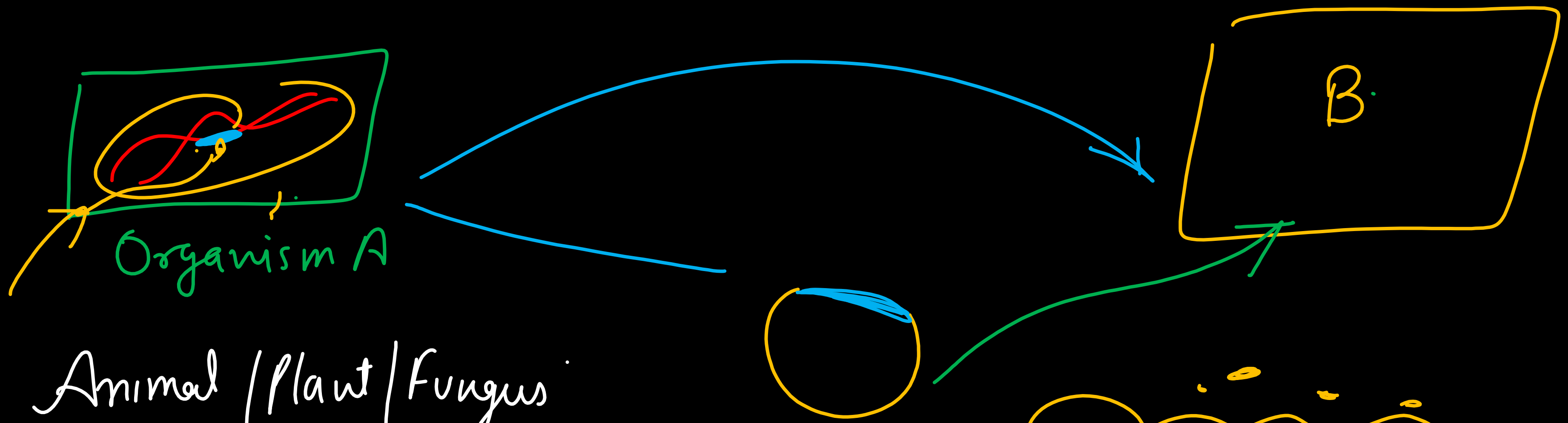
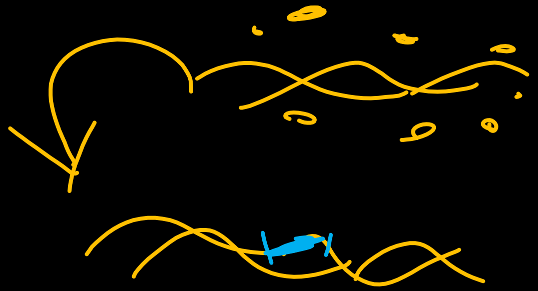
पुनर्योगज डीएनए प्रौद्योगिकी के प्रक्रम :–

पुनर्योगज डीएनए प्रौद्योगिकी (टेक्नोलॉजी) चरण विशिष्ट अनुक्रम में सम्मिलित हैं जैसे डीएनए का विलगन (पृथक्करण), डीएनए का खंडन, डीएनए खंड का संवाहक से बंधन, पुनर्योगज डीएनए का परपोषी में स्थानांतरण, परपोषी कोशिकाओं का माध्यम में व्यापक स्तर पर संवर्धन व वंछित उत्पाद का निष्कर्षण।



Animal / Plant / Fungus

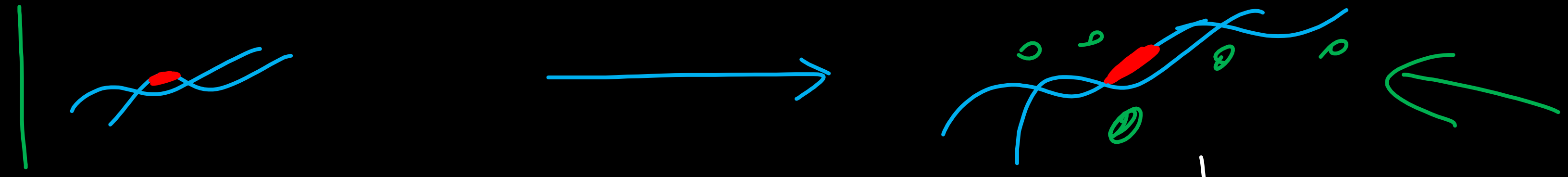


① DNA पृथक्करण

② DNA को काटना (खण्डन)

③

① DNA का विलगन (पृथक्करण)



Plant cell - Cellulase

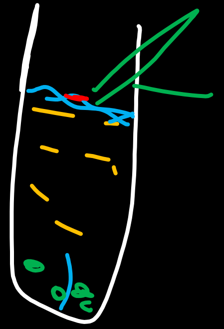
Animal cell - X

Fungus - Kitinase

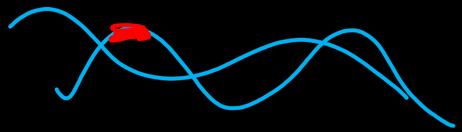
Bacteria - lysozyme

Chilled ethanol

enzyme
Protease
RNase



Spolling



आनुवंशिक पदार्थ (डीएनए) का पृथक्करण :—

याद रखें कि बिना अपवाद के सभी जीव का आनुवंशिक पदार्थ न्यूक्लिक अम्ल है। अधिकांश जीवों में यह डिऑक्सीराबोन्यूक्लिक अम्ल या डीएनए है। डीएनए को प्रतिबंधन एंजाइम द्वारा काटने के लिए यह आवश्यक है कि यह दूसरे वृहद्–अणुओं से मुक्त, शुद्ध रूप में होना चाहिए।

