

اکائی 1: بائیو ٹیکنالوجی: تصورات، دائرہ کار، اور سیل اور ٹشو کلچر کے ذرائع

(Biotechnology: Concepts, Scope, and Cell & Tissue Culture Sources)

اکائی کے اجزاء

تمہید (Introduction)	1.0
مقاصد (Objectives)	1.1
عمومی اکاؤنٹ (General Account)	1.2
قدیم بائیو ٹیکنالوجی (Ancient Biotechnology)	1.2.1
جدید بائیو ٹیکنالوجی (Modern Biotechnology)	1.2.2
بائیو ٹیکنالوجی کی اقسام (Types of Biotechnology)	1.3
بایو ٹکنالوجی میں مختلف تکنیکیں (Various Techniques in Biotechnology)	1.4
بائیو ٹیکنالوجی کی اپیلی کیشنز (Applications of Biotechnology)	1.5
سیل اور ٹشو کلچر (Cell Culture)	1.6
پرائمری سیل کلچرز: ٹشوفزیالوجی کے جوہر پر قبضہ کرنا (Primary Cell Cultures: Capturing the Essence of Tissue Physiology)	1.6.1
اسٹیم سیلز (Stem Cells)	1.6.2
سیل اور ٹشو کلچر میں اپیلی کیشنز اور چیلنجز (Applications and Challenges in Cell and Tissue Culture)	1.6.3
جانوروں کی ٹشو کلچر (Animal Tissue Culture)	1.6.4
ٹشوا انجینئرنگ تک رسائی (Tissue Engineering Approaches)	1.6.5
ٹشوا انجینئرنگ تکنیک کا جائزہ (Overview of Tissue Engineering Technique)	1.7
ٹشوا انجینئرنگ تکنیک کے کلیدی اجزاء (Key Components of Tissue Engineering Technique)	1.7.1

1.8	ٹشو انجینئرنگ تکنیک کا اطلاق (Application of Tissue Engineering Technique)
1.8.1	دوائیں (Regenerative Medicines)
1.8.2	وٹرو ہیومن ماڈلز کی تخلیق (In vitro human models)
1.8.3	ٹشو انجینئرنگ میں چیلنجز (Challenges in Tissue Engineering)
1.8.4	مدافعتی رد عمل اور گرافٹ رد عمل (Immune reaction and Graft rejection)
1.8.5	ناکافی ویسکولرائزیشن (Inadequate Vascularization)
1.9	اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)
1.10	کلیدی الفاظ (Keywords)
1.11	نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)
1.11.1	معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)
1.11.2	مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)
1.11.3	طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)
1.12	فرہنگ (Glossary)
1.13	مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1.0 تمہید (Introduction)

ہماری جامع گائیڈ کے تعارفی باب میں خوش آمدید، "بائیو ٹیکنالوجی: تصورات، دائرہ کار، اور سیل اور ٹشو کلچر کے ذرائع۔" اس باب میں، ہم بائیو ٹیکنالوجی کے متحرک منظر نامے کو دریافت کریں گے، اس کے بنیادی اصولوں، وسیع دائرہ کار، اور سیل اور ٹشو کلچر کی اہم تکنیکوں کو کھولتے ہوئے، خاص طور پر ان عملوں میں کام کرنے والے خلیوں کے متنوع ذرائع پر خاص زور دیتے ہیں۔

انسان گزشتہ 10,000 سالوں سے زندگی کے معیار کو بہتر بنانے کے لیے حیاتیاتی عمل کا استعمال کر رہا ہے۔ حیاتیاتی ایجنٹوں جیسے مائیکرو جینزموں کو مختلف مصنوعات حاصل کرنے کے لیے استعمال کیا گیا ہے۔ ایسی ٹیکنالوجی اور مصنوعات تیار کرنے کے لیے جانداروں کا استعمال جو ہماری زندگی اور صحت کو بہتر بنانے میں مدد کرتے ہیں اسے بائیو ٹیکنالوجی کہا جاتا ہے۔ بائیو ٹیکنالوجی کا تصور 19 ویں صدی میں اس وقت پروان چڑھنا شروع ہوا جب پودوں اور جانوروں کے خلیوں کے ساتھ ساتھ ان کے اجزاء کو مطلوبہ مصنوعات حاصل کرنے کے لیے

وٹرو حالات میں مہذب کیا گیا۔ تب سے مائکروجنزموں کو بڑے پیمانے پر بائیو کیمیکلز (جیسے الکحل، اینٹی بائیوٹکس)، فوڈ پروسسنگ اور ماحولیاتی تدارک کے لیے استعمال کیا جاتا رہا ہے۔ بائیو ٹیکنالوجی کی بڑی اپیلی کیشنز میں زراعت کی بہتری کے لیے علاج، تشخیص، فوڈ پروسسنگ، بائیو میڈیشن، فضلہ کا علاج، توانائی کی پیداوار اور جینیاتی طور پر تبدیل شدہ فصلیں شامل ہیں۔ Recombinant DNA ٹیکنالوجی کی آمد نے جرثوموں، پودوں اور جانوروں کی نشوونما کو ممکن بنا دیا ہے جو اعلیٰ اور نئی صلاحیتوں کے مالک ہیں۔ جینیاتی طور پر تبدیل شدہ حیاتیات (GMO) ایک یا ایک سے زیادہ جینز کو ایک جاندار سے دوسرے میں منتقل کر کے بنائے گئے ہیں۔ جینیاتی طور پر تبدیل شدہ پودے اعلیٰ درجہ حرارت، نمکیات کے تناؤ اور پیتھوجین اور کیڑوں کے حملے کے خلاف مزاحمت کے لیے تیار کیے گئے ہیں۔ یہ طریقے فصل کے پودوں کی پیداوار بڑھانے اور فصل کے بعد ہونے والے نقصانات کو کم کرنے میں بہت مفید ثابت ہوئے ہیں۔ بہتر غذائیت کے ساتھ فصلوں کے پودوں کی نشوونما اور کیمیائی کیڑے مار ادویات (کیڑوں سے بچنے والی فصلوں) پر انحصار کم کرنا بائیو ٹیکنالوجی کی تکنیک کے ذریعے ممکن ہوا ہے۔ موجودہ یونٹ آپ کو بائیو ٹیکنالوجی کے تصور سے متعارف کرتا ہے اور آپ کو پلانٹ بائیو ٹیکنالوجی کے مختلف طریقوں اور اس کے استعمال کے بارے میں معلومات فراہم کرتا ہے۔

Recombinant DNA ٹیکنالوجی کی آمد نے جرثوموں، پودوں اور جانوروں کی ترقی کی ہے جو اعلیٰ اور نئی صلاحیتوں کے مالک

ہیں۔

نمیر کے قدیم طریقوں سے لے کر جینیاتی انجینئرنگ کی انقلابی کامیابیوں تک، ہم انسانی ذہانت اور استقامت کی بھرپور ٹیسٹری سے پردہ اٹھاتے ہیں جس نے بائیو ٹیکنالوجی کو سائنسی کوششوں میں آگے بڑھایا ہے۔

اس تاریخی پس منظر کے ساتھ، ہم بائیو ٹیکنالوجی کے بنیادی تصورات اور دائرہ کار، اور اس کی بین الضابطہ نوعیت اور حیاتیات، کیمسٹری، طبیعیات، اور کمپیوٹیشنل سائنسز کے درمیان سمبیوٹک تعلق کا جائزہ لیتے ہیں۔ مثالوں اور کیس اسٹڈیز کے ذریعے، ہم بائیو ٹیکنالوجی کے متنوع اپیلی کیشنز کو روشن کرتے ہیں، جس میں زندگی بچانے والی دواسازی کی تیاری سے لے کر پائیدار بائیو ایندھن کی ترقی اور نازک ماحولیاتی نظام کی بحالی تک شامل ہیں۔

بائیو ٹیکنالوجیکل اختراع کا سنگ بنیاد سیل اور ٹشو کلچر کے دائرے میں ہے، جہاں زندہ خلیوں کی پرورش اور کنٹرول لیبارٹری کے حالات میں ہیرا پھیری کی جاتی ہے۔ اس باب میں، ہم سیل بائیولوجی، گروتھ مینیٹکس، اور ثقافت کے طریقہ کار کی پیچیدہ دنیا میں سفر شروع کرتے ہیں۔ سیلولر رویے کے اسرار کو کھول کر، قارئین سائنسی دریافت اور تکنیکی اختراع کو آگے بڑھانے میں سیل اور ٹشو کلچر کے کردار کے لیے گہری تعریف حاصل کریں گے۔

ہماری تلاش کا مرکز سیل اور ٹشو کلچر میں استعمال ہونے والے سیل ذرائع کی متنوع صف ہے۔ لافانی سیل لائنوں سے لے کر پرائمری سیل کلچر اور اسٹیم سیلز تک، ہر سیل ماخذ منفرد فوائد اور چیلنجز پیش کرتا ہے جو تجرباتی نتائج اور اپیلی کیشنز کو تشکیل دیتے ہیں۔ ایک تنقیدی عینک کے ذریعے ان ذرائع کی چھان بین کرنے سے، قارئین بائیو ٹیکنالوجیکل ریسرچ اور ڈیولپمنٹ کے لیے دستیاب ٹولز اور تکنیکوں کی باریک بینی سے سمجھ حاصل کریں گے۔

اس پورے اکائی میں، ہم قارئین کو مشغول کرنے اور کلیدی تصورات کی گہری تفہیم کو فروغ دینے کے لیے عملی مثالوں اور متعامل مشقوں کے ساتھ نظریاتی بصیرت کو ملاتے ہوئے ایک کثیر جہتی نقطہ نظر کا استعمال کرتے ہیں۔ اضافی وسائل اور حوالہ جات مزید دریافت اور آزادانہ سیکھنے کی حوصلہ افزائی کے لیے فراہم کیے جاتے ہیں، قارئین کو ذاتی دلچسپی اور تجسس کے شعبوں میں گہرائی میں جانے کے لیے باختیار بناتے ہیں۔

اس اکائی کے اختتام تک، قارئین بائیو ٹیکنالوجی کے دائرے میں ایک تبدیلی کا سفر شروع کر چکے ہوں گے، جو اس کے بنیادی اصولوں، متنوع اپیلی کیشنز، اور سیل اور ٹشو کلچر کی پیچیدگیوں کی مضبوط تفہیم سے لیس ہوں گے۔ اپنے کمپاس کے طور پر اس علم کے ساتھ، قارئین ہمیشہ سے ابھرتے ہوئے منظر نامے پر تشریف لے جانے کے لیے تیار ہیں۔

1.1 مقاصد (Objectives)

- اس یو اکائی کے اپنے مطالعہ کے اختتام پر، آپ کو قابل ہونا چاہیے کہ :-
- ❖ بائیو ٹیکنالوجی کے تصور اور دائرہ کار کی وضاحت کریں۔
- ❖ بائیو ٹیکنالوجی کی مختلف اپیلی کیشنز کو شمار کریں۔
- ❖ سیل اور ٹشو کلچر اور اس کا اطلاق بیان کریں۔

1.2 عمومی اکاؤنٹ (General Account)

- زمانہ قدیم سے انسان اپنی زندگی کو بہتر بنانے کے لیے جاندار چیزوں کا استعمال کرتا رہا ہے۔ ابتدائی زمانے میں (تقریباً 4000-8000 قبل مسیح) انسان پودوں اور جانوروں کو مختلف خدمات کے لیے استعمال کرتا رہا ہے۔ جیسے جیسے وقت گزرتا گیا، بائیو ٹیکنالوجی کے شعبے میں مختلف ترقیاں ہوئیں
- بائیو ٹیکنالوجی کی ترقی کے مختلف مراحل
- بائیو ٹیکنالوجی کی ترقی کی درجہ بندی کی جاسکتی ہے۔
- ❖ قدیم بائیو ٹیکنالوجی (8000-4000 BC): بائیو ٹیکنالوجی کی ابتدائی تاریخ کا تعلق جانوروں کے پالنے اور پودوں کی کاشت سے ہے۔
 - ❖ کلاسیکی بائیو ٹیکنالوجی (2000 قبل مسیح؛ 1800-1900 AD): بائیو ٹیکنالوجی کا یہ دور اہل، خوراک اور ادویات کی تیاری میں جرثوموں کے استعمال پر مبنی تھا۔ اس دور میں جینیات (1900-1953) کو تیار کیا گیا تھا اور ڈی این اے کی تحقیق شروع کی گئی تھی (1953-1976)۔
 - ❖ جدید بائیو ٹیکنالوجی (1977): اس دور میں، حیاتیات میں جینیاتی معلومات کو جینیاتی انجینئرنگ کے ذریعے ہیرا

پھیری کی گئی۔

1.2.1 قدیم بائیو ٹیکنالوجی (Ancient Biotechnology)

سال 1800 سے پہلے کے عرصے میں، دودھ یا گوشت حاصل کرنے کے لیے جانوروں کو پالنے جیسے واقعات، چاول، جو اور گندم جیسے پودوں کی کاشت کو خوراک کے بڑے ذرائع کے طور پر بائیو ٹیکنالوجی کی ترقی کے طور پر درجہ بندی کیا گیا تھا۔ پودوں اور جانوروں کی افزائش نسل کو مطلوبہ خصوصیات متعارف کروا کر ان کو بہتر بنانے کے لیے کیا گیا ہے۔

کلاسیکی بائیو ٹیکنالوجی

پنیر، دہی اور مائیکرو آرگنزم سے روٹی کی پیداوار، الکحل مشروبات جیسے بیئر اور شراب ابال کے ذریعے قدیم زمانے سے کی جاتی رہی ہے۔ ہائیڈرولیسس شکر میں مائیکرو جینزموں (جیسے بیکٹیریا، خمیر یا سانچوں) کا کردار اور اس وجہ سے ابال دریافت کیا گیا تھا۔ 1796 میں، ایڈورڈ جیز نے چیچک کے خلاف قوت مدافعت فراہم کرنے میں ویکسینیشن کے کردار کا مظاہرہ کیا، اس لیے انہیں ویکسینولوجی کا بانی سمجھا جاتا ہے۔ ابال کے سائنسی ثبوت سب سے پہلے لوئس پاسچر نے 1800 کی دہائی کے آخر میں بیان کیے تھے۔ اس نے ایک نظریہ تجویز کیا جسے جراثیم کے نظریے کے نام سے جانا جاتا ہے جس میں کہا گیا تھا کہ خمیر کے عمل میں مائیکرو جینزموں کا ایک اہم کردار ادا کرتے ہیں۔ شہد، سویا بین کے دہی کو قدیم زمانے سے قدرتی اینٹی بائیوٹک کے طور پر استعمال کیا جاتا رہا ہے اور یہ زخموں کو بھرنے میں موثر پایا جاتا ہے۔ یوکرین کے کسانوں نے متاثرہ زخموں کے علاج کے لیے ڈھلے پنیر کا استعمال کیا۔ بعد میں پتہ چلا کہ سانچوں میں موجود اینٹی بائیوٹک بیکٹیریا کو مار دیتی ہے اور انفیکشن کو پھیلنے سے روکتی ہے۔ انزائمز اور پروٹینز 1830 میں دریافت ہوئے تھے۔

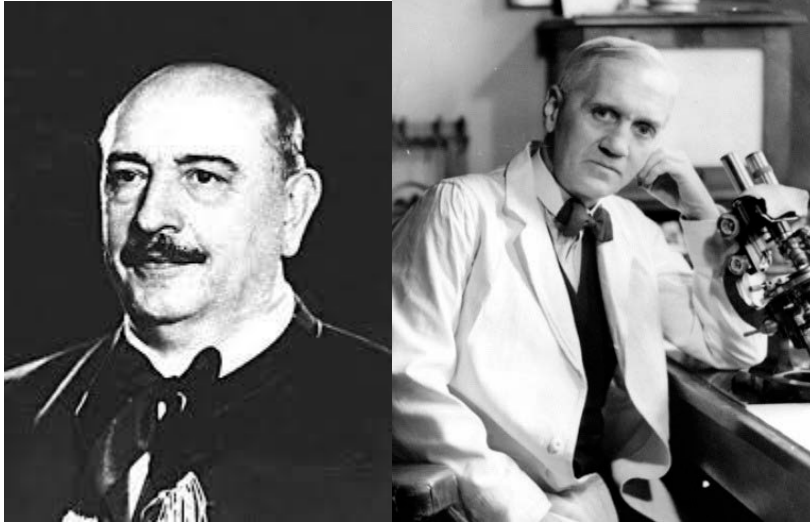
1919 میں ہنگری کے انجینئر کارل ایریکی نے "بائیو ٹیکنالوجی" کی اصطلاح بنائی۔ ان کے مطابق، بائیو ٹیکنالوجی زندہ جانداروں کا استعمال ہے جو اہم مواد یا مصنوعات تیار کرتی ہے۔ دوسرے لفظوں میں، یہ وہ ٹیکنالوجی ہے جو حیاتیاتی عمل، حیاتیات یا ایسی مصنوعات تیار کرنے کے نظام جو انسانی زندگیوں کو بہتر بناتے ہیں۔

1920 میں چیم ویزمین نے حیاتیاتی تکنیک کے ذریعے مفید کیمیائی مرکبات تیار کرنے کی کوشش کی۔ اس نے *Clostridium acetobutylicum* استعمال کیا جس نے نشاستے کو بٹانول میں تبدیل کیا۔ بعد میں، بائیو ٹیکنالوجی جیسے ابال کو آٹو مو باکل انڈسٹری کے لیے پینٹ سالوینٹس اور نشاستے سے ایسٹون تیار کرنے کے لیے بہتر کیا گیا۔ ان عملوں کو پہلی جنگ عظیم کے دوران فروغ دیا گیا۔ دوسری جنگ عظیم کے دوران، پینسلین دریافت ہوئی۔ 1929 میں، الیگزینڈر فلیمنگ نے *Penicillium Notatum* کی ثقافتوں سے اینٹی بائیوٹک پینسلین تیار کی۔ دوسری جنگ عظیم (تصویر 10.1) کے دوران زخمی فوجیوں کے علاج کے لیے پینسلین مفید ثابت ہوئی۔ بائیو ٹیکنالوجی کی توجہ 1930 کی دہائی میں فارماسیو ٹیکلر منتقل ہو گئی۔ نیز 1930 کی دہائی میں بائیو ٹیکنالوجی کا استعمال زراعت کے شعبے میں منتقل ہوا۔

پودوں اور جانوروں کی منتخب افزائش ماضی میں کی جاتی رہی ہے۔ اس طریقہ کار میں مطلوبہ خصلتوں کے حامل جانداروں کو ان کی اولاد میں ان خصلتوں کو مزید بڑھانے کے لیے ملاپ کی اجازت دی گئی۔ یہ پایا گیا کہ انتخابی افزائش پیداوار کے ساتھ ساتھ پیداواری صلاحیت کو بھی بہتر بنا سکتی ہے۔ نچر انسانوں کے فائدے کے لیے کراس بریڈنگ کی سب سے قدیم مثالوں میں سے ایک ہے۔ انسان نے نقل و حمل، بوجھ اٹھانے اور کھیتی باڑی کے لیے نچروں کا استعمال شروع کیا۔ بعد میں بائیو ٹیکنالوجی کی توجہ فارماسیو ٹیکلز کی طرف منتقل ہو گئی۔ مائیکروجنزموں کو اینٹی بائیوٹک کی تیاری میں استعمال کیا جاتا تھا۔

اٹھارویں صدی کے آخر اور انیسویں صدی کے آغاز پر، بائیو ٹیکنالوجی کی توجہ فصلوں کی گردش (بشمول پھلی دار فصلوں)، ویکسینیشن کی ترقی اور جانوروں پر مبنی مطالعات پر مرکوز کر دی گئی۔ نئی ٹیکنالوجیز کے ارتقاء اور زندگی کی سائنس کے مختلف اصولوں کی بہتر تفہیم کی وجہ سے بائیو ٹیکنالوجی کی پیچیدگی میں اضافہ ہوا۔

انیسویں صدی کے آخر تک، بہت سے مائیکروجنزموں دریافت ہوئے، جنہیں پرمینڈل کا کام مکمل ہو گیا اور مائیکرو بیل عمل جیسے اہال کی کھوج کی گئی۔ بیسویں صدی کے آغاز میں صنعت اور زراعت نے بائیو ٹیکنالوجی کے طریقوں کا استعمال شروع کیا۔



(a)

(b)

شکل 1.0: (a) کارل ایریکی (Karl Ereky)؛ (b) الیگزینڈر فلمینگ (Alexander Fleming)

1.2.2 جدید بائیو ٹیکنالوجی (Modern Biotechnology)

بعد میں 1960 اور 70 کی دہائیوں میں مائیکرو، سیلولر ٹیکنالوجیز ابھرنے لگیں۔ 1953 سے 1976 کے درمیانی عرصے میں ڈی این اے کی تحقیق شروع کی گئی۔ خلیات اور حیاتیاتی مائیکرو (DNA، RNA اور پروٹین) کو مفید مصنوعات بنانے کے لیے استعمال کیا گیا۔ حقیقی بائیو ٹیکنالوجی کا آغاز 1970 میں انسولین کی تیاری سے ہوا تھا۔ پہلی پابندی کا انزائم بھی 1970 میں دریافت ہوا تھا۔ اس دریافت نے محققین کو بیٹریا میں غیر ملکی جین داخل کرنے کے قابل بنایا۔ اس نے ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کی بنیاد بنائی اور اسے جدید دور کی بائیو ٹیکنالوجی کی پیدائش سمجھا جاتا ہے۔ جانداروں کے ڈی این اے میں ہیرا پھیری کی گئی اور چینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانداروں سے حاصل کردہ

مصنوعات کو مالیکولز کی ہیرا پھیری میں استعمال کیا گیا۔ 1977 میں، سکاٹ لینڈ میں محققین نے ڈولی نامی بھیڑ کا کلون بنایا، بعد میں پولی نامی بھیڑ کو نیو کلیئر ٹرانسفر ٹیکنالوجی کا استعمال کرتے ہوئے کلون کیا گیا کیونکہ اس میں انسانی جین کی انکوڈنگ فیکٹر IX تھی، جو ہیمو فیلیا کی روک تھام میں ملوث ایک پروٹین تھا۔ Genentech، Amgen، Biogen، Cetus اور Genex جیسی کمپنیاں 1970 کی دہائی کے وسط سے آخر تک قائم ہوئیں۔ انہوں نے بنیادی طور پر طبی اور ماحولیاتی استعمال کے لیے جینیاتی طور پر انجینئر مادہ تیار کیا۔ 1998 میں، ڈولی کی کلوننگ کی اہمیت کا احساس ہوا۔ مالیکولر بائیولوجسٹ سٹیم سیلز کا مطالعہ کرنے میں دلچسپی لینے لگے۔ 1999 میں، اینٹی باڈی کا تجربہ استعمال کے ایک اور آلے کے طور پر پایا گیا۔ بائیو ٹیکنالوجی میں تاریخی واقعات کی ایک جھلک

جدول 1.0 میں فراہم کی گئی ہے۔

دور	وقت / سال	احوال
1800ء سے پہلے	6000 قبل مسیح	بیز تیار کرنے کے لیے خمیر کا استعمال کیا جاتا تھا۔
	4000 قبل مسیح	مصر میں روٹی تیار کرنے کے لیے خمیر کا استعمال کیا جاتا تھا۔
	BC420	یونانی فلسفی سقراط نے پایاکہ والدین اور ان کی اولاد کے درمیان ایک جیسی خصوصیات پائی جاتی ہیں۔
	320 قبل مسیح	یونانی فلسفی ارسطو نے یہ تصور پیش کیا کہ کردار باپ سے وراثت میں ملتے ہیں۔
	1630-1000	ولیم ہاروے نے جسم میں خون کی گردش دریافت کی۔
1660-1675		مارسلو مالپیگی نے مائیکرو اسکوپ کا استعمال کرتے ہوئے کیپیلریوں میں خون کی گردش کا پتہ لگا یا اور دریافت کیا کہ دماغ ریڑھ کی ہڈی سے ریشوں کے بندز کے ذریعے منسلک ہوتا ہے جو اعصابی نظام تشکیل دیتے ہیں۔
1673		انٹونی وان لیوون ہوک نے پروٹوجوا اور بیکٹیریا جیسے مائیکرو حیاتیات کی شناخت کی، اور مشورہ دیا کہ مائیکرو آرگنزم فرمیشن میں فعال کردار ادا کرتے ہیں۔
1701		جیا کو موپیلارینی نے پایاکہ چچک کا انتظام زندگی میں بعد میں اس کے وقوع کو روکتا ہے۔ اس عمل کو اوکی نیشن ماکانام دیا گیا۔
1800-1900	1809	کولس اپرٹ نے کھانے کو جراثیم سے پاک کرنے کے لئے گرمی کا استعمال کرتے ہوئے ایک تکنیک ایجاد کی۔
	1856	پاسچر کے جسٹس وان لیڈگ نے مشورہ دیا کہ جراثیم فرمیشن کے ذمہ دار ہیں۔
	1859	چارلس ڈارون نے قدرتی انتخاب کا اندازہ لگایا۔
	1863	پاسچر ازیلین کا طریقہ پاسچر نے دریافت کیا تھا۔ ہائینرک انٹن ڈی بیر نے دریافت کیا کہ پھپھوندی آلو کے پھٹنے کا ذمہ دار ہے۔
	1865	مینڈل نے اموروٹی قوانین تجویز کیے۔
	1868	جوہانس فریڈرک میشر نے نیوکلین (نیوکلک ایسڈ سے بنایا مرکب) کو پاس کے خلیوں سے الگ کیا۔
	1870	والٹھر فلمینگ نے مائٹوسس دریافت کیا۔
	1871	کوچ نے اینتھریکس کی تحقیقات کی اور مائیکرو آرگنزم کی شناخت، ثقافت اور داغ لگانے کی تکنیکوں کی تلاش کی۔
	1880	لوئس پاسچر نے مائیکرو آرگنزم کی کمزور (کمزور) اقسام کی تلاش کی جو ممکنہ طور پر مہلک ہو سکتی ہیں۔

1881	کوچ نے آلو کے ٹکڑوں، جیلان اور اگر میڈیم پریکٹیر یا کالونیوں کی کٹائی کی تکنیکوں کی وضاحت کی۔	
1884	گرام نے سیولر پیٹنٹ وگاٹنگ پر مشتمل بیٹریا کے لئے امتیازی دھبے کی تکنیک کی وضاحت کی جسے اب گرام اسٹیننگ کے نام سے جانا جاتا ہے۔	
1900-1953	مینڈل کے کام کو ڈی وریز، وان شرک اور کوریز نے دوبارہ زندہ کیا۔	
1902	سوٹن نے پایاکہ کرو موسومز (جوڑے ہوئے) میں کچھ عناصر ہوتے ہیں جو ایک نسل سے دوسری نسل میں منتقل ہوتے ہیں۔	
1905	ایڈمنڈ پیچر ولسن اور نیٹی اسٹیونز نے ثابت کیا کہ ایک واحد وائی کرو موسوم مردانہ پن کا تعین کرتا ہے جبکہ ایکس کرو موسوم کی دو کاپیاں خواتین کا تعین کرتی ہیں۔	
1905-1908	ولیم بیٹسن اور آر سی پیٹ نے دریافت کیا کہ متعدد جینز دوسرے جینز کے عمل کو تبدیل یا تبدیل کرتے ہیں۔ لیو جینیٹیس، یا بے ساختہ نسل کا نظریہ پیش کیا گیا تھا۔	
1952	جارج اوٹوگی نے انسانی سروائیکل کار سینوما سے ہیلے کے نام سے ایک سیل لائن بنائی۔	
1953-1976	وائسن اور کرک کا یہ مضمون ڈی این اے کی ڈبل ہیلکس ساخت کو سامنے لانے پر مبنی ہے جو جرجل نیچر میں شائع ہوا تھا۔	
1957	کرک اور گاموف نے 'مرکزی اصول' کا مطالعہ کیا، جس سے ظاہر ہوتا ہے کہ ڈی این اے پروٹین کی تعمیر کے لئے کس طرح کام کرتا ہے۔	
1958	آرتھر کورنبرگ نے پہلی بار ٹیسٹ ٹیوب میں ڈی این اے بنایا۔ کینیڈیائی پروٹین سیکوئنسر، مور۔ اسٹائن امینو ایسڈ تجزیہ کار، تیار کیا گیا تھا۔	
1959	فرانسوا جیکب اور جیکس اوسین موند نے جینیاتی ضابطے کے تصور کو دستاویزی شکل دی۔ انہوں نے 'ریپریر' اور 'اوپرون' کے تصور کی وضاحت کی۔	
1960	ایک فرانسیسی محقق نے میسنجر آر این اے (ایم آر این اے) دریافت کیا۔	
1961	فرانسوا جیکب اور جیکس موناڈ نے اوپرون کا تصور دیا۔	
1962	وائسن اور کرک کو مورس وکنز کے ساتھ فزیالوجی یا میڈیسن میں نوبل انعام سے نوازا گیا تھا۔	
1963	سیمونل کاٹز اور جان ایف اینڈرز نے خسرے کی پہلی ویکسین تیار کی۔	
1964	انزائم ریورس ٹرانسکریپٹس دریافت کیا گیا تھا۔	
1966	جینیاتی کوڈ کو کئی محققین نے دریافت کیا تھا۔ مارشل وارن نیرنبرگ، جے ہیملرک متھائی اور ایس اوچوانے بتایا کہ تین نیوکلیوٹائیڈ میسز (جسے کوڈز کہا جاتا ہے) کی جینیاتی ترتیب 20 امینو ایسڈز میں سے ہر ایک کا فیصلہ کرتی ہے۔	
1967	آرتھر کورنبرگ نے سنگل اسٹینڈڈ نیچرل وائرل ڈی این اے کا استعمال کرتے ہوئے ایک مطالعہ کی اطلاع دی۔	
1969	ایک انزائم کو وٹرو حالات میں تشکیل دیا جاتا ہے۔	
1970	وائرو لو جیسٹ پیٹر ایچ ڈوئسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکو جین کی نشاندہی کی۔ پابندی کے انزائم دریافت کیے گئے تھے۔	
1971-1967	مورس ہلمین نے ممپس کے لیے پہلی امریکی ویکسین بنائی۔ روبیلا کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔	

1972	ہائیو کیسٹ پال برگ نے ڈی این اے کو ٹکڑوں میں کاٹنے کے لیے ایک محدود انزائم کا استعمال کیا۔ انہوں نے ایک ہائبرڈ سرکلر مائیکریول بنانے کے لیے بیک وقت دو ڈی این اے اسٹریٹنڈز کو جوڑنے کے لیے لیگیز انزائم کا استعمال کیا۔
1973	بروس نیٹھن ایس نامی ایک حیاتیاتی کیمیاء دان نے ڈی این اے کو نقصان پہنچانے والے کیمیکلز کی شناخت کے لیے ایک تحقیق تیار کی ہے۔ بعد میں، ایس ٹیسٹ بڑے پیمانے پر کینسر پیدا کرنے والے مادوں کی شناخت کے لیے استعمال کیا جانے لگا۔
	اسٹینلے کوہن اور ہر برٹ بوئر نے پہلا کامیاب آر ڈی این اے تجربہ کرنے کے لیے بیکٹیریل جینز کا استعمال کیا۔ سرائیڈون میسر سدرن نے ڈی این اے کے لیے ایک بلٹنگ تکنیک تیار کی جسے سدرن بلوٹ کہا جاتا ہے۔
1974	چکن پاکس کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔ مخصوص ڈی این اے سیکونسز کی شناخت کے لیے کالونی ہائبرڈائزیشن اور سدرن بلٹنگ کی تلاش کی گئی۔ پہلی مونو کلونل اینٹی باڈیز تیار کی گئیں۔
1975	جے مائیکل ہشپ اور ہیرالڈ ورس نے جانوروں کے کروموسومز پر کینسر پیدا کرنے والے جینز کی موجودگی کو قائم کیا جسے آنکو جینز کہا جاتا ہے۔ این آئی ایچ نے آر ڈی این اے تحقیق کے لیے پہلی ہدایات شائع کیں۔
1976	جینیاتی انجینئرنگ کی آمد کے ساتھ، پہلی باریکٹیر یا میں انسانی پروٹین پیدا کرنا ممکن ہوا۔ آر آسٹریٹ اور ان کے ساتھیوں نے نمونیا کے لیے پہلی ویکسین تیار کی۔ ہر برٹ ڈیلو بوئر نے انسولین جین کو بیکٹیریا سے پیچھا کر کے متعارف کروا کر مصنوعی انسانی انسولین کی ترکیب کی۔ لوئس براؤن، پہلا ٹیسٹ ٹیوب بچہ، برطانیہ میں پیدا ہوا تھا۔ مینٹو کوکل میننجاٹس کے لیے پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔
1977	کرک اور گاموف نے 'مرکزی اصول' کا مطالعہ کیا، جس سے ظاہر ہوتا ہے کہ ڈی این اے پروٹین کی تعمیر کے لیے کس طرح کام کرتا ہے۔
1978	آرتھر کورنبرگ نے سنگل اسٹینڈڈ نیچرل وائرل ڈی این اے کا استعمال کرتے ہوئے ایک مطالعہ کی اطلاع دی۔
1979	ایک انزائم کو وٹرو حالات میں تشکیل دیا جاتا ہے۔
1980	وائرولوجسٹ پیٹر ایچ ڈوکسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکو جین کی نشاندہی کی۔ پابندی کے انزائم دریافت کیے گئے تھے۔
1981	مورس ہلمین نے ممپس کے لیے پہلی امریکی ویکسین بنائی۔ روبیلا کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔
1982	ہائیو کیسٹ پال برگ نے ڈی این اے کو ٹکڑوں میں کاٹنے کے لیے ایک محدود انزائم کا استعمال کیا۔ انہوں نے ایک ہائبرڈ سرکلر مائیکریول بنانے کے لیے بیک وقت دو ڈی این اے اسٹریٹنڈز کو جوڑنے کے لیے لیگیز انزائم کا استعمال کیا۔ اسٹینلے کوہن اور ہر برٹ بوئر نے پہلا کامیاب آر ڈی این اے تجربہ کرنے کے لیے بیکٹیریل جینز کا استعمال کیا۔
1983	بروس نیٹھن ایس نامی ایک حیاتیاتی کیمیاء دان نے ڈی این اے کو نقصان پہنچانے والے کیمیکلز کی شناخت کے لیے ایک تحقیق تیار کی ہے۔ بعد میں، ایس ٹیسٹ بڑے پیمانے پر کینسر پیدا کرنے والے مادوں کی شناخت کے لیے استعمال کیا جانے لگا۔
	سرایڈون میسر سدرن نے ڈی این اے کے لیے ایک بلٹنگ تکنیک تیار کی جسے سدرن بلوٹ کہا جاتا ہے۔
1984	چکن پاکس کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔ مخصوص ڈی این اے سیکونسز کی شناخت کے لیے کالونی ہائبرڈائزیشن اور سدرن بلٹنگ کی تلاش کی گئی۔ پہلی مونو کلونل اینٹی باڈیز تیار کی گئیں۔

1985	جے مائیکل ہشپ اور ہیرالڈ ورس نے جانوروں کے کروموسومز پر کینسر پیدا کرنے والے جینز کی موجودگی کو قائم کیا جسے آنکو جینز کہا جاتا ہے۔ این آئی ایچ نے آر ڈی این اے تحقیق کے لئے پہلی ہدایات شائع کیں۔
1986	چینیائی انجینئرنگ کی آمد کے ساتھ، پہلی بار بیٹھیریا میں انسانی پروٹین پیدا کرنا ممکن ہوا۔
1987	کرک اور گاموف نے 'مرکزی اصول' کا مطالعہ کیا، جس سے ظاہر ہوتا ہے کہ ڈی این اے پروٹین کی تعمیر کے لئے کس طرح کام کرتا ہے۔
1988	آرتھر کورنبرگ نے سنگل اسٹینڈنچرل وائرل ڈی این اے کا استعمال کرتے ہوئے ایک مطالعہ کی اطلاع دی۔
1989	ایک انزائم کو وٹرو حالات میں تشکیل دیا جاتا ہے۔
1990	وائرولوجسٹ پیٹر ایچ ڈوکسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکو جین کی نشاندہی کی۔ پابندی کے انزائم دریافت کیے گئے تھے۔
1991	مورس ہلمین نے ممپس کے لیے پہلی امریکی ویکسین بنائی۔ روبیلا کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔
1992	بائیو کیمسٹ پال برگ نے ڈی این اے کو ٹکڑوں میں کاٹنے کے لیے ایک محدود انزائم کا استعمال کیا۔ انہوں نے ایک ہائپر ڈسٹرکٹر مائیکریول بنانے کے لئے بیک وقت دو ڈی این اے اسٹریٹجز کو جوڑنے کے لئے لیگنڈ انزائم کا استعمال کیا۔ اسٹینڈ کوہن اور ہربرٹ بوئر نے پہلا کامیاب آر ڈی این اے تجربہ کرنے کے لئے بیٹھیریل جینز کا استعمال کیا۔
1993	بروس نیتھن ایس نامی ایک حیاتیاتی کیمیا دان نے ڈی این اے کو نقصان پہنچانے والے کیمیکلز کی شناخت کے لیے ایک تحقیق تیار کی ہے۔ بعد میں، ایس ٹیسٹ بڑے پیمانے پر کینسر پیدا کرنے والے مادوں کی شناخت کے لئے استعمال کیا جانے لگا۔
	سرایڈون میلر سدرن نے ڈی این اے کے لیے ایک بلٹنگ تکنیک تیار کی جسے سدرن بلوٹ کہا جاتا ہے۔
1994	چکن پاکس کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔ مخصوص ڈی این اے سیکونسز کی شناخت کے لئے کالونی ہائپر ڈائریژن اور سدرن بلٹنگ کی تلاش کی گئی۔ پہلی مونو کلونل اینٹی ہائیز تیار کی گئیں۔
1995	جے مائیکل ہشپ اور ہیرالڈ ورس نے جانوروں کے کروموسومز پر کینسر پیدا کرنے والے جینز کی موجودگی کو قائم کیا جسے آنکو جینز کہا جاتا ہے۔ این آئی ایچ نے آر ڈی این اے تحقیق کے لئے پہلی ہدایات شائع کیں۔
1996	چینیائی انجینئرنگ کی آمد کے ساتھ، پہلی بار بیٹھیریا میں انسانی پروٹین پیدا کرنا ممکن ہوا۔
1997	کرک اور گاموف نے 'مرکزی اصول' کا مطالعہ کیا، جس سے ظاہر ہوتا ہے کہ ڈی این اے پروٹین کی تعمیر کے لئے کس طرح کام کرتا ہے۔
1998	آرتھر کورنبرگ نے سنگل اسٹینڈنچرل وائرل ڈی این اے کا استعمال کرتے ہوئے ایک مطالعہ کی اطلاع دی۔
1999	ایک انزائم کو وٹرو حالات میں تشکیل دیا جاتا ہے۔
2000	وائرولوجسٹ پیٹر ایچ ڈوکسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکو جین کی نشاندہی کی۔ پابندی کے انزائم دریافت کیے گئے تھے۔
2001	مورس ہلمین نے ممپس کے لیے پہلی امریکی ویکسین بنائی۔ روبیلا کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔
2002	بائیو کیمسٹ پال برگ نے ڈی این اے کو ٹکڑوں میں کاٹنے کے لیے ایک محدود انزائم کا استعمال کیا۔ انہوں نے ایک ہائپر ڈسٹرکٹر مائیکریول بنانے کے لئے بیک وقت دو ڈی این اے اسٹریٹجز کو جوڑنے کے لئے لیگنڈ انزائم کا استعمال کیا۔ اسٹینڈ کوہن اور ہربرٹ بوئر نے پہلا کامیاب آر ڈی این اے تجربہ کرنے کے لئے بیٹھیریل جینز کا استعمال کیا۔

2003	بروس نیٹھن ایس نامی ایک حیاتیاتی کیمیا دان نے ڈی این اے کو نقصان پہنچانے والے کیمیکلز کی شناخت کے لیے ایک تحقیق تیار کی ہے۔ بعد میں، ایس ٹیسٹ بڑے پیمانے پر کینسر پیدا کرنے والے مادوں کی شناخت کے لئے استعمال کیا جانے لگا۔
2004	سرایڈون میلر سدرن نے ڈی این اے کے لیے ایک بلٹنگ تکنیک تیار کی جسے سدرن بلوٹ کہا جاتا ہے۔ چکن پاکس کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔ مخصوص ڈی این اے سیکونسز کی شناخت کے لئے کالونی ہائبرڈائزیشن اور سدرن بلٹنگ کی تلاش کی گئی۔ پہلی مونو کلونل اینٹی ہائیز تیار کی گئیں۔
2005	جے مائیکل ہشپ اور ہیرالڈ ورس نے جانوروں کے کروموسومز پر کینسر پیدا کرنے والے جینز کی موجودگی کو قائم کیا جسے آنکو جینز کہا جاتا ہے۔ این آئی ایچ نے آر ڈی این اے تحقیق کے لئے پہلی ہدایات شائع کیں۔
2006	جینیاتی انجینئرنگ کی آمد کے ساتھ، پہلی بار بیکٹیریا میں انسانی پروٹین پیدا کرنا ممکن ہوا۔
2007	کرک اور گاموف نے 'مرکزی اصول' کا مطالعہ کیا، جس سے ظاہر ہوتا ہے کہ ڈی این اے پروٹین کی تعمیر کے لئے کس طرح کام کرتا ہے۔
2008	آرتھر کورنبرگ نے سنگل اسٹینڈ ڈیٹچرل وائرل ڈی این اے کا استعمال کرتے ہوئے ایک مطالعہ کی اطلاع دی۔
2009	ایک انزائم کو وٹرو حالات میں تفصیل دیا جاتا ہے۔
2010	وائرولوجسٹ پیٹر ایچ ڈونبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکو جین کی نشاندہی کی۔ پابندی کے انزائم دریافت کیے گئے تھے۔
2011	مورس ہلمین نے ممپس کے لیے پہلی امریکی ویکسین بنائی۔ روبیلا کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔
2012	بائیو کیمسٹ پال برگ نے ڈی این اے کو ٹکڑوں میں کاٹنے کے لیے ایک محدود انزائم کا استعمال کیا۔ انہوں نے ایک ہائبرڈ سرکلر مالیکیول بنانے کے لئے بیک وقت دو ڈی این اے اسٹریٹجز کو جوڑنے کے لئے لیگیز انزائم کا استعمال کیا۔ اسٹینلے کوہن اور ہربرٹ بوئر نے پہلا کامیاب آر ڈی این اے تجربہ کرنے کے لئے بیکٹیریل جینز کا استعمال کیا۔
2013	بروس نیٹھن ایس نامی ایک حیاتیاتی کیمیا دان نے ڈی این اے کو نقصان پہنچانے والے کیمیکلز کی شناخت کے لیے ایک تحقیق تیار کی ہے۔ بعد میں، ایس ٹیسٹ بڑے پیمانے پر کینسر پیدا کرنے والے مادوں کی شناخت کے لئے استعمال کیا جانے لگا۔
2014	سرایڈون میلر سدرن نے ڈی این اے کے لیے ایک بلٹنگ تکنیک تیار کی جسے سدرن بلوٹ کہا جاتا ہے۔ چکن پاکس کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔ مخصوص ڈی این اے سیکونسز کی شناخت کے لئے کالونی ہائبرڈائزیشن اور سدرن بلٹنگ کی تلاش کی گئی۔ پہلی مونو کلونل اینٹی ہائیز تیار کی گئیں۔
2015	جے مائیکل ہشپ اور ہیرالڈ ورس نے جانوروں کے کروموسومز پر کینسر پیدا کرنے والے جینز کی موجودگی کو قائم کیا جسے آنکو جینز کہا جاتا ہے۔ این آئی ایچ نے آر ڈی این اے تحقیق کے لئے پہلی ہدایات شائع کیں۔
2016	جینیاتی انجینئرنگ کی آمد کے ساتھ، پہلی بار بیکٹیریا میں انسانی پروٹین پیدا کرنا ممکن ہوا۔
2017	کرک اور گاموف نے 'مرکزی اصول' کا مطالعہ کیا، جس سے ظاہر ہوتا ہے کہ ڈی این اے پروٹین کی تعمیر کے لئے کس طرح کام کرتا ہے۔
2018	آرتھر کورنبرگ نے سنگل اسٹینڈ ڈیٹچرل وائرل ڈی این اے کا استعمال کرتے ہوئے ایک مطالعہ کی اطلاع دی۔
2019	ایک انزائم کو وٹرو حالات میں تفصیل دیا جاتا ہے۔

2020	وائرولوجسٹ پیٹر ایچ ڈوکسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکو جین کی نشاندہی کی۔ پابندی کے انزام دریافت کیے گئے تھے۔
2021	مورس ہلمین نے ممپس کے لیے پہلی امریکی ویکسین بنائی۔ روبیلا کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔
2022	ہائیو کیسٹ پال برگ نے ڈی این اے کو ٹکڑوں میں کاٹنے کے لیے ایک محدود انزائم کا استعمال کیا۔ انہوں نے ایک ہائبرڈ سرکلر مائیکریول بنانے کے لئے بیک وقت دو ڈی این اے اسٹریٹجز کو جوڑنے کے لئے لیگیٹ انزائم کا استعمال کیا۔ اسٹینلے کوہن اور ہربرٹ بورن نے پہلا کامیاب آرڈی این اے تجربہ کرنے کے لئے بیٹھریل جینز کا استعمال کیا۔
2023	بروس نیتھن ایس نامی ایک حیاتیاتی کیمیاء دان نے ڈی این اے کو نقصان پہنچانے والے کیمیکلز کی شناخت کے لیے ایک تحقیق تیار کی ہے۔ بعد میں، ایس ٹیسٹ بڑے پیمانے پر کینسر پیدا کرنے والے مادوں کی شناخت کے لئے استعمال کیا جانے لگا۔
	سرایڈون میلر سدرن نے ڈی این اے کے لیے ایک بلٹنگ تکنیک تیار کی جسے سدرن بلوٹ کہا جاتا ہے۔
2024	چکن پاکس کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔ مخصوص ڈی این اے سیکونسز کی شناخت کے لئے کالونی ہائبرڈائزیشن اور سدرن بلٹنگ کی تلاش کی گئی۔ پہلی مونو کلونل اینٹی باڈیز تیار کی گئیں۔

اس طرح جدید بائیو ٹیکنالوجی نے فوڈ پروسیسنگ سے لے کر انسانی صحت اور ماحولیاتی تحفظ تک کے شعبوں میں انسانی فلاح و بہبود کی بے پناہ صلاحیت کے ساتھ ایک سائنس کے طور پر ترقی کی ہے۔ بائیو ٹیکنالوجی کو اب متعدد شعبوں میں استعمال کیا جا رہا ہے جن میں بائیو میڈیشن، توانائی کی پیداوار، زراعت اور فوڈ پروسیسنگ شامل ہیں۔ بائیو ٹیکنالوجی کی زراعت میں ایسے پودوں کی پیداوار کی وسیع گنجائش ہے جو کیڑوں، ماتی لباس اور پودوں کی بیماریوں کے خلاف مزاحم ہیں۔ دواؤں کی پیداوار (ہائیو فارماسیوٹیکلز) دلچسپی کے جین (GOIs) کے ساتھ ویکٹر کی کلوننگ کے ذریعے بائیو ٹیکنالوجی کے ذریعے ممکن بنائی گئی ہے۔ جدید بائیو ٹیکنالوجی کا اطلاق طب اور صحت کی دیکھ بھال میں علاج میں کیا جاتا ہے، بنیادی طور پر نئی ادویات کی دریافت، ترقی اور پیداوار کے لیے اور تشخیص میں، پروٹین اور نیوکلک ایسڈ پر مبنی ٹیسٹ کے لیے۔ ماحولیات کے شعبے میں، بائیو ٹیکنالوجی کو بنیادی طور پر فضلہ کے علاج اور آلودگی کو روکنے کے لیے استعمال کیا گیا ہے۔ اس طرح جدید بائیو ٹیکنالوجی انسانوں کی زندگیوں کو بہتر بنانے میں اہم کردار ادا کرتی ہے۔

1.3 بائیو ٹیکنالوجی کی اقسام (Types of Biotechnology)

حالیہ برسوں میں، بائیو ٹیکنالوجی کا دائرہ وسیع ہوا ہے۔ اسے جس فیلڈ میں استعمال کیا جاتا ہے اس کی بنیاد پر اسے مختلف اقسام میں درجہ بندی کیا گیا ہے۔

1. میڈیکل بائیو ٹیکنالوجی (Medical Biotechnology)

اس سے مراد انسانوں کی صحت کو بہتر بنانے کے لیے زندہ خلیوں اور دیگر مواد کے استعمال سے ہے۔ اس کا استعمال بیماریوں کا علاج تلاش کرنے یا بیماریوں کی روک تھام کے لیے، انسانی صحت کا مطالعہ کرنے، پیٹھو جینز اور انسانی خلیے کی حیاتیات کو سمجھنے کے لیے ایک تحقیقی ٹول کے طور پر کیا جاتا ہے۔ اس تکنیک کو دوا سازی کی دوائیوں کے ساتھ ساتھ بیماریوں سے لڑنے کے لیے دیگر کیمیکلز بنانے کے لیے استعمال کیا

جاتا ہے۔ فیلڈ کو نئی ادویات اور علاج کی تیاری کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ مثالیں۔ ویکسین، ایک اینٹی لیفو ماویکسین جینیاتی طور پر انجینئر تمباکو کے پودوں کا استعمال کرتے ہوئے تیار کی گئی ہے جو مہلک (فعال طور پر کینسر والے) بی سیلز سے آراین اے (ڈی این اے سے ملتا جلتا کیمیکل) کی نمائش کرتی ہے۔

2. زرعی بائیو ٹیکنالوجی (Agriculture Biotechnology)

بائیو ٹیکنالوجی کا استعمال جینیاتی طور پر تبدیل شدہ پودوں کی تیاری میں فصل کی پیداوار بڑھانے یا ایسی خصوصیات متعارف کرانے میں کیا گیا ہے جو حیاتیاتی، ایبوٹک تناؤ کے خلاف رواداری فراہم کرتے ہیں، اور کیڑوں اور پیتھوجین کے حملے کے خلاف مزاحمت فراہم کرتے ہیں۔

مثالیں۔ فصلوں کی نشوونما جو کیڑوں کے خلاف خصوصیات کا اظہار کرتی ہے۔ *Bacillus Thuringiensis* کے جین فصلوں میں منتقل ہو چکے ہیں۔ *Bacillus thuringiensis* کے ذریعہ تیار کردہ ایک پروٹین (Bt) یورپی مکئی کے بورر جیسے کیڑوں کے خلاف بہت موثر پایا جاتا ہے۔

3. صنعتی بائیو ٹیکنالوجی (Industrial Biotechnology)

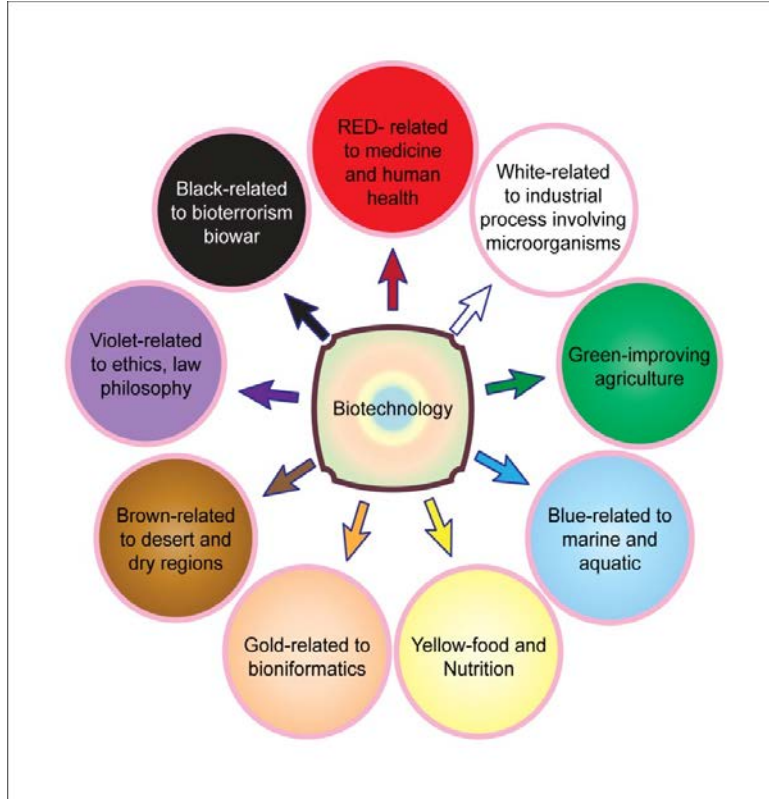
بائیو ٹیکنالوجی صنعتی شعبے میں بھی اپنی درخواستیں تلاش کرتی ہے۔ اس میں خوراک اور فیڈ، کیمیکلز، ڈرگز، کاغذ اور گودا، ٹیکسٹائل، بائیو فیول اور بائیو گیس جو صنعتی طور پر مفید ہیں۔ مثالیں۔ کیمیکلز کی ترکیب کے لیے صنعتی بائیو ٹیکنالوجی کے ذریعے Biocatalysts کو تیار کیا گیا ہے۔

4. ماحولیاتی بائیو ٹیکنالوجی (Industrial Biotechnology)

بائیو ٹیکنالوجی کو فضلہ کے علاج اور آلودگی کی روک تھام میں استعمال کیا جاتا ہے۔ یہ طریقے فضلے کو مؤثر طریقے سے صاف کرتے ہیں اور زمین پر مبنی ٹھکانے لگانے کے طریقوں پر ہمارے انحصار کو نمایاں طور پر کم کرتے ہیں۔ مثالیں۔ حیاتیاتی علاج میں، فضلہ کے اخراج/علاج کے لیے جانداروں کی صلاحیتوں کا فائدہ اٹھایا جاتا ہے۔ انزائم بائیوری ایکٹرز جو صنعتی اور کھانے کے فضلے کے اجزاء کو پہلے سے تیار کرتے ہیں اور سیوریج سسٹم کے ذریعے ان کو مؤثر طریقے سے ہٹانے کی اجازت دیتے ہیں تیار کیے گئے ہیں۔

حال ہی میں بائیو ٹیکنالوجی کی درجہ بندی کا ایک نیا نظام اپنایا گیا ہے۔ اس قسم کی درجہ بندی میں، بائیو ٹیکنالوجی کی مختلف شاخوں کو مختلف رنگ دیے گئے ہیں (ٹیبل 1.2، تصویر 1.1)۔

رگمین عہدہ	بیان
گولڈ بائیو ٹیکنالوجی یا بائیو انفارمیٹکس یا کمپیوٹیشنل بائیولوجی	حیاتیاتی اعداد و شمار کے تجزیہ کے لئے کمپیوٹیشنل ٹیکنیک کا استعمال۔
لال بائیو ٹیکنالوجی (بائیوفارما)	ادویات اور جانوروں کی مصنوعات سے متعلق ہے۔ اس میں جینیاتی ہیرا پھیری کا استعمال کرتے ہوئے بیماریوں کا علاج کرنے کے لئے نئی ادویات، ویکسین اور اینٹی بائیوٹکس، تجدیدی تھراپی، مالیکیولر تشخیص اور جینیاتی انجینئرنگ ٹیکنیک کی ترقی شامل ہے۔
وائٹ بائیو ٹیکنالوجی	توانائی کی بچت، کم آلودگی، اور کم وسائل خرچ کرنے والے عمل اور مصنوعات کی ڈیزائننگ شامل ہے۔
زرد بائیو ٹیکنالوجی	کھانے کی پیداوار میں بائیو ٹیکنالوجی کے استعمال سے متعلق ہے جیسے فرمٹیشن کے ذریعہ شراب، پنیر اور بیئر بنانا۔
گرے بائیو ٹیکنالوجی	بائیو ٹیکنالوجی کی ماحولیاتی ایپلی کیشنز شامل ہیں جیسے جراثیم اور پودوں کا استعمال کرتے ہوئے آلودگی یا آلودہ مواد کو ہٹانا۔
گرین بائیو ٹیکنالوجی	زراعت میں بائیو ٹیکنالوجی کا استعمال زرعی دلچسپی کے پودوں کی نئی اقسام تیار کرنے کے لئے، بائیو کیڑے مار ادویات، اور حیاتیاتی کھاد۔ اس شعبے میں جینیاتی ترمیم کے ذریعے ٹرانسجینک کی پیداوار شامل ہے۔
بلیو بائیو ٹیکنالوجی	مصنوعات بنانے اور مختلف شعبوں میں ان کی درخواست کے لئے سمندری وسائل کا استعمال۔
وائٹ بائیو ٹیکنالوجی	بائیو ٹیکنالوجی سے متعلق قانون، اخلاقی اور فلسفیانہ مسائل سے متعلق ہے
ڈارک بائیو ٹیکنالوجی	حیاتیاتی دہشت گردی، حیاتیاتی ہتھیاروں اور حیاتیاتی ہتھیاروں کا استعمال، اور زہریلے مادے انسانوں، گھریلو جانوروں اور فصلوں میں بیماریوں اور موت کا سبب بنتے ہیں۔



تصویر 1.1: رنگ کی بنیاد پر بائیو ٹیکنالوجی کی شاخوں کی درجہ بندی۔

1.4 بائیو ٹیکنالوجی میں مختلف تکنیکیں (Various Techniques in Biotechnology)

بائیو ٹیکنالوجی میں مختلف تکنیکوں کی پیروی کی گئی ہے۔ کچھ اہم میں شامل ہیں:

❖ جینیٹک انجینئرنگ ٹیکنالوجی

اس تکنیک میں غیر ملکی ڈی این اے ڈال کر کسی جاندار کے ڈی این اے میں ہیرا پھیری شامل ہے۔

❖ پروٹین انجینئرنگ ٹیکنالوجی

اس تکنیک میں موجودہ پروٹینوں میں بہتری یا مفید مصنوعات بنانے کے لیے نئے پروٹین بنانا شامل ہے۔

❖ انزائم انجینئرنگ

اس ٹیکنالوجی میں انزائم کی کارکردگی میں بہتری یا مینو ایسڈ کی ترتیب کو تبدیل کر کے انزائم کی سرگرمی کی تشکیل شامل ہے۔ جینیاتی

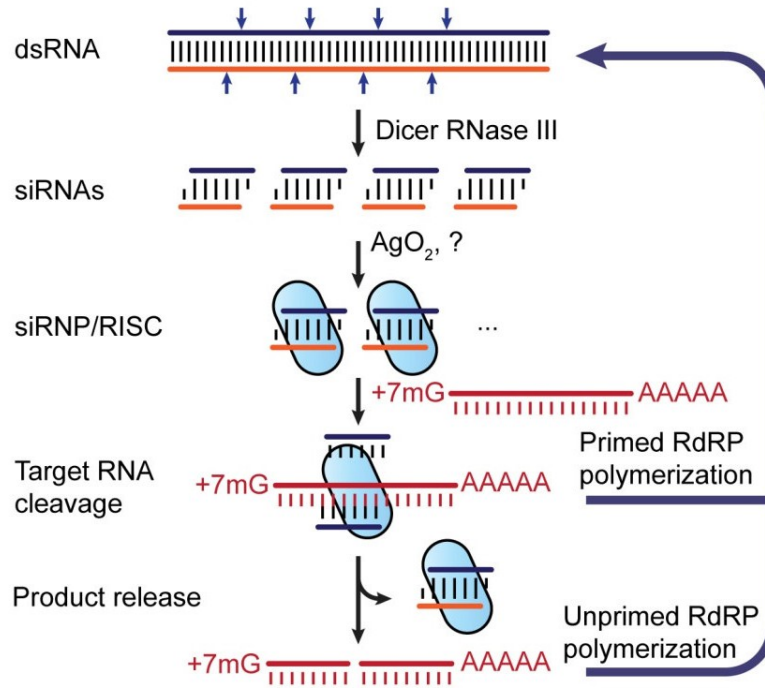
انجینئرنگ کی تکنیکوں کو بڑے پیمانے پر انزائم کی کارکردگی کو بہتر بنانے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

سیل اور ٹشو کلچر ٹیکنالوجی

اس تکنیک میں، خلیات / بافتوں کو لیبارٹری کے حالات میں اگایا جاتا ہے تاکہ کوئی جاندار یا نئی مصنوعات تیار کی جاسکیں۔

❖ اینٹی سینس یا RNAi ٹیکنالوجی

RNA مداخلت (RNAi)، ایک ایسا طریقہ کار ہے جس میں یو کریٹک جانداروں میں جین کے اظہار کو منظم کرنے میں چھوٹے RNAs (30 بیس سے کم لمبے) کا استعمال شامل ہے (تصویر 1.2)۔ RNAi پر مبنی میکا نزم نے بیماری کے علاج کے لیے جین کے فنکشن اور علاج معالجے کے مطالعے میں اس کے اطلاقات تلاش کیے ہیں۔



شکل 1.2: RNAi تکنیک کا ایک جائزہ

❖ بائیو انفارمیٹکس ٹیکنالوجی (Bioinformatics Technology)

حیاتیاتی ڈیٹا کا کمپیوٹیشنل تجزیہ، مثال کے طور پر، ترتیب کا تجزیہ میکرو و مالیکولر ڈھانچے، اعلیٰ تھرو پٹ پروفائلنگ ڈیٹا کا تجزیہ۔

❖ پروٹین کی علیحدگی اور شناخت کی تکنیک (Protein separation and identification techniques)

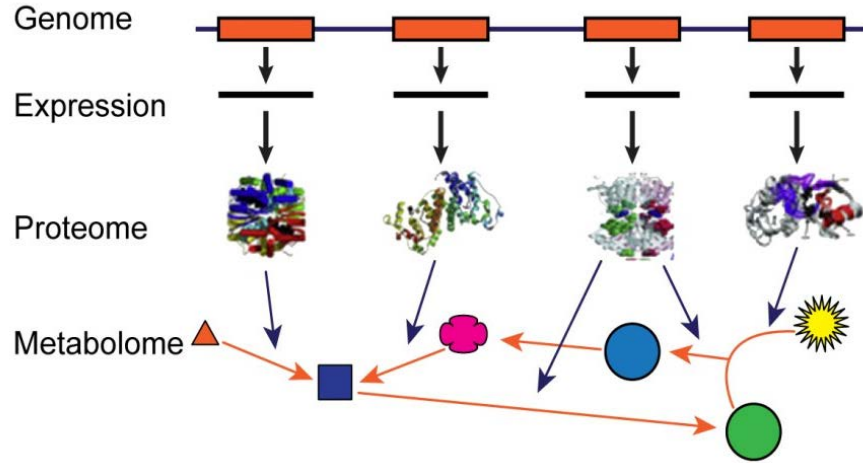
الیکٹروفورسس، مائیکرو رے اور بلوٹنگ تکنیک جیسی تکنیکیں جو مطلوبہ ڈی این اے کی علیحدگی اور شناخت میں مددگار

ہیں۔

❖ جینومکس (Genomics)

جینوم کے نقطہ نظر کو جین اور ان کی مصنوعات کے حیاتیاتی فعل کا تعین کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ ٹرانسکرپٹومکس (مائیکرو

رے ایکسپریشن کی پروفائلنگ)، پروٹومکس (پروٹین کے ڈھانچے/ترمیم/تعاملات)، میٹابولومکس (مثلاً میٹابولائٹ پروفائلنگ، کیمیکل فنکٹر پرنٹنگ، فلوکس تجزیہ) اس کے کچھ تنوع ہیں (شکل 1.3)۔



شکل 1.3: جینوم نقطہ نظر جینز اور ان کی مصنوعات کے حیاتیاتی افعال کا تعین کرنے کے لئے استعمال کیا جاتا ہے۔

1.5 بائیو ٹیکنالوجی کی ایپلی کیشنز (Applications of Biotechnology)

بائیو ٹیکنالوجی کو مختلف شعبوں میں کامیابی کے ساتھ لاگو کیا گیا ہے جیسے کہ ماحولیات، طب، زراعت، صنعتیں اور بہت کچھ۔

1- ماحولیات (Envrionment)

حیاتیاتی تکنیکوں کو ماحولیاتی مسائل کی تشخیص، ان کی نگرانی اور تخفیف میں استعمال کیا گیا ہے۔ اس ٹیکنالوجی کا استعمال فضلہ کے انتظام، بائیومیڈی ایشن (ماحولیاتی آلودگیوں کے علاج کے لیے جانداروں کا استعمال)، فائٹوری میڈمیشن (ماحول سے آلودگی کو دور کرنے کے لیے پودوں کا استعمال) کے شعبوں میں کیا گیا ہے۔ ان قابل تجدید وسائل کے علاوہ بائیو ٹیکنالوجی کا استعمال کرتے ہوئے بائیو ڈیگریڈیبل مصنوعات اور متبادل توانائی کے ذرائع بھی تیار کیے گئے ہیں۔ بائیو ٹیکنالوجی کا استعمال ان جرثوموں کو انجینئر کرنے کے لیے کیا جاتا ہے جو ماحول کے مختلف شعبوں سے آلودگیوں کی ایک وسیع رینج کو ہٹا کر ماحولیاتی صفائی کی بے پناہ صلاحیت کو ظاہر کرتے ہیں۔

2- دوا (Medicine)

بائیو ٹیکنالوجی کو تشخیص، علاج، ویکسین، انسانی جینوم ریسرچ میں استعمال کیا گیا ہے۔ انسولین اور ویکسین جیسے پیپٹائڈس بی کی ترقی دوائی میں بائیو ٹیکنالوجی کے اہم استعمال میں سے کچھ ہیں۔

Recombinant DNA ٹیکنالوجی نے مؤثر علاج کی بڑے پیمانے پر پیداوار کو قابل بنا کر صحت کی دیکھ بھال کے شعبے میں بہت زیادہ اثر ڈالا ہے۔ ٹرانسجینک جانوروں کو یہ سمجھنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے کہ جین کس طرح انسانی بیماریوں جیسے کینسر، سسٹک فائبروسس، ریمیٹائڈ گھٹیا اور الزائمر کی نشوونما میں کردار ادا کرتے ہیں۔ جین تھراپی نے موروٹی بیماریوں کا علاج فرد کے خلیوں اور بافتوں میں جین کے داخلے کے ذریعے ممکن بنایا تھا۔

کوویڈ 19 وبائی امراض کے خاتمے میں بائیو ٹیکنالوجی کا کردار (Role of biotechnology in abatement of Covid 19 pandemic)

بائیو ٹیکنالوجی COVID-19 کے خلاف جنگ میں ایک رہنما کے طور پر ابھری ہے۔ بائیو ٹیکنالوجیکل ٹولز کا استعمال کرتے ہوئے کورونا وائرس کے انفیکشن کے علاج کے لیے ویکسین تیار کی گئی ہے۔ Moderna اور Pfizer-BioNTech نے COVID-19 کے خلاف اعلیٰ افادیت والی mRNA ویکسین تیار کیں۔ BioNTech/Pfizer کی طرف سے تیار کردہ mRNA ویکسین COVID-19 کے انفیکشن کو روکنے میں 90% موثر ثابت ہوئی۔ دوسری ویکسین بھی دیگر ٹیکنالوجیز کی بنیاد پر تیار کی گئی ہیں جیسے کہ ایک انٹرفیس آر این اے جو وائرس کو نیبولائزرز کی شکل میں روکتا ہے، ریکومیننٹ ACE2 پروٹین جو وائرس کو انسانی خلیات سے منسلک نہ ہونے کے لیے چال چلاتا ہے، اور وائرس پر حملہ کرنے والے اینٹی باڈیز۔

وائرسل ویکسین AZD1222 اور Sputnik V AstraZeneca نے تیار کی ہیں۔ mRNA ویکسین mRNA-1273 اور Moderna، BNT162b2 (کیمبرج، MA، USA) اور Pfizer (نیویارک، USA) نے تیار کی ہیں

3۔ زراعت (Agriculture)

بائیو ٹیکنالوجیکل تکنیک بہتر غذائیت کے مواد، اعلیٰ پیداوار، اور مختلف ایبوٹک اور حیاتیاتی دباؤ کے خلاف مزاحمت کے ساتھ فصلوں کی نشوونما کے لیے بہت مفید ثابت ہوئی ہے۔ جینیاتی انجینئرنگ کا استعمال کرتے ہوئے خوراک، باغبانی کی فصلوں اور درختوں کی انواع کو کامیابی کے ساتھ تبدیل کیا گیا ہے۔ مثلاً پیٹروکیمیکلز، ایندھن کے لیے فیٹی ایسڈ تیار کرنے کے لیے تیل کے بیجوں میں ترمیم کی جاسکتی ہے۔ پودوں سے ویکسین تیار کرنے کی کوشش کی گئی ہے۔ وہ فصلیں جو کیڑوں/کیڑوں کی ایک وسیع رینج کے خلاف برداشت کا مظاہرہ کرتی ہیں تیار کی گئی ہیں۔

4۔ صنعتیں (Industries)

بائیو ٹیکنالوجی کا اطلاق سیلولر ڈھانچے کی تیاری یا متعدد استعمال کے لیے حیاتیاتی عناصر کی تیاری کے لیے کیا گیا ہے جیسے کہ تعمیراتی صنعت میں نئے مواد کی ترقی، اور بیئر اور وائن، واشنگ ڈٹرجنٹ، اور ذاتی نگہداشت کی مصنوعات کی تیاری۔ بائیو ٹیکنالوجی کا استعمال ٹیکسٹائل انڈسٹری میں کپڑوں اور ملبوسات کی تکمیل کے لیے کیا جاتا ہے۔ یہ دیگر خصوصیات کے ساتھ گرم، مضبوط، جھریوں اور سکڑنے سے مزاحم کپڑوں کی پیداوار میں مدد کرتا ہے جیسے کہ رنگنے کو بہتر بنانے اور برقرار رکھنے، جاذبیت میں اضافہ۔ فوڈ پروسیسنگ انڈسٹری میں بائیو ٹیکنالوجی کو کامیابی کے ساتھ لاگو کیا گیا ہے۔

5۔ حیاتیاتی ایندھن (Biofuel)

توانائی کی پیداوار کے شعبے میں بائیو ٹیکنالوجی کا استعمال کیا گیا ہے۔ جزیئر چلانے کے لیے بائیو میڈیشن فضلہ کو بائیو فیول میں تبدیل کیا جاسکتا ہے۔ گندھک کی شراب کو خراب کرنے والے بیکٹیریا، جو کہ کاغذ بنانے والی صنعت کی فضلہ پیداوار ہے، میتھین کی پیداوار میں مدد کر سکتے ہیں۔

6۔ ارتقائی مطالعات (Evolutionary Studies)

ماحولیاتی خصائص اور ارتقائی تنوع سے وابستہ جینز کو بائیو ٹیکنالوجیکل ٹولز کا استعمال کرتے ہوئے آسانی سے ٹریس کیا جاسکتا ہے۔

دیگر استعمالات

جرثوموں کو پودوں اور سبزیوں کے مواد کو بائیو ڈی گریڈ ایبل پلاسٹک کے بلڈنگ بلاکس میں تبدیل کرنے کے لیے درکار خامرے پیدا کرنے کے لیے آمادہ کیا جاسکتا ہے۔

علاقہ	درخواستوں
پلانٹ بائیو ٹیکنالوجی	ٹرانسجینک پودے، ثانوی میٹابولائٹ کی پیداوار، جراثیم سے پاک پودوں کی پیداوار یا فصل کی بہتری، جڑی بوٹیوں کے خلاف مزاحمت کرنے والی فصلوں کی پیداوار، کیڑوں کے خلاف مزاحمت کرنے والے ('بی ٹی' تصور) کیڑوں کے خلاف مزاحمت کرنے والے ٹرانسجینک پودے، خشک سالی کی مزاحمت،
جانور بائیو ٹیکنالوجی	فلکسنگ کی صلاحیت، تیزابیت اور نمکیات کی برداشت، ان وٹرو جراثیم کے تحفظ، جینیاتی تغیر، ان وٹرو پولی گیشن، میپلوڈی کی شمولیت، سویٹک ہائبرڈائزیشن، جینیاتی تبدیلی، مالیکیولر فارمنگ، سویٹک ایسیرپو جینیسیس، آرگنوجینیسیس، فاسٹوریمیڈی ایشن، ان وٹرو پودوں کے جراثیم کے تحفظ، متغیر انتخاب، سوماکلو نیل تغیر، پودوں کے جینوم تجزیہ، ہائبرڈیج، مصنوعی بیج۔
جانور بائیو ٹیکنالوجی	بائیو فارماسیوٹیکل: ہارمونز کی پیداوار، نشوونما کے عوامل، انٹرفیرن، انزائمز، ریکمینیٹ پروٹین، ویکسینز، خون کے اجزاء، آلیگونیو کلیوٹائڈز، ٹرانسکریپشن فیکٹر پر مبنی ادویات، اولیگونیو کلیوٹائڈز۔
انسانی بائیو ٹیکنالوجی	اینٹی بائیو ٹکس، تشخیص: اینٹی ہاڈیز، بائیوسنسز، پی سی آر، تھراپیوٹکس، ویکسینز، میڈیکل ریسرچ ٹولز، انسانی جینوم ریسرچ، بائیوسنسز کی ترقی
انسانی بائیو ٹیکنالوجی	جین تھراپی، اسٹیم سیل تھراپی، جانوروں کے ٹشو کلچر: سیل، ٹشو اور اعضاء کی ثقافت، جین کلوننگ: آر ڈی این اے ٹیکنالوجی، جینیاتی انجینئرنگ، ٹرانسجینک جانوروں، اینٹی بائیو ٹکس، ڈی این اے مارکرز، جانوروں کی افزائش، زینوٹرانسپلائنیشن، میڈیکل بائیو ٹیکنالوجی،
انسانی بائیو ٹیکنالوجی	بائیو فارماسیوٹیکل (بائیو ٹیکنالوجی کے ذریعے تیار کردہ دوا یا ویکسین)، تھیراپیوٹکس، یعنی صحت کو برقرار رکھنے یا بیماری کی روک تھام کے لئے استعمال ہونے والی مصنوعات، بائیو فارمنگ، یعنی مہذب حیاتیات میں دواسازی کی پیداوار،
بائیو پولیمر، ڈیزائنر ادویات	
زریعی بائیو ٹیکنالوجی	فصل بائیو ٹیکنالوجی، باغبانی بائیو ٹیکنالوجی، ٹری بائیو ٹیکنالوجی، فوڈ پروسیسنگ، پلانٹ بائیو ٹیکنالوجی (فوٹو سینتھیسس کو بہتر بنانے والے، بائیو فریٹلائزرز، تناؤ کے خلاف مزاحمت کرنے والی فصلیں اور پودے، بائیو کیڑے مار ادویات اور بائیو کیڑے مار ادویات)
خوراک: دودھ کی پیداوار میں اضافہ	
فارماسیوٹیکل: انسولین اور ویکسین سمیت ادویات کے لئے انسانی پروٹین تیار کرنے کے لئے تیار کردہ	

ماحولیاتی بائیو ٹیکنالوجی	ماحولیاتی نگرانی، فضلے کا انتظام، آلودگی کی روک تھام۔
اینڈھن اور چارہ	قابل تجدید ایندھن، خراب جنگلات کی تیزی سے شجرکاری اور سبزہ زار کی بحالی کے لئے نشوونما کلچر ٹکنیک
صنعتی بائیو ٹیکنالوجی	بیٹا بولائٹ کی پیداوار (الہیڈیٹون، بوٹانول، الکحل، اینٹی بائیو ٹکس، انزائمز، وٹامنز، نامیاتی ایسڈز)، اینوروبک ہاضمہ (ہتھین کی پیداوار کے لیے)، فضلے کا علاج (نامیاتی اور صنعتی دونوں)، بائیو کنٹرول ایجنٹس کی پیداوار، خوراک کی مصنوعات کی فرمینیٹیشن، بائیو میڈ ایندھن اور توانائی، دھاتوں اور معدنیات کی بازیابی، بائیو ہتھنول، گودا اور کاغذ، خوراک، ٹیکسٹائل اور چمڑے، فارماسیوٹیکل، پیداوار کے لئے ایک انزائمٹک عمل اینٹی بائیو ٹکس۔
آبی بائیو ٹیکنالوجی	آبی زراعت، سمندری ماحولیاتی نظام کی بحالی اور حفاظت، سمندری غذا کے معیار کو بہتر بنانا، ماحولیاتی اصلاح، انسانی صحت کے لئے سمندری ہائی پروڈکٹس، بائیو میٹرل اور بائیوپروسیسنگ، سمندری مالکیو لربائیو ٹیکنالوجی۔

1.6 سیل اور نشوونما کلچر (Cell Culture)

سیل اور نشوونما کلچر کے دلکش دائرے میں خوش آمدید، جہاں خوردبینی ہستیاں زندگی کے اسرار کو کھولنے اور بائیو ٹیکنالوجی میں جدت لانے کی کلید رکھتی ہیں۔ اس باب میں، ہم سیل اور نشوونما کلچر میں استعمال ہونے والے خلیات کے متنوع ذرائع میں ایک روشن سفر کا آغاز کرتے ہیں، ہر ایک سیلولر رویے اور مختلف شعبوں میں اس کے استعمال کو سمجھنے میں اپنا حصہ ڈالتا ہے۔

لافانی سیل لائنز: بائیو میڈیکل ریسرچ کے علمبردار

ایک ایسے خلیے کا تصور کریں جو عمر بڑھنے اور پھیلنے کی فطری رکاوٹوں کو روکتا ہے، خود کو مستقل طور پر تقسیم کرتا ہے اور اس کی نقل کرتا ہے۔ یہ وہ لافانی سیل لائنیں ہیں جنہوں نے بائیو میڈیکل ریسرچ میں انقلاب برپا کر دیا ہے۔ ان میں سب سے مشہور HeLa سیل لائن ہے، جو 1951 میں Henrietta Lacks کے سروائیکل کینسر سیلز سے حاصل کی گئی تھی۔ یہ قابل ذکر خلیات متعدد سائنسی دریافتوں میں اہم کردار ادا کرتے رہے ہیں، جن میں جو ناس سالک کی پولیو ویکسین کی تیاری بھی شامل ہے۔ آج، HeLa خلیات کینسر کی حیاتیات، متعدی امراض، اور منشیات کی اسکریننگ کے مطالعہ کے لیے انمول ٹولز کے طور پر کام جاری رکھے ہوئے ہیں۔

ایک اور قابل ذکر لافانی سیل لائن HEK 293 ہے، جو انسانی برائن گردے کے ٹشو سے نکلتی ہے۔ ان خلیات کو ریکومبیننٹ پروٹین، جین تھراپی کے لیے وائرل ویکٹر، اور سیل سگنلنگ کے راستوں کو سمجھنے کے لیے پلیٹ فارم کے طور پر بڑے پیمانے پر استعمال کیا گیا ہے۔ لافانی سیل لائنوں کے استعمال کے ذریعے، محققین نے سیلولر فرزیالوجی اور پیتھالوجی کی پیچیدگیوں کا پردہ فاش کیا ہے، جس سے جدید علاج اور طبی پیش رفت کی راہ ہموار ہوئی ہے۔

1.6.1 پرائمری سیل کلچرز: ٹشو فزیالوجی کے جوہر پر قبضہ کرنا (Primary Cell Cultures: Capturing the Essence of Tissue Physiology)

جب کہ لافانی سیل لائنیں توسیع پذیری اور سہولت پیش کرتی ہیں، وہ عام خلیات سے جینیاتی تبدیلیوں اور فینوٹائپک انحراف کو ظاہر کر سکتی ہیں۔ اس کے برعکس، پرائمری سیل کلچر ایک زیادہ جسمانی لحاظ سے متعلقہ ماڈل فراہم کرتے ہیں، جو بافتوں کی خصوصیات کو وفاداری سے محفوظ رکھتے ہیں جس سے وہ اخذ کیے گئے ہیں۔ چوہادماغ کے بافتوں سے پرائمری نیورونز پر غور کریں، جو vivo میں پائے جانے والے پیچیدہ نیورونل نیٹ ورکس اور Synaptic کنکشنز کی نمائش کرتے ہیں۔ یہ ثقافتیں نیورو ڈیولپمنٹل عمل، Synaptic پلاسٹکٹی، اور الزائمر اور پارکنسنز جیسی نیورو ڈیجینریٹو بیماریوں کے بارے میں قابل قدر بصیرت پیش کرتی ہیں۔

اسی طرح، جگر سے الگ تھلگ پرائمری میپاٹوسائٹس اپنے میٹابولک افعال کو برقرار رکھتے ہیں، جو انہیں مٹھات کے میٹابولزم کے مطالعے، میپاٹوٹوکسیک اسکریننگ، اور جگر کی بیماری کی تحقیق کے لیے ناگزیر بناتے ہیں۔ ثقافت میں اپنی محدود عمر کے باوجود، بنیادی سیل کلچر بے مثال جسمانی مطابقت پیش کرتے ہیں، جو بافتوں کے کام اور بیماری کے طریقہ کار کو سمجھنے کے لیے انمول اوزار کے طور پر کام کرتے ہیں۔

1.6.2 اسٹیم سیلز (Stem Cells)

دوبارہ پیدا کرنے والی دوائیوں میں سب سے آگے اسٹیم سیلز ہوتے ہیں، جو خود تجدید کرنے اور مخصوص خلیوں کی اقسام میں فرق کرنے کی قابل ذکر صلاحیت سے مالا مال ہوتے ہیں۔ ایمریونک اسٹیم سیل (ESCs)، جو ابتدائی مرحلے کے ایمریو سے اخذ کیے گئے ہیں، انخطاطی بیماریوں اور چوٹوں کے علاج کے لیے متبادل ٹشوز اور اعضاء پیدا کرنے کی بے پناہ صلاحیت رکھتے ہیں۔ مثال کے طور پر، محققین نے کامیابی کے ساتھ ESC کو انسولین پیدا کرنے والے لبلبے کے پیٹا خلیات میں فرق کیا ہے، جو ٹائپ 1 ذیابیطس کے علاج کی امید پیش کرتے ہیں۔ ESCs کے علاوہ، حوصلہ افزائی شدہ pluripotent اسٹیم سیلز (iPSCs) دوبارہ تخلیقی تھراپی کے لیے ایک ذاتی نقطہ نظر فراہم کرتے ہیں۔ بالغ سویٹک خلیوں کو برانن جیسی حالت میں دوبارہ پروگرام کر کے، iPSCs ٹشو انجینئرنگ اور بیماری کی ماڈلنگ کے لیے ایک غیر متنازعہ اور مریض کے لیے مخصوص سیل ذریعہ پیش کرتے ہیں۔ جینیاتی عوارض کے مریضوں سے آئی پی ایس سی کی نسل کے ذریعے، محققین بیماری کے طریقہ کار، اسکرین ممکنہ علاج، اور انفرادی مریضوں کے لیے تیار کردہ ذاتی علاج تیار کر سکتے ہیں۔

1.6.3 سیل اور ٹشو کلچر میں ایپلی کیشنز اور چیلنجز (Applications and Challenges in Cell and Tissue Culture)

سیل اور ٹشو کلچر کی تکنیکوں کی ایپلی کیشنز وسیع اور متنوع ہیں، جس میں فارماسیوٹیکل، رینجریٹو میڈیسن، ٹشو انجینئرنگ، اور بنیادی تحقیق شامل ہیں۔ مٹھات کی دریافت اور نشوونما میں، لافانی سیل لائنوں اور بنیادی سیل ثقافتوں کا استعمال کرتے ہوئے سیل پر مبنی اسیس ممکنہ علاج کی جانچ، مٹھات کے عمل کے طریقہ کار کو واضح کرنے، اور مٹھات کی افادیت اور زہریلے پن کی پیش گوئی کرنے میں اہم کردار ادا کرتے ہیں۔

دوبارہ پیدا کرنے والی دوائیوں اور ٹشو انجینئرنگ میں، اسٹیم سیل پر مبنی علاج خراب ٹشوز اور اعضاء کی مرمت اور دوبارہ تخلیق کا وعدہ کرتے ہیں۔ تاہم، چیلنجز جیسے کہ مدافعتی رد عمل، ٹیومر جنیکٹی، اور اسکیل لیسلٹی پر قابو پانے میں اہم رکاوٹیں ہیں۔ مزید برآں، برائن اسٹیم سیلز کے استعمال سے متعلق اخلاقی تحفظات اور خلیات کے جینیاتی ہیرا پھیری سے وابستہ حفاظتی خدشات پر محتاط غور و فکر اور ضابطے کی ضرورت ہوتی ہے۔

جیسا کہ ہم سیلو لر رویے اور ہیرا پھیری کی پیچیدگیوں سے پردہ اٹھاتے رہتے ہیں، سیل اور ٹشو کلچر کا مستقبل بائیو ٹیکنالوجیکل ایجادات کو آگے بڑھانے اور سماجی چیلنجوں سے نمٹنے کے لیے بہت بڑا وعدہ رکھتا ہے۔ ابھرتی ہوئی ٹیکنالوجیز جیسے آرگنائڈز، مائیکرو فلائیڈز کس،

1.6.4 جانوروں کی ٹشو کلچر (Animal Tissue Culture)

یہ ایک کثیر الضابطہ فیلڈ ہے جس کا مقصد موجودہ طبی مسائل پر قابو پانے کے لیے حیاتیاتی اور انجینئرنگ کی حکمت عملیوں کو استعمال کرتے ہوئے بافتوں یا اعضاء کے افعال کو بحال کرنے کے لیے متبادل علاج کی حکمت عملی تیار کرنا ہے۔ جین تھراپی کی طرح، ٹشو انجینئرنگ کا شعبہ بھی 1980 کی دہائی میں سامنے آیا۔ 90 کی دہائی کے اوائل میں، لینگر اور ویکینٹی نے ٹشو انجینئرنگ کی تعریف "ایک بین الضابطہ فیلڈ کے طور پر کی جو انجینئرنگ اور لائف سائنسز کے اصولوں کو حیاتیاتی متبادلات کی نشو و نما پر لاگو کرتا ہے جو ٹشو کے افعال یا پورے عضو کو بحال، برقرار رکھنے یا بہتر بناتے ہیں"۔

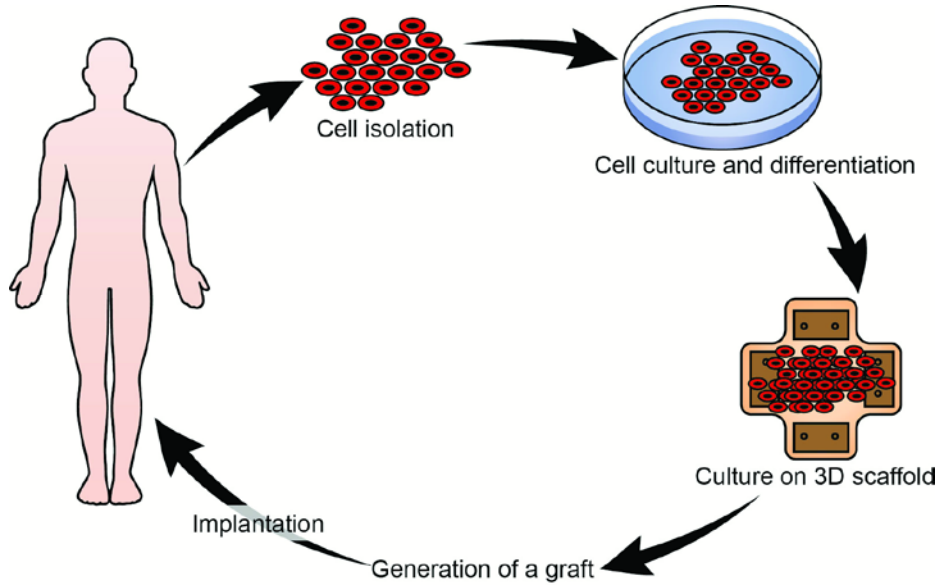
1970 کی دہائی کے اوائل میں، بچوں کے ہسپتال کے ایک پیڈیاٹرک آرٹھروپیڈک سرجن، ڈیلیوٹی گرین نے ہڈیوں کے اسپیکولز پر سیڈ کونڈروسائٹس کا استعمال کر کے اور اسے عریاں چوہوں میں ٹرانسپلانٹ کر کے نئی کارٹیلج پیدا کرنے کی کوشش کی۔ اگرچہ اس کا تجربہ ناکام رہا، لیکن اس نے یہ نتیجہ اخذ کیا کہ نئی ٹیکنالوجی اور بائیو کمپٹیبیل مواد کی اختراع کے ساتھ، یہ ممکن ہو گا کہ لائیو سیلز کو مناسب طریقے سے تشکیل شدہ سہاروں پر بیج کر کے بافتوں کو پیدا کیا جاسکے۔ بعد میں، ڈاکٹر برک اور یاناس نے جلد کے ٹشو انجینئرڈ جلد کے متبادل کو کولیجن میٹرکس کا استعمال کرتے ہوئے ڈرمل فابریکس کی نشو و نما میں مدد فراہم کی۔ اس کے بعد کئی تجربات کیے گئے۔ ڈاکٹر ہاورڈ گرین نے جلنے والے مریضوں پر کیراتینو سائٹس کی چادر لگائی، جبکہ ڈاکٹر یو جین بیل نے کولیجن جیلوں پر فابریکس (ایک قسم کے خلیات جو ڈرمس بناتے ہیں) کو سیڈ کیا اور نوٹ کیا کہ فابریکس کو لیجن جیلوں کے سکڑنے سے ٹشو نما ڈھانچے بناتے ہیں۔ ان تمام تجربات کے تجرباتی نتائج نے ٹشو انجینئرنگ کے نظم و ضبط کے بارے میں خیال دیا۔

ٹشو انجینئرنگ کی تکنیک 1980 کی دہائی کے وسط میں اس وقت سامنے آئی جب چلڈرن ہسپتال کے ڈاکٹر جوزف ویکینٹی نے MIT کے ڈاکٹر رابرٹ لینگر سے اس خیال کے ساتھ رابطہ کیا کہ پیوند کاری کے لیے بچوں کے اعضاء کی کمی کو دور کرنے کے لیے سیل کی ترسیل کے لیے مناسب سہاروں کو تیار کیا جائے۔

1.6.5 ٹشو انجینئرنگ تک رسائی (Tissue Engineering Approaches)

ٹشو انجینئرنگ میں بنیادی طور پر سیلو لر اور سیلو لر نقطہ نظر شامل ہیں۔ سیلو لر نقطہ نظر میں، قدرتی یا مصنوعی میٹرکس (سکافولڈز کے

طور پر کہا جاتا ہے: ایک سیل سپورٹ ڈیوائس جس پر خلیات کو بیچ دیا جاتا ہے (خلیوں یا جسم کے بافتوں کو فراہم کیا جاتا ہے جو جسم کی اپنی مرمت کرنے کی قدرتی صلاحیت کو بڑھاتا ہے اور اس میں مدد کرتا ہے۔ نئی ٹشو کی ترقی کی سمت کا تعین۔ سکینولڈز کو لیجن سے بھرپور ہو سکتے ہیں، جنہیں آہستہ آہستہ انحطاط کیا جاسکتا ہے اور ان کی جگہ بڑھتے ہوئے خلیوں کے ساتھ سرمایہ کاری کردہ ایک میزبان ایکسٹریکٹڈ سیلولر میٹرکس لے سکتا ہے۔ سہاروں کو یا تو آٹو لوجس (ایک ہی فرد سے حاصل کردہ خلیات یا ٹشوز)، ایلو جینک (کسی دوسرے شخص کے خلیات) یا زینو جینک ٹشوز (کسی اور نوع کے خلیات) سے بھی کاٹا جاسکتا ہے جس کے بعد سیلو لراجزاء کو ہٹانے کے لیے کیمیائی یا کینیکل عمل سے پروسیسنگ کی جاسکتی ہے۔ امپلانٹیشن کے لیے۔



1.7 ٹشو انجینئرنگ تکنیک کا جائزہ (Overview of Tissue Engineering Technique)

ٹشو انجینئرنگ امپلانٹیشن کے لیے فنکشنل ٹشوز کو دوبارہ تخلیق کرنے کے لیے مختلف طریقوں پر مشتمل ہے۔ ایک نمایاں طریقہ میں سیلو لراپروچ شامل ہے، جہاں عطیہ دہندگان کے خلیوں کو وٹرو میں پروسیس کیا جاتا ہے اور بافتوں کی نشوونما اور تخلیق نوکی حوصلہ افزائی کے لیے سہاروں پر بیچ دیا جاتا ہے۔ اسٹیم سیل، بشمول جنین، حمل کے ٹشو، اور بالغ اسٹیم سیل، اس عمل میں اہم کردار ادا کرتے ہیں، جو مخصوص ٹشوز پیدا کرنے کی صلاحیت پیش کرتے ہیں۔ خاص طور پر، آٹو لوجس خلیات کو مسترد ہونے کے خطرات کو کم کرنے کے لیے ترجیح دی جاتی ہے، حالانکہ صحت مند خلیوں کو حاصل کرنے میں چیلنجز موجود ہیں، خاص طور پر عمر رسیدہ یا بیمار افراد سے۔

1.7.1 ٹشو انجینئرنگ تکنیک کے کلیدی اجزاء (Key Components of Tissue Engineering Technique)

1. سیلز (Cells)

- ❖ خلیے ٹشو کی تشکیل کے بنیادی بلاکس کے طور پر کام کرتے ہیں، جو ٹشو کی شفا یابی اور تخلیق نو کے لیے اہم ہیں۔
- ❖ میزبان سے اخذ کردہ آٹو لوگھس سیلز کو ان کی مطابقت کی وجہ سے ترجیح دی جاتی ہے، حالانکہ سورسنگ مشکل ہو سکتی ہے۔
- ❖ اسٹیم سیل کی مختلف اقسام، بشمول برائن، حملاتی ٹشو، اور بالغ اسٹیم سیل (جیسے mesenchymal اسٹیم سیل)، متنوع بافتوں کی اقسام کے لیے تفریق کی صلاحیت پیش کرتے ہیں۔

2. پاڈ (Scaffold)

- ❖ سہاروں سیل کی نشوونما کے لیے ساختی مدد فراہم کرتے ہیں اور بافتوں کی تشکیل کی رہنمائی کرتے ہیں۔
- ❖ قدرتی اور مصنوعی سہاروں کا استعمال کیا جاتا ہے، جن میں سے ہر ایک الگ الگ خصوصیات اور فوائد کے ساتھ ہوتا ہے۔
- ❖ قدرتی سہاروں، جیسے کولیجن اور چائٹوسن، بائیو کمپیٹیبیلٹی پیش کرتے ہیں لیکن ان میں میکا کی طاقت کی کمی ہو سکتی ہے۔
- ❖ مصنوعی سہاروں ٹیون ایبلٹی اور مینیکل کنٹرول فراہم کرتے ہیں لیکن بہتر بائیو کمپیٹیبیلٹی کے لیے ترمیم کی ضرورت پڑ سکتی ہے۔

3. حیاتیاتی عوامل (Biological Factors)

- ❖ حیاتیاتی عوامل، بشمول نمو کے عوامل اور سائٹو کائٹز، سیلولر رد عمل اور بافتوں کی نشوونما کو منظم کرتے ہیں۔
- ❖ BMPs اور VEGF جیسے نمو کے عوامل سیلولر رویے اور ٹشو مورفوجینیسیس کی رہنمائی میں اہم کردار ادا کرتے ہیں۔
- ❖ ٹشو انجینئرنگ خلیوں کی نشوونما، تفریق، اور بافتوں کی تشکیل کے لیے سازگار ماحول پیدا کرنے کے لیے ان اجزاء کو مربوط کرتی ہے، جو ٹشوں کی تخلیق نو اور پیوند کاری کے لیے امید افزا حل پیش کرتی ہے۔

1.8 ٹشو انجینئرنگ تکنیک کا اطلاق (Application of Tissue Engineering Technique)

ٹشو انجینئرنگ بافتوں اور اعضاء کے افعال کی مرمت، بدلنے یا بڑھانے کے لیے حیاتیاتی متبادل پیدا کر کے متنوع پیٹھولوجیکل حالات کو حل کرنے کا وعدہ رکھتی ہے۔

1.8.1 دوائیں (Regenerative Medicines)

یہ علاج جسم کے خود مرمت کے طریقہ کار کو متحرک کر کے خراب ٹشوز یا اعضاء کی مرمت میں مدد کرتے ہیں۔ ایسے معاملات میں جہاں فزیولوجیکل یا پیٹھولوجیکل عوامل کی وجہ سے قدرتی شفاء ناکافی ہے، ٹشوز یا اعضاء کو وٹرو میں کاشت کیا جاسکتا ہے اور مریضوں میں لگایا جاسکتا ہے۔ دوبارہ پیدا کرنے والی دوا میں اسٹیم سیلز یا پروجینیٹر سیلز کو کنٹرول شدہ ماحول میں مخصوص سیل کی اقسام بنانے کے لیے ہدایت کرنا شامل ہے۔

مثالوں میں شامل ہیں:

- ❖ جلنے کے متاثرین اور السر یا دائمی زخموں والے مریضوں میں زخم بھرنے کے لیے ٹشو انجینئرڈ جلد۔
- ❖ خراب رینل اور کارڈیک ٹشوز میں کام کو بحال کرنے کے لیے ٹشو انجینئرڈ گرافٹس کی پیوند کاری۔

1.8.2 وٹرو ہومو ماڈلز کی تخلیق (In vitro human models)

- ❖ ٹشو انجینئرنگ سیلولر اور حیاتیاتی عمل پر کیمیکلز، مکینیکل اور جسمانی عوامل کے اثرات کا مطالعہ کرنے کے لیے وٹرو انسانی ماڈلز کی ترقی میں سہولت فراہم کرتی ہے۔
- ❖ یہ ماڈل Vivo تجربات پر انحصار کو کم کرتے ہیں اور جسمانی اور پیٹھولو جیکل راستوں کے بارے میں بصیرت فراہم کرتے ہیں۔
- ❖ D3 سیل کلچر زائنتھائی متعلقہ اور پیش گوئی کرنے والا ڈیٹا پیش کرتے ہیں، جو کہ vivo مائیکرو ماحولیات سے ملتے جلتے ہیں۔

1.8.3 ٹشو انجینئرنگ میں چیلنجز (Challenges in Tissue Engineering)

- ❖ مکمل طور پر پختہ ٹشوز کی تشکیل اور Vivo انٹیگریشن میں:
- ❖ قدرتی ڈھانچے اور تعاملات کو دوبارہ بنانے کی پیچیدگی کی وجہ سے وٹرو میں مکمل طور پر پختہ ٹشوز پیدا کرنا ایک اہم چیلنج ہے۔
- ❖ انجینئرڈ ٹشو کنسٹرکٹس کا میزبان میں انضمام فعالیت کے لیے بہت ضروری ہے، پھر بھی اکثر کاؤٹوں کا سامنا کرنا پڑتا ہے جس کی وجہ سے فنکشن خراب ہوتا ہے۔

1.8.4 مدافعتی رد عمل اور گرافٹ رد عمل (Immune reaction and Graft rejection)

- ❖ اللوجینک اور زینوجینک سیلولر ذرائع مدافعتی رد عمل اور گرافٹ کو مسترد کرنے کو متحرک کر سکتے ہیں، یہاں تک کہ امیونوسوپرسی تھراپی کے ساتھ بھی۔
- ❖ ان رد عمل پر قابو پانے کے لیے امیونوسوپریشن کے لیے جدید طریقوں کی ضرورت ہوتی ہے۔

1.8.5 ناکافی ویسکولرائزیشن (Inadequate Vascularization)

- ❖ ویسکولرائزیشن، غذائی اجزاء اور آکسیجن کی فراہمی اور فضلہ کو ہٹانے کے لیے ضروری ہے، ٹشو انجینئرنگ میں ایک عام چیلنج بنی ہوئی ہے۔
- ❖ خون کی نالیوں کی ناکافی تشکیل مصنوعی اعضاء کی نشوونما کو محدود کرتی ہے یا مخصوص قسموں سے باہر پیچیدہ بافتوں کی تعمیر کو محدود کرتی ہے، جیسے کارڈیالوج، لیگامینٹ اور جلد۔

1.9 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس اکائی کے مطالعے بعد طلباء نامیاتی ارتقا کے درج ذیل نظریات کو سمجھ کر آسانی سے بیان کر سکتے ہیں:

- ❖ بائیو ٹیکنالوجی کے تصور اور دائرہ کار کی وضاحت کریں۔
- ❖ بائیو ٹیکنالوجی کی مختلف اپیلی کیشنز کو شمار کریں۔
- ❖ سیل اور ٹشو کلچر اور اس کا اطلاق بیان کریں۔

1.10 کلیدی الفاظ (Keywords)

جاندروں، خلیات یا حیاتیاتی نظام کا استعمال ایسی مصنوعات اور ٹیکنالوجیز کو تیار کرنے کے لیے جو انسانی زندگی کو بہتر بناتے ہیں یا سماجی چیلنجوں سے نمٹتے ہیں۔	Biotechnology	بائیو ٹیکنالوجی
حیاتیاتی تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے کسی حیاتیات کے جینیاتی مواد کی ہیرا پھیری جس میں مطلوبہ خصلتوں یا خصوصیات کو متعارف کرایا جاتا ہے، جیسے کہ پیداوار میں اضافہ یا بیماری کے خلاف مزاحمت۔	Genetic Engineering	جینیاتی انجینئرنگ
ایک میٹابولک عمل جو کاربوہائیڈریٹس، جیسے شکر کو الکحل یا نامیاتی تیزاب میں تبدیل کرتا ہے جو خمیر یا بیکٹیریا جیسے مائکروجنزموں کا استعمال کرتے ہیں، جو اکثر کھانے کی پیداوار اور بیئر، شراب اور دہی جیسی مختلف مصنوعات کی تیاری میں کام کرتے ہیں۔	Fermentation	ابال
سیل کلچر سے مراد خلیات کو ان کے قدرتی ماحول سے باہر بڑھنے کا عمل ہے، عام طور پر لیبارٹری کی ترتیب میں۔ اس میں خلیات کو ضروری غذائی اجزاء، نشوونما کے عوامل اور حالات فراہم کرنا شامل ہے تاکہ ان کی بقا اور پھیلاؤ میں مدد مل سکے۔ سیل کلچر کی تکنیکوں کو حیاتیاتی تحقیق، فارماسیوٹیکل ڈیولپمنٹ، اور بائیو ٹیکنالوجی کے مختلف شعبوں میں بڑے پیمانے پر استعمال کیا جاتا ہے تاکہ سیل کے رویے کا مطالعہ کیا جاسکے، بیماریوں کا نمونہ بنایا جاسکے، حیاتیاتی مرکبات تیار کیے جائیں، اور منشیات کی افادیت اور زہریلے پن کی جانچ کی جاسکے۔	Cell Culture	سیل کلچر
وہ خلیے جنہوں نے جینیاتی تبدیلیوں کی وجہ سے غیر معینہ مدت تک پھیلنے کی صلاحیت حاصل کر لی ہے، عام طور پر بائیو میڈیکل ریسرچ میں استعمال ہوتا ہے۔	Immortalized Cell Lines	لافانی سیل لائنز
ڈھانچہ، قدرتی یا مصنوعی، ٹشو انجینئرنگ اپیلی کیشنز میں سیل کی ترقی اور ٹشو کی تشکیل کے لیے معاون کے طور پر استعمال ہوتا ہے۔	Scaffold	سکیفولڈ

1.1.1 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

1.1.1.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. کلاسیکی بائیو ٹیکنالوجی نے ابال پر توجہ مرکوز کی، ایڈورڈ جینز کے چچک کے خلاف ویکسینیشن پر کام نے _____ میں سنگ میل کو نشان زد کیا۔
2. ہنگری کے انجینئر کارل ایریکی نے _____ میں "بایو ٹیکنالوجی" کی اصطلاح بنائی، اس کی تعریف اہم _____ کے لیے جانداروں کے استعمال کے طور پر کی۔
3. بائیو ٹیکنالوجی کا جدید دور 1977 میں شروع ہوا، جس میں جینیاتی انجینئرنگ کی کامیابیاں جیسے انسولین کی پیداوار اور _____ میں پہلے پابندی والے انزائم کی دریافت سے نشان زد ہوا۔
4. قدیم بائیو ٹیکنالوجی، 4000-8000 قبل مسیح میں، بنیادی طور پر جانوروں کو پالنے اور مختلف خدمات کے لیے پودوں کی کاشت شامل تھی، بشمول _____ اور _____۔
5. بائیو ٹیکنالوجی کے زمرے میں انسانی صحت کو بہتر بنانے کے لیے میڈیکل بائیو ٹیکنالوجی، فصلوں کی پیداوار بڑھانے کے لیے زریعی بائیو ٹیکنالوجی، مختلف مصنوعات تیار کرنے کے لیے صنعتی بائیو ٹیکنالوجی، اور _____ اور _____ جیسے طریقوں کے ذریعے فضلہ اور آلودگی کے انتظام کے لیے ماحولیاتی بائیو ٹیکنالوجی شامل ہیں۔
6. سیل اور ٹشو کلچر کی تکنیکوں کا مقصد لیبارٹری کے کنٹرول شدہ ماحول میں خلیات اور ٹشوز کے رویے کو _____ کرنا ہے۔
7. لافانی سیل لائنز، جیسے HeLa خلیات، سائنسی کامیابیوں میں اہم رہے ہیں، جیسے _____ ویکسین کی ترقی۔
8. پرائمری سیل کلچرز زیادہ _____ ماڈل پیش کرتے ہیں، جو مقامی بافتوں کی خصوصیات سے ملتے جلتے ہیں۔
9. اسٹیم سیلز، جیسے ایسبرو نیک اسٹیم سیل اور انڈسٹڈ pluripotent اسٹیم سیل، _____ دو اور بافتوں کی تخلیق نو کا وعدہ رکھتے ہیں۔
10. ٹشو انجینئرنگ سیل کی نشوونما اور بافتوں کی تخلیق نو میں مدد کے لیے _____ سہاروں کا استعمال کرتی ہے۔

1.1.1.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. "بایو ٹیکنالوجی" کی اصطلاح کس نے اور کس سال میں بنائی؟
2. بائیو ٹیکنالوجی کے جدید دور کا آغاز کس چیز نے کیا؟
3. قدیم بائیو ٹیکنالوجی میں بنیادی سرگرمیاں کیا شامل تھیں؟
4. ٹشو انجینئرنگ کے اہم اجزاء کیا ہیں؟

5. لافانی سیل لائنیں بنیادی سیل ثقافتوں سے کیسے مختلف ہیں؟
6. دوبارہ پیدا کرنے والی دوائیوں میں اسٹیم سیل کے ممکنہ استعمال کیا ہیں؟

1.11.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. کلاسیکی بائیو ٹیکنالوجی میں اہم پیش رفت کیا تھی، اور انہوں نے انسانی معاشرے کی ترقی میں کس طرح حصہ ڈالا؟
2. جدید بائیو ٹیکنالوجی کی تاریخ کے اہم سنگ میلوں اور طب، زراعت اور صنعت جیسے شعبوں پر ان کے اثرات پر بحث کریں۔
3. بائیو ٹیکنالوجی کی مختلف اقسام کی وضاحت کریں اور مختلف شعبوں میں ان کی اپیلی کیشنز کی مثالیں فراہم کریں، بشمول ادویات، زراعت، صنعت، اور ماحولیاتی انتظام۔
4. بائیو میڈیکل ریسرچ میں لافانی سیل لائنوں کی اہمیت پر بحث کریں۔
5. لافانی سیل لائنوں کے ساتھ بنیادی سیل ثقافتوں کا موازنہ اور ان کے برعکس کریں۔
6. ٹشو انجینئرنگ سے وابستہ چیلنجز کی وضاحت کریں۔

1.12 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Recombinant DNA Technology	قدرتی انتخاب	ریکومبیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی	بایو ٹیکنالوجیکل جس میں مختلف ذرائع سے DNA کے ٹکڑوں کو جوڑ کر DNA کی ترتیب کے نئے امتزاج کی تخلیق شامل ہے۔ یہ عام طور پر جینیاتی انجینئرنگ میں حیاتیات میں مخصوص خصلتوں کو متعارف کرانے یا مطلوبہ پروٹین تیار کرنے کے لیے استعمال ہوتا ہے۔
- Bioremediation		حیاتیاتی علاج	ماحولیاتی آلودگیوں یا آلودگیوں کو صاف کرنے کے لیے جانداروں، جیسے بیکٹیریا، فنگس، یا پودوں کو استعمال کرنے کا عمل۔ بائیو میڈیشن کا استعمال مٹی، پانی، یا ہوا میں آلودگیوں کو کم کرنے یا اسے detoxify کرنے کے لیے کیا جاتا ہے، جو ماحولیاتی صفائی کی کوششوں میں حصہ ڈالتا ہے۔

1.13 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Smith, J. M., & Harwood, J. H. (2020). Biotechnology: Concepts and Applications. John Wiley & Sons.
2. Freshney, R. I. (2016). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (7th ed.). Wiley-Blackwell.
3. Masters, J. R. (Ed.). (2019). Animal Cell Culture: Essential Methods. John Wiley & Sons.
4. Freshney, R. I. (2016). Culture of Human Stem Cells (2nd ed.). John Wiley & Sons.

