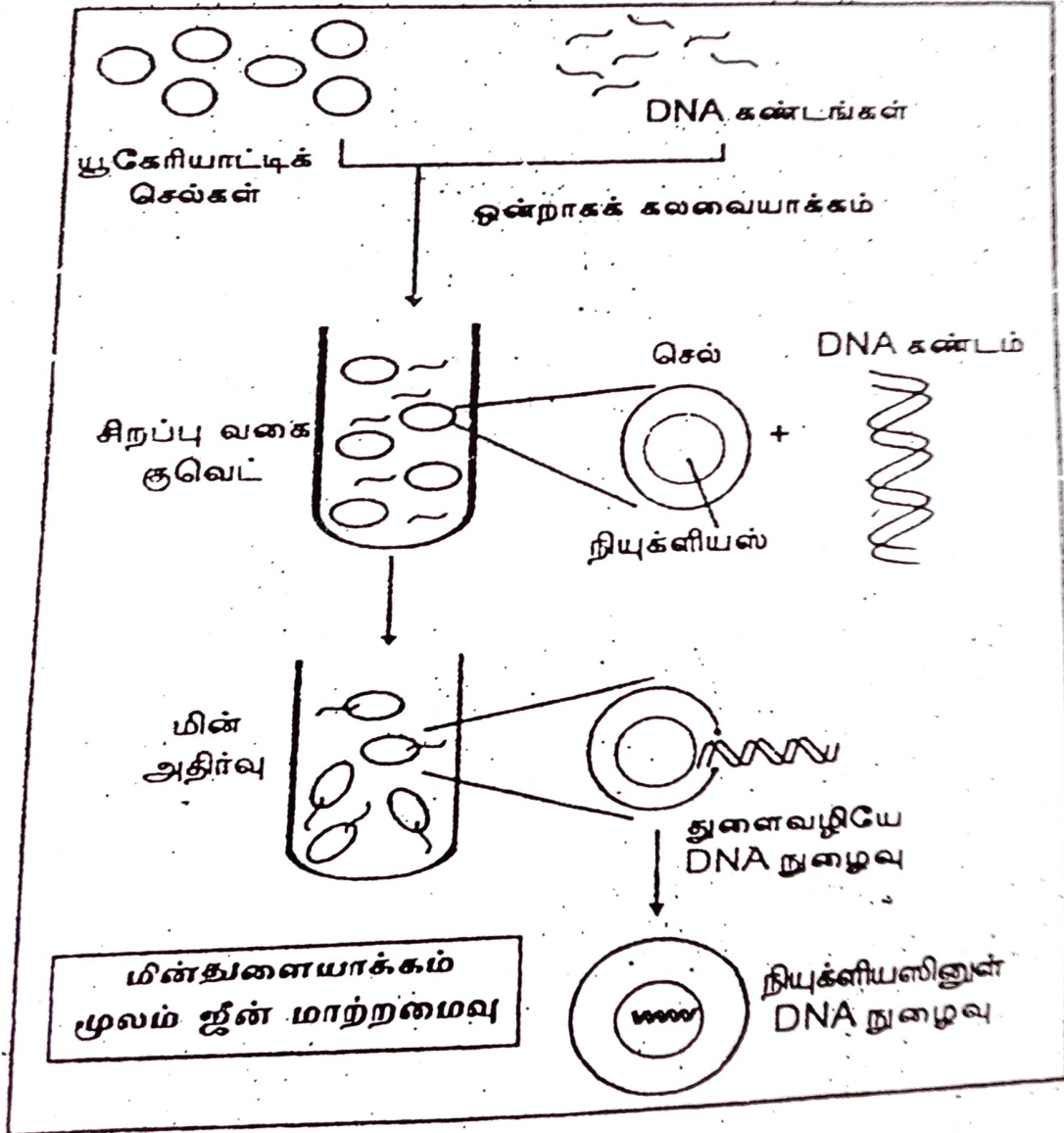


தமிழ் ஜீன் மாற்ற முறைகள் (Direct Gene Transfer Methods)

மின்சுளையாக்கம் (Electroporation)

மின்சுளையாக்கம் என்பது வெகு மின்னழுத்த அதிர்வைத் தழுவினதாகும். இதன் மூலம் செல் சவ்வினை இணைவுக்கு தூண்ட முடியும். அதாவது மின்புல இடையீட்டு சவ்வு ஊடுறவும் நுட்பம் ஆகும். புறஞ்சார்த்த DNA-வின் செல் உள்ளெடுப்புக்கு மின்அதிர்வு பயன்படுத்தப்படுகிறது. மின்அதிர்வுகள் மூலம் துளைகள் தோன்றுகின்றன. இத்துளையின் வழியே நியுக்ளியர் பொருட்கள் செல்வினுள் நுழைகின்றன. மின்சுளையாக்கம் எனியதான துரிதவகை நுட்பமாகும். வெவ்வேறு உயிரினங்களிலிருந்து செல்களுக்குள் ஜீன்களை உட்செலுத்துவதற்கு இந்நுட்பம் உதவி வருகிறது.



