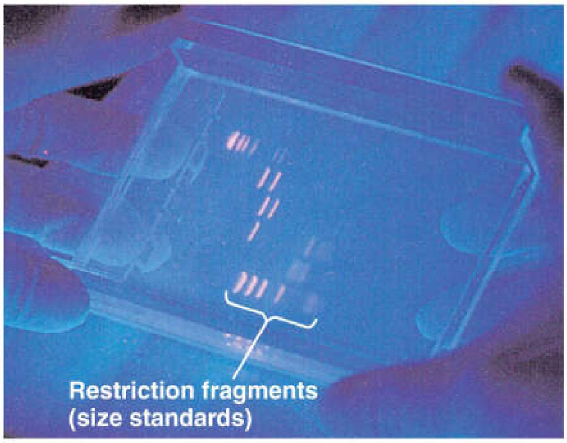
අණුක ජීව විද්‍යාව සහ ප්‍රතිසංයෝජිත DNA තාක්ෂණය සිද්ධාන්ත සටහන්

ආචාර්ය හිරාන් අමරසේකර

ඇගරෝස් ජෙල විද්‍යුතාගමනය - **Gel elecrophoresis**

1. විශාල ආරෝපිත අණු (DNA, RNA, ප්‍රෝටීන....) ඒවායේ සචලතාව අනුව විද්‍යුත් ක්ෂේත්‍රයක් භාවිතා කරමින් වෙන්කිරීම මෙසේ හැඳින්වේ.
2. විද්‍යුත් ක්ෂේත්‍රය තුළ අණු චලනය වීමේ වේගය එහි ශුද්ධ ආරෝපණය සහ අණුවේ ප්‍රමාණය (දිග/විශාලත්වය) මත රඳා පවතී.
3. මෙහිදී ජෙල පූරකයක කුඩා සිදුරු ඔස්සේ අණු චලනය වේ. ජෙලය මගින් අණුවල චලනය සීමාවන අතර මේනිසා අණුවල ප්‍රමාණයට අනුකූලව ඒවා වෙන්වේ.
4. DNA වල පොස්පේට් (PO_4^{3-}) කාණ්ඩ ඇති බැවින් ඒවා සෘණාරෝපිත නිසා ධනාරෝපිත ඇනෝඩය දෙසට සංක්‍රමණය වේ.
5. ඇගරෝස් ජෙල විද්‍යුතාගමනයේදී මුහුදු පැළෑටි (රතු ඇල්ගී) වලින් ලබාගන්නා පොලිසැකරයිඩයක් මගින් ඇගරෝස් ජෙල සාදා ගනී.
6. මෙහිදී ජෙල විද්‍යුතාගමන උපකරණයක ජෙලය ස්වාරක්ෂකයක් තුළ තබනු ලබයි.
7. ජෙලයේ කැතෝඩය පැත්තේ සිදුරු සාදන අතර DNA එම සිදුරු තුළට ඇතුල් කරයි.
8. විදුලි ජනකයක් භාවිතා කොට ධාරාවක් ලබාදුන් විට, සෘණාරෝපිත DNA ඛණ්ඩ ජෙලය ඔස්සේ ධනාරෝපිත ඇනෝඩය දෙසට සංක්‍රමණය වේ.
9. මෙහිදී දිග/බර අඩු ඛණ්ඩ වේගයෙන් ඈතට චලනය වීමත් විශාල ඛණ්ඩ සෙමින් චලනය වීමත් නිසා ජෙලයේ ඛණ්ඩ රටාවක් ඇතිවේ.
10. වෙන්වූ DNA ඛණ්ඩ රටාව එතිඩියම් බ්‍රෝමයිඩ් මගින් වර්ණ ගන්වන අතර, පසුව UV ආලෝකයට නිරාවරණය වීමට සැලැස්වීමෙන් එම ඛණ්ඩ රටාව නිරීක්ෂණය කළ හැකි වේ.
(DNA පියවි ඇසට නොපෙනෙන අතර UV කිරණවලට නිරාවරණය කළ විට පෙනේ)
11. එතිඩියම් බ්‍රෝමයිඩ් වර්ණක මගින් ඇගරෝස් ජෙලය මත ද්විත්ව දාම DNA පටියක් තිබීම පෙන්නුම් කරන නමුත්, ඒවාට විශිෂ්ට නියුක්ලියෝටයිඩ අනුක්‍රමයක් සහිත පටියක් අනික් ඒවායින් වෙන්කර දැක්විය නොහැකි වේ. මේ නිසා වෙනත් පටි රැසක් අතරින් එවැනි විශිෂ්ට පටියක් (සාම්පලයක නොදන්නා DNA ඛණ්ඩයක්) හඳුනාගැනීම සඳහා DNA ඒෂණයක් භාවිතා කෙරේ. මෙය මීළඟට සලකා බලමු.

(a) Negatively charged DNA molecules move toward the positive electrode.

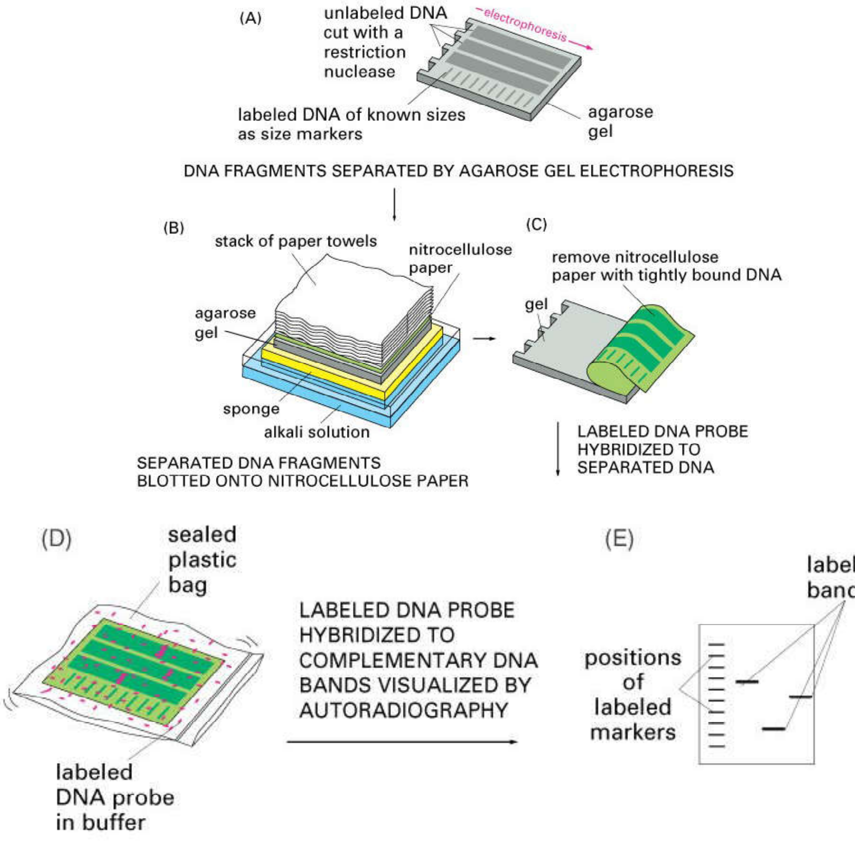


(b) Shorter molecules are slowed down less than longer ones, so they move faster through the gel.

ජෙල විද්‍යුතාගමනය

DNA ඒෂණ, සදර්න් මාරුව සහ දෙමුහුම්කරණය

1. DNA ඒෂණයක් යනු තනිදාම සලකුණු කළ DNA ඛණ්ඩයක් වන අතර මෙය දෙමුහුම්කරණය මගින් අනුපූරක නියුක්ලියෝටයිඩ අනුක්‍රමනයක් හඳුනාගැනීමට භාවිතා වේ.
2. සලකුණු කිරීම (Labeling) යනු DNA දාමයක් අනාවරණය කර ගැනීමට හැකි සංඥ ලබාදෙන පරිදි DNA දාමය විකරණය කිරීමයි.
3. විකිරණශීලී සමස්ථානික එකතු කිරීමෙන් හෝ ප්‍රතිදීප්ත අණුවක් භාවිතයෙන් DNA ඒෂණය සලකුණු කරනු ලැබේ.
4. මෙම තාක්ෂණය මගින් DNA හඳුනාගැනීමේදී ප්‍රථමයෙන්ම DNA විසංගමනය සහ අවක්ෂේපණය කර DNA ලබාගනී.
5. පසුව රෙස්ට්‍රික්ෂන් එන්ඩොනියුක්ලියේස් මගින් DNA නියැදිය අදාළ ස්ථානවලින් කපනු ලැබේ.
6. පසුව එම නියැදිය ඇගරෝස් ජෙල විද්‍යුතාගමනයට ලක්කර ජෙලය මත DNA ඛණ්ඩ රටාවක් ලබාගනී.
7. පසුව එයට NaOH දමා DNA දුස්සභාවීකරණය කරනු ලබයි.
8. පසුව එම ජෙලය මත නයිට්‍රොසෙලියුලෝස් හෝ නයිලෝන් පෙරහන් පටලයක් තබනු ලැබේ. මෙවිට ජෙලයේ තනිදාම ඛණ්ඩ රටාව (පටි) එම පටලයකට මාරු (තිර) වේ. මෙය සදර්න් මාරුව (southern blotting) නම් වේ.
9. පසුව සලකුණු කළ DNA ඒෂණ පටලයට එකතු කර සස්වභාවීකරණයට ඉඩ ලබාදේ.
10. අනුපූරක භෂ්ම අනුක්‍රමනය තිබේ නම් එම අනුක්‍රමය ඒෂණ පටලයට තිර වී ඇති ඒකදාම DNA වලට ප්‍රබල ලෙස බැඳී දෙමුහුම්කරණය වේ.
11. පටලය සේදූ විට ඉලක්ක නියුක්ලියෝටයිඩ අනුක්‍රමය සහිත පටියට බැඳුණු ඒෂණ හැර අනිකුත් ඒෂණ ඉවත් වේ.
12. ඒෂණය විකිරණශීලීව සලකුණු කර ඇති විට විකිරණ වලට භාජනය කිරීමෙන් ස්වයං විකිරණ ලේඛ ශිල්පය මගින් ඡායාරූප පටලයක අදාළ ඛණ්ඩ (පටි රටාව) සටහන ලබාගත හැක.
13. ප්‍රතිදීප්ත වර්ණක මගින් සලකුණු කර ඇති විට එම පටිය පාරජම්බුල කිරණ මගින් හඳුනාගත හැකිවේ.



සදර්න් මාරුව, දෙමුහුම්කරණය සහ DNA ඒෂණ මගින් DNA අනුක්‍රම හඳුනාගැනීම

ප්‍රතිසංයෝජිත DNA තාක්ෂණය

1. විද්‍යාගාර ක්‍රමවේද භාවිතා කරමින් වෙනස් ප්‍රභවවලින්/වෙනස් විශේෂවලින් ලබාගත් DNA එකට එකතුකර ස්වභාවයේ හමුනොවන අනුක්‍රමයක් නිර්මාණය කිරීම ප්‍රතිසංයෝජිත DNA තාක්ෂණය ලෙස හැඳින්වේ.
2. මෙසේ නිර්මාණය කළ වෙනස් ප්‍රභව කිහිපයක DNA සහිත DNA ප්‍රතිසංයෝජිත DNA ලෙස හැඳින්වේ.
3. ප්‍රතිසංයෝජිත DNA තාක්ෂණයේ (විවිධ ජීවීන්ගේ DNA සම්බන්ධ කිරීමට හැකිවීමේ) පදනම
   1. පෘථිවිය මත වූ සියලු ජීවීන් පොදු පූර්වජයෙකුගෙන් පරිණාමය වී තිබීම
   2. ප්‍රවේණික තොරතුරු DNA තුළ ගබඩා වී තිබීම (ඇතැම් වයිරසවල හැර).
   3. රසායනික මට්ටමේදී සියලු ජීවීන්ගේ DNA එක සමාන වීම.
   4. සියලු ජීවීන් එක සමාන ප්‍රවේණි කේතයක් භාවිත කරන අතර, ඒ නිසා බැක්ටීරියා, ශාක සහ සතුන් තුළ එක ම ජානයක් එක ම පොලිපෙප්ටයිඩයක් සඳහා කේතය සැපයීම. (ජාන ප්‍රකාශනය සමාන වීම)
4. මෙම තාක්ෂණයේදී වෙනස් විශේෂ දෙකක් හෝ වැඩි ගණනක DNA එකට සම්බන්ධ කර ලබාගත් ප්‍රතිසංයෝජිත DNA ධාරකයකු තුළට (උදා: *E.coli* බැක්ටීරියා) ඇතුළු කරයි.
5. මෙම නව ප්‍රවේණික සංකලන විද්‍යාව, වෛද්‍ය විද්‍යාව, කෘෂිකර්මාන්තය, කර්මාන්ත සහ පාරිසරික ක්ෂේත්‍රවල භාවිතා කෙරේ.

ප්‍රතිසංයෝජිත DNA තාක්ෂණය සහ PCR

1. ධාරක සෛලයක් තුළට DNA අණුවක් නිවේශනය අසීරු පියවරකි. මෙයට හේතුව සෛල ඒවා තුළට DNA ලබා ගැනීමට ප්‍රතිරෝධයක් දක්වීමයි. ආක්‍රමණික DNA සාමාන්‍යයෙන් හානිකර ප්‍රවේණික වෙනස්වීම්වලට හේතු වන බැවින් මෙය ජීවීන්ගේ පැවැත්මට වැදගත් ලක්ෂණයකි.
2. මේනිසා ධාරක සෛල කිහිපයකට හෝ පිටපතක් ලැබීම තහවුරු කිරීම සඳහා ප්‍රතිසංයෝජිත DNA අණුවල පිටපත් විශාල සංඛ්‍යාවක් අවශ්‍ය වේ.
3. එහිදී PCR ශිල්ප ක්‍රමය භාවිතයෙන් නාලස්ථව DNA ගුණනය කරයි.

