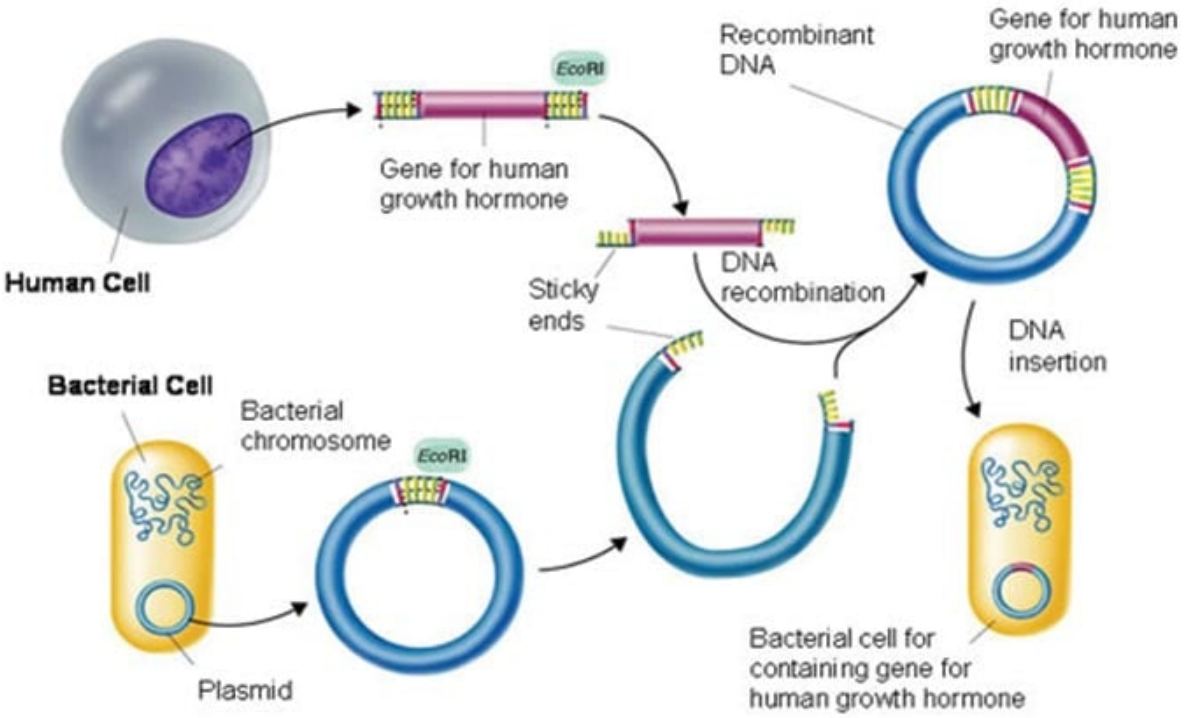
विभाग: बी.एससी जैव प्रौद्योगिकी

वर्ष 2 : वर्ष

पेपर: पुनः संयोजक डीएनए प्रौद्योगिकी

इकाई: 1

जीन क्लोनिंग और डीएनए विश्लेषण का मूल सिद्धांत



जीन क्लोनिंग का मूल सिद्धांत एक विशिष्ट जीन को अलग करना, उसे एक डीएनए वेक्टर (जैसे प्लास्मिड) में प्रविष्ट कराना, और इस पुनर्योगज डीएनए को एक मेज़बान कोशिका (आमतौर पर बैक्टीरिया) में प्रविष्ट कराकर जीन की कई समान प्रतियाँ बनाना है। जीन अनुक्रमण जैसी तकनीकों के माध्यम से डीएनए विश्लेषण , इन क्लोन किए गए डीएनए खंडों की जाँच करके उनके न्यूक्लियोटाइड अनुक्रम का निर्धारण करता है, जीन के कार्यों की पहचान करता है, उत्परिवर्तनों का पता लगाता है, और जीन विनियमन को समझता है।

जीन क्लोनिंग

1. 1. **रुचि के जीन को अलग करें** :

   प्रतिबंधन एंजाइमों का उपयोग करके बड़े डीएनए अणु से काटा जाता है , जो विशिष्ट स्थानों पर डीएनए को काटने के लिए "आणविक कैंची" की तरह कार्य करते हैं।
2. 2. **एक वेक्टर चुनें** :

प्लास्मिड , जो बैक्टीरिया में पाया जाने वाला डीएनए का एक छोटा, गोलाकार टुकड़ा है, आमतौर पर वेक्टर या "वाहन" के रूप में उपयोग किया जाता है।

3. 3. **पुनः संयोजक डीएनए बनाएं** :

   पृथक जीन को कटे हुए प्लास्मिड में डाला जाता है, तथा डीएनए लाइगेज का उपयोग टुकड़ों को जोड़ने के लिए किया जाता है, जिससे एकल पुनः संयोजक डीएनए अणु बनता है।

4. 4. **मेजबान कोशिकाओं को रूपांतरित करें** :

   पुनः संयोजक प्लास्मिड को मेजबान कोशिका, आमतौर पर जीवाणु में प्रविष्ट कराया जाता है।

5. 5. **जीन को प्रवर्धित करें** :

   जैसे-जैसे मेजबान कोशिकाएं विभाजित होती हैं और बढ़ती हैं, वे प्लाज्मिड की प्रतिकृति भी बनाती हैं, जिससे रुचिकर जीन की अनेक समान प्रतियां बनती हैं।

डीएनए विश्लेषण

- **अनुक्रमण** :

  एक बार क्लोन किए जाने के बाद, न्यूक्लियोटाइड बेस (ए, टी, सी, जी) के सटीक क्रम को निर्धारित करने के लिए जीन अनुक्रमण का उपयोग करके डीएनए टुकड़ों का विश्लेषण किया जाता है।

- **पहचान** :

  अनुक्रमण से जीन के विशिष्ट अनुक्रम, उसके नियंत्रण तत्वों और किसी भी भिन्नता या उत्परिवर्तन की पहचान करने में मदद मिलती है।

- **कार्य निर्धारण** :

  जीन के अनुक्रम को समझकर, वैज्ञानिक किसी जीव के लक्षणों या रोग के विकास में उसके कार्य और भूमिका को बेहतर ढंग से समझ सकते हैं।

- **प्रोटीन अभिव्यक्ति** :

  कुछ मामलों में, क्लोन किए गए जीन के प्रोटीन को अभिव्यक्त किया जा सकता है, जिससे बैक्टीरिया में मानव इंसुलिन जैसे महत्वपूर्ण अणुओं का उत्पादन संभव हो सकता है।

- जीन क्लोनिंग- आवश्यकताएँ, सिद्धांत, चरण, अनुप्रयोग

  6 जुलाई 2022 — जीन क्लोनिंग का सिद्धांत। क्लोन किए जाने वाले जीन वाले डीएनए के एक टुकड़े को एक उपयुक्त वेक्टर में डाला जाता है, ताकि...

परिचय, इतिहास, जीन क्लोनिंग का आगमन और महत्व तथा पॉलीमरेज़ चेन रिएक्शन

जीन क्लोनिंग और पॉलीमरेज़ चेन रिएक्शन (पीसीआर)

1 परिचय

जीन क्लोनिंग और पॉलीमरेज़ चेन रिएक्शन (पीसीआर) आधुनिक आणविक जीव विज्ञान में दो क्रांतिकारी तकनीकें हैं, जिन्होंने जैविक अनुसंधान, चिकित्सा, कृषि और जैव प्रौद्योगिकी को बदल दिया है।

- **जीन क्लोनिंग** जीवित कोशिकाओं, विशेष रूप से बैक्टीरिया का उपयोग करके किसी विशेष जीन या डीएनए अनुक्रम की कई समान प्रतियां बनाने की प्रक्रिया है।

- **पीसीआर** एक इन विट्रो (टेस्ट-ट्यूब आधारित) विधि है जो जीवित जीवों की आवश्यकता के बिना एक विशिष्ट डीएनए खंड के तीव्र प्रवर्धन की अनुमति देती है।

दोनों विधियां आनुवंशिक इंजीनियरिंग, निदान, फोरेंसिक विज्ञान और चिकित्सा अनुसंधान के लिए केंद्रीय हैं।

---

2. जीन क्लोनिंग का इतिहास और आगमन

प्रारंभिक खोजें (1940-1960 के दशक)

- **आनुवंशिक सामग्री के रूप में डीएनए** : एवरी, मैकलियोड और मैककार्टी द्वारा स्थापित (1944)।
- **डबल हेलिक्स मॉडल** : वॉटसन और क्रिक (1953) ने डीएनए का संरचनात्मक आधार प्रदान किया, जिससे प्रतिकृति और हेरफेर को समझना संभव हुआ।
- **प्रतिबंधन एंजाइम** : 1960 के दशक के अंत में वर्नर आर्बर, डैनियल नाथन और हैमिल्टन स्मिथ द्वारा खोजा गया, जो विशिष्ट स्थानों पर डीएनए को काट सकता था।

पुनः संयोजक डीएनए प्रौद्योगिकी का आगमन (1970 का दशक)

- **स्टेनली कोहेन और हर्बर्ट बॉयर (1973)** : पहला सफल जीन क्लोनिंग प्रयोग। उन्होंने एक प्लास्मिड वेक्टर में विदेशी डीएनए डाला और उसे *ई. कोलाई में प्रविष्ट कराया*, जिससे पहला पुनर्योगज जीव उत्पन्न हुआ।
- **पॉल बर्ग (1972)** : विभिन्न प्रजातियों के डीएनए को मिलाकर पुनः संयोजक डीएनए अणु बनाए। कोहेन और बॉयर के साथ रसायन विज्ञान में नोबेल पुरस्कार (1980) से सम्मानित।

उन्नति (1980-2000 के दशक)

- इंसुलिन, वृद्धि हार्मोन और इंटरफेरॉन जैसे प्रोटीन के उत्पादन के लिए **अभिव्यक्ति वेक्टर** का विकास ।
- कृषि में जीन क्लोनिंग का उपयोग (जैसे, बीटी फसलें, गोल्डन राइस)।
- पुनः संयोजक डीएनए प्रौद्योगिकी पर ध्यान केंद्रित करने वाली बायोटेक कंपनियों (जेनेंटेक, एमजेन) की स्थापना।

---

3. पॉलीमरेज़ चेन रिएक्शन (पीसीआर) का इतिहास और आगमन

वैचारिक पृष्ठभूमि

- वैज्ञानिकों को पता था कि डीएनए प्रतिकृति प्राकृतिक रूप से होती है, लेकिन इसे कृत्रिम रूप से पुनः बनाना एक चुनौती थी।

पीसीआर का आविष्कार (1983)

- **कैरी मुलिस ने** 1983 में सेटस कॉर्पोरेशन में काम करते हुए पीसीआर का आविष्कार किया था।

- उन्होंने सिंथेटिक प्राइमरों और डीएनए पॉलीमरेज़ का उपयोग करके डीएनए खंड को बार-बार गर्म और ठंडा करने के चक्रों के माध्यम से प्रवर्धित करने का प्रस्ताव रखा।

प्रमुख घटनाक्रम

- **टैक पॉलीमरेज़** (*थर्मस एक्वाटिकस से*) की खोज 1985 में थॉमस ब्रॉक द्वारा की गई: एक ताप-स्थिर एंजाइम जिसने पीसीआर को व्यावहारिक और कुशल बनाया।
- **थर्मल साइक्लर्स (1980 के दशक के अंत में)** के साथ स्वचालन ने उच्च गति वाले डीएनए प्रवर्धन को सक्षम किया।
- पीसीआर शीघ्र ही आनुवंशिकी, फोरेंसिक विज्ञान और चिकित्सा निदान में आवश्यक हो गया।

मान्यता

- पीसीआर का आविष्कार करने के लिए **रसायन विज्ञान में नोबेल पुरस्कार (1993)** मिला ।

---

4. जीन क्लोनिंग का महत्व

1. **दवा**
    - चिकित्सीय प्रोटीन (इंसुलिन, वृद्धि हार्मोन, थक्के कारक) का उत्पादन।
    - टीकों का विकास (जैसे, हेपेटाइटिस बी का टीका)।
    - आनुवंशिक विकारों के लिए जीन थेरेपी दृष्टिकोण।
2. **कृषि**
    - कीटों, शाकनाशियों और पर्यावरणीय तनाव के प्रति प्रतिरोधी आनुवंशिक रूप से संशोधित (जीएम) फसलों का विकास।
    - पोषण गुणवत्ता में सुधार (विटामिन ए से समृद्ध गोल्डन राइस)।
3. **अनुसंधान**
    - जीन कार्य और विनियमन का अध्ययन।
    - मॉडल जीवों का निर्माण (ट्रांसजेनिक चूहे, ज़ेब्राफिश)।
4. **औद्योगिक जैव प्रौद्योगिकी**
    - एंजाइम, जैव ईंधन और बायोप्लास्टिक का उत्पादन।

---

5. पीसीआर का महत्व

1. **चिकित्सा निदान**
    - संक्रामक रोगों (एचआईवी, तपेदिक, कोविड-19) का पता लगाना।
    - वंशानुगत विकारों के लिए आनुवंशिक परीक्षण।
    - उत्परिवर्तन का पता लगाने के माध्यम से कैंसर का निदान।
2. **फोरेंसिक विज्ञान**
    - आपराधिक जांच के लिए डीएनए फिंगरप्रिंटिंग।
    - पितृत्व और पहचान परीक्षण.
3. **अनुसंधान अनुप्रयोग**
    - जीनों की तीव्र क्लोनिंग और अनुक्रमण।
    - उत्परिवर्तन और बहुरूपता का पता लगाना।

- जीन अभिव्यक्ति का अध्ययन (आरटी-पीसीआर, क्यूपीसीआर)।

4. **पर्यावरण और विकासवादी जीवविज्ञान**
   - पर्यावरण नमूनों में सूक्ष्मजीवों का पता लगाना।
   - प्राचीन डीएनए अध्ययन (पुरातत्व, जीवाश्म विज्ञान)।

---

6. तुलनात्मक महत्व

विशेषता	जीन क्लोनिंग	पीसीआर
विधि का प्रकार	इन विवो (कोशिकाओं के अंदर)	इन विट्रो (टेस्ट ट्यूब-आधारित)
रफ़्तार	अपेक्षाकृत धीमा	बहुत तेज़ (कुछ घंटे)
उपयोग	बड़े पैमाने पर जीन/प्रोटीन उत्पादन	विश्लेषण के लिए डीएनए का प्रवर्धन
अनुप्रयोग	जैव प्रौद्योगिकी, कृषि, चिकित्सा	निदान, फोरेंसिक, अनुसंधान

---

7. निष्कर्ष

1970 के दशक में **जीन क्लोनिंग और 1980 के दशक में पीसीआर** का आगमन आणविक जीव विज्ञान में महत्वपूर्ण मोड़ का प्रतिनिधित्व करता है।

- जीन क्लोनिंग ने आधुनिक जैव प्रौद्योगिकी को जन्म दिया, जिससे दवाओं, टीकों और जीएम फसलों का बड़े पैमाने पर उत्पादन संभव हो सका।
- पीसीआर ने सूक्ष्म नमूनों से भी तीव्र डीएनए प्रवर्धन की अनुमति देकर निदान, फोरेंसिक और आनुवंशिक अनुसंधान में क्रांति ला दी।

साथ मिलकर, वे आनुवंशिक इंजीनियरिंग, जीनोमिक्स और व्यक्तिगत चिकित्सा की नींव रखते हैं, जो विज्ञान और मानव कल्याण में एक नए युग का सूत्रपात करते हैं।

जीवित कोशिकाओं से डीएनए का शुद्धिकरण

जीवित कोशिकाओं से डीएनए का शुद्धिकरण (सिद्धांत + प्रोटोकॉल + समस्या निवारण)

1) “डीएनए शुद्धिकरण” का क्या अर्थ है?

पृथक्करण (कोशिकाओं/ऊतकों से डीएनए को अलग करना) + शुद्धिकरण (प्रोटीन, लिपिड, आरएनए, रंजक, लवण, अवरोधकों को हटाना) ताकि निर्धारित **उपज** , **शुद्धता** और **अखंडता का डीएनए प्राप्त किया जा सके** , जो आगे के उपयोगों (पीसीआर, क्लोनिंग, अनुक्रमण, निदान) के लिए हो।

लक्ष्य: जीनोमिक डीएनए (जीडीएनए), प्लास्मिड डीएनए, माइटोकॉन्ड्रियल डीएनए, क्लोरोप्लास्ट डीएनए।
नमूने के प्रकार: बैक्टीरिया, यीस्ट/कवकपादप ऊतकजंतु कोशिकाएँ/ऊतकरक्त, फोरेंसिक स्वैब, पर्यावरणीय नमूने।

---

2) मुख्य जैव रासायनिक सिद्धांत

- **कोशिका विघटन (लिसिस):** यांत्रिक (पीसना, मनका-पीटना), एंजाइमेटिक (लाइसोजाइम, ज़ाइमोलीज़, प्रोटीनेज़ के), रासायनिक (एसडीएस/सीटीएबी जैसे डिटर्जेंट; ग्वानिडिनियम थायोसाइनेट जैसे कैओट्रोप्स)।
- **डीएनएस निष्क्रियता:** EDTA चेलेट Mg^{2+}; गर्मी; कैओट्रोप्स; तीव्र प्रसंस्करण।
- **प्रोटीन निष्कासन:** विकृतीकरण (एसडीएस/NaOH/चाओट्रोप्स), प्रोटियोलिसिस (प्रोटीनेज K), कार्बनिक निष्कर्षण (फिनोल:क्लोरोफॉर्म), या **सॉल्टिंग-आउट**उच्च नमक समुच्चय प्रोटीन)।
- **डीएनए कैप्चर:**
  - **अल्कोहल अवक्षेपण:** Na^+/NH_4^+ डीएनए फॉस्फेट को निष्क्रिय करता है → डीएनए को **इथेनॉल/आइसोप्रोपेनॉल में एकत्रित करता है**।
  - **सिलिका बंधन:** कैओट्रोप + अल्कोहल में, डीएनए निर्जलित हो जाता है और सिलिका को बांधता है; कम नमक/ उच्च पीएच पर जारी किया जाता है।
  - **चुंबकीय मोती (एसपीआरआई/पीईजी-NaCl):** डीएनए कार्बोक्सिलेटेड मोतियों को बांधता है; मोती: नमूना अनुपात आकार चयन को नियंत्रित करता है।
- **सफाई और निक्षालन:** 70% इथेनॉल धुलाई से लवणों को हटाया जाता है; डीएनए को **TE** (10 mM ट्रिस-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) या न्यूक्लिऐस-मुक्त जल में निक्षालित किया जाता है।

---

3) अभिकर्मक और वे क्या करते हैं (परीक्षा पसंदीदा)

- **एसडीएस (1-2%)** : आयनिक डिटर्जेंट; झिल्ली को बाधित करता है, प्रोटीन को विकृत करता है।
- **EDTA (1–50 mM)** : Mg^{2+}/Ca^{2+} को कीलेट करता है; न्यूक्लिऐसेस को बाधित करता है।
- **ट्रिस-एचसीएल (10–100 मिमी, पीएच 7.5–8.5)** : बफरिंग।
- **NaCl (0.2-1.5 M)** : आयनिक शक्ति; डीएनए अवक्षेपण एवं प्रोटीन एकत्रीकरण में मदद करता है।
- **प्रोटीनेज़ K (0.1–0.5 मि.ग्रा./मिली. @ 56 °C)** : न्यूक्लिऐज़ सहित प्रोटीन को पचाता है।
- **आरएनेज ए (10–50 µg/mL)** : लिसिस के बाद आरएनए को हटाता है।
- **फिनोल:क्लोरोफॉर्म:आइसोएमाइल अल्कोहल (25:24:1)** : प्रोटीन को कार्बनिक चरण में विभाजित करता है; आइसोएमाइल झाग को कम करता है।
- **चाओट्रोप्स (गुआनिडिनियम थायोसायनेट/HCl)** : प्रोटीन को फैलाते हैं; डीएनए-सिलिका बंधन को बढ़ावा देते हैं।
- **सीटीएबी (2%)** : धनायनिक डिटर्जेंट; कॉम्प्लेक्स पॉलीसेकेराइड्स (पौधों के लिए महत्वपूर्ण)।
- **β-मर्कैप्टोएथेनॉल** या **डीटीटी** : पौधों में पॉलीफेनोल/ऑक्सीडेंट को कम करता है।
- **अमोनियम एसीटेट/पोटेशियम एसीटेट** : प्रोटीन को नमक से अलग करना; प्लास्मिड तैयारी में उदासीनीकरण।
- **इथेनॉल 70%** / **आइसोप्रोपेनॉल** : डीएनए अवक्षेपण/धुलाई।

---

4) सार्वभौमिक कार्यप्रवाह (कोई भी जीव)

1. **नमूना तैयार करना:** ताजा/जमे हुए ऊतक़ठंडा रखें; डीएनएज़-मुक्त प्लास्टिक का उपयोग करें।
2. **कोशिका अपघटन + न्यूक्लिऐस निष्क्रियण:** कोशिका भित्ति/मैट्रिक्स के लिए उपयुक्त डिटर्जेंट/एंजाइम चुनें।
3. **प्रोटीन/लिपिड निष्कासन:** जैविक निष्कर्षण, लवणनिकालना, या प्रोटीएज़ पाचन।
4. **डीएनए कैप्चर:** अल्कोहल अवक्षेपण / स्पिन कॉलम / चुंबकीय मोती।
5. **धुलाई:** लवण और कैओट्रोप्स को हटाने के लिए 70% इथेनॉल।
6. **निस्सारण:** TE या जल में (pH ~8.5).
7. **क्यूसी:** मात्रा निर्धारित करें (ए260, फ्लोरोमेट्री), शुद्धता की जांच करें (ए260/280, ए260/230), अखंडता का आकलन करें (एगरोज़ जेल)।

---

5) चरणदर-चरण प्रोटोकॉल के साथ स्वर्ण-मानक विधियाँ

A. उच्च शुद्धता वाले gDNA के लिए कार्बनिक निष्कर्षण (फिनोल-क्लोरोफॉर्म)

कब उपयोग करें: ऊतक, संवर्धित कोशिकाएं, बैक्टीरिया; उत्कृष्ट शुद्धता; रासायनिक सुरक्षा के बिना कक्षाओं के लिए आदर्श नहीं।

प्रोटोकॉल (सामान्य 10–20 मिलीग्राम ऊतक़ 10^6–10^7 कोशिकाएं):

1. **लाइज़:** 500 µL लाइसिस बफर(100 mM ट्रिस-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100–200 mM NaCl, 1% SDS) + प्रोटीनेज़ K (0.2 mg/mL)। **56 °C पर 1–3 घंटे तक इनक्यूबेट करें** (धीरे से मिलाएँ)।
2. **वैकल्पिक RNase:** 10–20 µg/mL RNase A, **37 °C, 15 मिनट जोड़ें**।
3. **निष्कर्ष:** बराबर मात्रा में फिनोल:क्लोरोफॉर्म:IAA (25:24:1) मिलाएं, धीरे से पलटें, **10 मिनट तक सेंट्रीफ्यूज करें, 12,000×g**।
4. **जलीय प्रावस्था → नई ट्यूब।** फिनोल निकालने के लिए केवल क्लोरोफॉर्म के साथ एक बार दोहराएँ।
5. **डीएनए अवक्षेपण:** 0.1 वॉल्यूम 3 एम सोडियम एसीटेट (पीएच 5.2) + 2-2.5 वॉल्यूम इथेनॉल (ठंडा) **या** 0.7 वॉल्यूम आइसोप्रोपेनॉल जोड़ें; धागे दिखाई देने तक उलटें; **-20 °C, 15-30 मिनट**।
6. **गोली:** 10 मिनट, 12,000×g; **1 एमएल70% इथेनॉल से धोएं**; 5-10 मिनट हवा में सुखाएं।
7. **निस्सारण:** 50–200 µL TE (pH 8.0)। HMW DNA के लिए 4 °C पर रात भर घोलें।

लाभ: बहुत शुद्ध डीएनए; कई उपयोगों के लिए उपयुक्त।
नुकसान: खतरनाक रसायन; समय लेने वाला; लापरवाही बरतने पर फिनोल का रिसाव हो सकता है।

बी. नमकीन बनाना (गैर-जैविक), कक्षा के अनुकूल

विचार: उच्च नमक प्रोटीन को अवक्षेपित करता है; डीएनए जलीय रहता है और फिर अल्कोहल द्वारा अवक्षेपित हो जाता है।

शिष्टाचार:

1. **एसडीएस/ट्रिस/ईडीटीए** + प्रोटीनेज के (जैसा ऊपर बताया गया है) में लाइज़ ।
2. 1-1.5 एम फाइनल में **संतृप्त NaCl** जोड़ें ; उलटें; गोली प्रोटीन के लिए **अपकेंद्रित्र ।**
3. सतह पर तैरनेवाला स्थानांतरित करें; आइसोप्रोपेनॉल के साथ **डीएनए अवक्षेपित करें** ; 70% EtOH धोएँ; TE में निक्षालन करें।

फायदे: सुरक्षित, सस्ता। **नुकसान:** कभी-कभी A260/230 (नमक का भार) कम होता है।

सी. सिलिका स्पिन-कॉलम किट (चाओट्रोप-आधारित)

विचार: ग्वानिडिनियम लवण + इथेनॉल में, डीएनए सिलिका को बांधता है; धोता है; निक्षालित करता है।

शिष्टाचार:

1. **ग्वानिडिनियम-आधारित बफर**(अक्सर एसडीएस के साथ) + प्रोटीनेज़ के में लाइज़ नमूना ।
2. **इथेनॉल** जोड़ें ; स्तंभ पर लोड; **स्पिन** ।
3. **धुलाई** (आमतौर पर ग्वानिडिनियम धुलाई फिर 70-80% इथेनॉल धुलाई)।
4. 50-100 µL गर्म (60 °C) कम नमक बफर या पानी के साथ **मिलाएं ।**

फायदे: तेज़, साफ़; नियमित पीसीआर, क्लोनिंग, एनजीएस के लिए आदर्श।
नुकसान: कॉलम क्षमता सीमाएँ (~20–50 µg); कम धुलाई होने पर कैओट्रोप कैरीओवर।

डी. चुंबकीय मनका (एसपीआरआई/पीईजी-NaCl) शुद्धिकरण

विचार: डीएनए, PEG/NaCl में मोतियों को बाँधता है; चुम्बक मोतियों को खींचता है; 70% EtOH से धोता है; निक्षालित करता है।
युक्ति: मनका: नमूना अनुपात टुकड़े के आकार को नियंत्रित करता है (उदाहरण के लिए, 0.8 × >300 बीपी रखता है)।

शिष्टाचार:

1. **1.0×** मनका निलंबन के साथ मिलाएं ; 5-10 मिनट तक इनक्यूबेट करें।
2. चुंबक; सतह पर तैरनेवाला त्यागें; **दो 70% EtOH washes** (कोई resuspension नहीं)।
3. मैट होने तक हवा में सुखाएं (~5 मिनट); 30-100 µL में घोलें।

फायदे: तेज़, स्केलेबल, आकार-चयनात्मक। **नुकसान:** ज़्यादा सुखाने या कम धोने पर PEG/नमक के अवशेष।

ई. पौधों के लिए सीटीएबी विधि (पॉलीसेकेराइड/पॉलीफेनोल्स भारी)

सीटीएबी बफर (विशिष्ट): 2% सीटीएबी, 100 एमएम ट्रिस-एचसीएल पीएच 8.0, 20 एमएम ईडीटीए, **1.4 एमNaCl** , 0.2% β-मर्कैप्टोएथेनॉल (ताजा डालें)।

शिष्टाचार:

1. **क्रायोग्राइंड करके** बारीक पाउडर बना लें।
2. पहले से गर्म किया हुआ (65 °C) CTAB बफर डालें; **65 °C पर 30-60 मिनट तक**हल्के मिश्रण के साथ रखें।
3. **क्लोरोफॉर्म: आइसोएमाइल अल्कोहल (24:1)** के साथ निष्कर्षण ; स्पिन; जलीय चरण रखें।
4. **आइसोप्रोपेनॉल** (0.6-1 वॉल्यूम) के साथ डीएनए को अवक्षेपित करें ; दृश्यमान धागे स्पूल करें।
5. 70% EtOH धोकर गोली बना लें; TE + RNase A में घोल लें।

यह क्यों काम करता है: CTAB पॉलीसैकेराइड के साथ अघुलनशील कॉम्प्लेक्स बनाता है; β-ME पॉलीफेनोल्स को कम करता है।

एफ. बैक्टीरिया (जीनोमिक डीएनए)

- **ग्राम-नेगेटिव (उदाहरणार्थ, ई. कोलाई):** एसडीएस + प्रोटीनेज़ के अक्सर पर्याप्त होता है।
- **ग्राम-पॉजिटिव (उदाहरण के लिए, *बैसिलस* , *स्टैफिलोकोकस*): सुक्रोज/ट्रिस/ईडीटीए में लाइसोजाइम (1-10 मिलीग्राम/एमएल 37 डिग्री सेल्सियस, 15-30 मिनट) के** साथ पूर्व-उपचार करें , फिर एसडीएस/प्रोटीनेज के और उपरोक्त ए-डी में से किसी के साथ आगे बढ़ें।

जी. यीस्ट/कवक

- कठोर दीवार: स्फेरोप्लास्ट या मनका-धड़कन बनाने के लिए **ज़ाइमोलीज़/लिटिकेज़ (β-1,3-ग्लूकेनेस)।**
- फिर प्रोटीनेज़ K लिसिस → सिलिका/मोती/कार्बनिक जैसा पसंद किया जाता है।

एच. पशु ऊतक और संवर्धित कोशिकाएं

- ऊतक: कीमा; वैकल्पिक आरएनएउपचार; प्रोटीनेज़ के एसडीएस **56 डिग्री सेल्सियस पर** स्पष्ट होने तक विश्लेषण।
- **रक्त (WBC gDNA):**
    1. **आरबीसी लिसिस** (अमोनियम क्लोराइड बफर), गोली डब्ल्यूबीसी।
    2. डब्ल्यूबीसी लिसिस (एसडीएस/ईडीटीए/ट्रिस + प्रोटीनेज के)।
    3. सॉल्टिंग-आउट या कॉलम/बीड्स; आरएनेज; एल्यूट.
        - **EDTA-एंटीकोएग्युलेटेड रक्त का** उपयोग करें (हेपरिन PCR को रोकता है)।

I. प्लास्मिड डीएनए (क्षारीय लाइसिस मिनीप्रेप)

मुख्य रसायन विज्ञान:

- **समाधान I (पुनःनिलंबन):** ग्लूकोज (आसमाटिक), ट्रिस (पीएच), ईडीटीए (चेलेट्स)।
- **समाधान II (लिसिस): NaOH + SDS** → डीएनए एवं प्रोटीन को विकृत करना; गुणसूत्रीय डीएनए लंबे विकृत तंतु बन जाते हैं।
- **समाधान III (न्यूट्रलाइजेशन): पोटेशियम एसीटेट, pH ~5.5** → एसडीएस-प्रोटीन-लिपिड फ्लोकुलेंट अवक्षेप; जीनोमिक डीएनए पुनः एनील होता है और अवक्षेप में उलझ जाता है; **सुपरकोइल्ड प्लास्मिड** घुलनशील रहता है।

चरण:

1. पेलेट कोशिकाएं; **सोलन I में पुनः निलंबित** (RNase A सम्मिलित)।
2. **सोलन II** डालें ; धीरे से पलटें (कोई भंवर नहीं) 2-3 मिनट।
3. **सोलन III** डालें ; उलटें; बर्फ पर 10 मिनट तक रखें।
4. स्पिन; **स्पष्ट सतह पर तैरनेवाला स्थानांतरण** .
5. **सिलिका स्तंभ** से बंधित करें या **आइसोप्रोपेनॉल के साथ अवक्षेपित करें** ।
6. 70% EtOH धोएँ; 30-50 µL में घोलें।

नुकसान: विश्लेषण के बाद अत्यधिक मिश्रण से जीनोमिक डीएनए सतह पर तैरने वाले पदार्थ में बदल जाता है → "जीडीएनए संदूषण"।

जे. दीर्घ-पठन अनुक्रमण के लिए उच्च-आणविक-भार (एचएमडब्ल्यू) डीएनए

- **कोमल लिसिस** (कोई भंवर नहीं), चौड़े बोर युक्तियां, **लंबे प्रोटीनेज के** पाचन का प्रयोग करें ।
- **एगरोज़ प्लग** या **सॉल्टिंग-आउट कोमल स्पूलिंग** ।
- **बीड को न पीटें** ; फ्रीज-थॉ से बचें; कम नमक वाले बफर में निकालें; 4 डिग्री सेल्सियस पर अल्पावधि के लिए भंडारित करें।

---

6) गुणवत्ता नियंत्रण (परीक्षा में क्या रिपोर्ट करना है)

- **सांद्रता:** A260 (1 AU ≈ 50 µg/mL dsDNA)। दूषित पदार्थों की उपस्थिति में फ्लोरोमेट्री (क्यूबिट) अधिक सटीक होती है।
- **शुद्धता अनुपात:**
  - **A260/280:** शुद्ध डीएनए के लिए ~1.8 (प्रोटीन/फिनोल बढ़ता या घटता है)।
  - **A260/230:** 2.0–2.2 आदर्श (निम्न मान = लवण, गुआनिडिनियम, कार्बोहाइड्रेट, फेनोलिक्स)।
- **अखंडता:** 0.8-1% एगरोज़ जेल; एचएमडब्लू जीडीएनए = न्यूनतम स्मीयरिंग के साथ उच्च आणविक बैंड; प्लास्मिड सुपरकोइल्ड/निक्ड रूप दिखाता है।
- **कार्यात्मक परीक्षण:** पीसीआर या प्रतिबंध डाइजेस्ट।

---

7) सामान्य समस्याएँ और समाधान (तेज़ समस्या निवारण)

- **कम प्राप्ति**

- अपूर्ण लिसिस → ऊष्मायन में वृद्धि, लाइसोजाइम/जाइमोलीज़, बीड-मिल (गैर-एचएमडब्लू) जोड़ें।
- अतिभारित स्तंभ → विभाजित नमूना या उच्च क्षमता वाली किट का उपयोग करें।
- इथेनॉल/आइसोप्रोपेनॉल बहुत गर्म → ठंडा करें; सोडियम एसीटेट (0.3 M अंतिम) डालें।

- **डीएनए शियरिंग (जेल पर धब्बा)**
  - लिसिस के बाद भंवर से बचें; धीरे-धीरे पिपेट करें; चौड़े बोर वाले टिप का उपयोग करें; नमूनों को ठंडा रखें।
  - एचएमडब्लू के लिए: कोई बीड-बीटिंग नहीं; स्थानान्तरण न्यूनतम करें।
- **प्रोटीन संदूषण (A260/280 < 1.7)**
  - लम्बा प्रोटीनेज़ K; एक अतिरिक्त फिनोल:क्लोरोफॉर्म चरण या एक अतिरिक्त धुलाई।
- **नमक/चाओट्रोप कैरीओवर (A260/230 < 1.8)**
  - अतिरिक्त 70% EtOH धुलाई; विलायक गंध समाप्त होने तक गोली को सुखाएं; मोतियों पर पुनः शुद्धिकरण करें।
- **आरएनए संदूषण (जेल धुंध; A260 फुलाया हुआ)**
  - **RNase A** डालें , 37 °C पर 15-30 मिनट तक।
- **पादप पॉलीसेकेराइड/पॉलीफेनोल्स**
  - **CTAB + β-ME** का प्रयोग करें ; पॉलीफेनोल्स को बांधने के लिए PVP (1-2%) जोड़ें; अधिक क्लोरोफॉर्म वॉश।
- **फिनोल कैरीओवर**
  - केवल क्लोरोफॉर्म से सफाई करें; फेज-लॉक जेल ट्यूब से मदद मिलेगी; इंटरफेस को छूने से बचें।
- **पीसीआर अवरोध (डीएनए साफ़ लेकिन पीसीआर विफल)**
  - हेपरिनिज्ड रक्त, ह्यूमिक अम्ल, अवशिष्ट इथेनॉल/गुआनिडिनियम। पूर्णतः सुखाना सुनिश्चित करें; डीएनए को 1:10 के अनुपात में तनु करें; पीसीआर में बीएसए मिलाएँ।

---

8) सुरक्षा और अच्छे अभ्यास

- फिनोल और क्लोरोफॉर्म विषैले/संक्षारक हैं: धुआँ हुड, दस्ताने, आँखों की सुरक्षा।
- जैविक कचरे का उचित तरीके से निपटान करें।
- **डीएनएस-मुक्त प्लास्टिक और घोल का** उपयोग करें ; बेंचों को 70% EtOH या 0.5% ब्लीच से साफ करें (फिर बेअसर करें)।
- स्पष्ट रूप से लेबल करें; पुनरुत्पादन के लिए लॉट संख्या पर नज़र रखें।

---

9) भंडारण और स्थिरता

- **अल्पावधि (दिन-सप्ताह): TE** में 4 °C (EDTA DNAses से सुरक्षा करता है)।
- **दीर्घकालिक:** -20 °C या -80 °C; बार-बार जमने-पिघलने (एलिकोट) से बचें।
- संवेदनशील डाउनस्ट्रीम एंजाइम प्रतिक्रियाओं के लिए, **10 mM ट्रिस-एचसीएल पीएच 8.5** (कोई EDTA नहीं) में एल्यूट करें।

---

10) उपयोग के लिए तैयार बफर रेसिपी (याद रखने योग्य)

- **टीई बफर:** 10 मिमी ट्रिस-एचसीएल पीएच 8.0, 1 मिमी ईडीटीए।
- **जीनोमिक लाइसिस बफर:** 100 mM ट्रिस-एचसीएल पीएच 8.0, 10 mM EDTA, 100-200 mM NaCl, 1% एसडीएस।
- **सीटीएबी बफर (पौधे):** 2% सीटीएबी, 100 एमएम ट्रिस-एचसीएल पीएच 8.0, 20 एमएम ईडीटीए, 1.4 एम NaCl, 0.2% β-एमई (ताजा)।
- **क्षारीय लाइसिस समाधान (प्लास्मिड):**
  - घोल I: 50 mM ग्लूकोज, 25 mM ट्रिस-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA + RNase A.
  - घोल II: 0.2 एन NaOH, 1% एसडीएस (ताजा)।
  - घोल III: 3 एम पोटेशियम एसीटेट, पीएच 5.5 (≈ 60 एमएल5 एम KOAc + 11.5 एमएल ग्लेशियल एसिटिक एसिड + 28.5 एमएल पानी)।

---

11) परीक्षा-शैली तुलना (तेज़ तालिका)

तरीका	नमूना प्रकार	पवित्रता	रफ़्तार	खतरों	विशिष्ट उपयोग
फिनोल-क्लोरोफॉर्म	अधिकांश	****	**	रासायनिक	उच्चतम शुद्धता, विरासत स्वर्ण मानक
नमक डालना	रक्त, ऊतक	***	**	कम	सुरक्षित, कक्षाएँ/क्लिनिक
सिलिका स्तंभ	अधिकांश	***	****	कम	नियमित पीसीआर/एनजीएस/क्लोनिंग
चुंबकीय मोती (एसपीआरआई)	अधिकांश	***	****	कम	सफाई/आकार चयन, स्वचालन
सीटीएबी	पौधे	***	**	मध्यम	पॉलीसैकेराइड वाले पादप जीनोम
चेलेक्स	फोरेंसिक स्वैब	**	****	कम	तीव्र पीसीआर-तैयार डीएनए (दीर्घकालिक के लिए नहीं)

(सितारे: अधिक बेहतर है.)

---

12) मिनी-प्रोटोकॉल जिन्हें आप आरेख में चित्रित कर सकते हैं

- **सामान्य जीडीएनए:** लाइज़ (एसडीएस/प्रोटके) → एक्सट्रेक्ट/बाइंड → वाश (70% ईटीओएच) → एल्यूट (टीई) → क्यूसी।
- **प्लास्मिड:** पुनःनिलंबित (RNase) → क्षारीय विश्लेषण → उदासीनीकरण/साफ़ करना → स्तंभ बांधना → धोना → निस्सारण।
- **प्लांट (CTAB):** क्रायोग्राइंड → CTAB 65 °C → क्लोरोफॉर्म → आइसो-प्रोपेनॉल → वाश → TE+RNase.

---

13) नमूना मौखिक प्रश्न (स्पष्ट संकेतों के साथ)

1. **EDTA क्यों?** चेलेट Mg^{2+} → DNAses को बाधित करता है।
2. **A260/280 ≈ 1.8 क्यों?** प्रोटीन 280 पर अवशोषित होता है; न्यूक्लिक अम्ल 260 पर।
3. **पौधों के लिए CTAB क्यों?** पॉलीसैकेराइड्स को जटिल बनाता है; उच्च NaCl CTAB-DNA को घुलनशील बनाए रखता है।
4. **हेपरिनयुक्त रक्त समस्या?** हेपरिन Taq को रोकता है; EDTA ट्यूब पसंद करें।

5. **वोर्टेक्सिंग से कब बचें?** क्षारीय विश्लेषण के बाद और HMW DNA के लिए (कतरनी को रोकने के लिए)।
6. **गर्म निक्षालन क्यों?** सिलिका (60 °C) से पुनर्प्राप्ति में सुधार करता है।

जीवित कोशिका में डीएनए का प्रवेश

जीवित कोशिकाओं में डीएनए का प्रवेश

1. अर्थ और महत्व

जीवित कोशिकाओं में विदेशी डीएनए को प्रवेश कराने की प्रक्रिया को **डीएनए स्थानांतरण, अभिसरण या रूपांतरण (मेजबान प्रणाली पर निर्भर करता है)** कहा जाता है । यह **आनुवंशिक इंजीनियरिंग** और **पुनः संयोजक डीएनए तकनीक** का केंद्रीय चरण है क्योंकि विदेशी डीएनए के कोशिका में प्रवेश करने के बाद ही उसे **बनाए रखा जा सकता है, व्यक्त किया जा सकता है और विरासत में प्राप्त किया जा सकता है** ।

- **प्रोकैरियोटिक संदर्भ:** डीएनए के अवशोषण को **रूपांतरण कहा जाता है** ।
- **यूकेरियोटिक संदर्भ: इसे** अक्सर **ट्रांसफ़ेक्शन** (गैर-वायरल) या **ट्रांसडक्शन** (वायरस के माध्यम से) कहा जाता है।
- **उद्देश्य:** जीन कार्य का अध्ययन करना, प्रोटीन को अभिव्यक्त करना, आनुवंशिक रूप से संशोधित जीव (जीएमओ) बनाना और चिकित्सा विकसित करना।

---

2. सफल डीएनए परिचय के लिए आवश्यकताएँ

1. **वाहक डीएनए/वेक्टर** → प्लाज्मिड, फेज, कृत्रिम गुणसूत्र, वायरल जीनोम।
2. **सक्षम मेजबान कोशिकाओं** → को डीएनए अवशोषण के लिए ग्रहणशील (सक्षम) बनाया जाना चाहिए।
3. **वितरण विधि** → भौतिक, रासायनिक या जैविक विधि।
4. **चयन और अभिव्यक्ति प्रणाली** → मार्कर जीन (एंटीबायोटिक प्रतिरोध, जीएफपी) अवशोषण की पुष्टि करने के लिए।

---

3. कोशिकाओं में डीएनए प्रवेश की विधियाँ

A. प्रोकैरियोटिक कोशिकाओं (मुख्यतः बैक्टीरिया) में

(i) प्राकृतिक परिवर्तन

- कुछ बैक्टीरिया (जैसे, *स्ट्रेप्टोकोकस न्यूमोनिया* , *बैसिलस सबटिलिस*) स्वाभाविक रूप से अपने वातावरण से डीएनए लेते हैं।
- इसमें सतही डीएनए-बाइंडिंग प्रोटीन और डीएनए ट्रांसपोर्टर शामिल हैं।
- **क्षैतिज जीन स्थानांतरण** और **विकास** के लिए जैविक रूप से महत्वपूर्ण ।

(ii) कृत्रिम/प्रेरित परिवर्तन

पुनः संयोजक डीएनए प्रयोगों में व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है।

1. **रासायनिक विधि (कैल्शियम क्लोराइड विधि):**
    - **$CaCl_2$** से उपचारित जीवाणु कोशिकाएं → डीएनए और झिल्ली पर ऋणात्मक आवेशों को न िष्क्रिय कर देती हैं।
    - **हीट शॉक (लगभग 1 मिनट के लिए 42 °C)** छिद्र बनाता है → प्लास्मिड डीएनए कोशिका में प्रवेश करता है।
    - सरल, सस्ता, नियमित क्लोनिंग के लिए उपयुक्त।
2. **इलेक्ट्रोपोरेशन:**
    - लघु विद्युत स्पंद जीवाणु झिल्ली में क्षणिक छिद्र उत्पन्न करता है।
    - वैद्युतकणसंचलन के कारण डीएनए अंदर चला जाता है।
    - उच्च दक्षता, बड़े प्लास्मिड के लिए उपयोग किया जाता है।
3. **अन्य विधियाँ:**
    - **लिपोसोम-मध्यस्थता वितरण** (बैक्टीरिया के लिए दुर्लभ)।
    - **संयुग्मन-आधारित वेक्टर** (प्लास्मिड का संचलन)।

बी. यूकेरियोटिक कोशिकाओं में

(i) भौतिक विधियाँ

1. **माइक्रोइंजेक्शन:**
    - एक महीन कांच की सुई का उपयोग करके नाभिक या कोशिकाद्रव्य में डीएनए का सीधा इंजेक्शन।
    - बहुत सटीक लेकिन कम थ्रूपुट; अण्डाणुओं, भ्रूणों, ट्रांसजेनिक जानवरों में उपयोग किया जाता है।
2. **इलेक्ट्रोपोरेशन:**
    - विद्युत क्षेत्र प्लाज्मा झिल्ली में अस्थायी छिद्र उत्पन्न करता है।
    - डीएनए प्रवेश करता है और अभिव्यक्त होता है।
    - स्तनधारी कोशिकाओं, पौधों के प्रोटोप्लास्ट के लिए सामान्य।
3. **कण बमबारी (बायोलिस्टिक्स / जीन गन):**
    - **सोने या टंगस्टन सूक्ष्म कणों** पर लेपित डीएनए .
    - पौधे या पशु ऊतकों में उच्च-वेग से गोली मारी गई ।
    - **पादप आनुवंशिक इंजीनियरिंग** में व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है ।

(ii) रासायनिक विधियाँ

1. **कैल्शियम फॉस्फेट अवक्षेपण:**
   - डीएनए कैल्शियम फॉस्फेट क्रिस्टल के साथ अवक्षेपित होता है → एंडोसाइटोसिस द्वारा कोशिकाओं में प्रवेश करता है।
   - प्रारंभिक स्तनधारी कोशिका ट्रांसफ़ेक्शन विधियों में से एक।
2. **डीईएई-डेक्सट्रान विधि:**
   - धनात्मक आवेशित बहुलक ऋणात्मक आवेशित डीएनए को बांधता है → कोशिकाओं द्वारा आंतरिककृत।
   - अल्पकालिक अभिव्यक्ति, मुख्य रूप से क्षणिक परख के लिए उपयोग किया जाता है।
3. **लिपोसोम-मध्यस्थता स्थानांतरण (लिपोफ़ेक्शन):**
   - कृत्रिम लिपिड पुटिकाओं में संपुटित डीएनए।
   - लाइपोसोम कोशिका झिल्ली के साथ जुड़ जाते हैं → डीएनए कोशिकाद्रव्य में मुक्त हो जाता है।
   - लोकप्रिय, गैर विषैले, कुशल।

(iii) जैविक विधियाँ

1. **वायरल वेक्टर (ट्रांसडक्शन):**
   - संशोधित वायरस (रेट्रोवायरस, एडेनोवायरस, लेंटिवायरस) विदेशी जीन को मेज़बान जीनोम या कोशिकाद्रव्य में ले जाते हैं।
   - अत्यधिक कुशल, **जीन थेरेपी** और स्थिर कोशिका लाइन निर्माण में उपयोग किया जाता है।
2. **एग्रोबैक्टीरियम-मध्यस्थता स्थानांतरण (पौधे):**
   - *एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमेफैसिएन्स अपने टीआई प्लास्मिड से* **टी-डीएनए को** पादप कोशिकाओं में स्थानांतरित करता है ।
   - पौधों का प्राकृतिक आनुवंशिक इंजीनियर; ट्रांसजेनिक फसलों के निर्माण में उपयोग किया जाता है।

---

4. डीएनए अवशोषण को प्रभावित करने वाले कारक

- **डीएनए का आकार:** छोटे प्लास्मिड अधिक कुशलता से रूपान्तरित होते हैं।
- **मेजबान कोशिका अवस्था:** सक्रिय रूप से बढ़ने वाली कोशिकाएं अधिक सक्षम होती हैं।
- **आयनिक वातावरण:** द्विसंयोजी धनायन (Ca^{2+}, Mg^{2+}) आवेश प्रतिकर्षण को बेअसर करने में मदद करते हैं।
- **वितरण की शर्तें:** वोल्टेज (इलेक्ट्रोपोरेशन में), कण आकार (बायोलिस्टिक्स में), लिपोसोम संरचना, आदि।
- **चयन प्रणाली:** परिवर्तनकों की पहचान करने के लिए मार्करों की उपस्थिति।

---

5. डीएनए के अनुप्रयोग परिचय

1. **बुनियादी अनुसंधान:**
    - जीन कार्य और विनियमन का अध्ययन करना।
    - रिपोर्टर निर्माण (जैसे, GFP-फ्यूजन) बनाना।
2. **जैव प्रौद्योगिकी एवं चिकित्सा:**
    - पुनः संयोजक प्रोटीन (इंसुलिन, टीके) का उत्पादन.
    - जीन थेरेपी (दोषपूर्ण जीन को ठीक करना)।
    - मोनोक्लोनल एंटीबॉडी उत्पादक कोशिकाओं का विकास।
3. **कृषि:**
    - **ट्रांसजेनिक फसलों** (बीटी कपास, गोल्डन राइस) का उत्पादन ।
    - प्रतिरोधी गुणों (शाकनाशी, कीट, तनाव सहिष्णुता) का परिचय।
4. **पशु जैव प्रौद्योगिकी:**
    - रोग मॉडल के लिए ट्रांसजेनिक चूहों, ज़ेब्राफिश आदि का निर्माण।
    - दूध/अण्डों में औषधीय दृष्टि से मूल्यवान प्रोटीन का उत्पादन।

---

6. निष्कर्ष

जीवित कोशिकाओं में शुद्ध डीएनए का प्रवेश आणविक जीव विज्ञान और जैव प्रौद्योगिकी की आधारशिला है।

- **बैक्टीरिया** में कैल्शियम क्लोराइड रूपांतरण और इलेक्ट्रोपोरेशन जैसी विधियों का उपयोग किया जाता है।
- **पौधों** में *एग्रोबैक्टीरियम* और जीन गन विधियां हावी हैं ।
- **पशुओं/मनुष्यों** में , लिपोफ़ेक्शन, इलेक्ट्रोपोरेशन और वायरल वेक्टर का व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है।

इस प्रौद्योगिकी ने **आनुवंशिक इंजीनियरिंग, जीन थेरेपी और फसल सुधार को संभव बनाया है, जिससे अनुसंधान, चिकित्सा और कृषि में** मौलिक परिवर्तन आया है ।

प्लाज्मिड

1 परिचय

प्लास्मिड एक **छोटा, गोलाकार, द्वि-रज्जुकी डीएनए अणु होता है जो** बैक्टीरिया और कुछ निम्न यूकेरियोट्स में पाया जाता है। गुणसूत्रीय डीएनए के विपरीत, प्लास्मिड **गुणसूत्रेतर** (मुख्य जीनोम से अलग) और **स्व-प्रतिकृति होते हैं** ।

- वे सामान्य परिस्थितियों में **जीवित रहने के लिए आवश्यक नहीं हैं, लेकिन वे अक्सर चुनिंदा लाभ प्रदान करते ह** ðó , जैसे कि एंटीबायोटिक प्रतिरोध, विषाणुता, या चयापचय कार्य।

- जैव प्रौद्योगिकी में, प्लास्मिड का उपयोग व्यापक रूप से **क्लोनिंग वेक्टर के रूप में किया जाता है** , ताकि मेजबान कोशिकाओं में विदेशी डीएनए को प्रवेश कराया जा सके।

---

2. प्लास्मिड की खोज

- एक्स्ट्राक्रोमोसोमल डीएनए की अवधारणा पहली बार **1950 के दशक में प्रस्तावित की गई थी** ।
- **"प्लास्मिड"** शब्द **जोशुआ लेडरबर्ग (1952)** द्वारा गढ़ा गया था ।
- बाद में अनुसंधान से पता चला कि कई प्लास्मिड **एंटीबायोटिक प्रतिरोध जीन ले जाते हैं, जिससे आर -प्लास्मिड (प्रतिरोध प्लास्मिड)** की अवधारणा सामने आई ।
- 1970 के दशक तक , प्लास्मिड **पुनः संयोजक डीएनए प्रौद्योगिकी में केंद्रीय उपकरण बन गए** (कोहेन और बॉयर, 1973)।

---

3. प्लास्मिड के सामान्य गुण

1. **संरचना**
    - अधिकतर **गोलाकार** , दोहरे-रज्जुक वाला डी.एन .ए .
    - आकार सीमा: **1 केबी से >200 केबी तक** ।
    - **सुपरकोइल्ड** , रिलैक्स्ड या रैखिक रूपों में मौजूद हैं ।
2. **प्रतिलिपि संख्या**
    - **उच्च प्रतिलिपि प्लास्मिड:** प्रति कोशिका सैकड़ों प्रतियां (उदाहरणार्थ, ColE1)।
    - **निम्न-प्रतिलिपि प्लास्मिड:** प्रति कोशिका 1-5 प्रतियां (उदाहरणार्थ, एफ प्लास्मिड)।
    - प्रतिलिपि संख्या **प्रतिकृति के मूल (ori) पर निर्भर करती है** ।
3. **स्वायत्त प्रतिकृति**
    - प्रत्येक प्लास्मिड में **प्रतिकृति का एक मूल होता है** → गुणसूत्र से स्वतंत्र स्व-प्रतिकृति की अनुमति देता है।
4. **गतिशीलता**
    - कुछ प्लास्मिड **संयुग्मन** (स्व-संचारी प्लास्मिड) के माध्यम से बैक्टीरिया के बीच स्थानांतरित हो सकते हैं।
    - अन्य **गैर-मोबिलाइज़ेबल हैं** ।

---

4. प्लास्मिड के प्रकार (कार्य के आधार पर)

1. **प्रजनन क्षमता (F) प्लास्मिड**
    - इसमें संयुग्मन के माध्यम से बैक्टीरिया के बीच प्लास्मिड के स्थानांतरण के लिए जिम्मेदार **ट्रा जीन होते हैं।**

- *ई. कोलाई* में एफ प्लाज्मिड .

2. **प्रतिरोध (R) प्लास्मिड**
   - एंटीबायोटिक्स या विषाक्त धातुओं के प्रति प्रतिरोध के जीन होते हैं।
   - अस्पतालों में **एंटीबायोटिक प्रतिरोध फैलने** में योगदान ।
3. **कोल (कोलिसिनॉजेनिक) प्लास्मिड**
   - बैक्टीरियोसिन (अन्य बैक्टीरिया के लिए विषाक्त प्रोटीन) का उत्पादन करें।
   - उदाहरण: ColE1 प्लाज्मिड.
4. **विषाणु प्लास्मिड**
   - इनमें ऐसे जीन होते हैं जो बैक्टीरिया को रोगजनक बनाते हैं।
   - *एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमेफैसिएन्स* का टीआई प्लास्मिड (पौधों में क्राउन गॉल रोग का कारण बनता है)।
5. **चयापचय प्लास्मिड**
   - असामान्य चयापचय पथों (जैसे, टोल्यूनि, कपूर, हाइड्रोकार्बन का अपघटन) के लिए एंजाइमों को एनकोड करें।
   - **जैव उपचार** में महत्वपूर्ण .

---

5. आनुवंशिक इंजीनियरिंग में वेक्टर के रूप में प्लास्मिड

प्लास्मिड **सबसे व्यापक रूप से उपयोग किए जाने वाले क्लोनिंग वेक्टर हैं** , क्योंकि:

- छोटा आकार (संचालन में आसान)।
- उच्च प्रतिलिपि संख्या (डीएनए का प्रवर्धन)।
- **चयन योग्य मार्कर जीन** (एंटीबायोटिक प्रतिरोध, रिपोर्टर जीन) शामिल हैं ।
- अद्वितीय प्रतिबंध साइटों के साथ कई क्लोनिंग साइटों (एमसीएस) का निर्माण किया गया।

एक आदर्श प्लास्मिड वेक्टर की विशेषताएं

1. **प्रतिकृति की उत्पत्ति (ori)** → मेजबान कोशिका में प्रतिकृति सुनिश्चित करता है।
2. **चयन योग्य मार्कर** → एंटीबायोटिक प्रतिरोध जीन (एम्पीसिलीन, कैनामाइसिन)।
3. **बहु क्लोनिंग साइट (एमसीएस/पॉलीलिंकर)** → विदेशी डीएनए के सम्मिलन के लिए अद्वितीय प्रतिबंध साइटें।
4. **छोटा आकार** → हेरफेर को आसान बनाता है।
5. **उच्च प्रतिलिपि संख्या** → पुनः संयोजक डीएनए की बड़ी मात्रा उत्पन्न करती है।
6. **रिपोर्टर जीन** (उदाहरण के लिए, ब्लू-व्हाइट स्क्रीनिंग के लिए lacZ, GFP)।

सामान्यतः प्रयुक्त प्लास्मिड वेक्टर के उदाहरण

- **pBR322:** पहला व्यापक रूप से प्रयुक्त क्लोनिंग वेक्टर, *ampR* और *tetR को वहन करता है*।

- **pUC श्रृंखला (जैसे, pUC18, pUC19):** उच्च-प्रतिलिपि, lacZ रिपोर्टर, आधुनिक प्रयोगशालाओं में व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है।
- **टीआई प्लास्मिड (एग्रोबैक्टीरियम):** पादप आनुवंशिक इंजीनियरिंग में उपयोग किया जाता है।

---

6. प्लास्मिड के अनुप्रयोग

1. **चिकित्सा जैव प्रौद्योगिकी**
   - पुनः संयोजक प्रोटीन (इंसुलिन, वृद्धि हार्मोन, इंटरफेरॉन) का उत्पादन।
   - टीकों का विकास (हेपेटाइटिस बी, कोविड-19 डीएनए टीके)।
   - जीन थेरेपी वेक्टर.
2. **कृषि**
   - टीआई प्लास्मिड का उपयोग **ट्रांसजेनिक फसलों** (बीटी कपास, गोल्डन राइस) के उत्पादन के लिए किया जाता है।
   - कीटों, रोगों और शाकनाशियों के प्रति प्रतिरोध।
3. **पर्यावरण जैव प्रौद्योगिकी**
   - प्रदूषकों के अपघटन के लिए उपापचयी जीन वाले प्लास्मिड का उपयोग करके जैव-उपचार।
4. **अनुसंधान**
   - क्लोनिंग, अनुक्रमण, उत्परिवर्तन, प्रमोटर अध्ययन और अभिव्यक्ति विश्लेषण के लिए वेक्टर के रूप में उपयोग किया जाता है।

---

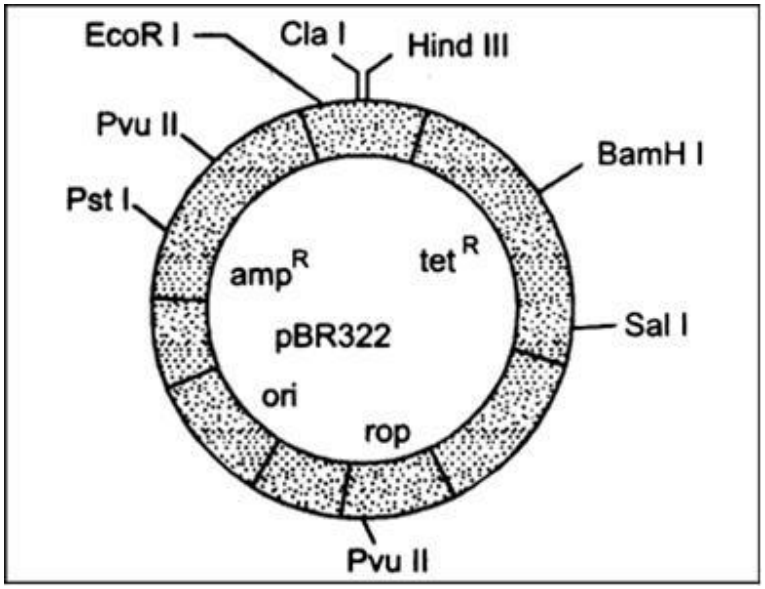
7. निष्कर्ष

प्लास्मिड **बहुमुखी एक्स्ट्राक्रोमोसोमल डीएनए अणु हैं** जो न केवल बैक्टीरिया के प्राकृतिक अनुकूलन में महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं, बल्कि **आनुवंशिक इंजीनियरिंग में भी शक्तिशाली उपकरण के रूप में काम करते हैं** । उनकी खोज ने जैव प्रौद्योगिकी में क्रांति ला दी, जिससे वैज्ञानिकों को पुनः संयोजक डीएनए अणु और आनुवंशिक रूप से संशोधित जीव बनाने में मदद मिली, जिनका चिकित्सा, कृषि, उद्योग और अनुसंधान में व्यापक अनुप्रयोग है।

युनिट 2 क्लोनिंग के लिए वेक्टर

क्लोनिंग वेक्टर: पीबीआर 322, बैक्टीरियोफेज, कॉस्मिड, फेजमिड, शटल वेक्टर

क्लोनिंग वेक्टर: PBR 322



pBR322 आनुवंशिक इंजीनियरिंग में प्रयुक्त एक सिंथेटिक प्लास्मिड क्लोनिंग वेक्टर है, जो व्यापक रूप से प्रयुक्त होने वाले पहले कृत्रिम वेक्टरों में से एक होने के कारण उल्लेखनीय है। यह लगभग 4,361 क्षार युग्मों वाला एक वृत्ताकार डीएनए अणु है, जिसमें जीवाणु प्रतिकृति के लिए प्रतिकृति का मूल (ori) और दो प्रमुख चयन योग्य मार्कर होते हैं: एम्पीसिलीन (ampR) और टेट्रासाइक्लिन (tetR) के प्रति प्रतिरोध प्रदान करने वाले जीन। ये मार्कर रूपांतरित जीवाणुओं की पहचान करने में सक्षम बनाते हैं, जबकि कई प्रतिबंधन स्थल विदेशी डीएनए के सम्मिलन की अनुमति देते हैं।

प्रमुख घटक और कार्य

- **नाम:**

  "p" का अर्थ प्लास्मिड है, और "BR" दो शोधकर्ताओं, फ्रांसिस्को बोलिवर और रेमंड एल. रोड्रिगेज के नामों से आया है, जिन्होंने 1977 में इसे संश्लेषित किया था। संख्या "322" इसे उनकी प्रयोगशाला में बनाए गए अन्य प्लास्मिडों से अलग करती है।

- **प्रतिकृति की उत्पत्ति (ori) :**

  यह अनुक्रम मेजबान कोशिका के भीतर डीएनए प्रतिकृति आरंभ करने के लिए आवश्यक है, जिससे मेजबान के डीएनए के साथ प्लास्मिड को प्रवर्धित किया जा सके।

- **चयन योग्य मार्कर :**

- **एम्पीसिलीन प्रतिरोध (ampR) :** एक जीन जो एंटीबायोटिक एम्पीसिलीन के प्रति प्रतिरोध प्रदान करता है।

- **टेट्रासाइक्लिन प्रतिरोध (tetR) :** एक जीन जो एंटीबायोटिक टेट्रासाइक्लिन के प्रति प्रतिरोध प्रदान करता है।

प्रतिबंध एंजाइम साइटें:

pBR322 में विभिन्न प्रतिबंधन एंजाइमों द्वारा पहचाने जाने वाले अनेक स्थल होते हैं, जो प्लास्मिड में विदेशी डीएनए को प्रविष्ट करने के लिए लचीलापन प्रदान करते हैं।

क्लोनिंग और चयन की क्रियाविधि

1. **1. प्रतिबंध पाचन:**

   प्लास्मिड को एक प्रतिबंधन एंजाइम का उपयोग करके काटा जाता है, जो प्रायः एंटीबायोटिक प्रतिरोध जीनों में से एक (जैसे, tetR जीन) के भीतर होता है।

2. **2. बंधाव:**

   इच्छित जीन को डीएनए लाइगेज का उपयोग करके कटे हुए प्लास्मिड में डाला जाता है, जो डीएनए टुकड़ों को सील कर देता है।

3. **3. परिवर्तन:**

   पुनः संयोजक प्लास्मिड को मेजबान जीवाणु कोशिका (आमतौर पर ई. कोलाई) में प्रविष्ट कराया जाता है।

4. **4. चयन:**

- **सम्मिलन निष्क्रियण :** जब एक विदेशी जीन को टेटआर जीन में डाला जाता है, तो प्लास्मिड अब टेट्रासाइक्लिन प्रतिरोध (सम्मिलन निष्क्रियण) प्रदान करने में सक्षम नहीं होता है।
- **ट्रांसफॉर्मेंट्स का चयन:**
- **एम्पीसिलीन और टेट्रासाइक्लिन दोनों के प्रति प्रतिरोधी ट्रांसफॉर्मेंट** : गैर-पुनः संयोजक होते हैं (इन्सर्ट के बिना मूल प्लास्मिड होते हैं)।
- **एम्पीसिलीन के प्रति प्रतिरोधी लेकिन टेट्रासाइक्लिन के प्रति संवेदनशील ट्रांसफॉर्मेंट** : पुनः संयोजक होते हैं (टेट्रआर जीन में प्रविष्ट विदेशी डीएनए होते हैं)।