डीएनए झिल्लियों से घिरा रहता है इसलिए कोशिका को तोड़कर खोलना पड़ेगा ताकि डीएनए दूसरे वृहद अणुओं जैसे आरएनए, प्रोटीन, बहुशर्करा, लिपिड के साथ मोचित (रिलीज) हो सके। यह तभी संभव है जब जीवाणु कोशिका/पादप या जंतु ऊतक, लाइसोजाइम (जीवाणु), सेलुलेज (पादपकोशिका), काइटिनेज (कवक) जैसे एंजाइम द्वारा संसाधित किए जाते हैं।

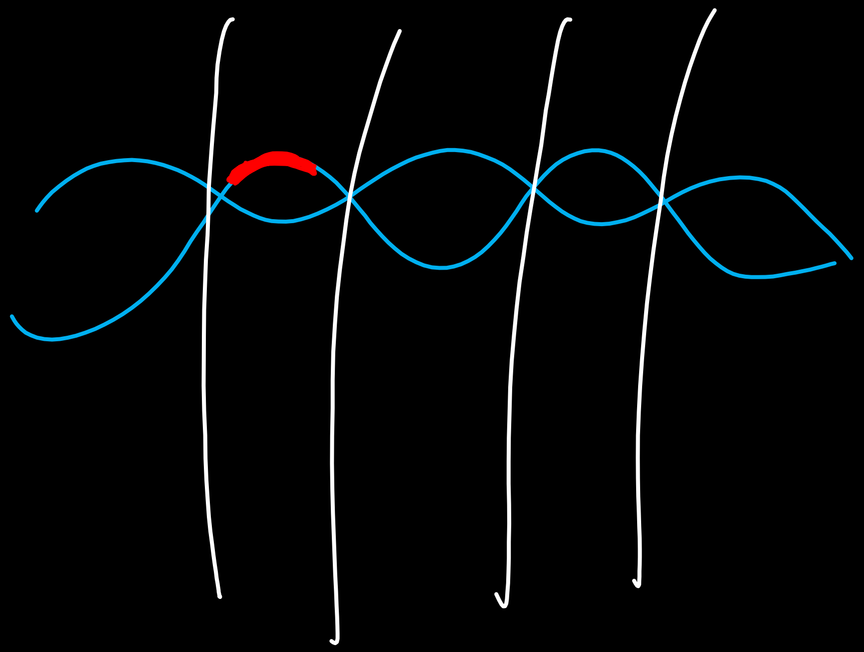
आप जानते हो जीन डीएनए के लंबे अणुओं पर स्थित होते हैं व हिस्टोन जैसे प्रोटीनों के साथ गुँथे रहते हैं। आरएनए को राइबोन्यक्लियज से उपचारित कर अलग कर सकते हैं जबकि प्रोटीन को प्रोटीएज से उपचारित कराने के बाद अलग कर सकते हैं। दूसरे अणुओं को उचित उपचार द्वारा अलग कर सकते हैं।

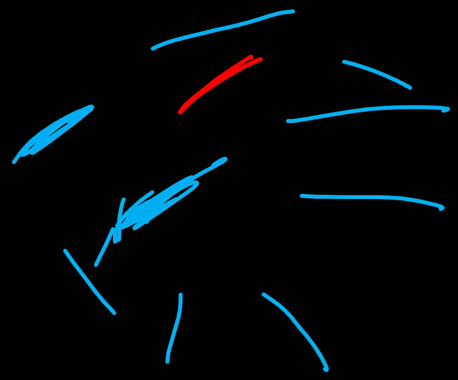
अंततोगत्वा द्रुतशीतित (चिल्ड) एथेनॉल मिलाने से शोधित डीएनए अवक्षेपित (प्रेसिपिटेट) हो जाता है। इसे निलंबन में महीन धागों के समूह के रूप में देख सकते हैं (चित्र 11.5)।

चित्र 11.5 पृथक किए गए डीएनए को स्पूलिंग द्वारा अलग करना

② DNA का खण्डन :- प्रतिबंधित एन्जाइम्स

Endonuclease enzyme





डीएनए को विशिष्ट स्थलों पर काटना :—

शोधित डीएनए अणुओं को प्रतिबंधन एंजाइम के साथ उनकी इष्टतम (ऑप्टिमम) परिस्थितियों में रखने पर प्रतिबंधन एंजाइम द्वारा पाचन संपन्न होता है। एगारोज जेल वैद्युत का संचलन प्रतिबंधन एंजाइम पाचन को नियंत्रित करने के काम में आता है।

डीएनए एक ऋणात्मक आवेशित अणु है। इस कारण से यह धनात्मक इलेक्ट्रोड (एनोड) की ओर गति करता है (चित्र 11. 3)। यह प्रक्रम संवाहक डीएनए के साथ भी दोहराया जाता है। डीएनए के जुड़ने में कई प्रक्रम शामिल हैं।

