บทที่ 3
การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค
(Biosynthesis of Nucleic Acids)

กรดนิวคลีอิคแบ่งได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิค (Deoxyribonucleic acid, DNA) และกรดไรโบนิวคลีอิค (Ribonucleic acid, RNA) ซึ่งทั้งสองพวกนี้ต่างก็ประกอบขึ้นด้วยนิวคลีโอไทด์หลายๆ โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ระหว่าง 3′-ไฮดรอกซิล ของส่วนน้ำตาลของนิวคลีโอไทด์หนึ่ง กับ 5′-ฟอสเฟท ของส่วนน้ำตาลของอีกนิวคลีโอไทด์หนึ่งที่อยู่ติดกัน ทำให้ได้เป็นสายยาวของกรดนิวคลีอิคขึ้น สิ่งที่แตกต่างกันระหว่าง DNA และ RNA ก็คือ

1. น้ำตาลที่พบใน DNA จะเป็นชนิดดีออกซีไรโบส ส่วนใน RNA จะเป็นน้ำตาลไรโบส
2. เบสเพียวรีนที่พบใน DNA ได้แก่ อดีนีนและกัวนีน ส่วนเบสไพริมิดีนที่พบได้แก่ ไซโตซีนและไธมีน สำหรับใน RNA จะพบเบสอดีนีน, กัวนีน, ไซโตซีน และยูราซิล

กรดนิวคลีอิคแต่เดิมนั้นถูกจัดเป็นสารเคมีตัวหนึ่ง จนกระทั่งหลายสิบปีต่อมาจึงได้มีการค้นพบว่ากรดนิวคลีอิคมีบทบาทสำคัญทางพันธุศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อความทางพันธุกรรม (genetic information) ของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดจะบรรจุอยู่ใน DNA ยกเว้นไวรัสบางชนิดเท่านั้นที่ใช้ RNA แทน DNA

ข้อความทางพันธุกรรมใน DNA นี้จะถูกส่งจากเซลล์พ่อแม่ (parent cell) ไปยังเซลล์ลูกหลาน (daughter cell) เพื่อให้เซลล์ลูกหลานยังคงมีคุณสมบัติทั่วๆ ไปเหมือนเดิม และไม่เปลี่ยนไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น ซึ่งวิธีนี้ก็คือการรักษาชาติพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดไว้นั่นเอง

ในปี ค.ศ.1958 Francis Crick ได้อธิบายถึงความสัมพันธ์ของ DNA, RNA และโปรตีน โดยบัญญัติศัพท์ขึ้นมาคำหนึ่งว่า Central Dogma ซึ่งมีใจความว่าการที่ข้อความทางพันธุกรรมจะถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูกหลานได้นั้น ก่อนอื่นจะต้องมีการสังเคราะห์ DNA ขึ้นใหม่ให้เหมือนเดิมก่อน ซึ่งขบวนการนี้เรียกว่า การลอกแบบ (replication) DNA นี้เมื่อถูกถ่ายทอด

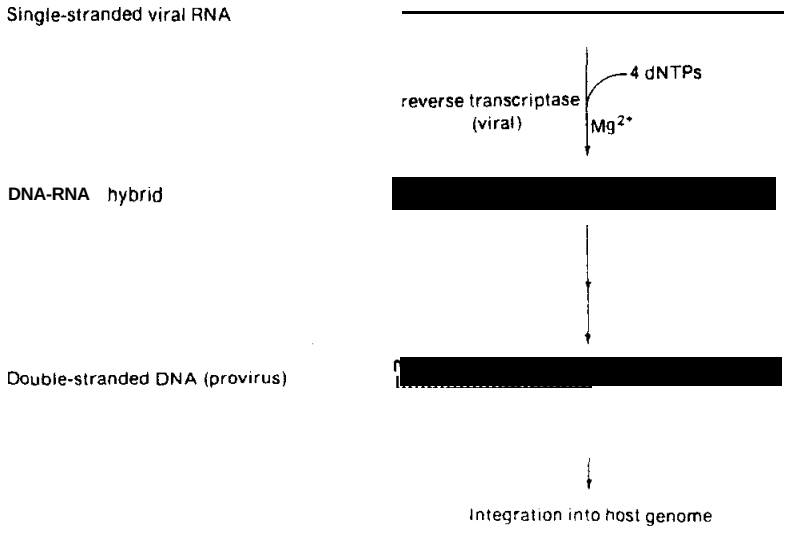
ไปให้เซลล์ลูกหลานแล้วก็จะถูกถอดข้อความ (transcription) ออกมาในรูปของ RNA แล้ว messenger RNA (m RNA) ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาก็จะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ (*template*) ในการสังเคราะห์โปรตีนอีกทอดหนึ่ง ซึ่งขบวนการสังเคราะห์โปรตีนให้มีลำดับการเรียงตัวของกรดอมิโนเป็นไปตามข้อความที่มีอยู่ใน RNA นั้น เรียกว่าการแปลข้อความ (translation)

$$\text{DNA} \xrightarrow{\text{transcription}} \text{RNA} \xrightarrow{\text{translation}} \text{Protein}$$

ในบทนี้จะกล่าวเฉพาะการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค คือเฉพาะขบวนการเรพลิเคชั่นและทรานสคริปชั่นเท่านั้น ส่วนขบวนการทรานสเลชั่น คือการสังเคราะห์โปรตีนนั้น จะได้กล่าวในบทต่อไป

เอนไซม์ reverse transcriptase

ในปี ค.ศ. 1970 Howard Temin และ David Baltimore ได้พบว่า RNA virus ที่ทำให้เกิดโรคเนื้องอกนั้น จะมีเอนไซม์ตัวหนึ่งคือ reverse transcriptase ซึ่งใช้ RNA สายเดี่ยวเป็นแม่พิมพ์แล้วสังเคราะห์ DNA ขึ้น โดยขั้นแรกจะสังเคราะห์ DNA-RNA hybrid ขึ้นก่อน แล้วจึงมีขบวนการ



ที่ยังไม่ทราบแน่ชัดต่อไปอีก จนได้ DNA เกลียวคู่ที่เรียกว่า provirus ขึ้นในที่สุด ในกรณีนี้จะเห็นได้ว่า ข้อความทางพันธุกรรมถูกส่งจาก RNA ไปยัง DNA เมื่อดูเผิน ๆ จึงเหมือนกับว่า ข้อมูลนี้ขัดแย้งกับ central dogma ของ Crick แต่ถ้าพิจารณาให้ลึกลงไปแล้ว การค้นพบเอนไซม์ reverse transcriptase (RNA-directed DNA polymerase) ทำให้แนวคิดรากฐานของ dogma ขยายกว้างขึ้น กล่าวคือเมื่อรวมเอาข้อมูลใหม่นี้บรรจุลงไปด้วยแล้ว จะเขียนแผนผังการส่งผ่านข้อความทางพันธุกรรมได้เป็นดังนี้

จากแผนผังสรุปได้เป็นข้อ ๆ ว่า

1. DNA และ viral RNA จะเป็น replicon คือโมเลกุลที่สามารถลอกแบบตัวเองได้

2. กรดนิวคลีอิคทั้งสองประเภท สามารถเป็นแม่พิมพ์สำหรับการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิคต่างประเภทได้ กล่าวคือ DNA จะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ RNA ได้ และในทำนองเดียวกัน RNA ก็จะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ DNA ได้เช่นกัน

3. โปรตีนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นจากข้อความทางพันธุกรรมที่มีอยู่ใน RNA

4. เนื่องจากไม่มีหลักฐานทางชีวเคมีว่า โปรตีนสามารถลอกแบบตัวเอง หรือถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ DNA และ RNA ได้ จึงกล่าวได้ว่า ข้อมูลทางพันธุกรรมของโปรตีนนั้นไม่สามารถถ่ายทอดได้ ลูกศรที่เป็นเส้นทึบในแผนผัง แสดงว่า ขบวนการนั้นเกิดขึ้นในทุก ๆ เซลล์ ส่วนลูกศรที่เป็นเส้นไข่ปลา แสดงถึงขบวนการที่เกิดขึ้นเฉพาะใน RNA virus เท่านั้น

การค้นพบ reverse transcriptase ของ RNA virus ยังมีผลในวงการวิจัยเกี่ยวกับมะเร็งอีกด้วย กล่าวคือ แม้ว่าจะเป็นที่ทราบกันทั่วไปว่า RNA และ DNA virus บางชนิดสามารถทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ ตัวอย่างเช่น RNA virus พวก Rous sarcoma ทำให้เกิดมะเร็งในไก่ avian myeloblastosis ทำให้เกิดลิวคีเมียในนก และ Rauscher leukemia ทำให้เกิดลิวคีเมียในหนู ส่วน DNA virus พวก SV40 ทำให้เกิดมะเร็งในลิง และ polyoma ทำให้เกิดมะเร็งในหนู แต่วิธีการที่ไวรัสทั้งสองประเภทใช้ในการทำให้เกิดมะเร็งนั้น ยังไม่เป็นที่ทราบชัด ทราบแต่เพียงเฉพาะในกรณีของ DNA virus ว่า เมื่อไวรัสเข้าไปใน host cell แล้ว DNA เกลียวคู่ของไวรัสที่เรียกว่า

provirus นั้น จะเข้ารวมตัวกับโครโมโซมของ host cell ด้วยเหตุนี้ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง (transformation) ไป เกิดมะเร็งขึ้น รูปแบบที่กล่าวมานี้ ในขณะที่ยังไม่พบเอนไซม์ reverse transcriptase จะใช้อธิบายกับ RNA virus ไม่ได้ เพราะจะต้องอธิบายว่า เกิดการรวมตัวระหว่าง RNA ของไวรัส กับ DNA ของ host cell ซึ่งเป็นไปไม่ได้ แต่เมื่อมีการค้นพบเอนไซม์ reverse transcriptase ใน RNA virus แล้ว ก็ทำให้เข้าใจถึงขบวนการที่ไวรัสประเภทนี้ใช้ในการทำให้เกิดมะเร็ง คือจะต้องมีการสังเคราะห์ DNA ขึ้นจาก RNA เสียก่อน แล้ว DNA ของไวรัสจึงจะเข้ารวมตัวกับ DNA ของ host ดังนั้นการค้นพบเอนไซม์ตัวนี้ จึงเป็นจุดเชื่อมโยงที่ช่วยให้สามารถอธิบายทฤษฎีของการเกิดมะเร็งได้อย่างสมบูรณ์ด้วย

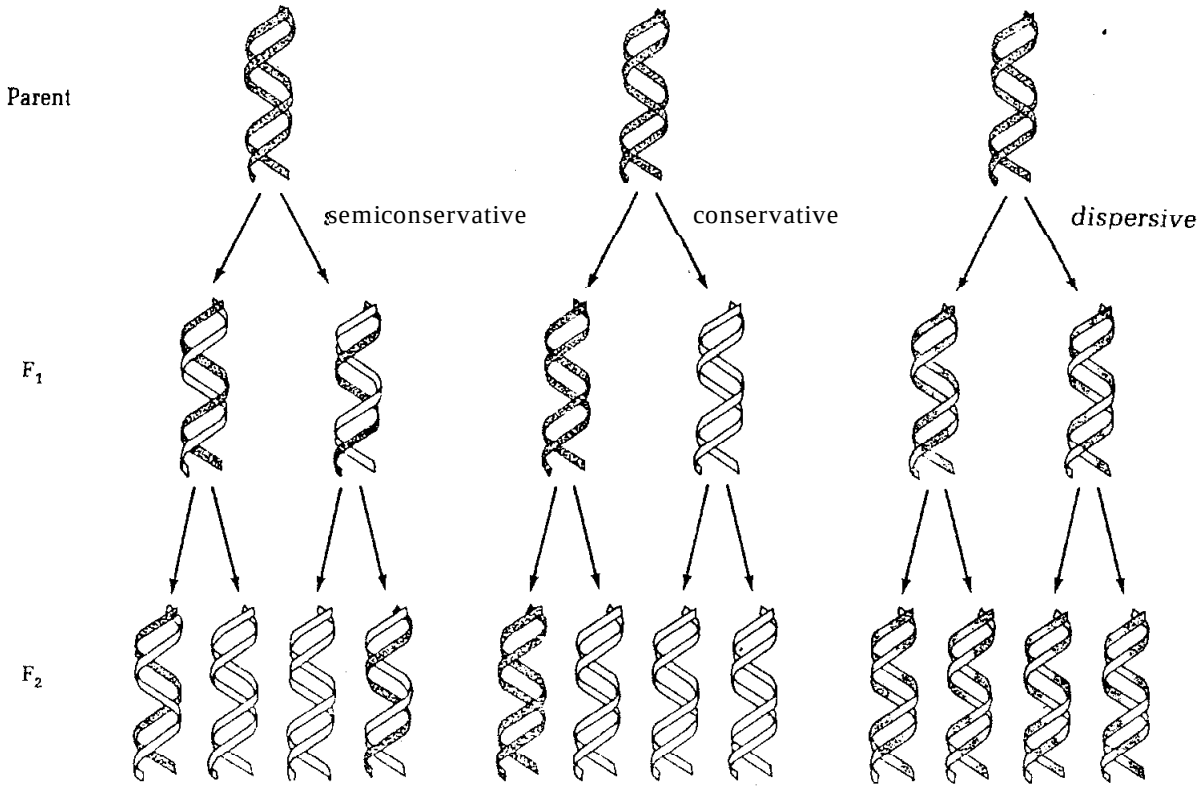
การสังเคราะห์ DNA (ขบวนการเรพลิเคชั่น)

DNA ในสภาพปกติจะอยู่ในลักษณะที่สองสายมาพันกันเป็นเกลียว (double helix) ดังนั้นเมื่อจะเกิดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ขึ้น DNA พ่อแม่ (parent DNA) จะต้องคลายเกลียวออกจากกันก่อนแล้วจึงจะเกิดเรพลิเคชั่นได้ โดยที่รูปแบบของเรพลิเคชั่น (รูปที่ 3-1) อาจจะเกิดได้ดังนี้

1. แบบอนุรักษ์ (conservative) วิธีนี้ในรุ่นลูก (F_1) จะได้ DNA 2 คู่ โดยที่คู่หนึ่งประกอบด้วย DNA 2 สายเดิมจากพ่อแม่ และอีกคู่หนึ่งประกอบด้วย DNA 2 สายที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ ส่วนในรุ่นหลาน (F_2) จะได้ DNA ทั้งหมด 4 คู่ โดยที่คู่หนึ่งประกอบขึ้นด้วย DNA พ่อแม่ 2 สาย ส่วนอีก 3 คู่ที่เหลือประกอบขึ้นด้วย DNA ใหม่ทั้งสิ้น

2. แบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative) ถ้าเรพลิเคชั่นเกิดในรูปแบบนี้ DNA ที่ได้ทั้ง 2 คู่ในรุ่น F_1 จะประกอบขึ้นจาก DNA พ่อแม่ 1 สายพันเกลียวอยู่กับ DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ 1 สาย และในรุ่น F_2 จะได้ DNA ชนิดเดียวกับที่ได้ใน F_1 2 คู่ ส่วนอีก 2 คู่จะเป็นการพันเกลียวกันระหว่าง DNA ใหม่ทั้งหมด

3. แบบกระจาย (dispersive) ในกรณีนี้ DNA พ่อแม่ทั้ง 2 สายจะหักออกเป็นช่วงๆ แล้วมีการสร้าง DNA ใหม่ขึ้นมาแซมส่วนที่ขาดหายไปจนครบสมบูรณ์ ดังนั้นทั้งในรุ่น F_1 และ F_2 DNA ทุกคู่ที่ได้จะมีลักษณะเหมือนกันหมดคือ แต่ละคู่จะประกอบขึ้นด้วย DNA ที่แต่ละสายจะมีทั้งส่วนของเก่าและของใหม่ผสมกัน



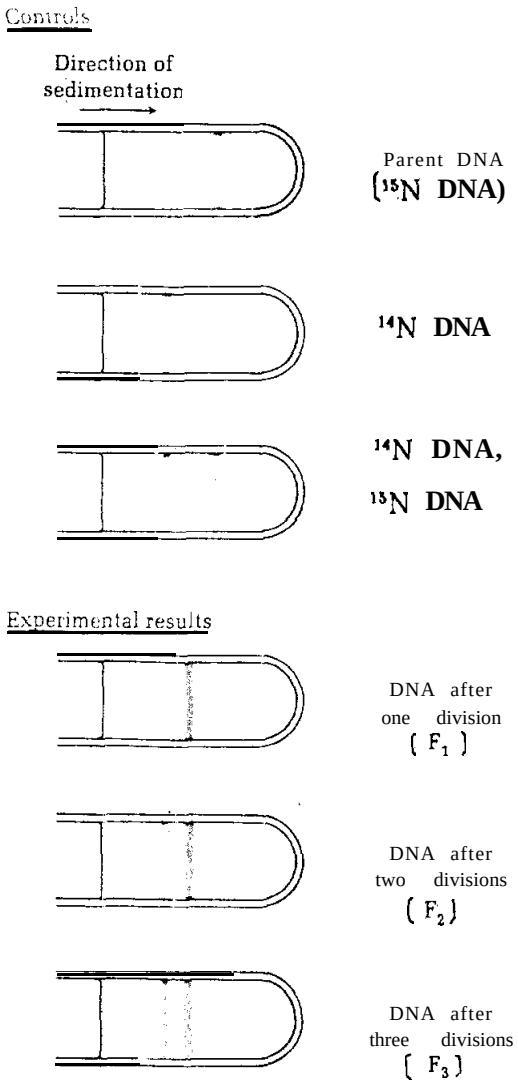
รูปที่ 3-1 รูปแบบที่เป็นไปได้ในการสังเคราะห์ DNA

