अध्याय - 11

जैवप्रोद्योगिकी - सिद्धांत व प्रक्रम

✿ जैव प्रोद्योगिकी (Biotechnology)

बायोटेक्नोलॉजी दो शब्दो बायो व टेक्नोलॉजी शब्द से मिलकर बना है इसका अर्थ है कि जीवित कोशिका या उनके घटक या उनसे प्राप्त एन्जाइमों के उपयोग द्वारा लाभदायक पदार्थो का औद्योगिक स्तर पर प्राप्त करना।
सूक्ष्मजीवो - जैसे - जीवाणु कवक शैवालो, यीस्ट पादप एवं जन्तु कोशिकाओ ; कोशिकाओं अथवा उतको में से किसी जीवित तन्त्र का उपयोग मानव समाज के लिए उपयोगी पदार्थो का औद्योगिक स्तर पर प्राप्त करना ही जैव प्रोद्योगिकी कहते है।

यूरोपीय जैव प्रोद्योगिकी संघ (EFB) के अनुसार -

"नए उत्पादो एवं सेवाओ के लिए प्रकृतिक विज्ञान, जीव या जीवित कोशिका अथवा उनके घटको का आण्विक स्तर पर

उपयोग या समायोजन जैव प्रौद्योगिकी कहलाता है।

☆ <u>जैव प्रौद्योगिकी का सिद्धान्त</u> -

आधुनिक जैव प्रौद्योगिकी के विकास में निम्न दो, प्रमुख तकनीकों का योगदान है -

(1.) <u>आनुवंशिक इंजीनियरिंग</u> - (Gentic Engineering) - जीवों के आनुवंशिक पदार्थ अर्थात् D.N.A में आवश्यकतानुसार फेर - बदल करके फीनोटाइप (लक्षण) उत्पन्न करवाना।

(2.) रासायनिक इंजीनियरिंग (Chemical Engineering) - रासायनिक इंजीनियरिंग प्रक्रमों में रोगाणु रहित वांछित जीवाणु या सुकेन्द्रकीय कोशिकाओं के शुद्धि द्वारा लाभदायक जैव प्रौद्योगिकी पदार्थ जैसे - प्रतिजैविक, टीके, एन्जाइम, हार्मोन आदि का निर्माण करना।

Gentic Engineering - or Recombinant DNA

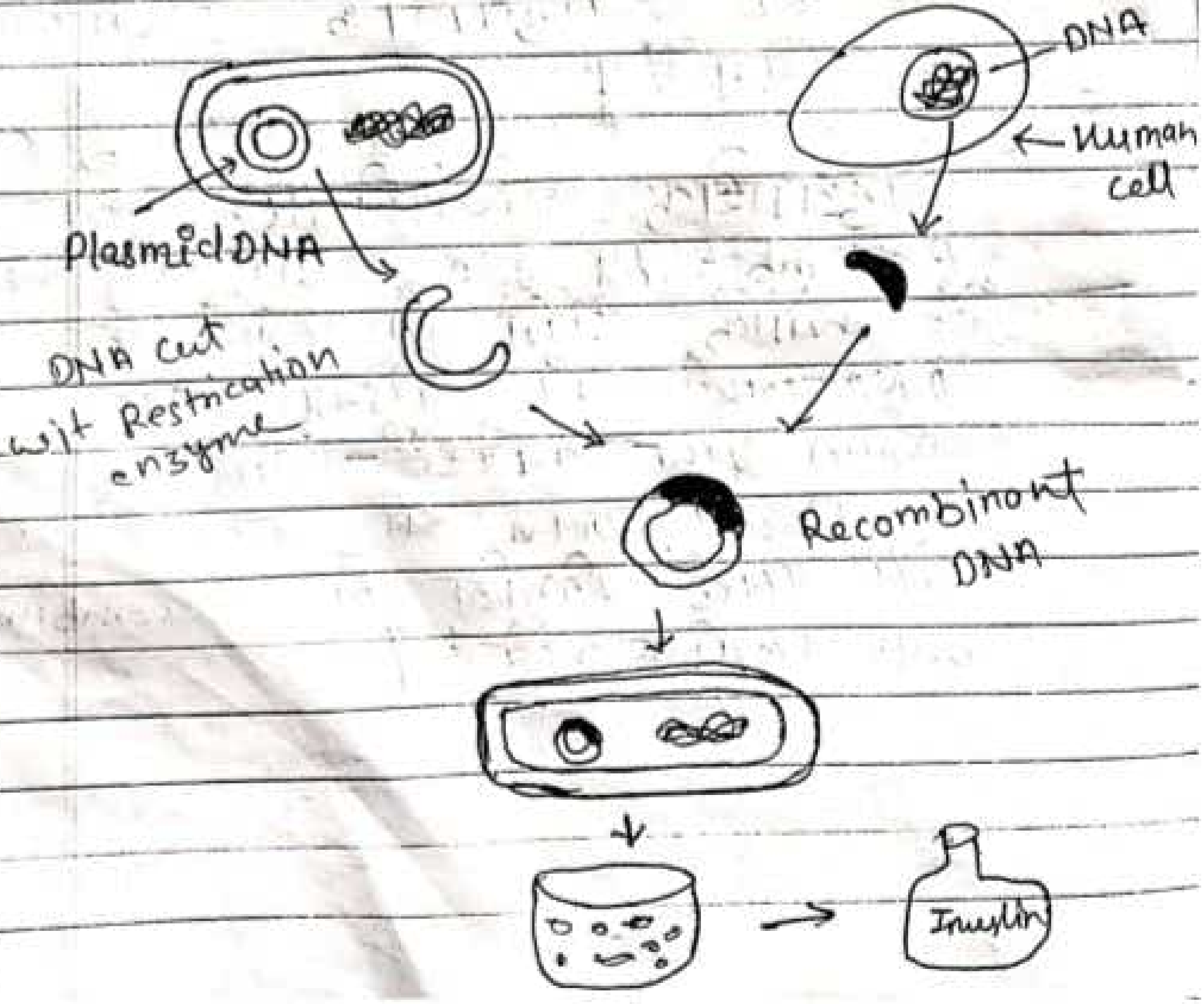
वैज्ञानिकों द्वारा D.N.A में आवश्यकतानुसार फेर बदल करना जीन मैनीपुलेशन या आनुवांशिक इन्जीनियरिंग कहते है।

