अध्याय-15
आनुवंशिक अभियांत्रिकी
(Genetic Engineering)

पिछली सदी में कोशिका एवं उसके कार्यों के ज्ञान में बहुत वृद्धि हुई है। इस ज्ञान वृद्धि में आनुवंशिकी ने मूलभूत सूचनाएँ प्रदान की है व आज हमें डी.एन.ए. की संरचना, उसकी प्रतिकृति, निर्माण एवं जीन अभिव्यक्ति की महत्वपूर्ण जानकारियाँ उपलब्ध हैं। विशेष तौर पर पिछले तीन दशकों में विज्ञान में तेजी से वृद्धि होने के कारण हम जीन अथवा डी.एन.ए. का अनुक्रम ज्ञात करने, जीन को क्लोन करने में तथा जीन स्थानान्तरण करने की तकनीकों को विकसित करने में सफल हुए है। यह इसलिए संभव हो पाया है क्योंकि प्रोकैरियोट एवं यूकैरियोट जीवों में एक समान आनुवंशिक कूट (Genetic code) होता है। 1970 में डॉ. हरगोविन्द खुराना ने परखनली में जीन संश्लेषण कर पुनर्योगज DNA तकनीकी के ज्ञान को एक ठोस धरातल प्रदान किया था।

जीवविज्ञान की नवीनतम शाखाओं में जैव प्रौद्योगिकी (Biotechnology) को सर्वोपरि माना गया है जिसका उद्देश्य विभिन्न सजीव जन्तुओं एवं पौधों की आनुवंशिकता में पर्याप्त गुणवत्ता का सुधार करना है। इस उद्देश्य की प्राप्ति हेतु अनेक तकनीकों को अपनाया गया है जिन्हें समग्र रूप से विभिन्न नामों से जाना जाता है जैसे डी.एन.ए. क्लोनिंग या आनुवंशिक अभियांत्रिकी इत्यादि।

'किसी भी जीव के मूल डी.एन.ए. में बाहरी डी.एन.ए. जोड़ने पर उत्पन्न परिवर्तित डी.एन.ए. ***पुनर्योगज डी.एन.ए.*** कहलाता है।'

'किसी भी जीव के डी.एन.ए. में हेरफेर करने के लिए आवश्यक प्रभावी प्रक्रमों को **पुनर्योगज डी.एन.ए. प्रौद्योगिकी** (Recombinant DNA Technology) कहते हैं। जीन अभियांत्रिकी का मतलब जीनों के हेरफेर द्वारा किसी भी जीव की आनुवंशिकता में उपयोगी परिवर्तन करना है।

पुनर्योगज डी.एन.ए. तकनीक की खोज का श्रेय **स्टेनले कोहन, बोयर व सहभागियों** (Stanley Cohen, Herbert Boyer, et al.) को जाता है। उन्होंने 1973 में ***सालमोनेला*** व ***ई.कोलाई*** जीवाणुओं में पुनर्योगज कर दिखाया।

इस अध्याय में हम आनुवंशिक अभियांत्रिकी के तहत पुनर्योगज प्रौद्योगिकी के मूलभूत सिद्धान्तों का अध्ययन करेंगे।

जीन अभियांत्रिकी की सामान्य विधि:- जीन अभियांत्रिकी की प्रमुख विधि **पुनर्योगज DNA तकनीक** है, इसके मुख्य चरण निम्न है:-

(1) वांछित जीन की पहचान व पृथक्करण

(2) क्लोनिंग वाहक का चयन

(3) वांछित जीन का क्लोनिंग वाहक में निवेशन

(4) पुनर्योगज डी.एन.ए. का परपोषी कोशिका में गुणन

(5) क्लोन की गई जीन की पहचान व अन्य जीवों में स्थानान्तरण

(6) वांछित जीन की अभिव्यक्ति।

जीन अभियांत्रिकी के द्वारा पुनर्योगज DNA प्राप्त करने के लिए निम्न उपकरणों (अवयवों) की आवश्यकता होती है:-

(1) रेस्ट्रीक्शन एन्डोन्यूक्लिऐज एन्जाइम

(2) वाहक

(3) परपोषी या ग्राही कोशिका

(4) जीन बैंक

1. वांछित जीन की पहचान व पृथक्करण

(Identification and isolation of desired gene)

वांछित जीन की पहचान कर उसे पृथक करने के लिए प्रतिबंध या सीमित अंतःन्यूक्लिएज (रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लिएज, Restriction endonuclease) एन्जाइम का प्रयोग किया जाता है। **वर्नर आर्बर व हेमिल्टन ओ. स्मिथ** (Werner Arber and Hamilton O. Smith) ने 1970 में रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लिएज एन्जाइम की खोज की थी।

रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लिएज

(अ) ये एन्जाइम आण्विक कैचियों (Molecular scissors) की तरह होते हैं जो डी.एन.ए. अणु को एक निश्चित स्थल (Specific site) पर काटते हैं।

(ब) प्राकृतिक रूप से ये एन्जाइम ***ई.कोलाई, बेसीलस, स्ट्रेप्टोकोकस, थर्मस एक्वेटिस*** आदि में पाए जाते हैं।

(स) रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लिएज एन्जाइम तीन प्रकार के होते हैं।

टाइप I एन्डोन्यूक्लिएज (RI) , टाइप II एन्डोन्यूक्लिएज (R-II), टाइप -III एन्डोन्यूक्लिएज (R-III)। टाइप -II एन्डोन्यूक्लिएज (R-II) का प्रयोग मुख्यतः जीन क्लोनिंग व रिस्ट्रिक्शन मानचित्रण में किया जाता है। उदाहरण *Eco* RI, *Hind* II आदि।

रिस्ट्रिक्शन एन्जाइम का नामकरण

(i) एन्जाइम का प्रथम अक्षर वंश का होता है जिससे उसको पृथक किया जाता है। यह हमेशा बड़े अक्षरों में लिखा जाता है।