महत्व और सीमाएँ

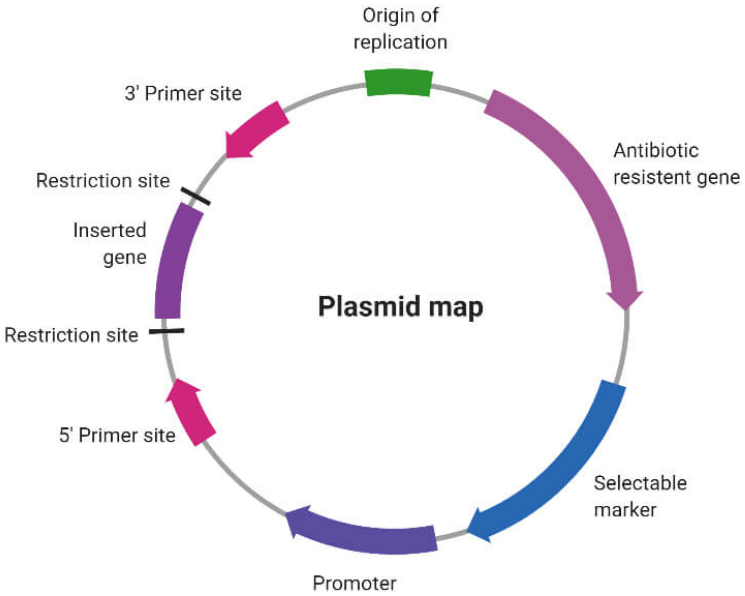
- **लाभ:**

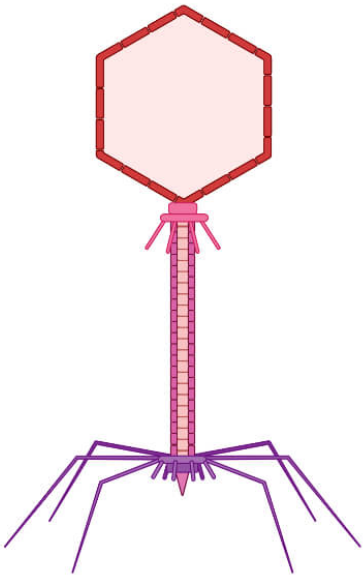
  pBR322 का छोटा आकार, परिभाषित अनुक्रम, दो चयन योग्य मार्कर, तथा ई. कोली में प्रतिकृति बनाने की क्षमता ने इसे क्लोनिंग और पुनः संयोजक डीएनए अनुसंधान के लिए एक मौलिक उपकरण बना दिया।

- **नुकसान:**

चयन के अभाव में यह अस्थिरता प्रदर्शित करता है और इसकी डीएनए वहन क्षमता अपेक्षाकृत कम होती है। इनमें से कुछ सीमाओं को दूर करने के लिए बाद के संस्करण और व्युत्पन्न वेक्टर विकसित किए गए।

जीवाणुभोजी





प्लास्मिड की क्षमता से परे बड़े टुकड़ों को ले जाने और बढ़ाने के लिए कुशल क्लोनिंग वेक्टर के रूप में कार्य करते हैं। प्रमुख फेज वेक्टर, जैसे लैम्ब्डा (λ) फेज , एम13 फेज और पी1 फेज को विदेशी डीएनए के प्रवेश के लिए विशिष्ट स्थानों को समाहित करने के लिए डिज़ाइन किया गया है। इस प्रक्रिया में फेज डीएनए और विदेशी डीएनए को प्रतिबंधक एंजाइमों द्वारा पचाना, उन्हें आपस में जोड़ना और पुनः संयोजक डीएनए को संक्रामक फेज कणों में पैक करना शामिल है। ये कण फिर जीवाणु कोशिकाओं को संक्रमित

करते हैं, जिससे विदेशी डीएनए की असंख्य प्रतियाँ बनती हैं, जिन्हें जीवाणु लॉन पर पट्टिकाओं की पहचान करके आसानी से पहचाना जा सकता है।

प्रमुख विशेषताएँ और लाभ

- **बड़ी डालने की क्षमता** :

  अधिकांश प्लास्मिडों की तुलना में फेज काफी बड़े डीएनए सम्मिलन को समायोजित कर सकते हैं, जिससे वे जीनोमिक डीएनए के बड़े टुकड़ों के क्लोनिंग के लिए आदर्श बन जाते हैं।

- **उच्च संक्रमण दक्षता** :

  फेज जीवाणु कोशिकाओं को संक्रमित करने में अत्यधिक कुशल होते हैं, जिसके परिणामस्वरूप अधिक संख्या में सफल जीन स्थानांतरण संभव होता है।

- **संचालन में आसानी** :

  एक बार पुनः संयोजक डीएनए को संक्रामक फेज कणों में पैक कर दिया जाए, तो उन्हें अधिक कुशलता से संग्रहीत और प्रबंधित किया जा सकता है।

- **पट्टिका स्क्रीनिंग** :
  पुनः संयोजक फेज क्लोनों की जांच जीवाणु लॉन पर स्पष्ट क्षेत्रों (पट्टिकाओं) का अवलोकन करके आसानी से की जा सकती है, जो जीवाणु कॉलोनियों की जांच की तुलना में सफल क्लोनों की पहचान को सरल बनाता है।

फेज वेक्टर के प्रकार

- **लैम्ब्डा (λ) फेज** :

  एक सामान्य रूप से प्रयुक्त फेज वेक्टर, जिसे लक्ष्य डीएनए के साथ एक अनावश्यक "स्टफ़र" खंड को प्रतिस्थापित करके विदेशी डीएनए प्रविष्टियों को स्वीकार करने के लिए डिज़ाइन किया गया है। यह लगभग 25 केबी तक के प्रविष्टियों को संभाल सकता है।

- **एम13 फेज** :

  एकल-रज्जुक डीएनए फेज का उपयोग क्लोनिंग और अनुक्रमण के लिए किया जाता है, जो विशेष रूप से एकल-रज्जुक डीएनए टेम्पलेट्स उत्पन्न करने के लिए उपयोगी है।

- **पी1 फेज** :
  एक अन्य प्रकार का फेज वेक्टर जो λ फेज से भी बड़े डीएनए सम्मिलन को ले जा सकता है।

कार्रवाई की प्रणाली

1. 1. **तैयारी** :

   फेज वेक्टर डीएनए और विदेशी डीएनए को एक ही प्रतिबंधन एंजाइम से काटा जाता है, जिससे संगत चिपचिपे सिरे बनते हैं ।

2. 2. **बंधाव** :

   विदेशी डीएनए को डीएनए लाइगेज द्वारा रैखिककृत वेक्टर डीएनए में जोड़ा जाता है।

3. 3. **पैकेजिंग** :

   पुनः संयोजक डीएनए को फिर नए फेज कणों में पैक किया जाता है। यह प्रक्रिया फेज वेक्टरों के लिए बहुत प्रभावी है।

4. 4. **संक्रमण** :

   संक्रामक फेज कणों का उपयोग जीवाणु मेजबान को संक्रमित करने के लिए किया जाता है।

5. 5. **प्रतिकृति और प्रवर्धन** :

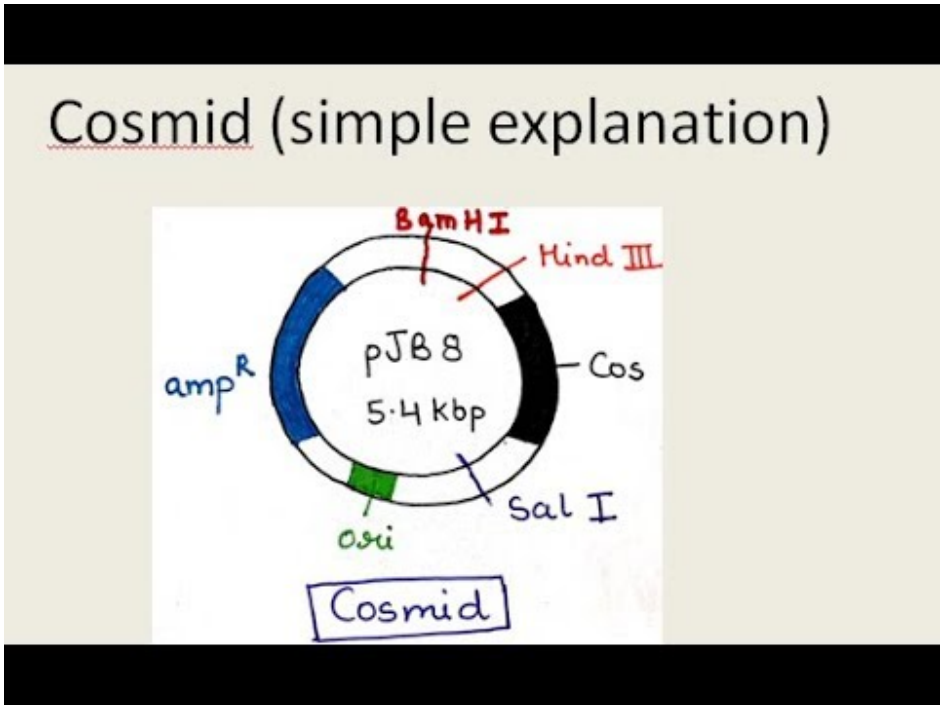
मेजबान कोशिका के भीतर, फेज की आनुवंशिक सामग्री (विदेशी डीएनए सहित) प्रतिकृति बनाती है, जिससे कई प्रतियां बनती हैं।

6. 6. **स्क्रीनिंग** :
   जीवाणु लॉन पर परिणामी पट्टिकाओं की जांच की जाती है ताकि पता लगाया जा सके कि उनमें पुनः संयोजक डीएनए मौजूद है या नहीं।

अनुप्रयोग

- **जीनोमिक लाइब्रेरी** :
  फेज वेक्टर जीनोमिक लाइब्रेरी के निर्माण के लिए महत्वपूर्ण हैं, जो किसी विशिष्ट जीव के सभी डीएनए का संग्रह होता है।
- **पित्रैक हाव भाव** :
  कुछ इंजीनियर्ड फेज अभिव्यक्ति वेक्टर के रूप में कार्य करते हैं, जो प्रोटीन के उत्पादन के लिए प्रविष्ट जीन के प्रतिलेखन और अनुवाद की अनुमति देते हैं।
- **अनुसंधान और निदान** :
  इनका उपयोग विभिन्न जैव-प्रौद्योगिकी अनुप्रयोगों में किया जाता है, जिसमें जीवाणु जीन का पता लगाना और उनमें हेरफेर करना भी शामिल है।

कॉस्मिड



कॉस्मिड एक संकर क्लोनिंग वेक्टर है जो प्लास्मिड के प्रतिकृति मूल (जीवाणु प्रतिकृति के लिए) और बैक्टीरियोफेज लैम्ब्डा के कॉस साइट्स (फेज कणों में पैकेजिंग के लिए) को मिलाता है। यह अनूठा संयोजन कॉस्मिड को बड़े डीएनए अंशों (35-45 केबी) को ले जाने और इन विट्रो पैकेजिंग और ट्रांसडक्शन के माध्यम से उन्हें जीवाणु मेजबान कोशिकाओं में कुशलतापूर्वक प्रविष्ट कराने में सक्षम बनाता है , जिससे वे जीनोमिक लाइब्रेरी बनाने के लिए आदर्श बन जाते हैं ।

प्रमुख घटक और कार्यक्षमता

- **प्लास्मिड घटक** :

  एक कॉस्मिड में प्रतिकृति का एक प्लास्मिड मूल (ओआरआई) होता है, जो इसे एक मेजबान जीवाणु के भीतर प्लास्मिड के रूप में प्रतिकृति करने की अनुमति देता है, और एक चयन योग्य मार्कर , जैसे कि एंटीबायोटिक प्रतिरोध जीन, सफलतापूर्वक रूपांतरित कोशिकाओं की जांच करने के लिए।

- **लैम्ब्डा फेज घटक** :

  कॉस्मिड की महत्वपूर्ण विशेषता लैम्ब्डा फेज कॉस साइटों का समावेश है । ये विशिष्ट अनुक्रम कॉस्मिड को, एक बार किसी विदेशी डीएनए इंसर्ट से जुड़ जाने के बाद, लैम्ब्डा फेज कणों में इन विट्रो में पैक करने में सक्षम बनाते हैं ।

- **बड़ी डीएनए क्षमता** :
  कॉस्मिड विदेशी डीएनए के बड़े आवेषण को समायोजित कर सकते हैं, आमतौर पर 35 से 45 किलोबेस जोड़े (केबी) की सीमा में, जो कि अधिकांश मानक प्लास्मिड की क्षमता से काफी बड़ा है।

  कॉस्मिड क्लोनिंग के चरण

1. 1. **बंधाव** :

   रुचिकर विदेशी डीएनए खंड को रैखिक कॉस्मिड वेक्टर में लिगेटेड किया जाता है। कॉस्मिड वेक्टर स्वयं एक रैखिककृत प्लास्मिड होता है जिसमें कॉस साइट्स और ओरी होते हैं।

2. 2. **इन विट्रो पैकेजिंग** :

   पुनः संयोजक कॉस्मिड डीएनए को फिर इन विट्रो में लैम्ब्डा फेज कणों में पैक किया जाता है।

3. 3. **पारगमन** :

   कॉस्मिड युक्त इन फेज कणों का उपयोग ई. कोलाई मेजबान कोशिकाओं को संक्रमित करने के लिए किया जाता है।

4. 4. **प्रतिकृति** :
   एक बार ई. कोलाई कोशिका के अंदर पहुंचने पर, कॉस्मिड डीएनए मुक्त हो जाता है और मेजबान की कोशिकीय मशीनरी का उपयोग करते हुए प्लास्मिड के रूप में प्रतिकृति बनाता है।

   कॉस्मिड्स के लाभ

- **कुशल जीन वितरण** :

  फेज कणों में पैकेजिंग और तत्पश्चात ट्रांसडक्शन, जीवाणु कोशिकाओं में बड़े डीएनए टुकड़ों की अत्यधिक कुशल डिलीवरी की अनुमति देता है।

- **जीनोमिक लाइब्रेरी निर्माण** :
  अपनी बड़ी डीएनए-वहन क्षमता और कुशल परिचय के कारण, कॉस्मिड विशेष रूप से जीनोमिक लाइब्रेरी के निर्माण के लिए उपयोगी होते हैं, जो कि संपूर्ण जीनोम का प्रतिनिधित्व करने वाले डीएनए टुकड़ों का संग्रह होता है।

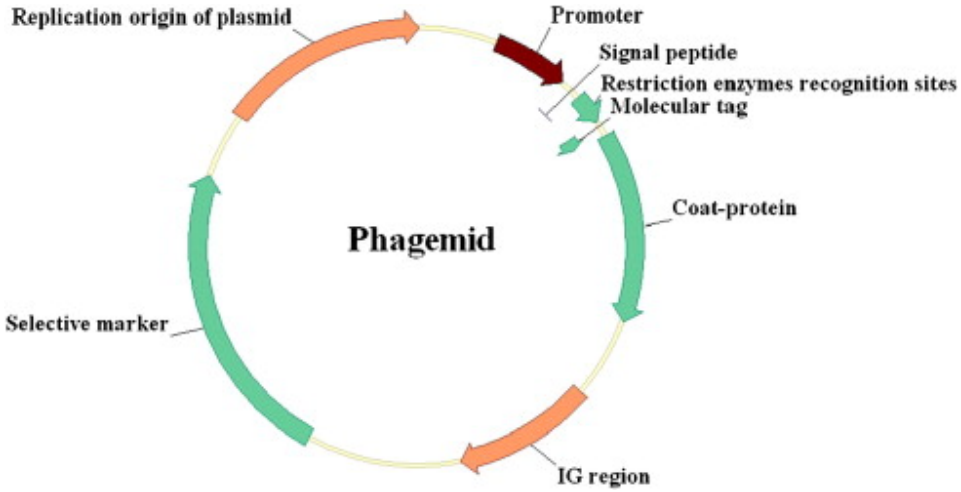
  सीमाएँ

- **केवल बड़ा सम्मिलित आकार** :

  कॉस्मिड छोटे डीएनए सम्मिलन के क्लोनिंग के लिए कम उपयुक्त हैं, और मानक प्लास्मिड जैसे अन्य वेक्टर उस उद्देश्य के लिए पसंद किए जाते हैं।

- **फेज पैकेजिंग की आवश्यकता है** :
  क्लोनिंग प्रक्रिया में एक कदम जोड़ने के लिए एक विशेष इन विट्रो पैकेजिंग प्रणाली की आवश्यकता होती है।

फेजमिड वेक्टर



---

1 परिचय

- **फेजमिड्स (फास्मिड्स) हाइब्रिड क्लोनिंग वेक्टर** हैं जो **प्लास्मिड और फिलामेंटस बैक्टीरियोफेज** (मुख्य रूप से एम 13 फेज) की विशेषताओं को मिलाते हैं।
- वे **प्लास्मिड हैं** जो ले जाते हैं:
  - *ई. कोलाई* में स्वतंत्र प्रतिकृति के लिए प्रतिकृति (ओआरआई) का एक प्लास्मिड **मूल** ।
  - जब सहायक फेज मौजूद हो तो फेज कणों में पैकेजिंग के लिए प्रतिकृति का एक **M13 फेज मूल (f1 ori)।**
- वे **बैक्टीरिया के अंदर प्लास्मिड के रूप में** और **फेज कणों के अंदर एकल-रज्जुक डीएनए (एसएसडीएनए) के रूप में प्रसार की अनुमति देते हैं** ।
- यह दोहरी प्रकृति उन्हें **डीएनए अनुक्रमण, उत्परिवर्तन और क्लोनिंग प्रयोगों में अत्यंत उपयोगी बनाती है** ।

---

2. फेजमिड की संरचना

एक विशिष्ट फेजमिड में निम्नलिखित तत्व होते हैं:

1. **प्लास्मिड घटक**
   - **ori (ColE1 ori)** → प्लास्मिड की तरह स्वायत्त प्रतिकृति की अनुमति देता है।
   - **चयन योग्य मार्कर जीन** (जैसे, *ampR* , *tetR*) → चयन के लिए एंटीबायोटिक प्रतिरोध।
   - **मल्टीपल क्लोनिंग साइट (एमसीएस)** → विदेशी डीएनए सम्मिलन के लिए अद्वितीय प्रतिबंध साइटें।
2. **फेज घटक**
   - **प्रतिकृति का f1 मूल (f1 ori)** M13 फेज से व्युत्पन्न है।
   - जब सहायक फेज (एम 13, एफ 1, एफडी) प्रदान किया जाता है, तो फेजमिड डीएनए को **फेज कणों में पैक किया जा सकता है** और एकल-रज्जुक डीएनए के रूप में स्रावित किया जा सकता है।

3. क्रियाविधि

1. **सामान्य प्रतिकृति (प्लास्मिड मोड)**
    - सहायक फेज की अनुपस्थिति में → फेजमिड एक सामान्य प्लाज्मिड की तरह व्यवहार करता है।
    - डबल-स्ट्रैंडेड सर्कुलर डीएनए (डीएसडीएनए) *ई. कोलाई में प्रतिकृति बनाता है*।
2. **फेज प्रतिकृति (फेज मोड)**
    - जब फेजमिड को आश्रय देने वाली *ई. कोली कोशिकाएं* **एक सहायक फेज के साथ अतिसंक्रमित होती हैं** , तो **एफ1 ओरी** सक्रिय हो जाती है।
    - फेजमिड डीएनए को **एकल-रज्जुक डीएनए के रूप में दोहराया जाता है** और फेज कणों में पैक किया जाता है।
    - एसएसडीएनए को संवर्धन माध्यम में स्रावित किया जाता है।

---

4. फेजमिड्स के लाभ

- **दोहरी प्रतिकृति प्रणाली** → प्लास्मिड (डीएसडीएनए) और फेज कण (एसएसडीएनए) दोनों के रूप में मौजूद हो सकती है।
- **एकल-रज्जुक डीएनए** प्रदान करता है , जो निम्न के लिए आवश्यक है:
    - **सेंगर डीएनए अनुक्रमण** (पुरानी लेकिन आधारभूत तकनीक)।
    - **साइट-निर्देशित उत्परिवर्तन** .
- **छोटा आकार** → आसान हेरफेर.
- **एमसीएस और चयन योग्य मार्कर** शामिल करें → क्लोनिंग को सुविधाजनक बनाएं।
- सहायक फेज उपलब्ध कराए जाने पर **ssDNA की उच्च उपज** ।

---

5. सीमाएँ

- एसएसडीएनए उत्पादन के लिए **सहायक फेज संक्रमण** पर निर्भरता ।
- इन्सर्ट आकार क्षमता सीमित है (कुछ केबी).
- अब आंशिक रूप से नई प्रौद्योगिकियों (पीसीआर-आधारित उत्परिवर्तन, स्वचालित अनुक्रमण) द्वारा प्रतिस्थापित किया गया है।

---

6. फेजमिड वेक्टर के उदाहरण

- **पीब्लूस्क्रिप्ट** (व्यापक रूप से प्रयुक्त, इसमें प्लाज्मिड ओरी और एफ 1 ओरी दोनों हैं)।
- **pUC119, pGEM, pSP65** (अनुक्रमण और क्लोनिंग के लिए इंजीनियर फेजमिड्स)।

---

7. अनुप्रयोग

1. **डीएनए श्रृंखला बनाना**
    - पीसीआर और स्वचालित अनुक्रमकों से पहले, फेजमिड्स सेंगर अनुक्रमण के लिए महत्वपूर्ण थे क्योंकि वे एसएसडीएनए टेम्पलेट्स प्रदान करते थे।
2. **साइट-निर्देशित उत्परिवर्तन**
    - फेजमिड्स से प्राप्त एसएसडीएनए का उपयोग सिंथेटिक ऑलिगोन्युक्लियोटाइड्स के साथ उत्परिवर्तन लाने के लिए किया जाता है।
3. **क्लोनिंग और सबक्लोनिंग**
    - विदेशी डीएनए टुकड़ों को **एमसीएस में डाला जा सकता है** ।
4. **फेज डिस्प्ले तकनीक**
    - संशोधित फेजमिड का उपयोग **एंटीबॉडी इंजीनियरिंग और प्रोटीन-लिगैंड इंटरैक्शन अध्ययनों में किया जाता है** ।
5. **पुस्तकालय निर्माण**
    - अनुक्रमण परियोजनाओं के लिए **सीडीएनए और जीनोमिक लाइब्रेरी** बनाने में उपयोगी ।

---

8. आरेख (परीक्षाओं के लिए महत्वपूर्ण)

चित्र बनाएं और लेबल लगाएं:

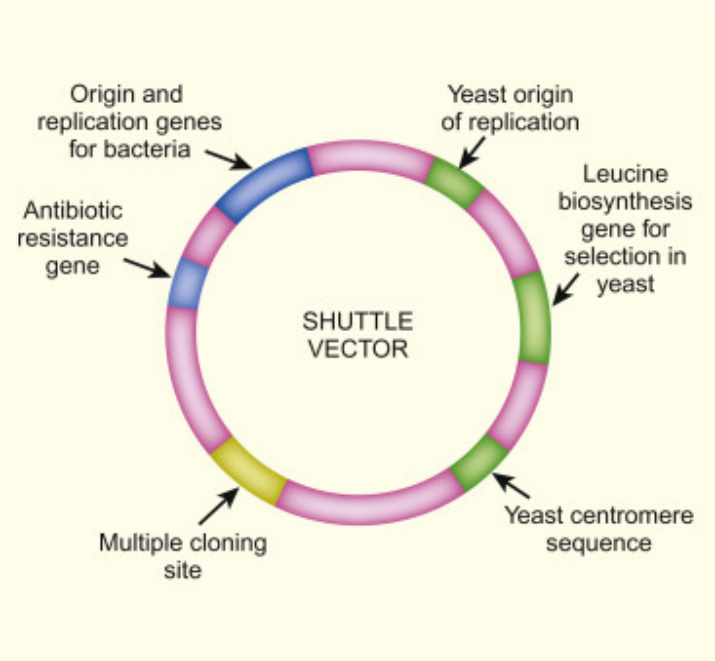
- **ColE1 ori** (प्लाज्मिड प्रतिकृति)।
- **एफ1 ओरि** (फेज प्रतिकृति)।
- **चयन योग्य मार्कर (जैसे, ampR)** .
- **एमसीएस (क्लोनिंग साइट्स)** .
- वृत्ताकार फेजमिड, प्लास्मिड और फेज दोनों की उत्पत्ति दर्शाता है।

---

9. निष्कर्ष

फेजमिड्स **क्लोनिंग वेक्टर्स के एक बहुमुखी वर्ग का प्रतिनिधित्व करते हैं** जो प्लास्मिड और फेज प्रणालियों को जोड़ते हैं। **सहायक फेज संक्रमण पर एकल-रज्जुक डीएनए उत्पन्न करने की उनकी क्षमता ने उन्हें शास्त्रीय अनुक्रमण और उत्परिवर्तन प्रयोगों** में आवश्यक बना दिया है। हालाँकि आधुनिक पीसीआर-आधारित विधियों ने उनके उपयोग को कम कर दिया ह ै, फिर भी फेजमिड्स **आणविक क्लोनिंग, फेज प्रदर्शन और उन्नत आनुवंशिक इंजीनियरिंग तकनीकों में एक महत्वपूर्ण उपकरण बने हुए हैं**।

शटल वेक्टर



1 परिचय

- शटल **वेक्टर एक विशेष रूप से डिज़ाइन किया गया क्लोनिंग वेक्टर** है जो **दो या अधिक विभिन्न मेजबान जीवों** में प्रतिकृति बना सकता है।
- इनमें **प्रतिकृति के दो उद्गम** तथा दोनों मेजबानों में प्रसार के लिए आवश्यक विनियामक अनुक्रम होते हैं।
- **प्रोकैरियोट्स (जैसे *ई. कोलाई*) और यूकेरियोट्स (जैसे खमीर, पौधे या पशु कोशिकाओं)** के बीच आवागमन कर सकते हैं ।
- क्योंकि वे मेजबानों के बीच "शटल " कर सकते हैं, वे **जीन क्लोनिंग, अभिव्यक्ति अध्ययन और आनुवंशिक इंजीनियरिंग में बहुत उपयोगी हैं**।

---

2. शटल वेक्टर की मूल संरचना

शटल वेक्टर **संकर प्लास्मिड होते हैं** जिनमें अनेक स्रोतों से तत्व होते हैं।

ज़रूरी भाग:

1. **प्रतिकृति के दो मूल (ओरी)**
    - *ई. कोलाई*(ColE1 ori) में एक कार्यात्मक ।
    - दूसरे मेजबान में एक और कार्यात्मक (उदाहरण के लिए, खमीर के लिए 2μ ori, स्तनधारी कोशिकाओं के लिए SV40 ori)।
2. **प्रत्येक होस्ट के लिए चयन योग्य मार्कर**
    - *ई. कोलाई*: **ampR, tetR, kanR** (एंटीबायोटिक प्रतिरोध)।
    - यीस्ट: **URA3, LEU2, HIS3** (पूरक मार्कर)।
    - स्तनधारी: **नियोमाइसिन प्रतिरोध, हाइग्रोमाइसिन प्रतिरोध** ।
3. **प्रमोटर और नियामक अनुक्रम**
    - प्रोकैरियोटिक और यूकेरियोटिक दोनों प्रणालियों में जीन अभिव्यक्ति के लिए उपयुक्त।
    - उदाहरण: **एसवी40 प्रमोटर (स्तनधारी), टी7 प्रमोटर (बैक्टीरिया)** ।
4. **मल्टीपल क्लोनिंग साइट (MCS)**
    - विदेशी डीएनए के सम्मिलन के लिए अद्वितीय प्रतिबंध स्थलों वाला क्षेत्र।

---

3. कार्य सिद्धांत

- विदेशी डीएनए को ***ई. कोलाई*के अंदर शटल वेक्टर में क्लोन किया जाता है** (क्योंकि बैक्टीरिया में रूपांतरण, प्रसार और प्लास्मिड तैयार करना सबसे आसान होता है)।
- क्लोनिंग के बाद, पुनः संयोजक शटल वेक्टर को **दूसरे मेजबान** (यीस्ट, स्तनधारी, या पादप कोशिकाओं) में स्थानांतरित कर दिया जाता है।
- चूंकि वेक्टर में उस मेज़बान के लिए प्रतिकृति मूल और चयन योग्य मार्कर होते हैं, इसलिए यह सम्मिलित जीन की प्रतिकृति बनाता है और उसे व्यक्त करता है।

---

4. शटल वैक्टर के उदाहरण

1. **YEp (यीस्ट एपीसोमल प्लास्मिड्स) -** *ई. कोलाई*और यीस्ट के बीच आवागमन ।
2. **YIp (यीस्ट इंटीग्रेटिव प्लास्मिड्स)** - यीस्ट जीनोम में एकीकृत होते हैं लेकिन *ई. कोलाई में प्रसारित होते हैं*।
3. **pSV2** - *ई. कोलाई*और स्तनधारी कोशिकाओं के बीच।
4. **बीएसी/वाईएसी** - बैक्टीरिया और खमीर के बीच बड़े सम्मिलित शटल वेक्टर।

---

5. अनुप्रयोग

1. **जीन क्लोनिंग और अभिव्यक्ति**
    - *ई. कोलाई* में क्लोन करें , फिर यूकेरियोटिक कोशिकाओं में व्यक्त करें (कार्यात्मक अध्ययन के लिए)।
2. **प्रोटीन उत्पादन**
    - स्तनधारी कोशिकाओं में यूकेरियोटिक प्रोटीन (जैसे इंसुलिन, वृद्धि हार्मोन) को व्यक्त करने के लिए जैव प्रौद्योगिकी में उपयोगी।
3. **उत्परिवर्तन और कार्यात्मक अध्ययन**
    - उत्परिवर्ती जीन को बैक्टीरिया में तैयार किया जा सकता है और खमीर या स्तनधारी कोशिकाओं में परीक्षण किया जा सकता है।
4. **ट्रांसजेनिक अनुसंधान**
    - शटल वेक्टर पौधों, कवकों या पशु कोशिका रेखाओं में जीन स्थानांतरित करने में मदद करते हैं।
5. **टीका विकास**
    - पुनः संयोजक वैक्सीन वेक्टर (जैसे, हेपेटाइटिस बी सतह प्रतिजन अभिव्यक्ति) में उपयोग किया जाता है।

---

6. लाभ

- **एकाधिक होस्टों में प्रचारित किया** जा सकता है .
- बैक्टीरिया में आसान हेरफेर (सस्ता, तेज) के बाद जटिल यूकेरियोटिक प्रणालियों में अभिव्यक्ति।
- दोनों मेज़बानों में **यूकेरियोटिक जीनों के कार्यात्मक अध्ययन को** सक्षम बनाना ।
- **बड़े पैमाने पर क्लोनिंग और प्रोटीन अभिव्यक्ति परियोजनाओं का** समर्थन करें ।

---

7. सीमाएँ

- साधारण प्लास्मिड की तुलना में **आकार में बड़ा → कभी-कभी रूपांतरित करना कठिन होता है।**
- कुछ होस्ट सिस्टम में स्थिरता संबंधी समस्याएँ उत्पन्न हो सकती हैं।
- इसमें अनेक विनियामक तत्व होते हैं, जिससे निर्माण कार्य अधिक जटिल हो जाता है।

---

8. आरेख (परीक्षा के लिए महत्वपूर्ण)

एक वृत्ताकार शटल वेक्टर दिखा रहा है:

- **ई. कोलाई ओरी (ColE1)**

- **यीस्ट ओरी (2μ ओरी)**
- **ampR (ई . कोलाई मार्कर)**
- **URA3 (यीस्ट मार्कर)**
- **एमसीएस (क्लोनिंग साइट)**
- **प्रमोटर (उदाहरण के लिए, स्तनधारी अभिव्यक्ति के लिए SV40)**

---

9. निष्कर्ष

शटल वेक्टर **बहुमुखी क्लोनिंग उपकरण हैं** जो एक से अधिक मेज़बानों में प्रतिकृति बना सकते हैं, जिससे वे **आणविक जीव विज्ञान, आनुवंशिक इंजीनियरिंग और जैव प्रौद्योगिकी में अत्यंत मूल्यवान बन जाते हैं**। उनका डिज़ाइन — **प्रतिकृति के दोहरे मूल, दोहरे मार्कर और अभिव्यक्ति संकेतों को वहन करने वाला** — शोधकर्ताओं को सरल जीवाणु प्रणालियों और जटिल यूकेरियोटिक प्रणालियों, दोनों के लाभों का दोहन करने की अनुमति देता ह ै।

ई. कोलाई के लिए क्लोनिंग वेक्टर

क्लोनिंग वेक्टर एक डीएनए अणु है जो एक विदेशी डीएनए खंड को ले जा सकता है, एक मेज़बान कोशिका के अंदर प्रतिकृति बना सकता है, और सम्मिलित डीएनए के क्लोनिंग में मदद कर सकता है। *ई. कोलाई* सबसे अधिक इस्तेमाल किया जाने वाला मेज़बान जीव है क्योंकि इसे विकसित करना आसान है, इसका अच्छी तरह से अध्ययन किया गया है, और इसकी आनुवंशिकी को अच्छी तरह से समझा गया है।

ई. कोलाई में क्लोनिंग वेक्टर की आवश्यक विशेषताएं

1. **प्रतिकृति की उत्पत्ति (ori):**
   - *ई. कोलाई* के अंदर वेक्टर की स्वायत्त प्रतिकृति सुनिश्चित करता है ।
   - उदाहरण: प्लास्मिड में *ColE1 ori* .
2. **चयन योग्य मार्कर जीन:**
   - रूपांतरित कोशिकाओं की पहचान की अनुमति दें.
   - आमतौर पर एंटीबायोटिक प्रतिरोध जीन (एम्पीसिलीन, टेट्रासाइक्लिन, कैनामाइसिन, क्लोरैमफेनिकोल)।
3. **मल्टीपल क्लोनिंग साइट (एमसीएस) / पॉलीलिंकर:**
   - लघु डीएनए क्षेत्र जिसमें अनेक अद्वितीय प्रतिबंधन एंजाइम पहचान स्थल होते हैं।
   - विदेशी डीएनए के सम्मिलन को सुगम बनाता है।
4. **छोटे आकार का:**
   - छोटे वेक्टर अधिक स्थिर होते हैं और उनमें हेरफेर करना आसान होता है।
5. **रिपोर्टर जीन (आधुनिक वेक्टर में):**

- उदाहरण: नीली-सफेद स्क्रीनिंग के लिए *lacZ (β-galactosidase) ।*

ई. कोलाई में प्रयुक्त क्लोनिंग वेक्टर के प्रकार

1. प्लास्मिड वेक्टर

- **परिभाषा:** छोटे, वृत्ताकार, दोहरे-रज्जुक वाले एक्स्ट्राक्रोमोसोमल डीएनए अणु।
- **उदाहरण:**
  - **पीबीआर322:**
    - पहला व्यापक रूप से प्रयुक्त क्लोनिंग वेक्टर।
    - इसमें दो एंटीबायोटिक प्रतिरोध जीन (Amp^R और Tet^R) शामिल हैं।
    - ori *ColE1 से व्युत्पन्न है*।
    - मार्कर जीन (प्रविष्ट निष्क्रियता) के भीतर अनेक अद्वितीय प्रतिबंध स्थल होते हैं।
  - **pUC श्रृंखला (जैसे, pUC18, pUC19):**
    - उच्च प्रतिलिपि संख्या प्लास्मिड.
    - नीले/सफेद कॉलोनी चयन के लिए *lacZα जीन खंड* शामिल हैं ।
    - *lacZ* के भीतर एकाधिक क्लोनिंग साइट .
- **लाभ:** हेरफेर करने में आसान, उच्च प्रतिलिपि संख्या, स्थिर।
- **सीमा:** सीमित क्षमता (~10 केबी तक)।

---

2. बैक्टीरियोफेज वेक्टर

- **λ (लैम्ब्डा) फेज** से व्युत्पन्न .
- **लाभ:**
  - बड़े डीएनए टुकड़े (15-25 केबी तक) ले जा सकता है।
  - कुशल संक्रमण (प्लास्मिड की तुलना में उच्च रूपांतरण दक्षता)।
- **प्रकार:**
  - **λ सम्मिलन वेक्टर:** गैर-आवश्यक क्षेत्र में प्रविष्ट विदेशी डीएनए।
  - **λ प्रतिस्थापन वेक्टर:** विदेशी डीएनए डिस्पोजेबल डीएनए क्षेत्र को प्रतिस्थापित करता है।

---

3. कॉस्मिड्स

- **हाइब्रिड वेक्टर** : λ फेज से प्लाज्मिड + कॉस साइटें।

- **विशेषताएँ:**
    - बड़े टुकड़े (35-45 केबी) ले जा सकता है।
    - कुशल वितरण के लिए फेज कणों में पैक किया गया।
    - *ई. कोलाई* के अंदर प्लास्मिड की तरह प्रतिकृति बनाएं ।
- **अनुप्रयोग:** जीनोमिक लाइब्रेरी के निर्माण के लिए उपयोगी।

---

4. फेजमिड्स

- **प्लास्मिड + फिलामेंटस फेज (एम 13) का संकर प्रतिकृति का मूल।**
- **विशेषताएँ:**
    - प्लास्मिड के रूप में प्रतिकृति बना सकते हैं।
    - हेल्पर फेज से संक्रमण होने पर एकल-रज्जुक डीएनए उत्पन्न होता है।
    - अनुक्रमण और उत्परिवर्तन के लिए उपयोगी।

---

5. बीएसी (बैक्टीरियल आर्टिफिशियल क्रोमोसोम)

- *ई. कोलाई* के एफ-प्लास्मिड से व्युत्पन्न ।
- बहुत बड़े डीएनए सम्मिलन (100-300 केबी) ले जाएं।
- स्थिर और जीनोम परियोजनाओं में उपयोग किया जाता है (जैसे, मानव जीनोम परियोजना)।

---

6. शटल वेक्टर

- इंजीनियर वेक्टर जो *ई. कोलाई* और अन्य जीवों (जैसे, खमीर या स्तनधारी कोशिकाओं) में प्रतिकृति बनाते हैं।
- प्रतिकृति के दो मूल तथा दोनों मेजबानों के लिए चयन योग्य मार्कर हों।
- *ई. कोलाई* में क्लोनिंग और किसी अन्य प्रणाली में अभिव्यक्ति की अनुमति दें।

ई. कोलाई वेक्टर के अनुप्रयोग

- जीनोमिक और सीडीएनए लाइब्रेरी का निर्माण।
- पुनः संयोजक प्रोटीन का उत्पादन (जैसे, इंसुलिन, वृद्धि हार्मोन)।
- साइट-निर्देशित उत्परिवर्तन.
- कार्यात्मक जीन विश्लेषण.

λ (लैम्ब्डा) बैक्टीरियोफेज के लिए क्लोनिंग वेक्टर

लैम्ब्डा (λ) बैक्टीरियोफेज **ई. *कोलाई* का एक समशीतोष्ण फेज है** , जिसका **डीएनए जीनोम रैखिक द्वि-रज्जुक (~48.5 kb) होता है**। यह **अपघट्य और लाइसोजेनिक दोनों चक्रों से गुजर सकता है। आनुवंशिक इंजीनियरिंग द्वारा, λ फेज को क्लोनिंग वेक्टर** के रूप में कार्य करने के लिए संशोधित किया गया है।

λ फेज को क्लोनिंग वेक्टर के रूप में क्यों उपयोग किया जाता है?

1. **बड़े विदेशी डीएनए टुकड़ों (10-25 केबी) को** समायोजित कर सकता है।
2. *ई. कोलाई को उच्च दक्षता से* संक्रमित करता है (प्लास्मिड से बेहतर)।
3. फेज जीनोम के अनावश्यक क्षेत्रों को संक्रमण को प्रभावित किए बिना विदेशी डीएनए से प्रतिस्थापित किया जा सकता है।
4. पुनः संयोजक डीएनए को इन विट्रो में फेज कणों में पैक करना आसान है।

λ डीएनए की संरचना

- आकार: **48.5 केबी रैखिक डीएसडीएनए**।
- दोनों सिरों पर **cos साइटें** हैं (12 bp एकल -रज्जुक संसंजक सिरे)।
- **आवश्यक** और **गैर-आवश्यक** श्रेणियों में विभाजित किया गया है।
- अनावश्यक क्षेत्रों को हटाया जा सकता है और उनके स्थान पर विदेशी डीएनए लगाया जा सकता है।

λ वैक्टर की सामान्य विशेषताएं

1. **प्रतिकृति की उत्पत्ति** : *ई. कोलाई में प्रसार के लिए*।
2. **कॉस साइट्स** : डीएनए को फेज कणों में पैक करने के लिए आवश्यक।
3. **चयन योग्य मार्कर** : एंटीबायोटिक प्रतिरोध या फेज फ़ंक्शन की बहाली के लिए जीन।
4. **क्लोनिंग स्थल** : विदेशी डीएनए के सम्मिलन के लिए बहु प्रतिबंध एंजाइम स्थल।
5. **डालने की क्षमता** : ~10–25 केबी, प्लास्मिड से बहुत बड़ी।

λ क्लोनिंग वेक्टर के प्रकार

1. सम्मिलन वेक्टर

- विदेशी डीएनए को λ डीएनए के गैर-आवश्यक क्षेत्र के भीतर **अद्वितीय प्रतिबंध स्थलों में डाला जाता है।**
- **सम्मिलित आकार क्षमता** : ~5–11 केबी तक।
- उदाहरण: **λgt10, λgt11** .
- अनुप्रयोग: **सीडीएनए क्लोनिंग के लिए उपयोगी** ।

---

2. प्रतिस्थापन (प्रतिस्थापन) सदिश

- एक **स्टफ़र खंड** (गैर-आवश्यक डीएनए) को विदेशी डीएनए से **प्रतिस्थापित किया जाता है।**
- **सम्मिलित आकार क्षमता** : ~20–25 केबी तक।
- उदाहरण: **λEMBL3, λEMBL4** .
- **जीनोमिक लाइब्रेरी** का निर्माण ।

---

3. चारोन वेक्टर

- λ-व्युत्पन्न सदिशों की श्रृंखला (चारोन 4, 16, 21, आदि).
- बेहतर दक्षता के साथ **बड़े डीएनए टुकड़ों की** क्लोनिंग के लिए विकसित किया गया ।

---

4. λ gt11 (अभिव्यक्ति वेक्टर)

- इसमें **lacZ जीन होता है** जिसके अन्दर कई क्लोनिंग स्थल होते हैं।
- डीएनए के सम्मिलन से β-गैलेक्टोसिडेस के साथ एक **संलयन प्रोटीन बनाया जा सकता है।**
- **अभिव्यक्ति क्लोनिंग** और **एंटीबॉडी स्क्रीनिंग** में उपयोग किया जाता है ।

λ वेक्टर के लाभ

- डीएनए वितरण की उच्च दक्षता (संक्रमण रूपांतरण की तुलना में अधिक कुशल है)।
- प्लास्मिड की तुलना में बड़ी डीएनए क्षमता।
- **सीडीएनए और जीनोमिक लाइब्रेरी** बनाने के लिए व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है ।
- कुछ वेक्टर (जैसे, λgt11) क्लोन जीन को व्यक्त कर सकते हैं।

सीमाएँ

- प्लास्मिड वेक्टरों की तुलना में अधिक जटिल।
- कॉस्मिड या बीएसी की तुलना में इन्सर्ट का आकार सीमित है।
- विशेष हैंडलिंग (इन विट्रो पैकेजिंग सिस्टम) की आवश्यकता होती है।

λ वैक्टर के अनुप्रयोग

1. **जीनोमिक और सीडीएनए पुस्तकालयों** का निर्माण .
2. **अभिव्यक्ति क्लोनिंग** (उदाहरण के लिए, संलयन प्रोटीन के उत्पादन के लिए λgt11)।
3. **परियोजनाओं के मानचित्रण और अनुक्रमण** में उपयोगी .
4. एंटीबॉडी या जांच के साथ स्क्रीनिंग।

उच्च क्षमता वाले वेक्टर

बढ़िया आप **उच्च क्षमता वाले वेक्टर - अंग्रेजी में पूर्ण विवरण** एक **पूर्ण परीक्षा-शैली प्रारूप में चाहते हैं**। मैं इसे चरण दर चरण लिखूंगा ताकि आप सीधे इससे तैयारी कर सकें।

उच्च क्षमता वाले वेक्टर

परिचय

- पुनः संयोजक डीएनए प्रौद्योगिकी में, **क्लोनिंग वेक्टर** डीएनए अणु होते हैं जो विदेशी डीएनए को मेजबान कोशिका में ले जा सकते हैं और उसकी प्रतिकृति की अनुमति दे सकते हैं।
- **प्लास्मिड** या **λ फेज** जैसे सरल वेक्टर की क्षमता सीमित होती है (लगभग 10 केबी तक)।
- **बड़े डीएनए खंडों** जैसे कि संपूर्ण जीन, ऑपेरॉन या जीनोम क्षेत्रों के लिए , **उच्च क्षमता वाले वेक्टर की** आवश्यकता होती है।
- ये वेक्टर **20 केबी से 2 एमबी तक के डीएनए इन्सर्ट ले जा सकते हैं, जिससे वे जीनोम परियोजनाओं** और **जीनोमिक लाइब्रेरी** में आवश्यक हो जाते हैं ।

उच्च क्षमता वाले वैक्टर की सामान्य विशेषताएं

1. **बड़ी डीएनए सम्मिलन क्षमता** (20 केबी-2 एमबी)।
2. **कम प्रतिलिपि संख्या** → बड़े सम्मिलन की अस्थिरता को रोकती है।
3. **चयन योग्य मार्कर** (एंटीबायोटिक प्रतिरोध, ऑक्सोट्रोफिक मार्कर)।
4. बड़े डीएनए खंडों का **स्थिर रखरखाव ।**
5. *ई. कोलाई* या यीस्ट जैसे **संगत मेजबान प्रणालियाँ ।**
6. बड़े डीएनए की **क्लोनिंग, मैपिंग, अनुक्रमण और कार्यात्मक विश्लेषण की** अनुमति दें ।

उच्च क्षमता वाले वैक्टर के प्रकार

1. कॉस्मिड्स

- **परिभाषा :** λ फेज से **cos साइटों** के साथ **प्लास्मिड रीढ़ को** संयोजित करने वाले हाइब्रिड वेक्टर ।
- **क्षमता** : 35–45 केबी.
- **संरचना** :
  - प्लास्मिड प्रतिकृति उत्पत्ति.
  - चयन योग्य मार्कर (एंटीबायोटिक प्रतिरोध).
  - λ cos साइटें → फेज कणों में पैकेजिंग की अनुमति देती हैं।
- **अनुप्रयोग** :
  - **जीनोमिक पुस्तकालयों** का निर्माण .
  - बड़े जीन और ऑपेरॉन की क्लोनिंग।

---

2. बैक्टीरियोफेज λ प्रतिस्थापन वेक्टर

- **परिभाषा** : संशोधित λ फेज जीनोम जहां **गैर-आवश्यक क्षेत्रों को** विदेशी डीएनए द्वारा प्रतिस्थापित किया जाता है।
- **क्षमता** : 9–23 केबी.
- **लाभ** : कुशल पैकेजिंग और *ई. कोलाई का संक्रमण*।
- **अनुप्रयोग** :
  - जीनोमिक पुस्तकालय.
  - सीडीएनए पुस्तकालय.

---

3. जीवाणु कृत्रिम गुणसूत्र (बीएसी)

- **परिभाषा :** *ई. कोलाई* के **एफ-प्लास्मिड** पर आधारित वेक्टर ।
- **क्षमता** : 100–300 केबी.

- **विशेषताएँ** :
    - प्रतिकृति की एफ-प्लास्मिड उत्पत्ति.
    - जीन विभाजन → स्थिर वंशानुक्रम सुनिश्चित करना।
    - कम प्रतिलिपि संख्या → डीएनए पुनर्व्यवस्था को रोकती है।
- **अनुप्रयोग** :
    - **मानव जीनोम परियोजना** .
    - जीनोम अनुक्रमण और भौतिक मानचित्रण।
    - बड़े यूकेरियोटिक जीनों का क्लोन बनाना।

---

4. यीस्ट कृत्रिम गुणसूत्र (YACs)

- **परिभाषा** : **खमीर में कार्य करने के लिए निर्मित कृत्रिम गुणसूत्र** ।
- **क्षमता** : 200 केबी – 2 एमबी.
- **संरचना** :
    - यीस्ट सेंट्रोमियर (CEN).
    - टेलोमेरेस (टीईएल)।
    - स्वायत्त प्रतिकृति अनुक्रम (एआरएस)।
    - चयन योग्य मार्कर (जैसे, URA3, TRP1).
- **लाभ** : **बहुत बड़े डीएनए टुकड़ों को क्लोन किया जा सकता है** ।
- **नुकसान** : कम स्थिर; पुनर्व्यवस्था के लिए प्रवण।
- **अनुप्रयोग** :
    - बड़े जीनोम का भौतिक मानचित्रण।
    - जीन संगठन का अध्ययन.

---

5. P1-व्युत्पन्न कृत्रिम गुणसूत्र (PACs)

- **परिभाषा : बैक्टीरियोफेज P1** से व्युत्पन्न वेक्टर ।
- **क्षमता** : 100–300 केबी.
- **विशेषताएँ** :
    - P1 प्रतिकृति का उद्गम.
    - स्थिरता के लिए विभाजन प्रणाली.
    - एंटीबायोटिक प्रतिरोध मार्कर.
- **अनुप्रयोग** :
    - जीनोमिक पुस्तकालय.
    - अनुक्रमण परियोजनाओं के लिए बड़े सम्मिलित क्लोनिंग।

उच्च क्षमता वाले वैक्टर की तुलना

वेक्टर प्रकार	आकार डालें	मेज़बान	स्थिरता	अनुप्रयोग
λ प्रतिस्थापन	9–23 केबी	*ई कोलाई*	उच्च	जीनोमिक और सीडीएनए पुस्तकालय
कॉस्मिड्स	35–45 केबी	*ई कोलाई*	मध्यम	जीनोमिक पुस्तकालय
बक्स	100–300 केबी	*ई कोलाई*	बहुत ऊँचा	जीनोम अनुक्रमण, मानचित्रण
उम्मीदवार PAC	100–300 केबी	*ई कोलाई*	उच्च	जीनोमिक पुस्तकालय
वाईएसी	200 केबी–2 एमबी	यीस्ट	न्यून	मध्यम बहुत बड़ी डीएनए क्लोनिंग

उच्च क्षमता वाले वैक्टर के अनुप्रयोग

1. **जीनोम परियोजनाएं** - अनुक्रमण परियोजनाओं में उपयोग की जाती हैं (जैसे, मानव जीनोम परियोजना)।
2. **जीनोमिक लाइब्रेरी** - उच्चतर जीवों के लिए पुस्तकालयों का निर्माण।
3. **भौतिक मानचित्रण** - गुणसूत्रों पर जीन की व्यवस्था।
4. **बड़े जीनों की क्लोनिंग** - विशेष रूप से लंबे इंट्रॉन वाले यूकेरियोटिक जीनों की।
5. **जीन विनियमन का अध्ययन** - ऑपेरॉन, बड़े चयापचय मार्ग।
6. **तुलनात्मक जीनोमिक्स** - जीनोम भिन्नता अध्ययन।
7. **चिकित्सा अनुसंधान** - रोग से संबंधित जीन की पहचान।

निष्कर्ष

- उच्च क्षमता वाले वेक्टर, बड़े डीएनए खंडों के क्लोनिंग और अध्ययन के लिए आणविक जीव विज्ञान में **अपरिहार्य उपकरण हैं।**
- मुख्य प्रकार हैं **कॉस्मिड, λ प्रतिस्थापन वेक्टर, बीएसी, पीएसी और वाईएसी** ।
- **बीएसी अपनी उच्च स्थिरता और बड़ी सम्मिलन क्षमता** के कारण सबसे व्यापक रूप से उपयोग किए जाते हैं , जबकि **वाईएसी** सबसे बड़े डीएनए टुकड़े ले जा सकते हैं लेकिन कम स्थिर होते हैं।
- ये वेक्टर **मानव जीनोम परियोजना के लिए महत्वपूर्ण थे** और इनका उपयोग जटिल जीवों के **जीनोमिक्स, मानचित्रण और कार्यात्मक विश्लेषण में किया जाता रहा है।**

यह **अंग्रेजी में पूर्ण विस्तृत विवरण है, परिचय, विशेषताएं, प्रकार, तुलना, अनुप्रयोग और निष्कर्ष के** साथ पूरा - बिल्कुल आप एक परीक्षा में कैसे लिख सकते हैं।

क्या आप चाहेंगे कि मैं **एक पृष्ठ का संक्षिप्त नोट्स / फ्लोचार्ट** संस्करण भी तैयार कर दूं ताकि आप **परीक्षा से पहले जल्दी से संशोधन कर सकें** ?

उच्च क्षमता वाले वेक्टर

परिचय

- पुनः संयोजक डीएनए प्रौद्योगिकी में, **क्लोनिंग वेक्टर** डीएनए अणु होते हैं जो विदेशी डीएनए को मेजबान कोशिका में ले जा सकते हैं और उसकी प्रतिकृति की अनुमति दे सकते हैं।
- **प्लास्मिड** या **λ फेज** जैसे सरल वेक्टर की क्षमता सीमित होती है (लगभग 10 केबी तक)।
- **बड़े डीएनए खंडों** जैसे कि संपूर्ण जीन, ऑपेरॉन या जीनोम क्षेत्रों के लिए , **उच्च क्षमता वाले वेक्टर की** आवश्यकता होती है।
- ये वेक्टर **20 केबी से 2 एमबी तक के डीएनए इन्सर्ट ले जा सकते हैं, जिससे वे जीनोम परियोजनाओं** और **जीनोमिक लाइब्रेरी** में आवश्यक हो जाते हैं ।

उच्च क्षमता वाले वैक्टर की सामान्य विशेषताएं

1. **बड़ी डीएनए सम्मिलन क्षमता** (20 केबी-2 एमबी)।
2. **कम प्रतिलिपि संख्या** → बड़े सम्मिलन की अस्थिरता को रोकती है।
3. **चयन योग्य मार्कर** (एंटीबायोटिक प्रतिरोध, ऑक्सोट्रोफिक मार्कर)।
4. बड़े डीएनए खंडों का **स्थिर रखरखाव ।**
5. *ई. कोलाई* या यीस्ट जैसे **संगत मेजबान प्रणालियाँ ।**
6. बड़े डीएनए की **क्लोनिंग, मैपिंग, अनुक्रमण और कार्यात्मक विश्लेषण की** अनुमति दें ।

उच्च क्षमता वाले वैक्टर के प्रकार

1. कॉस्मिड्स

- **परिभाषा :** λ फेज से **cos साइटों** के साथ **प्लास्मिड बैकबोन को** संयोजित करने वाले हाइब्रिड वेक्टर ।
- **क्षमता** : 35–45 केबी.
- **संरचना** :
    - प्लास्मिड प्रतिकृति उत्पत्ति.
    - चयन योग्य मार्कर (एंटीबायोटिक प्रतिरोध).
    - λ cos साइटें → फेज कणों में पैकेजिंग की अनुमति देती हैं।
- **अनुप्रयोग** :

- **जीनोमिक पुस्तकालयों** का निर्माण .
- बड़े जीन और ऑपेरॉन की क्लोनिंग।

---

2. बैक्टीरियोफेज λ प्रतिस्थापन वेक्टर

- **परिभाषा** : संशोधित λ फेज जीनोम जहां **गैर-आवश्यक क्षेत्रों को** विदेशी डीएनए द्वारा प्रतिस्थापित किया जाता है।
- **क्षमता** : 9–23 केबी.
- **लाभ** : कुशल पैकेजिंग और *ई. कोलाई का संक्रमण*।
- **अनुप्रयोग** :
  - जीनोमिक पुस्तकालय.
  - सीडीएनए पुस्तकालय.

---

3. जीवाणु कृत्रिम गुणसूत्र (बीएसी)

- **परिभाषा :** *ई. कोलाई* के **एफ-प्लास्मिड** पर आधारित वेक्टर ।
- **क्षमता** : 100–300 केबी.
- **विशेषताएँ** :
  - प्रतिकृति की एफ-प्लास्मिड उत्पत्ति.
  - जीन विभाजन → स्थिर वंशानुक्रम सुनिश्चित करना।
  - कम प्रतिलिपि संख्या → डीएनए पुनर्व्यवस्था को रोकती है।
- **अनुप्रयोग** :
  - **मानव जीनोम परियोजना** .
  - जीनोम अनुक्रमण और भौतिक मानचित्रण।
  - बड़े यूकेरियोटिक जीनों का क्लोन बनाना।

---

4. यीस्ट कृत्रिम गुणसूत्र (YACs)

- **परिभाषा** : **खमीर में कार्य करने के लिए निर्मित कृत्रिम गुणसूत्र** ।
- **क्षमता** : 200 केबी – 2 एमबी.
- **संरचना** :
  - यीस्ट सेंट्रोमियर (CEN).
  - टेलोमेरेस (टीईएल)।
  - स्वायत्त प्रतिकृति अनुक्रम (एआरएस)।
  - चयन योग्य मार्कर (जैसे, URA3, TRP1).
- **लाभ** : **बहुत बड़े डीएनए टुकड़ों को क्लोन किया जा सकता है** ।

- **नुकसान** : कम स्थिर; पुनर्व्यवस्था के लिए प्रवण।
- **अनुप्रयोग** :
    - बड़े जीनोम का भौतिक मानचित्रण।
    - जीन संगठन का अध्ययन.

---

5. P1-व्युत्पन्न कृत्रिम गुणसूत्र (PACs)

- **परिभाषा : बैक्टीरियोफेज P1** से व्युत्पन्न वेक्टर ।
- **क्षमता** : 100–300 केबी.
- **विशेषताएँ** :
    - P1 प्रतिकृति का उद्गम.
    - स्थिरता के लिए विभाजन प्रणाली.
    - एंटीबायोटिक प्रतिरोध मार्कर.
- **अनुप्रयोग** :
    - जीनोमिक पुस्तकालय.
    - अनुक्रमण परियोजनाओं के लिए बड़े सम्मिलित क्लोनिंग।

उच्च क्षमता वाले वैक्टर की तुलना

वेक्टर प्रकार	आकार डालें	मेज़बान	स्थिरता	अनुप्रयोग
λ प्रतिस्थापन	9–23 केबी	*ई कोलाई*	उच्च	जीनोमिक और सीडीएनए पुस्तकालय
कॉस्मिड्स	35–45 केबी	*ई कोलाई*	मध्यम	जीनोमिक पुस्तकालय
बक्स	100–300 केबी	*ई कोलाई*	बहुत ऊँचा	जीनोम अनुक्रमण, मानचित्रण
उम्मीदवार PAC	100–300 केबी	*ई कोलाई*	उच्च	जीनोमिक पुस्तकालय
वाईएसी	200 केबी–2 एमबी	यीस्ट	न्यून	मध्यम बहुत बड़ी डीएनए क्लोनिंग

उच्च क्षमता वाले वैक्टर के अनुप्रयोग

1. **जीनोम परियोजनाएं** - अनुक्रमण परियोजनाओं में उपयोग की जाती हैं (जैसे, मानव जीनोम परियोजना)।
2. **जीनोमिक लाइब्रेरी** - उच्चतर जीवों के लिए पुस्तकालयों का निर्माण।
3. **भौतिक मानचित्रण** - गुणसूत्रों पर जीन की व्यवस्था।
4. **बड़े जीनों की क्लोनिंग** - विशेष रूप से लंबे इंट्रॉन वाले यूकेरियोटिक जीनों की।
5. **जीन विनियमन का अध्ययन** - ऑपेरॉन, बड़े चयापचय मार्ग।
6. **तुलनात्मक जीनोमिक्स** - जीनोम भिन्नता अध्ययन।

7. **चिकित्सा अनुसंधान** - रोग से संबंधित जीन की पहचान।

निष्कर्ष

- उच्च क्षमता वाले वेक्टर, बड़े डीएनए खंडों के क्लोनिंग और अध्ययन के लिए आणविक जीव विज्ञान में **अपरिहार्य उपकरण हैं।**
- मुख्य प्रकार हैं **कॉस्मिड, λ प्रतिस्थापन वेक्टर, बीएसी, पीएसी और वाईएसी** ।
- **बीएसी अपनी उच्च स्थिरता और बड़ी सम्मिलन क्षमता** के कारण सबसे व्यापक रूप से उपयोग किए जाते हैं , जबकि **वाईएसी** सबसे बड़े डीएनए टुकड़े ले जा सकते हैं लेकिन कम स्थिर होते हैं।
- ये वेक्टर **मानव जीनोम परियोजना के लिए महत्वपूर्ण थे** और इनका उपयोग जटिल जीवों के **जीनोमिक्स, मानचित्रण और कार्यात्मक विश्लेषण में किया ज ाता रहा है।**

यूकेरियोट्स के लिए क्लोनिंग वेक्टर

1) यूकेरियोटिक वेक्टर अलग क्यों हैं

यूकेरियोटिक जीन और कोशिकाओं की विशेष आवश्यकताएं होती हैं:

- **प्रमोटर और प्रवर्धक:** यूकेरियोटिक (अक्सर प्रजाति/ऊतक -विशिष्ट) नियामक तत्वों की आवश्यकता होती है।
- **mRNA प्रसंस्करण:** इंट्रोन/एक्सॉन संरचना, अनुवाद प्रारंभ के लिए **कोज़ाक अनुक्रम** (GCCRCC **ATG G), पॉली (A) सिग्नल** (उदाहरण के लिए, SV40 या BGH)।
- **अनुवादोत्तर संशोधन:** स्रावी संकेत, ग्लाइकोसिलेशन, कोशिकांग लक्ष्यीकरण।
- **प्रतिलिपि संख्या एवं स्थिरता:** बड़े जीनोम; विशेष उत्पत्ति के बिना एपीसोमल रखरखाव दुर्लभ है (उदाहरण के लिए, EBV OriP/EBNA1)।
- **चयन योग्य मार्कर:** बैक्टीरिया से भिन्न (उदाहरण के लिए, जानवरों में **नियो/जी418, हाइग, प्यूरो, बीएसडी, ज़ीओ ;** खमीर में **यूआरए3, एलईयू2, एचआईएस 3, टीआरपी1 ;** पौधों में **एनपीटीआईआई/बार/एचपीटी)।**

अधिकांश व्यावहारिक प्लास्मिड **शटल वेक्टर होते हैं** : *ई. कोली में प्रसारित होते हैं*(आसान क्लोनिंग, amp^R/kan^R, ColE1 ori) और यूकेरियोट में कार्य करते हैं (उपयुक्त प्रमोटर, चयन , और - वैकल्पिक रूप से - एक एपीसोमल उत्पत्ति)।

---

2) यीस्ट क्लोनिंग वेक्टर (ए स. सेरेविसिया)

क्लासिक परीक्षा विषय। चार मुख्य कक्षाएँ + YAC:

A) YIp (यीस्ट इंटीग्रेटिंग प्लास्मिड)

- **मुख्य विचार:** कोई ए.आर .एस . नहीं; समजातीय पुनर्संयोजन द्वारा जीनोम में एकीकृत।
- **विशेषताएं:** बैक्टीरियल ओरि + amp ^ आर ; यीस्ट मार्कर (URA3 / LEU2 / आदि)।
- **लाभ:** बहुत स्थिर, एकल प्रतिलिपि। **नुकसान:** कम प्रतिलिपि; एकीकरण चरण आवश्यक।
- **उपयोग:** स्थिर अभिव्यक्ति, जीन प्रतिस्थापन, नॉक-इन्स।

बी) वाईआरपी (यीस्ट रेप्लिकेटिंग प्लास्मिड)

- **मुख्य विचार:** केवल **ARS** शामिल करें ।
- **लाभ:** गुणसूत्रेतर प्रतिकृति; आसान पुनर्प्राप्ति। **नुकसान:** प्रायः अस्थिर, परिवर्तनशील प्रतिलिपि।
- **उपयोग:** तीव्र क्लोनिंग/अल्पकालिक अभिव्यक्ति।

C) YCp (यीस्ट सेंट्रोमेरिक प्लास्मिड)

- **मुख्य विचार: ARS + CEN** → मिनी-गुणसूत्रों की तरह व्यवहार करते हैं।
- **पेशेवरों: एकल-प्रति, स्थिर** वंशानुक्रम। **नुकसान:** एकल प्रतिलिपि के कारण कम अभिव्यक्ति।
- **उपयोग:** ऐसे अध्ययन जिनमें सख्त स्टोइकोमीट्री या आनुवंशिक स्थिरता की आवश्यकता होती है।

डी) वाईईपी (यीस्ट एपीसोमल प्लास्मिड)

- **मुख्य विचार: 2µ मूल** (देशी उच्च प्रतिलिपि खमीर प्लाज्मिड)।
- **लाभ:** उच्च प्रतिलिपि → सशक्त अभिव्यक्ति। **हानि:** कुछ अस्थिरता; प्रतिलिपि भिन्न होती है।
- **उपयोग:** खमीर में प्रोटीन की अधिक अभिव्यक्ति।

ई) वाईएसी (यीस्ट कृत्रिम गुणसूत्र)

- **अवयव:** बड़े क्लोनिंग स्थल के साथ **TEL–CEN–ARS ; चयन योग्य मार्कर (TRP1/URA3)।**
- **क्षमता:** ~200 केबी से >1 एमबी.
- **उपयोग:** भौतिक मानचित्रण, बहुत बड़े जीनोमिक टुकड़ोंं की क्लोनिंग।
- **विपक्ष:** चिमेरिज्म/पुनर्व्यवस्था बी.ए .सी. की तुलना में अधिक सामान्य है।

सामान्य खमीर प्रवर्तक: GAL1/GAL10 (गैलेक्टोज़ द्वारा प्रेरित), **ADH1** , **PGK1** , **TEF1** ।
चयन: पोषण मार्कर (URA3, LEU2…), या दवा मार्कर (KanMX = G418^R)।

---

3) स्तनधारी क्लोनिंग/अभिव्यक्ति वेक्टर

दो व्यापक मोड: **गैर-वायरल प्लास्मिड** और **वायरल वेक्टर** ।

A) गैर-वायरल (प्लास्मिड) वेक्टर

- **रीढ़:** ColE1 ओरी + जीवाणु चयन ; यूकेरियोटिक अभिव्यक्ति कैसेट।
- **प्रमोटर (मजबूत, संवैधानिक): सीएमवी आईई** , **ईएफ1α** , **सीएजी** , **एसवी40 प्रारंभिक** ;
  प्रेरित: टेट-ऑन/ऑफ (टीआरई + आरटीटीए/टीटीए) , मेटालोथायोनीन (Zn^2+), स्टेरॉयड-उत्तरदायी प्रमोटर।
- **आवश्यक सुविधाएं:**
  - **कोज़ाक** आरम्भ कोडॉन के आसपास; **पॉलीए** सिग्नल (एसवी40/बीजीएच)।
  - **टैग:** हिज, फ्लैग, माइक, एचए ; फ्लोरोसेंट रिपोर्टर (जीएफपी/एमचेरी); ल्यूसिफेरेज़।
  - **मल्टीसिस्ट्रोनिक विकल्प:** दोहरी अभिव्यक्ति के लिए **IRES** (EMCV) या **2A पेप्टाइड्स** (P2A/T2A)।
  - **एपीसोमल रखरखाव (वैकल्पिक): एसवी40 ओरी** (केवल टी-एंटीजन$^+$ कोशिकाओं में), **ईबीवी ओरीपी** + **ईबीएनए1** (व्यापक एपीसोम्स), **एस/एमएआर** तत्व।
- **चयन योग्य मार्कर: नियो (जी418)** , **हाइग (एच वाईजीबी)** , **पुरो** , **बीएसडी** , **ज़ीओ** ।
- **स्थिर रेखाएँ:** यादृच्छिक एकीकरण (एनएचईजे), **ट्रांसपोज़न** (**स्लीपिंग ब्यूटी** , **पिग्गीबैक**), या सुरक्षित बंदरगाहों पर **सीआरआईएसपीआर/एचडीआर (उदाहरण के लिए, एएवीएस1)।**
- **जैव उत्पादन के लिए प्रवर्धन प्रणालियाँ: DHFR/MTX** in CHO dhfr$^-$; **GS/MSX** .