DNA ක්ලෝනකරණය

1. DNA ක්ලෝනකරණයේදී ධාරක සෛලයක් තුළ DNA පිටපත් සාදගැනීම සිදුකරයි.
2. මේ සඳහා ධාරක සෛලයේ DNA ප්‍රතිවලිත යාන්ත්‍රණය භාවිත වේ.
3. නමුත් ධාරක සෛලය තුළ පිටපත් සෑදීම සඳහා එම සෛල නිවේශනය කළ DNA ඛණ්ඩයෙහි ප්‍රතිවලිත ආරම්භයක් (Ori) තිබිය යුතුය.
4. ඒනිසා අදළ ජානය සහිත ප්‍රතිසංයෝජිත DNA අණුව Ori සහිත DNA සමඟ සම්බන්ධ කළ යුතු අතර එයට වර්ණදේහ DNA වලින් ස්වාධීනව ප්‍රතිවලිත වීමට හැකි විය යුතුය. (වර්ණදේහීය DNA ප්‍රතිවලිත වන්නේ සෛල විභාජනය තුළ එක් වරක් පමණි.)
5. මේනිසා ජානය (DNA ඛණ්ඩය) බොහෝ විට ප්ලාස්මිඩයක් හෝ බැක්ටීරියා භක්ෂක වැනි ස්වයංප්‍රතිවලිත වන ඒකක වන වාහකයකුට ඇතුල් කරනු ලැබේ.
6. පසුව එම වාහක *E.coli* බැක්ටීරියා වැනි ධාරක සෛලයක් තුළට ඇතුල් කරයි.
7. එම ධාරක බැක්ටීරියා සෛලය ගුණනය වීමේදී ප්‍රතිසංයෝජිත DNA (අදළ ජානය) පිටපත් රාශියක් ඇති කරයි.

වාහක

1. වාහක යනු අදාළ DNA අණු, ගුණනය හෝ ක්ලෝනකරණය සඳහා ධාරකයා තුළට රැගෙන යන යානාවන්/ඒකක වේ.
2. DNA ක්ලෝනකරණය සඳහා භාවිත වන වාහක ක්ලෝන වාහක නම් වේ.

3. ආගන්තුක (වෙනත් ජීවියකුගේ) DNA දරන වාහක ප්‍රතිසංයෝජිත වාහක ලෙස හැඳින්වේ.

4. ප්‍රතිසංයෝජිත DNA වාහකයක් සෑදීමේදී ප්‍රයෝජනවත් ජානය (දායක DNA) සහ වාහකය (ප්ලාස්මිඩ හෝ වයිරස DNA) එකම සීමා එන්සයිමයෙන් කැපිය යුතු ය.

5. පසුව එම දෙවර්ගය මිශ්‍ර කොට සමෝධානිත වීමට තැබිය යුතුය.

6. පසුව DNA ලයිගේස් භාවිත කර එකට සම්බන්ධ කළ යුතුය.(මෙහි අනුපූරක භෂ්ම 'ඉබේ' හයිඩ්‍රජන් බන්ධන මගින් යුගලනය වන අතර, පොස්පොඩයිඑස්ටර බන්ධන සෑදීම ලයිගේස් මගින් සිදුකෙරේ.

7. ක්ලෝනකරණ ස්ථානය යනු (cloning site) වාහකයා තුළ ඇති ක්ලෝණීකරණය කළ යුතු DNA නිවේශනය (insert) කරනු ලබන ස්ථානයයි.

8. ක්ලෝනකරණ ස්ථානයක සීමා එන්සයිම කිහිපයක් මගින් DNA කැපීමට අදාළ සීමා එන්සයිම සඳහා අණුක්‍රම තිබිය යුතුය.

වාහක වර්ග හා ඒවායේ වෙනස්කම්

1. ධාරක සෛලයක් තුළ ස්වයං ප්‍රතිවලිත වන ඒකකයක් වාහකයන් ලෙස භාවිත කළ හැක.

2. වාහක වර්ග කිහිපයකි.
   1. ප්ලාස්මිඩ
   2. බැක්ටීරියා භක්ෂක DNA
   3. යීස්ට් කෘත්‍රිම වර්ණදේහ YACs

3. ප්ලාස්මිඩ සහ බැක්ටීරියා භක්ෂක බැක්ටීරියාවලට ජාන ඇතුල් කිරීමට උපකාරී වන වාහක වේ. යීස්ට් කෘතිම වර්ණදේහ යුකැරියෝටා සෛලවලට ජාන ඇතුල් කිරීමට උපකාරී වේ.

4. මෙම සියලු වාහකවල වාහකයකු සඳහා අවශ්‍ය නොවන ජාන ද ඇත.

5. මෙහිදී එම ජාන ඉවත් කරන අතර එම ඉඩ අදාළ ජානය ඇතුළු කිරීමට භාවිත කෙරේ.

6. මෙම ක්ලෝනකරණ වාහකයක ප්‍රධාන අරමුණ ජීවස්ථ පද්ධතියක් තුළ DNA පිටපත් කිරීමයි.

7. මේ සඳහා තනි ධාරකයකු තුළ ඇති පිටපත් සංඛ්‍යාව වැඩි කර ගැනීමට බැක්ටීරියා ප්ලාස්මිඩ, බැක්ටීරියා භක්ෂක සහ YACs වලට හැකියාවක් ඇත.

ප්ලාස්මිඩ

1. බැක්ටීරියා සෛලවල ප්‍රධාන වෘත්තාකාර වර්ණදේහය (DNA අණුවට) අමතරව සෛල ප්ලාස්මයේ පිහිටන ස්වයංප්‍රතිවලිත වන කුඩා DNA වෘත ප්ලාස්මිඩ ලෙස හැඳින්වේ.

2. ප්ලාස්මිඩ DNA ධාරක (බැක්ටීරියා සෛලවල) ප්ලාස්ම පටලය ඔස්සේ කෙළින්ම ඇතුළු කිරීම මගින් ප්‍රවේණික වෙනස්වීමක් ප්‍රතිඵල කරමින් ඒකාබද්ධ කරගන්නා අතර එය **පරිණාමනය** ලෙස හැඳින්වේ.

3. මෙසේ ප්ලාස්මිඩ සෛල බිත්ති තුළින් බැක්ටීරියා සෛල තුළට පරිණාමනය ඉතා අකාර්යක්ෂම ක්‍රියාවලියකි.

බැක්ටීරියා භක්ෂක DNA

1. බැක්ටීරියා භක්ෂක වයිරසවල පවතින DNA අණුව මෙහිදී වාහක ලෙස භාවිතා කෙරේ.

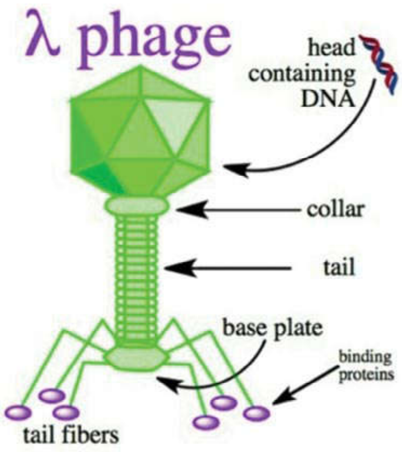
2. බැක්ටීරියා භක්ෂක වාහක ලෙස භාවිතා කිරීමේදී ඒවා ආසාදන යාන්ත්‍රණය මගින් වාහකය ධාරක සෛල තුළට නිවේශනය කරනු ලබයි. මේනිසා මෙය ප්ලාස්මිඩ පරිණාමනයට වඩා කාර්යක්ෂම වේ.

යීස්ට් කෘත්‍රිම වර්ණදේහ YACs

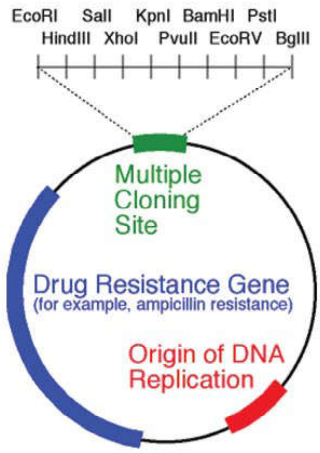
1. ප්ලාස්මීඩ යීස්ට් සෛල තුළ ද ඇත. යීස්ට් ක්ලෝනකරණ වාහක ලෙස භාවිතා කරන කෘත්‍රිමව නිපදවන ලද ප්ලාස්මිඩ යීස්ට් කෘත්‍රිම වර්ණදේහ (YACs) ලෙස හැඳින්වේ.

2. ඒවා ප්ලාස්මිඩ වන නමුත් වර්ණදේහ ලෙස හැඳින්වෙන්නේ සෙන්ට්‍රොමියර අනුක්‍රම දරන බැවිනි.

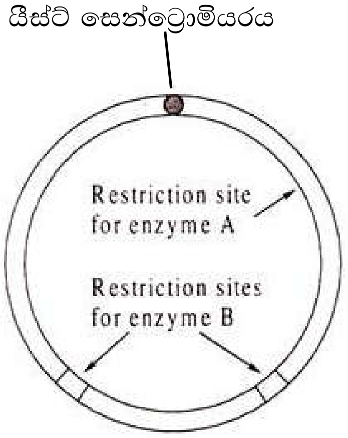
3. ඒවා රේඛීය වර්ණදේහ ලෙස ක්‍රියාකරයි.
4. යීස්ට් වාහක තුළ සෙන්ට්‍රොමියර අනුක්‍රම සහ සෛල විභාජනයේදී ස්වාධීනව ප්‍රතිවලිතවීමට වැදගත් වන ස්වයංපාලක ප්‍රතිවලිත අනුක්‍රම (ARS) ඇත.
5. YAC භාවිතයේ වාසි වන්නේ ඒවා විශාල බැවින් DNA විශාල ප්‍රමාණයක් පිටපත් කළ හැකි වීමත්, ඒවා සූන්‍යෂ්ටික පද්ධති තුළ ක්‍රියා කිරීමත්ය.



බැක්ටීරියා භක්ෂක



ප්ලාස්මිඩ



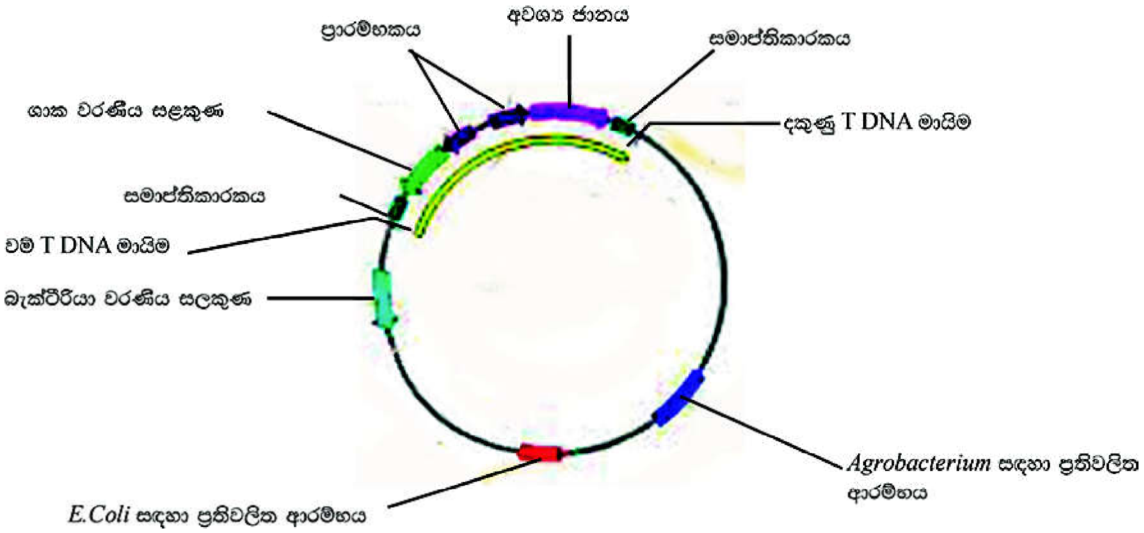
යීස්ට් කෘත්‍රිම වර්ණදේහ

සලකුණු ජාන (selectable marker genes) භාවිතය

1. ප්‍රතිසංයෝජිත ප්ලාස්මිඩ වාහක ධාරක සෛලවල ගෙනයාමේ දී පරිණාමන කාර්යක්ෂමතාව ඉතා අඩුය.
2. ප්‍රතිසංයෝජිත වාහකය පරිණාමනයට ලක් වූ එක් ධාරක සෛලයකට, පරිණාමනය නොවූ සෛල මිලියන/බිලියන ගණනක් පවතී.
3. පරිණාමනය සහ පරිණාමනය නොවූ යන සෛල දෙවර්ගය ම සුදුසු මාධ්‍යයක ගණාවාස සාදනු ලැබුවත් ඒවා වෙන් කර හඳුනා ගත නොහැකි ය.
4. ඒ නිසා සලකුණු ජානයක් ද ක්ලෝන වාහකයක තුළට ඇතුල් කරනු ලැබේ.
5. මෙවිට බොහෝ පරිණාමනය නොවූ සෛල අතුරින්, පරිණාමනය වූ සෛලවලින් සම්භවය වූ ගනාවාස පමණක් හඳුනා ගත හැකි ය.
6. බොහෝවිට සලකුණු ජාන ලෙස යොදගන්නේ ප්‍රතිජීවක ප්‍රතිරෝධී ජානයි.
7. ධාරක සෛල විශේෂ ප්‍රතිජීවකයකට සංවේදී වන අතර, එම ප්‍රතිජීවකය අඩංගු වන මාධ්‍යයක ඒවා වර්ධනය නොවී විනාශ වේ.
8. නමුත් වාහකයා ප්‍රතිජීවකවලට ප්‍රතිරෝධී ජාන රැගෙන යන බැවින් පරිණාමනය වූ ප්‍රතිසංයෝජිත ප්ලාස්මිඩය සහිත සෛල පමණක් මේ ප්‍රතිජීවක සහිත මාධ්‍යවල වර්ධනය වේ.
9. පරිණාමනයට ලක් වූ සෛලවල වර්ධනයට පමණක් ඉඩ සලසන බැවින් ඒවා වරණීය සලකුණු ලෙස හැඳින්වේ.
10. පරිණාමනය වීමෙන් නිවේශකය එහි අනිවාර්යයෙන් ඇති බව අදහස් නොවේ. සියලු වාහක ප්‍රයෝජනවත් ජානය සමග ප්‍රතිසංයෝජිත නොවේ. ඒ නිසා නිවේශකය අඩංගු වන වාහක සහිත ගණාවාස, වාහක පමණක් ඇති ගණාවාසවලින් වෙන් කර හඳුනා ගැනීමට තවත් සලකුණක් ද (උදා: සංදීප්ත/එළිය විහිදවන ජාන) ඇතුළත් කරනු ලැබේ.

