" سباق التسلُّح ("מירוץ החימוש ") - تطوير "جيل جديد" من المُضادّات الحيويّة (الأنتبيوتيكا).

المَهمّة II : الانتقال من تسلسل النوكلوئتيدات إلى تسلسل البروتين بمساعدة الأداة ORF Finder (صفحة 1 من 5 صفحات)

هدف المَهمّة :

في المرحلة السابقة عرفنا أنَّ تسلسل النوكلوئتيدات الذي عزلناه من الفطر كان مُماثلًا (هومولوجيًّا-הומולוגי) لتسلسلات الجينات المشفِّرة لإنزيم isopenicillin N synthetase، باختصار IPNS، والذي يشترك في المسار الأيضي لإنتاج البنسلين. لاحظنا أنّه بالرّغم من أنَّ تسلسل النوكلوئتيدات الذي عزلناه مشابه لتسلسل الجين المشفِّر ل IPNS، إلا أنَّ هناك مواضع كثيرة يختلف فيها التسلسلان عن بعضهما البعض. من المُحتمل أنْ تؤدّي هذه الفروقات في تسلسلات ال DNA إلى فروقات في تسلسل البروتينات أيضًا. علينا فحص إذا كانت هذه الفروقات الموجودة بين تسلسل البروتين الذي نبحثه (الذي يُشفَّر بواسطة التسلسل الذي عزلناه)، وبين تسلسل الإنزيم IPNS موجودة في مناطق مُهمة لفعاليّة الإنزيم، كالموقع الفعّال אתר הפעיל مثلًا. في المرحلة الأولى، يجب علينا تحديد تسلسل البروتين، ثمّ إيجاد الأحماض الأمينيّة المُتوقّع أنْ تركِّب الموقع الفعّال فيه، ومن ثُمّ فحص تطابقها مع الأحماض الأمينيّة للموقع الفعّال التابع لإنزيم IPNS معروف.

للمعلِّم: في هذه المرحلة البدائيّة من المُفضَّل التوضيح للطلاب أنَّ التماثل (הומולוגיה) الذي لاحظوه على مُستوى تسلسل النوكلوئتيدات هو شهادة أوليّة وليست مؤكدة، على هويّة البروتين الذي يُشفِّر له التسلسل. عند الأخذ بالحسبان الفروق بين تسلسل الجينات، هناك احتمال كبير أنْ يكون الجين الذي حدَّدنا تسلسله يُشفِّر لإنزيم مُشابه – ولكنّه غير مُطابق – بالتسلسل والمبنى لإنزيم IPNS، ومن المحتمل أيضًا أنْ يكون هذا الجين ذا فعاليّة مُشابهة في المسار الأيضيّ لإنتاج البنسلين. احتمال مُمكن آخر هو أنْ يكون للإنزيم الجديد الذي عزلناه وظائف تختلف عن وظائف الإنزيم IPNS في المسار الأيضيّ المذكور. انتبهوا أنّه من المُمكن إلغاء الامكانيّات التي تدّعي أنَّ تسلسل النوكلوئتيدات هو تسلسل جين كاذب (פסאודו-גן - Pseudogenes)(جين غير فعّال بسبب طفرة تمنع التعبير الفعّال للجين) لأنَّ عزل التسلسل تمَّ بالاعتماد على استعادة القدرة على إنتاج المُضادّ الحيويّ لدى الفطر الذي يحمل الطفرة.

في الفعاليّات القادمة سنحدِّد تسلسل البروتين الذي يُشفَّر بواسطة تسلسل النوكلوئتيدات الذي عزلناه، سنقوم بتحديد من هو البروتين وما هي فعاليّته، وذلك لتأكيد الفرضية أنَّ هذا الجين بالفعل يُشفِّر إلى إنزيم ذا فعاليّة مُشابهة ل IPNS. في هذه الفعاليّة سنُترجم أولًا تسلسل نوكلوئتيدات الجين (الذي عُزل وحُدِّد تسلسله في المَهمّة الأولى) إلى تسلسل أحماض أمينيّة (بروتين) بواسطة الأداة ORF Finder. بعدها سنبحث عن بروتينات ذات تسلسل مُماثل لتسلسل البروتين الذي ترجمناه، ونفحص إذا كان الموقع الفعّال فيه كالموقع الفعّال الذي يُميّز إنزيمات من نوع IPNS.

من أجل معرفة تسلسل البروتين الذي يُشفِّر له تسلسل الجين المعزول، نقوم بما يلي: تحديد إطار القراءة المفتوح (מסגרת קריאה פתוחה) في تسلسل النوكلوئتيدات الذي عزلناه وتحديد تسلسل البروتين – نتأكُّد من وجود إطار قراءة يُشفِّر إلى بروتين بطول مقبول، ومن ثمّ نُترجم تسلسل النوكلوئتيدات في إطار القراءة المفتوح لتسلسل أحماض أمينيّة بمساعدة الأداة ORF Finder.

" سباق التسلُّح ("מירוץ החימוש ") - تطوير "جيل جديد" من المُضادّات الحيويّة (الأنتبيوتيكا).

المَهمّة II : الانتقال من تسلسل النوكلوئيدات إلى تسلسل البروتين بمُساعدة الأداة ORF Finder (صفحة 2 من 5 صفحات)

تحديد إطار القراءة المفتوح (מסגרת קריאה פתוחה) في تسلسل النوكلوئيدات الذي عزلناه وتحديد تسلسل البروتين.

عن إطار القراءة מסגרות קריאה وعن الطريقة التي نُحدِّد فيها إطار القراءة المفتوح מסגרת קריאה פתוחה يمكن أنْ تقرأ في فصل المقدمة البيولوجيّة המבוא הביולוגי .

أمامنا المهمّات التالية: تحديد إطار القراءة المفتوح من بين أُطر القراءة السّتة المُمكنة للجين؛ تحديد التسلسل المُشفِّر للبروتين ومن خلاله استنتاج تسلسل الأحماض الأمينيّة للبروتين. لهذا الهدف يجب إيجاد تسلسل نوكلوتيدات طويل قدر الامكان، بدايته بشيفرة بدء ترجمة קודון התחלת תרגום (شيفرته في تسلسل الDNA هي ATG)، امتداده بشيفرات تُشفِّر إلى أحماض أمينيّة ونهايته أحد شيفرات وقف الترجمة קודוני סיום התרגום (هذه الشيفرات هي الثلاثيات TAA، TGA، TAG في تسلسل ال DNA).

