VIVEKANANDA COLLEGE

THAKURPUKUR

NAAC ACCREDITED GRADE—'A'

© Vivekananda College, Thakurpukur 2018

Subject: Botany

রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ প্রযুক্তি

Name of the Teacher: Dr. Ashutosh Mukherjee*

***Assistant Professor, Dept. of Botany, Vivekananda College**

রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ প্রযুক্তি

জৈব প্রযুক্তি কথাটি ১৯৭০ সালের শেষার্ধে চালু হয়। এই সময় উন্নত আনবিক ও কোষ-জীববিদ্যা তার অগ্রগতিক কাজে লাগিয়ে নতুন নতুন শিল্প উদ্যোগ গ্রহণে উদ্যোগী হয়। জৈব প্রযুক্তি হল মানুষের পক্ষে কার্যকারী উৎপাদনের জন্য সজীব জীবজগতের ব্যবহার। জীববিজ্ঞান, রসায়ন বিজ্ঞান, ও কারিগরী বিজ্ঞানের সুসংহত ব্যবহারে গড়ে উঠেছে এই বিষয়টি। জীবজগতের প্রতিনিধির প্রকৃতির উপর নির্ভর করে জৈব প্রযুক্তিকে বৃহদার্থে মাইক্রোবিয়াল জৈব প্রযুক্তি, উদ্ভিদের জৈব প্রযুক্তি এবং প্রণীর জৈব প্রযুক্তি এই তিনটি শ্রেণীতে বিন্যস্ত করা যায। জেনেটিক কারিগরী (ইঞ্জিনিয়ারিং) ডি এন এ প্রযুক্তি,প্রোটোপ্লাষ্ট সংযোজন, সংরক্ষণ প্রযুক্তি, কোষ-কৃষ্ট, কলা-কৃষ্ট, জার্মাপ্লাজমের উন্নতি, ভ্রুণ-স্থানান্তর প্রযুক্তি, উৎসেচক এবং প্রোটিন কারিগরী, ফার্মেন্টেশন, জৈব-রূপান্তর এবং কোষ ও কোষ উৎপাদিত বস্তুও অচলাবস্থা সংক্রান্ত জ্ঞান এই জৈব প্রযুক্তির অন্তর্ভূক্ত বিষয়।

জেনেটিক ইঞ্জিনিয়ারিং শব্দটির বৃহত্তর অর্থ হল একটি জীবের 'নিউক্লিক অ্যাসিড দক্ষতাসহকারে পুনর্গঠিত (recombine) করা। একটি জীব যার জিন পছন্দসইভাবে পুনর্গঠিত হয়েছে তাকে বলা হয় জেনেটিকালি মডিফায়েড জীব (Genetically Modified Organism বা GMO).

ডিএনএ ক্লোন করার প্রণালী (রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ প্রযুক্তি)

সংক্ষিপ্ত বিবরণঃ

1. ডি এন এ পৃথগীকরণ ও পরিশোধন
2. Restriction Endonuclease এর দ্বারা ডি এন এ-র সুনির্দিষ্ট স্থানে ছেদন
3. ক্লোনিং ভেক্টর এর মধ্যে Ligation (জুড়ে দেওয়া)
4. হোস্ট কোষে রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ অণুর রূপান্তর (transformation) ও সংখ্যাবৃদ্ধি
5. রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ অণু যুক্ত কোষের নির্বাচন

বিস্তারিত বিবরণঃ

ডি এন এ পৃথগীকরণ

দাতা কোষ থেকে ডি এন এ পৃথগীকরণ

প্রথমে দাতা কোষটির কোষপ্রাচীর (উদ্ভিদের ক্ষেত্রে) ও কোষপর্দা (প্রাণী ও উদ্ভিদ উভয়ের ক্ষেত্রে) নষ্ট করে দেওয়া হয়। এরপর প্রোটিয়েস উৎসেচক ও ফেনলের মাধ্যমে কোষের প্রোটিনগুলি ধ্বংস করা হয়। এরপর আর এন এ গুলিকে RNase উৎসেচক দ্বারা নষ্ট করা হয়। এরপর শুধু ডি এন এ থেকে যায়।

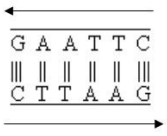
প্লাসমিড (ক্লোনিং ভেক্টর)-এর ডি এন এ পৃথগীকরণ

ক্ষারীয় দ্রবণ এর মাধ্যমে ব্যাকটেরিয়ার কোষগুলিকে ফাটিয়ে দেওয়া হয়। একে alkaline lysis বলে। এর ফলে ব্যাকটেরিয়ার জিনোম থেকে প্লাসমিড আলাদা হয়ে যায়।