कृत्रिम DNA का संश्लेषण, DNA की मरम्मत, DNA के न्यूक्लियोटाइड्स को विस्थापित या जोड़कर वांछित गुणों युक्त DNA प्राप्त करना और इस DNA को जीव धारियों में प्रवेश कराकर ऐच्छिक गुणों को उत्पन्न करना ~~का~~ ही आनुवांशिक इन्जीनियरिंग का ध्येय है।

अनुवांशिक इन्जीनियरिंग को Recombinant DNA तकनीक भी कहते है क्योंकि इसमें दो स्रोतों के D.N.A टुकड़ों को जोड़कर नया D.N.A प्राप्त करते है जिसे Recombinant DNA कहते है और इसके निर्माण को Recombinant DNA तकनीक कहते है।

पुनर्योगज DNA तकनीक Recombinant DNA (Technical)

- पुनर्योगज DNA तकनीक को जीन क्लोनिंग (Gene cloning) या जीन सम्बन्धन (Gene splicing) भी कहते हैं।
- इस प्रक्रिया में दो अलग-अलग प्रजाति के जीवों के DNA अणुओं के खण्डों को जोड़कर नया Recombinant DNA (पुनर्योगज DNA) बनाते हैं और किसी उचित पोषक में पहुँचाया जाता है।



पुनर्योगज DNA तकनीक के सफलता के कारण - / साधन

★ DNA की विकृतिकरण व पुनः स्वभाविकरण की क्षमता -

यदि DNA को 100°C तापमान पर गर्म किया जाय तो इसके दोनो रज्जुक अलग हो जाते है DNA के दोनो रज्जुको के पृथक्करण की इस प्रक्रिया को DNA की विकृतिकरण कहते है

विकृति DNA को cool करने पर दोनो रज्जुक आपस मे जुड़कर DNA अणु बना लेते है इस क्रिया को पुनः स्वभाविकरण या आकृतिकरण कहते है।

(2) एन्जाइम [Enzymes] :- पुनर्योज DNA तकनीक में निम्न एन्जाइम प्रयुक्त होते है-

(i) विदलन एन्जाइम (Cleavage Enzym

ये एन्जाइम DNA को खण्डो

में तोड़ना या काटता है।
ये निम्न दो प्रकार के होते हैं।

(a) एक्सो न्यूक्लिएज (Exonuclease) - ये DNA के 5' या 3' सिरों से न्यूक्लियोटाइड्स को पृथक करता है।

(b) एण्डो न्यूक्लिएज [Endonuclease]- ये D.N.A के अन्दर को मध्य से काटते है।

प्रतिबन्धन एण्डोन्यूक्लिएज इन्हें आण्विक कैंची या चाकू भी कहते है। ये DNA में विशिष्ट विलोमपद या पोलिन्ड्रोमिक न्यूक्लियोटाइड्स को पहचानकर वहाँ पर DNA को काटते है जैसे - Eco R1

महत्वपूर्ण बिन्दु -

- प्रतिबन्धन एण्डोन्यूक्लिएज की खोज आर्बर ने की थी।

- सबसे पहला प्रतिबन्धन एंजाइम HIND III था जिसकी खोज नैथान्स व स्मिथ ने सन् 1970 में किया था।

(ii) DNA लाइगेज - ये टूटे हुये पूरक DNA खण्डों को जोड़ते है प्राप्त DNA को पुनर्योगज DNA कहते है

Recombinant DNA को बैक्टीरिया मे प्रवेश कराया जाता है और इच्छित लक्षण प्राप्त करते है ये बैक्टीरिया के गुणन द्वारा इसकी अनेक प्रतिलिपियां तैयार की जाती है जिन्हें क्लोन DNA cDNA कहते है।

NOTE ⇒ बैक्टीरिया की कोशिका भित्ति पैप्टाइडोग्लाइकॉन का बना होता है जिसे नष्ट करने के लिए लाइसोजाइम एंजाइम का प्रयोग किया जाता है

कवक की कोशिका भित्ति - काइटिन की बनी होती है जिसे नष्ट करने के काइटिनेस एंजाइम का प्रयोग करेंगे

पादप की कोशिका भित्ति - सेल्युलोज का बना होता है इसे सेल्युलेज एंजाइम से नष्ट करते है।

(2) वाहक DNA - → प्लाज्मिड, तथा बैक्टीरियोफेज के DNA खण्ड को उचित पोषक के अन्दर पहुँचाने के लिए पुनर्योगज D.N.A को उपयोग में लाया जाता है इस लिए इसे वाहक D.N.A कहते है।

Scanned with CamScanner

(2) <u>क्लोनिंग वाहक या संवाहक</u> - जिस DNA अणु में वांछित जीन को जोड़ते है, उसे वाहक कहते है तथा यह वाहक DNA पोषक कोशिका में प्रतिकृति का सकता हो, क्लोनिंग वाहक कहलाता है जैसे- प्लाज्मिड, बैक्टीरियोफेज, रिट्रोविषाणु आदि।

प्लाज्मिड का उपयोग आज भी अत्यधिक किया जाता है

एक क्लोनिंग संवाहक में निम्न तीन विशेषताएं होनी चाहिए -

(I) <u>प्रतिकृति की उत्पत्ति</u> - (origin of replication, ori)

प्रतिकृति की उत्पत्ति - प्रत्येक प्लाज्मिड में कम से कम एक ऐसा नाइट्रोजनस क्षारों का अनुक्रम होता है जहाँ से DNA की प्रतिकृति प्रारम्भ होती है और एक प्लाज्मिड दो में गुणित

Scanned with CamScanner

हो जाते है अगर प्लाज्मिड में विजातीय DNA खण्डो को जोड़ दिया जाय तो प्लाज्मिड के साथ DNA खण्ड की भी प्रतिकृति हो जाती है।

(2) वरण योग्य चिन्हक (Selectabemarker)

संवाहक पर कुछ ऐसे जीन होने आवश्यक है जिनके उपस्थिति से संवाहक कि अन्य पोषक कोशिका में उपस्थिति को ज्ञात कीया जा सकता है

