BSZY601DST

حیوانی بائیو ٹیکنالوجی

(Animal Biotechnology)

Part I- Theory

Part II- Practical (Separate)

بیچلر آف سائنس (بی۔ایس سی۔)

(بی۔زیڈ۔سی)

(چھٹا سمسٹر)

نظامت فاصلاتی تعلیم

مولانا آزاد نیشنل اردو یونیورسٹی

حیدرآباد-32، تلنگانہ-بھارت

© Maulana Azad National Urdu University, Hyderabad

Course- Animal Biotechnology

ISBN: 978-81-972234-9-5

First Edition: **May, 2024**

Publisher	:	Registrar, Maulana Azad National Urdu University, Hyderabad
Publication	:	2024
Copies	:	500
Price	:	383/- (The price of the book is included in admission fees of distance mode students)
Copy Editing	:	Dr. Mohammed Asif, DDE, MANUU
Graph Designing	:	Dr. Mohammad Mahboob, School of Sciences, MANUU
Cover Designing	:	Dr. Mohd. Akmal Khan, DDE, MANUU
Printer	:	Print Time & Business Enterprises, Hyderabad

Animal Biotechnology

For

B.Sc. (BZC) 6th Semester

On behalf of the Registrar, Published by:

Directorate of Distance Education

Maulana Azad National Urdu University

Gachibowli, Hyderabad-500032 (TS), India

Director: dir.dde@manuu.edu.in *Publication:* ddepublication@manuu.edu.in

Phone number: 040-23008314 Website: manuu.edu.in

© All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronically or mechanically, including photocopying, recording or any information storage or retrieval system, without prior permission from the publisher (registrar@manuu.edu.in)

ایڈیٹرس
(Editors)

Dr. Arif Ahmad
Assistant Professor (Zoology)
School of Sciences, MANUU, Hyderabad

Dr. Mohammad Asif
Guest Faculty /Assistant Professor (Contractual), Zoology
Directorate of Distance Education, MANUU, Hyderabad

ڈاکٹر عارف احمد
اسسٹنٹ پروفیسر (حیوانیات)
اسکول برائے سائنسی علوم، مانو، حیدرآباد

ڈاکٹر محمد آصف
گیسٹ فیکلٹی/اسسٹنٹ پروفیسر (کانٹریکچول)، حیوانیات
نظامت فاصلاتی تعلیم، مولانا آزاد نیشنل اردو یونیورسٹی، حیدرآباد

لینگویج ایڈیٹرس
(Language Editors)

Dr. Mohammad Asif
Guest Faculty /Assistant Professor (Contractual), Zoology
Directorate of Distance Education, MANUU, Hyderabad

Dr. Mohammad Mahboob
Guest Faculty /Assistant Professor (Contractual),
School of Sciences (Zoology), MANUU, Hyderabad

ڈاکٹر محمد آصف
گیسٹ فیکلٹی/اسسٹنٹ پروفیسر (کانٹریکچول)، حیوانیات
نظامت فاصلاتی تعلیم، مولانا آزاد نیشنل اردو یونیورسٹی، حیدرآباد

ڈاکٹر محمد محبوب
گیسٹ فیکلٹی/اسسٹنٹ پروفیسر (کانٹریکچول)، حیوانیات
اسکول برائے سائنسی علوم، مانو، حیدرآباد

مجلس ادارت
(Editorial Board)

Prof. Parveen Jahan
Professor (Zoology), School of Sciences, MANUU, Hyderabad

Dr. Arif Ahmad
Assistant Professor (Zoology), School of Sciences, MANUU, Hyderabad

Dr. Mohammad Asif
Assistant Professor /Guest Faculty (Contractual)
Directorate of Distance Education, MANUU, Hyderabad

Dr. Mohammad Mahboob
Guest Faculty /Assistant Professor (Contractual),
School of Sciences (Zoology), MANUU, Hyderabad

پروفیسر پروین جہاں
پروفیسر (حیوانیات)، اسکول اسکول برائے سائنسی علوم، مانو

ڈاکٹر عارف احمد
اسسٹنٹ پروفیسر (حیوانیات)، اسکول برائے سائنسی علوم، مانو

ڈاکٹر محمد آصف
اسسٹنٹ پروفیسر (کانٹریکچول)/گیسٹ فیکلٹی (حیوانیات)
نظامت فاصلاتی تعلیم، مولانا آزاد نیشنل اردو یونیورسٹی

ڈاکٹر محمد محبوب
گیسٹ فیکلٹی/اسسٹنٹ پروفیسر (کانٹریکچول)، حیوانیات
اسکول برائے سائنسی علوم، مانو، حیدرآباد

کورس کوآرڈی نیٹر

ڈاکٹر عارف احمد، اسسٹنٹ پروفیسر (حیوانیات)
اسکول برائے سائنسی علوم، مولانا آزاد نیشنل اُردو یونیورسٹی، حیدر آباد

مصنفین	اکائی نمبر
☆ ڈاکٹر محمد وسیم	اکائی 1-4
☆ ڈاکٹر محمد محبوب، ڈاکٹر عارف احمد	اکائی 5-13
☆ پروفیسر پروین جہاں	اکائی 14-16
☆ ڈاکٹر محمد آصف، ڈاکٹر عارف احمد	اکائی 17-24

مترجمین

☆ ڈاکٹر محمد محبوب	اکائی 14-16

پروف ریڈرس

اول : ڈاکٹر محمد وسیم، ڈاکٹر سید اطہر دین قادری، ڈاکٹر محمد محبوب
دوم : ڈاکٹر عارف احمد
فائنل : ڈاکٹر محمد آصف

فہرست

(حصہ اول)

پیغام	وائس چانسلر	7
پیغام	ڈائرکٹر	8
کورس کا تعارف	کورس کوآرڈی نیٹر	9
بلاک I	**اینیمل سیل اور ٹشو کلچر**	
اکائی 1	بائیو ٹیکنالوجی: تصورات، دائرہ کار، اور سیل اور ٹشو کلچر کے ذرائع	11
اکائی 2	بنیادی سیل کلچر: خلیات کی تنہائی کی تکنیک	40
اکائی 3	سیل اور ٹشو کلچر: بنیادی ضروریات اور لیبارٹری مینجمنٹ	73
اکائی 4	سیل لائنز، سیل کلچر کی قسم اور سیل اور آرگن کلچر کا اطلاق	96
بلاک II	**جین کی ہیرا پھیری میں مالیکیولر تکنیک**	
اکائی 5	ریکومبینینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی	116
اکائی 6	کلوننگ ویکٹرس	135
اکائی 7	اظہاری/ایکسپریشن ویکٹر	154
اکائی 8	ٹرانس فارمیشن تکنیک	167
اکائی 9	ڈی این اے کی ترتیب کی تکنیک	184
بلاک III	**جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانور**	
اکائی 10	کلون اور ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار	201
اکائی 11	ٹرانسجین ٹرانسمیشن کے لیے ایمبریونک اسٹیم سیلز اور ریٹروواِئرل ویکٹر	217
اکائی 12	ٹرانسجینک مویشی	226
اکائی 13	ٹرانسجینک جانوروں سے دواسازی اور بائیومالیکیولز کی پیداوار	240

بلاک IV انسانی صحت میں درخواستیں

اکائی 14	جینیاتی امراض کی سالماتی تشخیص	251
اکائی 15	ادویات کی پیداوار میں ریکومبینٹ ڈی این اے	261
کائی 16	جین تھراپی پر ایک جائزہ	268
نمونہ امتحانی پرچہ		**278**

حصہ دوم (لیب مینول)

بلاک V پرائمری سیل کلچر، مالیکیولر کلوننگ

اکائی 1	مچھلی کے عضو کی بنیادی سیل ثقافت	1
اکائی 2	بند شی انزائم کا استعمال کرتے ہوئے پلازمڈ ڈی این اے / جینومک ڈی این اے کا عمل انہضام	14
اکائی 19	پولیمریز چین ری ایکشن (پی سی آر) کے ذریعے ڈی این اے کی توسیع	28
اکائی 20	فراہم کردہ ڈیٹا سے سرکلر اور لکیری پابندی والے انزائم میپنگ کی تعمیر	41

بلاک VI ڈی این اے کی ترتیب کے لیے تکنیکیں، بلوٹنگ کی تکنیکیں اور اچھی لیبارٹری پریکٹسز

اکائی 21	پلازمڈ ڈی این اے کے ساتھ *E. Coli* سیلز کی تَقلّب اور فراہم کردہ ڈیٹا سے تَقلّبی کارکردگی کا حساب	55
اکائی 22	تصویروں کے ذریعے ناردرن بلوٹنگ، ساؤتھرن بلاٹنگ اور ویسٹرن بلاٹنگ کی تکنیکوں کا مطالعہ	68
اکائی 23	مطالعہ ڈی این اے کی ترتیب، سینجر کا طریقہ اور تصاویر کے ذریعے ڈی این اے فنگر پرنٹنگ تکنیک	85
اکائی 24	چوہے کے ٹیسٹس اور بیضہ دانی کا مطالعہ	106
نمونہ امتحانی پرچہ (لیب مینول)		**117**

پیغام

مولانا آزاد نیشنل اُردو یونیورسٹی 1998 میں وطنِ عزیز کی پارلیمنٹ کے ایکٹ کے تحت قائم کی گئی۔ اس کے چار نکاتی مینڈیٹس یہ ہیں۔ (1) اردو زبان کی ترویج و ترقی (2) اردو میڈیم میں پیشہ ورانہ اور تکنیکی تعلیم کی فراہمی (3) روایتی اور فاصلاتی تدریس سے تعلیم کی فراہمی اور (4) تعلیم نسواں پر خصوصی توجہ۔ یہ وہ بنیادی نکات ہیں جو اِس مرکزی یونیورسٹی کو دیگر مرکزی جامعات سے منفرد اور ممتاز بناتے ہیں۔ قومی تعلیمی پالیسی 2020 میں بھی مادری اور علاقائی زبانوں میں تعلیم کی فراہمی پر کافی زور دیا گیا ہے۔

اُردو کے ذریعے علوم کو فروغ دینے کا واحد مقصد و منشا اُردو داں طبقے تک عصری علوم کو پہنچانا ہے۔ ایک طویل عرصے سے اُردو کا دامن علمی مواد سے لگ بھگ خالی رہا ہے۔ کسی بھی کتب خانے یا کتب فروش کی الماریوں کا سرسری جائزہ اس بات کی تصدیق کر دیتا ہے کہ اُردو زبان سمٹ کر چند ''ادبی'' اصناف تک محدود رہ گئی ہے۔ یہی کیفیت اکثر رسائل واخبارات میں دیکھنے کو ملتی ہے۔ اُردو قاری اور اُردو سماج دورِ حاضر کے اہم ترین علمی موضوعات سے نابلد ہیں۔ چاہے یہ خود ان کی صحت و بقا سے متعلق ہوں یا معاشی اور تجارتی نظام سے، یا مشینی آلات ہوں یا ان کے گرد و پیش ماحول کے مسائل ہوں، عوامی سطح پر اِن شعبہ جات سے متعلق اردو میں مواد کی عدم دستیابی نے عصری علوم کے تئیں ایک عدم دلچسپی کی فضا پیدا کر دی ہے۔ یہی وہ چیلنجز ہیں جن سے اُردو یونیورسٹی کو نبرد آزما ہونا ہے۔ نصابی مواد کی صورت حال بھی کچھ مختلف نہیں ہے۔ اِسکولی سطح پر اُردو کتب کی عدم دستیابی کے چرچے ہر تعلیمی سال کے شروع میں زیر بحث آتے ہیں۔ چوں کہ اُردو یونیورسٹی کا ذریعہ تعلیم اُردو ہے اور اس میں عصری علوم کے تقریباً سبھی اہم شعبہ جات کے کورسز موجود ہیں لہٰذا اِن تمام علوم کے لیے نصابی کتابوں کی تیاری اِس یونیورسٹی کی اہم ترین ذمہ داری ہے۔

مجھے اِس بات کی بے حد خوشی ہے کہ یونیورسٹی کے ذمہ داران بشمول اساتذہ کرام کی انتھک محنت اور ماہرین علم کے بھرپور تعاون کی بنا پر کتب کی اشاعت کا سلسلہ بڑے پیمانے پر شروع ہو چکا ہے۔ ایک ایسے وقت میں جب کہ ہماری یونیورسٹی اپنی تاسیس کی 25ویں سالگرہ منا رہی ہے، مجھے اس بات کا انکشاف کرتے ہوئے بہت خوشی محسوس ہو رہی ہے کہ یونیورسٹی کا نظامتِ فاصلاتی تعلیم از سرِ نو اپنی کارکردگی کے نئے سنگِ میل کی طرف رواں دواں ہے اور نظامتِ فاصلاتی تعلیم کی جانب سے کتابوں کی اشاعت اور ترویج میں بھی تیزی پیدا ہوئی ہے۔ نیز ملک کے کونے کونے میں موجود تشنگانِ علم فاصلاتی تعلیم کے مختلف پروگراموں سے فیضیاب ہو رہے ہیں۔ گرچہ گزشتہ برسوں کے دوران کووڈ کی تباہ کن صورتِ حال کے باعث انتظامی امور اور ترسیل و ابلاغ کے مراحل بھی کافی دشوار کن رہے تاہم یونیورسٹی نے اپنی حتی المقدور کوششوں کو بروئے کار لاتے ہوئے نظامتِ فاصلاتی تعلیم کے پروگراموں کو کامیابی کے ساتھ روبہ عمل کیا ہے۔ میں یونیورسٹی سے وابستہ تمام طلبا کو یونیورسٹی سے جڑنے کے لیے صمیم قلب کے ساتھ مبارک باد پیش کرتے ہوئے اس یقین کا اظہار کرتا ہوں کہ ان کی علمی تشنگی کو پورا کرنے کے لیے مولانا آزاد اردو یونیورسٹی کا تعلیمی مشن ہر لمحہ ان کے لیے راستے ہموار کرے گا۔

پروفیسر سید عین الحسن

وائس چانسلر

پیغام

موجودہ دور میں فاصلاتی طریقۂ تعلیم کو پوری دنیا میں ایک انتہائی کار گر اور مفید طریقۂ تعلیم کی حیثیت سے تسلیم کیا جاچکا ہے اور اس طریقۂ تعلیم سے بڑی تعداد میں لوگ مستفید ہو رہے ہیں۔ مولانا آزاد نیشنل اُردو یونیورسٹی نے بھی اپنے قیام کے ابتدائی دنوں ہی سے اردو آبادی کی تعلیمی ضروریات کے پیش نظر فاصلاتی طرز تعلیم کو متعارف کرایا۔ مولانا آزاد نیشنل اردو یونیورسٹی کا آغاز 1998 میں نظامتِ فاصلاتی تعلیم سے ہوا اور 2004 میں باقاعدہ روایتی طرز تعلیم (Regular Courses) کا آغاز ہوا اور بعد ازاں متعدد روایتی تدریس کے شعبہ جات قائم کیے گئے۔

ملک میں تعلیمی نظام کو بہتر انداز سے جاری رکھنے میں یو جی سی کا مرکزی کردار رہا ہے۔ فاصلاتی تعلیم (ODL) کے تحت جاری مختلف پروگرام UGC-DEB سے منظور شدہ ہیں۔ UGC-DEB اس بات پر زور دیتا رہا ہے کہ فاصلاتی نظامِ تعلیم کے نصابات اور نظامات کو روایتی نظامِ تعلیم کے نصابات اور نظامات سے کماحقہ ہم آہنگ کر کے فاصلاتی تعلیم کے طلبا کے معیار کو بلند کیا جائے۔ چوں کہ مولانا آزاد نیشنل اردو یونیورسٹی فاصلاتی اور روایتی طرزِ تعلیم کی جامعہ (Dual Mode University) ہے، لہٰذا اس مقصد کے حصول کے لیے یو جی سی۔ ڈی ای بی کے رہنمایانہ اصولوں کے مطابق (CBCS) Credit Based Credit System نظام متعارف کرایا گیا اور خود اکتسابی مواد (Self Learning Material) از سرِ نو، جس میں یو جی اور پی جی طلبا کے لیے چھ بلاک چوبیس اکائیوں اور چار بلاک سولہ اکائیوں پر مشتمل نئے طرز کی ساخت پر تیار کیا گیا ہے۔

نظامتِ فاصلاتی تعلیم یو جی، پی جی، بی ایڈ، ڈپلوما اور سرٹیفکیٹ کورسز پر مشتمل جملہ سترہ (17) کورسز چلا رہا ہے۔ ساتھ ہی تکنیکی ہنر پر مبنی کورسز بھی شروع کیے جا رہے ہیں۔ متعلمین کی سہولت کے لیے ملک کے مختلف حصوں میں 9 علاقائی مراکز بنگلورو، بھوپال، دربھنگہ، دہلی، کولکاتا، ممبئی، پٹنہ، رانچی اور سری نگر اور 6 ذیلی علاقائی مراکز حیدرآباد، لکھنؤ، جموں، نوح، وارانسی اور امراوتی کا ایک بہت بڑا نیٹ ورک موجود ہے۔ اس کے علاوہ وجے واڑہ میں ایک ایکسٹنشن سنٹر بھی قائم کیا گیا ہے۔ ان مراکز کے تحت سرِ دست 160 سے زیادہ متعلم امدادی مراکز (Learner Support Centres) نیز 20 پروگرام سنٹرس (Programme Centres) کام کر رہے ہیں، جو طلبا کو تعلیمی اور انتظامی مدد فراہم کرتے ہیں۔ نظامت فاصلاتی تعلیم اپنی تعلیمی اور انتظامی سرگرمیوں میں آئی سی ٹی کا بھرپور استعمال کرتا ہے، نیز اپنے تمام پروگراموں میں داخلے صرف آن لائن طریقے ہی سے دے رہا ہے۔

نظامتِ فاصلاتی تعلیم کی ویب سائٹ پر متعلمین کو خود اکتسابی مواد کی سافٹ کاپیاں بھی فراہم کی جا رہی ہیں، نیز آڈیو۔ ویڈیو ریکارڈنگ کا لنک بھی ویب سائٹ پر فراہم کیا گیا ہے۔ اس کے علاوہ متعلمین کے درمیان رابطے کے لیے ای میل اور وہاٹس ایپ گروپ کی سہولت فراہم کی گئی ہے، جس کے ذریعے متعلمین کو پروگرام کے مختلف پہلوؤں جیسے کورس کے رجسٹریشن، مفوضات، کونسلنگ، امتحانات وغیرہ کے بارے میں مطلع کیا جاتا ہے۔ پچھلے دو سال سے ریگولر کاؤنسلنگ کے علاوہ ایڈیشنل رمیڈیل آن لائن کاؤنسلنگ مہیا کی جا رہی ہے تاکہ طلبا کے تعلیمی معیار کو بلند کیا جا سکے۔

امید ہے کہ ملک کی تعلیمی اور معاشی حیثیت سے پچھڑی اردو آبادی کو عصری تعلیم کے مرکزی دھارے سے جوڑنے میں نظامتِ فاصلاتی تعلیم کا بھی نمایاں رول ہوگا۔ آنے والے دنوں میں تعلیمی ضروریات کے پیش نظر نئی تعلیمی پالیسی (NEP-2020) کے تحت مختلف کورسز میں تبدیلیاں کی جائیں گی اور امید ہے کہ یہ فاصلاتی نظام کو زیادہ مؤثر و کارگر بنانے میں مددگار ثابت ہوگی۔

پروفیسر محمد رضا اللہ خان
ڈائرکٹر، نظامت فاصلاتی تعلیم

کورس کا تعارف

مولانا آزاد نیشنل اردو یونیورسٹی کسی تعریف کی محتاج نہیں۔ یونیورسٹی کی ہمیشہ اس بات کی کوشش رہی ہے کہ علوم سائنس کو عام فہم اردو زبان میں روشناس کروایا جائے تاکہ حصول علم کا صحیح مقصد حاصل ہو سکے۔ یہ بات صد فیصد سچ ہے کہ اگر علم مادری زبان میں دستیاب ہو تو اس کے سمجھنے میں بے حد آسانی ہوتی ہے۔ سائنسی نظریات اور اس کے تصورات کی صحیح اور مکمل حقیقت کی جانکاری مادری زبان میں ہی ممکن ہے کیونکہ علوم سائنس اور اس کے حقائق انتہائی خشک ہوتے ہیں اور ایک عام فہم شخص اسے سمجھنے سے قاصر ہوتا ہے۔ اس کورس کے لکھنے میں اعلیٰ سائنسی مواد کو انتہائی عام فہم اور سلیس انداز میں لکھا گیا ہے۔ بالخصوص سائنسی اصطلاحات کو ان کے اردو املا کی شکل میں ہی اکثر پیش کیا گیا ہے اور اس کے متبادل سے متن میں قدرے پرہیز اس لیے کیا گیا ہے کہ طلبا کو مستقبل میں ان کے انٹرویو کے وقت کسی دشواری کا سامنا نہ کرنا پڑے۔

یہ کورس چھ بلاکس پر مشتمل ہے، جس میں 24 اکائیاں شامل ہیں، جو کہ بی ایس سی کے چھٹے سمسٹر کا حصہ ہیں۔ اس میں اینیمل بائیو ٹیکنالوجی کا احاطہ کیا گیا ہے، اور پورا کورس چھ بلاکس میں تقسیم کیا گیا ہے (حصہ اول جس میں چار تھیوری بلاک تھیوری اور پارٹ II دو پریکٹیکل بلاکس ہیں)

پہلا بلاک چار اکائیوں پر مشتمل ہے جس میں بائیو ٹیکنالوجی، اینیمل سیل اور ٹشو کلچر کا احاطہ کیا گیا ہے۔ پہلا یونٹ بائیو ٹیکنالوجی کے تصور اور دائرہ کار اور سیل اور ٹشو کلچر کے تعارف سے متعلق ہے، دوسرا یونٹ پرائمری کلچر کے ساتھ، اور تیسرا، چوتھا کور۔ سیل/ٹشو کلچر کے لیے بنیادی تقاضے اور لیبارٹری کا انتظام اور سیل لائنوں کی تنہائی۔

دوسرے بلاک میں پانچ یونٹ ہیں جو Recombinant DNA ٹیکنالوجی، کلوننگ ویکٹر کی خصوصیات، تبدیلی کی تکنیک اور DNA کی ترتیب کا احاطہ کرتے ہیں۔ تیسرا بلاک، جو چار اکائیوں پر مشتمل ہے، جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانوروں کا تصور فراہم کرتا ہے۔ چوتھا بلاک، جس میں تین یونٹس بھی شامل ہیں، انسانی صحت میں ان تکنیکوں کے اطلاق کے پہلوؤں کا احاطہ کرتا ہے۔

مزید برآں، پانچویں اور چھٹے بلاکس میں اینیمل بائیو ٹیکنالوجی میں پریکٹیکل سیشن کے 4 یونٹ ہیں جن کے لیے ایک الگ کتاب فراہم کی گئی ہے۔ سائنسی مضامین کی اردو میں نصابی کتابوں کی عدم موجودگی نہ صرف طلبا بلکہ اساتذہ کے لئے بھی ایک دیرینہ مسئلہ بنا ہوا تھا۔ اس دور میں جب کہ اردو میں لکھنے والے اساتذہ عنقا ہوتے چلے جا رہا ہیں۔ اس کتاب کا منظر عام پر آنا ایک سنگ میل سے کم نہیں۔

ڈاکٹر عارف احمد
کورس کوآرڈی

حیوانی بائیو ٹیکنالوجی

(Animal Biotechnology)

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

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

اکائی کے اجزا

1.0 تمہید(Introduction)

1.1 مقاصد(Objectives)

1.2 عمومی اکاؤنٹ(General Account)

1.2.1 قدیم بائیو ٹیکنالوجی(Ancient Biotechnology)

1.2.2 جدید بائیو ٹیکنالوجی(Morden Biotechnology)

1.3 بائیو ٹیکنالوجی کی اقسام(Types of Biotechnology)

1.4 بایو ٹکنالوجی میں مختلف تکنیکیں(Various Techniques in Biotechnology)

1.5 بائیو ٹیکنالوجی کی ایپلی کیشنز(Applications of Biotechnology)

1.6 سیل اور ٹشو کلچر(Cell Culture)

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

1.6.2 اسٹیم سیلز(Stem Cells)

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

1.6.4 جانوروں کی ٹشو کلچر(Animal Tissue Culture)

1.6.5 ٹشو انجینئرنگ تک رسائی(Tissue Engineering Approaches)

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

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

1.8 ٹشوانجینئرنگ تکنیک کااطلاق (Application of Tissue Engineering Technique)
1.8.1 دوائیں(Regenerative Medicines)
1.8.2 وٹروہیومن ماڈلز کی تخلیق(In vitro human models)
1.8.3 ٹشوانجینئرنگ میں چیلنجز(Challenges in Tissue Engineering)
1.8.4 مدافعتی ردعمل اور گرافٹ ردعمل(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 اکائی میں خوش آمدید، "بائیو ٹیکنالوجی: تصورات، دائرہ کار، اور سیل اور ٹشو کلچر کے ذرائع۔" اس اکائی 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 بیان کرتے 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 مائکروجنزموں(Micro-organisms) کو مختلف مصنوعات حاصل کرنے کے لیے استعمال کیا گیا ہے۔ ایسی ٹیکنالوجیز 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 مائکرو جنزموں کو بڑے پیمانے پر بائیو کیمیکلز (جیسے الکحل، اینٹی بائیو ٹکس)، فوڈ پروسیسنگ اور ماحولیاتی تدارک کے لیے استعمال کیا جاتا رہا ہے۔ بائیو ٹیکنالوجی کی بڑی ایپلی کیشنز میں زراعت کی بہتری کے لیے علاج، تشخیص، فوڈ پروسیسنگ، 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 بنادیا 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 اعلی 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 کراتا 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۔

خمیر کے قدیم طریقوں سے لے کر جینیاتی انجینئرنگ کی انقلابی کامیابیوں تک، ہم انسانی ذہانت اور استقامت کی بھرپور ٹیپسٹری 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 ایپلی 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 کینیٹکس، 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 کلچرز اور اسٹیم سیلز تک، ہر سیل ماخذ منفرد فوائد اور چیلنجز پیش کرتا ہے جو تجرباتی نتائج اور ایپلی 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 بااختیار 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 ایپلی 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 ایپلی 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 8000-4000 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 (BC4000–8000): بائیو ٹیکنالوجی کی ابتدائی تاریخ کا تعلق جانوروں کے پالنے اور پودوں کی کاشت سے ہے۔
- کلاسیکی بائیو ٹیکنالوجی (2000 قبل مسیح؛AD1900-1800): بائیو ٹیکنالوجی کا یہ دور ابال، 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)

سال1800 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 مائکروجنزموں (جیسے بیکٹیریا، خمیر یا سانچوں) کا کردار اور اس وجہ سے ابال دریافت کیا گیا تھا۔ 1796 میں، ایڈورڈ جینر 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 مائکروجنزم ایک اہم کردار ادا کرتے ہیں۔ شہد، سویابین 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۔

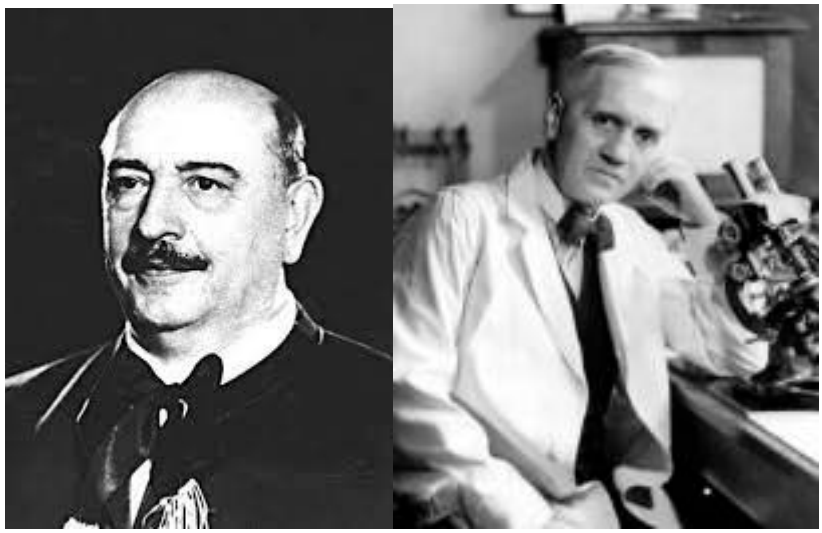
1919 میں ہنگری کے انجینئر کارل ایریکی نے "بائیو ٹیکنالوجی" کی اصطلاح بنائی۔ ان کے مطابق، بائیو ٹیکنالوجی زندہ جانداروں کا استعمال ہے جو اہم مواد یا مصنوعات تیار کرتی ہے۔ دوسرے لفظوں میں، یہ وہ ٹیکنالوجی ہے جو حیاتیاتی عمل، حیاتیات یا ایسی مصنوعات تیار کرنے کے نظام جو انسانی زندگیوں کو بہتر بناتے ہیں۔

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 موبائل 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 پینسلن مفید ثابت ہوئی۔ بائیو ٹیکنالوجی کی توجہ 1930 کی دہائی میں فارماسیوٹیکلز پر 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۔ خچر انسانوں کے فائدے کے لیے کراس بریڈ نگ کی سب سے قدیم مثالوں میں سے ایک ہے۔ انسان نے نقل و حمل، بوجھ اٹھانے اور کھیتی باڑی کے لیے خچروں کا استعمال شروع کیا۔ بعد میں بائیو ٹیکنالوجی کی توجہ فارماسیوٹیکلز کی طرف منتقل ہوگئی۔ مائکرو جنزموں 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 مائکرو جنزم دریافت ہوئے، جینیات پر مینڈل کا کام مکمل ہو گیا اور مائکرو بیل عمل جیسے ابال 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 فلیمنگ (Alexander Fleming)

1.2.2 جدید بائیو ٹیکنالوجی (Morden Biotechnology)

بعد میں 1960 اور 70 کی دہائیوں میں مالیکیولر، سیلولر ٹیکنالوجیز ابھرنے لگیں۔ 1953 سے 1976 کے درمیانی عرصے میں ڈی این اے کی تحقیق شروع کی گئی۔ خلیات اور حیاتیاتی مالیکیول (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 بیکٹیریا میں غیر ملکی جین داخل کرنے کے قابل بنایا۔ اس نے ریکومبینٹ 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 جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانداروں سے حاصل کردہ

مصنوعات کو مالیکیولز 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 نیوکلیئر ٹرانسفر ٹیکنالوجی کا استعمال کرتے ہوئے کلون کیا گیا کیونکہ اس میں انسانی جین کی انکوڈنگ فیکٹر IX تھی، جو ہیموفیلیا 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 طبّی اور ماحولیاتی استعمال کے لیے جینیاتی طور پر انجنیئر مادہ تیار کیا۔ 1998 میں، ڈولی کی کلوننگ کی اہمیت کا احساس ہوا۔ مالیکیولر بائیولوجسٹ سٹیم سیلز کا مطالعہ کرنے میں دلچسپی لینے لگے۔ 1999 میں، اینٹی باڈی کا تجزیہ 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	بیئر 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 پایا کہ والدین اور ان کی اولاد کے درمیان ایک جیسی خصوصیات پائی جاتی ہیں۔
	320 بی سی	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		مارسیلو مالپیگی نے مائیکرو اسکوپ کا استعمال کرتے ہوئے کیپلریوں میں خون کی گردش کا پتہ لگایا اور دریافت کیا کہ دماغ ریڑھ کی ہڈی سے ریشوں کے بنڈلز کے ذریعے منسلک ہوتا ہے جو اعصابی نظام تشکیل دیتے ہیں۔
1673		انٹونی وان لیووین ہوک نے پروٹوجوا اور بیکٹیریا جیسے مائکرو حیاتیات کی شناخت کی، اور مشورہ دیا کہ مائکرو آرگنزم فرمنٹیشن میں فعال کردار ادا کرتے ہیں۔
1701		جیاکومو پیلارینی نے پایا کہ چیچک کا انتظام زندگی میں بعد میں اس کے وقوع کو روکتا ہے۔ اس عمل کو 'ویکسی نیشن' کا نام دیا گیا۔
1800– 1900	1809	نکولس ایپرٹ نے کھانے کو جراثیم سے پاک کرنے کے لئے گرمی کا استعمال کرتے ہوئے ایک تکنیک ایجاد کی۔
	1856	پاسچر کے جسٹس وان لیبگ نے مشورہ دیا کہ جراثیم فرمنٹیشن کے ذمہ دار ہیں۔
	1859	چارلس ڈارون نے 'قدرتی انتخاب' کا اندازہ لگایا۔
	1863	پاسچرائزیشن کا طریقہ پاسچر نے دریافت کیا تھا۔ ہائنرک انٹن ڈی بیری نے دریافت کیا کہ پھپھوندی آلو کے پھٹنے کا ذمہ دار ہے۔
	1865	مینڈل نے 'موروثی قوانین' تجویز کیے۔
	1868	جوہانس فریڈرک میشر نے نیوکلیسن (نیوکلیک ایسڈ سے بنا ایک مرکب) کو پاس کے خلیوں سے الگ کیا۔
	1870	والتھر فلیمنگ نے مائٹوسیس دریافت کیا۔
	1871	کوچ نے اینتھریکس کی تحقیقات کی اور مائکرو آرگنزم کی شناخت، ثقافت اور داغ لگانے کی تکنیکوں کی تلاش کی۔
	1880	لوئس پاسچر نے مائکرو آرگنزم کی کمزور (کمزور) اقسام کی تلاش کی جو ممکنہ طور پر مہلک نہیں ہو سکتی ہیں۔

	1881	کوچ نے آلو کے ٹکڑوں، جیلاٹن اور اگر میڈیم پر بیکٹیریا کالونیوں کی کٹائی کی تکنیک وں کی وضاحت کی۔
	1884	گرام نے سیلولر پیپٹیڈوگلائکن پر مشتمل بیکٹیریا کے لئے امتیازی دھبے کی تکنیک کی وضاحت کی جسے اب گرام اسٹیننگ کے نام سے جانا جاتا ہے۔
1900–1953	1900	مینڈل کے کام کو ڈی وریز، وان شرمک اور کورینز نے دوبارہ زندہ کیا۔
	1902	سوٹن نے پایا کہ کروموسومز (جوڑے ہوئے) میں کچھ عناصر ہوتے ہیں جو ایک نسل سے دوسری نسل میں منتقل ہوتے ہیں۔
	1905	ایڈمنڈ بیچر ولسن اور نیٹی اسٹیونز نے ثابت کیا کہ ایک واحد وائی کروموسوم مردانہ پن کا تعین کرتا ہے جبکہ ایکس کروموسوم کی دو کاپیاں خواتین کا تعین کرتی ہیں۔
	1905–1908	ولیم بیٹسن اور آر سی پنیٹ نے دریافت کیا کہ متعدد جینز دوسرے جینز کے عمل کو تبدیل یا تبدیل کرتے ہیں۔ ابیو جینیسیس، یا بے ساختہ نسل کا نظریہ پیش کیا گیا تھا۔
	1952	جارج اوٹو گی نے انسانی سروائیکل کارسینوما سے ہیلا کے نام سے ایک سیل لائن بنائی۔
1953–1976	1953	واٹسن اور کرک کا یہ مضمون ڈی این اے کی ڈبل ہیلکس ساخت کو سامنے لانے پر مبنی ہے جو جرنل 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۔ مکینیکل پروٹین سیکوئنسر، مور-اسٹائن امینو ایسڈ تجزیہ کار، تیار کیا گیا تھا۔
	1959	فرانسوا جیکب اور جیکس لوسیئن مونود نے جینیاتی ضابطے کے تصور کو دستاویزی شکل دی۔ انہوں نے 'ریپریسر' 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	واٹسن اور کرک کو مورس ولکنز کے ساتھ فزیالوجی یا میڈیسن میں نوبل انعام سے نوازا گیا تھا۔
	1963	سیموئل کاٹز اور جان ایف اینڈرز نے خسرے کی پہلی ویکسین تیار کی۔
	1964	انزائم ریورس ٹرانسکرپٹس دریافت کیا گیا تھا.
	1966	جینیاتی کوڈ کو کئی محققین نے دریافت کیا تھا۔ مارشل وارن نیرنبرگ، جے ہینرک متھائی اور ایس اوچوا نے بتایا کہ تین نیوکلیوٹائڈ بیسز (جسے کوڈنز 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	وائرولوجسٹ پیٹر ایچ ڈوئسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکوجین 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	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 اسٹرینڈز کو جوڑنے کے لئے لیگیز انزائم کا استعمال کیا۔
	1973	بروس نیتھن ایمس 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، ایمس ٹیسٹ بڑے پیمانے پر کینسر پیدا کرنے والے مادوں کی شناخت کے لئے استعمال کیا جانے لگا۔
		اسٹینلے کوہن اور ہربرٹ بوئر نے پہلا کامیاب آر ڈی این اے تجربہ کرنے کے لئے بیکٹیریل جینز کا استعمال کیا۔ سرایڈون میلر 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 لئے کالونی ہائبرڈائزیشن اور سدرن بلٹنگ کی تلاش کی گئی۔ پہلی مونوکلونل اینٹی باڈیز تیار کی گئیں۔
	1975	جے مائیکل بشپ اور ہیرالڈ ورمس نے جانوروں کے کروموسومز پر کینسر پیدا کرنے والے جینز کی موجودگی کو قائم کیا جسے آنکوجینز کہا جاتا ہے۔ این آئی ایچ نے آر ڈی این اے تحقیق کے لئے پہلی ہدایات شائع کیں۔
	1976	جینیاتی انجینئرنگ کی آمد کے ساتھ، پہلی بار بیکٹیریا میں انسانی پروٹین پیدا کرنا ممکن ہوا۔ آر آسٹرین اور ان کے ساتھیوں نے نمونیا کے لئے پہلی ویکسین تیار کی۔ ہربرٹ ڈبلیو بوئر نے انسولین جین کو بیکٹیریا ایشیریچیا کولی میں متعارف کروا کر مصنوعی انسانی انسولین کی ترکیب کی۔ لوئس براؤن، پہلا ٹیسٹ ٹیوب بچہ، برطانیہ میں پیدا ہوا تھا. میننگو کوکل میننجائٹس کے لئے پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی.
–1977	1977	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۔
	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 ڈوئسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکوجین 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	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 اسٹرینڈز 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۔
	1983	بروس نیتھن ایمس 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، ایمس 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۔
	1984	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 مونوکلونل اینٹی باڈیز تیار کی گئیں۔

	1985	جے مائیکل بشپ اور ہیرالڈ ورمس نے جانوروں کے کروموسومز پر کینسر پیدا کرنے والے جینز کی موجودگی کو قائم کیا جسے آنکوجینز کہا جاتا ہے۔ این آئی ایچ نے آر ڈی این اے تحقیق کے لئے پہلی ہدایات شائع کیں۔
	1986	جینیاتی انجینئرنگ کی آمد کے ساتھ، پہلی بار بیکٹیریا 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 اسٹینڈ ڈنیچرل 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 ڈوئسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکوجین 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 ہائبرڈ سرکلر مالیکیول بنانے کے لئے بیک وقت دو ڈی این اے اسٹرینڈز 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۔
	1993	بروس نیتھن ایمس 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، ایمس 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 ہائبرڈائزیشن اور سدرن بلٹنگ کی تلاش کی گئی۔ پہلی مونوکلونل اینٹی باڈیز تیار کی گئیں۔
	1995	جے مائیکل بشپ اور ہیرالڈ ورمس نے جانوروں کے کروموسومز پر کینسر پیدا کرنے والے جینز کی موجودگی کو قائم کیا جسے آنکوجینز کہا جاتا ہے۔ این آئی ایچ نے آر ڈی این اے تحقیق کے لئے پہلی ہدایات شائع کیں۔
	1996	جینیاتی انجینئرنگ کی آمد کے ساتھ، پہلی بار بیکٹیریا 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 اسٹینڈ ڈنیچرل 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 ڈوئسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکوجین 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 ہائبرڈ سرکلر مالیکیول بنانے کے لئے بیک وقت دو ڈی این اے اسٹرینڈز 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۔

	2003	بروس نیتھن ایمس نامی ایک حیاتیاتی کیمیاءدان نے ڈی این اے کو نقصان پہنچانے والے کیمیکلز کی شناخت کے لیے ایک تحقیق تیار کی ہے۔ بعد میں، ایمس 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۔
	2004	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 مونوکلونل اینٹی باڈیز تیار کی گئیں۔
	2005	جے مائیکل بشپ اور ہیرالڈ ورمس نے جانوروں کے کروموسومز پر کینسر پیدا کرنے والے جینز کی موجودگی کو قائم کیا جسے آنکوجینز 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 ڈنیچرل وائرل ڈی این اے کا استعمال کرتے ہوئے ایک مطالعہ کی اطلاع دی۔
	2009	ایک انزائم کو وٹرو حالات میں تشکیل دیا جاتا ہے۔
	2010	وائرولوجسٹ پیٹر ایچ ڈوئسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکوجین 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 اسٹرینڈز 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 نیتھن ایمس نامی ایک حیاتیاتی کیمیاءدان نے ڈی این اے کو نقصان پہنچانے والے کیمیکلز کی شناخت کے لیے ایک تحقیق تیار کی ہے۔ بعد میں، ایمس 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۔
	2014	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 مونوکلونل اینٹی باڈیز تیار کی گئیں۔
	2015	جے مائیکل بشپ اور ہیرالڈ ورمس نے جانوروں کے کروموسومز پر کینسر پیدا کرنے والے جینز کی موجودگی کو قائم کیا جسے آنکوجینز 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 ڈنیچرل وائرل ڈی این اے کا استعمال کرتے ہوئے ایک مطالعہ کی اطلاع دی۔
	2019	ایک انزائم کو وٹرو حالات میں تشکیل دیا جاتا ہے۔

	2020	وائرولوجسٹ پیٹر ایچ ڈوئسبرگ اور پیٹر کے ووگٹ نے وائرس میں پہلے آنکوجین کی نشاندہی کی۔ پابندی کے انزائم دریافت کیے گئے تھے.
	2021	مورس ہلمین نے ممپس کے لیے پہلی امریکی ویکسین بنائی۔ روبیلا کی پہلی ویکسین تیار کی گئی تھی۔
	2022	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 اسٹرینڈز 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۔
	2023	بروس نیتھن ایمس 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، ایمس 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 مونوکلونل 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 جارہا 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، ماتمی لباس اور پودوں کی بیماریوں کے خلاف مزاحم ہیں۔ دواؤں کی پیداوار (بائیو 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، پیتھوجینز اور انسانی خلیے کی حیاتیات کو سمجھنے کے لیے ایک تحقیقی ٹول کے طور پر کیا جاتا ہے۔ اس تکنیک کو دواسازی 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 لیمفوما ویکسین جینیاتی طور پر انجنیئر تمباکو کے پودوں کا استعمال کرتے ہوئے تیار کی گئی ہے جو مہلک (فعال طور پر کینسر والے) بی سیلز سے آر این 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، ابیوٹک 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 thuringiensisis* 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، ڈٹرجنٹ، 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۔

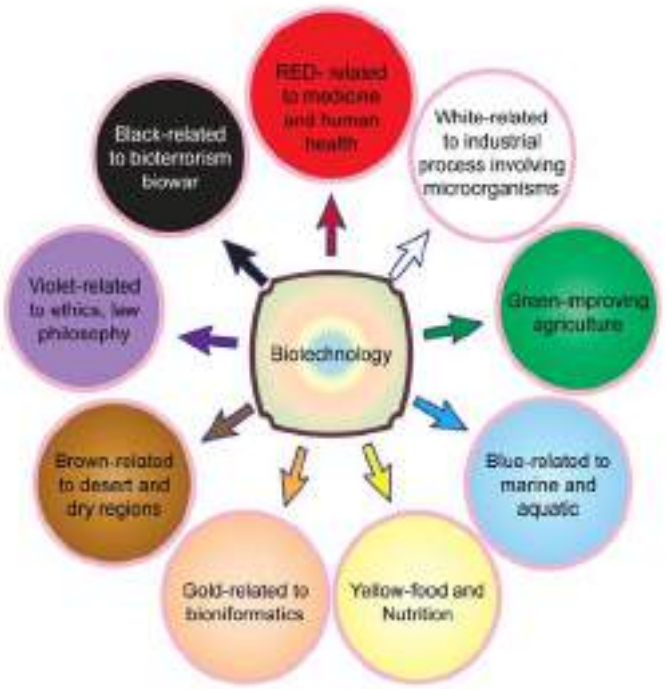
4. ماحولیاتی بائیو ٹیکنالوجی (Industrial Biotechnology)

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 موثر 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)۔

جدول1.2: رنگ کی بنیاد پر بائیو ٹیکنالوجی کی مختلف شاخوں کی درجہ بندی

رنگین عہدہ	بیان
گولڈ بائیو ٹیکنالوجی یا بائیو انفارمیٹکس یا کمپیوٹیشنل بائیولوجی	حیاتیاتی اعداد و شمار کے تجزیہ کے لئے کمپیوٹیشنل تکنیک کا استعمال.
لال بائیو ٹیکنالوجی (بائیو فارما)	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 بائیو ٹکس، تجدیدی تھراپی، مالیکیولر تشخیص اور جینیاتی انجینئرنگ تکنیک 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 فرمنٹیشن 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 application کے لئے سمندری وسائل کا استعمال.
وائلٹ 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 بایو ٹکنالوجی 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 پروتینوں میں بہتری یا مفید مصنوعات بنانے کے لیے نئے پروٹین بنانا شامل ہے۔

❖ انزائم انجینئرنگ

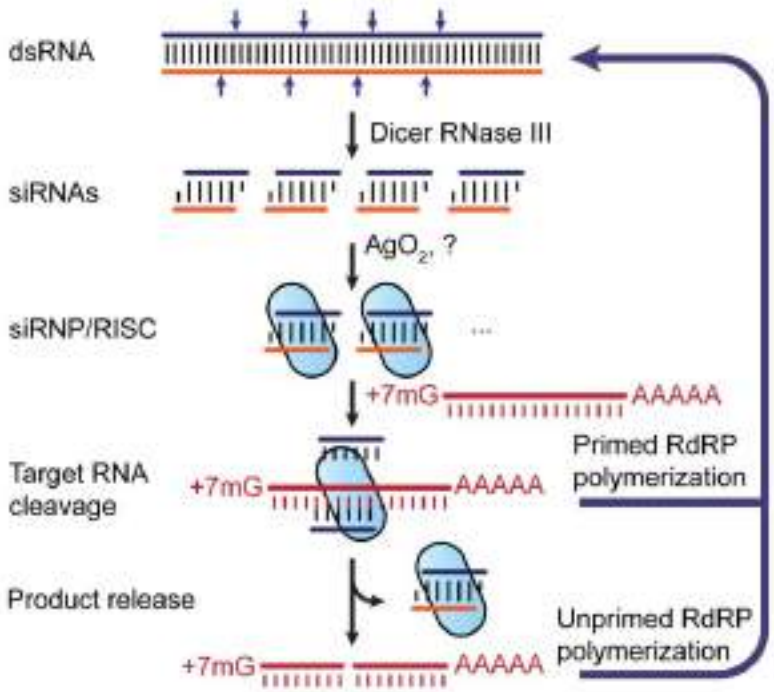
اس ٹکنالوجی میں انزائم کی کارکردگی میں بہتری یا امینو ایسڈ کی ترتیب کو تبدیل کر کے انزائم کی سرگرمی کی تشکیل شامل ہے۔ جینیاتی انجینئرنگ کی تکنیکوں کو بڑے پیمانے پر انزائم کی کارکردگی کو بہتر بنانے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

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 جا سکیں۔

❖ اینٹی سینس یا RNAi ٹیکنالوجی

RNA مداخلت (RNAi)، ایک ایسا طریقہ کار ہے جس میں یوکریاٹک جانداروں میں جین کے اظہار کو منظم کرنے میں چھوٹےRNAs(30بیس سے کم لمبے)کااستعمال شامل ہے(تصویر1.2)۔RNAiپر مبنی میکانزم نے بیماری کے علاج کے لیے جین کے فنکشن اور علاج معالجے کے مطالعے میں اس کے اطلاقات تلاش کیے ہیں۔



شکل1.2:RNAiتکنیک کاایک جائزہ

❖ بایوانفارمیٹکس ٹیکنالوجی(Bioinformatics Technology)

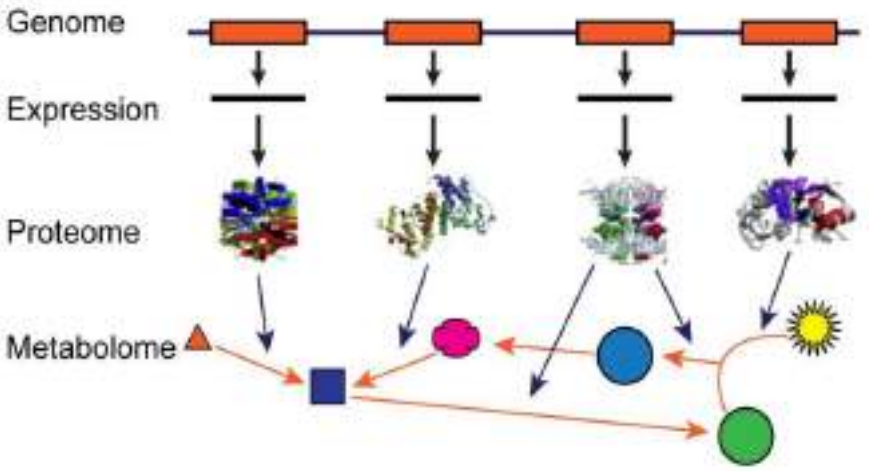
حیاتیاتی ڈیٹاکا کمپیوٹیشنل تجزیہ،مثال کے طور پر،ترتیب کا تجزیہ میکرومالیکولر ڈھانچے،اعلی تھروپٹ پروفائلنگ ڈیٹاکا تجزیہ۔

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

الیکٹروفورسس،مائیکرورے 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 فنگر پرنٹنگ،فلوکس تجزیہ)اس کے کچھ تنوع ہیں(شکل1.3)۔



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، بائیو میڈی ایشن (ماحولیاتی آلودگیوں کے علاج کے لیے جانداروں کا استعمال)، فائیٹور یمیڈیشن (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 بائیوڈیگریڈیبل 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 ٹیکنالوجیکل تکنیکوں کو تشخیص، علاج، ویکسین، انسانی جینوم ریسرچ میں استعمال کیا گیا ہے. انسولین اور ویکسین جیسے ہیپاٹائٹس 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 گٹھیا اور الزائمر کی نشوونما میں کردار ادا کرتے ہیں۔ جین تھراپی نے موروثی 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۔ Pfizer-BioNTech اور Moderna نے COVID-19 کے خلاف اعلی افادیت والی mRNA ویکسین تیار کیں۔ BioNTech/Pfizer کی طرف سے تیار کردہ mRNA ویکسین COVID-19 کے انفیکشن کو روکنے میں 90% مؤثر 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، ریکومبینینٹ ACE2 پروٹین جو وائرس کو انسانی خلیات سے منسلک نہ ہونے کے لیے چال چلاتا ہے، اور وائرس پر حملہ کرنے والے اینٹی باڈیز۔

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

3۔ زراعت (Agriculture)

بایو ٹیکنالوجیکل تکنیک بہتر غذائیت کے مواد، اعلی پیداوار، اور مختلف ابیوٹک 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 پیٹرو کیمیکلز، 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۔ جنریٹر 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 بایو ٹیکنالوجیکل ٹولز کا استعمال کرتے ہوئے آسانی سے ٹریس کیا جاسکتا ہے۔

دیگر استعمالات

جرثوموں کو پودوں اور سبزیوں کے مواد کو بائیوڈی 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،
	فلسنگ کی صلاحیت، تیزابیت اور نمکیات کی برداشت، ان وٹرو جراثیم کے تحفظ، جینیاتی تغیر، ان ویٹرو پولی گیشن، ہیپلوڈی کی شمولیت، سومیٹک ہائبرڈائزیشن، جینیاتی تبدیلی، مالیکیولر فارمنگ، سومیٹک ایمبریوجینیسس، آرگنوجینیسس، فائٹوریمیڈیایشن، ان وٹرو پودوں کے جراثیم کے تحفظ، متغیر انتخاب، سوماکلونیل تغیر، پودوں کے جینوم تجزیہ، ہائبرڈ بیج، مصنوعی بیج.
جانور بائیو ٹیکنالوجی	بائیو فارماسیوٹیکل: ہارمونز کی پیداوار، نشوونما کے عوامل، انٹرفیرونز، انزائمز، ریکمبینینٹ پروٹین، ویکسینز، خون کے اجزاء، آلیگونیوکلیوٹائڈز، ٹرانسکرپشن فیکٹر پر مبنی ادویات، اولیگونیوکلیوٹائڈز.
	اینٹی بائیوٹکس، تشخیص: اینٹی باڈیز، بایوسینسرز، پی سی آر، تھراپیوٹکس، ویکسینز، میڈیکل ریسرچ ٹولز، انسانی جینوم ریسرچ، بایوسینسرز کی ترقی
	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 بائیوٹکس، ڈی این اے مارکرز، جانوروں کی افزائش، زینوٹرانسپلانٹیشن، میڈیکل بائیوٹیکنالوجی،
	بائیو فارماسیوٹیکل (بائیوٹیکنالوجی کے ذریعے تیار کردہ دوا یا ویکسین)، تھیراپیوٹنٹس، 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
زرعی بائیو ٹیکنالوجی	فصل بائیو ٹیکنالوجی، باغبانی بائیو ٹیکنالوجی، ٹری بائیو ٹیکنالوجی، فوڈ پروسیسنگ، پلانٹ بائیو ٹیکنالوجی (فوٹو سینتھیسس کو بہتر بنانے والے، بائیو فرٹیلائزرز، 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.
ایندھن اور چارہ	قابل تجدید ایندھن، خراب جنگلات کی تیزی سے شجرکاری اور سبزہ زار کی بحالی کے لئے ٹشو کلچر تکنیک
صنعتی بائیو ٹیکنالوجی	میٹابولائٹ کی پیداوار (ایسیٹون، بوٹانول، الکحل، اینٹی بائیو ٹکس، انزائمز، وٹامنز، نامیاتی ایسڈز)، اینوروبک ہاضمہ (میتھین کی پیداوار کے لیے)، فضلے کا علاج (نامیاتی اور صنعتی دونوں)، بائیو کنٹرول ایجنٹس کی پیداوار، خوراک کی مصنوعات کی فرمینٹیشن، بائیو بیسڈ ایندھن اور توانائی، دھاتوں اور معدنیات کی بازیابی، بائیو ایتھنول، گودا اور کاغذ، خوراک، ٹیکسٹائل اور چمڑے، فارماسیوٹیکل، پیداوار کے لئے ایک انزائمیٹک 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 بائی پروڈکٹس، بائیو میٹریل اور بائیو پروسیسنگ، سمندری مالیکیولر بائیو ٹیکنالوجی.