اکائی 2: بنیادی سیل کلچر: خلیات کی تنہائی کی تکنیک

(Primary cell culture: Techniques of cells Isolation)

اکائی کے اجزاء:

تمہید (Introduction)	2.0
مقاصد (Objectives)	2.1
پرائمری سیل کلچر کا تصور (Concept of Primary Cell Culture)	2.2
تعریف اور اصول (Principle)	2.2.1
درخواستیں اور فوائد (Applications and Advantages)	2.2.2
چیلنجز اور غور و فکر (Challenges and Considerations)	2.2.3
بنیادی سیل کلچر کی اقسام (Types of primary Cell Culture)	2.3
جانوروں سے ٹشو کا حصول (Isolation of Animal Tissue)	2.4
ماؤس ایمبریو (Moise Embryo)	2.4.1
ماؤس ایمبریو زکاپروٹوکول تنہائی	2.4.2
مواد درکار	2.4.3
پروٹوکول	2.4.4
ٹشو کلچر لیبارٹری میں منتقلی	2.4.5
چک ایمبریو (Chick Embryo)	2.4.6
پروٹوکول (Protocol)	2.4.7
بنیادی سیل کلچر (Primary Cell Culture)	2.5
پرائمری ایکسپلانٹ (Primary Explant)	2.5.1
پروٹوکول پرائمری ایکسپلانٹس	2.5.2

2.6	انزیمیٹک تفریق (Enzymatic Disaggregation)
2.6.1	گرم ٹرپسن (Warm Trypsin)
2.6.2	پروٹوکول: گرم ٹرائپسن میں بافتوں کا انحراف (TISSUE DISAGGREGATION IN WARM TRYPSIN)
2.6.3	پروٹوکول
2.6.4	کولڈ پری ایکسپوزر کے ساتھ ٹرائپسنائزیشن (Trypsinization with Cold Preexposure)
2.6.5	دیگر انزیمیٹک طریقہ کار
2.6.6	کولجینیس
2.7	مکینیکل تفریق (Mechanical Degradation)
2.8	اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)
2.9	کلیدی الفاظ (Keywords)
2.10	نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)
2.10.1	معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)
2.10.2	مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)
2.10.3	طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)
2.11	فرہنگ (Glossary)
2.12	مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

2.0 تمہید (Introduction)

سیلولر بائیولوجی اور ٹشو انجینئرنگ کے میدان میں، بنیادی ثقافتی تکنیکیں بنیادی ستونوں کے طور پر کھڑی ہیں جو کہ خلیات کے مطالعہ اور ان کی قدرتی حالت میں ہیرا پھیری کی سہولت فراہم کرتی ہیں۔ یہ تکنیکیں، مکینیکل سے لے کر انزیمیٹک تفریق تک، خلیات کو بافتوں سے الگ کرنے اور ان کی ثقافت میں ایک اہم کردار ادا کرتی ہیں، تحقیق کے بے شمار امکانات اور طبی ایپلی کیشنز کو کھولتی ہیں۔

یہ باب بنیادی ثقافتی تکنیکوں کی پیچیدگیوں پر روشنی ڈالتا ہے، طریقہ کار، اصولوں، اور ایپلی کیشنز پر روشنی ڈالتا ہے جس میں مینیکل اور انزیمٹک اختلاف دونوں شامل ہیں۔ ان تکنیکوں کو واضح کرنے سے، محققین اور پریکٹیشنرز سیلولر رویے کی گہری سمجھ حاصل کرتے ہیں، جس سے دوبارہ پیدا ہونے والی ادویات، منشیات کی دریافت، اور بیماری کی ماڈلنگ میں ترقی کی راہ ہموار ہوتی ہے۔

بنیادی ثقافتی تکنیک براہ راست جانداروں سے نکالے جانے والے خلیوں کی صلاحیت کو بروئے کار لانے کے ابتدائی قدم کے طور پر کام کرتی ہے۔ قائم شدہ سیل لائنوں کے برعکس، جو جینیاتی تبدیلیوں اور لیبارٹری کے حالات کے مطابق موافقت سے گزری ہیں، بنیادی ثقافتیں اپنے اصل کے بافتوں کی فینوٹائپک اور جین ٹائپک خصوصیات کو برقرار رکھتی ہیں۔ اس طرح، وہ حیاتیاتی تحقیق اور علاج کی نشوونما کے لیے انمول ٹولز بناتے ہوئے، Vivo حالات میں زیادہ مستند نمائندگی پیش کرتے ہیں۔

مینیکل تفریق خلیات کو بافتوں سے الگ کرنے کے قدیم ترین اور آسان ترین طریقوں میں سے ایک ہے۔ جسمانی قوتوں کو کام میں لا کر جیسے کاٹنا، پیننا، یا موندنا، محققین ایکسٹراسیلولر میٹرکس میں خلل ڈال سکتے ہیں اور انفرادی خلیوں کو ان کی ساختی حدود سے آزاد کر سکتے ہیں۔ یہ تکنیک خاص طور پر مضبوط بافتوں جیسے پٹھوں یا کینکشیوٹشوز کے لیے موزوں ہے، جہاں خلیے گھنے بھرے ہوتے ہیں اور انزیمٹک ہاضمے کے لیے لچکدار ہوتے ہیں۔

دوسری طرف، انزیمٹک تفریق میں ایکسٹراسیلولر میٹرکس کو کم کرنے اور خلیات کو ان کے ہمسایہ ہم منصبوں سے الگ کرنے کے لیے پروٹولیتک انزائمز کا استعمال شامل ہے۔ ٹرپسن، کو لیگنیز، یا ڈیپسین جیسے خامروں کو عام طور پر پروٹین اور گلائکوپروٹیز کو توڑنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، جس سے الگ تھلک خلیوں کی رہائی میں سہولت ہوتی ہے۔ انزیمٹک تفریق مینیکل طریقوں کے مقابلے میں ایک نرم رویہ پیش کرتی ہے، سیلولر قابل عملیت اور فعالیت کو محفوظ رکھتی ہے، خاص طور پر جگر یا بلبہ جیسے نازک ٹشوز کے لیے۔

اس پورے باب میں، ہم مینیکل اور انزیمٹک تفریق کی دونوں تکنیکوں کی باریکیوں کا جائزہ لیں گے، ان کے فوائد، حدود اور بہترین طریقوں کو تلاش کریں گے۔ سیل کی تنہائی کی پیچیدگیوں کو سمجھ کر، محققین ثقافتی حالات کو بہتر بنا سکتے ہیں، تجرباتی تولیدی صلاحیت کو بڑھا سکتے ہیں، اور سیلولر رویے اور فنکشن میں نئی بصیرت کو کھول سکتے ہیں۔

خلاصہ یہ کہ بنیادی ثقافتی تکنیک سیلولر اور سالماتی حیاتیات کے ہتھیاروں میں ناگزیر اوزار کے طور پر کام کرتی ہے۔ مینیکل اور انزیمٹک ذرائع کے ذریعے خلیے کی تنہائی کے فن میں مہارت حاصل کر کے، محققین سیلولر بائیولوجی کے اسرار سے پردہ اٹھا سکتے ہیں، جو حیاتیاتی سائنس میں تبدیلی کی دریافتوں اور اختراعات کی راہ ہموار کر سکتے ہیں۔

2.1 مقاصد (Objectives)

اس اکائی کے مطالعہ کے اختتام پر، آپ اس قابل ہونا چاہیے کہ۔

❖ پرائمری سیل کلچر کا تصور کو بیان کر سکیں

❖ بنیادی ثقافت کے لیے جانوروں کے خلیے کو الگ کرنے کی تکنیک (کلینیکل؛ انزیمینٹک اختلاف)

2.2 پرائمری سیل کلچر کا تصور (Concept of Primary Cell Culture)

پرائمری سیل کلچر بائیومیڈیکل ریسرچ میں سب سے آگے ہے، جو ان کے آبائی ماحول میں سیلولر رویے کو کنٹرول کرنے والے پیچیدہ میکائزم کو دریافت کرنے کا ایک گیٹ وے پیش کرتا ہے۔ غیر فانی سیل لائنوں کے برعکس، جو مصنوعی حالات میں جینیاتی تبدیلیوں اور طویل عرصے تک کاشت سے گزرے ہیں، بنیادی سیل کلچرز براہ راست جانداروں سے حاصل کردہ خلیات کی فینوٹائپک اور جین ٹائپک خصوصیات کو برقرار رکھتی ہیں۔ Vivo کے حالات میں یہ وفاداری بنیادی حیاتیاتی عمل کو سمجھنے، بیماری کے طریقہ کار کو واضح کرنے، اور جدید علاج کی مداخلتوں کو تیار کرنے کے لیے بنیادی سیل ثقافتوں کو انمول ٹولز بناتی ہے۔

2.2.1 تعریف اور اصول (Principle)

اس کے مرکز میں، بنیادی سیل کلچر میں خلیات کی تنہائی اور کاشت شامل ہوتی ہے جو براہ راست کسی جاندار کے نشوونما یا اعضاء سے حاصل کیے جاتے ہیں۔ یہ عمل مطلوبہ بافتوں کو نکالنے کے ساتھ شروع ہوتا ہے، جس کے بعد انفرادی خلیات کو چھوڑنے کے لیے کلینیکل یا انزیمینٹک تفریق ہوتی ہے۔ ان الگ تھلگ خلیات کو پھر ثقافتی برتنوں میں بیج دیا جاتا ہے اور مناسب نشوونما کے ذرائع فراہم کیے جاتے ہیں، جو ان کے پھیلاؤ اور دیکھ بھال کے لیے سازگار مائیکرو ماحولیات بناتے ہیں۔

بنیادی سیل کلچر کا بنیادی اصول، بہترین حد تک ممکنہ حد تک، ان جسمانی حالات کو دوبارہ بنانا ہے جن کا خلیے جاندار کے اندر تجربہ کرتے ہیں۔ اس میں نقل کرنے والے عوامل شامل ہیں جیسے کہ درجہ حرارت، pH، osmolarity، اور غذائی اجزاء کی دستیابی، نیز مناسب سنگنگ اشارے اور ایکسٹریکٹس اسلولر میٹرکس اجزاء فراہم کرنا جو خلیے کی چپکنے، نمو، اور تفریق کے لیے ضروری ہیں۔

2.2.2 درخواستیں اور فوائد (Applications and Advantages)

پرائمری سیل کلچرز بائیومیڈیکل ریسرچ اور کلینیکل پریکٹس کے مختلف شعبوں میں وسیع پیمانے پر اپیلی کیشنز تلاش کرتے ہیں۔ وہ سیل بائیولوجی، فزیالوجی، اور پیٹھالوجی کا مطالعہ کرنے کے لیے انمول ماڈل کے طور پر کام کرتے ہیں، جس سے محققین کو سیل کے تعاملات، سگنل کی منتقلی کے راستے، اور ایک کنٹرول شدہ لیبارٹری سیٹنگ میں بیرونی محرکات کے رد عمل کی چھان بین کرنے کی اجازت ملتی ہے۔ مزید برآں، بنیادی سیل کلچر منشیات کی دریافت اور زہریلے پن کی جانچ کے لیے ناگزیر اوزار ہیں، جو روایتی سیل لائنوں کے مقابلے میں زیادہ پیش گوئی اور جسمانی لحاظ سے متعلقہ نتائج پیش کرتے ہیں۔

پرائمری سیل کلچرز کے بنیادی فوائد میں سے ایک ان کی ویوو میں پائے جانے والے بافتوں کی متفاوت اور پیچیدگی کو دوبارہ بیان کرنے کی صلاحیت ہے۔ یکساں سیل لائنوں کے برعکس، بنیادی ثقافتوں میں مختلف فینوٹائپس اور افعال کے ساتھ خلیات کی متنوع آبادی ہوتی

ہے، جو کہ بافتوں اور اعضاء کے اندر دیکھے جانے والے سیلولر تنوع کی آئینہ دار ہوتی ہے۔ یہ تفاوت محققین کو زیادہ درستی اور مطابقت کے ساتھ سیل کے مخصوص رد عمل، نشو کے مخصوص افعال، اور بیماری سے متعلق میکانزم کا مطالعہ کرنے کے قابل بناتا ہے۔

2.2.3 چیلنجز اور غور و فکر (Challenges and Considerations)

ان کے بے شمار فوائد کے باوجود، بنیادی سیل کلچر کچھ چیلنجز اور تحفظات پیش کرتے ہیں جن کو تجرباتی کامیابی کو یقینی بنانے کے لیے حل کرنا ضروری ہے۔ ان میں سب سے اہم بنیادی خلیات کی محدود عمر ہے، جو وقت کے ساتھ سنسنی یا تفریق سے گزرتے ہیں، طویل مدتی تجربات پر رکاوٹیں ڈالتے ہیں اور تازہ بافتوں کی مسلسل سورشنگ کی ضرورت ہوتی ہے۔ مزید برآں، پرائمری سیل کلچرز جینیاتی اور ماحولیاتی عوامل کی وجہ سے بچوں یا عطیہ دہندگان کے درمیان تغیر کا مظاہرہ کر سکتے ہیں، سخت کوالٹی کنٹرول کے اقدامات اور معیاری پروٹوکول کی ضرورت ہوتی ہے۔

مزید برآں، بنیادی سیل ثقافتوں کے قیام اور دیکھ بھال کے لیے خصوصی مہارتوں، آلات اور وسائل کی ضرورت ہوتی ہے، خاص طور پر نازک ڈھانچے یا کم سیل کی پیداوار والے بافتوں کے لیے۔ قابل تولید اور قابل اعتماد نتائج حاصل کرنے کے لیے محققین کو سیل کی تنہائی، ثقافت کی اصلاح، اور تجرباتی ہیرا پھیری کی پیچیدگیوں پر جانا چاہیے۔ مزید برآں، بافتوں کے نمونوں کی سورشنگ کے حوالے سے اخلاقی تحفظات، خاص طور پر انسانی عطیہ دہندگان سے، بنیادی سیل کلچر کی تحقیق میں باخبر رضامندی اور اخلاقی نگرانی کی اہمیت کو واضح کرتے ہیں۔

خلاصہ یہ کہ پرائمری سیل کلچر جدید بائیومیڈیکل ریسرچ کے سنگ بنیاد کی نمائندگی کرتا ہے، جو سیلولر فزیالوجی اور پیٹھالوجی کی متحرک دنیا میں ایک وندو پیش کرتا ہے۔ خلیات کی خصوصیات کو ان کی آبائی حالت میں وفاداری کے ساتھ محفوظ کر کے، بنیادی ثقافتیں محققین کو نظام زندگی کی پیچیدگیوں کو کھولنے، بنیادی سائنس، ترجمے کی دوائیوں اور طبی مشق میں پیشرفت کرنے کے قابل بناتی ہیں۔ پرائمری سیل کلچر میں موجود چیلنجوں کے باوجود، انعامات کئی گنا ہیں، صحت اور بیماری کے بارے میں ہماری سمجھ میں انقلاب لانے اور جدید علاج کی حکمت عملیوں کے لیے راہ ہموار کرنے کی صلاحیت کے ساتھ۔

2.3 بنیادی سیل کلچر کی اقسام (Types of primary Cell Culture)

ایک بنیادی ثقافت ثقافت کا وہ مرحلہ ہے جو خلیوں کو الگ تھلگ کرنے کے بعد لیکن پہلی ذیلی ثقافت سے پہلے ہے۔ غور کرنے کے لئے چار مراحل ہیں:

- (1) نمونے کا حصول،
- (2) نشو کی تنہائی،
- (3) تفریق اور/یا تفریق، اور

(4) ثقافت کے برتن میں بیج ڈالنے کے بعد ثقافت۔

الگ تھلک ہونے کے بعد، ایک بنیادی سیل کلچر یا تو خلیوں کو مناسب سمبٹر پیٹ سے منسلک ٹشو کے ٹکڑوں سے باہر منتقل ہونے کی اجازت دے کر حاصل کیا جاسکتا ہے یا میکائی طور پر یا انزیمیکٹک طور پر ٹشو کو الگ کر کے خلیوں کی معطلی پیدا کرنے کے لیے، کچھ جو بالآخر سمبٹر پیٹ سے منسلک ہو جائے گا۔ یہ زیادہ تر عام غیر تبدیل شدہ خلیوں کے لیے ضروری معلوم ہوتا ہے، سوائے ہیماٹوپوائٹک سیلز کے، زیادہ سے زیادہ کارکردگی کے ساتھ زندہ رہنے اور پھیلنے کے لیے ایک چھٹی سطح سے منسلک ہونا۔ دوسری طرف تبدیل شدہ خلیے، خاص طور پر ٹرانسپلانٹ ایبل جانوروں کے ٹیومر کے خلیے، اکثر معطلی میں پھیلنے کے قابل ہوتے ہیں۔

بافتوں کی تقسیم کے لیے کثرت سے استعمال کیے جانے والے انزائمز ٹریپسن، کولیگنیز، ایلستیز، پروناس، ڈسپیس، ڈی نیس، اور ہائیلورونڈیز کی خام تیاری ہیں، اکیلے یا مختلف مجموعوں میں، جیسے کہ قسم II لیوولر کے لیے ایلستیس اور ڈی نیس۔ سیل آکسولیشن [ڈوبز اینڈ گونزالیز، 2002]، کولیجینیز و ڈسپیس [بوٹھ اینڈ اوشیہ، 2002]، اور کولیجینیز کے ساتھ ہائیلورونڈیز [بیری اینڈ فرینڈ، 1969؛ سیگلن، 1975]۔ دیگر، غیر ممالیہ انزائمز ہیں، جیسے کہ ٹریپزین (سگما)، ایک دوبارہ پیدا کرنے والا، مکئی سے ماخوذ، ٹریپسن، ٹریپل (انوٹر و جن)، ریکومینٹ مائکرو بیل، اور Accutase اور Accumax (جدید سیل ٹیکنالوجیز)، بھی دستیاب ہیں۔ بنیادی تفریق کے قابل۔ خام تیاریاں اکثر پیوریفائیڈ انزائم کی تیاریوں سے زیادہ کامیاب ہوتی ہیں، کیونکہ پہلے میں دیگر پروٹیزز بطور آلودگی ہوتی ہیں، حالانکہ بعد والے عام طور پر کم زہریلے اور اپنے عمل میں زیادہ مخصوص ہوتے ہیں۔ Trypsin اور pronase سب سے زیادہ مکمل اختلاف کرتے ہیں، لیکن خلیات کو نقصان پہنچا سکتے ہیں۔ دوسری طرف کولیجینیز اور ڈسپیس نامکمل تفریق دیتے ہیں، لیکن کم نقصان دہ ہیں۔ Hyaluronidase کو کولیگنیز کے ساتھ مل کر انٹراسیلولر میٹرکس کو ہضم کرنے کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے، اور DNase کا استعمال lysed خلیوں سے جاری DNA کو منتشر کرنے کے لیے کیا جاتا ہے۔ ڈی این اے پروٹو لوسیس کو خراب کرتا ہے اور ری ایگریگیشن کو فروغ دیتا ہے (ٹیل 13.4 دیکھیں)۔

اگرچہ ہر ٹشو کو شرائط کے مختلف سیٹ کی ضرورت ہو سکتی ہے، لیکن کچھ تقاضے ان میں سے اکثر کے ذریعہ مشترک ہیں:

(1) چکنائی اور نیکروٹک ٹشو کو ڈسکیشن کے دوران بہترین طریقے سے ہٹایا جاتا ہے۔

(2) ٹشو کو تیز دھار سے باریک کاٹ لیا جائے۔

کم سے کم نقصان پہنچانے والے آلات

(3) تفریق کے لیے استعمال ہونے والے انزائمز کو بعد میں نرم سینٹر فیو گریشن کے ذریعے ہٹا دیا جانا چاہیے۔

(4) پرائمری کلچر میں خلیات کا ارتکاز عام طور پر ذیلی ثقافت کے لیے استعمال ہونے والے خلیات سے کہیں زیادہ ہونا چاہیے، کیونکہ

پرائمری کلچر میں زندہ رہنے والے بافتوں سے خلیات کا تناسب کافی کم ہو سکتا ہے۔

(5) ایک بھرپور میڈیم، جیسا کہ Ham's F12، ایک سادہ میڈیم، جیسے Eagle's MEM سے بہتر ہے، اور، اگر سیرم کی

ضرورت ہو تو، جنین کی بوائین اکثر پچھڑے یا گھوڑے کی نسبت بہتر بقا دیتی ہے۔ سیل کی مخصوص اقسام کو الگ تھلگ کرنے کے لیے ممکنہ طور پر منتخب میڈیمز کی ضرورت ہوگی۔

(6) ایسبریو تک ٹشوز زیادہ آسانی سے الگ ہو جاتے ہیں، زیادہ قابل عمل خلیات پیدا کرتے ہیں، اور پرائمری کلچر میں بالغ بافتوں کی نسبت زیادہ تیزی سے پھیلتے ہیں۔

2.4 جانوروں سے ٹشو کا حصول (Isolation of Animal Tissue)

انسانی جانوروں کے ٹشو کے ساتھ کام کرنے کی کوشش کرنے سے پہلے، اس بات کو یقینی بنائیں کہ آپ کا کام طبی اخلاقی اصولوں یا جانوروں کے ساتھ تجربہ کرنے کے بارے میں موجودہ قانون کے مطابق ہے (سیکشن 7.9.1 دیکھیں)۔ مثال کے طور پر، برطانیہ میں، 50 فیصد حمل یا انکیو بیٹشن سے زیادہ جنین یا جنین کے استعمال کو 1986 کے جانوروں کے تجربات (سائنسی طریقہ کار) ایکٹ کے تحت منظم کیا جاتا ہے۔ انسانی بائیوپسی یا جنین کے مواد کے ساتھ کام کرنے کے لیے عام طور پر مقامی اخلاقی کمیٹی اور مریض اور/یا اس کے رشتہ داروں کی رضامندی۔

ایک حفاظتی نوٹ۔ انسانی ٹشو کے ساتھ کام کلاس II کی حیاتیاتی حفاظتی کابینہ میں بے ہینمنٹ لیول 2 پر کیا جانا چاہیے اگر سائٹ کے آلودہ ہونے کا امکان ہو تو 70% الکحل کے ساتھ ریسیکشن کی جگہ کو جراثیم سے پاک کرنے کی کوشش کی جانی چاہیے (مثلاً جلد)۔ ٹشو کو غیر محفوظ طریقے سے ہٹائیں اور اسے جلد از جلد ڈسکیشن (DBSS) یا ٹرانسپورٹ میڈیم میں ٹشو کلچر لیبارٹری میں منتقل کریں (ملاحظہ کریں ضمیمہ I)۔ ٹشو کلچر لیبارٹری میں جانوروں کو جلد نہ کریں، کیونکہ جانور مائیکرو بیل آلودگی لے سکتے ہیں۔ اگر ٹشو کی منتقلی میں تاخیر ناگزیر ہے، تو اسے 4°C پر 72 گھنٹے تک رکھا جاسکتا ہے، حالانکہ عام طور پر تیز منتقلی کے نتیجے میں بہتر پیداوار حاصل ہوتی ہے۔

2.4.1 ماؤس ایسبریو (Moise Embryo)

ماؤس ایسبریو غیر متفاوت فیرو بلیوسٹک ثقافتوں کے لئے خلیوں کا ایک آسان ذریعہ ہیں۔ وہ اکثر فیڈر تھوں کے طور پر استعمال ہوتے ہیں (تصویر 2.1 دیکھیں)

2.4.2 ماؤس ایسبریو زکاپرو ٹوکول تنہائی

خاکہ

وقتی حاملہ ماؤس سے بچہ دانی کو غیر محفوظ طریقے سے ہٹائیں اور جنین کو کاٹ دیں۔

2.4.3 مواد درکار

جراثیم سے پاک

❖ ڈسکیشن: سیلنڈر سالٹ سلوشن: اینٹی بائیو ٹکس کی زیادہ مقدار کے ساتھ ڈسکیشن: سیلنڈر سالٹ سلوشن: 25 سے 50 ملی لیٹر میں سکرو کیپڈ ٹیوب یا یونیورسل کنٹینر ڈسکیشن: سیلنڈر سالٹ سلوشن 50 ملی لیٹر جراثیم سے پاک بیکر میں (آلات کو آگ کے بعد ٹھنڈا کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے)

❖ پیٹری ڈشز، 9 سینٹی میٹر

❖ پوائنڈ فور سپس ڈی پوائنڈ کیلنچی غیر جراثیم سے پاک:

❖ چھوٹا لیمینر فلو ہڈ

❖ حاملہ چوہوں کا مقررہ وقت (اس پروٹوکول کا مرحلہ 1 دیکھیں)

❖ الکوحل، 70%، واش بوتل میں

❖ الکوحل، 70%، آلات کو جراثیم سے پاک کرنے کے لیے (تصویر 7.4 دیکھیں)

❖ بنسن برنر

2.4.4 پروٹوکول

1. ایسٹرس کی انڈکشن: اگر نر اور مادہ چوہوں کو الگ الگ رکھا جائے تو تقریباً تین دن بعد ان کو ملاوٹ کے لیے ایک ساتھ رکھا جانا چاہیے تاکہ مادہ میں ایسٹرس پیدا ہو سکے۔ یہ وقت کامیاب ملن کے امکانات کو بڑھاتا ہے، منصوبہ بند جنین کی پیداوار میں سہولت فراہم کرتا ہے۔ ہر صبح اندام نہانی میں ایک سخت، چھچھاپلگ کی موجودگی کامیاب ملن کی نشاندہی کرتی ہے۔

2. جنین کی ڈیٹنگ: اندام نہانی کے پلگ کا پتہ لگانے کا دن، جسے "پلگ ڈیٹ" کہا جاتا ہے، جنین کی نشوونما کے لیے دن صفر سمجھا جاتا ہے۔ اس کے بعد جنین کی نشوونما کا وقت اس تاریخ سے طے ہوتا ہے، جس کی پوری مدت تقریباً 19-21 دن تک رہتی ہے۔ تمام متضاد جنینوں سے ثقافتوں کو تیار کرنے کے لیے بہترین عمر تقریباً 13 دن ہے جب جنین نسبتاً بڑا ہوتا ہے اور اس میں غیر متفرق mesenchyme کا زیادہ تناسب ہوتا ہے، جو ثقافت کے لیے اہم ہے۔ 50% سے زیادہ مکمل مدت کے جنین کو سنبھالنے کے لیے لائسنس کی ضرورت پڑ سکتی ہے، اس لیے 9-10 دن کے جنین کو ترجیح دی جا سکتی ہے۔ اگرچہ یہ جنین کم نشوونما کرتے ہیں، لیکن خلیات کا زیادہ تناسب بڑھے گا۔ دماغ اور دل کے علاوہ زیادہ تر انفرادی اعضاء 9 ویں دن کے ارد گرد بننا شروع کر دیتے ہیں لیکن تقریباً 11 ویں دن تک الگ تھلگ رہنا مشکل ہوتا ہے۔ 13-14 دنوں میں انفرادی اعضاء کا اخراج آسان ہو جاتا ہے، زیادہ تر اعضاء 18 دن تک مکمل طور پر بن جاتے ہیں۔

3. Euthanasia: گریو کی نقل مکانی (U.K. شیڈول I طریقہ کار) کے ذریعے انسانی طور پر ماؤس کو خوش کرنا۔ جراثیم

سے پاک کرنے کے لیے وینٹرل سطح کو 70% الکحل کے ساتھ آزادانہ طور پر جھاڑو (تصویر a2.1)۔

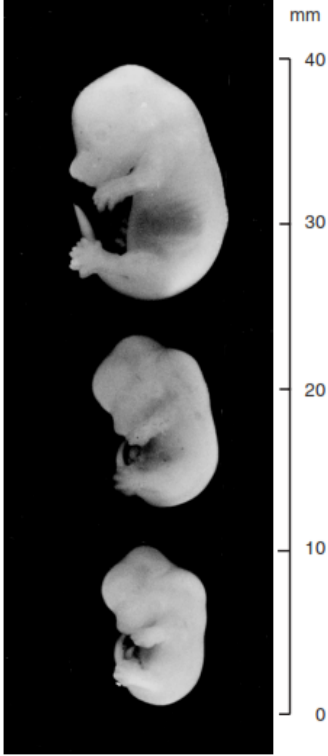
4. جلد کا چیرا: ڈایفرام (تصویر b2.3) کے بالکل اوپر درمیانی لکیر کے ساتھ ایک ٹرانسورس چیرا بنائیں۔ چیرا کے دونوں اطراف کی جلد کو پکڑیں اور پیٹ کی دیوار کی اچھوتی وینٹرل سطح کو بے نقاب کرنے کے لیے مخالف سمتوں میں کھینچیں (تصویر c2.1)۔

5. پیٹ کا چیرا: جراثیم سے پاک کینچی کا استعمال کرتے ہوئے، ظاہری پیٹ کی درمیانی لکیر کے ساتھ طول بلد کاٹ کر اندرونی ویزرا (تصویر d12.3) کو ظاہر کریں۔ اس مرحلے پر، رحم، جنین سے بھرا ہوا، پیٹ کے پچھلے گہا (تصویر e2.1) میں ظاہر ہوتا ہے۔

6. یوٹیری کا ڈسکشن: بچہ دانی کو احتیاط سے 25 ملی لیٹر یا 50 ملی لیٹر سکرو کیپڈ شیشی میں کاٹیں جس میں Dulbecco's Balanced Salt Solution (DBSS) (تصویر f2.1) کے 10 یا 20 ملی لیٹر ہوں۔
یہ پروٹوکول مزید تجزیے یا تجربہ کے لیے estrus، ڈیٹنگ ایسبرو، اور چوہوں سے بچہ دانی کو الگ کرنے کے لیے ایک جامع گائیڈ فراہم کرتا ہے۔

2.4.5 ٹشو کلچر لیبارٹری میں منتقلی

محفوظ بچہ دانی کو ٹشو کلچر لیبارٹری میں لے جائیں اور انہیں ایک تازہ پیٹری ڈش میں منتقل کریں جس میں جراثیم سے پاک Dulbecco's Balanced Salt Solution (DBSS) (تصویر g2.3) ہو۔
ایسبرو ڈسکشن:



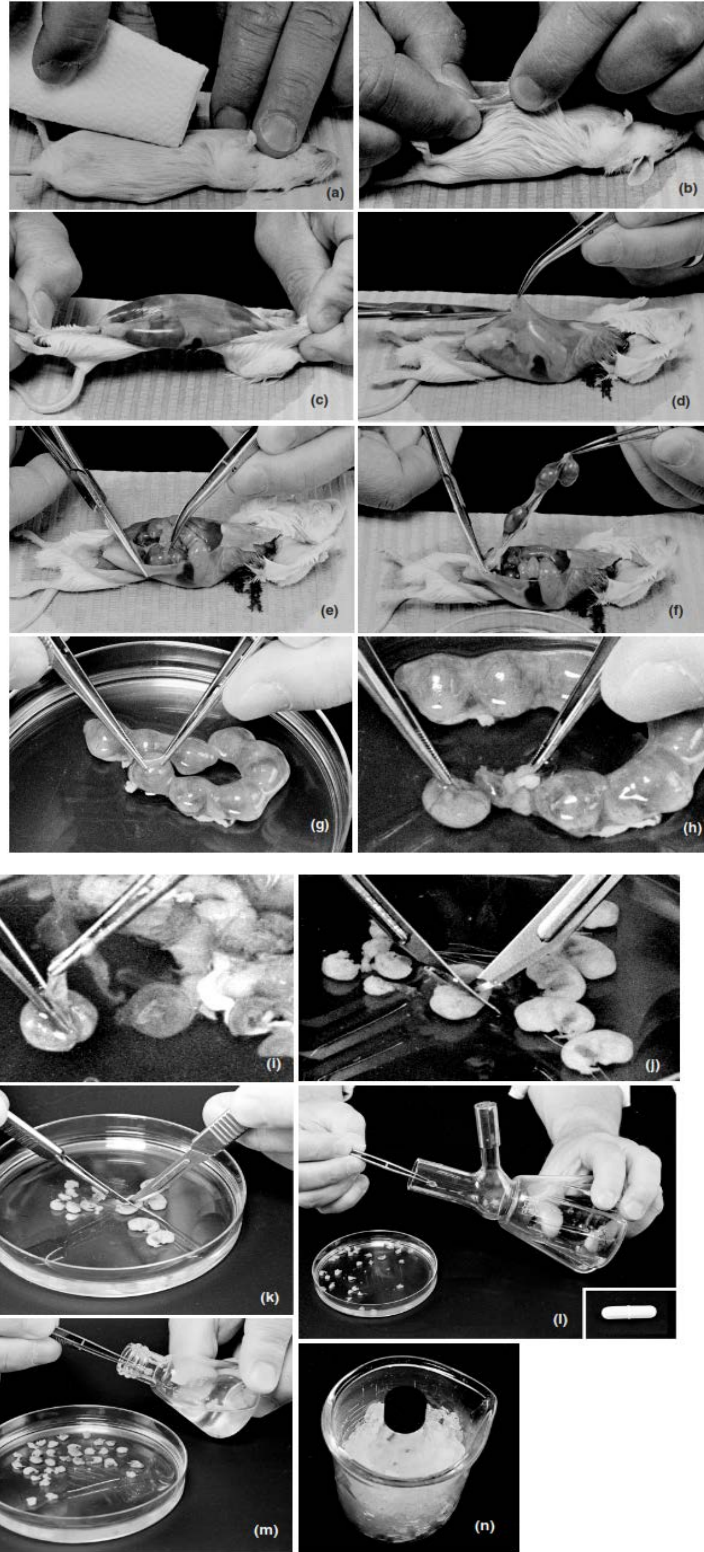
(a) جراثیم سے پاک فورپس کے دو جوڑے استعمال کرتے ہوئے بچہ دانی کو پھاڑ دیں، اس بات کو یقینی بناتے ہوئے کہ رحم کو مسخ کرنے یا ایسبریو (تصویر 2.3.1 جی، ایچ) پر ضرورت سے زیادہ ہاؤڈالنے سے بچنے کے لیے فورپس کے پوائنٹس کو ایک ساتھ رکھا جائے۔

(b) جنین کو ارد گرد کی جھلیوں اور نال سے احتیاط سے آزاد کریں، انہیں برتن کے ایک طرف رکھیں تاکہ خون بہہ سکے (تصویر 2.3.1-ii)۔
ایسبریو کی منتقلی:

❖ کٹے ہوئے جنین کو ایک تازہ پیٹری ڈش میں منتقل کریں۔ اگر بڑی تعداد میں ایسبریو کی ضرورت ہو (یعنی چار یا پانچ لیٹر سے زیادہ)، تو ڈش کو برف پر رکھنے پر غور کریں تاکہ بعد میں ڈسکشن اور کلچر کے لیے ان کی عملداری برقرار رہے۔

شکل 2.1-2. ماؤس ایسبریوز۔ حمل کے 12 ویں، 13 ویں اور 14 ویں دن سے جنین۔ 12 دن کا

جنین (نیچے) ایک چھوٹے کوڑے (تین) سے آیا ہے اور اس مرحلے پر عام طور پر پائے جانے والے اس سے بڑا ہے۔



شکل 2.2- ماؤس ڈسکشن۔ جنین کو جمع کرنے کے لیے حاملہ ماؤس کے ڈسکشن کے مراحل۔ (a) پیٹ کو جھاڑنا۔ (b)، (c) پیٹ کی دیوار کو بے نقاب کرنے کے لیے جلد کو

پھاڑنا۔ (d) پیٹ کا کھانا۔ (e) حالت میں بچہ دانی کو ظاہر کرنا۔ (f) بچہ دانی کو ہٹانا۔ (جی)، (h) رحم سے جنین کو الگ کرنا۔ (i) جھلیوں کو ہٹانا۔ (j) سر ہٹانا۔ (k) جنین کا ٹٹا۔ (l) ٹکڑوں کو ٹریپسٹیشن فلاسک میں منتقل کرنا۔ (m) ٹکڑوں کو چھوٹے ایرن میٹر فلاسک میں منتقل کرنا۔ (n) برف پر فلاسک

2.4.6 چک ایمبریو (Chick Embryo)

چوزے کے جنین کو کاٹنا آسان ہوتا ہے، کیونکہ وہ ترقی کے مساوی مرحلے میں ماؤس ایمبریو سے بڑے ہوتے ہیں۔ ماؤس ایمبریو کی طرح، چوزے کے ایمبریو کا استعمال سیل کے پھیلاؤ کے تجربے کے لیے بنیادی طور پر mesenchymal سیل کی بنیادی ثقافتیں فراہم کرنے، فیڈر لیٹرز فراہم کرنے، اور وائرل پروپیگنڈہ کے لیے ذیلی ذخیرے کے طور پر کیا جاتا ہے۔ ان کے بڑے سائز کی وجہ سے، مخصوص سیل کی اقسام، جیسے میپائٹو سائٹس، کارڈیک پٹھوں، اور پھیپھڑوں کے اپکلا کو پیدا کرنے کے لیے انفرادی اعضاء کو الگ کرنا آسان ہے۔ جیسا کہ ماؤس ایمبریو کے ساتھ، چوزے کے ایمبریو کا استعمال جانوروں کی قانون سازی کے ساتھ مشروط ہو سکتا ہے اور نصف مدت سے زیادہ جنین کے ساتھ کام کرنے کے لیے لائسنس کی ضرورت پڑ سکتی ہے۔

خاکہ:

I. انڈے سے ایمبریو کو غیر محفوظ طریقے سے ہٹانے اور ڈش میں منتقل کرنے کا طریقہ کار

A. تیاری

1۔ جراثیم سے پاک اور غیر جراثیم سے پاک مواد اکٹھا کریں۔

2۔ DBSS اور BSS حل تیار کریں۔

B. ڈسکیشن

1. انکیوبیشن کے 10 ویں دن جنین والے انڈے منتخب کریں۔

2. 70% الکحل کے ساتھ غیر جراثیم سے پاک مواد کو جراثیم سے پاک کریں۔

3. فورسپس کا استعمال کرتے ہوئے انڈے کے شیل کو ہٹادیں۔

C. منتقلی

1. جراثیم سے پاک جراثیم کا استعمال کریں

2. جنین کو DBSS پر مشتمل جراثیم سے پاک پیٹری ڈش میں منتقل کریں۔

3. غیر جراثیم سے پاک مواد کو ضائع کریں اور کام کی جگہ کو جراثیم سے پاک کریں۔

II. مواد

A. جراثیم سے پاک مواد

1. ڈی بی ایس ایس (ڈسٹیکشن، سیلنڈر سالٹ سلوشن) 25-50 ملی لیٹر اسکر وکیپڈ ٹیوب یا یونیورسل کنٹینر میں

2. BSS (متوازن نمک کا حل)، جراثیم سے پاک بیکر میں 50 ملی لیٹر (ٹھنڈا کرنے کے آلات کے لیے)

3. چھوٹا بیکر (20-50 ملی لیٹر) یا انڈے کا کپ

4. سیدھے اور مڑے ہوئے فورپس

5. پیٹری ڈشز (9 سینٹی میٹر)

B. غیر جراثیم سے پاک مواد

1. انکیوبیشن کے 10 ویں دن جنین والے انڈے

2. 70% الکحل

3. جھاڑو

4. مرطوب انکیوبیٹر (ماحول کی سطح سے اوپر کوئی اضافی CO2 نہیں)

یہ خاکہ مطلوبہ جراثیم سے پاک اور غیر جراثیم سے پاک مواد کی فہرست کے ساتھ انڈوں سے ایسبرو کو محفوظ طریقے سے ہٹانے اور انہیں ڈش میں منتقل کرنے کے لیے ایک منظم طریقہ فراہم کرتا ہے۔

2.4.7 پروٹوکول (Protocol)

1. انکیوبیشن:

❖ انڈوں کو 38.5 ڈگری سینٹی گریڈ پر مرطوب ماحول میں سینکیں۔

❖ انڈوں کو روزانہ 180° گھمائیں۔

❖ نوٹ: اگرچہ مرغیوں کے انڈے تقریباً 20 سے 21 دنوں میں نکلتے ہیں، لیکن نشوونما کے مراحل چوہوں کے جنین سے مختلف ہوتے ہیں۔ پورے ایسبرو سے منتشر خلیوں کی ثقافت کے لیے، تقریباً 8 دن میں انڈے منتخب کریں۔ الگ تھلگ اعضاء کی ابتدائی باتوں کے لیے، تقریباً 10-13 دنوں میں انڈے کا انتخاب کریں۔ برطانیہ میں، بغیر لائسنس کے 10 دن زیادہ سے زیادہ ہیں۔

2. انڈے کی تیاری:

❖ انڈے کو 70% الکحل کے ساتھ جھاڑو

❖ انڈے کو اس کے کندسرے کے ساتھ ایک چھوٹے بیکر میں رکھیں

3. شیل ہٹانا:

❖ خول کے اوپری حصے کو کریک کریں۔

❖ جراثیم سے پاک فورپس کا استعمال کرتے ہوئے شیل کو ہوا کی تھیلی کے کنارے تک چھیل دیں۔

4. جھلی کی نمائش:

❖ فورپس کو الکل میں ڈبو کر، الکل کو جلا کر، اور جراثیم سے پاک BSS میں فورپس کو ٹھنڈا کر کے دوبارہ جراثیم سے پاک کریں۔

❖ سفید خول کی جھلی کو چھیلنے کے لیے فورسپس کا استعمال کریں تاکہ نیچے کی chorioallantoic جھلی (CAM) کو اس کی خون کی نالیوں کے ساتھ ظاہر کریں۔

5. جنین نکالنا:

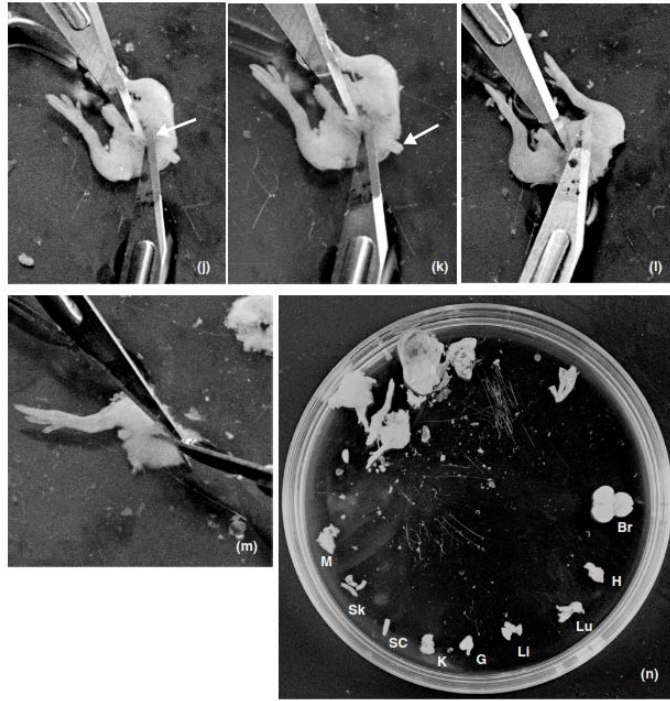
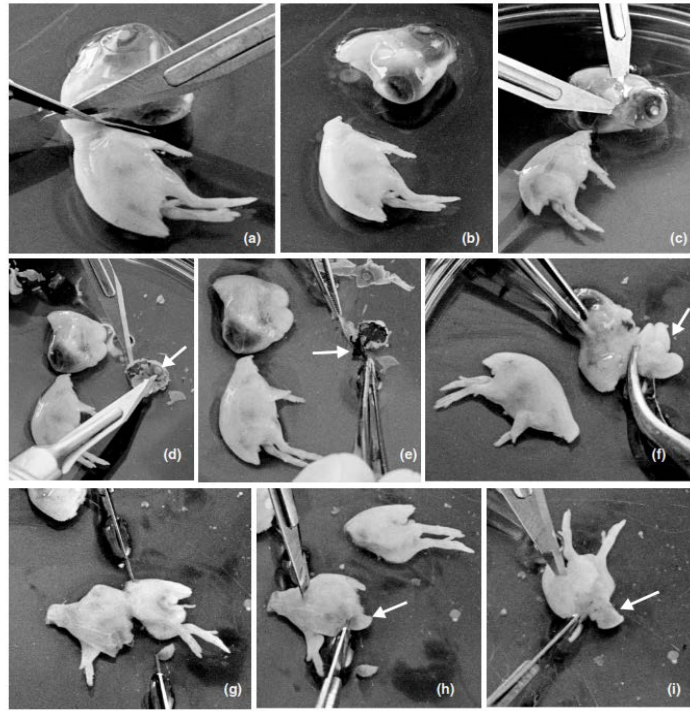
❖ CAM کو جراثیم سے پاک مڑے ہوئے فورپس کے ساتھ چھیدیں۔

❖ جنین کو سر کے نیچے پکڑ کر آہستہ سے باہر نکالیں۔ گردن کو توڑنے سے روکنے کے لیے فورپس کو مکمل طور پر بند کرنے سے گریز کریں۔ انگلی کے دباؤ کو محدود کرنے کے لیے فورپس اور فنکریپڈ کے نیچے درمیانی ہندسہ استعمال کریں۔

6. منتقلی:

❖ جنین کو 9 سیٹی میٹر پیٹری ڈش میں منتقل کریں جس میں 20 ملی لیٹر DBSS ہو۔

یہ پروٹوکول انڈوں سے ایمبریو کو غیر محفوظ طریقے سے ہٹانے اور انہیں مزید تجربات یا ثقافت کے لیے ڈش میں منتقل کرنے کے اقدامات کا خاکہ پیش کرتا ہے۔



شکل 2.11۔ چوزے کے ایسبریو کا اخراج۔ (a)، (b) سر ہٹانا۔ (c) آنکھ ہٹانا۔ (d) عینک کو الگ کرنا۔ (e) ریٹینا کو چھیلنا۔ (f) دماغ کو باہر نکالنا۔ (g) تنے کو آدھا کرنا۔ (h) پچھلے نصف سے دل اور پھیپھڑوں کو چھیڑنا۔ (i) پچھلے نصف سے جگر اور آنتوں کو چھیڑنا۔ (j) بائیں گردے اور ڈور سل باڈی والے درمیان اسکلیپل کی نوک داخل کرنا۔ (k) کریٹھ کی ہڈی کو نچوڑنا۔ (l) تنے اور پچھلی ٹانگ کے پچھلے

حصے سے جلد کو چھیلنا۔ (m) ران سے پٹھے کا ٹنا۔ (n) ڈش کے چاروں طرف آرگن ریڈیمینٹس کا اہتمام کیا جاتا ہے۔ دائیں طرف سے، گھڑی کی سمت سے، ہمارے پاس درج ذیل اعضاء ہیں: دماغ، دل، پھیپھڑے، جگر، گیزرڈ، گردے، ریڑھ کی ہڈی، جلد اور عضلات۔

2.5 بنیادی سیل کلچر (Primary Cell Culture)

پرائمری کلچر کے لیے بنائے گئے ٹشوز کو الگ کرنے کے لیے مختلف تکنیکیں تیار کی گئی ہیں۔ ان طریقوں کو (1) مکمل طور پر مکینیکل طریقوں میں درجہ بندی کیا جاسکتا ہے، جس میں ماکریشن کے ساتھ یا اس کے بغیر ڈسکشن شامل ہوتا ہے، اور (2) انزیمیٹک ڈیسگریگیشن (تصویر 2.5) کو استعمال کرنے والی تکنیک۔

پرائمری ایکسپلانٹس ٹشو کی بہت کم مقدار میں پروسیسنگ کے لیے موزوں ہیں۔ جب زیادہ مقدار میں بافتیں دستیاب ہوں تو انزیمیٹک تفریق بہتر نتائج دیتی ہے، جب کہ میکائی تفریق نرم بافتوں اور کچھ مضبوط بافتوں کے لیے موثر ہوتی ہے، خاص طور پر جب قابل عمل پیداوار کا سائز ایک اہم عنصر نہ ہو۔

2.5.1 پرائمری ایکسپلانٹ (Primary Explant)

بنیادی ایکسپلانٹ تکنیک اصل طریقہ تھا جسے ہیرسین [1907]، کیرل [1912]، اور ٹشو کلچر شروع کرنے کے لیے دیگر علمبرداروں نے تیار کیا تھا۔ ابتدائی طور پر، خون کے پلازما یا لف میں ٹشو کا ایک ٹکڑا سرایت کیا جاتا تھا، جسے ہیٹرولوگس سیرم اور ایمبریو ایکسٹریکٹ کے ساتھ ملایا جاتا تھا، اور ایک کنکاوٹی سلائڈ پر الٹی ہوئی کورسلپ پر رکھا جاتا تھا۔ پلازما کے جمنے سے بافتوں کو محفوظ بنانے میں مدد ملی، جسے پھر روایتی خوردبین کا استعمال کرتے ہوئے دیکھا جاسکتا ہے۔ ہیٹرولوگس سیرم نے پلازما کے جمنے کی حوصلہ افزائی کی، جبکہ ایمبریو ایکسٹریکٹ اور سیرم، پلازما کے ساتھ، غذائی اجزاء، نشوونما کے عوامل، اور ایکسپلانٹ سے خلیوں کی منتقلی کو متحرک کرتے ہیں۔

اگرچہ یہ تکنیک اب بھی استعمال کی جا رہی ہے، لیکن پروٹوکول 12.4 میں بیان کردہ آسان طریقے سے اس کی جگہ لے لی گئی ہے۔

2.5.2 پروٹوکول۔ پرائمری ایکسپلانٹس

خاکہ

1. ٹشو کو باریک کاٹ کر دھولیں۔ بیجوں کے ٹکڑوں کو کلچر فلاسک یا پیٹری ڈش کی سطح پر درمیانے درجے میں سیرم کی زیادہ ارتکاز کے ساتھ، انہیں بے ساختہ چکنے کی اجازت دیتا ہے (تصویر 12.6a)۔ سیل کی افزائش عام طور پر مندرجہ ذیل ہے (تصویر

(b12.6)

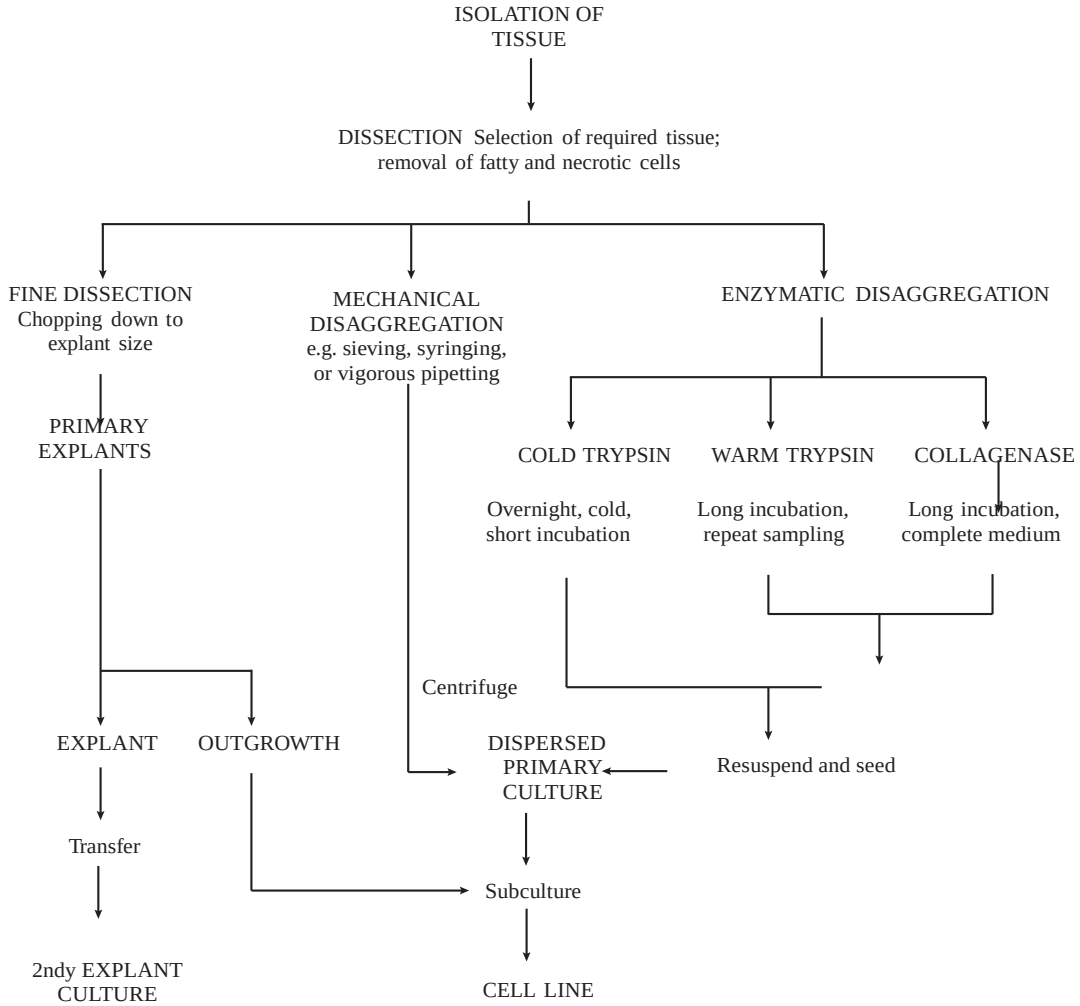
مواد (جراثیم سے پاک)

- گروتھ میڈیم (مثال کے طور پر، DMEM:F12 20%50:50 فیٹل بووائن سیرم کے ساتھ)
 - 100 mL DBSS
 - پیٹری ڈشز (9 سینٹی میٹر، نان ٹشو کلچر گریڈ)
 - فورپس
 - اسکیلپلس
 - پائپٹ (10 ملی لیٹر چوڑی ٹپس کے ساتھ)
 - سینٹری فیوج ٹیوبیں (15 یا 20 ملی لیٹر) یا یونیورسل کنٹینرز
 - کلچر فلاسکس (25 سینٹی میٹر) یا ٹشو کلچر گریڈ پیٹری ڈشز (5-6 سینٹی میٹر)
- پروٹوکول

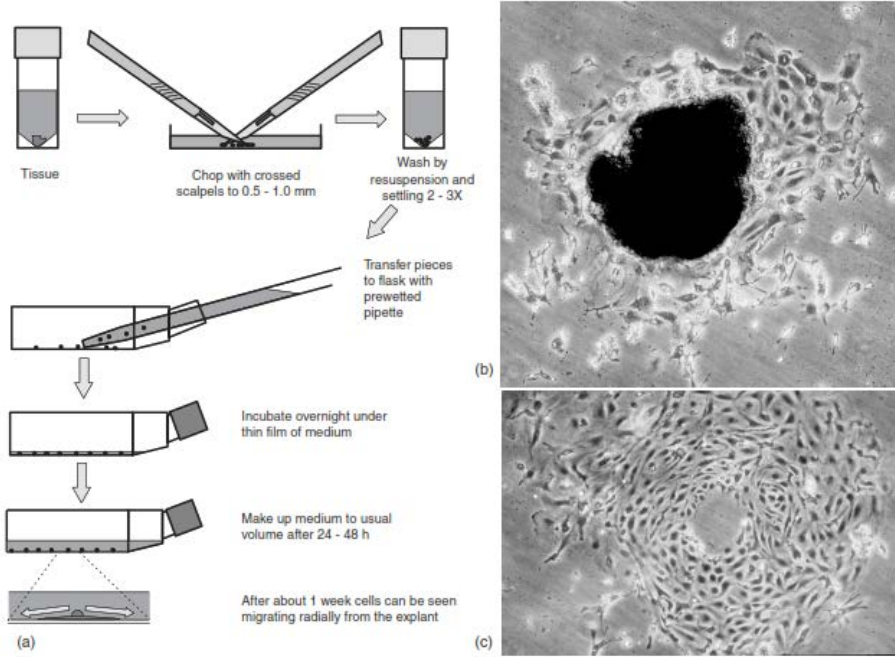
1. ٹشو کو تازہ، جراثیم سے پاک DBSS میں منتقل کریں اور کھلا کریں۔
 2. ٹشو کو دوسری ڈش میں منتقل کریں، ناپسندیدہ مواد کو الگ کرتے ہوئے، اور تیسری ڈش میں منتقل کریں۔
 3. ٹشو کو 1 ملی میٹر کیوبز میں کراس شدہ اسکیلپلز کے ساتھ باریک کاٹ لیں۔
 4. پیپٹ کے ذریعے ٹکڑوں کو جراثیم سے پاک سینٹری فیوج ٹیوب یا کنٹینرز میں منتقل کریں۔
 5. DBSS میں دوبارہ معطل کر کے ٹکڑوں کو حل کرنے اور دھونے کی اجازت دیں۔
 6. مزید دوبارہ دھونے کے مراحل کو دہرائیں۔
 7. ٹکڑوں کو کلچر فلاسک میں منتقل کریں، تقریباً 20-30 ٹکڑے فی 25-cm^2 فلاسک کے ساتھ۔
 8. گروتھ میڈیم شامل کریں اور ٹکڑوں کو یکساں طور پر پھیلانے کے لیے فلاسک کو آہستہ سے جھکائیں۔
 9. 37 ڈگری سینٹی گریڈ پر 18 سے 24 گھنٹے تک انکیوبیٹ کریں۔
 10. اگر ٹشو کے ٹکڑے لگے ہوئے ہیں، تو درمیانی حجم اگلے 3-5 دنوں میں بتدریج بڑھا کر 5 ملی لیٹر فی 25 سینٹی میٹر تک پہنچ سکتا ہے۔
- اس کے بعد، میڈیم کو ہفتہ وار تبدیل کیا جانا چاہیے جب تک کہ خلیات کی کافی حد تک بڑھوتری دیکھی نہ جائے (تصویر b12.6 دیکھیں)۔
11. ایک بار جب نمایاں اضافہ ہو جائے تو، بقیہ ایکسپلانٹ کو احتیاط سے ایک سکیلپل (تصویر c12.6) کے ساتھ اٹھایا جاسکتا ہے اور

ایک تازہ کلچر برتن میں پہلے سے بنے ہوئے پائپیٹ کے ذریعے منتقل کیا جاسکتا ہے۔ اس کے بعد، پروٹوکول کے مرحلہ 7 پر واپس جائیں۔

12. ابتدائی فلاسک میں میڈیم کو تبدیل کرنا جاری رکھیں جب تک کہ بڑھوتری بڑھنے کی سطح کا کم از کم 50% احاطہ نہ کر لے۔ اس مقام پر، خلیات ذیلی ثقافتی ہو سکتے ہیں جیسا کہ پروٹوکول 13.2 میں بیان کیا گیا ہے۔



شکل 2.5۔ بنیادی ثقافت کے لیے اختیارات۔ سیل لائن حاصل کرنے کے متعدد راستے؛ مرکز اور بائیں، مکینیکل تفریق کے ذریعے، دائیں، انزیمیٹک تفریق کے ذریعے۔ ایک ایکسپلانٹ کو منتقل کیا جاسکتا ہے تاکہ مزید افزائش کو تشکیل دیا جاسکے، جب کہ ایکسپلانٹ سے نکلنے والے کو سیل لائن بنانے کے لیے ذیلی ثقافت میں تبدیل کیا جاسکتا ہے۔



شکل 2.6۔ پرائمری ایکسپلانٹ کلچر۔ (a) ڈسکشن اور پیچنگ پرائمری ایکسپلانٹس میں مراحل کا اسکیمٹک خاکہ۔ (b) ماؤس اسکواوس سنک کار سنوماسے پرائمری ایکسپلانٹ کلچر؛ ایکسپلانٹ اور ایکسپلانٹ کے تقریباً 3 دن بعد بڑھنے کا ابتدائی مرحلہ۔

یہ تکنیک چھوٹے بفتوں کے نمونوں کو سنبھالنے کے لیے خاص طور پر قابل قدر ہے، جیسے کہ جلد کی باپسی، جہاں مینیکل یا انزیمٹک تفریق کے دوران سیل کے نقصان کا خطرہ ہوتا ہے۔ اس کی خرابیوں میں کچھ ٹشوز کا ناقص چپکانا اور بڑھوتری میں سیل کے انتخاب کا امکان شامل ہے۔ تاہم، عملی طور پر، زیادہ تر خلیے، خاص طور پر جنین، کامیابی کے ساتھ باہر منتقل ہو جاتے ہیں۔

ایکسپلانٹ ایچنٹ کو بڑھانا مختلف طریقوں سے حاصل کیا جاسکتا ہے۔ ایکسپلانٹ کے اوپر شیشے کی کور سلپ رکھنا، ایکسپلانٹ کو کور سلپ کے کنارے کے قریب رکھنا، یا ٹشو کو فلاسک سے جوڑنے کے لیے ایکسپلانٹ کے ذریعے پلاسٹک کی ڈش کو کھرچنا مؤثر طریقے ہیں (اس کے علاوہ، منسلکہ کو فروغ دیا جاسکتا ہے۔ پولی لیسین یا فائبرو نیٹکین جیسے مادوں سے پلاسٹک کا علاج کرنا، ایکسٹریکٹس کا استعمال کرنا یا فیڈر لیئرز کا استعمال کرنا۔

2.6 انزیمٹک تفریق (Enzymatic Disaggregation)

ٹشوز کے اندر سیل۔ سیل کے آسنبھن کو ہوموٹائپک انٹرایکٹنگ گلائکوپروٹینز کی ایک رینج کے ذریعے سہولت فراہم کی جاتی ہے، جسے سیل آسنبھن مالیکیولز (CAMs) بھی کہا جاتا ہے (سیکشن 3.2.1 دیکھیں)۔ ان میں سے کچھ CAMs، جیسے کیڈیرنز، کمپلیمینٹ پر منحصر ہوتے ہیں اور اس لیے EDTA یا EGTA جیسے چیلیننگ ایجنٹس کے لیے حساس ہوتے ہیں۔ انٹیگریز، جو ایکسٹریکٹس کا استعمال میں آر جینٹائن۔ گلائسین۔ ایسپارٹک ایسڈ (RGD) شکل سے منسلک ہوتے ہیں، Ca^{2+} ۔ بانڈنگ ڈومینز بھی ہوتے ہیں اور Ca^{2+} کی

کمی سے متاثر ہوتے ہیں۔ دوسرے گلائکوپروٹین جیسے فائبرونیکٹین اور لیمنین، جو انٹر سیلولر میٹرکس اور تہہ خانے کی جھلیوں میں موجود ہوتے ہیں، پروٹیز کے لیے حساس ہوتے ہیں۔ مزید برآں، پروٹیوگلائیکاز، اگرچہ کم حساس ہوتے ہیں، بعض اوقات گلائکیناسیس جیسے ہائیلورونائیڈیس یا ہیپیرینیس کے ذریعے انحطاط پذیر ہو سکتے ہیں۔

ایک عملی نقطہ نظریہ ہے کہ ایک سادہ تفریق حل کے ساتھ شروع کیا جائے اور مزید پیچیدہ حل (جدول 13.4 دیکھیں) کی طرف پیش رفت کی جائے، جس کا آغاز ٹرپسن اکیلے یا ٹرپسن/EDTA سے ہو۔ تفریق کو بڑھانے کے لیے دیگر پروٹیزز کو شامل کیا جاسکتا ہے، اور اگر ضروری ہو تو خلیے کی عملداری کو بہتر بنانے کے لیے ٹرپسن کو چھوڑا جاسکتا ہے۔ عام طور پر، انزائم کی پاکیزگی میں اضافہ کنٹرول کو بڑھاتا ہے، زہریلا کم کرتا ہے، اور مخصوصیت کو بڑھاتا ہے لیکن تفریق کی سرگرمی کو کم کر سکتا ہے۔

کینیکل اور انزیمٹک ٹشوز کی تفریق ہجرت کے ذریعے انتخاب کے مسائل کو روکتی ہے اور زیادہ تعداد میں خلیات پیدا کرتی ہے جو کم وقت میں پورے ٹشو کی بہتر نمائندگی کرتی ہے۔ تاہم، پرائمری ایکسپلانٹ تکنیک کی طرح، پروٹیز اور کینیکل تناؤ مزاحم خلیوں کے لیے بھی انحطاط کے طریقے منتخب کیے جاسکتے ہیں۔

ایسبرونک ٹشو زیادہ آسانی سے منتشر ہوتا ہے اور نوزائیدہ یا بالغ ٹشو کے مقابلے میں زیادہ پھیلنے والے خلیات پیدا کرتا ہے۔ عمر کے ساتھ ساتھ قابل عمل پھیلنے والے خلیوں کا حصول مشکل ہوتا جا رہا ہے جس کی وجہ تفریق شروع ہونے، ریشے دار کینیکٹیو ٹشو اور ایکسٹرا سیلولر میٹرکس میں اضافہ، اور غیر متفاوت پھیلنے والے سیل پول میں کمی جیسے عوامل ہیں۔

ٹرپسن گریڈ کا انتخاب ایک چیلنج بنتا ہے، کیونکہ متضاد رجحانات ہیں: خالص ٹرپسن کم زہریلا اور زیادہ متوقع ہے، جبکہ کروڈ ٹرپسن دیگر پروٹیزز کی وجہ سے زیادہ موثر ہو سکتا ہے۔ عام طور پر، زہریلے اثرات کی حساسیت اور تفریق کی صلاحیت کے درمیان توازن کو مد نظر رکھتے ہوئے، قابل عمل سیل کی پیداوار کے لیے بہترین درجے کا تعین کرنے کے لیے ایک ابتدائی ٹیسٹ تجربہ کی ضرورت ہوتی ہے۔

خام ٹرپسن عام طور پر بافتوں کی تقسیم میں استعمال کیا جاتا ہے کیونکہ یہ بہت سے خلیات کی طرف سے اچھی طرح سے برداشت کرتا ہے اور مختلف ٹشوز کے لیے موثر ہے۔ دھونے کے بعد کسی بھی بقایا سرگرمی کو کلچر میڈیم میں سیرم کے ذریعے یا سیرم فری میڈیم میں ٹرپسن روکنے والے (مثلاً سویا بین ٹرپسن انہیبیٹر) کے ذریعے بے اثر کیا جاسکتا ہے۔

2.6.1 گرم ٹرپسن (Warm Trypsin)

فعال ٹرپسن کی نمائش کو کم سے کم کرتے ہوئے سیل کا موثر انحطاط سیل کی زیادہ سے زیادہ قابل عملیت کو برقرار رکھنے کے لیے اہم ہے۔ 37 °C پر پورے ٹشو پر گرم ٹرپسن کا استعمال کرتے وقت، ہر آدھے گھنٹے میں الگ الگ خلیات کو جمع کرنے کی سفارش کی جاتی ہے۔ اس کے بعد ٹرپسن کو سینٹر فیو گریشن کے ذریعے ہٹا دیا جانا چاہیے اور سیرم پر مشتمل میڈیم کے ساتھ بے اثر کرنا چاہیے۔

2.6.2 پروٹوکول: گرم ٹرانسپن میں بافتوں کا انخفاف (TISSUE DISAGGREGATION IN WARM TRYPSIN)

خاکہ

ٹشو کو کاٹ کر ٹرانسپن میں کئی گھنٹوں تک ہلایا جاتا ہے۔ منقطع خلیات کو باقاعدہ وقفوں پر جمع کیا جاتا ہے، سینٹری فیوج کیا جاتا ہے، اور درمیانے درجے کے سیرم میں جمع کیا جاتا ہے (تصویر 12.7 دیکھیں)۔

مواد

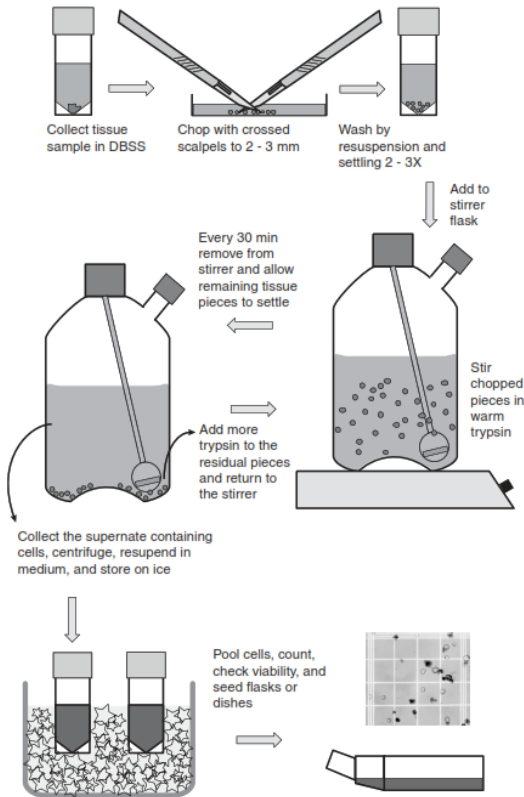
جراثیم سے پاک یا aseptically تیار:

- ٹشو (1-5 گرام)
- DBSS (50 mL)
- ٹرانسپن (خام، D-PBSA یا نارمل نمکین میں 2.5%)
- D-PBSA (200 mL)
- سیرم کے ساتھ گروتھ میڈیم (مثال کے طور پر، 10% DMEM/F12 فیٹل بووائن سیرم کے ساتھ)
- کلچر فلاسکس (5-10 فلاسکس فی جی ٹشو، ٹشو سیلولرٹی کے لحاظ سے مختلف ہوتے ہیں)
- پیٹری ڈشز (9 سینٹی میٹر، نان ٹشو کلچر گریڈ)
- پہلے سے وزنی شیشیاں، 50-mL سینٹری فیوج ٹیوبیں، یا یونیورسل کنٹینرز (2)
- ٹرانسپنریشن فلاسک: 250 ملی لیٹر ایرلن میسر فلاسک یا اسٹرر فلاسک
- مقناطیسی پیروکار، ایک ٹیسٹ ٹیوب میں آٹو کلیوڈ
- خمیدہ نورپس
- پائپس (پاسچر، 2 ملی لیٹر، 10 ملی لیٹر)
- جراثیم سے پاک:
- مقناطیسی محرک
- Haemocytometer یا سیل کاؤنٹر

2.6.3 پروٹوکول

1. ایک پیٹری ڈش میں ٹشو کو تازہ، جراثیم سے پاک DBSS میں منتقل کریں، اور کلا کریں۔
2. ناپنندیدہ ٹشو کو توڑ کر دوسری ڈش میں منتقل کریں۔

3. ٹشو کو تقریباً 3 ملی میٹر کیوبز میں کاٹ لیں۔
4. ٹشو کو پہلے سے وزنی شیشی یا ٹیوب میں منتقل کریں۔
5. ٹکڑوں کو ٹھیک ہونے دیں۔
6. DBSS میں دوبارہ معطل کر کے ٹشوں کو دھوئیں، تصفیہ کریں، اور سپرنٹنٹ کو ہٹا دیں۔ اس مرحلہ کو مزید دو بار دہرائیں۔
7. شیشی یا ٹیوب کو نکالیں اور دوبارہ وزن کریں۔
8. DBSS کے ساتھ فلتش کرتے ہوئے تمام ٹکڑوں کو ٹریپسنزیشن فلاسک میں منتقل کریں۔
9. زیادہ تر بقایا سیال کو ہٹا دیں اور 180 ملی لیٹر D-PBSA شامل کریں۔
10. 20 ملی لیٹر 2.5% ٹریپسن شامل کریں۔ اگر ضرورت ہو تو دیگر خامروں کو شامل کیا جاسکتا ہے۔
11. مقناطیسی پیر و کار شامل کریں اور فلاسک کو کیپ کریں۔
12. فلاسک کو انکیوبیٹر میں 37 ڈگری سینٹی گریڈ پر مقناطیسی اسٹرپر رکھیں۔
13. تقریباً 100 rpm پر 30 منٹ تک ہلائیں۔
14. ہر 30 منٹ میں الگ الگ سیل جمع کریں:



شکل 12.7۔ گرم ٹریپسن کی تفریق

- ٹکڑوں کو آباد ہونے دیں۔
 - سپرنٹنٹ کو ایک سینٹری فیوج ٹیوب میں ڈالیں اور برف پر رکھیں
 - فلاسک کے باقی ٹکڑوں میں تازہ ٹریپسن ڈالیں اور ہلاتے رہیں
 - سیرم کے ساتھ درمیانے درجے میں کٹے ہوئے خلیوں کو سینٹری فیوج کریں اور گولی کو دوبارہ بند کریں۔
15. مراحل 11-14 کو دہرائیں جب تک کہ مکمل تفریق نہ ہو جائے یا جب تک کہ مزید تفریق کا مشاہدہ نہ کیا جائے۔
 16. ٹھنڈے سیل معطلی کو جمع کریں اور ان کو پول کریں، سیلز کی گنتی کریں اور قابل عمل ہونے کی جانچ کریں۔

17. متفاوت سیل آبادیوں کی وجہ سے ہیپوسائٹومیٹر کے ساتھ الیکٹرانک سیل کی گنتی کی تصدیق کریں۔
 18. جراثیم سے پاک ملل یا چھلنی کے ذریعے چھان کر بڑی باقی چیزوں کو ہٹادیں۔
 19. سیل سسپنشن کو گروتھ میڈیم اور سیڈ فلاسکس میں مطلوبہ ارتکاز تک پتلا کریں۔
 20. باقاعدگی سے میڈیم تبدیل کریں اور ضائع کرنے سے پہلے قابل عمل خلیوں کے لیے سپر نیٹ چیک کریں۔
- یہ پروٹوکول گرم ٹریپسائزیشن کے دوران سیل کی قابل عملیت کو برقرار رکھتے ہوئے بانٹوں کی موثر تفریق کو یقینی بناتا ہے۔

2.6.4 کولڈ پری ایکسپوزر کے ساتھ ٹریپسائزیشن (Trypsinization with Cold Preexposure)

یہ تکنیک نسبتاً کم وقت میں بانٹوں کی بڑی مقدار کو موثر طریقے سے الگ کرنے کے لیے خاص طور پر قابل قدر ہے، خاص طور پر پورے ماؤس یا چوزے کے جنین کے لیے۔ تاہم، یہ ریشے دار کنیکٹیو ٹشو کی موجودگی کی وجہ سے بالغ بانٹوں کے ساتھ اتنا موثر نہیں ہو سکتا، اور میکا کی تحریک ممکنہ طور پر حساس خلیوں کی اقسام جیسے اسپیتھیملیم کو نقصان پہنچا سکتی ہے۔ اگر سنٹروفیو گریشن اور دوبارہ معطلی کے بعد دوبارہ جمع ہوتا ہے تو DNase (10–20 µg/mL) کے ساتھ 10–20 منٹ تک علاج کرنے سے مدد مل سکتی ہے۔

پروٹوکول 12.6۔ کولڈ ٹریپسین میں بانٹوں کا انحراف

خاکہ

ٹشو کو کاٹا جاتا ہے اور ٹریپسین میں 4°C پر 6–18 گھنٹے تک بھگو دیا جاتا ہے تاکہ کم سے کم ٹریپنگ سرگرمی کے ساتھ انزائم کی رسائی ہو سکے۔ ٹریپسین کو ہٹانے کے بعد، خلیات کو منتشر کرنے کے لیے ٹشو کو گرم میڈیم میں انکیوبیٹ کیا جاتا ہے۔

مواد

جراثیم سے پاک یا aseptically تیار:

ٹشو (1–5 گرام)

• گروتھ میڈیم (جیسے، DMEM/F12 10% FBS کے ساتھ)

• DBSS

• سیرم فری RPMI 1640 یا MEM/Stirer Salts (S-MEM) میں 0.25% خام ٹریپسین

• پیپٹری ڈشز (9 سینٹی میٹر، نان ٹشو کلچر گریڈ)

فورپس (سیدھے اور مڑے ہوئے)

• سکلیپلس

• ایرلن میسر فلاسک (25 یا 50 ملی لیٹر، سکرو کیپڈ، پہلے سے وزنی)

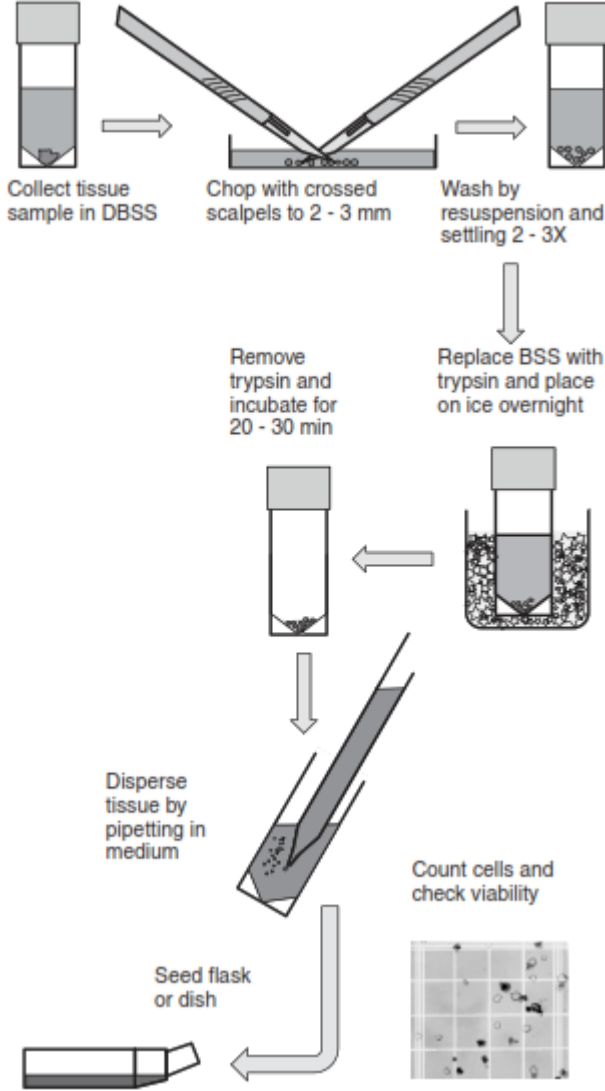
• کلچر فلاسکس (25 یا 275 cm)

• پائپٹس (پاسچر، 2 ملی لیٹر، 10 ملی لیٹر)

جراثیم سے پاک:

• برف کا غسل

پروٹوکول



1. ٹشو کو تازہ، جراثیم سے پاک DBSS میں 9- سینٹی میٹر پیٹری

ڈش میں منتقل کریں، اور کلدا کریں۔

2. ناپسندیدہ ٹشو کو کاٹ کر دوسری ڈش میں منتقل کریں۔

3. ٹشو کو تقریباً 3- ملی میٹر کیوبز میں کر اس شدہ اسکیلپل کے

ساتھ کاٹیں۔

4. ٹشو کو پہلے سے وزنی جراثیم سے پاک شیشی میں منتقل کریں۔

5. ٹکڑوں کو ٹھیک ہونے دیں۔

6. DBSS میں دوبارہ معطل کر کے ٹشو کو دھوئیں، تصفیہ

کریں، اور سپرنٹنٹ کو ہٹا دیں۔ اس مرحلہ کو مزید دو بار

دہرائیں۔

7. احتیاط سے بقیہ سیال نکالیں اور شیشی کا دوبارہ وزن کریں۔

8. RPMI 1640 یا S-MEM میں 0.25% ٹرپسن کے

10 mL/گ ٹشو کو 4°C پر شامل کریں۔

9. مکسچر کو 4°C پر 6-18 گھنٹے کے لیے رکھیں

10. ٹرپسن کو ہٹا دیں اور ضائع کر دیں، ٹشو کو بقایا ٹرپسن کے

ساتھ چھوڑ دیں۔ اگر ضرورت ہو تو دوسرے

انزائمز شامل کیے جاسکتے ہیں۔

11. ٹیوب کو 37 ڈگری سینٹی گریڈ پر 20-30 منٹ تک سینکیں۔

شکل 12.9- کو لڈ ٹرپسن ڈسگریگیشن۔ پلیٹ 2 اے، ڈی، ای اور پلیٹ 3 بھی دیکھیں

12. گرم میڈیم (ہر 100 ملی گرام اصلی ٹشو کے لیے تقریباً 1 ملی لیٹر) شامل کریں اور ٹشو مکمل طور پر منتشر ہونے تک آہستہ سے پیسٹ کریں۔

13. اگر غیر منتشر ٹشو کو ہٹانے کے لیے ضروری ہو تو جراثیم سے پاک ململ یا جالی کے ذریعے سیل کی معطلی کو فلٹر کریں۔

14. سیل کی حراستی اور قابل عملیت کا تعین کریں۔

15. سیل سپینشن کو گروتھ میڈیم اور سیڈ فلاسکس میں مطلوبہ ارتکاز تک پتلا کریں۔

16. باقاعدہ وقفوں پر میڈیم کو تبدیل کریں اور اسے ضائع کرنے سے پہلے قابل عمل سیلز کے لیے سپر نیٹ چیک کریں۔

گرم طریقہ کے مقابلے میں ٹھنڈا ٹریپس طریقہ عام طور پر 24 گھنٹے ثقافت کے بعد بہتر بقا کے ساتھ زیادہ قابل عمل خلیات پیدا کرتا ہے۔ مزید برآں، یہ زیادہ مختلف سیل اقسام کو محفوظ رکھتا ہے اور آسان ہے کیونکہ اسے ہلچل یا سینٹر فیو گریشن کی ضرورت نہیں ہے، اور 4°C پر راتوں رات انکیوبیشن عمل کو آسان بناتا ہے۔

2.6.5 دیگر انزیمینٹک طریقہ کار

ٹریپس کا استعمال کرتے ہوئے مختلف قسم کے خلیوں کے لیے نقصان دہ ہو سکتا ہے، جیسے اپکلا خلیات، یا بہت ریشے دار ٹشوز کے لیے غیر موثر۔ لہذا، متبادل خامروں کی تلاش کی گئی ہے۔ کولجینیس، مربوط ٹشو اور پٹھوں میں ایکسٹرا سیلولر میٹرکس کی کولجین سے بھرپور نوعیت کو دیکھتے ہوئے، ایک قابل عمل آپشن کے طور پر ابھرا ہے۔ دیگر بیکٹیریل پروٹیز جیسے pronase اور dispase کو بھی کامیابی کی مختلف ڈگریوں کے ساتھ استعمال کیا گیا ہے، ساتھ ہی کاربوہائیڈریٹس جیسے hyaluronidase اور neuraminidase کو نشانہ بنانے والے خامروں کے ساتھ۔ مختلف انزائمز کی دستیابی کے باوجود، اگر ٹریپس، کولجینیز، اور دیگر آپشنز ناکام ہو جاتے ہیں، تو مختلف انزائمز کے امتزاج کی اسکریننگ ہی واحد ذریعہ رہ جاتی ہے۔

2.6.6 کولجینیس

یہ تکنیک ٹشوز کی ایک وسیع رینج کے لیے سیدھی اور موثر ہے، بشمول جنین، بالغ، نارمل، اور مہلک۔ یہ خاص طور پر فائدہ مند ہے جب ضرورت سے زیادہ ریشے دار یا حساس بافتوں سے نمٹا جائے جہاں ٹریپس کا استعمال مشکل ہو سکتا ہے۔ خام کولجینیس کو عام طور پر استعمال کیا جاتا ہے اور اس کا کچھ عمل دیگر غیر مخصوص پروٹیز کے ساتھ آلودگی سے حاصل ہو سکتا ہے۔ اگرچہ غیر مخصوص پروٹولونک سرگرمی کو کم کرنے کے لیے مزید پیوریفائیڈ گریڈز دستیاب ہیں، لیکن وہ خام کولجینیس کی طرح موثر نہیں ہو سکتے۔

خاکہ

باریک کٹے ہوئے ٹشو کو کولجینیز پر مشتمل مکمل میڈیم میں انکیوبیت کیا جاتا ہے جب تک کہ وہ الگ نہ ہو جائیں۔ اس

کے بعد کو لیجینیز کو سینٹر فیو گریشن کے ذریعے ہٹا دیا جاتا ہے، اور خلیات کو ثقافت کے لیے اعلیٰ ارتکاز پر بیج دیا جاتا ہے۔

مواد

جراثیم سے پاک:

• کو لیجینیز (2000 یونٹس / ایم ایل)، ورتھنگٹن سی ایل ایس یا سگما 1 اے

• کلچر میڈیم (جیسے، DMEM/F12 10% FBS کے ساتھ)

DBSS•

• پائمیٹ (1 ملی لیٹر، 10 ملی لیٹر)

• پیٹری ڈشز (9 سینٹی میٹر، نان ٹشو کلچر گریڈ)

• کلچر فلاسکس (25 cm²)

• سینٹری فیو جیو بیس یا یونیورسل کنٹینرز (15-50 ملی لیٹر، ٹشو کی مقدار پر منحصر ہے)

• اسکلیپلس

جراثیم سے پاک:

• سینٹر فیو جیو

پروٹوکول

1. ٹشو کو تازہ، جراثیم سے پاک DBSS میں منتقل کریں اور کللا کریں۔

2. ناپسندیدہ بافتوں (مثلاً، چربی یا نیکیروٹک مواد) کو کاٹ دیں۔

3. ٹشو کو تقریباً 1 ملی میٹر کیوبز میں باریک کاٹ لیں۔

4. ٹشو کو جراثیم سے پاک سینٹری فیو جیو بیس یا کنٹینرز میں منتقل کریں۔

5. ٹشو کے ٹکڑوں کو ٹھیک ہونے دیں۔

6. DBSS میں دوبارہ معطل کر کے ٹشو کو دھوئیں، تصفیہ کریں، اور سپرنٹنٹ کو ہٹا دیں۔ مزید دو بار دہرائیں۔

7. مناسب کثافت پر بیج کے ٹشوز کو کلچر فلاسکس میں ڈالیں۔

8. فلاسکس میں سیرم کے ساتھ گروتھ میڈیم شامل کریں۔

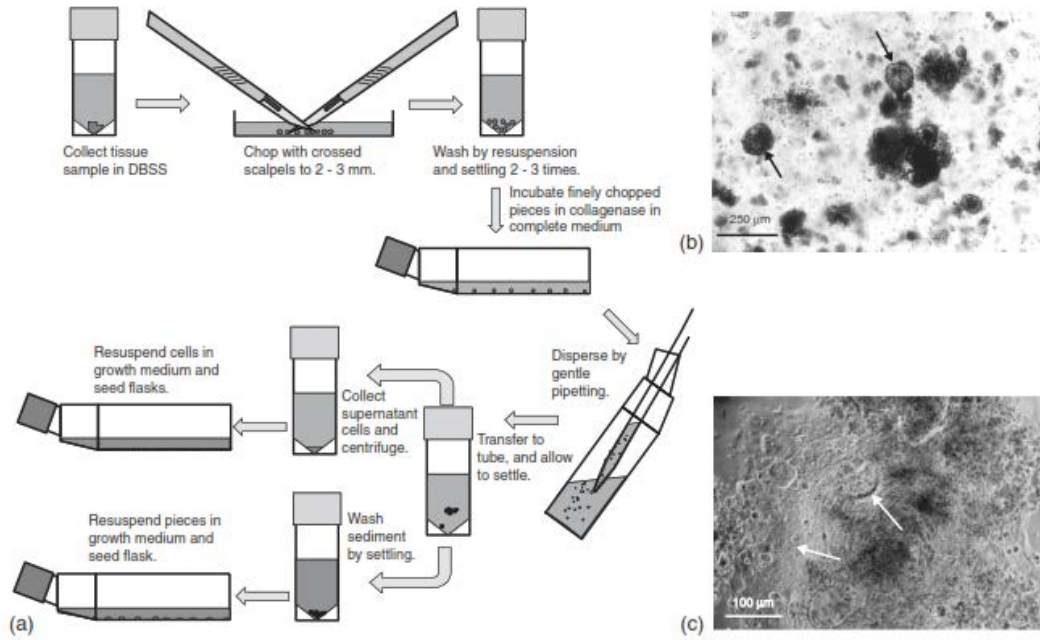
9. مطلوبہ ارتکاز حاصل کرنے کے لیے خام کو لیجینیز شامل کریں۔

10. بغیر کسی حرکت کے 37 ڈگری سینٹی گریڈ پر 4-48 گھنٹے تک انکیوبیٹ کریں۔

11. مؤثر تفریق کے لیے چیک کریں۔
12. اگر ضروری ہو تو اپکا خلیوں کے چھوٹے کلچرز کو الگ کریں۔
13. سینٹری فیوج سیل سپینشن اور ڈسکارڈ سپرنٹ
14. چھروں کو درمیانے درجے اور بیجوں کو فلاسکس میں دوبارہ استعمال کریں اور یکجا کریں۔
15. 48 گھنٹوں کے بعد میڈیم کو تبدیل کریں۔

کولیمینیز کا استعمال کرتے ہوئے تفریق انسانی ٹیومر، ماؤس کڈنی، دماغ، جگر، پھیپھڑوں، اور اپکا ٹشوز سمیت ٹشوز کی ایک وسیع صف کے لیے مؤثر ثابت ہوئی ہے۔ یہ ایک نرم عمل ہے جس کے لیے مینیکل ایجی ٹیشن یا خصوصی آلات کی ضرورت نہیں ہے۔ تاہم، یہ بڑی بافتوں کی مقدار کے ساتھ تکلیف دہ ہو سکتا ہے اور فائبر و بلاسٹک بڑھوتری کو تیز کر سکتا ہے، جس سے سلیکیٹو کلچر یا سیل علیحدگی کی تکنیکوں کی ضرورت ہوتی ہے۔ کولیمینیز کی تقسیم کے ذریعہ تیار کردہ اپکا خلیوں کے جھر مٹ کو مزید ثقافت یا تجزیہ کے لئے منتخب طور پر منتقل کیا جاسکتا ہے۔

CHAPTER 12 PRIMARY CULTURE 193



تصویر 2.12۔ کولیمینیز کے ذریعہ ٹشوز کی تفریق۔ (a) ڈسکشن کا اسکیمٹک ڈایا گرام جس کے بعد کولیمینیز میں تفریق۔ (b) کروڈ کولیمینیز (ور تھنگنگن سی ایل ایس گریڈ) میں 48 گھنٹے کی علیحدگی کے بعد انسانی کالونی کار سنوما سے سیل کلچرز؛ کولیمینیز کو ہٹانے سے پہلے۔ (c) جیسا کہ (b)، لیکن کولیمینیز کو ہٹانے کے بعد، پائپنگ کے ذریعے مزید تفریق، اور کلچر 48 گھنٹے

تک۔ واضح طور پر بیان کردہ گول گچھے (سیاہ تیر) (b) میں ایتھیلیم نما چادریں (سفید تیر) (c) میں بناتے ہیں، کچھ اب بھی سہ جہتی، کچھ ایک چادر کی طرح پھیلتے ہیں، اور زیادہ بے ترتیب شکل والے جھرمٹ فائبر و بلاسٹس پیدا کرتے ہیں۔ (پلیٹ b2 بھی دیکھیں)

2.7 مکینیکل تفریق (Mechanical Degradation)

اگرچہ انزیمائٹک ہاضمہ ممکنہ طور پر زیادہ نمائندہ ثقافت پیش کرتا ہے، پروٹولائٹک نقصان کے خدشات نے بہت سے محققین کو مکینیکل تفریق کے طریقوں کا انتخاب کرنے پر مجبور کیا ہے۔ مکینیکوں میں پھیلے ہوئے خلیات کو جمع کرنے کے لیے ٹشو کو احتیاط سے کاٹنا، گھٹی ہوئی جالی کے سائز کی چھلنی کے ذریعے ٹشو کو دبانا، یا ٹشو کے ٹکڑوں کو سرخ یا پائپنگ کے ذریعے بار بار زبردستی کرنا شامل ہے۔ یہ طریقے سیل معطلی کو زیادہ تیزی سے حاصل کرتے ہیں لیکن میکائی نقصان کا سبب بن سکتے ہیں۔ سکرپنگ اور چھلنی ہلکے طریقے ہیں، جبکہ پائپنگ اور سرنگنگ قینچ کے دباؤ کو جنم دے سکتی ہے۔ پروٹوکول 12.9 چھلنی کا استعمال کرتے ہوئے ایک اعتدال پسند کامیاب مکینیکل تفریق کا طریقہ بتاتا ہے، خاص طور پر دماغ جیسے نرم بافتوں کے لیے موزوں۔

پروٹوکول 12.9 چھلنی کے ذریعے مکینیکل انحراف

خاکہ

کلچر میڈیم میں ٹشو کو بتدریج چھوٹے میٹس سائز کے ساتھ چھلنی کی ایک سیریز سے گزرا جاتا ہے جب تک کہ واحد خلیات اور چھوٹے مجموعوں کی معطلی حاصل نہ ہو جائے۔ اس کے بعد معطلی کو براہ راست پتلا اور کلچر کیا جاتا ہے۔

مواد

جراثیم سے پاک:

• گروتھ میڈیم (جیسے، DMEM/F12 10% FBS کے ساتھ)

• فورپس

• چھلنی کی چھلنی یا درجہ بندی کی سیریز: (100 μm نیچے 20 μm) یا فائلکن "سیل سٹریز"

• پیٹری ڈشز (9 سینٹی میٹر)

• اسکلیپلس

ڈسپوزیبل پلاسٹک سرخ (2 ملی لیٹر یا 5 ملی لیٹر)

• ثقافتی فلاسکس

پروٹوکول

1. ٹشو کو ٹکڑوں میں کاٹ لیں (3-5 ملی میٹر بھر میں) ابتدائی دھونے اور جدا کرنے کے بعد۔
2. ایک وقت میں ٹشو کے چند ٹکڑوں کو پیٹری ڈش یا سینٹری فیوج ٹیوب میں 1 ملی میٹر میٹھ کے ساتھ چھلنی میں رکھیں۔
3. ڈسپوز ایبل پلاسٹک کی سرنج کے ساتھ ہلکے دباؤ کا استعمال کرتے ہوئے ٹشو کو میٹھ کے ذریعے درمیانے درجے پر مجبور کریں۔

خلیات کو چھلنی کے ذریعے زیادہ درمیانے درجے سے دھوئے۔

4. پیٹھ نے ٹشو کو جزوی طور پر ایک باریک میٹھ چھلنی میں الگ کیا (جیسے،

100- μm میٹھ) اور مرحلہ 3 کو دہرائیں۔

5. اس مرحلے پر معطلی اور کلچر کو پتلا کریں یا سنگل سیل سپنشن کے لیے

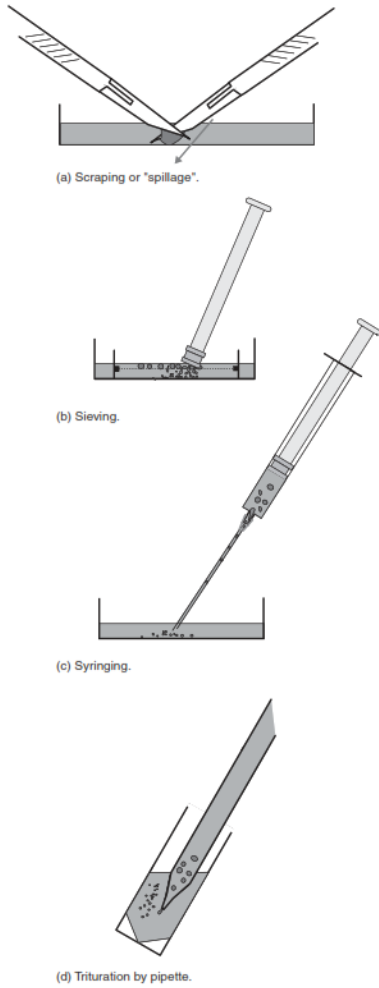
20- μm میٹھ کے ذریعے مزید چھلنی کریں۔ عام طور پر، زیادہ بازی

قیچ کے بڑھنے والے تناؤ کی وجہ سے کم عملداری کا باعث بنتی ہے۔

6. سیڈ کلچر فلاسکس سیل کی معطلی کو درمیانے درجے میں گھٹا کر سیل کے

مختلف ارتکاز پر کرتا ہے۔

یہ طریقہ خاص طور پر نرم بافتوں جیسے تلی، برائن جگر، دماغ اور بعض ٹیومر کے لیے موزوں ہے۔ اگرچہ نتیجے میں معطلی کی قابل عملیت انزیمیک ہضم سے کم ہو سکتی ہے، یہ عمل بہت تیز ہے۔ تاہم، تقابلی پیداوار حاصل کرنے کے لیے اسے نمایاں طور پر زیادہ بافتوں کی ضرورت پڑ سکتی ہے، جب ٹشو کی دستیابی محدود نہ ہو تو یہ کم کارگر ہو جاتی ہے۔



- شکل 2.13- مینیکل تفریق۔ (a) کھرچنا یا "سپیج"۔ کاٹنے کا عمل، یا کٹی ہوئی سطح کارگڑنا، خلیات کو جاری کرتا ہے۔
- (b) چھلنی سرنج پسٹن کے ساتھ چھلنی کے ذریعے زبردستی ٹشو۔ (فالکن سیل سٹریز استعمال کیا جاسکتا ہے؛ تصویر 12.8 دیکھیں۔)
- (c) سرنگنگ۔ وسیع بور سوئی یا کینولا کے ذریعے سرنج میں ٹشو کھینچنا اور اظہار کرنا۔ (d) پائپٹ کے ذریعے تراشنا۔ پیپٹنگ ٹشو کے ٹکڑے چوڑے بور پائپٹ کے ذریعے اوپر اور نیچے ہوتے ہیں۔

2.8 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس اکائی کے مطالعے بعد طلباء آسانی سے بیان کر سکتے ہیں:

- ❖ پرائمری سیل کلچر کا تصور کو بیان کر سکیں
- ❖ بنیادی ثقافت کے لیے جانوروں کے خلیے کو الگ کرنے کی تکنیک (مکینیکل؛ انزیمیٹک اختلاف)

2.9 کلیدی الفاظ (Keywords)

کھولت	Senescence	حیاتیاتی عمل جس کی خصوصیت سیل کے فنکشن اور پھیلاؤ کی صلاحیت میں ترقی پذیر کمی سے ہوتی ہے کیونکہ خلیات عمر بڑھتے ہیں۔ پرائمری سیل کلچر میں، سنسنی کلچر میں خلیوں کی عمر کو محدود کرتی ہے، جس سے ان کی عملداری اور وقت کے ساتھ ساتھ پھیلنے کی صلاحیت متاثر ہوتی ہے۔
متفاوت	Heterogeneity	معنی: خلیات، بافتوں، یا حیاتیات کی آبادی کے اندر مشاہدہ کردہ تنوع یا تغیر سے مراد ہے۔ بنیادی سیل کلچر کے تناظر میں، heterogeneity ثقافت کے اندر مختلف سیل اقسام یا فینوٹائپس کی موجودگی کو بیان کرتی ہے، جو vivo میں پائے جانے والے ٹشوز کی پیچیدگی کو ظاہر کرتی ہے۔
سیل آسنجین مالیکیولز (CAMs):	Cell Adhesion Molecules (CAMs)	مطلب: سیل سیل اور سیل میٹرکس کے تعاملات میں شامل گلائکوپروٹینز، خلیات کو ایک دوسرے اور ایکسٹرا سیلولر میٹرکس کے ساتھ چپکنے میں سہولت فراہم کرتے ہیں۔ مثالوں میں integrins، cadherins، اور Selectins شامل ہیں، جو ٹشو کی سالمیت کو برقرار رکھنے اور سیلولر رویے کو منظم کرنے میں اہم کردار ادا کرتے ہیں۔

2.10 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

2.10.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. پرائمری سیل کلچر میں خلیات کی تنہائی اور کاشت شامل ہوتی ہے جو براہ راست کسی جاندار کے ٹشوز یا اعضاء سے حاصل کیے جاتے ہیں، عام طور پر _____ کی ترتیب میں۔

2. الگ تھلگ خلیات کو ثقافتی برتنوں میں سیڈ کیا جاتا ہے اور انہیں مناسب _____ فراہم کیا جاتا ہے، جس سے ان کے پھیلاؤ اور دیکھ بھال کے لیے موزوں ماحول پیدا ہوتا ہے۔
3. پرائمری سیل کلچر سیل بائیولوجی، فزیالوجی اور پیٹھالوجی کے مطالعہ کے لیے انمول ماڈل کے طور پر کام کرتے ہیں، جس سے محققین کو سیل سیل کے تعاملات، سگنل کی نقل و حمل کے راستے، اور ایک کنٹرول شدہ _____ کی ترتیب میں بیرونی محرکات کے رد عمل کی چھان بین کرنے کی اجازت ملتی ہے۔
4. پرائمری سیل کلچر کے بنیادی فوائد میں سے ایک یہ ہے کہ _____ پائے جانے والے ٹشو کی متفاوت اور پیچیدگی کو دوبارہ بیان کرنے کی ان کی صلاحیت ہے۔
5. بنیادی خلیات کی محدود عمر، جو وقت کے ساتھ سنسنی یا تفریق سے گزرتی ہے، طویل مدتی تجربات پر پابندیاں عائد کرتی ہے اور تازہ _____ کی مسلسل سوسنگ کی ضرورت ہوتی ہے۔
6. انزیمٹک ڈسگریگیشن ایک تکنیک ہے جو بنیادی سیل کلچر میں استعمال ہوتی ہے، جس میں انزائمز جیسے ٹریپسن، کو لیگنٹس، اور _____ کا استعمال شامل ہوتا ہے تاکہ انفرادی خلیوں کو بافتوں کے ٹکڑوں سے آزاد کیا جاسکے۔
7. امبریونک ٹشو زیادہ آسانی سے منتشر ہوتے ہیں اور نوزائیدہ یا _____ ٹشو کے مقابلے زیادہ پھیلنے والے خلیات پیدا کرتے ہیں۔
8. فعال ٹریپسن کی نمائش کو کم سے کم کرتے ہوئے سیل کا موثر انحطاط سیل کی زیادہ سے زیادہ عملداری کو برقرار رکھنے کے لیے بہت ضروری ہے، جو _____ ٹریپسن کے استعمال سے حاصل کیا جاسکتا ہے۔
9. بافتوں کو الگ کرنے کے دیگر انزیمٹک طریقہ کار میں کاربوہائیڈریٹ جیسے _____ اور نیورامینائیڈس کو نشانہ بنانے والے خامروں کا استعمال شامل ہے۔
10. مینیکل تفریق کے طریقوں میں پھیلے ہوئے خلیات کو جمع کرنے کے لیے بافتوں کو احتیاط سے کاٹنا، گھٹے ہوئے میس سائز کی چھانی کے ذریعے ٹشو کو دبانا، یا ٹشو کے ٹکڑوں کو سرنج یا پائپنگ کے ذریعے بار بار دبانا، جو مینیکل _____ کا سبب بن سکتا ہے۔

2.10.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. بنیادی سیل کلچر کا بنیادی اصول کیا ہے؟
2. بائیومیڈیکل ریسرچ اور کلینیکل پریکٹس میں پرائمری سیل کلچر کے کچھ استعمال کیا ہیں؟
3. بنیادی سیل ثقافتیں کون سے چیلنجز پیش کرتی ہیں، اور محققین ان سے کیسے نمٹ سکتے ہیں؟

4. پرائمری سیل کلچر میں استعمال ہونے والی بنیادی ایکسپلانٹ تکنیک کی وضاحت کریں۔
5. پرائمری سیل کلچر میں بافتوں کو الگ کرنے کے لیے انزیمیٹک طریقہ کار کا انتخاب کرتے وقت کچھ غور کیا جاتا ہے؟

2.10.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. پرائمری سیل کلچر کے عمل کی وضاحت کریں، بشمول ٹشو نکالنے سے لے کر سیل سیڈنگ تک کے اقدامات،
2. بنیادی سیل ثقافتوں سے وابستہ کچھ چیلنجز کیا ہیں؟
3. پرائمری ایکسپلانٹ تکنیک اور پرائمری سیل کلچر میں استعمال ہونے والے انزیمیٹک ڈسگریگیشن طریقہ کار کا موازنہ اور اس کے برعکس
4. پرائمری سیل کلچر کے دوران ٹشووں کی تفریق میں گرم ٹرپسنائزیشن کی اہمیت کی وضاحت کریں۔

2.11 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Primary Cell Culture	پرائمری سیل کلچر	پرائمری سیل کلچر	کسی جاندار کے بافتوں یا اعضاء سے براہ راست حاصل کردہ خلیوں کو الگ تھلک کرنے اور ان کی افزائش کا عمل۔ اس میں مناسب نمو میڈیا اور حالات فراہم کر کے سیل کے پھیلاؤ اور دیکھ بھال کے لیے سازگار مائیکرو ماحولیات بنانا شامل ہے۔۔
Enzymatic Disaggregation	انزیمیٹک تفریق	-	مطلب: ایک تکنیک جو پرائمری سیل کلچر میں استعمال ہوتی ہے تاکہ انزیمیٹک ہاضمہ کا استعمال کرتے ہوئے انفرادی خلیوں میں ٹشو کو الگ کیا جاسکے۔ انزائمز جیسے ٹرپسن، کو لیگنسیس، اور ہائیلورونیدیس کو عام طور پر ایکسٹرا سیلولر میٹرکس کو توڑنے اور سیلز کو کلچر کے لیے چھوڑنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

Darwin finches ڈارون کے فنچز ڈارون کے فنچز چارلس ڈارون نے چھوٹے چڑیا نما کالے پرندوں کے ایک گروپ کا مشاہدہ کیا جن کی مضبوط، چھوٹی چونچیں ہیں جنہیں آج ڈارون کے فنچز کے نام سے جانا جاتا ہے۔

2.12 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Freshney, R. I. (2015). Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications (7th ed.). Wiley-Blackwell.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell (4th ed.). Garland Science.
3. Masters, J. R. W. (2000). Animal cell culture: A practical approach (3rd ed.). Oxford University Press.
4. Hay, R. J., & Eagle, H. (1977). Basic techniques for human cell culture. In R. I. Freshney (Ed.), Culture of animal cells: A manual of basic technique (pp. 37–58). Alan R. Liss.
5. Doyle, A., & Griffiths, J. B. (1998). Cell and tissue culture for medical research. John Wiley & Sons.

