บทที่ ๓

วิธีดำเนินและวิธีรวบรวมข้อมูล

๓.๑ วิธีเตรียมและส่วนประกอบ (materials and methods)[๑๗]

๓.๑.๑ วิธีเตรียมและแยกไรโบโซม, โปรตีนที่มีสารกัมมันตรังสี

ใช้หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ (WISTAR STRAIN) เพศตัวผู้น้ำหนักประมาณ ๑๐๐ กรัม หนูทุกตัวจะถูกทำให้สลบโดยการฉีด Nembutal Sodium (Sodium pentobarbital 50 mg/ml Abbott laboratories, North Chicago, ILL.) ในขนาด 0.1 ml เข้าช่องท้อง ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ ๕ นาที หนูก็จะสลบ หลังจากนั้นก็ผ่าตัดเปิดช่องท้องโดยพยายามให้ผ่านเส้นโลหิตใหญ่ให้น้อยที่สุด ระหว่างนี้ก็ให้ออกซิเจนแก่หนูที่สลบ โดยผ่านทางกรวยที่ครอบอยู่บนจมูก เพื่อให้สภาวะทางสรีระวิทยาของอวัยวะในร่างกายใกล้เคียงสภาพปกติมากที่สุด

ในหนูแต่ละตัวฉีด 55 μ Ci ของ C^{14} amino acid mixture (New England Nuclear Corp. 25 μ Ci/ml) เข้าทาง portal vein โดยใช้เข็มเบอร์ ๒๖ เมื่อเวลา ๑,๒,๓,๕,๗,๑๐ และ ๑๕ นาที ภายหลังการฉีดสารกัมมันตรังสี รีบตัดตับออกมาล้างใน iced-cold TKM buffer ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้

Tris (hydroxymethyl) aminomethane HCl, pH 7.6	0.050 M
KCl	0.025 M
$MgCl_2$	0.005 M

เมื่อล้างตับแล้วรีบนำไปชั่งแล้วนำมา minced ใน iced TKM buffer ที่มี 0.25 M Sucrose ในขนาด 2.5 ml ของ TKM buffer ต่อน้ำหนักตับ ๑ กรัม ขบวนการต่อไปกระทำโดยพยายามให้อุณหภูมิสูงไม่เกิน 4°C

หลังจากนั้นก็บดตับโดยใช้ Potter-Elvehjem Teflon-Glass homogenizer

ซึ่งปั่นโดยมอเตอร์ ๑,๓๐๐ รอบต่อนาทีโดยบดขึ้นลง ๖ ครั้ง Homogenate ที่ได้จะถูกไปปั่นในหลอดพลาสติกขนาด 50 ml ในเครื่องปั่น Sorvalle RC-2B โดยใช้หัวปั่น SS-34 ในขนาด 15,000 x g เป็นเวลา ๑๐ นาที โดยวิธีนี้จะสามารถแยกส่วนตะกอนซึ่งประกอบด้วยนิวเคลียสและไมโตคอนเดรียออกจากส่วน Post mitochondria supernatant (P.M.S.)

นำ PMS ที่ได้มาเติม TKM buffer ในจำนวนเท่าๆ กัน เพื่อลดความเข้มข้น แล้วเติม 10% Deoxycholate solution (DOC) และ 2% Triton X-100 จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% DOC และ 1% Triton X-100 เขย่าให้เข้ากัน ทั้งนี้เพื่อให้ละลายเยื่อเซลล์ต่างๆ และแยกไรโบโซมออกจาก Endoplasmic reticulum นำของเหลวที่ได้ไปปั่นในเครื่อง Preparative ultracentrifuge (Hitachi model HP 65.) โดยใช้หัว RP 50 ที่ความเร็ว ๔๐,๐๐๐ รอบต่อนาที (108,000 x g) อุณหภูมิ 2°C เป็นเวลา ๑ ชม. ต่อมาแยกส่วนที่เป็นน้ำและตะกอนออกจากกันโดยใช้ pipette แก้ว

ส่วนน้ำ (Sap) เป็นส่วนของโปรตีนในเซลล์

ส่วนตะกอน (pellet) เป็นส่วนของไรโบโซม

นำตะกอนมาล้าง ๓ ครั้งด้วย iced cold TKM buffer แล้วนำมาทำให้เป็น suspension ใน 2 ml ของ iced cold TKM buffer โดยใช้ P.E. homogenizer

๓.๑.๒ วิธีหาจำนวนโปรตีน

๓.๑.๒.๑ โปรตีนใน Sap:

นำ Sap 0.1 ml ผสมน้ำกลั่น 00.9 ml ใส่สารละลาย Biuret 4 ml

ส่วนประกอบของ Biuret - solution:

$CuSO_4.5\ H_2O$	1.50	gm
$NaKC_4H_4O_6.4H_2O$ (Sodium potassium tartrate)	6.00	gm
NaOH (10% aqueous solution)	300.00	ml

หอสมุดกลาง

เมื่อผสมเข้ากันดีแล้วตั้งทิ้งไว้ ๑๕ นาที

Control ใช้น้ำกลั่น 1 ml ผสมสารละลาย biuret 4 ml วัด O.D ที่ 550 nm. โดยใช้ Spectrophotometer, Gilford model 2400-2 O.D. ที่อ่านได้นำมาคำนวณหาค่าโปรตีนจาก standard curve โดยปกติ 1 O.D. มีค่าเท่ากับโปรตีน 21 mg. ในสารละลายเริ่มแรก

๓.๑.๒.๒ โปรตีนใน ribosome pellet:

นำ ribosome suspension มา 0.1 ml เพื่อวัดโปรตีนตามวิธีในข้อ ๒.๑

๓.๑.๓ วิธีวัดสารกัมมันตรังสีส่วนที่ยังไม่ได้ใช้ไป [p(t)]

สารกัมมันตรังสีส่วนที่ยังไม่ได้ incorparate เข้าไปโปรตีนจะอยู่ในสภาพโมเลกุลเล็กใน sap ซึ่งโมเลกุลของสารพวกนี้จะไม่ถูกตกตะกอนเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงใน pH

นำ sap 0.1 ml ผสมกับ 1 ml iced cold 10% Trichloroacetic acid ตั้งทิ้งเอาไว้ในห้องเย็น (4°C) ๑ ชม. นำมาปั่นที่ ๒,๐๐๐ รอบต่อนาที ๑๐ นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำ 0.1 ml ใส่ในขวดวัดสารกัมมันตรังสี ผสม Protosol 0.5 ml (New England Nuclear Co., Boston, Mass. USA.) นำไปอุ่นบน slide warmer ที่ 60°C ๑ ชม. แล้วผสม Scintillation cocktail 10 ml (ทำโดยผสม toluene AR grade ๑ ลิตรกับ liguifluor) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเข้าเครื่องวัดรังสีแกมม่า (Liquid Scintillation counter) ชนิดที่มี External standard ratio) ค่าที่ได้ออกมามีหน่วยเป็น count per minute (cpm) นำมาคำนวณหาค่าที่แท้จริงในหน่วย disintegration per minute (dpm) โดยใช้ค่าประสิทธิภาพของการวัดจาก External standard ratio มาช่วย