विशिष्ट उदाहरण जिनका आप हवाला दे सकते हैं: पीसीडीएनए श्रृंखला (सीएमवी), पीईएफ-आधारित, पीसीएजीजीएस, ईबीवी-आधारित एपीसोम्स (ओआरआईपी/ईबीएनए1)।

बी) वायरल वेक्टर (बहुत सामान्य परीक्षा बिंदु)

कुशल वितरण और स्थिर अभिव्यक्ति के लिए उपयोग किया जाता है।

वेक्टर	जीनोम	एकीकरण	आकार डालें	नोट्स / उपयोग
रेट्रोवायरस (γ-रेट्रो; MoMLV)	शाही सेना	**हाँ** (विभाजित कोशिकाएँ)	~7–8 केबी	विभाजित कोशिकाओं में स्थिर रेखाएँ; LTR प्रमोटर।
लेन्टिवायरस (एचआईवी-1 आधारित)	शाही सेना	**हाँ** (विभाजनकारी और अविभाजनकारी)	~8–9 केबी	व्यापक ट्रोपिज्म; shRNA/CRISPR के लिए सामान्य; स्व-निष्क्रियकारी (SIN) LTRs.
एडिनोवायरस	डीएसडीएनए	**नहीं** (एपिसोमॅल)	~7.5–36 केबी (आंत रहित)	उच्च अभिव्यक्ति, क्षणिक; मजबूत प्रतिरक्षा।

वेक्टर	जीनोम	एकीकरण	आकार डालें	नोट्स / उपयोग
एएवी	एसएसडीएनए	न्यूनतम (AAVS1 रेप के साथ; अधिकतर एपीसोमल कॉन्कैटेमर)	**~4.7 केबी**	कम प्रतिरक्षाजनकता; दीर्घकालिक एपीसोम्स; छोटा कार्गो।
एचएसवी-1	डीएसडीएनए	नहीं (न्यूक्लियर एपीसोम)	**>30 केबी**	बड़ा कार्गो; न्यूरोनल ट्रॉपिज्म (जीन थेरेपी, तंत्रिका विज्ञान)।

सुरक्षा नोट (परीक्षा के लिए): सहायक-मुक्त प्रणालियों , विभाजित पैकेजिंग प्लास्मिडों और **जैव सुरक्षा प्रथाओं का** उपयोग करें ; वेक्टर प्रतिकृति-अक्षम हैं।

---

4) कीट कोशिका वाहक (बैकुलोवायरस/बीईवीएस)

- **वायरस:** *ऑटोग्राफा कैलिफ़ोर्निका* एमएनपीवी (एसीएमएनपीवी)।
- **प्रमोटर: पॉलीहेड्रिन** (बहुत मजबूत), **पी10** .
- **कार्यप्रवाह:** जीन को स्थानांतरण वेक्टर में क्लोन करें → *ई. कोलाई* में **बैकमिड में स्थानांतरण करें → Sf9/Sf21/हाई फाइव** कोशिकाओं को ट्रांसफ़ेक्ट करें → उच्च-स्तरीय प्रोटीन का उत्पादन करें (अक्सर उचित रूप से फोल्ड और ग्लाइकोसिलेटेड)।
- **उपयोग:** बड़े पैमाने पर यूकेरियोटिक प्रोटीन उत्पादन; वीएलपी; झिल्ली प्रोटीन।

---

5) पादप क्लोनिंग वेक्टर (एग्रोबैक्टीरियम-मध्यस्थ)

केंद्रीय अवधारणा: *एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमेफैसिएन्स का* दोहन **टीआई प्लास्मिड** टी-डीएनए स्थानांतरण.

A) बाइनरी वेक्टर सिस्टम (मानक)

- **दो प्लास्मिड:**
  1. *ई. कोली/एग्रोबैक्टीरियम* में **बाइनरी वेक्टर,** जिसमें एमसीएस + पादप चयन योग्य मार्कर + पादप प्रमोटर/टर्मिनेटर के चारों ओर **टी-डीएनए बॉर्डर (एलबी/आरबी) हैं।**
  2. **वायर जीन** के साथ **सहायक प्लास्मिड** (कोई टी-डीएनए नहीं)।
- **प्रमोटर: CaMV 35S** (डाइकोट्स), **यूबिक्विटिन (Ubi-1)** या **एक्टिन** (मोनोकोट्स), ऊतक -विशिष्ट (जैसे, बीज-विशिष्ट), प्रेरित (जैसे, इथेनॉल, हीट शॉक)।
- **टर्मिनेटर: एनओएस** , **ओसीएस** , 35एस पॉलीए.

- **चयन/रिपोर्टर: एनपीटीआईआई (कनामाइसिन)** , **एचपीटी (हाइग)** , **बार (फॉस्फिनोथ्रीसिन/बास्टा)** , जीयूएस, जीएफपी।
- **क्षमता:** व्यावहारिक टी-डीएनए कार्गो आमतौर पर ~ **5-25 केबी** ।
- **वितरण:** एक्सप्लांट के साथ सह-खेती; ऊतक संवर्धन के माध्यम से पुनर्जनन; विकल्प: अड़ियल प्रजातियों के लिए **बायोलिस्टिक्स** (जीन गन)।

बी) सह -एकीकृत सदिश (ऐतिहासिक)

- *एग्रोबैक्टीरियम* के अंदर समजातीय पुनर्संयोजन द्वारा एक निःशस्त्र Ti प्लाज्मिड में एकीकृत हो जाता है ; जिसे बड़े पैमाने पर बाइनरी प्रणालियों द्वारा प्रतिस्थापित किया जाता है।

---

6) नवोदित खमीर से परे कवक वाहक

- **तंतुमय कवक (जैसे, *एस्परगिलस*) : AMA1 अनुक्रम** वाले प्लास्मिड स्वायत्त प्रतिकृति को सक्षम करते हैं; अन्यथा समजातीय पुनर्संयोजन के माध्यम से एकीकृत कैसेट।
- प्रमोटर: **gpdA** , **alcA** (प्रेरित), **tef1** ; चयन : **pyrG** , **argB** , hyg^R.

---

7) यूकेरियोटिक क्लोनिंग/अभिव्यक्ति कैसेट के मुख्य घटक

- **प्रमोटर** + **एन्हांसर** (प्रजाति/ऊतक /प्रेरित विकल्प)।
- **कोज़ाक सहमति** के साथ **5′ यूटीआर ;** स्राव के लिए वैकल्पिक **सिग्नल पेप्टाइड ।**
- **कोडिंग अनुक्रम:** इंट्रोन रहित सीडीएनए या इंट्रोन के साथ जीनोमिक (यीस्ट/पौधे स्प्लिस कर सकते हैं; स्तनधारी अभिव्यक्ति आमतौर पर सीडीएनए का उपयोग करती है)।
- **टैग:** एन-/सी-टर्मिनल एपिटोप या फ्लोरोसेंट टैग; क्लीवेज साइट्स (टीईवी/3सी)।
- **3′ यूटीआर और पॉलीएडेनिलेशन सिग्नल** (पौधों में एसवी40/बीजीएच/एनओएस)।
- **इंसुलेटर/एमएआर** (जैसे, **सीएचएस4**) (स्थिर लाइनों के लिए)।
- होस्ट के लिए उपयुक्त **चयन योग्य मार्कर .**
- **वैकल्पिक:** मल्टीसिस्ट्रोनिक अभिव्यक्ति के लिए IRES/2A; एपीसोम्स के लिए **OriP/EBNA1** या **S/MAR ।**

---

8) रूपांतरण/ट्रांसफ़ेक्शन विधियाँ

- **खमीर:** लिथियम एसीटेट/पीईजी, इलेक्ट्रोपोरेशन; ड्रॉपआउट मीडिया पर चयन करें।
- **स्तनधारी:** रासायनिक ($CaPO_4$, PEI), लाइपोफेक्शन, इलेक्ट्रोपोरेशन/न्यूक्लियोफेक्शन, **वायरल ट्रांसडक्शन** ।
- **पौधे:** *एग्रोबैक्टीरियम* सह-खेती, **बायोलिस्टिक्स** , पीईजी प्रोटोप्लास्ट ट्रांसफ़ेक्शन।
- **कीट:** बैकमिड डीएनए का ट्रांसफ़ेक्शन; वायरल प्रवर्धन।

---

9) वेक्टर चुनना: त्वरित निर्णय मार्गदर्शिका

- **बहुत बड़े जीनोमिक टुकड़ों की आवश्यकता है?** → **YAC** (यीस्ट) या **BAC** (बैक्टीरिया म ेंं संभाला जाता है; फिर टुकड़े वितरित करें)।
- **खमीर में स्थिर एकल-प्रति?** → **YCp** या **YIp** . उच्च अभिव्यक्ति? **YEp** .
- **स्तनधारी कोशिकाओं में क्षणिक उच्च अभिव्यक्ति?** → CMV-आधारित प्लास्मिड।
- **स्थिर स्तनधारी रेखा (विभाजित और गैर-विभाजित)?** → **लेंटिवायरल** ; बड़ा कार्गो लेकिन क्षणिक? **एडेनोवायरल** ; छोटा, सुरक्षित, दीर्घकालिक एपीसोमल? **एएवी** ।
- **पादप ट्रांसजेनिक?** → उपयुक्त प्रमोटर/मार्कर के साथ **बाइनरी टीआई प्लास्मिड प्रणाली।**
- **उच्च उपज यूकेरियोटिक प्रोटीन उत्पादन?** → कीट कोशिकाओं में **बैकुलोवायरस** ; या चिकित्सीय प्रोटीन के लिए DHFR/GS प्रणालियों के साथ CHO।

---

10) परीक्षा-अनुकूल तुलना तालिकाएँ

यीस्ट वेक्टर

प्रकार	प्रतिकृति	स्थिरता	प्रतिलिपि	विशिष्ट उपयोग
भौंकना	गुणसूत्र (एकीकरण)	बहुत ऊँचा	1	स्थिर जीन सम्मिलन/अभिव्यक्ति
वाईआरपी	केवल ARS	न्यून मध्यम चर		क्लोनिंग, अल्पकालिक अभिव्यक्ति
डायलिंग	एआरएस + सीईएन	उच्च	1	नियंत्रित खुराक के साथ स्थिर प्लास्मिड
हाँ	2μ ओरी	मध्यम	उच्च	अति अभिव्यक्ति
वाईएसी	टेली+सेन+एआरएस	मध्यम	1	बहुत बड़े सम्मिलन, मानचित्रण

स्तनधारी प्रसव

वेक्टर	एकीकरण	माल	अवधि	विशिष्ट उपयोग
प्लास्मिड (CMV/EF1α)	नहीं (जब तक कि	~10 केबी	क्षणिक	तीव्र परीक्षण, अतिअभिव्यक्ति

वेक्टर	एकीकरण	माल	अवधि	विशिष्ट उपयोग
	इंजीनियर्ड न हो)			
ईबीवी एपीसोम (ओआरआईपी/ईबीएनए1)	नहीं (एपिसोमॅल)	~10–20 केबी	दीर्घकालिक (माइटोटिक)	एकीकरण के बिना स्थिर
लेंटिवायरस	हाँ	8–9 केबी	स्थिर	दीर्घकालिक अभिव्यक्ति, shRNA/CRISPR
एएवी	दुर्लभ/एपिसोमल	4.7 केबी	दीर्घकालिक	विवो कार्य, सीमित कार्गो
एडिनोवायरस	नहीं	36 केबी तक (बिना पेट के)	क्षणिक	उच्च-स्तरीय, अल्पकालिक

पादप बाइनरी वैक्टर

भाग	भूमिका
एलबी/आरबी सीमाएं	स्थानांतरित किए जाने वाले टी-डीएनए को परिभाषित करें
एमसीएस + जीन	प्लांट प्रमोटर के नीचे डालें
प्रमोटर/टर्मिनेटर	35एस /यूबीआई-1; एनओएस /ओसीएस
चयन योग्य मार्कर	एनपीटीII, एचपीटी, बार
वीर जीन (सहायक प्लास्मिड)	टी-डीएनए स्थानांतरण में मध्यस्थता करें

---

11) मॉडल उत्तर संकेत (स्कोरिंग टिप्स)

- **यूकेरियोटिक वेक्टरों की आवश्यकता क्यों है** (नियामक तत्व, प्रसंस्करण) से शुरू करें ।
- **नामांकित आरेख** बनाएं (उदाहरण के लिए, यीस्ट शटल वेक्टर या एलबी/आरबी के साथ प्लांट बाइनरी वेक्टर)।
- **YIp, YEp, YCp, YRp** (परिभाषाएं, पक्ष/विपक्ष, उपयोग) पर **संक्षिप्त नोट्स** लिखें ।
- प्रमोटरों, मार्करों के साथ **एक स्तनधारी** और **एक पौधे का उदाहरण** जोड़ें ।
- **तुलना तालिका + अनुप्रयोगों** (अभिव्यक्ति, मानचित्रण, ट्रांसजेनिक) के साथ समाप्त करें ।

जीनोमिक और सीडीएनए लाइब्रेरी - गहन , परीक्षा-तैयार व्याख्या

नीचे पूर्ण, संरचित, परीक्षा-शैली का स्पष्टीकरण दिया गया है, जिसमें परिभाषाएं, उद्देश्य, विस्तृत निर्माण चरण , गुणवत्ता नियंत्रण, स्क्रीनिंग, लाभ/हानि, अनुप्रयोग, कार्य किए गए उदाहरण और परीक्षा युक्तियां शामिल हैं।

---

1. परिभाषाएँ और उद्देश्य - संक्षिप्त उत्तर

- **जीनोमिक लाइब्रेरी:** क्लोन किए गए डीएनए खंडों का एक संग्रह, जो एक साथ मिलकर किसी जीव के संपूर्ण जीनोम (कोडिंग अनुक्रम, इंट्रॉन, नियामक क्षेत्र, इंटरजेनिक डीएनए सहित) का प्रतिनिधित्व करते हैं। इसका उपयोग जीनों को उनके मूल नियामक अनुक्रमों के साथ पृथक करने, भौतिक मानचित्र बनाने, अनुक्रमण और स्थितिगत क्लोनिंग के लिए क्लोन बैंक बनाने के लिए किया जाता है।
- **सीडीएनए लाइब्रेरी:** *mRNA* से बने क्लोनों का एक संग्रह -> *सीडीएनए* , जो अभिव्यक्त जीन (केवल एक्सॉन / प्रसंस्कृत mRNA) का प्रतिनिधित्व करता है। अभिव्यक्त जीन खोजने, अभिव्यक्ति के लिए ORF प्राप्त करने, स्प्लिस वेरिएंट का अध्ययन करने और अभिव्यक्ति लाइब्रेरी बनाने के लिए उपयोग किया जाता है।

---

2. प्रमुख अंतर (एक पंक्ति)

- **जीनोमिक** = जीनोमिक डीएनए टुकड़े (इंट्रोन + प्रमोटर + इंटरजेनिक)।
- **cDNA** = रिवर्स-ट्रांस्क्राइब्ड mRNA (केवल अभिव्यक्त, विभाजित अनुक्रम; आमतौर पर कोई प्रमोटर नहीं)।
  (जब आपको नियामक अनुक्रम या पूर्ण जीनोमिक संदर्भ की आवश्यकता होगी, तो आप आमतौर पर जीनोमिक चुनेंगे; जब आपको प्रोटीन कोडिंग अनुक्रमों की आवश्यकता होगी या अभिव्यक्ति क ा अध्ययन करना होगा, तो cDNA चुनेंगे।)

A. जीनोमिक लाइब्रेरी - गहन विवरण

A.1 आप इसे कब और क्यों बनाते हैं

- (प्रवर्तक, प्रवर्धक) **सहित जीन को** पृथक करना ।
- स्थितिगत **क्लोनिंग , भौतिक मानचित्रण , और** एनजीएस (मानव जीनोम परियोजना में ऐतिहासिक भूमिका) से पहले **बड़े पैमाने पर अनुक्रमण** के लिए स्रोत सामग्री के रूप में ।
- जटिल जीनोम वाले जीवों के लिए जहां आपको सन्निहित जीनोमिक संदर्भ की आवश्यकता होती है।

A.2 वेक्टर चयन (इन्सर्ट आकार के आधार पर)

- **λ (लैम्ब्डा) प्रतिस्थापन** वेक्टर: ~9–23 केबी डालें।
- **कॉस्मिड्स** : ~35–45 केबी.
- **बीएसी (बैक्टीरियल आर्टिफिशियल क्रोमोसोम) / पीएसी** : ~100–300 केबी (स्थिर, कम प्रतिलिपि)।

- **YACs (यीस्ट आर्टिफिशियल क्रोमोसोम्स)** : 200 kb–2 Mb (बड़े इन्सर्ट लेकिन कम स्थिर/काइमेरिज़्म)।
  वेक्टर का चयन इस प्रकार करें कि इन्सर्ट का आकार × क्लोनों की संख्या, प्रबंधनीय क्लोन संख्याओं के साथ अच्छा कवरेज प्रदान करे।

A.3 चरण -दर -चरण निर्माण (विशिष्ट कार्यप्रवाह)

1. **उच्च गुणवत्ता वाले जीनोमिक डीएनए** अलगाव (उच्च आणविक भार, आरएनएएस उपचारित)।
2. **विखंडन**
   - *आंशिक प्रतिबंध पाचन* (जैसे, आंशिक MboI पाचन) या
   - यादृच्छिक टुकड़ों के लिए
     यांत्रिक कतरनी (नेबुलाइज़र, सोनिकेशन, हाइड्रोडायनामिक कतरनी)। आंशिक पाचन बड़े टुकड़ों को सुरक्षित रखता है और हर लक्ष्य के अंदर काटने से बचाता है।
3. **आकार चयन**
   - एगरोस जेल या पीएफजीई (पल्स्ड-फील्ड जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस) पर चलाएं और वेक्टर क्षमता से मेल खाते आकार की रेंज का उत्पादन करें (उदाहरण के लिए, बीएसी के लिए 100-200 केबी)।
4. **अंत-मरम्मत / कुंद / संसक्त अंत प्रसंस्करण** (भरण , टी4 डीएनए पोल, फॉस्फेट उपचार जब आवश्यक हो)।
5. पूर्व-कट वेक्टर में **बंधाव (वेक्टर: दाढ़ अनुपात अनुकूलित डालें)।**
6. **पैकेजिंग / परिवर्तन**
   - λ/कोस्मिड के लिए: फेज हेड में *इन विट्रो* पैकेजिंग → ई . कोलाई का संक्रमण।
   - प्लास्मिड/बीएसी के लिए: बड़े प्लास्मिड (जैसे, डीएच10बी) के लिए अनुकूलित सक्षम ई . कोली उपभेदों में इलेक्ट्रोपोरेशन।
7. **टिटरिंग और क्लोन बैंक निर्माण** - एकल कॉलोनियों/प्लेक प्राप्त करने के लिए प्लेट बनाना और माइक्रोटिटर प्लेटों में व्यवस्थित करना।
8. **भंडारण** - -80 डिग्री सेल्सियस पर ग्लिसरॉल स्टॉक; डुप्लिकेट लाइब्रेरी बनाए रखें।

A.4 कवरेज गणना (आपको कितने क्लोन की आवश्यकता है?)

क्लार्क और कार्बन / लैंडर-वाटरमैन प्रकार के फार्मूले का उपयोग करें :

N=ln (1−P)ln (1−f)जहाँ f=आकार डालें (i)जीनोम आकार (G)N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)} \quad\text{जहाँ}\; f = \frac{\text{आकार डालें (i)}}{\text{जीनोम आकार (G)}}N=ln(1−f)ln(1−P)जहाँ f=जीनोम आकार (G)आकार डालें (i)

- PPP = वांछित संभावना कि कोई दिया गया अनुक्रम मौजूद है (उदाहरण के लिए, 0.99)।
- एनएनएन = आवश्यक स्वतंत्र क्लोनों की संख्या.

कार्यान्वित उदाहरण (अंक-दर -अंक शैली):

मान लें मानव जीनोम G=3,000,000,000G = 3{,}000{,}000{,}000G=3,000,000,000 bp और लक्ष्य P=0.99P = 0.99P=0.99 (99% संभावना)।

(i) बीएसी सम्मिलन i=150,000i = 150{,}000i=150,000 बीपी

1. f=i/G=150,000/3,000,000,000=0.00005f = i/G = 150{,}000 / 3{,}000{,}000{,}000 = 0.00005f=i/G=150,000/3,000,000,000=0.00005.
2. 1−P=0.011 - P = 0.011−P=0.01 → ln⁡(1−P)=ln⁡(0.01)=−4.605170186\ln(1 - P) = \ln(0.01) = -4.605170186ln(1−P)=ln(0.01)=−4.605170186.
3. 1−f=1−0.00005=0.999951 - f = 1 - 0.00005 = 0.999951−f=1−0.00005=0.99995. श्रृंखला या कैलकुलेटर का उपयोग करें: ln⁡(0.99995)≈−0.00005000125\ln(0.99995) \approx -0.00005000125ln(0.99995)≈−0.00005000125.
4. N=−4.605170186/−0.00005000125≈92,103.4N = -4.605170186 / -0.00005000125 \लगभग 92{,}103.4N=−4.605170186/−0.00005000125≈92,103.4.
   अतः 99% कवरेज के लिए **~92,100 BAC क्लोन।**

(ii) कॉस्मिड सम्मिलन i=40,000i = 40{,}000i=40,000 bp

1. f=40,000/3,000,000,000=0.0000133333333f = 40{,}000 / 3{,}000{,}000{,}000 = 0.0000133333333f=40,000/3,000,000,000=0.0000133333333.
2. ln⁡(1−f)≈−0.0000133333334222\ln(1 - f) \लगभग -0.0000133333334222ln(1−f)≈−0.0000133333334222.
3. N≈4.605170186/0.0000133333334222≈345,387.8N \लगभग 4.605170186 / 0.0000133333334222 \लग भग 345{,}387.8N≈4.605170186/0.0000133333334222≈345,387.8.
   तो **~345,400 कॉस्मिड क्लोन**।

(iii) λ क्लोन i=15,000i = 15{,}000i=15,000 bp

1. f=15,000/3,000,000,000=0.000005f = 15{,}000 / 3{,}000{,}000{,}000 = 0.000005f=15,000/3,000,000,000=0.000005.
2. ln⁡(1−f)≈−0.0000050000000125\ln(1 - f) \लगभग -0.0000050000000125ln(1−f)≈−0.0000050000000125.
3. N≈4.605170186/0.0000050000000125≈921,034.0N \लगभग 4.605170186 / 0.0000050000000125 \लगभग 921{,}034.0N≈4.605170186/0.0000050000000125≈921,034.0.
   तो **~921,000 λ क्लोन**।

(ये दर्शाते हैं कि क्यों बड़े-इन्सर्ट वेक्टर आवश्यक क्लोनों की संख्या को काफी कम कर देते हैं।)

A.5 पुस्तकालय गुणवत्ता नियंत्रण और मीट्रिक

- **टिटर / कुल क्लोन गणना** - क्या यह आवश्यक N को पूरा करता है?
- **आकार वितरण डालें** - यादृच्छिक क्लोनों के प्रतिबंध डाइजेस्ट/PFGE द्वारा जाँच करें।
- **% पुनः संयोजक** (अर्थात, क्लोन ले जाने वाले सम्मिलन बनाम खाली वेक्टर)।

- **जटिलता / अतिरेकता** - कितने अद्वितीय क्लोन (संकरण या अनुक्रमण उपसमूह द्वारा अनुमान)।
- **स्थिरता** - पीढ़ियों के दौरान प्रतिबंध पैटर्न द्वारा पुनर्व्यवस्था की जांच करें।

A.6 स्क्रीनिंग और क्लोन अलगाव

- लेबलयुक्त जांच (रेडियोधर्मी या गैर-रेडियोधर्मी) के साथ **कॉलोनी/प्लेक संकरण ।**
- वेक्टर प्राइमर्स + जीन-विशिष्ट जांच का उपयोग करके **पीसीआर स्क्रीनिंग ।**
- **एंटीबॉडी/इम्यूनोस्क्रीनिंग** (कार्यात्मक/व्यक्त प्रोटीन)।
- कॉन्टिग्स के निर्माण के लिए **अतिव्याप्त क्लोनों के लिए लाइब्रेरी स्क्रीनिंग ।**
- उच्च-थ्रूपुट स्क्रीनिंग के लिए **फ़िल्टर लिफ्ट और मैक्रोएरेज़।**

A.7 फायदे और नुकसान

- **लाभ:** पूर्ण जीनोमिक संदर्भ, प्रमोटर/नियामक तत्व शामिल हैं, स्थितिगत क्लोनिंग के लिए अच्छा है।
- **नुकसान:** बड़े जीनोम के लिए कई क्लोनों की आवश्यकता होती है (जब तक कि बी.ए .सी. का उपयोग न किया जाए), संभावित चिमेरिज्म (विशेष रूप से वाई.ए .सी.), समय लेने वाली स्क्रीनिंग।

A.8 विशिष्ट अनुप्रयोग

- स्थितिगत क्लोनिंग, भौतिक मानचित्रण, विनियामक अनुक्रमों को पृथक करना, अनुक्रमण के लिए संदर्भ क्लोन मानचित्र बनाना, तुलनात्मक जीनोमिक्स।

बी. सीडीएनए लाइब्रेरीज़ - गहन विवरण

B.1 आप इसे कब और क्यों बनाते हैं

- आरएनए निष्कर्षण के समय किसी कोशिका/ऊतक के **ट्रांसक्रिप्टोम को** कैप्चर करना ।
- अभिव्यक्ति के लिए **पूर्ण ORFs का** क्लोन बनाना , स्प्लिस वेरिएंट का अध्ययन करना, या भिन्न रूप से व्यक्त जीन की पहचान करना।
- कार्यात्मक स्क्रीन (एंटीबॉडी स्क्रीनिंग, लिगैंड/रिसेप्टर पहचान) और ईएसटी परियोजनाओं के लिए।

B.2 प्रारंभिक सामग्री और mRNA संवर्धन

1. **कुल आरएनए गुणवत्ता महत्वपूर्ण** - अक्षुण्ण आरएनए (यदि बायोएनालाइजर का उपयोग कर रहे हैं तो आरआरएनए बैंड, आरआईएन की जांच करें)।
2. **mRNA संवर्धन** विकल्प:

- **ओलिगो(डीटी) चयन** (पॉलीए पूंछ को बांधता है) - पॉलीएडेनिलेटेड एमआरएनए को समृद्ध करता है।
- **rRNA रिक्तीकरण** (राइबोमाइनस, राइबोज़ीरो) — mRNAs के पॉलीएडेनिलेटेड न होने पर या प्रोकैरियोट्स के लिए उपयोगी।
  चयन निरूपण को प्रभावित करता है: यदि रिवर्स ट्रांसक्रिप्शन अधूरा है, तो ओलिगो(dT) 3′ सिरों की ओर अभिमुख होता है।

बी.3 रिवर्स ट्रांसक्रिप्शन और द्वितीय स्ट्रैंड संश्लेषण (तकनीकी विकल्प)

- **प्राइमिंग रणनीतियाँ:**
  - **ओलिगो (डीटी)** : यदि आरटी बंद हो जाता है तो पॉलीए टेल → 3′ पूर्वाग्रह को लक्षित करता है।
  - **यादृच्छिक हेक्सामर्स** : अधिक समान कवरेज, लेकिन इसमें rRNA संदूषण शामिल हो सकता है।
  - **जीन-विशिष्ट प्राइमर्स** : लक्षित लाइब्रेरीज़ के लिए।
  - **स्मार्ट / टेम्पलेट स्विचिंग** : आरटी के दौरान 5' अंत में एक परिभाषित अनुक्रम जोड़कर पूर्ण लंबाई वाले सीडीएनए के लिए समृद्ध करता है।
  - **कैप-ट्रैपिंग, ओलिगो-कैपिंग** : पूर्ण-लंबाई 5′ कैप्ड ट्रांसक्रिप्ट को समृद्ध करने के तरीके (पूर्ण-लंबाई ओआरएफ के लिए महत्वपूर्ण)।
- **द्वितीय स्ट्रैंड संश्लेषण:** आरएनएसे एच + डीएनए पोल I (क्लासिकल) या स्ट्रैंड-स्विचिंग पॉलीमरेज़।
- **अंत पॉलिशिंग:** कुंद/संयोजी सिरे बनाएं, दिशात्मक क्लोनिंग के लिए एडाप्टर/लिंकर जोड़ें।

B.4 दिशात्मक क्लोनिंग और अभिव्यक्ति लाइब्रेरी

- **दिशात्मक क्लोनिंग** (संरक्षित अभिविन्यास डालें) दो अलग एडाप्टर/प्रतिबंध साइटों के साथ या दिशात्मक पुनर्संयोजन प्रणालियों (गेटवे, TOPO दिशात्मक क्लोनिंग) का उपयोग करके प्राप्त की जाती है।
- **अभिव्यक्ति सीडीएनए लाइब्रेरी** : ऐसे वेक्टर में क्लोन किया जाता है जो बैक्टीरिया या यूकेरियोट्स में अभिव्यक्ति की अनुमति देते हैं (जैसे, λgt11, λZAP, स्तनधारी अभिव्यक्ति वेक्टर)। इम्यूनोस्क्रीनिंग, लिगैंड/रिसेप्टर खोज के लिए उपयोगी; लेकिन कई यूकेरियोटिक प्रोटीनों को अनुवादोत्तर संशोधनों की आवश्यकता होती है जो बैक्टीरिया में उपल ब्ध नहीं होते।

B.5 आकार विभाजन और सामान्यीकरण

- **आकार का चयन** (जेल या कॉलम द्वारा); कई आकार श्रेणियों को एकत्रित करने से क्लोनिंग पूर्वाग्रह कम हो जाता है।
- **सामान्यीकरण,** अक्सर पुनर्संयोजन गतिकी + द्वैध न्यूक्लीज़ या घटाव विधियों के माध्यम से प्रचुर प्रतिलेखों (जैसे, rRNA, एक्टिन) के अति-प्रतिनिधित्व को कम करता है। सामान्यीकरण दुर्लभ प्रतिलेखों की खोज को बढ़ाता है।

B.6 लाइब्रेरी निर्माण - विशिष्ट कार्यप्रवाह

1. उच्च गुणवत्ता वाले कुल आरएनए को अलग करें → mRNA (ओलिगो डीटी) को समृद्ध करें।

2. प्रथम-स्ट्रैंड सीडीएनए संश्लेषण (ओलिगो डीटी या स्मार्ट)।
3. द्वितीय स्ट्रैंड संश्लेषण → डीएस सीडीएनए.
4. आकार विभाजन (वैकल्पिक) और अंत पॉलिशिंग।
5. दिशात्मक क्लोनिंग के लिए एडाप्टर या प्रतिबंधन स्थल को लिगेट करें।
6. चुने हुए वेक्टर (प्लास्मिड, फेज) में क्लोन करें और रूपांतरित/पैकेजिंग करें।
7. कॉलोनियों या पट्टिकाओं को चुनें/व्यवस्थित करें; ग्लिसरॉल स्टॉक/प्लेटों को संग्रहित करें।

B.7 गुणवत्ता नियंत्रण और मीट्रिक

- **% क्लोन सम्मिलित के साथ** ; **सम्मिलित आकार वितरण** (सामान्य सीडीएनए 0.5-3 केबी)।
- **% पूर्ण-लंबाई वाले क्लोन** (5′ जांच या 5′/3′ पीसीआर के साथ म ूल्यांकन किया गया)।
- **जटिलता** : अद्वितीय प्रतिलेखों की संख्या; अनुक्रमण उपसमूह द्वारा अनुमान लगाया जा सकता है।
- **अतिरेकता** : दोहराए गए क्लोनों की आवृत्ति द्वारा मापा जाता है।

B.8 स्क्रीनिंग और क्लोन पहचान

- **जांच के साथ संकरण** (सीडीएनए जांच, ईएसटी)।
- जीन-विशिष्ट प्राइमरों और वेक्टर प्राइमरों का उपयोग करके **पीसीआर स्क्रीनिंग ।**
- **इम्यूनोस्क्रीनिंग** (यदि लाइब्रेरी व्यक्त की गई हो)।
- **अनुक्रमण (ईएसटी)** : क्लोन और सेंगर अनुक्रम 5′ सिरे चुनें — ऐतिहासिक रूप से निर्मित ईएसटी डेटाबेस। अब इसे बड़े पैमाने पर आरएनए -सीक्वेंस द्वारा प्रतिस्थापित किया जाता है, लेकिन अभी भी ओआरएफ पुनर्प्राप्ति के लिए उपयोग किया जाता है।

B.9 लाभ और हानियाँ

- **लाभ:** अभिव्यक्ति के लिए तैयार कोडिंग अनुक्रम प्रदान करता है; ऊतक /समय में व्यक्त प्रतिलेखों को प्रतिबिंबित करता है; वैकल्पिक स्प्लिसिंग और आइसोफॉर्म खोज के लिए उपयोगी है।
- **नुकसान:** इंट्रॉन और अपस्ट्रीम विनियामक तत्वों का अभाव; अभिव्यक्ति प्रारंभिक ऊतक /समय बिंदु पर निर्भर करती है (अभिव्यक्त नहीं किए गए प्रतिलेख अनुपस्थित हैं); 3′ पूर्वाग्रह और अपूर्ण/पूर्ण-लंबाई प्रतिनिधित्व संबंधी समस्याएं।

B.10 आधुनिक संदर्भ - RNA-Seq और जब cDNA लाइब्रेरी अभी भी मायने रखती है

- **RNA-Seq** (NGS) अब ट्रांसक्रिप्टोम प्रोफाइलिंग के लिए EST प्रोजेक्ट्स की जगह ले रहा है, लेकिन **क्लोन किए गए cDNA लाइब्रेरीज़** तब भी उपयोगी रहते हैं जब आपको अभिव्यक्ति, कार्यात्मक स्क्रीनिंग या प्रोटीन उत्पादन के लिए भौतिक क्लोन की आवश्यकता होती है। SMART-Seq और लॉन्ग-रीड cDNA सीक्वेंसिंग (PacBio Iso-Seq, ऑक्सफ़ोर्ड नैनोपोर) जैसी विधियाँ पूर्ण-लंबाई वाले ट्रांसक्रिप्ट कैप्चर को सीक्वेंसिंग के साथ जोड़ती हैं।

---

3. व्यावहारिक कमियाँ और समस्या निवारण (वाइवा/प्रैक्टिकल परीक्षाओं के लिए उपयोगी)

- **जीनोमिक लाइब्रेरी:**
  - खराब गुणवत्ता (कतरनी) जीनोमिक डीएनए → छोटे सम्मिलन।
  - अतिपाचन → बहुत अधिक छोटे टुकड़े।
  - अपर्याप्त आकार चयन → कई छोटे/गैर-सूचनात्मक क्लोनों के साथ शोर लाइब्रेरी।
  - मेजबान में पुनर्संयोजन → पुनर्व्यवस्थित क्लोन (पुनर्संयोजन-कमी वाले उपभेदों का उपयोग करें)।
- **सीडीएनए पुस्तकालय:**
  - आरएनएएस संदूषण → क्षीण mRNA / कटे हुए cDNAs.
  - अपूर्ण रिवर्स ट्रांसक्रिप्शन → 3′ पूर्वाग्रह (पूर्ण लंबाई को समृद्ध करने के लिए टेम्पलेट-स्विचिंग विधियों का उपयोग करें)।
  - प्रचुर मात्रा में प्रतिलेखों का अति-प्रतिनिधित्व → सामान्यीकरण या अनुक्रम का गहराई से उपयोग करें।

---

4. तुलना तालिका (त्वरित समीक्षा)

विशेषता	जीनोमिक लाइब्रेरी	सीडीएनए लाइब्रेरी
स्रोत डीएनए	जीनोमिक डीएनए (सभी अनुक्रम)	mRNA → cDNA (केवल अभिव्यक्त जीन)
प्रमोटर/इंट्रोन शामिल हैं	हाँ	नहीं (आमतौर पर)
पूर्ण जीन + विनियामक क्षेत्र प्राप्त करने के लिए उपयोग करें		
अभिव्यक्ति के लिए ORF प्राप्त करने हेतु उपयोग करें	संभव है लेकिन अक्सर इसमें इंट्रॉन होते हैं → cDNA की आवश्यकता होती है	(पूर्ण लंबाई होने पर ORF तैयार)
अभिव्यक्ति को दर्शाता है	नहीं	हाँ (ऊतक /समय पर निर्भर)
विशिष्ट सम्मिलित आकार	10 केबी - >200 केबी (लैम्ब्डा → बीएसी/वाईएसी)	0.5 – 3 केबी (सामान्य)
mRNA गुणवत्ता की आवश्यकता है	नहीं	हाँ (गंभीर)

---

5. आवेदन - त्वरित सूची

- **जीनोमिक लाइब्रेरी:** स्थितिगत क्लोनिंग, प्रमोटर विश्लेषण, भौतिक मानचित्रण, अनुक्रमण के लिए क्लोन मानचित्र का निर्माण।
- **सीडीएनए लाइब्रेरी:** व्यक्त जीन को अलग करना, वैकल्पिक स्प्लिसिंग का अध्ययन करना, प्रोटीन का उत्पादन करना, अभिव्यक्ति क्लोनिंग, ईएसटी परियोजनाएं, ऊतक -विशिष्ट जीन की पहचान करना।

---

6. परीक्षा उत्तर रणनीति और आरेख सुझाव

- **लघु उत्तर / 2-4 अंक:** प्रत्येक को परिभाषित करें, मुख्य अंतर और एक अनुप्रयोग बताएं।
- **दीर्घ उत्तर / 10-15 अंक:** परिभाषा दीजिए, चरणों की सूची बनाइए (विस्तृत), वेक्टर विकल्प दर्शाइए, एक कार्यान्वित उदाहरण दीजिए (कवरेज गणना), QC मेट्रिक्स और स्क्रीनिंग विधियों की सूची बनाइए, पक्ष/विपक्ष और अनुप्रयोगों का उल्लेख कीजिए।
- **आरेख सुझाव:** (i) जीनोमिक लाइब्रेरी के लिए कार्यप्रवाह बनाएँ (डीएनए → विखंडन → आकार चयन → बंधाव → पैकेजिंग/रूपांतरण → कॉलोनी बैंक), (ii) सीडीएनए कार्यप्रवाह (एमआरएनए → पहला स्ट्रैंड → दूसरा स्ट्रैंड → वेक्टर में क्लोन → रूपांतरित)। प्रमुख अभिकर्मकों (आरएनएसे अवरोधक, ओलिगो(डीटी), रिवर्स ट्रांसक्रिप्टेज़, पैकेजिंग एक्सट्रैक्ट) को लेबल करें।

---

7. लघु चेकलिस्ट (व्यावहारिक)

जीनोमिक लाइब्रेरी की सफलता के लिए: उच्च-एमडब्ल्यू डीएनए → उपयुक्त विखंडन → सटीक आकार चयन → कुशल बंधाव/पैकेजिंग → बड़े आवेषण के लिए सक्षम मेजबान → आवेषण आकार/स्थिरता की गुणवत्ता नियंत्रण → कवरेज के लिए पर्याप्त क्लोन संख्या।

सीडीएनए लाइब्रेरी की सफलता के लिए: उच्च गुणवत्ता वाला आरएनए (आरआईएन उच्च) → कुशल एमआरएनए संवर्धन → पूर्ण लंबाई कैप्चर के लिए दृष्टिकोण (स्मार्ट/कैप-ट्रैप) → दिशात्मक क्लोनिंग → यद ि आवश्यक हो तो आकार विभाजन/सामान्यीकरण → % पूर्ण लंबाई और सम्मिलित आकार की पुष्टि करें।

पेपर: रिकॉम्बिनेंट डीएनए टेक्नोलॉजी

वर्ष : 2nd B.sc.,(BT)

इकाई: 3

जेनेटिक मैनिपुलेशन की एंजाइमोलॉजी:

आनुवंशिक हेरफेर की एंजाइमोलॉजी

जेनेटिक मैनिपुलेशन (या जेनेटिक इंजीनियरिंग) में कई तरह के एंजाइम का इस्तेमाल करके जीवों के जेनेटिक मटीरियल में बदलाव करना शामिल है। ये एंजाइम DNA या RNA पर कंट्रोल्ड बायोकेमिकल रिएक्शन करते हैं ताकि जेनेटिक मटीरियल को काटा, जोड़ा, कॉपी, मॉडिफाई और डाला जा सके। मुख्य एंजाइम ग्रुप में **रिस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस** , **DNA लाइगेसेस** , **पॉलीमरेज़** , **मॉडिफाई करने वाले एंजाइम** , **न्यूक्लिएसेस** , **रीकॉम्बिनेज** और **क्लोनिंग वेक्टर और जीनोम एडिटिंग सिस्टम में इस्तेमाल होने वाले एंजाइम शामिल हैं** ।

---

1. रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस (रेस्ट्रिक्शन एंजाइम)

परिभाषा

रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिऐस ऐसे एंजाइम होते हैं जो *खास छोटे DNA सीक्वेंस* (4–8 bp) को पहचानते हैं और उन जगहों पर या उनके आसपास DNA को तोड़ देते हैं।

प्रकार

1. **प्रकार I**
    - बड़ी मल्टी-सबयूनिट, ATP और S-एडेनोसिलमेथियोनीन की ज़रूरत होती है
    - पहचान की जगह से दूर DNA को काटें
    - जेनेटिक इंजीनियरिंग में शायद ही कभी इस्तेमाल किया जाता है
2. **प्रकार II**
    - **बायोटेक्नोलॉजी में सबसे महत्वपूर्ण**
    - सिंपल एंजाइम को ATP की ज़रूरत नहीं होती
    - पहचान क्रम **के अंदर या बहुत करीब से** काटें
    - **चिपचिपे सिरे** (एकजुट) या **कुंद सिरे** बनाएँ
3. **प्रकार III**
    - बाहरी पहचान क्रम को काटें, ATP की ज़रूरत है, कम आम है

महत्त्व

- **परिभाषित DNA खंड** उत्पन्न करें
- वेक्टर में DNA का **सटीक इंसर्शन** सक्षम करें
- चिपचिपे सिरे क्लोनिंग के लिए **कॉम्प्लिमेंट्री बेस-पेयरिंग की सुविधा देते हैं**

उदाहरण

- **EcoRI** : GAATTC (चिपचिपे सिरे)
- **हिंदIII** : AAGCTT
- **SmaI** : CCCGGG (ब्लंट एंड्स)

---

2. डीएनए लाइगेस

समारोह

आस-पास के DNA स्ट्रैंड के बीच
फॉस्फोडाइस्टर बॉन्ड बनने को कैटलाइज़ करता है। क्लोनिंग के दौरान **DNA के टुकड़ों को जोड़ने** के लिए ज़रूरी है।

प्रकार

- **T4 DNA लाइगेज** (बैक्टीरियोफेज T4 से)
    - सबसे अधिक बार उपयोग किया जाता है
    - चिपचिपे और कुंद सिरों को जोड़ता है
    - ATP के साथ सबसे अच्छा काम करता है
- **ई. कोलाई डीएनए लाइगेज**
    - मुख्य रूप से चिपचिपे सिरों पर काम करता है
    - ATP के बजाय NAD^+ की ज़रूरत होती है

महत्त्व

- DNA के टुकड़ों को प्लास्मिड वेक्टर में सील करता है → **रिकॉम्बिनेंट DNA मॉलिक्यूल**
- DNA प्रतिकृति या मरम्मत के दौरान होने वाले टूट-फूट की मरम्मत करता है

---

3. डीएनए पॉलीमरेज़

DNA पॉलीमरेज़ एक टेम्पलेट का इस्तेमाल करके नए DNA स्ट्रैंड बनाते हैं। जेनेटिक मैनिपुलेशन में, वे **PCR, DNA सीक्वेंसिंग और म्यूटेजेनेसिस के लिए ज़रूरी हैं**।

प्रकार और उपयोग

1. **टैक डीएनए पोलीमरेज़**
   - थर्मोस्टेबल, *थर्मस एक्वाटिकस से*
   - 72 °C पर PCR के लिए इस्तेमाल किया जाता है
   - प्रूफ़रीडिंग एक्टिविटी की कमी → ज़्यादा एरर रेट
2. **Pfu, Phusion, Q5 पॉलीमरेज़**
   - **3′→5′ एक्सोन्यूक्लिऐस प्रूफ़रीडिंग** के साथ हाई-फ़िडेलिटी एंजाइम
   - क्लोनिंग में इस्तेमाल होता है जिसमें एक्यूरेसी, साइट-डायरेक्टेड म्यूटेशन की ज़रूरत होती है
3. **क्लेनो फ्रैगमेंट** (*ई. कोलाई*पोल I से)
   - के लिए इस्तेमाल होता है:
     - 5′ ओवरहैंग भरना
     - 3′ ओवरहैंग हटाना
     - कुंद सिरे बनाना
4. **रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस**
   - आरएनए-आश्रित डीएनए पोलीमरेज़
   - mRNA → cDNA में बदलता है
   - cDNA लाइब्रेरी बनाने और जीन एक्सप्रेशन की स्टडी करने के लिए इस्तेमाल किया जाता है

महत्त्व

- विशिष्ट DNA क्षेत्रों का प्रवर्धन
- DNA सीक्वेंसिंग (सैंगर DNA पॉलीमरेज़ + डाइडिऑक्सीन्यूक्लियोटाइड्स का इस्तेमाल करता है)
- उच्च-निष्ठा जीनोम इंजीनियरिंग

---

4. न्यूक्लिऐसेस

प्रकार

- **एक्सोन्यूक्लिअस** : DNA को सिरों से पचाते हैं
- **एंडोन्यूक्लिऐस** : DNA स्ट्रैंड के अंदर कट

प्रमुख एंजाइम

1. **एक्सोन्यूक्लिऐस III**
    - 3’ सिरे से न्यूक्लियोटाइड हटाता है
    - नेस्टेड डिलीशन जेनरेट करने के लिए इस्तेमाल किया जाता है
2. **मूंग न्यूक्लिऐस**
    - सिंगल-स्ट्रैंडेड ओवरहैंग्स को हटाता है
    - ब्लंट एंड्स बनाने के लिए उपयोगी
3. **डीएनएसे I**
    - dsDNA में रैंडम साइट्स को काटता है
    - DNA फुटप्रिंटिंग, DNA कंटैमिनेशन हटाने के लिए इस्तेमाल किया जाता है

---

5. डीएनए-संशोधक एंजाइम

ये DNA पर केमिकल ग्रुप्स को बदल देते हैं।

A. डीएनए मिथाइलट्रांसफेरेज़

- एडेनिन या साइटोसिन में मिथाइल ग्रुप जोड़ें
- बैक्टीरिया के DNA को रेस्ट्रिक्शन एंजाइम से बचाएं
- एपिजेनेटिक्स स्टडीज़ और DNA को डाइजेशन से बचाने में इस्तेमाल होता है

बी. फॉस्फेटेस

- 5’-फॉस्फेट समूहों को हटाएँ
- उदाहरण: **CIP (काफ़ इंटेस्टाइनल फ़ॉस्फ़ेटेज़)**
- वेक्टर्स को सेल्फ-लिगेशन से रोकता है → क्लोनिंग एफिशिएंसी को बेहतर बनाता है

सी. किनेसेस

- 5’-फॉस्फेट समूह जोड़ें
- उदाहरण: **T4 पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज (PNK)**
- फॉस्फेट की कमी वाले DNA के एंड-लेबलिंग और लिगेशन के लिए ज़रूरी

---

6. आरएनए मैनिपुलेशन एंजाइम

आरएनसे ए

- एकल-रज्जुक RNA को नष्ट करता है
- DNA तैयारी से RNA हटाता है

आरएनसे एच

- RNA-DNA हाइब्रिड में RNA को ख़राब करता है
- रिवर्स ट्रांसक्रिप्शन में उपयोगी

T7 आरएनए पोलीमरेज़

- T7 प्रमोटर-ड्रिवन टेम्पलेट्स से RNAs के इन-विट्रो ट्रांसक्रिप्शन के लिए इस्तेमाल किया जाता है

---

7. रिकॉम्बिनेज और इंटीग्रेज

ये एंजाइम **साइट-स्पेसिफिक रीकॉम्बिनेशन में मदद करते हैं** ।

क्रे रिकॉम्बिनेज (क्रे-लॉक्स प्रणाली)

- **loxP** अनुक्रमों को पहचानता है
- एनिमल मॉडल में सेगमेंट को हटाने, पलटने या डालने के लिए इस्तेमाल किया जाता है

एफएलपी रीकॉम्बिनेज (एफएलपी-एफआरटी प्रणाली)

- यीस्ट एंजाइम; Cre के समान उपयोग

PhiC31 इंटीग्रेज

- जीनोम में खास स्यूडो-attP साइट्स में DNA को इंटीग्रेट करता है

---

8. टोपोआइसोमेरेज़

DNA सुपरकॉइलिंग से छुटकारा दिलाएं या स्ट्रैंड को निकलने दें।

टोपोइज़ोमेरेज़ I और

- डीएनए स्ट्रैंड को तोड़ना और फिर से जोड़ना

- टाइप I एक स्ट्रैंड को काटता है, टाइप II दोनों को काटता है

अनुप्रयोग

- **टोपोआइसोमेरेज़-आधारित क्लोनिंग (TOPO क्लोनिंग)** में इस्तेमाल किया जाता है
    - लाइगेस की आवश्यकता नहीं
    - बहुत तेज़ क्लोनिंग विधि

---

9. CRISPR-एसोसिएटेड एंजाइम (मॉडर्न जीनोम एडिटिंग)

CRISPR काफी हद तक एंजाइम सिस्टम पर निर्भर करता है।

Cas9 (*स्ट्रेप्टोकोकस पाइोजेन्स से*)

- आरएनए-निर्देशित एंडोन्यूक्लिऐस
- टारगेट सीक्वेंस पर **डबल-स्ट्रैंड ब्रेक** बनाता है
- नॉकआउट, नॉक-इन, जीन सुधार की अनुमति देता है

Cas12a (Cpf1)

- अलग-अलग कट बनाता है
- टी-समृद्ध पीएएम को पहचानता है
- सरल गाइड डिज़ाइन

कैस13

- DNA के बजाय RNA को टारगेट करता है

प्राइम एडिटिंग एंजाइम

- डबल-स्ट्रैंड ब्रेक के बिना सटीक एडिट करने के लिए **Cas9 निकेज + रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस का** इस्तेमाल करता है

---

10. DNA क्लोनिंग वेक्टर में एंजाइम

α-पूरकता (LacZ प्रणाली)

- ब्लू-व्हाइट सिलेक्शन के लिए β-गैलेक्टोसिडेस एंजाइम का इस्तेमाल करता है

प्रतिबंध-संशोधन एंजाइम

- प्लास्मिड वेक्टर DNA की सुरक्षा के लिए मिथाइलट्रांसफेरेज़ को एनकोड कर सकते हैं

---

11. जेनेटिक मैनिपुलेशन में एंजाइमोलॉजी के एप्लीकेशन

- **जीन क्लोनिंग**
- **पुनःसंयोजक प्रोटीन और टीके बनाना**
- **पौधों, जानवरों, सूक्ष्मजीवों में जीनोम संपादन**
- **DNA/RNA प्रोब का निर्माण**
- **पित्रैक उपचार**
- **आणविक निदान (पीसीआर, आरटी-पीसीआर)**
- **अगली पीढ़ी की अनुक्रमण लाइब्रेरी तैयार करना**

मॉलिक्यूलर क्लोनिंग में उपयोगी एंजाइम

मॉलिक्यूलर क्लोनिंग, रिकॉम्बिनेंट DNA मॉलिक्यूल बनाने और उन्हें होस्ट ऑर्गेनिज़्म में फैलाने का प्रोसेस है। यह प्रोसेस **खास एंजाइम पर बहुत ज़्यादा निर्भर करता है** जो DNA को सटीकता से काट, बदल, कॉपी, जोड़ और मैनिपुलेट कर सकते हैं। ये एंजाइम रिकॉम्बिनेंट वेक्टर बनाने, जेनेटिक मटीरियल को बढ़ाने और होस्ट सेल्स में DNA डालने के लिए ज़रूरी हैं।

मॉलिक्यूलर क्लोनिंग में इस्तेमाल होने वाले मुख्य एंजाइम क्लास हैं:

1. **प्रतिबंध एंडोन्यूक्लिऐसेस**
2. **डीएनए लाइगेस**
3. **डीएनए पॉलीमरेज़**
4. **रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस**
5. **डीएनए संशोधित करने वाले एंजाइम**
6. **न्युक्लिअसिज़**
7. **टोपोईसोमेरासिज़**
8. **रिकॉम्बिनेस (कम आम लेकिन महत्वपूर्ण)**

प्रतिबंध एंडोन्यूक्लिअस

रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस (जिन्हें रेस्ट्रिक्शन एंजाइम भी कहा जाता है) सीक्वेंस-स्पेसिफिक DNA-क्लीविंग एंजाइम का एक क्लास है जो मॉलिक्यूलर क्लोनिंग और रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी में सेंट्रल रोल निभाते हैं। उनकी खोज ने तय जगहों पर DNA को सटीक रूप से काटने में मदद करके जेनेटिक इंजीनियरिंग में क्रांति ला दी।

---

1 परिचय

प्रतिबंध एंडोन्यूक्लिऐस मुख्य रूप से बैक्टीरिया और आर्किया द्वारा उनके **प्रतिबंध-संशोधन (आरएम) रक्षा प्रणाली के हिस्से के रूप में उत्पादित एंजाइम होते हैं** , जो उन्हें बैक्टीरियोफेज डीएनए पर हमला करने से बचाता है।

- *प्रतिबंध* = विदेशी DNA का विभाजन
- *मॉडिफिकेशन* = होस्ट DNA को टूटने से बचाने के लिए उसका मिथाइलेशन

ये एंजाइम डबल-स्ट्रैंडेड DNA में खास, छोटे न्यूक्लियोटाइड सीक्वेंस को पहचानते हैं और दोनों स्ट्रैंड को अलग कर देते हैं।

---

2. खोज और जैविक भूमिका

- इसकी खोज सबसे पहले 1960 के दशक में *E. coli में हुई थी*, जब रिसर्चर्स ने देखा कि कुछ फेज कुछ स्ट्रेन्स में ठीक से नहीं बढ़ते हैं।
- वर्नर आर्बर, हैमिल्टन स्मिथ और डैनियल नाथन ने रेस्ट्रिक्शन एंजाइम औरDNA एनालिसिस में उनके इस्तेमाल के बारे में बताया; उन्हें **1978 में नोबेल प्राइज़ मिला**।

बायोलॉजिकल भूमिका :
रेस्ट्रिक्शन एंजाइम अनमेथिलेटेड (बाहरी) DNA को खास सीक्वेंस पर काटते हैं, जिससे बैक्टीरियोफेज जीनोम इनएक्टिव हो जाते हैं।

---

3. पहचान अनुक्रम

प्रतिबंध एंजाइम आम तौर पर **पैलिंड्रोमिक अनुक्रमों को पहचानते हैं** :
एक पैलिंड्रोम दोनों स्ट्रैंड पर 5′→3′ से समान पढ़ता है।

उदाहरण :
EcoRI 5′-GAATTC-3′3′-CTTAAG-5′ को पहचानता है

ये पैलिंड्रोम आमतौर पर **4, 6, या 8 bp लंबे होते हैं**।

---

4. रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस के प्रकार

रेस्ट्रिक्शन एंजाइम को स्ट्रक्चर, कोफ़ैक्टर की ज़रूरतों और क्लीवेज की जगह के आधार पर कई तरह से बांटा जाता है।

प्रकार I

- जटिल, बहु-उप इकाई एंजाइम
- खास सीक्वेंस को पहचानें लेकिन **DNA को बहुत दूर से काटें** (1000 bp या उससे ज़्यादा)
- **ATP और S-एडेनोसिलमेथियोनीन की** आवश्यकता होती है
- जेनेटिक इंजीनियरिंग में इसका इस्तेमाल बहुत कम होता है क्योंकि क्लीवेज की जगह का अंदाज़ा नहीं लगाया जा सकता

टाइप II (क्लोनिंग के लिए सबसे महत्वपूर्ण)

- सरल होमोडिमेरिक प्रोटीन
- **छोटे पैलिंड्रोमिक अनुक्रमों को** पहचानें
- पहचान अनुक्रम **के भीतर या निकट** विभाजित करें
- **Mg^{2+}** की आवश्यकता है (ATP नहीं)
- **पुनरुत्पादनीय, पूर्वानुमानित कट्स** तैयार करें
- रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी में **सबसे ज़्यादा इस्तेमाल होता है**

प्रकार III

- **एटीपी** की आवश्यकता
- खास जगहों को पहचानें लेकिन थोड़ी दूरी बनाए रखें
- कम सामान्यतः उपयोग किया जाता है

प्रकार IIS

- गैर-पैलिंड्रोमिक अनुक्रमों को पहचानें
- पहचान वाली जगह *के बाहर* एक तय दूरी पर काटें
- **गोल्डन गेट क्लोनिंग** में इस्तेमाल किया गया
- उदाहरण: **BsaI**

---

5. क्लीवेज पैटर्न

रिस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस दो तरह के DNA एंड्स बनाते हैं:

A. चिपचिपे (एकजुट) सिरे

- अलग-अलग कटों से बनाया गया
- सिंगल-स्ट्रैंडेड ओवरहैंग कॉम्प्लिमेंट्री सीक्वेंस के साथ बेस-पेयर कर सकते हैं
- क्लोनिंग के लिए बहुत उपयोगी

उदाहरण: EcoRI

5 '---जी AATTC-- -3 '

3 '---सीटीटीएए जी-- -5 '

बी. ब्लंट एंड्स

- दोनों DNA स्ट्रैंड में सीधे कट से बनता है
- कोई ओवरहैंग नहीं
- बंधाव के लिए कम कुशल

उदाहरण: SmaI

5 '---सीसीसी ▼ जीजीजी-- -3 '

3 '---GGG ▲ CCC-- -5 '

---

6. रेस्ट्रिक्शन एंजाइम का नामकरण

रेस्ट्रिक्शन एंजाइम का नाम उस माइक्रोऑर्गेनिज्म के अनुसार रखा जाता है जिससे उन्हें अलग किया जाता है।

फ़ॉर्मेट :
जीनस + *स्पीशीज़* + *स्ट्रेन* + रोमन न्यूमरल

उदाहरण: **EcoRI**

- *ई* → एस्चेरिचिया
- *co* → कोली
- *R* → RY13 स्ट्रेन
- *I* → पहला पृथक एंजाइम

---

7. कार्य प्रणाली

टाइप II रेस्ट्रिक्शन एंजाइम इस क्रम को फॉलो करते हैं:

1. **DNA स्कैनिंग:** एंजाइम बिना किसी खास तरीके से जुड़ता है और DNA के साथ चलता है।
2. **सीक्वेंस पहचान:** टारगेट पैलिंड्रोम की पहचान करता है।
3. **DNA बेंडिंग:** एक बनावट में बदलाव लाता है जो कैटेलिटिक रेसिड्यू की जगह तय करता है।
4. **क्लीवेज:** दोनों स्ट्रैंड पर फॉस्फोडाइएस्टर बॉन्ड का हाइड्रोलिसिस।
5. **प्रोडक्ट रिलीज़:** चिपचिपे या कुंद सिरे बनाता है।

कैटेलिसिस में आमतौर पर पानी के मॉलिक्यूल्स को एक्टिवेट करने के लिए कोफ़ैक्टर के तौर पर **Mg^{2+} शामिल होता है** , जो फ़ॉस्फ़ोडाइएस्टर बैकबोन पर हमला करते हैं।

---

8. मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में एप्लीकेशन

बायोटेक्नोलॉजी में रेस्ट्रिक्शन एंजाइम ज़रूरी टूल हैं। इनके मुख्य इस्तेमाल में शामिल हैं:

1. रिकॉम्बिनेंट DNA का निर्माण

- दो अलग-अलग सोर्स से मिले DNA को एक ही एंजाइम से काटने पर कॉम्प्लिमेंट्री सिरे बनते हैं
- इन्हें DNA लाइगेज का इस्तेमाल करके जोड़ा जा सकता है

2. जीन क्लोनिंग

- प्लास्मिड वेक्टर में बाहरी DNA को सटीक रूप से डालने में मदद करें
- दो अलग-अलग एंजाइम का इस्तेमाल करके डायरेक्शनल क्लोनिंग की अनुमति दें

3. प्रतिबंध मानचित्रण

- DNA मॉलिक्यूल में रेस्ट्रिक्शन साइट्स की पोजीशन मैप करने के लिए इस्तेमाल किया जाता है
- जीनोम विश्लेषण के लिए महत्वपूर्ण

4. आनुवंशिक फिंगरप्रिंटिंग

- RFLP (रिस्ट्रिक्शन फ्रैगमेंट लेंथ पॉलीमॉर्फिज्म) एनालिसिस का हिस्सा
- फोरेंसिक, पैटरनिटी टेस्टिंग और जेनेटिक बीमारी के डायग्नोसिस में इस्तेमाल होता है

5. डीएनए अनुक्रमण

- शुरुआती सैंगर सीक्वेंसिंग में जीनोम की जटिलता को कम करने के लिए रिस्ट्रिक्शन फ़्रैगमेंट की ज़रूरत थी

6. डायग्नोस्टिक एप्लीकेशन

- उन SNPs का पता लगाना जो रेस्ट्रिक्शन साइट्स बनाते या खत्म करते हैं
- जीनोटाइपिंग और म्यूटेशन का पता लगाने में इस्तेमाल किया जाता है

7. सिंथेटिक जीवविज्ञान

- टाइप IIS एंजाइम (जैसे, BsaI) मॉड्यूलर DNA असेंबली को सक्षम करते हैं

---

9. कॉमन रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस के उदाहरण

एनजाइम	स्रोत	मान्यता अनुक्रम	समाप्त होता है
इकोआरआई	*ई कोलाई*	जीएएटीटीसी	चिपचिपा
हिंदIII	*एच. इन्फ्लूएंजा*	एएजीसीटीटी	चिपचिपा
बामएचआई	*बी. एमाइलोलिकेफैसिएन्स*	जीजीएटीसीसी	चिपचिपा
स्माई	*एस. मार्सेसेंस*	सीसीसीजीजीजी	कुंद
चना	*एन. ओटिटिडिस*	जीसीजीजीसीसीजीसी	चिपचिपा
बीएसएआई (टाइप आईआईएस)	*बी. स्टीयरोथर्मोफिलस*	GGTCTC (बाहर से कट)	चिपचिपा

---

10. रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस के फ़ायदे

- उच्च विशिष्टता
- पूर्वानुमानित दरार
- पुनरुत्पादनीय परिणाम
- रिकॉम्बिनेंट वेक्टर्स को डिज़ाइन करने के लिए उपयोगी
- बड़े पैमाने पर DNA हेरफेर सक्षम करें

---

11. सीमाएं

- स्टार एक्टिविटी: गलत कंडीशन में नॉन-स्पेसिफिक कटिंग
  (जैसे, हाई ग्लिसरॉल, हाई pH, लो आयनिक स्ट्रेंथ)
- ब्लंट-एंड लिगेशन अप्रभावी है
- विशिष्ट अनुक्रमों की उपस्थिति पर निर्भरता
- टारगेट DNA में कुछ सीक्वेंस मौजूद नहीं हो सकते हैं, जिसके लिए दूसरे तरीकों की ज़रूरत होती है।

---

12. प्रतिबंध-संशोधन प्रणाली

आर-एम प्रणाली एक प्रतिबंध एंजाइम को संबंधित **मेथिलट्रांसफेरेज़ के साथ जोड़ती है** , जो पहचान अनुक्रम को मिथाइलेट करके मेजबान डीएनए की रक्षा करता है।

उदाहरण :
EcoRI मेथिलेज़ GAATTC को संशोधित करता है → स्व-विभाजन को रोकता है।

---

13. आधुनिक एक्सटेंशन और डेरिवेटिव

- परिवर्तित विशिष्टता वाले **इंजीनियर्ड प्रतिबंध एंजाइम**
- **CRISPR-एसोसिएटेड न्यूक्लिएसेस** (असली रेस्ट्रिक्शन एंजाइम नहीं, बल्कि सीक्वेंस-स्पेसिफिक DNA क्लीवेज से प्रेरित)
- टाइप IIS एंजाइम का इस्तेमाल करके **गोल्डन गेट असेंबली**