اکائی 3: سیل اور ٹشو کلچر: بنیادی ضروریات اور لیبارٹری مینجمنٹ

(Cell and Tissue Culture: Basic Requirements and Laboratory Management)

اکائی کے اجزا

3.0	تمہید (Introduction)
3.1	مقاصد (Objectives)
3.2	بنیادی ضرورت اور لیبارٹری کا انتظام (Basic Requirement and Laboratory Management)
3.2.1	سیل کلچر لیبارٹری میں حفاظتی اقدامات (Safety Measures in a Cell Culture Laboratory)
3.2.2	سیل کلچر لیبارٹری میں آلات اور سامان (Equipment and Supplies in a Cell Culture Laboratory)
3.2.3	ایسپٹک ورک ایریا اور سیل کلچر ہڈ (Aseptic Work Area and Cell Culture Hood)
3.2.4	انکیوبیٹر (Incubators)
3.3	مناسب سیل لائن کا انتخاب (Selecting the Appropriate Cell Lines)
3.4	سیل کلچر میڈیا: کمپوزیشن اور تیاری (Cell Culture Media: Composition and Prepration)
3.4.1	نیچرل میڈیا (Natural Media)
3.4.2	مصنوعی میڈیا (Artificail Media)
3.4.3	مصنوعی میڈیا کی تیاری
3.4.4	قدرتی اور مصنوعی میڈیا کی مثالیں
3.5	جراثیم ربائی کی تکنیک (Sterilization Techniques)
3.6	کرایوپریزرویشن (Cryopreservation)

اكتسابی نتائج (Learning Outcomes)	3.7
کلیدی الفاظ (Keywords)	3.8
نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)	3.9
معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)	3.9.1
مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)	3.9.2
طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)	3.9.3
فرہنگ (Glossary)	3.10
مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)	3.11

3.0 تمہید (Introduction)

حیاتیاتی تحقیق اور بائیو ٹیکنالوجی کے دائرے میں، سیل اور ٹشو کلچر سیلولر رویے، بیماری کے طریقہ کار، منشیات کی نشوونما، اور ٹشو انجینئرنگ کے مطالعہ کے لیے ناگزیر ٹولز کے طور پر کام کرتے ہیں۔ یہ باب سیل اور ٹشو کلچر کے بنیادی پہلوؤں پر روشنی ڈالتا ہے، جس میں بنیادی ضروریات، لیبارٹری مینجمنٹ، کلچر میڈیا کی تشکیل، جراثیم ربائی کی تکنیک، اور کرائوپریزرویشن کے طریقہ کار شامل ہیں۔

سیل اور ٹشو کلچر کے لیے سازگار ماحول قائم کرنے کے لیے مختلف عوامل پر باریک بینی سے توجہ دینے کی ضرورت ہے۔ کلیدی عناصر میں بانجھ پن کو برقرار رکھنا، ماحولیاتی پیرامیٹرز جیسے درجہ حرارت، نمی اور پی ایچ کو کنٹرول کرنا، نیز حفاظتی پروٹوکولز کی پابندی کرنا شامل ہیں۔ لمینیز فلو ہڈز، CO_2 انکیوبیٹرز، مائیکروسکوپس، اور جراثیم سے پاک پیئرڈ لنگ کے آلات سے لیس ایک اچھی طرح سے لیس لیبارٹری سیل کلچر کے کامیاب تجربات کی ریڈھ کی ہڈی کی حیثیت رکھتی ہے۔

لیبارٹری کے انتظام میں آلودگی کو روکنے کے لیے پروٹوکول پر سختی سے عمل کرنا شامل ہے، جو تجرباتی سالمیت پر سمجھوتہ کر سکتا ہے۔ آلودگی سے پاک ماحول کو برقرار رکھنے کے لیے لیبارٹری کی سطحوں کی باقاعدہ صفائی اور جراثیم کشی، حیاتیاتی خطرناک فضلہ کو مناسب طریقے سے ٹھکانے لگانے، اور سیپٹک تکنیکوں کا نفاذ ضروری ہے۔

کلچر میڈیا ٹرو میں خلیوں اور بافتوں کی نشوونما، پھیلاؤ اور دیکھ بھال کے لیے ضروری غذائیت سے بھرپور ماحول کے طور پر کام کرتا ہے۔ ان ذرائع ابلاغ کو وسیع پیمانے پر قدرتی اور مصنوعی شکلوں میں تقسیم کیا جاسکتا ہے۔ قدرتی میڈیا، جیسے سیرم پر مشتمل میڈیا جیسے فیٹل بوائسن سیرم (FBS)، جسمانی ماحول کی زیادہ قریب سے نقل کرتا ہے اور سیل کی اقسام کی وسیع رینج کے لیے موزوں ہے۔ تاہم، بیج کی تغیر پذیری اور اخلاقی تحفظات سے متعلق خدشات نے کیمیاوی طور پر متعین مصنوعی میڈیا کی ترقی کا باعث بنا ہے۔

کلچر میڈیا کی ترکیب میں عام طور پر ضروری غذائی اجزاء شامل ہوتے ہیں جیسے امینو ایسڈ، وٹامنز، معدنیات، کاربوہائیڈریٹس اور نشوونما کے عوامل۔ خلیوں کی نشوونما اور کام کے لیے بہترین حالات فراہم کرنے کے لیے قطعی تشکیل اور جراثیم سے پاک تیاری بہت ضروری ہے۔ میڈیا کی تیاری میں جراثیم سے پاک حالات میں اجزاء کو درست طریقے سے ماپنا اور ملانا شامل ہے، اس کے بعد مائکرو بیل آلودگیوں کو ختم کرنے کے لیے فلٹریشن اور جراثیم کشی کی تکنیکیں شامل ہیں۔

کلچر میڈیا، ری ایجنٹس، اور آلات کی پاکیزگی کو برقرار رکھنے کے لیے جراثیم ربائی کی تکنیکیں ناگزیر ہیں۔ عام طریقوں میں آٹو کلیونگ، فلٹریشن، اور کیمیائی جراثیم کشی شامل ہیں۔ آٹو کلیونگ، جو ہائی پریشر بھاپ کا استعمال کرتی ہے، شیشے کے برتن، میڈیا، اور گرمی سے بچنے والے آلات کو جراثیم سے پاک کرنے کے لیے موثر ہے۔ تاکنا کے سائز کی جھلیوں کے ذریعے فلٹریشن مائع محلول سے بیکیٹیریا اور فنگس کو ان کی ساخت میں رد و بدل کیے بغیر ہٹا دیتی ہے، جس سے یہ گرمی سے حساس مواد کے لیے موزوں ہو جاتا ہے۔ کیمیائی جراثیم کشی میں جراثیم کش ادویات جیسے اینتھنول یا ہلچ کا استعمال سطحوں اور آلات کو جراثیم سے پاک کرنے کے لیے شامل ہے۔

Cryopreservation انتہائی کم درجہ حرارت پر خلیات اور بافتوں کو طویل مدتی ذخیرہ کرنے کے قابل بناتا ہے، عام طور پر مائع نائٹروجن (-196°C) میں، اس طرح مستقبل میں استعمال کے لیے ان کی قابل عملیت اور فعالیت کو محفوظ رکھتا ہے۔ کرایو پروٹیکٹیو ایجنٹس جیسے ڈائمتھائل سلفو کسائیڈ (DMSO) برف کے کرسٹل کی تشکیل اور سیلولر کو جمنے کے عمل کے دوران نقصان کو روکنے کے لیے استعمال کیے جاتے ہیں۔ مناسب cryopreservation پروٹوکول خلیات کی قابل عملیت اور جینیاتی استحکام کو یقینی بناتے ہیں، ان کی بحالی اور ضرورت پڑنے پر بعد میں تجربات کی سہولت فراہم کرتے ہیں۔

خلاصہ یہ کہ سیل اور ٹشو کلچر کے کامیاب تجربات کرنے کے لیے بنیادی ضروریات، لیبارٹری مینجمنٹ، کلچر میڈیا فارمولیشن، جراثیم کشی کی تکنیک، اور کرایو پریزرویشن طریقہ کار میں مہارت حاصل کرنا ضروری ہے۔ یہ بنیادی اصول متنوع شعبوں کی ترقی کو بنیاد بناتے ہیں جن میں بنیادی تحقیق سے لے کر دوبارہ پیدا ہونے والی ادویات اور فارماسیوٹیکل کی ترقی تک شامل ہیں۔

3.1 مقاصد (Objectives)

اساکنی کو مکمل کرنے کے بعد، طلباء اس قابل ہو جائیں گے کہ:

- ❖ سیل اور ٹشو کلچر کے بنیادی اصولوں اور بنیادی ضروریات کو سمجھیں،
- ❖ سیل کلچر کے کامیاب تجربات کے لیے موزوں لیبارٹری کے لیے درکار ضروری آلات اور سہولیات کی نشاندہی کریں،
- ❖ آلودگی کو روکنے اور تجرباتی سالمیت کو یقینی بنانے کے لیے لیبارٹری کے انتظام کے طریقوں کو لاگو کریں، بشمول باقاعدگی سے صفائی، جراثیم کشی، اور حیاتیاتی خطرناک فضلہ کو مناسب طریقے سے ٹھکانے لگانا۔
- ❖ قدرتی اور مصنوعی دونوں طرح کے کلچر میڈیا کی تشکیل اور تیاری کو سمجھیں۔

- ❖ کلچر میڈیا کے لیے جراثیم سے پاک تیاری کی تکنیکوں میں مہارت کا مظاہرہ کریں، بشمول درست پیمائش، جراثیم سے پاک حالات میں اختلاط، اور مائکرو بیل آلودگیوں کو ختم کرنے کے لیے فلٹریشن / جراثیم ربائی کے طریقے۔
- ❖ جراثیم کشی کی مختلف تکنیکوں کا جائزہ لیں، جیسے آٹو کلیوٹنگ، فلٹریشن، اور کیمیائی جراثیم کشی، اور کلچر میڈیا، ری ایجنٹس، اور آلات کی پاکیزگی کو برقرار رکھنے کے لیے انہیں مناسب طریقے سے لاگو کریں۔
- ❖ خلیات اور بافتوں کے طویل مدتی ذخیرہ کرنے کے لیے کرایو پریزرویشن کے اصولوں اور پروٹوکولز کی وضاحت کریں، بشمول کرایو پروٹیکٹو ایجنٹوں کا استعمال اور قابل عملیت اور جینیاتی استحکام کو یقینی بنانے کے لیے منجمد کرنے کی مناسب تکنیک۔

3.2 بنیادی ضرورت اور لیبارٹری کا انتظام (Basic Requirement and Laboratory Management)

سیل کلچر، حیاتیاتی تحقیق میں ایک اہم تکنیک، ایک کٹڑول مصنوعی ماحول میں جانوروں یا پودوں کے بافتوں سے خلیات کو نکالنا اور کاشت کرنا شامل ہے۔ سیل کلچر کی نشوونما کے مراحل کو سمجھنا ترقی کے حالات کو بہتر بنانے اور تجرباتی نتائج کی تولیدی صلاحیت کو یقینی بنانے کے لیے بہت ضروری ہے۔

پرائمری کلچر: پرائمری کلچر ٹشوز سے سیل الگ تھلگ ہونے کے بعد ابتدائی مرحلے کی نشاندہی کرتا ہے۔ مناسب حالات میں، یہ خلیے اس وقت تک پھیلتے ہیں جب تک کہ وہ دستیاب سبسٹریٹ کو ڈھانپ نہ لیں (سنگم تک پہنچ جائیں)۔ اس مقام پر، ذیلی کلچرنگ، یا گزرنہ، خلیات کو تازہ گروتھ میڈیم میں منتقل کرنے اور مسلسل ترقی کے لیے جگہ فراہم کرنے کے لیے ضروری ہو جاتا ہے۔

سیل لائن: پہلی ذیلی ثقافت کے بعد، بنیادی ثقافت سیل لائن یا سبکون میں تبدیل ہوتی ہے۔ ان سیل لائنوں کی ایک محدود عمر ہوتی ہے جو جینیاتی عوامل سے طے ہوتی ہے۔ جیسے جیسے خلیات گزر جاتے ہیں، وہ سب سے زیادہ ترقی کی صلاحیت کے حامل ہوتے ہیں، جس کی وجہ سے آبادی کے اندر جینی ٹائپک اور فینو ٹائپک یکسانیت پیدا ہوتی ہے۔

سیل کا تناؤ: اگر سیل لائن کی ذیلی آبادی کو کلوننگ یا دیگر طریقوں کے ذریعے مثبت طور پر منتخب کیا جاتا ہے، تو یہ سیل کا تناؤ بن جاتا ہے۔ پیرنٹ لائن کے آغاز کے بعد سیل کے تناؤ اکثر اضافی جینیاتی تبدیلیوں سے گزرتے ہیں، جو ان کی منفرد خصوصیات میں حصہ ڈالتے ہیں۔ محدود بمقابلہ مسلسل سیل لائنز: عام خلیات عام طور پر سنسنی کی حالت میں داخل ہونے سے پہلے محدود تعداد میں تقسیم سے گزرتے ہیں، جسے محدود سیل لائنز کے نام سے جانا جاتا ہے۔ تاہم، کچھ خلیے تبدیلی کے ذریعے لافانی ہو سکتے ہیں، یا تو بے ساختہ یا کیمیائی طور پر یا وائرلی طور پر۔ جب ایک محدود سیل لائن غیر معینہ مدت تک تقسیم کرنے کی صلاحیت حاصل کر لیتی ہے، تو یہ ایک مسلسل سیل لائن میں تبدیل ہو جاتی ہے، جو طویل مدتی ثقافت اور تجرباتی مستقل مزاجی کے لیے ایک قیمتی وسیلہ ہے۔

سیل کلچر کے لیے ثقافتی حالات کو احتیاط سے سیل کی نشوونما اور کام کے لیے ضروری جسمانی ماحول کی نقل کرنے کے لیے ڈیزائن کیا

کیا ہے۔ اگرچہ ہر خلیے کی قسم کے لیے مختلف ہوتے ہیں، لیکن مصنوعی ماحول میں عام طور پر ایک برتن شامل ہوتا ہے جس میں ضروری غذائی اجزاء جیسے امینو ایسڈ، کاربوہائیڈریٹس، وٹامنز اور معدنیات شامل ہوتے ہیں۔ مزید برآں، نمو کے عوامل، ہارمونز، اور آکسیجن (O₂) اور کاربن ڈائی آکسائیڈ (CO₂) جیسی گیسیں فراہم کی جاتی ہیں، جبکہ فزیکو-کیمیائی ماحول بشمول pH، اسموٹک پریشر، اور درجہ حرارت کو احتیاط سے کنٹرول کیا جاتا ہے۔

زیادہ تر خلیے لنگر پر انحصار کی نمائش کرتے ہیں، جس میں نشوونما کے لیے ٹھوس یا نیم ٹھوس سبسٹریٹ سے منسلک ہونا ضروری ہوتا ہے، جسے پیروکار یا monolayer کہا جاتا ہے۔ تاہم، کچھ خلیے سپینشن کلچر میں پروان چڑھ سکتے ہیں، کلچر میڈیم میں تیرتے ہیں۔

Cryopreservation: ایسی صورتوں میں جہاں ذیلی ثقافت کے ذریعے خلیات کی زائد مقدار پیدا ہوتی ہے، cryopreservation اہم ہو جاتا ہے۔ Cryopreservation میں خلیات کا مناسب حفاظتی ایجنٹوں، جیسے dimethyl sulfoxide (DMSO) یا گلیسرول کے ساتھ علاج کرنا، اور دوبارہ ضرورت پڑنے تک انہیں -130°C سے کم درجہ حرارت پر ذخیرہ کرنا شامل ہے۔ مناسب cryopreservation تکنیک خلیات کی طویل مدتی عملداری اور فعالیت کو یقینی بناتی ہے، انہیں مستقبل کے تجربات کے لیے محفوظ کرتی ہے۔

ثقافت میں خلیوں کو ان کی شکلیات کی بنیاد پر تین بنیادی زمروں میں درجہ بندی کیا جاسکتا ہے۔

- فبروبلاسٹ (یا فبروبلاسٹ نما) خلیات: یہ خلیے دو قطبی یا کثیر قطبی شکلوں کی نمائش کرتے ہیں، فطرت میں لمبے ہوتے ہیں، اور عام طور پر سبسٹریٹ سے منسلک ہوتے ہیں۔
- اپیتھیلیل نما خلیات: باقاعدہ طول و عرض کے ساتھ کثیر الاضلاع شکلوں کی خصوصیت کے حامل، یہ خلیے مجرد بیچ میں سبسٹریٹ کے ساتھ جڑے ہوتے ہیں۔

- لمفوبلاست نما خلیات: شکل میں کروی، یہ خلیے عام طور پر کسی سطح سے منسلک کیے بغیر سپینشن کلچر میں اگائے جاتے ہیں۔

حفاظتی تحفظات: سیل کلچر لیبارٹری کو چلانے سے انسانی یا حیوانی خلیوں اور بافتوں کو سنبھالنے کے ساتھ ساتھ زہریلے، corrosive، یا mutagenic سالوینٹس اور ری ایجنٹس سے وابستہ مخصوص خطرات لاحق ہوتے ہیں۔ عام خطرات میں حادثاتی پنچر، چھلکنے، ادخال، اور سانس کی نمائش شامل ہیں۔ سخت حفاظتی پروٹوکولز اور معیاری مائکرو بایولوجیکل طریقوں کی پابندی ان خطرات کو کم کرنے اور لیبارٹری کے عملے کے لیے کام کرنے کے محفوظ ماحول کو یقینی بنانے کے لیے بہت ضروری ہے۔

3.2.1 سیل کلچر لیبارٹری میں حفاظتی اقدامات (Safety Measures in a Cell Culture Laboratory)

حفاظتی ساز و سامان: سیل کلچر لیبارٹری میں حفاظتی ساز و سامان بنیادی رکاوٹوں پر مشتمل ہوتا ہے جیسے بائیو سیفٹی کیبنٹ، بند کنٹینرز، اور انجینئرنگ کنٹرولز جو خطرناک مواد کی نمائش کو کم سے کم کرنے کے لیے بنائے گئے ہیں۔ بائیو سیفٹی کیبنٹ، جسے سیل کلچر ہڈ بھی کہا جاتا ہے، خاص طور پر متعدی سپلینڈر یا ایروسول پر مشتمل ہونے اور سیل کلچر کی آلودگی کو روکنے کے لیے بہت اہم ہیں۔

ذاتی حفاظتی ساز و سامان (PPE): اہلکاروں اور خطرناک ایجنٹوں کے درمیان فوری رکاوٹ کے طور پر کام کرتا ہے۔ اس میں دستانے، لیبارٹری کوٹ، گاؤن، جوتے کے کور، جوتے، سانس لینے والے، چہرے کی ڈھال، حفاظتی شیشے، یا چشمے جیسی اشیاء شامل ہیں۔ PPE کو اکثر تحفظ کو بڑھانے کے لیے بنیادی رکاوٹوں کے ساتھ مل کر استعمال کیا جاتا ہے۔ لیبارٹری میں پی پی ای کے مناسب استعمال کے لیے ادارہ جاتی رہنما اصولوں پر عمل کرنا ضروری ہے۔

محفوظ لیبارٹری پریکٹس: لیبارٹری کے عملے کی فلاح و بہبود کو یقینی بنانے اور حادثات کو روکنے کے لیے محفوظ لیبارٹری طریقوں پر عمل کرنا بہت ضروری ہے۔ یہاں کچھ اہم تجاویز ہیں:

- ہمیشہ مناسب PPE پہنیں، اور آلودہ ہونے پر دستانے تبدیل کریں۔ استعمال شدہ دستانے کو لیبارٹری کے دیگر آلودہ فضلہ کے ساتھ ٹھکانے لگائیں۔
- خطرناک مواد کے ساتھ کام کرنے کے بعد اور لیبارٹری سے نکلنے سے پہلے ہاتھ اچھی طرح دھولیں۔
- کھانے، پینے، تمباکو نوشی، کانٹیکٹ لینز کو سنبھالنے، کاسمیٹکس لگانے، یا لیبارٹری میں انسانی استعمال کے لیے کھانے کو ذخیرہ کرنے سے گریز کریں۔
- تیز دھاروں کو محفوظ طریقے سے ہینڈل کرنے کے لیے ادارہ جاتی پالیسیوں پر عمل کریں (مثلاً، سوئیاں، کھوپڑی، پائپٹ، شیشے کے ٹوٹے ہوئے برتن)۔
- لیبارٹری کے طریقہ کار کے دوران ایروسل اور سپلیشز کی تخلیق کو کم سے کم کریں۔
- تجربات سے پہلے اور بعد میں تمام کام کی سطحوں کو جراثیم سے پاک کریں، اور مناسب جراثیم کش استعمال کرتے ہوئے ممکنہ طور پر متعدی مواد کے پھیلنے یا چھڑکنے کے فوراً بعد۔
- لیبارٹری کے آلات کو معمول کے مطابق صاف کریں، چاہے وہ صاف طور پر آلودہ نہ ہوں۔
- ٹھکانے لگانے سے پہلے تمام ممکنہ طور پر متعدی مواد کو جراثیم سے پاک کریں۔
- کسی بھی ایسے واقعے کی اطلاع دیں جس کے نتیجے میں متعدی مواد کی نمائش ہو سکتی ہے مناسب اہلکاروں کو، جیسے لیبارٹری سپروائزر یا حفاظتی افسر۔

3.2.2 سیل کلچر لیبارٹری میں آلات اور سامان (Equipment and Supplies in a Cell Culture Laboratory)

بنیادی سامان

سیل کلچر ہڈ: لمبیزر فلو ہڈ یا بایو سیفٹی کیبنٹ کے نام سے بھی جانا جاتا ہے، یہ سامان سیل کلچر کے کام کے لیے ایک جراثیم سے پاک ماحول فراہم کرتا ہے، جو خلیوں اور صارف دونوں کو آلودگی سے بچاتا ہے۔

انکیوبیٹر: درجہ حرارت، نمی اور CO₂ کی سطح سمیت سیل کی نشوونما کے لیے بہترین حالات کو برقرار رکھنے کے لیے ایک مرطوب CO₂ انکیوبیٹر کی سفارش کی جاتی ہے۔

- پانی کا غسل: استعمال سے پہلے مطلوبہ درجہ حرارت پر میڈیا اور ری ایجنٹس کو گرم کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔
- سینٹرفیوج: خلیات کو چھیڑنے، اجزاء کو الگ کرنے اور سیلولر فریکشن کو الگ کرنے کے لیے ضروری ہے۔
- ریفریجریٹر اور فریزر: میڈیا، سیرا، ری ایجنٹس، اور سیل لائنوں کو مناسب درجہ حرارت پر ذخیرہ کرنے کے لیے ضروری ہے۔ عام طور پر -20 °C پر سیٹ فریزر استعمال کیا جاتا ہے۔

• سیل کاؤنٹر: سیل کاؤنٹر کی درست گنتی کو قابل بنانا ہے، یا تو خود کار سسٹمز جیسے کہ Countess[®] خود کار سیل کاؤنٹر کے ذریعے یا ہیماسیٹومیٹر کا استعمال کرتے ہوئے دستی گنتی۔

- الٹی مائیکروسکوپ: ثقافت میں خلیات کو دیکھنے کی اجازت دیتا ہے، خاص طور پر سیل کی شکل اور نمو کی نگرانی کے لیے مفید ہے۔
- مانع نائٹروجن فریزر: انتہائی کم درجہ حرارت پر سیل لائنوں اور حیاتیاتی نمونوں کو طویل مدتی ذخیرہ کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

• جراثیم کش: استعمال سے پہلے شیشے کے برتن، میڈیا اور دیگر سامان کو جراثیم سے پاک کرنے کے لیے آٹو کلیو ضروری ہے۔
توسیع شدہ سامان:

- اسپائریشن پمپ: یا تو پیرسٹالٹک یا ویکيوم میڈ، سیل کلچر ویسلز سے مانع فضلہ کو ہٹانے میں مدد کرتا ہے۔
- پی ایچ میٹر: سیل کلچر میڈیا کے پی ایچ کی نگرانی اور ایڈجسٹ کرنے کے لیے ضروری
- کنفوکل مائیکروسکوپ: خلیات اور بافتوں کی اعلیٰ ریزولوشن امیجنگ فراہم کرتا ہے، جو کہ جدید مائیکروسکوپ اپیلی کیشنز کے لیے مفید ہے۔

• فلو سائٹومیٹر: سیل کی آبادی کے ان کی جسمانی اور کیمیائی خصوصیات کی بنیاد پر مقداری تجزیہ کو قابل بناتا ہے۔
اضافی سامان:

- سیل کلچر ویسلز: بشمول فلاسکس، پیٹری ڈشز، رولر بوتلیں، اور ملٹی ویل پلیٹس، مختلف فارمیٹس میں سیلز کو کلچر کرنے کے لیے ضروری ہے۔

• Pipettes اور Pipettors: سیل کلچر کے طریقہ کار کے دوران درست پیمائش اور مائع کی منتقلی کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

- سرنجیں اور سوئی: میڈیا، ری ایجنٹس، اور سیل سپینڈنٹس کے ایسڈنک ہینڈلنگ کے لیے درکار ہیں۔
- فضلہ کنٹینرز: استعمال شدہ پائپٹ ٹپس، آلودہ مواد، اور حیاتیاتی فضلہ کو مناسب طریقے سے ٹھکانے لگانے کے لیے۔

- میڈیا، سیرا، اور ری ایجنٹس: سیل کلچر کی نشوونما اور دیکھ بھال کے لیے ضروری اجزاء۔
- خلیے: تحقیقی توجہ کے لحاظ سے، تجربات کے لیے سیل لائنز یا بنیادی خلیے درکار ہیں۔

اگرچہ یہ فہرست سیل کلچر لیبارٹریوں میں عام طور پر پائے جانے والے بنیادی اور توسیع شدہ آلات کا احاطہ کرتی ہے، لیکن یہ نوٹ کرنا ضروری ہے کہ تحقیق کی گئی تحقیق کے لحاظ سے مخصوص تقاضے مختلف ہو سکتے ہیں۔ مزید برآں، فائدہ مند آلات اور سپلائیز میں سرمایہ کاری کا کردگی، درستگی کو بڑھا سکتی ہے، اور لیبارٹری کے اندر ممکنہ جانچ اور تجزیوں کی حد کو بڑھا سکتی ہے۔

3.2.3 ایسپٹک ورک ایریا اور سیل کلچر ہڈ (Aseptic Work Area and Cell Culture Hood)

ایسپٹک ورک ایریا: سیل کلچر لیبارٹری میں سیل کلچر، ری ایجنٹس اور میڈیا کی آلودگی کو روکنے کے لیے ایسپٹک ورک ایریا کو برقرار رکھنا بہت ضروری ہے۔ اگرچہ ایک علیحدہ ٹشو کلچر روم کو ترجیح دی جاتی ہے، لیکن ایک بڑی لیبارٹری کے اندر ایک نامزد سیل کلچر ایریا کو اب بھی جراثیم سے پاک ہینڈلنگ، انکیوبیشن، اور سیل کلچر ز اور متعلقہ مواد کو ذخیرہ کرنے کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔ ایسپٹک حالات فراہم کرنے کا بنیادی ٹول سیل کلچر ہڈ ہے، جسے بائیو سیفٹی کیبنٹ بھی کہا جاتا ہے۔

سیل کلچر ہڈ: سیل کلچر ہڈز مائیکرو بائیولوجیکل طریقہ کار کے دوران پیدا ہونے والے متعدی سپلشز یا ایروسول پر مشتمل ہوتے ہوئے کام کا ایک ایسا پٹک ماحول پیش کرتے ہیں۔ سیل کلچر ہڈز کی تین کلاسیں ہیں:

- کلاس I: اہلکاروں اور ماحول کو تحفظ فراہم کرتا ہے لیکن ثقافتوں کو آلودگی سے تحفظ فراہم نہیں کرتا ہے۔
- کلاس II: مختلف بائیو سیفٹی لیولز (2, BSL-1, اور 3) پر مشتمل کام کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے اور سیل کلچر کے تجربات کے لیے ضروری ایک غیر محفوظ ماحول فراہم کرتا ہے۔
- کلاس III: گیس سے تنگ الماریاں جو اعلیٰ ترین سطح کا تحفظ فراہم کرتی ہیں، BSL-4 مواد اور معلوم انسانی پیٹھو جینز پر مشتمل کام کے لیے درکار ہے۔

ہوا کے بہاؤ کی خصوصیات: سیل کلچر ہڈز کام کے علاقے میں مستقل، یک طرفہ ہوا کے بہاؤ کو برقرار رکھتے ہیں، عام طور پر HEPA فلٹر شدہ ہوا کے ذریعے حاصل کیا جاتا ہے۔ یہ ہوا کا بہاؤ افقی یا عمودی ہو سکتا ہے، ہڈ کے ڈیزائن کے لحاظ سے ثقافت یا صارف کو تحفظ فراہم کرتا ہے۔

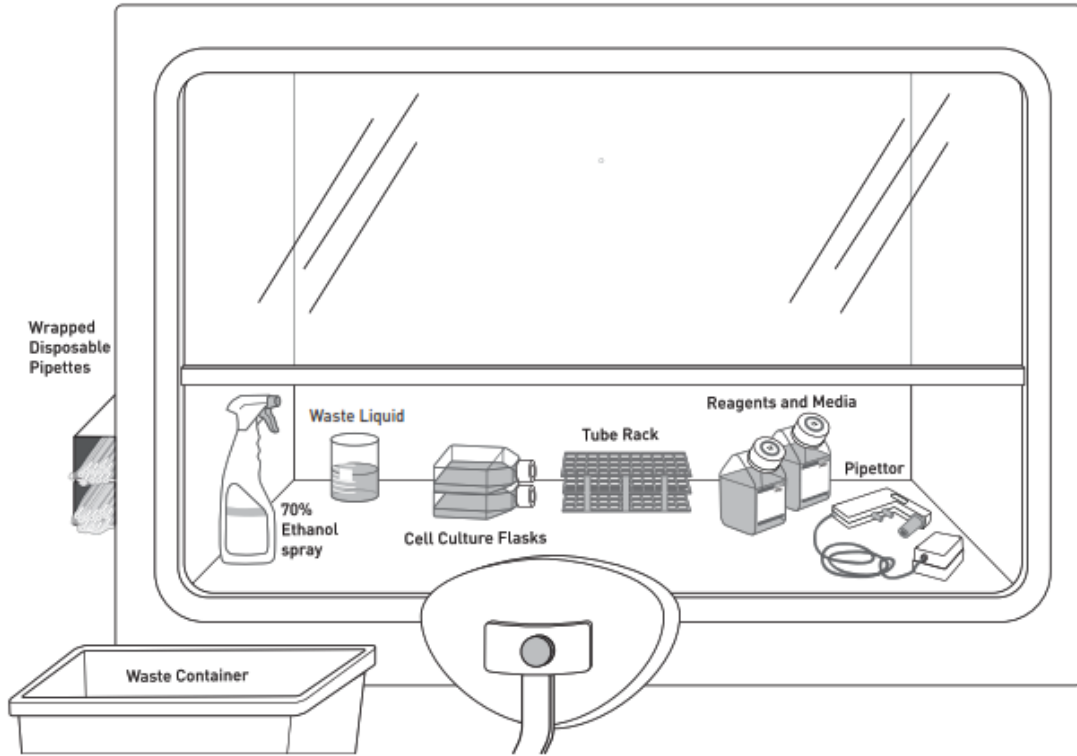
کلیئر بینچز: افقی یا عمودی لمینر فلو کلیئر بینچ بائیو سیفٹی کیبنٹ نہیں ہیں اور صرف پروڈکٹ کا تحفظ فراہم کرتے ہیں، اہلکار یا ماحولیاتی تحفظ نہیں۔ انہیں سیل کلچر کے مواد یا ممکنہ طور پر متعدی مواد کو سنبھالنے کے لیے استعمال نہیں کیا جانا چاہیے۔

سیل کلچر ہڈ لے آؤٹ:

سیل کلچر ہڈ ایک شخص کے لیے کافی کشادہ ہونا چاہیے، آسانی سے صاف، اچھی طرح سے روشن، اور کام کرنے کے لیے آرام دہ ہو۔

استعمال سے پہلے ہڈ میں رکھی تمام اشیاء کو 70% ہتھنول سے جراثیم سے پاک کریں۔
ترتیب:

- کام کی جگہ صاف کریں: سیل کلچر ویسلز کے لیے مرکز والا علاقہ
 - Pipettor: آسان رسائی کے لیے سامنے دائیں پوزیشن میں
 - ریجنٹس اور میڈیا: آسان پائپنگ کے لیے عقبی دائیں جانب واقع ہے۔
 - ٹیوب ریک: اضافی ریجنٹس رکھنے کے لیے عقبی وسط میں رکھا گیا ہے۔
 - مائع فضلہ کنٹینر: فضلہ کو ٹھکانے لگانے کے لیے عقبی بائیں جانب رکھا گیا ہے۔
- اس دائیں ہاتھ کے کنونشن کی پیروی سیل کلچر ہڈ کے اندر ایک منظم اور موثر ورک فلو کو یقینی بناتی ہے، حالانکہ لیبارٹری کی مخصوص ضروریات کو پورا کرنے کے لیے تبدیلیاں کی جاسکتی ہیں۔



شکل 1.3 دائیں ہاتھ کے کارکنوں کے لیے سیل کلچر ہڈ کی بنیادی ترتیب۔ بائیں ہاتھ سے کام کرنے والے کارکن کام کی سطح پر رکھی گئی اشیاء کی پوزیشن کو تبدیل کر سکتے ہیں۔

3.2.4 انکیوبیٹر (Incubators)

انکیوبیٹر سیل کی نشوونما کے لیے ایک بہترین ماحول فراہم کرتا ہے، جس میں مناسب سائز، جبری ہوا کی گردش، اور $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ کے اندر درست درجہ حرارت کنٹرول جیسی خصوصیات ہیں۔ سٹینلیس سٹیل کے انکیوبیٹرز آسان صفائی اور سنکرن سے تحفظ فراہم کرتے ہیں، جو کہ سپینک حالات کو برقرار رکھنے کے لیے ضروری ہے۔

اقسام:

- خشک انکیوبیٹر: اقتصادی لیکن بخارات کو روکنے کے لیے سیل بند فلاسکس کی ضرورت ہوتی ہے۔ پانی کی ڈش کے ساتھ اضافی نمی فراہم کی جاسکتی ہے، لیکن ماحولیاتی حالات پر کنٹرول محدود ہے۔
- مرطوب CO_2 انکیوبیٹر: زیادہ مہنگے لیکن ثقافتی حالات پر اعلیٰ کنٹرول پیش کرتے ہیں، پیٹری ڈشز یا ملٹی ویل پلیٹوں کے لیے موزوں ہیں جن میں زیادہ نمی اور CO_2 تناؤ کی ضرورت ہوتی ہے۔

ذخیرہ:

- سیل کلچر لیبارٹری میں مختلف اشیاء کے لیے ذخیرہ کرنے کی جگہ متعین ہونی چاہیے، بشمول مائع (میڈیا، ری ایجنٹس)، کیمیکلز (منشیات، اینٹی بائیوٹکس)، استعمال کی اشیاء (پائپٹ، ثقافتی برتن)، شیشے کے برتن، خصوصی آلات، اور ٹشو/خلیے۔

ریفریجریٹر:

- چھوٹی لیبارٹری ریفریجری ایجنٹس اور میڈیا کو $2-8^{\circ}\text{C}$ پر ذخیرہ کرنے کے لیے گھریلو ریفریجریٹر (ترجیحا طور پر آٹو ڈیفروسٹ فریزر کے بغیر) استعمال کر سکتی ہیں۔

• بڑی لیبارٹریوں کو ذخیرہ کرنے کے لیے سرد خانے کی ضرورت پڑ سکتی ہے۔

• آلودگی کو روکنے کے لیے باقاعدگی سے صفائی کو یقینی بنائیں

فریزر:

- زیادہ تر سیل کلچر ری ایجنٹس کو -5°C سے -20°C پر ذخیرہ کیا جاسکتا ہے، جو الٹرا ڈیپ فریزر (-80°C) کو اختیاری بناتا ہے۔
- گھریلو فریزر کو ایک سستے متبادل کے طور پر استعمال کیا جاسکتا ہے، لیکن حساس ریجنٹس جیسے اینٹی بائیوٹکس اور انزائمز کے لیے آٹو ڈیفروسٹ فریزر سے گریز کریں۔

روشنی کے لیے حساس مواد کو تاریک حالات میں ذخیرہ کرنا یا ایلومینیم ورق میں لپیٹنا ان کے استحکام کو برقرار رکھنے میں مدد کرتا ہے۔ باقاعدگی سے صفائی اور لیبل پر سٹوریج کی ہدایات پر عمل کرنا ذخیرہ شدہ مواد کی سالمیت کو برقرار رکھنے کے لیے ضروری مشقیں ہیں۔

کریوجینک اسٹوریج:

سیل لائسنوں کو محفوظ رکھنے اور جینیاتی عدم استحکام کو روکنے کے لیے، کام کرنے والے اسٹاک کو تیار کرنا اور انہیں کرائیو جینک حالات میں ذخیرہ کرنا بہت ضروری ہے۔ سیلز کو -20°C یا -80°C فریزر میں ذخیرہ کرنے سے گریز کریں کیونکہ ان درجہ حرارت پر ان کی قابل عملیت تیزی سے کم ہو جاتی ہے۔ مائع نائٹروجن ذخیرہ کرنے کے نظام، جو بخارات کے مرحلے یا مائع مرحلے کے طور پر درجہ بندی کیے گئے ہیں، حفاظت اور انعقاد کے اوقات کے لحاظ سے مختلف فوائد پیش کرتے ہیں۔ تنگ گردن والے کنٹینرز سست نائٹروجن بخارات کے ساتھ زیادہ کفایتی ہوتے ہیں، جبکہ چوڑی گردن والے کنٹینرز آسان رسائی اور زیادہ ذخیرہ کرنے کی گنجائش پیش کرتے ہیں۔

سیل کاؤنٹر:

ایک سیل کاؤنٹر مقداری نمو کے حرکیات کے لیے ناگزیر ہے، خاص طور پر ایک سے زیادہ سیل لائسنوں والی لیبارٹریوں میں۔ Countess خود کار سیل کاؤنٹر Trypan Blue uptake تکنیک کا استعمال کرتے ہوئے سیل کی گنتی اور قابل عمل (زندہ، مردہ، اور کل خلیات) کی درستگی سے پیمائش کرتا ہے۔ یہ فی نمونہ ایک منٹ سے بھی کم وقت میں فوری نتائج فراہم کرتا ہے اور مختلف یو کرائیو ٹک سیلز کے ساتھ مطابقت رکھتا ہے، سیل کلچر ورک فلو میں کارکردگی کو بڑھاتا ہے۔

سیل کلچر کی سالمیت کو برقرار رکھنا مائیکرو جنزموں جیسے بیکٹیریا، فنگی اور وائرس کے ذریعہ آلودگی کو روکنے پر بہت زیادہ انحصار کرتا ہے۔ ایسپیکٹ تکنیک ماحول کے مائیکرو جنزموں اور جراثیم سے پاک سیل کلچر کے درمیان ایک اہم رکاوٹ کے طور پر کام کرتی ہے، مختلف ذرائع سے آلودگی کو کم کرنے کے طریقہ کار کو استعمال کرتی ہے۔

جراثیم سے پاک کام کا علاقہ:

ہوا سے چلنے والے ذرات اور ایروسول سے آلودگی کو کم کرنے کے لیے سیل کلچر ہڈ کا استعمال کریں۔ ڈرافٹس سے پاک کنٹرول والے علاقے میں مناسب سیٹ اپ کو یقینی بنائیں، کام کی سطح کو صرف ضروری اشیاء کے ساتھ بے ترتیبی کریں، استعمال سے پہلے اور بعد میں سطحوں کو جراثیم سے پاک کریں، اور صفائی کے معمول کے طریقوں کو استعمال کریں۔ یو وی لائٹ سٹرلائزیشن کا اطلاق کیا جاسکتا ہے، جبکہ بنسن برنز کے استعمال کی سفارش نہیں کی جاتی ہے۔ ہڈز کو مسلسل چلاتے رہیں سوائے طویل عرصے تک غیر استعمال کے

اچھی ذاتی حفظان صحت:

سیل کلچر کے ساتھ کام کرنے سے پہلے اور بعد میں ہاتھ دھونے کو ترجیح دیں۔ ذاتی حفاظتی ساز و سامان نہ صرف خطرناک مواد سے حفاظت کرتا ہے بلکہ جلد، گندگی اور دھول سے آلودگی کے خطرات کو بھی کم کرتا ہے۔

جراثیم سے پاک ریجنٹس اور میڈیا:

اگرچہ تجارتی ریجنٹس اور میڈیا کو سختی سے کوالٹی کنٹرول کیا جاتا ہے، وہ پھر بھی ہینڈلنگ کے دوران آلودہ ہو سکتے ہیں۔ آلودگی کو روکنے کے لیے جراثیم سے پاک ہینڈلنگ کے رہنما خطوط پر عمل کریں، اور ہمیشہ لیبارٹری میں تیار کردہ ری ایجنٹس، میڈیا، یا مناسب جراثیم کش طریقے جیسے آٹو کلیوٹنگ یا جراثیم سے پاک فلٹریشن کا استعمال کرتے ہوئے جراثیم سے پاک کریں۔

جراثیم سے پاک ہینڈ لانگ:

- اپنے ہاتھوں اور کام کی جگہ کو معمول کے مطابق 70% ہینڈ سینیٹائزر سے صاف کریں۔
- سیل کچر ہڈ میں کنٹینرز رکھنے سے پہلے، 70% ہینڈ سینیٹائزر سے ان کے بیرونی حصوں کو صاف کریں۔
- بوتلوں یا فلاسکس سے براہ راست ڈالنے سے گریز کریں۔ جراثیم سے پاک شیشے یا ڈسپوزیبل پلاسٹک کے پائینٹ اور مائع ہیرا پھیری کے لیے ایک پائپڑ استعمال کریں۔ کراس آلودگی سے بچنے کے لیے پائپڑ کو صرف ایک بار استعمال کریں، انہیں پہنچ میں رکھتے ہوئے
- استعمال کے بعد بوتلوں اور فلاسکس پر مہر لگائیں، اور مائکروجنزموں اور ہوا سے پیدا ہونے والے آلودگیوں کو روکنے کے لیے ٹیپ یا ملٹی کنویل پلیٹوں کو دوبارہ قابل استعمال بیگ میں رکھیں۔
- جب تک استعمال کے لیے تیار نہ ہو جراثیم سے پاک برتنوں کو نہ کھولیں۔ ختم ہونے پر فوری طور پر دوبارہ ڈھانپیں۔ اگر کور عارضی طور پر نیچے رکھے گئے ہیں، تو انہیں نیچے کی طرف کھولنے کے ساتھ رکھیں
- یقینی بنائیں کہ تمام شیشے کے برتن اور استعمال ہونے والے آلات جراثیم سے پاک ہیں۔
- بات کرنے، گانے، یا سیٹی بجانے سے پرہیز کریں۔

3.3 مناسب سیل لائن کا انتخاب (Selecting the Appropriate Cell Lines)

- انواع: حیاتیاتی تحفظ اور تجرباتی تقاضوں پر غور کریں۔
- فنکشنل خصوصیات: تجرباتی اہداف کے مطابق (مثال کے طور پر، زہریلا کی جانچ کے لیے جگر۔ یا گردے سے ماخوذ)۔
- محدود یا مسلسل: دیکھ بھال میں آسانی کے ساتھ فنکشن کے اظہار کے اختیارات میں توازن رکھیں
- نارمل یا تبدیل شدہ: مستقل جینیاتی تبدیلیوں کے خلاف شرح نمو، پلیمٹنگ کی کارکردگی اور سیرم کی ضروریات کا جائزہ لیں۔
- ترقی کی شرائط: شرح نمو، کثافت، کلوننگ کی کارکردگی، اور معطلی کی صلاحیت کی ضروریات کا اندازہ لگائیں۔
- سیل لائنز حاصل کرنا:
- اسٹیبلشمنٹ بمقابلہ خریداری: پرائمری سیلز کاشت کرنے یا معروف سپلائرز سے قائم ثقافتوں کو خریدنے میں سے انتخاب کریں۔
- معیار کی یقین دہانی: سالمیت اور آلودگی سے پاک حیثیت کو یقینی بنائیں، استعمال سے پہلے مائکروپلازما کی آلودگی کی جانچ کریں۔
- فزیکیو کیمیکل اور فزیولوجیکل ہیرا پھیری:
- کنٹرول کے پیرامیٹرز: گروتھ میڈیا کے ذریعے درجہ حرارت، پی ایچ، اوسموتک پریشر، O₂، CO₂، ہارمون، اور غذائی اجزاء میں

ہیرا پھیری کریں۔

سیرم فری کلچر میں پیشرفت: سیرم کے اجزاء، نمو کے عوامل، اور سیرم فری میڈیا کے استعمال کے لیے مائیکرو ماحولیات کو سمجھنا۔
پیروکار بمقابلہ معطلی کی ثقافت:

ایڈورنٹ کلچر: زیادہ تر کشمیری خلیوں کو منسلک کرنے کے لیے ٹشو کلچر سے علاج شدہ سبسٹریٹس کی ضرورت ہوتی ہے، جب کہ بہت سے کیڑے سیل لائمنز (monolayer) اور سپینشن کلچر دونوں کو اپنا سکتے ہیں۔

معطلی کا کلچر: مناسب گیس کے تبادلے کے لیے ایجی ٹیشن کا استعمال کرتے ہوئے، عام طور پر مقناطیسی محرکات یا گھومنے والے اسپنر فلاسکس کا استعمال کرتے ہوئے کلچر کے حجم میں اضافہ کے مطابق بنائیں۔

3.4 سیل کلچر میڈیا: کمپوزیشن اور تیاری (Cell Culture Media: Composition and Prepration)

سیل کلچر میڈیا یا ٹرو میں خلیوں کی نشوونما اور پھیلاؤ کے لیے ضروری غذائی اجزاء، نشوونما کے عوامل اور ماحولیاتی حالات فراہم کرنے میں اہم کردار ادا کرتا ہے۔ ان ذرائع ابلاغ کو وسیع پیمانے پر قدرتی اور مصنوعی اقسام میں تقسیم کیا جاسکتا ہے، ہر ایک کی اپنی ساخت اور تیاری کے طریقے۔ سیل کلچر میڈیا کے اجزاء کو سمجھنا اور تیاری سیل کلچر کے کامیاب تجربات کے لیے ضروری ہے۔

3.4.1 نیچرل میڈیا (Natural Media)

قدرتی میڈیا سیل کلچر کے لیے استعمال ہونے والی ابتدائی فارمولیشنوں میں سے تھے اور یہ حیاتیاتی ذرائع جیسے کہ ٹشو کے عرق اور جسمانی رطوبتوں سے اخذ کیے گئے ہیں۔ ان ذرائع میں پروٹین، لیڈز، کاربوہائیڈریٹس، نمو کے عوامل، اور دیگر حیاتیاتی طور پر فعال مرکبات کے پیچیدہ مرکب ہوتے ہیں جو قدرتی طور پر ٹشو یا سیال میں موجود ہوتے ہیں۔ مثالوں میں شامل ہیں:

1. سیرم پر مشتمل میڈیا: فیٹل بووائن سیرم (FBS)، نوزائیدہ چھڑے کا سیرم (NCS)، اور ہارس سیرم عام طور پر قدرتی ذرائع ابلاغ میں استعمال ہونے والی اضافی چیزیں ہیں۔ یہ سیرا خلیوں کی نشوونما کے لیے ضروری نشوونما کے عوامل، ہارمونز، معدنیات، اور منسلک عوامل فراہم کرتے ہیں۔

2. ناریل کا دودھ میڈیم: ناریل کے دودھ میں مختلف غذائی اجزاء اور نشوونما کے عوامل ہوتے ہیں جو خلیوں کی مخصوص اقسام خصوصاً پودوں کے خلیوں اور مائکرو جنزموں کی نشوونما میں معاون ہوتے ہیں۔

3. اینینک فلوئڈ میڈیم: اینینک فلوئڈ جنین کے ٹشوز کی نشوونما کے لیے ضروری غذائی اجزاء اور نشوونما کے عوامل سے بھرپور ہوتا ہے۔ یہ انسانی امونک سیال سے ماخوذ خلیوں کی ثقافت کے لیے ایک میڈیم کے طور پر استعمال ہوتا رہا ہے۔

3.4.2 مصنوعی میڈیا (Artificial Media)

مصنوعی میڈیا کیمیائی طور پر طے شدہ فارمولیشنز ہیں جن میں معلوم مرکبات ہیں، جو تجرباتی حالات اور تولیدی صلاحیت پر زیادہ کنٹرول کی اجازت دیتے ہیں۔ یہ ذرائع ابلاغ عام طور پر مخصوص اجزاء کو عین ارتکاز میں ملا کر تیار کیے جاتے ہیں۔ مصنوعی میڈیا کے اہم اجزاء میں شامل ہیں:

1. بیل نمکیات: غیر نامیاتی نمکیات جیسے سوڈیم کلورائیڈ، پوٹاشیم کلورائیڈ، کیلشیم کلورائیڈ، اور میگنیشیم سلفیٹ سیلولر عمل اور آسموٹک توازن کے لیے ضروری آئن فراہم کرتے ہیں۔
2. امینو ایسڈز: ضروری اور غیر ضروری دونوں امینو ایسڈز پروٹین کی ترکیب اور سیلولر میٹابولزم کو سپورٹ کرنے کے لیے شامل ہیں۔
3. وٹامنز: ضروری وٹامنز جیسے رائبو فلاوین، تھامین، بایوٹین، اور فولک ایسڈ کو مختلف میٹابولک راستوں اور انزائم کے افعال کو سہارا دینے کے لیے شامل کیا جاتا ہے۔
4. کاربوہائیڈریٹس: گلوکوز سب سے زیادہ استعمال ہونے والا کاربوہائیڈریٹ ذریعہ ہے، جو ثقافت میں خلیوں کے لیے بنیادی توانائی کے ذیلی ذخیرے کے طور پر کام کرتا ہے۔
5. pH بفرز: بفرز جیسے HEPES، ہائپرکربونیٹ، اور فاسفیٹ کو جسمانی ریج کے اندر میڈیم کے pH کو برقرار رکھنے کے لیے شامل کیا جاتا ہے۔
6. سیرم سپلیمنٹس: اگرچہ مصنوعی میڈیا سیرم کے بغیر تیار کیا جاسکتا ہے، سیرم کے متبادل یا سیرم کے حصوں کو ترقی کے عوامل اور دیگر سیرم سے حاصل ہونے والے اجزاء فراہم کرنے کے لیے شامل کیا جاسکتا ہے۔

3.4.3 مصنوعی میڈیا کی تیاری

1. وزن اور تحلیل اجزاء: مطلوبہ فارمولیشن کے مطابق ہر جزو کی پیمائش اور وزن کریں۔ اجزاء کو آست پانی میں یا بفر ڈھلچل میں ہلکی ہلکی اور اگر ضرورت ہو تو گرم کریں۔
2. pH کو ایڈجسٹ کرنا: تمام اجزاء کے تحلیل ہونے کے بعد، تیزاب یا بیس سلوشنز کا استعمال کرتے ہوئے میڈیم کے pH کو مطلوبہ سطح پر ایڈجسٹ کریں۔ پی ایچ میٹر کے ساتھ نگرانی کے دوران پی ایچ ایڈجسٹمنٹ کو بتدریج بنایا جانا چاہیے۔
3. جراثیم کشی: ذرات اور مائکروجنزموں کو دور کرنے کے لیے جراثیم سے پاک فلٹر کا استعمال کرتے ہوئے تیار میڈیم کو فلٹر کریں۔ اجزاء کی حرارت کی حساسیت پر منحصر ہے، آٹو کلیوٹنگ یا جراثیم سے پاک فلٹریشن کے ذریعے فلٹر شدہ میڈیم کو جراثیم سے پاک کریں۔
4. اسٹورج: جراثیم سے پاک میڈیم کو مناسب درجہ حرارت اور حالات پر ذخیرہ کریں تاکہ استحکام اور بانجھ پن کو برقرار رکھا جاسکے جب تک کہ استعمال کے لیے تیار نہ ہو۔

سیل کلچر میڈیا، چاہے قدرتی ہو یا مصنوعی، وٹرو میں سیل کی نشوونما اور دیکھ بھال کے لیے ضروری غذائیت کے ذریعہ اور ماحول کے طور پر کام کرتا ہے۔ ان میڈیا کی ساخت اور تیاری کو سمجھنا سیل کلچر کے تجربات کی کامیابی کے لیے بنیادی چیز ہے، جس سے محققین تجرباتی متغیرات کو کنٹرول کرنے اور تولیدی نتائج حاصل کرنے کی اجازت دیتے ہیں۔

3.4.4 قدرتی اور مصنوعی میڈیا کی مثالیں

قدرتی میڈیا:

1. سیرم پر مشتمل میڈیا:

- ساخت: سیرم پر مشتمل میڈیا۔ بیسل میڈیا (جیسے، ایگلز کم از کم ضروری میڈیم-MEM، Dulbecco's Modified Eagle، Medium - DMEM) فیٹل بووائن سیرم (FBS) یا دوسرے جانوروں کے سیرا کے ساتھ تیار کیا جاتا ہے۔ FBS سیل کی نشوونما اور پھیلاؤ کے لیے ضروری نشوونما کے عوامل، ہارمونز، پروٹین، لیپڈز، اور معدنیات فراہم کرتا ہے۔
- مثال: DMEM کو 10% FBS، 1% سینسلن-اسٹریپیٹومائسن، اور 1% L-glutamine کے ساتھ ملایا جاتا ہے عام طور پر ممالیہ کے خلیات جیسے HeLa سیلز یا فائبروبلاسٹس کی ثقافت کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

2. ناریل کا دودھ درمیانہ:

- ساخت: ناریل کے دودھ کے درمیانے درجے میں ناریل کا دودھ ہوتا ہے جو بالغ ناریل سے حاصل ہوتا ہے، جو کاربوہائیڈریٹس، پروٹین، لیپڈز، وٹامنز اور معدنیات سے بھرپور ہوتا ہے۔ اس میں ناریل کے لیے مخصوص ترقی کو فروغ دینے والے عوامل بھی شامل ہیں۔
- مثال: ناریل کے دودھ کا میڈیم کو کونٹ پام (کو کوس نیو سیفیرا) لیمبر پو اور کالس ٹشوز کی وٹرو کلچر کے لیے استعمال کیا گیا ہے۔
- 3. امینٹک فلوئڈ میڈیم:

- ساخت: امینٹک سیال میڈیم انسانی یا حیوانی امینٹک سیال کا استعمال کرتے ہوئے تیار کیا جاتا ہے، جس میں مختلف غذائی اجزاء، نشوونما کے عوامل، ہارمونز، اور پروٹین ہوتے ہیں جو جنین کے بافتوں کی نشوونما اور نشوونما کے لیے ضروری ہیں۔
- مثال: امینٹک فلوئڈ میڈیم کی ایک بنیادی تشکیل میں DMEM/F12 شامل ہو سکتے ہیں جو امونٹک فلوئڈ، اینٹی بائیوٹک اور اضافی غذائی اجزاء کے ساتھ شامل ہیں۔ اسے تحقیقی مقاصد کے لیے انسانی امونٹک سیال سے ماخوذ خلیوں کی ثقافت کے لیے استعمال کیا گیا ہے۔

مصنوعی میڈیا:

1. بیسل سالٹ میڈیم:

- ساخت: بیسل سالٹ میڈیم ایک مصنوعی میڈیم ہے جو غیر نامیاتی نمکیات، امینو ایسڈز، وٹامنز اور کاربوہائیڈریٹس پر مشتمل ہے۔ اس میں سیرم یا سیرم سے ماخوذ اجزاء کی کمی ہے، جس سے زیادہ کنٹرول اور معیاری کاری کی اجازت دی جاسکتی ہے۔

• مثال: Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 میڈیم ایک بیسل سالٹ میڈیم ہے جو عام طور پر ممالیہ کے خلیوں کی ثقافت کے لیے استعمال ہوتا ہے۔ اس میں ضروری نمکیات، امینو ایسڈز، وٹامنز اور گلوکوز ہوتے ہیں۔ RPMI 1640 کو سیرم یا سیرم کے متبادل کے ساتھ پورا کیا جاسکتا ہے جیسا کہ مخصوص سیل اقسام کے لیے ضرورت ہے۔

2. متعین سیرم فری میڈیم:

• ساخت: ڈیفائنڈ سیرم فری میڈیم ایک کیمیائی طور پر بیان کردہ فارمولیشن ہے جس میں امینو ایسڈز، وٹامنز، معدنیات، اور نشوونما کے عوامل کے عین مطابق ارتکاز ہوتے ہیں۔ اس میں سیرم سے ماخوذ اجزاء شامل نہیں ہیں۔

مثال کے طور پر: DMEM/F12 انسولین، ٹرانسفرن، سلینینم، بووائن سیرم البومین (BSA)، اور افزائش کے عوامل جیسے ایپیڈرل گروتھ فیکٹر (EGF) اور بنیادی فیرو بلاسٹ گروتھ فیکٹر (bFGF) ایک متعین سیرم کی ایک مثال ہے۔ مفت میڈیم یہ میڈیم عام طور پر عصبی اسٹیم سیلز کی ثقافت کے لیے استعمال ہوتا ہے۔

3. کم سیرم میڈیم:

• ساخت: کم شدہ سیرم میڈیم ایک بیسل سالٹ میڈیم ہے جو سیرم یا سیرم فریکشنز کی کم ارتکاز کے ساتھ پورا ہوتا ہے۔ اس کا مقصد سیرم کے ناپسندیدہ اثرات کو کم کرنا ہے جبکہ اب بھی ضروری نشوونما کے عوامل اور غذائی اجزاء فراہم کرتے ہیں۔

• مثال: 2% فیٹل بووائن سیرم (FBS) کے ساتھ کم از کم ضروری میڈیم (MEM) اور اضافی نمو کے عوامل کم سیرم میڈیم کی ایک مثال ہے۔ یہ خلیات کی ثقافت کے لیے استعمال کیا جاتا ہے جس کے لیے سیرم کی کم ارتکاز کی ضرورت ہوتی ہے، جیسے کہ کچھ بنیادی سیل لائنز یا خلیے جن میں فرق ہوتا ہے۔

یہ مثالیں دستیاب سیل کلچر میڈیا کے تنوع کو واضح کرتی ہیں، ہر ایک مختلف سیل اقسام اور تجرباتی حالات کی مخصوص غذائیت اور نشوونما کی ضروریات کو پورا کرنے کے لیے تیار کیا گیا ہے۔

3.5 جراثیم ربائی کی تکنیک (Sterilization Techniques)

جراثیم کشی مختلف صنعتوں اور لیبارٹری کی ترتیبات میں ایک اہم عمل ہے، جس کا مقصد بیماریوں کی منتقلی، آلودگی اور خرابی کو روکنے کے لیے مائکرو بیل آبادی کو ختم کرنا یا نمایاں طور پر کم کرنا ہے۔ یہ مواد، مصنوعات، اور تجرباتی نتائج کی حفاظت، افادیت، اور سالمیت کو یقینی بناتا ہے۔

1۔ دباؤ کے تحت بھاپ (آٹو کلیو):

• تفصیل: آٹو کلیو ننگ، دباؤ میں بھاپ کا استعمال، جراثیم ربائی کے لیے ایک انتہائی موثر اور وسیع پیمانے پر استعمال ہونے والا طریقہ

ہے۔

• آپریشن: آٹو کلیو ایک چیمبر سے لیس ہوتے ہیں جہاں جراثیم سے پاک ہونے والی اشیاء رکھی جاتی ہیں۔ پانی کو بھاپ پیدا کرنے کے لیے گرم کیا جاتا ہے، اور پانی کے ابلتے ہوئے مقام سے اوپر درجہ حرارت حاصل کرنے کے لیے چیمبر کے اندر دباؤ بڑھایا جاتا ہے۔ یہ مائیکرو جنزموں کے لیے مہلک حالات پیدا کرتا ہے۔

• ایپلی کیشنز: آٹو کلیو مائیکرو بایولوجی اور سیل کلچر لیبارٹریز میں کلچر میڈیا، شیشے کے سامان، آلات، جراحی کے آلات، اور حیاتیاتی نقصان دہ فضلہ کو جراثیم سے پاک کرنے کے لیے ناگزیر ہیں۔

2۔ ابلتا ہوا پانی:

• تفصیل: ابلتا ہوا پانی جراثیم کشی کے لیے ایک سادہ لیکن محدود طریقہ ہے، بنیادی طور پر مائیکرو جنزموں کے نباتاتی خلیوں کو نشانہ بنانا۔

• آپریشن: جراثیم کشی حاصل کرنے کے لیے مواد کو ایک مخصوص مدت، عام طور پر کئی منٹ تک ابلتے پانی (100°C) میں ڈبو دیا جاتا ہے۔ ابالنا سیلو لروڈھانچے میں خلل ڈالتا ہے اور پروٹین کو منقطع کرتا ہے، مائیکرو جنزموں کو ناقابل عمل بناتا ہے۔

• حدود: اگرچہ ابلتا ہوا پانی زیادہ تر نباتاتی خلیات کو مؤثر طریقے سے ہلاک کرتا ہے، لیکن یہ بیکٹیریل بیضوں یا بعض گرمی سے بچنے والے پیتھوجینز کو ختم نہیں کر سکتا۔

• ایپلی کیشنز: ابلتے ہوئے پانی کو عام طور پر صحت کی دیکھ بھال کی ترتیبات میں لیبارٹری کے شیشے کے برتن، دھاتی آلات اور جراحی کے آلات کو جراثیم سے پاک کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

3۔ خشک گرمی یا گرم ہوا کا تندور:

• تفصیل: جب بھاپ کی براہ راست نمائش ناقابل عمل یا غیر مؤثر ہو تو خشک حرارت کی جراثیم کشی کا استعمال کیا جاتا ہے۔

• آپریشن: آئٹمز کو گرم ہوا کے تندور میں رکھا جاتا ہے اور سٹرلائزیشن حاصل کرنے کے لیے، عام طور پر 160°C سے 180°C کے درمیان، لمبے عرصے تک، عام طور پر 1 سے 2 گھنٹے تک، بلند درجہ حرارت کا نشانہ بنایا جاتا ہے۔ خشک گرمی پروٹین کو ختم کرتی ہے اور سیلو لروڈھانچے میں خلل ڈالتی ہے جس کے نتیجے میں مائیکرو بیل موت واقع ہوتی ہے۔

• ایپلی کیشنز: خشک گرمی کی جراثیم ربائی گرمی سے بچنے والے مواد جیسے شیشے کے برتن، پاؤڈر، تیل، اور دھاتی آلات کے لیے موزوں ہے۔

4۔ الٹرا وائلٹ (UV) روشنی:

• تفصیل: الٹرا وائلٹ (UV) روشنی جراثیم کش خصوصیات رکھتی ہے، جو مائیکرو جنزموں کے DNA کو نقصان پہنچانے کی صلاحیت رکھتی ہے۔

• آپریشن: UV جراثیم کشی میں مائکروجنزموں کو غیر فعال کرنے کے لیے سطحوں یا ہوا کو مخصوص طول موج، عام طور پر تقریباً 254 نینومیٹر (nm) کی UV روشنی سے بے نقاب کرنا شامل ہے۔ UV روشنی مائکرو بیل خلیوں میں گھس جاتی ہے، ڈی این اے کو نقصان پہنچاتی ہے اور نقل کو روکتی ہے۔

• حدود: UV روشنی میں مائکروجنزموں کے خلاف محدود رسائی اور افادیت ہے جو براہ راست نمائش سے محفوظ ہیں۔

• ایپلی کیشنز: لیبارٹری ہڈز، بائیو سیفٹی کیسینٹ، پانی کی صفائی کے نظام، اور ہوا صاف کرنے والے یونٹس میں سطح کی جراثیم کشی کے لیے UV جراثیم ربائی کا استعمال کیا جاتا ہے۔

5۔ فلٹریشن:

• تفصیل: فلٹریشن کے طریقے مائع یا گیسوں سے مائکروجنزموں کو جسمانی طور پر ہٹانے کے لیے غیر محفوظ مواد کا استعمال کرتے ہیں۔

• اقسام: مختلف فلٹرز، بشمول ڈیپتھ فلٹرز، میمبرین فلٹرز، اور HEPA (High-Efficiency Particulate Air) فلٹرز، دستیاب ہیں۔

• آپریشن: مائکروجنزموں کو فلٹر میٹرکس یا سوراخوں کے اندر پھنس جاتے ہیں، فلٹر کے ذریعے ان کے گزرنے کو روکتے ہیں۔ یکساں تاکنا سائز کے ساتھ جھلی کے فلٹرز سائز کے اخراج کی بنیاد پر مائکروجنزموں کو مؤثر طریقے سے پکڑتے ہیں۔

• ایپلی کیشنز: یکساں سوراخ کے سائز کے ساتھ جھلی کے فلٹرز بڑے پیمانے پر مائکرو بایولوجی میں مائع، ہوا اور گیسوں کو جراثیم سے پاک کرنے کے ساتھ ساتھ پانی کے نمونوں اور دوا سازی کی تیاریوں میں مائکرو بیل شمار کرنے کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔ دوسری طرف، گہرائی کے فلٹرز بڑے پیمانے پر ایپلی کیشنز جیسے HVAC (ہیٹنگ، وینٹیلیشن، اور ایئر کنڈیشننگ) سسٹمز اور صنعتی ایئر فلٹریشن کے لیے استعمال کیے جاتے ہیں۔

3.6 کرایوپریزرویشن (Cryopreservation)

Cryopreservation حیاتیاتی تحقیق میں ایک اہم تکنیک ہے، جو سیل ثقافتوں کے طویل مدتی ذخیرہ کو ان کی قابل عملیت اور فعالیت کو برقرار رکھتی ہے۔ یہ پرکھ Cryopreservation کے طریقوں کا ایک جائزہ فراہم کرتی ہے، بشمول سیل کی تیاری، cryoprotectant کے اضافے، منجمد کرنے والے پروٹوکول، اور سٹوریج کے حالات۔ یہ مستقبل کی تحقیقی کوششوں کے لیے سیل لائنوں کو برقرار رکھنے میں اس کی اہمیت کو اجاگر کرتے ہوئے، cryopreservation سے منسلک فوائد، چیلنجز اور تحفظات پر بھی بات کرتا ہے۔

Cryopreservation میں خلیات کو انتہائی کم درجہ حرارت پر منجمد کرنا شامل ہے تاکہ ان کی عملداری اور فعالیت کو طویل مدت تک محفوظ رکھا جاسکے۔ یہ تکنیک حیاتیاتی تحقیق کے مختلف شعبوں میں ناگزیر ہے، بشمول سیل بایولوجی، ری جزیٹیو میڈیسن، اور بائیو

ٹیکنالوجی۔ سیل کلچر کو مؤثر طریقے سے محفوظ کر کے، کرائوپریزرویشن تجربات کے لیے خلیات کی مستحکم فراہمی کو یقینی بناتا ہے، آلودگی کے خطرات کو کم کرتا ہے، اور قیمتی سیل لائنوں کے طویل مدتی ذخیرہ میں سہولت فراہم کرتا ہے۔

طریقے:

1. سیل کی تیاری:

- زیادہ سے زیادہ میٹابولک سرگرمی اور مضبوطی کو یقینی بنانے کے لیے لوگاریتھمک نمو کے مرحلے کے دوران خلیات کی کثافت کی جاتی ہے۔

- کثافت کے بعد، سیلز کو کلچر میڈیا اور لمبے کوہٹانے کے لیے دھویا جاتا ہے، سیل کی پاکیزگی کو فروغ دیتا ہے اور منجمد سے منسلک نقصان کو کم کرتا ہے۔

2. کرائوپروٹیکشنٹ اضافہ:

- Cryoprotective agents (CPAs)، جیسے کہ ڈائمیتھائل سلفوکسائیڈ (DMSO) یا گلیسرول، کو سیل سپنشن میں شامل کیا جاتا ہے تاکہ جنم کے دوران آئس کرسٹل کی تشکیل اور سیلولر چوٹ کو روکا جاسکے۔

- CPAs کے ارتکاز کو احتیاط سے بہتر بنایا جانا چاہیے تاکہ سیل کے تحفظ کو سائٹوٹوکسٹک کے ساتھ متوازن کیا جاسکے۔

3. منجمد پروٹوکول:

- کنٹرول شدہ شرح منجمد میں سیل کے معطلی کے درجہ حرارت کو ایک کنٹرول شدہ شرح پر، عام طور پر -1°C فی منٹ، برف کے کرسٹل کی تشکیل اور سیلولر کو پہنچنے والے نقصان کو کم کرنے کے لیے آہستہ آہستہ کم کرنا شامل ہے۔

- تیزی سے منجمد کرنے کے طریقے، جیسے کہ مائع نائٹروجن میں جمنہ، کچھ سیل اقسام کے لیے بھی استعمال کیے جاسکتے ہیں۔

- اسٹوریج کی شرائط:

- Cryovials جن میں منجمد سیل سپنشن ہوتے ہیں مائع نائٹروجن ٹینکوں میں -150°C سے کم درجہ حرارت پر محفوظ کیے جاتے ہیں۔

- مائع نائٹروجن ٹینکوں کی مناسب دیکھ بھال، بشمول درجہ حرارت کی باقاعدہ نگرانی اور بھرنا، پگھلنے سے روکنے اور ذخیرہ شدہ نمونوں کی سالمیت کو یقینی بنانے کے لیے ضروری ہے۔

- Cryopreservation کے فوائد:

- طویل المدت اسٹوریج: کریوپریزروڈ سیلز کو سالوں یا دہائیوں تک ذخیرہ کیا جاسکتا ہے، مستقبل کے تجربات کے لیے مسلسل فراہمی کو یقینی بنا کر۔

- آلودگی کے خطرات میں کمی: Cryopreservation مسلسل سیل کلچر کی دیکھ بھال کی ضرورت کو کم کرتا ہے، آلودگی اور جینیاتی بہاؤ کے خطرے کو کم کرتا ہے۔
- لاگت کی تاثیر: Cryopreservation محققین کو مسلسل ثقافت کی ضرورت کے بغیر سیل لائنوں کے ذخیرہ کو برقرار رکھنے، وقت اور وسائل کی بچت کی اجازت دیتا ہے۔
- سیلولر قابل عملیت کا تحفظ: مناسب طریقے سے کریوپریزروڈ سیلز قابل عملیت اور فعالیت کے اعلیٰ درجے کو برقرار رکھتے ہیں، تجربات میں تولیدی نتائج کو یقینی بناتے ہیں۔
- چیلنجز اور غور و فکر:
- Cryoprotectant toxicity: CPAs کی زیادہ ارتکاز خلیات کے لیے زہریلا ہو سکتی ہے، جس کے لیے cryoprotectant کے ارتکاز اور نمائش کے وقت کو احتیاط سے بہتر بنانے کی ضرورت ہوتی ہے۔
- منجمد اور پگھلنے کے پروٹوکول: کنٹرول شدہ شرح منجمد اور تیزی سے پگھلنے کے پروٹوکول سیلولر نقصان کو کم کرنے اور پگھلنے کے بعد کی بحالی کو زیادہ سے زیادہ کرنے کے لیے اہم ہیں۔
- کوالٹی کنٹرول: کرائیوپریزروڈ سیل لائنوں کی سالمیت کو یقینی بنانے کے لیے باقاعدہ قابل عمل جانچ اور بانجھ پن کی جانچ ضروری ہے۔
- ذخیرہ کرنے کے حالات: ذخیرہ شدہ نمونوں کو پگھلنے سے روکنے اور نمونے کی سالمیت کو یقینی بنانے کے لیے مائع نائٹروجن ٹینکوں کی مناسب دیکھ بھال ضروری ہے۔
- Cryopreservation حیاتیاتی تحقیق میں ایک بنیادی تکنیک ہے، جو سیل ثقافتوں کو برقرار رکھنے کے قابل عمل اور فعالیت کے ساتھ طویل مدتی ذخیرہ کرنے کے قابل بناتی ہے۔ آپٹائزڈ پروٹوکولز کی پیروی کر کے اور متعلقہ چیلنجز پر غور کرتے ہوئے، محققین مستقبل کے تجربات کے لیے سیل لائنوں کو مؤثر طریقے سے محفوظ رکھ سکتے ہیں، مختلف سائنسی شعبوں میں پیشرفت کی سہولت فراہم کر سکتے ہیں۔

3.7 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس باب کو مکمل کرنے کے بعد، طلباء اب وضاحت کر سکتے ہیں:

- ❖ سیل اور ٹشو کلچر کے بنیادی اصول اور بنیادی تقاضے، بشمول بانجھ پن کو برقرار رکھنا، ماحولیاتی پیرامیٹرز کو کنٹرول کرنا، اور حفاظتی پروٹوکول کی پابندی کرنا۔
- ❖ ایک اچھی طرح سے لیس لیبارٹری کے لیے ضروری سامان اور سہولیات جو سیل کلچر کے کامیاب تجربات کے لیے موزوں ہیں، جیسے لیمینز فلو ہڈز، CO_2 انکیوبیٹر، مائیکروسکوپس، اور جراثیم سے پاک ہینڈ لنگ کا سامان۔

- ❖ اب آلودگی کو روکنے اور تجرباتی سالمیت کو یقینی بنانے کے لیے لیبارٹری کے انتظام کے طریقوں کو لاگو کر سکتے ہیں، جس میں باقاعدہ صفائی، جراثیم کشی، اور حیاتیاتی خطرناک فضلہ کو مناسب طریقے سے ٹھکانے لگانا شامل ہے۔
- ❖ کلچر میڈیا کی تشکیل اور تیاری، قدرتی اور مصنوعی دونوں شکلیں، اور سیل کی نشوونما اور کام کے لیے بہترین حالات فراہم کرنے میں ان کی اہمیت۔
- ❖ کلچر میڈیا کے لیے جراثیم سے پاک تیاری کی تکنیکوں میں مہارت، بشمول درست پیمائش، جراثیم سے پاک حالات میں اختلاط، اور مائکرو بیل آلودگیوں کو ختم کرنے کے لیے فلٹریشن/نس بندی کے طریقے۔
- ❖ خلیات اور بافتوں کے طویل مدتی ذخیرہ کرنے کے لیے کرائیو پریزرویشن کے اصولوں اور پروٹوکولز کی وضاحت کریں، بشمول کرائیو پروٹیکٹو ایجنٹوں کا استعمال اور قابل عملیت اور جینیاتی استحکام کو یقینی بنانے کے لیے منجمد کرنے کی مناسب تکنیک۔

3.8 کلیدی الفاظ (Keywords)

کرائیو پریزرویشن	Cryopreservation	انتہائی کم درجہ حرارت پر کسی چیز کو محفوظ کرنا
جراثیم کش	Sterilization	جراثیم سے پاک کرنا یا بچھ کرنا غلاظت سے صاف کرنا۔

3.9 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

3.9.1 3.9.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. بنیادی ثقافت کا مرحلہ ٹشوز سے _____ کی پیروی کرتا ہے۔
2. بنیادی ثقافتی مرحلے میں، خلیات اس وقت تک پھیلتے ہیں جب تک کہ وہ _____ تک نہ پہنچ جائیں اور ذیلی ثقافت کی ضرورت ہوتی ہے۔
3. سیل لائنوں کی ایک _____ عمر ہوتی ہے جو جینیاتی عوامل سے طے ہوتی ہے۔
4. خلیے کے تناؤ کا نتیجہ _____ یا دوسرے طریقوں سے مثبت انتخاب سے ہوتا ہے۔
5. مسلسل سیل لائنیں طویل مدتی ثقافت کے لیے قابل قدر ہیں _____ کو تقسیم کرنے کی صلاحیت کی وجہ سے۔
6. مصنوعی میڈیا تجرباتی حالات اور _____ پر زیادہ کنٹرول فراہم کرتا ہے۔
7. گلو کوز سیل کلچر میں بنیادی _____ سبسٹریٹ کے طور پر کام کرتا ہے۔
8. جراثیم کشی میں، اہلتا ہو پانی زیادہ تر _____ خلیات کو مؤثر طریقے سے مارتا ہے۔
9. یووی نس بندی مائکرو بیل ڈی این اے کو نقصان پہنچاتی ہے، جو _____ کو روکتی ہے۔

10. Cryopreservation تجربات کے لیے خلیات کی مستحکم فراہمی کو یقینی بناتا ہے اور _____ خطرات کو کم کرتا ہے۔

3.9.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. سیل کلچر میں cryopreservation کا مقصد کیا ہے؟
2. مائکروجنزموں کو ختم کرنے کے لئے UV انس بند کیسے کام کرتی ہے؟
3. مصنوعی سیل کلچر میڈیا کے اہم اجزاء کیا ہیں؟
4. سیل کلچر میں ذیلی ثقافت کے عمل کو بیان کریں۔
5. سیل کلچر لیبارٹری میں کن حفاظتی تدابیر پر عمل کیا جانا چاہیے؟

3.9.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. سیل کلچر میں پرائمری کلچر، سیل لائن اور سیل سٹرین کے درمیان فرق کی وضاحت کریں۔
2. قدرتی اور مصنوعی سیل کلچر میڈیا کے فوائد اور نقصانات پر تبادلہ خیال کریں۔
3. سیل کلچر لیبارٹریوں میں عام طور پر استعمال ہونے والی انس بند کی مختلف تکنیکوں کو تفصیل سے بیان کریں۔
4. خلیوں کے کریوپریزرویشن میں شامل اقدامات کا خاکہ بنائیں۔
5. سیل کلچر لیبارٹری میں آلودگی سے پاک ماحول کو برقرار رکھنے کے لیے ضروری حفاظتی تحفظات اور پروٹوکولز کو دریافت کریں۔

3.10 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Sterilization	جراثیم کشی	جراثیم کشی	جراثیم کشی: جراثیم کی منتقلی کو روکنے اور مواد، آلات اور ماحول کی پاکیزگی کو برقرار رکھنے کے لیے مائکروبیئل آلودگی کو ختم کرنے یا کم کرنے کا عمل۔
Offspring	اخلاف	اولاد نسل	اولاد، بال بچے
Darwin finches	ڈارون کے فنچز	ڈارون کے فنچز	چارلس ڈارون نے چھوٹے چڑیا نما کالے پرندوں کے ایک گروپ کا مشاہدہ کیا جن کی مضبوط، چھوٹی چونچیں ہیں جنہیں آج ڈارون کے فنچز کے نام سے جانا جاتا ہے۔

3.11 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (6th ed.). Wiley-Liss.
2. Masters, J. R. (2011). *Animal Cell Culture: Essential Methods*. John Wiley & Sons.
3. Doyle, A., & Griffiths, J. B. (2017). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. John Wiley & Sons.
4. P. ollard, J. W., & Walker, J. M. (2013). *Basic Cell Culture Protocols* (3rd e.,d.). Humana Press.

.,

اکائی 4: سیل لائنز، سیل کلچر کی قسم اور سیل اور آرگن کلچر کا اطلاق

(Cell Lines, Type of Cell Culture And Application of Cell And Organ Culture)

اکائی کے اجزا

تمہید (Introduction)	4.0
مقاصد (Objectives)	4.1
سیل کلچر کے لیے سیل لائنز کی علیحدگی (Isolation of Cell Lines for Cell Culture)	4.2
سیل لائنوں کی بڑے پیمانے پر کلچر (Large scale culture of cell lines)	4.3
سیل کلچر ایپلی کیشنز کی مثالیں: (Examples of Cell culture Application)	4.3.1
کلچرڈ سیلز کی اقسام کا (Types of Cultured Cells)	4.4
اعضاء کی کلچر کے اطلاقات (Applications of Organ Culture)	4.5
سیل کلچر کی ایپلی کیشنز (Application of Cell Culture)	4.6
اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)	4.7
کلیدی الفاظ (Keywords)	4.8
نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)	4.9
معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)	4.9.1
مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)	4.9.2
طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)	4.9.3
فرہنگ (Glossary)	4.10
مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)	4.11

4.0 تمہید (Introduction)

سیل کلچر کی تکنیکوں نے حیاتیاتی تحقیق میں انقلاب برپا کر دیا ہے تاکہ ان کے قدرتی سیاق و سباق سے باہر خلیوں کی نشوونما اور ہیرا

پھیری کے لیے ایک کنزول شدہ ماحول فراہم کیا جاسکے۔ یہ باب سیل کلچر کے مختلف پہلوؤں کو دریافت کرتا ہے، جس میں سیل لائنوں کو الگ تھلگ کرنے سے لے کر خلیوں کی بڑے پیمانے پر کاشت تک، متنوع اقسام کے مہذب خلیوں اور حیاتیاتی تحقیق میں ان کے استعمال کو شامل کیا گیا ہے۔

سیل لائنوں کی علیحدگی: سیل لائنوں کی علیحدگی میں ٹشوز یا جانداروں سے خلیوں کو نکالنا اور ان کی کاشت شامل ہے۔ یہ عمل محققین کو لافانی سیل لائنیں قائم کرنے کی اجازت دیتا ہے جو لیبارٹری کی حالت میں غیر معینہ مدت تک پھیلائی جاسکتی ہیں۔ خلیے کو الگ تھلگ کرنے کی تکنیکیں ماخذ ٹشوز اور مطلوبہ خلیے کی قسم کے لحاظ سے مختلف ہو سکتی ہیں، جن میں اکثر انزیمینٹک ہاضمہ، مینیکل ڈسوسی ایشن، یا واضح کلچر کے طریقے شامل ہوتے ہیں۔ الگ تھلگ سیل لائنیں سیلولر فزیالوجی، پیٹھالوجی، اور علاج کی مداخلت کے مطالعہ کے لیے انمول ٹولز کے طور پر کام کرتی ہیں۔

سیل لائنوں کی بڑے پیمانے پر کلچر: بائیوفارماسیوٹیکلز، ویکسین کی ترقی، ٹشوز انجینئرنگ، اور دیگر صنعتی ایپلی کیشنز کی تیاری کے لیے سیل لائنوں کی بڑے پیمانے پر کاشت ضروری ہے۔ بائیو ریکٹرز اور خصوصی کلچر ویسلز کو کنزول شدہ حالات میں خلیوں کی نشوونما میں مدد کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، غذائی اجزاء کی فراہمی، پی ایچ، درجہ حرارت، اور آکسیجینیشن جیسے پیرامیٹرز کو بہتر بنانے کے لیے۔ بڑے پیمانے پر سیل کلچر کے نظام صنعتی پیمانے پر ریکومیننٹ پروٹیز، مونوکلونل اینٹی باڈیز اور سیل پر مبنی علاج کی موثر پیداوار کے قابل بناتے ہیں۔

مہذب خلیوں کی اقسام: مہذب خلیات متنوع حیاتیات، بافتوں اور اعضاء سے اخذ کردہ خلیوں کی اقسام کی ایک وسیع صف کو گھیرے ہوئے ہیں۔ ان میں بنیادی خلیے شامل ہیں، جو جانداروں سے براہ راست الگ تھلگ ہیں اور محدود تعداد میں اپنی جسمانی خصوصیات کو برقرار رکھتے ہیں، نیز لافانی سیل لائنیں، جو جینیاتی تبدیلیوں یا اچانک تبدیلی کی وجہ سے غیر معینہ مدت تک پھیلتی ہیں۔ مزید برآں، خصوصی کلچری تکنیکیں اسٹیم سیلز، آرگنائڈز، اور کوکلچر سسٹمز کی نشوونما کی اجازت دیتی ہیں، جو ترقیاتی حیاتیات، بیماری کی ماڈلنگ، اور منشیات کی دریافت کے لیے ماڈل فراہم کرتی ہیں۔

آرگن کلچر اور سیل کلچر پروڈکٹس کا اطلاق: اعضاء کی کلچر میں برقرار اعضاء یا ٹشوز ایکسپلانٹس ایکس ویو کی دیکھ بھال اور ہیرا پھیری شامل ہوتی ہے، جس سے محققین کو اعضاء سے متعلق مخصوص فزیالوجی، پیٹھوفیزیولوجی، اور منشیات کے رد عمل کا مطالعہ کرنے کی اجازت ملتی ہے۔ آرگنائڈک کلچریں بافتوں کی نشوونما، تخلیق نو، اور بیماری کے بڑھنے کے بارے میں قیمتی بصیرت پیش کرتی ہیں، جو منشیات کی اسکریننگ اور ٹاکسیکولوجی اسٹڈیز کے پلیٹ فارم کے طور پر کام کرتی ہیں۔ مزید برآں، سیل کلچر پروڈکٹس جیسے کہ نمو کے عوامل، سائٹوکائنز، اور سیل کلچر میڈیا سیل کی نشوونما، تفریق، اور خصوصی افعال میں معاونت میں اہم کردار ادا کرتے ہیں، مختلف تحقیق اور طبی ایپلی کیشنز کی سہولت فراہم کرتے ہیں۔

خلاصہ طور پر، سیل لائنوں کی علیحدگی اور کاشت، آرگن کلچر کی تکنیکوں اور سیل کلچر کی مصنوعات کے استعمال کے ساتھ، جدید حیاتیاتی تحقیق کے بنیادی ستونوں کی نمائندگی کرتی ہے۔ یہ طریقہ کار محققین کو سیلولر رویے کی پیچیدگیوں، پیچیدہ حیاتیاتی عمل کے ماڈل، اور طبی چیلنجوں سے نمٹنے کے لیے جدید علاج اور بائیو ٹیکنالوجی حل تیار کرنے کے قابل بناتے ہیں۔

4.1 مقاصد (Objectives)

- باب مکمل کرنے کے بعد، طلباء درج ذیل کو سمجھیں گے اور اس کی وضاحت کریں گے:
- ❖ وہ سیل لائنوں کو الگ تھلگ کرنے کے لیے استعمال کی جانے والی تکنیکوں کو سمجھیں گے، جس سے وہ تحقیق اور تجربات کے لیے خالص کلچر حاصل کر سکیں گے۔
 - ❖ وہ بڑے پیمانے پر سیل کلچر کے طریقوں سے واقف ہوں گے، جس سے وہ مختلف ایپلی کیشنز جیسے کہ منشیات کی جانچ یا بائیو پروڈکشن کے لیے سیل کی پیداوار کو بڑھا سکتے ہیں۔
 - ❖ طلباء تجرباتی ڈیزائن اور تشریح میں معاونت کرتے ہوئے، ان کی مورفولوجی، بائیو کیمیکل، یا جینیاتی خصوصیات کی بنیاد پر مختلف قسم کے مہذب خلیوں کی شناخت کر سکیں گے۔
 - ❖ وہ اعضاء کی کلچر کے استعمال کے بارے میں معلومات حاصل کریں گے، بشمول اعضاء کی نشوونما، بیماری کی ماڈلنگ، اور منشیات کی جانچ میں اس کا استعمال۔
 - ❖ طلباء سیل کلچر سے اخذ کردہ مصنوعات کی متنوع رینج کے بارے میں سیکھیں گے، جیسے کہ مونوکلونل اینٹی باڈیز، ویکسینز، اور دوبارہ پیدا کرنے والے پروٹین، اور طب، بائیو ٹیکنالوجی، اور تحقیق میں ان کے استعمال۔

4.2 سیل کلچر کے لیے سیل لائنز کی علیحدگی (Isolation of Cell Lines for Cell Culture)

سیل کلچر جدید حیاتیات اور بائیو ٹیکنالوجی میں ایک بنیادی تکنیک ہے، جس سے محققین کو حیاتیات سے باہر ایک کنٹرول شدہ ماحول میں خلیات کا مطالعہ کرنے کی اجازت ملتی ہے۔ مخصوص سیل لائنوں کو الگ کرنا اس عمل میں ایک اہم قدم ہے، جو محققین کو مخصوص سیل کی اقسام کے رویے، خصوصیات اور رد عمل کی چھان بین کرنے کے قابل بناتا ہے۔ علیحدگی کے عمل کا مزید تفصیلی جائزہ یہ ہے:

1. ٹشو پروکیورمنٹ: یہ عمل مطلوبہ سیل قسم پر مشتمل ٹشو کا نمونہ حاصل کرنے کے ساتھ شروع ہوتا ہے۔ یہ مختلف ذرائع سے حاصل کیا جاسکتا ہے جیسے کہ جانوروں کے ماڈل، انسانی بائیوپسی، یا سیل ریپوزٹریز۔ مثال کے طور پر، محققین میٹاسٹاسٹائٹس علیحدگی کے لیے ماؤس ماڈل سے جگر کے ٹشو جمع کر سکتے ہیں۔

2. ٹشو انخطاط: ایک بار ٹشو حاصل کرنے کے بعد، یہ انفرادی خلیات کو جاری کرنے کے لیے انخطاط سے گزرتا ہے۔ اس مرحلے میں ایکسٹریکٹڈ سیل اور سیل ٹو سیل آکسیجن کو توڑنا شامل ہے۔ انزیمینٹک ہاضمہ عام طور پر استعمال کیا جاتا ہے، جہاں انزائمز جیسے کہ لیچینیز، ٹریپس، یا ڈیپسین کو ٹشو پر لاگو کیا جاتا ہے تاکہ پروٹین کو توڑنے اور سیل کے اخراج کو آسان بنایا جاسکے۔ کمینیکل طریقوں جیسا کہ مائنسنگ یا پیمنٹ کو بھی الگ کرنے کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔

3. سیل کی علیحدگی: انخطاط کے بعد، نتیجے میں سیل کی معطلی مختلف سیل اقسام کا مرکب پر مشتمل ہو سکتی ہے۔ سیل علیحدگی

کی تکنیکوں کو پھر مطلوبہ سیل کی آبادی کو الگ کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ یہ کثافت میلان سنٹر فیوگریشن کے ذریعے حاصل کیا جاسکتا ہے، جہاں خلیات کو کثافت کے گریڈینٹ میڈیم پر تہہ کیا جاتا ہے اور سینٹر فیو جڈ کیا جاتا ہے، جس سے سیل کی کثافت کی بنیاد پر علیحدگی ہوتی ہے۔ متبادل طور پر، fluorescence-activated cell sorting (FACS) کو مخصوص سطح کے مارکر یا فلوروسینٹ لیبل کی بنیاد پر خلیات کو الگ تھلگ کرنے کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔ مثال کے طور پر، محققین پردی خون کے مونو نیوکلیر خلیوں کی مخلوط آبادی سے CD4+ T خلیات کو الگ کرنے کے لیے FACS کا استعمال کر سکتے ہیں۔

4. پرائمری کلچر اسٹیبلشمنٹ: الگ تھلگ سیلز کو پھر وٹرو میں ایک مناسب گروتھ میڈیم میں کلچر کیا جاتا ہے۔ میڈیم میں ضروری غذائی اجزاء، نشوونما کے عوامل، اور خلیے کے منسلک ہونے، پھیلاؤ، اور بقا کے لیے ضروری سپلیمنٹس شامل ہیں۔ بنیادی کلچر میں الگ تھلگ خلیوں سے قائم کی جاتی ہیں اور ان میں بافتوں کے منبع سے براہ راست اخذ کردہ متفاوت آبادی ہوتی ہے۔ مثال کے طور پر، نیوروسائنس کی تحقیق کے لیے منقطع دماغی بافتوں سے بنیادی اعصابی کلچر قائم کی جاسکتی ہیں۔

5. ذیلی کلچر اور کلونل توسیع: خلیات کی خالص آبادی حاصل کرنے کے لیے ذیلی کلچر کی تکنیکوں کو استعمال کیا جاتا ہے۔ پرائمری کلچر کے خلیات کو نئے کلچر کے برتنوں میں منتقل کیا جاتا ہے اور انہیں پھیلنے کی اجازت دی جاتی ہے، جس سے سیل کالونیاں بنتی ہیں۔ سنگل سیل یا سیل کالونیوں کو الگ تھلگ کرنے کے لیے سیریل ڈیلوشن یا محدود کرنے کے طریقے استعمال کیے جاسکتے ہیں، جنہیں پھر کلونل سیل لائنز قائم کرنے کے لیے بڑھایا جاتا ہے۔ یہ عمل مستقل خصوصیات کے ساتھ یکساں خلیے کی آبادی کے اخذ کو یقینی بناتا ہے۔ مثال کے طور پر، محققین مزید مطالعہ کے لیے سنگل کینسر اسٹیم سیلز کو الگ کرنے کے لیے محدود کمزوری کا استعمال کر سکتے ہیں۔

6. سیل لائن کی خصوصیت: ایک بار قائم ہونے کے بعد، سیل لائنز اپنی شناخت، پاکیزگی اور فینوٹائپک خصوصیات کی تصدیق کے لیے مکمل خصوصیات سے گزرتی ہیں۔ اس میں متعدد تکنیکیں شامل ہیں جن میں مورفولوجیکل تجزیہ، امیونوفینوٹائپنگ، جینیاتی پروفائلینگ، اور فنکشنل اسسیس شامل ہیں۔ مثال کے طور پر، پولیمریز چین ری ایکشن (PCR) کو الگ تھلگ سیل لائن میں مخصوص جینز یا تغیرات کے اظہار کی تصدیق کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔

7. مثالیں: متعدد سیل لائنوں کو الگ تھلگ کیا گیا ہے اور مختلف تحقیقی مقاصد کے لیے وسیع پیمانے پر مطالعہ کیا گیا ہے۔ مثالوں میں HeLa خلیات (سروائیکل کینسر)، MCF-7 خلیات (چھاتی کا کینسر)، اور HEK293 خلیات (انسانی برائن گردے) شامل ہیں۔ ہر سیل لائن میں منفرد خصوصیات اور اپیلی کیشنز ہوتے ہیں، جو انہیں کینسر کی حیاتیات، امیونولوجی، اور منشیات کی دریافت جیسے شعبوں میں تحقیق کے لیے قیمتی اوزار بناتے ہیں۔

خلاصہ یہ کہ سیل لائنوں کا الگ تھلگ ایک پیچیدہ اور پیچیدہ عمل ہے جس میں متعدد اقدامات شامل ہیں جن کا مقصد وٹرو اسٹڈیز کے لیے خالص اور اچھی خصوصیات والی سیل آبادی حاصل کرنا ہے۔ مختلف تحقیقی اپیلی کیشنز کے لیے کامیاب علیحدگی اور سیل لائنوں کے قیام کو یقینی بنانے کے لیے ہر قدم میں محتاط اصلاح اور غور و فکر کی ضرورت ہوتی ہے۔

4.3 سیل لائنوں کی بڑے پیمانے پر کلچر (Large scale culture of cell lines)

سیل لائنوں کی بڑے پیمانے پر کلچر بائیو ٹیکنالوجی، بائیو فارماسیوٹیکل، اور بائیو میڈیکل ریسرچ میں ایک بنیادی عمل ہے۔ اس میں حیاتیاتی طور پر فعال مرکبات، علاجاتی پروٹین، مونوکلونل اینٹی باڈیز، ویکسینز، اور سیل سے حاصل کردہ دیگر مصنوعات تیار کرنے کے لیے کنٹرول شدہ ماحول میں خلیوں کی ایک بڑی تعداد کی کاشت شامل ہے۔ اس عمل کے لیے کلچری حالات کی محتاط اصلاح، لیبارٹری کے پیمانے پر کلچروں سے صنعتی پیمانے کے بائیو ایکٹرز تک پیمانہ کاری، اور مصنوعات کی بحالی اور صاف کرنے کے لیے موثر بہاؤ پروسیجر کی ضرورت ہے۔ اس جامع جائزے میں، ہم بڑے پیمانے پر سیل کلچر کے مختلف پہلوؤں کا جائزہ لیں گے، بشمول طریقوں، چیلنجز، اور اپیلی کیشنز کی مثالیں۔

طریقے:

1. سیل لائن کا انتخاب: بڑے پیمانے پر کلچر کا آغاز مطلوبہ پروڈکٹ اور اپلیکیشن کی بنیاد پر مناسب سیل لائنوں کے انتخاب سے ہوتا ہے۔ عوامل جیسے ترقی کی خصوصیات، پیداواری صلاحیت، جینیاتی استحکام، اور ریگولیٹری تقاضے بہترین سیل لائن کو منتخب کرنے میں اہم کردار ادا کرتے ہیں۔ عام طور پر استعمال ہونے والی سیل لائنوں میں چینی ہیمسٹر اووری (CHO) خلیات، ہائپر ڈوما خلیات، کیڑے کے خلیے (جیسے Sf9) اور مختلف مالیہ سیل لائنیں شامل ہیں۔

2. سیڈ ٹرین کی توسیع: خلیوں کو بڑے پیمانے پر بائیوری ایکٹرز میں ٹیکہ لگانے سے پہلے، سیل بائیوماس کو بتدریج بڑھانے کے لیے بیچ ٹرین کی توسیع کا عمل استعمال کیا جاتا ہے۔ اس میں ماسٹر سیل بینک سے خلیوں کو چھوٹے پیمانے پر کلچروں میں ٹیکہ لگانا شامل ہے، جیسے شیک فلاکس یا بائیوری ایکٹرز، اور متعدد مراحل کے ذریعے کلچری حجم کو آہستہ آہستہ بڑھانا۔ سیڈ ٹرین کی توسیع یکساں نشوونما، کلچر کے حالات سے موافقت، اور سیل کی کارکردگی میں مستقل مزاجی کو یقینی بناتی ہے۔

3. بائیوری ایکٹر سیٹ اپ: بڑے پیمانے پر سیل کلچر عام طور پر بائیوری ایکٹرز یا فرمینٹرز میں کیا جاتا ہے جو جدید ترین ٹیکنالوجی اور کنٹرول سسٹم سے لیس ہوتے ہیں۔ بائیوری ایکٹر سیل کی نشوونما کے لیے ایک کنٹرول شدہ ماحول فراہم کرتے ہیں، جس میں درجہ حرارت، پی ایچ، تحلیل شدہ آکسیجن، اور اینٹی ٹیشن ریٹ جیسے پیرامیٹرز کو قریب سے منظم کیا جاتا ہے۔ مختلف قسم کے بائیوری ایکٹرز، بشمول سٹریٹینک ری ایکٹر، ایئر لفٹ ری ایکٹر، اور ویو بائیوری ایکٹرز، سیل لائن کی مخصوص ضروریات اور مطلوبہ پروڈکٹ کے لحاظ سے استعمال کیے جاتے ہیں۔

4. سیل ٹیکہ اور بڑھوتری: ایک بار جب بائیوری ایکٹر کو سیٹ اپ اور جراثیم سے پاک کیا جاتا ہے، بیچ کی ٹرین کی توسیع سے خلیوں کو کلچری برتن میں ٹیکہ لگایا جاتا ہے جس میں گروتھ میڈیم ہوتا ہے جو مخصوص سیل لائن کے لیے موزوں ہوتا ہے۔ ٹیکے لگائے گئے خلیوں کو کنٹرول شدہ حالات میں بڑھنے اور پھیلنے کی اجازت دی جاتی ہے، جس میں غذائی اجزاء مسلسل کھانا کھلانے یا وقفے وقفے سے سپلیمنٹ کے ذریعے فراہم کیے جاتے ہیں۔ زیادہ سے زیادہ ترقی اور پیداواری صلاحیت کو برقرار رکھنے کے لیے پورے عمل

کے دوران کلچر کے پیرامیٹرز کی نگرانی اور ایڈجسٹ کی جاتی ہے۔

5. Harvesting اور مصنوعات کی بازیافت: کلچر کی مدت کے اختتام پر، مطلوبہ مصنوعات کی بازیافت کے لیے خلیوں کی کٹائی کی جاتی ہے۔ اپیلی کیشن پر منحصر ہے، خلیوں کو انٹراسیلولر مصنوعات نکالنے کے لیے لیس کیا جاسکتا ہے یا سینٹروفیوگریشن یا فلٹریشن کے طریقوں کا استعمال کرتے ہوئے کلچر سپرنٹنٹ سے الگ کیا جاسکتا ہے۔ ڈاون اسٹریم پروسیسنگ کے اقدامات جیسے کہ صاف کرنے، ارتکاز اور فارمولیشن کو پھر مزید استعمال کے لیے پروڈکٹ کو الگ تھلگ اور بہتر کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

چیلنجز اور غور و فکر:

1. اسکیل اپ چیلنجز: لیبارٹری پیمانہ کلچروں سے بڑے پیمانے پر بائیوری ایکٹریز تک اسکیل کرنا کئی چیلنجز پیش کرتا ہے، بشمول بڑے پیمانے پر منتقلی کی حدود، فینچ کا دباؤ، اور کلچر کے حالات میں متفاوت۔ بائیوری ایکٹر میں یکساں نشوونما اور پیداواری صلاحیت کو یقینی بنانے کے لیے مکنگ، ہوا بازی، اور غذائی اجزاء کی تقسیم کی اصلاح ضروری ہے۔

2. آلودگی کا کنٹرول: بڑے پیمانے پر کلچر میں بیکیٹیریا، فنگی اور وائرس کے ذریعے آلودگی کے لیے حساس ہوتی ہیں، جو سیل کے قابل عمل ہونے اور مصنوعات کے معیار پر سمجھوتہ کر سکتی ہیں۔ آلودگی کو روکنے اور جراثیم کش حالات کو برقرار رکھنے کے لیے سخت جراثیم کش تکنیک، جراثیم سے پاک فلٹریشن، اور کلچر ویسلز کی باقاعدہ نگرانی ضروری ہے۔

3. میڈیا اور غذائیت کے تقاضے: بڑے پیمانے پر کلچروں میں خلیوں کی نشوونما اور پیداواری صلاحیت کو بڑھانے کے لیے گروتھ میڈیا اور غذائی اجزاء کی تکمیل بہت اہم ہے۔ میڈیا فارمولیشنز کو ضروری غذائی اجزاء، وٹامنز، معدنیات، اور سیل میٹابولزم اور پروٹین کے اظہار کے لیے درکار نمو کے عوامل فراہم کرنے کے لیے بہتر بنایا جانا چاہیے۔

4. سیل لائن موافقت: چھوٹے پیمانے سے بڑے پیمانے پر کلچروں میں منتقلی کے دوران خلیے فینوٹائپک تبدیلیوں یا موافقت سے گزر سکتے ہیں۔ سیل لائن کی مطلوبہ فینوٹائپ اور پیداواری صلاحیت کو برقرار رکھنے کے لیے کلچر کے حالات، جیسے کہ درجہ حرارت، پی ایچ، اور آکسیجن کی اصلاح ضروری ہو سکتی ہے۔

4.3.1 سیل کلچر اپیلی کیشنز کی مثالیں: (Examples of Cell culture Application)

1. مونوکلونل اینٹی باڈی کی پیداوار: CHO خلیوں کی بڑے پیمانے پر کلچر کو علاج اور تشخیصی مقاصد کے لیے مونوکلونل اینٹی باڈیز کی تیاری کے لیے بڑے پیمانے پر استعمال کیا جاتا ہے۔ CHO خلیات جینیاتی طور پر دوبارہ پیدا ہونے والے اینٹی باڈیز کے اظہار کے لیے بنائے جاتے ہیں، جو پھر بڑی مقدار میں بائیوری ایکٹریز میں تیار کیے جاتے ہیں اور طبی استعمال کے لیے صاف کیے جاتے ہیں۔

2. ویکسین کی تیاری: سیل پر مبنی ویکسین کی تیاری میں بڑے پیمانے پر ممالیہ یا کیڑے کے خلیوں کی کلچر شامل ہوتی ہے جو

دوبارہ پیدا ہونے والے وائرس یا وائرل ویکٹر سے متاثر ہوتے ہیں۔ یہ طریقہ وائرل ویکسین کی تیاری کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، جیسے کہ انفلوئنزا ویکسین، نیز سبوناٹ ویکسین، وائرس نماذرات (VLPs)، اور دیگر ویکسین امیدوار۔

3. انزائم اور پروٹین کی پیداوار: مائکرو بیل یا ممالیہ خلیوں کی بڑے پیمانے پر کلچر کو خامروں، دوبارہ پیدا کرنے والے پروٹینز، اور دیگر بائیو فارماسیوٹیکلز کی تیاری کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ اس میں علاج کے انزائمز، نمو کے عوامل، سائٹوکائینز، اور مختلف طبی استعمال کے لیے استعمال ہونے والے ہارمونز شامل ہیں۔

4. اسٹیم سیل کی توسیع: اسٹیم سیلز کا بڑے پیمانے پر کلچر دوبارہ پیدا کرنے والی ادویات، ٹشو انجینئرنگ، اور سیل پر مبنی علاج کے لیے ضروری ہے۔ مختلف ذرائع سے حاصل کردہ اسٹیم سیلز، جیسے بون میرو، ایڈیپوز ٹشو، یا ایسبرینک اسٹیم سیلز کو بائیو ٹیکنالوجی میں کنٹرول شدہ حالات میں پھیلا یا جاتا ہے تاکہ ٹرانسپلانٹیشن اور بافتوں کی تخلیق نو کے لیے کافی سیل نمبر پیدا کیے جاسکیں۔

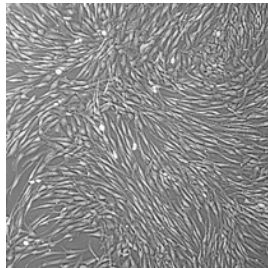
سیل لائنز کا بڑے پیمانے پر کلچر ایک پیچیدہ اور کثیرالثنباتی عمل ہے جو بائیو ٹیکنالوجی، بائیو فارماسیوٹیکل، اور بائیو میڈیکل ریسرچ میں اہم کردار ادا کرتا ہے۔ کلچر کے حالات کو بہتر بنا کر، پیداوار کو بڑھا کر، اور موثر بہاؤ پر وسیع کولاج کو لاگو کر کے، محققین اور صنعت کے ماہرین مختلف طبی اور صنعتی اپیلی کیشنز کے لیے نئے علاج، ویکسین، اور حیاتیات تیار کرنے کے لیے سیل پر مبنی ٹیکنالوجیز کی صلاحیت کو بروئے کار لاسکتے ہیں۔

4.4 کلچرڈ سیلز کی اقسام کا (Types of Cultured Cells)

سیل کلچر کے وسیع دائرے میں، محققین کو سیل کی اقسام کی بہتات کا سامنا کرنا پڑتا ہے، جن میں سے ہر ایک منفرد خصوصیات، طرز عمل اور اطلاقات کا حامل ہوتا ہے۔ بنیادی تحقیق سے لے کر طبی علاج اور صنعتی بائیو ٹیکنالوجی تک مختلف شعبوں میں ان کی صلاحیتوں سے فائدہ اٹھانے کے لیے مہذب خلیوں کی الگ الگ اقسام کو سمجھنا ضروری ہے۔ یہ تفصیلی تعارف مہذب خلیوں کی اہم اقسام کے بارے میں معلومات فراہم کرتا ہے، جس میں جامع بصیرت، مثالیں اور تصویری لنکس کو گہرائی سے سمجھنے کی سہولت فراہم کی گئی ہے۔

1۔ پرائمری سیلز (Primary Cells)

پرائمری خلیات بافتوں یا اعضاء سے براہ راست الگ تھلگ ہوتے ہیں اور ان کے vivo ہم منصوبوں کی بہت سی جسمانی



خصوصیات کو برقرار رکھتے ہیں۔ ان کی ایک محدود عمر ہوتی ہے اور آخر کار محدود تعداد میں خلیوں کی تقسیم کے بعد جوانی سے گزرتے ہیں۔ مثالوں میں شامل ہیں:

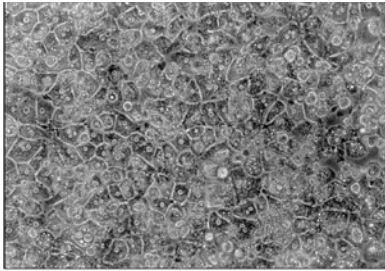
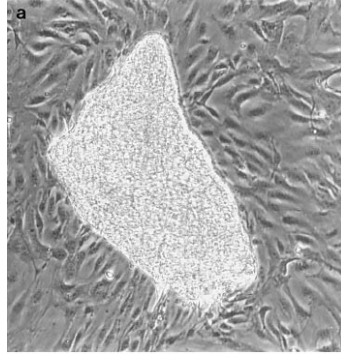
• انسانی ڈرمل فائبروبلاسٹس (Human Dermal Fibroblast): پرائمری فائبرو

بلاسٹس زخموں کو بھرنے اور بافتوں کی مرمت میں اہم کردار ادا کرتے ہیں۔ وہ جلد کی تحقیق اور

دوبارہ پیدا کرنے والی ادویات میں بڑے پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں۔

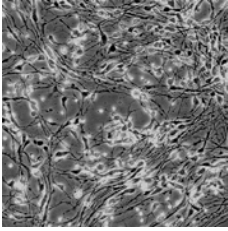
• اپیٹھل خلیے (Epithelial Cells): بنیادی اپیٹھل خلیے مختلف اعضاء کے استر بناتے ہیں اور ٹشو کے مخصوص افعال کو ظاہر کرتے ہیں۔

وہ اپیٹھل حیاتیات، رکاوٹ کی تقریب، اور بیماری کے طریقہ کار کے مطالعہ کے لیے قابل قدر ہیں۔



• میپاٹوسائٹس (Hepatocytes): پرائمری میپاٹوسائٹس جگر کے

فنکشن، منشیات کے میٹابولزم، اور زہریلے پین کی جانچ کے لیے ضروری ہیں۔ وہ جگر کی فزیالوجی اور بیماری کی تحقیق کے لیے ایک ماڈل سسٹم کے طور پر کام کرتے ہیں۔



• نیورونل سیلز (Neuronal Cells): پرائمری نیورونل کلچرز اعصابی نظام کی نشوونما،

Synaptic پلاسٹکٹی، اور نیوروڈیجنریٹو بیماریوں کے بارے میں بصیرت فراہم کرتے ہیں۔ وہ نیورو سائنس کی تحقیق کے لیے ناگزیر ہیں۔

پرائمری سیل کلچر عام سیلولر افعال، بیماری کے طریقہ کار، اور منشیات کے رد عمل کی تحقیقات کے لیے حیاتیاتی لحاظ سے متعلقہ ماڈل پیش کرتے ہیں۔ وہ ترجمہ کی تحقیق اور ذاتی نوعیت کی ادویات کے لیے ایک بنیاد فراہم کرتے ہیں۔

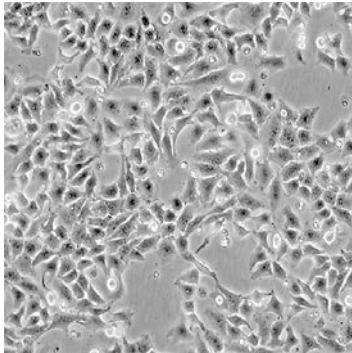
2۔ لافانی سیل لائنز (Immortal Cell Lines)

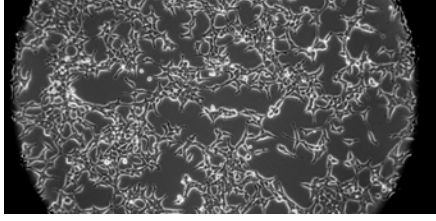
لافانی سیل لائنیں بنیادی خلیوں سے اخذ کی جاتی ہیں لیکن جوانی پر قابو پانے کے لیے جینیاتی تبدیلیوں یا انتخاب کے عمل سے

گزرے ہیں، کلچر میں غیر معینہ مدت تک پھیلاؤ کو قابل بناتے ہیں۔ مثالوں میں شامل ہیں:

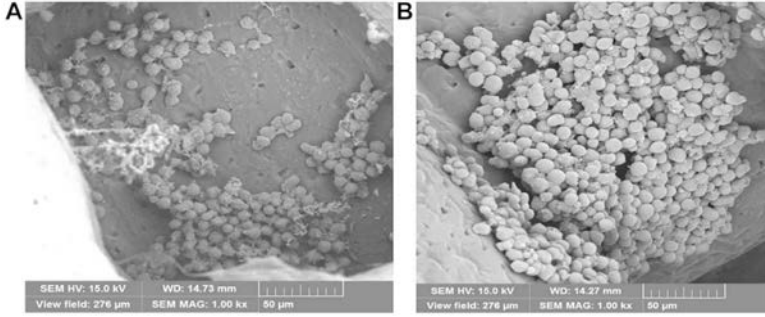
• HeLa سیلز: سروائیکل کینسر سے ماخوذ، HeLa سیلز بائیومیڈیکل ریسرچ میں سب سے زیادہ

استعمال ہونے والے لافانی سیل لائنوں میں سے ایک ہیں۔ انہوں نے متعدد سائنسی دریافتوں میں اپنا حصہ ڈالا ہے۔





• HEK293 خلیات: انسانی براؤن گردے کے خلیات سے ماخوذ، HEK293 خلیے پروٹین کے اظہار، وائرس کی پیداوار، اور سالماتی حیاتیات کے مطالعے کے لیے بڑے پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں۔

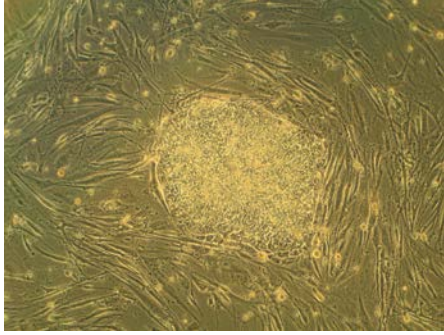


• جورکات خلیات (Jurkat Cells): انسانی ٹی لیمفوسائٹس سے ماخوذ، جورکات خلیات مدافعتی رد عمل، اپوٹوسس، اور سنگلنگ پاتھ ویز کا مطالعہ کرنے کے لیے قیمتی نمونے ہیں۔

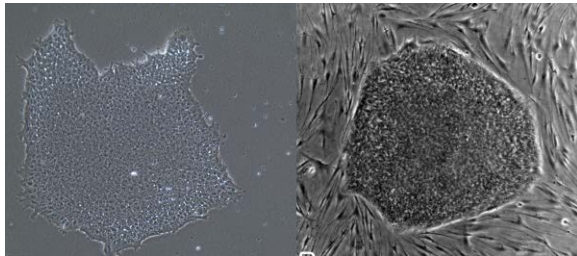
لافانی سیل لائنیں مستحکم جینیاتی خصوصیات فراہم کرتی ہیں اور بنیادی تحقیق، منشیات کی دریافت، اور بائیو ٹیکنالوجی ایپلی کیشنز میں ورک ہارسز کے طور پر کام کرتی ہیں۔

3۔ سٹیم سیلز (Stem Cells)

اسٹیم سیلز خود کو تجدید کرنے اور مخصوص سیل کی اقسام میں فرق کرنے کی قابل ذکر صلاحیت رکھتے ہیں۔ ان کے پاس دوبارہ پیدا کرنے والی ادویات، بیماری کی ماڈلنگ، اور منشیات کی اسکریننگ کے لیے بے پناہ صلاحیت موجود ہے۔ مثالوں میں شامل ہیں:

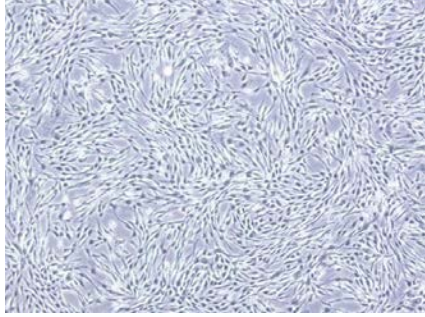


• ایمبریونک اسٹیم سیلز (Embryonic Stem Cells (ESCs): بلاسٹوسسٹس کے اندرونی خلیے سے ماخوذ، ESC میں یہ صلاحیت ہوتی ہے کہ وہ جسم کے تمام خلیوں کی اقسام میں فرق کر سکے۔ وہ ترقی اور بیماری کے بارے میں بصیرت پیش کرتے ہیں۔



• Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): بالغ

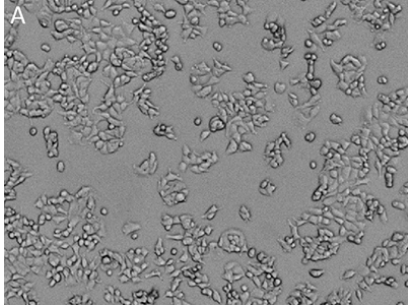
صوماتی خلیات کو دوبارہ پروگرام کرنے سے تیار کیا جاتا ہے، iPSCs pluripotency کو ظاہر کرتے ہیں اور سیل کی مختلف اقسام میں فرق کر سکتے ہیں۔ وہ ذاتی ادویات اور بیماری کی ماڈلنگ کو فعال کرتے ہیں۔



- Mesenchymal Stem Cells (MSCs): مختلف ٹشوز سے اخذ کیے گئے، MSCs دوبارہ تخلیقی اور امیونو موڈیولیٹری خصوصیات کے مالک ہوتے ہیں۔ وہ ٹشو کی مرمت اور سوزش کے عوارض کے علاج کا وعدہ رکھتے ہیں۔

4- کینسر سیل لائنز (Cancer Cell Lines)

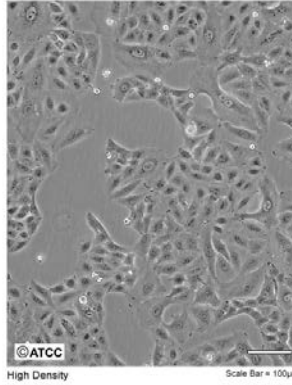
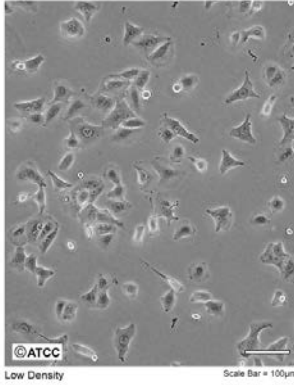
کینسر سیل لائنیں ٹیومر کے ٹشوز سے اخذ ہوتی ہیں اور بے قابو پھیلاؤ اور کینسر کی دیگر خصوصیات کو ظاہر کرتی ہیں۔ وہ کینسر کی تحقیق اور منشیات کی ترقی کے لیے انمول ماڈل کے طور پر کام کرتے ہیں۔ مثالوں میں شامل ہیں:



- MCF-7 خلیات: چھاتی کے اڈینوکارسینوما سے ماخوذ، MCF-7 خلیے چھاتی کے کینسر کی حیاتیات، ہارمون رد عمل، اور منشیات کی حساسیت کا مطالعہ کرنے کے لیے بڑے پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں۔

- A549 خلیے: A549 خلیے اڈینوکارسینومک انسانی ایپنڈیکس بیسل اپیتھیلیل

ATCC Number: CCL-185
Designation: A-549

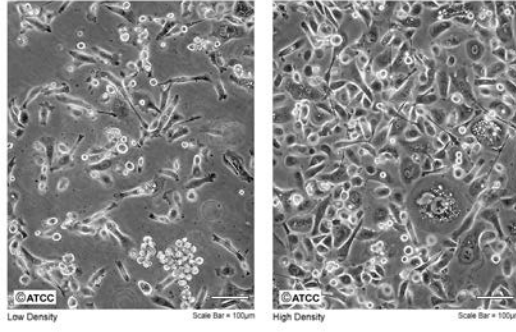


خلیات ہیں، اور ایک سیل لائن تشکیل دیتے ہیں جسے پہلی بار 1972 میں D. J. Giard et al نے تیار کیا تھا۔ ایک 58 سالہ کائشین مرد کے دریافت شدہ ٹیومر میں کینسر کے پھیپھڑوں کے ٹشو کو ہٹانے اور ان کی کلچر کے ذریعے۔ سیلز کو پھیپھڑوں کے کینسر کے مطالعہ اور اس کے خلاف منشیات کے علاج کی تیاری کے لیے بطور نمونہ استعمال کیا جاتا ہے۔

A549 خلیے عام طور پر پھیپھڑوں کے کینسر کی حیاتیات، منشیات کے خلاف مزاحمت کے طریقہ کار، اور علاج کی حکمت عملیوں کی تحقیقات کے لیے استعمال کیے جاتے ہیں۔

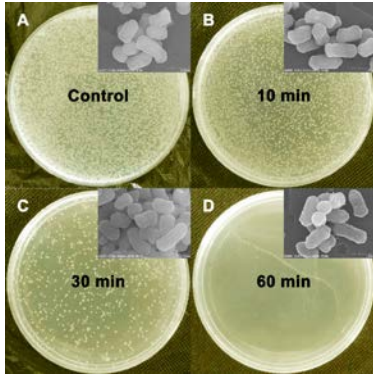
- PC-3 سیلز: پروسٹیٹ اڈینوکارسینوما سے ماخوذ، PC-3 سیلز کو پروسٹیٹ کینسر کے بڑھنے، میٹاسٹیسس، اور علاج کی مزاحمت کا مطالعہ کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ [تصویر کا لنک: PC-3 سیلز]

ATCC Number: CRL-1435
Designation: PC-3



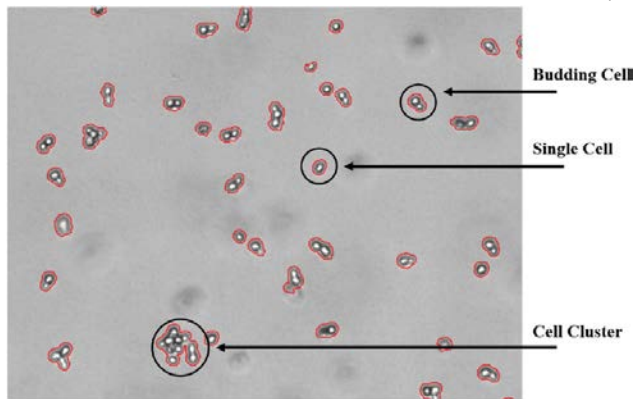
کینسر سیل لائنز کینسر کی حیاتیات کو واضح کرنے، علاج کے اہداف کی شناخت، اور کینسر مخالف ایجنٹوں کا جائزہ لینے میں اہم کردار ادا کرتی ہیں۔

5۔ مائکرو بیل سیلز (Microbial Cells)

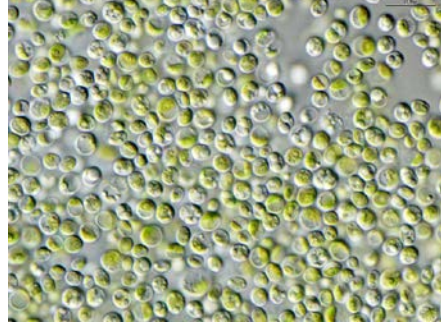


مائکرو بیل خلیات بیکٹیریا، فنگی اور طحالب کو گھیرے ہوئے ہیں، جو مائکرو بیل کلچروں کی بنیادی اکائیوں کے طور پر کام کرتے ہیں۔ وہ بائیو ٹیکنالوجی، صنعتی عمل، اور ماحولیاتی مطالعہ میں متنوع اپیلی کیشنز تلاش کرتے ہیں۔ مثالوں میں شامل ہیں: *Escherichia coli* (E. coli): ایک ماڈل بیکٹیریم جو دوبارہ پیدا ہونے والے پروٹین کی پیداوار، جینیاتی انجینئرنگ، اور بائیو پروسسنگ کے لیے استعمال ہوتا ہے۔

• *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast): استھنول اہل، دوبارہ پیدا کرنے والے پروٹین کے اظہار، اور جینیاتی مطالعہ کے لیے بائیو ٹیکنالوجی میں وسیع پیمانے پر استعمال کیا جاتا ہے۔



• *Chlorella spp.* (الگی): حیاتیاتی ایندھن کی پیداوار، گندے پانی کے علاج، اور کاربن کی تلاش کے لیے قیمتی ہے۔



مانکرو بیل سیل کلچر صنعتی بائیو ٹیکنالوجی، ماحولیاتی تدارک اور سائنسی تحقیق میں اہم کردار ادا کرتے ہیں۔ آخر میں، متنوع قسم کے مہذب خلیوں کو سمجھنا محققین کو اپنے مخصوص تحقیقی سوالات اور اپیلی کیشنز کے لیے موزوں ماڈل منتخب کرنے کا اختیار دیتا ہے۔ ہر سیل کی قسم کی منفرد خصوصیات کا فائدہ اٹھا کر، سائنس دان علم کو آگے بڑھا سکتے ہیں، اختراعی علاج تیار کر سکتے ہیں، اور سماجی چیلنجوں سے نمٹ سکتے ہیں۔

4.5 اعضاء کی کلچر کے اطلاقات (Applications of Organ Culture)

اعضاء کی کلچر، ایک ایسی تکنیک جس میں اعضاء یا بافتوں کی سابقہ دیکھ بھال اور ہیرا پھیری شامل ہے، نے اعضاء کی نشوونما، فزیالوجی، بیماری کے طریقہ کار، اور علاج معالجے کے بارے میں ہماری سمجھ میں نمایاں طور پر تعاون کیا ہے۔ ذیل میں اعضاء کی کلچر کے مختلف استعمال پر روشنی ڈالنے والے تفصیلی نوٹ ہیں۔

1. آرگن ڈویلپمنٹ اسٹڈیز (Organ Development Studies)

• اعضاء کی کلچر جنین اور بعد از پیدائش کی نشوونما کے دوران مختلف اعضاء کی نشوونما کا مطالعہ کرنے کے لیے ایک قابل قدر پلیٹ فارم مہیا کرتی ہے۔

• کلچری حالات میں اعضاء کو برقرار رکھ کر جو کہ *vivo* ماحول میں ان کی نقل کرتے ہیں، محققین آرگنوجینیسس کے تحت سیلو اور سالماتی میکا نزم کی چھان بین کر سکتے ہیں۔

• اعضاء کی کلچر اعضاء کی نشوونما میں ان کے کردار کو واضح کرنے کے لیے نشوونما کے عوامل، سگنلنگ راستے، اور ماحولیاتی اشارے کی ہیرا پھیری کی اجازت دیتی ہے۔

• مثال: ترقیاتی حیاتیات کے میدان میں، محققین آرگنوجینیسس کے پیچیدہ عمل کا مطالعہ کرنے کے لیے اعضاء کی کلچر کا استعمال کرتے ہیں۔ مثال کے طور پر، برائن کے پھیپھڑوں کے ایکسپلانٹس کلچر ڈائکس ویونے براؤننگ مورفوجینیسس اور ایوولر ڈیولپمنٹ میں شامل سگنلنگ راستوں کو واضح کرنے میں اہم کردار ادا کیا ہے۔ فبر بلاسٹ گروتھ فیکٹرز (FGFs) یا ریٹینوک ایسڈ جیسے عوامل کو کلچر میڈیم میں جوڑ کر، محققین پھیپھڑوں کی نشوونما میں اپنے کردار کی چھان بین کر سکتے ہیں۔

2. بیماری کی ماڈلنگ (Disease Modeling)

• اعضاء کی کلچر وٹرو میں انسانی بیماریوں کی ماڈلنگ کے لیے ایک طاقتور آلے کے طور پر ابھری ہے۔
 مریض کے خلیات سے حاصل کردہ بیمار ٹشو یا جینیاتی طور پر تبدیل شدہ آرگنائڈز کی کلچر کے ذریعے، محققین کینسر،
 نیوروڈیجینریٹو عوارض، اور میٹابولک سنڈروم جیسی بیماریوں کی پیٹھولو جیکل خصوصیات کی نقل کر سکتے ہیں۔
 • اعضاء کی کلچر کا استعمال کرتے ہوئے تیار کردہ بیماری کے ماڈل بیماری کی ترقی، منشیات کے رد عمل، اور ممکنہ علاج کی
 مداخلت کے مطالعہ کو قابل بناتے ہیں۔

• مثال: اعضاء کی کلچر نے بیماری کی ماڈلنگ میں انقلاب برپا کر دیا ہے، خاص طور پر آنکولوجی میں۔ چھاتی کے کینسر کے بڑھنے اور
 علاج معالجے کے رد عمل کا مطالعہ کرنے کے لیے محققین نے انسانی چھاتی کے بافتوں کے آرگنائڈز کی کلچر ماڈل تیار کیے ہیں،
 جن میں میمری ڈکٹ اور لوبول بھی شامل ہیں۔ یہ ماڈل ٹیومر مائیکرو ماحولیات کی کلیدی خصوصیات کو دوبارہ بیان کرتے ہیں،
 جیسے سیل سیل کے تعاملات، ایکسٹرا سیلولر میٹرکس کمپوزیشن، اور ہائپوکسیا، جس سے ٹیومر کی افزائش، حملے، اور میٹاسٹیسس کی
 تحقیقات کو جسمانی طور پر متعلقہ سیاق و سباق میں ممکن بنایا جاتا ہے۔