แล้วนำมาคำนวณกลับเป็นค่า dpm ต่อ 1 mg โปรตีนที่มีใน sap (วัดโดยวิธีในข้อ ๒)

๓.๑.๔ วิธีวัดสารกัมมันตรังสีส่วนที่ได้รับการสังเคราะห์เข้ามาในโปรตีนหรือไรโบโซม

เนื่องจากโปรตีนหรือไรโบโซมเป็นสารโมเลกุลใหญ่ สามารถตกตะกอนได้โดยการเปลี่ยนแปลงใน pH เช่น ทำให้เป็นกรด จึงใช้วิธีตกตะกอนด้วยกรดมาช่วยในการแยกสารพวกนี้จากสารกัมมันตรังสี ส่วนที่ยังไม่ได้ใช้ไป

๓.๑.๔.๑ วิธีวัดสารกัมมันตรังสีในโปรตีน $\left[C(t)\right]$

นำ sap ที่ได้จากข้อ ๓.๑.๑ มา 0.1 ml ตกตะกอนด้วย 1-2 ml ของ 10% TCA ตั้งทิ้งไว้ในห้องเย็นที่ 4 °C ๑ ชม. เพื่อให้การตกตะกอนสมบูรณ์

นำ aliquote นี้มาอุ่นที่ 90 °C ใน water bath ๑๕ นาที เพื่อจะได้ hydrolyse กรดนิวคลีอิคออกไป นำ aliquot ที่ได้มากรองผ่าน glass fiber-filter (Millipore filter - GF - 1) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๒๑ ม.ม โดยใช้ Millipore Vacuum Filter

วิธีการกรองกระทำเป็นขั้นตอนดังนี้

ก. Pipette suspension ของ celite (20 mg/ml) 1 ml ลงบน filter เพื่อให้ celite แผ่เป็นแผ่น film บางๆ ใน filter

ส่วนประกอบของ celite:

Diatomaceous Earth	10	gm
10% TCA	1,000	ml

ข. เท sample ลงบน filter เพื่อให้ดูดส่วนน้ำออกไป

ค. ล้างตะกอน ๒ ครั้งด้วย 10% TCA

ง. ล้างตะกอน ๒ ครั้งด้วย 95% ethanol ครั้งละประมาณ 10 ml

จ. ล้างตะกอน ๒ ครั้งด้วย ethanol : ether(3:1) ครั้งละ 10 ml

ฉ. ล้างตะกอน ๒ ครั้งด้วย diethyl ether

ปล่อยให้ตะกอนแห้ง แล้วนำมาใส่ใน Scintillation vial ใส่ 0.5 ml ของ protosol นำไปอุ่นที่ 60°C บน slide warmer ๑ ชม. หลังจากนั้นผสม 10 ml ของ Scintillation cocktail แล้วนำไปวัดโดยใช้ liquid scintillation counter ตามวิธีในข้อ ๓.๑.๓ ค่าที่คำนวณออกมาได้จะเป็น dmp./mg protein

๓.๑.๔.๒ วิธีวัดสารกัมมันตภาพรังสีในไรโบโซม [B(t)]

นำ ribosome suspension ที่ได้จากข้อ ๓.๑.๑ มา 0.2 ml ตกตะกอนด้วย iced- cold 10% TCA จำนวนมากเกินพอ วิธีการลำดับต่อไปนี้กระทำเหมือนข้อ ๓.๑.๔.๑ นอกจากตอนคำนวณค่าออกมาใช้ factor ที่ต่างกัน เพราะใช้จำนวน ribosome aliquote 0.2 ml แทน 0.1 ml.

๓.๒ ข้อสังเกต (Notation)

T_1 : Initiation Time คือเวลาที่ใช้ในการที่ไรโบโซมแต่ละหน่วย (unit) จะมาจับกับ mRNA ทางด้าน 5′ end เพื่อจะดำเนินการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป

T_2 : Elongation Time คือเวลาที่ไรโบโซมแต่ละหน่วยใช้ในการเคลื่อนที่จาก 5′ end ไปจนถึง 3′ end ของ mRNA และพร้อมๆ กันนั้นก็สังเคราะห์โปรตีนออกมา ๑ เส้น

T_3 : Termination Time คือเวลาที่ไรโบโซมที่อยู่ปลายทาง 3′ end ใช้ในการแยกตัวออกจาก mRNA และปล่อยโปรตีนที่เพิ่งสร้างเสร็จออกมา

L : ความยาวของ mRNA เป็นหน่วยของโคดอนมีหน่วยเป็น Trinucleotide ซึ่ง ๑ หน่วยโคดอนจะสามารถถอดรหัสออกมาเป็นกรดอะมิโน ๑ ตัว

l : ความยาวของ mRNA ส่วนที่ไรโบโซมแต่ละอันเกาะอยู่เป็นหน่วยของโคดอน

$\hat{T}_2$: เวลาที่ใช้ในการถอดรหัส ๑ โคดอน และพร้อมๆ กันก็สังเคราะห์โปรตีนให้ยาวขึ้นเท่ากับกรดอะมิโน ๑ ตัว

$1\hat{T}_2$: เวลาที่ใช้ในการถอดรหัส 1 โคดอนและไรโบโซมจะเคลื่อนต่อไปทาง 3′ เป็นระยะทางเท่ากับความกว้างของไรโบโซมเอง

$p(t)$: สัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีสารกัมมันตรังสีอยู่เมื่อเวลา t

$N(t)$: จำนวนไรโบโซมบน mRNA ที่เวลาที่ t

$B(t)$: จำนวนกรดอะมิโนที่มีสารกัมมันตรังสีในโปลี่เปปไทด์ที่กำลังถูกสังเคราะห์บนไรโบโซมซึ่งเกาะอยู่บน mRNA ที่เวลา t

$C(t)$: จำนวนกรดอะมิโนที่มีสารกัมมันตรังสีในโปรตีนที่สร้างบนโปลี่ไรโบโซมเสร็จและถูกปล่อยมาอยู่ในไซโตปลาสมของเซลล์เรียบร้อยแล้วเมื่อเวลา t

N_{max} : จำนวนไรโบโซมที่มากที่สุดซึ่งจะสามารถเกาะอยู่บน mRNA ได้และมีค่าเท่ากับ $\frac{L}{l}$

t_{crit} : เวลาตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งจำนวนไรโบโซมบน mRNA เท่ากับ N_{max}