1.6 سیل اور ٹشو کلچر (Cell Culture)

سیل اور ٹشو 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 ٹشو 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: بایومیڈیکل 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 جوناس 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 برانن 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 فزیالوجی اور پیتھالوجی کی پیچیدگیوں کا پردہ فاش کیا ہے، جس سے جدید علاج اور طبّی 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۔ چوہا دماغ 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 نیوروڈیولپمنٹل عمل، Synaptic پلاسٹکٹی، اور الزائمر اور پارکنسنز جیسی نیوروڈیجینریٹیو بیماریوں کے بارے میں قابل قدر بصیرت پیش کرتی ہیں۔

اسی طرح، جگر سے الگ تھلگ پرائمری ہیپاٹوسائٹس اپنے میٹابولک افعال کو برقرار رکھتے ہیں، جو انہیں منشیات کے میٹابولزم کے مطالعے، ہیپاٹوٹوکسٹی 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۔ ایمبریونک اسٹیم سیل (ESCs)، جو ابتدائی مرحلے کے ایمبریو سے اخذ کیے گئے ہیں، انحطاطی 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 بیٹا خلیات میں فرق کیا ہے، جو ٹائپ 1 ذیابیطس کے علاج کی امید پیش کرتے ہیں۔

ESCs کے علاوہ، حوصلہ افزائی شدہ pluripotent سٹیم سیلز (iPSCs) دوبارہ تخلیقی تھراپی کے لیے ایک ذاتی نقطہ نظر فراہم کرتے ہیں۔ بالغ سومیٹک خلیوں کو برانن جیسی حالت میں دوبارہ پروگرام کرکے، 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، ریجنریٹیو میڈیسن، ٹشو انجینئرنگ، اور بنیادی تحقیق شامل ہیں۔ منشیات کی دریافت اور نشوونما میں، لافانی سیل لائنوں اور بنیادی سیل ثقافتوں کا استعمال کرتے ہوئے سیل پر مبنی اسسیں ممکنہ علاج کی جانچ، منشیات کے عمل کے طریقہ کار کو واضح کرنے، اور منشیات 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 جنیکیٹی، اور اسکیل ایبلٹی پر قابو پانے میں اہم رکاوٹیں ہیں۔ مزید برآں، برانن 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 سیلولر 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 فلائیڈکس،

1.6.4 جانوروں کی ٹشو کلچر (Animal Tissue Culture)

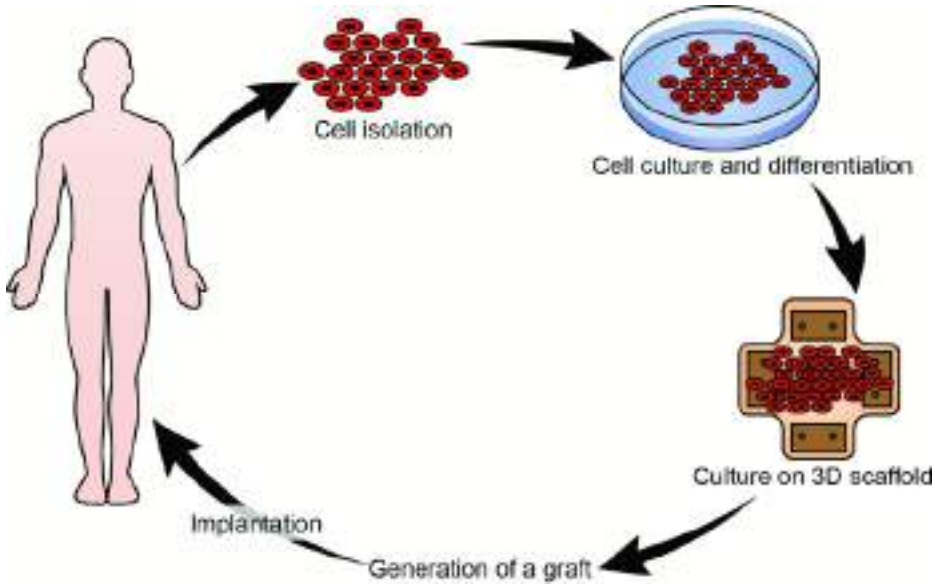
یہ ایک کثیر الضابطہ فیلڈ ہے جس کا مقصد موجودہ طبّی مسائل پر قابو پانے کے لیے حیاتیاتی اور انجینئرنگ کی حکمت عملیوں کو استعمال کرتے ہوئے بافتوں یا اعضاء کے افعال کو بحال کرنے کے لیے متبادل علاج کی حکمت عملی تیار کرنا ہے۔ جین تھراپی کی طرح، ٹشو انجینئرنگ کا شعبہ بھی 1980 کی دہائی میں سامنے آیا۔ 90 کی دہائی 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 نشوونما 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 آرتھوپیڈک سرجن، ڈبلیو ٹی گرین نے ہڈیوں کے اسپیکیولز پر سیڈ کونڈروسائٹس کا استعمال کرکے اور اسے عریاں چوہوں میں ٹرانسپلانٹ کرکے نئی کارٹلیج پیدا کرنے کی کوشش کی۔ اگرچہ اس کا تجربہ ناکام رہا، لیکن اس نے یہ نتیجہ اخذ کیا کہ نئی ٹیکنالوجی اور بائیو کمپیٹیبل مواد کی اختراع کے ساتھ، یہ ممکن ہوگا کہ لائیو سیلز کو مناسب طریقے سے تشکیل شدہ سہاروں پر بیج کرنے بافتوں کو پیدا کیا جا سکے۔ بعد میں، ڈاکٹر برک اور یاناس نے جلد کے ٹشو انجنیئرڈ جلد کے متبادل کو کولیجن میٹرکس کا استعمال کرتے ہوئے ڈرمل فائبروبلاسٹس کی نشوونما میں مدد فراہم کی۔ اس کے بعد کئی تجربات کیے گئے۔ ڈاکٹر ہاورڈ گرین نے جلنے والے مریضوں پر کیراتینوسائٹس کی چادر لگائی، جبکہ ڈاکٹر یوجین بیل نے کولیجن جیلوں پر فائبروبلاسٹس (ایک قسم کے خلیات جو ڈرمس بناتے ہیں) کو سیڈ کیا اور نوٹ کیا کہ فائبروبلاسٹس کولیجن جیلوں کے سکڑنے سے ٹشو نما ڈھانچہ بناتے ہیں۔ ان تمام تجربات کے تجرباتی نتائج نے ٹشو انجینئرنگ کے نظم وضبط 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 ٹشوانجینئرنگ تک رسائی(Tissue Engineering Approaches)

ٹشوانجینئرنگ میں بنیادی طور پر سیلولر اور سیلولر نقطہ نظر شامل ہیں۔ سیلولر نقطہ نظر میں، قدرتی یا مصنوعی میٹرکس (سکافولڈز کے طور پر کہا جاتا ہے: ایک سیل سپورٹ ڈیوائس جس پر خلیات کو بیج 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۔ نئ ٹشو کی ترقی کی سمت کا تعین. سکیفولڈز 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 ایکسٹراسیلولر میٹرکس لے سکتا ہے۔ سہاروں کو یا تو آٹولوگس (ایک ہی فرد سے حاصل کردہ خلیات یا ٹشوز)، ایلوجینک (کسی دوسرے شخص کے خلیات) یا زینوجنک ٹشوز (کسی اور نوع کے خلیات) سے بھی کاٹا جاسکتا ہے جس کے بعد سیلولر اجزاء کو ہٹانے کے لیے کیمیائی یا مکینیکل عمل سے پروسیسنگ کی جاسکتی ہے۔ امپلانٹیشن کے لیے.



1.7 ٹشوانجینئرنگ تکنیک کا جائزہ(Overview of Tissue Engineering Technique)

ٹشوانجینئرنگ امپلانٹیشن کے لیے فنکشنل ٹشوز کو دوبارہ تخلیق کرنے کے لیے مختلف طریقوں پر مشتمل ہے۔ ایک نمایاں طریقہ میں سیلولر اپروچ شامل ہے، جہاں عطیہ دہندگان کے خلیوں کو وٹرو میں پروسیس کیا جاتا ہے اور بافتوں کی نشوونما اور تخلیق نو کی حوصلہ افزائی کے لیے سہاروں پر بیج 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، آٹولوگس 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 شفایابی اور تخلیق نو کے لیے اہم ہیں۔
- میزبان سے اخذ کردہ آٹولوگس سیلز کو ان کی مطابقت کی وجہ سے ترجیح دی جاتی ہے، حالانکہ سورسنگ مشکل ہو سکتی ہے۔
- اسٹیم سیل کی مختلف اقسام، بشمول برانن، حملاتی ٹشو، اور بالغ اسٹیم سیل (جیسے mesenchymal اسٹیم سیل)، متنوع بافتوں کی اقسام کے لیے تفریق کی صلاحیت پیش کرتے ہیں۔

2. پاڑ (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 کمپیٹیبلٹی پیش کرتے ہیں لیکن ان میں میکانکی طاقت کی کمی ہو سکتی ہے۔
- مصنوعی سہاروں ٹیون ایبلٹی اور مکینیکل کنٹرول فراہم کرتے ہیں لیکن بہتر بائیو کمپیٹیبلٹی کے لیے ترمیم کی ضرورت پڑ سکتی ہے۔

3. حیاتیاتی عوامل (Biological Factors)

- حیاتیاتی عوامل، بشمول نمو کے عوامل اور سائٹوکائنز، سیلولر ردعمل 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 ٹشوؤں کی تخلیق نو اور پیوندکاری 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 پیتھولوجیکل 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 پیتھولوجیکل عوامل کی وجہ سے قدرتی شفاء ناکافی ہے، ٹشوز یا اعضاء کو وٹرو میں کاشت کیا جا سکتا ہے اور مریضوں میں لگایا جا سکتا 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 انجنیئرڈ جلد۔
- خراب رینل اور کارڈیک ٹشوز میں کام کو بحال کرنے کے لیے ٹشو انجنیئرڈ گرافٹس کی پیوند کاری۔

1.8.2 وٹرو ہیومن 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 پیتھولوجیکل راستوں کے بارے میں بصیرت فراہم کرتے ہیں۔
- 3D سیل کلچرز انتہائی 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 رکاوٹوں 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 امیونوسوپریسی 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 کارڈیج، لیگامینٹ اور جلد۔

1.9 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس اکائی کے مطالعے بعد طلبا 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)

بائیو ٹیکنالوجی	Biotechnology	جانداروں، 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۔
جینیاتی انجینئرنگ	Genetic Engineering	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۔
ابال	Fermentation	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۔
سیل کلچر	Cell Culture	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 جا سکے، بیماریوں کا نمونہ بنایا جا سکے، حیاتیاتی مرکبات تیار کیے جائیں، اور منشیات کی افادیت اور زہریلے پن کی جانچ کی جا سکے۔
لافانی سیل لائنز	Immortalized Cell Lines	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۔

سکیفولڈ	Scaffold	ڈھانچہ، قدرتی یا مصنوعی، ٹشو انجینئرنگ ایپلی کیشنز میں سیل کی ترقی اور ٹشو کی تشکیل کے لیے معاون کے طور پر استعمال ہوتا ہے۔

1.11 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

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

1. کلاسیکی بائیو ٹیکنالوجی نے ابال پر توجہ مرکوز کی، ایڈورڈ جینر کے چیچک 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 بایو ٹیکنالوجی، 8000-4000 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 زرعی 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 ایمبریونک اسٹیم سیل اور انڈسڈ pluripotent اسٹیم سیل، _____ دوا 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۔

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

1. "بائیو 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 سر گرمیاں کیا شامل تھیں؟
4. ٹشوانجینئرنگ 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 ایپلی 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. ٹشوانجینئرنگ سے وابستہ چیلنجز کی وضاحت کریں۔

1.12 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Recombinant DNA Technology	قدرتی انتخاب	ریکومبینینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی	بایو ٹیکنالوجیکل تکنیک 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 اجزا

2.0 تمہید(Introduction)

2.1 مقاصد(Objectives)

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

2.2.1 تعریف اور اصول(Principle)

2.2.2 درخواستیں اور فوائد(Applications and Advantages)

2.2.3 چیلنجز اور غور و فکر(Challenges and Considerations)

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

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

2.4.1 ماؤس ایمبریو(Mouse Embryo)

2.4.2 ماؤس ایمبریو آئسولیشن تکنیک/پروٹوکول(Mouse Embryo Isolation Protocol)

2.4.3 مواد درکار(Materials Required)

2.4.4 پروٹوکول(Protocol)

2.4.5 ٹشو کلچر لیبارٹری میں منتقلی(Transfer to Tissue Culture Laboratory)

2.4.6 چِک ایمبریو(Chick Embryo)

2.4.7 پروٹوکول(Protocol)

2.5 بنیادی سیل کلچر(Primary Cell Cultre)

2.5.1 پرائمری ایکسپلانٹ(Primary Explant)

2.5.2 پروٹوکول: پرائمری ایکسپلانٹس(Protocol: Primary Explants)

2.6 انزیمیٹک تفریق(Enzymatic Disaggregation)
2.6.1 گرم ٹرپسن(Warm Tyrpsin)
2.6.2 پروٹوکول: گرم ٹرائپسن میں بافتوں کا انحراف (Tissue Disaggregation in Warm Trypsin)
2.6.3 پروٹوکول(Protocol)
2.6.4 کولڈ پری ایکسپوزر کے ساتھ ٹرپسنائزیشن-(Trypsinization with Cold Pre-exposure)
2.6.5 دیگر انزیمیٹک طریقہ کار(Other Enzymatic Mechanisms)
2.6.6 کولیجینیس(Collegenase)
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 طبّی 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 مکینیکل اور انزیمیٹک 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 جینوٹائپک 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۔

مکینیکل 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، پیسنا، یا مونڈنا، 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 کنیکٹیو ٹشوز کے لیے موزوں ہے، جہاں خلیے گھنے بھرے ہوتے ہیں اور انزیمیٹک ہاضمے کے لیے لچکدار ہوتے ہیں۔

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

اس پورے باب میں، ہم مکینیکل اور انزیمیٹک 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۔ مکینیکل اور انزیمیٹک 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 (مکینیکل؛ انزیمیٹک اختلاف)

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

پرائمری سیل کلچر بائیو میڈیکل ریسرچ میں سب سے آگے ہے، جو ان کے آبائی ماحول میں سیلولر رویے کو کنٹرول کرنے والے پیچیدہ میکانزم 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۔ *InVivo* 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 ٹشوز 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 مکینیکل یا انزیمیٹک 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 سگنلنگ اشارے اور ایکسٹراسیلولر 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 بائیو میڈیکل ریسرچ اور کلینیکل پریکٹس کے مختلف شعبوں میں وسیع پیمانے پر ایپلی کیشنز تلاش کرتے ہیں۔ وہ سیل بائیولوجی، فزیالوجی، اور پیتھالوجی کا مطالعہ کرنے کے لیے انمول ماڈل کے طور پر کام کرتے ہیں، جس سے محققین کو سیل سیل کے تعاملات، سگنل کی منتقلی کے راستے، اور ایک کنٹرول شدہ لیبارٹری سیٹنگ میں بیرونی محرکات کے ردعمل 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 درستگی اور مطابقت کے ساتھ سیل کے مخصوص رد عمل، ٹشو 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 سورسنگ کی ضرورت ہوتی ہے۔ مزید برآں، پرائمری سیل کلچرز جینیاتی اور ماحولیاتی عوامل کی وجہ سے بیچوں 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 سورسنگ 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 بائیو میڈیکل ریسرچ کے سنگ بنیاد کی نمائندگی کرتا ہے، جو سیلولر فزیالوجی اور پیتھالوجی کی متحرک دنیا میں ایک ونڈو 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 طبّی 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) ٹشو کی تنہائی،

(3) تفریق اور/یا تفریق، اور

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

الگ تھلگ ہونے کے بعد، ایک بنیادی سیل کلچر یا تو خلیوں کو مناسب سبسٹریٹ سے منسلک ٹشو کے ٹکڑوں سے باہر منتقل ہونے کی اجازت دے کر حاصل کیا جا سکتا ہے یا میکانکی طور پر یا انزیمیٹک طور پر ٹشو کو الگ کر کے خلیوں کی معطلی پیدا کرنے کے لیے، کچھ جو بالآخر سبسٹریٹ 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 چپٹی 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 ٹرپسن، کولیگنیس، ایلسٹیز، پروناس، ڈسپیس، ڈی نیس، اور ہائیلورونڈیز کی خام تیاری ہیں، اکیلے یا مختلف مجموعوں میں، جیسے کہ قسم II الیوولر کے لیے ایلسٹیس اور ڈی نیس۔ سیل آئسولیشن [ڈوبز اینڈ گونزالیز، 2002]، کولیجینیز ود ڈسپیس [بوتھ اینڈ اوشیہ، 2002]، اور کولیجینیز کے ساتھ ہائیلورونڈیز [بیری اینڈ فرینڈ، 1969؛ سیگلن، 1975]۔ دیگر، غیر ممالیہ انزائمز ہیں، جیسے کہ ٹرپزین (سگما)، ایک دوبارہ پیدا کرنے والا، مکئی سے ماخوذ، ٹرپسن، ٹریپل (انویٹروجن)، ریکومبیننٹ مائکروبیل، 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 پروٹیز زبطور 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 کولیجینیس 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 جا سکتا ہے، اور DNase کا استعمال lysed خلیوں سے جاری DNA کو منتشر کرنے کے لیے کیا جاتا ہے۔ ڈی این اے پروٹولوسیس کو خراب کرتا ہے اور ری ایگریگیشن کو فروغ دیتا ہے (ٹیبل 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 مشترکہ ہیں:

(1) چکنائی اور نیکروٹک ٹشو کو ڈسیکشن 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 سینٹرفیوگریشن 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 بچھڑے 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 ہو گی۔

(6)ایمبریونک ٹشو 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 یا جانوروں کے ٹشو کے ساتھ کام کرنے کی کوشش کرنے سے پہلے، اس بات کو یقینی بنائیں کہ آپ کا کام طبّی اخلاقی اصولوں یا جانوروں کے ساتھ تجربہ کرنے کے بارے میں موجودہ قانون کے مطابق ہے۔ مثال کے طور پر، برطانیہ میں، 50 فیصد حمل یا انکیوبیشن سے زیادہ جنین یا جنین کے استعمال کو 1986 کے جانوروں کے تجربات (سائنسی طریقہ کار) ایکٹ کے تحت منظم کیا جاتا ہے۔ انسانی بایپسی 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 کم ٹینمنٹ 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 ڈسیکشن (DBSS) BSS یا ٹرانسپورٹ میڈیم میں ٹشو کلچر لیبارٹری میں منتقل کریں (ملاحظہ کریں ضمیمہ I)۔ ٹشو کلچر لیبارٹری میں جانوروں کو جدا نہ کریں، کیونکہ جانور مائکروبیل آلودگی لے سکتے ہیں۔ اگر ٹشو کی منتقلی میں تاخیر ناگزیر ہے، تو اسے 4oC پر 72 گھنٹے تک رکھا جا سکتا ہے، حالانکہ عام طور پر تیز منتقلی کے نتیجے میں بہتر پیداوار حاصل ہوتی ہے۔

2.4.1 ماؤس ایمبریو(Mouse Embryo)

ماؤس ایمبریو غیر متفاوت فبروبلوسٹک ثقافتوں کے لئے خلیوں کا ایک آسان ذریعہ ہیں۔ وہ اکثر فیڈر تہوں کے طور پر استعمال ہوتے ہیں (تصویر 2.1 دیکھیں)

2.4.2 ماؤس ایمبریو آئسولیشن تکنیک/پروٹوکول(Mouse Embryo Isolation Protocol)

خاکہ

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

2.4.3 مواد درکار(Materials Required)

جراثیم سے پاک

- ڈسیکشن بیلنسڈ سالٹ سلوشن: اینٹی بایوٹکس کی زیادہ مقدار کے ساتھ ڈسیکشن بیلنسڈ سالٹ سلوشن؛25 سے 50 ملی لیٹر میں سکرو کیپڈ ٹیوب یا یونیورسل کنٹینر ڈسیکشن بیلنسڈ 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
- پوائنٹڈ فورسپس ڈی پوائنٹڈ کینچی غیر جراثیم سے پاک:
- چھوٹا لیمینر فلوہڈ
- 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(Protocol)

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، چپچپا پلگ 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- یا 10 دن کے جنین کو ترجیح دی جا سکتی ہے۔ اگرچہ یہ جنین کم ٹشو پیدا 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: گریوا 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: ڈایافرام(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 ڈسیکشن: 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 ایمبریو، اور چوہوں سے بچہ دانی کو الگ کرنے کے لیے ایک جامع گائیڈ فراہم کرتا ہے۔

2.4.5 ٹشو کلچر لیبارٹری میں منتقلی(Transfer to Tissue Culture Laboratory)

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۔

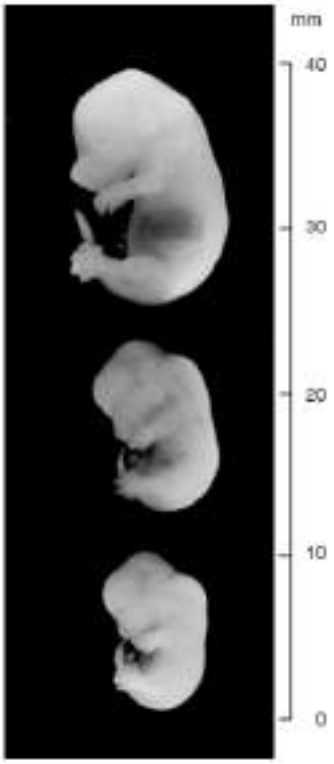
ایمبریو ڈسیکشن:

(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 ایمبریو (تصویر 12.3.جی، ایچ) پر ضرورت سے زیادہ دباؤ ڈالنے سے بچنے کے لیے فورپس کے پوائنٹس کو ایک ساتھ رکھا جائے۔

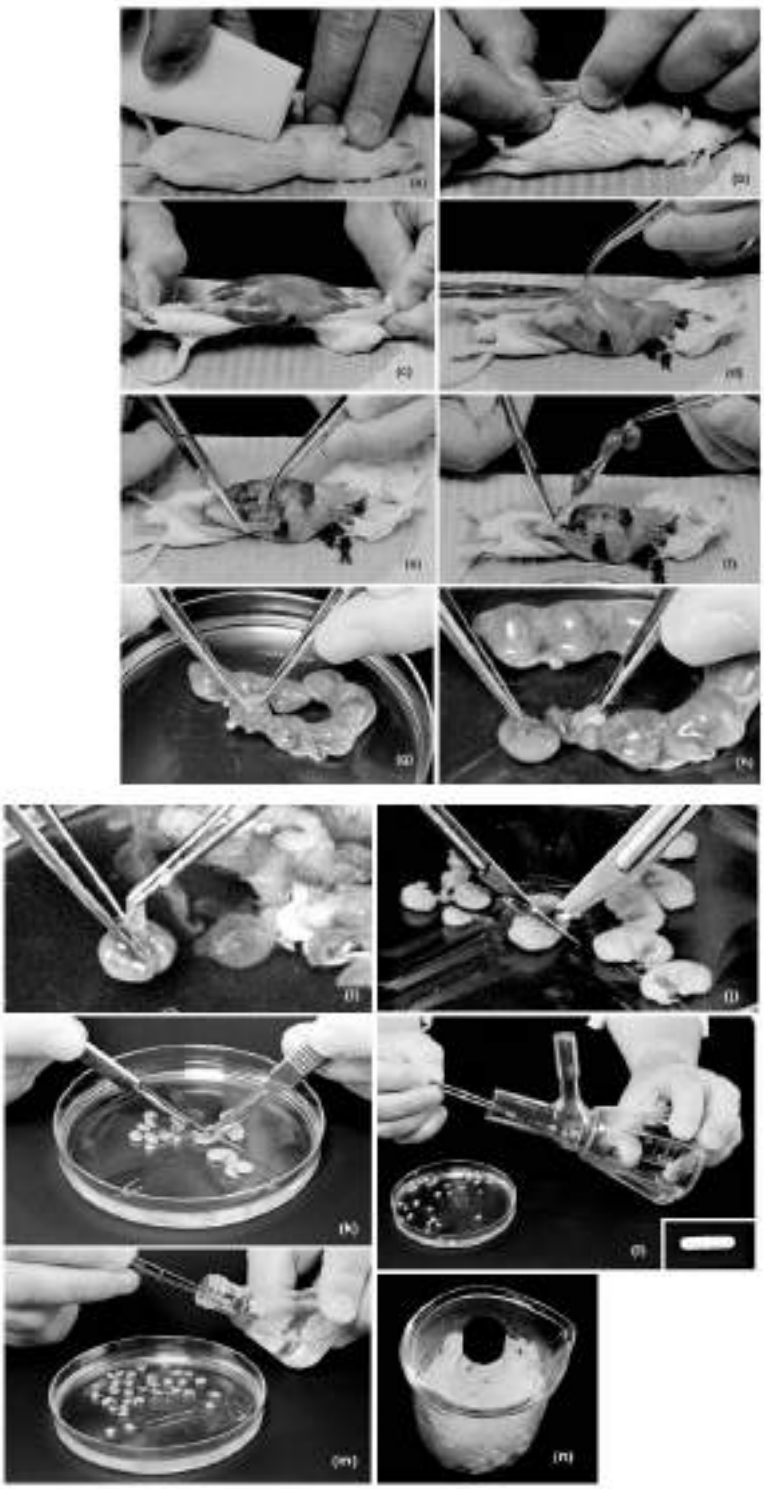
(b) جنین کو ارد گرد کی جھلیوں اور نال سے احتیاط سے آزاد کریں، انہیں برتن کے ایک طرف رکھیں تاکہ خون بہہ سکے (تصویر i2.3)۔

ایمبریوز کی منتقلی:

- کٹے ہوئے جنین کو ایک تازہ پیٹری ڈش میں منتقل کریں۔ اگر بڑی تعداد میں ایمبریو 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۔ ماؤس ایمبریوز۔ حمل کے 12ویں، 13ویں اور 14ویں 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 ڈسیکشن۔ 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 کھلنا۔ (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 کاٹنا۔ (l) ٹکڑوں کو ٹرپسنائزیشن فلاسک میں منتقل کرنا (m) ٹکڑوں کو چھوٹے ایرلن میئر فلاسک میں منتقل کرنا۔ (n) برف پر فلاسک

2.4.6 چِک 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 ایمبریوز کی طرح، چوزے کے ایمبریوز کا استعمال سیل کے پھیلاؤ کے تجزیے کے لیے بنیادی طور پر mesenchymal سیل کی بنیادی ثقافتیں فراہم کرنے، فیڈر لیئرز 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 ہیپاٹوسائٹس، کارڈیک پٹھوں، اور پھیپھڑوں کے اپکلا کو پیدا کرنے کے لیے انفرادی اعضاء کو الگ کرنا آسان ہے۔ جیسا کہ ماؤس ایمبریوز کے ساتھ، چوزے کے ایمبریوز 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. ڈسیکشن

1. انکیوبیشن کے 10ویں 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 ہٹا دیں۔

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 (ڈیسیکشن. بیلنسڈ سالٹ سلوشن) 25-50 ملی لیٹر اسکرو کیپڈ 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 10ویں دن جنین والے انڈے
2. 70% الکحل
3. جھاڑو
4. مرطوب انکیوبیٹر (ماحول کی سطح سے اوپر کوئی اضافی CO_2 نہیں)

یہ خاکہ مطلوبہ جراثیم سے پاک اور غیر جراثیم سے پاک مواد کی فہرست کے ساتھ انڈوں سے ایمبریو 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 ایمبریو 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 کند سرے 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 کوالکحل میں ڈبو کر، الکحل 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 فورسیپس کا استعمال کریں تاکہ نیچے کی chorioallantoic جھلی (CAM) کو اس کی خون کی نالیوں کے ساتھ ظاہر کریں۔

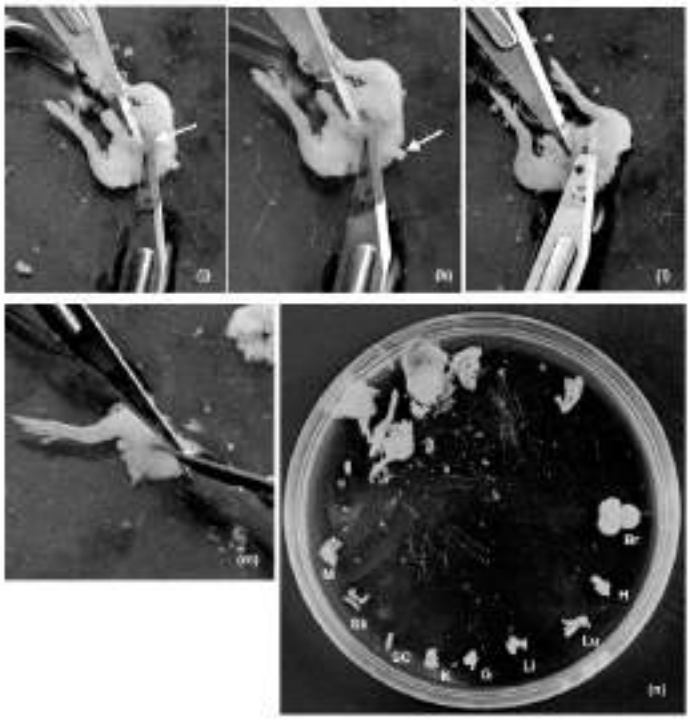
5. جنین نکالنا:

- ❖ 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 فنگر پیڈ کے نیچے درمیانی ہندسہ استعمال کریں۔

6. منتقلی:

- ❖ جنین کو 9 سینٹی 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 2.3۔ چوزے کے ایمبریو 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 ڈورسل باڈی وال کے درمیان اسکیلپل کی نوک داخل کرنا۔(k) ریڑھ کی ہڈی کو نچوڑنا۔(l) تنے اور پچھلی ٹانگ کے پچھلے حصے سے جلد کو چھیلنا۔(m) ران سے پٹھے کاٹنا۔(n) ڈش کے چاروں طرف آرگن ریڈیمنٹس 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 Cultre)

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 جا سکتا ہے، جس میں ماکریشن کے ساتھ یا اس کے بغیر ڈسکشن شامل ہوتا ہے، اور (2) انزیمیٹک ڈسگریگیشن (تصویر 2.4) 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 میکانکی 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 ہیریسن[1907]، کیرل[1912]،اور ٹشو کلچر شروع کرنے کے لیے دیگر علمبرداروں نے تیار کیا تھا۔ابتدائی طور پر،خون کے پلازما یا لمف میں ٹشو کا ایک ٹکڑا اسرایت کیا جاتا تھا، جسے ہیٹرولوگس سیرم اور ایمبریو ایکسٹریکٹ کے ساتھ ملایا جاتا تھا،اور ایک کنکاویٹی سلائیڈ پر الٹی ہوئی کور سلپ پر رکھا جاتا تھا۔ پلازما کے جمنے سے بافتوں کو محفوظ بنانے میں مدد ملی، جسے پھر روایتی خوردبین کا استعمال کرتے ہوئے دیکھا جا سکتا 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(Protocol: Primary Explants)

خاکہ

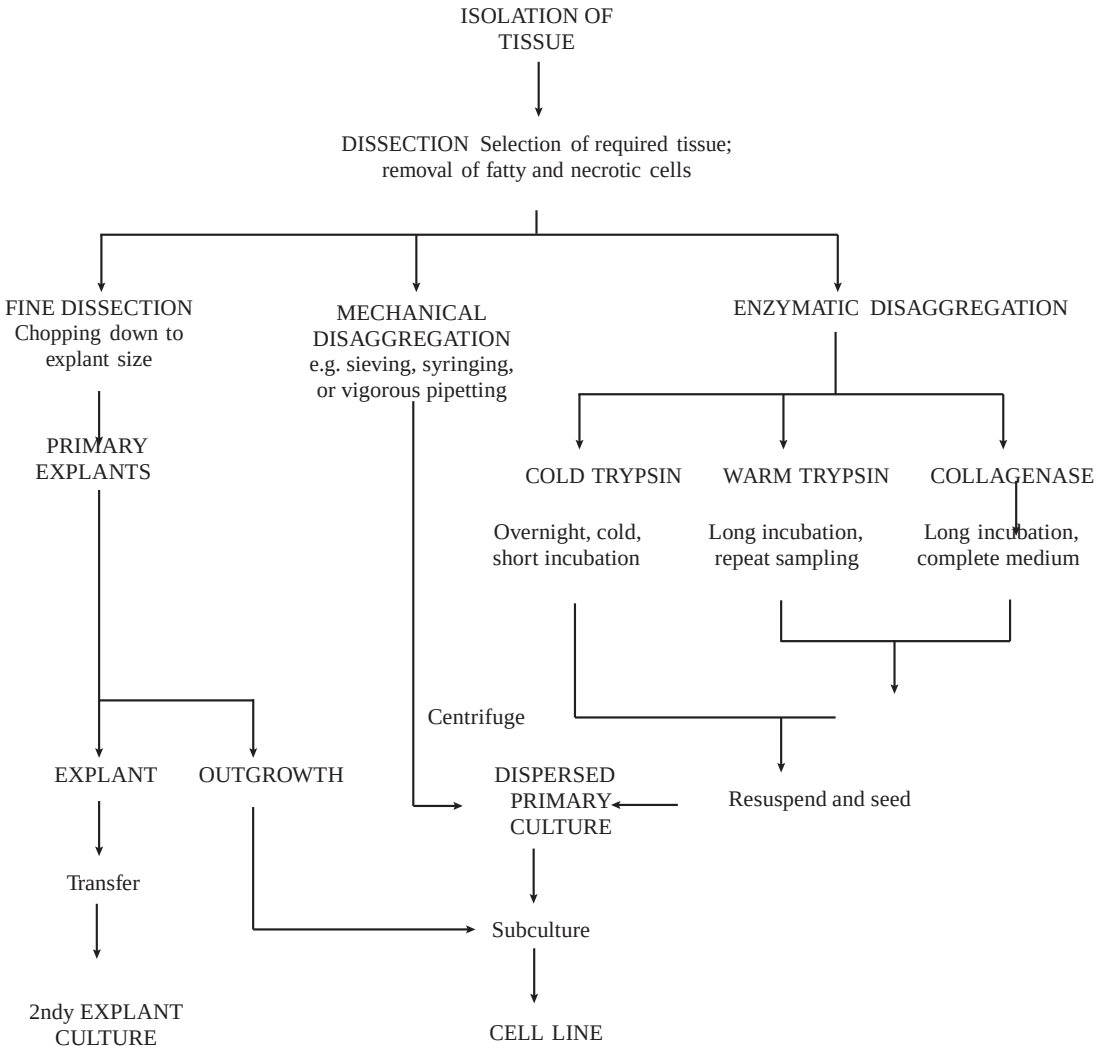
1. ٹشو کو باریک کاٹ کر دھولیں۔ بیجوں کو ٹکڑوں کو کلچر فلاسک یا پیٹری ڈش کی سطح پر درمیانے درجے میں سیرم کی زیادہ ارتکاز کے ساتھ، انہیں بے ساختہ چپکنے کی اجازت دیتا ہے (تصویر a2.5)۔ سیل کی افزائش عام طور پر مندرجہ ذیل ہے (تصویر b2.5)

مواد(جراثیم سے پاک)

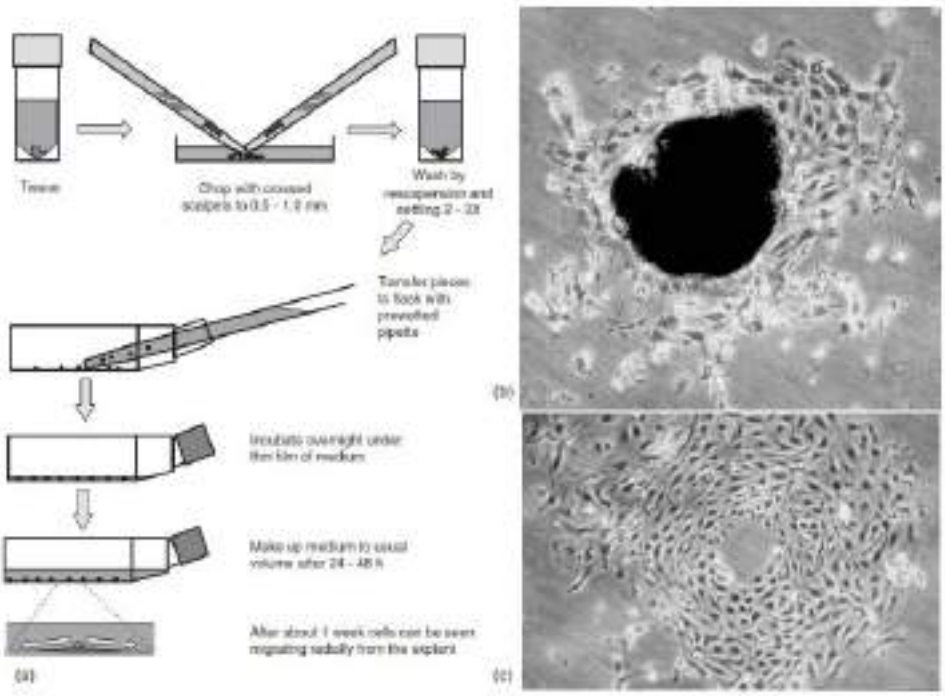
- گروتھ میڈیم(مثال کے طور پر،DMEM:F12 20%50:50 فیٹل بووائن سیرم کے ساتھ)
- 100 mL DBSS
- پیٹری ڈشز(9 سینٹی میٹر، نان ٹشو کلچر گریڈ)
- فورسپس
- اسکیلپلس
- پائپیٹ(10 ملی لیٹر چوڑی ٹپس کے ساتھ)
- سینٹری فیوج ٹیوبیں(15 یا 20 ملی لیٹر) یا یونیورسل کنٹینرز
- کلچر فلاسکس(25 سینٹی میٹر) یا ٹشو کلچر گریڈ پیٹری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

پروٹوکول

1. ٹشو کو تازہ، جراثیم سے پاک DBSS میں منتقل کریں اور کللا 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. پیپیٹ کے ذریعے ٹکڑوں کو جراثیم سے پاک سینٹری فیوج ٹیوب یا کنٹینر میں منتقل کریں۔
5. DBSS میں دوبارہ معطل کر کے ٹکڑوں کو حل کرنے اور دھونے کی اجازت دیں۔
6. مزید دو بار 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 b2.5 دیکھیں)۔
11. ایک بار جب نمایاں اضافہ ہو جائے تو، بقیہ ایکسپلانٹ کو احتیاط سے ایک سکیلپل (تصویر c2.5) کے ساتھ اٹھایا جا سکتا ہے اور ایک تازہ کلچر برتن میں پہلے سے بنے ہوئے پائیپیٹ کے ذریعے منتقل کیا جا سکتا 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۔



شکل 2.4۔ 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 جا سکتا ہے تاکہ مزید افزائش کو تشکیل دیا جا سکے، جب کہ ایکسپلانٹ سے نکلنے والے کو سیل لائن بنانے کے لیے ذیلی ثقافت میں تبدیل کیا جا سکتا ہے۔



شکل 2.5۔ پرائمری ایکسپلانٹ کلچر۔ (a) ڈسیکشن اور بیجنگ پرائمری ایکسپلانٹس میں مراحل کا اسکیمیٹک خاکہ۔ (b) ماؤس اسکواومس سکن کارسنوما سے پرائمری ایکسپلانٹ کلچر؛ ایکسپلانٹ اور ایکسپلانٹ کے تقریباً 3 دن بعد بڑھنے کا ابتدائی مرحلہ۔

یہ تکنیک چھوٹے بافتوں کے نمونوں کو سنبھالنے کے لیے خاص طور پر قابل قدر ہے، جیسے کہ جلد کی بایپسی، جہاں مکینیکل یا انزیمیٹک تفریق کے دوران سیل کے نقصان کا خطرہ ہوتا ہے۔ اس کی خرابیوں میں کچھ ٹشوز کا ناقص چپکنا 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 اٹیچمنٹ کو بڑھانا مختلف طریقوں سے حاصل کیا جا سکتا 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 جا سکتا ہے۔ پولی لیسین یا فائبرونیکٹین جیسے مادوں سے پلاسٹک کا علاج کرنا، ایکسٹراسیلولر میٹرکس کا استعمال کرنا یا فیڈر لیئرز کا استعمال کرنا۔

2.6 انزیمیٹک تفریق (Enzymatic Disaggregation)

ٹشوز کے اندر سیل–سیل کے آسنجن کو ہوموٹائپک انٹرایکٹنگ گلائکوپیپٹائڈس کی ایک رینج کے ذریعے سہولت فراہم کی جاتی ہے، جسے سیل آسنجن مالیکیولز (CAMs) بھی کہا جاتا ہے (سیکشن 3.2.1 دیکھیں)۔ ان میں سے کچھ CAMs، جیسے کیڈیرنز، کیلشیم پر منحصر ہوتے ہیں اور اس لیے EDTA یا EGTA جیسے چیلیٹنگ ایجنٹس کے لیے حساس ہوتے ہیں۔ انٹیگرینز، جو ایکسٹراسیلولر میٹرکس

میں آر جینائن-گلائسین-ایسپارٹک ایسڈ (RGD) شکل سے منسلک ہوتے ہیں، Ca2+- بائنڈنگ ڈومینز بھی ہوتے ہیں اور Ca2+ کی کمی سے متاثر ہوتے ہیں۔ دوسرے گلائکوپروٹین جیسے فائبرونیکٹین اور لیمینین، جو انٹرسیلولر میٹرکس اور تہہ خانے کی جھلیوں میں موجود ہوتے ہیں، پروٹیز کے لیے حساس ہوتے ہیں۔ مزید برآں، پروٹیوگلائیکانز، اگرچہ کم حساس ہوتے ہیں، بعض اوقات گلائکینا سیس جیسے ہائیلورونیڈیس یا ہیپرینیس کے ذریعے انحطاط پذیر ہو سکتے ہیں۔

ایک عملی نقطہ نظر یہ 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 پروٹیز کو شامل کیا جا سکتا ہے، اور اگر ضروری ہو تو خلیے کی عملداری کو بہتر بنانے کے لیے ٹرپسن کو چھوڑا جا سکتا 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۔

مکینیکل اور انزیمیٹک 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 مکینیکل تناؤ مزاحم خلیوں کے لیے بھی انحطاط کے طریقے منتخب کیے جا سکتے ہیں۔

ایمبریونک ٹشوز 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 کنیکٹیو ٹشو اور ایکسٹراسیلولر 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 پروٹیز 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 سویابین ٹرپسن انحیبیٹر) کے ذریعے بے اثر کیا جا سکتا ہے۔

2.6.1 گرم ٹرپسن (Warm Tyrpsin)

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 سینٹرفیوگریشن کے ذریعے ہٹادیا جاناچاہیےاور سیرم پر مشتمل میڈیم کے ساتھ بے اثر کرناچاہیے۔

2.6.2 پروٹوکول: گرم ٹرائیپسن میں بافتوں کاانحراف(Tissue Disaggregation in Warm Trypsin)

خاکہ

ٹشو کوکاٹ کرٹرپسن میں کئی گھنٹوں تک ہلایا جاتاہے۔منقطع خلیات کو باقاعدہ وقفوں پر جمع کیا جاتاہے، سینٹری فیوج کیاجاتا ہے،اور درمیانے درجے کے سیرم میں جمع کیاجاتاہے۔

مواد

جراثیم سے پاک یاasepticallyتیار:

- ٹشو(1–5 گرام)
- DBSS (50 mL)
- ٹرپسن(خام،D-PBSAیانارمل نمکین میں2.5%)
- D-PBSA (200 mL)
- سیرم کے ساتھ گروتھ میڈیم(مثال کے طورپر،DMEM/F12 10%فیٹل بووائن سیرم کے ساتھ)
- کلچرفلاسکس(5-10فلاسکس فی جی ٹشو،ٹشو سیلولرٹی کے لحاظ سے مختلف ہوتے ہیں)
- پیٹری ڈشز(9سینٹی میٹر،نان ٹشو کلچر گریڈ)
- پہلے سے وزنی شیشیاں،50mLسینٹری فیوج ٹیوبیں،یایونیورسل کنٹینرز(2)
- ٹرپسنائزیشن فلاسک:250ملی لیٹرایرلن میئرفلاسک یااسٹررفلاسک
- مقناطیسی پیروکار،ایک ٹیسٹ ٹیوب میں آٹوکلیوڈ
- خمیدہ فورسپس
- پائپٹس(پاسچر،2ملی لیٹر،10ملی لیٹر)

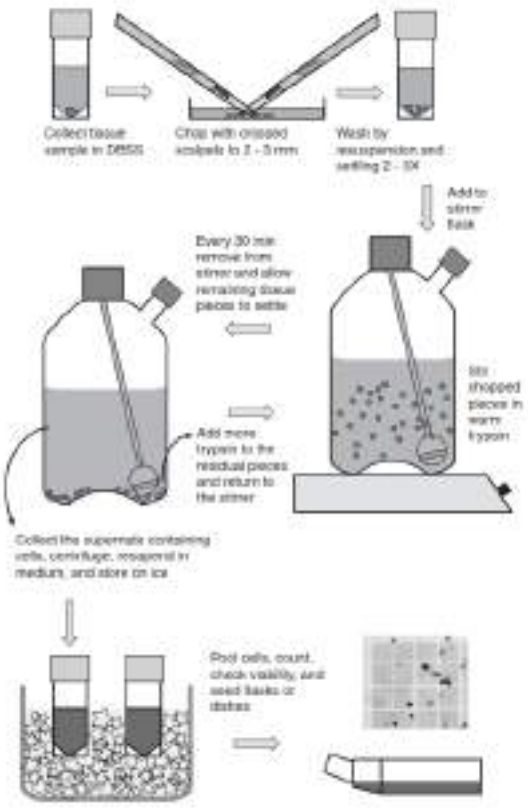
جراثیم سے پاک:

- مقناطیسی محرک
- Haemocytometerیاسیل کاؤنٹر

2.6.3 پروٹوکول(Protocol)

1. ایک پیٹری ڈش میں ٹشو کوتازہ،جراثیم سے پاکDBSSمیں منتقل کریں،اور کللا کریں۔

2. ناپسندیدہ 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 ٹشوؤں 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 فلش کرتے ہوئے تمام ٹکڑوں کو ٹرپسنائزیشن 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% ٹرپسن شامل کریں۔ اگر ضرورت ہو تو دیگر خامروں کو شامل کیا جا سکتا ہے۔
11. مقناطیسی پیروکار شامل کریں اور فلاسک کو کیپ کریں۔
12. فلاسک کو انکیوبیٹر میں 37 ڈگری سینٹی گریڈ پر مقناطیسی اسٹرر پر رکھیں۔
13. تقریباً 100rpm پر 30 منٹ تک ہلائیں۔
14. ہر 30 منٹ میں الگ الگ سیل جمع کریں:
    - ٹکڑوں کو آباد ہونے دیں۔
    - سپرناٹینٹ کو ایک سینٹری فیوج ٹیوب میں ڈالیں اور برف پر رکھیں
    - فلاسک کے باقی ٹکڑوں میں تازہ ٹرپسن 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،



