એકમ 9
બાયૉટેક્નોલૉજી (Biotechnology)

પ્રકરણ : 11

બાયૉટેક્નોલૉજી : સિદ્ધાંતો અને પ્રક્રિયાઓ

પ્રકરણ : 12

બાયૉટેક્નોલૉજી અને તેનાં પ્રયોજનો

17મી સદીના ફ્રેન્ચ તત્ત્વજ્ઞાની, ગણિતશાસ્ત્રી તથા જૈવવિજ્ઞાની રેને ડેસકાર્ટિઝ (Rene Descartes)ના દિવસોથી જ સમગ્ર માનવજ્ઞાન અને ખાસ કરીને પ્રકૃતિ વિજ્ઞાન તેવી દિશામાં આગળ વધ્યું કે જેમાં પ્રાદ્યૌગિક (technology) વિકાસ થયો જેના પરિણામ સ્વરૂપે માનવ-જીવનની સુખાકારીમાં વૃદ્ધિ થઈ અને મનુષ્યના જીવનનું મહત્ત્વ પણ પ્રસ્થાપિત થયું. આ પ્રાકૃતિક ઘટનાને સમજવા માટેના તમામ અભિગમો માનવકેન્દ્રી બની ગયા છે. ભૌતિકવિજ્ઞાન અને રસાયણવિજ્ઞાને ઇજનેરી, ટેક્નોલૉજી અને ઔદ્યોગિક સંસ્થાઓને જન્મ આપ્યો કે જે બધાએ માનવ-સુખસુવિધાઓ તથા તેના કલ્યાણ માટે કાર્ય કર્યું છે. જીવવિજ્ઞાનનો મુખ્ય ઉપયોગ ખોરાકના સ્રોત તરીકે થઈ રહ્યો છે. બાયૉટેક્નોલૉજી, 20મી સદીની આધુનિક જીવવિજ્ઞાનની પ્રશાખા છે, જેણે આપણા રોજબરોજના જીવનમાં પરિવર્તન લાવી દીધું છે કારણ કે તેનાં ઉત્પાદનોએ આરોગ્યમાં તથા ખોરાક-ઉત્પાદનમાં ગુણાત્મક સુધારણા લાવી દીધી છે. આ એકમમાં બાયૉટેક્નોલૉજીની પ્રક્રિયાઓ તથા કેટલાંક પ્રયોજનોને સમજવા માટેના મૂળભૂત સિદ્ધાંતો પ્રકાશિત કરવામાં આવ્યા છે તથા તેના ઉપર વિચાર-વિમર્શ કરવામાં આવેલ છે.

હરબર્ટ બૉયર
Herbert Boyer
(1936)

હરબર્ટ બૉયર(Herbert Boyer)નો જન્મ 1936માં થયો હતો તથા તેમનો ઉછેર પશ્ચિમી પેનસિલવેનિયાના એક પ્રાંતમાં થયો હતો જ્યાં મોટા ભાગના યુવાનોના ભાગ્યમાં રેલ, રસ્તા તથા સૂરંગો હતા. વર્ષ 1963માં પિટ્સબર્ગના વિશ્વવિદ્યાલયમાં તેઓએ તેમનો સ્નાતક અભ્યાસ પૂર્ણ કર્યો તથા તેને અનુસરીને યેલમાં તેઓએ અનુસ્નાતક અભ્યાસમાં ત્રણ વર્ષ પસાર કર્યાં.

વર્ષ 1966માં બૉયરે સાન ફ્રાન્સિસ્કોમાં આવેલ કેલિફોર્નિયા વિશ્વવિદ્યાલયમાં સહાયક પ્રાધ્યાપકનો કાર્યભાર સ્વીકાર્યો. 1969 સુધી તેઓએ વિશિષ્ટ લાભદાયક ગુણોયુક્ત ઈ. કોલાઇ બૅક્ટેરિયાના ઘણાબધા રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકો પર અધ્યયન પૂર્ણ કર્યું. બૉયરે અવલોકન કર્યું કે, આ ઉત્સેચકોમાં DNA શૃંખલાને એક વિશિષ્ટ ઢબે કાપવાની ક્ષમતા હોય છે અને જે ભાગ શેષરૂપે બચે છે તેને શૃંખલા પરનો 'ચીપકુ છેડો' કહેવાય છે. આ આલિંગન છેડા ચોક્કસ પ્રક્રિયામાં DNAના ટુકડાઓ સાથે જોડાઈ જાય છે.

આ શોધના પરિણામ સ્વરૂપે હાવાઈ સ્થિત સ્ટૈનફૉર્ડ વૈજ્ઞાનિક સ્ટેનલી કોહેન (Stanley Cohen) સાથે બહુમૂલ્ય તથા લાભદાયક વિચાર-વિમર્શ થઈ શક્યો. કોહેન DNAના નાનાં-નાનાં વલયો જેને પ્લાસ્મિડ કહે છે તેના પર કાર્ય કરતા હતા. આ પ્લાસ્મિડ કેટલાક વિશેષ બૅક્ટેરિયલ કોષોના કોષરસમાં મુક્ત સ્વરૂપે તરતા રહેતા હોય છે તથા DNAની સાંકેતિક શૃંખલા (કોષકેન્દ્રીય DNA)થી સ્વતંત્ર સ્વયંજનન કરે છે. કોહેને કોષમાંથી આ પ્લાસ્મિડને બહાર કાઢવાની તથા તેને ફરીથી અન્ય કોષોમાં દાખલ કરવાની પદ્ધતિ વિકસાવી હતી. આ પ્રક્રિયાને DNAના વિભાજન કરવાની પ્રક્રિયા સાથે સાંકળતા બૉયર (Boyer) અને કોહેને (Cohen) DNAના ખંડોને ઇચ્છિત રૂપરેખાંકનમાં ફરીથી ગોઠવી પુનઃ સંયોજિત કરી અને બૅક્ટેરિયલ કોષોમાં DNA દાખલ કરવા માટે સક્ષમ બનાવ્યા જે આગળ વધીને વિશિષ્ટ પ્રોટીન માટે ઉત્પાદક એકમ તરીકે કાર્ય કરી શકે. આ સફળતા બાયૉટેક્નોલૉજીનો મૂળભૂત આધાર છે કે જેના પાયા ઉપર જૈવતક્નિકી (Biotechnology) શાખાની સ્થાપના કરવામાં આવી હતી.

પ્રકરણ 11

બાયૉટેક્નોલૉજી : સિદ્ધાંતો અને પ્રક્રિયાઓ (Biotechnology : Principles and Processes)

11.1 બાયૉટેક્નોલૉજીના સિદ્ધાંતો

11.2 પુનઃસંયોજિત DNA ટેક્નોલૉજીનાં ઉપકરણો

11.3 પુનઃસંયોજિત DNA ટેક્નોલૉજીની ક્રિયાવિધિ

જૈવતક્નિકી (biotechnology) જે સજીવો અથવા તેઓમાંથી પ્રાપ્ત થતા ઉત્સેચકોનો ઉપયોગ કરી મનુષ્ય માટે ઉપયોગી નીપજો અને ઉપયોગી પ્રક્રિયાઓનું ઉત્પાદન કરવાની તક્નિકી સાથે સંકળાયેલ છે. આ અર્થમાં દહીં, બ્રેડ અથવા વાઈનની બનાવટ કે જે સૂક્ષ્મજીવો દ્વારા સંપન્ન પ્રક્રિયાઓથી બને છે, તેને પણ બાયૉટેક્નોલૉજીના સ્વરૂપ તરીકે વિચારવામાં આવે છે. વર્તમાન સમયમાં સીમિત અર્થમાં બાયૉટેક્નોલૉજીને જોવામાં આવે તો તેમાં એ પ્રક્રિયાઓ આવે છે જેમાં ઉપર્યુક્ત પદાર્થોના વધારે માત્રામાં ઉત્પાદન માટે જનીન-પરિવર્તિત સજીવો (Genetically Modified Organisms-GMO)નો ઉપયોગ કરવામાં આવે છે. આગળ જતા અનેક પ્રક્રિયાઓ / તક્નિકોનો સમાવેશ બાયૉટેક્નોલૉજીમાં કરવામાં આવ્યો છે. ઉદાહરણ તરીકે, ઈન વિટ્રો *(in vitro)* ફલન દ્વારા 'ટેસ્ટટ્યૂબ' બેબીનું નિર્માણ, જનીનનું સંશ્લેષણ તથા તેનો ઉપયોગ, DNA રસી અથવા ક્ષતિગ્રસ્ત જનીનની સુધારણા આ બધા બાયૉટેક્નોલૉજીનો જ ભાગ છે.

યુરોપિયન બાયૉટેક્નોલૉજી સંગઠન (European Federation of Biotechnology - EFB) દ્વારા બાયૉટેક્નોલૉજીની વ્યાખ્યા આપવામાં આવી જેમાં પરંપરાગત અભિગમ અને આધુનિક આણ્વિક બાયૉટેક્નોલૉજીનો સમાવેશ છે. EFB દ્વારા આપવામાં આવેલ વ્યાખ્યા આ મુજબ છે :

'નીપજો અને સેવાઓ માટે પ્રાકૃતિક જીવવિજ્ઞાન અને સજીવો, કોષો, તેમના ભાગો તથા આણ્વિય અનુરૂપતાનું સંચાલન.'

11.1 બાયૉટેક્નોલૉજીના સિદ્ધાંતો (Principles of Biotechnology)

ઘણી તક્નિકીઓ પૈકી, નીચેની મુખ્ય બે તક્નિકોએ આધુનિક બાયૉટેક્નોલૉજીને જન્મ આપ્યો :

(i) **જનીન ઇજનેરીવિદ્યા (Genetic Engineering) :** આ ટેક્નોલૉજી દ્વારા આનુવંશિક દ્રવ્યો (DNA અને RNA)ના રસાયણમાં પરિવર્તન પ્રેરીને તેને યજમાન સજીવમાં પ્રવેશ કરાવીને યજમાન સજીવના બાહ્ય સ્વરૂપ પ્રકારમાં ફેરફાર પ્રેરવામાં આવે છે.