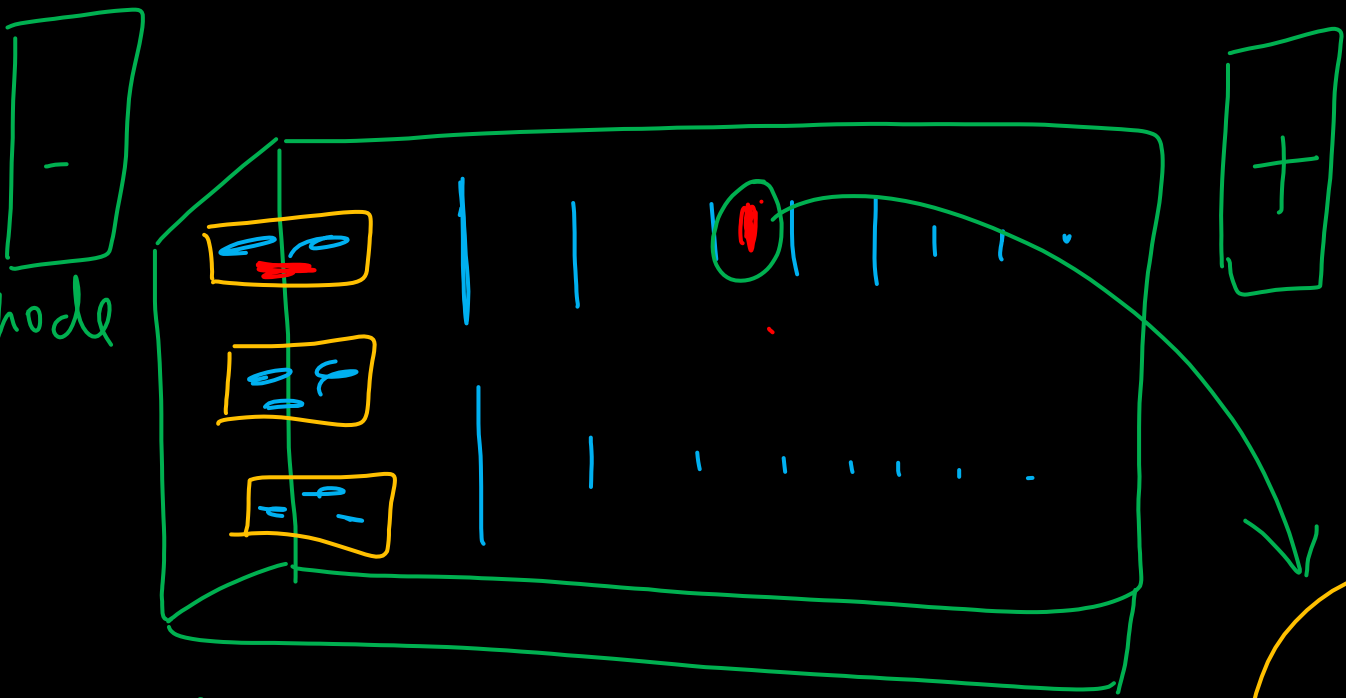
स्रोत डीएनए व संवाहक डीएनए को भी विशिष्ट प्रतिबंधन एंजाइम द्वारा काटे जाने के बाद, स्रोत डीएनए से कटा हुआ 'उपयोगी जीन' तथा उसकी खाली जगह के साथ संवाहक आपस में लाइगेज द्वारा जोड दिए जाते हैं। परिणामस्वरूप एक पुनर्योगज डीएनए का निर्माण होता है।

डीएनए खंड का पृथक्करण एवं विलगन :—

प्रतिबंधन एंडोन्यूक्लिएज द्वारा डीएनए को काटने के परिणामस्वरूप डीएनए का खंडन हो जाता है। इन खंडों को एक तकनीक द्वारा अलग कर सकते हैं जिसे जेल वैद्युत का संचलन (इलेक्ट्रोफोरेसिस) कहते हैं। चूंकि डीएनए खंड ऋणात्मक आवेशित (चार्जड) अणु होते हैं, इसलिए इन्हें विद्युत क्षेत्र में माध्यम / आधात्री द्वारा एनोड की तरफ बलपूर्वक भेजकर अलग कर सकते हैं।

③ जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस :- agose gel bed
electrical field

जिलेटियम



Cathode

anode

Agose gel

DNA - (-)ve

gene of intrest ent + gel

आजकल बहुत ही सामान्य रूप से उपयोग किया जाने वाला माध्यम, एगारोज है जो समुद्रीय घास (सी वीडस) से निकाला गया एक प्राकृतिक बहुलक (पॉलिमर) है। डीएनए खंडों को एगारोज जेल के छलनी प्रभाव द्वारा उनके आकार के अनुसार अलग करते हैं। इस कारण खंड जितने छोटे आकार के होंगे, वे अधिक दूर तक जायंगे।

चित्र 11.3 देखिए और अनुमान लगाइए कि जेल के किस सिरे पर प्रतिदर्श (सेंपल) लादा गया था। पृथक्कृत डीएनए खंडों को तभी देख सकते हैं जब इस डीएनए को इथीडियम ब्रोमाइड नामक यौगिक से अभिरंजित कर पराबैंगनी विकिरणों से अनावृत्त करते हैं। (आप शुद्ध डीएनए खंडों को दृ श्य प्रकाश में बिना अभिजित किए नहीं देख सकते।)

gel phoresis + इथीडियम ब्रोमाइड = नारंगी (DNA)