๓.๓ แบบจำลองและสมมุติฐาน (The Model and Assumptions)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามที่เขียนต่อไปนี้เป็นความนึกคิดที่คิดว่าจะเป็นไปได้ ตัวสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนคือ T_1, $\hat{T}_2$, T_3

วิธีการสังเคราะห์โปรตีนนี้เป็นแบบไดนามิค (dynamic) เราสามารถจะนำเอาวิธีการทางสถิติมาใช้ได้ และแบบแผนที่เลือกใช้เป็นแบบ Stochastic mathematical model แล้วหาค่าคงที่ (constance) ต่างๆ มาจากผลการทดลอง

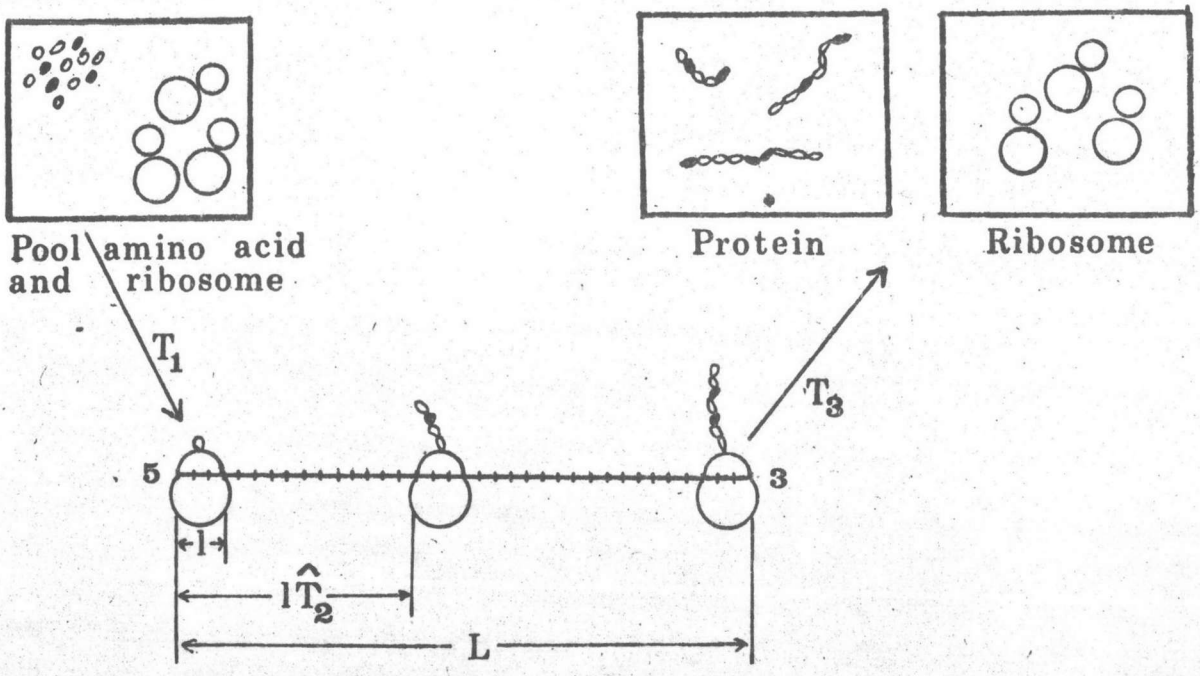
จาก Physical model จะแบ่งวิธีการสังเคราะห์โปรตีนได้เป็น ๒ ขั้นตอน คือ

๑. การสังเคราะห์โปรตีนในภาวะปกติ (non-congested case) คือ อัตราการปล่อยและเคลื่อนของไรโบโซมบน mRNA นั้นเป็นไปโดยปกติไม่มีอะไรมาขัดขวาง

๒. การสังเคราะห์โปรตีนในภาวะที่ผิดปกติ (congested case) คืออัตราการเคลื่อนที่ของไรโบโซมบน mRNA นี้มีอะไรมาขัดขวาง จึงทำให้การสังเคราะห์โปรตีน

นี้ลงกลง

แบบแผนทางคณิตศาสตร์เป็นแบบ Physical model นี้มีเนื้อหาเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของไรโบโซม การจับ Labelled amino acid และการปล่อยไรโบโซมรวมทั้ง Nascent protein นั้นเป็นแบบ continuous (ดังรูปที่ ๓.๑)



รูปที่ ๓.๑ PHYSICAL MODEL เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของไรโบโซม

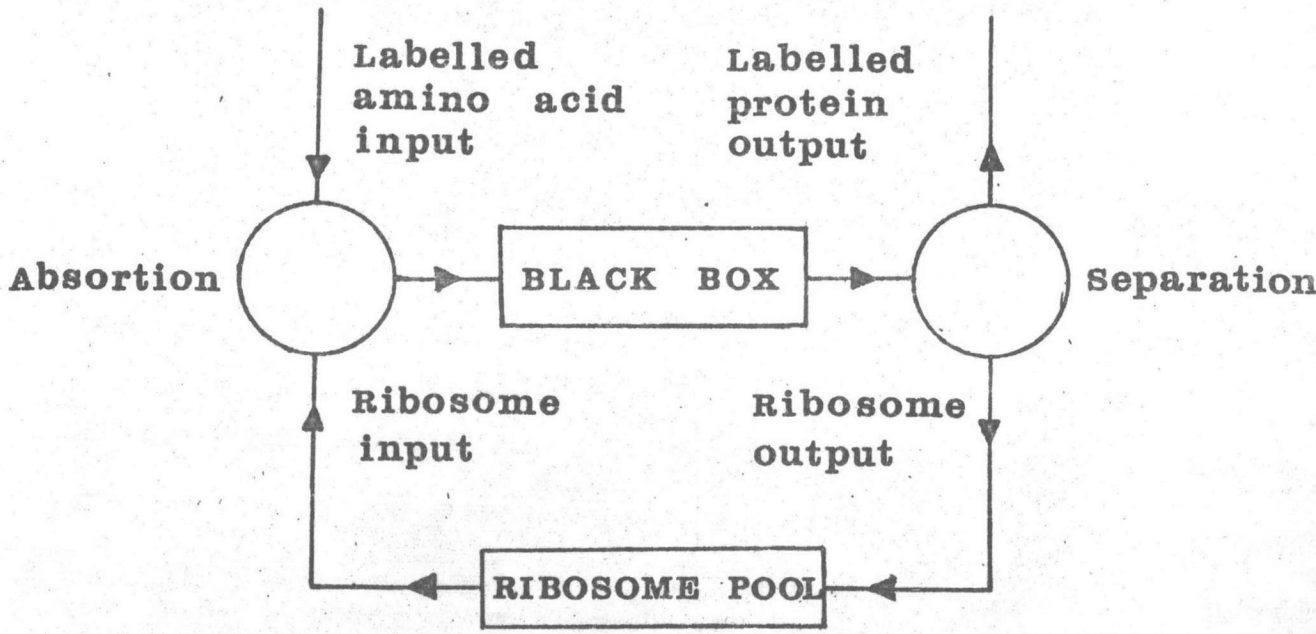
จาก BLACK-BOX DIAGRAM ของ Warner-Rich model[๑๔] ในรูปที่ ๓.๒