(ii) **જૈવપ્રક્રિયા-ઇજનેરીવિદ્યા (Bioprocess Engineering) :** રસાયણ ઇજનેરી પ્રક્રિયાઓમાં માત્ર ઇચ્છિત સૂક્ષ્મજીવો / સુકોષકેન્દ્રી કોષોની જંતુરહિત (સૂક્ષ્મજીવ સંક્રમણ- રહિત) જાળવણી કરીને વૃદ્ધિ કરાવી વધુ માત્રામાં બાયૉટેક્નોલૉજિકલ નીપજો જેવી કે ઍન્ટિબાયોટિક્સ, રસીઓ, ઉત્સેચકો વગેરેનું નિર્માણ કરવામાં આવે છે.

ચાલો આપણે હવે જનીન ઇજનેરીવિદ્યાના સિદ્ધાંતોના સંકલ્પનાત્મક વિકાસને સમજીએ.

સંભવતઃ તમે અલિંગીપ્રજનનની સાપેક્ષમાં લિંગીપ્રજનનના ફાયદા વિશે જાણતા હશો. લિંગીપ્રજનન અજોડ આનુવંશિક વ્યવસ્થાનાં સંયોજનોની રચના તથા ભિન્નતા માટે તકો પૂરી પાડે છે. તેમાંના કેટલાક સજીવ તથા વસ્તી માટે ફાયદાકારક હોઈ શકે છે. અલિંગીપ્રજનન આનુવંશિક માહિતીને પરિરક્ષિત કરી પેઢી દર પેઢી જાળવી રાખે છે, જ્યારે લિંગીપ્રજનન દ્વારા ભિન્નતા ઉદ્ભવે છે. પરંપરાગત સંકરણની પદ્ધતિઓ કે જે વનસ્પતિઓ તથા પ્રાણીઓના સંવર્ધનમાં ઉપયોગી છે તેના દ્વારા કેટલીક વખત ઇચ્છિત જનીનો સાથે-સાથે અનિચ્છનીય જનીનોનો સમાવેશ તથા ગુણન થઈ જાય છે. ઉપર્યુક્ત ક્ષતિઓ દૂર કરવા માટે જનીન ઇજનેરીવિદ્યામાં **જનીન ક્લોનિંગ** અને **જનીન સ્થળાંતરણ (gene cloning** and **gene transfer)**નો ઉપયોગ કરી પુનઃસંયોજિત **DNA (*r*-DNA recombinant DNA)**નું નિર્માણ કરવામાં આવે છે, જેનાથી અનિચ્છનીય જનીનોને બાકાત રાખીને એક અથવા એકથી વધુ ઇચ્છનીય જનીનોને અલગ તારવીને લક્ષ સજીવમાં દાખલ કરી શકાય છે.

શું તમે જાણો છો કે જે DNAનો ટુકડો વિજાતીય સજીવોમાં સ્થાનાંતરિત કરવામાં આવે છે તેનું ભવિષ્ય શું છે ? મોટા ભાગે આ DNAનો ટુકડો સજીવના બાળકોષોમાં સ્વયંજનન પામવાની ક્ષમતા ધરાવતો નથી. પરંતુ જ્યારે તે ગ્રાહીનાં જનીનો સાથે જોડાઈ જાય છે ત્યારે તે વિભાજન પામીને યજમાન DNA સાથે આનુવંશિક બની જાય છે કારણ કે, આ વિદેશી DNAનો ટુકડો રંગસૂત્રનો એક ભાગ બની જાય છે કે જેની પાસે સ્વયંજનનની ક્ષમતા હોય છે. રંગસૂત્રમાં DNAનો એક વિશિષ્ટ ક્રમ આવેલો હોય છે જેને **સ્વયંજનનની ઉત્પત્તિ (origin of replication)** કહે છે, જે સ્વયંજનનના પ્રારંભ માટે જવાબદાર હોય છે. આથી તે માટે કોઈ પણ સજીવમાં વિદેશી DNAના ટુકડાના ગુણન માટે તે રંગસૂત્ર અથવા રંગસૂત્રોનો ભાગ હોવો આવશ્યક હોય છે કે જે એક વિશિષ્ટ શૃંખલા ધરાવે છે જે 'સ્વયંજનનની ઉત્પત્તિ' તરીકે ઓળખાય છે. આ રીતે એક વિદેશી DNA સ્વયંજનનની ઉત્પત્તિ સાથે જોડાય છે, આથી આ વિદેશી DNAનો ટુકડો યજમાન સજીવમાં આપમેળે સ્વયંજનન તેમજ ગુણન પામી શકે છે. આને **ક્લોનિંગ (cloning)** પણ કહે છે અથવા કોઈ ટેમ્પલેટ DNAની એકસરખી અનેક નકલોનું નિર્માણ પણ કહી શકાય છે.

હવે એક કૃત્રિમ રિકોમ્બિનન્ટ DNA અણુના નિર્માણની પ્રથમ ઘટનાનો અભ્યાસ કરીશું. પ્રથમ રિકોમ્બિનન્ટ DNAનું નિર્માણ સાલમોનેલા ટાયફિમુરિયમ *(Salmonella typhimurium)*ના અસલ **પ્લાસ્મિડ** (native plasmid-વલયાકાર બાહ્ય રંગસૂત્રીય DNA કે જે સ્વતંત્ર સ્વયંજનન પામી શકે છે)માં ઍન્ટિબાયોટિક પ્રતિરોધી જનીનના ટુકડાને જોડીને થઈ શક્યું. સ્ટેનલી કોહેન અને હરબર્ટ બૉયરે 1972માં ઉપર્યુક્ત કાર્ય ઍન્ટિબાયોટિક પ્રતિરોધક જનીનના અલગીકરણ દ્વારા સંપન્ન કર્યું, જે માટે તેમણે પ્લાસ્મિડમાંથી DNAનો ટુકડો કાપ્યો. જેમાં ઍન્ટિબાયોટિક પ્રતિરોધકતા પ્રદાન કરવા માટે જવાબદાર જનીનો હતા. 'આણ્વિય કાતર' તરીકે ઓળખાતા **રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકો**ની શોધથી DNAને વિશિષ્ટ જગ્યાઓથી કાપવાનું શક્ય બની શક્યું. કાપેલા DNAના ટુકડાને પ્લાસ્મિડ સાથે જોડવામાં આવે છે. આ પ્લાસ્મિડ DNA એ

વાહકની જેમ કાર્ય કરે છે, જે તેની સાથે જોડાયેલ DNAને સ્થાનાંતરિત કરે છે. સંભવતઃ તમે જાણો છો કે મચ્છર, કીટવાહક તરીકે વર્તીને મૅલેરિયાના પરોપજીવીને મનુષ્યમાં સ્થાનાંતરિત કરે છે. બસ, આવી જ રીતે પ્લાસ્મિડનો વાહક તરીકે ઉપયોગ કરીને વિદેશી DNAના ટુકડાને યજમાન સજીવોમાં મોકલવામાં આવે છે. ઍન્ટિબાયોટિક જનીનને વાહક સાથે જોડવાનું કાર્ય DNA લાયગેઝ ઉત્સેચક દ્વારા થાય છે. જે DNA અણુના કપાયેલા ભાગ પર કામ કરીને તેના છેડાઓને જોડવાનું કામ કરે છે. આવી રીતે એક નવા સ્વયં પ્રતિકૃતિ બનાવવાવાળા (પોતાની રીતે સ્વયંજનિત થતા) વલયાકાર DNAનું *in vitro* નિર્માણ થાય છે, જે રિકોમ્બિનન્ટ DNA તરીકે ઓળખાય છે. જ્યારે આ DNA ઈ. કોલાઈ *(E. coli)* બૅક્ટેરિયા કે જે સાલ્મોનેલા *(Salmonella)* સાથે નજદીકનો સંબંધ ધરાવે છે તેમાં સ્થાનાંતરિત કરવામાં આવે છે ત્યારે તે નવા યજમાનના DNA પોલિમરેઝ ઉત્સેચકનો ઉપયોગ કરીને પ્રતિકૃતિઓ બનાવવા લાગે છે. ઈ. કોલાઈમાં ઍન્ટિબાયોટિક અવરોધક જનીનની અનેક નકલો બનાવવાની ક્ષમતાને ઈ. કોલાઈમાં ઍન્ટિબાયોટિક જનીનનું **ક્લોનિંગ** કહેવાય છે.

તમે અનુમાન લગાવી શકો છો કે, જનીન પરિવર્તિત સજીવોના નિર્માણમાં મૂળભૂત ત્રણ ચરણો છે :

(i) ઈચ્છિત જનીનયુક્ત DNAની ઓળખ;

(ii) ઓળખ પામેલા DNAનો યજમાનમાં પ્રવેશ

(iii) પ્રવેશેલા DNAની યજમાનમાં જાળવણી તથા તેની સંતતિઓમાં DNAનું સ્થળાંતર

11.2 રિકોમ્બિનન્ટ DNA ટેક્નોલૉજીનાં ઉપકરણો (Tools of Recombinant DNA Technology)

હવે આપણે પહેલાંની ચર્ચા પરથી જાણી ચૂક્યા છીએ કે, જનીન ઇજનેરીવિદ્યા અથવા રિકોમ્બિનન્ટ DNA ટેક્નોલૉજી ત્યારે જ પૂર્ણ થઈ શકે છે કે જ્યારે આપણી પાસે મહત્ત્વનાં ઉપકરણો જેવા કે, રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકો, પોલિમરેઝ ઉત્સેચકો, લાયગેઝ, વાહકો અને યજમાન સજીવ હોય. ચાલો, હવે આમાંથી કેટલાકને વિસ્તૃતમાં સમજવાનો પ્રયાસ કરીએ.

11.2.1 રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકો (Restriction Enzymes)

વર્ષ 1963માં બે ઉત્સેચકોને અલગ કરવામાં આવ્યા કે, જે ઈ. કોલાઈમાં બૅક્ટેરિયોફેઝની વૃદ્ધિને અવરોધવા માટે જવાબદાર છે. તેમાંનો એક DNAમાં મિથાઈલ સમૂહને ઉમેરે છે જ્યારે બીજો DNAને કાપે છે. પછીથી તેમાંના બીજાને **રિસ્ટ્રિક્શન ઍન્ડોન્યુક્લિએઝ** કહેવામાં આવ્યો.