UV rays

gene of intrest + gel

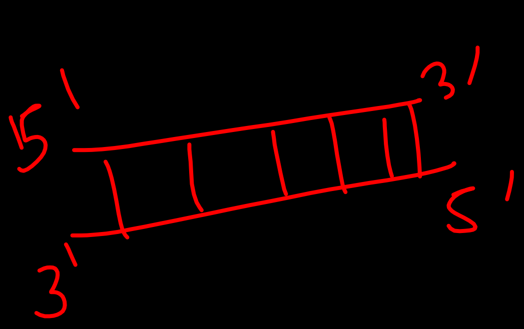
↓ क्षालन विधि

gene of intrest निकालन

-

इथीडियम ब्रोमाइड अभिजित (स्टेन्ड) जेल को पराबैंगनी प्रकाश से अनावृत्त करने पर डीएनए की चमकीली नारंगी रंग की पट्टी दिखाई पड़ती है (चित्र 11.3)। डीएनए की पृथक्कृत पट्टियों को एगारोज जेल से काट कर निकालते हैं और जेल के टुकड़ों से निष्कर्षित (एक्सट्रेक्ट) कर लेते हैं। इस प्रक्रिया को क्षालन (इलूसन) के कहते द्य हैं। इस तरह से शुद्ध किए गए डीएनए को क्लोनिंग संवाहक से जोड़कर, पुनर्योगज डीएनए निर्माण में उपयोग किया जाता है।

