జంతు జీవసాంకేతికశాస్త్రం

(Animal Biotechnology)

SEMESTER-V

BSc, PAPER V- ZOOLOGY

As per UGC - CBCS syllabus

Dr K JAYAPPA MSc, PhD.

(CSIR-UGC JRF, GATE, AP SET Qualified)

Lecturer in Zoology

P S Govt Degree College

Penukonda -515110

Anantapur; Andhra Pradesh

Email: jayappakammiti@gmail.com

https://www.youtube.com/channel/UCL01rDLEZ9tReT4T4_RwluA/

TABLE OF CONTENTS

Sl. No	Name of the content	Pages
1	Syllabus	
2	UNIT -I Tools of Recombinant DNA technology - Enzymes and Vectors	1-12
3	UNIT- II Techniques of Recombinant DNA technology	13-30
4	UNIT- III Animal Cell Technology	30 -36
5	Unit - IV Reproductive Technologies & Transgenic Animals	37-43
6	Previous question papers	44-49
7	YouTube video links	50

Dr K JAYAPPA

ZOOLOGY SYLLABUS FOR V SEMESTER
ZOOLOGY - PAPER - V
ANIMAL BIOTECHNOLOGY

Periods: 60 **Max. Marks: 75**

Unit 1: Tools of Recombinant DNA technology - Enzymes and Vectors

Restriction modification systems: Types I, II and III. Mode of action, nomenclature, applications of Type II restriction enzymes in genetic engineering

DNA modifying enzymes and their applications: DNA polymerases. Terminal deoxynucleotidyl transferase, kinases and phosphatases, and DNA ligases

Cloning Vectors: Plasmid vectors:pBR and pUC series, Bacteriophage lambda and M13 based vectors, Cosmids, BACs, YACs,

Unit 2 Techniques of Recombinant DNA technology

Cloning: Use of linkers and adaptors

Gene delivery: Microinjection, electroporation, biolistic method (gene gun), liposome and viral-mediated delivery

PCR: Basics of PCR.

DNA Sequencing: Sanger's method of DNA sequencing- traditional and automated sequencing

Hybridization techniques: Southern, Northern and Western blotting,

Genomic and cDNA libraries: Preparation and uses

UNIT 3 Animal Cell Technology

Cell culture media: Natural and Synthetic

Cell cultures: primary culture, secondary culture, continuous cell lines; Protocols for Primary Cell Culture; Established Cell lines (common examples such as MRC, HeLa, CHO, BHK, Vero); Organ culture; Cryopreservation of cultures.

Hybridoma Technology: Cell fusion, Production of Monoclonal antibodies (mAb), Applications of mAb

Stem cells: Types of stem cells, applications

Unit 4 Reproductive Technologies & Transgenic Animals

Manipulation of reproduction in animals: Artificial Insemination, *In vitro* fertilization , super ovulation, Embryo transfer, Embryo cloning

Transgenic Animals: Strategies of Gene transfer; Transgenic - sheep, - fish; applications

Unit 5 Applied Biotechnology

Industry: Fermentation: Different types of Fermentation: Short notes on - Submerged & Solid state; batch, Fed batch & Continuous; Stirred tank, Air Lift, Fixed Bed and Fluidized; Downstream processing - Filtration, centrifugation, extraction, chromatography, spray drying and lyophilization

Agriculture: fisheries – monoculture in fishes, polyploidy in fishes; DNA fingerprinting

Dr K JAYAPPA

రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లు/ నిరోధక ఎంజైమ్‌లు లేదా అణు కత్తెరలు (Molecular scissors) రెస్ట్రిక్షన్ ఎండో న్యూక్లియేజ్‌లు (లేదా) సైట్ స్పెసిఫిక్ ఎండోన్యూక్లియేజ్‌లు

ఏ జీవి DNA నైనా ఒక నిర్దిష్ట ప్రాంతంలో కత్తిరించును, బాక్టీరియాలలోకి ప్రవేశించిన వైరస్ లయొక్క DNA ప్రతికృతిని నిరోధిస్తాయి, అందువల్ల వీటిని రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్ లు లేదా నిరోధక ఎంజైమ్ లు అంటారు. వీటిని ***E.coli*** లో కనుగొన్నారు. వెర్నర్ ఆర్బర్, డేనియల్ నాథన్స్ మరియు హామిల్టన్ స్మిత్ అను శాస్త్రవేత్తలు రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లును కనుగొన్నారు దీనికి గాను వీరికి 1978 సం. లో శరీరధర్మశాస్త్రం మరియు వైద్యరంగంలో నోబెల్ బహుమతి లబించింది.

ధర్మాలు (Properties):

★ఇవి బాక్టీరియాలో మాత్రమే ఉండే ఎండోన్యూక్లియేస్‌లు

★ఇవి బాక్టీరియాలలోకి ప్రవేశించిన ఇతర జీవుల పెరుగుదలను నిరోధించి రక్షణలో తోడ్పడుతాయి (Restriction modification).

★పాస్ఫోడైఎస్టరేస్‌లు(ఫాస్ఫోడైఎస్టరేస్ బంధాలను విచ్ఛిన్నం)

★ఇవి కేవలం రెండు పోచల DNA (ds DNA) పై మాత్రమే పని చేస్తాయి

★ బాక్టీరియాలు తమ స్వంత DNA ను ఖండించకుండా మిథైలేషన్ చెందించడం ద్వారా కాపాడుకుంటాయి.

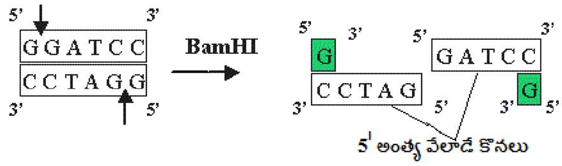
★ఇవి పునఃసంయోజక DNA (rDNA) తయారీ కి అవసరమయ్యే ప్రాథమిక పరికరాలు

పనిచేయు విధానం

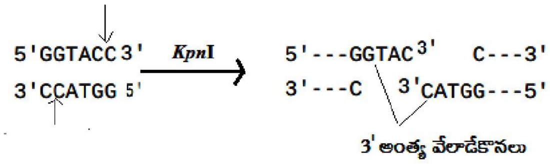
రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్ లు ద్విశృంఖల DNA లోని నత్రజని క్షారాలకు విచ్ఛిన్నంచేయకుండా కేవలం ఫాస్ఫోడైఎస్టర్ బంధం(చక్కెర మరియు ఫాస్ఫేట్ కు మధ్య ఉండే బందం)ను చేదించును. ఇలా విడగొట్టబడిన ఫాస్ఫోడైఎస్టర్ బంధాలు లైగేజ్ ఎంజైమ్ లతో కలుపబడుతాయి

రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్ లు DNA ను కత్తిరించే విధానాలు

i. 5' అంత్య వేలాడేకొనలు:- గుర్తింపు స్థానంలో అసౌష్టవంగా కత్తిరించబడటం వలన 5' – అంత్యభాగంలో తక్కువ పొడవుతో వేలాడుతూ ఉండే ఏకపోచ DNA ఏర్పడును. ఉదా: *Bam*HI



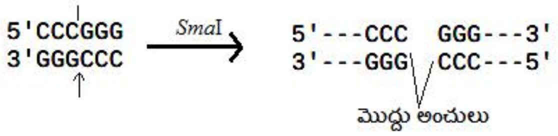
ii. 3' అంత్యంలో వేలాడేకొనలు:– ఇవికూడా గుర్తింపు స్థానంలో అసౌష్టవంగా కత్తిరించబడటం వలన 3' అంత్యంలో వేలాడే కొనలు ఏర్పడుతాయి. ఉదా:*Kpn*I



***iii.* మొద్దు అంచులు:-** ద్విశృంఖల DNA లో గుర్తింపు స్థానంలో ఎదురెదురుగా కత్తిరించడంవలన

Dr K JAYAPPA

వేలాడేకొనలు లేకుండా మొద్దు అంచులు గల DNA ముక్కలు ఏర్పడును. ఉదా: *Sma*I



నామీకరణం (Nomenclature)

★ ఏ బాక్టీరియా నుంచి వేరుచేయబడిందో ఆ బాక్టీరియంను చూచిస్తూ నామీకరణం జరుపుతారు

★ మొదటి అక్షరం బాక్టీరియా ప్రజాతిని

★ తరువాత రెండు అక్షరాలు జాతిని

★ మొదటి మూడు అక్షరాలు ఇటాలిక్స్ లో ముద్రించబడుతాయి

★ తరువాత బాక్టీరియం తెగ (Strain)- దీనిని ఆంగ్ల అక్షరాలతో గాని లేదా అరబిక్ సంఖ్యలచే (1, 2, 3, 4....) గాని చూచిస్తారు

★చివరలో రోమన్ సంఖ్య (కనుగొన్న వరుస క్రమంలో) ఉంటాయి ఉదా: 1 . *Eco*RI

ఎశ్చరీషియా కోలి *(Escherichia coli)*

E* – *ప్రజాతిలోని లోని మొదటి అక్షరం

co* – *జాతిలోని మొదటి రెండు అక్షరాలు

R* – *తెగ

I – *మొదటి ఎండో న్యూక్లియేజ్‌ను చూచిస్తాయి*

2. *Bam*HI - బాసిల్లస్ అమైలోలిక్విఫేసియెన్స్, తెగ H నుండి వేరుచేసిన మొదటి ఎంజైమ్.

3. థర్మస్ అక్వాటికస్ నుండి వేరుచేసిన మొదటి ఎంజైమ్ –*Taq*I

వర్గీకరణ: నిర్మాణం, ఖండించే విధానం మరియు వరుస క్రమం గుర్తింపు ఆధారంగా 3 రకాలు.

1. Type I రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లు
2. Type II రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లు
3. Type III రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లు

***1. Type I* రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లు**

★ఇవి బహుళ ఉప ప్రమాణాలను కల్గిన ఎంజైమ్‌లు.

★గుర్తింపు, ఖండించడం మరియు మార్పుచేయడం కోసం వేరు వేరు ఉప ప్రమాణాలు ఉంటాయి.

★బహుళ క్రియాశీలత కల్గి వుంటాయి. మార్పు చెందించడం మరియు ఖండించడం ఒకే ఎంజైమ్ నిర్వర్తిస్తుంది.

★గుర్తింపు వరుస క్రమాలు దాదాపుగా 12 – 17 నత్రజని క్షారాల జతల పరిమాణంతో సరళంగా ఉంటాయి.

★విచ్ఛేదన స్థానం గుర్తింపు స్థానానికి దాదాపుగా 1000 నత్రజని క్షారాల జతల దూరంలో ఉంటుంది.

★Mg^{2+}, SAM (S – అడినోసిల్ మిథియోనిన్) మరియు ATP లు సహ కారకాలుగా ఉపయోగపడుతాయి.

★వీటిని సాధారణంగా జెనిటిక్ ఇంజనీరింగ్ లో పయోగించరు

***2. Type II* రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లు**

★ఇవి ఒకే ఉప ప్రమాణాన్ని కల్గిన ఎంజైమ్‌లు

★ఒక ఎంజైమ్ ఒకే క్రియను నిర్వర్తిస్తుంది

★మిథైలేషన్ మరియు రెస్ట్రిక్షన్ విధులను రెండు వేరు వేరు ఎంజైమ్‌లు నిర్వర్తిస్తాయి

Dr K JAYAPPA

★వీటి గుర్తింపు స్థానం నిర్దిష్టంగా ఉండి భ్రమణ సమరూపత (Rotational symmetry); పాలిండ్రోమిక్ స్వభావాన్ని కల్గి ఉండును

ఖండించే స్థానం గుర్తింపు ప్రాంతంలో గాని లేదా గుర్తింపు ప్రాంతం ప్రక్కనే ఉంటుంది. వీటికి Mg^{2+} మాత్రమే సహకారకంగా ఉపయోగ పడును. జెనిటిక్ ఇంజనీరింగ్‌లో విరివిగా వినియోగిస్తారు.

3. Type III రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లు

★ఇవి బహుళ ఉప ప్రమాణాలను కల్గిన ఎంజైమ్‌లు, దాదాపుగా Type I ఎంజైమ్‌లను పోలి ఉంటాయి

★ఒకే ఎంజైమ్ విచ్ఛేధన మరియు మిథైలేషన్ చర్యలను నిర్వర్తిస్తుంది.

★ఇవి DNA లోని ఒకే వరుస క్రమంలో గుర్తించడం మరియు మిథైలేషన్ చెందించడం జరుగును.

విచ్ఛేధన గుర్తింపు స్థానానికి 24 – 26 నత్రజని క్షారాల జతలకు దూరంగా ఉండును.

★Mg^{2+}, SAM లు సహకారకాలుగా ఉపయోగపడుతాయి

వీటిని జెనిటిక్ ఇంజనీరింగ్‌లో వినియోగించరు.

ప్రయోజనాలు (Applications)

★జన్యు క్లోనింగ్‌లో వాంచనీయ జన్యువును ప్లాస్మిడ్ వాహకాలలోకి చొప్పించడానికి తోడ్పడుతాయి

★పునఃసంయోజక DNA తయారీలో తోడ్పడుతాయి

★ఏదైనా జన్యువులో ఒక నత్రజని క్షారం లో మార్పును కూడా గుర్తించవచ్చు (SNPs)

★రెస్ట్రిక్షన్ ఫ్రాగ్మెంట్ లెంగ్త్ పాలీ మార్ఫిజమ్ (RFLP) విశ్లేషణలో తోడ్పడుతాయి

★★★ క్లోనింగ్ వాహకాలు ★★★

వీటినే క్లోనింగ్ వాహకాలు అంటారు. ఇవి DNA అణువులను మోసుకుపోతాయి. ఉపయుక్తమైన వాహకానికి క్రింది లక్షణాలు ఉందాలి.

1. ప్రతికృతి జరపగల శక్తి ఉండాలి
2. DNA ను మోసుకుపోయే సామర్థ్యం ఉండాలి
3. వృద్ధి చెందే శక్తి ఉండి సులభంగా గుర్తించేటట్లు ఉండాలి
4. తక్కువ పరిమాణంను కల్గి ఉండాలి
5. వ్యాధి జనకంగా ఉండరాదు.

క్రింది వాటిని వాహకాలుగా వినియోగిస్తారు. అవి ప్లాస్మిడ్‌లు, బాక్టీరియోఫేజ్‌లు, కాస్మిడ్‌లు, కృత్రిమ క్రోమోసోమ్ వాహకాలు.

a. ప్లాస్మిడ్‌లు (PLASMIDS)

కేంద్రకపూర్వ కణాలలో ఉండే సర్పిలాకార, స్వయం ప్రతికృతి సామర్థ్యం కలిగిన క్రోమోసోమేతర DNA ను ప్లాస్మిడ్‌లు అంటారు. ప్లాస్మిడ్ అను పదాన్ని లిడర్బర్గ్ అను శాస్త్రవేత్త ప్రతిపాదించారు.

i. pBR322 వాహకం

★అత్యంత ప్రాచుర్యం కలిగిన మరియు అధికంగా వినియోగించే ప్లాస్మిడ్ దీని పరిమాణం 4363bp.

★శాన్‌ఫ్రాన్సిస్కోలోని కాలిఫోర్నియా విశ్వవిద్యాలయానికి చెందిన హెర్బర్ట్ బోయర్ ప్రయోగశాలలో 1977 సం. లో సృష్టించబడింది

★దీనిని కనుగొన్న శాస్త్రవేత్తల మీదుగా pBR322 అని పేరు పెట్టడం జరిగింది. ***ColEI* రకానికి చెందిన ప్లాస్మిడ్**

Dr K JAYAPPA

pBR – p – ప్లాస్మిడ్; B – బొలీవర్; R – రొడ్రిగెజ్.

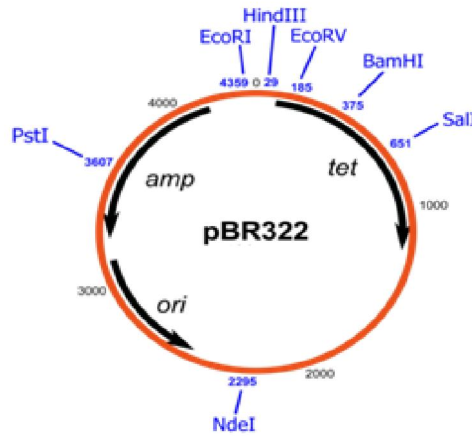
★ రెండు ఎన్నిక మార్కర్‌లు ఉంటాయి (amp^r, tet^r).

★amp^r జన్యువులో PstI, PvuI లకు రెండు ముఖ్య ప్రాంతాలు ఉంటాయి.

★tet^r జన్యువులో *Bam*H మరియు *Sal*I లకు గుర్తింపు ప్రాంతాలు ఉంటాయి

★సామర్థ్యం –< 5kb (Insertion capacity <5 kb)

★కావలసిన DNA ను ఎన్నిక మార్కర్ జన్యువులలోకి ప్రవేశపెట్టడంద్వారా, పునఃసంయోజక అతిథేయిని ఎన్నుకుంటారు.



ii. pUC 18 & pUC 19

★ఇవి pBR322 నుండి ఉద్భవించినవి. పరిమాణంలో (2.5 kb)చిన్నవిగా ఉంటాయి దీనిలో p – ప్లాస్మిడ్; UC – University of California.

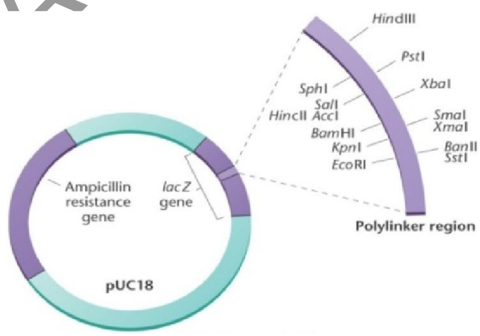
★*amp*^{r} మరియు *lacza*$^+$ అను రెండు ఎన్నిక మార్కర్లు ఉంటాయి

★క్లోనింగ్ కొరకు ఎన్నుకోబడిన E.coli laczα– ను కల్గివుండటంవల్ల అది β–గలాక్టోసిడేస్ యొక్క α ఉప ప్రమాణాన్ని ఉత్పత్తిచేయలేదు. కావున X– గలాక్టోస్ ను జలవిశ్లేషణ చేయలేదు. దాత DNA ను *amp*^{r} ప్రాంతంలోకి ప్రవేశపెడుతారు

★పునఃసంయోజక వాహకాన్ని కలిగిన E.coli ఆంఫిలిసిన్ కు సూక్ష్మగ్రాహ్యతను చూపును. కాని క్రియాత్మక β–గలాక్టోసిడేస్ ఎంజైమ్‌ను కల్గి ఉండును.

★క్రియాత్మక β–గలాక్టోసిడేస్ ఎంజైమ్ ను కల్గి వుండుట ద్వారా E.coli, X– గలాక్టోస్ ను IPTG (Isopropyl thiogalactose) సమక్షంలో జలవిశ్లేషణ చేసి నీలి రంగును ఏర్పరుచును.

★IPTG (Isopropyl thiogalacose) lac – ఒపరాన్ ప్రేరేపకం



b. భాక్టీరియోఫేజ్ వాహకాలు

★బాక్టీరియాలకు సంక్రమించే వైరస్‌లను బాక్టీరియోఫేజ్‌లు అంటారు.

★ఎక్కువ పరిమాణం కలిగిన DNA ను క్లోనింగ్ చేయడానికి వినియోగిస్తారు.

★ప్లాస్మిడ్‌ల కన్నా అధిక సామర్థ్యంను కలిగి ఉంటాయి.

★సాధారణంగా వాహకాలుగా వినియోగించే బాక్టీరియోఫేజ్‌లు, λ ఫేజ్, M13 ఫేజ్.

JAYAPPA

అ. లాంబ్డా(λ) ఫేజ్ వాహకాలు

★ఇవి ద్వి శృంఖల DNA (ds DNA) ను కల్గి ఉంటాయి.

★జీనోమ్ పరిమాణం 48.5 kbp, రేఖీయ స్థితిలో ఉండును. ట్రాన్స్ ఫర్ మేషన్ సామర్థ్యం ప్లాస్మిడ్‌ల కన్నా అధికంగా ఉంటుంది(High transformation efficiency)

★DNA యొక్క 5I కొనలో కొహెసివ్ (మొనదేలిన) అంత్యాలు ఉంటాయి. వీటివలన సులువుగా రేఖీయ స్థితి నుండి సర్పిలాకారంలోకి మారుతుంది.

★రేఖీయ స్థితిలో λ ఫేజ్ DNA ను మూడు భాగాలుగా విభజించ వచ్చు అవి

1. <u>ఎడమ వైపు భాగం:</u> ఇది ఆవశ్యకమైన భాగం ఇందులో తల, తోక భాగాలను సంశ్లేషించే జన్యువులుంటాయి

2. <u>కుడివైపు భాగం:</u> ఇది ఆవశ్యకమైన భాగం, DNA ప్రతికృతికి కావలసిన ప్రోటీన్ లను నిర్ధారిస్తుంది.

3. <u>మధ్యబాగం:</u> ఇది ఫేజ్‌కి అనావశ్యకభాగం కావున ఈ ప్రాంతంలోకి కావలసిన DNA ను ప్రవేశ పెడుతారు.

★క్లోనింగ్ పద్ధతిలో అన్యజీవుల DNA ను ఉపయోగించే

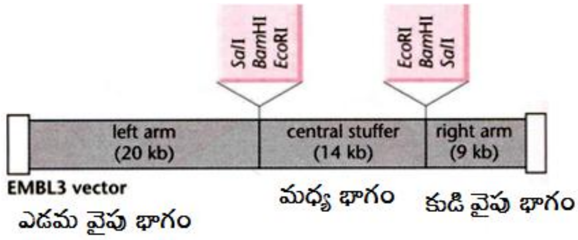
విధానాన్ని బట్టి λ ఫేజ్ వాహకాలు రెండు రకాలు

1. Insertional λ ఫేజ్ వాహకాలు:

ఉదా– **λ gt-10 , λ gt-11.**

2. Replacement λ ఫేజ్ వాహకాలు:

ఉదా– **EMBL3, EMBL4**



ఆ. M13 వాహకాలు

★అతి సాధారణంగా వుపయోగించే ఏక శృంకల DNA ఫేజ్ వాహకం

★జీనోమ్ పరిమాణం 6.4 kbases

★ఇవి కేవలం లైంగిక పిలై కల్గిన బాక్టీరియా కణాలలోకి మాత్రమే ప్రవేశిస్తాయి

★అతిథేయి కణంలోపల ద్విశృంఖల DNA గా మారును.

★M13 వాహకాన్ని ఉపయోగించి పెద్ద DNA ఖండాలను క్లోన్ చేయవచ్చు.

★M13 ఫేజ్‌లు ఏకశృంఖల DNA ను అందిస్తాయి . వీటినిDNA సీక్వెన్సింగ్ లో ఉపయోగిస్తారు **.**

c. కాస్మిడ్ వాహకాలు (COSMIDS)

ఇవి మొదటి తరం సంకర వాహకాలు

★కోలిన్స్ మరియు బ్రూనింగ్ అను శాస్త్రవేత్తలు మొట్టమొదటగా తయారు చేశారు

★కాస్(COS) అనునది **λ ఫేజ్ లోని కొహెసివ్** కొనలోని భాగం మిడ్ (MID) అనునది **ప్లాస్మిడ్** నుండితీసుకొనబడినది

(COSMID = COS from λ ఫేజ్ + MID from pBR322)

★వాహక సామర్థ్యం 50 kb

Dr K JAYAPPA

★సాధారణంగా వినియోగించే కాస్మిడ్ లు –**pJB8, pWE.**

★జీన్ లైబ్రరీలు తయారుచ్ చేయడంలో వినియోగిస్తారు

కాస్మిడ్ నిర్మాణం:

★ప్రతికృతి ఆరంభ స్థానం (Origin of replication (ori).), అన్యజీవుల DNA ను ప్రవేశపెట్టుటకు మరియు రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్ లకు స్థానాలు, ప్లాస్మిడ్ల యొక్క ఎన్నిక మార్కర్లు(Selectable marker from plasmid) ఉండును.