इनकी उपस्थिति द्वारा -

- पोषक की रूपान्तरित कोशिका को पहचाना जा सकता है इन कोशिका पुनर्योगज DNA होता है
- पोषक की अरूपान्तरित कोशिकाओं को पहचानकर उनको नष्ट कीया जा सकता है।
- पोषक की रूपान्तरित कोशिका को वृद्धि माध्यम में रखकर उनकी वृद्धि कीया जाता है

Scanned with CamScanner

★ Ampicilin, Tetracycline, chloramphenicol आदि Antibiotic के प्रति प्रतिरोध प्रदान करने वाले जीन को, वरण योग्य चिन्हक के रूप में प्रयोग कीया जाता है।

③ प्रतिबन्धन क्लोनिंग स्थल ⇒

प्लाज्मिड पर विजातीय या विदेशी DNA (जीन) के साथ जुड़ने के लिए प्रतिबन्धन एंजाइम की क्रिया हेतु एक पहचान स्थल होता है जिसे क्लोनिंग स्थल कहते है

इन ~~क्लोनिंग~~ स्थलों पर क्षारों का विलोमपद का अनुक्रम होता है।

किसी भी संवाहक अणु में विलोमपद क्रम से कम एक विलोम पदो का होना अनिवार्य

प्लाज्मिड संवाहक PBR322 में

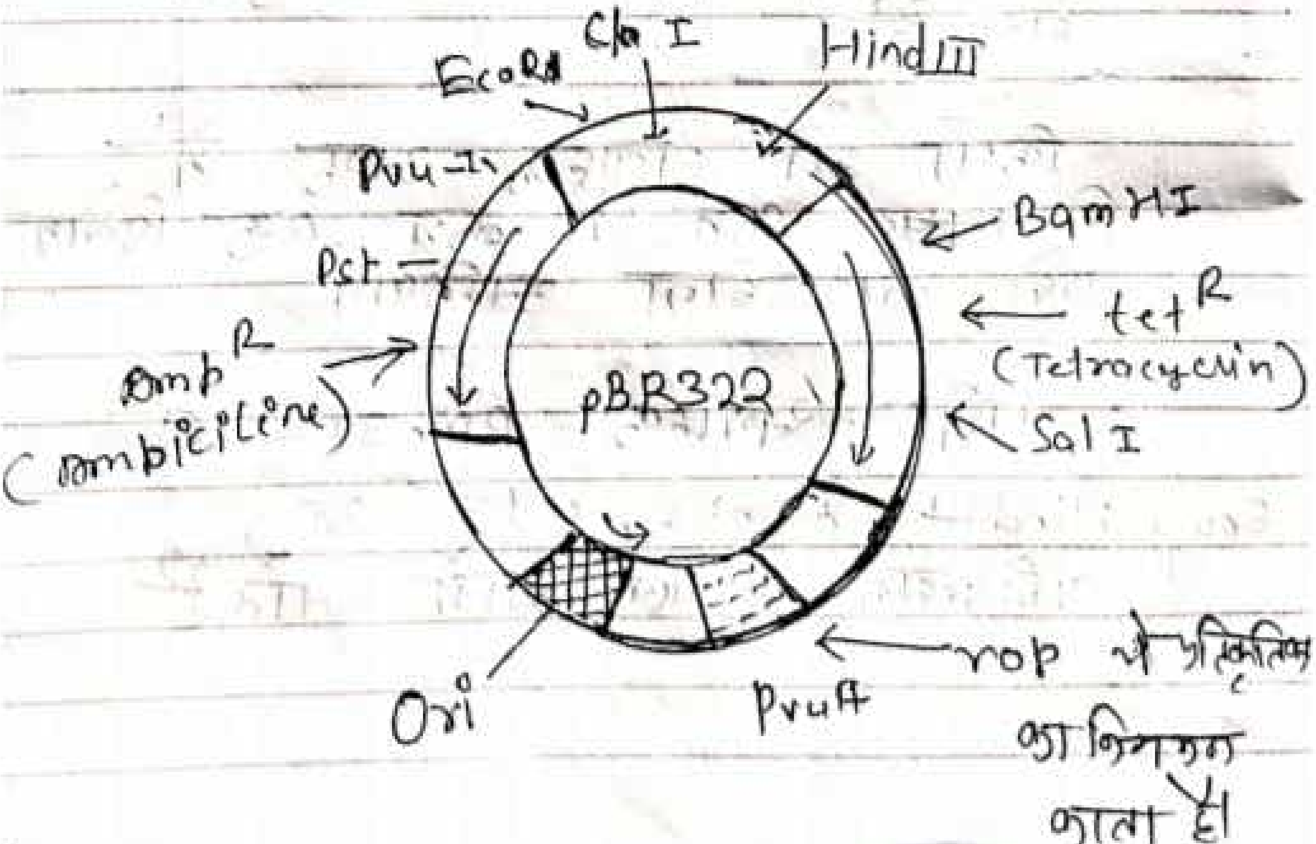
Eco, HindIII, BamHI, Sal I आदि प्रतिबन्धन स्थल पाये जाते है

Scanned with CamScanner

पुनर्योगज DNA तकनीक में निम्न वाहक उपयोग में लाये जाते हैं-

① **प्लाज्मिड** (Plasmid)- यह सर्वाधिक प्रयोग किया जाने वाला वाहक है इसका आकार छोटा होने के कारण कोशिका से आसानी से अलग किया जा सकता है।

सबसे अधिक उपयोग किया जाने वाला प्लाज्मिड pBR322 है यह E-coli में पाया जाता है-



☆ पुनर्योगज D.N.A. तकनीकी की क्रियाविधि

पुनर्योगज D.N.A. तकनीकी की क्रियाविधि निम्न चरणों में पूर्ण होती है -

(1) वांछित DNA खण्ड या जीन का विलगन एवं चरण -
(Isolation & selection of desired gene)-
यूकैरियोटिक कोशिकाओं के DNA अणुओं को प्रतिबन्धन एन्जाइम द्वारा काटने के लिए आवश्यक है की उसे कोशिका से बाहर मुक्त करे और उसमें उपस्थित वृहद अणुओं, जैसे R-N-A, कार्बोहाइड्रेट, प्रोटीन व लिपिड को हटाकर DNA को शुद्ध रूप से प्राप्त करते हैं अतः वांछित DNA खण्ड या जीन का विलगन एवं चरण में निम्नलिखित चरण आते हैं -