من المُفضَّل قبل مُتابعة المَهمّة مُشاهدة الجولة الإرشاديّة للأداة ORF Finder التي تشرح مبادئ الاستعمال الأساسيّة للأداة בטרם נמשיך בפעילותנו מומלץ לצפות בסיור המודרך של הכלי ORF Finder המסביר עקרונות שימוש בסיסיים בכלי.

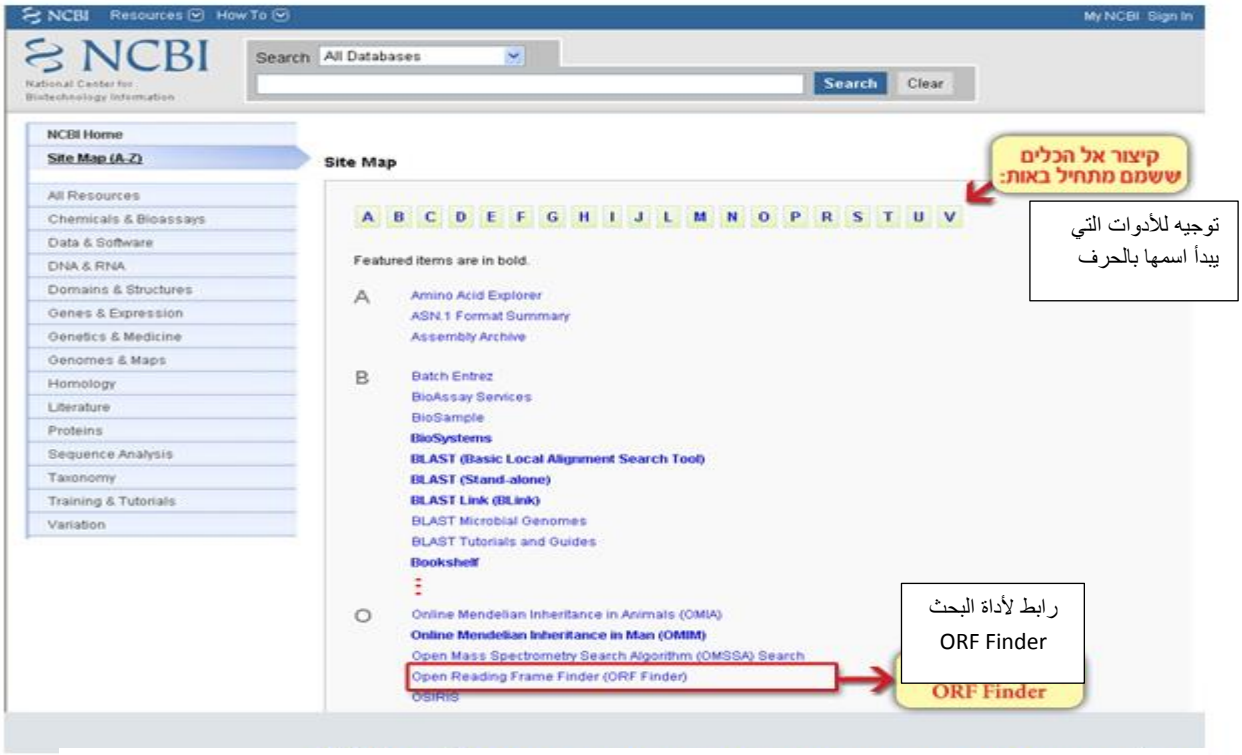
في المرحلة الأولى علينا تحديد إطار القراءة المفتوح للتسلسل الذي بحوزتنا. لقد طُورت أدوات بيوإنفورماتيّة عديدة تقوم بتحديد إطار القراءة المفتوح في الجينوم بشكل منهجي وسريع، وبإمكان هذه الطرق مُساعدتنا على إيجاد الجينات المُختلفة على طول الكروموسوم.

للمُعلم: يجب الانتباه إلى أنَّ اكتشاف الجين وتحديد خصائصه لا يعتمد فقط على إيجاد إطار القراءة المفتوح. يجب أيضًا أنْ تظهر في المنطقة التي نشك بأنّها عبارة عن جينات التسلسلات التالية: تسلسلات تُميِّز منطقة المراقبة في الجين، تسلسلات تُميِّز منطقة مبنى الجين، تسلسل يُميِّز منطقة بداية النسخ (תעתוק)، تسلسل يُميِّز منطقة نهاية النسخ (תעתוק)، تسلسلات تُميِّز نقاط الربط بين الاكسونات والانترونات وكذلك تسلسلات تُميِّز بداية الترجمة ووقف الترجمة داخل إطار القراءة. توجد أدوات مُختلفة تُساعد على تحديد الجينات الموجودة في تسلسل مُعطى، كل أداة تأخذ بعين الاعتبار عددًا من التسلسلات التي ذُكرت. الأداة المعروضة هنا هي أداة سهلة نسبيًا وتتركّز فقط في تحديد إطار القراءة المفتوح بالاعتماد على المقاييس التي ذُكرت سابقًا.

لهذا الهدف سنستعمل الأداة ORF Finder، التي تجد إطار القراءة داخل تسلسل نوكلوتيدات. ندخل إلى الصفحة الرئيسيّة لموقع NCBI حتّى نصل إلى الأداة ORF Finder نضغط على Resource List (A-Z) (في الماضي سُميَّ Site Map (A-Z))، للوصول إلى قائمة الأدوات البيوإنفورماتيّة ومُستودعات المعلومات التي يُشرف عليها الموقع NCBI (الشاشة 1).

