BSZY602CCT

حیوانی بائیو ٹیکنالوجی

(Animal Biotechnology)

Part II- Practical

بیچلر آف سائنس (بی۔ایس سی۔)

(بی۔زیڈ۔سی)

(چھٹا سمسٹر)

نظامت فاصلاتی تعلیم

مولانا آزاد نیشنل اردو یونیورسٹی

حیدرآباد-32، تلنگانہ-بھارت

فہرست

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**

اکائی 19: پولیمریز چین ری ایکشن (پی سی آر) کے ذریعے ڈی این اے کی توسیع

[Amplification of DNA through Polymerase Chain Reaction (PCR)]

اکائی کے اجزا

19.0 تعارف(Introduction)

19.1 مقاصد(Objectives)

19.2 اصول(Principle)

19.3 درکار مواد(Materials Required)

19.4 طریقہ کار(Procedure)

19.5 ایگرز جیل الیکٹروفورسس(Agarose Gel Electrophoresis)

19.6 نتیجہ اور مشاہدات(Result and Observations)

19.7 احتیاطی تدابیر

19.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

19.0 تعارف(Introduction)

پولیمریز چین ری ایکشن (پی سی آر) 1983 میں امریکی حیاتیاتی کیمیاء دان کیری مولس (*Kary Mullis*) نے سیٹس کارپوریشن میں تیار کیا تھا۔ اس میں ویٹرو میں ہدف ڈی این اے ٹکڑے (*DNA Fragments*) کی انزائم ثالثی کی ترکیب شامل ہے اور خاص طور پر ٹیمپلیٹ ڈی این اے پر مشتمل پیچیدہ مرکب سے شروع ہونے والے ڈی این اے ٹکڑے کو بڑھانے کے لئے استعمال کیا جاتا ہے۔ پی سی آر مختلف ذرائع سے ڈی این اے مطالعہ اور خصوصیات کے لئے ایک مقبول تکنیک کے طور پر ابھرا ہے۔

مالیکیولر بائیولوجی کے دائرے میں، مخصوص ڈی این اے ٹکڑوں کو درستگی اور کارکردگی کے ساتھ بڑھانے کی صلاحیت نے سائنسی تحقیق اور عملی اپلی کیشنز کے منظر نامے میں انقلاب برپا کر دیا ہے۔ پولیمریز چین ری ایکشن (پی سی آر) اس ڈومین میں ایک سنگ بنیاد تکنیک کے طور پر کھڑا ہے، جس سے سائنس دانوں کو ڈی این اے سیکونس کو تیزی سے بڑھانے کے قابل بناتا ہے، یہاں تک کہ ابتدائی مواد سے بھی۔ جینیاتی، طب، فرانزک اور بائیو ٹیکنالوجی سمیت مختلف شعبوں میں پی سی آر ناگزیر ہو گیا ہے۔

یہ باب پی سی آر کا استعمال کرتے ہوئے ڈی این اے کے ٹکڑے کی توسیع کو سمجھنے اور اس پر عمل درآمد کرنے کے لئے ایک عملی

رہنما کے طور پر کام کرتا ہے۔ یہ پی سی آر کے بنیادی اصولوں میں جھانکتا ہے، اس عمل میں شامل اجزاء اور اقدامات کی کھوج کرتا ہے، اور اس کی متنوع ایپلی کیشنز کی وضاحت کرتا ہے.

پی سی آر کا بنیادی مقصد ایک مخصوص ڈی این اے ترتیب کی کاپیوں کی کثرت پیدا کرنا ہے، جسے اکثر ہدف یا ٹیمپلیٹ ڈی این اے کہا جاتا ہے۔ یہ توسیع درجہ حرارت پر قابو پانے والے رد عمل کی ایک سائیکلیکل سیریز کے ذریعے حاصل کی جاتی ہے، جس میں سے ہر ایک ڈی این اے کی خرابی، پرائمر اینیلنگ، اور ڈی این اے توسیع کی سہولت فراہم کرتی ہے۔ نتیجہ ہدف ڈی این اے میں تیزی سے اضافہ ہے، جس سے پی سی آر مختلف مالیکیولر بائیولوجی ایپلی کیشنز کے لئے ایک انتہائی حساس اور ورسٹائل آلہ بن جاتا ہے۔

اس باب میں، ہم مندرجہ ذیل اہم پہلوؤں پر تبادلہ خیال کریں گے:

1. **پی سی آر کے اصول:** تھرموسائکلنگ کے عمل کو سمجھنا، بشمول تنزلی، اینیلنگ، اور توسیع، اور نئے ڈی این اے اسٹرینڈز کو مرتب کرنے میں ڈی این اے پولیمریز کا کردار۔
2. **پی سی آر کے اجزاء:** پی سی آر رد عمل کے ضروری اجزاء کی تلاش، بشمول ٹیمپلیٹ ڈی این اے، پرائمرز، نیوکلیوٹائڈز، ڈی این اے پولیمریز، اور بفر حل، اور توسیع میں ان کے کردار۔
3. **پی سی آر پروٹوکول:** پی سی آر رد عمل انجام دینے کے لئے مرحلہ وار طریقہ کار کی تفصیل، رد عمل مکس قائم کرنے سے لے کر تھرمل سائیکلنگ پروگرام چلانے تک۔
4. **آپٹیمائزیشن حکمت عملی:** پی سی آر کی کارکردگی کو متاثر کرنے والے عوامل اور مخصوصیت، حساسیت اور پیداوار کو بڑھانے کے لئے رد عمل کے حالات کو بہتر بنانے کی حکمت عملی پر تبادلہ خیال.
5. **پی سی آر کی ایپلی کیشنز:** پی سی آر کی متنوع ایپلی کیشنز کو اجاگر کرنا، جین کلوننگ، جینوٹائپنگ، اور سیکوئنسنگ سے لے کر تشخیصی جانچ، فرانزک تجزیہ، اور ماحولیاتی نگرانی تک۔
6. **مسائل کا ازالہ:** پی سی آر تجربات کے دوران سامنے آنے والے عام چیلنجوں اور نقصانات کو حل کرنا اور ان پر قابو پانے کے لئے مسائل کا ازالہ کرنے کی حکمت عملی فراہم کرنا۔

پی سی آر کا استعمال کرتے ہوئے ڈی این اے ٹکڑوں کی توسیع میں مہارت حاصل کر کے، محققین اور پریکٹیشنرز سائنسی علم کو آگے بڑھانے اور مختلف شعبوں میں حقیقی دنیا کے چیلنجوں سے نمٹنے کے لئے بہت سارے مواقع کھول سکتے ہیں۔ اس باب کا مقصد قارئین کو ان کی تحقیقی کوششوں میں پی سی آر کی طاقت کو بروئے کار لانے کے لئے ضروری نظریاتی تفہیم اور عملی مہارتوں سے لیس کرنا ہے۔

19.1 مقاصد (Objectives)

عملی یونٹ کی تکمیل کے بعد طالب علم اس قابل ہو جائیں گے

- پی سی آر کے پیچھے کام کرنے والے اصول کی وضاحت کریں۔

- پی سی آر انجام دینے کے لئے ضروری ریجنٹس کو شامل کریں۔
- ٹاک پولیمریز کی اہمیت۔اور
- پی سی آر کی ایپلی کیشنز کی وضاحت کریں۔

19.2 اصول(Principle)

مخصوص ہدف کی ترتیب کو بڑھانے کے لیے استعمال ہونے والے پولیمریز چین ری ایکشن کے درج ذیل مراحل ہوتے ہیں۔

1۔ابتدائی مرحلہ ***(Initialization step)***

یہ مرحلہ ڈی این اے کی پٹیوں کے درمیان ہائیڈروجن بانڈز کو توڑنے کے لیے کیا جاتا ہے۔رد عمل کا مرکب 1-9منٹ کے وقفے کے لیے94–96°C کے درجہ حرارت پر گرم کیا جاتا ہے۔۔

2۔ڈینیچریشن مرحلہ ***(Denaturation step)***

ڈینیچریشن میں 94-98 ° C کے درجہ حرارت پر 20-30 سیکنڈ تک حرارت شامل ہوتی ہے۔ یہ ڈی این اے کے تکمیلی کناروں میں اڈوں کے درمیان ہائیڈروجن بانڈز کی دراڑ کا سبب بنتا ہے اور اس کے نتیجے میں سٹرینڈز الگ ہو جاتے ہیں تاکہ واحد پھنسے ہوئے DNA پیدا ہو سکیں۔

3۔اینیلنگ مرحلہ ***(Annealing step)***

اس مرحلے میں واحد پھنسے ہوئے ٹیمپلیٹ ڈی این اے پرائمر کے ساتھ ڈینیچریشن اینیلز کے ذریعہ تیار کیا جاتا ہے۔ بہتر بائنڈنگ ہوتی ہے پرائمر کی ترتیب ٹیمپلیٹ ڈی این اے کی تکمیل کرتی ہے۔رد عمل کا درجہ حرارت مختصر طور پر 20-40 سیکنڈ کے لیے 50-65 ° C تک کم کیا جاتا ہے۔

عام طور پر، اینیلنگ کے لیے استعمال ہونے والا درجہ حرارت پرائمر کے پگھلنے والے درجہ حرارت سے 3-5°C کم ہوتا ہے۔ اینیلنگ کے بعد، ڈی این اے کی ترکیب شروع ہوتی ہے جب تھرموسٹیبل ڈی این اے پولیمریز انزائم آتا ہے اور ٹیمپلیٹ اور پرائمر کے ہائبرڈ سے منسلک ہوتا ہے اور توسیع کا عمل شروع کرتا ہے۔

پرائمر ٹیمپلیٹ میں ہدف کی ترتیب سے منسلک ہوتے ہیں اور اس طرح اس ترتیب کا تعین کرتے ہیں جسے مزید مراحل میں بڑھایا جائے گا۔ایک مثالی پرائمر میں درج ذیل خصوصیات ہیں-

- پرائمر کی لمبائی-18-30 نیوکلیوٹائڈز۔

52-60°C کے درمیان پگھلنے کا درجہ حرارت۔پگھلنے کا درجہ حرارت(*Tm*)اس درجہ حرارت کے طور پر بیان کیا جاتا ہے جس پر دوہری پھنسے ہوئے مالیکیولز کا نصف الگ ہو جاتا ہے۔اس کا حساب فارمولے سے کیا جاتا ہے۔

$$Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$$

□ پرائمر اینیلنگ کا درجہ حرارت احتیاط سے طے کرنا چاہیے۔ بہت زیادہ درجہ حرارت مناسب پابند ہونے کی اجازت نہیں دے گا اور اس طرح پی سی آر پروڈکٹ فارم کی کم مقدار۔ اینیلنگ کا بہت کم درجہ حرارت پرائمر کی اینیلنگ کو فروغ دے سکتا ہے۔۔

□ GC مواد 40-60% کے درمیان

□ پرائمر میں کوئی ثانوی ڈھانچہ نہیں جیسے ہیئرپن، سیلف اور کراس ڈائمرز۔

□ ایک ڈائنوکلیوٹائڈ تسلسل کو 4 بار سے زیادہ دہرانے سے گریز کرنا چاہیے۔ مثال کے طور پر، CGCGCGCG۔ یہ غیر مخصوص بائنڈنگ کو فروغ دیتا ہے۔۔

.توسیع/توسیع کا مرحلہ:

اس مرحلے میں استعمال ہونے والا درجہ حرارت ڈی این اے پولیمریز کے انتخاب پر منحصر ہے۔

انزائم ٹیک پولیمریز کی زیادہ سے زیادہ سرگرمی تقریبا 75-80 ڈگری سینٹی گریڈ ہے۔ اس معاملے میں 68-72 ڈگری سینٹی گریڈ کا درجہ حرارت برقرار رکھا جاتا ہے.

اس عمل کے دوران، ڈی این اے پولیمریز کے ذریعہ ایک نیا ڈی این اے اسٹرینڈ تشکیل دیا جاتا ہے اور یہ ڈی این اے ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ کی تکمیل کرتا ہے۔ پولیمریز ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ ترتیب کی بنیاد پر ڈی این ٹی پیز کو شامل کرتا ہے اور 5' سے 3' سمت میں اس کی تکمیل کرتا ہے۔

توسیع کا وقت دو عوامل پر منحصر ہے یعنی استعمال ہونے والے ڈی این اے پولیمریز کی پولیمرائزیشن کی شرح اور ہدف ڈی این اے ٹکڑے کی لمبائی کو بڑھانا۔ زیادہ سے زیادہ درجہ حرارت پر، ڈی این اے پولیمریز ہزاروں بیس/منٹ متعارف کرا سکتا ہے۔

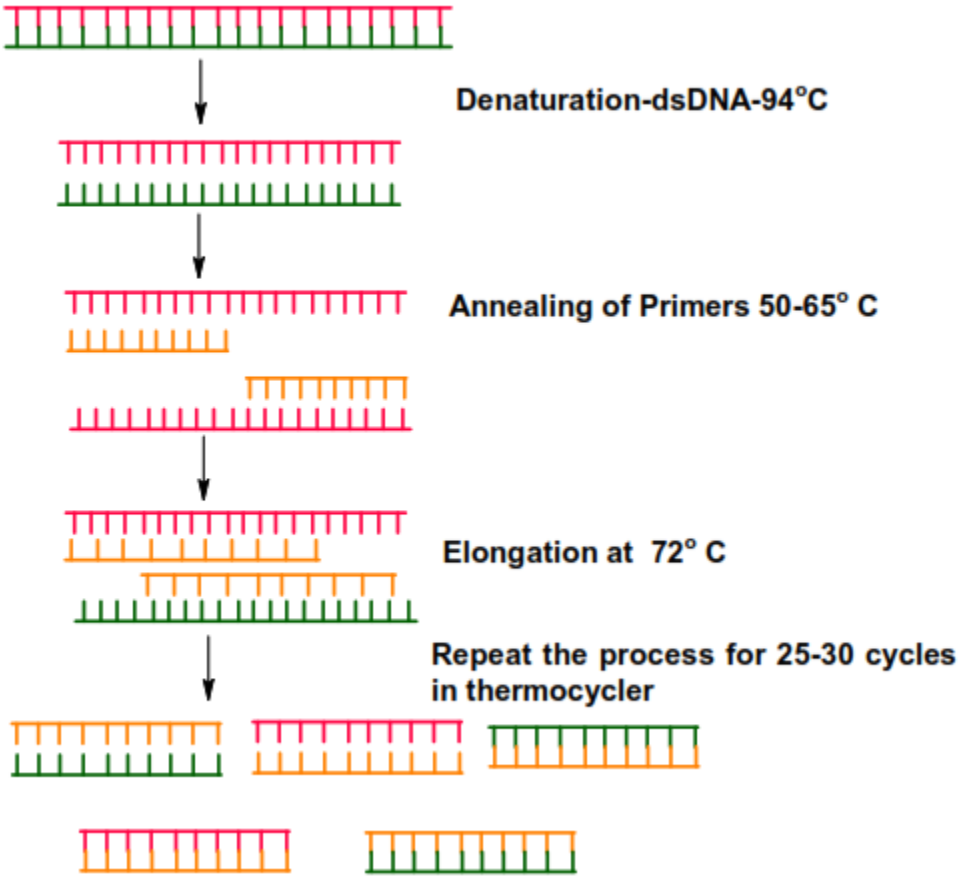
سازگار حالات میں، ہر توسیعی سائیکل کے اختتام پر، مخصوص ہدف ڈی این اے کی مقدار کو دوگنا کیا جانا چاہئے۔ اس طرح ہدف ڈی این اے کا ٹکڑا تیزی سے بڑھتا ہے۔

5.آخری توسیع کا مرحلہ:

یہ واحد مرحلہ پی سی آر کے آخری چکر کے اختتام پر انجام دیا جاتا ہے تاکہ اس بات کو یقینی بنایا جاسکے کہ تمام سنگل اسٹینڈڈ مالیکیولز کو بڑھایا گیا ہے۔ 70-74 ڈگری سینٹی گریڈ پر 5-15 منٹ کے لئے کیا گیا.

ایک خودکار تھرموسائیکلر نامی مشین بہت کم وقت میں تمام مراحل کے لئے ضروری درجہ حرارت حاصل کر سکتی ہے اور پی سی آر مراحل کو 20-30 بار دہرانے کے قابل بناتی ہے۔ اس کے نتیجے میں ہدف ڈی این اے کے ٹکڑے کی تیزی سے توسیع اور جمع ہوتا ہے۔

ایک حتمی ہولڈ صارف کو مختصر مدت کے لئے 4 ڈگری سینٹی گریڈ کے درجہ حرارت پر رد عمل کے مرکب کو ذخیرہ کرنے کی اجازت دیتا ہے (تصویر 19.0).



تصویر19.0پولیمریزچین ردعمل کے اقدامات

19.3 درکار مواد(Materials Required)

1. 10. ایکس پرکھ بفر
2. *10 x TBE*
3. *6X* جیل لوڈنگ بفر
4. 2.5ایم ایم ڈی این ٹی پی مکس
5. طاق ڈی این اے پولیمریز
6. 256ایم ایم ایم جی سی ایل2
7. فارورڈاوررِیورس پرائمر

8. آگروز
9. 0.2ملی لیٹر پی سی آر ٹیوبیں، پولی پروپیلین ٹیوبز
10. تجاویزاور مائیکروپیپیٹس
11. پسی ہوئی برف
12. پی سی آر پروڈکٹ کو کنٹرول کریں۔
13. ٹیمپلیٹ ڈی این اے
14. $DNA1kb$ سیڑھی
15. ڈبل آست پانی
16. تھرموسائکلر مشین اور پاور پیک
17. افقی الیکٹروفورسس اپریٹس
18. UV-ٹرانسلومینیٹر

ایس۔نہیں	جزو	بیان
1	سانچہ ڈی این اے	اس میں ہدف کا علاقہ شامل ہے جسے بڑھانے کی ضرورت
2	فارورڈاور ریورس پرائمرز	ڈی این اے پولیمریز کو باندھنے کے لئے ضروری ڈبل اسٹینڈڈ شروعاتی سائٹ فراہم کریں کیونکہ وہ حس اور اینٹی سینس ڈی این اے اسٹرینڈز دونوں کے 3 سروں کی
3	ڈی این اے پولیمرز	تھرموا سٹیبل، مثال کے طور پر-ٹاک، پی الف پو
4	تمام 4 ڈیآکسی نیوکلیوٹائڈ ٹرائی فاسفیٹ-ڈی ڈی اے ٹی پی،	ہدف ڈی این اے ٹکڑے کی ترکیب کے لئے ضروری ہے.
5	$Mg2^{+}/Mn2^{+}$آئن	ٹاک پولیمریز کی سرگرمی کے لئے ضروری پرائمر کو ٹیمپلیٹ میں بہتر اینیلنگ کو فروغ دینا
6	بفر	اس کے لئے بہترین حالات فراہم کریں

19.4 طریقہ کار(Procedure)

پی سی آر کے لیے رد عمل کے مرکب کی تیاری

مندرجہ ذیل اجزاء کو مخصوص مقدار میں پی سی آر ٹیوب میں شامل کیا جاتا ہے۔

اجزاء	مقدار
ٹیمپلیٹ ڈی این اے/Template DNA	1 µl
فارورڈ پرائمر(10nM)	1 µl
ریورس پرائمر(10nM)	1 µl
2.5ایم ایم ڈی این ٹی پی مکس	5 µl
10ایکس اے سے بفر	5 µl
25ایم ایم ایم جی سی ایل2	5 µl
دوگنا آست پانی(Double Distill Water)	31.5 µl
Taqڈی این اے پولیمریز(آخر میں شامل کیا جائے گا)	0.5 µl
کل حجم	50 µl

1. ٹیوب میں موجود مواد کو 1-2 سیکنڈ تک تھپتھپا کر ملایا جاتا ہے۔
2. ٹیوب خودکار تھرموسائکلر مشین میں رکھی گئی ہے۔اب پروگرام ڈی این اے پروردن حاصل کرنے کے لیے تیار ہے۔
3. *20-35PCR*ایمپلیفیکیشن سائیکل تھرموسائکلر میں درج ذیل شرائط کے ساتھ انجام دیا جاتا ہے۔

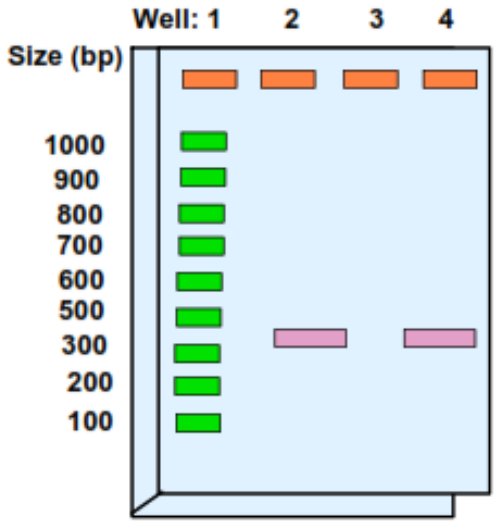
عمل	وقت	درجہ حرارت
Initial denaturation	10منٹ	94°C
Denaturation	30سیکنڈ	94°C
Annealing	30سیکنڈ	58°C
توسیع	45سیکنڈ	72°C
حتمی توسیع	10منٹ	72°C
فائنل کا انعقاد	-	4°C

19.5 ایگرز جیل الیکٹروفورسس (Agarose Gel Electrophoresis)

1. 0.8% ارتکاز کا Agarose جیل TBE 1 X بفر میں تیار کیا جاتا ہے اور کیتھوڈ سے تقریباً 2 سینٹی میٹر کے فاصلے پر کنگھیوں کے ساتھ ٹرے میں ڈالا جاتا ہے۔
2. جیل کو کمرے کے درجہ حرارت پر ٹھوس ہونے کی اجازت ہے۔
3. جیل ٹینک میں 1X TBE بفر ڈالا جاتا ہے۔ یہ یقینی بنایا جاتا ہے کہ بفر کی سطح جیل کی سطح سے 0.5-0.8 سینٹی میٹر اوپر ہے۔
4. کنگھیوں کو آہستہ سے اٹھایا جاتا ہے، اس بات کو یقینی بناتے ہوئے کہ کنوئیں کو نقصان نہ پہنچے
5. پہلا کنواں احتیاط سے 3μl مارکر DNA سے بھرا ہوا ہے۔
6. ہم 6X لوڈنگ بفر کے 2μl حاصل کردہ PCR پروڈکٹ کے 10μl میں شامل کرتے ہیں اور PCR کے نمونے کنویں میں لوڈ کرتے ہیں۔ الیکٹروفورسس کو ایک مستقل وولٹیج پر (50V - 100 پر 1-2 گھنٹے تک) آگے بڑھنے کی اجازت ہے۔
7. ٹریکنگ ڈائی (بروموفینول بلیو) کے سامنے ڈائی پر نظر رکھ کر بجلی بند کر دی جاتی ہے۔
8. ایگروز جیل ایتھیڈیم برومائیڈ سے داغدار ہے اور اسے UV-ٹرانسیلومیٹر کے نیچے تصور کیا جاتا ہے۔

19.6 نتیجہ اور مشاہدات (Result and Observations)

ایگروز جیل الیکٹروفورسس کے بعد پی سی آر (شکل 19.2) پر۔



شکل 19.2: پی سی آر کے بعد ڈی این اے بینڈ (بینڈ پی سی آر کے بعد ڈی این اے کی کامیاب پرورش کی نمائندگی کرتا ہے)

- لین 1- $1Kbp\ DNA$ سیڑھی لین 1 میں چلائی گئی تھی۔ جیسا کہ توقع تھی، $100\text{-}1000bp$ تک کے 10 بینڈ نمودار ہوئے۔ $100bp$ کا بینڈ کنویں سے سب سے دور (زیادہ سے زیادہ فاصلے پر سفر کیا) اور کنویں کے قریب ترین $1000bp$ کا سب سے بڑا ٹکڑا (کم از کم فاصلہ طے کیا) پر واقع ہو گا۔
- لین 2- پی سی آر ایمپلیکن ایک بینڈ کے طور پر نمودار ہوا۔ لین 1 میں چلنے والی سیڑھی کے مقابلے میں، اس کے سائز میں $300\text{-}400bp$ کے درمیان ہونے کی توقع ہے۔
- لین 3- منفی کنڑول- جیسا کہ توقع تھی اس لین میں کوئی بینڈ ظاہر نہیں ہوا۔ اس سے ظاہر ہوتا ہے کہ ری ایکشن قائم کرنے کے عمل میں یا ری ایجنٹس میں کوئی آلودگی نہیں تھی۔
- لین 4- مثبت کنڑول- الیکٹروفورسس کے بعد ایک بینڈ نمودار ہوا۔ اس سے ظاہر ہوتا ہے کہ ہمارا عمل کامیاب رہا اور تمام ریجنٹس اور انزائمز ٹھیک کام کر رہے ہیں۔
- پی سی آر ایمپلیکن کو لین 2 میں ایک بینڈ کے طور پر دیکھا گیا جس سے یہ ظاہر ہوتا ہے کہ ہمارے ہدف کے ڈی این اے کے ٹکڑے کو منتخب طور پر بڑھا دیا گیا ہے۔ مثبت کنڑول اور ٹیسٹ لین میں بینڈ کا ایک ہی سائز اس بات کو یقینی بناتا ہے کہ تمام ایمپلی کانز ٹارگٹڈ ٹیمپلیٹ کی ترتیب کی صحیح کاپیاں ہیں۔ نیز، ایمپلیکن کے لیے ایک سنگل بینڈ اشارہ کرتا ہے کہ مطلوبہ ترتیب کو بڑھاوا دیا گیا تھا اور امپلیفیکیشن کے عمل میں غلطیوں کی وجہ سے متضاد مرکب پیدا نہیں ہوا تھا۔ چونکہ متعدد بینڈز نہیں دیکھے گئے تھے، اس سے یہ بھی ظاہر ہوتا ہے کہ کوئی غیر مخصوص پرائمر اینیلنگ نہیں تھی۔
- لین 3- منفی کنڑول میں کوئی بینڈ نہیں دیکھا گیا۔ اس سے ظاہر ہوتا ہے کہ پی سی آر کا رد عمل آلودگی سے پاک ہے۔ غیر مطلوبہ ڈی این اے بینڈ غیر ملکی ڈی این اے کے ذریعے ریجنٹس کی آلودگی کی صورت میں تیار ہوتے ہیں۔
- لین 4- مثبت کنڑول میں ایک بینڈ نمودار ہوا، جس سے ظاہر ہوتا ہے کہ پی سی آر مکس کے تمام ریجنٹس اور انزائمز ٹھیک کام کر رہے ہیں

19.7 احتیاطی تدابیر

1. وور ٹیکسنگ (*Vortexing*) سے مکمل طور پر گریز کیا جاتا ہے تاکہ انزائم کی خرابی اور نمونے کے انحطاط کو روکا جا سکے۔ مرکب کو صرف ہلکے سے تھپتھپانے سے ملایا جاتا ہے۔
2. ری ایکشن مکسچر اور انزائم پر مشتمل شیشیوں کو برف میں محفوظ کیا جانا چاہیے کیونکہ انزائمز درجہ حرارت کے لیے حساس ہوتے ہیں۔
3. اس بات کو یقینی بنانے کے لیے کہ تھرموسائیکلر صحیح طریقے سے کام کر رہا ہے، مثبت کنڑول کو چلایا جانا چاہیے۔
4. جیل کی تیاری کے دوران بلبلوں کی تشکیل سے پرہیز کریں۔

19.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

1. Brown TA. (2010). Gene Cloning and DNA Analysis. 6th edition. Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
2. Cappucino J and Sherman N. (2010). Microbiology: A Laboratory Manual. 9th edition. Pearson Education Limited.
3. 3. Sambrook J and Russell D. (2001). Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Wiley JM, Sherwood LM and Woolverton CJ. (2013) Prescott's Microbiology. 9 th Edition. McGraw Hill International.
5. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. Chapter 5, Restriction Endonucleases.
6. Primrose SB and Twyman RM. (2006). Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7th edition. Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
7. Sambrook J and Russell D. (2001). Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Clark DP and Pazdernik NJ. (2009). Biotechnology: Applying the Genetic Revolution. Elsevier Academic Press, USA.

پریکٹیکل ریکارڈ شیٹ(Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

اکائی 18: بند شی انزائم کا استعمال کرتے ہوئے پلازمڈ ڈی این اے / جینومک ڈی این اے کا عمل انہضام

(Restriction Digestion of Plasmid DNA/Genomic DNA)

اکائی کے اجزا

18.0 تعارف(Introduction)

18.1 مقاصد(Objectives)

18.2 پری لیب کی تیاری(Pre-Lab Preparation)

18.3 اصول(Principle)

18.3.1 Agarose جیل کی تیاری

18.3.2 ڈی این اے کے ٹکڑوں کا الیکٹروفورسس(Electrophoresis of DNA fragments)

18.3.3 ڈی این اے کے ٹکڑوں کا تصور(Visualization of DNA fragments)

18.4 مواد درکار(Materials Required)

18.5 طریقہ کار(Procedure)

18.6 نتیجہ اور مشاہدات(Result and Observations)

18.7 احتیاطی تدابیر

18.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

18.0 تعارف(Introduction)

ورنر آربر(Werner Arber)، ڈینیئل ناتھنز(Daniel Nathansu) اور ہیملٹن اسمتھ(Hamilton Smith) کو 1978ء میں میڈیسن کا نوبل انعام دیا گیا تھا۔

بیکٹیریا نے بیکٹیریوفیج کے حملوں کا مقابلہ کرنے کے لئے دفاعی میکانزم کے طور پر پابندی اینڈونیوکلیز تیار کیا ہے۔ پابندی کے انزائم بیکٹیریوفیج ڈی این اے کو روکتے ہیں اور اس طرح بیکٹیریا کے میزبان کی حفاظت کرتے ہیں. بیکٹیریا اپنے ڈی این اے کی حفاظت ایڈنین اور

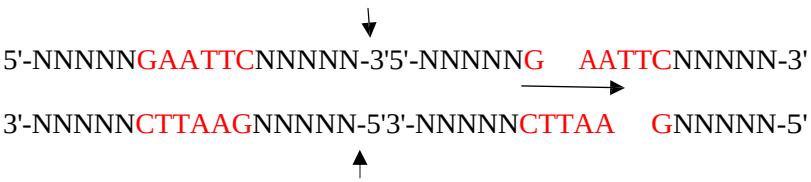
سائٹوسین بیسز کے میتھائیلیشن کے ذریعہ کرتے ہیں جو پابندی اینڈونیوکلیئز کے بندھن کو روکتے ہیں۔

پابندی ہضم مالیکیولر بائیولوجی میں ایک اہم تکنیک ہے جو پابندی انزائمز کے ذریعہ مخصوص شناخت کے ترتیب پر ڈی این اے مالیکیولز کی درست کٹائی کی اجازت دیتا ہے۔ یہ انزائم بیکٹیریا میں پائے جانے والے فطرت کے دفاعی میکانزم ہیں، جو غیر ملکی ڈی این اے پر حملہ آور ہونے سے بچانے کے لئے استعمال ہوتے ہیں، جیسے بیکٹیریوفیوز۔ لیبارٹری میں، سائنسدان ان انزائمز کو مختلف مقاصد کے لئے ڈی این اے میں ہیرا پھیری اور تجزیہ کرنے کے لئے استعمال کرتے ہیں، بشمول کلوننگ، میپنگ، اور سیکوئنسنگ.

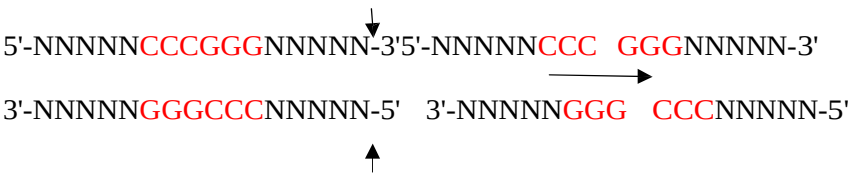
تجارتی طور پر دستیاب اور باقاعدگی سے استعمال ہونے والے انزائمز کلاس ٹو سے تعلق رکھتے ہیں۔ مخصوص ڈی این اے سیکونس کو شناخت کی ترتیب کہا جاتا ہے اور ٹائپ ٹو پابندی اینڈونیوکلیز کے ذریعہ شناخت اور کلیویڈ کیا جاتا ہے۔ وہ پیلنڈرومک سیکونس کو پہچانتے ہیں- وہی ترتیب جو ایک ہی 5' سے 3' سمت میں تکمیلی تاروں میں پائی جاتی ہے۔ ڈائی ویلنٹ میگنیشیم آئنز کی موجودگی میں، ڈی این اے کو انزائم کے ذریعہ اس مقام پر انزائم میں تبدیلی کی وجہ سے، ہیلکس میں کنک پیدا کر کے کچل دیا جاتا ہے۔ اس کے نتیجے میں، کٹھپتلی یا چپکے سرے بن سکتے ہیں.

مثال کے طور پر-

جب *EcoR I* سیکوئنس *5'GAATTC- 3'* کو پہچانتا ہے اور *G* اور *A* بیسز کے درمیان چپکے سرے *(Sticky Ends)* پیدا ہوتے ہیں جیسا کہ ذیل میں دکھایا گیا ہے۔



بلنٹ اینڈ(Blunt End)ڈالیکیول اس وقت تیار ہوتے ہیں جب SmaI ترتیب '5'- CCCGGG-3' کو پہچانتا ہے اور C اور G بیسز کے درمیان کلیوز جیسا کہ ذیل میں دکھایا گیا ہے۔



پابندی کے انزائم کی سرگرمی کا انحصار کئی پیرامیٹرز پر ہوتا ہے جیسے-

- درجہ حرارت
- آئنک ارتکاز
- استعمال شدہ بفر سسٹم
- ڈی این اے کی میتھیلیشن حالت

18.1 مقاصد(Objectives)

اس یونٹ کی تکمیل کے بعد آپ کو اس قابل ہونا چاہیے کہ :

- ❖ پابندی کے خامروں کی اہمیت کی وضاحت کریں۔
- ❖ پلاسمڈ ڈی این اے کے عمل انہضام کے لیے درکار ریجنٹس کی فہرست بنائیں؛اور
- ❖ ایگرز جیل تیار کریں۔

18.2 پری لیب کی تیاری(Pre-Lab Preparation)

عملی سیشن شروع کرنے سے پہلے، طلباء کو DNA کی ساخت اور فنکشن کے بنیادی تصورات کے ساتھ ساتھ جیل الیکٹروفورسس (Electrophoresis) کے اصولوں سے بھی آشنا ہونا چاہیے۔ یقینی بنائیں کہ تمام ضروری مواد اور ریجنٹس دستیاب ہیں اور مناسب طریقے سے لیبل لگا ہوا ہے۔ طلباء کو گروپس میں تقسیم کریں اور ہر گروپ میں کردار تفویض کریں۔

1. بند شی خامروں(Restriction Enzymes) اور ہاضمے کا تعارف (Introduction to Restriction Enzymes and Digestion)

- ❖ **بند شی** خامروں **یا** پابندی کے خامروں کے مختصر جائزہ کے ساتھ سیشن کا آغاز کریں، ان کے کام اور مالیکیولر بائیولوجی میں اہمیت کی وضاحت کریں۔
- ❖ مخصوص شناختی جگہوں پر ڈی این اے کو صاف کرنے میں پابندی کے خامروں کے کردار پر زور دیتے ہوئے عمل انہضام کی پابندی کے تصور پر بحث کریں۔
- ❖ عام طور پر استعمال ہونے والے پابندی کے خامروں اور ان کی شناخت کے سلسلے کی مثالیں فراہم کریں۔
- ❖ ان عوامل کی وضاحت کریں جو پابندی کے عمل انہضام کی کارکردگی کو متاثر کرتے ہیں، جیسے درجہ حرارت، پی ایچ، اور نمک کا ارتکاز۔

2. **پابندی ہاضمے کے رد عمل کی تیاری(Preparation of Restriction Digestion Reaction)**

- ❖ مینوفیکچرر کے پروٹوکول کی بنیاد پر ہاضمے کے رد عمل کے لئے ضروری ڈی این اے، پابندی انزائم، بفر، اور پانی کے حجم کا حساب لگائیں۔
- ❖ منجمد ہونے پر ڈی این اے کے نمونے کو برف پر پگھلائیں اور یکسانیت کو یقینی بنانے کے لئے آہستہ آہستہ مکس کریں۔
- ❖ مائیکروسینٹری فیوج ٹیوب میں پابندی ہضم کے رد عمل کو مندرجہ ذیل طور پر ترتیب دیں:

- ٹیوب میں ڈی این اے نمونے کا مناسب حجم شامل کریں۔
- پابندی کے انزائم کی مطلوبہ مقدار شامل کریں.
- انزائم کی سرگرمی کے لئے بہترین حالات فراہم کرنے کے لئے بفر کا مناسب حجم شامل کریں۔
- ردعمل کے حجم کو مطلوبہ کل تک لانے کے لئے پانی شامل کریں۔

❖ ٹیوب کے نچلے حصے میں تمام ریجنٹس کو جمع کرنے کے لئے ٹیوب کے مواد کو نرم پائپٹنگ اور مختصر طور پر سینٹری فیوجز کے ذریعہ مکس کریں۔

❖ ردعمل کے مرکب کو مقررہ مدت کے لئے تجویز کردہ درجہ حرارت پر انکوبیٹ کریں۔ یہ عام طور پر 1-2 گھنٹوں کے لئے 37 ڈگری سینٹی گریڈ سے 65 ڈگری سینٹی گریڈ تک ہوتا ہے.

