ليس كل ما يلمع ذهبًا- قصة بروتين فلورسنتي أخضر

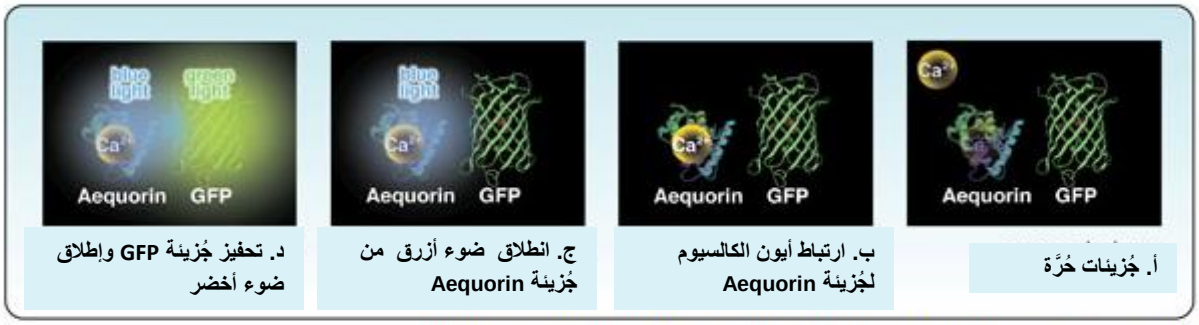
مُقدمة:

مُجمل المعلومات الوراثيّة الموجودة لدى الكائن الحي تُسمّى جينوم (גנום(genome) קישור). بروتيوم פרוטאום(proteome) קישור هو مصطلح يصف كافة البروتينات التي يتمّ التعبير عنها في النسيج أو في الكائن في زمن مُعيّن وفي ظروف مُعيّنة. لدى جميع الكائنات إنْ كانت بسيطة أو مُعقّدة، آلاف البروتينات المُختلفة، التي تعمل كأنّها فرقة موسيقيّة ضخمة وتُراقب عمليّات حيويّة مهمّة للحياة بشكل دقيق وبتلاؤم كبير فيما بينها. عندما لا يعمل أحد هذه البروتينات بشكل سليم فإنَّ ذلك يُمكنْ أنْ يؤدّي إلى مرض مُعيّن. لذلك من المهمّ أيضًا بالإضافة إلى التعرُّف على الجينات ورسم خرائطها، كشف الوظائف المُختلفة للبروتينات في الجسم. لهذا الهدف يبحث الباحثون عن طُرق وأدوات لتأشير البروتينات في الخليّة من أجل تعقّبها. تأشير البروتينات بواسطة بروتين صغير، مثلًا بروتين يُطلق ضوء مرئي ويشكّل وَسْم (إشارة)، يُمكّن الباحثين من النظر إلى الضوء المُنطلق من الوَسْم ورؤيته بالميكروسكوب، هكذا يتمُّ التعرّف على البروتين الموسوم، أي على البروتين الذي يتمّ بحثه. بهذه الطريقة يُمكننا التعرُّف على زمن التعبير عن البروتين وعلى الخلايا التي يتمّ التعبير عنه فيها بالإضافة إلى مُستوى التعبير أيضًا، كذلك نستطيع التعرُّف على مكان البروتين في الخليّة، زمن تغيّر مبنى البروتين، زمن ارتباطه بمادة الأساس (السُبسترات، סובסטרט) קישור أو ببروتين آخر ومعلومات أخرى مُشابهة. الوَسْم – طريقة التأشير- هو في الغالب بروتين صغير يتمّ تشخيص التعبير عنه بواسطة العين بسهولة، مثل إنزيم يقوم بإنتاج ناتج ملوّن أو بروتين يُطلق ضوءً مرئيًا؛ هذه الأمور تُخبِر عن وجود البروتين أو عن التعبير عن البروتين الذي نبحثه والذي يرتبط به الوَسْم في الخليّة أو في الكائن. لذلك يُسمّى الوسم أيضًا جين مُخبِر(أو بروتين مُخبِر) גן (או חלבון) מדווח. קישור تأشير البروتينات بواسطة الجينات المُخبِرة يشُقّ الطريق أمام مُشاهدة عمليّات إضافيّة لم يكن بالإمكان تعقبها من قبل، مثل تنقّل خلايا الدماغ (נדידת תאים במוח) أو انتشار الورم السرطاني.

لأول مرة في سنة 1955 تمَّ التعرُّف على مادة تُطلق ضوءً أخضر لدى قناديل البحر من نوع *Aequorea Victoria* والمُنتشرة في الشاطئ الغربي لشمال أمريكا (الرسم 1).

الرسم 1: ضوء فلورسنتي أخضر ينطلق من قناديل البحر

اهتمّ أوسامو شيمومورا (אוסאמו שימומורה-Osamu Shimomura) كثيرًا بهذه الظاهرة الموجودة لدى قناديل البحر وركَّز اهتمامه على عمليّة انطلاق الضوء الأخضر. في سنوات ال60 نجح أوسامو بعد جهود كبيرة بعزل بروتين يُطلق ضوءً أخضر عندما يتمّ تعريضه لأشعة فوق بنفسجية (UV). بعد مرور سنوات تمَّ اكتشاف الآليّة الجُزيئيّة (מנגנון מולקולרי) التي وراء إطلاق الضوء الأخضر في قناديل البحر:
يتم تحرير أيونات الكالسيوم المرتبطة بجُزيئة تُدعى Aequorin (אאקורין) كردّ فعل على تحفيز (גירוי) مُعيّن، وكنتيجة لذلك ينطلق ضوء أزرق. قِسْم من طاقة اللون الأزرق تنتقل إلى البروتين الذي عُزل من قبل؛ وكنتيجة لانتقال قسْم من طاقة اللون الأزرق يتحوّل إلى بروتين مُحفَّزٍ (מעורר)، أي يحمل فائض من الطاقة بالنسبة لوضعه البدائي؛ يتحرَّر قِسْم من فائض الطاقة على شكل انطلاق ضوء أخضر، ويعود البروتين إلى وضعه البدائيّ (رسم 2). هذه هي العمليّة الفلورسنتيّة، عمليّة فيها تستوعب مادة مُعيّنة أشعة بطول موجة مُعيّن، يتمّ تحفيز هذه المادة وتُطلق أشعة بطول موجة مُختلف، عادة بموجة أطول. لذلك سُمّي البروتين المُشترِك في العمليّة باسم GFP (Green Fluorescent Protein)- بروتين فلورسنتي أخضر.



أ. جُزيئات حُرَّة
ب. ارتباط أيون الكالسيوم لجُزيئة Aequorin
ج. انطلاق ضوء أزرق من جُزيئة Aequorin
د. تحفيز جُزيئة GFP وإطلاق ضوء أخضر

الرسم 2: الآلية الجُزيئيّة المسؤولة عن انطلاق ضوء فلورسنتي أخضر في قناديل البحر

منذ الاكتشاف الأول ل GFP، أدّت سلسلة من التطوّرات الهامّة إلى استعمال واسع للبروتين كأداة مركزيّة في بحث علوم الأحياء. استعمال تكنولوجيا الDNA المؤتلف (ريكومبننتي) קישור والهندسة الوراثيّة קישור مكَّنت الباحثين من ربط بروتين GFP إلى بروتينات مهمّة ولكَّنها عديمة اللون. المُؤشر اللامع، أي، الضوء الأخضر الذي ينطلق من GFP يُخبِر عن المكان، الكميّة ومبنى البروتينات التي يدلّ عليها. أدَّى GFP إلى انقلاب في مجال الأبحاث، وفي سنة 2008 تمَّ منح جائزة نوبل קישור للكيمياء لثلاثة علماء اشتركوا بشكل أساسيّ في عزل GFP، في تحديد مبناه وآليّة عمله، واستعماله كشارة جينيّة مُضيئة لبحث البروتينات، الخلايا والعمليّات البيولوجيّة .

سنتعلّم في هذه الفعاليّة كيف تحوَّلَ GFP إلى أحد الأدوات الأكثر أهميّة في علم الأحياء، بدايةً باستنساخ קישור تسلسل بروتين، ومرورًا بتشخيص مواضع فيه والتي تؤدي الطفرة فيها إلى انطلاق ضوء بأطوال أمواج مُختلفة، أي بألوان مُختلفة: أزرق، أزرق سماوي، أصفر وهكذا، وحتى بحث مبنى البروتين. تضمّ هذه العمليّة المراحل التاليّة:

المهمّة الأولى: تحديد إطار القراءة קישור المفتوح الذي يُشفِّر إلى بروتين GFP.

المهمّة الثانية : تخطيط بادئات קישור من أجل تعزيز التسلسل المُشفِّر واستنساخه في حامل بلاسميدي.

المهمّة الثالثة: مُقارنة تسلسلات קישור بروتينات فلورسنتيّة مُختلفة وتحديد المواقع المُهمّة للون البروتين.

المهمّة الرابعة: النظر إلى المبنى الفراغي קישור لGFP وفحص العلاقة بين مبنى البروتين وأدائه الوظيفي.

للمُعلِّم:

هدف المهمّات التالية هو التمرُّن من جديد على قِسْم من الأدوات البيوإنفورماتيّة التي تعرَّفنا عليها في الوحدات التعليميّة السابقة في البيوإنفورماتيكا.

في المهمّة الأولى نُحدِّد إطار القراءة المفتوح، إطار القراءة الذي بواسطته بإمكاننا استنتاج تسلسل البروتين بمُساعدة الأداة ORF Finder.

في المهمّة الثانية نُصمِّم بادئات (مشارع) تُستعمل في ال PCR لتعزيز التسلسل المُشفِّر، ومن ثُمَّ – استنساخ التسلسل إلى داخل بلاسميد. لهذا الهدف نستعين بالأداة البيوإنفورماتيّة Primer3Plus.

في المهمّة الثالثة نُشخِّص المواضع الموجودة في البروتين والتي تشترك في انطلاق الضوء، من خلال مُقارنة تسلسل GFP مع بروتينات طافرة تُطلق ضوءً بألوان مُختلفة، نقوم بذلك بواسطة الأداة ClustalW.

نفحص في المهمّة الأخيرة المبنى الفراغي لGFP بواسطة أداة عرض المباني ثُلاثيّة الأبعاد، Jmol، ونتعلَّم أي الأجزاء الموجودة في البروتين تمنحه الصفات المُناسبة ليكون بروتينًا مُخبِرًا.

يقوم الطلاب في جميع المهمّات بالتمرُّن على طريقة تشغيل الأداة وعلى الطريقة التي يتمّ فيها تحليل المعلومات الناتجة من كل أداة بيوإنفورماتيّة.

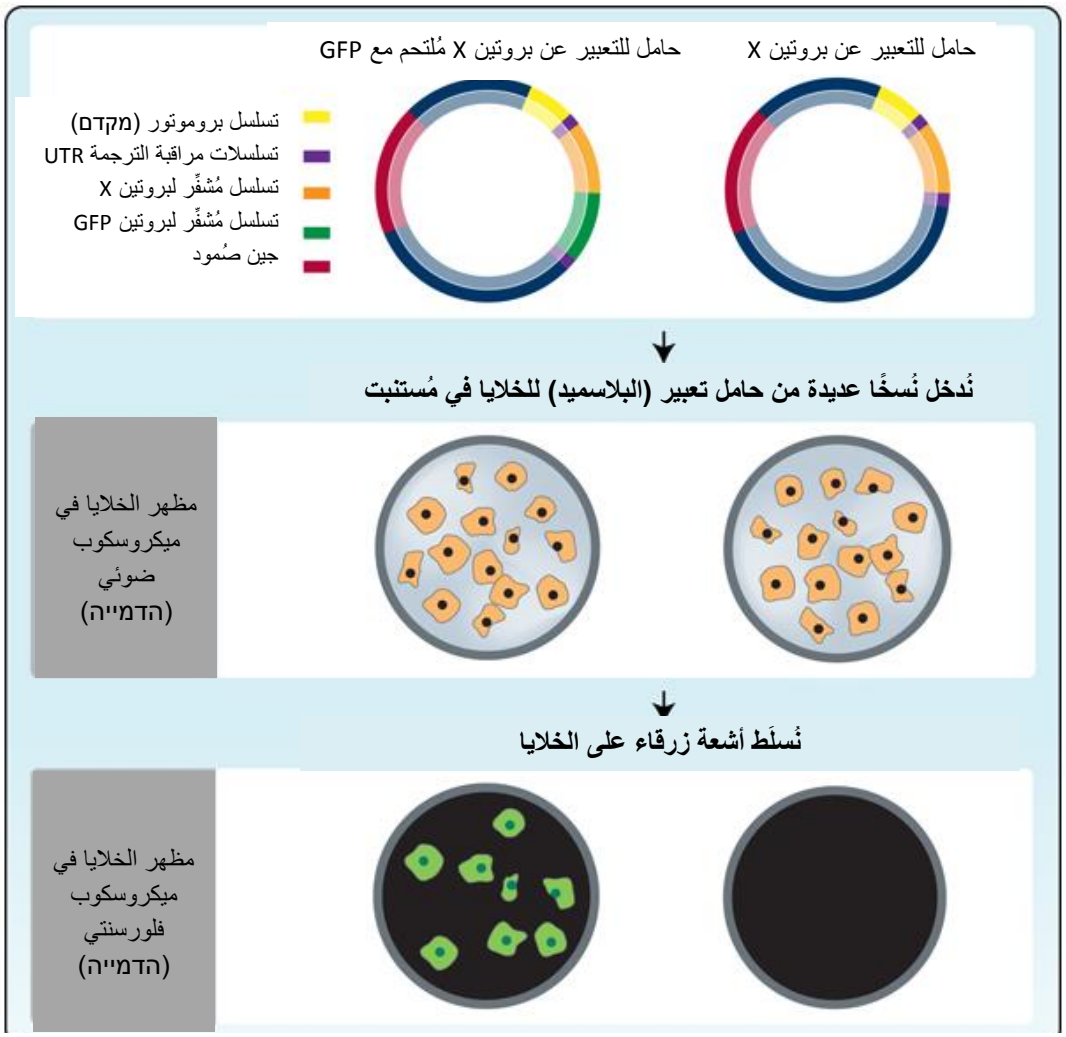
ليس كل ما يلمع ذهبًا- قصة بروتين فلورسنتي أخضر

المهمّة I: تحديد إطار القراءة المفتوح الذي يُشفِّر إلى بروتين GFP (صفحة 1 من 2)

كان داجلس فرشر (Douglas Prasher) أوّل مَنْ فَهِم القدرة الكامنة في GFP. وقد أدَّت فكرته باستعمال GFP كوَسْم لتأشير البروتينات والخلايا إلى انقلاب في مجال البيولوجيا. اعتمد بحثه على أنّه لا يُمكن تعقّب البروتينات لصغرها بالرّغم من أنَّها المُرَكّب الأساسي في الخلايا وتشترك في كل العمليّات الحيويّة فيها. بالمُقابل بإمكاننا تشخيص اللون المُنطلق من GFP بسهولة. إذا كان بإمكاننا ربط البروتين المبحوث مثل الهيموجلوبين من الإنسان، مع GFP، أي إنتاج بروتين مُلتحم (חלבון מאוחה) קישור، عندها اللون الأخضر الذي ينطلق من GFP يشهد ويُخبِر متى ينتج الهيموجلوبين، أين يتواجد في الخليّة وغيرها (الرسم 1). من أجل تحقيق نبوءته في بحث البروتينات بواسطة GFP، فهم داجلس فرشر أنَّ عليه التركيز على الجينات لأنَّها هي التي تُشفِّر إلى البروتينات. طَمِح فرشر إلى عزل الجين المُشفِّر إلى GFP من قنديل البحر وتشخيص التسلسل المُشفِّر له קישור، أي إيجاد إطار القراءة المفتوح קישור. بعدها بإمكانه بطرق الهندسة الوراثيّة أنْ يربط بين التسلسل المُشفِّر ل GFP وتسلسل جين آخر يُشفِّر إلى البروتين الذي نبحثه داخل بلاسميد קישור. من هذا البلاسميد تنتج بعملية النسخ קישור(תעתוק) جُزيئة mRNA קישור واحدة طويلة تُشفِّر إلى البروتين الذي نبحثه والمُلتحم مع GFP. اللون الأخضر يدلّ على وجود البروتين المُلتحم – وعلى التعبير عنه، مكانه في الخليّة وغيرها. هكذا نشأت فكرة استعمال GFP كجين أو بروتين مُخبِر קישור.

للمُعلم:

يجب الانتباه إلى أنه تمّ في هذه العملية عزل البروتين بطرق بيوكيماويّة في سنوات ال 60 على يد الباحث اوسامو شيمومورا، وفقط بعد سنوات عديدة، عمليًا في سنوات ال 90، عُزل الجين من قبل الباحث داجلس فرشر. هذا الأمر مُميّز للنصف الثاني للقرن العشرين، ويُبرز الطرق الشائعة في كل فترة .



الرسم 1: استعمال GFP مُلتحم مع البروتين الذي نبحثه يؤدّي إلى تأشير الخلايا التي تُعبّر عنه

لدى الباحث سبط (نسيلة أو سُلالة) من مكتبة وفيه تسلسل ال DNA المُشفِّر لبروتين GFP. حتى هذه المرحلة لم يكُن مفهومًا إذا كان مصدر السبط هو من مكتبة جينوميّة קישור أو مكتبة DNA مُكمِّل (ספריית DNA משלים).

قام الباحث بتحديد تسلسل المُدخل، وعليه أيضًا تحديد إطار القراءة المفتوح، أي تحديد التسلسل المُشفِّر لGFP.

هدف المهمّة هو تحديد إطار القراءة المفتوح في تسلسل نوكلوئتيدات وتحديد التسلسل المُشفِّر فقط من أجل استنساخه. نُشخِّص في إطار القراءة المفتوح حُدود التسلسل المُشفِّر، أي مكان كودون بداية الترجمة وكودون وقف الترجمة، ونُحدِّد تسلسل الأحماض الامينيّة للبروتين بمُساعدة الأداة ORF Finder.

للمُعلِّم:

تهدف المَهمّة إلى التمرّن من جديد على استعمال الأداة البيوإنفورماتيّة ORF Finder من أجل تحديد إطار القراءة المفتوح المُمكن في تسلسل نوكلوئتيدات مُعطى. كذلك التمرُّن على طريقة تحليل صفحة النتائج وتحديد التسلسل المُشفِّر الأكثر احتمالًا وحدوده.

ليس كل ما يلمع ذهبًا- قصة بروتين فلورسنتي أخضر

المهمّة 1: تحديد إطار القراءة المفتوح الذي يُشفِّر إلى بروتين GFP (صفحة 2 من 2)

علينا تحديد التسلسل المُشفِّر في إطار القراءة المفتوح الموجود في تسلسل النوكلوئتيدات קישור الذي بحوزتنا، لهذا الهدف نستعين بالأداة ORF Finder. نُنفِّذ المراحل التالية:

1. نَدخل الصفحة الرئيسيّة لموقع NCBI קישור

2. نجد الأداة ORF Finder تحت الرابط Resource List (A-Z) تحت الحرف O، نضغط على الرابط لفتح واجهة الأداة (ממשק הכלי).

3. ننسخ تسلسل GFP קישור، نُلصقه في النافذة المناسبة ونضغط على الزر "OrfFind" لتحديد أُطر القراءة المُمكنة.