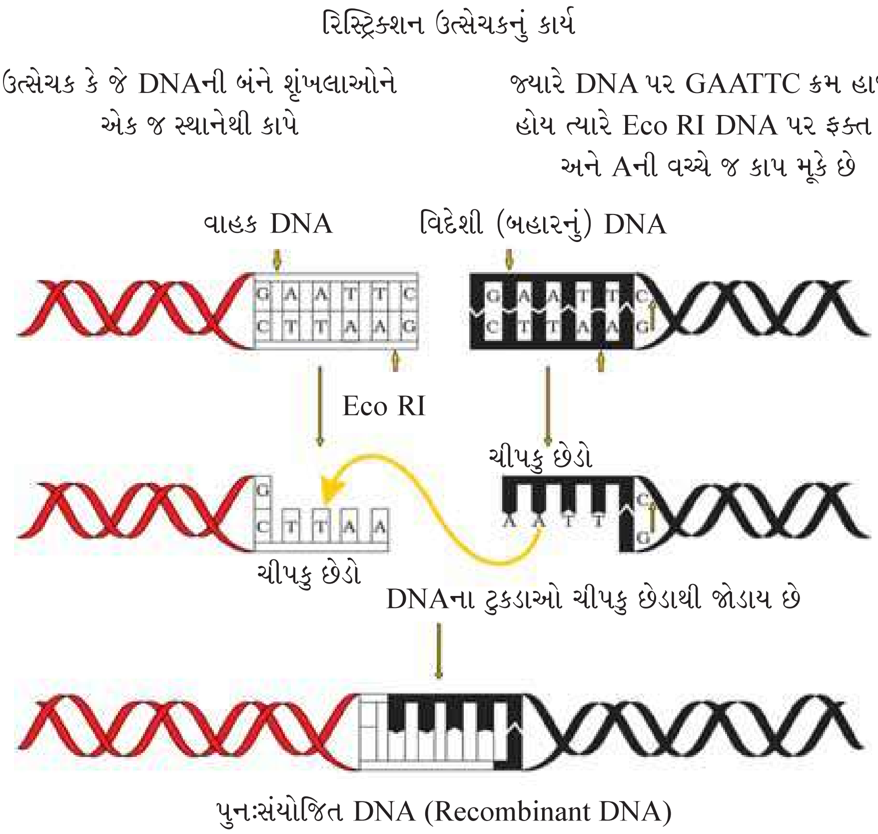
પ્રથમ રિસ્ટ્રિક્શન ઍન્ડોન્યુક્લિએઝ *Hind-II,* જેનું કાર્ય DNA ન્યુક્લિઓટાઇડના વિશિષ્ટ ક્રમ પર આધાર રાખે છે, તે પાંચ વર્ષ પછી અલગ કરાયો અને ઓળખવામાં આવ્યો. એવું જોવા મળ્યું કે, *Hind-II* હંમેશાં DNA અણુના એક ચોક્કસ બિંદુ પર કાપ મૂકે છે જ્યાં છ બેઇઝ જોડનો એક ચોક્કસ ક્રમ હોય છે. આ ચોક્કસ બેઇઝક્રમ *Hind-II*ના **ઓળખક્રમ** તરીકે જાણીતો છે. *Hind-II* સિવાય આજે 900થી વધારે રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકો વિશે જાણકારી છે જે બૅક્ટેરિયાની 230થી વધારે જાતમાંથી અલગ કરવામાં આવી છે, જેમાંથી પ્રત્યેક અલગ-અલગ ઓળખક્રમોને ઓળખે છે.

આ ઉત્સેચકોના નામકરણમાં પરંપરાનુસાર, નામનો પ્રથમ અક્ષર પ્રજાતિમાંથી જ્યારે બીજા બે અક્ષરો આદિકોષકેન્દ્રી કોષની જાતિમાંથી લેવામાં આવે છે કે, જેમાંથી તેને અલગ કરવામાં આવ્યા હતા. ઉદાહરણ : Eco RI, ઇશ્ચેરિશિયા કોલાઇ *(Escherichia coli)* RY 13માંથી આવ્યો છે.

તેમાં Eco RIમાં અક્ષર 'R' જાતના નામ પરથી લેવામાં આવેલ છે. નામ પછીનો રોમન અંક બૅક્ટેરિયાની જે-તે જાતમાંથી કયા ક્રમમાં ઉત્સેચકને અલગ કરવામાં આવ્યો હતો તે દર્શાવે છે.

રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકોનો **ન્યુક્લિએઝિસ** કહેવાતા ઉત્સેચકોના મોટા વર્ગમાં સમાવેશ થાય છે. તે બે પ્રકારના હોય છે : **એક્સોન્યુક્લિએઝ** અને **ઍન્ડોન્યુક્લિએઝ**. એક્સોન્યુક્લિએઝ DNAના છેડા પરથી ન્યુક્લિઓટાઈડ્સને દૂર કરે છે, જ્યારે ઍન્ડોન્યુક્લિએઝ DNAની અંદર ચોક્કસ સ્થાન પર કાપ મૂકે છે.

પ્રત્યેક રિસ્ટ્રિક્શન ઍન્ડોન્યુક્લિએઝ DNAની શૃંખલાની લંબાઈનું નિરીક્ષણ કર્યા પછી તે કાર્ય કરે છે. જ્યારે તે પોતાનો વિશિષ્ટ ઓળખક્રમ પ્રાપ્ત કરી લે છે ત્યારે તે DNA સાથે જોડાય છે અને બેવડા કુંતલની બંને શૃંખલાને શર્કરા-ફૉસ્ફેટ આધારસ્તંભોમાં વિશિષ્ટ કેન્દ્રો પરથી કાપે છે (આકૃતિ 11.1). પ્રત્યેક રિસ્ટ્રિક્શન ઍન્ડોન્યુક્લિએઝ DNAમાં વિશિષ્ટ **પેલિન્ડ્રોમિક ન્યુક્લિઓટાઈડ શૃંખલાઓ (palindromic nucleotide sequence)**ને ઓળખે છે.



આકૃતિ 11.1 : રિસ્ટ્રિક્શન એન્ડોન્યુક્લિએઝ ઉત્સેચક Eco RIની પ્રક્રિયા દ્વારા પુનઃસંયોજિત DNAના નિર્માણનાં ચરણો

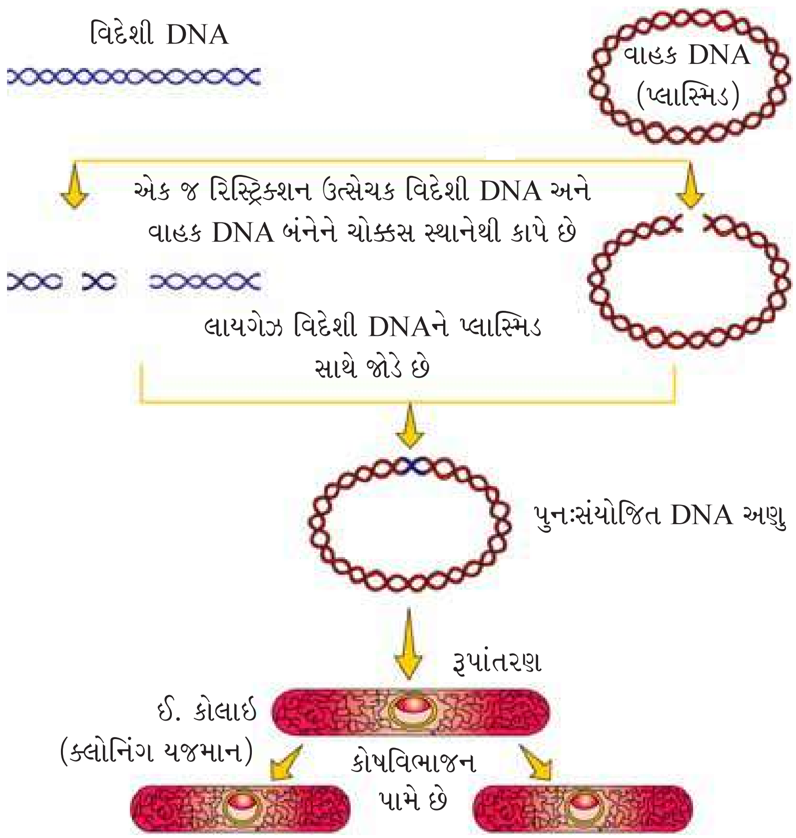
શું તમે જાણો છો કે, પેલિન્ડ્રોમ શું છે ? તે શબ્દોનો સમૂહ છે જેને આગળ-પાછળ બંને બાજુએથી વાંચતા સરખા વાંચી શકાય છે. ઉદાહરણ : 'મલયાલમ.' DNAમાં પેલિન્ડ્રોમ બેઈઝ જોડનો એક એવો ક્રમ હોય છે જે DNAની એક બાજુએથી બીજી બાજુ તરફ આગળ અને પાછળથી એકસરખા વાંચી શકાય છે. ઉદાહરણ : આપેલ ક્રમને $5' \rightarrow 3'$ દિશામાં વાંચવાથી બંને શૃંખલામાં એકસરખા વાંચી શકાય. જો તેને $3' \rightarrow 5'$ દિશામાં વાંચવામાં આવે તોપણ તે સાચું પડે છે.

5′ _____ GAATTC _____ 3′
3′ _____ CTTAAG _____ 5′

રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચક DNA શૃંખલાને પેલિન્ડ્રોમ સ્થાને કેન્દ્રથી સહેજ દૂર પરંતુ વિરુદ્ધ શૃંખલામાં બે સરખા બેઇઝની વચ્ચેથી કાપે છે જેના ફળ સ્વરૂપે છેડા પર એક શૃંખલાનો ભાગ રહી જાય છે. આથી બેવડા કુંતલના છેડા ઉપર એક શૃંખલાવાળો ટૂંકો ભાગ છૂટી જાય છે. આવા ટૂંકા એક શૃંખલામય લટકતા નાના ભાગને ચીપકુ છેડો કહે છે (આકૃતિ 11.1). તેનું આવું નામ એટલા માટે આપવામાં આવ્યું છે કારણ કે, તેના પૂરક કપાયેલા પ્રતિરૂપ સાથે હાઇડ્રોજન બંધ બનાવે છે. છેડાઓનું આ ચીપકાપણું (stickyness) ઉત્સેચક DNA લાયગેઝના કાર્યમાં સહાયતા પ્રદાન કરે છે.