3. اگروز جیل کی تیاری (Preparation of Agarose Gel)

❖ ڈی این اے کے ٹکڑوں کی مطلوبہ ریزولوشن کے مطابق TAE یا TBE بفر میں مناسب فیصد ایگرز جیل (عام طور پر 0.7-1.5%) تیار کریں۔

❖ بفر کو گرم کریں اور ایگرز پاؤڈر کو مکمل طور پر تحلیل ہونے تک ہلاتے رہیں

❖ جیل میں کوئی بھی ڈی این اے انٹر کلیٹنگ ڈائی (مثلاً، جیل ریڈ یا ایتھیڈیم بروما ئیڈ) شامل کرنے سے پہلے ایگرز محلول کو تقریباً 50-60 ڈگری سینٹی گریڈ تک ٹھنڈا ہونے دیں۔

❖ پگھلے ہوئے ایگرز محلول کو جیل کاسٹنگ ٹرے میں ڈالیں اور کنوئیں کی کنگھی ڈالیں تاکہ نمونہ لوڈ کرنے کے لیے کنویں بنائیں۔

❖ کمرے کے درجہ حرارت پر جیل کو تقریباً 20-30 منٹ تک ٹھوس ہونے دیں۔

4. جیل کو لوڈ کرنا اور چلانا (Loading and Running the Gel)

❖ جیل الیکٹروفورسس ٹینک کو تیار کریں اور اسے 1X TAE یا TBE بفر سے بھریں جب تک کہ جیل مکمل طور پر ڈوب نہ جائے۔

❖ ہضم شدہ ڈی این اے نمونوں میں جیل لوڈنگ ڈائی شامل کریں اور آہستہ سے مکس کریں۔

- ہضم شدہ ڈی این اے کے نمونوں کو مناسب ڈی این اے سیڑھی/مارکر کے ساتھ مائیکروپیپیٹس کا استعمال کرتے ہوئے ایگرز جیل کے کنویں میں لوڈ کریں۔
- اس بات کو یقینی بنائیں کہ ہر نمونہ کو احتیاط سے لوڈ کیا گیا ہے تاکہ کنوؤں کے درمیان رساؤ یا اختلاط سے بچا جا سکے۔

❖ جیل الیکٹروفورسس اپریٹس کو پاور سپلائی سے جوڑیں اور جیل کو ایک مستقل وولٹیج (عام طور پر V100) پر تقریباً 30-60 منٹ تک چلائیں، یا جب تک کہ ڈائی فرنٹ مطلوبہ فاصلے پر نہ پہنچ جائے۔

5. ڈی این اے کے ٹکڑوں کا تصور (Visualization of DNA Fragments)

- ❖ الیکٹروفورسس کے بعد، کاسٹنگ ٹرے سے جیل کو احتیاط سے ہٹائیں اور اسے یووی ٹرانسیلومیٹر پر رکھیں۔
- ❖ UV کی نمائش سے بچانے کے لیے مناسب ذاتی حفاظتی سامان (PPE) جیسے دستانے اور حفاظتی شیشے پہنیں۔
- ❖ UV ٹرانسیلومیٹر کو آن کریں اور DNA کے ٹکڑوں کو UV روشنی کے نیچے دیکھیں۔ ڈی این اے کے ٹکڑے ان کی لمبائی کے لحاظ سے مختلف شدت کے بینڈ کے طور پر ظاہر ہوں گے۔
- ❖ مناسب حفاظتی اقدامات کے ساتھ جیل دستاویزی نظام یا اسمارٹ فون کیمرے کا استعمال کرتے ہوئے جیل کی تصویر کو دستاویز کریں۔

6. نتائج کا تجزیہ (Analysis of Result)

- ❖ ڈی این اے سیڑھی/مارکرز کے نسبت منتقلی کے پیٹرن کی بنیاد پر ڈی این اے کے ٹکڑوں کے سائز کا تعین کرنے کے لیے جیل امیج کا تجزیہ کریں۔
- ❖ کنویں سے ہر ڈی این اے کے ٹکڑے کے ذریعے منتقل ہونے والے فاصلے کی پیمائش کریں اور ڈی این اے سیڑھی/مارکر کے معلوم سائز کا استعمال کرتے ہوئے ان کے سائز کا حساب لگائیں۔
- ❖ معلوم شدہ ڈی این اے کی ترتیب اور استعمال شدہ پابندی کے خامروں سے پہچانی جانے والی سائٹس کی بنیاد پر مشاہدہ شدہ بینڈنگ پیٹرن کا متوقع پیٹرن کے ساتھ موازنہ کریں۔
- ❖ مالیکیولر بائیولوجی ریسرچ میں ریسٹریکشن ہاضمہ کے نتائج اور ممکنہ ایپلی کیشنز کی اہمیت پر تبادلہ خیال کریں۔

7. صفائی اور بعد از لیب بحث

- ❖ لیبارٹری کے حفاظتی رہنما خطوط کے مطابق تمام استعمال شدہ مواد اور ری ایجنٹس کو مناسب طریقے سے ٹھکانے لگائیں۔
- ❖ لیبارٹری کے محفوظ اور منظم ماحول کو برقرار رکھنے کے لیے کام کے علاقے اور آلات کو اچھی طرح صاف کریں۔
- ❖ تجرباتی نتائج کا جائزہ لینے کے لیے لیبارٹری کے بعد کی بحث کا انعقاد کریں، طلبہ کی طرف سے اٹھائے گئے کسی بھی سوال یا خدشات کو دور کریں، اور عملی سیشن کے دوران سیکھے گئے کلیدی تصورات کو تقویت دیں۔

18.3 اصول (Principle)

ڈی این اے مالیکیولز کو ریسٹریکشن انزائمز (*Restriction Enzyme*) کی مدد سے چھوٹے چھوٹے ٹکڑوں میں تقسیم کر دیا جاتا ہے۔ قینچیوں کی طرح ڈی این اے کو کاٹنے کی صلاحیت کی وجہ سے ان انزائمز کو مالیکیولر سیزرز کی اصطلاح دی گئی ہے۔ پابندی کے انزائمز مخصوص شناخت کے سلسلے کے لیے ڈبل اسٹرینڈ ڈی این اے کو اسکین کرتے ہیں جو عام طور پر 4-6 بیس جوڑے طویل پیلینڈرومک ترتیب ہوتے ہیں۔ پتہ لگانے پر، یہ انزائمز ترتیب سے منسلک ہوتے ہیں اور اسے صاف کرتے ہیں۔ اسی عمل کو ڈی این اے مالیکیول کی پوری لمبائی کے

لیے دہرایا جاتا ہے اور آخر کار یہ کئی چھوٹے ٹکڑوں میں بٹ جاتا ہے۔

Agarose جیل الیکٹروفورسس ایک تکنیک ہے جو عام طور پر مالیکیولر بائیولوجی اور ریکومبینٹ *DNA* ٹیکنالوجی کے تجربات میں *DNA* کے ٹکڑوں کو ان کی لمبائی کی بنیاد پر الگ کرنے کے لیے استعمال ہوتی ہے۔ چھوٹے مالیکیول جیل کے سوراخوں سے آسانی سے گزر سکتے ہیں اور جیل میں تیزی سے سفر کر سکتے ہیں۔ لمبے سالموں کو سوراخوں سے گزرتے ہوئے مزاحمت کا سامنا کرنا پڑتا ہے اور اس طرح وہ ایک چھوٹا فاصلہ طے کرتے ہیں۔

Agarose جیل الیکٹروفورسس میں درج ذیل اقدامات شامل ہیں۔

18.3.1 Agarose جیل کی تیاری

Agarose ایک لکیری پولیمر ہے جو سرخ طحالب *Gelidium* اور *Gracilaria* سے حاصل کیا جاتا ہے۔ اس کا بنیادی ڈھانچہ agarobiose کی دہرائی جانے والی اکائیوں پر مشتمل ہے (D-galactose + 3,6- anhydro-L-galactopyranose سے بنا ہوا)۔

ایگرز جیل تیار کرنے کے لیے، ایگرز پاؤڈر کو بفر میں ابال کر تحلیل کیا جاتا ہے اور پگھلے ہوئے محلول کو کاسٹنگ ٹرے میں ڈالا جاتا ہے اور اسے ٹھوس ہونے دیا جاتا ہے۔ ایگروز شوگر کے مالیکیولز کو آپس میں جوڑ کر پولیمرائز کرتا ہے اور جیل کی تشکیل کا سبب بنتا ہے۔ جیل میں

مختلف تاکوں کے سائز حاصل کرنے کے لیے ایگروز کی ارتکاز کو حل میں مختلف کیا جا سکتا ہے۔

18.3.2 ڈی این اے کے ٹکڑوں کا الیکٹروفورسس (Electrophoresis of DNA fragments)

چارج شدہ مالیکیولز کو الیکٹروفورسس کی تکنیک سے الگ کیا جا سکتا ہے۔ ڈی این اے مالیکیولز منفی طور پر pH 7 پر چارج کیے جاتے ہیں اور جیل بھر میں برقی فیلڈ لگانے پر انوڈ کی طرف ہجرت کرتے ہیں۔ کئی عوامل جیل کے ذریعے ڈی این اے کی منتقلی کی شرح کا تعین کرتے ہیں۔

1. ڈی این اے کا سائز
2. agarose کا سائز 2pores کی حراستی سے طے ہوتا ہے۔
3. ڈی این اے کی تشکیل
4. استعمال شدہ وولٹیج
5. استعمال شدہ بفر میں آئنوں کی طاقت
6. ایتھیڈیم برومائیڈ جیسے انٹرکیلیٹنگ ڈائی کی موجودگی

جیل کی چھلنی کی صلاحیت کے لحاظ سے بیرونی وولٹیج لگانے پر ڈی این اے کے ٹکڑے ایگرز جیل میں منتقل ہو جاتے ہیں۔ کراس سے جڑے مالیکیولز کے درمیان کم جگہ رکھنے والی مضبوط جیلیں زیادہ ایگروز ارتکاز پر حاصل کی جاتی ہیں اور صرف چھوٹے ٹکڑوں کو آسانی سے گزرنے دیتی ہیں۔ ایگروز کی کم ارتکاز کی وجہ سے بڑے تاکنے والے سائز والے جیلوں کو بڑے سائز کے DNA کے ٹکڑوں کے لیے ترجیح دی جاتی ہے جن کے چھیدوں سے گزرنے کے لیے زیادہ جگہ ہوتی ہے۔

ٹریکنگ رنگ وہ نظر آنے والے رنگ ہیں جو اس عمل میں شامل ہوتے ہیں اور جیل میں ان کی منتقلی کی حد کو الیکٹروفورسس کی پیشرفت کی نگرانی کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ ٹریکنگ رنگ کم مالیکیولر وزن، منفی چارج شدہ مالیکیولز ہیں جو الیکٹروفورسس کے شروع میں نمونوں کے ساتھ کنویں میں بھرے ہوتے ہیں۔ مثال کے طور پر، بروموفینول بلیو اور زائلین سائینول

18.3.3 ڈی این اے کے ٹکڑوں کا تصور (Visualization of DNA fragments)

ڈی این اے مالیکیولز کا براہ راست مشاہدہ نہیں کیا جا سکتا کیونکہ ان کا اپنا کوئی رنگ نہیں ہوتا اور رنگوں کا استعمال کرتے ہوئے ان کا مناسب داغ ہونا ضروری ہے۔ ایک مجرد بینڈ کا پتہ لگایا جا سکتا ہے جب کافی ڈی این اے ڈائی کے ساتھ جڑا ہوا ہے، اسے نظر آتا ہے۔ گہرے رنگ کے ڈی این اے بینڈ جیل کے ہلکے پس منظر میں ظاہر ہوتے ہیں۔ وہ رنگ جو ڈی این اے کے ساتھ ملتے ہیں وہ بھی شامل کیے جا سکتے ہیں جیسے ایتھیڈیم برومائیڈ۔ یووی لائٹ کے نیچے تصور کرنے پر، ڈی این اے بینڈ میں ایتھیڈیم برومائڈ انٹرکیلیٹڈ فلوروسیس ہوتا ہے۔

18.4 مواددرکار (Materials Required)

---

1. 10X TBE buffer

اجزاء	رقم/وزن(1لیٹر میں)
Tris base	108 گرام
بورک ایسڈ(Boric Acid)	55 گرام
ای ڈی ٹی اے(0.5M(EDTA	40ml

2. 5X نیوکلک ایسڈ لوڈنگ بفر(25%گلیسرول+50mM Tris HCl)
3. الگ تھلگ پلازمیڈ ڈی این اے
4. پابندی والے انزائمز
5. دوگنا آست پانی
6. جراثیم سے پاک نکات، مائکروپیپیٹس
7. پانی کا غسل، ایگروز جیل الیکٹروفورسس ٹینک اور ٹرے سیٹ اپ، ٹرانسلومینیٹر اور جیل دستاویزی نظام۔

18.5 طریقہ کار(Procedure)

I. ڈی این اے عمل انہضام پابندی کے انزائم کا استعمال کرتے ہوئے:

1. آئس بالٹی میں پابندی والے انزائم پر مشتمل شیشی رکھیں
2. الگ تھلگ پلازمڈ ڈی این اے اور پرکھ کے بفر پر مشتمل شیشیوں کو گلایا جاتا ہے۔
3. پابندی ہضم کے لیے مرکب اب تیار کیا گیا ہے جیسا کہ ذیل میں دیا گیا ہے۔
   - ❖ REACTION مرکب(پابندی انزائم ہضم)
   - ❖ پلازمڈ ڈی این اے 5µl
   - ❖ Assay بفر10X 2.5µl
   - ❖ ڈبل ڈسٹل واٹر 6.5µl
   - ❖ پابندی کا انزائم (1U/mg) 1 µl
4. رد عمل کا مرکب شیشی میں ڈالا جاتا ہے اور شیشی کو 1 گھنٹے کے لیے 37 ° C پر انکیوبیٹ کیا جاتا ہے۔

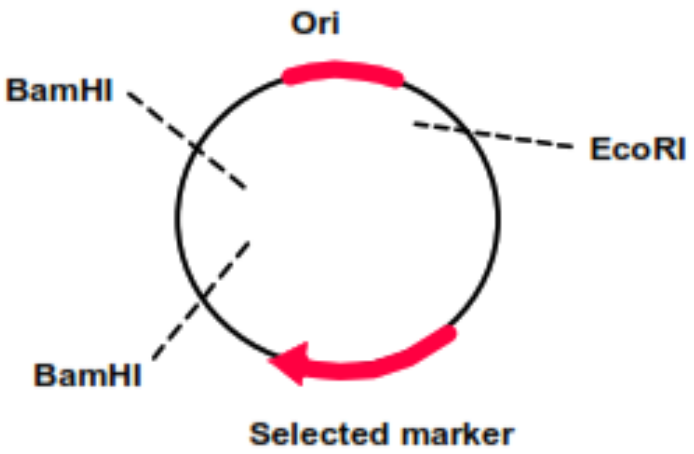
II. ایگرز جیل الیکٹروفورسس:

1. Agarose جیل 0.8٪ ارتکاز 1X TBE بفر میں تیار کیا جاتا ہے۔

2. کیتھوڈ سے تقریباً 2 سینٹی میٹر کے فاصلے پر کنگھیوں کے ساتھ ٹرے میں ڈالا گیا۔
3. جیل کو کمرے کے درجہ حرارت پر ٹھوس ہونے کی اجازت ہے۔
4. جیل ٹینک میں 1X TBE بفر ڈالا جاتا ہے۔ یہ یقینی بنایا جاتا ہے کہ بفر کی سطح جیل کی سطح سے 0.5-0.8 سینٹی میٹر اوپر ہے۔
5. کنگھیوں کو آہستہ سے اٹھایا جاتا ہے، اس بات کو یقینی بناتے ہوئے کہ کنوئیں کو نقصان نہ پہنچے
6. 15µl جیل لوڈنگ بفر کو شیشیوں میں شامل کیا جاتا ہے جس کے بعد پابندی ہضم کو ایک گھنٹے تک آگے بڑھنے دیتا ہے۔
7. اب مارکر کا 10µl، ہضم شدہ پلازمڈ نمونہ اور 10µl کنٹرول DNA کو الگ الگ کنوؤں میں احتیاط سے لوڈ کیا جاتا ہے۔
8. الیکٹروفورسس کو ایک مستقل وولٹیج پر آگے بڑھنے کی اجازت ہے (1-2 گھنٹے کے لیے 50-100V پر)۔
9. ٹریکنگ ڈائی (برومو فینول بلیو) کے سامنے ڈائی پر نظر رکھ کر بجلی بند کر دی جاتی ہے۔
10. ایگروز جیل کو ڈی این اے سٹیننگ ڈائی جیسے EtBR-Ethidium Bromide سے داغ دیا جاتا ہے اور UV ٹرانسیلومیٹر کے نیچے دیکھا جاتا ہے۔

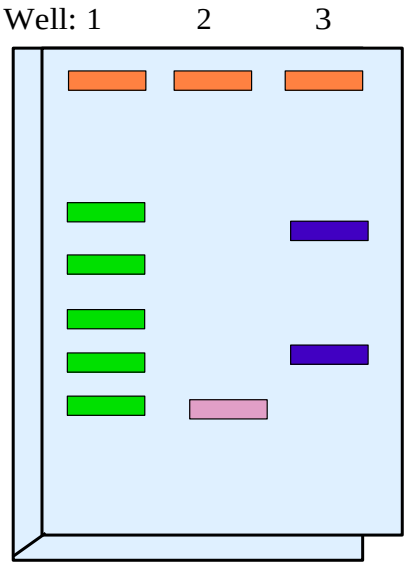
18.6 نتیجہ اور مشاہدات (Result and Observations)

آیئے ایک پلازمڈ پر غور کریں جیسا کہ ذیل میں دی گئی تصویر 18.0 میں دیا گیا ہے۔



شکل 18.0 پلاسمڈ ڈی این اے

پلازمڈ میں EcoRI انزائم کے لیے ایک انوکھی پابندی کی جگہ اور BamHI انزائم کے لیے دو پابندی والی جگہیں ہیں۔ 1U/mg BamHI انزائم کے ساتھ پابندی ہضم کرنے اور ایگرز جیل الیکٹروفورسس انجام دینے پر، درج ذیل جیل حاصل کیا جاتا ہے۔



شکل.18.1اگروز جیل پر ڈی این اے کے ٹکڑے

لین 1مار کر ڈی این اے بینڈز کی نمائندگی کرتی ہے۔

لین 2 کنٹرول ڈی این اے کی نمائندگی کرتا ہے (پلاسمڈ ڈی این اے ہے لیکن اس میں پابندی کا انزائم بام ایچ آئی شامل نہیں ہے)۔ یہ اس بات کو یقینی بنانا ہے کہ ریجنٹس صحیح طریقے سے کام کر رہے ہیں اور پلاسمڈ ڈی این اے برقرار ہے اور نہ کٹا ہوا ہے۔

لین 3 بام HI ہضم شدہ پلازمڈ DNA نمونے کی نمائندگی کرتی ہے۔2 بینڈز حاصل کیے گئے ہیں جو اس بات کی نمائندگی کرتے ہیں کہ بام HI پابندی والی دونوں جگہوں پر کلیو یج یا مکمل ہاضمہ ٹھیک سے ہوا ہے۔

18.7 احتیاطی تدابیر

1. انزائم پر مشتمل شیشیوں کو برف میں محفوظ کیا جانا چاہیے کیونکہ انزائم درجہ حرارت کے لیے حساس ہوتے ہیں۔
2. وورٹیکسنگ سے مکمل طور پر گریز کیا جاتا ہے تاکہ انزائم کی خرابی کو روکا جا سکے۔
3. مرکب کو صرف ہلکے سے تھپتھپانے سے ملایا جاتا ہے۔
4. تجربہ پر کام کرنے سے پہلے انکیوبیٹر کو 37 °C پر سیٹ کیا جانا چاہیے۔
5. جیل کی تیاری کے دوران بلبلوں کی تشکیل سے پرہیز کریں۔
6. رد عمل کے آمیزے کو غیر مخصوص کلیو یج سے بچنے کے لیے مقررہ وقت سے زیادہ پابندی والے انزائم کے ساتھ نہیں لگایا جانا چاہیے۔

18.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Section 4.6, Restriction Enzymes: Performing the Digestion.
2. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. Chapter 5, Restriction Endonucleases.
3. Green MR, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. Chapter 5, Digestion with Restriction Enzymes.
4. Wiley JM, Sherwood LM and Woolverton CJ. (2013) Prescott's Microbiology. 9 th Edition. McGraw Hill International.
5. Primrose SB and Twyman RM. (2006). Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7th edition. Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
6. Sambrook J and Russell D. (2001). Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
7. Clark DP and Pazdernik NJ. (2009). Biotechnology: Applying the Genetic Revolution. Elsevier Academic Press, USA.

پریکٹیکل ریکارڈ شیٹ(Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

اکائی 19: پولیمریز چین ری ایکشن (پی سی آر) کے ذریعے ڈی این اے کی توسیع

[Amplification of DNA through Polymerase Chain Reaction (PCR)]

اکائی کے اجزا:

19.0 تعارف(Introduction)

19.1 مقاصد(Objectives)

19.2 اصول(Principle)

19.3 درکار مواد(Materials Required)

19.4 طریقہ کار(Procedure)

19.5 ایگرز جیل الیکٹروفورسس(Agarose Gel Electrophoresis)

19.6 نتیجہ اور مشاہدات(Result and Observations)

19.7 احتیاطی تدابیر

19.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

19.0 تعارف(Introduction)

پولیمریز چین ری ایکشن (پی سی آر) 1983 میں امریکی حیاتیاتی کیمیاء دان کیری مولس (*Kary Mullis*) نے سیٹس کارپوریشن میں تیار کیا تھا۔ اس میں ویٹرو میں ہدف ڈی این اے ٹکڑے (*DNA Fragments*) کی انزائم ثالثی کی ترکیب شامل ہے اور خاص طور پر ٹیمپلیٹ ڈی این اے پر مشتمل پیچیدہ مرکب سے شروع ہونے والے ڈی این اے ٹکڑے کو بڑھانے کے لئے استعمال کیا جاتا ہے۔ پی سی آر مختلف ذرائع سے ڈی این اے مطالعہ اور خصوصیات کے لئے ایک مقبول تکنیک کے طور پر ابھرا ہے۔

مالیکیولر بائیولوجی کے دائرے میں، مخصوص ڈی این اے ٹکڑوں کو درستگی اور کارکردگی کے ساتھ بڑھانے کی صلاحیت نے سائنسی تحقیق اور عملی اپلی کیشنز کے منظر نامے میں انقلاب برپا کر دیا ہے۔ پولیمریز چین ری ایکشن (پی سی آر) اس ڈومین میں ایک سنگ بنیاد تکنیک کے طور پر کھڑا ہے، جس سے سائنس دانوں کو ڈی این اے سیکونس کو تیزی سے بڑھانے کے قابل بناتا ہے، یہاں تک کہ ابتدائی مواد سے بھی۔ جینیاتی، طب، فرانزک اور بائیو ٹیکنالوجی سمیت مختلف شعبوں میں پی سی آر ناگزیر ہو گیا ہے۔

یہ باب پی سی آر کا استعمال کرتے ہوئے ڈی این اے کے ٹکڑے کی توسیع کو سمجھنے اور اس پر عمل درآمد کرنے کے لئے ایک عملی

رہنما کے طور پر کام کرتا ہے۔ یہ پی سی آر کے بنیادی اصولوں میں جھانکتا ہے، اس عمل میں شامل اجزاء اور اقدامات کی کھوج کرتا ہے، اور اس کی متنوع اپیلی کیشنز کی وضاحت کرتا ہے.

پی سی آر کا بنیادی مقصد ایک مخصوص ڈی این اے ترتیب کی کاپیوں کی کثرت پیدا کرنا ہے، جسے اکثر ہدف یا ٹیمپلیٹ ڈی این اے کہا جاتا ہے۔ یہ توسیع درجہ حرارت پر قابو پانے والے رد عمل کی ایک سائیکلیکل سیریز کے ذریعے حاصل کی جاتی ہے، جس میں سے ہر ایک ڈی این اے کی خرابی، پرائمر اینیلنگ، اور ڈی این اے توسیع کی سہولت فراہم کرتی ہے۔ نتیجہ ہدف ڈی این اے میں تیزی سے اضافہ ہے، جس سے پی سی آر مختلف مالیکیولر بائیولوجی اپیلی کیشنز کے لئے ایک انتہائی حساس اور ورسٹائل آلہ بن جاتا ہے۔

اس باب میں، ہم مندرجہ ذیل اہم پہلوؤں پر تبادلہ خیال کریں گے:

1. **پی سی آر کے اصول:** تھرموسائکلنگ کے عمل کو سمجھنا، بشمول تنزلی، اینیلنگ، اور توسیع، اور نئے ڈی این اے اسٹرینڈز کو مرتب کرنے میں ڈی این اے پولیمریز کا کردار۔
2. **پی سی آر کے اجزاء:** پی سی آر رد عمل کے ضروری اجزاء کی تلاش، بشمول ٹیمپلیٹ ڈی این اے، پرائمرز، نیوکلیوٹائڈز، ڈی این اے پولیمریز، اور بفر حل، اور توسیع میں ان کے کردار۔
3. **پی سی آر پروٹوکول:** پی سی آر رد عمل انجام دینے کے لئے مرحلہ وار طریقہ کار کی تفصیل، رد عمل مکس قائم کرنے سے لے کر تھرمل سائیکلنگ پروگرام چلانے تک۔
4. **آپٹیمائزیشن حکمت عملی:** پی سی آر کی کارکردگی کو متاثر کرنے والے عوامل اور مخصوصیت، حساسیت اور پیداوار کو بڑھانے کے لئے رد عمل کے حالات کو بہتر بنانے کی حکمت عملی پر تبادلہ خیال.
5. **پی سی آر کی اپیلی کیشنز:** پی سی آر کی متنوع اپیلی کیشنز کو اجاگر کرنا، جین کلوننگ، جینوٹائپنگ، اور سیکوئنسنگ سے لے کر تشخیصی جانچ، فرانزک تجزیہ، اور ماحولیاتی نگرانی تک۔
6. **مسائل کا ازالہ:** پی سی آر تجربات کے دوران سامنے آنے والے عام چیلنجوں اور نقصانات کو حل کرنا اور ان پر قابو پانے کے لئے مسائل کا ازالہ کرنے کی حکمت عملی فراہم کرنا۔

پی سی آر کا استعمال کرتے ہوئے ڈی این اے ٹکڑوں کی توسیع میں مہارت حاصل کر کے، محققین اور پریکٹیشنرز سائنسی علم کو آگے بڑھانے اور مختلف شعبوں میں حقیقی دنیا کے چیلنجوں سے نمٹنے کے لئے بہت سارے مواقع کھول سکتے ہیں۔ اس باب کا مقصد قارئین کو ان کی تحقیقی کوششوں میں پی سی آر کی طاقت کو بروئے کار لانے کے لئے ضروری نظریاتی تفہیم اور عملی مہارتوں سے لیس کرنا ہے۔

19.1 مقاصد (Objectives)

عملی یونٹ کی تکمیل کے بعد طالب علم اس قابل ہو جائیں گے

- ★ پی سی آر کے پیچھے کام کرنے والے اصول کی وضاحت کریں۔

- ✶ پی سی آر انجام دینے کے لئے ضروری ریجنٹس کو شامل کریں۔
- ✶ ٹاک پولیمریز کی اہمیت۔اور
- ✶ پی سی آر کی اپلی کیشنز کی وضاحت کریں۔

19.2 اصول(Principle)

مخصوص ہدف کی ترتیب کو بڑھانے کے لیے استعمال ہونے والے پولیمریز چین ری ایکشن کے درج ذیل مراحل ہوتے ہیں۔

1۔ابتدائی مرحلہ ***(Initialization step)***

یہ مرحلہ ڈی این اے کی پٹیوں کے درمیان ہائیڈروجن بانڈز کو توڑنے کے لیے کیا جاتا ہے۔رد عمل کا مرکب 1-9منٹ کے وقفے کے لیے94–96°C کے درجہ حرارت پر گرم کیا جاتا ہے۔۔

2۔ڈینیچریشن مرحلہ ***(Denaturation step)***

ڈینیچریشن میں 94-98 ° C کے درجہ حرارت پر 20-30 سیکنڈ تک حرارت شامل ہوتی ہے۔ یہ ڈی این اے کے تکمیلی کناروں میں اڈوں کے درمیان ہائیڈروجن بانڈز کی دراڑ کا سبب بنتا ہے اور اس کے نتیجے میں سٹرینڈز الگ ہو جاتے ہیں تاکہ واحد پھنسے ہوئے DNA پیدا ہو سکیں۔

3۔اینیلنگ مرحلہ ***(Annealing step)***

اس مرحلے میں واحد پھنسے ہوئے ٹیمپلیٹ ڈی این اے پرائمر کے ساتھ ڈینیچریشن اینیلز کے ذریعہ تیار کیا جاتا ہے۔ بہتر بائنڈنگ ہوتی ہے پرائمر کی ترتیب ٹیمپلیٹ ڈی این اے کی تکمیل کرتی ہے۔رد عمل کا درجہ حرارت مختصر طور پر 20-40 سیکنڈ کے لیے 50-65 ° C تک کم کیا جاتا ہے۔

عام طور پر، اینیلنگ کے لیے استعمال ہونے والا درجہ حرارت پرائمر کے پگھلنے والے درجہ حرارت سے 3-5°C کم ہوتا ہے۔ اینیلنگ کے بعد، ڈی این اے کی ترکیب شروع ہوتی ہے جب تھرموسٹیبل ڈی این اے پولیمریز انزائم آتا ہے اور ٹیمپلیٹ اور پرائمر کے ہائبرڈ سے منسلک ہوتا ہے اور توسیع کا عمل شروع کرتا ہے۔

پرائمر ٹیمپلیٹ میں ہدف کی ترتیب سے منسلک ہوتے ہیں اور اس طرح اس ترتیب کا تعین کرتے ہیں جسے مزید مراحل میں بڑھایا جائے گا۔ایک مثالی پرائمر میں درج ذیل خصوصیات ہیں-

- پرائمر کی لمبائی-18-30 نیوکلیوٹائڈز۔

52-60°C کے درمیان پگھلنے کا درجہ حرارت۔پگھلنے کا درجہ حرارت(*Tm*)اس درجہ حرارت کے طور پر بیان کیا جاتا ہے جس پر دوہری پھنسے ہوئے مالیکیولز کا نصف الگ ہو جاتا ہے۔اس کا حساب فارمولے سے کیا جاتا ہے۔

$$Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$$

□ پرائمر اینیلنگ کا درجہ حرارت احتیاط سے طے کرنا چاہیے۔ بہت زیادہ درجہ حرارت مناسب پابند ہونے کی اجازت نہیں دے گا اور اس طرح پی سی آر پروڈکٹ فارم کی کم مقدار۔ اینیلنگ کا بہت کم درجہ حرارت پرائمر کی اینیلنگ کو فروغ دے سکتا ہے۔۔

□ GC مواد 40-60% کے درمیان

□ پرائمر میں کوئی ثانوی ڈھانچہ نہیں جیسے ہیئر پن، سیلف اور کراس ڈائمرز۔

□ ایک ڈائنوکلیوٹائڈ تسلسل کو 4 بار سے زیادہ دہرانے سے گریز کرنا چاہیے۔ مثال کے طور پر، CGCGCGCG۔ یہ غیر مخصوص بائنڈنگ کو فروغ دیتا ہے۔۔

.توسیع/توسیع کا مرحلہ:

اس مرحلے میں استعمال ہونے والا درجہ حرارت ڈی این اے پولیمریز کے انتخاب پر منحصر ہے۔

انزائم ٹیک پولیمریز کی زیادہ سے زیادہ سرگرمی تقریبا 75-80 ڈگری سینٹی گریڈ ہے۔ اس معاملے میں 68-72 ڈگری سینٹی گریڈ کا درجہ حرارت برقرار رکھا جاتا ہے.

اس عمل کے دوران، ڈی این اے پولیمریز کے ذریعہ ایک نیا ڈی این اے اسٹرینڈ تشکیل دیا جاتا ہے اور یہ ڈی این اے ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ کی تکمیل کرتا ہے۔ پولیمریز ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ ترتیب کی بنیاد پر ڈی این ٹی پیز کو شامل کرتا ہے اور 5' سے 3' سمت میں اس کی تکمیل کرتا ہے۔

توسیع کا وقت دو عوامل پر منحصر ہے یعنی استعمال ہونے والے ڈی این اے پولیمریز کی پولیمرائزیشن کی شرح اور ہدف ڈی این اے ٹکڑے کی لمبائی کو بڑھانا۔ زیادہ سے زیادہ درجہ حرارت پر، ڈی این اے پولیمریز ہزاروں بیس/منٹ متعارف کرا سکتا ہے۔

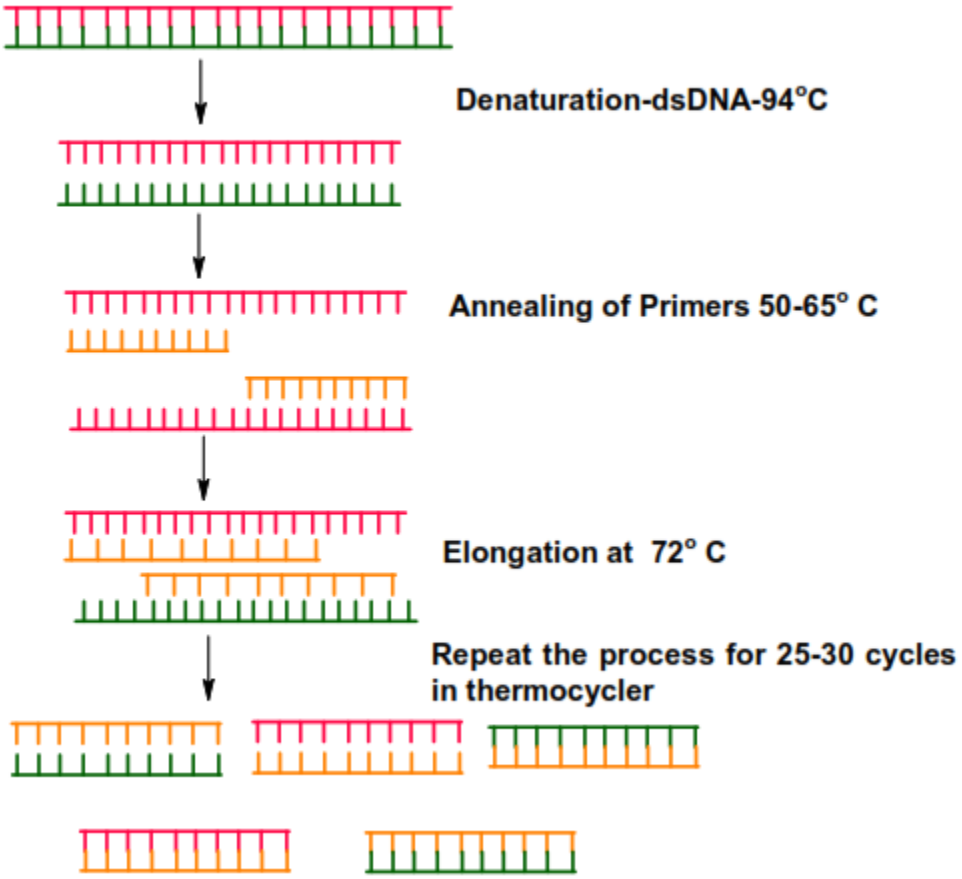
سازگار حالات میں، ہر توسیعی سائیکل کے اختتام پر، مخصوص ہدف ڈی این اے کی مقدار کو دوگنا کیا جانا چاہئے۔ اس طرح ہدف ڈی این اے کا ٹکڑا تیزی سے بڑھتا ہے۔

5. آخری توسیع کا مرحلہ:

یہ واحد مرحلہ پی سی آر کے آخری چکر کے اختتام پر انجام دیا جاتا ہے تاکہ اس بات کو یقینی بنایا جاسکے کہ تمام سنگل اسٹینڈڈ مالیکیولز کو بڑھایا گیا ہے۔ 70-74 ڈگری سینٹی گریڈ پر 5-15 منٹ کے لئے کیا گیا.

ایک خودکار تھرموسائیکلر نامی مشین بہت کم وقت میں تمام مراحل کے لئے ضروری درجہ حرارت حاصل کر سکتی ہے اور پی سی آر مراحل کو 20-30 بار دہرانے کے قابل بناتی ہے۔ اس کے نتیجے میں ہدف ڈی این اے کے ٹکڑے کی تیزی سے توسیع اور جمع ہوتا ہے۔

ایک حتمی ہولڈ صارف کو مختصر مدت کے لئے 4 ڈگری سینٹی گریڈ کے درجہ حرارت پر رد عمل کے مرکب کو ذخیرہ کرنے کی اجازت دیتا ہے (تصویر 19.0).



