาย RNA		
	ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสง $E^{1M}_{1cm} \times 10^{-3}$	R_f	A_{260}	ไมโครโมล/มล.	R_f	A_{260}
อะดีนีน	14.7					
กวานีน	11.7					
ไซโตซีน	6.2					
ยูราซิล	7.9					

การทดลองที่ 5.3 การหาปริมาณ RNA โดย orcinol test

หลักการ (ดูหน้า 180)

สารเคมี สารละลาย RNA มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มล.

สารละลาย RNA ตัวอย่าง (0.2-0.6 มิลลิกรัม/มล.)

*Orcinol reagent

อ่างน้ำเดือด

เครื่องมือวัดการดูดแสงสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีการ เติม orcinol reagent 3 มล. ลงในสารละลาย RNA 2 มล. แช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็นนำไปวัดค่าการดูดแสงที่ 665 นาโนเมตร โดยใช้ orcinol reagent เป็นสารเปรียบเทียบ(blank) ใช้น้ำกลั่นปรับสเกลให้เป็นศูนย์ นำค่าการดูดแสงของสารละลาย RNA ตัวอย่างไปแปรค่าเป็นความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มล.) โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐาน : ทำการทดลองแบบเดียวกันใช้สารละลาย RNA มาตรฐานปริมาตรต่าง ๆ กัน แต่อยู่ในช่วง 2 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น คงปริมาตรทั้งหมดไว้ 5 มล. เช่นเดิม หลังจากเกิดปฏิกริยาแล้วนำไปวัดการดูดแสงที่ 665 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างการดูดแสงกับมิลลิกรัม RNA

การทดลองที่ 5.4 การสกัด DNA จากม้ามของหมู (pig spleen)

หลักการ เซลล์ที่จะนำมาสกัดจะต้องมีปริมาณ DNA มากพอและเอ็นไซม์ nuclease จะต้องมีแอคติวิตีต่ำ ถ้าเอ็นไซม์ nuclease มีแอคติวิตีสูงโมเลกุล DNA จะถูกย่อยสลายไปหมด เนื้อเยื่อลิมฟอยด์ (lymphoid) ต่อมไธมัส (Thymus gland) และม้ามเป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะในการแยกและสกัด DNA

การสกัด DNA จะต้องทำด้วยความระมัดระวัง ป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติ เพื่อให้ DNA ที่ได้มีโครงสร้างเหมือนตอนอยู่ในเซลล์ทุกประการ ควบคุมสภาวะทุกอย่างให้เหมาะสม ยับยั้งแอคติวิตีเอ็นไซม์ nuclease โดยใช้ sodium citrate ไปจับแคลเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออนซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์ DNAase ทั้งนี้จนกว่าจะมีการแยกเอาโปรตีนออกไปซึ่งต้องกระทำโดยเร็ว

นิวคลีโอโปรตีนละลายในน้ำและในสารละลายที่มีค่า ionic strength สูง แต่จะไม่ละลายในสารละลายที่มีค่า ionic strength ต่ำ (0.05-0.25 M) นำเนื้อเยื่อมาบดหรือปั่นกับน้ำเกลือไอโซโทนิค pH 7 ในเครื่องปั่น (waring blendor) นิวคลีโอโปรตีนจะไม่ละลาย แต่จะนำมาละลายทีหลังด้วยน้ำเกลือ 2 M แยกเอาโปรตีนออกโดยใช้สารละลายผสมคลอโรฟอร์ม : แอมิลอัลกอฮอลล์ แล้วตกตะกอน DNA ด้วยเอธานอล DNA ที่ได้นำไปละลายในน้ำเกลือเจือจาง เก็บแช่แข็งไว้ DNA เสถียรอยู่ได้เป็นเวลาหลายเดือน

สารเคมี ม้ามของหมู

น้ำเกลือไอโซโทนิค pH 7 (0.15 M NaCl ใน 0.015 M sodium citrate ที่ pH 7)