(A) कोशिका का विघटन एवं उसके DNA का पृथक्करण -

सर्वप्रथम जिस जीव के किसी विशेष जीन या DNA खण्ड को अलग करना होता है, लाइसोजाइम की मदद से जीवाणु की कोशिभित्ति नष्ट किया जाता है, इसी प्रकार पादप की कोशिका भित्ति को सेल्यूलेज व कवक की कोशिका की भित्ति काइटिनेज एंजाइम द्वारा नष्ट करते है।

अपघटित कोशिका के प्रोटोप्लास्ट (R.N.A, DNA, Protein, Carbohydrate का सम्मिलित Name) को अपकेन्द्रण द्वारा विघटित कोशिका के तरल से उनके DNA अणु को पृथक्करण किया जाता है।

(B) प्रतिबन्धन एन्जाइम द्वारा DNA का विलोमपदो में विघटन -

इस उपचरण में अपकेन्द्रण द्वारा प्राप्त DNA अणुओं अणुओं को प्रतिबन्धन एण्डोन्यूक्लिएज एन्जाइम की सहायता से छोटे - 2 खण्डो में तोड़ दिया जाता है

(c) वांछित DNA खण्डों का वरण ⇒

अन्त में वांछित जीन वाले खण्डों को विखण्डित DNA के खण्डों से वैद्युत कण संचलन या इलेक्ट्रोफोरेसिस द्वारा अलग किया जाता DNA खण्ड पर ऋणात्मक आवेश होता है अतः ये जैल-इलेक्ट्रोफोरेसिस के समय माध्यम में वैद्युतीय क्षेत्र में एनोड की ओर गति करते हैं। molecular Prob (रेडियोएक्टिव DNA) की मदद से वांछित DNA खण्डों को पहचाना जाता है वैज्ञानिकों ने इसकी मदद से विभिन्न DNA खण्डों को पहचाना है और वांछित उपयोग किया है।

NOTE ⇒ इलेक्ट्रोफोरेसिस में प्रयुक्त जैल Agrose gel है जो समुद्री घास (see weeds) से प्राप्त किया जाता है यह एक प्राकृतिक बहुलक है।

जैल से DNA को बाहर करने की विधि इल्यूशन कहलाती है।

(1) पॉलीमरेज श्रृंखला अभिक्रिया (PCR) :-

(Polymerase chain Reaction)

इलेक्ट्रोफोरेसिस द्वारा अलग किये गये जीन या DNA खण्ड की PCR विधि द्वारा अनेक प्रतिलिपियां तैयार की जाती है।

DNA की अनेक प्रतिलिपियां तैयार करने की इस विधि PCR की खोज कैरी मुलिस (Kary mullis) ने 1985 में की थी।

इसके लिए ताप स्थिर एन्जाइम Taq DNA Polymerase exonuclease की आवश्यकता होती है यह एन्जाइम Thermus aquatics बैक्टीरिया से प्राप्त करते हैं ये बैक्टीरिया गर्म झरनों तथा हाइड्रोथर्मल वैन्ट में पाये जाते हैं अतः इनकी Polymerase उच्चताप पर भी कार्य करती है।

वास्तव Taq Polymerase एंजाइम की क्रिया पर 75-80°c के बीच होती है जिस पर 150 लगभग न्यूक्लियोटाइड्स को जोड़ सकती है

पॉलीमरेज श्रृंखला अभिक्रिया तीन चरणों में पूर्ण होती है।

<u>प्रथम पद</u> - <u>विकृतिकरण</u> (Denaturation)-

20-30 न्यूक्लियोटाइड्स से बने संश्लेषित प्राइमर को बड़ी मात्रा में PCR में डालते हैं वह उन DNA खण्ड को डालते है जिनका प्रवर्धन करना होता है। इस मिश्रण को 98° गर्म करने पर DNA खण्ड के दोनों रज्जुक अलग हो जाते हैं।

<u>द्वितीय पद</u>- <u>प्राइमर का एनीलिंग</u>-

अनुकूल मिश्रण को 54°c-60°c तक ठण्डा करते है, सामान्यतया: D.N.A के दोनो रज्जुक जुड़कर DNA खण्ड बना लेते है किंतु मध्यम अधिक प्राइमर की मात्रा होने के कारण DNA रज्जुक से जुड़ जाते है इस प्रक्रिया को उपक्रामक या प्राइमर का एनीलिंग कहते है।

Scanned with CamScanner

पॉलीमरेज श्रृंखला अभिक्रिया तीन चरणों में पूर्ण होती है।

<u>प्रथम पद</u> - <u>विकृतिकरण</u> (Denaturation)-

20-30 न्यूक्लियोटाइड्स से बने संश्लेषित प्राइमर को बड़ी मात्रा में PCR में डालते हैं वह उस DNA खण्ड को डालते हैं जिनका प्रवर्धन करना होता है। इस मिश्रण को 98° गर्म करने पर DNA खण्ड के दोनों रज्जुक अलग हो जाते हैं।

<u>द्वितीय पद</u>- <u>प्राइमर का एनीलिंग</u>-

उपयुक्त मिश्रण को 54°C-60°C तक ठण्डा करते हैं, सामान्यतयः D.N.A के दोनों रज्जुक जुड़कर DNA खण्ड बना लेते हैं किंतु महत्वपूर्ण अधिक प्राइमर की मात्रा होने के कारण DNA रज्जुक से जुड़ जाते हैं इस प्रक्रिया को उपक्रामक या प्राइमर का एनीलिंग कहते हैं।

