8

DNA විශ්ලේෂණය

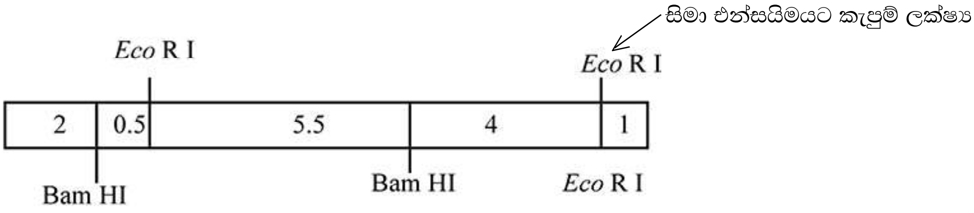
DNA විශ්ලේෂණය

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 (මින් පෙර සඳහන් කළ) ශිල්ප ක්‍රම ද යොදා ගනී.

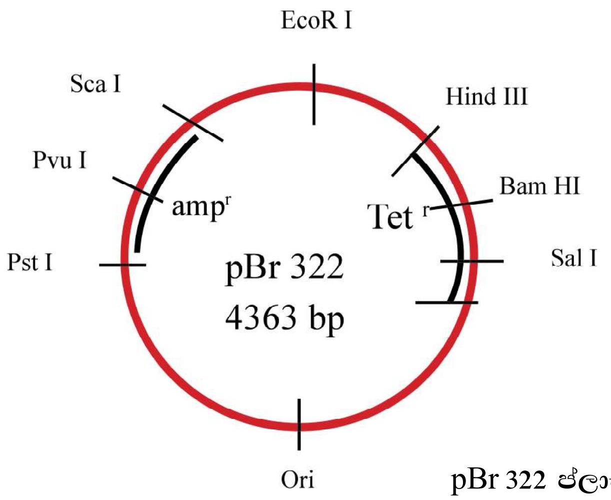
නිරෝධ/සීමා සිතියම් (Restriction maps)

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 ප්ලාස්මීඩ වාහකයක සීමා සිතියමක් 7.35 රූපයේ දැක්වේ.



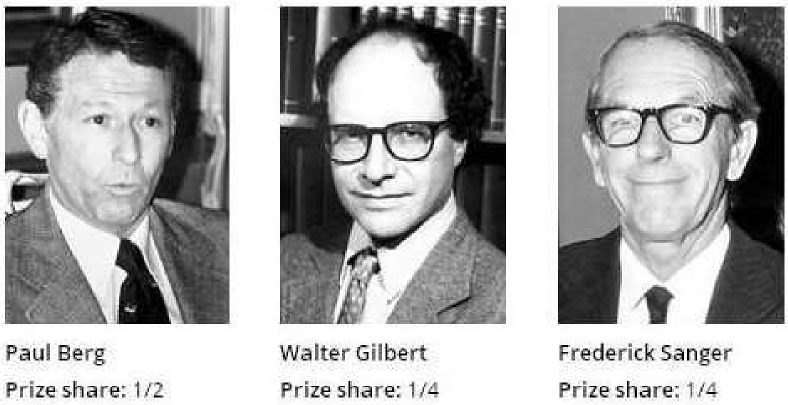
කුඩා DNA ඛණ්ඩයක සීමා සිතියම



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 සැදී 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 ජිනෝමය 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 සැඟවුණු 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. වෝහාරික 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, බෙටය) DNAවලට සමාන DNA අනුක්‍රම සහිත පුද්ගලයන් හඳුනා ගැනීම DNA අනුක්‍රම නිර්ණය මගින් සිදු කළ හැක. (උදහරණ: හෝකන්දර සමූහ මිනීමැරුමේදී මිනීමරුවන් හඳුනාගැනීමට සේයා සඳමිණි දැරියගේ දූෂකයා හඳුනාගැනීමේදී මෙම තාක්ෂණය භාවිත විය.) එලෙස ම පීතෘත්වය පරීක්ෂා කිරීම DNA අනුක්‍රම නිර්ණයේ තවත් ප්‍රයෝජනයකි. උදහරණ: 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.