★ కాస్ స్థానం (cos site) – ఇది 12 నత్రజని క్షారాలతో కూడిన మొనదేలిన అంచులను ఏర్పరుచును

★ ఆంపిసిలిన్ నిరోధక జన్యువు (amp^r).

d. బాక్టీరియల్ కృత్రిమ క్రోమోసోమ్(BACs)

★ఇవి కృత్రిమ సంకర వాహకాలు, **F**– ప్లాస్మిడ్స్ లోని కొంతభాగం మరియు λ ఫేజ్, T_4 ఫేజ్‌లలోని కొంతభాగాన్ని కల్గి ఉంటాయి

★λఫేజ్– యొక్క Cos–N భాగం, T_4ఫేజ్ యొక్క lox జన్యువులను BACs నిర్మాణంలో ఉపయోగిస్తారు.

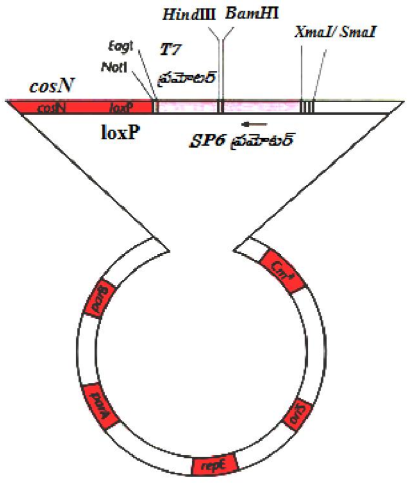
★T_7 మరియు SP_6 అను బలమైన ప్రమోటర్‌లను BACs కలిగి ఉండును.

★Hind III, BamHI మరియు NotI రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లకు ప్రత్యేకమైన రెస్ట్రిక్షన్ స్థానాలు ఉంటాయి.

★ఇతర కృత్రిమ క్రోమోసోమ్ వాహకాలకన్నా BACs ఎక్కువ స్థిరత్వంతో అధిక వాహక సామర్థ్యంను కలిగి ఉంటాయి.

★ప్రవేశపెట్టే DNA పరిమాణం సాధారణంగా 125kb ఉంటుంది.

★ఉన్నత నిజకేంద్రక జీవుల జీనోమిక్ లైబ్రరీల తయారీలో వీటిని వుపయోగిస్తారు.



BACs నిర్మాణం

e. ఈస్ట్ కృత్రిమక్రోమోసోమ్‌లు (Yeast Artificial chromosomes)

★ఇవి ఈస్ట్ లో రేఖీయంగా క్రోమోసోమ్‌ల రూపంలో ఉండే అధిక సామర్థ్యం కల వాహకాలు.

★ఇవి షటిల్ వెక్టార్‌లు, వీటిని మొదట *E.coli* లో సర్పిలాకార ప్లాస్మిడ్‌లుగా అనుసంధానం (manipulation) చేసి రేఖీయ క్రోమోసోమ్‌లుగా ఈస్ట్ లలోకి ప్రవేశ పెడతారు

★ఈ వాహకాలు ఈస్ట్ క్రోమోసోమ్‌ల లక్షణాలను కలిగి ఉంటాయి

ARS ప్రాంతం – స్వతంత్ర ప్రతికృతి ఆరంభస్థానం

CEN ప్రాంతం – సెంట్రోసోమ్ ప్రాంతం

TEL ప్రాంతం – క్రోమోసోమ్ స్థిరత్వంను కాపాడును (టీలోమియర్)

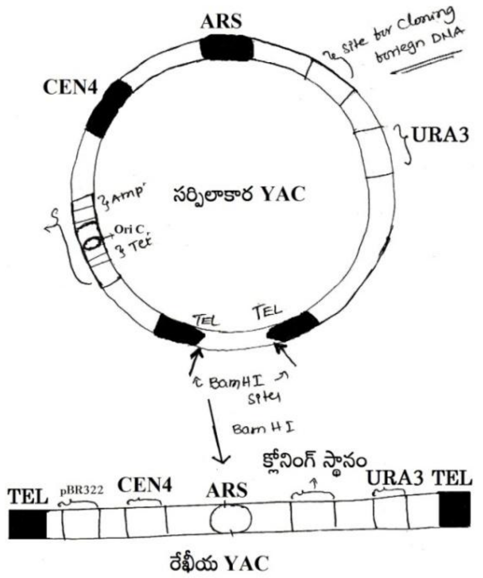
Dr K JAY

★pBR322 యొక్క వరుస క్రమాన్ని కలిగి ఉండటం వల్ల E.coli లో ఎన్నిక మరియు మార్పుచెందించడం సులువుగా ఉంటుంది.

★సాధారణంగా YACs నిర్మాణంలో URA -3 ఎన్నిక మార్కర్ గా వినియోగిస్తారు.

★YACs ను నిజకేంద్రక జీవుల జన్యువులు, DNA మరియు బాక్టీరియల్ ఒపరాన్‌ల క్లోనింగ్‌లో వినియోగిస్తారు

★వీటిని ఎక్కువగా ఉన్నత నిజకేంద్రక జీవుల జీనోమ్ ప్రాజెక్ట్ ల విశ్లేషణలో వినియోగిస్తారు

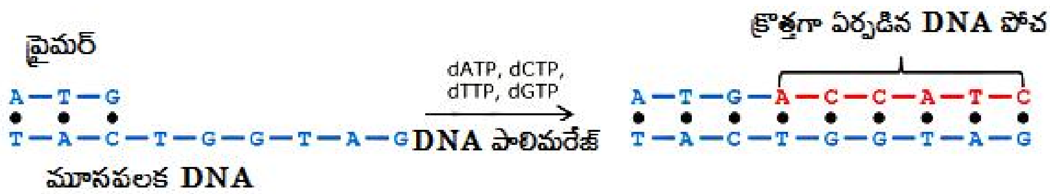


AYAPPA

DNA ను మార్పు చెందించే ఎంజైములు (DNA MODIFYING ENZYMES)

I. పాలిమరేజ్ లు:

- మూసఫలక(Template)DNA పోచ ఆధారంగా క్రొత్త DNA పోచను ఏర్పరచే ఎంజైమ్‌లను DNA పాలిమరేజ్‌లు అంటారు. ఇవి క్రొత్తగా ఏర్పడే DNA పోచ యొక్క 3I OH వైపు డీఆక్సీరైబో న్యూక్లియోటైడ్‌లను కలుపుతాయి.
- క్రొత్తగా ఏర్పడే DNA పోచ ఎల్లపుడూ 5^{I} – 3^{I} దిశలోనే ఏర్పడుతుంది.
- పాలిమరేజ్ ఎంజైమ్ చర్యావిధానంకు క్రింది పధార్థాలు అవసరం.
  a) మూసఫలక DNA
  b) స్వేచ్ఛా 3IOH ను కల్గిన ప్రైమర్
  c) నాలుగు రకాల డీ ఆక్సీరైబోన్యూక్లియోటైడ్ ఫాస్ఫేట్ ల సమూహం (dNTPs).



- r-DNA సాంకేతిక శాస్త్రంలో వివిధ రకాల పాలిమరేజ్.లను వినియోగిస్తారు.
  1. E.coli DNA పాలిమరేజ్
  2. క్లినోఫ్రాగ్మెంట్
  3. ఉష్ణస్థిర DNA పాలిమరేజ్
  4. రివర్స్ ట్రాన్స్ క్రిప్టేజ్

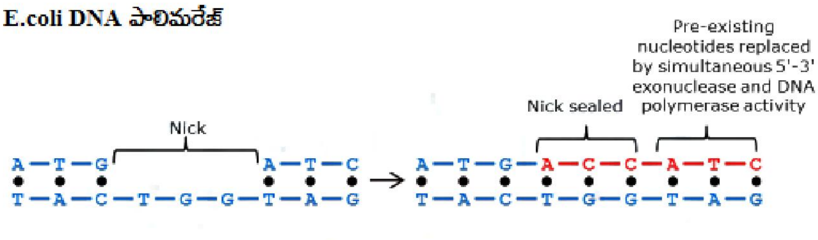
i. E.coli DNA పాలిమరేజ్

- ఇది DNA పాలిమరేజ్ మరియు DNA న్యూక్లియేజ్ క్రియాశీలత రెండింటిని కల్గి ఉండును
- ఈ ఎంజైమ్ మొదట DNA నిక్ ప్రాంతంలో అంటిపెట్టుకొని నిక్ ప్రాంతంలో మూసఫలక DNA ఆధారంగా క్రొత్త న్యూక్లియోటైడ్ లను జతచేస్తుంది.
- DNA పాలిమరేజ్ యొక్క వేరువేరు భాగాలు వేరువేరు క్రియాశీలతలను కలిగిఉండును.

1. కార్బాక్సిల్ అంత్యభాగం: 5^{I}– 3^{I} పాలిమరేజ్ క్రియాశీలత
2. మధ్యభాగం: 3^{I}–5^{I} ఎక్సోన్యూక్లియేజ్ క్రియాశీలత
3. అమినో అంత్యభాగం: 5^{I}–3^{I} ఎక్సోన్యూక్లియేజ్

Dr K JA

E.coli DNA పాలిమరేజ్

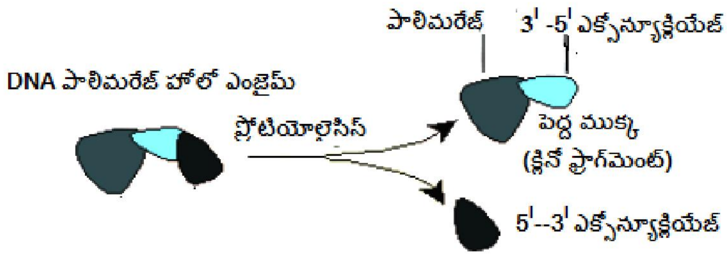


ii. క్లినోఫ్రాగ్మెంట్.

- E.coli DNA పాలిమరేజ్ I హోలో ఎంజైమ్ ను ప్రోటియేజ్ ఎంజైమ్ తో జలవిశ్లేషణ చేసినపుడు రెండు ముక్కలు ఏర్పడుతాయి
- <u>పెద్ద ముక్క</u>:– 5^{I}–3^{I} పాలిమరేజ్ మరియు 3^{I}–5^{I} ఎక్సోన్యూక్లియేజ్ క్రియాశీలతను కల్గి ఉండును.
- <u>చిన్న ముక్క</u>:– 5^{I}–3^{I} ఎక్సోన్యూక్లియేజ్ క్రియాశీలతను మాత్రమే కల్గి ఉండును.
- పెద్దముక్కను క్లినోఫ్రాగ్మెంట్ అంటారు, దీనిని ప్రదానంగా DNA సీక్వెన్సింగ్‌లో ఉపయోగిస్తారు.

rDNA సీక్వెన్సింగ్‌లో క్లినోఫ్రాగ్మెంట్ ఉపయోగాలు:

1. ఏకపోచ మూసఫలక DNA నుండి ద్విశృంఖల DNA ను ఏర్పరుచును
2. రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లు ఉత్పత్తిచేసిన 5^{I} మరియు 3^{I} అంత్యంలో మొనదేలిన కొనలను మొద్దు అంచులుగా మార్చును.



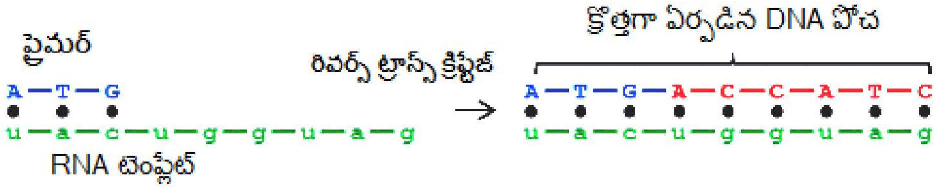
iii. ఉష్ణస్థిర DNA పాలిమరేజ్:

- ఇది అధిక ఉష్ణోగ్రతల వద్ద కూడా క్రియాశీలంగా వుండే ఎంజైమ్.
- దీనిని థర్మస్ అక్వాటికస్ అను బాక్టీరియా నుండి వేరు చేశారు. దీని నుండి వేరుచేసిన ఎంజైమ్‌ను Taq పాలిమరేజ్ అంటారు.
- ఈ ఎంజైమ్‌ను PCR (Polymerase chain reaction) లో DNA ను amplify చేయడానికి ఉపయోగిస్తారు.

iv. రివర్స్ ట్రాన్స్ క్రిప్టేజ్

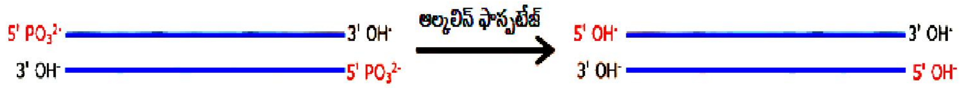
- ఇది RNA అధారిత DNA పాలిమరేజ్, RNA వైరస్‌ల (రిట్రో వైరస్)లో ప్రతికృతిలో ఉపయోగపడును.ఇందులో మొదట RNA అణువు DNA గా మారును తరువాత అతిథేయి జీనోమ్‌లోకి ప్రవేశించును.

- mRNA ఆధారంగా ఏర్పడిన క్రొత్త DNA పోచను cDNA (కాంప్లిమెంటరీ DNA) అంటారు.
- రివర్స్ ట్రాన్స్ క్రిప్టేజ్ ఎంజైమ్ RNAseH క్రియాశీలతను కల్గి DNA–RNA హైబ్రిడ్‌లోని RNA ను విచ్ఛిన్నం చేయును.
- రివర్స్ ట్రాన్స్ క్రిప్టేజ్ ఎంజైమ్‌ను వినియోగించి mRNA నుంచి తయారు చేసిన ద్విశృంఖల cDNA ను జెనిటిక్ ఇంజనీరింగ్ లో వినియోగిస్తారు.
- ద్విశృంఖల cDNA ను వ్యక్తీకరణ వాహకాలలో నేరుగా ప్రవేశపెట్టి దానికి సంబంధించిన ప్రోటీన్‌ను ఎక్కువ మొత్తంలో ఉత్పత్తి చేస్తారు.



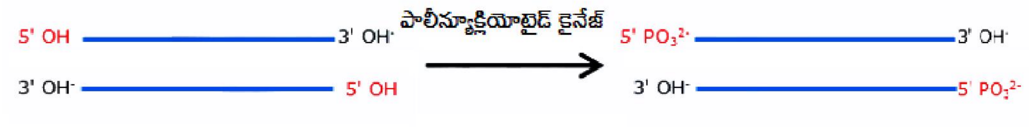
II. ఆల్కలైన్‌ఫాస్ఫటేజ్:

- ఈ ఎంజైమ్‌లు DNA 5[I] కొనలో ఫాస్ఫేట్ గ్రూప్‌ను తొలగించును. ఈ ఎంజైము ఆల్కలిన్ **pH** వద్ద క్రియాశీలం అవుతాయి కాబట్టి వీటికి ఆల్కలిన్ పాస్ఫటేజ్ అని పేరు వచ్చింది.
- వాణిజ్యపరంగా ఈ ఎంజైమ్‌ను ***E.coli*** (బాక్టీరియా), దూడయొక్క ప్రేగు మరియు ఆర్కిటిక్ ష్రింప్ నుండి వేరు చేస్తారు.
- క్లోనింగ్ ప్రయోగాలలో ఈ ఎంజైమ్‌ను సెల్ఫ్ లైగేషన్‌ను నిరోధించడానికి ఉపయోగిస్తారు.



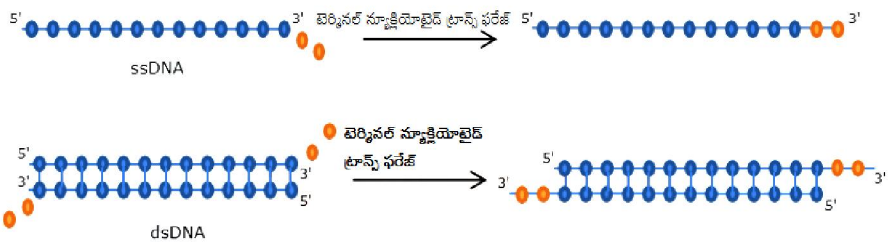
III. పాలిన్యూక్లియోటైడ్ కైనేజ్(PNK):

- ఈ ఎంజైమ్ ఆల్కలిన్‌పాస్ఫేట్‌కు పూర్తీ వ్యతిరేఖంగా పనిచేస్తుంది.ఈ ఎంజైమ్ ATP లోని ఫాస్ఫేట్ గ్రూప్‌ను DNA లోని 5[I] కొనకు అనుసంధానిస్తుంది.
- ఈ ఎంజైమ్‌ను T_4 ఫేజ్ సంక్రమించిన *E.coli* నుంచి వేరు చేశారు.



IV. టెర్మినల్ న్యూక్లియోటైడ్ ట్రాన్స్ ఫరేజ్:

- ఈ ఎంజైమ్‌లు DNA లోని 3^Iకొనకు ఒకటి లేదా అంతకంటే ఎక్కువ డీ ఆక్సీరైబోన్యూక్లియోటైడ్స్ కలపడంను ప్రేరేపిస్తుంది.
- ఈ ఎంజైమ్ ఏకశృంకల మరియు ద్వి శృంకల DNA లపై పనిచేస్తుంది.
- దీనికి ప్రైమర్ అవసరంలేదు.
- ఈ ఎంజైమ్‌ను లేగదూడ థైమస్ నుండి వేరు చేశారు.



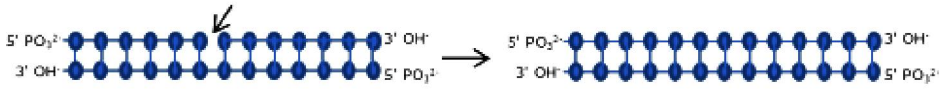
V. లైగేస్‌లు(అణు జిగురులు)

- లైగేస్ ఎంజైమ్‌లు రెండు భిన్న DNA అణువుల స్వేచ్ఛాకొనలలోని ఒక DNA పోచలోని స్వేచ్ఛా 5^I ఫాస్ఫేట్ గ్రూప్‌కి మరియు వేరొక పోచయొక్క 3^I హైడ్రాక్సిల్ గ్రూప్‌కి మధ్య ఫాస్ఫోడైఎస్టర్ బంధాన్ని ఏర్పరుస్తాయి.
- DNA ప్రతికృతిలో ఏర్పడిన ఒకజాకిశకలాలను కలపడంలో తోడ్పడును.
- పునఃసంయోజక DNA తయారీ విధానంలో ఒక జీవియొక్క DNA ను వాహక DNA తో కలపడానికి తోడ్పడును. దీనిని లైగేషన్ అంటారు.మాలిక్యులార్ క్లోనింగ్‌లో సాధారణంగా వినియోగించే DNA లైగేజ్– T_4 DNA లైగేజ్.
- T_4 DNA లైగేజ్ క్రియాశీలతకు ATP సహకారకం మరియు $Mg2^+$ అయాన్‌లు అవసరం.

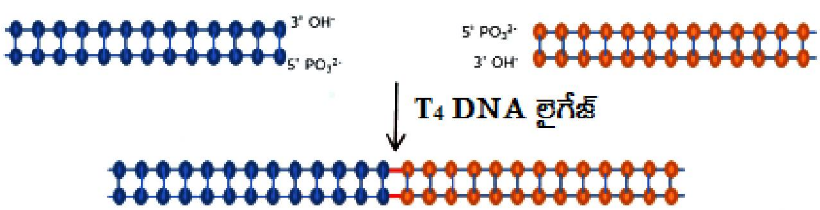
Dr K JAYAPPA

DNA ముక్కలను అతికించడంలో లైగేజ్ ఎంజైమ్ పాత్ర

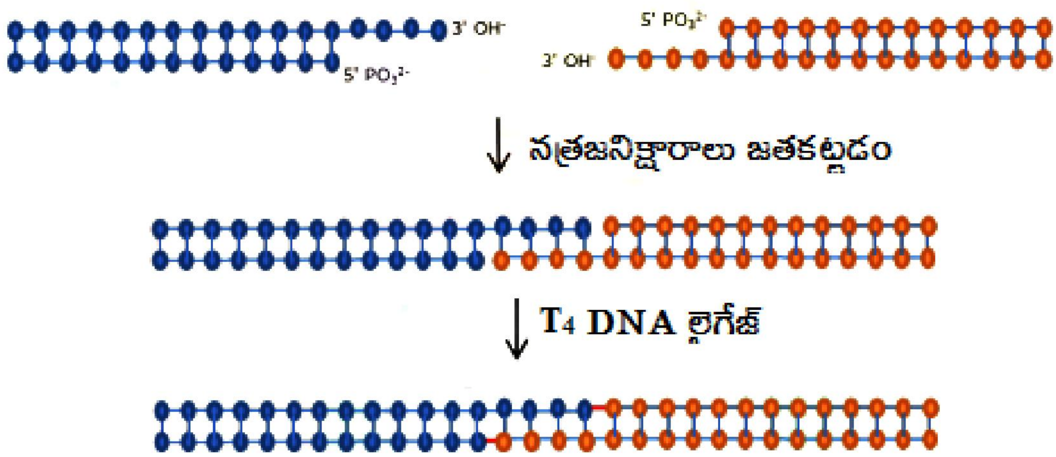
పాశోడైఎస్టర్ బంధం లేని ప్రాంతం



మొద్దు అంచుల లైగేషన్:–



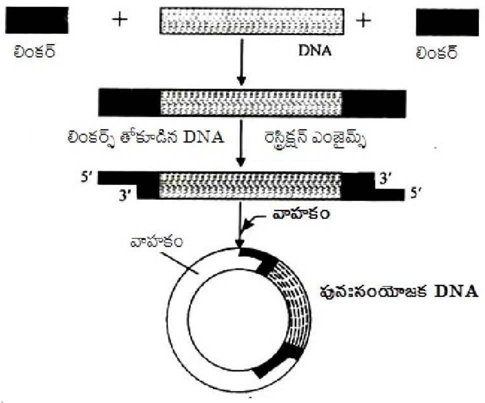
మొనదేలిన అంచుల లైగేషన్



Dr K JAYA

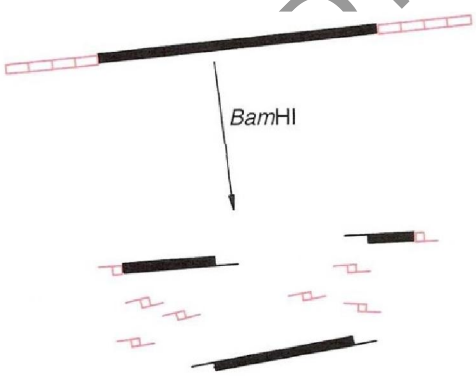
లింకర్స్ మరియు అడాప్టర్స్

లింకర్స్:– కొన్ని రైబోన్యూక్లియోటైడ్లను కలిగిన చిన్న చిన్న DNA ముక్కలను లింకర్స్ అంటారు. వీటిలో రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్ లకు నిర్దిష్టమైన స్థానాలు ఉంటాయి, ఇవి లైగేజ్ ల సమక్షంలో DNA కు అతుక్కొని మొద్దు అంచులను ఏర్పరుస్తాయి. లింకర్స్ ను రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్ లతో ఖండించినపుడు మొనదేలిన అంచులను ఏర్పరుస్తాయి.