மின்துளையாக்கத்தின் அடிப்படை நுட்பம் படத்தின் மூலம் விளக்கப்பட்டுள்ளது. பாலூட்டி செல்களினுள் ஜீன்கள் மாறியமைவதை இப்படம் விளக்குகிறது. DNA அடங்கிய ஒரு கரைசலில் செல்கள் வைக்கப்படுகின்றன. பின்பு மின் அதிர்வுகள் ஏற்படுத்தப்படுவதால் செல்சவ்வில் துளைகள் தோன்றுகின்றன. இத்துளையின் வழியே அந்நிய DNA கண்டம் நுழைந்து சைட்டோபிளாசத்தை அடைந்து இறுதியாக நியூக்ளியசினுள் சேர்கிறது. இ.கோலை செல்வில் உள்ள 100 kb நீளம் கொண்ட செருகு DNAக்களுடன் கூடிய பிளாஸ்மிடுகளை மாற்றுவதற்கு மின்துளையாக்கம் ஒரு பயன்மிக்க வழியாகத் திகழ்கிறது. சிறிய பிளாஸ்மிடுகளுக்கு (சுமார் 3kb) மற்றும் DNAவின் ஒரு மைக்ரோகிராமுக்கு 10² தோற்றமாற்றிகளாக உள்ளது. இதுபோல, பெரிய பிளாஸ்மிடுகளுக்கு (சுமார் 130 kb) சுமார் 10⁶ செயல்திறன் கொண்டதாக உள்ளது.

(வெகு மின்துடிப்பைப் பயன்படுத்தி பிளாஸ்மா செல்வின் பொருத்தத்தைத் தாண்டிக்க முடியும். மின்புல இடையீட்டுச் சவ்வு ஊடுருவாக்கம் நெற்றில் இந்நுட்பம் செயல்படுகிறது. மின் அதிர்வுகள் அயல் DNAவின் செல்சினுள் எடுக்கத் தாண்டுகின்றன. இந்நுட்பம் எளிதது, தரிதமானது, துண்ணுயிரிகள், தாவர விவங்கின செல்களினுள் அயல் ஜீன்களை புகுத்துவதற்கு எளிதாக உள்ளது. பாலூட்டி செல்களில் மாற்றப்பட இருக்கும் அயல் ஜீன்களுக்கான மின்னணு துளைவாக்க நுட்பம் படத்தில் காட்டப்பட்டுள்ளது.

DNA உள்ள கரைசலில் செல்கள் வைக்கப்படுகின்றன. செல் சவ்வில் துவாரம் (ஒட்டை) ஏற்படுவதற்கு மின்சார அதிர்வு தரப்படுகிறது. இப்பொழுது அயல் DNA கண்டம் இத்துவார வழியே துழைந்து சைட்டோபிளாசத்தை அடைந்த பின்பு நியூக்ளியசில் துழைகிறது. 100kb தளங்கொண்ட செருகு DNAக்களுடன் பிளாஸ்மிடுகள் உள்ள இ.கோலை செல்கள் மாற்றமடைவதற்கு சிறந்த வழியாக மின்னணு துளைவாக்கம் உதவுகிறது.)