(ii) इसके बाद के दो अक्षर उस वंश की जाति के होते हैं । ये छोटे अक्षरों में लिखे जाते हैं। ये तीनों अक्षर इटालिक्स में लिखे जाते हैं।

उदाहरण : ***Eco.= E.coli (एशेरिकिया कोली से)***

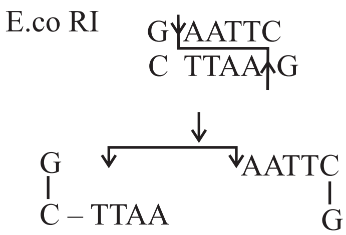
Hin = H. influenzae (हीमोफिलस इन्फ्लुयन्जी से)

(iii) चौथे अक्षर के रूप में वंश के उस प्रभेद को लिखा जाता है। जिससे उसे निकाला गया है।

उदाहरणः-EcoR=*E. coli* की प्रभेद R से।

(iv) यदि एक ही जीव से एक से अधिक रिस्ट्रिक्शन एन्जाइम प्राप्त होते हैं तो उन्हें रोमन अंकों द्वारा प्रदर्शित किया जाता है। उदाहरण Eco RI, Eco RII इत्यादि।

*Eco*RI एन्जाइम डी.एन.ए. में निम्न क्रम को पहचान कर उसे क्षार G व क्षार A के मध्य काट देता है।



अब यदि भिन्न स्रोतों से प्राप्त डी.एन.ए. टुकड़ों को डी.एन.ए. लाइगेज एन्जाइम (DNA Ligase enzyme) की उपस्थिति में मिला दे तो ये दोनों डी.एन.ए खण्ड फोस्फो डाई एस्टर बंध बनाकर द्विकुंडलीय संरचना का निर्माण कर लेंगे।

जीन अभियांत्रिकी में उपयोग में लिए जाने वाले अन्य एन्जाइम है:-

(1) RNA पर निर्भर DNA पोलीमरेज एन्जाइम (RNA dependent DNA Polymerase enzyme) - इनका कार्य RNA टेम्पलेट पर DNA सूत्र के न्यूक्लीओटाइड का बहुलीकरण करना है।

(2) DNA पर निर्भर DNA पॉलीमरेज एन्जाइम (DNA dependent DNA Polymerase enzyme) – यह DNA टेम्पलेट पर अनुपूरक DNA सूत्र के न्यूक्लीओटाइड का बहुलीकरण करता है।

(3) लाइगेजेज (Ligases) – इस एन्जाइम का कार्य टेम्पलेट पर DNA खण्डों के सिरों को जोड़ने का होता है।

(4) लाइजोजाइम्स (Lysozymes) :- ये एन्जाइम जीवाणु की कोशिका भित्ति को गला देते हैं ताकि जीवाणु के DNA को विलगित (Isolate) किया जा सके।

(5) क्षारीय फॉस्फेटेजेज (Alkaline Phosphatases) - यह वृत्ताकार DNA के 5^{1} सिरे पर फास्फेट को काट देता है तथा DNA को रेखाकार रखने में सहायक होता है ताकि विजातीय DNA का इसमें निवेशन (Insertion) कराया जा सके। यह एन्जाइम DNA की वृत्ताकार होने की प्रवृत्ति को रोकता है।

2. क्लोनिंग वाहकों का चयन (Selection of cloning vectors)

वांछित जीन को पृथक्कृत करने के पश्चात् एक वाहक की आवश्यकता होती है जो वांछित जीन सहित परपोषी में प्रवेश करके अपने डी.एन.ए. की पुनरावृत्ति कर सके। एक वाहक में निम्न विशेषताएँ होनी चाहिए:-

(1) यह परपोषी कोशिका में पुनरावृत्ति के लिए स्वतंत्र होना चाहिए।

(2) यह परपोषी में आसानी से प्रवेश कर सके तथा पुनः पृथक्कृत हो सके।

(3) वाहक अणु में विशिष्ट प्रतिबन्ध स्थल होने चाहिए (Restriction sites) जिनको रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लिएज एन्जाइम आसानी से तोड़ सके। प्रतिबन्ध स्थल पर विजातीय DNA का निवेश आसानी से हो सकता है।

(4) इनमें एक चिन्हित स्थल (Marker site) होनी चाहिए जो रूपान्तरित कोशिकाओं के चयन में सहायक हो।

(5) इसके द्वारा रूपान्तरण सरल व दक्ष हो।

(6) वांछित विजातीय DNA की अभिव्यक्ति के लिए वाहक में प्रमोटर (Promoter), आपरेटर (Opertor) जैसे नियामक अवयव होने चाहिए

ई. कोलाई में प्राकृतिक व मानव निर्मित दोनों प्रकार के वाहकों का प्रयोग किया जा सकता है। इनमें प्रयुक्त होने वाले प्रमुख वाहक हैं –

1. प्लाज्मिड (Plasmid)
2. जीवाणुभोजी (Bacteriophage)
3. कॉस्मिड(Cosmid)

(1) प्लाज्मिड (Plasmid)

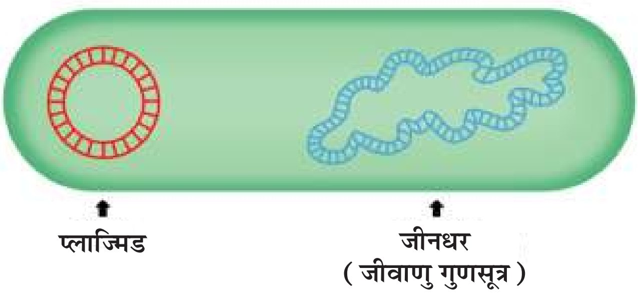
1952 में सर्वप्रथम **लेडरबर्ग** ने इसको जीवाणु कोशिका में अतिरिक्त गुणसूत्र के रूप में देखा था। इनकी निम्न विशेषताएँ होती है–