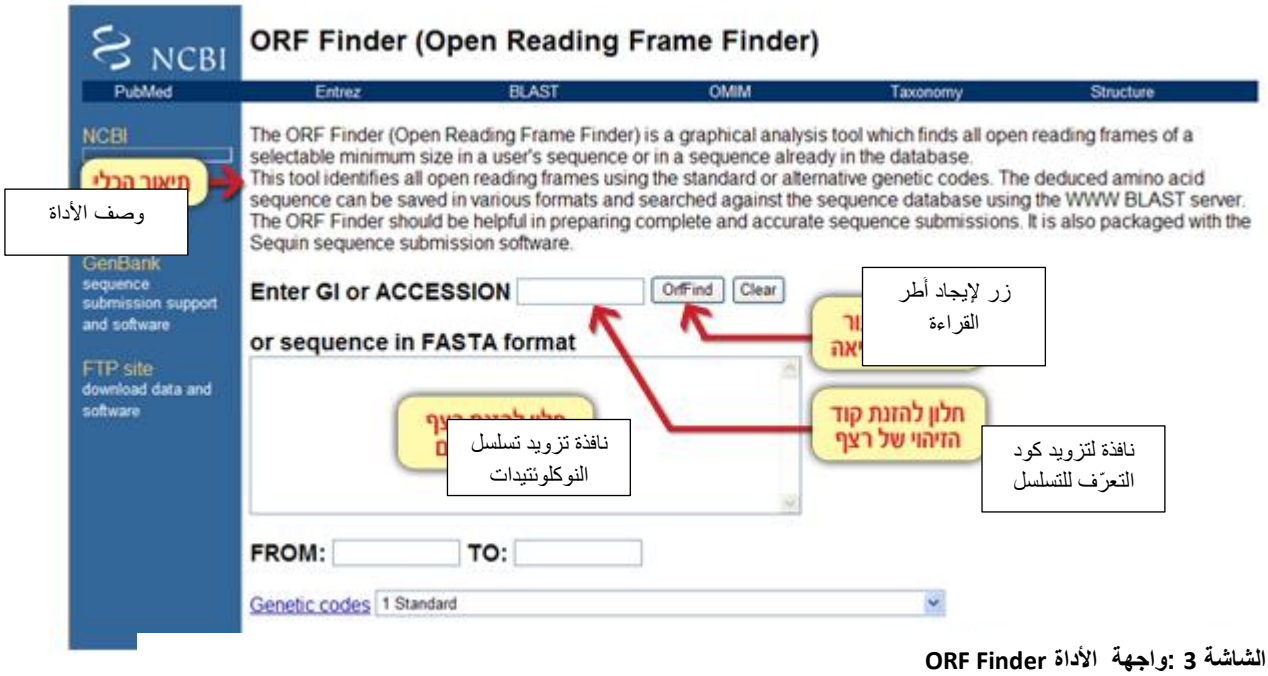
الشاشة 1: الصفحة الرئيسيّة لموقع NCBI.

نُدحرج عجلة الفأرة باتجاه الأسفل لنصل إلى الأدوات التي تبدأ بالحرف O، أو ببساطة نضغط على الحرف O في سطر الحروف في بداية الصفحة ونختار الرابط Open Reading Frame Finder (ORF Finder) (الشاشة 2).



الشاشة 2 : قائمة الأدوات البيوإنفورماتيّة وَمُستودعات المعلومات التي يُشرف عليها موقع NCBI.

الضغط على الرابط يفتح أمامنا واجهة الأداة (ממשק הכלי)(شاشة 3).



الشاشة 3 :واجهة الأداة ORF Finder

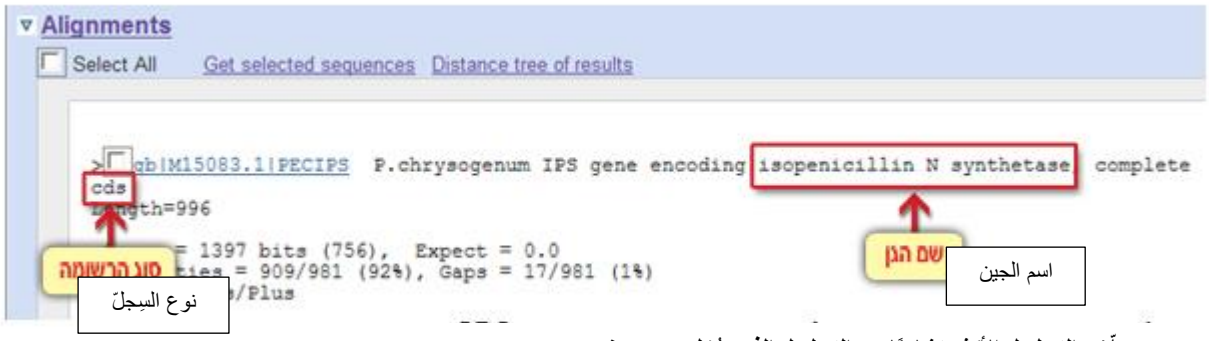
يتمُّ تزويد الأداة بتسلسل من النوكلوئتيدات. الأداة ORF Finder هي أداة بسيطة نسبيًا، لا تستطيع أنْ تتعرَّف على تسلسلات التعاقب الإجماعي (רצפי הסכמה -consensus sequences) التي تُميِّز تسلسلات مُحفِّزات النسخ רצפי מקדם(promoter) ، الانترونات אינטרונים(introns) وغيرها من التسلسلات الموجودة في تسلسل الاستعلام. الأداة ORF Finder تعتبر كل تسلسل النوكلوئتيدات المُزوّد لها تسلسل مشفِّر مُمكن רצף מקודד. لهذا من المقبول أنْ نُحلِّل بواسطتها تسلسلات خالية من الانترونات، مثل تسلسل الجينات التابعة لكائنات غير حقيقيّة النواة פרוקריוטים، أو تسلسلات من الDNA المكمّل(cDNA) من كائنات حقيقيّة النواة אאוקריוטים. في الحالات الأخرى التي يتمُّ فيها تزويد الأداة بتسلسلات تحتوي على انترونات فإنّها تعتبر الانترونات كتسلسلات مشفِّرة، عندها تسلسل البروتين الذي تعرضه الأداة لا يعرض بشكل صحيح التسلسل المُتوقّع من تسلسل الRNA الناضج.

" سباق التسلُّح "("מירוץ החימוש ") - تطوير "جيل جديد" من المُضادّات الحيويّة (الأنتبيوتيكا).

المَهمّة II : الانتقال من تسلسل النوكلوئتيدات إلى تسلسل البروتين بمُساعدة الأداة ORF Finder (صفحة 3 من 5 صفحات)

تزويد تسلسل النوكلوئتيدات

وجدنا أنَّ التسلسل الأكثر تشابهًا مع نتائج تحديد التسلسل هو تسلسل IPNS من فطر من نوع مُشابِهٍ (P. chrysogenum). ينتمي السِجلّ للنوع CDS أيْ coding sequence ، بما معناه كل التسلسل المشفِّر (الرسم 1). سِجلّات كهذه تحتوي على تسلسل النوكلوئتيدات المشفِّر فقط، من شيفرة بداية الترجمة وحتى شيفرة وقف الترجمة، بحيث لا تشمل كل من الانترونات والتسلسلات غير المُتَرْجمة كمقاطع UTR مثلًا. لهذا يُمكن استعمال الأداة للتنبّؤ بإطار القراءة وإيجاد التسلسل المشفِّر في تسلسل النوكلوئتيدات الذي وجدناه.