રિસ્ટ્રિક્શન ઍન્ડોન્યુક્લિએઝનો ઉપયોગ જનીન ઇજનેરીવિદ્યામાં પુનઃસંયોજિત DNA અણુ બનાવવા માટે કરવામાં આવે છે કે જે વિભિન્ન સ્રોતો/જનીન સંકુલ (genomes)માંથી પ્રાપ્ત થતા DNA ભેગા થઈને બનેલ હોય છે.

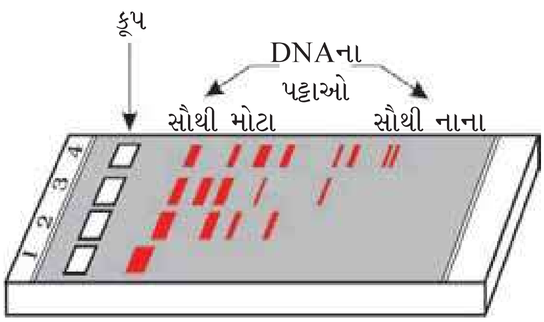
એક જ રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચક દ્વારા કાપવાથી પ્રાપ્ત થનારા DNAના ખંડોમાં સમાન પ્રકારના ચીપકુ છેડા (sticky end) હોય છે અને તેને DNA લાયગેઝની મદદથી એકબીજા સાથે (છેડાથી છેડા-end to end) જોડી શકાય છે (આકૃતિ 11.2).



આકૃતિ 11.2 : પુનઃસંયોજિત DNA (*r*-DNA) ટેક્નોલૉજીનું રેખાંકિત નિરૂપણ

તમે સંપૂર્ણ રીતે સમજી ચૂક્યા હશો કે, સામાન્યતઃ જ્યાં સુધી વાહક અને સ્રોત DNAને એક જ રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચક દ્વારા કાપવામાં ન આવે ત્યાં સુધી પુનઃસંયોજિત વાહક અણુનું નિર્માણ થઈ શકતું નથી.

DNA ખંડોનું પૃથક્કરણ અને અલગીકરણ : રિસ્ટ્રિક્શન ઍન્ડોન્યુક્લિએઝ દ્વારા DNAને કાપવાના પરિણામ સ્વરૂપે DNAના ટુકડા થઈ જાય છે. આ ટુકડાઓને **જૅલ ઇલેક્ટ્રૉફોરેસિસ (gel electrophoresis)** તરીકે ઓળખાતી પદ્ધતિ દ્વારા અલગીકૃત કરી શકાય છે. કેમકે DNA ટુકડાઓ ઋણ વીજભારિત અણુઓ હોય છે જેથી તેઓને માધ્યમ / આધારકમાં વિદ્યુતક્ષેત્રની મદદથી ધન વિદ્યુતધ્રુવ (anode)ની તરફ બળપૂર્વક ધકેલીને અલગ કરી શકાય છે. આજકાલ સામાન્ય રીતે ઉપયોગ કરવામાં આવતું માધ્યમ એગેરોઝ છે. તે દરિયાઈ નિંદણ (see weeds)માંથી અલગીકૃત કરાયેલ કુદરતી પોલીમર છે. એગેરોઝ જૅલની ચાળણી જેવી અસરથી DNAના ટુકડાઓ તેના કદ મુજબ અલગ થાય છે. આમ, તેના ટુકડાનું કદ જેટલું નાનું તેટલું તે વધુ દૂર સુધી ખસશે. *આકૃતિ 11.3માં જુઓ અને અનુમાન લગાવો કે જૅલના કયા છેડા પર સેમ્પલ ભરવામાં આવ્યું હતું.*



આકૃતિ 11.3 : અપાચિત (પટ્ટી 1) અને પાચિત (પટ્ટી 2 થી 4) DNAના ખંડોના સમૂહનું સ્થાનાંતરણ દર્શાવતું લાક્ષણિક એગારોઝ જૅલ ઇલેક્ટ્રૉફોરેસિસ

અલગીકૃત DNAના ટુકડાઓને ત્યારે જ જોઈ શકાય છે જ્યારે આ DNAને ઈથીડિયમ બ્રોમાઇડ (ethidium bromide) નામના સંયોજન વડે અભિરંજિત કરીને UV કિરણો દ્વારા નિરાચ્છાદન (exposed) કરવામાં આવે (તમે શુદ્ધ DNAના ટુકડાઓને દૃશ્યમાન પ્રકાશમાં અભિરંજિત કર્યા વગર જોઈ શકતા નથી). ઈથીડિયમ બ્રોમાઇડથી અભિરંજિત જૅલ ઉપર UV પ્રકાશ પાડતાં DNAના ચળકતા નારંગી રંગના પટ્ટાઓ તમે જોઈ શકો છો (આકૃતિ 11.3). DNAના પટ્ટાઓને એગેરોઝ જૅલમાંથી કાપીને બહાર કાઢવામાં આવે છે અને જૅલના ટુકડાઓથી અલગ કરવામાં આવે છે. આ પ્રક્રિયાને છાલન (elution) કહે છે. આ રીતે શુદ્ધ કરવામાં આવેલ DNAના ટુકડાઓને ક્લોનિંગ વાહકો સાથે જોડીને રિકોમ્બિનન્ટ DNAના નિર્માણમાં ઉપયોગ કરવામાં આવે છે.

11.2.2 ક્લોનિંગ વાહકો (Cloning Vectors)

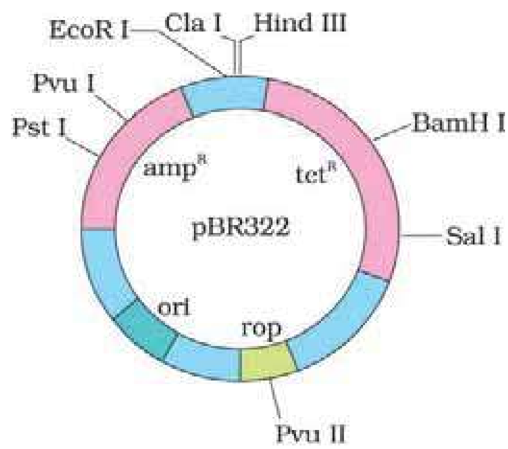
તમે જાણો છો કે પ્લાસ્મિડ અને બૅક્ટેરિયોફેઝ બૅક્ટેરિયલ કોષમાં રંગસૂત્રીય DNAના નિયંત્રણ વગર સ્વતંત્ર રીતે સ્વયંજનન કરવાની ક્ષમતા ધરાવે છે. બૅક્ટેરિયોફેઝની પ્રત્યેક કોષમાં ઘણી વધારે સંખ્યા હોવાથી બૅક્ટેરિયલ કોષમાં તેમના જનીનસંકુલ (genome)ની ઘણીબધી નકલો જોવા મળે છે. કેટલાક પ્લાસ્મિડની એક અથવા બે નકલો પ્રતિકોષ હોય છે જ્યારે બીજાની 15-100 નકલો પ્રતિ કોષ હોય છે. તેની સંખ્યા આનાથી પણ વધારે હોઈ શકે છે. જો આપણે વિદેશી DNAના ટુકડાને બૅક્ટેરિયોફેઝ અથવા પ્લાસ્મિડ DNA સાથે જોડીએ તો તેની સંખ્યા પણ બૅક્ટેરિયોફેઝ અથવા પ્લાસ્મિડની નકલોની સંખ્યાને સમકક્ષ ગુણન કરાવી શકીએ છીએ. વર્તમાન સમયમાં ઉપયોગ કરાવવામાં આવતા વાહકો એવી રીતે તૈયાર કરવામાં આવે છે કે, જેથી વિદેશી DNAના સરળતાથી જોડાણમાં તથા બિનપુનઃસંયોજિતમાંથી પુનઃસંયોજિતની પસંદગીમાં સહાયતા પ્રાપ્ત થાય.

નીચેની વિશેષતાઓ વાહકમાં સાનુકૂળ ક્લોનિંગ કરવા માટે જરૂરી છે :

(i) **સ્વયંજનનની ઉત્પત્તિ [Origin of Replicationo(ori)] :** આ તે ક્રમ છે જ્યાંથી સ્વયંજનનની શરૂઆત થાય છે અને જ્યારે કોઈ DNAનો ટુકડો આ શૃંખલા સાથે જોડાય છે ત્યારે યજમાન કોષની અંદર સ્વયંજનન કરી શકે છે. આ ક્રમ, જોડાયેલ DNA (સંકલિત DNA)ની નકલોની સંખ્યાના નિયંત્રણ માટે પણ જવાબદાર છે. એટલા માટે જો કોઈ લક્ષ્ય DNAની ઘણી નકલો પ્રાપ્ત કરવા માંગતા હોય તો તેને એવા વાહકમાં ક્લોન કરવું જોઈએ કે જેની ઉત્પત્તિ (origin) ખૂબજ વધારે નકલો બનાવવામાં સહયોગ કરતી હોય.

(ii) **પસંદગીમાન રેખક (વરણ ચિહ્ન-Selectable marker) :** સ્વયંજનનની ઉત્પત્તિ (ori)ની સાથે વાહકને પસંદગીમાન રેખકની પણ આવશ્યકતા હોય છે, કે જે અપરિવર્તનીય (non-transformants)ની ઓળખ તથા તેને દૂર કરવામાં મદદરૂપ હોય તથા પરિવર્તનીય (transformants)ની વૃદ્ધિ માટે પસંદગીમાન અનુમતી આપતું હોય. **રૂપાંતરણ (transformation)** એક એવી કાર્યપદ્ધતિ છે જેની મદદથી DNAના એક ખંડને યજમાન બૅક્ટેરિયામાં પ્રવેશ કરાવાય છે (તમે આગળના વિભાગમાં આ પ્રક્રિયાનો અભ્યાસ કરશો). સામાન્ય રીતે એમ્પિસિલિન, ક્લોરામ્ફેનિકોલ, ટેટ્રાસાયક્લિન તથા કેનામાયસિન જેવા પ્રતિજૈવિક (antibiotics) દ્રવ્યો પ્રત્યે અવરોધન સાંકેતન કરવાવાળા જનીનો ઈ. કોલાઇ માટે ઉપયોગી પસંદગીમાન રેખકો છે. સામાન્ય ઈ. કોલાઇ કોષો આમાંથી કોઈ પણ પ્રતિ જૈવિક દ્રવ્યોનું અવરોધન કરતા નથી.