1. ما هو عدد أُطر القراءة المُمكنة لتسلسل DNA (من ناحية نظرية)؟

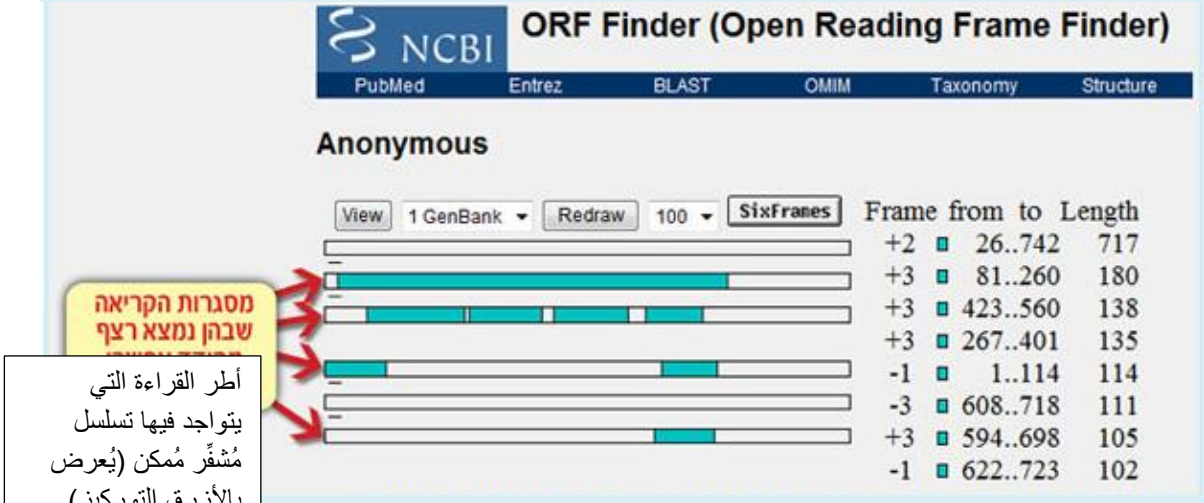
- أ. 1
- ب. 3
- ج. 4
- د. 6

الإجابة هي: د. لكل تسلسل DNA يوجد 6 أُطر قراءة مُمكنة: 3 أُطر من كل جديلة

2. ما هو عدد أُطر القراءة التي تحوي تسلسل مُشفِّر مُمكن؟ (أي في كم إطار قراءة وُجد إطار قراءة مفتوح مُمكن؟)

- أ. 1
- ب. 3
- ج. 4
- د. 6

الإجابة هي: ج. الأداة ORF Finder تقوم بعمليّة مسح على امتداد كل أطر القراءة وتشير فيها إلى تسلسلات مُشفِّرة مُمكنة، من كودون بداية ترجمة وحتى كودون وقف الترجمة، أي إلى أُطر قراءة مفتوحة مُمكنة. يُعرض التسلسل المُشفِّر المُمكن بلون أزرق توركيز (أزرق فيروزي). في أُطر القراءة 2+, 3+, 1- و 3- يوجد على الأقل تسلسل مُشفِّر مُمكن واحد (شاشة 1). عمليًا، في أُطر القراءة 3+ و 1- وَجدت الأداة عددًا من التسلسلات المُشفِّرة المُمكنة..

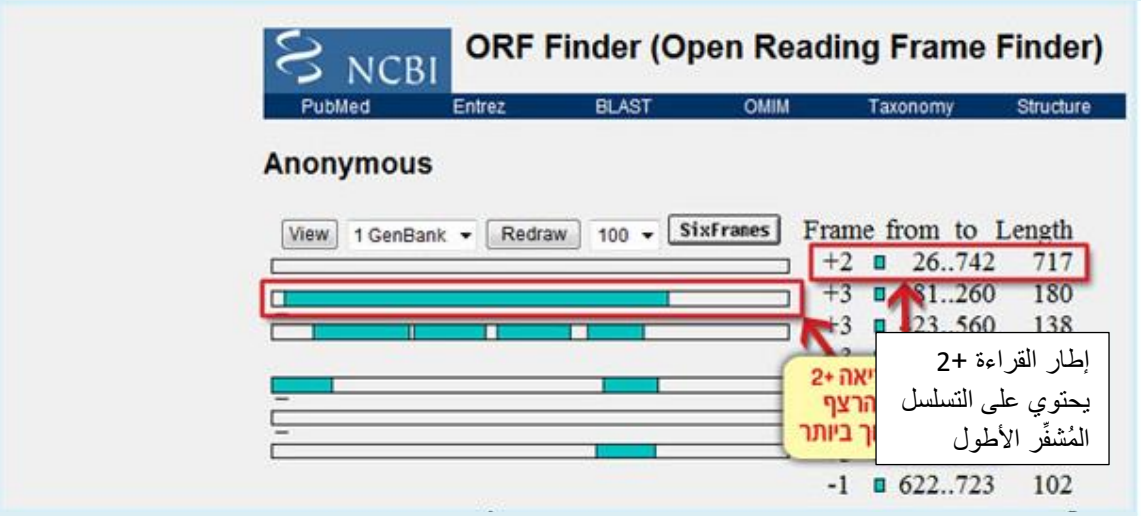


شاشة 1: صفحة النتائج وفيها تفاصيل التسلسلات المُشفَرة المُمكنة في كل أطر القراءة

3. أي إطار من أُطر القراءة التي وجدتها هو الإطار ذو الاحتمال الأكبر ليقوم بالتشفير إلى البروتين؟

- أ. 2+، لأنَّ هذا الإطار يحتوي على التسلسل المُشفِّر الأطول.
- ب. 3+، لأنَّ هذا الإطار يحتوي على عدَّة تسلسلات مُشفِّرة مُمكنة.
- ج. 1-، لأنَّ هذا الإطار يحتوي على تسلسل مُشفِّر مُمكن من النوكلوئتيد الأقرب إلى الجهة اليُسرى.
- د. 2-، لأنَّه في هذا الإطار تتمّ قراءة التسلسل من البداية وحتى النهاية بدون أي تشويش، حيث لا يتواجد مُستطيل بلون أزرق توركيز داخل المُستطيل الأبيض.

الإجابة هي: أ. إطار القراءة المفتوح الأكثر احتمالًا هو على الأغلب الذي يحتوي على التسلسل المُشفِّر المُمكن الأطول. وهو الإطار الأول الذي يظهر في الجهة اليُمنى من صفحة النتائج (شاشة 2).



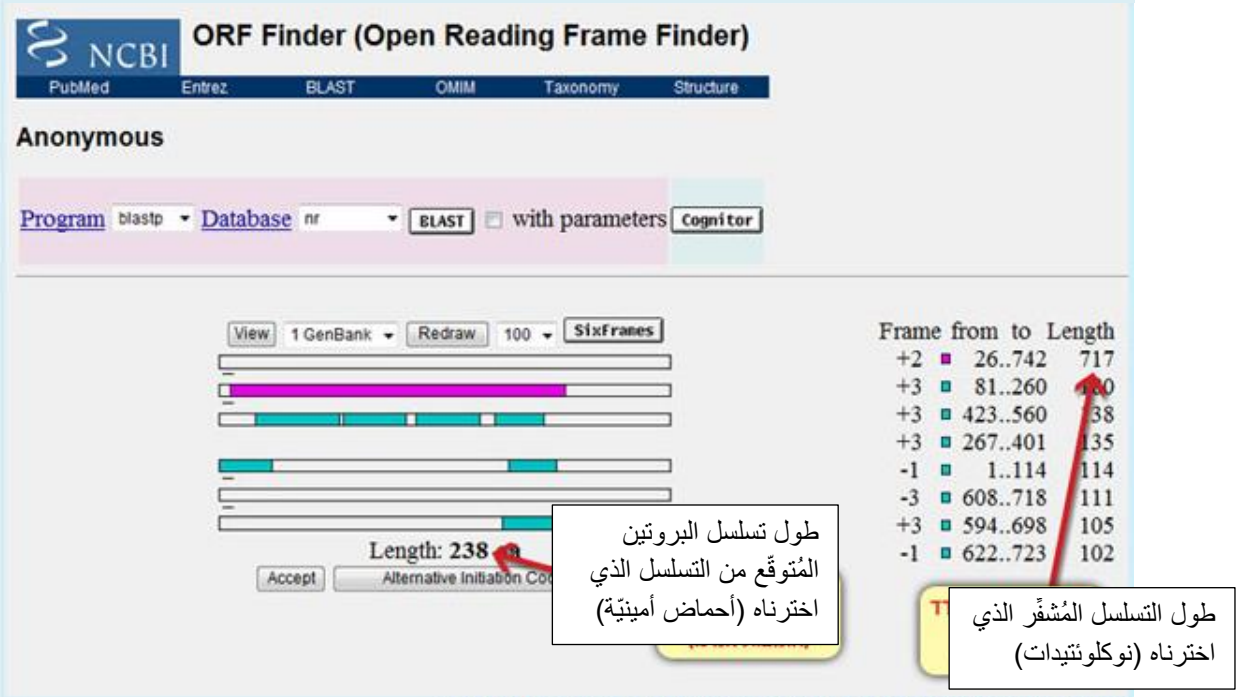
شاشة 2: صفحة النتائج وفيها تفاصيل التسلسلات المُشفَرة المُمكنة في كل أطر القراءة

نختار التسلسل المُشفِّر الأطول بواسطة الضغط على إشارة التسلسل المُشفِّر في إطار القراءة 2+ (مُستطيل أزرق توركيز في إطار القراءة من الجهة اليُسرى أو المربع الأزرق التوركيز الأعلى من الجهة اليُمنى).

4. ما هو طول البروتين المتوقّع من هذا الإطار؟

- أ. 717 نوكلوئتيد.
- ب. 717 حامض أميني. קישור
- ج. 238 حامض أميني.
- د. 742 حامض أميني.

الإجابة هي: ج. طول التسلسل المُشفِّر هو 717 نوكلوئتيد، وطول البروتين المُتوقّع هو 238 حامض أميني (شاشة 3)

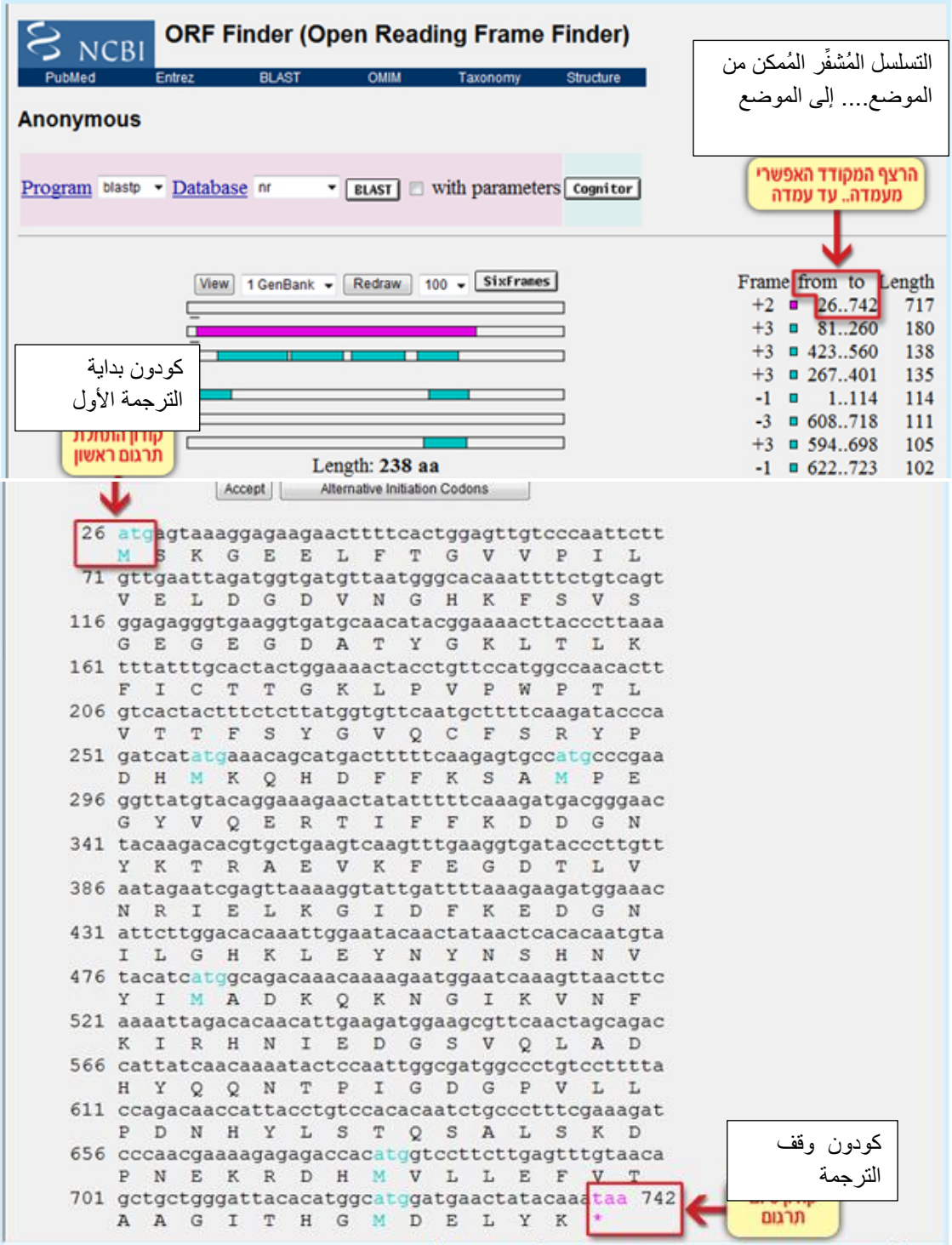


شاشة 3: تفاصيل التسلسل المُشفَر في إطار القراءة 2+ وتسلسل البروتين المُتوقّع

5. ما هي مواضع التسلسل المُشفِّر، من كودون بداية الترجمة **كيشور** الأول وحتى كودون وقف الترجمة **كيشور**؟

- أ. المواضع 742 -26 في التسلسل .
- ب. المواضع 717-26 في التسلسل.
- ج. المواضع 701-26 في التسلسل.
- د. كل التسلسل، من الموضع الأول وحتى الموضع الأخير.

الإجابة هي: أ. في التسلسل المُشفَّر الأطول يوجد عدة كودونات بداية ترجمة مُمكنة. الأول من بينها يبدأ في الموضع 26. التسلسل يُترجم بثُلاثيات من كودون بداية الترجمة الأول وحتى كودون وقف الترجمة الذي ينتهي في الموضع 742(الشاشة 4).



الشاشة 4: تفاصيل التسلسل المُشفَّر في إطار القراءة 2+ وتسلسل البروتين المُتوقّع.

6. كم كودون بداية ترجمة مُمكن وكم كودون وقف ترجمة مُمكن يتواجد في إطار القراءة المفتوح الأكثر احتمالًا والتي تمّ تشخيصها بواسطة الأداة ORF Finder؟

- أ. كودون بداية ترجمة واحد وكودون وقف ترجمة واحد.
- ب. كودون بداية ترجمة واحد وعدَّة كودونات وقف ترجمة.
- ج. عدَّة كودونات بداية ترجمة وكودون وقف ترجمة واحد.
- د. عدَّة كودونات بداية ترجمة وعدَّة كودونات وقف ترجمة.

الإجابة هي: ج. إطار القراءة المفتوح مُعرَّف كتسلسل يبدأ بكودون بداية ترجمة وينتهي بكودون وقف ترجمة. إذا شخّصت الأداة إطار قراءة مفتوح يظهر فيه كودون بداية ترجمة عدة مرات، لا تستطيع الأداة التعرُّف على كودون البداية الصحيح، ويُشار إلى جميعها بلون أزرق توركيز. عادة يكون كودون واحد من بين هذه الكودونات هو الكودون الصحيح، ومنه تبدأ الترجمة في الريبوزوم. الريبوزوم يقرأ ال mRNA بثُلاثيات، تتوقف الترجمة عند الوصول إلى كودون وقف الترجمة الأول الموجود في إطار القراءة المفتوح، بعد كودون بداية الترجمة. كودون وقف الترجمة ملوّن باللون الزهريّ. يجب أنْ نتذكَّر أنَّ الأداة تعرض أيضًا تسلسل مُشفِّر مُمكن والذي لا يضمّ كودون بداية ترجمة، بافتراض أنَّ هذا الكودون موجود قبل التسلسل الذي زوّدناه؛ في بعض الأحيان نرى تسلسل مُشفِّر مُمكن لا يحتوي على كودون نهاية ترجمة، على افتراض أنَّ هذا الكودون موجود بعد التسلسل الذي زوّدناه. في هذه الحالات يجب أنْ نتأكَّد أنَّ الكودونات الناقصة موجودة بالفعل في تتمّة التسلسل، وفي حال لم تتواجد هذه الكودونات فلا يوجد لهذه التسلسلات أي معنى. مثلًا: التسلسل المُشفِّر المُمكن من جهة اليسار في إطار القراءة 1- ينقصه كودون بداية ترجمة وكودون وقف ترجمة.

7. في بعض الأحيان تُشير الأداة في تسلسل مُشفِّر مُمكن إلى عدَّة كودونات بداية ترجمة، كما لاحظنا في هذا المثال. أي معلومات تلزمك من أجل التعرُّف على كودون بداية الترجمة الصحيح؟

للمُعلِّم: نظريًا، في تسلسل مُشفِّر مُحتمل يُمكن أنْ تبدأ الترجمة في أحد كودونات بداية الترجمة المُمكنة. للأداة ORF Finder لا توجد إمكانيّة لتحديد كودون بداية الترجمة الذي تبدأ منه الترجمة بشكل فعليّ. غالبًا يوجد لكل بروتين كودون بداية ترجمة مُعيّن تبدأ منه عمليّة الترجمة. تسلسلات التعاقب الإجماعي (consensus sequence- רצפי הסכמה) في ال mRNA تُساعد على ارتباط ال mRNA إلى الريبوزوم في موضع مُعيّن وتحدِّد مَنْ هو كودون بداية الترجمة الذي تبدأ منه الترجمة. في الكائنات حقيقيّة النواة تُسمّى هذه التسلسلات تسلسلات كوزاك (Kozak)، وفي الكائنات غير حقيقية النواة تُسمّى تسلسلات شاين دالجرنو(-Shine Delgarno)، على اسم مُكتشفيهم. توجد حالات وأوضاع تبدأ فيها الترجمة بكودون بداية ترجمة بديل، وهو ليس كودون بداية الترجمة الذي تبدأ منه الترجمة عادةً، ممّا يؤدّي إلى إنتاج بروتين بطول مُختلف وأحيانًا ذا تسلسل مُختلف أيضًا. هذه طريقة إضافيّة نحصل فيها على تشكيلة مُختلفة من البروتينات التي يُشفِّر لها جين واحد (بالإضافة إلى طريقة الوصْل البديل مثلًا (שחבור חלופי- alternative splicing))

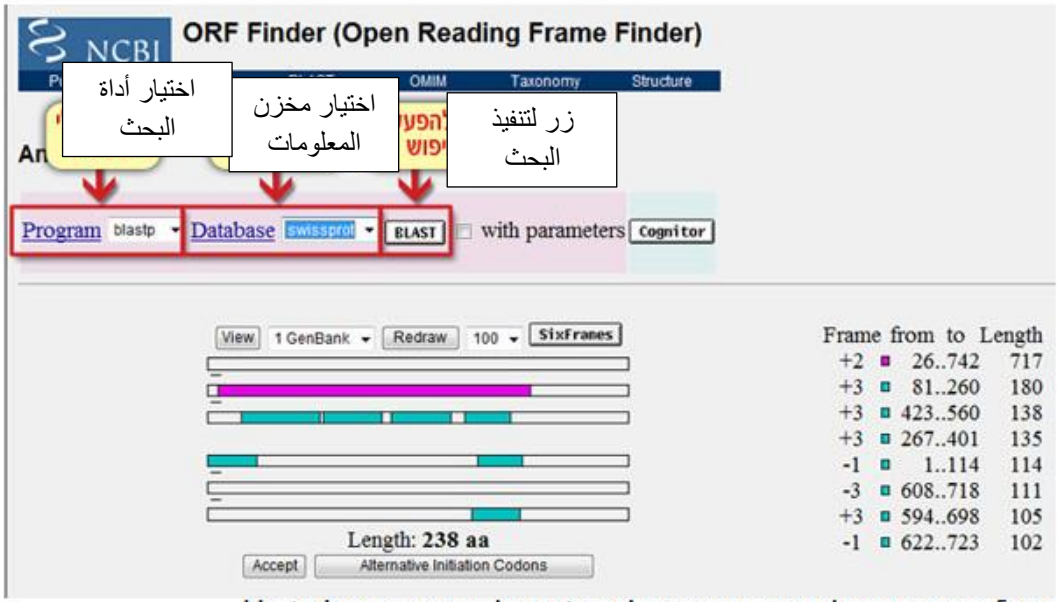
علينا الآن التأكُّد من أنَّ إطار القراءة المفتوح الذي اخترناه هو بالفعل إطار القراءة الحقيقيّ. طريقة إضافيّة لفعل ذلك هي بواسطة البحث عن بروتينات مُشابهة لتسلسل البروتين المتوقّع من إطار القراءة المفتوح في مخزن تسلسلات البروتينات.