এবার দাতা কোষের অপরিশোধিত ডি এন এ এবং অপরিশোধিত প্লাসমিড ডি এন এ উভয়কেই CsCl (সিজিয়াম ক্লোরাইড) নতিমাত্রা (gradient)-এর মাধ্যমে শোধিত করা হয়।

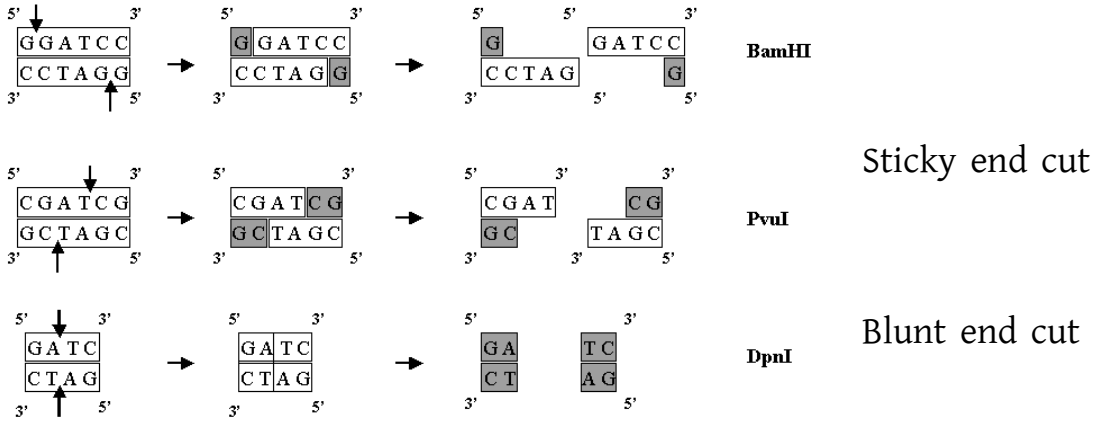
Restriction Endonuclease এর দ্বারা ছেদন

প্রথমে দাতা ডি এন এ (foreign DNA)-এর পছন্দসই অংশ কাটা হয়। এর জন্য restriction endonuclease (RE) নামক একটি নির্দিষ্ট শ্রেণীর ব্যাকটেরিয়াজাত উৎসেচক ব্যবহার করা হয়। এই উৎসেচক গুলি একটি নির্দিষ্ট স্থানে একটি ডিএনএ অনুক্রম (sequence) কে কাটতে পারে। প্রতিটি restriction endonuclease যে নির্দিষ্ট স্থানে ডিএনএ সূত্রকে কাটে, তাকে ওই restriction endonuclease এর recognition site বলে। Recognition site গুলি palindromic (অর্থাৎ ডি এন এ-র যে অংশের একটি সুত্রের 5’-3’ অনুক্রম অন্যটির 3’-5’ অনুক্রমের সমান)।



একটি palindromic অনুক্রম

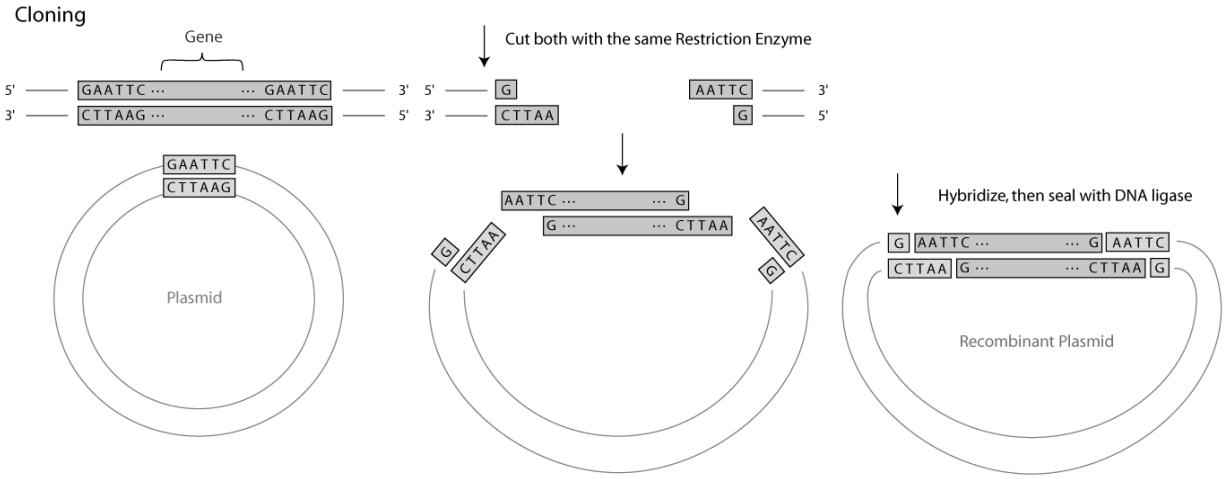
একটি restriction endonuclease, palindromic ডি এন এ-র দুটি সূত্রকেই কাটে। কোন কোন RE এই দুটি সূত্রকে সমানভাবে কাটে যার ফলে দুটি ভোঁতা প্রান্ত (blunt ends) তৈরী হয়। আবার কোন কোন RE এই দুটি সূত্রকে অসমানভাবে কাটে যার ফলে দুটি sticky বা staggered বা overhanging বা "আঠালো প্রান্ত" উৎপন্ন হতে পারে। অর্থাৎ অসমান প্রান্তের নিউক্লিওটাইড গুলি হাইড্রোজেন বন্ধন করতে সক্ষম।