คือ DNA เดิมจากพ่อแม่

คือ DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่

ในปี ค.ศ.1957 M.S. Meselson และ F.W. Stahl ได้ทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่าเรพลิเคชั่นของ DNA จะเกิดในรูปแบบใด โดยเลี้ยงเซลล์ของ E.coli ในน้ำเลี้ยง (medium) ที่มี NH_4Cl เพียงตัวเดียวเท่านั้นที่จะเป็นแหล่งให้ไนโตรเจนแก่เซลล์ NH_4Cl ที่ใช้เป็น $^{15}NH_4Cl$ ซึ่งสามารถติดตามได้โดยวิธีการทางรังสีวิทยา เขาเลี้ยง E. coli ในน้ำเลี้ยงนี้ไปหลายๆ ช่วงอายุ (generation) ดังนั้นสารประกอบไนโตรเจนทั้งหมดภายในเซลล์ซึ่งรวมทั้ง DNA ด้วย ก็จะมี ^{15}N แทนที่จะเป็น ^{14}N (ไนโตรเจนธรรมดา) จากนั้นจึงเปลี่ยนน้ำเลี้ยง E. coli เป็นชนิดที่มี NH_4Cl ธรรมดาคือ $^{14}NH_4Cl$ แล้วจึงนำเอาเซลล์ตัวอย่างมาสกัด DNA เพื่อศึกษาแรงลอยตัวของ DNA โดยใช้วิธีเซดิเมนท์ (sedimentation) ในสารละลาย CsCl พบว่าถ้าเลี้ยง E. coli ในน้ำเลี้ยงที่มี $^{14}NH_4Cl$ ไปได้ 1 ช่วงอายุ แล้วสุ่มเอาเซลล์ตัวอย่างออกมาศึกษาดู DNA ที่

สกัดออกมาได้จะให้แถบ (band) 1 แถบอยู่กึ่งกลางระหว่างแถบของ ^{14}N-DNA และ ^{15}N-DNA ที่เป็นมาตรฐาน (รูปที่ 3-2) ซึ่งจากผลนี้ก็พอที่จะคาดได้ว่า DNA รุ่นลูกคงประกอบไปด้วย ^{15}N-DNA 1 สาย (คือสายที่มาจากพ่อแม่เดิม) พันเกลียวอยู่กับ ^{14}N-DNA (คือ DNA ที่สร้างขึ้นใหม่) อีก 1 สาย



รูปที่ 3-2 การทดลองของ Meselson และ Stahl เพื่อพิสูจน์ว่าการสังเคราะห์ DNA เกิดขึ้นโดยใช้วิธีกึ่งอนุรักษ์

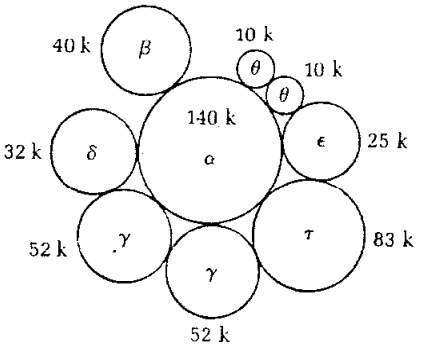
จากนี้ทำการทดลองต่อไปโดยปล่อยให้ E. coli เจริญเติบโตไปจนถึงสองและสามช่วง

อายุในน้ำเลี้ยงที่ใช้ $^{14}NH_4Cl$ นี้ แล้วนำเอาเซลล์ตัวอย่างมาสกัดดู DNA อีก คราวนี้พบว่าเกิดแถบขึ้น 2 แถบในกรณี 2 ช่วงอายุคือรุ่นหลาน (F_2) แต่ละแถบนั้นจะมีปริมาณเท่าๆ กัน โดยที่แถบหนึ่งอยู่ตรงกับแถบที่พบใน F_1 และอีกแถบจะอยู่ตรงกับแถบของ ^{14}N-DNA มาตรฐาน ส่วนในกรณี 3 ช่วงอายุคือรุ่นเหลน (F_3) จะพบว่าเกิด 2 แถบเช่นกัน แต่ปริมาณของแถบหนึ่งซึ่งอยู่ตรงกับแถบของ ^{14}N-DNA มาตรฐานจะมีปริมาณเป็นสามเท่าของอีกแถบหนึ่งซึ่งอยู่กึ่งกลางระหว่างแถบของ ^{14}N-DNA และ ^{15}N-DNA มาตรฐาน ผลจากการทดลองของ Meselson และ Stahl นี้ยืนยันว่าการสังเคราะห์ DNA จะเป็นไปในแบบกึ่งอนุรักษ์ (semi-conservative)

DNA โพลีเมอเรส (DNA-directed DNA polymerase)

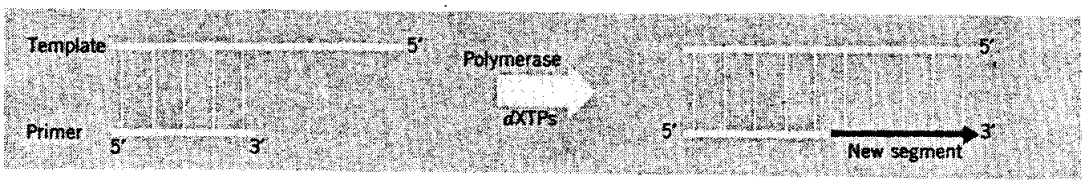
เอนไซม์นี้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1956 โดย A. Kornberg และผู้ร่วมงาน เมื่อแรกพบคิดว่ามีเพียงตัวเดียว Kornberg จึงให้ชื่อว่า DNA โพลีเมอเรส I และเข้าใจว่าเอนไซม์ตัวนี้มีบทบาทในขบวนการเรพลิเคชั่น แต่ต่อมาได้มีการค้นพบเอนไซม์อีกสองตัวคือ DNA โพลีเมอเรส II และ DNA โพลีเมอเรส III และในปัจจุบันนี้ก็ทราบแน่ชัดแล้วว่า DNA โพลีเมอเรส I นั้นมีหน้าที่ในการซ่อมแซม DNA ส่วน DNA โพลีเมอเรส III มีหน้าที่ในขบวนการเรพลิเคชั่น

DNA โพลีเมอเรส III ค้นพบโดย T. Kornberg และ M.L. Gefter เอนไซม์ตัวนี้ไม่ค่อยคงตัว (stable) นัก แต่อย่างไรก็ตามก็สามารถสกัดเอนไซม์ตัวนี้ออกมาได้ และพบว่ามีความว่องไวในการทำปฏิกริยามากกว่า DNA โพลีเมอเรส I ถึง 15 เท่า DNA โพลีเมอเรส III เป็นโปรตีนที่มีความซับซ้อนมาก โดยจะอยู่ในรูปของโฮโลเอนไซม์ ซึ่งประกอบขึ้นจากหน่วยย่อย 7 ชนิด จำนวน 9 ตัวมารวมกัน (ดังรูป) หน่วยย่อยอัลฟาจะเป็นส่วนที่มีคุณสมบัติของความเป็นโพลีเมอเรส ส่วนหน่วยย่อยอื่น ๆ ยังไม่ทราบหน้าที่

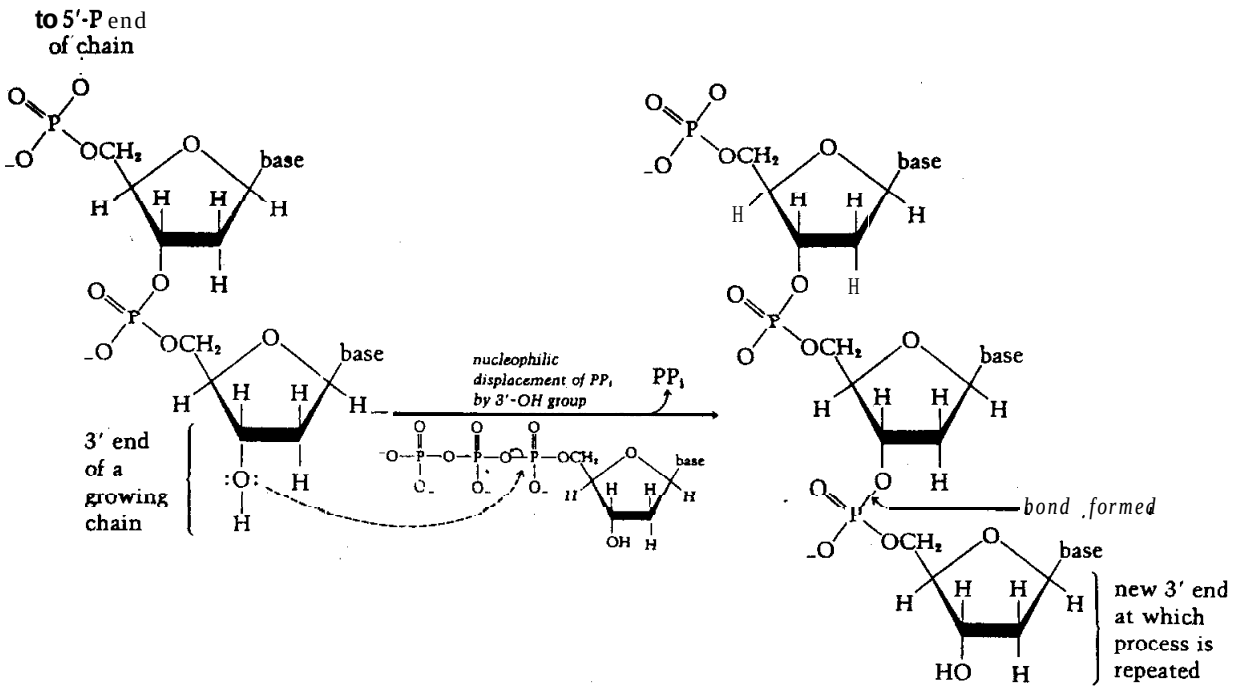


โครงร่างของ DNA โพลีเมอเรส III โฮโลเอนไซม์
(k = กิโลดาลตัน)

DNA โพลีเมอเรสจะทำหน้าที่เชื่อมดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์เข้าด้วยกัน เป็นสายใหม่ของ DNA โดยการเรียงลำดับเบสของ DNA ใหม่ให้เข้าคู่กับลำดับของเบสบน DNA สายเดิมที่มีอยู่ DNA สายเดิมนี้เรียกว่าแม่พิมพ์ (template) นอกจากนี้ในการทำงานของเอนไซม์นี้ยังต้องการไพรเมอร์ด้วย ไพรเมอร์คือสายสั้น ๆ ของ RNA ประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ที่มีการเรียงลำดับเบส เข้าคู่กับลำดับของเบสบน DNA แม่พิมพ์ เรพลิเคชั่นจะเกิดโดยการต่อดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ลงไปที่ปลายสายของไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5′→ 3′ ทีละตัว ๆ จนได้สายใหม่ของ DNA ที่ยาวขึ้น RNA ไพรเมอร์จะคงอยู่จนถึงขั้นตอนหลัง ๆ ของขบวนการเรพลิเคชั่น จึงถูกตัดออก แล้วจะมีการสร้างส่วนของ DNA ใหม่ขึ้นมาแทนที่



กลไกการต่อดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ จะเกิดโดยปฏิกริยา nucleophilic attack (รูปที่ 3-3) ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ปลาย 3′ ของสาย DNA ที่กำลังสร้างยาวขึ้นๆ นั้น ไปยังอัลฟาฟอสฟอรัสอะตอมของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ตัวที่จะเข้ามาใหม่ เกิดเป็นพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ขึ้น และหมู่ไพโรฟอสเฟทจะถูกตัดทิ้งไป



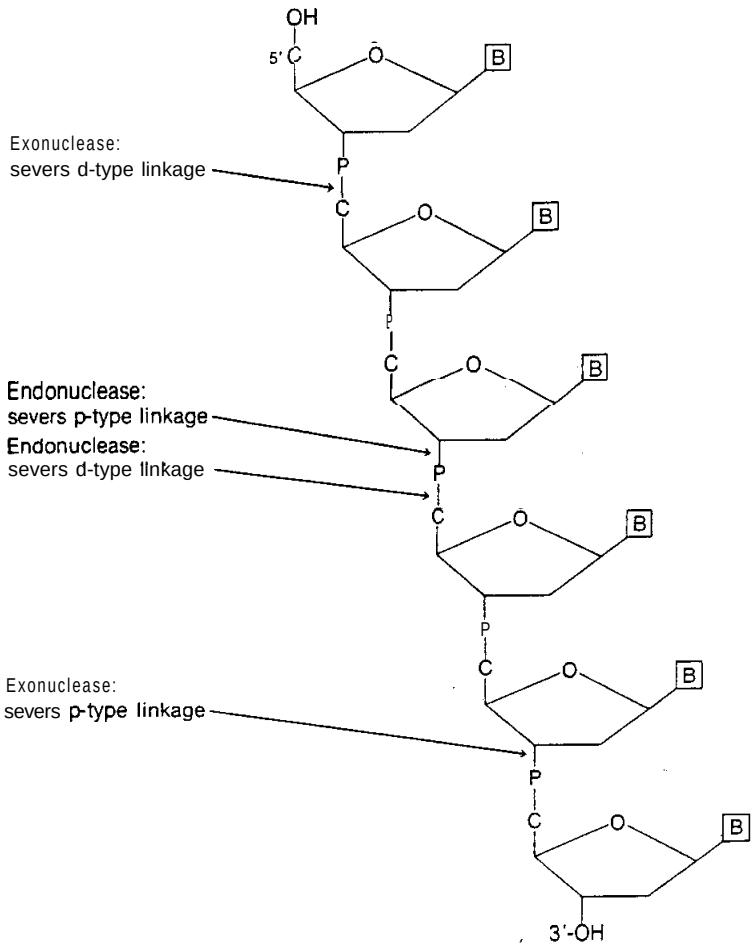
รูปที่ 3-3 กลไกการต่อดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์เพื่อให้เกิด DNA สายใหม่ โดยการทำงานของเอนไซม์ DNA โพลีเมอเรส

DNA โพลีเมอเรสจะทำงานได้ผลดี ถ้าใช้ DNA สายเดี่ยวเป็นแม่พิมพ์ และมีไพรเมอร์ แต่ถ้าเป็น DNA เกลียวคู่ไม่ว่าจะอยู่ในรูปเส้นตรง (linear) หรือวงปิด (circular) ต้องมีรอยหัก (nick) ที่สายใดสายหนึ่งก่อนจึงจะใช้เป็นแม่พิมพ์ได้

เอนไซม์นิวคลีเอส

เอนไซม์นี้จะทำลายพันธะระหว่างน้ำตาลและฟอสเฟท โดยถ้าเป็นการตัดพันธะที่เชื่อมระหว่าง 3′ ของน้ำตาลกับฟอสเฟท จะเรียกว่าการตัดชนิด p-type และถ้าเป็นการตัดพันธะที่เชื่อมระหว่าง 5′ ของน้ำตาลกับฟอสเฟท จะเรียกว่าการตัดชนิด d-type นิวคลีเอสแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามลักษณะการทำงานคือ

1. เอ็กโซนิวคลีเอส (exonuclease) จะทำลายพันธะจากปลายสายของ DNA เข้ามาทีละพันธะ



2. เอ็นโดนิวคลีเอส (endonuclease) จะทำลายพันธะที่อยู่ภายในสาย DNA

เอนไซม์ทั้งสองประเภทนี้จะมีทั้งชนิด 3′ → 5′ และ 5′ → 3′ ขึ้นกับว่าการทำงานของเอนไซม์นั้น จะเริ่มต้นจากทางปลายใดของ DNA สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของนิวคลีเอส อาจเป็นนิวคลีโอไทด์ล้วน ๆ หรือเป็นนิวคลีโอไทด์ปนกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ก็ได้

นิวคลีเอสแต่ละชนิดจะมีความเฉพาะเจาะจงของตัวเองในแง่ที่จะตัดพันธะแบบ p-type หรือ d-type และนิวคลีเอสบางชนิดยังเลือกตัดบางพันธะได้มากน้อยต่างกันด้วย ตัวอย่างเช่น ในกรณีของเอนไซม์ DNase I (ดูในตารางที่ 3-1) นอกจากนี้นิวคลีเอสทั้งสองประเภทยังมีความเฉพาะเจาะจงกับโครงสร้างภายนอกของโพลีนิวคลีโอไทด์ที่จะถูกตัดด้วย คือนิวคลีเอสบางชนิดจะเลือกตัดโพลีนิวคลีโอไทด์ประเภท DNA เพียงอย่างเดียวโดยไม่คำนึงว่า DNA นั้นจะอยู่ในลักษณะสายเดี่ยวหรือสายคู่ ในขณะที่นิวคลีเอสบางชนิดจะเลือกตัด DNA หรือ RNA ก็ได้ถ้าโพลีนิวคลีโอไทด์นั้นอยู่ในรูปสายเดี่ยว