---

14. निष्कर्ष

रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस मॉलिक्यूलर बायोलॉजी के ज़रूरी टूल हैं। DNA को खास सीक्वेंस पर पहचानने और काटने की उनकी क्षमता ने रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी, जीन क्लोनिंग, जेनेटिक इंजीनियरिंग, ट्रांसजेनेसिस और मॉडर्न सिंथेटिक बायोलॉजी की नींव रखी। टाइप II रेस्ट्रिक्शन एंजाइम, खास तौर पर, अपनी सटीकता, भरोसेमंद होने और इस्तेमाल में आसानी की वजह से लैब प्रोटोकॉल के लिए ज़रूरी बने हुए हैं।

ये एंजाइम बायोटेक्नोलॉजी को आगे बढ़ाने के लिए ज़रूरी हैं, जिससे जीनोम मैपिंग से लेकर इलाज के विकास तक सब कुछ मुमकिन हो पाता है।

डीएनए लाइगेसेस

फॉस्फोडाइस्टर बॉन्ड बनाकर DNA के टुकड़ों को जोड़ते हैं। वे **DNA रेप्लिकेशन, रिपेयर, रीकॉम्बिनेशन और रीकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी** , खासकर मॉलिक्यूलर क्लोनिंग में ज़रूरी टूल हैं।

---

1 परिचय

DNA लाइगेस ऐसे एंजाइम होते हैं जो दो DNA स्ट्रैंड को **जोड़ने (लिगेशन) को कैटलाइज़ करते हैं**। वे DNA बैकबोन में दरारों को **निक्स** (सिंगल-स्ट्रैंड ब्रेक) को सील करके या अलगअलगDNA टुकड़ों को जोड़कर ठीक करते हैं।

यह रिएक्शन इन मामलों में ज़रूरी है:

- **DNA प्रतिकृति** (ओकाज़ाकी टुकड़ों को जोड़ना)
- **बेस एक्सिशन और न्यूक्लियोटाइड एक्सिशन मरम्मत**
- **पुनः संयोजक डीएनए निर्माण**
- **आनुवंशिक इंजीनियरिंग और क्लोनिंग**

---

2. खोज और ऐतिहासिक पृष्ठभूमि

- **1967** में मार्टिन गेलर्ट और लेहमैन और वीस ने अलग-अलग इसकी खोज की थी।
- *ई. कोलाई* और बैक्टीरियोफेज T4 में पहचाना गया ।
- 1970 के दशक की शुरुआत में रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी के डेवलपमेंट को मुमकिन बनाया, जिससे जीन क्लोनिंग मुमकिन हुई।

---

3. DNA लाइगेस द्वारा उत्प्रेरित केमिकल रिएक्शन

DNA लाइगेस इनके बीच फॉस्फोडाइस्टर बॉन्ड बनने को कैटलाइज़ करते हैं:

- एक न्यूक्लियोटाइड का 3'-OH समूह
- आसन्न न्यूक्लियोटाइड का 5'-फॉस्फेट समूह

इससे लगातार शुगर-फॉस्फेट बैकबोन बनता है।

तीन-चरणीय तंत्र

1. **लाइगेज-एडेनिलट मध्यवर्ती का निर्माण**
    - लाइगेस ATP (या NAD^+) के साथ प्रतिक्रिया करता है।
    - एंजाइम एडेनिलेटेड (E–AMP) बन जाता है
2. **DNA पर 5′-फॉस्फेट का सक्रियण**
    - AMP को DNA ब्रेक के 5′-फॉस्फेट में ट्रांसफर किया जाता है
    - DNA-एडेनिलट इंटरमीडिएट का उत्पादन करता है
3. **फॉस्फोडाइएस्टर बंधन निर्माण**
    - 3′-OH सक्रिय 5′-फॉस्फेट पर हमला करता है
    - AMP जारी किया गया है
    - डीएनए स्ट्रैंड जुड़ते हैं

---

4. DNA लाइगेस के प्रकार

कोफ़ैक्टर की ज़रूरत के आधार पर दो मुख्य क्लास हैं।

A. एटीपी-आश्रित लिगेज

ATP को कोफ़ैक्टर के रूप में इस्तेमाल करें ।

1. T4 डीएनए लाइगेस

- बैक्टीरियोफेज T4 से व्युत्पन्न
- आणविक क्लोनिंग में **सबसे व्यापक रूप से इस्तेमाल किया जाने वाला लाइगेस**
- पर काम करता है:
    - चिपचिपे (एकजुट) सिरे
    - कुंद सिरे (हालांकि कम कुशल)
    - निक सीलिंग
- बड़े टेम्परेचर रेंज में एक्टिव, **16 °C पर सबसे अच्छा**

गुण

- रेस्ट्रिक्शन एंजाइम से कटे टुकड़ों को जोड़ने में बहुत असरदार
- यह RNA-DNA हाइब्रिड को भी जोड़ता है, जिससे यह कई तरह से काम आता है

अनुप्रयोग

- DNA इन्सर्ट को प्लास्मिड वेक्टर में जोड़ना
- पुनः संयोजक डीएनए का निर्माण
- कुंद-अंत बंधन
- लिंकर/एडाप्टर बंधन
- डीएनए मरम्मत अध्ययन

---

2. T7 डीएनए लाइगेस

- T4 लाइगेज से अधिक विशिष्ट
- एकजुट अंत पसंद करते हैं
- कुंद सिरों के लिए कम कुशल
- कुछ खास क्लोनिंग स्थितियों में उपयोगी जिनमें खासियत की ज़रूरत होती है

बी. एनएडी⁺-आश्रित लिगेस

NAD⁺ को कोफ़ैक्टर के रूप में इस्तेमाल करें।

1. ई. कोलाई डीएनए लाइगेस

- *ई. कोलाई* में प्राकृतिक रूप से पाया जाता है
- DNA में निशानों को सील करने में कुशल
- **जुड़े हुए सिरों** के लिए अच्छा काम करता है , लेकिन कुंद सिरों के लिए ठीक नहीं
- जीवाणु DNA प्रतिकृति में महत्वपूर्ण

अनुप्रयोग

- कुछ क्लोनिंग स्ट्रेटेजी में उपयोगी
- लिगेशन की पसंद (स्टिकी बनाम ब्लंट) तय करने में मददगार

---

5. DNA लाइगेस के स्रोत

DNA लाइगेस इनमें मौजूद होते हैं:

- **बैक्टीरिया** (NAD^+-आश्रित)
- **बैक्टीरियोफेज** (एटीपी-निर्भर)
- **यूकेरियोट्स** (ATP-आश्रित, बहु आइसोफॉर्म)

यूकेरियोटिक लिगेज

- **DNA लाइगेस I** → रेप्लिकेशन और रिपेयर
- **DNA लाइगेस III** → बेस एक्सिशन रिपेयर
- **DNA लाइगेस IV** → डबलस्ट्रैंड ब्रेक रिपेयर में नॉन-होमोलॉगस एंड जॉइनिंग (NHEJ)

इनका रिसर्च के लिए महत्व है लेकिन क्लोनिंग में इनका इस्तेमाल आम तौर पर नहीं होता।

---

6. मॉलिक्यूलर क्लोनिंग में DNA लाइगेस की भूमिका

DNA लाइगेज, रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी में एक**ज़रूरी एंजाइम है। इसके मुख्य काम हैं:**

1. रिस्ट्रिक्शन फ़्रैगमेंट को जोड़ना

- DNA को रिस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस द्वारा काटे जाने के बाद, लाइगेस जुड़ता है:
  - वेक्टर बैकबोन
  - खंड डालें
- रिकॉम्बिनेंट प्लास्मिड का निर्माण पूरा करता है

2. ब्लंट-एंड लिगेशन

- T4 DNA लाइगेज कुंद सिरों को कुशलता से जोड़ सकता है
- उपयोगी जब:
  - प्रतिबंध वाली साइटें उपलब्ध नहीं हैं
  - PCR उत्पादों में ओवरहैंग की कमी होती है
  - ब्लंट-एंड क्लोनिंग वेक्टर्स का इस्तेमाल किया जाता है (जैसे, SmaI-डाइजेस्टेड वेक्टर्स)

3. कोहेसिव एंड लिगेशन

- बेस पेयरिंग के कारण चिपचिपे सिरे एनील होते हैं
- लाइगेस रीढ़ की हड्डी को सील करता है
- बहुत कुशल और दिशात्मक

4. एडेप्टर/लिंकर लिगेशन

- लाइगेस सिंथेटिक ऑलिगोन्यूक्लियोटाइड को DNA टुकड़ों से जोड़ सकते हैं
- इसके लिए उपयोगी:
    - प्रतिबंध साइटें जोड़ना
    - अनुक्रमण एडाप्टर जोड़ना
    - डीएनए लाइब्रेरी तैयार करना

5. DNA रिपेयर में निक सीलिंग

- DNA मरम्मत परीक्षणों में उपयोग किया जाता है
- मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में निक ट्रांसलेशन से जुड़े एक्सपेरिमेंट के लिए ज़रूरी

---

7. लाइगेस एक्टिविटी को प्रभावित करने वाले कारक

1. तापमान

- कोहेसिव सिरों के लिए सबसे अच्छा: **12–16 °C**
- ब्लंट-एंड लिगेशन के लिए अक्सर **लंबे समय तक इनक्यूबेशन या ज़्यादा एंजाइम कंसंट्रेशन की ज़रूरत होती है**

2. डीएनए सांद्रता

- ज़्यादा इंसर्ट:वेक्टर रेश्यो से लिगेशन बेहतर होता है
- आम अनुपात: 3:1 या 5:1 (सम्मिलित करें:वेक्टर)

3. बफर संरचना

- Mg^{2+} की आवश्यकता है
- ATP अनस्टेबल है → फ्रेश होना चाहिए

4. DNA एंड कम्पैटिबिलिटी

- चिपचिपे सिरे कुंद सिरों की तुलना में ज़्यादा कुशलता से जुड़ते हैं

5. प्रतिक्रिया समय

- सिरों और एंजाइम की मात्रा के आधार पर 1 घंटे से लेकर रात भर तक

---

8. बायोटेक्नोलॉजी में DNA लाइगेस के इस्तेमाल

- जीन क्लोनिंग और प्लास्मिड निर्माण
- आणविक निदान
- एनजीएस के लिए लाइब्रेरी की तैयारी
- उत्परिवर्तन प्रयोग
- डीएनए लेबलिंग और निक ट्रांसलेशन
- इन विट्रो में DNA के टूटने की मरम्मत
- जीन थेरेपी के लिए वेक्टर निर्माण
- TA क्लोनिंग (A-टेल्ड PCR उत्पादों का लिगेशन)

---

9. उन्नत उपयोग

बंधाव-आधारित क्लोनिंग प्रणालियाँ

- बंधाव-निर्भर क्लोनिंग (LDC)
- गेटवे क्लोनिंग (रीकॉम्बिनेशन का इस्तेमाल करता है लेकिन अक्सर लाइगेज तैयारी में मदद करता है)
- गिब्सन असेंबली में एक्सोन्यूक्लिऐस और पॉलीमरेज़ के साथ लाइगेज भी शामिल है

डीएनए नैनोटेक्नोलॉजी में डीएनए लाइगेस

- नैनोस्ट्रक्चर बनाने के लिए ओलिगोस को जोड़ने के लिए इस्तेमाल किया जाता है
- सील डीएनए ओरिगामी निर्माण

T4 औरE. coli DNA लाइगेस के बीच अंतर

विशेषता	T4 डीएनए लाइगेस	ई. कोलाई डीएनए लाइगेस
सहायक कारक	एटीपी	एनएडी⁺
अंत प्रकार	चिपचिपा + कुंद	अधिकतर चिपचिपा
क्षमता	बहुत ऊँचा	निचला

विशेषता	T4 डीएनए लाइगेस	ई. कोलाई डीएनए लाइगेस
अनुप्रयोग	क्लोनिंग, मरम्मत, एडेप्टर	जीव में डीएनए प्रतिकृति
बहुमुखी प्रतिभा	डीएनए + आरएनए/डीएनए	मुख्य रूप से डीएनए

---

11. DNA लाइगेस की सीमाएं

- ब्लंट-एंड लिगेशन अप्रभावी है
- ATP का टूटना एक्टिविटी को कम कर सकता है
- अगर एक ही रेस्ट्रिक्शन एंजाइम इस्तेमाल कर रहे हैं तो गलत इंसर्ट ओरिएंटेशन
- कम्पैटिबल 5'-फॉस्फेट सिरों की ज़रूरत है
- वेक्टर सेल्फ-लिगेशन क्लोनिंग की क्षमता को कम कर सकता है (फॉस्फेटेस का इस्तेमाल करके हल किया गया)

---

12. निष्कर्ष

DNA लाइगेस मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में ज़रूरी एंजाइम हैं। वे DNA के टुकड़ों को मज़बूती से जोड़ने में मदद करते हैं, जिससे रिकॉम्बिनेंट DNA मॉलिक्यूल्स बनाना मुमकिन होता है। **T4 DNA लाइगेस** अपनी कई तरह से इस्तेमाल होने वाली और असरदार होने की वजह से जेनेटिक इंजीनियरिंग में सबसे ज़्यादा इस्तेमाल होने वाला लाइगेस है। मॉलिक्यूलर क्लोनिंग टेक्नीक में महारत हासिल करने और मॉडर्न बायोटेक्नोलॉजी को आगे बढ़ाने के लिए DNA लाइगेस के मैकेनिज्म, टाइप और इस्तेमाल को समझना ज़रूरी है।

पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज (PNK)

पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज (PNK) एक ज़रूरी DNA औरRNA-मॉडिफाइंग एंजाइम है जिसका इस्तेमाल मॉलिक्यूलर क्लोनिंग, DNA रिपेयर स्टडीज़, न्यूक्लिक एसिड लेबलिंग और एडवांस्ड जेनेटिक टेक्नीक में बड़े पैमाने पर किया जाता है। फॉस्फेट ग्रुप को न्यूक्लिक एसिड टर्मिनी में ट्रांसफर करने की इसकी क्षमता इसे रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी में ज़रूरी बनाती है।

---

1 परिचय

DNA या RNA के

5’-हाइड्रॉक्सिल (5’-OH) टर्मिनस तकट्रांसफर करने में मदद करता है। इसका सबसे ज़्यादा इस्तेमाल होने वाला रूप **T4 पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज है, जो** *बैक्टीरियोफेज T4* से मिलता है।

सामान्य प्रतिक्रिया

यह ATP के γ-फॉस्फेट को DNA या RNA के 5’-OH सिरे तक ट्रांसफर करता है।

5 ’-OH + एटीपी → 5 ’-फॉस्फेट (5 ’ -P) + एडीपी

5'-फॉस्फेट ग्रुप कई एंजाइमेटिक रिएक्शन, खासकर **DNA लिगेशन के लिए ज़रूरी है**।

---

2. ऐतिहासिक पृष्ठभूमि

- 1960 के दशक के मध्य में बैक्टीरियोफेज T4-संक्रमित *ई. कोली* में खोजा गया।
- T4 PNK को शुद्ध किया गया और सबसे शुरुआती DNA-मॉडिफाइंग एंजाइम में से एक के रूप में पहचाना गया।
- यह शुरुआती रिकॉम्बिनेंट DNA एक्सपेरिमेंट में एंड-लेबलिंग और लिगेशन के लिए एक ज़रूरी टूल बन गया।

---

3. पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज के स्रोत

A. T4 पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज

- मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में सबसे ज़्यादा इस्तेमाल होता है।
- DNA औरRNA दोनों के प्रति हाई एक्टिविटी।
- काइनेज और “3’-फॉस्फेटेज” दोनों एक्टिविटी दिखाता है।

बी. बैक्टीरियल पीएनके

- यह कई बैक्टीरिया में पाया जाता है, लेकिन कम एफिशिएंसी के कारण बायोटेक्नोलॉजी में आमतौर पर इसका इस्तेमाल नहीं किया जाता है।

---

4. T4 PNK की संरचना और डोमेन

T4 PNK एक**डुअल-फंक्शन एंजाइम है** , जिसमें दो मुख्य एक्टिविटी होती हैं:

1. **5′-काइनेज एक्टिविटी** – 5′-OH में फॉस्फेट जोड़ती है
2. **3′-फॉस्फेटेस एक्टिविटी** – 3′ फॉस्फेट (3′-P → 3′-OH) को हटाता है

ये एक्टिविटीज़ T4 PNK को एंड-रिपेयर और न्यूक्लिक एसिड मैनिपुलेशन के लिए बहुत उपयोगी बनाती हैं।

---

5. कार्य प्रणाली

पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज **दो-स्टेप ट्रांसफर रिएक्शन को कैटलाइज़ करता है** ।

चरण 1: एंजाइम-AMP इंटरमीडिएट का निर्माण

- एंजाइम ATP के साथ एक कॉम्प्लेक्स बनाता है।
- ATP, ADP + फॉस्फेट ग्रुप में टूट जाता है।

चरण 2: 5′ टर्मिनस का फॉस्फोरिलीकरण

- ATP से γ-फॉस्फेट DNA या RNA के 5′-OH ग्रुप में ट्रांसफर हो जाता है।
- **5′-फॉस्फोराइलेटेड** न्यूक्लिक एसिड बनाता है ।

3′-फॉस्फेटेस मैकेनिज्म (अतिरिक्त गतिविधि)

- 3′-फॉस्फेट ग्रुप को हटाता है, जिससे 3′-OH एंड्स बनते हैं।

यह दोहरी गतिविधि विशेष रूप से **बंधाव से पहले डीएनए अंत की मरम्मत में महत्वपूर्ण है** ।

---

6. पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज द्वारा स्वीकार किए गए सबस्ट्रेट्स

T4 PNK कई तरह के सबस्ट्रेट्स पर काम करता है:

- एकल-रज्जुक डीएनए
- दोहरे-रज्जुक वाले डीएनए
- शाही सेना
- डीएनए-आरएनए संकर

- ओलईगोन्युक्लियोटाईड्स
- कटे हुए डीएनए सिरे

---

7. मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज का उपयोग

1. लिगेशन के लिए DNA के सिरों की तैयारी

DNA लाइगेज को फॉस्फोडाइस्टर बॉन्ड बनाने के लिए **5′-फॉस्फेट** और **3′-OH की ज़रूरत होती है।**

अगर DNA इस तरह बनता है:

- PCR (टैक पॉलीमरेज़ अक्सर कोई फॉस्फेट नहीं देता)
- ओलिगोन्यूक्लियोटाइड का रासायनिक संश्लेषण
- विफॉस्फोराइलेटेड वैक्टर

→ DNA में फॉस्फेट की कमी होगी।

PNK गायब 5'-फॉस्फेट को जोड़ता है , जिससे बंधाव संभव होता है।

---

2. DNA और RNA की रेडियोलेबलिंग (5′-एंड लेबलिंग)

सबसे महत्वपूर्ण क्लासिकल इस्तेमाल में से एक।

तरीका

- PNK लेबल वाले ATP से 5' सिरे तक**γ-^{32}P या γ-^{33}P ट्रांसफर करता है।**
- बहुत ज़्यादा सेंसिटिव रेडियोएक्टिव प्रोब बनाता है।

अनुप्रयोग

- डीएनए अनुक्रमण (प्रारंभिक सेंगर विधि)
- संकरण प्रयोग
- फुटप्रिंटिंग परख
- जेल-शिफ्ट परख
- ट्रांसक्रिप्शन शुरू करने वाली जगहों की मैपिंग

---

3. गैर-रेडियोधर्मी लेबलिंग

PNK ये भी ट्रांसफर कर सकता है:

- फ्लोरोसेंट टैग
- बायोटिन-लेबल फॉस्फेट
- केमिलुमिनसेंट टैग

मॉडर्न डायग्नोस्टिक्स और NGS लाइब्रेरी की तैयारी में इस्तेमाल होता है।

---

4. डैमेज DNA एंड्स की रिपेयर

DNA ब्रेक में नॉन-आइडियल टर्मिनी हो सकती है:

- 3′-फॉस्फेट (3′-P)
- 5′-ओएच
- 3′-फॉस्फोग्लाइकोलेट

PNK की **3′-फॉस्फेटेज़ एक्टिविटी** इन सिरों को DNA पॉलीमरेज़ और लाइगेज़ के लिए तैयार करती है।

इसमें महत्वपूर्ण:

- एनएचईजे मरम्मत अध्ययन
- मरम्मत मार्ग विश्लेषण
- रेडिएशन बायोलॉजी (क्षतिग्रस्त 3′-सिरों को हटाना)

---

5. सिंथेटिक बायोलॉजी और NGS लाइब्रेरी की तैयारी

PNK का इस्तेमाल इस काम के लिए किया जाता है:

- सिंथेटिक ओलिगोन्यूक्लियोटाइड को संशोधित करें
- एडेप्टर में 5′-फॉस्फेट जोड़ें
- लिगेशन-बेस्ड असेंबली के लिए DNA फ़्रैगमेंट तैयार करें
- लाइब्रेरी प्रेप किट में टूटे हुए DNA को ठीक करें

---

6. आरएनए अध्ययन

चूंकि PNK, RNA पर काम करता है:

- RNA सिरों को लेबल करने के लिए उपयोग किया जाता है
- RNA दरार स्थलों का मानचित्रण (RNase मैपिंग)
- क्लोनिंग के लिए छोटे RNA तैयार करें
- माइक्रोRNA लाइब्रेरी तैयार करने में ज़रूरी

---

8. रिएक्शन की ज़रूरतें

T4 PNK के लिए ज़रूरी है:

- एटीपी (आमतौर पर 1 mM)
- Mg^{2+} (सहकारक)
- उपयुक्त बफर (pH ~7.6)
- डीटीटी (एंजाइम स्थिरता बनाए रखने के लिए)

सामान्य इनक्यूबेशन तापमान: **37°C**

---

9. अवरोध और विनियमन

PNK एक्टिविटी को इन तरीकों से रोका जा सकता है:

- EDTA (चेलेट्स Mg^{2+})
- उच्च नमक
- सक्रिय थायोल समूह का ऑक्सीकरण
- दूषित फॉस्फेटेस

काइनेज एक्टिविटी को ज़्यादा से ज़्यादा करने के लिए सही तैयारी की स्थिति ज़रूरी है।

---

10. पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज की सीमाएं

- पहले से केमिकली ब्लॉक किए गए सिरों को फॉस्फोराइलेट नहीं कर सकते (जैसे, 5′-कैप्ड mRNAs)।
- कुछ डबल-स्ट्रैंडेड सबस्ट्रेट्स पर बिना डीनेचुरेशन के ठीक से काम नहीं करता।
- ज़्यादा ATP कंसंट्रेशन से कभी-कभी रिवर्स रिएक्शन (एक्सचेंज) हो जाता है।
- अगर 3′ फॉस्फेट की ज़रूरत हो, तो 3′-फॉस्फेटेस एक्टिविटी कभी-कभी ठीक नहीं हो सकती है।

पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज और फॉस्फेटेस के बीच अंतर

विशेषता	पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज	क्षारीय/अम्लीय फॉस्फेटेस
समारोह	5′ फॉस्फेट जोड़ता है	5′ फॉस्फेट हटाता है
सहायक कारक	एटीपी, एमजी²⁺	कोई नहीं (या कुछ के लिए Zn²⁺)
एंजाइम उदाहरण	टी4 पीएनके	सीआईपी, एसएपी
उपयोग	बंधन के लिए DNA तैयार करें	स्व-बंधन को रोकें

इन्हें अक्सर क्लोनिंग स्ट्रेटेजी में एक साथ इस्तेमाल किया जाता है।

क्लेनो एंजाइम

क्लेनो *एंजाइम* **E. कोलाई DNA पॉलीमरेज़ I** का एक बड़ा प्रोटियोलिटिक टुकड़ा है। यह पेरेंट एंजाइम की पॉलीमरेज़ एक्टिविटी को बनाए रखता है लेकिन इसमें 5′→3′ एक्सोन्यूक्लिएज़ एक्टिविटी नहीं होती है। क्लेनो टुकड़ा मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में DNA एंड रिपेयर, लेबलिंग और क्लोनिंग के लिए सबसे ज़रूरी टूल्स में से एक है।

---

1 परिचय

एस्चेरिचिया कोलाई से DNA पॉलीमरेज़ I में तीन एंजाइमेटिक एक्टिविटी होती हैं:

1. **5′→3′ पॉलीमरेज़ गतिविधि** (डीएनए संश्लेषण)
2. **3′→5′ एक्सोन्यूक्लिऐस एक्टिविटी** (प्रूफ़रीडिंग)
3. **5′→3′ एक्सोन्यूक्लिऐस गतिविधि** (निक ट्रांसलेशन)

जब DNA पॉलीमरेज़ I को प्रोटीज़ **सबटिलिसिन से ट्रीट किया जाता है** , तो एंजाइम दो टुकड़ों में टूट जाता है:

- **छोटा टुकड़ा → 5′→3′ एक्सोन्यूक्लिएज़ होता है**
- **बड़ा टुकड़ा** → इसमें **5′→3′ पॉलीमरेज़ + 3′→5′ एक्सोन्यूक्लिएज़ होता है**

इस बड़े टुकड़े को **क्लेनो टुकड़ा** या **क्लेनो एंजाइम के रूप में जाना जाता है**।

---

2. ऐतिहासिक पृष्ठभूमि

- 1970 के दशक की शुरुआत में **हैंस क्लेनो** ने इसकी खोज की थी।
- एक स्थिर DNA पॉलीमरेज़ टुकड़ा दिया गया जिसमें डिसरप्टिव 5′→3′ एक्सोन्यूक्लिऐस एक्टिविटी नहीं थी।
- टेम्पलेट को खराब किए बिना **क्लीन DNA सिंथेसिस की** इजाज़त देकर रिकॉम्बिनेंट DNA तरीकों में क्रांति ला दी।

---

3. संरचनात्मक और कार्यात्मक विशेषताएँ

क्लेनो एंजाइम में शामिल हैं:

A. 5′→3′ पॉलीमरेज़ गतिविधि

- बढ़ते DNA स्ट्रैंड में न्यूक्लियोटाइड जोड़ता है।
- इसके लिए एक टेम्पलेट और प्राइमर की ज़रूरत होती है जिसमें फ्री **3′-OH ग्रुप हो**।

B. 3′→5′ एक्सोन्यूक्लिऐस (प्रूफ़रीडिंग)

- बेमेल न्यूक्लियोटाइड को हटाता है।
- DNA सिंथेसिस के दौरान हाई फिडेलिटी पक्का करता है।

C. 5′→3′ एक्सोन्यूक्लिऐस का अभाव

इसके उपयोगी होने का मुख्य कारण यह है :
→ यह **रेप्लिकेशन फोर्क से पहले DNA को खराब नहीं करता** , जिससे यह DNA लेबलिंग, फिल-इन रिएक्शन और ब्लंट एंड्स बनाने के लिए आदर्श है।

---

4. क्लेनो एंजाइम द्वारा उत्प्रेरित अभिक्रियाएँ

1. डीएनए संश्लेषण

- धंसे हुए 3′ सिरों को भरता है।
- सिंगल-स्ट्रैंडेड हिस्सों को डबलस्ट्रैंडेड DNA में बदलता है।

2. फिल-इन रिएक्शन

जब रेस्ट्रिक्शन एंजाइम **5′ ओवरहैंग बनाते हैं, तो क्लेनो उन्हें भरकर ब्लंट एंड्स** बनाता है ।

उदाहरण :
इकोआरआई 5' ओवरहैंग (एएटीटी) छोड़ता है। क्लेनो इन सिरों को भरने के लिए न्यूक्लियोटाइड जोड़ता है → कुंद सिरे बनते हैं।

3. 3′ ओवरहैंग्स को हटाना

3′→5′ एक्सोन्यूक्लिएज़ की वजह से , यह 3′ ओवरहैंग को ट्रिम कर सकता है।
इस तरह, यह 3′ बाहर निकले हुए सिरों को ब्लंट सिरों में बदल देता है।

4. डीएनए लेबलिंग

क्लेनो में लेबल वाले न्यूक्लियोटाइड शामिल हैं जैसे:

- रेडियोधर्मी (^{32}P, ^{33}P)
- फ्लोरोसेंट (Cy3, Cy5)
- बायोटिनिलेटेड न्यूक्लियोटाइड

उपयोग:

- डीएनए जांच
- सेंगर अनुक्रमण
- कॉलोनी संकरण

5. प्राइमर एक्सटेंशन

एक खास प्राइमर से कॉम्प्लिमेंट्री DNA स्ट्रैंड को सिंथेसाइज़ करने के लिए इस्तेमाल किया जाता है।
यह इसके लिए ज़रूरी है:

- फुटप्रिंटिंग परख
- ट्रांसक्रिप्शन शुरू करने वाली जगहों की पहचान करना
- प्रमोटर संरचना का अध्ययन

6. सेंगर (डाइडिऑक्सी) DNA अनुक्रमण

ओरिजिनल सेंगर मेथड में क्लेनो एंजाइम का इस्तेमाल **डाइडिऑक्सीन्यूक्लियोटाइड्स (ddNTPs) की मौजूदगी में प्राइमर को बढ़ाने के लिए किया जाता था** , जो चेन को लंबा होने से रोकते हैं।

---

5. मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में क्लेनो एंजाइम का उपयोग

यह वह सेक्शन है जो एग्जाम में सबसे ज़्यादा पूछा जाता है।

A. ब्लंट-एंड फॉर्मेशन

क्लेनो का इस्तेमाल बड़े पैमाने पर ब्लंट एंड्स बनाने के लिए किया जाता है:

- 5′ ओवरहैंग भरना
- 3′ ओवरहैंग को पीछे की ओर चबाना

ब्लंट एंड्स तब ज़रूरी होते हैं जब:

- क्लोनिंग पीसीआर उत्पाद
- ब्लंट वेक्टर्स में लिगेशन (जैसे, SmaI-डाइजेस्टेड वेक्टर्स)

बी. अंत लेबलिंग

क्लेनो का इस्तेमाल DNA के 3′ सिरे पर लेबल वाले न्यूक्लियोटाइड को जोड़ने के लिए किया जाता है:

- जांच
- दक्षिणी धब्बा
- डीएनए फुटप्रिंटिंग

C. सेकंड-स्ट्रैंड cDNA संश्लेषण

क्लासिकल cDNA लाइब्रेरी प्रोटोकॉल में, क्लेनो रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस द्वारा पहले DNA स्ट्रैंड को सिंथेसाइज़ करने के बाद दूसरे DNA स्ट्रैंड को सिंथेसाइज़ करता है।

D. रैंडम प्राइमिंग

लेबल्ड प्रोब बनाने के लिए रैंडम हेक्सामर्स के साथ इस्तेमाल किया जाता है।

ई. डीएनए अनुक्रम विश्लेषण

टैक पॉलीमरेज़ के स्टैंडर्ड बनने से पहले, क्लेनो का इस्तेमाल सेंगर सीक्वेंसिंग में बड़े पैमाने पर किया जाता था।

F. प्रतिबंध स्थलों को भरें

अगर DNA के किसी हिस्से में जुड़े हुए सिरे नहीं हैं, तो क्लेनो नए रेस्ट्रिक्शन साइट बनाने के लिए न्यूक्लियोटाइड भर सकता है।

---

6. क्लेनो एंजाइम की सीमाएं

हालांकि बहुत उपयोगी है, क्लेनो की कुछ सीमाएं हैं:

- थर्मोस्टेबल नहीं (लगभग37°C पर सबसे अच्छा)
- PCR के लिए इस्तेमाल नहीं किया जा सकता (हाई-टेम्परेचर डीनेचुरेशन इसे इनएक्टिव कर देगा)
- आधुनिक पॉलीमरेज़ की तुलना में कम प्रोसेसिविटी
- 3’→5’ एक्सोन्यूक्लिऐस एक्टिविटी अगर गलत तरीके से जोड़ी जाए तो प्राइमर को खराब कर सकती है
- Taq या Pfu पॉलीमरेज़ से धीमा

समाधान :
थर्मोस्टेबल क्लेनो-जैसे DNA पॉलीमरेज़, जैसे **क्लेनो (एक्सो-)** , खास इस्तेमाल के लिए उपलब्ध हैं।

---

7. मॉडिफाइड क्लेनो फ्रैगमेंट: क्लेनो (एक्सो–)

क्लेनो (एक्सो-), जिसे *एक्सो-माइनस क्लेनो* भी कहा जाता है , में **3’→5’ एक्सोन्यूक्लिऐस का अभाव होता है** ।

लाभ

- प्राइमर को खराब नहीं करता
- DNA लेबलिंग के लिए आदर्श
- अधिक पूर्वानुमानित विस्तार प्रतिक्रियाएं

उपयोग:

- फ्लोरोसेंट लेबलिंग
- यादृच्छिक प्राइमिंग

- डीएनए माइक्रोएरे जांच संश्लेषण

क्लेनो एंजाइम और DNA पॉलीमरेज़ I के बीच तुलना

विशेषता	डीएनए पोलीमरेज़ I	क्लेनो टुकड़ा
5′→3′ पॉलीमरेज़	उपस्थित	उपस्थित
3′→5′ एक्सोन्यूक्लिऐस	उपस्थित	उपस्थित
5′→3′ एक्सोन्यूक्लिऐस	उपस्थित	**अनुपस्थित**
क्लोनिंग में उपयोग	सीमित (एक्सोन्यूक्लिऐस DNA को ख़राब करता है)	**व्यापक**
डीएनए लेबलिंग	आदर्श नहीं	**उत्कृष्ट**
कुंद-अंत गठन	गरीब	**कुशल**
सेंगर अनुक्रमण	उपयोग नहीं किया	ऐतिहासिक रूप से व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है

डीएनए पोलीमरेज़-I

DNA पॉलीमरेज़ I (Pol I) **अब तक खोजा गया पहला DNA पॉलीमरेज़ है** और मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में सबसे ज़्यादा स्टडी किए गए एंजाइम में से एक है। यह *एस्चेरिचिया कोलाई में DNA रेप्लिकेशन और रिपेयर में ज़रूरी भूमिका निभाता है*, और इसके टुकड़े (खासकर क्लेनो टुकड़ा) रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी में बुनियादी टूल हैं।

---

1 परिचय

DNA पॉलीमरेज़ I एक एंजाइम है जो मूल रूप से *E. coli में खोजा गया था*।
इसकी तीन अलमअलग एंजाइमेटिक एक्टिविटीज़ हैं:

1. **5′ → 3′ DNA पॉलीमरेज़ एक्टिविटी** (DNA को सिंथेसाइज़ करती है)
2. **3′ → 5′ एक्सोन्यूक्लिएज़ एक्टिविटी** (प्रूफ़रीडिंग)
3. **5′ → 3′ एक्सोन्यूक्लिएज़ एक्टिविटी** (प्राइमर हटाता है, DNA की मरम्मत करता है)

इन मल्टीफंक्शनल एक्टिविटीज़ की वजह से, Pol I इनमें शामिल है :

- डीएनए प्रतिकृति
- डीएनए की मरम्मत
- ओकाज़ाकी खंड प्रसंस्करण
- न्यूक्लियोटाइड एक्सिशन मरम्मत

लेकिन, यह **मुख्य रेप्लिकेटिव पॉलीमरेज़ नहीं है** ; Pol III सबसे ज़्यादा रेप्लिकेशन करता है। Pol I का काम **क्लीनअप और रिपेयर करना है** ।

---

2. खोज और ऐतिहासिक महत्व

- **1956 में आर्थर कोर्नबर्ग** द्वारा खोजा गया (1959 में नोबेल पुरस्कार)।
- इन विट्रो में DNA सिंथेसाइज़ करने वाला पहला एंजाइम दिखाया गया।
- रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी के डेवलपमेंट के लिए फाउंडेशन।

---

3. DNA पॉलीमरेज़ I की संरचना

Pol I एक**928-अमीनो एसिड** एंजाइम है जिसमें तीन डोमेन **दाहिने हाथ की तरह व्यवस्थित होते हैं** :

A. ताड़ क्षेत्र

- पॉलीमरेज़ एक्टिविटी के लिए कैटेलिटिक अवशेष होते हैं
- DNA औरdNTPs को बांधता है

B. उंगलियों का क्षेत्र

- आने वाले न्यूक्लियोटाइड की स्थिति
- सही बेस-पेयरिंग सुनिश्चित करता है

C. अंगूठे का क्षेत्र

- DNA डुप्लेक्स को स्थिर करता है
- प्रक्रियात्मकता को प्रभावित करता है

एक्सोन्यूक्लिऐस डोमेन

- **3′ → 5′ एक्सोन्यूक्लिएज़** (प्रूफ़रीडिंग): गलत न्यूक्लियोटाइड को हटाता है
- **5′ → 3′ एक्सोन्यूक्लिएज़** : RNA प्राइमर और डैमेज DNA को हटाता है

---

4. DNA पॉलीमरेज़ I की एंजाइमेटिक गतिविधियाँ

1. 5′ → 3′ पॉलीमरेज़ गतिविधि

- पहले से मौजूद प्राइमर-टेम्पलेट में न्यूक्लियोटाइड जोड़ता है
- एक **मुक्त 3′-OH की आवश्यकता है**
- टेम्पलेट के पूरक DNA को संश्लेषित करता है
- DNA रिपेयर में छोटे गैप को भरता है

---

2. 3′ → 5′ एक्सोन्यूक्लिऐस (प्रूफ़रीडिंग)

- बेमेल न्यूक्लियोटाइड को हटाता है
- उच्च निष्ठा सुनिश्चित करता है
- उत्परिवर्तन को रोकता है
- गलत न्यूक्लियोटाइड डालने पर बैकट्रैक

---

3. 5′ → 3′ एक्सोन्यूक्लिऐस एक्टिविटी (Pol I के लिए यूनिक)

यह एक्टिविटी **खास है** और ज़्यादातर पॉलीमरेज़ में मौजूद नहीं होती है।

फ़ंक्शन में शामिल हैं:

- लैगिंग-स्ट्रैंड संश्लेषण में RNA प्राइमरों को हटाना
- क्षतिग्रस्त न्यूक्लियोटाइड्स (जैसे, पाइरीमिडीन डाइमर्स) को हटाना
- निक अनुवाद
- खाली जगह भरना

---

5. DNA पॉलीमरेज़ I की बायोलॉजिकल भूमिकाएँ

ए. ओकाजाकी फ्रैगमेंट प्रोसेसिंग

लैगिंग-स्ट्रैंड संश्लेषण के दौरान:

1. RNA प्राइमर को हटाना ज़रूरी है
2. गैप को DNA से भरना होगा
3. **DNA लाइगेज** से सील किया जाना चाहिए

Pol I अपने **5'→3' एक्सोन्यूक्लिऐस** का इस्तेमाल करके RNA प्राइमर को हटाता है और अपनी **पॉलीमरेज़ एक्टिविटी** से गैप को भरता है।

बी. डीएनए मरम्मत

Pol I में भाग लेता है :

- बेस एक्सिशन रिपेयर (BER)
- न्यूक्लियोटाइड एक्सिशन मरम्मत
- मिलान नहीं की गई मरम्मत
- UV, केमिकल्स, या रेप्लिकेशन एरर की वजह से हुए DNA घावों की मरम्मत

सी. निक अनुवाद

एक खास रिएक्शन जहां:

- 5'→3' एक्सोन्यूक्लिऐस आगे के न्यूक्लियोटाइड को हटाता है
- पॉलीमरेज़ पीछे न्यूक्लियोटाइड जोड़ता है

इससे एक चलता-फिरता "निक" उत्पन्न होता है।

लैब में इसके लिए इस्तेमाल होता है:

- रेडियोएक्टिव या फ्लोरोसेंट न्यूक्लियोटाइड के साथ DNA लेबलिंग
- जांच पीढ़ी

---

6. DNA पॉलीमरेज़ I के लैबोरेटरी एप्लीकेशन

हालांकि आजकल Pol I का सीधे तौर पर क्लोनिंग में बहुत ज़्यादा इस्तेमाल नहीं होता, लेकिन इसके टुकड़े—खासकर क्लेनो टुकड़ा—बहुत ज़रूरी हैं। हालांकि, Pol I के खास इस्तेमाल हैं :

1. निक ट्रांसलेशन

DNA को लेबल करने के लिए इस्तेमाल किया जाता है:

- ^{32}पी
- फ्लोरोसेंट रंजक (Cy3, Cy5)
- बायोटिन/एचआरपी लेबल

इसके लिए महत्वपूर्ण:

- डीएनए संकरण जांच
- दक्षिणी/उत्तरी सोख्ता
- डीएनए फुटप्रिंटिंग

---

2. DNA रिपेयर और फिलिंग रिएक्शन

- DNA में छोटे गैप को भरता है
- क्षतिग्रस्त न्यूक्लियोटाइड को प्रतिस्थापित करता है
- पूरक मरम्मत एंजाइम

---

3. इन विट्रो DNA सिंथेसिस की प्रूफरीडिंग

Pol I का 3’→5’ एक्सोन्यूक्लिऐस कुछ एंजाइमेटिक रिएक्शन में सटीक रेप्लिकेशन सुनिश्चित करने में मदद करता है।

---

4. RNA प्राइमर को हटाना

इन विट्रो में रीकॉन्स्टिट्यूटेड रेप्लिकेशन सिस्टम में इस्तेमाल किया जाता है।

---

7. क्लेनोव फ्रैगमेंट (पोल I का बड़ा फ्रैगमेंट)

सबटिलिसिन के साथ प्रोटियोलिटिक क्लीवेज से उत्पन्न।

बरकरार रखता है:

- 5′→3′ पॉलीमरेज़ गतिविधि
- 3′→5′ एक्सोन्यूक्लिऐस गतिविधि

कमी:

- 5′→3′ एक्सोन्यूक्लिऐस गतिविधि

क्लेनो के उपयोग

- 5′ ओवरहैंग्स का भराव
- 3′ ओवरहैंग हटाना
- कुंद-अंत गठन
- डीएनए लेबलिंग
- प्राइमर एक्सटेंशन
- सेंगर अनुक्रमण

(क्लेनो पर आपके पास पहले से ही डिटेल्ड जवाब है, इसलिए यह सेक्शन छोटा रखा गया है।)

---

8. क्लेनो (एक्सो–) फ्रैगमेंट

एक जेनेटिकली मॉडिफाइड क्लेनो फ्रैगमेंट जिसमें दोनों एक्सोन्यूक्लिएज़ एक्टिविटीज़ नहीं हैं।

उपयोग:

- यादृच्छिक प्राइमिंग लेबलिंग
- डीएनए श्रृंखला बनाना
- बिना किसी गिरावट के प्राइमर एक्सटेंशन

DNA पॉलीमरेज़ I, क्लेनो औरPol III के बीच अंतर

विशेषता	डीएनए पोल I	क्लेनो टुकड़ा	डीएनए पोल III
5′→3′ पॉलीमरेज़	हाँ	हाँ	हाँ
3′→5′ एक्सोन्यूक्लिऐस	हाँ	हाँ	हाँ
5′→3′ एक्सोन्यूक्लिऐस	हाँ	**नहीं**	नहीं
प्रक्रियात्मकता	कम	कम	**उच्च**
मुख्य प्रतिकृति एंजाइम	नहीं	नहीं	**हाँ**
मुख्य कार्य	प्राइमर हटाना, DNA की मरम्मत भरें, लेबलिंग थोक डीएनए प्रतिकृति		

---

10. क्लिनिकल और बायोटेक्नोलॉजिकल महत्व

- इंसानों में Pol I एनालॉग्स में म्यूटेशन से रिपेयर में कमी हो सकती है
- डायग्नोस्टिक्स के लिए लेबल्ड DNA प्रोब बनाने में इस्तेमाल होता है
- कई मॉलिक्यूलर बायोलॉजी किट का ज़रूरी हिस्सा
- प्रारंभिक सेंगर अनुक्रमण विधियों का आधार
- सभी जीवों में DNA पॉलीमरेज़ मैकेनिज्म को समझने का आधार

---

11. सीमाएं

- कम प्रोसेसिविटी (हर बाइंडिंग में ~20–50 न्यूक्लियोटाइड जोड़ता है)
- PCR (37°C पर थर्मोलेबल) के लिए सही नहीं है
- Pol III या Taq पॉलीमरेज़ की तुलना में अपेक्षाकृत धीमा
- DNA के लंबे हिस्सों की प्रतिकृति नहीं बना सकते

इस तरह, PCR और हाई-स्पीड तरीकों के लिए थर्मोस्टेबल पॉलीमरेज़ से इसकी जगह ले ली गई।

रिवर्स ट्रांसक्रिप्टेज़

रिवर्स ट्रांसक्रिप्टेज़ (RT) एक अनोखा RNA-डिपेंडेंट DNA पॉलीमरेज़ है जो असल में रेट्रोवायरस में खोजा गया था। यह **RNA → DNA को बदलता है** , जिससे सेंट्रल डोग्मा उलट जाता है। यह एंजाइम मॉलिक्यूलर बायोलॉजी, cDNA सिंथेसिस, RT-PCR, रेट्रोवायरल रेप्लिकेशन, जीन एक्सप्रेशन एनालिसिस और बायोटेक्नोलॉजी के लिए ज़रूरी है।

---

1 परिचय

रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस (RT) एक एंजाइम है जो RNA टेम्पलेट से
कॉम्प्लिमेंट्री DNA (cDNA) बनाता है। इसलिए, यह इस तरह काम करता है:

- **आरएनए-आश्रित डीएनए पोलीमरेज़**
- **राइबोन्यूक्लिऐस एच (आरएनसे एच)**
- **डीएनए-नि०र्भर डीएनए पोलीमरेज़**

इसकी खोज **हॉवर्ड टेमिन** और **डेविड बाल्टीमोर ने** 1970 में अलगअलग की थी (नोबेल प्राइज़ 1975)।

सेंट्रल डोग्मा बनाम रिवर्स फ्लो

सामान्य :
DNA → RNA → प्रोटीन

रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस इनेबल करता है :
RNA → DNA

इस खोज ने मॉलिक्यूलर बायोलॉजी, वायरोलॉजी और बायोटेक्नोलॉजी में क्रांति ला दी।

---

2. रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस के स्रोत

RT नैचुरली होता है:

A. रेट्रोवायरस

- एचआईवी -1
- एचआईवी-2
- म्यूरिन ल्यूकेमिया वायरस (एमएलवी)
- रौस सारकोमा वायरस (आरएसवी)

B. रेट्रोट्रांसपोसन

- लाइनों
- जीवाओं

- खमीर में Ty तत्व

C. टेलोमेरेज़

टेलोमेरेज़ एक खास RT है जो क्रोमोसोम में टेलोमेरिक रिपीट जोड़ता है।

D. कृत्रिम पुनः संयोजक आरटीएस

बेहतर स्टेबिलिटी और फिडेलिटी के लिए बनाया गया।

---

3. रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस की संरचना

रिवर्स ट्रांसक्रिप्टेस आमतौर पर हेटेरोडायमेरिक होते हैं (जैसे, HIV-1 RT):

- **p66 सबयूनिट** → पॉलीमरेज़ + RNase H गतिविधि
- **p51 सबयूनिट** → संरचनात्मक समर्थन

एंजाइम **दाहिने हाथ जैसा दिखता है** :

- **पाम** क्षेत्र → कैटेलिटिक साइट (पॉलीमराइजेशन)
- **अंगूठा** → DNA बाइंडिंग
- **फिंगर्स** → न्यूक्लियोटाइड इनकॉर्पोरेशन

RNase H डोमेन p66 के **C-टर्मिनल पर स्थित है।**

---

4. रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस की एंजाइमेटिक गतिविधियां

रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस **तीन ज़रूरी बायोकेमिकल एक्टिविटी करता है** :

---

1. RNA-निर्भर DNA पॉलीमरेज़ गतिविधि

- सिंगल-स्ट्रैंडेड RNA को कॉम्प्लिमेंट्री DNA (cDNA) में बदलता है
- **प्राइमर** की ज़रूरत होती है , आमतौर पर:
    - रेट्रोवायरस में tRNA

- cDNA संश्लेषण में ओलिगो-dT प्राइमर
- जीन-विशिष्ट प्राइमर

रिएक्शन :
RNA + dNTPs → DNA-RNA हाइब्रिड

---

2. RNase H गतिविधि

- RNA-DNA हाइब्रिड से RNA स्ट्रैंड को खराब करता है
- RNA को कई अंदरूनी जगहों पर तोड़ता है
- प्राइमर के रूप में इस्तेमाल होने वाले छोटे RNA टुकड़े छोड़ता है

यह स्टेप दूसरे DNA स्ट्रैंड के सिंथेसिस की अनुमति देता है।

---

3. DNA-निर्भर DNA पॉलीमरेज़ गतिविधि

- दूसरे DNA स्ट्रैंड को सिंथेसाइज़ करने के लिए पहले DNA स्ट्रैंड का इस्तेमाल करता है
- इंटीग्रेशन में सक्षम डबल-स्ट्रैंडेड DNA (dsDNA) बनाता है

---

5. एक्शन का तरीका: स्टेप-बाय-स्टेप

चरण 1: प्राइमर बाइंडिंग

रेट्रोवायरल RT एक होस्ट tRNA का इस्तेमाल करता है जो वायरल RNA पर प्राइमर बाइंडिंग साइट (PBS) से जुड़ता है।

स्टेप 2: माइनस-स्ट्रैंड DNA का सिंथेसिस

RT वायरल RNA के कॉम्प्लिमेंट्री DNA को सिंथेसाइज़ करता है।

चरण 3: RNA का विघटन

RNase H खास टुकड़ों को छोड़कर RNA टेम्पलेट को हटा देता है।

स्टेप 4: पहला स्ट्रैंड ट्रांसफर

नया सिंथेसाइज़्ड DNA, RNA पर दूसरे रिपीट रीजन (R) में हाइब्रिडाइज़ हो जाता है।

स्टेप 5: माइनस-स्ट्रैंड सिंथेसिस का पूरा होना

चरण 6: प्लस-स्ट्रैंड संश्लेषण

छोटे RNA टुकड़े प्राइमर का काम करते हैं।

चरण 7: सेकंड-स्ट्रैंड ट्रांसफर

स्टेप 8: डबलस्ट्रैंडेड वायरल DNA का बनना

इस DNA में इंटीग्रेशन के लिए ज़रूरी **लॉन्ग टर्मिनल रिपीट (LTRs)** होते हैं।

---

6. रेट्रोवायरल जीवन चक्र में भूमिका

रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस इनके लिए ज़रूरी है:

1. वायरल आरएनए को डीएनए में बदलना
2. प्रोवायरल dsDNA अणु का उत्पादन
3. इंटीग्रेज के ज़रिए होस्ट जीनोम में इंटीग्रेशन की अनुमति देना
4. वायरल जीन अभिव्यक्ति और प्रतिकृति को सक्षम करना

रेट्रोवायरस RT के बिना रेप्लिकेट नहीं कर पाएंगे।

---

7. मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में इस्तेमाल होने वाले रिवर्स ट्रांसक्रिप्टेज़ के प्रकार

1. मोलोनी म्यूरिन ल्यूकेमिया वायरस RT (M-MLV RT)

- cDNA संश्लेषण के लिए व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है
- कम RNase H एक्टिविटी → लंबे cDNA के लिए अच्छा है

2. AMV रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस (एवियन मायलोब्लास्टोसिस वायरस RT)

- उच्च तापमान स्थिरता
- GC-रिच टेम्पलेट्स के लिए इस्तेमाल किया जाता है

3. इंजीनियर्ड RT वेरिएंट

- थर्मोस्टेबल RTs (60°C तक)
- उच्च-निष्ठा RTs
- RNase H माइनस RTs (बेहतर cDNA यील्ड)

4. टेलोमेरेज़

स्पेशलाइज्ड RT जो टेलोमेरेस को लंबा करता है।

---

8. मॉलिक्यूलर बायोलॉजी और बायोटेक्नोलॉजी में एप्लीकेशन

यह एग्जाम के लिए सबसे ज़रूरी सेक्शन है।

A. सीडीएनए संश्लेषण

RT, mRNA को कॉम्प्लिमेंट्री DNA (cDNA) में बदलता है।

cDNA का इस्तेमाल इनमें किया जाता है:

- जीन क्लोनिंग
- अभिव्यक्ति अध्ययन
- cDNA लाइब्रेरी तैयार करना
- कार्यात्मक जीनोमिक्स

बी. रिवर्स ट्रांसक्रिप्शन पीसीआर (आरटी-पीसीआर)

दो-चरणीय विधि:

1. RNA → cDNA by RT
2. डीएनए पॉलीमरेज़ द्वारा प्रवर्धित सीडीएनए (टैक)

के लिए इस्तेमाल होता है:

- जीन अभिव्यक्ति विश्लेषण
- आरएनए वायरस का पता लगाना
- नैदानिक निदान

C. मात्रात्मक आरटी-पीसीआर (qRT-PCR)

RNA लेवल को मापने के लिए इस्तेमाल किया जाता है:

- कैंसर बायोमार्कर
- वायरल लोड (एचआईवी, SARS-CoV-2)
- जीन अभिव्यक्ति प्रोफाइलिंग

डी. सीडीएनए लाइब्रेरी निर्माण

रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस **पहले स्ट्रैंड cDNA को सिंथेसाइज़ करता है** , जिसे फिर एक्सप्रेस्ड जीन्स की स्टडी के लिए क्लोन किया जाता है।

ई. आरएनए-अनुक्रमण और ट्रांसक्रिप्टोमिक्स

RT सीक्वेंसिंग टेक्नोलॉजी (इलुमिना, नैनोपोर) के लिए cDNA टेम्पलेट बनाता है।

F. mRNA और फुल-लेंथ जीन की क्लोनिंग

RT पाने में मदद करता है:

- इंट्रॉन-मुक्त कोडिंग अनुक्रम
- प्रोटीन अभिव्यक्ति के लिए वांछित ORFs
- स्प्लिस वेरिएंट

जी. आणविक निदान

RNA वायरस का पता लगाने के लिए इस्तेमाल किया जाता है:

- HIV
- इंफ्लुएंजा
- SARS-CoV-2
- हेपेटाइटिस सी

एच. रेट्रोवायरल प्रतिकृति का अध्ययन

RT एंटीवायरल दवाओं (AZT, लैमिवुडिन, नेविरापीन) का टारगेट है।

I. टेलोमेयर जीवविज्ञान

टेलोमेरेज़, एक रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस, क्रोमोसोम के सिरों को बनाए रखता है और इसमें ज़रूरी है:

- स्टेम कोशिकाएँ
- जर्मलाइन कोशिकाएँ
- कैंसर जीवविज्ञान

---

9. रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस के अवरोधक

RT **एंटीरेट्रोवाइरल थेरेपी के लिए एक मुख्य लक्ष्य है** ।

1. NRTIs (न्यूक्लियोसाइड रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस इनहिबिटर्स)

- एजेडटी (ज़िडोवुडिन)
- 3TC (लैमिवुडिन)
- डीडीआई (डिडानोसिन)
- टेनोफोविर

मैकेनिज्म: चेन टर्मिनेशन।

---

2. NNRTIs (नॉन-न्यूक्लियोसाइड RT इनहिबिटर)

- नेविरेपीन
- इफावरेन्ज

मैकेनिज्म: एलोस्टेरिक इनहिबिशन।

ये इन्हिबिटर HIV को बढ़ने से रोकते हैं औरAIDS के इलाज में ज़रूरी हैं।

---

10. रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस के फायदे और सीमाएं

लाभ

- यूकेरियोटिक mRNA की क्लोनिंग को सक्षम बनाता है
- जीन अभिव्यक्ति के अध्ययन की अनुमति देता है
- RNA वायरस को पता लगाने योग्य DNA में बदलता है
- RNA सिग्नल को कुशलता से बढ़ा सकता है

सीमाएँ

- कम निष्ठा (त्रुटि-प्रवण)
- थर्मोलेबल (मानक RT ~37–42°C पर काम करता है)
- टेम्पलेट सेकेंडरी स्ट्रक्चर एफिशिएंसी कम करता है
- RNase H एक्टिविटी RNA को समय से पहले खराब कर सकती है

समाधान:

- उच्च-निष्ठा RTs
- RNase H माइनस म्यूटेंट
- थर्मोस्टेबल आरटीएस (55–60°C)

रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस और DNA पॉलीमरेज़ के बीच अंतर

विशेषता	रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस	डीएनए पोलीमरेज़
खाका	आरएनए या डीएनए	केवल डीएनए
भजन की पुस्तक	आवश्यक (आमतौर पर RNA)	आवश्यक

विशेषता	रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस	डीएनए पोलीमरेज़
आरएनसे एच गतिविधि	हाँ	नहीं
निष्ठा	कम	उच्च
जैविक भूमिका	रेट्रोवायरल जीनोम प्रतिकृति	मेजबान डीएनए प्रतिकृति
अनुप्रयोग	आरटी-पीसीआर, सीडीएनए	पीसीआर, प्रतिकृति

क्षारविशिष्ट फ़ॉस्फ़टेज़

एल्कलाइन फॉस्फेटेस (ALP) एक**नॉन-स्पेसिफिक फॉस्फोमोनोएस्टरेज़ है जो न्यूक्लियोटाइड, न्यूक्लिक एसिड, प्रोटीन और फॉस्फोलिपिड जैसे बायोलॉजिकल मॉलिक्यूल्स की एक बड़ी रेंज से फॉस्फेट ग्रुप्स को हटाता है। यह** जीवित जीवों में **मॉलिक्यूलर क्लोनिंग , सिग्नल एम्प्लीफिकेशन (ELISA) , क्लिनिकल डायग्नोस्टिक्स** और **मेटाबोलिक रेगुलेशन** में अहम भूमिका निभाता है ।

यह **क्षारीय पीएच (8.5-10.5) पर बेहतर तरीके से काम करता है** और इसके लिए कोफ़ैक्टर्स के रूप में **Zn^{2+} औरMg^{2+} की आवश्यकता होती है।**

---

1. परिभाषा

एल्कलाइन फॉस्फेटेस एक **डाइमेरिक मेटालोएंजाइम है** जो फॉस्फेट मोनोएस्टर के हाइड्रोलिसिस को कैटलाइज़ करता है:

$R–O–PO_3^{2-} + H_2O \rightarrow R–OH + Pi$

यह **DNA/RNA के 5'-सिरों से फॉस्फेट ग्रुप को हटाता है** , जिससे DNA का रीलिगेशन रुक जाता है।

---

2. एल्कलाइन फॉस्फेटेस की संरचना (गहरी व्याख्या)

ALP आमतौर पर एक**डाइमर होता है** , जिसमें हर मोनोमर में ये चीज़ें होती हैं:

A. मेटल आयन(एक्टिविटी के लिए ज़रूरी)

- **दो Zn^{2+} आयन**कैटेलिसिस के लिए ज़रूरी; ट्रांज़िशन स्टेट को स्टेबल करें।

- **एक Mg^{2+} आयन**सब्सट्रेट और पानी के मॉलिक्यूल को सही जगहपर रखने में मदद करता है।

B. सक्रिय साइट अवशेष

मुख्य अवशेष:

- **सेरीन** (न्यूक्लियोफाइल)
- **हिस्टडीन**
- **aspartate**
- **arginine**

ये एक कैटेलिटिक नेटवर्क बनाते हैं।

C. द्विगुणन

डाइमराइज़ेशन से स्टेबिलिटी और एक्टिविटी बढ़ती है।

D. उत्प्रेरक पॉकेट

खास तौर पर फॉस्फेट एस्टर के लिए बनाया गया, जो सबस्ट्रेट की बड़ी खासियत दिखाता है लेकिन कैटेलिटिक टर्नओवर ज़्यादा है।

---

3. काम करने का तरीका (बहुत डिटेल में)

ALP **दो-स्टेप वाले पिंग-पोंग Bi-Bi मैकेनिज्म को फॉलो करता है** :

चरण 1: फॉस्फो-सेरीन इंटरमीडिएट का निर्माण

1. एक्टिव-साइट **सेरीन,** सब्सट्रेट के फॉस्फेट पर न्यूक्लियोफिलिक अटैक करता है।
2. Zn^{2+} आयन फॉस्फेट को पोलराइज़ करते हैं, जिससे यह ज़्यादा इलेक्ट्रोफिलिक हो जाता है।
3. एक **कोवैलेंट फॉस्फो-एंजाइम इंटरमीडिएट** बनता है।
4. अल्कोहल भाग (R–OH) मुक्त हो जाता है।

आरेखीय रूप से:

सेर-ओएच + आरओपीओ3 → सेर-ओपीओ3 + आरओएच

चरण 2: फॉस्फो-एंजाइम का हाइड्रोलिसिस

1. पानी का एक मॉलिक्यूल Mg^{2+} और Zn^{2+} द्वारा एक्टिवेट होता है।
2. पानी फॉस्फोसेरीन बॉन्ड पर हमला करता है।
3. इनऑर्गेनिक फॉस्फेट (Pi) निकलता है।
4. एंजाइम अपने असली रूप में वापस आ जाता है।

सेर - O - PO3 + H2O → Ser - OH + अनुकरणीय

यह दो-स्टेप रिएक्शन एंजाइम को **बहुत तेज़ी से काम करने में मदद करता है** ।

---

4. एल्कलाइन फॉस्फेटेस के सोर्स (विस्तृत)

1. मैमेलियन ALPs (क्लिनिकल महत्व)

- **बोन एएलपी** – ऑस्टियोब्लास्ट द्वारा निर्मित
- **यकृत एएलपी** - हेपेटोसाइट्स की कैनालिकुलर झिल्ली
- **आंत्र एएलपी** - आंत म्यूकोसा
- **प्लेसेंटल एएलपी** – गर्भावस्था के दौरान उत्पन्न
- **जर्म सेल एएलपी** – वृषण, अंडाशय

क्लिनिकल टेस्ट सीरम में इन फॉर्म्स को मापते हैं।

---

2. माइक्रोबियल ALPs (बायोटेक्नोलॉजी महत्व)

ए. ई. कोलाई क्षारीय फॉस्फेटेस (ईसीएपी)

- उच्च शुद्धता
- DNA सिरों के डीफॉस्फोराइलेशन के लिए इस्तेमाल किया जाता है
- मध्यम स्थिरता

b. बछड़ा आंतों का फॉस्फेटेस (CIP/CIAP)

- बहुत अधिक गतिविधि

- बहुत स्थिर (निष्क्रिय करना कठिन)
- मुश्किल क्लोनिंग स्टेप्स के लिए सबसे अच्छा

सी. झींगा क्षारीय फॉस्फेटेस (एसएपी)

- अत्यधिक ऊष्मा-अस्थिर
- आसानी से निष्क्रिय (65°C, 15 मिनट)
- आसान क्लोनिंग और PCR क्लीनअप के लिए बढ़िया

d. अंटार्कटिक फॉस्फेटेस

- अति-अस्थिर
- 50°C पर निष्क्रिय
- अगली पीढ़ी के सीक्वेंसिंग वर्कफ़्लो में पसंदीदा

---

5. जीवित जीवों में कार्य

A. अस्थि खनिजीकरण

ALP हाइड्रॉक्सीएपेटाइट क्रिस्टल बनने के लिए ज़रूरी फ्री फॉस्फेट की लोकल कंसंट्रेशन को बढ़ाता है:

Ca10 (PO4) 6 (OH) 2

हाई ALP → एक्टिव बोन फॉर्मेशन।

बी. लिवर का कार्य

बाइल कैनालिकुली में पाया जाता है; ऑब्सट्रक्टिव जॉन्डिस में बढ़ जाता है।

C. बैक्टीरिया में पोषक तत्व अधिग्रहण

बैक्टीरिया ऑर्गेनिक मॉलिक्यूल्स से फॉस्फोरस निकालने के लिए ALP का इस्तेमाल करते हैं।

डी. विषहरण

बैक्टीरियल ALP **लिपोपॉलीसेकेराइड (LPS) को डिटॉक्सीफाई करता है**।

---

6. मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में एप्लीकेशन (एक्सटेंसिव)

यह एग्जाम के जवाबों के लिए सबसे ज़रूरी सेक्शन है।

---

1. वेक्टर DNA का डीफॉस्फोराइलेशन (सबसे ज़रूरी)

क्लोनिंग के दौरान, वेक्टर्स को रिस्ट्रिक्शन एंजाइम से काटा जाता है और उनमें ये होते हैं:

- 5'-फॉस्फेट
- 3’-ओएच

अगर वेक्टर खुद से जुड़ जाता है (गोलाकार हो जाता है), तो क्लोनिंग की क्षमता कम हो जाती है।

ALP **5’ फॉस्फेट को हटाता है** :

वेक्टर– P → वेक्टर–OH

नतीजा :
वेक्टर DNA डाले बिना लिगेट नहीं हो सकता (जिसमें अभी भी फॉस्फेट होता है)।

→ बैकग्राउंड कॉलोनियों को रोकता है
→ रिकॉम्बिनेंट यील्ड बढ़ाता है

---

2. इन्सर्ट DNA का डीफॉस्फोराइलेशन (ऑप्शनल इस्तेमाल)

कुछ क्लोनिंग स्ट्रेटेजी के लिए कंट्रोल्ड फॉस्फोरिलेशन की ज़रूरत होती है।

उदाहरण:

- इंसर्ट फॉस्फोराइलेटेड है
- वेक्टर डीफॉस्फोराइलेटेड है

इससे **डायरेक्शनल लिगेशन पक्का होता है** ।

---

3. PCR क्लीनअप

SAP एक्स्ट्रा dNTPs को हटाता है जो इनमें दखल देते हैं:

- अनुक्रमण
- प्रतिबंध पाचन
- लेबलिंग प्रतिक्रियाएं

यह **एक-स्टेप क्लीनअप** तरीका है।

---

4. DNA एंड लेबलिंग

T4 पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज (PNK) के साथ काम करता है ।

चरण:

1. ALP फॉस्फेट को हटाता है।
2. PNK रेडियोलेबल या फ्लोरोसेंट फॉस्फेट मिलाता है।

के लिए इस्तेमाल होता है:

- जांच
- पदचिह्न
- संकरण अध्ययन

---

5. एलिसा और इम्यूनोडिटेक्शन

एल्कलाइन फॉस्फेटेस का इस्तेमाल बड़े पैमाने पर **रिपोर्टर एंजाइम के तौर पर किया जाता है** :