ක්ලෝන වාහකයක තිබිය යුතු අත්‍යවශ්‍ය කොටස්

1. Ori /ප්‍රතිවලිත ආරම්භ ලක්ෂය
2. නිවේශකය (Insert - ඇතුළු කරන ලද ජානය)
3. විවිධ ක්ලෝනකරණ ස්ථාන
4. සලකුණු ජාන - උදා: Amp^r, Tet^r (ඇම්පිසිලින් සහ ටෙට්‍රසයික්ලින් ප්‍රතිරෝධී ජාන)
5. ඇතැම්විට වෙනත් සලකුණු ජාන



ක්ලෝනකරණ වාහකයක (pBR) 322 අත්‍යාවශ්‍ය ලක්ෂණ
(Ori, බහුවිධ ක්ලෝනකරණ ස්ථාන සහ සලකුණු ජාන)

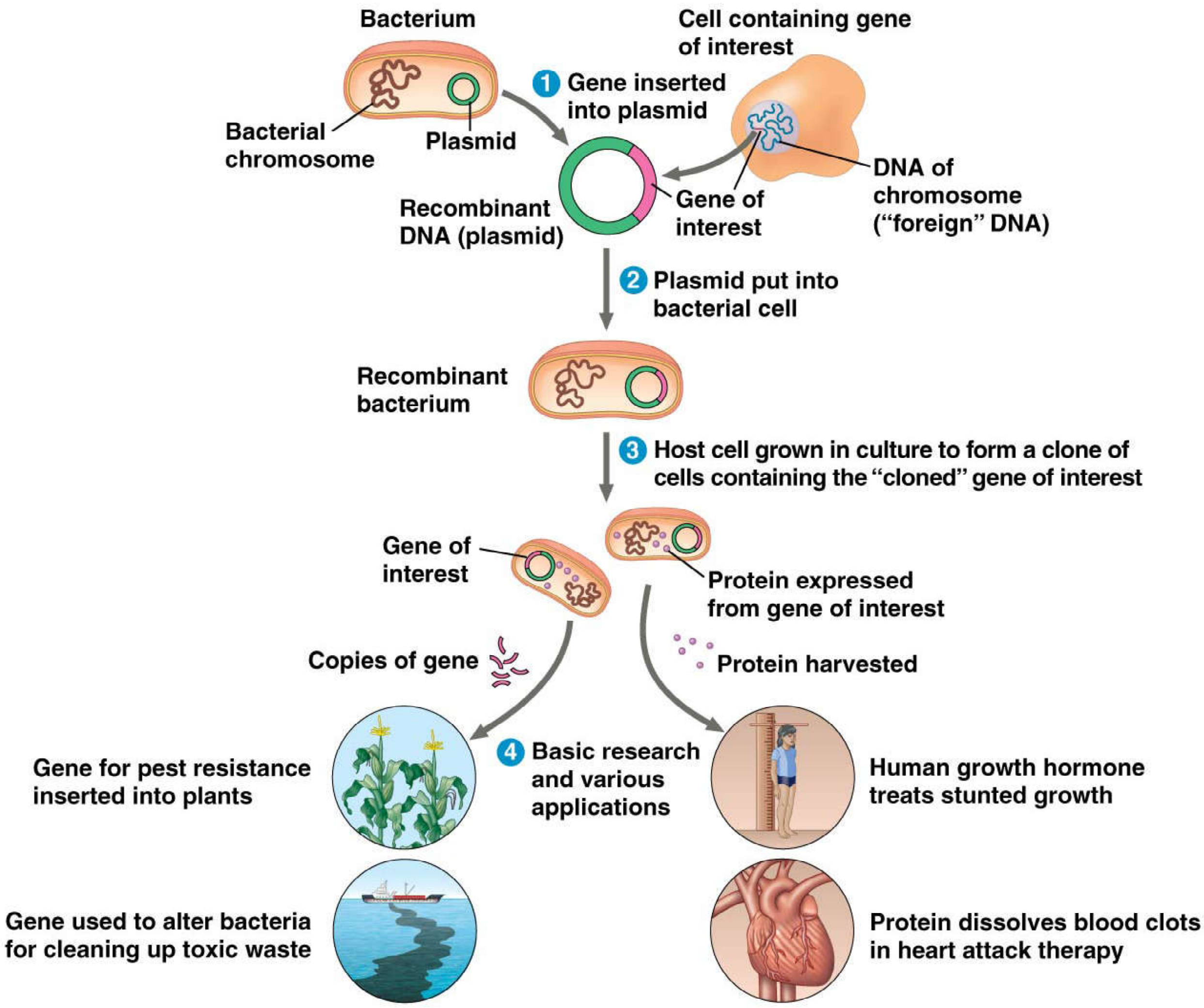
ප්‍රතිසංයෝජිත DNA තාක්ෂණයේ මූලික පියවර

උදාහරණ: මානව ඉන්සියුලින් ජානය සම්බන්ධ කොට ප්‍රතිසංයෝජිත DNA (rDNA) ප්ලාස්මිඩයක් ක්ලෝන කිරීමෙන් ඉන්සියුලින් ප්‍රෝටීනය නිෂ්පාදනය කර ගැනීමේ පියවර.

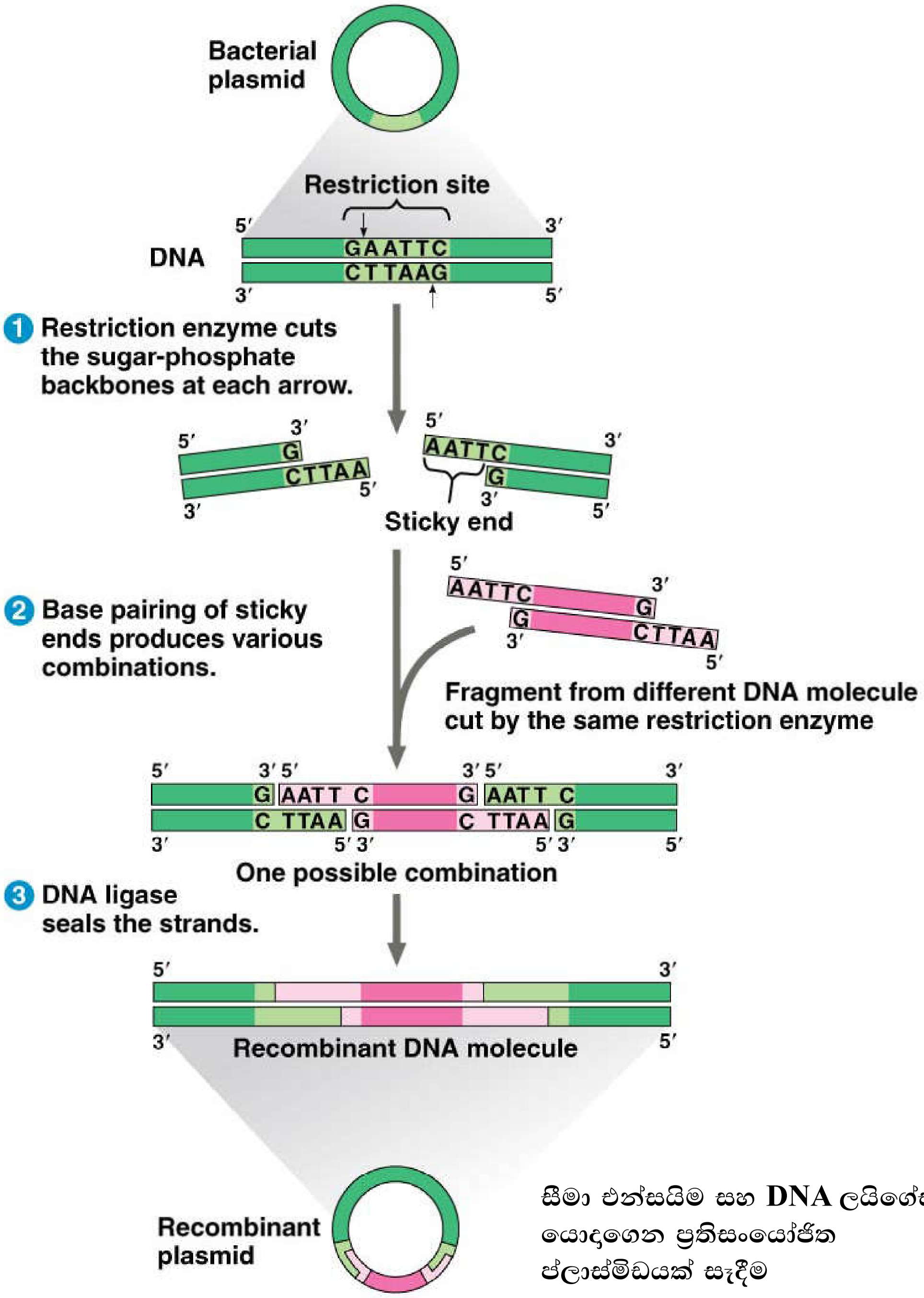
1. අග්න්‍යාශයේ β සෛල එකතු කර ගැනීම
2. එම සෛලවලින් DNA විසංගමනය කර ගැනීම
3. විසංගමනය කළ DNA සීමා එන්සයිමයක් මගින් සීමිත ජීරණය (කැපීම)
4. ජෙලවිද්‍යුතාගමනය මගින් DNA ඛණ්ඩ වෙන්කිරීම සහ පසුව සදර්න් මාරු ක්‍රමය මගින් DNA ඛණ්ඩ පෙරහන් කඩදාසිවලට මාරු කිරීම
5. අවශ්‍ය නියුක්ලියෝඩයිඩ අනුපිළිවෙළ සහිත නිවැරදි DNA ඛණ්ඩය (ඉන්සියුලින් ජානය) ඒෂණ භාවිතයෙන් හඳුනාගැනීම (ඒෂණයක් යනු සලකුණු කරන ලද කුඩා තනි දම DNA කොටසකි.
6. *E.coli* බැක්ටීරියා සෛලවලින් ප්ලාස්මිඩ (වාහකය) විසංගමනය
7. ඉන්සියුලින් ජානය කැපීමට භාවිතා කළ සීමා එන්සයිමයම යොදාගෙන ප්ලාස්මිඩය කැපීම. (විවෘත කිරීම)
8. විවෘත කරන ලද ප්ලාස්මිඩ සමග විසංගමනය කළ ඉන්සියුලින් ජානය මිශ්‍ර කිරීම
9. DNA ලයිගේස් එන්සයිම මගින් ඉන්සියුලින් ජානය ප්ලාස්මිඩයට සම්බන්ධ කිරීම. දැන් මෙම විශේෂ දෙකක DNA දරන ප්ලාස්මිඩය ප්‍රතිසංයෝජිත DNA අණුවක් වේ.
10. පරිණාමනය මගින් ප්‍රතිසංයෝජිත ප්ලාස්මිඩය *E.coli* ධාරක බැක්ටීරියා සෛල තුළට ඇතුල් කිරීම
11. මෙම ප්‍රතිසංයෝජිත බැක්ටීරියා සෛල ඒගාර් මාධ්‍යවල වගා කිරීම. බැක්ටීරියා ශීඝ්‍රව සෛල විභාජනය මගින් බෙදෙන විට ඉන්සියුලින් ජානයේ පිටපත් විශාල සංඛ්‍යාවක් සාදමින් එම ජානය ක්ලෝන වේ.

12. වාහක ප්ලාස්මිඩවල ප්‍රතිජීවක ප්‍රතිරෝධී ජාන වැනි සලකුණු ජාන ඇති බැවින් සාර්ථකව පරිණාමනය වූ ගණාවාස හඳුනාගත හැකි වේ.

13. ප්‍රතිසංයෝජිත DNAවල ඉන්සියුලින් ජානය මගින් කේත වන ඉන්සියුලින් (ප්‍රෝටීනය) බැක්ටීරියාවේ සෛල ප්ලාස්මිඩ නිදහස් කරයි. (පසුව එම ඉන්සියුලින් සංශුද්ධව ලබා ගනී.)