8. أي أداة بيوإنفورماتيّة تُمكِّن من البحث عن تسلسل استعلام في مخزن تسلسل البروتينات؟

- أ. Blastn.
- ب. Blastp.
- ج. Prosite.
- د. Entrez.

الإجابة هي: ب. الأداة Blast تُمكِّن من البحث عن تسلسل استعلام في مخزن مُعطيّات. تستقبل الأداة Blastp تسلسل أحماض أمينيّة وتبحث في المخازن عن تسلسل بروتينات، بينما الأداة Blastn تستقبل تسلسل نوكلوئتيدات وتبحث في مخازن تسلسلات من النوكلوئتيدات. البحث في مخازن النوكلوئتيدات في هذه المرحلة لا يُمكِّن من التقدَّم في البحث عن البروتينات المُشابهة في تسلسلها لتسلسل البروتين الناتج من ترجمة إطار القراءة المُختار.

تأكَّدوا أنَّكم ضغطتم على إطار القراءة المفتوح 2+ (لون زهري). في القسم العلوي من واجهة ORF Finder في نافذة برنامج (program) نختار الأداة blastp، وفي نافذة Database نختار مخزن المعطيات ذا الجودة العالية Swissprot קישור (شاشة 5). نضغط على الزر BLAST وبعدها على الزر view report. يستغرق البحث عدة ثواني.



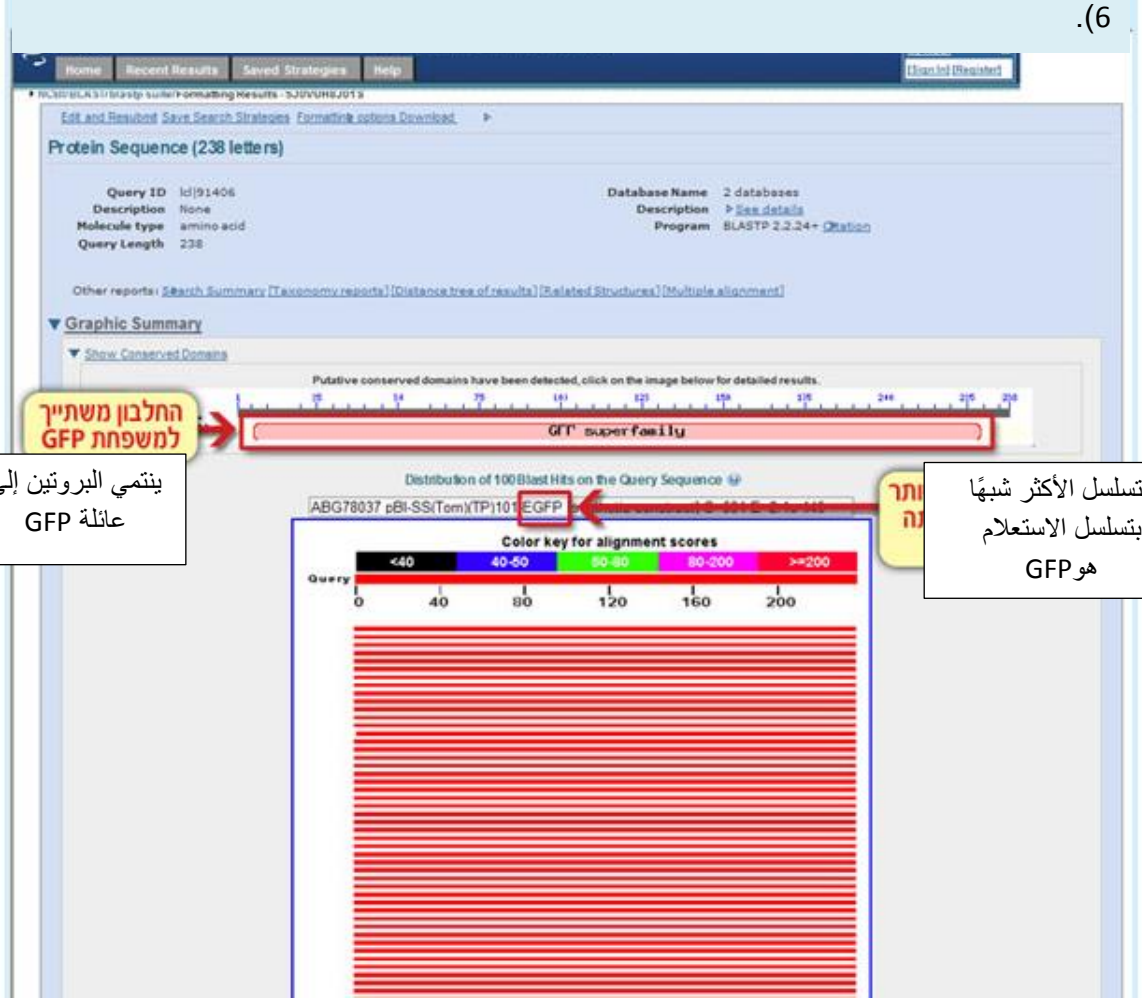
الشاشة 5: البحث عن تسلسل البروتين المُتوقّع في مخزن البروتينات Swissprot بواسطة الأداة blastp

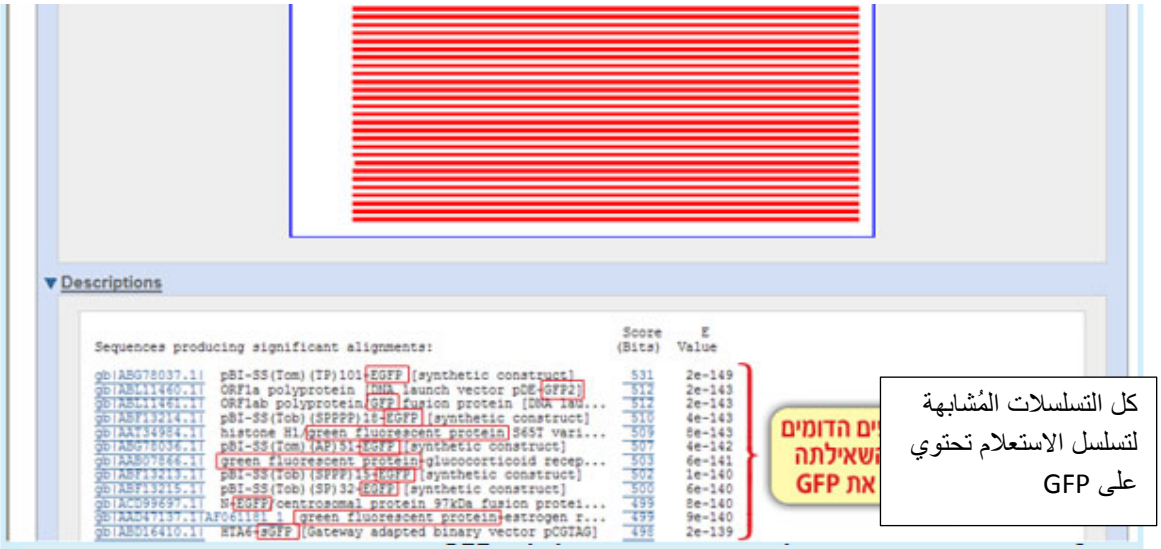
9. نفحص أسماء سِجلّات קישור النتائج. ما هو البروتين ذا التسلسل المُشابه لتسلسل الاستعلام؟

- أ. GFP
- ب. TOM

- ج. ORF1
- د. وُجدت بروتينات مُختلفة كُلّها مُشابهة لتسلسل الاستعلام.

الإجابة هي: أ. أظهر البحث في مستودع المعلومات أنَّ البروتين الأكثر شبهًا بتسلسل الاستعلام هو GFP. وُجدت كلمة GFP في سِجلّات كثيرة مصدرها من بلاسميدات مختلفة أو من بروتينات اصطناعيّة (الشاشة 6).





الشاشة 6: نتائج البحث- تسلسل البروتين المتوقّع يشبه تسلسل البروتين GFP بشكل كبير.

للمعلّم: الطلاب ذوي الملاحظة الحادة سينتبهون بأنّه في قِسْم من الوصف (Description) الموجود في صفحة النتيجة كُتب في الغالب EGFP وليس GFP، وفي قِسْم المُقارنة (Alignment) في صفحة النتيجة لا يوجد تطابق مُطلق بين تسلسل الاستعلام وتسلسل البروتين الموجود في مخزن المعلومات. ينبع هذا الأمر من تنفيذ البحث في مخزن nr وليس في مخزن swissprot (بالرّغم من أنّنا اخترنا الإمكانية لهذا المخزن– يوجد خلل في الأداة والذي يوّجه البحث إلى مخزن nr)، في حين أنَّ السِجلّ الأصلي للبروتين من قنديل البحر موجود في مخزن swissprot (كود السِجلّ P42212). في مخزن nr تتواجد سِجلّات بروتين GFP تحتوي على طفرات تؤدّي إلى تحسين في صفات البروتين كبروتين مُخبِر، مثل شدَّة إشعاع الضوء وثبات البروتين.

إنَّ إطار القراءة المفتوح الذي وجدناه، يُشفِّر بالفعل إلى بروتين GFP، بما معناه – هذا هو إطار القراءة المفتوح الصحيح.

10. نأخذ بالحسبان أنَّ إطار القراءة المفتوح الذي حدَّدته الأداة يُشفِّر بالفعل إلى بروتين GFP- ماذا يُمكن القول عن السبط الذي يحتوي على التسلسل؟

- أ. مصدره كما يبدو من مكتبة جينوميّة.
- ب. مصدره كما يبدو من مكتبة DNA مُكمّل.
- ج. لا يُمكن أنْ نعرف مصدره (من أي مكتبة).
- د. مصدره كما يبدو من مكتبة تسلسلات مراقبة (promoters).

الإجابة هي: ب. تذكَّر أنَّ الأداة ORF Finder لا يُمكنها أنْ تُميّز تسلسلات التعاقب الإجماعي (consensus sequence - רצפי הסכמה) الموجودة في تسلسلات البروموتور (promoter)، الانترونات (introns) وغيرها، وهي تَعتبر كل تسلسل النوكلوتيدات كتسلسل مُشفِّر مُمكن. من المقبول أنْ يتمّ تحليل تسلسلات خاليّة من الانترونات بواسطة الأداة ORF Finer - إذا لم يكن الأمر كذلك ستعتبِر الأداة تسلسل الانترونات تسلسل مُشفِّرًا أيضًا، وتسلسل البروتين الذي تعرضه عندها لا يعرض بشكل صحيح تسلسل البروتين المتوقّع من تسلسل ال RNA ناضح.

للتلخيص، وجدنا في هذه المهمّة إطار القراءة المفتوح في تسلسل ال DNA المُشفِّر ل GFP. أيضًا حدَّدنا أنَّ مصدرالتسلسل الذي بحوزتنا – من DNA مُكمّل، وتمّ تحديد حدود التسلسل المُشفِّر للبروتين، من الموضع 26 وحتى 742، وبالمجمل 717 نوكلوئتيد. طول البروتين المُتوقّع هو 238 حامض أميني.

نشر فرشر وزملائه في سنة 1992 في المجلّة العلميّة Gene نتائجهم فيما يتعلّق بتحديد تسلسل (ריצוף) الجين وال DNA المُكمّل ل GFP، كذلك نشروا نتائج تحديد التسلسل المُشفِّرلGFP ، طول البروتين ووزنه. لقد عبّروا عن أملهم بأنْ " يُساعد تحديد تسلسل نوكلوئتيدات الجين والDNA المُكمّل لGFP بتوضيح العلاقة بين المبنى والأداء الوظيفي لهذا البروتين المُميّز".

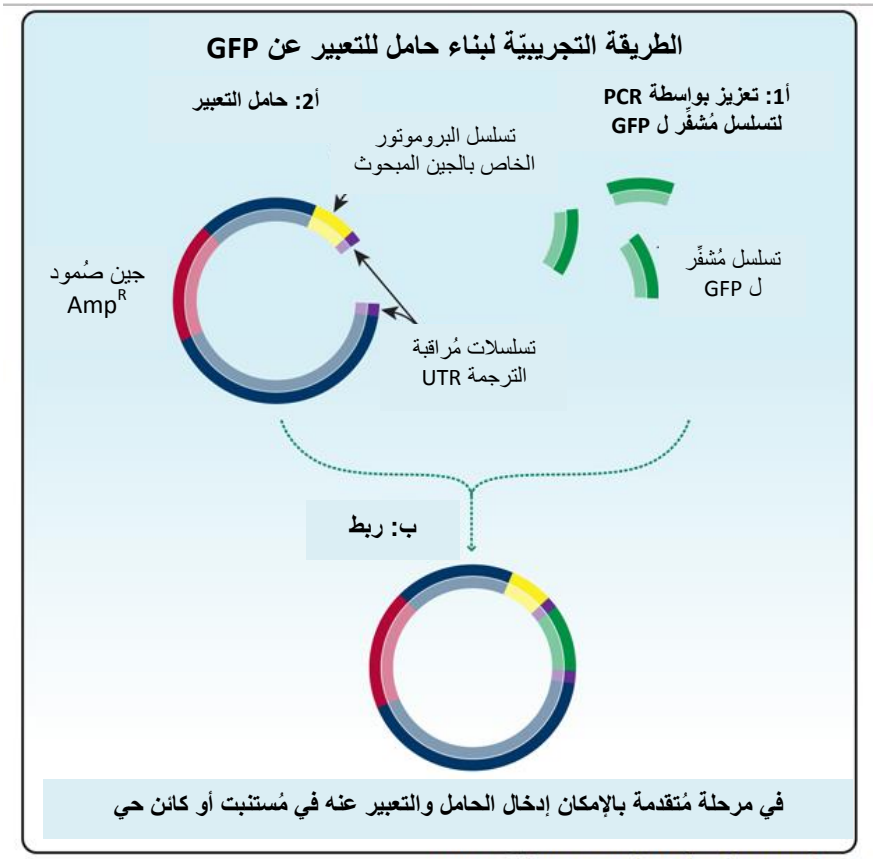
حتى نستطيع استعمال بروتين GFP كوَسْم مُشع في بحث البروتينات والعمليّات داخل الخلايا، يجب استنساخه داخل حامل كالبلاسميد مثلًا. عندما نقوم باستنساخ التسلسل المُشفِّر لGFP إلى داخل بلاسميد نستعين بالمعلومات الحيويّة التي وجدناها في هذه المهمّة عن التسلسل المُشفِّر وعن حدوده. لاحقًا، سنستعمل المعلومات عن تسلسل البروتين أيضًا لنتعلّم عن مبنى البروتين ووظيفته.

المهمّة II: تصميم بادئات بهدف تعزيز التسلسل المُشفِّر واستنساخه في حامل بلاسميدي (صفحة 1 من 2)

في هذه المرحلة، يدخل إلى الصورة مارتين تشالفي (Martin Chalfie)، فقط في سنة 1988 عرف مارتين مزايا GFP، وصمَّم على إثبات استعمال GFP كوَسْم مُشع. طمح إلى استنساخ التسلسل المُشفِّر קישור ل GFP داخل بلاسميد קישור يحتوي على تسلسل مُحفِّز نسخ (بروموتور) קישור، تابع للجين الذي نبحثه ممّا يؤدّي إلى التعبير عن GFP. في هذا الجهاز سيعمل GFP كجين مُخبِر ويُمكِّن من تعقُّب مراقبة نسخ (תעתוק) الجين الذي نبحثه والذي دُمج مع GFP. هكذا بإمكاننا أنْ نعرف متى، في أيّة خليّة وبأيّة شدَّة يؤدّي تسلسل البروموتور لنسخ الجين الذي نبحثه. فَهِم أنَّه لهذا الهدف عليه استعمال طُرق الهندسة الوراثيّة لإدخال كل التسلسل المُشفِّر ل GFP إلى داخل البلاسميد بالقرب من تسلسل البروموتور وتسلسلات مراقبة الترجمة التابعة للجين الذي يتمّ بحثه (الرسم 1). في البداية عليه تعزيز(مُفاقمة) التسلسل المُشفِّر حتى يكون بحوزته كميّة كافية للاستنساخ. لهذا الهدف قرَّر الاستعانة بطريقة ال PCR קישור. في هذه المهمّة سندرس المرحلة الأولى التي يجب تنفيذها في تجربة كهذه- مُضاعفة تسلسل النوكلوئتيدات بواسطة تفاعل PCR- سنستعمل الأداة البيوإنفورماتيّة Primer3Plus لتصميم البادئات קישור المُناسبة.

للمعلِّم :

حتّى تتمّ عمليّة الترجمة يجب أنْ يحتوي التسلسل المنسوخ على تسلسلات المُراقبة الموجودة في التسلسلات غير المُترجمة UTRs. عادةً يحتوي حامل التعبير على هذه التسلسلات من أجل التأكُّد من ترجمة أنجع وأفضل، لذلك كل ما تبقى هو مُضاعفة التسلسل المُشفِّر مع القليل من " أذناب " UTRs قبل كودون بداية الترجمة وبعد كودون وقف الترجمة.



الشاشة 1: مُخطط بلاسميد فحص التعبير عن البروتين GFP في الخلايا

هدف المهمّة هو تصميم بادئات لتفاعل PCR بمُساعدة الأداة Primer3Plus من أجل تعزيز التسلسل المُشفِّر ل GFP الموجود في تسلسل ال DNA المُكمّل.

للمُعلّم:

هدف المهمّة هو أنْ نعود ونتمرّن على استعمال الأداة البيوإنفورماتيّة Primer3Plus من أجل تصميم بادئات تُستعمل لمُضاعفة التسلسل المُشفر ل GFP. سيُدخل هذا التسلسل إلى داخل البلاسميد (حامل التعبير) الذي يحتوي على البروموتور للجين المبحوث وتسلسلات المُراقبة من أجل ترجمة ناجعة. كذلك سنتمرّن على تحليل صفحة النتيجة ونتعلّم كيف بالإمكان تغيير المتغيّرات المتعلّقة بمُميّزات البادئات والتسلسل الذي نُضاعفه بما يتلاءم مع احتياجات التجربة.