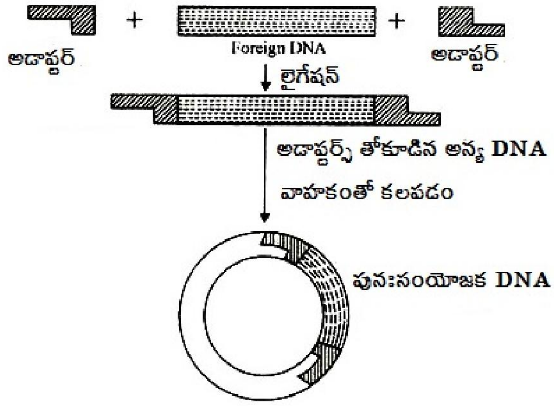
పరిమితి / లిమిటేషన్:

లింకర్స్ ను ఖండించడానికి ఉపయోగించే రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్కు ప్రధాన లేదా లక్షిత DNA లో కూడా రెస్ట్రిక్షన్ స్థానాలు ఉంటే లక్షిత DNA కూడా ఖండించబడడం అనేది లోపంగా ఉంటుంది.

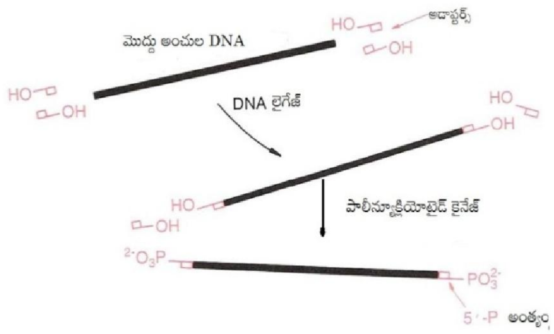


BamHI కు అంతర్గత స్థానాలుండటం ద్వారా ఖండించబడిన ప్రధాన DNA

అడాప్టర్స్:- కొన్ని రైబోన్యూక్లియోటైడ్లను కలిగిన చిన్న చిన్న సంశ్లేషిత DNA ముక్కలను అడాప్టర్స్ అంటారు. లింకర్స్ లగా కాకుండా ఆడాప్టర్స్ ముందుగానే మొనదేలిన అంత్యాలను కలిగి ఉంటాయి, కావున DNA కు లైగేషన్ చేసినపుడు రెస్ట్రిక్షన్ స్థానాలను ఏర్పరుస్తాయి.



కాని అడాప్టర్స్ మొనదేలిన అంత్యాలను కల్గి ఉండడం ద్వారారెండు అడాప్టర్స్ కలసిపోయి డైమర్ లను ఏర్పరచి తిరిగి మొద్దు అంచులను ఏర్పరుస్తాయి, ఈ సమస్యను అధిగమించడానికి 5' అంత్యం ను పాలీ న్యూక్లియోటైడ్ ఎంజైమ్ను వినియోగించి మార్పుచెందిస్తారు, దీని వల్ల లైగేజ్ ఎంజైమ్ ఫాస్ఫో డైఎస్టర్ బందంను ఏర్పరచలేదు.



అడాప్టర్ DNA కు బంధించబడిన తరువాత 5' అంత్యంను తిరిగి ఆల్కలిన్ ఫాస్ఫటేజ్ ఎంజైమ్ను వినియోగించి 5' అంత్యంలోని ఫాస్ఫేట్ను తొలగించి నిర్దేశిత వాహకంలోకి సులువుగా ప్రవేశపెట్టవచ్చు.

Dr K JAYAPPA

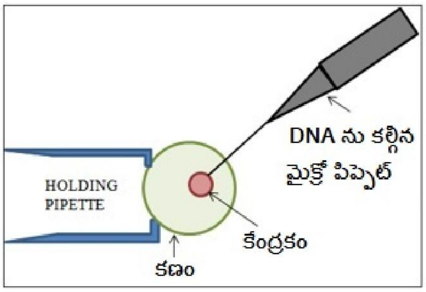
*** జన్యు డెలివరీ పద్ధతులు ***

మైక్రోఇంజెక్షన్ పద్ధతి:

ఈ పద్ధతిలో DNA ను మైక్రోఇంజెక్షన్ పరికరం సహాయంతో నేరుగా కణం లేదా కేంద్రకం లేదా ప్రోటోప్లాస్ట్ లోకి ప్రవేశపెడతారు. ఇది రసాయనిక పద్ధతికన్నా సమర్ధవంతమైనది.

ఈ పద్ధతిలో DNA ను నేరుగా కేంద్రకంలోకి ప్రవేశపెట్టుటను సూక్ష్మదర్శిని సహాయంతో పర్యవేక్షిస్తారు.

ఈ పద్ధతిని క్లోనింగ్ జంతువులను మరియు జన్యుపరివర్తిత జంతువులను ఉత్పత్తిచేయడంలోనూ వినియోగిస్తారు



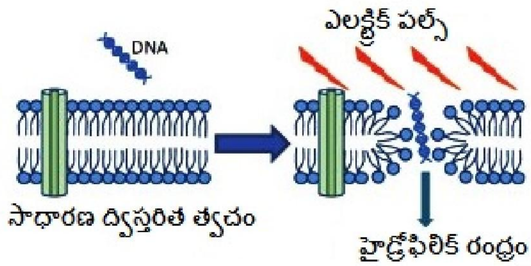
ఎలక్ట్రోపోరేషన్:

ఎలక్ట్రిక్ కరెంట్ ప్రభావంతో నిజకేంద్రక కణాలలోకి DNA ను ప్రవేశపెట్టుటను ఎలక్ట్రోపోరేషన్ అంటారు. ఎలక్ట్రిక్ కరెంట్ కణంయొక్క ప్లాస్మాత్వచంపై తాత్కాలిక రంధ్రాలను ఏర్పరుస్తాయి, వీటిద్వారా DNA లోపలికి ప్రవేశిస్తుంది.ఈ పద్ధతిలో కణంలోకి DNA ప్రవేశ శాతం ఎక్కువగా ఉంటుంది కాని నిర్దేశిత ప్రాంతాలలోకి DNA ప్రవేశించకపోవడం అనేది లోపంగా ఉంటుంది.

ఎలక్ట్రోపోరేషన్ ను రెండు విధాలుగా నిర్వహిస్తారు.

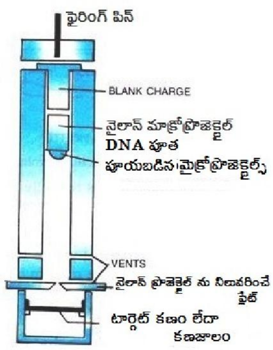
తక్కువ వోల్టేజి: ఈ పద్ధతిలో 300–400 Volts/cm కరెంటును 25–50 సార్లు పునరావృత పద్ధతిలో అందజేస్తారు. DNA ప్రవేశం సాధారణంగా అధికంగా ఉంటుంది కాని ప్రవేశపెట్టబడిన కణాలు అస్థిరంగా ఉంటాయి. జంతుకణాలు, ప్రోటోప్లాస్ట్ లలోకి DNA ను ప్రవేశపెట్టడానికి ఈ పద్ధతిని వినియోగిస్తారు.

ఎక్కువ వోల్టెజి:- ఈ పద్ధతిలో 1000–1500 volts/cm కరెంటును తక్కువ సమయంలో ఇస్తారు. DNA ప్రవేశ సామర్థ్యం తక్కువగా ఉంటుంది కాని ప్రవేశపెట్టబడిన కణాలు స్థిరంగా ఉంటాయి. ప్రోటోప్లాస్ట్ లలోకి DNA ను ప్రవేశపెట్టడానికి వినియోగిస్తారు.



మైక్రోప్రాజెక్టైల్ పద్ధతి (లేదా) బయోలిస్టిక్ పద్ధతి (లేదా) జీన్ గన్ పద్ధతి:

ఈ పద్ధతిలో అధిక పీడనంను ఉతత్తిచేసే పరికరం సహాయంతో కణజాలాల్లోకి DNA ను ప్రవేశపెడతారు. ఈ పరికరంలో అధిక పీడనంవల్ల మైక్రోప్రాజెక్టైల్ వ్యవస్థ, సమపాళ్ళలో టంగ్స్టన్ మరియు అధిక గాడతతో DNA పూతపూసిన మైక్రోప్రాజెక్టైల్ వ్యవస్థ క్రియాశీలమై కణజాలంలోకి DNA ను ప్రవేశపెట్టడం జరుగును. ఈ పద్ధతి ద్వారా DNA ను జీవించివున్న జీవి కణజాలంలోకి నేరుగా ప్రవేసపెట్టవచ్చు.

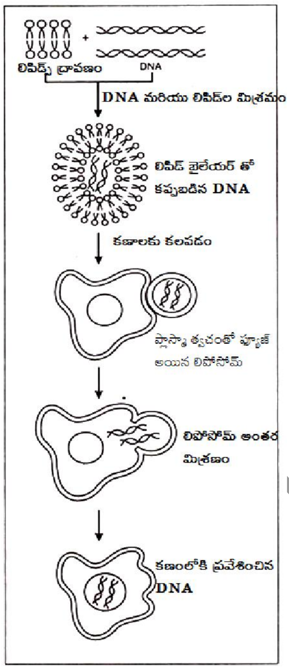


బాలిస్టిక్ పరికరం

Dr K JAYAPPA

లిపోసోమ్ మధ్యవర్తిత్వ DNA బదిలీ (లిపోసోమ్ మీడియేటేడ్ జీన్ ట్రాన్స్ఫర్):

ఫాస్పోలిపిడ్‌లు, లిపిడ్ బైలేయర్‌లను ఏర్పరచదం, సెల్ఫ్ సీలింగ్ సామర్థ్యం అను లక్షణాలను కల్గి ఉందటంద్వారా అవి సులువుగా లిపోసోమ్‌లను ఏర్పరుస్తాయి. DNA మరియు పాస్పోలిపిడ్‌లను కల్గిన ద్రావణ మిశ్రమంను కలియతిప్పడం వలన పాస్పోలిపిడ్ లిపోసోమ్‌లు ఏర్పడుతాయి. లిపోసోమ్‌లు ప్లాస్మాత్వచంద్వారా సులువుగా కణంలోపలికి ప్రవేశిస్తాయి.



పాలిమరేజ్ చైన్ రియాక్షన్ (PCR)

ఒక జన్యువును అసంఖ్యాకమైన ప్రతులుగా అభివృద్ధి పరచదానికి PCR సాంకేతికతను వినియోగిస్తారు. PCR ను ఆటోమేటెడ్ సైక్లర్ సహాయంతో నిర్వహిస్తారు. ఆటోమేటెడ్ సైక్లర్ లు రసాయనిక మిశ్రమాలను స్వల్ప వ్యవధిలో అతివేగంగా వేడి చేసి చల్లపరుస్తాయి. ఇందులో ప్రధానంగా మూడు దశలు ఉంటాయి, వీటిని 30–40 సార్లు పునరావృతం చేస్తారు.

PCR లో వినియోగించే రసాయనిక మిశ్రమంలో ప్రైమర్లు, క్లోనింగ్ చేయదలచిన DNA, DNA పాలిమరేజ్ ఎంజైమ్, dNTPs ఉంటాయి.

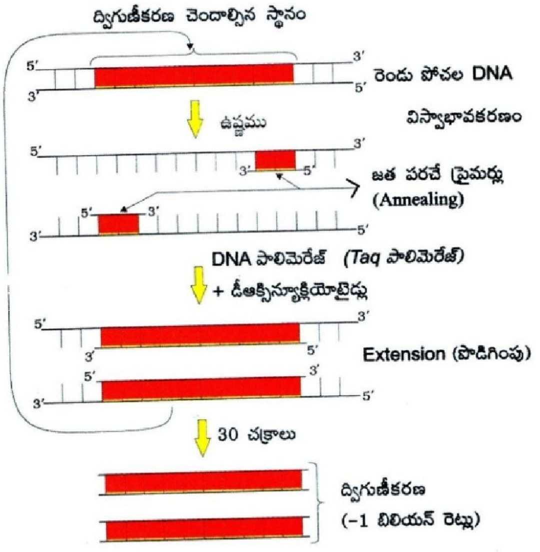
PCR విధానం:

విస్వభావీకరణ (Denaturation): ఈ దశలో DNA ను 94^0C ఉష్ణోగ్రతకు గురి చేస్తారు, దీని వల్ల DNA యొక్క హైడ్రోజన్ బంధాలు విచ్ఛిన్నమై ఏక పోచ DNA శకలాలుగా మారును.

అన్నీలింగ్(Annealing): ఈ చర్య 54^0C వద్ద నిర్వహించబడుతుంది, ఈ దశలో చర్యా మిశ్రమంలోని ఏకపోచ DNA ప్రైమర్లు ఏకపోచ DNA మూసఫలకాల మధ్య నిర్విరామంగా బంధాలు ఏర్పడడం విడిపోవడం జరుగుతుంది, సరియైన ప్రైమర్ అతికినపుడు ఎక్కువకాలం మనగగలిగే మూసఫలక DNA – ప్రైమర్ ఏర్పడుతాయి, తరువాత మూసఫలకానికి పాలిమరేజ్ ఎంజైమ్ అతికి తన చర్యను కొనసాగిస్తుంది.

విస్తరణ (Extension): ఈ దశను 72^0C వద్ద నిర్వహిస్తారు, 72^0C ఉష్ణోగ్రత పాలిమరేజ్ ఎంజైమ్‌కు యుక్తతమంగా ఉంటుంది. ఈ దశలో మూసఫలకానికి పరిపూరకంగా ఉండే నత్రజని క్షారాలు ప్రైమర్ యొక్క 3^I యొక్క స్థానానికి బంధింపబడడం ద్వారా మూసఫలక DNA కు పరిపూరకంగా కొత్త పోచ ఏర్పడి ద్విశృంఖల DNA ఏర్పడును.

K JAYAPPA



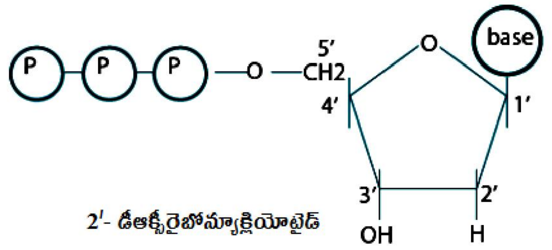
పాలిమరేజ్ చైన్ రియాక్షన్ (PCR)

*** ***DNA సీక్వెన్సింగ్ (DNA Sequencing)*** ***

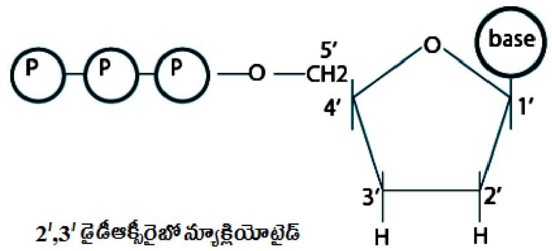
DNA లోని రేఖీయంగా అమరివున్న న్యూక్లియోటైడ్‌ల వరుస క్రమాన్ని గుర్తించడాన్ని DNA సీక్వెన్సింగ్ అంటారు. 1970 వ సం. కి ముందు కి ముందు DNA సీక్వెన్సింగ్ ను గుర్తించడానికి ఎటువంటి పద్ధతులు లేవు; 1977వ సం. లో ఫ్రెడరిక్ సాంగర్స్, కోల్సన్‌లు మరియు అను శాస్త్రవేత్తలు గొలుసు అంత్యీకరణ పద్ధతిని, కనుగొనడం జరిగింది. దీనికి గాను వీరికి 1980 వ సం.లో నోబెల్ బహుమతి లభించింది.

సాంగర్స్ – కోల్సన్ పద్ధతి (Sanger-Coulson method) లేదా గొలుసు అంత్యీకరణ పద్ధతి(Chain termination method): లేదా ఎంజైమాటిక్ పద్ధతి:

మూలసూత్రం: ఈ పద్ధతి “మూసఫలక DNA అధారంగా క్రొత్తగా ఏర్పడుతున్న పాలీన్యూక్లియోటైడ్ గొలుసులోకి 2^I, 3^I డైడీఆక్సీరైబోన్యూక్లియోటైడ్ ప్రవేశించినపుడు పాలీన్యూక్లియోటైడ్ గొలుసు పెరుగుదల అకాలంగా అంత్యీకరణ జరుగును” అను మూలసూత్రం ఆధారంగా పని చేస్తుంది.



2′- డీఆక్సీరైబోన్యూక్లియోటైడ్



2′,3′ డైడీఆక్సీరైబో న్యూక్లియోటైడ్

సాంగర్స్ DNA సీక్వెన్సింగ్ పద్ధతినందు DNA పాలిమరేజ్ ఎంజైమ్‌ను ఉపయోగించి పరిపూరక DNA (Complimentary DNA) ను సంశ్లేషిస్తారు.కావున ఈ పద్ధతిని ఎంజైమాటిక్ పద్ధతి అనికూడా అంటారు.

విధానం:

సాంప్రదాయక DNA సీక్వెన్సింగ్ పద్ధతిని నాలుగు వేరువేరు పరీక్షనాళికలలో నిర్వహిస్తారు. ప్రతి పరీక్షనాళిక చర్యామిశ్రమంలో ఈ క్రింది అంశాలను కలిగి వుంటాయి.

- ssDNA మూసఫలక ప్రతులు(ssDNA template copies): M13 ఆధారిత వాహకాలు లేదా అసౌష్టవPCR లను ఉపయోగించి ssDNA ప్రతులను తయారుచేస్తారు.
- రేడియోలేబుల్డ్ ప్రైమర్స్: ప్రైమర్స్.కు ^{32}P లేదా ^{33}P లేదా ^{35}P లతో పాలీన్యూక్లియోటైడ్‌కైనేజ్ ఎంజైమ్‌నుపయోగించి లేబులింగ్ చేస్తారు.
- నాలుగురకాల డీఆక్సీరైబోన్యూక్లియోటైడ్స్ – dATP, dGTP, dCTP, dTTP.
- DNA పాలిమరేజ్: ప్రారంభంలో DNA పాలిమరేజ్I యొక్క క్లినోఫ్రాగ్‌మెంట్.ను వినియోగించేవారు, తరువాత దానిస్థానంలో

Dr K JAYAPPA

Taqపాలిమరేజ్‌ను ఉపయోగించడం జరిగింది. ప్రస్తుతం ఆధునిక DNA సీక్వెన్సింగ్ పద్ధతులలో సెక్వినేజ్ (T7 బాక్టీరియోఫేజ్ యొక్క DNA పాలిమరేజ్)ను వినియోగిస్తున్నారు.

- ఒక్కొక్క పరీక్షనాళికలో(చర్యామిశ్రమంలో) ఒక్కొక్క రకానికి చెందిన డై డీఆక్సీరైబోన్యూక్లియోటైడ్ల మిశ్రమంను కలుపుతారు.

ఉదా: మొదటి పరీక్షనాళికలో ddATP, రెండవదానిలో ddGTP మూడవ నాళికలో ddCTP నాల్గవదానిలో ddTTP ల మిశ్రమంను కలుపుతారు.

DNA గొలుసు సంశ్లేషణ జరిగేటపుడు ఏదేని నత్రజనిక్షారానికి పరిపూరకంగా డీఆక్సీరైబోన్యూక్లియోటైడ్ కాని లేదా డైడీఆక్సీరైబోన్యూక్లియోటైడ్ గాని ప్రవేశించడం ద్వారా ఒక్కొక్క పరీక్షనాళికలో ఒక్కొక్క పొడవుతో DNA ముక్కలు ఏర్పడుతాయి.

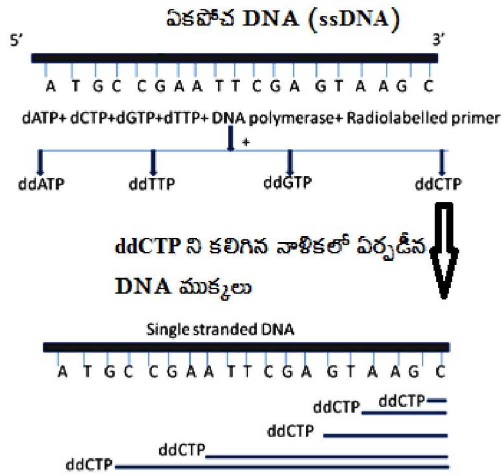
ప్రతి పరీక్షనాళికలో ఏర్పడిన DNA ముక్కలు ఆ పరీక్షనాళికలో ఉపయోగించిన డైడీఆక్సీన్యూక్లియోటైడ్‌తో అంత్యమగును.

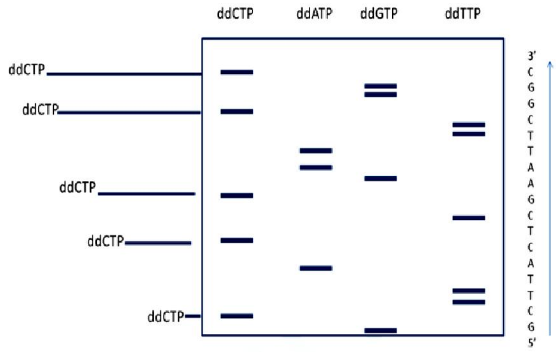
★ఎంజైమాటిక్ DNA సంశ్లేషణ పూర్తయిన తరువాత ఒక్కొక్క నాళికలో ఏర్పడిన DNA ముక్కలను పాలీఅక్రిలమైడ్ జెల్ ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్(PAGE) చేయాలి.

★ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ పూర్తయిన తరువాత ఆటోరేడియోగ్రఫి ద్వారా చేయబడిన ఆటోరేడియోగ్రామ్ సహాయంతో నత్రజనిక్షారాల వరుసక్రమాన్ని గుర్తించవచ్చు.

★ఎలక్ట్రోఫోరెటిక్ జెల్ నందు తక్కువ పరిమాణం ఉన్న DNA ముక్కలు ఎక్కువ దూరం ప్రయాణిస్తాయి, ఎక్కువ పరిమాణం ఉన్నవి తక్కువదూరం మాత్రమే ప్రయాణిస్తాయి. కావున ఆటోరేడియోగ్రామ్‌నందు నత్రజనిక్షారాల వరుసక్రమంను క్రిందినుండి పైకి **($5^{l}-3^{l}$)** గుర్తించాలి.

★ఆటోరేడియోగ్రామ్ ద్వారా ఆధారంగా గుర్తించిన నత్రజనిక్షారాల వరుసక్రమం పరీక్షనాళికలో ఉపయోగించిన మూసఫలక DNAకు సంపూరకంగా ఉంటుంది.





బ్లాటింగ్ టెక్నిక్స్ / హైబ్రిడైజేషన్ విధానాలు

ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ పద్ధతి ద్వారా వేరు చేసిన స్థూల జీవాణువులను, ఎలక్ట్రోఫోరెటిక్ జెల్ నుండి హైబ్రిడైజేషన్ త్వచం మీదకు బదిలీ చేయడాన్ని బ్లాటింగ్ అంటారు.

I. సదరన్ బ్లాటింగ్

E M సదరన్ అను శాస్త్రవేత్త మొట్ట మొదట సారిగా ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ ద్వరా వేరుచేసిన బాక్టీరియోఫేజ్ DNA ను నైట్రోసెల్యులోజ్ త్వచం మీదకు బదిలీ చేశాడు. అందువల్ల హైబ్రిడైజేషన్ త్వచం మీదకు DNA ను బదిలీ చేయడాన్ని “సదరన్ బ్లాటింగ్” అంటారు.

సదరన్ బ్లాటింగ్ ప్రక్రియలో క్రింది దశలు ఉంటాయి.

1. ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ పద్ధతిలో DNA ను వేరు చేయడం. వేరుచేసిన DNA పరిమాణం 10kb కన్నా తక్కువగా వుంటే, హైబ్రిడైజేషన్ కు యుక్తతమంగా వుండును.