(1) ये जीवाणु कोशिका में गुणसूत्र के अतिरिक्त पाए जाते हैं।

(2) ये वृत्ताकार तथा द्विरज्जुकी, सर्पिलाकार अणु होता है।

(3) ये अपनी पुनरावृत्ति करने के लिए स्वतंत्र होते है।

(4) ये जीवाणु की वृद्धि व उसके जीवित रहने के लिए आवश्यक नही है।



चित्र 15.1 एक जीवाणु कोशिका में प्लाज्मिड

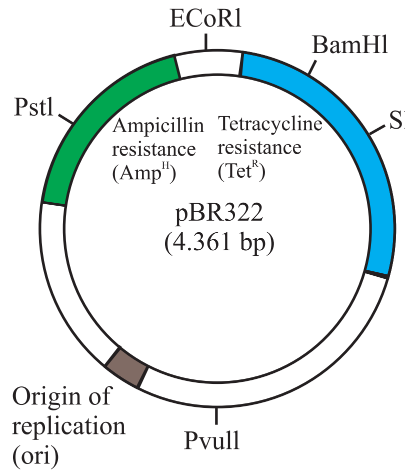
(5)इनमें विशिष्ट प्रतिबन्ध स्थल (Restriction sites) होती हैं, जहाँ वांछित जीन का निवेश कराया जा सके।

(6) इनमें चिन्हित स्थल (Marker sites) उपलब्ध होते हैं।

(7) प्लाज्मिड में तीन जीन से लेकर हजार जीन तक हो सकती हैं

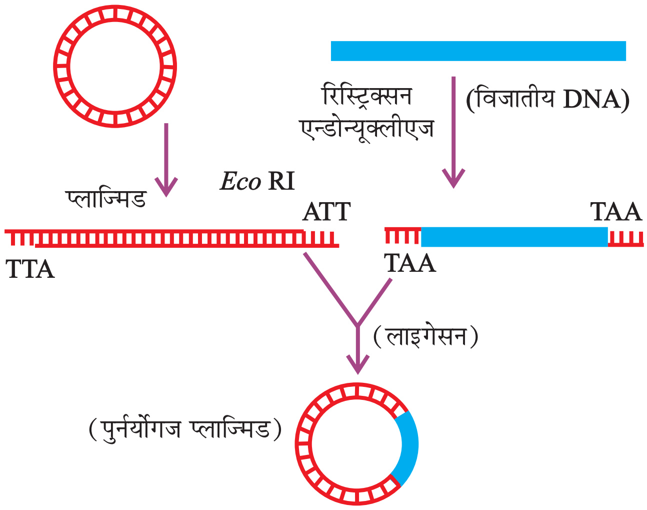
सबसे ज्यादा प्रयोग में लिए जाने वाला प्लाज्मिड– pBR 322 है।

इस प्लाज्मिड में दो चिन्हित स्थल TetR (टेट्रासाइक्लीन प्रतिरोधी) तथा AmpR (एम्पिसीलीन प्रतिरोधी) होते हैं। इसमें 12 भिन्न रिस्ट्रिक्शन एन्जाइमों के अभिज्ञान स्थल (Recognition sites) होते है। विजातीय DNA को TetR व AmpR जीन के बीच रिस्ट्रिक्शन एन्जाइम की सहायता से समाकलित करते हैं।



चित्र 15.2 pBR 322 प्लाज्मिड की संरचना

प्लाज्मिड में वांछित जीन के निवेश के लिए सर्वप्रथम रिस्ट्रिक्शन एन्जाइम द्वारा काट कर रैखिक कर लिया जाता है। इसके बाद दोनों सिरों को जोड़ते हुए (प्लाज्मिड DNA व विजातीय DNA) बीच में लगभग 5–10 Kb(Kilo base) लंबा वांछित डी.एन.ए. खण्ड जोड़ लिया जाता है।



चित्र 15.3 प्लाज्मिड में वांछित DNA का निवेशन

द्विगुणन की स्थिति के अनुसार अतिरिक्त गुणसूत्रीय संरचना को **प्लाज्मिड** अथवा **अधिकाय** (Episome) कहा जाता है।

स्वतंत्र रूप से द्विगुणन करने वाली संरचना को **प्लाज्मिड** जबकि जीवाणु के मुख्य गुणसूत्र से जुड़े रहकर उसके साथ ही द्विगुणन करने

वाली संरचना को अधिकाय कहते हैं।

(2) जीवाणुभोजी (Bacteriophage)

वे वाइरस जो जीवाणु को संक्रमित करते हैं जीवाणुभोजी कहलाते हैं। उदाहरण लेम्डा व M13।

प्लाज्मिड की तुलना में जीवाणुभोजी एक बेहतर वाहक है क्योंकि इसमें निम्न विशेषताएँ पाई जाती है:-

1. इसमें बड़े डी.एन.ए. खण्ड (24Kb) की क्लोनिंग की जा सकती है।

2. प्रत्येक जीवाणुभोजी से एक प्लाक (Plaque) क्षेत्र उत्पन्न होता है जिससे परीक्षण अपेक्षाकृत आसान होता है।

लेम्डा जीवाणुभोजी (λ Bacteriophage) का महत्व वाहक के रूप में M13 से ज्यादा होता है क्योंकि :

1. यह ***ई.कोलाई*** के जीवाणुभोजी है।

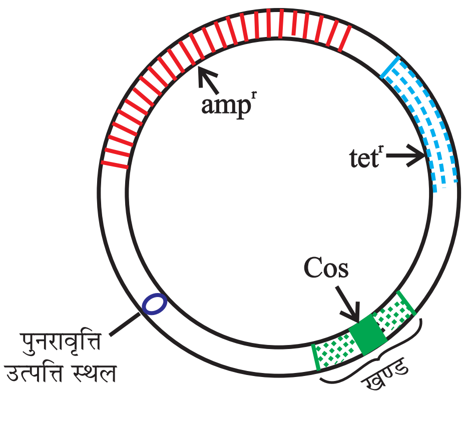
2. इसका डी.एन.ए. रैखीय व द्विकुण्डलित होता है।