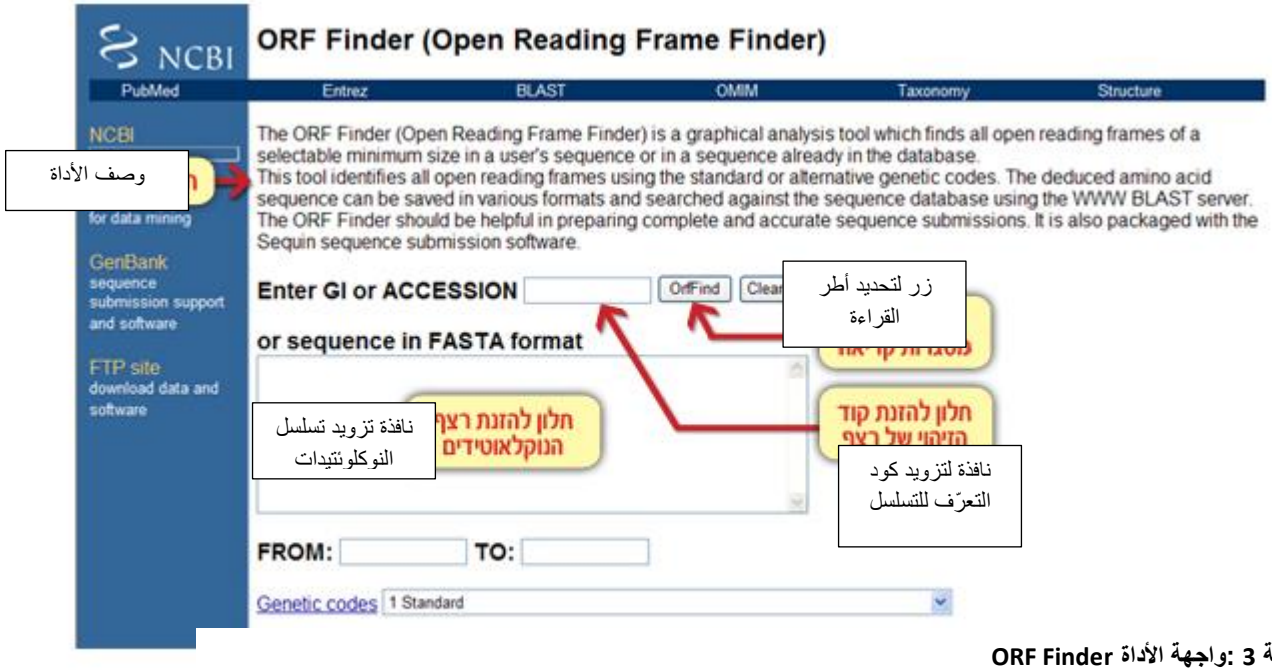


الرسم 1: سِجلّات التسلسل الأكثر تشابهًا مع التسلسل الذي عُزل هي من نوع CDS

للمعلم: يُمكن توسيع النقاش مع الطلاب حول أهميّة المكتبة التي أُستعملت في التجربة من أجل استعادة الفطر الطافر لقدرته على قتل البكتيريا: المكتبة الجينوميّة تحتوي على تسلسلات فيها انترونات، بينما مكتبة الDNA المُكمّل فتحتوي على تسلسلات خالية من الانترونات.

إذا كان التسلسل المطلوب موجودًا في مُستودعات المعلومات، يُمكننا تزويد رقم كود التعرّف الخاص به. نقوم بنسخ تسلسل نوكلوئتيدات الجين רצף הנוקלאוטידים של הגן الذي عُزل في مرحلة البحث السابقة، وإلصاقه في النافذة المُلائمة. لإيجاد إطار القراءة عليك الضغط على OrfFind (شاشة 3).

للمعلم: واجهة الأداة تُمكِّنك من تقييد البحث لنوكلوئتيد واحد في موضع مُعيّن و/أو حتى نوكلوئتيد في موضع مُعيّن، لكنَّ هذه الإمكانيّة غير مُلائمة لاحتياجات الطلاب ولذلك لمْ تُذكَر خلال الفعاليّة.