2. బ్లాటింగ్: ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ ద్వారా వేరు చేసిన DNA ముక్కలను, హైబ్రిడైజేషన్ త్వచం మీదకు బదిలీ చేస్తారు. సాధారణంగా నైట్రోసెల్యులోజ్ పేపర్స్.ను లేదా నైలాన్ ఫిల్టర్స్.ను హైబ్రిడైజేషన్ త్వచంగా వినియోగిస్తారు.బ్లాటింగ్ ను క్రింది పద్ధతుల ద్వారా చేస్తారు.

i. కాపిల్లరీ బ్లాటింగ్

ii. ఎలక్ట్రో బ్లాటింగ్

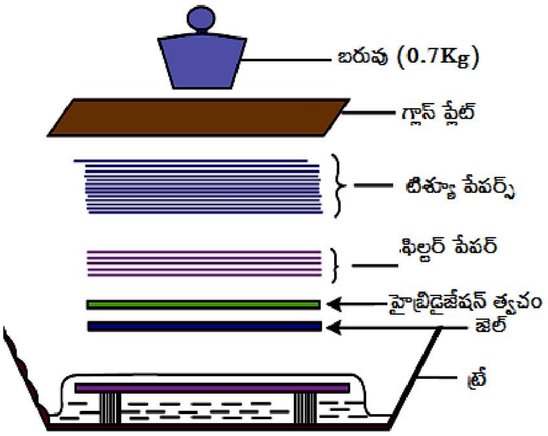
iii. వాక్యూమ్ బ్లాటింగ్

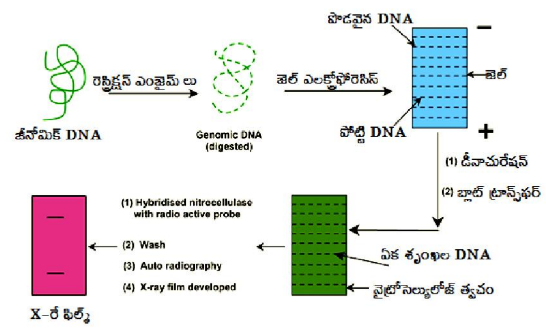
3. డీనాచురేషన్ మరియు స్థిరీకరణ: డీనాచురేషన్ ప్రక్రియను జెల్ మీద కాని లేదా బదిలీ జరిగేటపుడుగాని, డీనాచురేటింగ్ కారకాలైన HCl, యూరియా లేదా ఫార్మమైడ్.లను ఉపయోగించి చేస్తారు. డీనాచురేషన్ ప్రక్రియ తరువాత ssDNA ముక్కలను హైబ్రిడైజేషన్ త్వచం మీద స్థిరీకరిస్తారు. స్థిరీకరణను 80^0C వద్ద వాక్యూమ్ బేకింగ్ పద్ధతిలోగాని లేదా గది ఉష్ణోగ్రత వద్ద UV – క్రాస్ లింకింగ్ పద్ధతిలోగాని చేస్తారు.

4. ప్రోబింగ్: ఈ ప్రక్రియలో టార్గెట్ DNAను, లేబిలింగ్ ఏకపోచ RNA (ప్రోబ్) లేదా ఆలిగో రైబోన్యూక్లియోటైడ్ ప్రోబ్.తో హైబ్రిడైజేషన్ చేస్తారు.

5.హైబ్రిడైజేషన్ జరిగిన ప్రోబ్.నిగుర్తించుట:

రేడియోధార్మిక పధార్థంతో లేబుల్ చేసిన ప్రోబ్.ను వుపయోగించి వుంటే, హైబ్రిడైజేషన్ త్వచంనుX–రే ఫిల్మ్.కు బహిరంగపరచి ఆటోరేడియోగ్రామ్.ను అభివృద్ధి చేస్తారు.





అనువర్తనాలు/ఉపయోగాలు:

★DNA క్లోనింగ్ ఫలితాలను నిర్ధారించుటకు ఉపయోగిస్తారు.

★ఫోరెన్సిక్ పద్ధతిలో సూక్ష్మపరిమాణంలో ఉన్న DNAను కూడా గుర్తించడానికి ఈ పద్ధతి ఉపయోగపడుతుంది.

★జన్యుసంబధిత వ్యాధులను మరియు వ్యాధికారక జీవులను గుర్తించడంలో ఉపయోగపడును.

★వేరు వేరు జాతి జీవుల DNA మధ్య సంబంధాన్ని తెలుసుకోవడానికి ఉపయోగిస్తారు.

లిమిటేషన్: ఈ పద్ధతిని వుపయోగించి జీనోమ్‌లోని నిర్దిష్టమైన DNA వరుసక్రమాలను మాత్రమే గుర్తించవచ్చు. కాని గుర్తించిన ప్రాంతం క్రియాత్మకంగా వ్యక్తీకరించబడుతోందా లేదా అనుదానిని గుర్తించలేదు.

II. నార్తరన్ బ్లాటింగ్ (Northern Blotting)

నార్తరన్ బ్లాటింగ్ టెక్నిక్ RNAను గుర్తించడానికి వుపయోగపడును.

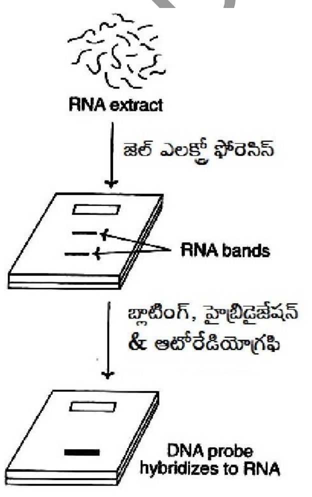
ఈ పద్ధతిలో RNA అణువులను లేదా ముక్కలను ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ ద్వారా వేరుచేయడం.

ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ ద్వారా వేరుచేసిన RNA అణువులను హైబ్రిడైజేషన్ త్వచం మీదకు బదిలీ చేయడం.

80^oC వద్ద వాక్యూమ్ బేకింగ్ మరియు స్థిరీకరణ చేయడం

ssDNA ప్రోబ్స్ లేదా ఏకపోచ ఆలిగోరైబో న్యూక్లియోటైడ్ ప్రోబ్.తో ప్రోబింగ్ చేయడం.

ఆటోరేడియోగ్రఫీ లేదా ఫ్లూరెసెన్స్ ద్వారా టార్గెట్ RNAను గుర్తించడం.



ప్రాముఖ్యత:

★నార్తరన్ హైబ్రిడైజేషన్, జీనోమ్ యొక్క వ్యక్తీకరణ బాగాన్ని గుర్తించడాని ఉపయోగపడును. దీనిద్వారా Biological status కణజాలం లేదా కణం యొక్క జీవస్థితిని(Biological status) తెలుసుకోవచ్చు

కణజాల విశిష్ట ★ RNA, అభివృద్ధి నిర్దిష్ట RNA లను గుర్తించదానికి ఉపయోగ పడును.

వ్యాధిగ్రస్థ పరిస్థితులలో అధిక వ్యక్తీకరణ లేదా అల్ప★ వ్యక్తీకరణ RNA లను గుర్తించడానికి ఉపయోగ పడును.

III. వెస్ట్రన్ బ్లాటింగ్ (Western Blotting)

ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ ద్వారా వేరుచేసిన ప్రోటీన్ అణువులను ఘన అధారిత త్వచం మీదకు బదిలీ చేయడాన్ని వెస్ట్రన్ బ్లాటింగ్ అంటారు.

★సదరన్, నార్తరన్ బ్లాటింగ్ పద్ధతులలా కాకుండా వెస్ట్రన్ బ్లాటింగ్.ను నేరుగా మార్పుచెందిన నైలాన్ త్వచం లేదా పాలీ వినైలిన్ డై ఫ్లూరైడ్ (PVDF) ను వినియోగిస్తారు.

★లక్షిత ప్రోటీన్.ను ప్రోటీన్–ప్రోటీన్ మధ్య సంబంధం ద్వారా గుర్తిస్తారు.

★శుద్ధి చేసిన (Puruify) ప్రోటీన్.కు మోనోక్లోనల్ ప్రతిదేహాలను ఉత్పత్తి చేసి వాటిని నమూనా(Sample) లోని లక్షిత ప్రోటీన్ (Target protein) ను గుర్తించడానికి వినియోగిస్తారు.

★సాధారణ వెస్ట్రన్ బ్లాటింగ్ పద్ధతిలో క్రింది దశలుంటాయి.

i. ఇచ్చిన నమూనాలోని ప్రోటీన్‌ను ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ (పాలీఅక్రిలమైడ్) ద్వారా వేరు చేయడం.

ii. ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ ద్వారా వేరు చేసిన ప్రోటీన్ ఘన ఆధారిత త్వచం (బ్లాటింగ్ త్వచం) మీదకు బదిలీ చేయడం.

iii. ఉపరితలంను బ్లాకింగ్ చేయడం (Blocking the surface): ఇందులో ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ ద్వారా వేరు చేసిన

Dr K JAYAPPA

ప్రోటీన్‌ను కలిగిన సాలిడ్ త్వచంను బ్లాకింగ్ కారకంతో నింపుతారు. బ్లాకింగ్ కారకాలుగా డీ ఫాటెన్డ్ కేసిన్ మరియు హెపారిన్.లను ఉపయోగిస్తారు. దీని ద్వారా ఇతర ప్రోటీన్‌లు బంధింపబడటంను నివారించవచ్చు.

బ్లాకింగ్ కారకాలతో కొంత సమయం నిల్వ ఉంచిన తరువాత నిర్దిష్ట ద్రావణాలతో కడుగుతారు దీని ద్వారా బంధితంకాని ప్రోటీన్‌లు తొలగిపోతాయి

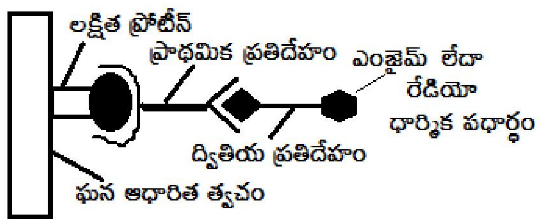
iv. ప్రోబింగ్: ఈ ప్రక్రియలో లక్షిత ప్రోటీన్‌ను ఏక ప్రతిదేహ సాంకేతిక పద్ధతి లేదా రెండు ప్రతిదేహాల సాంకేతిక పద్ధతి ద్వారాగాని గుర్తిస్తారు.

ఏక ప్రతిదేహ సాంకేతిక పద్ధతిలో ఘన ఆధార త్వచంను లక్షిత ప్రోటీన్ యొక్క మోనోక్లోనల్ ప్రతిదేహ మిశ్రమంలో కొంత సమయం నిల్వ ఉంచి, రేడియోధార్మికత కలిగిన ప్రతిదేహం లేదా ప్రోటీన్A నికలిపి గాని లక్షిత ప్రోటీన్‌ను గుర్తిస్తారు.

రెండు ప్రతిదేహాల సాంకేతిక పద్ధతిలో లక్షిత ప్రోటీన్‌కు తయారు చేసిన ప్రతిదేహాలను (ప్రాథమిక ప్రతిదేహం), ద్వితియ ప్రతిదేహాల ఉత్పత్తి కోసం ప్రతిజనకాలుగా వినియోగిస్తారు, ద్వితియ ప్రతిదేహాలకు ఫ్లోరెసెంట్ (రేడియోధార్మిక పధార్థాలు) పధార్థాలనుకాని లేదా ఎంజైమ్‌తో కాని ట్యాగింగ్ చేస్తారు.

నమూనాలో లక్షిత ప్రోటీన్ ఉన్నట్లయితే, అది ప్రాథమిక ప్రతిదేహంతో బంధించబడుతుంది. ద్వితియ ప్రతిదేహంను UV కిరణాలకు గురిచేసి గాని లేదా నిర్ధిష్ట అదస్థ పధార్థం ద్వారా కలిపి లక్షిత ప్రోటీన్‌ను గుర్తిస్తారు.

సాధారణంగా ఫ్లోరెసెంట్ ట్యాగ్‌గా రోడమైన్ మరియు ఫ్లోరెసీన్ లను, మరియు ఎంజైమ్‌గా హార్స్ రాడిష్ పెరాక్సిడేజ్‌ను వినియోగిస్తారు.



అనువర్తనాలు:

★ఇచ్చిన కణజాలంలోని నిర్దిష్టమైన లక్షిత ప్రోటీన్‌ను గుర్తించడానికి ఉపయోగ పడును

★ఏదైనా జన్యువు లేదా జన్యువుల వ్యక్తీకరణ నమూనాను గుర్తించవచ్చు.

★వ్యాధిగ్రస్థకణాలు, ఒత్తిడికి గురయిన కణాలు, ట్యూమర్ కణాలు వంటి ప్రత్యేకమైన కణాలలో ఉత్పత్తి అయ్యే ప్రోటీన్‌లను గుర్తించడంలో ఉపయోగపడును.

★ట్రాన్స్.జెనిక్ జంతువులు గాని లేదా క్లోనింగ్ ద్వారా ఉత్పత్తి చేసిన జీవులలో ఉత్పత్తి అయ్యే పునఃసంయోజక ప్రోటీన్‌లను గుర్తించడానికి ఉపయోగపడుతుంది.

Dr K JAYAPPA

DNA లైబ్రరీ – ఒక జీవి నుండి లేదా కణం నుండి వేరు చేసిన వేర్వేరు DNA ముక్కల యొక్క సేకరణ. వీటిలో ప్రతి ఒక్క DNA ముక్కను వెక్టర్‌లోకి క్లోన్ చేసి విశ్లేషణ సౌలభ్యం కోసం నిల్వ ఉంచుతారు. DNA లైబ్రరీలు రెండు రకాలు.

I. జీనోమిక్ లైబ్రరీ – జీనోమిక్ DNA నుండి తయారు చేస్తారు

II. cDNA లైబ్రరీ – cDNA (mRNA యొక్క కాపీ) నుండి తయారు చేస్తారు

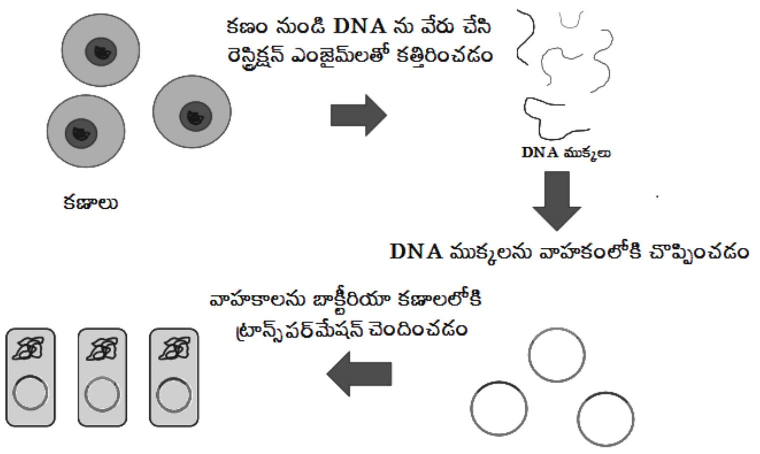
I. జీనోమిక్ లైబ్రరీ:

"జీనోమిక్ లైబ్రరీ అనగా సంపూర్ణమైన జీనోమ్ లోని నిర్దిష్టమైన DNA సంగ్రహణ" లేదా "జీవియొక్క మొత్తం జీనోమ్ ను సూచించడానికి సంగ్రహించిన క్లోన్ ల సమూహం."

Dr K JAYAPPA

జీనోమిక్ లైబ్రరీ తయారీలో క్రింది దశలు ఉంటాయి

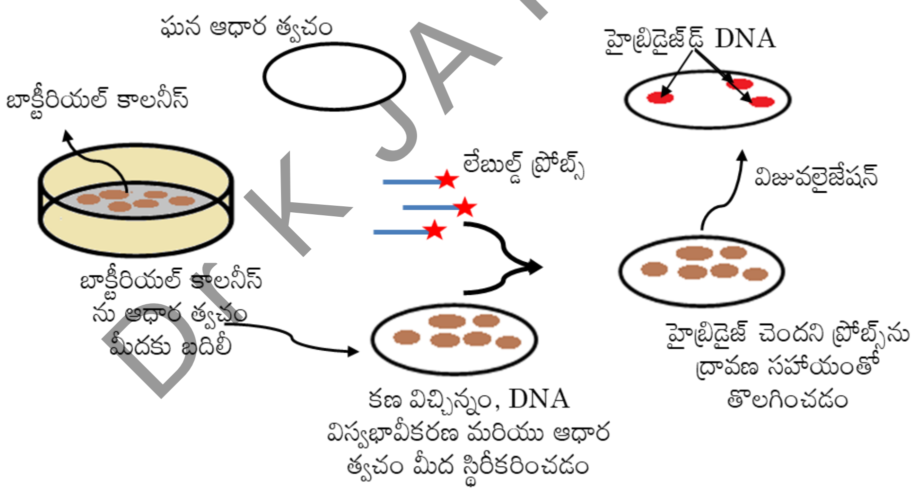
1. మొదట అతిథేయి కణం లేదా కణజాలం నుండి జీనోమిక్ DNA ను వేరు చేయడం
2. వాహకంలోకి చొప్పించదానికి వీలుగా ఉండేటట్టు వేరుచేసిన జీనోమిక్ DNAను యథేచ్ఛగా (Randomly) యాంత్రిక పద్ధతులలో గాని లేదా రెస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్ లతో గాని కత్తిరించాలి.
3. క్లోనింగ్ కు ఉపయోగించే వాహక DNA ను కూడా జీనోమిక్ DNAను కత్తిరించిన విధానంలోనే కత్తిరించాలి
4. కత్తిరించబడిన జీనోమిక్ DNA ముక్కలను వాహక DNAలోకి చొప్పించాలి, అపుడు ప్రతి వాహకం వేరు వేరు జీనోమిక్ DNA ముక్కలను కలిగి వుంటుంది.
5. పునఃసంయోజక DNA ను కలిగిన వాహకాన్ని బాక్టీరియా కణంలోకి ప్రవేశపెట్టి అధిక క్లోన్ లను ఉత్పత్తి చేస్తారు.



పటం. 1 జీనోమిక్ లైబ్రరీ తయారీ దశలు

Dr K JAYAPPA

6. కాలనీ బ్లాట్ హైబ్రిడైజేషన్ పద్ధతి ద్వారా పరివర్తనం (transformation) చెందిన క్లోన్ లను గుర్తించడం



పటం 2. కాలనీ బ్లాట్ హైబ్రిడైజేషన్

7. తక్కువ పరిమాణం జీనోమ్ గల జీవుల జీనోమిక్ లైబ్రరీ తయారీలో ప్లాస్మిడ్ వాహకాలను వినియోగిస్తారు.

   ఉదా: *E.coli* జీనోమ్ 4.6×10^6bp.

8. అధిక పరిమాణం జీనోమ్ గల జీనోమిక్ లైబ్రరీలను తయారుచేయడానికి లాంబ్డా ఫేజ్, BAC లేదా YAC వాహకాలను వినియోగిస్తారు.

ఉపయోగాలు:

i. ఏదేని జీవి యొక్క మొత్తం జీనోమ్ వరుస క్రమాన్నిగుర్తిచడంలో

ii. జీనోమ్ పరిమాణంను రెట్టింపు చేయడంలో

iii. క్రోమోజోముల చిత్రపటం ద్వారా క్రోమోజోముపై జన్యువుల వరుస క్రమంను గుర్తించడం

iv. జన్యుసాంకేతికత ద్వారా జన్యుపరివర్తిత జంతువులను తయారు చేయడానికి వనరుగా ఉపయోగపడును

v. నియంత్రిత జన్యువరుసక్రమాల విధుల అధ్యయనం (ఇన్.విట్రో పరిస్థితులలో)

vi. జన్యు సంభదిత వ్యాధులలో జన్యు ఉత్పరివర్తనల అధ్యయనం చేయడానికి ఉపయోగపడును

vii. మానవ జన్యు ప్రాజెక్ట్ తయారీలో ఉపయోగపడును

viii. జాతుల సంరక్షణ కోసం జెర్మ్ ప్లాసం తయారీలో ఉపయోగపడును

పరిమితులు:

- నిజకేంద్రక జీవుల జీనోమ్ సంక్లిష్టత అనేది ప్రధాన అవరోధంగా ఉండును
    - కనుక జీనోమిక్ లైబ్రరీ తయారీ తక్కువ ఆచరణాత్మకంగా ఉండును.
    - క్లోనులను గుర్తించడం కూడా అత్యంత క్లిష్టంగా ఉండును.

Dr K JAYAPPA

II. cDNA లైబ్రరీ

"ఒక కణంలోని mRNA అణువుల నుండి సంశ్లేషణ చేయబడిన పరిపూరకరమైన cDNA అణువుల సమూహం".

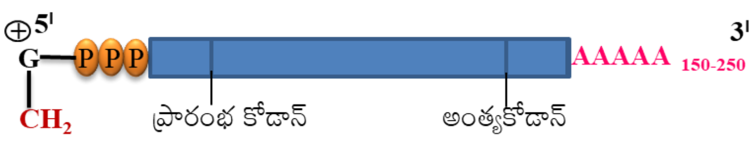
cDNA లైబ్రరీలో జన్యువు యొక్క వ్యక్తీకరింపబడే భాగాన్ని మాత్రమే కలిగి ఉంటుంది, ఎందుకంటే mRNA లు ఎక్సాన్స్ ను మాత్రమే కలిగి ఉంటాయి.

cDNA లైబ్రరీ తయారీలో క్రింది దశలు ఉంటాయి.

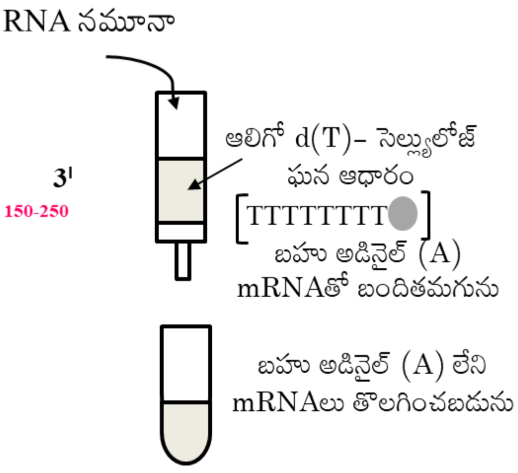
1. mRNA ను వేరుపరచడం
2. RNA స్థిరత్వంను పరీక్షించడం
3. cDNA సంశ్లేషణ
4. cDNA ను వాహక DNA కు జత చేయుట
5. అథిథేయి కణంలోకి పరివర్తనం చెందించడం

Dr K JAYAPPA

1. mRNA ను వేరుపరచడం– నిజకేంద్రక జీవుల– mRNAలు 3' అంత్యంలో బహు అడినైల్ సమూహాలను కలిగి ఉండును. కావున అఫినిటి క్రొమాటోగ్రఫి (ఆలిగో d(T)– సెల్యులోజ్ ఘన ఆధారం) పద్ధతి ద్వారా వేరు చేస్తారు.