ජාන ක්ලෝනකරණය සහ ක්ලෝන කළ ජානවල ප්‍රයෝජන කිහිපයක්



සීමා එන්සයිම සහ DNA ලයිගේස් යොදගෙන ප්‍රතිසංයෝජිත ප්ලාස්මිඩයක් සෑදීම

DNA පුස්තකාල

1. DNA පුස්තකාලයක් යනු එක් ජීවියෙකු ගේ සම්පූර්ණ ජීනෝමයේ DNA ඛණ්ඩ වෙන්කොට, ක්ලෝනකරණ වාහක මගින් එම ඛණ්ඩ විවිධ ක්ෂුද්‍රජීවීන්ට ඇතුල් කොට, එම රෝපණ ක්ලෝනකරණය කිරීමෙන් ලබාගත් ක්ෂුද්‍රජීවී රෝපණ එකතුවකි.

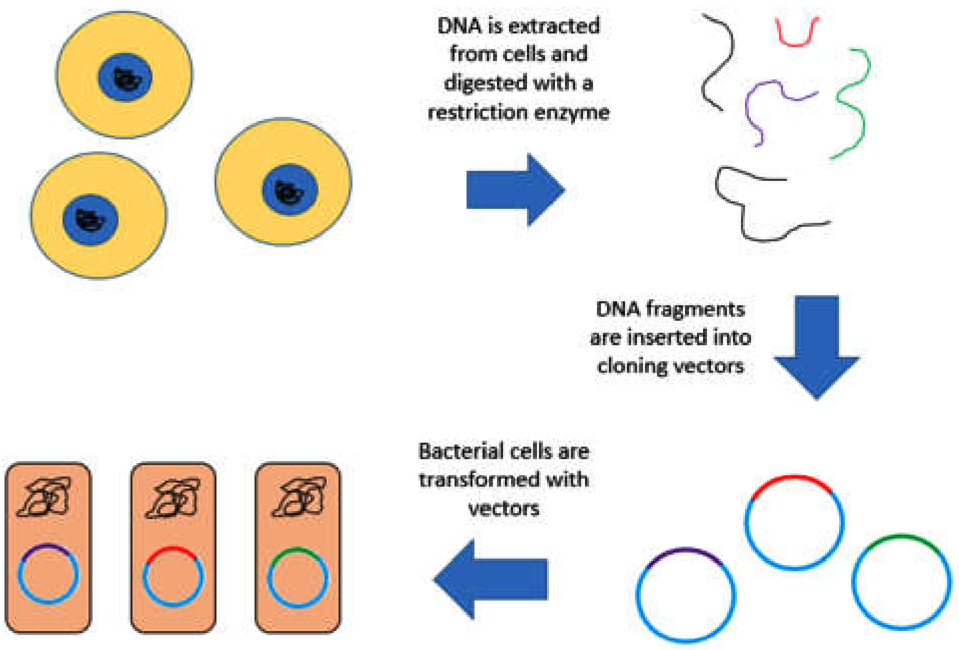
2. මේවා වර්ග දෙකකි.

   1. ජීනෝම DNA පුස්තකාල
   2. cDNA පුස්තකාල

   1. **ජීනෝම DNA පුස්තකාල**

      1. යාන්ත්‍රික බල හෝ සීමා එන්සයිම මගින් ජිනෝමයක් කැපූවිට විවිධ අහඹු ප්‍රමාණවලින් යුත් DNA අනුක්‍රම අතිවිශාල සංඛ්‍යාවක් ඇතිවේ.
      2. DNA පුස්තකාලයක් සාදගැනීමට එම සියලු කැබලි ක්ලෝනකරණ වාහකවලට (ප්‍රතිසංයෝජිත වාහකවලට) සමෝධානික කර පසුව ඒවා බැක්ටීරියා ධාරකයන්ට පරිණාමනය කරනු ලැබේ.

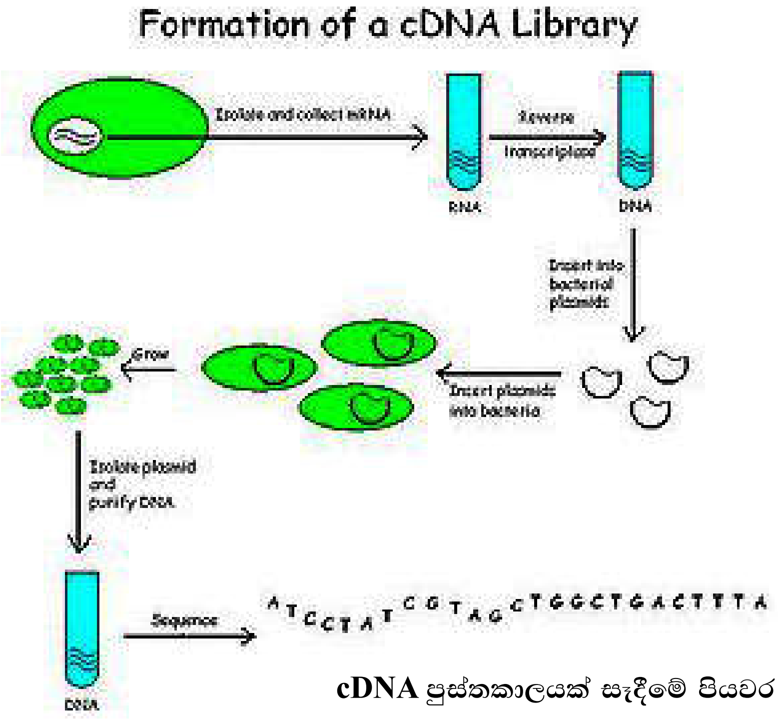
3. එම ධාරකයන් සුදුසු මාධ්‍යයක රෝපණය කොට නිවේශකය දරන වාහක සහිත පරිණාමනය වූ සෛල වෙන් කර ගනු ලැබේ. පරිණාමනය වූ විවිධ සෛලවල ජීනෝමයේ වෙනස් DNA කොටස් අන්තර්ගත වේ.
4. සියලු ගණාවාස විසංගත කර වෙන් වෙන්ව රෝපණය කළ විට එම ගනාවාසවල එකතුව ජීනෝම DNA පුස්තකාලයක් ලෙස හැඳින්වේ.
5. මේ අනුවDNA පුස්තකාල යනු, සමස්ත ජීනෝමික DNA වලින්, එකිනෙකට වෙනස් ඛණ්ඩ ප්‍රචාරණය කළ හැකි ක්‍ෂුද්‍රජීවී රෝපණ එකතුවකි.
6. ජීනෝමයේ සම්පූර්ණ අනුක්‍රමය ලබා ගැනීම සඳහා ගණාවාසයේ නිවේශක තවදුරටත් වෙන් වෙන් ම අනුක්‍රමණය කළ යුතුය.
7. මානව ජීනෝම ව්‍යාපෘතිය යටතේ මානව ජීනෝමයේ අනුක්‍රමය ලබාගැනීම ඒ ආකාරයට සිදු විය.



ජීනෝම DNA පුස්තකාලයක් සෑදීමේ පියවර

2. **cDNA පුස්තකාල (අනුපූරක DNA පුස්තකාල)**
   1. සෛල/පටකවලින් විසංගත කළ mRNA වල ප්‍රතිවර්තී ප්‍රතිලේඛනය මගින් ලබා ගත් අනුපූරක DNA (cDNA) ඇතුල් කොට ලබාගත් ධාරක සෛල එකතුවක් මෙසේ හැඳින්වේ.
   2. සෛලයක mRNA එකතුව ට්‍රාන්ස්ක්‍රිප්ටෝමය ලෙස හැඳින්වේ.
   3. මෙහිදී mRNA විසංගත කරන අතර පසුව එය රිවර්ස් ට්‍රාන්ස්ක්‍රිප්ටේස් එන්සයිමය භාවිතා කොට අනුපූරක DNA දාමය බවට ප්‍රතිවර්තී ප්‍රතිලේඛන කරයි.
   4. පසුව DNA පොලිමරේස් භාවිත කරමින්, ප්‍රථම DNA අච්චුව මත දෙවන DNA දාමය ප්‍රතිවලිත කිරීමෙන් ද්විත්ව දම cDNAලබාගනී.
   5. එම DNA ඛණ්ඩ වාහකවලට ක්ලෝනකර cDNA පුස්තකාලය සෑදීම සඳහා ජීනෝම පුස්තකාල සෑදීමට සමාන ක්‍රියාමාර්ගයක් අනුගමනය කරයි.

- DNA ජීනෝම පුස්තකාල මූලික ව භාවිත වන්නේ අනුක්‍රමණය සඳහා DNA ඛණ්ඩවල ප්‍රභව ලෙසයි.
- cDNA පුස්තකාල ද ජාන ප්‍රකාශනයේ රටාව විදහා දක්වයි.
- DNA මගින් කේතවන mRNA හෙවත් ට්‍රාන්ස්ක්‍රිප්ටෝමය පමණක් අන්තර්ගතවන බැවින් cDNA පුස්තකාලයේ විශාලත්වය ජීනෝම DNA පුස්තකාලයේ විශාලත්වයට වඩා අඩුය.



cDNA පුස්තකාලයක් සැදීමේ පියවර

DNA ඇතුළු කිරීමෙ පදයත

ආගන්තුක DNA අඩංගු සෛලයක් පරිණාමනයට ලක් වූ සෛලයක් ලෙස හැඳින්වේ. සෛලය තුළට ආගන්තුක DNA ඇතුල් කිරීමේ ක්‍රම කිහිපයක් මෙසේය.

පරිණාමනය

1. මේ ක්‍රමයේ දී ප්‍රයෝජනවත් DNA වල පිටපත් විශාල සංඛ්‍යාවක් (උදා: ප්‍රතිසංයෝජිත වාහකය) ධාරක සෛල සමග මිශ්‍ර කෙරේ.
2. මෙවිට සෛල පටලය හරහා එහි වටපිටාවේ සිට සෛලයට DNA ඇතුල් වේ.
3. සෛලයකට DNA ලබා ගැනීමේ හැකියාව හෙවත් DNA ලබාගැනීමේ කාර්යක්ෂමතාව ඉතා අඩු ය. විවිධ ප්‍රතිකර්ම මගින් ධාරක සෛලවල ශක්‍යතාව (පිටත සිට DNA ලබා ගැනීමේ හැකියාව) වැඩි කළ හැකි ය.

පාරසාදනය

1. ධාරක සෛල (බැක්ටීරියා) තුළට භක්ෂක DNA මගින් ආගන්තුක DNA ආසාදනය කරවීම මෙසේ හැඳින්වේ.
2. ශාක හා සතුන් ආසාදනය කරන වයිරස ද ආගන්තුක DNA ශාක හා සත්ත්ව ධාරක තුළට ඇතුළු කරන වාහක ලෙස භාවිත කළ හැකි ය.
3. ප්‍රයෝජනවත් ජානය, විකරණයට ලක් කළ වයිරස ජිනෝමය තුළට සමෝධානික කර ප්‍රෝටීන කැප්සිඩය තුළට අසුරාලයි.
4. මෙම වයිරස අංශුවට එහි සාමාන්‍ය ආසාදන ක්‍රියාවලියේ දී මෙන් ප්‍රතිසංයෝජිත DNA ද සම්ප්‍රේෂණයට හැකි ය. කැප්සිඩය DNA ආරක්ෂා කරන අතර, මේ ක්‍රමය පරිණාමනයට වඩා වැඩි කාර්යක්ෂමතාවක් දක්වයි.

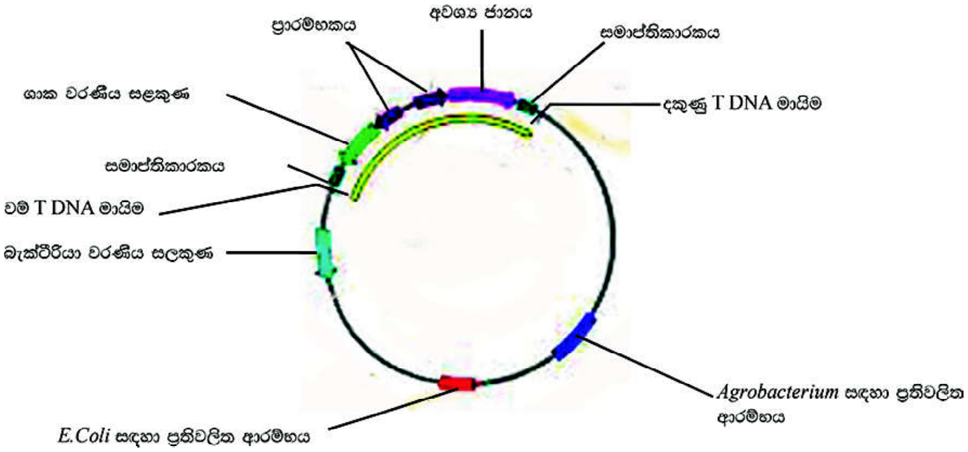
ජාන තුවක්කුව (Gene Gun)

1. මේ ක්‍රමයේ දී රත්රන් වැනි බැර ලෝහවල කුඩා අංශු, ප්‍රයෝජනවත් DNA වල පිටපත් විශාල සංඛ්‍යාවකින් ආලේප කර, ඒ අංශු ඉහළ ප්‍රවේගයකින් පරිණාමනය විය යුතු සෛලය තුළට විදියි (shoot).
2. මේ සඳහා ජාන තුවක්කුවක් භාවිතා කෙරේ.