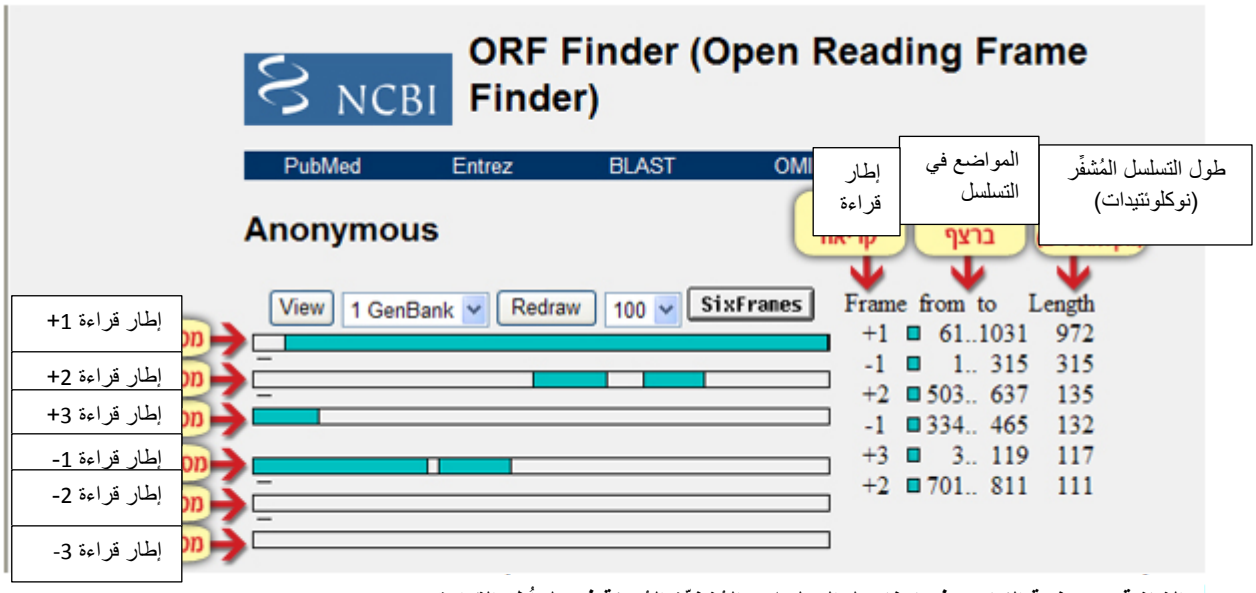


الشاشة 3: واجهة الأداة ORF Finder

المَهمّة II : الانتقال من تسلسل نوكلوئتيدات إلى تسلسل البروتين بمُساعدة الأداة ORF Finder (صفحة 4 من 5 صفحات)

تحليل النتائج

شاشة النتائج (شاشة 4) مُقسمة إلى قسمين. تُعرض في الجهة اليُسرى ستة مُستطيلات تُعبر عن أُطر القراءة الستة. في البداية تُعرض ثلاثة أُطر قراءة تنتج من التسلسل الذي قُمنا بتزويده (الأول من الأعلى هي إطار قراءة 1+، الثاني 2+، والثالث 3+)، وبعدها ثلاثة أُطر قراءة تنتج من التسلسل المُكمّل للتسلسل الذي زوّدناه (الرابع إطار القراءة 1-، إطار القراءة الخامس 2-، الإطار الأخير في الأسفل 3-). في كل إطار قراءة، التسلسل الذي يحتوي على إطار قراءة مفتوح مُحتمل (من شيفرة بداية وحتى شيفرة وقف) يُعرض كمستطيل بلون أزرق (توركيز). في الجهة اليُمنى يوجد وصف كلامي نتعرَّف من خلاله على مميّزات كل تسلسل مشفِّر: من أي إطار قراءة نتج (fram)، مجال مواضع النوكلوئتيدات الذي نتج منها التسلسل المُشفِّر (From to)، وما هو طوله (Length). يجب أنْ ننتبه أنَّ التسلسلات مُرتبة بحسب الطول من التسلسل المشفِّر الأطول (في الأعلى) إلى التسلسل المشفِّر الأقصر (في الأسفل)، وليست مُرتبة بحسب تسلسل ظهورها في أطر القراءة (في القسم الأيسر من الشاشة).



الشاشة 4: صفحة النتائج وفيها تفاصيل التسلسلات المُشفرّة المُمكنة في كل أُطر القراءة

1.أيْ إطار قراءة يحوي أكثر من تسلسل مشفِّر واحد؟

- أ . لا يتواجد أي إطار قراءة كهذا .
- ب. إطار القراءة 2+ فقط.
- ج. إطار القراءة 1+ فقط.
- د. إطار القراءة 1- و 2+.

الإجابة هي : د. يُمكننا أنْ نلاحظ أنَّ إطاريّ القراءة 2+ (الثاني) و 1- (الرابع)، يحتوي كل واحد منهما على تسلسلَيْن مُشفِّريْن مُمكنيْن، حيث نُلاحظ في كل واحد منهما وجود مُستطيلان بلون أزرق توركيز.

2. ما هو المُشترك لكل التسلسلات المشفِّرة الموجودة في كل أُطر القراءة؟

- أ. لا يوجد بينها شيء مُشْتَرك.
- ب. طول كل تسلسل مشفِّر ينقسم على 3.
- ج. كُلها تشفِّر لنفس البروتين.
- د. كُلها تشفِّر لبروتين بلون أزرق توركيز.

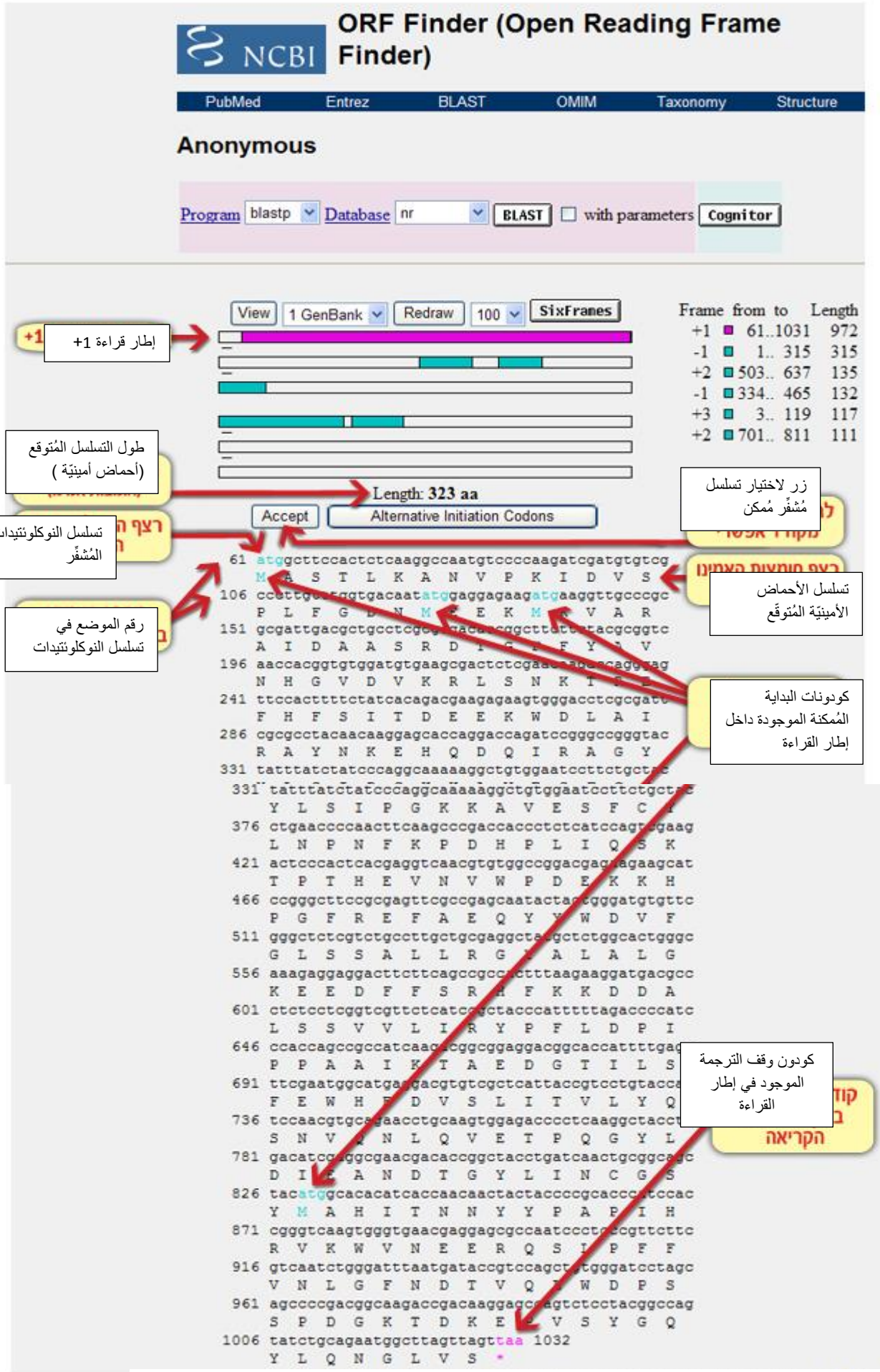
الإجابة هي : ب. بما أنَّ الكودون مكوّن من ثلاثيّة نوكلوئتيدات، فإنَّ طول التسلسل المبني من كودونات تُشفِّر الى أحماض أمينيّة أو كودون وقف ترجمة، هو بالضّرورة من مُضاعفات الرقم 3.