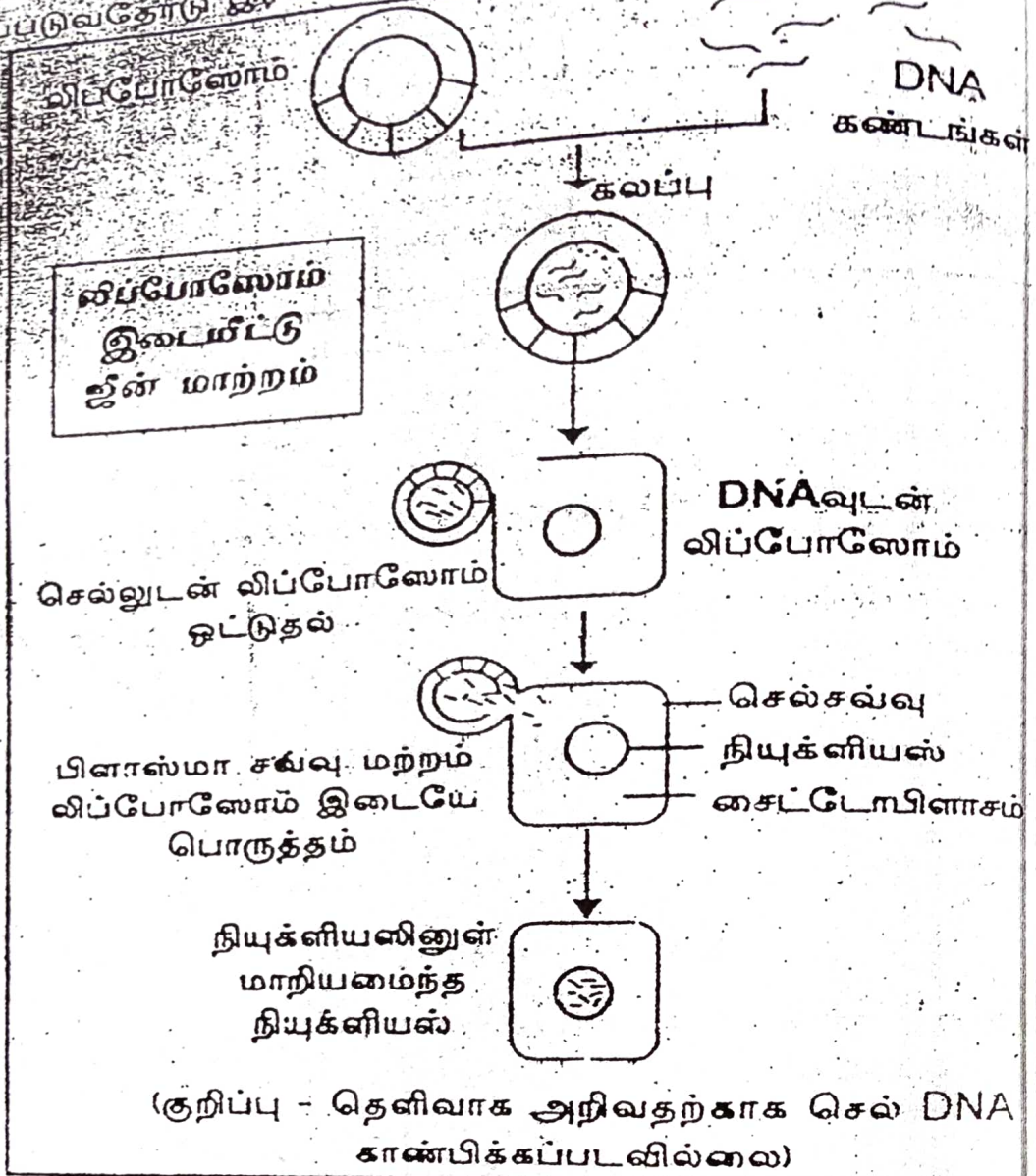
லிப்போசோம் இடையீட்டு ஜீன் மாற்றம் (Liposome mediated gene transfer)

லிப்போசோம்கள் என்பவை வட்டவடிவ மூலக்கூறுகள் ஆகும். இவை உட்பக்கமாக தண்ணீர் தொய்ந்து காணப்படும். இவை நியூக்ளிக் அமிலங்களைக் கொண்டுசெலுத்தக்கூடியன. லிப்போசோம்களில் உள்ள DNA பொதியுறையாக்கத்திற்கு பல நுட்பங்கள் தோற்றுவிக்கப்பட்டுள்ளன. லிப்போசோம் இடையீட்டு ஜீன் மாற்றம் லிப்போசோம் பெக்ஸன் (lipofection) என அழைக்கப்படுகிறது. DNA கண்டங்களை லிப்போசோம்கள் மூலம் சிகிச்சை செய்யும்பொழுது லிப்போசோம்களின் உட்பக்கமாக DNA கண்டங்கள் போதிந்து கொள்கின்றன. இந்த லிப்போசோம்கள் செல் சவ்வுடன் ஒட்டிக்கொள்வதுடன் அதனுடன் இணைந்து DNA கண்டங்களை மாற்றுகின்றன. இதன் மூலம் செல்வின் உள்ளே நுழைந்த DNA இறுதியாக நியூக்ளியசுடன் சேர்ந்து கொள்கிறது. DNAவுடன் வெகுசெயுத்திறன் மிக்க பற்கூட்டமைப்பான நேர்மின் லிப்போசோம்கள் துரிதமாக செல்களுடன் ஒட்டிக்கொண்டு DNAவை மாற்றுகின்றன. லிப்போசோம் பெக்ஸன் மிகவும் செயல்திறன்மிக்க நுட்பமாகும். இந்நுட்பம் மூலம் பாக்கிரியம், விலங்கினம் தாவரம் போன்ற செல்களினுள் ஜீன்களை மாற்றி அமைக்க முடியும்.

