7

ජාන තාක්ෂණය

1. DNA විසංගමනයෙන් (DNA Isolation) ආරම්භ කොට, අවශ්‍ය DNA අනුක්‍රමය හඳුනාගැනීම සහ පසුව ජාන තාක්ෂණය හෝ ප්‍රතිසංයෝජිත DNA තාක්ෂණය දක්වා ජාන තාක්ෂණයේ ක්‍රියාවලි සඳහා මෙම ශිල්ප ක්‍රම භාවිතා කෙරේ.
2. විසංගමනය කළ DNA කැපීම, වෙනස් DNA ඛණ්ඩ සම්බන්ධ කිරීම සහ සමහර විට DNA නාළස්ථව පිටපත් කිරීම අවශ්‍ය වේ. මේ සඳහා DNA මත ක්‍රියාකරන එන්සයිම ගණනාවක් මෙයට සහභාගි වේ.
3. අනන්‍ය DNA අනුක්‍රමයක් අනිකුත් DNA වලින් වෙන්කොට හඳුනාගැනීම සඳහා ඛණ්ඩවල ප්‍රමාණය වෙන්කොට හඳුනාගැනීම අවශ්‍ය වේ. ප්‍රවේණිකව විකරණය කළ (GMO) ජීවියකු සාද ගැනීමේදී එම DNA ප්‍රතිග්‍රාහක ජීවියකුට හුවමාරු කළ යුතු වේ.
6. DNA පිටපත් සෑදීම, ක්ලෝනකරණය භාවිතා කරමින් ජීවස්ථව (In vivo) සහ පොලිමරේස් දාම ප්‍රතික්‍රියාව (PCR) භාවිතා කරමින් නාළස්ථව (In vitro) සිදු කළ හැකිය.
7. එමෙන්ම DNA අනුක්‍රම නිර්ණය (DNA sequence) ද ඉතා වැදගත් ශිල්ප ක්‍රමයකි.

DNA විසංගමනය (DNA isolation)

1. සාම්පලයකින් (සෙල හෝ වයිරසවලින්) DNA නිස්සාරණය (DNA extraction) ලෙස හැඳින්වේ.
2. දායක සෛලයක සම්පූර්ණ ගෙනෝමයෙන් අදාළ/ඉලක්ක DNA අනුක්‍රමයක් විසංගමනය සමග ජාන තාක්ෂණය ආරම්භ වේ.
3. DNA විසංගමනය පහත ක්‍රමවේද සඳහා අවශ්‍ය වේ.
   1. සංශුද්ධ කළ DNA ලබා ගැනීම
   2. DNA වල ව්‍යුහය සහ රසායනය අධ්‍යයනය
   3. DNA ප්‍රෝටීන අන්තර්ක්‍රියා පිරික්සීම
   4. DNA දෙමුහුම්කරණය (DNA hybridization) සිදුකිරීම
   5. DNA අනුක්‍රම නිර්ණය
   6. PCR - පොලිමරේස් දාම ප්‍රතික්‍රියාව
   7. බොහෝ ප්‍රවේණික අධ්‍යයන
   8. ජාන ක්ලෝනකරණය
4. ප්ලාස්මිඩ DNA සහ වෛරස DNA වැනි කෙටි DNA සම්පූර්ණ දිගම විසංගමනය කළ හැකි වුවද, සූන්‍යෂ්ටික DNA ඉතා දිග බැවින් ඒවායේ සම්පූර්ණ දිග විසංගමනය කළ නොහැක.
5. එසේ වෙතත් DNA නිස්සාරණ ක්‍රියාවලියේදී DNA කැපීයාම හෝ කැඩීයාම අවම කළ යුතු වේ.

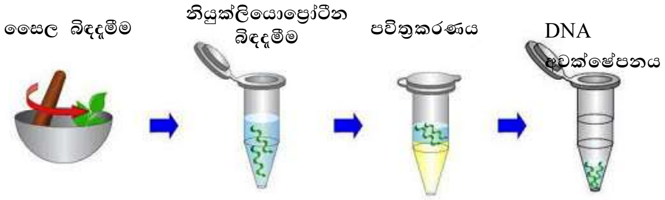
DNA විසංගමනයට භාවිතා කරන ශිල්ප ක්‍රම සහ පියවර

DNA විසංගමනය සඳහා විද්‍යාගාරවල වෙනස් ක්‍රමවේද භාවිතා කෙරෙනඅතර සම්පත් පොතට අනුව DNA විසංගමනය පියවර 5 කින් යුක්තය.

1. සෛල බිඳ දැමීම
2. DNAse ක්‍රියාව නිශේධනය
3. නියුක්ලියෝප්‍රෝටීන බිඳ දැමීම
4. පවිත්‍රකරණය
5. DNA අවක්ෂේපනය

1. සමජාතිකරණය හෝ සෛල බිඳදැමීම

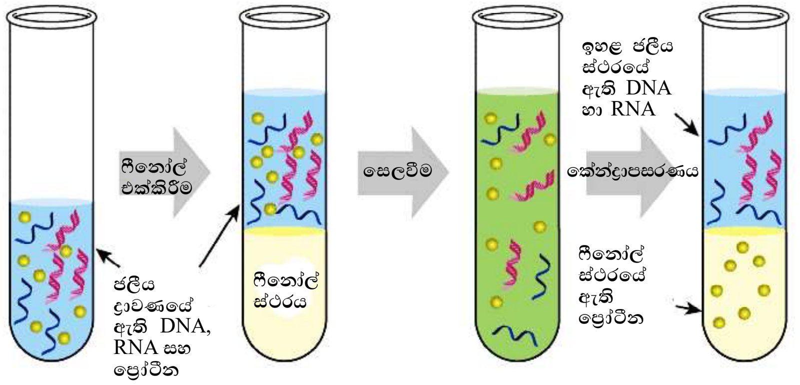
   1. සූන්‍යෂ්ටික සෛලයක DNA න්‍යෂ්ටිය තුළ පිහිටන අතර ප්‍රාග් න්‍යෂ්ටික සෛලයක ඒවා නියුක්ලියෝඩය තුළ ඒකරාශී ඇත.