- एलिसा
- वेस्टर्न ब्लॉटिंग
- इम्युनोहिस्टोकैमिस्ट्री

सब्सट्रेट:

- **pNPP** → पीला रंग
- **BCIP/NBT** → वेस्टर्न ब्लॉटिंग के लिए बैंगनी अवक्षेप

लाभ:

- अत्यंत संवेदनशील
- स्थिर
- उच्च संकेत प्रवर्धन
- कमरे के तापमान पर काम करता है
- एंडपॉइंट और काइनेटिक एसेज़ के लिए उपयुक्त

---

6. RNA से 5′ फॉस्फेट को हटाना

RNA सीक्वेंसिंग और ट्रांसक्रिप्टोमिक्स में इस्तेमाल होता है।

---

7. NGS (नेक्स्ट-जेनरेशन सीक्वेंसिंग) लाइब्रेरीज़

अंटार्कटिक फॉस्फेटेस जैसे ALP एंजाइम मदद करते हैं:

- डीएनए सिरों की मरम्मत
- एडॉप्टर लिगेशन से पहले फॉस्फेट हटा दें
- सफाई प्रतिक्रियाएँ

वे सीक्वेंसिंग एक्यूरेसी और लाइब्रेरी यूनिफॉर्मिटी को बेहतर बनाते हैं।

---

7. अलग-अलग ALPs की डिटेल्ड तुलना

विशेषता	सीआईएपी	एसएपी	अंटार्कटिक फॉस्फेटेस	ईसीएपी
ऊष्मा निष्क्रियता	मुश्किल	आसान	बहुत आसान	मध्यम
गतिविधि	बहुत ऊँचा	उच्च	उच्च	मध्यम
के लिए आदर्श	कठिन बंधन	पीसीआर सफाई	एनजीएस, संवेदनशील प्रतिक्रियाएं	सामान्य उपयोग
प्रतिक्रिया पीएच	8.5–9.5	8–9	7.5–8.5	8–9

विशेषता	सीआईएपी	एसएपी	अंटार्कटिक फॉस्फेटेस	ईसीएपी
सामान्य उपयोग	डीफॉस्फोराइलेटिंग वैक्टर	सफाई और क्लोनिंग	अनुक्रमण तैयारी	प्रयोगशाला क्लोनिंग

---

8. क्लिनिकल एप्लीकेशन (गहन व्याख्या)

सीरम में ALP माप सबसे आम डायग्नोस्टिक टेस्ट में से एक है।

बढ़ा हुआ ALP बताता है:

- **अस्थि विकार**
  - सूखा रोग
  - अस्थिमृदुता
  - पेजेट रोग
  - अस्थि मेटास्टेसिस
- **यकृत रोग**
  - हेपेटाइटिस
  - अवरोधक पीलिया
  - सिरोसिस
- **गर्भावस्था**
  - प्लेसेंटल एएलपी बढ़ जाता है
- **ट्यूमर** : डिम्बग्रंथि/वृषण कैंसर

कम ALP बताता है:

- हाइपोफॉस्फेटेसिया
- कुपोषण
- हाइपोथायरायडिज्म

---

9. क्षारीय फॉस्फेटेस की सीमाएं

- ज़्यादा इस्तेमाल करने पर DNA के सिरों का **ज़्यादा पाचन** हो सकता है
- CIAP को इनएक्टिवेट करना मुश्किल है → इसे लिगेशन मिक्स में ले जाया जाता है
- उच्च लागत (विशेष रूप से CIAP)
- अधूरे इनएक्टिवेशन से क्लोनिंग फेल हो जाती है
- नॉन-स्पेसिफिक हाइड्रोलिसिस (कई तरह के मॉलिक्यूल पर काम करता है)

---

10. अलग-अलगALPs को इनएक्टिवेट कैसे करें

सीआईएपी

- बहुत स्थिर
- हाई हीट या SDS की ज़रूरत है
- अक्सर फिनोल-क्लोरोफॉर्म निकालने की ज़रूरत होती है

एसएपी / अंटार्कटिक फॉस्फेटेस

- 65°C पर 10–15 मिनट के लिए निष्क्रिय
- क्लोनिंग में बहुत सुविधाजनक

---

11. क्लोनिंग में एल्कलाइन फॉस्फेटेस क्यों ज़रूरी है

बिना ALP के:

- वेक्टर रीलिगेट्स → कई झूठी कॉलोनियाँ
- इन्सर्ट लिगेट नहीं हो सकता
- पृष्ठभूमि शोर बढ़ जाता है
- प्रयोगों को दोहराया जाना चाहिए

ALP के साथ:

- केवल पुनः संयोजक प्लास्मिड गोलाकार होते हैं
- क्लोनिंग कुशल हो जाती है
- उच्च सफलता दर
- कम स्क्रीनिंग की आवश्यकता

इस प्रकार ALP जीन क्लोनिंग में रेस्ट्रिक्शन एंजाइम और लाइगेस जितना ही महत्वपूर्ण है।

टर्मिनल डीओक्सीन्यूक्लियोटाइडिल ट्रांसफरेज (TdT)

टर्मिनल डिऑक्सीन्यूक्लियोटाइडिल ट्रांसफ़ेरेज़ (TdT) एक**अनोखा DNA पॉलीमरेज़ है** जो **DNA के 3’-OH सिरों** पर **डिऑक्सीन्यूक्लियोटाइड्स के टेम्पलेट-इंडिपेंडेंट एडिशन को कैटलाइज़ करता है**। इसे **टेम्पलेट स्ट्रैंड की ज़रूरत नहीं होती** , जो इसे ज़्यादातर DNA पॉलीमरेज़ से अलग बनाता है।

---

1 परिचय

- TdT एक**न्यूक्लियर एंजाइम है, जो मुख्य रूप से इमैच्योर लिम्फोइड सेल्स** (प्री-B और प्री-T सेल्स) में पाया जाता है ।
- इम्युनोग्लोबुलिन (आईजी) और टी-सेल रिसेप्टर (टीसीआर) जीन के **वी(डी)जे पुनर्संयोजन** के दौरान **जंक्शनल विविधता** उत्पन्न करने में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है ।
- **1960 के दशक**में खोजा गया , इसे **टेम्पलेट-इंडिपेंडेंट DNA पॉलीमरेज़ के रूप में पहचाना गया** ।

---

2. वर्गीकरण

- एंजाइम कमीशन नंबर: **EC 2.7.7.31**
- **DNA पॉल ीमरेज़ X परिवार** से संबंधित है ।
- पारंपरिक पॉलीमरेज़ के विपरीत:
  - **टेम्पलेट की ज़रूरत नहीं** है
  - **3’-OH के साथ सिंगल-स्ट्रैंडेड और डबल-स्ट्रैंडेड DNA** पर काम करता है

---

3. संरचना

- TdT एक**मोनोमेरिक न्यूक्लियर प्रोटीन है** , मॉलिक्यूलर वेट ~58 kDa है।
- डोमेन:
  - **कैटेलिटिक डोमेन** : DNA औरdNTPs को बांधता है
  - **न्यूक्लियर लोकलाइज़ेशन सिग्नल** : न्यूक्लियर इंपोर्ट सुनिश्चित करता है
- **डाइवैलेंट कैटायन** (Mg^{2+} या Co^{2+}) की ज़रूरत होती है ।
- एक्टिव साइट में कंजर्व्ड रेसिड्यू होते हैं:
  - एस्पार्टेट और ग्लूटामेट समन्वय धातु आयन
  - लाइसिन अवशेष DNA 3’-अंत से जुड़ते हैं

---

4. सब्सट्रेट विशिष्टता

- TdT **मुक्त 3’-OH के साथ एकल-रज्जुक डीएनए को प्राथमिकता देता है** ।
- सभी चार डीऑक्सीन्यूक्लियोटाइड (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) जोड़ सकते हैं।
- लेबलिंग के लिए इन विट्रो में **मॉडिफाइड न्यूक्लियोटाइड को** शामिल किया जा सकता है ।

- दूसरे पॉलीमरेज़ के उलट, इसकी एक्टिविटी **टेम्पलेट-इंडिपेंडेंट होती है।**

---

5. मैकेनिज्म ऑफ एक्शन (डीप एक्सप्लेनेशन)

चरण 1: DNA बाइंडिंग

- TdT, सिंगल-स्ट्रैंडेड DNA के **3’-OH सिरे से जुड़ता है।**

चरण 2: न्यूक्लियोटाइड बाइंडिंग

- एक डीऑक्सीन्यूक्लियोटाइड ट्राइफॉस्फेट (dNTP) एक्टिव साइट में प्रवेश करता है।
- मेटल आयन (Mg^{2+}/Co^{2+}) ट्राइफॉस्फेट को स्थिर करते हैं।

स्टेप 3: फॉस्फोडाइएस्टर बॉन्ड बनना

- 3’-OH, dNTP के α-फॉस्फेट पर हमला करता है।
- 3’-अंत पर नया न्यूक्लियोटाइड जोड़ा गया।

चरण 4: जोड़ दोहराएँ

- **रैंडम तरीके से** न्यूक्लियोटाइड जोड़ना जारी रख सकता है , जिससे होमोपॉलीमेरिक या मिक्स्ड सीक्वेंस बन सकते हैं।

---

6. जैविक भूमिकाएँ

ए. इम्यूनोलॉजी – वी(डी)जे रीकॉम्बिनेशन

- TdT, V, D, और J सेगमेंट के जंक्शन पर **N-न्यूक्लियोटाइड डाइवर्सिटी लाता है।**
- **एंटीबॉडी और टी-सेल रिसेप्टर डायवर्सिटी** (~10^6–10^8 यूनिक रिसेप्टर्स) बढ़ाता है ।
- अडैप्टिव इम्यूनिटी के लिए ज़रूरी।

बी. हेमटोपोइजिस

- **अपरिपक्व लिम्फोइड प्रोजेनिटर** में व्यक्त किया गया ।
- बोन मैरो में **शुरुआती B और T सेल्स** का मार्कर ।

सी. सेल मार्कर

- TdT एक्सप्रेशन **एक्यूट लिम्फोब्लास्टिक ल्यूकेमिया (ALL) में एक डायग्नोस्टिक मार्कर है**।

---

7. प्रयोगशाला अनुप्रयोग

A. डीएनए की 3'-एंड लेबलिंग

- TdT **फ्लोरोसेंट, बायोटिन, या रेडियोएक्टिव लेबल वाले न्यूक्लियोटाइड जोड़ सकता है**।
- अनुप्रयोग:
  - डीएनए जांच
  - एफआईएसएच (फ्लोरोसेंस इन सीटू हाइब्रिडाइजेशन)
  - विशिष्ट DNA सिरों का पता लगाना

उदाहरण : DNA टुकड़ों के 3’ छोर पर लेबलयुक्त dUTP जोड़ना।

बी. ट्यूनेल परख

- **टर्मिनल डिऑक्सीन्यूक्लियोटाइडिल ट्रांसफ़ेरेस dUTP निक एंड लेबलिंग (TUNEL)** में किया जाता है :
  - एपोप्टोसिस के दौरान **DNA के टूटने का** पता लगाता है ।
  - TdT, टूटे हुए DNA के 3’-OH पर लेबल्ड dUTP को शामिल करता है।

C. सीडीएनए टेल एडिशन

- DNA के सिरों पर **होमोपॉलीमेरिक टेल्स (पॉली-dA, पॉली-dC)** जोड़ सकते हैं ।
- **cDNA लाइब्रेरी बनाने** और **RACE (cDNA एंड्स का रैपिड एम्प्लीफिकेशन)** में इस्तेमाल होता है ।

D. आणविक क्लोनिंग

- TdT से बनी पूंछ, **लिगेशन-इंडिपेंडेंट क्लोनिंग की अनुमति देती है**।
- कम्पैटिबल रेस्ट्रिक्शन साइट्स के बिना DNA फ़्रैगमेंट को जोड़ने में मदद करता है।

---

8. मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में TdT के फायदे

1. टेम्पलेट-स्वतंत्र संश्लेषण
2. संशोधित न्यूक्लियोटाइड को शामिल कर सकते हैं
3. लेबलिंग, क्लोनिंग और डिटेक्शन तकनीकों में उपयोगी
4. cDNA क्लोनिंग के लिए होमोपॉलीमेरिक टेल्स बना सकते हैं

---

9. सीमाएं

- रैंडम न्यूक्लियोटाइड जोड़ → सीक्वेंस अनप्रिडिक्टेबिलिटी
- **सिंगल-स्ट्रैंडेड 3′-OH DNA सिरों** पर सबसे अच्छा काम करता है
- लंबे समय तक जोड़ने के लिए सीमित प्रक्रियात्मकता
- लेबलिंग एफिशिएंसी के लिए सावधानी से रिएक्शन ऑप्टिमाइज़ेशन की ज़रूरत होती है

---

10. प्रतिक्रिया की स्थितियाँ

- इष्टतम pH: **7.5–8.5**
- तापमान: ~37°C
- सहकारक: Mg^{2+} या Co^{2+}
- dNTPs: 0.1–0.5 mM
- DNA सब्सट्रेट: 3′-OH सिरे, सिंगल- या डबलस्ट्रैंडेड

---

11. TdT बनाम पारंपरिक DNA पॉलीमरेज़

विशेषता	टीडीटी	डीएनए पोलीमरेज़
खाका	कोई नहीं (टेम्प्लेट-स्वतंत्र)	DNA टेम्पलेट ज़रूरी है
सब्सट्रेट	एसएसडीएनए 3′-ओएच	ssDNA/dsDNA प्राइमर-टेम्पलेट
समारोह	न्यूक्लियोटाइड को बेतरतीब ढंग से जोड़ता है	टेम्पलेट की प्रतिकृतियाँ
जैविक भूमिका	प्रतिरक्षा विविधता	डीएनए प्रतिकृति/मरम्मत
प्रयोगशाला उपयोग	DNA लेबलिंग, TUNEL, cDNA टेलिंग	पीसीआर, क्लोनिंग, अनुक्रमण

---

12. नैदानिक महत्व

- **ALL** (एक्यूट लिम्फोब्लास्टिक ल्यूकेमिया) के लिए मार्कर
- TdT+ कोशिकाएं **अपरिपक्व लिम्फोइड कोशिकाओं को दर्शाती हैं**
- TdT लेवल **डायग्नोसिस, प्रोग्नोसिस और थेरेपी मॉनिटरिंग में मदद करते हैं**

इकाई: 4

जीन संपादन:

जीन संपादन

जीन एडिटिंग मॉलिक्यूलर तकनीकों का एक कलेक्शन है **जो किसी जीव के जीनोम में सटीक बदलाव करने की इजाज़त देता है , जिसमें खास जीनोमिक जगहों पर DNA सीक्वेंस को डालना, हटाना, बदलना या ठीक करना शामिल है। यह** रिसर्च, थेरेपी और बायोटेक्नोलॉजी के लिए **जीन में कंट्रोल्ड बदलाव करने में** मदद करता है ।

---

1 परिचय

- **जीनोम एडिटिंग** या **जीनोम इंजीनियरिंग** भी कहा जाता है ।
- पारंपरिक जेनेटिक इंजीनियरिंग (जो अक्सर विदेशी DNA को बेतरतीब ढंग से सम्मिलित करती है) के विपरीत, जीन संपादन **विशिष्ट स्थानों** पर **लक्षित संशोधन की अनुमति देता है** ।
- **ZFNs, TALENs, और CRISPR-Cas सिस्टम** जैसे **साइट-स्पेसिफिक न्यूक्लिएसेज़** के डेवलपमेंट से क्रांति आई है ।
- एप्लीकेशन में **फंक्शनल जीनोमिक्स, जीन थेरेपी, एग्रीकल्चर और सिंथेटिक बायोलॉजी शामिल हैं** ।

---

2. मूल सिद्धांत

जीन एडिटिंग तीन मुख्य स्टेप्स पर निर्भर करती है:

1. **लक्ष्य DNA अनुक्रम की पहचान**
    - एंजाइम या कॉम्प्लेक्स को जीनोम में सही जगह मिलनी चाहिए।
2. **डबल-स्ट्रैंड ब्रेक (DSB) या सिंगल-स्ट्रैंड निक का इंडक्शन**
    - DSBs सेलुलर DNA रिपेयर मैकेनिज्म को ट्रिगर करते हैं।
3. **सेलुलर तंत्र द्वारा मरम्मत**
    - **नॉन-होमोलॉगस एंड जॉइनिंग (NHEJ)** → गलती की संभावना, इंसर्शन/डिलीशन (इंडेल्स) लाता है → जीन में रुकावट

- **होमोलॉजी-डायरेक्टेड रिपेयर (HDR)** → डोनर टेम्पलेट का इस्तेमाल करता है → सटीक इंसर्शन, करेक्शन, या रिप्लेसमेंट

DNA रिपेयर का इस्तेमाल **जीन को पहले से बदलने के लिए किया जाता है**।

---

3. जीन एडिटिंग टूल्स और एंजाइम्स

A. मेगन्यूक्लिऐसेस

- प्राकृतिक रूप से पाए जाने वाले एंडोन्यूक्लिऐस जो लंबे DNA सीक्वेंस (12–40 bp) को पहचानते हैं।
- दुर्लभ कटिंग साइट्स → बहुत खास।
- पहले इस्तेमाल होता था लेकिन **मुश्किल इंजीनियरिंग की वजह से सीमित था**।

बी. जिंक फिंगर न्यूक्लिऐसेस (ZFNs)

- आर्टिफ़िशियल फ़्यूज़न प्रोटीन:
  - **जिंक फिंगर DNA-बाइंडिंग डोमेन** (हर उंगली पर 3 bp पहचानता है)
  - **FokI न्यूक्लिऐस डोमेन** → DNA को काटता है
- पेयर्ड ZFNs डाइमराइज़ → टारगेट साइट पर DSB
- फायदे: टारगेटेड एडिटिंग
- सीमाएं: जटिल डिज़ाइन, ऑफ़-टारगेट प्रभाव

C. TALENs (ट्रांसक्रिप्शन एक्टिवेटर-लाइक इफ़ेक्टर न्यूक्लिएसेज़)

- DNA-बाइंडिंग डोमेन: TAL इफ़ेक्टर्स से रिपीट यूनिट्स, हर एक**1 bp को पहचानता है**
- **FokI न्यूक्लिऐस** से जुड़ा हुआ
- ZFNs की तुलना में आसान डिज़ाइन, बहुत ज़्यादा स्पेसिफ़िक
- DSB बना सकते हैं → NHEJ या HDR से रिपेयर किया गया

D. CRISPR-Cas सिस्टम (सबसे ज़्यादा इस्तेमाल किया जाने वाला)

- जीवाणु अनुकूली प्रतिरक्षा से व्युत्पन्न

- अवयव:
    - **Cas न्यूक्लिऐस** (जैसे, Cas9, Cas12) → DNA को काटता है
    - **गाइड RNA (gRNA या sgRNA)** → टारगेट DNA का कॉम्प्लिमेंट्री
- तंत्र:

1. gRNA बेस-पेयरिंग के ज़रिए टारगेट DNA से जुड़ता है
2. Cas9, PAM (प्रोटोस्पेसर एडजेसेंट मोटिफ) के 3 bp पहले DSB को प्रेरित करता है।
3. NHEJ या HDR द्वारा DNA की मरम्मत

लाभ:

- सरल और प्रोग्राम करने योग्य
- एक साथ कई जीन को टारगेट कर सकता है (मल्टीप्लेक्सिंग)
- कुशल और लागत प्रभावी

सीमाएँ:

- ऑफ-टारगेट क्लीवेज
- डिलीवरी की चुनौतियाँ

ई. बेस एडिटर्स

- फ्यूजन प्रोटीन जो **कैटेलिटिक रूप से मृत या निकेज Cas9 को साइटिडीन या एडेनिन डीएमाइनेज** के साथ मिलाते हैं
- DSB के बिना **सिंगल-बेस बदलाव की** अनुमति दें
- उदाहरण:
    - C → T रूपांतरण
    - A → G रूपांतरण

एफ. प्राइम एडिटिंग

- **रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस से जुड़े Cas9 निकेज का** इस्तेमाल करता है
- **प्राइम एडिटिंग गाइड RNA (pegRNA)** के साथ जोड़ा गया
- DSB या डोनर DNA के बिना **सटीक सब्स्टिट्यूशन, इंसर्शन, डिलीशन को** सक्षम करता है
- बहुत बहुमुखी और कम ऑफ-टारगेट प्रभाव

---

4. जीन एडिटिंग के तरीके

ए. गैर-समरूप अंत संयोजन (एनएचईजे)

- DNA DSB को बिना टेम्पलेट के सीधे लिगेट किया जाता है
- त्रुटि-प्रवण → indels
- **उपयोग** : जीन नॉकआउट

बी. होमोलॉजी-डायरेक्टेड रिपेयर (HDR)

- होमोलॉजी आर्म्स के साथ डोनर टेम्पलेट की ज़रूरत है
- सटीक रिपेयर → सटीक इंसर्शन या करेक्शन
- **उपयोग** : जीन सुधार, नॉक-इन

---

5. जीन एडिटिंग एक्सपेरिमेंट के स्टेप्स (जनरलाइज़्ड)

1. **डिज़ाइन** : टारगेट सीक्वेंस की पहचान करें और सही न्यूक्लिऐस (CRISPR, TALEN, ZFN) चुनें।
2. **डिलीवरी** : टारगेट सेल्स में न्यूक्लिएज़/gRNA और डोनर DNA डालें
    - तरीके: प्लास्मिड, वायरल वेक्टर, इलेक्ट्रोपोरेशन, लिपोफेक्शन
3. **क्लीवेज** : न्यूक्लिऐस टारगेट से जुड़ता है औरDSB या सिंगल-स्ट्रैंड निक बनाता है
4. **रिपेयर** : सेल NHEJ (इंडेल्स) या HDR (सटीक बदलाव) का इस्तेमाल करता है
5. **स्क्रीनिंग** : PCR, सीक्वेंसिंग, या रिपोर्टर जीन का इस्तेमाल करके सफलतापूर्वक एडिट किए गए सेल्स की पहचान करें

---

6. जीन एडिटिंग के अनुप्रयोग

दवा

- **जीन थेरेपी** : म्यूटेशन को ठीक करना (जैसे, सिकल सेल एनीमिया, β-थैलेसीमिया)
- **कैंसर थेरेपी** : CAR-T सेल्स की इंजीनियरिंग कैंसर ...
- **एंटीवायरल थेरेपी** : HIV को रोकने के लिए CCR5 को एडिट करना

बी. कृषि

- **बेहतर फसलें** : सूखा सहने की क्षमता, कीटों से बचाव

- **पशुधन** : रोग-प्रतिरोधी या कम वसा वाला मांस उत्पादन

C. कार्यात्मक जीनोमिक्स

- नॉकआउट, नॉक-इन या पॉइंट म्यूटेशन के ज़रिए जीन फ़ंक्शन की स्टडी करें

D. सिंथेटिक बायोलॉजी

- सिंथेटिक जीवों या मेटाबोलिक रास्तों का डिज़ाइन

ई. दवा की खोज

- कोशिकाओं और जानवरों में रोग मॉडल
- चिकित्सीय लक्ष्यों के लिए स्क्रीनिंग

---

7. जीन एडिटिंग के फ़ायदे

1. पारंपरिक म्यूटेशन की तुलना में उच्च परिशुद्धता
2. विशिष्ट स्थानों पर लक्षित संशोधन
3. तेज़ और किफ़ायती (खासकर CRISPR)
4. विभिन्न जीवों में लागू
5. नॉकआउट, नॉक-इन या पॉइंट म्यूटेशन जेनरेट कर सकता है

---

8. सीमाएं / चुनौतियां

1. लक्ष्य-बाह्य उत्परिवर्तन
2. विशिष्ट कोशिकाओं या ऊतकों तक डिलीवरी
3. नैतिक चिंताएँ (मानव जर्मलाइन संपादन)
4. NHEJ की तुलना में HDR की एफिशिएंसी कम है
5. इम्युनोजेनेसिटी (खासकर वायरल डिलीवरी के साथ)

---

9. नैतिक और नियामक विचार

- इंसानों में जर्मलाइन एडिटिंग **बहुत विवादित है**

- **क्लिनिकल ट्रायल और खेती से जुड़े इस्तेमाल** के लिए रेगुलेटरी गाइडलाइंस मौजूद हैं
- अनचाहे नतीजों के जोखिम पर सावधानी से नज़र रखने की ज़रूरत है

---

10. भविष्य की दिशाएँ

- **प्राइम और बेस एडिटिंग** : ज़्यादा सुरक्षित, सटीक बदलाव
- **इन विवो जीन थेरेपी** : मरीजों में सीधे वंशानुगत बीमारियों का इलाज करें
- **मल्टीप्लेक्स जीनोम इंजीनियरिंग** : एक साथ कई जीन को टारगेट करना
- **एपिजीनोम एडिटिंग** : सीक्वेंस बदले बिना जीन एक्सप्रेशन को मॉड्यूलेट करें

जीन पुनर्संयोजन

जीन रीकॉम्बिनेशन, जिसे **जेनेटिक रीकॉम्बिनेशन भी कहते हैं** , वह **प्रोसेस है जिससे DNA सीक्वेंस को रीअरेंज किया जाता है ताकि जेनेटिक मटीरियल के नए कॉम्बिनेशन बन सकें** , या तो जीनोम के अंदर या जीनोम के बीच। यह **जेनेटिक डाइवर्सिटी, रिपेयर और इवोल्यूशन के लिए ज़रूरी है, और मॉलिक्यूलर क्लोनिंग और रीकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी** का बेस बनाता है।

---

1 परिचय

- जीन रीकॉम्बिनेशन **नैचुरली** (मियोटिक रीकॉम्बिनेशन, बैक्टीरियल ट्रांसफॉर्मेशन) हो सकता है या **आर्टिफिशियली** (रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी) इंड्यूस किया जा सकता है।
- **बैक्टीरिया, फंगस और ड्रोसोफिला में जेनेटिक एक्सपेरिमेंट** से इसकी खोज हुई।
- **नए एलीलिक कॉम्बिनेशन** , जीन शफलिंग औरDNA रिपेयर को मुमकिन बनाता है।

---

2. जीन रीकॉम्बिनेशन के प्रकार

A. समजातीय पुनर्संयोजन (HR)

- **एक जैसे या एक जैसे सीक्वेंस वाले DNA मॉलिक्यूल्स** के बीच होता है।
- **DNA रिपेयर, मेयोसिस और जेनेटिक मैपिंग** में महत्वपूर्ण।
- **तंत्र** :
    1. समजातीय अनुक्रमों का संरेखण
    2. **हॉलिडे जंक्शनों** का निर्माण

3. स्ट्रैंड आक्रमण और विनिमय
4. शाखा स्थानांतरण
5. रिज़ॉल्यूशन → क्रॉसओवर या नॉन-क्रॉसओवर प्रोडक्ट्स

मुख्य एंजाइम :

- **RecA (बैक्टीरिया)** – स्ट्रैंड आक्रमण को बढ़ावा देता है
- **Rad51/Rad52 (यूकेरियोट्स)** – समजातीय युग्मन की मध्यस्थता करता है
- **RuvABC** – हॉलिडे जंक्शन को हल करता है

उदाहरण :

- इंसानों में मेयोटिक रीकॉम्बिनेशन → गैमेट्स में जेनेटिक डायवर्सिटी
- UV डैमेज के बाद E. coli में DNA रिपेयर

बी. साइट-विशिष्ट पुनर्संयोजन

- **विशिष्ट DNA अनुक्रमों** पर होता है , जो अक्सर छोटा (20–40 bp) होता है।
- **रीकॉम्बिनेस** द्वारा कैटलाइज़ किया गया।
- इसके **लिए एक्सटेंसिव सीक्वेंस होमोलॉजी की ज़रूरत नहीं है**।

साइट-स्पेसिफिक रीकॉम्बिनेशन के उदाहरण :

1. **क्रे-लॉक्स प्रणाली**
    - **Cre recombinase LoxP साइट्स को** पहचानता है
    - चूहों में कंडीशनल जीन नॉकआउट में इस्तेमाल किया जाता है
2. **एफएलपी-एफआरटी प्रणाली**
    - यीस्ट से **Flp रीकॉम्बिनेज FRT साइट्स पर काम करता है**

अनुप्रयोग :

- जीन विलोपन, सम्मिलन, व्युत्क्रमण, स्थानांतरण
- अनुसंधान में सशर्त जीन अभिव्यक्ति

C. गैर-समरूप अंत संयोजन (NHEJ)

- एक DNA रिपेयर मैकेनिज्म जो बिना होमोलॉजी के **डबल-स्ट्रैंड ब्रेक को जोड़ता है ।**
- इंसर्शन या डिलीशन बना सकते हैं → सीक्वेंस का रीकॉम्बिनेशन।
- प्रतिरक्षा प्रणाली विविधता के लिए **वी(डी)जे पुनर्संयोजन** में कुंजी ।

D. ट्रांसपोसॉन-मध्यस्थ पुनर्संयोजन

- **मोबाइल जेनेटिक एलिमेंट (ट्रांसपोसोन)** शामिल हैं जो जीनोम के अंदर घूमते रहते हैं।
- जीन में गड़बड़ी, डुप्लीकेशन, या नए कॉम्बिनेशन बन सकते हैं।
- एंजाइम: **ट्रांसपोज़ेज़**

उदाहरण :

- बैक्टीरियल इंसर्शन सीक्वेंस, मक्का Ac/Ds एलिमेंट्स

---

3. होमोलोगस रीकॉम्बिनेशन का मैकेनिज्म (डिटेल में)

1. **दीक्षा**
   - DNA के टूटने या रेप्लिकेशन फोर्क के टूटने से सिंगल-स्ट्रैंडेड 3′ सिरे बनते हैं।
2. **स्ट्रैंड आक्रमण**
   - RecA/Rad51 ssDNA को कोट करता है → समजातीय डुप्लेक्स DNA पर आक्रमण करता है → **D-लूप बनाता है** ।
3. **हॉलिडे जंक्शन फॉर्मेशन**
   - समजातीय धागों के बीच क्रॉसिंग ओवर से एक बनता है **X-आकार का जंक्शन** ।
4. **शाखा प्रवास**
   - जंक्शन DNA के साथ-साथ चलता है, और हेटेरोडुप्लेक्स क्षेत्र को बढ़ाता है।
5. **संकल्प**
   - एंडोन्यूक्लिअसेज़ जंक्शन को तोड़ते हैं → **क्रॉसओवर** या **नॉन-क्रॉसओवर** प्रोडक्ट।

डायग्राम (टेक्स्ट-बेस्ड):

डीएनए1: ----आआआआ
डीएनए2: ----बीबीबीबी----

HR के बाद:
डीएनए1: ----ABAB----
डीएनए2: ----बाबा----

---

4. जीन रीकॉम्बिनेशन में शामिल एंजाइम

एनजाइम	समारोह	उदाहरण
RecA/Rad51	स्ट्रैंड इनवेज़न, होमोलॉजी सर्च	बैक्टीरिया/खमीर
रुवएबीसी	हॉलिडे जंक्शन संकल्प	ई कोलाई
स्पो11	अर्धसूत्रीविभाजन में DSB प्रेरित करता है	यीस्ट
क्रे रीकॉम्बिनेज	साइट-विशिष्ट पुनर्संयोजन	LoxP प्रणाली
एफएलपी रीकॉम्बिनेज	साइट-विशिष्ट पुनर्संयोजन	एफआरटी प्रणाली
ट्रांसपोज़ेज़	ट्रांसपोसॉन सम्मिलन/उत्सर्जन	Tn तत्वों

---

5. कृत्रिम जीन पुनर्संयोजन

बायोटेक्नोलॉजी में, जीन रीकॉम्बिनेशन का इस्तेमाल **रिकॉम्बिनेंट DNA मॉलिक्यूल बनाने के लिए किया जाता है** :

1. **रेस्ट्रिक्शन एंजाइम** DNA को खास जगहों पर काटते हैं
2. **डीएनए लाइगेस** डीएनए टुकड़ों को जोड़ते हैं
3. **वेक्टर्स** विदेशी जीन्स को होस्ट सेल्स में ले जाते हैं
4. **ट्रांसफॉर्मेशन / ट्रांसफेक्शन** सेल्स में रिकॉम्बिनेंट DNA डालता है

उदाहरण अनुप्रयोग :

- ई. कोलाई में रिकॉम्बिनेंट इंसुलिन उत्पादन
- जीएम फसलें (बीटी कपास, गोल्डन राइस)
- जीन थेरेपी (दोषपूर्ण जीन को ठीक करना)

---

6. इम्यून सिस्टम में रीकॉम्बिनेशन

- **वी(डी)जे पुनर्संयोजन** एंटीबॉडी और टी-सेल रिसेप्टर विविधता उत्पन्न करता है।
- तंत्र:
    1. RAG1/RAG2 प्रोटीन **RSS (रीकॉम्बिनेशन सिग्नल सीक्वेंस) को पहचानते हैं**
    2. क्लीवेज → हेयरपिन फॉर्मेशन
    3. NHEJ DNA की मरम्मत करता है → जंक्शनल डाइवर्सिटी
- TdT रैंडम न्यूक्लियोटाइड जोड़ता है → **N-न्यूक्लियोटाइड डाइवर्सिटी**

---

7. जीन रीकॉम्बिनेशन का महत्व

ए. विकास

- **जेनेटिक डाइवर्सिटी** पैदा करता है , जिससे नेचुरल सिलेक्शन मुमकिन होता है।

बी. डीएनए मरम्मत

- HR **डबल-स्ट्रैंड ब्रेक को रिपेयर करता है** , जीनोमिक इंटेग्रिटी बनाए रखता है।

C. जैव प्रौद्योगिकी

- **रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी** , क्लोनिंग और जेनेटिक इंजीनियरिंग का आधार ।

डी. चिकित्सा

- **जीन थेरेपी, इम्यूनोलॉजी और कैंसर रिसर्च** के लिए रीकॉम्बिनेशन को समझना बहुत ज़रूरी है ।

---

8. फायदे

1. **नए आनुवंशिक संयोजन** उत्पन्न करता है
2. **सटीक आनुवंशिक इंजीनियरिंग को** सक्षम बनाता है
3. **कार्यात्मक जीनोमिक्स अध्ययनों को** सुगम बनाता है
4. **प्रतिरक्षा प्रणाली की विविधता** को बढ़ाता है

---

9. सीमाएं / जोखिम

- गलत रीकॉम्बिनेशन → **म्यूटेशन, ट्रांसलोकेशन, या कैंसर**
- रैंडम इंटीग्रेशन ज़रूरी जीन्स को खराब कर सकता है
- कृत्रिम प्रणालियों में ऑफ-टारगेट पुनर्संयोजन

जीन स्थानांतरण

जीन ट्रांसफर एक **प्रोसेस है जिसमें किसी होस्ट सेल या जीव में बाहरी DNA डाला जाता है** , जिससे नए जेनेटिक गुण मिलते हैं। यह प्रोसेस **माइक्रोबियल जेनेटिक्स, मॉलिक्यूलर बायोलॉजी, बायोटेक्नोलॉजी और जेनेटिक इंजीनियरिंग के लिए ज़रूरी है** ।

---

1 परिचय

- जीन ट्रांसफर से **जीन का हॉरिजॉन्टल एक्विजिशन** (जीवों के बीच) या **आर्टिफिशियल इंट्रोडक्शन** (लैब में) हो सकता है।
- यह बैक्टीरिया और वायरस में **नैचुरली या** यूकेरियोटिक और प्रोकैरियोटिक सेल्स में **आर्टिफिशियली हो सकता है।**
- के लिए आवश्यक है:
    - **जीन कार्य का** अध्ययन
    - **पुनः संयोजक प्रोटीन** विकसित करना
    - **आनुवंशिक रूप से संशोधित जीव (GMOs)** बनाना

---

2. जीन ट्रांसफर के प्रकार

A. बैक्टीरिया में प्राकृतिक जीन स्थानांतरण

बैक्टीरिया **तीन मुख्य तरीकों से जेनेटिक मटीरियल एक्सचेंज करते हैं** :

1. परिवर्तन

- काबिल सेल्स द्वारा एनवायरनमेंट से **नेकेड DNA** का अपटेक।
- सबसे पहले ग्रिफिथ (1928) ने **स्ट्रेप्टोकोकस न्यूमोनिया में इसकी खोज की थी** ।
- चरण:
    1. DNA कोशिका की सतह से जुड़ता है
    2. डीएनए कोशिका द्रव्य में प्रवेश करता है

3. **समजातीय पुनर्संयोजन** के माध्यम से जीनोम में शामिल किया गया

उदाहरण : स्ट्रेप्टोकोकस न्यूमोनिया, बैसिलस सबटिलिस

एप्लीकेशन : क्लोनिंग के लिए लैब ट्रांसफॉर्मेशन, रिकॉम्बिनेंट DNA एक्सपेरिमेंट

---

2. पारगमन

- **बैक्टीरियोफेज** (वायरस) के ज़रिए बैक्टीरियल जीन का ट्रांसफर ।
- प्रकार:
    - **सामान्यीकृत ट्रांसडक्शन** : यादृच्छिक जीवाणु DNA स्थानांतरित
    - **स्पेशलाइज़्ड ट्रांसडक्शन** : प्रोफ़ेज एक्सिशन साइट के पास खास बैक्टीरियल जीन

तंत्र :

1. फेज दाता बैक्टीरिया को संक्रमित करता है
2. फेज कैप्सिड में पैक किया गया बैक्टीरियल DNA
3. फेज रिसीवर बैक्टीरिया को इन्फेक्ट करता है → DNA इंटीग्रेट होता है

उदाहरण : साल्मोनेला, ई. कोलाई

---

3. संयुग्मन

- **सेक्स पिली** के माध्यम से दो बैक्टीरिया के बीच **DNA का सीधा ट्रांसफर** ।
- आवश्यक:
    - दाता (F^+ या Hfr)
    - प्राप्तकर्ता (F^-)
- DNA आमतौर पर **प्लास्मिड या क्रोमोसोमल टुकड़ों के रूप में ट्रांसफर होता है**
- तंत्र:

1. पिलस डोनर और रिसीवर को जोड़ता है
2. एकल-रज्जुक डीएनए स्थानांतरित
3. DNA रेप्लिकेशन डबलस्ट्रैंडेड DNA को रिस्टोर करता है

उदाहरण : E. coli में F-प्लास्मिड स्थानांतरण

B. कृत्रिम जीन स्थानांतरण

मॉलिक्यूलर बायोलॉजी और बायोटेक्नोलॉजी में होस्ट सेल्स में ज़रूरी जीन डालने के लिए आर्टिफिशियल जीन ट्रांसफर का इस्तेमाल किया जाता है। **प्रोकैरियोट्स** और **यूकेरियोट्स** के लिए तरीके अलग-अलग होते हैं।

1. बैक्टीरिया में जीन ट्रांसफर

क. परिवर्तन

- **केमिकल ट्रीटमेंट ($CaCl_2$)** या **इलेक्ट्रोपोरेशन का** इस्तेमाल करके लैब में बनाया गया।
- काबिल सेल्स प्लास्मिड DNA को अच्छे से सोख लेती हैं।

ख. इलेक्ट्रोपोरेशन

- छोटी **इलेक्ट्रिक पल्स** सेल मेम्ब्रेन को DNA के लिए पारगम्य बनाती है।
- प्लास्मिड और जीनोमिक DNA दोनों के लिए बहुत असरदार।

---

2. यूकेरियोटिक कोशिकाओं में जीन स्थानांतरण

क. भौतिक विधियाँ

1. **microinjection**
    - DNA को एक पतली सुई का इस्तेमाल करके सीधे जानवरों की कोशिकाओं के न्यूक्लियस में इंजेक्ट किया जाता है।
    - **ट्रांसजेनिक जानवरों** (जैसे, चूहे) में इस्तेमाल किया जाता है।
2. **बायोलिस्टिक्स / जीन गन**
    - DNA-कोटेड माइक्रोप्रोजेक्टाइल को पौधों के टिशू में डाला गया।
    - **ट्रांसजेनिक पौधे** बनाता है।

ख. रासायनिक विधियाँ

- **कैल्शियम फॉस्फेट** या **लिपोसोम-मध्यस्थता ट्रांसफ़ेक्शन**
- DNA लिपिड के साथ कॉम्प्लेक्स होता है → सेल मेम्ब्रेन के साथ फ्यूज होता है → DNA साइटोप्लाज्म में जाता है

सी. वायरल वेक्टर

- **एडेनोवायरस, लेंटिवायरस, रेट्रोवायरस** स्तनधारी कोशिकाओं में जीन पहुंचाते हैं

- **जीन थेरेपी** में इस्तेमाल होने वाली हाई एफिशिएंसी

---

3. DNA इंटीग्रेशन के मैकेनिज्म

- सेल में एंट्री के बाद, DNA या तो **एपिसोमल** (प्लाज़्मिड) रह सकता है या होस्ट जीनोम में इंटीग्रेट हो सकता है।
- इंटीग्रेशन इस तरह होता है:
    - **समजातीय पुनर्संयोजन** (अनुक्रम समानता आवश्यक है)
    - **गैर-समरूप अंत संयोजन (NHEJ)** (यूकेरियोट्स में)
    - **ट्रांसपोसॉन-मध्यस्थ एकीकरण**

शामिल एंजाइम :

- **DNA लाइगेस** → DNA टुकड़ों को जोड़ना
- **रिकॉम्बिनेस** → साइट-स्पेसिफिक इंटीग्रेशन
- **टोपोआइसोमेरेज़** → DNA सुपरकॉइलिंग से राहत दिलाते हैं

---

4. पौधों में जीन स्थानांतरण

- **एग्रोबैक्टीरियम-मध्यस्थ परिवर्तन** :
    - नेचुरल Ti प्लास्मिड, **T-DNA को** प्लांट जीनोम में ट्रांसफर करता है
    - GM फसलें (बीटी कॉटन, गोल्डन राइस) उगाने के लिए इस्तेमाल किया जाता है
- **प्रत्यक्ष DNA अवशोषण** :
    - प्रोटोप्लास्ट का इलेक्ट्रोपोरेशन
    - जैविक वितरण

---

5. जानवरों में जीन ट्रांसफर

- **वायरल वेक्टर** (रेट्रोवायरस, एडेनोवायरस, एएवी)
- प्रोन्यूक्लिआई में **DNA का माइक्रोइंजेक्शन → ट्रांसजेनिक जानवर**
- सटीक जीन इंसर्शन के लिए **CRISPR-Cas9 जीन एडिटिंग**

---

6. जीन स्थानांतरण के अनुप्रयोग

ए. अनुसंधान

- **नॉकआउट** या **ओवरएक्सप्रेशन** द्वारा जीन फ़ंक्शन का अध्ययन करें
- रिपोर्टर जीन परख

बी. चिकित्सा

- **जीन थेरेपी** : खराब जीन को ठीक करना
- कैंसर के लिए **CAR-T सेल थेरेपी**
- **वैक्सीन** : वायरल वेक्टर वैक्सीन (जैसे, COVID-19)

C. कृषि

- ट्रांसजेनिक पौधे: कीट-प्रतिरोधी, शाकनाशी-प्रतिरोधी, पोषण से भरपूर फसलें
- पशुधन: रोग-प्रतिरोधी या बेहतर गुण

D. जैव प्रौद्योगिकी

- रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन उत्पादन (इंसुलिन, ग्रोथ हार्मोन)
- औद्योगिक एंजाइम (एमिलेज, सेल्युलेज)

---

7. फायदे

1. जीनोम के **सटीक संशोधन को** सक्षम बनाता है
2. **कार्यात्मक जीनोमिक्स अध्ययनों को** सुगम बनाता है
3. **ट्रांसजेनिक जीवों के उत्पादन की** अनुमति देता है
4. **वंशानुगत बीमारियों के लिए जीन थेरेपी** संभव बनाता है

---

8. सीमाएं / चुनौतियां

1. कोशिकाओं और जीवों के बीच दक्षता अलग-अलग होती है
2. ऑफ-टारगेट इंटीग्रेशन → जीनोमिक अस्थिरता
3. नैतिक चिंताएँ (मानव जर्मलाइन संशोधन)

4. टारगेट सेल्स में DNA पहुंचाना टेक्निकली मुश्किल हो सकता है
5. वायरल वेक्टर के खिलाफ प्रतिरक्षा प्रतिक्रियाएं

जीवाणु संयुग्मन

बैक्टीरियल कॉन्जुगेशन **हॉरिजॉन्टल जीन ट्रांसफर का एक तरीका है** जिसमें **जेनेटिक मटीरियल सीधे एक बैक्टीरिया (डोनर) से दूसरे बैक्टीरिया (रिसीपिएंट) में सेल-टू-सेल कॉन्टैक्ट के ज़रिए ट्रांसफर होता है। यह ट्रांसफॉर्मेशन** (नग्न DNA का अपटेक) औ**ट्रांसडक्शन** (फेज-मीडिएटेड ट्रांसफर) से अलग है।

---

1 परिचय

- **लेदरबर्ग और टैटम (1946)** द्वारा *ई. कोली* में देखा गया था।
- Conjugation की इसमें अहम भूमिका होती है:
  - **बैक्टीरिया में आनुवंशिक विविधता**
  - **एंटीबायोटिक प्रतिरोध का प्रसार**
  - प्रकृति और प्रयोगशाला सेटिंग्स में **प्लास्मिड स्थानांतरण**
- आवश्यक:
  - **संयुग्मी प्लास्मिड** (F प्लास्मिड या R प्लास्मिड) के साथ दाता कोशिका
  - प्लाज्मिड रहित प्राप्तकर्ता कोशिका
  - पिली के माध्यम से सीधा **कोशिका-से-कोशिका संपर्क**

---

2. बैक्टीरियल कंजुगेशन के प्रकार

A. एफप्लास्मिड (प्रजनन कारक) मध्यस्थ संयुग्मन

- डोनर: F^+ (इसमें F प्लास्मिड होता है)
- प्राप्तकर्ता: F^- (F प्लास्मिड की कमी)
- तंत्र:
  1. डोनर **सेक्स पिलस बनाता है** → रिसीवर से जुड़ जाता है
  2. पिलस पीछे हटता है → कोशिकाओं को एक साथ लाता है
  3. **रिलैक्सेज एंजाइम ट्रांसफर के ओरिजिन** पर प्लास्मिड DNA को निक्स करता है **(oriT)**
  4. सिंगल-स्ट्रैंडेड DNA (ssDNA) को प्राप्तकर्ता को ट्रांसफर किया गया
  5. दाता और प्राप्तकर्ता दोनों पूरक स्ट्रैंड को संश्लेषित करते हैं → दोनों F^+ बन जाते हैं

नतीजा: F प्लास्मिड का ट्रांसफर; आमतौर पर कोई क्रोमोसोमल DNA ट्रांसफर नहीं होता

बी. एचएफआ(उच्च-आवृत्ति पुनर्संयोजन) संयुग्मन

- Hfr स्ट्रेन: F प्लास्मिड बैक्टीरियल क्रोमोसोम में इंटीग्रेटेड हो गया
- तंत्र:
    1. Hfr कोशिका F^- कोशिका के साथ पिलस बनाती है
    2. **F प्लास्मिड के पास मौजूद क्रोमोसोमल DNA को** काटकर ट्रांसफर किया जाता है
    3. आमतौर पर, पिलस टूटने से पहले **क्रोमोसोम का सिर्फ़ एक हिस्सा ही ट्रांसफर होता है।**
    4. रिसीपिएंट F^- बना रहता है लेकिन **डोनर क्रोमोसोम से नए जीन ले सकता है**

नतीजा: क्रोमोसोमल जीन ट्रांसफर किए जा सकते हैं → **बैक्टीरियल जीनोम की मैपिंग** (इंटरप्शन मेथड)

C. F' (F-प्राइम) संयुग्मन

- F प्लास्मिड गलत तरीके से निकाला जाता है → कुछ क्रोमोसोमल जीन ले जाता है → जिसे **F’ प्लास्मिड कहते हैं**
- प्लास्मिड और क्रोमोसोमल दोनों जीन को प्राप्तकर्ता तक पहुंचाता है
- ट्रांसफ़र किए गए जीन के लिए **आंशिक द्विगुणता (मेरोडिप्लोइड)** मिल सकती है

---

3. F-प्लास्मिड कंजुगेशन का मैकेनिज्म (स्टेप-बाय-स्टेप)

1. **पिलस गठन** : दाता F^+ F^- सेल से संपर्क करने के लिए सेक्स पिलस का उत्पादन करता है
2. **पिलस रिट्रैक्शन** : कोशिकाओं को एक साथ खींचता है
3. **रिलैक्सेस-मीडिएटेड निकिंग** : **oriT पर** , F प्लास्मिड का एक स्ट्रैंड कट जाता है
4. **ssDNA का ट्रांसफर** : सिंगल स्ट्रैंड, कॉन्जुगेशन ब्रिज के ज़रिए रिसीवर में जाता है
5. **पूरक स्ट्रैंड संश्लेषण** :
    - डोनर नया कॉम्प्लिमेंट्री स्ट्रैंड बनाता है → dsDNA बन जाता है
    - प्राप्तकर्ता कॉम्प्लिमेंट्री स्ट्रैंड को सिंथेसाइज़ करता है → ssDNA को dsDNA में बदलता है
6. **सेल्स का सेपरेशन** : अब दोनों F^+

आरेखीय निरूपण (पाठ-आधारित) :

F+ दाता कोशिका ---> लिंग पिलस ---> F- प्राप्तकर्ता कोशिका
[एफ प्लास्मिड] [कोई एफ प्लास्मिड नहीं]

ट्रांसफर ssDNA → कॉम्प्लिमेंट्री स्ट्रैंड सिंथेसिस → रिसीवर F+ बन जाता है

---

4. शामिल एंजाइम और प्रोटीन

अवयव	समारोह
रिलैक्सेज़	oriT पर निक्स प्लास्मिड, DNA ट्रांसफर शुरू करता है
हेलीकेस	स्थानांतरण के दौरान DNA को खोलता है
डीएनए पोलीमरेज़	डोनर और रिसीवर में कॉम्प्लिमेंट्री स्ट्रैंड को सिंथेसाइज़ करता है
ट्रा प्रोटीन	फॉर्म मेटिंग ब्रिज और पिलस असेंबली

---

5. संयुग्मन की विशेषताएं

1. **सीधे सेल संपर्क की आवश्यकता है**
2. **प्लास्मिड-मध्यस्थ** (F प्लास्मिड या R प्लास्मिड)
3. **एकतरफ़ा ट्रांसफ़र** : डोनर → पाने वाला
4. **गुणसूत्र जीन** (Hfr) स्थानांतरित कर सकते हैं
5. Hfr स्ट्रेन में **हाई-फ़्रीक्वेंसी ट्रांसफ़र**

---

6. अनुप्रयोग

A. आनुवंशिकी

- **Hfr x F⁻ क्रॉस** का इस्तेमाल करके बैक्टीरियल क्रोमोसोम की मैपिंग
- **जीन लिंकेज** और पुनर्संयोजन का अध्ययन

बी. जैव प्रौद्योगिकी

- लैब स्ट्रेन में **ज़रूरी जीन वाले प्लास्मिड** का ट्रांसफर
- **प्रोटीन उत्पादन** के लिए रिकॉम्बिनेंट स्ट्रेन का निर्माण

सी. चिकित्सा

- पैथोजेनिक बैक्टीरिया में **फैले एंटीबायोटिक रेजिस्टेंस को** समझना

---

7. F^+, Hfr, और F' कंजुगेशन के बीच अंतर

विशेषता	F^+ संयुग्मन	Hfr संयुग्मन	F' संयुग्मन
प्लास्मिड प्रकार	मुक्त F प्लाज्मिड	F गुणसूत्र में एकीकृत होता है	गुणसूत्र जीन के साथ F प्लास्मिड
डीएनए स्थानांतरित	केवल प्लास्मिड	गुणसूत्र + प्लास्मिड	प्लास्मिड + विशिष्ट गुणसूत्र जीन
प्राप्तकर्ता	F^+ बन जाता है	अवशेष F^-	F' (आंशिक द्विगुणित) बन जाता है
आवृत्ति	मध्यम	गुणसूत्र जीन स्थानांतरण के लिए उच्च	मध्यम
उद्देश्य	प्लास्मिड प्रसार	जीन मैपिंग	जीन दोहराव / मेरोडिप्लोइडी

---

8. बैक्टीरियल कॉन्जुगेशन का महत्व

1. **जेनेटिक डाइवर्सिटी** : बैक्टीरियल पॉपुलेशन में जीन्स के नए कॉम्बिनेशन बनाता है
2. **प्लास्मिड का फैलाव** : एंटीबायोटिक रेजिस्टेंस (R प्लास्मिड) सहित
3. **जीनोम मैपिंग** : Hfr कंजुगेशन जीन ऑर्डर पता करने का एक क्लासिकल तरीका है।
4. **बायोटेक्नोलॉजी : प्लास्मिड ट्रांसफर** और रिकॉम्बिनेंट DNA एक्सपेरिमेंट के लिए टूल

जीवाणु परिवर्तन

ट्रांसफॉर्मेशन , पर्यावरण से फ्री, बिना कपड़ों के DNA को बैक्टीरियल सेल में लेना और शामिल करना है , जिससे रिसीवर के **जीनोटाइप और फेनोटाइप में** एक जेनेटिक बदलाव होता है। यह बैक्टीरिया में खोजे गए हॉरिजॉन्टल जीन ट्रांसफर के पहले मैकेनिज्म में से एक था।

---

1. ऐतिहासिक पृष्ठभूमि

- *स्ट्रेप्टोकोकस न्यूमोनिया* में **फ्रेडरिक ग्रिफिथ (1928)** द्वारा खोजा गया :
    - ज़िंदा नॉन-वायरुलेंट (R स्ट्रेन) बैक्टीरिया, गर्मी से मारे गए वाइरुलेंट बैक्टीरिया के संपर्क में आने पर वाइरुलेंट (S स्ट्रेन) बन गए।
    - **"परिवर्तनकारी सिद्धांत" का** प्रदर्शन किया , जिसे बाद में **एवरी, मैकलियोड और मैकार्थी (1944)** द्वारा डी.एन.ए. के रूप में पहचाना गया ।

---

2. परिभाषा

- ट्रांसफॉर्मेशन, **काबिल सेल्स द्वारा DNA का नैचुरल या आर्टिफिशियल तरीके से लेना है** , जिसके बाद **DNA को** होमोलॉगस रीकॉम्बिनेशन या प्लास्मिड के रूप में मेंटेनेंस के ज़रिए जीनोम में इंटीग्रेट किया जाता है।

---

3. परिवर्तन के प्रकार

A. प्राकृतिक परिवर्तन

- खास हालात में कुछ **नैचुरली काबिल बैक्टीरिया** में होता है ।
- उदाहरण: *स्ट्रेप्टोकोकस न्यूमोनिया, बैसिलस सबटिलिस, निस्सेरिया गोनोरिया*
- **तंत्र** :
    1. सेल्स **सक्षम अवस्था में आ जाती हैं** (DNA ले सकती हैं)
    2. बाह्यकोशिकीय DNA कोशिका की सतह के रिसेप्टर्स से जुड़ता है
    3. DNA पेरिप्लाज्म या साइटोप्लाज्म में प्रवेश करता है (आमतौर पर सिंगल-स्ट्रैंडेड)
    4. **रीकॉम्बिनेशन** DNA को होस्ट क्रोमोसोम में इंटीग्रेट करता है
- **कॉम्पिटेंस जीन** और **एनवायरनमेंटल कंडीशन** (स्ट्रेस, न्यूट्रिएंट की कमी) से रेगुलेट होता है ।

B. कृत्रिम (प्रयोगशाला-प्रेरित) परिवर्तन

- **मॉलिक्यूलर बायोलॉजी और बायोटेक्नोलॉजी** में बहुत इस्तेमाल होता है ।
- तरीके:
    1. **रासायनिक परिवर्तन** :
        - बैक्टीरियल मेम्ब्रेन को पारगम्य बनाने के लिए **कैल्शियम क्लोराइड ($CaCl_2$)** का इस्तेमाल करता है ।
        - 42°C पर हीट-शॉक DNA को अंदर जाने देता है।
        - *E. coli* क्लोनिंग एक्सपेरिमेंट में आम ।
    2. **इलेक्ट्रोपोरेशन** :
        - मेम्ब्रेन में कुछ समय के लिए छेद बनाने के लिए एक **छोटी इलेक्ट्रिकल पल्स का इस्तेमाल करता है।**
        - DNA अच्छे से अंदर जाता है।
    3. **प्रोटोप्लास्ट फ्यूजन (पौधे और कवक**
        - सेल की दीवारें हटा दी गईं → DNA को आसानी से लेने के लिए मेम्ब्रेन को जोड़ दिया गया।

एप्लीकेशन: क्लोनिंग प्लास्मिड, जीन नॉकआउट, ओवरएक्सप्रेशन स्टडीज़, रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन प्रोडक्शन।

---

4. परिवर्तन का तंत्र (प्राकृतिक परिवर्तन)

1. **योग्यता का विकास**
    - बैक्टीरियल सेल मेम्ब्रेन पर **DNA-बाइंडिंग प्रोटीन एक्सप्रेस करता है।**
2. **डीएनए का बंधन**
    - एक्स्ट्रासेलुलर DNA **कॉम्पिटेंस पिली या सरफेस रिसेप्टर्स से जुड़ता है** ।
3. **डीएनए का अवशोषण**
    - DNA का एक स्ट्रैंड खराब हो जाता है; **सिंगल-स्ट्रैंडेड DNA** साइटोप्लाज्म में चला जाता है।
4. **जीनोम में एकीकरण**
    - होमोलॉगस रीकॉम्बिनेशन DNA को होस्ट क्रोमोसोम में इंटीग्रेट करता है।
    - जो DNA इंटीग्रेटेड नहीं है, उसे होस्ट में **प्लास्मिड के रूप में बनाए रखा जा सकता है।**

डायग्राम (टेक्स्ट-बेस्ड रिप्रेजेंटेशन):

एक्स्ट्रासेलुलर DNA --> रिसेप्टर से जुड़ता है --> सिंगल स्ट्रैंड सेल में जाता है --> होस्ट जीनोम के साथ रीकॉम्बिनेशन --> ट्रांसफॉर्म्ड सेल

---

5. परिवर्तन की विशेषताएं

1. **नेकेड DNA का अपटेक** (ट्रांसडक्शन/कॉन्जुगेशन की तरह फेज या पिली के ज़रिए नहीं)
2. **प्राकृतिक या कृत्रिम रूप से** हो सकता है
3. DNA क्रोमोसोम में इंटीगरेट हो सकता है या एपिसोमल (प्लास्मिड) रह सकता है।
4. **यूनिडायरेक्शनल** : डोनर DNA → रिसीवर
5. पहचान के क्रम के कारण प्राकृतिक परिवर्तन में अक्सर **प्रजाति-विशिष्ट**

---

6. जीन और प्रोटीन शामिल हैं

- **कॉम्पिटेंस प्रोटीन (Com प्रोटीन)** : DNA को बांधते और ट्रांसपोर्ट करते हैं
- **RecA** : समजातीय पुनर्संयोजन की मध्यस्थता करता है
- **डीएनएसेस** : गैर-एकीकृत डीएनए को नष्ट करते हैं

---

7. परिवर्तन के अनुप्रयोग

A. आणविक जीवविज्ञान

- बैक्टीरियल कोशिकाओं में रिकॉम्बिनेंट **प्लास्मिड या वेक्टर** का प्रवेश
- डीएनए की क्लोनिंग और प्रवर्धन
- रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन (इंसुलिन, एंजाइम) का एक्सप्रेशन

बी. आनुवंशिकी

- **जीन नॉकआउट** या **रिपोर्टर एसेज़** के ज़रिए जीन फ़ंक्शन की स्टडी करना

C. जैव प्रौद्योगिकी

- **आनुवंशिक रूप से संशोधित सूक्ष्मजीवों** का उत्पादन
- डीएनए लाइब्रेरी निर्माण

डी. चिकित्सा

- **पुनःसंयोजक टीकों का** उत्पादन
- जीन थेरेपी वैक्टर

---

8. फायदे

1. कोशिकाओं में DNA डालने का असरदार तरीका
2. **लीनियर DNA** या प्लास्मिड का इस्तेमाल कर सकते हैं
3. **क्लोनिंग और जीन मैनिपुलेशन को** सक्षम बनाता है
4. **प्रोकैरियोटिक और यूकेरियोटिक** दोनों सिस्टम में लागू

---

9. सीमाएं

1. **प्राकृतिक परिवर्तन** में कम दक्षता
2. क्रोमोसोमल ट्रांसफॉर्मेशन में इंटीग्रेशन के लिए DNA का **होमोलॉगस** होना ज़रूरी है
3. आर्टिफ़िशियल तरीकों के लिए **खास इक्विपमेंट या रिएजेंट की ज़रूरत हो सकती है**
4. सभी बैक्टीरिया की प्रजातियां प्राकृतिक रूप से सक्षम नहीं होती हैं

जीवाणु संक्रमण

ट्रांसडक्शन एक **प्रोसेस है जिसमें बैक्टीरिया के जीन को एक बैक्टीरिया से दूसरे बैक्टीरिया में बैक्टीरियोफेज (बैक्टीरिया को इन्फेक्ट करने वाले वायरस) के ज़रिए ट्रांसफर किया जाता है**। यह एक तरह का **हॉरिजॉन्टल जीन ट्रांसफर है और**

बैक्टीरिया के विकास, जेनेटिक डाइवर्सिटी और एंटीबायोटिक रेजिस्टेंस जैसे लक्षणों के फैलने में अहम भूमिका निभाता है ।

---

1. ऐतिहासिक पृष्ठभूमि

- *साल्मोनेला* में **ज़िंडर और लेदरबर्ग (1952)** द्वारा खोजा गया ।
- यह दिखाया गया कि **बैक्टीरियोफेज बैक्टीरिया के जीन को एक सेल से दूसरे सेल तक ले जा सकते हैं** , यहां तक कि बैक्टीरिया के बीच सीधे संपर्क के बिना भी।

---

2. परिभाषा

ट्रांसडक्शन, **वायरस की मदद से बैक्टीरियल DNA का** डोनर सेल से रिसीवर सेल में ट्रांसफर है।

- बैक्टीरियोफेज गलती से वायरल DNA की जगह**होस्ट DNA को पैकेज कर लेता है** और उसे नए होस्ट में इंजेक्ट कर देता है, जिससे जेनेटिक रीकॉम्बिनेशन हो पाता है।

---

3. ट्रांसडक्शन के प्रकार

A. सामान्यीकृत पारगमन

- किसी भी **रैंडम बैक्टीरियल जीन को** ट्रांसफर किया जा सकता है।
- बैक्टीरियोफेज के **लाइटिक साइकिल** के दौरान होता है ।

तंत्र :

1. फेज डोनर बैक्टीरिया को इन्फेक्ट करता है → बैक्टीरिया का क्रोमोसोम **खराब हो जाता है** ।
2. फेज पार्टिकल्स इकट्ठा होते हैं → कभी-कभी **बैक्टीरियल DNA के टुकड़े** फेज कैप्सिड में पैक हो जाते हैं।
3. फेज, रेसिपिएंट बैक्टीरिया को इन्फेक्ट करता है → **बैक्टीरिया का DNA रेसिपिएंट साइटोप्लाज्म में एंटर करता है** ।
4. DNA, रेसिपिएंट क्रोमोसोम के साथ **होमोलॉगस रीकॉम्बिनेशन के ज़रिए रीकॉम्बिनेशन करता है** ।

उदाहरण : *साल्मोनेला फेज P22 , ई. कोलाई फेज P1*

नतीजा : रैंडम बैक्टीरियल जीन का ट्रांसफर; रिसीवर में कोई वायरल रेप्लीकेशन नहीं होता।

बी. विशिष्ट ट्रांसडक्शन

- प्रोफेज इंटीग्रेशन साइट के पास सिर्फ़ **खास बैक्टीरियल जीन ही ट्रांसफर होते हैं।**
- **लाइसोजेनिक साइकिल** के दौरान होता है जब प्रोफेज गलत तरीके से निकलता है।

तंत्र :

1. फेज, बैक्टीरियल क्रोमोसोम (प्रोफेज) में इंटीग्रेट हो जाता है।
2. इंडक्शन पर, प्रोफेज एक्साइज करता है → कभी-कभी **आस-पास के बैक्टीरियल जीन को** भी साथ ले जाता है।
3. फेज पाने वाले को इन्फेक्ट करता है → बैक्टीरियल जीन ट्रांसफर हो जाते हैं और पाने वाले जीनोम के साथ रीकॉम्बिन हो सकते हैं।

उदाहरण : *ई. कोली फेजλ* → **गैल** या **बायो** जीन ट्रांसफर करता है

नतीजा : सिर्फ़ इंटीग्रेशन साइट के पास के खास जीन ही ट्रांसफर होते हैं; अगर वायरल जीन मौजूद हों तो फेज रेप्लिकेट कर सकता है।

---

4. ट्रांसडक्शन का मैकेनिज्म (स्टेप-बाय-स्टेप)

सामान्यीकृत पारगमन

1. **डोनर का फेज इन्फेक्शन** : वायरल DNA बैक्टीरियल साइटोप्लाज्म में चला जाता है
2. **बैक्टीरियल DNA डिग्रेडेशन** : होस्ट जीनोम का टूटना
3. **पैकेजिंग में गलती** : बैक्टीरियल DNA गलती से फेज कैप्सिड में पैक हो गया → **ट्रांसड्यूसिंग पार्टिकल**
4. **रिसीवर का इन्फेक्शन** : ट्रांसड्यूसिंग फेज बैक्टीरियल DNA इंजेक्ट करता है
5. **रीकॉम्बिनेशन** : DNA, रिसीवर जीनोम में इंटीग्रेट होता है → नया जीनोटाइप

विशिष्ट पारगमन

1. फेज लाइसोजेनी: फेज DNA बैक्टीरियल क्रोमोसोम में इंटीग्रेट हो जाता है
2. गलत एक्सिशन: फेज DNA के साथ आसपास के बैक्टीरियल जीन को एक्साइज़ करना
3. डिफेक्टिव फेज का बनना → बैक्टीरियल जीन ले जाता है
4. रिसीवर का इन्फेक्शन → रीकॉम्बिनेशन बैक्टीरियल जीन को इंटीग्रेट करता है