இடப்பரிமாற்றிகள் (Transposons)

இடப்பரிமாற்றி என்பது ஒரு DNAவைக் குறிக்கிறது. ஒரு மரபகத்திலிருந்து (Genome) இன்னொரு மரபகத்திற்கு இது நகரக்கூடியது. இதுவே இடப்பரிமாற்றமைவு (Transposition) எனப்படும். இடப்பரிமாற்றத்தின்

பொழுது இரட்டிப்பு நிகழ்கிறது. இதில் ஒரு நகல் அசல் இலக்கிலேயே வைக்கப்படுவதோடு இரண்டாவது நகல் மாற்றீடு அடைகிறது.

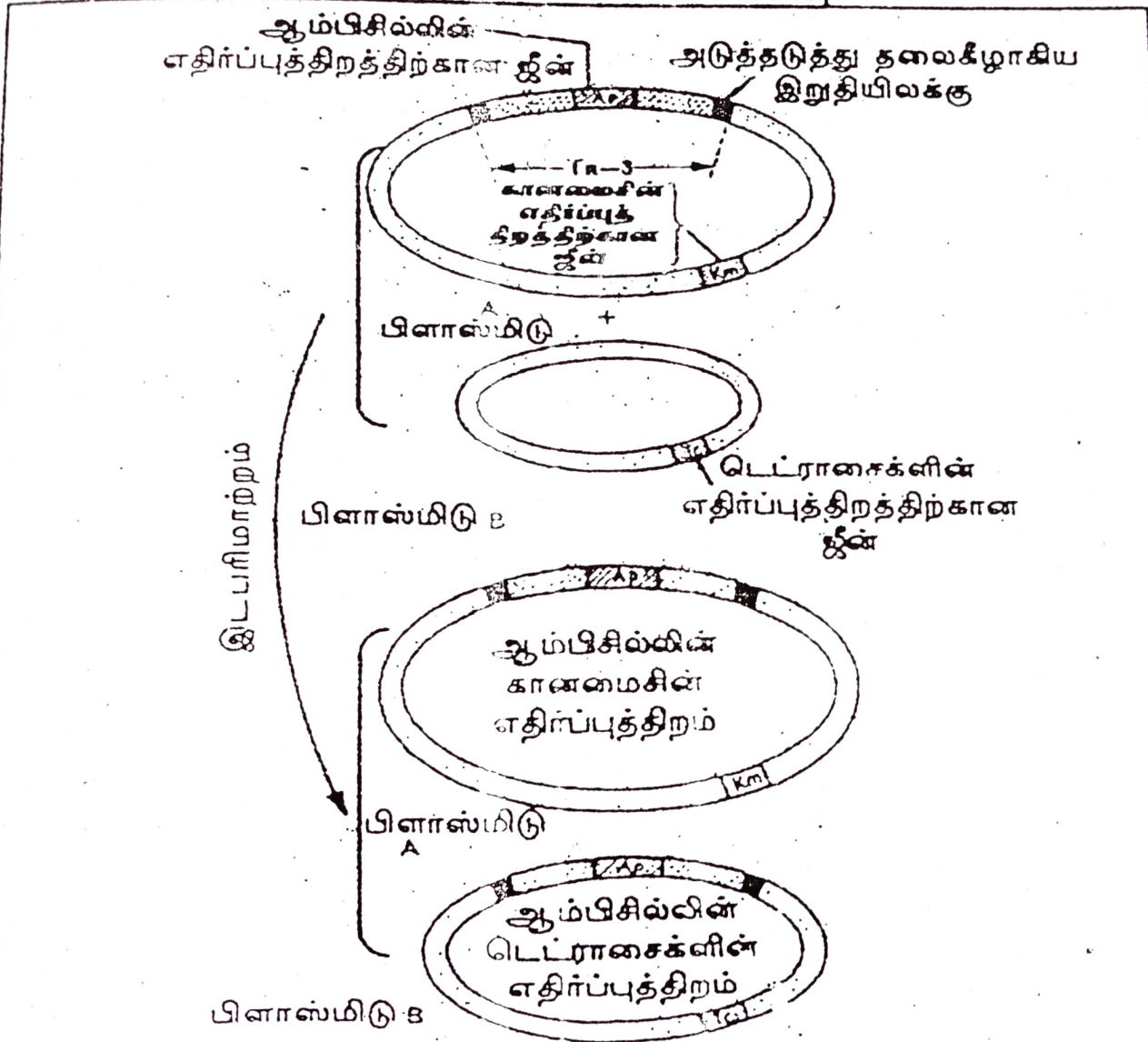
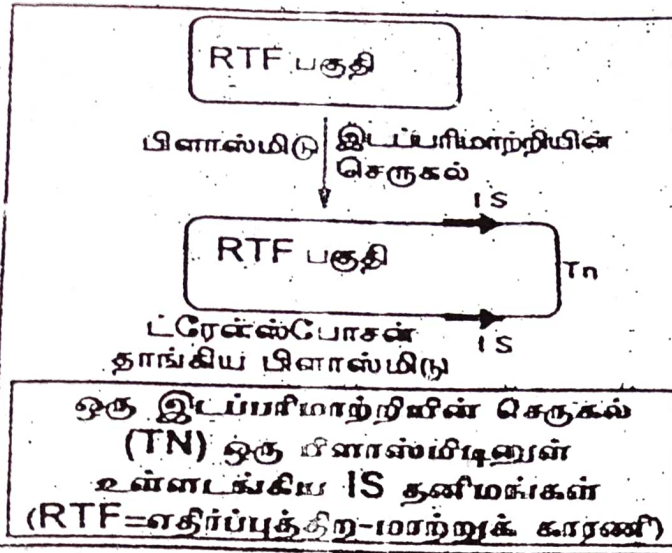