2. DNA විසංගමනයේ ප්‍රථම පියවර වන්නේ සෛලවලින් DNA නිදහස් කර ගැනීමයි. මේ සඳහා සෛල ජීරණය ආකාර දෙකකට සිදුකරයි.
   1. සෛල යාන්ත්‍රිකව බිඳහෙළීම (ජාරණය) - ඇඹරීම (grinding) සහ සමජාතිකරණය (Homogenigation) මගින්
   2. එන්සයිම මගින් - උදාහරණ - ලයිසොසයිම් වැනි එන්සයිම මගින් බැක්ටීරියා සෛල බිත්ති බිඳදැමීම

2. DNAse ක්‍රියාව නිශේධනය
   1. සෛල බිඳ දමූ පසු පිටවන DNA ඩිඔක්සිරයිබොනියුක්ලියේස් (DNAse) වැනි DNA හායනය කරන එන්සයිම මගින් කැපීම්වලට භාජනය වී හායනය විය හැක.
   2. මේ නිසා නියුක්ලියේස් ක්‍රියාකාරිත්වයට අවශ්‍ය ලෝහ අයන ඉවත් කිරීමට නබරීය කාරක (Chelating agents) රසායනික ද්‍රව්‍ය එකතු කරනු ලැබේ.
   3. එවිට නියුක්ලියේස් ක්‍රියාකාරිත්වය නිශේධනය වී DNA ආරක්ෂා වේ.

3. නියුක්ලියෝප්‍රෝටීන සංකීර්ණ විඝටනය
   1. DNA බැඳී ඇති හිස්ටෝන ප්‍රෝටීන බිඳදැමීම එහිදී සිදුකරයි.
   2. මේ සඳහා SDS (Sodium dodecyl sulphate) වැනි ක්ෂාලකයක් (detergent), ෆීනෝල් හෝ ප්‍රෝටියෝලටික එන්සයිම භාවිතා කෙරේ.

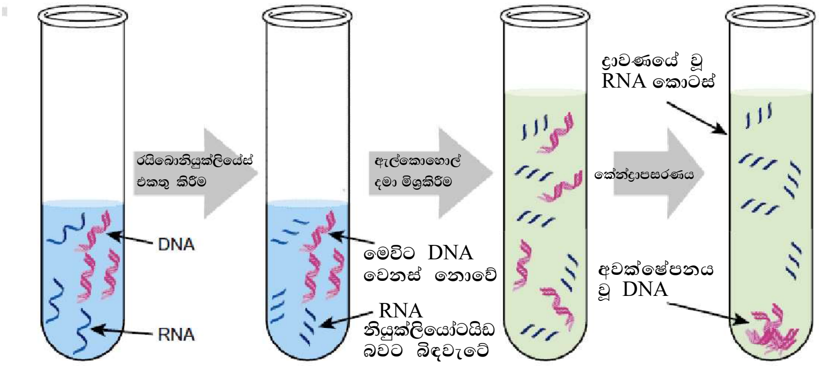


4. පවිත්‍රකරණය (Purification) - අපවිත්‍රකාරක ඉවත් කිරීම.

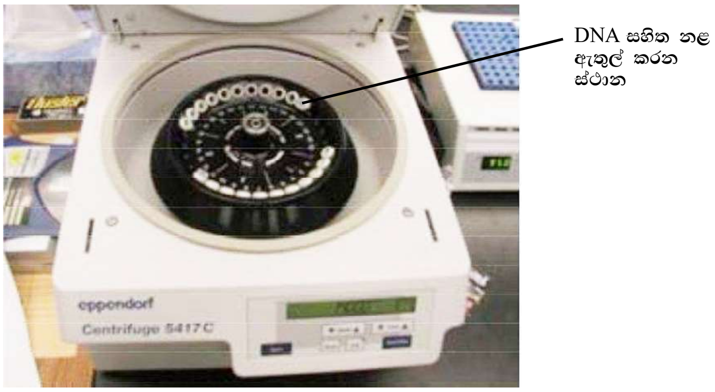
ඉහත සඳහන් කළ හිස්ටෝන ප්‍රෝටීන මෙන්ම බිඳවැටුණු සෛලවල පිහිටන වෙනත් අණු වර්ග ද (පොලිසැකරයිඩ, ලිපිඩ, සෙලියුලෝස්, කයිටීන්) DNA සඳහා අපවිත්‍රකාරක වන අතර, මෙහිදී එම අපවිත්‍රකාරක ඉවත් කොට DNA පවිත්‍ර කිරීම සිදුකරයි.