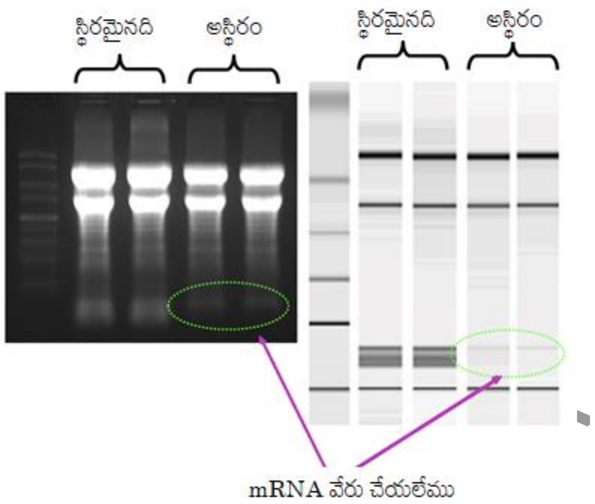


పటం3. నిజకేంద్రకజీవుల mRNA



పటం 4. అఫినిటి క్రొమాటోగ్రఫి

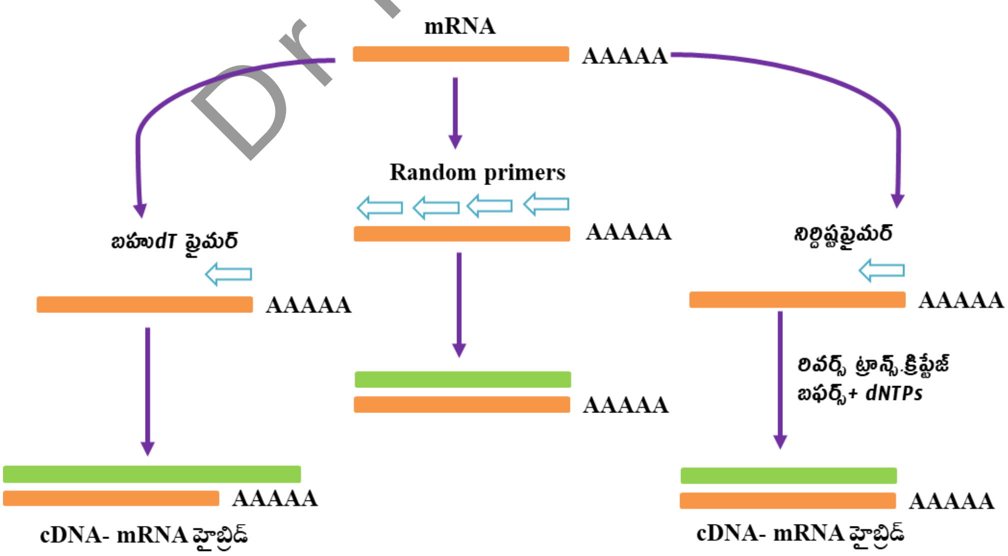
2. RNA స్థిరత్వంను పరీక్షించడం– జెల్ ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్ ద్వారా mRNA విశ్లేషణ చేసి స్థిరమైన అనగా విచ్ఛిన్నం కాని RNA ను ఎన్నుకోవాలి.



పటం 5. mRNA ను వేరుచేసిన జెల్ ఎలక్ట్రోఫోరెసిస్

3. cDNA సంశ్లేషణ –

a) మొదటి cDNA తంతువు సంశ్లేషణ – బాహు dT ప్రైమర్ లేదా యథేచ్ఛ ప్రైమర్స్ లేదా నిర్దిష్టప్రైమర్స్ ను గాని ఉపయోగించి రివర్స్ ట్రాన్స్క్రిప్టేస్ ఎంజైమ్ సహాయంతో మొదటి cDNA తంతువును సంశ్లేషణ చేస్తారు.

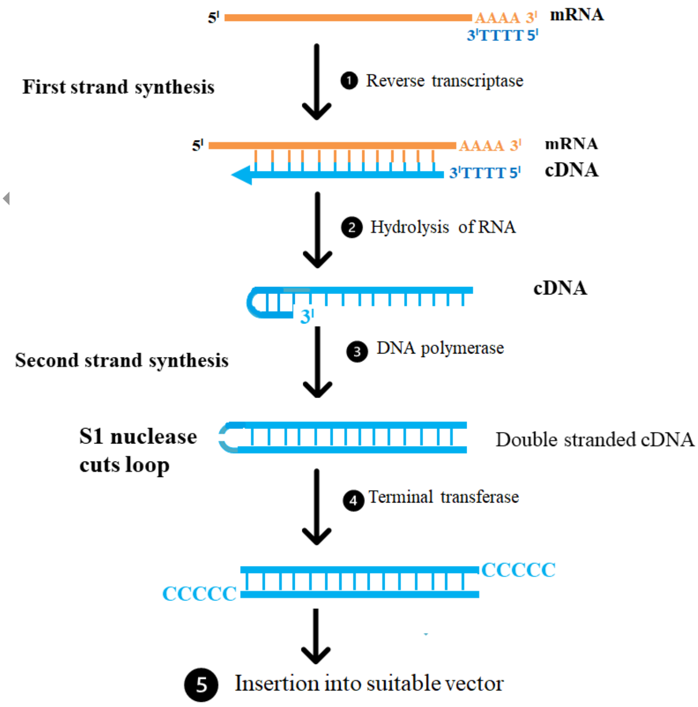


పటం 6. cDNA మొదటి తంతువు సంశ్లేషణ

Dr K JAYAP

b) రెండవ cDNA తంతువు సంశ్లేషణ: రెండవ cDNA తంతువును మూడు రకాల పద్ధతుల ద్వారా సంశ్లేసిస్తారు.

i. హెయిర్‌పిన్ ప్రైమ్డ్ సెకండ్ స్ట్రాండ్ DNA సంశ్లేషణ (మానియాటిస్ మరియు ఇతరులు, 1976): ఈ పద్ధతిలో ఆలిగో dT ప్రైమర్ సహాయంతో రివర్స్ ట్రాన్స్. క్రిప్టేజ్ ఎంజైమ్ ను ఉపయోగించి మొదటి తంతువును సంశ్లేషిస్తారు. దీని ద్వారా తయారయిన RNA-cDNA హైబ్రిడ్ తంతువును ఆల్కలిక్ ద్రావణం (సోడియం హైడ్రాక్సైడ్)తో జలవిశ్లేషణ గావించడం ద్వారా mRNA తంతువును తొలగిస్తారు. క్రొత్తగా ఏర్పడిన cDNA తంతువు యొక్క $3^{\prime}$ అంత్యం హెయిర్ పిన్ లాంటి నిర్మాణంలా ఏర్పడి ప్రైమర్ గా పనచేయును. దీని ఆధారంగా రెండవ తంతువును తయారు చేస్తారు. ఈ విధంగా ఏర్పడిన రెండుపోచల cDNA తంతువులలో ఉన్న హెయిర్ పిన్ నిర్మాణంను S1 న్యూక్లియేజ్ అను ఎంజైమును ఉపయోగించి తొలగిస్తారు. తరువాత రెండు cDNA తంతువుల అంత్యాలలో టెర్మినల్ ట్రాన్స్.ఫరేజ్ ఎంజైమును ఉపయోగించి హోమోపాలిమర్ తంతువులను జత చేసి తగిన వాహకంలోకి ప్రవేశపెట్టి cDNA లైబ్రరీను తయారు చేస్తారు. కానీ ఈ పద్ధతిలో S1 న్యూక్లియేస్ ఎంజైమ్ ను ఉపయోగించడం వల్ల cDNA యొక్క $5^{\prime}$ చివరలో కొంత భాగంను కోల్పోవడం అనునది లోపంగా ఉండును.

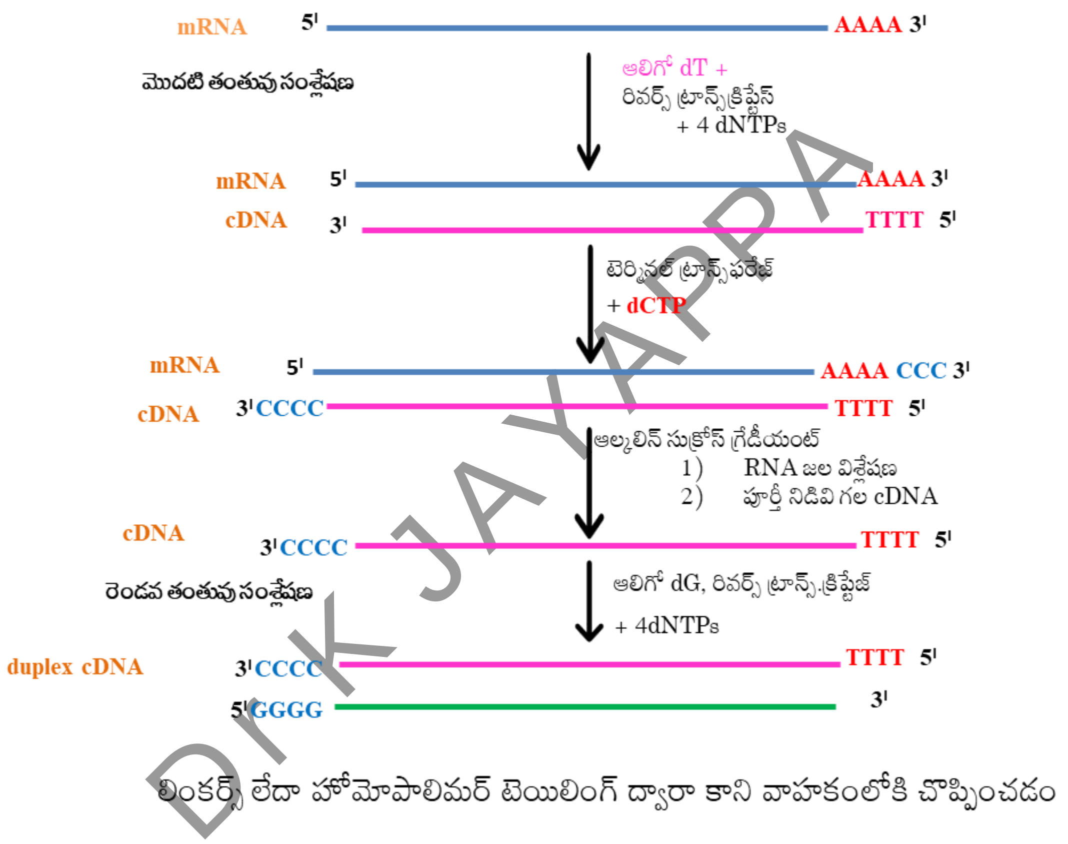


.

పటం 7. ప్రారంభ cDNA క్లోనింగ్ పద్ధతి- (మానియాటిస్ మరియు ఇతరులు, 1976)

JAYAPPA

ii. పూర్తి నిడివి గల cDNA ను తయారు చేయాలి అంటే మొదటి స్ట్రాండ్ యొక్క 3^{I} అంత్యంను మార్పు చేయడం ఉత్తమ మార్గం. దీని కోసం 1981 వ సం.లో లాండ్ మరియు ఇతర శాస్త్ర వేత్తలు మొదటి cDNA తంతువు యొక్క 3^{I} అంత్యంలో టెర్మినల్ ట్రాన్స్.ఫరేజ్ ఎంజైమనుపయోగించి పాలి సైటిడిన్ కొనలను జతచేస్తారు. తరువాత ఆలిగో dG ప్రైమర్ ను ఉపయోగించి రెండవ cDNA తంతువును సంశ్లేషణ చేస్తారు.



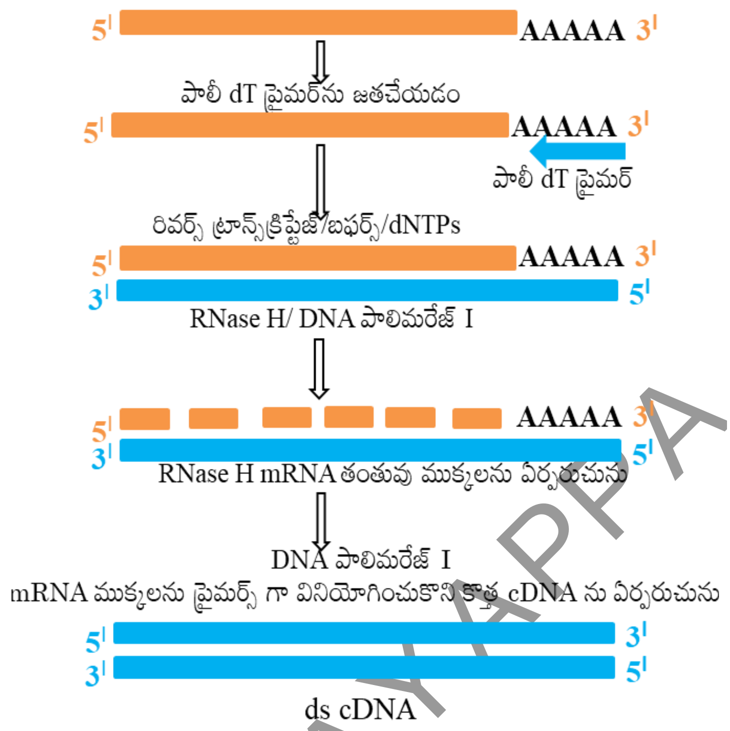
Dr K JAYAPPA

పటం 8. cDNA రెండవ తంతువు సంశ్లేషణ (లాండ్ మరియు ఇతరులు 1981)

iii. గుబ్లర్–హాఫ్ మన్ పద్ధతి–

నాన్ డైరెక్షనల్ cDNA క్లోనింగ్ కోసం సాధారణ మరియు సులువైన పద్ధతి. ఈ పద్ధతిలో RNase H అను ఎంజైమ్ ను ఉపయోగించి mRNA–cDNA హైబ్రిడ్ ను జలవిశ్లేషణ చేయగా mRNA పాక్షికంగా

జలవిశ్లేషణ చెంది చిన్న చిన్న ముక్కలుగా ఏర్పడి ప్రైమర్స్ గా ఉపయోగపడును. DNA పాలిమరేజ్ ఎంజైమ్. RNA ముక్కలను ప్రైమర్స్ గా వినియోగించుకొని mRNA స్థానంలో క్రొత్త cDNA పునఃస్థాపించబడును.

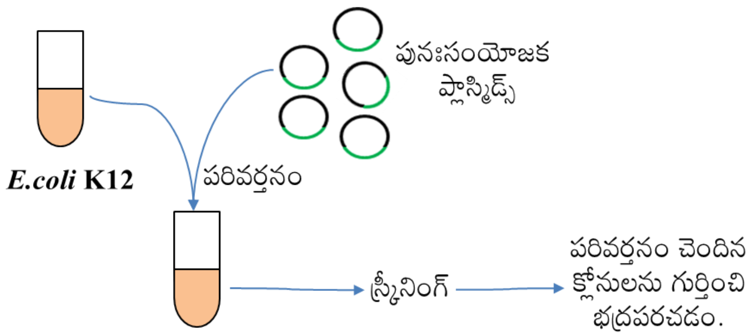


పటం 9. నాన్ డైరెక్షనల్ cDNA క్లోనింగ్ (గుబ్లర్-హాఫ్ మన్ పద్ధతి)

4. cDNA ను వాహక DNA కు జత చేయుట– cDNA సంశ్లేషణ పూర్తి అయిన తరువాత cDNA అంత్యాలకు హోమోపాలిమర్ టెయిల్స్ తో కానీ లేదా లింకర్స్ ను కానీ జత చేసి ఎంపిక చేసుకున్న వాహకంలోకి (ఉదా. ప్లాస్మిడ్) ప్రవేశపెట్టాలి.

5. అతిథేయి కణంలోకి పరివర్తనం చెందించడం– పునఃసంయోజక వాహకాలను అతిథేయి (*E.coli* K12) లోకి ప్రవేశపెట్టాలి. జన్యు పరివర్తన జరిగిన క్లోనులను గుర్తించి భద్రపరచడం.

Dr K JAYAPPA

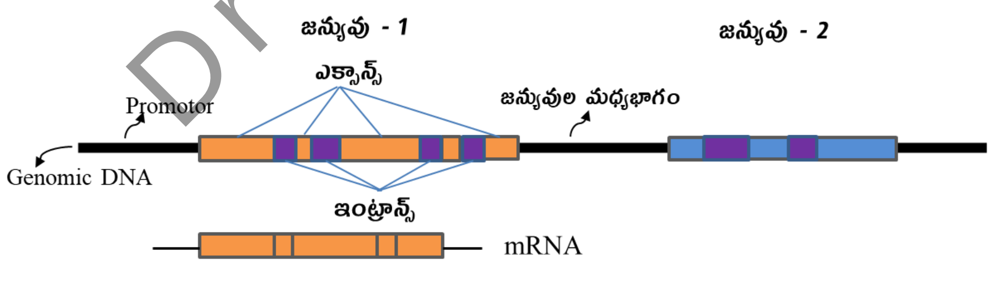


పటం 10. పునఃసంయోజక DNA కలిగిన వాహకాలను అతిథేయి కణాలలోకి పరివర్తన చెందించడం

ఉపయోగాలు:

- తక్కువపరిమాణంలో మొత్తం జన్యు సమాచారాన్ని నిలువ ఉంచవచ్చు
- cDNA ను కేంద్రకపూర్వ జీవులలో నేరుగా వ్యక్తీకరించవచ్చు
- హోమోలాగస్ జన్యువులను వేరుచేయడానికి ఉపయోగపడును
- పూర్తి-పొడవు cDNA అణువులను క్లోన్ చేసి జన్యు పనితీరును ఇన్ విట్రో పరిస్థితులలో అధ్యయనం కోసం
- వేర్వేరు కణాలు లేదా కణజాలాలలో వ్యక్తీకరించబడిన mRNA ల మొత్తం అధ్యయనం .

Dr K JAYAPPA



పటం 11. నిజకేంద్రక జీవుల జన్యు నిర్మాణం

జీనోమిక్ లైబ్రరీ మరియు cDNA లైబ్రరీ మధ్య భేదాలు

జీనోమిక్ లైబ్రరీ	cDNA లైబ్రరీ
జీనోమ్ మొత్తంలోని వ్యక్తీకరించబడు మరియు వ్యక్తీకరించబడని జన్యువులను కలిగి ఉండును	కేవలం వ్యక్తీకరించబడే జన్యువులను మాత్రమే కలిగి ఉండును
ఎక్కువ పరిమాణంతో ఉండును	తక్కువ పరిమాణంలో ఉండును
వీటిలోని జన్యువులను కేంద్రక పూర్వ జీవులలో వ్యక్తీకరించలేము (కేంద్రక పూర్వ జీవులలో స్ప్లైసింగ్ యంత్రాంగం లోపించి ఉండును).	కేంద్రక పూర్వ జీవులలో సులువుగా వ్యక్తీకరించవచ్చు
ప్లాస్మిడ్స్, కాస్మిడ్స్,ఫేజ్, BAC, YAC వంటి వాహకాలను ఉపయోగించి తయారు చేస్తారు.	ప్లాస్మిడ్స్, కాస్మిడ్స్ మరియు ఫేజ్ వాహకాలను ఉపయోగించి తయారు చేస్తారు.

Dr K JAYAPPA

References

1. Principles of Gene Manipulation: sixth edition, Sandy B Primrose, Richard M Twyman and Robert W Old.
2. A textbook of Biotechnology; R C Dubey, S Chand publications (2008)

డా. కె జయప్ప

జంతుశాస్త్ర అధ్యాపకులు

పరిటాల శ్రీరాములు ప్రభుత్వ డిగ్రీ కళాశాల

పెనుకొండ, అనంతపురం, ఆంధ్ర ప్రదేశ్

jayappakammiti@gmail.com

కణ సంవర్ధన యానకం (CULTURE MEDIA)

రెండు రకాలు

1. సహజ యానకం (Natural media):

జంతువుల కణాల పెరుగుదల మరియు విభజనకు అవసరమైన సహజ పోషకాలను కలిగిన యానకాన్ని సహజ యానకం అంటారు. ఇవి మూడు రకాలు

i)కొయాగ్యులన్స్ లేదా ప్లాస్మా క్లాట్స్: మగ పక్షుల రక్తం నుంచి ప్లాస్మాను సేకరించి స్కందన నివారణకు హెపారిన్ ను కలుపుతారు.

ii) జీవ ద్రవాలు: వీటిని ప్రౌఢ మానవుని రక్తం, ప్లాసెంటా, బొడ్డు తాడు (Cord blood) రక్తం, గుర్రం రక్తం, లేగదూడ రక్తం లేదా జీవ ద్రవాలైన కొబ్బరి నీళ్ళు, ఉల్బ ద్రవం, పుపుస ద్రవం, కీటకాల హీమోలింఫ్, నేత్రాలలోని ఆక్వియస్ హ్యూమర్‌లను ఉపయోగిస్తారు.

మానవ ప్లాసెంటా సీరమ్, బొడ్డు తాడు సీరమ్, లేగదూడ సీరమ్‌లు సాధారణంగా వినియోగించే జీవ ద్రవాలు.

iii) టిష్యూ ఎక్స్‌ట్రాక్ట్ లేదా కణజాల సారం (Tissue Extract) :

★కణజాలం నుంచి వేరు చేసిన ద్రవం. పిండం, కాలేయం, ప్లీహం, ల్యూకోసైట్స్, ట్యూమర్, అస్థిమజ్జ కణజాల ద్రవాలను జంతు కణాల సంవర్ధనంలో వుపయోగిస్తారు.

★పిండకణజాలంనుండి వేరు చేసిన ద్రవాన్ని సాధారణంగా వినియోగిస్తారు.

★కణజాలంనుంచి వేరుచేసిన ద్రవ యానకాన్ని వారం రోజులలోపు వినియోగించాలి లేదా 27^{0}C ఉష్ణోగ్రత వద్ద నిల్వ ఉంచాలి.

2.సింథటిక్ మీడియా(కృత్రిమ యానకం):

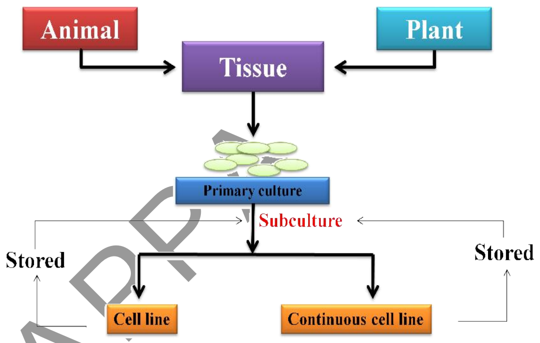
సింథటిక్ మీడియాను అనేక పోషకాలు (కర్బన, అకర్బన), విటమిన్‌లు, లవణాలు ఆక్సిజన్, కార్బన్‌డై ఆక్సైడ్ వాయువులు, సీరమ్ ప్రోటీన్.లు, సహకారకాలు మొదలైన వాటిని వినియోగించి కృత్రిమంగా తయారు చేస్తారు.

ఉదా: 1.EMEM (ఈగల్స్ మినిమల్ ఎసెన్షియల్ మీడియమ్)–Eagle's minimal essential medium

2. DMEM— (దుల్‌బెకోస్ మార్పు చెందిన ఈగల్స్ మీడియమ్) Dulbecco's modification of Eagle's medium.

కణవర్ధనం/కణ సంవర్ధనాలు (Cell culture):

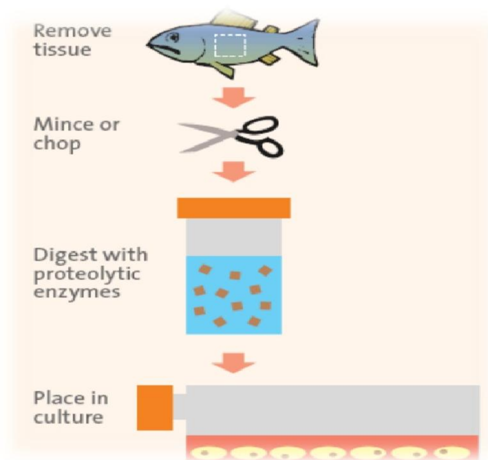
కణవర్ధనం అనునది ఒక బహుముఖ ప్రక్రియ, ఇందులో జంతువులు మరియు మొక్కలనుండి కణాలను వేరుచేసి వాటి సహజవాతావరణంలో కాకుండా కృత్రిమంగా పెరుగుదల మాధ్యమంలో వాటి పెరుగుదలను ప్రేరేపిస్తారు.



ప్రాథమిక కణవర్ధనం(primary culture):

కణసంవర్ధనం(Cellculture) లో ప్రప్రథమంగా ప్రాథమిక కణవర్ధణాలను తయారుచేస్తారు.

దీనికోసం మొదటగా ఏదేని కణజాలంనుండి కణాలను వేరు చేస్తారు, ఈ కణాలను అనువైన పరిస్థితులలో పోషక మాధ్యమం కలిగిన గాజు లేదా ప్లాస్టిక్ పాత్రలో వృద్ధి చెందిస్తారు.