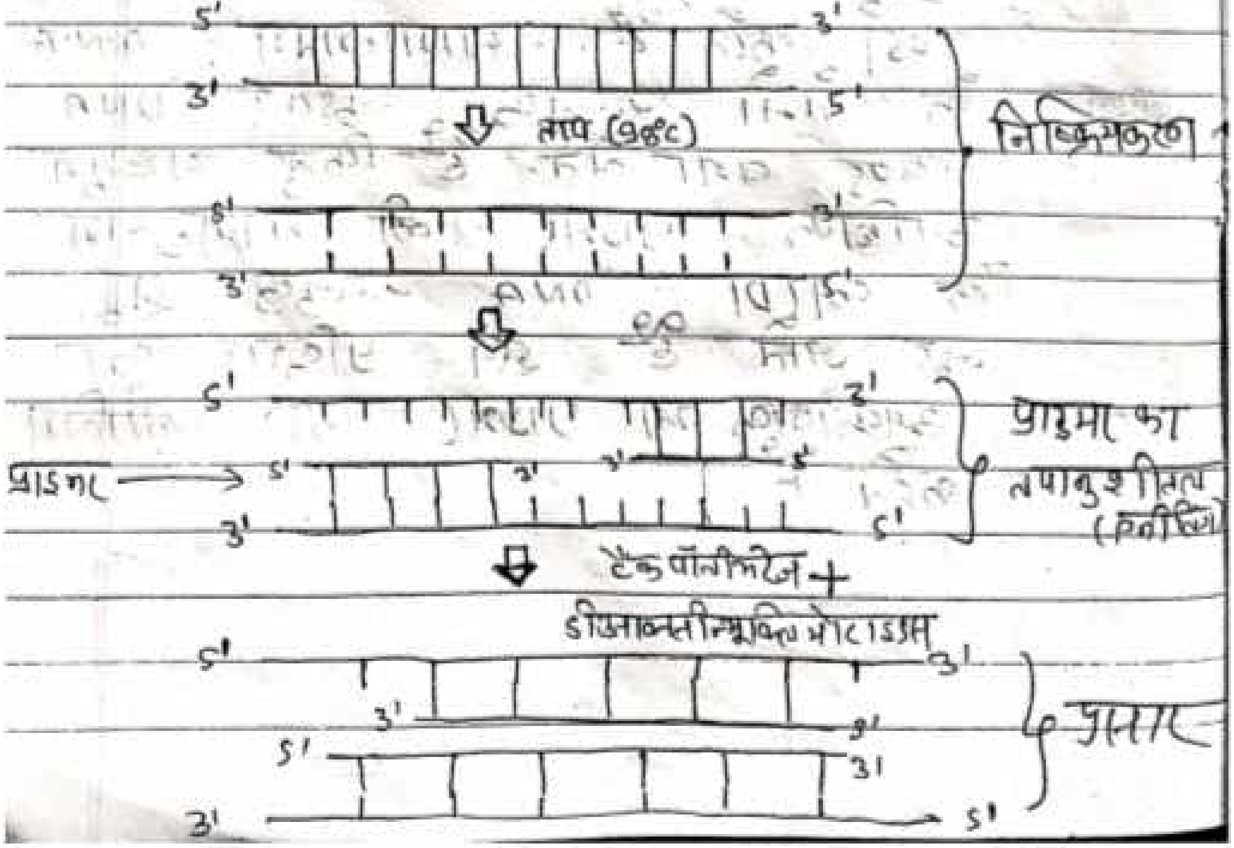
Scanned with CamScanner

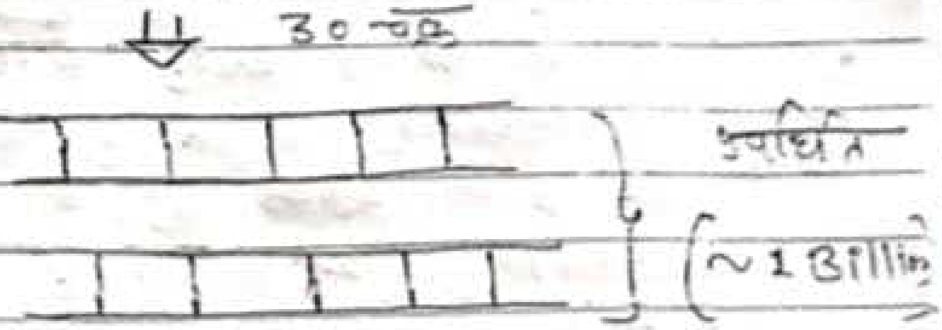
तृतीय पद - प्राइमर का विस्तार -

उपर्युक्त घोल में चार प्रकार के DNA न्यूक्लियोटाइड्स के ट्राई फास्फेट अणु को मिलाया जाता है प्रयुक्त Taq DNA Polymerase एंजाइम की मदद से ये न्यूक्लियोटाइड्स भी DNA टेम्पलेट से जुड़कर नये DNA खण्ड का निर्माण करते हैं

PCR के प्रत्येक चक्र में 1 minute का समय लगता है

20 चक्र में PCR 1 million नये DNA अणु बना सकता है





(2.) <u>वाहक D.N.A. अणु का चयन</u> :-

वाहक DNA अणु का चयन निम्नलिखित लक्षणों के आधार पर किया जाता है

- वाहक DNA आकार में छोटा होना चाहिए।
- इसको सरलता से अलग करके शुद्ध रूप में प्राप्त कर सकें।
- वाहक DNA ~~खण्ड~~ अणु में वही पैलिन्ड्रोम अनुक्रम होना चाहिए जो वांछित DNA खण्ड पर हो
- जिससे प्रतिबन्धक एण्डोन्यूक्लिएज एन्जाइम, वाहक DNA व विजातीय DNA के पैलिन्ड्रोम का अनावरण कर सके।
- एक समान पैलिन्ड्रोम होने पर वांछित DNA वाहक DNA से जुड़कर पुनर्योगज DNA अणु का निर्माण कर सके