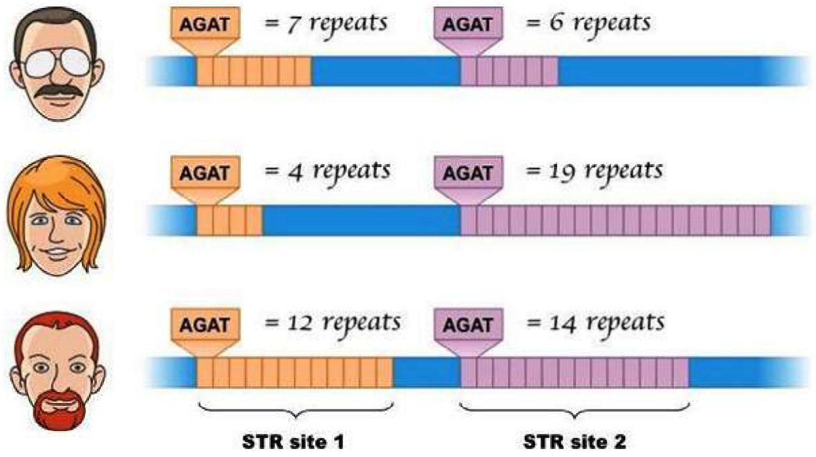
4. කෙසේ වුව ද විශාල ක්ෂුද්‍රජීවී සංඛ්‍යාවක් මෙසේ රෝපණ මාධ්‍ය තුළ රෝපණය කළ නොහැකි බැවින් හඳුනාගතහැකි ක්ෂුද්‍රජීවීන් විශාල ප්‍රමාණයක් නොසලකා හැරීමට ලක්වේ.
5. මෙටාජාන විද්‍යාව මගින් මෙම ප්‍රජා DNA තුළ ඇති විශිෂ්ට අනුක්‍රම යෝග්‍ය මෘදුකාංග භාවිතා කර විශ්ලේෂණය මගින් පරිසරයක වූ වෙනස් විශේෂ රාශියක අනන්‍යතාව 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 භෂ්ම යුගල සංඛ්‍යාවක් එකක් පසුපස එකක් 100 සිට 1000 වාරයක් පුනරාවර්තී වන බැවින් එම පිළියුම් (පුනරාවර්ථ)වල දිග විවිධ වේ.

   උදාහරණ: TG භෂ්ම අනුක්‍රමය 8 වරක් පුනරාවර්ත වන විට

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



Repeats = පුනරාවර්ත

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 දන් 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.