ఈ వర్ధన కణాలు బంధనకణాలు, విడికణాలు (Suspension cells) అని రెండు రకాలుగా ఉంటాయి.

Dr K JAYAPPA

బంధనకణాలు పెరుగుదలకోసం ఇతర లేదా ప్రక్కన ఉన్న కణాలపై ఆధారపడును.

ఉదా: మూత్రపిండం వంటి అవయవం నుండి వేరు చేసిన కదలలేని చిక్కుకొన్న కణజాలం.

విడికణాలు పెరుగుదలకోసం ఇతర కణాలపై ఆధారపడవు మరియు ఇవి ఇతర కణాలతో సంభందాన్ని కలిగి ఉండవు.

ఉదా: రక్తం నుండి సేకరించబడిన కణాలు(లింఫోసైట్లు).

లక్షణాలు:

- ప్రాథమిక వర్ధనంలోని కణాలు బాహ్యస్వరూపంలోమాతృకణాలను పోలి ఉంటాయి
- కణవిభజన సామర్థ్యం పరిమితంగా ఉంటుంది అనగా జీవితకాలం తక్కువగా ఉంటుంది (limited number of cell divisions)
- ఈ కణాలు ఇన్.వైవో ప్రయోగ పరిస్థితులకు బాగా ఉపయోగపడును.

సాధారణంగా ఇన్.వైవో పరిస్థితులలో ఉండే అనేక విభేధీకృత కణాల లక్షణాలను కలిగి ఉండటం ప్రయోజనకరం (advantage)గా ఉంటుంది కానీ ఈ కణాలను వేరు చేయడం కష్టం కావడం, కణాల జీవితకాలం తక్కువగా ఉండటం మరియు కంటామినేషన్.కు సూక్ష్మగ్రాహ్యతను కలిగి ఉండటం అనేవి లోపాలుగా ఉంటాయి.

కణవర్ధనాల రకాలు:

ద్వితియ కణవర్ధనాలు (secondary cultures):

ప్రాథమిక కణవర్ధనం ద్వారా లభించిన కణాలను తిరిగి ఉపవర్ధనం(subculture) చేయబడిన కణాలను ఒక పాత్రనుంచి వేరొక పాత్రలోకి మార్పిడి చేయగా ఏర్పడే కణాలను ద్వితియ కణవర్ధనం అంటారు.

ఈ పద్ధతిలో పెరుగుదల మాధ్యమాన్ని తొలగించి ఎంజైమ్.లను ఉపయోగించి బంధనకణాలు విడదీస్తారు.

ఇందులో కాలానుగుణంగా పెరుగుతున్న కణ తంతువులకు తాజా పోషకాలు, స్థలాన్ని అందించుట చేయవచ్చు.

సెల్ లైన్లు:

ప్రాథమిక కణవర్ధణం ను మొదట ఉప వర్ధనం చేయగా ఏర్పడిన కణాలను సెల్ లైన్ అంటారు. (లేదా) సెల్ లైన్ అనేది శాశ్వతంగా ఏర్పాటు చేయబడిన కణవర్ధణం, ఇది సరైన(Suitable), తాజా మాధ్యమం మరియు నిర్ధిష్టమైన స్థలంలో నిరవధికంగా పెరుగుదలను చూపుతుంది. ఇవి హేఫ్లిక్ పరిమితిని అధిగమించి, అమర కణాలయ్యాయి.

హేలిఫ్లిక్ పరిమితి (లేదా హేఫ్లిక్ దృగ్విషయం) అనగా ఒక సాధారణ కణం యొక్క కణవిభజన ఆగిపోయేకంటే ముందు జరిగే కణవిభజనల సంఖ్య.

సెల్ లైనులు రెండు రకాలు:

నిశ్చిత సెల్ లైనులు/ నిశ్చిత కణపంక్తులు:

పరిమిత కణవిభజన సామర్థ్యంను కలిగి ఉండి కణవిభజన నిలచి పోయే సెల్ లైనులను నిశ్చిత కణపంక్తులు లేదా నిశ్చిత సెల్ లైనులు అంటారు. వీటి పెరుగుదల రేటు లేదా రెట్టింపు సమయం 24-96 గంటలు.

నిరంతర కణ పంక్తులు/ నిరంతర సెల్ లైన్.లు:

సెల్ లైనులను నిరంతరం ఒక మాధ్యమం నుంచి వేరొక మాధ్యమంలోకి గానీ లేదా నిరంతర మాధ్యమ ప్రవాహంలోగాని పెంచిన యెడల నిరంతర కణ పంక్తులు ఏర్పడతాయి. వీటికి మరణం ఉండదు (Immortal/అమర కణాలు).

ఈ కణాలు సాధారణంగా అన్యూప్లాయిడీ (Aneuploidy) గా ఉండి క్రోమోసోముల సంఖ్య ఎల్లపుడూ డిప్లాయిడ్ మరియు టెట్రాప్లాయిడీకి మద్య ఉంటుంది (హెటిరోప్లాయిడీ). వీటి పెరుగుదల రేటు 12-24 గంటలు.

నిరంతర కణాల యొక్క కొన్ని ముఖ్యమైన లక్షణాలు:-

* పెరుగుదలకు తక్కువ సీరం అవసరం
* కణాల వృద్ధి సాంద్రత పరిమితికి మించి ఉంటుంది
* పాక్షిక ఘనరూప మాధ్యమంలో వృద్ధి
* అన్యూప్లాయిడీ

ప్రాథమిక కణవర్ధనాలను తయారు చేయు పద్ధతులు:

ప్రాథమిక కణవర్ధనాలను మూడు పద్ధతులలో తయారు చేస్తారు.

1. యాంత్రిక పద్ధతి: ఈ పద్ధతిలో మృదుకణజాలలైన ప్లీహం, మెదడు, పిండకణజాలము, మెత్తని కణతులును యాంత్రికంగా విచ్చిన్నంచేసి కణాలను తయారు చేస్తారు. ఇందులో ప్రాథమికంగా కణజాలంను ముక్కలు ముక్కలుగా

Dr K JAYAPPA

విడగొడతారు లేదా కణజాలాలను వివిధపరిమాణము కల్గిన జల్లెడవంటి వాటిని వాడిగాని లేక సిరంజి సూదినిగాని ఉపయోగించి కణజాలలనుంచి కణాలను వేరు చేస్తారు. ఈ పద్ధతి ద్వారా నష్టాలు ఉన్నప్పటికి విధానం తక్కువ ఖరీదు, తక్కువ సమయంలో చేయుట వంటిసౌకర్యాలు వల్ల ఈ పద్ధతిని ఎక్కువగా ఉపయోగిస్తారు.

2. ఎంజైమాటిక్ పద్ధతి: కణజాలాలలో అధికంగా బంధన కణజాలం ఉంటుంది. కావున ట్రిప్సిన్, కొల్లజినేస్ మరియు ఇతర ఎంజైమ్.లను ఉపయోగించి కణాలను వేరుచేస్తారు. పిండ కణజాలం మరియు అధిక బంధన కణజాలం కలిగిన అవయవాలనుండి కణాలను వేరుచేయుటకు ఈ పద్ధతిని ఉపయోగిస్తారు.

కొల్లాజినేజ్:-

అభివృద్ధిచెందిన జంతువుల కణజాలము కొల్లజిన్ తో నిండి ఉంటుంది. ఇటువంటి కణజాలంలోని కణాలను వేరు చేయుటకు కొల్లాజినేజ్ అను ఎంజైమ్ ను వాడుతారు. ఎంచుకోబడిన కణజాలాన్ని ఉప్పునీటి ద్రావణంలో ఉంచి వాటిని చిన్న ముక్కలుగా కత్తిరించుకోవాలి. ఈ ముక్కలను 1-5 రోజులపాటు కొల్లాజినేజు కొల్లాజినేజ్ ఎంజైమ్ ఉంచిన పాత్రలో ఉంచాలి. 5 రోజుల తరువాత పాత్రలో అడుగు భాగానికి చేరిన కణజాలంనుండి కణాలను వేరు చేస్తారు. కొల్లాజినేస్ ఎంజైమ్ ను హయలురునిడేస్ ఎంజైమ్ తో కలిపి ఎలుక, కుందేలు కాలేయకణాలు సమర్థవంతంగా వేరు పడతాయి.

ట్రిప్సిన్ ఎంజైమ్:

ట్రిప్సిన్ ఎంజైమ్ ను ఉపయోగించి కణజాలంను విచ్ఛిన్నం చేసి కణాలను వేరు చేయడాన్ని ట్రిప్సినైజేషన్ అంటారు. క్రూడ్ ట్రిప్సిన్ లేదా స్వచ్ఛమైన ట్రిప్సిన్ ను ఉపయోగించి ట్రిప్సినైజేషన్ చేస్తారు.

ట్రిప్సినైజేషన్ ను రెండు పద్ధతులద్వారా చేస్తారు.

వార్మ్ ట్రిప్సినైజేషన్:-

కణాలను వేరుచేయడం కోసం ఈ పద్ధతిని విస్తృతంగా ఉపయోగిస్తారు. ముక్కలుగా చేసిన కణజాలంను డిసెక్షన్ బేసల్ సాల్ట్ ద్రావణం (DBSS) తో కడుగుతారు, తరువాత వార్మ్ ట్రిప్సిన్ (37°C) కలిగిన ఫ్లాస్క్ లోకి బదిలీ చేసి కలియతిప్పుతారు(Stirring). ప్రతి 30 నిమిషాల విరామంతో, అవలంబితం(Supernatant) నుండి వేరుచేయబడిన కణాలనుసేకరిస్తారు. సేకరించిన కణలనుండి ట్రిప్సిన్ ఎంజైమును తొలగించి, తగిన మాధ్యమంలో సంరక్షిస్తారు (మంచు మీద సీసాను ఉంచడం ద్వారా).

కోల్డ్ ట్రిప్సినైజేషన్:-

వార్మ్ ట్రిప్సినైజేషన్‌లో కణాలను 37°C వద్ద ఎక్కువ కాలం బహిర్గతం చేయడం ద్వారా కణాలకు నష్టం జరిగే అవకాశం ఎక్కువ. దీనిని కోల్డ్ ట్రిప్సినైజేషన్ ద్వారా అధిగమించవచ్చు.

కత్తిరించిన కణజాల ముక్కలను ఒక సీసాలో (మంచు మీద) ఉంచి, చల్లని ట్రిప్సిన్ తో 6-24 గంటలు నానబెట్టాలి. అయినప్పటికీ, కణజాల ముక్కలలో అవశేష ట్రిప్సిన్‌ను తొలగించాలి. ఈ కణజాల ముక్కలను ఒక మాధ్యమంలో 37°C వద్ద 20-30 నిమిషాలు నిల్వ ఉంచాలి. తరువాత పదేపదే పై-పెట్టింగ్స్ ద్వారా కణాలను వేరుచేసి లెక్కించాలి. కణాలను సజలీకరించి ఉపయోగించవచ్చు.

స్థాపించబడిన కణ పంక్తులు (సెల్ లైనులు)/ *నిరంతర సెల్ లైనులు:*

ద్వితీయ కణవర్ధనం తరువాత లభించిన కణాలకు వృద్ధి, నిరవధిక జీవనం ఉంటుంది. వీటిని తాజామాధ్యమంలోకి మార్పిడి చేసి ఉంచుతారు. ఈ రకమైన సెల్‌లైనులను స్థాపించబడిన సెల్‌లైనులు లేదా నిరంతర సెల్‌లైనులు అంటారు. కణపంక్తులను నిరంతరం ఒక మాధ్యమం నుంచి వేరొక మాధ్యమంలోకి గాని లేదా నిరంతర మాధ్యమంలో గాని పెంచిన ఎడల నిరంతర కణపంక్తులు(Continuous cell lines) ఏర్పడుతాయి. ఈ కణపంక్తులు అన్యూప్లాయిడీ లేదా హెటిరోప్లాయిడీ అనే లక్షణాలను కలిగి ఉంటాయి. వీటి రెట్టింపు సమయం 12-24 గంటలు.

Dr K JAYAPPA

ఉదా: MRC, HeLa, CHO, BHK మరియు Vero కణాలు.

1. MRC (Medical Research council Cell strain): MRC సెల్ లైనులు, గర్భస్రావం జరిగిన 14 వారాల వయసున్న కాకేసియన్ యొక్క మగపిండం ఊపిరితిత్తుల కణజాలం నుంచి తీయబడిన ఫైబ్రోబ్లాస్ట్ కణాలు. ఈ కణాలను JB జాకబ్స్ మరియు ఇతర సహచరులు 1966 వ సంవత్సరం సెప్టెంబర్.లో వేరు చేశారు. ఈ కణాలను ఉపయోగించి వారిసెల్లా, MMR మరియు పోలియో వంటి టీకాలను ఉత్పత్తి చేస్తారు. వ్యాధి సోకిన MRC కణాలు వైరస్ ను స్రవిస్తాయి.
2. HeLa కణాలు:- HeLa కణాలు మానవ సర్వైకల్ కాన్సర్ కణాలు, వీటిని హెన్రియెట్టా లాక్స్(Henrietta Lacks) అను సర్వైకల్ కాన్సర్ ఉన్న అమెరికా మహిళ సర్విక్స్ నుంచి 1951 సం.లో వేరుచేశారు. ఇవి అతి పురాతన మరియు అతి సాధారణంగా ఉపయోగించే సెల్ లైన్లు. ఆ మహిళ పేరు మొదటి రెండు అక్షరాలను తీసుకొని ఈ కణాలకు HeLa అని నామకరణం చేశారు.
3. CHO (Chinese hamster ovary) కణాలు: ఇవి చైనీస్ చిట్టెలుక అండాశయంనుంచి వేరు చేయబడిన ఉపకళాకణాలు. వీటిని జీవ మరియు వైద్య పరిశోధన రంగంలో వాణిజ్యపరంగా వైద్యచికిత్సలో ఉపయోగపడే ప్రోటీన్లు, హార్మోన్ ల ఉత్పత్తికి ఉపయోగిస్తారు. వీటికి సస్పెన్షన్ మాధ్యమంలో బాగా పెరిగే సామర్థ్యం ఉండటం మరియు అధిక ప్రోటీన్ ఉత్పత్తి సామర్థ్యం ఉండటం ద్వారా వీటిని సెల్ లైనులుగా విరివిగా వినియోగిస్తారు.
4. BHK (Baby Hamster Kidney cells) కణాలు: ఇవి బేబీ హామ్ స్టర్ మూత్రపిండాల ఫైబ్రోబ్లాస్ట్ కణాలు, వీటిని 1961 వ సంవత్సరంలో IA మాక్ ఫెర్సన్, MGP స్టోకర్వేరుచేశారు. ఈ కణాలు అడినోవైరస్ D, రియోవైరస్3 మరియు వెసిక్యులార్ స్టొమటైటిస్ వైరస్ లకు సూక్ష్మగ్రాహ్యతను కలిగి ఉంటాయి. వైరస్ సంక్రమణ వ్యాధులను అధ్యయనంచేయడానికి ఈ కణాలను ఉపయోగిస్తారు.
5. Vero కణాలు: క్లోరోసెబస్ జాతికి చెందిన ఆఫ్రికన్ గ్రీన్ మంకీ మూత్రపిండాల ఉపకళాకణాలనుంచి 1962 సంవత్సరంలో యసుమూరా మరియు కవాకితా అను జపాన్ శాస్త్రవేత్తలు ఈ కణాలను వేరు చేశారు.verda reno అనగా గ్రీన్ కిడ్నీ కనుక ఈ కణాలకు vero కణాలు అని పేరు పెట్టారు.

E.coli విషపధార్థాల(వెరొటాక్సిన్, షిగాటాక్సిన్)ను, రేబిస్ వైరస్ యొక్క ఉనికిని కనుగొనడానికి ఉపయోగిస్తారు.

*****మోనోక్లోనల్ ప్రతిదేహాలు/ హైబ్రిడోమా టెక్నాలజి*****

నిర్దిష్టమైన లింఫోసైట్ క్లోన్‌ల ద్వారా ఉత్పత్తి అయిన ప్రతిదేహాలను మోనోక్లోనల్ ప్రతిదేహాలు అంటారు.

★1975 G F కొహ్లర్, C. మిల్ స్టీన్ అను శాస్త్రవేత్తలు సంయుక్తంగా హైబ్రిడోమా టెక్నాలజిను ఉపయోగించి మోనోక్లోనల్ ప్రతిదేహాలను తయారు చేశారు

★ఈ విధానంలో ప్రతిదేహాన్ని ఉత్పత్తి చేయగల B-లింఫోసైట్‌ను ఒక మయలోమా కణంతో (కాన్సర్ కణం) కలపడం వల్ల హైబ్రిడోమా కణం తయారవుతుంది. ఈ హైబ్రిడోమా కణం తన జన్మకారక రెండు రకాల కణాల లక్షణాలను కలిగి ఉంటుంది (అనగా B- లింఫోసైట్ ప్రతిదేహ స్రావిక లక్షణం, కాన్సర్ కణం యొక్క అపరిమిత కణవిభజన లక్షణం), ఇలాంటి హైబ్రిడోమా కణాల క్లోను ఎల్లపుడూ ఒకేరకమైన ప్రతిదేహాలను అంటే ఒకేరకమైన ప్రతిజనకాలతొ చర్య జరిపే వాటిని ఉత్పత్తి చేస్తాయి.

విధానం:-

★ఎలుక ప్లీహం నుంచి B - లింఫోసైట్‌ను, కాన్సర్ కణతులనుండి కాన్సర్ కణాలను(మయలోమా కణం) సేకరిస్తారు.

★ఈ రెండు రకాల కణాలను కలయిక కారకాలయిన (Fusogens) పాలీఇథిలిన్ గ్లైకాల్ (PEG) సమక్షంలో కలుపుతారు.

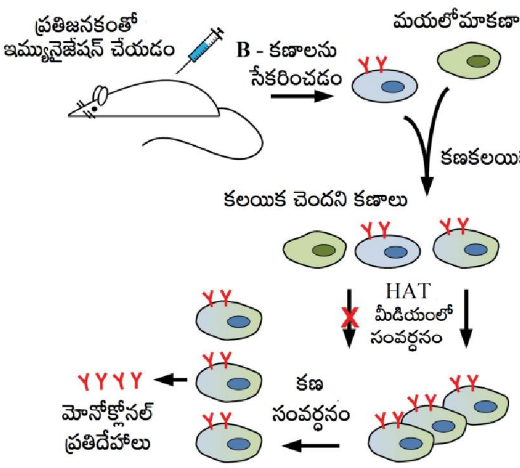
★తరువాత కణాల మిశ్రమాన్ని కడిగి వరణాత్మక యానకం (Selective medium) లో ఉంచితే హైబ్రిడోమా కణాలు వృద్ధి చేందుతాయి.

Dr K JAYAPPA

★HAT (హైపోక్సాంథిన్, ఎమినోప్టెరిన్, థైమిడిన్) యానకంను వరణాత్మక యానకంగా వినియోగిస్తారు సంకరపు కణాలు HAT కు నిరోధక శక్తిని కలిగి ఉంటాయి, కాని కాన్సర్ కణాలు HAT యానకంలో చనిపోతాయి, ప్లీహపు కణాలు ఒకటి రెండు రోజులు మాత్రమే జీవిస్తాయి.

★హైబ్రిడోమా కణాలను సేకరించి వాటి సంఖ్యను వృద్ధి పరచి పారిశ్రామికంగా మోనోక్లోనల్ ప్రతిదేహాలను ఉత్పత్తి చేస్తారు.

మోనోక్లోనల్ ప్రతిదేహాల ఉత్పత్తి విధానం



ఉపయోగాలు:

★క్లమీడియా (స్ట్రెప్టోకోకస్ రకపు బాక్టీరియా), ఎయిడ్స్ కారక HIV ని గుర్తించడానికి వినియోగిస్తారు.

★దేహంలోని వివిధ ప్రోటీన్ల విషతుల్యాల, ఔషధాల గాడతను కొలవడానికి, పాలలోని సూక్ష్మజీవ నాశకాలను గుర్తించడానికి వినియోగిస్తారు.

★అవయవ మార్పిడి శస్త్ర చికిత్సలలో తిర్యక్ చర్యల్ని నిరోధించడానికి వీటిని వినియోగిస్తారు

★ఆటో ఇమ్యూన్ వ్యాధుల చికిత్సల్లోనూ వీటిని వినియోగిస్తారు.

మూలకణాలు (Stem cells)

స్టెమ్‌సెల్స్ అను పదం 'స్టామ్‌జెల్లె' అను జర్మన్ పదం నుండి ఉద్భవించింది, స్టామ్‌జెల్లె అనగా బహుకణ జీవి ఉత్పత్తికి కారణమయ్యే ఒక పూర్వకణం.

★స్టెమ్‌సెల్ అను పదాన్ని మొట్టమొదటసారిగా 1868 వ సం.లో ఎర్నెస్ట్ హెకెల్ అను జీవశాస్త్రవేత్త ఉపయోగించారు.

"అనుకూలమైన పరిస్థితులలో వివిధ రకాల కణాలుగా విభేదీకృతం చెందే కణాలను మూలకణాలు అంటారు."

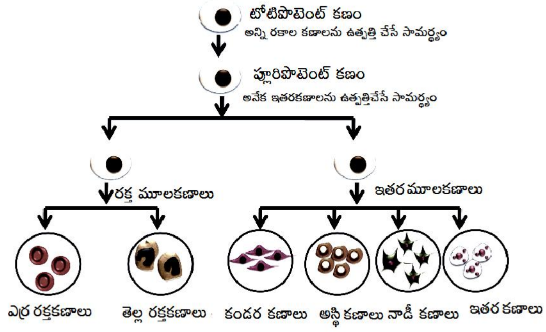
★సాధారణంగా పూర్తిగా విభేదీకృతం (Differentiation) చెందిన కణాలు నిర్దిష్టమైన విధులను నిర్వర్తిస్తూ తమలాంటి కణాలను మాత్రమే ఉత్పత్తి చేస్తుంది. అనగా ఆకణం నిబద్ధమైనది (Committed) అంటాము.

★కాని మూలకణంకు నిర్దిష్టమైన విధులు అనేవి లేకుండా అనుకూలమైన పరిస్థితులలో ప్రత్యేకమైన కణాలుగా మార్పు చెందే సామర్థ్యాన్ని కలిగి ఉండును.

★ శరీరంలో ఉన్న ఏదైనా కణజాలంకానీ, కణాలు కానీ కోల్పోయినపుడు వాటిని తిరిగి పునఃస్థాపించడంలో మూలకణాలు ప్రధాన పాత్ర వహిస్తాయి.అందువలన మూలకణాలను రిజర్వ్‌కణాలు (Reserve cells) అంటారు.

★మూలకణం వేరు వేరు రకాల కణాలను ఉత్పత్తి చేయగల సామర్థ్యంను పొటెన్సి(Potency) అంటారు.

★మూలకణాలు స్వయం పునరుద్ధరణ(Self renewal) (అనగా తమంతట తాము విభజన చెంది తమలాంటి అనేక కణాలను ఏర్పరచడం) సామర్థ్యంను కలిగి అవే కణాలు తిరిగి వేరు వేరు ఇతర కణాలను ఉత్పత్తి చేస్తాయి. ఈ లక్షణాన్ని స్టెమ్‌నెస్ (Stemness) అంటారు.