3. λ फाज में अनावश्यक डी.एन.ए. भाग को हटाया जा सकता है ताकि वाहक अणु का आकार छोटा हो जाता है तथा बड़े आकार का विजातीय डी.एन.ए.इसमें जोड़ सकते हैं।

(3) कॉस्मिड (Cosmid)

यह प्लाज्मिड व लेम्डा फाज का संकर है। इसका निर्माण 1978 में **बारबरा हॉन** व **जोन कॉलिन्स** (Barbara Horn and John collins) ने किया था। ऐसे प्लाज्मिड कण जिनमें लेम्डा जीवाणुभोजी के कॉस स्थलों वाले डी.एन.ए. अनुक्रमों को निवेशित किया जाता है **कास्मिड** कहलाते हैं। अत: कॉस्मिड व प्लाज्मिड में लेम्डा जीवाणुभोजी दोनों के गुण होते हैं। कॉस्मिड, जीवाणु कोशिका में प्लाज्मिड की तरह पुनरावर्त करते हैं तथा कॉस स्थल के कारण इनकी पैकिंग लेम्डा कणों की भांति होती है।

उदाहरण कॉस्मिड P^{LFR-5} इस कास्मिड में दो कॉस स्थल , 6 प्रतिबंध एन्जाइम स्थल, पुनरावर्ती उत्पत्ति स्थल व टेट्रासाइक्लिन प्रतिरोधक जीन उपस्थित होते हैं।



चित्र 15.4 कॉस्मिड वाहक

प्लाज्मिड, जीवाणुभोजी व कॉस्मिड के अतिरिक्त जीन अभियांत्रिकी में कुछ और वाहक प्रयोग में लिए जाते हैं। इनमें से मुख्य हैं :-

1. फाज्मिड 2. शटल वाहक 3. ट्रान्सपोजोन्स

ट्रान्सपोजोन्स को **जम्पिंग जीन** (Jumping genes) भी कहते हैं।

3. वांछित जीन का क्लोनिंग वाहक में निवेशन (Insertion of desired gene in cloning vector) :- वांछित जीन को वाहक जीन में जोड़ने के लिए सर्वप्रथम दोनों जीनों में समान रिस्ट्रिक्शन स्थल बनाए जाते हैं तथा इसके बाद दोनों को जोड़ा जाता है। इसे लाइगेशन (Ligation) कहते हैं। इस प्रक्रिया में निम्न एन्जाइमों की आवश्यकता होती है:-

(i) रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लीएज (Restriction endonucleases)
(ii) मिथाइलेजेज (Methylases)
(iii) डी.एन.ए. लाइगेजेज (DNA Ligases)
(iv) एल्केलाइन फास्फेटेज (Alkaline phosphatases)
(v) रिवर्स ट्रांसक्रिप्टेज (Reverse transcriptase)
(vi) टर्मिनल ट्रांसफेरेजेज (Terminal transferases)

4. पुनर्योगज DNA का परपोषी कोशिका में गुणन (Multiplication of recombinant DNA in host cell) - परपोषी कोशिका में DNA को पुनर्योगज दो प्रकार से निवेशित कराया जाता है-

1. रूपान्तरण द्वारा (Transformation)

2. पारक्रमण द्वारा (Transduction)

इस प्रक्रिया में ***ई.कोलाई*** जीवाणु कोशिका का मुख्यत: प्रयोग परपोषी के रूप में किया जाता है। इन प्रक्रियाओं का अध्ययन पूर्व में किया जा चुका है। *ई. कोलाई* कोशिका में पुनर्योगज DNA का गुणन होता है।

(5) क्लोन की गई जीन की पहचान एवं अन्य जीवों में स्थानान्तरण (Identification of cloned gene and its transfer in other organisms) :- जब वांछित जीन को वाहक के साथ जोड़ा जाता है तो कई अवांछित उत्पाद भी प्राप्त होते हैं। इन अवांछित उत्पाद को हटाने के लिए व परपोषी कोशिका में पुनर्योजी डी.एन.ए. का चयन करने के लिए विशेष प्रकार की जीन का प्रयोग किया जाता है। इस जीन को **मार्कर जीन** (Marker gene) कहते हैं जो कि रूपान्तरित कोशिकाओं मे विशेष लक्षण उत्पन्न करती है। इस

जीन को वाहक डी.एन.ए. में जोड़ा जाता है। उदाहरण:- केनामाइसिन प्रतिरोधक जीन

मार्कर जीन के अतिरिक्त कुछ जीन ऐसी भी है जो कोशिका में विशेष लक्षण प्ररूप प्रदर्शित करती है। इन्हें **रिपोर्टर जीन** कहते हैं जो अपने लक्षण प्ररूप के कारण दूसरी कोशिकाओं से अलग दिखती है। उदाहरण:-LUC (ल्यूसीफरेज) जीन जो जुगनू में उपस्थित होती है तथा जैवप्रदीप्तीकरण (Bioluminiscence) उत्पन्न करती है।

(6) वांछित जीन की अभिव्यक्ति (Expression of desired gene) :- वांछित जीन से प्राप्त क्लोन जीन की अभिव्यक्ति का अर्थ है क्लोन जीन को ***ई.कोलाई*** से प्राप्त कर उसे किसी सूक्ष्मजीव, पादप या जन्तु में निवेशित करवा कर उससे वांछित उत्पाद प्राप्त करना। उदाहरण :- ***ई.कोलाई*** में इन्सुलिन उत्पादन

वे पादप व जंतु जिनमें विजातीय डी.एन.ए. उपस्थित होता है ट्रान्सजैनिक पादप या ट्रॉन्सजैनिक जन्तु कहलाते हैं।

c-DNA (पूरक DNA) व जीनोमिक लाइब्रेरी

[c-DNA (Complementary DNA) and Genomic Library]