เอนไซม์	สับสเตรท	ความเฉพาะเจาะจง
เอ็กโซนิวคลีเอส		
ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (จากพิษงู)	DNA หรือ RNA ที่เป็นสายเดี่ยวเท่านั้น	ตัดทุกพันธะที่เป็นแบบ p-type โดยเริ่มต้นจากปลาย 3′ ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ แล้วจึงค่อย ๆ ตัดเรื่อยไปหาปลาย 5′ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นนิวคลีโอไซด์ – 5′-ฟอสเฟท และไม่มีความเฉพาะเจาะจงในเรื่องของเบส
ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (จากม้ามของวัว)	DNA หรือ RNA ที่เป็นสายเดี่ยวเท่านั้น	ตัดทุกพันธะที่เป็นแบบ d-type โดยเริ่มต้นจากปลาย 5′ ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ แล้วจึงค่อย ๆ ตัดเรื่อยไปหาปลาย 3′ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นนิวคลีโอไซด์ – 3′-ฟอสเฟท และไม่มีความเฉพาะเจาะจงในเรื่องของเบส

เอนไซม์	สับสเตรท	ความเฉพาะเจาะจง
เอ็นโดนิวคลีเอส		
DNase I	DNA ไม่ว่าจะเป็นสายเดี่ยวหรือสายคู่	ตัดทุกพันธะที่เป็นแบบ p-type โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าพันธะนั้นอยู่ระหว่างเบสเพียวรีนและไพริมิดีน
DNase II	DNA ไม่ว่าจะเป็นสายเดี่ยวหรือสายคู่	ตัดทุกพันธะที่เป็นแบบ d-type โดยจะตัดแบบสุ่ม

ตารางที่ 3-1 ชนิดของสับสเตรทและความเฉพาะเจาะจงในการตัดพันธะระหว่างน้ำตาลและฟอสเฟทของนิวคลีเอสบางชนิด

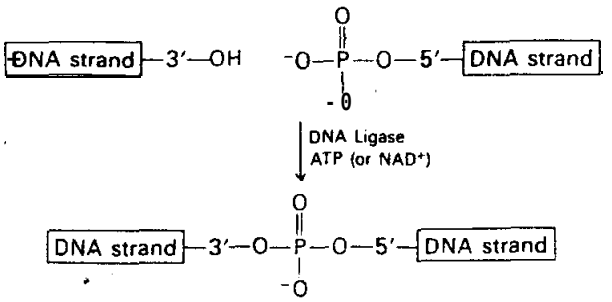
เอ็กโซนิวคลีเอสจะพบในเอนไซม์ DNA โพลีเมอเรสด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง DNA โพลีเมอเรส I ได้มีการศึกษาพบว่า DNA โพลีเมอเรส I เป็นสายยาวของโพลีเปปไทด์ (poly peptide) ซึ่งเมื่อถูกตัดออกโดยเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนแล้วจะได้เป็นสองส่วน ส่วนใหญ่ (น้ำหนักโมเลกุล 76,000 ดาลตัน) ประกอบขึ้นด้วย DNA โพลีเมอเรส และ $3' \longrightarrow 5'$ เอ็กโซนิวคลีเอส ส่วนส่วนย่อย (น้ำหนักโมเลกุล 36,000 ดาลตัน) จะมีเพียง $5' \longrightarrow 3'$ เอ็กโซนิวคลีเอสเท่านั้น ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าโมเลกุลของ DNA โพลีเมอเรส I นั้นโดยแท้จริงแล้ว จะประกอบขึ้นด้วยเอนไซม์สองชนิดที่แยกจากกัน ชนิดหนึ่งคือ DNA โพลีเมอเรส กับ $3' \longrightarrow 5'$ เอ็กโซนิวคลีเอส และอีกชนิดหนึ่งคือ $5' \longrightarrow 3'$ เอ็กโซนิวคลีเอส โดยที่เอนไซม์ทั้งสองนี้จะเชื่อมต่อกันอยู่โดยใช้พันธะเปปไทด์ สำหรับ DNA โพลีเมอเรส II และ DNA โพลีเมอเรส III จะมี $3' \longrightarrow 5'$ เอ็กโซนิวคลีเอสเพียงอย่างเดียว

หน้าที่ของเอ็กโซนิวคลีเอสในการสังเคราะห์ DNA ก็คือ เอนไซม์นี้จะเป็นตัวกำจัดสิ่งผิดปกติต่างๆ ออกจากสายของ DNA ที่กำลังจะเกิดขบวนการเรพลิเคชั่น โดย $3' \longrightarrow 5'$ เอ็กโซนิวคลีเอสจะคอยดูแลให้เบสตรงปลาย $3'$ ของไพรเมอร์มีการจับคู่ที่ถูกต้องกับเบสบนแม่พิมพ์ก่อนที่จะมีการต่อสายของ DNA ใหม่ออกไป สำหรับ $5' \longrightarrow 3'$ เอ็กโซนิวคลีเอสจะดูแลความเรียบร้อยทางปลาย $5'$ ของสาย DNA ก่อนหน้าที่ DNA โพลีเมอเรสจะทำงาน โดยถ้ามีส่วน

ของ DNA สายใดที่ยาวออกไปและไม่ได้จับคู่กับอีกสายหนึ่ง 5′⟶3′ เอ็กโซนิวคลีเอสก็จะต้องตัดตรงส่วนนั้นทิ้งไป หรือถ้าบริเวณนั้นเกิดมีนิวคลีโอไทด์ที่ผิดปกติเกิดขึ้นจากเหตุต่างๆ ส่วนที่ผิดปกติก็จะต้องถูกตัดออกก่อนจะมีเรพลิเคชั่นเกิดขึ้นเช่นกัน สำหรับเอ็นโดนิวคลีเอสจะมีบทบาทในการซ่อมแซม DNA ซึ่งจะได้กล่าวต่อไปภายหลัง

DNA ไลเกส (DNA ligase)

เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเชื่อมปลายของ DNA สองสายเข้าด้วยกัน โดยจะคะตะไลซ์การเกิดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างหมู่ 3′-ไฮดรอกซิลของ DNA สายหนึ่ง กับหมู่ 5′-ฟอสเฟทของปลาย DNA อีกสายหนึ่ง (รูปที่ 3-4)

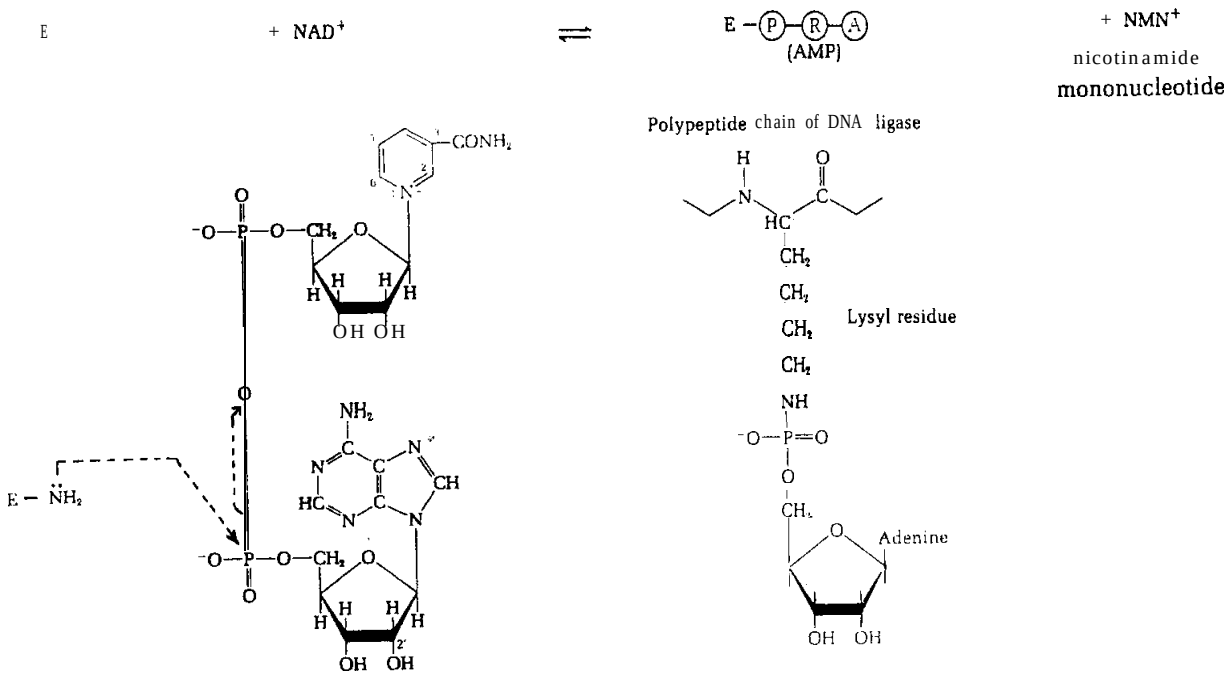


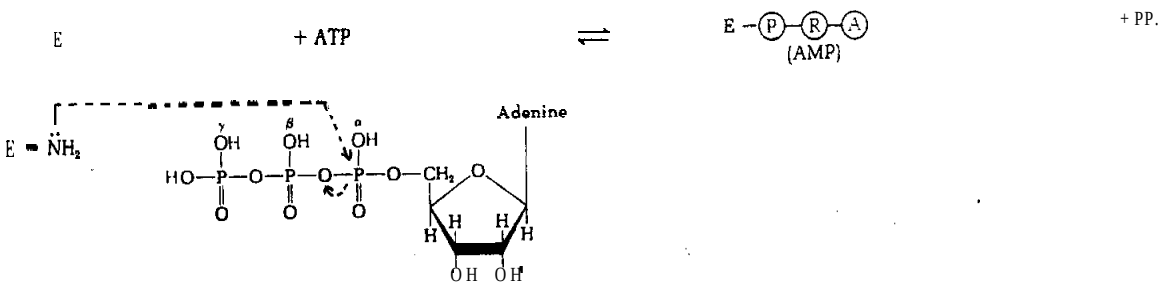
รูปที่ 3-4 การเชื่อมปลายของ DNA สองสายเข้าด้วยกัน โดยใช้เอนไซม์ DNA ไลเกส

DNA ไลเกสจะสามารถสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างปลายของสาย DNA ได้เพียง 1 พันธะเท่านั้น และเอนไซม์นี้ไม่สามารถทำให้เกิดเรพลิเคชั่นได้เลย

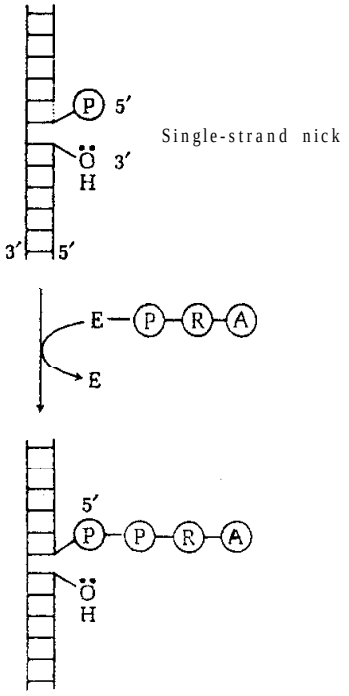
การสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ต้องใช้พลังงานด้วย โดยที่ใน E. coli และแบคทีเรียอื่นๆ จะมี NAD^+ เป็นแหล่งพลังงาน ส่วนในเซลล์สัตว์และไวรัสบางชนิดจะใช้ ATP เป็นตัวผลักดันปฏิกริยา

กลไกของปฏิกริยาเกิดโดย ATP หรือ NAD^+ จะเข้าทำปฏิกริยากับเอนไซม์ DNA ไลเกส แล้วได้เป็นเอนไซม์-AMP complex โดย AMP จะไปเชื่อมต่อกับหมู่ ε-อมิโนของส่วนไลซีนของเอนไซม์ด้วยพันธะ phosphoamide

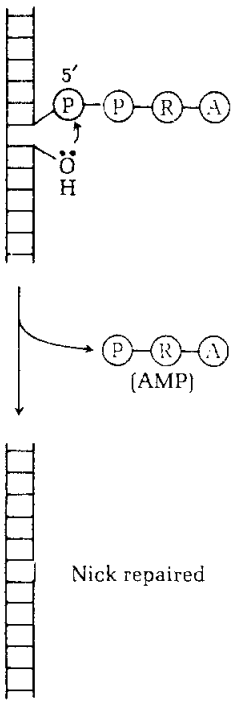




จากนั้นหมู่ AMP จากเอนไซม์จะถูกเคลื่อนย้ายไปยังปลาย 5′-ฟอสเฟทของ DNA สายหนึ่ง



ขั้นตอนสุดท้ายของกลไกคือ จะเกิด nucleophilic attack ของหมู่ 3′-ไฮดรอกซิลที่ปลาย DNA อีกสายหนึ่ง ทำให้ส่วน AMP ที่ปลาย 5′ ถูกตัดออกไป และเกิดการเชื่อมต่อของ DNA สองสายขึ้น



ในกรณีที่ใช้ ATP เป็นแหล่งพลังงาน จะเห็นว่าในขั้นตอนแรกของกลไก ATP จะถูกสลายได้เป็น AMP และไพโรฟอสเฟท ซึ่งไพโรฟอสเฟทก็จะต้องถูกสลายต่อไปอีก ดังนั้นแสดงว่าในการเชื่อมสาย DNA เข้าด้วยกันนั้น ต้องสลายพันธะฟอสเฟทที่ให้พลังงานถึง 2 พันธะ

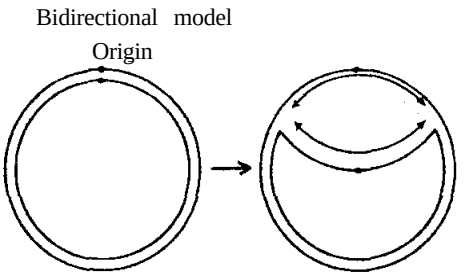
เอนไซม์ DNA ไลเกสจะพบได้ทั้งในสัตว์ชั้นต่ำและสัตว์ชั้นสูง โดยมีหน้าที่ดังนี้คือ

1. ซ่อมแซมรอยหักของ DNA สายเดี่ยว
2. เชื่อมปลายของ DNA เกลียวคู่ที่เป็นเส้นตรง ให้เกิดเป็น DNA เกลียวคู่ชนิดวงปิด
3. เชื่อมช่วงสั้นๆ ของ DNA ให้ต่อเป็นสายยาว
4. ทำงานร่วมกับ DNA โพลีเมอเรสในขบวนการเรพลิเคชั่น

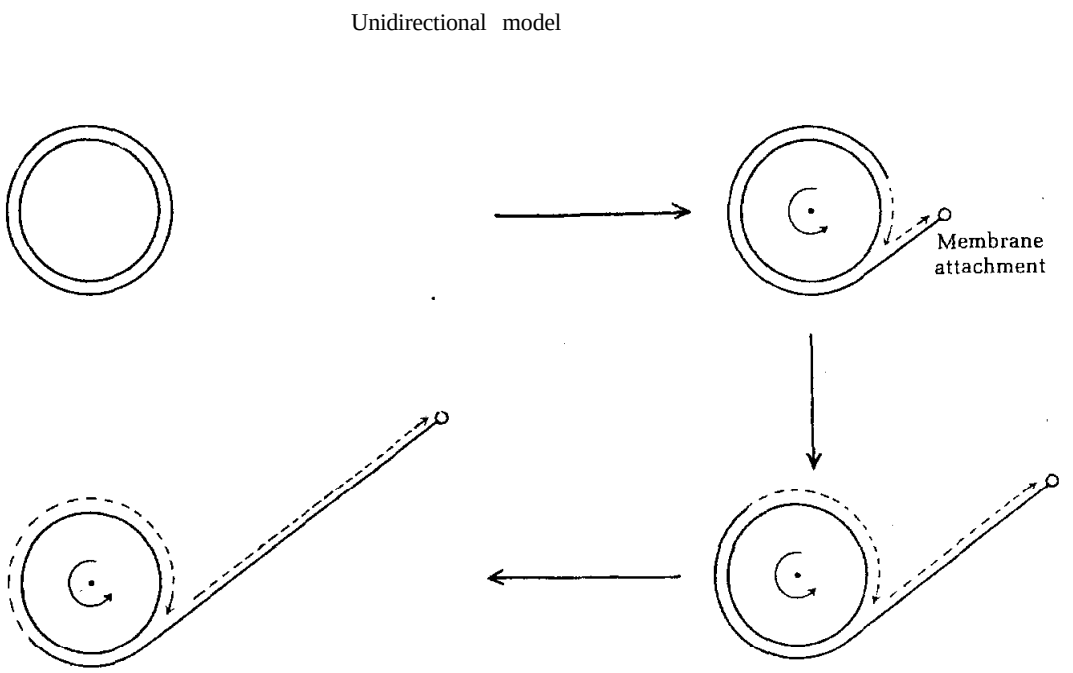
ทิศทางของการสังเคราะห์ DNA

ในแบคทีเรีย เช่น E. coli เรพลิเคชั่น จะเป็นแบบสองทิศทาง (bidirectional) คือ

เกิดจากจุดเริ่มต้นจุดเดียว แล้วจึงสร้าง DNA ใหม่ออกจากจุดนั้นไปในทั้งสองทิศจนมาชนกัน แล้ว DNA ใหม่จึงจะแยกออกมา ได้เป็นชนิดวงปิดเหมือน DNA แม่พิมพ์