(iii) **ક્લોનિંગ જગ્યાઓ (Cloning Sites) :** વિદેશી DNAને જોડવા માટે સામાન્ય રીતે ઉપયોગમાં લેવાઈ રહેલા રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકો માટે વાહકમાં ખૂબ જ ઓછી કે મોટે ભાગે એક જ ઓળખ જગ્યા હોવી જોઈએ. વાહકની અંદર એકથી વધારે **ઓળખ જગ્યા** હોવાથી તેના ઘણાબધા ટુકડા થઈ જશે જે જનીન ક્લોનિંગને જટિલ બનાવી દે છે (આકૃતિ 11.4). વિદેશી DNAનું જોડાણ (ligation) એ બંને **પ્રતિજૈવિક અવરોધક** (antibiotic resistance) જનીનોમાંથી એકમાં આવેલ રિસ્ટ્રિક્શન સ્થાન પર કરવામાં આવે છે. ઉદાહરણ તરીકે, તમે વિદેશી DNAને વાહક pBR322માં સ્થિત ટેટ્રાસાયક્લિન પ્રતિરોધી જનીનના Bam H I સ્થાને જોડી શકો છો. પુનઃસંયોજિત પ્લાસ્મિડ પરજાત DNA દાખલ થવાથી ટેટ્રાસાયક્લિન અવરોધન ગુમાવે છે, પરંતુ પુનઃસંયોજન પામતાં ઘટકોને એમ્પિસિલિન સમાવિષ્ટ માધ્યમ પર રહેલા પરિવર્તનીય ઘટકોના લેપન (plating) દ્વારા પુનઃસંયોજિત ન પામતાં ઘટકોથી અલગ પસંદગી કરી શકાય છે. ઍમ્પિસિલિનયુક્ત માધ્યમ પર વૃદ્ધિ કરવાવાળાં રૂપાંતરણો(પરિવર્તનીય ઘટકો)ને હવે ટેટ્રાસાયક્લિનયુક્ત માધ્યમ પર સ્થળાંતરિત કરવામાં આવે છે. પુનઃસંયોજિત ઘટકો ઍમ્પિસિલિન માધ્યમ પર વૃદ્ધિ પામશે પરંતુ ટેટ્રાસાયક્લિનયુક્ત માધ્યમ પર વૃદ્ધિ પામશે નહિ. પણ પુનઃસંયોજન ન પામતા ઘટકો (બિન પુનઃ સંયોજિત) બંને પ્રતિજૈવિક દ્રવ્યો ધરાવતા માધ્યમમાં વૃદ્ધિ પામશે.



આકૃતિ 11.4 : *E. coli* ક્લોનિંગ વાહક pBR322માં રિસ્ટ્રિક્શન સ્થાનો (*Hind* III, *Eco*R I, *Bam*H I, *Sal* I, *Pvu* II, *Pst* I, *Cla* I), ori તેમજ પ્રતિજૈવિક અવરોધક જનીનો (amp^R અને tet^R) rop પ્લાસ્મિડના સ્વયંજનનમાં ભાગ લેતા પ્રોટીનનું સંકેતન કરે છે

આ કિસ્સામાં, અહીં એક ઍન્ટિબાયોટિક્સ અવરોધક જનીન પરિવર્તનશીલ ઘટકોની પસંદગીમાં મદદ કરે છે, જ્યારે બીજું ઍન્ટિબાયોટિક અવરોધક જનીન વિદેશી DNAના પ્રવેશથી નિષ્ક્રિય થઈ જાય છે અને પુન:સંયોજિત ઘટકોની પસંદગીમાં મદદ કરે છે.

ઍન્ટિબાયોટિક્સના નિષ્ક્રિય થવાના કારણે પુન:સંયોજિતની પસંદગી એક જટિલ ક્રિયા છે કેમકે તેમાં જુદાં-જુદાં ઍન્ટિબાયોટિક્સ ધરાવતી બંને પ્લેટમાં વિદ્યુતલેપન એકસાથે જરૂરી છે તેથી વૈકલ્પિક પસંદગીમાન રેખકને વિકસાવવામાં આવ્યું કે જે રંગસર્જક પદાર્થની હાજરીમાં પુન:સંયોજિત અને બિનપુન:સંયોજિતને તેમની રંગ ઉત્પન્ન કરવાની ક્ષમતાના આધારે અલગ પાડે છે. જેમાં, *r*-DNAને β ગેલેક્ટોસાઈડેઝ ઉત્સેચકની સાંકેતિક શૃંખલામાં પ્રવેશ કરાવતા β ગેલેક્ટોસાઈડેઝ ઉત્પન્ન કરતું જનીન નિષ્ક્રિય થઈ જાય છે. જેને **નિવેશી નિષ્ક્રિયતા (insertional inactivation)** કહે છે. જો બૅક્ટેરિયાના પ્લાસ્મિડમાં નિવેશ (insert) ન હોય તો રંગ સર્જક પદાર્થની હાજરીમાં ભૂરા રંગની વસાહતોનું નિર્માણ થાય છે. નિવેશની હાજરી β ગેલેક્ટોસાઈડેઝ જનીનની નિવેશી નિષ્ક્રિયતામાં પરિણમે છે તેથી વસાહતો કોઈ રંગ ઉત્પન્ન કરતી નથી જેને પુન:સંયોજિત વસાહતો તરીકે ઓળખવામાં આવે છે.

(iv) **વનસ્પતિઓ અને પ્રાણીઓમાં ક્લોનિંગ જનીનો માટે વાહકો (Vectors for cloning genes in plants and animals)** : તમને એ જાણીને આશ્ચર્ય થશે કે, જનીનોને વનસ્પતિઓ અને પ્રાણીઓમાં સ્થળાંતરિત કરવાનું આપણે બૅક્ટેરિયા અને વાઇરસમાંથી શીખ્યાં, જેને આ વાતની લાંબા સમયથી ખબર હતી તેઓ જાણતા હતા કે સુકોષકેન્દ્રી કોષોને રૂપાંતરિત કરવા માટે જનીનોને કેવી રીતે સ્થળાંતરિત કરવા કે જે બૅક્ટેરિયા તથા વાઇરસ જે ઇચ્છે છે તે કરવા માટે પ્રેરે છે. ઉદાહરણ તરીકે, એગ્રોબૅક્ટેરિયમ ટ્યુમિફેસિયન્સ *(Agrobacterium tumifaciens)* કેટલીય દ્વિદળી વનસ્પતિઓ માટે રોગકારક છે, તે DNAનો એક ખંડ જેને T-DNA કહે છે જે સામાન્ય વનસ્પતિ કોષોને રૂપાંતરિત કરી **ગાંઠ (tumor)**માં ફેરવે છે અને આ ટ્યુમર કોષો રોગકારક માટે જરૂરી રસાયણોનું ઉત્પાદન કરે છે. તેવી જ રીતે પ્રાણીઓમાં રિટ્રોવાઇરસ સામાન્ય કોષોને **કૅન્સરગ્રસ્ત કોષો**માં પરિવર્તિત કરે છે. રોગકારક દ્વારા સુકોષકેન્દ્રી યજમાનમાં જનીન સ્થળાંતરણની પદ્ધતિને આપણે સારી રીતે સમજી રોગકારકની આ પદ્ધતિ દ્વારા ઉપયોગી વાહકનો ઉપયોગ કરી માનવ માટે લાભદાયક જનીનનું સ્થાનાંતરણ કરી શકીએ છીએ. એગ્રોબૅક્ટેરિયમ ટ્યુમિફેસિયન્સનું ટ્યુમર ઈન્ડ્યુસિંગ (Ti) પ્લાસ્મિડ ક્લોનિંગ વાહકના રૂપમાં રૂપાંતરિત કરી દેવામાં આવ્યું છે જે વનસ્પતિ માટે હવે રોગજન્ય રહ્યું નથી. પરંતુ તેનો ઉપયોગ પોતાની અભિરુચિના જનીનને અનેક વનસ્પતિઓમાં સ્થાનાંતરિત કરવા માટે કરાય છે. આ રીતે જ્યારે એક જનીન અથવા DNAના ખંડને યોગ્ય વાહક સાથે જોડી દેવામાં આવે છે ત્યારે તેને બૅક્ટેરિયા, વનસ્પતિઓ તેમજ પ્રાણી યજમાનમાં સ્થાનાંતરિત કરવામાં આવે છે (જ્યાં તે ગુણન પામી શકે).

11.2.3 સક્ષમ યજમાન (Competent Host) (પુન:સંયોજિત DNA સાથેના રૂપાંતરણ માટે)

DNA જલાનુરાગી (hydrophilic) અણુ છે, એટલા માટે તે કોષરસપટલમાંથી પસાર થઈ શકતો નથી. કેમ ? બૅક્ટેરિયાને પ્લાસ્મિડ સ્વીકારવા માટે ગ્રાહી કરતાં પહેલાં તે આવશ્યક છે કે બૅક્ટેરિયલ કોષને DNAના સ્વીકાર હેતુ સક્ષમ બનાવવામાં આવે. એવું કરવા માટે પહેલા તેને નિશ્ચિત સાંદ્રતા ધરાવતા દ્વિસંયોજિત (divalent) ધન આયન (cation) જેમકે કૅલ્શિયમની સારવાર આપવામાં આવે છે. તેનાથી

DNAને બૅક્ટેરિયાની કોષદીવાલમાં આવેલાં છિદ્રો દ્વારા પ્રવેશ પામવાની ક્ષમતામાં વધારો થાય. પુનઃસંયોજિત DNA (*r*-DNA)ને કોષમાં દાખલ કરાવવા માટે પ્રથમ તેમને બરફ પર રાખવામાં આવે છે. ત્યાર બાદ 42 °C તાપમાને મૂકવામાં આવે છે અને અંતે પુનઃ બરફ પર મૂકવામાં આવે છે. આમ કરવાથી બૅક્ટેરિયા *r*-DNA નો સ્વીકાર કરવા માટે સક્ષમ બની જાય છે.