شکل 2.6۔ گرم ٹرپسن کی تفریق

سیلز کی گنتی کریں اور قابل عمل ہونے کی جانچ کریں۔

17. متفاوت سیل آبادیوں کی وجہ سے ہیموسائیٹومیٹر کے ساتھ الیکٹرانک سیل کی گنتی کی تصدیق کریں۔
18. جراثیم سے پاک ململ 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 سپرنیٹ چیک کریں۔

یہ پروٹوکول گرم ٹرپسنائزیشن کے دوران سیل کی قابل عملیت کو برقرار رکھتے ہوئے بافتوں کی مؤثر تفریق کو یقینی بناتا ہے۔

2.6.4 کولڈ پری ایکسپوزر کے ساتھ ٹرپسنائزیشن (Trypsinization with Cold Pre-exposure)

یہ تکنیک نسبتاً کم وقت میں بافتوں کی بڑی مقدار کو مؤثر 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 بافتوں کے ساتھ اتنا موثر نہیں ہو سکتا، اور میکانکی تحریک ممکنہ طور پر حساس خلیوں کی اقسام جیسے اپیتھیلیم کو نقصان پہنچا سکتی ہے۔ اگر سنٹرفیوگریشن اور دوبارہ معطلی کے بعد دوبارہ جمع ہوتا ہے تو (10–20 µg/mL) DNase کے ساتھ 10-20 منٹ تک علاج کرنے سے مدد مل سکتی ہے۔

پروٹوکول۔ کولڈ ٹرپسن میں بافتوں کا انحراف

خاکہ

ٹشو کو کاٹا جاتا ہے اور ٹرپسن میں 4°C پر 6-18 گھنٹے تک بھگو دیا جاتا ہے تاکہ کم سے کم ٹرپٹک سرگرمی کے ساتھ انزائم کی رسائی ہو سکے۔ ٹرپسن 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 ٹرپسن
- پیٹری ڈشز (9 سینٹی میٹر، نان ٹشو کلچر گریڈ)

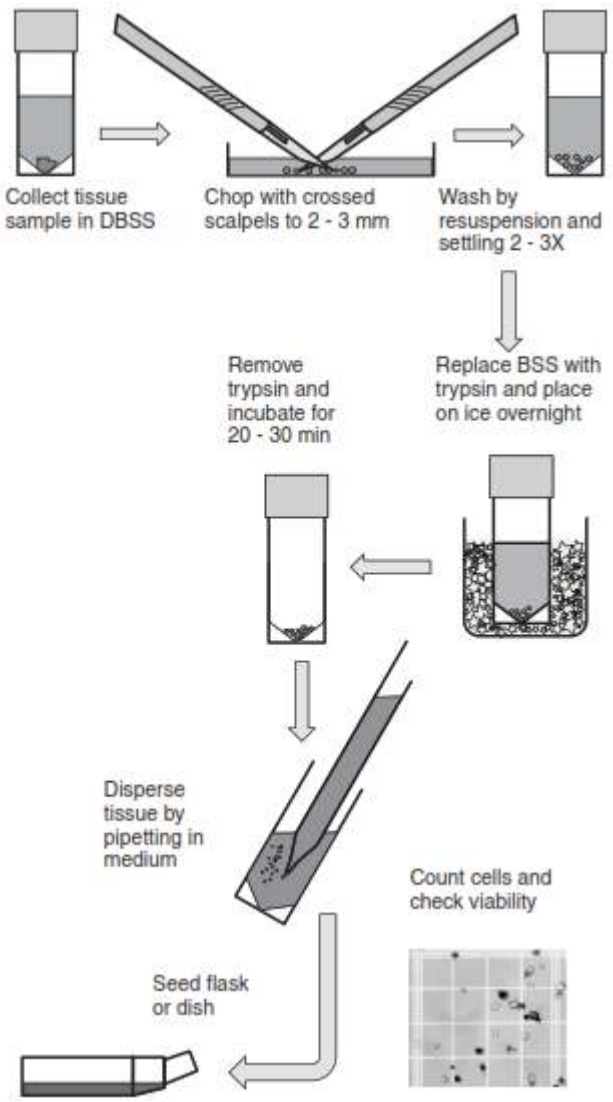
فورپس (سیدھے اور مڑے ہوئے)

- اسکیلپلس
- ایرلن میئر فلاسک (25 یا 50 ملی لیٹر، سکرو کیپڈ، پہلے سے وزنی)
- کلچر فلاسکس ($25cm^2$ یا 75)
- 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 کللا کریں۔
2. ناپسندیدہ ٹشو کو کاٹ کر دوسری ڈش میں منتقل کریں۔
3. ٹشو کو تقریباً 3- ملی میٹر کیوبز میں کراس 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 ٹشووں 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 10mL/g 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 جا سکتے ہیں۔

شکل 2.7۔ کولڈ ٹرپسن ڈسگریگیشن۔ پلیٹ 2 اے، ڈی، ای اور پلیٹ 3 بھی دیکھیں

11. ٹیوب کو37ڈگری سینٹی گریڈپر20-30منٹ تک سینکیں۔
12. گرم میڈیم(ہر100ملی گرام اصلی ٹشو کے لیے تقریباً1ملی لیٹر)شامل کریں اور ٹشو مکمل طور پر منتشر ہونے تک آہستہ سے پیپیٹ 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 سسپنشن 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 سپرنیٹ چیک کریں۔

گرم طریقہ کے مقابلے میں ٹھنڈا ٹرپسن طریقہ عام طور پر24گھنٹے 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 سینٹرفیوگریشن کی ضرورت نہیں ہے،اور4°C پر راتوں رات انکیوبیشن عمل کو آسان بناتا ہے۔

2.6.5 دیگر انزیمیٹک طریقہ کار(Other Enzymatic Mechanisms)

ٹرپسن 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۔کولیجینیس، مربوط ٹشو اور پٹھوں میں ایکسٹراسیلولر میٹرکس کی کولیجن سے بھرپور نوعیت کو دیکھتے ہوئے،ایک قابل عمل آپشن کے طور پر ابھرا ہے۔دیگر بیکٹیریل پروٹیز جیسےpronase اور dispase کو بھی کامیابی کی مختلف ڈگریوں کے ساتھ استعمال کیا گیا ہے، ساتھ ہی کاربوہائیڈریٹس جیسےhyaluronidase اورneuraminidase کو نشانہ بنانے والے خامروں کے ساتھ۔ مختلف انزائمز کی دستیابی کے باوجود، اگر ٹرپسن، کولیگنیز، اور دیگر آپشنز ناکام ہو جاتے ہیں، تو مختلف انزائم کے امتزاج کی اسکریننگ ہی واحد ذریعہ رہ جاتی ہے۔

2.6.6 کولیجینیس(Collegenase)

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 ٹرپسن کا استعمال مشکل ہو سکتا ہے۔ خام کولیگنیس 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 پروٹولوٹک سرگرمی کو کم کرنے کے لیے مزید پیوریفائیڈ گریڈز دستیاب ہیں، لیکن وہ خام کولیگنیس کی طرح موثر نہیں ہو سکتے۔

خاکہ

باریک کٹے ہوئے ٹشو کو کولیجینیز پر مشتمل مکمل میڈیم میں انکیوبیٹ کیا جاتا ہے جب تک کہ وہ الگ نہ ہو جائیں۔اس کے بعد کولیجینیز کو سینٹرفیوگریشن کے ذریعے ہٹادیا جاتا ہے،اور خلیات کو ثقافت کے لیے اعلیٰ ارتکاز پر بیج دیا جاتا ہے۔

مواد

جراثیم سے پاک:

- کولیجینیس (2000 یونٹس/ایم ایل)، ورتھنگٹن سی ایل ایس یا سگما 1 اے
- کلچر میڈیم (جیسے، DMEM/F12 10% FBS کے ساتھ)
- DBSS
- پائپیٹ (1 ملی لیٹر، 10 ملی لیٹر)
- پیٹری ڈشز (9 سینٹی میٹر، نان ٹشو کلچر گریڈ)
- کلچر فلاسکس ($25\ cm^2$)
- سینٹری فیوج ٹیوبیں یا یونیورسل کنٹینرز (15-50 ملی لیٹر، ٹشو کی مقدار پر منحصر ہے)
- اسکیلپلس

جراثیم سے پاک:

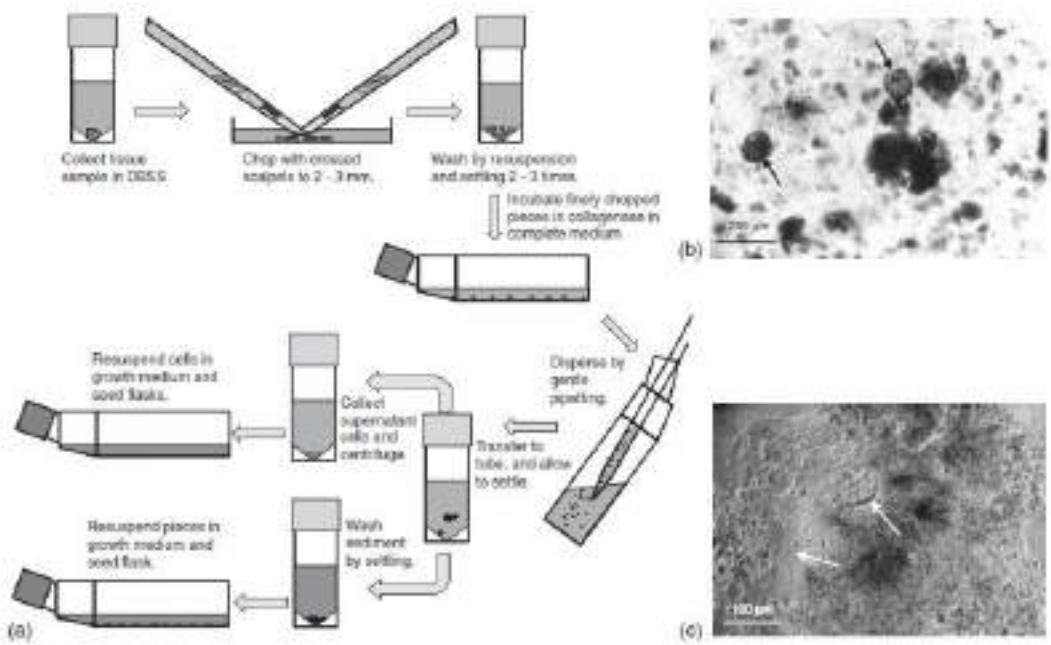
- سینٹرفیوج

پروٹوکول

1. ٹشو کو تازہ، جراثیم سے پاک DBSS میں منتقل کریں اور کللا کریں۔
2. ناپسندیدہ بافتوں (مثلاً، چربی یا نیکروٹک مواد) کو کاٹ دیں۔
3. ٹشو کو تقریباً 1 ملی میٹر کیوبز میں باریک کاٹ لیں۔
4. ٹشو کو جراثیم سے پاک سینٹری فیوج ٹیوب یا کنٹینر میں منتقل کریں۔
5. ٹشو کے ٹکڑوں کو ٹھیک ہونے دیں۔
6. DBSS میں دوبارہ معطل کر کے ٹشوؤں کو دھوئیں، تصفیہ کریں، اور سپرنٹنٹ کو ہٹادیں۔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 کولیگنیس 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 اپکلا خلیوں کے چھوٹے کلسٹرز کو الگ کریں۔
13. سینٹری فیوج سیل سسپنشن اور ڈسکارڈ سپر نٹنٹ
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۔

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



تصویر 2.8۔ کولیجینیس کے ذریعہ ٹشوں کی تفریق۔(a) ڈسیکشن کا اسکیمیٹک ڈایا گرام جس کے بعد کولیگنیس میں تفریق۔(b) کروڈ کولیجینیز (ورتھنگٹن سی ایل ایس گریڈ) میں 48 گھنٹے کی علیحدگی کے بعد انسانی کالونی کارسنوما سے سیل کلسٹرز؛ کولیگنیس کو ہٹانے سے پہلے۔(c) جیسا کہ (b)، لیکن کولیجینیز کو ہٹانے کے بعد، پائپٹنگ کے ذریعے مزید تفریق، اور کلچر 48 گھنٹے

تک۔ واضح طور پر بیان کردہ گول گچھے (سیاہ تیر)(b) میں اپیتھیلیم 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 فائبروبلاسٹس پیدا کرتے ہیں۔ (پلیٹ b2 بھی دیکھیں)

2.7 مکینیکل تفریق (Mechanical Degradation)

اگرچہ انزیمیٹک ہاضمہ ممکنہ طور پر زیادہ نمائندہ ثقافت پیش کرتا ہے، پروٹولیٹک نقصان کے خدشات نے بہت سے محققین کو مکینیکل تفریق کے طریقوں کا انتخاب کرنے پر مجبور کیا ہے۔ تکنیکوں میں پھیلے ہوئے خلیات کو جمع کرنے کے لیے ٹشو کو احتیاط سے کاٹنا، گھٹتی ہوئی جالی کے سائز کی چھلنی کے ذریعے ٹشو کو دبانا، یا ٹشو کے ٹکڑوں کو سرنج یا پائپنگ کے ذریعے بار بار زبردستی کرنا شامل ہے۔ یہ طریقے سیل معطلی کو زیادہ تیزی سے حاصل کرتے ہیں لیکن میکانکی نقصان کا سبب بن سکتے ہیں۔ سکریپنگ اور چھلنی ہلکے طریقے ہیں، جبکہ پائپنگ اور سرنگنگ قینچ کے دباؤ کو جنم دے سکتی ہے۔ پروٹوکول 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: چھلنی کے ذریعے مکینیکل انحراف

خاکہ

کلچر میڈیم میں ٹشو کو بتدریج چھوٹے میش 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 (100µm نیچے 20µm) یا فالکن "سیل سٹریز"
- پیٹری ڈشز (9 سینٹی میٹر)
- اسکیلپلس

ڈسپوزایبل پلاسٹک سرنج (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 میش کے ساتھ چھلنی میں رکھیں۔
3. ڈسپوزایبل پلاسٹک کی سرنج کے ساتھ ہلکے دباؤ کا استعمال کرتے ہوئے ٹشو کو میش کے ذریعے درمیانے درجے پر مجبور کریں۔ خلیات کو چھلنی کے ذریعے زیادہ درمیانے درجے سے دھوئے۔
4. پیپٹ نے ٹشو کو جزوی طور پر ایک باریک میش چھلنی میں الگ کیا (جیسے، 100µm میش) اور مرحلہ 3 کو دہرائیں۔
5. اس مرحلے پر معطلی اور کلچر کو پتلا کریں یا سنگل سیل سسپنشن کے لیے 20µm میش کے ذریعے مزید چھلنی کریں۔ عام طور پر، زیادہ بازی قینچ 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، برانن جگر، دماغ اور بعض ٹیومر کے لیے موزوں ہے۔ اگرچہ نتیجے میں معطلی کی قابل عملیت انزیمیٹک 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 2.9۔ مکینیکل تفریق۔ (a) کھرچنا یا ''سپیلج''۔ کاٹنے کا عمل، یا کٹی ہوئی سطح کا رگڑنا، خلیات کو جاری کرتا ہے۔ (b) چھلنی سرنج پسٹن کے ساتھ چھلنی کے ذریعے زبردستی ٹشو۔ (فالکن سیل سٹریز استعمال کیا جا سکتا ہے؛ تصویر 12.8 دیکھیں۔) (c) سرنگنگ۔ وسیع بور سوئی یا کینولا کے ذریعے سرنج میں ٹشو کھینچنا اور اظہار کرنا۔ (d) پائپیٹ کے ذریعے تراشنا۔

پیپٹنگ ٹشو کے ٹکڑے چوڑے بور پائیپٹ کے ذریعے اوپر اور نیچے ہوتے ہیں۔

2.8 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس اکائی کے مطالعے بعد طلبا 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)

کہولت	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 آسنجن 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 cadherins، integrins، 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 کلچرز سیل بائیولوجی، فزیالوجی اور پیتھالوجی 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 کلچرز کے بنیادی فوائد میں سے ایک یہ ہے کہ _____ پائے جانے والے ٹشوز 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 سورسنگ کی ضرورت ہوتی ہے۔
6. انزیمیٹک ڈسگریگیشن ایک تکنیک ہے جو بنیادی سیل کلچر میں استعمال ہوتی ہے، جس میں انزائمز جیسے ٹرپسن، کولیگنیس، اور _____ کا استعمال شامل ہوتا ہے تاکہ انفرادی خلیوں کو بافتوں کے ٹکڑوں سے آزاد کیا جا سکے۔
7. ایمبریونک ٹشوز زیادہ آسانی سے منتشر ہوتے ہیں اور نوزائیدہ یا _____ ٹشو کے مقابلے زیادہ پھیلنے والے خلیات پیدا کرتے ہیں۔
8. فعال ٹرپسن 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 _____ ٹرپسن کے استعمال سے حاصل کیا جا سکتا ہے۔
9. بافتوں کو الگ کرنے کے دیگر انزیمیٹک طریقہ کار میں کاربوہائیڈریٹ جیسے _____ اور نیورامینیڈیس کو نشانہ بنانے والے خامروں کا استعمال شامل ہے۔
10. مکینیکل تفریق کے طریقوں میں پھیلے ہوئے خلیات کو جمع کرنے کے لیے بافتوں کو احتیاط سے کاٹنا، گھٹتے ہوئے میش سائز کی چھلنی کے ذریعے ٹشو کو دبانا، یا ٹشو کے ٹکڑوں کو سرنج یا پائپنگ کے ذریعے بار بار دبانا، جو مکینیکل _____ 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. بائیو میڈیکل ریسرچ اور کلینیکل پریکٹس میں پرائمری سیل کلچرز 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 کا موازنہ اور اس کے برعکس
4. پرائمری سیل کلچر کے دوران ٹشوں 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 تھلگ 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 جا سکے۔ انزائمز جیسے ٹرپسن، کولیگنیس، اور ہائیلورونیڈیس 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	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(Artificial Media)

3.4.3 مصنوعی میڈیا کی تیاری(Artificial Media Prepration)

3.4.4 قدرتی اور مصنوعی میڈیا کی مثالیں(Examples of Natural and Artifical Media)

3.5 جراثیم رہائی کی تکنیک(Sterilization Techniques)

3.6 کرایوپریزرویشن(Cryopreservation)

3.7 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

3.8 کلیدی الفاظ(Keywords)

3.9 نمونہ امتحانی سوالات(Model Examination Questions)

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

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

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

3.10 فرہنگ(Glossary)

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

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 کرائیوپریزرویشن 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۔ لیمینر فلوہڈز، CO_2 انکیوبیٹرز، مائیکروسکوپس، اور جراثیم سے پاک ہینڈلنگ کے آلات سے لیس ایک اچھی طرح سے لیس لیبارٹری سیل کلچر کے کامیاب تجربات کی ریڑھ 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 وٹرو 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 جا سکتا ہے۔ قدرتی میڈیا، جیسے سیرم پر مشتمل میڈیا جیسے فیٹل بووائن سیرم (FBS)، جسمانی ماحول کی زیادہ قریب سے نقل کرتا ہے اور سیل کی اقسام کی وسیع رینج کے لیے موزوں ہے۔ تاہم، بیچ 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 اجزا 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 مائکروبیل 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 رہائی کی تکنیکیں ناگزیر ہیں۔ عام طریقوں میں آٹوکلیونگ، فلٹریشن، اور کیمیائی جراثیم کشی شامل ہیں۔ آٹوکلیونگ، 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 بیکٹیریا اور فنگس کو ان کی ساخت میں ردوبدل 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 ایتھنول یا بلیچ 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 (196C°) میں، اس طرح مستقبل میں استعمال کے لیے ان کی قابل عملیت اور فعالیت کو محفوظ رکھتا ہے۔ کرائیو پروٹیکٹیو ایجنٹس جیسے ڈائمتھائل سلفوکسائیڈ (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 کرائیو 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)

اساکائی 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 رہائی کے طریقے۔
- ❖ جراثیم کشی کی مختلف تکنیکوں کا جائزہ لیں، جیسے آٹوکلیونگ، 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 کرائیوپریزرویشن کے اصولوں اور پروٹوکولز کی وضاحت کریں، بشمول کرائیوپروٹیکٹو 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 کنٹرول 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 گزرنا، 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 سبکلون 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 فینوٹائپک 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 کیمیاوی 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

گیا 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 (O_2) اور کاربن ڈائی آکسائیڈ (CO_2) جیسی گیسیں فراہم کی جاتی ہیں، جبکہ فزیکو-کیمیائی ماحول بشمول pH، اوسموٹک 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 کلچر کہا جاتا ہے۔ تاہم، کچھ خلیے سسپنشن 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 سلفوکسائیڈ (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 جا سکتا ہے۔

• فبروبلوسٹک (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 پیچ میں سبسٹریٹ کے ساتھ جڑے ہوتے ہیں۔

• لمفوبلاسٹ نما خلیات: شکل میں کروی، یہ خلیے عام طور پر کسی سطح سے منسلک کیے بغیر سسپنشن 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 پنکچر، چھلکنے، ادخال، اور سانس کی نمائش شامل ہیں۔ سخت حفاظتی پروٹوکولز اور معیاری مائکروبایولوجیکل 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۔ بایو سیفٹی کیبنٹ، جسے سیل کلچر ہڈ بھی کہا جاتا ہے، خاص طور پر متعدی سپلیشز یا ایروسول پر مشتمل ہونے اور سیل کلچر کی آلودگی کو روکنے کے لیے بہت اہم ہیں۔

ذاتی حفاظتی سازوسامان PPE :(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 رہنمااصولوں پر عمل کرنا ضروری ہے۔

محفوظ لیبارٹری پریکٹسز: 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، پائیپٹ، شیشے کے ٹوٹے ہوئے برتن)۔
- لیبارٹری کے طریقہ کار کے دوران ایروسول 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: لیمینر فلو ہڈ یا بائیو 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 CO_2 کی سطح سمیت سیل کی نشوونما کے لیے بہترین حالات کو برقرار رکھنے کے لیے ایک مرطوب CO_2 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 بناتا ہے، یا تو خودکار سسٹمز جیسے کہ ® Countess خودکار 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۔
- مائع 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 آٹوکلیو ضروری ہے۔
- توسیع شدہ سامان:
- اسپائریشن پمپ: یا تو پیرسٹالٹک یا ویکیوم بیسڈ، سیل کلچر ویسلز سے مائع 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 ریزولیوشن امیجنگ فراہم کرتا ہے، جو کہ جدید مائکروسکوپی ایپلی کیشنز کے لیے مفید ہے۔
- فلوسائٹومیٹر: 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 مائعات کی منتقلی کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔
- سرنجیں اور سوئیاں: میڈیا، ری ایجنٹس، اور سیل سسپنشنز کے ایسپٹک ہینڈلنگ کے لیے درکار ہیں۔

- فضلہ کنٹینرز: استعمال شدہ پائپیٹ 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 کارکردگی، 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 کلچرز، 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 کلچرز اور متعلقہ مواد کو ذخیرہ کرنے کے لیے استعمال کیا جا سکتا 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 سپلیشز 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 (BSL-1, 2, 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 پیتھوجینز 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۔

کلین بینچز: افقی یا عمودی لیمینر فلو کلین 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۔

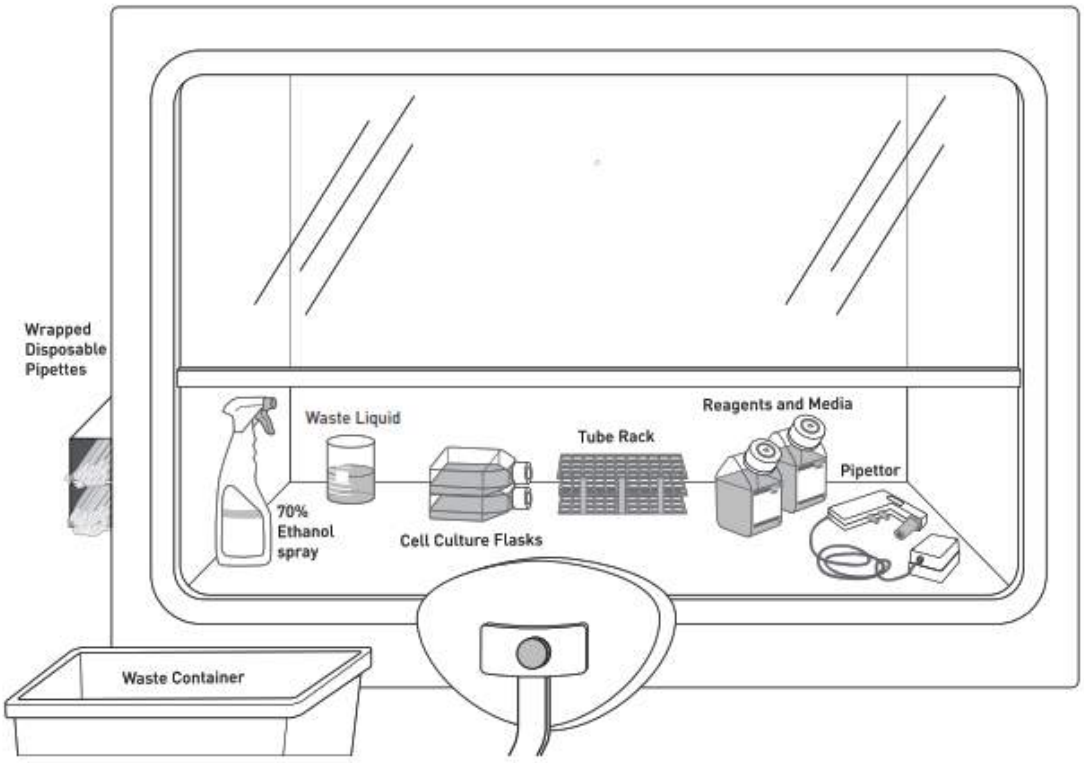
سیل کلچر ہڈ لے آؤٹ:

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% ایتھنول 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 3.1: 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 ±0.2°C کے اندر درست درجہ حرارت کنٹرول جیسی خصوصیات ہیں۔ سٹینلیس سٹیل کے انکیوبیٹرز آسان صفائی اور سنکنرن سے تحفظ فراہم کرتے ہیں، جو کہ سیپٹک حالات کو برقرار رکھنے کے لیے ضروری ہے۔

اقسام:

- خشک انکیوبیٹرز: 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 انکیوبیٹرز: 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 مائعات (میڈیا، ری ایجنٹس)، کیمیکلز (منشیات، اینٹی بائیوٹکس)، استعمال کی اشیاء (پائپیٹ، ثقافتی برتن)، شیشے کے برتن، خصوصی آلات، اور ٹشوز/خلیے۔

ریفریجریٹرز:

- چھوٹی لیبارٹریزری ایجنٹس اور میڈیا کو 2–8°C پر ذخیرہ کرنے کے لیے گھریلو ریفریجریٹرز (ترجیحاً 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 لائنوں کو محفوظ رکھنے اور جینیاتی عدم استحکام کو روکنے کے لیے، کام کرنے والے اسٹاک کو تیار کرنا اور انہیں کرائیوجینک 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 لائنوں والی لیبارٹریوں میں۔ Countess خودکار 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 یوکرائیوٹک سیلز کے ساتھ مطابقت رکھتا ہے، سیل کلچر ورک فلو میں کارکردگی کو بڑھاتا ہے۔

سیل کلچر کی سالمیت کو برقرار رکھنا مائکروجنزموں جیسے بیکٹیریا، فنگی اور وائرس کے ذریعہ آلودگی کو روکنے پر بہت زیادہ انحصار کرتا ہے۔ ایسپٹک تکنیک ماحول کے مائکروجنزموں 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۔ یووی لائٹ سٹرلائزیشن کا اطلاق کیا جا سکتا ہے، جبکہ بنسن برنرز 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 آٹوکلیونگ یا جراثیم سے پاک فلٹریشن کا استعمال کرتے ہوئے جراثیم سے پاک کریں۔

جراثیم سے پاک ہینڈلنگ:

- اپنے ہاتھوں اور کام کی جگہ کو معمول کے مطابق 70% ایتھنول سے صاف کریں۔
- سیل کلچر ہڈ میں کنٹینرز رکھنے سے پہلے، 70% ایتھنول سے ان کے بیرونی حصوں کو صاف کریں۔
- بوتلوں یا فلاسکس سے براہ راست ڈالنے سے گریز کریں۔ جراثیم سے پاک شیشے یا ڈسپوزایبل پلاسٹک کے پائیپٹ اور مائع ہیرا پھیری کے لیے ایک پائپٹر استعمال کریں۔ کراس آلودگی سے بچنے کے لیے پائپٹس 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، پلیٹنگ 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 مائکوپلاسما کی آلودگی کی جانچ کریں۔

فزیکوکیمیکل اور فزیولوجیکل ہیرا پھیری:

کنٹرول کے پیرامیٹرز: گروتھ میڈیا کے ذریعے درجہ حرارت، پی ایچ، اوسموٹک پریشر، CO_2، O_2، 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 کشیراتی خلیوں کو منسلک کرنے کے لیے ٹشو کلچر سے علاج شدہ سبسٹریٹس کی ضرورت ہوتی ہے، جب کہ بہت سے کیڑے سیل لائنزmonolayer اور سسپینشن 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 وٹرو 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 جا سکتا 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، لپڈز، 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 بچھڑے 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 مائکروجنزموں کی نشوونما میں معاون ہوتے ہیں۔
3. امینیٹک فلوئڈ میڈیم: امینیٹک فلوئڈ جنین کے ٹشوز کی نشوونما کے لیے ضروری غذائی اجزاء اور نشوونما کے عوامل سے بھرپور ہوتا ہے۔ یہ انسانی امونٹک 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 کیمیاوی 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 اجزا کو عین ارتکاز میں ملا کر تیار کیے جاتے ہیں۔ مصنوعی میڈیا کے اہم اجزاء میں شامل ہیں:

1. بیسل نمکیات: غیر نامیاتی نمکیات جیسے سوڈیم کلورائڈ، پوٹاشیم کلورائڈ، کیلشیم کلورائیڈ، اور میگنیشیم سلفیٹ سیلولر عمل اور آسموٹک توازن کے لیے ضروری آئن فراہم کرتے ہیں۔
2. امینوایسڈز: ضروری اور غیر ضروری دونوں امینوایسڈ پروٹین کی ترکیب اور سیلولر میٹابولزم کو سپورٹ کرنے کے لیے شامل ہیں۔
3. وٹامنز: ضروری وٹامنز جیسے رائبوفلاوین، 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، بائکاربونیٹ، اور فاسفیٹ کو جسمانی رینج 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(Artificial Media Prepration)

1. وزن اور تحلیل اجزاء: مطلوبہ فارمولیشن کے مطابق ہر جزو کی پیمائش اور وزن کریں۔ اجزاء کو آست پانی میں یا بفرڈ محلول 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، آٹوکلیونگ یا جراثیم سے پاک فلٹریشن کے ذریعے فلٹر شدہ میڈیم کو جراثیم سے پاک کریں۔
4. اسٹوریج: 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 (Examples of Natural and Artifical Media)

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، لپڈز، اور معدنیات فراہم کرتا ہے۔
- مثال: DMEM کو 10% FBS، 1% پینسلن-اسٹریپٹومائسن، 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، لپڈز، 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 (کوکوس نیوسیفیرا) ایمبریو اور کالس ٹشوز کی وٹرو کلچر کے لیے استعمال کیا گیا ہے۔

3. اینیٹک فلوئڈ میڈیم:

- ساخت: اینیٹک سیال میڈیم انسانی یا حیوانی امنیٹک 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: اینیٹک فلوئڈ میڈیم کی ایک بنیادی تشکیل میں DMEM/F12 شامل ہو سکتے ہیں جو امونٹک فلوئڈ، اینٹی بایوٹک 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 ایسڈ، 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، سیلینیم، بووائن سیرم البومین (BSA)، اور افزائش کے عوامل جیسے ایپیڈرمل گروتھ فیکٹر (EGF) اور بنیادی فبروبلاسٹ 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 رہائی 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 مائکروبیل 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 (آٹوکلیو):

- تفصیل: آٹوکلیونگ، دباؤ میں بھاپ کا استعمال، جراثیم رہائی کے لیے ایک انتہائی موثر اور وسیع پیمانے پر استعمال ہونے والا طریقہ ہے۔
- آپریشن: آٹوکلیو 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 مائکرو جنزموں کے لیے مہلک حالات پیدا کرتا ہے۔
- ایپلی کیشنز: آٹوکلیو 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 مائکرو 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 سیلولر ڈھانچے میں خلل ڈالتا ہے اور پروٹین کو منقطع کرتا ہے، مائکرو 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 موثر 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 سیلولر ڈھانچے میں خلل ڈالتی ہے جس کے نتیجے میں مائکرو بیل موت واقع ہوتی ہے۔
- ایپلی کیشنز: خشک گرمی کی جراثیم رہائی گرمی سے بچنے والے مواد جیسے شیشے کے برتن، پاؤڈر، تیل، اور دھاتی آلات کے لیے موزوں ہے۔

4. الٹراوائلٹ (UV) روشنی:

- تفصیل: الٹراوائلٹ (UV) روشنی جراثیم کش خصوصیات رکھتی ہے، جو مائکروجنزموں 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 نینو میٹر (nm) کی UV روشنی سے بے نقاب کرنا شامل ہے۔ UV روشنی مائکروبیل 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 کیبینٹ، پانی کی صفائی کے نظام، اور ہوا صاف کرنے والے یونٹس میں سطح کی جراثیم کشی کے لیے UV جراثیم رہائی کا استعمال کیا جاتا ہے۔

5. فلٹریشن:

- تفصیل: فلٹریشن کے طریقے مائعات 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: مائکروجنزم فلٹر میٹرکس یا سوراخوں کے اندر پھنس جاتے ہیں، فلٹر کے ذریعے ان کے گزرنے کو روکتے ہیں۔ یکساں تا کنا 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 مائکروبایولوجی میں مائعات، ہوا اور گیسوں کو جراثیم سے پاک کرنے کے ساتھ ساتھ پانی کے نمونوں اور دواسازی کی تیاریوں میں مائکروبیل شمار کرنے کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔ دوسری طرف، گہرائی کے فلٹرز بڑے پیمانے پر ایپلی کیشنز جیسے HVAC (ہیٹنگ، وینٹیلیشن، اور ایئر کنڈیشنگ) 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 بائیولوجی، ری جنریٹیو میڈیسن، اور بائیو ٹیکنالوجی۔ سیل کلچر کو مؤثر طریقے سے محفوظ کرکے، کرائیوپریزرویشن 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 کٹائی کی جاتی ہے۔
- کٹائی کے بعد، سیلز کو کلچر میڈیا اور ملبے کو ہٹانے کے لیے دھویا جاتا ہے، سیل کی پاکیزگی کو فروغ دیتا ہے اور منجمد سے منسلک نقصان کو کم کرتا ہے۔

2. کرائیوپروٹیکٹنٹ اضافہ:

- Cryoprotective agents (CPAs)، جیسے کہ ڈائمتھائل سلفوکسائیڈ (DMSO) یا گلیسرول، کو سیل سسپنشن میں شامل کیا جاتا ہے تاکہ جمنے 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 سائٹوٹوکسسٹی 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 جمنا، کچھ سیل اقسام کے لیے بھی استعمال کیے جاسکتے ہیں۔
- اسٹوریج کی شرائط:
- Cryovials جن میں منجمد سیل سسپنشن 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 جا سکتا 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 اعلی 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۔ آپٹمائزڈ 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 لیمینر فلو ہڈز، CO_2 انکیوبیٹر، مائیکروسکوپس، اور جراثیم سے پاک ہینڈلنگ 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 مائکروبیل آلودگیوں کو ختم کرنے کے لیے فلٹریشن/نس بندی کے طریقے۔
- خلیات اور بافتوں کے طویل مدتی ذخیرہ کرنے کے لیے کرائیوپریزرویشن کے اصولوں اور پروٹوکولز کی وضاحت کریں، بشمول کرائیوپروٹیکٹو ایجنٹوں کا استعمال اور قابل عملیت اور جینیاتی استحکام کو یقینی بنانے کے لیے منجمد کرنے کی مناسب تکنیک۔

3.8 کلیدی الفاظ (Keywords)

کرایوپریزرویشن	Cryopreservation	انتہائی کم درجہ حرارت پر کسی چیز کو محفوظ کرنا
جراثیم کش	Sterilization	جراثیم سے پاک کرنا بانجھ کرنا غلاظت سے صاف کرنا۔

3.9 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

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. گلوکوز سیل کلچر میں بنیادی _____ سبسٹریٹ کے طور پر کام کرتا ہے۔
8. جراثیم کشی میں، ابلتا ہوا پانی زیادہ تر _____ خلیات کو مؤثر طریقے سے مار دیتا 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. مائکرو جنزموں کو ختم کرنے کے لئے UV نس بندی 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 نس بندی 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 مائکروبیل 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 Cultre And Application of Cell And Organ Cultre)

اکائی کے اجزا

4.0 تمہید(Introduction)

4.1 مقاصد(Objectives)

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

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

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

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

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

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

4.7 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

4.8 کلیدی الفاظ(Keywords)

4.9 نمونہ امتحانی سوالات(Model Examination Questions)

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

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

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

4.10 فرہنگ(Glossary)

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

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 کنٹرول 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 جا سکتی ہیں۔ خلیے کو الگ تھلگ کرنے کی تکنیکیں ماخذ ٹشو اور مطلوبہ خلیے کی قسم کے لحاظ سے مختلف ہو سکتی ہیں، جن میں اکثر انزیمیٹک ہاضمہ، مکینیکل ڈسوسی ایشن، یا واضح کلچر کے طریقے شامل ہوتے ہیں۔ الگ تھلگ سیل لائنیں سیلولر فزیالوجی، پیتھالوجی، اور علاج کی مداخلت کے مطالعہ کے لیے انمول ٹولز کے طور پر کام کرتی ہیں۔

سیل لائنوں کی بڑے پیمانے پر کلچر: بائیو فارماسیوٹیکلز، ویکسین کی ترقی، ٹشو انجینئرنگ، اور دیگر صنعتی ایپلی کیشنز کی تیاری کے لیے سیل لائنوں کی بڑے پیمانے پر کاشت ضروری ہے۔ بایوریکٹرز اور خصوصی کلچر ویسلز کو کنٹرول شدہ حالات میں خلیوں کی نشوونما میں مدد کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، غذائی اجزاء کی فراہمی، پی ایچ، درجہ حرارت، اور آکسیجنیشن جیسے پیرامیٹرز کو بہتر بنانے کے لیے۔ بڑے پیمانے پر سیل کلچر کے نظام صنعتی پیمانے پر ریکومبینٹ پروٹینز، 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 کو کلچر 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 ٹشو ایکسپلانٹس ایکس ویوو کی دیکھ بھال اور ہیرا پھیری شامل ہوتی ہے، جس سے محققین کو اعضاء سے متعلق مخصوص فزیالوجی، پیتھوفیسولوجی، اور منشیات کے ردعمل کا مطالعہ کرنے کی اجازت ملتی ہے۔ آرگنوٹائپک 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 طبّی 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 طبّی چیلنجوں سے نمٹنے کے لیے جدید علاج اور بائیو ٹیکنالوجی حل تیار کرنے کے قابل بناتے ہیں۔

4.1 مقاصد(Objectives)

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

- ❖ 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 کلچریں حاصل کر سکیں گے۔
- ❖ وہ بڑے پیمانے پر سیل کلچر کے طریقوں سے واقف ہوں گے، جس سے وہ مختلف اپلی 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 مورفولوجیکل، 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 بایو 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 ردعمل 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 جا سکتا ہے جیسے کہ جانوروں کے ماڈل، انسانی بایپسی، یا سیل ریپوزٹریز۔ مثال کے طور پر، محققین ہیپاٹوسائٹ علیحدگی کے لیے ماؤس ماڈل سے جگر کے ٹشو جمع کر سکتے ہیں۔
2. ٹشو کا انحطاط: ایک بار ٹشو حاصل کرنے کے بعد، یہ انفرادی خلیات کو جاری کرنے کے لیے انحطاط سے گزرتا ہے۔ اس مرحلے میں ایکسٹرا سیلولر میٹرکس اور سیل ٹو سیل آسنشن کو توڑنا شامل ہے۔ انزیمیٹک ہاضمہ عام طور پر استعمال کیا جاتا ہے، جہاں انزائمز جیسے کولیجینیز، ٹرپسن، یا ڈسپیس کو ٹشو پرلاگو کیا جاتا ہے تاکہ پروٹین کو توڑنے اور سیل کے اخراج کو آسان بنایا جا سکے۔ مکینیکل طریقوں جیسا کہ مائنسنگ یا پیسنے کو بھی الگ کرنے کے لیے استعمال کیا جا سکتا ہے۔
3. سیل کی علیحدگی: انحطاط 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 سنٹرفیوگریشن کے ذریعے حاصل کیا جا سکتا ہے، جہاں خلیات کو کثافت کے گریڈینٹ میڈیم پر تہہ کیا جاتا ہے اور سینٹرفیوجڈ 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 جا سکتا ہے۔ مثال کے طور پر، محققین پردیی خون کے مونونیوکلیئر 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 کلچریں 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 کلچریں قائم کی جا سکتی 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 ڈیلیوشن یا محدود کرنے کے طریقے استعمال کیے جا سکتے 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، امیونو فینوٹائپنگ، جینیاتی پروفائلنگ، اور فنکشنل اسسیں 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 جا سکتا 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 برانن گردے) شامل ہیں۔ ہر سیل لائن میں منفرد خصوصیات اور ایپلی 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 ایپلی 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 بائیوایکٹرز تک پیمانہ کاری، اور مصنوعات کی بحالی اور صاف کرنے کے لیے موثر بہاو پروسیسنگ کی ضرورت ہے۔ اس جامع جائزے میں، ہم بڑے پیمانے پر سیل کلچر کے مختلف پہلوؤں کا جائزہ لیں گے، بشمول طریقوں، چیلنجز، اور ایپلی کیشنز کی مثالیں۔

طریقے:

1. سیل لائنز کا انتخاب: بڑے پیمانے پر کلچر کا آغاز مطلوبہ پروڈکٹ اور ایپلیکیشن 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، ہائبرڈوما خلیات، کیڑے کے خلیے (جیسے، Sf9) اور مختلف ممالیہ 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 بیج 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 فلاسکس 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 نگرانی 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 ایجی ٹیشن ریٹ جیسے پیرامیٹرز کو قریب سے منظم کیا جاتا ہے۔ مختلف قسم کے بائیوری ایکٹرز، بشمول سٹرڈ ٹینک 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، بیج 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 اجزا 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 کی اور مصنوعات کی بازیافت: کلچر کی مدت کے اختتام پر، مطلوبہ مصنوعات کی بازیافت کے لیے خلیوں کی کٹائی کی جاتی ہے۔ ایپلی کیشن پر منحصر ہے، خلیوں کو انٹرا سیلولر مصنوعات نکالنے کے لیے لیس کیا جا سکتا ہے یا سینٹرفیوگریشن یا فلٹریشن کے طریقوں کا استعمال کرتے ہوئے کلچر سپرنٹنٹ سے الگ کیا جا سکتا 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 ایکٹرز تک اسکیل کرنا کئی چیلنجز پیش کرتا ہے، بشمول بڑے پیمانے پر منتقلی کی حدود، قینچ کا دباؤ، اور کلچر کے حالات میں متفاوت۔ بایوری ایکٹر میں یکساں نشوونما اور پیداواری صلاحیت کو یقینی بنانے کے لیے مکسنگ، ہوابازی، اور غذائی اجزاء کی تقسیم کی اصلاح ضروری ہے۔
2. آلودگی کا کنٹرول: بڑے پیمانے پر کلچریں بیکٹیریا، 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 ایپلی کیشنز کی مثالیں: (Examples of Cell cultre 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 ایکٹرز میں تیار کیے جاتے ہیں اور طبّی 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

انفلوئنزاویکسین، نیز سبونائٹ ویکسین، وائرس نماذرات (VLPs)، اور دیگر ویکسین امیدوار۔

3. انزائم اور پروٹین کی پیداوار: مائکروبیل یا ممالیہ خلیوں کی بڑے پیمانے پر کلچر کو خامروں، دوبارہ پیدا کرنے والے پروٹیز، اور دیگر بایوفارماسیوٹیکلز کی تیاری کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ اس میں علاج کے انزائمز، نمو کے عوامل، سائٹوکائنز، اور مختلف طبّی 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 ایمبریونک اسٹیم سیلز کو بایوریکٹرز میں کنٹرول شدہ حالات میں پھیلایا جاتا ہے تاکہ ٹرانسپلانٹیشن اور بافتوں کی تخلیق نو کے لیے کافی سیل نمبر پیدا کیے جا سکیں۔

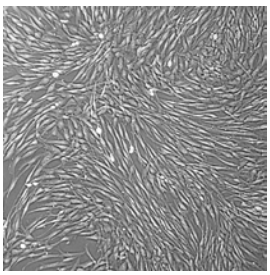
5. سیل لائنز کا بڑے پیمانے پر کلچر ایک پیچیدہ اور کثیر الثباتی عمل ہے جو بائیوٹیکنالوجی، بائیوفارماسیوٹیکل، اور بائیومیڈیکل ریسرچ میں اہم کردار ادا کرتا ہے۔ کلچر کے حالات کو بہتر بنا کر، پیداوار کو بڑھا کر، اور موثر بہاو پر وسیسنگ کو لاگو کر کے، محققین اور صنعت کے ماہرین مختلف طبّی اور صنعتی ایپلی کیشنز کے لیے نئے علاج، ویکسین، اور حیاتیات تیار کرنے کے لیے سیل پر مبنی ٹیکنالوجیز کی صلاحیت کو بروئے کار لا سکتے 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 طبّی علاج اور صنعتی بائیوٹیکنالوجی 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۔

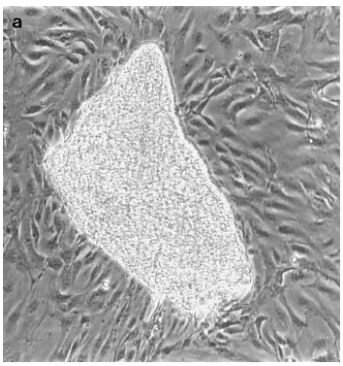
1. پرائمری سیلز (Primary Cells)

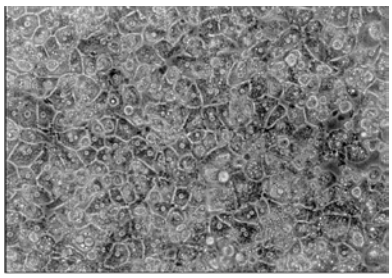
- پرائمری خلیات بافتوں یا اعضاء سے براہ راست الگ تھلگ ہوتے ہیں اور ان کے vivo ہم منصبوں کی بہت سی جسمانی خصوصیات کو برقرار رکھتے ہیں۔ ان کی ایک محدود عمر ہوتی ہے اور آخر کار محدود تعداد میں خلیوں کی تقسیم کے بعد جوانی سے گزرتے ہیں۔ مثالوں میں شامل ہیں:



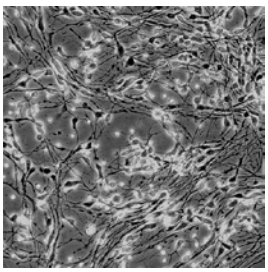
- انسانی ڈرمل فائبروبلاسٹس (Human Dermal Fibroblast): پرائمری فائبروبلاسٹس زخموں کو بھرنے اور بافتوں کی مرمت میں اہم کردار ادا کرتے ہیں۔ وہ جلد کی تحقیق اور دوبارہ پیدا کرنے والی ادویات میں بڑے پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں۔

- اپکلا خلیے(Epithelial Cells):بنیادی اپکلا خلیے مختلف اعضاء کے استر بناتے ہیں اور ٹشو کے مخصوص افعال کو ظاہر کرتے ہیں۔ وہ اپکلا حیاتیات، رکاوٹ کی تقریب، اور بیماری کے طریقہ کار کے مطالعہ کے لیے قابل قدر ہیں۔





- ہیپاٹوسائٹس(Hepatocytes): پرائمری ہیپاٹوسائٹس جگر کے فنکشن، منشیات کے میٹابولزم، اور زہریلے پن 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۔

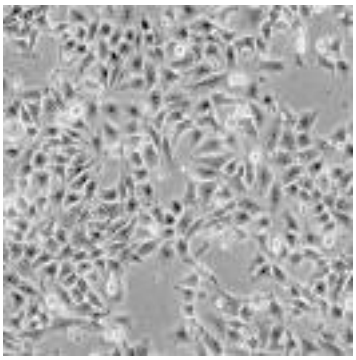


- نیورونل سیلز(Neuronal Cells): پرائمری نیورونل کلچرز اعصابی نظام کی نشوونما، Synaptic پلاسٹکٹی، اور نیوروڈیجنریٹیو بیماریوں کے بارے میں بصیرت فراہم کرتے ہیں۔ وہ نیوروسائنس کی تحقیق کے لیے ناگزیر ہیں۔

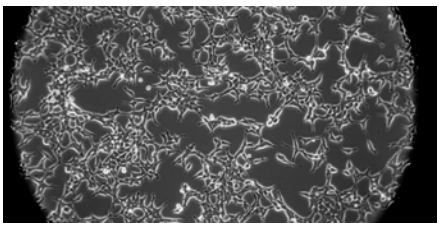
پرائمری سیل کلچر عام سیلولر افعال، بیماری کے طریقہ کار، اور منشیات کے رد عمل کی تحقیقات کے لیے حیاتیاتی لحاظ سے متعلقہ ماڈل پیش کرتے ہیں۔ وہ ترجمی تحقیق اور ذاتی نوعیت کی ادویات کے لیے ایک بنیاد فراہم کرتے ہیں۔

2. لافانی سیل لائنز(Immortal Cell Lines)