gene of Intrest



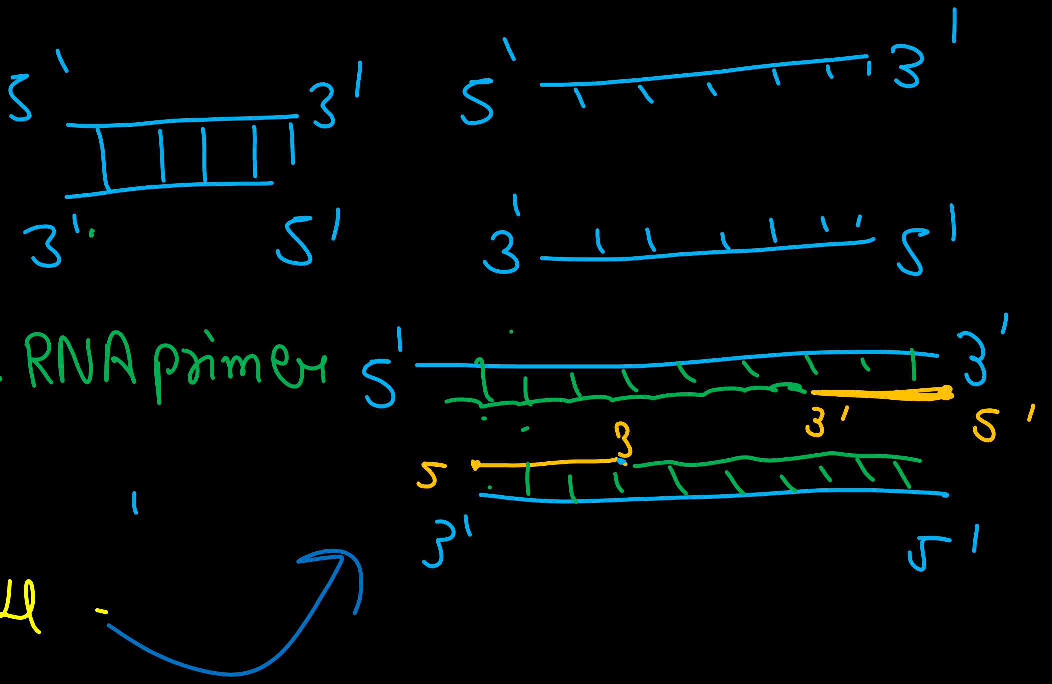
PCR - Polymerase Chain Reaction

① विकृतिकरण : 90 C

② तापानुशीलता . 50 C _ RNA primer

③ प्रसार : Taq Polymerase

Nucleotides

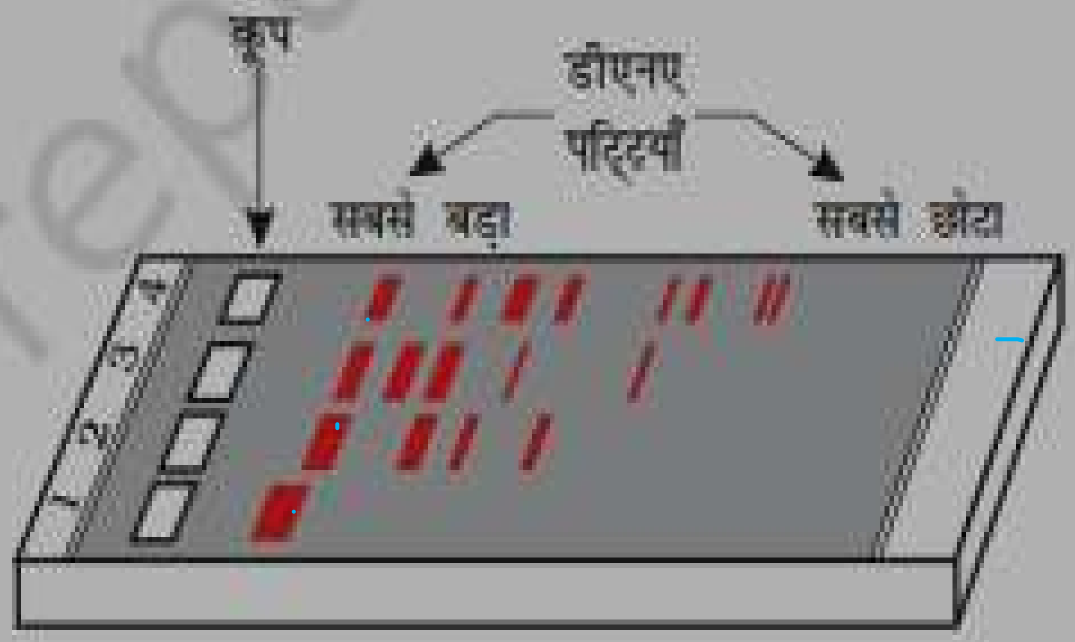


पीसीआर का उपयोग करते हुए लाभकारी जीन का प्रवर्धन :–

पीसीआर का अर्थ पोलीमरेजचेन रिऐक्शन (पॉलिमरेज श्रृंखला अभिक्रिया) है। इस अभिक्रिया में उपक्रमकों (प्राइमर्स– छोटे रासायनिक संश्लेषित अल्पन्य्क्लियोटाइड जो करते हुए पात्रे (इनविट्रो) विधि द्वारा उपयोगी जीन के कई प्रतिकृतियों का संश्लेषण होता है। यह एंजाइम जिनोमिक डीएनए को टेंपलेट के रूप में काम में लेकर;

डीएनए क्षेत्र के पूरक होते हैं) के दो समुच्चयों (सेट्स) व डीएनए पॉलिमरेज एंजाइम का उपयोग अभिक्रिया से मिलने वाले न्यूक्लियोटाइडों का उपयोग करते हुए उपक्रामकों को विस्तृत कर देता है। यदि डीएनए प्रतिकृतयन प्रक्रम कई बार दोहराया जाता है तब डीएनए खंड को लगभग एक अरब गुना (एक बिलियन) प्रवर्धित किया जा सकता है

अर्थात् एक अरब प्रतिरूपों का निर्माण होता है। यह सतत् प्रवर्धन तापस्थायी (थर्मोस्टेबल) डीएनए पॉलिमरेज (जीवाणु, थर्मस एक्वेटिकस से पृथक किया गया है) द्वारा किया जाता है। उच्च तापमान द्वारा प्रेरित द्विलड़ीय डीएनए के विकृतीकरण के समय भी यह हमेशा सक्रिय बना रहता है। यदि आवश्यकता पड़े, तो अब प्रवर्धित खंड को संवाहक के साथ बांध कर आगे क्लोनिंग में प्रयोग कर सकते हैं। (चित्र 11.6)