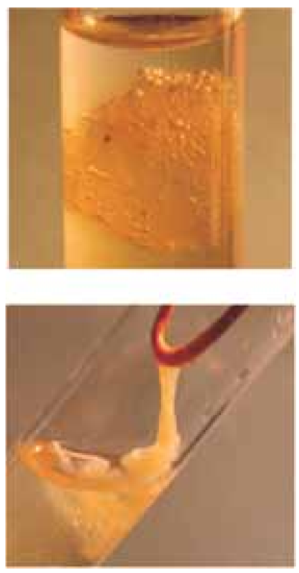
યજમાન કોષોમાં વિદેશી DNAને પ્રવેશ કરાવવાની માત્ર આ જ એક રીત નથી. **સૂક્ષ્મ અંતઃક્ષેપણ (micro-injection)** વિધિમાં પુનઃસંયોજિત DNAને પ્રાણીકોષના કોષકેન્દ્રમાં સીધું જ અંતઃક્ષેપણ કરાવવામાં આવે છે. અન્ય પદ્ધતિ કે જે વનસ્પતિઓ માટે અનુકૂળ છે જેમાં ટંગસ્ટન કે સોના (gold)ના લઘુ તીવ્ર વેગીય કણો દ્વારા આવરિત DNAનો કોષો પર મારો (bombarding) કરવામાં આવે છે. આ પદ્ધતિને **જૈવ પ્રાક્ષેપિકી (biolistics)** અથવા **જનીન સ્ફોટક (gene gun)** તરીકે ઓળખાય છે અને અંતિમ પદ્ધતિ જેમાં બિનહાનિકારક રોગકારક વાહકનો ઉપયોગ કરવામાં આવે છે. આ વાહકોથી જ્યારે કોષો સંક્રમિત થાય છે ત્યારે તે પુનઃસંયોજિત DNAને યજમાનમાં સ્થાનાંતરિત કરી દે છે.

તમે પુનઃસંયોજિત DNAના નિર્માણ માટેનાં ઉપકરણો વિશે અભ્યાસ કરી ચૂક્યા છો. ચાલો હવે, એ પદ્ધતિનું વર્ણન કરીશું જે પુનઃસંયોજિત ટેક્નોલૉજીને સરળ બનાવે છે.

11.3 પુનઃસંયોજિત DNA ટેક્નોલૉજીની ક્રિયાવિધિ (Processes of Recombinant DNA Technology)

પુનઃસંયોજિત DNA ટેક્નોલૉજીમાં કેટલાંક ચોક્કસ ક્રમના સોપાનોનો સમાવેશ થાય છે, જેમકે DNAનું અલગીકરણ, રિસ્ટ્રિક્શન ઍન્ડોન્યુક્લિએઝની મદદથી DNAનું અવખંડન, ઇચ્છિત DNA ખંડનું અલગીકરણ, વાહકમાં DNA ખંડોનું જોડાણ, યજમાનમાં પુનઃસંયોજિત DNAનો પ્રવેશ, યજમાન કોષોનું માધ્યમમાં વ્યાપક સ્તરે સંવર્ધન અને ઇચ્છિત નીપજોનું નિષ્કર્ષણ. ચાલો, હવે આ બધાં ચરણોનો વિસ્તૃત સ્વરૂપે અભ્યાસ કરીએ.

11.3.1 જનીન દ્રવ્ય (DNA)નું અલગીકરણ [Isolation of the Genetic Material (DNA)]



આકૃતિ 11.5 : અલગ કરાયેલ DNAને સ્પૂલિંગ (spooling) દ્વારા દૂર કરવો

યાદ રાખો કે કોઈ પણ અપવાદ વગર બધા જ સજીવોમાં આનુવંશિક દ્રવ્ય ન્યુક્લિઇક ઍસિડ છે. મોટા ભાગના સજીવોમાં તે ડિઑક્સિરિબોન્યુક્લિઇક ઍસિડ અથવા DNA છે. DNAને રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકોની મદદથી કાપવા માટે તે આવશ્યક છે કે તે શુદ્ધ સ્વરૂપે, બીજા મહાઅણુઓથી મુક્ત હોવો જોઈએ. DNA પટલો વડે ઘેરાયેલું હોય છે, એટલા માટે આપણે કોષોને તોડીને ખોલતા, બીજા બૃહદ્ અણુઓ જેમકે RNA, પ્રોટીન, પોલિસેકેરાઇડ્સ અને લિપિડની સાથે DNA મુક્ત થાય છે. જ્યારે બૅક્ટેરિયલ કોષો / વનસ્પતિ અથવા પ્રાણીપેશીને; **લાઇસોઝાઇમ** (બૅક્ટેરિયા), **સેલ્યુલેઝ** (વનસ્પતિકોષો), **કાઇટિનેઝ** (ફૂગ) જેવા ઉત્સેચકોની સારવાર દ્વારા જ તે મેળવી શકાય છે. તમે જાણો છો કે, હિસ્ટૉન જેવા પ્રોટીન સાથે ગૂંથાયેલા DNAના લાંબા અણુઓ પર જનીનો સ્થાન પામેલ હોય છે. RNAને રિબોન્યુક્લિએઝની સારવારથી દૂર કરી શકાય છે, જ્યારે પ્રોટીનને પ્રોટીએઝની સારવારથી દૂર કરાય છે. બીજા અણુઓને યોગ્ય સારવાર દ્વારા દૂર કરવામાં આવે છે અને અંતે ઠંડો ઇથેનોલ ઉમેરીને શુદ્ધ સ્વરૂપે DNAનું અવક્ષેપન કરાય છે. તેને અવલંબિત (suspension) માધ્યમમાં પાતળાં તાતણાંઓના સમૂહ સ્વરૂપે જોઈ શકાય છે (આકૃતિ 11.5).

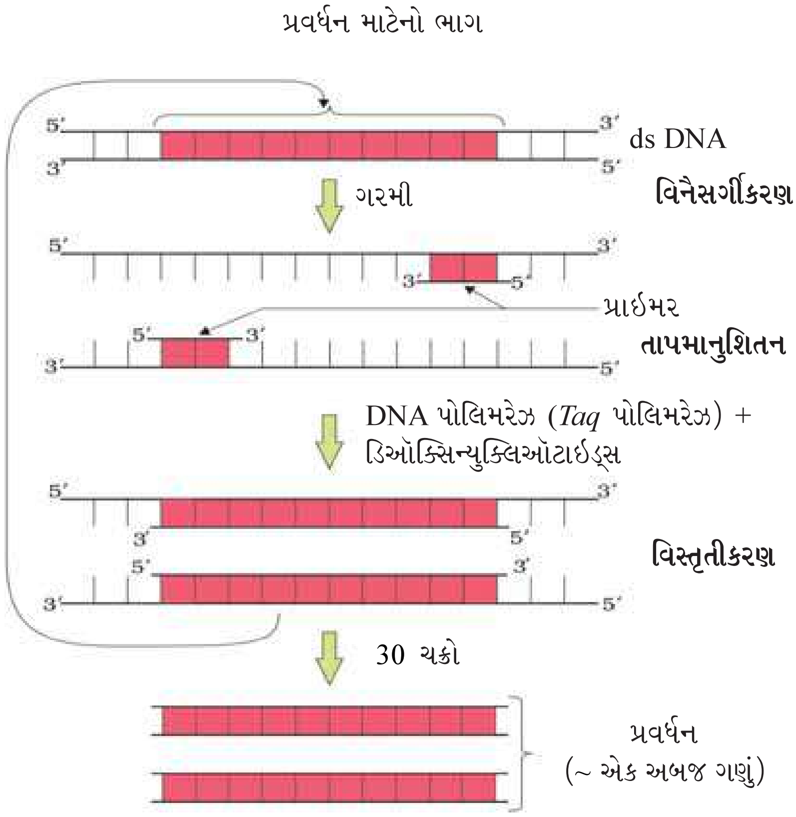
11.3.2 ચોક્કસ જગ્યાએથી DNAની કાપણી (Cutting of DNA at Specific Locations)

શુદ્ધ DNA અણુને રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકની સાથે આ નિશ્ચિત ઉત્સેચક માટેની ઈષ્ટતમ પરિસ્થિતિમાં રાખવાથી રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચક દ્વારા પાચન સંપન્ન થાય છે. રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચક દ્વારા થતા પાચનની પ્રગતિ જાણવા માટે એગેરોઝ જૅલ ઇલેક્ટ્રોફોરેસિસનો ઉપયોગ થાય છે. DNA એ ઋણ વીજભારિત અણુ છે, તેના કારણે તે ધન વિદ્યુતધ્રુવ (anode)ની તરફ ગતિ કરે છે (આકૃતિ 11.3). આ પ્રક્રિયા વાહક DNA દ્વારા પણ પુનરાવર્તિત કરી શકાય છે.

DNAના જોડાણ માટે ઘણીબધી પ્રક્રિયાઓ સામેલ છે. સ્રોત (source) DNA તથા વાહક DNAને વિશિષ્ટ રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચક દ્વારા કાપ્યા પછી સ્રોત DNAમાંથી કાપેલ રુચિ પ્રમાણેના ઉપયોગી જનીનને વાહકની કપાયેલી જગ્યામાં મૂકી લાયગેઝ દ્વારા જોડવામાં આવે છે. પરિણામ સ્વરૂપે એક પુનઃસંયોજિત DNAનું નિર્માણ થાય છે.