पूरक DNA(Complimentary DNA) : RNA की रज्जुक पर **रिवर्स ट्रान्सक्रिप्टेज एन्जाइम** (Reverse transcriptase enzyme) द्वारा निर्मित डी.एन.ए की प्रति पूरक डी.एन.ए. कहलाती है।

c-DNA लाइब्रेरी (c-DNA Library):- जीन क्लोनिंग के द्वारा किसी जीव के समस्त अथवा कई पूरक DNA को परपोषी कोशिका में निवेशित करवाकर संधारित करने को c-DNA लाइब्रेरी कहते हैं।

c-DNA लाइब्रेरी का निर्माण

(1) सर्वप्रथम एक क्रियाशील प्रोटीन निर्माण करने वाले ऊतक की कोशिकाओं से m RNA प्राप्त कर लिया जाता है। उदाहरण पौधे की जड़, पर्ण कोशिका या स्तनधारियों के अण्डाशय से।

(2) अब प्रत्येक mRNA अणु से रिवर्स ट्रान्सक्रिप्टेज एन्जाइम की सहायता से c-DNA का निर्माण किया जाता है।

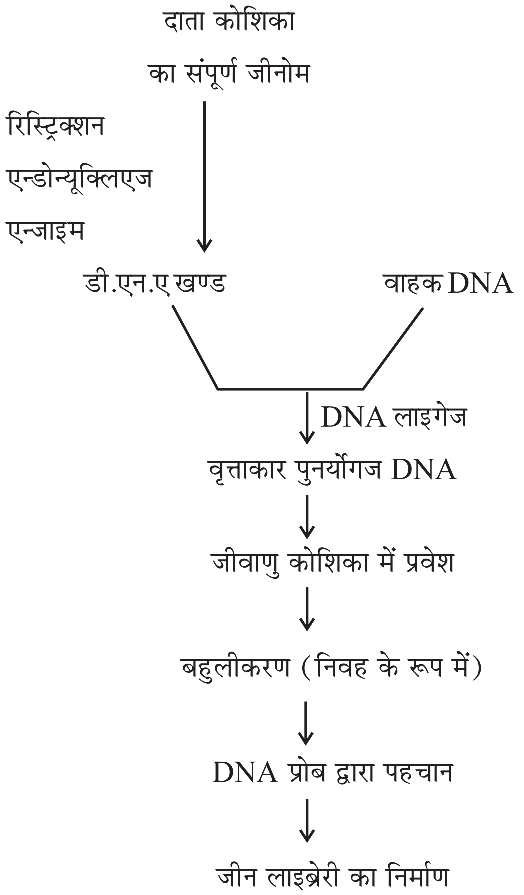
(3) इस c-DNA को वाहक में क्लोन कर जीवाणु कोशिका में प्रवेश करा दिया जाता है।

(4) इसके बाद c-DNA का प्रोब द्वारा संकरण कर पहचान व विशिष्टिकरण कर लिया जाता है।

c-DNA का उपयोग यूकेरियोटिक जीन के, प्रोकेरियोट्स में अभिलक्षण करने के लिए करते हैं, क्योंकि इनमें यूकेरियोटिक जीन के इन्ट्रॉन का अभाव होता है।

जीनोमिक लाइब्रेरी (Genomic Library)

किसी भी जीव के संपूर्ण संजीव (Genome) के क्लोनित खण्डों का संग्रह **जीनोमिक लाइब्रेरी** कहलाता है। किसी जीव के सम्पूर्ण अगुणित DNA समुच्चय को उस जीव का संजीन कहते है। जीन लाइब्रेरी का निर्माण एक कोशिका से उसका संपूर्ण DNA निकाल कर किया जाता है। इसका निर्माण निम्न तरीके से होता है:-



आण्विक प्रोब्स (Molecular probes):- DNA या RNA के खण्ड जिनकी सहायता से किसी भी जीव में उपस्थित उसके पूरक DNA या RNA खण्डों की पहचान की जा सकती है **आण्विक प्रोब्स** कहलाते हैं। प्रोब्स निम्न प्रकार के होते हैं-

1. DNA प्रोब्स
2. RNA प्रोब्स

प्रोब्स का महत्व

(1) जीन अभियांत्रिकी में शोध हेतु इनका उपयोग विशिष्ट डी.एन.ए. खण्डों की पहचान के लिए होता है।

(2) प्रोब्स की सहायता से भोजन में उपस्थित प्रदूषकों की पहचान की जा सकती है।

(3) अपराध विज्ञान में, पैतृकता के मामले सुलझाने में, पारिवारिक रिश्तेदारी स्थापित करने में इनका प्रयोग होता है।

(4) फसल प्रजनक बीज व पौधों की अच्छी जातियों को पहचानने में प्रोब्स का उपयोग करते हैं।

क्लोनित जीनों के विश्लेषण की विधियाँ
(Techniques of analysis of cloned genes)

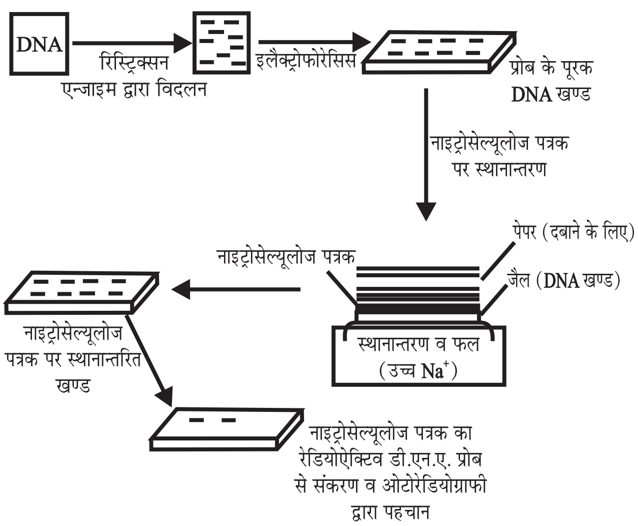
पिछले दशक में क्लोनित जीनों के विश्लेषण के लिए विशेष तकनीकों का आविष्कार हुआ है। इस अध्याय में कुछ महत्वपूर्ण तकनीकों का संक्षिप्त वर्णन किया जा रहा है:-