5. DNA අවක්ශේපණය

1. මෙහිදී ජලීය කලාවක දියවී ඇති DNA ශීත (0^0C) එතනෝල් මගින් අවක්ෂේපනය කෙරේ.
2. ඊටපසු එම අවක්ෂේපය ස්වාරක්ෂකයක් තුළ නැවත දියකරයි.
3. පසුව DNAse සහිත RNAse (රයිබොනියුක්ලියේස්) මගින් පිරියම් කිරීම මගින් RNA ඉවත් කරයි.



- DNA අවක්ශේපණය සඳහා DNA සහිත නළ ඝනත්ව අනුක්‍රමන කේන්ද්‍රපසරණ උපකරණයක දමා අධික වේගයකින් කේන්ද්‍රාපසරණය කරනු ලැබේ. මෙවිට ඝනත්වය වැඩි DNA එම නළයේ පතුළට අවක්ෂේපණය වන බැවින් එය වෙන්කර ගත හැකිවේ.

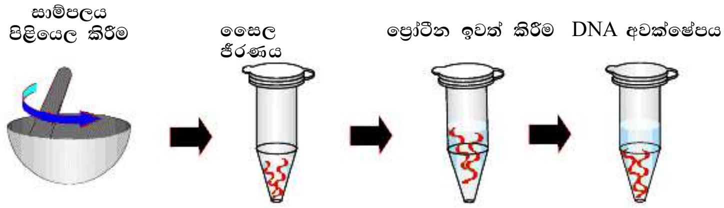


කේන්ද්‍රාපසරණ උපකරණය - DNA අවක්ෂේපනය සඳහා භාවිතා කෙරේ.

- ජීවවිද්‍යාව සම්පත් පොතෙහි DNA විසංගමනය සඳහා ඉහත පියවර විස්තර කළද මෙම ක්‍රියාවලිය සඳහා බොහෝ ක්‍රමවේද (Protocol) භාවිතා කෙරේ. එම ක්‍රමවේද භාවිතා වන පටක වර්ගය (වයිරස, බැක්ටීරියා, ශාක, රුධිර සෛල) මත ද වෙනස් වේ. එම ක්‍රමවේදවල ප්‍රධාන පියවර 4 ක් ඇත.

1. සෛල ජාරණය - සෛල බිත්ති, සෛල පටල වැනි බාධක බිඳ දැමීම. (ඉහත 1 පියවර)
2. නියුක්ලියේස ක්‍රියාව නිශේධනය (ඉහත 2 පියවර)
3. අපවිත්‍රකාරක ඉවත් කිරීම ප්‍රෝටීන, පොලිසැකරයිඩ, ලිපිඩ සහිත බිඳවැටුණු සෛලීය සංඝටක ඉවත් කිරීම. (ඉහත 3, සහ 4 පියවර)
4. DNA අවක්ෂේපණය (ඉහත 5 පියවර)

DNA විසංගමනය

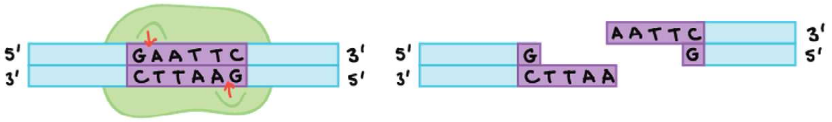


DNA සමග ක්‍රියාකරන එන්සයිම.

නාළස්ථව (In vitro) DNA කැපීම, සම්බන්ධ කිරීම සහ පිටපත් සාදාගැනීම සඳහා මෙම එන්සයිම භාවිතා කරයි.

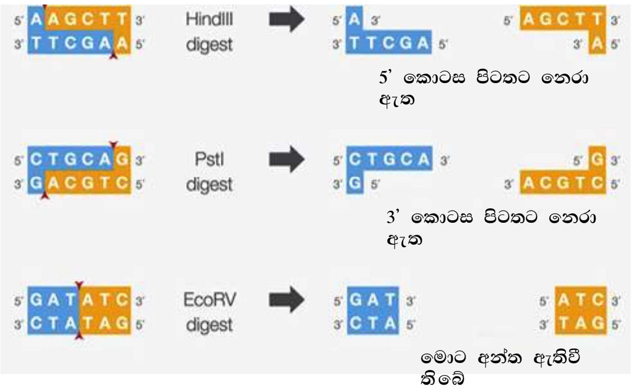
1. සීමා (රෙස්ට්‍රික්ෂන්) එන්ඩොනියුක්ලියේස් එන්සයිම (Restriction endonuclease)
   1. DNA විශිෂ්ට භෂ්ම අනුක්‍රමයක් හඳුනාගෙන එම ස්ථානවලින් හෝ ඒ අසළින් කපන එන්සයිම සීමා එන්ඩොනියුක්ලියේස් එන්සයිම ලෙස හැඳින්වේ.
   2. DNA අනුක්‍රමය කපන ස්ථානය ඡේදන ස්ථානය හෙවත් සීමා ස්ථානය ලෙස හැඳින්වේ.
   උදාහරණ: *E.coli* බැක්ටීරියාවේ ECRO1 එන්සයිම GAATCC අනුක්‍රමය හඳුනාගෙන G සහ A අතරින් DNA අණුව කපනු ලබයි.