3. منشیات کی دریافت اور زہریلا ٹیسٹنگ (Drug Discovery and Toxicity Testing)

• اعضاء کی ثقافت منشیات کی دریافت اور زہریلے پن کی جانچ کے لیے ایک قابل قدر پلیٹ فارم کے طور پر کام کرتی
 ہے، جو روایتی سیل کلچر ماڈلز کے مقابلے میں زیادہ جسمانی طور پر متعلقہ نظام پیش کرتی ہے۔
 • آرگن کلچر سسٹم کا استعمال کرتے ہوئے ہائی تھروپٹ اسکریننگ اسسز افادیت اور حفاظت کے لیے منشیات کے
 امیدواروں کی تیز رفتار جانچ کی اجازت دیتے ہیں۔
 • اعضاء کی ثقافت کے ماڈل ٹشو کے مخصوص سیاق و سباق میں منشیات کے میٹابولزم، فارماکوکینٹکس، اور منشیات کے
 درمیان تعاملات کی تشخیص کو قابل بناتے ہیں۔

• مثال: اعضاء کی ثقافت کے نظام منشیات کی دریافت اور زہریلا کی جانچ کے لیے انمول ہیں۔ مثال کے طور پر،
 محققین دواسازی کے مرکبات کی میٹابولٹکسٹی کا اندازہ لگانے کے لیے جگر کے سلائس کلچر ماڈلز کا استعمال کرتے ہیں۔ ٹیسٹ
 مرکبات کے ساتھ جگر کے ٹکڑوں کو درست طریقے سے انکیوبیٹ کر کے، محققین منشیات کی وجہ سے جگر کی چوٹ، میٹابولک
 ایکٹیویشن، اور منشیات کے باہمی تعامل کا اندازہ لگا سکتے ہیں۔ یہ ماڈل روایتی سیل کلچر سسٹمز کے مقابلے میں انسانی میٹابولٹکسٹی
 کی زیادہ درست پیشین گوئیاں فراہم کرتے ہیں۔

4. ٹشو انجینئرنگ اور ری جرنیو میڈیسن (Tissue Engineering and Regenerative Medicine)

• اعضاء کی ثقافت ٹشو انجینئرنگ کے طریقوں میں ایک اہم کردار ادا کرتی ہے جس کا مقصد پیوند کاری کے لیے
 فنکشنل ٹشوز اور اعضاء پیدا کرنا ہے۔

• خلیات کو باہم مطابقت پذیر سہاروں پر بیج کر اور انہیں اعضاء کی ثقافت کے نظاموں میں کلچر کر کے، محققین بافتوں

کی نشوونما، پختگی اور عروقی کو فروغ دے سکتے ہیں۔

• اعضاء کی ثقافت کی تکنیکیں تمام انجینئرڈ ٹشوز میں غذائی اجزاء اور آکسیجن کے اخراج کی سہولت فراہم کرتی ہیں، ان کی عملداری اور فعالیت کو بڑھاتی ہیں۔

• مثال: اعضاء کی ثقافت ٹشو انجینئرنگ کی حکمت عملیوں میں ایک اہم کردار ادا کرتی ہے جس کا مقصد ٹرانسپلانٹیشن کے لیے بائیو انجینئرڈ اعضاء کو تیار کرنا ہے۔ ایک قابل ذکر مثال گردے کے آرگنائزڈ کلچر ڈائکس ویو کا استعمال کرتے ہوئے بائیو مصنوعی گردے کی نشوونما ہے۔ محققین گردوں کے خلیوں کو غیر محفوظ سہاروں پر بیجتے ہیں اور انہیں بائیوری ایکٹر سسٹم میں کلچر کرتے ہیں جو گردوں کے مائیکرو ماحولیات کی نقل کرتا ہے۔ یہ نقطہ نظر فنکشنل نیفرون اور ویسکولر نیٹ ورکس کی تشکیل کو فروغ دیتا ہے، جو وائیٹ ڈائلا سزیا گردے کی پیوند کاری کا ایک امید افزا متبادل پیش کرتا ہے۔

5. پیوند کاری اور اعضاء کا تحفظ (Transplantation and Organ Preservation)

• اعضاء کی ثقافت میں عطیہ دہندگان کے اعضاء سابق ویو کی پیشگی شرط کے لیے پلیٹ فارم فراہم کر کے اعضاء کی پیوند کاری اور تحفظ میں درخو استیں ہیں۔

• غذائیت سے بھرپور کلچر میڈیا اور فارماسولوجیکل ایجنٹس کے ساتھ عطیہ کرنے والے اعضاء کو پرفیوز کرنا اعضاء کی عملداری کو بہتر بنا سکتا ہے، اسکیمیا ریپرفیوژن انجری کو کم کر سکتا ہے، اور اعضاء کے تحفظ کے اوقات کو بڑھا سکتا ہے۔

• اعضاء کی ثقافت کی تکنیکیں پیوند کاری سے پہلے اعضاء کے معیار اور افعال کا جائزہ لینے کی بھی اجازت دیتی ہیں، جو مریض کے بہتر نتائج میں حصہ ڈالتی ہیں۔

• مثال: پیوند کاری کے لیے عطیہ دہندگان کے اعضاء کے معیار اور عملداری کو بہتر بنانے کے لیے آرگن کلچر کی تکنیکیں اہم ہیں۔ مثال کے طور پر، ایکس ویو ہارٹ پرفیوژن سسٹمز کا استعمال کرتے ہوئے دل کی حفاظت اعضاء کے تحفظ کے اوقات کو بڑھانے اور اسکیمیا ریپرفیوژن انجری کو کم کرنے کے لیے ایک امید افزا حکمت عملی کے طور پر سامنے آئی ہے۔ عطیہ دہندگان کے دلوں کو آکسیجن والے خون اور قلبی حفاظتی حل کے ساتھ پرفیوز کر کے، محققین ٹرانسپلانٹیشن سے پہلے مایو کارڈیل عملداری اور کام کو برقرار رکھ سکتے ہیں، گرافٹ کی بقا اور مریض کے نتائج کو بڑھا سکتے ہیں۔

6. بائیو میڈیکل ریسرچ اینڈ ٹرانسلیشنل اسٹڈیز (Biomedical Research and Translational Studies)

• اعضاء کی ثقافت بنیادی تحقیق اور کلینیکل ایپلی کیشنز کے درمیان ایک پُل کا کام کرتی ہے، ترجمہ مطالعات کی سہولت فراہم کرتی ہے جس کا مقصد نئے علاج اور طبی مداخلتوں کو تیار کرنا ہے۔

• ثقافت میں اعضاء کو برقرار رکھنے سے، محققین بیماری کے طریقہ کار کی چھان بین کر سکتے ہیں، علاج کی حکمت عملیوں کی جانچ کر سکتے ہیں، اور کلینیکل ٹرائلز میں منتقل ہونے سے پہلے ایک کنٹرول شدہ ماحول میں طبی نتائج کی توثیق کر سکتے

ہیں۔

• اعضاء کی ثقافت کے ماڈلز علاج کے لیے مریض کے مخصوص رد عمل، ذاتی نوعیت کے ادویات کے طریقوں، اور بیماری کی تشخیص کے لیے بائیومارکر کی شناخت کے مطالعہ کو قابل بناتے ہیں۔

• مثال: اعضاء کی ثقافت ترجمہ تحقیق کے لیے ایک قیمتی پلیٹ فارم کے طور پر کام کرتی ہے جس کا مقصد جینیاتی عوارض کے مریضوں کے لیے ذاتی نوعیت کے علاج تیار کرنا ہے۔ مثال کے طور پر، محققین سسٹک فائبروسس کے نمونے کے لیے مریض سے اخذ کردہ آنتوں کے آرگنائڈز کلچر ڈائکس ویو کا استعمال کرتے ہیں، یہ ایک موروثی پھیپھڑوں کی بیماری ہے جو CFTR جین میں تغیرات کی وجہ سے ہوتی ہے۔ مریض کے لیے مخصوص آرگنائڈز کو کلچر کر کے اور انہیں ڈرگ اسکریننگ ایسیس کے تابع کر کے، محققین امیدواروں کے علاج کی شناخت کر سکتے ہیں جو CFTR فنکشن کو بحال کرتے ہیں اور بیماری کی علامات کو کم کرتے ہیں، اور صحت سے متعلق ادویات کے طریقوں کے لیے راہ ہموار کرتے ہیں۔

خلاصہ یہ کہ اعضاء کی ثقافت ایک ور سٹائل اور طاقتور تکنیک ہے جس میں بائیو میڈیکل ریسرچ، ڈیزیز ماڈلنگ، ڈرگ دریافت، ٹشو انجینئرنگ، ٹرانسپلائنٹیشن، اور ٹرانسپلائنٹیشنل میڈیسن میں وسیع پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں۔ آرگن کلچر کے طریقہ کار میں مسلسل پیشرفت، بشمول آرگن آن اے چپ سسٹمز اور بائیو انجینئرنگ کے طریقوں کی ترقی، سائنس اور طب کے مختلف شعبوں میں اس کی افادیت اور مطابقت کو مزید وسعت دینے کا وعدہ رکھتی ہے۔

4.6 سیل کلچر کی ایپلی کیشنز (Application of Cell Culture)

سیل کلچر، کنٹرول شدہ حالات میں ان کے قدرتی ماحول سے باہر خلیات کی پرورش اور ہیرا پھیری کا فن، جدید بائیو میڈیکل ریسرچ اور علاج معالجے کی بنیاد کے طور پر کھڑا ہے۔ اس کی استعداد مختلف ڈومینز میں پھیلی ہوئی ہے، بنیادی سیلولر عمل کو کھولنے سے لے کر جدید علاج کو آگے بڑھانے تک۔ اس جامع ریسرچ میں، ہم سیل کلچر کے کثیر جہتی ایپلی کیشنز کا جائزہ لیتے ہیں، جو بائیو میڈیکل سائنس کی تشکیل میں اس کے اہم کردار کو ظاہر کرنے والی مثالی مثالوں سے بھرپور ہے۔

1. بنیادی تحقیق اور سیلولر بیالوجی (Basic Research and Cellular Biology)

سیل کلچر سیلولر حیاتیات کی پیچیدگیوں کی تحقیقات کے لیے ایک ناگزیر آلے کے طور پر کام کرتا ہے۔

• مثال: انسانی برائن سٹیم سیلز (hESCs) کی کاشت نے pluripotency اور تفریق کے بارے میں ہماری سمجھ میں انقلاب برپا کر دیا ہے۔ blastocysts سے ماخوذ، hESCs جنین کی نشوونما کو کنٹرول کرنے والے مالیکیولر میکانزم کو واضح کرنے میں اہم کردار ادا کرتے رہے ہیں۔ مختلف خلیوں کے نسبوں میں فرق کرنے کی ان کی صلاحیت ٹشو کی تشکیل اور تخلیق نو کے بارے میں بصیرت پیش کرتی ہے، جو دوبارہ پیدا کرنے والی دوائی کے طریقوں کی بنیاد رکھتی ہے۔

2. ڈیزیز ماڈلنگ اور ڈرگ ڈسکوری (Disease Modeling and Drug Discovery)

سیل کلچر ماڈل بیماریوں کی ماڈلنگ اور ممکنہ علاج معالجے کے لیے انمول پلیٹ فارم فراہم کرتے ہیں۔
مثال کے طور پر: چوہا یا انسانی بافتوں سے حاصل ہونے والی بنیادی اعصابی ثقافتیں الزائمر کی بیماری جیسے نیوروڈیجنریٹو عوارض کے لیے وفادار نمونے کے طور پر کام کرتی ہیں۔ یہ ثقافتیں بیماری سے متعلق مخصوص پیتھالوجیز کو دوبارہ بیان کرتی ہیں، محققین کو بیماری کے طریقہ کار کی تحقیقات کرنے اور امیدواروں کی دوائیوں کا جائزہ لینے کے قابل بناتی ہیں۔ اس طرح کے ماڈلز نے نیوروڈیجنریٹو کونشانہ بنانے والی نئی علاج کی حکمت عملیوں کی ترقی میں تعاون کیا ہے۔

3. ویکسین ڈیولپمنٹ اور وائرل ریسرچ (Vaccine Development and Viral Research)

• سیل کلچر ویکسین کی تیاری اور وائرولوجی ریسرچ میں ایک اہم کردار ادا کرتا ہے۔
مثال کے طور پر: افریقی سبز بندر گردے کے خلیات سے اخذ کردہ ویروسیل، ویکسین کی تیاری میں استعمال ہونے والے وائرس کے پھیلاؤ کے لیے بڑے پیمانے پر کام کرتے ہیں۔ قابل ذکر بات یہ ہے کہ پولیو وائرس، خسرہ کے وائرس، اور انفلوئنزا وائرس کے خلاف ویکسین کی تیاری اور تیاری میں ویرو خلیات بہت اہم رہے ہیں۔ وائرل انفیکشن کے لیے ان کی اجازت انہیں وائرل روگجن کا مطالعہ کرنے اور اینٹی وائرل ایجنٹوں کا جائزہ لینے کے لیے ناگزیر اوزار بناتی ہے۔

4. کینسر ریسرچ اینڈ آنکولوجی (Cancer Research and Oncology)

• سیل کلچر ماڈل کینسر کی حیاتیات کی پیچیدگیوں کو واضح کرنے اور علاج کی مداخلتوں کی تلاش میں اہم کردار ادا کرتے ہیں۔

• مثال: گریو کینسر کے مریض سے اخذ کردہ HeLa خلیات، کینسر کی تحقیق میں بڑے پیمانے پر استعمال کیے گئے ہیں۔ یہ خلیے کینسر کے خلیات کی مخصوص خصوصیات کو ظاہر کرتے ہیں، جیسے بے قابو پھیلاؤ اور لافانی ہونا۔ HeLa خلیات کینسر کی حیاتیات کا مطالعہ کرنے، منشیات کی اسکریننگ، اور منشیات کے خلاف مزاحمت کے طریقہ کار کو سمجھنے میں اہم کردار ادا کرتے رہے ہیں، جس سے کینسر کے ہدف کے علاج کی راہ ہموار ہوتی ہے۔

5. اسٹیم سیل تھراپی اور regeneration کرنے والی دوا (Stem Cell Therapy and Regenerative Medicine)

سیل کلچر کی تکنیکیں علاج کے استعمال کے لیے اسٹیم سیلز کی توسیع اور تفریق کے لیے ناگزیر ہیں۔
مثال کے طور پر: انڈسٹنڈ پلورپوٹنٹ اسٹیم سیلز (iPSCs)، جو بالغ صوماتی خلیات سے دوبارہ پروگرام کیے گئے ہیں، جن میں دوبارہ پیدا کرنے والی دوا کے لیے بے پناہ صلاحیت موجود ہے۔ iPSCs کو مہذب کیا جاسکتا ہے اور سیل کی مختلف اقسام میں تفریق کی جاسکتی ہے، جو نیوروڈیجنریٹو بیماریوں سے لے کر قلبی عوارض تک کے حالات کے لیے ذاتی نوعیت کے علاج کے اختیارات پیش کرتے ہیں۔ ٹرانسپلائنٹیشن کے لیے مریض کے لیے مخصوص خلیات پیدا کرنے کی ان کی صلاحیت ذاتی ادویات میں ان کی اہمیت کو واضح کرتی ہے۔

6. بائیو فارماسیوٹیکل پروڈکشن اور بائیو ٹیکنالوجی (Biopharmaceutical Production and Biotechnology)

سیل کلچر بائیو فارماسیوٹیکل مینوفیکچرنگ کی ریڑھ کی ہڈی کے طور پر کام کرتا ہے، علاجی پروٹین اور حیاتیات کی تیاری میں سہولت فراہم کرتا ہے۔

• مثال: چینی ہیمرسٹریضہ دانی (CHO) خلیے بائیو فارماسیوٹیکل پیداوار کے کام کے گھوڑے ہیں۔ سی ایچ او خلیے، جو انسانوں کی طرح کے بعد از ترجمے کی تبدیلیوں کے ساتھ پیچیدہ گلائیکوپروٹین تیار کرنے کی صلاحیت کے لیے مشہور ہیں، ان کا استعمال مونوکلونل اینٹی باڈیز اور ریکومیننٹ پروٹینز کی تیاری میں کیا جاتا ہے۔ ان کی توسیع پذیری اور بایوری ایکٹر سسٹم کے ساتھ مطابقت انہیں بڑے پیمانے پر بائیو پروڈکشن کے لیے مثالی امیدوار بناتی ہے۔

سیل کلچر بائیو میڈیکل ریسرچ اور علاج کی ترقی میں ایک ور سٹائل اور ناگزیر ٹول کے طور پر کھڑا ہے، جو سیلولر بائیولوجی کے اسرار کو کھولنے اور سائنسی دریافتوں کو کلینیکل ایپلی کیشنز میں ترجمہ کرنے کے بے مثال مواقع فراہم کرتا ہے۔ فراہم کردہ مثالیں بائیو میڈیکل سائنس کے مختلف پہلوؤں پر اس کے تبدیلی کے اثرات کو واضح کرتی ہیں، صحت کی دیکھ بھال کے بہتر نتائج کے حصول میں مسلسل جدت اور ترقی کا وعدہ کرتی ہیں۔

4.7 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

- ❖ اکائی مکمل کرنے کے بعد، طلباء نے مندرجہ ذیل چیزیں سیکھی ہوں گے کہ۔
- ❖ اب وہ سیل لائنوں کو الگ تھلگ کرنے کے لیے استعمال ہونے والی تکنیکوں کی وضاحت کر سکتے ہیں، جس سے وہ تحقیق اور تجربات کے لیے خالص ثقافتیں حاصل کر سکتے ہیں۔
- ❖ اب وہ بڑے پیمانے پر سیل کلچر کے طریقوں سے واقف ہیں، جس کی وجہ سے وہ مختلف ایپلی کیشنز جیسے کہ منشیات کی جانچ یا بائیو پروڈکشن کے لیے سیل کی پیداوار کو بڑھا سکتے ہیں۔
- ❖ طلباء اب تجرباتی ڈیزائن اور تشریح میں مدد کرتے ہوئے مختلف قسم کے مہذب خلیوں کی شناخت کرنے کے قابل ہو جائیں گے جو ان کی مورفولوجیکل، بائیو کیمیکل یا جینیاتی خصوصیات کی بنیاد پر ہیں۔
- ❖ اب وہ اعضاء کی ثقافت کے استعمال کی وضاحت کر سکتے ہیں، بشمول اعضاء کی نشوونما، بیماری کی ماڈلنگ، اور منشیات کی جانچ میں اس کا استعمال۔
- ❖ طلباء اب سیل کلچر سے اخذ کردہ مصنوعات کی متنوع رینج کی وضاحت کر سکتے ہیں، جیسے کہ مونوکلونل اینٹی باڈیز، ویکسینز، اور ریکومیننٹ پروٹین، اور طب، بائیو ٹیکنالوجی، اور تحقیق میں ان کے استعمال۔

4.8 کلیدی الفاظ (Keywords)

م بافتوں کا انحطاط	Tissue dissociation	: بافتوں کے نمونوں کو انفرادی خلیوں میں توڑنے کا عمل، عام طور پر انزیمیٹک ہاضمہ یا کینیکل طریقوں کا استعمال کرتے ہوئے۔
فلوروسینس ایکٹیویٹڈ سیل	Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	فلوروسینس ایکٹیویٹڈ سیل فلوروسائٹومیٹری کا استعمال کرتے ہوئے مخصوص سطح کے مارکر یا فلوروسینٹ لیبل پر مبنی خلیوں کو الگ کرنے کا طریقہ۔۔
چھانٹنا (FACS)	Primary culture	: ٹشو کے نمونوں سے الگ تھلگ سیلز کو براہ راست کلچر کرنا تاکہ ماخذ ٹشو سے پرائمری کلچر
		اخذ کردہ متفاوت آبادی قائم کی جاسکے۔

4.9 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

4.9.1 4.9.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. _____ زخم بھرنے اور بافتوں کی مرمت میں اہم کردار ادا کرتا ہے۔ وہ جلد کی تحقیق اور دوبارہ پیدا کرنے والی ادویات میں بڑے پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں۔
2. _____ خلیات بڑے پیمانے پر پروٹین کے اظہار، وائرس کی پیداوار، اور سالماتی حیاتیات کے مطالعہ کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔
3. پرائمری میٹابولائٹس _____ فنکشن، ڈرگ میٹابولزم، اور زہریلے پن کی جانچ کے لیے ضروری ہیں۔
4. _____ ثقافتیں اعصابی نظام کی نشوونما، synaptic plasticity، اور neurodegenerative بیماریوں کے بارے میں بصیرت فراہم کرتی ہیں۔
5. HeLa خلیے سروائیکل کینسر سے اخذ کیے گئے ہیں اور کینسر کی تحقیق، منشیات کی جانچ، اور منشیات _____ کے طریقہ کار کو سمجھنے میں بڑے پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں۔
6. ویروسائز کو ویکسین کی تیاری میں استعمال ہونے والے وائرس کے پھیلاؤ کے لیے بڑے پیمانے پر استعمال کیا جاتا ہے، جیسے پولیو وائرس، خسرہ کا وائرس، اور انفلوئنزا وائرس۔
7. حوصلہ افزائی شدہ pluripotent اسٹیم سیلز (iPSCs) میں _____ دوا کے لیے بے پناہ صلاحیت موجود ہے، جو مختلف حالات کے لیے ذاتی نوعیت کے علاج کے اختیارات پیش کرتے ہیں۔
8. CHO خلیے انسانوں کی طرح کے بعد از ترجمے کی تبدیلیوں کے ساتھ پیچیدہ گلائیکوپروٹین تیار کرنے کی اپنی صلاحیت کے لیے مشہور ہیں اور ان کا استعمال مونوکلونل اینٹی باڈیز اور ریکومیننٹ _____ کی تیاری میں کیا جاتا ہے۔

9. _____ ثقافت بنیادی تحقیق اور کلینیکل اپیلی کیشنز کے درمیان ایک پل کا کام کرتی ہے، ترجمہ مطالعات کی سہولت فراہم کرتی ہے جس کا مقصد نئے علاج اور طبی مداخلتوں کو تیار کرنا ہے۔

10. اعضاء کی ثقافت وٹرو میں انسانی بیماریوں کی ماڈلنگ کے لیے ایک طاقتور ٹول کے طور پر ابھری ہے، جس سے بیماری کے بڑھنے، منشیات کے رد عمل، اور ممکنہ علاج _____ کے مطالعہ کو قابل بنایا جاسکتا ہے۔

4.9.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. سیل کلچر میں مخصوص سیل لائنوں کو الگ کرنے کا بنیادی مقصد کیا ہے؟
2. تنہائی کے عمل میں خلیے کی علیحدگی کے لیے استعمال ہونے والا ایک عام طریقہ بیان کریں۔
3. سیل کلچر میں اسٹیم سیلز لافانی سیل لائنوں سے کیسے مختلف ہیں؟
4. کینسر کی تحقیق اور اس کی اصلیت میں وسیع پیمانے پر استعمال ہونے والی سیل لائن کی مثال فراہم کریں۔
5. بائیومیڈیکل ریسرچ اور علاج معالجے میں اعضاء کی ثقافت کی کیا اہمیت ہے؟

4.9.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. سیل کلچر کے لیے سیل لائنوں کو الگ تھلگ کرنے میں ٹشو پروکیورمنٹ کی اہمیت پر تبادلہ خیال کریں۔
2. سیل کلچر میں بنیادی ثقافت کے قیام کے عمل کی وضاحت کریں،
3. خلیات کی خالص آبادی حاصل کرنے کے لیے سیل کلچر میں استعمال ہونے والی ذیلی ثقافت اور کلونل توسیع کی تکنیکوں کی وضاحت کریں۔
4. سیل لائنوں کے بڑے پیمانے پر کلچر میں شامل مختلف طریقوں اور چیلنجوں کو دریافت کریں،
5. پرائمری سیلز، لافانی سیل لائنز، اسٹیم سیلز، کینسر سیل لائنز اور مائکرو بیل سیلز سمیت اہم قسم کے مہذب سیلز کا موازنہ اور ان کے برعکس کریں۔

4.10 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Bioreactor	بائیوریکٹر	بائیوریکٹر	ایک برتن جو بڑے پیمانے پر سیل کلچر کے لیے استعمال ہوتا ہے، جو سیل کی نشوونما اور مصنوعات کی پیداوار کے لیے ایک کنٹرول شدہ ماحول فراہم کرنے کے لیے نگرانی اور کنٹرول کے نظام سے لیس ہوتا ہے۔

Stem cells	اسٹیم سیلز	اسٹیم سیلز	خلیے جن میں خود تجدید اور خصوصی سیل کی اقسام میں فرق کرنے کی صلاحیت ہوتی ہے، بشمول ایسبریونک اسٹیم سیل اور انڈسٹڈ pluripotent اسٹیم سیل۔
Subculture	ذیلی ثقافت	-	ایک بنیادی ثقافت سے خلیات کو نئے ثقافتی برتنوں میں منتقل کرنے کا عمل مزید پھیلاؤ کی اجازت دینے کے لیے۔

4.11 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Freshney, R. I. (2016). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (7th ed.). Wiley-Blackwell.
2. Masters, J. R. W. (2012). Human Cell Culture: Cancer Cell Lines Part 2. Springer.
3. Doyle, A., & Griffiths, J. B. (2000). Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. Wiley-Blackwell.
4. Pollard, J. W., & Walker, J. M. (Eds.). (2018). Basic Cell Culture Protocols (4th ed.). Springer.
5. Hay, R. J., & Park, J. G. (Eds.). (2018). Basic Techniques in Cell Culture. Springer.
6. Davis, J. M. (2017). Basic Cell Culture. Academic Press.

اکائی 5: ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی

(Recombinant DNA Technology)

اکائی کے اجزاء:

تعارف (Introduction)	5.0
مقاصد (Objectives)	5.1
ریکومیننٹ ڈی این اے (Recombinant DNA)	5.2
Recombinant DNA ٹیکنالوجی کا اطلاق	5.2.1
Recombinant DNA ٹیکنالوجی کی حدود	5.2.2
لائگیشن کے انزائمز (اینڈونکلیزٹائپ I – IV)	5.3
(Restriction Enzymes Endonucleases I-IV)	
لائگیشن Endonucleases کی درجہ بندی	5.3.1
ڈی این اے لائگیشن کے طریقے (Methods of DNA Ligation)	5.4
لائگیشن (Ligation)	5.4.1
لائگیشن رد عمل (Ligation Reaction)	5.4.2
لائگیشن کو متاثر کرنے والے عوامل (Factors affecting ligation)	5.4.3
ڈی این اے کی ارتکاز (DNA concentration)	5.4.4
Ligase کی ارتکاز (Ligase Concentration)	5.4.5
لائگیشن کے رد عمل کا درجہ حرارت (Temperature of Ligation reaction)	5.4.6
بفر کمپوزیشن (Buffer Composition)	5.4.7
چپچپا آخر لائگیشن (Sticky-end Ligation)	5.4.8
کند آخر لائگیشن (Blunt End Ligation)	5.4.9
عمومی ہدایات (General Guidelines)	5.4.10

5.4.11	DNA ligation کے دیگر طریقے
5.5	اكتسابی نتائج (Learning Outcomes)
5.6	کلیدی الفاظ (Keywords)
5.7	نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)
5.7.1	معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)
5.7.2	مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)
5.7.3	طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)
5.8	فرہنگ (Glossary)
5.9	مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

5.0 تمہید (Introduction)

مالیکیولر بائیولوجی کے وسیع منظر نامے میں، ریکومینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی ایک سنگ بنیاد کے طور پر کھڑی ہے، جو سائنسدانوں کو متعدد مقاصد کے لیے ڈی این اے میں ہیرا پھیری اور انجینئرنگ کرنے کے قابل بناتی ہے۔ یہ باب جینیاتی ہیرا پھیری کی پیچیدہ دنیا کا ذکر کرتا ہے، جس میں ریکومینٹ ڈی این اے کی تخلیق پر توجہ مرکوز کی گئی ہے، لانگشن والے اینڈونکلیز کا اہم کردار، لانگیشن کے طریقے، اور ڈی این اے لیگیسز کی فعالیت۔ ان بنیادی اصولوں کو سمجھ کر، سیکھنے والے بنیادی تکنیکوں کے ذریعے سفر کا آغاز کرتے ہیں جنہوں نے حیاتیاتی تحقیق اور بائیو ٹیکنالوجی میں انقلاب برپا کر دیا ہے۔

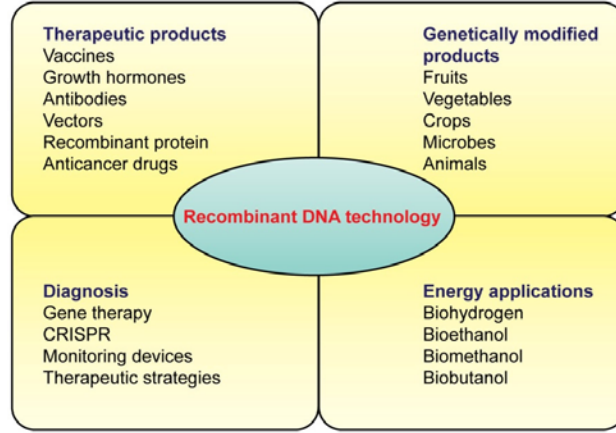
ریکومینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی جینیاتی مواد میں ترمیم کرنے کی ہماری صلاحیت میں ایک مثالی تبدیلی کی نشاندہی کرتی ہے، مختلف ذرائع سے ترتیب کے امتزاج کے ذریعے نئے ڈی این اے مالیکیولز کی تخلیق میں سہولت فراہم کرتی ہے۔ اس کے دل میں ڈی این اے کے ٹکڑوں کا عین مطابق ہیرا پھیری ہے، یہ ایک ایسا عمل ہے جو لانگشن والے اینڈونکلیز کے عمل سے ممکن ہوا ہے۔ یہ مالیکیولر قینچیاں، جو بیکیٹیریا اور آثار قدیمہ سے حاصل کی گئی ہیں، مخصوص شناخت کے سلسلے میں ڈی این اے کو کلیو کرتی ہیں، جس سے ٹارگٹ جین ہیرا پھیری کی راہ ہموار ہوتی ہے۔

ریکومینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کی کامیابی کے لیے بہت اہم ہے ligation کا عمل، جس میں DNA کے ٹکڑے بغیر کسی رکاوٹ کے آپس میں جڑ جاتے ہیں۔ یہ باب ڈی این اے کے مالیکیولز کے درمیان فاسفو ڈیوسٹر بانڈز کی تشکیل کو متحرک کرنے کے لیے DNA ligases کے استعمال کردہ میکانزم پر روشنی ڈالتے ہوئے، ligation کے مختلف طریقوں کی کھوج کرتا ہے۔ خواہ ہم آہنگی یاد دہانہ سے انجام سے

نمٹنا ہو، سیکھنے والے ٹکڑوں کی اسمبلی کی پیچیدگیوں کے بارے میں بصیرت حاصل کریں گے، جو کہ درستی اور کارکردگی کے ساتھ دوبارہ پیدا ہونے والے DNA مالیکیولز کی تعمیر کے لیے ضروری ہے۔

جب ہم دوبارہ پیدا ہونے والی ڈی این اے ٹیکنالوجی کی باریکیوں کے ذریعے تشریف لے جائیں گے، سیکھنے والے مالیکیولر ٹولز اور تکنیکوں کے پیچیدہ جال کو کھولیں گے جو جدید بائیو ٹیکنالوجی اور جینیاتی انجینئرنگ کی بنیاد رکھتے ہیں۔ ڈی این اے کی ہیرا پھیری کے اصولوں کو سمجھنے سے لے کر ligation کے طریقوں میں مہارت حاصل کرنے تک، یہ باب جینیاتی تبدیلی کی صلاحیت کو کھولنے اور سائنسی تحقیق اور اس سے آگے اس کے بے شمار اپیلی کیشنز کو کھولنے کے لیے ایک گیٹ وے کا کام کرتا ہے۔

روایتی طریقے، جیسے پودوں کی افزائش، کئی سالوں سے زرعی پیداواری صلاحیت کو بڑھانے، مختلف ایونٹک / بائیونٹک دباؤ کا مقابلہ کرنے، اور کیڑوں اور کیڑوں کے خلاف مزاحمت پیدا کرنے کے لیے استعمال کیے جا رہے ہیں۔ تاہم، جینیاتی انجینئرنگ نے روایتی پودوں کی نشوونما اور پیداواری حکمت عملیوں کا متبادل فراہم کیا ہے۔ قابل اعتماد مصنوعات حاصل کرنے کے لیے، جینیاتی انجینئرنگ جدید آلات جیسے مالیکیولر کلوننگ، تبدیلی، اور جین کے اظہار کو استعمال کرتی ہے، جو پودوں کی افزائش کے روایتی طریقوں کے مقابلے میں کم وقت لیتی ہے۔ Recombinant DNA ٹیکنالوجی کسی جاندار کے جینیاتی مواد کو تبدیل کرنے پر مبنی ہے تاکہ دلچسپی کے جین کے بہتر اظہار کو حاصل کیا جا سکے۔ کسی جاندار کے جینوم میں ہیرا پھیری جین یا ریگولیٹری عناصر کے تعارف کے ساتھ ساتھ اینڈو جینس جین کے اظہار کی روک تھام کے ذریعے ہوتی ہے۔ ایک مناسب ویکٹر، جیسا کہ پلاسماڈ، کسی جاندار کے جینوم میں مطلوبہ جین کی ترتیب داخل کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ ریکومیننٹ ڈی این اے اس وقت بنتا ہے جب مطلوبہ ڈی این اے کا ٹکڑا یا دلچسپی کا ایک جین میزبان جینوم میں داخل کیا جاتا ہے۔ ماڈل مائکرو جینز کو ریکومیننٹ پلاسماڈ کے ساتھ تبدیل کیا جا رہا ہے، یہ ڈی این اے کی کاپیاں بنا کر اس کی نقل تیار کرتا ہے اور اسے اپنی اولاد میں منتقل کرتا ہے۔ پال برگ، ہربرٹ بوئیر، اینی چانگ، اور شینلے کوہن سٹینفورڈ یونیورسٹی اور کیلیفورنیا یونیورسٹی، سان فرانسسکو نے 1972 میں پہلا دوبارہ پیدا کرنے والا DNA (rDNA) مالیکیول بنایا۔ کئی مصنوعات جیسے ہارمونز، ویکسین، علاج معالجے اور تشخیصی آلات 1980 کی دہائی کے وسط میں ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کی مدد سے تیار کیے گئے تھے۔ مزید برآں، حیواشم ایندھن کی وجہ سے پیدا ہونے والی آلودگی کو کم کرنے کے لیے حیواشم ایندھن تیار کرنے کے لیے جینیاتی انجینئرنگ کی حکمت عملیوں کا استعمال کیا گیا ہے۔ نئی ویکسین اور دوا سازی تیار کرنے سے، دوبارہ پیدا ہونے والی ڈی این اے ٹیکنالوجی صحت کے حالات کو بہتر بنانے میں مدد کرتی ہے۔ حالیہ برسوں میں، جینیاتی انجینئرنگ نے پودوں میں ان فصلوں کی نشوونما کے ذریعے اپنے استعمال کا مظاہرہ کیا ہے جو فنگل، وائرل اور پودوں کی بیماریوں کے انفیکشن کے خلاف مزاحم ہیں۔ شکل 5.0 جینیٹک انجینئرنگ ٹیکنالوجی کی مختلف اپیلی کیشنز کا خلاصہ کرتا ہے۔



شکل 5.0 جینیاتی انجینئرنگ ٹیکنالوجی کی مختلف ایپلی کیشنز

5.1 مقاصد (Objectives)

اس یونٹ کا مطالعہ کرنے کے بعد، آپ اس قابل ہو جائیں گے:

- ❖ ریکومبیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کے تصور کی وضاحت کریں۔
- ❖ ریکومبیننٹ ڈی این اے کی تشکیل میں شامل مختلف انزائمز کی فہرست بنائیں۔

❖ ligation کے طریقے، DNA ligases، cohesive، blunt ends کی وضاحت کریں۔

5.2 ریکومبیننٹ ڈی این اے (Recombinant DNA)

ریکومبیننٹ ڈی این اے (آر ڈی این اے) ٹیکنالوجی ایسی خصوصیات یا خصوصیات کے ساتھ پر جاتیوں کو تیار کرنے میں مدد کرتی ہے جو قدرتی طور پر ان پر جاتیوں میں نہیں پائی جاتی ہیں۔ تیاری میں چار اہم مراحل شامل ہیں:

1. ڈی این اے کی علیحدگی
2. ڈی این اے کو الگ کرنا
3. ڈی این اے کی لائگیشن
4. تبدیلی
5. آر ڈی این اے کی افزائش

1. ڈی این اے کی علیحدگی (DNA Isolation)

ویکٹر اور ڈونز ڈی این اے دونوں الگ تھلگ اور لائزوزائمز، سیلولیز، چٹینینس، رابونیکلیر، اور پروٹیز کا استعمال کرتے ہوئے پاک

ہوتے ہیں۔

2. ڈی این اے کی سپلائنگ سنگ (Splicing of DNA)

صاف شدہ ڈی این اے منتخب لاگشٹن والے انزائم کے ساتھ تیار کیا جاتا ہے۔ لاگشٹن انزائمز ڈی این اے کاٹتے ہیں۔ لاگشٹن کا انزائم مطلوبہ ٹکڑا حاصل کرنے کے لیے مخصوص مقامات پر مخصوص ڈی این اے کی ترتیب کو پہچانتا ہے۔ ان جگہوں پر درار پیدا ہوتی ہے جس کی وجہ سے ترتیب کی تشکیل ہوتی ہے جسے بیلینڈروم کہتے ہیں۔ سرکلر ڈی این اے کھلتا ہے۔ ڈونر ڈی این اے کے چچیپا یا مربوط سرے (پوائنٹس جہاں کاٹا گیا تھا) چچیپا کے ساتھ مطابقت رکھتے ہیں

ویکٹر ڈی این اے کے سرے ہضم شدہ ڈی این اے کے ٹکڑوں کو الیکٹروفورسس کا استعمال کرتے ہوئے الگ کیا جاتا ہے۔ ویکٹر ڈی این اے پر بھی اسی طریقہ کار سے عمل کیا جاتا ہے۔

3. ڈی این اے کو جوڑنا (DNA Ligation)

لاگشتنا جوڑنے والے انزائم کے استعمال کے بعد دونوں ڈی این اے کے ٹکڑوں میں بننے والے چچیا سرے تکمیلی ہوتے ہیں۔ لہذا، دونوں ڈی این اے کے ٹکڑوں کو ملا کر نیا آر ڈی این اے بنایا جاسکتا ہے۔ ڈبل سٹرینڈ ڈی این اے بنانے کے لیے سنگل اسٹرینڈز پر تکمیلی سلسلے کے درمیان ہائیڈروجن بانڈز بنانے کے عمل کو اینیلنگ کہتے ہیں۔ اینزائم ڈی این اے لیگیس ڈی این اے کے ٹکڑوں میں شامل ہوتا ہے۔ ڈی این اے لیگیس ٹکڑوں کے درمیان فاسفو ڈیوسٹر ریٹ پیدا کرتا ہے۔ عمل

انزائم DNA ligase کا استعمال کرتے ہوئے ان دو ٹکڑوں کو ایک ساتھ جوڑنا 'ligation' ہے۔ نتیجہ خیز ڈی این اے مالیکیول دو ڈی این اے مالیکیولز کا ایک ہائبرڈ ہے (تصویر 14.9)۔ ہائبرڈ DNA مالیکیول کو ریکومیننٹ DNA مالیکیول بھی کہا جاتا ہے، اور ٹیکنالوجی کو ریکومیننٹ DNA ٹیکنالوجی کہا جاتا ہے۔ وہ پروٹین جو ریکومیننٹ ڈی این اے مالیکیولز سے تیار ہوتے ہیں انہیں ریکومیننٹ پروٹین کہا جاتا ہے۔

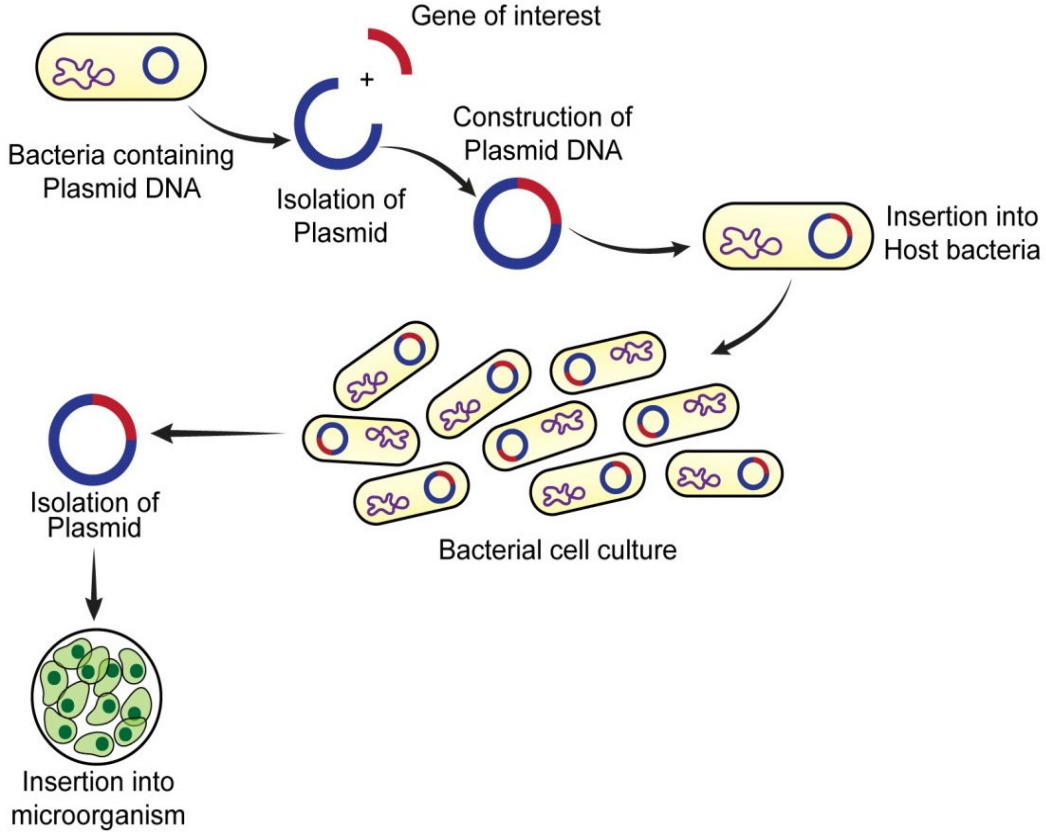
4. تبدیلی (Transformation)

rDNA وصول کنندہ کے میزبان سیل (ہیکٹیریل سیل) میں داخل کیا جاتا ہے۔ اس عمل کو 'تبدیلی' کہا جاتا ہے۔ تبدیلی کا عمل تبدیل شدہ اور غیر تبدیل شدہ میزبان خلیوں کی مخلوط آبادی پیدا کرتا ہے۔ پلاسٹمڈ ویکٹر کا مارکر جین غیر دوبارہ پیدا ہونے والے خلیے سے ریکومیننٹ سیل کو الگ کرنے میں لگا جاتا ہے۔

5. وسعت (Amplification)

تبدیلی سے پہلے، ڈی این اے کے ٹکڑے جو بڑی مقدار میں دستیاب نہیں ہیں ان کو ایمپلیفیکیشن کے ذریعے ضرب کیا جاسکتا ہے۔

ایک پی سی آر رد عمل ڈی این اے کی ترتیب کو بڑھادیتا ہے جسے بلنٹ یا سنگل بیس اوور ہینگ ligation کے ذریعے ویکٹر پر لگایا جاسکتا ہے۔
ڈی این اے کی ایک کاپی ڈی این اے کی لاکھوں کاپیاں حاصل کرنے کے لیے استعمال کی جاسکتی ہے۔



شکل 5.1: ریکومیننٹ ڈی این اے کی تشکیل میں مختلف اقدامات شامل ہیں۔

5.2.1 Recombinant DNA ٹیکنالوجی کا اطلاق

- ❖ Recombinant DNA ٹیکنالوجی کو طب اور تحقیق میں بڑے پیمانے پر استعمال کیا جاتا ہے۔
- ❖ اس ٹیکنالوجی کا استعمال جینوں کی شناخت، نقشہ اور ترتیب اور ان کے کام کا تعین کرنے کے لیے کیا جاتا ہے۔
- ❖ اس ٹیکنالوجی کو بیماریوں کی موجودگی کا پتہ لگانے کے لیے بھی استعمال کیا جاتا ہے۔
- ❖ ایک شخص میں ایچ آئی وی
- ❖ اس ٹیکنالوجی کا استعمال جینیاتی طور پر انجینئرڈ فصلوں کی تیاری میں کیا جاسکتا ہے۔
- ❖ یہ تکنیک جین کے نقائص کو درست کرنے کے لیے جین تھراپی میں مفید ہے جو موروٹی بیماریوں کو جنم دیتے ہیں۔
- ❖ ریکومیننٹ پروٹیز، خلیات اور جانداروں کے اندر پروٹین کی ترکیب کی جانچ کے لیے اینٹی باڈی پروبس تیار کرتے ہیں۔

5.2.2 Recombinant DNA ٹیکنالوجی کی حدود

- ❖ دوبارہ پیدا ہونے والے جاندار قدرتی ماحول کو آلودہ کرتے ہیں۔ جانداروں کے درمیان ملکیتی ڈی این اے کی آلودگی اور منتقلی کے نتیجے میں "جین آلودگی" ہو سکتی ہے۔ اس کے علاوہ، دوبارہ پیدا ہونے والے جاندار بیماریوں، کیڑوں اور دیگر ایجنٹوں کے لیے خطرے سے دوچار ہوتے ہیں جو پوری جنگلی آبادی کو تیزی سے مٹا دیتے ہیں۔
- ❖ اسپروئڈز وقت کے ساتھ ساتھ نشوونما پاتے ہیں کیونکہ ہائبرڈائزیشن نئے جینز کو جنگلی پودوں میں منتقل کرتی ہے اور جڑی بوٹیوں سے دوچار ہونے والی مزاحمت، تناؤ کو برداشت کرنے، اور کیڑوں کے خلاف مزاحمت کی خصوصیات متعارف کراتی ہے۔
- ❖ آر ڈی این اے میں ترمیم شدہ پودوں کا انسانی یا جانوروں کا استعمال زہریلا ثانوی میٹابولائٹ یا پروٹین ٹاکسن پیدا کر سکتا ہے، خاص طور پر اگر پودوں کو کیڑے مکوڑوں کے خلاف مزاحمت کرنے کے لیے انجینئر کیا گیا ہو۔

5.3 لائگشن کے انزائمز (اینڈونکلیز ٹائپ I – IV)

(Restriction Enzymes Endonucleases I-IV)

لائگشن کا انزائم نیوکلیز انزائم کی ایک قسم ہے جو ڈی این اے کو بے ترتیب یا مخصوص شناختی جگہوں پر بند کرتی ہے جسے لائگشن کی جگہوں کے نام سے جانا جاتا ہے، یہ ڈی این اے کی کلون یا کاپیاں حاصل کرنے کے لیے بہت مفید ہے۔

5.3.1 لائگشن Endonucleases کی درجہ بندی

ذیلی یونٹ کی ساخت، کلیوٹج پوزیشنز، کو فیکٹر کی بنیاد پر

تقاضے، اور ترتیب کی خصوصیت، لائگشن کے خامروں کو I، II، III، اور IV کے طور پر درجہ بندی کیا گیا ہے۔

قسم I لائگشن کے خامروں Type I restriction enzymes

یہ انزائمز ملٹی انزائم کمپلیکس ہیں، جن میں 15-bp کی شناخت کی ترتیب ہے، اور یہ لائگشن اور ترمیم دونوں کے قابل ہیں۔ یہ انزائمز ڈی این اے کو اس کی شناخت کے سلسلے سے بہت دور کاٹ دیتے ہیں۔ شناخت کی جگہ سے تقریباً 1000 bp دور فاصلہ ہوتا ہے۔ شناخت کی جگہ غیر متناسب ہے اور دو الگ الگ حصوں پر مشتمل ہے، ایک 3-4 نیوکلیوٹائیڈز کے ساتھ اور دوسرا 4-5 نیوکلیوٹائیڈز کے ساتھ۔ تقریباً 6-8 نیوکلیوٹائیڈز کا ایک غیر مخصوص اسپیسر دونوں حصوں کو الگ کرتا ہے۔ ہدف ڈی این اے کا میتھیلیشن لائگشن کا تعین کرتا ہے۔ سرگرمی کے لیے، ان انزائمز کو S adenosylmethionine (SAM)، ATP، اور میگنیشیم آئنز (Mg^{2+}) کی ضرورت ہوتی ہے۔ یہ انزائمز تین ذیلی یونٹوں سے مل کر بنتے ہیں: ایک مخصوص ذیلی یونٹ جو ڈی این اے کی شناخت کی سائٹ کا تعین کرتا ہے، ایک لائگشن کا ذیلی یونٹ جو شناخت کی جگہ کے علاوہ دوسری جگہوں پر ہوتا ہے، اور ایک ترمیمی ذیلی یونٹ جو کلیوٹج سائٹ کا تعین کرتا ہے، مثال کے طور پر، Eco B.

قسم II لائگشن کا انزائم

یہ انزائم اپنی لائگشن والی جگہوں کے قریب یا اندر مخصوص مقامات پر کاٹتے ہیں۔ سپیلیمنڈرومک تسلسل کو ان انزائمز سے پہچانا جاتا ہے۔ چونکہ وہ ہوموڈیمر کے طور پر ڈی این اے سے منسلک ہوتے ہیں، زیادہ تر ہم آہنگی ڈی این اے کی ترتیب کو تسلیم کرتے ہیں، لیکن کچھ (مثلاً، BbvCI: CCTCAGC) غیر متناسب ڈی این اے کی ترتیب کو پہچانتے ہیں کیونکہ وہ ہیٹروڈیمرز کے طور پر منسلک ہوتے ہیں۔ سرگرمی کے لیے، انہیں صرف میگنیشیم کی ضرورت ہوتی ہے، اور متعلقہ ترمیمی خامروں کو صرف S-adenosylmethionine کی ضرورت ہوتی ہے۔ وہ عام طور پر چھوٹے ہوتے ہیں، جن میں 200 سے 350 امینو ایسڈ ہوتے ہیں۔ 350 سے زیادہ مختلف قسم کی قسم II لائگشن والے اینڈونکلیز ہیں۔ یہ انزائمز جین کلوننگ، میپنگ اور ڈی این اے کی تعمیر نو میں کام کرتے ہیں۔ مثال ہند III اور EcoRI۔ قسم III لائگشن کے انزائمز قسم I اور قسم II لائگشن کے خامروں کے درمیان ایک پل ہیں۔ یہ انزائمز اسی ڈی این اے کی ترتیب کو پہچانتے اور میتھلیٹ کرتے ہیں لیکن تقریباً 24-26 bp دور، یعنی وہ شناخت کی جگہ کے قریب ڈی این اے کو توڑ دیتے ہیں۔ یہ دوزیلی یونٹس میں تقسیم ہیں۔ ایک DNA subunit (M) کی ترتیب کو پہچانتا اور اس میں ترمیم کرتا ہے، جبکہ دوسرا (R) نیوکلیز کے طور پر کام کرتا ہے۔ ڈی این اے کلیوٹج کے لیے Mg^{2+} ، ATP، اور SAM کی موجودگی کی ضرورت ہوتی ہے، مثال کے طور پر، EcoPI۔ قسم IV لائگشن والے انزائمز، جیسے McrBC، ہدف میں ترمیم شدہ ڈی این اے جیسے میتھلیٹڈ، ہائیڈروکسی میتھلیٹڈ، اور گلوکوسائل-ہائیڈروآکسی میتھلیٹڈ ڈی این اے۔ ان کے طرز عمل کی بنیاد پر، لائگشن کے خامروں کو دو قسموں میں درجہ بندی کیا گیا ہے:

1 Exonucleases - وہ انزائمز جو DNA یا RNA مالیکیول کے اختتام سے ٹرمینل نیوکلئوٹائیڈز کے ہائیڈرولیسس کو 5'

سے 3' سمت یا 3' سے 5' سمت تک متحرک کرتے ہیں۔ مثال کے طور پر، Exonuclease I، Exonuclease II، وغیرہ

2 Endonucleases - وہ انزائمز جو DNA یا RNA مالیکیول کے اندر مخصوص بنیادی ترتیب (لائگشن سائٹ) کو

پہچانتے ہیں اور DNA مالیکیول کے اندر اندرونی فاسفوڈیسٹر بانڈز کو توڑتے ہیں۔ مثال کے طور پر، Eco R I، Hind III، Bam HI.

ایک لائگشن endonuclease ایک ترتیب کو تسلیم کرتی ہے اور ملحقہ نیوکلئوٹائیڈس کے درمیان ہائیڈرولیسس (پانی کے مالیکیول کے اضافے کے ساتھ کیمیائی بانڈ کو توڑ کر) ڈی این اے کے مالیکیولز کو کاٹ دیتی ہے۔ ڈی این اے مالیکیول کی شوگر فاسفیٹ ریڈھ کی ہڈی کو دوبارہ کاٹا جاتا ہے۔ لائگشن والے انزائمز سپیلیمنڈروم کی ترتیب کو پہچانتے ہیں، جو کہ 4 سے 8 بیس جوڑوں کی لمبائی میں مختصر ڈی این اے کی ترتیب ہیں۔ سپیلیمنڈروم 3' to 5' سمت میں DNA کے دو تکمیلی اسٹرینڈز پر ایک ہی نیوکلئوٹائیڈ تسلسل ہیں۔ مثال کے طور پر، اگر ایک اسٹرینڈ کی ترتیب 3' GAATTC 5' ہے، تو مخالف اسٹرینڈ کی ترتیب 5' CTTAAG 3' ہے۔ جب دونوں اسٹرینڈز کو $5' \rightarrow 3'$ سمت میں پڑھا جاتا ہے، تو ترتیب ایک ہی رہتی ہے۔ سپیلیمنڈروم کو 3' GAATTC 5'، 5' CTTAAG 3' کے طور پر لکھا جاتا ہے مختلف انزائمز DNA میں مختلف اور مخصوص ترتیبوں کو پہچانتے ہیں۔ جب ایک ہی لائگشن کا انزائم ڈی این اے کو دونوں سروں پر کاٹتا ہے، تو یہ ایک اسٹرینڈ کے دوسرے پر لٹکتے ہوئے ختم ہوتا ہے، جس کے نتیجے میں ایک مختصر واحد پھنسے ہوئے حصے کی صورت میں نکلتا ہے۔

اور ہینگ آسانی سے دوسرے ملتے جلتے سروں سے دوبارہ جوڑتا ہے اور اس طرح اسے "چپچپا سرے" کہا جاتا ہے۔ یہاں تک کہ اگر اوور ہینگز مختلف پیرنٹ ڈی این اے مالیکیولز سے آتے ہیں، وہ ہائبرڈائز ("اینیل") کرتے ہیں۔ چسپاں سرے، نتیجے کے طور پر، متنوع ڈی این اے سیگمنٹس اور نول ڈی این اے کنسٹرکٹس کی تشکیل میں سہولت فراہم کرتے ہیں۔ دیگر لائگشن والے اینڈونکلیز ایک "بلنڈ اینڈ" پیدا کرتے ہیں، جس کا مطلب ہے کہ ٹکڑوں کے آخر میں کوئی جوڑا نہ بنا ہوا بیس یا اوور ہینگز نہیں ہیں۔ چونکہ یہ ڈی این اے کے ٹکڑے ایک دوسرے سے جڑ نہیں سکتے، ان کا کلون بنانا مشکل ہے۔ کچھ انزائمز، کلیوٹج کے علاوہ، میتھیلیشن کی شکل میں تبدیلی لاتے ہیں۔ ان انزائمز کو ترمیمی انزائمز (جسے میتھیلیسز بھی کہا جاتا ہے) کہا جاتا ہے۔ بیکٹیریا میں، لائگشن کے انزائمز ایک مشترکہ نظام (لائگشن + ترمیمی نظام) بناتے ہیں، جس کا مطلب ہے کہ وہ بیکٹیریا کے ڈی این اے کے ساتھ ساتھ اسے میتھائلیٹ کرتے ہیں۔ بیکٹیریا کے ڈی این اے کی میتھیلیشن بیکٹیریا کے اپنے ڈی این اے کو ایک لائگشن والے انزائم کے ذریعے پھٹنے سے بچاتی ہے۔

لائگشن والے اینڈونکلیز کا نام اس جاندار کے نام پر رکھا گیا ہے جس نے انہیں دریافت کیا۔ انزائمز کی شناخت حروف اور اعداد سے ہوتی ہے۔ رومن حروف کو عام طور پر استعمال کیا جاتا ہے اور ترچھا کیا جاتا ہے۔ ہر انزائم کا نام اس بیکٹیریم کے نام پر رکھا گیا ہے جس نے اسے پیدا کیا۔ مخصوص خامروں کی شناخت رومن ہندسوں کے ذریعے کی جاتی ہے۔ مثال کے طور پر ہند III، ہیمو فیلز انفلوئنزا میں دریافت ہوا تھا، اور Eco RI E. coli سے اخذ کیا گیا تھا۔ EcoRI کے نام میں، E کا مطلب Escherichia جینس ہے، co کا مطلب پر جاتی کولی، R کا مطلب ہے تائو RY13، اور L کا مطلب بیکٹیریم میں شناخت کی ترتیب ہے۔ ہند II، پہلا لائگشن والا اینڈونکلیز انزائم، 1970 میں ہیمو فیلز انفلوئنزا RdI سٹرین II سے الگ تھلک کیا گیا تھا۔ ڈینیکل ناتھن، ورنز آربر، اور ہیمملٹن اواسٹھ نے 1978 میں الگ تھلک اور خصوصیت والے لائگشن والے اینڈونکلیز۔ انہیں لائگشن کے انزائمز تیار کرنے پر فزیالوجی اور طب میں نوبل سے نوازا گیا۔

لائگشن کے خامروں کی درخواستیں • لائگشن کے خامروں کا استعمال کرتے ہوئے ڈی این اے کے ٹکڑوں کو جوڑ کر بنایا جاسکتا ہے۔ یہ انزائمز ہم آہنگی کے نقطہ کے ارد گرد ڈی این اے مالیکیول میں حیرت زدہ کٹوتیوں کے ذریعے سنگل پھنسے ہوئے ڈی این اے اور ہینگس بناتے ہیں۔ دوسری طرف، کچھ خامرے سڈول محور پر مالیکیول کے اس پار سیدھے کاٹتے ہیں، جس کے نتیجے میں کند سرے ہوتے ہیں۔ ہر انزائم ایک ہی منفرد بنیادی ترتیب کو پہچانتا ہے اور DNA کے مالیکیولز کو مقررہ نشانات قائم کرنے میں مدد کرتا ہے۔ جیل الیکٹروفورسس ایک طویل ڈی این اے مالیکیول کو ٹکڑوں میں الگ کر سکتا ہے (آپ نے اس تکنیک کا مطالعہ کورس BBYET 141: سیل اور سالماتی حیاتیات میں کیا ہے)۔ تیار کردہ ہر ٹکڑے کو مزید تجزیہ کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، جیسے کہ ترتیب یا ویکٹر کلوننگ۔ ڈی این اے کے ٹکڑوں کا استعمال کرتے ہوئے، ایک مخصوص جین کے مقام کو آسانی سے ٹریک کیا جاسکتا ہے۔ • لائگشن کے انزائمز کو خاص طور پر جین ایللیس کو الگ کرنے کے لیے بھی استعمال کیا جاسکتا ہے۔ • ڈی این اے میں واحد بنیادی تبدیلیوں کو تسلیم کرنا، جسے سنگل نیو کلیوٹائیڈ پولیمورفزم (متغیرات) (SNPs) بھی کہا جاتا ہے۔ لائگشن کے خامروں کو لائگشن کے ٹکڑے کی لمبائی پولیمورفزم (RFLP) تجزیہ کے علاج میں استعمال کیا جاتا ہے۔ • یہ طریقہ کسی مخصوص نوع کے افراد یا تائو کی شناخت کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

5.4 ڈی این اے لائگیشن کے طریقے (Methods of DNA Ligation)

DNA ligation کے رد عمل کے دو مراحل

DNA ligation کے رد عمل کے خود دو بنیادی مراحل ہوتے ہیں۔

1. سب سے پہلے ڈی این اے کے سروں کو اتفاق سے ٹکرا نا پڑتا ہے اور لیگیس ان میں شامل ہونے کے لیے کافی دیر تک ایک ساتھ رہنا پڑتا ہے۔ یہ رد عمل کا سب سے غیر موثر حصہ ہے، لیکن کم درجہ حرارت پر آسان ہے۔ ہم آہنگی کے لئے، ایک اضافی وجہ ہے؛ کم درجہ حرارت تکمیلی نیوکلیوٹائیڈس کے درمیان ہائیڈروجن بانڈنگ کو مستحکم کرتا ہے، جو واقعی چیزوں کو جگہ پر رکھنے میں مدد کرتا ہے۔

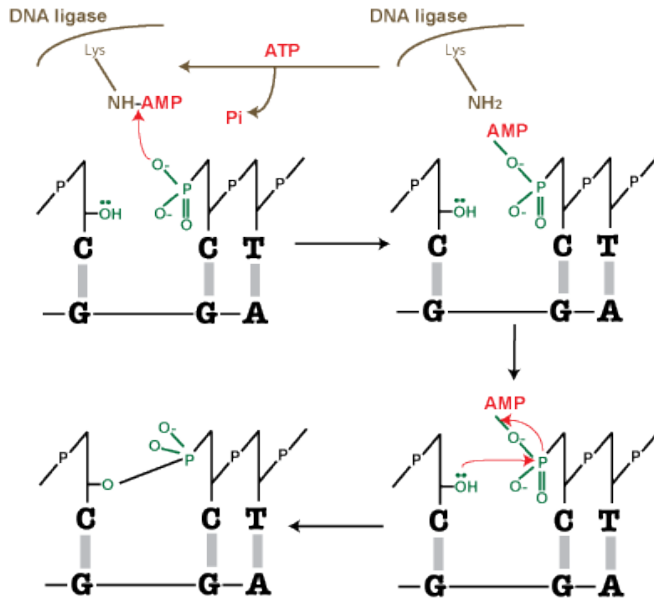
دوسرا مرحلہ انزیمٹک رد عمل ہے، ڈی این اے لیگیس دو قدموں کے طریقہ کار کے ذریعے 3'-OH کو 5'-فوسفیٹ کے ساتھ ملانے کو اتپریرک کرتا ہے۔

i. سب سے پہلے، AMP نیوکلیوٹائیڈ، جو انزائم کی فعال جگہ میں لائسن کی باقیات سے منسلک ہے، 5'-فوسفیٹ میں منتقل کیا جاتا

ہے۔

ii. پھر AMP-فوسفیٹ بانڈ پر 3'-OH سے حملہ کیا جاتا ہے، covalent بانڈ بناتا ہے اور AMP کو جاری کرتا ہے۔ انزائم

کو مزید رد عمل کرنے کی اجازت دینے کے لیے انزائم کی فعال سائٹ میں موجود AMP کو ATP کے ذریعے بھرنا ضروری ہے۔



5.4.1 لا نگیشن (Ligation)

سالماتی حیاتیات میں، ligation ایک انزائم کے عمل کے ذریعے دو نیوکلک ایسڈ کے ٹکڑوں کو ملانا ہے جو دوبارہ پیدا کرنے والے DNA مالیکولز کو تخلیق کرتا ہے، جیسے کہ جب ایک غیر ملکی DNA کا ٹکڑا پلاسما میں داخل کیا جاتا ہے۔ ڈی این اے کے ٹکڑوں کے سرے ایک ڈی این اے ٹرمینس کے 3'-ہائیڈروکسیل اور دوسرے کے 5'-فسفوریل کے درمیان فوسفوڈیسٹر بانڈز کی تشکیل کے ذریعے آپس میں جڑ جاتے ہیں۔ ایک کو فیکٹر عام طور پر رد عمل میں شامل ہوتا ہے، اور یہ عام طور پر ATP یا NAD⁺ ہوتا ہے۔ جانوروں اور بیکٹیریا میں، ATP کو ligation کے لیے توانائی کے ذریعہ کے طور پر استعمال کیا جاتا ہے، جبکہ بیکٹیریا میں، NAD⁺ استعمال کیا جاتا ہے۔

لیبارٹری میں ligation عام طور پر T4 DNA ligase کا استعمال کرتے ہوئے انجام دیا جاتا ہے، تاہم، معیاری DNA ligase کے استعمال کے بغیر ligation کے طریقہ کار بھی مقبول ہیں۔

5.4.2 لیگیشن رد عمل (Ligation Reaction)

ligation کے رد عمل کا طریقہ کار سب سے پہلے I. Robert Lehman کی لیبارٹری میں واضح کیا گیا تھا۔ DNA ligase سب سے پہلے ATP یا NAD⁺ کے ساتھ رد عمل ظاہر کرتا ہے، AMP کے ساتھ ایک ligase-AMP انٹر میڈیٹ بناتا ہے جو کہ ایک فوسفو مائیڈ بانڈ کے ذریعے ligase کی فعال سائٹ میں لائسن کے ε-امینو گروپ سے منسلک ہوتا ہے۔ یہ ایڈنائل گروپ پھر فوسفیٹ گروپ میں DNA چین کے 5' سرے پر منتقل ہو جاتا ہے، جس سے DNA-adenylate کمپلیکس بنتا ہے۔ آخر میں، دو ڈی این اے سروں کے درمیان فوسفوڈیسٹر بانڈ دوسرے کے فعال 5'-فسفوریل گروپ پر ڈی این اے اسٹرینڈ کے آخر میں 3'-ہائیڈروکسیل کے نیوکلئوفیلک حملے کے ذریعے بنتا ہے۔

ڈی این اے میں ایک نیک /nick (یعنی ڈبل پھنسنے ہوئے ڈی این اے کے ایک اسٹرینڈ میں وقفہ) کو لیگیس کے ذریعے بہت مؤثر طریقے سے ٹھیک کیا جاسکتا ہے۔ تاہم، ligation کی ایک پیچیدہ خصوصیت اپنے آپ کو اس وقت پیش کرتی ہے جب دو الگ الگ ڈی این اے کے سروں کو باندھتے ہیں کیونکہ ligation کے رد عمل کو آگے بڑھنے سے پہلے دونوں سروں کو ایک ساتھ آنے کی ضرورت ہوتی ہے۔ چیچچا یا مربوط سروں کے ساتھ ڈی این اے کے بندھن میں، ڈی این اے کے پھیلے ہوئے تاروں کو پہلے ہی ایک ساتھ جوڑا جاسکتا ہے، اس لیے یہ نسبتاً مؤثر عمل ہے کیونکہ یہ ڈی این اے میں دو ٹکوں کی مرمت کے مترادف ہے۔ تاہم، کند سروں کے بندھن میں، جس میں ڈی این اے کو ایک دوسرے کے ساتھ جوڑنے کے لیے پھیلے ہوئے سروں کی کمی ہوتی ہے، یہ عمل بے ترتیب تصادم پر منحصر ہوتا ہے تاکہ سروں کو باندھے جانے سے پہلے ایک دوسرے کے ساتھ سیدھ میں لے لیا جائے، اور اس کے نتیجے میں یہ بہت کم مؤثر ہے عمل۔

E. coli سے DNA ligase blunt-ended DNA کو بند نہیں کر سکتا سوائے سالماتی ہجوم کے حالات کے، اور اس لیے یہ عام طور پر لیبارٹری میں ligation کے لیے استعمال نہیں ہوتا ہے۔ اس کے بجائے T4 سے DNA ligase استعمال کیا

جاتا ہے کیونکہ یہ کند ختم ہونے والے DNA کے ساتھ ساتھ سنگل پھنسے ہوئے DNA کو بھی لگا سکتا ہے۔

5.4.3 ligation کو متاثر کرنے والے عوامل (Factors affecting ligation)

Mg (+2) کیٹالیسٹ کے لیے ایک کو فیکٹر ہے، اس لیے Mg (+2) کے زیادہ ارتکاز پر ligation کی کارکردگی زیادہ ہوتی ہے۔ اگر Mg (+2) کا ارتکاز محدود ہے، نکل سیلنگ عمل کی شرح کو محدود کرنے والا رد عمل ہے، اور ایڈنائیلیٹیڈ ڈی این اے انٹر میڈیٹ محلول میں رہتا ہے۔ انزائم کی اس طرح کی adenylation کی Achilles کی ہیل کے adenylylated DNA انٹر میڈیٹ موازنہ کو دوبارہ بانڈنگ کو روکتی ہے، اور اگر وہ طے نہیں ہوتے ہیں تو یہ خطرے کی نمائندگی کرتا ہے۔

5.4.4 ڈی این اے کی ارتکاز (DNA concentration)

ڈی این اے کا ارتکاز ligation کی شرح کو متاثر کر سکتا ہے، اور آیا ligation ایک بین سالماتی یا انٹرا مالیکیولر رد عمل ہے۔ لیگیشن میں ڈی این اے کے سروں کو دوسرے سروں کے ساتھ جوڑنا شامل ہے، تاہم، ہر ڈی این اے کے ٹکڑے کے دوسرے ہوتے ہیں، اور اگر سرے مطابقت رکھتے ہیں، تو ڈی این اے مالیکیول اپنے سروں کو جوڑ کر گردش کر سکتا ہے۔

❖ اعلیٰ ڈی این اے ارتکاز میں، ڈی این اے مالیکیول کے ایک سرے کے دوسرے ڈی این اے کے اختتام سے ملنے کا زیادہ امکان ہوتا ہے، اس طرح بین سالماتی بندھن بنتا ہے۔

❖ کم DNA ارتکاز پر، DNA مالیکیول کے ایک سرے کے اسی سالمے کے دوسرے سرے سے ملنے کا امکان بڑھ جاتا ہے، اس لیے DNA کو گردش کرنے والے intramolecular رد عمل کا امکان زیادہ ہوتا ہے۔

❖ لکیری ڈی این اے کی تبدیلی کی کارکردگی بھی سرکلر ڈی این اے سے بہت کم ہے، اور ڈی این اے کو گردش کرنے کے لیے، ڈی این اے کا ارتکاز بہت زیادہ نہیں ہونا چاہیے۔

❖ ڈی این اے کے ٹکڑوں کا رشتہ دار ارتکاز، ان کی لمبائی، نیز بفر کی حالتیں بھی ایسے عوامل ہیں جو اس بات کو متاثر کر سکتے ہیں کہ آیا انٹرمولیکیولر یا انٹرمولیکیولر رد عمل پسند کیا جاتا ہے۔

❖ ڈی این اے کے ارتکاز کو مصنوعی طور پر کنڈینسنگ ایجنٹوں جیسے کو بالٹ ہیکسائین اور بائیوجینک پولی امائنز جیسے اسپرماڈائن کو شامل کر کے یا پولیٹھیلین گلائکول (پی ای جی) جیسے کراؤڈنگ ایجنٹس کا استعمال کر کے مصنوعی طور پر بڑھایا جاسکتا ہے جو انزائم کے موثر ارتکاز کو بھی بڑھاتے ہیں۔

❖ ام اصول کے طور پر، کل ڈی این اے کا ارتکاز 10 µg/ml سے کم ہونا چاہیے۔

5.4.5 Ligase کی ارتکاز (Ligase Concentration)

❖ ligase کا ارتکاز جتنا زیادہ ہوگا، ligation کی شرح اتنی ہی تیز ہوگی۔

❖ Blunt-end ligation چھپا end ligation کے مقابلے میں بہت کم موثر ہے، لہذا ligase کی زیادہ ارتکاز کو بلنڈ اینڈ ligation میں استعمال کیا جاتا ہے۔

❖ زیادہ DNA ligase ارتکاز کو PEG کے ساتھ مل کر تیزی سے ligation کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔

5.4.6 ligation کے رد عمل کا درجہ حرارت (Temperature of Ligation reaction)

❖ ligation کے رد عمل کے درجہ حرارت پر غور کرتے وقت دو مسائل شامل ہیں۔

❖ DNA ligase سرگرمی کے لیے بہترین درجہ حرارت جو کہ 37°C ہے۔

❖ DNA کا پگھلنے کا درجہ حرارت (T_m) بند ہونے پر ختم ہوتا ہے۔

❖ پگھلنے کا درجہ حرارت ڈی این اے کے اوور ہینگ کی لمبائی اور بنیادی ساخت پر منحصر ہے—G اور C کی تعداد جتنی زیادہ ہوگی، T_m اتنا ہی زیادہ ہوگا کیونکہ G-C بیس جوڑے کے درمیان تین ہائیڈروجن بانڈز بنتے ہیں جب کہ A-T بیس جوڑے کے لیے دو کے مقابلے ٹکڑوں کے درمیان اڈوں کے اسٹیلنگ سے کچھ شراکت کے ساتھ۔

❖ ligation کے رد عمل کو مؤثر طریقے سے آگے بڑھنے کے لیے، سروں کو مضبوطی سے منسلک کیا جانا چاہیے، اور ligation کے تجربات میں، DNA کے سروں کا T_m عموماً 37°C سے بہت کم ہوتا ہے۔

❖ ligating مربوط سروں کے لیے بہترین درجہ حرارت اس لیے DNA ligase سرگرمی کے لیے بہترین درجہ حرارت اور T_m کے درمیان ایک سمجھوتہ ہے جہاں سرے مل سکتے ہیں۔

❖ تاہم، مختلف پابندی والے انزائمز مختلف سرے پیدا کرتے ہیں، اور ان انزائمز کے ذریعہ تیار کردہ سروں کی بنیادی ساخت میں بھی فرق ہو سکتا ہے، پگھلنے کا درجہ حرارت اور اس وجہ سے زیادہ سے زیادہ درجہ حرارت استعمال کیے جانے والے پابندی کے خامروں، اور زیادہ سے زیادہ درجہ حرارت کی بنیاد پر وسیع پیمانے پر مختلف ہو سکتا ہے۔ ligation کے لیے سروں کے لحاظ سے $4-15^{\circ}\text{C}$ کے درمیان ہو سکتا ہے۔

❖ لیگیشنز میں اکثر ایک ہی رد عمل کے مرکب میں مختلف پابندی والے خامروں سے پیدا ہونے والے ligating ends بھی شامل ہوتے ہیں، اس لیے کسی خاص ligation کے رد عمل کے لیے زیادہ سے زیادہ درجہ حرارت کا انتخاب کرنا عملی نہیں ہو سکتا اور زیادہ تر پروٹوکول صرف $12-16^{\circ}\text{C}$ ، کمرے کا درجہ حرارت، منتخب کرتے ہیں دیا 4°C

5.4.7 بفر کمپوزیشن (Buffer Composition)

❖ استعمال کیے جانے والے بفر کی آئنک طاقت ligation کو متاثر کر سکتی ہے۔

❖ قسم کے کیشنز کی موجودگی ligation کے رد عمل کو بھی متاثر کر سکتی ہے، مثال کے طور پر، Na⁺ کی زیادہ مقدار

- ❖ DNA کو زیادہ سخت بنانے اور بین سالماتی ligation کے امکانات کو بڑھا سکتی ہے۔
- ❖ monovalent cation ($>200 \text{ mM}$) کے زیادہ ارتکاز پر بھی تقریباً مکمل طور پر روکا جاسکتا ہے۔
- ❖ ligation کے لیے استعمال ہونے والے معیاری بفر کو ionic اثرات کو کم کرنے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے۔

5.4.8 چچی آخر (Sticky-end Ligation)

- ❖ پابندی کے انزائمز DNA میں مختلف قسم کے سرے پیدا کر سکتے ہیں جسے وہ ہضم کرتے ہیں، لیکن کلوننگ کے تجربات میں سب سے زیادہ استعمال ہونے والے پابندی والے انزائمز ایک 4-بیس سنگل سٹریٹڈ اور پیگ تیار کرتے ہیں جسے چچی یا مربوط اختتام کہتے ہیں۔
- ❖ یہ چکنے والے سرے دوسرے ہم آہنگ سروں سے جڑ سکتے ہیں اور چکنے والے سرے (یا ہم آہنگی والے سرے) میں بندھے ہو سکتے ہیں۔ مثال کے طور پر EcoRI ایک AATT اینڈ تیار کرتا ہے۔
- ❖ پلاسماڈ ویکٹر میں ڈی این اے کے ٹکڑے کو داخل کرنے کے لیے، ڈی این اے کو ہضم کرنے کے لیے دو مختلف پابندی والے انزائمز کا استعمال کرنا بہتر ہے تاکہ مختلف سرے پیدا ہوں۔ دو مختلف سرے بغیر کسی داخل کے ویکٹر کے مذہب کو روک سکتے ہیں، اور یہ ٹکڑے کو دشمنک انداز میں داخل کرنے کی بھی اجازت دیتا ہے۔
- ❖ جب دو مختلف سائٹس کا استعمال ممکن نہ ہو، تو پھر ویکٹر ڈی این اے کو ڈی فاسفوریلیٹ کرنے کی ضرورت پڑ سکتی ہے تاکہ ری سرکلر ایزڈ ویکٹر ڈی این اے کے اعلیٰ پس منظر سے بچنے کے لیے بغیر کسی داخل کے۔ سرے پر فاسفیٹ گروپ کے بغیر ویکٹر اپنے آپ کو باندھ نہیں سکتا، لیکن فاسفیٹ گروپ کے ساتھ داخل کرنے کے لیے باندھا جاسکتا ہے۔ ڈی فاسفوریلیشن عام طور پر پچھڑے کے آنتوں کے الکلائن فاسفیٹیس (CIAP) کا استعمال کرتے ہوئے کیا جاتا ہے جو ہضم شدہ DNA کے 5' سرے سے فاسفیٹ گروپ کو ہٹاتا ہے، لیکن نوٹ کریں کہ CIAP کو غیر فعال کرنا آسان نہیں ہے اور بغیر کسی اضافی قدم کے ligation میں مداخلت کر سکتا ہے۔ CIAP کو ہٹانا، جس کے نتیجے میں ligation کی ناکامی ہوتی ہے۔ CIAP کو ضرورت سے زیادہ مقدار میں استعمال نہیں کیا جانا چاہیے اور صرف اس وقت استعمال کیا جانا چاہیے جب ضروری ہو۔ جھینگا الکلائن فاسفیٹیس (SAP) یا انٹارکٹک فاسفیٹیس (AP) مناسب متبادل ہیں کیونکہ انہیں آسانی سے غیر فعال کیا جاسکتا ہے۔

5.4.9 کند آخر (Blunt End Ligation)

- ❖ بلنڈ اینڈ ligation میں پھیلے ہوئے سروں کا بیس جوڑا شامل نہیں ہوتا ہے، اس لیے کسی بھی کند سرے کو دوسرے کند سرے سے باندھا جاسکتا ہے۔
- ❖ Blunt ends پابندی والے خامروں جیسے SmaI اور EcoRV سے پیدا ہو سکتے ہیں۔
- ❖ بلنڈ اینڈ کلوننگ کا ایک بڑا فائدہ یہ ہے کہ مطلوبہ انسٹ کو اس کی ترتیب میں کسی پابندی والی سائٹس کی ضرورت نہیں ہوتی ہے

کیونکہ بلنٹ اینڈز عام طور پر پی سی آر میں تیار ہوتے ہیں، اور پی سی آر نے بلنٹ اینڈ ڈی این اے کے ٹکڑے کو پھر بند کیا جاسکتا ہے۔
پابندی ڈائجسٹ سے پیدا ہونے والے دو ٹوک ویکٹر میں

❖ **Blunt-end ligation**، تاہم، سنگی اینڈ ligation کے مقابلے میں بہت کم موثر ہے، عام طور پر رد عمل سنگی اینڈ ligation سے X100 سست ہوتا ہے۔ چونکہ بلنٹ اینڈ کے پھیلے ہوئے سرے نہیں ہوتے ہیں، اس لیے ligation کا رد عمل بلنٹ اینڈ کے درمیان بے ترتیب تصادم پر منحصر ہوتا ہے اور اس کے نتیجے میں یہ بہت کم موثر ہوتا ہے۔

❖ کم کارکردگی کی تلافی کرنے کے لیے، استعمال کیے جانے والے ligase کا ارتکاز سنگی اینڈ ligation (10x یا اس سے زیادہ) سے زیادہ ہے۔

❖ بلنٹ اینڈ ligation میں استعمال ہونے والے DNA کا ارتکاز بھی سروں کے درمیان تصادم کے امکان کو بڑھانے کے لیے زیادہ ہوتا ہے، اور لمبا انکیوبیشن ٹائم بھی بلنٹ اینڈ ligations کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔

❖ اگر کسی ویکٹر میں باندھنے کے لیے ضروری دونوں سرے دو ٹوک ہیں، تو ویکٹر کو ڈیفاسفوریلیٹ کرنے کی ضرورت ہے تاکہ سیلف لنگیشن کو کم سے کم کیا جاسکے۔ یہ CIAP کا استعمال کرتے ہوئے کیا جاسکتا ہے، لیکن اس کے استعمال میں احتیاط ضروری ہے جیسا کہ پہلے ذکر کیا گیا ہے۔ چونکہ ویکٹر کو ڈیفاسفوریلیٹ کیا گیا ہے، اور ligation کے لیے 5'-فاسفیٹ کی موجودگی کی ضرورت ہوتی ہے، اس لیے داخل کو فاسفوریلیٹ ہونا چاہیے۔ Blunt-ended PCR پروڈکٹ میں عام طور پر 5'-فاسفیٹ کی کمی ہوتی ہے، اس لیے اسے T4 polynucleotide kinase کے ساتھ علاج کے ذریعے فاسفوریلیٹ کرنے کی ضرورت ہے۔

❖ **Blunt-end ligation** بھی ATP کے زیادہ ارتکاز کی وجہ سے الٹاروکا جاتا ہے۔

❖ پی سی آر عام طور پر دو ٹوک پی سی آر پروڈکٹس تیار کرتا ہے، لیکن نوٹ کریں کہ پی سی آر Taq پولیمریز کا استعمال کرتے ہوئے PCR پروڈکٹ کے 3' آخر میں اضافی ایڈنائن (A) کا اضافہ کر سکتا ہے۔ اس پر اپریٹی کو TA کلوننگ میں استعمال کیا جاسکتا ہے جہاں PCR پروڈکٹ کے سرے کسی ویکٹر کے T سرے سے منسلک ہو سکتے ہیں۔ TA ligation لہذا اچھا اختتامی ligation کی ایک شکل ہے۔ ٹرمینل ٹرانسفرز کا استعمال کرتے ہوئے بلنٹ اینڈ ویکٹر کو TA ligation کے لیے dideoxythymidine triphosphate (ddTTP) کے ساتھ ویکٹر میں تبدیل کیا جاسکتا ہے۔

5.4.10 عمومی ہدایات (General Guidelines)

سرکلر پلاسمڈ میں داخل کی کلوننگ کے لیے:

1. استعمال شدہ کل ڈی این اے ارتکاز 10 µg/ml سے کم ہونا چاہیے کیونکہ پلاسمڈ کو دوبارہ گردش

کرنے کی ضرورت ہے۔

2. داخل کرنے سے ویکٹر کا داڑھ کا تناسب عام طور پر 3:1 کے قریب استعمال ہوتا ہے۔ بہت زیادہ تناسب متعدد داخلات پیدا کر سکتا ہے۔

3. تناسب کو داخل کرنے کے سائز کے لحاظ سے ایڈجسٹ کیا جاسکتا ہے، اور دیگر تناسب استعمال کیے جاسکتے ہیں، جیسے 1:1۔

5.4.11 DNA ligation کے دیگر طریقے

تجارتی طور پر دستیاب ڈی این اے کلوننگ کٹس کی ایک بڑی تعداد ligation کے دوسرے طریقے استعمال کرتی ہے جن کے لیے عام DNA ligases کے استعمال کی ضرورت نہیں ہوتی ہے۔ یہ طریقے کلوننگ کو بہت زیادہ تیزی سے کرنے کی اجازت دیتے ہیں، اور ساتھ ہی کلون شدہ ڈی این اے کو مختلف ویکٹروں میں داخل کرنے کی آسان منتقلی کی اجازت دیتے ہیں۔ تاہم ان طریقوں میں خاص طور پر ڈیزائن کردہ ویکٹر اور اجزاء کے استعمال کی ضرورت ہوتی ہے، اور ان میں چمک کی کمی ہو سکتی ہے۔

❖ Topoisomerase-mediated ligation

ligation کے لیے ligase کے بجائے Topoisomerase کا استعمال کیا جاسکتا ہے، اور کلوننگ زیادہ تیزی سے بغیر ویکٹر کے ڈائجسٹ یا انسٹ کی پابندی کی ضرورت کے بغیر کی جاسکتی ہے۔ اس ٹوپو کلوننگ کے طریقہ کار میں ایک لکیری ویکٹر ٹوپو سومیریز I کو اس کے سروں سے جوڑ کر چالو کیا جاتا ہے، اور یہ "TOPO" - ایکٹیویٹڈ "ویکٹر پھر PCR پروڈکٹ کے 5' سروں میں سے دونوں کو لگا کر پی سی آر پروڈکٹ کو قبول کر سکتا ہے۔ topoisomerase جاری ہوتا ہے اور اس عمل میں ایک سرکلر ویکٹر بنتا ہے۔

❖ ہو مولوگس دوبارہ ملاپ (Homologous recombination)

لیگس کے استعمال کے بغیر کلوننگ کا ایک اور طریقہ ڈی این اے ری کمبائنیشن ہے، مثال کے طور پر گیٹ وے کلوننگ سسٹم میں استعمال کیا جاتا ہے۔ جین، ایک بار کلوننگ ویکٹر (جسے اس طریقہ میں انٹری کلون کہا جاتا ہے) میں کلون کیا جاتا ہے، آسانی سے مختلف قسم کے اظہار ویکٹر میں دوبارہ ملاپ کے ذریعے متعارف کرایا جاسکتا ہے۔

5.5 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس یونٹ کو مکمل کرنے کے بعد، اب آپ اس قابل ہو گئے ہیں کہ:

❖ ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کے تصور کی وضاحت کریں۔

❖ ریکومیننٹ ڈی این اے کی تشکیل میں شامل مختلف انزائمز کی فہرست بنائیں؛۔

❖ لigation کے طریقے، DNA ligases، ligation of fragment with cohesive and blunt ends وضاحت کریں

5.6 کلیدی الفاظ (Keywords)	
بند سی انزائمز	Restriction Enzyme
ہم آہنگی	Cohesive

پابندی والے انزائمز یہ ہیں: "ہیکٹیئر یا اور آثار قدیمہ میں پائے جانے والے انزائمز جو ڈی این اے کو مخصوص شناخت کے سلسلے میں کاٹتے ہیں، جینیاتی انجینئرنگ اور سالماتی حیاتیات کی تکنیکوں کے لیے اہم ہیں۔"

"ہم آہنگی" سے مراد قریب سے متحد ہونے یا ایک دوسرے کے ساتھ چپکے رہنے کے معیار سے ہے۔ یہ ان بانڈز یا قوتوں کی طاقت کو بیان کر سکتا ہے جو کسی مادے کے ذرات یا اجزاء کو ایک ساتھ رکھتے ہیں۔

5.7 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

- 5.7.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)
1. Recombinant DNA ٹیکنالوجی میں _____ کے جین کے بہتر اظہار کو حاصل کرنے کے لیے کسی جاندار کے جینیاتی مواد میں ترمیم کرنا شامل ہے۔
 2. بندھن کے دوران ڈی این اے کے ٹکڑوں میں شامل ہونے کے لیے ذمہ دار انزائم کو DNA _____ کہا جاتا ہے۔
 3. Recombinant DNA ٹیکنالوجی میں DNA تہائی کا بنیادی مقصد _____ اور ڈونر DNA دونوں کے خالص نمونے حاصل کرنا ہے۔
 4. ریکومبیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی میں تبدیلی میں ایک _____ میزبان سیل میں ریکومبیننٹ ڈی این اے کا اندراج شامل ہے۔
 5. وٹرو میں ڈی این اے کے ٹکڑوں کو بڑھانے کے لیے استعمال ہونے والا انزائم _____ کہا جاتا ہے۔
 6. پابندی کے انزائمز ڈی این اے کو مخصوص شناختی ترتیبوں پر کاٹتے ہیں جنہیں _____ سائٹس کہا جاتا ہے۔
 7. Recombinant DNA ٹیکنالوجی میں، DNA splicing میں ایک منتخب _____ انزائم کے ساتھ پیوریفائیڈ DNA کا انکیویشن شامل ہوتا ہے۔
 8. ڈبل سٹرینڈڈ ڈی این اے بنانے کے لیے سنگل اسٹرینڈز پر تکمیلی سلسلے کے درمیان ہائیڈروجن بانڈز بنانے کے عمل کو _____ کہا جاتا ہے۔

9. قسم II پابندی کے خامرے ڈی این اے کو پہچانتے ہیں اور ان کی پابندی کے اندر یا اس کے اندر مخصوص جگہوں پر کاٹتے ہیں۔
10. سالماتی حیاتیات میں ligation سے مراد ایک انزائم کے عمل کے ذریعے دو نیوکلک ایسڈ کے ٹکڑوں کو ملانا ہے جس سے دوبارہ پیدا ہونے والے DNA مالیکیولز پیدا ہوتے ہیں، جیسے کہ جب ایک غیر ملکی DNA کا ٹکڑا _____ میں داخل کیا جاتا ہے۔

5.7.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. Recombinant DNA ٹیکنالوجی کا بنیادی مقصد کیا ہے؟
2. Recombinant DNA ٹیکنالوجی میں پابندی کے خامروں کے کردار کی وضاحت کریں۔
3. ڈی این اے لیگیشن دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے مالیکیولز کی تشکیل میں کس طرح تعاون کرتا ہے؟
4. Recombinant DNA ٹیکنالوجی کے تناظر میں DNA کی تبدیلی کے عمل کی مختصر وضاحت کریں۔
5. ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کے دوران ڈی این اے کو الگ کرنے میں اہم اقدامات کیا ہیں؟

5.7.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانداروں (GMOs) کی نشوونما میں ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کی اہمیت اور زراعت اور خوراک کی پیداوار پر اس کے اثرات پر تبادلہ خیال کریں۔
2. ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی میں ڈی این اے کو الگ کرنے کے عمل کی وضاحت کریں، بشمول پابندی کے خامروں اور ڈی این اے لیگیشن کا کردار۔
3. طب کے میدان میں ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کے استعمال کی وضاحت کریں۔
4. ڈی این اے کی ہیرا پھیری میں پابندی کے خامروں کے کردار کا تجزیہ کریں،
5. جینیاتی انجینئرنگ، جی ایم اوز سے متعلق خدشات سمیت ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کے استعمال سے متعلق اخلاقی تحفظات کو دریافت کریں۔

5.8 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Recombinant DNA	ریکومیننٹ ڈی این اے	-	ڈی این اے مالیکیولز جو مختلف ذرائع سے جینیاتی مواد کو ملا کر تشکیل پاتے ہیں، اکثر جینیاتی انجینئرنگ تکنیکوں کے ذریعے حاصل کیے جاتے ہیں۔

DNA Splicing ڈی این اے سپلینگ - ڈی این اے کے ٹکڑوں کو مختلف ذرائع سے کاٹنے اور ان میں شامل ہونے کا عمل دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے مایکرو لوز کو بنانے کے لیے۔

Ligation ڈارون کے فنچز ڈارون کے فنچز لیکیشن: ڈی این اے کے ٹکڑوں کو ایک ساتھ جوڑنے کا عمل ڈی این اے لیکس انزائم کا استعمال کرتے ہوئے دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے مایکرو لوز کو تخلیق کرتا ہے۔

5.9 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Berg, P., Boyer, H., Chang, A., & Cohen, S. (1972). [Recombinant DNA molecule]. Stanford University and University of California, San Francisco.
2. Nathans, D., Arber, W., & Smith, H. O. (1978). [Characterization of restriction endonucleases]. Nobel Prize in Physiology or Medicine.
3. Lehman, I. R. (n.d.). [Mechanism of the ligation reaction]. Unpublished manuscript.
4. Johnson, L. M. (2020). *Exploring Psychology: Understanding Human Behavior*. Pearson Education.
5. Thompson, P. H. (2017). *History of Western Philosophy: From Plato to Postmodernism*. Routledge.

اکائی 6: کلوننگ ویکٹرس

(Cloning Vectors)

اکائی کے اجزا	
6.0	تمہید (Introduction)
6.1	مقاصد (Objectives)
6.2	ویکٹرز (Vectors)
6.3	کلوننگ ویکٹر کی اقسام (Types of Cloning Vectors)
6.3.1	پلاسمڈ (Plasmid)
6.3.2	پلازمیڈ کی خصوصیات
6.4	بیکٹیریوفیج (Bacteriophage)
6.5	Phagemids
6.6	کاسمیڈس (Cosmid)
6.7	M13 ویکٹر (M 13 vector)
6.8	بیکٹیریئل مصنوعی کروموسوم (Bacteria Artificial Chromosome)
6.9	خمیر ویکٹر (Yeast Vector)
6.9.1	نشئل ویکٹر
6.9.2	خمیر مصنوعی کروموسوم (Yeast Artificial Chromosome)
6.10	ممالیہ مصنوعی کروموسوم (Mammalian Artificial Chromosome)
6.11	اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)
6.12	کلیدی الفاظ (Keywords)
6.13	نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)
6.13.1	معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

6.13.2	مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)
6.13.3	طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)
6.14	فرہنگ (Glossary)
6.15	مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

6.0 تمہید (Introduction)

دوبارہ پیدا ہونے والی ڈی این اے ٹیکنالوجی میں، جینیاتی ہیرا پھیری کی دلچسپ دنیا اور اس کے بے شمار اطلاقات۔ اس تعارفی باب میں، ہم ان بنیادی تصورات اور تکنیکوں کو سمجھنے کے لیے ایک سفر کا آغاز کریں گے جو مالیکیولر بائیولوجی کے اس انقلابی شعبے کی بنیاد رکھتے ہیں۔

Recombinant DNA ٹیکنالوجی کے مرکز میں کلوننگ ویکٹر کا استعمال ہے، جو میزبان خلیوں کے اندر غیر ملکی DNA کے ٹکڑوں کو داخل کرنے اور پھیلانے کے لیے کیریئر کے طور پر کام کرتے ہیں۔ یہ ویکٹر مختلف شکلوں میں آتے ہیں، ہر ایک اپنی منفرد خصوصیات اور صلاحیتوں کے ساتھ۔ آئیے کلیدی کلوننگ ویکٹر میں سے کچھ کو قریب سے دیکھتے ہیں:

پلازمیڈز: پلازمیڈ چھوٹے، گول ڈی این اے مالیکیولز ہیں جو بیکٹیریل خلیوں میں میزبان کروموسوم سے آزادانہ طور پر موجود ہوتے ہیں۔ وہ ورسائل کلوننگ ویکٹر ہیں جو سالماتی حیاتیات کی تحقیق میں بڑے پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں۔ پلازمیڈ نسبتاً چھوٹے ڈی این اے داخل کر سکتے ہیں اور میزبان خلیوں کے اندر خود مختاری سے نقل کر سکتے ہیں۔

Cosmids: Cosmids ہائپرڈ ویکٹر ہیں جو پلازمیڈ اور بیکٹیریوفیج کی خصوصیات کو یکجا کرتے ہیں۔ وہ پلازمیڈ سے بڑے ڈی این اے داخل کر سکتے ہیں اور خاص طور پر جینومک لائبریریوں کی تعمیر اور ڈی این اے کے بڑے ٹکڑوں کی کلوننگ کے لیے مفید ہیں۔

Phagemids: Phagemids پلازمیڈ ہیں جو بیکٹیریوفیج سے اخذ کردہ ترتیب پر مشتمل ہیں۔ وہ بیکٹیریل خلیوں میں پلاسمیڈ کے طور پر پھیل سکتے ہیں لیکن یہ ڈی این اے کو بیکٹیریوفیج کے ذرات میں پیک کرنے کی صلاحیت بھی رکھتے ہیں۔ Phagemids کو عام طور پر DNA کی ترتیب اور سائٹ سے ہدایت شدہ mutagenesis کے لیے واحد پھنسے ہوئے DNA پیدا کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

لیمبڈ بیکٹیریوفیج: لیمبڈ بیکٹیریوفیج ایک بیکٹیریل وائرس ہے جو اسپریجیا کولی سلز کو متاثر کرتا ہے۔ اس میں ایک لکیری ڈبل پھنسے ہوئے DNA جینوم ہے اور یہ جینومک لائبریریوں کی تعمیر اور DNA کے بڑے ٹکڑوں کے پھیلاؤ کے لیے کلوننگ ویکٹر کا کام کرتا ہے۔

M13: M13 ایک فلیمینٹس بیکٹیریوفیج ہے جس میں ایک واحد پھنسے ہوئے DNA جینوم ہے۔ یہ وسیع پیمانے پر ڈی این اے کی ترتیب اور سائٹ سے ہدایت شدہ میوٹیجینیسس کے لیے واحد پھنسے ہوئے ڈی این اے ٹیمپلیٹس کی تیاری کے لیے استعمال ہوتا ہے۔

BAC (بیکٹیریل مصنوعی کروموسوم): BACs بڑے کلوننگ ویکٹر ہیں جو بیکٹیریل کروموسوم سے اخذ کیے گئے ہیں۔ ان کے

پاس بڑے ڈی این اے داخل کرنے کی اعلیٰ صلاحیت ہے، جو انہیں پورے جینومک علاقوں کی کلوننگ اور جینومک لائبریریوں کی تعمیر کے لیے موزوں بناتے ہیں۔

YACs (خمیر مصنوعی کروموسوم): YACs خمیر کروموسوم کی بنیاد پر کلوننگ ویکٹر ہیں۔ وہ بہت بڑے ڈی این اے داخل کرنے کی صلاحیت رکھتے ہیں اور بڑے یو کرائیونک ڈی این اے کے ٹکڑوں کی کلوننگ اور ہیرا پھیری کے لیے استعمال ہوتے ہیں، بشمول پورے جینز اور جین کلسٹرز۔

MACs (Mammalian Artificial Chromosome): MACs مصنوعی کروموسوم ہیں جو ممالیہ کے خلیوں میں استعمال کے لیے بنائے گئے ہیں۔ وہ بڑے ڈی این اے داخل کر سکتے ہیں اور مختلف اپیلی کیشنز کے لیے استعمال ہوتے ہیں، بشمول جین تھراپی اور ممالیہ کے نظاموں میں فنکشنل جینومکس اسٹڈیز۔

یہ متنوع کلوننگ ویکٹر محققین کو جینیاتی ہیرا پھیری کے لیے ٹولز اور تکنیکوں کی ایک وسیع رینج پیش کرتے ہیں، جس سے درست کنٹرول اور چمک کے ساتھ دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے مالیکیولز کی تعمیر کی اجازت دی جاتی ہے۔ اس پورے باب میں، ہم ان ویکٹرز کے استعمال کے بنیادی اصولوں اور جینیاتی انجینئرنگ، بائیو ٹیکنالوجی، اور بائیو میڈیکل ریسرچ میں ان کے استعمال کو تلاش کریں گے۔ ہمارے ساتھ شامل ہوں جب ہم دوبارہ پیدا ہونے والی ڈی این اے ٹیکنالوجی کے اسرار اور لائف سائنسز پر اس کے گہرے اثرات کو کھولتے ہیں۔

6.1 مقاصد (Objectives)

اس باب کو مکمل کرنے کے بعد، طلباء اس قابل ہو جائیں گے کہ:

❖ ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی میں کلوننگ ویکٹر کے کردار کی وضاحت کریں اور کلوننگ ویکٹر کی مختلف اقسام کے درمیان فرق کریں، بشمول پلازمڈ، کاسمید، فیجمڈ، لیمبڈا بیسٹیر یوفیجز، M13 فیج، BACs، YACs، اور MACs۔

❖ مختلف کلوننگ ویکٹرز کی خصوصیات اور اپیلی کیشنز کو سمجھیں، جیسے ڈی این اے داخل کرنے کی ان کی صلاحیت، نقل بنانے کے طریقہ کار،

❖ تجزیہ کریں کہ کلوننگ ویکٹر کا انتخاب تجرباتی ڈیزائن اور مخصوص جینیاتی انجینئرنگ کے کاموں کی فزہ بیلٹی کو کس طرح متاثر کرتا ہے۔

6.2 ویکٹرز (Vectors)

ایک ویکٹر ایک DNA کا ٹکڑا ہے جو نئے داخل کردہ DNA کے ساتھ نقل کر سکتا ہے۔ میزبان سیل میں داخل ہونے پر، ویکٹر غیر ملکی DNA کے ٹکڑے کو منتقل کرنے کے لیے گاڑیوں کے طور پر کام کرتے ہیں، جس کے نتیجے میں دوبارہ پیدا ہونے والے DNA کے

متعدد کلون بنتے ہیں۔ ایک مناسب ویکٹر کی نقل کی اصل، ایک یا زیادہ سلیکشن جینیاتی مارکر، اور ایک سے زیادہ کلوننگ سائٹس (MCS) ہونی چاہئیں جہاں غیر ملکی DNA داخل کیا جاسکتا ہے۔ پلاسمڈ، بیکٹیریوفج، کاسمید، فیجمڈ، یا یہاں تک کہ ایک وائرس ویکٹر کے طور پر کام کر سکتا ہے۔ کلوننگ ویکٹر میں عام طور پر ایک سائٹ ہوتی ہے جہاں غیر ملکی DNA بغیر کسی ضروری کام میں مداخلت کیے داخل کیا جاسکتا ہے۔ ایک مثالی ویکٹر کی خصوصیات درج ذیل ہیں:

- ❖ یہ سائز میں کمپیکٹ ہونا چاہیے (10 KB سے کم)
- ❖ یہ خود مختار نقل کے قابل ہونا چاہیے، یعنی میزبان سیل کے اندر خود کی نقل تیار کرنا۔
- ❖ میزبان سیل سے الگ تھلگ اور پاک کرنا آسان ہونا چاہیے۔
- ❖ میزبان سیل میں شامل کرنا آسان ہونا چاہیے۔ مزید برآں، یہ خود کو یا DNA کو میزبان سیل کے جینوم میں شامل کرنے کے قابل ہونا چاہیے۔
- ❖ اس میں دوبارہ پیدا ہونے والے خلیوں کی شناخت کے لیے ایک قابل انتخاب مارکر جین ہونا چاہیے (عام طور پر ایک اینٹی بائیوٹک مزاحمتی جین جو میزبان سیل میں موجود نہیں ہوتا ہے)۔
- ویکٹر کے پاس مختلف ٹارگٹ سائٹس کے ساتھ ساتھ مختلف پابندی والے انزائمز کے لیے شناخت کی سائٹیں ہونی چاہئیں۔
- مخصوص پابندی والی سائٹس کی موجودگی ایک مخصوص پابندی والے اینڈونکلیز کو مخصوص ترتیب والی پابندی والی سائٹوں کو ختم کرنے کی اجازت دیتی ہے۔ عطیہ دہندگان کے ڈی این اے کے ٹکڑوں کا تعارف ویکٹر کی نقل کی خاصیت میں مداخلت نہیں کرنا چاہیے۔
- ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی میں ان کے کردار کی بنیاد پر ویکٹرز کو دو اقسام میں تقسیم کیا گیا ہے۔

1. اظہار ویکٹر (Expression vector)

2. کلوننگ ویکٹر (Cloning vector)

1. کلوننگ ویکٹر ڈی این اے کے مالیکیولز ہیں جو میزبان سیل میں دلچسپی کا ایک مخصوص جین فراہم کرتے ہیں۔ ان کا بنیادی مقصد داخل کردہ جین کو زیادہ سے زیادہ بار نقل کرنا ہے۔ وہ بیکٹیریا میں دوبارہ پیدا کرنے اور پھیلانے کے لیے ڈی این اے داخل کرنے کی بنیاد کے طور پر کام کرتے ہیں۔ کلوننگ ویکٹرز میں نقل کی اصل، مخصوص پابندی والی سائٹس، اور قابل انتخاب مارکر شامل ہیں۔ پلازمید، کاسمید، فیز، BACs، YACs، اور MACs سبھی کلوننگ ویکٹر کی مثالیں ہیں۔
2. ایکسپریشن ویکٹرز جین کے اصل اظہار سے mRNA اور ہدف والے جاندار میں پروٹین سے جڑے ہوئے ہیں۔ ایک ایکسپریشن ویکٹر میں وہ تمام عناصر شامل ہونے چاہئیں جو میزبان سیل کے لیے جین کو نقل کرنے اور ترجمہ کرنے کے لیے درکار ہوتے ہیں۔ ایکسپریشن ویکٹر میں اضافہ کرنے والے، ایک پروموٹر ریجن، ایک ٹرمینیشن کوڈن، ایک ٹرانسکرپشن انیشییشن سیکوینس، ایک

ٹرانسلیکشن انیشیشن سیکوینس، وغیرہ پر مشتمل ہے۔ مزید برآں، پلاسماڈ ایکسپریژن ویکٹر کے طور پر کام کرتا ہے۔ کلوننگ ویکٹر اور ایکسپریژن ویکٹر دونوں میزبان سیل کے اندر اپنے طور پر نقل کر سکتے ہیں۔

❖ شٹل ویکٹر اس (Shuttle Vectors) قسم کے ویکٹر میں دو مختلف میزبان پر جاتیوں میں دوبارہ پیدا کرنے کی صلاحیت ہے۔ نتیجے کے طور پر، داخل کردہ ڈی این اے کو دو الگ الگ سیل اقسام میں جانچا اور جوڑ توڑ کیا جاسکتا ہے۔ یہ ویکٹر یو کریوٹس اور پروکیریٹس دونوں پر لاگو ہوتے ہیں۔ ان ویکٹروں کا بنیادی فائدہ یہ ہے کہ انہیں E میں تبدیل کیا جاسکتا ہے۔ کولی کو زیادہ مشکل یا سست نظام میں استعمال کرنے سے پہلے۔ شٹل ویکٹر کو تیزی سے E میں جین کی نقل تیار کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ کولی ان وٹرو تجربات اور ترمیمات جیسے کہ mutagenesis اور PCR کو بھی ان کا استعمال کرتے ہوئے انجام دیا جاسکتا ہے۔ خمیر شٹل ویکٹر سب سے زیادہ عام شٹل ویکٹرز میں سے ایک ہے، کیونکہ اس میں ایسے اجزاء ہوتے ہیں جو E دونوں میں نقل اور انتخاب کی اجازت دیتے ہیں۔ کولی اور خمیر کے خلیات۔ ایک خمیر شٹل ویکٹر کے E. کولی جزو میں نقل کی اصلیت اور ایک قابل انتخاب مارکر شامل ہے، جیسے کہ ایک اینٹی بائیوٹک مزاحمتی جین۔ جیسے β -lactamase. ایک خمیر شٹل ویکٹر کا خمیر جزو ایک خود مختار طور پر نقل کرنے والی ترتیب (ARS)، ایک خمیر سینٹر ویر (CEN)، اور ایک منتخب خمیر مارکر پر مشتمل ہوتا ہے۔

جدول 6.1: کچھ مشہور ویکٹرز کی خصوصیات کا خلاصہ۔

ویکٹر کا نام	پسندیدہ میزبان سیل	سائز داخل کریں	انوکھا فچر	مثال
پلازمڈ	<i>E. coli</i>	10 kb ڈی این اے کلوننگ	خود نقل کرنے والا، اعلیٰ کاپی نمبر، اور مالک اینٹی بائیوٹک کے خلاف مزاحمت کرنے والے جین۔	پہلی آر 322، پہلی یو سی 18، ایف- پلاسماڈ
بیکٹیریوفج	<i>E. coli</i>	30 kb تک سائز کا ٹکڑا	یہ غیر ملکی ڈی این اے کے بہت بڑے ٹکڑوں کو قبول کر سکتا ہے۔	Phage λ , M13 فج
Phagemid		سائز کا ٹکڑا جس کی حد 100- to 300-kb تک	ان کے پاس متعدد کلوننگ سائٹس اور ایک انڈیسیبل لیک جین پر موثر ہے۔	pEMBL pBluescript پلاسماڈ
بیکٹیریا مصنوعی کریموسومز (بی اے سی)	<i>E. coli</i>	150 to 300 kb تک کے سائز کے ٹکڑے	اینٹی بائیوٹک مزاحمت جین جیسے مقامات کی طرح مارکر اور نقل (وری) کی ایک بہت مستحکم اصل۔ وہ ڈی این اے کے بہت بڑے ٹکڑے رکھ سکتے ہیں	

P1- اخذ شدہ مصنوعی کروموسومز (پی اے سی)	<i>E.coli</i>	سائز کا ٹکڑا جس کی حد 100- 300kb	یہ ایک ڈی این اے ساخت ہے جس سے اخذ کیا گیا ہے پی 1 بیکٹیر یوفیوز کا ڈی این اے اور بیکٹیریل مصنوعی کروموسومز۔ یہ بڑے ڈی این اے سے سیکونس لے جاسکتا ہے۔
خمیر مصنوعی کروموسومز (وائی اے سی)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ٹکڑوں سے لے کر 200 سے 2000kb	یہ جینوم کی نقشہ سازی اور ترتیب میں استعمال ہوتا ہے۔
Cosmids		تقریباً 40 kb تک کے داخل	وہ اس قابل ہیں بیکٹیر یوفیوز ڈی این اے کو شامل کرنا ٹکڑا۔
انسان مصنوعی کروموسوم (ایچ اے سی)	مہذب انسانی خلیات	ٹکڑے کا سائز >2000kb	نئے جینوں کی منتقلی، ان کے اظہار اور کروموسومل فٹنشن کا مطالعہ کرنے میں مدد۔

6.3 کلوننگ ویکٹر کی اقسام (Types of Cloning Vectors)

کلوننگ کے مختلف تجربات کے لیے مختلف قسم کے کلوننگ ویکٹر استعمال کیے جاتے ہیں، یعنی جین پروردن، ligation، تبدیلی، اور اظہار۔ ویکٹر کا انتخاب میزبان سیل کی قسم (پروکاریوٹک / یوکاریوٹک)، سائز، اور ڈی این اے کی قسم (چھوٹے / بڑے ٹکڑے) پر بھی منحصر ہے۔ پروکاریوٹک ویکٹر میں پلاسمیدز، بیکٹیر یوفیوز، فیجیڈز اور فوسمیدز شامل ہیں۔ یوکاریوٹک ویکٹر خمیر، جانوروں اور پودوں کے خلیات پر مشتمل ہوتے ہیں۔

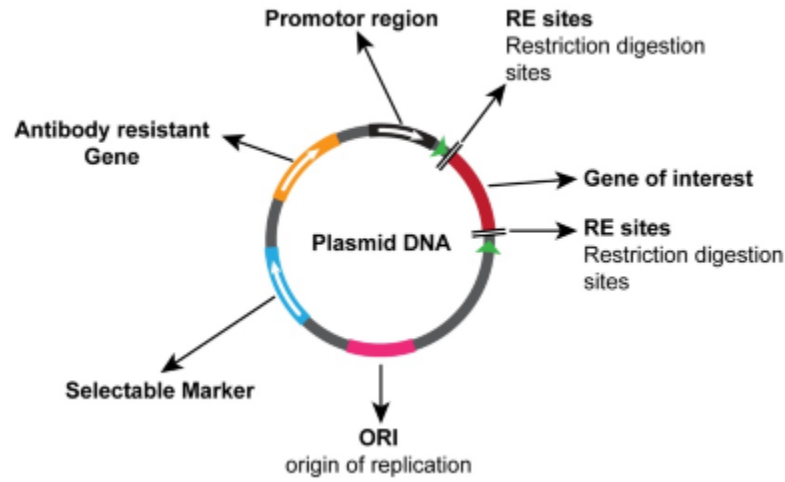
6.3.1 پلاسمڈ (Plasmid)

پلاسمیدز خود نقل کرنے والے، دوہرے پھنسے ہوئے، سرکمر DNA مالیکیولز ہیں جو بیکٹیریا میں پائے جاتے ہیں جو ایکسٹرا کروموسومل ہستی ہیں۔ پلازمیدز کا سائز تقریباً >1kb سے <500kb ہے، یہ سنگل یا ملٹی کاپی پلاسمیدز ہے۔ ہر پلاسمڈ کی نقل کی ایک اصل ہوتی ہے (ori) جو میزبان سیل کے اندر اس کی نقل میں مدد کرتی ہے (تصویر 14.2)۔ پلازمیدز نسبتاً بڑے (100bp سے 10kbp) غیر ملکی DNA کے ٹکڑوں کو کلون کر سکتا ہے۔ Col E1، pSC101، pSF2124، pSC101، وغیرہ سب سے بنیادی کلوننگ ویکٹر ہیں جو دوبارہ پیدا ہونے والی DNA ٹیکنالوجی میں استعمال ہوتے ہیں۔

قدرتی طور پر پائے جانے والے پلازمیدز میں اکثر کئی اہم خصوصیات کی کمی ہوتی ہے جو کلوننگ کے لیے درکار ہوتی ہیں، اور اس لیے ان میں ترمیم کی جانی چاہیے۔ سائز میں کمی، غیر ضروری اور ٹاکسن پیدا کرنے والے جینز کو حذف کرنا، قابل انتخاب مارکر جینز (مثلاً، اینٹی

بائیونک مزاحمتی جین) کا اندراج، اور پابندی کے خامروں کا اضافہ (RE سائٹس) جیسے MCS یا پولی لنکر اس کی مثالیں ہیں۔ ترمیمات pUC19، pUC18، pUC8، pBR327، pBR322 وغیرہ۔