ক্লোনিং-এর জন্য সাধারণতঃ "আঠালো প্রান্ত" উৎপাদনকারী একটি নির্দিষ্ট RE ব্যবহার করা হয় যার দ্বারা দাতা ও প্লাসমিড উভয়ের ডি এন এ কেই কাটা হয়।

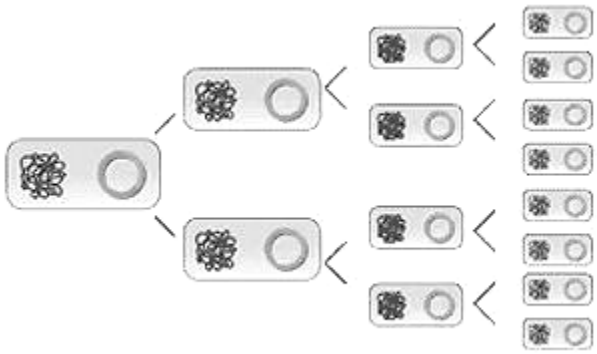
ক্লোনিং ভেক্টর এর মধ্যে Ligation (জুড়ে দেওয়া)

RE দ্বারা কাটার পর দাতা ও প্লাসমিড উভয়ের ডি এন এ কে একসাথে একটি টিউব-এ মিশিয়ে দেওয়া হয়। যেহেতু দু প্রকার ডি এন এ-কেই একই RE দ্বারা কাটা হয়, সেহেতু তাদের উভয়েরই একই অনুক্রম (sequence) বিশিষ্ট 'আঠালো প্রান্ত' (sticky end) থাকে, ফলে তারা সংযোগশীল হয়। দাতা ডি এন এ-র ' আঠালো প্রান্ত' গুলি ক্লোনিং ভেক্টর-এর 'আঠালো প্রান্তের' সাথে হাইড্রোজেন বন্ধনীর মাধ্যমে জুড়ে যায়। এবার ডি এন এ লাইগেজ (DNA ligase) দ্বারা উভয়ের কাটা অংশ গুলি জুড়ে দেওয়া হয়। ডি এন এ লাইগেজ দুটি ডি এন এ-র মধ্যে ফসফোডাইএস্টার বন্ধনী তৈরী করে। এই বন্ধনী সৃষ্টির ফলে প্রবর্তিত দাতার জিনটি প্লাসমিড এর একটি অংশ হয়ে ওঠে। এটিই রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ। একে chimeric (মিশ্রিত?) DNA ও বলে। দাতার ডি এন এ টিকে ' insert' (সন্নিবেশ) বলা হয়। এই সমগ্র পদ্ধতিটিকে ক্লোনিং বলা হয়।



হোস্ট কোষে রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ অণুর রূপান্তর (transformation)

প্রচুর পরিমাণ রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ অণু পাওয়ার জন্য এগুলিকে কোন পোষক কোষে (যেমন, একটি ব্যাকটিরিয়ামে) রূপান্তর করা হয়। বিভিন্নভাবে এটি করা যেতে পারে। একটি উপায় হল কোষগুলিকে $CaCl_2$ দ্বারা প্রক্রিয়া করা হয়। এরপর ক্লোনড ডি এন এ টিকে প্রক্রিয়াক্রিত কোষগুলির সাথে যোগ করা হয়। এরপর কোষগুলিকে $42^{\circ}C$-এ উত্তপ্ত করলে ডি এন এ কোষের মধ্যে প্রবেশ করে। কোষের মধ্যে এই ডি এন এ গুলি প্রতিলিপি গঠন করে। কোষগুলির বিভাজনের সাথে সাথে ক্লোনড ভেক্টরটিও প্রতিলিপি গঠনের মাধ্যমে সংখ্যাবৃদ্ধি করে। প্রতিটি রূপান্তরিত কোষ বহুবার বিভক্ত হয়ে একটি উপনিবেশ (colony) গঠন করে যার প্রত্যেকটি কোষে রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ অণু (ডি এন এ ক্লোন) থাকে।



রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ অণু যুক্ত কোষের নির্বাচন

জীবাণুনাশক প্রতিরোধী ক্লোনের নির্বাচন

একটি উপনিবেশের সবকটি কোষে রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ অণু প্রবেশ করে না। কোন কোষগুলিতে রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ প্রবেশ করেছে, তা বোঝার জন্য ক্লোনিং ভেক্টর তৈরীর সময় তাতে antibiotic resistant (জীবাণুনাশক প্রতিরোধী) জিন আগে থেকেই দেওয়া থাকে। যেমন pBR322 প্লাসমিড-এ অ্যাম্পিসিলিন প্রতিরোধী (ampicillin resistant বা *ampR*) এবং টেট্রাসাইক্লিন প্রতিরোধী (tetracycline resistant বা *tetR*) জিন প্রবিষ্ট থাকে। এর মধ্যে টেট্রাসাইক্লিন প্রতিরোধী জিনটির মধ্যে একটি *Bam*HI RE site থাকে। যখন *Bam*HI ব্যবহার করে দাতা জিনটিকে প্লাসমিড-এ প্রবেশ করানো হয়, তখন টেট্রাসাইক্লিন প্রতিরোধী জিনটির কার্যকারিতা নষ্ট হয়ে যায় (যেহেতু জিনটির মাঝে দাতা জিনটি প্রবেশ করেছে)। এবার অ্যাম্পিসিলিন যুক্ত মাধ্যমে যে কোষগুলি বৃদ্ধি পাবে, বুঝতে হবে সেগুলিতে প্লাসমিডটি প্রবেশ করেছে (রিকম্বিন্যান্ট হোক বা না হোক), কারণ প্লাসমিড ছাড়া কোষগুলি অ্যাম্পিসিলিন যুক্ত মাধ্যমে বাঁচতে পারত না। এবার অ্যাম্পিসিলিন যুক্ত মাধ্যমের উপনিবেশগুলি replica plating (মুখ্য উপনিবেশগুলির একটি ছাপ নিয়ে অন্য একটি মাধ্যমে বৃদ্ধি করা) পদ্ধতির মাধ্যমে টেট্রাসাইক্লিন যুক্ত মাধ্যমে বৃদ্ধি পেতে দিলে রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ অণু যুক্ত উপনিবেশগুলি বাঁচতে পারবে না (যেহেতু টেট্রাসাইক্লিন প্রতিরোধী জিনটির কার্যকারিতা নষ্ট হয়ে যায়)। এই replica plate টি দেখে মুখ্য উপনিবেশগুলির কোনটির মধ্যে রিকম্বিন্যান্ট ডি এন এ অণু প্রবেশ করেছে, তা বোঝা যায় এবং সেগুলিকে নির্বাচন করা হয়।

সাদা/নীল নির্বাচন

বর্তমানে pUC শ্রেণীর ভেক্টরে *lacZ* নামক একটি জিন দেওয়া থাকে যা থেকে বিটা-গ্যালাকটোসাইডেজ (*β*-galactosidase) উৎসেচক উৎপাদন করে। এই উৎসেচকটি *X-gal* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- *β*-D-galactopyranoside) নামক একটি রাসায়নিকের উপর ক্রিয়া করে নীল রং তৈরী করে। এই *lacZ* জিনটির মধ্যে RE site থাকে যেখানে দাতা জিনটি প্রবেশ করানো হয়। ফলে *lacZ* জিনটির বিটা-গ্যালাকটোসাইডেজ কার্যকলাপ লোপ পায়। ক্লোনিং-এর পরে যে উপনিবেশগুলি নীল রং দেয়, সেগুলি রিকম্বিন্যান্ট নয়, আর যে উপনিবেশগুলি রংবিহীন থাকে, সেগুলি রিকম্বিন্যান্ট।

x-gal selection

গ্রন্থপঞ্জী (References)

Jha, T.B. & Ghosh, B. Plant Tissue Culture, 2003, Universities Press.

Kar, D.K. & Halder, S. Plant Breeding, Biometry & Biotechnology, 2010, New Central Book Agency.

Lehninger Principles of Biochemistry. Sixth Edition. 2013. David L. Nelson, Michael M. Cox. Freeman, Macmillan.