Input คือ Free mRNA กรดอะมิโนที่ไม่ได้ Labelled กับที่ Labelled ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี และไรโบโซมกับการที่ไรโบโซมและกรดอะมิโนจะเข้ามาใน mRNA นี้จะเข้ามาด้วยอัตรา $\frac{1}{T_1}$ (Rate of Initiation)

Output คือ โปรตีน ไรโบโซม และ Free mRNA และการที่ไรโบโซมจะหลุดออกมาจาก mRNA ด้วยอัตรา $\frac{1}{T_3}$ (Rate of Termination)

ภายในกล่อง (box) เป็นการเคลื่อนของไรโบโซมบน mRNA ด้วยอัตรา $\frac{1}{\hat{T}_2}$

(rate of chain elongation) และในขณะเดียวกันไรโบโซมสามารถจะจับ Labelled amino acid ด้วยอัตราที่สัมพันธ์กับ $\frac{1}{T_1} + \frac{N(t)}{T_2}$ และสัดส่วนความเข้มของ Labelled amino acid เท่ากับ p(t) ส่วนการที่ Labelled amino acid จะหลุดออกมาจาก mRNA นั้นก็จะออกมาด้วยอัตรา $\frac{1}{T_3}$ เช่นกัน



รูปที่ ๓.๒ BLACK BOX DIAGRAM

ก. สมมุติฐาน (Assumption)

๑. น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนหน่วยย่อยมีค่าเฉลี่ยประมาณ ๒๐,๐๐๐ – ๒๕,๐๐๐ ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ ๒๐๐ ตัว ดังนั้น mRNA ก็จะมีความยาวประมาณ ๒๐๐ โคดอน ความรู้นี้จะใช้เป็นแบบแผนในการศึกษาการเลียนสภาพ

๒. ความกว้างของไรโบโซม เมื่อไรโบโซมเกาะบน mRNA จะมีความกว้างประมาณ 24 bases[๒๐] และ ๑ โคดอน มี 3 base ดังนั้นไรโบโซม ๑ ตัว จะครอบคลุม ๘ โคดอน

๓. จำนวนสูงสุดของไรโบโซมบน mRNA ประมาณ $\frac{200}{8}$

๔. อัตราการเกาะติดและหลุดออกของไรโบโซมให้ถือว่าคงที่ ดังนั้นจำนวนของไรโบโซมที่มีอยู่จะไม่สำคัญในการนี้ แต่การจำกัดหรือควบคุมไรโบโซมในบางสภาพจะทำให้การเปลี่ยนแปลงใน rate of initiation

๕. เวลาที่ใช้ในการเริ่มต้น (initiation) การสังเคราะห์โปรตีนเท่ากับ T_1 ซึ่งเป็นเวลาที่ใช้ในการสร้าง initiation complex จากไรโบโซม 30S, 50S, กรดอะมิโนในตัวแรก (N-formyl methinyl t-RNA) (๒๑ – ๒๔)

๖. $\hat{T}_2$ เป็นเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนไรโบโซมไปเท่ากับความกว้าง ๑ ช่วงโคดอน ดังนั้น $\hat{T}_2$ คือเวลาที่ใช้ในการสร้าง transferase 1-GTP-amino acyl tRNA complex, (๒๕ – ๓๐) การสลายตัวของ GTP ให้เป็นพลังงาน (๓๑ – ๓๒) การสร้างเปปไทด์บอนด์ (๓๓) การปล่อย tRNA ที่ใช้กรดอะมิโนไปแล้ว รวมทั้ง translocation ของโคดอนตัวต่อไป

๗. ช่วง $\hat{T}_2$ ถือว่าเท่ากันและใช้ได้เท่ากับโคดอนทุกอันของ mRNA (๓๔)

๘. ในทุกช่วงเวลา $1\hat{T}_2$ ไรโบโซมแต่ละตัวจะเคลื่อนที่ไปตาม mRNA เป็นระยะเท่ากับ ๑ ความกว้างของไรโบโซม

๙. เมื่อถึงระยะสุดท้าย (termination point) คือมาถึงโคดอนตัวสุดท้าย ไรโบโซมจะใช้เวลาอยู่ที่ตำแหน่งนี้เท่ากับ T_3 (termination time) เวลา T_3 นี้ใช้สำหรับปฏิกริยาตัวสุดท้ายที่มีแบบการต่างๆ คือ ไรโบโซมจะหลุดจากโคดอนสุดท้ายและปล่อยให้โมเลกุลของโปรตีนที่สร้างเสร็จแล้วหลุดออกมาเป็นอิสระ (๓๕)

๑๐. ให้ถือว่าจำนวนกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดมีจำนวนมาก จนกระทั่งเมื่อมีการรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนแล้วจะไม่ทำให้อัตราการใช้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ ค่า p(t) ที่หามาจะใช้ได้ทั้งในภาวะปกติและในภาวะผิดปกติ

ข. พิสัยของค่า T_1, T_2, T_3 (The range of value for T_1 T_2 and T_3)

๑. โปรตีนในตับซึ่งมีจำนวนอะมิโน ๑๕๐ ถึง ๒๐๐ ตัวต่อ ๑ โมเลกุล แต่ละโมเลกุลใช้เวลาสร้างจนสมบูรณ์เฉลี่ยประมาณ ๓ – ๔ นาที ต่อโมเลกุล (๓๖) (มีน้ำหนักโมเลกุล (M.W.) ๒๐,๐๐๐ – ๒๕,๐๐๐ ดาลตัน) อัตราส่วนเข้ามาของกรด

อะมิโนในระหว่างการเคลื่อนย้าย[๓๔] นั้นเนื่องจากเวลาที่กรดอะมิโนจะเข้ามาในแต่ละตำแหน่งประมาณ ๐.๕ – ๐.๗๕ วินาที ดังนั้นจึงกำหนดเวลาที่ใช้ในการถอดรหัสโคดอนแต่ละตัว (codon decoding time) $\hat{T}_2$ ให้เป็น ๐.๔ – ๒.๕ วินาที และบางครั้งอาจจะถึง ๑๐ วินาที

๒. ไรโบโซมมีความกว้างประมาณ ๘ โคดอน[๒๐] ชี้ให้เห็นว่าช่องเวลาระหว่างที่เกิด initiation complex ๒ อันติดกัน จะต้องไม่เร็วไปกว่า 8 $\hat{T}_2$ ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการสร้าง initiation complex (T_1) จึงกำหนดไว้ระหว่าง ๔ – ๒.๕ วินาที