تصویر19.0پولیمریزچین ردعمل کے اقدامات

19.3 درکار مواد(Materials Required)

1. 10. ایکس پرکھ بفر
2. *10 x TBE*
3. *6X* جیل لوڈنگ بفر
4. 2.5ایم ایم ڈی این ٹی پی مکس
5. طاق ڈی این اے پولیمریز
6. 256ایم ایم ایم جی سی ایل2
7. فارورڈاوررِیورس پرائمر

8. آگروز
9. 0.2ملی لیٹر پی سی آر ٹیوبیں، پولی پروپیلین ٹیوبز
10. تجاویزاور مائیکروپیپیٹس
11. پسی ہوئی برف
12. پی سی آر پروڈکٹ کو کنٹرول کریں۔
13. ٹیمپلیٹ ڈی این اے
14. $DNA1kb$ سیڑھی
15. ڈبل آست پانی
16. تھرموسائکلر مشین اور پاور پیک
17. افقی الیکٹروفورسس اپریٹس
18. UV-ٹرانسلومینیٹر

ایس۔نہیں	جزو	بیان
1	سانچہ ڈی این اے	اس میں ہدف کا علاقہ شامل ہے جسے بڑھانے کی ضرورت
2	فارورڈاور ریورس پرائمرز	ڈی این اے پولیمریز کو باندھنے کے لئے ضروری ڈبل اسٹینڈڈ شروعاتی سائٹ فراہم کریں کیونکہ وہ حس اور اینٹی سینس ڈی این اے اسٹرینڈز دونوں کے 3 سروں کی
3	ڈی این اے پولیمرز	تھرموا سٹیبل، مثال کے طور پر-ٹاک، پی الف پو
4	تمام 4 ڈیآکسی نیوکلیوٹائڈ ٹرائی فاسفیٹ-ڈی ڈی اے ٹی پی،	ہدف ڈی این اے ٹکڑے کی ترکیب کے لئے ضروری ہے.
5	$Mg2^{+}/Mn2^{+}$آئن	ٹاک پولیمریز کی سرگرمی کے لئے ضروری پرائمر کو ٹیمپلیٹ میں بہتر اینیلنگ کو فروغ دینا
6	بفر	اس کے لئے بہترین حالات فراہم کریں

19.4 طریقہ کار(Procedure)

پی سی آر کے لیے رد عمل کے مرکب کی تیاری

مندرجہ ذیل اجزاء کو مخصوص مقدار میں پی سی آر ٹیوب میں شامل کیا جاتا ہے۔

اجزاء	مقدار
ٹیمپلیٹ ڈی این اے/Template DNA	1 µl
فارورڈ پرائمر(10nM)	1 µl
ریورس پرائمر(10nM)	1 µl
2.5ایم ایم ڈی این ٹی پی مکس	5 µl
10ایکس اے بفر	5 µl
25ایم ایم ایم جی سی ایل2	5 µl
دوگنا آست پانی(Double Distill Water)	31.5 µl
Taqڈی این اے پولیمریز(آخر میں شامل کیا جائے گا)	0.5 µl
کل حجم	50 µl

1. ٹیوب میں موجود مواد کو 1-2 سیکنڈ تک تھپتھپا کر ملایا جاتا ہے۔
2. ٹیوب خودکار تھرموسائکلر مشین میں رکھی گئی ہے۔اب پروگرام ڈی این اے پروردن حاصل کرنے کے لیے تیار ہے۔
3. *20-35PCR* ایمپلیفیکیشن سائیکل تھرموسائکلر میں درج ذیل شرائط کے ساتھ انجام دیا جاتا ہے۔

عمل	**وقت**	**درجہ حرارت**
Initial denaturation	10منٹ	94°C
Denaturation	30سیکنڈ	94°C
Annealing	30سیکنڈ	58°C
توسیع	45سیکنڈ	72°C
حتمی توسیع	10منٹ	72°C
فائنل کاانعقاد	-	4°C

19.5 ایگرز جیل الیکٹروفورسس (Agarose Gel Electrophoresis)

1. 0.8% ارتکاز کا Agarose جیل TBE 1 X بفر میں تیار کیا جاتا ہے اور کیتھوڈ سے تقریباً 2 سینٹی میٹر کے فاصلے پر کنگھیوں کے ساتھ ٹرے میں ڈالا جاتا ہے۔
2. جیل کو کمرے کے درجہ حرارت پر ٹھوس ہونے کی اجازت ہے۔
3. جیل ٹینک میں 1X TBE بفر ڈالا جاتا ہے۔ یہ یقینی بنایا جاتا ہے کہ بفر کی سطح جیل کی سطح سے 0.5-0.8 سینٹی میٹر اوپر ہے۔
4. کنگھیوں کو آہستہ سے اٹھایا جاتا ہے، اس بات کو یقینی بناتے ہوئے کہ کنوئیں کو نقصان نہ پہنچے
5. پہلا کنواں احتیاط سے 3µl مارکر DNA سے بھرا ہوا ہے۔
6. ہم 6X لوڈنگ بفر کے 2µl حاصل کردہ PCR پروڈکٹ کے 10µl میں شامل کرتے ہیں اور PCR کے نمونے کنویں میں لوڈ کرتے ہیں۔ الیکٹروفورسس کو ایک مستقل وولٹیج پر (50V - 100 پر 1-2 گھنٹے تک) آگے بڑھنے کی اجازت ہے۔
7. ٹریکنگ ڈائی (برومو فینول بلیو) کے سامنے ڈائی پر نظر رکھ کر بجلی بند کر دی جاتی ہے۔
8. ایگروز جیل ایتھیڈیم برومائیڈ سے داغدار ہے اور اسے UV - ٹرانسیلومیٹر کے نیچے تصور کیا جاتا ہے۔

19.6 نتیجہ اور مشاہدات (Result and Observations)

ایگروز جیل الیکٹروفورسس کے بعد پی سی آر (شکل 19.2) پر۔

شکل 19.2: پی سی آر کے بعد ڈی این اے بینڈ (بینڈ پی سی آر کے بعد ڈی این اے کی کامیاب پرورش کی نمائندگی کرتا ہے)

- لین 1- *Kbp DNA* 1 سیڑھی لین 1 میں چلائی گئی تھی۔ جیسا کہ توقع تھی، 100-1000 *bp* تک کے 10 بینڈ نمودار ہوئے۔ 100 *bp* کا بینڈ کنویں سے سب سے دور (زیادہ سے زیادہ فاصلے پر سفر کیا) اور کنویں کے قریب ترین 1000 *bp* کا سب سے بڑا ٹکڑا (کم از کم فاصلہ طے کیا) پر واقع ہوگا۔
- لین 2- پی سی آر ایمپلیکن ایک بینڈ کے طور پر نمودار ہوا۔ لین 1 میں چلنے والی سیڑھی کے مقابلے میں، اس کے سائز میں 300-400 *bp* کے درمیان ہونے کی توقع ہے۔
- لین 3- منفی کنٹرول- جیسا کہ توقع تھی اس لین میں کوئی بینڈ ظاہر نہیں ہوا۔ اس سے ظاہر ہوتا ہے کہ ری ایکشن قائم کرنے کے عمل میں یا ری ایجنٹس میں کوئی آلودگی نہیں تھی۔
- لین 4- مثبت کنٹرول- الیکٹروفورسس کے بعد ایک بینڈ نمودار ہوا۔ اس سے ظاہر ہوتا ہے کہ ہمارا عمل کامیاب رہا اور تمام ریجنٹس اور انزائمز ٹھیک کام کر رہے ہیں۔
- پی سی آر ایمپلیکن کو لین 2 میں ایک بینڈ کے طور پر دیکھا گیا جس سے یہ ظاہر ہوتا ہے کہ ہمارے ہدف کے ڈی این اے کے ٹکڑے کو منتخب طور پر بڑھا دیا گیا ہے۔ مثبت کنٹرول اور ٹیسٹ لین میں بینڈ کا ایک ہی سائز اس بات کو یقینی بناتا ہے کہ تمام ایمپلی کانز ٹارگٹڈ ٹیمپلیٹ کی ترتیب کی صحیح کاپیاں ہیں۔ نیز، ایمپلیکن کے لیے ایک سنگل بینڈ اشارہ کرتا ہے کہ مطلوبہ ترتیب کو بڑھا دیا گیا تھا اور

امپلیفیکیشن کے عمل میں غلطیوں کی وجہ سے متضاد مرکب پیدا نہیں ہوا تھا۔ چونکہ متعدد بینڈز نہیں دیکھے گئے تھے، اس سے یہ بھی ظاہر ہوتا ہے کہ کوئی غیر مخصوص پرائمر اینیلنگ نہیں تھی۔

- ❖ لین 3- منفی کنڑول میں کوئی بینڈ نہیں دیکھا گیا۔ اس سے ظاہر ہوتا ہے کہ پی سی آر کا ردعمل آلودگی سے پاک ہے۔ غیر مطلوبہ ڈی این اے بینڈ غیر ملکی ڈی این اے کے ذریعے ریجنٹس کی آلودگی کی صورت میں تیار ہوتے ہیں۔
- ❖ لین 4- مثبت کنڑول میں ایک بینڈ نمودار ہوا، جس سے ظاہر ہوتا ہے کہ پی سی آر مکس کے تمام ریجنٹس اور انزائمز ٹھیک کام کر رہے ہیں

19.7 احتیاطی تدابیر

1. وورٹیکسنگ (*Vortexing*) سے مکمل طور پر گریز کیا جاتا ہے تاکہ انزائم کی خرابی اور نمونے کے انحطاط کو روکا جاسکے۔ مرکب کو صرف ہلکے سے تھپتھپانے سے ملایا جاتا ہے۔
2. ری ایکشن مکسچر اور انزائم پر مشتمل شیشیوں کو برف میں محفوظ کیا جانا چاہیے کیونکہ انزائمز درجہ حرارت کے لیے حساس ہوتے ہیں۔
3. اس بات کو یقینی بنانے کے لیے کہ تھرموسائکلر صحیح طریقے سے کام کر رہا ہے، مثبت کنڑول کو چلایا جانا چاہیے۔
4. جیل کی تیاری کے دوران بلبلوں کی تشکیل سے پرہیز کریں۔

19.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں (Suggested Books for Further Readings)

1. Brown TA. (2010). Gene Cloning and DNA Analysis. 6th edition. Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
2. Cappucino J and Sherman N. (2010). Microbiology: A Laboratory Manual. 9th edition. Pearson Education Limited.
3. 3. Sambrook J and Russell D. (2001). Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Wiley JM, Sherwood LM and Woolverton CJ. (2013) Prescott's Microbiology. 9 th Edition. McGraw Hill International.

5. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. Chapter 5, Restriction Endonucleases.
6. Primrose SB and Twyman RM. (2006). Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7th edition. Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
7. Sambrook J and Russell D. (2001). Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Clark DP and Pazdernik NJ. (2009). Biotechnology: Applying the Genetic Revolution. Elsevier Academic Press, USA.

پریکٹیکل ریکارڈ شیٹ(Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

اکائی 20: فراہم کردہ ڈیٹا سے سرکلر اور لکیری پابندی والے انزائم میپنگ کی تعمیر

[Construction of Circular And Linear Restriction Enzyme Mapping From The Data Provided.]

اکائی کے اجزا

20.0 تعارف(Introduction)

20.1 مقاصد(Objectives)

20.2 اصول(Principle)

20.3 درکار مواد(Materials Required)

20.4 طریقہ کار(Procedure)

20.5 احتیاطی تدابیر(Precautions)

20.6 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

20.0 تعارف(Introduction)

ڈی این اے مالیکیولز کی ساخت اور تنظیم کی وضاحت مالیکیولر بائیولوجی میں ایک سنگ بنیاد رہی ہے، جس سے جینیاتی میکانزم کی گہرائی سے تفہیم اور مختلف بائیو ٹیکنالوجی ایپلی کیشنز کو سہولت فراہم کی جاسکتی ہے۔ڈی این اے کی ساخت کا مطالعہ کرنے میں استعمال ہونے والی بنیادی تکنیکوں میں سے ایک پابندی کے نقشوں کی تعمیر ہے، جو ڈی این اے مالیکیول کے ساتھ مخصوص ترتیب کی پوزیشنوں کے بارے میں قیمتی بصیرت فراہم کرتی ہے۔

پابندی کے نقشے تجرباتی اعداد و شمار کی بنیاد پر بنائے جاتے ہیں جو تکنیکوں کے ذریعے حاصل کیے جاتے ہیں جیسے کہ پابندی انزائم ہضم اور جیل الیکٹروفورسس۔ یہ نقشے دو قسم کے ہو سکتے ہیں: سرکلر اور لکیری، ہر ایک DNA مالیکیولز کے ساتھ مختلف ٹوپولاجیز کے ساتھ پابندی والی جگہوں کے انتظام کی نمائندگی کرتا ہے۔

اس عملی باب میں، ہم تجرباتی اعداد و شمار سے سرکلر اور لکیری پابندی کے نقشے بنانے میں شامل طریقہ کار اور عمل کا جائزہ لیتے ہیں۔ تجربات اور ڈیٹا کے تجزیے کے ذریعے، شرکاء DNA کی ساختی تنظیم اور پابندی کی نقشہ سازی کے بنیادی اصولوں کے بارے میں بصیرت حاصل کریں گے۔

باب کا آغاز تجرباتی تکنیکوں کے ایک جائزہ کے ساتھ ہوتا ہے جو ضروری ڈیٹا تیار کرنے کے لیے استعمال کی جاتی ہیں، بشمول پابندی انزائم ہاضمہ اور جیل الیکٹروفورسس۔ شرکاء سیکھیں گے کہ ان تجربات کو کیسے انجام دیا جائے اور نقشہ کی تعمیر کے لیے درکار فریگمنٹ سائز ڈیٹا حاصل کیا جائے۔

اس کے بعد، توجہ ڈیٹا کے تجزیہ کی طرف منتقل ہو جاتی ہے، جہاں شرکاء جیل الیکٹروفورسس کے نتائج کی تشریح کریں گے اور ڈی این اے مالیکیول کے ساتھ پابندی والی جگہوں کی پوزیشن کا اندازہ لگائیں گے۔ مرحلہ وار نقطہ نظر کے ذریعے، شرکاء ٹکڑوں کے سائز میں نمونوں کی شناخت کرنا اور پابندی والی جگہوں کے درمیان رشتہ دار فاصلوں کا اندازہ لگانا سیکھیں گے۔

تجرباتی اعداد و شمار کے تجزیہ کے ساتھ، شرکاء پھر سرکلر اور لکیری پابندی کے نقشے بنانے کے لیے آگے بڑھیں گے۔ تعمیراتی عمل میں پابندی کی جگہوں کو مناسب ترتیب میں ترتیب دینا اور تجرباتی شواہد کے مطابق ان میں وقفہ کاری شامل ہے۔ اس مشق کے ذریعے، شرکاء ڈی این اے کی ساخت کو دیکھنے اور نقشے کی شکل میں اس کی نمائندگی کرنے میں عملی مہارت پیدا کریں گے۔

مجموعی طور پر، یہ عملی باب پابندی کے نقشوں کی تعمیر میں سیکھنے کا ایک عمیق تجربہ پیش کرتا ہے، جو مالیکیولر بائیولوجی میں ایک بنیادی تکنیک ہے۔ تجربات اور ڈیٹا کے تجزیے میں شامل ہو کر، شرکاء *DNA* کے ڈھانچے اور تنظیم کے بارے میں گہری سمجھ حاصل کریں گے، جس سے جینیات اور بائیو ٹیکنالوجی کے میدان میں مزید تحقیق کی بنیاد رکھی جائے گی۔

20.1 مقاصد (Objectives)

اس پریکٹیکل یونٹ کی تکمیل کے بعد طالب علم بیان کر سکتا ہے۔

❖ پابندی انزائم ہاضمہ:

- پابندی کے انزائم کے عمل انہضام کے اصول اور ڈی این اے مالیکیولز کو ٹکڑے کرنے میں اس کا اطلاق سیکھیں۔
- مخصوص خامروں کا استعمال کرتے ہوئے پابندی کے انزائم ہضم کے تجربات کو انجام دینے میں عملی مہارتیں حاصل کریں۔

❖ جیل الیکٹروفورسس کے نتائج کی تشریح:

- ڈی این اے کے ٹکڑوں کے سائز کا تعین کرنے کے لیے جیل الیکٹروفورسس ڈیٹا کا تجزیہ کرنے میں مہارت حاصل کریں۔
- بینڈنگ پیٹرن کی تشریح کرنے اور الیکٹروفوریٹک جیلوں سے مقداری معلومات حاصل کرنے کی صلاحیت پیدا کریں۔

❖ پابندی والی سائٹوں کی شناخت:

- فریگمنٹ سائز ڈیٹا کی بنیاد پر ڈی این اے کی ترتیب میں پابندی والی سائٹس کی موجودگی کو پہچاننا سیکھیں۔
- پابندی کی جگہ کی پوزیشنوں اور جیل الیکٹروفورسس میں مشاہدہ شدہ ٹکڑے کے سائز کے درمیان تعلق کو سمجھیں۔

❖ سرکلر پابندی کے نقشے کی تعمیر:

- تجرباتی ڈیٹا کی بنیاد پر سرکلر کنفیگریشن میں پابندی والی سائٹس کو ترتیب دینے میں مہارت پیدا کریں۔

• سرکلر ڈی این اے میپنگ کے بنیادی اصولوں اور جینیاتی تجزیہ میں سرکلر ٹوپولوجی کی اہمیت کو سمجھیں۔

❖ لکیری پابندی کے نقشے کی تعمیر:

• ڈی این اے مالیکیولز کی لکیری ٹوپولوجی کی عکاسی کرتے ہوئے، ایک لکیری ترتیب میں پابندی والی جگہوں کو منظم کرنا سیکھیں۔

• ملحقہ پابندی والی سائٹوں کے درمیان فاصلوں کا حساب لگانے اور لکیری نقشے میں درست طریقے سے ان کی نمائندگی کرنے کے لیے بصیرت حاصل کریں۔

❖ سرکلر اور لکیری نقشوں کا موازنہ:

ٹوپولوجی اور نمائندگی کے لحاظ سے سرکلر اور لکیری پابندی کے نقشوں کے درمیان فرق کو سمجھیں۔

• مالیکیولر بائیولوجی ریسرچ میں مختلف ایپلی کیشنز کے لیے ہر نقشہ کی قسم کے فوائد اور حدود کا تجزیہ کریں۔

❖ پابندی کی نقشہ سازی کی تکنیکوں کا اطلاق:

• مالیکیولر بائیولوجی میں پابندی کی نقشہ سازی کے عملی اطلاقات کو دریافت کریں، جیسے کہ جین میپنگ اور جینوم کا تجزیہ۔

• سمجھیں کہ پابندی کے نقشے کس طرح جینیاتی انجینئرنگ اور بائیو ٹیکنالوجی ریسرچ کے لیے قیمتی ٹولز کے طور پر کام کرتے ہیں۔

❖ تنقیدی سوچ اور مسئلہ حل کرنے کی مہارتیں تیار کرنا:

• شرکاء کی حوصلہ افزائی کریں کہ وہ تجرباتی ڈیٹا کا تنقیدی تجزیہ کریں اور پابندی کے نقشے بنانے میں باخبر فیصلے کریں۔

• نقشہ سازی کے عمل کے دوران درپیش چیلنجوں اور غیر یقینی صورتحال سے نمٹنے کے ذریعے مسائل حل کرنے کی مہارتوں کو فروغ دیں۔

❖ لیبارٹری تکنیکوں اور ڈیٹا کے تجزیہ کی مہارتوں کو بڑھانا:

• ہینڈ آن تجربہ اور ڈیٹا اکٹھا کرنے کے ذریعے لیبارٹری کی مہارت کو بہتر بنائیں

• تجرباتی نتائج کی مؤثر طریقے سے تشریح کرنے کے لیے اعداد و شمار کے طریقوں اور تصور کی تکنیکوں کا استعمال کرتے ہوئے ڈیٹا کے تجزیہ کی مہارت کو بہتر بنائیں۔

20.2 اصول(Principle)

عملی اکائی پابندی کی نقشہ سازی کے اصول کے گرد گھومتی ہے، مالیکیولر بائیولوجی میں ایک بنیادی تکنیک جو ڈی این اے مالیکیول کے ساتھ مخصوص DNA ترتیبوں کے مقامات کا تعین کرنے کے لیے استعمال ہوتی ہے، جسے پابندی کی جگہوں کے نام سے جانا جاتا ہے۔ یہ تکنیک ریسٹریکشن انزائمز کی انزیمیٹک سرگرمی پر انحصار کرتی ہے، جسے ریسٹریکشن اینڈونوکلیز بھی کہا جاتا ہے، جو مخصوص شناختی سلسلے میں ڈی این اے کو کلیو کرتے ہیں۔

1. پابندی انزائم ہاضمہ ***(Restriction Enzyme Digestion)***

- پہلے مرحلے میں ڈی این اے کے نمونے کو ایک یا زیادہ پابندی والے خامروں کے ساتھ ہضم کرنا شامل ہے۔

یہ انزائمز ڈی این اے مالیکیول کے اندر مخصوص نیوکلیوٹائڈ کی ترتیب کو پہچانتے ہیں، عام طور پر پیلینڈرومک۔

- اپنی شناخت کی جگہوں کے پابند ہونے پر، پابندی کے خامرے DNA کو الگ کر دیتے ہیں، مختلف سائز کے ٹکڑے پیدا کرتے ہیں۔

2. جیل الیکٹروفورسس (Gel Electrophoresis)

- عمل انہضام کے بعد، نتیجے میں ڈی این اے کے ٹکڑوں کو جیل الیکٹروفورسس کا استعمال کرتے ہوئے ان کے سائز کی بنیاد پر الگ کیا جاتا ہے۔
- ایگاروز جیل، ایک برقی میدان میں ڈوبا ہوا، ڈی این اے کے ٹکڑوں کو ان کے سائز کے مطابق اس کے ذریعے منتقل ہونے دیتا ہے، چھوٹے ٹکڑے بڑے سے زیادہ تیزی سے سفر کرتے ہیں۔

3. تصور اور تجزیہ (Visualization and Analysis)

- الیکٹروفورسس کے بعد، ڈی این اے کے ٹکڑوں کو داغ لگانے کی تکنیک یا فلوروسینٹ لیبلز کا استعمال کرتے ہوئے تصور کیا جاتا ہے۔
- نتیجے میں جیل کی تصویر مختلف سائز کے ڈی این اے کے ٹکڑوں کے مطابق الگ الگ بینڈ دکھاتی ہے۔

4. جیل الیکٹروفورسس ڈیٹا کی تشریح (Interpretation of Gel Electrophoresis Data)

- DNA کے ٹکڑوں کے سائز کا معلوم سائز مارکر کے ساتھ موازنہ کر کے، شرکاء پابندی کے انزائم ہضم سے پیدا ہونے والے ٹکڑوں کے سائز کا اندازہ لگا سکتے ہیں۔
- جیل پر بینڈنگ پیٹرن کا تجزیہ بار بار آنے والے ٹکڑے کے سائز کی شناخت کرنے کی اجازت دیتا ہے، جو ڈی این اے کی ترتیب کے اندر مخصوص پابندی والی جگہوں کی موجودگی کی نشاندہی کرتا ہے۔

5. سرکلر اور لکیری پابندی کے نقشوں کی تعمیر (Construction of Circular and Linear Restriction Maps)

- جیل الیکٹروفورسس سے حاصل کردہ ٹکڑے کے سائز کے ڈیٹا کی بنیاد پر، شرکاء پابندی کے نقشے بناتے ہیں جو ڈی این اے مالیکیول کے ساتھ پابندی والی جگہوں کی پوزیشن کو ظاہر کرتے ہیں۔
- سرکلر نقشوں کے لیے، شرکاء ڈی این اے مالیکیول کی کنیکٹوٹی کو مد نظر رکھتے ہوئے، پابندی کی جگہوں کو سرکلر کنفیگریشن میں ترتیب دیتے ہیں۔
- لکیری نقشے ڈی این اے مالیکیول کے ساتھ پابندی والی جگہوں کے لکیری ترتیب کی نمائندگی کرتے ہیں، سائٹس کے درمیان فاصلوں کا حساب ٹکڑے کے سائز کی بنیاد پر کیا جاتا ہے۔

6. تصدیق اور توثیق (Verification and Validation)

- تعمیر شدہ پابندی کے نقشوں کا موازنہ نظریاتی توقعات سے کیا جاتا ہے اور اضافی تجرباتی ڈیٹا یا کمپیوٹیشنل ٹولز کا استعمال کرتے ہوئے ان کی توثیق کی جاسکتی ہے۔
- تصدیق تعمیر شدہ نقشوں کی درستگی کو یقینی بناتی ہے اور پابندی کی نقشہ سازی کی تکنیک کے تحت اصولوں کی تفہیم کو تقویت دیتی ہے۔

ان اصولوں کی بنیاد پر عملی مشقوں میں شامل ہو کر، شرکاء پابندی کی نقشہ سازی کا تجربہ تیار کرتے ہیں، تجرباتی ڈیزائن، ڈیٹا کے تجزیہ اور تشریح میں لیبارٹری کی ضروری مہارتوں کا احترام کرتے ہوئے ڈی این اے کی ساخت اور تنظیم کے بارے میں ان کی سمجھ میں اضافہ کرتے ہیں۔

20.3 درکار مواد (Materials Required)

عملی یونٹ کے لیے درکار مواد: سرکلر اور لکیری پابندی کے نقشے کی تعمیر

1. ڈی این اے کے نمونے (DNA Samples)
   - پلاسمڈ ڈی این اے یا جینومک ڈی این اے جس میں معلوم ہدف کی ترتیب ہوتی ہے۔
2. پابندی کے انزائمز (Restriction Enzymes)
   - ہدف کی ترتیب کی بنیاد پر مناسب پابندی کے خامروں کا انتخاب
3. بفرز اور انزائم ڈیلیوینٹس (Buffers and Enzyme Diluents)
   - انزیمیٹک رد عمل اور پابندی کے خامروں کی کمی کے لیے بفر حل
4. Agarose جیل الیکٹروفورسس سیٹ اپ (Agarose Gel Electrophoresis Setup)
   - جیل کی تیاری کے لیے آگروز پاؤڈر
   - جیل الیکٹروفورسس کے لیے TAE (Tris-acetate-EDTA) یا TBE (Tris-borate-EDTA) بفر۔
   - جیل الیکٹروفورسس اپریٹس بشمول جیل ٹرے، کنگھی، بجلی کی فراہمی، اور جیل ٹینک۔
5. DNA لوڈنگ ڈائی (DNA Loading Dye)
   - جیل الیکٹروفورسس کے دوران ویژولائزیشن کے لیے ڈی این اے کے نمونوں کے ساتھ ملانے کے لیے ڈائی لوڈ کرنا۔
6. ڈی این اے سائزمارکر (DNA Size Marker)
   - تجارتی ڈی این اے سائزمارکر یا سیڑھی ٹکڑے کے سائز کا اندازہ لگانے کے لیے

7. جیل دستاویزی نظام(Gel Documentation System)

• جیل الیکٹروفورسس کے نتائج کی تصاویر لینے کے لیے کیمرہ یا جیل دستاویزات کا نظام۔

8. مائیکروسینٹرفیوج ٹیوبیں(Microcentrifuge Tubes)

• پابندی ینجائم عمل انہضام کے دوران نمونے کی تیاری اور ذخیرہ کرنے کے لیے ٹیوبیں۔

9. تھرمل سائیکلر (اختیاری)[Thermal Cycler (Optional)]

• اگر پابندی کے انزائم کے عمل انہضام سے پہلے مخصوص ڈی این اے کے ٹکڑوں کو بڑھانے کے لیےPCRانجام دے رہے ہیں۔

10. انکیوبیٹریاپانی کا غسل(Incubator or Water Bath)

• عمل انہضام کے دوران انزیمیٹک رد عمل کے لیے درکار درجہ حرارت کو برقرار رکھنے کا سامان

11. مائیکروپیپیٹس اور تجاویز(Micropipettes and Tips)

• ریجنٹس اور نمونوں کی درست پیمائش اور منتقلی کے لیے

12. لیبارٹری سیفٹی کا سامان(Laboratory Safety Equipment)

• کیمیکلز اور حیاتیاتی مواد کی محفوظ ہینڈلنگ کو یقینی بنانے کے لیے لیب کوٹ، دستانے، اور حفاظتی شیشے۔

13. تحریری مواد اور لیب نوٹ بک(Writing Materials and Lab Notebooks)

• تجرباتی طریقہ کار، مشاہدات، اور ڈیٹا کو ریکارڈ کرنے کے لیے قلم، مارکر، اور لیب کی نوٹ بک۔

14. تجزیہ سافٹ ویئر کے ساتھ کمپیوٹر(Computer with Analysis Software)

• جیل الیکٹروفورسس امیجز کا تجزیہ کرنے اور تجرباتی ڈیٹا پر کارروائی کرنے کے لیے سافٹ ویئر

15. حوالہ مواد(Reference Materials)

• تجرباتی طریقہ کار اور ڈیٹا کے تجزیہ میں رہنمائی کے لیے نصابی کتابیں، پروٹوکول، اور حوالہ جاتی مواد۔

16. اختیاری: ڈی این اے کی ترتیب کی سہولیات(Optional: DNA Sequencing Facilities)

• اگر ضروری ہو تو ڈی این اے کے ٹکڑوں کی شناخت اور ترتیب کی تصدیق کے لیے ڈی این اے کی ترتیب کی سہولیات تک رسائی۔

20.4 طریقہ کار(Procedure)

عملی اکائی کے لیے طریقہ کار: سرکلر اور لکیری پابندی کے نقشوں کی تعمیر

1. ڈی این اے کے نمونوں کی تیاری(***Preparation of DNA Samples***)

•تفصیلات: پلاسمڈ ڈی این اے کا نمونہ حاصل کریں جس میں دلچسپی کا جین ہو۔ پلاسمڈ ڈی این اے کو اس کی سرکلر ساخت کی وجہ سے اکثر پابندی کی نقشہ سازی کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، جو اسے سرکلر پابندی کے نقشے بنانے کے لیے موزوں بناتا ہے۔

•مثال: کلوننگ کے تجربات کے لیے گرین فلوروسینٹ پروٹین (GFP) کے لیے جین پر مشتمل پلازمیڈ حاصل کریں۔

•ڈیٹا: پلاسمڈ DNA کی ابتدائی ارتکاز کو سپیکٹروفوٹومیٹر کا استعمال کرتے ہوئے ng/µL100 ناپا جاتا ہے۔

2. پابندی کے خامروں کا انتخاب(***Selection of Restriction Enzymes***)

•تفصیلات: ٹارگٹ ڈی این اے کے اندر معلوم پہچان کے سلسلے کی بنیاد پر مناسب پابندی والے انزائمز کا انتخاب کریں۔ پابندی کے انزائمز ڈی این اے کو مخصوص ترتیبوں میں توڑتے ہیں، ایسے ٹکڑے پیدا کرتے ہیں جنہیں الگ اور تجزیہ کیا جا سکتا ہے۔

•مثال: EcoRI اور BamHI پابندی والے خامروں کو منتخب کریں جو DNA کو مخصوص ترتیب پر کاٹنے کے لیے جانا جاتا ہے۔

•ڈیٹا: EcoRI ترتیب GAATTC کو تسلیم کرتا ہے، جبکہ BamHI GGATCC کو تسلیم کرتا ہے۔

3. پابندی انزائم ہاضمہ(***Restriction Enzyme Digestion***)

•تفصیلات: پلاسمڈ ڈی این اے کو منتخب انزائمز اور مناسب بفرز کے ساتھ ملا کر پابندی والے انزائم ہضم کے رد عمل کو ترتیب دیں۔ ڈی این اے کے انزیمیٹک کلیوتیج کی اجازت دینے کے لیے مخصوص حالات میں رد عمل کو انکیوبیٹ کریں۔

•مثال: ٹکڑوں کے مختلف سیٹ بنانے کے لیے EcoRI اور BamHI انزائمز کے ساتھ پلازمڈ DNA کو الگ الگ ہضم کریں۔

•ڈیٹا: ہاضمے کے رد عمل کو 1 گھنٹہ کے لیے 37°C پر انکیوبیٹ کریں۔

4. جیل الیکٹروفورسس سیٹ اپ(***Gel Electrophoresis Setup***)

•تفصیلات: بفر محلول میں ایگرز جیل تیار کریں اور جیل الیکٹروفورسس اپریٹس سیٹ اپ کریں۔ ہضم شدہ ڈی این اے نمونے جیل پر ڈی این اے سائزمارکر کے ساتھ حوالہ کے لیے لوڈ کریں۔

•مثال: TAE بفر میں 1% ایگروز جیل تیار کریں اور جیل الیکٹروفورسس ٹینک کو اسمبل کریں۔

•ڈیٹا: ہر ہضم شدہ DNA نمونے کا 5µL اور DNA سائزمارکر کا 1µL جیل کے کنویں پر لوڈ کریں۔

5. جیل الیکٹروفورسس(***Gel Electrophoresis***)

• تفصیلات: سائز کی بنیاد پر ڈی این اے کے ٹکڑوں کو الگ کرنے کے لیے جیل کو مستقل وولٹیج پر چلائیں۔ جیل دستاویزی نظام کا استعمال کرتے ہوئے الگ کیے گئے ٹکڑوں کا تصور کریں۔

• مثال: ڈی این اے کے ٹکڑوں کی بہترین علیحدگی کو یقینی بنانے کے لیے جیل کو 100 وولٹ پر 60 منٹ تک چلائیں۔

• ڈیٹا: جیل کو ایتھیڈیم برومائیڈ سے داغنے کے بعد UV روشنی کے نیچے DNA کے ٹکڑوں کا تصور کریں۔

6. جیل الیکٹروفورسس ڈیٹا کا تجزیہ ***(Analysis of Gel Electrophoresis Data)***

• تفصیلات: پابندی کے انزائم ہضم سے پیدا ہونے والے DNA کے ٹکڑوں کے سائز کا تعین کرنے کے لیے جیل کی تصاویر کا تجزیہ کریں۔ DNA سائز مارکر کے نسبت ہر ٹکڑے کے ذریعے منتقل ہونے والے فاصلوں کی پیمائش کریں۔

• مثال: جیل امیجز سے ڈی این اے کے ٹکڑوں کے سائز کی پیمائش کرنے کے لیے تصویری تجزیہ سافٹ ویئر استعمال کریں۔

• ڈیٹا: 100 بیس پیئرز (bp) سے لے کر 3000bp تک کے مشاہدہ شدہ ٹکڑے کے سائز کو ریکارڈ کریں۔

7. سرکلر پابندی کے نقشے کی تعمیر ***(Construction of Circular Restriction Map)***

• تفصیلات: حاصل کردہ ٹکڑے کے سائز کی بنیاد پر، سرکلر DNA مالیکیول کے ساتھ پابندی والی جگہوں کی پوزیشن کا اندازہ لگائیں۔ ڈی این اے مالیکیول کے کنیکٹیویٹی کو مد نظر رکھتے ہوئے، پابندی والی جگہوں کو سرکلر کنفیگریشن میں ترتیب دیں۔

• مثال: سرکلر پلاسمڈ کے ساتھ EcoRI اور BamHI کی پابندی والی جگہوں کی پوزیشن کا اندازہ لگانے کے لیے مشاہدہ شدہ ٹکڑے کے سائز کا استعمال کریں۔

• ڈیٹا: مثال کے طور پر، EcoRI ہضم 2500bp اور 500bp کے ٹکڑے پیدا کر سکتا ہے، جبکہ BamHI ہضم 1500 bp اور 1500bp کے ٹکڑے پیدا کر سکتا ہے۔

8. لکیری پابندی کے نقشے کی تعمیر ***(Construction of Linear Restriction Map)***

• تفصیلات: ٹکڑوں کے سائز اور ان کے رشتہ دار فاصلوں کی بنیاد پر پابندی والی جگہوں کو ایک لکیری ترتیب میں ترتیب دیں۔ ڈی این اے مالیکیول کے ساتھ پابندی والی جگہوں کے لکیری ترتیب کی نمائندگی کریں۔

مثال کے طور پر: EcoRI اور BamHI پابندی والی جگہوں کو پلاسمڈ DNA کے ساتھ ان کی پوزیشنوں کی بنیاد پر ایک لکیری ترتیب میں ترتیب دیں۔

• ڈیٹا: مثال کے طور پر، اگر EcoRI سائٹ پوزیشن 500bp پر ہے اور BamHI سائٹ پوزیشن 2000bp پر ہے، لکیری نقشہ اس ترتیب کو ظاہر کرے گا۔

9. تصدیق اور توثیق ***(Verification and Validation)***

• تفصیلات: تعمیر شدہ پابندی کے نقشوں کا نظریاتی توقعات اور معلوم ترتیب کی معلومات کے ساتھ موازنہ کریں۔ معلوم پابندی والی سائٹس کی پوزیشنوں کی تصدیق کر کے نقشوں کی درستگی کی تصدیق کریں۔

• مثال: EcoRI اور BamHI سائٹس کی پیشن گوئی کی گئی پوزیشنوں کا جیل پر مشاہدہ کی گئی اصل پوزیشنوں سے موازنہ کریں۔

• ڈیٹا: تصدیق کریں کہ مشاہدہ شدہ ٹکڑوں کے سائز اور پابندی والی جگہ کی پوزیشنیں نظریاتی پیشین گوئیوں سے ملتی ہیں، تعمیر شدہ نقشوں کی درستگی کو یقینی بناتے ہوئے

10. دستاویزی اور پریزنٹیشن (***Documentation and Presentation***)

• تفصیلات: تجرباتی طریقہ کار، مشاہدات، اور نتائج کو لیبارٹری کی نوٹ بک میں دستاویز کریں۔ تجرباتی نتائج کا خلاصہ پیش کرتے ہوئے ایک پریزنٹیشن تیار کریں، بشمول جیل کی تصاویر اور پابندی کے نقشے۔

• مثال: تجرباتی سیٹ اپ، جیل الیکٹروفورسس کے نتائج، اور لیبارٹری نوٹ بک میں پابندی کے نقشوں کی تعمیر کی تفصیلات ریکارڈ کریں۔

• ڈیٹا: ایک پاور پوائنٹ پریزنٹیشن بنائیں جس میں کلیدی نتائج کو نمایاں کیا جائے، بشمول جیل کی تصاویر جو ڈی این اے کے ٹکڑے اور تعمیر شدہ پابندی کے نقشے دکھاتی ہوں۔

11. بحث اور تشریح (***Discussion and Interpretation***)

• تفصیلات: سالماتی حیاتیات کی تحقیق میں پابندی کے نقشوں کی اہمیت پر تبادلہ خیال کریں۔ جین کلوننگ، جینیاتی انجینئرنگ کے لیے نقشہ سازی کے نتائج کے مضمرات کی تشریح کریں

ذیل میں ایک مثال دی گئی ہے کہ آپ نقشہ سازی کے نتائج کو ٹیبلر شکل میں کیسے پیش کر سکتے ہیں

Restriction Enzyme	Observed Fragment Sizes (bp)	Predicted Restriction Sites (bp)	Position on Circular Map (degrees)	Position on Linear Map (bp)
EcoRI	2500, 500	500	120	500
BamHI	1500, 1500	2000	240	2000

یہ جدول *EcoRI* اور *BamHI* کے عمل انہضام کے نتیجے میں مشاہدہ شدہ ٹکڑوں کے سائز فراہم کرتا ہے، ساتھ ہی معلوم شناختی ترتیبوں کی بنیاد پر پابندی والی جگہوں کی پیش گوئی کی گئی پوزیشن بھی۔ اس کے علاوہ، اس میں آسان حوالہ اور موازنہ کے لیے سرکلر اور لکیری دونوں نقشوں پر پابندی والی سائٹس کی پوزیشنیں شامل ہیں۔ آپ اپنے مخصوص تجرباتی ڈیٹا اور ضروریات کی بنیاد پر ٹیبل فارمیٹ اور مواد کو ایڈجسٹ کر سکتے ہیں۔

20.5 احتیاطی تدابیر (Precautions)

سرکلر اور لکیری پابندی کے نقشے بنانے کا طریقہ کار چلاتے وقت، درست اور قابل اعتماد نتائج کو یقینی بنانے کے لیے کئی احتیاطی تدابیر اختیار کرنا ضروری ہے۔ غور کرنے کے لیے یہاں کچھ اہم احتیاطی تدابیر ہیں:

1. جراثیم سے پاک تکنیکیں: آلودگی کے خطرے کو کم کرنے کے لیے پورے طریقہ کار کے دوران جراثیم سے پاک تکنیکوں کا

استعمال کریں۔ صاف اور جراثیم کش لیبارٹری کے ماحول میں کام کریں، اور جراثیم سے پاک آلات کا استعمال کریں، بشمول پائپیٹ، مائیکرو سینٹرفیوج ٹیوب، اور جیل الیکٹروفورسس اپریٹس۔

2. ڈی این اے کی مناسب ہینڈلنگ: انحطاط یا آلودگی کو روکنے کے لیے ڈی این اے کے نمونوں کو احتیاط سے ہینڈل کریں۔ ڈی این اے کی سالمیت کو برقرار رکھنے کے لیے نیوکلیز سے پاک پانی، بفرز اور ری ایجنٹس کا استعمال کریں۔ UV روشنی کی نمائش کو کم سے کم کریں، جو ڈی این اے کو نقصان پہنچا سکتا ہے۔

3. ہاضمے کے حالات کی اصلاح: اس بات کو یقینی بنائیں کہ عمل انہضام کے رد عمل کو استعمال ہونے والے ہر پابندی والے انزائم کے لیے بہتر بنایا گیا ہو۔ انزائم کے ارتکاز، بفر کی ساخت، اور انکیوبیشن کے حالات کے لیے مینوفیکچرر کی سفارشات پر عمل کریں۔ انزائم کی سرگرمی اور مخصوصیت کی تصدیق کے لیے کنٹرول ری ایکشن انجام دیں۔

4. جیل الیکٹروفورسس سیفٹی: زہریلے مادوں کی نمائش سے بچنے کے لیے ایگرز جیل اور الیکٹروفورسس بفر کو احتیاط کے ساتھ ہینڈل کریں۔ کیمیکلز کو سنبھالتے وقت مناسب ذاتی حفاظتی سامان، جیسے دستانے اور چشمے پہنیں۔ لیبارٹری کے حفاظتی رہنما خطوط کے مطابق جیلوں اور بفروں کو مناسب طریقے سے ضائع کریں۔

5. ڈیٹا کی درستگی اور درستگی: جیل الیکٹروفورسس تجزیہ کے دوران ڈی این اے کے ٹکڑے کے سائز کی درست پیمائش کریں۔ بینڈ کے سائز کو درست طریقے سے ماپنے کے لیے کیلیبریٹڈ امیجنگ سسٹم یا سافٹ ویئر استعمال کریں۔ تولیدی صلاحیت اور نتائج کی مستقل مزاجی کو یقینی بنانے کے لیے تجربات اور تجزیوں کو دہرائیں۔

6. دستاویزی اور ریکارڈ کیپنگ: تجرباتی طریقہ کار، مشاہدات، اور نتائج کے تفصیلی ریکارڈ کو لیبارٹری نوٹ بک میں رکھیں۔ معیاری پروٹوکول سے کسی بھی انحراف کو دستاویز کریں اور تجربے کے دوران پیش آنے والے کسی بھی غیر متوقع نتائج یا مسائل کو نوٹ کریں۔

7. تشریح اور توثیق: تعمیر شدہ پابندی کے نقشوں کا نظریاتی توقعات اور معلوم ترتیب کی معلومات کے ساتھ موازنہ کر کے ان کی درستگی کی تصدیق کریں۔ اگر ممکن ہو تو آزاد طریقوں، جیسے ترتیب سازی یا متبادل نقشہ سازی کی تکنیکوں کے ذریعے نتائج کی توثیق کریں۔

8. ماحولیاتی تحفظات: لیبارٹری کے فضلے کو ٹھکانے لگائیں، بشمول استعمال شدہ پیپیٹ ٹپس، مائیکرو سینٹرفیوج ٹیوبز، اور ایگرز جیل، جو کہ حیاتیاتی خطرناک مواد کے لیے ادارہ جاتی ہدایات کے مطابق ہیں۔ خطرناک فضلہ کی پیداوار کو کم سے کم کریں اور جب بھی ممکن ہو مواد کو ری سائیکل یا دوبارہ استعمال کریں۔

ان احتیاطی تدابیر پر عمل کرنے سے، محققین غلطیوں کے خطرے کو کم کر سکتے ہیں، تجرباتی نتائج کی وشوسنیتا کو یقینی بنا سکتے ہیں، اور لیبارٹری میں کام کرنے کے لیے محفوظ ماحول کو برقرار رکھ سکتے ہیں۔ مزید برآں، مالیکیولر بائیولوجی تکنیک کے لیے معیاری آپریٹنگ طریقہ کار

اور رہنما اصولوں پر عمل کرنا پابندی کی نقشہ سازی کے تجربات میں کامیاب نتائج حاصل کرنے کے لیے ضروری ہے۔

20.6 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

1. Sambrook, J., Russell, D. W., & Green, M. R. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Davis, L. (2001). Basic methods in molecular biology. Elsevier Science.
3. Primrose, S. B., & Twyman, R. (2006). Principles of gene manipulation and genomics. Blackwell Publishing.
4. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (Eds.). (1995). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons.
5. Glover, D. M. (Ed.). (1995). DNA cloning: A practical approach. Oxford University Press.
6. Smith, K. M. (Ed.). (2003). Laboratory methods in enzymology: DNA. Academic Press.