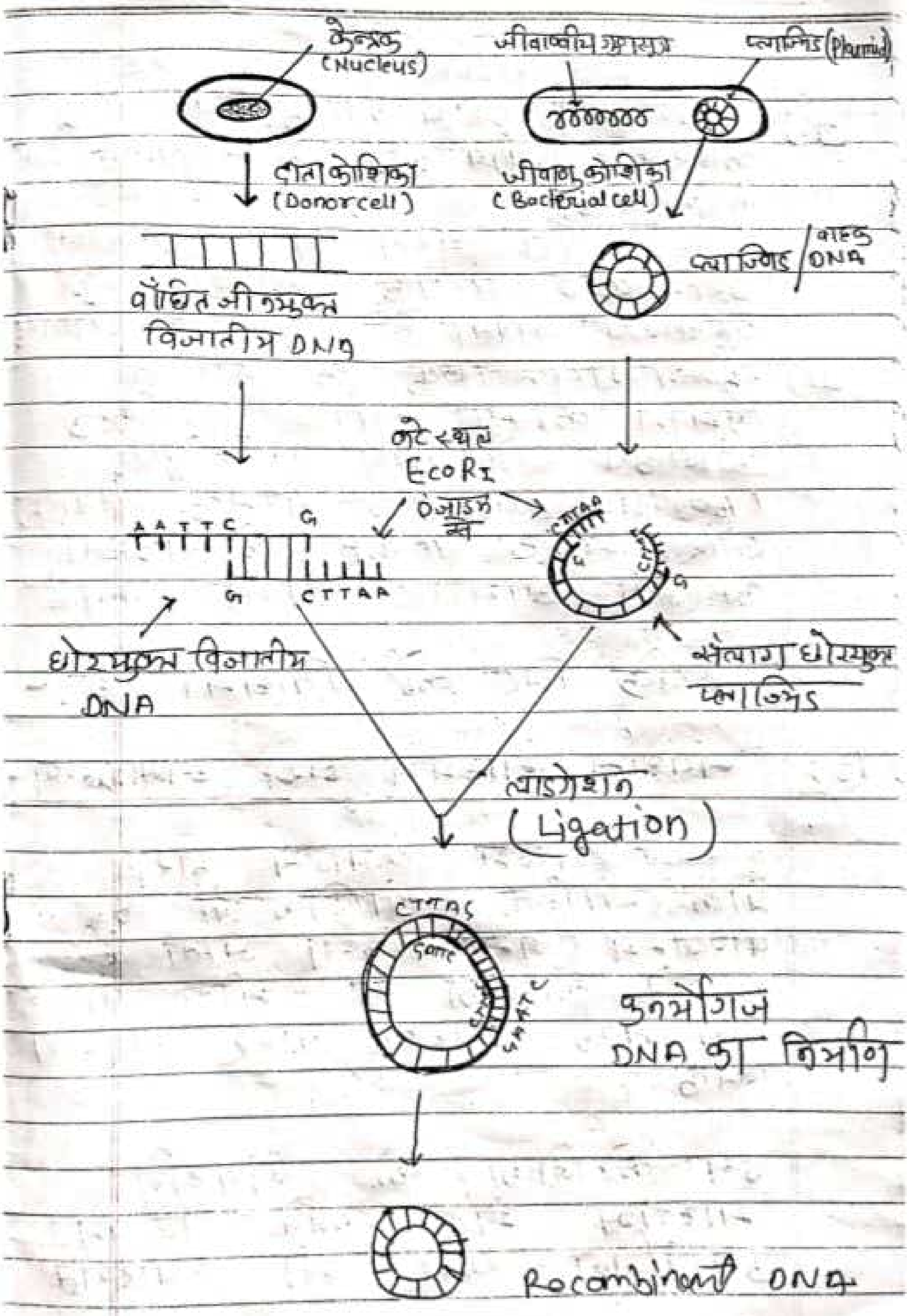
• वाहक DNA अणु पोषक कोशिका मे स्थानान्तरित करने पर वह पोषक कोशिका के अन्दर अपनी प्रतिकृति बना सके।

[3.] वाहक DNA अणु के साथ वांछित जीन को जोड़कर पुनर्योगज DNA अणु का निर्माण ·

पृथक कीये गये DNA खण्ड के इसके क्लोनिंग वाहक से जुड़ने पर पुनर्योगज DNA का निर्माण होता है
किसी विशिष्ट प्रतिबन्धन एण्डो-न्यूक्लिएज की सहायता से वाहक को काटकर खोल लेते एवं विजातीय DNA खण्ड के सिरों को भी समान एंजाइम द्वारा काटकर समान चिपचिपे सिरे प्राप्त करते है।

लाइगेज एंजाइम की सहायता से D·N·A खण्ड व वाहक DNA को जोड़कर पुनर्योगज DNA का निर्माण करते हैं।

Scanned with CamScanner


केन्द्रक
(Nucleus)
प्लास्मिड (Plasmid)
दाता कोशिका
(Donor cell)
जीवाणु कोशिका
(Bacterial cell)
प्लास्मिड / वाहक DNA
वांछित जीनयुक्त
विजातीय DNA
कटे स्थल
EcoRI
AATTC
G
G
CTTAA
छोरयुक्त विजातीय
DNA
लाइगेशन
(Ligation)
CTTAG
पुनर्योगज
DNA का निर्माण
Recombinant DNA

(4) पुनर्योगज DNA को पोषद कोशिका (जीवाणु) में स्थानान्तरित करना -

इस चरण में पुनर्योगज DNA को पोषक कोशिका में पहुँचाया जाता है, E-coli जीवाणु मुख्यतया पोषक के रूप में प्रयोग कीया जाता है किन्तु आजकल बैसिलस सब्टिलिस (Bacillus Subtilis) नामक जीवाणु और यीस्ट Yeast कोशिकाओं का भी उपयोग कीया जाता है

इसके लिए कई विधियाँ है -

(I) संवर्धन माध्यम द्वारा अन्तर्ग्रहण -

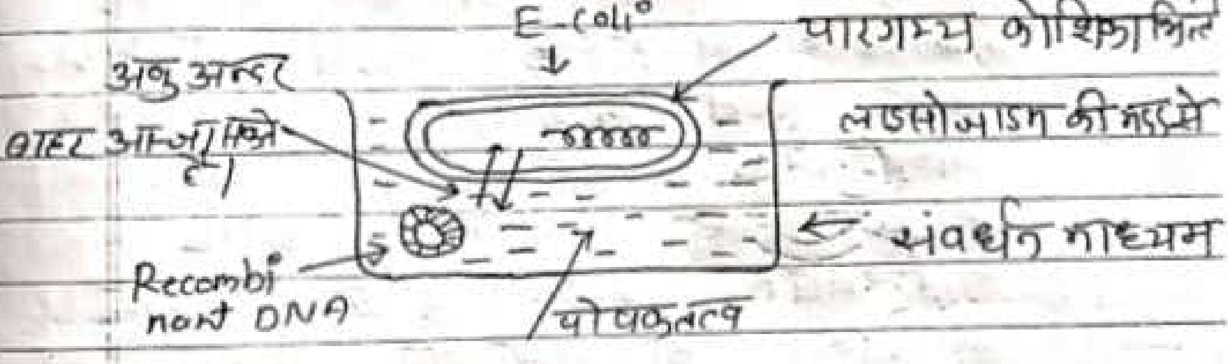
लाइसोजाइम एंजाइम द्वारा प्रोकैरियोटिक कोशिकाओं को पारगम्य बना दिया जाता है जिससे कोशिका के भीतर पोषक या अणु अन्दर बाहर आ-जा सके।