NaCl 2 M

สารละลายผสม $CHCl_3$: amyl alcohol (6 : 1)

อีเธอร์

เอธานอล (absolute ethanol)

เครื่องปั่น

วิธีการ นำม้ามของหมู 50 กรัมมาสับให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปปั่นกับน้ำเกลือ pH 7 200 มล. ในเครื่องปั่นเป็นเวลา 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5000 g 15 นาที ปั่นตะกอนที่ได้อีกครั้งหนึ่งกับน้ำเกลือ pH 7 200 มล. เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง ทิ้งส่วน supernatant เก็บตะกอนไว้ นำตะกอนมาละลายใน 2 M NaCl ให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร ซึ่งสารทุกอย่างควรจะละลายหมด แต่ถ้ามีตะกอนก็ให้นำไปหมุนเหวี่ยงออก คนสารละลายด้วยแท่งแก้วอย่างต่อเนื่อง พร้อม ๆ กับเติมน้ำกลั่นเป็นปริมาตรที่เท่ากันกับปริมาตรของสารละลาย พันตะกอนที่มีลักษณะเป็นเส้นใยขึ้นมาด้วยแท่งแก้ว ตั้งทิ้งไว้ในบีคเกอร์ 30 นาที เส้นใยนี้จะหดตัวบีบของเหลวออกมาซับด้วยกระดาษกรอง เส้นใยนี้ก็คือดีออกซีไรโบนิวคลีโอโปรตีน

ละลายดีออกซีไรโบนิวคลีโอโปรตีนใน 100 มล. ของ 2 M NaCl เติมสารละลายผสม $CHCl_3$: amyl alcohol (6 : 1) ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน ปั่น 30 วินาที นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 5000 g เป็นเวลา 10-15 นาที เก็บส่วนบนซึ่งมี DNA ไว้ ระวังอย่าให้โปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติ

ซึ่งอยู่ระหว่างชั้นทั้งสองปนขึ้นมา ตกตะกอนโปรตีนโดยใช้สารละลายผสม $CHCl_3$: amyl alcohol (6 : 1) อีกสองครั้ง เก็บส่วน supernatant ใส่บีคเกอร์ไว้

ตกตะกอน DNA โดยการเติมเอธานอลแช่เย็นปริมาตรสองเท่าของ supernatant คนอย่างช้า ๆ ใช้แท่งแก้วพันเส้นใยของ DNA ขึ้นมา กดเส้นใยกับบีคเกอร์ด้านในเพื่อไล่เอธานอลออกให้ได้มากที่สุด แล้วล้างเส้นใยโดยการจุ่มแท่งแก้วที่พันเส้นใยลงในตัวทำละลายอินทรีย์ต่อไปนี้ตามลำดับ 70% เอธานอล 80% เอธานอล 95% เอธานอล และอีเธอร์ ไล่ตัวทำละลายออกโดยการกดเส้นใยกับบีคเกอร์ด้านในอีกเช่นกัน อาจใช้กระดาษกรองช่วยซับด้วย หลังจากการล้างครั้งสุดท้ายด้วยอีเธอร์แล้วให้ตั้งบีคเกอร์ที่ใส่ DNA ไว้ในตู้ดวันประมาณ 10 นาทีเพื่อให้อีเธอร์ระเหยไปให้หมด

ชั่งน้ำหนัก DNA ที่สกัดได้ แล้วนำไปละลายในน้ำเกลือที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า (2 มิลลิกรัม/มล.) พร้อมทั้งคนอย่างต่อเนื่อง เก็บไว้ในช่องน้ำแข็งจนกว่าจะต้องการใช้

การทดลองที่ 5.5 การหาปริมาณ DNA โดย diphenylamine test

หลักการ ดูหน้า 180

สารเคมี สารละลาย DNA มาตรฐานความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มล.