پریکٹیکل ریکارڈ شیٹ(Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

اکائی 21: پلازمڈ ڈی این اے کے ساتھ *E. Coli* سیلز کی تَقلّب اور فراہم کردہ ڈیٹا سے تَقلّبی کارکردگی کا حساب

[Transformation of *E.coli* Cells With Plasmid DNA and Calculation of transformation efficiency from the data provided]

اکائی کے اجزا:

19.0 تعارف(Introduction)

19.1 مقاصد(Objectives)

19.2 اصول(Principle)

19.3 درکار مواد(Materials Required)

19.4 طریقہ کار(Procedure)

19.5 ایگرز جیل الیکٹروفورسس(Agarose Gel Electrophoresis)

19.6 نتیجہ اور مشاہدات(Result and Observations)

19.7 احتیاطی تدابیر

19.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

21.0 تعارف(Introduction)

Escherichia coli (E. coli) خلیوں کی پلازمڈ DNA کے ساتھ تبدیلی مالیکیولر بائیولوجی میں ایک بنیادی تکنیک ہے جو متعدد جینیاتی انجینئرنگ ایپلی کیشنز میں استعمال ہوتی ہے۔ یہ عملی باب پلاسمڈ ڈی این اے کے ساتھ ای کولی سیلز کو تبدیل کرنے کے تجرباتی عمل اور ان تجربات سے حاصل کردہ ڈیٹا کا استعمال کرتے ہوئے تبدیلی کی کارکردگی کے بعد کے حساب کتاب دونوں کے لیے ایک جامع رہنما کے طور پر کام کرتا ہے۔

E. coli، حیاتیاتی تحقیق میں عام طور پر استعمال ہونے والا ماڈل آرگنزم، جینیاتی ہیرا پھیری کے لیے انتہائی قابل عمل ہے۔ غیر ملکی ڈی این اے کو، عام طور پر پلازمیڈ کی شکل میں، ای کولی سیلز میں متعارف کروا کر، محققین قابل ذکر درستگی کے ساتھ جین کے اظہار، پروٹین کی پیداوار، اور مختلف سیلولر عمل کا مطالعہ کر سکتے ہیں۔ مزید برآں، یہ تکنیک ریکومبینینٹ پروٹین کی پیداوار، جین کلوننگ، اور جینیاتی طور پر

تبدیل شدہ جانداروں کی تخلیق جیسی ایپلی کیشنز کی بنیاد بناتی ہے۔

اس عملی باب کا پہلا حصہ پلاسمڈ ڈی این اے کے ساتھ ای کولی سیلز کی تبدیلی کے لیے تفصیلی پروٹوکول اور رہنما اصول فراہم کرے گا۔ اس میں قابل خلیات کی تیاری، گرمی کے جھٹکے یا الیکٹروپوریشن طریقوں کے ذریعے بیکٹیریل خلیوں میں غیر ملکی ڈی این اے کو شامل کرنا، اور منتخب میڈیا پر تبدیل شدہ کالونیوں کی بعد میں بحالی اور ترقی شامل ہے۔

تجرباتی طریقہ کار کے بعد، باب پھر تبدیلی کی کارکردگی کا حساب لگانے کے اہم پہلو پر توجہ مرکوز کرے گا۔ تبدیلی کی کارکردگی غیر ملکی ڈی این اے کو بیکٹیریل خلیوں میں متعارف کرانے کی کامیابی کی شرح کو درست کرتی ہے اور تبدیلی کے پروٹوکول کی تاثیر کا جائزہ لینے کے لیے ایک اہم پیرامیٹر ہے۔ تبدیلی کی کارکردگی کا درست تعین کر کے، محققین تجرباتی حالات کو بہتر بنا سکتے ہیں، مسائل کو حل کر سکتے ہیں، اور تبدیلی کے مختلف طریقوں کی کارکردگی کا موازنہ کر سکتے ہیں۔

اس باب میں تجزیہ کے لیے فراہم کردہ ڈیٹا *E. coli* کے تبدیلی کے تجربات سے حاصل کردہ عام نتائج کی نمائندگی کرتا ہے۔ ہینڈ آن مشقوں کے ذریعے، قارئین یہ سیکھیں گے کہ تجرباتی ڈیٹا کی تشریح کیسے کی جائے، مناسب فارمولوں کا استعمال کرتے ہوئے تبدیلی کی کارکردگی کا حساب لگایا جائے، اور حساب کی گئی قدروں کی اہمیت کا تجزیہ کیا جائے۔

بالآخر، پلاسمڈ ڈی این اے کے ساتھ ای کولی سیلز کی تبدیلی میں مہارت حاصل کرنا اور تبدیلی کی کارکردگی کا حساب کتاب جینیاتی انجینئرنگ اور مالیکیولر بائیولوجی کے مطالعے میں مصروف محققین اور بائیو ٹیکنالوجی ماہرین کے لیے ضروری ہے۔ اس عملی باب کا مقصد قارئین کو کامیاب تبدیلیاں کرنے کے لیے ضروری مہارتوں اور علم سے آراستہ کرنا ہے اور ان کے تجرباتی پروٹوکولز کی کارکردگی کا درست اندازہ لگانا ہے، اس طرح ریکومبینٹ *DNA* ٹیکنالوجی کے شعبے کو آگے بڑھانا ہے۔

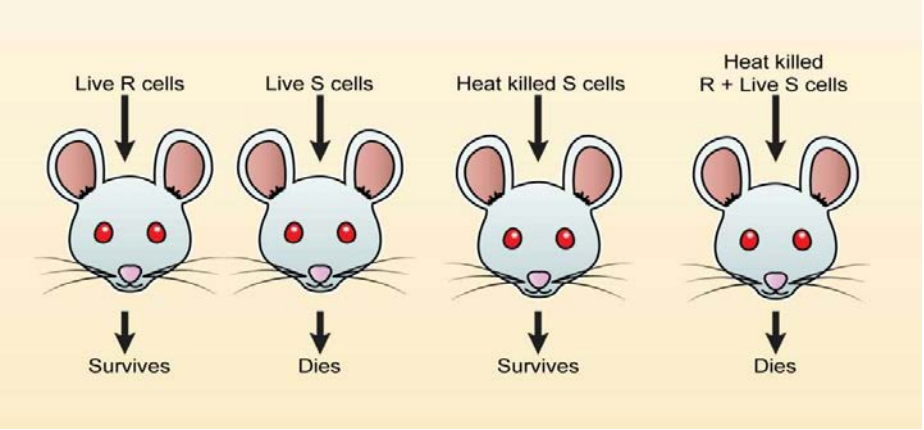
21.1 مقاصد (Objectives)

عملی یونٹ کی تکمیل کے بعد طالب علم اس قابل ہو جائیں گے

- تَقَلّب کے پیچھے اصول بیان کریں؛۔
- تَقَلّب کے لیے دستیاب مختلف طریقوں کی فہرست بنائیں؛۔
- تَقَلّب کے لیے درکار ری ایجنٹس کی فہرست بنائیں؛ اور
- تَقَلّب ی کی کارکردگی کا حساب کتاب
- ای کولی کی ثقافت کیسے کی جائے۔

21.2 تَقلّب(Transformation)

تبدیلی ایک میزبان سیل سے وصول کنندہ سیل میں DNA کی منتقلی اور انضمام کا عمل ہے۔ فریڈرک گریفتھ نے 1920 کی دہائی میں Streptococcus نمونیا پر تجربات کیے اور مشاہدہ کیا کہ جب ایک ہموار (S) انکیپسیلیٹڈ پیتھوجینک تناؤ کو گرمی سے ہلاک کیا جاتا تھا تو اسے غیر انکیپسیلیٹڈ، کھردرے (R) تناؤ کی زندہ ثقافت میں شامل کیا جاتا تھا، اس کی وجہ سے R. سٹرین کو وائرلینٹ ایس سٹرین میں تبدیل کیا جائے گا (شکل 21.1)۔



شکل 21.1: گریفتھ کی طرف سے تَقلّب کا تجربہ

تبدیلی کے دوران، میزبان سیل چھوٹے ڈی این اے کے ٹکڑوں کو چھوڑنے کے لیے لیز کرتا ہے جو کہ سیل کی دیوار اور سیل کی جھلی جیسے وصول کنندہ سیل کے اجزاء سے گزرتے ہیں۔ وصول کنندہ سیل کے جینوم میں اس طرح ترمیم نہیں کی جاتی ہے کہ جاندار عطیہ کرنے والے خلیے کی مخصوص خصوصیات کو حاصل کرتا ہے۔

جینیاتی مواد کے تبادلے کے لیے روگجنک مائکروجنزموں میں قدرتی تبدیلی ایک عام طور پر دیکھا جانے والا رجحان ہے۔ پیتھوجینک جانداروں کا ایک بہت بڑا فیصد اس تبدیلی کو ظاہر کرتا ہے کہ غیر پیتھوجینک جیسے ہیمو فیلس انفلوئنزا (*Haemophilus influenza*) اور اسٹریپٹو کوکس نمونیا (*Streptococcus pneumoniae*)۔

تمام بیکٹیریا قدرتی طور پر قابل نہیں ہیں اور اس طرح انہیں تبدیلی کے قابل بنانے کے لیے ذرائع وضع کیے گئے۔ یہ کئی عملوں سے حاصل کیا جاسکتا ہے جیسے۔

تبدیلی کا طریقہ	تفصیل
کیلشیم کلورائد Treatment	ٹھنڈے کیلشیم کلورائد محلول کے ساتھ اختلاط سیل کی جھلی کی پار گمیتا کو تبدیل کرتا ہے اور اس طرح خلیات کے ذریعے ڈی این اے کو اٹھانے کی اجازت دیتا ہے۔
الیکٹرو پوریشن (Electroporation)	خلیات کو محلول میں رکھے جاتے ہے اور مختصر وقت کے لیے ہائی وولٹیج برقی دالوں کا نشانہ بنایا جاتا ہے۔ یہ جھلی کی پار گمیتا کو بڑھاتا ہے اور ڈی این اے کو اٹھانے کی اجازت دیتا ہے۔
ٹارنسڈکشن (Transduction)	وہ تکنیک جو بیکٹیریا کے درمیان بیکٹیریوفیج ثالثی جین کی منتقلی کی اجازت دیتی ہے۔
کنجگیشن (Conjugation)	خلیات کے درمیان ڈی این اے کی منتقلی کنجگیشن پل یا جنسی پائلس (Sex Pilus) کی تشکیل کے ذریعے ہوتی ہے۔

21.3 اصول (Principle)

پلاسمڈ کو سیل میں لینے کے لیے قابل خلیات کی تیاری ضروری ہے۔ یہ برف ٹھنڈے کیلشیم کلورائد محلول کے ساتھ خلیوں کے علاج سے حاصل کیا جاسکتا ہے۔ دوطرفہ کیلشیم آئنز جھلی میں چھوٹے سوراخ بنا کر خلیے کی جھلی کی پار گمیتا میں اضافے کا سبب بنتے ہیں۔ ٹارگٹ ڈی این اے (یہاں پلاسمڈ ڈی این اے) سیل کی سطح پر تیز ہوتا ہے اور 42 ڈگری سینٹی گریڈ پر خلیات کی طرف سے اٹھنے میں ثالثی کے لیے پلسڈ ہیٹ شاک دیا جاتا ہے۔ برف پر تیز ٹھنڈک قدموں سے سوراخ بند ہو جاتے ہیں (شکل 21.2)

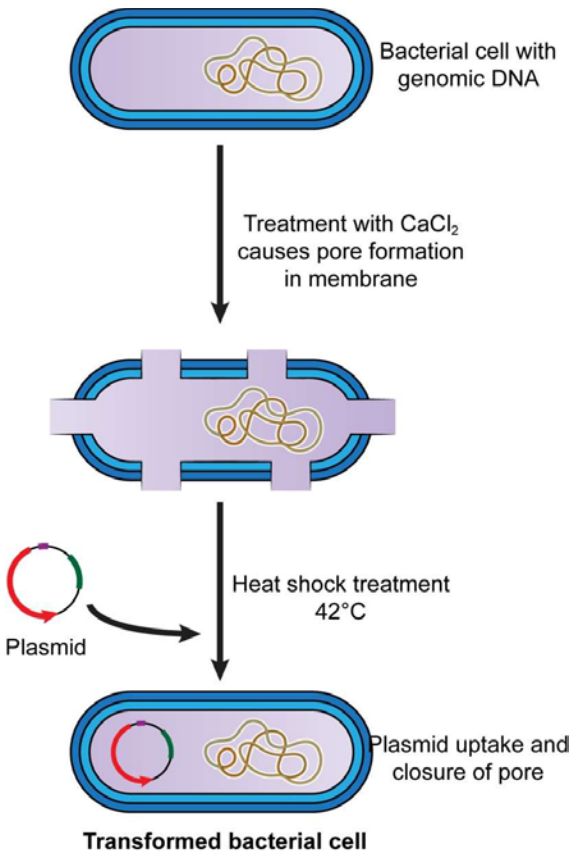
خلیوں کو تبدیل شدہ خلیوں کے انتخاب کے لیے موزوں سلیکٹیو میڈیا پر پھیلایا جاتا ہے۔ اس انتخاب کے نتیجے کے طور پر، صرف پلاسمڈ رکھنے والے ٹرانسفارمینٹ پروپیگنڈے کے قابل ہوتے ہیں۔

پلازمیڈ میں کئی جین ہوتے ہیں اور اس میں وہ جین بھی شامل ہوتے ہیں جو اینٹی بائیوٹکس کے خلاف مزاحمت فراہم کرنے کے ذمہ دار ہوتے ہیں۔ ان جینز کو ٹرانسفارمینٹس کو منتخب کرنے کے لیے منتخب مارکر کے طور پر استعمال کیا جاتا ہے۔

ای کولی میں موجود پلاسمڈ pUC19 ایک جین پر مشتمل ہے جو تبدیلی کے تجربے میں قابل انتخاب مارکر کے طور پر استعمال ہوتا ہے۔

pUC19 پلازمڈ میں Ampicillin اینٹی بائیوٹک کے خلاف مزاحمت کے لیے ایک جین ہوتا ہے جو Ampicillin کے ساتھ Luria Bertani پلیٹوں پر صرف ٹرانسفارمینٹس کو پھیلانے کے قابل بناتا ہے۔ ٹرانسفارمینٹس میں امپیسلن ریزسٹنس جین کی وجہ سے امپیسیلن پلیٹوں پر بڑھنے کی صلاحیت ہوتی ہے اور ان کا انتخاب کیا جا سکتا ہے۔

pUC19 اینزائم β- galactosidase کے لئے N ٹرمینل کوڈنگ ترتیب بھی رکھتا ہے جو ہیلاک اوپیرون میں موجود ہے۔ LacZ جین β- galactosidase کے لیے کوڈ کرتا ہے اور تجربے میں استعمال ہونے والے E. Coli ہوسٹ سٹرین میں اس کے امینو ٹرمینل کے آخر میں حذف ہوتا ہے۔ تبدیل شدہ میزبان خلیوں میں، میزبان سیل اور پلاسمڈ سے کٹی ہوئی مصنوعات کے درمیان تکمیل کو دیکھا جاتا ہے اور اس وجہ سے فعال β-galactosidase انزائم تیار ہوتا ہے۔ اس عمل کو α-Complementation کے نام سے جانا جاتا ہے۔ فعال β-galactosidase کی پیداوار کی وجہ سے، ٹرانسفارمینٹس X-gal اور IPTG پر مشتمل پلیٹوں پر نیلی کالونیاں بناتے ہیں۔ X-gal انزائم کے لیے سبسٹریٹ ہے اور β-galactosidase IPTG کی پیداوار کے لیے Lac operon کے ایک محرک کے طور پر کام کرتا ہے۔



شکل 21.2: CaCl2 کے ذریعے کیمیائی تبدیلی

21.4 درکار مواد(Materials Required)

1. 0.1M Calcium chloride solution -40ml (4ml 1M CaCl2 + 36ml distilled water-DW)
2. Luria Bertani Broth (1.38g Luria Bertani media+ 55ml DW)
3. LB agar plates (0.5g LB media+ 0.4g agar+ 20ml DW)
4. 50mg/ml ampicillin
5. LB agar plates with X-gal, IPTG and ampicillin. (2.5g LB media+ 1.5g agar+ 100ml distilled water+200 µl X-Gal +200 µl IPTG+100 µl)
6. Plasmid DNA (50 ng/µl)
7. مخروطی فلاسک(Conical Flask)
8. بیکر(Beaker)
9. سلنڈر کی پیمائش(Measuring Cylinder)
10. جراثیم سے پاک ایپنڈورف ٹیوبیں-2ملی لیٹر(Sterile eppendrof tubes)
11. ٹپ(Tip)
12. اسپریڈر،انوکولیٹنگ لوپ(Spreader, Inoculating loop)
13. مائکروپیپیٹس(Micropipettes)
14. پسی ہوئی برف(Crushed ice)
15. جراثیم سے پاک ڈبل آست پانی(sterile double distilled water)
16. شیکر(Shaker)
17. پانی کا غسل(Water bath (42°C)
18. سینٹری فیوج(Centrifuge)

21.5 طریقہ کار(Procedure)

دن-1:

E.Coli کی تازہ اگائی ہوئی ثقافت کو *LB* پلیٹوں کو سٹریک کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے اور پلیٹوں کو 37*oC* پر راتوں رات انکیوبیٹ کیا جاتا ہے۔

دن-2:

1 ملی لیٹر ایل بی شوربے کو پہلے دن انکیوبیشن کے ذریعے حاصل کی گئی پلیٹ سے کلچر چن کر ٹیکہ لگایا جاتا ہے اور پھر رات بھر 370*C* پر انکیوبیشن کیا جاتا ہے۔

دن-3:

50 ملی لیٹر ایل بی شوربے کو 37 سینٹی گریڈ پر 200*rpm* پر شیکر میں 3-4 گھنٹے تک انکیوبیٹ کیا جاتا ہے اور اس میں دن 2 کو راتوں رات اگائے جانے والے کلچر کا 1 ملی لیٹر شامل کیا جاتا ہے۔

21.5.1 قابل سیل تیاری(Competent Cell Preparation)

1. کلچر کو اب ایک ٹھنڈی 50 ملی لیٹر سینٹرفیوگریشن ٹیوب میں منتقل کیا جاتا ہے اور اسے برف پر رکھ کر ٹھنڈا کیا جاتا ہے جب تک کہ درجہ حرارت 40 سینٹی گریڈ تک نہ پہنچ جائے۔ اس کے بعد ٹیوب کو 5000*rpm* پر 370*C* پر 10 منٹ کے لیے سینٹری فیوج کیا جاتا ہے۔
2. میڈیم مکمل طور پر ہٹا دیا گیا ہے۔
3. حاصل کردہ سیل گولی کو 30 ملی لیٹر برف کے ٹھنڈے 0.1*M* $CaCl_2$ محلول میں دوبارہ معطل کیا جاتا ہے اور برف پر 30 منٹ تک انکیوبیٹ کیا جاتا ہے۔

پی سی آر کے لیے رد عمل کے مرکب کی تیاری

مندرجہ ذیل اجزاء کو مخصوص مقدار میں پی سی آر ٹیوب میں شامل کیا جاتا ہے۔

1. ٹیوب میں موجود مواد کو 1-2 سیکنڈ تک تھپتھپا کر ملایا جاتا ہے۔
2. ٹیوب خودکار تھرموسائکلر مشین میں رکھی گئی ہے۔ اب پروگرام ڈی این اے پر ورد ن حاصل کرنے کے لیے تیار ہے۔
3. *20-35PCR* ایمپلیفیکیشن سائیکل تھرموسائکلر میں درج ذیل شرائط کے ساتھ انجام دیا جاتا ہے۔
4. محلول کو 10 منٹ کے لیے 4^oC 5,000*rpm* پر سینٹرفیوج کیا جاتا ہے۔
5. سپرنٹنٹ میں موجود کیلشیم کلورائیڈ مکمل طور پر ختم ہو جاتا ہے۔

6. گولی جس میں قابل خلیات ہوتے ہیں اسے 2 ملی لیٹر ٹھنڈا 0.1 ایم کیلشیم کلورائیڈ محلول میں دوبارہ بند کیا جاتا ہے۔

21.5.2 خلیات کی تبدیلی (Transformation of Cells)

1. دو کلیکشن ٹیوبیں لی گئیں اور ان پر بالترتیب کنٹرول 'اور 'ٹرانسفارمڈ' کا لیبل لگا دیا گیا اور ان میں 200 μl قابل سیل سلوشن شامل کیا گیا۔
2. تبدیل شدہ کے طور پر لیبل والی ٹیوب میں، 2 μl پلاسمڈ DNA شامل کیا جاتا ہے اور مناسب طریقے سے ملایا جاتا ہے۔
3. دونوں ٹیوبیں برف پر 30 منٹ تک انکیوبیٹ ہوتی ہیں۔
4. گرمی کا جھٹکا دونوں ٹیوبوں کو 42^oC پر 2 منٹ کے لیے پہلے سے گرم پانی کے غسل میں منتقل کر کے دیا جاتا ہے۔
5. ٹیوبوں کو باہر نکالا جاتا ہے اور جلدی سے برف والے باکس میں منتقل کیا جاتا ہے اور 5 منٹ تک ٹھنڈا ہونے دیا جاتا ہے۔
6. پھر دونوں ٹیوبوں میں 800 μl لوریہ برٹانی شوربہ شامل کیا جاتا ہے۔
7. انکیوبیشن ایک گھنٹے کے لیے 37^oC پر کی جاتی ہے۔ یہ خلیات کو گرمی کے جھٹکے سے صحت یاب ہونے اور پلازمیڈ سے وابستہ اینٹی بائیوٹک مزاحمتی جین کا اظہار کرنے کے قابل بناتا ہے۔
8. چار ایل بی آگر پلیٹیں جن میں ایمپسلن، ایکس گال اور آئی پی ٹی جی لیا جاتا ہے اور ان پر بالترتیب۔ کنٹرول، اے، بی اور سی کا لیبل لگایا جاتا ہے۔
9. جراثیم سے پاک اسپریڈر کا استعمال کرتے ہوئے، ٹیوب سے کلچر کا 200 μl لیبل لگا ہوا ہے۔
10. 'کنٹرول' پلیٹ پر لیبل کنٹرول کے ساتھ چڑھایا جاتا ہے۔ A، B اور C کے طور پر لیبل والی پلیٹوں پر بالترتیب 50 μl، 100 μl اور 200 μl کلچر کے ٹیوب لیبل والے کنٹرول سے چڑھایا جاتا ہے۔
11. پلیٹوں کو رات بھر 37 oC پر انکیوبیٹ کریں اور انہیں محیطی درجہ حرارت پر مناسب طریقے سے خشک ہونے دیں۔
12. پلیٹوں پر کالونیوں کو پھر ٹرانسفارمینٹس کو منتخب کرنے کے لیے دیکھا جاتا ہے۔

21.6 نتیجہ اور مشاہدات (Result and Observations)

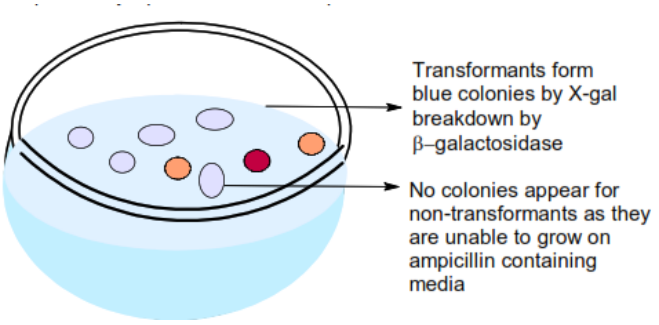
تبدیلی کی کارکردگی کا حساب ذیل میں دیے گئے فارمولے کا استعمال کرتے ہوئے حاصل کی گئی کالونیوں کی تعداد اور DNA چڑھایا جانے والی مقدار کے حساب سے لگایا جا سکتا ہے۔

تبدیلی کی کارکردگی=کالونیوں کی تعداد1000 xاین جی/ڈی این اے چڑھایا کی مقدار

Transformation efficiency = No. of colonies x 1000 ng/Amount of DNA plated

pUC19پلازمیڈ میں اینٹی بائیوٹک Ampicillinکے خلاف مزاحمت کے لیے ایک جین ہوتا ہے۔ یہ جین صرف E.coliخلیات میں موجود ہے جنہوں نے پلاسمڈ لیا ہے اور ایک قابل انتخاب مارکر کے طور پر کام کرتا ہے۔ اس طرح، امپیسلن پلیٹوں پر بڑھنے کی صلاحیت رکھنے والے صرف ٹرانسفارمینٹس کا انتخاب کیا جاتا ہے۔

LacZ encoding β -galactosidase جین کے N-ٹرمینل کے آخر میں حذف ہونے والا E. کولی ہوسٹ سٹرین میں موجود ہے. pUC19پلاسمڈ میں β-galactosidaseانزائم کا LacZحصہ ہوتا ہے جو انزائم کے غائب ہونے والے حصے کو انکوڈ کرتا ہے۔ تبدیل شدہ E.coli خلیوں میں.. pUC19 کی قابل میزبان خلیوں میں تبدیلی ایک انزیمیٹک طور پر فعال β-galactosidase کی پیداوار کا سبب بنتی ہے جس کی وجہ سے α-complementation نامی عمل کے ذریعے میزبان سیل اور پلازمیڈ سے کٹی ہوئی مصنوعات کی تکمیل ہوتی ہے۔



شکل20.3:Ampicillin+IPTG+X-galکے ساتھ پلیٹ

لہذا، ٹرانسفارمینٹ جو β-galactosidaseتیار کرتے ہیں وہ LBاگر پلیٹوں پر نیلے رنگ کی کالونیاں بناتے ہیں جس میں X-gal substrate+ inducer IPTGہوتا ہے۔ پیدا ہونے والا رنگ ہائیڈولیسس اور سبسٹریٹ X-galکے ذریعے نیلے رنگ کے مرکب کی تشکیل کی وجہ سے ہے اور β-galactosidase enzyme IPTGکی پیداوار کے لیے Lac operonکے لیے inducer moleculeہے۔

کنٹرول پلیٹ پر کوئی ٹرانسفارمینٹ نہیں دیکھا گیا کیونکہ اس میں پلاسمڈ این اے نہیں تھا۔ چونکہ قابل خلیات کے ذریعہ کوئی اپٹیک نہیں ہوا، اس پلیٹ میں کوئی کالونیاں نمودار نہیں ہوئیں۔ اس طرح، کنٹرول پلیٹ یقینی بناتی ہے کہ پورے عمل میں کوئی آلودگی نہیں ہے۔

21.7 احتیاطی تدابیر

1. قابل خلیات کی تیاری کے بعد تبدیلی کے طریقہ کار پر تیزی سے عمل کیا جانا چاہیے کیونکہ طویل عرصے تک ذخیرہ کرنے سے تبدیلی کی کارکردگی پر بہت زیادہ اثر پڑتا ہے۔
2. 0.1 *M* کیلشیم کلورائیڈ محلول کو پہلے سے ٹھنڈا کر کے سینٹری فیوج کیا جانا چاہیے۔
3. طریقہ کار کو غیر جانبداری سے انجام دیا جانا چاہئے۔

21.8 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

1. Brown TA. (2010). Gene Cloning and DNA Analysis. 6th edition. Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
2. Cappucino J and Sherman N. (2010). Microbiology: A Laboratory Manual. 9th edition. Pearson Education Limited.
3. 3. Sambrook J and Russell D. (2001). Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Wiley JM, Sherwood LM and Woolverton CJ. (2013) Prescott's Microbiology. 9 th Edition. McGraw Hill International.
5. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. Chapter 5, Restriction Endonucleases.
6. Primrose SB and Twyman RM. (2006). Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7th edition. Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
7. Sambrook J and Russell D. (2001). Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Clark DP and Pazdernik NJ. (2009). Biotechnology: Applying the Genetic Revolution. Elsevier Academic Press, USA.