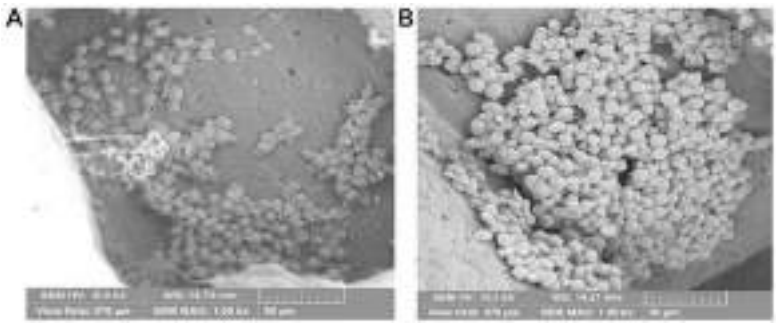
لافانی سیل لائنیں بنیادی خلیوں سے اخذ کی جاتی ہیں لیکن جوانی پر قابو پانے کے لیے جینیاتی تبدیلیوں یا انتخاب کے عمل سے گزرے ہیں، کلچر میں غیر معینہ مدت تک پھیلاؤ کو قابل بناتے ہیں۔ مثالوں میں شامل ہیں:



- HeLa سیلز: سروائیکل کینسر سے ماخوذ، HeLa سیلز بایومیڈیکل 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 برانن 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۔

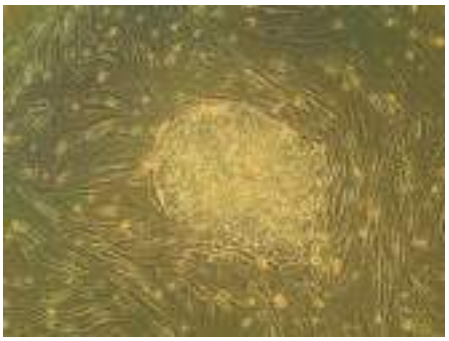


- جورکات خلیات (Jurkat Cells): انسانی ٹی لیمفوسائٹس سے ماخوذ، جورکات خلیات مدافعتی رد عمل، اپوپٹوس، اور سگنلنگ پاتھ ویز کا مطالعہ کرنے کے لیے قیمتی نمونے ہیں۔

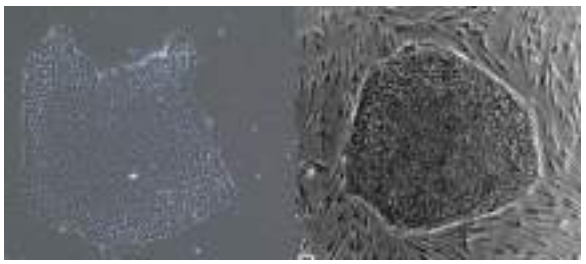
لافانی سیل لائنیں مستحکم جینیاتی خصوصیات فراہم کرتی ہیں اور بنیادی تحقیق، منشیات کی دریافت، اور بائیو ٹیکنالوجی ایپلی کیشنز میں ورک ہارسز کے طور پر کام کرتی ہیں۔

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۔

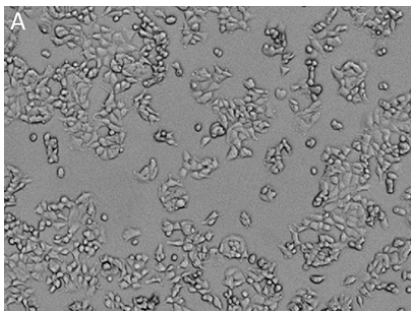


- Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): بالغ صوماتی خلیات کو دوبارہ پروگرام کرنے سے تیار کیا جاتا ہے، iPSCs pluripotency کو ظاہر کرتے ہیں اور سیل کی مختلف اقسام میں فرق کر سکتے ہیں۔ وہ ذاتی ادویات اور بیماری کی ماڈلنگ کو فعال کرتے ہیں۔

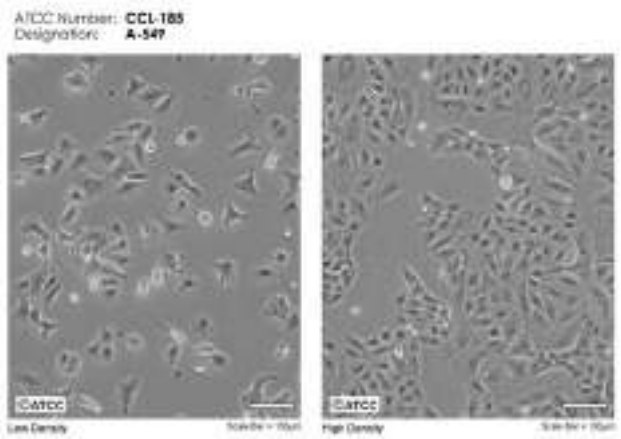
- Mesenchymal اسٹیم سیلز (MSCs): مختلف ٹشوز سے اخذ کیے گئے، MSCs دوبارہ تخلیقی اور امیونو موڈیولیٹری خصوصیات کے مالک ہوتے ہیں۔ وہ ٹشو کی مرمت اور سوزش کے عوارض کے علاج کا وعدہ رکھتے ہیں۔

4. کینسر سیل لائنز (Cancer Cell Lines)

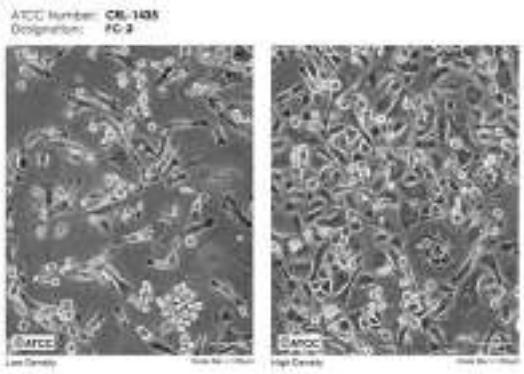
کینسر سیل لائنیں ٹیومر کے ٹشوز سے اخذ ہوتی ہیں اور بے قابو پھیلاؤ اور کینسر کی دیگر خصوصیات کو ظاہر کرتی ہیں۔ وہ کینسر کی تحقیق اور منشیات کی ترقی کے لیے انمول ماڈل کے طور پر کام کرتے ہیں۔ مثالوں میں شامل ہیں:



- MCF-7 خلیات: چھاتی کے اڈینو کارسینوما 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 اڈینو کارسینومک انسانی الیوولر بیسل اپیتھیلیل 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 کاکیشین 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۔

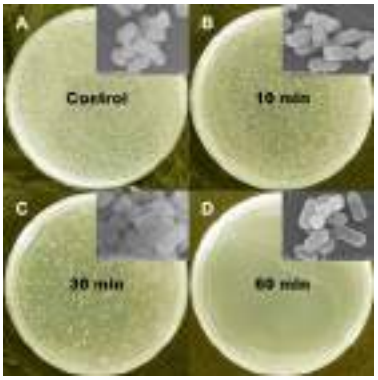


- PC-3 سیلز: پروسٹیٹ اڈینو کارسینوما سے ماخوذ، PC-3 سیلز کو پروسٹیٹ کینسر کے بڑھنے، میٹاسٹیسیس، اور علاج کی مزاحمت کا مطالعہ کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ [تصویر کا لنک: PC-3 سیلز]



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۔

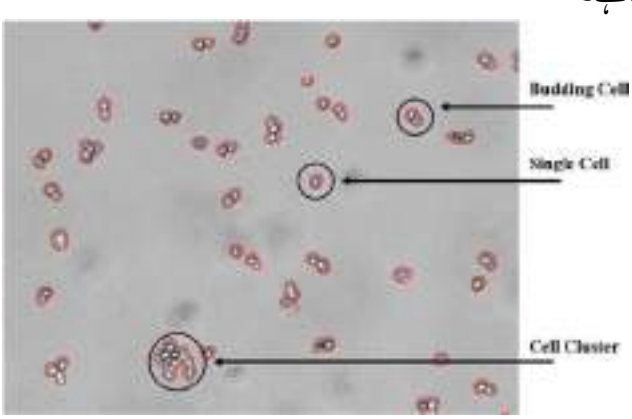
5۔مائکروبیل سیلز(Microbial Cells)



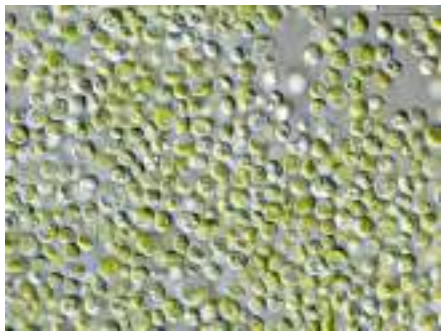
مائکروبیل خلیات بیکٹیریا، فنگی اور طحالب کو گھیرے ہوئے ہیں، جو مائکروبیل کلچروں کی بنیادی اکائیوں کے طور پر کام کرتے ہیں۔ وہ بائیو ٹیکنالوجی، صنعتی عمل، اور ماحولیاتی مطالعہ میں متنوع ایپلی کیشنز تلاش کرتے ہیں۔ مثالوں میں شامل ہیں:

Escherichia coli (E. coli): ایک ماڈل بیکٹیریم جو دوبارہ پیدا ہونے والے پروٹین کی پیداوار، جینیاتی انجینئرنگ، اور بائیوپروسیسنگ کے لیے استعمال ہوتا ہے۔

- Saccharomyces cerevisiae (Yeast): ایتھنول ابال، 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۔



مائکرو 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 ایپلی 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 آرگنجینیسیس کے تحت سیلولر اور سالماتی میکانزم 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 آرگنوجنیسس کے پیچیدہ عمل کا مطالعہ کرنے کے لیے اعضاء کی کلچر کا استعمال کرتے ہیں۔ مثال کے طور پر، برانن کے پھیپھڑوں کے ایکسپلانٹس کلچر ڈائیکس ویوو نے برانچنگ مورفوجینیسیس اور ایلوولر ڈیولپمنٹ میں شامل سگنلنگ راستوں کو واضح کرنے میں اہم کردار ادا کیا ہے۔ فبروبلاسٹ 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 ٹشوز یا جینیاتی طور پر تبدیل شدہ آرگنائڈز کی کلچر کے ذریعے، محققین کینسر، نیوروڈیجینریٹو عوارض، اور میٹابولک سنڈروم جیسی بیماریوں کی پیتھولوجیکل 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 آرگنوٹائپک 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، ایکسٹراسیلولر میٹرکس کمپوزیشن، اور ہائپوکسیا، جس سے ٹیومر کی افزائش، حملے، اور میٹاسٹیسیس کی تحقیقات کو جسمانی طور پر متعلقہ سیاق وسباق 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 وسباق میں منشیات کے میٹابولزم، فارماکوکینیٹکس، 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 ہیپاٹوٹوکسٹی 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 اسسیس کے مقابلے میں انسانی ہیپاٹوٹوکسٹی کی زیادہ درست پیشین گوئیاں فراہم کرتے ہیں۔

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

- اعضاء کی ثقافت ٹشو انجینئرنگ کے طریقوں میں ایک اہم کردار ادا کرتی ہے جس کا مقصد پیوندکاری کے لیے فنکشنل ٹشوز اور اعضاء پیدا کرنا ہے۔
- خلیات کو بایو 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 انجینیئرڈ اعضاء کو تیار کرنا ہے۔ ایک قابل ذکر مثال گردے کے آرگنائڈز کلچر ڈ ایکس ویوو 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 روایتی ڈائیلاسز یا 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 ویوو کی پیشگی شرط کے لیے پلیٹ فارم فراہم کر کے اعضاء کی پیوند کاری اور تحفظ میں درخواستیں 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 ویوو 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 مایوکارڈیل 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 اپلی کیشنز کے درمیان ایک پُل کا کام کرتی ہے، ترجمی مطالعات کی سہولت فراہم کرتی ہے جس کا مقصد نئے علاج اور طبّی 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 طبّی نتائج کی توثیق کر سکتے ہیں۔
- اعضاء کی ثقافت کے ماڈلز علاج کے لیے مریض کے مخصوص ردعمل، 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 ترجمی 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 ڈایکس ویوو 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 کرکے اور انہیں ڈرگ اسکریننگ اسیس کے تابع کرکے، 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 ورسٹائل اور طاقتور تکنیک ہے جس میں بائیو میڈیکل ریسرچ، ڈیزیز ماڈلنگ، ڈرگ دریافت، ٹشو انجینئرنگ، ٹرانسپلانٹیشن، اور ٹرانسلیشنل میڈیسن میں وسیع پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں۔ آرگن کلچر کے طریقہ کار میں مسلسل پیشرفت، بشمول آرگن آن اے چپ سسٹمز اور بائیو انجینیئرنگ 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 بایو 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 بایو 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 برانن 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 نیوروڈیجنریٹیو 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 امید واروں کی دوائیوں کا جائزہ لینے کے قابل بناتی ہیں۔ اس طرح کے ماڈلز نے نیوروڈیجنریشن کو نشانہ 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 ویرو سیل، 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 روگجنن 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: گریوا 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: انڈسڈ pluripotent 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 جا سکتا ہے اور سیل کی مختلف اقسام میں تفریق کی جا سکتی ہے، جو نیوروڈیجینریٹیو بیماریوں سے لے کر قلبی عوارض تک کے حالات کے لیے ذاتی نوعیت کے علاج کے اختیارات پیش کرتے ہیں۔ ٹرانسپلانٹیشن 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 ہیمسٹر بیضہ 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 گلائکوپروٹین تیار کرنے کی صلاحیت کے لیے مشہور ہیں، ان کا استعمال مونوکلونل اینٹی باڈیز اور ریکومبینٹ 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 ورسٹائل 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)

اس اکائی کو مکمل کرنے کے بعد، طلباء نے مندرجہ ذیل چیزیں سیکھی ہوں گے کہ۔

- ❖ اب وہ سیل لائنوں کو *isolate* 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
- ❖ طلباء اب تجرباتی ڈیزائن اور تشریح میں مدد کرتے ہوئے مختلف قسم کے مہذب خلیوں کی شناخت کرنے کے قابل 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 کی وضاحت کر سکتے ہے۔
- ❖ طلباء اب سیل کلچر سے اخذ کردہ مصنوعات کی متنوع رینج کی وضاحت کر سکتے ہیں۔

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 مکینیکل طریقوں کا استعمال کرتے ہوئے۔
فلوروسینس ایکٹیویٹڈ سیل چھانٹنا (FACS)	Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	فلو سائٹومیٹری کا استعمال کرتے ہوئے مخصوص سطح کے مارکر یا فلوروسینٹ لیبل پر مبنی خلیوں کو الگ کرنے کا طریقہ۔۔
پرائمری کلچر	Primary culture	:ٹشو کے نمونوں سے الگ تھلگ سیلز کو براہ راست کلچر کرنا تاکہ ماخذ ٹشو سے

4.9 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

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 ہیپاٹوسائٹس _____ 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. ویروسیلز 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 گلائکوپروٹین تیار کرنے کی اپنی صلاحیت کے لیے مشہور ہیں اور ان کا استعمال مونوکلونل اینٹی باڈیز اور ریکومبینٹ _____ کی تیاری میں کیا جاتا ہے۔
9. _____ ثقافت بنیادی تحقیق اور کلینیکل ایپلی کیشنز کے درمیان ایک پل کا کام کرتی ہے، ترجمی مطالعات کی سہولت فراہم کرتی ہے جس کا مقصد نئے علاج اور طبّی 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 ردعمل، 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. بائیو میڈیکل 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، سٹیم سیلز، کینسر سیل لائنز اور مائکروبیل 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 ایمبریونک 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: ریکومبینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی

(Recombinant DNA Technology)

اکائی کے اجزا:

5.0 تعارف(Introduction)

5.1 مقاصد(Objectives)

5.2 ریکومبینٹ ڈی این اے(Recombinant DNA)

5.2.1 Recombinant DNA ٹیکنالوجی کا اطلاق

5.2.2 Recombinant DNA ٹیکنالوجی کی حدود

5.3 لائگیشن کے انزائمز (اینڈونکلیز ٹائپ I – IV)

(Restriction Enzymes Endonucleases I-IV)

5.3.1 لائگیشن Endonucleases کی درجہ بندی

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

5.4.1 لائگیشن(Ligation)

5.4.2 لیگیشن ردعمل(Ligation Reaction)

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

5.4.4 ڈی این اے کی ارتکاز(DNA concentration)

5.4.5 Ligase کی ارتکاز(Ligase Concentration)

5.4.6 ligation کے ردعمل کا درجہ حرارت(Temprature of Ligation reaction)

5.4.7 بفر کمپوزیشن(Buffer Composition)

5.4.8 چپچپا آخر ligation (Sticky-endLigation)

5.4.9 کند آخر Ligation (Blunt End Ligation)

5.4.10 عمومی ہدایات(General Guidelines)

5.4.11 DNA ligation کے دیگر طریقے
5.5 اکتسابی 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، ریکومبینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی ایک سنگِ 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 ریکومبینٹ ڈی این اے کی تخلیق پر توجہ مرکوز کی گئی ہے، لائگشن والے اینڈونکلیز کا اہم کردار، لنگیشن 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۔

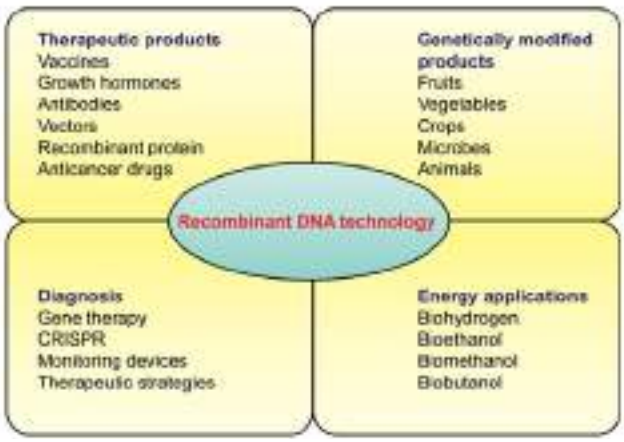
ریکومبینٹ ڈی این اے ٹکنالوجی جینیاتی مواد میں ترمیم کرنے کی ہماری صلاحیت میں ایک مثالی تبدیلی کی نشاندہی کرتی ہے، مختلف ذرائع سے ترتیب کے امتزاج کے ذریعے نئے ڈی این اے مالیکیولز کی تخلیق میں سہولت فراہم کرتی ہے۔ اس کے دل میں ڈی این اے کے ٹکڑوں کا عین مطابق ہیرا پھیری ہے، یہ ایک ایسا عمل ہے جو لائگشن والے اینڈونکلیز کے عمل سے ممکن ہوا ہے۔ یہ مالیکیولر قینچیاں، جو بیکٹیریا 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۔

ریکومبینٹ 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 فاسفوڈیسٹر 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 یا دو

ٹوک انجام سے نمٹنا ہو، سیکھنے والے ٹکڑوں کی اسمبلی کی پیچیدگیوں کے بارے میں بصیرت حاصل کریں گے، جو کہ درستگی 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 ایپلی 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 ابیوٹک / بائیوٹک 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 ریگولیٹری عناصر کے تعارف کے ساتھ ساتھ اینڈوجینس جین کے اظہار کی روک تھام کے ذریعے ہوتی ہے۔ ایک مناسب ویکٹر، جیسا کہ پلاسمڈ، کسی جاندار کے جینوم میں مطلوبہ جین کی ترتیب داخل کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ ریکومبینٹ 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 مائکروجنزم کو ریکومبینٹ پلاسمڈ 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 سٹینلے 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 ریکومبینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کی مدد سے تیار کیے گئے تھے۔ مزید برآں، جیواشم ایندھن کی وجہ سے پیدا ہونے والی آلودگی کو کم کرنے کے لیے جیوایندھن تیار کرنے کے لیے جینیاتی انجینئرنگ کی حکمت عملیوں کا استعمال کیا گیا ہے۔ نئی ویکسین اور دواسازی 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 ایپلی کیشنز کا خلاصہ کرتا ہے۔



شکل5.0جینیاتی انجینئرنگ ٹیکنالوجی کی مختلف اپیلی کیشنز

5.1 مقاصد(Objectives)

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

- ریکومبینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کے تصور کی وضاحت کریں۔
- ریکومبینٹ ڈی این اے کی تشکیل میں شامل مختلف انزائمز کی فہرست بنائیں۔
- ligation کے طریقے، DNA ligases، ligation of fragment with cohesive and blunt ends کی وضاحت کریں۔

5.2 ریکومبینٹ ڈی این اے(Recombinant DNA)

ریکومبینٹ 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 ڈونر ڈی این اے دونوں الگ تھلگ اور لائزوزائمز، سیلولیز، چٹینیس، رائبونیوکلیز، اور پروٹیز کا استعمال کرتے ہوئے پاک

ہوتے ہیں۔

2. ڈی این اے کی سپلائی سنگ(Spilicing of DNA)

صاف شدہ ڈی این اے منتخب لائگشن والے انزائم کے ساتھ تیار کیا جاتا ہے۔لائگشن انزائمز ڈی این اے کاٹتے ہیں۔لائگشن 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 پیلینڈروم کہتے ہیں۔ سر کلر ڈی این اے کھلتا ہے۔ڈونر ڈی این اے کے چپچپا یا مربوط سرے (پوائنٹس جہاں کاٹا گیا تھا) چپچپا 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)

لائگشنا جوڑنے والے انزائم کے استعمال کے بعد دونوں ڈی این اے کے ٹکڑوں میں بننے والے چپچپا سرے تکمیلی ہوتے ہیں۔لہذا، دونوں ڈی این اے کے ٹکڑوں کو ملا کر نیا آر ڈی این اے بنایا جا سکتا 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 فاسفوڈیسٹر ربط 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 ریکومبینٹ DNA مالیکیول بھی کہا جاتا ہے، اور ٹیکنالوجی کو ریکومبینٹ DNA ٹیکنالوجی کہا جاتا ہے۔وہ پروٹین جو ریکومبینٹ ڈی این اے مالیکیولز سے تیار ہوتے ہیں انہیں ریکومبینٹ پروٹین کہا جاتا ہے۔

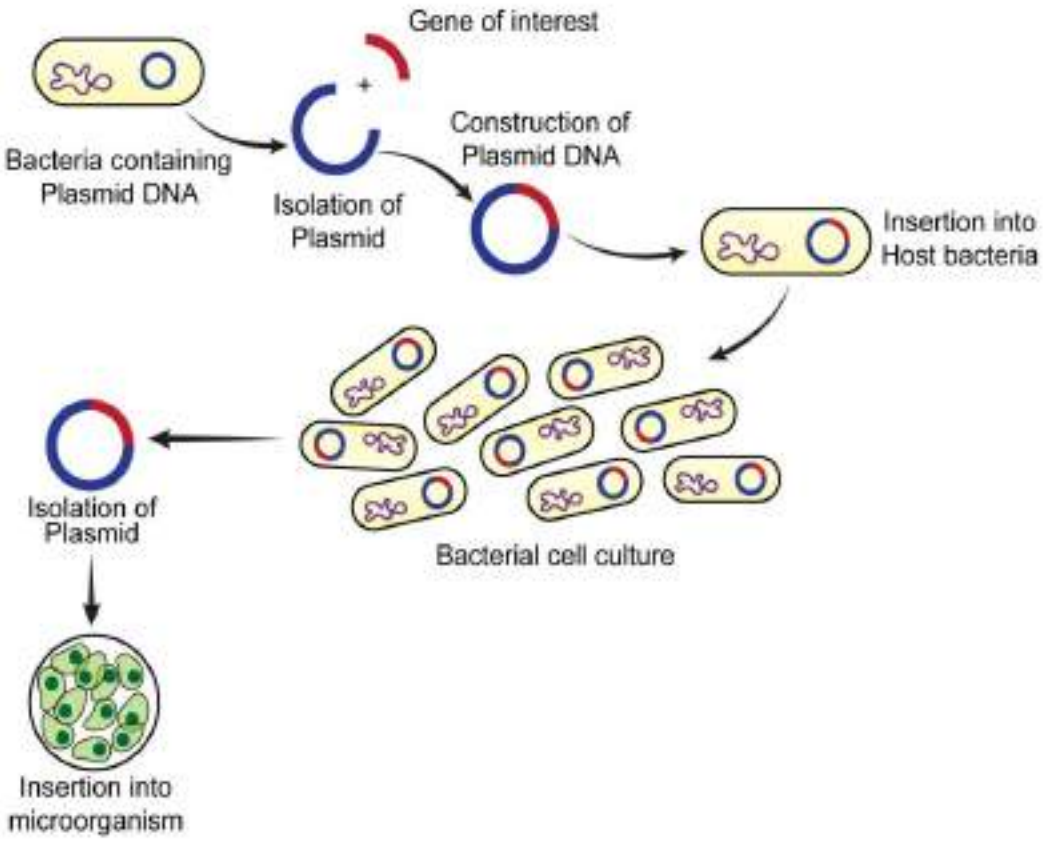
4. تبدیلی(Transformation)

rDNA وصول کنندہ کے میزبان سیل (بیکٹیریل 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۔ پلاسمڈ ویکٹر کا مارکر جین غیر دوبارہ پیدا ہونے والے خلیے سے ریکومبینٹ سیل کو الگ کرنے میں لگایا 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 جا سکتا ہے۔ ایک پی سی آر رد عمل ڈی این اے کی ترتیب کو بڑھا دیتا ہے جسے بلنٹ یا سنگل بیس اوورہینگ ligation کے ذریعے ویکٹر پر لگایا جا سکتا ہے۔

ڈی این اے کی ایک کاپی ڈی این اے کی لاکھوں کاپیاں حاصل کرنے کے لیے استعمال کی جاسکتی ہے۔



شکل 5.1: ریکومبینٹ 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 موروثی بیماریوں کو جنم دیتے ہیں۔
- ریکومبینٹ پروٹینز: 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۔
- 'سپر ویڈز' 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 انجنیئر 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، کلیوتیج پوزیشنز، کوفیکٹر 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 bp-15 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 1000bp دور فاصلہ ہوتا ہے۔ شناخت کی جگہ غیر متناسب ہے اور دو الگ الگ حصوں پر مشتمل ہے، ایک 3-4 نیوکلیوٹائڈز کے ساتھ اور دوسرا 4-5 نیوکلیوٹائڈس کے ساتھ۔ تقریباً 6-8 نیوکلیوٹائڈز 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 (SAM) S adenosylmethionine، ATP، اور میگنیشیم آئنز (Mg2+) 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 کلیوتیج سائٹ کا تعین کرتا ہے، مثال کے طور پر، Eco B.

قسم IIلا ئگشن کاانزائم

یہ انزائم اپنی لا ئگشن والی جگہوں کے قریب یااندر مخصوص مقامات پر کاٹتے ہیں۔پیلینڈ رومک 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 لا ئگشن 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 لا ئگشن کے انزائمز قسم I اور قسم II لا ئگشن کے خامروں کے درمیان ایک پل ہیں۔ یہ انزائمز اسی ڈی این اے کی ترتیب کو پہچانتے اور میتھلیٹ کرتے ہیں لیکن تقریباً 24-26bp دور، یعنی وہ شناخت کی جگہ کے قریب ڈی این اے کو توڑ دیتے ہیں۔ یہ دو ذیلی یونٹس میں تقسیم ہیں۔ ایک DNA (M) subunit کی ترتیب کو پہچانتا اور اس میں ترمیم کرتا ہے، جبکہ دوسرا (R) نیوکلیز کے طور پر کام کرتا ہے۔ ڈی این اے کلیوتیج کے لیے +Mg2، ATP، اور SAM کی موجودگی کی ضرورت ہوتی ہے، مثال کے طور پر، EcoPI۔ قسم IV لا ئگشن والے انزائمز، جیسے McrBC، ہدف میں ترمیم شدہ ڈی این اے جیسے میتھلیٹیڈ، ہائیڈروکسی میتھیلیٹڈ، اور گلوکوسائل-ہائیڈروآکسیمیتھلیٹیڈ ڈی این اے۔ ان کے طرز عمل کی بنیاد پر، لا ئگشن کے خامروں کو دو قسموں میں درجہ بندی کیا گیا ہے:

1) Exonucleases- وہ انزائمز جو DNA یا RNA مالیکیول کے اختتام سے ٹرمینل نیوکلیوٹائڈز 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 (لا ئگشن 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 لا ئگشن endonuclease ایک ترتیب کو تسلیم کرتی ہے اور ملحقہ نیوکلیوٹائڈس 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 ریڑھ کی ہڈی کو دو بار کاٹا جاتا ہے۔ لا ئگشن والے انزائمز پیلینڈروم کی ترتیب کو پہچانتے ہیں، جو کہ 4 سے 8 بیس جوڑوں کی لمبائی میں مختصر ڈی این اے کی ترتیب ہیں۔ پیلینڈرومز ′5 to ′3 سمت میں DNA کے دو تکمیلی اسٹرینڈز پر ایک ہی نیوکلیوٹائڈ تسلسل ہیں۔ مثال کے طور پر، اگر ایک اسٹرینڈ کی ترتیب '5' GAATTC 3 ہے، تو مخالف اسٹرینڈ کی ترتیب '3' CTTAAG 5 ہے۔ جب دونوں اسٹرینڈز کو '5 → ′3 سمت میں پڑھا جاتا ہے، تو ترتیب ایک ہی رہتی ہے۔ پیلینڈروم کو ′5′ GAATTC 3′, 3′ CTTAAG 5 کے طور پر لکھا جاتا ہے مختلف انزائمز DNA میں مختلف اور مخصوص ترتیبوں کو پہچانتے ہیں۔ جب ایک ہی لا ئگشن 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۔ اوورہینگ آسانی سے دوسرے ملتے جلتے سروں سے دوبارہ جوڑتا ہے اور اس طرح اسے "چپچپا سرے" کہا جاتا ہے۔ یہاں تک کہ اگر اوورہینگز 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 نوول ڈی این اے کنسٹرکٹس کی تشکیل میں سہولت فراہم کرتے ہیں۔ دیگر لائگشن والے اینڈونکلیز ایک "بلنٹ اینڈ" پیدا کرتے ہیں، جس کا مطلب ہے کہ ٹکڑوں کے آخر میں کوئی جوڑا نہ بنا ہوا بیس یا اوورہینگز نہیں ہیں۔ چونکہ یہ ڈی این اے کے ٹکڑے ایک دوسرے سے جڑ نہیں سکتے، ان کا کلون بنانا مشکل ہے۔ کچھ انزائمز، کلیوج 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، ہیموفیلس 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 تناؤ RY13، اور I کا مطلب بیکٹیریم میں شناخت کی ترتیب ہے۔ ہند II، پہلا لائگشن والا اینڈونکلیز انزائم، 1970 میں ہیموفیلس انفلوئنزا Rd سٹرین II سے الگ تھلگ کیا گیا تھا۔ ڈینیئل ناتھنز، ورنر آربر، اور ہیملٹن او اسمتھ نے 1978 میں الگ تھلگ 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 جا سکتا 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 اوورہینگس 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 جا سکتا ہے۔ • لائگشن کے انزائمز کو خاص طور پر جین ایلیلس کو الگ کرنے کے لیے بھی استعمال کیا جا سکتا ہے۔ • ڈی این اے میں واحد بنیادی تبدیلیوں کو تسلیم کرنا، جسے سنگل نیوکلیوٹائڈ 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 تناؤ 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

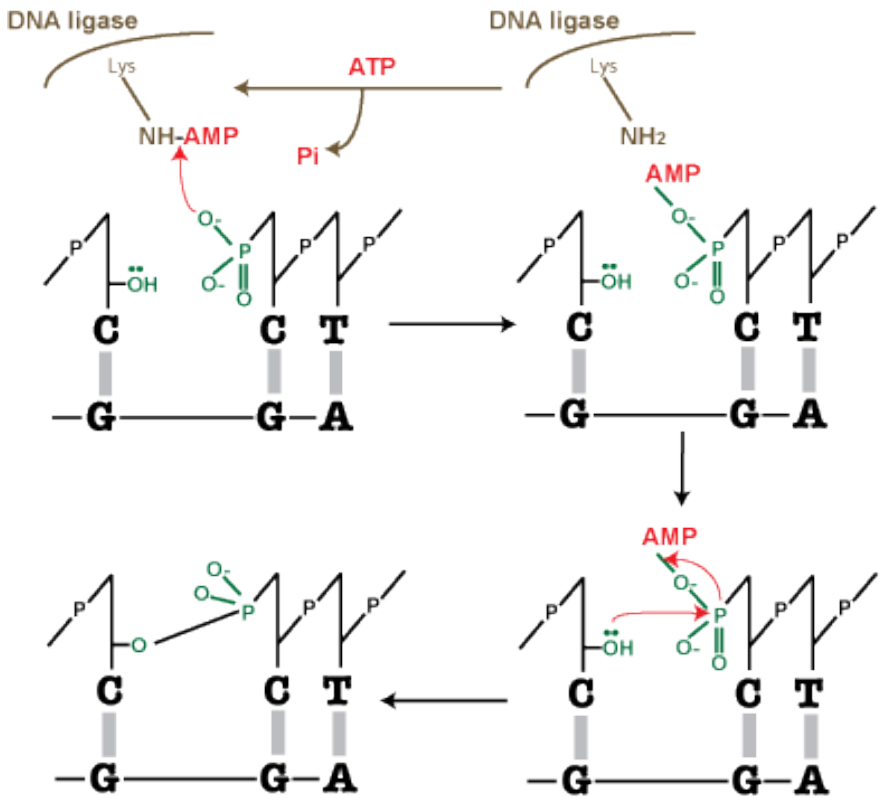
DNA ligation کے رد عمل کے خود دو بنیادی مراحل ہوتے ہیں۔

1. سب سے پہلے ڈی این اے کے سروں کو اتفاق سے ٹکرانا 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 نیوکلیوٹائڈس کے درمیان ہائیڈروجن بانڈنگ کو مستحکم کرتا ہے، جو واقعی چیزوں کو جگہ پر رکھنے میں مدد کرتا ہے۔

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

i. سب سے پہلے، AMP نیوکلیوٹائڈ، جو انزائم کی فعال جگہ میں لائسن کی باقیات سے منسلک ہے، 5′-فاسفیٹ میں منتقل کیا جاتا ہے۔

ii. پھر AMP-فاسفیٹ بانڈ پر 3′-OH سے حملہ کیا جاتا ہے، covalent بانڈ بناتا ہے اور AMP کو جاری کرتا ہے۔ اینزائم کو مزید رد عمل کرنے کی اجازت دینے کے لیے اینزائم کی فعال سائٹ میں موجود AMP کو ATP کے ذریعے بھرنا ضروری ہے۔



5.4.1 لائگیشن(Ligation)

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

لیبارٹری میں ligationعام طور پر T4 DNA ligaseکا استعمال کرتے ہوئے انجام دیا جاتا ہے، تاہم، معیاری DNA ligaseکے استعمال کے بغیر ligationکے طریقہ کار بھی مقبول ہیں۔

5.4.2 لیگیشن رد عمل(Ligation Reaction)

ligationکے رد عمل کا طریقہ کار سب سے پہلے I. Robert Lehmanکی لیبارٹری میں واضح کیا گیا تھا۔

DNA ligase سب سے پہلے ATP یاNAD+ کے ساتھ رد عمل ظاہر کرتا ہے، AMP کے ساتھ ایک ligase-AMP انٹرمیڈیٹ بناتا ہے جو کہ ایک فاسفومائیڈ بانڈ کے ذریعے ligaseکی فعال سائٹ میں لائسین کے ε-امینو گروپ سے منسلک ہوتا ہے۔ یہ ایڈنائلل گروپ پھر فاسفیٹ 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 فاسفوڈیسٹر بانڈ دوسرے کے فعال 5'-فاسفوریل گروپ پر ڈی این اے اسٹرینڈ کے آخر میں 3'-ہائیڈروکسیل کے نیوکلیوفیلک حملے کے ذریعے بنتا ہے۔

ڈی این اے میں ایک نک /nick(یعنی ڈبل پھنسے ہوئے ڈی این اے کے ایک اسٹرینڈ میں وقفہ) کو لیگیس کے ذریعے بہت مؤثر طریقے سے ٹھیک کیا جا سکتا ہے۔ تاہم، ligationکی ایک پیچیدہ خصوصیت اپنے آپ کو اس وقت پیش کرتی ہے جب دو الگ الگ ڈی این اے کے سروں کو باندھتے ہیں کیونکہ ligationکے رد عمل کو آگے بڑھنے سے پہلے دونوں سروں کو ایک ساتھ آنے کی ضرورت ہوتی ہے۔ چپچپا یا مربوط سروں کے ساتھ ڈی این اے کے بندھن میں، ڈی این اے کے پھیلے ہوئے تاروں کو پہلے ہی ایک ساتھ جوڑا جا سکتا ہے، اس لیے یہ نسبتاً موثر عمل ہے کیونکہ یہ ڈی این اے میں دونکوں 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 موثر ہے عمل۔

E. coli سے DNA ligase blunt-ended DNAکو 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 فیج 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)

$Mg^{(+2)}$ کیٹالیسس کے لیے ایک کوفیکٹر 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 ایڈنائلیلیٹڈ ڈی این اے انٹرمیڈیٹ محلول میں رہتا ہے۔ انزائم کی اس طرح کی LIG1 adenylylation کی Achilles کی ہیل کے adenylylated DNA انٹرمیڈیٹ موازنہ کو دوبارہ بائنڈنگ 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۔

- اعلی 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 انٹر مولیکیولر یا انٹر مولیکولر رد عمل پسند کیا جاتا ہے۔
- ڈی این اے کے ارتکاز کو مصنوعی طور پر کنڈینسنگ ایجنٹوں جیسے کوبالٹ ہیکسامین اور بائیوجینک پولی امائنز جیسے اسپرمائڈائن کو شامل کر کے یا پولیتھیلین گلائکول (پی ای جی) جیسے کراؤڈنگ ایجنٹس کا استعمال کر کے مصنوعی طور پر بڑھایا جا سکتا ہے جو انزائمز 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 چپچپا end ligation کے مقابلے میں بہت کم موثر ہے، لہذا ligase کی زیادہ ارتکاز کو بلنٹ 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 (Temprature 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 (Tm) 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، Tm 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 اسٹیکنگ 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 Tm 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 Tm 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°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°C، کمرے کا درجہ حرارت، منتخب کرتے ہیں، یا 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 mM) کے زیادہ ارتکاز پر بھی تقریباً مکمل طور پر روکا جا سکتا ہے۔ ligation کے لیے استعمال ہونے والے معیاری بفر کو ionic اثرات کو کم کرنے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے۔

5.4.8 چپچپا آخر ligation (Sticky-endLigation)

- ❖ 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 سٹرینڈ اوور ہینگ تیار کرتے ہیں جسے چپچپا یا مربوط اختتام کہتے ہیں۔
- ❖ یہ چپکنے والے سرے دوسرے ہم آہنگ سروں سے جڑ سکتے ہیں اور چپکنے والے سرے (یا ہم آہنگی والے سرے) میں بندھے ہو سکتے ہیں۔ مثال کے طور پر EcoRI ایک AATT اینڈ تیار کرتا ہے۔
- ❖ پلاسمڈ 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 دشاتمک 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 سرکلرائزڈ ویکٹر ڈی این اے کے اعلی 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 جا سکتا ہے۔ ڈیفاسفوریلیشن عام طور پر بچھڑے 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 چاہئے اور صرف اس وقت استعمال کیا جانا چاہئے جب ضروری ہو۔ جھینگا الکلائن فاسفیٹیس (SAP) یا انٹارکٹک فاسفیٹیس (AP) مناسب متبادل ہیں کیونکہ انہیں آسانی سے غیر فعال کیا جا سکتا ہے۔

5.4.9 کند آخر Ligation (Blunt End Ligation)

- بلنٹ 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 جا سکتا ہے۔
- Blunt ends پابندی والے خامروں جیسے SmaI اور EcoRV سے پیدا ہو سکتے ہیں۔
- بلنٹ اینڈ کلوننگ کا ایک بڑا فائدہ یہ ہے کہ مطلوبہ انسرٹ 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 جا سکتا ہے۔ پابندی ڈائجسٹ سے پیدا ہونے والے دو ٹوک ویکٹر میں
- Blunt-end ligation، تاہم، سٹکی اینڈ ligation کے مقابلے میں بہت کم موثر ہے، عام طور پر رد عمل سٹکی 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 سٹکی اینڈ ligation (x10 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 جا سکتا 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 جا سکے۔ یہ CIAP کا استعمال کرتے ہوئے کیا جا سکتا 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 الٹا روکا 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 پراپرٹی کو TA کلوننگ میں استعمال کیا جا سکتا ہے جہاں PCR پروڈکٹ کے سرے کسی ویکٹر کے T سرے سے منسلک ہو سکتے ہیں۔ TA ligation لہذا چپچپا اختتامی ligation کی ایک شکل ہے۔ ٹرمینل ٹرانسفراز کا استعمال کرتے ہوئے بلنٹ اینڈ ویکٹر کو TA ligation کے لیے dideoxythymidine triphosphate (ddTTP) کے ساتھ ویکٹر میں تبدیل کیا جا سکتا ہے۔

5.4.10 عمومی ہدایات(General Guidelines)

سر کلر 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 جا سکتا ہے، اور دیگر تناسب استعمال کیے جا سکتے 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 لچک کی کمی ہو سکتی ہے۔

❖ Topoisomerase-mediated ligation

ligation کے لیے ligase کے بجائے Topoisomerase کا استعمال کیا جا سکتا ہے، اور کلوننگ زیادہ تیزی سے بغیر ویکٹر کے ڈائجسٹ یا انسرٹ کی پابندی کی ضرورت کے بغیر کی جا سکتی ہے۔ اس ٹوپو کلوننگ کے طریقہ کار میں ایک لکیری ویکٹر ٹوپوسومیریز 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 سر کلر ویکٹر بنتا ہے۔

❖ ہومولوگس دوبارہ ملاپ(Homologous recombination)

لیگیس کے استعمال کے بغیر کلوننگ کا ایک اور طریقہ ڈی این اے ری کمبینیشن 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 جا سکتا ہے۔

5.5 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس یونٹ کو مکمل کرنے کے بعد، اب آپ اس قابل ہو گیے ہے کہ :

- ریکومبینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کے تصور کی وضاحت کریں۔
- ریکومبینٹ ڈی این اے کی تشکیل میں شامل مختلف انزائمز کی فہرست بنائیں؛۔
- *ligation* کے طریقے، *DNA ligases*، *ligation of fragment with cohesive and blunt ends* کی وضاحت کریں

5.6 کلیدی الفاظ (Keywords)

بند سی انزائمز	Resttriction Enzyme	پابندی والے انزائمز یہ ہیں: "بیکٹیریا 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	Cohesive	"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 تنہائی کا بنیادی مقصد _____ اور ڈونر DNA دونوں کے خالص نمونے حاصل کرنا ہے۔
4. ریکومبینٹ ڈی این اے ٹکنالوجی میں تبدیلی میں ایک _____ میزبان سیل میں ریکومبینٹ ڈی این اے کا اندراج شامل ہے۔
5. وٹرو میں ڈی این اے کے ٹکڑوں کو بڑھانے کے لیے استعمال ہونے والا انزائم _____ کہلاتا 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 انکیوبیشن 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. ریکومبینینٹ ڈی این اے ٹکنالوجی 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 ریکومبینینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کی اہمیت اور زراعت اور خوراک کی پیداوار پر اس کے اثرات پر تبادلہ خیال کریں۔
2. ریکومبینینٹ ڈی این اے ٹکنالوجی میں ڈی این اے کو الگ کرنے کے عمل کی وضاحت کریں، بشمول پابندی کے خامروں اور ڈی این اے لیگیس کا کردار۔
3. طب کے میدان میں ریکومبینینٹ 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 ریکومبینینٹ 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	ریکومبینٹ 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 سپلیسنگ	-	ڈی این اے کے ٹکڑوں کو مختلف ذرائع سے کاٹنے اور ان میں شامل ہونے کا عمل دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے مالیکیولز کو بنانے کے لیے۔
Ligation	ڈارون کے فنچز	ڈارون کے فنچز	لیگیشن: ڈی این اے کے ٹکڑوں کو ایک ساتھ جوڑنے کا عمل ڈی این اے لیگیس انزائم کا استعمال کرتے ہوئے دوبارہ پیدا ہونے والے ڈی این اے مالیکیولز 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(Characteristics of Plasmid)

6.4 بیکٹیریوفیج(Bacteriophage)

6.5 فیجمڈ(Phagemids)

6.6 کاسمیڈس(Cosmids)

6.7 M13ویکٹر(M 13 vector)

6.8 بیکٹیریل مصنوعی کروموسوم(Bacteria Artificial Chromosome)

6.9 خمیر ویکٹر(Yeast Vector)

6.9.1 شٹل ویکٹر(Shuttle Vector)

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۔ آیئے کلیدی کلوننگ ویکٹرز 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 ورسٹائل 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 ہائبرڈ ویکٹر ہیں جو پلازمیڈ اور بیکٹیریوفیجز 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 بیکٹیریوفیجز 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۔

لیمبڈا بیکٹیریوفیج: لیمبڈا فیج ایک بیکٹیریل وائرس ہے جو ایسچریچیا کولی سیلز 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 میوٹیجینیسیس 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 اعلی صلاحیت ہے، جو انہیں پورے جینومک علاقوں کی کلوننگ اور جینومک لائبریریوں کی تعمیر کے لیے موزوں بناتے ہیں۔

YAC (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 یوکرائیوٹک ڈی این اے کے ٹکڑوں کی کلوننگ اور ہیرا پھیری کے لیے استعمال ہوتے ہیں، بشمول پورے جینز اور جین کلسٹرز۔

MAC (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 ایپلی 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 لچک 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، بائیوٹیکنالوجی، 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:

- ریکومبینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی میں کلوننگ ویکٹر کے کردار کی وضاحت کریں اور کلوننگ ویکٹر کی مختلف اقسام کے درمیان فرق کریں، بشمول پلازمڈ، کاسمیڈ، فیجمڈ، لیمبڈا بیکٹیریوفیجز، M13 فیج، BACs، YACs، اور MACs۔
- مختلف کلوننگ ویکٹرز کی خصوصیات اور ایپلی 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 فزیبلٹی 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 جا سکتا ہے۔ پلاسمڈ، بیکٹیریوفیج، کاسمیڈ، 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 جا سکتا 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۔

ریکومبینینٹ 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۔ پلازمیڈ، کاسمیڈ، 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 انیشیشن سیکوینس، ایک ٹرانسلیشن انیشیشن سیکوینس، وغیرہ پر مشتمل ہے۔ مزید برآں، پلاسمڈ ایک ایکسپریشن ویکٹر کے طور پر کام کرتا ہے۔ کلوننگ ویکٹر اور ایکسپریشن 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 جا سکتا ہے۔ یہ ویکٹر یوکریوٹس اور پروکیریٹس دونوں پر لاگو ہوتے ہیں۔ ان ویکٹروں کا بنیادی فائدہ یہ ہے کہ انہیں E میں تبدیل کیا جا سکتا 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 جا سکتا 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 سینٹرومیر (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 فیچر	مثال
پلازمڈ	*E.coli*	10 kb ڈی این اے ٹکڑا تک.	خود نقل کرنے والا، اعلی کاپی نمبر، اور مالک اینٹی بائیوٹک کے خلاف مزاحمت کرنے والے جین.	پی بی آر 322، پی یو سی 18، ایف-پلاسمیڈ
بیکٹیریوفیج	*E.coli*	30 kb تک سائز کا ٹکڑا	یہ غیر ملکی ڈی این اے کے بہت بڑے ٹکڑوں کو قبول کر سکتا ہے.	Phage λ, M13 فیج
Phagemid		سائز کا ٹکڑا جس کی حد 100- to 300-kb تک	ان کے پاس متعدد کلوننگ سائٹس اور ایک انڈیسیبل لیک جین پروموٹر ہے۔	pEMBL, pBluescript پلاسمیڈ
بیکٹیریا مصنوعی کروموسومز (بی اے سی)	*E.coli*	150 to 300 تک کے سائز کے ٹکڑے kb.	اینٹی بائیوٹک مزاحمت جین جیسے مقامات کی طرح مارکر اور نقل (اوری) کی ایک بہت مستحکم اصل. وہ ڈی این اے کے بہت بڑے ٹکڑے رکھ سکتے ہیں	

P1-اخذ شدہ مصنوعی کروموسومز (پی اے سی)	*E.coli*	سائز کا ٹکڑا جس کی حد 100- 300kb	یہ ایک ڈی این اے ساخت ہے جس سے اخذ کیا گیا ہے پی 1 بیکٹیریوفیوز کا ڈی این اے اور بیکٹیریل مصنوعی کروموسومز. یہ بڑے ڈی این اے سیکونس لے جاسکتا ہے.	
خمیر مصنوعی کروموسومز (وائی اے سی)	*Saccharomyces cerevisiae*	ٹکڑوں سے لے کر 2000kb سے 200kb	یہ جینوم کی نقشہ سازی اور ترتیب میں استعمال ہوتا ہے۔	
Cosmids		تقریباً 40 kb تک کے داخل	وہ اس قابل ہیں بیکٹیریوفیج ڈی این اے کو شامل کرنا ٹکڑا.	کرنل کوسمیڈ، پی ایچ سی 79، پی جے بی 8، پی ڈبلیو ای کوسمیڈ، سی 2 آر بی
انسان مصنوعی کروموسوم (ایچ اے سی)	مہذب انسانی خلیات	ٹکڑے کا سائز >2000kb	نئے جینوں کی منتقلی، ان کے اظہار اور کروموسومل فنکشن 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 (پروکیریوٹک/یوکاریوٹک)، سائز، اور ڈی این اے کی قسم (چھوٹے/بڑے ٹکڑے) پر بھی منحصر ہے۔ پروکاریوٹک ویکٹرز میں پلاسمیڈز، بیکٹیریوفیجز، فیجمڈز اور فوسمیڈز شامل ہیں۔ یوکرائیوٹک ویکٹر خمیر، جانوروں اور پودوں کے خلیات پر مشتمل ہوتے ہیں۔

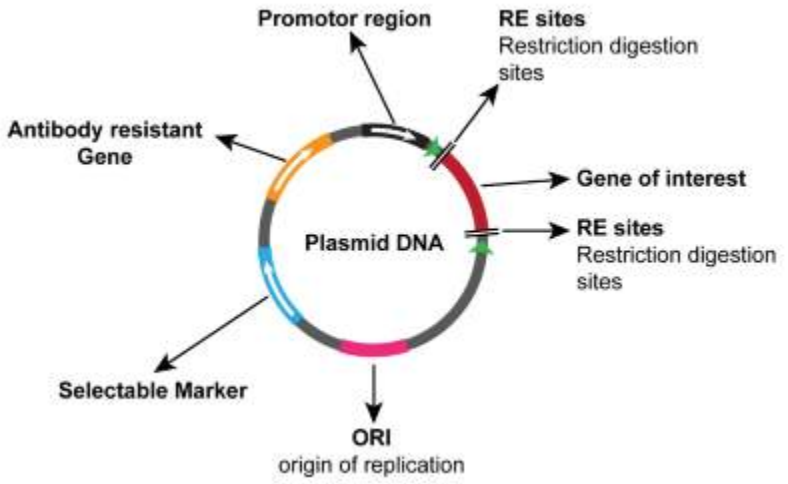
6.3.1 پلاسمڈ (Plasmid)