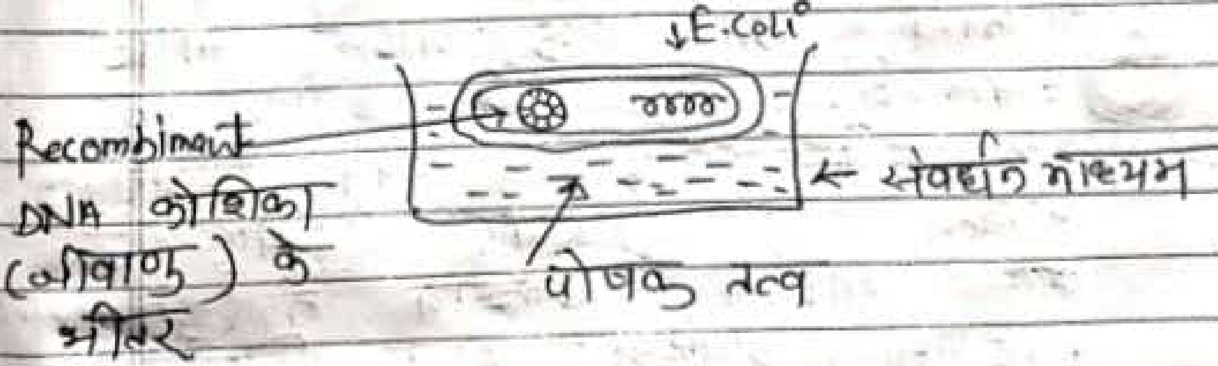
इन कोशिका को संवर्धन माध्यम में रखते जिसमें पुनर्योगज DNA भी उपस्थित

Scanned with CamScanner

होता है वृद्धि करते इसे कोशिका (जीवाणु) पोषक तत्वों के साथ पुनर्योगज DNA को भी अन्दर ले लेते हैं।

यह विधि मुख्यतया कुछ जीवाणुओं जैसे इश्चेरीचिया कोलाई (E-coli) में Recombident DNA को अन्तर्ग्रहण कराया जाता है।





(II) इलेक्ट्रोपोरेशन (Electroporation) -

उच्च वोल्टेज की विद्युत धारा प्रवाह से कोशिका की भित्ति

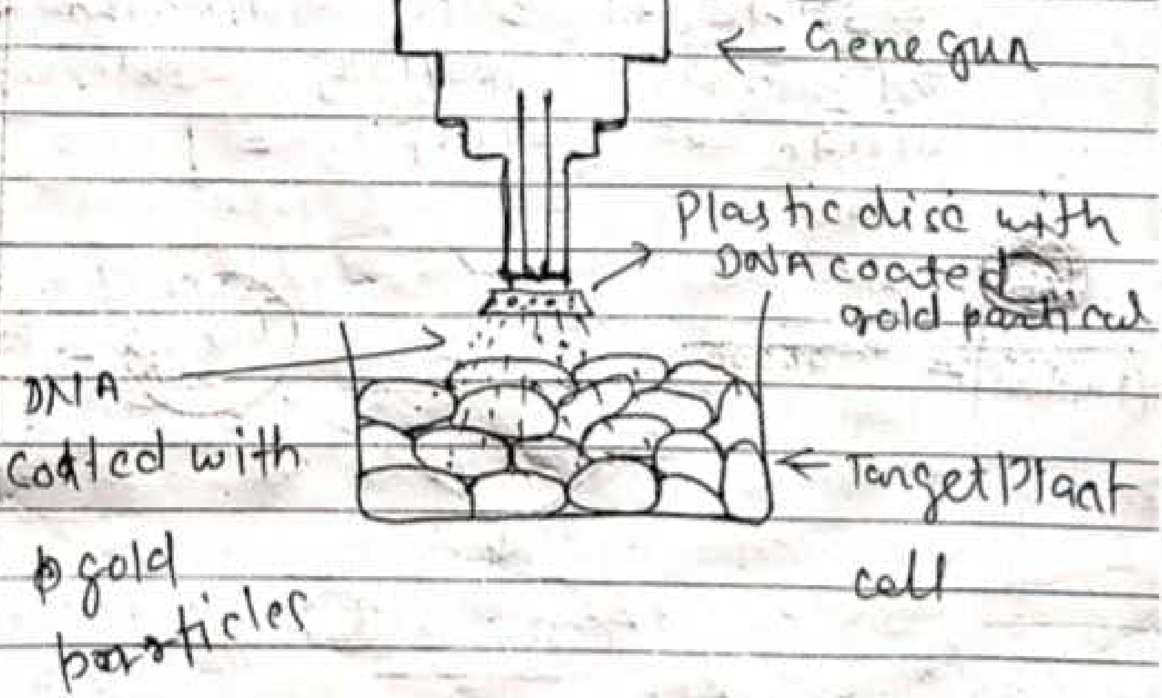
कला अस्थायी रूप से कट या फट जाती है जिसके परिणाम स्वरूप पुनर्योगज DNA को कोशिका में प्रवेश कराया जाता है इस विधि को इलेक्ट्रो पोरेशन कहते है।

(III) <u>माइक्रोइंजेक्शन</u>

माइक्रोइंजेक्शन क्रियाविधि में एक सूक्ष्म आवर्धन वाला माइक्रोस्कोप तथा दो मैनीपुलेटर होते है। माइक्रोस्कोप द्वारा DNA प्रतिस्थापन प्रक्रिया के समय कोशिका को देखते रहते है। एक विशेष प्रकार मैनीपुलेटर में काँच का एक माइक्रो पीपेट होता है जो कोशिका को आंशिक ~~उत्तकीय~~ चूषण द्वारा स्थिर रखता है दूसरे मैनीपुलेटर माइक्रो इंजेक्शन में पुनर्योगज DNA उपस्थित होता जिसे कोशिका में प्रवेश करा दिया जाता है।

(IV) माइक्रोप्रोजेक्टाइल बम्बार्डमेन्ट या बायोलिस्टिक या जीन गन.