ECORI ලක්ෂය



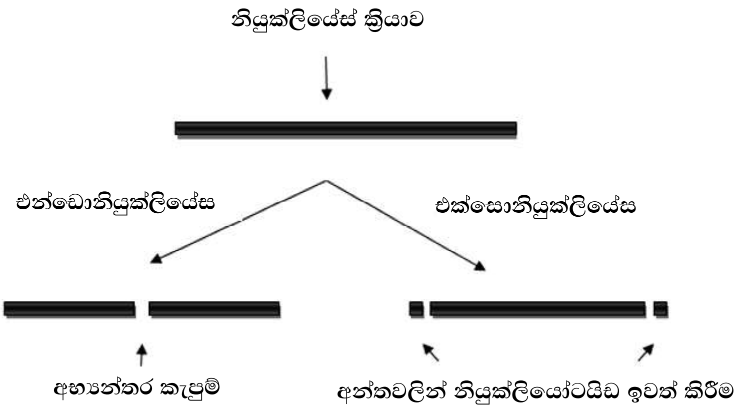
ECORI එන්සයිමය කැපීමෙන් ලැබුණු DNA කැබලි දෙක

3. මෙවැනි එන්ඩොනියුක්ලියේස් වර්ග රැසක් ඇති අතර එම එක එකක් මගින් DNA නිශ්චිත ස්ථානයකින් කපනු ලබයි.



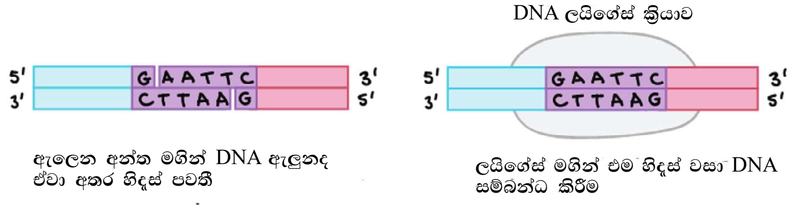
සීමා එන්සයිම වර්ග තුනක සීමා ලක්ෂ්‍ය සහ ඒවා මගින් ඇතිකරන DNA ඛණ්ඩ

4. සෛලය තුළ වෙනත් කෘත්‍යයන් ඉටුකරන වෙනත් වර්ගවල නියුක්ලියේස් ගණනාවක් ඇති අතර එන්ඩොනියුක්ලියේස් යනු ඉන් එක් වර්ගයකි. උදාහරණ - DNA ප්‍රතිවලිත වීමේදී DNA පොලිමරේස් එක්සොනියුක්ලියේස් (බහිෂ් නියුක්ලියේස්) ක්‍රියාකාරිත්වය මගින් රැහැනක කෙළවර වැරදි නියුක්ලියෝටයිඩ ඉවත් කිරීම



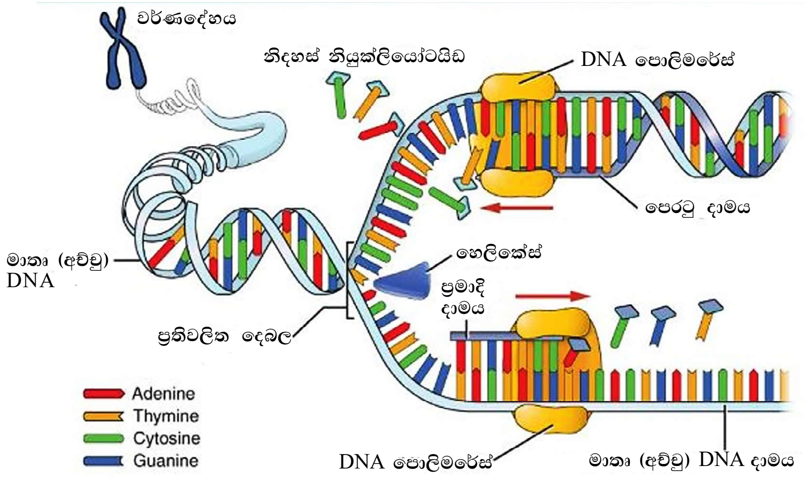
2. DNA ලයිගේස් DNA ligase

   1. ප්‍රතිසංයෝජිත DNA අණුවක් ලබාගැනීමේදී වෙනස් ප්‍රභවවලින් ලබාගත් DNA ඛණ්ඩ පොස්පොඩයිඑස්ටර බන්ධනයක් සාදා එකිනෙකට සම්බන්ධ කිරීම සඳහා DNA ලයිගේස් භාවිතා වේ.
   2. T4 DNA ලයිගේස් තාක්ෂණයේදී T4 බැක්ටීරියා භක්ෂකයකුගෙන් ලබාගත් DNA ලයිගේස් භාවිතය මෙයට උදාහරණ වේ.



3. DNA පොලිමරේස DNA polymerase

   1. වර්ධනය වන DNA දාමයක අච්චු දාමයට අනුපූරක ඩිඔක්සි රයිබෝ නියුක්ලියෝටයිඩ එකතු කරමින් නව DNA දාම සංස්ලේෂණය කරන එන්සයිම මෙසේ හැඳින්වේ.
   2. මේනිසා මෙය DNA පිටපත් කරගැනීමට භාවිතා වේ.
   3. ස්වභාවිකව මෙම එන්සයිමය DNA ප්‍රචලිතවීමට භාවිතා වේ.
   4. ජාන තාක්ෂණයේදී PCR සඳහා සහ ජාන අනුක්‍රම නිර්ණයේදී ද මෙය භාවිතා වේ.
   5. වඩාත්ව පුළුල්ව භාවිතාවන DNA පොලිමරේස් වර්ගය Taq DNA පොලිමරේස් වන අතර එය *Thermus aquaticus* තාපකාමී බැක්ටීරියාවෙන් විසංගමනය කළ තාපස්ථායි එන්සයිමයකි.
   6. මීට අමතරව mRNA අච්චුවක් මගින් cDNA (අනුපූරක DNA) සංස්ලේෂණයට රිවර්ස් ට්‍රාන්ස්ක්‍රිප්ටේස් එන්සයිමය භාවිතා වේ.
   7. සීමා එන්සයිම මගින් DNA කැපීම නිසා වෙනස් ප්‍රමාණවල DNA ඛණ්ඩ මිශ්‍රණයක් ඇති වේ.