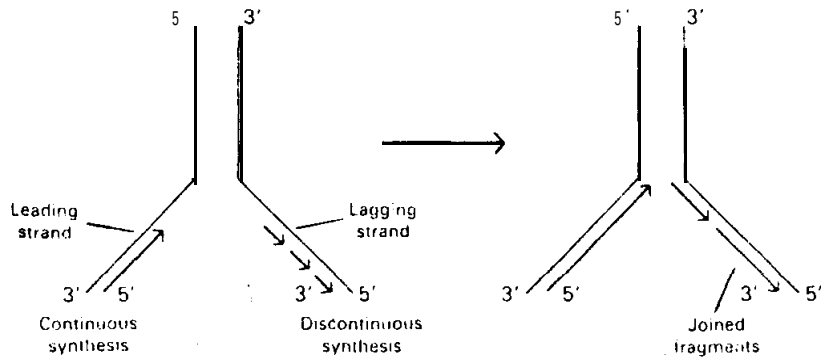


ในไวรัสเช่น Ø × 174 เรพลิเคชั่นจะเป็นแบบทิศทางเดียว (unidirectional) และ DNA ใหม่ที่ได้จะอยู่ในรูปเส้นตรง เรพลิเคชั่นชนิดนี้อธิบายได้ด้วย rolling circle model (รูปที่ 3-5) ซึ่งเริ่มต้นโดย DNA สายหนึ่งจะหักออก แล้วปลายหนึ่งไปยึดกับ cell membrane จากนั้น DNA จะหมุนตัวออกเรื่อยๆ ทำให้เกิดเรพลิเคชั่นได้ DNA ใหม่เป็นเส้นตรงสายหนึ่ง และเป็นวงปิดอีกสายหนึ่ง สำหรับสายที่เป็นวงปิดนั้นจะถูกตัดออกในภายหลังให้ได้เป็นเส้นตรงเช่นกัน



รูปที่ 3–5 เรพลิเคชั่นประเภทที่เกิดในทิศทางเดียว (unidirectional)

DNA ใหม่ที่เกิดขึ้นจากเรพลิเคชั่นนี้ ถ้าเป็นสายที่เข้าคู่กับแม่พิมพ์ที่มีทิศ 3′→5′ ซึ่งเรียกว่า leading strand จะเกิดการสร้างในลักษณะต่อเนื่องเป็นสายยาว แต่ถ้าเป็น DNA ใหม่ที่เกิดจากแม่พิมพ์ทิศ 5′→3′ ซึ่งเรียกว่า lagging strand แล้ว การสร้างจะเกิดเป็นช่วงสั้น ๆ (fragment) ที่ไม่ต่อเนื่องกัน เรียกแต่ละช่วงนั้นว่า Okazaki fragment ตามชื่อของ Rieji Okazaki ผู้ค้นพบ ในปลายคริสตศตวรรษ 1960 ใน E.coli Okazaki fragment แต่ละช่วงจะมีความยาวประมาณ 1,000-2,000 นิวคลีโอไทด์ หลังจากนี้ช่วงสั้น ๆ ทั้งหลาย ก็จะถูกเชื่อมต่อกันโดยใช้ DNA ไลเกส



การสังเคราะห์ DNA ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

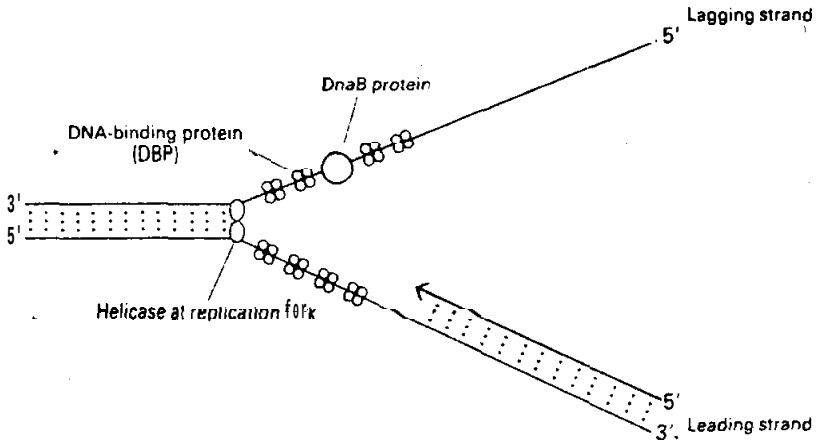
Kornberg และคณะ ได้ศึกษาโดยใช้ DNA สายเดี่ยวของ bacteriophage ØX 174, G4 และ M13 ผลที่พบก็ตรงกับที่ผู้วิจัยกลุ่มอื่น ๆ ทำ คือพบว่าเรพลิเคชั่นเป็นขบวนการที่มีหลายขั้นตอน และต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA replicase หลายชนิด Kornberg ได้เสนอรูปแบบอันหนึ่ง ซึ่งแบ่งเรพลิเคชั่นออกเป็น 4 ขั้นตอนด้วยกัน คือ

1. การเตรียมพร้อมที่จะเริ่มเรพลิเคชั่น (prepriming)
2. การสังเคราะห์ RNA ไพรเมอร์ (priming)
3. การเติม sequence ของ DNA เข้าไปทางปลาย 3′ ของไพรเมอร์ (elongation)
4. การตัด RNA ไพรเมอร์ออก เติม DNA sequence เข้าไปแทน และเชื่อม DNA แต่ละช่วงเข้าด้วยกัน (termination)

DNA เรพลิเคชั่น จะเกิดขึ้นเพียงระยะเดียวในแต่ละรอบของวัฏจักรของเซลล์ โดยที่ในยามปกติ DNA จะอยู่ในรูปขดไปมาเป็น supercoil ดังนั้นก่อนจะเกิดเรพลิเคชั่น จะต้องมีการยืดให้ตรง (relax) เสียก่อน โดยเอนไซม์ไจเรส (gyrase) จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ออก และเมื่อเกิดเรพลิเคชั่นแล้ว เอนไซม์ไจเรสก็จะใช้พลังงานจากการสลาย ATP เข้ามาช่วยในการสร้างพันธะนี้ขึ้นมาใหม่ เพื่อให้ DNA กลับเข้าสู่สภาพเป็นขดดังเดิม

ขั้นตอนที่หนึ่งและขั้นตอนที่สอง

ขั้นตอนแรกคือ prepriming นั้น เป็นการเตรียม DNA สองสายสำหรับขบวนการเรพลิเคชั่น ซึ่งต้องมีโปรตีนอย่างน้อยถึง 6 ชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง จากรูปจะเห็นว่าการคลายเกลียว



คู่เกิดได้โดยใช้เอนไซม์ชื่อ helicase เมื่อเกิด DNA สายเดี่ยวขึ้นแล้ว จะมีโปรตีนชนิดหนึ่งคือ DNA-binding protein (DBP) เข้ามาเคลือบแต่ละสายเดี่ยวนั้น เพื่อให้มีเสถียรภาพมากขึ้น สำหรับจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ RNA ไพรเมอร์ จะมี dna B protein เข้ามาเกาะ โดยที่การเกาะนี้ จะต้องอาศัยความช่วยเหลือจากโปรตีนอีก 3 ชนิดคือ dna C, i และ n proteins สำหรับ dna proteins ที่ได้ชื่อเช่นนี้ เพราะเป็นผลิตผลของยีน dna B และ dna C ซึ่งพบว่าต่างก็เป็นยีนที่เกี่ยวข้องในขบวนการเรพลิเคชั่น

dna B protein มีหน้าที่เปิดสาย DNA เพื่อให้เอนไซม์ไพรเมส (primase) หรืออีกชื่อคือ dna G protein สามารถสังเคราะห์ RNA ไพรเมอร์ขึ้นได้ในทิศ 5′→3′ เมื่อทำหน้าที่ที่บริเวณหนึ่งแล้ว dna B protein ก็จะเคลื่อนตัวต่อไปบนสาย DNA เพื่อไปเปิดจุดเริ่มต้นจุดอื่น ๆ ให้กับเอนไซม์ไพรเมส ได้สังเคราะห์ RNA ไพรเมอร์ขึ้นอีก

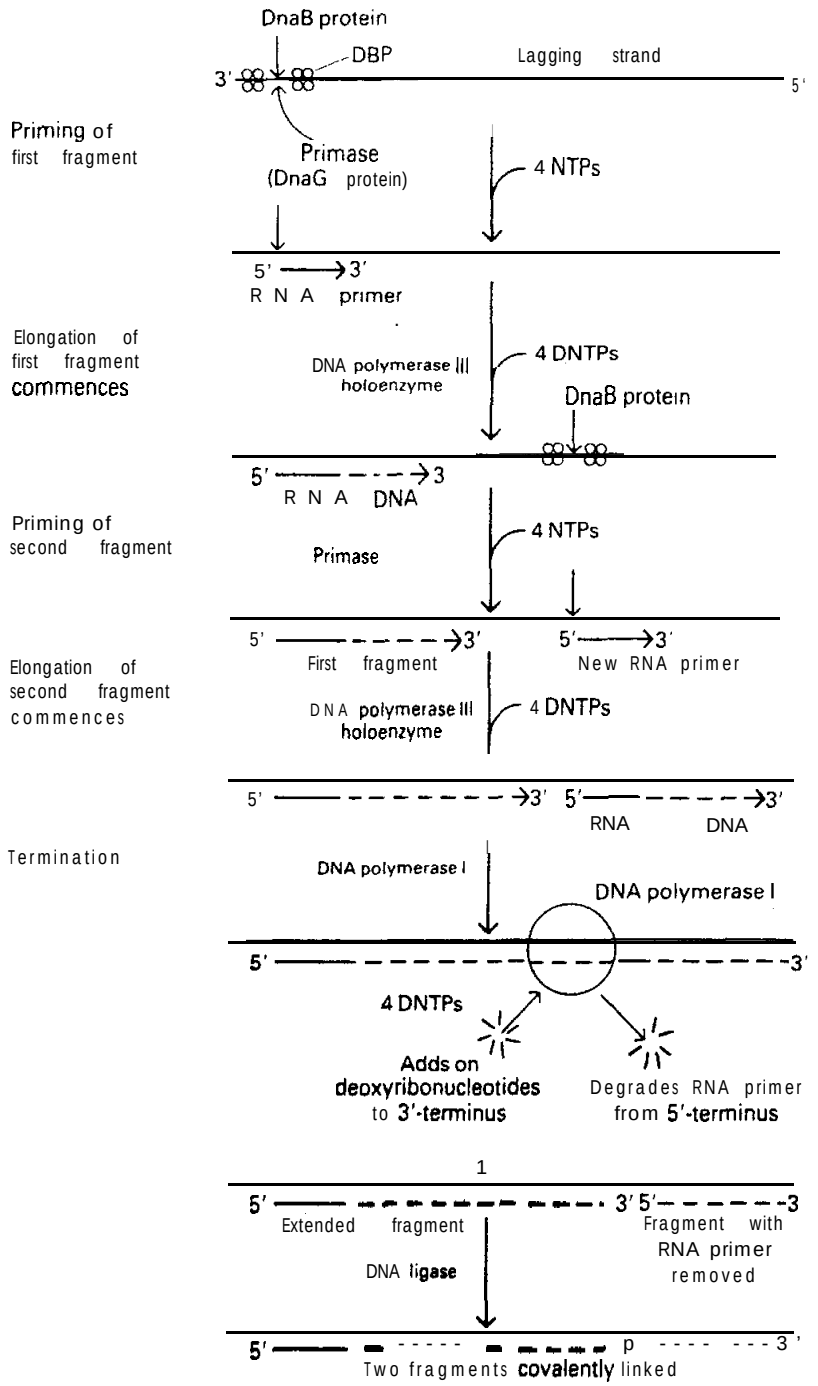
ขั้นตอนที่สามและขั้นตอนที่สี่

เมื่อ RNA ไพรเมอร์ถูกสังเคราะห์ขึ้นแล้ว ต่อไปก็จะมีการเติม DNA sequence เข้าไปที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์นั้น (elongation) ขบวนการต่อสายนี้เกิดขึ้นได้โดยใช้ DNA โพลีเมอเรส III โฮโลเอนไซม์ เมื่อได้ DNA ใหม่เกิดขึ้นเป็นช่วง ๆ แล้ว จะมีเอนไซม์อีก 2 ตัว เข้ามาช่วยทำให้ได้ DNA สายใหม่ที่ต่อเป็นเส้นยาวตลอด เอนไซม์ตัวหนึ่งนั้นก็คือ DNA โพลีเมอเรส I ซึ่งจะทำหน้าที่สองอย่างพร้อม ๆ กัน คือ ตัด RNA ไพรเมอร์ออกโดยใช้การทำงานของส่วนที่เป็น 5′→3′ exonuclease กับต่อ sequence ทางปลาย 3′ ของ DNA แต่ละช่วงให้เข้าไปใกล้กับปลาย 5′ ของ DNA อีกช่วงที่อยู่ถัดไป ซึ่งปฏิกริยานี้ใช้การทำงานของส่วน 5′→3′ โพลีเมอเรส ขบวนการตัดและต่อนี้จะเกิดขึ้นที่บริเวณเร่ง (active site) ที่ต่างกันของเอนไซม์ DNA โพลีเมอเรส I และผลที่ได้ก็คือ ช่วงของ DNA ส้วน ๆ ที่ไม่มี RNA ไพรเมอร์ปนอยู่ด้วยเลย เอนไซม์อีกตัวหนึ่งก็คือ DNA ไลเกส ซึ่งจะทำให้เกิดขั้นตอนสุดท้าย คือสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่าง DNA แต่ละช่วง โดยเชื่อมปลาย3′- ไฮดรอกซิลของช่วงหนึ่งเข้ากับหมู่ฟอสเฟทที่ปลาย 5′ ของอีกช่วงหนึ่ง พลังงานในการเชื่อมนี้ ถ้าเป็นเซลล์สัตว์และ bacteriophage จะใช้จากการสลาย $ATP \rightarrow AMP + PP_i$ แต่ถ้าเป็นแบคทีเรีย จะใช้จากการสลาย $NAD^+ \rightarrow AMP + NMN$

รายละเอียดเกี่ยวกับขบวนการเรพลิเคชั่นที่ยังไม่ทราบนั้นมีอีกมาก เช่น รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ RNA ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นเอนไซม์คนละตัวกับ RNA โพลีเมอเรสที่ใช้ในการสังเคราะห์ RNA ทั่ว ๆ ไป นอกจากนี้ก็ยังไม่ทราบถึงหน้าที่ของส่วนประกอบต่าง ๆ ของ DNA โพลีเมอเรส III โฮโลเอนไซม์ครบทั้ง 7 ส่วน ซึ่งสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้ยังคงต้องมีการค้นคว้าต่อไปจนกว่าจะได้รู้แน่ชัด

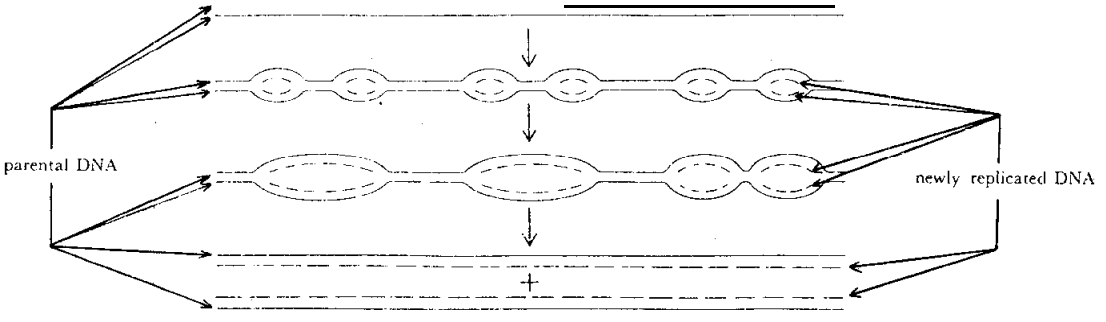
การสังเคราะห์ DNA ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

ขั้นตอนและทิศทางในการสังเคราะห์ DNA ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงหรือยูคาริโอท (eucaryote)



DNA เรพลิเคชั่นของ lagging strand

นี้จะเหมือนกับที่เกิดในแบคทีเรีย แต่สิ่งที่แตกต่างกันคือ เรพลิเคชั่นในยูคาริโอทจะเกิดจากจุดเริ่มต้นหลายๆ จุด (รูปที่ 3-6) ทั้งนี้เพราะ DNA ของพวกนี้มีความยาวมาก และอัตราเร็วของการสังเคราะห์ก็ช้ากว่าที่เกิดในพวกแบคทีเรีย ดังนั้นถ้าเรพลิเคชั่นมีจุดเริ่มต้นจุดเดียวเหมือนในกรณีของแบคทีเรียแล้ว ขบวนการนี้จะต้องใช้เวลาถึงสองอาทิตย์ นอกจากนี้ยังพบด้วยว่า Okazaki fragment ที่เกิดขึ้นจะสั้นกว่าในแบคทีเรีย คือมีความยาวเพียงประมาณ 100-150 ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ สำหรับเอนไซม์ DNA โพลีเมอเรสก็พบว่ามีสามชนิดที่แตกต่างกัน โดยที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัดว่าจะคล้ายคลึงหรือเหมือนกับ DNA โพลีเมอเรส I, II และ III ของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำหรือโปรคาริโอท (procaryote) หรือไม่



รูปที่ 3–6 การสังเคราะห์ DNA ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งจะเกิดจากจุดเริ่มต้นหลายๆ จุด