پلاسمیڈز خود نقل کرنے والے، دوہرے پھنسے ہوئے، سرکلر DNA مالیکیولز ہیں جو بیکٹیریا میں پائے جاتے ہیں جو ایکسٹرا کروموسومل ہستی ہیں۔ پلازمیڈز کا سائز تقریباً <1kb سے >500kb ہے، یہ سنگل یا ملٹی کاپی پلاسمیڈ 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)۔ پلازمیڈ نسبتاً بڑے (100bp سے 10kbp) غیر ملکی DNA کے ٹکڑوں کو کلون کر سکتا ہے۔ pSC101, pSF2124, pSC101, pSF2124, Col E1، وغیرہ سب سے بنیادی کلوننگ ویکٹر ہیں جو دوبارہ پیدا ہونے والی DNA ٹیکنالوجی میں استعمال ہوتے ہیں۔

قدرتی طور پر پائے جانے والے پلازمیڈ 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

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

جب کسی ویکٹر کا نام لیتے ہیں، مثال کے طور پر، "pBR322"، "p" 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۔ کولی اور امپیسلن اور ٹیٹراسائکلین کے لیے اینٹی بائیوٹک 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. میسنگ 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 پر وموٹر سے متعلق ہیں۔ ایسی ہی ایک جوڑی ہے pUC 8 اور 9



شکل 6.1: مختلف خطوں پر مشتمل پلاسمڈ کی اسکیمیٹک نمائندگی

6.3.2 پلازمیڈ کی خصوصیات (Characteristics of Plasmid)

1. عام طور پر سائز میں چھوٹا (<10 kb)
2. اسے صاف کرنا اور ہینڈل کرنا آسان ہے۔
3. دو اینٹی بائیوٹک مزاحمتی جین (AmpR اور TetR) بنائیں جو تبدیل شدہ یا دوبارہ پیدا ہونے والے خلیوں کے انتخاب میں مدد کرتے ہیں (تصویر 6.1)۔
4. ایک اعلیٰ کاپی نمبر دکھائیں۔ مثال کے طور پر، ایک تبدیل شدہ *E. coli* سیل میں 15 مالیکیول ہوتے ہیں، لیکن کلورامفینیکول کی موجودگی میں پلاسمڈ امپلیفیکیشن کے ذریعے کاپی نمبر کو 1000-3000 تک بڑھایا جا سکتا ہے۔

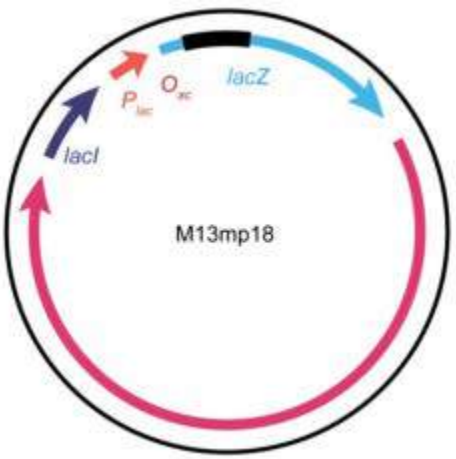
6.4 بیکٹیریوفیج(Bacteriophage)

کلوننگ ویکٹر کا ایک اور ذریعہ بیکٹیریوفیج ہے۔ فیز 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 فیج پارٹیکل (تصویر 6.2) بناتے ہیں۔ چونکہ فیج ہیڈ کی صلاحیت محدود ہے، اس میں صرف تھوڑی مقدار میں غیر ملکی ڈی این اے ڈالا جا سکتا ہے۔ فیج استعمال کرنے سے پہلے، ڈی این اے کے وہ حصے جن میں ضروری جین نہیں ہوتے ہیں، عام طور پر ہٹا دیے جاتے ہیں۔ فیج 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 بیکٹیریوفیج لیمبڈا ڈی این اے کی وجہ سے اسے Vivo میں وائرس کے ذرات میں پیک کرنے کی اجازت دیتا ہے۔ ویوو پیکیجنگ میں لیمبڈا جینوم کے کل سائز (kb48.5) سے ڈی این اے مالیکیولز کے انتخاب میں مدد کرتا ہے۔ نتیجے کے طور پر، ایک لیمبڈا کلوننگ ویکٹر غیر ضروری علاقے کے ایک حصے کو ہٹا کر (پابندی کو حذف کرنا) بنایا جا سکتا ہے۔ غیر ضروری خطے میں، غیر ملکی ڈی این اے کے ایک حصے کو ایک انوکھی پابندی والی جگہ پر کلون کیا جا سکتا ہے۔ یہ ویکٹر 'انسرشن 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

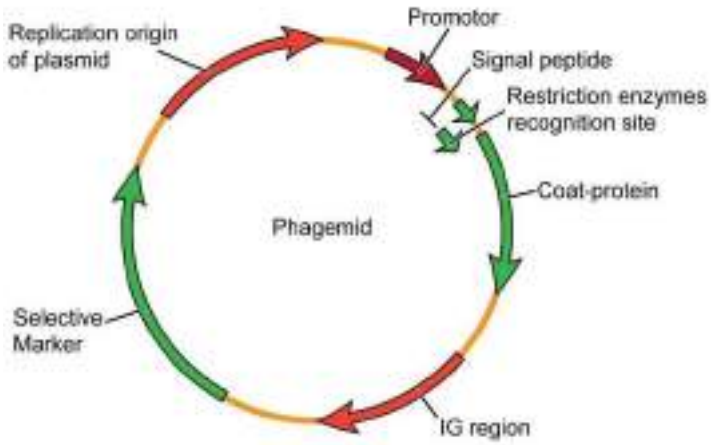
لیمبڈا جینوم کو فیز ہیڈ کے اندر پیک کیا جاتا ہے جسے 'ہیڈ فل میکانزم' کہا جاتا ہے۔ اس کا مطلب ہے فیج ہیڈ کے اندر پیک کیے گئے ڈی این اے کی مقدار کی اوپری حد



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

6.5 فیجمڈ(Phagemids)

یہ ایک کلوننگ ویکٹر ہے جو فلیمینٹس فیز M13 کو پلازمیڈ کے ساتھ ملا کر ایک ایسا ویکٹر بناتا ہے جو دونوں پلاسمڈ کے طور پر بڑھ سکتا ہے اور اسے وائرل ذرات میں سنگل سٹرینڈ ڈی این اے کے طور پر پیک کیا جا سکتا ہے (شکل 6.3). فیجمڈ پلاسمڈ اور کوسیفیج دونوں کی نقل کی اصل پر مشتمل ہے۔ پی بلیو اسکرپٹ ویکٹر ایک عام فجیمڈ ویکٹر ہے۔ pBluescript phagemids کی اصلیت *E. coli* (pMB9-like) اور filamentous phage f1 دونوں ہیں۔ pBluescript II KS 2691 بیس جوڑے لمبا ہے اور pUC19 سے اترا ہے



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

6.6 کاسمیڈس(Cosmids)

کاسمیڈ ویکٹر پلاسمڈ اور بیکٹیریوفیج 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 لیمبڈا مرحلے میں پیک کرنے کے قابل بناتی ہیں (شکل 6.4)۔ Cosmids وٹرو میں فیز ڈی این اے کو فیز پارٹیکلز میں پیک کرنے کی اجازت دیتے ہیں۔ کاسمیڈ ویکٹر پہلی بار 1978 میں جے کولنز اور ساتھی کارکنوں نے تیار کیا تھا تاکہ پلازمیڈ سے بڑے ڈی این اے کے ٹکڑوں کی کلوننگ کی سہولت فراہم کی جا سکے۔ عام طور پر استعمال ہونے والے کاسمیڈ کی ایک مثال pHV79 ہے pBR322۔ اس میں مربوط اختتامی سائٹ λ cos ہے، جس میں 45kb سائز کے اندراجات شامل ہیں۔

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

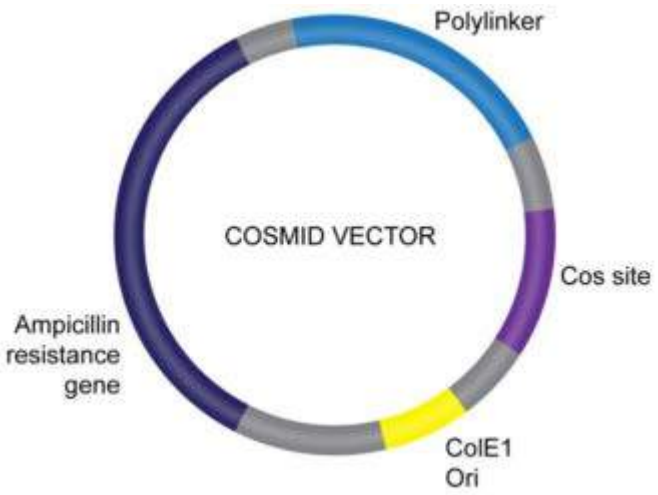
چھ الگ الگ سائٹس (ہنڈIII، PstI، Sail، BamHI، SmaI، اور EcoRI) کے ساتھ کلوننگ کی ترتیب، DNA کی نقل (ori)، اور ایک (TetR) tetracycline resistance جین۔ اس برہمانڈی میں تقریباً 40kb کلون شدہ DNA ہوتا

ہے۔

فیج کی پیکنگ کے دوران کوس اینڈ کلیو ہو جاتے ہیں۔ نتیجے کے طور پر، cos ends بیس پیئر بیکٹیریا کے اندر ایک سرکلر DNA مالیکیول بناتا ہے۔ یہ سرکلر فارم مستحکم ہے، لہذا کلون شدہ ڈی این اے کو پلاسمڈ-انسرٹ ڈی این اے کی تعمیر کے طور پر برقرار رکھا جا سکتا ہے۔

کاسمیڈ ویکٹر استعمال کرنے کے فوائد یہ ہیں۔

- ❖ سالماتی سطح پر برقرار جین اور ربط کا مطالعہ کیا جا سکتا ہے۔
- ❖ ان میں پلازمیڈز کے مقابلے میں تبدیلی کی اعلی تعدد ہوتی ہے۔
- ❖ کاسمیڈز ایک لکیری پلاسمڈ ڈی این اے کو بیکٹیریو فیج کے ڈی این اے کے ٹکڑوں کے ساتھ جوڑ کر بنائے جاتے ہیں جن کے کوس اینڈ ہوتے ہیں۔ مثال کے طور پر، 85kbp کا DNA P1 فیج کے سر میں 115kbp کے جینوم سائز کے ساتھ پیک کیا جا سکتا ہے۔
- ❖ یہ کاسمیڈز بیکٹیریا میں بڑے جینز اور جین کلسٹرز کو کلون کرنے میں مدد کرتے ہیں۔
- ❖ کاسمیڈز حیاتیات کے جینوم میں نان سینس تسلسل کے مطالعہ میں مدد کرتے ہیں۔



شکل 6.4: کاسمڈ ویکٹر کی خاکہ نما نمائندگی

6.7 M13 ویکٹر (M 13 vector)

M13 ویکٹر کلوننگ ویکٹر کی ایک قسم ہے جو M13 بیکٹیریو فیج 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 سٹرینڈڈ ڈی این اے (ssDNA) کی ترتیب کے لیے، سائٹ سے ڈائریکٹڈ mutagenesis، اور دیگر جینیاتی انجینئرنگ تکنیکوں کے لیے۔ یہاں M13 ویکٹرز کا تفصیلی جائزہ ہے:

1. ساخت: M13 بیکٹیریو فیج 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 نیوکلیوٹائڈز 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 بیکٹیریوفیجز 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 انٹرمیڈیٹ 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 پروجنی 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 انجنیئر کیا جا سکتا 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 فیج جینوم میں داخل کرنے کی اجازت دیتا ہے۔

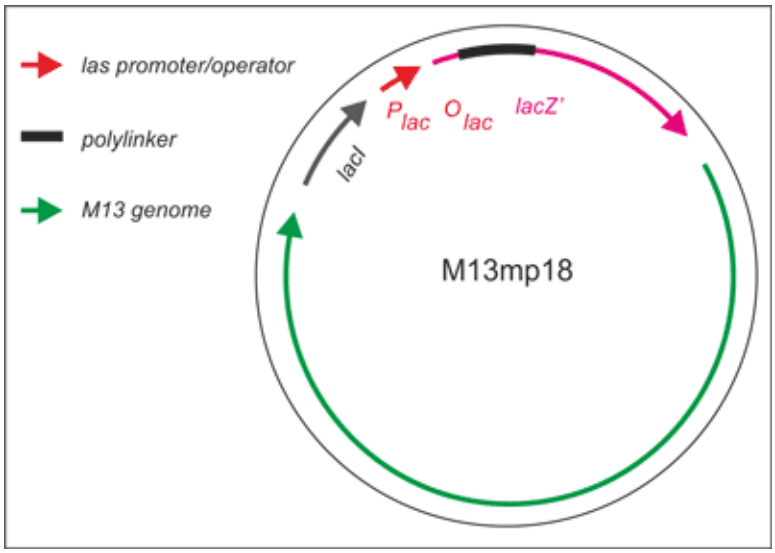
4. سنگل سٹرینڈڈ ڈی این اے پروڈکشن: M13 ویکٹرز کی ایک اہم خصوصیت ان کی سنگل سٹرینڈڈ ڈی این اے (ssDNA) پیدا کرنے کی صلاحیت ہے۔ یہ مطلوبہ DNA داخل کرنے والے ریکومبینینٹ M13 فیز کے ساتھ E. کولی کے خلیوں کو متاثر کر کے حاصل کیا جاتا ہے۔ نقل کے دوران، فیز ڈبل سٹرینڈڈ DNA (dsDNA) اور تکمیلی سنگل سٹرینڈ DNA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

5. ترتیب اور سائٹ کی طرف سے ہدایت شدہ Mutagenesis: M13 ویکٹرز 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 نیوکلیوٹائڈ ترتیب کا تعین کر سکتے ہیں۔ مزید برآں، M13 ویکٹرز کا استعمال سائٹ پر مبنی mutagenesis تجربات کے لیے کیا جاتا ہے، جہاں مخصوص نیوکلیوٹائڈ تبدیلیوں کو کلون شدہ DNA ترتیب میں متعارف کرایا جا سکتا ہے۔

6. Phagemid ویکٹر: ssDNA کی پیداوار کی کارکردگی کو بڑھانے کے لیے، M13 ویکٹر کو فیجمڈ کے طور پر انجینئر کیا جا سکتا ہے۔ Phagemids ہائبرڈ ویکٹر ہیں جو پلاسمڈ اور بیکٹیریوفیجز دونوں سے اخذ کردہ ترتیب پر مشتمل ہیں۔ وہ میزبان سیل کے اندر پلاسمڈ کے طور پر نقل کرتے ہیں لیکن مددگار فیج کو انفیکشن کے ذریعہ ssDNA پیدا کرنے کے لئے آمادہ کیا جا سکتا ہے۔ Phagemid ویکٹر روایتی M13 ویکٹر کے مقابلے 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 سٹرینڈڈ ڈی این اے کی تیاری اور

مختلف جینیاتی انجینئرنگ ایپلی 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۔



شکل6.5:M13فیج ویکٹر کی خاکہ نما 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 ایپلی 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 پرجاتیوں سے۔ وہ عام طور پر سرکلر ڈی این اے مالیکیول 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 روکتا 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 ریسٹریکشن اینزائم ریکگنیشن کی ترتیب ان کی

ساخت کے اندر ہوتی ہے۔ یہ سائٹیں محققین کو کلوننگ اور ہیرا پھیری کے لیے BAC میں بڑے DNA کے ٹکڑے داخل کرنے کی اجازت دیتی ہیں۔

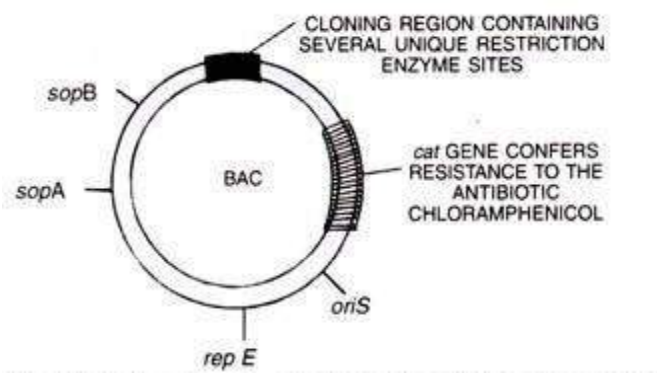
2. سائز اور استحکام داخل کریں: BACs کی وضاحتی خصوصیات میں سے ایک یہ ہے کہ وہ 100 سے 300 کلوبیس (kb) یا اس سے زیادہ کے بڑے DNA داخلوں کو ایڈجسٹ کرنے کی صلاحیت ہے۔ یہ انہیں بڑے جینومک خطوں کی کلوننگ اور مطالعہ کرنے کے لیے مثالی بناتا ہے، بشمول پورے جین، جین کلسٹرز، اور ریگولیٹری عناصر۔ BACs کو ان کے استحکام 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 کرکے، 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 جا سکتا 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 ورسٹائل اور طاقتور ٹولز ہیں، جو کلوننگ، ہیرا پھیری، اور بڑے ڈی این اے کے ٹکڑوں کی اعلی 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 نما نمائندگی۔

6.9 خمیر ویکٹر(Yeast Vector)

زیادہ تر خمیری تناؤ میں موجود ایک پلازمیڈ(*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 اعلی کاپی نمبر ویکٹر ہیں جو *E. coli* میں نقل کر سکتے ہیں۔
3. یہ سب دوبارہ پیدا کرنے والوں کو منتخب کرنے کے لیے مارکر استعمال کرتے ہیں۔

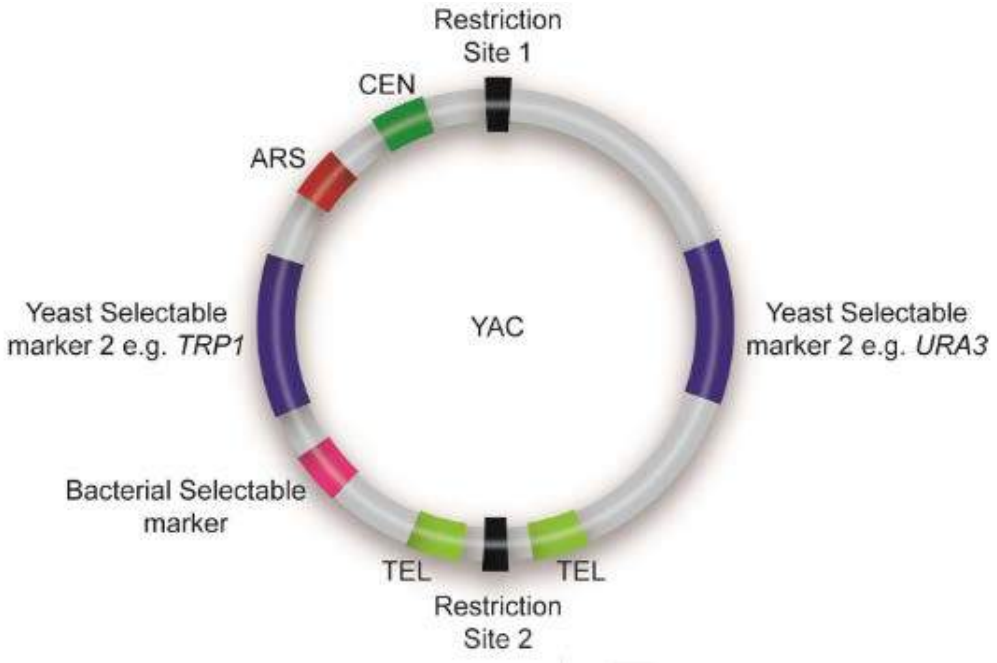
کلوننگ کے زیادہ تر تجربات *E. coli* کے ساتھ بطور میزبان کیے جاتے ہیں۔ کئی کلوننگ ویکٹروں کو جینیاتی عناصر کے ساتھ ڈیزائن کیا گیا ہے جو غیر ملکی جینوں کے اظہار کی اجازت دیتے ہیں۔ ان عناصر میں عام طور پر نقل اور ترجمہ شروع کرنے کے اشارے شامل ہوتے ہیں۔ پلازمیڈ اور بیکٹیریوفیج کلوننگ ویکٹرز کو انفرادی جینز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

6.9.1 شٹل ویکٹر(Shuttle Vector)

ویکٹرز کو دو پرجاتیوں 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۔

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 پلاسمڈ میں خمیر کے بہت سے جین داخل کیے گئے ہیں۔ URA3 اور TRP1 دونوں جینز کو بالترتیب YIP اور YRp7 کے لیے قابل انتخاب مارکر 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 جا سکے جسے CEN4 کہا جاتا ہے، جو کروموسوم 4 کے سینٹرومیر 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 آجاتے ہیں، تو یہ ٹیلومیر کی نشوونما کے نقطہ آغاز کے طور پر کام کرتے ہیں۔ pYAC3 کا جزو: SUP4، نیا ڈی این اے داخل کرنے کے لیے کلوننگ کے دوران استعمال ہونے والا سلیکٹ ایبل مارکر ہے۔ شکل YAC6.6 کو ویکٹر کے طور پر استعمال کرتے ہوئے کلوننگ کی حکمت عملیوں کی وضاحت کرے گی۔



شکل6.6: خمیر مصنوعی کروموسوم(YAC)

YACsکے 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 ہو گا۔

✶ 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 اوری کو سیلولر ریپلیکیشن مشینری کے ذریعے پہچانا جاتا ہے، جو MAC کو میزبان سیل کے کروموسوم کے ساتھ نقل کرنے کے قابل بناتا ہے۔

● سینٹرومیر: MAC ویکٹر میں اکثر فعال سینٹرومیر کی ترتیب شامل ہوتی ہے۔ سیل کی تقسیم کے دوران کروموسوم کی مناسب علیحدگی کے لیے سینٹرومیر 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 ٹیلومیر کی ترتیب پر مشتمل ہو سکتے ہیں۔

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

3. درخواستیں:

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

● فنکشنل جینومکس: MAC ویکٹر ممالیہ خلیوں میں فنکشنل جینومکس 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 ویکٹرز کو انجینئر کر سکتے ہیں، جس سے نئے سیلولر افعال یا حیاتیات کی تخلیق کی اجازت دی جا سکتی ہے۔

4. تعمیر اور ہیرا پھیری: MAC ویکٹر عام طور پر بیکٹیریل خلیوں میں مالیکیولر کلوننگ کی تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے بنائے جاتے ہیں، جہاں بڑے DNA داخلوں کو MAC ویکٹر بیک بون میں کلون کیا جاتا ہے۔ ایک بار تعمیر ہونے کے بعد، MAC ویکٹر کو ممالیہ کے خلیوں میں منتقل کیا جا سکتا ہے جیسے کہ منتقلی یا وائرل ثالثی ترسیل۔ محققین مخصوص ایپلی کیشنز کے لیے ضرورت کے مطابق ڈی این 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 ،MACویکٹر ممالیہ کے خلیوں میں بڑےDNAکی ترتیب کا مطالعہ کرنے اوران میں ہیرا پھیری کرنے کے لیے طاقتور ٹولز ہیں۔ بڑے ڈی این اے داخل کرنے کی ان کی صلاحیت انہیں جینیاتی اور جینومک ایپلی کیشنز کی وسیع رینج کے لیے ورسٹائل 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، طلباءاب اس قابل ہو جائیں گے:

- ریکومبیننٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی میں کلوننگ ویکٹر کے کردار کی وضاحت کریں اور کلوننگ ویکٹر کی مختلف اقسام کے درمیان فرق کریں، بشمول پلاسمڈ، کاسمیڈ، فیجمڈ، لیمبڈا بیکٹیریوفیجز، *M13* فیج، *BACs*، *YACs*، 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 فزیبلٹی 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۔
پلاسمیڈ	Plasmid	چھوٹے، سرکلر ڈی این اے مالیکیول جو بیکٹیریا میں پائے جاتے ہیں، جو آزاد نقل کے قابل ہوتے ہیں۔۔
ڈی این اے کی ترتیب	DNA sequencing	ڈی این اے مالیکیول یا جینوم میں نیوکلیوٹائڈس کی درست ترتیب کا تعین کرنا۔
ویکٹ	Vector	ایک ڈی این اے مالیکیول 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 مالیکیولز کو کیا کہتے ہیں؟ (پلاسمیڈز)
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. ریکومبینٹ 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 ایپلی 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	کاسمیڈس	کاسمیڈس	ہائبرڈ ویکٹر پلازمیڈ اور بیکٹیریوفیجز کی خصوصیات کو یکجا کرتے ہیں، جو بڑے ڈی این اے کے ٹکڑوں کی کلوننگ کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔
Bacterial Artifical Chromosome	بیکٹیریل کروموسوم	مصنوعی -	بیکٹیریل کروموسوم سے اخذ کردہ بڑے کلوننگ ویکٹر، بڑے جینومک علاقوں کی کلوننگ کے لیے موزوں۔
Shuttle Vector	شٹل ویکٹر	شٹل ویکٹر	: دو مختلف میزبان پرجاتیوں 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؟(How Do Expression Vectors Work)

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 اکتسابی 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)

7.0 تمہید(Introduction)

مالیکیولر بائیولوجی کے میدان میں، جین کے اظہار کا مطالعہ ایک بنیاد کے طور پر کھڑا ہے، جو خود زندگی کے اندر موجود میکانزم کے بارے میں بصیرت پیش کرتا ہے۔ اس ڈومین کے اندر، ایکسپریشن ویکٹر ناگزیر ٹولز کے طور پر ابھرتے ہیں، جینیاتی مواد کی درستگی اور خوبی کے ساتھ ہیرا پھیری اور تجزیہ 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 بااختیار 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 پروبس کے ساتھ ریکومبینینٹ پلاسمیڈ 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 درستگی 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 بیکٹیریوفیجز کے دائرے میں ایک سنگ بنیاد کے طور پر ابھرتی ہے۔ بیکٹیریل لان پر فیجز کی لائٹک نوعیت اور ان کی تختی بنانے کی صلاحیت کا فائدہ اٹھاتے ہوئے، یہ تکنیک ٹھوس سپورٹ پر ریکومبینینٹ ڈی این اے کو پناہ دینے والے فیز ذرات کو متحرک کرتی ہے، جس کے بعد لیبل لگے ہوئے پروبس 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 ایکسپریشن ویکٹر(Expression Vector)

ایکسپریشن ویکٹر مالیکیولر بائیولوجی 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: ایکسپریشن ویکٹر کو مالیکیولر بائیولوجی 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 جا سکتا ہے۔ اس ماڈیولی کا کلیدی جُز 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 ایکسپریشن 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 پروموٹرز، بیچنے والے، اور ٹرانسکرپشن ختم کرنے کے سلسلے میں شامل ہیں۔ فروغ دینے والے این اے کی ترتیب کے خواہشمند ہیں جو کہ آر این اے کو بھرتیار نقل کی بات کرتے ہیں۔ دنیا والے ریگولیٹری ترتیب ہیں جو پروموٹرز 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 آر این اے مالیکیولز کی مناسب پروسیسنگ 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. 5۔ اظہار خیال: ویکٹر کو مختلف میزبان جانداروں کے ساتھ ہم آہنگ ہونے کے لیے ڈیزائن کیا گیا، معاون بیکٹیریا، خمیر، اور ممیہ 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 ایسچریچیا میں جین کو کلون اور تقریر کرنے کے لیے بیکٹیریل ایکسپریشن ویکٹر۔ استعمال کر سکتے ہیں

6. لچک اور حسب ضرورت: ایکسپر ویکٹر اعلی درجے کی لچک اور حسب ضرورت پیش کرتے ہیں، جس سے محققین ویکٹر کو ان کی مخصوص تجربہ کاری کے مطابق تیار کیا جا سکتا 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 تردیدپر وموٹر کے لیے ایک تشکیلاتی پروموٹر کو تبدیل کر سکتے ہیں۔ یہ لچکدار 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 ایپلی کیشنز کے لیے مختلف: ایکسپریشن ویکٹر مختلف ایپلی کیشنز اور میزبان جانداروں کے لیے مختلف مواقع میں حاضر ہیں۔ بیکٹیریل اظہار کے لیے، پلاسم ویکٹر عام طور پر بیکٹیریل نمبر ان کی ہیرا پھیری اور آؤٹ میں آسانی سے استعمال کرتے ہیں۔ ووٹنگ ویکٹر، جیسے کہ ریٹرو یا اڈینورائے ویکٹر، کو ممالیہ کے پارلیمانی انتخابات اور اظہار کے لیے ترجیح دی جاتی ہے۔ خمیر ایکٹر، اپی سومل پلاسمیڈ 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. باٹیکنالوجی میں بڑے پیمانے پر استعمال کیا جاتا ہے: ایکسپریشن ویکٹر بائیوٹیکنالوجی اور جینیاتی الیکشن میں ہر جگہ استعمال ہونے والے ٹولز۔ وہ ایپلی کیشنز کی ایک تیز رفتار رینج میں کام کرتے ہیں، جینی کلوننگ، ریکومبینٹ پروٹو ایکسپریشن، جین ناک آؤٹ اسٹڈیز، جین صبح

سویلین، فنکشنل جینومکس۔ ایکسپریشن ویکٹر سائنسز کو جینیاتی مواد کو درستگی کے ساتھ ہیرا پھیری کرنے، متنوع حیاتیاتی سیاق اور سباق 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۔

خلاصہ

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 جا سکتا 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 ایپلی 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 جا سکتا ہے۔ یہ لچک سائنسدانوں کو مختلف تجربات کے لیے ویکٹرز کو اپنی مرضی کے مطابق بنانے کی اجازت دیتی ہے۔
5. ایپلی 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 بائیوٹیکنالوجی 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۔

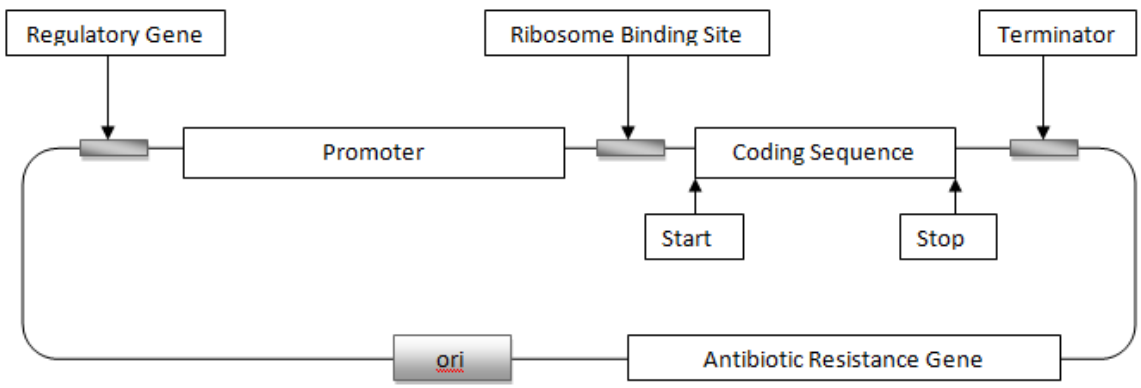
7.2.1 اظہار ویکٹر: اقسام اور خصوصیات (Expression Vectors: Types and Characteristics)

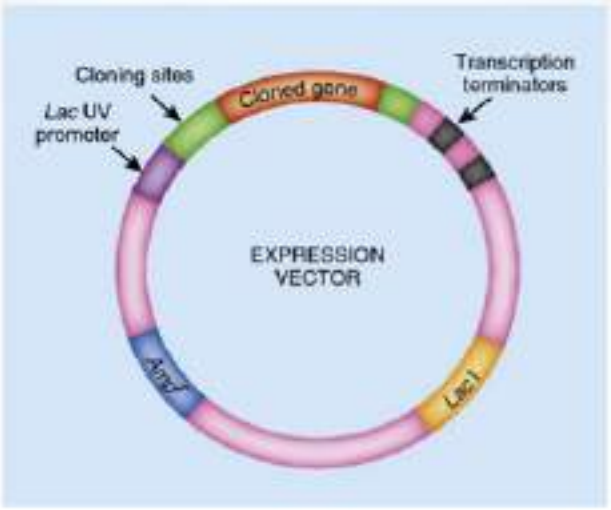
اظہار ویکٹر ویکٹر ہوتے ہیں جو ڈی این اے داخل کرنے کے لیے گاڑیوں کے طور پر کام کرتے ہیں اور ڈی این اے کے داخل کو مؤثر طریقے سے ظاہر کرنے کی اجازت دیتے ہیں۔ دلچسپی کے جین کے علاوہ، ان اظہار کی تعمیرات میں ریگولیٹری عناصر جیسے اضافہ کرنے والے اور فروغ دینے والے بھی شامل ہوتے ہیں تاکہ دلچسپی کے جین کی موثر نقل ہو سکے۔ یہ پلازمیڈ یا وائرس ہو سکتے ہیں۔ اظہار ویکٹر کو اظہار کی تعمیر کے نام سے بھی جانا جاتا ہے۔

سب سے آسان اظہار کی تعمیرات کو ٹرانسکرپشن 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۔ ٹرانسکرپشن 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 lac پروموٹر، lacUV کا اتپریورتی ورژن ہے۔ lacUV پروموٹر حوصلہ افزائی کی شرائط کے تحت ٹرانسکرپشن کی اعلی سطح کا آغاز کرتا ہے۔ مزید یہ کہ، کچھ ایکسپریشن ویکٹرز میں، ایک رائبوسومل بائنڈنگ سائٹ اسٹارٹ کوڈن کے اوپر کی طرف موجود ہوتی ہے۔ رائبوسومل بائنڈنگ 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؟(How Do Expression Vectors Work)

- 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 رائبوسومل کمپلیکس کا استعمال کرتا ہے۔
- اکثر، پلاسمڈ کو جینیاتی طور پر ریگولیٹری عناصر جیسے بڑھانے والے اور فروغ دینے والوں کے لیے انجنیئر 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 'ٹیگ' ہونا چاہیے۔ یہ ٹیگ کوئی بھی مارکر پیپٹائڈ یا ہسٹیڈائن (اس کا ٹیگ) ہو سکتا ہے۔

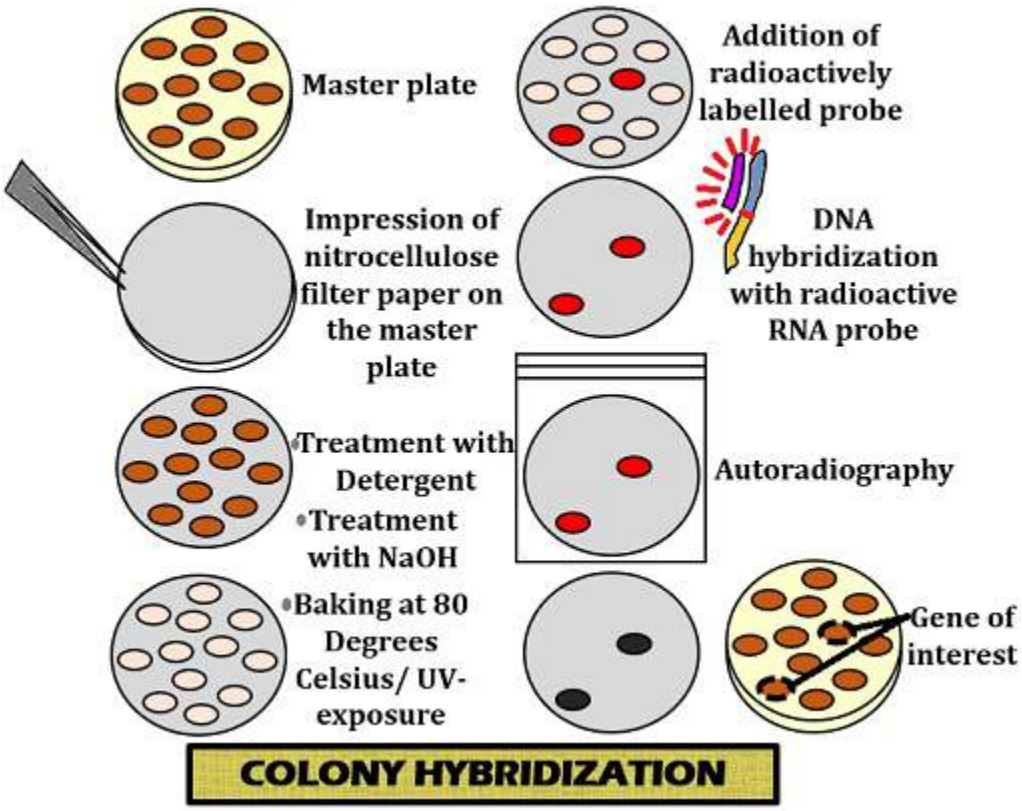
7.3 جین لائبریریوں کی اسکریننگ کی حکمت عملی(Screening Strategies of Gene Libraries)

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 جا سکتا ہے (بعض اوقات لیبل لگے ہوئے آر این اے پروبس کو بھی استعمال کیا جا سکتا 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 اجزا کی پلیٹ پر بہت کم آبادی والے بیکٹیریل کالونیوں کی ثقافت سے ہوتا ہے۔ ان کالونیوں کو متوازی طور پر ایک نائٹروسیلوز 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 پروب (خاص طور پر پہلے سے چنے گئے) کے لیے ہائبرڈائز کیے جاتے ہیں اور آٹوڈیوگرافی 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 جا سکتا 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 نائٹروسیلوز میمبرین فلٹر کے ذریعہ ہائبرڈ ڈی این اے والے بیکٹیریل خلیوں سے مخصوص ڈی این اے کی ترتیب یا جین کو الگ تھلگ کرنے کے طریقہ کے طور پر بیان کیا جا سکتا ہے۔ منتقلی کا ذریعہ پھر کئی کیمیائی اور جسمانی علاج سے گزرتا ہے۔

کالونی ہائبرڈائزیشن کا ٹرانسفرنگ میڈیم: نائٹروسیلوز فلٹر پیپر کالونی ہائبرڈائزیشن کا ٹرانسفرنگ میڈیم ہے جو ماسٹر پلیٹ کی نقل تیار کرتا ہے۔ نائٹروسیلوز ایک جھلی کے طور پر کام کرتا ہے جس میں ماسٹر پلیٹ کی جین کی صحیح کاپیاں ہوتی ہیں۔ نائٹروسیلوز فلٹر پیپر "بلاٹنگ پیڈ"

کے طور پر کام کرتا ہے۔

کالونی ہائبر ڈائزیشن 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 پلازمیڈز کے ساتھ تیار ہو جائے گی جو "ماسٹر یا حوالہ پلیٹ" کے طور پر حوالہ دیتے ہیں۔

نائٹروسیلوز فلٹر پر نقل کی تشکیل: پھر بیکٹیریل سیلز کو ماسٹر پلیٹ سے جھلی پر منتقل کریں یا "نائٹروسیلولوز فلٹر" کے ذریعے فلٹر کریں۔ نائٹروسیلوز 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 نائٹروسیلولوز فلٹر پیپر کو ڈٹرجنٹ جیسے ایس ڈی ایس (سوڈیم ڈوڈیسائل سلفیٹ) سے ٹریٹ کریں تاکہ بیکٹیریل سیلز کو ختم کیا جا سکے۔

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 اسٹرینڈ میں الگ کیا جا سکے۔

ڈی این اے کا فلٹر میڈیم پر فکس کرنا: ڈی این اے کو نائٹروسیلوز فلٹر پیپر پر ٹھیک کرنے کے لیے، یا تو فلٹر پیپر کو 80 ڈگری سیلسیس پر بیک کریں یا اسے یووی لائٹ میں بے نقاب کریں۔

تابکار تحقیقات کا اضافہ: تابکار RNA تحقیقات کے اضافے سے پلازمڈ DNA کے نقوش پر مشتمل نائٹروسیلوز فلٹر پیپر کو ہائبر ڈائز کریں۔ یہ تابکار آر این اے پروب بیکٹیریل خلیوں سے ترتیب کے مطلوبہ جین کو کوڈ کرے گا۔

دھلائی اور آٹوراڈیو گرافی: غیر پابند تحقیقاتی ذرات کو ہٹانے کے لیے فلٹر پیپر کو دھوئے۔ اس کے بعد، نائٹروسیلولوز فلٹر پیپر کو ایکس رے فلم میں اس طریقہ سے ظاہر کریں جسے "آٹوڈیو گرافی" کہا جاتا ہے۔ آٹوراڈیو گرافی کے بعد ظاہر ہونے والی کالونی کو "آٹوراڈیو گرام" کہا جائے گا جس میں دلچسپی کے جین ہوتے ہیں۔

مطلوبہ جین کی شناخت: پھر ترقی یافتہ آٹوراڈیو گرام کا ماسٹر پلیٹ کے ساتھ موازنہ کریں تاکہ دلچسپی کے جین پر مشتمل کالونیوں کی شناخت کی جا سکے۔

مطلوبہ جین پر مشتمل خلیات مائع میڈیم میں بڑھ سکتے ہیں اور ریکومبینینٹ پلاسمڈ ڈی این اے کو الگ تھلگ کرنے کے لیے مزید عمل کر سکتے ہیں۔

کالونی ہائبر ڈائزیشن 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 بینٹن 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۔

• نائٹروسیلولوز 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 ڈینیچر کیا جاتا ہے، فلٹر کے ساتھ لگایا جاتا ہے، تابکار تحقیقات کے ساتھ ہائبرڈائز کیا جاتا ہے اور آٹوڈیوگرافی کے ذریعے اس کی جانچ کی جاتی ہے۔

فوائد

• یہ طریقہ بیکٹیریل کالونیوں کے بجائے تختیوں کو اٹھاتے وقت بیکٹیریل میزبان سے نائٹروسیلوز جھلی میں ڈی این اے کی کم منتقلی کی وجہ سے پلاک اسکریننگ کے لیے 'کلینر' پس منظر اور الگ سگنل (کم بیک گراؤنڈ پروب 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 کرکے بہت زیادہ کثافت پر اسکریننگ کی جاسکتی ہے۔ اعلی کثافت کی اسکریننگ کا فائدہ یہ ہے کہ ایک بڑی تعداد میں ریکومبینٹ

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 اکائی کو مکمل کرنے کے بعد، طلباء اب اس قابل ہو گیے ہے 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)

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 _____ کے کام کا مطالعہ کر سکیں۔
2. یہ ویکٹر کئی اہم خصوصیات کے مالک ہیں: ایک سے زیادہ کلوننگ سائٹ (MCS)، فروغ دینے والے اور بڑھانے والے، اور قابل انتخاب _____۔
3. مختلف قسم کے اظہار ویکٹر ہیں جو مختلف ایپلی 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۔
4. 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 جا سکتا 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 آکسیڈیس 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 درستگی 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 ماڈیولریٹی 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 میکانزم اور ایپلی 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 پراکاریوٹک اور یوکرائیوٹک ایکسپریشن سسٹم سے وابستہ چیلنجز اور فوائد کو دریافت کریں۔

7.7 فرہنگ(Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Plaque Hybridization	پلاک ہائبرڈائزیشن	پلاک ہائبرڈائزیشن	: مخصوص جینیاتی مواد لے جانے والے دوبارہ پیدا ہونے والے مراحل کی نشاندہی کرنے کے لئے فیز تختیوں کی اسکریننگ کا ایک طریقہ۔
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	ایکسپریشن 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

8.0 تمہید(Introduction)

8.1 مقاصد(Objectives)

8.2 $CaCl_2$ ٹرانس فارمیشن تکنیک($CaCl_2$Transformation Technique)

8.2.1 اصول(Principle)

8.2.2 ری ایجنٹس کی ضرورت اور ان کا کردار لوریا برٹانی شوربہ

8.2.3 مواد(Materials)

8.2.4 طریقہ(Method)

8.3 الیکٹروپوریشن(Electoporation)

8.3.1 الیکٹروپوریشن کا اصول(Principles of Electroporation)

8.3.2 الیکٹروپوریشن کے مراحل(Electroporation Steps)

8.3.3 الیکٹروپوریشن ایپلی کیشنز(Electopration Applications)

8.4 ڈی این اے بلوٹنگ: سدرن، ناردرن اور ویسٹرن بلوٹنگ

(DNA Blotting: Southern, Northern and Western Blotting)

8.4.1 سدرن بلوٹنگ(Southern Blotting)

8.4.2 ناردرن بلوٹنگ(Northern Blotting)

8.4.3 ویسٹرن بلوٹنگ(Western Blotting)

8.5 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

8.6 کلیدی الفاظ(Keywords)

8.7 نمونہ امتحانی سوالات(Model Examination Questions)

8.7.1 معروضی جوابات کے حامل سوالات(Objective Answer Type Questions)
8.7.2 مختصر جوابات کے حامل سوالات(Short Answer Type Questions)
8.7.3 طویل جوابات کے حامل سوالات(Long Answer Type Questions)
8.8 فرہنگ(Glossary)
8.9 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ مواد(Suggested Material for Further Reading)

8.0 تمہید(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 کلورائڈ کا طریقہ اور الیکٹرو پوریشن مالیکیولر بائیولوجسٹ کے ہتھیاروں میں بنیاد کے طور پر ابھرتے ہیں۔

کیلشیم کلورائڈ طریقہ، ایک وقتی تکنیک ہے، جس میں کیلشیم کلورائڈ 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، الیکٹرو پوریشن 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۔

بلوٹنگ تکنیک مخصوص نیوکلک ایسڈز اور پروٹینز 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 بلوٹنگ تکنیکوں نے جین کے اظہار اور پروٹین کے فنکشن کے مطالعہ میں انقلاب برپا کر دیا ہے۔

سدرن بلوٹنگ، 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 ہائبر ڈائزیشن 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، آر این اے مالیکیولز کا پتہ لگانے اور ان کی مقدار درست کرنے میں سہولت فراہم کرتا ہے۔ اس تکنیک میں آر این اے مالیکیولز کی جیل سے جھلی میں منتقلی شامل ہے، اس کے بعد دلچسپی کے آر این اے کے لیے مخصوص لیبل والی تحقیقات کے ساتھ ہائبر ڈائزیشن ہوتی ہے۔ ناردرن بلوٹنگ جین ایکسپریشن پیٹرن اور آر این اے پروسیسنگ ایونٹس کے بارے میں بصیرت فراہم کرتی ہے۔

1970 کی دہائی میں جارج اسٹارک اور ساتھیوں کے ذریعہ 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 امیونو ڈیٹیکشن 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 پروٹینز 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 کلورائڈ کے طریقہ کار اور الیکٹروپوریشن کو دو بنیادی اکا ٹرانس فارمیشن کی تکنیک کے طور پر بیان کر سکتا ہے۔ سسس
- کیلشیم کلورائڈ 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۔

8.2 $CaCl_2$ ٹرانس فارمیشن تکنیک ($CaCl_2$ Transformation Technique)

قابل خلیے بیکٹیریل خلیے ہیں جو ماحول سے اضافی کروموسومل ڈی این اے یا پلاسمیڈ (ننگے 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 پار گمی کیا جاسکے۔ قدرتی قابلیت 1928 کی ہے جب فریڈرک گریفتھ نے دریافت کیا کہ پیتھوجینک بیکٹیریم کے تیار کردہ حرارت سے مارے جانے والے خلیات نان پیتھوجینک خلیوں کو پیتھوجینک قسم میں تبدیل کر سکتے ہیں۔ بہت سے بیکٹیریل تناؤ میں قدرتی قابلیت کی اطلاع دی گئی ہے، یعنی *Streptococcus pneumonia*، *Bacillus subtil* Neisseria gonorrhoeae اور *Haemophilus influenza*. قدرتی قابلیت کا رجحان 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 مالیکیولز جیسے کروموسومل ڈی این اے کے لیے موثر ہے لیکن سرکلر پلاسمڈ مالیکیولز 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 کیلشیم سے بھرپور 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 مالیکیولز قابل خلیات کی سطح پر لیپوپولیسا کرائڈ (LPS) ریسیپٹر مالیکیولز سے منسلک ہوتے ہیں۔ ڈیویلنٹ کیشنز منفی چارج شدہ ڈی این اے مالیکیولز 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 سائز کی وجہ سے سیل کی جھلی کو خود سے نہیں گزر سکتا، اس لیے گرمی کے جھٹکے کا مرحلہ کیلشیم کلورائڈ 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 جا سکتا 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۔ $CaCl_2$ طریقہ، بیکٹیریل خلیات میں چھیدوں کو کیلشیم کے اعلیٰ ارتکاز پر مشتمل محلول میں معطل کر کے ان کی صلاحیت حاصل کی جا سکتی ہے۔ تب ڈی این اے کو ٹرانس فارمیشن کے عمل کے لیے $42^{o}C$ پر ہیٹ شاک ٹریٹمنٹ کے ذریعے میزبان سیل میں مجبور کیا جا سکتا 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 پارگمی بنایا جا سکے۔ 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 گریفتھ 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 نیوکلیز 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 بیکٹیریا کی 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 CaCl2 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. کولی سیل ثقافتوں کے لیے مائکروبایولوجی اور مالیکیولر بائیولوجی اسٹڈیز میں سب سے زیادہ استعمال ہونے والا میڈیم ہے۔ آسان تیاری، زیادہ تر E. کولی کے تناؤ کی تیزی سے نشوونما، تیار دستیابی اور سادہ ترکیبیں LB شوربے کی مقبولیت میں معاون ہیں۔ LB عام ملنے والی انکیوبیشن حالات میں E. کولی کی نمو (OD600 = 2–3) کی حمایت کر سکتا ہے۔

کیلشیم کلورائڈ

کیلشیم کلورائیڈ کی ٹرانس فارمیشن کی تکنیک قابل سیل تیاری پروٹوکول میں سب سے زیادہ موثر تکنیک ہے۔ یہ بیکٹیریل سیل کی پلاسمڈ ڈی 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 پلاسمڈ ڈی 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 پلاسمڈ ڈی این اے بیکٹیریل سیل میں جاتا ہے۔ 2000 ملی لیٹر 50 ایم ایم کیلشیم کلورائیڈ سٹاک سلوشن کو 14.701 گرام $CaCl_2.2H_2O$ کو 12 ملی-کیو پانی میں شامل کر کے تیار کریں، اور 4 ° C پر اسٹور کریں۔

8.2.3 مواد (Materials)

1. LB شوربہ: خمیر کا عرق 0.5%، NaCl 1%، ٹرپٹون 1%۔
2. LB آگر: جیسا کہ اوپر، نیز 2% آگر آٹوکلیونگ سے پہلے
3. 0.1M $CaCl_2$..