๓. เพื่อไม่ให้มีการคั่ง (congested) ของไรโบโซมบน mRNA เวลาที่ใช้ในการเคลื่อนไรโบโซมจากตำแหน่งที่ n ไปยังตำแหน่งที่ n+1 ควรอยู่ระหว่าง ๔ – ๒.๕ วินาที ซึ่งเท่ากับ $1\hat{T}_2$ ดังนั้นค่า T_3 จึงต้องน้อยกว่าค่า $1\hat{T}_2$

ค. The Simulation Program

The simulation program[๓๗ – ๓๘] เขียนด้วยภาษาโฟรแทรน 4[๓๙ – ๔๐] โดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ NEAC-SERIES 2200 MODEL 200 ของสถาบันบริการคอมพิวเตอร์จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย โดยออกแบบเลียนสภาพไรโบโซมจับ Labelled amino acid ซึ่งไรโบโซมนี้จะไปเกาะบน mRNA แล้วเคลื่อนไปบน mRNA โปรแกรมจะสร้างตาราง

๑) Labelled amino acid บนไรโบโซม

๒) Labelled amino acid ที่ปล่อยออกมาเป็น nascent protein ;

๓) fraction concentration of labelled amino acid ;

๔) จำนวนไรโบโซมบน mRNA

Parameter ที่อ่านเข้าในโปรแกรมได้แก่

๑) ค่าคงที่ต่างๆ ได้แก่ A, A_0, B_1, C_1, TAU

๒) เวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเลียนสภาพ (นาที)

๓) เวลาที่เปลี่ยนไปทีละเท่าไร (time advanced)

๔) เวลาที่ไรโบโซมแต่ละอันจะมาเกาะกับ mRNA = T_1 (นาที)

๕) เวลาที่ไรโบโซมแต่ละอันจะเคลื่อนที่ไปจนตลอดความยาวของ mRNA = T_2 (นาที)

๖) เวลาที่ไรโบโซมจะหลุดออกมาจาก mRNA และปล่อยโปรตีนออกมา = T_3 (นาที)

๗) ความยาวของ mRNA = L

๘) ความกว้างของไรโบโซม = l

ซึ่งการทำงานของโปรแกรมนั้นอธิบายอยู่ในแผนผังแสดงลำดับขั้นการทำงาน (FLOW CHART OUTLINING THE PROGRAM) ในภาคผนวก (APPENDIX)

๓.๔ ขั้นตอนที่จะวิเคราะห์ p(t) (๔๑ – ๔๕)

ความหมาย

total aa : จำนวนกรดอะมิโนอิสระที่สามารถนำมาใช้สังเคราะห์โปรตีนได้ โดยนับรวมทั้งที่มีสารกัมมันตรังสีและไม่มีสารกัมมันตรังสี ถือว่ามีจำนวนคงที่ = x

aa^* : จำนวนกรดอะมิโนที่มีสารกัมมันตรังสี ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามเวลาที่ผ่านไป = Y_t

m : อัตราการใช้กรดอะมิโนในการสังเคราะห์โปรตีนในสภาวะคงที่ (steady state) จะมีค่าคงที่ (จำนวนกรดอะมิโนที่ใช้ / หน่วยเวลา)

t : เวลา

p(t) = สัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีสารกัมมันตรังสีอยู่

$$p(t) = \frac{aa^*}{\text{total aa } (=aa+aa^*)}$$

เวลา = 0 นาที ; $Y(t) = Yo$

เวลา = 1 นาที ; $Y_1 = Yo - m\frac{Yo}{x}$

$Y_1 = Yo\left(\frac{x-m}{x}\right)$

เวลา = 2 นาที ; $Y_2 = Y_1\left(\frac{x-m}{x}\right)$

$Y_2 = Yo\left(\frac{x-m}{x}\right)^2$

เวลา = 3 นาที ; $Y_3 = Y_2\left(\frac{x-m}{x}\right)$

$Y_3 = Yo\left(\frac{x-m}{x}\right)^3$

เวลา = n นาที ; $Y_n = Yo\left(\frac{x-m}{x}\right)^n$; $x > m$; $\frac{x-m}{x} < 1$

นั้นคือเวลา = t นาที ; $Y_t = Yo\left(\frac{x-m}{x}\right)^t$

แต่ $p(t) = \frac{aa^*}{aa+aa^*}$

$= \frac{Y_t}{x}$

นั้นคือ $p(t) = \frac{Yo}{x}\left(\frac{x-m}{x}\right)^t$ (1)

เนื่องจาก x คงที่และ m คงที่

$\therefore \frac{x-m}{x}$ ก็คงที่ด้วย ซึ่งให้เท่ากับ Q; $Q < 1$

$\therefore \left(\frac{x-m}{x}\right)^t = Q^t$ (2)

ให้ $Q^t = e^a$ (3)

$\therefore t \ln Q = a$ (4)

เนื่องจาก $Q < 1$; และมีค่าคงที่ ดังนั้น $\ln Q$ จึงคงที่และมีค่าเป็นลบ

นั้นคือให้ $\ln Q = -\frac{1}{\gamma}$ (5)

แทนค่า (2) ใน (1)

$$p(t) = \frac{Yo}{x} Q^{t} \qquad (6)$$

แทนค่า (3) ใน (6)

$$p(t) = \frac{Yo}{x} e^{a}$$

ให้ $\frac{Yo}{x} = Ao$;

$$p(t) = Ao.e^{a} \qquad (7)$$

แทนค่า (4) ใน (7)

$$p(t) = Ao.e^{t\ln Q} \qquad (8)$$

แทนค่า (5) ใน (8)

$$p(t) = Ao.e^{t} \qquad (9)$$

ในภาวะปกติ (NON CONGESTED CASE)

ความสัมพันธ์กันระหว่างอัตราการเข้าของไรโบโซม ($\frac{1}{T_1}$) กับอัตราการที่ไรโบโซมเคลื่อนที่ไปบน mRNA ($\frac{1}{T_2}$) และกับอัตราการที่ไรโบโซมหลุดออกไปจาก mRNA ($\frac{1}{T_3}$) ภาวะปกตินี้

$\frac{1}{T_1} \leqslant \frac{1}{l\hat{T}_2} \leqslant \frac{1}{T_3}$ เมื่อ l เป็นความกว้างของไรโบโซมบน mRNA

หรือ $T_1 \geqslant l\hat{T}_2 \geqslant T_3$

ในภาวะผิดปกติ (CONGESTED CASE)

ในกรณีนี้อัตราการเข้าไรโบโซม ($\frac{1}{T_1}$) จะต้องมากกว่าอัตราการเคลื่อนที่ของไรโบโซม mRNA ($\frac{1}{\hat{T}_2}$) และก็จะต้องมากกว่าการที่ไรโบโซมหลุดออกไปจาก mRNA ($\frac{1}{T_3}$)