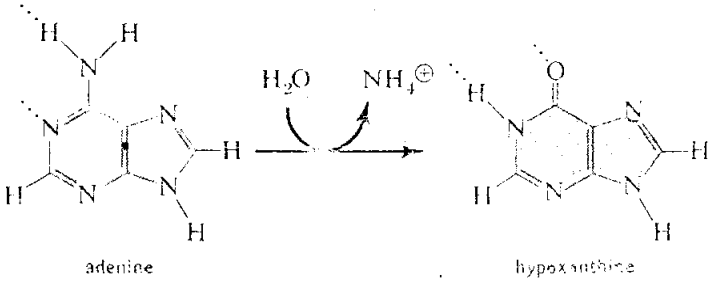
ความผิดพลาด (Errors) ของ DNA

เนื่องจาก DNA เป็นโมเลกุลที่ควบคุมลักษณะของเซลล์สิ่งมีชีวิต ดังนั้นถ้าเกิดความผิดพลาดขึ้นในสายของ DNA เมื่อเกิดเรพลิเคชั่น DNA ใหม่ที่ได้ก็จะมีการเรียงลำดับของเบสผิดไปจากเดิม ซึ่งจะเป็นผลทำให้ได้โปรตีนที่ผิดชนิดเกิดขึ้น ผลที่เกิดขึ้นนั้นบางครั้งอาจจะไม่รุนแรงนัก แต่บางครั้งก็อาจทำให้เซลล์นั้นๆ ถึงแก่ความตายได้ ยิ่งถ้าเป็นความผิดพลาดในสาย DNA ของเซลล์สืบพันธุ์ด้วยแล้ว ผลที่ตามมาจะร้ายแรงยิ่งขึ้น เพราะความผิดปกติเหล่านั้นจะถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูกหลานด้วย ความผิดพลาดที่ถ่ายทอดต่อไปได้นี้เรียกว่า การผ่าเหล่า (mutation)

ความผิดพลาดของ DNA มีที่มาได้ดังนี้คือ

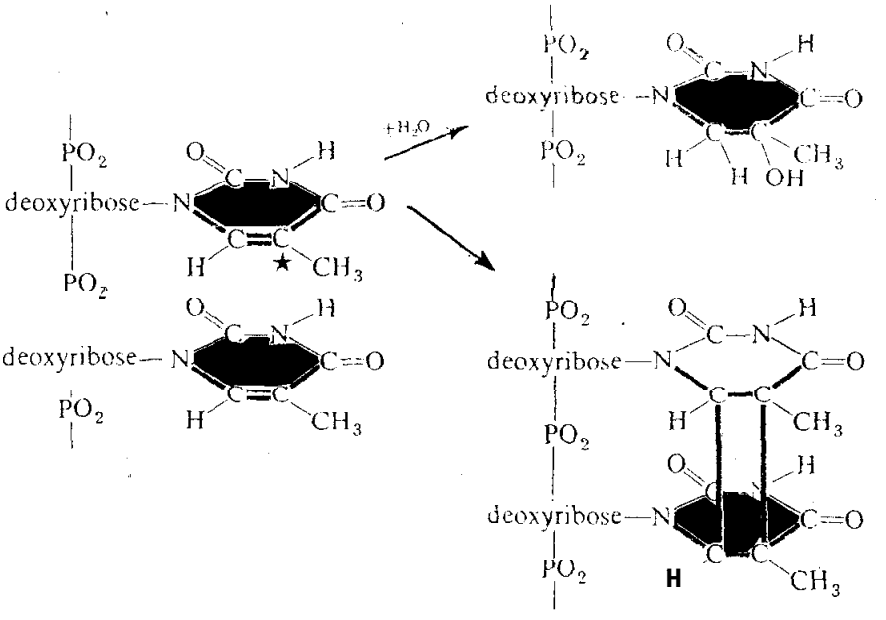
1. เกิดจากขบวนการเรพลิเคชั่น คือในระหว่างที่มีการต่อดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์เข้าไปที่ DNA สายใหม่ทีละตัวๆ นั้น อาจจะมีการข้ามดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไปตัวหนึ่งหรือต่อเกินเข้าไปอีกตัวหนึ่ง แต่ที่พบมากก็คือกรณีที่ต่อดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ตัวที่ไม่เข้าคู่กับเบสบนแม่พิมพ์เข้าไปใน DNA ใหม่ ถ้าความผิดพลาดเกี่ยวข้องกับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกัน เช่นที่ถูกควรจะต่อเพียวรีนนิวคลีโอไทด์ตัวหนึ่งเข้าไป แต่กลับนำเอาเพียวรีนนิวคลีโอไทด์อีกตัวหนึ่งมาต่อแทน กรณีนี้เรียกว่า transition แต่ถ้าความผิดพลาดเกี่ยวข้องกับนิวคลีโอไทด์ต่างชนิดกัน เช่นที่ถูกควรจะต่อเพียวรีนนิวคลีโอไทด์เข้าไป แต่กลับนำเอาไพริมิดีนนิวคลีโอไทด์อีกตัวหนึ่งมาต่อแทน กรณีนี้เรียกว่า transversion

2. เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น เบสอดีนีนสามารถที่จะถูกไฮโดรไลซ์เอาหมู่แอมโมเนียออกได้เป็นไฮโปแซนธีน



ไฮโปแซนธีนที่ได้จะประพฤติตัวเหมือนกัวนีน คือจะจับคู่กับไซโตซีน

3. เกิดจากการถูกกับรังสี DNA จะถูกทำลายได้ถ้าได้รับรังสีในช่วงความยาวคลื่นของอุลตราไวโอเลต (290-320 nm) หรือสั้นกว่า ถ้าเป็นช่วงอุลตราไวโอเลต จะมีผลมากกับไพริมิดีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งคือไธมีน โดยที่พลังงานจากรังสีจะไปกระตุ้นพันธะเอธิลีน (ethylene bond) ในวงแหวน ทำให้ไธมีนตัวที่ถูกกระตุ้นสามารถรับเอาโมเลกุลของน้ำเข้าไปในวงแหวนได้ (รูปที่ 3-7) หรือถ้าเบสตัวถัดไปเป็นไพริมิดีนเช่นกัน ในกรณีนี้จะเกิดพันธะระหว่างเบสทั้งสองนี้ได้ เรียกว่าเกิดไดเมอร์ขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือไธมีนไดเมอร์ (รูปที่ 3-7) พันธะระหว่างไธมีนไดเมอร์จะเป็นพันธะ covalent ของวงแหวนไซโคลบิวเทน (cyclobutane ring)



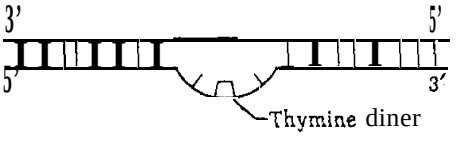
รูปที่ 3–7 เบสไธมีนที่ดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (ตัวที่มี ★) จะสามารถรับโมเลกุลของน้ำเข้าไปในวงแหวนได้ (บนขวา) หรือสามารถเกิดไธมีนไดเมอร์ได้ (ล่างขวา)

สำหรับรังสีที่มีช่วงความยาวคลื่นสั้นกว่าอุลตราไวโอเลต เช่น รังสีเอ็กซ์, รังสีแกมม่านั้น จะทำให้สายของ DNA หักออก โดยไปทำลายพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ และทำให้วงแหวนของส่วนเบสแตกออกด้วย

การซ่อมแซม DNA

กลไกของการซ่อมแซม DNA แบ่งได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ คือ

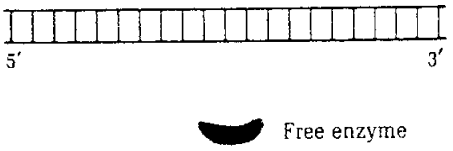
1. Enzymatic Photoreactivation วิธีนี้โดยทั่วๆ ไปแล้วจะใช้ซ่อมแซมความผิดปกติของ DNA ที่เกิดจากไธมีนไดเมอร์



โดยต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถรับพลังงานจากแสงสีน้ำเงิน (visible blue light) ได้ เอนไซม์นี้จะเข้ามาจับกับสายของ DNA ตรงส่วนที่มีความผิดปกติเกิดขึ้น

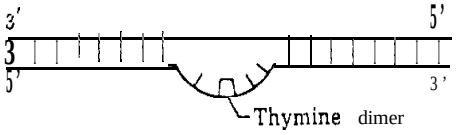
จากนั้นให้พลังงานแสงแก่เอนไซม์ ซึ่งพลังงานนี้จะถูกเอนไซม์นำไปใช้ในการทำลายวงแหวนไซโคลบิวเทนของไธมีนไดเมอร์

เมื่อส่วนที่ผิดปกติถูกตัดออกไปแล้ว ก็จะได้สาย DNA ที่สมบูรณ์ดีตามเดิม ส่วนเอนไซม์ก็จะหลุดออกไปเป็นอิสระ



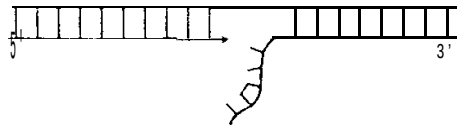
ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีนี้เป็นการใช้แสงสีน้ำเงินช่วยซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำให้ผิดปกติไปโดยแสงอุลตราไวโอเลต

2. Excision Repair เป็นการซ่อมแซม DNA ชนิดที่ไม่ต้องใช้พลังงานแสง การซ่อมแซมจะเป็นไปโดยการตัดบริเวณที่ผิดพลาดออกไป แล้วจะมีการสร้างส่วนใหม่ที่ถูกต้องขึ้นมาแทน เช่น ถ้าในสาย DNA เกิดมีไธมีนไดเมอร์ขึ้น

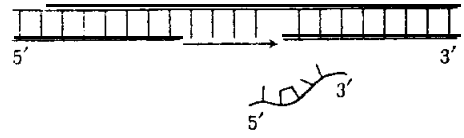


เอนไซม์ 5′ ⟶ 3′ เอ็นโดนิวคลีเอสก็จะมาตัดทางปลาย 5′ ของบริเวณที่ผิดปกตินั้นออก

จากนั้นเอนไซม์ DNA โพลีเมอเรส I จะมาทำการสร้าง DNA ส่วนใหม่ที่มีความถูกต้องขึ้นที่บริเวณนั้น



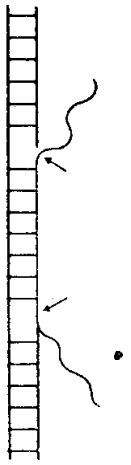
ต่อไปเอนไซม์ 5′ ⟶ 3′ เอ็กโซนิวคลีเอส จะมาทำการตัดอีกปลายหนึ่งที่เหลือของส่วนที่ผิดปกติให้หลุดออกจากสาย DNA เดิม



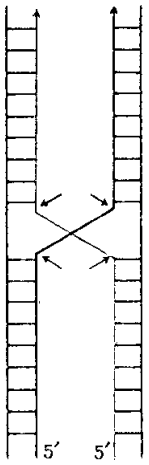
แล้ว DNA โพลีเมอเรส I ก็จะสร้าง DNA ส่วนใหม่ขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งใกล้จะถึงปลายที่เหลืออยู่ของ DNA เดิม จากนั้นปลาย 3′ ของส่วนที่สร้างใหม่ก็จะเชื่อมกับปลาย 5′ ที่เหลืออยู่ของ DNA เดิมนั้นโดยใช้เอนไซม์ DNA ไลเกส ทำให้ได้สาย DNA ที่ถูกต้องสมบูรณ์เกิดขึ้น

3. Recombination Repair ขบวนการนี้พบมากในการซ่อมแซมโครโมโซมของไวรัส ซึ่งวิธีนี้จะซ่อมแซมโดยนำเอายีนของโครโมโซมที่ถูกต้อง มาแทนตรงส่วนที่ผิดพลาดในอีกโครโมโซมหนึ่ง เกิดได้เป็น 2 แบบ คือ

ก. จะเป็นการนำเอายีนของสายอื่นมาแทนตรงส่วนที่เกิดผิดปกติใน DNA เกลียวคู่ แล้วเอนไซม์เอ็นโดนิวคลีเอสจะตัดส่วนที่ไม่ใช้ออกไป (ศรชี้) จากนั้น DNA โพลีเมอเรส I จะสร้างส่วนที่ยังขาดอยู่เติมเข้ามาจนใกล้เคียงกับปลายของ DNA สายเดิม แล้วจึงมีการเชื่อมรอยต่อโดยเอนไซม์ DNA ไลเกส



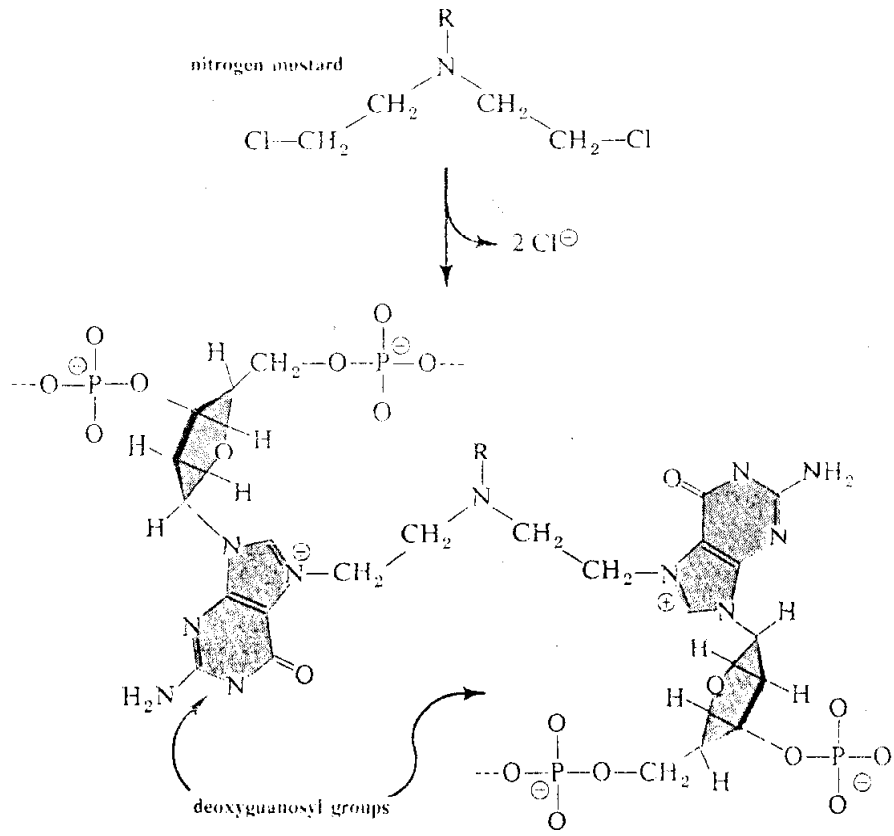
ข. เป็นการแลกเปลี่ยนส่วนของ DNA ระหว่าง DNA เกลียวคู่ 2 คู่ ด้วยกัน จากนั้นเอ็นโดนิวคลีเอสจะตัดส่วนที่ไม่ใช้ออกทิ้งไป (ศรชี้) แล้วเอนไซม์ DNA โพลีเมอเรส I และ DNA ไลเกสจะมาสร้างส่วนที่ยังไม่ครบและเชื่อมรอยต่อตามลำดับ



ถ้ากลไกการซ่อมแซม DNA ของร่างกายเสียไป จะทำให้เกิดโรค Xeroderma pigmentosum คนป่วยด้วยโรคนี้จะแพ้แสงอุลตราไวโอเลตโดยเมื่อถูกแดด เซลล์จะไม่สามารถซ่อมแซม DNA ได้ ทำให้เซลล์ผิวหนังบริเวณนั้นตายไป จึงเกิดเป็นผื่นหรือเม็ดสีเข้มขึ้นตามใบหน้าหรือแขน เมื่อเป็นมาก ๆ เข้าก็จะทำให้เป็นมะเร็งผิวหนัง (skin cancer) นอกจากนี้ระบบการมองเห็น, การได้ยินจะเสื่อมถอยลง ในบางรายจะมีอาการทางสมองด้วย เหตุที่ทำให้เกิดโรคนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ตัวหนึ่งใน excision repair คือเอ็นโดนิวคลีเอส ซึ่งใช้ในการทำลายไธมีนไดเมอร์อันเกิดจากอุลตราไวโอเลตนั้นอาจจะบกพร่อง จึงไม่สามารถแก้ความผิดปกตินั้นได้ การซ่อมแซม DNA จึงไม่เกิดขึ้น

ตัวยับยั้งการสังเคราะห์ DNA

ตัวที่น่าสนใจได้แก่ nitrogen mustards ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ mustard gas (หรือ sulfur mustards) ที่ใช้ในสงครามโลกครั้งที่หนึ่ง nitrogen mustards เป็น alkylating agent ซึ่งจะทำปฏิกริยากับเบสกัวนีน โดยจะเชื่อม (link) กัวนีนในสายเกลียวคู่ของ DNA ทำให้ DNA ไม่สามารถคลายเกลียวออกเพื่อจะใช้เป็นแม่พิมพ์ในขบวนการสังเคราะห์ DNA และ RNA ได้ ดังนั้น nitrogen mustards นี้จึงสามารถยับยั้งได้ทั้งเรพลิเคชั่นและทรานสคริปชั่น