(1) जैल वैद्युत कण-संचलन या जैल इलेक्ट्रोफोरेसिस (Gel Electrophoresis) - इलेक्ट्रोफोरेसिस एक विश्लेषणात्मक विधि है जो सामान्यत: डी.एन.ए. खण्डों को शुद्ध करके अलग करने में काम में लिया जाता है। इसमें विद्युत क्षेत्र के प्रभाव से, ऋणात्मक रूप से आवेशित डी.एन.ए. खण्डों को उनके आकार के आधार पर अलग किया जाता है। इस उपकरण में दो प्रकार का जैल काम में लेते हैं:-

1. अगेरोज जैल   2. पॉलीएक्राइलेमाइड जैल

इन जैल अणुओं के मध्य छिद्र उपस्थित होते हैं जिनके कारण यह आण्विक चलनी (Molecular sieves) की तरह कार्य करती है। डी.एन.ए. खण्ड को अभिरंजित कर इन जैल में विद्युत प्रवाह देकर प्रवाहित करने पर अपने आकार के आधार पर कुछ ही डी.एन.ए. खण्ड तेजी से व कुछ धीमे से गति करते हैं व अलग अलग जगह पर समान लम्बाई के बैण्ड बना देते हैं। बाद में इन जैल को अभिरंजित करके जब UV प्रकाश में देखते है तो ये खण्ड चमकीले नारंगी रंग के दिखते हैं।

(2) ब्लाटिंग तकनीक (Blotting techniques) :- इस विधि में डी.एन.ए. टुकड़ों को अगेरोज जैल पर प्राप्त करने के बाद (जैल इलेक्ट्रोफोरेसिस द्वारा) इन्हें नाइट्रोसेल्यूलोज फिल्टर (Nitrocellulose) पर स्थानान्तरित कर स्थिर कर लिया जाता है। फिर इन्हें डी.एन.ए. प्रोब्स द्वारा संकरण से पहचाना जाता है। इस प्रक्रिया को ब्लाटिंग तकनीक (Blotting Technique) कहते हैं।



चित्र 15.5 सदर्न ब्लाटिंग तकनीक

सर्वप्रथम **ई.एम. सदर्न** (E.M.Southern) ने 1975 में डी.एन.ए. खण्डों को नाइट्रोसेल्यूलोज (Nitrocellulose) फिल्टर पर स्थानान्तरित किया व यह तकनीक **सदर्न ब्लाटिंग तकनीक** (Southern blotting technique) कहलाई। (देखे चित्र 15.5) इस तकनीक द्वारा DNA खण्डों का विश्लेषण किया जाता है।

1979 में **आल्विन व साथियों** (Alwin et. al) ने RNA खण्डों को जैल इलेक्ट्रोफोरेसिस के बाद नाइट्रोसेल्यूलोज फिल्टर के स्थान पर अमीनोबेन्जाइल ऑक्सीमिथाइल पत्र (OBM) पर स्थानान्तरित किया यह तकनीक **नदर्न ब्लाटिंग तकनीक** (Northrn blotting technique) कहलाई। इस तकनीक द्वारा RNA खण्डों का विश्लेषण किया जाता है। 1979 में **तौबिन** व **साथियों** ने प्रोटीन को सर्वप्रथम सोडियम डोडिसाइल सल्फेट (Sodium-do-decyl-sulphate) की सहायता से पालिपेप्टाइडों (Polypeptides) में विलगित किया व फिर जैल इलैक्ट्रोफोरेसिस की सहायता से अलग कर नाइट्रोसेल्यूलोज पेपर (फिल्टर) या नाइलोन झिल्ली पर स्थानान्तरित किया तथा एक्स-रे प्लेट पर उद्भाषित कर प्रोटीन की पहचान की। इस तकनीक द्वारा प्रोटीनों का विश्लेषण किया जाता है। इसको **वेस्टर्न ब्लॉटिंग** (Western blotting) कहते हैं।

(3) पालीमरेज शृंखला अभिक्रिया (Polymerase chain reaction-PCR):- 1985 तक यूकेरियोटिक व प्रोकेरियोटिक कोशिकाओं में जीन के प्रतिलिपिकरण हेतु वाहक को आवश्यक साधन समझा जाता था। लेकिन 1989 में **मुलिस** (Mullis) ने डी.एन.ए. प्रतिलिपिकरण के लिए एक सशक्त तकनीक खोजी जिसके द्वारा डी.एन.ए. की एक प्रतिलिपि से लाखों प्रतिलिपियाँ अत्यन्त कम समय में प्राप्त की जा सकती है। इसे **पॉलीमरेज शृंखला अभिक्रिया** के नाम से जाना जाता है।

इस अभिक्रिया के तीन प्रमुख चरण है जो बारम्बार चक्रित हो डी.एन.ए. बहुलीकरण करते हैं तथा लगभग 20-30 बार दोहराने पर डी.एन.ए. की लाखों प्रतियाँ निर्मित हो जाती है। यह अभिक्रिया डी.एन.ए. थर्मल साइक्लर (Thermal cycler) में संपन्न की जाती है। प्रत्येक चक्र को पूर्ण होने में 225 सैकण्ड का समय लगता है।