สารละลาย DNA ตัวอย่างหรือสารละลาย DNA ที่สกัดจากม้ามของหมูตามการทดลองที่ 5.4

น้ำเกลือ pH 7 (0.15 M NaCl ใน 0.015 M sodium citrate ที่ pH 7)

*diphenylamine reagent

อ่างน้ำเดือด

เครื่องมือวัดการดูดแสงสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

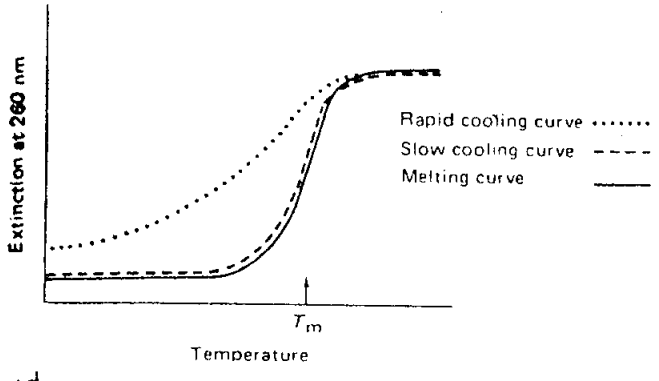
วิธีการ ละลาย DNA 10 มิลลิกรัม ในน้ำเกลือ pH 7 ปริมาตร 50 มล. นำสารละลายนี้มา 2 มล. เติม diphenylamine reagent 4 มล. ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นอ่านค่าการดูดแสงที่ 595 นาโนเมตรโดยใช้น้ำเป็นสารเปรียบเทียบ (blank) นำค่าการดูดแสงของสารละลาย DNA ตัวอย่างไปแปรค่าเป็นความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มล.) โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐาน : ใช้สารละลาย DNA มาตรฐานปริมาตรระหว่าง 0-2 มล. เติม diphenylamine reagent 4 มล. หลังจากเกิดปฏิกริยาแล้วนำไปอ่านค่าการดูดแสงที่ 595 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดแสงกับมิลลิกรัม DNA

การทดลองที่ 5.6 การดูดแสงในช่วง UV ของกรดนิวคลีอิค

หลักการ กรดนิวคลีอิคสามารถดูดแสงในช่วง UV ได้ก็เนื่องจากพันธะคู่แบบคอนจูเกต (conjugated double bond) ในเบสเพียวรีนและพิริมิดีน การดูดแสงมากสุดที่ 260 นาโนเมตร น้อยสุดที่ 230 นาโนเมตร

การเพิ่มความร้อนให้กับสารละลายของ DNA เกลียวคู่อย่างช้า ๆ จะทำให้การดูดแสงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งถึง melting temperature หรือ T_m พันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสแต่ละคู่จะแตกออกทำให้สาย DNA แยกจากกัน การดูดแสงจะยิ่งเพิ่มขึ้นโดยเร็ว และเมื่อนำสารละลาย DNA ที่ร้อนนั้นมาทำให้เย็นอย่างช้า ๆ ค่าการดูดแสงก็จะลดลงเนื่องจากสาย DNA จะเกิดรีคอมบิเนชั่น (recombination) กลับเข้ารวมกันได้ใหม่ กราฟระหว่างการดูดแสงและอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเรียกว่า melting curve กราฟระหว่างการดูดแสงและอุณหภูมิที่ลดลง เรียกว่า cooling curve ถ้าลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ cooling curve เกือบจะทับเป็นรูปเดียวกันกับ melting curve แต่ถ้าทำให้สารละลาย DNA เย็นลงโดยเร็วจะได้กราฟที่ลักษณะต่างออกไป ค่าการดูดแสงจะไม่ลดลงเท่ากับค่าเดิม เนื่องจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ทำให้สายของ DNA เกิดรีคอมบิเนชั่นเพียงบางส่วนเป็นแบบแรนดอม (random) การดูดแสงจึงยังสูงกว่าปกติ