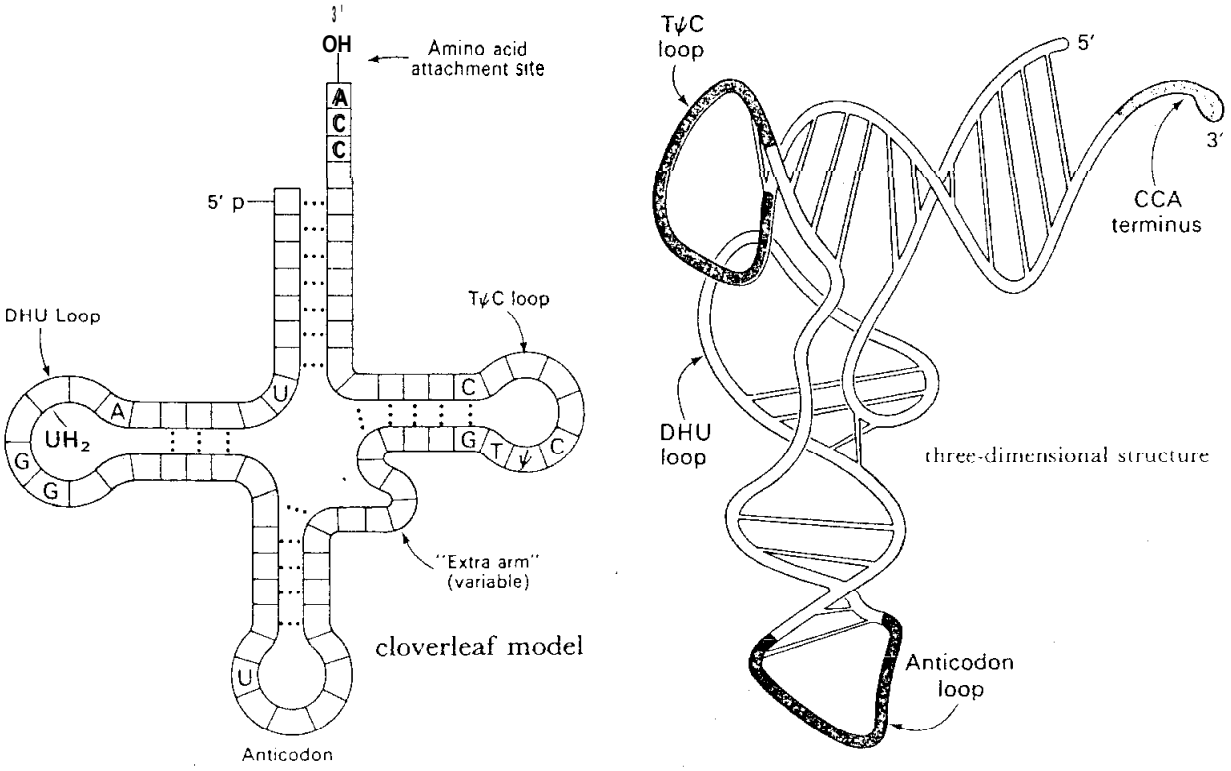


การสังเคราะห์ RNA (ขบวนการทรานสคริปชั่น)

RNA เป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า DNA และในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของสายเดี่ยว โดยอาจจะมีลักษณะของเกลียวคู่อยู่ในบางส่วนของสายเดี่ยวนั้นได้บ้าง RNA ที่พบในเซลล์สิ่งมีชีวิตแบ่งได้เป็น 3 พวก คือ

1. messenger RNA (mRNA) เป็นโมเลกุลที่จะนำข้อความทางพันธุกรรมจาก DNA ไปถ่ายทอดให้เกิดเป็นโปรตีนทั้งในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำและชั้นสูง ในโปรคาริโอทซึ่งไม่มีนิวเคลียส การสังเคราะห์ m RNA และโปรตีนจะเกิดในไซโตซอล ส่วนในยูคาริโอท m RNA จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในนิวเคลียส จากนั้นจึงจะผ่านออกไปยังไรโบโซม (ribosome) ในไซโตซอล เพื่อเกิดการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป m RNA นี้เป็นโมเลกุลที่มีอายุสั้นมาก เมื่อถูกสังเคราะห์ขึ้นมาแล้ว ภายในเวลาไม่ถึง 1 ชั่วโมงก็จะถูกทำลายไป และปริมาณของ m RNA ก็น้อยที่สุด คือมีเพียง 5% ของ RNA ทั้งหมด

2. transfer RNA (t RNA) เป็นตัวที่จะนำเอากรดอมิโนไปยังไรโบโซมเพื่อสร้างสายโปรตีนตามลำดับของเบสบน m RNA จะมีอย่างน้อย 1 ชนิดของ t RNA สำหรับแต่ละกรดอมิโนในจำนวน 20 ตัว โมเลกุลของ t RNA จะมีประมาณ 75 นิวคลีโอไทด์มาต่อกัน และเป็น RNA ชนิดที่เล็กที่สุด นอกจากนี้ยังพบเบสอื่นๆ ที่นอกเหนือไปจากกัวนีน, ไซโตซีน, อดีนีน และยูราซิลในโมเลกุลของ t RNA ด้วย t RNA จะมีการขดตัวที่มีรูปแบบเฉพาะตัว (รูปที่ 3-8) มิได้เป็นเส้นตรงเหมือน mRNA



รูปที่ 3–8 รูปแสดงโครงสร้างแบบ clover leaf (ซ้าย) และแบบสามมิติ (ขวา) ของ tRNA

3. ribosomal RNA (rRNA) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของไรโบโซม ซึ่งเป็นแหล่งสังเคราะห์โปรตีน แต่หน้าที่ทางชีววิทยาของ rRNA นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด

เอนไซม์ RNA โพลีเมอเรส

ในปี ค.ศ.1959 S. Weiss และผู้ร่วมงานได้ค้นพบเอนไซม์ตัวหนึ่ง ซึ่งจะคะตะไลซ์การสังเคราะห์ RNA ขึ้นตามคำสั่งที่มีอยู่ใน DNAแม่พิมพ์ เอนไซม์นี้คือ RNA โพลีเมอเรส

การสังเคราะห์ RNA โดย RNA โพลีเมอเรสใน E. coli พบว่าต้องการสิ่งต่อไปนี้คือ

1. แม่พิมพ์ที่ดีที่สุดคือ DNA เกลียวคู่ DNA สายเดี่ยวก็ใช้ได้บ้างแต่ไม่ดีนัก ส่วน RNA จะใช้เป็นแม่พิมพ์ไม่ได้เลย

2. สารตั้งต้น ได้แก่ไรโบนิวคลีโอไทด์ทั้งสี่คือ ATP, GTP, CTP และ UTP

3. โคแฟคเตอร์ คือ Mg^{2+} หรือ Mn^{2+}

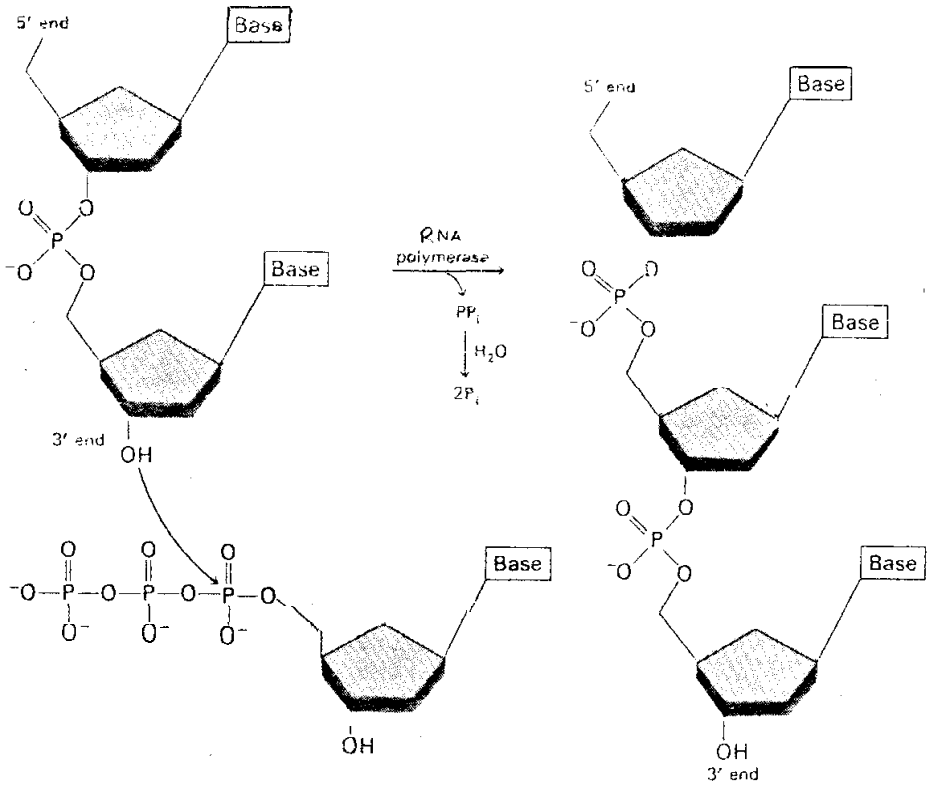
RNA โพลีเมอเรสจะคะตะไลซ์ปฏิกริยาต่อไปนี้คือ

นิวคลีโอไซด์ไทรฟอสเฟท + (นิวคลีโอไซด์โมโนฟอสเฟท)$_n$
(ตัวที่เข้ามาใหม่) (สายของ RNA)

Mg^{2+} ⇌ RNA โพลีเมอเรส

ไพโรฟอสเฟท + (นิวคลีโอไซด์โมโนฟอสเฟท)$_{n+1}$
(สายของ RNA ที่ยาวขึ้น)

การต่อนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่เข้าไปในสายของ RNA นี้ จะเกิดในทิศทางเดียวกับการสังเคราะห์ DNA คือจากทิศ $5' \longrightarrow 3'$ และกลไกของปฏิกริยาการต่อสาย RNA ก็จะเหมือนกับการต่อสาย DNA ด้วย คือเกิดจาก nucleophilic attack ของหมู่ $3'$-ไฮดรอกซิลที่ปลายของสาย RNA ไปยังอัลฟาฟอสฟอรัสอะตอมของนิวคลีโอไทด์ตัวที่เข้ามาใหม่ (รูปที่ 3-9)



รูปที่ 3–9 กลไกการต่อนิวคลีโอไทด์เข้าไปในสายของ RNA โดยการทำงานของเอนไซม์ RNA โพลีเมอเรส

ใน E. coli RNA ทั้ง 3 ชนิดคือ mRNA, rRNA และ tRNA จะถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก RNA โพลีเมอเรสตัวเดียวกัน ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้มีความซับซ้อนมาก เพราะประกอบขึ้นจากหน่วยย่อย (subunit) ถึงห้าหน่วย โดยมีน้ำหนักโมเลกุลและสัดส่วนดังแสดงในตารางที่ 3-2

Subunit	Molecular weight	Number
β'		
β	165,000	1
σ	95,000	1
α	39.000	2

ตารางที่ 3–2 ส่วนประกอบของ RNA โพลีเมอเรสที่พบใน E. coli

หน้าที่ของหน่วยย่อยต่างๆ มีดังนี้คือ

1. หน่วยย่อยเบต้าไพรม์ (β') จะมีสัมพรรคภาค (affinity) สูงต่อ DNA ดังนั้นจึง

เป็นส่วนสำคัญในการที่จะช่วยให้ RNA โพลีเมอเรสจับกับ DNA แม่พิมพ์ได้ดี

2. หน่วยย่อยซิกม่า (σ) จะเป็นส่วนที่ช่วยให้ความแน่ใจว่าการจับตัวระหว่างเอนไซม์กับแม่พิมพ์เกิดที่บริเวณแหล่งส่งเสริม (promoter site) เท่านั้น

3. หน่วยย่อยเบต้า (β) เป็นส่วนที่สามารถทำปฏิกริยาได้กับไรฟามัยซิน (rifamycin) หรืออนุพันธ์ของไรฟามัยซิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเริ่มต้นสังเคราะห์ RNA ได้ ดังนั้นหน่วยย่อยเบต้าจะต้องมีหน้าที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการสร้างพันธะระหว่างนิวคลีโอไทด์พันธะแรก

4. หน่วยย่อยอัลฟา (α) สำหรับหน่วยย่อยนี้ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอน

หน่วยย่อยของ RNA โพลีเมอเรสเมื่ออยู่รวมกันทั้งหมดคือ $\alpha_2\ \beta\ \beta'\ \sigma$ เรียกว่าโฮโลเอนไซม์ (holoenzyme) แต่ถ้าส่วนซิกม่าถูกทำให้หลุดออกไป เช่นในกรณีที่ใช้สารละลายยูเรียเข้มข้น ก็จะเหลือเพียง $\alpha_2\beta\beta'$ เรียกว่าคอร์เอนไซม์ (core enzyme) ซึ่งยังคงมีบริเวณเร่ง (catalytic site) อยู่ด้วย แสดงว่าหน่วยย่อยซิกม่าที่หายไปนั้นไม่มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาอยู่ในตัวเองเลย

แม่พิมพ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ RNA

ตามที่ได้กล่าวแล้วว่า แม่พิมพ์ที่ดีที่สุดของ RNA โพลีเมอเรสนั้นคือ DNA เกลียวคู่ แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขบวนการทรานสคริปชั่นคือ RNA ซึ่งเป็นสายเดี่ยวและมีจำนวนเพียงสายเดียว จึงได้มีการศึกษาว่า DNA จะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์อย่างไร โดยศึกษาจากไวรัสตัวหนึ่งคือ Ø×174 ซึ่งเป็นไวรัสที่สามารถทำอันตรายต่อแบคทีเรีย

Ø×174 เป็นไวรัสที่มี DNA สายเดี่ยว เรียกว่าสายบวก (plus strand) อยู่ในลักษณะวงปิด เมื่อเข้าไปในแบคทีเรียจะเกิดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ขึ้น ซึ่งเข้าคู่กับสายบวก เรียกสายใหม่นี้ว่าสายลบ (minus strand) ทำให้ได้ DNA วงปิดเกลียวคู่เกิดขึ้น ซึ่งจะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ mRNA แล้ว mRNA ก็จะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัสอีกทอดหนึ่ง การติดตามผลการทดลองนี้ทำได้โดยใช้วิธีการทางรังสีวิทยา คือเมื่อให้ไวรัสรุกรานเข้าไปในแบคทีเรียเรียบร้อยแล้วก็รีบเติม ^{32}P-ฟอสเฟทลงในน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย ดังนั้น mRNA ที่เกิดขึ้นก็จะประกอบด้วย ^{32}P-ฟอสเฟท จากนั้นแยกเอา mRNA ออกมา และ DNA วงปิดเกลียวคู่ก็จะถูกแยกออกเป็นสายบวกและสายลบ การแยกนี้เกิดขึ้นได้เพราะส่วนประกอบ

ของเบสและความหนาแน่นของแต่ละสายต่างกัน ต่อไปก็นำเอา DNA และ RNA มาทดลองจับคู่กัน (hybridization) ผลปรากฏว่า DNA สายลบเท่านั้นที่สามารถจับคู่กับ mRNA ได้ และการเรียงลำดับของเบสบนสายทั้งสองนั้นก็เข้าคู่กันด้วย ดังนั้นจึงแสดงว่าในการสังเคราะห์ RNA ของไวรัส ØX174 จะใช้เพียงสายเดียวเท่านั้นของ DNA เกลียวคู่เป็นแม่พิมพ์

ในไวรัสอื่นๆ เช่น T7, SP8 และ α ก็ใช้ DNA เพียงสายเดียวเป็นแม่พิมพ์ แต่ในไวรัสบางตัวเช่น T4 และ λ ขบวนการทรานสคริปชั่นจะค่อนข้างซับซ้อน คือจะใช้บางส่วนของ DNA สายหนึ่งเป็นแม่พิมพ์ แล้วใช้บางส่วนของ DNA อีกสายหนึ่งเป็นแม่พิมพ์ด้วย