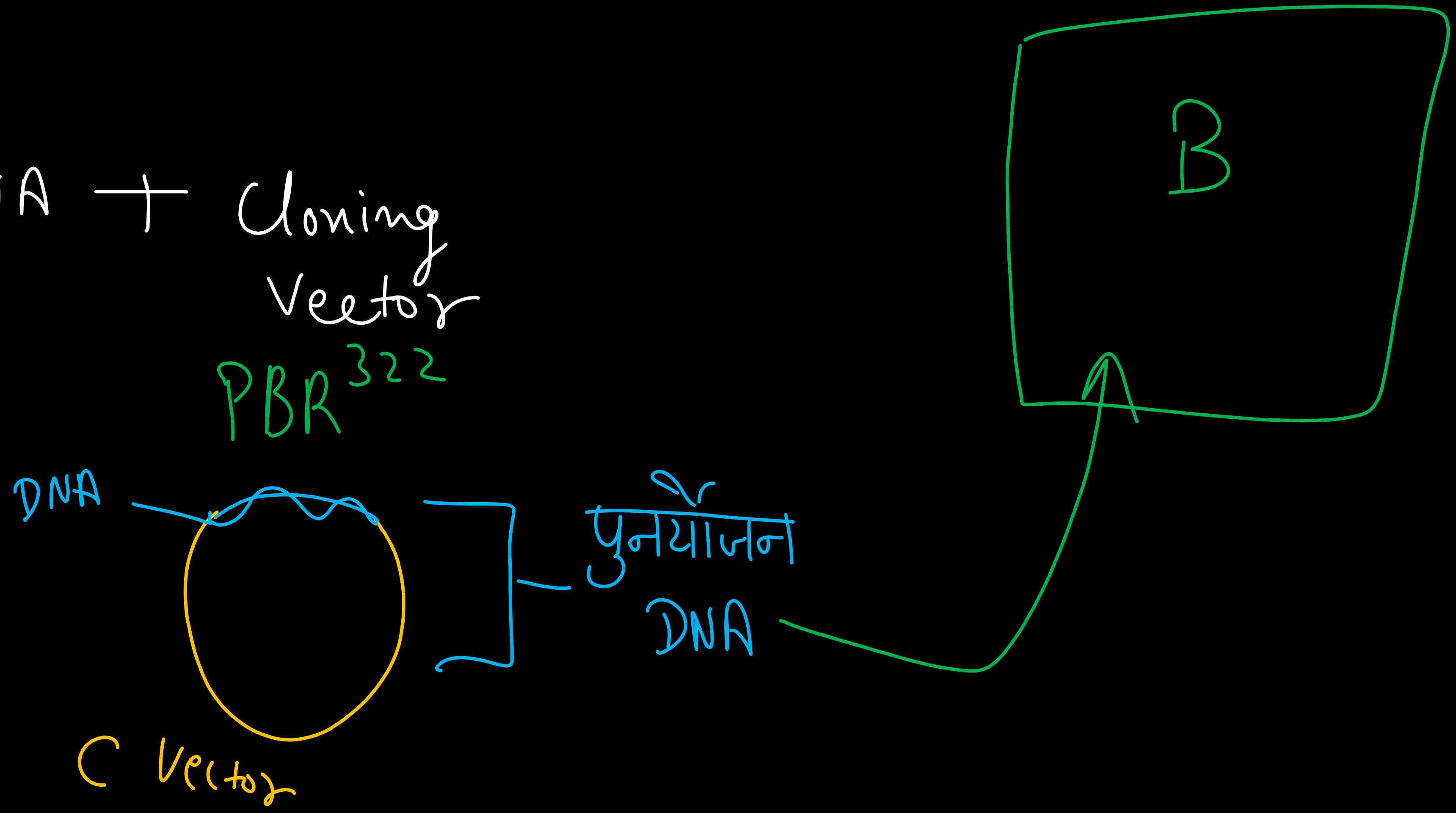


चित्र 11.3 एक प्रारूपी एगरोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस जो असार संग्रही (पथ 1) व सार संग्रही डीएनए खंडों के समूह का स्थानांतरण प्रदर्शित करता है (पथ 2 से 4)

परपोषी कोशिका में पुनर्योजन DNA का प्रवेश

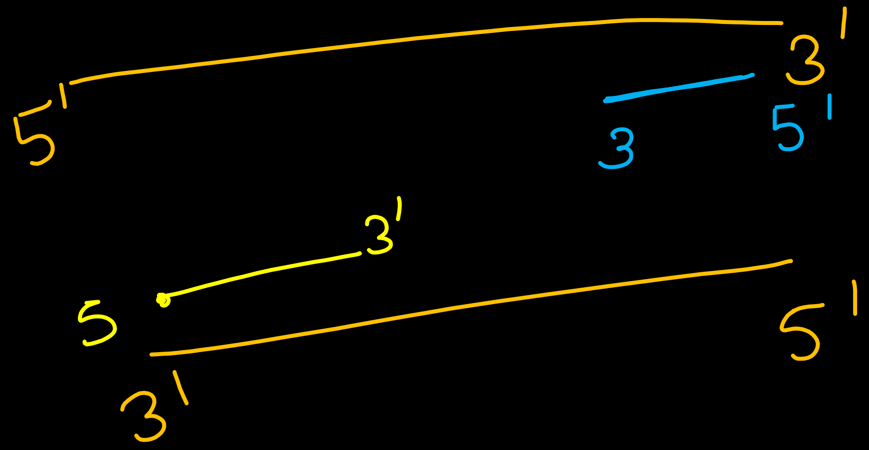
DNA + Cloning Vector

PBR^{322}



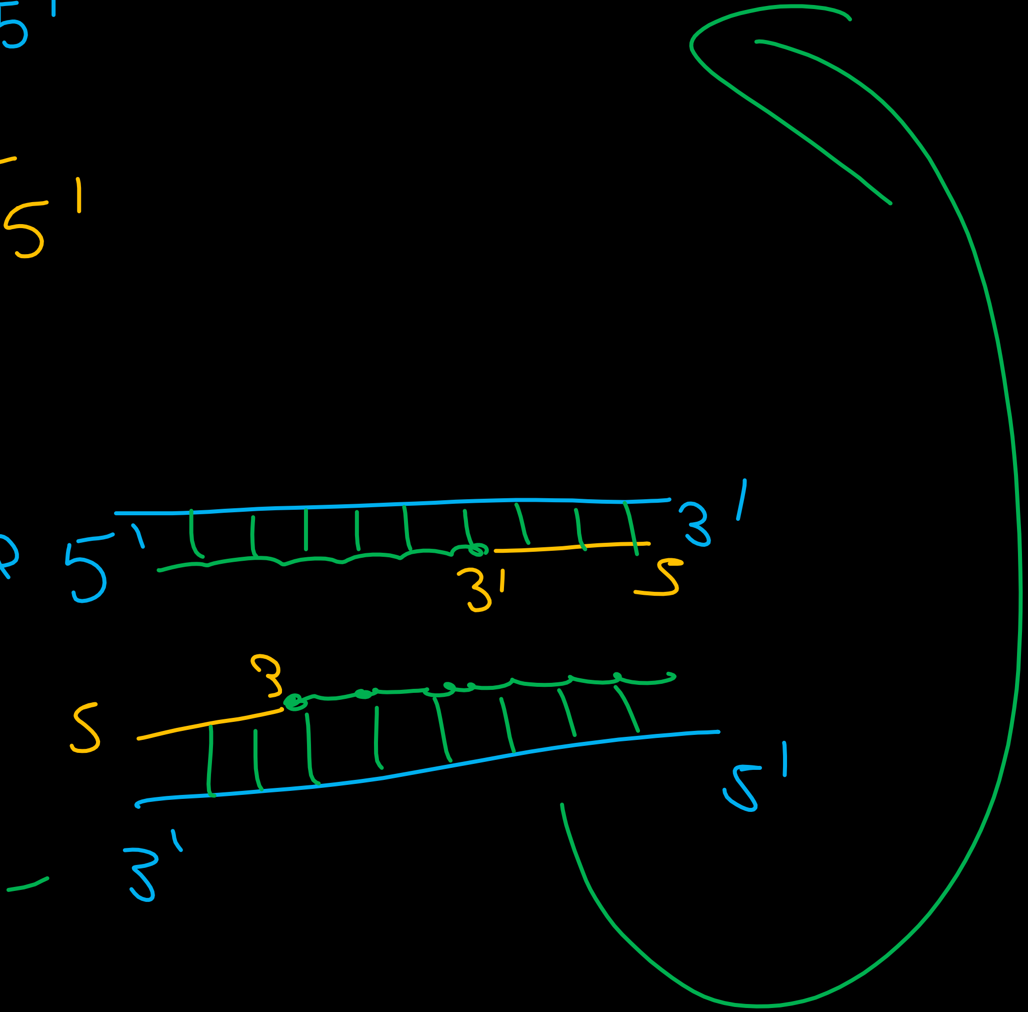
① Denaturation → gene खुलती – तापमान अधिक 92c