पी.सी.आर. की उपयोगिता

(1) आण्विक मानचित्रण व अनुसंधान उद्देश्यों हेतु।

(2) जीन अभियांत्रिकी व जीन थेरेपी प्रयोगों में।

(3) डी.एन.ए. की बहुआकारिकी के अध्ययन में।

(4) अपराध विज्ञान में अपराधियों की पहचान हेतु काम में ली जा सकती है।

(5) आनुवंशिक रोग जैसे हीमोफीलिया, सिकल सेल एनीमिया की पहचान में।

(4) डी.एन. ए. फिंगरप्रिन्टिंग (DNA Finger

Printing) :- इस विधि की खोज 1985 में **एलेक जेफ्रिज (Alec Jeffreys)** व साथियों ने की थी। डी.एन.ए. में उपस्थित नाइट्रोजन क्षारों के विशिष्ट अनुक्रम के कारण एक व्यक्ति विशेष को पृथकता से पहचाना जा सकता है। प्रत्येक व्यक्ति विशेष के डी.एन.ए. की छाप या चित्र सदैव एक जैसा होता है चाहे वो शरीर के किसी भी अंग की कोशिका से लिया गया हो।

इस विधि में डी.एन.ए. को छोटे खण्डों में रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लीज एन्जाइम की सहायता से तोड़ कर जैल इलेक्ट्रोफोरेसिस की सहायता से बैंड (Bands) के रूप में अलग कर लेते हैं। फिर सदर्न ब्लाटिंग तकनीक द्वारा एक्सरे प्लेट पर या UV प्रकाश की सहायता से उद्भाषित कर लिया जाता है। इसे डी.एन.ए. फिंगर प्रिन्टिंग कहते हैं।

डी.एन.ए. फिंगर प्रिन्टिंग का उपयोग

(i) किसी भी बच्चे के माता पिता के बारे में पता लगाना ।

(ii) आनुवंशिक रोग जैसे हीमोफिलिया आदि का शिशु जन्म से पूर्व पता लगाना।

(iii) बलात्कार व हत्या जैसे अपराध के अभियुक्तों की पहचान में।

5. प्रतिबन्ध खण्ड लम्बाई बहुरूपिता चित्रण (Mapping Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP):- जब कोई रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लीएज विभिन्न प्रभेदों या संबंधित जातियों के जिनोमिक डी.एन.ए. खण्ड काटता है तो इसे RFLP कहते हैं।

इस विधि में संबंधित जातियों के डी.एन.ए. को पृथक कर उसे रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लीएज एन्जाइम द्वारा पाचित कर जैल इलेक्ट्रोफोरेसिस द्वारा पृथक कर लिया जाता है। इन डी.एन.ए. बैण्ड को नाइट्रोसेल्यूलोज (Nitrocellulose) फिल्टर पत्र पर स्थानान्तरित कर इस फिल्टर पेपर को रेडियो चिन्हित प्रोब युक्त विचलन में रखा जाता है। अंत में इन्हें ऑटोरेडियोग्राफी द्वारा ज्ञात कर लिया जाता है।

RFLP के उपयोग -

(1) विभिन्न जातियों या प्रभेदों के आपसी संबंध निर्धारित करना।

(2) मात्रात्मक लक्षणों की जीन संरचना व कार्य ज्ञात करना।

(3) इस विधि को डी.एन.ए. फिंगर प्रिंटिंग के लिए भी काम ले सकते हैं।

(4) इस विधि द्वारा मक्का, चावल, गेहूँ आदि के RFLP मानचित्र तैयार किए जा चुके हैं।

पुनर्योगज डी.एन.ए. प्रौद्योगिकी की उपलब्धियाँ

(Achivements of Recombinant DNA Technology)

जैव प्रौद्योगिकी की सहायता से मनुष्य ने चिकित्सा विज्ञान, कृषि विज्ञान व औद्योगिक क्षेत्र में कई उपलब्धियाँ प्राप्त की है। इस तकनीक को प्रयोग में लेते हुए मनुष्य फसली पौधे व पालतू पशुओं की किस्मों में सुधार कर सकता है।

पुनर्योगज डी.एन.ए. प्रौद्योगिकी की कुछ उपलब्धियाँ निम्न है:-

(i) नाइट्रोजन स्थिरीकरण (Nif) जीन की क्लोनिंग

(ii) हीमोफीलिया के जीन की क्लोनिंग

(iii) हिपेटाइटिस B विषाणु की जीन क्लोनिंग

(iv) मानव वृद्धि हारमोन एवं इन्सुलिन के जीन की क्लोनिंग

(v) मानव जीनोम परियोजना (Human Genome Project)

(vi) प्रतिजैविक पेनिसिलिन का निर्माण करने हेतु पेनिसिलिन जी एसाइलेज जीन की क्लोनिंग

महत्वपूर्ण बिन्दु

(1) किसी भी जीव के डी.एन.ए. में हेर फेर करने के लिए आवश्यक प्रभावी प्रक्रमों को पुनर्योगज डी.एन.ए. प्रौद्योगिकी कहते हैं।

(2) रिस्ट्रिक्सन एन्डोन्यूक्लिएज एन्जाइम को आण्विक कैची भी कहते हैं क्योंकि ये डी.एन.ए. के फोस्फो- डाई-एस्टर बंधों को एक निश्चित स्थल पर काटते हैं।

(3) रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लिएज एन्जाइम तीन प्रकार के होते हैं : RI, RII व RIII ।

(4) वांछित डी.एन.ए. खण्डों का परपोषी कोशिका में स्थानान्तरण वाहकों (Vectors) के द्वारा होता है।

(5) मुख्य वाहक है प्लाज्मिड, जीवाणुभोजी व कॉस्मिड।

(6) सबसे अधिक प्रयोग में लिए जाने वाला प्लाज्मिड है pBR 322।

(7) जीवाणुभोजी जो मुख्यत: वाहक के रूप में प्रयोग होते हैं वो है लेम्डा व M13

(8) परपोषी के रूप में ***ई.कोलाई*** को सबसे अधिक प्रयोग में लिया जाता है।

(9) RNA रज्जुक पर रिवर्स ट्रान्सक्रिप्टेज एन्जाइम द्वारा निर्मित डी.एन.ए. की प्रति, पूरक डी.एन.ए. या c-DNA कहलाती है।