---

5. ट्रांसडक्शन की विशेषताएं

1. **फेज-मध्यस्थ** जीन स्थानांतरण
2. बैक्टीरिया के बीच **सीधे संपर्क की ज़रूरत नहीं होती**
3. DNA **समजातीय पुनर्संयोजन के माध्यम से एकीकृत हो सकता है**
4. **प्लास्मिड या क्रोमोसोमल DNA** ट्रांसफर कर सकते हैं
5. प्रकृति में **हॉरिजॉन्टल जीन ट्रांसफर** में योगदान देता है

---

6. शामिल एंजाइम और प्रोटीन

अवयव	समारोह
फेज कैप्सिड प्रोटीन	पैकेज डीएनए टुकड़े
इंटीग्रेज / रीकॉम्बिनेज	फेज DNA को होस्ट क्रोमोसोम में एकीकृत करता है
एक्सोन्यूक्लिऐसेस / डीएनएसेस	लाइटिक चक्र के दौरान बैक्टीरिया के DNA का टुकड़ा
होस्ट RecA	स्थानांतरित DNA के पुनर्संयोजन की मध्यस्थता करता है

---

7. ट्रांसडक्शन के अनुप्रयोग

A. आनुवंशिकी

- जीवाणु जीन का मानचित्रण
- **फेज-मीडिएटेड म्यूटेशन** के ज़रिए जीन फंक्शन की स्टडी करना

बी. जैव प्रौद्योगिकी

- **पुनःसंयोजक उपभेदों** का निर्माण
- जीन डिलीवरी के लिए फेज वेक्टर

सी. चिकित्सा

- ट्रांसड्यूसिंग फेज के ज़रिए **एंटीबायोटिक रेजिस्टेंस के फैलाव को** समझना
- **फेज थेरेपी** में संभावित उपयोग

---

8. फायदे

1. **सेल-टू-सेल संपर्क के बिना** जीन ट्रांसफर कर सकते हैं
2. बैक्टीरिया की आबादी में **लंबी दूरी** तक DNA ट्रांसफर कर सकते हैं
3. **जीन मैपिंग और फंक्शनल स्टडीज़** में उपयोगी

---

9. सीमाएं

1. केवल फेज के प्रति संवेदनशील बैक्टीरिया ही प्राप्तकर्ता हो सकते हैं
2. तक सीमित **जिसे फेज पैकेज कर सकता है**
3. स्पेशलाइज़्ड ट्रांसडक्शन सिर्फ़ **प्रोफ़ेज साइट के पास ही जीन ट्रांसफर कर सकता है**
4. सभी फेज सामान्यीकृत ट्रांसडक्शन में सक्षम नहीं होते हैं

जीन स्थानांतरण तकनीकें:

जीन स्थानांतरण तकनीकें

जीन ट्रांसफर का मतलब है **किसी पाने वाले सेल या जीव में बाहरी DNA डालने का प्रोसेस** , जिससे एक**स्टेबल जेनेटिक बदलाव होता है। यह मॉलिक्यूलर बायोलॉजी, बायोटेक्नोलॉजी और जेनेटिक इंजीनियरिंग** की नींव है । जीन ट्रांसफर **नेचुरल** (माइक्रोऑर्गेनिज्म में होता है) या **आर्टिफिशियल** (लैबोरेटरी में होता है) हो सकता है ।

---

1. प्राकृतिक जीन स्थानांतरण तकनीक

A. परिवर्तन

- **परिभाषा:** सक्षम सेल्स द्वारा पर्यावरण से **नग्न DNA** का अवशोषण ।
- **तंत्र:**
    1. DNA सेल सरफेस रिसेप्टर्स से जुड़ता है।
    2. सिंगल-स्ट्रैंडेड DNA साइटोप्लाज्म में प्रवेश करता है।
    3. **होमोलॉगस रीकॉम्बिनेशन** के ज़रिए जीनोम में इंटीग्रेट किया गया ।
- **उदाहरण:** *स्ट्रेप्टोकोकस न्यूमोनिया* , *बैसिलस सबटिलिस*
- **एप्लीकेशन:** शुरुआती जेनेटिक स्टडीज़, लैब्स में प्लास्मिड अपटेक।

B. संयुग्मन

- **परिभाषा: सेक्स पिली** के ज़रिए डोनर बैक्टीरिया से पाने वाले तक **DNA का डायरेक्ट ट्रांसफर** ।

- **प्रकार:**
    1. **F^+ से F^- संयुग्मन** → प्लास्मिड स्थानांतरण
    2. **Hfr संयुग्मन** → गुणसूत्र जीन स्थानांतरण
    3. **F' संयुग्मन** → प्लास्मिड + गुणसूत्र जीन स्थानांतरण
- **मैकेनिज्म:** पिलस फॉर्मेशन → DNA निक एट **ओरिट** → सिंगल-स्ट्रैंडेड DNA ट्रांसफर → कॉम्प्लिमेंट्री स्ट्रैंड सिंथेसिस।
- **एप्लीकेशन:** बैक्टीरियल क्रोमोसोम की मैपिंग, प्लास्मिड ट्रेट्स को फैलाना।

C. पारगमन

- **परिभाषा: बैक्टीरियोफेज** के माध्यम से बैक्टीरिया डीएनए का स्थानांतरण ।
- **प्रकार:**
    1. **जनरलाइज़्ड ट्रांसडक्शन** → लाइटिक साइकिल के दौरान ट्रांसफर हुए रैंडम बैक्टीरियल जीन
    2. **स्पेशलाइज्ड ट्रांसडक्शन** → लाइसोजेनिक साइकिल के दौरान प्रोफेज एक्सिशन साइट के पास ट्रांसफर हुए खास जीन
- **एप्लीकेशन:** जीन मैपिंग, हॉरिजॉन्टल जीन ट्रांसफर स्टडीज़, फेज थेरेपी रिसर्च।

---

2. आर्टिफिशियल जीन ट्रांसफर तकनीक

आर्टिफिशियल जीन ट्रांसफर का इस्तेमाल **मॉलिक्यूलर बायोलॉजी और बायोटेक्नोलॉजी में बड़े पैमाने पर किया जाता है** ताकि टारगेट सेल्स में **ज़रूरी जीन डाले जा सकें।**

A. प्रोकैरियोट्स (बैक्टीरिया) में जीन स्थानांतरण

1. रासायनिक परिवर्तन

- **$CaCl_2$** से उपचारित कोशिकाएं → झिल्ली पारगम्य हो जाती हैं
- हीट-शॉक से DNA में प्रवेश संभव होता है
- **ई. कोलाई में प्लास्मिड अपटेक** के लिए इस्तेमाल किया जाता है

2. इलेक्ट्रोपोरेशन

- **छोटे इलेक्ट्रिक पल्स** बैक्टीरियल मेम्ब्रेन में कुछ समय के लिए छेद बनाते हैं

- **प्लास्मिड और लीनियर DNA** के लिए बहुत असरदार

3. प्रोटोप्लास्ट संलयन

- सेल वॉल्स का हटना → जेनेटिक मटीरियल को मिलाने के लिए मेम्ब्रेन का जुड़ना
- स्ट्रेन सुधार के लिए **बैसिलस, स्ट्रेप्टोमाइसेस** में इस्तेमाल किया जाता है

B. यूकेरियोट्स (जानवरों और पौधों) में जीन ट्रांसफर

1. भौतिक विधियाँ

- **माइक्रोइंजेक्शन:** DNA को सीधे न्यूक्लियस में इंजेक्ट किया जाता है (ट्रांसजेनिक जानवरों के लिए प्रोन्यूक्लियर इंजेक्शन)
- **जीन गन / बायोलिस्टिक्स:** DNA-कोटेड गोल्ड/टंगस्टन पार्टिकल्स को पौधों की कोशिकाओं में डाला गया

2. रासायनिक विधियाँ

- **लिपोसोम-मीडिएटेड ट्रांसफर:** लिपोसोम में एनकैप्सुलेटेड DNA → सेल मेम्ब्रेन के साथ फ्यूज हो जाता है
- **कैल्शियम फॉस्फेट प्रेसिपिटेशन:** DNA प्रेसिपिटेटेड → सेल्स द्वारा लिया गया

3. वायरल वेक्टर-मध्यस्थ स्थानांतरण

- **रेट्रोवायरस, एडेनोवायरस, AAV** का इस्तेमाल मैमल सेल्स में जीन पहुंचाने के लिए किया जाता है
- **जीन थेरेपी और रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन एक्सप्रेशन** का आधार

C. रिकॉम्बिनेज-मध्यस्थ जीन स्थानांतरण

- **साइट-स्पेसिफिक रीकॉम्बिनेशन सिस्टम** (Cre-Lox, Flp-FRT) का इस्तेमाल जीन को **सटीक रूप से डालने या हटाने के लिए किया जाता है।**
- **कंडीशनल नॉकआउट या ट्रांसजेनिक चूहों** में आम

---

3. जीन एकीकरण का तंत्र

होस्ट सेल में DNA के प्रवेश के बाद, यह निम्न में से कोई भी हो सकता है:

1. **एपीसोमल (प्लास्मिड) बने रहें** → स्वतंत्र रूप से प्रतिकृति बनाएं
2. **होस्ट जीनोम में इंटीग्रेट करें** :
    - **समजातीय पुनर्संयोजन** → अनुक्रम समानता की आवश्यकता है
    - **नॉन-होमोलॉगस एंड जॉइनिंग (NHEJ)** → यूकेरियोट्स में गलती की संभावना
    - **साइट-स्पेसिफिक रीकॉम्बिनेशन** → सटीक इंटीग्रेशन

शामिल एंजाइम:

- **DNA लाइगेस:** DNA टुकड़ों को जोड़ते हैं
- **रिकॉम्बिनेज / इंटीग्रेज:** साइट-स्पेसिफिक इंटीग्रेशन को कैटलाइज़ करते हैं
- **DNA पॉलीमरेज़:** कॉम्प्लिमेंट्री स्ट्रैंड्स को सिंथेसाइज़ करते हैं

---

4. जीन ट्रांसफर तकनीकों के अनुप्रयोग

A. आणविक जीवविज्ञान

- जीन की क्लोनिंग और प्रवर्धन
- कार्यात्मक जीनोमिक्स (नॉकआउट, ओवरएक्सप्रेशन)
- रिपोर्टर जीन परख

बी. जैव प्रौद्योगिकी

- रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन प्रोडक्शन (इंसुलिन, ग्रोथ हार्मोन, एंजाइम)
- औद्योगिक माइक्रोबियल स्ट्रेन सुधार

सी. चिकित्सा

- वंशानुगत बीमारियों के लिए **जीन थेरेपी**
- **वायरल वेक्टर-आधारित टीकों** का विकास
- सीएआर-टी कोशिका चिकित्सा

D. कृषि

- ट्रांसजेनिक फसलें (बीटी कॉटन, गोल्डन राइस, हर्बिसाइड-रेसिस्टेंट पौधे)
- बेहतर गुणों के लिए ट्रांसजेनिक पशुधन

---

5. फायदे

1. **नए गुणों को कुशलता से** पेश करता है
2. **जीन फ़ंक्शन का अध्ययन करने** में सक्षम बनाता है
3. **रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन और GMOs** के प्रोडक्शन को सपोर्ट करता है
4. साइट-स्पेसिफिक तरीकों से **सटीक** हो सकता है

---

6. सीमाएं

1. एफिशिएंसी **होस्ट और मेथड पर निर्भर करती है**
2. DNA **इंटीग्रेट नहीं हो सकता** या खराब हो सकता है
3. जीनोम एडिटिंग में संभावित **ऑफ-टारगेट प्रभाव**
4. **मानव और जर्मलाइन संशोधन** में नैतिक चिंताएँ

जीन स्थानांतरण दृष्टिकोण

जीन ट्रांसफर के तरीके वे तरीके हैं जिनका इस्तेमाल **रिसर्च, इलाज या बायोटेक्नोलॉजिकल मकसद**के लिए **, पाने वाले सेल्स या जीवों में बाहरी DNA डालने के लिए किया जाता है। इन तरीकों को मोटे तौर पर नेचुरल, फिजिकल, केमिकल, बायोलॉजिकल और मॉलिक्यूलर तरीकों** में बांटा जा सकता है।

---

1. प्राकृतिक जीन स्थानांतरण दृष्टिकोण

ये प्रकृति में होते हैं और इनमें माइक्रोऑर्गेनिज्म के बीच **हॉरिजॉन्टल जीन ट्रांसफर शामिल होता है।**

A. परिवर्तन

- **परिभाषा:** सक्षम सेल्स द्वारा नग्न DNA का अवशोषण।
- **मैकेनिज्म:** DNA सेल की सतह से जुड़ता है → सिंगल-स्ट्रैंड DNA अंदर जाता है → होमोलॉगस रीकॉम्बिनेशन इसे इंटीग्रेट करता है।
- **एप्लीकेशन:** लैबोरेटरी क्लोनिंग, रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन एक्सप्रेशन।
- **उदाहरण:** *स्ट्रेप्टोकोकस न्यूमोनिया* , *बैसिलस सबटिलिस*।

B. संयुग्मन

- **परिभाषा: सेक्स पिल**ी के माध्यम से दाता से प्राप्तकर्ता तक सीधा डीएनए स्थानांतरण ।

- **मैकेनिज्म: प्लास्मिड को** oriT पर पकड़ा गया → सिंगल-स्ट्रैंड DNA ट्रांसफर हुआ → दोनों सेल्स में कॉम्प्लिमेंट्री स्ट्रैंड सिंथेसाइज़ हुआ।
- **एप्लीकेशन:** जीन मैपिंग, एंटीबायोटिक रेजिस्टेंस का फैलाव।
- **उदाहरण:** *E. कोली* में $F^+ \rightarrow F^-$ स्थानांतरण ।

C. पारगमन

- **परिभाषा:** फेज-मीडिएटेड DNA ट्रांसफर।
- **प्रकार:** जनरलाइज्ड (रैंडम जीन) और स्पेशलाइज्ड (प्रोफेज के पास स्पेसिफिक जीन)।
- **अनुप्रयोग:** जीन मैपिंग, क्षैतिज जीन स्थानांतरण अध्ययन।
- **उदाहरण:** *साल्मोनेला* में फेज P22 , *E. कोली* में λ फेज ।

---

2. आर्टिफिशियल / लैबोरेटरी तरीके

आर्टिफिशियल तरीकों को कंट्रोल्ड कंडीशन में **सेल्स में DNA डालने के लिए बनाया गया है।**

A. भौतिक दृष्टिकोण

1. **microinjection**
    - **जानवरों की कोशिकाओं के न्यूक्लियस** में DNA का सीधा इंजेक्शन ।
    - **ट्रांसजेनिक जानवर** बनाने के लिए इस्तेमाल किया जाता है ।
2. **इलेक्ट्रोपोरेशन**
    - **हाई-वोल्टेज पल्स** मेम्ब्रेन में कुछ समय के लिए छेद बनाता है।
    - DNA अच्छे से साइटोप्लाज्म में प्रवेश करता है।
3. **जीन गन / बायोलिस्टिक्स**
    - DNA-कोटेड माइक्रोप्रोजेक्टाइल को पौधों की कोशिकाओं में डाला गया।
    - **ट्रांसजेनिक पौधे** पैदा करता है ।

बी. रासायनिक दृष्टिकोण

1. **कैल्शियम फॉस्फेट विधि**
    - $CaPO_4$ के साथ जमा हुआ DNA → कल्चर्ड यूकेरियोटिक सेल्स द्वारा लिया गया।
2. **लिपोसोम-मध्यस्थ स्थानांतरण**
    - लिपिड वेसिकल्स में बंद DNA → प्लाज़्मा मेम्ब्रेन के साथ जुड़ जाता है।

3. **पीईजी-मध्यस्थ संलयन**
    - पॉलीइथिलीन ग्लाइकॉल DNA वाले प्रोटोप्लास्ट के फ्यूज़न को बढ़ावा देता है।

C. जैविक / वेक्टर-मध्यस्थ दृष्टिकोण

1. **वायरल वेक्टर**
    - **रेट्रोवायरस, एडेनोवायरस, AAV** का इस्तेमाल मैमल सेल्स में जीन पहुंचाने के लिए किया जाता है।
    - **जीन थेरेपी** और वायरल वैक्सीन डेवलपमेंट का आधार ।
2. **प्लास्मिड वैक्टर**
    - गोल DNA जिसमें ज़रूरी जीन है → ट्रांसफॉर्मेशन या इलेक्ट्रोपोरेशन के ज़रिए लाया गया।
3. **बैक्टीरियोफेज वेक्टर**
    - फेज जीनोम को बैक्टीरियल ट्रांसफॉर्मेशन के लिए जीन ले जाने के लिए मॉडिफाई किया गया।

डी. रिकॉम्बिनेज / साइट-स्पेसिफिक अप्रोच

1. **क्रे-लॉक्स सिस्टम**
    - Cre recombinase LoxP साइट्स को पहचानता है → DNA का एक्सिशन या इंटीग्रेशन।
2. **एफएलपी-एफआरटी प्रणाली**
    - Flp रीकॉम्बिनेज, FRT साइट्स पर साइट-स्पेसिफिक रीकॉम्बिनेशन में मदद करता है।
3. **अनुप्रयोग**
    - चूहों में सशर्त जीन नॉकआउट
    - सटीक जीनोम इंजीनियरिंग

---

3. होस्ट टाइप के आधार पर तरीके

होस्ट प्रकार	सामान्य दृष्टिकोण	उदाहरण
जीवाणु	रूपांतरण, संयुग्मन, पारगमन, विद्युत-विस्थापन, प्रोटोप्लास्ट संलयन	*ई. कोलाई*, *बैसिलस सबटिलिस*
पौधे	एग्रोबैक्टीरियम-मध्यस्थ, बायोलिस्टिक्स, प्रोटोप्लास्ट संलयन	बीटी कपास, गोल्डन राइस
पशु / स्तनधारी	माइक्रोइंजेक्शन, वायरल वेक्टर, इलेक्ट्रोपोरेशन, लिपोसोम-मीडिएटेड	ट्रांसजेनिक चूहे, जीन थेरेपी

---

4. एकीकरण के तंत्र

- **एपिसोमल मेंटेनेंस** : DNA प्लास्मिड के रूप में रहता है और स्वतंत्र रूप से रेप्लिकेट करता है।
- **होमोलॉगस रीकॉम्बिनेशन** : सीक्वेंस सिमिलैरिटी की ज़रूरत होती है → DNA को जीनोम में इंटीग्रेट करता है
- **नॉन-होमोलॉगस एंड जॉइनिंग (NHEJ)** : यूकेरियोट्स में DNA फ्रैगमेंट का डायरेक्ट लिगेशन
- **साइट-स्पेसिफिक रीकॉम्बिनेशन** : रीकॉम्बिनेस का इस्तेमाल करके सटीक इंटीग्रेशन

---

5. जीन ट्रांसफर तरीकों के इस्तेमाल

1. **मॉलिक्यूलर बायोलॉजी:** क्लोनिंग, जीन एक्सप्रेशन स्टडीज़, रिपोर्टर एसेज़
2. **दवा:** जीन थेरेपी, CAR-T सेल थेरेपी, वैक्सीन
3. **बायोटेक्नोलॉजी:** रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन, इंडस्ट्रियल एंजाइम, GMOs
4. **कृषि:** ट्रांसजेनिक फसलें और पशुधन

---

6. फायदे

- **सटीक जेनेटिक मैनिपुलेशन की** अनुमति देता है
- **कार्यात्मक जीनोमिक्स अध्ययनों को** सुगम बनाता है
- **थेराप्यूटिक्स और GMOs के प्रोडक्शन को** सक्षम बनाता है
- **प्रोकैरियोटिक और यूकेरियोटिक सिस्टम** में लागू

---

7. सीमाएं

- दक्षता होस्ट और विधि के साथ भिन्न होती है
- DNA इंटीग्रेट नहीं हो सकता या खराब हो सकता है
- जीनोम एडिटिंग में संभावित ऑफ-टारगेट प्रभाव
- मानव जर्मलाइन संशोधन के साथ नैतिक चिंताएँ

जीन साइलेंसिंग

जीन साइलेंसिंग का मतलब **जीन एक्सप्रेशन का रेगुलेशन है जिसमें किसी खास जीन को अपना RNA या प्रोटीन प्रोडक्ट बनाने से रोका जाता है**। DNA सीक्वेंस को बदलने वाले म्यूटेशन के उलट, जीन साइलेंसिंग **जेनेटिक कोड को बदले बिना जीन एक्सप्रेशन को दबा देता है , और इसका इस्तेमाल फंक्शनल जीनोमिक्स, बायोटेक्नोलॉजी और थेराप्यूटिक्स** में बड़े पैमाने पर किया जाता है।

---

1 परिचय

- जीन साइलेंसिंग सेल्स में एक **नेचुरल रेगुलेटरी मैकेनिज्म है** और इसे लैब में **आर्टिफिशियली भी इंड्यूस किया जा सकता है।**
- यह इनके लिए ज़रूरी है:
    1. **जीन अभिव्यक्ति को** नियंत्रित करना
    2. **वायरल संक्रमण** से कोशिकाओं की रक्षा करना
    3. **जीनोम स्थिरता** बनाए रखना
    4. नॉकडाउन तकनीकों का उपयोग करके **जीन फ़ंक्शन** का अध्ययन

---

2. जीन साइलेंसिंग के प्रकार

जीन साइलेंसिंग **दो मुख्य लेवल पर होती है** :

ए. ट्रांसक्रिप्शनल जीन साइलेंसिंग (टीजीएस)

- **परिभाषा:** साइलेंसिंग **ट्रांसक्रिप्शन से पहले होती है** , जो mRNA सिंथेसिस को रोकती है।
- **तंत्र:**
    1. **डीएनए मिथाइलेशन:**
        - प्रमोटर क्षेत्रों में **साइटोसिन अवशेषों** में मिथाइल समूहों ($–CH_3$) का योग
        - **क्रोमेटिन कंडेंसेशन** और **ट्रांसक्रिप्शन के रिप्रेशन** की ओर ले जाता है
        - **एपिजेनेटिक विनियमन** में सामान्य
    2. **हिस्टोन संशोधन:**
        - हिस्टोन डीएसिटिलेशन या मिथाइलेशन → हेटरोक्रोमैटिन निर्माण
        - RNA पॉलीमरेज़ को DNA तक पहुँचने से रोकता है
- **उदाहरण:** महिलाओं में X-क्रोमोसोम इनएक्टिवेशन, जीन इम्प्रिंटिंग

नतीजा: जीन ट्रांसक्रिप्शनली इनएक्टिव है; कोई mRNA या प्रोटीन नहीं बनता है।

बी. पोस्ट-ट्रांसक्रिप्शनल जीन साइलेंसिंग (पीटीजीएस)

- **परिभाषा:** साइलेंसिंग **ट्रांसक्रिप्शन के बाद होती है** , जो mRNA को प्रोटीन में ट्रांसलेट होने से रोकती है।
- **तंत्र:**
    1. **आरएनए हस्तक्षेप (आरएनएआई**
        - छोटे RNA टारगेट mRNA को खराब करते हैं या ट्रांसलेशन को रोकते हैं

- मुख्य अणु:
  - **siRNA (स्मॉल इंटरफेरिंग RNA)** → टारगेट mRNA के लिए पूरी तरह से कॉम्प्लिमेंट्री → क्लीवेज
  - **miRNA (माइक्रोRNA)** → आंशिक रूप से पूरक → अनुवाद को रोकता है
- प्रक्रिया:

1. **डाइसर एंजाइम** द्वारा प्रोसेस किया गया dsRNA → siRNA या miRNA
2. **RISC कॉम्प्लेक्स (RNA-इंड्यूस्ड साइलेंसिंग कॉम्प्लेक्स)** में शामिल
3. टारगेट mRNA को तोड़ दिया जाता है या ट्रांसलेशनली दबा दिया जाता है

एंटीसेंस आरएनए :
लक्ष्य mRNA के पूरक सिंथेटिक RNA
डबल-स्ट्रैंडेड RNA बनाता है → ट्रांसलेशन को रोकता है

राइबोजाइम-मध्यस्थता मौन :
कैटेलिटिक एक्टिविटी वाले RNA मॉलिक्यूल टारगेट mRNA को चीर देते हैं

नतीजा: mRNA खराब हो गया या ट्रांसलेशन ब्लॉक हो गया; प्रोटीन सिंथेसाइज़ नहीं हुआ

---

3. जीन साइलेंसिंग के मैकेनिज्म

स्तर	तंत्र	प्रमुख अणु / एंजाइम	प्रभाव
ट्रांसक्रिप्शनल (टीजीएस)	डीएनए मिथाइलेशन, हिस्टोन संशोधन	डीएनए मेथिलट्रांसफेरेज़, हिस्टोन डीएसिटाइलेज़	क्रोमेटिन कंडेंसेशन → ट्रांसक्रिप्शन ब्लॉक हो गया
पोस्ट-ट्रांसक्रिप्शनल (पीटीजीएस)	आरएनएआई, एंटीसेंस आरएनए, राइबोजाइम	डाइसर, RISC, siRNA, miRNA	mRNA क्षरण या अनुवाद अवरोध

---

4. आर्टिफिशियल जीन साइलेंसिंग के लिए इस्तेमाल किए जाने वाले तरीके

A. आरएनए हस्तक्षेप (आरएनएआई

- सिंथेटिक **siRNA** डालना → जीन नॉकडाउन
- **फंक्शनल जीनोमिक्स और टारगेट वैलिडेशन** के लिए बड़े पैमाने पर इस्तेमाल किया जाता है

बी. एंटीसेंस ओलिगोन्यूक्लियोटाइड्स

- mRNA के पूरक एकल-रज्जुक DNA/RNA
- ट्रांसलेशन को ब्लॉक करता है या mRNA डिग्रेडेशन के लिए RNase H को रिक्रूट करता है

C. CRISPR इंटरफेरेंस (CRISPRi)

- **कैटेलिटिकली डेड Cas9 (dCas9)** रिप्रेसर डोमेन के साथ फ्यूज हो गया
- sgRNA द्वारा प्रमोटर तक गाइडेड → **ट्रांसक्रिप्शन को ब्लॉक करता है**
- प्रतिवर्ती जीन साइलेंसिंग की अनुमति देता है

D. राइबोजाइम

- उत्प्रेरक आरएनए विशिष्ट mRNA अनुक्रमों को विभाजित करते हैं
- **लक्षित mRNA निष्क्रियता** के लिए प्रयोगात्मक रूप से उपयोग किया गया

---

5. जीन साइलेंसिंग के अनुप्रयोग

ए. अनुसंधान

- **नॉकडाउन एक्सपेरिमेंट** के ज़रिए जीन फ़ंक्शन का अध्ययन करें
- दवा विकास के लिए जीन लक्ष्यों को मान्य करें

बी. चिकित्सा

- थेराप्यूटिक जीन साइलेंसिंग:
    - **वायरल इन्फेक्शन का** इलाज करें (जैसे, HIV के खिलाफ siRNA)
    - कैंसर थेरेपी में **ऑन्कोजीन को** शांत करना
    - ओवरएक्सप्रेशन डिसऑर्डर को ठीक करें

C. कृषि

- **रोग-प्रतिरोधी पौधे** विकसित करें
- एलर्जी या अनचाहे लक्षणों का दिखना कम करें
- उदाहरण: पपीते में RNAi-बेस्ड वायरस रेजिस्टेंस

D. जैव प्रौद्योगिकी

- इंडस्ट्रियल माइक्रोब्स में **अनचाहे प्रोटीन प्रोडक्शन को** कम करें
- **बेहतर प्रोडक्ट यील्ड** के लिए मेटाबोलिक पाथवे को कंट्रोल करें

---

6. जीन साइलेंसिंग के फ़ायदे

1. जीन का विशिष्ट और लक्षित डाउनरेगुलेशन
2. रिवर्सिबल (कुछ तरीकों में, जैसे, CRISPRi)
3. DNA को हमेशा के लिए नहीं बदलता (नॉकआउट से ज़्यादा सुरक्षित)
4. एक साथ कई जीन को शांत कर सकता है

---

7. सीमाएं / चुनौतियां

1. ऑफ-टारगेट प्रभाव → अनपेक्षित जीन साइलेंसिंग
2. सेल्स में साइलेंसिंग मॉलिक्यूल्स (siRNA, एंटीसेंस) की डिलीवरी
3. पार्शियल साइलेंसिंग जीन फंक्शन को पूरी तरह ब्लॉक नहीं कर सकती है
4. PTGS में शॉर्ट-टर्म असर हमेशा परमानेंट नहीं

म्युटाजेनेसिस

म्यूटेजेनेसिस वह **प्रोसेस है जिससे किसी जीव के जेनेटिक मटीरियल में बदलाव होता है, जिससे DNA सीक्वेंस में बदलाव होता है**। ये बदलाव, जिन्हें **म्यूटेशन कहते हैं, जीन** , प्रोटीन और कभी-कभी जीव के फीनोटाइप **के स्ट्रक्चर और काम** पर असर डाल सकते हैं। म्यूटेजेनेसिस **नेचुरली हो सकता है** या रिसर्च, मेडिसिन और बायोटेक्नोलॉजी के लिए **आर्टिफिशियली शुरू किया जा सकता है।**

---

1. परिभाषा

म्यूटेजेनेसिस **DNA के न्यूक्लियोटाइड सीक्वेंस में परमानेंट बदलाव लाने का प्रोसेस है** , जिससे जीन एक्सप्रेशन या प्रोटीन फंक्शन में बदलाव हो सकता है।

---

2. म्यूटेशन के प्रकार

ओरिजिन, मैकेनिज्म या मकसदके आधार पर बांटा जा सकता है :

A. प्राकृतिक उत्परिवर्तन

- **DNA रेप्लिकेशन, रिपेयर या रीकॉम्बिनेशन** में गलतियों के कारण अपने आप होता है।
- **स्पॉन्टेनियस म्यूटेशन के कारण** :
    1. **रेप्लिकेशन एरर:** DNA पॉलीमरेज़ का गलत इस्तेमाल
    2. **टॉटोमेरिक शिफ्ट:** बेस-पेयर मिसमैच
    3. **डिप्यूरिनेशन / डीएमिनेशन:** बेस का नुकसान या केमिकल मॉडिफिकेशन
    4. **ट्रांसपोज़ेबल एलिमेंट्स:** जीन में डाले जाने वाले मोबाइल DNA सीक्वेंस

फ़्रीक्वेंसी: कम (हर पीढ़ी में हर जीन के लिए 10^{-6} से 10^{-9})

बी. प्रेरित उत्परिवर्तन

- **फिजिकल, केमिकल या बायोलॉजिकल एजेंट्स का** इस्तेमाल करके जान-बूझकर म्यूटेशन करना।

1. भौतिक उत्परिवर्तजन

- **रेडिएशन** जो DNA को नुकसान पहुंचाता है:
    - **UV लाइट:** पाइरीमिडीन डाइमर्स → रेप्लिकेशन एरर का कारण बनती है
    - **एक्स-रे / γ-रे:** DNA स्ट्रैंड टूटने का कारण
    - **आयनाइज़िंग रेडिएशन:** क्रोमोसोमल रीअरेंजमेंट की ओर ले जाता है

2. रासायनिक उत्परिवर्तजन

- DNA बेस या स्ट्रक्चर को बदलने वाले केमिकल:
    - **बेस एनालॉग्स:** जैसे, 5-ब्रोमोरासिल → थाइमिन के सब्स्टीट्यूट → मिसपेयरिंग
    - **एल्काइलेटिंग एजेंट:** जैसे, EMS, MNNG → एल्काइल ग्रुप जोड़ें → बेस मिसपेयरिंग
    - **डिएमिनेटिंग एजेंट:** जैसे, नाइट्रस एसिड → साइटोसिन को यूरेसिल में बदलता है
    - **इंटरकैलेटिंग एजेंट:** जैसे, एथिडियम ब्रोमाइड → बेस के बीच इंसर्ट → फ्रेमशिफ्ट म्यूटेशन

3. जैविक उत्परिवर्तजन

- वायरस, ट्रांसपोसोन, या **रीकॉम्बिनेस** जो DNA को एकीकृत या संशोधित करते हैं
- उदाहरण: **बैक्टीरिया में इंसर्शन सीक्वेंस**

---

3. म्यूटेशन के प्रकार

प्रकार	विवरण	प्रभाव
प्वाइंट म्यूटेशन	एकल न्यूक्लियोटाइड परिवर्तन (प्रतिस्थापन)	मौन, गलत अर्थ, या बकवास
फ्रेम शिफ्ट मुतसिओन	3 के गुणज में न होने वाले क्षारों का योग/विलोपन	रीडिंग फ्रेम बदलता है → नॉनफंक्शनल प्रोटीन
विलोपन	डीएनए खंड का नुकसान	कार्यात्मक जीन को हटा सकता है
सम्मिलन / दोहराव	अतिरिक्त डीएनए खंड	जीन के कार्य में परिवर्तन हो सकता है
उलटा / स्थानांतरण	गुणसूत्र का पुनर्व्यवस्थापन	जीन क्रम, अभिव्यक्ति को बाधित करता है
सशर्त उत्परिवर्तन	अभिव्यक्ति पर्यावरण पर निर्भर करती है	तापमान-संवेदनशील, रसायन-संवेदनशील

---

4. उत्परिवर्तन के तंत्र

A. DNA प्रतिकृति त्रुटियाँ

- DNA पॉलीमरेज़ गलत न्यूक्लियोटाइड डालता है
- प्रूफ़रीडिंग में विफलता → स्थायी म्यूटेशन

B. DNA क्षति और मरम्मत में विफलता

- UV या केमिकल से डैमेज हुआ DNA
- **रिपेयर मैकेनिज्म** (NER, BER, मिसमैच रिपेयर) फेल हो सकते हैं → म्यूटेशन

C. पुनर्संयोजन त्रुटियाँ

- असमान क्रॉसिंग ओवर या ट्रांसपोसोन इंसर्शन → जीन डिसरप्शन

---

5. एक्सपेरिमेंटल / साइट-डायरेक्टेड म्यूटेजेनेसिस के तरीके

जीन फंक्शन, प्रोटीन स्ट्रक्चर और बायोटेक्नोलॉजी की स्टडी के लिए किया जाता है।

A. यादृच्छिक उत्परिवर्तन

- जीनोम में म्यूटेशन **रैंडम तरीके से होते हैं**
- **तरीके:**
    - पराबैंगनी विकिरण
    - रासायनिक उत्परिवर्तजन (EMS, नाइट्रोसामाइन)
- **एप्लीकेशन:** नए ट्रेट्स या एंजाइम वेरिएंट्स की स्क्रीनिंग

बी. साइट-निर्देशित उत्परिवर्तन

- **पहले से तय जगह पर** एक खास न्यूक्लियोटाइड बदलाव लाता है
- **तकनीकें:**
    1. **ओलिगोन्यूक्लियोटाइड-डायरेक्टेड म्यूटेजेनेसिस:** ज़रूरी म्यूटेशन वाले सिंथेटिक प्राइमर → PCR एम्प्लीफिकेशन → प्लास्मिड में शामिल करना
    2. **CRISPR-Cas9 आधारित म्यूटेशन:** टारगेटेड DNA क्लीवेज → रिपेयर से म्यूटेशन होता है
- **एप्लीकेशन:** जीन/प्रोटीन का फंक्शनल एनालिसिस, एंजाइम एक्टिविटी में बदलाव, बीमारी के मॉडल बनाना

---

6. म्यूटेशन मे ं शामिल एंजाइम

एनजाइम	समारोह
डीएनए पोलीमरेज़	एरर-प्रोन रेप्लिकेशन म्यूटेशन को प्रेरित कर सकता है
एपी एंडोन्यूक्लिऐस	खराब प्यूरिनेटेड जगहों को रिपेयर करता है; गलत रिपेयर से म्यूटेशन हो सकता है
डीएनए लाइगेज	DNA के टुकड़ों को जोड़ता है; गलत जुड़ाव से सीक्वेंस बदल सकता है
ट्रांसपोज़ेज़	ट्रांसपोसोन के इंसर्शन में मदद करता है → इंसर्शन म्यूटेशन
CRISPR-Cas9	साइट-डायरेक्टेड म्यूटेशन के लिए टारगेटेड डबल-स्ट्रैंड ब्रेक बनाता है

---

7. म्यूटेशन के अनुप्रयोग

A. कार्यात्मक जीनोमिक्स

- जीन के काम का अध्ययन करने के लिए उन्हें हटा दें या उनमें बदलाव करें

- **हानि-कार्य या लाभ-कार्य उत्परिवर्ती** बनाएँ

बी. प्रोटीन इंजीनियरिंग

- **स्टेबिलिटी, स्पेसिफिसिटी या एक्टिविटी को** बेहतर बनाने के लिए एंजाइम एक्टिव साइट्स को बदलें
- उदाहरण: बदले हुए इंडस्ट्रियल एंजाइम या थेराप्यूटिक प्रोटीन

सी. चिकित्सा

- रोग पैदा करने वाले उत्परिवर्तनों का अध्ययन
- **कैंसर, मेटाबोलिक डिसऑर्डर या जेनेटिक बीमारियों** के लिए मॉडल बनाएं

D. कृषि

- ऐसी फसल की किस्में उगाएं जो **कीड़ों, हर्बिसाइड्स या पर्यावरण के तनाव से सुरक्षित हों**

ई. जैव प्रौद्योगिकी

- बेहतर मेटाबोलाइट प्रोडक्शन के लिए **माइक्रोबियल स्ट्रेन** डेवलप करें

---

8. फायदे

1. **जीन और प्रोटीन फ़ंक्शन का कंट्रोल्ड स्टडी** संभव बनाता है
2. **नए गुण या एंजाइम** बना सकते हैं
3. **जेनेटिक मैपिंग, दवा की खोज और सिंथेटिक बायोलॉजी** के लिए ज़रूरी

---

9. सीमाएं / चुनौतियां

1. रैंडम म्यूटेशन से **अनचाहे ऑफ-टारगेट म्यूटेशन हो सकते हैं**
2. साइट-डायरेक्टेड म्यूटेशन के लिए **सटीक टूल्स और डिज़ाइन की ज़रूरत होती है**
3. कुछ म्यूटेशन **जानलेवा या नुकसानदायक हो सकते हैं**
4. **मानव और जर्मलाइन म्यूटेशन** में नैतिक विचार

यादृच्छिक और साइट-निर्देशित उत्परिवर्तन

रैंडम म्यूटेजेनेसिस और **साइट-डायरेक्टेड म्यूटेजेनेसिस** में बांटा जा सकता है , यह इस बात पर निर्भर करता है कि म्यूटेशन **जीनोम में रैंडम तरीके से होता है** या **जीन में किसी खास साइट पर टारगेट किया जाता है। दोनों फंक्शनल जीनोमिक्स, प्रोटीन इंजीनियरिंग और बायोटेक्नोलॉजी** में ज़रूरी हैं।

---

1. यादृच्छिक उत्परिवर्तन

परिभाषा

टारगेट साइट की पहले से जानकारी के बिना, **जीनोम या जीन में अनप्रिडिक्टेबल जगहों पर म्यूटेशन लाने** का प्रोसेस है।

तंत्र / विधियाँ

1. **भौतिक उत्परिवर्तजन**
    - **UV रेडिएशन:** थाइमिन डाइमर्स → मिसपेयरिंग → रैंडम पॉइंट म्यूटेशन का कारण बनता है
    - **एक्स-रे / γ-रे:** सिंगल या डबल-स्ट्रैंड ब्रेक → डिलीशन, इंसर्शन, या रीअरेंजमेंट को इंड्यूस करें
2. **रासायनिक उत्परिवर्तजन**
    - **एल्काइलेटिंग एजेंट** (EMS, MNNG): एल्काइल ग्रुप जोड़ें → रेप्लिकेशन के दौरान मिसपेयरिंग
    - **बेस एनालॉग्स** (5-ब्रोमोरासिल): DNA में शामिल → मिसपेयरिंग का कारण बनता है
    - **इंटरकैलेटिंग एजेंट** (एथिडियम ब्रोमाइड, एक्रिडीन ऑरेंज): बेस के बीच डालें → फ्रेमशिफ्ट म्यूटेशन
3. **जैविक एजेंट**
    - ट्रांसपोज़ेबल एलिमेंट रैंडमली इंसर्ट होते हैं → जीन फंक्शन को डिस्टर्ब करते हैं

विशेषताएँ

- म्यूटेशन की जगह का **अंदाज़ा नहीं लगाया जा सकता**
- **म्यूटेंट्स की** एक लाइब्रेरी बनाता है
- ज़रूरी म्यूटेंट की पहचान के लिए हाई-थ्रूपुट स्क्रीनिंग की ज़रूरत है
- **प्राकृतिक विकास** की नकल करता है

अनुप्रयोग

1. **प्रोटीन इंजीनियरिंग:** बेहतर एक्टिविटी या स्टेबिलिटी वाले एंजाइम वेरिएंट बनाएं
2. **फंक्शनल जीनोमिक्स:** फीनोटाइपिक बदलावों को देखकर जीन फंक्शन की पहचान करें

3. **माइक्रोबियल स्ट्रेन में सुधार:** ज़्यादा यील्ड या रेजिस्टेंस वाले इंडस्ट्रियल माइक्रोब्स
4. **दवा की खोज:** टारगेट और रेजिस्टेंस मैकेनिज्म की पहचान करें

लाभ

- सरल और तेज़
- म्यूटेशन की **बड़ी विविधता** उत्पन्न कर सकता है
- **विकासवादी अध्ययनों** के लिए उपयोगी

सीमाएँ

- **व्यापक स्क्रीनिंग की** आवश्यकता है
- म्यूटेशन **नुकसानदायक या जानलेवा हो सकते हैं**
- विशिष्ट जीन को लक्षित नहीं किया जा सकता

---

2. साइट-डायरेक्टेड म्यूटेजेनेसिस (SDM)

परिभाषा

साइट-डायरेक्टेड म्यूटेजेनेसिस एक जीन में **पहले से तय न्यूक्लियोटाइड या अमीनो एसिड की जगह पर जानबूझकर एक खास म्यूटेशन लाना है।**

तंत्र / विधियाँ

1. **ओलिगोन्यूक्लियोटाइड-निर्देशित उत्परिवर्तन**
    - ज़रूरी न्यूक्लियोटाइड बदलाव वाले सिंथेटिक **म्यूटाजेनिक प्राइमर को टेम्पलेट DNA में एनील किया जाता है।**
    - पीसीआर उत्परिवर्तित डीएनए को बढ़ाता है
    - इसके नतीजे में DNA को प्लास्मिड में क्लोन किया जाता है और होस्ट सेल्स में एक्सप्रेस किया जाता है।
    - आमतौर पर **पॉइंट म्यूटेशन, इंसर्शन या डिलीशन के लिए इस्तेमाल किया जाता है**
2. **CRISPR-Cas9 मध्यस्थ उत्परिवर्तन**
    - **sgRNA** Cas9 को एक खास जीनोमिक लोकस तक ले जाता है
    - Cas9 ने डबलस्ट्रैंड ब्रेक पेश किया
    - रिपेयर के ज़रिए:
        - **नॉन-होमोलॉगस एंड जॉइनिंग (NHEJ):** छोटे इंसर्शन/डिलीशन

        - **होमोलॉजी-डायरेक्टेड रिपेयर (HDR):** डोनर टेम्पलेट का इस्तेमाल करके सटीक न्यूक्लियोटाइड सब्स्टिट्यूशन
3. **पीसीआर-आधारित उत्परिवर्तन**
    - PCR प्रोडक्ट्स में शामिल किए गए मनचाहे म्यूटेशन वाले साइट-स्पेसिफिक प्राइमर्स
    - DNA लाइगेज निक्स को सील कर देता है, जिससे सटीक म्यूटेशन वाला प्लास्मिड बनता है।

विशेषताएँ

- म्यूटेशन की जगह **ठीक से बताई गई है**
- **खास अमीनो एसिड सब्स्टिट्यूशन, डिलीशन या इंसर्शन** बना सकते हैं
- **जीन या प्रोटीन के फंक्शनल एनालिसिस की** अनुमति देता है

अनुप्रयोग

1. **प्रोटीन इंजीनियरिंग:** एंजाइम स्पेसिफिसिटी बदलने के लिए एक्टिव साइट रेसिड्यू को बदलें
2. **फंक्शनल जीनोमिक्स:** खास अमीनो एसिड या न्यूक्लियोटाइड की भूमिका की स्टडी करें
3. **जीन थेरेपी:** पॉइंट म्यूटेशन को ठीक करें या शुरू करें
4. **मॉडल जीव:** सटीक म्यूटेशन के साथ ट्रांसजेनिक या नॉक-इन मॉडल बनाएं

लाभ

- अत्यधिक सटीक और नियंत्रित
- कम से कम ऑफ-टारगेट इफ़ेक्ट (ध्यान से डिज़ाइन के साथ)
- **संरचना-कार्य संबंधों का** अध्ययन कर सकते हैं

सीमाएँ

- तकनीकी रूप से रैंडम म्यूटेशन से ज़्यादा जटिल
- **जीन अनुक्रम का ज्ञान** आवश्यक है
- कभी-कभी बड़े जीन के लिए एफिशिएंसी कम होती है

---

3. तुलना: रैंडम बनाम साइट-डायरेक्टेड म्यूटेजेनेसिस

विशेषता	यादृच्छिक उत्परिवर्तन	साइट-निर्देशित उत्परिवर्तन
उत्परिवर्तन स्थान	अप्रत्याशित	पूर्वनिर्धारित
तरीका	यूवी, रसायन, ट्रांसपोसोन	उत्परिवर्तजन प्राइमर, CRISPR-Cas9
स्क्रीनिंग	व्यापक आवश्यकता	न्यूनतम, लक्ष्य ज्ञात
अनुप्रयोग	लाइब्रेरी जनरेशन, विकासवादी अध्ययन	प्रोटीन इंजीनियरिंग, फंक्शनल एनालिसिस, सटीक मॉडलिंग
लाभ	आसान, विविधता पैदा करता है	सटीक, विशिष्ट, पुनरुत्पादनीय
सीमाएँ	जानलेवा हो सकता है, कम असरदार	तकनीकी रूप से मुश्किल, क्रम ज़रूरी

---

4. शामिल एंजाइम और मॉलिक्यूल

- **DNA पॉलीमरेज़:** रैंडम म्यूटेशन में गलती वाले पॉलीमरेज़
- **DNA लाइगेज:** प्लास्मिड या रिपेयर किए गए DNA में निशानों को सील करता है
- **Cas9 न्यूक्लिऐस:** साइट-डायरेक्टेड म्यूटेजेनेसिस में टारगेटेड DNA ब्रेक बनाता है
- **sgRNA / प्राइमर्स:** डायरेक्ट साइट-स्पेसिफिक म्यूटेशन
- **DpnI:** म्यूटेंट प्लास्मिड को बेहतर बनाने के लिए मिथाइलेटेड टेम्पलेट DNA को डाइजेस्ट करता है

नॉक-इन(KI)

नॉक-इन(KI) एक **जेनेटिक इंजीनियरिंग तकनीक है** जिसमें एक खास जीन, रिपोर्टर, या म्यूटेशन को **जीनोम में एक सटीक जगह पर डाला जाता है** । नॉक-आउट(KO) के उलट जिसमें एक जीन को **डिसरप्ट या डिलीट किया जाता है** , नॉक-इन **जेनेटिक मटीरियल को जोड़ता या रिप्लेस करता है** , जिससे ज़रूरी जीन या म्यूटेशन का कंट्रोल्ड एक्सप्रेशन हो पाता है।

---

1. परिभाषा

नॉक-इन, जीन के काम को बदलने, प्रोटीन के काम की स्टडी करने, या बीमारी के मॉडल बनाने के लिए **किसी खास जीनोमिक जगह पर DNA को टारगेट करके डालना या बदलना है।**

---

2. नॉक-इन का उद्देश्य

1. इंसानों की जेनेटिक बीमारियों की नकल करने के लिए **खास पॉइंट म्यूटेशन** लाना
2. **रिपोर्टर जीन** (जैसे, GFP, ल्यूसिफ़रेज़) डालें
3. नेटिव प्रमोटर्स के तहत **थेराप्यूटिक जीन्स को** एक्सप्रेस करें

4. **जीन रेगुलेशन, प्रमोटर एक्टिविटी और प्रोटीन लोकलाइज़ेशन की** स्टडी करें

---

3. नॉक-इन का तंत्र

नॉक **-इन स्ट्रेटेजी सटीक जीनोम एडिटिंग पर निर्भर करती है** , आमतौर पर इसके ज़रिए:

A. समजातीय पुनर्संयोजन (शास्त्रीय दृष्टिकोण)

1. **डिज़ाइन टारगेटिंग वेक्टर:** इसमें ज़रूरी जीन होता है जिसके दोनों तरफ **होमोलॉजी आर्म्स होते हैं** (सीक्वेंस टारगेट लोकस के जैसे होते हैं)
2. **सेल्स में वेक्टर डालना:** आमतौर पर **एम्ब्र्योनिक स्टेम (ES) सेल्स**
3. **होमोलॉगस रीकॉम्बिनेशन होता है:** वेक्टर टारगेट लोकस पर जीन को रिप्लेस या इन्सर्ट करता है
4. **मॉडिफाइड सेल्स का सिलेक्शन:** चुने जा सकने वाले मार्कर (जैसे, एंटीबायोटिक रेजिस्टेंस) का इस्तेमाल करें।
5. **वेरिफिकेशन:** सही इंटीग्रेशन कन्फर्म करने के लिए PCR, सदर्न ब्लॉट, या सीक्वेंसिंग

सीमाएं: होमोलॉगस रीकॉम्बिनेशन के ज़रिए क्लासिकल KI **ज़्यादा समय लेने वाला और इनएफ़िशिएंट है (~10^6–10^7 सेल्स में 1)**

B. CRISPR-Cas9 मीडिएटेड नॉक-इन(आधुनिक तरीका)

1. **sgRNA डिज़ाइन:** Cas9 को टारगेट जीनोमिक लोकस तक गाइड करता है
2. **Cas9-मीडिएटेड डबलस्ट्रैंड ब्रेक (DSB):** इसे ठीक उसी जगह पर लगाया जाता है जहाँ इसे लगाना होता है।
3. **डोनर DNA / रिपेयर टेम्पलेट:** इसमें ज़रूरी जीन होता है और दोनों तरफ **होमोलॉजी आर्म्स होते हैं।**
4. **होमोलॉजी-डायरेक्टेड रिपेयर (HDR) के ज़रिए इंटीग्रेशन:** डोनर DNA, DSB पर रिप्लेस या इन्सर्ट करता है।
5. **स्क्रीनिंग:** सफल KI वाले सेल्स को चुना और वैलिडेट किया जाता है

क्लासिकल से ज़्यादा फ़ायदे: तेज़, ज़्यादा कुशल, और इसे कई तरह के सेल्स और जीवों पर इस्तेमाल किया जा सकता है

---

4. नॉक-इन के प्रकार

ए. रिपोर्टर नॉक-इन

- **रिपोर्टर जीन** (GFP, LacZ, ल्यूसिफेरेज़) का अंतर्जात स्थानों में सम्मिलन
- **जीन एक्सप्रेशन पैटर्न, प्रमोटर एक्टिविटी, या प्रोटीन लोकलाइज़ेशन की** स्टडी करने के लिए इस्तेमाल किया जाता है

बी. सशर्त नॉक-इन

- **प्रेरित या ऊतक-विशिष्ट प्रमोटरों के नियंत्रण** में जीन सम्मिलन
- **Cre-Lox या Flp-FRT रीकॉम्बिनेज सिस्टम** के साथ इस्तेमाल किया जाता है

सी. पॉइंट म्यूटेशन नॉक-इन

- एकल न्यूक्लियोटाइड परिवर्तन या कोडॉन प्रतिस्थापन
- चूहों या सेल लाइनों में **इंसानी बीमारी के म्यूटेशन को मॉडल करने** के लिए इस्तेमाल किया जाता है

डी. टैग नॉक-इन

- **एपिटोप टैग** (FLAG, HA) या फ्लोरोसेंट प्रोटीन का एंडोजेनस प्रोटीन में फ्यूजन
- **प्रोटीन ट्रैकिंग, प्यूरिफिकेशन या इंटरेक्शन स्टडी की** अनुमति देता है

---

5. नॉक-इन के अनुप्रयोग

A. कार्यात्मक जीनोमिक्स

- एंडोजेनस रेगुलेशन को बाधित किए बिना **जीन फ़ंक्शन का** अध्ययन करें
- **लोकलाइज़ेशन और डायनामिक्स की** स्टडी के लिए प्रोटीन को टैग करें

बी. रोग मॉडलिंग

- चूहों या सेल लाइनों में **मानव आनुवंशिक उत्परिवर्तन की** नकल करें
- **रोगजनन और दवा प्रतिक्रिया का** अध्ययन

C. जैव प्रौद्योगिकी और चिकित्सा

- स्टेम सेल या जीवों में **थेराप्यूटिक जीन** डालें
- **ड्रग स्क्रीनिंग और जीन रेगुलेशन स्टडीज़** के लिए रिपोर्टर KI

D. कृषि

- पौधों और जानवरों में **फ़ायदेमंद गुण या रिपोर्टर जीन** डालना

---

6. फायदे

1. **सटीक और नियंत्रित आनुवंशिक संशोधन**
2. **अंतर्जात जीन विनियमन** बनाए रखता है
3. वर्सेटाइल: **म्यूटेशन, रिपोर्टर या टैग डालने की सुविधा देता है**
4. रिसर्च के लिए **बीमारी से जुड़े मॉडल** बना सकते हैं

---

7. सीमाएं / चुनौतियां

1. **कुशल होमोलॉगस रीकॉम्बिनेशन या HDR की** ज़रूरत होती है , जो कुछ सेल्स में कम हो सकता है
2. CRISPR-Cas9 KI से **ऑफ-टारगेट असर हो सकते हैं**
3. KI क्लोन की स्क्रीनिंग और वैलिडेशन में **समय लगता है**
4. पूरे जीव के KI के लिए **खास ES सेल्स या डिलीवरी सिस्टम की** ज़रूरत हो सकती है

---

8. मुख्य एंजाइम और अणु

अवयव	समारोह
कैस9	लक्षित DNA डबलस्ट्रैंड ब्रेक पेश करता है
एसजीआरएनए	Cas9 को टारगेट लोकस तक गाइड करता है
DNA रिपेयर टेम्पलेट / डोनर DNA	डालने के लिए जीन या म्यूटेशन देता है
रिकॉम्बिनेस (Cre, Flp)	कंडीशनल नॉक-इन या एक्सिशन को नियंत्रित करें
डीएनए लाइगेज और पॉलीमरेज़	सम्मिलित DNA की मरम्मत और एकीकरण

नॉक-आउट(KO)

नॉक-आउट(KO) एक **जेनेटिक इंजीनियरिंग तकनीक है** जिसमें किसी जीव के जीनोम से एक खास जीन को **पूरी तरह से इनएक्टिवेट या डिलीट कर दिया जाता है। यह जीन को अपना फंक्शनल RNA या प्रोटीन बनाने से रोकता है, जिससे रिसर्चर जीन के काम करने के तरीके, रेगुलेटरी रास्ते और बीमारी के तरीकों की** स्टडी कर पाते हैं ।

---

1. परिभाषा

नॉक-आउट **किसी जीव में टारगेट जीन का परमानेंट इनएक्टिवेशन या डिलीशन है** , जिससे उसका एक्सप्रेशन और फंक्शन खत्म हो जाता है।

---

2. नॉक-आउट का उद्देश्य

1. काम करने की क्षमता खोने के बाद फीनोटाइप का एनालिसिस करके **जीन का काम** पता करें
2. जेनेटिक बीमारियों के मॉडल बनाकर **बीमारी के तरीकों का** अध्ययन करें
3. **जीन विनियामक नेटवर्क और मार्गों** की जांच करें
4. **थेराप्यूटिक टारगेट** या ड्रग स्क्रीनिंग मॉडल डेवलप करें

---

3. नॉक-आउट का मैकेनिज्म

नॉक-आउट स्ट्रेटेजी **जीन को डिलीशन, सेलेक्टेबल मार्कर के इंसर्शन, या टारगेटेड म्यूटेशन से डिसरप्ट करने पर डिपेंड करती है** । इसके दो मेन अप्रोच हैं:

ए. शास्त्रीय / समजातीय पुनर्संयोजन नॉक-आउट

1. **एक टारगेटिंग वेक्टर डिज़ाइन करें:** इसमें शामिल हैं:
    - **चयन योग्य मार्कर** (जैसे, एंटीबायोटिक प्रतिरोध)
    - टारगेट जीन के आस-पास के सीक्वेंस से मेल खाते **होमोलॉजी आर्म्स**
2. **सेल्स में वेक्टर डालना** (आमतौर पर एम्ब्र्योनिक स्टेम सेल्स)
3. **होमोलोगस रीकॉम्बिनेशन:** वेक्टर एंडोजेनस जीन की जगह लेता है
4. **सिलेक्शन:** सफल KO वाले सेल्स सिलेक्टेबल मार्कर के ज़रिए ज़िंदा रहते हैं
5. **वैलिडेशन:** PCR, सदर्न ब्लॉट, या सीक्वेंसिंग से सही KO कन्फर्म होता है

सीमाएँ: कम दक्षता (10^{6}–10^{7} कोशिकाओं में 1), श्रम-गहन

B. CRISPR-Cas9 मीडिएटेड नॉक-आउट (आधुनिक तरीका)

1. **sgRNA डिज़ाइन करें:** Cas9 को टारगेट जीन में खास जगह तक ले जाता है

2. **Cas9 न्यूक्लिऐस:** टारगेट लोकस पर डबल-स्ट्रैंड ब्रेक (DSB) इंट्रोड्यूस करता है
3. **नॉन-होमोलॉगस एंड जॉइनिंग (NHEJ) द्वारा मरम्मत:**
    - एरर-प्रोन रिपेयर में **इंसर्शन/डिलीशन (इंडेल्स) होते हैं**
    - **फ्रेमशिफ्ट म्यूटेशन** , समय से पहले स्टॉप कोडॉन → नॉनफंक्शनल प्रोटीन के नतीजे
4. **स्क्रीनिंग:** PCR, सीक्वेंसिंग के ज़रिए सफल KO वाले सेल्स/ऑर्गेनिज़्म की पहचान करें

फायदे: तेज़, ज़्यादा असरदार, कई तरह के सेल और जीवों पर लागू

---

4. नॉक-आउट के प्रकार

ए. संवैधानिक नॉक-आउट

- शुरुआती विकास से ही सभी सेल्स में जीन **हमेशा के लिए इनएक्टिव हो जाता है**
- उदाहरण: जर्मलाइन में टारगेट जीन को हटाने वाले पारंपरिक KO चूहे

बी. सशर्त नॉक-आउट

- जीन **सिर्फ़ खास टिशू में या खास समय पर ही इनएक्टिव होता है**
- **Cre-LoxP या Flp-FRT रीकॉम्बिनेज सिस्टम का** इस्तेमाल करके हासिल किया गया
- **ज़रूरी जीन्स** की स्टडी करने की इजाज़त देता है जिनका पूरी तरह से डिलीट होना जानलेवा होता है

सी. प्रेरित नॉक-आउट

- जीन इनएक्टिवेशन को **बाहरी स्टिमुलस** (जैसे, डॉक्सीसाइक्लिन, टैमोक्सीफेन) से कंट्रोल किया जाता है।
- जीन फ़ंक्शन का अस्थायी नियंत्रण प्रदान करता है

---

5. नॉक-आउट के अनुप्रयोग

A. कार्यात्मक जीनोमिक्स

- डेवलपमेंट, मेटाबॉलिज्म और सिग्नलिंग में **खास जीन की भूमिका का** पता लगाएं

बी. रोग मॉडलिंग

- चूहों या कोशिका रेखाओं में मानव **आनुवंशिक विकारों की नकल करें**

- **सिस्टिक फाइब्रोसिस, कैंसर, डायबिटीज, न्यूरोडीजेनेरेशन** जैसी बीमारियों का अध्ययन करें

सी. दवा की खोज

- KO मॉडल में **थेराप्यूटिक टारगेट की** पहचान करें और **दवा के असर का टेस्ट करें**

D. कृषि और जैव प्रौद्योगिकी

- **खासियत वाले KO जीव** विकसित करें , जैसे, बीमारी से बचाने वाले पौधे या जानवर

---

6. फायदे

1. **कार्य-हानि की निश्चित जानकारी** प्रदान करता है
2. **सटीक और स्थायी** हो सकता है
3. कंडीशनल KO **ज़रूरी जीन की स्टडी की इजाज़त देता है**
4. **रोग मॉडलिंग और थेराप्यूटिक रिसर्च** के लिए बड़े पैमाने पर इस्तेमाल किया जाता है

---

7. सीमाएं / चुनौतियां

1. क्लासिकल KO में **ज़्यादा समय लगता है और यह असरदार नहीं है**
2. पूरा KO **जानलेवा हो सकता है** , जिसके लिए कंडीशनल स्ट्रेटेजी की ज़रूरत होती है
3. CRISPR KO के **ऑफ-टारगेट प्रभाव हो सकते हैं**
4. स्क्रीनिंग और वैलिडेशन में **बहुत मेहनत लगती है**
5. शरीर में **कम्पेनसेटरी मैकेनिज्म को** ट्रिगर कर सकता है

---

8. मुख्य एंजाइम और अणु

अवयव	समारोह
Cas9 न्यूक्लिऐस	लक्षित DNA डबलस्ट्रैंड ब्रेक बनाता है
एसजीआरएनए	Cas9 को खास जीनोमिक लोकस तक गाइड करता है
डीएनए मरम्मत मशीनरी (एनएचईजे)	इंडेल्स → फ्रेमशिफ्ट → जीन इनएक्टिवेशन का परिचय देता है
Cre या Flp रीकॉम्बिनेज	ऊतक-विशिष्ट या सशर्त KO

अवयव	समारोह
चयन योग्य मार्कर	सफलतापूर्वक संशोधित कोशिकाओं की पहचान करें

इकाई: 5

जीन क्लोनिंग के अनुप्रयोग और तकनीकें

जीन क्लोनिंग एक खास जीन या DNA के टुकड़े को अलग करने और उसकी कई एक जैसी कॉपी बनाने का प्रोसेस है , आमतौर पर इसे एक**वेक्टर** में डालकर और एक सही **होस्ट ऑर्गेनिज़्म** में फैलाकर । जीन क्लोनिंग **मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में एक बेसिक टेक्निक है** जिसका इस्तेमाल मेडिसिन, एग्रीकल्चर और बायोटेक्नोलॉजी में होता है।

---

1. परिभाषा

जीन क्लोनिंग, **किसी खास DNA टुकड़े को अलग करना और उसे बढ़ाना है** , जिसमें रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी का इस्तेमाल करके उसके स्ट्रक्चर, काम या प्रैक्टिकल इस्तेमाल की स्टडी की जाती है।

---

2. जीन क्लोनिंग के चरण

1. **डीएनए का अलगाव**
   - जीनोमिक DNA या cDNA निकालें (**रिवर्स ट्रांसक्रिप्टेस का इस्तेमाल करके mRNA से**)
2. **विखंडन**
   - कम्पैटिबल सिरे बनाने के लिए DNA को **रिस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस** का इस्तेमाल करके काटा जा सकता है
3. **वेक्टर में सम्मिलन**
   - **DNA लाइगेज का इस्तेमाल करके DNA फ्रैगमेंट को क्लोनिंग वेक्टर** (प्लास्मिड, बैक्टीरियोफेज, कॉस्मिड, BAC, YAC) में जोड़ा गया
4. **होस्ट में परिचय**
   - रिकॉम्बिनेंट DNA को होस्ट सेल्स (बैक्टीरिया, यीस्ट, मैमेलियन सेल्स) में **ट्रांसफॉर्मेशन, ट्रांसफेक्शन, इलेक्ट्रोपोरेशन, या माइक्रोइंजेक्शन के ज़रिए डाला जाता है।**
5. **पुनर्संयोजक क्लोनों का चयन**
   - **चुने जा सकने वाले मार्कर** (एंटीबायोटिक रेजिस्टेंस, कलरमेट्रिक मार्कर) का इस्तेमाल करें
   - **lacZ जीन का** इस्तेमाल करके ब्लू-व्हाइट स्क्रीनिंग आमतौर पर इस्तेमाल की जाती है
6. **स्क्रीनिंग और सत्यापन**

- **PCR, रेस्ट्रिक्शन डाइजेशन, हाइब्रिडाइजेशन, या सीक्वेंसिंग का** इस्तेमाल करके ज़रूरी जीन की मौजूदगी कन्फर्म करें।

7. **विस्तारण**
   - होस्ट सेल्स रेप्लिकेट करती हैं, **क्लोन किए गए जीन की कई कॉपी बनाती हैं**

---

3. जीन क्लोनिंग की तकनीकें

A. शास्त्रीय क्लोनिंग तकनीकें

1. **प्रतिबंध एंजाइम और लाइगेस विधि**
   - **प्रतिबंध एंडोन्यूक्लिएसेस** के साथ काटा गया डीएनए
   - प्लास्मिड या फेज वेक्टर में लिगेट किया गया
   - मेज़बान बैक्टीरिया पुनः संयोजक डीएनए का प्रसार करते हैं
2. **सीडीएनए क्लोनिंग**
   - **cDNA** में रिवर्स-ट्रांस्क्राइब
   - **व्यक्त जीन का** अध्ययन करने के लिए सीडीएनए को वेक्टर में क्लोन किया गया

बी. आधुनिक / पुनर्संयोजक तकनीकें

1. **पॉलीमरेज़ चेन रिएक्शन (पीसीआर) क्लोनिंग**
   - **प्राइमर** और **थर्मोस्टेबल DNA पॉलीमरेज़** का इस्तेमाल करके खास DNA फ़्रैगमेंट को बढ़ाना
   - एम्प्लीफाइड फ्रैगमेंट को वेक्टर में डालें
   - तीव्र और अत्यधिक विशिष्ट
2. **गेटवे क्लोनिंग**
   - रेस्ट्रिक्शन एंजाइम के बजाय **साइट-स्पेसिफिक रीकॉम्बिनेशन का** इस्तेमाल करता है
   - लाइगेज के बिना कुशल, दिशात्मक क्लोनिंग
3. **टीए क्लोनिंग**
   - 3′ A-ओवरहैंग वाले PCR उत्पाद पूरक 3′ T-ओवरहैंग वाले वेक्टर में लिगेट किए गए
   - PCR से बनने वाले DNA के लिए आसान और तेज़
4. **गिब्सन असेंबली**
   - कई DNA टुकड़ों का निर्बाध संयोजन
   - एक रिएक्शन में **एक्सोन्यूक्लिएज़, पॉलीमरेज़ और लाइगेज का** इस्तेमाल करता है
5. **गोल्डन गेट क्लोनिंग**
   - **टाइप IIS रेस्ट्रिक्शन एंजाइम का** इस्तेमाल करता है
   - **एक ही स्टेप में डायरेक्शनल और मल्टीपल फ्रैगमेंट असेंबली की** सुविधा देता है