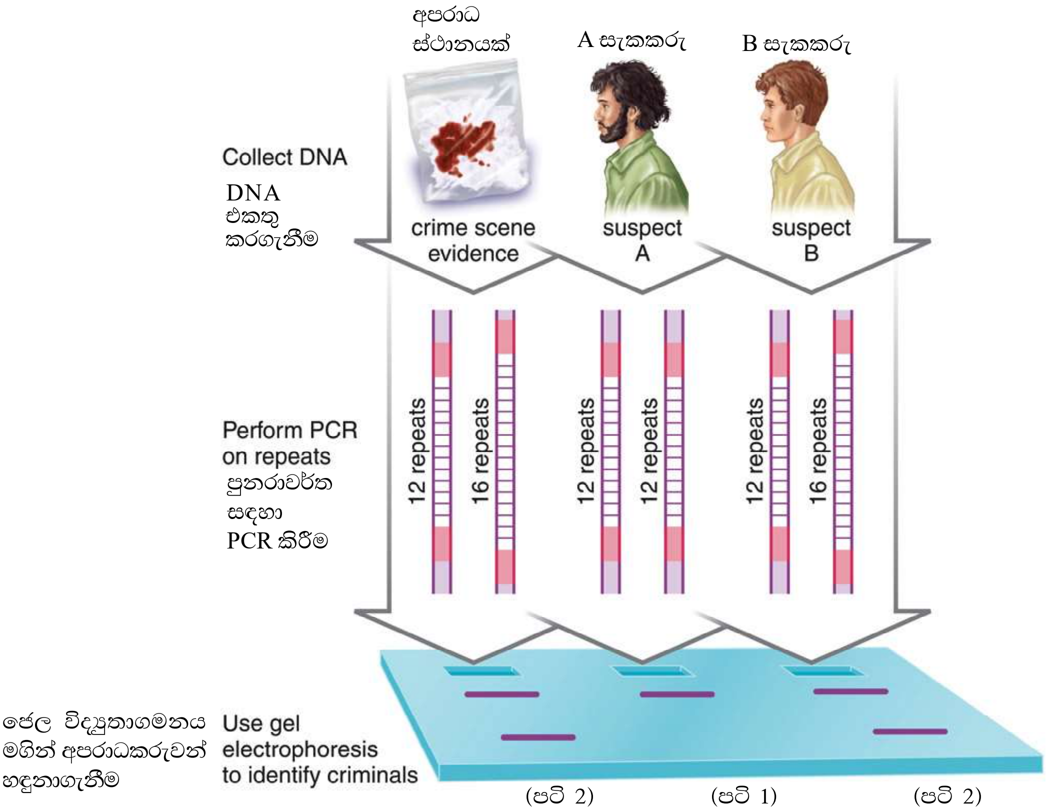
DNA ඇඟිලි සලකුණු තාක්ෂණයේ යෙදීම්

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.

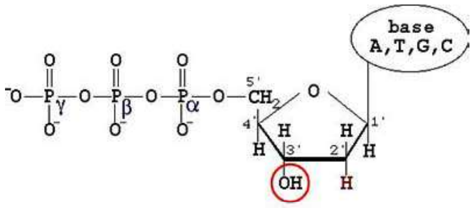
පොලිමරේස් දාම ප්‍රතික්‍රියාව (PCR)

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 ඩිඔක්සි රයිබොනියුක්ලියෝටයිඩ ට්‍රයි පොස්පේට්
deoxyribonucleotide triphosphate

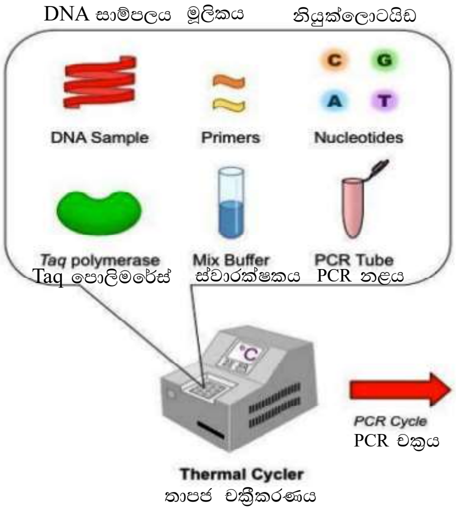
c. ප්‍රගුණනය කිරීමට අවශ්‍ය තනි DNA අච්චු දාමය

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. ද්‍රස්වභාවීකරණය
2. තාපානුශීත යුගලනය
3. දිගුවීම

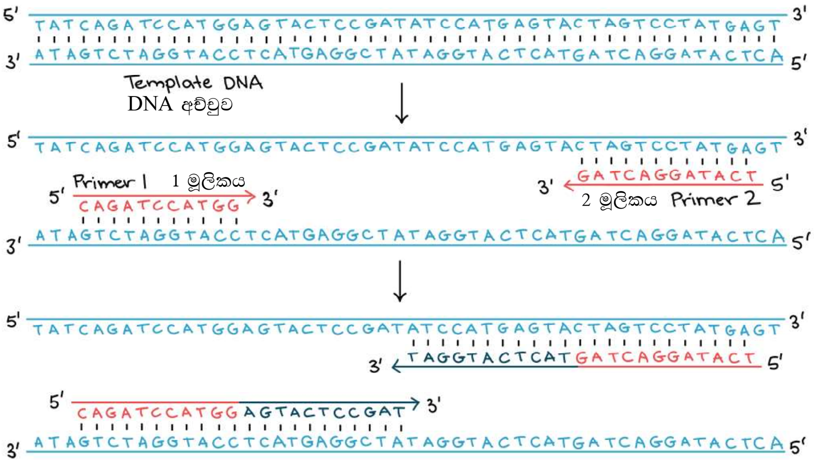
1. **ද්‍රස්වභාවීකරණය**

DNA ඛණ්ඩයක පිටපත් කරනු ලබන අනුක්‍රමය ඇත්තේ ds DNA හෙවත් ද්විපට DNA ලෙසය. ප්‍රථමයෙන්ම PCR මිශ්‍රණය 95^0C ට රත් කිරීම මගින් ද්‍රස්වභාවිකරණය කරනු ලැබේ. මේනිසා 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.