นั้นคือ $\frac{1}{T_1} > \frac{1}{1\hat{T}_2} > \frac{1}{T_3}$ เมื่อ 1 เป็นความกว้างของไรโบโซมบน mRNA

หรือ $T_1 < 1\hat{T}_2 < T_3$

ในภาวะผิดปกตินี้ค่า $1\hat{T}_2$ จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนเท่ากับ T_3 ดังสมการ (10)

$$1\hat{T}_{2new} = 1\hat{T}_2 + (T_3 - 1\hat{T}_2)\frac{(1 - e^{-\frac{t}{t_x}})}{(1 - e^{-1})} \qquad (10)$$

t = เวลา

t_x = เวลาที่ใช้ในการคงที่ $1\hat{T}_2$ จะเพิ่มจนเท่ากับ T_3 หรือเวลาตั้งแต่เริ่มต้นดั่งจากสภาวะคงที่ (steady state) ไปจนถึงสภาวะคงที่ใหม่ (max congest)

$$t_x = \frac{\text{จำนวน space ที่ available สำหรับไรโบโซมบน mRNA}}{\text{net rate of input of ribosome}}$$

$$t = \frac{Nmax - N(t)\text{steady state}}{\frac{1}{T_{1\text{original}}} - \frac{1}{T_{3\text{congested}}}} \qquad (11)$$

๓.๕ ขั้นตอนที่ใช้ในการวิเคราะห์ $N(t)$ (๔๑ - ๔๕)

$N(t)$ คือจำนวนไรโบโซมบน mRNA ที่เวลา t

ความสัมพันธ์ของ $N(t)$

จำนวนไรโบโซมบน mRNA ที่เวลา t นั้นจะแปรผันตามผลต่างระหว่างจำนวน (อัตรา x เวลา) การเข้าและจำนวน (อัตรา x เวลา) การออกของไรโบโซม, ความยาวของ mRNA และเวลาถอดรหัสโคดอน

นั้นคือ $N(t) \propto \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_o}\right)t$

$N(T) \propto L$

$$N(t) \propto \hat{T}_2$$

$$N(t) = a.L.T_2\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_o}\right) t$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = a.L.T_2\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_o}\right) \qquad (12)$$

เมื่อ a > o เป็น coefficient of proportionality Integrating equation (12) จะได้

$$N(t) = a.L.T_2\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_o}\right)t + No \qquad (13)$$

No = N(t) steady state

$$No = \frac{T_2}{T_1}$$

$$= \frac{L.\hat{T}_2}{T_1}$$

Nmax = จำนวนไรโบโซมที่มากที่สุดบน mRNA

$$Nmax = \frac{L}{l}$$

นั้นคือ $$t_{crit} = \frac{Nmax - No}{a.L.\hat{T}_2\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_o}\right)}$$

ถ้า $o < t < t_{crit}$;

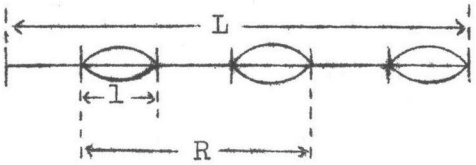
แทนค่า N_o ในสมการ (13)

$$N(t) = a.L.\hat{T}_2\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_o}\right)t + \frac{\hat{T}_2.L}{T_1} \qquad (14)$$

ถ้า $t \geq t_{crit}$;

$$N(t) = \frac{L}{l} \qquad (15)$$

หาค่า T_o ;



ถ้า $R\hat{T}_2 \geq T_3$ ให้ $T_o = R\hat{T}_2$

แต่ $$R = \frac{L}{N(t)_{steady\ state}}$$

$$N(t)_{ss} = \frac{T_2}{T_1}$$

$$= \frac{L.\hat{T}_2}{T_1}$$

$$R = \frac{T_1}{\hat{T}_2}$$

$$T_o = T_1$$

นั่นคือถ้า $RT_2 \geq T_3$ ให้ $T_o = T_1$

และถ้า $RT_2 < T_3$ ให้ $T_o = T_3$

๓.๖ ขั้นตอนที่ใช้ในการวิเคราะห์ B(t)[๔๑ - ๔๕]

B(t) คือจำนวน Labelled amino acid บนไรโบโซมที่อยู่บน mRNA ที่เวลา t

อัตราการใช้ Labelled amino acid (aa^*)

จำนวน aa^* ที่ลดจาก pool = จำนวน aa^* ที่เข้าไปในโปลี่ไรโบโซม

= Bin (16)

จำนวน aa^* ที่เข้าในโปลี่ไรโบโซมที่เวลา t

= จำนวน aa ทั้งหมดที่เข้าในโปลี่ไรโบโซมที่เวลา

t x p(t) (17)

จำนวน aa^* บนไรโบโซมตัวสุดท้ายที่จะหลุดออกไปใน cell sap

= Bout (18)

อัตรา aa^* ที่เข้าในโปลี่ไรโบโซมที่เวลา t

= อัตรา aa^* ที่เข้าในโปลี่ไรโบโซม

- อัตรา aa^* บนไรโบโซมตัวสุดท้ายหลุดออกไป

นั้นคือ

$$\frac{dB(t)}{dt} = \frac{dBin(t)}{dt} - \frac{dBout(t)}{dt} \quad (19)$$

จำนวน aa ที่เข้าโปลี่ไรโบโซม = aa ที่เข้าที่ initiation + aa ที่เข้าที่ elongation (20)

อัตรา aa ที่เข้าโปลี่ไรโบโซม = อัตรา aa ที่เข้าที่ initiation

+ อัตรา aa ที่เข้าที่ elongation

นั้นคือ

$$\frac{dBin(t)}{dt} = \frac{dBin(t)init}{dt} + \frac{dBin(t)elong}{dt} \qquad (21)$$

aa ที่เข้าระยะ initiation $\propto$ อัตราการเกิด initiation step x time x จำนวน aa ที่เข้าไปในแต่ละ initiation

$$\propto \frac{1}{x} \text{ x time x } 1$$

aa ที่เข้าระยะ elongation $\propto$ อัตราการมี elongation x time x จำนวน aa ที่เข้าบนโปลี่ไรโบโซมในการเคลื่อนที่ของไรโบโซมแต่ละครั้ง (เท่ากับจำนวนไรโบโซมบน mRNA ในขณะนั้น ถ้าคาดคิดว่าไรโบโซมแต่ละตัวเคลื่อนที่ไปพร้อมกัน)

$$\propto \frac{1}{\hat{T}_2} \text{ x } N(t) \text{ x time}$$

aa ทั้งหมดที่เข้าโปลี่ไรโบโซม $\propto$ $\text{time}\left(\frac{1}{T_1} + \frac{N(t)}{\hat{T}_2}\right)$