ජාන තුවක්කුව

Agrobacterium භාවිතයෙන් ජාන හුවමාරුව

1. ශාක ආසාදනය කළ හැකි පාංශු බැක්ටීරියාවක් වන *Agrobacterium* වල T1 ප්ලාස්මිඩය මගින් ශාක වලට ජාන ඇතුල් කිරීම මෙහිදී සිදුකෙරේ.
2. මෙම බැක්ටීරියාව ආසාදනය වූ විට ශාකය මත අර්බුදයක් සාදන අතර, බැක්ටීරියාව එය තුළ ජීවත් වෙමින් ශාකයට මුදුන් ගඩු රෝගය (crown gall disease) ඇති කරයි. අර්බුදය හෝ ගඩුවේ සෛල *Agrobacterium* අර්බුද ප්‍රේරණය කරන T1 ප්ලාස්මිඩයේ ඛණ්ඩයක් මගින් ප්‍රවේණිකව පරිණාමනය වී ඇත. එම ප්ලාස්මිඩයේ කොටසක් ශාක ජිනෝමයට මාරුවීමෙන් හුවමාරුක DNA හෙවත් T-DNA සාදයි.
3. T-DNA වල ගඩුවක් සෑදීමට ප්‍රේරණය කරන ජාන මෙන්ම ප්‍රචණ්ඩතාවට අදාළ ජාන ද ඇත.
4. විද්‍යාඥයන් T-DNA වලින් ප්‍රචණ්ඩ ජාන සහ බැක්ටීරියා ජාන බහුතරයක් ඉවත් කර, T-DNA වම් සහ දකුණු සීමා අනුක්‍රම දෙක අතර අවකාශය තුළට ප්‍රයෝජනවත් ජාන නිවේශනය කරනු ලැබේ.
5. *Agrobacterium* ශාකවලට ආසාදනය කරවීමෙන් මෙම නිවිෂ්ට (ඇතුල් කළ) ජාන සහිත විකරණය කළ T-DNA ශාක සෛල තුළට මුදාහරී. ප්‍රචණ්ඩ ජාන T-DNA වලින් ඉවත්කොට ඇති බැවින් ශාක සෛල රෝගී තත්ත්වයට පත් නොවන අතර, මෙය T-DNA නිරායුධ කිරීමක් ලෙස හැඳින්වේ.



T1 ප්ලාස්මිඩ වාහකය

DNA විශ්ලේෂණය

1. DNA විශ්ලේෂණය මගින් ජීවීන් අතර ප්‍රවේණික සමානතා සහ අසමානතා හඳුනා ගැනීමත්, පුද්ගලයන් හඳුනාගැනීමත් සිදුකළ හැකිය.
2. වර්ගීකරණය රූපවිද්‍යාත්මක ලක්ෂණ යොදා ගනිමින් සිදුකරන විට, සීමිත ලක්ෂණ සංඛ්‍යාවක් පමණක් භාවිතා බැවින් සාමාන්‍යයෙන් හඳුනා ගත හැකි කුඩා ම කාණ්ඩය වන්නේ විශේෂයයි.

3. ලක්ෂණ වැඩි ප්‍රමාණයක් භාවිතයට ගත් විට උපවිශේෂ, මාදිලි, ප්‍රභේද වැනි උපමට්ටම් වලට වර්ග කළ හැකි වේ.

4. ජීවීන් කුඩා කාණ්ඩවලට වෙන් කිරීමට වර්ගීකරණයේ දී ජෛව රසායනික ගුණාංග (එන්සයිම ක්‍රියා) ද යොදා ගනී.

5. ජීවියකුගේ ලක්ෂණ ප්‍රවේණිය සහ ඔවුන්ගේ පරිසරය එක් වූ සංකලනයක් මගින් පාලනය වන බැවින් මෙම ලක්ෂණ පරිසරය මත වෙනස් විය හැකි ය.

6. ජීවී කාණ්ඩ දෙකක් ප්‍රවේණිකව සමාන හෝ වෙනස් වන්නේ කෙසේ දැයි පිරික්සීම සිදුකළ හැක්කේ DNA මට්ටමින් පරීක්ෂා කිරීමෙන් පමණකි.

7. ජීවීන් අතර ප්‍රවේණික සමානතා සහ වෙනස්කම් හඳුනා ගැනීම සඳහා විවිධ DNA විශ්ලේෂණ ශිල්ප ක්‍රම වැඩි දියුණු කර ඇති අතර, එම ඇතැම් ක්‍රමයන් පුද්ගලයන් හඳුනා ගැනීමටද භාවිත කරනු ලැබේ.

8. මේ ශිල්ප ක්‍රමවලදී විසංගමනය, ජෙල විද්‍යුත්ගාමනය ඒෂණ භාවිතය වැනි (මීන් පෙර සඳහන් කළ) ශිල්ප ක්‍රම ද යොදා ගනී.

නිරෝධ/සීමා සිතියම් (Restriction maps)

1. සීමා සිතියමක් යනු DNA ඛණ්ඩයක සීමා ස්ථානවල සාපේක්ෂ පිහිටීම සහ එම ස්ථාන අතර දුර දැක්වෙන රූපසටහනයි.

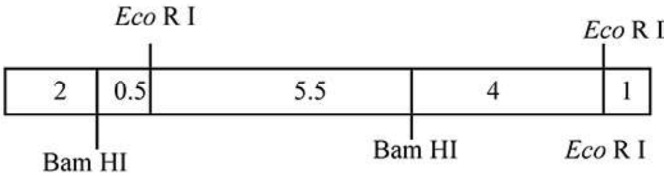
2. සීමා සිතියම් ගතකිරීමේදී නොදන්නා DNA ඛණ්ඩයක් කොටස්වලට කපා ඒ මගින් විවිධ කැපුම් ස්ථාන (සීමා ස්ථාන) හඳුනාගැනීම සිදු කෙරේ.

3. විශේෂිත DNA අනුක්‍රම ද්විත්ව දාම DNA ඛණ්ඩවලට කැපීම සීමා එක්සයිම මගින් සිදුවේ.

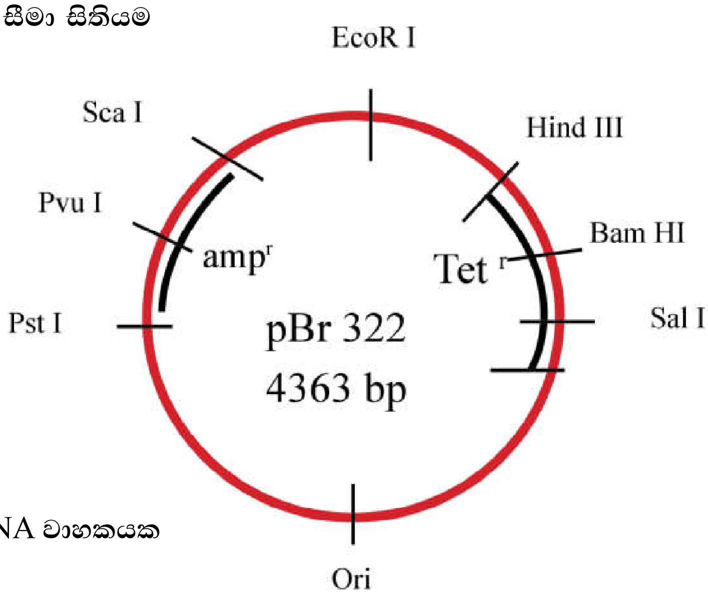
4. සීමා ස්ථාන සංඛ්‍යාව සහ ඒවා පිහිටන ස්ථාන මත විවිධ ප්‍රමාණයෙන් යුතු DNA ඛණ්ඩ විශාල සංඛ්‍යාවක් ඇති වේ. වෙනස් සීමා එන්සයිම DNA අණුව වෙනස් ස්ථානවලින් කපන බැවින් මේ නිසා වෙනස් ප්‍රමාණවලින් යුතු DNA ඛණ්ඩ ඇති වේ.

5. ක්ලෝනකරණ වාහක ගොඩනැගීමේ දී සීමා සිතියම් ඉතා වැදගත් වේ. ආගන්තුක DNA ඛණ්ඩයක් ක්ලෝනකරණ ස්ථානයට නිවේශනය කිරීම සඳහා සීමා එන්සයිම මගින් මෙම සිතියම්වල දැක්වෙන ක්ලෝනකරණ ස්ථානයකදී ඒවා කපනු ලැබේ.

   සුලභව භාවිත වන ප්ලාස්මිඩ වාහකයක සීමා සිතියමක් 7.35 රූපයේ දැක්වේ.



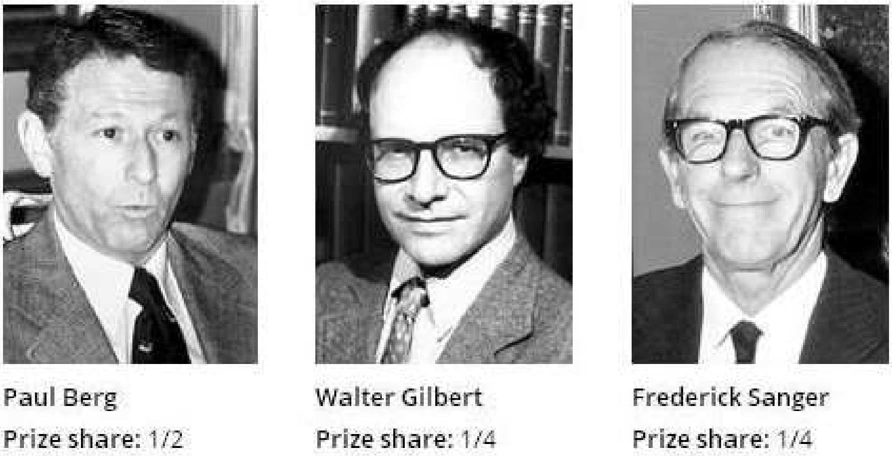
කුඩා DNA ඛණ්ඩයක සීමා සිතියම



pBr 322 ප්ලාස්මිඩ DNA වාහකයක සීමා සිතියම

DNA අනුක්‍රම නිර්ණය

1. DNA අණුවක එක් දමයක පිහිටන ඇඩිනීන්, ගුවැනින්, සයිටොසින් සහ තයමින් යන භස්මවල නිවැරදි අනුපිළිවෙළ නිර්ණය කිරීමේ ක්‍රියාවලිය DNA අනුක්‍රම නිර්ණයයි.
2. DNA අණුවක් අනුපූරක සහ ප්‍රතිසමාන්තර දාම දෙකකින් සෑදී ඇති අතර, ඉන් එක් රේඛීය අනුක්‍රමයක සැකසුම මෙහිදී නිර්ණය කෙරේ.
3. 1977 දී ෆෙඩ්රික් සැන්ගර් (Sanger) DNA අනුක්‍රමනිර්ණය හඳුන්වා දුන්නේය. (බ්‍රිතාන්‍ය ජෛව රසායනික විද්‍යාඥයෙක් වන සැන්ගර් රසායන විද්‍යාව පිළිබඳ නොබෙල් ත්‍යාගය දෙවතාවක් ලබාගත් විද්‍යාඥයකි.)
4. සැන්ගර් හඳුන්වා දුන් DNA අනුක්‍රම නිර්ණ ශිල්ප ක්‍රමය 1977 සිට අද දක්වා විශාල වශයෙන් වැඩිදියුණු වී ඇත.
5. 2003 දී සමස්ත මානව ජිනෝමය අනුක්‍රමය ලබා ගැනීමේ කාලය වන විට DNA අනුක්‍රම නිර්ණ තාක්ෂණය භාවිතයට ගත හැකිව පැවතිණි.
6. මානව ජිනෝම ව්‍යාපෘතිය යටතේ දී එය පළමු පරම්පරාවේ අනුක්‍රම නිර්ණය තාක්ෂණය ලෙස හැඳින්විණි. ඒ සඳහා වැඩි කාලයක් ගතවූ අතර කෙටි DNA ඛණ්ඩවල පමණක් අනුක්‍රමය නිර්ණය කළ හැකි විය.
7. එතැන් සිට ආරම්භ වූ ඊළඟ පරම්පරාව අනුක්‍රම නිර්ණය දෙවැනි පරම්පරාවේ අනුක්‍රමනිර්ණය දක්වා ද, වඩාත් නූතන තෙවැනි පරම්පරාව අනුක්‍රම නිර්ණය තාක්ෂණය දක්වා ද, වැඩි දියුණු වී ඇත.
8. වඩාත් ම නූතන තාක්ෂණය මගින් නියුක්ලියෝටයිඩ මිලියන ගණනක් දිගින් යුතු දාම අනුක්‍රමය කළ හැකි අතර, අනුක්‍රම නිර්ණය සඳහා අවශ්‍ය කාලය ද විශාල වශයෙන් අඩුවී ඇත.
9. මානව ජිනෝම ව්‍යාපෘතියට වසර 15 ක් ගත වූ පසු අද වන විට පුද්ගලයකුට තම අනුක්‍රම කළ ජිනෝමය පැය ගණනක් තුළ ඇමරිකන් ඩොලර් 1000 ක (2018 වර්ෂය) මිලකට ලබා ගත හැකි ය.
10. DNA අනුක්‍රම නිර්ණය තාක්ෂණයේ සංවර්ධනය සමග එහි භාවිතාවන් ද පුළුල් වීමකට ලක් වී ඇත.



1980 දී DNA අනුක්‍රම නිර්ණය සොයාගැනීම වෙනුවෙන් රසායනවිද්‍යාව පිළිබඳ නොබෙල් ත්‍යාගය ලබාගත් විද්‍යාඥයන්. ෆෙඩ්රික් සැන්ගර් මීට පෙර 1958 දී ද ඉන්සියුලින්වල ඇමයිනෝ අම්ල අනුපිළිවෙළ සොයාගැනීම වෙනුවෙන් නොබෙල් ත්‍යාගය ලබාගත්තේය.