பொதுவாக, இடப்பரிமாற்றியினை இடப்பரிமாற்றத் தனிமம் (Transposable element), கட்டுப்பாட்டுத் தனிமம் (controlling element), இடம்பெயர்வு ஜீன் (Mobile gene), தாவல் ஜீன் (Jumping gene), தன்னல ஜீன் (Selfish gene) என பலவாறு அழைப்பர். இடப்பரிமாற்றியைக் கொண்டுள்ள ஒரு பிளாஸ்மிடு, இடப்பரிமாற்றி இல்லாத ஒரு பிளாஸ்மிடு உள்ள பாக்டீரியா செல்லினுள் செலுத்தப்பட்டால் அதன் மகவு செல்களின் இரு பிளாஸ்மிடுகளுக்கும் இடப்பரிமாற்றிகளைப் பெற்றுக் கொள்கின்றன.

புரோகேரியாட்டிக் யூகேரியாட்டிக் ஆகிய இருவகை செல்களிலும் இடப்பரிமாற்றிகள் காணப்படுகின்றன. எ.கா. இ.கோலை, ட்ரோஸோபைலஸ் பாக்டீரியப் பிளாஸ்மிடு, மக்காச்சோளம் முதலியன.

பிளாஸ்மிடுகளில் காணப்படும் இடப்பரிமாற்றம் பற்றி விரிவாக ஆய்வு செய்யப்பட்டுள்ளது. பிளாஸ்மிடிலிருந்து தனிமையான ட்ரான்ஸ்போஸன்கள் மற்றொரு பிளாஸ்மிடு அல்லது பாக்டீரியக் குரோமசோம் அல்லது வைரலினுள்ளே ஒன்றாகக் கூடிவிடுகின்றன.

பிளாஸ்மிடு/வைரஸ்/பாக்டீரியக் குரோசோமின் ஒரு பகுதியாக இருக்கும் இடப்பரிமாற்றியை மட்டுமே ஒரு உயிரினத்திலிருந்து இன்னொரு உயிரினத்திற்கு மாற்ற முடியும்.



ஒரு பிளாஸ்மிடிலிருந்து இன்னொரு பிளாஸ்மிடிற்கு ஆம்பிசில்லின் எதிர்ப்புத்திறனைக் கொண்டு செல்லுதலும் ஒரு இடப்பரிமாற்றியின் (Tn3) இடப்பரிமாற்றம். (பிளாஸ்மிடு A வானது கேனமைசின்க்கான (Km) கூடுதல் எதிர்ப்புத்திறனை சுமந்து செல்லுதல்) பிளாஸ்மிடு B என்பது டெட்ராசைக்ளின் எதிர்ப்புத்திறனை (TC) சுமந்து செல்லுதல்.