DNA ප්‍රතිවලිත වීමේදී DNA පොලිමරේස්වල ක්‍රියාව

   8. DNA ඇඟිලි සලකුණු තාක්ෂණයේදී PCR භාවිතයෙන් විවිධ ප්‍රමාණවල DNA දාම මිශ්‍රණයක් ලැබේ.
   9. මේනිසා DNA අණු වෙන්කිරීම වැදගත් වන අතර මෙය බොහෝවිට ප්‍රායෝගිකව සිදු කරන්නේ විවිධ ප්‍රමාණ දරන කැබලි ජෙල පූරකයක් මත වෙන්කිරීම මගිනි. මීළඟට ඇගරෝස් ජෙල විද්‍යුතාගමනය මගින් මෙය විස්තර කෙරේ.

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 දක්විය 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.

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 ද්වස්සභාවීකරණය 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 ඛණඩ (පටි රටාව) සටහන ලබාගත හැක.
13. ප්‍රතිදීප්ත වර්ණක මගින් සලකුණු කර ඇති විට එම පටිය පාරජම්බුල කිරණ මගින් හඳුනාගත හැකිවේ.

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.

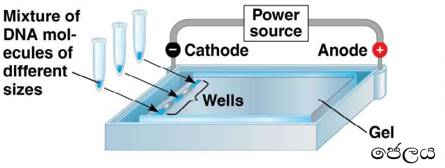
7. ජෙලයේ කැතෝඩය පැත්තේ සිදුරු සාදන අතර DNA එම සිදුරු තුළට ඇතුල් කරයි.

8. විදුලි ජනකයක් භාවිතා කොට ධාරාවක් ලබාදුන් විට, සෘණාරෝපිත DNA ඛණ්ඩ ජෙලය ඔස්සේ ධනාරෝපිත ඇනෝඩය දෙසට සංක්‍රමණය වේ.

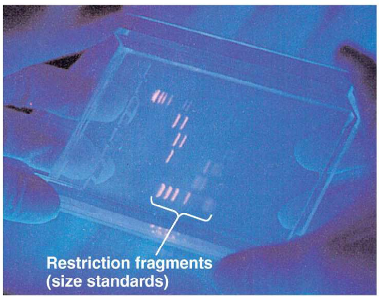
9. මෙහිදී දිග/බර අඩු ඛණ්ඩ වේගයෙන් ඈතට චලනය වීමත් විශාල ඛණ්ඩ සෙමින් චලනය වීමත් නිසා ජෙලයේ ඛණ්ඩ රටාවක් ඇතිවේ.

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) සෘණ ආරෝපිත DNA අණු ඇනෝඩය දෙසට චලනය



(b) කෙටි ඛණ්ඩ දිගු ඛණ්ඩවලට වඩා වේගයෙන් චලනය වීම

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.

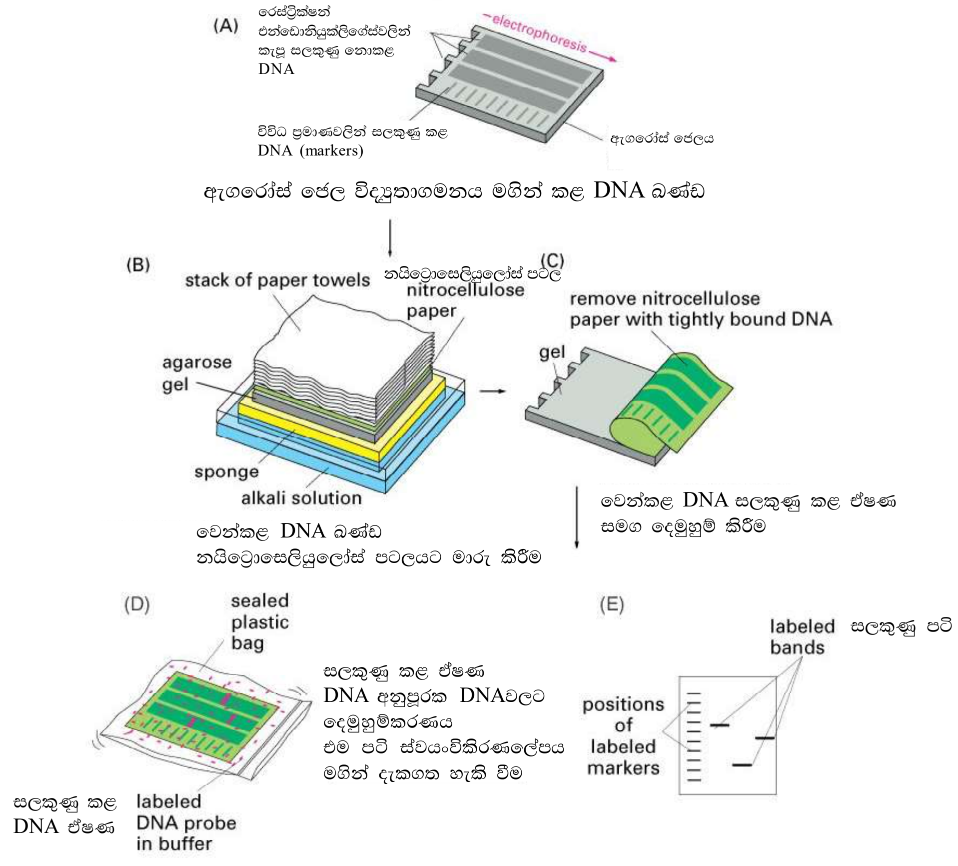
9. පසුව සලකුණු කළ DNA ඒෂණ පටලයට එකතු කර සස්වභාවීකරණයට ඉඩ ලබාදේ.