جب کسی ویکٹر کا نام لیتے ہیں، مثال کے طور پر، 'pBR322' کا مطلب پلاسمڈ ہے، 'BR' کا مطلب ہے Bo- جگر اور روڈریگز، دو محققین جنہوں نے اسے تیار کیا، اور '2'2'3' کا مطلب ہے پلازمیڈ دوسروں کے برخلاف (جیسے پی بی آر 523 اور پی بی آر 723 لیبارٹری پی بی آر 223 ویکٹر E سے ماخوذ ہے۔ کوئی اور امپیلن اور ٹیٹراسائیکلین کے لیے اینٹی بائیونک مزاحمتی جینز پر مشتمل ہے۔ pUC ابھی تک ایک اور کلوننگ ویکٹر سیریز ہے۔ پلازمیڈ کو حرف 'p' سے ظاہر کیا جاتا ہے، اور حرف 'UC' کا مطلب یونیورسٹی آف کیلیفورنیا ہے، جہاں جے۔ مینگ اور اس کے ساتھیوں نے سب سے پہلے اسے تیار کیا۔ یہ ویکٹر جوڑوں میں پایا جاتا ہے اور اس میں الٹا آرڈر پابندی والی سائٹیں ہیں جو lacZ پروموٹر سے متعلق ہیں۔ ایسی ہی ایک جوڑی ہے pUC 8 اور 9



شکل 6.1: مختلف خطوں پر مشتمل پلاسمڈ کی اسکیمٹک نمائندگی

6.3.2 پلازمیڈ کی خصوصیات

1. عام طور پر سائز میں چھوٹا (<10 kb)
2. اسے صاف کرنا اور ہینڈل کرنا آسان ہے۔
3. دوائی بائیونک مزاحمتی جین (AmpR اور TetR) بنائیں جو تبدیل شدہ یاد و بارہ پیدا ہونے والے خلیوں کے انتخاب میں مدد کرتے ہیں (تصویر 14.2)۔
4. ایک اعلیٰ کاپی نمبر دکھائیں۔ مثال کے طور پر، ایک تبدیل شدہ E. coli سیل میں 15 مالیکول ہوتے ہیں، لیکن کلورامفنیکول کی موجودگی میں پلاسمڈ ایمپلیفیکیشن کے ذریعے کاپی نمبر کو 1000-3000 تک بڑھایا جاسکتا ہے۔

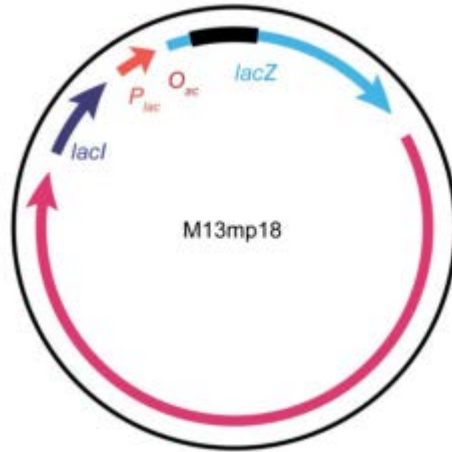
6.4 بیکٹیریوفج (Bacteriophage)

کلوئنگ ویکٹر کا ایک اور ذریعہ بیکٹیریوفج ہے۔ فیر کے لکیری ڈی این اے مالیکیول میں ایک ہی وقفے سے دو ٹکڑے پیدا ہوتے ہیں، جو بعد میں غیر ملکی ڈی این اے کی مدد سے جوڑ کر ایک chimeric فنج پارٹیکل (تصویر 14.3) بناتے ہیں۔ چونکہ فنج ہیڈ کی صلاحیت محدود ہے، اس میں صرف تھوڑی مقدار میں غیر ملکی ڈی این اے ڈالا جاسکتا ہے۔ فنج استعمال کرنے سے پہلے، ڈی این اے کے وہ حصے جن میں ضروری جین نہیں ہوتے ہیں، عام طور پر ہٹا دیے جاتے ہیں۔ فنج لیمبڈا میں، اس تکنیک کا استعمال ایک چھوٹا ویکٹر جینوم بنانے کے لیے کیا گیا تھا جس میں انزائم EcoRI کے لیے واحد پابندی والی جگہ تھی۔

Takagi اور ساتھیوں (1976) نے ایک مربوط اختتامی سائٹ (cos) دریافت کی۔ پلاسمڈ میں بیکٹیریوفج لیمبڈا ڈی این اے کی وجہ سے اسے Vivo میں وائرس کے ذرات میں پیک کرنے کی اجازت دیتا ہے۔ ویو ویکسیجنگ میں لیمبڈا جینوم کے کل سائز (48.5 kb) سے ڈی این اے مالیکیولز کے انتخاب میں مدد کرتا ہے۔ نتیجے کے طور پر، ایک لیمبڈا کلوئنگ ویکٹر غیر ضروری علاقے کے ایک حصے کو ہٹا کر (پابندی کو حذف کرنا) بنایا جاسکتا ہے۔ غیر ضروری خطے میں، غیر ملکی ڈی این اے کے ایک حصے کو ایک انوکھی پابندی والی جگہ پر کلون کیا جاسکتا ہے۔ یہ ویکٹر انسریشن ویکٹر کے نام سے جانے جاتے ہیں۔ لیمبڈا میں درج ذیل خصوصیات ہیں جو اسے ویکٹر کے طور پر استعمال کرنے کے لیے موزوں بناتی ہیں۔

• لیمبڈا جینز کا تقریباً 50% میزبان سیل کی نقل اور lysis کے لیے درکار ہے

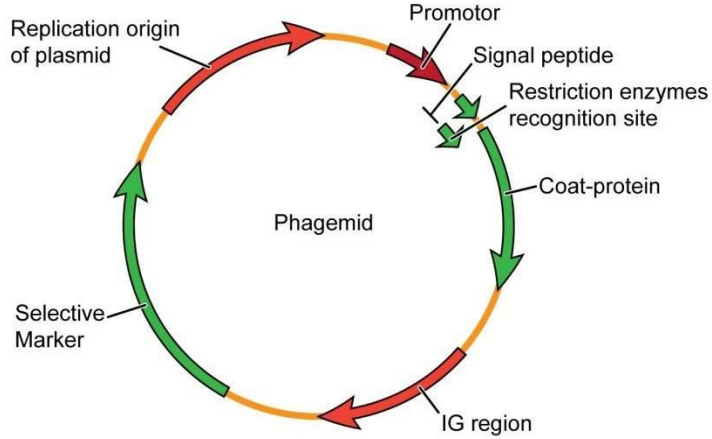
لیمبڈا جینوم کو فیر ہیڈ کے اندر پیک کیا جاتا ہے جسے 'ہیڈ فل میکانزم' کہا جاتا ہے۔ اس کا مطلب ہے فنج ہیڈ کے اندر پیک کیے گئے ڈی این اے کی مقدار کی اوپری حد



شکل 6.2: ایک ویکٹر کے طور پر استعمال ہونے والے بیکٹیریوفج کی خاکہ نمائندگی

6.5 Phagemids

یہ ایک کلوننگ ویکٹر ہے جو فلیمینٹس فیر M13 کو پلازمید کے ساتھ ملا کر ایک ایسا ویکٹر بناتا ہے جو دونوں پلاسمنڈ کے طور پر بڑھ سکتا ہے اور اسے وائرل ذرات میں سنگل سٹریٹڈی این اے کے طور پر پیک کیا جاسکتا ہے (شکل 6.3). فیکمڈ پلاسمنڈ اور کو لیفج دونوں کی نقل کی اصل پر مشتمل ہے۔ پی بلیو اسکرپٹ ویکٹر ایک عام فیکمڈ ویکٹر ہے۔ pBluescript phagemids کی اصلیت (pMB9-like) اور ColE اور filamentous phage f1 دونوں ہیں۔ pBluescript II KS 2691 میں جوڑے لمبا ہے اور pUC19 سے اترا ہے



شکل 6.3: ایک ویکٹر کے طور پر Phagemid کی خاکہ نمائندگی

6.6 کاسمیدس (Cosmid)

کاسمید ویکٹر پلاسمنڈ اور بیکٹیریوفجیج λ کی ترتیب سے بنا ہے۔ اس میں ڈی این اے کی ترتیب ہوتی ہے جس میں کوس سائٹس ان میں داخل کی جاتی ہیں جو ڈی این اے کو لیمبڈ امر حلے میں پیک کرنے کے قابل بناتی ہیں (شکل 6.4)۔ Cosmids وٹرو میں فیر ڈی این اے کو فیر پارٹیکلز میں پیک کرنے کی اجازت دیتے ہیں۔ کاسمید ویکٹر پہلی بار 1978 میں جے کولنز اور ساتھی کارکنوں نے تیار کیا تھا تاکہ پلازمید سے بڑے ڈی این اے کے ٹکڑوں کی کلوننگ کی سہولت فراہم کی جاسکے۔ عام طور پر استعمال ہونے والے کاسمید کی ایک مثال pHV79 ہے pBR322۔ اس میں مربوط اختتامی سائٹ λ cos ہے، جس میں 45 kb سائز کے اندراجات شامل ہیں۔

عام طور پر استعمال ہونے والے کاسمید pLFR-5 (6 kb سائز) میں دو بیکٹیریوفجیج کاس سائٹس پر مشتمل ہوتا ہے (کیونکہ ختم ہوتا ہے) کو ایک پابندی کے ذریعے الگ کیا جاتا ہے endonuclease سائٹ، ایک متعدد

چھ الگ الگ سائٹس (ہند III، PstI، Sail، BamHI، SmaI، اور EcoRI) کے ساتھ کلوننگ کی ترتیب، DNA کی نقل (ori)، اور ایک tetracycline resistance (TetR) جین۔ اس برہمانڈی میں تقریباً 40 kb کلون شدہ DNA ہوتا ہے۔

فجیج کی پیکنگ کے دوران کوس اینڈ کلیو ہو جاتے ہیں۔ نتیجے کے طور پر، cos ends میں پیئر بیکٹیری یا کے اندر ایک سرکلر DNA

مالیکیول بناتا ہے۔ یہ سرکلفارم مستحکم ہے، لہذا کلون شدہ ڈی این اے کو پلاسمڈ-انسرٹ ڈی این اے کی تعمیر کے طور پر برقرار رکھا جاسکتا ہے۔

❖ کاسمید ویکٹر استعمال کرنے کے فوائد یہ ہیں۔

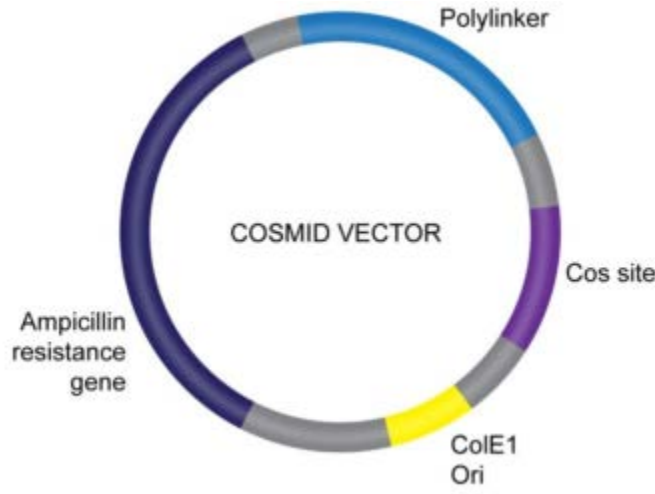
❖ سالماتی سطح پر برقرار جین اور ربط کا مطالعہ کیا جاسکتا ہے۔

❖ ان میں پلازمیڈز کے مقابلے میں تبدیلی کی اعلیٰ تعدد ہوتی ہے۔

❖ کاسمیدز ایک لکیری پلاسمڈ ڈی این اے کو بیکٹیریوفیج کے ڈی این اے کے ٹکڑوں کے ساتھ جوڑ کر بنائے جاتے ہیں جن کے کوس اینڈ ہوتے ہیں۔ مثال کے طور پر، 85 kbp DNA P1 کے سر میں 115 kbp کے جینوم سائز کے ساتھ پیک کیا جاسکتا ہے۔

❖ یہ کاسمیدز بیکٹیریامیں بڑے جینز اور جین کلٹرز کو کلون کرنے میں مدد کرتے ہیں۔

❖ کاسمیدز حیاتیات کے جینوم میں نان سینس تسلسل کے مطالعہ میں مدد کرتے ہیں۔



شکل 6.4: کاسمید ویکٹر کی خاکہ نمائندگی

6.7 M13 ویکٹر (M13 vector)

M13 ویکٹر کلوننگ ویکٹر کی ایک قسم ہے جو M13 بیکٹیریوفیج سے ماخوذ ہے، ایک فلیمینٹس وائرس جو *Escherichia coli* بیکٹیریا کو متاثر کرتا ہے۔ یہ ویکٹر بڑے پیمانے پر مالیکیولر بائیولوجی میں مختلف ایپلی کیشنز کے لیے استعمال کیے جاتے ہیں، خاص طور پر سنگل سٹرینڈ ڈی این اے (ssDNA) کی ترتیب کے لیے، سائٹ سے ڈائریکٹڈ mutagenesis، اور دیگر جینیاتی انجینئرنگ تکنیکوں کے لیے۔ یہاں M13 ویکٹر کا تفصیلی جائزہ ہے:

ساخت: M13 بیکٹیریوفیج میں ایک سادہ، لمبا ڈھانچہ ہوتا ہے جو ایک واحد پھنسے ہوئے DNA جینوم پر مشتمل ہوتا ہے جو ایک پروٹین کوٹ کے اندر سمیٹے ہوتے ہیں۔ جینوم کی لمبائی عام طور پر تقریباً 6,400 سے 7,300 نیوکلیوٹائیڈز تک ہوتی ہے اور اس میں متعدد

جین انکوڈنگ پروٹینز ہوتے ہیں جو وائرل نقل اور اسمبلی کے لیے ضروری ہیں۔

2. نقل: M13 دوسرے بیکٹیریوفیج کے مقابلے میں منفرد انداز میں نقل کرتا ہے۔ ای کولی میزبان سیل کے انفیکشن کے بعد، وائرل ڈی این اے ایک ڈبل پھنسے ہوئے شکل میں تبدیل ہو جاتا ہے اور ایک رولنگ سرکل انٹر میڈیٹ کے طور پر نقل کرتا ہے۔ اس کے نتیجے میں وائرل جینوم کی ایک سے زیادہ کاپیاں تیار ہوتی ہیں، جو میزبان سیل کو لیس کیے بغیر پر وجنی وائرس میں پیک کی جاتی ہیں۔

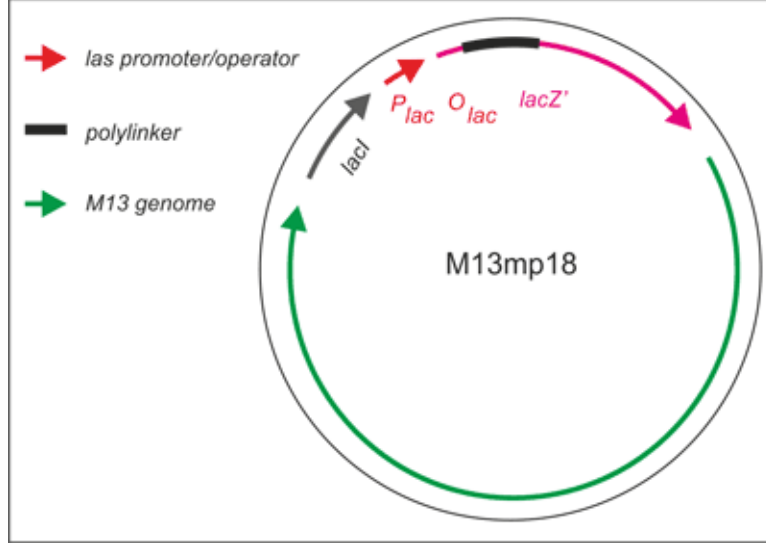
3. کلوننگ ویکٹر: M13 کو اس کے جینوم کے مخصوص خطوں میں غیر ملکی DNA کی ترتیب ڈال کر کلوننگ ویکٹر کے طور پر کام کرنے کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے۔ سب سے زیادہ استعمال ہونے والے M13 ویکٹرز میں M13mp18 اور M13mp19 شامل ہیں، جن میں DNA کے ٹکڑوں کو داخل کرنے کے لیے وائرل جینوم کے اندر ایک سے زیادہ کلوننگ سائٹس (MCS) ہوتی ہیں۔ MCS ضروری وائرل افعال میں خلل ڈالے بغیر ڈی این اے کے ٹکڑوں کو فوج جینوم میں داخل کرنے کی اجازت دیتا ہے۔

4. سنگل سٹرینڈ ڈی این اے پروڈکشن: M13 ویکٹر کی ایک اہم خصوصیت ان کی سنگل سٹرینڈ ڈی این اے (ssDNA) پیدا کرنے کی صلاحیت ہے۔ یہ مطلوبہ DNA داخل کرنے والے ریکومیننٹ M13 فیز کے ساتھ E. coli کے خلیوں کو متاثر کر کے حاصل کیا جاتا ہے۔ نقل کے دوران، فیز ڈبل سٹرینڈڈ DNA (dsDNA) اور تکمیلی سنگل سٹرینڈڈ DNA دونوں تیار کرتا ہے۔ ایس ایس ڈی این اے کو متاثرہ خلیات سے الگ کیا جاسکتا ہے اور مختلف اپیلی کیشنز کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے، جیسے ڈی این اے کی ترتیب سنجر کے طریقہ کار سے۔

5. ترتیب اور سائٹ کی طرف سے ہدایت شدہ M13: Mutagenesis: ویکٹر کو عام طور پر DNA کی ترتیب کے لیے استعمال کیا جاتا ہے کیونکہ وہ اعلیٰ معیار کے سنگل سٹرینڈڈ DNA ٹیمپلیٹس تیار کرنے کی صلاحیت رکھتے ہیں۔ ایس ایس ڈی این اے ڈی این اے کی ترتیب کے رد عمل کے لیے ٹیمپلیٹس کے طور پر کام کر سکتا ہے، جس سے محققین داخل کیے گئے ڈی این اے کے ٹکڑے کی نیو کلیوٹائیڈ ترتیب کا تعین کر سکتے ہیں۔ مزید برآں، M13 ویکٹر کا استعمال سائٹ پر مبنی mutagenesis تجربات کے لیے کیا جاتا ہے، جہاں مخصوص نیو کلیوٹائیڈ تبدیلیوں کو کلون شدہ DNA ترتیب میں متعارف کرایا جاسکتا ہے۔

6. Phagemid: ویکٹر: ssDNA کی پیداوار کی کارکردگی کو بڑھانے کے لیے، M13 ویکٹر کو فیجیڈ کے طور پر انجینئر کیا جاسکتا ہے۔ Phagemids ہائبرڈ ویکٹر ہیں جو پلاسماڈ اور بیکٹیریوفیج دونوں سے اخذ کردہ ترتیب پر مشتمل ہیں۔ وہ میزبان سیل کے اندر پلاسماڈ کے طور پر نقل کرتے ہیں لیکن مددگار فیج کو انسفیکشن کے ذریعہ ssDNA پیدا کرنے کے لئے آمادہ کیا جاسکتا ہے۔ Phagemid ویکٹر وائری M13 ویکٹر کے مقابلے میں ssDNA کی بڑھتی ہوئی پیداوار پیش کرتے ہیں۔

مجموعی طور پر، M13 ویکٹر مالیکیولر بائیولوجی ریسرچ میں قیمتی ٹولز ہیں، جو اعلیٰ معیار کے سنگل سٹرینڈ ڈی این اے کی تیاری اور مختلف جینیاتی انجینئرنگ اپیلی کیشنز کو سہولت فراہم کرنے کے لیے ایک قابل اعتماد طریقہ فراہم کرتے ہیں۔ ان کی استعداد اور استعمال میں آسانی انہیں سالماتی حیاتیات کی تکنیکوں کی وسیع رینج کے لیے دنیا بھر کی لیبارٹریوں میں ناگزیر بناتی ہے۔



شکل 6.5: M13 فیج ویکٹر کی خاکہ نمائندگی

6.8 بیکٹیریل مصنوعی کروموسوم (Bacteria Artificial Chromosome)

بیکٹیریل مصنوعی کروموسوم (BACs) کلوننگ ویکٹر ہیں جو بیکٹیریل خلیوں میں بڑے DNA کے ٹکڑوں کی ہیرا پھیری اور مطالعہ کے لیے ڈیزائن کیے گئے ہیں۔ یہ ویکٹر بیکٹیریل کروموسوم کی قدرتی خصوصیات پر مبنی ہیں اور مختلف قسم کے اپیلی کیشنز کے لیے سالماتی حیاتیات کی تحقیق میں بڑے پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں۔ یہاں BACs کا تفصیلی جائزہ ہے:

1. اصلیت اور ساخت: BACs بیکٹیریل کروموسوم سے ماخوذ ہیں، خاص طور پر *Escherichia coli* (E. coli) یا متعلقہ جاتیوں سے۔ وہ عام طور پر سرکلر ڈی این اے مالیکول ہوتے ہیں جو بیکٹیریل میزبان خلیوں کے اندر خود مختاری سے نقل کر سکتے ہیں۔ BACs کئی اہم عناصر پر مشتمل ہے:

- نقل کی اصلیت: BACs نقل کی ایک اصل (ori) کو رکھتا ہے، جو کہ ایک DNA ترتیب ہے جسے میزبان سیل مشینری کے ذریعے نقل شروع کرنے کے لیے تسلیم کیا جاتا ہے۔ یہ BAC کو بیکٹیریل میزبان کے اندر آزادانہ طور پر نقل تیار کرنے کی اجازت دیتا ہے۔

- سلیکٹ ایبل مارکر: BACs میں اکثر قابل انتخاب مارکر جین ہوتے ہیں، جیسے کہ اینٹی بائیوٹک مزاحمتی جین، جو بیکٹیریل سیلز کی شناخت اور انتخاب کی اجازت دیتے ہیں جنہوں نے BAC کو کامیابی سے لے لیا ہے۔

- کلوننگ سائٹس: BACs کے پاس ایک سے زیادہ کلوننگ سائٹس (MCS) یا ریپریکیشن اینڈرائمر یلگنیشن کی ترتیب ان کی ساخت کے اندر ہوتی ہے۔ یہ سائٹس محققین کو کلوننگ اور ہیرا پھیری کے لیے BAC میں بڑے DNA کے ٹکڑے داخل کرنے کی

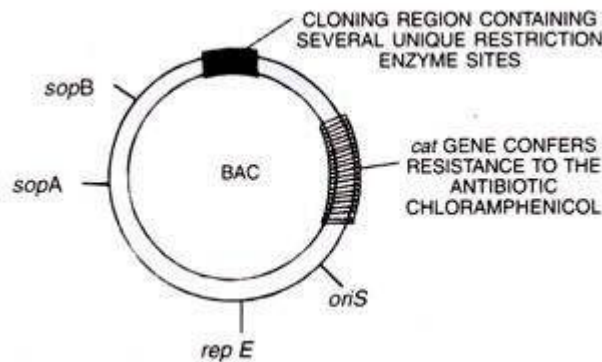
اجازت دیتی ہیں۔

2. سائز اور استحکام داخل کریں: BACs کی وضاحتی خصوصیات میں سے ایک یہ ہے کہ وہ 100 سے 300 کلو بیس (kb) یا اس سے زیادہ کے بڑے DNA داخلوں کو ایڈجسٹ کرنے کی صلاحیت ہے۔ یہ انہیں بڑے جینومک خطوں کی کلوننگ اور مطالعہ کرنے کے لیے مثالی بناتا ہے، بشمول پورے جین، جین کلسٹرز، اور ریگولیٹری عناصر۔ BACs کو ان کے استحکام اور دوبارہ ترتیب دینے کی کم شرح کے لیے جانا جاتا ہے، جو کہ بیکٹیریل خلیوں میں پھیلاؤ کے دوران بڑے DNA داخلوں کی سالمیت کو برقرار رکھنے کے لیے اہم ہے۔

3. لائبریری کی تعمیر: BACs کو عام طور پر جینومک لائبریریوں کی تعمیر کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، جو کہ ڈی این اے کے ٹکڑوں کے مجموعے ہیں جو کسی جاندار کے پورے جینوم کی نمائندگی کرتے ہیں۔ BACs کا استعمال کرتے ہوئے تخلیق کردہ جینومک لائبریریاں محققین کو کسی جاندار کے جینیاتی میک اپ کا منظم طریقے سے مطالعہ اور تجزیہ کرنے، دلچسپی کے جینوں کی شناخت کرنے اور جینومک تنظیم اور ساخت کی تحقیقات کرنے کی اجازت دیتی ہیں۔

4. فنکشنل جینومکس اسٹڈیز: BACs فنکشنل جینومکس اسٹڈیز کے لیے قیمتی ٹولز کے طور پر کام کرتے ہیں، جہاں جین کے فنکشن اور ریگولیشن کی چھان بین کی جاتی ہے۔ بڑے جینومک ٹکڑوں کو BACs میں کلون کر کے، محققین جین کے اظہار، فروغ دینے والی سرگرمی، اور ریگولیٹری عناصر کا اپنے مقامی جینومک تناظر میں مطالعہ کر سکتے ہیں۔ BACs کو مخصوص جینیاتی تبدیلیوں کے ساتھ ٹرانسجینک جانوروں یا پودوں کو پیدا کرنے کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے، جس سے Vivo میں جین کے فنکشن کا مطالعہ ممکن ہو سکتا ہے۔

5. فزیکل میپنگ اور سیکوینسنگ: BACs فزیکل میپنگ اور سیکوینسنگ پروجیکٹس میں ایک اہم کردار ادا کرتے ہیں جن کا مقصد کسی جاندار کے جینوم کی پوری ڈی این اے سیکوینس کو سمجھنا ہے۔ بڑے جینومک علاقوں کا احاطہ کرنے والے BAC کلون کو ترتیب دیا جاتا ہے اور اعلیٰ معیار کے حوالہ جینوم تیار کرنے کے لیے جمع کیا جاتا ہے۔ BAC پر مبنی فزیکل نقشے ترتیب وار ڈی این اے کے ٹکڑوں کو ترتیب دینے اور ترتیب دینے کے لیے ایک فریم ورک فراہم کرتے ہیں، مکمل جینوم کی ترتیب کی اسمبلی اور تشریح کی سہولت فراہم کرتے ہیں۔ مجموعی طور پر، BACs سالماتی حیاتیات کی تحقیق میں در سائل اور طاقور ٹولز ہیں، جو کلوننگ، ہیرا پھیری، اور بڑے ڈی این اے



کے ٹکڑوں کی اعلیٰ درستگی اور استحکام کے ساتھ مطالعہ کو قابل بناتے ہیں۔ ان کی درخواستوں کی وسیع رینج انہیں بنیادی تحقیق اور اطلاقی شعبوں دونوں میں مختلف قسم کے جینیاتی اور جینومک مطالعات کے لیے ناگزیر بناتی ہے۔

شکل 6.8۔ بیکٹیریل مصنوعی کروموسوم کی خاکہ نمائندگی۔

6.9 خمیر ویکٹر (Yeast Vector)

زیادہ تر خمیری تناؤ میں موجود ایک پلازمید (*Saccharomyces cerevisiae*) بھی کلوننگ ویکٹر کا کردار ادا کرتا ہے۔ ان ویکٹر کے استعمال کے فوائد یہ ہیں:

1. ان میں متعدد پابندی والے اینڈونکلیز کے لیے منفرد ٹارگٹ سائٹس شامل ہیں۔
2. یہ اعلیٰ کاپی نمبر ویکٹر ہیں جو *E. coli* میں نقل کر سکتے ہیں۔
3. یہ سب دوبارہ پیدا کرنے والوں کو منتخب کرنے کے لیے مار کر استعمال کرتے ہیں۔

کلوننگ کے زیادہ تر تجربات *E. coli* کے ساتھ بطور میزبان کیے جاتے ہیں۔ کئی کلوننگ ویکٹروں کو جینیاتی عناصر کے ساتھ ڈیزائن کیا گیا ہے جو غیر ملکی جینوں کے اظہار کی اجازت دیتے ہیں۔ ان عناصر میں عام طور پر نقل اور ترجمہ شروع کرنے کے اشارے شامل ہوتے ہیں۔ پلازمید اور بیکٹیریوفیج کلوننگ ویکٹرز کو انفرادی جینز یا ملٹی جین فیملیز کی تنہائی اور تجزیہ کے لیے وسیع پیمانے پر استعمال کیا گیا ہے۔

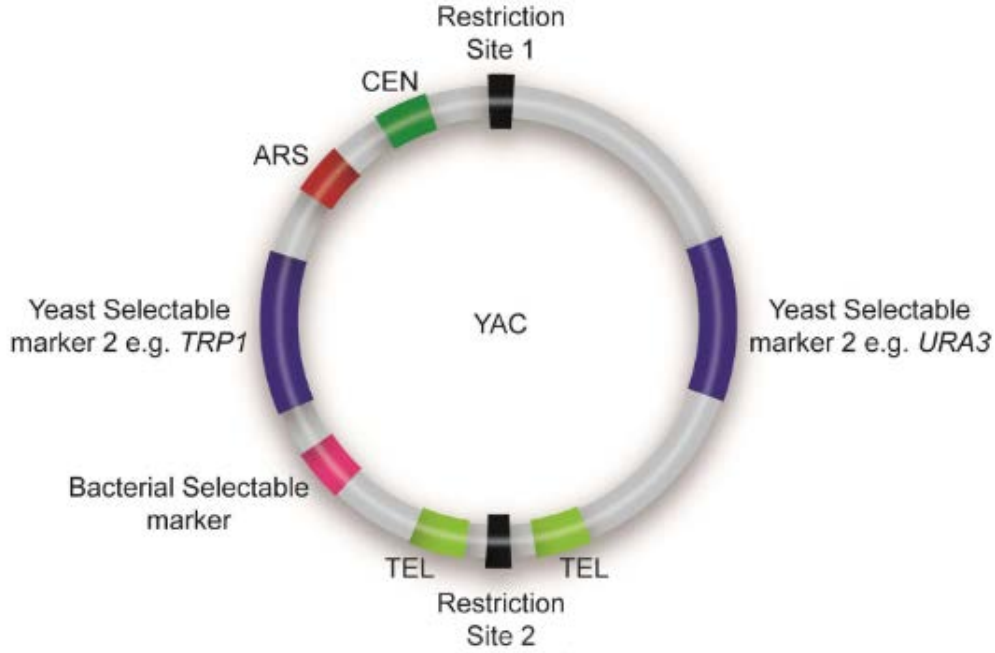
6.9.1 شٹل ویکٹر

ویکٹرز کو دو پر جاتیوں کے خلیات میں نقل کرنے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے کیونکہ ان میں نقل کی دو اصلیتیں ہیں جنہیں شٹل ویکٹر کے نام سے جانا جاتا ہے (شکل 6.6)۔

6.9.2 خمیر مصنوعی کروموسوم (Yeast Artificial Chromosome)

جین کلوننگ کے حوالے سے، YAC بالکل مختلف طریقہ پیش کرتا ہے۔ YAC ویکٹر کی ایک بڑی تعداد دستیاب ہے، لیکن ان سب کی ساخت ایک جیسی ہے، pYAC3 ریڑھ کی ہڈی کے طور پر کام کرتا ہے (تصویر 3.3)۔ اگرچہ pYAC3 میں کوئی مخصوص خصوصیات نہیں ہیں، لیکن قریب سے جائزہ لینے سے اس کی منفرد خصوصیات کا پتہ چلتا ہے۔ پی وائی اے سی 3 بنانے کے لیے پی بی آر 322 پلاسماڈ میں خمیر کے بہت سے جین داخل کیے گئے ہیں۔ URA3 اور TRP1 دونوں جینز کو بالترتیب YIP اور YRp7 کے لیے قابل انتخاب مار کر تسلیم کیا گیا ہے۔ DNA طبقہ جو TRP1 کو لے کر جاتا ہے اس کی نقل کی اصل ہوتی ہے، جیسا کہ YRp7 میں، لیکن pYAC3 میں اس ٹکڑے کو اور بھی بڑھایا جاتا ہے تاکہ اس ترتیب کو شامل کیا جاسکے جسے CEN4 کہا جاتا ہے، جو کروموسوم 4 کے سینٹر ویر ریجن سے DNA ہے۔ TRP1 لہذا اصل CEN4 طبقہ مصنوعی کروموسوم کے تین حصوں میں سے دو پر مشتمل ہے۔ تیسرا جزو، ٹیلومیرس، دو TEL تسلسل کے ذریعے دیا گیا ہے۔ یہ مکمل ٹیلومیر کی ترتیب نہیں ہیں، لیکن ایک بار جب وہ خمیر کے مرکز کے اندر آ جاتے ہیں، تو یہ ٹیلومیر کی نشوونما کے نقطہ آغاز کے طور پر کام کرتے ہیں۔ pYAC3 کا جزو: SUP4، نیڈی این اے داخل کرنے کے لیے کلوننگ کے دوران استعمال ہونے والا سلیکٹ ایبل مارکر ہے۔ شکل 6.6 YAC کو ویکٹر کے طور پر استعمال کرتے ہوئے کلوننگ کی

حکمت عملیوں کی وضاحت کرے گی۔



شکل 6.6: خمیر مصنوعی کروموسوم (YAC)

YACs کے فوائد:

- * ڈی این اے کی ایک بڑی ترتیب کو کلون کرنے کے لیے مفید ہے۔
- * بہترین حصہ ڈی این اے کا سائز جتنا بڑا ہے کلون کیا جائے گا اتنا ہی مستحکم YAC ہوگا۔
- * جین میپنگ آسانی سے کی جاسکتی ہے۔
- * YAC کی ایک کاپی فی سیل دستیاب ہے۔

6.10 ممالیہ مصنوعی کروموسوم (Mammalian Artificial Chromosome)

ممالیہ مصنوعی کروموسوم (MACs) مصنوعی کروموسوم ہیں جو ممالیہ کے خلیوں میں استعمال کے لیے بنائے گئے ہیں۔ یہ ویکٹر بڑے ڈی این اے داخل کرنے کے لیے بنائے گئے ہیں اور مختلف جینیاتی اور جینومک ایپلی کیشنز میں استعمال ہوتے ہیں، بشمول جین تھراپی، فنکشنل جینومکس، اور مصنوعی حیاتیات۔ یہاں MAC ویکٹر کے بارے میں کچھ تفصیلات ہیں:

1. اصلیت اور ساخت: MAC ویکٹر عام طور پر ممالیہ کے خلیوں میں پائے جانے والے قدرتی کروموسوم سے اخذ کیے جاتے ہیں، جیسے کہ انسان یا ماؤس کروموسوم۔ انہیں قدرتی کروموسوم کی ساخت اور رویے کی نقل کرنے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے، جن میں اہم

خصوصیات شامل ہیں:

● نقل کی اصلیت: MAC ویکٹر میں نقل کی اصل (ori) ہوتی ہے جو انہیں ممالیہ جانوروں کے خلیوں کے اندر خود مختاری سے نقل کرنے کی اجازت دیتی ہے۔ اس اور ی کو سیلولر ریپلیکیشن مشینری کے ذریعے پہچانا جاتا ہے، جو MAC کو میزبان سیل کے کروموسوم کے ساتھ نقل کرنے کے قابل بناتا ہے۔

● سینٹر ویر: MAC ویکٹر میں اکثر فعال سینٹر ویر کی ترتیب شامل ہوتی ہے۔ سیل کی تقسیم کے دوران کروموسوم کی مناسب علیحدگی کے لیے سینٹر ویر ضروری ہے، اس بات کو یقینی بناتے ہوئے کہ MAC کو بیٹی کے خلیات سے وراثت میں ملا ہے۔

● Telomeres: Telomeres قدرتی کروموسوم کے سروں پر پائے جانے والے مخصوص DNA کی ترتیب ہیں۔ MAC ویکٹر مصنوعی کروموسوم کے سروں کو مستحکم کرنے اور انحطاط کو روکنے کے لیے ٹیلو ویر کی ترتیب پر مشتمل ہو سکتے ہیں۔

2. بڑے ڈی این اے انسریٹس: MAC ویکٹر کے بنیادی فوائد میں سے ایک ان کی بڑی ڈی این اے انسریٹس کو ایڈجسٹ کرنے کی صلاحیت ہے، جس میں سیکڑوں کلومیٹس سے لے کر سائز میں کئی میگا بیسز شامل ہیں۔ یہ انہیں بڑے جینومک علاقوں، جین کلسترز، یا ان کے ریگولیٹری عناصر کے ساتھ پورے جین کی کلوننگ اور مطالعہ کرنے کے لیے مثالی بناتا ہے۔

3. درخواستیں:

● جین تھراپی: MAC ویکٹر جین تھراپی اپیلی کیشنز کے لیے وعدہ رکھتے ہیں، جہاں وہ مریض کے خلیات میں علاج کے جین پہنچانے کے لیے استعمال کیے جاسکتے ہیں۔ علاج کے جینز، ریگولیٹری عناصر، اور دیگر ضروری ترتیبوں پر مشتمل بڑے DNA داخلوں کو MAC ویکٹر میں کلون کیا جاسکتا ہے اور جینیاتی عوارض کو درست کرنے یا بیماریوں کے علاج کے لیے ہدف کے خلیوں میں متعارف کرایا جاسکتا ہے۔

● فنکشنل جینوٹکس: MAC ویکٹر ممالیہ خلیوں میں فنکشنل جینوٹکس اسٹڈیز کے لیے قیمتی ٹولز ہیں۔ محققین اپنے مقامی جینومک سیاق و سباق میں جین کے اظہار، ریگولیٹری عناصر، اور کروموسومل تنظیم کا مطالعہ کرنے کے لیے بڑے جینومک علاقوں کو MAC ویکٹر میں کلون کر سکتے ہیں۔

● مصنوعی حیاتیات: MAC ویکٹر کو مصنوعی حیاتیات میں بھی اپنی مرضی کے مطابق ڈیزائن کردہ فنکشنز کے ساتھ مصنوعی کروموسوم بنانے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ محققین مصنوعی ڈی این اے کی ترتیب، جین سرکٹس، یا پورے میٹابولک راستوں کو لے جانے کے لیے MAC ویکٹر کو انجینئر کر سکتے ہیں، جس سے نئے سیلولر افعال یا حیاتیات کی تخلیق کی اجازت دی جاسکتی ہے۔

4. تعمیر اور ہیرا پھیری: MAC ویکٹر عام طور پر بیکٹیریل خلیوں میں مالدیو لکلوٹنگ کی تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے بنائے جاتے ہیں، جہاں بڑے DNA داخلوں کو MAC ویکٹر بک بون میں کلون کیا جاتا ہے۔ ایک بار تعمیر ہونے کے بعد، MAC ویکٹر کو ممالیہ کے خلیوں میں منتقل کیا جاسکتا ہے جیسے کہ منتقلی یا وائرل ثالثی ترسیل۔ محققین مخصوص اپیلی کیشنز کے لیے ضرورت کے مطابق ڈی این اے

اے کی ترتیب کو متعارف کرانے یا اس میں ترمیم کرنے کے لیے جینیاتی انجینئرنگ ٹولز کا استعمال کرتے ہوئے MAC ویکٹرز کو جوڑ سکتے ہیں۔

خلاصہ یہ کہ، MAC ویکٹر ممالیہ کے خلیوں میں بڑے DNA کی ترتیب کا مطالعہ کرنے اور ان میں ہیرا پھیری کرنے کے لیے طاقتور ٹولز ہیں۔ بڑے ڈی این اے داخل کرنے کی ان کی صلاحیت انہیں جینیاتی اور جینومک اپیلی کیشنز کی وسیع رینج کے لیے ورٹائل پلیٹ فارم بناتی ہے، جین تھراپی سے لے کر فنکشنل جینومکس اور مصنوعی حیاتیات تک۔

6.11 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس باب کو مکمل کرنے کے بعد، طلباء اب اس قابل ہو جائیں گے:

- ❖ ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی میں کلوننگ ویکٹر کے کردار کی وضاحت کریں اور کلوننگ ویکٹر کی مختلف اقسام کے درمیان فرق کریں، بشمول پلاسمڈ، کاسمید، فیجیڈ، لیمبڈا ویکٹیر، فیکس، M13، YACs، BACs، اور MACs۔
- ❖ مختلف کلوننگ ویکٹرز کی خصوصیات اور استعمال کو سمجھیں، جیسے ڈی این اے داخل کرنے کی ان کی صلاحیت، نقل کے طریقہ کار،
- ❖ تجزیہ کریں کہ کلوننگ ویکٹر کا انتخاب کس طرح مخصوص جینیاتی انجینئرنگ کاموں کے تجرباتی ڈیزائن اور فنریبلٹی کو متاثر کرتا ہے۔

6.12 کلیدی الفاظ (Keywords)

کلوننگ	Cloning	ڈی این اے کے ٹکڑوں، خلیات یا جانداروں کی جینیاتی طور پر ایک جیسی کاپیاں تیار کرنے کا عمل۔
پلاسمید	Plasmid	چھوٹے، سرکلر ڈی این اے مالیکول جو بیکٹیریا میں پائے جاتے ہیں، جو آزاد نقل کے قابل ہوتے ہیں۔
ڈی این اے کی ترتیب	DNA sequencing	ڈی این اے مالیکول یا جینوم میں نیوکلیوٹائیڈس کی درست ترتیب کا تعین کرنا۔
ویکٹ	Vector	ایک ڈی این اے مالیکول جو غیر ملکی جینیاتی مواد کو میزبان خلیوں میں منتقل کرنے کے لیے بطور کیریئر استعمال ہوتا ہے۔

6.13 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

6.13.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. بیکٹیریل خلیات میں میزبان کروموسوم سے آزادانہ طور پر موجود چھوٹے، سرکلر DNA مالکیولز کو کیا کہتے ہیں؟ (پلاسמידز)
2. کس قسم کے ویکٹر پلاسمڈ اور بیکٹیریوفیجز کی خصوصیات کو یکجا کرتے ہیں؟ (Cosmids)
3. کون سے ویکٹر بیکٹیریوفیجز سے اخذ کردہ ترتیب پر مشتمل ہیں اور بیکٹیریل خلیوں میں پلاسمڈ کے طور پر پھیل سکتے ہیں؟ (Phagemids)
4. بیکٹیریل وائرس کا نام کیا ہے جو *Escherichia coli* خلیات کو متاثر کرتا ہے اور کلوننگ ویکٹر کا کام کرتا ہے؟ (لیمبڈا بیکٹیریوفیج)
5. کون سا بیکٹیریوفیج ایک واحد پھنسے ہوئے ڈی این اے جینوم رکھتا ہے اور بڑے پیمانے پر ڈی این اے کی ترتیب کے لیے استعمال ہوتا ہے؟ (M13)
6. BAC کا مطلب ہے بیکٹیریل _____ کروموسوم۔ (مصنوعی)
7. کس قسم کے ویکٹر خمیر کروموسوم سے اخذ کیے گئے ہیں اور بہت بڑے ڈی این اے داخل کرنے کے قابل ہیں؟ (YACs)
8. MAC ویکٹرز _____ خلیات میں استعمال کے لیے بنائے گئے ہیں۔ (ممالیہ)
9. ڈی این اے کے ٹکڑے کیا ہیں جو نئے داخل کردہ ڈی این اے کے ساتھ نقل کر سکتے ہیں؟ (ویکٹرز)
10. شٹل ویکٹر دو مختلف _____ پر جاتیوں میں دوبارہ پیدا کرنے کی صلاحیت رکھتے ہیں۔ (میزبان)

6.13.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی میں کلوننگ ویکٹر کا بنیادی کام کیا ہے؟
2. بیکٹیریل آرٹیفیشل کروموسوم (BACs) کو کلوننگ ویکٹر کے طور پر استعمال کرنے کا ایک فائدہ بتائیں۔
3. M13 بیکٹیریوفیج ویکٹر کی ساخت کو مختصراً بیان کریں۔
4. cosmids میں cos سائٹس کا کیا کردار ہے، اور وہ DNA پیکیجنگ کو کس طرح سہولت فراہم کرتے ہیں؟
5. شٹل ویکٹر دوسرے کلوننگ ویکٹرز سے کیسے مختلف ہیں، اور سالماتی حیاتیات کے تجربات میں وہ کیا فائدہ پیش کرتے ہیں؟

6.13.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. کلوننگ ویکٹر کے طور پر پلازمیڈ کی خصوصیات اور فوائد پر تبادلہ خیال کریں، اور سالماتی حیاتیات کی تحقیق میں عام طور پر استعمال ہونے والے پلاسمڈ ویکٹر کی مثالیں فراہم کریں۔

2. کلوننگ ویکٹر کے طور پر بیکٹیریل مصنوعی کروموسوم (BACs) کی ساخت اور کام کی وضاحت کریں۔
3. Recombinant DNA ٹیکنالوجی میں M13 بیکٹیریوفیج ویکٹر کی منفرد خصوصیات بیان کریں۔
4. کلوننگ ویکٹر کے طور پر cosmids اور phagemids کی خصوصیات اور اپیلی کیشنز کا موازنہ اور موازنہ کریں۔
5. سالماتی حیاتیات کی تحقیق میں شٹل ویکٹر کے ڈیزائن اور افادیت کو دریافت کریں۔

6.14 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Cosmids	کاسمیدس	کاسمیدس	ہائبرڈ ویکٹر پلازمید اور بیکٹیریوفیج کی خصوصیات کو یکجا کرتے ہیں، جو بڑے ڈی این اے کے ٹکڑوں کی کلوننگ کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔
Bacterial	بیکٹیریل	مصنوعی -	بیکٹیریل کروموسوم سے اخذ کردہ بڑے کلوننگ ویکٹر،
Artificial	کروموسوم		بڑے جینومک علاقوں کی کلوننگ کے لیے موزوں۔
Chromosome			
Shuttle Vector	شٹل ویکٹر	شٹل ویکٹر	: دو مختلف میزبان پر جاتیوں میں نقل کرنے کے قابل ویکٹر، مختلف خلیوں کی اقسام میں جینیاتی ہیرا پھیری کی سہولت فراہم کرتے ہیں۔

6.15 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res. 1952;12(4):264-5.
2. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol. 1977;36(1):59-74.

اکائی 7: اظہاری/ایکسپریشن ویکٹر

(Expression Vectors)

اکائی کے اجزا	
7.0	تمہید (Introduction)
7.1	مقاصد (Objectives)
7.2	ایکسپریشن ویکٹر (Expression Vector)
7.2.1	اظہار ویکٹر: اقسام اور خصوصیات: (Expression Vectors: Types and Characteristics)
7.2.2	اظہار ویکٹر کیسے کام کرتے ہیں؟
7.3	جین لائبریریوں کی اسکریننگ کی حکمت عملی (Screening Strategies of Gene Libraries)
7.3.1	کالونی ہائبرڈائزیشن کے ذریعے اسکریننگ (Screening by Colony Hybridization)
7.3.2	تختی ہائبرڈائزیشن (Plaque hybridization)
7.4	اكتسابی نتائج (Learning Outcomes)
7.5	کلیدی الفاظ (Keywords)
7.6	نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)
7.6.1	معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)
7.6.2	مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)
7.6.3	طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)
7.7	فرہنگ (Glossary)
7.8	مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

مالیکیولر بائیولوجی کے میدان میں، جین کے اظہار کا مطالعہ ایک بنیاد کے طور پر کھڑا ہے، جو خود زندگی کے اندر موجود میکا نزم کے بارے میں بصیرت پیش کرتا ہے۔ اس ڈومین کے اندر، ایکسپریشن ویکٹر ناگزیر ٹولز کے طور پر ابھرتے ہیں، جینیاتی مواد کی درستی اور خوبی کے ساتھ ہیرا پھیری اور تجربہ میں سہولت فراہم کرتے ہیں۔ جیسا کہ ہم اس باب کو شروع کرتے ہیں، ہم جینیاتی انجینئرنگ کے دائرے میں قدم رکھتے ہیں، اظہار ویکٹر کی خصوصیات اور افعال کو تلاش کرتے ہیں جو محققین کو ڈی این اے کے اندر انکوڈ شدہ رازوں کو کھولنے کے لیے با اختیار بناتے ہیں۔

ایکسپریشن ویکٹر، جو ان کی استعداد کے لیے قابل احترام ہیں، ان خصوصیات کی ایک صف پر فخر کرتے ہیں جو انہیں تجربہ گاہ کی ترتیب میں انمول قرار دیتے ہیں۔ ان کے ماڈیولر ڈیزائن سے، غیر ملکی DNA کے ٹکڑوں کو بغیر کسی رکاوٹ کے داخل کرنے کی اجازت دیتے ہوئے، ان کے مضبوط پروموٹرز اور بڑھانے والوں تک جو جین کے اظہار کو بے مثال کارکردگی کے ساتھ چلاتے ہیں، یہ ویکٹر ایسے راستے کے طور پر کام کرتے ہیں جن کے ذریعے جینیاتی معلومات کو استعمال کیا جاتا ہے اور فعال پروٹین میں ترجمہ کیا جاتا ہے۔ مزید برآں، میزبان حیاتیات کی متنوع رینج کے ساتھ ان کی مطابقت انہیں عالمگیریت سے نوازتی ہے، جو محققین کو سائنسی دریافت کے حصول میں انواع کی حدود کو عبور کرنے کے قابل بناتی ہے۔

ایکسپریشن ویکٹرز کے استعمال کا مرکز اسکریننگ کا عمل ہے، جس میں دوبارہ پیدا ہونے والے DNA کی تعمیرات کی افادیت اور سالمیت کا باریک بینی سے جائزہ لیا جاتا ہے۔ دو نمایاں تکنیکیں، کالونی ہائبرڈائزیشن اور پلاک ہائبرڈائزیشن، اس کوشش میں ستون کے طور پر کھڑی ہیں، جینومک پس منظر کے درمیان ہدف کی ترتیب کی شناخت اور الگ تھلگ کرنے کے لیے الگ الگ طریقہ کار پیش کرتی ہیں۔

کالونی ہائبرڈائزیشن، نیوکلک ایسڈ ہائبرڈائزیشن کے اصولوں پر مبنی ایک طریقہ، جس میں بیکٹیریل کالونیوں کی جانچ پڑتال شامل ہے جو ہدف کی ترتیب کے لیے تکمیلی لیبل والے ڈی این اے پر ولس کے ساتھ ریکومیننٹ پلاسٹک کو پناہ دیتی ہے۔ کالونیوں کے اندر اس کی تکمیلی ترتیب کے لیے تحقیقات کے انتخابی پابندی کے ذریعے، محققین مطلوبہ ڈی این اے کے ٹکڑوں کی موجودگی کو درستی کے ساتھ جان سکتے ہیں، اس طرح دلچسپی کے جین والے کلون کی تنہائی اور خصوصیت کو فعال کرتے ہیں۔

اس کے برعکس، پلاک ہائبرڈائزیشن وائرل ویکٹر سسٹمز، خاص طور پر بیکٹیریوفیج کے دائرے میں ایک سنگ بنیاد کے طور پر ابھرتی ہے۔ بیکٹیریل لان پر فیجی کی لائٹک نوعیت اور ان کی سختی بنانے کی صلاحیت کا فائدہ اٹھاتے ہوئے، یہ تکنیک ٹھوس سپورٹ پر ریکومیننٹ ڈی این اے کو پناہ دینے والے فیروزات کو متحرک کرتی ہے، جس کے بعد لیبل لگے ہوئے پروٹین کے ساتھ ان تختیوں کی جانچ کی جاتی ہے۔ انفرادی تختیوں کے اندر ہائبرڈائزیشن سگنلز کا پتہ لگانے کے ذریعے، محققین مطلوبہ جینیاتی مواد کی موجودگی کی نشاندہی کر سکتے ہیں، مزید تجزیہ اور ہیرا پھیری کی راہ ہموار کر سکتے ہیں۔

جب ہم اظہار ویکٹر اور اسکریننگ کی تکنیکوں کے منظر نامے کو عبور کرتے ہیں، تو ہم جینیاتی ہیرا پھیری کی پیچیدگیوں کو تلاش کرتے

ہیں، ان دھاگوں کو کھولتے ہیں جو سالماتی حیاتیات کی ٹیپسٹری کو ایک ساتھ باندھتے ہیں۔ نظریہ اور عمل کی ترکیب کے ذریعے، ہم دریافت کے سفر کا آغاز کرتے ہیں، خود زندگی کے جینیاتی تانے بانے میں موجود رازوں سے پردہ اٹھاتے ہیں۔

7.1 مقاصد (Objectives)

- اس اکائی کی تکمیل کے بعد طالب علم اس کی وضاحت کر سکے گا۔
- ❖ جین کے اظہار اور سالماتی حیاتیات کے بنیادی تصورات۔
- ❖ جینیاتی ہیرا پھیری اور تجزیہ کے لیے ناگزیر اوزار کے طور پر اظہار ویکٹر کی اہمیت۔
- ❖ اظہار ویکٹر کی خصوصیات اور افعال،
- ❖ کالونی ہائبرڈائزیشن اور پلاک ہائبرڈائزیشن کی تکنیکوں پر توجہ مرکوز کرتے ہوئے دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے کی تعمیرات کی افادیت اور سالمیت کا جائزہ لینے کے لیے اسکریننگ کے عمل کی وضاحت کریں۔

7.2 ایکسپریژن ویکٹر (Expression Vector)

ایکسپریژن ویکٹر مائیکروبیالوجی میں ناگزیر ٹولز ہیں، جو سائنس دانوں کو جینز کا درستگی کے ساتھ مطالعہ کرنے اور ان کا مطالعہ کرنے کی اجازت دیتے ہیں۔ اظہار ویکٹر کے بارے میں سمجھنے کے لیے کچھ اہم نکات یہ ہیں:

1. بامقصد ڈیزائن: ایکسپریژن ویکٹر کو مائیکروبیالوجی کے تجربات میں مخصوص کاموں کو پورا کرنے کے لیے احتیاط سے ڈیزائن کیا گیا ہے۔ وہ میزبان کے اندر داخل ہونے والے جینوں کو لے جانے اور اظہار کرنے کے لیے تیار کیے گئے۔ یہ ڈیزائن محققین کو خلیات میں غیر ملکی کو متضاد اور کنٹرول شدہ ماحول میں ان جینز کے کام کا مطالعہ کرنے کی اجازت دیتا ہے۔

2. ماڈیولر ڈھانچہ: اظہار ویکٹر میں عام طور پر ایک ماڈیولر فن تعمیر ہوتا ہے، جس کا مطلب یہ ہے کہ وہ مختلف فنکشنل عناصر پر مشتمل ہے جو آپ کی ضرورت کے مطابق ہے یا تبدیل کیا جاسکتا ہے۔ اس ماڈیولر کا کلیدی جز ایک سے زیادہ کلوننگ سائٹ (MCS) ہے، یہ پولی لنکر ریجن بھی کہا جاتا ہے۔ ایم سی ایس ڈی این اے کا ایک حصہ ہے جس میں متعدد افراد کو انزائم کی شناخت کی جگہ ہوتی ہے، غیر ملکی ڈی این اے کے ٹکڑوں کو داخل کرنے میں سہولت فراہم کرتے ہیں۔ یہ ماڈیول ڈیزائنر محققین کو قابل بناتا ہے کہ وہ مختلف تجرباتی مقاصد کے لیے ایکسپریژن ویکٹر کو آسانی سے تبدیل کر کے یا مخصوص ڈی این اے سیکوئنز کو شامل کر لیں۔

3. ریگولیٹری عناصر: اظہار خیال میں ضروری ریگولیٹری عناصر ہیں جو اظہار رائے کرتے ہیں۔ ان عناصر میں پرموٹرز، ہیچنے والے، اور ٹرانسکرپشن ختم کرنے کے سلسلے میں شامل ہیں۔ فروغ دینے والے این اے کی ترتیب کے خواہشمند ہیں جو کہ آراین اے کو بھر تیار نقل کی بات کرتے ہیں۔ دنیا والے ریگولیٹری ترتیب ہیں جو پرموٹرز کی سرگرمی اور جین کے اظہار کی سطح کو بہتر بنا سکتے ہیں۔ ٹرانسکرپشن ختم کرنے کے عمل کو نقل کرنے کا اشارہ دیتے ہیں اور ایم آراین اے مائیکروبیالوجی کی مناسب پرسسٹنگ کو یقینی بنانے میں مدد کرتے ہیں۔ ان ریگولیٹری عناصر

کو شامل کیا گیا ہے، اظہار خیال اس بات کو درست طریقے سے کنٹرول کر سکتے ہیں کہ میزبان جین کب میں اور کیسے ظاہر ہوتے ہیں۔

4. قابل انتخاب مارکر: ویکٹر اکثر قابل انتخاب مارکر ہیں، جو جیسے جین آپ کو مخصوص اینٹی بائیوٹکس یا مرکبات کے خلاف مزاحمت فراہم کرتے ہیں۔ مارکر دو اہم مقاصد کو پورا کرتے ہیں: اول، وہ محققین کو آسانی سے خلیات کی شناخت اور ان کا انتخاب کرنے کی اجازت دیتے ہوئے انتخابی راستے (مثلاً، اینٹی بائیوٹک پر میڈیا پر مشتمل) خلیات کو لاگو کرتے ہیں۔ پولیس کامیابی کے ساتھ ویکٹر کو حاصل کیا؛ دوم، وہ کئی نسلوں کے دوران خلیات کے اندر ویکٹر کو بنانے کا ذریعہ فراہم کرتے ہیں۔ عام انتخاب کے نشانات میں اینٹی بائیوٹک مزاحمتی جینز امپیسلن ریزسٹنس (ampR) یا کانامائسن ریزسٹنس (kanR) کے ساتھ نیومائسن یا ہائیگرومائسن جیسے زہریلے مرکبات کے خلاف مزاحمت فراہم کرنے والے جین شامل ہیں۔

5- اظہار خیال: ویکٹر کو مختلف میزبان جانداروں کے ساتھ ہم آہنگ ہونے کے لیے ڈیزائن کیا گیا، معاون بیکٹیریا، خمیر، اور میہ کے خلیات۔ یہ محققین کو مختلف میزبان نظاموں میں ایک ہی ویکٹر بیک بون کو استعمال کرنے، تجرباتی کام کے بہاؤ کو ہموار کرنے اور تقابلی مطالعات کی سہولت فراہم کرنے کی اجازت ہے۔ مثال کے طور پر، جین کے فنکشن کا مطالعہ کرنے والا ایک محقق ممالیہ کے پاس اس کے کام کا مطالعہ کرنے کے لیے ممالیہ کے تاثرات ویکٹر کی طرف جانے سے پہلے اسپریمچیا میں جین کو کلون اور تقریر کرنے کے لیے بیکٹیریل ایکسپریژن ویکٹر استعمال کر سکتے ہیں

6. پلگ اور حسب ضرورت: ایکسپریژن ویکٹر اعلیٰ درجے کی پلگ اور حسب ضرورت پیش کرتے ہیں، جس سے محققین ویکٹر کو ان کی مخصوص تجربہ کاری کے مطابق تیار کیا جاسکتا ہے۔ سائنس دان ریگولیٹری عناصر، قابل انتخاب مارکر، یا دیگر فعال اجزاء کی ترتیب کو جوڑ کر اظہار ویکٹر میں ترمیم کر سکتے ہیں۔ مثال کے طور پر، محققین بیرونی محرکات کے جواب میں جین کے اظہار کو کنٹرول کرنے کے لیے ایک غیر تردید پروموٹر کے لیے ایک تشکیلاتی پروموٹر کو تبدیل کر سکتے ہیں۔ یہ پلگدار محققین کو مطلوبہ نتائج حاصل کرنے کے لیے جین کے اظہار کی سطح، پیداوار کی پیداوار، یا دیگر تجرباتی پیرامیٹرز کو بہتر بنانے کے قابل بناتی ہے۔

7. مختلف اپیلی کیشنز کے لیے مختلف: ایکسپریژن ویکٹر مختلف اپیلی کیشنز اور میزبان جانداروں کے لیے مختلف مواقع میں حاضر ہیں۔ بیکٹیریل اظہار کے لیے، پلاسٹم ویکٹر عام طور پر بیکٹیریل نمبر ان کی ہیرا پھیری اور آؤٹ میں آسانی سے استعمال کرتے ہیں۔ وائٹک ویکٹر، جیسے کہ ریٹرو وائڈیورائے ویکٹر، کو ممالیہ کے پارلیمانی انتخابات اور اظہار کے لیے ترجیح دی جاتی ہے۔ خمیر ایکٹر، اپی سول پلاسٹم اور انٹیگری ویکٹر دونوں، خمیر کی انواع جیسے *Saccharomyces cerevisiae* میں جین کے ویکٹرز کے گروپ کے لیے استعمال کے وقت ہر قسم کے نظام کے اظہار ویکٹر میں منفرد ہوتی ہے جو میزبان کی مخصوص خصوصیات اور تجربہ کے مطابق ہوتی ہے۔

8. بائیوٹکنالوجی میں بڑے پیمانے پر استعمال کیا جاتا ہے: ایکسپریژن ویکٹر بائیوٹیکنالوجی اور جینیاتی انکشن میں ہر جگہ استعمال ہونے والے ٹولز۔ وہ اپیلی کیشنز کی ایک تیز رفتار تیج میں کام کرتے ہیں، جینی کلوننگ، ریکومبیننٹ پروٹو ایکسپریژن، جین ناک آؤٹ اسٹڈیز، جین صحت سولین، فنکشنل جینوٹکس۔ ایکسپریژن ویکٹر سائنسز کو جینیاتی مواد کو درستگی کے ساتھ ہیرا پھیری کرنے، متنوع حیاتیاتی سیاق اور سابق میں

جین کے فنکشن کا مطالعہ کرنے، اور مختلف نفسیاتی علاج کے لیے تیار کرنے کے قابل۔ ان کی صلاحیت، وشوسنیتا، اور آسانی سے استعمال کریں، ویکٹر کو مالیکیولر کے بارے میں ہماری سمجھ کو آگے کے آلات کے لیے ناگزیر بناتی ہے۔

1. ایکسپریشن ویکٹرز کو میزبان خلیوں میں جین لے جانے اور ظاہر کرنے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے۔ وہ ڈیلیوری گاڑیوں کے طور پر کام کرتے ہیں، مخصوص جینیاتی مواد کو خلیات میں منتقل کرتے ہیں تاکہ سائنسدان ان جینوں کے کام کا مطالعہ کر سکیں۔
2. خصوصیات: یہ ویکٹر کئی اہم خصوصیات کے مالک ہیں۔

❖ ایک سے زیادہ کلوننگ سائٹ (Multiple Cloning Site (MCS): ویکٹر کے اندر ایک خطہ جہاں غیر ملکی DNA آسانی سے داخل کیا جاسکتا ہے۔

❖ فروغ دینے والے اور بڑھانے والے: یہ عناصر جین کے اظہار کو کنٹرول کرتے ہیں، اس بات کو یقینی بناتے ہیں کہ ویکٹر کے ذریعے لے جانے والے جین کو چالو کیا جاتا ہے اور اس کی پروٹین کی پیداوار ہوتی ہے۔

❖ قابل انتخاب مارکر (Selectable Marker): یہ وہ جین ہیں جو اینٹی بائیوٹکس یا دیگر مرکبات کے خلاف مزاحمت فراہم کرتے ہیں، جس سے سائنسدان آسانی سے ان خلیات کی شناخت کر سکتے ہیں جنہوں نے ویکٹر کو لے لیا ہے۔

3. اقسام: مختلف قسم کے ایکسپریشن ویکٹرز ہیں جو مختلف اپیلی کیشنز کے لیے تیار کیے گئے ہیں۔ عام مثالوں میں بیکٹیریل خلیوں کے لیے پلازمڈ ویکٹر، ممالیہ خلیوں کو متاثر کرنے کے لیے وائرل ویکٹر، اور خمیری خلیوں کے لیے خمیر ویکٹر شامل ہیں۔

4. ماڈیولرٹی: ایکسپریشن ویکٹر اکثر ماڈیولر ہوتے ہیں، مطلب یہ ہے کہ مخصوص تجرباتی ضروریات کے مطابق مختلف اجزاء کو اندر اور باہر تبدیل کیا جاسکتا ہے۔ یہ پلک سائنسدانوں کو مختلف تجربات کے لیے ویکٹرز کو اپنی مرضی کے مطابق بنانے کی اجازت دیتی ہے۔

5. اپیلی کیشنز: ایکسپریشن ویکٹر کا استعمال وسیع پیمانے پر تجربات میں کیا جاتا ہے، بشمول جین کلوننگ، پروٹین ایکسپریشن، جین ناک آؤٹ اسٹڈیز، اور جین تھراپی ریسرچ۔ وہ بائیو ٹیکنالوجی اور جینیاتی انجینئرنگ میں بنیادی اوزار ہیں۔

مجموعی طور پر، اظہار ویکٹر مالیکیولر بائیولوجی میں ضروری آلات ہیں، جو سائنسدانوں کو جینیاتی کوڈ کے رازوں کو کھولنے اور جانداروں کے بارے میں ہماری سمجھ کو آگے بڑھانے کے قابل بناتے ہیں۔

7.2.1 اظہار ویکٹر: اقسام اور خصوصیات: (Expression Vectors: Types and

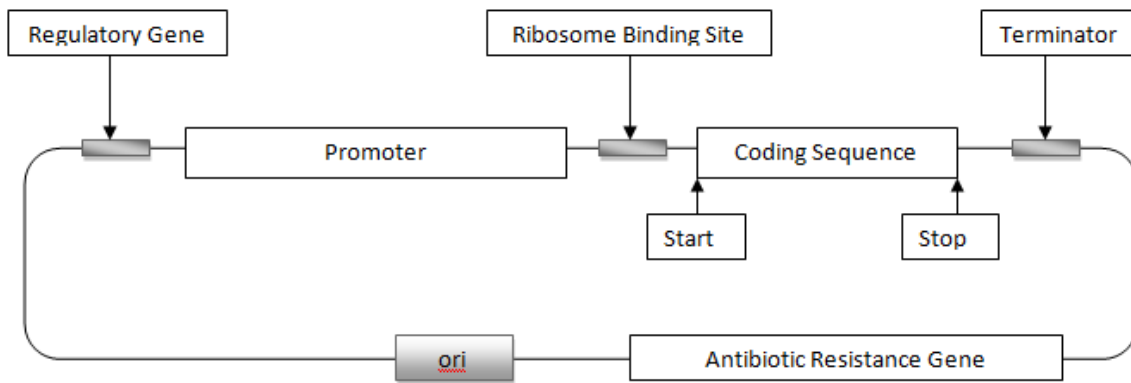
Characteristics)

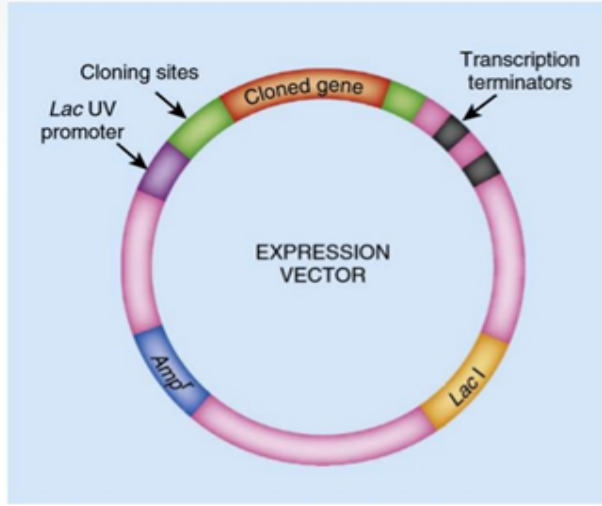
اظہار ویکٹر ویکٹر ہوتے ہیں جو ڈی این اے داخل کرنے کے لیے گاڑیوں کے طور پر کام کرتے ہیں اور ڈی این اے کے داخل کو موثر طریقے سے ظاہر کرنے کی اجازت دیتے ہیں۔ دلچسپی کے جین کے علاوہ، ان اظہار کی تعمیرات میں ریگولیٹری عناصر جیسے اضافہ کرنے والے اور فروغ دینے والے بھی شامل ہوتے ہیں تاکہ دلچسپی کے جین کی موثر نقل ہو سکے۔ یہ پلازمیڈ دائرہ ہو سکتے ہیں۔ اظہار ویکٹر کو اظہار کی تعمیر کے نام سے بھی جانا جاتا ہے۔

سب سے آسان اظہار کی تعمیرات کو ٹرانسکریپشن ویکٹر کے نام سے بھی جانا جاتا ہے۔ صرف اس لیے کہ وہ کلون شدہ غیر ملکی جین کی نقل کی اجازت دیتے ہیں نہ کہ اس کے ترجمہ کی۔ وہ ویکٹر جو کلون شدہ غیر ملکی جین کی نقل اور ترجمہ دونوں کی سہولت فراہم کرتے ہیں انہیں پروٹین ایکسپریشن ویکٹر کہا جاتا ہے۔ یہ پروٹین ایکسپریشن تعمیرات دوبارہ پیدا ہونے والے پروٹین کی پیداوار کا باعث بھی بنتے ہیں۔

اب، نقل اور ترجمے کے لیے، ایک پروموٹر اور ختم کرنے کی ترتیب ضروری ہے۔ ٹرانسکریپشن پروموٹر سے شروع ہوتی ہے اور ختم ہونے والی جگہ پر ختم ہوتی ہے۔ ایکسپریشن ویکٹر کے پروموٹرز کے آن/آف سوئچز ہونے چاہئیں۔ یہ سوئچز جین پروڈکٹ کی پیداوار کے ضابطے میں مدد کرتے ہیں۔ دلچسپی کے جین کی مصنوعات کی ضرورت سے زیادہ مقدار سیل کے لیے زہریلا ہو سکتی ہے۔

اظہار کی تعمیر میں استعمال ہونے والا ایک عام پروموٹر lacUV، lacUV کا اظہار یورٹی ورنٹن ہے۔ lacUV پروموٹر حوصلہ افزائی کی شرائط کے تحت ٹرانسکریپشن کی اعلیٰ سطح کا آغاز کرتا ہے۔ مزید یہ کہ، کچھ ایکسپریشن ویکٹرز میں، ایک رائبوسومل بانڈنگ سائٹ اسٹارٹ کوڈن کے اوپر کی طرف موجود ہوتی ہے۔ رائبوسومل بانڈنگ سائٹ کلون شدہ غیر ملکی جین کے موثر ترجمہ کی سہولت فراہم کرتی ہے۔





Expression Vectors Have Tightly Regulated Promoters: eg lacUV promoter. To stimulate transcription, the artificial inducer, IPTG, is added. IPTG binds to the LacI repressor protein, which then detaches from the DNA. This allows RNA polymerase to transcribe the gene. Before IPTG is added, the LacI repressor prevents expression of the cloned gene.

7.2.2 اظہار ویکٹر کیسے کام کرتے ہیں؟

- ❖ ایک بار جب اظہار کی تشکیل میزبان سیل کے اندر ہو جائے تو، دلچسپی کے جین کے ذریعے انکوڈ شدہ پروٹین نقل کے ذریعے تیار ہوتا ہے۔ اس کے بعد، یہ میزبان جاندار کے ترجمے کی مشینری اور رابو سول کمپلیکس کا استعمال کرتا ہے۔
- ❖ اکثر، پلاسمنڈ کو جینیاتی طور پر ریگولیٹری عناصر جیسے بڑھانے والے اور فروغ دینے والوں کے لیے انجنیر کیا جاتا ہے۔ یہ ریگولیٹر ترتیب دلچسپی کے جین کی موثر نقل میں مدد کرتے ہیں۔
- ❖ جب پروٹین کی مصنوعات کو ظاہر کیا جاتا ہے، تو اسے صاف کرنا ہوتا ہے۔ طہارت کے عمل کو آسان بنانے کے لیے، اظہار ویکٹر پر لی جانے والی دلچسپی کے جین میں ہمیشہ ایک 'ٹیک' ہونا چاہیے۔ یہ ٹیک کوئی بھی مارکر پیپٹائڈ یا ہسٹیدائن (اس کا ٹیک) ہو سکتا ہے۔

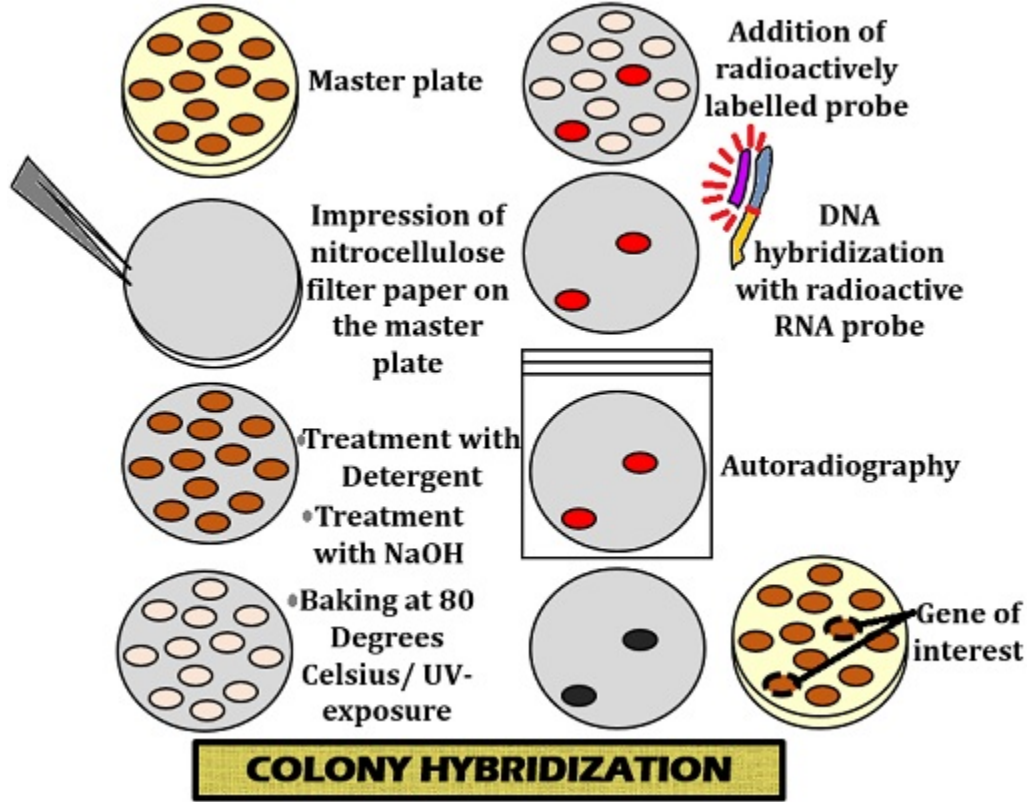
7.3 جین لائبریریوں کی اسکریننگ کی حکمت عملی (Screening Strategies of Gene Libraries)

کالونی ہائبرڈائزیشن مطلوبہ جین کے ساتھ بیکٹیریل کالونیوں کو منتخب کرنے کا ایک طریقہ ہے۔

7.3.1 کالونی ہائبرڈائزیشن کے ذریعے اسکریننگ (Screening by Colony Hybridization)

تبدیل شدہ کالونیوں میں ڈی این اے کی ترتیب کو تابکار ڈی این اے پروبس کے ساتھ ہائبرڈائزیشن کے ذریعے معلوم کیا جاسکتا ہے (بعض اوقات لیبل لگے ہوئے آر این اے پروبس کو بھی استعمال کیا جاسکتا ہے)۔ کالونی ہائبرڈائزیشن کی تکنیک کو کچھ مصنفین کے ذریعہ

ریپلیکا چڑھانا بھی کہا جاتا ہے۔ تصویر میں دکھایا گیا تکنیک بیان کی گئی ہے۔



کالونی ہائبرڈائزیشن کا آغاز غذائی اجزاء کی پلیٹ پر بہت کم آبادی والے بیکٹیریل کالونیوں کی ثقافت سے ہوتا ہے۔ ان کالونیوں کو متوازی طور پر ایک نائٹروسیلووز فلٹر پر براہ راست رابطے کے ذریعے نقل کیا جاتا ہے، جس کے بعد فلٹر جھلی پر موجود خلیات کو لیس کیا جاتا ہے اور ان کے ڈی این اے کو منحرف کر دیا جاتا ہے، جس سے وہ فلٹر سے منسلک ہو جاتے ہیں۔ یہ ڈی این اے کلسٹرز پھر مطلوبہ تابکار لیبل والے آر این اے یا ڈی این اے پر وب (خاص طور پر پہلے سے چنے گئے) کے لیے ہائبرڈائز کیے جاتے ہیں اور آٹوڈیو گرافی کے ذریعے اسکرین کیے جاتے ہیں۔ ڈی این اے کلسٹرز جو ایک مطلوبہ جین کی نمائش کرتے ہیں اس کے بعد متعلقہ (زندہ) بیکٹیریل کالونیوں سے ملایا جاتا ہے، جنہیں مزید ترقی اور تجربات کے لیے الگ کیا جاسکتا ہے۔

کالونی ہائبرڈائزیشن کی تعریف: کالونی ہائبرڈائزیشن "بلاٹ تجزیہ تکنیک" ہے جہاں بیکٹیریل خلیات کو ٹھوس غذائیت والے میڈیم سے جاذب مواد میں منتقل کیا جاتا ہے۔ کالونی ہائبرڈائزیشن کو نائٹروسیلووز میمبرین فلٹر کے ذریعہ ہائبرڈائزیشن کے ذریعہ والے بیکٹیریل خلیوں سے مخصوص ڈی این اے کی ترتیب یا جین کو الگ تھلگ کرنے کے طریقہ کے طور پر بیان کیا جاسکتا ہے۔ منتقلی کا ذریعہ پھر کئی کیمیائی اور جسمانی علاج سے گزرتا ہے۔

کالونی ہائبرڈائزیشن کا ٹرانسفرنگ میڈیم: نائٹروسیلووز فلٹر پیپر کالونی ہائبرڈائزیشن کا ٹرانسفرنگ میڈیم ہے جو ماسٹر پلیٹ کی نقل تیار کرتا ہے۔ نائٹروسیلووز ایک جھلی کے طور پر کام کرتا ہے جس میں ماسٹر پلیٹ کی جین کی صحیح کاپیاں ہوتی ہیں۔ نائٹروسیلووز فلٹر پیپر "بلائنگ پیڈ" کہلاتا ہے۔

کے طور پر کام کرتا ہے۔

کالونی ہائبرڈائزیشن میں درج ذیل اقدامات شامل ہیں:

ماسٹر پلیٹ کی تیاری: سب سے پہلے، ماسٹر پلیٹ کی تیاری کے لیے ٹھوس آگر میڈیم پر بیکٹیریل سیل سسپنشن کو ٹیکہ لگائیں۔ ٹیکہ لگانے کے بعد، بیکٹیریل کالونیوں کی تعداد مختلف پلاز میڈز کے ساتھ تیار ہو جائے گی جو "ماسٹر یا حوالہ پلیٹ" کے طور پر حوالہ دیتے ہیں۔

نائٹرو سیلووز فلٹر پر نقل کی تشکیل: پھر بیکٹیریل سیلز کو ماسٹر پلیٹ سے جھلی پر منتقل کریں یا "نائٹرو سیلووز فلٹر" کے ذریعے فلٹر کریں۔ نائٹرو سیلووز فلٹر پیپر کو ماسٹر پلیٹ کی سطح پر دبائیں۔ فلٹر جھلی کا یہ کمپریشن ماسٹر پلیٹ کی طرح بیکٹیریل خلیوں کی نقلیں یا کاپیاں بنائے گا۔

ایس ڈی ایس کے ساتھ فلٹر میڈیم کا علاج: اس کے بعد نائٹرو سیلووز فلٹر پیپر کو ڈٹرجنٹ جیسے ایس ڈی ایس (سوڈیم ڈوڈیلسل سلفیٹ) سے ٹریٹ کریں تاکہ بیکٹیریل سیلز کو ختم کیا جاسکے۔

الکلی کے ساتھ فلٹر میڈیم کا علاج: فلٹر میڈیم کو الکلی کے ساتھ سوڈیم ہائیڈروآکسائیڈ کی طرح ٹریٹ کریں تاکہ ڈی این اے کو سنگل اسٹریٹ میں الگ کیا جاسکے۔

ڈی این اے کا فلٹر میڈیم پر فکس کرنا: ڈی این اے کو نائٹرو سیلووز فلٹر پیپر پر ٹھیک کرنے کے لیے، یا تو فلٹر پیپر کو 80 ڈگری سیلسیس پر بیک کریں یا اسے یو وی لائٹ میں بے نقاب کریں۔

تابکار تحقیقات کا اضافہ: تابکار RNA تحقیقات کے اضافے سے پلاز مڈ DNA کے نقوش پر مشتمل نائٹرو سیلووز فلٹر پیپر کو ہائبرڈائز کریں۔ یہ تابکار آر این اے پروب بیکٹیریل خلیوں سے ترتیب کے مطلوبہ جین کو کوڈ کرے گا۔

دھلائی اور آٹور ایڈیو گرافی: غیر پابند تحقیقاتی ذرات کو ہٹانے کے لیے فلٹر پیپر کو دھوئے۔ اس کے بعد، نائٹرو سیلووز فلٹر پیپر کو ایکس رے فلم میں اس طریقہ سے ظاہر کریں جسے "آٹو ایڈیو گرافی" کہا جاتا ہے۔ آٹور ایڈیو گرافی کے بعد ظاہر ہونے والی کالونی کو "آٹور ایڈیو گرام" کہا جائے گا جس میں دلچسپی کے جین ہوتے ہیں۔

مطلوبہ جین کی شناخت: پھر ترقی یافتہ آٹور ایڈیو گرام کا ماسٹر پلیٹ کے ساتھ موازنہ کریں تاکہ دلچسپی کے جین پر مشتمل کالونیوں کی شناخت کی جاسکے۔

مطلوبہ جین پر مشتمل خلیات مائع میڈیم میں بڑھ سکتے ہیں اور ریکو میننٹ پلاسٹمڈ ڈی این اے کو الگ تھلگ کرنے کے لیے مزید عمل کر سکتے ہیں۔

کالونی ہائبرڈائزیشن کا طریقہ "اسکریننگ تکنیک" ہے جو تابکار تحقیقات کا استعمال کرتا ہے۔ تابکار لیبل لگا ہوا پروب پھر بیکٹیریل کالونیوں کی تعداد سے مخصوص جین کو اسکرین یا الگ کرتا ہے۔

7.3.2 تختی ہائبرڈائزیشن (Plaque hybridization)

پلاک ہائبرڈائزیشن، جسے پلاک لفٹ بھی کہا جاتا ہے، کو مینٹن اور ڈیوس نے 1977 میں تیار کیا تھا اور یہ فلٹر لفٹ کا طریقہ استعمال کرتا ہے جو فیج تختیوں پر لاگو ہوتا ہے۔ یہ طریقہ کار نیوکلک ایسڈ ہائبرڈائزیشن کے ذریعے دوبارہ پیدا ہونے والے فیز کو الگ تھلگ کرنے پر کامیابی کے ساتھ لاگو کیا جاتا ہے اور شاید یہ لائبریری اسکریننگ کا سب سے زیادہ استعمال ہونے والا طریقہ ہے۔ تختی ہائبرڈائزیشن کے ذریعہ لائبریری کی اسکریننگ کا طریقہ ذیل میں بیان کیا گیا ہے۔

- نائٹرو سیلولوز فلٹر آگر پلیٹوں کی اوپری سطح پر لگایا جاتا ہے، جس سے تختیوں اور فلٹر کے درمیان براہ راست رابطہ ہوتا ہے۔
 - تختیوں میں فیز کے ذرات ہوتے ہیں، ساتھ ہی ساتھ کافی مقدار میں بغیر پیک کیے ہوئے دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے جو فلٹر سے منسلک ہوتے ہیں۔
 - ڈی این اے کو ڈینچر کیا جاتا ہے، فلٹر کے ساتھ لگایا جاتا ہے، تابکار تحقیقات کے ساتھ ہائبرڈائز کیا جاتا ہے اور آٹوڈیو گرافی کے ذریعے اس کی جانچ کی جاتی ہے۔
- فوائد

- یہ طریقہ بیکیٹریل کالونیوں کے بجائے تختیوں کو اٹھاتے وقت بیکیٹریل میزبان سے نائٹرو سیلولوز جھلی میں ڈی این اے کی کم منتقلی کی وجہ سے پلاک اسکریننگ کے لیے اکنیز اپس منظر اور الگ سگنل (کم بیک گراؤنڈ پرب ہائبرڈائزیشن) کا نتیجہ ہوتا ہے۔
- ایک ہی پلیٹ سے متعدد اسکرینیں لگائی جاسکتی ہیں کیونکہ تختیوں کو کئی بار اٹھایا جاسکتا ہے۔
- چھوٹی تختیوں کی اسکریننگ کر کے بہت زیادہ کثافت پر اسکریننگ کی جاسکتی ہے۔ اعلیٰ کثافت کی اسکریننگ کا فائدہ یہ ہے کہ ایک بڑی تعداد میں ریکو مینٹ
- کلون کو ایک ہی تجربے میں تحقیقات کے ہم جنس ترتیبوں کی موجودگی کے لیے اسکرین کیا جاسکتا ہے۔

7.4 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

- اس باب کو مکمل کرنے کے بعد، طلباء اب اس قابل ہو گئے ہیں کہ:
- ❖ جین کے اظہار اور سالماتی حیاتیات کے بنیادی تصورات۔
- ❖ جینیاتی ہیرا پھیری اور تجزیہ کے لیے ناگزیر اوزار کے طور پر اظہار ویکٹر کی اہمیت۔
- ❖ اظہار ویکٹر کی خصوصیات اور افعال،
- ❖ کالونی ہائبرڈائزیشن اور پلاک ہائبرڈائزیشن کی تکنیکوں پر توجہ مرکوز کرتے ہوئے دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے کی

تعمیرات کی افادیت اور سالمیت کا جائزہ لینے کے لیے اسکریننگ کے عمل کی وضاحت کریں۔

7.5 کلیدی الفاظ (Keywords)

اظہار ویکٹر	Expression Vector	ڈی این اے مالیکیول میزبان خلیوں میں جین کو لے جانے اور ظاہر کرنے کے لیے استعمال ہوتے ہیں، جینیاتی ہیرا پھیری اور پروٹین کی پیداوار میں سہولت فراہم کرتے ہیں۔
پروموٹر	Promoter	ڈی این اے کی ترتیب جو نقل کا عمل شروع کرتی ہے اور جین کے اظہار کو منظم کرتی ہے۔
ماڈیولرٹی	Modularity	ماڈیولر ہونے کی خاصیت، اظہار ویکٹر ڈیزائن میں قابل تبادلہ اجزاء کی اجازت دیتی ہے۔
کالونی ہائبرڈائزیشن	Colony Hybridization	لیبل لگے ہوئے ڈی این اے پروبس کا استعمال کرتے ہوئے بیکٹیریل کالونیوں سے مخصوص ڈی این اے کی ترتیب کو الگ کرنے کی ایک تکنیک۔

7.6 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

7.6.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

- ایکسپریشن ویکٹرز کو میزبان خلیوں میں جین لے جانے اور ظاہر کرنے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے۔ وہ ڈیلیوری گاڑیوں کے طور پر کام کرتے ہیں، مخصوص جینیاتی مواد کو خلیات میں منتقل کرتے ہیں تاکہ سائنسدان ان _____ کے مطالعہ کر سکیں۔
- یہ ویکٹر کئی اہم خصوصیات کے مالک ہیں: ایک سے زیادہ کلوننگ سائٹ (MCS)، فروغ دینے والے اور بڑھانے والے، اور قابل انتخاب _____۔
- مختلف قسم کے اظہار ویکٹر ہیں جو مختلف اپیلی کیشنز کے لیے تیار کیے گئے ہیں۔ عام مثالوں میں بیکٹیریل خلیوں کے لیے پلازمڈ ویکٹر، ممالیہ کے خلیوں کو متاثر کرنے کے لیے وائرل ویکٹر، اور _____ کے لیے خمیر ویکٹر شامل ہیں۔
- ایکسپریشن ویکٹر اکثر ماڈیولر ہوتے ہیں، اس کا مطلب یہ ہے کہ مخصوص تجرباتی _____ کی بنیاد پر مختلف اجزاء کو اندر اور باہر تبدیل کیا جاسکتا ہے۔

5. ایکسپریشن ویکٹر وسیع پیمانے پر تجربات میں استعمال ہوتے ہیں، بشمول جین کلوننگ، پروٹین ایکسپریشن، جین ناک آؤٹ اسٹڈیز، اور جین تھراپی۔
6. پروموٹرز دلچسپی کے جین کی قابل اعتماد نقل کو یقینی بناتے ہیں اور اکثر کنٹرول شدہ _____ کے لیے ریگولیٹ ہوتے ہیں۔
7. الکحل آکسیدیس کو انکوڈنگ کرنے والے جین کا AOX1 پروموٹر _____ کی طرف سے حوصلہ افزائی کرتا ہے اور *Pichia pastoris* میں پروٹین کے اظہار کے لیے بہترین موزوں ہے۔
8. فیوژن پروٹین پروٹین کو صاف کرنے اور تجزیہ کرنے میں سہولت فراہم کرتے ہیں اور میزبان سیل میں دلچسپی کے جین کو _____ سے بچاتے ہیں۔
9. کالونی ہائبرڈائزیشن اور پلاک ہائبرڈائزیشن وہ تکنیک ہیں جو عام طور پر مالیکیولر بائیولوجی میں بیکٹیریل کالونیوں یا فیج تختیوں سے ڈی این اے _____ کے ذریعے مخصوص جینیاتی مواد کو الگ کرنے کے لیے استعمال ہوتی ہیں۔
10. ایکسپریشن ویکٹر جینیاتی انجینئرنگ میں ایک اہم کردار ادا کرتے ہیں، محققین کو اس قابل بناتے ہیں کہ وہ جینوں کو درستی کے ساتھ جوڑ توڑ اور مطالعہ کر سکیں، اس طرح _____ جانداروں کے بارے میں ہماری سمجھ کو آگے بڑھاتے ہیں۔

7.6.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. اظہار ویکٹر کی وہ اہم خصوصیات کیا ہیں جو انہیں سالماتی حیاتیات میں ناگزیر اوزار بناتی ہیں؟
2. پروموٹرز اور بڑھانے والے اظہار ویکٹر کی فعالیت میں کیسے حصہ ڈالتے ہیں؟
3. سالماتی حیاتیات کی تحقیق میں کالونی ہائبرڈائزیشن اور پلاک ہائبرڈائزیشن کے درمیان بنیادی فرق کیا ہیں؟
4. ایکسپریشن ویکٹر کس طرح دلچسپی کے جین کے ذریعے انکوڈ شدہ پروٹین کی تیاری کو آسان بنانے کے لیے کام کرتے ہیں؟
5. اظہار ویکٹر کے ڈیزائن میں ماڈیولر بیٹی کیوں اہم ہے، اور اس سے محققین کو ان کے تجربات میں کیا فائدہ ہوتا ہے؟

7.6.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. سالماتی حیاتیات کی تحقیق میں اظہار ویکٹر کی اہمیت پر بحث کریں۔
2. اظہار ویکٹر کے ماڈیولر ڈیزائن اور مالیکیولر بائیولوجی کے تجربات میں تخصیص کے لیے اس کے مضمرات کی وضاحت کریں۔
3. سالماتی حیاتیات میں کالونی ہائبرڈائزیشن اور پلاک ہائبرڈائزیشن کی تکنیکوں کے میکا نزم اور اپیلی کیشنز کا موازنہ اور موازنہ کریں۔
4. ایکسپریشن ویکٹر کے اندر جین کے اظہار کو چلانے میں پروموٹرز کے کردار کی چھان بین کریں۔
5. مالیکیولر بائیولوجی ریسرچ میں پراکار یونٹ اور یو کرائیونٹ ایکسپریشن سسٹم سے وابستہ چیلنجز اور فوائد کو دریافت کریں۔

7.7 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Plaque	پلاک ہائبرڈائزیشن	پلاک	: مخصوص جینیاتی مواد لے جانے والے دوبارہ پیدا ہونے والے مراحل کی نشاندہی کرنے کے لئے فیئر تختیوں کی اسکریننگ کا ایک طریقہ۔
Hybridization		ہائبرڈائزیشن	
Selectable Marker	قابل انتخاب مارکر	قابل انتخاب مارکر	: اظہار کے ویکٹرز میں شامل جینز جو اینٹی بائیوٹکس یا دیگر مرکبات کے خلاف مزاحمت فراہم کرتے ہیں، ان خلیات کی شناخت اور انتخاب کی اجازت دیتے ہیں جنہوں نے کامیابی سے ویکٹر کو اپنا لیا ہے۔
Fusion Protein	فیوژن پروٹینز	فیوژن پروٹینز	ایکسپریژن ویکٹرز کے ذریعہ تیار کردہ پروٹین جو مختلف جینوں کے سلسلے پر مشتمل ہوتے ہیں، دلچسپی کے پروٹین کو صاف کرنے اور تجزیہ کرنے میں سہولت فراہم کرتے ہیں۔

7.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). Molecular Biology of the Cell (6th ed.). Garland Science.
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
3. Maloy, S., & Hughes, K. (Eds.). (2011). Brenner's Encyclopedia of Genetics (2nd ed.). Academic Press.
4. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., & Matsudaira, P. (2016). Molecular Cell Biology (8th ed.). W. H. Freeman.
5. Winicov, I. (Ed.). (2012). Molecular Biology of Stress Responses (Vol. 1). Springer.

اکائی 8: ٹرانس فارمیشن تکنیک

(Transformation Techniques)

اکائی کے اجزا

تعارف (Introduction)	8.0
مقاصد (Objectives)	8.1
CaCl ₂ ٹرانس فارمیشن تکنیک (CaCl ₂ Transformation Technique)	8.2
اصول (Principle)	8.2.1
ری ایجنٹس کی ضرورت اور ان کا کردار اور یا برٹانی شور بہ	8.2.2
مواد (Materials)	8.2.3
طریقہ (Method)	8.2.4
الیکٹروپوریشن (Electroporation)	8.3
الیکٹروپوریشن کا اصول (Principles of Electroporation)	8.3.1
الیکٹروپوریشن کے مراحل (Electroporation Steps)	8.3.2
الیکٹروپوریشن ایپلی کیشنز (Electroporation Applications)	8.3.3
ڈی این اے بلوٹنگ: سدرن، ناردرن اور ویسٹرن بلوٹنگ	8.4
(DNA Blotting: Southern, Northern and Western Blotting)	
سدرن بلوٹنگ (Southern Blotting)	8.4.1
ناردرن بلوٹنگ (Northern Blotting)	8.4.2
ویسٹرن بلوٹنگ (Western Blotting)	8.4.3
اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)	8.5
کلیدی الفاظ (Keywords)	8.6
نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)	8.7

معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)	8.7.1
مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)	8.7.2
طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)	8.7.3
فرہنگ (Glossary)	8.8
مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)	8.9

8.0 تعارف (Introduction)

مالیکیولر بائیولوجی کے دائرے میں، بے شمار تکنیک اور طریقہ کار اس بنیاد کے طور پر کھڑے ہیں جس پر جینیات کے بارے میں ہماری سمجھ قائم ہے۔ اس باب میں، ہم جینیاتی تجزیہ کے پیچیدہ منظر نامے کے ذریعے ایک سفر کا آغاز کرتے ہیں، ان ٹرانس فارمیشن کی تکنیکوں کو تلاش کرتے ہیں جنہوں نے میدان میں انقلاب برپا کر دیا ہے۔

ٹرانس فارمیشن کی تکنیک غیر ملکی ڈی این اے کو میزبان جانداروں میں متعارف کرانے کا گیٹ وے ہے، جس سے جینیاتی مواد کی ہیرا پھیری اور مطالعہ ممکن ہے۔ ان تکنیکوں میں، کیلشیم کلورائد کا طریقہ اور الیکٹروپوریشن مالیکیولر بائیولوجسٹ کے ہتھیاروں میں بنیاد کے طور پر ابھرتے ہیں۔

کیلشیم کلورائد طریقہ، ایک وقتی تکنیک ہے، جس میں کیلشیم کلورائد کے محلول کے ساتھ قابل بیکٹیریل خلیات کا علاج شامل ہے، جو انہیں غیر ملکی DNA کے لیے قابل رسائی بناتا ہے۔ اس طریقہ کار نے، جو اس کی سادگی اور افادیت سے خصوصیت رکھتا ہے، نے جین کلوننگ اور دوبارہ پیدا ہونے والی ڈی این اے ٹیکنالوجی میں بے شمار تجربات کی سہولت فراہم کی ہے۔

اس کے برعکس، الیکٹروپوریشن سیل کی جھلی کو عارضی طور پر خلل ڈالنے کے لیے برقی دالوں کی طاقت کا استعمال کرتی ہے، جس سے ڈی این اے کو خلیے میں داخل ہونے دیا جاتا ہے۔ یہ تکنیک کارکردگی اور استعداد کے لحاظ سے فوائد پیش کرتی ہے، جس سے خلیوں کی وسیع اقسام، بشمول بیکٹیریا، خمیر، اور ممالیہ کے خلیات کی ٹرانس فارمیشن کو ممکن بناتی ہے۔

بلوننگ تکنیک مخصوص نیوکلیک ایسڈز اور پروٹیز کا پتہ لگانے اور تجزیہ کرنے کے لیے طاقتور ٹولز کے ایک مجموعہ کی نمائندگی کرتی ہے۔ ان کے متعلقہ دریافت کنندگان کے نام سے منسوب، جنوبی، شمالی اور مغربی بلوننگ تکنیکوں نے جین کے اظہار اور پروٹین کے فنکشن کے مطالعہ میں انقلاب برپا کر دیا ہے۔

سدرن بلوننگ، جس کا آغاز ایڈون سدرن نے 1970 کی دہائی میں کیا تھا، محققین کو ایک پیچیدہ مرکب کے اندر مخصوص ڈی این اے کی ترتیب کا پتہ لگانے کی اجازت دیتا ہے۔ جیل سے ڈی این اے کے ٹکڑوں کو جھلی پر منتقل کر کے، اس کے بعد لیبل لگے ہوئے پروب کے

ساتھ ہائبرڈائزیشن کے ذریعے، سدرن بلوٹنگ اعلیٰ خصوصیت کے ساتھ ہدف کی ترتیب کی شناخت کے قابل بناتی ہے۔

ناردرن بلوٹنگ، سدرن بلوٹنگ کا ایک ہم منصب، آراین اے مالیکیولز کا پتہ لگانے اور ان کی مقدار درست کرنے میں سہولت فراہم کرتا ہے۔ اس تکنیک میں آراین اے مالیکیولز کی جیل سے جھلی میں منتقلی شامل ہے، اس کے بعد دلچسپی کے آراین اے کے لیے مخصوص لیبل والی تحقیقات کے ساتھ ہائبرڈائزیشن ہوتی ہے۔ ناردرن بلوٹنگ جین ایکسپریژن اور آراین اے پروسیسنگ ایونٹس کے بارے میں بصیرت فراہم کرتی ہے۔

1970 کی دہائی میں جارج اسٹارک اور ساتھیوں کے ذریعے تیار کردہ مغربی بلوٹنگ نے پروٹین کے تجزیہ کے شعبے میں انقلاب برپا کر دیا۔ ایک جیل سے پروٹین کو جھلی پر منتقل کر کے، اس کے بعد مخصوص اینٹی باڈیز کا استعمال کرتے ہوئے امیونوڈیٹیکیشن کے ذریعے، مغربی بلوٹنگ پیچیدہ نمونوں میں پروٹین کی شناخت، مقدار اور خصوصیات کو قابل بناتی ہے۔

اس باب میں، ہم جینیاتی تجزیہ کی ٹرانس فارمیشن کی تکنیکوں کے ذریعے ایک سفر شروع کرتے ہیں، ٹرانس فارمیشن کی تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے میزبان جانداروں میں غیر ملکی DNA کے داخل ہونے سے لے کر بلوٹنگ تکنیک کا استعمال کرتے ہوئے نیوکلک ایسڈز اور پروٹیز کا پتہ لگانے اور تجزیہ کرنے تک۔ ان طریقوں کو تفصیل سے دریافت کرتے ہوئے، ہمارا مقصد قارئین کو جینیاتی تحقیق کی پیچیدگیوں کو نیویگیٹ کرنے کے لیے ضروری علم اور مہارت سے آراستہ کرنا ہے۔

8.1 مقاصد (Objectives)

اس اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو جائیں گے کہ:

- ❖ سالماتی حیاتیات اور جینیاتی تجزیہ میں ٹرانس فارمیشن کی تکنیک کی اہمیت کی وضاحت کر سکتا ہے۔
- ❖ میزبان جانداروں میں غیر ملکی ڈی این اے کو متعارف کرانے کے لیے کیلشیم کلورائیڈ کے طریقہ کار اور الیکٹروپوریشن کو دوبیادی کا ٹرانس فارمیشن کی تکنیک کے طور پر بیان کر سکتا ہے۔
- ❖ کیلشیم کلورائیڈ کے طریقہ کار اور الیکٹروپوریشن کے پیچھے اصولوں کی وضاحت کر سکتا ہے، بشمول ان کے فوائد اور استعمال۔
- ❖ مخصوص نیوکلک ایسڈز اور پروٹیز کا پتہ لگانے اور تجزیہ کرنے میں بلوٹنگ تکنیک کے کردار پر تبادلہ خیال کر سکتے ہیں۔
- ❖ جنوبی، شمالی اور مغربی بلوٹنگ تکنیکوں کے درمیان فرق کر سکتے ہیں، بشمول ان کے متعلقہ مقاصد اور طریقہ کار۔
- ❖ جنوبی، شمالی اور مغربی بلوٹنگ تکنیکوں کے ذریعے حاصل کیے گئے تجرباتی نتائج کی تشریح کر سکتے ہیں۔

8.2 CaCl_2 ٹرانس فارمیشن تکنیک (CaCl_2 Transformation Technique)

قابل خلیے بیکٹیریل خلیے ہیں جو ماحول سے اضافی کروموسومل ڈی این اے یا پلاسمید (نگٹ ڈی این اے) کو قبول کر سکتے ہیں۔ قابل

خلیات کی نسل دو طریقوں سے ہو سکتی ہے: قدرتی قابلیت اور مصنوعی قابلیت۔ قدرتی قابلیت ایک بیکٹیریم کی قدرتی یا وٹرو حالات میں ماحولیاتی ڈی این اے حاصل کرنے کی جینیاتی صلاحیت ہے۔ بیکٹیریا کو کیمیکل ٹریٹمنٹ اور ہیٹ شاک کے ذریعے بھی مصنوعی طور پر قابل بنایا جاسکتا ہے تاکہ انہیں ڈی این اے میں عارضی طور پر پارگی کیا جاسکے۔ قدرتی قابلیت 1928 کی ہے جب فریڈرک گریفیتھ نے دریافت کیا کہ پیٹھوجینک بیکٹیریم کے تیار کردہ حرارت سے مارے جانے والے خلیات نان پیٹھوجینک خلیوں کو پیٹھوجینک قسم میں تبدیل کر سکتے ہیں۔ بہت سے بیکٹیریل تناؤ میں قدرتی قابلیت کی اطلاع دی گئی ہے، یعنی *Neisseria*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* اور *Haemophilus influenzae*۔ قدرتی قابلیت کارحان بیکٹیریا میں انتہائی منظم ہوتا ہے اور ہر نسل میں مختلف ہوتا ہے۔ کچھ نسلوں میں، آبادی کے کچھ حصے ایک وقت میں قابل ہوتے ہیں، اور دوسروں میں، پوری آبادی ایک ہی وقت میں قابلیت حاصل کر لیتی ہے۔ جب غیر ملکی DNA خلیات کے اندر داخل ہوتا ہے، تو یہ سیلولر نیوکلیز کے ذریعے انحطاط پذیر ہو سکتا ہے یا سیلولر کروموسوم کے ساتھ دوبارہ مل سکتا ہے۔ تاہم، قدرتی قابلیت اور ٹرانس فارمیشن لکیری مالیکولز جیسے کروموسومل ڈی این اے کے لیے موثر ہے لیکن سرکلر پلاسماڈ مالیکولز کے لیے نہیں۔ مصنوعی قابلیت بیکٹیریل خلیوں کے جینوں کے ذریعہ کوڈ نہیں کی جاتی ہے۔ یہ ایک تجربہ گاہ کا طریقہ کار ہے جس میں خلیات کو غیر فطری حالات کا استعمال کرتے ہوئے غیر فعال طور پر ڈی این اے کے لیے قابل رسائی بنایا جاتا ہے۔ مصنوعی قابلیت کا طریقہ کار نسبتاً آسان اور آسان ہے اور اسے جینیاتی طور پر بیکٹیریا کو انجینئر کرنے کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔ تاہم، ٹرانس فارمیشن کی کارکردگی بہت کم ہے کیونکہ خلیات کا صرف ایک حصہ کامیابی کے ساتھ ڈی این اے لینے کے قابل ہو جاتا ہے۔

8.2.1 اصول (Principle)

ڈی این اے کی ہائیڈروفیلک فطرت عام طور پر اسے بیکٹیریا کی سیل جھلی کو عبور کرنے سے روکتی ہے۔ بیکٹیریل خلیات کو جینیاتی مواد کو اٹھانے کے قابل بنانے کے لیے، انہیں سب سے پہلے ڈی این اے کے اخراج کے لیے قابل بنایا جانا چاہیے۔ یہ بیکٹیریل سیل جھلی میں چھوٹے سوراخ بنا کر حاصل کیا جاتا ہے، عام طور پر کمیشن سے بھر پور محلول کے ذریعے علاج کے ذریعے۔ اس عمل میں، اضافی کروموسومل ڈی این اے سیل میں داخل ہونے پر مجبور ہوتا ہے۔

اس طریقہ کار میں قابل خلیات اور ڈی این اے کو برف پر اکٹھا کرنا شامل ہے، جس کے بعد گرمی کا ایک مختصر جھٹکا لگا ہے۔ یہ تھرمل علاج بیکٹیریل خلیوں کو ڈی این اے لینے کے لیے اکساتا ہے۔ تاہم، خلیے کی جھلی میں سوراخوں کی تخلیق بیکٹیریا کو کم مستحکم اور موت کے لیے حساس بناتی ہے۔ مزید برآں، ایک ذیلی طریقہ کار کے نتیجے میں ڈی این اے لینے کے قابل خلیات ناکافی ہو سکتے ہیں۔

تحقیق سے پتہ چلتا ہے کہ ننگے ڈی این اے مالیکولز قابل خلیات کی سطح پر لیپو پولیسا کر ایڈ (LPS) ریسپیکٹر مالیکولز سے منسلک ہوتے ہیں۔ ڈیولنٹ کیشنز منفی چارج شدہ ڈی این اے مالیکولز اور ایل پی ایس کے ساتھ کوآرڈینیشن کمپلیکس تشکیل دیتے ہیں، جو ڈی این اے کو حاصل کرنے میں مدد فراہم کرتے ہیں۔ چونکہ ڈی این اے اپنے ساز کی وجہ سے سیل کی جھلی کو خود سے نہیں گزر سکتا، اس لیے گرمی کے جھٹکے کا مرحلہ کمیشن کلورائیڈ سے علاج شدہ خلیوں میں سیل جھلی کی قطبیت میں خلل ڈالتا ہے۔ نتیجتاً، جھلی کی صلاحیت میں کمی سیل کی اندرونی منفیت

کو کم کرتی ہے، جس سے منفی چارج شدہ ڈی این اے کی سائٹوسول میں نقل و حرکت آسان ہو جاتی ہے۔ بعد میں آنے والا ٹھنڈا جھٹکا جھلی کی صلاحیت کو اس کی ابتدائی قدر میں بحال کرتا ہے۔

قابل خلیے بیکٹیریل خلیات کو استعمال کرنے کے لیے تیار ہیں جو زیادہ آسانی سے تبدیل شدہ خلیے کی دیواروں کے مالک ہوتے ہیں جن کے ذریعے غیر ملکی ڈی این اے کو آسانی سے منتقل کیا جاسکتا ہے۔ زیادہ تر قسم کے خلیے ڈی این اے کو مؤثر طریقے سے نہیں لے سکتے جب تک کہ انہیں قابل بنانے کے لیے خصوصی کیمیائی یا برقی علاج سے آگاہ نہ کیا جائے۔ بیکٹیریا کو ڈی این اے تک قابل رسائی بنانے کے معیاری طریقہ میں کیلشیم آئنوں کے ساتھ علاج شامل ہے۔ برقی میدان میں خلیات کی مختصر نمائش بھی بیکٹیریا کو ڈی این اے لینے کی اجازت دیتی ہے اور اس عمل کو الیکٹروپوریشن کہا جاتا ہے۔ تاہم، کچھ قسم کے بیکٹیریا قدرتی طور پر تبدیل ہوتے ہیں، جس کا مطلب ہے کہ وہ اپنے ماحول سے ڈی این اے کو بغیر کسی خاص علاج کی ضرورت کے لے سکتے ہیں۔ مصنوعی قابلیت میں شامل عین طریقہ کار ابھی تک اچھی طرح سے معلوم نہیں ہے۔ $\ln \text{CaCl}_2$ طریقہ، بیکٹیریل خلیات میں چھیدوں کو کیلشیم کے اعلیٰ ارتکاز پر مشتمل محلول میں معطل کر کے ان کی صلاحیت حاصل کی جاسکتی ہے۔ تب ڈی این اے کو ٹرانس فارمیشن کے عمل کے لیے 42°C پر ہیٹ شاک ٹریٹمنٹ کے ذریعے میزبان سیل میں مجبور کیا جاسکتا ہے۔

قابلیت کو قدرتی قابلیت میں ممتاز کیا جاتا ہے، بیکٹیریا کی ایک جینیاتی طور پر مخصوص صلاحیت جو قدرتی حالات کے ساتھ ساتھ لیبارٹری اور حوصلہ افزائی یا مصنوعی قابلیت میں پائی جاتی ہے، اس وقت پیدا ہوتی ہے جب لیبارٹری ثقافتوں میں خلیوں کا علاج کیا جاتا ہے تاکہ انہیں عارضی طور پر پارگی بنایا جاسکے۔ ڈی این اے

قدرتی قابلیت (Natural Competence)

بیکٹیریا اپنے ماحول سے تین طریقوں سے ڈی این اے لینے کے قابل ہوتے ہیں۔ جوڑ، ٹرانس فارمیشن، اور نقل و حمل۔ ٹرانس فارمیشن میں، ڈی این اے براہ راست سیل میں داخل ہوتا ہے۔ ڈی این اے کو تبدیل کرنے کے لیے وصول کنندہ کے خلیات کا ایک خصوصی جسمانی حالت میں ہونا ضروری ہے جسے اہل حالت کہتے ہیں۔ قدرتی قابلیت سب سے پہلے فریڈرک گریفٹھ نے 1928 میں دریافت کی تھی۔ یہ بیکٹیریا میں بہت زیادہ ریگولیٹ ہوتی ہے، اور اہلیت میں شامل عوامل نسلوں میں مختلف ہوتے ہیں۔ تیار کردہ قابلیت پروٹین میں کچھ ہم آہنگی ہوتی ہے لیکن گرام منفی اور گرام مثبت بیکٹیریا میں مختلف ہوتے ہیں۔ ایک بار جب ڈی این اے کو سیل کے سائٹوپلازم میں لایا جاتا ہے، تو یہ نیوکلیناز انزائمز کے ذریعے انحطاط پذیر ہو سکتا ہے، یا، اگر یہ خلیات کے اپنے ڈی این اے سے بہت ملتا جلتا ہے، تو ڈی این اے کی مرمت کرنے والے انزائمز اسے کروموسوم کے ساتھ دوبارہ جوڑ سکتے ہیں۔

مصنوعی قابلیت اور ٹرانس فارمیشن (Artificial Competence and Transformation)

مصنوعی قابلیت سیل کے جینز میں انکوڈ نہیں ہوتی۔ اس کے بجائے، یہ ایک تجربہ گاہ کا طریقہ کار ہے جس کے ذریعے خلیات کو ڈی این اے کے لیے قابل رسائی بنایا جاتا ہے، ایسے حالات کے ساتھ جو عام طور پر فطرت میں نہیں ہوتے۔ یہ طریقہ کار نسبتاً آسان اور سادہ ہے،

اور اسے بیکٹیریائی جینیاتی انجینئرنگ میں استعمال کیا جاسکتا ہے لیکن عام طور پر ٹرانس فارمیشن کی کارکردگی کم ہے۔ قابل خلیات کی تیاری کے طریقے منڈیل اور ہیگا کے کام سے اخذ کیے گئے ہیں جنہوں نے خلیات کو ٹھنڈے CaCl_2 میں بھگونے پر مبنی ایک سادہ علاج تیار کیا۔ قابل خلیات کی تیاری کے لیے دو اہم طریقے ہیں؛ وہ ہیں کیلشیم کلورائیڈ طریقہ اور الیکٹروپوریشن۔

تیزی سے بڑھنے والے خلیے دوسرے نمو کے مراحل میں خلیوں کی نسبت زیادہ آسانی سے قابل بنائے جاتے ہیں۔ لہذا عمل شروع ہونے سے پہلے خلیات کو لاگ مرحلے میں لانا ضروری ہے۔ تیزی سے بڑھنے والے خلیات (لاگ فیز) زندہ، صحت مند اور فعال طور پر میٹابولائز کر رہے ہیں۔ قابل سیلز تجارتی منڈیوں میں آسانی سے دستیاب ہیں۔

8.2.2 ری ایجنٹس کی ضرورت اور ان کا کردار لوریا برٹانی شوربہ

لوریا برٹانی (LB) شوربہ ایک بھرپور ذریعہ ہے جو *E. coli* سمیت بہت سی انواع کے لیے تیز رفتار نشوونما اور اچھی پیداوار کی اجازت دیتا ہے۔ یہ *E. coli* سیل ثقافتوں کے لیے مائیکرو بائیولوجی اور مالیکیولر بائیولوجی اسٹڈیز میں سب سے زیادہ استعمال ہونے والا میڈیم ہے۔ آسان تیاری، زیادہ تر *E. coli* کے تناؤ کی تیزی سے نشوونما، تیار دستیابی اور سادہ ترکیبیں LB شوربے کی مقبولیت میں معاون ہیں۔ LB عام ہلنے والی انکیوبیشن حالات میں *E. coli* کی نمو ($\text{OD}_{600} = 2-3$) کی حمایت کر سکتا ہے۔