6. **बैक्टीरियल आर्टिफिशियल क्रोमोसोम (BACs) और यीस्ट आर्टिफिशियल क्रोमोसोम (YACs)**
    - **बहुत बड़े DNA फ़्रैगमेंट (300 kb तक)** क्लोन करें
    - **जीनोम मैपिंग और सीक्वेंसिंग प्रोजेक्ट्स** के लिए इस्तेमाल किया जाता है

---

4. जीन क्लोनिंग के अनुप्रयोग

दवा

1. **चिकित्सीय प्रोटीन का उत्पादन**
    - इंसुलिन, ग्रोथ हार्मोन, बैक्टीरिया या यीस्ट में बनने वाले क्लॉटिंग फैक्टर
2. **पित्रैक उपचार**
    - मरीजों में **खराब जीन को बदलने** के लिए क्लोन जीन का इस्तेमाल किया जाता है
3. **वैक्सीन विकास**
    - पुनःसंयोजक टीके (जैसे, हेपेटाइटिस बी टीका)
4. **रोग निदान**
    - क्लोन किए गए DNA को प्रोब के तौर पर इस्तेमाल करके बीमारी पैदा करने वाले जीन का पता लगाना

बी. अनुसंधान

1. **कार्यात्मक जीनोमिक्स**
    - **ओवरएक्सप्रेशन, नॉक-इन या नॉक-आउट एक्सपेरिमेंट** के ज़रिए जीन फ़ंक्शन का अध्ययन करें
2. **प्रोटीन अध्ययन**
    - **स्ट्रक्चरल और फंक्शनल एनालिसिस** के लिए प्रोटीन एक्सप्रेस करने के लिए जीन क्लोनिंग
3. **रिपोर्टर जीन्स**
    - **GFP, ल्यूसिफ़रेज़** का इस्तेमाल करके प्रमोटर एक्टिविटी या जीन एक्सप्रेशन पैटर्न की स्टडी करें

C. कृषि

1. **आनुवंशिक रूप से संशोधित फसलें**
    - **रेजिस्टेंस जीन** (हर्बिसाइड, पेस्ट, बीमारी) डालें
2. **पोषण वृद्धि**
    - उदाहरण: **बीटा-कैरोटीन से भरपूर गोल्डन राइस**

D. जैव प्रौद्योगिकी और उद्योग

1. **एंजाइम उत्पादन**
    - माइक्रोब्स में क्लोन और एक्सप्रेस किए गए इंडस्ट्रियल एंजाइम
2. **जैव ईंधन उत्पादन**
    - **सेल्यूलोज के विघटन** में शामिल जीन की क्लोनिंग
3. **जैविक उपचार**
    - **प्रदूषकों या विषाक्त पदार्थों** के विघटन के लिए जीन की क्लोनिंग

---

5. जीन क्लोनिंग में मुख्य वेक्टर

वेक्टर	आकार डालें	मेज़बान	आवेदन
प्लाज्मिड	1–15 केबी	जीवाणु	नियमित क्लोनिंग, प्रोटीन अभिव्यक्ति
जीवाणुभोजी λ	10–25 केबी	जीवाणु	बड़े जीन क्लोनिंग
कॉस्मिड्स	35–45 केबी	जीवाणु	पुस्तकालय निर्माण
बीएसी	150–300 केबी	जीवाणु	जीनोम अनुक्रमण
वाईएसी	200–2000 केबी	यीस्ट	बहुत बड़े जीन टुकड़े, जीनोम मैपिंग

---

6. जीन क्लोनिंग के फ़ायदे

1. **बड़ी मात्रा में विशिष्ट DNA या प्रोटीन का** उत्पादन
2. **जीन और प्रोटीन के फंक्शनल और स्ट्रक्चरल स्टडीज़ को** संभव बनाता है
3. **जीवों की जेनेटिक इंजीनियरिंग को** आसान बनाता है
4. **डायग्नोस्टिक्स, थेराप्यूटिक्स औ एग्रीकल्चर** के लिए टूल्स देता है

---

7. सीमाएं / चुनौतियां

1. **खास वेक्टर और काबिल होस्ट की** ज़रूरत होती है
2. क्लोन किया गया जीन कुछ होस्ट में ठीक से एक्सप्रेस नहीं हो सकता है
3. बड़े DNA टुकड़े अस्थिर हो सकते हैं
4. सही क्लोन की स्क्रीनिंग में **बहुत मेहनत लग सकती है**

पोलीमरेज़ चेन रिएक्शन (पीसीआर)

पॉलीमरेज़ चेन रिएक्शन (PCR) एक **मॉलिक्यूलर बायोलॉजी तकनीक है जिसका इस्तेमाल किसी खास DNA सीक्वेंस को तेज़ी से बढ़ाने के लिए किया जाता है। यह कम से कम शुरुआती मटीरियल** से एक तय DNA फ़्रैगमेंट की लाखों से अरबों कॉपी बनाने की इजाज़त देता है , जिससे यह रिसर्च, मेडिसिन और फ़ोरेंसिक साइंस में एक ज़रूरी टूल बन जाता है।

---

1. परिभाषा

PCR एक**तकनीक है जिसमें थर्मोस्टेबल DNA पॉलीमरेज़, प्राइमर और थर्मल साइकलिंग का इस्तेमाल करके एक खास DNA सीक्वेंस को इन विट्रो में बढ़ाया जाता है**।

---

2. इतिहास

- **1983** में कैरी मुलिस द्वारा विकसित
- मॉलिक्यूलर बायोलॉजी, डायग्नोस्टिक्स, फोरेंसिक साइंस और जेनेटिक रिसर्च में क्रांति ला दी
- **1993 में रसायन विज्ञान में नोबेल पुरस्कार** से सम्मानित

---

3. सिद्धांत

PCR **DNA रेप्लिकेशन के नेचुरल प्रोसेस पर निर्भर करता है** , लेकिन इन विट्रो और **कई साइकिल में दोहराया जाता है**। इसमें इस्तेमाल होता है:

1. **टेम्पलेट DNA** – वह DNA फ़्रैगमेंट जिसमें एम्प्लीफ़ाई किया जाने वाला सीक्वेंस होता है
2. **प्राइमर्स** – टारगेट के किनारे वाले हिस्सों के लिए छोटे, सिंगल-स्ट्रैंडेड DNA कॉम्प्लिमेंट्री
3. **थर्मोस्टेबल डीएनए पॉलीमरेज़** - उदाहरण के लिए, **टैक पॉलीमरेज़** , जो बार-बार गर्म करने पर भी टिक जाता है
4. **dNTPs (डीऑक्सीन्यूक्लियोटाइड ट्राइफॉस्फेट)** – नए DNA के लिए बिल्डिंग ब्लॉक्स
5. **बफ़र और Mg^{2+} आयन** एंजाइम एक्टिविटी के लिए सबसे अच्छी स्थिति देते हैं

पीसीआर प्रवर्धन अभिक्रिया

- हर साइकिल में टारगेट DNA की मात्रा दोगुनी हो जाती है
- 25-35 साइकिल के बाद एक्सपोनेंशियल एम्प्लीफिकेशन से **लाखों कॉपी बनती हैं**

---

4. PCR स्टेप्स / थर्मल साइक्लिंग

PCR एक**थर्मोसाइक्लर में किया जाता है** और इसमें **तीन मुख्य स्टेप्स होते हैं जो साइकल पर दोहराए जाते हैं** :

A. विकृतीकरण (94–98°C)

- डबल-स्ट्रैंडेड DNA पिघलकर सिंगल स्ट्रैंड बन जाता है
- पूरक क्षारों के बीच हाइड्रोजन बंध टूट जाते हैं

बी. एनीलिंग (50–65°C)

- शॉर्ट प्राइमर सिंगल-स्ट्रैंडेड टेम्पलेट पर **कॉम्प्लिमेंट्री सीक्वेंस से जुड़ते हैं (एनील करते हैं)**
- तापमान प्राइमर सीक्वेंस और GC कंटेंट पर निर्भर करता है

C. विस्तार / बढ़ाव (72°C)

- प्राइमर से शुरू करके **नया DNA बनाता है**
- टेम्पलेट स्ट्रैंड के पूरक dNTPs को शामिल करता है
- Taq पॉलीमरेज़: ~1 kb/min एक्सटेंशन रेट

दोहराए गए चक्र : 25–35 चक्रों से एक्सपोनेंशियल DNA एम्प्लीफिकेशन होता है

---

5. पीसीआर वेरिएंट

1. **रिवर्स ट्रांसक्रिप्शन पीसीआर (आरटी-पीसीआर)**
    - **RNA से cDNA को** बढ़ाता है
    - **जीन अभिव्यक्ति का** अध्ययन करने के लिए उपयोग किया जाता है
2. **क्वांटिटेटिव पीसीआर (qPCR) / रियल-टाइम पीसीआर**
    - फ्लोरोसेंट डाई या प्रोब का इस्तेमाल करके **रियल-टाइम में** DNA एम्प्लीफिकेशन को मापता है
    - **वायरल लोड, जीन एक्सप्रेशन, डायग्नोस्टिक्स** के लिए इस्तेमाल किया जाता है
3. **मल्टीप्लेक्स पीसीआर**
    - **एक साथ कई DNA टुकड़ों को** बढ़ाता है
    - कई प्राइमर सेट की ज़रूरत होती है
4. **नेस्टेड पीसीआर**
    - **स्पेसिफिसिटी बढ़ाने** के लिए लगातार दो PCR रिएक्शन

- गैर-विशिष्ट प्रवर्धन को कम करता है

5. **हॉट-स्टार्ट पीसीआर**
   - नॉन-स्पेसिफिक एम्प्लीफिकेशन को रोकने के लिए DNA पॉलीमरेज़ **सिर्फ़ हाई टेम्परेचर पर एक्टिवेट होता है**
6. **डिजिटल पीसीआर**
   - **सैंपल को** हज़ारों रिएक्शन में बांटकर DNA मॉलिक्यूल का एब्सोल्यूट क्वांटिफिकेशन

---

6. PCR के कंपोनेंट और उनकी भूमिकाएँ

अवयव	भूमिका
टेम्पलेट डीएनए	DNA अनुक्रम को बढ़ाने के लिए प्रदान करता है
प्राइमर (फॉरवर्ड और रिवर्स)	टारगेट सीक्वेंस की सीमाएं तय करें
टैक डीएनए पोलीमरेज़	थर्मोस्टेबल एंजाइम जो DNA को संश्लेषित करता है
डीएनटीपी	नए DNA स्ट्रैंड के लिए बिल्डिंग ब्लॉक्स
बफर	pH और आयनिक शक्ति बनाए रखता है
Mg^{2+} आयन	पॉलीमरेज़ गतिविधि के लिए आवश्यक सहकारक

---

7. पीसीआर के अनुप्रयोग

A. आणविक जीवविज्ञान

- जीन की क्लोनिंग और अनुक्रमण
- दुर्लभ डीएनए टुकड़ों का प्रवर्धन
- उत्परिवर्तन अध्ययन

बी. चिकित्सा

- **संक्रामक रोगों** का निदान (HIV, COVID-19, टीबी)
- **जेनेटिक बीमारियों** (सिस्टिक फाइब्रोसिस, सिकल सेल एनीमिया) का पता लगाना
- **वायरल लोड की** निगरानी

सी. फोरेंसिक विज्ञान

- डीएनए फिंगरप्रिंटिंग
- **छोटे बायोलॉजिकल सैंपल** से व्यक्तियों की पहचान

डी. अनुसंधान

- मात्रात्मक जीन अभिव्यक्ति विश्लेषण (RT-qPCR)
- **उत्परिवर्तन या बहुरूपता** का पता लगाना

ई. कृषि और खाद्य उद्योग

- **जीएमओ** का पता लगाएं
- फसलों या खाद्य उत्पादों में रोगजनकों की पहचान करें

---

8. पीसीआर के फायदे

1. अत्यधिक **संवेदनशील** - बहुत कम मात्रा से DNA को बढ़ाता है
2. **रैपिड** – घंटों में नतीजे
3. स्पेसिफिक – प्राइमर्स सटीक सीक्वेंस को टारगेट करते हैं
4. वर्सेटाइल – किसी भी सोर्स (जीनोमिक, cDNA, प्लास्मिड) से DNA को एम्प्लिफाई कर सकता है
5. डाउनस्ट्रीम एप्लीकेशन को आसान बनाता है – क्लोनिंग, सीक्वेंसिंग, डायग्नोस्टिक्स

---

9. पीसीआर की सीमाएं

1. प्राइमर डिज़ाइन के लिए **सीक्वेंस की पहले से जानकारी** होना ज़रूरी है
2. **कंटैमिनेशन** के प्रति सेंसिटिव , जिससे गलत पॉजिटिव रिजल्ट मिलते हैं
3. **लो-फिडेलिटी पॉलीमरेज़** का इस्तेमाल करने पर एम्प्लीफिकेशन एरर
4. **फ्रैगमेंट साइज़** तक सीमित (स्टैंडर्ड PCR के लिए ~10 kb)
5. अगर प्राइमर खराब तरीके से डिज़ाइन किए गए हैं तो नॉन-स्पेसिफिक एम्प्लीफिकेशन

क्वांटिटेटिव पीसीआर (qPCR / रियल-टाइम पीसीआर)

क्वांटिटेटिव PCR (qPCR) एक **बहुत सेंसिटिव मॉलिक्यूलर बायोलॉजी तकनीक है** जो **रियल टाइम में खास DNA सीक्वेंस को एम्प्लीफाई और क्वांटिफाई करने की सुविधा देती है। आमPCR के उलट, जहाँ रिएक्शन के बाद एम्प्लीफाइड DNA को एनालाइज किया जाता है, qPCR हर साइकिल के दौरान DNA सिंथेसिस को** मॉनिटर करता है , और क्वालिटेटिव और क्वांटिटेटिव दोनों तरह का डेटा देता है।

---

1. परिभाषा

क्वांटिटेटिव PCR (qPCR) एकPCR-बेस्ड तकनीक है जो फ्लोरोसेंट डाई या प्रोब का इस्तेमाल करके **एम्प्लीफिकेशन प्रोसेस के दौरान सैंपल में DNA या cDNA की मात्रा को मापती है ।**

---

2. सिद्धांत

qPCR **स्टैंडर्ड PCR** पर आधारित है : DNA डीनेचुरेशन, प्राइमर एनीलिंग, औरDNA पॉलीमरेज़ द्वारा एक्सटेंशन। मुख्य अंतर फ्लोरेसेंस का उपयोग करके **रियल-टाइम डिटेक्शन है।**

- **फ्लोरेसेंस की तीव्रता,** एम्प्लिफाइड DNA की मात्रा के अनुपात में बढ़ती है।
- **साइकिल थ्रेशहोल्ड (Ct या Cq)** : वह PCR साइकिल जिस पर फ्लोरेसेंस एक पहले से तय थ्रेशहोल्ड को पार कर जाता है।
    - कम Ct → ज़्यादा शुरुआती DNA कंसंट्रेशन
    - उच्च Ct → कम प्रारंभिक DNA सांद्रता

---

3. qPCR के घटक

अवयव	समारोह
टेम्पलेट डीएनए / सीडीएनए	प्रवर्धन के लिए लक्ष्य अनुक्रम
फॉरवर्ड और रिवर्स प्राइमर	लक्ष्य DNA सीमाओं को परिभाषित करें
डीएनए पोलीमरेज़	थर्मोस्टेबल एंजाइम (जैसे, टैक)
डीएनटीपी	नए DNA के लिए बिल्डिंग ब्लॉक्स
Mg^{2+} और बफर	एंजाइम एक्टिविटी और रिएक्शन की स्थिति बनाए रखें
फ्लोरोसेंट डाई या जांच	वास्तविक समय में पता लगाने में सक्षम बनाता है

---

4. पता लगाने के तरीके

A. डीएनए-बाइंडिंग डाई

- **SYBR ग्रीन डबलस्ट्रैंडेड DNA (dsDNA)** को बांधता है
- PCR प्रोडक्ट जमा होने पर फ्लोरेसेंस बढ़ता है

- फायदे: आसान, सस्ता
- सीमाएं: किसी भी dsDNA से नॉन-स्पेसिफिक बाइंडिंग → **मेल्टिंग कर्व एनालिसिस की ज़रूरत हो सकती है**

बी. अनुक्रम-विशिष्ट जांचें

1. **टैकमैन जांच**
    - रिपोर्टर डाई 5′ पर, क्वेंचर 3′ पर
    - Taq पॉलीमरेज़ एक्सटेंशन के दौरान प्रोब को काटता है → फ्लोरेसेंस निकलता है
    - बहुत खास, नॉन-स्पेसिफिक प्रोडक्ट्स से कोई सिग्नल नहीं
2. **आणविक बीकन**
    - हेयरपिन के आकार का प्रोब टारगेट DNA के साथ ह◌ाइब्रिडाइज़ होने पर फ्लोरोसेंट होता है
3. **बिच्छू जांच**
    - प्राइमर और प्रोब एक मॉलिक्यूल में; प्राइमर एक्सटेंशन के तुरंत बाद फ्लोरोसेंट होता है

---

5. qPCR के प्रकार

A. निरपेक्ष परिमाणीकरण

- **टारगेट DNA मॉलिक्यूल की सही संख्या** तय करता है
- ज्ञात DNA सांद्रता से **मानक वक्र की** आवश्यकता होती है

बी. सापेक्ष परिमाणीकरण

- **रेफरेंस जीन के मुकाबले** टारगेट जीन एक्सप्रेशन को मापता है
- **जीन एक्सप्रेशन स्टडीज़ (RT-qPCR)** में आम तौर पर इस्तेमाल किया जाता है

C. रिवर्स ट्रांसक्रिप्शन qPCR (RT-qPCR)

- रिवर्स ट्रांसक्रिपटेस का इस्तेमाल करके **RNA को cDNA में** बदलता है
- **जीन अभिव्यक्ति स्तरों** की मात्रा निर्धारित करता है

---

6. qPCR वर्कफ़्लो

1. **सैंपल तैयार करना:** DNA/RNA निकालें; ज़रूरत हो तो RNA को cDNA में बदलें
2. **रिएक्शन सेटअप:** मिक्स टेम्पलेट, प्राइमर, पॉलीमरेज़, dNTPs, बफ़र, Mg^{2+}, और फ़्लोरोसेंट डाई/प्रोब

3. **qPCR मशीन में थर्मल साइकलिंग:**
    - विकृतीकरण → एनीलिंग → विस्तार
    - हर साइकिल के बाद फ्लोरेसेंस मापा जाता है
4. **डेटा विश्लेषण:**
    - प्राप्त Ct मान
    - **स्टैंडर्ड कर्व (एब्सोल्यूट) या ΔΔCt मेथड (रिलेटिव) का** इस्तेमाल करके DNA क्वांटिटी कैलकुलेट करें

---

7. qPCR के अनुप्रयोग

ए. चिकित्सा निदान

- **वायरस** का पता लगाना और उनकी मात्रा का पता लगाना (HIV, COVID-19, हेपेटाइटिस)
- **जीवाणु रोगजनकों** का पता लगाना
- मरीजों में **वायरल लोड की** निगरानी

बी. जीन अभिव्यक्ति अध्ययन

- टिशू या एक्सपेरिमेंटल कंडीशन में **mRNA लेवल** को मापें
- **नॉक-आउट/नॉक-इन प्रयोगों को** मान्य करें

C. आनुवंशिक परीक्षण

- **म्यूटेशन, SNPs, या जीन कॉपी नंबर वेरिएशन** का पता लगाना

D. कृषि और खाद्य सुरक्षा

- **जीएमओ** का पता लगाएं
- **पौधों के रोगजनकों** या खराब करने वाले जीवों का पता लगाना

ई. फोरेंसिक विज्ञान

- **अपराध स्थल के नमूनों** से DNA की मात्रा निर्धारित करें

---

8. qPCR के फ़ायदे

1. अत्यधिक **संवेदनशील और विशिष्ट**

2. **वास्तविक समय मात्रा निर्धारण** प्रदान करता है
3. हाई थ्रूपुट – एक साथ कई सैंपल
4. पोस्ट-PCR प्रोसेसिंग की ज़रूरत नहीं
5. **RNA एनालिसिस के लिए RT** के साथ मिलाया जा सकता है

---

9. सीमाएं

1. महंगे उपकरण और अभिकर्मक
2. ध्यान से **प्राइमर और प्रोब डिज़ाइन की ज़रूरत होती है**
3. **कंटैमिनेशन** के प्रति सेंसिटिव → फॉल्स पॉजिटिव
4. SYBR ग्रीन **सभी dsDNA को जोड़ता है** → नॉन-स्पेसिफिक सिग्नल संभव हैं
5. जीन एक्सप्रेशन स्टडीज़ में नॉर्मलाइज़ेशन के लिए **स्टेबल रेफरेंस जीन की ज़रूरत होती है**

---

10. qPCR में मुख्य पैरामीटर

- **Ct (साइकिल थ्रेशोल्ड):** वह साइकिल जिस पर फ्लोरेसेंस थ्रेशोल्ड से ज़्यादा हो जाता है
- **बेसलाइन:** कम से कम फ्लोरेसेंस के साथ शुरुआती साइकल
- **एक्सपोनेंशियल फेज़:** DNA एम्प्लीफिकेशन हर साइकिल में दोगुना हो जाता है
- **पठारी चरण:** अभिकर्मक की कमी के कारण प्रतिक्रिया धीमी हो जाती है

न्यूक्लिक एसिड लेबलिंग

न्यूक्लिक एसिड को लेबल करने का मतलब है DNA या RNA मॉलिक्यूल्स से एक डिटेक्टेबल मार्कर जोड़ना, ताकि उन्हें अलग-अलग मॉलिक्यूलर बायोलॉजी एक्सपेरिमेंट्स, जैसे हाइब्रिडाइजेशन, ब्लॉटिंग, इन सिटू लोकलाइजेशन, या PCR में **देखा, ट्रैक या क्वांटिफाई किया जा सके।**

मार्कर रेडियोएक्टिव, फ्लोरोसेंट, या एंजाइमेटिक हो सकता है, और**चुनाव सेंसिटिविटी, सेफ्टी और डाउनस्ट्रीम एप्लीकेशन पर निर्भर करता है** ।

---

1. न्यूक्लिक एसिड लेबलिंग का उद्देश्य

1. **डिटेक्शन: सदर्न, नॉर्दर्न, या डॉट ब्लॉट्स** में DNA या RNA सीक्वेंस की पहचान करें
2. **क्वांटिफिकेशन:** सैंपल में न्यूक्लिक एसिड की मात्रा मापें
3. **लोकलाइज़ेशन: सेल्स या टिशू** में न्यूक्लिक एसिड को विज़ुअलाइज़ करें (इन सीटू हाइब्रिडाइज़ेशन)

4. **ट्रैकिंग:** DNA या RNA रेप्लिकेशन, ट्रांसक्रिप्शन और रिपेयर की स्टडी करें
5. **हाइब्रिडाइजेशन स्टडीज़:** जीन एक्सप्रेशन या जीनोम मैपिंग की जांच करें

---

2. लेबल के प्रकार

A. रेडियोधर्मी लेबल

- आमतौर पर **फास्फोरस या हाइड्रोजन के आइसोटोप का इस्तेमाल किया जाता है** :
  - **^{32}P** – DNA प्रोब के लिए हाई-एनर्जी β-एमिटर
  - **^{3}H (ट्रिटियम)** – कम ऊर्जा, सुरक्षित लेकिन कम संवेदनशील
- **फायदे:** बहुत सेंसिटिव (फेमटोमोल की मात्रा का पता लगाना)
- **सीमाएं:** खतरनाक, खास हैंडलिंग की ज़रूरत, कम हाफ़-लाइफ़

बी. फ्लोरोसेंट लेबल

- फ्लोरोसेंट डाई न्यूक्लियोटाइड से कोवैलेंट रूप से जुड़ी होती हैं:
  - उदाहरण: **FITC, Cy3, Cy5, Alexa Fluor डाइज़**
- **जांच:** फ्लोरेसेंस माइक्रोस्कोपी, स्पेक्ट्रोफोटोमेट्री, फ्लो साइटोमेट्री
- **फायदे:** सुरक्षित, रियल-टाइम डिटेक्शन, मल्टीकलर लेबलिंग संभव
- **सीमाएं:** बहुत कम संख्या वाले टारगेट के लिए रेडियोएक्टिव लेबलिंग की तुलना में कम सेंसिटिव

C. एंजाइमेटिक लेबल

- **एल्कलाइन फॉस्फेटेस (AP)** या **हॉर्सरैडिश पेरोक्सीडेस (HRP)** जैसे एंजाइम न्यूक्लिक एसिड से जुड़े होते हैं
- **क्रोमोजेनिक या केमिल्यूमिनसेंट सबस्ट्रेट्स** के ज़रिए पता लगाना
- **गैर-रेडियोधर्मी ब्लॉटिंग तकनीकों** में आम
- **फायदे:** सुरक्षित, बहुत सेंसिटिव, सिग्नल को बढ़ा सकता है
- **सीमाएं:** ज़्यादा जटिल कंजुगेशन और बैकग्राउंड नॉइज़

डी. बायोटिन / डिगोक्सीजेनिन लेबल

- **स्ट्रेप्टाविडिन-HRP** के ज़रिए **बायोटिन-लेबल वाले न्यूक्लियोटाइड का पता लगाया गया**
- **एंटी-DIG एंटीबॉडी** के ज़रिए **डिगोक्सीजेनिन (DIG) लेबल का पता लगाया गया**
- **नॉन-रेडियोएक्टिव हाइब्रिडाइजेशन प्रोब** के लिए इस्तेमाल किया जाता है

---

3. लेबलिंग के तरीके

ए. अंत-लेबलिंग

- DNA या RNA के **5′ या 3′ सिरे को** लेबल करना

1. **5′-अंत लेबलिंग**
    - **T4 पॉलीन्यूक्लियोटाइड काइनेज** और γ-^{32}P-ATP का उपयोग करना
    - DNA या RNA के 5′ सिरे पर एक रेडियोएक्टिव फॉस्फेट जोड़ता है
2. **3′-अंत लेबलिंग**
    - **टर्मिनल डिऑक्सीन्यूक्लियोटाइडिल ट्रांसफ़ेरेज़ (TdT)** का उपयोग करना
    - DNA के 3′-OH में लेबल वाले न्यूक्लियोटाइड जोड़ता है

बी. आंतरिक / यादृच्छिक निगमन

- लेबल को सिंथेसिस के दौरान **पूरे न्यूक्लिक एसिड स्ट्रैंड में शामिल किया जाता है**

1. **निक अनुवाद**
    - **DNase I** से DNA का रिसाव
    - DNA पॉलीमरेज़ I में लेबल वाले न्यूक्लियोटाइड होते हैं जो निकाले गए DNA को बदल देते हैं
2. **रैंडम प्राइमिंग**
    - शॉर्ट प्राइमर रैंडम तरीके से डीनेचर्ड DNA में एनील करते हैं
    - DNA पॉलीमरेज़ टेम्पलेट में लेबल वाले न्यूक्लियोटाइड को शामिल करता है
3. **इन विट्रो प्रतिलेखन**
    - **लेबल वाले न्यूक्लियोटाइड** वाले DNA टेम्प्लेट से बनाए गए RNA प्रोब

सी. पीसीआर-आधारित लेबलिंग

- PCR एम्प्लीफिकेशन के दौरान **लेबल वाले न्यूक्लियोटाइड को सीधे** शामिल करें
- **लेबल्ड DNA प्रोब को** जल्दी से बनाने के लिए उपयोगी

---

4. लेबल्ड न्यूक्लिक एसिड के अनुप्रयोग

A. संकरण तकनीकें

1. **सदर्न ब्लॉट** – DNA का पता लगाना

2. **नॉर्दर्न ब्लॉट** – आरएनए का पता लगाना
3. **डॉट ब्लॉट / स्लॉट ब्लॉट** – न्यूक्लिक एसिड की तेज़ स्क्रीनिंग

बी. इन सीटू हाइब्रिडाइजेशन

- **क्रोमोसोम या टिशू सेक्शन** में DNA या RNA का पता लगाना
- लेबल्ड प्रोब्स टारगेट सीक्वेंस के साथ हाइब्रिडाइज़ होते हैं

सी. पीसीआर और रियल-टाइम पीसीआर

- फ्लोरोसेंट लेबल वाले प्राइमर या प्रोब **qPCR में एम्प्लीफिकेशन को ट्रैक करते हैं**

D. माइक्रोएरे विश्लेषण

- फ्लोरोसेंट लेबल वाले DNA या RNA प्रोब एक चिप पर हज़ारों सीक्वेंस को हाइब्रिडाइज़ करते हैं

ई. जीनोमिक मैपिंग और अनुक्रमण

- लेबल्ड न्यूक्लियोटाइड **खास सीक्वेंस या म्यूटेशन की पहचान करते हैं**

---

5. लेबल का चुनाव

लेबल प्रकार	संवेदनशीलता	सुरक्षा	अनुप्रयोग
रेडियोधर्मी (^{32}P)	उच्चतम	खतरनाक	ब्लॉटिंग, ट्रैकिंग, कम मात्रा का पता लगाना
फ्लोरोसेंट (FITC, Cy3, Cy5)	मध्यम-उच्च	सुरक्षित	इन सीटू हाइब्रिडाइजेशन, माइक्रोएरे, इमेजिंग
एंजाइमेटिक (एचआरपी, एपी)	उच्च	सुरक्षित	सोख्ता, रसायन-प्रकाश-प्रकाश
बायोटिन / डीआईजी	उच्च	सुरक्षित	गैर-रेडियोधर्मी सोख्ता और जांच

---

6. फायदे

1. **बहुत कम मात्रा वाले न्यूक्लिक एसिड का पता लगाने में** मदद करता है
2. सीक्वेंस के **क्वांटिफिकेशन और लोकलाइज़ेशन की** अनुमति देता है
3. कई तरह से इस्तेमाल होने वाला – **DNA, RNA और cDNA के लिए सही**
4. **रेडियोधर्मी और गैर-रेडियोधर्मी पहचान विधियों** के साथ संगत

---

7. सीमाएं

1. रेडियोएक्टिव प्रोब **खतरनाक होते हैं और समय के साथ खराब हो जाते हैं**
2. फ्लोरोसेंट या एंजाइमेटिक लेबलिंग में **बैकग्राउंड नॉइज़ हो सकता है**
3. प्रोब लेबलिंग की क्षमता को बेहतर बनाया जाना चाहिए
4. पता लगाने के लिए खास इक्विपमेंट (फ्लोरोमीटर, फॉस्फोराइमेजर, वगैरह) की ज़रूरत होती है।

ब्लॉटिंग तकनीकें

ब्लॉटिंग तकनीक लैब के तरीके हैं जिनका इस्तेमाल खास बायोमॉलिक्यूल्स —जैसे DNA, RNA, या प्रोटीन — का पता लगाने, पहचानने और उनकी मात्रा तय करने के लिए किया जाता है। इसके लिए उन्हें जेल से **मेम्ब्रेन पर ट्रांसफर किया जाता है** , उसके बाद **हाइब्रिडाइजेशन या एंटीबॉडी-बेस्ड डिटेक्शन किया जाता है**। ब्लॉटिंग से इलेक्ट्रोफोरेसिस से अलग किए गए मॉलिक्यूल्स का सेंसिटिव, खास डिटेक्शन किया जा सकता है।

---

1. ब्लॉटिंग का उद्देश्य

1. कॉम्प्लेक्स मिक्सचर में **खास DNA, RNA, या प्रोटीन मॉलिक्यूल का** पता लगाना
2. **जीन एक्सप्रेशन या प्रोटीन एक्सप्रेशन** का पता लगाएं
3. **म्यूटेशन, पॉलीमॉर्फिज्म या आइसोफॉर्म की** पहचान करें
4. रिसर्च या डायग्नोस्टिक्स के लिए मॉलिक्यूल्स की मात्रा तय करें

---

2. ब्लॉटिंग के मुख्य प्रकार

A. सदर्न ब्लॉट (डीएनए)

- **उद्देश्य:** खास **DNA सीक्वेंस का पता लगाना**
- **डेवलप किया:** एडविन सदर्न, 1975

चरण:

1. **रेस्ट्रिक्शन डाइजेशन:** रेस्ट्रिक्शन एंजाइम से DNA को टुकड़ों में काटा जाता है
2. **जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस:** DNA के टुकड़ों को साइज़ के हिसाब से अलग करें
3. **डीनेचुरेशन:** डबल-स्ट्रैंडेड DNA को सिंगल स्ट्रैंड में बदलना
4. **ट्रांसफर: DNA को नायलॉन या नाइट्रोसेल्यूलोज मेम्ब्रेन** में ट्रांसफर किया जाता है

5. **फिक्सेशन:** DNA को गर्मी या UV से मेम्ब्रेन पर स्थिर करना
6. **हाइब्रिडाइजेशन: लेबल्ड DNA प्रोब** के साथ मेम्ब्रेन को इनक्यूबेट किया जाता है
7. **पता लगाना:** रेडियोएक्टिव, फ्लोरोसेंट, या एंजाइमेटिक लेबल का इस्तेमाल करना

अनुप्रयोग:

- जीन पहचान, उत्परिवर्तन का पता लगाना, जीनोम मैपिंग

बी. नॉर्दर्न ब्लॉट (आरएनए)

- **उद्देश्य:** जीन एक्सप्रेशन का अध्ययन करने के लिए खास **RNA मॉलिक्यूल का पता लगाना**
- **डेवलप किया:** एल्विन, केम्प, और स्टार्क, 1977

चरण:

1. कोशिकाओं या ऊतकों से कुल RNA निकालें
2. डीनेचुरिंग कंडीशन में **जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस (सेकेंडरी स्ट्रक्चर को रोकने के लिए)**
3. झिल्ली में RNA **स्थानांतरित करना**
4. लेबल वाले DNA या RNA प्रोब के साथ **हाइब्रिडाइज़ करें**
5. दक्षिणी धब्बा के रूप में **पता लगाना**

अनुप्रयोग:

- mRNA लेवल मापें, अल्टरनेटिव स्प्लिसिंग, जीन एक्सप्रेशन पैटर्न की स्टडी करें

सी. वेस्टर्न ब्लॉट (प्रोटीन)

- **उद्देश्य:** एंटीबॉडी का उपयोग करके विशिष्ट **प्रोटीन का पता लगाना**
- इम्यूनोब्लॉटिंग **भी कहा जाता है**

चरण:

1. कोशिकाओं/ऊतकों से प्रोटीन निष्कर्षण
2. **SDS-PAGE:** साइज़ के आधार पर प्रोटीन को अलग करें
3. नाइट्रोसेल्यूलोज या PVDF मेम्ब्रेन पर प्रोटीन **ट्रांसफर करें**
4. **ब्लॉकिंग:** BSA या दूध का इस्तेमाल करके नॉनस्पेसिफिक बाइंडिंग को रोकें

5. **प्राइमरी एंटीबॉडी इनक्यूबेशन:** टारगेट प्रोटीन के लिए खास
6. **सेकेंडरी एंटीबॉडी इन्क्यूबेशन:** पता लगाने के लिए एंजाइम (HRP, AP) के साथ कंजुगेटेड
7. **डिटेक्शन:** कलरमेट्रिक, केमिल्यूमिनसेंट, या फ्लोरोसेंट तरीके

अनुप्रयोग:

- प्रोटीन एक्सप्रेशन, पोस्ट-ट्रांसलेशनल मॉडिफिकेशन, बीमारी के बायोमार्कर

डी. साउथवेस्टर्न ब्लॉट (प्रोटीन-डीएनए इंटरैक्शन)

- **उद्देश्य: DNA-बाइंडिंग प्रोटीन** का पता लगाना
- **स्टेप्स:** SDS-PAGE से अलग किए गए प्रोटीन, मेम्ब्रेन पर रीनेचर किए गए, लेबल वाले DNA प्रोब के साथ इनक्यूबेट किए गए

एप्लीकेशन: ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर, DNA-बाइंडिंग प्रोटीन की स्टडी

ई. ईस्टर्न ब्लॉट (प्रोटीन संशोधन)

- **मकसद: पोस्ट-ट्रांसलेशनल मॉडिफिकेशन** (जैसे ग्लाइकोसिलेशन या फॉस्फोराइलेशन) का पता लगाना
- बदलावों का पता लगाने के लिए केमिकल या एंजाइमेटिक प्रोब का इस्तेमाल करता है

---

3. ब्लॉटिंग के सामान्य चरण

1. **सैंपल तैयार करना** – न्यूक्लिक एसिड या प्रोटीन निकालना
2. **जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस** – मॉलिक्यूल्स को साइज़ (DNA/RNA) या मॉलिक्यूलर वेट (प्रोटीन) के हिसाब से अलग करें
3. **झिल्ली में स्थानांतरण** – केशिका, विद्युत स्थानांतरण, या वैक्यूम ब्लोटिंग
4. **फिक्सेशन** – मॉलिक्यूल्स को स्थिर करने के लिए UV, हीट या केमिकल क्रॉसलिंकिंग
5. **डिटेक्शन** – प्रोब या एंटीबॉडी लेबलिंग (रेडियोएक्टिव, फ्लोरोसेंट, एंजाइमेटिक)
6. **विज़ुअलाइज़ेशन और एनालिसिस** – ऑटोरेडियोग्राफी, केमिल्यूमिनेसेंस, या फ्लोरेसेंस इमेजिंग

---

4. इस्तेमाल की गई की मेम्ब्रेन

झिल्ली प्रकार	उपयोग	लाभ
nitrocellulose	डीएनए, आरएनए, प्रोटीन	उच्च प्रोटीन-बंधन क्षमता
नायलॉन	डीएनए, आरएनए	मजबूत, टिकाऊ, उच्च न्यूक्लिक एसिड बंधन
पीवीडीएफ	प्रोटीन	हाई मैकेनिकल स्ट्रेंथ, मल्टीपल डिटेक्शन के साथ कम्पैटिबल

---

5. डिटेक्शन लेबल

1. **रेडियोएक्टिव** – ^{32}P, संवेदनशील लेकिन खतरनाक
2. **फ्लोरोसेंट** – FITC, Cy3, Cy5; सुरक्षित, मल्टीप्लेक्सिंग की अनुमति देता है
3. **एंजाइमेटिक** – HRP, क्रोमोजेनिक या केमिल्यूमिनसेंट सबस्ट्रेट्स के साथ एल्कलाइन फॉस्फेटेज़

---

6. ब्लॉटिंग के अनुप्रयोग

- **सदर्न ब्लॉट:** जीन मैपिंग, म्यूटेशन का पता लगाना, ट्रांसजीन वेरिफिकेशन
- **नॉर्दर्न ब्लॉट:** जीन एक्सप्रेशन एनालिसिस, RNA प्रोफाइलिंग
- **वेस्टर्न ब्लॉट:** प्रोटीन एक्सप्रेशन, आइसोफॉर्म डिटेक्शन, पोस्ट-ट्रांसलेशनल मॉडिफिकेशन
- **साउथवेस्टर्न ब्लॉट:** DNA-प्रोटीन इंटरैक्शन, ट्रांसक्रिप्शन फैक्टर स्टडीज़
- **ईस्टर्न ब्लॉट:** ग्लाइकोसिलेशन जैसे प्रोटीन मॉडिफिकेशन का पता लगाएं

---

7. फायदे

1. अत्यधिक **विशिष्ट और संवेदनशील**
2. **कम संख्या वाले लक्ष्यों का** पता लगा सकता है
3. **साइज़ और मात्रा के बारे में जानकारी** देता है
4. **रेडियोधर्मी और गैर-रेडियोधर्मी पहचान** के लिए अनुकूल

---

8. सीमाएं

1. श्रम-गहन और समय लेने वाला
2. **उच्च गुणवत्ता वाले नमूनों की** आवश्यकता है
3. **खतरनाक** है

4. क्वांटिफिकेशन **सेमी-क्वांटिटेटिव हो सकता है** जब तक कि इसे डेंसिटोमेट्री या qPCR के साथ न जोड़ा जाए

- **ब्लॉटिंग तकनीक** जेल को अलग करने के बाद **खास DNA, RNA, या प्रोटीन का पता लगाने** का तरीका है।
- **प्रकार:**
  - **दक्षिणी धब्बा:** DNA का पता लगाना
  - **नॉर्दर्न ब्लॉट:** RNA का पता लगाना
  - **वेस्टर्न ब्लॉट:** प्रोटीन का पता लगाना
  - **साउथवेस्टर्न ब्लॉट:** DNA-बाइंडिंग प्रोटीन
  - **ईस्टर्न ब्लॉट:** पोस्ट-ट्रांसलेशनल प्रोटीन मॉडिफिकेशन
- **मुख्य स्टेप्स:** सेपरेशन → ट्रांसफर → फिक्सेशन → डिटेक्शन → विज़ुअलाइज़ेशन
- **एप्लीकेशन:** जीन मैपिंग, एक्सप्रेशन एनालिसिस, म्यूटेशन डिटेक्शन, प्रोटीन स्टडीज़, पोस्ट-ट्रांसलेशनल मॉडिफिकेशन

दक्षिणी धब्बा तकनीक

सदर्न ब्लॉटिंग एक मॉलिक्यूलर बायोलॉजी तकनीक है जिसका इस्तेमाल **DNA के कॉम्प्लेक्स मिक्सचर में खास DNA सीक्वेंस का पता लगाने के लिए किया जाता है**। यह जीनोमिक DNA में जीन की पहचान, कैरेक्टराइजेशन और क्वांटिफिकेशन की सुविधा देता है।

इसका नाम एडविन सदर्न (1975) के नाम पर रखा गया, जिन्होंने DNA एनालिसिस के लिए यह तरीका डेवलप किया था।

---

1. सिद्धांत

- **DNA हाइब्रिडाइजेशन पर आधारित** : एक**लेबल्ड DNA प्रोब खास तौर पर** एक मेम्ब्रेन पर स्थिर अपने **कॉम्प्लिमेंट्री DNA सीक्वेंस से जुड़ता है।**
- टारगेट DNA को पहले **जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस से टुकड़ों में बांटा जाता है, साइज़ के हिसाब से अलग किया जाता है, और एक मेम्ब्रेन में ट्रांसफर किया जाता है**, फिर एक लेबल्ड प्रोब से हाइब्रिडाइज़ किया जाता है।
- हाइब्रिडाइज्ड प्रोब का पता लगाने से **खास DNA टुकड़ों की मौजूदगी और साइज़ का पता चलता है**।

---

2. साउथर्न ब्लॉटिंग के स्टेप्स

चरण 1: DNA आइसोलेशन

- स्टैंडर्ड तरीकों का इस्तेमाल करके सेल्स या टिशू से जीनोमिक DNA निकालें
- सटीक नतीजों के लिए DNA शुद्ध और सही होना चाहिए

स्टेप 2: रेस्ट्रिक्शन डाइजेशन

- **विशिष्ट प्रतिबंध एंडोन्यूक्लिऐसेस** के साथ DNA को पचाना
- इलेक्ट्रोफोरेसिस के लिए **अलग-अलग लंबाई के DNA टुकड़े** बनाता है
- एंजाइम का चुनाव **पसंद के सीक्वेंस पर निर्भर करता है**

चरण 3: जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस

- **एगारोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस** का इस्तेमाल करके DNA के टुकड़ों को साइज़ के हिसाब से अलग करें
- छोटे टुकड़े बड़े टुकड़ों की तुलना में तेज़ी से पलायन करते हैं
- साइज़ का अंदाज़ा लगाने के लिए **DNA साइज़ मार्कर (लैडर)** शामिल करें

चरण 4: विकृतीकरण

- एल्कलाइन ट्रीटमेंट (NaOH) का इस्तेमाल करके डबलस्ट्रैंडेड DNA को **सिंगल-स्ट्रैंडेड DNA** में बदलें
- **प्रोब हाइब्रिडाइजेशन** के लिए सिंगल-स्ट्रैंडेड DNA की ज़रूरत होती है

स्टेप 5: मेम्ब्रेन में ट्रांसफर करें

- DNA के टुकड़ों को जेल से **नाइट्रोसेल्यूलोज या नायलॉन मेम्ब्रेन पर ट्रांसफर किया जाता है**
- तरीके:
    1. **कैपिलरी ट्रांसफर:** बफर कैपिलरी एक्शन के ज़रिए DNA को जेल से मेम्ब्रेन तक ले जाता है
    2. **वैक्यूम ट्रांसफर:** DNA को मेम्ब्रेन पर खींचने के लिए वैक्यूम का इस्तेमाल करता है
    3. **इलेक्ट्रोब्लॉटिंग:** DNA ट्रांसफर करने के लिए इलेक्ट्रिक फील्ड का इस्तेमाल करता है

चरण 6: फिक्सेशन

- DNA को मेम्ब्रेन पर स्थिर करने के लिए:
    - **यूवी क्रॉसलिंकिंग**
    - नाइट्रोसेल्यूलोज के लिए **80°C पर बेकिंग**
- यह सुनिश्चित करता है कि हाइब्रिडाइजेशन के दौरान DNA जुड़ा रहे

स्टेप 7: प्रोब के साथ हाइब्रिडाइजेशन

- टारगेट सीक्वेंस के कॉम्प्लिमेंट्री **लेबल्ड DNA प्रोब** के साथ इनक्यूबेट मेम्ब्रेन
- प्रोब **रेडियोएक्टिव, फ्लोरोसेंट या एंजाइमेटिक हो सकता है**
- विशिष्टता सुनिश्चित करने के लिए हाइब्रिडाइजेशन **सख्त परिस्थितियों में होता है**

चरण 8: धुलाई

- **बफर वॉश** से हटाएँ
- कठोरता **तापमान और नमक की मात्रा पर निर्भर करती है**
- यह सुनिश्चित करता है कि केवल **विशिष्ट हाइब्रिड ही रहें**

चरण 9: पता लगाना

- DNA फ़्रैगमेंट से जुड़े लेबल्ड प्रोब का पता लगाएं:
    - **रेडियोधर्मी जांच:** ऑटोरेडियोग्राफी
    - **फ्लोरोसेंट प्रोब:** फ्लोरोसेंस इमेजिंग
    - **एंजाइमेटिक प्रोब:** केमिल्यूमिनेसेंस या कलरमेट्रिक डिटेक्शन

---

3. मुख्य अभिकर्मक और घटक

अवयव	भूमिका
प्रतिबंध वाले एंजाइम	DNA को प्रबंधनीय टुकड़ों में काटें
अगारोज जेल	DNA टुकड़ों को आकार के अनुसार अलग करें
झिल्ली (नाइट्रोसेल्यूलोज/नायलॉन)	प्रोब बाइंडिंग के लिए DNA को स्थिर करें
डीएनए जांच	पूरक DNA अनुक्रम का पता लगाना

अवयव	भूमिका
संकरण बफर	विशिष्ट जांच-लक्ष्य बंधन को बढ़ावा देता है
धुलाई बफर	स्पेसिफिसिटी के लिए अनबाउंड प्रोब हटाता है
पता लगाने की प्रणाली	DNA-प्रोब हाइब्रिड को विज़ुअलाइज़ करें

---

4. सदर्न ब्लॉटिंग के इस्तेमाल

1. **जीन डिटेक्शन:** खास जीन की मौजूदगी या गैर-मौजूदगी की पहचान करना
2. **जीन मैपिंग:** जीन की जगह और साइज़ पता करें
3. **रेस्ट्रिक्शन फ़्रैगमेंट लेंथ पॉलीमॉर्फिज़्म (RFLP):** जेनेटिक वेरिएशन की स्टडी करें
4. **जेनेटिक बीमारियों का डायग्नोसिस:** म्यूटेशन या डिलीशन का पता लगाना (जैसे, सिकल सेल एनीमिया, सिस्टिक फाइब्रोसिस)
5. **ट्रांसजीन वेरिफिकेशन:** जीवों में सफल जेनेटिक इंजीनियरिंग की पुष्टि करें
6. **फोरेंसिक:** पहचान या पितृत्व परीक्षण के लिए DNA फिंगरप्रिंटिंग

---

5. फायदे

1. प्रोब-टारगेट हाइब्रिडाइजेशन के कारण बहुत **खास**
2. जटिल जीनोम में **सिंगल-कॉपी जीन का** पता लगा सकते हैं
3. DNA टुकड़ों के **आकार की जानकारी** देता है
4. **जेनेटिक्स, डायग्नोस्टिक्स और फोरेंसिक** में व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है

---

6. सीमाएं

1. श्रम-गहन औ**समय लेने वाला** (2–3 दिन)
2. **उच्च गुणवत्ता वाले DNA** की आवश्यकता है
3. सेंसिटिविटी प्रोब लेबलिंग और डिटेक्शन मेथड पर निर्भर करती है
4. रेडियोएक्टिव प्रोब को **खास हैंडलिंग और डिस्पोज़ल की ज़रूरत होती है**

- **सदर्न ब्लॉटिंग:** एक कॉम्प्लेक्स सैंपल में **खास DNA सीक्वेंस का** पता लगाता है

- **स्टेप्स:** DNA आइसोलेशन → रेस्ट्रिक्शन डाइजेशन → जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस → डीनेचुरेशन → ट्रांसफर → फिक्सेशन → हाइब्रिडाइजेशन → वॉशिंग → डिटेक्शन
- **प्रोब:** टारगेट के कॉम्प्लिमेंट्री DNA; रेडियोएक्टिव, फ्लोरोसेंट या एंजाइम से लेबल किया हुआ
- **एप्लीकेशन:** जीन डिटेक्शन, मैपिंग, RFLP, म्यूटेशन एनालिसिस, ट्रांसजीन वेरिफिकेशन, फोरेंसिक DNA एनालिसिस

नॉर्दर्न ब्लॉट तकनीक

नॉर्दर्न ब्लॉटिंग एक मॉलिक्यूलर बायोलॉजी तकनीक है जिसका इस्तेमाल किसी सैंपल में **खास RNA मॉलिक्यूल्स का पता लगाने, पहचानने और उनकी मात्रा पता लगाने के लिए किया जाता है**। यह कॉन्सेप्ट के हिसाब से **सदर्न ब्लॉटिंग जैसा ही है, लेकिन इसका इस्तेमाल खास तौर पर RNA** के लिए किया जाता है , जिससे **mRNA लेवल पर जीन एक्सप्रेशन** का एनालिसिस किया जा सकता है।

1977 में एल्विन, केम्प और स्टार्क द्वारा विकसित।

---

1. सिद्धांत

- **न्यूक्लिक एसिड हाइब्रिडाइजेशन पर आधारित** : एक**लेबल्ड DNA या RNA प्रोब,** एक मेम्ब्रेन पर स्थिर अपने **कॉम्प्लिमेंट्री RNA सीक्वेंस के साथ हाइब्रिडाइज हो जाता है।**
- **डीनेचुरिंग जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस के ज़रिए साइज़** के हिसाब से अलग करने से यह पक्का होता है कि RNA की इंटीग्रिटी बनी रहे और सेकेंडरी स्ट्रक्चर हटा दिए जाएं।
- हाइब्रिडाइज्ड प्रोब का पता लगाने से **खास mRNA एक्सप्रेशन लेवल** , ट्रांसक्रिप्ट साइज़ और अल्टरनेटिव स्प्लिसिंग फॉर्म को मापा जा सकता है।

---

2. नॉर्दर्न ब्लॉटिंग के स्टेप्स

चरण 1: RNA आइसोलेशन

- **TRIzol** या कॉलम-बेस्ड किट जैसे रिएजेंट का इस्तेमाल करके सेल्स या टिशू से टोटल RNA या mRNA निकालें
- **RNA की इंटेग्रिटी** ज़रूरी है; RNase कंटैमिनेशन से बचें

चरण 2: जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस

- **डीनेचुरिंग एजेंट्स के साथ एगरोस जेल** का इस्तेमाल करके RNA मॉलिक्यूल्स को अलग करें :
    - सेकेंडरी स्ट्रक्चर को रोकने के लिए **फॉर्मेल्डिहाइड** या **ग्लायोक्सल**
- ट्रांसक्रिप्ट की लंबाई का अनुमान लगाने के लिए **RNA साइज़ मार्कर** लोड करें
- ऐसी स्थितियों में चलाएं जो RNA के क्षरण को रोकें

चरण 3: RNA स्थानांतरण

- जेल से **नायलॉन या नाइट्रोसेल्यूलोज मेम्ब्रेन में RNA ट्रांसफर करें**
- तरीके:
    1. **कैपिलरी ट्रांसफर** – बफरRNA को मेम्ब्रेन पर ले जाता है
    2. **वैक्यूम ट्रांसफर** - वैक्यूम RNA को खींचता है
    3. **इलेक्ट्रोब्लॉटिंग** – इलेक्ट्रिक फील्ड RNA को अच्छे से ट्रांसफर करता है

चरण 4: फिक्सेशन

- मेम्ब्रेन पर RNA को स्थिर करने के लिए निम्न का उपयोग करें:
    - **यूवी क्रॉसलिंकिंग**
    - **80°C पर बेकिंग**
- यह सुनिश्चित करता है कि हाइब्रिडाइजेशन के दौरान RNA बंधा रहे

स्टेप 5: प्रोब के साथ हाइब्रिडाइजेशन

- टारगेट mRNA के कॉम्प्लिमेंट्री **लेबल वाले DNA या RNA प्रोब** से मेम्ब्रेन को इनक्यूबेट करें।
- प्रोब **रेडियोएक्टिव (^{32}P), फ्लोरोसेंट, या एंजाइमेटिक (DIG/बायोटिन) हो सकते हैं।**
- **सख्त परिस्थितियों** में हाइब्रिडाइजेशन से स्पेसिफिसिटी सुनिश्चित होती है

चरण 6: धुलाई

- खास **नमक कंसंट्रेशन और टेम्परेचर वाले वॉशिंग बफ़र्स का इस्तेमाल करके अनबाउंड प्रोब निकालें**
- यह पक्का करता है कि सिर्फ़ **पूरी तरह से कॉम्प्लिमेंट्री RNA-प्रोब हाइब्रिड** ही रहें

चरण 7: पता लगाना

- बाउंड प्रोब का पता लगाएं:
  - **रेडियोधर्मी जांच:** ऑटोरेडियोग्राफी
  - **फ्लोरोसेंट प्रोब:** फ्लोरोसेंस इमेजिंग
  - **एंजाइमेटिक प्रोब:** केमिल्यूमिनसेंट या कलरमेट्रिक डिटेक्शन

---

3. मुख्य अभिकर्मक और घटक

अवयव	भूमिका
आरएनए नमूना	पता लगाने के लिए लक्ष्य प्रतिलेख
डीनेचुरिंग जेल (फॉर्मेल्डिहाइड/एगरोज़)	RNA को साइज़ के हिसाब से अलग करें और सेकेंडरी स्ट्रक्चर को रोकें
नायलॉन या नाइट्रोसेल्यूलोज झिल्ली	प्रोब हाइब्रिडाइजेशन के लिए RNA को स्थिर करें
लेबल्ड प्रोब (डीएनए/आरएनए)	विशिष्ट RNA अनुक्रमों का पता लगाना
संकरण बफर	जांच-लक्ष्य बंधन को बढ़ावा देता है
वॉश बफर	स्पेसिफिसिटी के लिए अनबाउंड प्रोब हटाता है
पता लगाने की प्रणाली	RNA-प्रोब हाइब्रिड को विज़ुअलाइज़ करें

---

4. नॉर्दर्न ब्लॉटिंग के इस्तेमाल

1. **जीन एक्सप्रेशन एनालिसिस** – अलगअलग टिशू, ट्रीटमेंट या डेवलपमेंटल स्टेज में mRNA लेवल को मापें
2. **ट्रांसक्रिप्ट साइज़ का पता लगाना** – दूसरे स्प्लिसिंग फ़ॉर्म की पहचान करना
3. **RNA प्रोसेसिंग स्टडीज़** – प्रीकर्सर और मैच्योर RNA फ़ॉर्म देखें
4. **RT-PCR नतीजों का वैलिडेशन** – जीन एक्सप्रेशन डेटा कन्फर्म करें
5. **वायरल RNA डिटेक्शन** – रिसर्च या डायग्नोस्टिक्स में RNA वायरस का पता लगाना

---

5. फायदे

1. **लक्ष्य mRNA** का विशिष्ट पता लगाना
2. ट्रांसक्रिप्ट के **साइज़ की जानकारी** देता है
3. एक्सप्रेशन लेवल की **क्वांटिटेटिव तुलना की** अनुमति देता है

4. **अल्टरनेटिव स्प्लिसिंग या मल्टीपल ट्रांसक्रिप्ट का** पता लगा सकता है

---

6. सीमाएं

1. श्रम-गहन और समय लेने वाला
2. **हाई-क्वालिटी, साबुत RNA की** ज़रूरत होती है
3. **RT-qPCR** की तुलना में कम संवेदनशीलता
4. रेडियोएक्टिव प्रोब को **खास हैंडलिंग की ज़रूरत होती है**
5. क्वांटिफिकेशन **सेमी-क्वांटिटेटिव होता है** जब तक कि इसे डेंसिटोमेट्री के साथ न जोड़ा जाए

---

7. नॉर्दर्न और सदर्न ब्लॉट के बीच अंतर

विशेषता	उत्तरी धब्बा	सदर्न ब्लॉट
लक्ष्य	शाही सेना	डीएनए
विकृतीकरण	आवश्यक (फॉर्मेल्डिहाइड)	आवश्यक (NaOH)
जांच	डीएनए या आरएनए पूरक	डीएनए जांच
उद्देश्य	जीन अभिव्यक्ति विश्लेषण	जीन का पता लगाना, मैपिंग, म्यूटेशन विश्लेषण
संवेदनशीलता	दक्षिणी से कम	उच्च, विशेष रूप से रेडियोधर्मी जांच के साथ

- **नॉर्दर्न ब्लॉटिंग** सैंपल में **खास RNA मॉलिक्यूल्स का** पता लगाता है।
- **स्टेप्स:** RNA आइसोलेशन → डीनेचुरिंग जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस → ट्रांसफर → फिक्सेशन → हाइब्रिडाइजेशन → वॉशिंग → डिटेक्शन
- **प्रोब:** टारगेट के कॉम्प्लिमेंट्री DNA या RNA; रेडियोएक्टिव, फ्लोरोसेंट या एंजाइम से लेबल किया हुआ
- **एप्लीकेशन:** जीन एक्सप्रेशन, ट्रांसक्रिप्ट साइज़, RNA प्रोसेसिंग, वायरल RNA डिटेक्शन
- **फायदे:** खास, साइज़ पता लगाने में मदद करता है, दूसरे ट्रांसक्रिप्ट का पता लगाता है
- **कमियां:** इसमें समय लगता है, इसके लिए पूरे RNA की ज़रूरत होती है, qPCR से कम सेंसिटिविटी होती है।

वेस्टर्न ब्लॉट तकनीक

वेस्टर्न ब्लॉटिंग (जिसे **इम्यूनोब्लॉटिंग भी कहते हैं**) एक मॉलिक्यूलर बायोलॉजी तकनीक है जिसका इस्तेमाल किसी कॉम्प्लेक्स मिक्सचर में **खास प्रोटीन का पता लगाने और उसे एनालाइज़ करने के लिए किया जाता है। यह जेल**

इलेक्ट्रोफोरेसिस से प्रोटीन को अलग करने को एंटीबॉडी-बेस्ड डिटेक्शन के साथ जोड़ती है , जिससे प्रोटीन की पहचान, क्वांटिफिकेशन और कैरेक्टराइजेशन किया जा सकता है।

1981 में डब्ल्यू. नील बर्नेट द्वारा विकसित।

---

1. सिद्धांत

- प्रोटीन को पहले **SDS-PAGE** का इस्तेमाल करके **साइज़ के आधार पर अलग किया जाता है** ।
- अलग किए गए प्रोटीन को फिर **एक मेम्ब्रेन** (नाइट्रोसेल्यूलोज या PVDF) में ट्रांसफर किया जाता है।
- प्रोटीन के लिए खास एक **प्राइमरी एंटीबॉडी उसे बांधती है, उसके बाद** एक रिपोर्टर एंजाइम (जैसे, HRP या एल्कलाइन फॉस्फेटेस) के साथ जुड़ी एक **सेकेंडरी एंटीबॉडी बांधती है।**
- **कलरमेट्रिक, केमिल्यूमिनसेंट, या फ्लोरोसेंट सिग्नल** से चलता है , जिससे प्रोटीन की मौजूदगी और उसकी रिलेटिव मात्रा का पता चलता है।

---

2. वेस्टर्न ब्लॉटिंग के स्टेप्स

चरण 1: प्रोटीन निष्कर्षण

- **लाइसिस बफर** (जैसे, SDS, ट्राइटन X-100) का इस्तेमाल करके टिशू या सेल्स से प्रोटीन निकालें।
- प्रोटीन के खराब होने से रोकने के लिए **प्रोटीज़ इनहिबिटर** शामिल करें
- **बराबर लोडिंग** के लिए प्रोटीन कंसंट्रेशन मापें

स्टेप 2: SDS-PAGE (सेपरेशन)

- SDS और रिड्यूसिंग एजेंट (β-मरकैप्टोएथेनॉल या DTT) से **प्रोटीन को डीनेचर करें।**
- SDS प्रोटीन को बांधता है और**एक जैसा नेगेटिव चार्ज देता है** , इसलिए अलग होना मुख्य रूप से **मॉलिक्यूलर वेट पर निर्भर करता है।**
- प्रोटीन को अलग करने के लिए जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस चलाएं

चरण 3: प्रोटीन स्थानांतरण

- **इलेक्ट्रोब्लॉटिंग** का इस्तेमाल करके जेल से अलग किए गए प्रोटीन को **नाइट्रोसेल्यूलोज या PVDF मेम्ब्रेन में ट्रांसफर करें**
- झिल्ली एंटीबॉडी बाइंडिंग के लिए प्रोटीन को स्थिर करती है

चरण 4: ब्लॉकिंग

- **ब्लॉकिंग बफर** (जैसे, BSA, नॉन-फैट मिल्क) के साथ इनक्यूबेट मेम्ब्रेन
- बैकग्राउंड सिग्नल को कम करने के लिए मेम्ब्रेन पर **नॉन-स्पेसिफिक बाइंडिंग साइट्स को** ब्लॉक करता है

चरण 5: प्राथमिक एंटीबॉडी इनक्यूबेशन

- **खास प्राइमरी एंटीबॉडी** वाली इनक्यूबेट मेम्ब्रेन जो टारगेट प्रोटीन को पहचानती है
- एंटीबॉडी खास तौर पर **प्रोटीन के एपिटोप से जुड़ती है**

स्टेप 6: सेकेंडरी एंटीबॉडी इनक्यूबेशन

- प्राइमरी एंटीबॉडी को पहचानने वाली **सेकेंडरी एंटीबॉडी** वाली इनक्यूबेट मेम्ब्रेन
- सेकेंडरी एंटीबॉडी को एक **रिपोर्टर एंजाइम** (HRP या एल्कलाइन फॉस्फेटेस) या फ्लोरोसेंट डाई से जोड़ा जाता है
- पता लगाने के लिए सिग्नल को बढ़ाता है

चरण 7: पता लगाना

- प्रोटीन बैंड को देखने के लिए एंजाइम सब्सट्रेट का इस्तेमाल करें:
    - **कलरमेट्रिक:** मेम्ब्रेन पर रंगीन प्रेसिपिटेट बनता है
    - **केमिल्यूमिनसेंट:** एक्स-रे फिल्म या CCD कैमरे से पता लगाया गया लाइट एमिशन
    - **फ्लोरोसेंट:** इमेजिंग सिस्टम का इस्तेमाल करके फ्लोरोसेंस का पता लगाया गया

चरण 8: विश्लेषण

- **आणविक भार मार्करों** की तुलना में प्रोटीन बैंड
- बैंड की तीव्रता **प्रोटीन की मात्रा से संबंधित है**

- डेंसिटोमेट्री सॉफ्टवेयर का इस्तेमाल **सेमी-क्वांटिटेटिव या क्वांटिटेटिव एनालिसिस के लिए किया जा सकता है**

---

3. मुख्य अभिकर्मक और घटक

अवयव	भूमिका
प्रोटीन नमूना	कोशिकाओं/ऊतकों से लक्ष्य प्रोटीन
एसडीएस-पेज जेल	आकार के आधार पर प्रोटीन को अलग करें
झिल्ली (नाइट्रोसेल्यूलोज/PVDF)	एंटीबॉडी का पता लगाने के लिए प्रोटीन को स्थिर करें
प्राथमिक एंटीबॉडी	विशिष्ट प्रोटीन एपिटोप को पहचानता है
द्वितीयक एंटीबॉडी	सिग्नल को बढ़ाता है; एंजाइम या फ्लोरोफोर से जुड़ा हुआ
ब्लॉकिंग बफर	गैर-विशिष्ट एंटीबॉडी बंधन को रोकता है
पता लगाने की प्रणाली	कलरमेट्रिक, केमिल्यूमिनसेंट, या फ्लोरोसेंट विज़ुअलाइज़ेशन

---

4. वेस्टर्न ब्लॉट के प्रकार

1. **डॉट ब्लॉट:** इलेक्ट्रोफोरेसिस के बिना सीधे प्रोटीन का पता लगाना
2. **फ़ार-वेस्टर्न ब्लॉट:** एंटीबॉडी के बजाय लेबल्ड प्रोटीन प्रोब का इस्तेमाल करके प्रोटीन-प्रोटीन इंटरैक्शन का पता लगाएं
3. **क्वांटिटेटिव वेस्टर्न ब्लॉट:** सटीक क्वांटिफिकेशन के लिए फ्लोरोसेंट सेकेंडरी एंटीबॉडी और इमेजिंग का इस्तेमाल करता है