మూలకణాలు రకాలు:

1. టోటిపొటెంట్ కణాలు/ఆమ్ని పొటెంట్ కణాలు
2. ప్లూరిపొటెంట్ కణాలు
3. మల్టిపొటెంట్ కణాలు
4. ఆలిగోపొటెంట్ కణాలు

1. టోటిపొటెంట్ కణాలు/ఆమ్ని పొటెంట్ కణాలు:

ఇవి అన్ని రకాల కణాలను ఉత్పత్తి చేసే సామర్థ్యాన్ని కలిగి ఉంటాయి. కావున ఇలాంటి ఒక కణం మొత్తం జీవిని

Dr K JAYAPPA

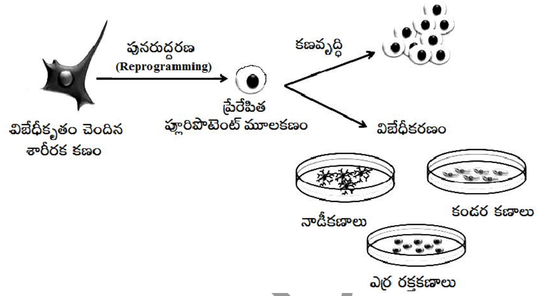
ఏర్పరుస్తుంది. ఉదా: పిండ మూలకణాలు లేదా సంయుక్త బీజంలోని కణాలు

2. ప్లూరీపొటెంట్ కణాలు: ఇవి టొటిపొటెంట్ కణాలనుండి ఉత్పత్తి అవుతాయి. ప్రాథమిక జననస్తరాలైన బహిస్త్వచం, మధ్యస్త్వచం, అంతస్త్వచం దేనినుంచి ఉత్పత్తి అవుతాయో దాని యొక్క కణాలను మాత్రమే ఉత్పత్తి చేస్తాయి. ఉదా: పిండాభివృద్ధి తరువాతి దశలలోఉండే కణాలు.

ప్రేరేపిత ప్లూరిపొటెంట్ మూలకణాలు(Induced pluripotent stemcells): విభేదీకృతం చెందిన శారీరక కణాలను రీప్రోగ్రామింగ్ లేదా పునఃవిభేదీకృతం చెందించదం ద్వారా ఏర్పడిన కణాలను ప్రేరేపిత ప్లూరిపోటెంట్ మూలకణాలు అంటారు.

వీటిని మొట్టమొదటసారిగా 2006 సం.లో ఉత్పత్తిచేసారు. కాని ఇంకా ప్రయోగశాలదశలోనే ఉంది.

ఇవి ప్లూరిపొటెంట్ స్టెమ్‌సెల్స్ లాగా మూడురకాల జనన స్తరాలనుండి ఏర్పడే కణాలను ఉత్పత్తి చేస్తాయి. ఇటువంటి కణాల ఉత్పత్తి కణజాల ఇంజనీరింగ్‌లో తోడ్పడుతుంది.



3.మల్టిపొటెంట్ కణాలు: ఇవి వాటి మూల ఆధారిత కణాలను మాత్రమే ఉత్పత్తి చేస్తాయి మరియు ఉత్పత్తిచేసే కణాలసంఖ్య పరిమితంగా ఉంటుంది.

ఉదా: ప్రౌఢమూలకణాలు: అభివృద్ధిచెందిన కణజాలలో విభేదీకృతం చెందకుండా ఆ కణజాలానికి సంబంధించిన కణాలను మాత్రమే ఉత్పత్తి చేసే కణాలను ప్రౌఢ మూలకణాలు అంటారు. వాటి యొక్క ప్రధానపాత్ర కోల్పోయిన కణజాలంను తిరిగి భర్తీచేయడం(లేదా చనిపోయిన కణాలను భర్తీ చేయడం)

హిమటోపాయిటిక్ స్టెమ్‌సెల్స్: ఇవి రక్త మూలకణాలు, ఇవి విభజన చెంది లింఫోసైట్స్, మోనోసైట్స్, మాక్రోఫేజ్, ఎరిత్రోసైట్స్,న్యూట్రోఫిల్స్, ఇసినోఫిల్స్ మొదలైన కణాలను ఏర్పరుస్తాయి.

మీసెంకైమల్ మూలకణాలు: ఇవి విభేదీకృతంచెంది ఆస్టియోసైట్స్(ఎముక), కాండ్రోసైట్స్(మృదులాస్థి) మరియు అడిపోసైట్స్(కొవ్వు కణాలు)ను ఏర్పరుస్తాయి.

4.ఆలిగోపొటెంట్ మూలకణాలు: ఇవి మల్టిపొటెంట్ కణాలయొక్క ఉపకేటగిరీకి చెందుతాయి. ఇవి తక్కువ రకాల కణాలను ఉత్పత్తి చేస్తాయి.

ఉదా: మైలాయిడ్ స్టెమ్‌సెల్స్: ఇవి కేవలం B మరియుT లింఫోసైట్ కణాలుగా మాత్రమే విభేదీకృతం చెందుతాయి.

అనువర్తనాలు:

★ప్రౌఢ జీవులలో అభివృద్ధి చెందిన కణజాలంలో మూలకణాలు ఉన్నప్పటికి అవి వ్యాధికి గురయిన లేదా కోల్పోయిన కణాలను తిరిగి ఏర్పరచలేవు. దీనికి కారణం ఈ కణాలు స్వీయ పునరుద్ధరణ(self renewal) మరియువిభేదీకరణం చెందడానికి ప్రేరణ అవసరం.

★మూలకణాలను ప్రేరేపించే ప్రక్రియ ఇన్‌వివోలో స్పష్టంగా గుర్తించబడలేదు.

★వ్యాధి సంబదిత ప్రాంతంలోకి మూలకణాలను ప్రవేశపెట్టడం ఉపయోగకరంగా ఉంటుంది. కాని ఒక్కొక్కసారి మూలకణాలు ప్రవేశపెట్టిన స్థానం నుండి వేరేస్థానంకు వలస చెందే అవకాశం ఉంది. దీని వల్ల చికిత్సా సామర్థ్యం తగ్గడమే కాకుండా, వలస చెందిన ప్రాంతాలలో కణితులు(ట్యూమర్స్) పెరిగే అవకాశం ఉంది.

★రక్తకణాలు అవసరమైన వ్యాధిగ్రస్తులలోకి హిమటోపాయిటిక్ కాండకణాలను ప్రవేశపెట్టి వాటినుంచి అవసరమైన కణాలను ఏర్పడేటట్లు చేయడమ్ మూలకణాల పరిశోధనలో ముఖ్యమైనది.

★ పిండమూలకణాలను ఉపయోగించి మెదడులోకోల్పోయిన నాడీకణాలను తిరిగి ఉత్పత్తిచేసి పార్కిన్.సన్స్ వ్యాధి మరియు మధుమేహం లాంటి కణ ఆధారిత వ్యాధులను నివారించవచ్చు.

కృత్రిమ బీజవాహం (Artificial insemination)

పురుష జీవి యొక్క శుక్రకణాలను కృత్రిమంగా స్త్రీ జీవి యొక్క బీజ వాహికలలోకి ప్రవేశ పెట్టుటను కృత్రిమ బీజవాహం అంటారు.

సాధారణంగా సహజ బీజవాహం కన్నా కృత్రిమ బీజవాహం చాలా రకాలుగా ప్రయోజనకరంగా ఉంటుంది.

- ఉన్నత జాతికి చెందిన మగ జీవులు (సిరెస్) చాలా ఖరీదయినవి, కావున వాటి శుక్రకణాలను వుపయోగించడం చవకైన పద్ధతి.
- సహజ సంతానోత్పత్తి పద్ధతిలో సంపర్క సమయంలో స్త్రీజీవికి అనేక వ్యాధులు సంక్రమించే వకాశం వుంది, కృత్రిమ పద్ధతివల్ల దీనిని అధిగమించవచ్చు.
- ఉన్నతజాతికి చెందిన మగజీవులను ఇతర దేశాలనుంచి దిగుమతిచేసుకోవాలంటే, క్వారంటైన్ పద్ధతి ద్వారా చేసుకోవాల్సి ఉంటుంది. దీనివల్ల ఎక్కువ సమయం వృధా కావడంతో పాటు అధిక ఖర్చు వెచ్చించాల్సి ఉంటుంది.

కృత్రిమ బీజవాహం విధానం:

★ఉన్నతజాతికి చెందిన మగజీవి నుండి వీర్యంను పరీక్షనాళికలోకి సేకరించడం.

★వీర్యం యొక్క నాణ్యతను పరీక్షించుట: శుక్రకణాల సంఖ్య మరియు వాటి కదలిక సామర్థ్యంను సూక్ష్మదర్శిని సహాయంతో పరీక్షిస్తారు. సాధారణంగా 0.2 మి.లీ. వీర్యం 10 మిలియన్ల చలన సహిత శుక్రకణాలను కల్గి వుండును.

★సేకరించిన వీర్యంకు పాలు లేదా సొన లేదా గ్లిసరిన్ మరియు సూక్ష్మజీవ నాశకాలను కలిపి సజలీకరించి ద్రవరూప నత్రజనిలో, అతిశీతల ఉష్ణోగ్రత(-196^0C) వద్ద నిల్వ ఉంచుతారు.

★కృత్రిమ గర్భధారణకు ముందు, స్త్రీ జీవి యొక్క ఎస్ట్రస్ వలయంపై అవగాహన కలిగి ఉండాలి. దీని ద్వారా అండం ఏ సమయంలో విడుదలవుతోందో సులువుగా గుర్తించవచ్చు.

★వీర్యంను స్త్రీ జీవి బీజవాహికలలోకి ప్రవేశపెట్టడం ద్వారా ఫలధీకరణం జరుగును.

ఇన్‌విట్రో ఫెర్టిలైజేషన్ (Invitro fertilization)/ IVF

ఇన్‌విట్రో ఫలధీకరణ అనగా ప్రయోగశాలలో కృత్రిమంగా అండకణంను శుక్రకణంతో ఫలధీకరణం చెందించడం. దీనినే పరస్థానిక ఫలధీకరణ అనికూడా అంటారు.

ఇటీవల కాలంలో IVF సాంకేతికత జీవసాంకేతిక శాస్త్రంలో అత్యంత ప్రాచుర్యం పొందినది. ఈ సాంకేతికతను ఉపయోగించి సహజ పద్ధతి కన్నా ఎక్కువ జీవులను ఉత్పత్తి చేయవచ్చు. ఉదాహరణకు ఒక స్త్రీ జీవి తన జీవితకాలంలో సహజ సంతానోత్పత్తి ద్వారా 4-5 పిల్ల జీవులను ఉత్పత్తి చేయగలదు. IVF సాంకేతికత ద్వారా అదేజీవి నుండి 50-80 జీవులను ఉత్పత్తి చేయవచ్చు.

IVF విధానంలో క్రింది దశలు ఉంటాయి

1. స్త్రీ జీవి నుండి అండకణాలను సేకరించుట
2. సేకరించిన అండకణాలను పరిపక్వత చెందించడం

Dr K JAYAPPA

3. ఫలధీకరణం: పరిణతి చెందిన అండకణాలను కృత్రిమంగా ప్రయోగశాలలో సేకరించి ఉన్న ఉన్నత జాతికి చెందిన మగ జీవి శుక్రకణాలతో ఫలధీకరణ చెందించడం

4. పిండం పెరుగుదల: ఫలధీకరణం చెంది ఏర్పడిన పిండంను కొద్దిరోజులు కృత్రిమంగా ప్రయోగశాలలో బ్లాస్టులా దశ వరకూ పెంచాలి.

5. పిండ ప్రతిస్థాపన: 7–8 రోజులు వయసున్న పిండాలను గ్రహీత స్త్రీ జీవి యొక్క గర్భాశయంలోకి ప్రవేశపెడతారు. గ్రహీత స్త్రీ జీవిని సరోగేట్ తల్లి అంటారు. సరోగేట్ తల్లి జన్యుమార్పిడిలో పాత్ర వహించదు. కేవలం పిండం పెరుగుదల, అభివృద్ధికి స్థానం కల్పిస్తుంది.

ఉన్నతమైనఅండోత్సర్గం/బహుళఅండోత్సర్గం

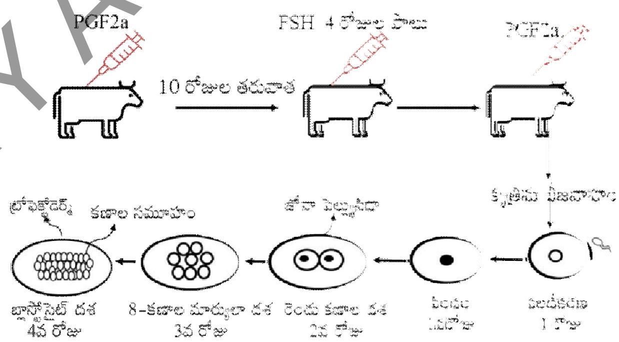
ఒక ఎస్ట్రస్ వలయంలో విడుదలయ్యే అండకణాల సంఖ్యను పెంచడం లేదా హార్మోనులను (PGF2a & FSH) ఉపయోగించి పుటికా కణాల అభివృద్ధిని ప్రేరేపించి ఎక్కువ సంఖ్యలో అండాలను విడుదల చేయడం.

పశువులలో స్త్రీ ప్రత్యుత్పత్తి వలయం

గర్భం ధరించని సాధారణ ఆడజీవి, ఒక ఎస్ట్రస్ వలయంలో అండాశయ ఫోలికల్ పరిణతి చెందిఒక సారవంతమైన అండంను విడుదల చేస్తుంది.అండం విడుదలయ్యే సమయం వివిధ జీవులలో వేరు వేరుగా ఉంటుంది. ఉదాహరణకు ఆవు మరియుగుర్రం లో 21 రోజులు; గొర్రె మరియుమేకలలో16 రోజులు.

ఉన్నతమైన అండోత్సర్గం– హార్మోనులు:

పుటికా ప్రేరేపక హార్మోను (FSH) – అండోత్సర్గంలో తోడ్పడును, అధిక గాడత పుటికా ప్రేరేపక హార్మోను అండాశయ పుటికలను ప్రేరేపించి ఎక్కువ అండాలను విడుదలయ్యేలా చేయును.ప్రొస్టగ్లాండిన్F2a ఎస్ట్రస్ సమకాలీకరణ ప్రేరేపణలో తోడ్పడును, ఒక ఎస్ట్రస్ వలయంలో ఉన్నత అండోత్సర్గ ప్రక్రియ ద్వారా8–10 అండాలనుపొందవచ్చు.



ఉన్నతమైన అండోత్సర్గ ప్రక్రియలోని దశలు

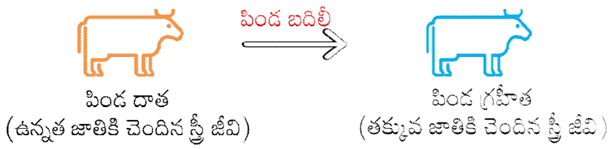
ఉన్నతమైన అండోత్సర్గం – ప్రయోజనాలు

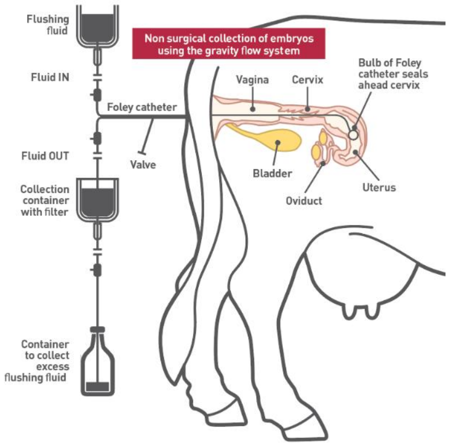
i. పిండబదిలీ ప్రక్రియలో తోడ్పడును
ii. ఎస్ట్రస్ సమకాలీకరణను ప్రేరేపించడం
iii. తరాల మధ్య కాలవ్యవధిని తగ్గించడంలో ఉపయోగపడును
iv. పశువుల సంతతి సంఖ్యను పెంచడంలో ఉపయోగపడును.
v. పశువుల ఆడజీవుల ప్రత్యుత్పత్తి సామర్థ్యంను పెంచడంలోను తోడ్పడును.

Dr K JAYAPPA

పిండ బదిలీ(ET)

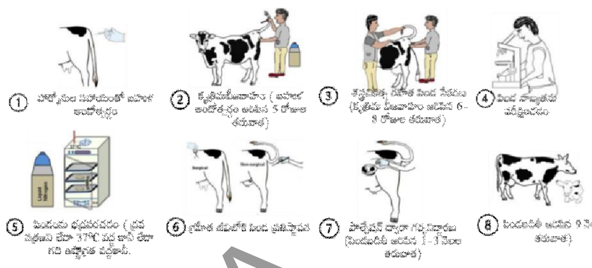
దాత స్త్రీ జీవినుండి సేకరించిన పిండాలను గ్రహీత స్త్రీ జీవి (పెంపుడు తల్లి) గర్భాశయంలోకి బదిలీ చేయడం.





పిండబదిలీ–దశలు:

1. పిండసేకరణ– కాథెటర్ సహాయంతో ఉన్నత అండోత్సర్గం చేసిన స్త్రీ జీవులనుంచి సేకరణ (కృత్రిమ బీజవాహం జరిపిన6–8 రోజుల తరువాత)
2. కాథెటర్ ద్వారా ద్రావణంను ఉపయోగించి ఫెలోఫియన్ నాళాలను మరియు గర్భాశయంను ఫ్లష్ చేయడం.
3. ఒక ఫ్లష్ ద్వారా 6–8 ఎంబ్రియోలను సేకరించవచ్చు.
4. పిండం యొక్క నాణ్యతను పరీక్షించడం
5. గ్రహీతజీవిలోకి పిండంను ప్రతిస్థాపించడం మిగిలిన వాటిని శీతలీకరించి భద్రపరచడం.
6. దాత మరియు గ్రహీత జీవుల ఎస్ట్రస్ వలయం ఏకరీతిగా ఉండాలి.
7. పిండబదిలీ ద్వారా 50–60% మాత్రమే గర్భధారణ సాదించవచ్చు



ఉన్నతమైన అండోత్సర్గం –పిండబదిలీ దశలు

పిండబదిలీ – ఉపయోగాలు

- వేగంగా జన్యు మెరుగుదలసాధించవచ్చు
- జీవులను ఎగుమతి, దిగుమతి కన్నా పిండంను ఎగుమతి, దిగుమతి సులభంగా ఉండును.
- వంధ్యత్వ సమస్యలనుఅధిగమించవచ్చు.
- పశువులలో కవలలనుపొందవచ్చు.
- అంతరించిపోతున్న జాతులనురక్షించడం

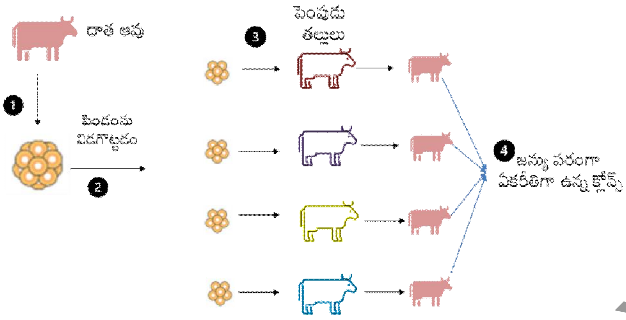
పిండబదిలీ – పరిమితులు

- ఉన్నతఅండోత్సర్గం జరిపిన జీవినుంచి పిండసరఫరా పరిమితంగా ఉండును.
- శీతలీకరణ మరియు కరిగించడం ప్రక్రియలో పిండంను క్రియాత్మకంగా ఉంచడానికి చాలా జాగ్రత్త అవసరం.
- పిండబదిలీ అధిక ఖర్చుతో కూడినదే కాకుండా, సాంకేతిక నైపుణ్యం కూడా అవసరం.

Dr K JAYAPPA

పిండ క్లోనింగ్/పిండ విభజన

అభివృద్ధి యొక్క ప్రారంభ దశలలో (8 కణాల దశ లేదా మార్త్యులా) పిండాన్ని ఒకటి కంటే ఎక్కువ సమూహ కణాలుగా విడగొట్టడం. ఇలా వేరు చేయబడిన కణాల సమూహాలను పెంపుడు తల్లుల గర్భాశయంలోకి ప్రతిస్థాపించడం ద్వారా జన్యుపరంగా ఒకేలా ఉండే క్లోన్‌లుగా అభివృద్ధి చెందుతాయి.



పిండ క్లోనింగ్ – దశలు

1. దాత స్త్రీ జీవినుండి పిండ సేకరణ 2. పిండంను చిన్న చిన్న కణాల సమూహంగా విడగొట్టడం. 3. గ్రహీత (పెంపుడు తల్లి) జీవిలోకి పిండ ప్రతిస్థాపన 4.జన్యుపరంగా ఒకేలా ఉన్న క్లోన్ ల అభివృద్ధి

జన్యుపరివర్తిత జంతువులు Transgenic animals

ఒక జీవిలోని నిర్దిష్టమైన ఒక జన్యువును ఎంపిక చేయబడ్డ ఇంకొక జీవి జీనోమ్ లోకి ప్రవేశపెట్టడంను జన్యు పరివర్తన అంటారు. జీనోమ్.లో వేరొక జీవి యొక్క జన్యువు (DNA)ను కలిగి ఉన్న జీవులను జన్యు పరివర్తక జీవులు అంటారు. ప్రవేశ పెట్టబడిన జన్యువును "ట్రాన్స్ జీన్" అని అంటారు.

జన్యుపరివర్తక జంతువులు జన్యుపరంగా మార్పుచేయబడిన జీవులు. వీటిలో కొత్త అనువంశిక లక్షణాలు నిక్షిప్తమై ఉంటాయి.

ట్రాన్స్ జీన్ ను ప్రవేశపెట్టడం:

ఒక జీవి జీవి జీనోమ్ లోకి ట్రాన్స్ జీన్.ను మూడు పద్ధతుల ద్వారా ప్రవేశ పెట్టవచ్చు.

1.రిట్రోవైరల్ వెక్టార్ పద్ధతి: చిన్నDNA ఖండాలను(8kb) రిట్రోవైరల్ వెక్టార్ ద్వారా సమర్ధవంతంగా ప్రవేశపెట్టవచ్చు. పెద్ద పరిమాణంలో ఉన్న DNA ను ప్రవేశ పెట్టడానికి ఈ పద్ధతి అనువుగా ఉండదు. ఈ పద్ధతిలో ఏర్పరచబడిన జన్యుపరివర్తక జంతువులు ఉత్పత్తి చేసిన పధార్థాలు రిట్రోవైరస్ చే సాంక్రమితమై ఉండటం ఈ విధానంలో ముఖ్యమైన అవరోధం. అందువల్ల ఈ పద్ధతి అంతగా వాడుకలో లేదు.

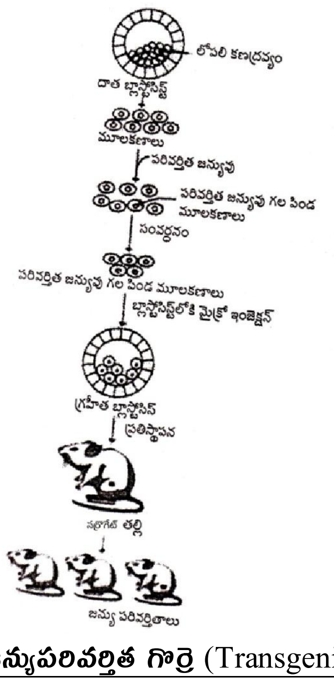
2. మైక్రో ఇంజెక్షన్ పద్ధతి: లైంగికంగా పరిణతి చెందని తక్కువ వయసుగల ఆడ చుంచెలుకకు పుటికా ప్రేరేపక హార్మోను (FSH), మానవ కోరియానిక్ గొనాడోట్రోపిన్ (HCG) ను ఇంజెక్ట్ చేస్తారు ఫలితంగా సాధారణంగా విడుదల చేసే 5-10 అండాలకు బదులు 30-35 అండాలను ఉత్పత్తి చేస్తుంది. ఫలదీకరణంకు ముందే ఫాలోఫియన్ నాళాలనుంచి అండాలను సేకరించి, ట్రాన్స్.జీన్.ను ప్రవేష పెట్టిన పురుష ప్రాక్కేంద్రకంతో ఫలధీకరణం చెందిస్తారు. ఇపుడు పిండాన్ని సర్రోగేట్ తల్లి గర్భాశయంలో ప్రతిస్థాపన చేస్తారు. జన్మించిన జీవులు జన్యుపరివర్తక జీవులుగా ఉంటాయి. ఈ పద్ధతిలో కూడా

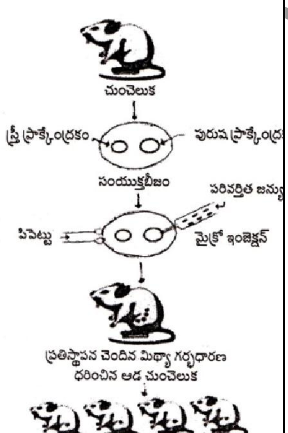
Dr K JAYAPPA

లోపాలు ఉన్నాయి అవి ట్రాన్స్ జీవి అతిథేయి జీనోమ్.లో ఎక్కడైనా కలువవచ్చు లేదా కొన్ని సార్లు అనేక ట్రాన్స్.జీన్.లు అనుసంధానం కావొచ్చు.