รูปที่ 5.13 ผลของอุณหภูมิต่อการดูดแสงของ DNA

สารเคมี DNA

RNA

เอ็นไซม์ deoxyribonuclease

acetate buffer 0.5 M pH 5.5

สารละลาย acetate buffer-magnesium sulphate (0.01 M $MgSO_4$ ใน acetate buffer 0.5 M pH 5.5)

น้ำเกลือ pH 7 (0.15 M NaCl ใน 0 105 M sodium citrate pH 7)

อ่างน้ำอุณหภูมิต่าง ๆ จนถึงอุณหภูมิ 95°ซ

UV-สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่มี thermostatically-controlled cell housing

วิธีการ ละลาย RNA และละลาย DNA 10 มิลลิกรัมด้วยน้ำเกลือ pH 7 ให้ปริมาตรสารละลายแต่ละชนิดเป็น 100 มล. นำไปวัดการดูดแสงในช่วง 220-320 นาโนเมตร แสดงสเปคตรัมของสารทั้งสองนี้

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อ DNA : เตรียมสารละลาย DNA ในน้ำเกลือให้อ่านค่าการดูดแสงได้ประมาณ 0.3-0.5 ซึ่งจะมีความเข้มข้นประมาณ 0.1 มิลลิกรัม/มล. เทสารละลายนี้ลงในคิวเวตต์ นำไปอ่านค่าการดูดแสงโดยใช้ UV-สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่มี thermostatically-controlled cell housing บันทึกผลการดูดแสงที่เปลี่ยนไปเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นถึง 90°ซ ถ้าเป็นไปได้ให้วัดอุณหภูมิจากสารละลาย DNA โดยตรง เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำที่หล่อคิวเวตต์อยู่มักจะสูงกว่าอุณหภูมิของสารที่อยู่ภายในคิวเวตต์

จากนั้นค่อย ๆ ลดอุณหภูมิสารละลาย DNA ลงจนกระทั่งเป็นอุณหภูมิห้อง วัดการดูดแสงที่ลดลง ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่งแต่ว่าเป็นการลดอุณหภูมิโดยเร็ว เปรียบเทียบ melting curve กับ cooling curve ที่ลดอุณหภูมิอย่างช้าและอย่างเร็ว

ผลของเอ็นไซม์ deoxyribonuclease (deoxyribonucleate oligonucleotidehydrolase, EC 3.1.4.4) : เตรียม DNA ในสารละลาย acetate buffer-magnesium sulphate ความเข้มข้นประมาณ 10 มิลลิกรัม/100 มล. ปิเปตต์สารละลายที่เตรียมได้นี้ 2.5 มล. ใส่ลงในคิวเวตต์ เติมสารละลายเอ็นไซม์ที่เจือจางพอเหมาะแล้วลงไป 0.5 มล. วัดค่าการดูดแสงที่ 260 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับการดูดแสงที่ได้เมื่อใช้น้ำกลั่นแทนเอ็นไซม์

ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้กับ RNA ด้วย

การเตรียมสารละลายบางชนิดที่ใช้ในการทดลอง

1. orcinol reagent :

   ละลาย ferric chloride ($FeCl_3.6\,H_2O$) 1 กรัมในกรดเกลือเข้มข้น 1 ลิตร เติม 35 มล. ของ 6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) orcinol ในอัลกอฮอลล์

2. diphenylamine reagent :

   ละลายสาร diphenylamine 10 กรัม ใน glacial acetic acid 1 ลิตร เติม 25 มล. ของ H_2SO_4 เข้มข้น เตรียมใช้ใหม่ ๆ