11.3.3 PCRના ઉપયોગથી રુચિ પ્રમાણેનાં જનીનનું પ્રવર્ધન (Amplification of Gene of Interest Using PCR)

PCRનો અર્થ **પોલિમરેઝ ચેઇન રિએક્શન (Polymerase Chain Reaction)** છે. આ પ્રક્રિયામાં પ્રાઇમરના બે સેટ (નાનાં રાસાયણિક સંશ્લેષિત ઓલિગો ન્યુક્લિઓટાઇડ જે DNA વિસ્તારના પૂરક હોય) અને DNA પોલિમરેઝ ઉત્સેચકનો ઉપયોગ કરીને ઇન વિટ્રો (*In vitro*) ક્રિયાવિધિ દ્વારા રુચિ પ્રમાણેના ઉપયોગી જનીન (કે DNA)ની ઘણીબધી બહુગુણિત પ્રતિકૃતિઓ (multiple copies)નું સંશ્લેષણ કરાય છે. આ DNA પોલિમરેઝ ઉત્સેચક એ જનીન સંકુલ ધરાવતા DNA (genomic



આકૃતિ 11.6 : પોલિમરેઝ ચેઇન રિએક્શન (PCR) : પ્રત્યેક ચક્રમાં ત્રણ ચરણો છે : (i) વિનૈસર્ગીકરણ (ii) પ્રાઇમર તાપમાનુશિતન અને (iii) પ્રાઇમરનું વિસ્તૃતીકરણ

DNA)ને ટેમ્પલેટ (બીબા કે ફરમા) સ્વરૂપે કામમાં લઈને તથા પ્રક્રિયામાં રહેલા ન્યુક્લિઓટાઇડ્સનો ઉપયોગ કરીને પ્રાઇમરને વિસ્તૃત કરી દે છે. જો DNAની સ્વયંજનનની પ્રક્રિયા ઘણી વખત પુનરાવર્તિત થાય તો DNAના ખંડો આશરે અબજો વખત પ્રવર્ધિત થઈ શકે છે, એટલે કે અબજો નકલો બને છે. થરમૉસ્ટેબલ DNA પોલિમરેઝ (થર્મસ એક્વેટિક્સ- *Thermus aquaticus* બૅક્ટેરિયામાંથી અલગ કરવામાં આવેલ) ઉત્સેચકના ઉપયોગ દ્વારા આ રીતે પુનરાવર્તિત પ્રવર્ધન મેળવવામાં આવે છે, જે ઊંચા તાપમાન દરમિયાન પણ સક્રિય રહી દ્વિશૃંખલીય DNAના વિનૈસર્ગીકરણને પ્રેરે છે. જો જરૂરિયાત હોય તો આ પ્રવર્ધિત ખંડોને વાહક સાથે જોડીને ક્લોનિંગ માટે ઉપયોગ કરી શકીએ છીએ (આકૃતિ 11.6).

11.3.4 યજમાન કોષ કે સજીવમાં પુનઃસંયોજિત DNAનો પ્રવેશ (Insertion of Recombinant DNA into the Host Cell/Organism)

જોડાયેલ DNA (ligated DNA)ને ગ્રાહીકોષોમાં પ્રવેશ કરાવવાની અનેક ક્રિયાવિધિઓ છે. આ કાર્ય જ્યારે ગ્રાહીકોષો પોતાની ફરતે આવેલ DNAને ધારણ કરવા સક્ષમ થઈ જાય ત્યારે તે તેને ગ્રહણ કરે છે. જો પુનઃસંયોજિત DNA પ્રતિજૈવિક અવરોધક જનીન (દા.ત., એમ્પિસિલિન) ધરાવતો હોય તેને *E. coli* કોષોમાં સ્થાનાંતરિત કરાતાં યજમાન કોષો એ એમ્પિસિલિન અવરોધક કોષોમાં રૂપાંતરિત થાય છે. જો આપણે આવા રૂપાંતરિત થયેલા કોષોને એમ્પિસિલિન ધરાવતી અગર (agar) પ્લેટ્સ પર મૂકીએ તો ફક્ત રૂપાંતરિત કોષો જ વૃદ્ધિ પામે છે અને રૂપાંતરિત ન થયેલા ગ્રાહીકોષો મૃત્યુ પામે છે. કારણ કે એમ્પિસિલિનની હાજરીમાં રૂપાંતરિત કોષોની પસંદગીમાં સક્ષમ એવો એમ્પિસિલિન પ્રતિરોધક જનીન હોય છે. આવા કિસ્સામાં એમ્પિસિલિન પ્રતિજૈવિક અવરોધક જનીનને **પસંદગીમાન રેખક (selectable marker)** કહે છે.

11.3.5 વિદેશી (પરજાત) જનીન નીપજ મેળવવી (Obtaining the Foreign Gene Product)

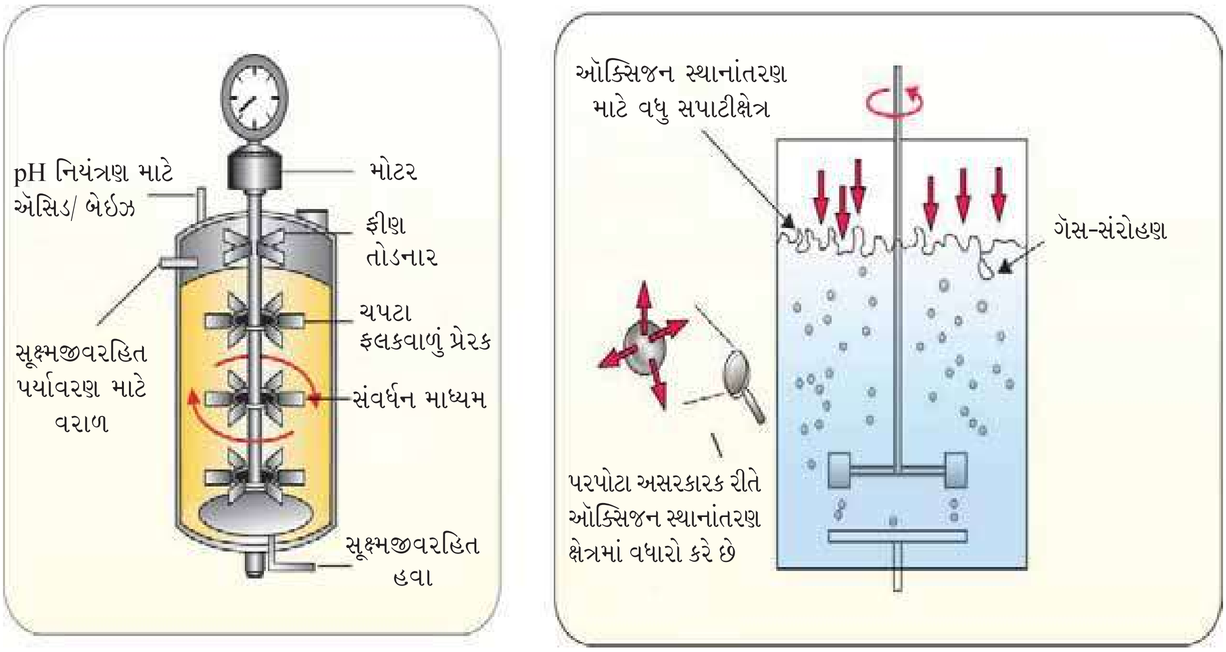
જ્યારે તમે વિદેશી DNA ખંડને ક્લોનિંગ વાહકમાં પ્રવેશ કરાવીને કોઈ પણ બૅક્ટેરિયા, વનસ્પતિ અથવા પ્રાણીકોષમાં સ્થાનાંતરિત કરો છો ત્યારે વિદેશી DNA તેમાં બહુગુણિત થવા લાગે છે. લગભગ બધી જ પુનઃસંયોજિત ટેક્નોલૉજીનો અંતિમ ઉદ્દેશ ઇચ્છિત પ્રોટીનનું ઉત્પાદન કરવાનો હોય છે. એટલા માટે પુનઃસંયોજિત DNA અભિવ્યક્ત થવું જરૂરી હોય છે. વિદેશી જનીન ઇષ્ટતમ પરિસ્થિતિઓમાં જ અભિવ્યક્ત થાય છે. યજમાન કોષોમાં વિદેશી જનીનોની અભિવ્યક્તિને સમજવા માટે ઘણીબધી તક્નિકી બાબતોને ઊંડાણપૂર્વક જાણવી જરૂરી છે.

ઇચ્છિત જનીનને ક્લોન કરીને લક્ષ્ય પ્રોટીનની અભિવ્યક્તિને પ્રેરિત કરતી પરિસ્થિતિઓને અનુકૂલત્તમ બનાવ્યા પછી કોઈ પણ તેનો વ્યાપક સ્તરે ઉત્પાદન કરવા વિશે વિચારી શકે છે. *શું તમે કોઈ કારણ વિચારી શકો છો કે, મોટા પાયે (large scale) ઉત્પાદનની શું આવશ્યકતા છે ?* જો કોઈ પ્રોટીન સંકેતન જનીન કોઈક વિષમજાત યજમાનમાં અભિવ્યક્ત થાય છે તો તેને **પુનઃસંયોજિત પ્રોટીન** કહેવાય છે. લાભદાયી ક્લોનિંગ જનીનોને આશ્રય આપતા કોષોને નાના પાયે પ્રયોગશાળામાં ઉછેરવામાં આવે છે. ઇચ્છિત પ્રોટીનના નિષ્કર્ષણ (extraction) માટે સંવર્ધન માધ્યમનો ઉપયોગ કરી શકાય છે અને પછી જુદી-જુદી અલગીકરણ પદ્ધતિઓનો ઉપયોગ કરી તેનું શુદ્ધીકરણ કરવામાં આવે છે.

કોષોને સતત સંવર્ધનતંત્રમાં ગુણિત કરી શકાય છે કે, જેમાં વપરાયેલ માધ્યમને એક બાજુએથી બહાર કાઢવામાં આવે છે અને બીજી બાજુએથી તાજું માધ્યમ ભરવામાં આવે છે, જેથી કોષો પોતાની દેહધાર્મિક રીતે સક્રિય સ્વરૂપે ઝડપી / વિસ્તારિત પ્રાવસ્થા (log/expontential phase)માં જળવાઈ રહે. આ સંવર્ધન પદ્ધતિ મોટા પાયે જૈવભારના ઉત્પાદન તથા ઇચ્છિત પ્રોટીનના વધુ ઉત્પાદન માટે ઉપયોગી છે.