3. పిండమూలకణాల ద్వారా ట్రాన్స్ జన్యువును ప్రవేశపెట్టుట:

ఎలుక బ్లాస్టోసిస్ట్ దశలోని కణాల (ప్లూరిపొటెంట్ కణాలు)ను సేకరించి సంవర్ధనం చేసి కణాలసంఖ్యను పెంచుతారు. ఈ కణాలలోకి ట్రాన్స్ జీన్ ను మైక్రోఇంజెక్షన్ లేదా ఎలక్ట్రోపోరేషన్ ద్వారా ప్రవేశపెడతారు. ట్రాన్స్ జీన్ ను కలిగిన కణాలను సంవర్ధనం చేసి మైక్రోఇంజెక్షన్ ద్వారా బ్లాస్టోసిస్ట్ లో ప్రవేశపెడతారు. ఈ బ్లాస్టోసిస్ట్ ను సర్రోగేట్ తల్లిలోకి ప్రవేశ పెట్టి జన్యు పరివర్తక జీవిని ఉత్పత్తి చేస్తారు.





మైక్రో ఇంజెక్షన్ పద్ధతి

జన్యుపరివర్తిత గొర్రె (Transgenic sheep):

1998సం. లో సిమన్స్ అను శాస్త్రవేత్త మొట్టమొదట రెండు జన్యు పరివర్తిత గొర్రెలను ఉత్పత్తి చేశారు, అవి దాదాపు cDNA రూపంలో10 ప్రతుల ఆంటీ హీమోఫిలిక్ కారకం IX జన్యువులను కల్గి ఉన్నాయి.

*β లాక్టోగ్లోబ్యులిన్ జన్యువు క్షీరగ్రంధులలో జన్యు వ్యక్తీకరణకు చాలా ముఖ్యమైనది.

★ జన్యు పరివర్తిత గొర్రె(ఈవ్) లో ఆంటీ హీమోఫిలిక్ కారకం IX ను β లాక్టోగ్లోబ్యులిన్ (BLG) జన్యువుతో అనుసంధానించినపుడు హీమోఫిలిక్ కారకం IX (Human α- 1 antitrypsin (hα-1AT)) ను వాటి పాలలో స్రవించడం జరిగింది.

అధిక నాణ్యత కలిగిన ఉన్నిని ఉత్పత్తి చేయడానికి సిస్టీన్ అనే అమైనో ఆమ్లం అవసరం. కానీ గొర్రెల ఆంత్రనాళంలోని సూక్ష్మజీవులు సిస్టీన్ ను ఇనియోగించుకోవడం వల్ల గొర్రెలకు సరిపడనంత సిస్టీన్ అందదు. అందువల్ల సిస్టైన్ ట్రాన్స్ జీన్ ను గొర్రెలో ప్రవేశపెట్టి జన్యుపరివర్తక గొర్రెను రూపొందించారు. సిస్టైన్ సమృద్ధిగా సంశ్లేషితమవడం వల్ల మంచి నాణ్యత కలిగిన ఉన్నిని ఉత్పత్తి చేయగలుగుతున్నాయి.

జన్యు పరివర్తిత చేప:

చేపలు అధిక పోషక విలువలు కలిగిన ఆహారంగా ఉపయోగపడుతాయి. కావున అధిక నాణ్యత కలిగిన చేపల ఉత్పత్తి అవసరం పెరిగింది. మేడకా చేప, సాలమన్, కార్ప్, జీబ్రా చేప, గోల్డ్ ఫిష్, ట్రౌట్ మరియు కాటిల్ ఫిష్ లో జన్యు మార్పిడి చేయడం జరిగింది. లక్షిత జన్యువును ప్రారంభ పిండ దశల్లోకి మైక్రో ఇంజెక్షన్ పద్ధతి ద్వారా ప్రవేశ పెడతారు. కొన్ని చేపలలో ట్రాన్స్

JAYAPPA

జన్యువును ఊసైట్‌లలోకి ప్రవేశపెడతారు. చేపలలో ఫలధీకరణం నీటిలో జరుగుతుంది కావున జన్యు బదిలీని ఎలక్ట్రోఫోరేషన్ పద్ధతిని ఉపయోగించి చేస్తారు.

ట్రాన్స్ జెనిక్ చేపలను రూపొందించు కార్యక్రమం 1985 లోనే మొదలైనది. చేపలలోకి ప్రవేశపెట్టబడిన జన్యువులన్ని సూక్ష్మసిరంజి ద్వారా ప్రవేశపెట్టబడినవి.

చేపలలోకి ట్రాన్స్ జెనిసిస్ చేసిన కొన్ని జన్యువులు:-

1. మానవుడు లేదా ఎలుక యొక్క పెరుగుదల హార్మోను.
2. E. coli యొక్క β– గలాక్సీ డైయేజ్ జన్యువు
3. E.coli యొక్క నియోమైసిన్ నిరోధకత జన్యువు.

జన్యు మార్పిడి చేసిన చేపలు వన్య జాతులకన్నా ఆరు రెట్లు వేగంతో పెరుగుదలను చూపిస్తాయి. ఇలాంటి చేపలను వేరు చేసి ప్రత్యేకంగా పెంచుతారు.

జన్యుపరివర్తిత జంతువులు – అనువర్తనాలు:

జన్యుపరివర్తిత జంతువులు మానవ సంక్షేమంలో అనేక ఉపయోగాలను కలిగి ఉన్నాయి అవి.

I. వ్యవసాయ రంగం

II. వైద్యరంగం

III. పారిశ్రామిక రంగం

I. వ్యవసాయ రంగంలో:-

ట్రాన్స్ జెనిసిస్ లేదా జన్యు పరివర్తితం చేయడం వల్ల నిర్దిష్టమైన లక్షణాలతో కూడిన పశువుల సమూహంను ఏర్పాటు చేయవచ్చు.

a) సంతానోత్పత్తి (Breeding):-

జన్యు పరివర్తిన ప్రక్రియను ఉపయోగకరమైన లక్షణాలను కలిగిన జంతువులను ఉత్పత్తి చేయడానికి మరియు వాటినుండి నిర్దిష్టమైన ఉత్పన్నాల ఉత్పత్తి మోతాదును పెంచడానికి ఉపయోగిస్తారు. ఉదా: పాల ఉత్పత్తిలో పెరుగుదల, అధికవృద్ధిరేటు.

సాంప్రదాయక పెంపక పద్ధతి అధిక సమయం మరియు శ్రమతో కూడినది. అణుజీవశాస్త్ర సాంకేతికత పెరగడం ద్వారా, జంతువులలో నిర్ధిష్టమైన లక్షణాలను అతి తక్కువ సమయంలో అబివృద్ధి చేయవచ్చు. దీనిద్వారా రైతులు సులభంగాఅధిక దిగుబడులను పొందుతున్నారు.

b) నాణ్యత:

ట్రాన్స్ జెనిక్ ఆవులు అధిక మొత్తంలో పాలను ఇవ్వడంగాని లేదా తక్కువ లాక్టోస్ శాతం మరియు తక్కువ కొలెస్టరాల్‌ను కలిగిన పాలను ఉత్పత్తి చేస్తాయి. అదేవిధంగా పశువులు, పందులు ఎక్కువ మాంసంను కలిగి ఉండటం మరియు గొర్రెలు అధిక మొత్తంలో ఉన్నిని ఉత్పత్తిచేయడం.

c) వ్యాధినిరోధకత:-

వ్యాధినిరోధకత కలిగిన జంతువులను ఉత్పత్తిచేయడం ప్రస్తుతం ప్రయోగదసలలో ఉంది. ఉదా: ఇన్ ఫ్లూయెంజా వ్యాధినిరోధక పందులు. జంతువులలో వ్యాధినిరోధకతకు కారణమైన జన్యువులను చాలా తక్కువ సంఖ్యలో కనుగొన్నారు.

Dr K JAYAPPA

II. వైద్యరంగంలో:

a) జీనోట్రాన్స్ ప్లాంటేషన్(Xeno- transplantation):-

జన్యుపరివర్తితజంతువులనుండి అవయవ మార్పిడికి అవసరమైన అవయావాలను ఉత్పత్తిచేయడం ప్రయోగదశల్లో ఉంది. అవయమార్పిడి కోసం ఉపయోగించే అవయవాలు (గుండె, కాలేయం మరియు మూత్రపిండాలు) లభించక ప్రతియేటా అనేక మంది రోగులు మరణిస్తున్నారు. ఒక బ్రిటన్ దేశంలోనే ప్రతియేటా 5000 అవయవాల అవసరం ఉంది. జన్యుపరివర్తిత జంతువులను (పందులు) పెంచడం ద్వారా దీనిని అధిగమించవచ్చు.

b) పోషక పదార్థాలు మరియు ఔషధాలు:-

పాలను ఉత్పత్తి చేసే జన్యు పరివర్తిత జంతువులు మందుల ఉత్పత్తికి బాగా తోడ్పడుతాయి. ఇన్సులిన్, పెరుగుదల హార్మోన్ మరియు రక్తస్కందన వ్యతిరేఖ కారకాలు వంటి ఉత్పత్తులను జన్యు పరివర్తిత ఆవు, గొర్రె లేదా మేక యొక్క పాలనుండి ఉత్పత్తి చేస్తున్నారు.

ఫినైల్ కీటోన్యూరియా, అనువంశిక ఎంఫైసీమా మరియు సిస్టిక్ ఫైబ్రోసిస్ వంటి బలహీన పరిచే వ్యాధుల చికిత్సకోసం జన్యుపరివర్తిత పాలను ఉత్పత్తిచేయడానికి పరిశోధనలు సాగుతున్నాయి. 1997 వ సం.లో మొట్టమొదటి జన్యు పరివర్తిత ఆవు (రోజీ) నుండి మానవ ప్రోటీన్ తోకూడిన పాలను ఉత్పత్తిచేయడం జరిగింది. ఈ పాలు సాధారణ పాలకంటే అధిక పోషక విలువలను కలిగి ఉండటం వల్ల పోషకాహార లోపం మరియు జీర్ణ సంబంధలోపాలున్న పిల్లలకు మరియు వృద్ధులకు ఉపయోగకరంగా ఉంటాయి.

c) మానవ జన్యు చికిత్స:-

మానవ ఎర్రరక్తకణాల పెరుగుదలకు సహాయపడే పదార్థాన్ని ఉత్పత్తిచేసే జన్యు పరివర్తిత ఆవును ఫిన్ లాండ్ లోని A I విర్టానెన్ అను సంస్థ ఉత్పత్తిచేసింది.

III. పారిశ్రామికరంగంలో:-

2001వసం.లో కెనడాలోని నెక్సియా బయోటెక్నాలజీస్ లోని శాస్త్రవేత్తలు స్పైడర్ జన్యువులను పాలిచ్చే మేకలలోకి ప్రవేశపెట్టారు. దీనితో మేకలు పాలతో పాటు పట్టు దారాలను కూడా ఉత్పత్తి చేశాయి. పాలనుండి పట్టు పాలిమర్‌లను వేరుచేసి తేలికైన, దృఢమైన మరియు స్థితిస్థాపకత కలిగిన దారాలను తయారు చేశారు. దీనిని మిలటరీ దుస్తులు, శస్త్ర చికిత్సలో గాయాలను కుట్టడానికి మరియు టెన్నిస్ రాకెట్ తీగల తయారీలో ఉపయోగించారు.

విషపదార్థ పరీక్షలకోసం, విషపదార్థాలకు సున్నితమైన జన్యుపరివర్తిత జంతువులు ఉత్పత్తి చేయబడ్డాయి.

అనేక రకాల ప్రోటీన్‌ల ఉత్పత్తికోసం సూక్ష్మజీవులను జన్యుపరంగా మార్పుచెందించారు.

Dr K JAYAPPA

S5–321

B.Sc. DEGREE EXAMINATION –NOVEMBER/DECEMBER **2017**.

FIFTH SEMESTER

Part II : ZOOLOGY

Paper – V : ANIMAL BIOTECHNOLOGY

(New Regulation 2016–17)

Time : 3 Hours *Max. Marks : 75*

SECTION – A

Answer any FIVE of the following. (5 × 5 = 25 marks)

1. Restriction enzymes

   రిస్ట్రిక్షన్ ఎంజైమ్‌లు.

2. DNA polymerases

   DNA పాలిమరేజ్‌లు.

3. Linkers

   లింకర్లు.

4. PCR

   పాలీమరేజ్ చైన్ రియాక్షన్.

5. Applications of stem cells

   మూలకణాల ప్రయోజనాలు.

6. HaLa cells

   HaLa కణాలు.

7. Embryo cloning

   పిండక్లోనింగ్.

8. Chromatography.

   క్రొమెటో గ్రఫీ.

SECTION – B

Answer ALL questions. (5 × 10 = 50 marks)

9. (a) Write an essay on cloning vectors.

క్లోనింగ్ వెక్టారులను గురించి ఒక వ్యాసము వ్రాయుము.

Or

(b) Explain the DNA modifying enzymes and their applications.

DNA రూపాంతర ఎంజైమ్‌లు మరియు వాటి అప్లికేషన్స్ గురించి వివరింపుము.

10. (a) Write an essay on hybridization techniques.

హైబ్రిడైజేషన్ సాంకేతిక పై ఒక వ్యాసం వ్రాయుము.

Or

(b) Write a note on gene delivery.

జన్యువును ప్రవేశపెట్టు వివిధ పద్ధతులను వివరింపుము.

11. (a) Explain the hybridoma technology.

హైబ్రిడోమా సాంకేతికతను వివరింపుము.

Or

(b) What is cell culture? Explain different types of cell culture.

కణవర్ధనం అనగానేమి? వివిధ రాకాల కణవర్ధన పద్ధతులు వివరింపుము.

12. (a) Write an essay on IVF.

IVF పై ఒక వ్యాసం వ్రాయుము.

Or

(b) Explain about any two transgenic animals.

ఏవైనా రెండు జన్యుమార్పిడి జంతువులను గురించి వివరింపుము.

13. (a) Write a note on different types of fermentation.

ఫెర్మెంటేషన్‌లోని వివిధ రకాలను వివరింపుము.

Or

(b) Write a note on applications of biotechnology in agriculture.

వ్యవసాయంలో జీవసాంకేతిక శాస్త్ర అనువర్తనాలను వివరింపుము.

S5-321

B.Sc. DEGREE EXAMINATION – OCTOBER/NOVEMBER, 2018.

FIFTH SEMESTER

PART – II : ZOOLOGY

Paper – V : ANIMAL BIOTECHNOLOGY

(New Regulation 2016-17)

Time : 3 Hours *Max. Marks : 75*

SECTION – A

Answer any FIVE of the following. (5 × 5 = 25 marks)

1. Genomic libraries.

   జీనోమిక్ లైబ్రరీస్.

2. PBR vector.

   PBR వెక్టర్.

3. Fermentation.

   కిణ్వనము.

4. Electrophoration.

   ఎలక్ట్రోపోరేషన్.

5. Western blotting.

   వెస్టర్న్ బ్లోటింగ్.

6. Transgenic sheep.

   ట్రాన్స్‌జెనిక్ గొర్రె.

7. Chromatography.

   క్రోమాటోగ్రఫీ.

8. Micro injection.

   మైక్రో ఇంజెక్షన్.

Turn Over

SECTION – B

Answer ALL questions. (5 × 10 = 50 marks)

9. (a) Write the importance of different types of vectors in biotechnology.

జీవసాంకేతిక శాస్త్రంలో ఉపయోగించబడు వివిధ రకాల వెక్టర్ల పాత్రను వివరించుము.

Or

(b) Explain the DNA modifying enzymes and their application.

డి.ఎన్.ఎ రూపాంతర ఎంజైములు మరియు అనువర్తనాలను వివరించండి.

10. (a) Explain in detail about the basics of PCR.

PCR లోని ప్రాథమిక అంశాలను గూర్చి వ్రాయుము.

Or

(b) Write a note on monoclonal antibodies.

మోనోక్లోనల్ యాంటిబాడిస్ గురించి వ్రాయండి.

11. (a) Give a detailed account on the stem cell technology and its applications.

మూల కణ సాంకేతిక ఉత్పత్తి మరియు వాటి ఉపయోగాలను గురించి వ్రాయుము.

Or

(b) What is cell culture? Explain different types of cell culture.

కణవర్ధనం అనగానేమి? వివిధ రకాల కణవర్ధన పద్ధతులను వివరింపుము.

12. (a) Describe in detail about hybridoma technology.

హైబ్రిడోమ సాంకేతికతను గురించి వ్రాయుము.

Or

(b) Write an essay on IvF (In vitro Fertilization).

IvF పై ఒక వ్యాసం వ్రాయండి.

13. (a) What are the transgenic animals? How they are important?

ట్రాన్స్‌జెనిక్ జంతువులు అనగానేమి? వాటి ప్రాముఖ్యతను వివరించుము.

Or

(b) Describe and define DNA finger printing. How is support criminal confirmations.

DNA ఫింగర్ ప్రింటింగ్ అనగానేమి? నిర్ధారణలో ఇది ఏ విధముగా ఉపయోగపడుతుంది.

———

2 S5-321

S5-321

B.Sc. DEGREE EXAMINATION – OCTOBER & NOVEMBER, 2019.

FIFTH SEMESTER

PART – II - ZOOLOGY

(Regular / Supplementary)

Paper – V: ANIMAL BIOTECHNOLOGY

(New Regulations 2016-17)

Time : 3 Hours *Max. Marks : 75*

SECTION – A

Answer any FIVE of the following. (5 × 5 = 25 marks)

ఏవైనా ఐదు ప్రశ్నలకు సమాధానములు వ్రాయుము.

1. Plasmids

   ప్లాస్మిడ్స్

2. Microinjection

   మైక్రో ఇంజెక్షన్

3. cDNA libraries

   cDNA లైబ్రరీస్

4. Cryopreservation

   క్రయో ప్రిసర్వేషన్

5. Natural media

   నేచురల్ మీడియా

6. Super ovulation

   సూపర్ ఓవులేషన్

7. Transgenic sheep

   ట్రాన్స్ జెనిక్ గొర్రె

8. Centrifugation

   సూక్ష్మ గాలనము.

Turn Over

SECTION – B

Answer ALL questions (5 × 10 = 50 marks)

అన్ని ప్రశ్నలకు సమాధానములు వ్రాయండి.

9. (a) Write an essay on DNA modifying enzymes and their applications.

D.N.A రూపాంతర ఎంజైములు మరియు అనువర్తనాలు వ్రాయుము.

Or

(b) Write an essay on cloning vectors.

క్లోనింగ్ వెక్టార్‌ల పై వ్యాసము వ్రాయుము.

10. (a) Write an essay on Southern, northern blotting techniques.

సదరన్, నార్థన్ బ్లోట్టింగ్ సాంకేతికత పై వ్యాసము వ్రాయుము.

Or

(b) What is gene delivery? Explain the process of viral mediated gene delivery.

జన్యు బదిలీ అనగానేమి? వైరల్ మధ్యవర్తిత్వ జన్యు బదిలీ గూర్చి వ్రాయండి.

11. (a) Write an essay on Hybridoma Technology.

హైబ్రిడోమా సాంకేతికతపై వ్యాసము వ్రాయుము.

Or

(b) Explain types of stem cells and their applications.

వివిధ రకాల మూల కణాల వాటి అనువర్తనాల గూర్చి వివరింపుము.

12. (a) Write an essay on In Vitro Fertilization.

IVF పై వ్యాసము వ్రాయుము.

Or

(b) Write an essay on transgenic animals and their applications.

జన్యు పరివర్తన జంతువులు మరియు వాటి అనువర్తనాలు పై వ్యాసము వ్రాయుము.

13. (a) Write an essay on fermentation.

కిన్వన ప్రక్రియ గూర్చి వ్యాసము వ్రాయుము.

Or

(b) Describe the DNA finger printing. Write its applications.

DNA ఫింగర్ ప్రింటింగ్ వర్ణించి దాని అనువర్తనాలు వ్రాయుము.

S5-321

S.No	Name of the topic		YouTube Video link
1	UNIT -I	Restriction enzymes part 1	https://studio.youtube.com/video/B0_L36TO7fA/edit
2		Restriction enzymes part 2	https://studio.youtube.com/video/8NM2zx4cJek/edit
3		DNA Modifying enzymes	https://studio.youtube.com/video/Xh-XF6gZm2U/edit
4		Cloning vectors part 1	https://studio.youtube.com/video/LuHo712RCeg/edit
5		Cloning vectors part 2	https://studio.youtube.com/video/wENIhoefwEw/edit
6			
	UNIT-II	Use of linkers and adaptors	https://studio.youtube.com/video/JxmCdJ9bGnQ/edit
7		Gene delivery methods; Biological; Physical and Chemical methods	https://studio.youtube.com/video/ru1jhvajisY/edit
8			https://studio.youtube.com/video/43Zwdg56NIA/edit
9			https://studio.youtube.com/video/vcVv0HBdN2g/edit
10		Basics of PCR	https://studio.youtube.com/video/DVs9h64zEUw/edit
11		DNA Sequencing	https://studio.youtube.com/video/kAqjEJ5uwcQ/edit
12		Introduction to Hybridisation techniques	https://studio.youtube.com/video/BvCpK5rtvI4/edit
13		Southern Blotting	https://studio.youtube.com/video/A4TqSmzVisU/edit
14		Northern Blotting	https://studio.youtube.com/video/Gdad6EJ93XY/edit
15		Western blotting	https://studio.youtube.com/video/m8uzA1TU9Qg/edit
16		Genomic library	https://studio.youtube.com/video/AU_GSMiz6BE/edit
17		cDNA library	https://studio.youtube.com/video/gKZYbpcDE3w/edit
18	UNIT- III	Cell culture media	https://studio.youtube.com/video/JxdbNzfVQnk/edit
19		Cell cultures	https://studio.youtube.com/video/q_3aqEHIbcU/edit
20		Protocols for primary cell culture	https://studio.youtube.com/video/lERtNmF8PwM/edit
21		Established cell lines	https://studio.youtube.com/video/PvckoxAT4wY/edit
22		Hybridoma technology	https://studio.youtube.com/video/hP-tH9ZLeVE/edit
23		Stem cells	https://studio.youtube.com/video/Hl5SfaR7KXY/edit
24	UNIT- IV	Artificial insemination	https://studio.youtube.com/video/eqq_Zq4ETcA/edit
25		IVF, Super ovulation, Embryo transfer	https://studio.youtube.com/video/vpWpSdMyCnY/edit
26		Strategies of gene transfer	https://studio.youtube.com/video/SBdL5AvoiQw/edit
27		Transgenic fish and sheep	https://studio.youtube.com/video/Qt-ZKyvpDeQ/edit
28		Transgenic animals applications	https://studio.youtube.com/video/Qtz8g-DTjwc/edit
	UNIT - V		
29		Types of fermentations	https://studio.youtube.com/video/ZHPYz34yxQM/edit
30		Solid state and submerged fermentations	https://studio.youtube.com/video/xo7eh4X0H6U/edit

Dr K JAYAPPA