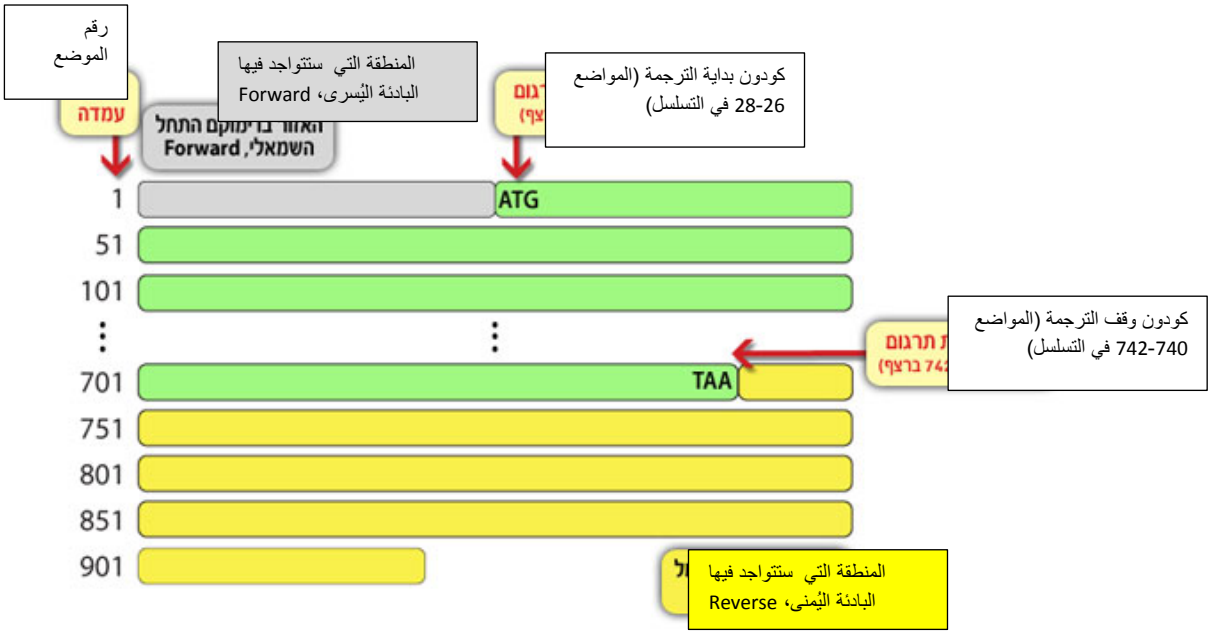
ليس كل ما يلمع ذهبًا- قصة بروتين فلورسنتي أخضر

المهمّة II: تصميم بادئات بهدف تعزيز التسلسل المُشفِّر واستنساخه في حامل بلاسميدي (صفحة 2 من 2)

لإنتاج البلاسميد بحيث يضمّ تسلسل بروموتور الجين المبحوث ويليه التسلسل المُشفِّر ل GFP، علينا تصميم بادئات تؤدّي إلى مُضاعفة كل التسلسل المُشفِّر ل GFP ولهذا نستعين بالأداة Primer3Plus. نُنفِّذ المراحل التالية :

1. ندخل إلى واجهة الأداة (ממשק הכלי) Primer3Plus קישור.

2. نُلصق تسلسل קישור الDNA المُكمّل المُشفِّر إلى البروتين GFP والذي يمتدّ من الموضع 26 وحتى الموضع 742، في المُجمل طوله 717 نولكوئتيد. علينا أنْ نُصمّم بادئات لمُضاعفة كل التسلسل المُشفِّر. لذلك من المهمّ أنْ يكون الموضع الأول (المُشار له في الحقل Start) للبادئة اليُسرى في الموضع 26 أو قبله، والموضع الأول للبادئة اليُمنى في الموضع 742 أو بعده (الرسم 2).



الشاشة 2: الإشارة إلى التسلسل المُشفَر ل GFP والمناطق التي تُصمّم فيها البادئات لمُضاعفة التسلسل في تفاعل PCR

نفحص أزواج البادئات التي صُمِّمت بواسطة الأداة.

1. هل استعمال أحد أزواج البادئات يؤدي إلى مُضاعفة كل التسلسل المُشفِّر ل GFP؟

- أ. نعم.
- ب. لا.

2. اذا اخترتم الإجابة " نعم "، أشيروا إلى زوج البادئات الذي اخترتموه والموضع الأول لكل بادئة. وإذا اخترتم الإجابة " لا "، عللوا إجابتكم.

الإجابة هي: لا. كل زوج من البادئات صُمّم بواسطة الأداة Primer3Plus بحيث يكون ناتج المُضاعفة بطول 150- 250 زوج من النوكلوئتيدات، هذا الطول يتجاوب مع الخيار التلقائي للأداة (ברירת מחדל). لهذا في كل أزواج البادئات، إحدى البادئات على الأقل موجودة داخل التسلسل المُشفِّر ذاته. هذا الأمر يؤدي إلى ناتج مُضاعفة يضمّ قِسْم صغير فقط من التسلسل المُشفِّر ل GFP.

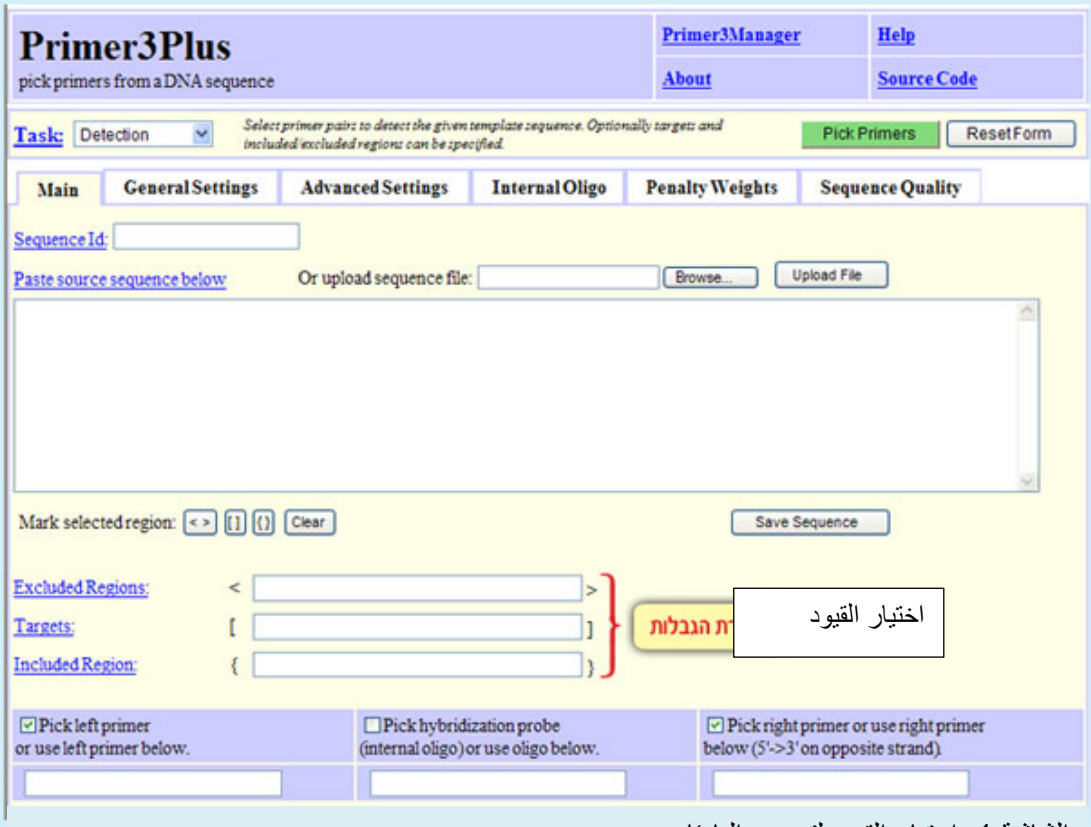
نعود إلى واجهة الأداة .

علينا أنْ نُعرِّف للأداة حدود التسلسل الذي نرغب بمُضاعفته: التسلسل في المواضع 742- 26. من المهمّ أيضًا أنْ نتذكَّر أنَّه حتى تتمّ مُضاعفة التسلسل، يجب أنْ تتواجد أطراف البادئات على كلا طرفيّ التسلسل الذي نرغب بمُضاعفته.

3. أي طريقة نستخدم لتحديد حدود التسلسل الذي نرغب بمُضاعفته ؟

- أ. في بطاقة الاختيار(לשונית) General Settings نُعرِّف طول الناتج ل750- 720 (الحقل Product Size Ranges) بحيث أنَّ البادئات التي تُصمّم تكون بالتأكيد موجودة في كلا طرفيّ التسلسل المُشفِّر.
- ب. نعطي (نُملي على) الأداة تسلسل إحدى البادئات، البادئة اليُمنى مثلًا. البادئة الأخرى التي تُصمّمها الأداة (البادئة اليُسرى)، تتواجد في مكان بعيد بما فيه الكفاية، بحيث يحوي ناتج المُضاعفة كل التسلسل المُشفِّر.
- ج. نستعمل إحدى إمكانيّات التقييد.
- د. لا توجد أي إمكانيّة لنُعرِّف للأداة حدود التسلسل الذي نرغب بمُضاعفته.

الإجابة هي: ج. نستعمل إحدى إمكانيّات التقييد لنُعرِّف للأداة حدود التسلسل الذي نرغب بمُضاعفته (شاشة 1). الإمكانيّة الأولى خاطئة لأنَّ طول الناتج الذي حُدِّد يضمن تواجد البادئات على طرفيّ التسلسل، لكنْ لا يُمكن أنْ نعرف مُسبقًا حدود الناتج، ومن المُمكن أنْ تتواجد إحدى البادئات داخل التسلسل المُشفِّر. الإمكانيّة ب خاطئة لأن مكان البادئة الأخرى مُتعلّق بطول ناتج المُضاعفة المطلوب، والاختيار التلقائي (ברירת מחדל) لا يزال بطول 250-150 نوكلوئتيد.



الشاشة 1: اختيار القيود لتصميم البادئات.

4. أية إمكانيّة تقييد بحسبها ستقوم بالتأكيد كل أزواج البادئات التي تُصمِّمها الأداة بمُضاعفة التسلسل الموجود في المواضع 742- 26؟

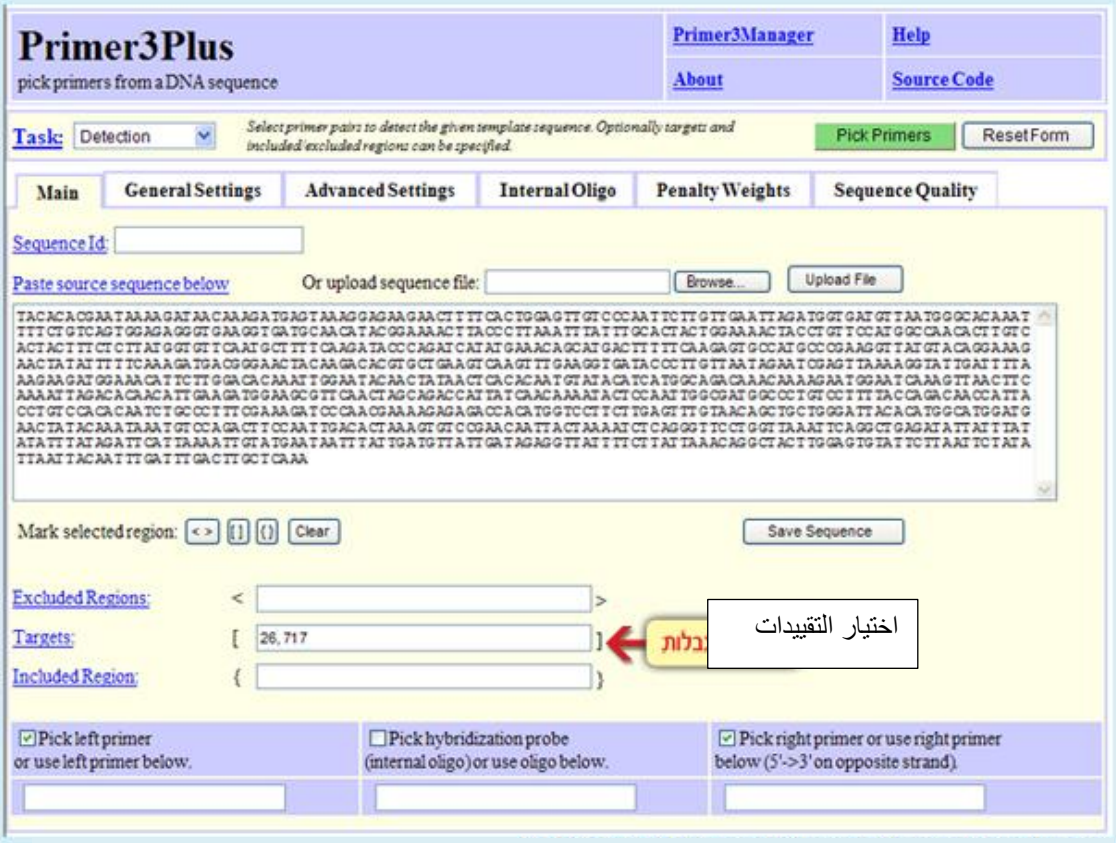
- أ. الإمكانيّة Excluded Regions لتحديد التسلسل الذي لا تتواجد فيه البادئات.
- ب. الإمكانيّة Targets لتحديد التسلسل الذي على طرفيْة تتواجد البادئات.
- ج. الإمكانيّة Included Regions لتحديد المنطقة التي تتواجد عليها البادئات.
- د. الإجابات أ و ج صحيحة.

الإجابة هي: ب. استعمال الإمكانّية Targets تؤدّي إلى تصميم بادئتيْن على طرفيّ التسلسل الذي نرغب بمُضاعفته، هذا الأمر يضمن ناتج يحتوي على كل التسلسل المُشفِّر. يجب أنْ ننتبه إلى أنَّه في بعض الأحيان يؤدّي استعمال الإمكانيّة Excluded Regions إلى إنتاج بادئات مناسبة، وكل واحدة منها موجودة على الطرف الآخر للتسلسل المُشفِّر (كما نرى)، ولكنْ في بعض الأحيان يؤدّي إلى تصميم بادئتيْن تتواجد كلتاهما على نفس الطرف للتسلسل المُشفِّر، وفي هذه الحالة ناتج المُضاعفة لا يضمّ كل التسلسل المُشفِّر.

5. كيف نُشير إلى التسلسل الذي نرغب بمُضاعفته في سطر التقييد؟

- أ. [26,742]
- ب. [26,717]
- ج. [1,717]
- د. [1,742].

الإجابة هي: ب. الرقم الأيسر يُشير إلى الموضع الأول للتسلسل الذي تتمّ فيه المُضاعفة، أي الموضع 26، والرقم الأيمن يُشير إلى طول التسلسل الذي تتمّ مُضاعفته، أي 717 نوكلوتيد (الشاشة 2). من هنا المُضاعفة تتمّ للمواضع 26 حتى 742.



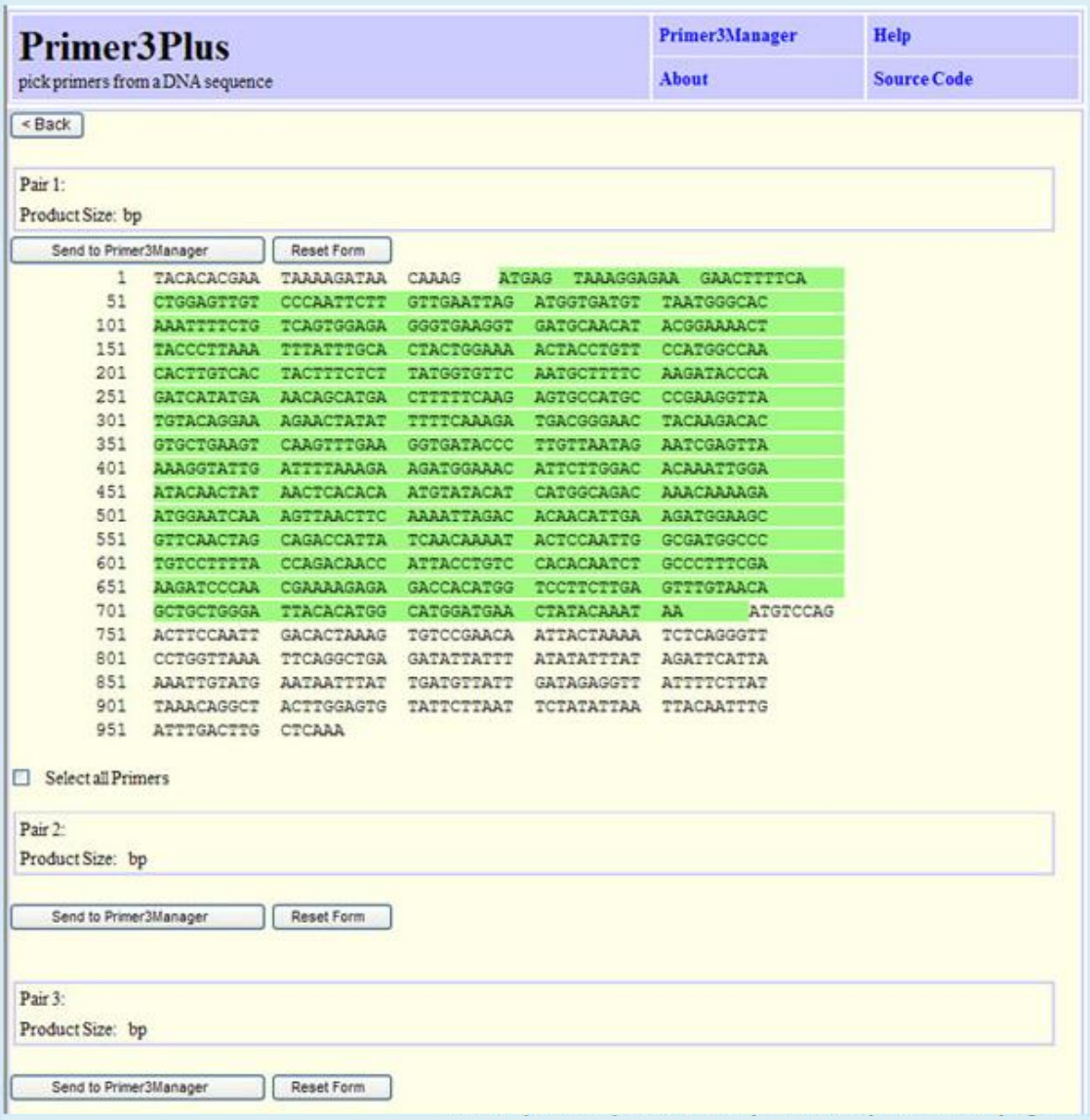
الشاشة 2: إمكانيّات التقييد المرغوبة لمُضاعفة التسلسل المُشفِّر ل GFP.

نكتب التقييد المطلوب ونطلب من الأداة أنْ تُصمّم بادئات (تذكَّر أنْ تضغط على الزر Pick Primers).

6. كم زوج من البادئات صُمّمت بعد أنْ أضفنا التقييد Targets[26,717]؟

- أ. 5
- ب. 2
- ج. 1
- د. 0

الإجابة هي: د. لا تعرض الأداة أي زوج من البادئات (الشاشة 3) .



الشاشة 3: لم تتواجد بادئات تتوفَّر فيها الشروط التي حدّدناها البادئات ولتقييد التسلسل.