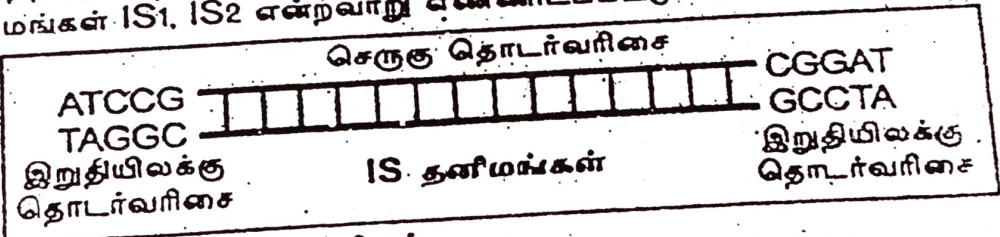
1. ஒரு பிளாஸ்டிடிலிருந்து மற்றொன்றுக்கு அவ்வது ஒரு பாக்டீரியத்திலிருந்து மற்றொரு பாக்டீரியத்திற்கு அக்கறையான / ஆர்வமான இனப்பெருதலுக்கு இவ்விடப் பரிமாற்றிகள் உதவுகின்றன. 2. ஒரு உயிரினத்திலிருந்து மற்றொரு உயிரினத்திற்கு DNA கண்டத்தை மாற்றுவதற்கு இவை உதவுகின்றன. 3. ஒரு உயிரினத்தின் மீள் அமைப்பிற்கு (Restructure) இது உதவுகிறது. 4. மீள் அமைப்பை DNA கட்டுமானத்திற்கு இது ஏதுவாகிறது. 5. ஜீன் போத்தாக்கண்படுத்திற்கு இது துணைபுரிகிறது.

இப்பரிமாற்றிகள் மூன்று வகைப்படும்

1. எளிய இடப்பரிமாற்றிகள் (Simple transposons) அவ்வது செருகு வரிசைகள் (Insertion sequences)
2. பற்கூட்டு இடப்பரிமாற்றிகள் (Complex transposons)
3. கூட்டு பரிமாற்றிகள் (Composite transposons)

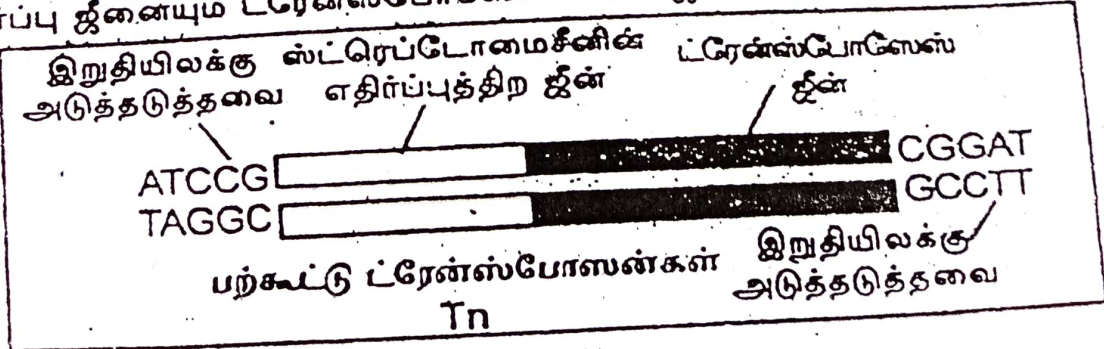
1. செருகு தொடர்வரிசைகள் (IS Elements)

இவை எளிய ட்ரேன்ஸ்போஸன்கள் ஆகும். இவை ஒவ்வொன்றிலும் 200bp க்கு குறைவான காரணிகள்கள் உள்ளன. ஒவ்வொரு தொடர்வரிசையின் தலைகீழ் இலக்கு அடுத்தடுத்து இணைக்கப்பட்டுள்ளது. இடப்பரிமாற்ற நொதிக்கான ஜீன்களை இது கொண்டுள்ளது. இறுதிஇலக்கு தலைகீழான அடுத்தடுத்த வகைகள் இடப்பரிமாற்றத்திற்கு தேவைப்படுகின்றன. இந்த IS தனிமங்கள் IS1, IS2 என்றவாறு எண்ணிடப்பட்டுள்ளன.