پریکٹیکل ریکارڈ شیٹ(Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

اکائی 22: تصویروں کے ذریعے ناردرن بلوٹنگ، ساؤتھرن بلاٹنگ اور ویسٹرن بلاٹنگ کی تکنیکوں کا مطالعہ

[Study of Southern Blotting, Northern Blotting And Western Blotting Ttechniques Through Photographs]

اکائی کے اجزا

22.0 تعارف(Introduction)

22.1 مقاصد(Objectives)

22.2 اصول(Principle)

22.3 ساؤتھرن بلاٹنگ(Southern Blotting)

22.3.1 آؤٹ لائن(Outline)

22.3.2 ڈی این اے کی پروسیسنگ(Processing of the DNA)

22.3.3 پابندی انزائم کے ساتھ ہاضمہ(Digestion with Restriction Enzyme)

22.3.4 الیکٹروفورسس کے ذریعے علیحدگی(Separation by Electrophoresis)

22.3.5 بلوٹنگ سے پہلے جیل کا ٹریٹمینٹ(Treatment of Gel before Blotting)

22.3.6 بلوٹنگ میں تحقیقات(The Probe in Blotting)

22.3.7 اقدامات شامل ہیں

22.3.8 بلاٹ تجزیہ(Blot Analysis)

22.3.9 درخواستیں(Application)

22.4 ناردرن بلاٹنگ(Northern Blotting)

22.4.1 شمالی بلوٹنگ کا اصول(Principle of Northern Blotting)

22.4.2 طریقہ کار(Procedure)

22.4.3 بلوٹنگ میمبرین کا انتخاب(Choice of Blotting Membrane)

22.4.4 Agarose-Formaldehyde جیل الیکٹروفورسس (Agarose-Formaldehyde Gel Electrophoresis)
22.4.5 اقدامات شامل ہیں (Steps Involved)
22.4.6 ناردرن بلوٹنگ کی ایپلی کیشنز (Applications of Northern Blotting)
22.4.7 فوائد اور استعمال (Advantages and Uses)
22.5 ویسٹرن بلاٹنگ (Western Blotting)
22.6 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں (Suggested Books for Further Readings)

22.0 تمہید (Introduction)

جین کے اظہار، ضابطے، اور جینیاتی تغیرات کا مطالعہ حیاتیاتی نظاموں کے پیچیدہ کام کو سمجھنے کے لیے اہم ہے۔ اس طرح کی تحقیقات کے لیے دستیاب مالیکیولر بائیولوجی تکنیکوں کے ہتھیاروں میں سے، جنوبی، شمالی اور مغربی بلوٹنگ مخصوص نیوکلک ایسڈز اور پروٹینز کا پتہ لگانے اور تجزیہ کرنے کے لیے ناگزیر ٹولز کے طور پر نمایاں ہیں۔

اس عملی باب کا مقصد فوٹو گرافس کے ذریعے سہولت فراہم کرنے والے بصری سفر کے ذریعے جنوبی بلوٹنگ، ناردرن بلوٹنگ، اور ویسٹرن بلوٹنگ کی تکنیکوں کی ایک جامع دریافت فراہم کرنا ہے۔ ان تکنیکوں میں سے ہر ایک سالماتی حیاتیات میں ایک منفرد کردار ادا کرتی ہے، جس سے محققین کو جین کے اظہار اور سالماتی تعامل کے مختلف پہلوؤں کی تحقیق کرنے کے قابل بناتا ہے۔

بلوٹنگ وہ تکنیک ہے جس میں نیوکلک ایسڈ یا پروٹین کو ایک ٹھوس سپورٹ پر عام طور پر نایلان یا نائٹروسیلوز جھلیوں پر متحرک کیا جاتا ہے۔ نیوکلک ایسڈ کا بلوٹنگ ہائبرڈائزیشن اسٹڈیز کی مرکزی تکنیک ہے۔ جھلیوں پر نیوکلک ایسڈ لیبلنگ اور ہائبرڈائزیشن نے تجرباتی تکنیکوں کی ایک رینج کی بنیاد بنائی ہے جس میں جین کے اظہار، تنظیم وغیرہ کو سمجھنا شامل ہے۔ پیچیدہ حیاتیاتی مرکب میں مخصوص پروتینوں کی شناخت اور پیمائش کرنا، جیسے کہ خون، میں طویل عرصے سے اہم مقاصد رہے ہیں۔ سائنسی اور تشخیصی مشق. ابھی حال ہی میں جینومک ڈی این اے میں غیر معمولی جینوں کی شناخت طبّی تحقیق اور جینیاتی مشاورت میں تیزی سے اہم ہو گئی ہے۔ بلاٹنگ تکنیکوں کا استعمال منفرد پروٹین اور نیوکلک ایسڈ کی ترتیب کی شناخت کے لیے کیا جاتا ہے۔ وہ انتہائی مخصوص اور حساس ہونے کے لیے تیار کیے گئے ہیں اور سالماتی حیاتیات اور طبّی تحقیق دونوں میں اہم اوزار بن گئے ہیں۔

سدرن بلوٹنگ ایک پیچیدہ مرکب کے اندر مخصوص ڈی این اے کی ترتیب کا پتہ لگانے کے لیے استعمال ہونے والا طریقہ ہے۔ جینومک ڈی این اے کو ٹکڑے ٹکڑے کر کے، جیل الیکٹروفورسس کے ذریعے ٹکڑوں کو الگ کر کے، انہیں جھلی میں منتقل کر کے، اور لیبل والے ڈی این اے پروب کے ذریعے تحقیقات کر کے، محققین دلچسپی کے ڈی این اے کے ٹکڑوں کی موجودگی اور سائز کی شناخت کر سکتے ہیں۔

یہ تکنیک جین میپنگ، جینیاتی تغیرات کی شناخت، اور ڈی این اے میتھیلیشن پیٹرن کا مطالعہ کرنے جیسے کاموں کے لیے انمول ہے۔

دوسری طرف، شمالی بلوٹنگ کو ایم آر این اے کی سطح پر جین کے اظہار کا تجزیہ کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ سدرن بلوٹنگ جیسے اقدامات کے سلسلے کے ذریعے، لیکن ڈی این اے کے بجائے آر این اے کا استعمال کرتے ہوئے، ناردرن بلوٹنگ محققین کو نمونے کے اندر مخصوص آر این اے ٹرانسکرپٹس کا پتہ لگانے اور ان کی مقدار درست کرنے کی اجازت دیتی ہے۔ یہ تکنیک خاص طور پر مختلف تجرباتی حالات کے تحت جین کے اظہار کے نمونوں کا مطالعہ کرنے، متبادل طور پر کٹے ہوئے ٹرانسکرپٹس کی شناخت، اور *RNA* پروسیسنگ میکانزم کی تحقیقات کے لیے مفید ہے۔

آخر میں، ویسٹرن بلوٹنگ ایک ایسی تکنیک ہے جو نمونے کے اندر پروٹین کا پتہ لگانے اور ان کا تجزیہ کرنے کے لیے استعمال ہوتی ہے۔ جیل الیکٹروفورسس کے ذریعے سائز کی بنیاد پر پروٹین کو الگ کرکے، انہیں جھلی پر منتقل کرکے، اور مخصوص اینٹی باڈیز کی جانچ کرکے، ویسٹرن بلوٹنگ اعلی خاصیت کے ساتھ ٹارگٹ پروٹینز کا پتہ لگانے کے قابل بناتی ہے۔ اس تکنیک کو مختلف شعبوں میں وسیع پیمانے پر استعمال کیا جاتا ہے، بشمول سیل بائیولوجی، امیونولوجی، اور بائیو میڈیکل ریسرچ، پروٹین کی مقدار کا تعین، پروٹین-پروٹین کے تعامل کے مطالعے، اور بعد از ترجمہ ترمیمی تجزیہ جیسے کاموں کے لیے۔

اس پورے عملی باب کے دوران، قارئین کو تجرباتی سیٹ اپ، جیل الیکٹروفورسس، جھلی کی منتقلی، تحقیقات، اور پتہ لگانے کے مراحل کی عکاسی کرنے والی تصویروں کے ذریعے جنوبی، شمالی اور مغربی بلوٹنگ کے طریقہ کار کے ہر مرحلے میں رہنمائی کی جائے گی۔ ان تکنیکوں کے ساتھ بصری طور پر مشغول ہو کر، قارئین کو ان کے اصولوں، اطلاقات، اور ممکنہ نقصانات کی گہری سمجھ حاصل ہو جائے گی۔

بالآخر، جنوبی، شمالی اور مغربی بلوٹنگ تکنیکوں کی اس بصری تحقیق کا مقصد محققین، طلباء، اور پرجوش افراد کو یکساں علم اور مہارت کے ساتھ بااختیار بنانا ہے تاکہ ان طاقتور ٹولز کو ان کی مالیکیولر بائیولوجی کی کوششوں میں مؤثر طریقے سے استعمال کیا جا سکے۔ نظریہ اور بصری مظاہروں کے امتزاج کے ذریعے، یہ باب ان تکنیکوں کو بے نقاب کرنے اور جینیاتی اور پروٹومک مناظر کے اسرار کو واضح کرنے کے لیے ان کی درخواست پر اعتماد پیدا کرنے کی کوشش کرتا ہے۔

22.1 مقاصد (Objectives)

اس پریکٹیکل یونٹ کی تکمیل کے بعد طالب علم اس قابل ہو جائے گا۔

- جنوبی، شمالی اور مغربی بلوٹنگ تکنیکوں کے بنیادی اصولوں کو سمجھنا۔
- شرکاء کو ہر بلوٹنگ تکنیک کے لیے درکار تجرباتی سیٹ اپ اور آلات سے واقف کرانا۔
- سدرن، ناردرن اور ویسٹرن بلوٹنگ کے تجربات کرنے میں شامل مرحلہ وار طریقہ کار سیکھنے کے لیے۔
- ہر بلوٹنگ تکنیک کے لیے نمونے، جیل، جھلی، اور تحقیقات کی تیاری میں مہارت پیدا کرنا۔
- جیل الیکٹروفورسس، نیوکلک ایسڈ یا پروٹین کی جھلیوں میں منتقلی، اور بعد میں پتہ لگانے کے طریقوں میں تجربہ حاصل کرنے کے

لیے۔

- سدرن، ناردرن اور ویسٹرن بلوٹنگ تجربات کے دوران پیش آنے والے عام مسائل کو حل کرنے کی مشق کرنا۔
- تجرباتی نتائج کی توثیق کرنے میں کنٹرولز اور معیارات کی اہمیت کو سمجھنا۔
- جنوبی، شمالی اور مغربی بلوٹنگ کے تجربات سے حاصل کردہ ڈیٹا کی تشریح اور تجزیہ کرنے کے لیے۔
- مالیکیولر بائیولوجی ریسرچ میں سدرن، ناردرن اور ویسٹرن بلوٹنگ تکنیک کے اطلاق اور حدود کو سمجھنا۔
- مخصوص تحقیقی سوالات اور مقاصد کے لیے بلاٹنگ تکنیک کو ڈھالنے کے لیے تنقیدی سوچ اور تجرباتی ڈیزائن کی مہارتوں کو فروغ دینا۔

22.2 اصول(Principle)

عام اصول داغ لگانے کے طریقے کافی آسان ہیں اور عام طور پر چار الگ الگ مراحل پر مشتمل ہوتے ہیں: نمونے میں پروٹین یا نیوکلک ایسڈ کے ٹکڑوں کی الیکٹروفورٹک علیحدگی؛ منتقلی اور کاغذی مدد پر متحرک ہونا؛ کاغذ پر مالیکیول کو نشانہ بنانے کے لیے تجزیاتی تحقیقات کا پابند؛ اور پابند تحقیقات کا تصور۔ نمونے میں مالیکیولز کو پہلے الیکٹروفورسس کے ذریعے الگ کیا جاتا ہے اور پھر آسانی سے سنبھالے جانے والے سپورٹ میڈیم یا جھلی میں منتقل کیا جاتا ہے۔ یہ پروٹین یا ڈی این اے کے ٹکڑوں کو متحرک کرتا ہے، اصل علیحدگی کی ایک وفادار نقل فراہم کرتا ہے، اور بعد میں بائیو کیمیکل تجزیہ کی سہولت فراہم کرتا ہے۔ سپورٹ میڈیم میں منتقل ہونے کے بعد متحرک پروٹین یا نیوکلک ایسڈ کا ٹکڑا پروبس، جیسے اینٹی باڈیز یا ڈی این اے کے استعمال سے مقامی کیا جاتا ہے، جو خاص طور پر دلچسپی کے مالیکیول سے منسلک ہوتے ہیں۔ آخر میں، تحقیقات کی پوزیشن جو غیر متحرک ہدف مالیکیول سے منسلک ہے عام طور پر آٹوراڈیو گرافی کے ذریعے تصور کی جاتی ہے۔ بلوٹنگ کی تین اہم تکنیکیں تیار کی گئی ہیں اور جنہیں عام طور پر سدرن، ناردرن اور ویسٹرن بلوٹنگ کہا جاتا ہے۔

ڈی این اے، آر این اے اور پروٹین کے ٹکڑوں کے مرکب کو جیل الیکٹروفورسس کے ذریعے الگ کیا جا سکتا ہے۔ اس کے علاوہ، الگ کیے گئے جیل بینڈ کو مخصوص رنگوں سے داغ دیا جا سکتا ہے اور ان کا مطالعہ کیا جا سکتا ہے۔ ان بینڈز کی شناخت کی تصدیق ایک معروف مالیکیولر پروب کے ذریعے کی جا سکتی ہے جو کہ ایک یا زیادہ بینڈز سے مماثلت کو ظاہر کرتا ہے۔ الگ کیے گئے بینڈوں کو جیل کے اندر موجود تحقیقات کا استعمال کرتے ہوئے ہائبرڈائز کیا جا سکتا ہے۔ پروبس کا استعمال کرتے ہوئے ہائبرڈائزیشن بینڈوں کو نائٹروسیلوز جھلی میں منتقل کرنے کے بعد کی جاتی ہے۔ بلوٹنگ سے مراد بینڈز کو جھلی پر منتقل کرنا اور پھر انہیں ایک مخصوص پروب کے ساتھ ہائبرڈائز کرنا ہے۔ ایک نمونے میں، سدرن بلوٹنگ مخصوص ڈی این اے کی ترتیب کا پتہ لگاتی ہے، ناردرن بلوٹنگ مخصوص آر این اے کی ترتیب کا پتہ لگاتی ہے، اور ویسٹرن بلوٹنگ مخصوص پروٹین کی ترتیب کا پتہ لگاتی ہے۔ نتیجے کے طور پر، تین بلوٹنگ تکنیکوں کے درمیان بنیادی فرق میکرومولیکول قسم ہے جس کا وہ پتہ لگاتے ہیں۔

22.3 ساؤتھرن بلاٹنگ(Southern Blotting)

1975 میں، برطانوی ماہر حیاتیات ایڈون سدرن نے اس طریقہ کار کا مظاہرہ کیا جو ڈی این اے کے نمونے میں کسی خاص ترتیب کا پتہ لگاتا ہے اور اس کی شناخت کرتا ہے۔ یہ جین کی ساخت، جینیاتی تبدیلی اور جینوم میں کسی بھی غیر ملکی ڈی این اے کے انضمام کا مطالعہ کرنے کے لیے سب سے زیادہ استعمال ہونے والی تکنیکوں میں سے ایک ہے حالانکہ تبدیلی یا جینیاتی انجینئرنگ۔ اس کا بنیادی اصول لیبل شدہ تحقیقات کا استعمال کرتے ہوئے ٹھوس سپورٹ پر دلچسپی کے ڈی این اے کا پتہ لگانا ہے۔ بنیادی طور پر، ایک نایلان یا نائٹروسیلوز جھلی کو جنوبی بلوٹنگ تکنیک میں استعمال کیا جاتا ہے۔

22.3.1 آؤٹ لائن(Outline)

PCR کے رد عمل یا پلازمڈ کے عمل انہضام پر پابندی کے بعد، *DNA* کا الگ بینڈ الیکٹروفورٹک جیل میں نظر آتا ہے۔ متبادل صورتوں میں، ڈی این اے کے مسلسل سمیر، الگ الگ بینڈز کے بجائے ایک جیل میں ظاہر ہوں گے جب کروموسومل (جینومک) ڈی این اے کی پابندی کے بعد ڈی این اے کے ٹکڑے کی زیادہ متغیر تعداد موجود ہو گی۔ ان صورتوں میں، ڈی این اے سمیر میں موجود کسی بھی مخصوص ڈی این اے سیگمنٹ کو سدرن بلوٹنگ کی متبادل تکنیک کا استعمال کرتے ہوئے پتہ لگایا جا سکتا ہے۔

22.3.2 ڈی این اے کی پروسیسنگ(Processing of the DNA)

ڈی این اے کی کافی مقدار ٹشو کے نمونے سے الگ کی جاتی ہے (مثال کے طور پر: پردیی خون یا دوسرے نمونوں جیسے نال یا خصیوں سے)۔ ڈی این اے کے معیار اور مقدار کو بالترتیب ایگرز جیل الیکٹروفورسس اور سپیکٹروفوٹومیٹرک تکنیک کے ذریعے چیک کیا جانا چاہیے۔

22.3.3 پابندی انزائم کے ساتھ ہاضمہ(Digestion with Restriction Enzyme)

ہائی مالیکیولر وزن والے ڈی این اے کو 0.5-15*Kbp* لمبائی کے چھوٹے ٹکڑوں میں ہضم کرنے کے لیے پابندی والے انزائم کے ساتھ علاج انتہائی اہم ہے۔ یہ پابندی کے انزائمز کا انتخاب مختلف پیرامیٹرز کی بنیاد پر کیا جاتا ہے جیسے کٹ سائٹ کی شناخت کی ترتیب کی لمبائی یا ڈی این اے میتھیلیشن کی حد (جیسا کہ انسانوں میں)۔ جس فریکوئنسی پر یہ انزائمز کاٹتے ہیں اس کا انحصار ایسے عوامل پر ہوتا ہے۔

22.3.4 الیکٹروفورسس کے ذریعے علیحدگی(Separation by Electrophoresis)

کٹے ہوئے ڈی این اے کو سائز کی بنیاد پر الگ کیا جاتا ہے اور ڈی این اے کے ٹکڑوں کے سائز کی بنیاد پر میٹرکس کا انتخاب کیا جاتا ہے۔ زیادہ تر معاملات میں، ڈی این اے کے ٹکڑوں کو الگ کرنے کے لیے روایتی ایگروز جیل الیکٹروفورسس تکنیک کا استعمال کیا جاتا ہے۔ چھوٹے ٹکڑوں جیسے کہ 100 سے کم بیس جوڑوں کے لیے، ایکریلامائیڈ کو زیادہ حل کرنے کی طاقت حاصل کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔~15 *kbp* سے زیادہ بڑے *DNA* کے ٹکڑوں کے لیے، روایتی ایگروز جیل الیکٹروفورسس تکنیک کو ترجیح نہیں دی جاتی۔ اس کے بجائے، فیلڈ انورژن جیل الیکٹروفورسس (*FIGE*) یا پلسڈ فیلڈ جیل الیکٹروفورسس (*PEGE*) استعمال کیا جاتا ہے، اور بعض صورتوں میں، یہ کچھ برقرار

کروموسوم کو بھی الگ کرنے کی صلاحیت رکھتے ہیں۔

22.3.5 بلوٹنگ سے پہلے جیل کا ٹریٹمینٹ (Treatment of Gel before Blotting)

الیکٹروفورسس کے بعد جیل کے ع ٹریٹمینٹ کے لیے ڈیلیٹ ہائیڈروکلورک ایسڈ استعمال کیا جاتا ہے۔ جیل کو سوڈیم ہائیڈرو آکسائیڈ میں نہانے کے بعد اکیلی پھنسے ہوئے نِکس ڈی پیوریشنیڈ ڈی این اے مقامات پر پیدا ہوتے ہیں، جس کے نتیجے میں ڈی این اے بکھر جاتا ہے۔

دوسری صورت میں، دھبے کے معیار کو متاثر کیا جائے گا. نیز، اس مرحلے میں، جیل کو نائٹروسیلوز یا غیر جانبدار/مثبت چارج شدہ نایلان جھلی میں منتقل کرنے سے پہلے مستقبل کے مقاصد کے لیے مستقل ریکارڈ کے لیے تصویر کشی کی جاتی ہے۔

22.3.6 بلوٹنگ میں تحقیقات (The Probe in Blotting)

عام طور پر، *cDNA* (تکمیلی *DNA*) یا جینومک *DNA* کے کلون شدہ حصوں کو تحقیقات کے طور پر استعمال کیا جاتا ہے۔ جینومک پروب میں جینومک ترتیب کے ایکسون اور انٹرن دونوں شامل ہو سکتے ہیں۔ سی ڈی این اے کلون کے ساتھ بار بار ڈی این اے کی ترتیب کا ایک غیر معمولی مسئلہ رہا ہے، جو اسے تحقیقات کے طور پر غیر موزوں بنا دیتا ہے۔ اس مسئلے کو بغیر لیبل والے ڈی این اے کے ساتھ دھبے کو ہائبرڈائز کر کے اور علاقوں کو سب کلون کر کے حل کیا جا سکتا ہے۔

ایلیل مخصوص مصنوعی اولیگونوکلیوٹائڈس کو بھی تحقیقات کے طور پر استعمال کیا جا سکتا ہے، کچھ تنقیدی کنٹرول شدہ پوسٹ ہائبرڈائزیشن تکنیکوں کو برقرار رکھتے ہوئے۔

ہائبرڈائزیشن کے بعد ہدف کو بہتر انداز میں دیکھنے کے لیے ان پروبس کو مختلف تابکار یا کیمیلومینیسینٹ مرکبات کا استعمال کرتے ہوئے لیبل لگایا گیا ہے۔ عام طور پر، *deoxynucleotide hexamer primers* لیبلنگ کے لیے استعمال کیے جاتے ہیں۔ یہ ہیکسامر پرائمر واحد پھنسے ہوئے ڈی این اے اسٹرینڈ سے منسلک ہوتے ہیں، جو حرارت کی کمی سے حاصل ہوتے ہیں۔ بعد میں اس عمل میں، ڈی این اے پولیمریز *I* کے کلینو ٹکڑے کا استعمال کرتے ہوئے تکمیلی اسٹرینڈ حاصل کیا جاتا ہے۔

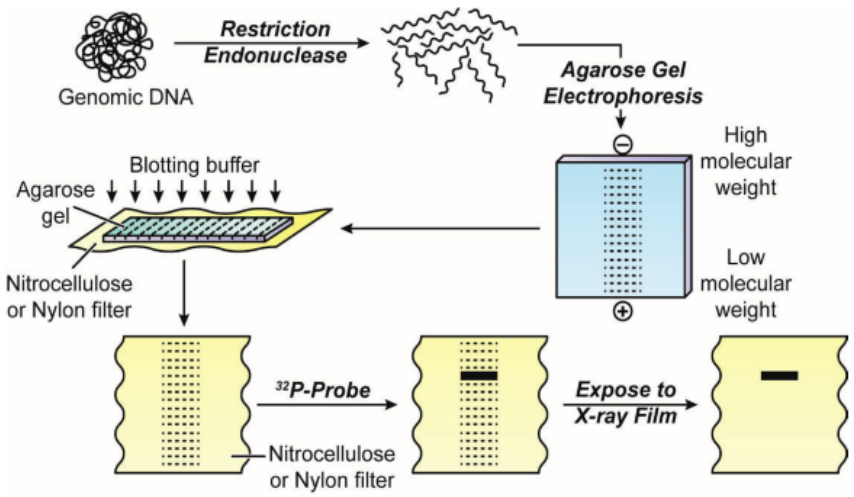
22.3.7 اقدامات شامل ہیں

اس قسم کے بلوٹنگ کے طریقے عام طور پر سادہ ہوتے ہیں اور بنیادی طور پر چار الگ الگ مراحل پر مشتمل ہوتے ہیں: سب سے پہلے، نمونے میں نیوکلک ایسڈ کے ٹکڑوں کو ان کے سائز کی بنیاد پر الیکٹروفوریٹک تکنیک کے ذریعے الگ کیا جاتا ہے۔ پھر، سپورٹ کے لیے نائٹروسیلوز پیپر پر نمونے کی منتقلی؛ پھر تجزیاتی تحقیقات کا مشاہدہ جو ہدف کے مالیکیول سے منسلک ہے۔

1. پابندی اینڈونکلیز کا استعمال کرتے ہوئے، اعلی مالیکیولر-وزن DNA اسٹرینڈز کو چھوٹے ٹکڑوں میں تقسیم کیا جاتا ہے۔ ایگرز جیل میں الیکٹروفورسس تکنیک کا استعمال کرتے ہوئے ٹکڑوں کو مختلف سائز کے مطابق ترتیب دیا جاتا ہے۔
2. جب ڈی این اے کے ٹکڑے $15Kbp$ سے زیادہ ہوتے ہیں تو ان کو صاف کرنے کے لیے ہائیڈروکلورک ایسڈ جیسے تیزاب کو لگانے سے چھوٹے ٹکڑے پیدا ہوتے ہیں، جیل سے جھلی میں منتقل کرنے کے عمل کو آسان بناتے ہیں۔

3. کچھ بقایا آر این اے واحد پھنسے ہوئے ڈی این اے کے ساتھ موجود رہ سکتے ہیں۔ ان کو الکلائن طریقہ سے ہٹایا جا سکتا ہے۔ ڈی این اے جیل کو ایک الکلائن محلول میں رکھا جاتا ہے جس میں $NaOH$ ہوتا ہے۔ الکلائن محلول میں ڈینیچریشن منفی چارج شدہ ڈی این اے کی مثبت چارج شدہ نائٹروسیلوز جھلی میں منتقلی کی کارکردگی کو بڑھا سکتی ہے۔
4. نائٹروسیلوز جھلی کو یا تو جیل کے اوپر یا نیچے رکھا جاتا ہے جس میں کاغذ کے تولیوں کا ایک ڈھیر لگا کر یکساں طور پر تقسیم کیا جاتا ہے تاکہ ایگرز جیل اور نائٹروسیلوز جھلی کے درمیان مناسب رابطہ قائم ہو سکے۔
5. ڈی این اے کو مستقل طور پر جھلی سے منسلک کرنے کے لیے، اسے UV شعاعوں کے سامنے لایا جاتا ہے یا $80\ ^\circ C$ پر 2 گھنٹے تک پکایا جاتا ہے۔
6. ایک پروب، جو زیادہ تر سنگل سٹرینڈڈ ڈی این اے ہوتا ہے ایک مخصوص ترتیب کے ساتھ، ہدف ڈی این اے کا تعین کرنے کے لیے استعمال ہوتا ہے۔ اس کے بعد پہلے سے طے شدہ جھلی کو تحقیقات کے سامنے لایا جاتا ہے، جسے عام طور پر ریڈیو لیبل یا فلوروسینٹ یا کرومو جینک ڈائی کے ساتھ ٹیگ کیا جاتا ہے۔

ہائبرڈائزیشن کے مرحلے کے بعد، اضافی تحقیقات کو ایکس رے فلم پر آٹوڈیوگرافی کے ذریعے دھویا جاتا ہے یا کرومو جینک طریقہ (شکل 22.1) میں فلوروسینٹ پروب کے لیے جھلی پر رنگ تیار کر کے دیکھا جاتا ہے۔



شکل 22.1: جنوبی بلوٹنگ میں شامل مختلف اقدامات

22.3.8 بلاٹ تجزیہ (Blot Analysis)

تحقیقات کے ساتھ ہائبرڈائزڈ بلاٹ کا تجزیہ عام طور پر رد عمل کے عمل میں استعمال شدہ تحقیقات پر مبنی ہوتا ہے۔ عام طور پر، $p32$، $p33$، $p35$ جیسے تابکار پروبس کا استعمال کیا جاتا ہے، اور ان کا پتہ کم درجہ حرارت جیسے کنٹرول شدہ ماحول میں آٹوراڈیوگرافی کے ذریعے کیا جاتا

ہے۔ نمائش کا وقت عوامل کے ساتھ ساتھ تجرباتی ڈیٹا پر مبنی ہے۔۔

22.3.9 درخواستیں(Application)

سدرن بلوٹنگ کی مختلف اہم ایپلی کیشنز میں، سب سے اہم ایک دیے گئے نمونے میں جین کے کلون شدہ یا غیر کلون شدہ حصے کو تلاش کرنا ہے۔ دوبارہ ملاپ کے نتیجے میں پیدا ہونے والے قدرتی تغیرات، جیسے کہ داخل کرنا، حذف کرنا یا دوبارہ ترتیب دینا، کسی جین کے پابندی والے انزائم کے نقشے کا پتہ لگانے کے لیے بلاٹنگ کے ذریعے چھان بین کی جاسکتی ہے۔ پابندی کے ٹکڑے کی لمبائی پولیمور فزم (*RFLPs*) کو دریافت کیا گیا تھا جو پابندی کے انزائم سائٹس کے *dimorphism* پر مبنی ہے۔اس کی وجہ سے بعد میں جینیاتی نقشہ سازی اور تغیراتی واقعات کے میدان میں مختلف دریافتیں ہوئیں۔ لہٰذا، سدرن بلوٹنگ بتدریج کسی بھی جین میں تبدیلی کی وجہ سے ہونے والی بیماری کا پتہ لگانے کے لیے ایک کلیدی آلہ ثابت ہوا۔

لیمفوپرولیفیریٹو عوارض کا پتہ لگانے کے لیے،امیونوگلوبلینز اور ٹی سیل ریسیپٹرز کی دوبارہ ترتیب سے متعلق تحقیقات ایک اہم کردار ادا کرتی ہیں۔ان تشخیصی استعمالات کے علاوہ، یہ جرائم کے شعبے میں ایک کارآمد ٹول بھی ہے۔ مجرموں اور متاثرین کی شناخت کے لیے،اسے جانچ کے نمونے کے لیے جینیاتی مواد کے چھوٹے ٹکڑوں کو تلاش کرنے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ڈی این اے فنگر پرنٹنگ نے سدرن بلوٹنگ کی مدد کو بھی سہولت فراہم کی ہے۔

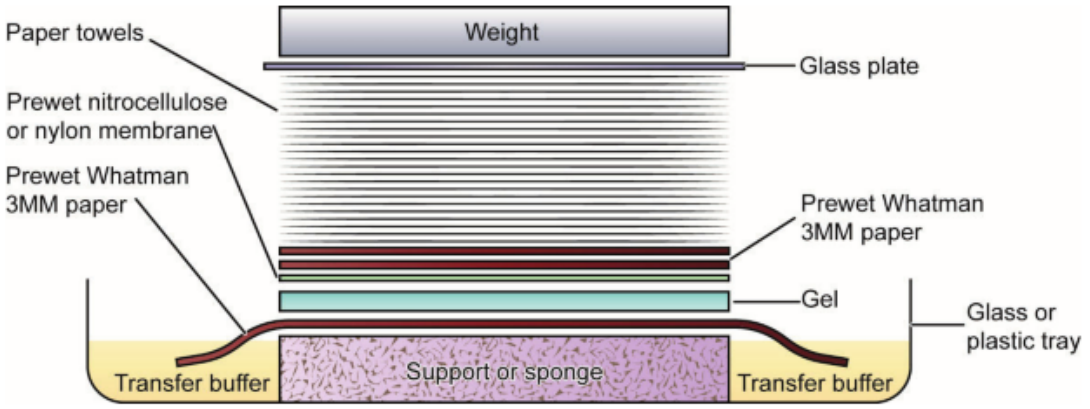
22.4 ناردرن بلاٹنگ(Northern Blotting)

جین کے اظہار کا تجزیہ کرنے کے لیے استعمال ہونے والی لیبارٹری تجزیاتی تکنیک میں شمالی دھبہ شامل ہے۔ خاص طور پر، حیاتیاتی نمونوں (جیسے خون یا ٹشو) سے آر این اے مالیکیول کو فارمامائڈ ایگروز جیل میں لوڈ کر کے الگ کیا جاتا ہے جس کے بعد الیکٹروفورسس ہوتا ہے۔ جیل میں علیحدگی کے بعد آر این اے مالیکیول کو ٹھوس جھلی پر منتقل کیا جاتا ہے،اس کے بعد ریڈیو لیبلڈ/فلوریسنٹلی لیبلڈ/کیمیکل ٹیگ شدہ ڈی این اے پروب کی نمائش ہوتی ہے۔ ناردرن بلٹ کا طریقہ 1977 میں سٹینفورڈ یونیورسٹی میں جیمز ایلوائن، ڈیوڈ کیمپ اور جارج سٹارک نے تیار کیا تھا۔

ڈینیچرنگ جیل ابتدائی طور پر آر این اے کو الگ کرنے کے لیے شمالی دھبے میں استعمال کیا جاتا ہے۔ پھر آر این اے کو جیل سے نایلان جھلی میں منتقل کیا جاتا ہے۔ آر این اے کو غیر متحرک آر این اے کے ساتھ ہائبرڈائز کرنے کے لیے جھلی میں طے کیے جانے کے بعد دلچسپی کے جین کے لیے ایک ٹیگ شدہ پروب کو شامل کیا جاتا ہے۔ دھونے کے ذریعہ مسلسل ہٹانے سے غیر مخصوص طور پر پابند تحقیقات کی رہائی کی اجازت ملتی ہے۔ ایک بار جب تحقیقات کو ہدف کے آر این اے سے قطعی طور پر منسلک کیا جاتا ہے، ٹھوس جھلی خشک، بے نقاب اور تجزیہ کے تابع ہو جاتی ہے۔

22.4.1 شمالی بلوٹنگ کا اصول(Principle of Northern Blotting)

نار درن بلوٹنگ تکنیک کا استعمال جین کے اظہار کی نگرانی کے لیے کیا جاتا ہے۔ٹارگٹ آر گنزم سے نمونہ آر این اے کو الگ تھلگ کیا جاتا ہے اور الیکٹر وفورسس کا استعمال کرتے ہوئے فارمالڈیہائیڈ ایگرز جیل پر الگ کیا جاتا ہے جس کے بعد الگ تھلگ آر این اے کو سپورٹ میمبرین (نائٹر و سیلولوز میمبرین) میں منتقل کیا جاتا ہے۔ایک مخصوص بفر کی موجودگی میں، یہ کیپلیری ٹرانسفر تکنیک (*Figure22.3*) کا استعمال کرتے ہوئے پورا کیا جاسکتا ہے۔اس کے بعد جھلی کو یا تو اعلی درجہ حرارت پر پکایا جاتا ہے یا اسے *UV* کراس لنکنگ کا نشانہ بنایا جاتا ہے، جو *RNA* کی جھلی سے ہم آہنگی کے بندھن کا سبب بنتا ہے اور بعد میں پروسیسنگ کے دوران نیوکلک ایسڈ کو دھونے سے روکتا ہے۔



شکل 22.2: آر این اے کی عام کیپلیری منتقلی ایگروز جیل سے فلٹر جھلی کی ترتیب میں (سائیڈ ویو)

22.4.2 طریقہ کار(Procedure)

الیکٹر وفورٹیکلی طور پر الگ کیے گئے *RNAs* کو جیل سے ایک فلٹر جھلی میں منتقل کیا جاتا ہے، جہاں پھر انہیں کسی خاص پروب یا پروبس کے سیٹ میں طے اور ہائبر ڈائز کیا جاتا ہے۔ چونکہ *RNA* بالکل اسی ترتیب میں منتقل کیا جاتا ہے جیسا کہ اسے جیل پر الگ کیا گیا تھا، اس لیے نار درن بلاٹ تجزیہ کے ذریعے تیار کردہ ہائبر ڈائزیشن سگنلز کو زیر تفتیش نمونے کا معیاری اور مقداری پروفائل حاصل کرنے کے لیے استعمال کیا جاسکتا ہے۔

ڈینیچر نگ ایگروز جیلوں کو تیار کرنے اور چلانے، جیلوں سے نیوکلک ایسڈ کی منتقلی، اور آر این اے مالیکیول کو الگ کرنے کے لیے کئی تکنیکیں موجود ہیں۔ مزید برآں، فلٹر میمبرین کی قسم، متحرک کرنے کی تکنیک، تحقیقات کی قسم، پروب لیبلنگ تکنیک، ہائبر ڈائزیشن مکس اور پتہ لگانے کی حکمت عملی کے بارے میں فیصلے کیے جانے چاہئیں۔ بہت سے انتخاب کرنے ہیں.

22.4.3 بلوٹنگ میمبرین کا انتخاب(Choice of Blotting Membrane)

ایک ٹھوس سپورٹ میٹرکس کا انتخاب جس میں الیکٹر وفورٹیکلی طور پر الگ *RNA* کو ہائبر ڈائزیشن سے پہلے منتقل کیا جاتا ہے، شمالی بلٹ تجزیہ کے ذریعے *RNA* کے مطالعہ میں شامل ایک اہم انتخاب ہے۔اس فیصلے کو اس بات پر غور کرنا چاہیے کہ مختلف میٹرکس مختلف منتقلی

اور متحرک کرنے کی تکنیکوں کو فعال کر سکتے ہیں اور نیوکلک ایسڈز کو باندھنے کی اپنی صلاحیت میں کافی تغیرات کا مظاہرہ کر سکتے ہیں۔ مزید برآں، بہت سے محققین تحقیقاتی ترتیبوں کی بیٹری کا استعمال کرتے ہوئے تحقیقاتی حکمت عملیوں کا اطلاق کرتے ہیں کیونکہ فلٹر پیپر پر آر این اے نمونے کی منتقلی ایک اہم، محنتی کوشش کی اچھی طرح نمائندگی کر سکتی ہے۔ آٹوراڈیو گرافی کے بعد، ہائبرڈائزڈ پروب کو مینوفیکچرر کی طرف سے فراہم کردہ ہدایات کے مطابق ہائی-سٹرینسی واش کا استعمال کرتے ہوئے ہٹایا جاسکتا ہے۔ اس کے بعد فلٹر کو بالکل مختلف تحقیقات کا استعمال کرتے ہوئے دوبارہ ہائبرڈائز کیا جاسکتا ہے۔ لہذا، یہ جاننا ضروری ہے کہ کس قسم کا فلٹر اس طرز عمل کو برداشت کر سکتا ہے۔

22.4.4 Agarose-Formaldehyde جیل الیکٹروفورسس (Agarose-Formaldehyde Gel Electrophoresis)

mRNAs کی طرح، واحد پھنسے ہوئے نیوکلک ایسڈ ثانوی ڈھانچے بنا سکتے ہیں جو مالیکیولز کی الیکٹروفورٹک موبلٹیز کو متاثر کرتے ہیں۔ منحرف شدہ آر این اے کو برقرار رکھنے کے لیے، نمونے کی تیاری بفر، الیکٹروفورسس بفر اور جیل سبھی اعلی درجہ حرارت کی موجودگی میں فارمامائیڈ، فارملڈہائیڈ پر مشتمل ہوتے ہیں۔ بصورت دیگر، ایگرز جیل الیکٹروفورسس اور بلوٹنگ کے طریقے جنوبی بلوٹنگ کے لیے استعمال کیے جانے والے طریقوں سے موازنہ ہیں۔

22.4.5 اقدامات شامل ہیں (Steps Involved)

مرحلہ 1: آر این اے مالیکیول ڈینیچرنگ ایگروز جیل پر چلایا جاتا ہے۔

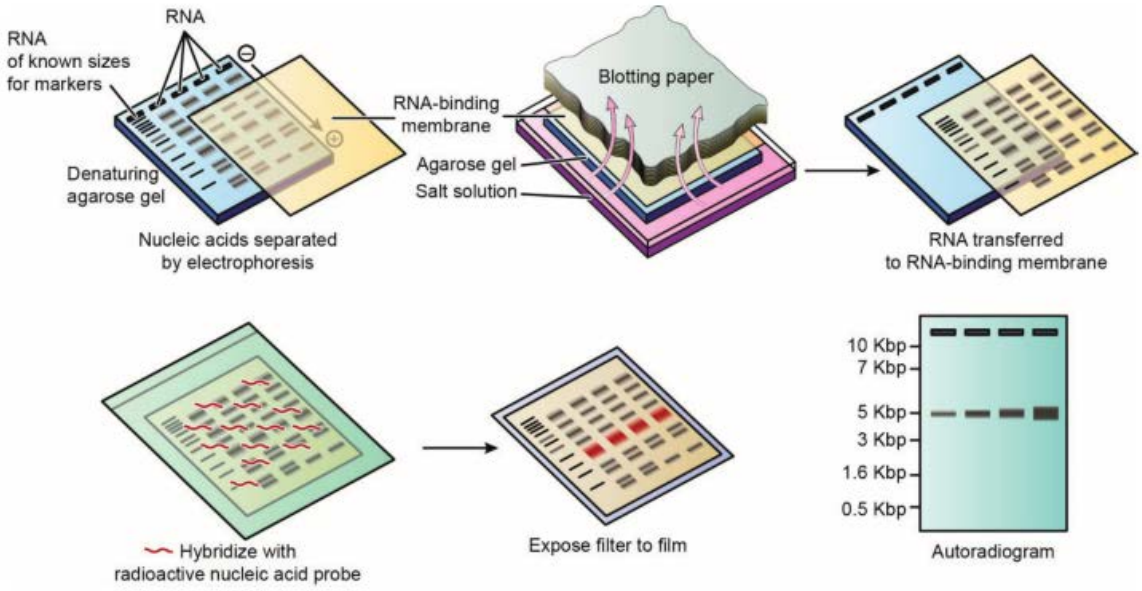
مرحلہ 2: جیل الیکٹروفورسس ٹکڑوں کو الگ کرتا ہے۔ ایتھیڈیم بروماٹڈ کے ساتھ داغ لگانے سے آر این اے مالیکیول کا تصور ممکن ہوتا ہے۔

مرحلہ 3: بلوٹنگ آر این اے بینڈ کو نائٹروسیلوز فلٹر میں منتقل کرتی ہے۔ جیل اور فلٹر ٹرانسفر بفر کو گزرنے اور کاغذ کے تولیے تک پہنچنے دیتے ہیں۔

مرحلہ 4: اس کے نتیجے میں ایک نائٹروسیلوز فلٹر ہوتا ہے جس میں *RNA* کے ٹکڑوں کو جیل سے بالکل ٹھیک منتقل کیا جاتا ہے۔

مرحلہ 5: ایک خاص جین کی تحقیقات جس پر تابکار طریقے سے لیبل لگا ہوا ہے فلٹر کے سامنے ہے۔ ٹرانسکرپٹ تیار ہونے کی صورت میں، تحقیقات *RNA* سے منسلک ہو جائیں گی۔

مرحلہ 6: آٹوراڈیو گرافی کے لیے فلٹر ایکس رے فلم کے سامنے ہے۔ فلم پر ایک بینڈ مطلوبہ جین پر مشتمل ٹکڑے کی شناخت کرتا ہے (شکل 22.3)۔



شکل22.3: شمالی بلوٹنگ میں شامل طریقہ کار کو ظاہر کرنے کے اقدامات

22.4.6 ناردرن بلوٹنگ کی ایپلی کیشنز(Applications of Northern Blotting)