آٹوکلیونگ کے بعد مذکورہ میڈیا میں اینٹی بائیوٹکس شامل کی جاتی ہیں۔ ٹیٹراسائکلائن کو 15 pg/mL کے حتمی ارتکاز تک اور ایمپسلن سے 50kg/mL تک ان اینٹی بائیوٹکس کے حل ایمپسلن کے ساتھ 50mg/mL قدرے الکلین ڈسٹل واٹر اور tetracycline 15 mg/mL ایتھنول 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 5^7 x 10 سیلز/mL کی سیل کثافت تک نہ پہنچ جائے۔ آپٹیکل کثافت کو (OD650) 650nm کے مطابق اپنے مخصوص بیکٹیریل تناؤ کے لیے ایڈجسٹ کریں۔
3. ہر ٹرانس فارمیشن کے ردعمل 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. 5x 5000g پر منٹ کے لئے سینٹر فیوگ کر کے خلیوں کو گولی لگائیں۔ یقینی بنائیں کہ سینٹر فیو گریشن 4°C پر انجام دیا گیا ہے۔ اس قدم کے لیے ریفریجریٹڈ بینچ سینٹری فیوج کی سفارش کی جاتی ہے۔
5. سپرناٹینٹ کو ہٹادیں اور 25 ملی لیٹر ٹھنڈے 0.1 ایم کیلشیم کلورائڈ ($CaCl_2$) محلول میں سیل چھروں کو دوبارہ بند کریں۔ کم از کم 20 منٹ تک برف پر لگائیں۔
6. سسپنشن کو سینٹر فیوج 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 $CaCl_2$ محلول میں دوبارہ بند کریں۔
8. سیل سسپنشنز 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 اسٹوریج بفر جیسے Tris-EDTA (TE) بفر میں تیار کردہ ہر ٹیوب میں 0.1mg تک DNA شامل کریں، 100 µL کے حتمی حجم میں۔ ٹیوبوں کو برف پر 30 منٹ تک سینکیں۔
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 90-60 منٹ تک ہلاتے ہوئے انکیوبیٹ کریں تاکہ متعارف کرائے گئے ڈی این اے کے ذریعے لے جانے والے اینٹی بائیوٹک مزاحمتی جینوں کا اظہار ہو سکے۔

12. ایل بی ایگر پلیٹوں پر 0.1 ملی لیٹر کے ایلی کوٹس کو انڈ یلیٹڈ، 10^-1، اور 10^-2 ڈائی لیشنز کے انتخاب کے لیے مناسب اینٹی بائیو ٹکس 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 ملیگرام کلوز سرکل پلاسمڈ DNA کے درمیان حاصل کرتا ہے۔ تاہم، یہ نوٹ کرنا ضروری ہے کہ شامل کردہ DNA کی مقدار اور ٹرانس فارمیشن کی کارکردگی کے درمیان تعلق مکمل طور پر خطی نہیں ہے۔ 0.1 ملی گرام سے زیادہ پلاسمڈ ڈی این اے فی ٹیوب شامل کرنے سے ٹرانس فارمیشن 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 ٹرانس فارمیشن کی کارکردگی کو متاثر کر سکتا ہے۔
3. ایک بار قابل ہو جانے کے بعد، خلیات کو 4 ° C پر ذخیرہ کیا جا سکتا ہے۔ اس درجہ حرارت پر $CaCl_2$ میں خلیات کو ذخیرہ کرنا دراصل ٹرانس فارمیشن 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 جا سکتا ہے۔
4. پلاسمڈ کو قائم کرنے اور تبدیل شدہ خلیوں کے ذریعے مزاحمتی جینز کے اظہار کی اجازت دینے کے لیے بحالی کا مرحلہ ضروری ہے۔
5. امپسلن پر چڑھاتے وقت، ایک عام مسئلہ ثانوی ترقی کے علاقے سے گھری ہوئی مزاحم کالونیوں کی موجودگی ہے۔ یہ مزاحم خلیات کی بیٹا لیکٹیمیس سرگرمی کی وجہ سے ہوتا ہے، جو ارد گرد کے اینٹی بائیوٹک کو ہائیڈولائز کرتا ہے، جس سے حساس خلیات بڑھنا شروع ہو جاتے ہیں۔ اس مسئلے سے بچنے کے لیے، تازہ تیار کی گئی امپیسلن پلیٹیں استعمال کریں اور راتوں رات بڑھنے کی مدت کے بعد انہیں فوری طور پر انکیوبیٹر سے ہٹا دیں۔

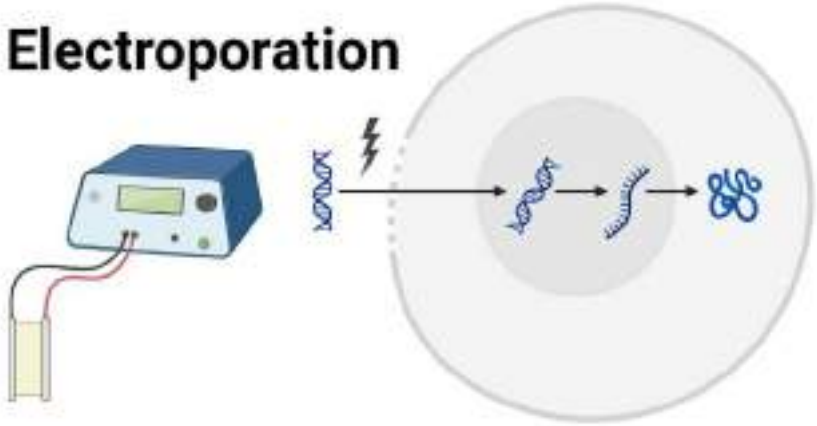
8.3 الیکٹروپوریشن (Electoporation)

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 اپلی 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 ویوو 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۔



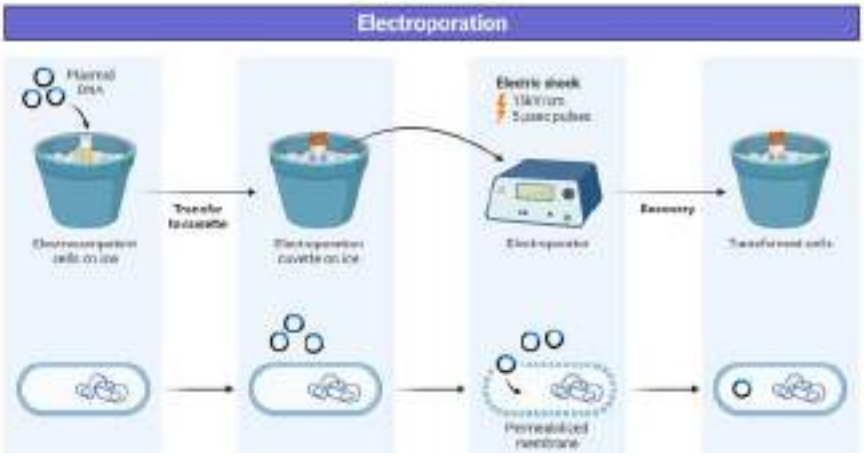
8.3.1 الیکٹروپوریشن کا اصول (Principles of Electroporation)

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۔

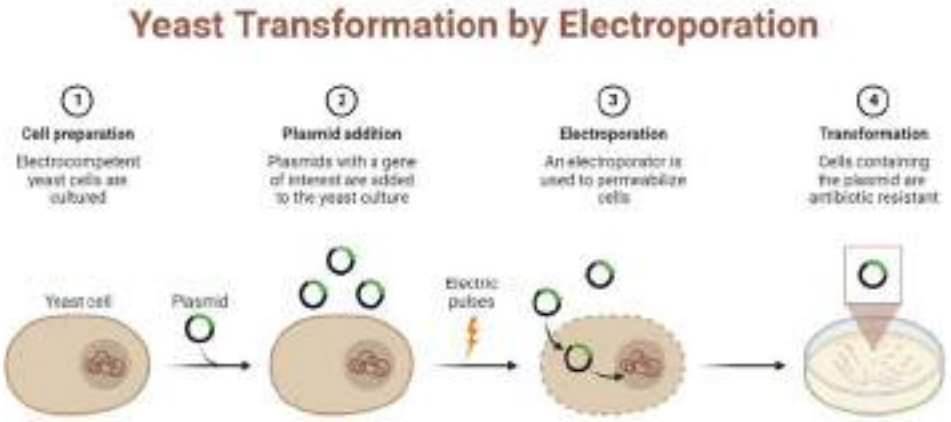
خلیات پر لگائی جانے والی برقی دالیں سیل کی جھلی کے اس پار برقی صلاحیت کو تبدیل کر کے خلل کا باعث بنتی ہیں۔ یہ خلل فاسفولیپڈ بیلیئر میں عارضی چھیدوں کی تشکیل کا باعث بنتا ہے جو خلیہ کی جھلی پر مشتمل ہوتا ہے۔ یہ سوراخ ایسے چینلز کے طور پر کام کرتے ہیں جن کے ذریعے مالیکیول جھلی کو عبور کر سکتے ہیں۔

برقی نبض کے بند ہونے پر، سوراخ آہستہ آہستہ بند ہونے لگتے ہیں، اور خلیہ کی جھلی اپنی معمول کی حالت میں واپس آجاتی ہے۔ کچھ مالیکیول جو سیل میں داخل ہوتے ہیں وہ جھلی کے دوبارہ پھیلتے 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 میکانزم کے ساتھ تعامل کر سکتے ہیں، اس طرح سیلولر عمل اور



افعال کو متاثر کرتے ہیں۔ یہ تعامل مختلف شعبوں بشمول مالیکیولر بائیولوجی، بائیوٹیکنالوجی اور طب میں الیکٹروپوریشن کے متنوع ایپلی کیشنز پر روشنی ڈالتا ہے۔



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 سینٹرفیوگریشن 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 مکسچر کو الیکٹروپوریشن کیویٹ میں منتقل کریں، ایک خصوصی چیمبر 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 ہٹا دیں۔
- ❖ 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 ایپلی کیشنز(Electopration Applications)

- ❖ بیکٹیریل خلیات کی ٹرانس فارمیشن : دوبارہ پیدا ہونے والے پروٹین کی پیداوار، کلوننگ، اور دیگر بائیو ٹیکنالوجی ایپلی کیشنز کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔
- ❖ ٹرانسفیکشن: یوکرائیوٹک 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 نیوکلک ایسڈ کی ترتیب کی شناخت کے لیے مختلف بلوٹنگ تکنیکوں کا استعمال کیا جاتا ہے۔

بلوٹنگ سے مراد وہ عمل ہے جس کے دوران میکرومالیکیولز 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 ایگرز جیل کے اوپر رکھا جاتا ہے۔اس قسم کا جیل خاص طور پر نیوکلک 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، نیوکلک ایسڈ الیکٹروفورسس کے ذریعہ تخلیق کردہ برقی میدان کا جواب دیں گے۔ان کے سائز کی بنیاد پر، چھوٹے مالیکیولز اگروز 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۔ ھدف 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 کیمیلومینسنٹ 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 فارمیشن 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 تنہائی 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 نیوکلک 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 نایلان جھلی پر منتقل کیا جاتا ہے۔ اس کے بعد جھلی کو ریڈیو ایکٹیو لیبل والے آر این اے پروب کے ساتھ لگایا جاتا ہے۔ جو تابکار لیبل والے RNA تحقیقات کے ذریعے فراہم کردہ کیمیلومینیسینس 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 بناتا 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 ڈینیچر 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 ڈینیچرنگ 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۔ ایگرز جیل سے کافی مشابہت رکھتے ہوئے، پولی کریلامائڈ جیل یہاں استعمال کیا جاتا ہے کیونکہ یہ زیادہ درست نتائج فراہم کرتا ہے، کیونکہ یہ کیمیاوی طور پر ایگرز 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 پروتینوں کے وزن کا موازنہ اور اندازہ لگانے کے لیے کئی رنگین پروتینوں کا حوالہ نمونہ شامل کیا گیا ہے جن کے مالیکیولر وزن معلوم ہیں۔

ایک بار جب پروٹین کو ایس ڈی ایس کے ذریعہ ڈینیچر 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 نائٹروسیلوز جھلی میں منتقل کر دیا جاتا ہے تاکہ پروٹین کو درست کیا جا سکے اور درج ذیل عمل میں مدد مل سکے۔ جھلی کو بلاک 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 کیمیلومینیسینٹ 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 بلوٹنگ تکنیک اکثر بعض پروتینوں 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 جا سکتا ہے۔ یا ناقص پروٹین کا پتہ لگانے کے لیے، ہیپاٹائٹس بی، کریوٹزفیلڈ 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 میکرومالیکیول کی شناخت کرنا ہے اور یہ سب بائیوٹیکنالوجی 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 گیے ہے 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 کلورائڈ کے طریقہ کار اور الیکٹروپوریشن کو دو بنیادی اکا ٹرانس فارمیشن کی تکنیک کے طور پر بیان کر سکتا ہے۔
- کیلشیم کلورائڈ 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 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 نیومن ایٹ ال نے متعارف کرایا تھا۔ _____ میں

10. کینسر کے علاج میں ناقابل واپسی الیکٹروپوریشن 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. الیکٹروپوریشن کے عمل میں شامل اقدامات کی وضاحت کریں۔
3. خلیات میں جینیاتی مواد کو متعارف کرانے کے طریقہ کار کے طور پر الیکٹروپوریشن 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 الیکٹروپوریشن 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 الیکٹروپوریشن 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. الیکٹروپوریشن 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 Blotting	سدرن بلوٹنگ	سدرن بلوٹنگ	ڈی این اے کے ٹکڑوں کو جیل سے جھلی پر منتقل کر کے 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۔

Artificial Competence	مصنوعی قابلیت	مصنوعی قابلیت	: کیمیائی علاج یا گرمی کے جھٹکے جیسے لیبارٹری کے طریقہ کار کے ذریعے بیکٹیریل خلیوں کی عارضی پار گمیتا کو ڈی این اے میں شامل کرنا۔
Blotting techniques	بلوٹنگ کی تکنیک	بلوٹنگ کی تکنیک	ایک پیچیدہ مرکب کے اندر مخصوص نیوکلک ایسڈز (DNA یا RNA) یا پروٹین کا پتہ لگانے کے لیے لیبارٹری کے طریقے۔ ان تکنیکوں میں سدرن بلوٹنگ (ڈی این اے کے لیے)، ناردرن بلوٹنگ (آر این اے کے لیے) اور ویسٹرن بلوٹنگ (پروٹینز کے لیے) شامل ہیں۔

8.9 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. Brown, T. A. (2002). Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction (4th ed.). Wiley-Blackwell.
4. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
5. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (Eds.). (2002). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons.

اکائی 9: ڈی این اے کی ترتیب کی تکنیک

(DNA Sequencing Techniques)

اکائی کے اجزا

9.0 تمہید(Introduction)

9.1 مقاصد(Objectives)

9.2.1 اصول(Priciple)

9.2.2 طریقہ کار(Procedure)

9.2.3 الیکٹروفورسس اور جیل ریڈنگ(Electrophoresis and gel reading)

9.3 پولیمریز چین ری ایکشن(Polymerase Chain Reaction/PCR)

9.3.1 پی سی آر کیا ہے؟

9.3.2 پی سی آر کیسے کام کرتا ہے؟(How PCR Works?)

9.4 ڈی این اے فنگر پرنٹ(DNA Fingerprinting)

9.4.1 پس منظر(Background)

9.4.2 ڈی این اے پروفائلنگ(DNA Profiling)

9.4.3 ڈی این اے پروفائل کیسے تیار کیا جاتا ہے(How is a DNA profile produced)

9.4.4 ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کا اطلاق(Application of DNA Fingerprinting)

9.5 ڈی این اے مائیکرورے(DNA Microarray)

9.5.1 ڈی این اے مائیکرورے تکنیک کا اصول(Principle of DNA Microarray)

9.5.2 ڈی این اے مائیکرورے تکنیک(DNA Microarray Technique)

9.5.3 مائیکرورے کی ایپلی کیشنز(Application of Mircoarray)

9.6 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

9.7 کلیدی الفاظ(Keywords)

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 تمہید(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، سنجر کا طریقہ سائنسدانوں کو قابل ذکر درستگی کے ساتھ ڈی این اے اسٹرینڈ کے نیوکلیوٹائڈ 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 فنگر پرنٹنگ کی آمد نے فرانزک سائنس اور پرسنلائزڈ 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 ایلک جیفریز کے ذریعہ شروع کیا گیا تھا، ڈی این اے فنگر پرنٹنگ 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 ورے 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 سبسٹریٹ پر ہزاروں ڈی این اے تحقیقات کو متحرک کر کے، مائیکرورے 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 اتپریرک 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 مائیکرورے 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 کلیو تج 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(Priciple)

- ❖ ڈی این اے پرائمر کو ہائبرڈائزیشن کے ذریعے ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ سے منسلک کیا جاتا ہے اور ڈی آکسینیو 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 آکسینیو 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 نیوکلیوٹائڈ 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 نیوکلیوٹائڈ کے ساتھ فاسفوڈیسٹر بانڈ نہیں بنا سکتا، اس طرح نیوکلیوٹائڈ 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۔

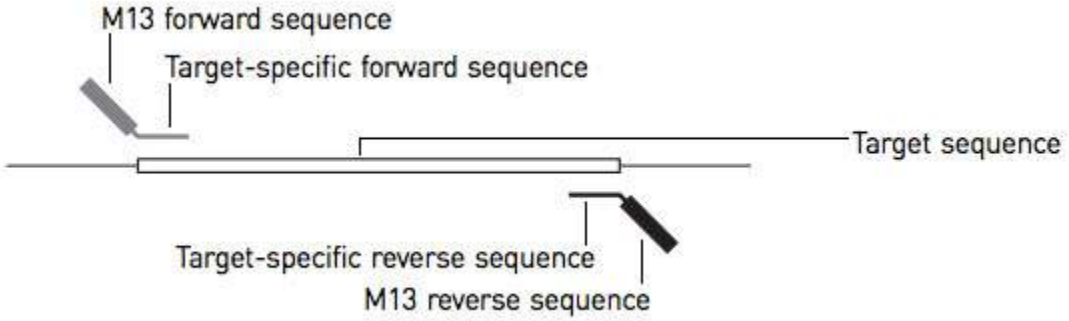
9.2.2 طریقہ کار (Procedure)

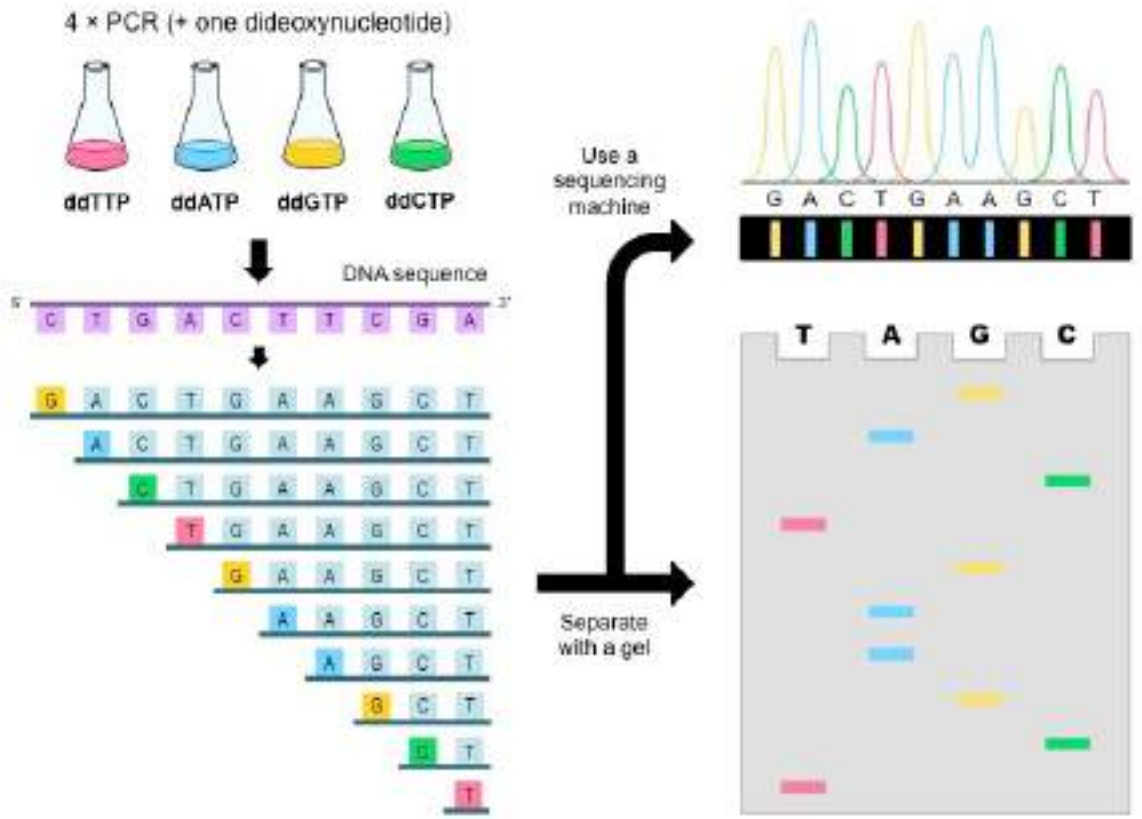
ٹیمپلیٹ کی تیاری (Preparation of template)

- 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 end'3 پر جوڑا گیا ہے جو پرائمر کے لیے بائنڈنگ سائٹ کے طور پر کام کرتا ہے۔

لیبل والے ٹکڑوں کے نیسٹڈ سیٹ کی تخلیق (Creation of a nested set of labeled fragments)

- 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 سنتھیسائز کرنے کے لیے، ddATP کو 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 بیچوں سے رد عمل کے مرکب کو پولی کریلامائڈ جیل اور الیکٹروفورسڈ پر چار مختلف کنویں میں لوڈ کیا جاتا ہے۔
- ❖ جیل کے آٹوراڈیوگرام کو تکمیلی اسٹرینڈ کے اڈوں کی ترتیب کو ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ سے متعین کرنے کے لیے پڑھا جاتا ہے۔
- ❖ مختصر ترین ٹکڑوں کا بینڈ آٹوریڈیوگرام 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 راؤنڈ کے ذریعے ڈی این اے کے مخصوص ٹکڑے کی بہت سی کاپیوں کو ترکیب کرنے کا ایک خودکار 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؟(How PCR Works?)

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 خودکار کرنے کے لیے، تھرموسائکلر جیپ 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)

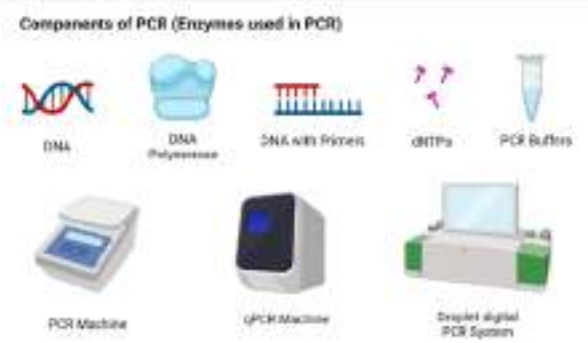
PCR میں پہلے مرحلے کے دوران، ابتدائی محلول کو ضروری درجہ حرارت پر گرم کیا جاتا ہے، عام طور پر 90° اور 100°C کے درمیان۔ جیسے جیسے گرمی بنتی ہے، یہ ڈی این اے ڈبل ہیلکس کے دو اسٹرینڈز کو جوڑنے والے بانڈز کو توڑ دیتی ہے، اس طرح ڈی این اے کو دو سنگل اسٹرینڈز میں الگ کرنے کے قابل بناتا ہے۔ ڈی این اے کے اس "پگھلنے" کو سنگل اسٹرینڈ میں ڈینیچریشن کہتے ہیں۔

مرحلہ 2: اینیلنگ (Annealing)

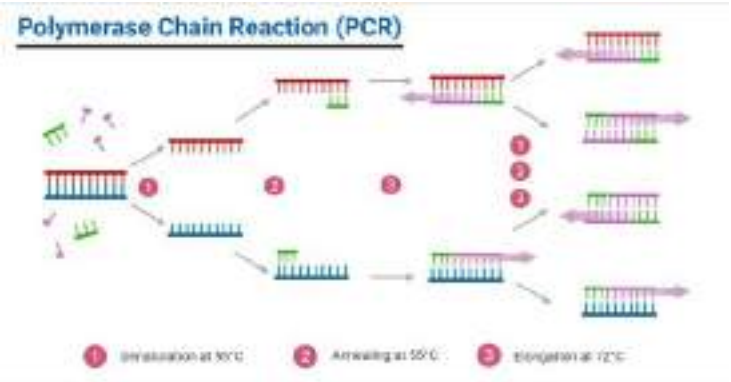
ابتدائی ہدف کے درجہ حرارت پر اسے کئی منٹ تک رکھنے کے بعد، رد عمل کا مرکب تیزی سے ٹھنڈا ہو جاتا ہے، عام طور پر 30° اور 65°C کے درمیان۔ اس کے بعد مرکب کو اس درجہ حرارت پر ایک منٹ سے بھی کم کے لیے رکھا جاتا ہے۔ اس سے پرائمر کو ڈی این اے کے واحد کناروں پر ان کے تکمیلی سلسلے کو باندھنے، یا اینیل کرنے کا موقع 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° 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 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۔



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۔



پی سی آر بہت سے عملی ایپلی کیشنز کے ساتھ ایک ناقابل یقین حد تک ورسٹائل 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 جا سکتا 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)

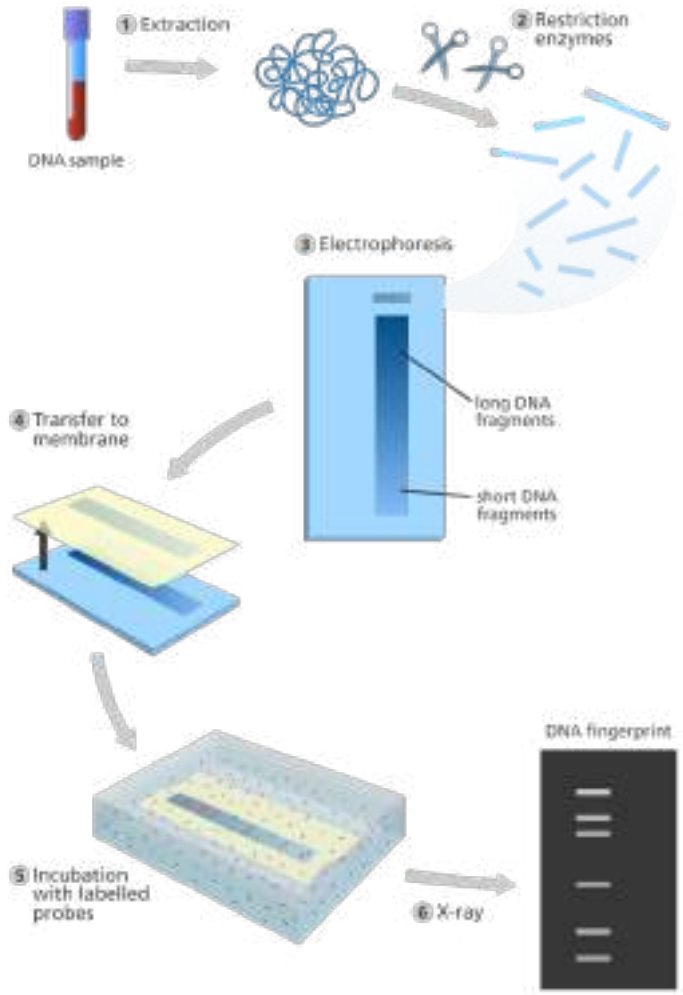
- تمام خلیات کا ڈی این اے ایک جیسا ہوتا ہے۔

- 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 جا سکتا ہے اور کسی اور سے فرق کرنے میں مدد کے لیے استعمال کیا جا سکتا 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۔۔

★ پروبس 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 نایلان جھلی کو ایکس رے فلم میں بے نقاب کر کے تصور کیا گیا۔۔

★ جب ریڈیو ایکٹیویٹی 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۔ تصویری 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 مائیکرو سیٹلائٹس پر انحصار کرتا ہے۔

❖ مائیکرو سیٹلائٹس، 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 فنگر پرنٹنگ کے طریقے کے برعکس، ڈی این اے پروفائلنگ 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 فلورسنٹ 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 فنگر پرنٹنگ کا اطلاق (Application of DNA Fingerprinting)

چونکہ یہ 1984 میں ایجاد ہوا تھا، ڈی این اے فنگر پرنٹنگ 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

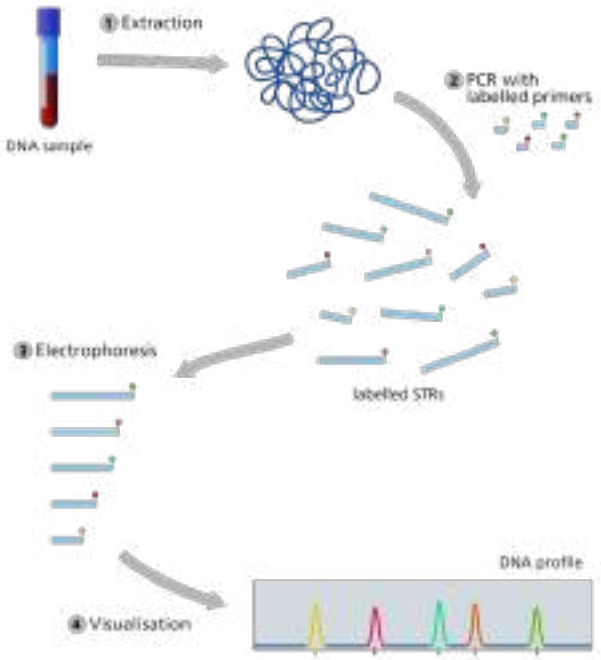
ڈی این اے فنگر پرنٹنگ انتہائی درست ہے۔ اب زیادہ تر ممالک ڈی این اے کا ریکارڈ اسی طرح فائل میں رکھتے ہیں جس طرح پولیس اصل فنگر پرنٹس کی کاپیاں رکھتی ہے۔

اس کے طبّی 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 مائیکرورے (DNA Microarray)

❖ ڈی این اے مائیکرورے 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 مائیکرورے بیک وقت دسیوں ہزار جینوں کے اظہار کا تجزیہ کر سکتے ہیں۔

❖ ڈی این اے مائیکرورے 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 مائیکرورے تکنیک کا اصول (Principle of DNA Microarray)

❖ ڈی این اے مائیکرورے کا اصول نیوکلک ایسڈ اسٹرینڈز کے درمیان ہائبرڈائزیشن پر مضمر ہے۔

❖ تکمیلی نیوکلک ایسڈ کی ترتیب کی خاصیت یہ ہے کہ خاص طور پر تکمیلی نیوکلیوٹائڈ بیس جوڑوں کے درمیان ہائیڈروجن 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 نیوکلک 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۔۔
- فلورو سینٹلی 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/مائکرورے کی 2 قسمیں ہیں:

1. سی ڈی این اے پر مبنی مائیکرورے (cDNA based microarray)

2. Oligonucleotide پر مبنی مائیکرورے (Oligonucleotide based microarray)

1. اسپاٹڈ 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 مائیکرورے 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 اسپاٹنگ 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 میکانکی یا روبوٹک طریقے سے پہنچایا جاتا ہے۔

2. Oligonucleotide arrays (Gene Chips)

- oligonucleotide microarrays میں، مختصر DNA oligonucleotides کو صف پر دیکھا جاتا ہے۔
- 20-25 میر س/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۔

❖ کمپیوٹر انڈسٹری سے فوٹولیتھو گرافی کے ذریعے فعال

9.5.2 ڈی این اے مائیکرورے تکنیک (DNA Microarray Technique)

ڈی این اے مائیکرورے سسٹم کو ڈیزائن کرنے کے لیے کچھ تقاضے ہیں، جیسے:

1. ڈی این اے چپ (DNA Chip)
2. ہدف کا نمونہ (فلوریسنٹلی لیبل لگا ہوا) (Target sample (Fluorescently labelled)
3. فلوروسینٹ رنگ (Flourescent Dye)
4. پروبس (Probes)
5. سکینر (Scanner)

ڈی این اے مائیکرورے کے رد عمل کا طریقہ کار کئی مراحل میں ہوتا ہے:

1. نمونوں کا مجموعہ (Collection of samples)

❖ 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 کا Isolation

❖ 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 (Creation of labeled cDNA)

❖ cDNA (کمپلیمنٹری DNA اسٹرینڈ) بنانے کے لیے، mRNA کی ریورس ٹرانسکرپشن کی جاتی ہے۔

❖ دونوں نمونوں کو پھر فلوروسینٹ سی ڈی این اے اسٹرینڈز 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 (Hybridization)

❖ 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 (Collection and Analysis)

❖ 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 فلورو سینس کو اکساتا 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 Mircoarray)

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 ہوگا۔اس سے فارماسیوٹیکل کمپنیوں 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 پروتینوں سے لڑتی ہیں اور ان کے اثر کو کم کرتی ہیں۔

❖ ٹاکسیولوجیکل ریسرچ (Toxicological Research): مائیکرو رے ٹکنالوجی خلیات پر زہریلے مادوں کے اثرات اور اولاد میں ان کے منتقلی کی تحقیق کے لیے ایک مضبوط پلیٹ فارم مہیا کرتی ہے۔ٹاکسیکو 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 گیے ہے 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 مائیکرورے کا تصور کو بیان کر سکیں

9.7 کلیدی الفاظ(Keywords)

پولیمریز	Polymerase	:ایک انزائم جو ڈی این اے یا آر این اے مالیکیولز کو نیوکلیوٹائڈس سے ترکیب کرتا ہے۔
ڈینیچریشن	Denaturation	ہائیڈروجن بانڈز کو توڑ کر ڈی این اے کے دو کناروں کو الگ کرنے کا عمل۔
مائیکرورے	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 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 فنگر پرنٹنگ کی ایجاد _____ نے _____ میں کی تھی۔
4. ڈی این اے مائیکرورے کو جین _____ کے نام سے بھی جانا جاتا ہے۔
5. پی سی آر کے لیے ضروری کیمیکل جزو _____ ہے۔
6. ڈی این اے فنگر پرنٹنگ بنیادی طور پر _____ ترتیبوں کے تجزیہ پر انحصار کرتی ہے۔
7. PCR میں DNA کو گرم کرنے کے عمل کو _____ کہا جاتا ہے۔
8. مائیکرورے _____ اظہار کی سطحوں کا بیک وقت پتہ لگانے اور ان کی مقدار درست کرنے کے قابل بناتے ہیں۔
9. نیشنل سینٹر فار بایو ٹیکنالوجی انفارمیشن (NCBI) نے مائیکرورے 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 فنگر پرنٹنگ کے عمل کی وضاحت کریں، بشمول اس کے پس منظر اور ایپلی کیشنز۔
4. ڈی این اے مائیکرو رے کے پیچھے اصول کیا ہے، اور ان کی بنیادی اقسام کیا ہیں؟
5. نیشنل سینٹر فار بایو 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 فنگر پرنٹنگ کے بارے میں تفصیل سے وضاحت کریں۔
4. ڈی این اے مائیکرو رے کے بارے میں تفصیل سے بتائیں
5. بیکٹیریا میں قدرتی قابلیت کی اہمیت پر بحث کریں۔

9.9 فرہنگ (Glossary)

انگریزی اصطلاح	اردو املا	اردو متبادل	تشریح
Polymerase Chain Reaction	پولیمریز چین ری ایکشن	-	ایک لیبارٹری تکنیک جو ڈی این اے کے ایک مخصوص حصے کو ڈینیچریشن، اینیلنگ اور توسیع کے بار بار چکروں کے ذریعے بڑھاتی ہے۔
DNA Fingerprinting	ڈی این اے فنگر 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 مائیکرورے 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

10.0 تمہید(Introduction)

10.1 مقاصد(Objectives)

10.2 جانوروں میں جینیاتی جوڑ توڑ کے طریقے (Methods of Genetic Manipulation in Animals)

10.2.1 ٹرانس جینیسس(Transgenesis)

10.2.2 2ناک آؤٹ اور ناک ان(Knock Out and knock In)

10.2.3 CRISPR/Cas9

10.2.4 سومیٹک سیل نیوکلیئر ٹرانسفر(Somatic Cell Nuclear Transfer)

10.2.5 RNA مداخلت(RNA Interference/ RNAi)

10.2.6 جین تھراپی(Gene Therapy)

10.3 پرونیوکلیئر ٹرانسفر کا عمل(Process of Pronuclear Transfer)

10.4 مائکروا نجیکشن جین(Microinjetion)

10.4.1 مائیکروا نجیکشن کا اصول(Principle of Microinjection)

10.4.2 مائیکروا نجیکشن میں اقدامات(Steps in Microinjection)

10.4.3 مائیکروا نجیکشن کی اپلی کیشنز(Application of Microinjection)

10.5 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

10.6 کلیدی الفاظ(Keywords)

10.7 نمونہ امتحانی سوالات(Model Examination Questions)

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

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 جوڑ توڑ 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 جوڑ توڑ(Genetic Manipulation) کے مرکز میں کئی سالوں کی تحقیق اور تجربات کے ذریعے نفیس طریقے ہیں۔ دو بنیادی تکنیکیں، پرونیوکلیئر ٹرانسفر اور مائیکرو انجیکشن، جانوروں کی جینیاتی انجینئرنگ کے دائرے میں ستونوں کے طور پر کھڑی ہیں، ہر ایک الگ الگ فوائد اور ایپلی کیشنز پیش کرتی ہے۔

پرونیوکلیئر 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 جوڑ توڑ 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 جوڑ توڑ کے ذریعے، محققین جانوروں کو مطلوبہ خصلتوں سے متاثر کر سکتے ہیں، جس سے

جینیاتی انجینئرنگ کے دائرے میں، مائیکرو انجیکشن ایک بنیادی تکنیک کے طور پر کھڑا ہے، جو ہدف کے خلیات کے نیوکلئس میں غیر ملکی جینیاتی مواد کی براہ راست ترسیل میں سہولت فراہم کرتا ہے۔ انسانی بالوں سے زیادہ باریک مائیکرو پیپیٹس کا استعمال کرتے ہوئے، محققین ڈی این اے کی ساخت کو فرٹیلائزڈ انڈوں یا ابتدائی مرحلے کے ایمبریوز میں درستگی کے ساتھ انجیکشن 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 اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو جائیں گے کہ :

- جینیاتی جوڑ توڑ 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 پرونیوکلیئر ٹرانسفر اور مائیکروانجیکشن 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، بائیوٹیکنالوجی، اور بنیادی تحقیق میں دریافت کریں گے۔

10.2 جانوروں میں جینیاتی جوڑ توڑ کے طریقے (Methods of Genetic Manipulation in Animals)

جینیاتی جوڑ توڑ، 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 جوڑ توڑ 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 جوڑ توڑ کا اطلاق حیاتیات کی ایک وسیع رینج پر کیا جا سکتا ہے، بشمول پودوں، حیوانات اور مائکروجنزموں پر، مختلف مقاصد کے ساتھ زرعی بہتری سے لے کر طبّی تحقیق تک۔

جانوروں میں جینیاتی جوڑ توڑ میں کسی جاندار کے ڈی این اے کو تبدیل کرنا شامل ہے تاکہ نئی خصلتوں کو متعارف کرایا جا سکے، موجودہ خصوصیات میں ترمیم کی جا سکے، یا جین کے فنکشن کا مطالعہ کیا جا سکے۔ یہ جوڑ توڑ سائنسی تحقیق، زراعت، اور طبّی ترقی کے لیے اہم ہیں۔ جانوروں میں جینیاتی جوڑ توڑ کے لیے کئی طریقے استعمال کیے جاتے ہیں، ہر ایک اپنے فوائد اور حدود کے ساتھ :

10.2.1 ٹرانس جینیسس(Transgenesis)

- مائیکروانجیکشن: مائیکروانجیکشن 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 فرٹیلائزڈ انڈے کے پرو ونکلئس 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۔ انجکشن شدہ ڈی این اے تصادفی طور پر میزبان جینوم میں ضم ہو سکتا ہے، جس کے نتیجے میں اظہار کی متغیر سطح اور پوزیشنی اثرات مرتب ہوتے ہیں۔ مائیکروانجیکشن کی مثال: 1985 میں، محققین نے فرٹیلائزڈ ماؤس ایمبریو کے پرونیوکلی میں ایک غیر ملکی جین کو مائیکروانجیکشن 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 فزیبلٹی کا مظاہرہ کیااور ٹرانسجینک جانوروں کی تحقیق میں وسیع پیمانے پر استعمال کی راہ ہموار کی۔

- الیکٹروپوریشن: الیکٹروپوریشن میں ڈی این اے کی موجودگی میں خلیات یا ایمبریوز پر مختصر برقی دالیں لگانا شامل ہے، جس سے خلیے کی جھلی میں عارضی سوراخوں کی تشکیل ہوتی ہے۔ یہ ڈی این اے کے مالیکیولز کو سیل سائٹوپلازم میں لے جانے کی اجازت دیتا ہے۔ الیکٹروپوریشن اکثر ڈی این اے کی ساخت کو برانن سٹیم سیلز یا ابتدائی ایمبریو 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 زیبرا فش جیسے ماڈل جانداروں کے ایمبریو میں ٹرانسجینز متعارف کرانے کے لیے استعمال کیا گیا ہے۔ مثال کے طور پر، محققین نے CRISPR/Cas9 اجزاء کو زیبرا فش ایمبریو 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 جا سکتا ہے۔
- وائرل ویکٹر: وائرل ویکٹر انجینئرڈ وائرس ہوتے ہیں جو مؤثر طریقے سے جینز کو ہدف کے خلیات میں پہنچا سکتے ہیں۔ ریٹروو ائرس اور لینٹیو 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 ٹرانسجن کا اظہار مستحکم ہوتا ہے۔ وائرل ویکٹرز کو مطلوبہ ٹرانسجن لے جانے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے اور سیل کی مخصوصیت کو بڑھانے اور امیونوجنیسیٹی کو کم کرنے کے لیے عام طور پر سیوڈوٹائپ 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-ثالثی جین تھراپی نے کتوں میں ہیموفیلیا 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 انٹرامسکولر انجیکشن کے نتیجے میں علاج کے پروٹین کا طویل مدتی اظہار ہوتا ہے۔.

10.2.2 2 ناک آؤٹ اور ناک ان (Knock Out and knock In)

- ہومولوجس ری کمبینیشن: ناک آؤٹ اور ناک آؤٹ حکمت عملی اکثر ہومولوجس ری کمبینیشن پر انحصار کرتی ہے، یہ ایک ایسا عمل ہے جس میں خلیات یا ایمبریوز میں متعارف ہونے والا خارجی ڈی این اے اینڈوجینس 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 جا سکتا ہے یا مطلوبہ ترتیب (ناک اِن) کے عین مطابق داخل کیا جا سکتا ہے۔ ہومولوجس ری کمبینیشن سیل کی ہومولوجی ڈائریکٹڈ مرمت کی مشینری کے ذریعے ڈبل اسٹرینڈ بریکس کی شناخت اور مرمت کے ذریعے ہوتا ہے۔ ہومولوجس ری کمبینیشن مثال: 1992 میں، محققین نے پہلا ناک آؤٹ ماؤس بنانے کے لیے جنین کے اسٹیم سیلز میں ہومولوجس ری کمبینیشن کا استعمال کیا، جس میں سائٹوکائن 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۔

- ایمبریونک اسٹیم سیلز میں جین کا ہدف بنانا: ایمبریونک اسٹیم سیلز pluripotent (ESCs) خلیے ہیں جو بلاسٹوسسٹس کے اندرونی خلیے سے اخذ کیے گئے ہیں۔ان خلیات کو وٹرو میں کلچر کیا جاسکتا ہے اور ہم جنس ریکومبینیشن تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے جینیاتی طور پر جوڑ توڑ 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۔ایمبریونک 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 نیوروڈیولپمنٹ میں مخصوص جینز کے کردار کا مطالعہ کرنے کے لیے استعمال کیا ہے اور انہیں مشروط طور پر نیورونل پروجینیٹر سیلز یا بالغ نیوران میں حذف کر دیا ہے۔

10.2.3 CRISPR/Cas9

- 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 نیوکلیوٹائڈ ٹارگٹنگ سیکوئنس ہوتا ہے جو کلیوتیج کے لیے جینومک لوکس کا تعین کرتا ہے۔گائیڈ آر این اے ڈیزائن کی مثال: محققین نے میلانین کی پیداوار میں خلل ڈال کر البینو فینوٹائپس کو آمادہ کرنے کے لیے چوہوں میں ٹائروسینیز 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 کلیوتیج اور ڈی این اے کی مرمت: Cas9 ٹارگٹ سائٹ پر ڈبل اسٹرینڈ بریکس (DSBs) کی حوصلہ افزائی کرتا ہے، Cas9 کلیوتیج موڈ کے لحاظ سے بلنٹ اینڈ یا سٹگر ڈ اینڈز پیدا کرتا ہے۔DSBs کی مرمت سیل کی DNA مرمت کی مشینری کے ذریعے نان ہومولوجس اینڈ جوائننگ (NHEJ) یا ہومولوجی ڈائریکٹڈ ریپیر (HDR) کے ذریعے کی جاتی ہے۔NHEJ اکثر کلیوتیج 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 کلیوتیج اور ڈی این اے کی مرمت کی مثال: CRISPR/Cas9 کو کم کثافت لیپوپروٹین ریسیپٹر (LDLR) جین میں ہدفی تبدیلیوں کے ساتھ انجینیئر کرنے کے لیے استعمال کیا گیا ہے، جس کی وجہ سے LDL کولیسٹرول کی سطح میں کمی واقع ہوتی ہے۔یہ نقطہ نظر خاندانی ہائپر کولیسٹرولیمیا کے پورسین 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 سومیٹک سیل نیوکلیئر ٹرانسفر (Somatic Cell Nuclear Transfer)

- ❖ نیوکلیئر ٹرانسفر: SCNT میں کئی مراحل شامل ہیں، بشمول عطیہ کرنے والے جانور سے ایک سومیٹک 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۔ نیوکلیئر ٹرانسفر کی مثال: 2018 میں، چینی محققین نے ژونگ ژونگ اور ہوا ہوا نامی مکاک بندروں کو کلون کرنے کے لیے SCNT کا استعمال کیا، جو کہ سومیٹک خلیات کے نیوکلیائی کو انوکلیٹڈ oocytes میں منتقل کر کے۔ اس اہم کامیابی نے غیر انسانی پریمیٹ 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 سومیٹک سیل نیوکلئس کے عطیہ کرنے والے سے مماثل ہے۔ یہ عمل سومیٹک سیل نیوکلئس کو دوبارہ پروگرام کرنے پر انحصار کرتا ہے جو کہ برانن 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 پیوندکاری میں ممکنہ استعمال کرتے ہیں۔

10.2.5 RNA مداخلت (RNA Interference/ RNAi)

- ❖ میکانزم: RNA مداخلت (RNAi) میں خلیات میں دوہرے پھنسے ہوئے RNA (dsRNA) مالیکیولز کا تعارف شامل ہے، جو چھوٹے مداخلت کرنے والے RNAs (siRNAs) یا چھوٹے ہیئر پین RNAs (shRNAs) میں پروسیس ہوتے ہیں۔ یہ چھوٹے RNAs RNA-حوصلہ افزائی سائلنسنگ کمپلیکس (RISC) کو تکمیلی mRNA مالیکیولز کی رہنمائی کرتے ہیں، جس سے ان کی تنزلی یا ترجمی جبر ہوتا ہے۔ میکانزم 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

invertebratesاور vertebrates. مصنوعی siRNAs یا shRNAs کو براہ راست خلیات یا جانداروں میں پہنچایا جا سکتا ہے تاکہ دلچسپی کے مخصوص جینوں کو نشانہ بنایا جا سکے۔ 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 وائرسز، اڈینو سے وابستہ وائرسز (AAVs)، اور lentiviruses، کو ٹارگٹ سیلز میں علاج کے جین کی فراہمی کے لیے انجنیئر کیا گیا ہے۔ غیر وائرل ویکٹر، بشمول پلاسمڈ ڈی این اے، لپڈ نینو پارٹیکلز، اور پولیمر پر مبنی کیریئرز، اکثر عارضی جین کے اظہار یا ایکس ویوو 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 ایڈینو وائرل ویکٹر کا استعمال کرتے ہوئے ایئروے کے اپیتھلیم 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 ردعمل 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 پرونیوکلیئر ٹرانسفر کا عمل (Process of Pronuclear Transfer)

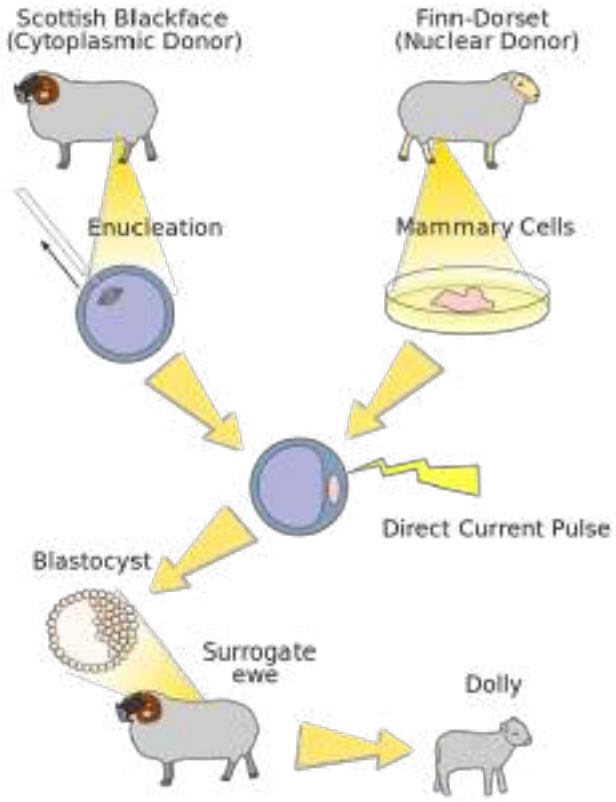
1. Pronuclei کا مجموعہ: یہ عمل ڈونر ایمبریوز سے pronuclei کو جمع کرنے سے شروع ہوتا ہے۔ یہ جنین عام طور پر فرٹلائزیشن کے فوراً بعد واحد خلیے کے مرحلے پر ہوتے ہیں۔
2. جینیاتی مواد کی جوڑ توڑ: مائیکروسرجیکل تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے، سائنسدان احتیاط سے ڈونر ایمبریو سے پرونکلئس کو ہٹا سکتے ہیں۔ اس پرونکلئس میں عطیہ کرنے والے جاندار کا جینیاتی مواد (DNA) ہوتا ہے۔
3. وصول کنندہ ایمبریو کی تیاری: اس کے ساتھ ہی، وصول کنندہ ایمبریو تیار کیے جاتے ہیں۔ یہ ایمبریوز عام طور پر عطیہ دینے والے جاندار کے طور پر ایک ہی یا قریب سے متعلقہ نوع سے ہوتے ہیں۔ وصول کنندہ کے ایمبریو سے پرونیوکلئی کو ہٹایا جا سکتا ہے یا اسے غیر فعال کیا جا سکتا ہے تاکہ عطیہ دہندگان کے لیے جگہ بنائی جا سکے۔
4. Pronuclei کی منتقلی: مطلوبہ جینیاتی مواد پر مشتمل pronucleus پھر وصول کنندہ ایمبریو میں منتقل کیا جاتا ہے۔ یہ عام طور پر