ઓછું કદ ધરાવતા સંવર્ધનથી નીપજોનું પર્યાપ્ત માત્રાનું ઉત્પાદન થઈ શકતું નથી. તેના વ્યાપક સ્તરે ઉત્પાદન માટે **જૈવભઠ્ઠી (bioreactor)**ના વિકાસની આવશ્યકતા હોય છે કે જેમાં સંવર્ધનનો મોટી માત્રામાં (100-1000 લિટર) ઉપયોગ કરી શકાય. આ રીતે **જૈવભઠ્ઠી** એક વાસણ (vessels) સમાન છે જેમાં સૂક્ષ્મ વનસ્પતિઓ, પ્રાણીઓ તેમજ માનવકોષોનો ઉપયોગ કરીને કાચા સામાન (raw material)ને જૈવસ્વરૂપે વિશિષ્ટ નીપજો, વ્યક્તિગત ઉત્સેચકો વગેરેમાં પરિવર્તિત કરવામાં આવે છે. ઇચ્છિત નીપજ મેળવવા માટે જૈવભઠ્ઠીમાં ઇષ્ટતમ પરિસ્થિતિ પૂરી પાડવામાં આવે છે. જે માટે (તાપમાન, pH, પ્રક્રિયાર્થી, ક્ષાર, વિટામિન કે ઑક્સિજન) ઇષ્ટતમ વૃદ્ધિ માટેની પરિસ્થિતિ પૂરી પડાય છે.

સર્વાધિક ઉપયોગમાં લેવામાં આવતું બાયૉરિએક્ટર સ્ટિરિંગ પ્રકારનું છે જેને આકૃતિ 11.7માં દર્શાવવામાં આવેલ છે.



(a) (b)

આકૃતિ 11.7 : (a) સરળ સ્ટીરેડ-ટેન્ક બાયૉ રિએક્ટર (b) સ્પર્જ્ડ સ્ટીરેડ ટેન્ક બાયૉરિએક્ટર જેના દ્વારા સૂક્ષ્મજીવરહિત હવાના પરપોટાઓનો પ્રવેશ કરાવાય છે

મિશ્રક (stirred) ટેન્ક રિએક્ટર સામાન્ય રીતે નળાકાર હોય છે અથવા જેનું તળિયું વળેલું હોય છે જેથી રિએક્ટરની અંદર દ્રવ્યોના મિશ્રણમાં સહાયતા પ્રાપ્ત થાય છે. બાયૉરિએક્ટરમાં મિશ્રક એ ઑક્સિજનની ઉપલબ્ધતા તથા તેના મિશ્રણનું પણ કામ કરે છે. સમયાંતરે હવા પરપોટા સ્વરૂપે બાયૉરિએક્ટરમાં મોકલવામાં આવે છે. જો તમે આકૃતિને ધ્યાનથી જોશો તો જણાશે કે, રિએક્ટરમાં એક આંદોલક (agitator) તંત્ર, ઑક્સિજન વિતરણ તંત્ર, ફીણ-નિયંત્રણ તંત્ર, તાપમાન-નિયંત્રણ તંત્ર, pH નિયંત્રણ તંત્ર અને પ્રતિચયન પ્રધાર (sampling ports) આવેલા છે, જેનાથી સમયાંતરે સંવર્ધનની થોડી માત્રા બહાર કાઢી શકાય છે.

11.3.6 અનુપ્રવાહિત પ્રક્રિયા (Downstream Processing)

જૈવ સંશ્લેષિત તબક્કો પૂર્ણ થયા બાદ નીપજોને બજારમાં માર્કેટિંગ માટે મોકલતા પહેલાં શૃંખલામય

પ્રક્રિયાઓમાંથી પસાર કરવામાં આવે છે. નીપજોની અલગીકરણ અને શુદ્ધીકરણ જેવી પ્રક્રિયાઓને સામૂહિક રીતે અનુપ્રવાહિત પ્રક્રિયા તરીકે ઉલ્લેખવામાં આવે છે. નીપજોને યોગ્ય પરિરક્ષકોથી પરિરક્ષિત બનાવાય છે. ઔષધોની બાબતમાં આવી બનાવટોને ચીવટપૂર્વકના ચિકિત્સકીય પરીક્ષણમાંથી પસાર કરવામાં આવે છે. પ્રત્યેક નીપજોની ચુસ્તપણે ગુણવત્તા નિયંત્રણ ચકાસણી થાય તે પણ આવશ્યક હોય છે. અનુપ્રવાહિત પ્રક્રિયા અને ગુણવત્તા નિયંત્રણ ચકાસણી (પરીક્ષણ) પ્રત્યેક નીપજો માટે અલગ-અલગ હોય છે.

સારાંશ

બાયૉટેક્નોલૉજી સજીવો, કોષો અથવા ઉત્સેચકોનો ઉપયોગ કરીને નીપજો તથા પ્રક્રિયાઓના વ્યાપક સ્તરે ઉત્પાદન અને માર્કેટિંગ કરવા સાથે સંકળાયેલ છે. આધુનિક બાયૉટેક્નોલૉજીમાં જનીનિક રૂપાંતરિત સજીવોનો ઉપયોગ ત્યારે સંભવ થઈ શક્યો જ્યારે માનવે DNAના રસાયણને પરિવર્તિત કરવાનું અને પુનઃસંયોજિત DNAનું નિર્માણ કરવાનું શીખી લીધું. આ ચાવીરૂપ પ્રક્રિયાને રિકોમ્બિનન્ટ DNA ટેક્નોલૉજી અથવા જિનેટિક એન્જિનિયરિંગ કહે છે. આ પ્રક્રિયામાં રિસ્ટ્રિક્શન ઍન્ડોન્યુક્લિએઝ, DNA લાયગેઝ, યોગ્ય પ્લાસ્મિડ અથવા વાઈરસ વાહકોનો ઉપયોગ કરી વિજાતીય DNAને અલગ કરવું તથા યજમાન સજીવોમાં વિજાતીય DNAને સ્થળાંતરિત કરવું, વિજાતીય કે વિદેશી જનીનની અભિવ્યક્તિ, જનીન-ઉત્પાદનનું શુદ્ધીકરણ જેવા કે ક્રિયાત્મક પ્રોટીન અને તે રીતે માર્કેટિંગ માટે યોગ્ય સ્વરૂપમાં ફેરવવું વગેરે સામેલ છે. વ્યાપક સ્તરે થતા ઉત્પાદનમાં બાયૉરિએક્ટરનો ઉપયોગ થાય છે.

સ્વાધ્યાય

1. શું તમે 10 પુનઃસંયોજિત (રિકોમ્બિનન્ટ) પ્રોટીનની યાદી બનાવી શકો છો કે જેનો ચિકિત્સકીય પ્રણાલીમાં ઉપયોગ થતો હોય ? તપાસ કરો કે તે ચિકિત્સકીય રીતે ક્યાં ઉપયોગમાં લેવાય છે (ઈન્ટરનેટનો ઉપયોગ કરો).
2. રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકો કે જેઓ પ્રક્રિયક DNA પર કાર્ય કરતા હોય, જ્યાંથી તે DNA પર કાપ મૂકતા હોય તે સ્થાન અને તેનાથી ઉત્પાદિત નીપજોને દર્શાવતો હોય તેવો એક રેખાકૃતિવાળો ચાર્ટ બનાવો.
3. તમે કરેલા અભ્યાસના આધારે શું તમે કહી શકો છો કે, આણ્વિય કદના આધારે ઉત્સેચકો મોટા છે કે DNA મોટો છે ? તમે કેવી રીતે જાણકારી મેળવશો ?
4. મનુષ્યના એક કોષમાં તેના DNAની મોલર સાંદ્રતા શું હશે ? તમારા શિક્ષક સાથે પરામર્શ કરો.
5. સુકોષકેન્દ્રી સજીવો રિસ્ટ્રિક્શન ઍન્ડોન્યુક્લિએઝ ધરાવે છે ? તમારા જવાબને ન્યાયોચિત કરો.
6. સુયોગ્ય વાતાભિસરણ તથા મિશ્રણ વિશેષતા સિવાય સ્ટિરિંગ ટેન્ક બાયૉરિએક્ટરના કંપન્ન ફ્લાસ્કના અન્ય ફાયદાઓ હોય છે ?

7. શિક્ષક સાથે પરામર્શન કરીને પેલિન્ડ્રોમિક DNA શૃંખલાઓનાં 5 ઉદાહરણ એકત્રિત કરો. બેઝ-જોડના નિયમોનું પાલન કરીને પેલિન્ડ્રોમિક શૃંખલા બનાવવા ખૂબ જ સારો પ્રયાસ કરો.
8. અર્ધિકરણને ધ્યાનમાં રાખીને જણાવી શકો છો કે, પુનઃસંયોજિત DNA કઈ અવસ્થામાં બને છે ?
9. શું તમે વિચારીને જવાબ આપી શકો છો કે, રિપોર્ટર ઉત્સેચકને પસંદગીમાન રેખક ઉપરાંત વિદેશી DNA દ્વારા યજમાન કોષોના રૂપાંતરણના નિયમન માટે કેવી રીતે ઉપયોગમાં લઈ શકાય છે ?
10. નીચે આપેલનું સંક્ષિપ્તમાં વર્ણન કરો :
    (a) સ્વયંજનનની ઉત્પત્તિ
    (b) બાયૉરિએક્ટર
    (c) અનુપ્રવાહિત-પ્રક્રિયા
11. સંક્ષિપ્તમાં સમજાવો :
    (a) PCR
    (b) રિસ્ટ્રિક્શન ઉત્સેચકો અને DNA
    (c) કાઈટિનેઝ
12. તમારા શિક્ષક સાથે ચર્ચા કરીને શોધી કાઢો કે, નીચેના વચ્ચેનો ભેદ કેવી રીતે કરાય :
    (a) પ્લાસ્મિડ DNA અને રંગસૂત્રીય DNA
    (b) RNA અને DNA
    (c) ઍક્સોન્યુક્લિએઝ અને ઍન્ડોન્યુક્લિએઝ