คำถามท้ายบท

1. บอกความแตกต่างระหว่างสิ่งต่อไปนี้
   ก) เพียวรีนและพิริมิดีนเบส
   ข) น้ำตาลไรโบสและดีออกซีโรโบส
   ค) นิวคลีโอไซด์และนิวคลีโอไทด์
   ง) นิวคลีโอไทด์และกรดนิวคลีอิค

2. เปรียบเทียบ DNA และ RNA ในหัวข้อต่อไปนี้
   ก) องค์ประกอบทางเคมี
   ข) โครงสร้างทุติยภูมิ
   ค) ตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์
   ง) หน้าที่ทางชีวภาพ

3. แรง (force) หรือพันธะใดที่ช่วยค้ำจุนโครงสร้างทุติยภูมิของเกลียวคู่ DNA?

4. เซลล์ทุกชนิดจะต้องมี DNA ใช่หรือไม่? เปรียบเทียบปริมาณ DNA ของเซลล์เม็ดเลือดแดงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ปลาและสัตว์เลื้อยคลาน

5. วิธีทางเคมีใดที่สะดวกและรวดเร็วเหมาะที่จะใช้วิเคราะห์ว่าสารน้ำหนักโมเลกุลสูงนั้น ๆ เป็น DNA หรือ RNA?

6. เมื่อเพิ่มอุณหภูมิแก่สารละลาย DNA เกลียวคู่อย่างช้า ๆ จะพบว่าการดูดแสงที่ 260 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ถ้าจะให้การดูดแสงที่ 260 นาโนเมตรลดลงมาตาม melting curve จะต้องขึ้นอยู่กับอัตราเร็วการทำให้เย็น (rate of cooling) เป็นเพราะเหตุใด?

7. อธิบายความหมายคำว่า "melting temperature"

8. สารละลาย DNA เกลียวคู่ในสภาวะปกติมีความหนืด (viscosity) สูงหรือต่ำ? เมื่อนำไปให้ความร้อนจนกระทั่งถึง melting temperature สารละลาย DNA จะมีความหนืดสูงขึ้นหรือลดลงจากสภาวะปกติ? อธิบายเหตุผล

9. ทำไมโอลิโกนิวคลีโอไทด์ pGpGpApGpApAp จึงทนทานต่อการไฮโดรไลซ์ของเอ็นไซม์ pancreatic ribonuclease ได้?

10. การเรียงตัวของเบสบนสายเดี่ยว DNA ข้างหนึ่งเป็น pGpCpTpGpGpA อยากทราบว่าการเรียงตัวของ complementary base บน DNA อีกสายหนึ่งเป็นอย่างไร?

11. การเรียงตัวของเบสในโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของ RNA เป็นดังนี้

pGpGpCpUpApCpGpUpApGpApUpCpAp

นิวคลีโอไทด์สายนี้จะถูกย่อยสลายที่ตำแหน่งใดบ้าง ถ้านำไปทำปฏิกริยากับสารหรือเอ็นไซม์ต่อไปนี้

ก) NaOH

ข) เอ็นไซม์ pancreatic ribonuclease

ค) เอ็นไซม์ Takadiastase

12. จงบอกวัตถุประสงค์การใช้สารละลายผสม $CHCl_3$: amyl alcohol และการใช้ 95% EtOH ในขั้นตอนการแยก DNA

13. สารละลายเบส อะดีนีน กวานีน ไซโตซีน และยูราซิล จะให้สีน้ำเงินเข้มหรือไม่เมื่อนำไปทำปฏิกริยากับ diphenylamine reagent? เพราะเหตุใด?

14. สารละลายเบส อะดีนีน กวานีน ไซโตซีนและยูราซิล จะให้สีน้ำเงินเขียวหรือไม่เมื่อนำไปทำปฏิกริยากับ orcinol reagent? เพราะเหตุใด?

15. เขียนปฏิกริยาการย่อยสลายกรดนิวคลีอิคด้วย 0.3 M KOH DNA และ RNA ให้ผลเหมือนกันหรือไม่อย่างไร? จงอธิบาย