لم تتواجد أزواج من البادئات تتوفَّر فيها شروط مُميّزات البادئات – مثل طول البادئة، درجة حرارة ارتباط البادئات (טמפ' היצמדות) وما شابه – والتي تتواجد بحسب شروط التقييد من جهتي التسلسل الموجود في المواضع 26- 742. نحاول تخمين سبب ذلك. نفحص التسلسلات من جهتي التسلسل المُشفِّر وفي أطرافه ونبحث عن عوامل يُمكنها أنْ تؤثّر على مُميّزات البادئات.

7. طول التسلسل من جهتي التسلسل المُشفِّر– أي منطقة من المناطق التي يُمكن أنْ تتواجد فيها البادئات هي الأطول؟

- أ. المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُسرى أقصر من المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُمنى.
- ب. المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُمنى أقصر من المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُسرى.

- ج. المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُسرى مُشابه بطوله للمجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُمنى.
- د. لا توجد أي أهميّة لطول المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه بادئة مُعيّنة.

الإجابة هي: أ. المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُسرى قصير نسبيًا: من الموضع 1 وحتى الموضع 50 تقريبًا. بالمُقابل المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُمنى ليس قصير بتاتًا: من الموضع 720 تقريبًا إلى الموضع الأخير- 966.

8. ما معنى الفرق في طول المنطقة التي بالإمكان أنْ تتواجد فيها البادئات؟

- أ. إمكانيّات الأداة لتصميم البادئة اليُمنى قليلة بالمُقارنة مع إمكانيّاتها لتصميم البادئة اليُسرى.
- ب. إمكانيّات الأداة لتصميم البادئة اليُسرى قليلة بالمُقارنة مع إمكانيّاتها لتصميم البادئة اليُمنى.
- ج. لا توجد علاقة بين طول المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه بادئة مُعيّنة وبين عدد الإمكانيّات لتصميم البادئة.
- د. عدد الإمكانيّات لتصميم البادئة اليُمنى تُشبه دائمًا عدد الإمكانيّات لتصميم البادئة اليُسرى.

الإجابة هي: ب. بسبب كون المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُسرى أقصر بالمُقارنة مع المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُمنى، للأداة Primer3Plus توجد إمكانيّات أقل لتصميم البادئة اليُسرى بالمُقارنة مع إمكانيّاتها لتصميم البادئة اليُمنى.

لكون المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُسرى أقصر بكثير من المجال بإمكان البادئة اليُمنى أنْ تتواجد فيه، من المُحتمل وجود صعوبة في تصميم البادئة اليُسرى بالذات. نحاول أنْ نتركَّز بمُميّزات التسلسل.

9. مُميّزات (طابع) التسلسل- ما هي النوكلوئتيدات الأكثر انتشارًا في المنطقة التي بالإمكان أنْ تتواجد فيها البادئة اليُسرى (مواضع 1-50)؟

- أ. المنطقة التي بالإمكان أنْ تتواجد فيها البادئة اليُسرى غنيّة بنوكلوئتيدات من نوع G و C.
- ب. المنطقة التي بالإمكان أنْ تتواجد فيها البادئة اليُسرى غنيّة بنوكلوئتيدات من نوع G و T.
- ج. المنطقة التي بالإمكان أنْ تتواجد فيها البادئة اليُسرى غنيّة بنوكلوئتيدات من نوع A و T.
- د. المنطقة التي بالإمكان أنْ تتواجد فيها البادئة اليُسرى غنية بنوكلوئتيدات من نوع C و T.

الإجابة هي: ج. تقريبًا 70% من النوكلوئتيدات في المجال الذي بالإمكان أنْ تتواجد فيه البادئة اليُسرى هي من نوع A و T.

10. أيّ من مُميّزات البادئات ستتأثّر بشكل مُباشر من كثرة نوكوئتيدات من نوع مُعيّن، في المجال الذي يُمكن أنْ تتواجد فيه البادئة اليُسرى؟

- أ. حرارة ارتباط (Primer Tm) البادئة وطول البادئة (Primer Size).
- ب. نسبة النوكلوئتيدات من نوع G وC في البادئة (Primer GC%) وطول البادئة (Primer Size).
- ج. حرارة الارتباط (Primer Tm) ونسبة النوكلوئتيدات من نوع C وG (Primer GC%).
- د. نسبة النوكلوئتيدات من نوع C وG في البادئة (Primer GC%) ، حرارة الارتباط (Primer Tm) البادئة وطول البادئة (Primer Size).

الإجابة هي: ج. نوكلوئتيدات من نوع A و T في الجدائل المُكمّلة تُنتج بينها فقط رابطيْن من الروابط الهيدروجينيّة، بالمُقارنة مع ثلاثة روابط هيدروجينيّة بين نوكلوئتيدات من نوع C وG. لذلك قوة الرابط بين البادئة والقالب الغنيّ بنوكلوئتيدات من نوع A و T مُنخفض أكثر، وارتباط البادئة بالقالب يتمّ في درجة حرارة مُنخفضة أكثر. لذلك مُميّزات البادئة التي ستتأثّر بشكل مُباشر من التسلسل الغنيّ بنوكلوئتيدات من نوع A و T، هي التالية: نسبة النوكلوئتيدات من نوع G وC (قيمته ستقل) وحرارة الارتباط (تقل). بشكل غير مُباشر يوجد أيضًا تأثير على طول البادئة، حيث عادةً نحتاج إلى بادئة أطول حتى تكون حرارة الارتباط في المجال المطلوب وبشكل مُشابه للبادئة الثانية.

اكتشفنا أنَّ التسلسل في المجال الذي يُمكن أنْ تتواجد فيه البادئة اليُسرى – ليس فقط قصير جدًّا. ولكنَّه غني أيضًا بنوكلوئتيدات من نوع A وT، وهذا الأمر بإمكانه أن يؤثّر بشكل مُباشر على حرارة الارتباط للبادئة وبشكل غير مُباشر أيضًا على طولها. بسبب كون المجال قصير أساسًا، فإنَّ تغيير طول البادئة لا يُفيد، ويجب علينا أنْ نُغيّر حرارة الارتباط للبادئة حتى تكون هناك مرونة أكثر في تصميم البادئة .

مجال حرارة الارتباط للبادئات، كما هو مُعرَّف في بطاقة الاختيار General Settings، يتراوح بين 57 ^{o}C و63 ^{o}C، وحرارة الارتباط المثاليّة هي 60 ^{o}C.

11.كيف بإمكاننا تغيير مجال حرارة الارتباط لتصميم البادئة؟

- أ. تصغير القيمة الصغرى (min) بحيث تكون أصغر من 57 ^{o}C.
- ب. تكبير القيمة الصغرى بحيث تكون أكبر من 57 ^{o}C.
- ج. تصغير القيمة الكبرى (max) بحيث تكون أصغر من 63 ^{o}C.
- د. تكبير القيمة الكبرى بحيث تكون أكبر من 63 ^{o}C.

الإجابة هي: أ. لكون البادئة غنيّة بنوكلوئتيدات من نوع A وT، حرارة ارتباطها مُنخفضة أكثر. من أجل منح الأداة مرونة بتصميم بادئات كهذه، يجب تصغير القيمة الصُغرى لحرارة الارتباط.

في بطاقة الاختيار General Settings، نُصغِّر القيمة الصغرى في حقل حرارة الارتباط إلى 52^{o}C. نُصغِّر أيضًا القيمة المثاليّة في حقل حرارة الارتباط إلى 54 ^{o}C، لكي نضمن أنْ يكون لكلا البادئتين حرارة ارتباط متشابهة (شاشة 4).

للمُعلّم:

إذا لم نصغِّر بشكل ملحوظ حرارة الارتباط المثاليّة – ستُصمّم البادئة اليُسرى بحسب حرارة الارتباط الصغرى (قريبة ل 54 °C، حيث وجدنا أنَّه ليس بالإمكان تصميم بادئة يُسرى حرارة ارتباطها هي 57 °C)، والبادئة اليُمنى تُصمَّم بحسب حرارة الارتباط المثاليّة وهي 60 °C.

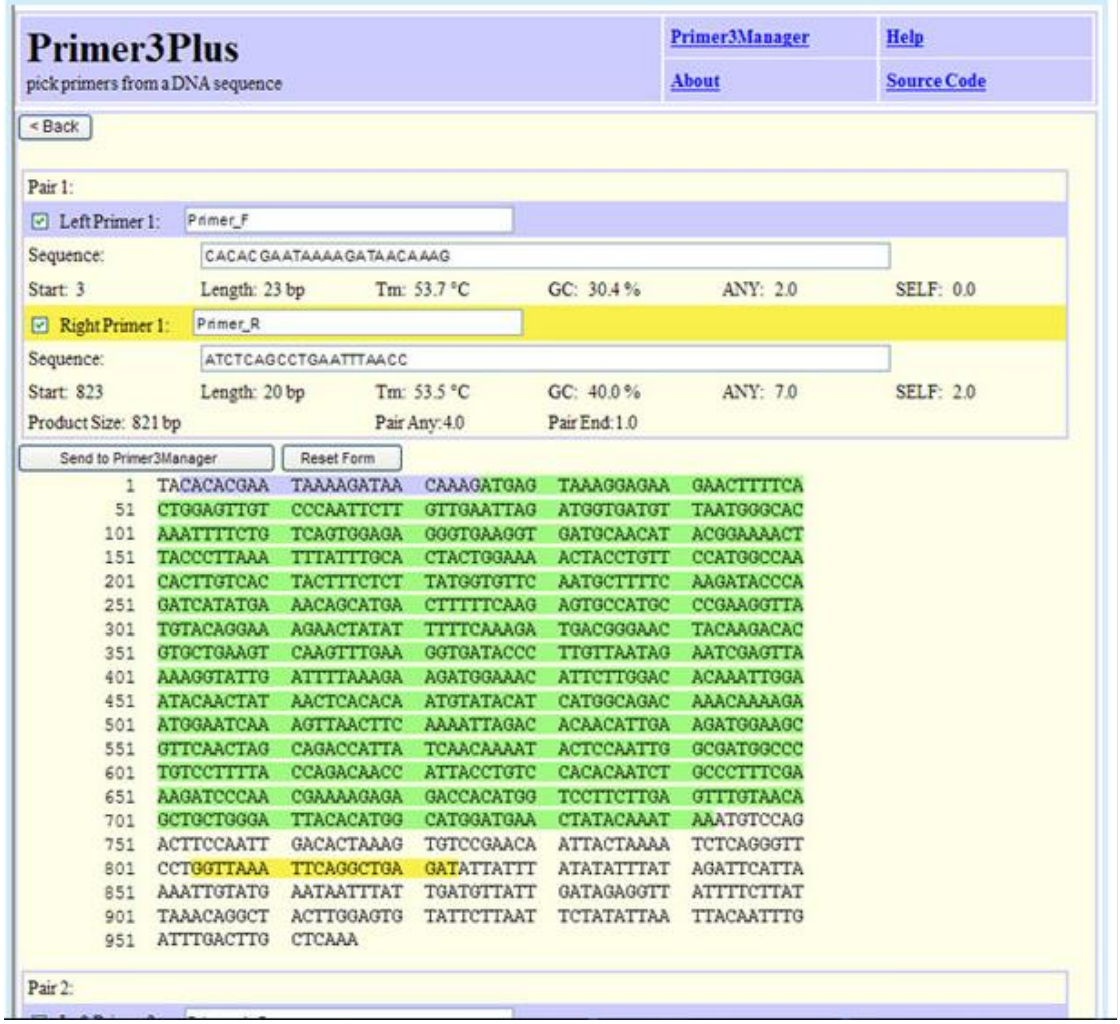
الشاشة 4: تغيير حرارة الارتباط الصغرى والمثاليّة للبادئة.

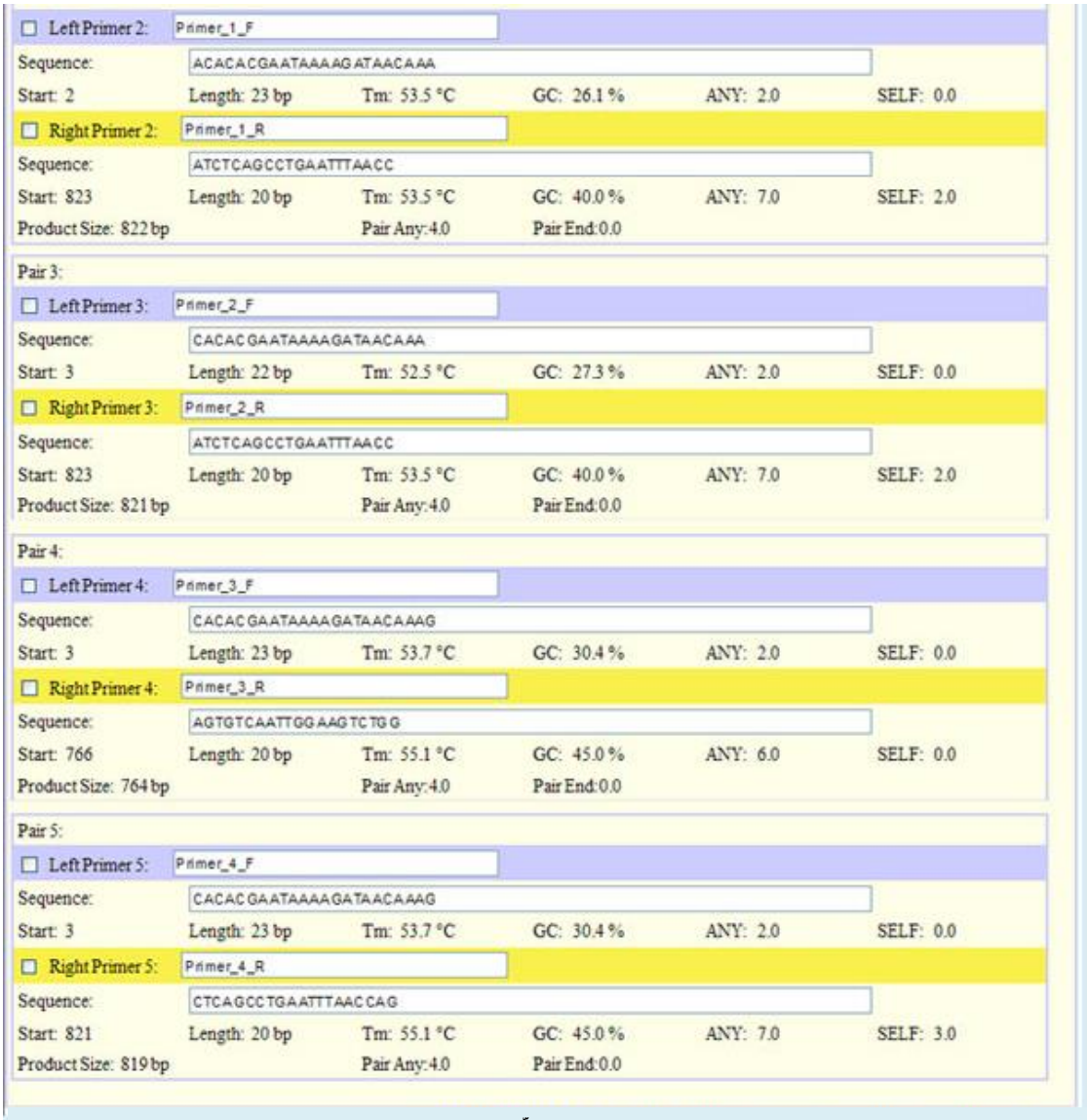
نعود إلى بطاقة الاختيار Main ونضغط على Pick Primers لتصميم البادئات.

12. هل كل أزواج البادئات التي صُمِّمت تستجيب لحاجتنا، أي تقوم بمُضاعفة التسلسل المُشفِّر ل GFP في المجال الموجود بين المواضع 26-742؟

- أ. لا، فقط الزوج الأول من البادئات مناسب لتعزيز(مُضاعفة) التسلسل في المجال المطلوب.
- ب. لا، ناتج المُضاعفة الناتج من استعمال زوج البادئات الرابع أقصر بكثير ويحتوي فقط على قِسْم من التسلسل المُشفِّر لGFP.
- ج. لا، بالرّغم من أنَّ كل أزواج البادئات تؤدّي إلى مُضاعفة ناتج بالطول المُناسب، لكنْ نواتج المُضاعفة ليست من المنطقة المناسبة في التسلسل، ولذلك فهي تحتوي فقط على قِسْم من التسلسل المُشفِّر ل GFP.
- د. نعم، استعمال كل واحد من أزواج البادئات التي صُمِّمت يؤدّي إلى مُضاعفة التسلسل المُشفِّر ل GFP.

الإجابة هي: د. تغيير المميّزات أدّى إلى تصميم أزواج بادئات تتواجد على طرفيّ التسلسل المُشفِّر، ولذلك هي مناسبة لحاجتنا (الشاشة 5).





الشاشة 5: البادئات التي صُمِّمت لمُضاعفة التسلسل المُشفِّر ل GFP ومُميّزاتها.

كل دورة من دورات تفاعل PCR مكّونة من ثلاثة مراحل، فَصْل جدائل قالب ال DNA، ارتباط البادئات بجدائل القالب، واستطالة البادئات بواسطة الإنزيم DNA polymerase.

13. مع الأخذ بالحسبان مُميّزات البادئات الجديدة التي صُمِّمت، في أي درجة حرارة تتمّ مرحلة ارتباط البادئات بالقالب وفي أي درجة حرارة تتمّ مرحلة استطالة البادئات.

- أ. مرحلة ارتباط البادئات بالقالب تتمّ بدرجة حرارة 95°C، بينما تتمّ مرحلة استطالة البادئات في درجة حرارة 54°C.
- ب. مرحلة ارتباط البادئات بالقالب تتمّ بدرجة حرارة 54°C، بينما تتمّ مرحلة استطالة البادئات في درجة حرارة 95° C.
- ج. مرحلة ارتباط البادئات بالقالب تتمّ بدرجة حرارة 54°C، بينما تتمّ مرحلة استطالة البادئات في درجة حرارة 72°C.

- د. مرحلة ارتباط البادئات بالقالب تتمّ بدرجة حرارة 72°C، بينما تتمّ مرحلة استطالة البادئات في درجة حرارة 54°C.

الإجابة هي: ج. مرحلة فصل الجدائل ومرحلة استطالة البادئات تتمّان في جميع تفاعلات ال PCR في نفس درجة الحرارة (درجة حرارة مرحلة فصل الجدائل هي 95°C ودرجة حرارة مرحلة استطالة البادئات هي 72°C) ولا علاقة لها بمُميّزات البادئات. بالمُقابل مرحلة ارتباط البادئات بالقالب مُتعلّقة بمُميّزات البادئات، وتتمّ في درجة ارتباط البادئات، كما ذُكر في هذه الحالة ب 54°C.

للمُعلِّم: عند تصميم البادئات من المهمّ أنْ تكون حرارة الارتباط لتصميم كلا البادئتيْن هي درجة الحرارة ذاتها. ولكن ليس بالضرورة أنْ تكون حرارة الارتباط للبادئتيْن مُتطابقة. في هذه الحالة مرحلة ارتباط البادئات تتمّ في درجة حرارة ارتباط البادئة التي حرارة ارتباطها هي الأقل.