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 ඛණඩ (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 සමග 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 (දයක 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 අදළ 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 යූකැරියෝටා 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

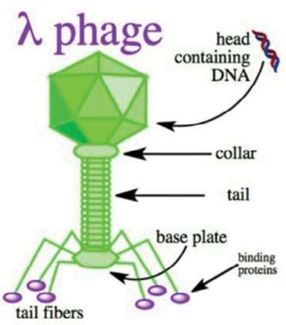
1. බැක්ටීරියා සෛලවල ප්‍රධාන වෘත්තාකාර වර්ණදේහය (DNA අණුවට) අමතරව සෛල ප්ලාස්මයේ පිහිටන ස්වයංප්‍රතිවලිත වන කුඩා DNA වෘත ප්ලාස්මිඩ ලෙස හැඳින්වේ.
2. ප්ලාස්මිඩ DNA ධාරක (බැක්ටීරියා සෛලවල) ප්ලාස්ම පටලය ඔස්සේ කෙළින්ම ඇතුළු කිරීම මගින් ප්‍රවේණික වෙනස්වීමක් ප්‍රතිඵල කරමින් ඒකාබද්ධ කරගන්නා අතර එය **පරිණාමනය** ලෙස හැඳින්වේ.
3. මෙසේ ප්ලාස්මිඩ සෛල බිත්ති තුළින් බැක්ටීරියා සෛල තුළට පරිණාමනය ඉතා අකාර්යක්ෂම ක්‍රියාවලියකි.

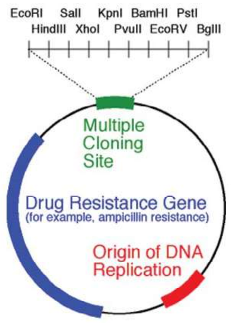
බැක්ටීරියා භක්ෂක DNA

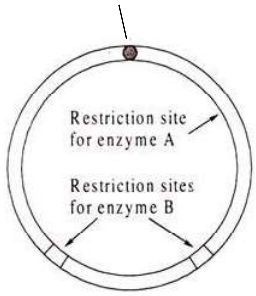
1. බැක්ටීරියා භක්ෂක වයිරසවල පවතින DNA අණුව මෙහිදී වාහක ලෙස භාවිතා කෙරේ.
2. බැක්ටීරියා භක්ෂක වාහක ලෙස භාවිතා කිරීමේදී ඒවා ආසාදන යාන්ත්‍රණය මගින් වාහකය ධාරක සෛල තුළට නිවේශනය කරනු ලබයි. මේනිසා මෙය ප්ලාස්මිඩ පරිණාමනයට වඩා කාර්යක්ෂම වේ.

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 ප්ලාස්මීඩ 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.

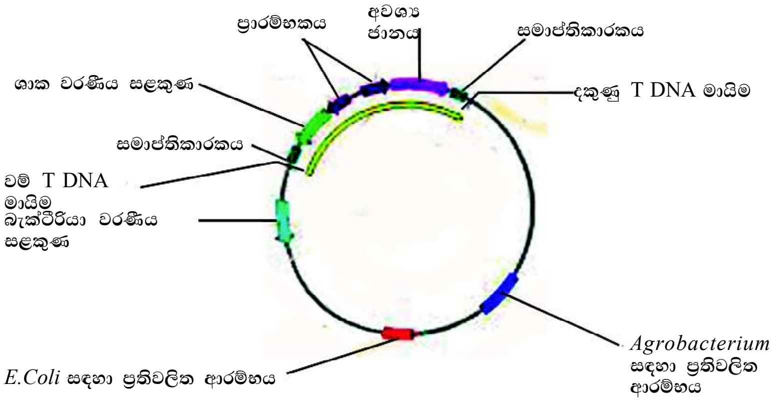
8. නමුත් වාහකයා ප්‍රතිජීවකවලට ප්‍රතිරෝධී ජාන රැගෙන යන බැවින් පරිණාමනය වූ ප්‍රතිසංයෝජිත ප්ලාස්මිඩය සහිත සෛල පමණක් මේ ප්‍රතිජීවක සහිත මාධ්‍යවල වර්ධනය වේ.

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 කඩදසිවලට 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.