② 50 C



③ प्रसार – Taq polymerase

72°C



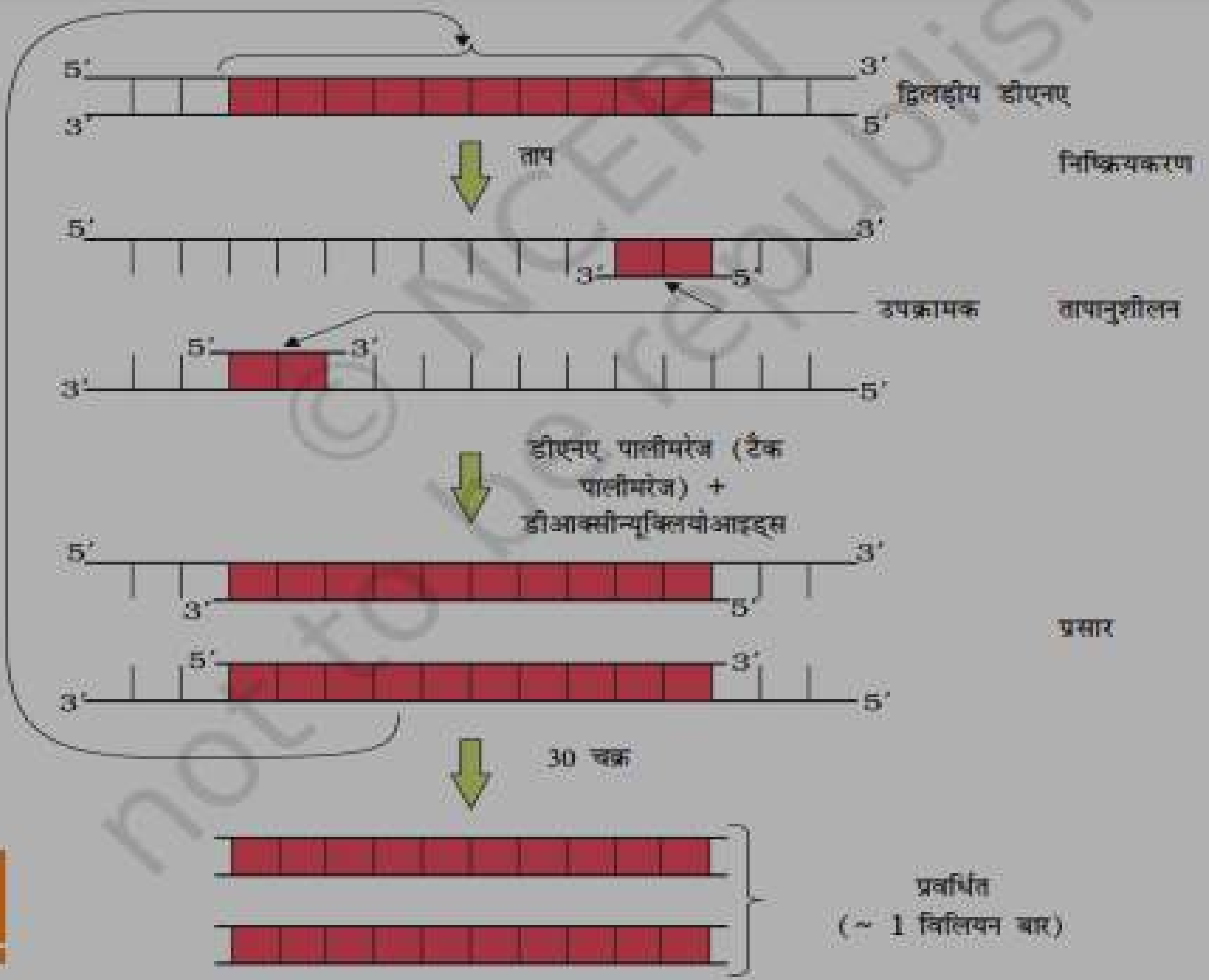
पुर्नयोजन *DNA* का निर्माण :– *PCR* – *Polymerase Chain Reaction*

इस अभिक्रिया में छोटे रसायनिक संश्लेषित अल्पन्यु्क्लियोटाइड जो *DNA* क्षेत्र के पूक होते है। के दो समुच्चयों (सेट्स) *DNA* का उपयोग करते हुए इनविद्रो विधि द्वारा उपयोगी जीन के कई प्रतिकृतियो का सेश्लेषण होता है।