بہت سے حیاتیاتی نمونوں میں جین کو کس طرح منظم کیا جاتا ہے اور کام کرتا ہے اس کے بارے میں ہماری سمجھ جین کے اظہار پر تحقیق سے بہت زیادہ متاثر ہوئی ہے۔ انسانی کینسر کے خلیات اور مہلک اور صحت مند بافتوں میں آر این اے کی سطح کے جین کے اظہار کے نمونے شمالی دھبے کے تجزیے کے ذریعے دریافت کیے جاتے ہیں۔ ریڈیو لیبل والے نیوکلک ایسڈ پروبس اور مالیکیولر ہائبرڈائزیشن کا استعمال کرتے ہوئے مخصوص آر این اے کی ترتیبیں جھلی پر پائی جاتی ہیں۔ شمالی دھبے کا تجزیہ اب بھی ایک آزمائشی اور سچی تکنیک ہے، جو *mRNA* کی سطح کا پتہ لگانے اور ان کی مقدار درست کرنے میں استعمال ہوتی ہے کیونکہ یہ حقیقی وقت جیسی نئی تکنیکوں کی ترقی کے باوجود، ایک ہی جھلی پر نمونوں کے درمیان *mRNA* کی کثرت کا براہ راست موازنہ کرنے کی اجازت دیتی ہے۔ پی سی آر، نیوکلیز پروٹیکشن اسیس اور مائیکرو ورے۔ ناردرن بلوٹنگ ایم آر این اے سپلیسنگ کا مطالعہ کرنے کے لیے بھی ایک مددگار ٹول ہے۔

22.4.7 فوائد اور استعمال(Advantages and Uses)

اسپلائس کی نئی قسمیں، پروسیس شدہ *RNAs* اور نان کوڈنگ *RNAs* سبھی کی شناخت ان کی نسبتا کثرت کے ساتھ شمالی بلوٹنگ کا استعمال کرتے ہوئے کی جاسکتی ہے۔ یہ طریقہ جین کی مخصوص مقدار، اور اظہار کی سطح کو ظاہر کرتا ہے۔ یہ طریقہ تفریق اور مورفوجینیسیس کے مختلف مراحل پر آر این اے ٹرانسکرپٹ میں تبدیلیوں کا تعین کر سکتا ہے۔ مزید برآں، یہ عام، بیمار یا متعدی افراد کی سالماتی کھوج میں مدد کرتا ہے۔

22.5 ویسٹرن بلاٹنگ(Western Blotting)

ویسٹرن بلوٹنگ ایک تجزیاتی تکنیک ہے جو وسیع پیمانے پر ایک پیچیدہ مرکب میں مخصوص پروتینوں کی کھوج، شناخت اور مقدار درست کرنے کے لیے استعمال ہوتی ہے۔اس تکنیک کو 'امیونو بلوٹنگ' بھی کہا جاتا ہے کیونکہ اینٹی باڈیز کو الگ ہونے کے بعد مخصوص اینٹیجنز کا پتہ لگانے کے لیے بطور تحقیقات استعمال کیا جاتا ہے۔ تکنیک میں بنیادی طور پر درج ذیل اہم اقدامات شامل ہیں:

1۔SDS-PAGE(*Sodium dodecyl sulphate– polyacrylamide gel*)الیکٹروفورسس کا استعمال کرتے ہوئے پروٹین کی علیحدگی: لاگو برقی فیلڈ کی موجودگی میں، سیرم کے نمونے میں موجود پروٹین کے مالیکیولز الگ ہو جاتے ہیں کیونکہ ان کی نقل و حرکت کا انحصار ماس اور چارج پر ہوتا ہے۔ کم سالماتی مالیکیول تیزی سے حرکت کرتے ہیں اس کے بعد بڑے ہوتے ہیں۔ جو مالیکیول مثبت طور پر چارج ہوتے ہیں وہ انوڈ کی طرف اور منفی چارج شدہ مالیکیولز کیتھوڈ کی طرف منتقل ہوتے ہیں۔ ایس ڈی ایس (سوڈیم ڈوڈیسائل سلفیٹ، ایک صابن) کا کردار پروٹین کو کھولنا اور منفی چارجز فراہم کرنا ہے۔

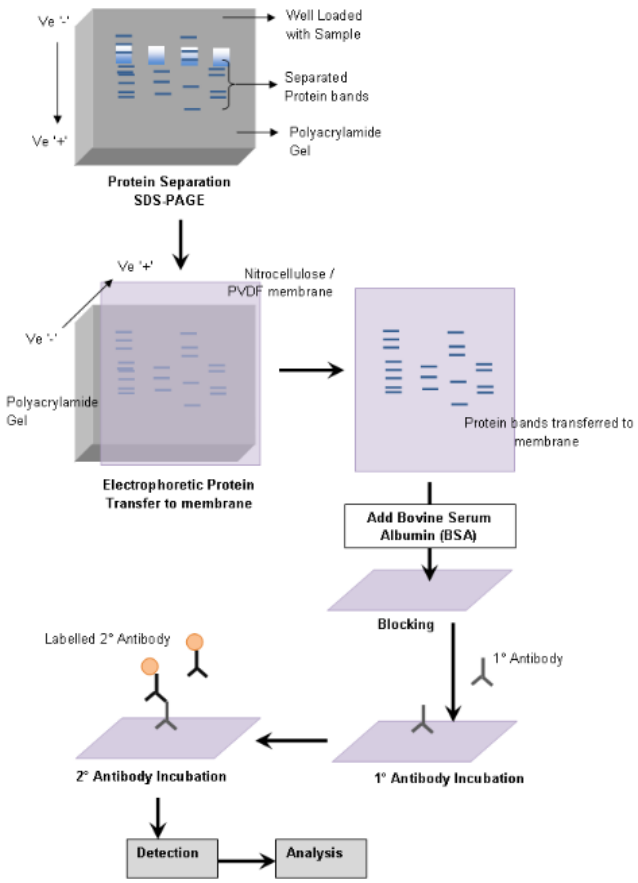
2۔ جیل سے جھلی میں پروٹین کی منتقلی: علیحدہ پروٹین بینڈوں پر مشتمل جیل کو ہٹا کر پروٹین بائنڈنگ جھلی (نائٹروسیلولوز یا پولی وینیلائیڈین فلورائیڈ) میں منتقل کیا جاتا ہے تاکہ مزید تشخیص اور تجزیہ کیا جا سکے۔ منتقلی ایک لاگو برقی فیلڈ کی موجودگی میں ہوتی ہے جسے ممکن بنایا جاتا ہے کیونکہ جیل میں موجود تمام پروٹینز منفی طور پر چارج ہوتے ہیں (الیکٹروفورٹک ٹرانسفر)۔

3۔ غیر مخصوص بائنڈنگ کی روک تھام: چونکہ اینٹی باڈیز بھی ہیں۔

پروٹین، وہ جھلی پر کہیں بھی باندھ سکتے ہیں۔ یہ تجزیہ کی مخصوصیت اور حساسیت میں خلل ڈال سکتا ہے۔ بوائین سیرم البومین (*BSA*) جیسے بلاک کرنے والے ایجنٹ کو شامل کر کے اینٹی باڈیز کی غیر مخصوص پابندی سے بچا جا سکتا ہے تاکہ پروٹین بینڈ کو چھوڑ کر تمام جگہوں پر قبضہ کر لیا جائے۔

4۔اینٹی باڈی پروبنگ: جھلی کو بنیادی اینٹی باڈیز کے ساتھ انکیوبیٹ کیا جاتا ہے جو جھلی کے بینڈز میں واقع مخصوص اینٹی باڈیز کو نشانہ بنائے گی۔ لیبل والے ثانوی اینٹی باڈیز کو شامل کرنے سے پہلے اضافی بنیادی اینٹی باڈیز کو دھویا جاتا ہے۔ ثانوی اینٹی باڈی پہلے سے پابند بنیادی اینٹی باڈیز سے منسلک ہوتی ہے۔ دلچسپی کے اینٹی باڈی کا پتہ لگانے میں مدد کرنے کے علاوہ، ثانوی اینٹی باڈیز پتہ لگانے کے سگنل کو بڑھا کر پرکھ کی حساسیت کو بھی بڑھاتی ہیں۔ اضافی ثانوی اینٹی باڈیز بھی دھل جاتی ہیں۔

5۔ جھلی پر پروٹین کا پتہ لگانا (بلاٹنگ): ثانوی اینٹی باڈیز پر موجود لیبل کی قسم کی بنیاد پر پتہ لگایا جاتا ہے۔ اگر لیبل ایک انزائم ہے، تو انزائم-سبسٹریٹ کا ردعمل(*ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)*کا استعمال کرتے ہوئے متعلقہ اینٹی باڈی کی جگہ پر رنگین ناقابل حل پروڈکٹ دے گا۔ کیمیلومینیسینٹ یا ریڈیو لیبل والی ثانوی اینٹی باڈیز کو بھی مناسب آلات سے پتہ لگانے کے لیے استعمال کیا جا سکتا ہے۔



ویسٹرن بلٹ امیج کو دیکھنے میں عام طور پر کیمیلو مینیسینس امیجنگ سسٹم کا استعمال شامل ہوتا ہے، جیسے کہ سی سی ڈی کیمرہ پر مبنی امیجر یا فلم پر مبنی آٹوراڈیو گرافی سسٹم۔ ویسٹرن بلٹ امیج کو دیکھنے کے طریقے کے بارے میں یہاں ایک عمومی گائیڈ ہے:

1. دھبہ تیار کریں: مغربی بلوٹنگ کے طریقہ کار کو مکمل کرنے اور کیمیلو مینیسنٹ کا پتہ لگانے کے مرحلے کو انجام دینے کے بعد، اس بات کو یقینی بنائیں کہ دھبہ امیجنگ کے لیے تیار ہے۔ اضافی سبسٹریٹ محلول کو ہٹا دیں اور کسی بھی بقایا کیمیکل کو ہٹانے کے لیے جھلی کو آست پانی سے دھوئیں جو امیجنگ میں مداخلت کر سکتے ہیں۔

2. امیجنگ سسٹم سیٹ اپ کریں: کیمیلو مینیسینس امیجنگ سسٹم کو آن کریں اور اگر ضروری ہو تو اسے گرم ہونے دیں۔ امیجنگ پیرامیٹرز ترتیب دینے کے لیے مینوفیکچرر کی ہدایات پر عمل کریں، بشمول نمائش کا وقت، بیرچر، اور فوکس۔ اس بات کو یقینی بنائیں کہ کیمیلو مینسنٹ کا پتہ لگانے کے لیے امیجنگ سسٹم کو مناسب طریقے سے کیلیبریٹ کیا گیا ہے۔

3. بلاٹ لگائیں: ویسٹرن بلٹ میمبرین کو احتیاط سے سسٹم کی امیجنگ سطح پر رکھیں، اس بات کو یقینی بناتے ہوئے کہ یہ چپٹا ہے اور جھریوں یا ہوا کے بلبلوں سے پاک ہے۔ جھلی کو اس طرح رکھیں کہ دلچسپی کے پروٹین بینڈ امیجنگ فیلڈ کے مرکز میں ہوں۔

4. تصویر کیپچر کریں: امیجنگ سافٹ ویئر شروع کریں اور کیمیلو مینسنٹ کا پتہ لگانے کے لیے مناسب امیجنگ موڈ منتخب کریں۔

کیمیلومینسنٹ سگنل کی شدت اور امیجنگ سسٹم کی حساسیت کی بنیاد پر نمائش کا وقت مقرر کریں۔ عام طور پر، اس بات کو یقینی بنانے کے لیے متعدد ایکسپوژرز ضروری ہو سکتے ہیں کہ تمام بینڈز بغیر سنترپتی کے مناسب طریقے سے پکڑے جائیں۔

5. تصویری حصول: تصویر کے حصول کے عمل کو شروع کریں، جس سے امیجنگ سسٹم کو جھلی پر پروٹین بینڈز کے ذریعے خارج ہونے والے کیمیلومینسینٹ سگنل کو حاصل کرنے کی اجازت ملتی ہے۔ ریئل ٹائم میں امیج کے حصول کی پیشرفت کی نگرانی کریں اور اگر سگنل ٹو شور کے تناسب کو بہتر بنانے اور سنترپتی کو روکنے کی ضرورت ہو تو نمائش کی ترتیبات کو ایڈجسٹ کریں۔

6. تصویر کو محفوظ کریں: تصویر کا حصول مکمل ہونے کے بعد، اس بات کو یقینی بنانے کے لیے کیپچر کی گئی تصویر کا جائزہ لیں کہ تمام پروٹین بینڈ واضح طور پر دکھائی دے رہے ہیں اور مناسب طریقے سے سامنے آئے ہیں۔ مزید تجزیہ اور دستاویزات کے لیے تصویر کی فائل کو مناسب فارمیٹ میں محفوظ کریں (جیسے، *JPEG*، *TIFF*)۔

7. تجزیہ اور تشریح: پروٹین بینڈز کی شدت کا اندازہ لگانے، نمونوں کے درمیان اظہار کی سطح کا موازنہ کرنے اور کثافت کا تجزیہ کرنے کے لیے تصویری تجزیہ سافٹ ویئر استعمال کریں۔ تجرباتی مقاصد کے تناظر میں نتائج کی تشریح کریں اور مناسب کنٹرولز اور معیارات کے ساتھ نتائج کی توثیق کریں۔

ان اقدامات پر عمل کرتے ہوئے، آپ کیمیلومینیسینس امیجنگ سسٹم کا استعمال کرتے ہوئے ایک مغربی دھبے کی تصویر کو مؤثر طریقے سے تصور کر سکتے ہیں، حیاتیاتی نمونوں میں پروٹین کے اظہار کے نمونوں کے تجزیہ اور تشریح میں سہولت فراہم کرتے ہیں۔

22.6 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں (Suggested Books for Further Readings)

1. Brown TA. (2010). Gene Cloning and DNA Analysis. 6th edition. Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
2. Cappucino J and Sherman N. (2010). Microbiology: A Laboratory Manual. 9th edition. Pearson Education Limited.
3. 3. Sambrook J and Russell D. (2001). Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Wiley JM, Sherwood LM and Woolverton CJ. (2013) Prescott's Microbiology. 9 th Edition. McGraw Hill International.

پریکٹیکل ریکارڈ شیٹ(Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

اکائی 23: مطالعہ ڈی این اے کی ترتیب، سینجر کا طریقہ اور تصاویر کے ذریعے ڈی این اے فنگر پرنٹنگ تکنیک

[To study DNA Sequencing, Sanger's Method And DNA fingerprinting Techniques Through Photographs]

اکائی کے اجزا

23.0 تعارف(Introduction)

23.1 مقاصد(Objectives)

23.2 اصول(Principle)

23.3 ڈی این اے کی ترتیب کے طریقے(Methods of DNA Sequencing)

23.4 سنجر کا طریقہ(Sanger's Method)

23.5 میکسم اور گلبرٹ طریقہ(Maxam and Gilbert Method)

23.6 پائروسیکونسنگ(PYROSEQUENCING)

23.7 خودکار ڈی این اے کی ترتیب(Automated DNA Sequence)

23.7.1 جینوم کی ترتیب کا شاٹگن طریقہ(Shotgun Method of Genome Sequencing)

23.8 ڈی این اے فنگر پرنٹنگ(DNA Fingerprinting)

23.8.1 تعریف(Introduction)

23.8.2 ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کا عمل(Process of DNA Fingerprinting)

23.8.3 آر ایف ایل پی تجزیہ RFLP analysis

23.8.4 پی سی آر پر مبنی تجزیہ(PCR Analysis)

23.8.5 RT-PCR پر مبنی تجزیہ

23.8.6 جانوروں میں ڈی این اے فنگر پرنٹنگ(DNA Fingerprinting in Animals)

23.9 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

23.0 تعارف(Introduction)

ڈی این اے مالیکیولز میں انکوڈ شدہ جینیاتی معلومات کی وضاحت جدید حیاتیاتی تحقیق کا سنگ بنیاد رہی ہے، جو مالیکیولر بائیولوجی سے لے کر فرانزک تک کے شعبوں میں انقلاب برپا کرتی ہے۔ڈی این اے کی پیچیدگیوں سے پردہ اٹھانے کے لیے تیار کی گئی بے شمار تکنیکوں میں سے، ڈی این اے کی ترتیب، سینجر کا طریقہ، اور ڈی این اے فنگر پرنٹنگ جینیاتی کوڈز کو سمجھنے، ارتقائی تعلقات کو واضح کرنے، اور فرانزک اسرار کو حل کرنے کے لیے اہم ٹولز کے طور پر نمایاں ہیں۔

یہ عملی باب ڈی این اے کی ترتیب، سینجر کے طریقہ کار، اور ڈی این اے فنگر پرنٹنگ تکنیکوں کی ایک عمیق تحقیق کے طور پر کام کرتا ہے، جس میں تصویروں کے ذریعے سہولت فراہم کیے گئے بصری سفر کے ذریعے اضافہ کیا گیا ہے۔ ان میں سے ہر ایک تکنیک مالیکیولر بائیولوجی کی تاریخ میں ایک اہم سنگ میل کی نمائندگی کرتی ہے، جو ڈی این اے مالیکیولز کی ساخت، فنکشن اور تنوع میں منفرد بصیرت پیش کرتی ہے۔

ڈی این اے کی ترتیب جینیاتی کوڈ کو سمجھنے کے مرکز میں ہے، جو محققین کو ڈی این اے مالیکیول کے اندر نیوکلیوٹائڈس کی درست ترتیب کا تعین کرنے کے قابل بناتی ہے۔ڈی این اے کی بنیادوں کی ترتیب کو کھول کر، سائنسدان بے مثال درستگی کے ساتھ جین، جینوم اور جینیاتی تغیرات کے رازوں کو کھول سکتے ہیں۔ ہینڈ آن مظاہروں اور بصری امداد کے ذریعے، اس باب کا مقصد ڈی این اے کی ترتیب کے بنیادی اصولوں اور طریقہ کار کو بے نقاب کرنا، محققین اور طالب علموں کو جینوم کے اندر انکوڈ شدہ رازوں کو کھولنے کے لیے بااختیار بنانا ہے۔

سنجر کا طریقہ، فریڈرک سینجر نے 1970 کی دہائی میں تیار کیا، ڈی این اے کی ترتیب دینے والی ٹیکنالوجی میں ایک تاریخی پیشرفت کی نمائندگی کرتا ہے۔اس طریقہ کار نے مخصوص بنیادوں پر ختم ہونے والے ڈی این اے کے ٹکڑوں کی ترکیب کے ذریعے ڈی این اے کی ترتیب کے درست تعین کو قابل بنا کر میدان میں انقلاب برپا کر دیا۔ سینجر کے اہم کام کے نقش قدم کو پیچھے ہٹاتے ہوئے، شرکاء ان اصولوں اور تکنیکوں کی گہری سمجھ حاصل کریں گے جو جدید ڈی این اے کی ترتیب کے طریقہ کار کی بنیاد رکھتے ہیں۔

ڈی این اے فنگر پرنٹنگ، جس کا آغاز 1980 کی دہائی میں سر ایلک جیفریز نے کیا تھا، نے فرانزک سائنس اور پیٹرنٹی ٹیسٹنگ کو تبدیل کر دیا ہے، جو افراد کو ان کے ڈی این اے کے اندر منفرد نمونوں کی بنیاد پر شناخت کرنے کے لیے ایک طاقتور ٹول پیش کرتا ہے۔ پولیمریز چین ری ایکشن (PCR) ایمپلیفیکیشن اور جیل الیکٹروفورسس کے امتزاج کے ذریعے، ڈی این اے فنگر پرنٹنگ جینیاتی پروفائلز کا موازنہ، خاندانی تعلقات، مجرمانہ تحقیقات، اور ارتقائی مطالعات پر روشنی ڈالنے کے قابل بناتا ہے۔

اس پورے عملی باب کے دوران، شرکاء ایک بصری سفر کا آغاز کریں گے، جس میں تجرباتی سیٹ اپ، طریقہ کار، اور DNA کی ترتیب کے نتائج، سنجر کا طریقہ، اور DNA فنگر پرنٹنگ تکنیکوں کی وضاحت کرنے والی تصاویر کی رہنمائی ہو گی۔ خود کو ان بصری بیانیوں میں غرق کر کے، شرکاء ان تبدیلی کی سالماتی حیاتیات کی تکنیکوں کے اصولوں، اطلاقات اور اہمیت کے بارے میں اپنی سمجھ کو گہرا کریں گے۔

بالآخر، ڈی این اے کی ترتیب، سینجر کے طریقہ کار، اور ڈی این اے فنگر پرنٹنگ تکنیک کی اس بصری تحقیق کا مقصد تجسس کو فروغ

دینا، سیکھنے کو فروغ دینا، اور افراد کو بااختیار بنانا ہے کہ وہ جینیاتی کوڈ کے اسرار کو کھولنے میں مالیکیولر بائیولوجی کی طاقت کو بروئے کار لائیں اور اس میں اس کے بے شمار اطلاقات سائنس اور معاشرہ۔

23.1 مقاصد(Objectives)

اس پریکٹیکل یونٹ کی تکمیل کے بعد طالب علم اس قابل ہو جائے گا۔

- ڈی این اے کی ترتیب، سنجر کا طریقہ، اور ڈی این اے فنگر پرنٹنگ تکنیک کے بنیادی اصولوں کو سمجھنے کے لیے۔
- شرکاء کو تجرباتی سیٹ اپ، آلات اور ہر تکنیک کے لیے درکار مواد سے واقف کرانا۔
- ڈی این اے کی ترتیب، سنجر کا طریقہ، اور ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کے تجربات کرنے میں شامل مرحلہ وار طریقہ کار سیکھنے کے لیے۔
- نمونے کی تیاری، ڈی این اے ایمپلیفیکیشن، جیل الیکٹروفورسس، اور ہر طریقہ سے وابستہ ڈیٹا تجزیہ تکنیک میں مہارت پیدا کرنے کے لیے۔
- ڈی این اے سیکوینسنگ کرومیٹوگرامس، جیل الیکٹروفورسس پیٹرنز، اور ڈی این اے فنگر پرنٹنگ پروفائلز کی ترجمانی کرنے کا تجربہ حاصل کرنے کے لیے۔
- ڈی این اے کی ترتیب، سنجر کا طریقہ، اور ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کے تجربات کے دوران پیش آنے والے عام مسائل کو حل کرنے کی مشق کرنے کے لیے۔
- ڈی این اے کی ترتیب، سنجر کے طریقہ کار، اور ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کی تکنیکوں کو مختلف شعبوں بشمول مالیکیولر بائیولوجی، فرانزکس اور جینیات کے اطلاقات اور حدود کو سمجھنے کے لیے۔
- ان تکنیکوں کو مخصوص تحقیقی سوالات اور مقاصد کے مطابق ڈھالنے کے لیے تنقیدی سوچ اور تجرباتی ڈیزائن کی مہارتوں کو فروغ دینا۔

23.2 اصول(Principle)

عام اصول داغ لگانے کے طریقے کافی آسان ہیں اور عام طور پر چار الگ الگ مراحل پر مشتمل ہوتے ہیں: نمونے میں پروٹین یا نیوکلک ایسڈ کے ٹکڑوں کی الیکٹروفورٹک علیحدگی؛ منتقلی اور کاغذی مدد پر متحرک ہونا؛ کاغذ پر مالیکیول کو نشانہ بنانے کے لیے تجزیاتی تحقیقات کا پابند؛ اور پابند تحقیقات کا تصور۔ نمونے میں مالیکیولز کو پہلے الیکٹروفورسس کے ذریعے الگ کیا جاتا ہے اور پھر آسانی سے سنبھالے جانے والے سپورٹ میڈیم یا جھلی میں منتقل کیا جاتا ہے۔ یہ پروٹین یا ڈی این اے کے ٹکڑوں کو متحرک کرتا ہے، اصل علیحدگی کی ایک وفادار نقل فراہم کرتا ہے، اور بعد میں بائیو کیمیکل تجزیہ کی سہولت فراہم کرتا ہے۔ سپورٹ میڈیم میں منتقل ہونے کے بعد متحرک پروٹین یا نیوکلک ایسڈ کا ٹکڑا پروبس، جیسے اینٹی باڈیز یا ڈی این اے کے استعمال سے مقامی کیا جاتا ہے، جو خاص طور پر دلچسپی کے مالیکیول سے منسلک ہوتے ہیں۔ آخر میں،

تحقیقات کی پوزیشن جو غیر متحرک ہدف مالیکیول سے منسلک ہے عام طور پر آٹوراڈیو گرافی کے ذریعے تصور کی جاتی ہے۔ بلوٹنگ کی تین اہم تکنیکیں تیار کی گئی ہیں اور جنہیں عام طور پر سدرن، ناردرن اور ویسٹرن بلوٹنگ کہا جاتا ہے۔

ڈی این اے، آر این اے اور پروٹین کے ٹکڑوں کے مرکب کو جیل الیکٹروفورسس کے ذریعے الگ کیا جاسکتا ہے۔ اس کے علاوہ، الگ کیے گئے جیل بینڈ کو مخصوص رنگوں سے داغ دیا جاسکتا ہے اور ان کا مطالعہ کیا جاسکتا ہے۔ ان بینڈز کی شناخت کی تصدیق ایک معروف مالیکیولر پروب کے ذریعے کی جاسکتی ہے جو کہ ایک یا زیادہ بینڈز سے مماثلت کو ظاہر کرتا ہے۔ الگ کیے گئے بینڈوں کو جیل کے اندر موجود تحقیقات کا استعمال کرتے ہوئے ہائبرڈائز کیا جاسکتا ہے۔ پروبس کا استعمال کرتے ہوئے ہائبرڈائزیشن بینڈوں کو نائٹروسیلوز جھلی میں منتقل کرنے کے بعد کی جاتی ہے۔ بلوٹنگ سے مراد بینڈز کو جھلی پر منتقل کرنا اور پھر انہیں ایک مخصوص پروب کے ساتھ ہائبرڈائز کرنا ہے۔ ایک نمونے میں، سدرن بلوٹنگ مخصوص ڈی این اے کی ترتیب کا پتہ لگاتی ہے، ناردرن بلوٹنگ مخصوص آر این اے کی ترتیب کا پتہ لگاتی ہے، اور ویسٹرن بلوٹنگ مخصوص پروٹین کی ترتیب کا پتہ لگاتی ہے۔ نتیجے کے طور پر، تین بلوٹنگ تکنیکوں کے درمیان بنیادی فرق میکرومولیکول قسم ہے جس کا وہ پتہ لگاتے ہیں۔

23.3 ڈی این اے کی ترتیب کے طریقے (Methods of DNA Sequencing)

ڈی این اے مالیکیول میں موجود نائٹروجن بیسز کی ترتیب کو جاننا ہمیشہ دلچسپ اور دلچسپ ہوتا ہے۔ ڈی این اے کی ترتیب کی یہ معلومات اتپریورتنوں، پولیمورفزم کو سمجھنے اور مختلف حالات میں ڈی این اے کے اظہار کو منظم کرنے والے بعض جینوں کی شناخت میں بہت زیادہ مددگار ہے۔ ڈی این اے کی ترتیب کو انجام دینے کے دو مشہور طریقے انزیمیٹک طریقہ ہیں جو محققین کے ذریعہ بڑے پیمانے پر استعمال ہوتے ہیں اور اس کا نام اس کے ڈویلپر سنجر کے نام پر رکھا گیا ہے۔ ایک اور طریقہ جو کیمیکل طریقہ کے نام سے جانا جاتا ہے جو میکسم اور گلبرٹ نامی سائنسدانوں نے تیار کیا ہے، اس لیے ان کے نام پر یہ طریقہ رکھا گیا۔ انزیمیٹک اور کیمیائی دونوں طریقے 1977 میں تیار کیے گئے تھے۔ ان دنوں کمرشل کٹس جو استعمال ہوتی ہیں۔

انجام *DNA* ترتیب *enzymatic* طریقہ پر مبنی ہیں. دونوں طریقوں میں بنیادی اصول ڈی این اے کی ترتیب کو لیبل والے ٹکڑوں کے چار سیٹوں میں کم کرنا ہے۔

تاہم، اسکریننگ کے ذریعے پی سی آر اور دیگر کے آغاز سے ڈی این اے کی ترتیب کے میدان میں زبردست تبدیلیاں آئیں۔ یہ جدید تجزیاتی تکنیک ڈی این اے کی ترتیب کو انجام دینے میں لگنے والے وقت اور محنت دونوں کو کم کرتی ہے۔ اس سیکشن میں ہم ڈی این اے کی ترتیب کے لیے استعمال ہونے والی کچھ تکنیکوں کا جائزہ لیں گے۔

23.4 سنجر کا طریقہ (Sanger's Method)

یہ طریقہ انزائم پولیمریز کی قدرتی صلاحیت کی بنیاد پر تیار کیا گیا ہے لہذا یہ طریقہ کئی طریقوں سے ڈی این اے کی ترکیب کے قدرتی

عمل کی نقل کرتا ہے۔اس طریقہ کار کو انجام دینے کے لیے بنیادی ضروریات میں سے ایک واحد پھنسے ہوئے DNA کا ہونا ہے۔ واحد پھنسے ہوئے ڈی این اے کی یہ ضرورت پی سی آر تکنیک کے ذریعے حاصل کی جاتی ہے۔ پی سی آر تکنیک کی دستیابی سے پہلے محققین واحد پھنسے ہوئے ڈی این اے کی تیاری کے لیے M13 نامی بیکٹیریو فیج ویکٹر استعمال کرتے تھے۔۔

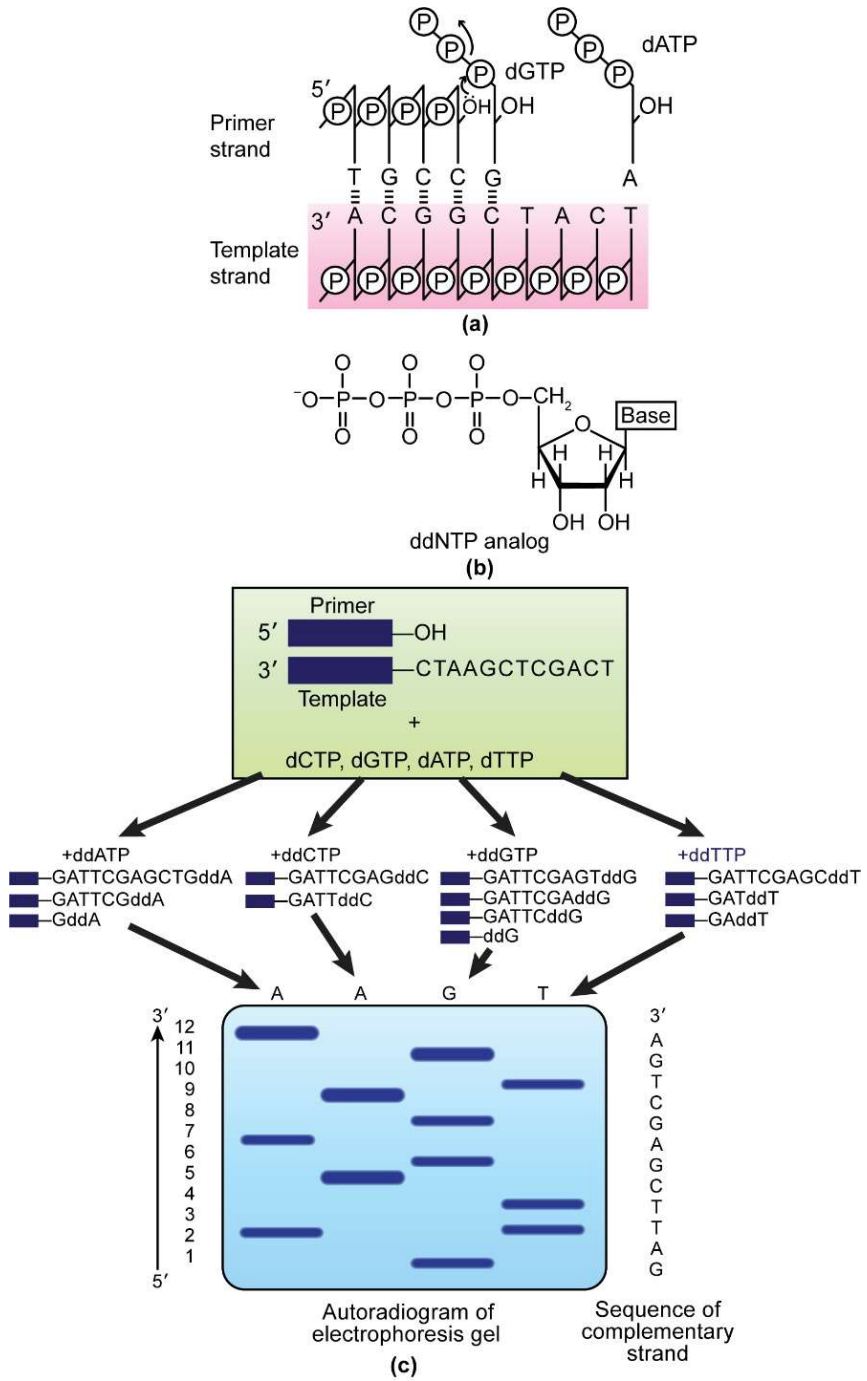
یادرکھنے کے لیے نکات:

اس طریقہ کار کا کلیدی پہلو ڈیوکسی نیوکلیوسائیڈ ٹرائی فاسفیٹ (ڈی این ٹی پی) کے بجائے ڈائی آکسی نیوکلیوسائیڈ ٹرائی فاسفیٹ (ddNTP) کا استعمال ہے۔اس لیے یہ طریقہ ڈیڈیوکسی طریقہ کے نام سے بھی جانا جاتا ہے۔ddNTP کی موجودگی DNA کی ترتیب کی توسیع کو ختم کردے گی کیونکہ مفت 3'-OH گروپ کی کمی ہے۔

ٹارگٹ ڈی این اے کو ترتیب دینے کے لیے ٹیمپلیٹ اسٹرینڈ کے طور پر استعمال کیا جاتا ہے اور اسے 3' آخر (3'-OH) پر فری ہائیڈروکسیل گروپ کے ساتھ پرائمر کی ایک ریڈیو لیبل یا فلوروسینٹ مختصر ترتیب (تصویر 9.1 کا حوالہ دیں) کے ساتھ اینیل کیا جاتا ہے۔

ddNTPs میں سے ہر ایک کے لئے چار مختلف انفرادی سیٹ اپ میں رد عمل کیا جاتا ہے۔رد عمل کا مرکب dNTPs، ddNTPs اور DNA پولیمریز پر مشتمل ہوتا ہے۔

جیل الیکٹروفورسس کے تحت حاصل کیے گئے ڈی این اے کے چھوٹے ٹکڑے آٹوڈیوگرافی کے ذریعے آتے ہیں۔ جیل کا آٹوریڈیوگرام 5' سے 3' بنیادی سمت (نیچے سے اوپر) تک پڑھا جاتا ہے۔ یہ نوٹ کرنا ضروری ہے کہ حاصل کردہ ترتیب ٹارگٹ اسٹرینڈ کے لیے تکمیلی ہے۔

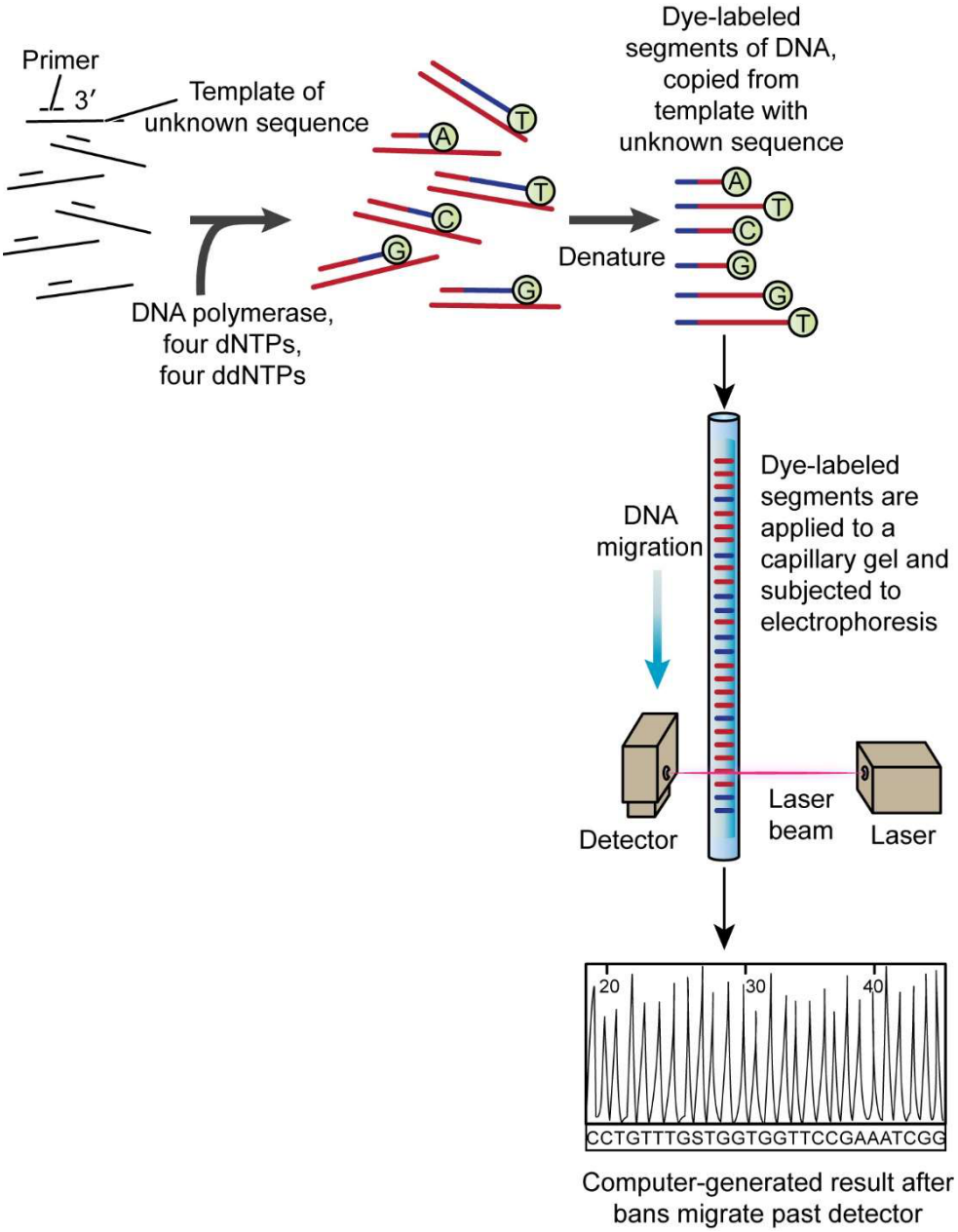


شکل 23.1: ڈی این اے کی ترتیب کا سینجر زڈیوڈ آکسی طریقہ

نئ تکنیکوں اور حکمت عملیوں کی ترقی کے ساتھ سنجر کا طریقہ کار خود کار ہو گیا ہے (شکل 23.2)۔ سنجر کے اس ترمیم شدہ طریقہ میں ہر ڈی ڈی این ٹی پی پر فلورو سینٹ مالیکیول کے 4 مختلف رنگوں کا لیبل لگا ہوا ہے۔