2. பற்கூட்டு இடப்பரிமாற்றிகள் (Complex transposons)

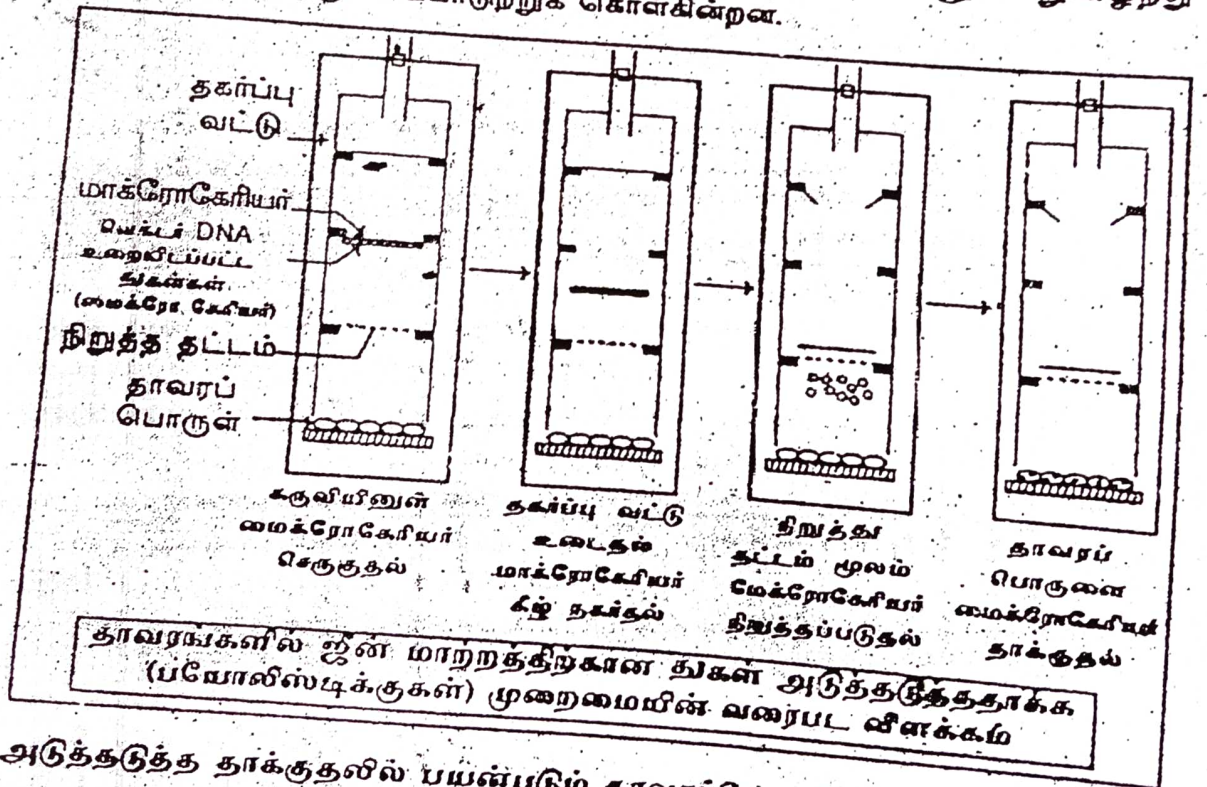
பற்கூட்டு ட்ரேன்ஸ்போஸன் என்பது ஒரு உயிரெதிர்ம எதிர்ப்பு ஜீனையும் இடப்பரிமாற்ற நொதிக்கான ஜீன்களையும் உள்ளடக்கியுள்ளது. தலைகீழ் இறுதியிலக்கு அடுத்தடுத்தவைகளால் (Repeats) இது பிணைக்கப்பட்டுள்ளது. பற்கூட்டு ட்ரேன்ஸ்போஸன்கள் Tn மூலம் நியமிக்கப்படுகின்றன. இவை Tn1, Tn2, Tn3 என்றவாறு எண்களிடப்படுகின்றன. எடுத்துக்காட்டாக, Tn7 என்பது ஸ்ட்ரெப்டோமைசீன் எதிர்ப்பு ஜீனையும் ட்ரேன்ஸ்போஸேஸ்க்கான ஜீனையும் உள்ளடக்கியது.