3. أي إطار من بين أطر القراءة التي وُجدت ذا الاحتمال الأكبر ليُشفِّر إلى بروتين؟

- أ. إطار القراءة 1-، لأنّه يحتوي على تسلسلَيْن مشفِّرين مُحتملين (مستطيلين بلون أزرق توركيز).
- ب. إطار قراءة 3+، لأنَّ التسلسل المشفِّر يظهر في بداية التسلسل (مستطيل أزرق توركيز).
- ج. إطار قراءة 3-، لأنَّه لا يتواجد فيه مستطيل أزرق توركيز.
- د. إطار قراءة 1+، لأنَّه يحتوي على التسلسل المشفِّر الأطول.

الإجابة هي: د. كما ذَكر إطار القراءة المفتوح هو عادةً ذلك الإطار الذي يحتوي على التسلسل المُشفِّر الأطول.

إطار القراءة الأول 1+، كما يبدو ذا الاحتمال الأعلى ليُشفِّر إلى بروتين. يُمكن بواسطة الأداة ORF Finder أنْ نُترجم تسلسل النوكلوئتيدات في إطار القراءة هذا لتسلسلٍ من الأحماض الأمينيّة. اضغطوا على إشارة التسلسل المشفِّر في إطار القراءة (المستطيل الأزرق التوركيز العلوي الموجود من الجهة اليُسرى أو المُربع الأزرق التوركيز العلوي من الجهة اليُمنى). في الشاشة الجديدة (شاشة 5) تمَّ تلوين التسلسل المشفِّر الذي اخترناه باللون البنفسجيّ. القسم الأسفل والأساسيّ من الشاشة يحتوي على تسلسل النوكلوئتيدات المُشفِّرة وعلى تسلسل الأحماض الأمينيّة الذي يُترجم منه. يُعرض تحت كلِّ كودون (شيفرة) الحامض الأمينيّ الذي يُشفَّر بواسطته. يُعبَّر عن كلِّ حامض بحرف واحد، مثلًا الحرف M يُعبِّر عن الحامض الأمينيّ مثيونين، S يُعبِّر عن الحامض الأمينيّ سيرين وهكذا. حتّى نستطيع رؤية كودونات بداية الترجمة المُمكنة، الموجودة في إطار القراءة بشكل واضح يتمّ تلوينها بلون أزرق توركيز، أما كودونات وقف الترجمة فيُشار إليها ب-"*" باللون البنفسجيّ.



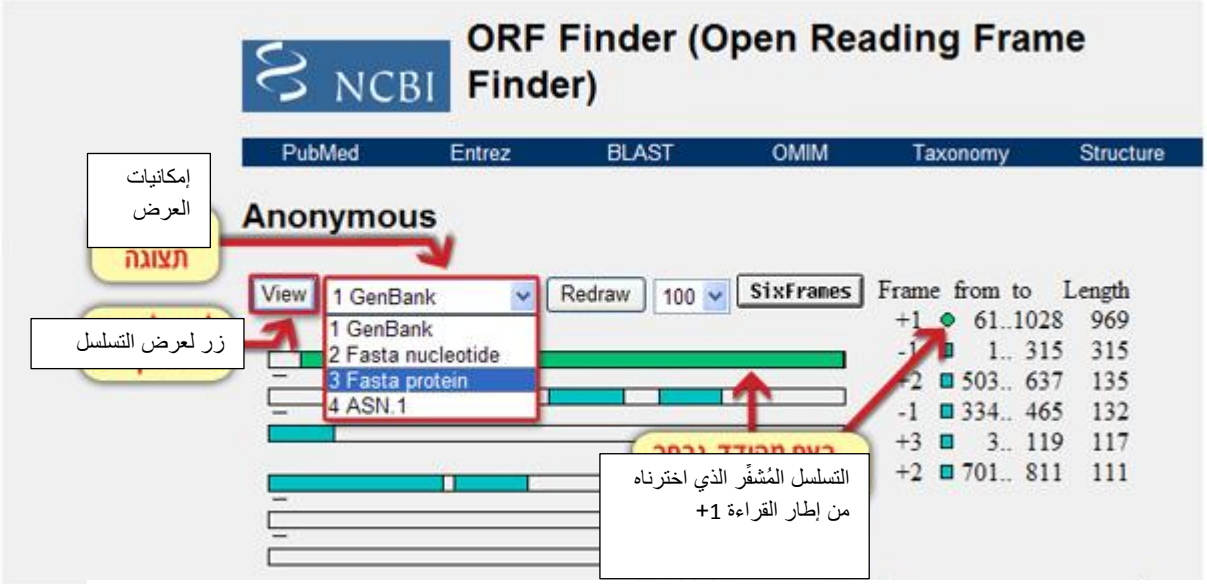
الشاشة 5: تفاصيل التسلسل المُشفَر في إطار القراءة الأول، وتسلسل البروتين المُتوقّع.