کیلشیم کلورائیڈ

کیلشیم کلورائیڈ کی ٹرانس فارمیشن کی تکنیک قابل سیل تیاری پروٹوکول میں سب سے زیادہ موثر تکنیک ہے۔ یہ بیکٹیریل سیل کی پلاسمنڈی این اے کو شامل کرنے کی صلاحیت کو بڑھاتا ہے، جینیاتی ٹرانس فارمیشن کی سہولت فراہم کرتا ہے۔ سیل سسپنشن میں کیلشیم کلورائیڈ کا اضافہ پلاسمنڈی این اے کو ایل پی ایس سے منسلک کرنے کی اجازت دیتا ہے۔ اس طرح، منفی چارج شدہ ڈی این اے بیک بون اور ایل پی ایس دونوں اکٹھے ہو جاتے ہیں اور جب گرمی کا جھٹکا دیا جاتا ہے تو پلاسمنڈی این اے بیکٹیریل سیل میں جاتا ہے۔ 2000 ملی لیٹر 50 ایم ایم کیلشیم کلورائیڈ سٹاک سلوشن کو 14.701 گرام $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ کو 12 ملی لیٹر کیو پانی میں شامل کر کے تیار کریں، اور 4°C پر اسٹور کریں۔

8.2.3 مواد (Materials)

LB.1 شوربہ: نمیر کا عرق 0.5%، NaCl 1%، ٹریپٹون 1%۔

LB2 آگر: جیسا کہ اوپر، نیز 2% آگر آٹو کلیونگ سے پہلے

0.1M CaCl_2 ..3

آٹو کلیونگ کے بعد مذکورہ میڈیا میں اینٹی بائیوٹکس شامل کی جاتی ہیں۔ ٹیٹراسائیکلائن کو 15 pg/mL کے حتمی ارتکاز تک اور ایمپسلن سے 50 kg/mL تک ان اینٹی بائیوٹکس کے حل ایمپسلن کے ساتھ 50 mg/mL قدرے الکلین ڈسٹل واٹر اور

tetracycline 15 mg/mL استھنول میں تیار کیے جاتے ہیں۔

8.2.4 طریقہ (Method)

1. لوریہ برٹانی (LB) شوربے میں بیکٹیریا کی ایک چھوٹی، راتوں رات کلچر تیار کریں۔ بیکٹیریا کی نشوونما کے لیے بغیر ہلائے 37 °C پر انکیوبیٹ کریں۔
2. اہم طریقہ کار شروع کرنے سے تقریباً 2 گھنٹے پہلے، 100 ملی لیٹر تازہ ایل بی شوربے کو ٹیکہ لگانے کے لیے رات بھر کلچر کا 1.0 ملی لیٹر استعمال کریں۔ اس کلچر کو تیزی سے ہلاتے ہوئے 37 °C پر بڑھائیں جب تک کہ یہ تقریباً $10^7.5$ سیلز/mL کی سیل کثافت تک نہ پہنچ جائے۔ آپٹیکل کثافت کو 650 (OD650) nm کے مطابق اپنے مخصوص بیکٹیریل تناؤ کے لیے ایڈجسٹ کریں۔
3. ہر ٹرانس فارمیشن کے رد عمل سے 5 ملی لیٹر ایلی کوٹ لیں اور اسے جراثیم سے پاک پلاسٹک سینٹری فیوج ٹیوبوں میں منتقل کریں۔ نلیاں کو برف پر 10 منٹ تک ٹھنڈا کریں۔
4. 5000 g x 5 منٹ کے لئے سینٹری فوگ کر کے خلیوں کو گولی لگائیں۔ یقینی بنائیں کہ سینٹری فوگ ریشن 4 °C پر انجام دیا گیا ہے۔ اس قدم کے لیے ریفریجریٹڈ مینج سینٹری فیوج کی سفارش کی جاتی ہے۔
5. سپر ناٹینٹ کو ہٹا دیں اور 25 ملی لیٹر ٹھنڈے 0.1 ایم کیلشیم کلورائیڈ (CaCl₂) محلول میں سیل چھروں کو دوبارہ بند کریں۔ کم از کم 20 منٹ تک برف پر لگائیں۔
6. سپینشن کو سینٹری فوج کریں جیسا کہ مرحلہ 3 میں بیان کیا گیا ہے۔ آپ کو ایک زیادہ پھیلی ہوئی گولی کا مشاہدہ کرنا چاہیے، جو کہ قابل خلیات کی تشکیل کو ظاہر کرتا ہے۔
7. خلیوں کو 0.2 ملی لیٹر سرد 0.1 ایم CaCl₂ محلول میں دوبارہ بند کریں۔
8. سیل سپینشنز کو جراثیم سے پاک، پتلی دیواروں والی شیشے کی بوتلوں یا ٹیوبوں میں منتقل کریں۔ شیشے کے برتنوں کا استعمال گرمی کے بعد کے جھٹکوں کی تاثیر کو بڑھاتا ہے۔
9. معیاری DNA اسٹورج بفر جیسے Tris-EDTA (TE) بفر میں تیار کردہ ہر ٹیوب میں 0.1 mg DNA شامل کریں، 100 µL کے حتمی حجم میں۔ ٹیوبوں کو برف پر 30 منٹ تک سینکلیں۔
10. ٹیوبوں کو 2 منٹ کے لیے 42 °C کے پانی کے غسل میں منتقل کریں، اس کے بعد برف پر تھوڑی دیر سے واپسی کریں۔
11. ہر ٹیوب کے مواد کو ایک چھوٹے فلاسک میں 2 ملی لیٹر ایل بی شوربے میں منتقل کریں۔ فلاسکس کو 37 ڈگری سینٹی گریڈ پر 60-90 منٹ تک ہلاتے ہوئے انکیوبیٹ کریں تاکہ متعارف کرائے گئے ڈی این اے کے ذریعے لے جانے والے اینٹی

بائیونک مزاحمتی جینوں کا اظہار ہو سکے۔

12. ایل بی ایگر پلیٹوں پر 0.1 ملی لیٹر کے ایل کوٹس کو انڈیلیٹڈ، 10^{-1} ، اور 10^{-2} ڈائی لیشنز کے انتخاب کے لیے مناسب اینٹی بائیوٹکس کے ساتھ شامل کریں۔

13. کالونی بننے کی اجازت دینے کے لیے پلیٹوں کو رات بھر 37°C پر انکیوبیٹ کریں۔
نوٹس:

1. یہ طریقہ عام طور پر 10^4 سے 10^6 ٹرانسفارمنٹس فی میلوگرام کلوز سرکل پلاسما DNA کے درمیان حاصل کرتا ہے۔ تاہم، یہ نوٹ کرنا ضروری ہے کہ شامل کردہ DNA کی مقدار اور ٹرانسفارمیشن کی کارکردگی کے درمیان تعلق مکمل طور پر خطی نہیں ہے۔ 0.1 ملی گرام سے زیادہ پلاسما ڈی این اے فی ٹیوب شامل کرنے سے ٹرانسفارمیشن کی کارکردگی کم ہو سکتی ہے۔

2. اس بات کو یقینی بنانا کہ کٹائی کے وقت استعمال ہونے والے بیکٹیریل خلیات تیزی سے نشوونما کے مرحلے میں ہیں۔ انہیں اسٹیشنری مرحلے تک پہنچنے کی اجازت دینے سے گریز کریں، کیونکہ یہ ٹرانسفارمیشن کی کارکردگی کو متاثر کر سکتا ہے۔

3. ایک بار قابل ہو جانے کے بعد، خلیات کو 4°C پر ذخیرہ کیا جاسکتا ہے۔ اس درجہ حرارت پر CaCl_2 میں خلیات کو ذخیرہ کرنا دراصل ٹرانسفارمیشن کی کارکردگی کو بڑھا سکتا ہے، حالانکہ یہ اثر 24 گھنٹوں کے بعد کم ہو جاتا ہے۔ لمبے سٹوریج کی مدت کے لیے، قابل خلیات کو منجمد کیا جاسکتا ہے۔

4. پلاسما کو قائم کرنے اور تبدیل شدہ خلیوں کے ذریعے مزاحمتی جینز کے اظہار کی اجازت دینے کے لیے بحالی کا مرحلہ ضروری ہے۔

5. اسپلن پر چڑھاتے وقت، ایک عام مسئلہ ثانوی ترقی کے علاقے سے گھری ہوئی مزاحم کالونیوں کی موجودگی ہے۔ یہ مزاحم خلیات کی پیٹا لیکٹیمیس سرگرمی کی وجہ سے ہوتا ہے، جو ارد گرد کے اینٹی بائیونک کو ہائیڈرولائز کرتا ہے، جس سے حساس خلیات بڑھنا شروع ہو جاتے ہیں۔ اس مسئلے سے بچنے کے لیے، تازہ تیار کی گئی اسپیلن پلیٹیں استعمال کریں اور راتوں رات بڑھنے کی مدت کے بعد انہیں فوری طور پر انکیوبیٹر سے ہٹادیں۔

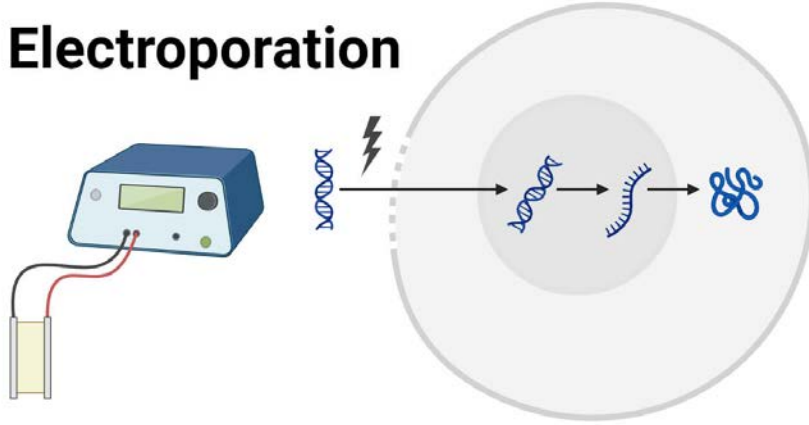
8.3 الیکٹروپوریشن (Electroporation)

الیکٹروپوریشن، جسے الیکٹروپرمیبلائزیشن (Electropermeabilization) کے نام سے بھی جانا جاتا ہے، ایک جسمانی طریقہ ہے جو مختلف مقاصد کے لیے خلیات میں جینیاتی مواد، پروٹین، ادویات، یا دیگر مطلوبہ مالیکیولز کو متعارف کرانے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ اس تکنیک میں سیل جھلی پر برقی دالوں کا اطلاق شامل ہے، اس طرح اس کی ساخت میں عارضی سوراخ پیدا ہوتے ہیں۔ ان چھیدوں کے ذریعے، مالیکیولز کو خلیوں میں پہنچایا جاتا ہے، جس سے اپیلی کیشنز کی ایک حد ہوتی ہے۔

نیومن وغیرہ۔ نے 1982 میں الیکٹروپوریشن کا تصور متعارف کرایا، جس نے ایک ایسے شعبے کی شروعات کی جس کے بعد سے قابل ذکر پیشرفت ہوئی ہے۔ ابتدائی طور پر سادہ ان وٹرو تجربات تک محدود، الیکٹروپوریشن نے جین کی منتقلی، جین تھراپی، منشیات کی ترسیل، اور ویو علاج کے بے شمار طریقوں کو شامل کرنے کے لیے تیار کیا ہے۔

الیکٹروپوریشن کا اصول خلیوں پر برقی دالوں کے اطلاق کے گرد گھومتا ہے، جس سے خلیے کی جھلی میں عارضی سوراخوں کی تشکیل ہوتی ہے۔ یہ سوراخ نالی کے طور پر کام کرتے ہیں جس کے ذریعے مالیکیولز، بشمول ڈی این اے، پروٹین، ادویات اور دیگر مادے، خلیات میں جا سکتے ہیں، اس طرح اپنے مطلوبہ اثرات مرتب کرتے ہیں۔

Electroporation

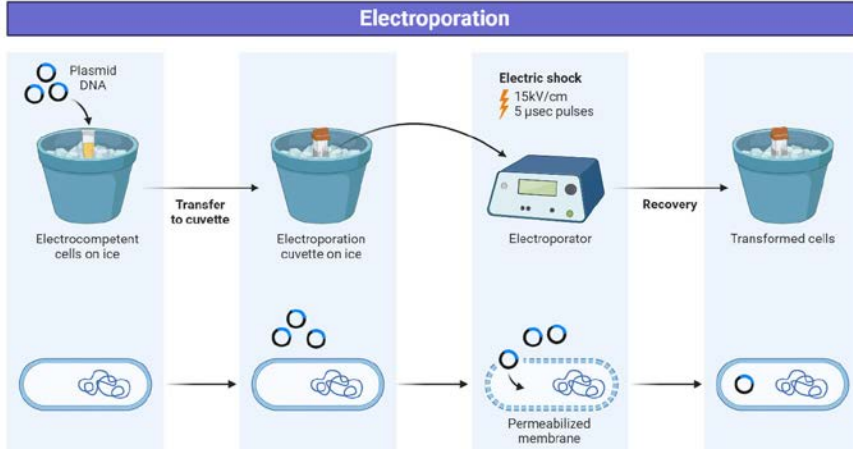


8.3.1 الیکٹروپوریشن کا اصول (Principles of Electroporation)

الیکٹروپوریشن کا اصول خلیوں پر برقی دالوں کا اطلاق کرتا ہے، جس سے خلیے کی جھلی میں عارضی سوراخوں کی تشکیل ہوتی ہے۔ یہ سوراخ مالیکیولز بشمول ڈی این اے، پروٹین، ادویات اور دیگر مادوں کے خلیوں میں داخل ہونے میں سہولت فراہم کرتے ہیں۔ خلیات پر لگائی جانے والی برقی دالیں سیل کی جھلی کے اس پار برقی صلاحیت کو تبدیل کر کے خلل کا باعث بنتی ہیں۔ یہ خلل فاسفولیپڈ بیلیر میں عارضی چھیدوں کی تشکیل کا باعث بنتا ہے جو خلیے کی جھلی پر مشتمل ہوتا ہے۔ یہ سوراخ ایسے چینلز کے طور پر کام کرتے ہیں جن کے ذریعے مالیکیول جھلی کو عبور کر سکتے ہیں۔

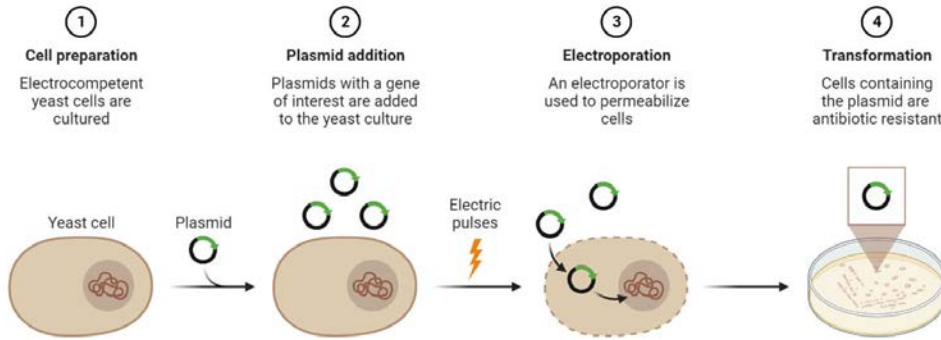
برقی نبض کے بند ہونے پر، سوراخ آہستہ آہستہ بند ہونے لگتے ہیں، اور خلیے کی جھلی اپنی معمول کی حالت میں واپس آ جاتی ہے۔ کچھ مالیکیول جو سیل میں داخل ہوتے ہیں وہ جھلی کے دوبارہ پھیلنے ہی اندر پھنس جاتے ہیں۔ اگر برقی میدان جھلی کے نقائص کو مکمل طور پر دوبارہ کھولنے کی اجازت دیتا ہے، تو اسے ریورس ایبل الیکٹروپوریشن کہا جاتا ہے۔ تاہم، اگر نقائص برقرار رہتے ہیں، تو اس کا نتیجہ ناقابل واپسی الیکٹروپوریشن ہوتا ہے، جو بالآخر سیل کی موت کا باعث بنتا ہے۔

ایک بار عارضی سوراخوں کے ذریعے خلیات کے اندر، مالیکیول سیلولر میکا نزم کے ساتھ تعامل کر سکتے ہیں، اس طرح سیلولر عمل اور



یہ افعال کو متاثر کرتے ہیں۔ یہ تعامل مختلف شعبوں بشمول مالیکیولر بائیولوجی، بائیو ٹیکنالوجی اور طب میں الیکٹروپوریشن کے متنوع ایپلی کیشنز پر روشنی ڈالتا ہے۔

Yeast Transformation by Electroporation



8.3.2 الیکٹروپوریشن کے مراحل (Electroporation Steps)

1. سیلز کو الیکٹروپوریشن کے لیے تیار کریں:

❖ دلچسپی کے خلیات کو ترقی کے مطلوبہ مرحلے تک ثقافت بنائیں

❖ سیلز کو سینٹر فیو گریشن کے ذریعے کٹائیں اور انہیں ایک مناسب الیکٹروپوریشن بفر میں دوبارہ معطل کریں۔

❖ ڈی این اے یا دلچسپی کے مالیکیولز تیار کریں، جس میں ڈی این اے کو الگ تھلگ اور صاف کرنا یا مطلوبہ مالیکیولز کا حل تیار کرنا شامل ہو سکتا ہے۔

2. خلیات کو الیکٹروپوریٹ کریں:

❖ سیل ڈی این اے مکچر کو الیکٹروپوریشن کیویٹ میں منتقل کریں، ایک خصوصی جیمبر الیکٹروپوریشن کے لیے ڈیزائن کیا گیا

ہے۔

❖ کیویٹ کو الیکٹروپوریشن ڈیوائس میں رکھیں، جسے الیکٹروپوریٹر کہا جاتا ہے۔

❖ الیکٹروپوریشن ڈیوائس کو چالو کر کے سیلوں پر الیکٹرک پلس لگائیں۔

3. خلیات کی بازیابی:

❖ پلس کے بعد الیکٹروپوریشن ڈیوائس سے کیویٹ کو فوری طور پر ہٹادیں۔

❖ خلیوں کو کمرے کے درجہ حرارت پر یا برف پر مختصر طور پر بحال ہونے دیں، جس کے دوران خلیے کی جھلیوں کو دوبارہ بحال

کیا جاتا ہے، اور متعارف کرائے گئے مالیکیولز کو خلیات میں شامل کیا جاتا ہے۔

4. منتقل شدہ خلیوں کی ثقافت اور کٹائی:

❖ بقا اور نشوونما کو فروغ دینے کے لیے مناسب حالات میں منتقل شدہ خلیوں کی ثقافت کریں۔

❖ خلیات کو کیویٹ سے ایک مناسب گروتھ میڈیم میں منتقل کریں۔

❖ تجرباتی تقاضوں کی بنیاد پر خلیات کو انکیوبیٹ کریں۔

8.3.3 الیکٹروپوریشن اپیلی کیشنز (Electroporation Applications)

❖ بیکٹیریل خلیات کی ٹرانس فارمیشن: دوبارہ پیدا ہونے والے پروٹین کی پیداوار، کلوننگ، اور دیگر بائیو ٹیکنالوجی اپیلی کیشنز کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

❖ ٹرانسفیکشن: یوکرائیٹک خلیات کو ان کے جینیاتی مواد کی انجینئرنگ کے ذریعے ہیرا پھیری کی اجازت دیتا ہے۔

❖ جینیاتی انجینئرنگ: غیر ملکی ڈی این اے کو خلیوں میں متعارف کرانے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، جیسے کہ پودوں کے خلیے فصل کی بہتری کے لیے۔

❖ منشیات اور ویکسین کی ترسیل: بڑے مادوں کی ترسیل کو قابل بناتا ہے، بشمول مختلف بیماریوں کے خلاف ڈی این اے ویکسین۔

❖ جین تھراپی: ترمیم شدہ یا اضافی جینیاتی مواد کی فراہمی کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

❖ کینسر کے علاج میں ناقابل واپسی الیکٹروپوریشن: ہائی وولٹیج الیکٹرک پلس کا استعمال کرتے ہوئے ٹیومر میں مستقل نقصان اور سیل کی موت کا سبب بنتا ہے۔

8.4 ڈی این اے بلوٹنگ: سدرن، ناردرن اور ویسٹرن بلوٹنگ

(DNA Blotting: Southern, Northern and Western Blotting)

مالیکیولر بائیولوجی کے میدان میں، کسی مخصوص پروٹین کی موجودگی کا پتہ لگانے، شناخت کرنے اور اس کی مقدار معلوم کرنے یا

نیوکلیک ایسڈ کی ترتیب کی شناخت کے لیے مختلف بلوٹنگ تکنیکوں کا استعمال کیا جاتا ہے۔

بلوٹنگ سے مراد وہ عمل ہے جس کے دوران میکرو مالیکیولز کو ایک جیل سے جھلی کی ٹھوس سطح پر منتقل کیا جاتا ہے، جو دوسرے لفظوں میں جیل کی سطح سے معلومات حاصل کرے گا۔ تین اہم تکنیکیں استعمال کی جاتی ہیں: جنوبی، شمالی اور مغربی بلاٹ۔ یہ تینوں ایک جیسے پروٹوکول پر مبنی ہیں، لیکن نتیجہ مختلف ہوتا ہے، نیز پروٹوکول کے کچھ مراحل۔ اس مضمون میں ہم ہر ایک تکنیک کے اہداف اور اقدامات کو جانیں گے۔

8.4.1 سدرن بلوٹنگ (Southern Blotting)

سدرن بلوٹنگ کو پہلی بار ایڈورڈ ایم سدرن نے 1975 میں دریافت کیا اور قائم کیا۔

پروٹوکول خلیات سے ڈی این اے نکالنے کے ساتھ شروع ہوتا ہے، جو پھر ڈی این اے کے ٹکڑوں کی پیداوار کا باعث بنتا ہے۔ پھر ان ٹکڑوں کو ایگز جیل کے اوپر رکھا جاتا ہے۔ اس قسم کا جیل خاص طور پر نیوکلیک ایسڈ کو الگ کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے کیونکہ اس کی ریٹیکولیشن کی صلاحیت ہے، جس کا مطلب ہے کہ جیل بڑے اور چھوٹے مالیکیولز کو آسانی سے الگ کرنے کے قابل ہے۔ چونکہ وہ منفی طور پر چارج کیے جاتے ہیں، نیوکلیک ایسڈ الیکٹروفورسس کے ذریعہ تخلیق کردہ برقی میدان کا جواب دیں گے۔ ان کے سائز کی بنیاد پر، چھوٹے مالیکیولز اگر روز جیل شیٹ کے نیچے منتقل ہو جائیں گے اور اس کے برعکس، بڑے مالیکیول جیل کے اوپری حصے پر موجود رہیں گے۔

علیحدگی مکمل ہونے کے بعد، جیل پر موجود ڈی این اے کو نایلان جھلی پر منتقل کیا جاتا ہے۔ اس جھلی کو پھر ایک محلول میں انکیوبیٹ کیا جاتا ہے جس میں ڈی این اے پروب ہوتا ہے، جو ہدف کے ڈی این اے کی تکمیل کرتا ہے۔ ہدف بنائے گئے مالیکیولز کا آسانی سے پتہ لگانے اور ان کو ظاہر کرنے کے لیے، ایکس رے فلم کی بدولت پروب کو فلوروسینٹ طور پر لیبل لگایا جاسکتا ہے اور ان کا تصور کیا جاسکتا ہے، یا وہ انزائم بھی ہو سکتے ہیں جو کیمیو مینسٹ سگنل پیدا کر سکتے ہیں جو ہدف ڈی این اے کو ظاہر کرے گا۔

سدرن بلوٹنگ پروٹوکول مثال کے طور پر پیٹرنٹی ٹیسٹ کرنے، خون یا ڈی این اے پر مشتمل دوسرے نمونوں کے ذریعے متاثرین یا مجرموں کی شناخت کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ اسے ڈی این اے کی ٹرانس فاریشن وں، حذف یا جین کی دوبارہ ترتیب کا پتہ لگانے کے ساتھ ساتھ کسی انفیکشن یا قبل از پیدائش کی جینیاتی بیماری کا پتہ لگانے کے لیے بھی استعمال کیا جاسکتا ہے۔

8.4.2 ناردرن بلوٹنگ (Northern Blotting)

ناردرن بلوٹنگ ایک ایسا طریقہ کار ہے جس کا اطلاق مخصوص آر این اے کی ترتیبوں کا پتہ لگانے اور شناخت کرنے کے لیے کیا جاتا ہے۔ سب سے پہلے، پروٹوکول کو RNA تہائی کی ضرورت ہوتی ہے۔ ترتیب کے سائز پر منحصر ہے، علیحدگی کا مرحلہ مختلف ہوگا۔ مثال کے طور پر formaldehyde agarose جیل پر الیکٹروفورسس کے ذریعے بڑے سلسلے الگ کیے جاتے ہیں۔ سمجھا جاتا ہے کہ یہ جیل آر این اے کو جس طرح سے الگ تھلگ کیا گیا ہے اسے ترتیب دینے دیتا ہے اور نیوکلیک ایسڈ کی نارمل بیس جوڑی کو روکتا ہے۔

پولی کریلامائڈ جیل پر چھوٹے سلسلے لگائے جاتے ہیں۔ الیکٹروفورسس رد عمل اور علیحدگی کا عمل اب شروع ہو سکتا ہے۔ اس کے بعد، آر این اے کو جیل سے ایک نایڈان جھلی پر منتقل کیا جاتا ہے۔ اس کے بعد جھلی کو ریڈیو ایکٹیو لیبل والے آر این اے پر وب کے ساتھ لگایا جاتا ہے۔ جو تابکار لیبل والے RNA تحقیقات کے ذریعے فراہم کردہ کیمیلو مینیسینس کی بدولت ہدف بنائے گئے عناصر کا پتہ لگانے کی اجازت دیتا ہے۔

یہ تکنیک بنیادی طور پر جین ایکسپریشن اسٹڈیز کے میدان میں استعمال ہوتی ہے۔ ہمارا ڈی این اے ہمیں بتاتا ہے کہ ہم کون ہیں۔ یہ ہمارے خلیوں کو ہر وہ چیز تیار کرنے کے لیے ہدایات فراہم کرتا ہے جس کی انہیں ضرورت ہوتی ہے تاکہ ہمارا جسم صحیح طریقے سے کام کر سکے۔ جب ہمارے ڈی این اے میں ذخیرہ شدہ معلومات کو پروٹین بنانے کے لیے ہدایات میں تبدیل کیا جاتا ہے، مثال کے طور پر، یہ جین کا اظہار ہوتا ہے۔

8.4.3 ویسٹرن بلوٹنگ (Western Blotting)

ویسٹرن بلوٹنگ ایک طریقہ کار ہے جس کا مقصد نمونے میں مخصوص پروٹین کی موجودگی، سائز اور کثرت کی نشاندہی کرنا ہے۔ یہ تکنیک عام طور پر چھوٹے سلسلے پر استعمال ہوتی ہے۔

سب سے پہلے، پروٹوکول خلیوں سے پروٹین کو الگ کر کے نمونے کی تیاری پر مشتمل ہوتا ہے۔ ایسا کرنے کے لیے، ایک lysate تیاری کا اطلاق ہوتا ہے جس کا مقصد پروٹین کو دوسرے خلیے کے اجزاء سے الگ کرنا ہوتا ہے۔

ایک بار جب پروٹین کو صحیح طریقے سے الگ کر دیا جاتا ہے، تو ان میں سے ہر ایک کو کم کرنے والے ایجنٹ، جسے SDS کہتے ہیں، کے ذریعے ڈینچر کرنے کی ضرورت ہوتی ہے۔ جب گرمی کا نشانہ بنتا ہے، SDS پروٹین کو منقطع کرنے جا رہا ہے اور اسے منفی الیکٹریکل چارج دے گا، جو بعد میں جیل کی منتقلی کی اجازت دے گا۔ یہ ڈینچرنگ عمل پروٹین کو کھولنے اور ان کے مالیکیولر وزن کا تعین کرنے جا رہا ہے۔

یہ مرحلہ درج ذیل عمل کے لیے اہم ہے۔ ڈی این اے اور آر این اے کے برعکس، پروٹین کی تشکیل پولی کریلامائڈ جیل میں پروٹین کی منتقلی پر اثر انداز ہو سکتی ہے، لہذا، ان کو منقطع کرنے کی ضرورت ہے۔ پروٹین کے نمونے تیار ہونے کے بعد، علیحدگی کا مرحلہ الیکٹروفورسس سے شروع ہو سکتا ہے۔ ایگز جیل سے کافی مشابہت رکھتے ہوئے، پولی کریلامائڈ جیل یہاں استعمال کیا جاتا ہے کیونکہ یہ زیادہ درست نتائج فراہم کرتا ہے، کیونکہ یہ کیمیائی طور پر ایگز سے زیادہ مستحکم ہے۔

تمام پروٹین کے نمونے جیل کے اوپری حصے میں کنویں پر جمع کیے جاتے ہیں۔ ان نمونوں کے آگے دوسرے نمونوں میں موجود پروٹینوں کے وزن کا موازنہ اور اندازہ لگانے کے لیے کئی رنگین پروٹینوں کا حوالہ نمونہ شامل کیا گیا ہے جن کے مالیکیولر وزن معلوم ہیں۔

ایک بار جب پروٹین کو ایس ڈی ایس کے ذریعے ڈینچر کیا جاتا ہے، تو ان پر منفی چارج کیا جاتا ہے۔ جب برقی کرنٹ چالو ہو جائے گا تو چھوٹے مالیکیول جیل سے مزید نیچے چلے جائیں گے جبکہ بڑے مالیکیول سب سے اوپر رہیں گے، جب کہ حوالہ نمونہ سے پروٹین اپنے مالیکیولر وزن کے مطابق الگ ہو جائیں گے۔

تمام مالیکیولز کے الگ ہونے کے بعد، انہیں نائٹرو سیلو ز جھلی میں منتقل کر دیا جاتا ہے تاکہ پروٹین کو درست کیا جاسکے اور درج ذیل عمل میں مدد مل سکے۔ جھلی کو ہلاک کرنے والے ایجنٹ کے ساتھ انکیوبیٹ کیا جاتا ہے، جس سے غیر مطلوبہ اینٹی باڈیز کو پروٹین سے منسلک کرنے کا خطرہ کم ہوتا ہے۔

جھلی ایک بنیادی اینٹی باڈی کے ساتھ سیکی جاتی ہے جو صرف مخصوص پروٹین سے منسلک ہوتی ہے۔ چند لمحوں بعد، جھلی ایک ثانوی اینٹی باڈی کے ساتھ سیکی جاتی ہے۔ اینٹی باڈیز یا تو کیمیلومینسینٹ یا فلوروسینٹ ہوتے ہیں یا کسی رنگ سے متاثر ہوتے ہیں، جس سے ماہرین حیاتیات واضح طور پر ہدف شدہ پروٹین کی موجودگی یا غیر موجودگی کی شناخت کر سکتے ہیں۔

مغربی بلوئنگ تکنیک اکثر بعض پروٹینوں کی موجودگی کا تعین کرنے کے لیے استعمال ہوتی ہے۔ اس طریقہ کار کو مثال کے طور پر ایچ آئی وی انفیکشن کی تشخیص کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔ یا ناقص پروٹین کا پتہ لگانے کے لیے، پیپائٹس بی، کریوٹز فیلڈ جیکوب بیماری، لائم بیماری اور ہرپس انفیکشن۔

سدرن، ناردرن اور ویسٹرن بلاٹ تین شناختی تکنیکیں ہیں جو بنانے کے عمل میں کافی ملتی جلتی ہیں۔ تینوں تکنیکیں ایک ہی قسم کا طریقہ کار استعمال کرتی ہیں: نمونہ نکالنے سے شروع کرنا، جیل پر الیکٹروفورسس علیحدگی کے مرحلے کو جاری رکھنا، پھر نمونے کو جھلی میں منتقل کرنا اور مطلوبہ مالیکیول کا پتہ لگانا۔

ان سب کا مقصد ایک ہی نمونے کے اندر ایک مخصوص میکرو مالیکیول کی شناخت کرنا ہے اور یہ سب بائیو ٹیکنالوجی اور میڈیسن پر لاگو ہوتے ہیں۔

تینوں تکنیکوں میں فرق کرنا شاید اتنا آسان نہ ہو۔ تاہم، اہم فرق جو نوٹ کرنا ضروری ہے وہ مالیکیول ہے جس کی شناخت ہر تکنیک سے ہوتی ہے۔ سدرن بلاٹ مخصوص ڈی این اے کی ترتیب کا پتہ لگاتا ہے، شمالی دھبہ مخصوص آر این اے کی ترتیب کا پتہ لگاتا ہے، اور مغربی دھبہ مخصوص پروٹین کا پتہ لگاتا ہے۔ یہ تمام تکنیکیں تکمیلی ہیں۔

8.5 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

- اس اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو گئے ہیں کہ:
- اس اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو جائیں گے کہ:
- ❖ سالماتی حیاتیات اور جینیاتی تجزیہ میں ٹرانس فارمیشن کی تکنیک کی اہمیت کی وضاحت کر سکتا ہے۔
- ❖ میزبان جانداروں میں غیر ملکی ڈی این اے کو متعارف کرانے کے لیے کیلشیم کلورائیڈ کے طریقہ کار اور الیکٹروپوریشن کو دوبیادی اکا ٹرانس فارمیشن کی تکنیک کے طور پر بیان کر سکتا ہے۔
- ❖ کیلشیم کلورائیڈ کے طریقہ کار اور الیکٹروپوریشن کے پیچھے اصولوں کی وضاحت کر سکتا ہے، بشمول ان کے فوائد اور استعمال۔

- ❖ مخصوص نیوکلک ایسڈز اور پروٹینز کا پتہ لگانے اور تجزیہ کرنے میں بلوٹنگ تکنیک کے کردار پر تبادلہ خیال کر سکتے ہیں۔
- ❖ جنوبی، شمالی اور مغربی بلوٹنگ تکنیکوں کے درمیان فرق کر سکتے ہیں، بشمول ان کے متعلقہ مقاصد اور طریقہ کار۔
- ❖ جنوبی، شمالی اور مغربی بلوٹنگ تکنیکوں کے ذریعے حاصل کیے گئے تجرباتی نتائج کی تشریح کر سکتے ہیں۔

8.6 کلیدی الفاظ (Keywords)

قابل خلیات	Competent Cells	بیکٹیریل خلیات جو ماحول سے غیر ملکی DNA یا پلازمیڈ کو قبول کرنے کے قابل ہوتے ہیں۔
قدرتی قابلیت	Natural Competence	قدرتی قابلیت: قدرتی یا لیبارٹری کے حالات میں ماحولیاتی ڈی این اے حاصل کرنے کے لیے بیکٹیریا کی جینیاتی صلاحیت۔
الیکٹروپوریشن	Electroporation	خلیے کی جھلی میں عارضی سوراخ بنانے کے لیے برقی دالیں لگا کر خلیات میں جینیاتی مواد، پروٹین یا دیگر مالیکیولز کو متعارف کرانے کا طریقہ
کیلشیم کلورائیڈ کا طریقہ	Calcium Chloride Method	بیکٹیریل خلیوں کو کیلشیم آئنوں پر مشتمل محلول سے علاج کر کے ان کو قابل بنانے کی تکنیک۔

8.7 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

8.7.1 8.7.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. قابل خلیے بیکٹیریل خلیے ہیں جو ماحول سے _____ کو قبول کر سکتے ہیں۔
2. _____ اور مصنوعی قابلیت قابل خلیات پیدا کرنے کے دو طریقے ہیں۔
3. قدرتی قابلیت کو پہلی بار 1928 میں _____ نے دریافت کیا۔
4. کیلشیم کلورائیڈ کے طریقہ کار میں، قابل بیکٹیریل خلیات کا علاج _____ پر مشتمل محلول سے کیا جاتا ہے۔
5. الیکٹروپوریشن خلیے کی جھلی میں عارضی _____ پیدا کرتا ہے۔
6. سدرن بلوٹنگ ایک تکنیک ہے جو مخصوص _____ کی ترتیب کا پتہ لگانے کے لیے استعمال ہوتی ہے۔
7. شمالی بلوٹنگ کا استعمال _____ مالیکیولز کا پتہ لگانے اور ان کی مقدار درست کرنے کے لیے کیا جاتا ہے۔
8. پیچیدہ نمونوں میں _____ کی شناخت اور خصوصیت کے لیے مغربی بلوٹنگ کا استعمال کیا جاتا ہے۔
9. الیکٹروپوریشن نیو من ایٹ ال نے متعارف کرایا تھا۔ _____ میں

10. کینسر کے علاج میں ناقابل واپسی الیکٹر وپوریشن ہائی وولٹیج الیکٹرک پلس کا استعمال کرتے ہوئے _____ میں مستقل نقصان اور سیل کی موت کا سبب بنتا ہے۔

8.7.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. متن میں داغ لگانے کی تین تکنیکیں کیا ہیں، اور وہ کس قسم کے مالیکیولز کا پتہ لگاتے ہیں؟
2. الیکٹر وپوریشن کے عمل میں شامل اقدامات کی وضاحت کریں۔
3. خلیات میں جینیاتی مواد کو متعارف کرانے کے طریقہ کار کے طور پر الیکٹر وپوریشن کو استعمال کرنے کے کیا فوائد ہیں؟
4. بیکٹیریل تبدیلی کے لیے قابل خلیات پیدا کرنے کے دو طریقے کیا ہیں؟
5. بیکٹیریا کے خلیات کو قابل بنانے کے لیے کیلشیم کلورائیڈ کے طریقہ کار کے پیچھے اصول کی مختصر وضاحت کریں۔
6. مختلف شعبوں میں الیکٹر وپوریشن کے کچھ اطلاقات کیا ہیں، جیسا کہ متن میں بتایا گیا ہے؟

8.7.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. بیکٹیریا میں قدرتی قابلیت کی اہمیت پر بحث کریں۔
2. غیر ملکی ڈی این اے کو میزبان جانداروں میں متعارف کروانے کی تکنیک کے طور پر کیلشیم کلورائیڈ کے طریقہ کار اور الیکٹر وپوریشن کا موازنہ اور اس کے برعکس کریں۔
3. مالیکیولر بائیولوجی میں سدرن، ناردرن اور ویسٹرن بلوٹنگ تکنیک کے اصولوں اور استعمال کی وضاحت کریں۔
4. الیکٹر وپوریشن کے اصول پر تفصیل سے بحث کریں۔
5. بیکٹیریل تبدیلی میں مصنوعی قابلیت سے وابستہ فوائد اور چیلنجوں کو دریافت کریں۔

8.8 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Southern	سدرن بلوٹنگ	سدرن بلوٹنگ	ڈی این اے کے ٹکڑوں کو جیل سے جھلی پر منتقل کر کے
Blotting			اور لیبل لگے ہوئے تحقیقات کے ساتھ ہائبرڈائز کر کے
			پیچیدہ مرکب کے اندر مخصوص ڈی این اے کی ترتیب کا
			پتہ لگانے کی تکنیک۔

اکائی 9: ڈی این اے کی ترتیب کی تکنیک

(DNA Sequencing Techniques)

اکائی کے اجزا	
تعارف (Introduction)	9.0
مقاصد (Objectives)	9.1
اصول (Principle)	9.2.1
طریقہ کار (Procedure)	9.2.2
الیکٹروفورسس اور جیل ریڈنگ (Electrophoresis and gel reading)	9.2.3
پولیمریز چین ری ایکشن (Polymerase Chain Reaction/PCR)	9.3
پی سی آر کیا ہے؟	9.3.1
پی سی آر کیسے کام کرتا ہے؟	9.3.2
ڈی این اے فنگر پرنٹ (DNA Fingerprinting)	9.4
پس منظر (Background)	9.4.1
ڈی این اے پروفائلنگ (DNA Profiling)	9.4.2
ڈی این اے پروفائل کیسے تیار کیا جاتا ہے (How is a DNA profile produced)	9.4.3
ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کا اطلاق (Application of DNA Fingerprinting)	9.4.4
ڈی این اے مائیکروری (DNA Microarray)	9.5
ڈی این اے مائیکروری تکنیک کا اصول	9.5.1
ڈی این اے مائیکروری تکنیک (DNA Microarray Technique)	9.5.2
مائیکروری کی ایپلی کیشنز (Application of Microarray)	9.5.3
اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)	9.6
کلیدی الفاظ (Keywords)	9.7

9.8	نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)
9.8.1	معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)
9.8.2	مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)
9.8.3	طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)
9.9	فرہنگ (Glossary)
9.10	مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

9.0 تعارف (Introduction)

جینیاتی ریسرچ میں سب سے آگے سینجر کا طریقہ کار ہے، جو ایک اہم تکنیک ہے جس نے اپنے آغاز پر ہی میدان میں انقلاب برپا کر دیا۔ 1970 کی دہائی میں فریڈرک سینگر اور ساتھیوں کے ذریعہ تیار کیا گیا، یہ طریقہ جدید ترتیب کی کوششوں کی بنیاد کی نمائندگی کرتا ہے۔ ڈی این اے کی ترکیب، خاتمے، اور ٹکڑے کی علیحدگی کے پیچیدہ عمل کے ذریعے، سینجر کا طریقہ سائنسدانوں کو قابل ذکر درستگی کے ساتھ ڈی این اے اسٹرینڈ کے نیوکلئوٹائیڈ ترتیب کو سمجھنے کی اجازت دیتا ہے۔ اس کی پائیدار میراث جینیاتی تحقیق کے ہر پہلو پر پھیلی ہوئی ہے، بنیادی حیاتیاتی عمل کے بارے میں ہماری سمجھ کو تشکیل دیتی ہے اور اہم دریافتوں میں سہولت فراہم کرتی ہے۔

سینجر کے طریقہ کار کی تکمیل پولیمریز چین ری ایکشن (PCR) ہے، جو ایک انقلابی ٹول ہے جو بے مثال کارکردگی کے ساتھ ڈی این اے کے حصوں کو بڑھاتا ہے۔ 1980 کی دہائی میں کیری ملس کی طرف سے تصور کیا گیا، پی سی آر مخصوص ڈی این اے ترتیبوں کی ٹارگٹڈ نقل تیار کرنے کے قابل بناتا ہے، جس سے بعد کے تجزیے کے لیے ان کی کثرت میں تیزی سے اضافہ ہوتا ہے۔ یہ تکنیک نہ صرف ترتیب کے عمل کو تیز کرتی ہے بلکہ محققین کو غیر معمولی گہرائی کے ساتھ جینیاتی مواد کی منٹ کی مقدار کو دریافت کرنے کا اختیار بھی دیتی ہے۔ قدیم جینومز کو کھولنے سے لے کر جینیاتی امراض کی تشخیص تک، پی سی آر جدید ماہر حیاتیات کے ہتھیاروں میں ناگزیر ہے، جو کہ جینیاتی ریسرچ کی حدود کو مزید آگے بڑھاتا ہے۔

مزید یہ کہ ڈی این اے فنکٹر پر ٹنگ کی آمد نے فرانزک سائنس اور پرسنلایڈ میڈیسن کے ایک نئے دور کا آغاز کیا ہے۔ انفرادی جینومز کی منفرد تغیرات کا فائدہ اٹھاتے ہوئے، یہ تکنیک افراد کے جینیاتی پروفائلز کی بنیاد پر ان کی شناخت اور امتیاز کو قابل بناتی ہے۔ اصل میں 1980 کی دہائی میں ایک جیفریز کے ذریعہ شروع کیا گیا تھا، ڈی این اے فنکٹر پر ٹنگ اس کے بعد سے ایک ورسٹائل ٹول کے طور پر تیار ہوا ہے، جس میں مجرمانہ انصاف سے لے کر پیٹرنٹی ٹیسٹنگ تک کے متنوع شعبوں میں شامل ہے۔ پیچیدہ جینیاتی تعلقات کو بے مثال درستگی کے ساتھ حل کرنے کی اس کی صلاحیت سائنسی اور سماجی دونوں شعبوں میں اس کی اہمیت کو واضح کرتی ہے۔

مزید برآں، ڈی این اے مائیکرو رے ٹکنالوجی کے ظہور نے جینومک تجزیہ کے منظر نامے میں انقلاب برپا کر دیا ہے، جس سے

جینوم کے وسیع پیمانے پر جین کے اظہار کے نمونوں کی اعلیٰ تھروپٹ تفتیش کی سہولت فراہم کی گئی ہے۔ ایک ٹھوس سمبٹ پر ہزاروں ڈی این اے تحقیقات کو متحرک کر کے، مائیکرو رے پورے جینومز میں بیک وقت جین کے اظہار کی سطحوں کا پتہ لگانے اور ان کی مقدار درست کرنے کے قابل بناتے ہیں۔ اس طاقتور ٹول نے آنکولوجی، فارماکولوجی، اور ڈیولپمنٹ بائیولوجی جیسے شعبوں میں اہم دریافتوں کو اظہار کیا ہے، جس سے جینز اور ان کے ریگولیٹری نیٹ ورکس کے پیچیدہ تعامل کے بارے میں بے مثال بصیرتیں پیش کی گئی ہیں۔

9.1 مقاصد (Objectives)

اس اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو جائیں گے کہ:

- ❖ سنجر کے طریقہ کار سے ڈی این اے کی ترتیب کی طریق کی وضاحت کر سکیں۔
- ❖ پولیمریز چین ری ایکشن کی وضاحت کر سکیں۔
- ❖ ڈی این اے فنگر پرنٹنگ اور ڈی این اے مائیکرو رے کا تصور کو بیان کر سکیں

9.2 سنجر کا طریقہ / سلسلہ ختم کرنے کا طریقہ (Sanger Method / Chain termination Method)

پھر 1974 میں، بالکل ایسا کرنے کے لیے ایک امریکی ٹیم اور ایک انگلش ٹیم نے آزادانہ طور پر دو طریقے تیار کیے تھے۔ میکسم اور گلبرٹ کی قیادت میں امریکیوں نے "کیمیکل کلیوٹج پروٹوکول" کا استعمال کیا، جبکہ انگریزوں نے، سنجر کی قیادت میں، ڈی این اے کی نقل کے قدرتی عمل کی طرح ایک طریقہ کار وضع کیا۔ اگرچہ دونوں ٹیموں نے 1980 کا نوبل انعام مشترکہ طور پر حاصل کیا، لیکن فریڈرک سینگر کا طریقہ اپنی عملیت کی وجہ سے معیاری بن گیا۔

9.2.1 اصول (Principle)

- ❖ ڈی این اے پرائمر کو ہائبرڈائزیشن کے ذریعے ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ سے منسلک کیا جاتا ہے اور ڈی آکسینو کلیو سائیڈس ٹرائی فاسفیٹس (dNTPs) کو ترتیب وار ڈی این اے پولیمریز کے ذریعے پرائمر اسٹرینڈ میں شامل کیا جاتا ہے۔
- ❖ پرائمر کو ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ کے 3' سرے پر معلوم ترتیب کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے۔
- ❖ M13 کی ترتیب عام طور پر 3' سرے سے منسلک ہوتی ہے اور اس M13 کا پرائمر بنایا جاتا ہے۔
- ❖ رد عمل کے مرکب میں معمول کے ڈی این ٹی پیز کے ساتھ ڈائی آکسینو کلیو سائیڈ ٹرائی فاسفیٹ (ddNTPs) بھی ہوتا ہے۔
- ❖ اگر نقل کے دوران ddNTPs کو بڑھتے ہوئے DNA اسٹرینڈ میں معمول کے dNTPs کی بجائے شامل کیا جائے تو نقل اس نیو کلیوٹائیڈ پر رک جاتی ہے۔
- ❖ ddNTPs dNTPs کے مطابق ہیں۔

❖ ddNTPs میں رائبوز شوگر کے c3 پر ہائیڈروکسیل گروپ (-OH) کی کمی ہوتی ہے، اس لیے یہ نیسٹ نیوکلئوٹائیڈ کے ساتھ فاسفوڈیسٹر بانڈ نہیں بنا سکتا، اس طرح نیوکلئوٹائیڈ چین ختم ہو جاتا ہے۔

❖ dNTPs کے متعلقہ ddNTPs اپنی متعلقہ سائٹ پر سلسلہ ختم کر دیتے ہیں۔ مثال کے طور پر ddATP A سائٹ پر ختم ہو جاتا ہے۔ اسی طرح ddCTP، ddGTP اور ddTTP بالترتیب C، G اور T سائٹ پر ختم ہو جاتے ہیں۔

9.2.2 طریقہ کار (Procedure)

ٹیمپلیٹ کی تیاری:

❖ ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ کی کاپیاں ترتیب دی جانی چاہئیں، ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ کے 3' آخر میں مختصر معلوم ترتیب کے ساتھ تیار کی جائیں۔

❖ ٹیمپلیٹ کی نقل تیار کرنے کے لیے ڈی این اے پرائمر ضروری ہے، لہذا 3' کے آخر میں معلوم ترتیبوں کی پرائمر کی تیاری ہمیشہ ضروری ہے۔

❖ اس مقصد کے لیے ایک سنگل اسٹرینڈ کلوننگ ویکٹر M13 کو ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ کے ساتھ 3' end پر جوڑا گیا ہے جو پرائمر کے لیے بانڈنگ سائٹ کے طور پر کام کرتا ہے۔

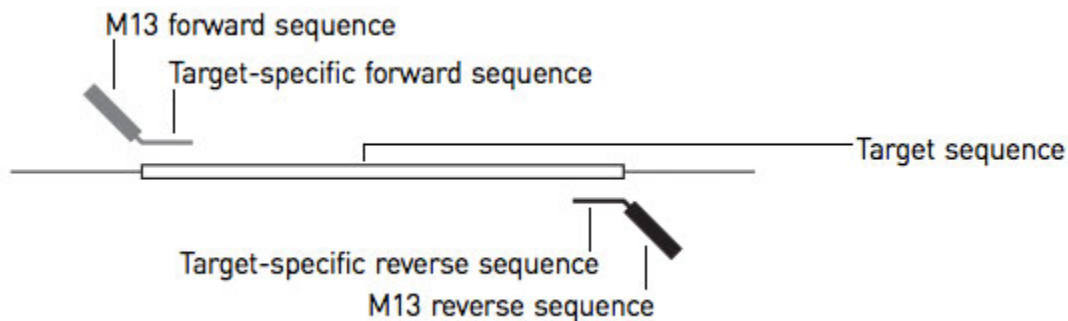
لیبل والے ٹکڑوں کے نیسٹڈ سیٹ کی تخلیق:

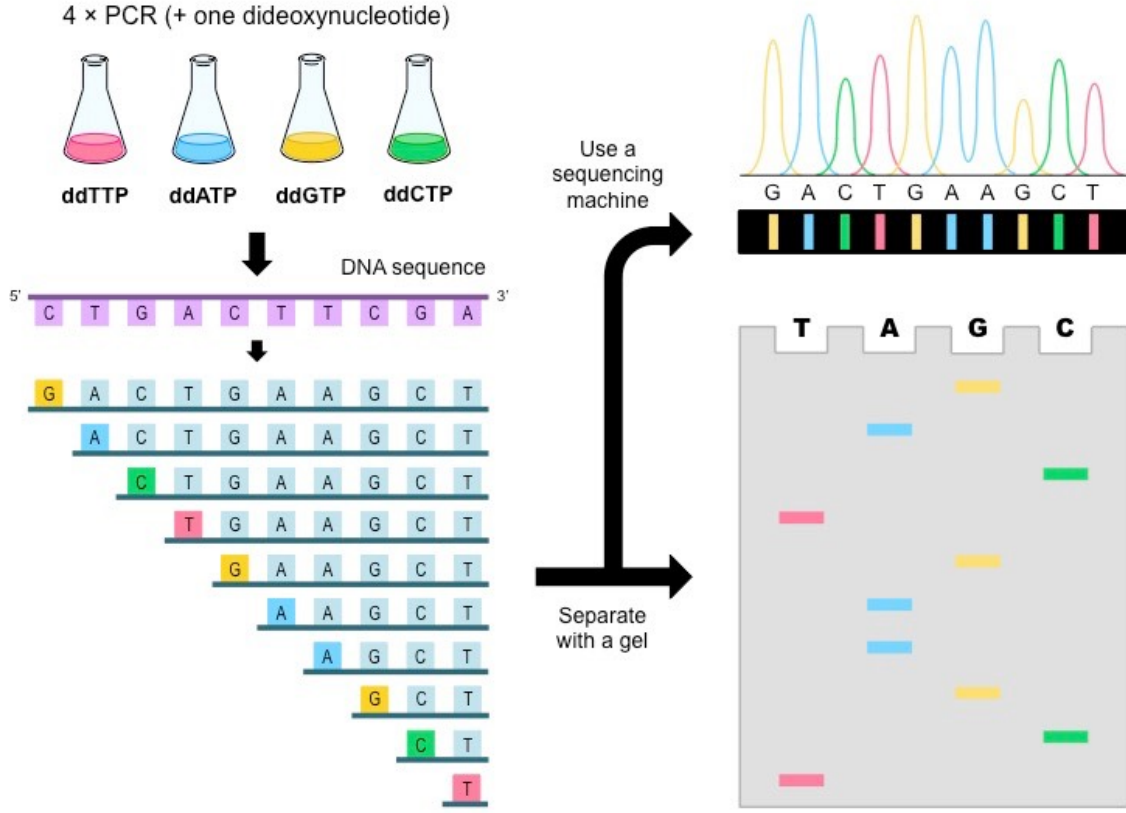
❖ ہر ٹیمپلیٹ کی کاپیوں کو چار بیچوں میں تقسیم کیا گیا ہے اور ہر بیچ کو مختلف نقل کے رد عمل کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

❖ معیاری پرائمر اور ڈی این اے پولیمریز I کی کاپیاں چاروں بیچوں میں استعمال ہوتی ہیں۔

❖ A پر ختم ہونے والے ٹکڑوں کو سنٹھیائز کرنے کے لیے، ddATP، dATP، dTTP، dCTP اور dGTP، معیاری پرائمر اور DNA پولیمریز I کے ساتھ بیچ I پر رد عمل کے مرکب میں شامل کیا جاتا ہے۔

❖ اسی طرح، پیدا کرنے کے لیے، تمام ٹکڑے جو C، G اور T پر ختم ہوتے ہیں، متعلقہ ddNTPs یعنی ddCTP، ddGTP اور ddTTP کو بالترتیب عام dNTPs کے ساتھ مختلف بیچ پر مختلف رد عمل کے مرکب میں شامل کیا جاتا ہے۔





9.2.3 الیکٹروفورسس اور جیل ریڈنگ (Electrophoresis and gel reading)

- ❖ چار پیپوں سے رد عمل کے مرکب کو پولی کریلامائیڈ جیل اور الیکٹروفورسڈ پرچار مختلف کنویں میں لوڈ کیا جاتا ہے۔
- ❖ جیل کے آٹورادیو گرام کو تکمیلی اسٹرینڈ کے اڈوں کی ترتیب کو ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ سے متعین کرنے کے لیے پڑھا جاتا ہے۔
- ❖ مختصر ترین ٹکڑوں کا بینڈ آٹورادیو گرام کے نچلے حصے میں ہوتا ہے تاکہ تکمیلی اسٹرینڈ کی ترتیب کو نیچے سے اوپر تک پڑھا جائے۔

9.3 پولیمریز چین ری ایکشن (Polymerase Chain Reaction/PCR)

ڈی این اے کی نقل کے بار بار راونڈ کے ذریعے ڈی این اے کے مخصوص ٹکڑے کی بہت سی کاپیوں کو ترکیب کرنے کا ایک خود کار طریقہ۔ 1980 کی دہائی میں پی سی آر کی ترقی سے پہلے، جین کی بہت سی کاپیاں تیار کرنے کا بنیادی طریقہ نسبتاً زیادہ وقت لینے والا عمل تھا جسے ڈی این اے کلوننگ کہا جاتا تھا۔ اس تکنیک میں زندہ بیکٹیریل خلیوں میں دلچسپی کے جین کو داخل کرنا شامل تھا، جس کے نتیجے میں تقسیم اور نقل کے عمل کے دوران جین کو ان کے اپنے ڈی این اے کے ساتھ نقل کیا گیا۔

9.3.1 پی سی آر کیا ہے؟

پی سی آر کا کلیدی عنصر حرارت ہے۔ پی سی آر کے پورے عمل کے دوران، ڈی این اے کو بار بار حرارتی اور کولنگ سائیکلوں کا نشانہ بنایا جاتا ہے جس کے دوران اہم کیمیائی رد عمل ہوتا ہے۔ ان تھرمل سائیکلوں کے دوران، ڈی این اے پرائمر ہدف کے ڈی این اے کی ترتیب

سے منسلک ہوتے ہیں، جس سے ڈی این اے پولیمریز کو بڑی مقدار میں ہدف کی ترتیب کی کاپیاں جمع کرنے کے قابل بناتے ہیں۔۔۔
پی سی آر ٹیسٹ ٹیوب میں ڈی این اے کی ترتیب کی لاکھوں کاپیاں صرف چند گھنٹوں میں تیار کرنا ممکن بناتا ہے، یہاں تک کہ ڈی این اے کی بہت کم ابتدائی مقدار کے ساتھ۔ اپنے تعارف کے بعد سے، پی سی آر نے سالماتی حیاتیات میں انقلاب برپا کر دیا ہے، اور یہ ماہرین حیاتیات، معالجین اور ڈی این اے کے ساتھ کام کرنے والے کسی اور کے لیے ایک ضروری آلہ بن گیا ہے۔

9.3.2 پی سی آر کیسے کام کرتا ہے؟

پی سی آر کئی اہم کیمیائی اجزاء پر انحصار کرتا ہے۔

ڈی این اے کی ایک چھوٹی سی مقدار جو ابتدائی ٹیمپلیٹ یا ہدف کی ترتیب کے طور پر کام کرتی ہے۔

❖ پرائمر کا ایک جوڑا ہدف کی ترتیب کے ہر سرے سے منسلک کرنے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے۔

❖ ایک DNA پولیمریز

❖ چار dNTPs (یعنی، dATP، dCTP، dGTP، dTTP)

❖ چند ضروری آئن اور نمکیات

پھر پی سی آر عمل ان اجزاء کو قدرتی ڈی این اے نقل کے عمل کی نقل کرنے کے لیے استعمال کرتا ہے جو خلیات میں ہوتا ہے۔ اس عمل کو خود کار کرنے کے لیے، تھر مو ساٹکٹر جمپ نامی مشین مخصوص اوقات میں کیمیائی اجزاء کے درجہ حرارت کو بڑھا کر اور کم کر کے اور پہلے سے طے شدہ سائیکلوں کے لیے رد عمل کے ہر مرحلے کو شروع کرتی ہے۔

PCR کے ہر دور میں تین اہم مراحل ہوتے ہیں، جیسا کہ درج ذیل حصوں میں بیان کیا گیا ہے۔

مرحلہ 1: ڈینیچریشن (Denaturation)

PCR میں پہلے مرحلے کے دوران، ابتدائی محلول کو ضروری درجہ حرارت پر گرم کیا جاتا ہے، عام طور پر 90°C اور 100°C کے درمیان۔ جیسے جیسے گرمی بنتی ہے، یہ ڈی این اے ڈبل ہیکس کے دواسٹرینڈز کو جوڑنے والے بانڈز کو توڑ دیتی ہے، اس طرح ڈی این اے کو دو سنگل اسٹرینڈز میں الگ کرنے کے قابل بناتا ہے۔ ڈی این اے کے اس "پکھلنے" کو سنگل اسٹرینڈز میں ڈینیچریشن کہتے ہیں۔

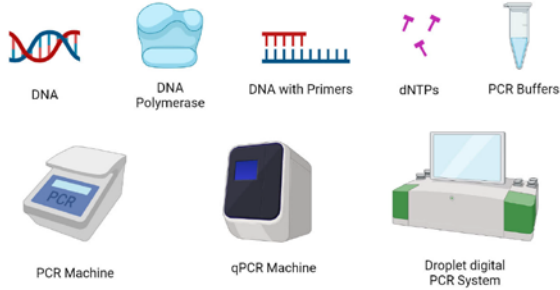
مرحلہ 2: اینیلنگ (Annealing)

ابتدائی ہدف کے درجہ حرارت پر اسے کئی منٹ تک رکھنے کے بعد، رد عمل کا مرکب تیزی سے ٹھنڈا ہو جاتا ہے، عام طور پر 30°C اور 65°C کے درمیان۔ اس کے بعد مرکب کو اس درجہ حرارت پر ایک منٹ سے بھی کم کے لیے رکھا جاتا ہے۔ اس سے پرائمر کو ڈی این اے کے واحد کناروں پر ان کے تکمیلی سلسلے کو باندھنے، یا اینیل کرنے کا موقع ملتا ہے

مرحلہ 3: توسیع (Extension)

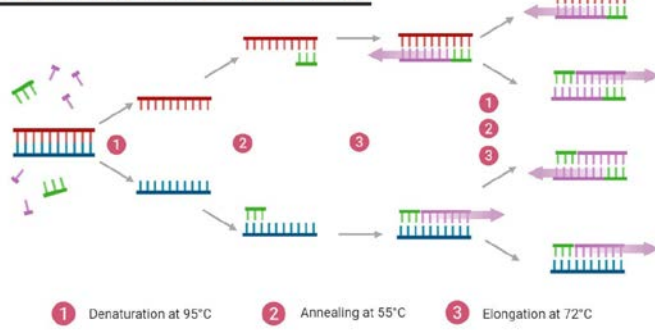
PCR کے فائنل یا توسیع کے مرحلے کے دوران، نمونے کو دوبارہ گرم کیا جاتا ہے، عام طور پر 60°C اور 75°C کے درمیان، اور اسے اس درجہ حرارت پر ایک منٹ سے بھی کم وقت کے لیے رکھا جاتا ہے۔ اس مقام پر، ڈی این اے پولیمریز پرائمر سے منسلک ہو کر اور پھر ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ میں ڈی این اے ٹی پیز شامل کر کے ایک نیا ڈی این اے اسٹرینڈ بنانا شروع کر دیتا ہے، اس طرح ہدف کی ترتیب کی تکمیلی کاپی تیار ہوتی ہے۔

Components of PCR (Enzymes used in PCR)



دلچسپی کے ڈی این اے کی ترتیب کی نئی کاپیوں کی تعداد ہر تین قدمی چکر کے ساتھ دوگنی ہو جاتی ہے۔ اس طرح، اگر پی سی آر کے عمل کو 40 یا 50 بار دہرایا جائے تو ڈی این اے کے سانچے کے چھوٹے نمونے بھی لاکھوں ایک جیسی کاپیاں حاصل کر سکتے ہیں۔

Polymerase Chain Reaction (PCR)



پی سی آر بہت سے عملی ایپلی کیشنز کے ساتھ ایک ناقابل یقین حد تک ور سٹائل تکنیک ہے۔ پی سی آر سائیکلنگ مکمل ہونے کے بعد، نقل شدہ ڈی این اے مالیکیولز کو کلوننگ، ترتیب، نقشہ سازی، یا جین کے اظہار کا مطالعہ کرنے کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔

9.4 ڈی این اے فنگر پرنٹ (DNA Fingerprinting)

ڈی این اے فنگر پرنٹنگ ایک ایسا طریقہ ہے جو کسی فرد کو ڈی این اے کے نمونے سے اس کے ڈی این اے میں منفرد نمونوں کو دیکھ کر شناخت کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

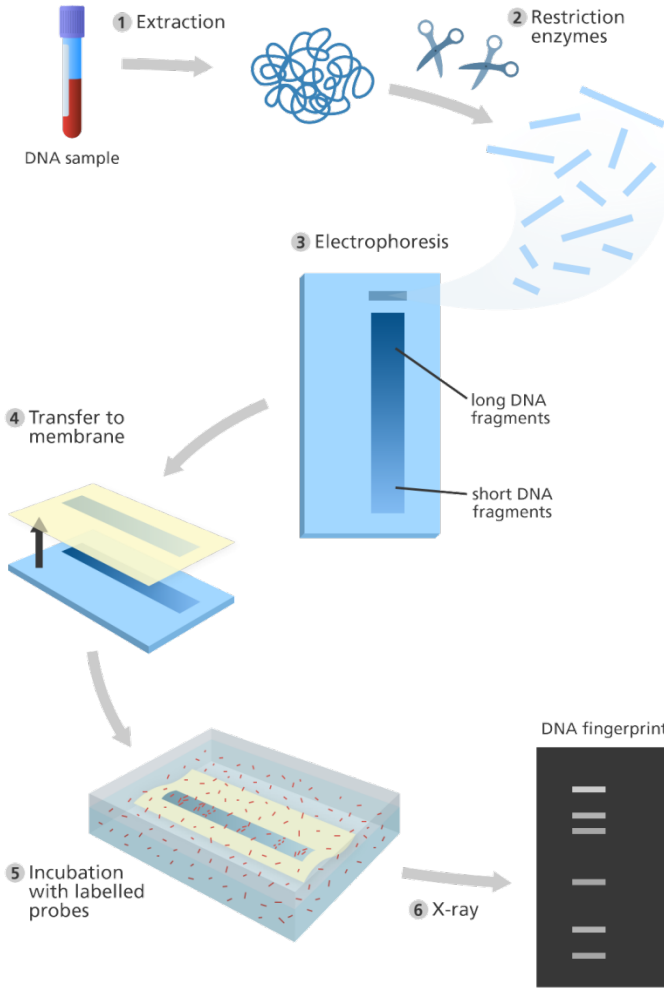
ڈی این اے پروفائلنگ / DNA profiling (جسے ڈی این اے فنگر پرنٹنگ بھی کہا جاتا ہے) کسی فرد کی ڈی این اے خصوصیات کا تعین کرنے کا عمل ہے، جو فنگر پرنٹس کی طرح منفرد ہیں۔

ڈی این اے تجزیہ جس کا مقصد کسی فرد کی بجائے کسی نوع کی شناخت کرنا ہے، اسے DNA بار کوڈنگ (DNA Barcoding) کہتے ہیں۔

9.4.1 پس منظر (Background)

❖ تمام خلیات کا ڈی این اے ایک جیسا ہوتا ہے۔

- ❖ اوسطاً، دو انسانوں کے درمیان ڈی این اے کا تقریباً 99.9 فیصد ایک جیسا ہے۔۔
 - ❖ باقی فیصد وہ ہے جو ہمیں منفرد بناتا ہے (جب تک کہ آپ ایک جیسے جڑواں نہ ہوں)۔۔
 - ❖ تقریباً تیس لاکھ بیس جوڑے ہیں جو دو لوگوں کے درمیان مختلف ہیں۔ ان اختلافات کا موازنہ کیا جاسکتا ہے اور کسی اور سے فرق کرنے میں مدد کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔۔
 - ❖ منی سیٹلائٹس (Minisatellites) دہرائے جانے والے ڈی این اے کے مختصر سلسلے (10-60 بیس جوڑے) ہیں جو جینوم کے دوسرے حصوں کے مقابلے میں ایک شخص سے دوسرے شخص میں زیادہ فرق ظاہر کرتے ہیں۔ یہ تغیرات منی سیٹلائٹ کی ترتیب میں دہرائی جانے والی اکائیوں یا اسٹرس کی تعداد میں ظاہر ہوتا ہے۔
 - ❖ پہلا منی سیٹلائٹ 1980 میں دریافت ہوا تھا۔
- ڈی این اے فنگر پرنٹنگ (DNA fingerprinting)
1. ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کی ایجاد 1984 میں پروفیسر سر ایلک جیفریز نے کی تھی۔ ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کا پہلا مرحلہ انسانی مواد، عام طور پر خون کے نمونے سے ڈی این اے نکالنا تھا۔
 2. ڈی این اے کو کاٹنے کے لیے پابندی والے انزائمز کا استعمال کیا گیا۔ اس کے نتیجے میں ڈی این اے کے ہزاروں ٹکڑے مختلف لمبائیوں کے ساتھ نکلے۔
 3. ڈی این اے کے ان ٹکڑوں کو جیل الیکٹروفورسس کے ذریعے سائز کے مطابق الگ کیا گیا۔
 4. ڈی این اے کے ٹکڑوں کو نایلان کی جھلی میں منتقل کیا گیا اور پھر ڈی این اے کے واحد تار پیدا کرنے کے لیے 'ان زپ' کر دیا گیا۔
 5. اس کے بعد نایلان کی جھلی کو تابکار تحقیقات کے ساتھ انکیوبیٹ کیا گیا تھا۔
- ★ پربلس منی سیٹلائٹ ڈی این اے کے چھوٹے ٹکڑے ہوتے ہیں جنہیں تابکار فاسفورس کے ساتھ ٹیگ کیا جاتا ہے۔



★ تحقیقات صرف ڈی این اے کے ٹکڑوں سے منسلک ہوتی ہیں کہ وہ جینوم میں موجود منی سیٹلائٹس کے تکمیلی ہوتے ہیں۔

6. منی سیٹلائٹس جن کے ساتھ تحقیقات نے منسلک کیا ہے اس کے بعد نایان جھلی کو ایکس رے فلم میں بے نقاب کر کے تصور کیا گیا۔

★ جب ریڈیو ایکٹیوٹی کے سامنے آئے تو فلم پر 30 سے زیادہ ڈارک بینڈز کا نمونہ ظاہر ہوا جہاں ڈی این اے کا لیبل لگا ہوا تھا۔ یہ نمونہ ڈی این اے فنگر پرنٹ تھا۔

★ دو یا دو سے زیادہ مختلف ڈی این اے فنگر پرنٹس کا موازنہ کرنے کے لیے مختلف ڈی این اے کے نمونے ایک ہی الیکٹروفورسس جیل پر ساتھ ساتھ چلائے گئے۔

تصویر: ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کے مراحل کو ظاہر کرنے والی مثال۔ تصویر کریڈٹ: جینوم ریسرچ لمیٹڈ

9.4.2 ڈی این اے پروفائلنگ (DNA Profiling)

❖ جدید دور کی DNA پروفائلنگ کو (STR) short tandem repeats تجزیہ بھی کہا جاتا ہے اور DNA فنگر پرنٹنگ میں استعمال ہونے والے منی سیٹلائٹس کے بجائے مائیکروسیٹلائٹس پر انحصار کرتا ہے۔

❖ مائیکروسیٹلائٹس، یا شارٹ ٹینڈم ریپیٹس (STRs)، منی سیٹلائٹس کے چھوٹے رشتہ دار ہیں جو عام طور پر دو سے پانچ بیس جوڑے لمبے ہوتے ہیں۔ منی سیٹلائٹس کی طرح وہ انسانی جینوم میں کئی بار دہرائے جاتے ہیں، مثال کے طور پر 'TATATATATATA'۔

9.4.3 ڈی این اے پروفائل کیسے تیار کیا جاتا ہے (How is a DNA profile produced)

1. ڈی این اے حیاتیاتی نمونے سے نکالا جاتا ہے۔ STR تجزیہ ناقابل یقین حد تک حساس ہے لہذا اسے درست نتیجہ پیدا کرنے کے لیے

کسی کے DNA کی صرف ایک چھوٹی سی مقدار کی ضرورت ہوتی ہے۔ نتیجے کے طور پر ڈی این اے کو حیاتیاتی نمونوں کی ایک وسیع رینج سے نکالا جاسکتا ہے، بشمول خون، تھوک اور بال۔

2. اصل ڈی این اے فنکچر پر ٹنگ کے طریقے کے برعکس، ڈی این اے پر وفائٹنگ ڈی این اے کو کاٹنے کے لیے پابندی کے خامروں کا استعمال نہیں کرتی ہے۔ اس کے بجائے یہ پولیمریز چین ری ایکشن (PCR) کا استعمال کرتا ہے تاکہ مخصوص STR تسلسل کی بہت سی کاپیاں تیار کی جاسکیں۔

❖ ایس ٹی آر تجزیہ میں پی سی آر میں استعمال ہونے والے پرائمر دلچسپی کی STR ترتیب کے دونوں سرے سے منسلک کرنے کے لیے بنائے گئے ہیں۔

❖ ہر STR کے پرائمر پر ایک مخصوص رنگ کے فلورسٹ ٹیگ کا لیبل لگا ہوا ہے۔ اس سے پی سی آر کے بعد ایس ٹی آر کی ترتیب کی شناخت اور ریکارڈ کرنا آسان ہو جاتا ہے۔

3. پی سی آر کے ذریعہ ترتیب کی کافی کاپیاں تیار کرنے کے بعد، سائز کے مطابق ٹکڑوں کو الگ کرنے کے لیے الیکٹروفورسس کا استعمال کیا جاتا ہے۔

4. ہر ٹکڑا ایک لیزر سے گزرتا ہے جس کی وجہ سے فلوروسینٹ ٹیگز والے ٹکڑے ایک مخصوص رنگ کے ساتھ چمکتے ہیں۔ آؤٹ پٹ رنگین چوٹیوں کی ایک سیریز کے طور پر ظاہر ہوتا ہے جو ہر STR ترتیب کے رنگ اور لمبائی کو نمایاں کرتا ہے۔

9.4.4 ڈی این اے فنکچر پر ٹنگ کا اطلاق (Application of DNA Fingerprinting)

چونکہ یہ 1984 میں ایجاد ہوا تھا، ڈی این اے فنکچر پر ٹنگ اکثر عدالتی معاملات اور قانونی معاملات میں استعمال ہوتی رہی ہے۔ یہ کر سکتا ہے:

❖ جسمانی طور پر ثبوت کے ٹکڑے کو کسی شخص سے جوڑیں یا کسی کو مشتبہ کے طور پر مسترد کریں۔

❖ دکھائیں کہ آپ کے والدین، بہن بھائی اور دیگر رشتہ دار کون ہو سکتے ہیں۔

❖ کسی ایسی لاش کی شناخت کریں جو بہت پرانی یا خراب ہو کہ پہچانی نہیں جاسکتی

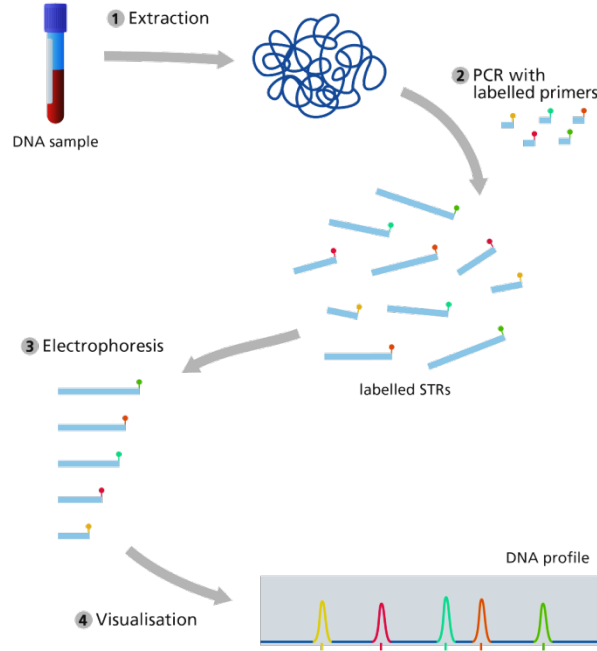
ڈی این اے فنکچر پر ٹنگ انتہائی درست ہے۔ اب زیادہ تر ممالک ڈی این اے کا ریکارڈ اسی طرح فائل میں رکھتے ہیں جس طرح پولیس اصل فنکچر پر ٹس کی کاپیاں رکھتی ہے۔

اس کے طبی استعمال بھی ہیں۔ یہ کر سکتا ہے:

❖ اعضاء کے عطیہ دہندگان کے ٹشوز کو ان لوگوں کے ساتھ جوڑیں جنہیں ٹرانسپلانٹ کی ضرورت ہے۔

❖ ان بیماریوں کی نشاندہی کریں جو آپ کے خاندان میں منتقل ہوتی ہیں۔

❖ ان بیماریوں کا علاج تلاش کرنے میں مدد کریں، جنہیں موروثی حالات کہتے ہیں۔



تصویر: ڈی این اے پروفائلنگ کے مراحل کو ظاہر کرنے والی مثال۔ تصویری کریڈٹ: جینوم ریسرچ لمیٹڈ

9.5 ڈی این اے مائیکروری (DNA Microarray)

❖ ڈی این اے مائیکروری ٹھوس سپورٹ ہوتے ہیں، عام طور پر شیشے یا سلیکون کے، جن پر ڈی این اے پہلے سے طے شدہ گرڈ انداز میں منسلک ہوتا ہے۔

❖ ڈی این اے کا ہر مقام، جسے پروب کہا جاتا ہے، ایک ہی جین کی نمائندگی کرتا ہے۔

❖ ڈی این اے مائیکروری بیک وقت دسیوں ہزار جینوں کے اظہار کا تجزیہ کر سکتے ہیں۔

❖ ڈی این اے مائیکروری کے متعدد مترادفات ہیں جیسے ڈی این اے چپس، جین چپس، ڈی این اے اری، جین اری اور بائیو چپس۔

9.5.1 ڈی این اے مائیکروری تکنیک کا اصول

❖ ڈی این اے مائیکروری کا اصول نیوکلیک ایسڈ اسٹریٹج کے درمیان ہائبرڈائزیشن پر مضمحل ہے۔

❖ تکمیلی نیوکلیک ایسڈ کی ترتیب کی خاصیت یہ ہے کہ خاص طور پر تکمیلی نیوکلیوٹائیڈس جوڑوں کے درمیان ہائبرڈوجن بانڈز بنا کر ایک دوسرے کے ساتھ جوڑا جائے۔

❖ اس کے لیے، فلوروسینٹ رنگوں کا استعمال کرتے ہوئے نمونوں پر لیبل لگایا جاتا ہے۔

❖ کم از کم دو نمونے چپ کے لیے ہائبرڈائز کیے گئے ہیں۔

- ❖ نمونے اور چپ پر منسلک تحقیقات کے درمیان تکمیلی نیوکلیک ایسڈ کی ترتیب ہائیڈروجن بانڈز کے ذریعے جوڑ دی جاتی ہے۔
- ❖ غیر مخصوص بانڈنگ کے سلسلے جبکہ عمل کے دھونے کے مرحلے کے دوران غیر منسلک رہتے ہیں اور دھوئے جاتے ہیں۔
- ❖ فلوروسینٹ لیبل لگائے گئے ہدف کے سلسلے جو کہ تحقیقات کی ترتیب سے منسلک ہوتے ہیں ایک سگنل پیدا کرتے ہیں۔
- ❖ سگنل ہائبرڈائزیشن کے حالات (مثال کے طور پر: درجہ حرارت)، ہائبرڈائزیشن کے بعد دھونے وغیرہ پر منحصر ہے جبکہ سگنل کی کل طاقت، موجود ہدف کے نمونے کی مقدار پر منحصر ہے۔
- ❖ اس ٹیکنالوجی کا استعمال کرتے ہوئے 1,00,000 یا اس سے زیادہ ترتیب میں ایک جینومک یا cDNA ترتیب کی موجودگی کو ایک ہی ہائبرڈائزیشن میں اسکرین کیا جاسکتا ہے۔
- DNA چپس / مائکروری کے 2 قسمیں ہیں:

1. سی ڈی این اے پر مبنی مائکروری (cDNA based microarray)

2. Oligonucleotide based microarray پر مبنی مائکروری (Oligonucleotide based microarray)

1. اسپائڈ DNA Arrays ("cDNA arrays")

- ❖ چپس سی ڈی این اے کا استعمال کر کے تیار کی جاتی ہیں۔
- ❖ سی ڈی این اے چپس یا سی ڈی این اے مائکروری یا پروب ڈی این اے کہلاتا ہے۔
- ❖ پی سی آر کا استعمال کرتے ہوئے سی ڈی این اے کو بڑھایا جاتا ہے۔
- ❖ پھر یہ شیشے کی سلائیڈ (31 x انچ) کے نایلان فلٹر سے بنے ٹھوس سپورٹ پر متحرک ہو گئے۔ تحقیقاتی ڈی این اے کو کیپلیری ایکشن کے ذریعے اسپائنگ اسپن میں لوڈ کیا جاتا ہے۔
- ❖ اس ڈی این اے کی تیاری کا چھوٹا حجم ٹھوس سطح پر دیکھا گیا ہے جو ان دونوں کے درمیان جسمانی رابطہ بناتا ہے۔
- ❖ ڈی این اے میکائی یارو بوٹک طریقے سے پہنچایا جاتا ہے۔

2. Oligonucleotide arrays (Gene Chips)

- ❖ oligonucleotide microarrays میں، مختصر DNA oligonucleotides کو صف پر دیکھا جاتا ہے۔

❖ 20-25 میرس / جین کی چھوٹی تعداد

- ❖ oligonucleotide microarray کی اہم خصوصیت یہ ہے کہ ہر جین کو عام طور پر ایک سے زیادہ پروب کے ذریعے دکھایا جاتا ہے۔

❖ کمپیوٹرائڈ سٹری سے فوٹولیتھوگرافی کے ذریعے فعال

9.5.2 ڈی این اے مائیکروری تکنیک (DNA Microarray Technique)

ڈی این اے مائیکروری سسٹم کو ڈیزائن کرنے کے لیے کچھ تقاضے ہیں، جیسے:

1. ڈی این اے چپ

2. ہدف کا نمونہ (فلورسینٹ لیبل لگا ہوا)

3. فلوروسینٹ رنگ

4. تحقیقات

5. سیکور

ڈی این اے مائیکروری کے رد عمل کا طریقہ کار کئی مراحل میں ہوتا ہے:

1. نمونوں کا مجموعہ

❖ نمونہ اس جاندار کا سیل / ٹشو ہو سکتا ہے جس پر ہم مطالعہ کرنا چاہتے ہیں۔

❖ دو قسم کے نمونے جمع کیے جاتے ہیں: صحت مند خلیے اور متاثرہ خلیے، موازنہ اور نتائج حاصل کرنے کے لیے۔

2. mRNA کی تنہائی

❖ آر این اے نمونے سے کالم یا سالوینٹ جیسے فینول کلوروفارم کا استعمال کرتے ہوئے نکالا جاتا ہے۔

❖ نکالے گئے RNA سے، mRNA کو rRNA اور tRNA کو پیچھے چھوڑ کر الگ کیا جاتا ہے۔

❖ چونکہ mRNA میں پولی-A ٹیل ہوتی ہے، mRNA کو باندھنے کے لیے پولی-T-ٹیل کے ساتھ کالم موتیوں کا استعمال کیا جاتا ہے۔

❖ نکالنے کے بعد، mRNA کو موتیوں سے الگ کرنے کے لیے کالم کو بفر سے دھویا جاتا ہے۔

3. لیبل والے سی ڈی این اے کی تخلیق

❖ cDNA (کمپلیمنٹری DNA سٹریٹ) بنانے کے لیے، mRNA کی ریورس ٹرانسکرپشن کی جاتی ہے۔

❖ دونوں نمونوں کو پھر فلوروسینٹ سی ڈی این اے سٹریٹ بنانے کے لیے مختلف فلوروسینٹ رنگوں کے ساتھ شامل کیا جاتا ہے۔ یہ سی ڈی این اے کے نمونے کے زمرے میں فرق کرنے میں مدد کرتا ہے۔

4. ہائبرڈائزیشن

❖ دونوں نمونوں سے لیبل لگے ہوئے سی ڈی این اے کو ڈی این اے مائیکرو رے میں رکھا جاتا ہے تاکہ ہر سی ڈی این اے اپنے تکمیلی اسٹرینڈ میں ہائبرڈائز ہو جائے۔ ان کو بھی اچھی طرح سے دھویا جاتا ہے تاکہ غیر محدود ترتیب کو ہٹایا جاسکے۔

5. جمع اور تجزیہ

- ❖ ڈیٹا اکٹھا کرنا مائیکرو رے سکینر کے ذریعے کیا جاتا ہے۔
- ❖ یہ سکینر ایک لیزر، ایک کمپیوٹر اور ایک کیمرہ پر مشتمل ہے۔ لیزر سی ڈی این اے کے فلوروسینس کو اکسٹانڈ ہے، سگنلز پیدا کرتا ہے۔
- ❖ جب لیزر صف کو اسکین کرتا ہے تو کیمرہ تیار کردہ تصاویر کو ریکارڈ کرتا ہے۔
- ❖ پھر کمپیوٹر ڈیٹا کو ذخیرہ کرتا ہے اور فوری طور پر نتائج فراہم کرتا ہے۔ اس کے بعد تیار کردہ ڈیٹا کا تجزیہ کیا جاتا ہے۔
- ❖ ہر جگہ کے رنگوں کی شدت میں فرق اس مخصوص جگہ پر جین کے کردار کا تعین کرتا ہے۔

9.5.3 مائیکرو رے کی ایپلی کیشنز (Application of Microarray)

جین کی دریافت: ڈی این اے مائیکرو رے ٹیکنالوجی نئے جینز کی شناخت میں مدد کرتی ہے، مختلف حالات میں ان کے کام کرنے اور اظہار کی سطح کے بارے میں جانتی ہے۔

❖ بیماری کی تشخیص (Disease Diagnosis): ڈی این اے مائیکرو رے ٹیکنالوجی محققین کو مختلف بیماریوں جیسے کہ دل کی بیماریوں، دماغی بیماری، متعدی بیماری اور خاص طور پر کینسر کے مطالعہ کے بارے میں مزید جاننے میں مدد کرتی ہے۔ حال ہی میں، کینسر کی مختلف اقسام کی درجہ بندی ان اعضاء کی بنیاد پر کی جاتی رہی ہے جن میں ٹیومر بنتے ہیں۔ اب، مائیکرو رے ٹیکنالوجی کے ارتقاء کے ساتھ، محققین کے لیے کینسر کی اقسام کو ٹیومر کے خلیوں میں جین کی سرگرمی کے نمونوں کی بنیاد پر مزید درجہ بندی کرنا ممکن ہو گا۔ اس سے فارماسیوٹیکل کمیونٹی کو زیادہ موثر دوائیں تیار کرنے میں بہت مدد ملے گی کیونکہ علاج کی حکمت عملیوں کو براہ راست کینسر کی مخصوص قسم پر نشانہ بنایا جائے گا۔

❖ منشیات کی دریافت (Drug Discovery): مائیکرو رے ٹیکنالوجی کا فارماکو جینومکس میں وسیع اطلاق ہے۔ فارماکو جینومکس دوائیوں کے علاج کے رد عمل اور مریضوں کے جینیاتی پروفائلز کے درمیان ارتباط کا مطالعہ ہے۔ ایک بیمار اور ایک عام خلیے سے جینز کا تقابلی تجزیہ بیمار جینز کے ذریعے ترکیب شدہ پروٹین کے بائیو کیمیکل ساخت کی شناخت میں مدد کرے گا۔ محققین اس معلومات کو دواؤں کی ترکیب کے لیے استعمال کر سکتے ہیں جو ان پروٹینوں سے لڑتی ہیں اور ان کے اثر کو کم کرتی ہیں۔

❖ ٹاکسیکولوجیکل ریسرچ (Toxicological Research): مائیکرو رے ٹیکنالوجی خلیات پر زہریلے مادوں کے اثرات اور اولاد میں ان کے منتقلی کی تحقیق کے لیے ایک مضبوط پلیٹ فارم مہیا کرتی ہے۔ ٹاکسیکولوجی جینومکس زہریلے مادوں کے رد عمل اور اس طرح کے زہریلے مادوں کے سامنے آنے والے خلیوں کے جینیاتی پروفائلز میں ہونے والی تبدیلیوں کے درمیان تعلق قائم کرتا

ہے۔

9.6 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

- اس اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو گئے ہیں کہ:
- ❖ سنجر کے طریقہ کار سے ڈی این اے کی ترتیب کی طریق کی وضاحت کر سکیں۔
- ❖ پولیمریز چین ری ایکشن کی وضاحت کر سکیں۔
- ❖ ڈی این اے فنکٹر پر ننگ اور ڈی این اے مائیکرو رے کا تصور کو بیان کر سکیں

9.7 کلیدی الفاظ (Keywords)

پولیمیریز	Polymerase	ایک انزائم جو ڈی این اے یا آراین اے مالیکیولز کو نیو کلیوٹائیڈس سے ترکیب کرتا ہے۔
ڈینیچریشن	Denaturation	ہائیڈروجن بانڈز کو توڑ کر ڈی این اے کے دو کناروں کو الگ کرنے کا عمل۔
مائیکرو رے	Microarray	بیک وقت ہزاروں جینوں کے اظہار کا تجزیہ کرنے کا ایک ٹول۔
پروب	Probe	DNA یا RNA نمونوں میں مخصوص ہدف کی ترتیب کا پتہ لگانے کے لیے استعمال ہونے والے مختصر DNA سلسلے۔

9.8 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

9.8.1 9.8.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. ڈی این اے کی ترتیب کا سینجر طریقہ _____ کے اصول پر مبنی ہے۔
2. پی سی آر کا مطلب ہے _____۔
3. ڈی این اے فنکٹر پر ننگ کی ایجاد _____ نے _____ میں کی تھی۔
4. ڈی این اے مائیکرو رے کو جین _____ کے نام سے بھی جانا جاتا ہے۔
5. پی سی آر کے لیے ضروری کیمیکل جزو _____ ہے۔
6. ڈی این اے فنکٹر پر ننگ بنیادی طور پر _____ ترتیبوں کے تجزیہ پر انحصار کرتی ہے۔
7. PCR میں DNA کو گرم کرنے کے عمل کو _____ کہا جاتا ہے۔
8. مائیکرو رے _____ اظہار کی سطحوں کا بیک وقت پتہ لگانے اور ان کی مقدار درست کرنے کے قابل بناتے ہیں۔

9. نیشنل سینٹر فار بائیو ٹیکنالوجی انفارمیشن (NCBI) نے مائیکرو رے ڈیٹا تک آسان رسائی کے لیے _____ وضع کیا۔
10. ڈی این اے مائیکرو رے ہزاروں چھوٹے دھبوں کے ساتھ پرنٹ کیے جاتے ہیں، ہر ایک میں معلوم DNA ترتیب یا _____ ہوتا ہے۔

9.8.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. ڈی این اے کی ترتیب کے سنجر کے طریقہ کار میں کون سے اہم اقدامات شامل ہیں؟
2. پی سی آر کیسے کام کرتا ہے، اور اس کے اہم اجزاء کیا ہیں؟
3. ڈی این اے فنکر پرنٹنگ کے عمل کی وضاحت کریں، بشمول اس کے پس منظر اور اپیلی کیشنز۔
4. ڈی این اے مائیکرو رے کے پیچھے اصول کیا ہے، اور ان کی بنیادی اقسام کیا ہیں؟
5. نیشنل سینٹر فار بائیو ٹیکنالوجی انفارمیشن (NCBI) مائیکرو رے ڈیٹا کی رسائی میں کس طرح تعاون کرتا ہے؟

9.8.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. جینیاتی تحقیق میں سنجر کے طریقہ کار کی اہمیت پر بحث کریں۔
2. PCR کے عمل کی تفصیل سے وضاحت کریں۔
3. ڈی این اے فنکر پرنٹنگ کے بارے میں تفصیل سے وضاحت کریں۔
4. ڈی این اے مائیکرو رے کے بارے میں تفصیل سے بتائیں
5. بیکیٹیریا میں قدرتی قابلیت کی اہمیت پر بحث کریں۔

9.9 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Polymerase Chain Reaction	پولیمریزیشن ری ایکشن	-	ایک لیبارٹری تکنیک جو ڈی این اے کے ایک مخصوص حصے کو ڈیمنچریشن، اینیلنگ اور توسیع کے بار بار چکروں کے ذریعے بڑھاتی ہے۔
DNA Fingerprinting	ڈی این اے فنکر پرنٹنگ	-	ایک طریقہ جو افراد کو ان کے ڈی این اے میں منفرد نمونوں کی بنیاد پر شناخت کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، جو اکثر فرانزک سائنس اور پیٹرنٹی ٹیسٹنگ میں استعمال ہوتا ہے۔

Autoradiogram آٹوریڈیو گرام آٹوریڈیو گرام مالیکیولر بائیولوجی کے تجربات کے دوران پیدا ہونے والے تابکار یا فلوروسینٹ سگنلز کی بصری نمائندگی، جیسے ڈی این اے کی ترتیب یا مائیکرو رے تجزیہ۔

9.10 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Watson, J. D., et al. (2013). *Molecular Biology of the Gene* (7th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). *Methods in Enzymology: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction* (Vol. 155). Academic Press.
3. Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). *Nature: Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA* (Vol. 314, No. 6006, pp. 67-73).
4. Schena, M., et al. (1995). *Science: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray* (Vol. 270, No. 5235, pp. 467-470).
5. Edgar, R., Domrachev, M., & Lash, A. E. (2002). *Nucleic Acids Research: Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository* (Vol. 30, No. 1, pp. 207-210).

اکائی 10: کلون اور ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار

(Production of Clone and Transgenic Animals)

اکائی کے اجزا

تمہید (Introduction)	10.0
مقاصد (Objectives)	10.1
جانوروں میں جینیاتی ہیرا پھیری کے طریقے (Methods of Genetic Manipulation in Animals)	10.2
ٹرانس جینیسیس (Transgenesis)	10.2.1
2 ناک آؤٹ اور ناک ان (Knock out and knock in)	10.2.2
CRISPR/Cas9	10.2.3
سومیٹک سیل نیوکلیر ٹرانسفر (Somatic Cell Nuclear Transfer)	10.2.4
RNA مداخلت (RNAi)	10.2.5
جین تھراپی (Gene Therapy)	10.2.6
پرونیوکلیر ٹرانسفر کا عمل (Process of Pronuclear Transfer)	10.3
مائیکرو انجیکشن جین (Microinjection)	10.4
مائیکرو انجیکشن کا اصول (Principle of Microinjection)	10.4.1
مائیکرو انجیکشن میں اقدامات (Steps in Microinjection)	10.4.2
مائیکرو انجیکشن کی ایپلی کیشنز (Application of Microinjection)	10.4.3
اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)	10.5
کلیدی الفاظ (Keywords)	10.6
نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)	10.7
معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)	10.7.1

10.7.2	مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)
10.7.3	طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)
10.8	فرہنگ (Glossary)
10.9	مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

10.0 تمہید (Introduction)

بائیو ٹیکنالوجی کے ابھرتے ہوئے منظر نامے میں، کلون شدہ اور ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار ان قابل ذکر پیش رفتوں کا ثبوت ہے جو انسانیت نے جانداروں کے جینیاتی تانے بانے میں ہیرا پھیری کی ہے۔ یہ باب ان جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانداروں کی تخلیق میں استعمال کیے جانے والے پیچیدہ طریقہ کار پر روشنی ڈالتا ہے، جو ان بنیادی تکنیکوں پر روشنی ڈالتا ہے جنہوں نے جینیات کے بارے میں ہماری سمجھ میں انقلاب برپا کیا ہے اور سائنسی اختراع کو بے مثال بلندیوں تک پہنچایا ہے۔

جانوروں میں جینیاتی ہیرا پھیری کے مرکز میں کئی سالوں کی تحقیق اور تجربات کے ذریعے نفیس طریقے ہیں۔ دو بنیادی تکنیکیں، پرونیو کلیئر ٹرانسفر اور مائیکرو انجکشن، جانوروں کی جینیاتی انجینئرنگ کے دائرے میں ستونوں کے طور پر کھڑی ہیں، ہر ایک الگ الگ فوائد اور اپیلی کیشنز پیش کرتی ہے۔

پرونیو کلیئر ٹرانسفر، ایک تکنیک جو معاون تولیدی ٹیکنالوجی کے دائرے میں پیش کی گئی ہے، اس میں فرٹیلائزڈ oocytes کے pronuclei کے اندر جینیاتی مواد کی درست ہیرا پھیری شامل ہے۔ یہ نازک طریقہ کار مخصوص جینز کے ہدفی تعارف یا تبدیلی کی اجازت دیتا ہے، جس کے نتیجے میں پیدا ہونے والی اولاد کی جینیاتی ساخت پر بے مثال کنٹرول پیش کیا جاتا ہے۔ جنین کے مرحلے پر پیچیدہ ہیرا پھیری کے ذریعے، محققین جانوروں کو مطلوبہ خصلتوں سے متاثر کر سکتے ہیں، جس سے

جینیاتی انجینئرنگ کے دائرے میں، مائیکرو انجکشن ایک بنیادی تکنیک کے طور پر کھڑا ہے، جو ہدف کے خلیات کے نیوکلیس میں غیر ملکی جینیاتی مواد کی براہ راست ترسیل میں سہولت فراہم کرتا ہے۔ انسانی بالوں سے زیادہ باریک مائیکرو پیپیسٹس کا استعمال کرتے ہوئے، محققین ڈی این اے کی ساخت کو فرٹیلائزڈ اندوں یا ابتدائی مرحلے کے ایمبریوز میں درستگی کے ساتھ انجکشن لگا سکتے ہیں، جینیاتی اپٹیک میں قدرتی رکاوٹوں کو نظر انداز کرتے ہوئے۔ یہ طریقہ نئے جینیاتی خصلتوں کو پناہ دینے والے ٹرانسجینک جانوروں کی تخلیق کو قابل بناتا ہے، جو جین کے افعال کو واضح کرنے، انسانی بیماریوں کی ماڈلنگ، اور بائیو فارماسیوٹیکل پیداوار کو آگے بڑھانے کے لیے انمول ٹولز کے طور پر کام کرتا ہے۔

10.1 مقاصد (Objectives)

اس یونٹ کے اپنے مطالعہ کے اختتام پر، آپ کو قابل ہونا چاہیے:-

- ❖ جینیاتی ہیرا پھیری کے اصولوں کی وضاحت کریں جن میں جین کی منتقلی، جین ایڈیٹنگ، اور جین ایکسپریشن ریگولیشن کے تصورات شامل ہیں۔
- ❖ جانوروں میں جینیاتی انجینئرنگ کے طریقوں کی وضاحت کریں جو جانوروں کی جینیاتی انجینئرنگ میں شامل طریقہ کار ہیں، جس میں پرونیوکلیر ٹرانسفر اور مائیکرو انجیکشن تکنیکوں پر توجہ دی جاتی ہے۔
- ❖ کلون شدہ اور ٹرانسجینک جانوروں کی ایپلی کیشنز پر تبادلہ خیال کریں: طلباء کلون اور ٹرانسجینک جانوروں کی متنوع ایپلی کیشنز کو مختلف شعبوں جیسے زراعت، طب، بائیو ٹیکنالوجی، اور بنیادی تحقیق میں دریافت کریں گے۔

10.2 جانوروں میں جینیاتی ہیرا پھیری کے طریقے (Methods of Genetic Manipulation in Animals)

جینیاتی ہیرا پھیری، جسے جینیاتی انجینئرنگ یا جینیاتی ترمیم بھی کہا جاتا ہے، سے مراد حیاتیاتی تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے کسی جاندار کے جینیاتی مواد کی جان بوجھ کر تبدیلی ہے۔ اس ہیرا پھیری میں کسی جاندار کے جینوم کے اندر مخصوص جینوں کا اندراج، حذف یا ترمیم شامل ہو سکتی ہے، جس کی وجہ سے اس کی خصوصیات یا خصوصیات میں تبدیلی آتی ہے۔ جینیاتی ہیرا پھیری کا اطلاق حیاتیات کی ایک وسیع رینج پر کیا جاسکتا ہے، بشمول پودوں، حیوانات اور مائیکرو جینزموں پر، مختلف مقاصد کے ساتھ زرعی بہتری سے لے کر طبی تحقیق تک۔

جانوروں میں جینیاتی ہیرا پھیری میں کسی جاندار کے ڈی این اے کو تبدیل کرنا شامل ہے تاکہ نئی خصلتوں کو متعارف کرایا جاسکے، موجودہ خصوصیات میں ترمیم کی جاسکے، یا جین کے فنکشن کا مطالعہ کیا جاسکے۔ یہ ہیرا پھیری سائنسی تحقیق، زراعت، اور طبی ترقی کے لیے اہم ہیں۔

جانوروں میں جینیاتی ہیرا پھیری کے لیے کئی طریقے استعمال کیے جاتے ہیں، ہر ایک اپنے فوائد اور حدود کے ساتھ:

10.2.1 ٹرانس جینیسیس (Transgenesis)

- ❖ مائیکرو انجیکشن: مائیکرو انجیکشن کے دوران، شیشے کی سوئی کا استعمال ایسے محلول کو انجیکشن کرنے کے لیے کیا جاتا ہے جس میں مطلوبہ ڈی این اے کی ساخت براہ راست ایک فریٹلائزڈ انڈے کے پروونکلیس میں ہوتی ہے۔ ڈی این اے کی تعمیر میں عام طور پر جین کے اظہار کو چلانے کے لیے ایک پروموٹر کی ترتیب، دلچسپی کے جین کے لیے کوڈنگ کی ترتیب، اور مناسب اظہار کے لیے ریگولیٹری عناصر شامل ہوتے ہیں۔ انجیکشن شدہ ڈی این اے تصادفی طور پر میزبان جینوم میں ضم ہو سکتا ہے، جس کے نتیجے میں اظہار کی متغیر سطح اور پوزیشن اثرات مرتب ہوتے ہیں۔ مائیکرو انجیکشن کی مثال: 1985 میں، محققین نے فریٹلائزڈ ماؤس امبریو کے پرونیوکلے میں ایک غیر ملکی جین کو مائیکرو انجیکشن لگا کر کامیابی کے ساتھ پہلا ٹرانسجینک چوہا تیار کیا۔ اس تاریخی مطالعہ نے

ممالیہ کے جینوم میں خارجی ڈی این اے کو متعارف کروانے کی فزیکلٹی کا مظاہرہ کیا اور ٹرانسجینک جانوروں کی تحقیق میں وسیع پیمانے پر استعمال کی راہ ہموار کی۔

❖ الیکٹروپوریشن: الیکٹروپوریشن میں ڈی این اے کی موجودگی میں خلیات یا ایسبر یوز پر مختصر برقی دالیں لگانا شامل ہے، جس سے خلیے کی جھلی میں عارضی سوراخوں کی تشکیل ہوتی ہے۔ یہ ڈی این اے کے مالیکیوز کو سیل سائٹوپلازم میں لے جانے کی اجازت دیتا ہے۔ الیکٹروپوریشن اکثر ڈی این اے کی ساخت کو برائن سٹیم سیلز یا ابتدائی ایسبر یوز میں متعارف کرانے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، جہاں ڈی این اے بعد میں جینوم میں ضم ہو سکتا ہے۔ الیکٹروپوریشن کی مثال: الیکٹروپوریشن کو زیرافش جیسے ماڈل جانداروں کے ایسبر یوز میں ٹرانسجینز متعارف کرانے کے لیے استعمال کیا گیا ہے۔ مثال کے طور پر، محققین نے CRISPR/Cas9 اجزاء کو زیرافش ایسبر یوز میں پہنچانے کے لیے الیکٹروپوریشن کا کام کیا ہے، جس سے موثر جین ایڈیٹنگ اور ٹارگٹڈ میوٹیشنز کے ساتھ ٹرانسجینک لائنوں کی تخلیق کو ممکن بنایا جاسکتا ہے۔

❖ وائرل ویکٹر: وائرل ویکٹر انجینئرڈ وائرس ہوتے ہیں جو موثر طریقے سے جینز کو ہدف کے خلیات میں پہنچا سکتے ہیں۔ ریٹرو وائرس اور لینٹو وائرس عام طور پر ان کے جینیاتی مواد کو میزبان جینوم میں ضم کرنے کی صلاحیت کی وجہ سے استعمال ہوتے ہیں، جس کے نتیجے میں ٹرانسجین کا اظہار مستحکم ہوتا ہے۔ وائرل ویکٹرز کو مطلوبہ ٹرانسجین لے جانے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے اور سیل کی مخصوصیت کو بڑھانے اور امیونو جنیسیٹی کو کم کرنے کے لیے عام طور پر سیڈو وٹائپ کیے جاتے ہیں۔ وائرل ویکٹرز مثال: اڈینو سے وابستہ وائرل (AAV) ویکٹران کی حفاظت اور کارکردگی کی وجہ سے جانوروں کے ماڈلز میں جین کی ترسیل کے لیے بڑے پیمانے پر استعمال کیے گئے ہیں۔ مثال کے طور پر، AAV-ٹائلی جین تھراپی نے کتوں میں ہیمو فیلیا B جیسے جینیاتی عوارض کے علاج میں وعدہ ظاہر کیا ہے، جہاں انسانی فیکٹر IX جین کو لے جانے والے AAV ویکٹر کے ایک واحد انٹرا اسکولر انجیکشن کے نتیجے میں علاج کے پروفٹین کا طویل مدتی اظہار ہوتا ہے۔

10.2.2 2 ناک آؤٹ اور ناک ان (Knock out and knock in)

❖ ہو مولو جس ری کبہ مینیشن: ناک آؤٹ اور ناک آؤٹ حکمت عملی اکثر ہو مولو جس ری کبہ مینیشن پر انحصار کرتی ہے، یہ ایک ایسا عمل ہے جس میں خلیات یا ایسبر یوز میں متعارف ہونے والا خارجی ڈی این اے اینڈو جینس جینومک ترتیب کے ساتھ دوبارہ جوڑتا ہے۔ اس کے نتیجے میں ٹارگٹ جین کو منتخب کرنے کے قابل مارکر (ناک آؤٹ) کے ساتھ تبدیل کیا جاسکتا ہے یا مطلوبہ ترتیب (ناک ان) کے عین مطابق داخل کیا جاسکتا ہے۔ ہو مولو جس ری کبہ مینیشن سیل کی ہو مولو جی ڈائریکٹڈ مرمت کی مشینری کے ذریعے ڈبل اسٹریٹڈ بریکس کی شناخت اور مرمت کے ذریعے ہوتا ہے۔ ہو مولو جس ری کبہ مینیشن مثال: 1992 میں، محققین نے پہلا ناک آؤٹ ماؤس بنانے کے لیے جین کے اسٹیم سیلز میں ہو مولو جس ری کبہ مینیشن کا استعمال کیا، جس میں سائٹو کائن انٹرفیرون گاما کے لیے جین کی کمی تھی۔ اس بنیادی مطالعہ نے فنکشنل تجزیہ کے لیے مخصوص جین کی رکاوٹوں کے ساتھ جانوروں

کو پیدا کرنے میں جین کو نشانہ بنانے کی طاقت کا مظاہرہ کیا۔

❖ ایسبریونک اسٹیم سیلز میں جین کا ہدف بنانا: ایسبریونک اسٹیم سیلز (ESCs) pluripotent خلیے ہیں جو بلاسٹوسٹس کے اندرونی خلیے سے اخذ کیے گئے ہیں۔ ان خلیات کو وٹرو میں کلچر کیا جاسکتا ہے اور ہم جنس ریگرجنیشن تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے جینیاتی طور پر ہیرا پھیری کی جاسکتی ہے۔ ESCs میں جین کا ہدف درست جینیاتی تبدیلیوں کے ساتھ چوہوں کی نسل کی اجازت دیتا ہے، بشمول جین ناک آؤٹ، ناک آؤٹ، اور مشروط ایللیس۔ ایسبریونک اسٹیم سیلز میں جین کا ہدف بنانا مثال: بیکٹیریوفیج P1 سے ماخوذ Cre-loxP نظام، چوہوں میں مشروط جین ناک آؤٹ یا ٹشو سے متعلق مخصوص جین اظہار کے لیے وسیع پیمانے پر استعمال ہوتا ہے۔ مثال کے طور پر، محققین نے اس نظام کو نیور وڈیولپمنٹ میں مخصوص جینز کے کردار کا مطالعہ کرنے کے لیے استعمال کیا ہے اور انہیں مشروط طور پر نیور وٹل پروجینیٹر سیلز یا بالغ نیوران میں حذف کر دیا ہے۔

CRISPR/Cas9 10.2.3

❖ گائیڈ RNA ڈیزائن: CRISPR/Cas9 سسٹمز ایک سنگل گائیڈ RNA (sgRNA) کا استعمال کرتے ہیں تاکہ Cas9 endonuclease کو sgRNA کے تکمیلی مخصوص DNA ترتیبوں کی طرف لے جائیں۔ ایس جی آر این اے میں 20 نیوکلیوٹائیڈ ٹارگٹنگ سیکوئنس ہوتا ہے جو کلیوٹیج کے لیے جینومک لوکس کا تعین کرتا ہے۔ گائیڈ آر این اے ڈیزائن کی مثال: محققین نے میلانین کی پیداوار میں خلل ڈال کر البینوفینوٹائپس کو آمادہ کرنے کے لیے چوہوں میں ٹائروسینینز جین کو نشانہ بنانے والے گائیڈ RNAs کو ڈیزائن کیا۔ اس مطالعے نے روغن سے متعلق جینز میں فنکشن کے نقصان کے تغیرات پیدا کرنے، پگمنٹیشن بائیولوجی میں بصیرت فراہم کرنے اور انسانی جینیاتی عوارض کا مطالعہ کرنے کے لیے ایک ماڈل کے طور پر کام کرنے کے لیے CRISPR/Cas9 کی افادیت کو ظاہر کیا۔

❖ Cas9 کلیوٹیج اور ڈی این اے کی مرمت: Cas9 ٹارگٹ سائٹ پر ڈبل اسٹریینڈ بریکس (DSBs) کی حوصلہ افزائی کرتا ہے، Cas9 کلیوٹیج موڈ کے لحاظ سے ہلٹ اینڈ یا سٹگرڈ اینڈز پیدا کرتا ہے۔ DSBs کی مرمت سیل کی DNA مرمت کی مشینری کے ذریعے نان ہو مولو جس اینڈ جوائننگ (NHEJ) یا ہو مولو جی ڈائر ایکٹڈ ریپیئر (HDR) کے ذریعے کی جاتی ہے۔ NHEJ اکثر کلیوٹیج سائٹ پر چھوٹے داخل یا حذف (انڈیل) کے نتیجے میں ہوتا ہے، جس کے نتیجے میں جین میں خلل پڑتا ہے (ناک آؤٹ)۔ CRISPR/Cas9 اجزاء کے ساتھ DNA مرمت ٹیمپلیٹ فراہم کر کے درست ترتیب میں ترمیم کو متعارف کرانے کے لیے HDR کا فائدہ اٹھایا جاسکتا ہے۔ Cas9 کلیوٹیج اور ڈی این اے کی مرمت کی مثال: CRISPR/Cas9 کو کم کثافت لیپو پروٹین ریسیپٹر (LDLR) جین میں ہدفی تبدیلیوں کے ساتھ انجینئر کرنے کے لیے استعمال کیا گیا ہے، جس کی وجہ سے LDL کو لیٹھروں کی سطح میں کمی واقع ہوتی ہے۔ یہ نقطہ نظر خاندانی ہائپر کولیسٹرولیمیا کے پور سین ماڈل تیار کرنے اور قلبی امراض کا مطالعہ کرنے کا وعدہ رکھتا ہے۔ مطالعہ کرنے کے لیے ایک ماڈل کے طور پر کام کرنے کے لیے CRISPR/Cas9 کی افادیت کو

ظاہر کیا۔

10.2.4 سویٹک سیل نیوکلیر ٹرانسفر (Somatic Cell Nuclear Transfer)

❖ نیوکلیر ٹرانسفر: SCNT میں کئی مراحل شامل ہیں، بشمول عطیہ کرنے والے جانور سے ایک سویٹک سیل کا الگ تھلگ، وصول کنندہ جانور سے ایک oocyte (انڈے کے خلیے) کا enucleation، اور somatic cell کے نیوکلئس کا enucleated oocyte کے ساتھ فیوژن۔ پھر تعمیر شدہ جنین کو وٹرو میں کلچر کیا جاتا ہے یا ترقی کے لیے سروگیٹ ماں کو منتقل کیا جاتا ہے۔ نیوکلیر ٹرانسفر کی مثال: 2018 میں، چینی محققین نے ڈونگ ڈونگ اور ہوا ہوانا نامی مکاک بندروں کو کلون کرنے کے لیے SCNT کا استعمال کیا، جو کہ سویٹک خلیات کے نیوکلئس کو انوکلیڈڈ oocytes میں منتقل کر کے۔ اس اہم کامیابی نے غیر انسانی پری میٹ پر جاتیوں کی پہلی کامیاب کلوننگ کی نشاندہی کی اور بائیو میڈیکل تحقیق میں، خاص طور پر انسانی بیماریوں کے مطالعہ میں کلون شدہ بندروں کے استعمال کے لیے راستے کھولے۔

❖ کلوننگ: SCNT کے ذریعے کلوننگ کے نتیجے میں ایک ایسے جاندار کی نسل پیدا ہوتی ہے جو جینیاتی طور پر سویٹک سیل نیوکلئس کے عطیہ کرنے والے سے مماثل ہے۔ یہ عمل سویٹک سیل نیوکلئس کو دوبارہ پروگرام کرنے پر انحصار کرتا ہے جو کہ برائن کی نشوونما میں معاونت کرنے اور جاندار کی تمام اقسام کو پیدا کرنے کے قابل ہے۔ کلوننگ کی مثال: SCNT کا استعمال زراعت میں مطلوبہ خصلتوں کے ساتھ جینیاتی طور پر تبدیل شدہ مویشی تیار کرنے کے لیے کیا گیا ہے۔ مثال کے طور پر، محققین نے myostatin جین میں ہدفی تبدیلیوں کے ساتھ خنزیروں کی کلوننگ کی ہے، جس کے نتیجے میں پٹھوں میں اضافہ ہوا ہے اور گوشت کی پیداوار میں بہتری آئی ہے۔ یہ جینیاتی طور پر تبدیل شدہ خنزیر گوشت کی پیداوار اور اعضاء کی پیوند کاری میں ممکنہ استعمال کرتے ہیں۔

10.2.5 RNA مداخلت (RNAi)

❖ میکازم: RNA مداخلت (RNAi) میں خلیات میں دوہرے پھنسے ہوئے dsRNA (dsRNA) مالیکیولز کا تعارف شامل ہے، جو چھوٹے مداخلت کرنے والے RNAs (siRNAs) یا چھوٹے ہیز پین RNAs (shRNAs) میں پروسیس ہوتے ہیں۔ یہ چھوٹے RNAs RNA-RNAs حوصلہ افزائی ساٹلنگ کمپلیکس (RISC) کو تکمیلی mRNA مالیکیولز کی رہنمائی کرتے ہیں، جس سے ان کی تنزلی یا ترجمی جبر ہوتا ہے۔ میکازم کی مثال: C. elegans میں RNA مداخلت کو RNAi کی ثالثی خاموشی کے ذریعے مخصوص جینوں کو دستک دے کر جین کے فنکشن کا مطالعہ کرنے کے لیے بڑے پیمانے پر استعمال کیا گیا ہے۔ مثال کے طور پر، محققین نے RNAi کو اس ماڈل جاندار میں جنین کی نشوونما، نیورونل فنکشن، اور لمبی عمر میں شامل جینوں کی اسکریننگ کے لیے لگایا ہے۔