یہ خصوصیت محقق کو مختصر وقت میں تیزی سے تجزیہ کرنے کے قابل بناتی ہے۔

حاصل کردہ رنگین ڈی این اے کے ٹکڑوں کو سنگل ٹیوب جیل الیکٹروفورسس پر الگ کرنے کی اجازت ہے جو فلوروسینٹ ڈیٹیکٹر سے وابستہ ہے۔ ریکارڈر کے ذریعے جمع کی گئی معلومات کا کمپیوٹر کے ذریعے تجزیہ کیا جائے گا اور متعلقہ ثقافتی چوٹیوں کو پیدا کیا جائے گا۔ ڈی این اے کی ترتیب کے اس تجزیے کی وجہ سے وہ الگ ہو رہے ہوتے ہیں۔ اس طریقہ سے انسانی جینوم پروجیکٹ کو 2001 میں مکمل کرنے کی اجازت ملی

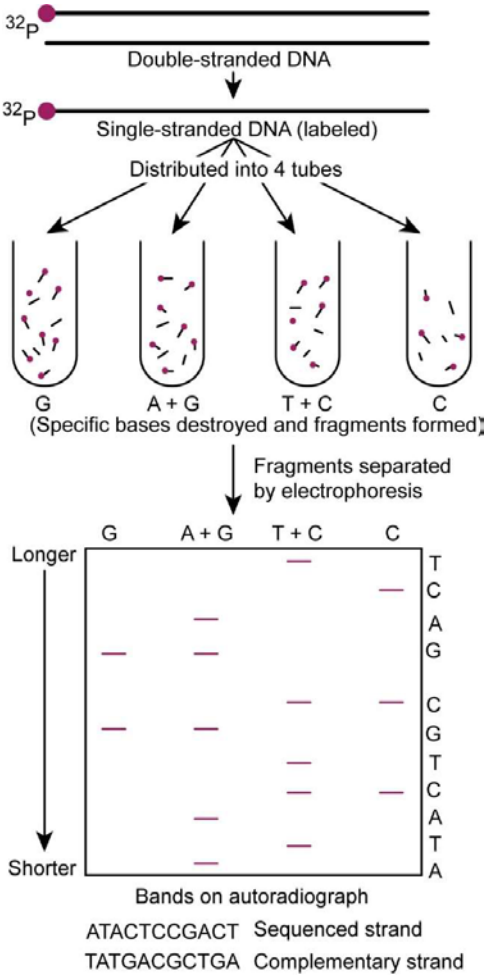


شکل23.2:خودکار سنجر کا طریقہ

23.5 میکسم اور گلبرٹ طریقہ (Maxam and Gilbert Method)

ال 1977 میں، میکسم اور گلبرٹ نے کیمیائی ترتیب کا طریقہ تیار کیا جس میں 4 نائٹروجن بیسز کی سلیکٹیو کلیوج شامل تھی۔ اس کیمیائی عمل کو انجام دینے سے ڈی این اے کو مختلف ٹکڑوں میں الگ کیا جاتا ہے ان ٹکڑوں کو جیل الیکٹروفورسس میں ان کے سائز کی بنیاد پر الگ کیا جاتا ہے۔

اس طریقہ کار میں ڈی این اے کے ایک سرے پر ^{32}P کا لیبل لگایا جاتا ہے، یہ دونوں ڈی این اے الگ الگ کھڑے ہوتے ہیں اور چار انفرادی ٹیسٹ ٹیوبوں میں منتقل ہوتے ہیں۔ جہاں کیمیائی ریجنٹس دستیاب ہیں جو خاص طور پر G، $A+G$، $T+C$ اور C نائٹروجن بیسز کو تباہ کر سکتے ہیں۔ پھر حاصل کیے گئے ڈی این اے کے ٹکڑے جیل الیکٹروفورسس (تصویر 9.3) کے ذریعے الگ کیے جاتے ہیں۔ آخر کار، آٹوڈیوگرافی کا استعمال کرتے ہوئے ان بینڈز کا پتہ چلا۔ ڈی این اے کا نیوکلیوٹائڈس ترتیب الیکٹروفورسس میں حاصل کردہ بینڈوں کی بنیاد پر بنایا گیا ہے۔



شکل 23.3: میکسم اور گلبرٹ ڈی این اے کی ترتیب کا طریقہ

مندرجہ بالا ڈی این اے کی ترتیب کے طریقوں کے علاوہ کچھ اور تکنیکیں ہیں جیسے خود کار ڈی این اے سیکوینسنگ جو سیکوینسر، پی سی آر پر مبنی ڈی این اے سیکوینسنگ اور واکنگ میتھڈ کے ذریعے ڈی این اے سیکوینسنگ کے ذریعے انجام دی جاتی ہے۔

23.6 پائروسیکونسنگ(PYROSEQUENCING)

ابھی تک آپ سنجر اور میکسم اور گلبرٹ کے طریقوں سے ڈی این اے کی ترتیب کا مطالعہ کر چکے ہیں۔اب آنے والے حصے میں آپ pyrosequencingاور اس کے فوائد سیکھیں گے۔

حالیہ دنوں میں Pyrosequencing DNA کی ترتیب دینے والی ٹیکنالوجی کی دوسری سب سے عام شکل کے طور پر ابھری ہے۔ Pyrosequencing سلسلہ ختم کرنے کی ترتیب سے زیادہ تیز ہے کیونکہ اس کے لیے الیکٹروفورسس یا کسی دوسرے ٹکڑے کو الگ کرنے کے طریقوں کی ضرورت نہیں ہے جس کا پچھلے سیکشن میں مطالعہ کیا گیا ہے۔ یہ طریقہ صرف ایک تجربے میں 150bp تک پیدا کر سکتا ہے اور یہ سلسلہ ختم کرنے کے نقطہ نظر سے کم موثر معلوم ہوتا ہے۔ لہذا جب مقصد مکمل جینوم کو ترتیب دینا ہوتا ہے تو کم موثر دکھائی دیتا ہے۔

تاہم، pyrosequencing کا فائدہ یہ ہے کہ اسے بڑے پیمانے پر متوازی فیشن میں میکانائز کیا جا سکتا ہے، جس سے ایک ہی بار میں سیکڑوں ہزاروں سیکوینس حاصل کیے جا سکتے ہیں (شاید ایک ہی دوڑ میں 1000Mb تک)۔ نتیجے کے طور پر، سلسلہ ختم ہونے کے نقطہ نظر سے کہیں زیادہ تیزی سے تیار ہوتا ہے۔ یہی وجہ ہے کہ پائروسیکنسنگ دوسرے طریقوں کے مقابلے میں بتدریج مقبولیت حاصل کر رہی ہے۔

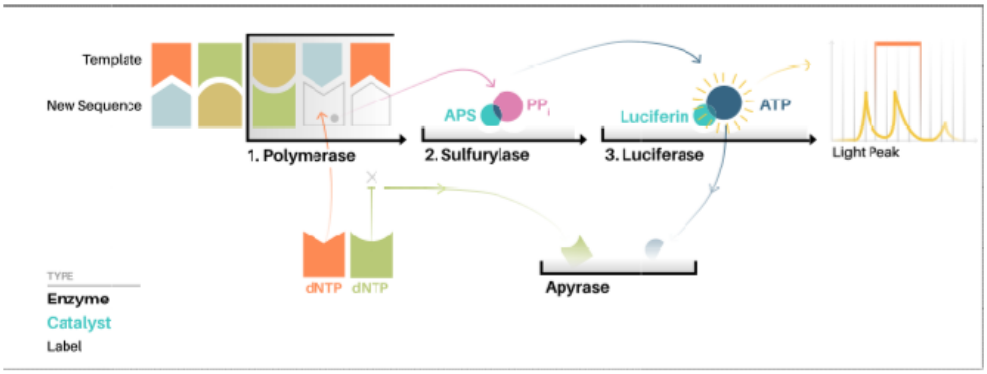
اصول اور کام کرنے کا طریقہ کار:

کیمیلومینیسینٹ دالوں کا پتہ لگانا پائروسیکینسنگ کے پیچھے کام کرنے والا اصول ہے۔ پیروسیکوینسنگ میں، سنجر کے طریقہ کار کی طرح ایک جیسے واحد پھنسے ہوئے ڈی این اے مالیکیولز کو ابتدائی مواد کے طور پر تیار کرتا ہے۔ یہ واحد پھنسے ہوئے ڈی این اے مالیکیول الکلی ہائیڈولیسس کے ذریعے حاصل کیے جاتے ہیں۔ یہ طریقہ بڑے پیمانے پر پی سی آر مصنوعات اور ریکومبینینٹ پلاسمڈ ڈی این اے کے تجزیہ کے لیے استعمال ہوتا ہے۔ ایک بار جب پرائمر منسلک ہو جاتا ہے، ٹیمپلیٹ کے ساتھ DNA پولیمریز ڈپلیکیٹ DNA اسٹرینڈ کی ترکیب مکمل کرتا ہے۔ جس ترتیب میں deoxynucleotides کو مربوط کیا جاتا ہے اس کا پتہ اس وقت ہوتا ہے جب نیا اسٹرینڈ بنتا ہے، جس سے رد عمل کے آگے بڑھنے کے ساتھ ترتیب کو "پڑھا" جانے کی اجازت ملتی ہے۔

"ترقی پذیر اسٹرینڈ کے آخر میں ڈیوکسی نیوکلیوٹائڈ کا اضافہ قابل مشاہدہ ہے کیونکہ اس کے ساتھ پائروفاسفیٹ کے مالیکیول کا اخراج ہوتا ہے، جو انزائم سلفیوریلیس کے ذریعے کیمیلومینیسینس کے فلیش میں تبدیل ہو سکتا ہے"۔

لہٰذا ہر ایک ڈی آکسینیوکلیوٹائڈ کو ایک وقت میں شامل کیا جاتا ہے، ایک نیوکلیوٹائڈ یا انزائم کے ساتھ رد عمل کے مرکب میں موجود ہوتا ہے تاکہ اس بات کو یقینی بنایا جا سکے کہ اگر کوئی ڈیوکسینیوکلیوٹائڈ پولی نیوکلیوٹائڈ میں ضم نہیں ہوتا ہے، تو اسے اگلا شامل کرنے سے پہلے

فوری طور پر تباہ کر دیا جاتا ہے (تصویر 23.4)۔ یہ طریقہ آپ کو اس ترتیب کو ٹریک کرنے کی اجازت دیتا ہے جس میں ڈیوکسینیوکلیوٹائڈز ترقی پذیر اسٹرینڈ میں ضم ہوتے ہیں۔



تصویر 23.4: پائرو سیکنسنگ کا اصول (جہاں: پی پی آئی پائرو فاسفیٹ ہے؛ اے پی ایس ایڈینوسین 5-فاسفسفیٹ ہے؛ اے ٹی پی ایڈینوسین ٹرائی فاسفیٹ ہے؛ $O2$ آکسیجن مالیکیول ہے؛ AMP ایڈینوسین مونوفاسفیٹ ہے؛ $CO2$ ہے؛ کاربونائڈ لائٹ ہے۔
(https://en.wikipedia.org/wiki/Pyrosequencing)

23.7 خودکار ڈی این اے کی ترتیب (Automated DNA Sequence)

خصوصیت، معیار اور تیز رفتاری کو بڑھانے کے لیے خودکار سیکوینسر کی ضرورت وجود میں آئی۔ بعد میں اس سیکشن میں آپ دو طریقے سیکھیں گے یعنی شاٹگن اپروچ اور کلون کونٹیگ اپروچ۔

23.7.1 جینوم کی ترتیب کا شاٹگن طریقہ (Shotgun Method of Genome Sequencing)

جینوم کی ترتیب کا شاٹ گن طریقہ جدید جینومکس کی تحقیق میں وسیع پیمانے پر استعمال ہونے والی تکنیک ہے۔ یہ طریقہ کسی جاندار کے پورے جینوم کو ترتیب دینے کے لیے استعمال کیا جاتا ہے، بشمول اس کے تمام جینز، ریگولیٹری ریجنز، اور نان کوڈنگ ڈی این اے۔ شاٹگن کی ترتیب کے طریقہ کار میں جینوم کو بہت سے چھوٹے ٹکڑوں میں توڑنا، ہر ٹکڑے کو ترتیب دینا، اور پھر ایک مکمل جینوم بنانے کے لیے ٹکڑوں کو دوبارہ ایک ساتھ جمع کرنا شامل ہے (تصویر 22.5)۔

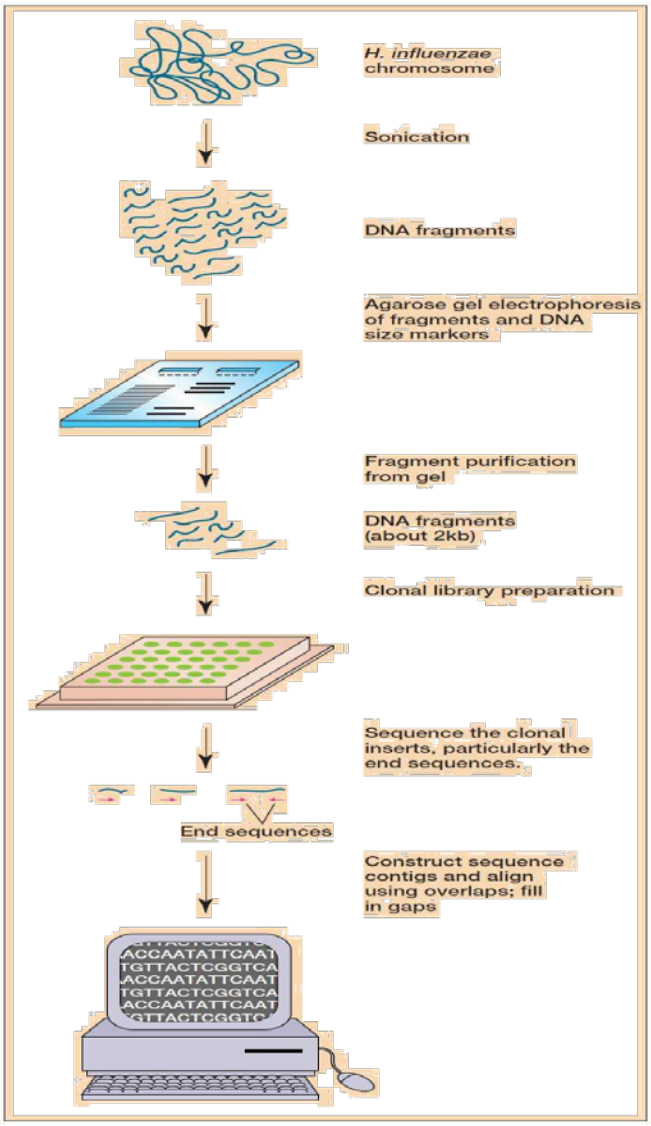
یہ طریقہ پہلی بار 1990 کی دہائی میں روایتی سینگر سیکوینسنگ طریقوں کی حدود کو دور کرنے کے طریقے کے طور پر تیار کیا گیا تھا، جو محنت طلب اور وقت طلب تھے۔ شاٹگن کے نقطہ نظر میں جینوم کو چھوٹے چھوٹے ٹکڑوں میں تقسیم کرنا شامل ہے، عام طور پر 500 اور 800 بیس جوڑوں کے درمیان

لمبائی، اور پھر ہائی تھروپٹ سیکوینسنگ ٹیکنالوجیز جیسے ایلومینا سیکوینسنگ کا استعمال کرتے ہوئے ہر ٹکڑے کو ترتیب دینا۔ اس کے بعد نتیجہ خیز ترتیب پڑھنے کو خصوصی سافٹ ویئر ٹولز کا استعمال کرتے ہوئے ملحقہ ترتیب میں جمع کیا جاتا ہے۔

شاٹ گن کے طریقہ کار کے اہم فوائد میں سے ایک یہ ہے کہ اس کی کم سے کم ان پٹ ڈی این اے کے ساتھ اعلیٰ معیار کے جینوم

اسمبلیاں بنانے کی صلاحیت ہے۔اس کے علاوہ، شاٹ گن کا طریقہ حیاتیات کی ایک وسیع رینج کو ترتیب دینے کے لیے استعمال کیا جا سکتا ہے، بشمول بیکٹیریا، فنگس، پودوں اور جانوروں کو، یہ جینومکس کی تحقیق میں ایک ورسٹائل اور وسیع پیمانے پر استعمال ہونے والا طریقہ ہے۔

سب سے بڑے چیلنجوں میں سے ایک ہے بکھری ترتیب سے جینوم کی درست اسمبلی۔ان چیلنجوں پر قابو پانے کے لیے، جینوم اسمبلیوں کی درستگی اور مکملیت کو بہتر بنانے کے لیے خصوصی سافٹ ویئر ٹولز اور الگورتھم تیار کیے گئے ہیں۔ بایوانفارمیٹکس تجزیہ جس کے نتیجے میں جینوم کو جمع اور تشریح کرنے کی ضرورت ہے۔



تصویر22.5شاٹ گن کے طریقہ کار کی اسکیمیٹک نمائندگی: ہیموفیلس انفلوئنزا۔

(ماخذ:-*https://microbiologynotes.org/whole-genome-shotgun-sequencing- overview-steps*)

جینوم کی ترتیب کا شاٹ گن طریقہ جدید جینومکس ریسرچ میں ایک طاقتور اور وسیع پیمانے پر استعمال ہونے والا ٹول ہے۔ کم سے کم ان پٹ ڈی این اے کے ساتھ اعلیٰ معیار کی جینوم اسمبلیاں بنانے کی اس کی صلاحیت نے زندگی کی جینیاتی بنیاد کے بارے میں ہماری سمجھ میں

انقلاب برپا کر دیا ہے۔ جاری تحقیق کو ترتیب اور اسمبلی کے عمل کو بہتر بنانے اور نتیجے میں جینومک ڈیٹا کی تشریح اور استعمال کرنے کی ہماری صلاحیت کو بہتر بنانے کی ضرورت ہے۔

23.8 ڈی این اے فنگر پرنٹنگ (DNA Fingerprinting)

ہمارے جسم کے ہر خلیے میں ڈی این اے ہوتا ہے اور تقریباً 99.9 فیصد ڈی این اے دو انسانوں کے درمیان ایک جیسا ہوتا ہے۔ کسی کو منفرد بنانے کے لیے صرف 0.1% فرق ذمہ دار ہے (سوائے ایک جیسے جڑواں بچوں کے) اور یہ 0.1% DNA فنگر پرنٹنگ میں اہم کردار ادا کرتا ہے۔

جیسا کہ ہم جانتے ہیں، ہمارے جینوم کا صرف 3% کوڈ کیا جاتا ہے اور پروٹین کی ترکیب کے لیے کام کرتا ہے یعنی جین کہلاتا ہے اور باقی 97% نان کوڈنگ، بار بار اور ردی ہوتے ہیں۔ یہ ردی ڈی این اے ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کے لیے استعمال کیا جاتا ہے۔ ترتیب کی ساخت اور تکرار کی تعداد افراد اور حیاتیات کے درمیان مختلف ہوتی ہے۔ اس بنیاد پر ڈی این اے پرنٹ تیار کیا جا سکتا ہے۔

ڈی این اے فنگر پرنٹنگ تکنیک سب سے پہلے برطانوی پروفیسر سر ایلک جیفری نے 1984 میں تیار کی تھی۔ انہوں نے محسوس کیا کہ ہم منی سیٹلائٹس کی شکل میں انسانی ڈی این اے میں تغیرات کا پتہ لگا سکتے ہیں۔ جیفری نے پابندی ہضم کی لمبائی پولیمورفزم کا استعمال کرتے ہوئے پہلا DNA پروفائل بنایا۔ اس کا طریقہ دراصل آر ایف ایل پی اور آٹوراڈیوگرافی کا مجموعہ تھا۔

23.8.1 تعریف (Introduction)

"یہ ایک سالماتی طریقہ ہے کہ کسی فرد یا کسی جاندار کو اس کے ڈی این اے کے نمونے سے اس کے ڈی این اے میں منفرد نمونوں کو دیکھ کر شناخت کیا جائے۔"

سیٹلائٹس ڈی این اے (*Satellite DNA*)

سیٹلائٹس ڈی این اے نان کوڈنگ، بار بار ڈی این اے والے علاقے ہیں، جو ٹیلومیرس اور سینٹرومیرس پر واقع ہیں۔ یہ صحیح نقل میں مدد کرتا ہے، جب کہ ان ترتیبوں میں تبدیلی نقل کی غلطیوں کا سبب بنتی ہے۔

یہ انسانی جینوم میں دو طرح کی ہوتی ہے جو ان کی تکرار کی ترتیب کی بنیاد پر ہوتی ہے۔

1۔ منی سیٹلائٹ

2۔ مائیکرو سیٹلائٹس

منی سیٹلائٹ ڈی این اے کی ترتیب 10 سے 60 بیس جوڑی لمبی ہوتی ہے اور جینوم میں 5 سے 50 بار دہرائی جاتی ہے۔ وہ انتہائی متغیر (پولیمورفک)، منفرد، اور *GC* سے بھرپور ترتیب ہیں۔ یہ عام طور پر ٹیلومیرک علاقوں میں موجود ہے۔ جیسے *VNTRs*.

مائیکرو سیٹلائٹس منی سیٹلائٹس سے چھوٹے ہوتے ہیں۔ اس میں ایک جینوم میں 1-6 بیس جوڑے اور 5 سے 10 بار بار بار ڈی این اے کی ترتیب ہوتی ہے۔ جیسے ایس ٹی آر اور ایس ایس آر۔ یہ علاقے ہائپر ویری ایبل، نان کوڈنگ اور ٹیلومیرک بھی ہیں۔

23.8.2 ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کا عمل (Process of DNA Fingerprinting)

1۔ حیاتیاتی نمونوں کا مجموعہ *(Collection of biological samples)*

2۔ ڈی این اے نکالنا *(Isolation of DNA)*

3۔ پابندی ہاضمہ یا پی سی آر ایمپلیفیکیشن *(Restriction digestion or PCR amplification)*

4۔ ایگرز جیل الیکٹروفورسس، کیپلیری الیکٹروفورسس یا ڈی این اے کی ترتیب *(Agarose gel electrophoresis, capillary electrophoresis or DNA sequencing)*

5۔ نتائج کی ترجمانی کرنا *(Interpreting results)*

1. نمونہ جمع

- ڈی این اے کسی بھی حیاتیاتی نمونوں سے حاصل کیا جاسکتا ہے۔ جیسے پودوں یا جانوروں کا کوئی بھی حصہ

2. ڈی این اے نکالنا:

- ڈی این اے کو مختلف طریقوں سے نکالا جاسکتا ہے جیسے *CTAB DNA* نکالنے کے طریقے، *Proteinase K DNA* نکالنے کے طریقے اور *Phenol-chloroform DNA* نکالنے کے طریقے یا کسی بھی *DNA* نکالنے کی کٹ کے ساتھ ہو سکتے ہیں۔

3. پابندی ہضم یا پی سی آر امپلیفیکیشنز::

- یہ عمل تین مختلف تکنیکوں کے ذریعے انجام دیا جاسکتا ہے۔ *(i)* آر ایف ایل پی تجزیہ

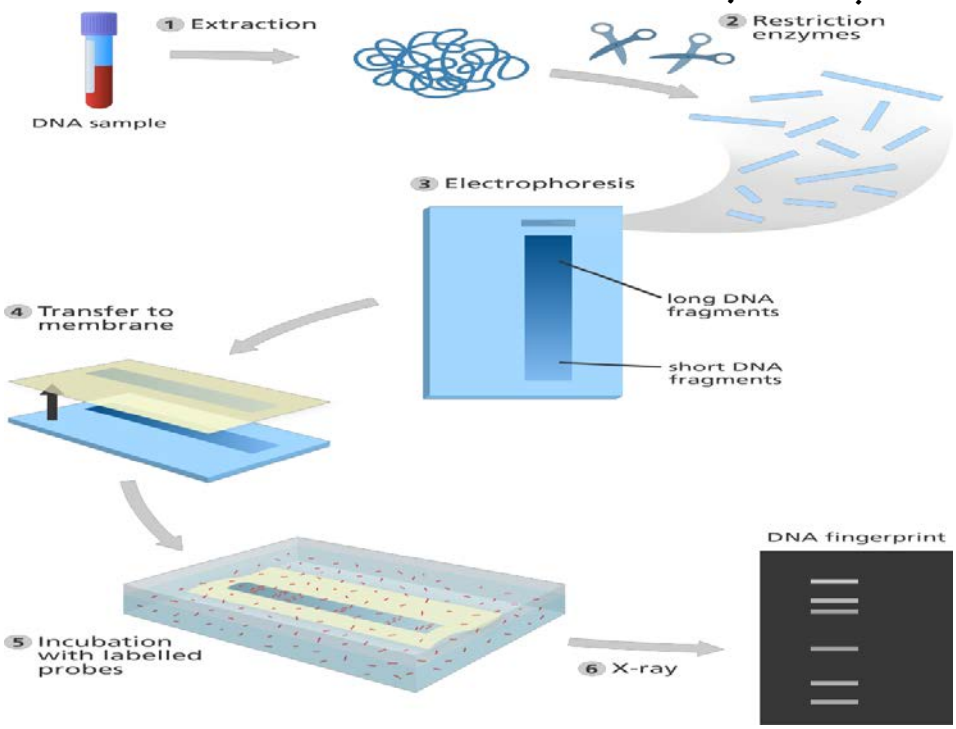
(ii) پی سی آر تجزیہ

(iii) ریئل ٹائم پی سی آر تجزیہ

23.8.3 آر ایف ایل پی تجزیہ RFLP analysis

RFLP پہلا طریقہ ہے جو *DNA fingerprinting* کے لیے استعمال ہوتا ہے۔ یہ پابندی کے خامروں کے ساتھ انجام دیا گیا ہے، جو ڈی این اے کو کاٹنے کے لیے استعمال ہوتا ہے۔ اس کے نتیجے میں ڈی این اے کے ہزاروں ٹکڑے مختلف لمبائیوں کے ساتھ نکلے۔ ایگرز جیل الیکٹروفورسس کی مدد سے ان ڈی این اے کو ان کے سائز کی بنیاد پر الگ کیا گیا ہے۔ مزید یہ کہ ڈی این اے کا ٹکڑا نایلان کی جھلی میں منتقل کر دیا گیا ہے۔ نایلان کی جھلی تابکار تحقیقات کے ساتھ سیکی ہوئی تھی (تحقیقات منی سیٹلائٹ ڈی این اے کے چھوٹے ٹکڑے ہیں جو ریڈیو ایکٹیو فاسفورس کے ساتھ ٹیگ کیے گئے ہیں)۔ تحقیقات صرف ڈی این اے کے تکمیلی ٹکڑوں سے منسلک ہوتی ہیں اور یہاں، وہ جینوم میں منی سیٹلائٹس سے منسلک ہوتے ہیں۔ تحقیقات کے ساتھ منسلک منی سیٹلائٹس کو پھر نایلان کی جھلی کو ایکس رے فلم میں بے نقاب کر کے تصور کیا گیا۔ جب ریڈیو ایکٹیویٹی کے سامنے آیا تو لیبل والے ڈی این اے کی نظر میں فلم پر ڈارک بینڈز کا ایک نمونہ نمودار ہوا۔ اس پیٹرن کو ڈی این اے فنگر پرنٹ کہا جاتا ہے۔ دو یا 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۔



شکل23.5:ایکس رے فلم کی مدد سے آر ایف ایل پی تجزیہ دکھا رہا ہے۔

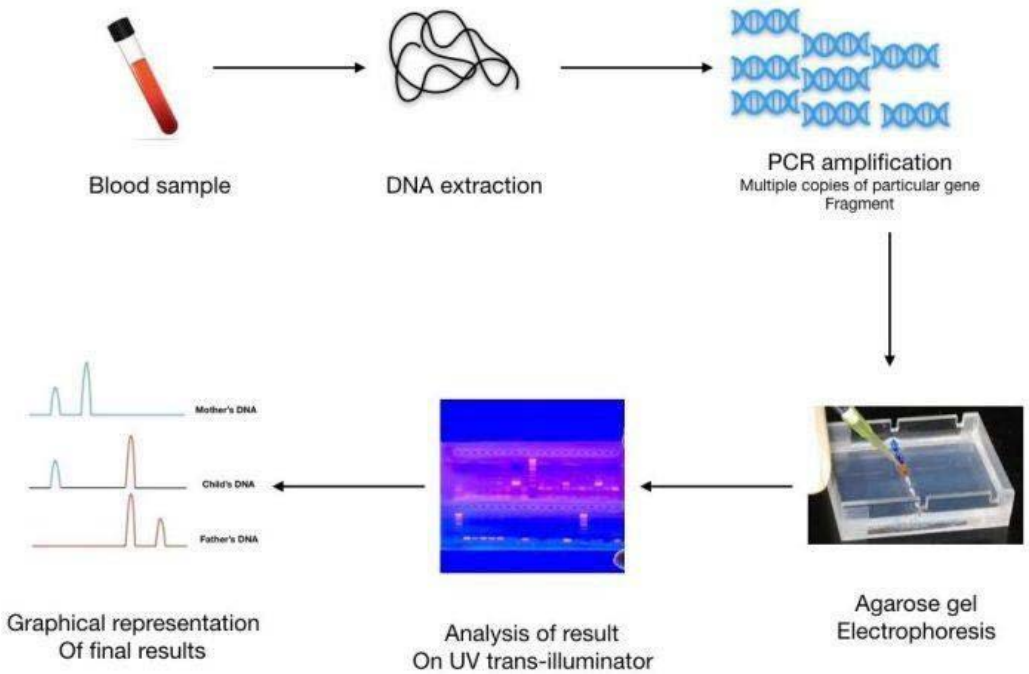
23.8.4 پی سی آر پر مبنی تجزیہ(PCR Analysis)

پی سی آر پر مبنی ڈی این اے فنگر پرنٹنگ تکنیک سب میں سب سے زیادہ مقبول ہے۔ یہ *RFLP*-آٹوڈیو گرافی سے آسان ہے اور روایتی تکنیکوں کے مقابلے میں قابل اعتماد نتائج دیتا ہے۔ یہ تیز تر اور زیادہ درست ہے۔

پی سی آر پر مبنی ڈی این اے فنگر پرنٹنگ مائیکرو سیٹلائٹس جیسے *STRs*(شارٹ ٹینڈم ریپیٹس)اور *VNTRs* پر انحصار کرتی ہے۔ *RFLP DNA* فنگر پرنٹنگ کے طریقے کے برعکس، یہ *DNA* کو کاٹنے کے لیے پابندی کے خامروں کا استعمال نہیں کرتا ہے۔ پولیمریز چین ری ایکشن(*PCR*) کو مخصوص *STR* اور *VNTR* تسلسل کی بہت سی کاپیاں بنانے کے لیے استعمال کیا گیا ہے۔

ہماری دلچسپی کے بہت سے *STRs* اور *VNTRs* کے سلسلے *NCBI* ڈیٹا بیس پر دستیاب ہیں اور پرائمر کو ان ترتیب شدہ ڈیٹا کی بنیاد پر ڈیزائن کیا جا سکتا ہے۔ پی سی آر کو تیار شدہ پرائمز کے سیٹ کے ساتھ انجام دیا گیا ہے اور نتائج حاصل کرنے کے لیے مزید ایگروز جیل الیکٹروفورسس سیٹ اپ کیا گیا ہے۔ ڈی این اے کے ٹکڑوں کے سائز کی بنیاد پر، ایک جیل میں مختلف ڈی این اے بینڈ ظاہر ہوتے ہیں۔

تاہم، *PCR* پر مبنی جیل الیکٹروفورسس زیادہ تر *VNTR* تجزیہ کے لیے استعمال ہوتا ہے۔ ایس ٹی آر لمبائی میں چھوٹے ہوتے ہیں اس لیے ایگروز جیل میں فرق کرنا مشکل ہوتا ہے۔ اس مقصد کے لیے، *RT PCR* پر مبنی تجزیہ کیا گیا۔



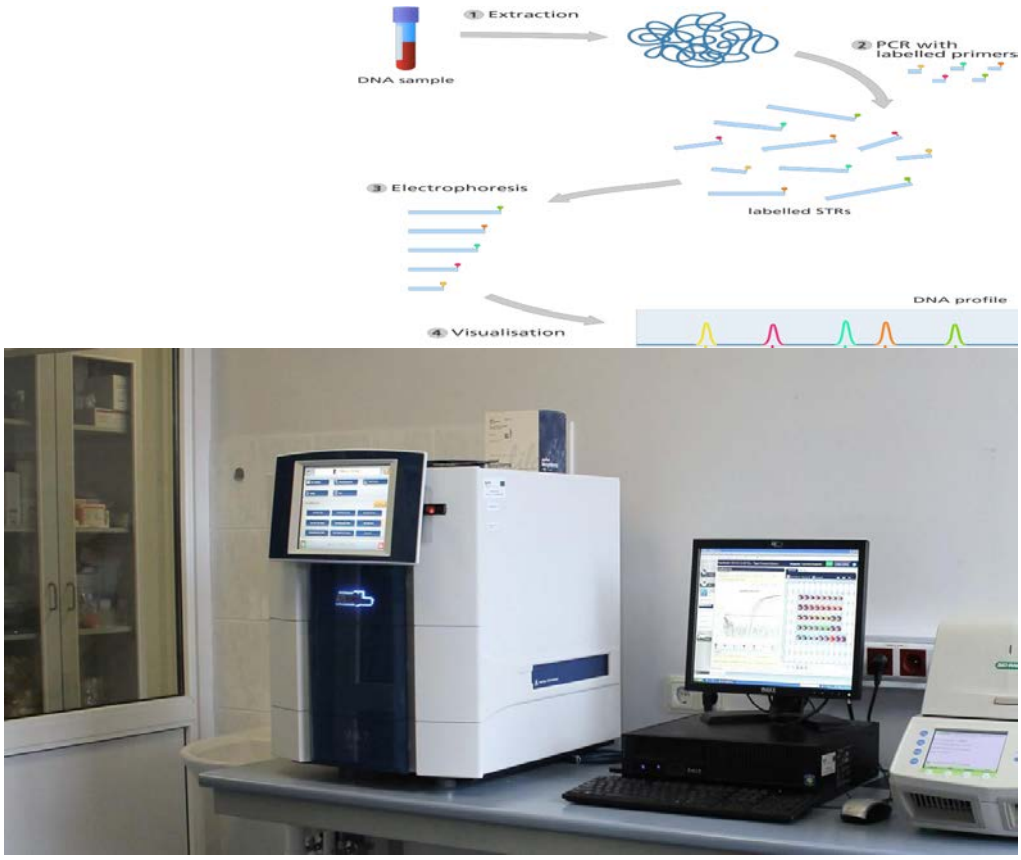
تصویر22.6:*Agarose* جیل کے ساتھ*DNA* فنگر پرنٹنگ کے لیے*PCR* تکنیک دکھا رہا ہے۔

الیکٹروفورسس

23.8.5 RT-PCR پر مبنی تجزیہ

جیسا کہ ہم جانتے ہیں، ایس ٹی آر لمبائی میں چھوٹے ہوتے ہیں، اس لیے ایگرز جیل پر تصور کرنا بہت مشکل ہے۔ ریئل ٹائم پی سی آر ڈی این اے کو بڑھاوا دینے کے ساتھ ساتھ امپلیون کی تعداد کو بھی شمار کرتا ہے۔ لہذا نمونے میں موجود ہر ائی جانے والی تعداد کا حساب لگایا جا سکتا ہے۔ یہ درست، تیز، قابل اعتماد اور دیگر طریقوں سے سستا ہے۔ مزید یہ کہ یہ کسی بھی نمونے سے ڈی این اے کی ایک چھوٹی مقدار کو بھی درست کر سکتا ہے۔

فلورو لیبل والی تحقیقات*RT-PCR* میں استعمال ہوتی ہیں۔ ایک بار جب فلورو لیبل والی تحقیقات کو تکمیلی ترتیب کے ساتھ جوڑا جاتا ہے، تو یہ مشین کو اشارہ کرتا ہے کہ وہ اس خاص ٹکڑے کی پرورش کے عمل کی نگرانی کرے۔ موصول ہونے والے فلورو سینٹ سگنلز کی بنیاد پر، یہ مانیٹر پر مختلف تکرار کے لیے مختلف چوٹیوں کو تخلیق کرتا ہے (اس لیے اس تکنیک میں جیل الیکٹروفورسس کی ضرورت نہیں ہے)۔ ہم مختلف نمونوں میں موجود تکرار کی تعداد کا حساب لگا سکتے ہیں۔



تصویر 22.7:(a)فلوروسینٹ لیبل والے پرائمر کے ساتھ RT- PCR

(b) RT-PCR مشین (الیکٹروفورسس کا استعمال نہیں) نتیجہ اسکرین پر ظاہر ہوتا ہے۔

23.8.6 جانوروں میں ڈی این اے فنگر پرنٹنگ (DNA Fingerprinting in Animals)

جانوروں میں ڈی این اے فنگر پرنٹنگ مختلف شعبوں میں کئی فوائد پیش کرتی ہے، بشمول ویٹرنری میڈیسن، تحفظ حیاتیات، اور زراعت۔ کچھ اہم فوائد میں شامل ہیں:

1. شناخت اور تصدیق: ڈی این اے فنگر پرنٹنگ انفرادی جانوروں کی درست شناخت اور تصدیق کی اجازت دیتا ہے۔ یہ خاص طور پر افزائش کے پروگرام جیسے حالات میں مفید ہے، جہاں والدین کی تصدیق اور جینیاتی سالمیت کو برقرار رکھنا ضروری ہے۔ ویٹرنری میڈیسن میں، ڈی این اے فنگر پرنٹنگ گمشدہ یا چوری شدہ پالتو جانوروں کی شناخت اور ملکیت کے تنازعات کو حل کرنے میں مدد کر سکتی ہے۔

2. جینیاتی تنوع کی تشخیص: ڈی این اے فنگر پرنٹنگ جانوروں کی آبادی کے اندر جینیاتی تنوع کے بارے میں قیمتی بصیرت فراہم کرتی ہے۔ تحفظ کی کوششوں کے لیے جینیاتی تغیرات کو سمجھنا بہت ضروری ہے، کیونکہ یہ آبادی کی صحت کا اندازہ لگانے، خطرے سے دوچار پرجاتیوں کی شناخت، اور حیاتیاتی تنوع کے تحفظ کے لیے حکمت عملی تیار کرنے میں مدد کرتا ہے۔

3. پیرنٹیج ٹیسٹنگ: ڈی این اے فنگر پرنٹنگ والدین کی درست جانچ کے قابل بناتی ہے، جس سے نسل کنندگان کو اولاد کی ولدیت

کی تصدیق کرنے اور نسل کشی کو روکنے کی اجازت ملتی ہے۔ یہ مویشیوں اور ساتھی جانوروں میں مطلوبہ خصلتوں کو برقرار رکھنے کے لیے اہم ہے جبکہ جینیاتی عوارض کے خطرے کو کم سے کم کرتا ہے۔

4. بیماری کی تشخیص اور روک تھام: ڈی این اے فنگر پرنٹنگ جانوروں میں جینیاتی بیماریوں کی تشخیص اور روک تھام میں مدد کر سکتی ہے۔ مخصوص بیماریوں سے وابستہ جینیاتی مارکروں کی شناخت کر کے، جانوروں کے ڈاکٹر جانوروں کو بعض حالات کے پیش نظر اور احتیاطی تدابیر پر عمل درآمد کر سکتے ہیں۔

5. فرانزک تحقیقات: ڈی این اے فنگر پرنٹنگ جانوروں سے متعلق فرانزک تحقیقات میں ایک طاقتور ٹول ہے۔ اس کا استعمال حیاتیاتی شواہد کو مخصوص افراد سے جوڑنے، جانوروں سے متعلق جرائم (جیسے غیر قانونی شکار یا جانوروں پر ظلم) کے مرتکب افراد کی شناخت اور قانونی کارروائی میں ثبوت فراہم کرنے کے لیے کیا جا سکتا ہے۔

6. خوراک کی پیداوار میں سراغ لگانے کی صلاحیت: زراعت کی صنعت میں، ڈی این اے فنگر پرنٹنگ کو ٹریس ایبلٹی اور کوالٹی کنٹرول کے مقاصد کے لیے استعمال کیا جا سکتا ہے۔ جانوروں کی مصنوعات (جیسے گوشت یا ڈیری) کے ڈی این اے کا تجزیہ کر کے، پروڈیوسر کھانے کی مصنوعات کی صداقت کی تصدیق کر سکتے ہیں، لیبلنگ کے ضوابط کی تعمیل کو یقینی بنا سکتے ہیں، اور سپلائی چین میں دھوکہ دہی کو روک سکتے ہیں۔

7. تحقیق اور تحفظ: ڈی این اے فنگر پرنٹنگ تحقیقی کوششوں کی حمایت کرتی ہے جس کا مقصد جانوروں میں خصلتوں، طرز عمل اور موافقت کی جینیاتی بنیاد کو سمجھنا ہے۔ یہ علم رہائش کے انتظام کی حکمت عملیوں، قیدی افزائش کے پروگراموں، اور خطرے سے دوچار انواع کے لیے جینیاتی بچاؤ کی کوششوں سے آگاہ کر کے تحفظ کے اقدامات میں حصہ ڈالتا ہے۔

مجموعی طور پر، جانوروں میں ڈی این اے فنگر پرنٹنگ ایپلی کیشنز کی ایک وسیع رینج کے لیے ایک طاقتور اور ورسٹائل ٹول پیش کرتا ہے، انفرادی شناخت اور جینیاتی تنوع کی تشخیص سے لے کر بیماری کی تشخیص، فرانزک تحقیقات، اور تحفظ کی کوششوں تک۔ ٹیکنالوجی اور طریقہ کار میں ترقی کی وجہ سے اس کی ایپلی کیشنز میں توسیع ہوتی رہتی ہے کیونکہ ڈی این اے تجزیہ زیادہ قابل رسائی اور لاگت سے موثر ہوتا ہے۔

23.9 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں (Suggested Books for Further Readings)

1. Brown TA. (2010). Gene Cloning and DNA Analysis. 6th edition. Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
2. Cappucino J and Sherman N. (2010). Microbiology: A Laboratory Manual. 9th edition. Pearson Education Limited.