مائیکرو انجیکشن سوئی کا استعمال کرتے ہوئے کیا جاتا ہے تاکہ احتیاط سے ڈونر پرونیو کلئس 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: پرونیو کلیئر ٹرانسفر کا استعمال کرتے ہوئے ٹرانسجینک چوہوں کی پیداوار: ڈولی دی بھیڑ کی پیداوار، جو کہ ایک بالغ سومیٹک سیل سے کلون کیا گیا پہلا ستنداری جانور ہے، جس میں سومیٹک سیل نیوکلیئر ٹرانسفر (SCNT) نامی تکنیک کا استعمال شامل ہے، جو کہ ایک قسم کی پرونیو کلیئر ہے۔ منتقلی. پرونیو کلیئر 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 سومیٹک سیل کے انتخاب کے ساتھ شروع ہوا۔ ڈولی کے معاملے میں، یہ خلیہ فن ڈورسیٹ بھیڑ کے ممری غدود سے حاصل کیا گیا تھا۔
2. نیوکلئس کی تنہائی: منتخب سومٹک سیل کے نیوکلئس کو پھر مائکرو مینیپولیشن 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 انوکیلیشن: 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 انوکلیٹڈ انڈے کے خلیے کو چھوڑ دیا گیا۔
4. سومٹک سیل نیوکلئس اور انوکلیٹڈ ایگ کا فیوژن: سومیٹک سیل کے نیوکلئس کو پھر ہٹائے گئے پرونیو کلئس کی جگہ لے کر انوکلیٹڈ انڈے کے خلیے میں داخل کیا گیا۔ اس قدم نے مؤثر طریقے سے جینیاتی مواد کے مکمل سیٹ کو سومیٹک سیل سے انڈے کے خلیے میں منتقل کیا۔
5. دوبارہ تعمیر شدہ انڈے کا فعال ہونا: دوبارہ تعمیر شدہ انڈے، جو اب سومیٹک 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 امپلانٹیشن: 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 سومیٹک سیل ڈونر سے مماثل ہے، جو کامیاب کلوننگ کا ثبوت فراہم کرتا ہے۔

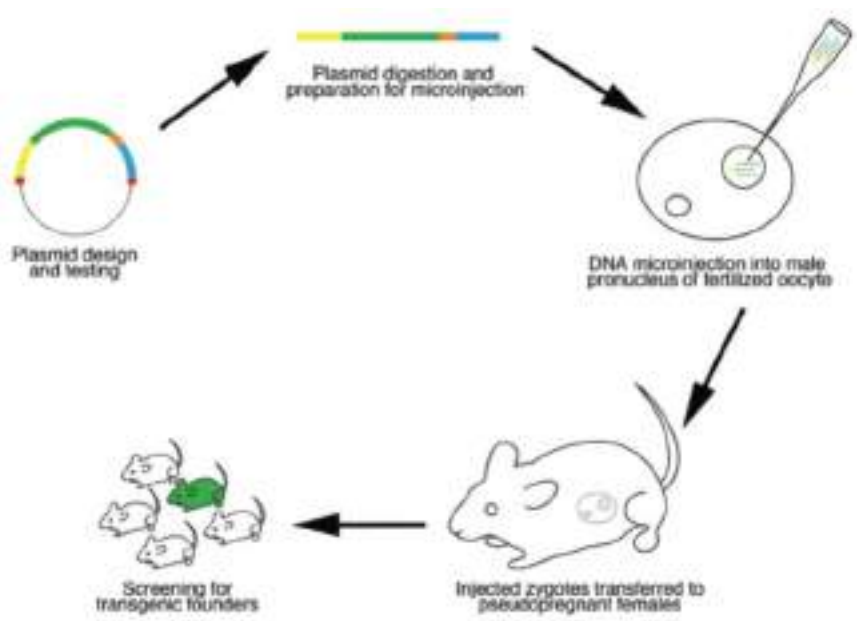
اہمیت: ڈولی کی پیدائش تولیدی حیاتیات کے شعبے میں ایک اہم سنگ میل کی حیثیت رکھتی ہے، جس نے پہلی بار یہ ظاہر کیا کہ ایک مکمل طور پر مختلف بالغ سومیٹک سیل کو ایک مکمل جاندار میں نشوونما کرنے کے لیے دوبارہ پروگرام کیا جا سکتا ہے۔ اس پیش رفت نے کلوننگ ٹیکنالوجی میں مزید تحقیق کی راہ ہموار کی اور انسانی اور جانوروں کی فلاح و بہبود کے لیے کلوننگ کے مضمرات کے بارے میں اخلاقی اور معاشرتی سوالات اٹھائے۔

مثال: پرونیوکلیئر ٹرانسفر کا استعمال کرتے ہوئے ٹرانسجینک چوہوں کی پیداوار:

ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار میں پرونیوکلیئر 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. جوڑ توڑ اور منتقلی: مائیکرو انجیکشن تکنیک کا استعمال کرتے ہوئے، دلچسپی کے جین کو ماؤس ایمبریوز کے پرونیوکلی 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: ٹرانسجینک چوہوں کی مزید افزائش کی جاسکتی ہے تاکہ مطلوبہ جینیاتی تبدیلی کو لے کر مستحکم لائنیں قائم کی جا سکیں۔ 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 مائکروانجیکشن جین(Microinjetion)

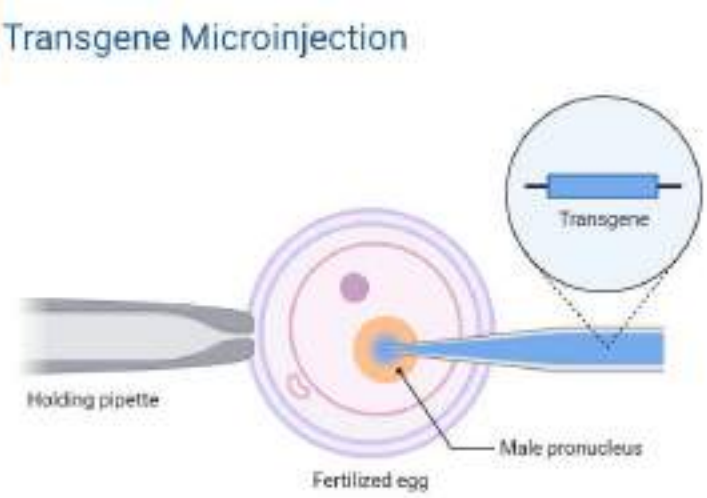
مائکروانجیکشن جین کی منتقلی کے جسمانی طریقوں میں سے ایک ہے جو ڈی این اے یا دیگر جینیاتی مواد کو براہ راست ایک چھوٹی شیشے کی سوئی یا مائیکروپیپیٹ کا استعمال کرتے ہوئے سیل میں داخل کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

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 بار برنے 19ویں صدی کے اوائل میں ڈی این اے مائیکروانجیکشن کا تصور متعارف کرایا۔ اس کے بعد سے، یہ بایومیڈیکل شعبوں میں ہونے والی پیشرفت کو برقرار رکھنے کے لیے مسلسل تیار ہوا ہے۔ اس میں متنوع شعبوں میں ایپلی 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)

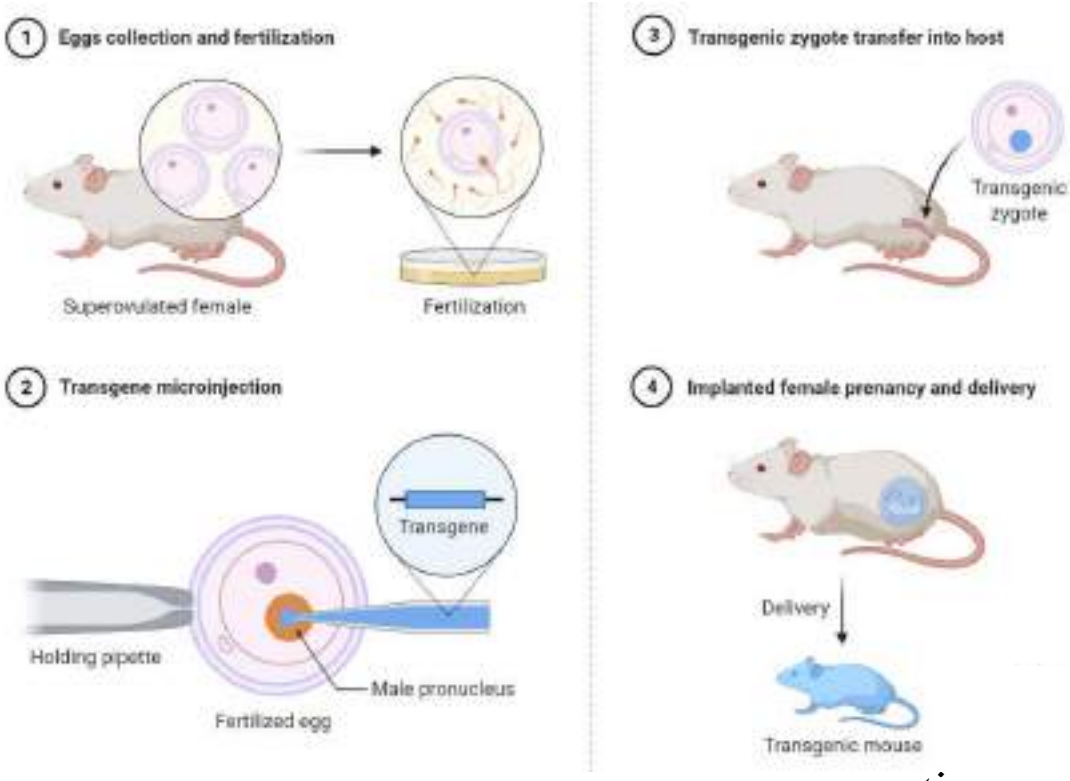
مائیکرو انجیکشن کا اصول جینیاتی مواد کی براہ راست انفرادی خلیات میں شیشے کی ایک سوئی کا استعمال کرتے ہوئے جس کو مائیکرو پیپیٹ کہا جاتا ہے، ایک پوزیشننگ ڈیوائس جسے مائیکرو مینیپلیٹر کہا جاتا ہے، اور ایک مائیکرو انجیکٹر پر مبنی ہے۔ یہ عمل ایک طاقتور خورد بین کے تحت کیا جاتا ہے۔ جینیاتی مواد کو ہائیڈروسٹیٹک دباؤ لگا کر سیل میں پہنچایا جاتا ہے تاکہ ڈی این اے پر مشتمل مائع کو مائکرو پیپیٹ کے ذریعے خارج کیا جا سکے۔ مائیکرو پیپیٹ کا چھوٹا ٹپ قطر اور مائیکرو مینیپلیٹر 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 پائپیٹ 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، انجکشن کی سوئی سے مشابہ۔
2. مائیکرو انجیکشن کا استعمال کرتے ہوئے غیر ملکی مواد کی ترسیل کا پورا عمل درست جوڑ توڑ اور مشاہدے کے لیے ایک طاقتور خورد بین کے تحت انجام دیا جاتا ہے۔۔
3. مائیکرو انجیکشن کے لیے خلیات ایک کنٹینر میں رکھے جاتے ہیں۔۔
4. ایک ہولڈنگ پائپیٹ 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. مائیکروپیپیٹ، مطلوبہ مواد پر مشتمل ہے، ایک مائیکرو نیپلیٹر پر نصب ہے، جو پائیپٹ کی درست پوزیشننگ اور حرکت کی اجازت دیتا ہے۔ مائکروپیپٹ کو سیل کے قریب نیچے کیا گیا ہے۔
7. جینیاتی مواد کے ہدف کے مقام کے لحاظ سے مائکروپائیپٹ کو احتیاط سے سیل کی جھلی میں، یا تو سائٹوپلازم یا نیوکلئس میں داخل کیا جاتا ہے۔ مائیکروپیپیٹ کے مواد کو پھر ایک مائیکروانجیکٹر کا استعمال کرتے ہوئے ہائیڈروسٹیٹک پریشر لگا کر سیل میں داخل کیا جاتا ہے۔ دباؤ جینیاتی مواد پر مشتمل سیال کو مائکروپیپیٹ کے ذریعے سیل میں چھوڑنے پر مجبور کرتا ہے۔
8. سیل میں مواد پہنچانے کے بعد، خالی مائیکروپیپٹ 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 مائیکروپیپیٹس 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 فرٹیلائزڈ 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 چوہے پیدا کرنے کے لیے کیا گیا تھا۔ چائمری جانور جنین کی نشوونما، ٹشو ٹرانسپلانٹیشن، اور سیل نسب کو سمجھنے میں مفید رہے ہیں۔

- وٹرو فرٹیلائزیشن کے میدان میں، مائیکرو انجیکشن کا استعمال انٹرا سیٹوپلاسمک سپرم انجیکشن (ICSI) میں کیا جاتا ہے، جو مردانہ بانجھ پن کے معاملات میں کامیاب فرٹلائزیشن 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 سومیٹک سیل نیوکلیئر ٹرانسفر (SCNT) میں بھی استعمال کیا جاتا ہے تاکہ کسی جاندار کی جینیاتی طور پر یکساں کاپیاں پیدا کی جا سکیں جو ایک انوکلیٹڈ oocyte میں سومیٹک سیل کو منتقل کر کے۔
- مائیکرو انجیکشن کو مختلف مطالعات میں بڑے پیمانے پر استعمال کیا گیا ہے، بشمول انسانی ایمبریو ریسرچ اور مائٹوٹک سیلز کا انجیکشن۔
- نیورو سائنس 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 کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو گیے ہے کہ :

- جینیاتی جوڑ توڑ (Gene Manipulation) 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 پرونیوکلیئر 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۔

10.6 کلیدی الفاظ (Keywords)

ٹرانس جینیسس	Trangenesis	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۔
ناک آؤٹ	Knockout	: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۔

سومٹک سیل نیوکلیئر ٹرانسفر	Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)	سومٹک سیل نیوکلیئر ٹرانسفر (SCNT): ایک کلوننگ تکنیک جس میں ایک سومیٹک سیل نیوکلئس کی ایک انوکلیٹڈ 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 بایو ٹیکنالوجیکل تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے جاندار کے جینیاتی مواد کی جان بوجھ کر تبدیلی ہے۔
2. مائیکروانجیکشن 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 فرٹیلائزڈ 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 ریٹروواِئرس اور لینٹیوواِئرس، عام طور پر جینیاتی جوڑ توڑ 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 ایمبریو میں متعارف کرایا جانے والا خارجی ڈی این اے اینڈوجینس جینومک ترتیب کے ساتھ دوبارہ مل جاتا ہے۔
6. ایمبریونک اسٹیم سیلز pluripotent (ESCs) خلیات ہیں جو بلاسٹوسسٹس کے اندرونی خلیے سے ماخوذ ہوتے ہیں اور _____ تکنیکوں کے ذریعے جینیاتی طور پر جوڑ توڑ 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 نیوکلیئر ٹرانسفر (SCNT) میں عطیہ کرنے والے جانور سے سومیٹک سیل کا الگ تھلگ ہونا، وصول کنندہ جانور سے ایک oocyte کا انوکیلیشن، اور _____ کے ساتھ سومیٹک سیل نیوکلئس کا فیوژن شامل ہے۔
9. RNA مداخلت (RNAi) میں خلیات میں دوہرے پھنسے ہوئے RNA (dsRNA) مالیکیولز کا تعارف شامل ہوتا ہے، جو چھوٹے مداخلت کرنے والے RNAs (siRNAs) یا چھوٹے ہیئر پین RNAs (shRNAs) میں پروسیس ہوتے ہیں جو RNA-حوصلہ افزائی سائلنسنگ کمپلیکس (RISC) کی تکمیل کے لیے رہنمائی کرتے ہیں۔ _____
10. مائیکروانجیکشن عام طور پر ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار میں استعمال کیا جاتا ہے، غیر ملکی ڈی این اے کو فرٹیلائزڈ 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 جوڑ توڑ میں مائیکرو انجیکشن کا مقصد کیا ہے؟
2. مائیکرو انجیکشن کے پیچھے اصول بیان کریں۔
3. وضاحت کریں کہ جینیاتی جوڑ توڑ 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 پرونیوکلیئر ٹرانسفر کے عمل کی وضاحت کریں، اس میں شامل ہر ایک قدم اور جینیاتی جوڑ توڑ میں اس کی اہمیت کو بیان کریں۔
2. جانوروں کی جینیاتی جوڑ توڑ میں ان کے میکانزم، ایپلی کیشنز، اور حدود کے لحاظ سے ٹرانسجینیسیس، ناک آؤٹ اور ناک ان، CRISPR/Cas9، اور somatic cell نیوکلیئر ٹرانسفر (SCNT) کے طریقوں کا موازنہ اور ان کے برعکس کریں۔
3. جینیاتی جوڑ توڑ میں مائیکرو انجیکشن کی ایپلی کیشنز پر تبادلہ خیال کریں، بشمول ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار، وٹرو فرٹیلائزیشن، سومیٹک سیل نیوکلیئر ٹرانسفر، اور نیوروسائنس ریسرچ میں اس کا کردار۔
4. جینیاتی جوڑ توڑ 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 ریکمبینیشن	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	بلاسٹوسسٹس 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 جوڑ توڑ اور تحقیقی مقاصد کے لیے کیا جاتا ہے۔		
ایک حیاتیاتی عمل جس میں دوہرے پھنسے ہوئے RNA مالیکیول انحطاط یا ترجمی جبر کے لیے تکمیلی mRNA مالیکیولز کو نشانہ بنا کر مخصوص جینز کے اظہار کو خاموش کر دیتے ہیں۔	RNA مداخلت (RNAi):	RNA Interference (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 ریٹروائرل ویکٹر

(Embryonic Stem Cells and Retroviral Vectors for Transgene Transmission)

اکائی کے اجزا

11.0 تمہید(Introduction)

11.1 مقاصد(Objectives)

11.2 ایمبریونک اسٹیم سیل(Embryonic Stem Cells)

11.2.1 ایمبریونک اسٹیم سیلز کی تبدیلی(Embroyonic Stem Cell Transgenesis)

11.3 ٹرانسجنیسیس کے لئے ریٹروائرل ویکٹر(Retroviral Vector for Transgenesis)

11.3.1 ٹرانسمیشن کا طریقہ کار(Mechanism of Transmission)

11.3.2 ٹرانسمیشن کو متاثر کرنے والے عوامل(Factors Influencing Transmission)

11.4 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

11.5 کلیدی الفاظ(Keywords)

11.6 نمونہ امتحانی سوالات(Model Examination Questions)

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

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

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

11.7 فرہنگ(Glossary)

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

11.0 تمہید(Introduction)

جینیاتی انجینئرنگ کے وسیع منظر نامے میں، برانن سٹیم سیلز اور ریٹروائرل ویکٹرز کا استعمال جدت طرازی کا ایک سنگ بنیاد ہے، جس نے مختلف شعبوں میں، تخلیق نو کی دوائی سے لے کر جین تھراپی تک اپلی کیشنز کی ایک بڑی تعداد کا وعدہ کیا ہے۔ یہ باب جینیاتی جوڑ توڑ اور علاج کی ترقی کے صف اول کو روشن کرتے ہوئے، ٹرانسجنز کی منتقلی کے لیے جنین کے اسٹیم سیلز اور ریٹروائرل 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 طبّی 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 ریٹرووائرل ویکٹرز کا ہوشیار استعمال ہے، جدید ترین گاڑیاں جو درستگی اور کارکردگی کے ساتھ میزبان خلیوں میں ٹرانسجینز لے جانے کی صلاحیت رکھتی ہیں۔ ریٹرووائرس، اپنے مخصوص ریورس ٹرانسکرپٹیس 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۔ ریٹرووائرل ویکٹرز کے اسٹریچ جوڑ توڑ 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، برانن سٹیم سیلز اور ریٹرووائرل 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، ریٹرووائرل ویکٹر کی ثالثی والے جین کی ترسیل سے وابستہ ممکنہ خطرات، جیسے کہ داخلی تبدیلی اور مدافعتی ردعمل، باریک بینی سے جانچ پڑتال اور خطرے کو کم کرنے کی چوکس حکمت عملیوں کی ضرورت ہے۔

جب ہم ایمبریونک اسٹیم سیلز اور ریٹرووائرل 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 دور اندیشی کے ساتھ نیویگیٹ کریں۔ ٹرانسجن ٹرانسمیشن کے بنیادی میکانزم کو واضح کرتے ہوئے اور ان جدید ٹیکنالوجیز کے علاج معالجے کی تلاش کرتے ہوئے، ہم جینیاتی جوڑ توڑ کے اسرار کو کھولنے اور تبدیلی کی طبّی 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 ریٹرووائرل 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 اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو جائیں گے کہ:

- ریٹرووائرل ویکٹر میڈیٹیڈ ٹرانسجن ٹرانسمیشن کو سمجھیں اور اس کی وضاحت کریں۔

- ایمبریونک 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 ریٹروو ائرل ویکٹر کی تبدیلی کی صلاحیت کی وضاحت کریں۔

11.2 ایمبریونک اسٹیم سیل (Embryonic Stem Cells)

ایمبریونک اسٹیم 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 درستگی 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 اپلی 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، سومیٹک سیل نیوکلیئر ٹرانسفر (SCNT)، کلوننگ کی بنیاد کے طور پر ESCs پر انحصار کرتی ہے۔ SCNT میں، ایک سومیٹک سیل کا مرکزہ ایک انوکلیٹڈ انڈے کے خلیے میں منتقل ہوتا ہے، جس سے کلون شدہ ایمبریو 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 مویشیوں کے جانوروں سے لے کر بائیو میڈیکل 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 جین 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 جوڑ توڑ کے لیے ایک ورسٹائل 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 بائیو فارماسیوٹیکل 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۔

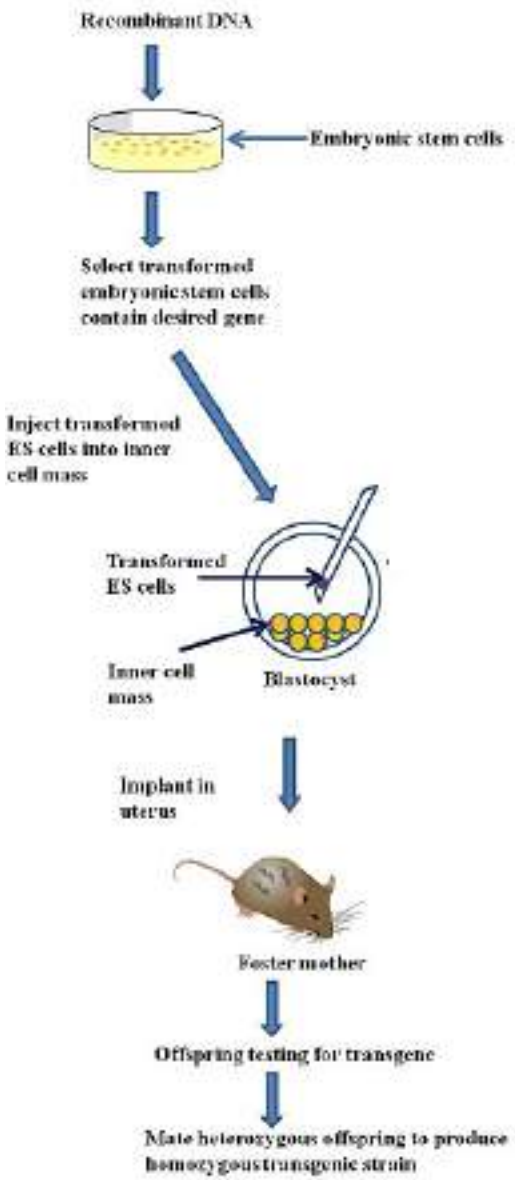
کلوننگ اور ٹرانسجینک آرگنزم کی پیداوار میں ESCs کی بے پناہ صلاحیت کے باوجود، کئی چیلنجز اور اخلاقی تحفظات برقرار ہیں۔ کم کارکردگی اور جینیاتی عدم استحکام سمیت تکنیکی رکاوٹیں ان تکنیکوں کو وسیع پیمانے پر اپنانے میں اہم رکاوٹیں کھڑی کرتی ہیں۔ مزید برآں، انسانی ESCs کے

استعمال سے متعلق اخلاقی بحثیں جینیاتی جوڑ توڑ کے اخلاقی اثرات اور انسانی وقار کے تحفظ کے بارے میں پیچیدہ سوالات اٹھاتی ہیں۔

11.2.1 ایمبریونک اسٹیم سیلز کی تبدیلی(Embroyonic 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 جوڑ توڑ کے لیے برانن سٹیم سیلز میں متعارف کرانا شامل ہے۔

جنین اسٹیم سیلز کے ساتھ ٹرانس جینیسس 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 ریٹروواِئرل 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(Example)

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 آنکوجین 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 سٹیم 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 بیٹا خلیات میں پیدا کیا جا سکے۔ یہ جینیاتی طور پر تبدیل شدہ خلیات پھر مختلف مقاصد کے لیے استعمال کیے جا سکتے 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 ٹموتھی سٹیورٹ کی قیادت میں بنایا تھا۔

OncoMouse کو ایک مخصوص ٹرانسجین لے جانے کے لیے بنایا گیا تھا جسے "ماؤس میمری ٹیومر وائرس" (MMTV) پروموٹر کے ساتھ مل کر c-myc نامی آنکوجین کے نام سے جانا جاتا ہے۔ایم ایم ٹی وی پروموٹر 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 ایمبریونک اسٹیم سیلز کو جینیاتی طور پر MMTV-c-myc ٹرانسجن کو اپنے جینوم میں ریٹروواِئرل ویکٹر کا استعمال کرتے ہوئے متعارف کروا کر تبدیل کیا گیا۔ان ترمیم شدہ ایمبریونک اسٹیم سیلز کو پھر ابتدائی مرحلے کے ماؤس ایمبریوز میں انجکشن لگایا گیا تھا، جنہیں بلاسٹوسسٹس کہا جاتا ہے، جو بعد میں سروگیٹ مادہ چوہوں میں لگائے گئے تھے۔

ان سروگیٹ چوہوں کے نتیجے میں پیدا ہونے والی اولاد نے ٹرانسجن 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 اعلی 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 میٹاسٹیسیس اور ٹیومر امیونولوجی کے مطالعہ کے لیے ایک ماڈل کے طور پر کام کیا ہے۔

11.3 ٹرانسجنیسیس کے لئے ریٹروواِئرل ویکٹر (Retroviral Vector for Transgenesis)

ریٹروواِئرل ویکٹر ایسے اوزار ہیں جو جین تھراپی میں علاج کے جین کو ہدف کے خلیوں میں پہنچانے کے لیے استعمال ہوتے ہیں۔یہ ویکٹر ریٹروواِئرس 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 ریٹروواِئرل ویکٹرز کو خلیات میں ٹرانسجینز پہنچانے کے لیے کارآمد گاڑیاں بناتی ہے، جس سے علاج کے جینز کے طویل مدتی اظہار کو قابل بنایا جا سکتا ہے۔ریٹروواِئرل ویکٹر ٹرانسمیشن کے طریقہ کار کو سمجھنا اور ٹرانسجنز 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)

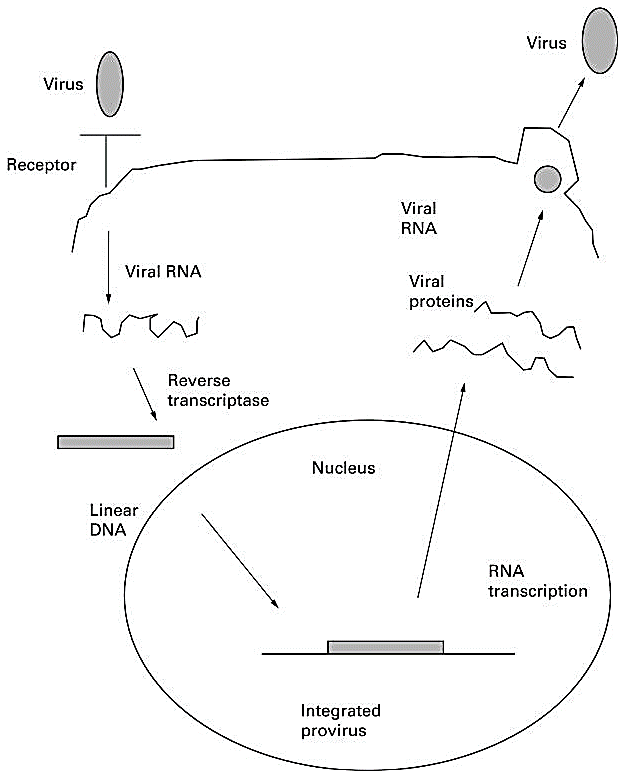
1. اٹیچمنٹ اور انٹری: ریٹروواِئرل ویکٹرز ٹارگٹ سیلز کی سطح پر مخصوص ریسیپٹرز سے منسلک ہوتے ہیں، سیل میں داخلے کی سہولت

فراہم کرتے ہیں۔

2. ریورس ٹرانسکرپشن: ایک بار سیل کے اندر، ریٹرو وائرل ویکٹر کے آر این اے جینوم کو انزائم ریورس ٹرانسکرپٹیس کے ذریعے ڈی این اے میں ریورس ٹرانسکرپٹ 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 اعلی 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 ٹرانسجینز 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۔ اعلی ویکٹر ٹائٹرز کے نتیجے میں نقل و حمل کی شرح میں اضافہ ہو سکتا ہے۔



4. میزبان مدافعتی ردعمل: ریٹرو وائرل ویکٹر کے لیے میزبان مدافعتی ردعمل ہدف کے خلیات کو کامیابی سے منتقل کرنے کی صلاحیت کو متاثر کر سکتا ہے۔ ویکٹر یا منتقلی خلیوں کی مدافعتی کلیئرنس جین تھراپی کی تاثیر کو کم کر سکتی ہے۔
5. حفاظتی تحفظات: ریٹرو وائرل ویکٹرز کو داخلی mutagenesis کے خطرے کو کم کرنے کے لیے انجنیئر 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 ڈیفیسینسی

(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 ریٹروو ائرل ویکٹر کے ذریعے منتقل کیا جاتا ہے، اور پھر مریض میں دوبارہ ملایا جاتا ہے۔ مربوط ٹرانسجن 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 کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو گیے ہے کہ :

- ریٹروو ائرل ویکٹر میڈیٹیڈ ٹرانسجن ٹرانسمیشن کو سمجھیں اور اس کی وضاحت کریں۔
- ایمبریونک 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 ریٹروو ائرل ویکٹر کی تبدیلی کی صلاحیت کی وضاحت کریں۔

11.5 کلیدی الفاظ (Keywords)

ٹرانس جینیسس	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۔
ایمبریونک 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۔
ریٹروو ائرل ویکٹر	RetroViral Vectors	ریٹروو ائرس 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. ایمبریونک اسٹیم سیل (ESCs) _____ کے اندرونی خلیے سے اخذ کیے گئے ہیں۔
2. سومیٹک سیل نیوکلیئر ٹرانسفر (SCNT) میں _____ سیل کے نیوکلئس کو انوکلیٹڈ انڈے کے خلیے میں منتقل کرنا شامل ہے۔
3. ریٹروو ائرل 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. آنکوجینز 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 پروموٹر ڈی این اے کا ایک سلسلہ ہے جو خاص طور پر _____ غدود میں جین کے اظہار کو چلاتا ہے۔
9. ریٹرووائرل 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. ایمبریونک اسٹیم سیل (ESCs) کیا ہیں، اور کیا چیز انہیں بایو ٹیکنالوجی کے میدان میں منفرد بناتی ہے؟
2. سومیٹک سیل نیوکلیئر 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 برانن 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 پوٹنسے	پلیوری پوٹنسے	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 اتپریورتن	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

12.0 تمہید(Introduction)

12.1 تمہید(Objectives)

12.2 ٹرانسجینک لائیوسٹاک اوران کے استعمال (Transgenic Live Stock and Their Uses)

12.3 ٹرانسجینک سور(Transgenic Pigs)

12.4 ٹرانسجینک بکری(Transgenic Goats)

12.5 ٹرانسجینک بھیڑ(Transgenic Sheep)

12.6 ٹرانسجینک چکن(Transgenic Chicken)

12.7 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

12.8 کلیدی الفاظ(Keywords)

12.9 نمونہ امتحانی سوالات(Model Examination Questions)

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

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

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

12.10 فرہنگ(Glossary)

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

12.0 تمہید(Introduction)

ٹرانسجینک لائیوسٹاک، 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 انجنیئر کیا ہے۔ یہ تعارف جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانوروں کے تنوع اور زراعت، بائیو میڈیسن اور اس سے آگے ان کے بے شمار ایپلی 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 انجنیئر۔ انسانی بیماریوں کا مطالعہ کرنے اور علاج کی مداخلتوں 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 بائیو ٹکس 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 بائیوری ایکٹرز میں علاج کے پروٹین، اینٹی باڈیز اور ویکسین کی لاگت سے موثر پیداوار۔ اعضاء کی پیوند کاری: زینوٹرانسپلانٹیشن کے لیے اعضاء اور ٹشوز 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 اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو جائیں گے 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 اسٹاک 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 ایپلی کیشنز پیش کرتے ہیں۔ ٹرانسجینک لائیو سٹاک کے متنوع استعمال کی تفصیلی تلاش یہ ہے:

1. پیداواری صلاحیت میں اضافہ (Increased Productivity)

- ❖ ٹرانسجینک مویشیوں کو ان خصلتوں کی نمائش کے لیے انجنیئر کیا جا سکتا 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 جا سکتا ہے، بکریوں کو زیادہ دودھ کی پیداوار کے لیے انجنیئر کیا جا سکتا ہے، اور تیز رفتار ترقی کی شرح کے لیے خنزیر کو پالا جا سکتا 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(Disease Resistance)

- ❖ جینیاتی تبدیلیاں ان بیماریوں کے خلاف مزاحمت فراہم کر سکتی ہیں جو عام طور پر مویشیوں کو متاثر کرتی ہیں، اینٹی بائیو ٹکس کی ضرورت کو کم کرتی ہیں اور جانوروں کی فلاح و بہبود کو بہتر بناتی ہیں۔ ٹرانسجینک مویشیوں کو وائرل، بیکٹیریل اور پرجیوی انفیکشن کے خلاف مزاحمت کے لیے انجنیئر کیا جا سکتا ہے، جس سے صحت مند جانور ہوتے ہیں اور کسانوں کے معاشی نقصانات کو کم کیا جاتا ہے۔

3. بایومیڈیکل ریسرچ(Biomedical Research)

❖ 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 پیتھالوجی اور فزیالوجی کی قریب سے نقل کرتے ہیں۔ یہ ماڈلز بیماری کے طریقہ کار، منشیات کی افادیت، اور حفاظتی جانچ کے مطالعہ کو زیادہ جسمانی طور پر متعلقہ سیاق وسباق میں قابل بناتے ہیں۔

4. فارماسیوٹیکل پروٹین کی پیداوار(Pharmaceutical Protein Production)

❖ ٹرانسجینک مویشیوں کو ان کے دودھ، خون، یا بافتوں میں قیمتی پروٹین یا دواسازی پیدا کرنے کے لیے انجنیئر کیا جا سکتا ہے۔ مثال کے طور پر، بکریوں کو ان کے دودھ میں اینٹی تھرومبن، جمنے کے عوامل، یا اینٹی باڈیز جیسے علاجاتی پروٹین تیار کرنے کے لیے تبدیل کیا جا سکتا ہے۔ ان پروتینوں کو طبّی استعمال کے لیے کاٹا اور صاف کیا جا سکتا ہے، جو بائیو فارماسیوٹیکلز کے لیے ایک سرمایہ کاری مؤثر اور توسیع پذیر پروڈکشن پلیٹ فارم پیش کرتا ہے۔

5. زینوٹرانسپلانٹیشن(Xenotransplantation)

❖ خنزیر کے ایسے اعضاء ہوتے ہیں جو جسمانی طور پر انسانوں سے ملتے جلتے ہیں، جو انہیں زینوٹرانسپلانٹیشن 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 ٹرانسپلانٹیشن 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 زینوجینک اینٹیجنز کے کم اظہار کے ساتھ ٹرانسجینک سور تیار کیے جا رہے ہیں۔

6. ماحولیاتی پائیداری(Environmental Sustainability)

❖ جینیاتی انجینئرنگ کے ذریعے، مویشیوں کو ان خصلتوں کے لیے پالا جا سکتا ہے جو زراعت میں ماحولیاتی پائیداری کو فروغ دیتے ہیں۔ مثال کے طور پر، ٹرانسجینک مویشیوں کو فیڈ کی بہتر کارکردگی، میتھین کے اخراج میں کمی، یا غذائی اجزاء کے بہتر استعمال کے لیے انجنیئر کیا جا سکتا 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(Nutritional Enhancement)

❖ ٹرانسجینک مویشیوں کو بہتر غذائی مواد کے ساتھ کھانے کی مصنوعات تیار کرنے کے لیے انجنیئر کیا جا سکتا ہے۔ مثال کے طور پر، مویشیوں کو فائدہ مند اومیگا 3 فیٹی ایسڈز کی بڑھتی ہوئی سطح کے ساتھ دودھ پیدا کرنے کے لیے تبدیل کیا جا سکتا ہے، یا مرغیوں کو وٹامنز یا اینٹی آکسیڈنٹس سے بھرپور انڈے دینے کے لیے انجنیئر کیا جا سکتا ہے۔ یہ غذائیت میں اضافہ صارفین کو ممکنہ صحت کے فوائد پیش کرتا

ہےاورانسانی خوراک میں مخصوص غذائیت کی کمی کودور کرتاہے۔

آخر میں، ٹرانسجینک لائیو سٹاک کے استعمال متنوع اور دور رس ہیں، زراعت، بائیو میڈیسن، 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 ایپلی 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 فائٹیز جین
- استعمال کریں: Enviropig کو اس کے لعاب اور نظام انہضام میں انزائم فائٹیز پیدا کرنے کے لیے بنایا گیا ہے۔ فائٹیز خنزیروں کو فائیٹیٹ 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: زینوٹرانسپلانٹیشن 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 زینوٹرانسپلانٹیشن کا وعدہ کرتے ہیں، جو پیوند کاری کے لیے انسانی عطیہ دہندگان کے اعضاء کی کمی کا ممکنہ حل پیش کرتے ہیں۔

3. ہیموفیلیا 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 جمنے والے عوامل ہیموفیلیا کے علاج کے لیے استعمال کیے جاتے ہیں، یہ ایک جینیاتی خون بہنے کی خرابی ہے جس کی خصوصیت جمنے کے عوامل میں کمی ہے۔ خنزیر طبّی استعمال کے لیے علاج کے پروٹین کی تیاری کے لیے بائیوایکٹر کے طور پر کام کرتے ہیں۔

4. ہائی اومیگا3 فیٹی ایسڈ پگز (High Omega-3 Fatty Acid Pigs)

❖ خصوصیت: اومیگا3 فیٹی ایسڈ کی مقدار میں اضافہ کے ساتھ گوشت کی پیداوار

❖ جین داخل کیا گیا: اومیگا3 فیٹی ایسڈ کی ترکیب میں شامل جینز انکوڈنگ انزائمز۔

❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک خنزیر کو فائدہ مند اومیگا3 فیٹی ایسڈ کی اعلی سطح کے ساتھ گوشت تیار کرنے کے لیے انجنیئر کیا جاسکتا ہے، جیسے کہ eicosapentaenoic acid (EPA) اور docosahexaenoic acid (DHA)۔ Omega-3 افزودہ 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 انٹری ریسیپٹرز)۔

❖ 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 ریسپائریٹری 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 ایپلی کیشنز پیش کرتے ہیں۔ یہاں ٹرانسجینک بکروں کی کچھ مثالیں، ان کی خصوصیات، اور داخل کردہ جین ہیں:

1. ایٹرین 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 تھروبین کا استعمال موروثی اینٹی تھروبین کی کمی والے مریضوں میں یا بعض طبّی طریقہ کار جیسے سرجری کے دوران خون کے جمنے 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 بائیو میڈیکل ایپلی کیشنز کے لیے استعمال کی جاسکتی ہے۔ مکڑی کا ریشم اپنی غیر معمولی طاقت اور لچک کے لیے جانا جاتا ہے، جو اسے بائیو میٹریلز، ٹیکسٹائل اور طبّی آلات کی تیاری کے لیے قیمتی بناتا ہے۔

3. GTC بایوتھراپیٹکس 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 بایوتھراپیٹکس کی ٹرانسجینک بکریوں کو ان کے دودھ میں مختلف علاجاتی پروٹین تیار کرنے کے لیے بنایا گیا ہے، بشمول ہیموفیلیا 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 دواسازی 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 مورفوجینیٹک پروٹین ریسیپٹر 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)۔

اومیگا3افزودہ بکری کادودھ ایک غذائی فائدہ پیش کرتاہےاور صارفین کو صحت کے فوائد فراہم کر سکتا ہے۔

12.5 ٹرانسجینک بھیڑ(Transgenic Sheep)

1. الفا-1اینٹی ٹریپسن(AAT)بھیڑ(Alpha-1 Antitrypsin (AAT) Sheep)

- سائنسی نام:Ovis aries
- داخل کردہ جین:انسانیAAT جین
- استعمال کریں: ٹرانسجینک بھیڑوں کو ان کے دودھ میں الفا-1 اینٹی ٹریپسن (AAT) بنانے کے لیے بنایا گیا ہے۔ AATایک پروٹیز روکنے والا ہے جوالفا-1اینٹی ٹریپسن کی کمی جیسے جینیاتی امراض کے علاج کے لیےاستعمال ہوتاہے، جو انسانوں میں پھیپھڑوں اور جگر کی بیماری کا باعث بن سکتا ہے۔انسانیAAT جین کو بھیڑوں کے جنین میں داخل کیا جاتا ہے، جس سے ٹرانسجینک بھیڑوں کے دودھ میں فعالAATپروٹین 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 کوانکوڈنگ کرنے والے جین
- استعمال کریں: محققین نے ٹرانسجینک بھیڑ بنائی ہے جواپنے دودھ میں مکڑی کے ریشم کے پروٹین پیدا کرنے کی صلاحیت رکھتی ہے۔ مکڑی کاریشم اپنی قابل ذکر طاقت اور لچک کے لیے جانا جاتاہے، جواسے مختلف صنعتی اور طبّی استعمال کے لیے قیمتی بناتاہے، جیسے سیون، بایومیٹریلز،اور حفاظتی لباس۔ مکڑی کے ریشم کے پروٹین کوانکوڈنگ 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 کوایگولیشن فیکٹر VIII (FVIII)بھیڑ (Human Coagulation Factor VIII (FVIII) Sheep)

- سائنسی نام:*Ovis aries*
- داخل کردہ جین:انسانیFVIII جین
- استعمال کریں:ٹرانسجینک بھیڑوں کوان کے دودھ میں انسانی جمنے کا عنصر(FVIII) VIII پیدا کرنے کے لیے تیار کیا گیا ہے۔FVIII ہیموفیلیاے والے افراد میں جمنے کاایک عنصر ہے، جوایک جینیاتی خون بہنے کی خرابی ہے۔ بھیڑ سے تیار کردہFVIII ہیموفیلیا کے علاج کے لیےاس ضروری پروٹین کا ممکنہ ذریعہ پیش کرتاہے۔انسانیFVIII 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 انجنیئر 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 سکریپی، بھیڑوں کو متاثر کرنے والی پرین بیماری۔ بیماریوں کے خلاف مزاحمت سے وابستہ مختلف جینز، جیسے کہ مدافعتی ردعمل کے جینز یا وائرل انٹری ریسیپٹر جین، کو بھیڑوں کے جنین میں داخل کیا جاتا ہے تاکہ ہدف شدہ بیماریوں کے خلاف مزاحمت فراہم کی جا سکے۔

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، یا رنگ 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 جنین میں داخل کیے جاتے ہیں۔

12.6 ٹرانسجینک چکن (Transgenic Chicken)

جینیاتی تبدیلی کی تکنیکوں کے ذریعے انجنیئر شدہ ٹرانسجینک مرغیاں، زراعت، بائیو میڈیسن 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: بیٹا کیروٹین 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 بیٹا کیروٹین۔ بیٹا کیروٹین 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 امیونوتھراپی کے لیے LAK خلیات کی پیداوار
- ❖ جین داخل کیا گیا: جین انکوڈنگ سائٹوکائنز (مثلاً، interleukin-2، interleukin-12)۔
- ❖ استعمال کریں: ٹرانسجینک LAK خلیات مرغیوں کو سائٹوکائنز کے اظہار کے لیے انجنیئر 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 کو کینسر کی امیونوتھراپی میں ٹیومر کے خلاف جسم کے مدافعتی ردعمل کو بڑھانے کے لیے استعمال کیا جا سکتا 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 ریکومبینٹ پروٹین یا اینٹی باڈیز بنانے کے لیے ڈیزائن کیا گیا ہے۔ علاج کے پروٹین یا اینٹی باڈیز کو انکوڈنگ کرنے والے جین چکن ایمبریو میں داخل کیے جاتے ہیں، جس سے ٹرانسجینک مرغیوں کے انڈے کی سفیدی میں ان پروتینوں کا اظہار ہوتا ہے۔ یہ پیداواری نظام طبّی 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 مائکروبیل انزائم، پیدا کرنے کے لیے انجنیئر 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 افزودہ 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 کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو گیے ہے 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۔

12.8 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 جا سکے جو قدرتی طور پر پرجاتیوں میں موجود نہیں ہیں۔ ان ترامیم کا مقصد عام طور پر پیداوری، 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 انجنیئر کیا جا سکتا 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 بائیوٹکس 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 انجنیئر کیا جا سکتا 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 جا سکتا ہے جو زراعت میں ماحولیاتی _____ کو فروغ دیتے ہیں۔
7. ٹرانسجینک مویشیوں کو بہتر _____ مواد کے ساتھ کھانے کی مصنوعات تیار کرنے کے لیے انجنیئر کیا جا سکتا 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 اسپائیڈر وئن بکرے اپنے دودھ میں مکڑی کے سلک پروٹین تیار کرتے ہیں، جنہیں کاٹا جا سکتا ہے اور مختلف صنعتی اور _____ ایپلی کیشنز کے لیے استعمال کیا جا سکتا 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. بایومیڈیکل 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 ٹریپسن (AAT) پیدا کرنے کے لیے استعمال کرنے کے ممکنہ فوائد کی وضاحت کریں،اور AAT کس طبّی 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 ایپلی 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	بائیو میڈیکل ایپلی کیشنز	-	:

مطلب: انسانی صحت سے متعلق مسائل کو حل کرنے کے لیے حیاتیاتی اور طبّی علم، اوزار، اور تکنیک کا عملی استعمال۔ بائیو میڈیکل ایپلی کیشنز سرگرمیوں کی ایک وسیع رینج کو گھیرے ہوئے ہیں، بشمول نئی ادویات اور علاج کی تیاری، تشخیصی ٹیسٹ، طبّی آلات، اور مختلف بیماریوں اور طبّی 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

13.0 تمہید(Introduction)

13.1 مقاصد(Objectives)

13.2 بایوفارماسیوٹیکلز اور بائیومالیکیولز کی پیداوار (Production of Biopharmaceuticals and Biomolecules)

13.3 ٹرانسجینک جانوروں کے ذریعہ عطیہ کرنے والے اعضاء کی پیداوار (Production of Donor Organs by Transgenic Animals)

13.4 ناک آؤٹ چوہے(Knockout Mice)

13.5 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

13.6 کلیدی الفاظ(Keywords)

13.7 نمونہ امتحانی سوالات(Model Examination Questions)

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)

13.8 فرہنگ(Glossary)

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

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 ایپلی 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 بائیومالیکیولز 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 مالیکیولز 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 طبّی اثرات کے ساتھ اعلیٰ معیار کے علاج کے ایجنٹوں کی تخلیق میں بھی سہولت فراہم کرتا ہے۔

مزید برآں، یہ باب زینوٹرانسپلانٹیشن کے فرنٹیئر 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 انجنیئر کیا جا سکتا ہے، جس سے ان کے اعضاء کو انسانوں میں ٹرانسپلانٹیشن کے لیے موزوں بنایا جا سکتا 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 پیتھالوجی 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 طبّی 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 اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو جائیں گے کہ :

- 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 بایوری ایکٹرز میں تبدیل کرنے کے عمل کی وضاحت کریں۔
- زینوٹرانسپلانٹیشن کے فرنٹیئر اور جینیاتی طور پر تبدیل شدہ جانوروں کے کردار کا جائزہ لیں، خاص طور پر خنزیر، انسانی پیوندکاری 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 بایوفارماسیوٹیکلز اور بائیومالیکیولز 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 تھرومبن *III*، بکریوں کے جینوم میں پرونیوکلیئر مائیکروانجیکشن یا سومیٹک سیل نیوکلیئر 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، ٹرانسجینک 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۔ ٹرانسجینک بکریوں سے دودھ اکٹھا کیا جاتا ہے، اور دلچسپی کے پروٹین کو کرومیٹوگرافی اور دیگر تکنیکوں کے ذریعے پاک کیا جاتا ہے۔

2. ٹرانسجینک بکریوں سے *ATryn® (Recombinant Antithrombin)*

- مثال کے طور پر جین: انسانی اینٹی تھرومبن *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: ٹرانسجینک 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 امیونوگلوبلینز (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 لیمفوسائٹس میں ظاہر ہوتے ہیں، جو اینٹی باڈی کی پیداوار کے لیے ذمہ دار ہوتے ہیں۔
- ❖ پیداواری عمل: ٹرانسجینک چوہوں کو ہدف کے اینٹیجن 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 جلوہ گر سیال سے حاصل کی جاتی ہیں اور کینسر اور آٹوامیون 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 ٹرپسن (AAT) کو انکوڈنگ کرنے والا جین، پھیپھڑوں کے کام کے لیے اہم ایک پروٹیز 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 علاج کی صلاحیت ہوتی ہے۔

5. ٹرانسجینک پودوں اور جانوروں سے بایوفارماسیوٹیکل **(Biopharmaceuticals from Transgenic Plants and Animals)**

- ❖ مثال کے طور پر جین: مختلف جینز کو انکوڈنگ کرنے والے علاج کے پروٹین، انزائمز، اینٹی باڈیز، یا سائٹوکائنز 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 جا سکتا 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 دواسازی کے درجے کی مصنوعات حاصل کرنے کے لیے پاک کیا جاتا ہے۔