بإمكاننا بواسطة أحد أزواج البادئات التي صُمِّمت مُضاعفة التسلسل المُشفِّر ل GFP واستنساخه داخل بلاسميد يحمل تسلسل بروموتور الجين المبحوث (وتسلسلات المراقبة الإضافيّة الحيويّة لترجمة ناجعة)، بعدها بإمكاننا إدخال هذا البلاسميد المؤتلف (الريكومبننتي) إلى بكتيريا، إلى خلايا في مُستنبت أو إلى كائن حي. يحدِّد تسلسل البروموتور بأي خلايا وبأية شدَّة يتمّ نسخ (תעתוק) التسلسل المُشفِّر ل GFP والذي ضاعفناه بواسطة ال PCR. عندها ستظهر هذه الخلايا (التي قامت بالتعبير عن البروتين) بلون أخضر عند النظر إليها من خلال ميكروسكوب فلورسنتي.

للتلخيص، في هذه المهمّة تمّ تصميم بادئات لاستخدامها في تفاعل PCR، لتقوم بمضاعفة كل التسلسل المُشفِّر ل GFP من أجل استنساخه داخل بلاسميد. استعننا بالإمكانية Targets من أجل تعيين حدود التسلسل الذي نرغب بمُضاعفته، أي، التسلسل المُشفِّر. الأداة لم تجد بادئات تستجيب لمُميّزات الخيار التلقائي (ברירת מחדל) والتي تأخذ بالحسبان الحدود التي عيّناها بالنسبة لمكان التسلسل الذي نرغب بمُضاعفته. فحصنا مُميّزات التسلسلات التي ستتواجد فيها البادئات واكتشفنا أنَّ المنطقة التي يُمكن أنْ تتواجد فيها البادئة اليُسرى قصيرة وغنيّة بنوكلوئتيدات من نوع A وT. لذلك غيّرنا في شاشة التحديدات General Settings درجة حرارة الارتباط الصُغرى والمثاليّة للبادئة، وهكذا مكّنّا الأداة من تصميم بادئات تستجيب لمُميّزات تعريف البادئة، وأيضًا للقيود التي يفرضها التسلسل.

هذا بالضبط ما فعله مارتين تشالفي وتلميذة البحث عنده جايا اوسكيرشن. ضاعفا بواسطة تفاعل PCR التسلسل المُشفِّر ل GFP، أدخلاه إلى بلاسميد وأثبتا أنَّ التعبير في البلاسميد أدّى إلى إطلاق ضوء بلون أخضر في خلايا غير حقيقيّة النواة קישור (بكتيريا E.coli) وحقيقيّة النواة קישור (دودة C. elegans). لقد كانا أول من نجح بذلك عام 1992، وقاما بنشر النتائج التي حصلا عليها في المجلّة العلميّة Science. من المهمّ أنْ نشير أنَّ مجموعات بحث منافسة حاولت استنساخ الجين GFP بواسطة إنزيمات التقييد קישור، ولكنَّها لم تنجح في التعبير عن البروتين في البكتيريا.

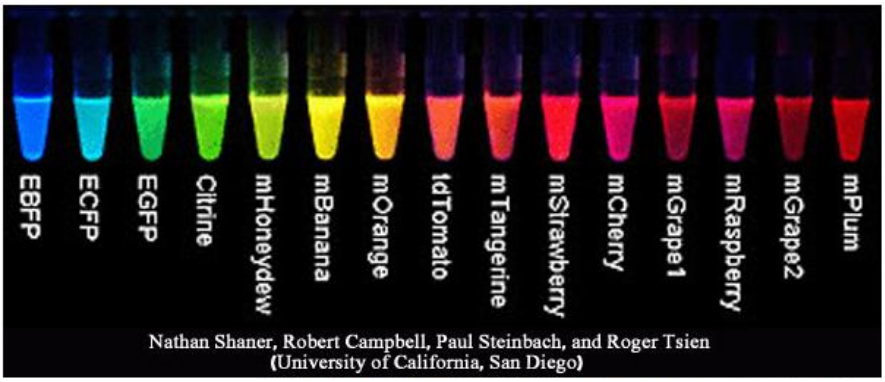
للمعلم :
الاستنساخ بواسطة إنزيمات التقييد أدّى إلى احتواء التسلسل المُستنسخ على مقطع إضافيّ منع التعبير عن الإشعاع الفلورسنتيّ ل GFP.

تجسِّد هذه النتيجة أفضليّات الاستنساخ بواسطة PCR وأهميّة التصميم الحكيم للبادئات. استنساخ GFP شقَّ الطريق ليس فقط أمام استعمال البروتين كوَسْم مُشع لتأشير البروتينات، الخلايا والعمليّات في الجسم، وإنَّما أيضًا سهَّل عمليّات تحديد مبنى هذا البروتين وإيجاد الطفرات التي تؤثِّر على صفاته الضوئيّة (האופטית). سنتناول هذا الأمر في المهمّات التالية.

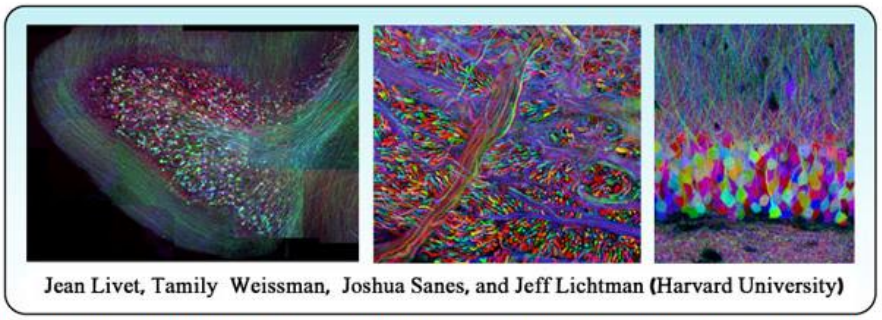
ليس كل ما يلمع ذهبًا - قصة بروتين فلورسنتي أخضر

المهمّة III: مُقارنة تسلسلات بروتينات فلوروسنتيّة لتشخيص مواضع هامّة في GFP (صفحة 1من2)

منذ سنة 1979، قبل استنساخ الجين المُشفِّر ل GFP بكثير، اكتشف أوسامو شيمومورا مبنى المجموعة اللونيّة في بروتين GFP والأحماض الأمينيّة קישור التي تكوِّنها. **المجموعة اللونيّة** (chromophore) هي مجموعة كيميائيّة أو جُزء من جُزيئة مُعينة يمنحها لونًا. عُلم أنَّ الأحماض الأمينيّة التي تكوّن المجموعة اللونيّة في بروتين GFP موجودة في المواضع: سيرين (S) في الموضع 65، تايروسين (Y) في الموضع 66، وجليتسين (G) في الموضع 67. بعد ترجمة البروتين وطيّه، تمرّ المجموعة اللونيّة بعدة تغييرات مبنويّة هامّة تجعلها فلورسنتيّة، وبذلك يتمّ منح البروتين القدرة على التقاط الأشعة بطول موجة مُعيّن (أزرق) وإطلاقها بطول موجة أطول (أخضر). في سنة 1996 تمّ تحديد المبنى الفراغي קישור لبروتين GFP الذي يحمل طفرة هامّة بواسطة طرق الكريستالوغرافيا (שיטות קריסטלוגרפיות) קישור، وتبيّن أنَّ الطفرات شكلّت عاملًا هامًا وحاسمًا في تحديد المبنى الفراغي للبروتين GFP وساهمت أيضًا في فهم وظيفته. طفرات مُعيّنة كانت مسؤولة عن الصفات المُحسَّنة للبروتين كبروتين فلورسنتيّ، في حين أنَّ طفرات أخرى أدَّت إلى إنتاج بروتينات تُطلق ضوء بألوان مُختلفة (الرسوم 1 و2).



الرسم 1: أمثلة لبروتينات فلورسنتيّة متنوّعة تُطلق ضوء بألوان مُختلفة



الرسم 2: دمج بروتينات فلورسنتيّة تُطلق ضوء بألوان مُختلفة تُمكِّن من تأشير خلايا عديدة في نفس الوقت. تُعرض في هذا المثال تقنيّة تُسمّى Brainbow: brain- حيث جُرِّبت أول مرة في الخلايا العصبية للدماغ و bow اختصار للكلمة الإنجليزيّة "قوس قزح" التي تُشير إلى الألوان المتنوعة. تُعرض مناطق مُختلفة للدماغ، حيث كل خليّة (وامتداداتها) ملوّنة بلون مُختلف، بسبب تركيبة مُختلفة من البروتينات الفلورسنتيّة.

1. أذكروا ما هي الإيجابيّات التي تمنحها البروتينات الفلورسنتيّة ذات الألوان المُختلفة للبحث التطبيقي؟

للمُعلِّم : أصبح استعمال البروتينات المُشعة لتعقّب البروتينات أمرًا مُفيدًا وشائعًا جدًّا في البحث، أحيانًا تكون هناك حاجة لتعقّب عدد من البروتينات المُختلفة في نفس الوقت، تأشير البروتينات المُختلفة بنفس الوسْم الفلورسنتي لا يُمكِّن العلماء من التمييز بين البروتينات التي يبحثونها، لأن جميعها مؤشرة بنفس اللون. لذلك توجد حاجة لوسْم كل بروتين بوَسْم فلورسنتيّ يُطلق ضوءً ذا لون مُختلف، وهكذا بالإمكان التمييز بين البروتينات المُختلفة وتعقّبها.

2. كما ذُكر، أدّت الطفرات إلى فهم وظائف بروتين GFP. ماذا حسب رأيك، يُمكن أنْ نعرف من البروتينات الفلورسنتيّة الطافرة عن بروتين GFP الأصلي؟ كيف يُمكن إجراء ذلك؟ بأيّ أداة بيوإنفورماتيّة تعرفها بإمكانك الاستعانة لتحقيق هذا الهدف؟

للمُعلِّم: هذا مثال جيّد للعلاقة بين الجينوتيب والفينوتيب. معظم الطفرات المذكورة هي طفرات نقطيّة أدَّت إلى تغيير في حامض أميني واحد في تسلسل البروتين. مُقارنة تسلسل البروتينات الفلورسنتيّة الطافرة مع بروتين GFP الأصلي تُمكِّن من تشخيص المواضع في تسلسل البروتين، التي يؤدّي التغيير فيها إلى تغيير في الصفات الفلورسنتيّة له. بهذه الطريقة بالإمكان ايجاد العلاقة بين المجموعة الجانبيّة في موضع مُعيّن وصفة مُعيّنة للبروتين. مثلًا، إذا كان التغيير في حامض أميني في موضع معين يؤدّي إلى تغيير اللون المُنطلق من البروتين، فمن المُمكن من تكون المجموعة الجانبيّة الموجودة في هذا الموضع جزءً من المجموعة اللونيّة أو لها علاقة بمبناها. الأداة البيوإنفورماتيّة التي تُستعمل هنا هي أداة مُقارنة التسلسلات وتحديد المواضع المُتشابهة والمُختلفة بينها، ClustalW.

منذ أواسط التسعينات، وخلال عقد كامل، استعمل روبرت تسين (Robert Tsien) وغيره الطفرات العشوائيّة والموجهّة، ليس فقط لزيادة تشكيلة البروتينات الفلورسنتيّة ولتحسين صفاتها، وإنَّما أيضًا ليتعلّموا عن البروتين GFP ومُميّزاته. طمحوا بواسطة هذه الطفرات إلى التعرُّف على الأحماض الأمينيّة الحيويّة للعمليّة الفلورسنتيّة في البروتين، مثل التغييرات في مبنى المجموعة اللونيّة أو استيعاب وإطلاق الأشعة.

من أجل تشخيص المواضع والمجموعات الجانبيّة المهمّة لصفات GFP، نُقارن بواسطة الأداة ClustalW تسلسل بروتين GFP مع تسلسلات بروتينات GFP تحوي طفرة أدَّت إلى تغيير في صفات البروتين. تحليل نتائج مُقارنة التسلسلات سيُشير إلى الأحماض الأمينيّة التي يؤدي تغييرها إلى التأثير على الصفات الفلورسنتيّة ل GFP.

للمُعلِّم: هدف المهمّة هو أنْ نعود ونتمرَّن على استعمال الأداة البيوإنفورماتيّة ClustalW المُستعملة لمُقارنة التسلسلات. في هذه المهمّة سنتعرَّف على الأحماض الأمينيّة الموجودة في مواضع هامّة في البروتين والتي تمنح GFP صفاته الفلورسنتيّة، ولن نتطرَّق إلى مناطق كاملة في التسلسل. كذلك سنتمرَّن على تحليل صفحة النتائج ونتعلَّم كيف نستنتج من نتائج مُقارنة تسلسلات بروتينات مُتعدِّدة عن المُتشابه والمُختلف بين تسلسلات هذه البروتينات.

المهمّة III: مُقارنة تسلسلات بروتينات فلوروسنتيّة لتشخيص مواضع هامّة في GFP (صفحة 2من2)

مُقارنة تسلسلات

الطفرات קישור العشوائيّة أو الموجهّة في تسلسل الجين المُشفِّر لبروتين GFP، أدَّت إلى إنتاج بروتينات ذات صفات فلورسنتيّة تختلف عن صفات البروتين الأصلي. هكذا وجد الباحثون بروتين طافر ذا مبنى أكثر ثباتًا ويقوم بإطلاق ضوء بشدَّة أكبر، ولذلك لُقب هذا البروتين باسم EGFP (اختصار ل enhanced GFP) للإشارة إلى GFP مُحسّن. كذلك وجد الباحثون بروتينات طافرة الأول من بينها يُطلق أشعة صفراء، الثاني يُطلق أشعة زرقاء – تميل للأخضر والثالث يُطلق أشعة باللون الأزرق؛ سُمّيت هذه البروتينات بـYFP (اختصار ل Yellow Fluorescent Protein)، CFP (اختصار ل Cyan Fluorescent Protein) و BFP (اختصار ل Blue Fluorescent Protein). سنستعين بمُقارنة تسلسل קישור GFP الأصلي مع تسلسلات البروتينات التي تحوي طفرات لنتعرَّف على المواضع التي حدثت فيها الطفرة وعن العلاقة بين هذه المواضع وبين الصفات الفلورسنتيّة لبروتين GFP. لهذا الهدف سنستعين بالأداة ClustalW المستعملة للتراصف التسلسليّ "העמדת רצפים".

أمامكم التسلسلات קישור بصيغة FASTA קישור- الصيغة اللازمة من أجل مُقارنة التسلسلات. انسخوا التسلسلات وقارنوا بينها بمُساعدة الأداة ClustalW קישור.

أمعنوا النظر في النتائج وابحثوا عن المواضع المُختلفة بين التسلسلات. لهذا الهدف حاولوا إيجاد أسطر في المُقارنة فيها الإشارة تحت الموضع تختلف عن الاشارة *، ممّا يُشير إلى عدم وجود تطابق. بالإمكان أيضًا تلوين الأحماض الأمينيّة بحسب مُميّزاتها بواسطة الضغط على الزر Show Colors(شاشة 1).

```
CFP       MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTL 60
BFP       MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTL 60
YFP       MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTL 60
GFP       MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTL 60
eGFP      MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTL 60
          ************************************************************

CFP       VTTFSWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV 120
BFP       VTTFSHGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV 120
YFP       VTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV 120
GFP       VTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV 120
eGFP      VTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV 120
          ****: ********************************************************

CFP       NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD 180
BFP       NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD 180
YFP       NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD 180
GFP       NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD 180
eGFP      NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD 180
          ************************************************************

CFP       HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYK 238
BFP       HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYK 238
YFP       HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYK 238
GFP       HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYK 238
eGFP      HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYK 238
          ********************* **********************************
```

الشاشة 1: نتائج مُقارنة تسلسلات البروتينات الفلورسنتيّة المُختلفة.

3. ما هي الطفرة في البروتين EGFP؟

- أ. تغيير في الموضع 65، استبدال الحامض الأميني ثريونين (T) بالحامض الأميني سيرين(S).
- ب. تغيير في الموضع 65، استبدال الحامض الأميني سيرين(S) بالحامض الأميني ثريونين (T).

- ج. تغيير في الموضع 66، استبدال الحامض الأميني تايروسين (Y) بالحامض الأميني هستيدين(H).
- د. تغيير في الموضع 66، استبدال الحامض الأميني تايروسين (Y) بالحامض الأميني تربتوفان(W)

الإجابة هي: ب. استبدال الحامض الأميني سيرين(S) الموجود في الموضع 65 بالحامض الأميني ثريونين (T) يؤدّي إلى الصفات المُحسّنة في بروتين EGFP. الطفرة تُدعى S65T لتُشير إلى موضع الطفرة وإلى الأحماض الأمينيّة التي تغيّرت فيها (الشاشة 1).

4. من هما البروتينان الطافران اللذان يحملان طفرة في نفس الموضع؟

- أ. EGFP و GFP.
- ب. BFP و YFP.
- ج. BFP وCFP.
- د.YFP و EGFP.

الإجابة هي: ج. البروتين BFP والبروتين CFP يحملان طفرة في الموضع 66 في البروتين (الشاشة2). استبدال الحامض الأميني تايروسين (Y) بالحامض الأميني هستيدين (H) يؤدّي إلى إطلاق ضوء بلون أزرق (BFP)، بينما استبداله بالحامض الأميني تربتوفان (W) يؤدّي إلى إطلاق ضوء بلون أزرق- يميل للأخضر (CFP).

5. أي من البروتينات يحمل طفرة في حامض أميني ليس جُزءً من المجموعة اللونيّة (الموجودة في المواضع 65-67)؟

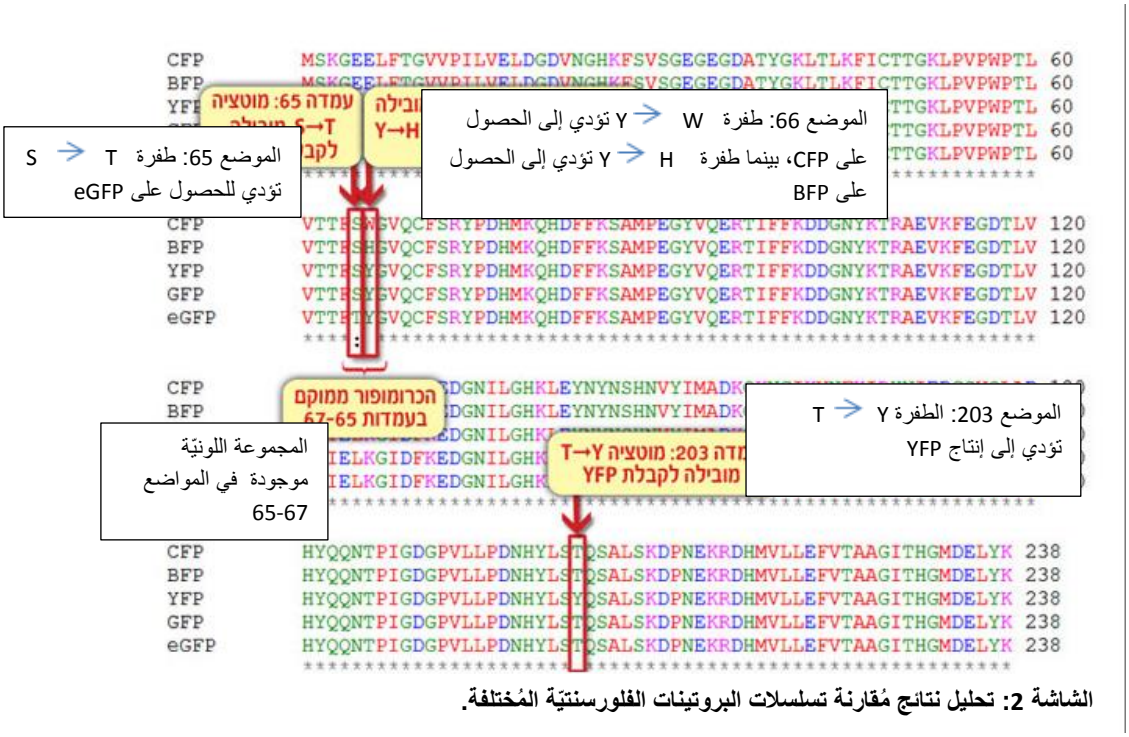
- أ. EGFP
- ب. YFP
- ج. BFP
- د. CFP.