จาก (17) นั่นคือ

อัตรา aa* ที่เข้าในโปลี่ไรโบโซมที่เวลา t

$$= \text{time}\left(\frac{1}{T_1} + \frac{N(t)}{\hat{T}_2}\right)p(t)$$

อัตราการเข้าของ aa* $\propto \frac{dBin(t)}{dt}$

$$\therefore \quad \frac{dBin(t)}{dt} = time\left(\frac{1}{T_1} + \frac{N(t)}{\hat{T}_2} \right) p(t)$$

b_1 = constant ;

$$\frac{dBin(t)}{dt} = b_1 . p(t) \left(\frac{1}{T_1} + \frac{N(t)}{\hat{T}_2} \right) \qquad (22)$$

ความสัมพันธ์ของ B(t)

จำนวน Labelled amino acid ที่ลดจากไรโบโซมขึ้นอยู่กับจำนวน Labelled amino acid บนไรโบโซมตัวสุดท้ายที่ปลาย 3′ และอัตราการหลุดออกไป $\left(\frac{1}{T_3} \right)$

นั้นคือ

$$B_{out}(t) \propto B(t)$$

$$B_{out}(t) \propto \frac{1}{T_3}$$

c_1 = constant ;

$$\frac{dB_{out}(t)}{dt} = c_1 . \frac{B(t)}{T_3} \qquad (23)$$

นำค่าจาก (22), (23) แทนใน (19)

$$\frac{dB(t)}{dt} = b_1 . p(t) \left(\frac{1}{T_1} + \frac{N(t)}{\hat{T}_2} \right) - c_1 \frac{B(t)}{T_3} \qquad (24)$$

นำค่า p(t) จาก (๐) แทนใน (24)

$$\frac{dB(t)}{dt} = b_1 . A_o . e^{\frac{-t}{\tau}} \left(\frac{1}{T_1} + \frac{N(t)}{\hat{T}_2} \right) - c_1 \frac{B(t)}{T_3} \qquad (25)$$

ให้

$$A_1 = b_1 \cdot A_o \frac{1}{T_1} + \frac{N(t)}{\hat{T}_2}$$

$$A_2 = \frac{c_1}{T_3}$$

หอสมุดกลาง

นำค่า A_1, A_2 แทนใน (25) ;

$$\frac{dB(t)}{dt} = A_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} - A_2 \cdot B(t) \qquad (26)$$

จาก general formular of differential equation ;

$$y' + Py = Q \qquad (27)$$

นำค่า (26) เทียบกับ (27)

$$y' = \frac{dB(t)}{dt}$$

$$y = B(t)$$

$$P = A_2$$

$$Q = A_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$$

แทนค่าต่างๆ ใน (27)

$$\frac{dB(t)}{dt} + A_2 \cdot B(t) = A_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \qquad (28)$$

จากสูตร ; $$Y = 1^{-\int pdx}\left\{ Qe^{\int pdx} dx + C \right\}$$

ให้ $dx = dt$;

นั้นคือ $$e^{\int pdx} = e^{\int A_2 dt}$$

$$= e^{A_2 t}$$

$$Qe^{\int pdx} = A_1 \cdot e^{-\frac{t}{q}} \cdot e^{A_2 t}$$

$$= A_1 \cdot e^{A_2 t - \frac{t}{q}}$$

$$= A_1 \cdot e^{\left(A_2 - \frac{1}{q}\right) t}$$

$$\int Qe^{\int pdx} dx = \int A_1 \cdot e^{\left(A_2 - \frac{1}{q}\right) t} dt$$

$$= \frac{A_1 \cdot e^{\left(A_2 - \frac{1}{q}\right) t}}{A_2 - \frac{1}{q}}$$

$$Y = \frac{e^{-A_2 t} \cdot A_1 \cdot e^{\left(A_2 - \frac{1}{q}\right) t}}{A_2 - \frac{1}{q}} + C$$

$$Y = \frac{e^{-A_2 t} \cdot A_1^{A_2 t} \cdot e^{-\frac{t}{q}}}{A_2 - \frac{1}{q}} + C \cdot e^{-A_2 t}$$

$$Y = \frac{A_1 \cdot e^{-\frac{t}{q}}}{A_2 - \frac{1}{q}} + C \cdot e^{-A_2 t}$$

นั้นคือ $$B(t) = \frac{A_1}{A_2 - \frac{1}{\tau}} e^{-\frac{t}{\tau}} + C.e^{-A_2 t} \qquad (29)$$

B(t) คือจำนวน Labelled amino acid บนโปลี่ไรโบโซมที่เวลา t ณะนั้นใน
สภาวะที่ t = 0 ; B(t) = 0

แทนค่าใน (29)

$$0 = \frac{A_1}{A_2 - \frac{1}{\tau}} e^{0} + C.e^{0}$$

$$C = - \frac{A_1}{A_2 - \frac{1}{\tau}}$$

แทนค่า C ใน (29)

$$B(t) = \frac{A_1}{A_2 - \frac{1}{\tau}} e^{-\frac{t}{\tau}} - \frac{A_1}{A_2 - \frac{1}{\tau}} e^{-A_2 t}$$

$$= \frac{A_1}{A_2 - \frac{1}{\tau}} \left(e^{-\frac{t}{\tau}} - e^{-A_2 t} \right)$$

ให้ $$\alpha = \frac{A_1}{A_2 - \frac{1}{\tau}}$$

นั้นคือ $$B(t) = \alpha \left(e^{-\frac{t}{\tau}} - e^{-A_2 t} \right) \qquad (30)$$

๓.๗ ขั้นตอนที่ใช้ในการวิเคราะห์ C(t)[๔๑ - ๔๕]

C(t) คือจำนวน Labelled amino acid ในโปรตีนที่สมบูรณ์ใน cellular sap ที่เวลา t

นั้นคือ $$dC(t) = dB_{out}(t)$$

$$\int dC(t) = \int dB_{out}(t)$$

$$C(t) = \int dB_{out}(t)$$

จาก $$\frac{dB_{out}(t)}{dt} \propto B(t)$$

และ $$\frac{dB_{out}(t)}{dt} \propto \frac{1}{T_3}$$

$$\therefore \quad \frac{dB_{out}(t)}{dt} = c_1 \frac{B(t)dt}{T_3}$$

นั้นคือ $$C(t) = \int \frac{c_1}{T_3} B(t)dt$$

$$= \frac{c_1}{T_3} \int B(t)dt$$

$$= \frac{c_1}{T_3} \int \propto (e^{-\frac{t}{\tau}} - e^{-A_2 t})dt$$

$$= \propto \frac{c_1}{T_3}\left(-\tau . e^{-\frac{t}{\tau}} + \frac{1}{A_2} . e^{-A_2 t} + \text{const.}\right)$$