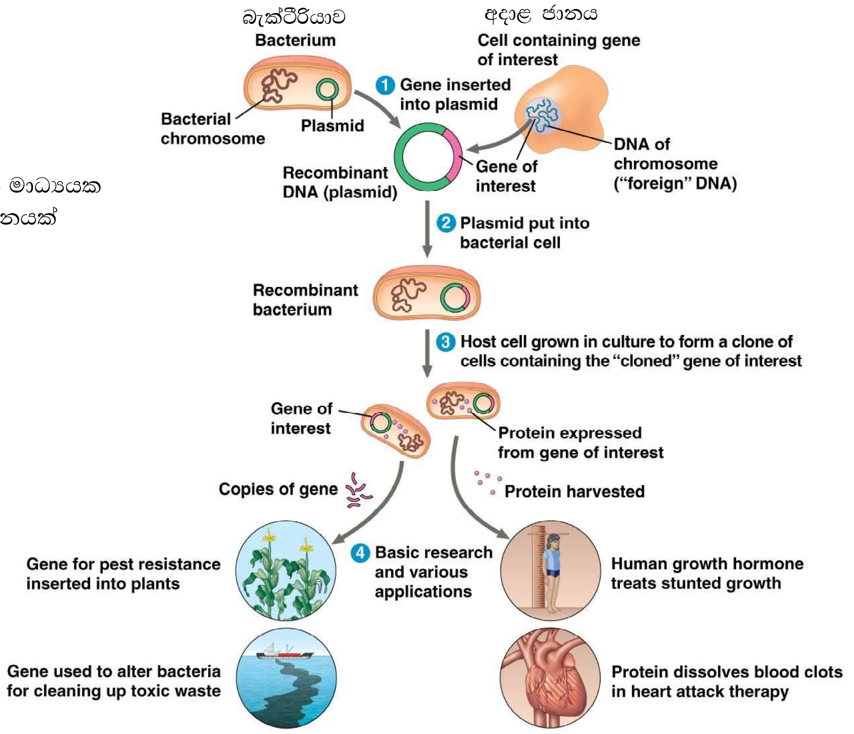
10. පරිණාමනය මගින් ප්‍රතිසංයෝජිත ප්ලාස්මිඩය *E.coli* ධාරක බැක්ටීරියා සෛල තුළට ඇතුල් කිරීම

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.

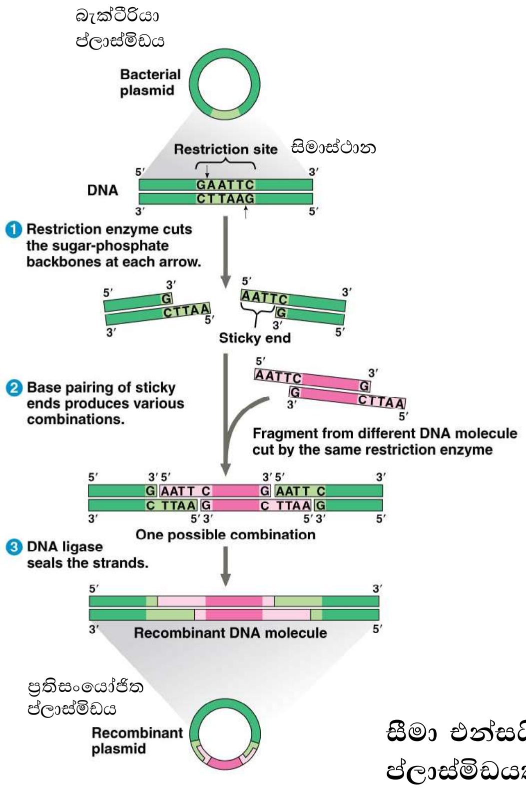
12. වාහක ප්ලාස්මිඩවල ප්‍රතිජීවක ප්‍රතිරෝධී ජාන වැනි සලකුණු ජාන ඇති බැවින් සාර්ථකව පරිණාමනය වූ ගණාවාස හඳුනාගත හැකි වේ.

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

1 - ප්ලාස්මිඩයට ඇල් කිරීම
2 - ප්ලාස්මිඩය බැක්ටීරියා සෛලයට දැමීම
3 - ප්‍රතිසංයෝජිත ධාරක බැක්ටීරියා රෝපණ මාධ්‍යයක වගා කිරීමෙන් අදාළ ජානය සහිත ක්ලෝනයක් ලබාගැනීම
4 - පරීක්ෂණ සහ විවිධ භාවිත සඳහා



ජාන ක්ලෝනකරණය සහ ක්ලෝන කළ ජානවල ප්‍රයෝජන කිහිපයක්



1 - සීමා එන්සයිමය ඊතල අසල දී සීනි පොස්පේට් කොඳු නාරටිය කැපීම
2 - ඇලෙන අන්තවලදී හයිඩ්‍රජන් බන්ධන සෑදීම
3 - DNA ලයිගේස් මගින් ඛණ්ඩ සම්බන්ධ කිරීම