الإجابة هي: ب. الطفرة في البروتين YFP موجودة في الموضع 203، بينما الطفرات في بقيّة البروتينات التي فحصناها موجودة في المواضع 65-66. كما ذُكر، الأحماض الأمينيّة التي تُكوِّن المجموعة اللونيّة موجودة في المواضع 65-67.

6. ماذا يُمكن القول عن المواضع التي تركَّزت فيها الطفرات التي تؤثِّر على الصفات الفلورسنتيّة للبروتينات؟ كيف يُمكن أنْ تشرحوا ذلك بحسب المعلومات عن المواضع التي تُركِّب المجموعة اللونيّة؟

للمُعلِّم: مُعظم الطفرات مُركَّزة في الأحماض الأمينيّة التي تُركِّب المجموعة اللونيّة، فالمجموعة اللونيّة هي قِسْم البروتين المسؤول عن صفاته الفلورسنتيّة، لذلك فالتغيير في مبناها الكيميائيّ، أيْ في الأحماض الأمينيّة التي تُركِّبها، يُمكنه أنْ يؤثِّر على طول الموجة المُنطلقة (لون) من البروتين، أو على ثبات الضوء وغيرها. مع ذلك هناك طفرات كتلك التي في البروتين YFP، تؤثِّر على الأحماض الأمينيّة البعيدة عن المجموعة اللونيّة، بحسب مكانها في تسلسل البروتين، ولكن يُمكن أنْ تكون لهذه الأحماض علاقة مُعيّنة بالمجموعة اللونيّة، بإمكاننا معرفة ذلك فقط من خلال بحث المبنى الفراغي للبروتين.

للتلخيص، استعملنا في هذه المهمّة الأداة ClustalW لمُقارنة تسلسل البروتين GFP مع بروتينات تحمل طفرات في مواضع هامّة تؤثِّر على الصفات الفلورسنتيّة الخاصة باللبروتين (شاشة2).



الشاشة 2: تحليل نتائج مُقارنة تسلسلات البروتينات الفلورسنتيّة المُختلفة.

الطفرات لم تمنح فقط العلوم الأساسيّة فهم الآليّات الفلورسنتيّة في GFP (شاشة 2)، وإنَّما أدَّت إلى توسيع تشكيلة البروتينات الفلورسنتيّة (شاشة1) وتطبيق استعمالها (رسم2). لاحظنا بواسطة مُقارنة التسلسلات، نوع الطفرات أي، الأحماض الأمينيّة التي تغيّرت في موضع مُعيّن، وأيضًا وجدنا أنَّ مُعظم الطفرات موجودة في المجموعة اللونيّة، إنْ لم تكن جميعها. لفهم العلاقة بين هذه المجموعات الجانبية والمجموعة اللونيّة أو البروتين الكامل، من الضروريّ أنْ نفحص مكانها في المبنى الفراغي. هذا ما سنفعله في المهمّة التالية.

ليس كل ما يلمع ذهبًا- قصة بروتين فلورسنتي أخضر

المهمّة IV: التعرُّف على المبنى الفراغي لبروتين GFP (صفحة 1من 2)

في مراحل البحث السابقة حدَّدنا إطار القراءة المفتوح קישור المُشفِّر لبروتين GFP، صمَّمنا بادئات קישור من أجل مُضاعفة التسلسل المُشفِّر واستنساخه داخل حامل التعبير وقارننا تسلسل البروتين مع بروتينات طافرة تغيّرت صفاتها الفلورسنتيّة، بهذه الطريقة عرفنا المواضع الهامّة لوظيفة البروتين GFP. بقي علينا الآن أنْ نفحص ما هو المبنى الفراغي קישור للبروتين؟ وكيف يُمكِّن هذا المبنى من أداء البروتين لوظيفته كوَسْم فلورسنتيّ؟

نتمعّن في هذه المهمّة في المبنى الفراغي لبروتين GFP. للإجابة عن أسئلة البحث نتعمّق في المُستويات المختلفة لمبنى البروتين، من طيِّ البروتين الكامل وحتى تسلسل عدَّة أحماض أمينيّة فيه. كذلك سنؤشِّر الأحماض الأمينيّة الحيويّة التي تُركِّب الموقع الفعّال أي، المجموعة اللونيّة، أو تلك الأحماض التي تؤثِّر الطفرات فيها على الصفات الفلورسنتيّة، ونُحاول أنْ نفهم كيف يُمكِّن مبنى البروتين من أدائه لوظيفته.

للمُعلِّم:

من المفضَّل في هذه المرحلة أنْ نُذكِّر الطلاب أنَّ هناك علاقة وطيدة بين مبنى البروتين وبين أدائة الوظيفي (هذه العلاقة تُسمّى بالمصطلحات العلميّة struture-function). باختصار، في هذه المهمّة نقوم بمسح مبنى بروتين GFP الأول الذي حُلِّل على يد الباحثين في سنة 1996 وكان بداية طريق فهم آليّات عمل البروتين، سنتركَّز على الأحماض الأمينيّة الحيويّة لأداء بروتين GFP لوظيفته كبروتين فلورسنتيّ.

لفحص المبنى الفراغي للبروتين GFP نستعمل الأداة Jmol وملّف مبنى البروتين. سيُساعدنا تغيير طريقة عرض المبنى الفراغي بمُساعدة البرنامج في التعمق بالمُستويات المُختلفة لمبنى البروتين.

ليس كل ما يلمع ذهبًا- قصة بروتين فلورسنتي أخضر

المهمّة IV: التعرُّف على المبنى الفراغي لبروتين GFP (صفحة 1من 2)

تحليل مبنى البروتين GFP

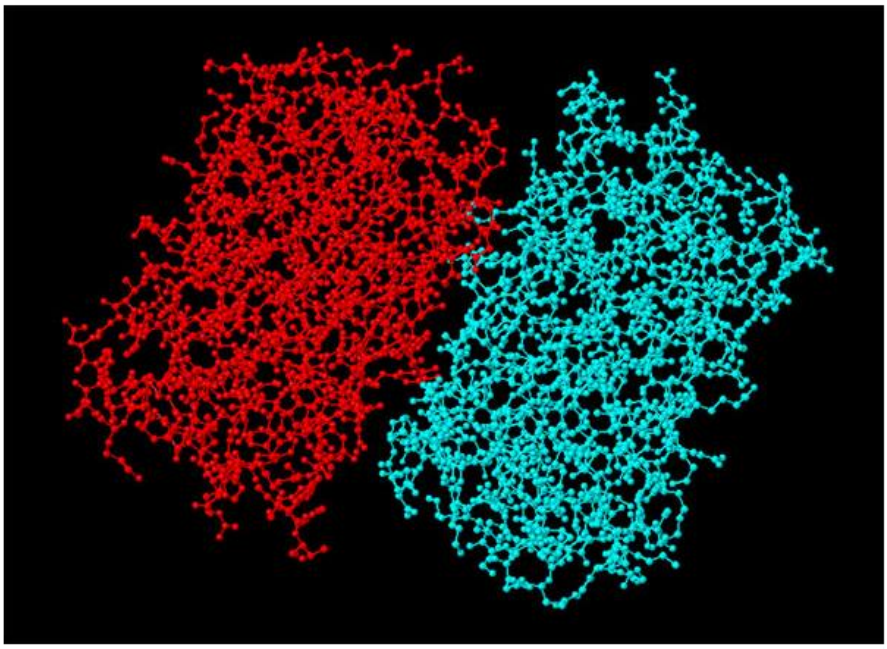
تجدون على سطح المكتب (שולחן עבודה) مكتبة (ספרייה) اسمها "Jmol" وفيها مكتبة تُسمّى PDB. نجد في هذه المكتبة ملف مبنى يُسمّى 1GFL.pdb مصدره من مخزن المعلومات RCSB-PDB קישור. إذا لم تجد الملف، قُم بتحميله من الرابط 1GFL.pdb קישור واحفظه على سطح المكتب. افتحوا بيئة عمل الأداة Jmol، بواسطة الملف jmol.jar، افتحوا الملف 1GFL.pdb، باستعمال الأمر **File ➔ Open ➔1GFL.pdb**. انتبهوا، يُمكن أنْ يختلف الخيار التلقائي (ברירת המחדל) بحسب نسخة البرنامج الموجودة في حاسوبكم. إذا كان عرض المبنى يختلف عن طريقة عرض عيدان وكرات، اضغط على الجهة اليُمنى للفأرة، واختر من القائمة **Style ➔ Scheme ➔ Ball and Stick**. المبنى الذي يظهر أمامنا مُكتظ قليلًا (مُتراصٌ)، سنقوم بعدَّة تغييرات بطريقة عرض المبنى الفراغي لGFP.

نقوم في المرحلة الأولى بتغيير لون البروتين بمُساعدة الأوامر التاليّة:

- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة (عندما يكون مؤشر الفأرة على المبنى) ونختار الأمر: **Color➔ Atoms ➔Red**.

- نفتح لوحة المراقبة **File ➔ Console**. ونكتب داخلها الأمر**"Select :B"** نضغط على Enter. ونُغلق نافذة Console.
- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر:**Cyan ➔ Atoms ➔ Color .**
- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر:**All water ➔ Hetro ➔ Select.**
- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر:**Off ➔ Atoms ➔ Style .**

نُدير المبنى (بمُساعدة الضغط على الجهة اليسرى للفأرة وتحريك الفأرة) ونغيّر دقة الصورة (بواسطة استعمال عجل الفأرة). بإمكاننا رؤية طريقة عرض البروتين الناتجة في الشاشة 1.



الشاشة1: طريقة عرض البروتين GFP الناتجة بعد تنفيذ الأوامر.

1. ما هو التغيير الذي حدث لطريقة عرض البروتين نتيجة للأوامر التي نفَّذتها؟

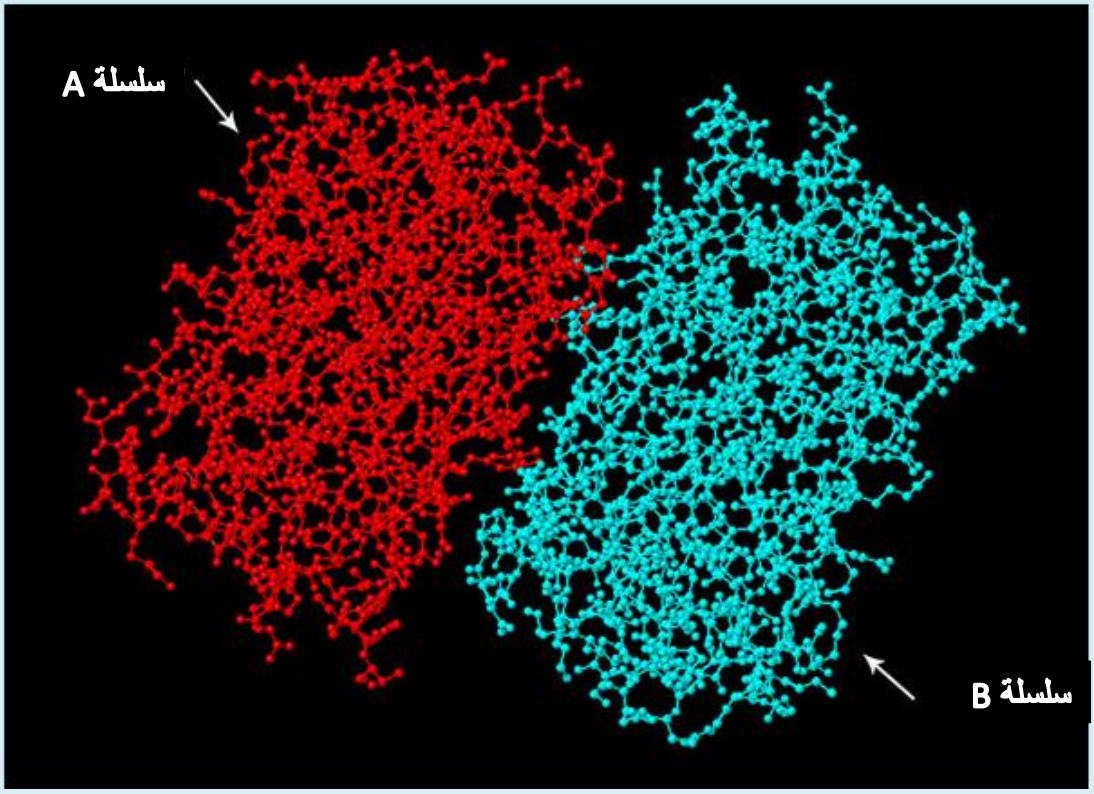
- أ. يحتوي المبنى على سلسلة بروتينيّة واحدة (chain)، تمّ تلوين المناطق المُختلفة في البروتين بألوان مُختلفة.
- ب. يحتوي المبنى على سلسلة بروتينيّة واحدة (chain)، تمّ تلوين المناطق المُختلفة في البروتين بألوان مُختلفة. وحُذفت جُزيئات الماء.
- ج. يحتوي المبنى على زوج من السلاسل البروتينيّة (chains)، لوّنت كل سلسلة بلون مُختلف.
- د. يحتوي المبنى على زوج من السلاسل البروتينية (chains), لوّنت كل سلسلة بلون مُختلف. وحُذفت جُزيئات الماء.

الإجابة هي: د. ملف المبنى يحتوي على معلومات عن جُزيئتيّ بروتين GFP اللتان تُسمّيان سلسلة A و B (chains) وكذلك معلومات عن مكان جُزيئات الماء. الأوامر التي نُفِّذت أزالت جُزيئات الماء من العرض ولوّنت البروتينيْن (السلسلتين) بلونين مُختلفين.

2. ما هو المبنى الرُّباعيّ الموجود أمامكم (تذكَّر المبنى الرُّباعيّ يتطرّق إلى الارتباط بين سلاسل البروتين المُختلفة)؟

- أ. بروتين وحيد (مونومير)
- ب. زوج بروتينات (ديمير)
- ج. ثلاثة بروتينات (تريمير)
- د. لا يُمكن المعرفة.

الإجابة هي: ب. تعرض الأداة مبنى سلسلتي بروتين GFP مُتجاورتيْن، أي، ديمير (شاشة2). في هذه الحالة الحديث عن "هومو-ديمير". "هومو" معناها "مُتطابق"، "ديمير" معناها "زوج".



شاشة 2: مبنى الديمير

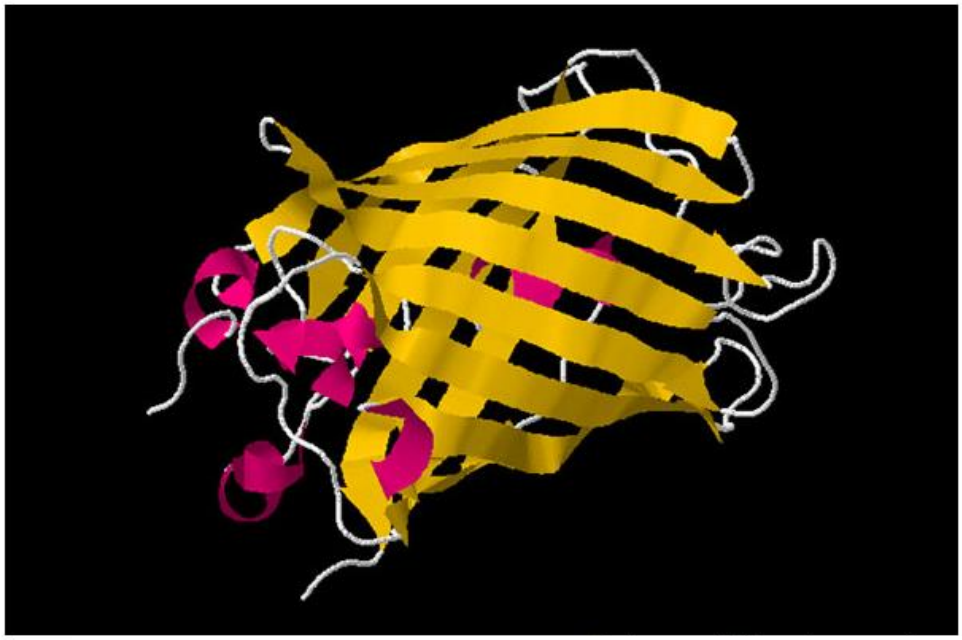
أمامنا مبنى GFP الذي تمَّت بلورته קישור، نرى فيه سلسلتيْن بروتينيّتيْن مُتطابقتيْن، مُتجاورتيْن ومتلامستيْن تقريبًا. هذه القُرب يُميّز غالبًا البروتينات الفلورسنتيّة الموجودة في الخلايا الحيّة، وهو ضروريّ في أغلب الأحيان لظاهرة الفلورسنتيّة داخل الخليّة الحيّة. كشفت أبحاث مُختلفة أنَّه توجد بروتينات فلورسنتيّة تميل لتشكيل مُعقّد (תצמיד) أكبر مثل رُباعيّات (تترامير קישור).

نُغيّر الآن طريقة عرض جُزيئة البروتين، للتعرُّف على مُميّزاته وبشكل خاص للتعرُّف على المباني الثانويّة الموجودة فيه:

- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر: **Select ➔ Protein ➔ All .**
- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر: **Style ➔ Scheme ➔ Cartoon .**
- نفتح لوحة المراقبة **File ➔ Console** . ونكتب داخلها الأمر"**Select :B**" نضغط على Enter. ونُغلق نافذة Console.

- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر: **Style ➔ Structures ➔ Off** .

في الشاشة 3 يُمكننا رؤية طريقة عرض البروتين الناتجة.



الشاشة3: طريقة عرض البروتين GFP الناتجة بعد تنفيذ الأوامر .

3. ما هو التغيير الذي حدث لطريقة عرض البروتين نتيجة للأوامر التي نفَّذتها؟

- أ. لم يحدث أي تغيير، الأوامر أدَّت فقط إلى اختيار جُزيئة البروتين.
- ب. تغيّرت طريقة عرض البروتين إلى طريقة عرض المبنى الثانويّ.
- ج. تغيّرت طريقة عرض البروتين إلى طريقة عرض المبنى الثانويّ؛ تمّ تلوين مُسطحات صفائح بيتا ولوالب ألفا بالألوان المُلائمة.
- د. تغيّرت طريقة عرض البروتين إلى طريقة عرض المبنى الثانويّ، تمّ تلوين مُسطحات صفائح بيتا ولوالب ألفا بالألوان المُلائمة. بالإضافة إلى ذلك أُزيلت سلسلة واحدة من السلاسل التي تكوِّن الديمير קישור.