DNA අනුක්‍රම නිර්ණයේ භාවිත

1. **අණුක ජීව විද්‍යාව:**
   (DNA වල කෘත්‍යයන් අවබෝධ කර ගැනීමට DNA භෂ්ම අනුක්‍රමයේ තොරතුරු වැදගත් වේ.)
   1. DNA අනුක්‍රමය අධ්‍යයනය මගින් පොලිපෙප්ටයිඩයක් සඳහා කේතනය වන ජානවල පිහිටීම සොයා ගත හැකි ය.
   2. ජානයක DNA අනුක්‍රමය තුළ ඇති ඇතැම් බලප්‍රදේශ (ඩොමේන) ප්‍රෝටීනයේ කෘත්‍යය නිර්ණය කරයි.
   3. උදාහරණයක් ලෙස, ප්‍රෝටීනයක් සෛල පටලයේ තීර්යක් පටල ප්‍රෝටීනයක් බවට පත් වේ ද නැතහොත් DNA බන්ධක ප්‍රෝටීනයක් බවට පත් වේ ද යන්න ජානයක DNA අනුක්‍රමය මගින් තීර්ණය වේ.

4. මානව ජීනෝමය තුළ ජානවල බහුපිටපත් (පිටපත් කිහිපයක්) ඇති බව DNA අනුක්‍රම නිර්ණය මගින් අනාවරණය වී ඇත.
5. ඇමයිනෝ අම්ල අනුක්‍රමික භාවිත කර පෙප්ටයිඩයක ඇමයිනෝ අම්ල අනුපිළිවෙළ නිර්ණය කළ හැකි නමුත් DNA අනුක්‍රමය ඔස්සේ ඇමයිනෝ අම්ල අනුක්‍රමය අවබෝධ කර ගැනීම දැන් වඩාත් පහසු වී ඇත.

2. පරිණාමික ජීව විද්‍යාව:

1. ජීව විශේෂයක් තුළ සාමාජිකයන්ගේ සහ වෙනස් විශේෂ අතර DNA අනුක්‍රමවල සමානතා සහ වෙනස්කම් ඔවුන්ගේ පරිණාමික බන්ධුතා අනාවරණය කරයි.
2. මෙයට හේතුව DNA පරම්පරාවෙන් පරම්පරාවට ගමන් කරන බැවින් කාලයත් සමග සිදුවන වෙනස්වීම් DNA තුළ ඒකරාශී වී තිබීමයි.
3. ආදි මානවයන්ගේ ආරක්ෂිත ව කාලයක් තිබූ මළසිරුරුවලින් (උදාහරණ ලෙස මමී හෝ අයිස් තුළ වැළලුණු හෝ ෆොසිල බවට පත් වූ මළසිරුරු) ලබා ගත් DNA අනුක්‍රම නිර්ණය මගින්, Homo sapiens පරිණාමය වූයේ කුමන කාලයක ද සහ ලෝකය ජය ගැනීමට ඔවුන් මුල් ස්ථානවලින් (අප්‍රිකාවෙන් පිටතට) සංක්‍රමණය වූයේ කෙසේ ද යන්න පිළිබඳ සැඟවුණ සත්‍ය දැන ගැනීමේ හැකියාව සලසා දී ඇත.

3. වෛද්‍ය විද්‍යාව:

1. ඇතැම් පවුල්වල ආවේණි ගතවන ප්‍රවේණික ආබාධ පිහිටයි.
2. නිරෝගී පුද්ගලයකු වාහකයකු වීම හෝ නොවීම DNA අනුක්‍රම නිර්ණය මගින් අනාවරණය කරගත හැක. යම් විශේෂිත රෝගයකට හේතු වන ඇලීලයක් පවුලක සාමාජිකයන් අතර ව්‍යාප්තව ඇති ආකාරය අවදානම් තක්සේරු කිරීමේ දී සහ කළමනාකරණය සැලසුම් කිරීමට ඉතා වැදගත් වේ.
3. පිළිකා රෝග විනිශ්චය ද DNA අනුක්‍රම නිර්ණය ඔස්සේ සිදු කළ හැකි ය.
4. පිළිකා සඳහා ඖෂධයක් දීමෙන් පසු රෝගියාගේ රුධිරය තුළ ඇති DNA වල අනුක්‍රම නිර්ණය මගින් ප්‍රතිචාරය හඳුනා ගත හැකි ය. ඖෂධය ප්‍රතිචාර දක්වන්නේ නම් රුධිරය තුළ වූ පිළිකාවලට සබඳතාවක් දක්වන DNA අනුක්‍රම අඩු විය යුතුය.
5. භ්‍රෑණයක කලල බන්ධයෙන් විසංගත කළ DNA ප්‍රවේණික ආබාධ තිබීම කල් තබා විනිශ්චයට ප්‍රයෝජනවත් වේ.

4. **ව්‍යවහාරික කටයුතු (Forensics)**

1. සර්වසම නිඹුල්ලුන් හැර පුද්ගලයන් දෙදෙනකු සර්වසම DNA අනුක්‍රම දැරීම අතිශයින් දුර්ලභ ය.
2. අපරාධයක් සිදු වූ ස්ථානයකින් (ස්ත්‍රී/ළමා දූෂණ, මිනීමරුවන්, බෝම්බ පිපිරීම) හමු වූ ද්‍රව්‍යවල (රුධිරය, කෙස්, ශුක්‍රාණු, ඛේටය) DNAවලට සමාන DNA අනුක්‍රම සහිත පුද්ගලයන් හඳුනා ගැනීම DNA අනුක්‍රම නිර්ණය මගින් සිදු කළ හැක. (උදාහරණ: හෝකන්දර සමූහ මිනීමැරුමේදී මිනීමරුවන් හඳුනාගැනීමට සේයා සඳෙව්මි දැරියගේ දූෂකයා හඳුනාගැනීමේදී මෙම තාක්ෂණය භාවිත විය.) එලෙස ම පිතෘත්වය පරීක්ෂා කිරීම DNA අනුක්‍රම නිර්ණයේ තවත් ප්‍රයෝජනයකි. උදාහරණ: 2004 සුනාමි ඛේදවාචකයෙන් අස්ථානගතවූ Baby 81 දරුවාගේ දෙමාපියන් හඳුනාගෙන ඔහු අභිලාෂ් ලෙස හඳුනාගැනීම.

5. **මෙටා ජාන විද්‍යාව (Metagenomics)**

1. පරිසරයක් තුළ ඇති DNA ප්‍රජා DNA ලෙස නිස්සාරණය කර මේ සාම්පලය සමස්තයක් ලෙස අධ්‍යයනය සිදු කරන විද්‍යාව මෙටාජාන විද්‍යාව ලෙස හැඳින්වේ.
2. මානව දේහය සහ වෙනත් පරිසරයක් වැනි යම් විශේෂ වාසස්ථානයක සිටින ක්ෂුද්‍රජීවීන්ගේ සම්පූර්ණ එකතුව ක්ෂුද්‍රබියෝමයක් ලෙස හැඳින්වේ. ක්ෂුද්‍රබියෝමයක සිටින ජීවීන් අධ්‍යයනය සඳහා වන සාම්ප්‍රදායික ක්‍රම ශුද්ධ රෝපිත ලෙස වගා කිරීම මත පදනම් වේ.
4. කෙසේ වුව ද විශාල ක්ෂුද්‍රජීවී සංඛ්‍යාවක් මෙසේ රෝපණ මාධ්‍ය තුළ රෝපණය කළ නොහැකි බැවින් හඳුනාගතහැකි ක්ෂුද්‍රජීවීන් විශාල ප්‍රමාණයක් නොසලකා හැරීමට ලක්වේ.

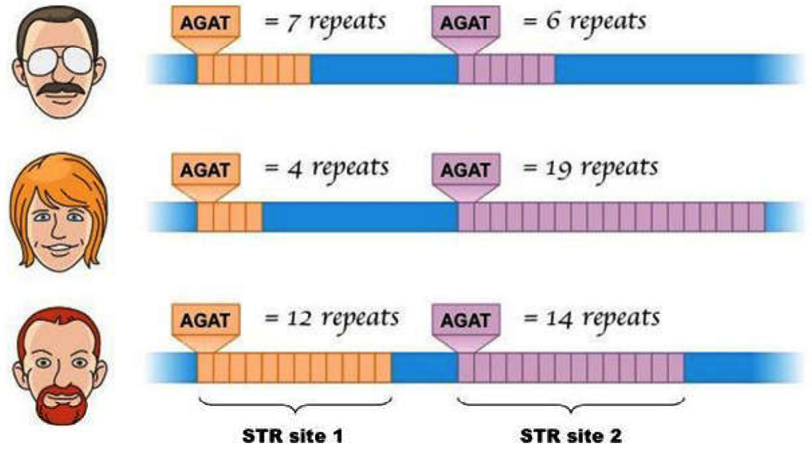
5. මෙටාජාන විද්‍යාව මගින් මෙම ප්‍රජා DNA තුළ ඇති විශිෂ්ට අනුක්‍රම යෝග්‍ය මෘදුකාංග භාවිතා කර විශ්ලේෂණය මගින් පරිසරයක වූ වෙනස් විශේෂ රාශියක අනන්‍යතාව සොයා ගැනීමට හැකි වේ.
6. ඔවුන්ගෙන් සමහරකු වර්තමානයේ හඳුනාගෙන ඇති අතර, තවත් විශාල සංඛ්‍යාවක් නව විශේෂ විය හැකි ය.
7. ඒ නිසා පරිසර විද්‍යාව, වසංගත රෝග අධ්‍යයනය (COVID 19 වැනි ඉදිරියේදී පැමිණිය හැකි නව රෝග කාරකයන් හඳුනාගැනීමට) සහ වෙනත් ක්ෂේත්‍රවල දී මෙටා ජාන විද්‍යාව වැදගත් වේ.

6. **DNA ඇඟිලි සලකුණු තාක්ෂණය (DNA fingerprinting)**

1. යම් පුද්ගලයෙකුට අනන්‍ය ජාන සලකුණ/DNA රටාව DNA ඇඟිලි සලකුණක් හෙවත් ජාන පැතිකඩක් (DNA Profile) ලෙස හැඳින්වේ.
2. සලකුණු තිබීම හෝ නොතිබීම දැනට තීරණය කරනු ලබන්නේ සලකුණ සඳහා විශිෂ්ට මූලිකයක් (Primer) භාවිත කරමින් ප්‍රධාන වශයෙන් PCR මගිනි.
3. එම සලකුණු කුඩා/කෙටි සමපාටික පිළියුම් (small/short tandem repeats/STR) හෙවත් ක්ෂුද්‍ර අනුසැරිය DNA (microsatellite DNA) ලෙස හැඳින්වේ.
4. සූන්‍යෂ්ටික DNAවල ඇතැම් නිර්කේත අනුක්‍රම අඩංගු වන අතර, එහි දී දෙකේ සිට හය දක්වා හෂ්ම යුගල සංඛ්‍යාවක් එකක් පසුපස එකක් 100 සිට 1000 වාරයක් පුනරාවර්තී වන බැවින් එම පිළියුම් (පුනරාවර්ථ)වල දිග විවිධ වේ.

   උදාහරණ: TG හෂ්ම අනුක්‍රමය 8 වරක් පුනරාවර්ත වන විට

   $(TG)_8$ = TGTGTGTGTGTGTGTG
   AAT හෂ්ම අනුක්‍රමය 6 වරක් පුනරාවර්ත වන විට
   $(AAT)_6$= AATAATAATAATAATAAT



පුද්ගලයන් තිදෙනකුගේ STR පථ දෙකක පුනරාවර්ත රටාවල විවිධත්වය

5. ඒවා නිර්කේත බැවින් ඒවායේ වෙනස්වීම රූපාණුදර්ශය මත බලපෑමක් නොකරයි.
6. නමුත් මේවා පුද්ගලයන් අනුව වෙනස් (විචල්‍ය) වන බැවින් සලකුණු DNA ලෙස භාවිත කළ හැකි ය.
7. STR සලකුණු භාවිත කිරීමේ වාසි නම්
   - ඒවා ජිනෝමය තුළ බහුලව තිබීම
   - PCR මගින් පහසුවෙන් ප්‍රගුණනය කළ හැකි වීම
   - බෙහෙවින් විචල්‍ය වන බහුරූප්‍යතාව
   - ලාක්ෂණික STR විශාල සංඛ්‍යාවක් පැවතීම
8. DNA ඇඟිලි සලකුණු තාක්ෂණය සඳහා කලින් භාවිත කළ ක්‍රමය වන්නේ, සලකුණු කරන ලද සලකුණක් (labelled marker) භාවිත කර විශිෂ්ට අනුක්‍රම ඒෂණ කිරීමයි (DNA ඒෂණ සහ ඒවා දෙමුහුම්කරණය කිරීම. මේ පිළිබඳ මීට පෙර සඳහන් විය.)

9. නමුත් දැන් DNA ආකෘති පැතිකඩ ලබාගැනීම සඳහා සලකුණු කට්ටලයක් (ඒෂණ හෝ PCR මූලිකය) භාවිතා වේ.

10. පුද්ගලයන්ට බොහොමයකට සමාන පටි රටාවක් (banding pattern) පිහිටිය හැකි බැවින් එක සලකුණක් (marker) භාවිත කර DNA ඇඟිලි සලකුණක් ලබා ගත නොහැකි වේ.