4. من المُتوقّع أنْ يكون الحامض الأميني الثالث في البروتين هو الحامض الأميني سيرين (S). ما هو الكودون الذي يُشفِّر لهذا الحامض في تسلسل النوكلوئتيدات؟

- أ. tcc.
- ب. atg.
- ج. ttc.
- د. tct.

الإجابة هي: أ. بما أنَّ كل كودون مكوّن من ثلاثيّة نوكلوئتيدات، فإنَّ الكودون الأول هو ATG وهو يُشفِّر إلى الحامض الأمينيّ مثيونين (رمزه M)؛ الكودون الثاني GCT يُشفِّر إلى ألانين (A)، والكودون الثالث هو TCC يُشفِّر إلى سيرين (S).

إذا أردنا تخزين تسلسل البروتين المُتوقّع من أجل الاستمرار بالبحث نضغط على Accept التي تظهر فوق التسلسل. ننتبه أنَّ لون المُربع في إطار القراءة 1+ تغيّر من زهريّ إلى أخضر. نختار الآن إمكانيّة العرض بواسطة 3 FASTA protein ونضغط على الزِّر View (الشاشة 6).



الشاشة 6: اختيار عرض تسلسل البروتين المُتوقّع من ترجمة إطار القراءة الذي اخترناه (بصيغة FASTA).

فيما يلي عرض للتسلسل المُتوقّع من ترجمة إطار القراءة المفتوح الذي أُخْتير بصيغة FASTA (בפורמט FASTA) (الشاشة 7)

الشاشة 7: تسلسل البروتين المُتوقّع من ترجمة إطار القراءة المفتوح الذي اخترناه (بصيغة FASTA).

للمعلم: الأسئلة التالية مُناسبة لإجراء نقاش في الصف وهي مُعَدة لتلخيص استعمال الأداة (الأسئلة 6-7)، تتطرق أيضًا لنتائج من الفعاليّة السابقة (سؤال 5)، كما تتناول استعمال أدوات بيوإنفورماتيّة أخرى (سؤال 8).

" سباق التسلُّح ("מירוץ החימוש ") - تطوير "جيل جديد" من المُضادّات الحيويّة (الأنتبيوتيكا).

المَهمّة II : الانتقال من تسلسل النوكلوئتيدات إلى تسلسل البروتين بمُساعدة الأداة ORF Finder (صفحة 5 من 5 صفحات)

تلخيص المَهمّة II

5. في مرحلة سابقة من البحث، لاحظنا بواسطة الأداة BLASTn وجود تماثل (הומולוגיה) بين المواضع 61-1032 في التسلسل الذي عزلناه وبين تسلسل الجين المشفِّر لإنزيم IPNS. في هذه المرحلة وجدنا أيضًا بواسطة الأداة ORF Finder أنَّ تسلسل النوكلوئتيدات المشفِّر الأطول، أيْ إطار القراءة المفتوح الأكثر احتمالًا يبدأ في الموضع 61 وينتهي في الموضع 1032. ماذا يُمكن أنْ نتعلّم من أنَّ التسلسل المُماثل لجين IPNS هو أيضًا، (كما يبدو) التسلسل المشفِّر للبروتين IPNS؟

للمعلم: بشكل غير مُفاجئ، نُلاحظ أنَّ التسلسل المُماثل للجين IPNS هو أيضًا التسلسل المُشفَّر لبروتين IPNS. في الغالب التسلسلات المُشفِّرة محفوظة أكثر من التسلسلات غير المُشفِّرة، مثل UTR أو تسلسلات الانترونات، ذلك لأنَّ الطفرة في التسلسلات المُشفِّرة تؤثِّر على تسلسل البروتين ومن المُحتمل أنْ تؤثِّر على مبناه و/أو على وظيفته. الطفرة التي تضرُّ بالأداء السليم للبروتين غالبًا ما تضرُّ أيضًا بمُلائمة الكائن لبيئته، ولذلك تختفي من مستودع أليلات الجين (في عمليّة تحتاج إلى سنوات طويلة). بالمُقابل فإنَّ التسلسلات غير المُشفِّرة بالرّغم من أهميتها في عمليّات المراقبة المُختلفة، فهي تحتوي على طفرات بنسبة أكبر.

6. بشكل مبدئيّ، هل بإمكان الباحث أنْ يقوم بتحديد التسلسل المُتوقّع لبروتين معين فقط من خلال التمعّن بتسلسل نوكلوئتيدات RNA الرسول المشفِّر للبروتين، دون استعمال أداة بيوإنفورماتيّة؟ ما هي إيجابيات استعمال الأداة البيوإنفورماتيّة؟

للمعلم: هذا الأمر غير مُمكن تقريبًا، استعمال الأداة البيوانفورماتيّة يُمكِّن من تنفيذ المَهمّة بسرعة كبيرة، بدقة، بنجاعة وبدون أخطاءٍ. كذلك فهي تعرض النتائج بشكل مرئي (ויזואלי) مما يُسهِّل الأمر على المُستخدِم. كما أنَّ الأدوات البيوإنفورماتيّة توجّه إلى أدوات بيوإنفورماتيّة إضافيّة أو مُستودعات معلومات مُناسبة.

عندما يتواجد لدينا تسلسل mRNA أحادي الجديلة معنى ذلك 3 أطر قراءة مُمكنة (3+،2+، 1+). مع هذا، ففي حالات عديدة، بشكل خاص في الماضي ، عملوا بواسطة المكتبات أو قبل ذلك قاموا بالاستنساخ، عندها عمليًّا كان بحوزة الباحثين تسلسل مُدخل DNA ثُنائي الجديلة مصدره من ال mRNA المُشفِّر للبروتين، وبسبب عدم معرفتنا أي من الجديلتيْن تُنسخ (תתועתק) تواجدت 6 أُطر قراءة مُمكنة (1+, 2+, 3+, 1-, 2-, 3-)، فكان على الباحثين فحص الأطر الستة المُمكنة والبحث عن إطار القراءة المفتوح (إطار قراءة مفتوح يضُمّ تسلسل يبدأ بكودون بداية ترجمة واستمراره كودونات تُشفِّر إلى أحماض أمينيّة، وفي الغالب ينتهي بأحد كودونات وقف الترجمة). عادةً إطار واحد فقط من بين أطر القراءة الستة، يحتوي على تسلسل يُشفِّر إلى بروتين بطول كبير. هذا هو أيضًا مبدأ عمل الأداة OFR Finder التي تُساعد الباحثين في تحديد إطار القراءة المفتوح الأكثر احتمالًا. مع ذلك فهذا لا يؤكّد أنَّ هذا هو إطار القراءة المفتوح – في الغالب نحتاج لهذا الهدف إلى إثبات بيوإنفورماتي إضافيّ (أنظروا السؤال التالي)، وفي بعض الأحيان إلى إثبات بيوكيميائي أيضًا. في إطار القراءة المفتوح الأكثر احتمالًا، بالإمكان الضغط على طول وحدود التسلسل المُشفِّر (CDS) والتسلسلات غير المُترجَمة (UTRs). كذلك بالإمكان التنبؤ بالتسلسل المُتوقّع من ترجمة التسلسل المُشفِّر، بالاعتماد على أداة بيوإنفورماتيّةٍ أو قائمة الشيفرة الوراثيّة (טבלת הקוד הגנטי).