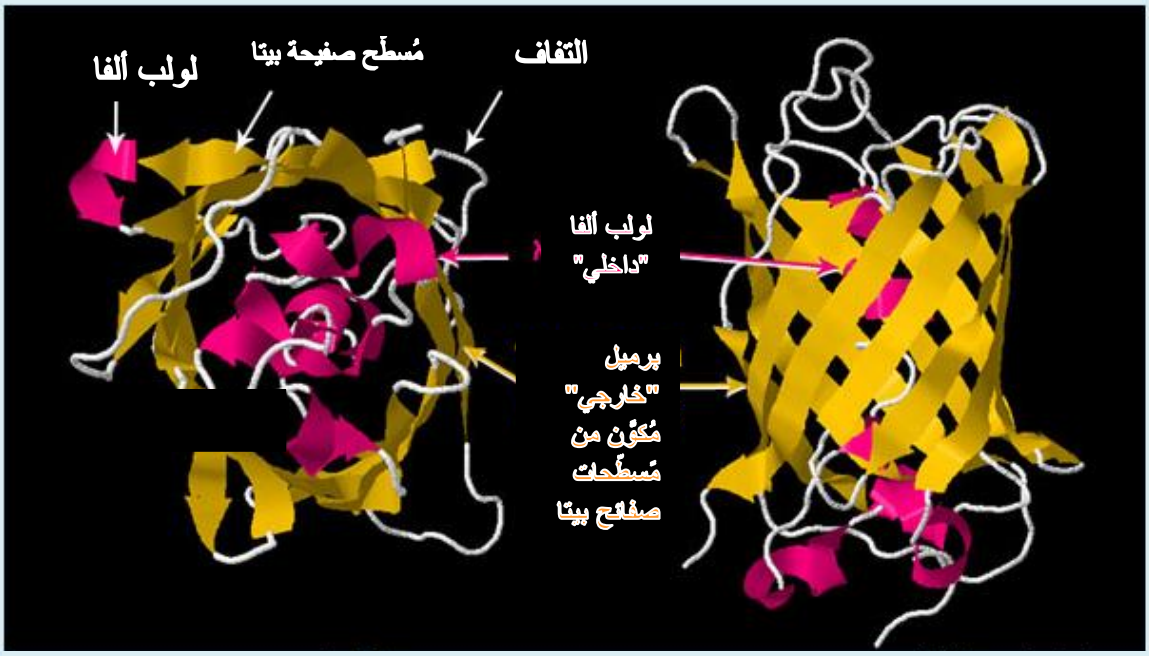
الإجابة هي: د. كما يُمكن أنْ نلاحظ في الشاشة 3، تغيّرت طريقة عرض البروتين. الآن لا يُمكنْ أنْ نرى الذرات المُنفردة التي تُركِّب البروتين ولكَّننا نرى المباني الثانويّة الموجودة فيه. بالإضافة إلى ذلك تغيّر لون البروتين، الألوان ليست حسب السلاسل A و B وإنَّما حسب مُركَّبات المبنى الثانويّ. بعد تنفيذ الأمر الأخير اختفت السلسلة B.

4. كيف تصفون مبنى البروتين (دوِّروا المبنى من أجل النظر إلى البروتين من زوايا مُختلفة)؟

- أ. برميل مُكوّن في الأساس من مُسطحات صفائح بيتا وفي داخلها لولب ألفا.
- ب. برميل مُكوّن في الأساس من لوالب ألفا קישור داخلها مُسطّح صفائح بيتا קישור.
- ج. كرة مُغلقة مُكوّنة في الأساس من مُسطّحات صفائح بيتا في داخلها لولب ألفا.

- د. كرة مُغلقة مُكوّنة في الأساس من لوالب ألفا في داخلها مُسطّح صفائح بيتا.

الإجابة هي: أ. كما نرى في الشاشة 4، للبروتين مبنى يُشبه البرميل، مكوَّن في الأساس من مُسطّحات صفائح بيتا في داخلها لولب ألفا.

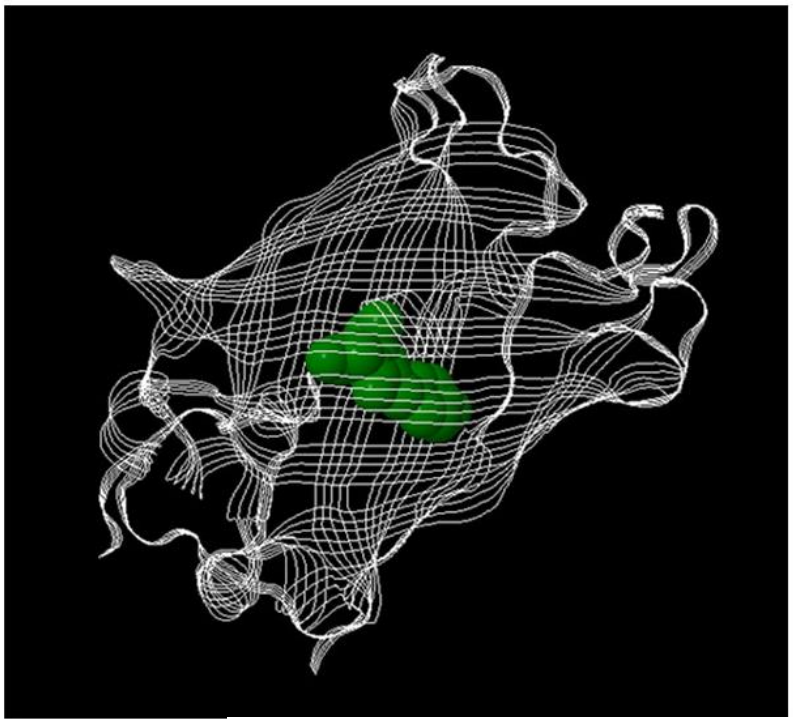


الشاشة 4: لبروتين GFP مبنى يُشبه البرميل، مُكوّن من مُسطّحات صفائح بيتا في داخلها لولب ألفا

نتركّز الآن في المجموعة اللونيّة. المجموعة اللونيّة هي بمثابة " الموقع الفعّال للبروتين" קישור، حيث أنَّها مسؤولة عن الظاهرة الفلورسنتيّة. المجموعة اللونيّة في GFP تحتوي على ثلاثة أحماض أمينيّة في المواضع 65- 67 والتي تمّر بعدد من التغييرات بعد ترجمة البروتين. نقوم بتغيير طريقة عرض الأحماض الأمينيّة التي تكوِّن المجموعة اللونيّة من أجل دراستها عن قُرب.

- نفتح لوحة المُراقبة **File ➔ Console**. نكتب داخلها الأمر "Select :A" ونضغط على Enter. نُغلق نافذة Console.
- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر: **Style ➔ Structures ➔ Strands**.
- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر: **Color ➔ Structures ➔ Strands ➔ White**.
- نفتح لوحة المُراقبة مُجدَّدًا **File ➔ Console**. نكتب داخل لوحة المراقبة الأمر "**Select 65-67:A**" ونضغط على Enter. نُغلق نافذة Console.
- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر: **Style ➔ Atoms ➔ 100% van der Waals**.
- نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر: **Color ➔ Atoms ➔ Green** .
- نقوم بتدوير المبنى ونُحاول إيجاد الأحماض الأمينيّة التي لوّناها.

في الشاشة 5 يُمكن أنْ نرى طريقة العرض الناتجة للبروتين



الشاشة 5: طريقة عرض البروتين الناتجة بعد تنفيذ الأوامر

5. أين تتواجد الأحماض الأمينيّة التي تُكوِّن المجموعة اللونيّة؟

- أ. لا يُمكن المعرفة.
- ب. على لولب ألفا، في مركز البرميل المكوّن من مُسطحات صفائح بيتا.
- ج. خارج البرميل المكوّن من مُسطحات صفائح بيتا، على مُسطح صفائح بيتا.
- د. في طرف البرميل المكوّن من مُسطحات صفائح بيتا، على مُسطّح صفائح بيتا.

الإجابة هي: ب. على لولب ألفا، في مركز البرميل المكوّن من مُسطّحات صفائح بيتا.

6. مبنى برميل مكوَّن من مُسطّحات صفائح بيتا وفي مركزها موقع فعّال، هو مبنى موجود أيضًا لدى إنزيمات أخرى، مثل البروتوزوم (פרוטאוזום) קישור). ما هي الأفضليّة التي يمنحها هذا المبنى؟

للمُعلِّم: مبنى البرميل يُمكِّن من إنتاج بيئة داخليّة "معزولة ومحميّة " في مركزه. هذا العزل عن البيئة الخارجية عمليٌّ جدًّا في فعاليّات إنزيمية كثيرة. مثلًا لدى بروتينات من نوع porins أي القنوات البروتينيّة التي تخترق غشاء الخلية، يُنتج هذه المبنى بيئة داخليّة هيدروفيليّة (مُحبّة للماء) التي تُمكِّن الأيونات من عبور غشاء الخليّة

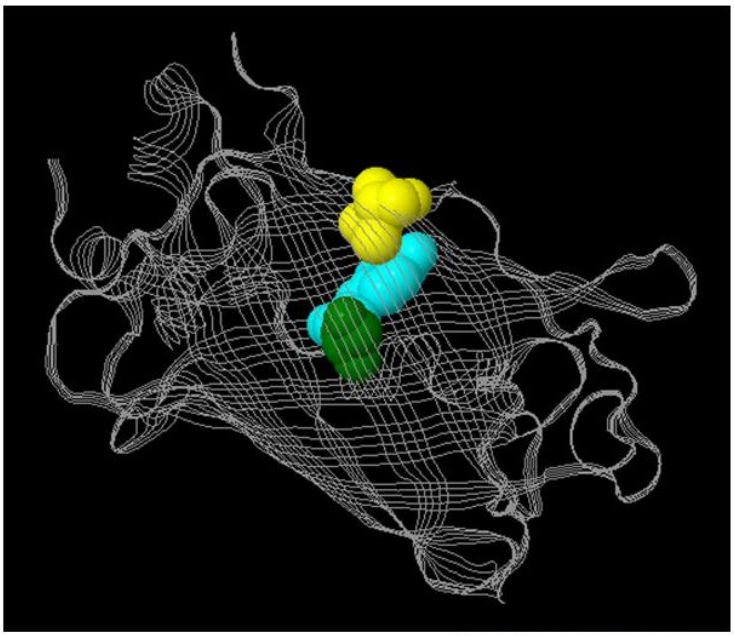
الهيدروفوبي. في GFP، يُزوّد هذا المبنى بيئة داخليّة خاصة توفّر "الحماية" للمجموعة اللونيّة وتُؤدي إلى ثباتها في ظروف بيئيّة قاسية نسبيًا، ممّا يجعل البروتين يتمتّع بصفة الفلورسنتيّة في مجال ظروف واسع نسبيًا.

كما لاحظنا في المهمّة السابقة، أنَّ طفرات مُعيّنة في البروتين تؤدي إلى إطلاقه ضوءً مُختلفًا عن الضوء الأخضر. هكذا مثلًا، أدَّت الطفرات النقطيّة إلى إنتاج BFP، CFP، YFP وغيرها من البروتينات الفلورسنتيّة المُشابهة جدًّا لGFP. نُحاول أنْ نجد مكان مواقع هذه الطفرات في المبنى الفراغي للبروتين. أولًا نقوم بعرض كل السلسلة بشكل موّحد. لذلك نفتح لوحة المُراقبة **File ➔ Console**، نكتب داخلها الأمر "**Select :A**"، نضغط على Enter، نضغط على الجهة اليُمنى للفأرة ونختار الأمر: **Style ➔ Structures ➔ Strands**. استخدموا الأمر Select في لوحة المُراقبة لاختيار المجموعات الجانبيّة التي ترغبون بها، وأمر التحكُّم بحجم الذرات (**Style ➔ Atoms ➔ 100% van der Waals**)، والأمر لاختيار لون الذرات (**Color ➔ Atoms ➔**)، من أجل تلوين هذه المواضع:

للمُعلِّم: من المُفضَّل أولًا اختيار حجم الذرات ومن ثمَّ اختيار اللون، لأن الطالب يستطيع أنْ يتعقَّب بشكل مرئي نتيجة كل مرحلة. يُمكن أيضًا أنْ نختار أولًا لون وفقط بعدها نُغيّر حجم الذرات، لكن عندها لا يرى الطالب تغييرًا بعد اختيار اللون، لأنَّ حجم الذرات "صغير جدًّا".

- تلوين الحامض الأميني في الموضع 65 بلون أخضر، green (في هذا الموضع طفرة في بروتين eGFP).
- تلوين الحامض الأميني في الموضع 66 بلون أزرق سماوي، cyan (في هذا الموضع طفرة في بروتينات BFP وCFP).
- تلوين الحامض الأميني في الموضع 203 بلون أصفر، yellow (في هذا الموضع طفرة في بروتين YFP).

في الشاشة 6 يُمكن أنْ نرى المواضع المذكورة بعد تغير طريقة عرضها في البروتين.



الشاشة 6: الإشارة إلى مواضع حيويّة في GFP

7. فكّروا ثُمَّ فسروا مكان وجود المواضع التي تؤدي إلى التغيير في الصفات الفلورسنتيّة لبروتين GFP؟

للمُعلِّم: المجموعة اللونيّة المسؤولة عن الصفات الفلورسنتيّة موجود في مركز مبنى البرميل. بالرّغم من أنَّ التغييرات في هذا الموقع تؤدي في أغلب الأحيان لتغيير في مبنى البروتين ونتيجته يفقد البروتين قدرته على إطلاق الضوء، لكن توجد أيضًا عدَّة تغييرات في مواضع الموقع الفعّال، أو بالقرب منه، تؤثر على لون الضوء المُنطلق. من المُهم أنْ نذكر أنَّ طفرات إضافيّة معروفة لنا تؤثِّر على لون الأشعة الفلورسنتيّة موجودة خارج الموقع الفعّال. الطفرات في هذه المواضع تؤثر بشكل غير مُباشر على مبنى الموقع الفعّال ذاته وبالتالي تؤثر على اللون. مثلًا، الطفرة في الموضع 203، بالرغم من أنَّها بعيدة جدًّا عن المجموعة اللونيّة في تسلسل البروتين، إلا انها قريبة جدًّا منها في المبنى الفراغي ولذلك فهي تشترك في صفات البروتين الفلورسنتيّة.

للتلخيص، تمعَّننا في هذه المهمّة في مبنى بروتين GFP الموجود لدى قناديل البحر. عرفنا أنَّ المبنى الذي بُلوِّر هو هومو-ديمير يتركَّب من بروتينْين مُتشابهيْن من GFP، مُرتبطان ببعضهما البعض. بعد أن لوَّننا كل واحد من البروتينين بحسب المبنى الثانوي، رأينا أنَّ كل وحدة بروتينيّة مُكوَّنة من برميل مكوَّن من مُسطحات صفائح بيتا. يُنتج هذا المبنى بيئة داخليّة محميّة للموقع الفعّال للبروتين والمُسمّى المجموعة اللونيّة. المجموعة اللونيّة عبارة عن جُزء من لولب ألفا الموجود في مركز البرميل. ساعَدَنا بحث المبنى الثانوي على تحديد مكان الطفرات التي تؤثِّر على الصفات الفلورسنتيّة ل GFP، أي على أنْ نعرف: هل تتواجد هذه الطفرات في المجموعة اللونيّة أو بالقرب منها على البرميل. ساعدتنا هذه النتائج على أنْ نفهم أنَّ أهمية مبنى المجموعة اللونيّة وأدائها السليم لوظيفتها لا يتعلَّق فقط بالأحماض الأمينيّة التي تكوِّنها، وإنَّما أيضًا بالأحماض الأمينيّة الموجودة بالقرب منها في المبنى الفراغي .

ليس كل ما يلمع ذهبًا- قصة بروتين فلورسنتي أخضر

تلخيص

انضممنا في هذه الفعاليّة إلى المراحل الأساسيّة لبحث استغرق سنوات عديدة وغيّر مجاليّ البيولوجيا الجُزيئيّة و البيوكيمياء العصريين. ركَّزنا في البداية على وسائل استنساخ التسلسل المُشفِّر لGFP لنستعمله كوَسْم مُضيئ لتأشير البروتينات وتعقّبها ولبحث مراقبة التعبير عن الجينات. لهذا الهدف وجدنا إطار القراءة المفتوح وحدود التسلسل المُشفِّر للبروتين بواسطة الأداة ORF Finder. استعملنا هذه المعلومات والأداة Primer3Plus لتصميم بادئات لاستعمالها لتعزيز التسلسل المطلوب بطريقة ال PCR قبل استنساخه إلى داخل بلاسميد. ركَّزنا بعدها على الجوانب المُتعلِّقة بمبنى ووظيفة البروتين وشدَّدنا على الصفات الفلورسنتيّة ل GFP. قارننا بمُساعدة الأداة ClustalW بين تسلسل البروتين السليم وتسلسلات بروتينات طافرة. تعلَّمنا من خلال هذه المقارنة عن المواضع الهامّة في البروتين، التي تؤثِّر الطفرة فيها على ثبات البروتين، على شدَّة الضوء الفلورسنتي أو على لونه. تعلَّمنا بواسطة الأداة Jmol عن المبنى الفراغي للبروتين وعرفنا أنَّ ل GFP مبنى مُشابه للبرميل والمكوّن من مُسطّحات صفائح بيتا، وبداخله تتواجد المجموعة اللونيّة. يمنح مبنى البرميل الحماية للمجموعة اللونيّة ممّا يجعل البروتين قادرًا على القيام بوظيفته في ظروف بيئية سيئة أيضًا. بالإضافة إلى ذلك اكتشفنا أنَّ الطفرات التي تؤثِّر على الصفات الفلورسنتيّة للبروتين موجودة في المجموعة اللونيّة أو بقربها على سطح البرميل. من خلال الفعاليّة تعلَّمنا كيف يتلاءم مبنى GFP مع وظيفته.

خلال الفعاليّة تعرَّفنا على باحثين مُهمين، ساهموا بشكل كبير في اكتشاف GFP، فهم مبناه وطريقة عمله وتطوير استخدامات له. فاز قسم منهم بجائزة نوبل للكيمياء سنة 2008: عزل أوساموشيمومورا لأول مرة بروتين GFP من قنديل البحر *Aequorea Victoria* واكشف أنَّ البروتين يُطلق أشعة عندما يتعرض لأشعة فوق بنفسجية (אולטרה-סגולה)؛ أثبت مارتين تشالفي قيمة GFP كبروتين مُخبِر عندما نجح بالتعبير عنه في البكتيريا وفي ظروف مُعيّنة داخل دودة؛ ساهم روجر تشين بفهم آليّة إضاءة GFP، وزاد من تشكيلة ألوان البروتينات الفلورسنتيّة، الأمر الذي مكَّن الباحثين من تعقُّب عدَّة عمليّات بيولوجيّة مُنفصلة في نفس الوقت.

مع مرور الزمن ساعدت الأدوات البيوإنفورماتيّة المُتنوعة والمُختلفة بالبحث الأساسي، وأيضًا بالبحث التطبيقي المُتعلِّق ببروتين GFP وببروتينات فلورسنتيّة إضافيّة والتي اكتُشفت وبُحثت بعد ذلك. كما نرى فإنَّ مُساهمة البيوإنفورماتيكا مُهمّة وكبيرة، وبإمكانها أنْ تُساعد وتدعم البحث الذي يعتمد على التجارب، إنْ كان في المراحل التخطيطيّة للبحث (مثلًا تصميم بادئات لPCR بالاستعانة بإطار القراءة الذي تمّ تحديده من التسلسل المعزول)، أو في عرض وتحليل نتائجه (مثل عرض المبنى الفراغي لبروتين أو تشخيص مواقع الطفرات).

ليس كل ما يلمع ذهبًا- قصة بروتين فلورسنتي أخضر

مصادر وإثراء

- סרטון המציג את מנגנון הפעולה שלGFP
- דף החלבון GFP בפרוטאופדיה
- כתבה בנושא הענקת פרס נובל בכימיה למגלי הGFP- - אתר הידען, 8.10.2008
- אתרGFP) באנגלית (