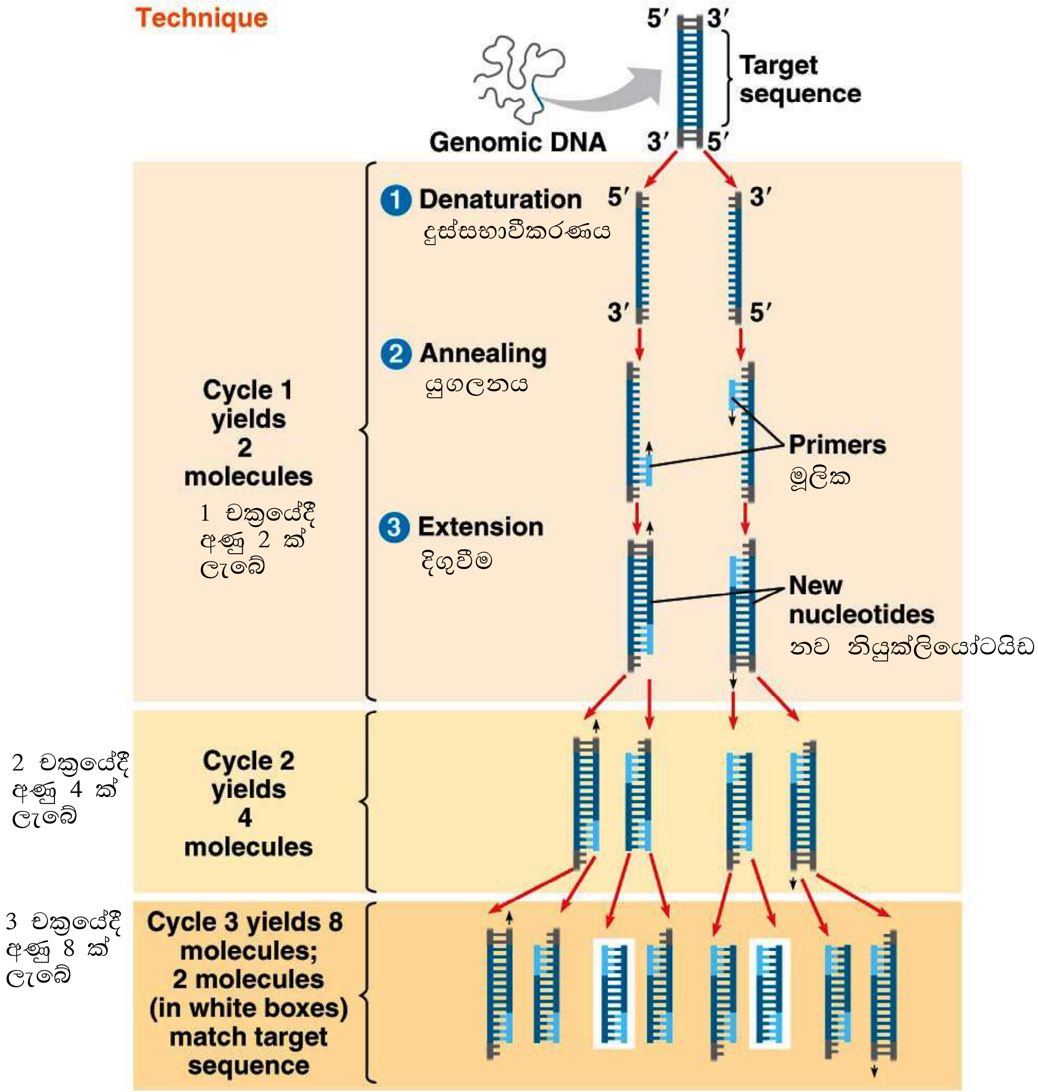
ප්‍රථම තාපජ චක්‍රයක අවසානයේ (දුස්වභාවීකරණය, තාපානුශිත යුගලනය, සහ දිගු වීම) එක් දාමයකින් එක් පිටපත බැගින් පිටපත් දෙකක් ලැබේ.

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.)

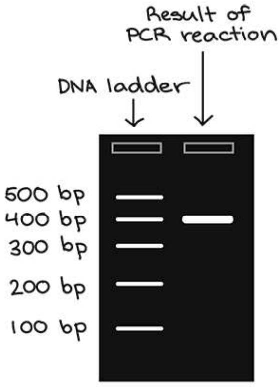


PCR ප්‍රතික්‍රියාවක මුල් චක්‍ර තුනේදී PCR ඵල සෑදෙන අයුරු

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 ලබා ගත් 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 කීටෝනුයූරියා)
3. ව්‍යවහාරික 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 පාෂාණීය 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 ඇද්දැයි 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.