11. සලකුණු වැඩි සංඛ්‍යාවක් සංකලන ලෙස භාවිත වන විට එක ම රටාව හමු වීමේ සම්භාවිතාව ක්‍රමයෙන් අඩු වේ. සලකුණු 13 ක් භාවිත වූයේ නම් එකම රටාව හමුවීමේ සම්භාවිතාව බිලියන 10 සිට ට්‍රිලියන ගණනාවක් අතර අගයකට පැමිණෙන බව ගණනය කර ඇත.

12. ලෝක ජනගහනය බිලියන 7 ක් පමණ වන බැවින්, පුද්ගලයන් දෙදෙනකු එක ම ප්‍රවේණි පැතිකඩ/ ඇඟිලි සලකුණ දැරීම බෙහෙවින් ම විය නොහැකි දෙයකි.

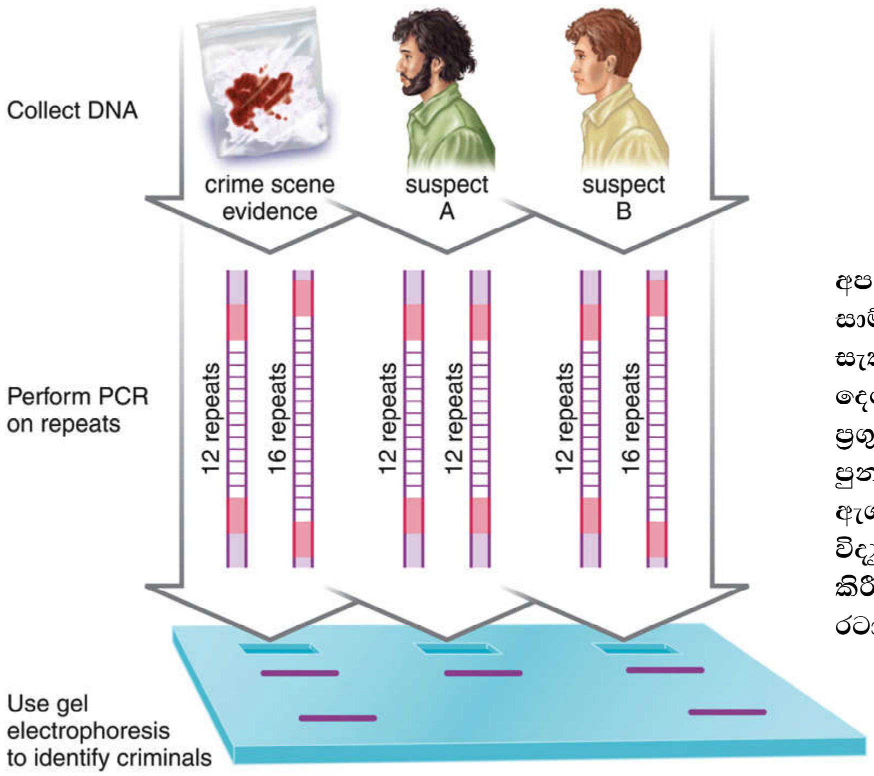
DNA ඇඟිලි සලකුණු තාක්ෂණයේ යෙදීම්

1. අපරාධකරුවන් හඳුනා ගැනීම සහ ගොදුරු වූවන් හඳුනා ගැනීම (රූපය 7.37)
   සැකකරුවන් (මිනීමරුවන්, ස්ත්‍රී දූෂකයන්) ගේ ඇඟිලි සලකුණු, අපරාධය සිදු වූ ස්ථානයේ ජෛවීය ද්‍රව්‍යවලින් ලබා ගත් ඇඟිලි සලකුණු සමග ගැලපීමට ලක්කරයි. අපරාධකරුවන්ගේ අනන්‍යතාව පිළිබඳ විශේෂඥ අදහස අධිකරණය මගින් පිළිගනියි.

   අපරාධයක් වූ ස්ථානයකින් ලැබුණු සාම්පලයක ඇඟිලි සලකුණු සැකකරුවන් තිදෙනකුගේ ඇඟිලි සලකුණු සමග සැසඳීමේ දී, දෙවන සැකකරුගේ DNA පැතිකඩ අපරාධ ස්ථානයෙන් ලැබුණු සාම්පලය සමග ගැළපේ. (රූපය 7.37)

2. පීතෘත්ව පරීක්ෂාව
   දරුවකුගේ DNA ඇඟිලි සලකුණ, පියාගේ හෝ මවගේ DNA ඇඟිලි සලකුණු සමග කිසිවිටෙකත් සර්වසම නොවේ. නමුත් දරුවකුට ඇතැම් සලකුණු පියාගෙන් ද අනෙක්වා මවගෙන් ද ලැබේ. ඒ නිසා දරුවකුගේ පීතෘත්වය ගැටලුවක් වී ඇති විට යම් පුද්ගලයකු එකී දරුවාගේ පියා ලෙස තහවුරු කිරීමට හෝ එසේ නොවේ යැයි බැහැර කිරීමට DNA පැතිකඩ නිරවද්‍යවම භාවිත කළ හැකි ය (රූපය 7.38)

3. ආසාදිත කාරක හඳුනා ගැනීම:
   ව්‍යාධිජනක ආසාදක ජීවියකුගේ ඇඟිලි සලකුණ සඳහා ඒෂණ හෝ මූලික ඇති විට මේ ව්‍යාධිජනකයා රෝගියා තුළ, ආහාර හෝ ජලය තුළ සිටීම හෝ නොසිටීම DNA ඇඟිලි සලකුණු තාක්ෂණය මගින් අනාවරණය කළ හැකි ය.



අපරාධ ස්ථානයක සාම්පලයක සහ සැකකරුවන් දෙදෙනෙකුගේ **PCR** මගින් ප්‍රගුණනය කළ **STR** පුනරාවර්ත ඒකක සහ ඒවා ඇගරෝස්ජෙල විද්‍යුතාගමනයට ලක් කිරීමෙන් ලබාගත් ඛණ්ඩ රටාව.

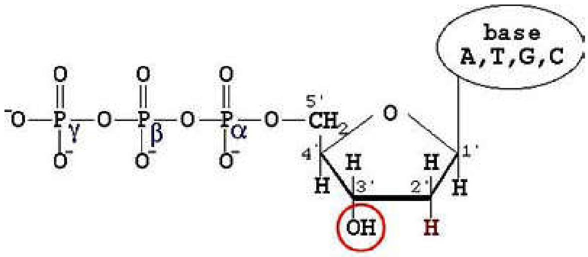
පොලිමරේස් දාම ප්‍රතික්‍රියාව (PCR)

1. DNA ප්‍රතිවලිත වීම අනුකරණය කරමින් නාලස්ථව නිශ්චිත DNA අනුක්‍රමයක පිටපත් රාශියක් (මිලියන හෝ බිලියන ගණනක්) ලබාගැනීමට (DNA ප්‍රගුණනය හෙවත් Amplifi කිරීමට) භාවිතා වන තාක්ෂණය මෙසේ හැඳින්වේ. PCR යනු ඉහළ නිවරද්‍යතාවකින් යුතුව ඉක්මනින් DNA වල පිටපත් විශාල සංඛ්‍යාවක් ලබාගත හැකි ක්‍රමයකි.

2. මෙහිදී PCR මිශ්‍රණයක අඩංගු විය යුතු ද්‍රව්‍ය

   a. DNA පොලිමරේස් එන්සයිමය - මෙය ප්‍රතිවලිත වීම සහ නව DNA දාමය දිගු වීමේ ප්‍රතික්‍රියාව උත්ප්‍රේරණය කරයි.

   b. අමුද්‍රව්‍ය ලෙස dNTP (ඩිඔක්සි රයිබොනියුක්ලියොටයිඩ ට්‍රයි පොස්පේට්) - dNTP සෑදී ඇත්තේ පොස්පේට් කාණ්ඩ තුනකින්, ඩිඔක්සි රයිබෝස් සීනි අණුවකින් සහ නයිට්‍රජනීය භෂ්ම අණුවකින්ය. මෙම dNTP ඩිඔක්සිරයිබෝනියුක්ලියොටයිඩ වර්ග හතරකි. ඒවා dATP, dGTP, dTTP සහ dCTP ය.



dNTP
deoxyribonucleotide triphosphate

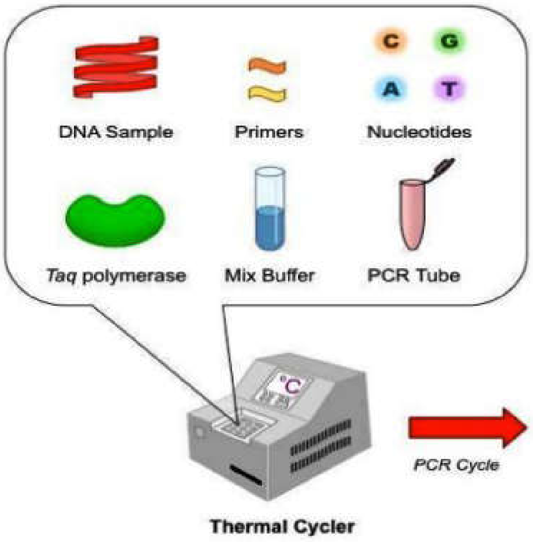
   c. ප්‍රගුණනය කිරීමට අවශ්‍ය තනි DNA අච්චු දාමය

   d. තනිදම ඔලිගොනියුක්ලියෝටයිඩ මූලික (Primer) - DNA පොලිමරේස් මගින් DNA ප්‍රතිවලිත වීම ආරම්භ කිරීම සඳහා මූලිකයක් අවශ්‍ය වේ. PCR වල මූලිකය නියුක්ලියොටයිඩ සුළු සංඛ්‍යාවක් සහිත (ඔලිගොනියුක්ලියොටයිඩ) විශිෂ්ට DNA අනුක්‍රමයකි.

   මෙහිදී මූලික දෙකක් භාවිතා වන අතර ඉන් එකක් එක් DNA දමයක 3' අන්තයේ අනුක්‍රමයටද අනෙක් මූලිකය ඊළඟ දමයේ 3' අන්තයටද බැඳේ. (සෛලය තුළදී මූලික ලෙස ක්‍රියාකරන්නේ RNA අනුක්‍රමයක් වුවද PCR සඳහා යොදගන්නේ DNA මූලිකයකි.)

   e. එන්සයිමය සඳහා සහසාධක - Mg^{2+}

   f. ප්‍රතික්‍රියාවට අවශ්‍ය ස්වාරක්ෂකය.



PCR මිශ්‍රණයක අඩංගු විය යුතු ද්‍රව්‍ය, PCR නළයක් සහ තාපජ චක්‍රීකරණ PCR උපකරණය

PCRවලදී චක්‍ර කිහිපයක් සිදුකරන අතර එම එක් එක් චක්‍රයක පියවර තුනක් ඇත.

1. දුස්වභාවීකරණය
2. තාපානුශීත යුගලනය
3. දිගුවීම

1. **දුස්වභාවීකරණය**

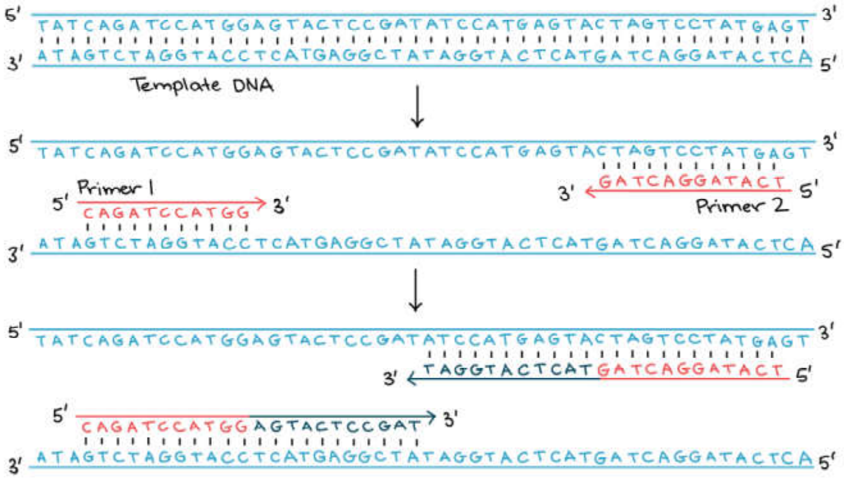
DNA ඛණ්ඩයක පිටපත් කරනු ලබන අනුක්‍රමය ඇත්තේ ds DNA හෙවත් ද්විපට DNA ලෙසය. ප්‍රථමයෙන්ම PCR මිශ්‍රණය 95^{0}C ට රත් කිරීම මගින් දුස්වභාවිකරණය කරනු ලැබේ. මෙනිසා ඊළඟ පියවර සඳහා අවශ්‍ය තනිදම DNA අච්චු දෙකක් ඇති වේ.

මෙම උෂ්ණත්වයේ දී එන්සයිම වැඩි ප්‍රමාණයක් දුස්වභාවීකරණය වන බැවින් දුස්වභාවිකරණයට පසුව DNA පොලිමරේස් එකතු කිරීම අවශ්‍ය විය හැක.

නමුත් තාපකාමී ජීවීන්ගේ එන්සයිම ඉහළ උෂ්ණත්වයට ප්‍රතිරෝධී ය. ඒ නිසා PCR හි දී භාවිතා වන සුලබ තාප ප්‍රතිරෝධී DNA පොලිමරේසය Taq DNA පොලිමරේස් වන අතර, එය තාපකාමී බැක්ටීරියාවක් වන Thermus aquaticus ගෙන් ලබා ගනී.