टंगस्टन या गोल्ड के भारी माइक्रो पार्टिकल को पुनर्योगज DNA से लेपित करके पुनर्योगज DNA को अधिक गति पर अपकर्षण द्वारा पादप कोशिकाओं में ~~परिवेश~~ प्रवेश करा सकते हैं।
इस तकनीक का विकास प्रो॰ स्टेनफोर्ड व उनके सहयोगियों ने किया था

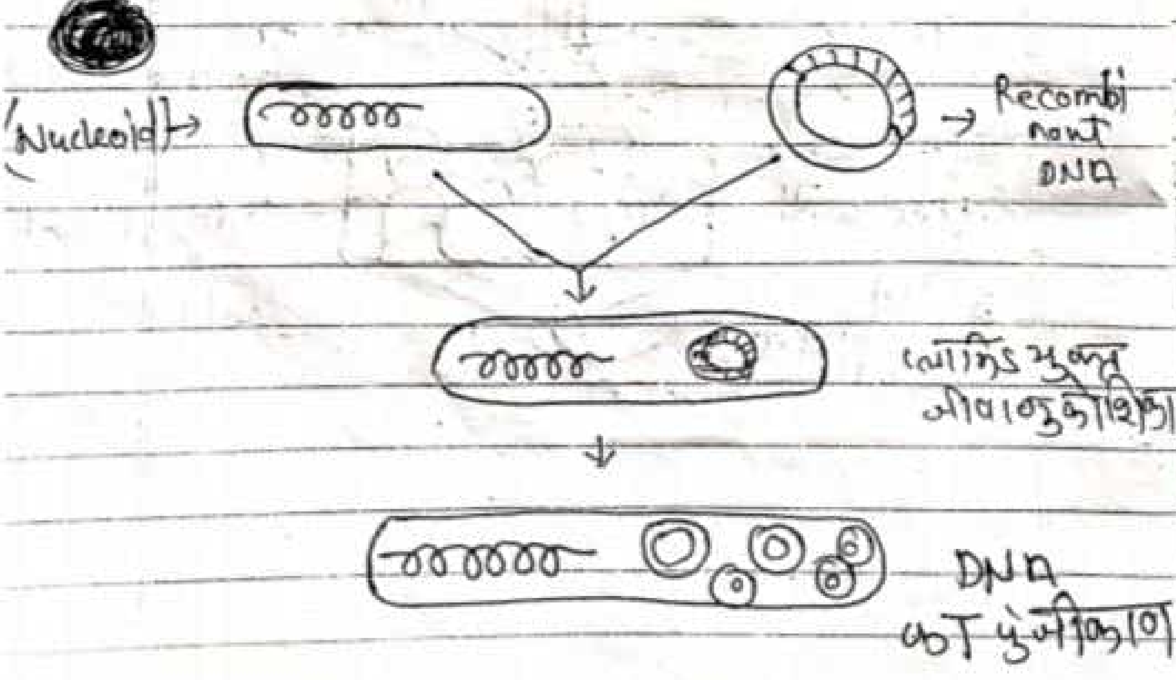


(5.) पुनर्योगज DNA अणु का क्लोनिंग (प्रतिरूपण).

पुनर्योगज DNA अणु की अनेक प्रतिलिपियाँ प्राप्त करना आनुवंशिक इन्जीनियरिंग का अन्तिम चरण है।

इस क्रिया में पुनर्योगज DNA जीवाणु कोशिका के अन्दर बारम्बार गुणन करता है जिससे उनकी अनेक प्रतिलिपियाँ बन जाती है।

इनमें से केवल रूपान्तरित जीवाणु कोशिकाएँ प्रतिजैविक की में जीवित रह जाती है।



(6.) पुनर्योगज DNA से विजातीय जीन उत्पाद प्राप्त करना -

वांछित जीन का पुंजीकरण करके तथा लक्ष्य प्रोटीन की अभिव्यक्ति को प्रेरित करने वाली परिस्थितियों को अनुकूल बनाने के पश्चात कोई भी इसका व्यापक स्तर पर उत्पादन कर सकता है।

यदि कोई कूट लेखन जीन किसी विषमजात परपोषी में अभिव्यक्त होता है, तो यह पुनर्योगज प्रोटीन कहलाता है। वांछित जीन युक्त परपोषी कोशिकाओं का छोटे पैमाने पर प्रयोगशाला में संवर्धन किया जाता है।

अनेक तकनीकों द्वारा इस संवर्धन से प्रोटीन का निष्कर्षण और शोधन किया जा सकता है। कोशिकाओं के सतत संवर्धन के लिए पुराने पोषक माध्यम को निकालने और ताजा पोषक माध्यम को डालने की व्यवस्था की जाती है।

Scanned with CamScanner

जिससे कोशिकाएँ संख्या में और अधिक सक्रिय बनी रहें तथा वांछित प्रोटीन अधिक मात्रा में प्राप्त होती रहें

अनुप्रवाह संसाधन (Downstream processing)

बायोरिएक्टर में जैव संश्लेषित पदार्थ को शुद्ध रूप से प्राप्त करने को अनुप्रवाह संसाधन कहलाता है।

इस के लिए संश्लेषित मिश्रण को कई प्रक्रमों से गुजरना होता है - जिसमें पृथक्करण व शोधन मुख्य है इसके लिए छानना व अवसादन, सैन्ट्रीफ्यूगेशन तथा विभिन्न प्रकार की विधियां तथा विद्युत कण संचलन विधियों का प्रयोग कहलाता है

इसके पश्चात प्रत्येक पदार्थ के लिए सुनिश्चित गुणवत्ता नियंत्रण की भी आवश्यकता होती है।

Scanned with CamScanner