---

5. अनुप्रयोग

1. **प्रोटीन एक्सप्रेशन एनालिसिस** – टिशू या ट्रीटमेंट में प्रोटीन लेवल की तुलना करें
2. **अनुवादोत्तर संशोधन का पता लगाना** – फॉस्फोराइलेशन, ग्लाइकोसिलेशन, एसिटिलेशन
3. **जीन नॉक-आउट या नॉक-इन प्रयोगों का सत्यापन**
4. **रोग बायोमार्कर का पता लगाना** – जैसे, कैंसर, संक्रामक रोग
5. **एंटीबॉडी विशिष्टता परीक्षण**
6. **प्रोटीन-प्रोटीन इंटरैक्शन अध्ययन** (फ़ार-वेस्टर्न ब्लॉट वेरिएंट)

---

6. फायदे

1. एंटीबॉडी पहचान के कारण उच्च **विशिष्टता**
2. **कम मात्रा वाले प्रोटीन का** पता लगा सकता है
3. प्रोटीन के **आकार की जानकारी** प्रदान करता है
4. कई डिटेक्शन तरीकों के साथ कम्पैटिबल
5. **अनुवाद-पश्चात संशोधनों का** पता लगा सकता है

---

7. सीमाएं

1. समय लेने वाला (1–2 दिन लग सकते हैं)
2. हाई-क्वालिटी **स्पेसिफिक एंटीबॉडीज़ की ज़रूरत होती है**
3. सेमी-क्वांटिटेटिव, जब तक कि डेंसिटोमेट्री या फ्लोरोसेंट क्वांटिफिकेशन के साथ संयुक्त न हो
4. अगर ब्लॉकिंग या धुलाई काफ़ी नहीं है तो बैकग्राउंड सिग्नल मिल सकता है
5. **केमिल्यूमिनेसेंस या फ्लोरेसेंस डिटेक्शन के लिए इक्विपमेंट की** ज़रूरत है

- **वेस्टर्न ब्लॉट: एंटीबॉडी** का इस्तेमाल करके खास प्रोटीन का पता लगाता है और उनका एनालिसिस करता है
- **स्टेप्स:** प्रोटीन एक्सट्रैक्शन → SDS-PAGE → ट्रांसफर → ब्लॉकिंग → प्राइमरी एंटीबॉडी → सेकेंडरी एंटीबॉडी → डिटेक्शन → एनालिसिस
- **डिटेक्शन:** कलरमेट्रिक, केमिल्यूमिनसेंट, या फ्लोरोसेंट
- **एप्लीकेशन:** प्रोटीन एक्सप्रेशन, पोस्ट-ट्रांसलेशनल मॉडिफिकेशन, बायोमार्कर डिटेक्शन, जीन एडिटिंग का वैलिडेशन
- **फायदे:** खास, सेंसिटिव, बदलावों का पता लगा सकता है; **कमियां:** मेहनत वाला, एंटीबॉडी पर निर्भर, सेमी-क्वांटिटेटिव

चिड़ियाघर ब्लॉट

ज़ू ब्लॉटिंग एक **मॉलिक्यूलर तकनीक है जिसका इस्तेमाल अलग-अलग प्रजातियों में जीन के कंजर्वेशन की स्टडी करने के लिए किया जाता है**। यह असल में एक **सदर्न ब्लॉट है जो कई प्रजातियों के DNA के साथ किया जाता है** , जिससे रिसर्चर यह पता लगा सकते हैं कि कोई खास DNA सीक्वेंस इवोल्यूशनरी रूप से कंजर्व्ड है या नहीं।

- शब्द **"चिड़ियाघर ब्लॉट" कई प्रजातियों ("चिड़ियाघर") से डीएनए** के उपयोग से आता है।
- **कम्पेरेटिव जीनोमिक्स, इवोल्यूशनरी बायोलॉजी और जीन कंज़र्वेशन स्टडीज़** में उपयोगी।

---

1. सिद्धांत

- **डीएनए-डीएनए संकरण पर आधारित**
- कई प्रजातियों के DNA को **पचाया जाता है, अलग किया जाता है, और एक मेम्ब्रेन** (जैसे सदर्न ब्लॉट) पर स्थिर किया जाता है।
- एक **लेबल्ड DNA प्रोब को** मेम्ब्रेन के साथ हाइब्रिडाइज़ किया जाता है।
- हाइब्रिडाइजेशन दूसरी प्रजातियों में **सीक्वेंस में समानता/संरक्षण को दिखाता है**

महत्वपूर्ण अवधारणा:

- **हाई सीक्वेंस कंज़र्वेशन → मज़बूत हाइब्रिडाइज़ेशन**
- **कम संरक्षण → कमज़ोर या कोई हाइब्रिडाइज़ेशन नहीं**

---

2. ज़ू ब्लॉटिंग के स्टेप्स

चरण 1: DNA आइसोलेशन

- कई प्रजातियों से **हाई-क्वालिटी जीनोमिक DNA** निकालें
- स्टडी के आधार पर स्पीशीज़ संबंधित (मैमल्स) या दूर से संबंधित (मैमल्स बनाम मछली) हो सकती हैं

स्टेप 2: रेस्ट्रिक्शन डाइजेशन

- DNA के टुकड़े बनाने के लिए सभी प्रजातियों के DNA को **रेस्ट्रिक्शन एंजाइम से डाइजेस्ट करें**
- एंजाइम का चुनाव फ्रैगमेंट के साइज़ और हाइब्रिडाइज़ेशन पैटर्न पर असर डाल सकता है

चरण 3: जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस

- **एगारोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस** का इस्तेमाल करके DNA के टुकड़ों को साइज़ के हिसाब से अलग करें
- संदर्भ के लिए **DNA साइज़ मार्कर** लोड करें

स्टेप 4: मेम्ब्रेन में ट्रांसफर करें

- **नायलॉन या नाइट्रोसेल्यूलोज मेम्ब्रेन** में ट्रांसफर करें
- तरीके: कैपिलरी ट्रांसफर, वैक्यूम ट्रांसफर, या इलेक्ट्रोब्लॉटिंग

चरण 5: फिक्सेशन

- मेम्ब्रेन पर DNA को स्थिर करने के लिए निम्न का उपयोग करें:
    - **यूवी क्रॉसलिंकिंग**
    - **हीट बेकिंग**
- हाइब्रिडाइजेशन के दौरान DNA के नुकसान को रोकता है

स्टेप 6: प्रोब के साथ हाइब्रिडाइजेशन

- किसी रेफरेंस स्पीशीज़ के जीन के हिसाब से **लेबल वाले DNA प्रोब** के साथ इनक्यूबेट मेम्ब्रेन
- प्रोब **रेडियोएक्टिव, फ्लोरोसेंट या एंजाइमेटिक हो सकते हैं**

चरण 7: धुलाई

- नॉन-स्पेसिफिक बाइंडिंग को हटाने के लिए मेम्ब्रेन को **सख्त कंडीशन** में धोएं
- कठोरता **क्रॉस-स्पीशीज़ हाइब्रिडाइज़ेशन** संवेदनशीलता को प्रभावित करती है

चरण 8: पता लगाना

- हाइब्रिडाइज्ड प्रोब का पता लगाने के लिए:
    - **ऑटोरेडियोग्राफी** (रेडियोधर्मी जांच)
    - **प्रतिदीप्ति इमेजिंग** (प्रतिदीप्ति जांच)
    - **केमिलुमिनेसेंस** (एंजाइमेटिक प्रोब्स)

---

3. मुख्य अभिकर्मक और घटक

अवयव	भूमिका

अवयव	भूमिका
कई प्रजातियों से जीनोमिक डीएनए	तुलना के लिए लक्ष्य अनुक्रम
प्रतिबंधित एंजाइम	DNA को टुकड़ों में काटें
अगारोज जेल	DNA टुकड़ों को आकार के अनुसार अलग करें
झिल्ली (नायलॉन/नाइट्रोसेल्यूलोज)	प्रोब बाइंडिंग के लिए DNA को स्थिर करें
लेबलयुक्त डीएनए जांच	संरक्षित अनुक्रम का पता लगाना
संकरण बफर	जांच-लक्ष्य बंधन को बढ़ावा देता है
धुलाई बफर	अनबाउंड जांच हटाएँ
पता लगाने की प्रणाली	DNA-प्रोब हाइब्रिडाइजेशन को विज़ुअलाइज़ करें

---

4. ज़ू ब्लॉटिंग के इस्तेमाल

1. **प्रजातियों में जीन संरक्षण का अध्ययन**
2. **इवोल्यूशनरी बायोलॉजी** – समझें कि जीन कैसे विकसित हुए
3. **तुलनात्मक जीनोमिक्स** – ऑर्थोलॉगस जीन की पहचान करें
4. **जीन फ़ैमिली स्टडीज़** – यह पता लगाना कि क्या कोई जीन फ़ैमिली दूसरी प्रजातियों में मौजूद है
5. **अत्यधिक संरक्षित विनियामक अनुक्रमों का पता लगाना**

---

5. फायदे

1. विभिन्न प्रजातियों के जीनों का **तुलनात्मक विश्लेषण करने** की अनुमति देता है
2. **विकासवादी संरक्षण पर जानकारी** प्रदान करता है
3. दूर से संबंधित प्रजातियों में भी **समजातीय अनुक्रमों का** पता लगा सकते हैं

---

6. सीमाएं

1. सभी प्रजातियों से **हाई-क्वालिटी जीनोमिक DNA की** ज़रूरत होती है
2. **कम सीक्वेंस सिमिलैरिटी** के साथ हाइब्रिडाइजेशन एफिशिएंसी कम हो जाती है
3. श्रम-गहन और समय लेने वाला
4. केवल **अर्ध-मात्रात्मक जानकारी** प्रदान करता है

---

7. उदाहरण

- जांच: मानव **β-ग्लोबिन जीन**
- DNA: चिम्पांजी, गाय, चूहे, मेंढक, मछली से जीनोमिक DNA
- अवलोकन:
    - चिम्पांजी में मज़बूत हाइब्रिडाइज़ेशन → ज़्यादा कंज़र्वेशन
    - चूहे/गाय में मध्यम → आंशिक संरक्षण
    - मछलियों में कमज़ोर या कोई हाइब्रिडाइज़ेशन नहीं → कम कंज़र्वेशन

यह **इवोल्यूशनरी रिश्तों** और **जीन कंज़र्वेशन पैटर्न को दिखाता है**।

डीएनए श्रृंखला बनाना

DNA सीक्वेंसिंग एकDNA मॉलिक्यूल में न्यूक्लियोटाइड (A, T, G, C) का सही क्रम पता लगाने का प्रोसेस है। यह **जीन एनालिसिस, म्यूटेशन का पता लगाने, जीनोम मैपिंग और बायोटेक्नोलॉजी एप्लीकेशन के लिए मॉलिक्यूलर बायोलॉजी में एक बेसिक तकनीक है**।

---

1. सिद्धांत

- DNA का सीक्वेंस **कॉम्प्लिमेंट्री DNA स्ट्रैंड्स को सिंथेसाइज़ करके** और **शामिल न्यूक्लियोटाइड्स का पता लगाकर तय किया जाता है**।
- एक टेम्पलेट स्ट्रैंड को रेप्लिकेट करने के लिए **DNA पॉलीमरेज़ एक्टिविटी** पर निर्भर करते हैं , जिसमें सीक्वेंस को पढ़ने के लिए **नॉर्मल न्यूक्लियोटाइड** या **मॉडिफाइड चेन-टर्मिनेटिंग न्यूक्लियोटाइड को शामिल किया जाता है।**
- **रेडियोएक्टिविटी, फ्लोरेसेंस या ल्यूमिनेसेंस** से लगाया जा सकता है।

---

2. DNA अनुक्रमण के तरीके

ए. सेंगर अनुक्रमण (श्रृंखला-समाप्ति विधि)

- 1977 में फ्रेडरिक सेंगर द्वारा विकसित
- **छोटे DNA टुकड़ों को सीक्वेंस करने और सीक्वेंस की पुष्टि करने के लिए बड़े पैमाने पर इस्तेमाल किया जाता है**

सिद्धांत:

- DNA सिंथेसिस **डाइडिऑक्सीन्यूक्लियोटाइड्स (ddNTPs) द्वारा रैंडमली खत्म हो जाता है** , जिसमें 3’-OH ग्रुप नहीं होता है।
- ddNTP को शामिल करने से **आगे बढ़ने से रोका जा सकता है** , जिससे अलग-अलग लंबाई के टुकड़े बनते हैं।
- **जेल या कैपिलरी इलेक्ट्रोफोरेसिस** से अलग किया जाता है , और सीक्वेंस को पढ़ने के लिए **टर्मिनल ddNTP का पता लगाया जाता है ।**

चरण:

1. **टेम्पलेट DNA को** डीनेचर किया जाता है और एक छोटे **ओलिगोन्यूक्लियोटाइड प्राइमर से प्राइम किया जाता है**
2. **DNA पॉलीमरेज़** प्राइमर को किसकी मौजूदगी में बढ़ाता है:
    - सामान्य डीऑक्सीन्यूक्लियोटाइड्स (dNTPs)
    - रेडियोएक्टिविटी या फ्लोरोसेंट डाई से लेबल की गई चेन-टर्मिनेटिंग ddNTPs की थोड़ी मात्रा
3. जब भी ddNTP को शामिल किया जाता है, तो **रैंडम टर्मिनेशन होता है**
4. अलग-अलग लंबाई के DNA टुकड़ों को **पॉलीएक्रिलामाइड जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस से अलग किया जाता है।**
5. सीक्वेंस **को लेबल किए गए टुकड़ों के पैटर्न से पढ़ा जाता है** , या तो मैन्युअली (ऑटोरेडियोग्राफी) या ऑटोमैटिकली (फ्लोरेसेंस)

वेरिएंट:

- **रेडियोधर्मी लेबलिंग:** प्रारंभिक सेंगर अनुक्रमण
- **फ्लोरोसेंट लेबलिंग:** मॉडर्न ऑटोमेटेड DNA सीक्वेंसर

बी. मैक्सम-गिल्बर्ट अनुक्रमण (रासायनिक विखंडन विधि)

- 1977 में एलन मैक्सम और वाल्टर गिल्बर्ट द्वारा विकसित
- **आज कम इस्तेमाल होता है** लेकिन ऐतिहासिक रूप से महत्वपूर्ण है

सिद्धांत:

- **सिरे पर** रेडियोएक्टिव मार्कर लगा होता है
- DNA **खास बेस** (G, A+G, C, C+T) पर केमिकल तरीके से टूटता है।
- **हाई-रिज़ॉल्यूशन PAGE** से अलग किया जाता है , और पैटर्न को पढ़कर सीक्वेंस निकाला जाता है

सीमाएं: खतरनाक केमिकल और मेहनत वाला

सी. नेक्स्ट-जेनरेशन सीक्वेंसिंग (एनजीएस)

- मॉडर्न हाई-थ्रूपुट सीक्वेंसिंग जो **एक साथ लाखों DNA फ़्रैगमेंट को सीक्वेंस कर सकती है**
- **Illumina (Solexa), Ion Torrent, PacBio, Oxford Nanopore** जैसे प्लेटफॉर्म शामिल हैं

सिद्धांत:

- DNA **खंडित हो जाता है** और **एडेप्टर लिगेट हो जाते हैं**
- टुकड़ों को **एम्प्लीफाई किया जाता है** (ब्रिज एम्प्लीफिकेशन या इमल्शन PCR)
- सीक्वेंसिंग इस तरह होती है:
    - **संश्लेषण द्वारा अनुक्रमण** (इलुमिना) – प्रतिदीप्त लेबल वाले न्यूक्लियोटाइडों को सम्मिलित रूप में पहचाना गया
    - **रियल-टाइम सीक्वेंसिंग** (PacBio, Nanopore) – DNA सिंथेसिस या पोर से गुजरने का सीधा पता लगाना

फायदे: हाई-थ्रूपुट, प्रति बेस कम लागत, तेज़ सीक्वेंसिंग

---

3. मुख्य अभिकर्मक और घटक

अवयव	भूमिका
टेम्पलेट डीएनए	अनुक्रम निर्धारित किया जाना है
भजन की पुस्तक	संश्लेषण शुरू करने के लिए छोटा ओलिगोन्यूक्लियोटाइड
डीएनए पोलीमरेज़	पूरक डीएनए का संश्लेषण करता है
डीएनटीपी	बढ़ाव के लिए सामान्य न्यूक्लियोटाइड
डीडीएनटीपी	श्रृंखला-समाप्त न्यूक्लियोटाइड (सेंगर)
लेबल (रेडियोधर्मी/फ्लोरोसेंट)	टुकड़ों का पता लगाना
जेल/केशिका प्रणाली	DNA टुकड़ों को आकार के अनुसार अलग करें

---

4. DNA सीक्वेंसिंग के अनुप्रयोग

1. **जीन पहचान और लक्षण वर्णन**
2. **म्यूटेशन का पता लगाना** – पॉइंट म्यूटेशन, इंसर्शन, डिलीशन
3. **जेनेटिक डिसऑर्डर का डायग्नोसिस** – सिस्टिक फाइब्रोसिस, सिकल सेल एनीमिया, BRCA म्यूटेशन
4. **जीनोम अनुक्रमण** – बैक्टीरिया, वायरस, मनुष्य
5. **फायलोजेनेटिक अध्ययन** – विकासवादी संबंध
6. **ट्रांसक्रिप्टोम एनालिसिस (RNA-Seq)** – जीन एक्सप्रेशन का अध्ययन

---

5. फायदे

1. **सटीक न्यूक्लियोटाइड अनुक्रम** प्रदान करता है
2. **मॉलिक्यूलर क्लोनिंग, डायग्नोस्टिक्स और जीनोमिक्स** के लिए ज़रूरी
3. ऑटोमेटेड सीक्वेंसिंग से **हाई थ्रूपुट मिलता है**
4. **सिंगल न्यूक्लियोटाइड पॉलीमॉर्फिज्म (SNPs)** का पता लगा सकता है

---

6. सीमाएं

1. पारंपरिक सेंगर सीक्वेंसिंग **कम-थ्रूपुट** और **समय लेने वाली है**
2. **उच्च गुणवत्ता वाले DNA** की आवश्यकता है
3. NGS **बहुत ज़्यादा डेटा बनाता है जिसके लिए बायोइन्फ़ॉर्मेटिक्स एनालिसिस की ज़रूरत होती है**
4. शॉर्ट-रीड सीक्वेंसिंग में **रिपिटिटिव सीक्वेंस के साथ मुश्किल हो सकती है**

---

7. सेंगर बनाम NGS की तुलना

विशेषता	सेंगर	एनजीएस
प्रवाह	कम	बहुत ऊँचा
पढ़ने की लंबाई	500–1000 बीपी	50–300 bp (शॉर्ट-रीड) या >10 kb (लॉन्ग-रीड)
रफ़्तार	धीमा	तेज़
प्रति आधार लागत	उच्च	कम

विशेषता	सेंगर	एनजीएस
अनुप्रयोग	छोटे पैमाने पर अनुक्रमण, सत्यापन	संपूर्ण जीनोम, ट्रांसक्रिप्टोम, बड़े पैमाने की परियोजनाएं

डीएनए फिंगरप्रिंटिंग

DNA फिंगरप्रिंटिंग , जिसे **DNA प्रोफाइलिंग भी कहते हैं** , एक मॉलिक्यूलर बायोलॉजी तकनीक है जिसका इस्तेमाल **लोगों के DNA में खास पैटर्न के आधार पर उनकी पहचान करने के लिए किया जाता है** । यह **जीनोम के बहुत अलग-अलग हिस्सों पर निर्भर करता है** जो हर व्यक्ति में अलग-अलग होते हैं।

- **1984 में एलेक जेफ्रीस** द्वारा विकसित
- **फोरेंसिक एनालिसिस, पैटरनिटी टेस्टिंग और जेनेटिक स्टडीज़** में इस्तेमाल होता है

---

1. सिद्धांत

- बहुत अलग-अलग हिस्सों में **एक जैसा नहीं होता।**
- DNA फिंगरप्रिंटिंग **पॉलीमॉर्फिक DNA रीजन के आधार पर लोगों की पहचान करती है** , जैसे:
    1. **VNTRs (वेरिएबल नंबर टैंडम रिपीट्स):** लंबे रिपीट्स, 10–100 bp कई बार दोहराए जाते हैं
    2. **एसटीआर (शॉर्ट टैंडम रिपीट्स / माइक्रोसैटेलाइट्स):** शॉर्ट रिपीट्स, 2–6 बीपी रिपीट
    3. **SNPs (सिंगल न्यूक्लियोटाइड पॉलीमॉर्फिज्म):** सिंगल बेस चेंज (मॉडर्न प्रोफाइलिंग में इस्तेमाल होता है)
- इन हिस्सों में अंतर का पता लगाकर, हर व्यक्ति **DNA के टुकड़ों का एक खास पैटर्न बनाता है** ।

---

2. DNA फिंगरप्रिंटिंग के स्टेप्स

चरण 1: नमूना संग्रह

- DNA वाले बायोलॉजिकल सैंपल इकट्ठा करें, जैसे:
    - खून
    - लार
    - बालों के रोम
    - वीर्य
    - ऊतक

चरण 2: DNA निष्कर्षण

- स्टैंडर्ड तरीकों (फिनोल-क्लोरोफॉर्म, सिलिका कॉलम, या किट) का इस्तेमाल करके हाई-क्वालिटी DNA निकालें।
- DNA **सही सलामत और इनहिबिटर से मुक्त होना चाहिए**

चरण 3: DNA पाचन

- खास पहचान वाली जगहों पर **रेस्ट्रिक्शन एंडोन्यूक्लिएसेस (REs)** के साथ DNA को डाइजेस्ट करें
- पॉलीमॉर्फिक साइट्स के आधार पर **अलग-अलग लंबाई के DNA फ़्रैगमेंट** बनाता है

चरण 4: जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस

- DNA के टुकड़ों को **एगारोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस** (बड़े टुकड़ों के लिए) या **पॉलीएक्रिलामाइड जेल** (हाई रेजोल्यूशन के लिए) का इस्तेमाल करके अलग करें।
- छोटे टुकड़े बड़े टुकड़ों की तुलना में तेज़ी से पलायन करते हैं

स्टेप 5: मेम्ब्रेन में ट्रांसफर करें (सदर्न ब्लॉट)

- **नाइट्रोसेल्यूलोज या नायलॉन मेम्ब्रेन** पर ट्रांसफर करें
- **UV क्रॉसलिंकिंग या हीट बेकिंग का** इस्तेमाल करके DNA को ठीक करें

स्टेप 6: प्रोब के साथ हाइब्रिडाइजेशन

- VNTR या STR रीजन के कॉम्प्लिमेंट्री **लेबल्ड DNA प्रोब** के साथ मेम्ब्रेन को हाइब्रिडाइज़ करें
- प्रोब **रेडियोएक्टिव या नॉन-रेडियोएक्टिव (फ्लोरोसेंट या केमिल्यूमिनसेंट) हो सकते हैं।**

चरण 7: धुलाई

- अनबाउंड प्रोब को **अच्छी तरह धोकर निकालें**

- सिर्फ़ टारगेट रीजन के लिए **खास बाइंडिंग** पक्का करता है

चरण 8: पता लगाना

- प्रोब-बाउंड DNA टुकड़ों का पता लगाना:
  - **ऑटोरेडियोग्राफी** (रेडियोधर्मी जांच)
  - **केमिलुमिनेसेंस या फ्लोरेसेंस** (आधुनिक नॉन-रेडियोएक्टिव प्रोब)
- नतीजा **बैंड पैटर्न (DNA फिंगरप्रिंट)** हर व्यक्ति के लिए अलग होता है

---

3. आधुनिक तकनीकें

1. **पीसीआर-आधारित एसटीआर प्रोफाइलिंग**
   - **प्राइमर का** उपयोग करके विशिष्ट STR लोकाई को बढ़ाता है
   - RFLP-बेस्ड सदर्न ब्लॉटिंग की तुलना में तेज़ औ**रकम DNA की ज़रूरत होती है**
2. **केशिका वैद्युतकणसंचलन**
   - उच्च-रिज़ॉल्यूशन खंड पृथक्करण
   - ऑटोमेटेड DNA प्रोफाइलिंग के लिए फोरेंसिक लैब में इस्तेमाल किया जाता है
3. **एसएनपी-आधारित डीएनए फिंगरप्रिंटिंग**
   - सिंगल न्यूक्लियोटाइड वेरिएशन का पता लगाने के लिए एरे या सीक्वेंसिंग का इस्तेमाल करता है

---

4. DNA फिंगरप्रिंटिंग के अनुप्रयोग

1. **फोरेंसिक विज्ञान**
   - आपराधिक जांच में संदिग्धों की पहचान करना
   - क्राइम सीन DNA को लोगों से मिलाना
2. **पितृत्व और मातृत्व परीक्षण**
   - जैविक माता-पिता का निर्धारण
3. **अवशेषों की पहचान**
   - बड़े पैमाने पर आपदाएँ, लापता लोग, या ऐतिहासिक नमूने
4. **जनसंख्या आनुवंशिकी और वंशावली**
   - आनुवंशिक विविधता, वंश और वंशावली का अध्ययन करें
5. **चिकित्सा अनुप्रयोग**
   - वंशानुगत आनुवंशिक विकारों का पता लगाना

---

5. फायदे

1. बहुत **खास और भरोसेमंद** – हर व्यक्ति के लिए लगभग अनोखा
2. **DNA की बहुत कम मात्रा की** आवश्यकता होती है
3. कई तरह के बायोलॉजिकल सैंपल पर लागू
4. तेज़ी से फोरेंसिक एनालिसिस के लिए **ऑटोमेटेड किया** जा सकता है

---

6. सीमाएं

1. **खराब DNA** सटीकता कम करता है
2. PCR-आधारित तरीके **दूषित DNA को बढ़ा सकते हैं**
3. RFLP-आधारित तरीकों के लिए **बड़े, हाई-क्वालिटी DNA सैंपल की ज़रूरत होती है**
4. **प्राइवेसी और DNA जानकारी के गलत इस्तेमाल से** जुड़ी नैतिक चिंताएं

---

7. तुलना: RFLP बनाम STR प्रोफाइलिंग

विशेषता	आरएफएलपी (वीएनटीआर)	एसटीआर (पीसीआर-आधारित)
डीएनए आवश्यक है	बड़ा, उच्च गुणवत्ता वाला	छोटा, यहाँ तक कि क्षीण भी
समय	कई दिनों	1–2 दिन
संकल्प	उच्च	उच्च, स्वचालित
उपयोग	ऐतिहासिक विधि	आधुनिक फोरेंसिक पद्धति
संवेदनशीलता	कम	उच्च

- **DNA फिंगरप्रिंटिंग:** यूनिक **पॉलीमॉर्फिक DNA सीक्वेंस के आधार पर लोगों की पहचान करता है**
- **मुख्य पॉलीमॉर्फिक क्षेत्र:** VNTRs, STRs, SNPs
- **स्टेप्स:** सैंपल कलेक्शन → DNA एक्सट्रैक्शन → डाइजेशन → जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस → ट्रांसफर → प्रोब हाइब्रिडाइजेशन → वॉशिंग → डिटेक्शन → बैंड पैटर्न एनालिसिस
- **एप्लीकेशन:** फोरेंसिक, पैटरनिटी टेस्टिंग, पॉपुलेशन जेनेटिक्स, मेडिकल डायग्नोस्टिक्स
- **फायदे:** खास, भरोसेमंद, छोटे सैंपल पर लागू
- **सीमाएं:** DNA की क्वालिटी पर निर्भर, नैतिक बातें

रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी (RDT) के अनुप्रयोग

रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी (RDT) में **DNA सीक्वेंस में बदलाव करके नए जेनेटिक कॉम्बिनेशन बनाए जाते हैं** जिन्हें अलग-अलग कामों के लिए जीवों में डाला जा सकता है। इसके इस्तेमाल **दवा, खेती, इंडस्ट्री और बेसिक रिसर्च में होते हैं**।

---

1. चिकित्सा अनुप्रयोग

A. चिकित्सीय प्रोटीन का उत्पादन

- रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी माइक्रोबियल या मैमेलियन सेल्स में **ह्यूमन प्रोटीन बनाने की सुविधा देती है।**
- **उदाहरण:**
    1. **इंसुलिन:** ह्यूमन इंसुलिन जीन को *E. coli में क्लोन किया गया* → डायबिटीज के लिए रिकॉम्बिनेंट इंसुलिन
    2. **ग्रोथ हार्मोन (hGH):** ग्रोथ की कमियों का इलाज करता है
    3. **एरिथ्रोपोइटिन (EPO):** किडनी फेलियर के मरीजों में एनीमिया का इलाज करता है
    4. **क्लॉटिंग फैक्टर (फैक्टर VIII, IX):** हीमोफीलिया का इलाज करें

महत्व: सुरक्षित, शुद्ध, और जानवरों से मिलने वाले प्रोटीन पर निर्भरता कम करता है।

बी. जीन थेरेपी

- जेनेटिक बीमारियों को ठीक करने के लिए **मरीज़ की कोशिकाओं में फंक्शनल जीन** डालना।
- **उदाहरण: गंभीर कंबाइंड इम्यूनोडेफिशिएंसी (SCID) के मरीज़ों का इलाज** बोन मैरो सेल्स में **फंक्शनल ADA जीन** डालकर किया जाता है।
- **एक्स विवो** (शरीर के बाहर सेल्स को मॉडिफाई करना) या **इन विवो** (सीधे मरीज़ में) हो सकता है।

महत्व: खराब जीन को बदलकर जेनेटिक बीमारियों का संभावित इलाज।

C. टीकों का उत्पादन

- रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी का इस्तेमाल **सुरक्षित और असरदार वैक्सीन बनाने के लिए किया जाता है** :
    1. **हेपेटाइटिस B वैक्सीन:** सरफेस एंटीजन जीन को यीस्ट में क्लोन किया गया → रिकॉम्बिनेंट वैक्सीन
    2. **HPV वैक्सीन:** रिकॉम्बिनेंट वायरस जैसे कण

- **DNA वैक्सीन** बनाने में भी किया जाता है, जहाँ एंटीजन को एनकोड करने वाले प्लास्मिड को सीधे इंजेक्ट किया जाता है।

D. मोनोक्लोनल एंटीबॉडी

- थेरेपी के लिए **ह्यूमनाइज़्ड मोनोक्लोनल एंटीबॉडीज़** का प्रोडक्शन करने में मदद करता है :
    - **ट्रास्टुज़ुमैब (हर्सेप्टिन):** ब्रेस्ट कैंसर थेरेपी
    - **एडालिमुमैब (हुमिरा):** ऑटोइम्यून बीमारियाँ

महत्व: बीमारी के मॉलिक्यूल्स को टारगेट करने वाला बहुत खास इलाज।

ई. डायग्नोस्टिक्स

- रिकॉम्बिनेंट DNA तकनीक **पैथोजन्स या जेनेटिक डिसऑर्डर्स का पता लगाने में सुधार करती है** :
    - **HIV, हेपेटाइटिस वायरस, टीबी** का PCR-आधारित पता लगाना
    - **जीन उत्परिवर्तन** का माइक्रोएरे-आधारित पता लगाना

---

2. कृषि अनुप्रयोग

A. आनुवंशिक रूप से संशोधित (जीएम) फसलें

- पौधों में **ज़रूरी गुणों के लिए जीन** डालना :
    1. **कीट प्रतिरोधक क्षमता:** *बैसिलस थुरिंजिएंसिस* से बीटी जीन → कीट-प्रतिरोधी फसलें
    2. **हर्बिसाइड टॉलरेंस:** EPSPS जीन → ग्लाइफोसेट-रेसिस्टेंट फसलें
    3. **रोग प्रतिरोधक क्षमता:** वायरल, बैक्टीरियल या फंगल प्रतिरोधक क्षमता देने वाले जीन

महत्व: पैदावार में सुधार, पेस्टिसाइड का इस्तेमाल कम करना, फूड सिक्योरिटी को बढ़ाना ।

B. बेहतर पोषण गुणवत्ता

- रिकॉम्बिनेंट DNA का इस्तेमाल करके बायोफोर्टिफिकेशन:

- **गोल्डन राइस:** बीटा-कैरोटीन (विटामिन A का प्रीकर्सर) प्रोडक्शन
- बेहतर प्रोटीन के लिए **हाई-लाइसिन कॉर्न**

C. पशु जैव प्रौद्योगिकी

- ट्रांसजेनिक जानवरों का उत्पादन इनके लिए किया जाता है:
  1. **बेहतर ग्रोथ:** गायों, सूअरों या मछलियों में ग्रोथ हार्मोन जीन डालना
  2. **रोग प्रतिरोधक क्षमता:** जैसे, ट्रांसजेनिक सूअर कुछ वायरस के प्रति प्रतिरोधक होते हैं
  3. **बायोरिएक्टर:** दूध में थेराप्यूटिक प्रोटीन बनाने वाले जानवर (जैसे, एंटीथ्रोम्बिन)

---

3. औद्योगिक और पर्यावरणीय अनुप्रयोग

A. एंजाइम उत्पादन

- रिकॉम्बिनेंट माइक्रोब्स **इंडस्ट्रियल एंजाइम बनाते हैं** :
  - डिटर्जेंट के लिए एमाइलेज, लाइपेज, प्रोटीएज
  - जैव ईंधन उत्पादन के लिए सेल्यूलेस
- नेचुरल सोर्स की तुलना में ज़्यादा कुशल, सस्ता और स्केलेबल।

बी. जैवउपचार

- जेनेटिकली इंजीनियर्ड बैक्टीरिया **टॉक्सिक पॉल्यूटेंट्स को खत्म कर सकते हैं** :
  - तेल रिसाव की सफाई
  - भारी धातु विषहरण

महत्व: इको-फ्रेंडली प्रदूषण मैनेजमेंट।

C. जैव ईंधन

- बायोमास से **इथेनॉल, ब्यूटेनॉल या हाइड्रोजन बनाने** के लिए ऑप्टिमाइज़ किए गए रिकॉम्बिनेंट माइक्रोऑर्गेनिज़्म
- बायोफ्यूल प्रोडक्शन की एफिशिएंसी बढ़ाना।

---

4. रिसर्च एप्लीकेशन

A. कार्यात्मक जीनोमिक्स

- जीन फ़ंक्शन का अध्ययन करें:
  - **जीन नॉकआउट** (कार्य-हानि)
  - **जीन नॉक-इन** या ट्रांसजेनिक ओवरएक्सप्रेशन
- **बीमारी के तरीके, मेटाबोलिक रास्ते और डेवलपमेंटल बायोलॉजी को** समझने में मदद करता है

बी. प्रोटीन इंजीनियरिंग

- **बेहतर स्टेबिलिटी, एक्टिविटी या स्पेसिफिसिटी** के लिए प्रोटीन को मॉडिफाई करें
- फार्मास्यूटिकल्स, डिटर्जेंट और इंडस्ट्रियल कैटेलिसिस में इस्तेमाल होता है

C. मॉडल जीव

- रिकॉम्बिनेंट DNA से **ट्रांसजेनिक चूहे, ज़ेब्राफ़िश या पौधों** का अध्ययन किया जा सकता है:
  - मानव रोग
  - दवा के प्रभाव
  - जीन विनियमन

---

5. रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी के फायदे

1. **हाई स्पेसिफिसिटी और एफिशिएंसी** – एकदम सही जीन को क्लोन और एक्सप्रेस किया जा सकता है
2. प्रोटीन और एंजाइमों का **बड़े पैमाने पर उत्पादन**
3. जानवरों से मिलने वाले उत्पादों के **सुरक्षित विकल्प**
4. दवा और कृषि में **रिसर्च और डेवलपमेंट को तेज़ करता है**
5. बायोरेमेडिएशन और बायोफ्यूल में **पर्यावरण के अनुकूल एप्लीकेशन**

---

6. सीमाएं और चिंताएं

1. **नैतिक मुद्दे** – जीन थेरेपी, GM फसलें, और ट्रांसजेनिक जानवर
2. **बायोसेफ्टी की चिंताएँ** – अनचाहे इकोलॉजिकल असर की संभावना
3. **रेगुलेटरी रुकावटें** – क्लिनिकल और एग्रीकल्चरल एप्लीकेशन पर सख्त कंट्रोल
4. **तकनीकी सीमाएं** – होस्ट सिस्टम में जीन एक्सप्रेशन अलगअलग हो सकता है

- **रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी** होस्ट ऑर्गेनिज़्म में **जीन क्लोनिंग, मैनिपुलेशन और एक्सप्रेशन की** इजाज़त देती है ।
- **अनुप्रयोग:**
    1. **मेडिसिन:** थेराप्यूटिक प्रोटीन, वैक्सीन, मोनोक्लोनल एंटीबॉडी, जीन थेरेपी, डायग्नोस्टिक्स
    2. **खेती:** GM फसलें, बेहतर पोषण, बीमारी-रोधी जानवर
    3. **इंडस्ट्री:** एंजाइम, बायोफ्यूल, बायोरेमेडिएशन
    4. **रिसर्च:** फंक्शनल जीनोमिक्स, प्रोटीन इंजीनियरिंग, ट्रांसजेनिक मॉडल
- **फायदे:** खास, स्केलेबल औरकई तरह से इस्तेमाल होने वाले
- **सीमाएं:** नैतिक, सुरक्षा और तकनीकी चुनौतियां

कृषि में पुनः संयोजक डीएनए प्रौद्योगिकी

खेती में **रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी (RDT) में पौधों या जानवरों में जीन डालना, बदलना या हटाना शामिल है, ताकि ज़्यादा पैदावार, कीड़ों से लड़ने की ताकत, बीमारियों से लड़ने की ताकत, न्यूट्रिशन बढ़ाना और स्ट्रेस सहने की ताकत** जैसे अच्छे गुण डेवलप किए जा सकें ।

इसने **जेनेटिकली मॉडिफाइड (GM) फसलें औरबेहतर** गुणों वाले ट्रांसजेनिक जानवर पैदा करके **मॉडर्न खेती में क्रांति ला दी है।**

---

1. सिद्धांत

- **पौधों, माइक्रोब्स या दूसरे जीवों** से ज़रूरी जीन को अलग किया जाता है, क्लोन किया जाता है, और**रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी** का इस्तेमाल करके **फसल या जानवरों की प्रजातियों** के जीनोम में डाला जाता है ।
- इन जीन्स को अक्सर **एग्रोबैक्टीरियम-मीडिएटेड ट्रांसफॉर्मेशन** , **जीन गन (बायोलिस्टिक्स)** , या **जानवरों में माइक्रोइंजेक्शन का इस्तेमाल करके डिलीवर किया जाता है** ।
- होस्ट में विदेशी जीन का एक्सप्रेशन **बेहतर खेती के गुण देता है** ।

---

2. खेती में जीन इंट्रोडक्शन के तरीके

तरीका	सिद्धांत	आवेदन
एग्रोबैक्टीरियम-मध्यस्थ परिवर्तन	मिट्टी का बैक्टीरिया *एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमेफैसियंस* प्राकृतिक रूप से T-DNA को पौधे के जीनोम में ट्रांसफर करता है	टमाटर, तंबाकू, कपास जैसे द्विबीजपत्री पौधों के लिए व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है
जीन गन / बायोलिस्टिक्स	DNA-कोटेड पार्टिकल्स पौधों की कोशिकाओं में जाते हैं; जीनोम में मिल जाते हैं।	मक्का, चावल, गेहूं जैसे मोनोकोट के लिए उपयोग किया जाता है
इलेक्ट्रोपोरेशन / प्रोटोप्लास्ट संलयन	इलेक्ट्रिकल पल्स सेल मेम्ब्रेन की परमीएबिलिटी बढ़ाते हैं; DNA अंदर जाता है	संकर पौधों का उत्पादन
microinjection	भ्रूण या युग्मनज में DNA का सीधा इंजेक्शन	ट्रांसजेनिक जानवरों में उपयोग किया जाता है
CRISPR/Cas जीन संपादन	जीन का लक्षित संशोधन या सम्मिलन/विलोपन	पौधों और जानवरों में सटीक संशोधन

---

3. पौधों में उपयोग

A. कीट प्रतिरोध

- **समस्या:** कीड़े-मकौड़े और पेस्ट्स से फसल को बहुत नुकसान होता है।
- **समाधान:** कीटनाशक प्रोटीन को एन्कोड करने वाले **Bt (बैसिलस थुरिंजिएंसिस) जीन का** इस्तेमाल करें ।
- **उदाहरण:** बीटी कपास, बीटी मक्का
- **फ़ायदा:** पेस्टिसाइड का इस्तेमाल कम करता है, पैदावार बढ़ाता है, पर्यावरण के लिए अच्छा है।

B. शाकनाशी सहिष्णुता

- **समस्या:** खरपतवार पोषक तत्वों के लिए फसलों से मुकाबला करते हैं।
- **समाधान: हर्बिसाइड टॉलरेंस** के लिए जीन डालें (जैसे, ग्लाइफोसेट रेजिस्टेंस के लिए EPSPS जीन)।
- **उदाहरण:** राउंडअप रेडी सोयाबीन और मक्का
- **फ़ायदा:** खरपतवार का मैनेजमेंट आसान होता है, हाथ से काम करने की ज़रूरत और केमिकल का इस्तेमाल कम होता है।

C. रोग प्रतिरोधक क्षमता

- **फंगल, बैक्टीरियल या वायरल पैथोजन्स** के लिए रेजिस्टेंस देने वाले जीन्स का इस्तेमाल करें।
- **उदाहरण:** पपीता रिंगस्पॉट वायरस-प्रतिरोधी पपीता (PRSV-प्रतिरोधी पपीता)
- **फ़ायदा:** पैदावार की सुरक्षा करता है, फसल का नुकसान कम करता है।

D. अजैविक तनाव सहनशीलता

- **सूखा, खारापन, गर्मी या ठंड** झेलने के लिए बदलें।
- **उदाहरण:** नमक-सहिष्णु चावल, सूखा-सहिष्णु मक्का
- **फ़ायदा:** खराब मौसम में खेती करने से फूड प्रोडक्शन स्थिर रहता है।

ई. पोषण संवर्धन (बायोफोर्टिफिकेशन)

- फसलों में **विटामिन, मिनरल और ज़रूरी अमीनो एसिड** का लेवल बढ़ाएं।
- **उदाहरण:**
    - **गोल्डन राइस:** चावल के एण्डोस्पर्म में बीटा-कैरोटीन (विटामिन A का प्रीकर्सर)
    - **हाई-लाइसिन कॉर्न:** प्रोटीन की क्वालिटी बेहतर करता है
- **फ़ायदा:** विकासशील देशों में कुपोषण कम होता है।

एफ. बेहतर शेल्फ लाइफ

- **समस्या:** तेज़ी से खराब होने से खाने की उपलब्धता कम हो जाती है।
- **समाधान: पकने और बुढ़ापे** में देरी करने वाले जीन का इस्तेमाल करें।
- **उदाहरण:** कम पॉलीगैलेक्टुरोनेज एक्टिविटी वाला फ्लेवर सेवर टमाटर
- **फ़ायदा:** शेल्फ़ लाइफ़ लंबी होती है, कटाई के बाद होने वाले नुकसान कम होते हैं।

---

4. जानवरों में अनुप्रयोग

A. बढ़ी हुई वृद्धि और उत्पादकता

- **ग्रोथ हार्मोन (GH) या इंसुलिन-लाइक ग्रोथ फैक्टर (IGF)** के लिए जीन का परिचय दें।
- **उदाहरण:** तेज़ विकास दर वाली ट्रांसजेनिक मछली या पशुधन

- **फ़ायदा:** मांस, दूध और अंडे का प्रोडक्शन बढ़ा

बी. रोग प्रतिरोधक क्षमता

- **वायरल या बैक्टीरियल बीमारियों** के लिए रेजिस्टेंस देने वाले जीन डालें।
- **उदाहरण:** सूअरों को पोर्सिन रिप्रोडक्टिव एंड रेस्पिरेटरी सिंड्रोम वायरस (PRRSV) से बचाने के लिए बनाया गया
- **फ़ायदा:** नुकसान कम होता है, फ़ूड सिक्योरिटी बेहतर होती है

C. चिकित्सीय प्रोटीन का उत्पादन

- जानवर **बायोरिएक्टर की तरह काम करते हैं** , दूध या अंडे में प्रोटीन बनाते हैं।
- **उदाहरण:** बकरियां दूध में एंटीथ्रोम्बिन बनाती हैं
- **फ़ायदा:** खेती वाले जानवरों का इस्तेमाल करके बड़े पैमाने पर दवाइयों का प्रोडक्शन

---

5. खेती में RDT के फायदे

1. **उच्च उपज** और उत्पादकता
2. **कीटनाशक और शाकनाशी के उपयोग में कमी**
3. फसलों में **पोषक तत्वों की मात्रा में वृद्धि**
4. **अजैविक और जैविक तनाव सहनशीलता**
5. पारंपरिक तरीकों की तुलना में **पर्यावरण के अनुकूल**
6. पारंपरिक ब्रीडिंग की तुलना में **तेज़ विकास**

---

6. सीमाएं और चिंताएं

1. GMOs के संबंध में **नैतिक और सामाजिक चिंताएँ**
2. **बायोसेफ्टी रिस्क:** जंगली प्रजातियों में जीन फ्लो, इकोलॉजिकल इम्बैलेंस
3. **विनियामक बाधाएं** और सार्वजनिक स्वीकृति के मुद्दे
4. **विकास और व्यावसायीकरण की लागत**
5. कुछ मामलों में संभावित **एलर्जिक रिएक्शन या अनचाहे असर**

- **खेती में RDT:** इसमें फसलों और जानवरों को बेहतर बनाने के लिए जीन डालना या बदलना शामिल है

- **मुख्य अनुप्रयोग:**
    - **पौधे:** पेस्ट रेजिस्टेंस (Bt), हर्बिसाइड टॉलरेंस, डिजीज रेजिस्टेंस, स्ट्रेस टॉलरेंस, बायोफोर्टिफिकेशन, बेहतर शेल्फ लाइफ
    - **जानवर:** ग्रोथ बढ़ाना, बीमारी से बचाव, बायोफार्मिंग
- **तरीके:** एग्रोबैक्टीरियम-मीडिएटेड ट्रांसफॉर्मेशन, जीन गन, CRISPR/Cas, माइक्रोइंजेक्शन
- **फायदे:** ज़्यादा पैदावार, स्ट्रेस रेजिस्टेंस, बेहतर न्यूट्रिशन, कम केमिकल का इस्तेमाल
- **सीमाएं:** नैतिक चिंताएं, बायोसेफ्टी, रेगुलेटरी बाधाएं

चिकित्सा में पुनः संयोजक डीएनए प्रौद्योगिकी

रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी (RDT) में थेराप्यूटिक मॉलिक्यूल, वैक्सीन या जेनेटिकली मॉडिफाइड सेल्स बनाने के लिए **DNA सीक्वेंस में बदलाव किया** जाता है। मेडिसिन में, इसने **बीमारी के डायग्नोसिस, थेरेपी और वैक्सीन डेवलपमेंट में क्रांति ला दी है**।

---

1. सिद्धांत

- **खास इंसानी प्रोटीन, एंटीजन या जीन को** एनकोड करने वाले DNA के टुकड़ों को **सही वेक्टर** (प्ला◌ास्मिड, वायरस) में क्लोन किया जाता है।
- इन वेक्टर्स को **होस्ट सेल्स** (बैक्टीरिया, यीस्ट, मैमेलियन सेल्स) में डाला जाता है, जो **प्रोटीन को एक्सप्रेस करते हैं** या **फंक्शनल जीन को कैरी करते हैं**।
- रिकॉम्बिनेंट प्रोडक्ट्स को **शुद्ध किया जाता है और थेरेपी, वैक्सीनेशन या डायग्नोस्टिक्स के लिए इस्तेमाल किया जाता है**।

---

2. चिकित्सा में अनुप्रयोग

A. चिकित्सीय प्रोटीन का उत्पादन

- **समस्या:** थेरेपी के लिए ज़रूरी कई ह्यूमन प्रोटीन पहले **खून, टिशू या जानवरों से निकाले जाते थे**, जिससे **सुरक्षा का खतरा रहता था** और सप्लाई भी सीमित थी।
- **समाधान:** RDT माइक्रोब्स या मैमेलियन सेल्स में ह्यूमन प्रोटीन का **सुरक्षित और बड़े पैमाने पर प्रोडक्शन संभव बनाता है।**

उदाहरण:

प्रोटीन	स्रोत और अभिव्यक्ति	चिकित्सा उपयोग

प्रोटीन	स्रोत और अभिव्यक्ति	चिकित्सा उपयोग
इंसुलिन	*ई. कोलाई* या यीस्ट में ह्यूमन इंसुलिन जीन	मधुमेह का इलाज
मानव विकास हार्मोन (hGH)	जीवाणु/यीस्ट कोशिकाओं में क्लोन किया गया	ग्रोथ हार्मोन की कमी का इलाज करें
एरिथ्रोपोइटिन (ईपीओ)	स्तनधारी कोशिकाओं	क्रोनिक किडनी रोग में एनीमिया का इलाज करें
थक्के कारक (कारक VIII, IX)	पुनर्संयोजक स्तनधारी कोशिकाएं	हीमोफीलिया का इलाज
इंटरफेरॉन (α, β, γ)	पुनर्संयोजक अभिव्यक्ति	एंटीवायरल और एंटीकैंसर थेरेपी
इंटरल्यूकिन्स	पुनः संयोजक जीवाणु या स्तनधारी कोशिकाएं	कैंसर में इम्यूनोथेरेपी

महत्व: सुरक्षित, शुद्ध, और जानवरों से मिलने वाले प्रोटीन में मौजूद पैथोजन्स से होने वाले कंटैमिनेशन से बचाता है।

बी. जीन थेरेपी

- **परिभाषा:** जेनेटिक कमियों को ठीक करने के लिए **मरीज़ की कोशिकाओं में फंक्शनल जीन** डालना ।
- **दृष्टिकोण:**
    1. **एक्स विवो:** मरीज़ के सेल्स को निकाल दिया जाता है, इन विट्रो में जेनेटिकली मॉडिफाई किया जाता है, और फिर से डाला जाता है (जैसे, ADA-SCID थेरेपी)।
    2. **इन विवो:** वेक्टर्स (वायरल या नॉन-वायरल) का इस्तेमाल करके मरीज़ में थेराप्यूटिक जीन की डायरेक्ट डिलीवरी।

उदाहरण:

- **गंभीर कंबाइंड इम्यूनोडेफिशिएंसी (SCID):** फंक्शनल ADA जीन रेट्रोवायरल वेक्टर के ज़रिए दिया जाता है
- **लेबर का जन्मजात अमायरोसिस (LCA):** RPE65 जीन रेटिना तक पहुंचाया गया
- **हीमोफीलिया बी:** फैक्टर IX जीन थेरेपी

महत्व: जेनेटिक बीमारियों का संभावित परमानेंट इलाज।

C. वैक्सीन विकास

- **ज़्यादा सुरक्षित और असरदार वैक्सीन** बनाई जा सकती हैं ।

उदाहरण:

- **हेपेटाइटिस B वैक्सीन:** यीस्ट में क्लोन किया गया सरफेस एंटीजन (HBsAg) जीन → रिकॉम्बिनेंट वैक्सीन
- **ह्यूमन पेपिलोमावायरस (HPV) वैक्सीन:** L1 प्रोटीन जीन → वायरस जैसे कण
- **मलेरिया और COVID-19 वैक्सीन:** वेक्टर या प्रोटीन प्लेटफॉर्म में एक्सप्रेस होने वाले एंटीजन जीन

फ़ायदा: ज़िंदा पैथोजन्स की ज़रूरत नहीं; इन्फेक्शन का खतरा कम हो जाता है।

D. मोनोक्लोनल एंटीबॉडी (mAbs)

- **ह्यूमनाइज़्ड या पूरी तरह से ह्यूमन mAbs को खास बीमारी के इलाज** के लिए रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी का इस्तेमाल करके बनाया जाता है ।

उदाहरण:

मोनोक्लोनल एंटीबॉडी	**लक्ष्य**	**नैदानिक उपयोग**
ट्रैस्टुज़ुमैब (हर्सेप्टिन)	HER2 रिसेप्टर	स्तन कैंसर
एडालिमुमैब (हुमिरा)	टीएनएफ-α	ऑटोइम्यून रोग (आरए, क्रोहन)
रिटक्सिमैब	बी कोशिकाओं पर CD20	लिम्फोमा, ऑटोइम्यून विकार

महत्व: बहुत खास टारगेटेड थेरेपी, कम साइड इफ़ेक्ट।

ई. डायग्नोस्टिक्स

- रिकॉम्बिनेंट DNA टूल्स मेडिकल डायग्नोस्टिक्स में **सेंसिटिविटी और स्पेसिफिसिटी को बढ़ाते हैं।**

अनुप्रयोग:

1. **PCR-आधारित पहचान** – HIV, हेपेटाइटिस वायरस, टीबी
2. **रीकॉम्बिनेंट एंटीजन के साथ ELISA** – वायरल इन्फेक्शन के खिलाफ एंटीबॉडी का पता लगाता है
3. **माइक्रोएरे और DNA चिप्स** – जेनेटिक म्यूटेशन या पैथोजन सीक्वेंस का पता लगाते हैं

फ़ायदा: तेज़, सटीक, और पैथोजन या म्यूटेशन के कम लेवल का पता लगाने में सक्षम।

एफ. कैंसर थेरेपी

- **टारगेटेड जीन थेरेपी** और रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन कैंसर के इलाज में सुधार करते हैं:
    - रिकॉम्बिनेंट **साइटोकाइन्स** (इंटरफेरॉन, इंटरल्यूकिन्स)
    - **सुसाइड जीन्स** : ट्यूमर सेल्स में ऐसे जीन्स डालना जिनसे सेलेक्टिव सेल डेथ होती है
    - इम्यूनोथेरेपी के लिए रिकॉम्बिनेंट mAbs (जैसे, चेकपॉइंट इनहिबिटर)

---

3. मेडिकल आरडीटी में तरीके और टूल्स

1. **वेक्टर:** प्लास्मिड, वायरल वेक्टर (रेट्रोवायरस, एडेनोवायरस, लेंटिवायरस)
2. **होस्ट सिस्टम:** बैक्टीरिया (*E. coli*), यीस्ट (*Saccharomyces cerevisiae*), मैमेलियन सेल्स (CHO, HEK293)
3. **जीन एडिटिंग टूल्स:** जीन के सटीक मॉडिफिकेशन के लिए CRISPR/Cas
4. **प्रोटीन प्यूरिफिकेशन सिस्टम:** थेराप्यूटिक प्रोटीन के लिए एफिनिटी क्रोमैटोग्राफी

---

4. फायदे

1. मानव प्रोटीन का **सुरक्षित और प्रभावी उत्पादन**
2. थेरेपी और डायग्नोस्टिक्स में **उच्च विशिष्टता**
3. जीन थेरेपी से जेनेटिक बीमारियों का **पक्का इलाज**
4. **तेजी से वैक्सीन विकास**
5. जानवरों या इंसानों से होने वाले **कंटैमिनेशन का खतरा** कम करता है

---

5. सीमाएं और चुनौतियां

1. जीन थेरेपी और जेनेटिक मॉडिफिकेशन के बारे में **नैतिक चिंताएं**
2. वेक्टर या रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन के प्रति **प्रतिरक्षा प्रतिक्रियाएं**
3. विकास और उत्पादन की **उच्च लागत**
4. **विनियामक और सुरक्षा चुनौतियाँ**
5. जीन थेरेपी में संभावित **ऑफ-टारगेट प्रभाव**

---

6. समरी (एग्जाम के लिए तैयार पॉइंट्स)

- **मेडिसिन में RDT:** थेराप्यूटिक प्रोटीन, वैक्सीन, डायग्नोस्टिक्स और जीन थेरेपी के लिए जीन की क्लोनिंग, मॉडिफिकेशन और एक्सप्रेसिंग
- **मुख्य अनुप्रयोग:**
    1. थेराप्यूटिक प्रोटीन (इंसुलिन, hGH, क्लॉटिंग फैक्टर, साइटोकाइन्स)
    2. जीन थेरेपी (SCID, हीमोफीलिया, रेटिनल डिसऑर्डर)
    3. टीके (हेपेटाइटिस बी, एचपीवी, कोविड-19)
    4. मोनोक्लोनल एंटीबॉडी (ट्रैस्टुजुमाब, एडालिमुमैब)
    5. डायग्नोस्टिक्स (PCR, ELISA, DNA चिप्स)
- **फायदे:** खास, सुरक्षित, स्केलेबल, बीमारी पर टारगेटेड
- **सीमाएं:** नैतिक, बायोसेफ्टी, लागत, इम्यून रिस्पॉन्स

स्वास्थ्य में पुनः संयोजक डीएनए प्रौद्योगिकी

रिकॉम्बिनेंट DNA टेक्नोलॉजी (RDT) मॉलिक्यूलर बायोलॉजी टूल्स का एक सेट है जो **जीन में बदलाव करके** फायदेमंद प्रोडक्ट बनाने, बीमारी के मैनेजमेंट को बेहतर बनाने और हेल्थकेयर को बेहतर बनाने की इजाज़त देता है। हेल्थ साइंस में, इसके इस्तेमाल **थेराप्यूटिक्स, डायग्नोस्टिक्स, वैक्सीन, जीन थेरेपी और पब्लिक हेल्थ मैनेजमेंट तक फैले हुए हैं**।

---

1. सिद्धांत

- **थेराप्यूटिक या डायग्नोस्टिक प्रोटीन को** एनकोड करने वाले DNA फ़्रैगमेंट को **वेक्टर** (प्लास्मिड, वायरस) में क्लोन किया जाता है ।
- इन वेक्टर्स को **होस्ट सेल्स** (बैक्टीरिया, यीस्ट, मैमेलियन सेल्स) में डाला जाता है, जो ज़रूरी प्रोटीन या जीन को एक्सप्रेस करते हैं।
- रिकॉम्बिनेंट प्रोडक्ट को **इलाज, डायग्नोसिस या प्रिवेंटिव हेल्थकेयर के लिए प्यूरिफाई किय०ा जा सकता है** ।

---

2. स्वास्थ्य में अनुप्रयोग

A. चिकित्सीय प्रोटीन का उत्पादन

- इंसानों में नैचुरली पाए जाने वाले कई प्रोटीन अब RDT का इस्तेमाल करके **सुरक्षित रूप से और बड़ी मात्रा में बनाए जा सकते हैं।**

उदाहरण:

प्रोटीन	स्रोत/अभिव्यक्ति	स्वास्थ्य अनुप्रयोग
इंसुलिन	*ई. कोलाई* या यीस्ट में मानव जीन	मधुमेह का उपचार
मानव विकास हार्मोन (hGH)	जीवाणु या स्तनधारी कोशिकाएं	वृद्धि विकारों का इलाज करें
एरिथ्रोपोइटिन (ईपीओ)	स्तनधारी कोशिकाओं	किडनी फेलियर में एनीमिया का इलाज
थक्के कारक (VIII, IX)	पुनर्संयोजक स्तनधारी कोशिकाएं	हीमोफीलिया प्रबंधन
इंटरफेरॉन	पुनर्संयोजक जीवाणु/स्तनधारी कोशिकाएं	एंटीवायरल थेरेपी (HCV, HBV) और कैंसर इम्यूनोथेरेपी
इंटरल्यूकिन्स	पुनर्संयोजक अभिव्यक्ति	कैंसर थेरेपी में इम्यून मॉड्यूलेशन

महत्व: सुरक्षित, एक जैसे और पैथोजन-फ्री प्रोटीन देता है , जिससे जानवरों या इंसानों के टिशू सोर्स पर निर्भरता कम होती है।

बी. जीन थेरेपी

- **जीन थेरेपी का मकसद** मरीज़ के सेल्स में फंक्शनल जीन डालकर **जेनेटिक बीमारियों को** ठीक करना है ।

तरीके:

1. **एक्स विवो:** मरीज़ से सेल्स निकाले गए → जीन डाला गया → सेल्स वापस आए(जैसे, ADA-SCID)
2. **इन विवो:** वायरल/नॉन-वायरल वेक्टर के ज़रिए जीन सीधे मरीज़ में पहुंचाया जाता है

स्वास्थ्य में उदाहरण:

- **गंभीर संयुक्त इम्यूनोडेफिशियेंसी (SCID):** ADA जीन थेरेपी
- **हीमोफीलिया बी:** फैक्टर IX जीन थेरेपी
- **वंशानुगत रेटिनल रोग:** RPE65 जीन थेरेपी

महत्व: यह सिर्फ़ लक्षणों को मैनेज करने के बजाय **जेनेटिक बीमारियों को ठीक** कर सकता है ।

C. वैक्सीन विकास

- ज़िंदा पैथोजन्स का इस्तेमाल किए बिना **ज़्यादा सुरक्षित और असरदार वैक्सीन** बनाने में मदद की है ।

उदाहरण:

- **हेपेटाइटिस B वैक्सीन:** यीस्ट में एक्सप्रेस होने वाला रिकॉम्बिनेंट HBsAg
- **HPV वैक्सीन:** L1 प्रोटीन वायरस जैसे कणों के रूप में दिखाई देता है
- **COVID-19 वैक्सीन:** mRNA-बेस्ड या रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन वैक्सीन

महत्व: इससे इन्फेक्शन का खतरा कम होता है, पब्लिक हेल्थ बेहतर होती है, और महामारी के दौरान वैक्सीन का तेज़ी से प्रोडक्शन हो पाता है।

डी. निदान

- रिकॉम्बिनेंट DNA-बेस्ड तकनीकों ने **डायग्नोस्टिक एक्यूरेसी में क्रांति ला दी है** ।

अनुप्रयोग:

1. **पीसीआर-आधारित पहचान:** एचआईवी, हेपेटाइटिस बी और सी, टीबी
2. **रिकॉम्बिनेंट एंटीजन के साथ ELISA:** वायरल इन्फेक्शन के एंटीबॉडी का पता लगाना
3. **माइक्रोएरे/DNA चिप्स:** एक साथ कई पैथोजन्स या जीन म्यूटेशन्स का पता लगाते हैं

महत्व: बीमारियों का तेज़, सेंसिटिव और बहुत खास पता लगाना।

ई. थेरेपी के लिए मोनोक्लोनल एंटीबॉडी

- **, टारगेटेड थेरेपी** के लिए **ह्यूमनाइज़्ड या पूरी तरह से ह्यूमन मोनोक्लोनल एंटीबॉडी** बनाने की सुविधा देता है ।

उदाहरण:

एंटीबॉडी	लक्ष्य	स्वास्थ्य अनुप्रयोग
त्रास्तुज़ुमाब	HER2 रिसेप्टर	स्तन कैंसर
एडालिमुमैब	टीएनएफ-α	ऑटोइम्यून रोग (आरए, क्रोहन)
बेवाकिज़ुमैब	वीईजीएफ़	कैंसर एंजियोजेनेसिस अवरोध

महत्व: कम से कम साइड इफ़ेक्ट वाली सटीक दवा।

F. हार्मोन और एंजाइम का उत्पादन

- रिकॉम्बिनेंट हार्मोन और एंजाइम **हार्मोनल बैलेंस और मेटाबोलिक फंक्शन को बेहतर बनाते हैं** :
    - मधुमेह के लिए **पुनः संयोजक इंसुलिन**
    - एंडोक्राइन/मेटाबोलिक डिसऑर्डर के लिए **थायरॉइड हार्मोन और डाइजेस्टिव एंजाइम**

जी. बायोफार्मिंग

- ट्रांसजेनिक जानवर **दूध, अंडे या खून में थेराप्यूटिक प्रोटीन बना सकते हैं** :
    - उदाहरण: बकरियां दूध में एंटीथ्रोम्बिन बनाती हैं
    - उदाहरण: मुर्गियां अंडों में ह्यूमन वैक्सीन बना रही हैं

महत्व: इंसानी सेहत के लिए मुश्किल इलाज का सस्ता प्रोडक्शन।

---

3. स्वास्थ्य में लाभ

1. पैथोजन्स के बिना ह्यूमन प्रोटीन का **सुरक्षित प्रोडक्शन**
2. **लक्षित थेरेपी** (जीन थेरेपी और मोनोक्लोनल एंटीबॉडी)
3. **तेजी से और बड़े पैमाने पर वैक्सीन उत्पादन**
4. **सटीक, संवेदनशील निदान**
5. जेनेटिक बीमारियों के लिए संभावित **इलाज का तरीका**

---

4. सीमाएं और चुनौतियां

1. **नैतिक चिंताएँ:** जीन थेरेपी, जीनोम एडिटिंग
2. **इम्यून रिएक्शन:** रिकॉम्बिनेंट प्रोटीन या वेक्टर के प्रति
3. विकास और उत्पादन की **उच्च लागत**
4. क्लिनिकल एप्लीकेशन के लिए **रेगुलेटरी और सेफ्टी रुकावटें**
5. **तकनीकी सीमाएं:** जीन थेरेपी में ऑफ-टारगेट प्रभाव

- **हेल्थ में RDT** जीन में बदलाव करके थेराप्यूटिक प्रोटीन, वैक्सीन, डायग्नोस्टिक्स और जीन थेरेपी बनाने में मदद करता है।
- **अनुप्रयोग:**
    1. थेराप्यूटिक प्रोटीन (इंसुलिन, hGH, क्लॉटिंग फैक्टर, साइटोकाइन्स)

2. जीन थेरेपी (SCID, हीमोफीलिया जैसे जेनेटिक डिसऑर्डर)
3. टीके (हेपेटाइटिस बी, एचपीवी, कोविड-19)
4. डायग्नोस्टिक्स (पीसीआर, एलिसा, डीएनए माइक्रोएरे)
5. मोनोक्लोनल एंटीबॉडी (कैंसर और ऑटोइम्यून बीमारियों के लिए टारगेटेड थेरेपी)
6. बायोफार्मिंग (ट्रांसजेनिक जानवरों से चिकित्सीय प्रोटीन)

- **फायदे:** सुरक्षित, खास, स्केलेबल, तेज़ और इलाज की क्षमता
- **सीमाएं:** नैतिक मुद्दे, लागत, इम्यून रिएक्शन, रेगुलेटरी चुनौतियां

----------अंत----------