7. هل تتوقّع وجود اختلاف في تحديد إطار القراءة المفتوح الصحيح، إذا كان لدينا تسلسل جين بدلًا من تسلسل RNA رسول؟

للمعلم: من المُؤكد أنْ نتوقّع وجود فرق. التفسير لذلك يتعلّق بحقيقة كوْن الجين يحتوي أيضًا على تسلسل إنترونات (التي تُزال عند مُعالجة RNA البدائي بعمليّة الوصْل(שחבור) بعد عملية النسخ (תעתוק)). لذلك فقط قِسْم من تسلسل الجين يُمْسح بواسطة الريبوزوم في عملية الترجمة. بالمقابل أداة التنبؤ بإطار القراءة تَعتبر كل التسلسل الذي تستقبله تسلسلًا مُشفِّرًا مُتاحًا للترجمة. لذلك من أجل الحصول على نتائج ذات معنى، يجب علينا استعمال تسلسلات RNA رسول أو تسلسل DNA مكمّل (مصدره من ال RNA رسول) فقط.

8. الآن، عندما وُجد لديك تسلسل البروتين المُتوقّع، الذي يبلغ طوله 323 حامض أمينيّ، اِقْتَرح طريقة مُمكنة لتحديد هويّة البروتين.
هل تعتمد الطريقة التي اقترحتها على مبدأ عمل أداة بيوإنفورماتيّة أخرى استعملتها من قبل؟

للمعلم: الإجابة المطلوبة هي مُقارنة تسلسل البروتين المُتوقّع من ترجمة إطار القراءة المفتوح مع البروتينات الموجودة في مُستودعات البروتينات، من أجل إيجاد بروتينات معروفة ذات تسلسل مُماثل. مبدأ العمل يُشبه المبدأ الذي نفّذناه في المرحلة السابقة حيث اعتمدنا فيه على الأداة BLASTn، فقُمنا بتزويدها بتسلسل استعلام من النوكلوئتيدات ومُقارنته مع التسلسلات الموجودة في مُستودع تسلسلات النوكلوئتيدات. أما هنا فنُقارن تسلسل استعلام من الأحماض الأمينيّة، مع التسلسلات الموجودة في مُستودع تسلسلات للأحماض الأمينيّة. كما

ذُكر، استعمال الأداة BLAST مناسب عندما يتواجد لدينا تسلسل مُعيّن، ونرغب بالبحث عن تسلسلات مُشابهة له في مُستودع المعلومات ومن خلال ذلك التعرّف على هوّية ووظيفة التسلسل المُمكنة.

تعلّمنا في هذه الفعاليّة كيف تقوم الأداة البيوإنفورماتيّة ORF Finder بمُساعدة الباحثين على إيجاد تسلسل الأحماض الأمينيّة التي شُفِّرت بواسطة تسلسل نوكلوئتيدات مُعطى. ضمّت مراحل العمل مَسْحًا ل6 أُطر قراءة مُمكنة، من أجل تحديد إطار القراءة المفتوح الذي يحتوي على التسلسل المُشفِّر الأطول. ترجمة تسلسل النوكلوئتيدات لتسلسل من الأحماض الأمينيّة هو أمر ضروريّ حتَّى نتمكَّن من تحديد هويّة البروتين والتنبؤ بمبناه ووظيفته.

في الفعاليّة الأولى وجدنا أنَّ تسلسل النوكلوئتيدات الذي عُزل يُشبه تسلسل الجين الذي يُشفِّر لإنزيم IPNS من فطر البنسيليوم. إلى جانب التشابه في مواضع عديدة بين تسلسل الجين الذي عزلناه وبين تسلسل جين IPNS، توجد مواضع ليست قليلة يختلف فيها تسلسل الجينات. الاختلافات بين تسلسل الجينات يُمكنها أنْ تُؤدي إلى اختلافات في تسلسل البروتينات التي تُشفَّر بواسطة هذه الجينات. نحن نتوقّع أنْ يكون تسلسل البروتين الذي حدَّدناه في هذه الفعاليّة مُماثل لتسلسل إنزيم IPNS وذا مبنى وفعاليّة مُشابهه. لكنْ علينا أنْ نتذكَّر أنَّه من المُمكن أنْ يحتوي تسلسل الجين الذي وجدناه على طفرات أو يختلف عن تسلسل بروتين IPNS ولذلك علينا أنْ نفحص ونُؤكد ذلك مُقابل مُستودعات تسلسلات البروتينات. أولًا علينا البحث عن بروتينات ذات تسلسل مُشابه للتسلسل الذي حدَّدناه وفحص إذا كانت هذه الإنزيمات من النوع IPNS، هذه المرحلة تُشبه بطابعها الفعاليّة الأولى، ولكننا سنستعمل فيها تسلسل البروتين الذي حدَّدناه كتسلسل استعلام ولن نستعمل تسلسل النوكلوئتيدات. بعد ذلك علينا أنْ نتأكَّد أنَّ المجموعات الهامة لفعاليّة الإنزيم كالأحماض الأمينيّة التي تركِّب الموقع الفعّال، محفوظة وموجودة أيضًا في التسلسل الذي عزلناه، وبإمكانها أنْ تدلُّ على فعاليّة مُشابهه في المسار الأيضيّ لإنتاج مضادّ البنسلين.