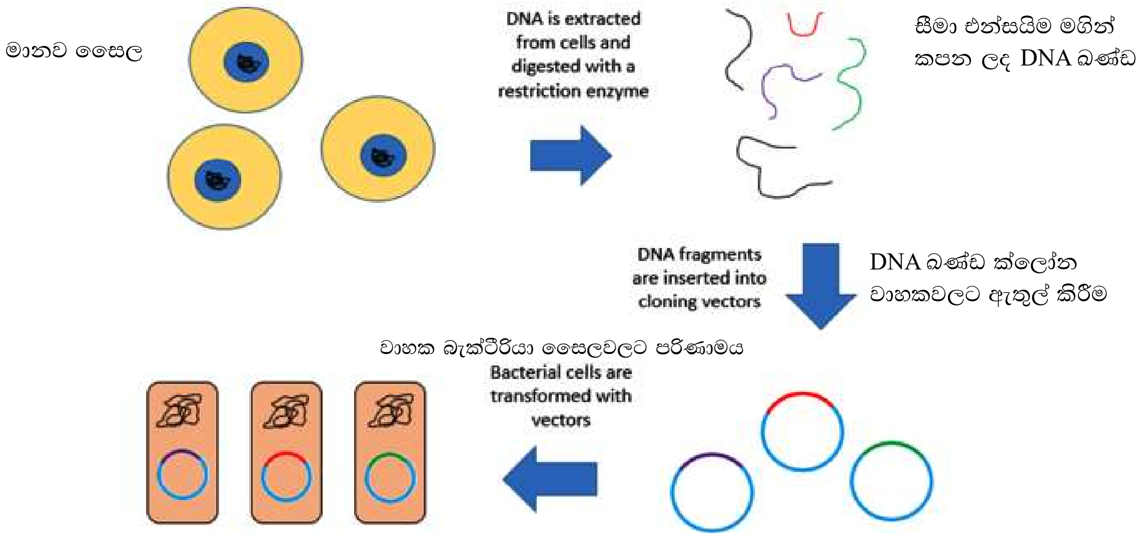
සීමා එන්සයිම සහ DNA ලයිගේස් යොදගෙන ප්‍රතිසංයෝජිත ප්ලාස්මිඩයක් සෑදීම

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 ජීනෝමයක් 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 ජිනෝම ව්‍යාපෘතිය යටතේ මානව ජිනෝමයේ අනුක්‍රමය ලබාගැනීම ඒ ආකාරයට සිදු විය.



ජීනෝම DNA පුස්තකාලයක් සෑදීමේ පියවර

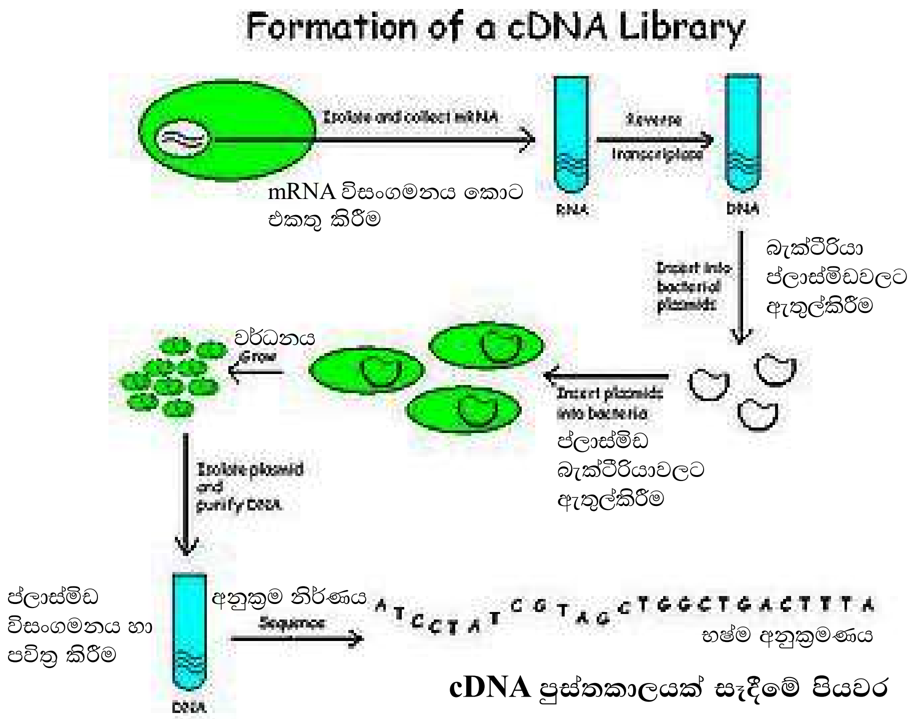
2. **cDNA පුස්තකාල (අනුපූරක DNA පුස්තකාල)**

1. සෛල/පටකවලින් විසංගත කළ mRNA වල ප්‍රතිවර්ති 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 ප්‍රතිවර්ති 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 ජිනෝම පුස්තකාල සෑදීමට සමාන ක්‍රියාමාර්ගයක් අනුගමනය කරයි.

- DNA ජිනෝම 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 ජිනෝම DNA පුස්තකාලයේ විශාලත්වයට වඩා අඩුය.



cDNA පුස්තකාලයක් සෑදීමේ පියවර

DNA ඇතුළු කිරීමේ පද්ධති

ආගන්තුක DNA අඩංගු සෙලයක් 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.

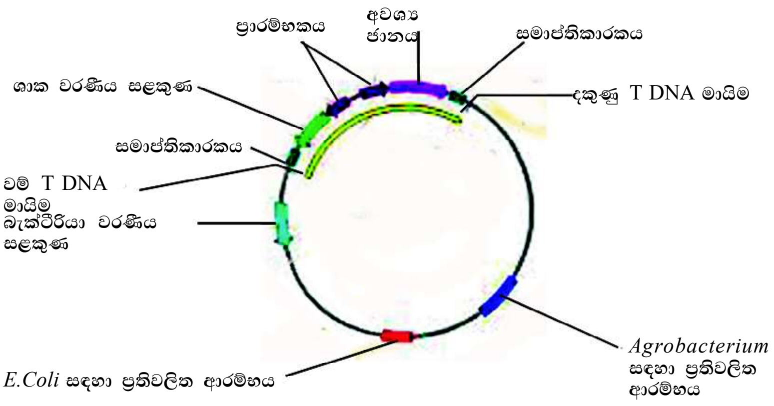
ජාන තුවක්කුව (Gene Gun)

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