3. 3. Sambrook J and Russell D. (2001). Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Wiley JM, Sherwood LM and Woolverton CJ. (2013) Prescott's Microbiology. 9 th Edition. McGraw Hill International.
5. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. Chapter 5, Restriction Endonucleases.
6. Primrose SB and Twyman RM. (2006). Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7th edition. Blackwell Publishing, Oxford, U.K.
7. Sambrook J and Russell D. (2001). Molecular Cloning-A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Clark DP and Pazdernik NJ. (2009). Biotechnology: Applying the Genetic Revolution. Elsevier Academic Press, USA.

پریکٹیکل ریکارڈ شیٹ(Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

اکائی 24: اچھی لیبارٹری پریکٹسز

[Good Laboratory Practices (GLP)]

اکائی کے اجزا:

24.0 تعارف(Introduction)

24.1 مقاصد(Objectives)

24.2 GLP کے بنیادی نکات(Fundamental Points of GLP)

24.3 اچھی لیبارٹری پریکٹسز کے اصول(Principles of GLP)

24.4 لیبارٹری کا دورہ کرتے وقت(When Visiting a Laboratory)

24.5 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

24.0 تعارف(Introduction)

اچھی لیبارٹری پریکٹس (*GLP*) کے ضوابط 1970 کی دہائی کے آخر میں فارماسیوٹیکل کمپنیوں اور ان کے ذریعے استعمال ہونے والی کنٹریکٹ سہولیات کی تحقیق اور ترقی (*R&D*) کی سرگرمیوں میں بدعنوانی کے جواب میں ریگولیٹری لینڈ سکیپ کا حصہ بن گئے۔

بدعنوانی میں دھوکہ دہی کے معاملات شامل تھے، لیکن اب تک کے سب سے اہم پہلو ریگولیٹری ڈوزیئرز کے لیے ڈیٹا تیار کرنے کے لیے کیے گئے مطالعات کا مناسب انتظام اور تنظیم کا فقدان تھا۔ یو ایس فوڈ اینڈ ڈرگ ایڈمنسٹریشن (ایف ڈی اے) نے پورے امریکہ میں ٹاکسیکولوجی لیبارٹریوں میں تحقیقات کا سلسلہ شروع کیا۔ ان تحقیقات کے نتائج نے ایک ایسی صورت حال کا انکشاف کیا جس سے صرف پابند ضوابط نافذ کر کے ہی نمٹا جا سکتا ہے۔ یہ ضابطے *GLP* کے ضوابط ہیں۔ جی ایل پی کے ضوابط سب سے پہلے یو ایس ایف ڈی اے، پھر یو ایس انوائرمنٹل پروٹیکشن ایجنسی (ای پی اے) کے ذریعے بنائے گئے تھے۔ اس کے بعد بہت سے دوسرے ممالک نے اس کی پیروی کی ہے۔

1981 میں آرگنائزیشن فار اکنامک کوآپریشن اینڈ ڈیولپمنٹ (او ای سی ڈی) نے بھی جی ایل پی کے اصول شائع کیے، اور اب یہ بین الاقوامی میدان میں حاوی ہیں۔ آج تک 30 ممالک (*OECD* کے رکن ممالک) نے ایک معاہدے پر دستخط کیے ہیں جو انہیں *OECD GLP* اصولوں کا پابند کرتے ہیں۔ دیگر غیر *OECD* رکن ریاستوں نے بھی *OECD GLP* اصولوں کو اپنایا ہے۔

GLP کا مقصد ممکنہ ادویات (اور دیگر کیمیکل یا بائیو کیمیکل اداروں) کی حفاظتی جانچ پر کام کرنے والے سائنسدانوں کے طریقوں کو منظم کرنا ہے۔ ادویات لینے والے مریضوں اور کلینیکل ٹرائلز کے لیے بھرتی کیے گئے لوگوں پر واضح ممکنہ اثرات کے ساتھ، دواؤں کی حفاظت ایک اہم مسئلہ ہے اور *GLP* کو اس بات کو یقینی بنانے کے ایک ذریعہ کے طور پر دیکھا جاتا ہے کہ سائنسدان حفاظتی ڈیٹا ایجاد یا ہیرا پھیری نہ

کریں، اور ایک ذریعہ کے طور پر اس بات کو یقینی بنانے کے لیے کہ مطالعات کا صحیح طریقے سے انتظام اور انعقاد کیا جاتا ہے، اس طرح درست تجرباتی ڈیٹا تیار کرنے کے امکانات میں کافی اضافہ ہوتا ہے۔ جی ایل پی کی تعمیل اس بات کی ضمانت ہے کہ حفاظتی ڈیٹا کی ایمانداری سے رجسٹریشن حکام کو اطلاع دی جارہی ہے۔ ان مطالعات کے نتائج کلینکل ٹرائلز کے ساتھ آگے بڑھنے کے فیصلے کی بنیاد بناتے ہیں، مارکیٹ میں کسی نئی دوا کی اجازت دینے سے پہلے۔ ریگولیٹری اتھارٹیز کی طرف سے صنعت پر GLP اسی طرح نافذ کیا گیا تھا جس طرح گڈ مینوفیکچرنگ پریکٹس (GMP) پہلے تھا، اور گڈ کلینیکل پریکٹس (GCP) بعد میں ہوگا۔

24.1 مقاصد (Objectives)

اچھی لیبارٹری پریکٹسز (جی ایل پی) کے عملی باب کے مقاصد:

1. جانوروں کی بائیو ٹیکنالوجی کی تحقیق کے تناظر میں اچھی لیبارٹری پریکٹسز (GLP) کے بنیادی اصولوں اور اہمیت کو سمجھیں۔
2. شرکاء کو لیبارٹری کی ترتیبات میں GLP کے نفاذ کو کنٹرول کرنے والے کلیدی رہنما خطوط، ضوابط اور بہترین طریقوں سے واقف کروائیں۔
3. تجربات کو ڈیزائن کرنے، درست ریکارڈ برقرار رکھنے، اور GLP معیارات کے مطابق ڈیٹا کی سالمیت کو یقینی بنانے کے لیے عملی تکنیک اور حکمت عملی سیکھیں۔
4. لیبارٹری کے انتظام میں مہارت پیدا کریں، بشمول لیبارٹری کے آلات، ری ایجنٹس، اور تجرباتی طریقہ کار کی مناسب ہینڈلنگ تاکہ تجرباتی تغیر کو کم سے کم کیا جاسکے اور تولیدی صلاحیت کو یقینی بنایا جاسکے۔
5. تحقیقی جانوروں کی فلاح و بہبود کو یقینی بنانے کے لیے حفاظتی پروٹوکول، خطرے کے انتظام اور جانوروں کی بائیو ٹیکنالوجی ریسرچ سے وابستہ اخلاقی تحفظات کے بارے میں آگاہی پیدا کریں۔
6. GLP معیارات اور بہترین طریقوں کی تعمیل کے کلچر کو فروغ دینے کے لیے لیبارٹری کے عملے کے درمیان تعاون، مواصلات اور ٹیم ورک کو فروغ دیں۔
7. لیبارٹری کی ترتیبات میں پیدا ہونے والے تحقیقی نتائج کی وشوسنیتا اور درستگی کو برقرار رکھنے میں کوالٹی اشورینس اور کوالٹی کنٹرول کے اقدامات کی اہمیت کو تقویت دیں۔
8. شرکاء کو ان کی اپنی تحقیقی کوششوں میں GLP اصولوں کو مؤثر طریقے سے لاگو کرنے کے لیے ضروری علم، مہارت اور اخلاقی بیداری کے ساتھ بااختیار بنائیں، اس طرح دیانتداری اور ساکھ کے ساتھ جانوروں کی بائیو ٹیکنالوجی کی تحقیق کو آگے بڑھانے میں اپنا حصہ ڈالیں۔

24.2 GLP کے بنیادی نکات (Fundamental Points of GLP)

GLP کے ضوابط اچھے عمل کے لیے اصول مرتب کرتے ہیں اور محققین کو ان کے اپنے پہلے سے قائم کردہ منصوبوں اور معیاری طریقہ کار کی تعمیل میں اپنا کام انجام دینے میں مدد کرتے ہیں۔ قواعد وضوابط کا تعلق تحقیقی پروگراموں کے سائنسی یا تکنیکی مواد سے نہیں ہے۔ نہ ہی ان کا مقصد مطالعہ کی سائنسی قدر کا اندازہ لگانا ہے۔

تمام GLP متن، ان کی اصل سے قطع نظر، مندرجہ ذیل پانچ نکات کی اہمیت پر زور دیتے ہیں:

1. وسائل: تنظیم، اہلکار، سہولیات اور سامان
2. خصوصیت: ٹیسٹ آئٹمز اور ٹیسٹ سسٹم
3. قواعد: مطالعہ کے منصوبے (یا پروٹوکول) اور تحریری طریقہ کار
4. نتائج: خام ڈیٹا، حتمی رپورٹ اور آرکائیوز
5. کوالٹی اشورینس

GLP لیبارٹری پر مبنی تحقیقی سرگرمیوں کے معیار، سالمیت اور وشوسنیتا کو فروغ دینے کے لیے بنائے گئے رہنما خطوط، ضوابط، اور بہترین طریقوں کا ایک مجموعہ شامل کرتا ہے۔ یہ تجربہ گاہوں کے انتظام کے مختلف پہلوؤں پر مشتمل ہے، بشمول تجرباتی ڈیزائن، دستاویزات، ڈیٹا کا تجزیہ، کوالٹی ایشورنس، اور حفاظتی پروٹوکول۔ GLP کی پابندی نہ صرف تحقیقی نتائج کی درستگی اور تولیدی صلاحیت کو بڑھاتی ہے بلکہ ضابطے کی ضروریات اور اخلاقی تحفظات کی تعمیل کو بھی یقینی بناتی ہے۔

جانوروں کی بائیوٹیکنالوجی کی تحقیق میں جی ایل پی کی اہمیت کو بڑھاوا نہیں دیا جا سکتا۔ جیسا کہ محققین جینیاتی ہیرا پھیری، سالماتی حیاتیات کی تکنیکوں، اور جانوروں پر مشتمل بائیوٹیکنالوجی مداخلتوں کی پیچیدگیوں کا جائزہ لیتے ہیں، مضبوط تجرباتی طریقوں کی ضرورت سب سے اہم ہو جاتی ہے۔ چاہے یہ جین ایڈیٹنگ، ٹرانسجینک جانوروں کی پیداوار، یا وٹروفرٹیلائزیشن کی تکنیک ہو، تحقیق کی کوششوں کی درستگی، مستقل مزاجی اور اخلاقی طرز عمل کو یقینی بنانے کے لیے GLP اصولوں کی پابندی ضروری ہے۔

یہ عملی باب جانوروں کی بائیوٹیکنالوجی کی تحقیق کے تناظر میں GLP کو سمجھنے اور لاگو کرنے کے لیے ایک جامع رہنما کے طور پر کام کرتا ہے۔ نظریاتی بصیرت، عملی مظاہروں، اور مشقوں کے مجموعے کے ذریعے، شرکاء کو GLP کو کنٹرول کرنے والے کلیدی اصولوں اور رہنما خطوط کی مکمل تفہیم حاصل ہو گی۔ وہ سیکھیں گے کہ کس طرح تجربات کو ڈیزائن کرنا، درست ریکارڈ کو برقرار رکھنا، لیبارٹری کے آلات اور ری ایجنٹس کو ہینڈل کرنا، اور GLP معیارات کے مطابق تحقیقی جانوروں کی حفاظت اور بہبود کو یقینی بنانا۔

مزید برآں، یہ عملی باب سائنسی سالمیت کو فروغ دینے، شفافیت کو فروغ دینے، اور تحقیقی نتائج کی ساکھ کو بڑھانے میں GLP کے وسیع تر مضمرات کو تلاش کرے گا۔ شرکاء سائنسی سختی اور اخلاقی طرز عمل کے اعلیٰ ترین معیارات کو برقرار رکھنے میں کوالٹی اشورینس، ڈیٹا

مینجمنٹ،اور ریگولیٹری معیارات کے ساتھ تعمیل کی اہمیت کے بارے میں قابل قدر بصیرت حاصل کریں گے۔

بالآخر،اس عملی باب کا مقصد شرکاء کو ان کی اپنی تحقیقی کوششوں میں GLP معیارات کو برقرار رکھنے کے لیے ضروری علم، مہارت اور اخلاقی بیداری کے ساتھ بااختیار بنانا ہے۔GLP کے اصولوں کو اپناتے ہوئے، محققین جانوروں کی بائیو ٹیکنالوجی کی ترقی میں اس انداز میں اپنا حصہ ڈال سکتے ہیں جو نہ صرف سائنسی طور پر مضبوط ہو بلکہ اخلاقی طور پر ذمہ دار اور سماجی طور پر بھی مؤثر ہو۔

24.3 اچھی لیبارٹری پریکٹسز کے اصول(Principles of GLP)

گڈ لیبارٹری پریکٹسز(GLP) کے اصول لیبارٹری پر مبنی تحقیق کی دیانتداری، وشوسنیتا اور اخلاقی طرز عمل کو یقینی بنانے کے لیے رہنما اصول کے طور پر کام کرتے ہیں۔اگرچہ ریگولیٹری فریم ورک اور سائنسی نظم وضبط کے لحاظ سے مخصوص رہنما خطوط مختلف ہو سکتے ہیں، لیکن مندرجہ ذیل اصولوں کو عام طور پر GLP کی بنیاد کے طور پر تسلیم کیا جاتا ہے:

1. کوالٹی ایشورنس: GLP تجرباتی ڈیٹا کی درستگی، وشوسنیتا اور تولیدی صلاحیت کو یقینی بنانے کے لیے منظم معیار کی یقین دہانی کے اقدامات کے نفاذ پر زور دیتا ہے۔اس میں تغیرات اور غلطیوں کو کم کرنے کے لیے طریقوں کی سخت توثیق، آلات کی انشانکن، اور ماحولیاتی حالات کی نگرانی شامل ہے۔

2. معیاری کاری: GLP تمام تجربات میں مستقل مزاجی اور موازنہ کو فروغ دینے کے لیے طریقہ کار، پروٹوکولز، اور دستاویزی طریقوں کو معیاری بنانے کی وکالت کرتا ہے۔معیاری پروٹوکول اس بات کو یقینی بناتے ہیں کہ تجربات یکساں انداز میں کیے جائیں، تولیدی صلاحیت اور ڈیٹا کی سالمیت کو آسان بنایا جائے۔

3. دستاویزی: جامع اور درست دستاویزات GLP کے مطابق لیبارٹریز میں ضروری ہیں۔تجرباتی طریقہ کار، مشاہدات، نتائج، اور ڈیٹا کے تجزیوں کے تفصیلی ریکارڈ کو تحقیقی سرگرمیوں کا شفاف اور قابل شناخت ریکارڈ فراہم کرنے کے لیے رکھا جاتا ہے۔یہ دستاویزات تصدیق، نقل، اور ریگولیٹری تعمیل کے لیے ایک اہم ٹول کے طور پر کام کرتی ہیں۔

4. تربیت اور قابلیت: GLP تحقیقی سرگرمیوں میں شامل لیبارٹری کے اہلکاروں کے لیے تربیت اور قابلیت کی تشخیص کی اہمیت پر زور دیتا ہے۔مناسب تربیت اس بات کو یقینی بناتی ہے کہ عملے کے پاس درست، محفوظ اور اخلاقی طور پر تجربات کرنے کے لیے ضروری علم، مہارت اور مہارت ہو۔جاری تربیت اور پیشہ ورانہ ترقی لیبارٹری کے طریقوں اور کارکردگی میں مسلسل بہتری کی حمایت کرتی ہے۔

5. ڈیٹا کی سالمیت: GLP تحقیق کے پورے عمل کے دوران ڈیٹا کی سالمیت کو برقرار رکھنے کا حکم دیتا ہے۔اس میں تجرباتی ڈیٹا اور نتائج کی درستگی، مکمل ہونے اور صداقت کو یقینی بنانا شامل ہے۔ڈیٹا بیک اپ، ورژن کنٹرول، اور ڈیٹا کی توثیق جیسے اقدامات ڈیٹا کے نقصان، ہیرا پھیری، یا جعل سازی سے بچانے کے لیے لاگو کیے جاتے ہیں۔

6. آلات اور سہولت کا انتظام: GLP کو تحقیقی سرگرمیوں میں مدد کے لیے لیبارٹری کی مناسب سہولیات اور آلات کے قیام اور

دیکھ بھال کی ضرورت ہے۔اس میں درستگی، وشوسنیتااور حفاظت کو یقینی بنانے کے لیے لیبارٹری کے آلات کا باقاعدہ معائنہ ،انشانکن ،اور دیکھ بھال شامل ہے۔اہلکاروں اور تحقیقی جانوروں کے لیے کام کرنے کا سازگار ماحول پیدا کرنے کے لیے مناسب سہولیات اور بنیادی ڈھانچہ فراہم کیا گیا ہے۔

7. حفاظت اور اخلاقیات: GLP لیبارٹری کے عملے، تحقیقی جانوروں اور ماحول کی حفاظت اور بہبود کو ترجیح دیتا ہے۔ خطرناک مواد، آلات اور تجرباتی طریقہ کار سے وابستہ خطرات کو کم کرنے کے لیے سخت حفاظتی پروٹوکولز اور طریقہ کار لاگو کیے جاتے ہیں۔اخلاقی تحفظات، بشمول جانوروں کی بہبود، باخبر رضامندی، اور ذمہ دارانہ تحقیقی طرز عمل، GLP کے مطابق تحقیقی طریقوں کے لیے لازمی ہیں۔

8. ریگولیٹری تعمیل: GLP کے مطابق لیبارٹریز متعلقہ ریگولیٹری تقاضوں، رہنما خطوط اور تحقیقی سرگرمیوں کو کنٹرول کرنے والے معیارات پر عمل کرتی ہیں۔اس میں قومی اور بین الاقوامی ضوابط کی تعمیل شامل ہے، جیسے کہ حکومتی ایجنسیوں، ریگولیٹری اداروں، اور فنڈنگ تنظیموں کی طرف سے مقرر کردہ۔ ریگولیٹری تعمیل اس بات کو یقینی بناتی ہے کہ تحقیقی سرگرمیاں اخلاقی، قانونی اور سائنسی اصولوں کے مطابق چلائی جائیں۔

ان اصولوں پر عمل کرتے ہوئے، تجربہ گاہیں اپنی تحقیقی سرگرمیوں میں معیار، دیانتداری اور اخلاقی طرز عمل کے اعلیٰ ترین معیارات کو برقرار رکھ سکتی ہیں،اس طرح سائنسی دریافتوں اور پیشرفت کی ساکھ اور اثر کو بڑھا سکتی ہیں۔

کامن گڈ لیبارٹری پریکٹسز (جی ایل پی) بہت سے طریقہ کار، پروٹوکولز، اور رہنما خطوط پر محیط ہیں جن کا مقصد لیبارٹری پر مبنی تحقیق کی سالمیت، وشوسنیتا، اور تولیدی صلاحیت کو یقینی بنانا ہے۔ یہ مشقیں سائنسی تحقیقات میں معیار، حفاظت اور اخلاقی طرز عمل کے اعلیٰ معیار کو برقرار رکھنے کے لیے ضروری ہیں۔ یہاں کچھ عام GLP ہیں جو لیبارٹری کی ترتیبات میں بڑے پیمانے پر اپنائے جاتے ہیں:

1. مناسب دستاویزی: تجرباتی طریقہ کار، مشاہدات، نتائج، اور ڈیٹا کے تجزیوں کی درست اور جامع دستاویزات ضروری ہیں۔اس میں تفصیلی لیبارٹری نوٹ بک، لاگ بک، اور ریکارڈز کو برقرار رکھنا شامل ہے تاکہ تحقیقی سرگرمیوں کی سراغ رسانی، شفافیت، اور تولیدی صلاحیت کو یقینی بنایا جا سکے۔

2. معیاری آپریٹنگ طریقہ کار (SOPs): لیبارٹری کی تمام سرگرمیوں کے لیے معیاری پروٹوکول اور طریقہ کار قائم کیے جانے چاہئیں، بشمول نمونے کی تیاری، تجرباتی طریقہ کار، آلات کے آپریشن، اور ڈیٹا کا تجزیہ۔ایس او پیز مستقل مزاجی کو یقینی بناتے ہیں، تغیر کو کم کرتے ہیں، اور لیبارٹری کے عملے کے درمیان تربیت اور علم کی منتقلی کو آسان بناتے ہیں۔

3. کوالٹی کنٹرول (QC) کے اقدامات: لیبارٹری کے طریقہ کار کی کارکردگی اور وشوسنیتا کی نگرانی اور تصدیق کرنے کے لیے معمول کے معیار کے کنٹرول کے اقدامات کو لاگو کیا جانا چاہیے۔اس میں تجزیاتی طریقوں کی درستگی اور درستگی کو یقینی بنانے کے لیے کنٹرول کے نمونے، انشانکن معیار، حوالہ جات، اور مہارت کی جانچ کے پروگراموں کا استعمال شامل ہو سکتا ہے۔

4. ساز وسامان کی انشانکن اور دیکھ بھال: پیمائش کی درستگی، وشوسنیتا، اور مستقل مزاجی کو یقینی بنانے کے لیے لیبارٹری کے آلات،

آلات،اور پیمائش کے آلات کو باقاعدگی سے کیلیبریٹ کیا جانا چاہیے،ان کی دیکھ بھال اور توثیق کی جانی چاہیے۔کیلیبریشن کا نظام الاوقات قائم کیا جانا چاہیے،اور انشانکن سرگرمیوں کے ریکارڈ کو برقرار رکھا جانا چاہیے۔

5. حفاظتی پروٹوکولز اور ذاتی حفاظتی ساز وسامان (*PPE*): خطرناک مواد، کیمیکلز، اور تجرباتی طریقہ کار سے وابستہ خطرات کو کم کرنے کے لیے سخت حفاظتی پروٹوکولز پر عمل کیا جانا چاہیے۔اس میں خطرناک مادوں کی مناسب ہینڈلنگ،اسٹوریج اور ٹھکانے لگانے کے ساتھ ساتھ مناسب ذاتی حفاظتی آلات (*PPE*) جیسے لیب کوٹ، دستانے، چشمیں اور چہرے کی ڈھال کا استعمال شامل ہے۔

6. تربیت اور قابلیت کا اندازہ: لیبارٹری کے عملے کو مناسب تربیت حاصل کرنی چاہیے اور تجرباتی طریقہ کار، آپریٹنگ آلات، اور حفاظتی پروٹوکول کی پیروی کرنے میں قابلیت کا مظاہرہ کرنا چاہیے۔تربیتی پروگراموں کو دستاویزی شکل دی جانی چاہیے،اور *GLP* معیارات کی تعمیل کو یقینی بنانے کے لیے قابلیت کی تشخیص باقاعدگی سے کی جانی چاہیے۔

7. ڈیٹا کی سالمیت اور سلامتی: تحقیقی ڈیٹا کی سالمیت، رازداری اور سلامتی کے تحفظ کے لیے اقدامات کو لاگو کیا جانا چاہیے۔اس میں ڈیٹا بیک اپ کے طریقہ کار، پاس ورڈ کا تحفظ، رسائی کے کنٹرول، اور غیر مجاز رسائی، چھیڑ چھاڑ، یا ڈیٹا کے نقصان کو روکنے کے لیے خفیہ کاری کے طریقے شامل ہیں۔

8. ماحولیاتی کنٹرول: تجرباتی نتائج کی درستگی اور وشوسنیتا کو یقینی بنانے کے لیے مناسب ماحولیاتی حالات کو برقرار رکھا جانا چاہیے۔ اس میں تغیر کو کم کرنے اور تجرباتی حالات کے استحکام کو یقینی بنانے کے لیے لیبارٹری کی جگہوں کے اندر درجہ حرارت، نمی، روشنی، اور ہوا کے بہاؤ کو کنٹرول کرنا شامل ہے۔

9. اخلاقی تحفظات: اخلاقی اصولوں کو لیبارٹری تحقیق کے تمام پہلوؤں کی رہنمائی کرنی چاہیے، بشمول تحقیقی جانوروں، انسانی مضامین، اور جینیاتی مواد کا استعمال۔ جانوروں یا انسانی مضامین پر مشتمل تحقیق کو اخلاقی رہنما خطوط پر عمل کرنا چاہیے اور ادارہ جاتی جائزہ بورڈز (*IRBs*) یا جانوروں کی دیکھ بھال اور کمیٹیوں (*IACUCs*) سے مناسب منظوری حاصل کرنی چاہیے۔

10. مسلسل بہتری: لیبارٹریوں کو لیبارٹری کے طریقوں، طریقہ کار، اور کارکردگی کے میٹرکس کا باقاعدگی سے جائزہ لینے اور جانچ کر کے مسلسل بہتری کی ثقافت کو فروغ دینا چاہیے۔ کوالٹی کنٹرول کے اقدامات، آڈٹ اور معائنے سے حاصل ہونے والے تاثرات کو اصلاح اور بڑھانے کے لیے شعبوں کی شناخت کے لیے استعمال کیا جانا چاہیے۔

لیبارٹری کے ان اچھے طریقوں پر عمل کرتے ہوئے، لیبارٹریز معیار، حفاظت اور اخلاقی طرز عمل کے اعلیٰ معیارات کو برقرار رکھ سکتی ہیں،اس طرح سائنسی تحقیقی نتائج کی ساکھ اور بھروسے کو بڑھاتی ہیں۔

24.4 لیبارٹری کا دورہ کرتے وقت (When Visiting a Laboratory)

لیبارٹری کا دورہ کرتے وقت، چاہے بطور مہمان، انسپکٹر، یا معاون کے طور پر، حفاظت کو یقینی بنانے، صفائی کو برقرار رکھنے، اور کی جا

رہی تحقیق کا احترام کرنے کے لیے لیبارٹری کے کچھ طریقوں پر عمل کرنا ضروری ہے۔ لیبارٹری کا دورہ کرتے وقت یہاں کچھ لیبارٹری کے طریقے ہیں جن پر عمل کرنا ضروری ہے:

1. مناسب لباس پہنیں: لیبارٹری کے ماحول کے لیے ہمیشہ مناسب لباس پہنیں۔ اس میں عام طور پر بند پیر کے جوتے، لمبی پتلون، اور لیب کوٹ پہننا شامل ہے۔ ڈھیلے کپڑے پہننے سے گریز کریں، لٹکتے زیورات، یا ایسی اشیاء جو سامان میں پھنس سکتی ہیں۔

2. سیفٹی پروٹوکولز پر عمل کریں: داخل ہونے سے پہلے لیبارٹری کے حفاظتی پروٹوکولز اور طریقہ کار سے خود کو واقف کر لیں۔ تمام پوسٹ کردہ حفاظتی نشانات اور ہدایات کا مشاہدہ کریں، بشمول ہنگامی انخلاء کے راستے، حفاظتی سامان کے مقامات، اور خطرناک مواد کی وارننگ۔

3. چیک ان کے طریقہ کار: پہنچنے پر، لیبارٹری کے عملے یا نامزد لیب مینیجر سے چیک ان کریں۔ کسی بھی مطلوبہ لاگ بک یا وزیٹر رجسٹر پر دستخط کریں، اور کوئی بھی ضروری ذاتی حفاظتی سامان (PPE) حاصل کریں جیسے حفاظتی شیشے، دستانے، یا لیب کوٹ۔

4. اچھی حفظان صحت کا مشاہدہ کریں: حفظان صحت کی اچھی عادات پر عمل کریں، بشمول لیب میں داخل ہونے سے پہلے اور کسی بھی ممکنہ خطرناک مواد کو سنبھالنے کے بعد اپنے ہاتھوں کو صابن اور پانی سے اچھی طرح دھونا۔ لیب میں رہتے ہوئے اپنے چہرے، آنکھوں یا منہ کو چھونے سے گریز کریں۔

5. لیبارٹری کے آلات کا احترام کریں: لیبارٹری کے آلات، آلات، یا تجربات کو چھونے یا چھیڑ چھاڑ کرنے سے گریز کریں جب تک کہ لیبارٹری کے اہلکاروں کی طرف سے ایسا کرنے کی ہدایت نہ کی جائے۔ نازک یا حساس آلات کا خیال رکھیں اور فراہم کردہ استعمال کے رہنما خطوط پر عمل کریں۔

6. چوکنا اور چوکنا رہیں: اپنے ارد گرد کے ماحول پر توجہ دیں اور ہر وقت چوکس رہیں۔ ممکنہ خطرات جیسے کہ گرنے، شیشے کے ٹوٹے ہوئے سامان، یا خرابی کے آلات پر نظر رکھیں، اور لیبارٹری کے اہلکاروں کو فوری طور پر کسی بھی حفاظتی خدشات کی اطلاع دیں۔

7. خلفشار کو کم سے کم کریں: لیبارٹری میں رہتے ہوئے غیر ضروری حرکت اور خلفشار کو محدود کریں تاکہ حادثات یا جاری تجربات میں رکاوٹوں کے خطرے کو کم سے کم کیا جا سکے۔ مقررہ راستوں پر عمل کریں اور کام کے علاقوں یا راستوں میں رکاوٹ پیدا کرنے سے گریز کریں۔

8. فضلے کو صحیح طریقے سے ٹھکانے لگائیں: کسی بھی فضلہ کے مواد کو، بشمول استعمال شدہ دستانے، ٹشوز، یا دیگر ڈسپوزایبل اشیاء، کو مخصوص کچرے کے ڈبوں یا کنٹینرز میں ٹھکانے لگائیں۔ لیبارٹری کے فضلے کو ٹھکانے لگانے کے رہنما خطوط اور علیحدگی کے طریقہ کار پر عمل کریں۔

9. مدد طلب کریں: اگر آپ کو لیبارٹری کے طریقہ کار یا آلات کے استعمال کے کسی پہلو کے بارے میں یقین نہیں ہے، تو لیبارٹری کے عملے سے مدد طلب کرنے میں ہچکچاہٹ محسوس نہ کریں۔ وہ رہنمائی فراہم کرنے اور آپ کے کسی بھی سوال کا جواب دینے میں خوش ہوں

گے۔

10. باہر نکلنے کا طریقہ کار: لیبارٹری سے نکلتے وقت، اس بات کو یقینی بنائیں کہ آپ اپنے استعمال کردہ کسی بھی آلات یا سطحوں کو صحیح طریقے سے صاف اور جراثیم سے پاک کریں۔ کسی بھی ادھار شدہ پی پی ای یا سامان کو اس کے نامزد کردہ اسٹور تیج والے مقام پر واپس کریں، اور کسی بھی چیک آؤٹ طریقہ کار کی ضرورت پر عمل کریں۔

لیبارٹری کے ان طریقوں پر عمل کرتے ہوئے جب لیبارٹری کا دورہ کیا جائے تو، آپ تمام مکینوں کے لیے ایک محفوظ، نتیجہ خیز، اور باعزت ماحول کو یقینی بنانے میں مدد کر سکتے ہیں اور جو تحقیق کی جا رہی ہے اس کی مجموعی کامیابی میں اپنا حصہ ڈال سکتے ہیں۔

24.5 مزید مطالعے کے لیے تجویز کردہ کتابیں(Suggested Books for Further Readings)

1. Weinberg, S., & Hein, N. W. (Eds.). (2018). Good Laboratory Practice Regulations, Fourth Edition (Drugs and the Pharmaceutical Sciences). CRC Press.
2. Kumar, V. (Ed.). (2017). Handbook of Good Laboratory Practices (GLP): Quality Practices for Regulated Non-clinical Research and Development. CRC Press.
3. Seiler, J. P., & Maurer, H. H. (2019). Good Laboratory Practice: The Why and the How. John Wiley & Sons.
4. Weinberg, S., & Hein, N. W. (Eds.). (2021). Good Laboratory Practice Regulations, Fifth Edition (Drugs and the Pharmaceutical Sciences). CRC Press.
5. Ghosh, P. K. (2016). Good Laboratory Practice: Regulations, Management, and Techniques (Food and Drug Administration's Guidelines). CRC Press.
6. Lucier, G. W. (1993). Good Laboratory Practice Compliance: Inspection Manual. CRC Press.

پریکٹیکل ریکارڈ شیٹ(Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

عملی ریکارڈ شیٹ (Practical Record Sheet)

بی ایس سی (لائف سائنسز) سمسٹر-VI

پریکٹیکل امتحان

حیوانی بائیو ٹیکنالوجی

نوٹ: تمام سوالات کی کوشش کریں۔

1. نمونے 1 سے 5 کی شناخت کریں اور اس پر تبصرہ کریں۔ (15 نمبر)
2. دیئے گئے جانوروں کے بافتوں سے ڈی این اے نکالنے کا عمل انجام دیتے ہیں۔ (10 نمبر)
3. فراہم کردہ ڈیٹا سے تبدیلی (Transformation) کی کارکردگی کا حساب لگائیں۔ (10 نمبر)
4. لیب ریکارڈ (10 نمبر)
5. Viva-Voce (5 نمبر)