การสังเคราะห์ RNA ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ

ขั้นตอนของการสังเคราะห์ RNA ใน E. coli แบ่งได้ดังนี้คือ

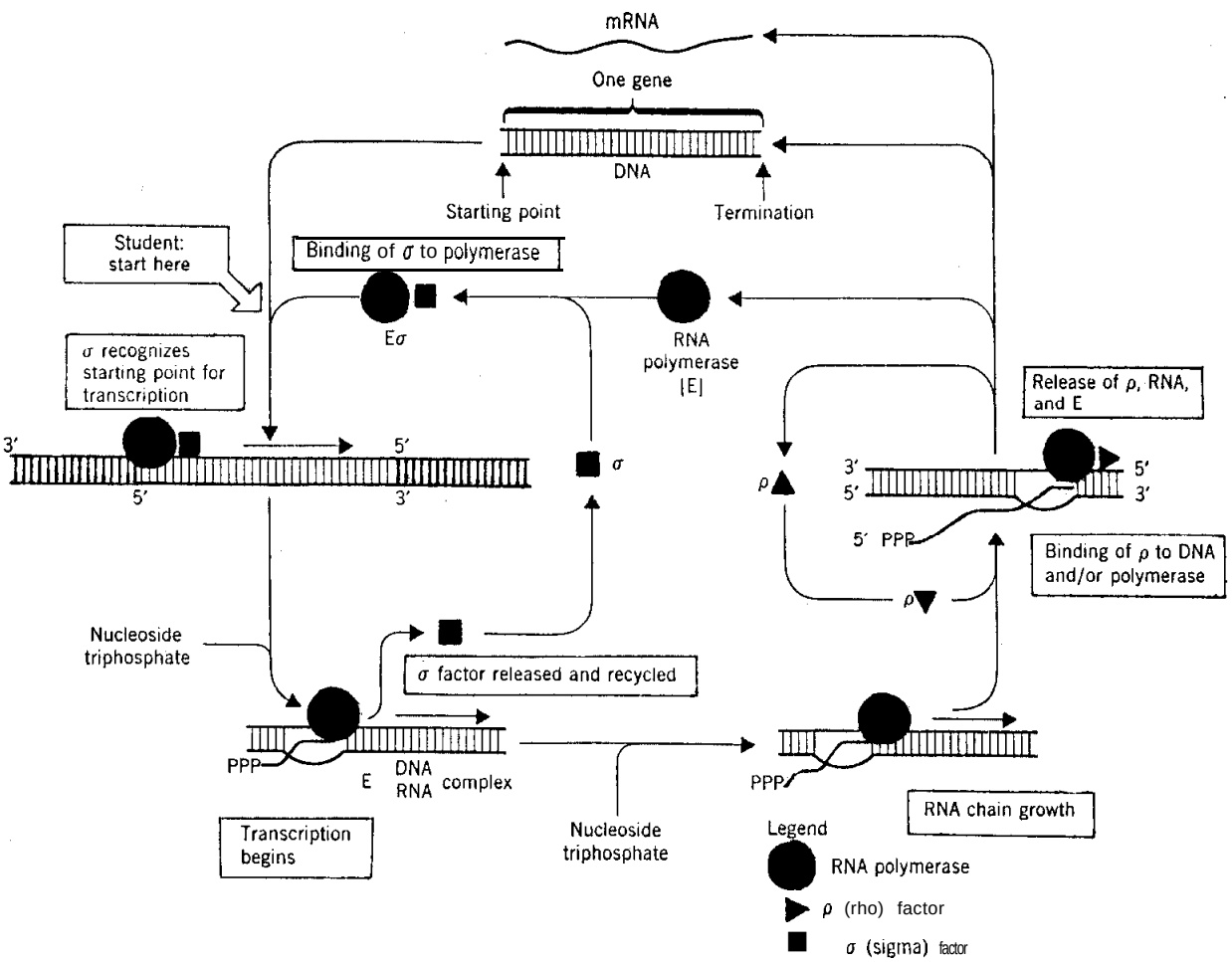
1. ขั้นตอนการจับตัวของเอนไซม์ RNA โพลีเมอเรสบน DNA แม่พิมพ์ ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ RNA โพลีเมอเรสในรูปของโฮโลเอนไซม์ คือมีหน่วยย่อยซิกม่าอยู่ด้วย (รูปที่ 3-10) หน่วยย่อยซิกม่าจะช่วยเพิ่มความเฉพาะเจาะจง (spicificity) ของทรานสคริปชั่น โดยทำให้เอนไซม์สามารถหาจุดเริ่มต้นบนแม่พิมพ์ได้ ซึ่งจุดนั้นจะอยู่ติดกับบริเวณส่งเสริม ปฏิกิริยาระหว่าง RNA โพลีเมอเรส และ DNA แม่พิมพ์จะเริ่มต้นจาก RNA โพลีเมอเรสจะจับอย่างสุ่ม (random) บน DNA โดยอาศัยวิธี diffusion การจับตัวอย่างสุ่มนี้จะเกิดในเวลาอันรวดเร็วและสามารถผันกลับได้ จนกว่าเอนไซม์จะหาบริเวณส่งเสริมพบ ซึ่งก็จะใช้เวลาเพียงไม่กี่วินาทีเท่านั้น RNA โพลีเมอเรสมีสัมพรรคภาพต่อบริเวณส่งเสริมสูงกว่าบริเวณอื่น ดังนั้นจะจับตัวกับบริเวณนี้อย่างแน่นหนา แล้วจึงเกิดการคลายเกลียวของ DNA ขึ้น เพื่อเปิดโอกาสให้ RNA โพลีเมอเรสเลือกใช้สายที่เหมาะสมเพียงสายเดียวเป็นแม่พิมพ์

จากการศึกษาในโปรคาริโอท พบว่าบริเวณส่งเสริมอันเป็นสถานที่ที่ RNA โพลีเมอเรสมาจับตัวนี้ จะมีการเรียงลำดับเบสและความยาวแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตาม มักจะอยู่ก่อนหน้าจุดเริ่มต้นทรานสคริปชั่นขึ้นไป ประมาณ 10 คู่เบส และในบริเวณส่งเสริม มักจะพบการเรียงลำดับที่มีเบสอดีนีนและไธมีนอยู่มาก เรียงกัน 7 คู่เบสนี้อยู่ด้วยเสมอคือ

5′—T—A—T—Pu—A—T—G—3′
3′—A—T—A—Py—T—A—C—5′

การเรียงลำดับนี้เรียกว่า Pribnow box สำหรับในยูคาริโอท ก็จะมีการเรียงลำดับของเบสที่คล้ายกันนี้อยู่ในบริเวณส่งเสริมเช่นกัน โดยจะอยู่ก่อนหน้าที่จะถึงจุดเริ่มต้นทรานสคริปชั่นขึ้นไป 20 ถึง 30 คู่เบส บริเวณนี้เรียกว่า Goldberg-Hogness box หรือ TA TA box

2. ขั้นตอนการเริ่มต้นสร้างสาย RNA (initiation step) เมื่อ DNA เกิดการคลายเกลียวแล้ว ก็จะเริ่มมีการสร้างสาย RNA ขึ้นจากไรโบนิวคลีโอไทด์ โดยขั้นตอนนี้จะเกิดที่จุดเริ่มต้น (initiation site) ซึ่งอยู่ถัดมาจากบริเวณส่งเสริม เมื่อเกิดพันธะฟอสโฟ ไดเอสเทอร์พันธะแรกขึ้นแล้ว ซิกม่าก็จะหลุดออกจาก RNA โพลีเมอเรส และสามารถที่จะถูกนำกลับไปใช้ได้

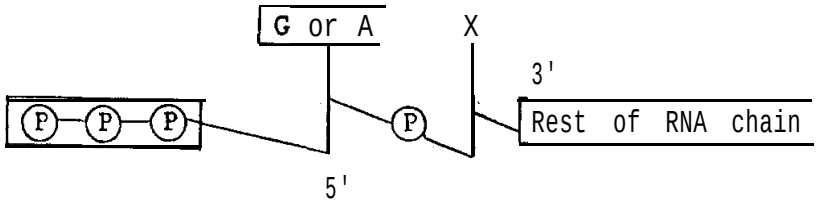


รูปที่ 3–10 การสังเคราะห์ RNA โดยเอนไซม์ RNA โพลีเมอเรส ใน E. coli

อีกในการเริ่มต้นสร้างสาย RNA อื่นต่อไป

3. ขั้นตอนการต่อสายของ RNA ให้ยาวออกไป (elongation step) RNA โพลีเมอเรส ในรูปของคอร์เอนไซม์จะเคลื่อนที่ไปตามสาย DNA จากทิศ $3' \longrightarrow 5'$ ทำให้ RNA ที่ได้นั้นเป็นทิศ $5' \longrightarrow 3'$ DNA บริเวณใดที่ถูกใช้เป็นแม่พิมพ์เรียบร้อยแล้วจะกลับเข้าสู่สภาพเกลียวคู่ตามเดิม แล้วบริเวณที่อยู่ถัดไปก็จะคลายเกลียวออกเพื่อเกิดทรานสคริปชั่นต่อไป

ทรานสคริปชั่นต่าง จากเรพลิเคชั่นคือขบวนการนี้ไม่ต้องการไพรเมอร์ และที่พิเศษอีกประการได้แก่ทางปลาย $5'$ ของสาย RNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้น มักจะเริ่มต้นด้วยกัวนีนหรืออดีนีนเสมอ ดังรูป



4. ขั้นตอนสิ้นสุดการสังเคราะห์ RNA (termination step) บน DNA จะมีสัญญาณพิเศษที่จะบอกให้ทรานสคริปชั่นหยุดลง ซึ่งสัญญาณนี้บางแห่งจะถูกหาพบได้ด้วย RNA-โพลีเมอเรส แต่บางแห่งจะต้องใช้โปรตีนตัวหนึ่งมาช่วย ได้แก่โรแฟคเตอร์ (Rho factor, ρ) โรแฟคเตอร์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 ดาลตัน และทำงานโดยไปจับตัวกับ RNA โพลีเมอเรส ทำให้ทรานสคริปชั่นสิ้นสุดลง แล้วได้ผลิตภัณฑ์ของขบวนการออกมาคือสายของ RNA

การสังเคราะห์ RNA ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

รายละเอียดของขบวนการทรานสคริปชั่นในยูคาริโอทนี้จะคล้ายคลึงกับที่เกิดในโปรคาริโอท แต่สิ่งที่แตกต่างกันคือในยูคาริโอทจะมีเอนไซม์ RNA โพลีเมอเรสมากกว่า 1 ชนิด ได้แก่

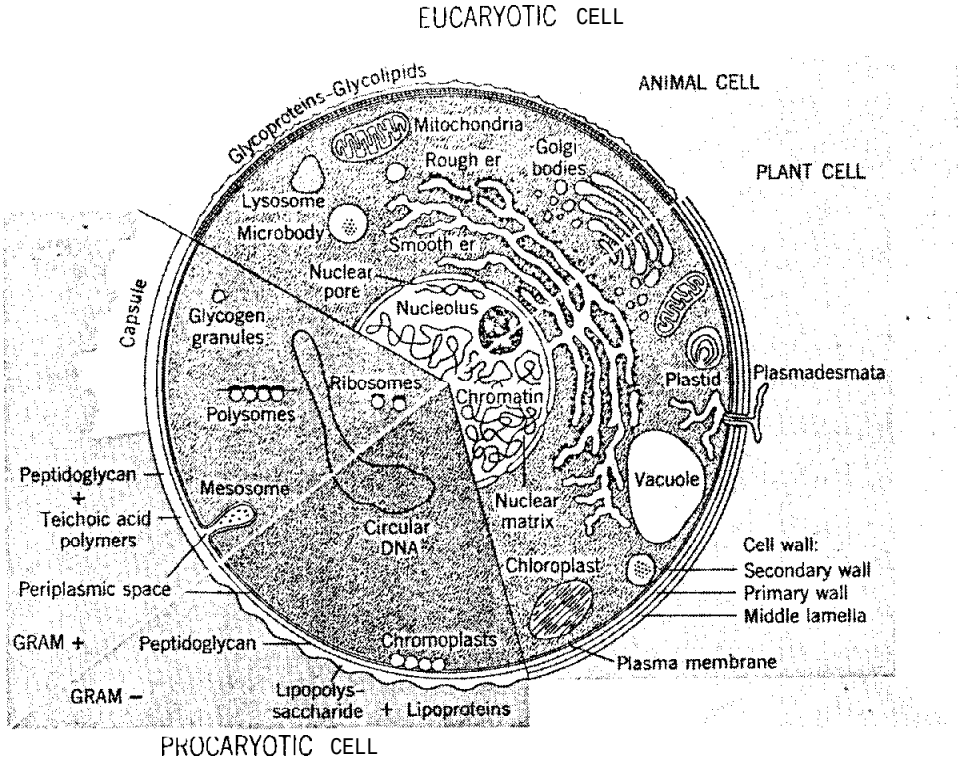
1. RNA โพลีเมอเรส I จะอยู่รวมกับนิวคลีโอลัส (nucleolus) (รูปที่ 3-11) และมีหน้าที่ในการสังเคราะห์ rRNA

2. RNA โพลีเมอเรส II อยู่ในนิวคลีโอปลาสม (nucleoplasm) เอนไซม์ตัวนี้จะเป็นตัวที่ไว (sensitive) ที่สุดต่อสารพิษอัลฟาอะมานิทิน (α-amanitin) และมีหน้าที่ในการสังเคราะห์ mRNA

3. RNA โพลีเมอเรส III อยู่ในนิวคลีโอปลาสมเช่นกัน และมีหน้าที่ในการสังเคราะห์ tRNA

4. RNA โพลีเมอเรส IV อยู่ที่ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรีย และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ RNA ในไมโตคอนเดรียนี้

5. คลอโรพลาสต์ RNA โพลีเมอเรส พบในพืชที่มีคลอโรพลาสต์



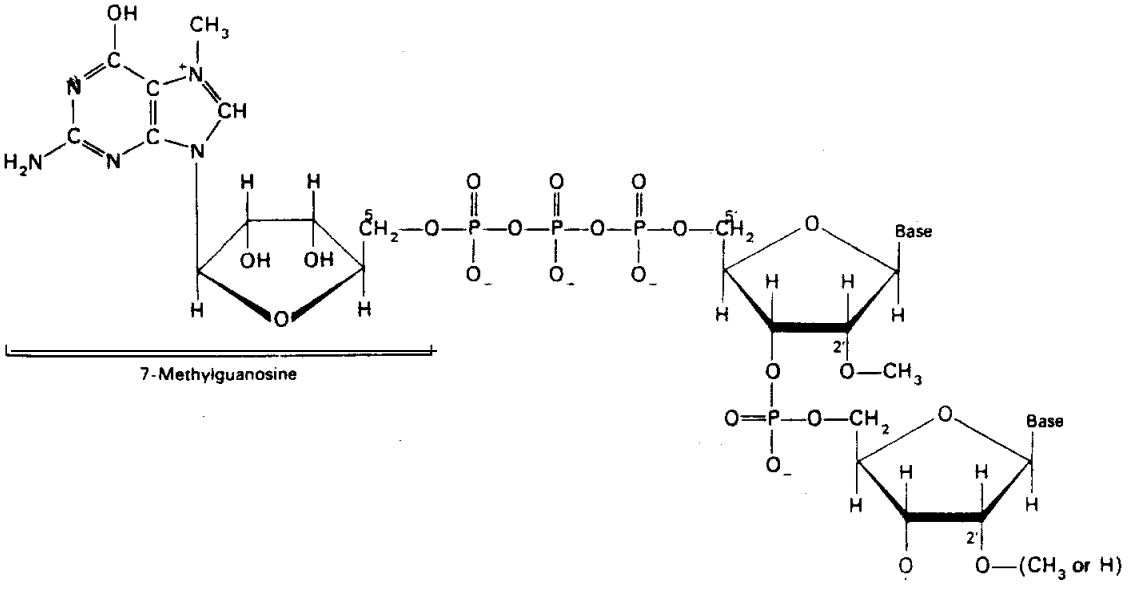
รูปที่ 3–11 รูปแสดงส่วนประกอบภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอทและโปรคาริโอท

การดัดแปลง RNA ที่ได้จากทรานสคริปชั่น

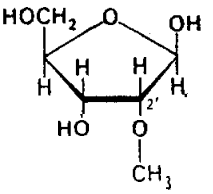
RNA ที่ได้จากทรานสคริปชั่นมักไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่จะถูกนำไปใช้ได้ทันที โดยมากแล้ว RNA นั้นจะต้องถูกดัดแปลงเสียก่อน ซึ่งการดัดแปลง (modification) ก็ทำได้หลายวิธี เช่น

1. **ในกรณีของ mRNA** ถ้าเป็นยูคาริโอท mRNA ที่ได้จากทรานสคริปชั่น จะต้องถูกเติม poly A เข้าไปทางปลาย 3′ โดยใช้เอนไซม์ poly A polymerase ความยาวของอดีนิลนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต่อเข้าไปนี้จะแตกต่างกันไปได้ โดยที่ทั่วไปแล้วจะอยู่ระหว่าง 50-200 นิวคลีโอไทด์ สำหรับหน้าที่ของ poly A เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการขนส่ง mRNA ผ่านเยื่อหุ้มออกจากนิวเคลียสไปยังไซโตปลาสม หรืออาจช่วยทำให้ mRNA ถูกทำลายได้ช้าลง

ที่ปลาย 5′ ของยูคาริโอติค mRNA ส่วนใหญ่ก็จะถูกดัดแปลงด้วย โดย 7-methylguanosine จะถูกเติมเข้าไปที่หมู่ไทรฟอสเฟทของนิวคลีโอไทด์ตัวริมสุดทางปลาย 5′ โดยใช้การรวมตัวแบบ 5′-5′ condensation ขบวนการนี้เรียกว่า "capping" ข้อที่น่าสังเกตอีกประการก็คือ ที่ตำแหน่ง 2′-ไฮดรอกซิลของนิวคลีโอไทด์ตัวที่เกิด capping จะถูกเติมหมู่เมธิลด้วย และในบางครั้งนิวคลีโอไทด์ตัวที่อยู่ถัดไปก็จะถูกเติมหมู่เมธิลเช่นกัน สำหรับความสำคัญของ capping เชื่อกันว่าเป็นสิ่งจำเป็นในขบวนการสังเคราะห์โปรตีนของยูคาริโอท แต่อย่างไรก็ดีก็ยังมียูคาริโอติค mRNA บางส่วนที่แม้ไม่เกิด capping แต่ก็ยังสามารถทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์สำหรับขบวนการทรานสเลชั่นได้