(10) जैल इलेक्ट्रोफोरेसिस तकनीक द्वारा डी.एन.ए. को शुद्ध कर बैण्ड के रूप में अलग कर लेते हैं।

(11) डी.एन.ए. के विश्लेषण के लिए सदर्न ब्लाटिंग तकनीक, RNA के लिए नादर्न ब्लाटिंग तकनीक व प्रोटीन विश्लेषण के लिए वैस्टर्न ब्लाटिंग तकनीक का प्रयोग किया जाता है।

(12) PCR तकनीक से बहुत कम समय में डी.एन.ए. की लाखों प्रतिलिपियाँ तैयार की जा सकती है।

(13) डी.एन. ए. फिंगर प्रिन्टिंग का प्रयोग आनुवंशिक बीमारियाँ पता लगाने के लिए होता है।

(14) जीन अभियांत्रिकी तकनीकों को प्रयोग में लेते हुए, मनुष्य

फसली पौधों व जानवरों की किस्मों में सुधार कर सकता है।

अभ्यासार्थ प्रश्न

बहुवैकल्पिक प्रश्न

1. कौन से एन्जाइम डी.एन.ए. को विशिष्ट स्थल पर काटते हैं–
   (अ) लाइगेज
   (ब) पॉलिमरेज
   (स) रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लिएज
   (द) उपरोक्त सभी
2. प्राकृतिक रूप से रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लिएज एन्जाइम पाया जाता है–
   (अ) जीवाणु में (ब) विषाणु में
   (स) पादपों में (द) जन्तुओं में
3. वाहक डी.एन.ए. है–
   (अ) प्लाज्मिड (ब) c-DNA
   (स) संश्लेषित DNA (द) उपरोक्त सभी
4. M13 उदाहरण है:–
   (अ) प्लाज्मिड का (ब) जीवाणुभोजी का
   (स) कॉस्मिड का (द) उपरोक्त सभी का
5. DNA खण्डों की पहचान में कौन सी ब्लाटिंग तकनीक प्रयोग की जाती है:–
   (अ) जीनोमिक DNA (ब) वैस्टर्न
   (स) सदर्न (द) नादर्न
6. डी.एन.ए. के मुक्त सिरों को जोड़ने का कार्य करता है:–
   (अ) रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लीएज
   (ब) लाइगेजेज
   (स) लाइसोजाइम
   (द) उपरोक्त सभी
7. जम्पिंग जीन्स कहते हैं:–
   (अ) फाज्मिड को (ब) प्लाज्मिड को
   (स) कॉस्मिड को (द) ट्रान्सपोजोन्स को।
8. 1989 में मुलिस ने खोज की थी–
   (अ) प्लाज्मिड की
   (ब) पॉलिमरेज शृंखला अभिक्रिया की
   (स) सदर्न ब्लाटिंग तकनीक की
   (द) वैस्टर्न ब्लाटिंग तकनीक की
9. c-DNA के निर्माण में प्रयुक्त होता है:–
   (अ) tRNA (ब) mRNA
   (स) rRNA (द) DNA
10. *Eco* R नामक एन्जाइम का स्रोत है–
    (अ) जीवाणु (ब) शैवाल
    (स) पादप (द) उपरोक्त सभी

अतिलघूत्तरात्मक प्रश्न

1. पुनर्योगज डी.एन.ए. तकनीक की खोज किसने की थी?
2. पुनर्योगज डी.एन.ए. प्रौद्योगिकी की परिभाषा दीजिए।
3. क्लोनिंग वाहक क्या होते हैं?
4. आण्विक प्रोब्स क्या है?
5. मार्कर जीन क्या होते हैं? उदाहरण दीजिए।
6. रिपोर्टर जीन क्या होते हैं? उदाहरण दीजिए।
7. जीन लाइब्रेरी क्या है?
8. कॉस्मिड क्या होते हैं?
9. रिस्ट्रिक्शन एन्डोन्यूक्लीएज एन्जाइम को परिभाषित कीजिए।
10. जैल इलेक्ट्रोफोरेसिस में प्रयोग आने वाले जैल के नाम बताए।
11. RFLP का पूरा नाम लिखिए।

लघूत्तरात्मक प्रश्न

1. क्लोनिंग वाहक क्या हैं? पुनर्योगज डी.एन. ए. प्रौद्योगिकी में काम आने वाले विभिन्न वाहकों का संक्षिप्त वर्णन कीजिए।
2. pBR 322 प्लाज्मिड पर टिप्पणी कीजिए।
3. निम्नलिखित पर टिप्पणियाँ कीजिए।
   (i) सदर्न ब्लाटिंग तकनीक
   (ii) डी.एन.ए. फिंगर प्रिंटिंग
   (iii) पॉलीमरेज शृंखला अभिक्रिया
   (iv) रिस्ट्रिक्शन एन्जाइम का नामकरण
   (v) वाहक के लक्षण
4. जिनोमिक लाइब्रेरी की निर्माण विधि समझाइए।
5. वाहक के रूप में जीवाणुभोजी की उपयोगिता का संक्षिप्त वर्णन कीजिए।

निबन्धात्मक प्रश्न

1. जीन अभियांत्रिकी की पुनर्योगज डी.एन.ए. तकनीक के विभिन्न चरणों का उल्लेख कीजिए।
2. ब्लाटिंग तकनीकों का विस्तृत वर्णन कीजिए।
3. प्लाज्मिड पर विस्तृत टिप्पणी कीजिए।
4. आण्विक प्रोब्स से आप क्या समझते हैं? इनके उपयोग का वर्णन कीजिए।
5. आनुवंशिक अभियांत्रिकी के महत्व का वर्णन कीजिए।

उत्तरमाला

1. (स) 2. (अ) 3. (अ) 4. (ब) 5. (स) 6. (ब) 7. (द) 8. (ब) 9. (ब) 10. (अ)

❑❑❑