❖ ایپلی کیشنز: RNAi بڑے پیمانے پر جانوروں کے ماڈلز میں جین کو خاموش کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، بشمول

invertebrates اور vertebrates. مصنوعی siRNAs یا shRNAs کو براہ راست خلیات یا جانداروں میں پہنچایا جاسکتا ہے تاکہ دلچسپی کے مخصوص جینوں کو نشانہ بنایا جاسکے۔ RNAi کی ثالثی جین کی خاموشی فنکشنل جینومکس اسٹڈیز کے لیے خاص طور پر قابل قدر ہے، کیونکہ یہ جین کے اظہار کو دبا کر جین کے فنکشن کی تیز رفتار تشخیص کی اجازت دیتا ہے۔

10.2.6 جین تھراپی (Gene Therapy)

❖ ویکٹر: جین تھراپی ویکٹر وائرل یا غیر وائرل ہو سکتے ہیں۔ وائرل ویکٹرز، جیسے کہ اڈینو وائرل، اڈینو سے وابستہ وائرل سز (AAVs)، اور lentiviruses، کو ٹارگٹ سیلز میں علاج کے جین کی فراہمی کے لیے انجینئر کیا گیا ہے۔ غیر وائرل ویکٹر، بشمول پلاسما سڈی این اے، لپڈ نیو پارٹیکلز، اور پولیمر پر مبنی کیریئرز، اکثر عارضی جین کے اظہار یا ایکس ویو جین کی ترسیل کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔ ویکٹرز کی مثال: سسٹک فائبروسس کے مریضوں میں جین تھراپی کے لیے کلینیکل ٹرائلز میں اڈینو وائرل ویکٹر استعمال کیے گئے ہیں۔ ایک مطالعہ میں، محققین نے سسٹک فائبروسس ٹرانس میمبرین کنڈکٹنس ریگولیٹر (CFTR) جین کی ایک فعال کاپی ایک اڈینو وائرل ویکٹر کا استعمال کرتے ہوئے ایڑوں کے اپیتھلم کو فراہم کی۔ اس نقطہ نظر کا مقصد CFTR فنکشن کو بحال کرنا اور سسٹک فائبروسس والے افراد میں پھیپھڑوں کے فنکشن کو بہتر بنانا ہے۔

❖ ایپلی کیشنز: جین تھراپی جینیاتی عوارض کی ایک وسیع رینج کے علاج کا وعدہ رکھتی ہے، بشمول مونوجینک امراض، کینسر، اور متعدی امراض۔ جین تھراپی ویکٹر کے ذریعے فراہم کیے جانے والے علاج کے جین بنیادی جینیاتی نقائص کو درست کر سکتے ہیں، سیلولر فنکشن کو بحال کر سکتے ہیں، یا مدافعتی رد عمل کو تبدیل کر سکتے ہیں۔ مختلف جانوروں کے ماڈلز اور انسانی مریضوں میں جین تھراپی کے طریقوں کی حفاظت اور افادیت کا جائزہ لینے کے لیے کلینیکل ٹرائلز جاری ہیں۔

10.3 پرونیوکلیر ٹرانسفر کا عمل (Process of Pronuclear Transfer)

1. Pronuclei کا مجموعہ: یہ عمل ڈونر ایسیریوز سے pronuclei کو جمع کرنے سے شروع ہوتا ہے۔ یہ جنین عام طور پر فریلا ٹرائزیشن کے فوراً بعد واحد خلیے کے مرحلے پر ہوتے ہیں۔
2. جینیاتی مواد کی ہیرا پھیری: مائیکروسرجیکل تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے، سائنسدان احتیاط سے ڈونر ایسیریوز سے پروونکلیس کو ہٹا سکتے ہیں۔ اس پروونکلیس میں عطیہ کرنے والے جاندار کا جینیاتی مواد (DNA) ہوتا ہے۔
3. وصول کنندہ ایسیریوز کی تیاری: اس کے ساتھ ہی، وصول کنندہ ایسیریوز تیار کیے جاتے ہیں۔ یہ ایسیریوز عام طور پر عطیہ دینے والے جاندار کے طور پر ایک ہی یا قریب سے متعلقہ نوع سے ہوتے ہیں۔ وصول کنندہ کے ایسیریوز سے پرونیوکلئی کو ہٹایا جاسکتا ہے یا اسے غیر فعال کیا جاسکتا ہے تاکہ عطیہ دہندگان کے لیے جگہ بنائی جاسکے۔
4. Pronuclei کی منتقلی: مطلوبہ جینیاتی مواد پر مشتمل pronucleus پھر وصول کنندہ ایسیریوز میں منتقل کیا جاتا ہے۔ یہ عام طور پر

مائیکرو انجیکشن سوئی کا استعمال کرتے ہوئے کیا جاتا ہے تاکہ احتیاط سے ڈونر پرونیوکلئس کو وصول کنندہ ایمبریو کے سائٹوپلازم میں داخل کیا جاسکے۔

5. پیوند کاری اور نشوونما: دوبارہ تعمیر شدہ جنین کو سروگیٹ ماؤں میں پیوند کیا جاتا ہے، جہاں وہ پیدائش تک نشوونما پاتے ہیں۔ اگر کامیاب ہو جاتا ہے تو، نتیجے میں پیدا ہونے والی اولاد عطیہ دہندگان سے جینیاتی مواد لے جائے گی۔

مثال: پرونیوکلئس ٹرانسفر کا استعمال کرتے ہوئے ٹرانسجینک چوہوں کی پیداوار: ڈولی دی بھیڑ کی پیداوار، جو کہ ایک بالغ سوئیٹک سیل سے کلون کیا گیا پہلا سنداری جانور ہے، جس میں سوئیٹک سیل نیوکلئس ٹرانسفر (SCNT) نامی تکنیک کا استعمال شامل ہے، جو کہ ایک قسم کی پرونیوکلئس ہے۔ منتقلی۔ پرونیوکلئس ٹرانسفر کا استعمال کرتے ہوئے ڈولی تیار کرنے میں شامل عمل کا تفصیلی جائزہ یہ ہے:

1. سیل کا انتخاب: یہ عمل ایک بالغ بھیڑ سے سوئیٹک سیل کے انتخاب کے ساتھ شروع ہوا۔ ڈولی کے معاملے میں، یہ خلیہ فن ڈور سیٹ بھیڑ کے مری غدد سے حاصل کیا گیا تھا۔

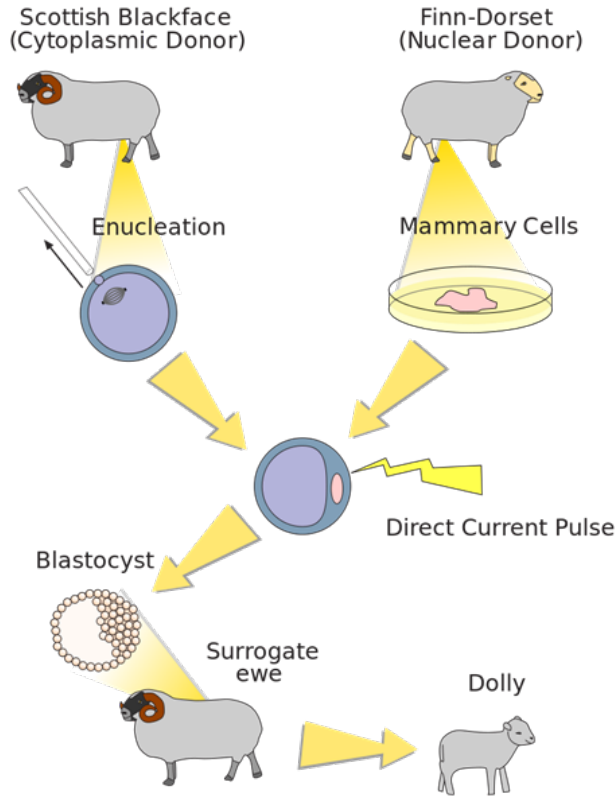
2. نیوکلئس کی تنہائی: منتخب سوئیٹک سیل کے نیوکلئس کو پھر مائیکرومینپولیشن تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے الگ تھلگ کیا گیا۔ اس نیوکلئس میں عطیہ کرنے والی بھیڑوں کا مکمل جینیاتی مواد (DNA) ہوتا ہے۔

3. انڈے کے خلیے کا انوکھیلیشن: اس کے ساتھ ہی، ایک انڈے کا خلیہ (oocyte) ایک اور بھیڑ سے حاصل کیا گیا اور اس کے مرکزے (pronucleus) کو ہٹا دیا گیا، جس سے ایک انوکھلیڈ انڈے کے خلیے کو چھوڑ دیا گیا۔

4. سوئیٹک سیل نیوکلئس اور انوکھلیڈ ایک کایوٹن: سوئیٹک سیل کے نیوکلئس کو پھر ہٹائے گئے پرونیوکلئس کی جگہ لے کر انوکھلیڈ انڈے کے خلیے میں داخل کیا گیا۔ اس قدم نے مؤثر طریقے سے جینیاتی مواد کے مکمل سیٹ کو سوئیٹک سیل سے انڈے کے خلیے میں منتقل کیا۔

5. دوبارہ تعمیر شدہ انڈے کا فعال ہونا: دوبارہ تعمیر شدہ انڈے، جو اب سوئیٹک سیل نیوکلئس پر مشتمل ہے، سیل کی تقسیم کو شروع کرنے اور جنین کی نشوونما کے عمل کو فعال کرنے کے لیے کیمیکلز یا برقی محرک سے علاج کیا گیا تھا۔

6. سروگیٹ مدر میں امپلائنٹیشن: دوبارہ تعمیر شدہ ایمبریو کو سروگیٹ مدر بھیڑ کے بچہ دانی میں پیوند کیا گیا، جس نے جنین کو مدت تک پہنچایا۔



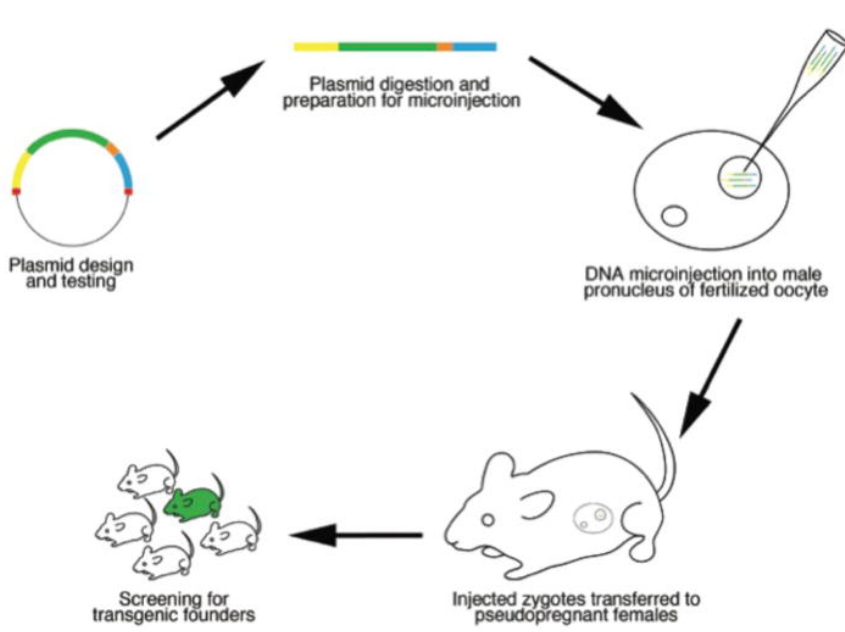
7. پیدائش اور تصدیق: عام حمل کے دورانیے کے بعد، ڈولی کی بھیڑ 5 جولائی 1996 کو پیدا ہوئی۔ جینیاتی جانچ نے اس بات کی تصدیق کی کہ ڈولی کا ڈی این اے سویٹک سیل ڈونر سے مماثل ہے، جو کامیاب کلوننگ کا ثبوت فراہم کرتا ہے۔

اہمیت: ڈولی کی پیدائش تولیدی حیاتیات کے شعبے میں ایک اہم سنگ میل کی حیثیت رکھتی ہے، جس نے پہلی بار یہ ظاہر کیا کہ ایک مکمل طور پر مختلف بالغ سویٹک سیل کو ایک مکمل جاندار میں نشوونما کرنے کے لیے دوبارہ پروگرام کیا جاسکتا ہے۔ اس پیش رفت نے کلوننگ ٹیکنالوجی میں مزید تحقیق کی راہ ہموار کی اور انسانی اور جانوروں کی فلاح و بہبود کے لیے کلوننگ کے مضمرات کے بارے میں اخلاقی اور معاشرتی سوالات اٹھائے۔

مثال: پرونیو کلیئر ٹرانسفر کا استعمال کرتے ہوئے ٹرانسجینک چوہوں کی پیداوار:

ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار میں پرونیو کلیئر ٹرانسفر کی ایک قابل ذکر مثال ٹرانسجینک چوہوں کی تخلیق ہے۔

1. دلچسپی کے جین کی شناخت: سائنسدان سب سے پہلے دلچسپی کے جین کی شناخت کرتے ہیں جسے وہ چوہوں میں متعارف یا تبدیل کرنا چاہتے ہیں۔ یہ جین کسی خاص پروٹین یا خاصیت کے لیے کوڈ کر سکتا ہے جس کا محققین مطالعہ کرنا چاہتے ہیں یا جوڑ توڑ کرنا چاہتے ہیں۔
2. Pronuclei کی تنہائی: Pronuclei کو فرٹیلائزڈ ماؤس ایمبریو سے الگ تھلگ کیا جاتا ہے جس میں جینیاتی تبدیلی کو متعارف کرایا جانا ہے۔ یہ جنین عام طور پر جنگلی قسم کے چوہوں کے ساتھ جینیاتی طور پر تبدیل شدہ چوہوں کے ملاپ کے ذریعے حاصل کیے جاتے ہیں۔
3. ہیرا پھیری اور منتقلی: مائیکرو انجیکشن تکنیک کا استعمال کرتے ہوئے، دلچسپی کے جین کو ماؤس ایمبریوز کے پرونیو کلی میں متعارف کرایا جاتا ہے۔ اس کے بعد جنین کو مزید نشوونما کے لیے سیوڈو حاملہ مادہ چوہوں کے بیضہ نالیوں میں منتقل کیا جاتا ہے۔



4. پیدائش اور اسکریننگ: اگر کامیاب ہو جائے تو، نتیجے میں پیدا ہونے والی اولاد میں سے کچھ مطلوبہ جینیاتی تبدیلی لے کر آئیں گی۔ ٹرانسجن کی موجودگی کی تصدیق کے لیے ان چوہوں کو مالیکیولر بائیولوجی تکنیک کا استعمال کرتے ہوئے اسکرین کیا جاتا ہے۔

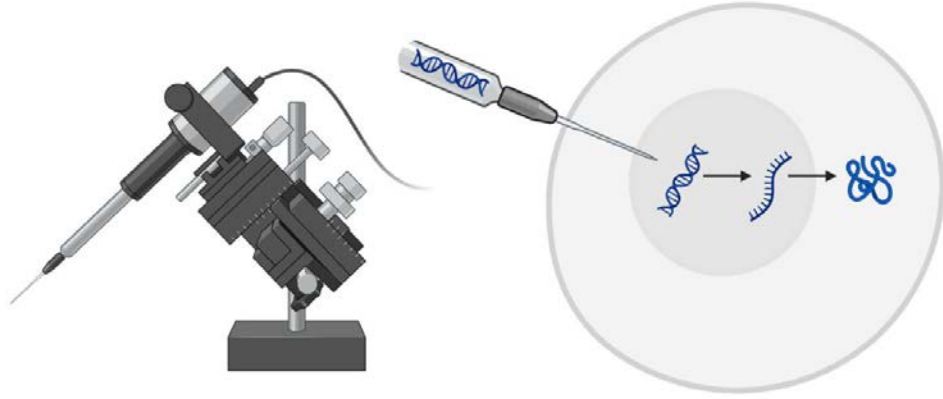
5. مزید افزائش اور تحقیق: ٹرانسجنک چوہوں کی مزید افزائش کی جاسکتی ہے تاکہ مطلوبہ جینیاتی تبدیلی کو لے کر مستحکم لائنیں قائم کی جاسکیں۔ یہ چوہے جین کے فنکشن، بیماری کے طریقہ کار، اور ممکنہ علاج کی مداخلتوں کا مطالعہ کرنے کے لیے قابل قدر ماڈل کے طور پر کام کرتے ہیں۔

10.4 مائکرو انجیکشن جین (Microinjection)

مائکرو انجیکشن جین کی منتقلی کے جسمانی طریقوں میں سے ایک ہے جو ڈی این اے یا دیگر جینیاتی مواد کو براہ راست ایک چھوٹی شیشے کی سوئی یا نائیکرو پیسپیٹ کا استعمال کرتے ہوئے سیل میں داخل کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

یہ طریقہ میزبان سیل کے جینوم میں مطلوبہ جینوں کی موثر منتقلی اور انضمام کی اجازت دیتا ہے۔ یہ مطلوبہ مواد کی ترسیل پر قطعی کنٹرول فراہم کرتا ہے اور اسے مختلف تحقیقی شعبوں میں ایک طاقتور ٹول بناتا ہے۔

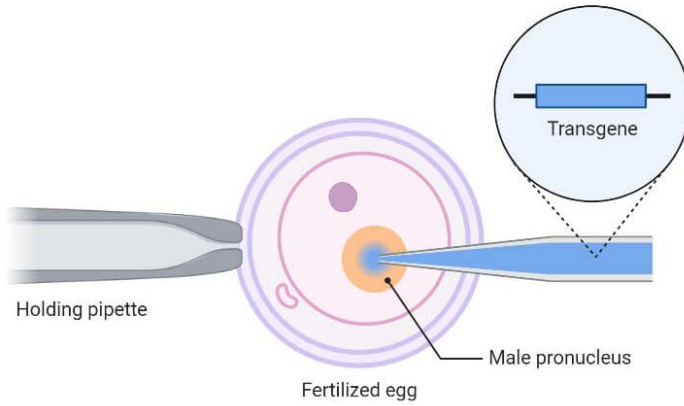
ڈاکٹر مارشل اے باربر نے 19 ویں صدی کے اوائل میں ڈی این اے مائیکرو انجیکشن کا تصور متعارف کرایا۔ اس کے بعد سے، یہ بائیومیڈیکل شعبوں میں ہونے والی پیشرفت کو برقرار رکھنے کے لیے مسلسل تیار ہوا ہے۔ اس میں متنوع شعبوں میں اپیلی کیشنز ہیں جیسے ٹرانسجینکس، جانوروں کی کلوننگ، انسانی بانجھ پن کا علاج، جینیاتی انجینئرنگ، اور جینوم ایڈیٹنگ۔



10.4.1 مائیکرو انجیکشن کا اصول (Principle of Microinjection)

مائیکرو انجیکشن کا اصول جینیاتی مواد کی براہ راست انفرادی خلیات میں شیشے کی ایک سوئی کا استعمال کرتے ہوئے جس کو مائیکرو پیپیٹ کہا جاتا ہے، ایک پوزیشننگ ڈیوائس جسے مائیکرو ویہ نیپلیٹر کہا جاتا ہے، اور ایک مائیکرو انجیکٹر پر مبنی ہے۔ یہ عمل ایک طاقتور خوردبین کے

Transgene Microinjection



تحت کیا جاتا ہے۔ جینیاتی مواد کو ہائیڈروسٹیک دباؤ لگا کر سیل میں پہنچایا جاتا ہے تاکہ ڈی این اے پر مشتمل مائع کو مائیکرو پیپیٹ کے ذریعے خارج کیا جاسکے۔ مائیکرو پیپیٹ کا چھوٹا قطر اور مائیکرو ویہ نیپلیٹر کے ذریعے فعال کردہ درست حرکتیں مطلوبہ مواد کی درست ترسیل کی اجازت دیتی ہیں۔

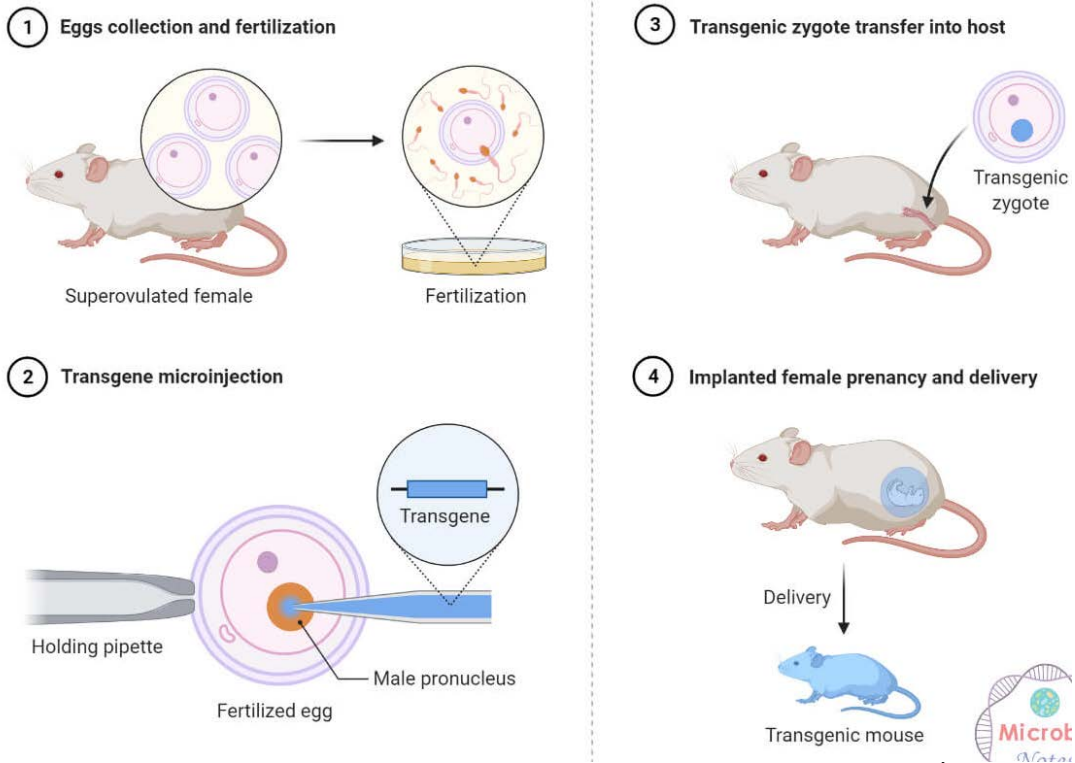
10.4.2 مائیکرو انجیکشن میں اقدامات (Steps in Microinjection)

1. سب سے پہلے، شیشے کی مائیکرو پائپٹ یا سوئی کو شیشے کو گرم کر کے اور کھینچ کر تیار کیا جاتا ہے تاکہ گرم سرے پر ایک عمدہ نوک بن سکے۔ نتیجے میں ٹپ کا سائز عام طور پر تقریباً 0.5 ملی میٹر قطر کا ہوتا ہے، انجیکشن کی سوئی سے مشابہ۔
2. مائیکرو انجیکشن کا استعمال کرتے ہوئے غیر ملکی مواد کی ترسیل کا پورا عمل درست ہیرا پھیری اور مشاہدے کے لیے ایک طاقتور خوردبین کے تحت انجام دیا جاتا ہے۔
3. مائیکرو انجیکشن کے لیے خلیات ایک کنٹینر میں رکھے جاتے ہیں۔
4. ایک ہولڈنگ پائپٹ ہدف سیل کے قریب رکھی گئی ہے۔ یہ انجیکشن کے عمل کے دوران سیل کو پکڑنے کے لیے نرم سکشن کا استعمال کرتا ہے۔

6. مائیکروپسپیٹ، مطلوبہ مواد پر مشتمل ہے، ایک مائیکروہنیپلٹر پر نصب ہے، جو پائپٹ کی درست پوزیشننگ اور حرکت کی اجازت دیتا ہے۔ مائیکروپسپیٹ کو سیل کے قریب نیچے کیا گیا ہے۔

7. جینیاتی مواد کے ہدف کے مقام کے لحاظ سے مائیکروپائپٹ کو احتیاط سے سیل کی جھلی میں، یا تو سائٹوپلازم یا نیوکلیئس میں داخل کیا جاتا ہے۔ مائیکروپسپیٹ کے مواد کو پھر ایک مائیکروانجیکٹر کا استعمال کرتے ہوئے ہائڈروسٹینک پریشر لگا کر سیل میں داخل کیا جاتا ہے۔ دباؤ جینیاتی مواد پر مشتمل سیال کو مائیکروپسپیٹ کے ذریعے سیل میں چھوڑنے پر مجبور کرتا ہے۔

8. سیل میں مواد پہنچانے کے بعد، خالی مائیکروپسپیٹ سوئی کو آہستہ آہستہ اور احتیاط سے سیل سے نکالا جاتا ہے، جس سے سیل اور اس کی جھلی کو پہنچنے والے نقصان کو کم کیا جاتا ہے۔ مناسب تکنیک اور اعلیٰ معیار کے مائیکروپسپیٹس اس مرحلے کے دوران سیل کی موت کو کم کرنے میں مدد کرتے ہیں۔



10.4.3 مائیکروانجیکشن کی ایپلی کیشنز (Application of Microinjection)

مائیکروانجیکشن کے کچھ بڑے استعمال یہ ہیں:

❖ مائیکروانجیکشن عام طور پر ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار میں استعمال کیا جاتا ہے، غیر ملکی ڈی این اے کو فریڈائزڈ انڈوں میں متعارف کروانے کے لیے جین کے کام کا مطالعہ کرنے اور بیماری کے ماڈل بنانے کے لیے۔

❖ مائیکروانجیکشن کا استعمال پہلے chimeric transgenic چھپے پیدا کرنے کے لیے کیا گیا تھا۔ چائمری جانور جنین کی نشوونما، ٹشو ٹرانسپلانٹیشن، اور سیل نسب کو سمجھنے میں مفید رہے ہیں۔

- ❖ وٹروفریلارزیشن کے میدان میں، مائیکرو انجیکشن کا استعمال انٹراسیٹوپلازمک سپرم انجیکشن (ICSI) میں کیا جاتا ہے، جو مردانہ بانجھ پن کے معاملات میں کامیاب فریڈلارزیشن کی اجازت دیتا ہے، اور حمل اور صحت مند پیدائش کا باعث بنتا ہے۔ ICSI میں، حرکت پذیری کے نقائص کے ساتھ انفرادی سپرم کو براہ راست الگ تھلگ oocytes میں مائیکرو انجیکٹ کیا جاتا ہے۔
- ❖ مائیکرو انجیکشن کو سویٹک سیل نیوکلیر ٹرانسفر (SCNT) میں بھی استعمال کیا جاتا ہے تاکہ کسی جاندار کی جینیاتی طور پر یکساں کاپیاں پیدا کی جاسکیں جو ایک انوکلیڈ oocyte میں سویٹک سیل کو منتقل کر کے۔
- ❖ مائیکرو انجیکشن کو مختلف مطالعات میں بڑے پیمانے پر استعمال کیا گیا ہے، بشمول انسانی لمبر یوریرس جیچ اور مائٹوٹک سیلز کا انجیکشن۔
- ❖ نیوروسائنس میں، مائیکرو انجیکشن بنیادی ثقافتی انسانی نیوران کے ساتھ کام کرنے، پروٹین، پیپٹائڈس، اور سی ڈی این اے کو انسانی نیوران کے سائٹوسول میں فراہم کرنے کے لیے مفید ہے جو کہ دوسری جین کی منتقلی کی تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے انجام دینا مشکل ہے۔

10.5 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

- ❖ اس اکائی کے مطالعے بعد طلباء آسانی سے بیان کر سکتے ہیں:
- ❖ جینیاتی ہیرا پھیری کے اصولوں کی وضاحت کریں جن میں جین کی منتقلی، جین ایڈیٹنگ، اور جین ایکسپریشن ریگولیشن کے تصورات شامل ہیں۔
- ❖ جانوروں میں جینیاتی انجینئرنگ کے طریقوں کی وضاحت کریں جو جانوروں کی جینیاتی انجینئرنگ میں شامل طریقہ کار ہیں، جس میں پرونیوکلیر ٹرانسفر اور مائیکرو انجیکشن تکنیکوں پر توجہ دی جاتی ہے۔
- ❖ کلون شدہ اور ٹرانسجینک جانوروں کی اپیلی کیشنز پر تبادلہ خیال کریں: طلباء کلون اور ٹرانسجینک جانوروں کی متنوع اپیلی کیشنز کو مختلف شعبوں جیسے زراعت، طب، بائیو ٹیکنالوجی، اور بنیادی تحقیق میں دریافت کریں گے۔

10.6 کلیدی الفاظ (Keywords)

مطلوبہ خصلتوں کے ساتھ جینیاتی طور پر تبدیل شدہ حیاتیات (GMOs) بنانے کے لیے کسی جاندار کے جینوم میں خارجی DNA کو متعارف کرانے کا عمل۔

Trangensis

ٹرانس جینیسیس

ایک جینیاتی انجینئرنگ تکنیک جس کا استعمال کسی مخصوص جین کو غیر فعال یا "ناک آؤٹ" کرنے کے لیے کیا جاتا ہے جس میں تغیرات متعارف کرائے جاتے ہیں جو اس کے کام میں خلل ڈالتے ہیں۔

Knockout

ناک آؤٹ

سومٹک سیل نیوکلیر ٹرانسفر (SCNT): ایک کلوننگ تکنیک جس میں ایک
Somatic Nuclear Cell Transfer (SCNT)
سومٹک سیل نیوکلئس کی ایک انوکلیدڈ oocyte میں منتقلی شامل ہوتی ہے
تاکہ جینیاتی طور پر ایک جیسے جاندار تخلیق کیے جاسکیں۔

10.7 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

10.7.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. _____ سے مراد باپوٹیکنا لوجیکل تکنیکیوں کا استعمال کرتے ہوئے جاندار کے جینیاتی مواد کی جان بوجھ کر تبدیلی ہے۔
2. مائیکرو انجیکشن کے دوران، ایک شیشے کی سوئی کا استعمال ایک محلول کو انجیکشن کرنے کے لیے کیا جاتا ہے جس میں مطلوبہ ڈی این اے کی ساخت براہ راست ایک فریٹلائزڈ انڈے کے _____ میں داخل ہوتی ہے۔
3. ڈی این اے کی موجودگی میں خلیات یا جنین پر مختصر برقی دالیں لگانا شامل ہے، جس سے خلیے کی جھلی میں عارضی چھیدوں کی تشکیل ہوتی ہے۔
4. وائرل ویکٹر، جیسے کہ ریٹرو وائرس اور لینٹو وائرس، عام طور پر جینیاتی ہیرا پھیری کے لیے استعمال ہوتے ہیں کیونکہ ان کے جینیاتی مواد کو _____ میں ضم کرنے کی صلاحیت ہوتی ہے۔
5. ناک آؤٹ اور ناک آؤٹ حکمت عملی اکثر _____ پر انحصار کرتی ہے، یہ ایک ایسا عمل ہے جہاں خلیات یا ایسبریو میں متعارف کرایا جانے والا خارجی ڈی این اے اینڈو جینس جینومک ترتیب کے ساتھ دوبارہ مل جاتا ہے۔
6. ایسبریو ناک اسٹیم سیزلر pluripotent (ESCs) خلیات ہیں جو بلاسٹوسٹس کے اندرونی خلیے سے ماخوذ ہوتے ہیں اور _____ تکنیکوں کے ذریعے جینیاتی طور پر ہیرا پھیری کی جاسکتی ہے۔
7. CRISPR/Cas9 سسٹمز ایک سنگل گائیڈ RNA (sgRNA) کا استعمال کرتے ہیں تاکہ Cas9 endonuclease کو _____ کے تکمیلی مخصوص DNA ترتیبوں کی طرف لے جائیں۔
8. سومٹک سیل نیوکلیر ٹرانسفر (SCNT) میں عطیہ کرنے والے جانور سے سومٹک سیل کا الگ تھلگ ہونا، وصول کنندہ جانور سے ایک oocyte کا انوکلیدیشن، اور _____ کے ساتھ سومٹک سیل نیوکلئس کا فیوژن شامل ہے۔
9. RNA مداخلت (RNAi) میں خلیات میں دوہرے پھنسے ہوئے RNA (dsRNA) یا مالیکولز کا تعارف شامل ہوتا ہے، جو چھوٹے مداخلت کرنے والے RNAs (siRNAs) یا چھوٹے ہیزرپین RNAs (shRNAs) میں پروسیس ہوتے ہیں جو RNA- _____ حوصلہ افزائی سائٹنگ کمپلیکس (RISC) کی تکمیل کے لیے رہنمائی کرتے ہیں۔
10. مائیکرو انجیکشن عام طور پر ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار میں استعمال کیا جاتا ہے، غیر ملکی ڈی این اے کو فریٹلائزڈ انڈوں میں متعارف کروانے کے لیے جین کے افعال کا مطالعہ کرنے اور _____ تخلیق کرنے کے لیے۔

10.7.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. جینیاتی ہیرا پھیری میں مائیکرو انجیکشن کا مقصد کیا ہے؟
2. مائیکرو انجیکشن کے پیچھے اصول بیان کریں۔
3. وضاحت کریں کہ جینیاتی ہیرا پھیری میں CRISPR/Cas9 سسٹم کیسے کام کرتے ہیں۔
4. تولیدی حیاتیات کے شعبے میں ڈولی دی بھیڑ کی کیا اہمیت ہے؟

10.7.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار میں پرونیوکلیر ٹرانسفر کے عمل کی وضاحت کریں، اس میں شامل ہر ایک قدم اور جینیاتی ہیرا پھیری میں اس کی اہمیت کو بیان کریں۔
2. جانوروں کی جینیاتی ہیرا پھیری میں ان کے میکازم، اپیلی کیشنز، اور حدود کے لحاظ سے ٹرانسجینیسیس، ناک آؤٹ اور ناک ان، CRISPR/Cas9، اور somatic cell نیوکلیر ٹرانسفر (SCNT) کے طریقوں کا موازنہ اور ان کے برعکس کریں۔
3. جینیاتی ہیرا پھیری میں مائیکرو انجیکشن کی اپیلی کیشنز پر تبادلہ خیال کریں، بشمول ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار، وٹرو فرٹیلائزیشن، سویٹک سیل نیوکلیر ٹرانسفر، اور نیوروسائنس ریسرچ میں اس کا کردار۔
4. جینیاتی ہیرا پھیری میں RNA مداخلت (RNAi) کی اہمیت کو بیان کریں، اس کے عمل کے طریقہ کار کا خاکہ، جانوروں کے ماڈلز میں استعمال، اور ممکنہ علاج کے مضمرات۔

10.8 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Homologous Recombination	-	ہومولوگس ریکمبائنیشن	ایک جینیاتی دوبارہ ملاپ کا عمل جو ڈی این اے کی ایک جیسی یا ایک جیسی ترتیب کے درمیان ہوتا ہے، جس سے جینیاتی مواد کا تبادلہ ہوتا ہے اور دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے مالیکیولز کی تشکیل ہوتی ہے۔
Embryonic Stem Cells (ESCs)		ایمبریونک اسٹیم سیلز	بلاسٹوسٹس کے اندرونی خلیے سے اخذ کردہ Pluripotent خلیات جو مختلف خلیوں کی اقسام میں

فرق کرنے کی صلاحیت رکھتے ہیں اور جن کا استعمال
جینیاتی ہیرا پھیری اور تحقیقی مقاصد کے لیے کیا جاتا ہے۔

ایک حیاتیاتی عمل جس میں دوہرے پھنسے ہوئے RNA	RNA	RNA
مالیکیول انحطاط یا ترجمہ جبر کے لیے تکمیلی mRNA	مداخلت	Interference
مالیکیولز کو نشانہ بنا کر مخصوص جینز کے اظہار کو خاموش کر دیتے ہیں۔	:(RNAi)	(RNAi)

10.9 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Clark, A. J., & Coward, K. (Eds.). (2015). Transgenesis Techniques: Principles and Protocols (3rd ed.). Humana Press.
2. Liu, P., & Kaufman, R. J. (Eds.). (2018). Molecular Biology of the Cell (6th ed.). Garland Science.
3. Carroll, D. (2016). The CRISPR/Cas9 System: Methods and Protocols. Springer.
4. Lanza, R. P., Cibelli, J. B., & West, M. D. (Eds.). (2016). Principles of Cloning (3rd ed.). Academic Press.

اکائی 11: ٹرانسجین ٹرانسمیشن کے لیے ایمبریونک اسٹیم سیلز اور ریٹرو وائرل ویکٹر

(Embryonic Stem Cells and Retroviral Vectors for Transgene Transmission)

اکائی کے اجزا

تمہید (Introduction)	11.0
مقاصد (Objectives)	11.1
ایمبریونک اسٹیم سیل (Embryonic Stem Cells)	11.2
ایمبریونک اسٹیم سیلز کی تبدیلی (Embryonic Stem Cell Transgenesis)	11.2.1
ٹرانسجینیسس کے لئے ریٹرو وائرل ویکٹر (Retroviral Vector for Transgenesis)	11.3
ٹرانسمیشن کا طریقہ کار (Mechanism of Transmission)	11.3.1
ٹرانسمیشن کو متاثر کرنے والے عوامل (Factors Influencing Transmission)	11.3.2
اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)	11.4
کلیدی الفاظ (Keywords)	11.5
نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)	11.6
معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)	11.6.1
مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)	11.6.2
طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)	11.6.3
فرہنگ (Glossary)	11.7
مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)	11.8

11.0 تمہید (Introduction)

جینیاتی انجینئرنگ کے وسیع منظر نامے میں، برائن اسٹیم سیلز اور ریٹرو وائرل ویکٹرز کا استعمال جدت طرازی کا ایک سنگ بنیاد ہے، جس نے مختلف شعبوں میں، تخلیق نوکی دوائی سے لے کر جین تھراپی تک اپیلی کیشنز کی ایک بڑی تعداد کا وعدہ کیا ہے۔ یہ باب جینیاتی ہیرا پھیری اور علاج کی ترقی کے صف اول کو روشن کرتے ہوئے، ٹرانسجینز کی منتقلی کے لیے جنین کے اسٹیم سیلز اور ریٹرو وائرل ویکٹرز کے استعمال

میں شامل پیچیدہ میکانزم اور امید افزا صلاحیتوں کا ذکر کرتا ہے۔

ایمبریونک اسٹیم سیلز، جو مختلف قسم کے خلیات میں فرق کرنے کی قابل ذکر صلاحیت سے مالا مال ہیں، نے سائنس دانوں اور طبی محققین کو بافتوں کی تخلیق نو اور بیماری کے علاج کے لیے ان کی بے پناہ صلاحیتوں سے یکساں طور پر مسحور کیا ہے۔ اسٹیم سیل ریسرچ نے ذاتی نوعیت کی دوائیوں کے ایک نئے دور کا آغاز کیا ہے، جو کہ موزوں علاج اور دوبارہ تخلیقی مداخلتوں کے لیے پریشان کن امکانات پیش کرتا ہے۔ جنین اسٹیم سیلز کی pluripotent فطرت کو استعمال کرتے ہوئے، سائنسدانوں کا مقصد سیلولر تفریق اور بافتوں کی نشوونما کے رازوں کو کھولنا ہے، جس سے کمزور بیماریوں اور زخموں کے علاج کے لیے نئے طریقوں کی راہ ہموار ہوتی ہے۔

جینیاتی تبدیلیوں کے پھیلاؤ کا مرکز ریٹرو وائرل ویکٹرز کا ہوشیار استعمال ہے، جدید ترین گاڑیاں جو درستی اور کارکردگی کے ساتھ میزبان خلیوں میں ٹرانسجینز لے جانے کی صلاحیت رکھتی ہیں۔ ریٹرو وائرس، اپنے مخصوص ریورس ٹرانسکریپٹس انزائم سے لیس، اپنے جینیاتی مواد کو میزبان جینوم میں ضم کرتے ہیں، غیر ملکی جینوں کے مستحکم اور وراثتی اظہار کو قابل بناتے ہیں۔ ریٹرو وائرل ویکٹرز کے اسٹریٹجک ہیرا پھیری کے ذریعے، محققین مطلوبہ جینیاتی ترتیب کو ہدف کے خلیات میں متعارف کروا سکتے ہیں، علاج یا تحقیقی مقاصد کے لیے درست جینیاتی تبدیلیوں کو ترتیب دے سکتے ہیں۔

تاہم، برائن اسٹیم سیلز اور ریٹرو وائرل ویکٹرز کی وسیع صلاحیت کے ساتھ ساتھ، چیلنجز اور اخلاقی تحفظات بھی بہت زیادہ ہیں۔ جنین اسٹیم سیلز کے استعمال سے متعلق اخلاقی بحثیں اخلاقی مضمرات اور ریگولیٹری فریم ورک پر سوچ سمجھ کر غور کرنے کی ضرورت پر زور دیتی ہیں۔ مزید برآں، ریٹرو وائرل ویکٹر کی ثالثی والے جین کی ترسیل سے وابستہ ممکنہ خطرات، جیسے کہ داخلی تبدیلی اور مدافعتی رد عمل، باریک بینی سے جانچ پڑتال اور خطرے کو کم کرنے کی چوکس حکمت عملیوں کی ضرورت ہے۔

جب ہم ایمبریونک اسٹیم سیلز اور ریٹرو وائرل ویکٹرز کی پیچیدگیوں کے ذریعے سفر شروع کرتے ہیں، تو یہ ضروری ہے کہ اخلاقی، سائنسی، اور عملی غور و فکر کے پیچیدہ خطوں کو سمجھداری اور دوراندیشی کے ساتھ نیویگیٹ کریں۔ ٹرانسجین ٹرانسمیشن کے بنیادی میکانزم کو واضح کرتے ہوئے اور ان جدید ٹیکنالوجیز کے علاج معالجے کی تلاش کرتے ہوئے، ہم جینیاتی ہیرا پھیری کے اسرار کو کھولنے اور تبدیلی کی طبی مداخلتوں کے ادراک کی طرف نئے راستے بنانے کی کوشش کرتے ہیں۔

جامع ریسرچ اور سخت انکوائری کے ذریعے، یہ باب جنین کے اسٹیم سیلز اور ریٹرو وائرل ویکٹرز کی تبدیلی کی صلاحیت پر روشنی ڈالنے کی کوشش کرتا ہے جو کہ جینیاتی انجینئرنگ اور علاج کی اختراع کے مستقبل کے منظر نامے کو تشکیل دیتا ہے۔

11.1 مقاصد (Objectives)

اس یونٹ کے اپنے مطالعہ کے اختتام پر، آپ کو قابل ہونا چاہیے:-

❖ ریٹرو وائرل ویکٹر میڈیٹڈ ٹرانسجین ٹرانسمیشن کو سمجھیں اور اس کی وضاحت کریں۔

- ❖ ایسٹیم سیلز کی تفریق کی صلاحیتوں کی وضاحت کریں۔
- ❖ ان ٹیکنالوجیز سے وابستہ اخلاقی تحفظات اور خطرات کا تجزیہ کریں۔
- ❖ جینیاتی انجینئرنگ اور تھراپی میں جنین اسٹیم سیلز اور ریٹرو وائرل ویکٹر کی تبدیلی کی صلاحیت کی وضاحت کریں۔

11.2 ایسٹیم سیل (Embryonic Stem Cells)

ایسٹیم سیلز (ESCs) جدید بائیو ٹیکنالوجی میں سب سے آگے ہیں، جو کلوننگ اور ٹرانسجینک آرگنزم کی پیداوار کے دائروں میں بہت سارے امکانات پیش کرتے ہیں۔ ان کی منفرد خصوصیات، بشمول pluripotency اور خود تجدید کی صلاحیت، انہیں جانداروں کے جینیاتی میک اپ کو درستی اور کارکردگی کے ساتھ جوڑنے کے لیے ناگزیر اوزار فراہم کرتی ہے۔ اس نوٹ میں ESC کے استعمال کی پیچیدگیوں کا ذکر کیا گیا ہے، کلوننگ اور ٹرانسجینک جانداروں کی تخلیق میں ان کے متنوع اپیلی کیشنز کی تلاش کے ساتھ ساتھ متعلقہ چیلنجز اور اخلاقی تحفظات بھی شامل ہیں۔

کلوننگ، جینیاتی طور پر ایک جیسے جاندار بنانے کا عمل، ESCs کے اسٹریٹجک انضمام کے ذریعے اہم پیشرفت دیکھی ہے۔ سب سے نمایاں تکنیکوں میں سے ایک، سویٹک سیل نیوکلیر ٹرانسفر (SCNT)، کلوننگ کی بنیاد کے طور پر ESCs پر انحصار کرتی ہے۔ SCNT میں، ایک سویٹک سیل کا مرکزہ ایک انوکلیڈ انڈے کے خلیے میں منتقل ہوتا ہے، جس سے کلون شدہ ایسٹیم سیلز پیدا ہوتا ہے۔ ESCs کلون شدہ جاندار کی نشوونما کے لیے ضروری pluripotent خلیات کے ماخذ کے طور پر کام کرتے ہیں۔ یہ تکنیک زرعی مقاصد کے لیے موشیوں کے جانوروں سے لے کر بائیومیڈیکل ریسرچ کے لیے لیبارٹری کے جانوروں تک مختلف انواع میں کامیابی کے ساتھ لاگو کی گئی ہے۔ ESCs نہ صرف کلون شدہ جانداروں کی تخلیق میں سہولت فراہم کرتے ہیں بلکہ ترقیاتی حیاتیات اور بیماری کی ماڈلنگ کے بارے میں بصیرت بھی پیش کرتے ہیں۔

غیر ملکی چین یا جینیاتی تبدیلیوں کے اظہار کے لیے جینیاتی طور پر تبدیل شدہ ٹرانسجینک جاندار، ایک دوسرے ڈومین کی نمائندگی کرتے ہیں جہاں ESCs اہم کردار ادا کرتے ہیں۔ ESCs میں ٹرانسجینز کو متعارف کروا کر، محققین موزوں جینیاتی خصلتوں کے ساتھ حیاتیات پیدا کر سکتے ہیں، جس میں پودوں میں بیماری کے خلاف مزاحمت سے لے کر جانوروں میں علاج کے پروٹین کی تیاری تک شامل ہیں۔ ESCs جینیاتی مواد کے عین مطابق ہیرا پھیری کے لیے ایک ورثا نسل پلیٹ فارم مہیا کرتی ہے، جس سے مطلوبہ فینوٹائپک خصوصیات کے ساتھ ٹرانسجینک جانداروں کی تخلیق ممکن ہوتی ہے۔ اس ٹیکنالوجی نے زراعت، ادویات اور بائیوفارماسیوٹیکل پروڈکشن جیسے شعبوں میں انقلاب برپا کر دیا ہے، جو فصلوں کی پیداوار کو بہتر بنانے، بیماریوں کے طریقہ کار کا مطالعہ کرنے، اور نئے علاج تیار کرنے کے لیے نئی راہیں پیش کرتے ہیں۔

کلوننگ اور ٹرانسجینک آرگنزم کی پیداوار میں ESCs کی بے پناہ صلاحیت کے باوجود، کئی چیلنجز اور اخلاقی تحفظات برقرار ہیں۔ کم کارکردگی اور جینیاتی عدم استحکام سمیت تکنیکی رکاوٹیں ان تکنیکوں کو وسیع پیمانے پر اپنانے میں اہم رکاوٹیں کھڑی کرتی ہیں۔ مزید برآں، انسانی ESCs کے

استعمال سے متعلق اخلاقی بحثیں جینیاتی ہیرا پھیری کے اخلاقی اثرات اور انسانی وقار کے تحفظ کے بارے میں پیچیدہ سوالات اٹھاتی ہیں۔

11.2.1 ایمبریونک اسٹیم سیلز کی تبدیلی (Embryonic Stem Cell Transgenesis)

جنین اسٹیم سیلز پر مشتمل ٹرانسجینیسیس جینیاتی انجینئرنگ میں ایک جدید نقطہ نظر کی نمائندگی کرتا ہے، جس میں تحقیق اور علاج کے استعمال دونوں کے لیے بہت زیادہ وعدہ ہے۔ اس تکنیک میں غیر ملکی جینیاتی مواد کو متعارف کرانا شامل ہے، جسے ٹرانسجینز کے نام سے جانا جاتا ہے، مخصوص جینیاتی تبدیلیوں کو آمادہ کرنے اور سیلولر رویے میں ہیرا پھیری کے لیے برانن اسٹیم سیلز میں متعارف کرانا شامل ہے۔

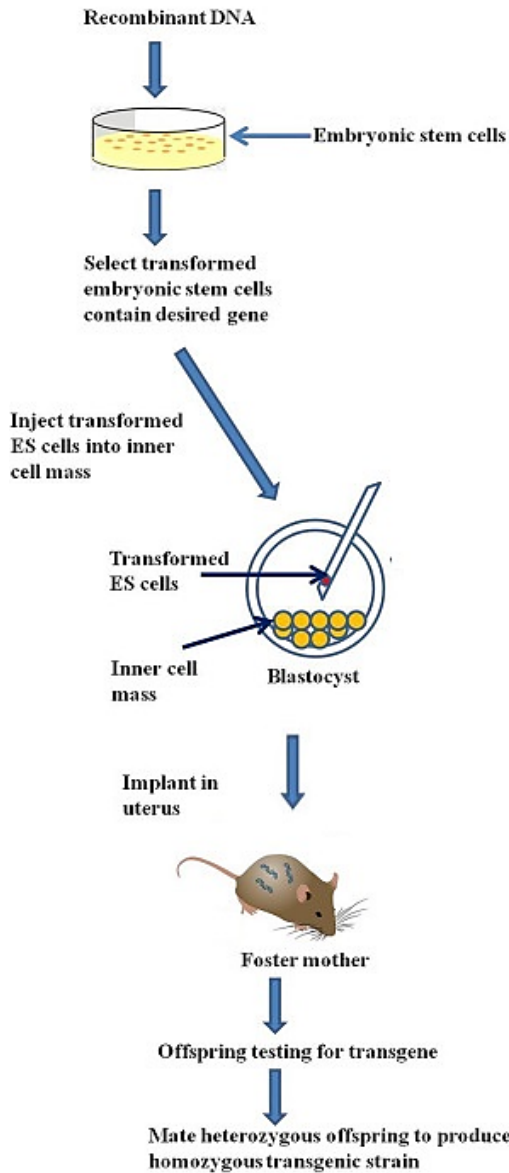
جنین اسٹیم سیلز کے ساتھ ٹرانس جینیسیس کی ایک تفصیلی مثال میں جینیاتی طور پر تبدیل شدہ چوہوں کی تخلیق شامل ہے۔ سائنسدان سب سے پہلے ابتدائی نشوونما کے مرحلے میں ماؤس ایمبریو سے ایمبریونک اسٹیم سیلز کو الگ کرتے ہیں۔ یہ خلیات قابل ذکر pluripotency کے مالک ہیں، یعنی وہ مختلف سیل اقسام میں فرق کر سکتے ہیں۔ اس کے بعد محققین ریٹرو وائرل ویکٹرز یا جین کی ترسیل کے دیگر طریقوں کا استعمال کرتے ہوئے ان ایمبریونک اسٹیم سیلز میں دلچسپی کا ایک ٹرانسجن متعارف کراتے ہیں۔

مثال

مثال کے طور پر، فرض کریں کہ سائنسدانوں کا مقصد کینسر کی نشوونما میں ایک خاص جین کے کردار کا مطالعہ کرنا ہے۔ وہ ماؤس ماڈل بنانے کے لیے جنین اسٹیم سیلز میں ایک آنکو جین کو انکوڈ کرتے ہوئے ایک ٹرانسجن داخل کر سکتے ہیں جس کا کینسر ہونے کا خدشہ ہے۔ متبادل طور پر، وہ ٹریکنگ کے مقاصد کے لیے مخصوص سیل کی آبادی کو لیبل کرنے کے لیے فلوروسینٹ پروٹین کو انکوڈنگ کرنے والا ٹرانسجن متعارف کروا سکتے ہیں۔

ایک بار جب ٹرانسجن کامیابی کے ساتھ برانن اسٹیم سیل جینوم میں ضم ہو جاتا ہے، محققین ان خلیوں کو مخصوص حالات کے تحت کاشت کرتے ہیں تاکہ ان کے فرق کو مطلوبہ سیل کی اقسام، جیسے نیوران، پٹھوں کے خلیات، یا لبلبے کے پیٹا خلیات میں پیدا کیا جاسکے۔ یہ جینیاتی طور پر تبدیل شدہ خلیات پھر مختلف مقاصد کے لیے استعمال کیے جاسکتے ہیں، بشمول بیماری کی ماڈلنگ، منشیات کی دریافت، اور دوبارہ پیدا کرنے والی دوا۔

جنین اسٹیم سیلز سے تیار ہونے والے ٹرانسجینک جاندار کی ایک قابل ذکر مثال OncoMouse ہے، جسے ہارورڈ ماؤس یا انسانی کینسر کے لیے ماؤس



ماڈل بھی کہا جاتا ہے۔ اس ٹرانسجینک ماؤس کو 1980 کی دہائی کے آخر میں ہارورڈ یونیورسٹی کے محققین نے ڈاکٹر فلپ لیڈر اور ڈاکٹر ٹو تھی سٹیورٹ کی قیادت میں بنایا تھا۔

OncoMouse کو ایک مخصوص ٹرانسجین لے جانے کے لیے بنایا گیا تھا جسے "ماؤس میمری ٹیومر وائرس" (MMTV) پر موٹر کے ساتھ مل کر c-myc نامی آنکو جین کے نام سے جانا جاتا ہے۔ ایم ایم ٹی وی پر موٹر ڈی این اے کا ایک سلسلہ ہے جو خاص طور پر میمری غدود میں جین کے اظہار کو چلاتا ہے۔ c-myc oncogene، جب زیادہ متاثر ہوتا ہے، سیل کی بے قابو نشوونما کو فروغ دینے کے لیے جانا جاتا ہے اور اس کا تعلق چھاتی کے کینسر سمیت مختلف کینسروں سے ہوتا ہے۔

چوہوں کے ایسبر یونک اسٹیم سیلز کو جینیاتی طور پر MMTV-c-myc ٹرانسجین کو اپنے جینوم میں ریٹرو وائرل ویکٹر کا استعمال کرتے ہوئے متعارف کروا کر تبدیل کیا گیا۔ ان ترمیم شدہ ایسبر یونک اسٹیم سیلز کو پھر ابتدائی مرحلے کے ماؤس ایسبر یوز میں انجکشن لگایا گیا تھا، جنہیں بلاسٹوسٹس کہا جاتا ہے، جو بعد میں سروگیٹ مادہ چوہوں میں لگائے گئے تھے۔

ان سروگیٹ چوہوں کے نتیجے میں پیدا ہونے والی اولاد نے ٹرانسجین کو اپنے جینوم میں لے لیا، جس سے خاص طور پر ان کے میمری غدود میں c-myc oncogene کے اظہار کی اجازت دی گئی۔ نتیجے کے طور پر، ان چوہوں نے ایک اعلیٰ تعدد پر میمری ٹیومر تیار کیے، جو کینسر کی نشوونما کے طریقہ کار کا مطالعہ کرنے اور ممکنہ علاج کی مداخلتوں کی جانچ کے لیے ایک قابل قدر ماڈل فراہم کرتے ہیں۔

OncoMouse کینسر کی حیاتیات کے بارے میں ہماری سمجھ کو آگے بڑھانے میں اہم کردار ادا کرتا رہا ہے اور اسے دنیا بھر میں کینسر ریسرچ لیبارٹریوں میں بڑے پیمانے پر استعمال کیا جاتا رہا ہے۔ اس نے کینسر کے نئے علاج کی نشوونما اور جانچ میں سہولت فراہم کی ہے اور کینسر کی انفرادی اقسام کے مطابق ذاتی نوعیت کے ادویات کے طریقوں کی ترقی میں اہم کردار ادا کیا ہے۔ مزید برآں، OncoMouse نے کینسر کے دیگر پہلوؤں جیسے میٹاسٹیسس اور ٹیومر امیونولوجی کے مطالعہ کے لیے ایک ماڈل کے طور پر کام کیا ہے۔

11.3 ٹرانسجینسیس کے لئے ریٹرو وائرل ویکٹر (Retroviral Vector for Transgenesis)

ریٹرو وائرل ویکٹر ایسے اوزار ہیں جو جین تھراپی میں علاج کے جین کو ہدف کے خلیوں میں پہنچانے کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔ یہ ویکٹر ریٹرو وائرس سے اخذ کیے گئے ہیں، ایک قسم کا RNA وائرس جو اپنے جینیاتی مواد کو میزبان جینوم میں ضم کر سکتا ہے۔ انضمام کی یہ صلاحیت ریٹرو وائرل ویکٹر کو خلیات میں ٹرانسجینز پہنچانے کے لیے کارآمد گاڑیاں بناتی ہے، جس سے علاج کے جینز کے طویل مدتی اظہار کو قابل بنایا جاسکتا ہے۔ ریٹرو وائرل ویکٹر ٹرانسمیشن کے طریقہ کار کو سمجھنا اور ٹرانسجینز کی کامیاب منتقلی کو متاثر کرنے والے عوامل کو جین تھراپی کی موثر حکمت عملیوں کی ترقی کے لیے بہت ضروری ہے۔

11.3.1 ٹرانسمیشن کا طریقہ کار (Mechanism of Transmission)

1. انجکشن اور انسری: ریٹرو وائرل ویکٹر ڈارگٹ سیلز کی سطح پر مخصوص ریسپیکٹر سے منسلک ہوتے ہیں، سیل میں داخلے کی سہولت

فراہم کرتے ہیں۔

2. ریورس ٹرانسکریپشن: ایک ہارسل کے اندر، ریٹرو وائرل ویکٹر کے آر این اے جینوم کو انزائم ریورس ٹرانسکریپٹس کے ذریعے ڈی این اے میں ریورس ٹرانسکریپٹ کیا جاتا ہے۔

3. انٹیگریشن: نئے ترکیب شدہ ڈی این اے کو پھر انزائم انٹیگریس کی مدد سے میزبان جینوم میں ضم کیا جاتا ہے۔ انضمام کا یہ مرحلہ ٹرانسجن کے مستحکم، طویل مدتی اظہار کے لیے ضروری ہے۔

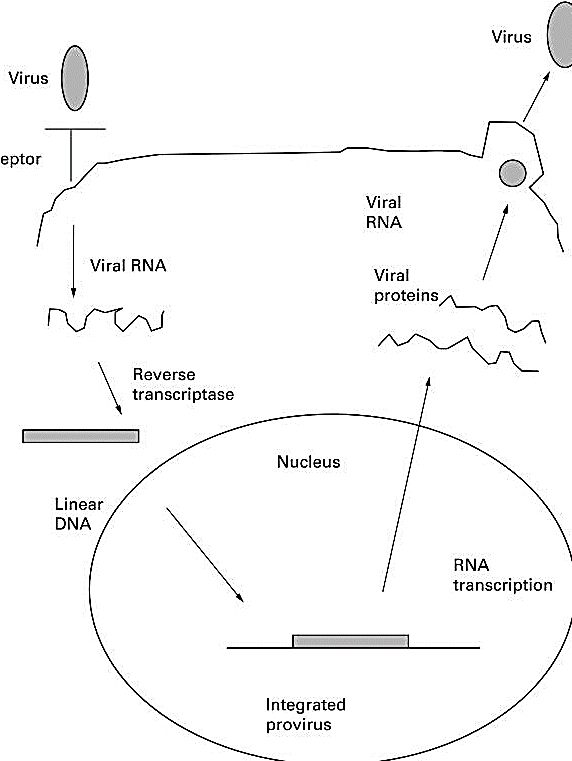
4. اظہار: مربوط ڈی این اے کو میزبان سیل کی مشینری کے ذریعے نقل اور ترجمہ کیا جاتا ہے، جس سے ٹرانسجن کے اظہار اور مطلوبہ علاجی پروٹین کی پیداوار ہوتی ہے۔

11.3.2 ٹرانسمیشن کو متاثر کرنے والے عوامل (Factors Influencing Transmission)

1. سیل کی قسم: سیل کی مختلف اقسام ریٹرو وائرل ویکٹر کی منتقلی کے لیے حساسیت میں مختلف ہو سکتی ہیں۔ کچھ خلیوں میں ریٹرو وائرل ریسیپٹر اظہار کی اعلیٰ سطح ہو سکتی ہے، جس سے وہ انفیکشن کے لیے زیادہ اجازت دیتے ہیں۔

2. ویکٹر ڈیزائن: ریٹرو وائرل ویکٹر کا ڈیزائن، بشمول وائرل لفافے کے پروٹین اور پروموٹر عناصر کا انتخاب، ہدف کے خلیات کو متاثر کرنے اور ٹرانسجنز کو ظاہر کرنے کی اس کی صلاحیت کو متاثر کر سکتا ہے۔

3. ویکٹر ٹائٹر: نقل و حمل کے لیے استعمال ہونے والے ریٹرو وائرل ویکٹر کا ارتکاز جین کی ترسیل کی کارکردگی کو متاثر کر سکتا ہے۔ اعلیٰ ویکٹر ٹائٹر کے نتیجے میں نقل و حمل کی شرح میں اضافہ ہو سکتا ہے۔



4. میزبان مدافعتی رد عمل: ریٹرو وائرل ویکٹر کے لیے میزبان مدافعتی رد عمل ہدف کے خلیات کو کامیابی سے منتقل کرنے کی صلاحیت کو متاثر کر سکتا ہے۔ ویکٹر یا منتقلی خلیوں کی مدافعتی کلیئر نس جین تھراپی کی تاثیر کو کم کر سکتی ہے۔

5. حفاظتی تحفظات: ریٹرو وائرل ویکٹر کو داخلی mutagenesis کے خطرے کو کم کرنے کے لیے انجینیئر کیا جانا چاہیے، جہاں ٹرانسجن کا انضمام ضروری میزبان جینوں میں خلل ڈالتا ہے اور منفی اثرات کا باعث بنتا ہے۔

مثال: ایک ایسے منظر نامے پر غور کریں جہاں ریٹرو وائرل ویکٹرز کا استعمال جینیاتی عارضے جیسے شدید مشترکہ امیونو ڈیفیسیئنسی (SCID) کے علاج کے لیے علاج کے لیے جین فراہم کرنے کے لیے کیا جاتا ہے۔

ہیماٹوپوائٹک اسٹیم سیلز (HSCs) کو مریض کے بون میرو سے الگ کر دیا جاتا ہے، اصلاحی جین کو لے جانے والے ریٹرو وائرل ویکٹر کے ذریعے منتقل کیا جاتا ہے، اور پھر مریض میں دوبارہ ملایا جاتا ہے۔ مربوط ٹرانسجین ترمیم شدہ HSCs کو فعال مدافعتی خلیات پیدا کرنے کی اجازت دیتا ہے، مریض کے مدافعتی فعل کو بحال کرتا ہے۔

11.4 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

- ❖ اس اکائی کے مطالعے بعد طلباء آسانی سے بیان کر سکتے ہیں:
- ❖ ریٹرو وائرل ویکٹر میڈیٹڈ ٹرانسجین ٹرانسمیشن کو سمجھیں اور اس کی وضاحت کریں۔
- ❖ ایسبر یونک اسٹیم سیلز کی تفریق کی صلاحیتوں کی وضاحت کریں۔
- ❖ ان ٹیکنالوجیز سے وابستہ اخلاقی تحفظات اور خطرات کا تجزیہ کریں۔
- ❖ جینیاتی انجینئرنگ اور تھراپی میں جنین اسٹیم سیلز اور ریٹرو وائرل ویکٹر کی تبدیلی کی صلاحیت کی وضاحت کریں۔

11.5 کلیدی الفاظ (Keywords)

ٹرانس جینیسیس	Transgenesis	غیر ملکی جینیاتی مواد کو متعارف کرانے کا عمل، جیسے کہ ٹرانسجینز، کو کسی جاندار کے جینوم میں مخصوص جینیاتی تبدیلیوں کو آمادہ کرنے کے لیے۔
ایسبر یونک اسٹیم سیلز	Embryonic Stem Cells	ایک بلاسٹوسسٹ کے اندرونی خلیے سے اخذ کردہ Pluripotent خلیات، جو مختلف قسم کے خلیوں میں فرق کرنے کے قابل ہوتے ہیں۔
ریٹرو وائرل ویکٹر	RetroViral Vectors	ریٹرو وائرس سے اخذ کردہ ترمیم شدہ وائرس، جن کو جین تھراپی کے لیے ٹارگٹ سیلز میں علاج کے جین پہنچانے کے لیے گاڑیوں کے طور پر استعمال کیا جاتا ہے۔

11.6 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

11.6.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. ایسبر یونک اسٹیم سیل (ESCs) _____ کے اندرونی خلیے سے اخذ کیے گئے ہیں۔
2. سویٹک سیل نیوکلیر ٹرانسفر (SCNT) میں _____ سیل کے نیوکلئس کو انوکلیڈ انڈے کے خلیے میں منتقل کرنا شامل ہے۔
3. ریٹرو وائرل ویکٹر _____ وائرس سے اخذ کیے گئے ہیں، جو اپنے جینیاتی مواد کو میزبان جینوم میں ضم کر سکتے ہیں۔

4. ٹرانسجینز غیر ملکی جینز ہیں جو کسی جاندار کے جینوم میں مخصوص خصائص یا افعال کے لیے متعارف کرائے جاتے ہیں، اکثر _____ ویکٹر کا استعمال کرتے ہیں۔
5. Pluripotency سے مراد ایک سٹیم سیل کی تینوں جراثیم کی تہوں سے اخذ کردہ متعدد سیل اقسام میں فرق کرنے کی صلاحیت ہے: _____، میسوڈرم، اور ایکٹوڈرم۔
6. آٹو جینز وہ جینز ہیں جو _____ یا تبدیل ہونے پر کینسر پیدا کرنے کی صلاحیت رکھتے ہیں۔
7. داخلی mutagenesis ایک جینیاتی تغیر ہے جو جینوم میں غیر ملکی DNA کے _____ کی وجہ سے ہوتا ہے۔
8. ایم ایم ٹی وی پرو موڈی این اے کا ایک سلسلہ ہے جو خاص طور پر _____ غدود میں جین کے اظہار کو چلاتا ہے۔
9. ریٹرو وائرل ویکٹر ثالثی جین تھراپی میں، ٹرانسجن کو انزائم _____ کے ذریعے میزبان جینوم میں ضم کیا جاتا ہے۔
10. _____ ٹیکنالوجی کے اطلاق میں ذمہ دارانہ اور اخلاقی طور پر درست طریقوں کو یقینی بنانے کے لیے ریگولیٹری فریم ورک قائم کیا جانا چاہیے۔

11.6.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. ایسبر یونک اسٹیم سیل (ESCs) کیا ہیں، اور کیا چیز انہیں بائیو ٹیکنالوجی کے میدان میں منفرد بناتی ہے؟
2. سویٹک سیل نیو کلیئر ٹرانسفر (SCNT) کے عمل اور کلوننگ میں اس کی اہمیت کو بیان کریں۔
3. ریٹرو وائرل ویکٹر جین تھراپی کو کس طرح سہولت فراہم کرتے ہیں، اور کون سے عوامل علاج کے جین کی فراہمی میں ان کی کارکردگی کو متاثر کرتے ہیں؟
4. تحقیق اور تھراپی میں جنین اسٹیم سیلز کے استعمال سے منسلک اخلاقی تحفظات اور چیلنجز پر تبادلہ خیال کریں۔

11.6.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. ٹرانسجینک حیاتیات کی پیداوار میں برائن سٹیم سیلز کیا کردار ادا کرتے ہیں، اور یہ عمل جینیاتی انجینئرنگ کی ترقی میں کس طرح حصہ ڈالتا ہے؟
2. کیا آپ ریٹرو وائرل ویکٹر ثالثی جین تھراپی کے بنیادی طریقہ کار اور جینیاتی عوارض کے علاج کے لیے اس کے مضمرات کی وضاحت کر سکتے ہیں؟
3. تحقیق اور تھراپی میں جنین اسٹیم سیلز کے استعمال سے متعلق بنیادی اخلاقی خدشات کیا ہیں، اور ان خدشات کو ریگولیٹری فریم ورک کے اندر کیسے حل کیا جاتا ہے؟
4. جنین اسٹیم سیلز سے پیدا ہونے والے ٹرانسجینک جاندار مختلف صنعتوں، جیسے زراعت اور ادویات پر کیسے اثر انداز ہوتے ہیں، اور حفاظت اور ضابطے کے لحاظ سے وہ کون سے چیلنجز کا سامنا کرتے ہیں؟

11.7 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Pluripotency	پلیوری پوٹنسی	پلیوری پوٹنسی	جنین کی تینوں جراثیم کی تہوں (اینڈوڈرم، میسوڈرم، اور ایکٹوڈرم) سے اخذ کردہ متعدد سیل اقسام میں فرق کرنے کے لیے اسٹیم سیل کی صلاحیت۔
Insertional Mutagenesis	-	داخلی اتپرورتن	جینوم میں غیر ملکی ڈی این اے کے داخل ہونے کی وجہ سے جینیاتی تبدیلی، ممکنہ طور پر عام جین کے کام میں خلل ڈالتی ہے اور کینسر یا دیگر بیماریوں جیسے منفی اثرات کا باعث بنتی ہے۔

11.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Smith, J. K., & Johnson, L. M. (Eds.). (2018). Advances in Stem Cell Research. Springer.
2. Jones, R. A., & Davis, M. P. (2019). Gene Therapy: Principles and Applications. CRC Press.
3. Brown, K. D., & Robinson, S. E. (Eds.). (2020). Ethical Issues in Biotechnology. Wiley-Blackwell.
4. Lee, C. K., & Zhang, Y. (Eds.). (2017). Transgenic Organisms: Methods and Protocols. Humana Press.

اکائی 12: ٹرانسجینک مویشی

(Transgenic Livestock)

اکائی کے اجزا

تمہید (Introduction)	12.0
تمہید (Objectives)	12.1
ٹرانسجینک لائیو اسٹاک اور ان کے استعمال (Transgenic Live Stock and Their Uses)	12.2
ٹرانسجینک سور (Transgenic Pigs)	12.3
ٹرانسجینک بکری (Transgenic Goats)	12.4
ٹرانسجینک بھیڑ (Transgenic Sheep)	12.5
ٹرانسجینک چکن (Transgenic Chicken)	12.6
اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)	12.7
کلیدی الفاظ (Keywords)	12.8
نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)	12.9
معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)	12.9.1
مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)	12.9.2
طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)	12.9.3
فرہنگ (Glossary)	12.10
مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)	12.11

12.0 تمہید (Introduction)

ٹرانسجینک لائیو اسٹاک، جسے جدید بائیو ٹیکنالوجی کی پہچان کے طور پر پیش کیا جاتا ہے، جانوروں کی افزائش اور جینیاتی انجینئرنگ میں ایک مثالی تبدیلی کی نمائندگی کرتا ہے۔ مویشیوں کی انواع کے جینوم میں غیر ملکی جینوں کے اسٹریٹجک داخلے کے ذریعے، سائنس دانوں نے

نسل کی قدرتی حدود کو عبور کرتے ہوئے، نئے خصائص اور افعال کے ساتھ جانوروں کو انجینئر کیا ہے۔ یہ تعارف جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانوروں کے تنوع اور زراعت، بائیو میڈیسن اور اس سے آگے ان کے بے شمار اپیلی کیشنز کو تلاش کرتے ہوئے ٹرانسجینک مویشیوں کے دائرے میں سفر کا آغاز کرتا ہے۔

متنوع ٹرانسجینک لائیو سٹاک:

ٹرانسجینک خنزیر: بہتر بیماریوں کے خلاف مزاحمت، بہتر گوشت کے معیار، اور اعضاء کی پیوند کاری کے لیے انجینئر۔ انسانی بیماریوں کا مطالعہ کرنے اور علاج کی مدخلتوں کو فروغ دینے کے لیے قابل قدر ماڈل کے طور پر کام کریں۔

ٹرانسجینک بھیڑ: بہتر اون کے معیار، بیماریوں کے خلاف مزاحمت، اور گوشت کی پیداوار کی بہتر خصوصیات کے لیے انجینئرڈ۔ جینیاتی بیماریوں کا مطالعہ کرنے اور جانوروں اور انسانوں دونوں میں علاج تیار کرنے کے لیے قابل قدر

ٹرانسجینک بکری: دودھ کی پیداوار میں اضافہ، گوشت کی کوالٹی میں بہتری، اور فارماسیوٹیکل پروٹین کی پیداوار کے لیے تیار کیا گیا ہے۔ ان کے دودھ میں علاجی پروٹین پیدا کرنے کی صلاحیت پیش کرتے ہیں، جیسے کہ اینٹی کوگولینٹ اور نمو کے عوامل۔

ٹرانسجینک مرغیاں: بیماریوں کے خلاف مزاحمت، بہتر انڈے کی پیداوار، اور انڈوں میں غذائیت کے مواد کو بہتر بنانے کے لیے تیار کیا گیا ہے۔ ایویئن بیماریوں کا مطالعہ کرنے اور ویکسین تیار کرنے کے ماڈل کے طور پر کام کریں۔

ٹرانسجینک لائیو سٹاک کے استعمال:

زراعت: بہتر پیداواری: بڑھتی ہوئی عالمی مانگ کو پورا کرنے کے لیے گوشت، دودھ اور انڈے کی پیداوار میں اضافہ۔ بیماریوں کے خلاف مزاحمت: مویشیوں کی عام بیماریوں کے خلاف جینیاتی مزاحمت کے ذریعے اینٹی بائیوٹکس پر انحصار کم کرنا۔ ماحولیاتی پائیداری: وسائل کے موثر استعمال اور کم فضلہ کے ذریعے ماحولیاتی اثرات کو کم کیا گیا۔

بائیو میڈیسن: فارماسیوٹیکل پروٹین کی پیداوار: جانوروں کے بائیو ری ایکٹرز میں علاج کے پروٹین، اینٹی باڈیز اور ویکسین کی لاگت سے موثر پیداوار۔ اعضاء کی پیوند کاری: زینو ٹرانسپلانٹیشن کے لیے اعضاء اور ٹشوؤں کا ممکنہ ذریعہ، اعضاء کی کمی کے بحران کو حل کرنا۔ بیماری کی ماڈلنگ: انسانی بیماریوں کا مطالعہ کرنے اور نئے علاج تیار کرنے کے لیے جانوروں کے ماڈلز کی تخلیق

ٹرانسجینک لائیو سٹاک جدید سائنس اور عملی جدت طرازی کا مظہر ہے، جو زراعت، بائیو میڈیسن اور اس سے آگے کے چیلنجوں کا حل پیش کرتا ہے۔ زراعت میں پیداواری صلاحیت اور بیماریوں کے خلاف مزاحمت سے لے کر بائیو میڈیسن میں زبردست پیشرفت تک، ٹرانسجینک مویشیوں کا اطلاق اتنا ہی متنوع ہے جتنا کہ خود انواع۔ جیسا کہ جینیاتی انجینئرنگ میں تحقیق آگے بڑھ رہی ہے، انسانی بہبود کو بہتر بنانے، خوراک کی حفاظت کو بڑھانے اور پائیدار ترقی کو آگے بڑھانے کے لیے ٹرانسجینک مویشیوں کی صلاحیت بے حد باقی ہے۔

12.1 تمہید (Objectives)

اس یونٹ کے اپنے مطالعہ کے اختتام پر، آپ کو قابل ہونا چاہیے کہ:

- ❖ ٹرانسجینک لائیو سٹاک کے تصور اور جینیاتی انجینئرنگ کو مخصوص خصلتوں کے لیے جانوروں کو تبدیل کرنے کے لیے کس طرح استعمال کیا جاتا ہے کی وضاحت کر سکتا ہے۔
- ❖ ٹرانسجینک مویشیوں کی متنوع اقسام، بشمول سور، گائے، بھیڑ، بکری اور مرغیوں کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں، اور ان کے پاس موجود منفرد خصلتوں کے بارے میں۔
- ❖ زراعت میں ٹرانسجینک لائیو سٹاک کے استعمال کی وضاحت کر سکتا ہے، جیسے کہ پیداواری صلاحیت میں اضافہ، بیماریوں کے خلاف مزاحمت کو بڑھانا، اور ماحولیاتی پائیداری کو فروغ دینا۔
- ❖ ٹرانسجینک مویشیوں کی حیاتیاتی اہمیت کی وضاحت کر سکتے ہیں، بشمول فارماسیوٹیکل پروٹین کی پیداوار، اعضاء کی پیوند کاری، اور بیماری کی ماڈلنگ میں ان کا کردار۔

12.2 ٹرانسجینک لائیو سٹاک اور ان کے استعمال (Transgenic Live Stock and Their Uses)

جینیاتی انجینئرنگ کی تکنیکوں کے ذریعے تخلیق کردہ ٹرانسجینک لائیو سٹاک، زراعت، بائیو میڈیسن اور صنعت میں بے شمار اپیلی کیشنز پیش کرتے ہیں۔ ٹرانسجینک لائیو سٹاک کے متنوع استعمال کی تفصیلی تلاش یہ ہے:

1. پیداواری صلاحیت میں اضافہ:

- ❖ ٹرانسجینک مویشیوں کو ان خصلتوں کی نمائش کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے جو زراعت میں پیداواری صلاحیت کو بڑھاتے ہیں۔ مثال کے طور پر، زیادہ دودھ پیدا کرنے کے لیے مویشیوں کو جینیاتی طور پر تبدیل کیا جاسکتا ہے، بکریوں کو زیادہ دودھ کی پیداوار کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے، اور تیز رفتار ترقی کی شرح کے لیے خنزیر کو پالا جاسکتا ہے۔ پیداواری صلاحیت میں یہ بہتری وسائل کی کارکردگی کو زیادہ سے زیادہ کرتے ہوئے جانوروں کی مصنوعات کی بڑھتی ہوئی عالمی مانگ کو پورا کرنے میں مدد کرتی ہے۔

2. بیماری کے خلاف مزاحمت:

- ❖ جینیاتی تبدیلیاں ان بیماریوں کے خلاف مزاحمت فراہم کر سکتی ہیں جو عام طور پر مویشیوں کو متاثر کرتی ہیں، اینٹی بائیوٹکس کی ضرورت کو کم کرتی ہیں اور جانوروں کی فلاح و بہبود کو بہتر بناتی ہیں۔ ٹرانسجینک مویشیوں کو وائرل، بیکٹیریل اور پر جیوی انفیکشن کے خلاف مزاحمت کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے، جس سے صحت مند جانور ہوتے ہیں اور کسانوں کے معاشی نقصانات کو کم کیا جاتا ہے۔

3. بائیو میڈیکل ریسرچ

❖ ٹرانسجینک مویشی انسانی بیماریوں کا مطالعہ کرنے اور ممکنہ علاج کی جانچ کے لیے قیمتی نمونے کے طور پر کام کرتے ہیں۔ مویشیوں کی انواع کے جینوم میں انسانی بیماریوں سے وابستہ مخصوص جینیاتی تغیرات کو متعارف کروا کر، محققین ایسے جانوروں کے ماڈل بنا سکتے ہیں جو انسانی پیچیدہ جینیاتی اور فزیالوجی کی قریب سے نقل کرتے ہیں۔ یہ ماڈلز بیماری کے طریقہ کار، مثنیات کی افادیت، اور حفاظتی جانچ کے مطالعہ کو زیادہ جسمانی طور پر متعلقہ سیاق و سباق میں قابل بناتے ہیں۔

4. فارماسیو ٹیکل پروٹین کی پیداوار:

❖ ٹرانسجینک مویشیوں کو ان کے دودھ، خون، یا بامقوتوں میں قیمتی پروٹین یاد دہانی پیدا کرنے کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے۔ مثال کے طور پر، بکریوں کو ان کے دودھ میں اینٹی تھرومبین، جمنے کے عوامل، یا اینٹی باڈیز جیسے علاجاتی پروٹین تیار کرنے کے لیے تبدیل کیا جاسکتا ہے۔ ان پروٹینوں کو طبی استعمال کے لیے کاٹا اور صاف کیا جاسکتا ہے، جو بائیو فارماسیو ٹیکلز کے لیے ایک سرمایہ کاری مؤثر اور توسیع پذیر پروڈکشن پلیٹ فارم پیش کرتا ہے۔

5. زینو ٹرانسپلائنٹیشن:

❖ خنزیر کے ایسے اعضاء ہوتے ہیں جو جسمانی طور پر انسانوں سے ملتے جلتے ہیں، جو انہیں زینو ٹرانسپلائنٹیشن کے لیے ممکنہ عطیہ دہندگان بناتے ہیں۔ جینیاتی طور پر خنزیر کے اعضاء کو مسترد کرنے اور مختلف قسم کی بیماریوں کی منتقلی کے خطرے کو کم کرنے کے ذریعے، ٹرانسجینک سور ٹرانسپلائنٹیشن کے لیے انسانی عطیہ کرنے والے اعضاء کی کمی کو پورا کرنے میں مدد کر سکتے ہیں۔ اس مقصد کے لیے تبدیل شدہ مدافعتی پروفائلز اور زینو جینک 4 نٹیجنز کے کم اظہار کے ساتھ ٹرانسجینک سور تیار کیے جا رہے ہیں۔

6. ماحولیاتی پائیداری:

❖ جینیاتی انجینئرنگ کے ذریعے، مویشیوں کو ان خصلتوں کے لیے پالا جاسکتا ہے جو زراعت میں ماحولیاتی پائیداری کو فروغ دیتے ہیں۔ مثال کے طور پر، ٹرانسجینک مویشیوں کو فیڈ کی بہتر کارکردگی، میٹھین کے اخراج میں کمی، یا غذائی اجزاء کے بہتر استعمال کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے۔ یہ خصوصیات مویشیوں کی پیداوار کے ماحولیاتی اثرات کو کم سے کم کرتے ہوئے، زیادہ پائیدار کاشتکاری کے طریقوں میں حصہ ڈالتی ہیں۔

7. غذائیت میں اضافہ

❖ ٹرانسجینک مویشیوں کو بہتر غذائی مواد کے ساتھ کھانے کی مصنوعات تیار کرنے کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے۔ مثال کے طور پر، مویشیوں کو فائدہ مند امیگا 3 فیٹی ایسڈز کی بڑھتی ہوئی سطح کے ساتھ دودھ پیدا کرنے کے لیے تبدیل کیا جاسکتا ہے، یا مرغیوں کو وٹامنز یا اینٹی آکسائیڈنٹس سے بھرپور انڈے دینے کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے۔ یہ غذائیت میں اضافہ صارفین کو ممکنہ صحت کے فوائد پیش کرتا ہے اور انسانی خوراک میں مخصوص غذائیت کی کمی کو دور کرتا ہے۔

آخر میں، ٹرانسجینک لائیو سٹاک کے استعمال متنوع اور دور رس ہیں، زراعت، بائیومیڈیسن، اور ماحولیاتی پائیداری پر پھیلے ہوئے

ہیں۔ اگرچہ ممکنہ فوائد اہم ہیں، لیکن معاشرے کی بہتری کے لیے اس کے ذمہ دارانہ اور پائیدار استعمال کو یقینی بنانے کے لیے جانوروں میں جینیاتی انجینئرنگ کے اخلاقی، سماجی اور ضابطے کے مضمرات پر غور کرنا ضروری ہے۔ ٹرانسجینک لائیو سٹاک میں مسلسل تحقیق اور اختراع خوراک کی حفاظت، انسانی صحت اور پائیدار ترقی میں عالمی چیلنجوں سے نمٹنے کا وعدہ رکھتی ہے۔

12.3 ٹرانسجینک سور (Transgenic Pigs)

جینیاتی انجینئرنگ کے ذریعے تخلیق کیے گئے ٹرانسجینک سور، زراعت، بائیو میڈیسن اور صنعت میں وسیع پیمانے پر اپیلی کیشنز پیش کرتے ہیں۔ یہاں ٹرانسجینک خنزیر کی کچھ مثالیں ہیں، ان کی خصوصیات، اور داخل کیے گئے جین:

1. انوائرہ سور (Enviropig)

- ❖ خاصیت: کھاد میں فاسفورس کی آلودگی کو کم کرنا
- ❖ جین داخل کیا گیا: بیکٹیریل فائٹیر جین
- ❖ استعمال کریں: Enviropig کو اس کے لعاب اور نظام انہضام میں انزائم فائٹیر پیدا کرنے کے لیے بنایا گیا ہے۔ فائٹیر خنزیروں کو فائٹیت ہضم کرنے میں مدد کرتا ہے، فاسفورس کی ایک شکل جو اناج میں پائی جاتی ہے، ان کی کھاد میں فاسفورس کی مقدار کو کم کرتی ہے۔ یہ سور فارمنگ کے علاقوں میں فاسفورس کے بہاؤ سے ماحولیاتی آلودگی کو کم کرتا ہے۔

2. گیل سیف پگ (GalSafe Pig)

- ❖ خصوصیت: زینو ٹرانسپلائنیشن میں اعضاء کے مسترد ہونے کا کم خطرہ
- ❖ جین داخل کیا گیا: Alpha-1,3-galactosyltransferase جین (GGTA1) ناک آؤٹ۔
- ❖ استعمال کریں: GalSafe خنزیر کو جینیاتی طور پر تبدیل کیا جاتا ہے تاکہ ان کے خلیات کی سطح پر الفا-گیل شوگر کی کمی ہو، جس سے ان کے اعضاء کو انسانوں میں ٹرانسپلانٹ کیے جانے پر انتہائی شدید رد عمل کا خطرہ کم ہو جاتا ہے۔ یہ خنزیر زینو ٹرانسپلائنیشن کا وعدہ کرتے ہیں، جو پیوند کاری کے لیے انسانی عطیہ دہندگان کے اعضاء کی کمی کا ممکنہ حل پیش کرتے ہیں۔

3. ہیمو فیلیا پگ (Hemophilia Pigs)

- ❖ خاصیت: انسانی خون جمنے والے عوامل کی پیداوار
- ❖ داخل کردہ جین: انسانی جمنے کا عنصر جین (مثلاً، فیکٹر VIII یا فیکٹر IX)۔
- ❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک سوروں کو ان کے دودھ یا خون میں انسانی خون کے جمنے کے عوامل پیدا کرنے کے لیے بنایا گیا ہے۔ یہ

جنمے والے عوامل ہیموفیلیا کے علاج کے لیے استعمال کیے جاتے ہیں، یہ ایک جینیاتی خون بہنے کی خرابی ہے جس کی خصوصیت جنمے کے عوامل میں کمی ہے۔ خنزیر طبی استعمال کے لیے علاج کے پروٹین کی تیاری کے لیے بائیو ایکٹر کے طور پر کام کرتے ہیں۔

4. ہائی اومیگا 3 فیٹی ایسڈ پگز (High Omega-3 Fatty Acid Pigs)

- ❖ خصوصیت: اومیگا 3 فیٹی ایسڈ کی مقدار میں اضافہ کے ساتھ گوشت کی پیداوار
- ❖ جین داخل کیا گیا: اومیگا 3 فیٹی ایسڈ کی ترکیب میں شامل جینز انکوڈنگ انزائمز۔
- ❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک خنزیر کو فائدہ مند اومیگا 3 فیٹی ایسڈ کی اعلیٰ سطح کے ساتھ گوشت تیار کرنے کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے، جیسے کہ eicosapentaenoic acid (EPA) اور docosahexaenoic acid (DHA)۔ Omega-3 افزہ سور کا گوشت صارفین کے لیے ممکنہ صحت کے فوائد پیش کرتا ہے، بشمول امراض قلب کا کم خطرہ۔

5. بیماری سے بچنے والے سور (Disease-Resistant Pigs)

- ❖ خصوصیت: مخصوص بیماریوں کے خلاف مزاحمت میں اضافہ
- ❖ جین داخل کیا گیا: بیماری کے خلاف مزاحمت سے وابستہ جین (مثلاً، وائرل اٹری ریسپیٹر)۔
- ❖ استعمال کریں: خنزیر کو وائرل، بیکٹیریل، یا پرجیوی انفیکشن کے خلاف مزاحمت کرنے کے لیے جینیاتی طور پر تبدیل کیا جاسکتا ہے جو عام طور پر سوائن کی آبادی کو متاثر کرتے ہیں۔ مثال کے طور پر، ٹرانسجینک خنزیروں کو سور کی کھیتی پر ان بیماریوں کے معاشی اثرات کو کم کرتے ہوئے، پورسائن ری پروڈکٹیو اور ریسپائرٹری سنڈروم (PRRS) یا افریقی سوائن فیور (ASF) جیسی بیماریوں کے خلاف مزاحمت میں اضافہ کیا گیا ہے۔

12.4 ٹرانسجینک بکری (Transgenic Goats)

جینیاتی تبدیلی کی تکنیکوں کے ذریعے تخلیق کردہ ٹرانسجینک بکری، زراعت، بائیو میڈیسن اور صنعت میں وسیع پیمانے پر اپیلی کیشنز پیش کرتے ہیں۔ یہاں ٹرانسجینک بکروں کی کچھ مثالیں، ان کی خصوصیات، اور داخل کردہ جین ہیں:

1. ایٹرن بکری (ATryn)

- ❖ خصوصیت: دودھ میں اینٹی تھرومبن (ATryn) کی پیداوار
- ❖ جین داخل کیا گیا: انسانی اینٹی تھرومبن جین (SERPINC1)
- ❖ استعمال کریں: ATryn بکری اپنے دودھ میں خون کو پتلا کرنے والا قدرتی اینٹی تھرومبن پیدا کرتی ہے۔ اینٹی تھرومبن کا استعمال موروثی اینٹی تھرومبن کی کمی والے مریضوں میں یا بعض طبی طریقہ کار جیسے سرجری کے دوران خون کے جنمے کو روکنے کے لیے کیا جاتا ہے۔

2. اسپائیڈروئن بکری:

- ❖ خصوصیت: دودھ میں مکڑی کے سلک پروٹین کی پیداوار
- ❖ جین داخل کیا گیا: مکڑی کے سلک پروٹین کو انکوڈنگ کرنے والے جینز (مثلاً، سلک فائبروئن)۔
- ❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک اسپائیڈروئن بکری اپنے دودھ میں مکڑی سلک پروٹین تیار کرتے ہیں، جن کی کٹائی کی جاسکتی ہے اور مختلف صنعتی اور بائیومیڈیکل اپیلی کیشنز کے لیے استعمال کی جاسکتی ہے۔ مکڑی کاریشم اپنی غیر معمولی طاقت اور لچک کے لیے جانا جاتا ہے، جو اسے بائیومیٹرلز، ٹیکسٹائل اور طبی آلات کی تیاری کے لیے قیمتی بناتا ہے۔

3. GTC بایو تھراپیٹکس کے بکری (Spidroin Goat)

- ❖ خصوصیت: دودھ میں علاج کے پروٹین کی پیداوار
- ❖ جین داخل کیا گیا: مخصوص علاج کے پروٹین کو انکوڈنگ کرنے والے جین (مثلاً، جمنے کے عوامل، اینٹی باڈیز)۔
- ❖ استعمال کریں: GTC بایو تھراپیٹکس کی ٹرانسجینک بکریوں کو ان کے دودھ میں مختلف علاج جاتی پروٹین تیار کرنے کے لیے بنایا گیا ہے، بشمول ہیمو فیلیا کے علاج کے لیے جمنے کے عوامل اور غیر فعال امیونو تھراپی کے لیے اینٹی باڈیز۔ یہ پروٹین بکری کے دودھ سے حاصل کیے جاتے ہیں اور دوا سازی کے مقاصد کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔

4. FecB جین میں ترمیم شدہ بکری (3) (GTC Biotherapeutics' Goats)

- ❖ خصوصیت: بہتر زرخیزی اور افزائش
- ❖ ترمیم شدہ جین: FecB جین (بون مور فوجینٹک پروٹین ریسیٹر قسم IB)۔
- ❖ استعمال کریں: FecB جین میں قدرتی طور پر پائے جانے والے تغیر کے ساتھ بکریوں میں بیضہ دانی کی شرح اور کوڑے کے سائز میں اضافہ ہوتا ہے۔ جین ایڈیٹنگ کے ذریعے، محققین بکریوں کی آبادی میں اس تغیر کو متعارف کروا سکتے ہیں تاکہ بکری کی فارمنگ میں تولیدی کارکردگی اور پیداواری صلاحیت کو بہتر بنایا جاسکے۔

5. اومیگا 3 افزودہ بکری (Omega-3 Enriched Goat)

- ❖ خصوصیت: اومیگا 3 فیٹی ایسڈ سے بھرپور دودھ کی پیداوار
- ❖ جین داخل کیا گیا: اومیگا 3 فیٹی ایسڈ کی ترکیب میں شامل جینز انکوڈنگ انزائمز۔
- ❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک اومیگا 3 افزودہ بکری فائدہ مند اومیگا 3 فیٹی ایسڈ کی بڑھتی ہوئی سطح کے ساتھ دودھ پیدا کرتی ہے، جیسے کہ eicosapentaenoic acid (EPA) اور docosahexaenoic acid (DHA)۔ اومیگا 3 افزودہ بکری کا دودھ ایک غذائی فائدہ پیش کرتا ہے اور صارفین کو صحت کے فوائد فراہم کر سکتا ہے۔

12.5 ٹرانسجینک بھیڑ (Transgenic Sheep)

1. الفا-1 اینٹی ٹریپسین (AAT) بھیڑ (Alpha-1 Antitrypsin (AAT) Sheep)

- ❖ سائنسی نام: *Ovis aries*
- ❖ داخل کردہ جین: انسانی AAT جین
- ❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک بھیڑوں کو ان کے دودھ میں الفا-1 اینٹی ٹریپسین (AAT) بنانے کے لیے بنایا گیا ہے۔ AAT ایک پروٹیز روکنے والا ہے جو الفا-1 اینٹی ٹریپسین کی کمی جیسے جینیاتی امراض کے علاج کے لیے استعمال ہوتا ہے، جو انسانوں میں پھیپھڑوں اور جگر کی بیماری کا باعث بن سکتا ہے۔ انسانی AAT جین کو بھیڑوں کے جنین میں داخل کیا جاتا ہے، جس سے ٹرانسجینک بھیڑوں کے دودھ میں فعال AAT پروٹین کی پیداوار ہوتی ہے۔

2. مکڑی ریشم پیدا کرنے والی بھیڑ (Spider Silk-Producing Sheep)

- ❖ سائنسی نام: *Ovis aries*
- ❖ جین داخل کیا گیا: مکڑی ریشم کے پروٹین کو انکوڈنگ کرنے والے جین
- ❖ استعمال کریں: محققین نے ٹرانسجینک بھیڑ بنائی ہے جو اپنے دودھ میں مکڑی کے ریشم کے پروٹین پیدا کرنے کی صلاحیت رکھتی ہے۔ مکڑی کا ریشم اپنی قابل ذکر طاقت اور لچک کے لیے جانا جاتا ہے، جو اسے مختلف صنعتی اور طبی استعمال کے لیے قیمتی بناتا ہے، جیسے سیون، بایومیٹریلز، اور حفاظتی لباس۔ مکڑی کے ریشم کے پروٹین کو انکوڈنگ کرنے والے جین بھیڑوں کے جنین میں داخل کیے جاتے ہیں، جس کے نتیجے میں ٹرانسجینک بھیڑوں کے دودھ میں مکڑی کے سلک پروٹین کی پیداوار ہوتی ہے۔

3. ہیومن کو ایگولیشن فیکٹر VIII (FVIII) بھیڑ (Human Coagulation Factor VIII (FVIII) Sheep)

- ❖ سائنسی نام: *Ovis aries*
- ❖ داخل کردہ جین: انسانی FVIII جین
- ❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک بھیڑوں کو ان کے دودھ میں انسانی جمنے کا عنصر VIII (FVIII) پیدا کرنے کے لیے تیار کیا گیا ہے۔ FVIII ہیمو فیلیا کے والے افراد میں جمنے کا ایک عنصر ہے، جو ایک جینیاتی خون بہنے کی خرابی ہے۔ بھیڑ سے تیار کردہ FVIII ہیمو فیلیا کے علاج کے لیے اس ضروری پروٹین کا ممکنہ ذریعہ پیش کرتا ہے۔ انسانی FVIII جین کو بھیڑوں کے جنین میں داخل کیا جاتا ہے، جس سے ٹرانسجینک بھیڑوں کے دودھ میں فعال FVIII پروٹین کی پیداوار ہوتی ہے۔

4. بیماری سے بچنے والی بھیڑ (Disease-Resistant Sheep)

❖ سائنسی نام: *Ovis aries*

❖ جین داخل کیا گیا: بیماری کے خلاف مزاحمت کے لیے مختلف جین

❖ استعمال کریں: سائنسدانوں نے مخصوص بیماریوں کے خلاف بہتر مزاحمت کے ساتھ ٹرانسجینک بھیڑوں کو انجنیر کیا ہے۔ مثال کے طور پر، بھیڑوں کو جینیاتی طور پر تبدیل کیا گیا ہے تاکہ پیتھوجینز کی وجہ سے ہونے والے انفیکشنز جیسے کہ پاؤں اور منہ کی بیماری کے وائرس یا سکرپی، بھیڑوں کو متاثر کرنے والی پرین بیماری۔ بیماریوں کے خلاف مزاحمت سے وابستہ مختلف جینز، جیسے کہ مدافعتی رد عمل کے جینز یا وائرس انٹری ریسپٹر جین، کو بھیڑوں کے جین میں داخل کیا جاتا ہے تاکہ ہدف شدہ بیماریوں کے خلاف مزاحمت فراہم کی جاسکے۔

5. اون کے معیار کی بھیڑ (Wool-Quality Sheep)

❖ سائنسی نام: *Ovis aries*

❖ جین داخل کیا گیا: اون کے معیار کی خصوصیات سے وابستہ جین

❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک بھیڑوں کو اون کے معیار کی بہتر خصوصیات کے ساتھ تیار کیا گیا ہے، جیسے فائبر کی لمبائی میں اضافہ، باریک پن، یارنگ کی تبدیلی۔ ان جینیاتی تبدیلیوں کا مقصد ٹیکسٹائل اور مینوفیکچرنگ صنعتوں کے لیے بھیڑ کے اون کی تجارتی قدر اور استعداد کو بڑھانا ہے۔ ٹرانسجینک بھیڑوں میں اون کے معیار کو بہتر بنانے کے لیے اون کی نشوونما، فائبر کی ساخت، یا پگمنٹیشن سے وابستہ جین بھیڑوں کے جین میں داخل کیے جاتے ہیں۔

12.6 ٹرانسجینک چکن (Transgenic Chicken)

جینیاتی تبدیلی کی تکنیکوں کے ذریعے انجنیر شدہ ٹرانسجینک مرغیاں، زراعت، بائیومیڈیسن اور تحقیق میں متعدد درخواستیں پیش کرتی ہیں۔ یہاں ٹرانسجینک مرغیوں کی کچھ مثالیں، ان کی خصوصیات، اور داخل کیے گئے جین ہیں:

1. گولڈن رائس چکن (Golden Rice Chicken)

❖ خصوصیت: وٹامن اے سے بھرپور انڈے کی پیداوار

❖ جین داخل کیا گیا: پیٹاکیر وٹین کی ترکیب میں شامل جینز انکوڈنگ انزائمز (پرووٹامن اے)۔

❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک گولڈن رائس مرغیاں پرووٹامن A کی بڑھتی ہوئی سطح کے ساتھ انڈے دیتی ہیں، خاص طور پر پیٹاکیر وٹین۔ پیٹاکیر وٹین انسانی جسم میں وٹامن اے میں تبدیل ہو جاتی ہے اور بصارت، قوت مدافعت اور مجموعی صحت میں اہم کردار ادا کرتی ہے۔ یہ انڈے وٹامن اے کی کمی کا ایک غذائی حل پیش کرتے ہیں، جو ترقی پذیر ممالک میں صحت عامہ کا ایک وسیع مسئلہ ہے۔

2. لیمفوکین ایکٹیویٹڈ کلر (LAK) سیلز چکن (Lymphokine-Activated Killer (LAK) Cells Chicken)

- ❖ خصوصیت: کینسر کے امیونو تھراپی کے لیے LAK خلیات کی پیداوار
- ❖ جین داخل کیا گیا: جین انکوڈنگ سائٹو کائنگز (مثلاً، interleukin-2، interleukin-12)۔
- ❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک LAK خلیات مرغیوں کو سائٹو کائنگز کے اظہار کے لیے انجینئر کیا گیا ہے جو کہ لیمفوکین ایکٹیویٹڈ قاتل (LAK) سیلز کو چالو کرتے ہیں، ایک قسم کا مدافعتی سیل جو کینسر کے خلیوں کو مارنے کی صلاحیت رکھتا ہے۔ ان مرغیوں سے حاصل کیے گئے LAK خلیات کینسر کی امیونو تھراپی میں ٹیو مر کے خلاف جسم کے مدافعتی رد عمل کو بڑھانے کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔

3. ٹرانسجینک چکن بائیوریکٹر (Transgenic Chicken Bioreactor)

- ❖ خاصیت: انڈے کی سفیدی میں دوبارہ پیدا ہونے والے پروٹین کی پیداوار
- ❖ جین داخل کیا گیا: مخصوص علاج کے پروٹین یا اینٹی باڈیز کو انکوڈنگ کرنے والے جین
- ❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک چکن بائیوری ایکٹرز کو انڈے کی سفیدی میں بڑی مقدار میں ریکومیننٹ پروٹین یا اینٹی باڈیز بنانے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے۔ علاج کے پروٹین یا اینٹی باڈیز کو انکوڈنگ کرنے والے جین چکن ایسبرو میں داخل کیے جاتے ہیں، جس سے ٹرانسجینک مرغیوں کے انڈے کی سفیدی میں ان پروٹینوں کا اظہار ہوتا ہے۔ یہ پیداواری نظام طبی استعمال کے لیے فارماسیوٹیکل پروٹین تیار کرنے کے لیے ایک سرمایہ کاری مؤثر اور توسیع پذیر طریقہ پیش کرتا ہے۔

4. ہیومن لائزوزائم چکن (Human Lysozyme Chicken)

- ❖ خاصیت: انڈے کی سفیدی میں انسانی لائزوزائم کی پیداوار
- ❖ داخل کردہ جین: انسانی لائزوزائم جین (LYZ)
- ❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک مرغیوں کو ان کے انڈے کی سفیدی میں انسانی لائزوزائم، ایک اینٹی مائکرو بیل انزائم، پیدا کرنے کے لیے انجینئر کیا گیا ہے۔ انسانی لائزوزائم اینٹی بیکٹیریل خصوصیات کی نمائش کرتا ہے اور پیدائشی قوت مدافعت میں کردار ادا کرتا ہے۔ ان ٹرانسجینک مرغیوں کے انڈوں نے بیکٹیریل آلودگی کے خلاف مزاحمت کو بڑھایا ہو سکتا ہے، جو کھانے کی حفاظت کے فوائد پیش کرتے ہیں۔

5. فولیٹ سے بھرپور چکن (Folate-Enriched Chicken)

- ❖ خصوصیت: فولیٹ سے بھرپور انڈوں کی پیداوار
- ❖ جین داخل کیا گیا: فولیٹ کی ترکیب میں شامل جین انکوڈنگ انزائمز

❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک فولیٹ سے افزوہ مرغیاں فولیٹ کی بڑھتی ہوئی سطح کے ساتھ انڈے پیدا کرتی ہیں (وٹامن B9)، جو ڈی این اے کی ترکیب اور سیل کی تقسیم کے لیے ایک ضروری غذائیت ہے۔ فولیٹ سے بھرپور انڈے خاص طور پر حاملہ خواتین اور فولیٹ کی کمی کے خطرے والے افراد کے لیے غذائی فوائد پیش کر سکتے ہیں۔

12.7 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

- اس اکائی کے مطالعے بعد طلباء آسانی سے بیان کر سکتے ہیں:
- ❖ ٹرانسجینک لائیو سٹاک کے تصور اور جینیاتی انجینئرنگ کو مخصوص خصلتوں کے لیے جانوروں کو تبدیل کرنے کے لیے کس طرح استعمال کیا جاتا ہے کی وضاحت کر سکتا ہے۔
 - ❖ ٹرانسجینک مویشیوں کی متنوع اقسام، بشمول سور، گائے، بھیڑ، بکری اور مرغیوں کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں، اور ان کے پاس موجود منفرد خصلتوں کے بارے میں۔
 - ❖ زراعت میں ٹرانسجینک لائیو سٹاک کے استعمال کی وضاحت کر سکتا ہے، جیسے کہ پیداواری صلاحیت میں اضافہ، بیماریوں کے خلاف مزاحمت کو بڑھانا، اور ماحولیاتی پائیداری کو فروغ دینا۔
 - ❖ ٹرانسجینک مویشیوں کی حیاتیاتی اہمیت کی وضاحت کر سکتے ہیں، بشمول فارماسیوٹیکل پروٹین کی پیداوار، اعضاء کی پیوندکاری، اور بیماری کی ماڈلنگ میں ان کا کردار۔

12.8 کلیدی الفاظ (Keywords)

ٹرانسجینک لائیو سٹاک Transgenic Livestock
 مویشی جانور جن کے جینیاتی میک اپ کو جینیاتی انجینئرنگ تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے جان بوجھ کر تبدیل یا تبدیل کیا گیا ہے تاکہ مخصوص خصلتوں یا خصوصیات کو متعارف کرایا جاسکے جو قدرتی طور پر پر جاتیوں میں موجود نہیں ہیں۔ ان ترمیم کا مقصد عام طور پر پیداواری، بیماری کے خلاف مزاحمت، یا دیگر مطلوبہ صفات کو بہتر بنانا ہے۔

جینیاتی انجینئرنگ Genetic Engineering
 حیاتیات کے جینیاتی مواد (DNA) کو نئی خصلتوں یا خصوصیات کو متعارف کرانے کے لیے بائیو ٹیکنالوجی کی تکنیک کا استعمال کرتے ہوئے جوڑ توڑ کا عمل۔ اس میں مطلوبہ نتائج حاصل کرنے کے لیے کسی جاندار کے جینوم کے اندر جین داخل کرنا، حذف کرنا یا ان میں ترمیم کرنا شامل ہو سکتا ہے، جیسے کہ پیداواری صلاحیت میں اضافہ، بیماری کے خلاف مزاحمت، یا قیمتی پروٹین کی پیداوار۔

12.9 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

12.9.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. ٹرانسجینک مویشیوں کو ان خصلتوں کی نمائش کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے جو زراعت میں _____ کو بڑھاتے ہیں۔
2. جینیاتی تبدیلیاں ان بیماریوں کے خلاف مزاحمت فراہم کر سکتی ہیں جو عام طور پر _____ کو متاثر کرتی ہیں، اینٹی بائیو ٹکس کی ضرورت کو کم کرتی ہیں۔
3. ٹرانسجینک مویشی انسانی بیماریوں کا مطالعہ کرنے اور _____ کے میدان میں ممکنہ علاج کی جانچ کے لیے قیمتی نمونے کے طور پر کام کرتے ہیں۔
4. ٹرانسجینک مویشیوں کو ان کے _____ میں قیمتی پروٹین یا فارماسیوٹیکل تیار کرنے کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے۔
5. خنزیر کے ایسے اعضاء ہوتے ہیں جو جسمانی طور پر انسانوں سے ملتے جلتے ہیں، جو انہیں _____ کے لیے ممکنہ عطیہ دہندگان بناتے ہیں۔
6. جینیاتی انجینئرنگ کے ذریعے، مویشیوں کو ان خصلتوں کے لیے پالا جاسکتا ہے جو زراعت میں ماحولیاتی _____ کو فروغ دیتے ہیں۔
7. ٹرانسجینک مویشیوں کو بہتر _____ مواد کے ساتھ کھانے کی مصنوعات تیار کرنے کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے۔
8. Enviropig کو اس کے لعاب اور ہاضمے میں انزائم _____ پیدا کرنے کے لیے بنایا گیا ہے۔
9. GalSafe خنزیر کو جینیاتی طور پر تبدیل کیا جاتا ہے تاکہ ان کے خلیات کی سطح پر الفا-گال شوگر کی کمی ہو، جس سے ان کے اعضاء کو انسانوں میں ٹرانسپلانٹ کیے جانے پر _____ کا خطرہ کم ہو جاتا ہے۔
10. ٹرانسجینک اسپائڈروئن بکرے اپنے دودھ میں مکڑی کے سلک پروٹین تیار کرتے ہیں، جنہیں کاٹا جاسکتا ہے اور مختلف صنعتی اور _____ اپیلی کیشنز کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔

12.9.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. ٹرانسپلانٹیشن کے لیے انسانی عطیہ کرنے والے اعضاء کی کمی کو پورا کرنے میں ٹرانسجینک خنزیر کیا کردار ادا کرتے ہیں، اور اعضاء کے مسترد ہونے کے خطرے کو کم کرنے کے لیے ان کی جینیاتی طور پر تبدیلی کیسے کی جاتی ہے؟
2. بائیومیڈیکل تحقیق میں ٹرانسجینک بکرے کس طرح حصہ ڈالتے ہیں، خاص طور پر اینٹی تھرومبین (ATryn) اور مکڑی سلک پروٹین کی تیاری میں؟
3. ٹرانسجینک بھیڑوں کو ان کے دودھ میں الفا-1 اینٹی ٹریپسین (AAT) پیدا کرنے کے لیے استعمال کرنے کے ممکنہ فوائد کی وضاحت کریں، اور AAT کس طبی حالت کا علاج کرتا ہے؟

4. ٹرانسجینک مرغیوں کو دوبارہ پیدا کرنے والے پروٹین یا اینٹی باڈیز بنانے کے لیے بائیوری ایکٹرز کے طور پر بنانے کی اہمیت کی وضاحت کریں، اور یہ طریقہ روایتی پیداواری طریقوں پر کیا فوائد پیش کرتا ہے؟

12.9.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. جینیاتی انجینئرنگ، جین ایڈیٹنگ، اور کلوننگ سمیت ٹرانسجینک مویشی بنانے کے لیے استعمال ہونے والے مختلف طریقوں اور تکنیکوں کا موازنہ اور ان کے برعکس کریں۔
2. ٹرانسجینک اینیمل کی اپیلی کیشنز لکھیں۔
3. عالمی غذائی تحفظ، انسانی صحت اور ماحولیاتی پائیداری سے نمٹنے کے لیے ٹرانسجینک مویشیوں کے مستقبل کے امکانات اور چیلنجز کا جائزہ لیں۔

12.10 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Xenotransplantation	زینوٹرانسپلانٹیشن	-	:
			معنی: اعضاء، بافتوں یا خلیات کی ایک نوع سے دوسری نسل میں، عام طور پر غیر انسانی جانوروں سے انسانوں میں ٹرانسپلانٹیشن۔ زینوٹرانسپلانٹیشن پیوند کاری کے لیے انسانی عطیہ دہندگان کے اعضاء کی کمی کے حل کے طور پر صلاحیت رکھتا ہے لیکن مدافعتی مسترد ہونے اور بیماریوں کے مختلف نسلوں سے منتقل ہونے کے خطرے کے بارے میں خدشات پیدا کرتا ہے۔۔
Biomedical Applications	بایو میڈیکل اپیلی کیشنز	-	:
			مطلب: انسانی صحت سے متعلق مسائل کو حل کرنے کے لیے حیاتیاتی اور طبی علم، اوزار، اور تکنیک کا عملی استعمال۔ بایو میڈیکل اپیلی کیشنز سرگرمیوں کی ایک وسیع رینج کو گھیرے ہوئے ہیں،

بشمول نئی ادویات اور علاج کی تیاری، تشخیصی
ٹیسٹ، طبی آلات، اور مختلف بیماریوں اور طبی
حالات کے علاج کی حکمت عملی

12.11 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Smith, J. D. (2019). *Genetic Engineering in Agriculture: Ethics and Impacts* (2nd ed.). Wiley.
2. Johnson, R. E. (2020). *Transgenic Livestock: Applications and Perspectives*. Springer.
3. Patel, S. K. (Ed.). (2018). *Biomedical Applications of Genetic Engineering*. CRC Press.
4. Lee, C. K., & Jones, M. H. (2017). *Environmental Sustainability in Livestock Production*. Cambridge University Press.