แต่เนื่องจากถ้าเวลา t = 0 ค่า C(t) จะต้องเป็น 0 ด้วย

$$\therefore \quad \text{constant} = \tau - \frac{1}{A_2}$$

และ $$A_2 = \frac{c_1}{T_3}$$

$$C(t) = \alpha . A_2 \left(- \tau . e^{-\frac{t}{\tau}} + \frac{1}{A_2} e^{-A_2 t} + \tau - \frac{1}{A_2} \right) \quad (31)$$

๓.๘ วิธีหาค่าตัวคงที่ในสมการจากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ (๔๖ – ๔๗)

๓.๘.๑ วิธีหาค่าตัวคงที่ในสมการ $p(t) = A_o e^{-\frac{t}{\tau}}$

จากสมการบนใส่ In ทั้ง 2 ข้าง :

$$\ln p(t) = \ln A_o - \frac{t}{\tau} \quad (32)$$

จากสมการ (32) จะเห็นได้ว่า $\ln p(t)$ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับเวลา t (linear relation)

ค่า $\ln p(t)$ ซึ่งสัมพันธ์กับ t จะได้จากการทดลองตามข้อ ๓.๑.๓ ซึ่งผลรวมแสดงอยู่ในตารางที่ ๓.๑

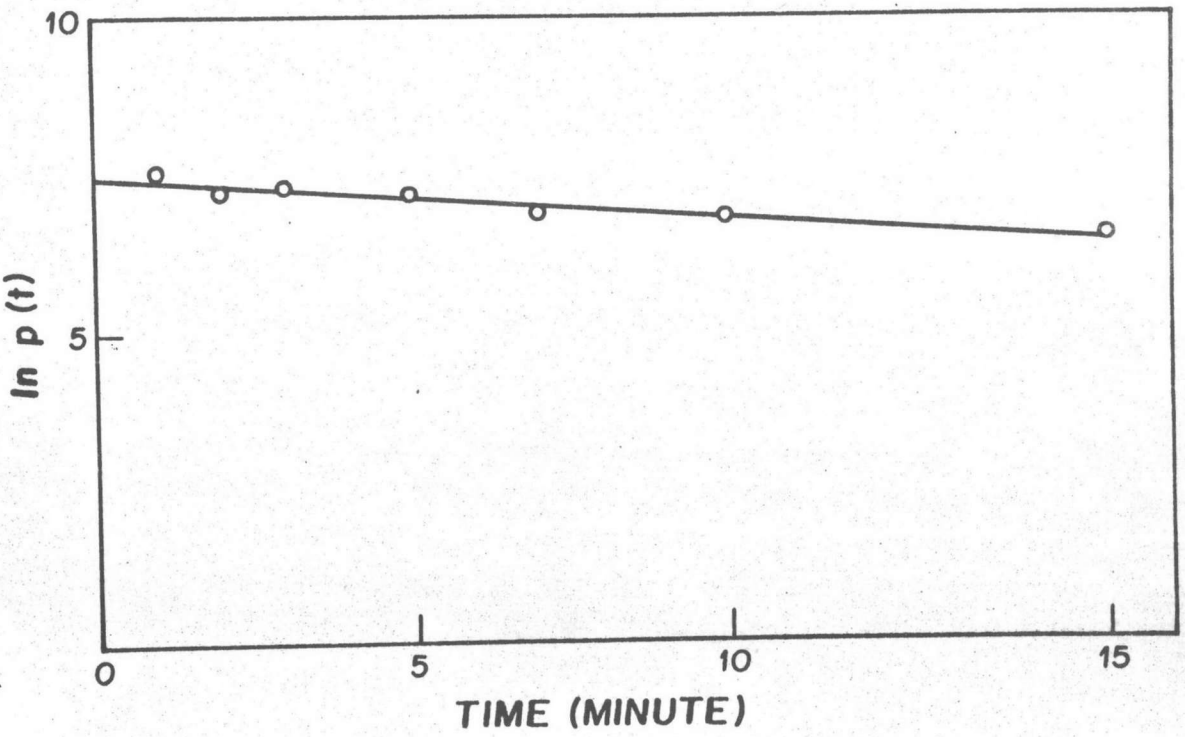
t = เวลา(นาที)	p(t)	ln p(t)
1	1898.47	7.5488
2	1407.41	7.2407
3	1395.08	7.2495
5	1341.45	7.2015
7	941.91	6.8479
10	940.34	6.8072
15	669.89	6.5071

ตารางที่ ๓.๑ แสดงค่า p(t) และหาค่า ln p(t) เมื่อเวลา t

เมื่อนำค่า lnp(t) และ t มาเขียนกราฟ (รูปที่ ๓.๓) ซึ่งจะได้เป็นกราฟเส้นตรง เราจึงทำเป็นสมการเส้นตรงได้ แล้วก็จะหาค่า τ กับ A_0 ได้ค่าตัวคงที่ที่หาได้

$$\tau = 14.776767$$

$$A_0 = 1760.2991$$



รูปที่ 3.3 กราฟเส้นตรงแสดงค่า $ln\ p\ (t)$

๓.๔.๒ วิธีหาค่าตัวคงที่ในสมการ $B(t) = \alpha(e^{-\frac{t}{\tau}} - e^{-A_2 t})$

ค่า B(t) ที่สัมพันธ์กับ t ได้จากการทดลองตามข้อ ๓.๑.๔.๒ ซึ่งแสดงอยู่ในตารางที่ ๓.๒

นำค่า B(t), t และ τ ที่ได้มาแทนค่าในสมการ (30) แล้วคำนวณหาค่า α และ A_2

ค่าคงที่ที่หาได้

α = 6003.2231

A_2 = 6.767

t = เวลา(นาที)	B(t) (dpm/mg protein)
1	171.7
2	111.1
3	103.2
5	84.5
7	73.8
10	65.2
15	64.8

ตารางที่ ๓.๒ แสดงว่า B(t) ตามเวลา t

๓.๘.๓ วิธีหาค่าตัวคงที่ในสมการ $C(t) = \alpha . A_2 \frac{1}{A_2} e^{-A_2 t} - e^{-\frac{t}{\tau}} + \tau - \frac{1}{A_2}$

ค่า C(t) ที่สัมพันธ์กับ t ได้จากการทดลองตามข้อที่ ๓.๑.๔.๑ ซึ่งแสดงอยู่ในตารางที่ ๓.๓

แต่เนื่องจากหาค่า τ, A_0, α และ A_2 ได้จากสมการ (32) และสมการ (30) ได้แล้ว จึงนำค่าต่างๆ มาแทนค่าในสมการ (31) เพื่อจะหาค่า A_1 และ c_1

ค่าคงที่ที่หาได้

A_1 = 40217.55

c_1 = 0.06767

t = เวลา(นาที)	C(t) (dpm/mg protein)
1	29.5
2	68.2
3	95.0
5	121.8
7	139.9
10	141.6
15	171.2

ตารางที่ ๓.๓ แสดงค่า C(t) ตามเวลา t