2. **තාපානුශීත යුගලනය**

මෙහිදී උෂ්ණත්වය අඩුකරන අතර (සිසිල් කිරීම), එවිට මූලික තනිදම අච්චු DNA වල අනුපූරක භෂ්ම අනුක්‍රමයට හයිඩ්‍රජන් බන්ධන මගින් බැඳේ. අඩු උෂ්ණත්වවලදී මෙය සිදු වන බැවින්, මෙය තාපානුශීත යුගලනය ලෙස හැඳින්වේ. තාපානුශීත යුගලනය වන උෂ්ණත්වය මූලිකයේ දිග සහ අනුක්‍රමය මත රඳා පවතී.



DNA අච්චුවලට මූලික බැඳි පොලිමරේස් එන්සයිම ක්‍රියාව නිසා නව DNA දාම සංස්ලේෂණය වෙමින් දෙපසට දිගුවීම

3. **දිගු වීම (මූලිකය දිගුවීම හෙවත් බහුඅවයවීකරණය)**

මෙහිදී DNA පොලිමරේස් මගින් අච්චු DNA වල 3' අන්තයේ වූ මූලිකයට නව නියුක්ලියෝටයිඩ එක්කරමින් DNA දාමය දික්කරයි. මෙහිදී මූලිකය දිගු වීම (DNA සංශ්ලේෂණය) වෙනස් උෂ්ණත්වයක දී (භාවිත කළ DNA පොලිමරේස්වල ප්‍රශස්ත උෂ්ණත්වයේදී) සිදු වේ. උදහරණ: Taq DNA පොලිමරේස්වල ප්‍රශස්ත උෂ්ණත්වය 72^{0}C වේ. මෙහිදී ප්‍රමාණවත් කාලයක් ලබා දුන් විට අච්චු DNA වලට අනුපූරක පිටපත සෑදී සම්පූර්ණ වේ.

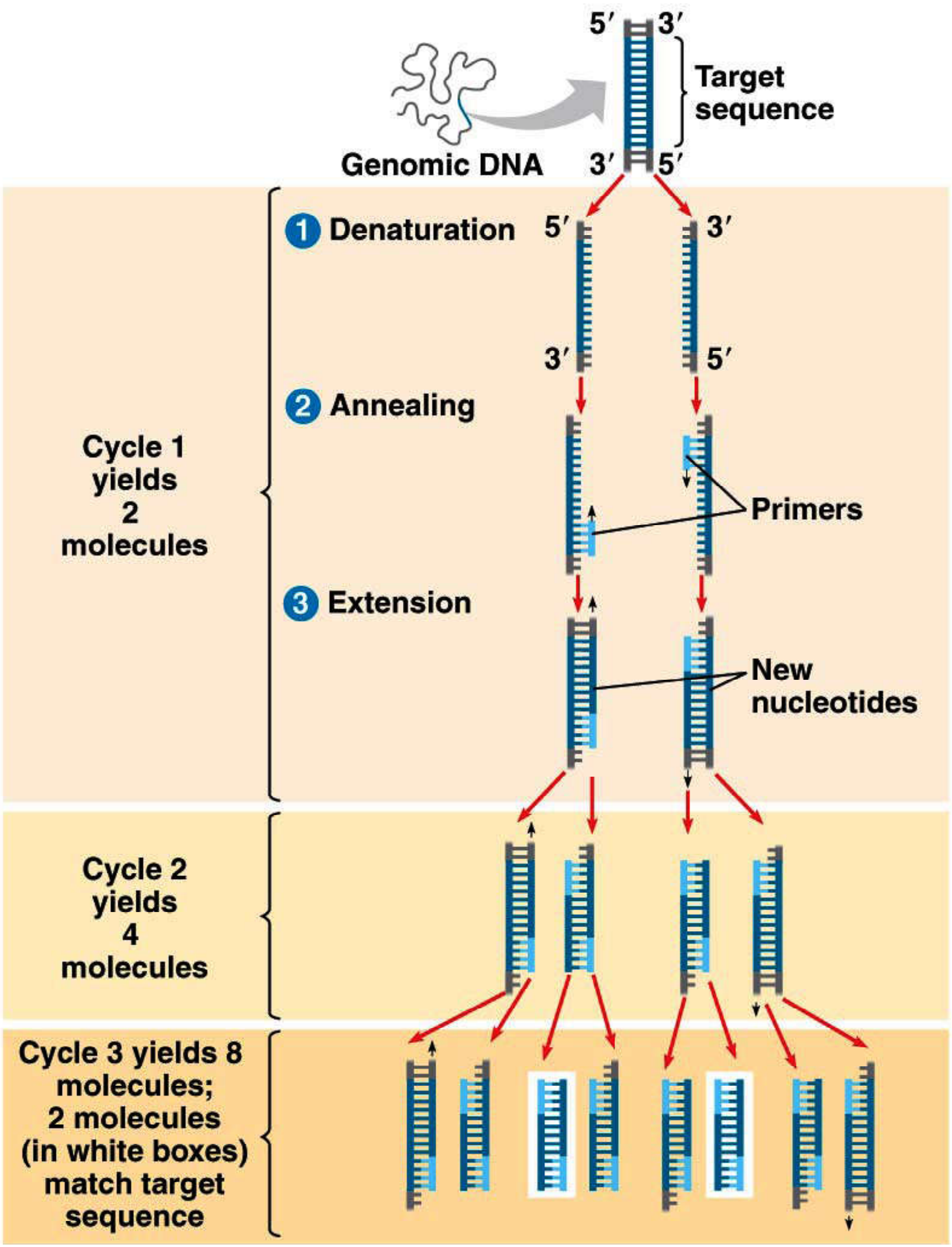
ප්‍රථම තාපජ චක්‍රයක අවසානයේ (දුස්වභාවීකරණය, තාපානුශිත යුගලනය, සහ දිගු වීම) එක් දාමයකින් එක් පිටපත බැගින් පිටපත් දෙකක් ලැබේ.

කෙසේ වුව ද, මූලිකයෙන් ආරම්භ වී සම්ප්‍රේෂණය වන නව DNA පිටපත ඉලක්ක DNA අනුක්‍රමයේ අපේක්ෂිත පිටපතට වඩා දිගින් වැඩි වියහැකි නමුත් PCR චක්‍ර දෙකකට පසුව ඉලක්ක DNA වල නිරවද්‍ය පිටපත සංශ්ලේෂණය වේ.

පළමු චක්‍රයේදී DNA පිටපත් දෙකක්ද, දෙවැනි චක්‍රයේදී පිටපත් හතරක්ද ලැබේ. පසුව ඉලක්ක DNA වල පිටපත් එක් එක් චක්‍රයට පසුව ඝාතීය ආකාරයකට (exponential) (2, 4, 8, 16 ආදි ලෙස) නිපදවේ. දර්ශීය PCR වල චක්‍ර 35-40 දක්වා ඇත. අවසානයේ තනි DNA අච්චු අණුවකින් අවශ්‍ය DNA අනුක්‍රමයේ පිටපත් මිලියන ගණනක් නිපදවේ.

මුල් චක්‍ර තුනේ දී PCR ඵල සෑදෙන අන්දම පහත රූපයේ සහ සම්පත් පොතෙහි 7.39 රූපයේ දක්වේ.

පුනරාවර්තනය වන චක්‍ර ස්වයංක්‍රීයව මෙහෙයවෙන අතර එය PCR යන්ත්‍රය (තාපජ චක්‍රීකාරකය) තුළ සිදු කෙරේ. PCR මිශ්‍රණය PCR නල තුළ පිළියෙල කරන අතර, ඒවා PCR යන්ත්‍රයේ සිදුරු තුළට ඇතුළු කෙරේ (නිවේශනය කරයි.)

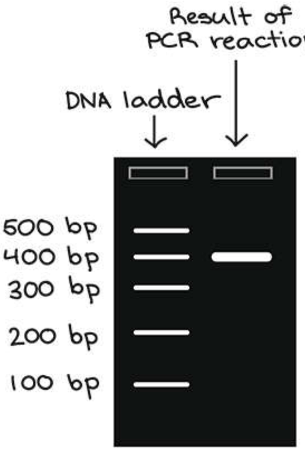


PCR ප්‍රතික්‍රියාවක මුල් චක්‍ර තුනේදී PCR ඵල සෑදෙන අයුරු

PCR සහ ජෙලවිද්‍යුතාගමනය

PCR විශ්ලේෂණය මගින් ප්‍රගුණනය කළ DNA ඛණ්ඩ බලාගැනීම සඳහා ජෙලවිද්‍යුතාගමනය භාවිතා කෙරේ. DNA අන්වීක්ෂයකට පවා නොපෙනෙන බැවින් PCR මගින් ප්‍රගුණනය කළ විට අදාළ DNA අනුක්‍රමයේ පිටපත් විශාල ප්‍රමාණයක් ලැබෙන බැවින් එය ජෙලයේ පටියක් (Band) ලෙස බලාගත හැකිය.

උදහරණ: මෙම රූපයේ දක්වා ඇති පරිදි භෂ්ම යුගල් 400 ක් සහිත (400 bp) සහිත පටියක් ජෙලයේ දැකගත හැකිවේ.



සම්මත දිග ප්‍රමාණ සහිත DNA ඉනිමගක් (වමේ) සහ PCR මගින් ප්‍රගුණනය කොට ලබාගත් ඛණ්ඩය පෙන්වන ජෙලවිද්‍යුතාගමන රූපයක්

PCR වල භාවිත

1. ආසාදී කාරක (උදා: HIV හෙපටයිටිස්, මැලේරියා) තිබීම සඳහා සායනික නිදර්ශක විශ්ලේෂණය
2. ප්‍රවේණික රෝග ඇති කරන විකෘති විශ්ලේෂණය උදා: සිස්ටික් ෆෛබ්‍රෝසිස්, දෑකැති සෛල රක්තහීනතාව, ෆීනයිල් කීටොනුයූරියා)
3. ව්‍යෝහාරික පරීක්ෂණාගාරවල භාවිත වේ. අච්චු DNA කුඩා සංඛ්‍යාවකින් පිටපත් විශාල සංඛ්‍යාවක් සෑදීමට PCR ට හැකි බැවින් එය විශේෂයෙන් ප්‍රයෝජනවත් වේ. මන්ද යත්: ආරම්භක DNA ඉතා සුළු ප්‍රමාණයක් පමණක් අවශ්‍ය බැවිනි (උදා: රුධිර බින්දුවක් හෝ තනි කෙස් ගසක්).
4. PCR ක්ලෝනීකරණ ක්‍රියාමාර්ගයේ අත්‍යවශ්‍ය ශිල්ප ක්‍රමයක් වන අතර, එය අච්චු දාම ඉතා කුඩා ප්‍රමාණයකින් ශුද්ධ DNA විශාල ප්‍රමාණයක් ජනනයට සහ යම් විශේෂ ජානයක් ගැන තවදුරටත් අධ්‍යයනයට ඉඩ සලසයි.
5. DNA අනුක්‍රමණිර්ණය PCR මත රඳා පවතී.
6. පරිණාමික ජීව විද්‍යා ක්ෂේත්‍රයේ දී විශේෂ අතර සබඳතා හඳුනා ගැනීමට සහ ගවේෂණයට PCR භාවිතයට ගනී.
7. මානව විද්‍යාවේ දී පුරාතන මානව සංක්‍රමණ රටා අවබෝධ කර ගැනීමට ද එය භාවිත වේ. පුරාවිද්‍යාවේ දී පුරාතන මානව වර්ගයා පිළිබඳ සොයා බැලීමට එය භාවිතයට ගන්නා ලදී.
8. වසර මිලියන ගණනාවක් පැරණි නෂ්ට වූ විශේෂවලින් හෝ අධිශීතසංරක්ෂිත ෆොසිලවලින් ගත් DNA ප්‍රගුණනය මගින් පාෂාණිය ධාතු විද්‍යාඥයෝ PCR සුලබව භාවිත කරති. එමගින් ඔවුන්ගේ පරිණාමික බන්ධුතා පැහැදිලි කිරීමට තවදුරටත් අධ්‍යයනයට ලක් කළ හැකි ය.

RT-PCR රිවර්ස් ට්‍රාන්ස්ක්‍රිප්ටේස් පොලිමරේස් දාම ප්‍රතික්‍රියාව

PCR පරීක්ෂාවේ විකරණයක් වන මෙහිදී DNA අච්චුවක් වෙනුවට RNA අච්චුවක් භාවිතා කොට සාම්පලයක RNA විශාලනය කර ගැනීම සහ හඳුනාගැනීම සිදුකෙරේ. මෙහිදී ප්‍රථමයෙන් RNA සාම්පලය රිවර්ස් ට්‍රාන්ස්ක්‍රිප්ටේස් එන්සයිමය මගින් cDNA (අනුපූරක DNA) වලට පරිවර්තනය කෙරේ. පසුව එම cDNA සාමාන්‍ය PCR වලට ලක් කෙරේ.

Real Time RT-PCR මගින් සාම්පලයක RNA හඳුනාගැනීම සහ එහි ඇති RNA ප්‍රමාණය නිර්ණය කරනු ලැබේ. පුද්ගලයකුට COVID-19 ආසාදනය වී ඇද්දයි බැලීමට එම පුද්ගලයාගේ නාසා ග්‍රසනිකාවෙන් හෝ ස්වරාලික ග්‍රසනිකාවෙන් (නාසය තුළින් හෝ මුඛය තුළින්) ලබාගත් (swab) මාත්තුවක එම වයිරසය තිබේ දැයි මෙම RT-PCR තාක්ෂණය මගින් පරීක්ෂා කරනු ලැබේ.