اکائی 13: ٹرانسجینک جانوروں سے دواسازی اور بائیومالیکیولز کی پیداوار

(Production of Pharmaceuticals and Biomolecules From Transgenic Animals)

اکائی کے اجزا

تمہید (Introduction)	13.0
مقاصد (Objectives)	13.1
بایوفارماسیوٹیکلز اور بائیومالیکیولز کی پیداوار (Production of Biopharmaceuticals and Biomolecules)	13.2
ٹرانسجینک جانوروں کے ذریعہ عطیہ کرنے والے اعضاء کی پیداوار (Production of Donor Organs by Transgenic Animals)	13.3
ناک آؤٹ چوہے (Knockout Mice)	13.4
اكتسابی نتائج (Learning Outcomes)	13.5
کلیدی الفاظ (Keywords)	13.6
نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)	13.7
13.7.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)	
13.7.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)	
13.7.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)	
فرہنگ (Glossary)	13.8
مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)	13.9

13.0 تمہید (Introduction)

بائیو ٹیکنالوجی کے دائرے میں، جینیاتی انجینئرنگ کی آمد نے دواسازی، بائیومالیکیولز، اور یہاں تک کہ عطیہ کرنے والے اعضاء کی تیاری کے لیے بے مثال راستے کھولے ہیں۔ جینیاتی تبدیلی کے بے شمار اپیلی کیشنز میں، ٹرانسجینک جانوروں کا استعمال میڈیکل سائنس اور بائیو

مینوفیکچرنگ میں ایک امید افزا محاذ کے طور پر کھڑا ہے۔ یہ باب ضروری دواسازی اور بائیو مالیکولز کی تیاری، عطیہ دہندگان کے اعضاء کی تخلیق، اور تحقیق کے لیے ناک آؤٹ چوہوں کے ماڈلز کی تیاری کے لیے ٹرانسجینک جانوروں کی صلاحیت کو بروئے کار لانے میں قابل ذکر پیشرفت کی تلاش کا آغاز کرتا ہے۔

ٹرانسجینک جانوروں سے دواسازی اور بائیو مالیکولز کی تیاری اہم علاج کے ایجنٹوں کی بڑھتی ہوئی مانگ کو پورا کرنے کے لیے ایک اہم نقطہ نظر کی نمائندگی کرتی ہے۔ بکری، بھیڑ، خنزیر اور خرگوش جیسے جانوروں کے جینوم میں مخصوص جین متعارف کروا کر، محققین ان جانداروں کو زندہ بایوری ایکٹرز میں تبدیل کر سکتے ہیں جو مختلف بیماریوں کے علاج کے لیے ضروری پیچیدہ پروٹین، انزائمز اور اینٹی باڈیز پیدا کرنے کی صلاحیت رکھتے ہیں۔ یہ عمل نہ صرف دواسازی کی پیداوار کے قابل توسیعی اور لاگت سے موثر ذریعہ پیش کرتا ہے بلکہ اہم طبی اثرات کے ساتھ اعلیٰ معیار کے علاج کے ایجنٹوں کی تخلیق میں بھی سہولت فراہم کرتا ہے۔

مزید برآں، یہ باب زینو ٹرانسپلائنیشن کے فرنیئر کا ذکر کرتا ہے، جہاں جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانور انسانی اعضاء کی پیوند کاری کے لیے ممکنہ عطیہ دہندگان کے طور پر کام کرتے ہیں۔ عین مطابق جینیاتی تبدیلیوں کے ذریعے، خنزیروں کو اعضاء کے مسترد ہونے کے خطرے کو کم کرنے اور مختلف اقسام کی بیماریوں کی منتقلی سے متعلق خدشات کو کم کرنے کے لیے انجینئر کیا جاسکتا ہے، جس سے ان کے اعضاء کو انسانوں میں ٹرانسپلائنیشن کے لیے موزوں بنایا جاسکتا ہے۔ ٹرانسجینک جانوروں سے عطیہ دہندگان کے اعضاء تیار کرنے کا تصور انسانی عطیہ کرنے والے اعضاء کی شدید کمی کو پورا کرنے اور اعضاء کی پیوند کاری کے میدان میں انقلاب برپا کرنے میں بہت بڑا وعدہ رکھتا ہے۔

مزید برآں، باب بائیو میڈیکل ریسرچ میں ناک آؤٹ چوہوں کے ماڈلز کے ناگزیر کردار کی کھوج کرتا ہے۔ جینیاتی انجینئرنگ کی تکنیکوں کے ذریعے چوہوں میں مخصوص جینوں کو منتخب طور پر غیر فعال کر کے، محققین ان جینوں کے کام اور بیماری کے پیچھا لوجی میں ان کے کردار کو واضح کر سکتے ہیں۔ ناک آؤٹ چوہے جین کے فنکشن کا مطالعہ کرنے، انسانی بیماریوں کی ماڈلنگ، اور ممکنہ علاجاتی مداخلتوں کی جانچ کے لیے انمول ٹولز کے طور پر کام کرتے ہیں، اس طرح پیچیدہ حیاتیاتی عمل کے بارے میں ہماری سمجھ کو آگے بڑھاتے ہیں اور جدید طبی علاج کی راہ ہموار کرتے ہیں۔

جیسا کہ ہم ٹرانسجینک جانوروں کے دائرے میں اس سفر کا آغاز کرتے ہیں، ہم طب، بائیو ٹیکنالوجی، اور سائنسی تحقیق میں انقلاب برپا کرنے میں جینیاتی انجینئرنگ کی تبدیلی کی صلاحیت سے پردہ اٹھاتے ہیں۔ زندگی بچانے والی دواسازی کی تیاری سے لے کر عطیہ کرنے والے اعضاء کی نسل اور انمول تحقیقی ماڈلز کی تخلیق تک، ٹرانسجینک جانور حیاتیاتی سائنس میں جدت اور پیشرفت کا سنگ بنیاد ہیں۔

13.1 مقاصد (Objectives)

اس یونٹ کے اپنے مطالعہ کے اختتام پر، آپ کو قابل ہونا چاہیے کہ:-

❖ جینیاتی انجینئرنگ کے تصور کی وضاحت کریں اور ٹرانسجینک جانوروں کا استعمال کرتے ہوئے فارماسیو ٹیکلز، بائیو مالیکولز

اور عطیہ کرنے والے اعضاء کی تیاری میں اس کے اطلاق کی وضاحت کریں۔

❖ پیچیدہ پروٹین، انزائمز اور اینٹی باڈیز کی تیاری کے لیے جانوروں کے جینوم میں مخصوص جینز کو زندہ بایو ری ایکٹرز میں تبدیل کرنے کے عمل کی وضاحت کریں۔

❖ زینو ٹرانسپلائنیشن کے فرنیئر اور جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانوروں کے کردار کا جائزہ لیں، خاص طور پر خنزیر، انسانی پیوند کاری کے لیے ممکنہ اعضاء کے عطیہ دہندگان کے طور پر، اعضاء کو مسترد کرنے اور بیماری کی منتقلی جیسے مسائل کو حل کرنا۔

13.2 بایو فارماسیو ٹیکلز اور بائیو مالیکیولز کی پیداوار (Production of Biopharmaceuticals and Biomolecules)

1. بکری کے دودھ میں دوبارہ پیدا ہونے والے انسانی پروٹین (Recombinant Human Proteins in Goat Milk)

❖ مثالی جین: مطلوبہ انسانی پروٹین کو انکوڈ کرنے والا جین، جیسے کہ اینٹی تھرومبین III، بکریوں کے جینوم میں پرونیو کلیئر مائیکرو انجکشن یا سویٹک سیل نیو کلیئر ٹرانسفر (کلوننگ) جیسی تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے متعارف کرایا جاتا ہے۔

❖ اظہار کی جگہ: ٹرانسجن کو عام طور پر جینوم میں اس طرح داخل کیا جاتا ہے کہ یہ ایک میمری غدود کے مخصوص پروموٹر کے کنٹرول میں ہوتا ہے، جیسے کہ بکری بیٹا کیسین پروموٹر۔

❖ پیداواری عمل: کامیاب انضمام کے بعد، ٹرانسجنک بکرے دوبارہ پیدا ہونے والے انسانی پروٹین پر مشتمل دودھ تیار کرتے ہیں۔ پروٹین کو *mammary epithelial* خلیات کے ذریعے ترکیب کیا جاتا ہے اور دودھ میں چھپایا جاتا ہے۔ ٹرانسجنک بکریوں سے دودھ اکٹھا کیا جاتا ہے، اور دلچسپی کے پروٹین کو کرومیٹو گرافی اور دیگر تکنیکوں کے ذریعے پاک کیا جاتا ہے۔

2. ٹرانسجنک بکریوں سے *ATryn®* (Recombinant Antithrombin)

❖ مثال کے طور پر جین: انسانی اینٹی تھرومبین III (*ATIII*) کو انکوڈنگ کرنے والا جین، جو کہ خون کے جمنے کا ایک اہم ریگولیٹر ہے، بکریوں کے جینوم میں متعارف کرایا جاتا ہے۔

❖ اظہار کی جگہ: ٹرانسجن کو ایک *mammary gland-specific promoter* کے کنٹرول میں جینوم میں داخل کیا جاتا ہے، خاص طور پر *mammary epithelial* خلیات میں اس کے اظہار کو یقینی بناتا ہے۔

❖ پیداواری عمل: ٹرانسجنک بکری دودھ تیار کرتی ہے جس میں دوبارہ پیدا ہونے والا انسانی *ATIII* ہوتا ہے۔ پروٹین کو دودھ سے حاصل کیا جاتا ہے اور اسے *ATryn®* حاصل کرنے کے لیے صاف کیا جاتا ہے، جو ایک دواسازی کے

درجے کا اینٹی تھرومبن ہے جو موروثی اینٹی تھرومبن کی کمی والے مریضوں میں خون کے جمنے کو روکنے کے لیے استعمال ہوتا ہے۔

3. ٹرانسجینک چوہوں میں انسانی مونوکلونل اینٹی باڈیز (Humanized Monoclonal Antibodies in Transgenic Mice)

- ❖ مثال جین: انسانی امیونوگلوبولینز (بھاری اور ہلکی زنجیریں) کے متغیر خطوں کو انکوڈ کرنے والے جین ماؤس جینوم میں متعارف کرائے جاتے ہیں۔
- ❖ اظہار کی جگہ: ٹرانسجینز کو ماؤس جینوم میں اس طرح ضم کیا جاتا ہے کہ وہ خاص طور پر بی لیمنوسائٹس میں ظاہر ہوتے ہیں، جو اینٹی باڈی کی پیداوار کے لیے ذمہ دار ہوتے ہیں۔
- ❖ پیداواری عمل: ٹرانسجینک چوہوں کو ہدف کے ۶ نٹیجین کے ساتھ حفاظتی ٹیکے لگائے جاتے ہیں، B خلیات کے ذریعے مکمل طور پر انسانی اینٹی باڈیز کی پیداوار کو متحرک کرتے ہیں۔ یہ اینٹی باڈیز، بشمول مونوکلونل اینٹی باڈیز، چوہوں کے خون یا جلوه گریسیال سے حاصل کی جاتی ہیں اور کینسر اور آٹو امیون ڈس آرڈر جیسی بیماریوں کے علاج میں علاج کے لیے استعمال کی جاتی ہیں۔

4. Transgenic Sheep سے Alpha-1 Antitrypsin (AAT)

- ❖ مثال جین: انسانی الفا-1 اینٹی ٹریپسین (AAT) کو انکوڈنگ کرنے والا جین، پھیپھڑوں کے کام کے لیے اہم ایک پروٹین روکنے والا، بھیڑوں کے جینوم میں متعارف کرایا جاتا ہے۔
- ❖ اظہار کی جگہ: ٹرانسجین کو میمری غدود کے مخصوص پروموٹر کے کنٹرول میں جینوم میں داخل کیا جاتا ہے، اس کے اظہار کو میمری اپکلا خلیوں میں ہدایت کرتا ہے۔
- ❖ پیداواری عمل: ٹرانسجینک بھیڑ انسانی AAT پر مشتمل دودھ تیار کرتی ہے۔ پروٹین کو دودھ سے نکالا جاتا ہے اور اسے فارماسیوٹیکل گریڈ AAT حاصل کرنے کے لیے صاف کیا جاتا ہے، جس میں AAT کی کمی سے متعلق پھیپھڑوں اور جگر کی بیماریوں کے علاج کے لیے صلاحیت ہوتی ہے۔

5. ٹرانسجینک پودوں اور جانوروں سے بائیوفارماسیوٹیکل (Biopharmaceuticals from Transgenic Plants and Animals)

- ❖ مثال کے طور پر جین: مختلف جینز کو انکوڈنگ کرنے والے علاج کے پروٹین، انزائمز، اینٹی باڈیز، یا سائٹوکائٹس کو ٹرانسجینک جانداروں کے جینوم میں متعارف کرایا جاتا ہے۔
- ❖ اظہار کی جگہیں: ہدف پروٹین اور اس کے مطلوبہ اطلاق پر منحصر ہے، ٹرانسجینز کا اظہار مخصوص ٹشوز، اعضاء، یا ٹرانسجینک

جانوروں یا پودوں کے جسمانی رطوبتوں میں کیا جاسکتا ہے۔

❖ پیداواری عمل: پیداواری عمل میزبان حیاتیات اور مطلوبہ مصنوعات کے لحاظ سے مختلف ہوتے ہیں۔ مثال کے طور پر، علاج کے پروٹین کو ٹرانسجینک جانوروں کے دودھ سے حاصل کیا جاسکتا ہے یا ٹرانسجینک پودوں کے مخصوص ٹشوز سے نکالا جاسکتا ہے۔ اس کے بعد پروٹین کو دوا سازی کے درجے کی مصنوعات حاصل کرنے کے لیے پاک کیا جاتا ہے۔

فارماسیوٹیکلز اور بائیو مالیکولیو لزی تیار کرنے کے لیے ٹرانسجینک جانوروں کے استعمال نے بائیو ٹیکنالوجی میں قابل ذکر کامیابیاں حاصل کی ہیں، جو صحت کی دیکھ بھال کی ضروریات کو پورا کرنے کے لیے جدید حل پیش کرتے ہیں۔ ذیل میں قابل ذکر مثالیں ہیں جو متنوع اپیلی کیشنز اور اس تبدیلی کے نقطہ نظر کی کامیابی کی کہانیوں کی نمائش کرتی ہیں۔

13.3 ٹرانسجینک جانوروں کے ذریعہ عطیہ کرنے والے اعضاء کی پیداوار (Production of Donor Organs by Transgenic Animals)

پیوند کاری کے لیے عطیہ دہندگان کے اعضاء کی کمی جدید طب میں ایک اہم چیلنج بنی ہوئی ہے، جس کے نتیجے میں طویل انتظار کا وقت ہوتا ہے اور بعض صورتوں میں، مریض کی اموات ہوتی ہیں۔ ٹرانسجینک جانوروں کی ٹیکنالوجی انجینئرنگ کے ذریعے جانوروں کی زینو ٹرانسپلانٹیشن کے لیے اعضاء کے عطیہ دہندگان کے طور پر کام کرنے کے لیے اس اہم مسئلے کو حل کرنے کے لیے ایک امید افزا راستہ پیش کرتی ہے۔ یہ تفصیلی نوٹ ٹرانسجینک جانوروں سے عطیہ دہندگان کے اعضاء کی پیداوار کے عمل کی کھوج کرتا ہے، جن میں شامل جینیاتی تبدیلیوں اور بعد میں پیوند کاری کے قابل اعضاء کی کٹائی پر توجہ مرکوز کرتا ہے۔

1. ٹرانسجینک جانوروں کی جینیاتی انجینئرنگ (Genetic Engineering of Transgenic Animals)

❖ مثالی جین: α -1,3-galactosyltransferase (GGTA1) کو اکثر ٹرانسجینک خزیروں میں ناک آؤٹ کے لیے نشانہ بنایا جاتا ہے جس کا مقصد زینو ٹرانسپلانٹیشن ہے۔ یہ جین ایک انزائم کو انکوڈ کرتا ہے جو α -gal⁺ منیجین کی ترکیب کے لیے ذمہ دار ہے، جو کہ انسانی اینٹی پگ اینٹی باڈیز کا ایک بڑا ہدف ہے۔

❖ ناک آؤٹ حکمت عملی: CRISPR-Cas9 جین ایڈیٹنگ یا دیگر تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے، α -gal⁺ منیجین اظہار کو ختم کرنے اور xenotransplantation میں ہائپرکیوٹ رد عمل کو کم کرنے کے لیے GGTA1 جین کو پگ جینوم سے روکا یا ہٹا دیا جاتا ہے۔

❖ اضافی تبدیلیاں: دیگر جینوں کو مدافعتی رد عمل میں ترمیم کرنے، اعضاء کی نشوونما کو منظم کرنے، یا انسانی وصول کنندگان کے ساتھ مطابقت کو بڑھانے کے لیے نشانہ بنایا جاسکتا ہے، جیسے کہ تکمیلی ضابطے میں شامل جین یا بڑے ہسٹو کمپیوٹیشنل کمپلیکس (MHC) اظہار۔

2. ٹرانسجینز کا اظہار (Expression of Transgenes)

❖ ٹشو- مخصوص پروموٹرز: ٹرانسجینک سوروں کو ٹشو- مخصوص پروموٹرز کے ساتھ انجینئر کیا جاتا ہے تاکہ ٹرانسپلائنٹیشن کے لیے ہدف بنائے گئے مخصوص اعضاء، جیسے دل، گردے، جگر، یا بلبہ میں مطلوبہ ٹرانسجینز کا اظہار کیا جاسکے۔

❖ ریگولیٹری عناصر: مناسب اظہار کی سطحوں اور بافتوں کی خصوصیت کو یقینی بنانے کے لیے بہتر بنانے والے، انسولیٹر، اور دیگر ریگولیٹری عناصر کو ٹرانسجین تعمیرات میں شامل کیا جاتا ہے۔

3. ٹرانسجینک جانوروں کی نشوونما اور پختگی (Development and Maturation of Transgenic Animals)

❖ مثال: $GGTA1$ ناک آؤٹ اور بافتوں کے لیے مخصوص ٹرانسجین اظہار کے ساتھ ٹرانسجینک خنزیروں کی افزائش کی جاتی ہے اور انہیں مستحکم ٹرانسجین اظہار اور انسانی وصول کنندگان کے ساتھ مطابقت کے لیے منتخب کیا جاتا ہے۔

❖ نشوونما اور نشوونما: ٹرانسجینک خنزیر معمول کی نشوونما اور نشوونما سے گزرتے ہیں، خاص طور پر ٹرانسپلائنٹیشن کے لیے بنائے گئے ہدف کے اعضاء کی نشوونما اور کام پر توجہ دی جاتی ہے، ان کی عملداری اور فعالیت کو یقینی بنانا۔

4. عطیہ کرنے والے اعضاء کی کٹائی (Harvesting of Donor Organs)

❖ جراحی کے طریقہ کار: جب ٹرانسجینک خنزیر پختگی کو پہنچ جاتے ہیں، عطیہ کرنے والے اعضاء جیسے دل، گردے، یا جگر کو جراثیم سے پاک حالات میں ماہر ویٹرنری سرجنوں کے ذریعہ انجام دی جانے والی معیاری جراحی تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے کاٹا جاتا ہے۔

❖ اعضاء کا تحفظ: عطیہ کرنے والے اعضاء کو فوری طور پر اعضاء کے تحفظ کے حل میں رکھا جاتا ہے اور ٹرانسپلائنٹیشن تک عملداری اور فعالیت کو برقرار رکھنے کے لیے کنٹرول شدہ حالات میں منتقل کیا جاتا ہے۔

5. زینوٹرانسپلائنٹیشن (Xenotransplantation)

❖ مثال: آخری مرحلے کے اعضاء کی ناکامی، جیسے کہ جگر کی سروسس یا دل کی ناکامی والے مریض کو طبی ضرورت اور مطابقت کی بنیاد پر زینوٹرانسپلائنٹیشن کے لیے موزوں وصول کنندہ کے طور پر منتخب کیا جاتا ہے۔

❖ جراحی کا طریقہ کار: عطیہ دہندگان کے محفوظ اعضاء، جیسے جگر یا دل، عضو کی پیوند کاری کے لیے قائم کردہ جراحی کے طریقہ کار کا استعمال کرتے ہوئے وصول کنندہ میں ٹرانسپلائنٹ کیا جاتا ہے، مناسب عروقی انسٹوموسس اور عضو کے کام کو یقینی بناتا ہے۔

❖ ٹرانسپلائنٹ کے بعد کی نگرانی: وصول کنندہ کو ٹرانسپلائنٹ کے بعد کی سخت نگرانی سے گزرنا پڑتا ہے اور اسے مسترد ہونے سے بچنے اور ٹرانسپلائنٹ شدہ عضو کی طویل مدتی عملداری اور کام کو یقینی بنانے کے لیے مدافعتی تھراپی حاصل ہوتی ہے۔

ٹرانسجینک جانوروں سے عطیہ دہندگان کے اعضاء کی پیداوار، جس کی مثال زینوٹرانسپلائنٹیشن کے لیے بنائے گئے ٹرانسجینک خنزیر کے ذریعے دی گئی ہے، پیوند کاری کے لیے اعضاء کی سنگین کمی کو دور کرنے کے لیے ایک امید افزا حکمت عملی کی نمائندگی کرتی ہے۔ عین مطابق جینیاتی انجینئرنگ اور محتاط افزائش کے ذریعے، ٹرانسجینک جانور ایسے اعضاء کے ساتھ پیدا کیے جاسکتے ہیں جنہوں نے مدافعتی صلاحیت

کو کم کیا ہو اور انسانی وصول کنندگان کے ساتھ بہتر مطابقت پیدا کی ہو، جس سے زندگی بچانے والے اعضاء کی پیوند کاری کی ضرورت والے مریضوں کے لیے امید پیدا ہوتی ہے۔ اگرچہ اہم چیلنجز باقی ہیں، ٹرانسجینک جانوروں کی ٹیکنالوجی میں جاری تحقیق اور پیشرفت اعضاء کی پیوند کاری میں انقلاب لانے اور دنیا بھر کے مریضوں کے لیے نتائج کو بہتر بنانے کی صلاحیت رکھتی ہے۔

13.4 ناک آؤٹ چوہے (Knockout Mice)

ناک آؤٹ چوہے جدید بائیومیڈیکل ریسرچ کے سنگ بنیاد کی نمائندگی کرتے ہیں، جو جین کے فنکشن، سالماتی راستے اور بیماری کے طریقہ کار کے بارے میں انمول بصیرت پیش کرتے ہیں۔ یہ سائنسی نوٹ ناک آؤٹ ماؤس ٹیکنالوجی، اس کے استعمال، نسل کے طریقوں، اور انسانی حیاتیات اور بیماری کو سمجھنے میں اس کے تعاون کا ایک جائزہ فراہم کرتا ہے۔

1. تعارف

- ❖ ناک آؤٹ چوہے جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جاندار ہیں جن میں دلچسپی کا ایک مخصوص جین غیر فعال یا "ناک آؤٹ" کر دیا گیا ہے، جس سے محققین فینوٹائپ اور فنکشن پر جین کے نقصان کے اثرات کا مطالعہ کر سکتے ہیں۔
- ❖ ان چوہوں نے جین کے افعال کے بارے میں ہماری سمجھ میں انقلاب برپا کر دیا ہے اور انسانی بیماریوں کی مالیکیولر بنیاد کو واضح کرنے کے لیے ناگزیر اوزار بن گئے ہیں، بشمول کینسر، نیوروڈیجیٹیز، عوارض، اور میٹابولک سنڈروم۔

2. تخلیق کے طریقے (Methods of Generation)

- ❖ ٹارگیٹڈ جین میں خلل: ناک آؤٹ چوہوں کو عام طور پر برائن اسٹیم سیلز میں ہومولوگس ری کمبائنیشن کا استعمال کرتے ہوئے پیدا کیا جاتا ہے، جہاں ایک ہدف بنانے والے ویکٹر کو قابل انتخاب مارکر یا دوسری ترتیب سے تبدیل کر کے دلچسپی کے جین کو خراب کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔
- ❖ CRISPR-Cas9 ٹیکنالوجی: جینوم ایڈیٹنگ کی تکنیکوں میں حالیہ پیشرفت، جیسے CRISPR-Cas9، نے مخصوص جینومک لوکی پریڈبل اسٹرینڈ بریکس کو شامل کر کے ناک آؤٹ چوہوں کی زیادہ درست اور موثر نسل کو فعال کیا ہے۔

3. ناک آؤٹ چوہوں کی ایپلی کیشنز (Applications of Knockout Mice)

- ❖ فنکشنل جینومکس: ناک آؤٹ چوہوں کا استعمال عام نشوونما، فزیالوجی اور رویے میں مخصوص جینز کے کردار کا تعین کرنے کے لیے کیا جاتا ہے۔ جین کے نقصان کے فینوٹائپک نتائج کا مشاہدہ کر کے، محققین جین کے کام اور سالماتی راستے کا اندازہ لگا سکتے ہیں۔
- ❖ بیماری کی ماڈلنگ: ناک آؤٹ چوہے انسانی بیماریوں کے رجحان کا مطالعہ کرنے کے لیے قیمتی نمونے کے طور پر کام کرتے

ہیں۔ بیماریوں سے وابستہ جینیاتی تغیرات کی نقل کرتے ہوئے، یہ چوہے بیماری کے طریقہ کار اور ممکنہ علاج کے اہداف کے بارے میں بصیرت فراہم کرتے ہیں۔

❖ • منشیات کی دریافت: ناک آؤٹ چوہوں کو منشیات کے اہداف کی توثیق کرنے اور ممکنہ علاج کی افادیت اور حفاظت کا اندازہ لگانے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ ناک آؤٹ چوہوں میں فارماسولوجیکل اسٹڈیز منشیات کے امیدواروں کو مزید ترقی اور کلینیکل ٹرائلز کے لیے ترجیح دینے میں مدد کرتی ہیں۔

4. ناک آؤٹ ماؤس اسٹڈیز کی مثالیں (Examples of Knockout Mouse Studies)

❖ ٹیومر کو دبانے والے جینز: ناک آؤٹ چوہوں میں ٹیومر دبانے والے جینز کی کمی ہوتی ہے جیسے کہ *p53* یا *PTEN* خود بخود ٹیومر تیار کرتے ہیں، جو کینسر کی روک تھام میں ان کے اہم کردار کا ثبوت فراہم کرتے ہیں۔

❖ اعصابی عوارض: نیوروڈیجینریٹو بیماریوں سے منسلک جینوں میں تبدیلیوں کے ساتھ ناک آؤٹ چوہوں، جیسے کہ الزائمر یا پارکینسنز کی بیماری، انسانی پیٹھالوجی سے مشابہہ فینوٹائپس کی نمائش کرتے ہیں، علاج کی مداخلتوں کی نشوونما میں مدد کرتے ہیں۔

❖ میٹابولک سنڈروم: ناک آؤٹ چوہوں میں میٹابولزم کے کلیدی ریگولیٹرز کی کمی ہوتی ہے، جیسے لیسٹین یا انسولین ریسپنڈرز، موٹاپا، ذیابیطس اور دیگر میٹابولک عوارض پیدا کرتے ہیں، جو میٹابولک ہومیوسٹاسس کو برقرار رکھنے میں ان جینز کی اہمیت کو اجاگر کرتے ہیں۔

5. چیلنجز اور مستقبل کی سمتیں (Challenges and Future Directions)

❖ ہدف سے باہر اثرات: *CRISPR-Cas9* -ثالثی والے ناک آؤٹ چوہے ہدف سے باہر کی تبدیلیوں کی نمائش کر سکتے ہیں، فینوٹائپس اور جین ٹائپس کی محتاط توثیق کی ضرورت ہے۔

❖ جین فالتو پن: معاوضہ کے طریقہ کار اور جینیاتی فالتو پن ناک آؤٹ فینوٹائپس کی تشریح کو الجھا سکتے ہیں، جس کے لیے مشترکہ یا مشروط ناک آؤٹ طریقوں کی ضرورت ہوتی ہے۔

❖ فنکشنل جینومکس: مستقبل کے مطالعے میں پیچیدہ حیاتیاتی عمل اور بیماریوں کے تحت جین نیٹ ورکس اور تعاملات کو واضح کرنے کے لیے جامع ناک آؤٹ اسکرینوں پر توجہ مرکوز کی جائے گی۔

ناک آؤٹ چوہوں نے بائیومیڈیکل تحقیق میں انقلاب برپا کر کے جین کے فنکشن کی درست ہیرا پھیری کو فعال کر کے اور جین کے کام، بیماری کے طریقہ کار، اور علاج کے اہداف کے بارے میں انمول بصیرت فراہم کی ہے۔ ناک آؤٹ ماؤس ٹیکنالوجی میں مسلسل پیشرفت انسانی حیاتیات کے بارے میں ہماری سمجھ کو مزید بڑھانے اور بیماری کی تشخیص اور علاج کی حکمت عملیوں کو بہتر بنانے کا وعدہ کرتی ہے۔

13.5 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس اکائی کے مطالعے بعد طلباء آسانی سے بیان کر سکتے ہیں:

- ❖ جینیاتی انجینئرنگ کے تصور کی وضاحت کریں اور ٹرانسجینک جانوروں کا استعمال کرتے ہوئے فارماسیوٹیکلز، بائیو مالیکیولز اور عطیہ کرنے والے اعضاء کی تیاری میں اس کے اطلاق کی وضاحت کریں۔
- ❖ پیچیدہ پروٹین، انزائمز اور اینٹی باڈیز کی تیاری کے لیے جانوروں کے جینوم میں مخصوص جینز کو زندہ باپوری ایکٹرز میں تبدیل کرنے کے عمل کی وضاحت کریں۔
- ❖ زینو ٹرانسپلانٹیشن کے فرنیٹر اور جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانوروں کے کردار کا جائزہ لیں، خاص طور پر خنزیر، انسانی پیوند کاری کے لیے ممکنہ اعضاء کے عطیہ دہندگان کے طور پر، اعضاء کو مسترد کرنے اور بیماری کی منتقلی جیسے مسائل کو حل کرنا۔

13.6 کلیدی الفاظ (Keywords)

Transgenic Animal	ٹرانسجینک جانور
وہ جانور جن کو جینیاتی طور پر تبدیل کیا گیا ہے تاکہ کسی دوسری نسل سے ایک یا زیادہ غیر ملکی جین (ٹرانسجینز) شامل ہوں۔	
Xenotransplantation	زینو ٹرانسپلانٹیشن
خلیات، ٹشوز، یا اعضاء کی ایک نوع سے دوسری نسل میں، عام طور پر جانوروں سے انسانوں میں ٹرانسپلانٹیشن۔	
Knockout mice	ناک آؤٹ چوہے
وہ چوہے جن کو جینیاتی طور پر ایک مخصوص جین "ناک آؤٹ" یا غیر فعال کرنے کے لیے بنایا گیا ہے، جو محققین کو فینو ٹائپ اور فنکشن پر جین کے نقصان کے اثرات کا مطالعہ کرنے کے قابل بناتے ہیں۔	
Biopharmaceuticals	بائیو فارماسیوٹیکل
حیاتیاتی ذرائع سے حاصل کردہ دوا سازی، بشمول پروٹین، نیوکلک ایسڈ، اینٹی باڈیز، یا زندہ خلیات، جو اکثر بائیو ٹیکنالوجی کے طریقوں سے تیار ہوتے ہیں۔	

13.7 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

13.7.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. بکری کے دودھ میں دوبارہ پیدا ہونے والے انسانی پروٹین کی پیداوار میں، ٹرانسجین کو عام طور پر _____ پر مومٹر کے

کنٹرول میں جینوم میں داخل کیا جاتا ہے۔ Mammary gland-specific

2. ناک آؤٹ چوہے جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جاندار ہیں جہاں دلچسپی کا ایک مخصوص جین _____ غیر فعال یا "ناک آؤٹ" کر دیا گیا ہے۔
3. ٹرانسپلائنٹیشن کے لیے عطیہ کرنے والے اعضاء کی کمی کو زینو ٹرانسپلائنٹیشن کے لیے _____ جانوروں کے استعمال سے پورا کیا جاسکتا ہے۔ ٹرانسجینک
4. CRISPR-Cas9 ٹیکنالوجی مخصوص جینومک _____ پروڈبل اسٹرینڈ بریکس کو شامل کر کے ناک آؤٹ چوہوں کی زیادہ درست اور موثر نسل کو قابل بناتی ہے۔
5. زینو ٹرانسپلائنٹیشن کے لیے بنائے گئے ٹرانسجینک خنزیر اکثر جینیاتی تبدیلی سے گزرتے ہیں تاکہ _____ antigen.α- gal کی ترکیب کے لیے ذمہ دار اینزائم کو انکوڈنگ کرنے والے جین میں خلل ڈالنے یا ہٹانے کے لیے
6. ٹرانسجینک جانوروں سے عطیہ کرنے والے اعضاء کی پیداوار میں، ٹشو کے لیے مخصوص _____ کو انجینیئر کیا جاتا ہے تاکہ ٹرانسپلائنٹیشن کے لیے ہدف بنائے گئے مخصوص اعضاء میں مطلوبہ ٹرانسجینز کا اظہار کیا جاسکے۔
7. ناک آؤٹ چوہے _____ سے وابستہ جینیاتی تغیرات کی نقل کر کے انسانی بیماریوں کے روگجن کا مطالعہ کرنے کے لیے قیمتی نمونے کے طور پر کام کرتے ہیں۔
8. ٹرانسجینک بکریوں کو A Tryn® پیدا کرنے کے لیے انجینیئر کیا گیا ہے جو اپنے _____ دودھ میں دوبارہ پیدا ہونے والے انسانی اینٹی تھر و مین III کو خارج کرتے ہیں
9. _____ چوہے انسانی بیماریوں کی مالیکیولر بنیاد کو واضح کرنے کے لیے ناگزیر اوزار بن چکے ہیں، بشمول کینسر، نیورو ڈیجینریٹو عوارض، اور میٹابولک سنڈروم۔ ناک آؤٹ
10. زینو ٹرانسپلائنٹیشن میں خلیات، ٹشوز، یا اعضاء کی ایک نوع سے دوسری نسل میں، عام طور پر _____ سے انسانوں میں پیوند کاری شامل ہوتی ہے۔ جانور

13.7.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. بکری کے دودھ میں دوبارہ پیدا ہونے والے انسانی پروٹین کی پیداوار بائیوفارماسیوٹیکل ترقی میں کس طرح کردار ادا کرتی ہے؟
2. زینو ٹرانسپلائنٹیشن کے لیے ٹرانسجینک جانوروں کے استعمال سے وابستہ ممکنہ فوائد اور چیلنجز پر تبادلہ خیال کریں۔
3. اعضاء کی پیوند کاری کے لیے انجینیئر کیے گئے ٹرانسجینک جانوروں میں ٹرانسجینز کے اظہار کو چلانے میں ٹشو مخصوص پروموٹرز کے کردار کی وضاحت کریں۔
4. ناک آؤٹ چوہوں کو پیدا کرنے اور بائیو میڈیکل ریسرچ کو آگے بڑھانے کے لیے CRISPR-Cas9 ٹیکنالوجی کے کیا مضمرات ہیں؟

13.7.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. بائیوفارماسیو ٹیکنالوجی کی تیاری کے لیے ٹرانسجینک جانوروں کے استعمال سے متعلق اخلاقی تحفظات پر بحث کریں۔
2. ٹرانسپلانٹیشن کے لیے عطیہ دہندگان کے اعضاء کی کمی کے حل کے طور پر زینو ٹرانسپلانٹیشن کی فزیکلٹی اور حفاظت کا جائزہ لیں۔
3. ٹرانسجینک جانوروں سے ماخوذ بائیوفارماسیو ٹیکنالوجی کے پیداواری عمل اور اپیلی کیشنز کا موازنہ اور اس کے برعکس کریں۔
4. حیاتیاتی تحقیق کے میدان پر CRISPR-Cas9 ٹیکنالوجی کے اثرات کا تجزیہ کریں۔

13.8 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Transgene	ٹرانسجین	ٹرانسجین	ایک جین جو مصنوعی طور پر کسی دوسری نسل سے کسی جاندار کے جینوم میں متعارف کرایا گیا ہے۔
Promotor	پروموٹر	پروموٹر	ڈی این اے کا ایک خطہ جو کسی خاص جین کی نقل کو شروع کرتا ہے، یہ کنٹرول کرتا ہے کہ جین کا اظہار کب اور کہاں ہوتا ہے۔
Homologous Recombination	ہم جنس دوبارہ ملاپ	-	ایک ایسا عمل جہاں ڈی این اے کی ترتیب کا تبادلہ دو ملتے جلتے یا ایک جیسے ڈی این اے مالیکیولز کے درمیان ہوتا ہے، جو اکثر جینوم میں مخصوص تبدیلیوں کو متعارف کرانے کے لیے جین کو نشانہ بنانے میں استعمال ہوتا ہے۔

13.9 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Clark, A. J., & Coward, K. (Eds.). (2017). Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook (3rd ed.). Academic Press.
2. Forsberg, E. J., & Fransson, L. A. (Eds.). (2004). Xenotransplantation: Basic Research and Clinical Applications. Springer.
3. Murray, J. D., Maga, E. A., & Murray, J. D. (Eds.). (2013). Gene Transfer and Therapy in the Nervous System. Academic Press.

اکائی 14: جینیاتی امراض کی سالماتی تشخیص

(An Overview on Gene Therapy)

اکائی کے اجزاء:

تمہید (Introduction)	14.0
مقاصد (Objectives)	14.1
سسٹک فائبروسس (Cystic Fibrosis)	14.2
ایلیل مخصوص او لیکونو کلیوٹائیڈ (ASO) ہائبرڈائزیشن (Allele Specific Oligonucleotide (ASO) Hybridisation)	14.2.1
سکیل سیل انیمیا (Sickle Cell Anemia)	14.3
Polymerase Chain Reaction - Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)	14.3.1
ممالیہ کے خلیوں میں کلون شدہ جین کا اظہار (Expressing cloned genes in mammalian cells)	14.4
اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)	14.5
کلیدی الفاظ (Keywords)	14.6
نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)	14.7
معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)	14.7.1
مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)	14.7.2
طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)	14.7.3
فرہنگ (Glossary)	14.8
مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)	14.9

14.0 تمہید (Introduction)

ایک خلیہ تمام جانداروں کی بنیادی عمارت ہے۔ اس کی سالماتی ساخت کو ایک جین کے ذریعے کوڈ کیا جاتا ہے جو ڈی این اے سے بنا موروثی کی بنیادی جسمانی اور فعال اکائی ہے۔ ایک جینیاتی خرابی اس وقت ہوتی ہے جب کسی فرد کے جینیاتی میک اپ میں روگجنک تبدیلی ہوتی ہے۔ دستیاب روایتی تشخیصی طریقے ناقابل اعتماد نتائج دے سکتے ہیں اور مخصوص تشخیص کی کمی بھی علاج کے دوران کو متاثر کر سکتی ہے۔ اس طرح سالماتی تشخیص کے میدان میں حالیہ پیشرفت نے تیز رفتار، کم محنتی ترقی میں مدد کی

14.1 مقاصد (Objectives)

- اس یونٹ کے اپنے مطالعہ کے اختتام پر، آپ کو قابل ہونا چاہیے:-
- ❖ انسان میں جینیاتی بیماریوں کی سالماتی تشخیص کے پیچھے اصول کی وضاحت کریں۔
- ❖ جینیاتی بیماریوں کی تشخیص کے لیے دستیاب مختلف تکنیکوں کی وضاحت کریں جیسے سسٹک فائبروسس اور سکل سیل انیمیا۔
- ❖ علاج کے مقاصد کے لیے ستنداریوں کے خلیوں میں کلون شدہ جین کے اظہار کے فوائد کی وضاحت کریں۔

14.2 سسٹک فائبروسس (Cystic Fibrosis)

سسٹک فائبروسس (سی ایف) ایک پیچیدہ ملٹی سسٹم ڈس آرڈر ہے جو آٹوسومل ریسسیو فیشن میں وراثت میں ملتا ہے جو پلمونری، لبلبے، معدے اور تولیدی نظام کو متاثر کرتا ہے۔ یہ 7 ویں کروموسوم (q31.27) پر واقع CFTR جین میں تغیرات کی وجہ سے ہوتا ہے جو کہ سسٹک فائبروسس ٹرانس میبرن کنڈکٹنس ریگولیٹری پروٹین کو انکوڈنگ کرتا ہے، جو کہ اپکلا خلیوں میں موجود ایک جھلی کلورائیڈ چینل ہے۔ غیر معمولی موٹی اور چپچپا بلغم کی پیداوار کی وجہ سے مریضوں میں رکاوٹ پلمونری بیماری، لبلبے کی کمی، اور پسینے میں کلورائیڈ کی زیادہ مقدار کی علامات ظاہر ہوتی ہیں۔

1989 میں CFTR جین کی دریافت کے بعد سے، اس جین کی 2000 کے قریب تبدیل شدہ شکلیں نوٹ کی گئی ہیں، جن میں سے سب سے زیادہ عام اور شدید ڈیلٹا ایف 508 ایلوٹروپورتن ہے جس کی وجہ سے CFTR میں 508 ویں پوزیشن پر فینیل آلینین امینو ایسڈ (F) کہا جاتا ہے (کو حذف کیا جاتا ہے۔ ڈیل ایف 508 کہلاتا جین ایک غیر فعال CFTR پروٹین کی طرف لے جاتا ہے۔

سسٹک فائبروسس کے معیاری تشخیصی ٹیسٹ سینے کے ایکمرے، پلمونری فنکشن ٹیسٹ اور سویٹ ٹیسٹ ہیں جو پسینے میں نمک کی مقدار ($\text{mmol/L} < 60$) کی پیمائش میں مدد کرتے ہیں۔ یہ تشخیص کلینشین کو اس حالت کے علاج اور انتظام میں مدد دیتی ہے، تاہم اس جینیاتی بیماری کی آئندہ نسلوں تک منتقلی کے بارے میں کوئی معلومات حاصل نہیں کرے گی۔ ڈی این اے کی بنیاد پر مالیکیولر تشخیص اس بیماری

کے لیے ذمہ دار میوٹیشن کی قسم کے بارے میں معلومات فراہم کرے گی جس سے آنے والی نسلوں میں جینیاتی مشاورت میں مدد ملے گی۔۔

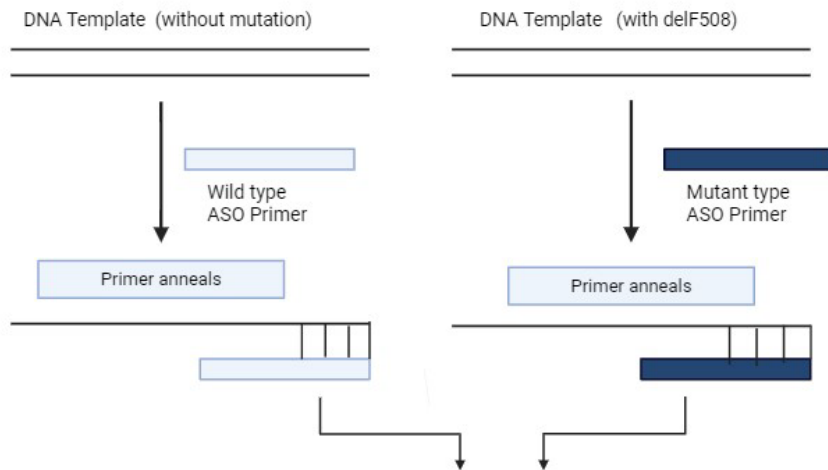
جینیاتی جانچ کے ذریعے تغیرات کی شناخت پی سی آر، آر ایف ایل پی، ڈی این اے کی ترتیب یا ایلیل مخصوص اولیگونوکلئوٹائیڈ (اے ایس او) ہائبرڈائزیشن کے ذریعے کی جاسکتی ہے۔ سسٹک فائبروسس کی ڈی این اے پر مبنی تشخیص کو سمجھنے کے لیے ہم یہاں ASO کی سادہ تکنیک پر بات کریں گے۔

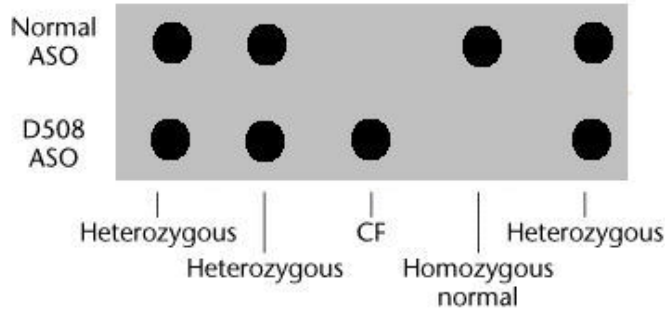
❖ خون کی نالیوں کی ناکافی تشکیل مصنوعی اعضاء کی نشوونما کو محدود کرتی ہے یا مخصوص قسموں سے باہر پیچیدہ بافتوں کی تعمیر کو محدود کرتی ہے، جیسے کارٹیلج، لیگامینٹ اور جلد۔

14.2.1 ایلیل مخصوص اولیگونوکلئوٹائیڈ (ASO) ہائبرڈائزیشن (Allele Specific Oligonucleotide Hybridisation) (ASO)

اس ٹیسٹ میں ایک مختصر نیوکلئوٹائیڈ چین جسے oligonucleotide probe کہا جاتا ہے ڈیل ایف 508 ڈیلیٹیشن کے ساتھ نارمل اور اہیر یورٹی ایللی کے لیے ڈی این اے کی ترتیب کے تکمیلی سلسلے کے ساتھ بنایا گیا ہے، یعنی ایک ایلیل مخصوص اولیگونوکلئوٹائیڈ (ASO)۔ اگر فرد اس اہیر یورتن کو لے کر جاتا ہے تو ASO خاص طور پر اس کے ساتھ اس بات کی نشاندہی کرے گا کہ کون متاثر ہوا ہے۔۔

ٹیسٹ کیے جانے والے افراد سے خون کا نمونہ جمع کیا جاتا ہے جس کے بعد ڈی این اے آکسولیشن ہوتا ہے۔ الگ تھلگ ڈبل پھنسنے ہوئے ڈی این اے کو ڈینیچر کیا جاتا ہے اور اسے جنوبی ہائبرڈائزیشن جھلی پر دیکھا جاتا ہے۔ جھلی کو تابکار ASO سے جانچا جاتا ہے۔ واحد پھنسنے ہوئے ڈی این اے میں اے ایس او کی ہائبرڈائزیشن آٹوریڈیو گرام پر ایک جگہ سے ظاہر ہوتی ہے، جو عام ایلیل یا ڈیل ایف 508 ایلیل یا دونوں ایللیز کی موجودگی کی نشاندہی کرتا ہے جو ان کے جین ٹائپ کو ہوموزائگس نارمل، ہوموزائگس اہیر یورٹی یا متضاد ایلیل کے لیے heterozygous کے طور پر ظاہر کرتا ہے۔ اس طرح خاص طور پر مالیکیولر تشخیص کا استعمال کسی فرد کے ساتھ ساتھ ان کے خاندان کے افراد میں سسٹک فائبروسس ایلیل کا پتہ لگانے کے لیے کیا جاسکتا ہے جسے جینیاتی مشاورت اور قبل از پیدائش کی تشخیص کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔۔

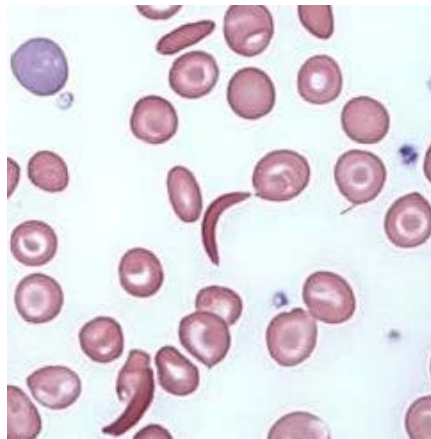




یہ اعداد و شمار سسٹک فائبروسس کی اسکریننگ کے لیے ایلیلی مخصوص اولیگوہائبرڈائزیشن طریقہ کے پیچھے اصول کو واضح کرتا ہے۔ اگر فرد ہوموزائگس نارمل ہے یا متاثرہ دھبے پر صرف ایک دھبہ نظر آتا ہے جیسا کہ شکل میں دکھایا گیا ہے جہاں دو جگہ کے طور پر دیکھا جائے گا کہ آیا فرد ڈیلٹا ایف 508 میوٹیشن کے لیے متضاد کیریئر ہے۔

14.3 سکیل سیل انیمیا (Sickle Cell Anemia)

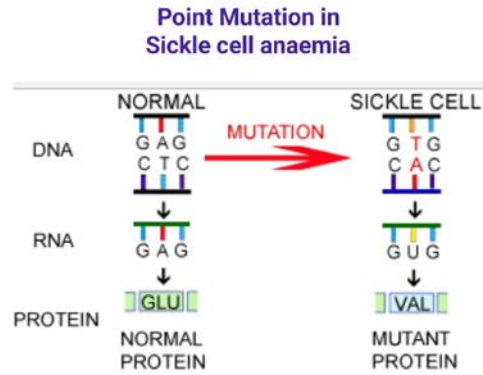
سکل سیل انیمیا ایک جینیاتی عارضہ ہے جو خود کار طریقے سے وراثت میں ملتا ہے جو ایک سے زیادہ نظاموں کو متاثر کرتا ہے جس کے نتیجے میں وقت کے ساتھ ساتھ اعضاء کو بتدریج نقصان پہنچتا ہے۔ یہ ہیموگلوبن β چین جین میں 6 ویں کوڈن کو $GTG > GAG$ سے تبدیل کرنے والے متبادل ($A > T$) پوائنٹ کی تبدیلی کی وجہ سے ہوتا ہے۔ ڈی این اے میں اس تبدیلی کے نتیجے میں، امینو ایسڈ گلوٹامک ایسڈ ہیموگلوبن پروٹین میں ویلانن سے بدل جاتا ہے۔ یہ ایک غیر معمولی پروٹین ہے جسے سکیل ہیموگلوبن کہا جاتا ہے جس نے ڈی آکسیجن والی حالت میں حل پذیری کو کم کر دیا ہے جس کی وجہ سے درانتی کی شکل کے سرخ خون کے خلیات بنتے ہیں۔ سکل سیل کی بیماری فرد میں $\beta S/\beta S$ ، ہوموزائگس جین کی دو تبدیل شدہ کاپیاں ہوتی ہیں۔ سکیل سیل خاصیت والے افراد متفاوت ہوتے ہیں جن میں ایک نارمل ایلیل اور دوسرا اہتر یورٹی ایلیل ($\beta A/\beta S$) ہوتا ہے جہاں عام افراد میں $\beta A/\beta A$ ہوتا ہے۔



مندرجہ بالا اعداد و شمار عام درانتی کی شکل والے آر بی سی کو دکھاتا ہے۔

Hb S کا پتہ لگانے اور سکیل سیل کی بیماری کی تشخیص میں بائیو کیمیکل اور مالیکیولر ٹیسٹوں کا امتزاج شامل ہے، تاہم سکیل سیل ایلیل کا

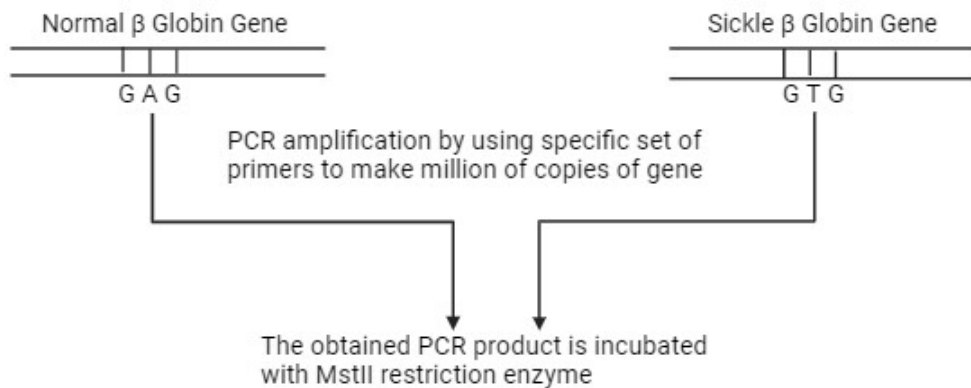
پتہ لگانے کے لیے، DNA پر مبنی مالیکیولر ٹیسٹ یہاں PCR – RFLP طریقہ پر بات کریں گے۔

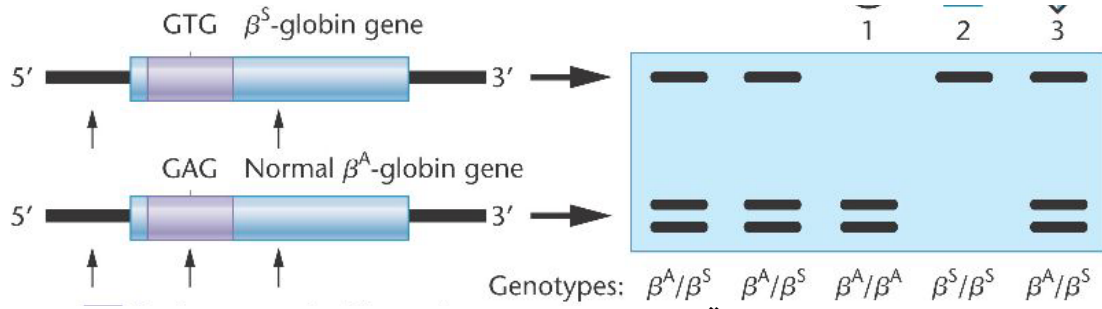


یہ اعداد و شمار بیمار سیل انیمیا کی وجہ کے پیچھے میکائزم کو واضح کرتا ہے جہاں نقطہ اتپر یورتن کی وجہ سے نیو کلیوٹائیڈ A سے T کا متبادل ہوتا ہے جس کے نتیجے میں اتپر یورتنی پروٹین میں گلوٹامک ایسڈ کو ویلائن میں تبدیل کیا جاتا ہے۔

Polymerase Chain Reaction - Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 14.3.1

ریسٹرکشن اینزائمز وہ انزائمز ہیں جو ڈی این اے کو مخصوص سائٹس (پابندی کی جگہ) پر کاٹ سکتے ہیں۔ PCR تکنیک کی مدد سے β جین کو پرائمر کے مخصوص سیٹ کا استعمال کرتے ہوئے بہت سی کاپیوں میں بنایا جاتا ہے۔ ایمپلیفائیڈ پی سی آر پروڈکٹ کا علاج ایک پابندی والے انزائم کے ذریعے کیا جاتا ہے جسے MstII کہتے ہیں۔ $(\beta A \beta A)$ والے ایک صحت مند فرد میں، MstII کے ذریعے جین کاٹا جاتا ہے اور دو ٹکڑے حاصل ہوتے ہیں جب کہ صرف ایک ٹکڑا اگر فرد $\beta S \beta S$ لے رہا ہو۔ اگر فرد سکیل سیل ٹریٹ $(\beta A \beta S)$ کا ہے تو کل تین ٹکڑے پیدا ہوتے ہیں، دو βA سے اور ایک βS لیلیل سے۔ ان ٹکڑوں کو جیل الیکٹروفورسس کے ذریعے دیکھا جاسکتا ہے۔





درج ذیل اعداد و شمار میں سکیل سیل انیمیا کی تشخیص کے لیے PCR-RFLP کے پیچھے طریقہ دکھایا گیا ہے۔ پہلے مطلوبہ علاقے کو پرائمر کے مخصوص سائٹ کا استعمال کرتے ہوئے بڑھایا جاتا ہے اور لاکھوں کاپیاں بنائی جاتی ہیں۔ حاصل کردہ پی سی آر پروڈکٹ کو پابندی کے انزائم MstII کا استعمال کر کے کاٹ دیا جاتا ہے۔ تیرا انزائم کے لیے پابندی کی جگہ کی نشاندہی کرتا ہے۔ اس کے بعد ٹکڑوں کا تجزیہ کیا جاتا ہے جس سے پتہ چلتا ہے کہ β -گلوبین جین میں نقطہ اتپر پورتن کی وجہ سے MstII انزائم کے لیے ایک پابندی والی جگہ ختم ہو گئی ہے، متاثرہ فرد میں صرف ایک ٹکڑا پیدا کر کے۔

14.4 ممالیہ کے خلیوں میں کلون شدہ جین کا اظہار (Expressing cloned genes in mammalian cells)

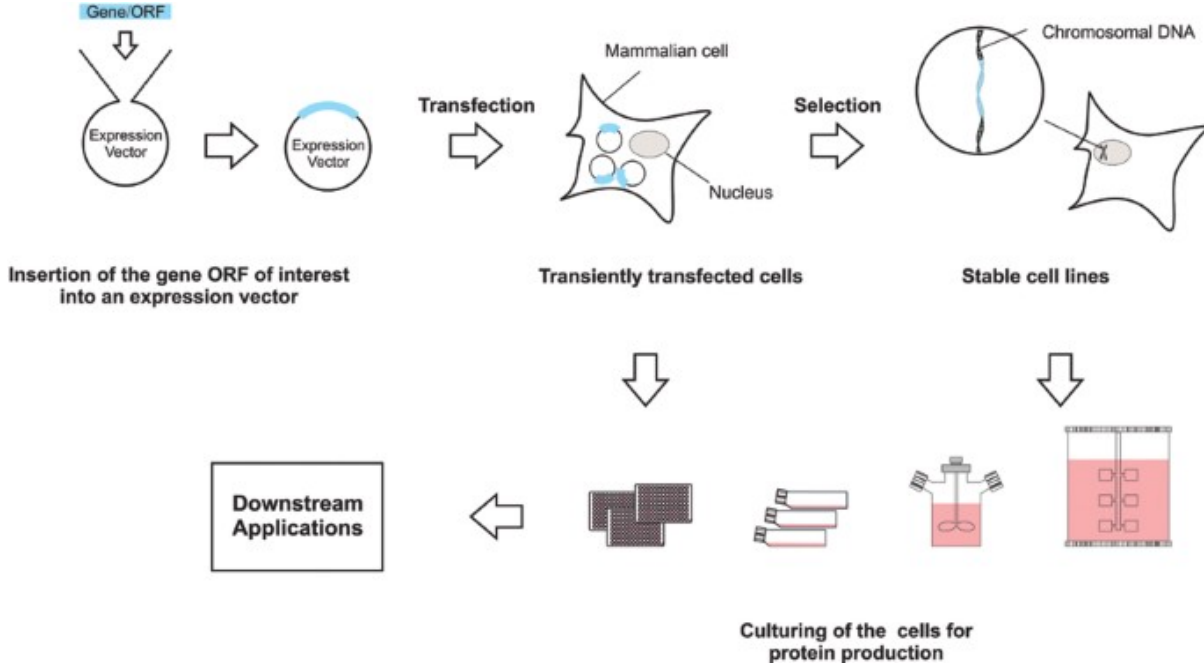
جین کلوننگ ڈی این اے سیگمنٹ کی متعدد کاپیاں بنانے کا عمل ہے۔ اس کے لیے مطلوبہ جین کو کلوننگ ویکٹر (بیکٹیریل پلاسمید یا بیکٹیریوفج) کے ساتھ ملا کر ایک ریکوہرینینٹ ڈی این اے بنایا جاتا ہے۔ کلوننگ ویکٹر کا استعمال مطلوبہ ٹکڑے کو بڑھانے کے لیے کیا جاتا ہے لیکن اس کے اظہار کو یوکر یوٹک پروٹین کے اظہار میں مدد کے لیے خصوصی نظام کی ضرورت ہوتی ہے۔ کلون شدہ جین کو اس کی حیاتیاتی طور پر فعال شکل میں ظاہر کرنے کے لیے، مناسب اظہار ویکٹر کے ساتھ ایک ممالیہ سیل لائن کو تعمیر کرنے کی ضرورت ہے۔ ایکسپریشن ویکٹر بیکٹیریل یا وائرل ڈی این اے ہو سکتا ہے جس میں ریگولیٹری ترتیب جیسے فروغ دینے والے، بڑھانے والے اور ممالیہ کے خلیے میں مطلوبہ جین کے موثر اظہار کے لیے دلچسپی کا جین ہوتا ہے۔

تکنیکی طور پر زیادہ تر جینیاتی تبدیلیاں حیاتیات کی سادگی اور حفاظت کی وجہ سے بیکٹیریا میں کی جاتی ہیں تاہم ہماری دلچسپی کے یوکر ایوٹک پروٹین کو ظاہر کرنے کے لیے بعد از ترجمے کی ترمیم اور پروٹین فولڈنگ کے لیے پروکیرٹس میں مشینری کی کمی ہے۔ اس لیے یوکر ایوٹک خلیات جیسے خمیر اور ممالیہ کے خلیے بڑی مقدار میں فعال یوکر ایوٹک پروٹین حاصل کرنے کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔

ممالیہ کے خلیوں میں جین کا اظہار کرنے کے لیے، سب سے پہلے ایک موزوں خلیے (چینی ہیمسٹر اووری (CHO) خلیات، ماؤس مائیلوما سلیز وغیرہ) کا انتخاب کیا جاتا ہے اور سیل لائنوں کو ممالیہ کے وائرل ویکٹر کے ذریعے منتقل کیا جاتا ہے جس میں موثر پروموٹر ہوتا ہے۔ مطلوبہ جین کے ساتھ سلیکشن مار کر۔ ایک بار جب یہ حاصل ہو جاتا ہے تو پروٹین کا اظہار کیا جاتا ہے جو مناسب طریقے سے تبدیل کر کے اپنی حیاتیاتی طور پر فعال شکلوں میں جوڑ دیا جاتا ہے۔

ممالیہ کے خلیات سے پہلی منظور شدہ مصنوعات ٹشو پلاسمینوجن ایکٹیویٹر (ٹی پی اے) تھی جو فالج اور دل کے مریضوں کے لیے خون کے

لو تھڑے کو تحلیل کرنے میں استعمال ہوتی تھی جسے 1987 میں جہنٹیک انکارپوریشن نے تیار کیا تھا۔ آج تک متعدد طبی اور صنعتی طور پر اہم مصنوعات جیسے کہ ویکسین، انزائمز، ہارمونز وغیرہ کوریومینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی اور ممالیہ سیل کلچرز کا استعمال کرتے ہوئے تیار کیا گیا ہے جو مصنوعات کی لاگت اور آسانی سے دستیابی کو کم کرنے میں مدد کرتے ہیں۔



یہ اعداد و شمار اس طریقہ کار کو واضح کرتا ہے کہ کس طرح دلچسپی کے جین کو اظہار ویکٹر میں متعارف کرایا جاتا ہے۔ ایکسپریشن ویکٹر کو ممالیہ کے خلیوں میں منتقلی کے ذریعے متعارف کرایا جاتا ہے۔ وہ خلیات جو دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے کو لیتے ہیں ان کا انتخاب کیا جاتا ہے اور پروٹین کی تیاری کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

14.5 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس اکائی کے مطالعے بعد طلباء آسانی سے بیان کر سکتے ہیں:

- ❖ بنیادی باتوں کی وضاحت کر سکتا ہے کہ کس طرح جین میں تغیرات جینیاتی امراض کا سبب بن سکتے ہیں۔
- ❖ جینیاتی امراض کی تشخیص کے لیے دستیاب مختلف مالیکیولر تشخیصی تکنیکوں کے پیچھے اصول کی وضاحت کر سکتے ہیں۔
- ❖ وضاحت کر سکتے ہیں کہ ممالیہ کے خلیوں میں ایک فعال پروٹین کا اظہار کیسے کیا جاتا ہے۔

14.6 کلیدی الفاظ (Keywords)

نقطہ اتپر یور تن Point mutation : یہ ایک اور نیو کلیوٹائیڈ کے ساتھ واحد جنگلی قسم کے نیو کلیوٹائیڈ کے متبادل کے

طور پر بیان کیا جاتا ہے۔

پروب	Probe	مختصر اولیگو نیوکلیوٹائیڈ اسٹریٹجی جو جینومک ڈی این اے میں ہدف والے علاقے سے منسلک ہونے کے لیے تکمیلی ترتیب رکھتا ہے۔
جینیاتی مشاورت	Genetic Counselling	یہ خاندانوں میں جینیاتی عوارض کی وراثت اور لاعلاج جینیاتی خرابی سے نمٹنے اور ان کا انتظام کرنے کے بارے میں معلومات فراہم کرتا ہے۔
منتقل	Transfection	یہ غیر ملکی DNA/RNA کو کسی خلیے میں متعارف کرانے کی تکنیک ہے جہاں یہ اصل میں خلیے کی خصوصیات کو تبدیل کرنے کی نیت کے ساتھ نہیں پایا جاتا ہے۔۔

14.7 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

14.7.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. سسٹک فائبروسس _____ جین میں تبدیلی کی وجہ سے ہوتا ہے۔
2. CFTR جین _____ پر موجود ہے۔
3. CFTR جین میں DeltaF508 اٹیورتن _____ نامی جینیاتی عارضے کا سبب بنتا ہے۔
4. سکیل سیل انیمیا کی وراثت کا طریقہ ہے _____۔
5. ری ایکشن کو جین کی کاپیوں کی تعداد کو ضرب دینے میں استعمال کیا جاتا ہے۔
6. β گلوبن جین کے 6 ویں کوڈن میں اٹیورتن کی وجہ سے _____ کو ویلان سے بدل دیا جاتا ہے۔
7. خامروں کو مالیکیولر کینیجی کہا جاتا ہے۔
8. چینی ہیمر اور سیل لائن _____ کی ایک مثال ہے۔
9. پروموٹر اور بڑھانے والا _____ ویکٹر میں موجود ہیں۔
10. پروبس کو سسٹک فائبروسس کی تشخیص کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

14.7.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. سسٹک فائبروسس کیا ہے؟
2. ہیموگلوبن جین کے لیے سکیل سیل (βS) اور نارمل ایلبل (βA) کے لیے ممکنہ جین ٹائپس لکھیں؟
3. جین کلوننگ کی تعریف کیا ہے؟

4. Restriction enzymes کیا ہیں؟

5. کلوننگ اور ایکسپریژن ویکٹر میں کیا فرق ہے؟

14.7.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. ASO کیا ہے؟ یہ سسٹم فائبروسس کی تشخیص میں کیسے استعمال ہوتا ہے؟
2. لکھیں کہ PCR-RFLP کو سکیل سیل انیمیا کی سالماتی تشخیص میں کیسے استعمال کیا جاتا ہے؟
3. یو کریٹک پروٹین کا اظہار پروکاریک نظام میں کیوں نہیں کیا جاسکتا؟
4. ممالیہ کے خلیے میں کلون شدہ جین کے اظہار کی خاکہ نگاری کی وضاحت کریں؟ ممالیہ سیل ایکسپریژن سسٹم کے اطلاقات کیا ہیں؟

14.8 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Primer	پرائمر	پرائمر	پرائمر: یہ ایک مختصر نیوکلک ایسڈ تسلسل ہے جو ڈی این اے کے نئے اسٹریٹنڈز کی ترکیب کے لیے ایک نقطہ آغاز کی طرح کام کرتا ہے جیسا کہ پولیمریز چین ری ایکشن میں ہوتا ہے۔
Recombinant DNA	ریکومبیننٹ ڈی این اے	ریکومبیننٹ ڈی این اے	یہ مصنوعی طور پر بنایا گیا ڈی این اے سیگمنٹ ہے جو مختلف ذرائع سے حاصل کردہ دو یا دو سے زیادہ مختلف جین ترتیبوں کے امتزاج سے بنتا ہے۔
Homozygous / Heterozygous	ہوموزائگس / ہیٹروزائگس	ہوموزائگس / ہیٹروزائگس	Homozygous وہ افراد ہیں جو جیسے A/A یا a/a کے لیے ایللیس کی ایک جیسی شکلیں رکھتے ہیں جبکہ Heterozygous سے مراد ایک فرد کی جین ٹائپ ہے جو مثال کے طور پر A/a کے لیے ایللیس کی متبادل شکلیں لے کر جاتا ہے۔

14.9 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Molecular Biology of Gene by Robert Weaner.
2. Genetics and Molecular Biology by Robert Schleif.
3. Cell and Molecular Biology by Veer Bala Rastogi.
4. Molecular Biology of Gene by James.D.Watson.
5. Genetics: A conceptual approach by Benjamin Pierce

اکائی 15: ادویات کی پیداوار میں ریکومیننٹ ڈی این اے

(Production of Medicine using Recombinant DNA)

اکائی کے اجزا

تمہید (Introduction)	15.0
مقاصد (Objectives)	15.1
ریکومیننٹ انسولین (Recombinant Insulin)	15.2
ریکومیننٹ گروتھ ہارمون (سوماٹو سٹینٹن) (Recombinant Growth Hormone/Somatostatin)	15.3
اكتسابی نتائج (Learning Outcomes)	15.4
کلیدی الفاظ (Keywords)	15.5
نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)	15.6
15.6.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)	
15.6.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)	
15.6.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)	
فرہنگ (Glossary)	15.7
مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)	15.8

15.0 تمہید (Introduction)

ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی دو مختلف قسم کے جانداروں کے ڈی این اے مالیکیولز کے آپس میں مل کر ریکومیننٹ ڈی این اے تشکیل دیتی ہے۔ دوبارہ جوڑنے والا ڈی این اے مالیکیول ایک مناسب میزبان جاندار میں داخل ہونے پر دوبارہ پیدا کرنے والا پروٹین تیار کرتا ہے جو سائنس، طب، زراعت اور صنعت کے لیے اہمیت کا حامل ہے۔

15.1 مقاصد (Objectives)

اس یونٹ کے اپنے مطالعہ کے اختتام پر، آپ کو قابل ہونا چاہیے کہ۔

❖ Recombinant DNA مالیکیول کی تخلیق کے پیچھے بنیادی اصول کی وضاحت کر سکتا ہے۔

❖ علاج کے مالیکیولز جیسے ریکومبیننٹ انسولین اور گروتھ ہارمون کی تیاری میں ریکومبیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کے لاگو ہونے والے پہلوؤں کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں۔

15.2 ریکومبیننٹ انسولین (Recombinant Insulin)

انسولین کئی سالوں سے ذیابیطس کے علاج اور انتظام کے لیے استعمال ہوتی رہی ہے۔ پہلے مارے گئے مویشیوں اور خنزیروں کے لبلبے سے انسولین نکالی جاتی تھی۔ اس کے کچھ نقصانات تھے جیسے اس نے کچھ لوگوں میں الرجک رد عمل کو متحرک کیا اور ایک اور چیلنج بڑھتی ہوئی مانگ اور بڑے پیمانے پر پیداوار کو پورا کرنا تھا۔

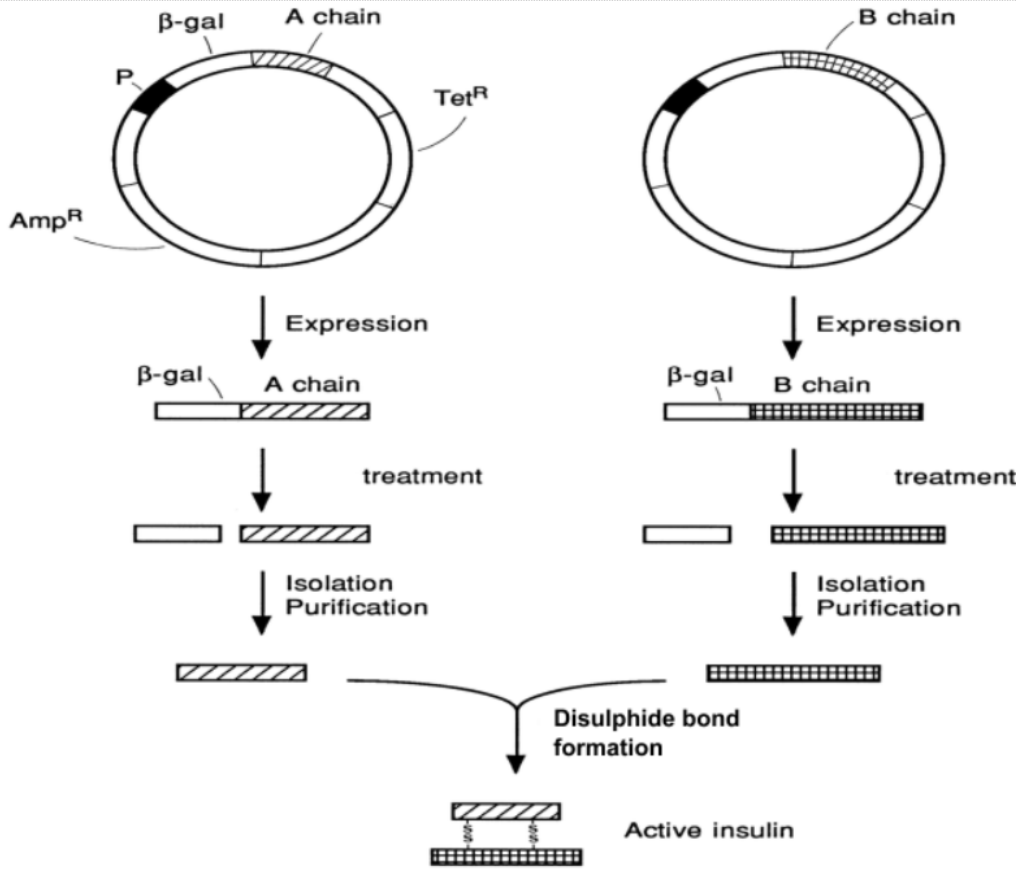
اس پر قابو پانے کے لیے Recombinant DNA ٹیکنالوجی کے ذریعے انسولین کی تیاری کی گئی اور یہ بہت فائدہ مند ثابت ہوئی ہے۔ اسے پہلی بار 1983 میں ایک امریکی بائیوٹیک کمپنی نے تیار کیا تھا، جسے ایل لی کو تجارتی نام Humulin کے ساتھ لائسنس دیا گیا تھا۔ یہ پہلی دوبارہ پیدا کرنے والی دوا تھی۔ کم از کم ضمنی اثرات کے ساتھ بڑے پیمانے پر پیدا ہونے والا ایک بایوسنتھٹک مالیکیول

جسم میں انسولین گلوکوز میٹابولزم کے ریگولیشن کے لیے ذمہ دار لبلبے کے β -خلیات کے ذریعے تیار کی جاتی ہے۔ فنکشنل انسولین ایک 5.8 kDa مالیکیول ہے، جو دو پولی پپٹائڈ چینز A (21 امینو ایسڈ) اور B (30 امینو ایسڈز) پر مشتمل ہے جو دو ڈسلفائیڈ پلوں کے ذریعے جڑے ہوئے ہیں۔ ریکومبیننٹ انسولین تیار کرنے کے لیے درج ذیل اقدامات پر عمل کیا جاتا ہے۔

- I. جینومک DNA سے انسولین چین A اور چین B کے لئے DNA کے حصوں کو الگ کرنا۔
- II. بیکٹیریل پلاسمڈ ایکسپریشن ویکٹر DNA مالیکیول کی تیاری جس میں پروموٹر (β -gal) اور قابل انتخاب مارکر (Tetracycline resistance gen – TetR) ہوتا ہے۔
- III. زنجیر A اور B کے لیے DNA سیگمنٹ کو ڈنگ کو پلازمڈ ویکٹرز میں الگ سے داخل کرنا اور مختلف ریکومبیننٹ DNA مالیکیولز بنانا ہے یعنی چین A اور B کے لیے۔
- IV. زنجیر A اور B کے لیے الگ الگ میزبان بیکٹیریل خلیوں میں دوبارہ پیدا ہونے والے DNA کی منتقلی۔
- V. ریکومبیننٹ بیکٹیریا بڑے اہال والے ٹینک میں اگائے جاتے ہیں جو بڑی مقدار میں ریکومبیننٹ پروٹین چینز A اور B پیدا

کرتے ہیں۔

VI. ان A اور B انسولین کی زنجیروں کو پھر نکالا جاتا ہے، صاف کیا جاتا ہے اور سیانوجن برومائڈ کو ملا کر A اور B چین کے درمیان ڈسلفائیڈ بانڈز بنا کر فنکشنل ریکومبیننٹ ہیومن انسولین تشکیل دیا جاتا ہے جسے ہومولین کہتے ہیں۔



شکل 15.0: بالا اعداد و شمار میں ریکومبیننٹ انسولین کی تیاری کے عمل کو دکھایا گیا ہے جہاں انسولین کے لیے جین کو نکال کر ویکٹر میں داخل کیا جاتا ہے تاکہ مناسب میزبان جاندار میں جین لے جاسکے۔ اس کے بعد دوبارہ پیدا کرنے والا میزبان مطلوبہ پروٹین تیار کرتا ہے جسے بعد میں خالص نکالا جاتا ہے اور ذیابیطس کے علاج کے لیے انسانی انسولین کے طور پر تیار کیا جاتا ہے۔

15.3 ریکومبیننٹ گروتھ ہارمون (سوماٹو سٹیسٹن) (Recombinant Growth Hormone/Somatostatin)

ہونا ایک ایسی حالت ہے جب ایک فرد اوسط قد سے چھوٹا ہوتا ہے جس کی خصوصیت چھوٹے قد اور چھوٹے اعضاء ہوتے ہیں۔ یہ عام طور پر گروتھ ہارمون کی کمی کی وجہ سے ہوتا ہے۔ گروتھ ہارمون تقریباً 22 KDa سائز کا پولی پپٹائیڈ ہے جو پیٹوٹری غدود میں ترکیب کیا جاتا ہے۔ جیسا کہ یہ پیٹوٹری میں ترکیب کیا جاتا ہے، یہ ایک پری ہارمون کے طور پر بنایا جاتا ہے جس کی لمبائی میں ایک ہائیڈروفوبک لیڈر پپٹائیڈ 24 امینو ایسڈ ہوتے ہیں۔ اس لیڈر پپٹائیڈ کو ہارمون کے اخراج کے دوران پروٹولیسٹک طور پر ہٹا دیا جاتا ہے۔

E.coli میں لیڈر پپٹائڈ کو فنکشنل پروٹین سے نکالنے کے لیے مشینری کی کمی ہے اس لیے اس سیگمنٹ کو الگ سے ترکیب کیا جاتا ہے اور اسے فعال پروٹین بنانے کے لیے منسلک کیا جاتا ہے۔ rDNA ٹیکنالوجی کے ذریعے E.coli میں گروتھ ہارمون کی تیاری کا مرحلہ وار طریقہ کار درج ذیل ہے۔

پہلا مرحلہ: پہلے 24 مینو ایڈز کے لیے لیڈر ترتیب کی کیمیائی ترکیب

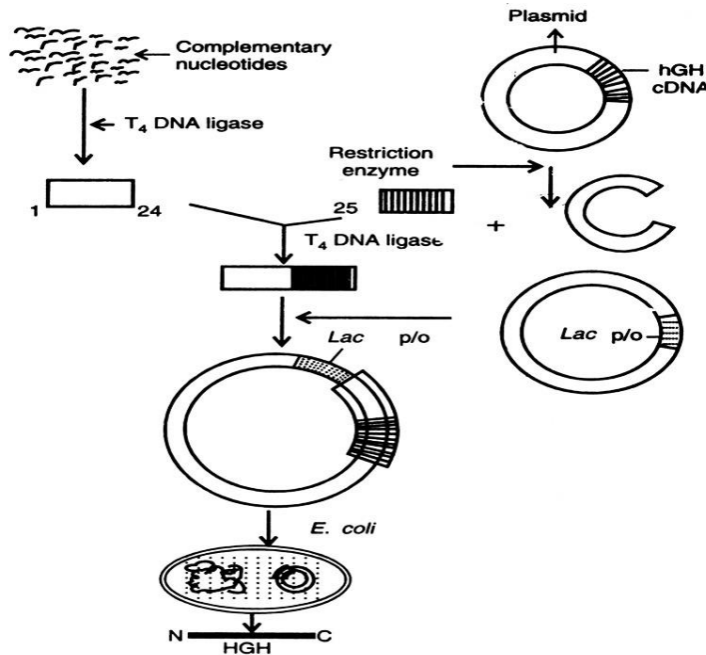
مرحلہ II: انسانی بیٹیوٹری غدود کے بافتوں سے انسانی گروتھ ہارمون (hGH) کے لیے mRNA کو الگ کرنا۔

مرحلہ III: کمپلیمینٹری (cDNA) cDNA کو ریورس ٹرانسکرپٹس انزائم کا استعمال کرتے ہوئے hGH کے mRNA سے ترکیب کیا جاتا ہے۔۔

مرحلہ چہارم: ڈی این اے لیکس انزائم کی مدد سے مصنوعی لیڈر کی ترتیب اور سی ڈی این اے کو جوڑ دیا جاتا ہے تاکہ اس کے اپنے ابتدائی کوڈن (AUG) کے ساتھ مکمل جین حاصل کیا جاسکے۔

مرحلہ V: ایکسپریشن ویکٹر hGH407 phGH جین کو ظاہر کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

مرحلہ VI: ریکومیننٹ ایکسپریشن ویکٹر پھر مناسب میزبان سیل میں تبدیل ہو جاتا ہے جسے E.coli کہتے ہیں جو پھر hGH پروٹین بنانا شروع کر دیتا ہے۔



شکل 15.1: بالاعداد و شمار ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کے ذریعہ انسانی نمو کے ہارمون کی تیاری کے طریقہ کار کو ظاہر کرتا ہے۔

15.4 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس اکائی کے مطالعے بعد طلباء نامیاتی ارتقاء کے درج ذیل نظریات کو سمجھ کر آسانی سے بیان کر سکتے ہیں:

- ❖ اب علاج کے استعمال کے لیے ریکومیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کی اہمیت کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں۔
- ❖ بائیوفارمیوٹیکل مصنوعات جیسے ریکومیننٹ انسولین اور ہیومن گروتھ ہارمون کی تخلیق کے پیچھے میکائزم کے بارے میں کوئی وضاحت نہیں کر سکتا۔

15.5 کلیدی الفاظ (Keywords)

Lac promoter/operator	یہ RNA پولیمریز کے بانڈنگ کے لیے سائٹ ہے، ایک اینزائم جو نیچے کی دھارے کے علاقے میں موجود جین کی نقل کرتا ہے۔	Lac پروموٹر/آپریٹر
Selectable marker	وہ خلیوں کے درمیان شناخت میں مدد کرتے ہیں جنہوں نے دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے کو لیا ہے اور سیل جس نے انہیں منتخب میڈیا میں نہیں بڑھایا، مثال کے طور پر:۔ اینٹی بائیوٹک مزاحم جین اور امپیسلن مزاحم جین۔	قابل انتخاب مارکر
Biopharmaceutical product	یہ وہ پیچیدہ ادویات ہیں جو زندہ خلیوں یا جانداروں سے بنی ہیں۔	بائیوفارماسیوٹیکل پروڈکٹ

15.6 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

15.6.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. ٹائپ 2 ذیابیطس میلٹس کے علاج کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔
2. گروتھ ہارمون نامی غدود میں ترکیب کیا جاتا ہے۔
3. امریکی بائیوٹیک کمپنی کے ذریعہ تیار کردہ انسولین کا تجارتی نشان تھا۔
4. فنکشنل گروتھ ہارمون کے اخراج کے لیے کوپروٹولینک طور پر ہٹانا پڑتا ہے۔
5. ریکومیننٹ DNA ٹیکنالوجی میں سب سے زیادہ استعمال ہونے والا میزبان ہے۔
6. ویکٹر اور ہدف DNA مالیکیول کی مدد سے بندھے ہوئے ہیں۔
7. خاص طور پر ڈی این اے مالیکیول پر ہدف کی جگہ پر پھٹنے میں مدد کرتا ہے۔
8. انزائم ریورس ٹرانسکرپٹیس کے ذریعے mRNA مالیکیول سے تیار کیا جاتا ہے۔

15.6.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. بونا کیا ہے، اور اس کی عام وجہ کیا ہے؟
2. گروتھ ہارمون کے اخراج کے دوران لیڈر پیپٹائڈ کو پروٹولیسٹک طور پر کیوں ہٹایا جاتا ہے؟
3. E. coli فنکشنل پروٹین سے لیڈر پیپٹائڈ کو ہٹانے میں ناکامی کی تلافی کیسے کرتا ہے؟
4. مویشیوں اور خنزیروں سے نکالی جانے والی انسولین کے کیا نقصانات تھے؟

15.6.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. rDNA ٹیکنالوجی کے ذریعے E. coli میں گروتھ ہارمون کی پیداوار کے لیے مرحلہ وار طریقہ کار بیان کریں۔
2. ریکومیننٹ ڈی این اے ٹکنالوجی کے ذریعے ریکومیننٹ انسولین تیار کرنے کے عمل کی وضاحت کریں، اس میں شامل ہر قدم کو اجاگر کریں۔
3. انسولین کی پیداوار کے روایتی طریقہ کار سے منسلک چیلنجز کیا تھے، اور دوبارہ پیدا ہونے والی انسولین کی پیداوار ان چیلنجز سے کیسے نمٹتی ہے؟
4. ریکومیننٹ گروتھ ہارمون اور ریکومیننٹ انسولین کی تیاری کے عمل کا موازنہ اور ان کے برعکس کریں، ان کے متعلقہ طریقہ کار اور میڈیکل بائیو ٹیکنالوجی میں اہمیت پر توجہ مرکوز کریں۔

15.7 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Restriction Enzyme	بند سی انزائم	-	پابندی کا انزائم: یہ اینڈونکلیز کا خصوصی گروپ ہے جو جینومک ڈی این اے کے اندر موجود ترتیب کے مخصوص سیٹ کو پہچان کر ڈی این اے کو چھوٹے چھوٹے ٹکڑوں میں کاٹ دیتا ہے۔
Expression vector	اظہار ویکٹر	اظہار ویکٹر	یہ ایک ویکٹر ہے جو بڑے پیمانے پر پروٹین کی پیداوار کے لیے استعمال ہوتا ہے۔ ان میں ویکٹر کی بنیادی خصوصیات ہیں جیسے اوری (نقل کی اصل)، داخل کرنے کی جگہ، قابل انتخاب مارکر، وغیرہ۔ مزید برآں، ان میں

ریگولیٹری عناصر بھی ہوتے ہیں جو پروٹین کی ترکیب میں
مدد کرتے ہیں۔

15.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). Molecular biology of the cell (6th ed.). Garland Science.
2. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Molecular cell biology (4th ed.). W. H. Freeman.
3. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Biochemistry (5th ed.). W. H. Freeman.
4. Brown, T. A. (2002). Genomes (2nd ed.). Wiley-Liss.

اکائی 16: جین تھراپی پر ایک جائزہ

(An Overview on Gene Therapy)

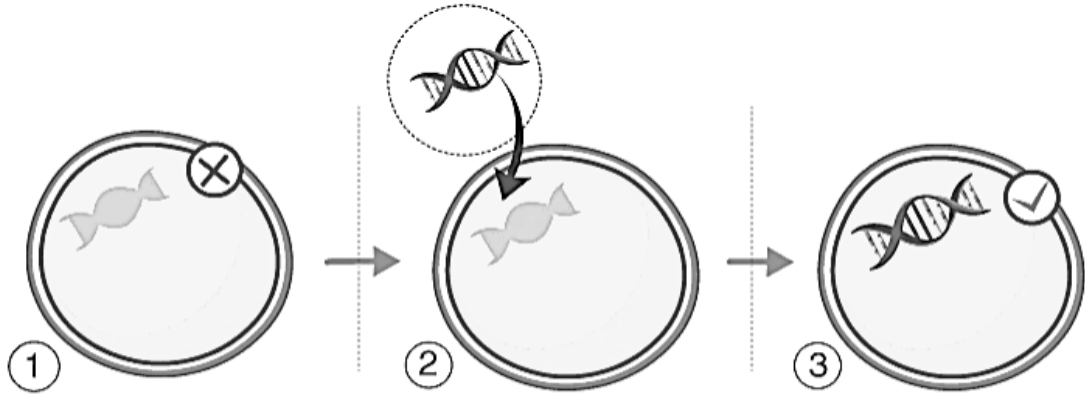
اکائی کے اجزاء

تمہید (Introduction)	16.0
مقاصد (Objectives)	16.1
جین تھراپی (Gene Therapy)	16.2
ویکٹر	16.2.1
وائزل ویکٹر	16.2.2
جین تھراپی میں بائیو سیفٹی اور اخلاقی مسائل	16.3
(Biosafety and ethical issues in gene therapy)	
اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)	16.4
کلیدی الفاظ (Keywords)	16.5
نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)	16.6
معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)	16.6.1
مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)	16.6.2
طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)	16.6.3
فرہنگ (Glossary)	16.7
مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)	16.8

16.0 تمہید (Introduction)

پروٹین خلیوں کی ساختی اور فعال ہیں جو جین کے ذریعہ کوڈ ہوتے ہیں۔ جینیاتی کوڈ میں تبدیلی پروٹین کی پیداوار یا کام کو متاثر کرتی ہے جس کے نتیجے میں جینیاتی خرابی ہوتی ہے۔ جین تھراپی ان اہم پروٹینوں کے کردار کو بحال کرنے اور جسم کو توقع کے مطابق کام کرنے کی

اجازت دینے کے لیے بیماری پیدا کرنے والی جینیاتی تبدیلیوں کو ٹھیک کرنا یا معاوضہ دے رہی ہے۔ جین تھراپی ایک عام فنکشنل جین کو کسی فرد کے جینوم میں داخل کرنا ہے تاکہ کسی ایسے تغیر کو ٹھیک کیا جاسکے جو جینیاتی بیماری کا سبب بنتا ہے۔



1 Cell with non-functioning gene | 2 Adding DNA containing a functional version of the lost gene | 3 Cell functioning normally

شکل 16.0: عام طور پر جین تھراپی کے پیچھے اس مقصد کی عکاسی کرتا ہے کہ یہ کس طرح جین کو کسی بھی قسم کی خرابی کے ساتھ اس کی صحیح کام کرنے والی شکل میں ان کی گمشدگی یا غیر معمولی پروٹین کو عام فعال پروٹین سے تبدیل کر کے درست کر سکتا ہے۔

16.1 مقاصد (Objectives)

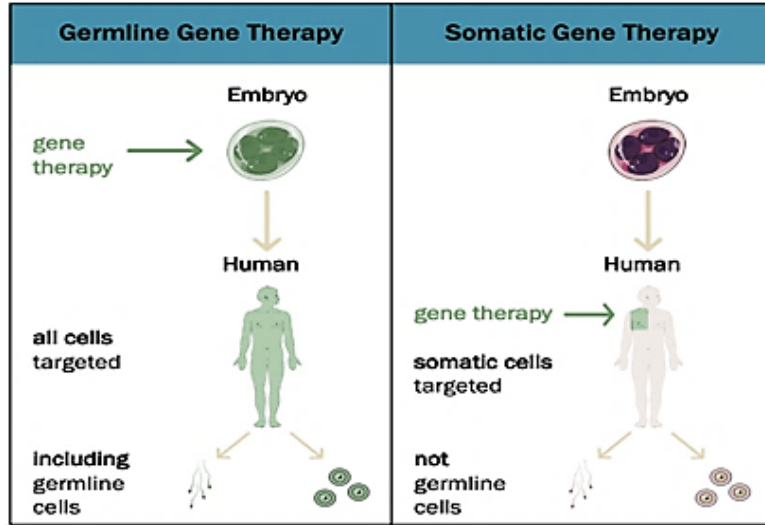
اس یونٹ کے اپنے مطالعہ کے اختتام پر، آپ کو قابل ہونا چاہیے کہ :-

- ❖ جین تھراپی کے تصور کے بارے میں بنیادی اصول کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں۔
- ❖ جینیاتی امراض کے علاج میں جین تھراپی کے اطلاق کی وضاحت کر سکتے ہیں۔
- ❖ جین تھراپی سے متعلق بائیو سیفٹی اور اخلاقی مسائل کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں۔

16.2 جین تھراپی (Gene Therapy)

جین تھراپی نقصان دہ جینیاتی تبدیلیوں کو درست کرنے کا عمل ہے جو جینیاتی بیماری کو اس کے کام کرنے کی معمول کی حالت تک پہنچانے کے لیے ذمہ دار ہے۔ یہ پہلی بار 1972 میں تصور کیا گیا تھا۔ پہلی کامیاب جین کی منتقلی کو 1990 میں ایڈینوسین ڈیمنیز کی کمی کے علاج کے لیے ایک ٹرائل میں دکھایا گیا تھا۔

جین تھراپی دو قسم کے ہوتے ہیں۔ جراثیم لائن جین تھراپی (GGT) اور سویٹنگ سیل جین تھراپی (SCGT)۔ GGT میں، جراثیم کے خلیات (مثال کے طور پر، بیضہ دانی یا خلیوں کے خلیات) کو ان کے جینوم میں درست / فعال جینوں کے تعارف کے ذریعے تبدیل کیا جاتا ہے۔ اگر یہ حاصل ہو جاتا ہے، تو یہ خلیے میووسس سے گزریں گے اور اگلی نسل کو ایک عام گیمینٹک شراکت فراہم کریں گے۔ جراثیمی جین تھراپی تجرباتی طور پر جانوروں میں حاصل کی گئی ہے لیکن انسانوں میں نہیں۔



شکل 16.1: جراثیمی اور سومیٹک جین تھراپی کے درمیان فرق کو دکھایا گیا ہے۔۔

سومیٹک سیل جین تھراپی جراثیم سیل یا غیر متفاوت اسٹیم سیل کے علاوہ کسی بھی خلیے میں ایک درست / فعال جین متعارف کرواتی ہے۔ SCGT بنیادی تحقیق اور جین سے متعلقہ بیماریوں کے علاج، کینسر کے علاج، ویکسینیشن، اور زخم کی شفا یابی کے لیے جین تھراپی کے استعمال کا مرکزی دھارا ہے۔ جین تھراپی سے ٹھیک ہونے والے سومیٹک خلیے علاج شدہ فرد میں بیماری کی علامات کو تبدیل کر سکتے ہیں، لیکن یہ تبدیلی اگلی نسل تک نہیں پہنچائی جاتی۔

فی الحال، جین تھراپی ایک ایسا شعبہ ہے جو بنیادی طور پر تحقیقی لیبارٹریوں میں موجود ہے، اور اس کا اطلاق اب بھی تجرباتی ہے۔ زیادہ تر ٹرانسلاٹریو امریکہ، یورپ اور آسٹریلیا میں کیے جاتے ہیں۔ یہ نقطہ نظر وسیع ہے، جس میں متواتر جین کی خرابی (سینک فائبروسس، ہیمو فیلیا، مسکولر ڈسٹروفی، اور سکل سیل انیمیا) کی وجہ سے ہونے والی بیماریوں کے ممکنہ علاج کے ساتھ، حاصل شدہ جینیاتی امراض جیسے کینسر، اور کچھ وائرل انفیکشن، جیسے ایڈز۔

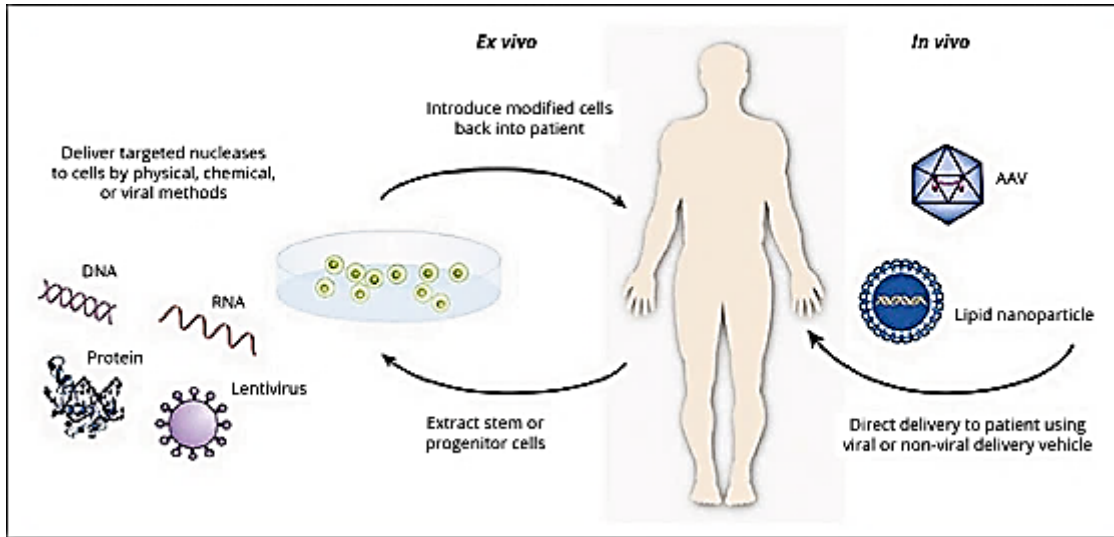
اب تک، انسانی جین تھراپی کی کوشش صرف سومیٹک (جسم کے) خلیوں پر کی گئی ہے جیسے کہ کینسر اور شدید مشترکہ امیونو سنڈروم (SCIDS)۔

جین کے علاج کا انحصار چند اہم عناصر پر ہوتا ہے۔ جین تھراپی کے لیے، ایک بیمار جین، ایک علاقائی جین، اور ایک موثر ترسیل کا نظام یا کیریئر ہونا چاہیے جسے ویکٹر کہتے ہیں۔ ویکٹر وائرل ویکٹر (جینیاتی طور پر انجینئرڈ وائرس) یا غیر وائرل ویکٹر (نگے ڈی این اے یا ڈی این اے کمپلیکس) ہو سکتا ہے۔ وائرل ویکٹر کو اس طرح تبدیل کیا جاتا ہے کہ وہ سیل کو متاثر کر سکتے ہیں تاکہ وہ اپنے جین کو سیل کروموزوم کی میزبانی کے لیے بغیر کسی بیماری کے پیدا کر سکیں۔

صحیح جین کی ترسیل کے لیے دو طرح کے طریقے ہیں، ویو اور ایس ویو ویکٹروں میں۔ Vivo تکنیک میں صحیح جین کو براہ راست

ٹارگٹ سیل یا ٹشو میں پہنچاتا ہے۔ Vivo جین تھراپی میں چیلنج خصوصیت کو یقینی بنانا اور دلچسپی کے ہدف سیل تک پہنچانا ہے۔ جینیاتی مواد کو کسی مخصوص ٹشو میں انجیکشن کے ذریعے براہ راست متعارف کرایا جاسکتا ہے، الیکٹروپوریشن، جین گن / بائیو پلاسٹک اپیلی کیشن وغیرہ۔ Vivo میں جین تکنیک کا استعمال کیا جاتا ہے جہاں خلیے کی الگ تھلگ، ان وٹرو کلچرنگ اور جینیاتی طور پر ہیرا پھیری والے خلیے کو جسم میں دوبارہ داخل کیا جاتا ہے۔ ممکن نہیں ہے۔

Ex vivo تکنیک میں ناقص خلیات کو مریض سے الگ کر دیا جاتا ہے، وٹرو سیل کلچر میں کارکردگی کا مظاہرہ کیا جاتا ہے اور کلچرڈ سیلز درست جین داخل کرنے کے لیے جینیاتی طور پر تبدیل شدہ ویکٹر سے متاثر ہوتے ہیں۔ جینیاتی طور پر درست شدہ خلیات کو منتخب کیا جاتا ہے، ان کی ثقافت کی جاتی ہے اور پھر میزبان میں دوبارہ متعارف کرایا جاتا ہے۔ یہ تکنیک صحیح ٹارگٹ سیل میں صحیح جین متعارف کرواتا ہے۔ نتیجتاً، مدافعتی رد عمل کا امکان کم ہوتا ہے اور نقل و حمل کی اعلیٰ سطح (وائرل ویکٹر کا استعمال کرتے ہوئے یوکر ایوٹک سیل میں غیر ملکی ڈی این اے کا تعارف) حاصل ہوتا ہے۔ لیکن یہ صرف ان خلیوں کے لیے مخصوص ہے جنہیں جسم سے نکالا جاسکتا ہے۔



شکل 16.2: ایک فرد میں جین تھراپی انجام دینے کے مختلف طریقوں کو دکھایا گیا ہے۔

16.2.1 ویکٹر

ڈی این اے کی فراہمی کے لیے مناسب طریقہ کا انتخاب کرنا بہت ضروری ہے۔ جین تھراپی میں ویکٹر کا استعمال دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے کو ایک خلیے سے دوسرے خلیے میں منتقل کرنے کے لیے کیا جاتا ہے۔ ویکٹر وائرل یا غیر وائرل ہو سکتا ہے اور ان دونوں کو vivo اور ex vivo تکنیکوں میں استعمال کیا جاسکتا ہے۔ جین تھراپی کی کامیابی کا انحصار ویکٹر کے مناسب انتخاب پر ہے۔

16.2.2 وائرل ویکٹر

انسانی جین تھراپی میں متعدد وائرل استعمال کیے گئے ہیں، جن میں ریٹرو وائرل، لینٹیو وائرل، اڈینو وائرل، اڈینو سے وابستہ وائرل، ہرپس سمپلیکس وائرل، سائٹومیگالو وائرل، اور ویکسینیا وائرل شامل ہیں۔ ان میں سے، ریٹرو وائرل سب سے زیادہ سازگار ہے۔

اگرچہ وائرل ویکٹر میں جین کی منتقلی کی اعلیٰ کارکردگی ہے، لیکن بنیادی خرابی وائرس سے منسلک زہریلا، پیچیدہ پیداواری عمل، اور زیادہ لاگت ہے۔ وائرل نقل کے لیے جینیاتی مواد کو علاج کے جین سے بدل دیا جاتا ہے۔ علاج کے جین لے جانے والے وائرس ہدف سیل کو متاثر کرتے ہیں۔ صحیح جین کو ٹارگٹ سیل جینوم میں شامل کریں، جو کہ عارضی طور پر یا مستقل طور پر درست پروٹین کی ترکیب کے لیے ٹیمپلیٹ کے طور پر کام کرتا ہے۔

غیر وائرل ویکٹر ننگے ڈی این اے، پارٹیکل میڈ اور کیمیکل پر مبنی طریقے ہیں۔ انہیں یا تو براہ راست انتظامیہ کے ذریعے یا کیمیائی اور جسمانی طریقوں سے پولیمر، لیپڈز، غیر نامیاتی ذرات اور مختلف اقسام کے امتزاج سے جوڑ کر دیا جاتا ہے۔

16.3 جین تھراپی میں بائیو سیفٹی اور اخلاقی مسائل

(Biosafety and ethical issues in gene therapy)

جین تھراپی میں اخلاقی مسائل میں انسانی بھلائی کے لیے جینیاتی سائنس کا استعمال اور روکے جانے والے نقصانات سے بچنا شامل ہے۔ فوری مسائل جینیاتی جانچ کے نتائج کا کنٹرول اور رازداری، جینیاتی امراض میں مبتلا پائے جانے والوں کے خلاف ممکنہ امتیازی سلوک اور فائدہ مند جینیاتی علاج کی منصفانہ تقسیم ہیں۔ کم عملی، لیکن ممکنہ طور پر زیادہ اہم، مخصوص میں جینیاتی سائنس کا استعمال ایسے طریقوں سے ہوتا ہے جو بیماری کی روک تھام اور علاج سے بالاتر ہیں۔ خاصیت میں اضافہ اور "نویو جینکس" جیسے استعمال سے پریشان کن اخلاقی خدشات پیدا ہوتے ہیں۔ مستقبل میں ممکنہ خطرات، اخلاقی اور تکنیکی وجوہات کے بارے میں ناکافی معلومات کی وجہ سے انسانوں میں GGT کا اطلاق اب بھی قابل بحث ہے۔

❖ جین ایڈیٹنگ تھراپی میں خطرات اور فوائد کی تشخیص کو مریض اور اگلی نسلوں پر توجہ مرکوز کرنی چاہیے، کیونکہ جین تھراپی کی وجہ سے ڈی این اے کی تبدیلی والدین سے ان کی اولاد میں منتقل ہو سکتی ہے۔

❖ وراثی حالات سے متعلق فائدہ کے متعدد درجات ہیں:

- مریض کا علاج؛
- خاندان کے دیگر افراد کے لیے علاج یا روک تھام؛
- شدید علامات سے نجات یا تاخیر جس کا کوئی علاج دستیاب نہیں ہے۔

❖ جین تھراپی کے لیے امیدواروں کا انتخاب کرنے کے لیے کچھ معیارات کو پورا کرنے کی ضرورت ہوتی ہے۔ ان میں شامل ہیں:

- کیا ایک یا دو کام کرنے والے جینز متعارف کروا کر صورتحال کو بہتر بنایا جاسکتا ہے؟
- کیا ہم جانتے ہیں کہ کون سے جین کام کر رہے ہیں؟
- کیا ہم خرابی کی حیاتیات کو سمجھتے ہیں؟

- کیا متاثرہ بافتوں میں جین کو خلیات تک پہنچایا جاسکتا ہے؟

جین تھراپی سمیت کوئی بھی طبی علاج شروع کرنے سے پہلے مریض کی خود مختاری کا احترام اور باخبر رضامندی حاصل کرنا ضروری ہے۔ سائنسی کمیونٹی میں ایک وسیع معاہدہ ہے کہ جراثیم کی لائن تھراپی؛ خاص طور پر غیر طبی استعمال ممنوع ہونا چاہئے۔ جین تھراپی میں جینوم میں ترمیم کے بارے میں بنیادی خدشات میں سے ایک یہ ہے کہ اس کے غیر طبی اہداف کے لیے استعمال کیے جانے کا امکان ہے، جیسے کہ اضافہ یا یوجینک سرگرمیاں۔ ہدف شدہ جینیاتی تبدیلیوں کے نایاب انسانی نتائج جین تھراپی کے کسی بھی علاج معالجے کے ساتھ آگے بڑھنے سے پہلے احتیاط اور عمل کے مکمل علم کی تجویز کرتے ہیں۔

16.4 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس اکائی کے مطالعے بعد طلباء آسانی سے بیان کر سکتے ہیں:

- ❖ جین تھراپی کے تصور کے بارے میں بنیادی اصول کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں۔
- ❖ جینیاتی امراض کے علاج میں جین تھراپی کے اطلاق کی وضاحت کر سکتے ہیں۔
- ❖ جین تھراپی سے متعلق بائیو سیفٹی اور اخلاقی مسائل کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں۔

16.5 کلیدی الفاظ (Keywords)

ایک جرم خلیہ ایک ایسا خلیہ ہے جو کسی جاندار کے گیمیٹس کو جنم دیتا ہے جو جنسی طور پر دوبارہ پیدا کرتا ہے جو کہ عورتوں میں ایک انڈا اور مردوں میں سپرم ہوتا ہے۔	Germ Cells	جرم خلیہ
سومیٹک خلیات زندہ جاندار کے جسم میں تولیدی خلیوں کے علاوہ کوئی دوسرا خلیہ ہیں۔	Somatic Cell	سومیٹک سیل
: یہ تولیدی ٹیکنالوجی اور جینیاتی انجینئرنگ کے استعمال کے ذریعے انسانی خصوصیات اور صلاحیتوں کو بڑھانے کا عمل ہے۔	Neo-eugenics	نویوجینکس
یہ وائرس کے ذریعے ایک خلیے سے دوسرے خلیے میں جینیاتی مواد کی منتقلی ہے۔	Transduction	ٹرانزڈکشن

16.6 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

16.6.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات (Objective Answer Type Questions)

1. پہلی بار جین تھراپی _____ کے علاج کے لیے کی گئی تھی۔
2. _____ ڈی این اے میں تغیرات وراثتی ہیں۔
3. وائرل ویکٹر کے ذریعے خلیے میں غیر ملکی DNA کے داخل ہونے کے عمل کو _____ کہا جاتا ہے۔
4. _____ سیل میں ڈی این اے کو براہ راست انجکشن کرنے کا طریقہ ہے۔
5. _____ تکنیک میں سیل کو خلیات کے باہر تبدیل کیا جاتا ہے اور پھر جسم میں دوبارہ متعارف کرایا جاتا ہے۔
6. _____ وائرس جین تھراپی میں سب سے زیادہ مناسب طریقے سے استعمال ہوتا ہے۔
7. _____ تھراپی میں سپرمز یا انڈے جین کی اصلاح کے لیے استعمال کیے جاتے ہیں۔
8. _____ قسم کی جین تھراپی کا استعمال شدید مشترکہ امیونو ڈیفینسی ڈس آرڈر کے علاج کے لیے کیا جاتا ہے۔

16.6.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات (Short Answer Type Questions)

1. جین تھراپی کیا ہے؟ کوئی مثال دیں؟
2. جین تھراپی کی مختلف اقسام کی وضاحت کریں؟
3. جین تھراپی کے لیے استعمال ہونے والی مختلف حکمت عملی کیا ہیں؟
4. جین تھراپی کے حوالے سے بائیو سیفیٹی اور اخلاقی خدشات کیا ہیں؟

16.6.3 طویل جوابات کے حامل سوالات (Long Answer Type Questions)

1. جین تھراپی اور اس کے لیے استعمال ہونے والی مختلف حکمت عملیوں کے بارے میں تفصیل سے بتائیں؟

16.7 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Genetic Engineering	جینیاتی انجینئرنگ	جینیاتی انجینئرنگ	یہ جینیات اور بائیو ٹیکنالوجی کی اطلاق شدہ تکنیکوں کا ایک گروپ ہے جو جاندار کی ایک یا زیادہ انواع سے ڈی این اے کو کاٹنے اور اس میں شامل ہونے کے لیے استعمال کیا

جاتا ہے جس کے نتیجے میں کسی جاندار میں خصوصیات کی تبدیلی ہوتی ہے۔

Genetic engineered virus - جینیاتی انجینئرڈ وائرس
:ان میں بیماری کا باعث بننے والے پیستھو جینک علاقے کی جگہ علاجی جین لے لی جاتی ہے جو بعد میں علاج کے جین کو ہدف کے خلیے میں منتقل کرنے کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔

Gene Gun/ bioplastic جین گن/ بائیوپلاسٹک جین گن/ بائیو پلاسٹک
یہ جینیاتی انجینئرنگ ٹول ہے جو ڈی این اے کو براہ راست ہدف کے خلیے میں پہنچانے کے لیے استعمال ہوتا ہے۔

16.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد (Suggested Material for Further Reading)

1. Friedmann, T., & Roblin, R. (Eds.). (1972). Gene Therapy. Springer Science & Business Media.
2. Kay, M. A., & Friedmann, T. (Eds.). (2007). Advanced Methods in Molecular Therapy: Vector System Design and Gene Targeting. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
3. Raper, S. E., & Wilson, J. M. (Eds.). (1994). Gene Therapy: A Primer for Physicians. American College of Physicians.
4. Ginn, S. L., Alexander, I. E., & Edelstein, M. L. (Eds.). (2018). Gene Therapy: Principles and Challenges. Academic Press.
5. Wivel, N. A. (Ed.). (2002). Gene Therapy: A Handbook for Physicians. Mary Ann Liebert, Inc.

Maulana Azad National Urdu University

سال: 2024

بی ایس سی حیاتیات پرچہ: جانوروں کی بائیو ٹیکنالوجی

B. Sc. Zoology Paper (BSZY601DST): Animal Biotechnology
Semester-VI

Time: 3 Hours

Marks:70

ہدایات:

یہ پرچہ سوالات تین حصوں پر مشتمل ہے۔ حصہ اول، حصہ دوم، حصہ سوم۔ تمام حصوں سے سوالوں کا جواب دینا لازمی ہے۔

1. حصہ اول میں 10 لازمی سوالات ہیں جو کہ معروضی سوالات / خالی جگہ پورا کرنا / مختصر جواب والے سوالات ہیں۔ ہر سوال کا جواب لازمی ہے۔ ہر سوال کے لیے 1 نمبر مختص ہے۔

(10x1=10)

2. حصہ دوم میں 08 سوال ہیں، اس میں سے تالیف علم کو کوئی 06 سوالوں کے جواب دینے ہیں۔ ہر سوال کے لیے 05 نمبر مختص ہے۔

(5x6=30)

3. حصہ سوم میں 05 سوال ہیں، اس میں سے تالیف علم کو کوئی 03 سوال کا جواب دینے ہے۔ ہر سوال کے لیے 10 نمبر مختص ہے۔

(3x10=30)

حصہ اول

1. خالی جگہ کو پُر کریں

- i. بنیادی سیل کے کلچر براہ راست _____ ٹشو سے اخذ (derived) کی جاتی ہیں اور وٹرو میں محدود عمر ہوتی ہیں۔
- ii. لافانی سیل لائنیں، جیسے ہیلہا سیل (HeLa cell)، _____ سیل سے اخذ کی جاتی ہیں اور مناسب حالات میں غیر معینہ مدت تک بڑھ سکتے ہیں۔
- iii. سیل لائنوں کو اکثر ان _____، مورفولوجی، اور نشوونما خصوصیات (growth properties) کی بنیاد پر نمایاں کیا جاتا ہے۔
- iv. ٹرانسجینک جانور اپنے _____، خون، انڈے، یا دیگر جسمانی سیال / ٹشوز میں مطلوبہ پروٹین یا بائیو مالیکیولز پیدا کر سکتے ہیں۔
- v. میزبان جینوم میں ٹرانسجین کا انضمام ریٹرو وائرل انزائم کے عمل کے ذریعہ ہوتا ہے جسے _____ کہا جاتا ہے۔
- vi. انزائم _____ کا استعمال دو مختلف قسم کے ڈی این اے مالیکیولز کو آپس میں جوڑنے کے لیے کیا جاتا ہے۔
- vii. ہائی وولٹیج الیکٹرک پلس دے کر سیل میں ڈی این اے کا داخلہ _____ کہلاتا ہے۔
- viii. ویسٹرن بلوٹنگ تکنیک کو نمونے میں مخصوص _____ کا پتہ لگانے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

- ix. ڈی این اے فنکچرل ٹیکنیک _____ ڈی این اے سیگمنٹس کو چیک کرتی ہے۔
- x. پولی لنکر ڈی این اے کا ایک ٹکڑا ہے، جو بہت سے _____ کے لیے منفرد ہے۔

حصہ دوم

2. سیل کے ذرائع لکھیں اور بنیادی سیل، سیل لائن اور سیل اسٹرینز (Cell Strains) کے مابین اختلافات کے ساتھ اعضاء (Organ)، ٹشوز اور سیل کلچر پر تفصیل سے بارے ان کریں۔
3. مائکرو انجکشن (Microinjection) کے عمل کو تفصیل سے بیان کریں۔
4. ٹرانسجینک جانوروں کا استعمال کرتے ہوئے دوا سازی (Pharmaceuticals) اور بائیو مالیکولز کی پیداوار میں شامل اقدامات کی وضاحت کریں۔
5. ٹرانسجینک مویشیوں (Livestock) کی کم از کم پانچ اپیلی کیشنز لکھیے۔
6. "سکل سیل انیمیا" کی Molecular تشخیص۔
7. پلازمیڈ کلوننگ ویکٹر pBR322 کے بارے میں لکھیں۔
8. Restriction Enzymes کیا ہیں؟
9. "ناردرن بلاٹنگ ٹیکنیک" کا مکمل طریقہ کار لکھیں۔

حصہ سوم

10. بایوری ایکٹر کی ساخت اور فنکشن کی وضاحت کریں اور مختلف شعبوں میں سیل کلچر کی اپیلی کیشنز لکھیے۔
11. تفصیلی نوٹ لکھیں کہ ناک آؤٹ چوہے کیسے اور کیوں پیدا کیے جاتے ہیں۔
12. ریٹرو وائرل ویکٹر کی بنیادی ساخت اور اجزاء بیان کریں۔ ریٹرو وائرل ویکٹر ٹرانسجن کو کیسے پیک کرتا ہے اور میزبان جینوم میں اس کے انضمام میں ثالثی (Mediate) کرتا ہے؟
13. سٹیم سیل تھراپی پر تفصیل سے بحث کریں۔
14. ڈی این اے ٹیکنالوجی کے ذریعے "انسولین" کی تیاری کے بارے میں تفصیل سے لکھیں۔