فارماسیوٹیکلز اور بائیومالیکیولز کی تیاری 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 ایپلی 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 زینوٹرانسپلانٹیشن 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* جین (*GGTA1*) کو اکثر ٹرانسجینک خنزیروں میں ناک آؤٹ کے لیے نشانہ بنایا جاتا ہے جس کا مقصد زینوٹرانسپلانٹیشن ہے۔یہ جین ایک انزائم کو انکوڈ کرتا ہے جو *α-gal* اینٹیجن کی ترکیب کے لیے ذمہ دار ہے، جو کہ انسانی اینٹی باڈیز کا ایک بڑا ہدف ہے۔
- ناک آؤٹ حکمت عملی: *CRISPR-Cas9* جین ایڈیٹنگ یا دیگر تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے، *α-gal* اینٹیجن اظہار کو ختم کرنے اور *xenotransplantation* میں ہائپر یکیوٹ 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 کمپیٹیبلٹی کمپلیکس (*MHC*) اظہار۔

2. ٹرانسجینز کا اظہار (Expression of Transgenes)

- ٹشو-مخصوص پروموٹرز: ٹرانسجینک سوروں کو ٹشو-مخصوص پروموٹرز کے ساتھ انجنیئر کیا جاتا ہے تاکہ ٹرانسپلانٹیشن کے لیے ہدف بنائے گئے مخصوص اعضاء، جیسے دل، گردے، جگر، یا لبلبہ میں مطلوبہ ٹرانسجینز کا اظہار کیا جاسکے۔

❖ ریگولیٹری عناصر: مناسب اظہار کی سطحوں اور بافتوں کی مخصوصیت 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 ٹرانسجن 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 ٹرانسپلانٹیشن 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 ٹرانسپلانٹیشن تک عملداری اور فعالیت کو برقرار رکھنے کے لیے کنٹرول شدہ حالات میں منتقل کیا جاتا ہے۔

5. زینوٹرانسپلانٹیشن (Xenotransplantation)

❖ مثال: آخری مرحلے کے اعضاء کی ناکامی، جیسے کہ جگر کی سروسس یا دل کی ناکامی والے مریض کو طبّی ضرورت اور مطابقت کی بنیاد پر زینوٹرانسپلانٹیشن 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 ٹرانسپلانٹ کیا جاتا ہے، مناسب عروقی اناسٹوموسس اور عضو کے کام کو یقینی بناتا ہے۔

❖ ٹرانسپلانٹ کے بعد کی نگرانی: وصول کنندہ کو ٹرانسپلانٹ کے بعد کی سخت نگرانی سے گزرنا پڑتا ہے اور اسے مسترد ہونے سے بچنے اور ٹرانسپلانٹ 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 زینوٹرانسپلانٹیشن 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 جا سکتے 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 بایو میڈیکل 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 ٹکنالوجی، 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، نیوروڈیجینریٹو عوارض، اور میٹابولک سنڈروم۔

2. تخلیق کے طریقے (Methods of Generation)

- ٹارگیٹڈ جین میں خلل: ناک آؤٹ چوہوں کو عام طور پر برانن اسٹیم سیلز میں ہومولوگس ری کمبینیشن 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 پر ڈبل 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 روگجنن 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: نیوروڈیجینریٹیو بیماریوں سے منسلک جینوں میں تبدیلیوں کے ساتھ ناک آؤٹ چوہوں، جیسے کہ الزائمر یا پارکنسنز کی بیماری، انسانی پیتھالوجی 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 لیپٹین یا انسولین ریسیپٹرز، 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 بایومیڈیکل تحقیق میں انقلاب برپا کر کے جین کے فنکشن کی درست جوڑ توڑ 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 کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو گیے ہے کہ :

- ❖ جینیاتی انجینئرنگ کے تصور کی وضاحت کریں اور ٹرانسجینک جانوروں کا استعمال کرتے ہوئے فارماسیوٹیکلز، بائیومالیکیولز 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 بایوری ایکٹرز میں تبدیل کرنے کے عمل کی وضاحت کریں۔
- ❖ زینوٹرانسپلانٹیشن کے فرنٹیئر 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)

ٹرانسجینک جانور	Transgenic Animal	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۔
زینوٹرانسپلانٹیشن	Xenotransplantation	خلیات، ٹشوز، یا اعضاء کی ایک نوع سے دوسری نسل میں، عام طور پر جانوروں سے انسانوں میں ٹرانسپلانٹیشن۔
ناک آؤٹ چوہے	Knockout mice	وہ چوہے جن کو جینیاتی طور پر ایک مخصوص جین "ناک آؤٹ" یا غیر فعال کرنے کے لیے بنایا گیا ہے، جو محققین کو فینوٹائپ اور فنکشن پر جین کے نقصان کے اثرات کا مطالعہ کرنے کے قابل بناتے ہیں۔
بائیوفارماسیوٹیکل	Biopharmaceuticals	حیاتیاتی ذرائع سے حاصل کردہ دواسازی، 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، ٹرانسجن کو عام طور پر _____ پروموٹر 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. ٹرانسپلانٹیشن کے لیے عطیہ کرنے والے اعضاء کی کمی کو زینوٹرانسپلانٹیشن کے لیے _____ جانوروں کے استعمال سے پورا کیا جاسکتا ہے۔ٹرانسجینک

4. CRISPR-Cas9 ٹیکنالوجی مخصوص جینومک _____ پر ڈبل اسٹرینڈ بریکس کو شامل کرکے ناک آؤٹ چوہوں کی زیادہ درست اور موثر نسل کو قابل بناتی ہے۔

5. زینوٹرانسپلانٹیشن کے لیے بنائے گئے ٹرانسجینک خنزیر اکثر جینیاتی تبدیلی سے گزرتے ہیں تاکہ _____-antigen.α gal کی ترکیب کے لیے ذمہ دار ایزائم 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 ٹرانسپلانٹیشن کے لیے ہدف بنائے گئے مخصوص اعضاء میں مطلوبہ ٹرانسجینز کا اظہار کیا جاسکے۔

7. ناک آؤٹ چوہے _____ سے وابستہ جینیاتی تغیرات کی نقل کرکے انسانی بیماریوں کے روگجنن کا مطالعہ کرنے کے لیے قیمتی نمونے کے طور پر کام کرتے ہیں۔

8. ٹرانسجینک بکریوں کو ATryn® پیدا کرنے کے لیے انجنیئر کیا گیا ہے جو اپنے _____ .دودھ میں دوبارہ پیدا ہونے والے انسانی اینٹی تھرومبن III کو خارج کرتے ہیں

9. _____ چوہے انسانی بیماریوں کی مالیکیولر بنیاد کو واضح کرنے کے لیے ناگزیر اوزار بن چکے ہیں، بشمول کینسر، نیوروڈیجینریٹو عوارض، اور میٹابولک سنڈروم۔ناک آؤٹ

10. زینوٹرانسپلانٹیشن میں خلیات، ٹشوز، یا اعضاء کی ایک نوع سے دوسری نسل میں، عام طور پر _____ سے انسانوں میں پیوندکاری 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. زینوٹرانسپلانٹیشن کے لیے ٹرانسجینک جانوروں کے استعمال سے وابستہ ممکنہ فوائد اور چیلنجز پر تبادلہ خیال کریں۔
3. اعضاء کی پیوندکاری کے لیے انجنیئر 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. بائیوفارماسیوٹیکلز 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 زینوٹرانسپلانٹیشن کی فزیبلٹی اور حفاظت کا جائزہ لیں۔
3. ٹرانسجینک جانوروں سے ماخوذ بائیو فارماسیوٹیکلز کے پیداواری عمل اور ایپلی 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

(Molecular Diagnostic of Genetic Diseases)

اکائی کے اجزا

14.0 تمہید(Introduction)

14.1 مقاصد(Objectives)

14.2 سسٹک فائبروسس(Cystic Fibrosis)

14.2.1 ایلیل مخصوص اولیگونوکلیوٹائڈ(ASO)ہائبرڈائزیشن (Allele Specific Oligonucleotide (ASO) Hybridisation)

14.3 سکیل سیل انیمیا(Sickle Cell Anemia)

14.3.1 Polymerase Chain Reaction - Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

14.4 ممالیہ کے خلیوں میں کلون شدہ جین کا اظہار (Expressing cloned genes in mammalian cells)

14.5 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

14.6 کلیدی الفاظ(Keywords)

14.7 نمونہ امتحانی سوالات(Model Examination Questions)

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

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

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

14.8 فرہنگ(Glossary)

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

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 اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو جائیں گے کہ:

- ❖ 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 ریسیسیو فیشن میں وراثت میں ملتا ہے جو پلمونری، لبلبے، معدے اور تولیدی نظام کو متاثر کرتا ہے۔ یہ 7ویں کروموسوم (7q31.2)پر واقع CFTR جین میں تغیرات کی وجہ سے ہوتا ہے جو کہ سسٹک فائبروسس ٹرانس میبرن کنڈکنس ریگولیٹری پروٹین کو انکوڈنگ کرتا ہے، جو کہ اپکلا خلیوں میں موجود ایک جھلی کلورائڈ 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 اتپریورتن ہے جس کی وجہ سے CFTR میں 508 ویں پوزیشن پر فینیلالینین 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 ایکسرے، پلمونری فنکشن ٹیسٹ اور سویٹ ٹیسٹ ہیں جو پسینے میں نمک کی مقدار ($>$60mmol/L) 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

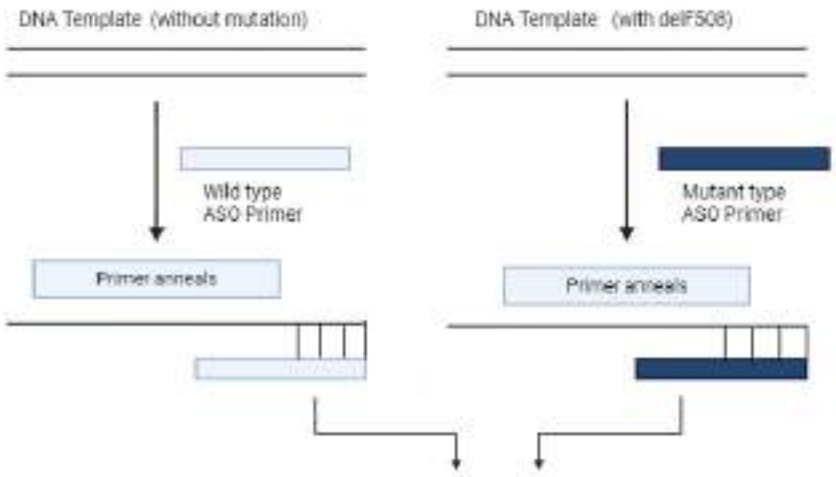
کے لیے ذمہ دار میوٹیشن کی قسم کے بارے میں معلومات فراہم کرے گی جس سے آنے والی نسلوں میں جینیاتی مشاورت میں مدد ملے گی۔۔

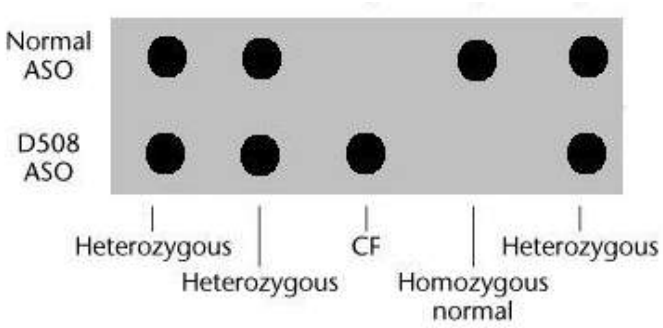
جینیاتی جانچ کے ذریعے تغیرات کی شناخت پی سی آر، آر ایف ایل پی، ڈی این اے کی ترتیب یا ایلیل مخصوص اولیگونیوکلیوٹائڈ (اے ایس او) ہائبرڈائزیشن کے ذریعے کی جاسکتی ہے۔ سسٹک فائبروسس کی ڈی این اے پر مبنی تشخیص کو سمجھنے کے لیے ہم یہاں ASO کی سادہ تکنیک پر بات کریں گے۔

- ❖ 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 کارٹلیج، لیگامینٹ اور جلد۔

14.2.1 ایلیل مخصوص اولیگونوکلیوٹائڈ (ASO) ہائبرڈائزیشن (Allele Specific Oligonucleotide (ASO) Hybridisation)

اس ٹیسٹ میں ایک مختصر نیوکلیوٹائڈ چین جسے oligonucleotide probe کہا جاتا ہے ڈیل ایف 508 ڈیلیٹیشن کے ساتھ نارمل اور اتپریورتی ایللی کے لیے ڈی این اے کی ترتیب کے تکمیلی سلسلے کے ساتھ بنایا گیا ہے، یعنی ایک ایلیل مخصوص اولیگونوکلیوٹائڈ (ASO)۔ اگر فرد اس اتپریورتن 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 آئسولیشن ہوتا ہے۔ الگ تھلگ ڈبل پھنسے 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 پھنسے ہوئے ڈی این اے میں اے ایس او کی ہائبرڈائزیشن آٹوریڈیوگرام پر ایک جگہ سے ظاہر ہوتی ہے، جو عام ایلیل یا ڈیل ایف 508 ایلیل یا دونوں ایلیلز کی موجودگی کی نشاندہی کرتا ہے جو ان کے جین ٹائپ کو ہوموزائگس نارمل، ہوموزائگس اتپریورتی 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۔۔



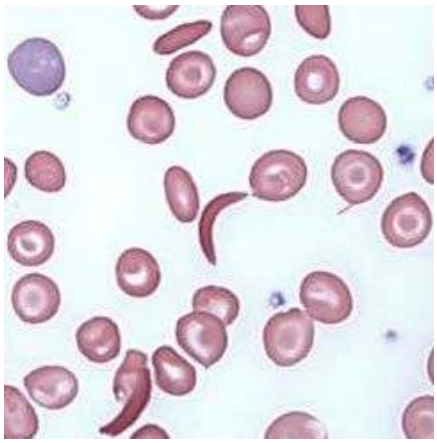


یہ اعداد و شمار سسٹک فائبروسس کی اسکریننگ کے لیے ایللی مخصوص اولیگوہائبرڈائزیشن طریقہ کے پیچھے اصول کو واضح کرتا ہے۔

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 ایف508 میوٹیشن کے لیے متضاد کیریئر ہے۔

14.3 سکیل سیل انیمیا(Sickle Cell Anemia)

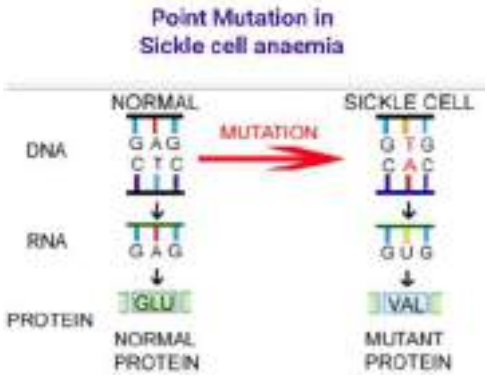
سکل سیل انیمیا ایک جینیاتی عارضہ ہے جو خود کار طریقے سے وراثت میں ملتا ہے جو ایک سے زیادہ نظاموں کو متاثر کرتا ہے جس کے نتیجے میں وقت کے ساتھ ساتھ اعضاء کو بتدریج نقصان پہنچتا ہے۔ یہ ہیموگلوبن β چین جین میں 6ویں کوڈن کو GAG > GTG سے تبدیل کرنے والے متبادل (A>T) پوائنٹ کی تبدیلی کی وجہ سے ہوتا ہے۔ ڈی این اے میں اس تبدیلی کے نتیجے میں، امینو ایسڈ گلوٹامک ایسڈ ہیموگلوبن پروٹین میں ویلائن 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 βS/βS، ہوموزائگس جین کی دو تبدیل شدہ کاپیاں ہوتی ہیں۔ سکیل سیل خاصیت والے افراد متفاوت ہوتے ہیں جن میں ایک نارمل ایلیل اور دوسرا اتپریورتی ایلیل (βA/βS) ہوتا ہے جہاں عام افراد میں βA/βA ہوتا ہے۔



مندرجہ بالا اعداد و شمار عام اور 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

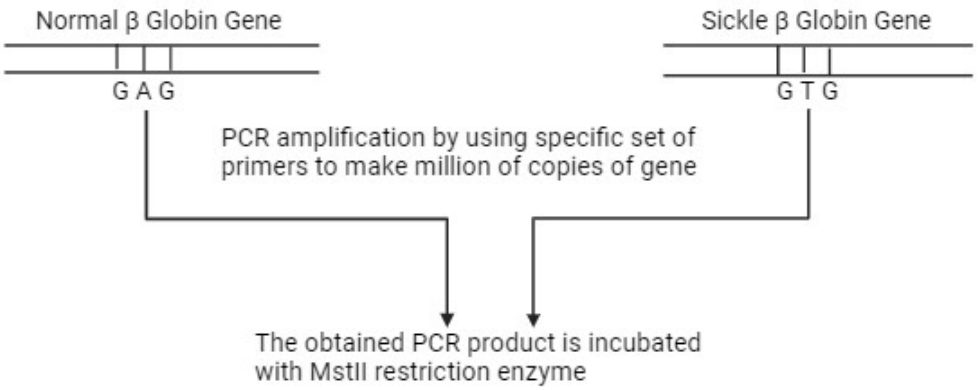
پتہ لگانے کے لیے،DNAپر مبنی مالیکیولر ٹیسٹ یہاںPCR – RFLPطریقہ پر بات کریں گے۔

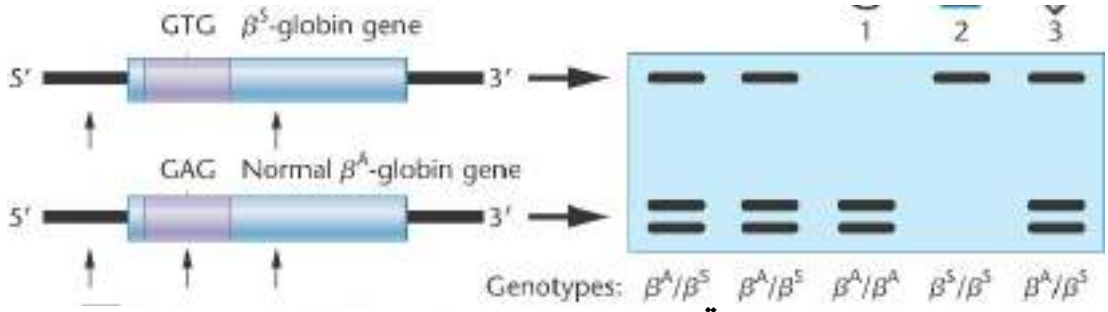


یہ اعداد و شمار بیمار سیل انیمیا کی وجہ کے پیچھے میکانزم کو واضح کرتا ہے جہاں نقطہ اتپریورتن کی وجہ سے نیوکلیوٹائڈA سےTکا متبادل ہوتا ہے جس کے نتیجے میں اتپریورتی پروٹین میں گلوٹامک ایسڈ کو ویلائن میں تبدیل کیا جاتا ہے۔

14.3.1 Polymerase Chain Reaction - Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

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۔(βA βA)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 βSβS لے رہا ہو۔اگر فرد سکیل سیل ٹریٹ(βAβS)کا ہے تو کل تین ٹکڑے پیدا ہوتے ہیں،دو βA سے اور ایک βS ایلیل سے۔ان ٹکڑوں کو جیل الیکٹروفورسس کے ذریعے دیکھا جا سکتا 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 سیٹ 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۔ تیر 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 اتپریورتن کی وجہ سے MstII انزائم کے لیے ایک پابندی والی جگہ ختم ہو گئی ہے، متاثرہ فرد میں صرف ایک ٹکڑا پیدا کر کے۔

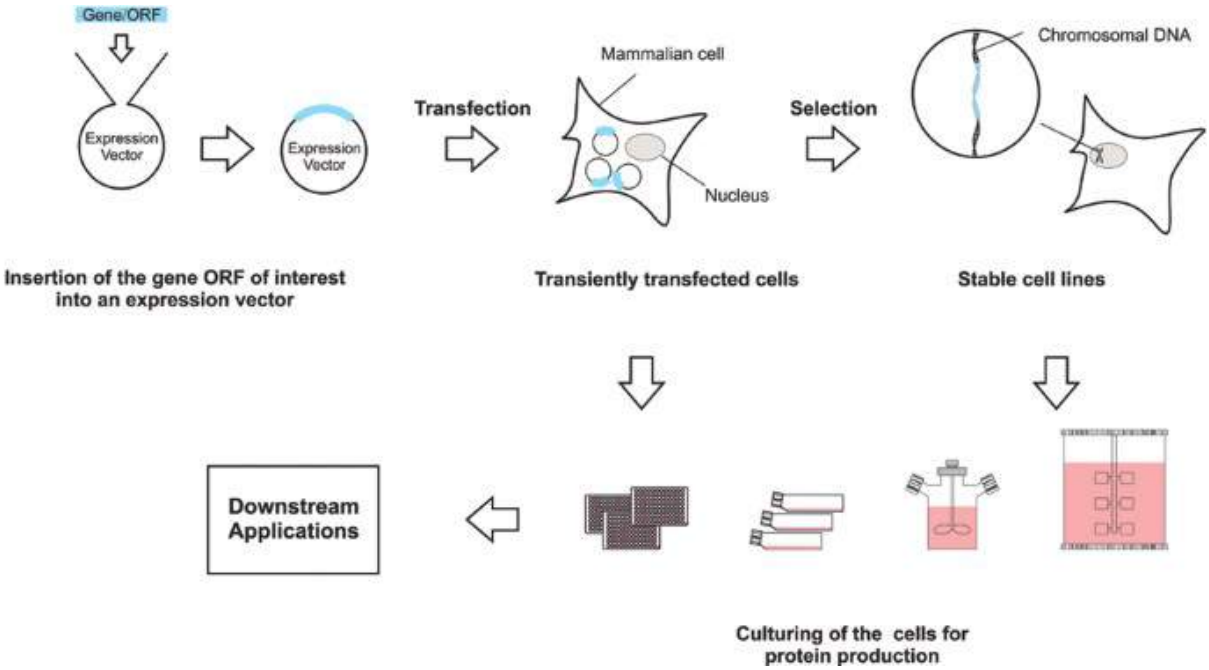
14.4 ممالیہ کے خلیوں میں کلون شدہ جین کا اظہار (Expressing cloned genes in mammalian cells)

جین کلوننگ ڈی این اے سیگمنٹ کی متعدد کاپیاں بنانے کا عمل ہے۔ اس کے لیے مطلوبہ جین کو کلوننگ ویکٹر (بیکٹیریل پلاسمڈ یا بیکٹیریوفیج) کے ساتھ ملا کر ایک ریکومبینینٹ ڈی این اے بنایا جاتا ہے۔ کلوننگ ویکٹر کا استعمال مطلوبہ ٹکڑے کو بڑھانے کے لیے کیا جاتا ہے لیکن اس کے اظہار کو یوکریوٹک 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 مؤثر 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 یوکرائیوٹک پروٹین کو ظاہر کرنے کے لیے بعد از ترجمے کی ترمیم اور پروٹین فولڈنگ کے لیے پروکیریٹس میں مشینری کی کمی ہے۔ اس لیے یوکرائیوٹک خلیات جیسے خمیر اور ممالیہ کے خلیے بڑی مقدار میں فعال یوکرائیوٹک 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 سیلز 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 مارکر۔ 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 لوتھڑے کو تحلیل کرنے میں استعمال ہوتی تھی جسے 1987 میں جینٹیک انکارپوریشن نے تیار کیا تھا۔ آج تک متعدد طبّی اور صنعتی طور پر اہم مصنوعات جیسے کہ ویکسین، انزائمز، ہارمونز وغیرہ کو ریکومبینینٹ 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 کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو گیے ہے کہ :

- ❖ 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 اتپریورتن	Point mutation	: یہ ایک اور نیوکلیوٹائڈ کے ساتھ واحد جنگلی قسم کے نیوکلیوٹائڈ کے متبادل کے طور پر بیان کیا جاتا ہے۔
پروب	Probe	مختصر اولیگونیوکلیوٹائڈ اسٹرینڈ 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	ی: 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 اتپریورتن _____ 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 6ویں کوڈن میں اتپریورتن کی وجہ سے _____ کو ویلائن سے بدل دیا جاتا ہے۔
7. _____ خامروں کو مالیکیولر کینچی کہا جاتا ہے۔
8. چینی ہیمسٹر اووری 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 ایلیل(βA)کے لیے ممکنہ جین ٹائپس لکھیں؟
3. جین کلوننگ کی تعریف کیا ہے؟
4. Restriction enzymes کیا ہیں؟
5. کلوننگ اور ایکسپریشن ویکٹر میں کیا فرق ہے؟

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

1. ASO کیا ہے؟ یہ سسٹک 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. یوکریاٹک پروٹین کا اظہار پروکیریٹک نظام میں کیوں نہیں کیا جا سکتا؟
4. ممالیہ کے خلیے میں کلون شدہ جین کے اظہار کی خاکہ نگاری کی وضاحت کریں؟ ممالیہ سیل ایکسپریشن 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 اسٹرینڈز کی ترکیب کے لیے ایک نقطہ آغاز کی طرح کام کرتا ہے جیسا کہ پولیمریز چین ری ایکشن میں ہوتا ہے۔
Recombinant DNA	ریکومبینینٹ ڈی این اے	ریکومبینینٹ 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 ریکومبینٹ ڈی این اے

(Production of Medicine Using Recombinant DNA)

اکائی کے اجزا

15.0 تمہید(Introduction)

15.1 مقاصد(Objectives)

15.2 ریکومبینٹ انسولین(Recombinant Insulin)

15.3 ریکومبینٹ گروتھ ہارمون(سوماٹوسٹیٹن) (Recombinant Growth Hormone/Somatostatin

15.4 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

15.5 کلیدی الفاظ(Keywords)

15.6 نمونہ امتحانی سوالات(Model Examination Questions)

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)

15.7 فرہنگ(Glossary)

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

15.0 تمہید(Introduction)

ریکومبینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی دو مختلف قسم کے جانداروں کے ڈی این اے مالیکیولز کے آپس میں مل کر ریکومبینٹ 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 اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو جائیں گے کہ :

- ❖ Recombinant DNA مالیکیول کی تخلیق کے پیچھے بنیادی اصول کی وضاحت کر سکتا ہے۔
- ❖ علاج کے مالیکیولز جیسے ریکومبینٹ انسولین اور گروتھ ہارمون کی تیاری میں ریکومبینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کے لاگو ہونے والے پہلوؤں کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں۔

15.2 ریکومبینٹ 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 ایلی للی 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 بایو سنتھیٹک 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 5.8kDa مالیکیول ہے، جو دو پولی پیپٹائڈ چینز A(21 امینو ایسڈ) اور B(30 امینو ایسڈز) پر مشتمل ہے جو دو ڈسلفائیڈ پلوں کے ذریعے جڑے ہوئے ہیں۔ ریکومبینٹ 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۔۔

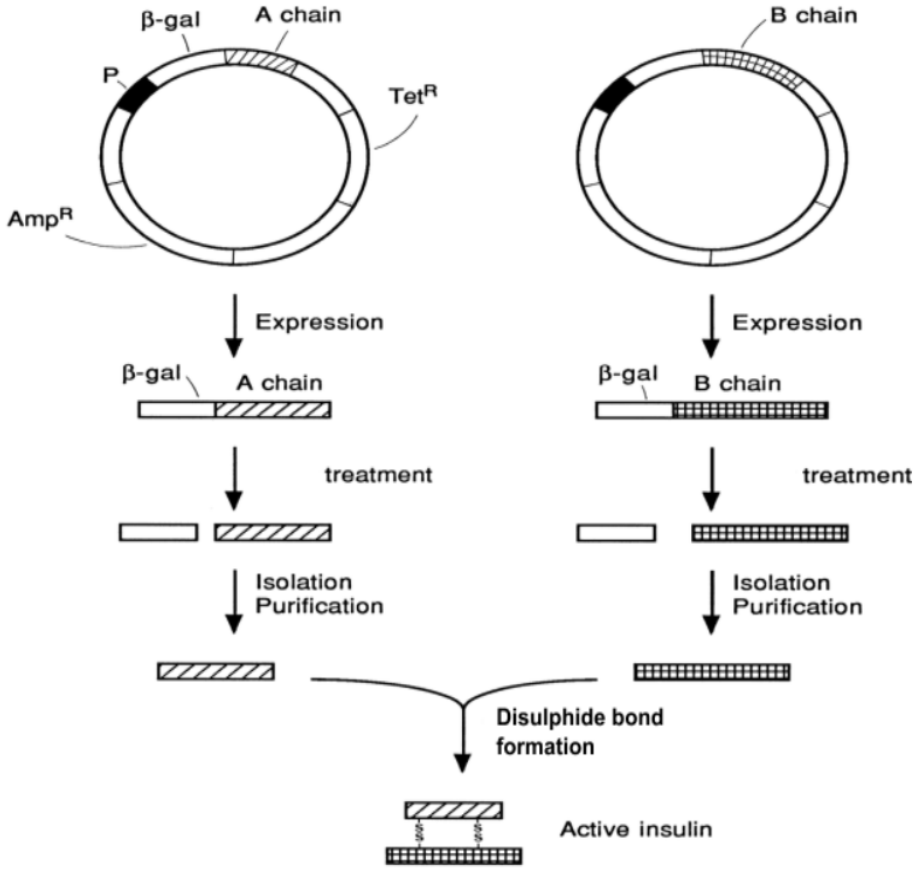
II. بیکٹیریل پلاسمڈ ایکسپریشن ویکٹر DNA مالیکیول کی تیاری جس میں پروموٹر (β-gal) اور قابل انتخاب مارکر (Tetracycline resistance gen – TetR) ہوتا ہے۔

III. زنجیر A اور B کے لیے DNA سیگمنٹ کو ڈنگ کو پلازمڈ ویکٹرز میں الگ سے داخل کرنا دو مختلف ریکومبینٹ DNA مالیکیولز بناتا 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. ریکومبینٹ بیکٹیریا بڑے ابال والے ٹینک میں اگائے جاتے ہیں جو بڑی مقدار میں ریکومبینٹ 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 سیانو جن بر ومائیڈ کو ملا کر A اور B چین کے درمیان ڈسلفائیڈ بانڈز بنا کر فنکشنل ریکومبینٹ ہیومن انسولین تشکیل دیا جاتا ہے جسے ہمولین کہتے ہیں۔



شکل 15.0: بالا اعداد و شمار میں ریکومبینٹ 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 جا سکے۔ 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 ریکومبینٹ گروتھ ہارمون (سوماٹوسٹیٹن) (Recombinant Growth Hormone/Somatostatin)

بونا 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 22KDa سائز کا پولی پیپٹائڈ ہے جو پٹیوٹری غدود میں ترکیب کیا جاتا ہے۔ جیسا کہ یہ پٹیوٹری میں ترکیب کیا جاتا ہے، یہ ایک پری ہارمون کے طور پر بنایا جاتا ہے جس کی لمبائی میں ایک ہائیڈروفوبک لیڈر پیپٹائڈ 24 امینو ایسڈ ہوتے ہیں۔ اس لیڈر پیپٹائڈ کو ہارمون کے اخراج کے دوران پروٹولیٹک طور پر ہٹا دیا جاتا ہے۔ *E.coli* میں لیڈر پیپٹائڈ 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 امینوایسڈز کے لیے لیڈر ترتیب کی کیمیائی ترکیب

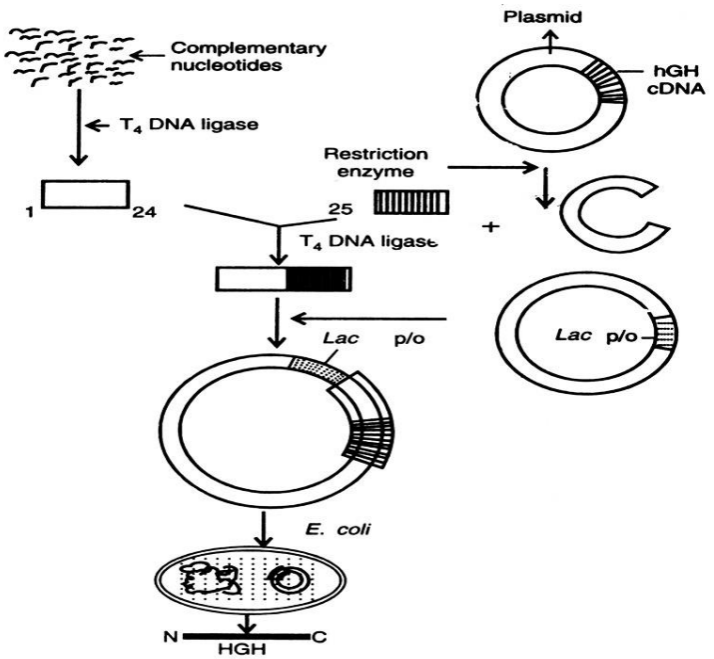
مرحلہ II: انسانی پیٹیوٹری غدود کے بافتوں سے انسانی گروتھ ہارمون (hGH) کے لیے mRNA کو الگ کرنا۔

مرحلہ III: کمپلیمنٹری (cDNA) cDNA کو ریورس ٹرانسکرپٹیس انزائم کا استعمال کرتے ہوئے hGH کے mRNA سے ترکیب کیا جاتا ہے۔۔

مرحلہ چہارم: ڈی این اے لیگیس 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 phGH407 hGH جین کو ظاہر کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔

مرحلہ VI: ریکومبینٹ 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: بالا اعداد و شمار ریکومبینٹ ڈی این اے ٹکنالوجی کے ذریعہ انسانی نمو کے ہارمون کی تیاری کے طریقہ کار کو ظاہر کرتا ہے۔

15.4 اکتسابی نتائج (Learning Outcomes)

اس اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو گیے ہے کہ :

- علاج کے استعمال کے لیے ریکومبینٹ ڈی این اے ٹیکنالوجی کی اہمیت کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں۔
- بائیو فارمیوٹیکل مصنوعات جیسے ریکومبینٹ انسولین اور ہیومن گروتھ ہارمون کی تخلیق کے پیچھے میکانزم کے بارے میں کوئی وضاحت نہیں کر سکتا۔

15.5 کلیدی الفاظ(Keywords)

Lacپروموٹر/آپریٹر	Lac promoter/operator	یہ RNA پولیمریز کے بائنڈنگ کے لیے سائٹ ہے، ایک اینزائم جو نیچے کی دھارے کے علاقے میں موجود جین کی نقل کرتا ہے۔
قابل انتخاب مارکر	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۔
بائیو فارماسیوٹیکل پروڈکٹ	Biopharmaceutical product	: یہ وہ پیچیدہ ادویات ہیں جو زندہ خلیوں یا جانداروں سے بنی ہیں۔

15.6 نمونہ امتحانی سوالات (Model Examination Questions)

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

1. _____ ٹائپ 2 ذیابیطس میلیتس 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 _____ کو پروٹولیٹک طور پر ہٹانا پڑتا ہے۔
5. ریکومبینٹ 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 پروٹولیٹک 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. ریکومبینٹ ڈی این اے ٹکنالوجی کے ذریعے ریکومبینٹ 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 چیلنجوں سے کیسے نمٹتی ہے؟
4. ریکومبینٹ گروتھ ہارمون اور ریکومبینٹ 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 اجزا

16.0 تمہید(Introduction)

16.1 مقاصد(Objectives)

16.2 جین تھراپی(Gene Therapy)

16.2.1 ویکٹر(Vector)

16.2.2 وائرل ویکٹر(Viral Vectors)

16.3 جین تھراپی میں بائیو سیفٹی اور اخلاقی مسائل

(Biosafety and Ethical Issues In Gene Therapy)

16.4 اکتسابی نتائج(Learning Outcomes)

16.5 کلیدی الفاظ(Keywords)

16.6 نمونہ امتحانی سوالات(Model Examination Questions)

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

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

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

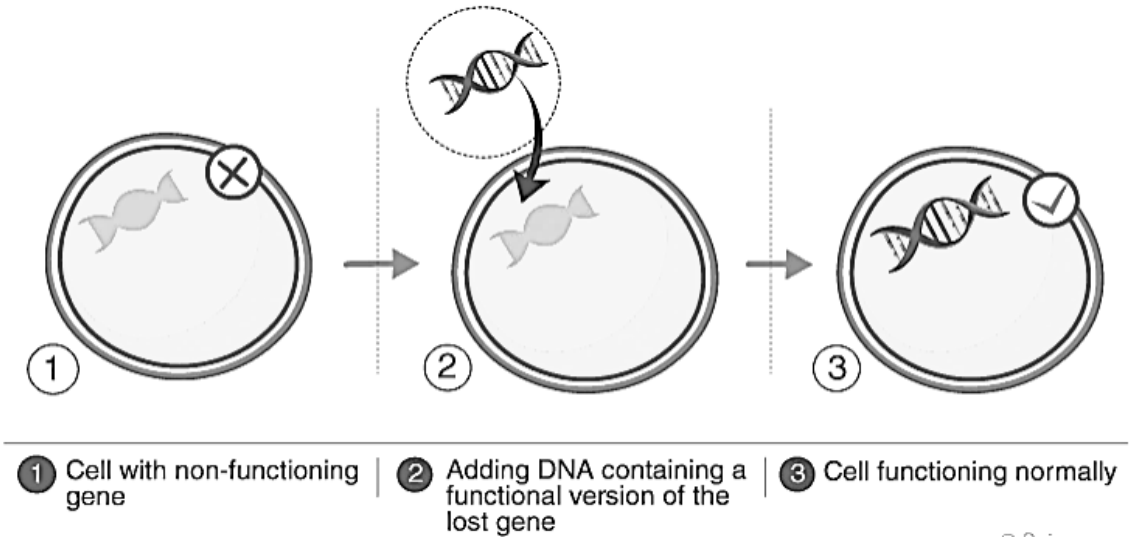
16.7 فرہنگ(Glossary)

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

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 پروتینوں 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۔



شکل16.0: 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 اکائی کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو جائیں گے کہ :

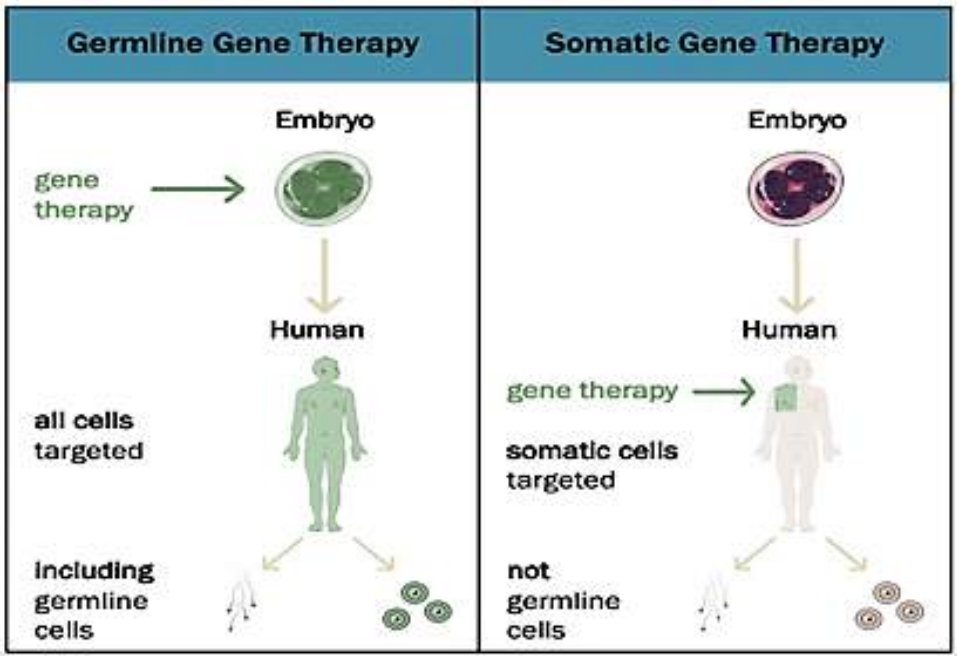
- جین تھراپی کے تصور کے بارے میں بنیادی اصول کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں۔
- جینیاتی امراض کے علاج میں جین تھراپی کے اطلاق کی وضاحت کر سکتے ہیں۔
- جین تھراپی سے متعلق بائیو سیفٹی اور اخلاقی مسائل کے بارے میں وضاحت کر سکتے ہیں۔

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 ایڈینو سین ڈیمینیز 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 سومیٹک سیل جین تھراپی (SCGT)۔ GGT میں، جراثیم کے خلیات (مثال کے طور پر، بیضہ دانی یا خصیوں 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 مییوسس سے گزریں گے اور اگلی نسل کو ایک عام گیمیٹک 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 شفایابی 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 ٹرائلز امریکہ، یورپ اور آسٹریلیا میں کیے جاتے ہیں۔ یہ نقطہ نظر وسیع ہے، جس میں متواتر جین کی خرابی (سسٹک فائبروسس، ہیموفیلیا، 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۔

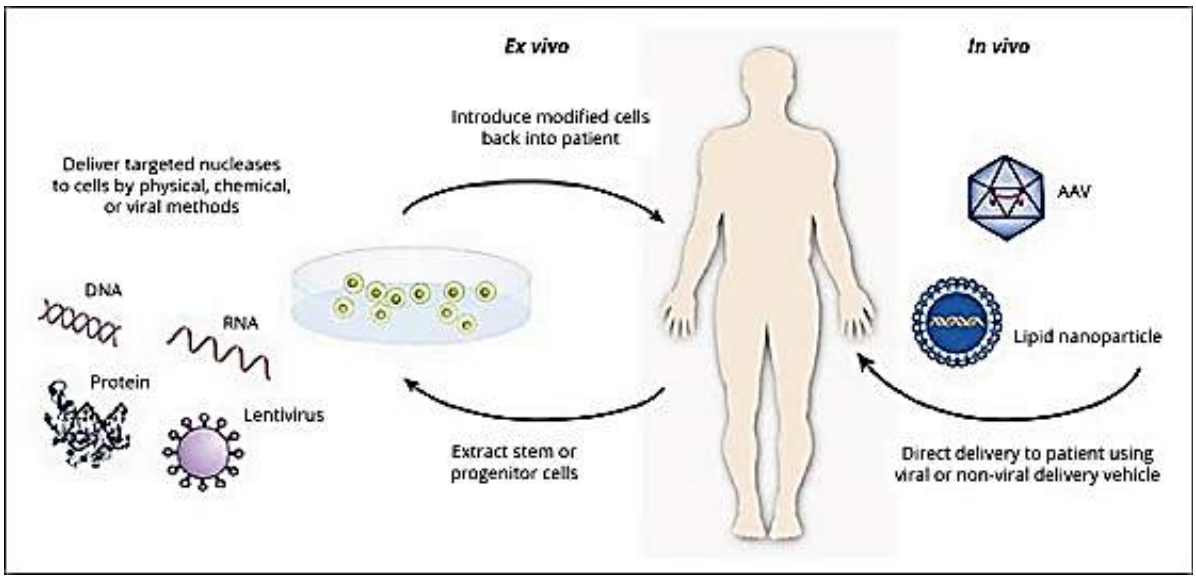
اب تک، انسانی جین تھراپی کی کوشش صرف سومیٹک (جسم کے) خلیوں پر کی گئی ہے جیسے کہ کینسر اور شدید مشترکہ امیونوسنڈروم (SCIDS)۔

جین کے علاج کا انحصار چند اہم عناصر پر ہوتا ہے۔ جین تھراپی کے لیے، ایک بیمار جین، ایک علاجاتی 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 (ننگے ڈی این اے یا ڈی این

اے کمپلیکس) ہو سکتا ہے۔ وائرل ویکٹرز کو اس طرح تبدیل کیا جاتا ہے کہ وہ سیل کو متاثر کر سکتے ہیں تاکہ وہ اپنے جین کو سیل کرو موزوم کی میزبانی کے لیے بغیر کسی بیماری کے پیدا کر سکیں۔

صحیح جین کی ترسیل کے لیے دو طرح کے طریقے ہیں، ویوو اور ایکس ویوو تکنیکوں میں۔ In-Vivo تکنیک میں صحیح جین کو براہ راست ٹارگٹ سیل یا ٹشو میں پہنچاتا ہے۔ In Vivo جین تھراپی میں چیلنج مخصوصیت کو یقینی بنانا اور دلچسپی کے ہدف سیل تک پہنچنا ہے۔ جینیاتی مواد کو کسی مخصوص ٹشو میں انجیکشن کے ذریعے براہ راست متعارف کرایا جا سکتا ہے، الیکٹروپوریشن، جین گن/بائیو پلاسٹک اپیلی کیشن وغیرہ۔ In 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 کرواتی ہے۔ نتیجتاً، مدافعتی ردعمل کا امکان کم ہوتا ہے اور نقل و حمل کی اعلیٰ سطح (وائرل ویکٹر کا استعمال کرتے ہوئے یوکرائیوٹک 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 جا سکتا ہے۔



شکل 16.2: ایک فرد میں جین تھراپی انجام دینے کے مختلف طریقوں کو دکھایا گیا ہے۔

16.2.1 ویکٹر (Vector)

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 *in vivo* اور *ex vivo* تکنیکوں میں استعمال کیا جا سکتا ہے۔ جین تھراپی کی کامیابی کا انحصار ویکٹر کے مناسب انتخاب پر ہے۔

16.2.2 وائرل ویکٹر(Viral Vectors)

انسانی جین تھراپی میں متعدد وائرس استعمال کیے گئے ہیں، جن میں ریٹرو وائرس، لینٹیو وائرس، اڈینو وائرس، اڈینو سے وابستہ وائرس، ہرپس سمپلیکس وائرس، سائٹومیگالو وائرس، اور ویکسینیا وائرس شامل ہیں۔ ان میں سے، ریٹرو وائرس 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 بیسڈ اور کیمیکل پر مبنی طریقے ہیں۔ انہیں یا تو براہ راست انتظامیہ کے ذریعے یا کیمیائی اور جسمانی طریقوں سے پولیمر، لپڈز، 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، مخمصوں میں جینیاتی سائنس کا استعمال ایسے طریقوں سے ہوتا ہے جو بیماری کی روک تھام اور علاج سے بالاتر ہیں۔ خاصیت میں اضافہ اور "نو یو 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۔
- ❖ وراثتی 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:

- کیاایک یادوکام کرنے والے جینز متعارف کرواکر صورتحال کو بہتر بنایاجاسکتاہے؟
- کیاہم جانتے ہیں کہ کون سے جین کام کررہے ہیں؟
- کیاہم خرابی کی حیاتیات کو سمجھتے ہیں؟
- کیامتاثرہ بافتوں میں جین کو خلیات تک پہنچایاجاسکتاہے؟

جین تھراپی سمیت کوئی بھی طبّی علاج شروع کرنے سے پہلے مریض کی خود مختاری کااحترام اور باخبر رضامندی حاصل کرناضروری ہے۔سائنسی کمیونٹی میں ایک وسیع معاہدہ ہے کہ جراثیم کی لائن تھراپی؛خاص طورپر غیر طبّی استعمال ممنوع ہوناچاہئے. جین تھراپی میں جینوم میں ترمیم کے بارے میں بنیادی خدشات میں سے ایک یہ ہے کہ اس کے غیر طبّی اہداف کے لیے استعمال کیے جانے کاامکان ہے، جیسے کہ اضافہ یایوجینک سرگرمیاں۔ھدف 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 کا مطالعہ کرنے کے بعد آپ اس قابل ہو گیے ہے 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۔

16.5 کلیدی الفاظ(Keywords)

جرم خلیہ	Germ Cells	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۔
سومیٹک سیل	Somatic Cell	سومیٹک خلیات زندہ جاندار کے جسم میں تولیدی خلیوں کے علاوہ کوئی دوسرا خلیہ ہیں۔
نویوجینکس	Neo-eugenics	: یہ تولیدی ٹیکنالوجی اور جینیاتی انجینئرنگ کے استعمال کے ذریعے انسانی خصوصیات اور صلاحیتوں کو بڑھانے کا عمل ہے۔

ٹرانزڈکشن	Transduction	یہ وائرس کے ذریعے ایک خلیے سے دوسرے خلیے میں جینیاتی مواد کی منتقلی ہے۔

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 انجیکشن 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 سیفٹی 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؟
2. جراثیم کی لائن جین تھراپی (GGT) اور سومٹک سیل جین تھراپی (SCGT) کا ان کے طریقہ کار، اطلاقات اور اخلاقی تحفظات کے لحاظ سے موازنہ اور ان کے برعکس کریں۔
3. جین تھراپی میں استعمال ہونے والے مختلف ویکٹرز پر بحث کریں، جین کی ترسیل کے تناظر میں وائرل اور غیر وائرل ویکٹر کے فوائد اور نقصانات کو اجاگر کریں۔
4. جین تھراپی کی ان ویو اور ایکس ویو تکنیکوں کی وضاحت کریں۔ ہر طریقہ سے وابستہ چیلنجوں اور فوائد کی وضاحت کریں۔

5. جینیاتی عوارض، کینسر، اور وائرل انفیکشن کے علاج میں جین تھراپی کے ممکنہ استعمال کا خاکہ بنائیں۔ ان بیماریوں کی مثالیں فراہم کریں جنہیں کلینیکل ٹرائلز میں نشانہ بنایا گیا ہے اور نتائج پر تبادلہ خیال کریں۔

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 انجنیئرڈ وائرس	:ان میں بیماری کا باعث بننے والے پیتھوجینک علاقے کی جگہ علاجاتی 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/بائیو پلاسٹک	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

بی ایس سی حیاتیات پرچہ: جانوروں کی بایو ٹیکنالوجی سال :2024

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 سوالت 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** صوال ہیں، اس میں سے تالب علم کو کوئی 06 سوالوں کے جواب دینے ہیں۔ ہر سوال کے لیے **05** نمبر مختص ہے۔

(5x6=30)

3. حصہ سوم میں **05** صوال ہیں، اس میں سے تالب علم کو کوئی 03 سوال کا جواب دینے ہے۔ ہاس 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 ہیلا 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 نشو و نما 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 فنگر پرنٹنگ تکنیک _____ 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 بحث 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 مالیکیولز کی پیداوار میں شامل اقدامات کی وضاحت کریں۔
5. ٹرانسجینک مویشیوں (Livestock) کی کم از کم پانچ اپلی کیشنز لیکھے۔
6. "سکل سیل انیمیا" کی Molecular تشخیص۔
7. پلازمیڈ کلوننگ ویکٹر pBR322 کے بارے میں لکھیں۔
8. Restriction Enzymes کیا ہیں؟
9. "نارڈرن بلاٹنگ تکنیک" کا مکمل طریقہ کار لکھیں۔

حصہ سوم

10. بایوری ایکٹر کی ساخت اور فنکشن کی وضاحت کریں اور مختلف شعبوں میں سیل کلچر کی اپلی کیشنز لیکھے۔
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۔