पुनयोजन *DNA* का परपोषी कोशिक/जीव में निवेशन :–

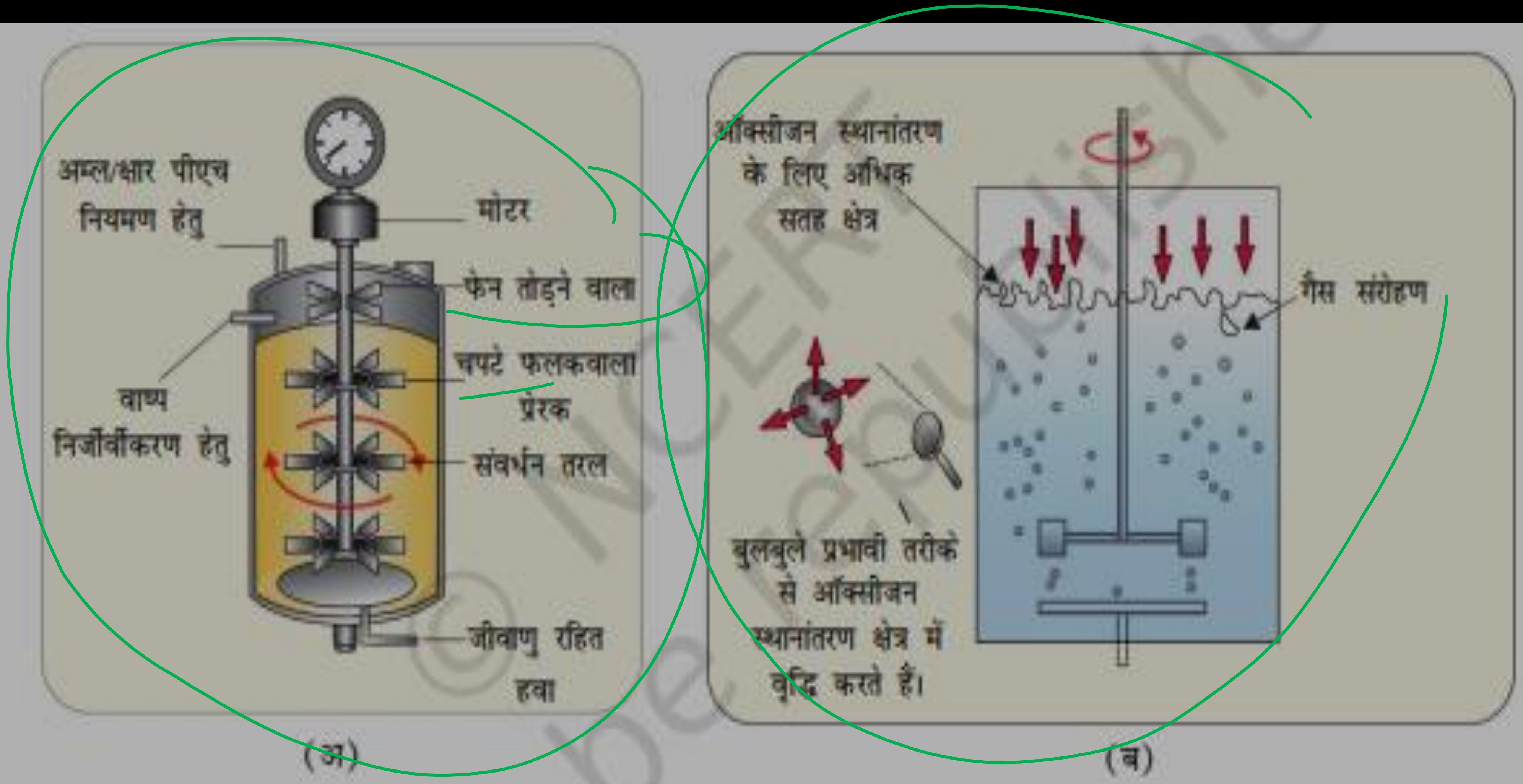
- बंधे हुए *DNA* का आदात्म कोशिका में प्रवेश कराने की विधिया है।
- यह काय जब आदाता कोशिका अपने चारो तरफ स्थित *DNA* को धारण करने में सक्ष्म हो तब किया जा सकता है।
- परोषी कोशिका के माध्यम से उत्पाद प्राप्त करना।
- परपोषी कोशिका पुर्नयोजन *DNA* में उपस्थित जीन के द्वारा उत्पाद निर्मित करते है।

- जसे पुर्नयोजन प्रोटीन भी कहा जाता है।
- इस प्रोटीन के संवधन तथा निष्कर्षण के लिए भिन्न–भिन्न तकनीक का प्रयोग किया जाता है।
- जैसे– बायोरिएक्टर



चित्र 11.6 पालिमरेज़ शृंखला अभिक्रिया (पीसीआर) का प्रदर्शन — प्रत्येक चक्र में तीन चरण हैं — (अ) निष्क्रियकरण (ब) उपक्रामक तापानुशीलन व (स) उपक्रामकों का विस्तार

© NCERT not to be republished



चित्र 11.7 (अ) साधारण बिलोडन हौज बायोरिएक्टर (ब) दंड बिलोडक हौज बायोरिएक्टर जिसके द्वारा जीवाणु विहीन हवा के बुलबुलों का प्रवेश

विद्यां ददाति विनयं, विनयाद् याति पात्रताम्।

धन्यवाद