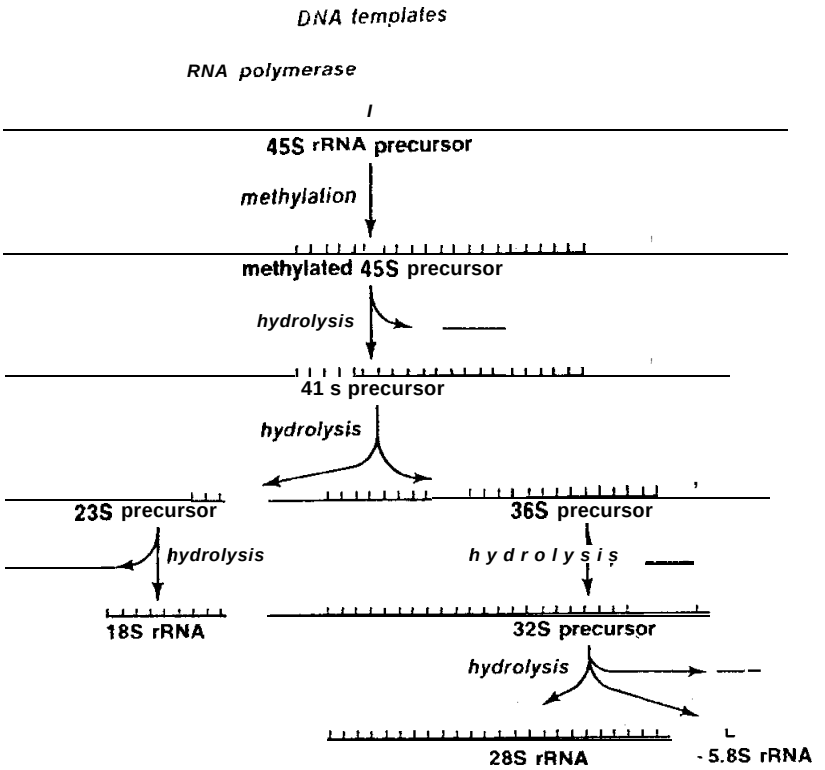


2. **ในกรณีของ rRNA** rRNA ที่พบในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเป็นชนิด 18S และ 28S rRNA ซึ่งไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยตรงจากขบวนการทรานสคริปชั่น อันได้แก่ 45S rRNA ดังนั้น 45S rRNA จะต้องถูกทำให้เล็กลงโดย SAM จะเข้ามาเติมหมู่เมธิลให้กับตำแหน่ง 2′ ของส่วนน้ำตาลไรโบส ได้เป็นเมธิลไรโบส

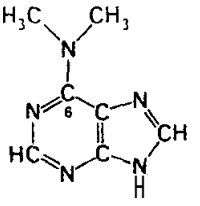


2′-*O*-Methylribose

จากนั้นจะมีเอนไซม์พิเศษมาตัดสายของ RNA ตรงที่ถูกเติมหมู่เมธิลนี้ออกอีกหลายขั้นตอน จนในที่สุดได้ 18S และ 28S rRNA เกิดขึ้น



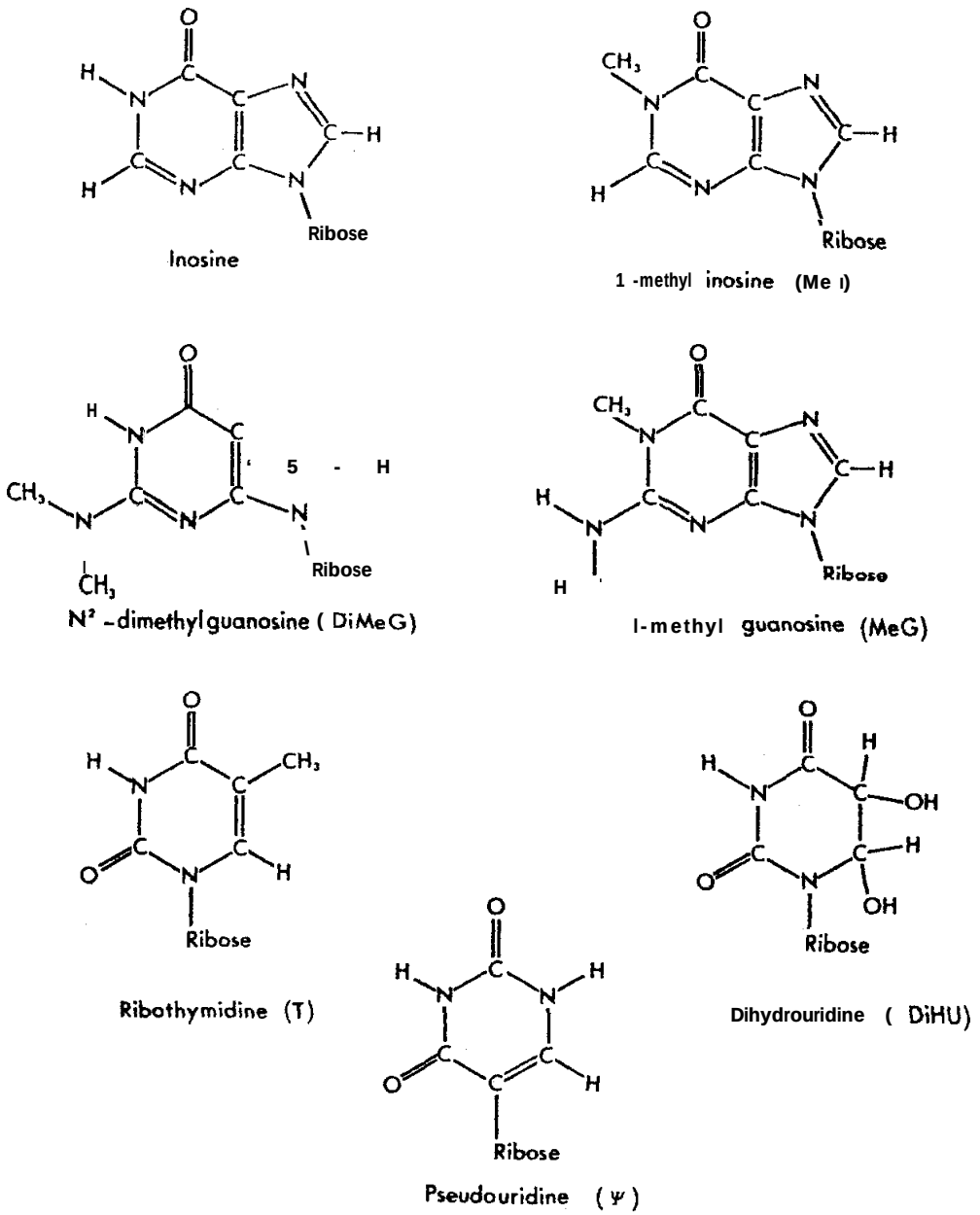
ถ้าเป็นในแบคทีเรีย rRNA ที่ได้จากทรานสคริปชั่นก็จะต้องถูกเติมหมู่เมธิลแล้วตัดออกให้สั้นลงเช่นกัน แต่ส่วนที่จะถูกเติมหมู่เมธิลนั้นจะเป็นที่เบสไม่ใช่ที่น้ำตาลไรโบส ตัวอย่างเช่น เบสอดีนีนเมื่อถูกเติมเมธิลแล้วจะได้เป็น 6-dimethyl adenine



6-Dimethyladenine

3. **ในกรณีของ tRNA** tRNA ที่พบโดยทั่วๆ ไป ที่ปลาย 5′ จะเป็นโมโนฟอสเฟท มิใช่ไทรฟอสเฟท แสดงว่า tRNA นั้นจะต้องเกิดจากโมเลกุลที่ใหญ่กว่าแล้วถูกตัดให้เล็กลง ตัวอย่างเช่น ใน E coli tRNA ที่มี 85 นิวคลีโอไทด์จะได้มาจากการตัด tRNA ที่มี 129 นิวคลีโอไทด์ออก โดยใช้เอนไซม์นิวคลีเอสชนิดพิเศษ

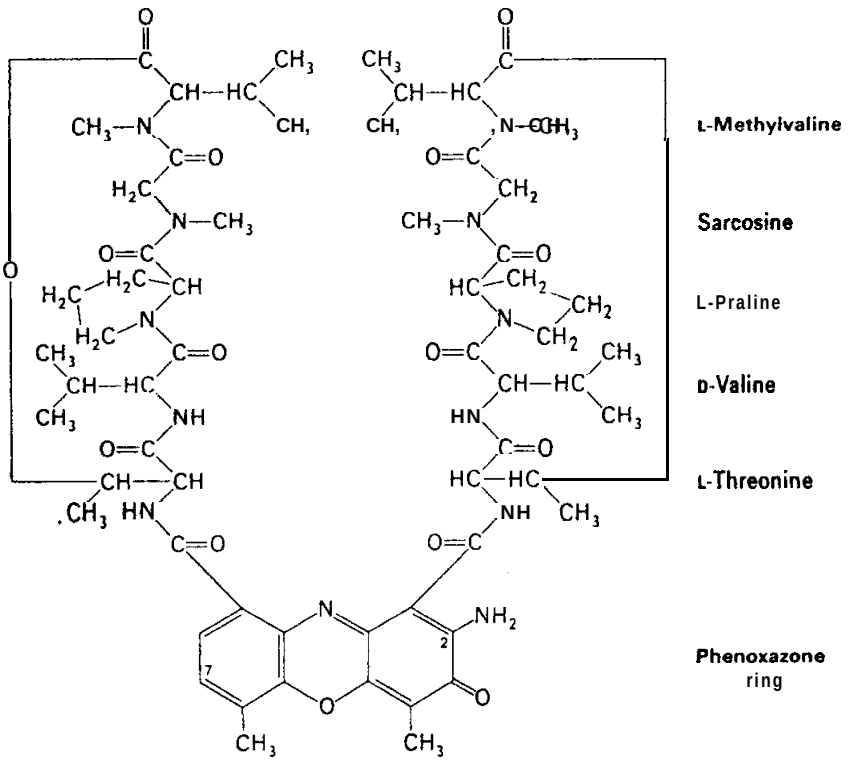
นอกจากนี้ tRNA ยังประกอบด้วยเบสที่ถูกดัดแปลงอีกหลายชนิด คือเมื่อโมเลกุลของ tRNA ถูกตัดให้ได้ขนาดที่ต้องการแล้ว ก็จะเกิดการดัดแปลงทางเอนไซม์ (enzymatic modification) ขึ้น ได้เบสที่ต่างไปจาก A, G, C และ U (รูปที่ 3-12) หน้าที่ของเบสเหล่านี้ยังไม่ทราบแน่นอน แต่คาดว่าจะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการจับคู่ของเบสตามปกติ ทำให้เบสในบริเวณนั้นสามารถเกิดปฏิกริยาอื่นๆ ได้



รูปที่ 3–12 นิวคลีโอไซด์ที่ประกอบด้วยเบสดัดแปลง ซึ่งสามารถพบได้ใน tRNA

ตัวยับยั้งการสังเคราะห์ RNA

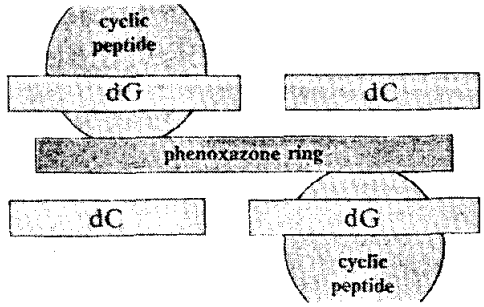
1. แอคติโนมัยซินดี (Actinomycin D) เป็นยาปฏิชีวนะที่สกัดจากเชื้อรา Streptomyces โครงสร้างประกอบขึ้นจากเปปไทด์วงปิด (cyclic peptide) สองวงเชื่อมต่อกันด้วยระบบวงแหวน phenoxazone



Actinomycin D

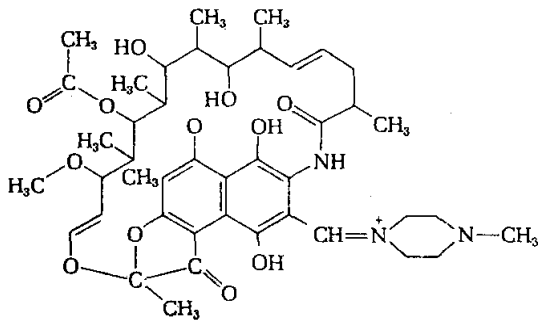
แอคติโนมัยซินดีจะจับตัวได้อย่างแน่นหนากับ DNA เกลียวคู่ โดยวงแหวน phenoxazone จะสอดตัว (intercalate) เข้าไปอยู่ระหว่างคู่ของเบส G-C ใน DNA นั้น (รูปที่ 3-13) และเปปไทด์วงปิดแต่ละวงก็จะเกิดพันธะไฮโดรเจนขึ้นกับหมู่อมิโนที่ตำแหน่งที่ 2 ของเบสกัวนีน ทำให้ DNA บริเวณนี้ไม่สามารถเกิดการคลายเกลียวได้ จึงหมดสภาพที่จะเป็นแม่พิมพ์สำหรับการสังเคราะห์ RNA เนื่องจากเมื่อ RNA โพลีเมอเรสเคลื่อนตัวมาถึงบริเวณนี้แล้ว ก็จะไม่สามารถเคลื่อนที่ต่อไปได้ แอคติโนมัยซินดีนี้ถ้าใช้ความเข้มข้นต่ำ จะยับยั้งทรานสคริปชั่นโดยไม่มีผลกับเรพลิเคชั่นเลย ในปัจจุบันมักไม่ค่อยนิยมใช้ยาตัวนี้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียมากนัก เพราะยานี้มีความเป็นพิษอยู่บ้าง แต่อย่างไรก็ดีปรากฏว่าได้มีการใช้ยานี้เป็นส่วนหนึ่ง

ในการรักษาโรคมะเร็งบางชนิด ซึ่งก็ได้ผลพอสมควร



รูปที่ 3-13 รูปแสดงการสอดตัวของแอคติโนมัยซินดีเข้าไปในสายเกลียวคู่ของ DNA เพื่อยับยั้งขบวนการทรานสคริปชั่นที่ขั้นตอนการต่อสายของ RNA ให้ยาวออกไป (elongation step)

2. **ไรฟามัยซิน** เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จาก Streptomyces เช่นกัน อนุพันธ์ของสารประกอบจำพวกนี้ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา และใช้กันมากได้แก่ ไรแฟมพิซิน (rifampicin) ซึ่งใช้เป็นยารักษาวัณโรคปอดที่ได้ผลดี

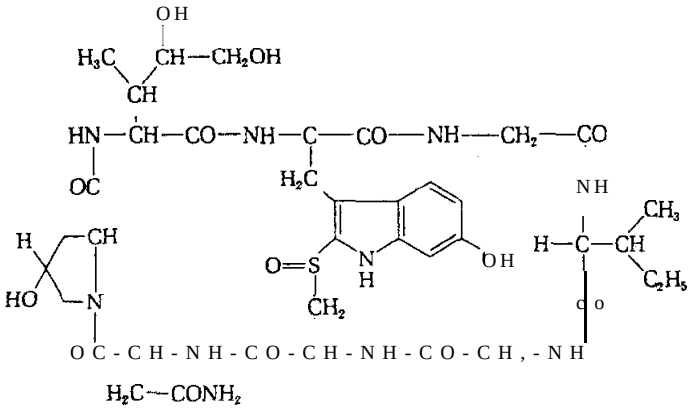


Rifampicin

ไรแฟมพิซินจะยับยั้งขั้นตอนการเริ่มต้นสร้างสาย RNA โดยจะเข้าไปจับตัวกับหน่วยย่อยเบต้าของเอนไซม์ RNA โพลีเมอเรส ทำให้การสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์พันธะแรกเกิดขึ้นไม่ได้ ถ้าใช้ยานี้เมื่อทรานสคริปชั่นดำเนินไปจนถึงขั้นตอนการต่อสาย RNA ให้ยาวขึ้นแล้ว จะไม่สามารถยับยั้งขบวนการนี้ได้เลย ยาปฏิชีวนะจำพวกไรฟามัยซินจะยับยั้งการทำงาน

ของเอนไซม์ RNA โพลีเมอเรสในแบคทีเรียได้ดี แต่จะไม่มีผลต่อ RNA โพลีเมอเรสในนิวเคลียสของยูคาริโอทและ RNA โพลีเมอเรสของไวรัสบางชนิด

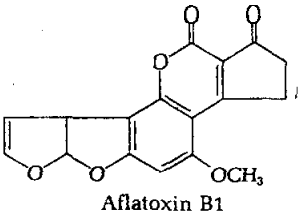
3. อัลฟาอะมานิทิน เป็นสารพิษที่พบในเห็ดตระกูล Amanita ประกอบขึ้นจากกรดอมิโน 8 ตัวต่อกันเป็นวง



a-Amanitin

สารพิษตัวนี้จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNA โพลีเมอเรส II ที่พบในนิวคลีโอปลาสมของยูคาริโอท ซึ่งมีหน้าที่สร้าง mRNA โดยที่จะไม่เป็นพิษต่อ RNA โพลีเมอเรส I และ III แต่อย่างใด นอกจากนี้อัลฟาอะมานิทินจะไม่ยับยั้ง RNA โพลีเมอเรสในไมโตคอนเดรีย, คลอโรพลาสต์ และ RNA โพลีเมอเรสของแบคทีเรียด้วย อาการของผู้ที่รับประทานเห็ดพิษตระกูลนี้เข้าไปก็คือ เซลล์ตับและไตจะถูกทำลายลงอย่างรวดเร็ว และถ้าได้รับสารพิษเข้าไปเป็นจำนวนสูงจะทำให้ตายได้ภายใน 2-3 วัน

4. อัฟล่าทอกซิน (Aflatoxin) เป็นสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งพบทั่วไปในประเทศเขตร้อน โดยจะพบเชื้อรานี้ในธัญญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เป็นต้น



Aflatoxin B1

จากการทดลองพบว่า อัฟล่าทอกซินสามารถจับกับ DNA ได้ดี ดังนั้นจึงยับยั้งได้ทั้งเรพลิเคชั่นและทรานสคริปชั่น นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าอัฟล่าทอกซินเป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือมะเร็งของตับ