துகள் அடுத்தடுத்த தாக்கம் (Particle bombardment)

இதில் துகள் என்பது நுண்ம உந்துவியைக் (microprojectile) குறிக்கிறது. ஜீன் மாற்றம் மற்றும் மரபணுமாற்ற தாவரத் தோற்றுவிப்புக்கு இது சிறந்த முறையாகக் கருதப்படுகிறது. தாவர மட்டுமின்றி பாலூட்டி செவ்களிலும் நுண்ணுயிர் செவ்களிலும் DNA மாற்றுவதற்கு இந்நுட்பம் வெற்றிகரமாக பயன்பட்டு வருவது குறிப்பிடத்தக்கது. இந்நுட்பம் 1988ம் ஆண்டு அறிமுகப்படுத்தப்பட்டது. ஸான். போர்டு பரல்விஸ்டிக்ஸ் (ballistics) என்ற வல்லுறியின் பெயரும் உயிரிய (biological) என்ற சொல்லும் ஒருங்கிணைத்து பயோலிஸ்டிக்ஸ் (biolistics) என்ற பெயர் சூட்டப்பட்டது. துகள் துப்பாக்கி, ஜீன் துப்பாக்கி, உயிரிய வெடிப்பு (particle gun, gene gun, bioblaster) என்ற பெயர்களும் இதற்கு உண்டு. தாவரங்களில் ஜீன் மாற்றத்திற்காக நுண்ம உந்துவியின் அடுத்தடுத்த தாக்க முறைக்கு வரைபடத்தினைக் காண்க.

நுண்ம உந்துவிகளை நுண்மந்தாங்கிகள் என அழைப்பர். DNA பூச்சு ஆக்கிய தங்கத் துகள்கள் அல்லது டங்க்ஸ்டன், நுண்ம உந்துவிகளைத் தாங்கியுள்ளன. இத்தாங்கிகள் சாதனத்தில் செருகப்பட்டு வட்டு தகர்ப்பால் கீழ்நோக்கி தள்ளப்படுகின்றன. நுண்மந்தாங்கிகள் வெகு வேகத்தில் தாவரப் பொருளினுள் முனோக்கிச் செலுத்தப்படும்பொழுது நிறுத்தும் தட்டு (Stopping plate) நுண்மந்தாங்கியின் இயக்கத்தை அனுமதிப்பதில்லை. இங்கு விடுவிக்கப்பட்ட DNA கண்டங்கள் தாவர செவ்களினுள் நுழைந்து மரபகத்துடன் ஒருமைப்பாடுற்றுக் கொள்கின்றன.



அடுத்தடுத்த தாக்குதலில் பயன்படும் தாவரப்பொருள் துகள் அடுத்தடுத்த தாக்கத்திற்கு தாவரத்திலின் திரு வகைகள் பொதுவாகப் பயன்படுத்தப்படுகின்றன.

1. முதன்மை திசு துகள்களுக்குள் அடுத்தடுத்த தாக்கத்திற்கு இத்துணுக்குகளை வைப்பதற்கு கருச்சுளமும், சுரத்தி தோளையும் வேண்டிய தூண்டுதலை இத்துணுக்குகளை அளிக்கின்றன.

2. பெரும்பகுதி துகள்கள் அடுத்தடுத்த தாக்கப்படுவதுடன் வளர்ப்புகளில் இதிகுக்கள் அனுமதிக்கின்றன. அதிகுக்கள் பெருகவும், சந்தியாகவும் அனுமதிக்கின்றன.

அடுத்தடுத்த தாக்குதலால் ஏற்படும் பாதிப்பிலிருந்து தாவரத் திசுக்கள் பாதுகாப்பு பெறுவதற்கு வளர்ப்புகளை அதி ஆஸ்மாடிகம் ஊடகத்தி் பராமரிக்கலாம் அவ்வது வரையறை பிளாஸ்மோலைஸிஸ்க்கு அனுமதிக்கலாம்.

அடுத்தடுத்த தாக்குதலில் மாற்று ஜீன் ஒருமைப்பாடு (Transgene integration in bombardment) துகள் அடுத்தடுத்த தாக்குதலில் ஜீன் மாற்றம், இருநிலை செயல்முறையாக உள்ளது.

1) முன்ஒருமைப்பாட்டு நிலை (preintegrative phase) இந்நிலையில் நுண்மங்கடத்து DNA மூலக்கூறுகள் ஒன்றாக இணைவற்றுக் கொள்கின்றன. இதன் விளைவாக, இத்துண்டங்கள் பன்மடங்கு ஜீன் நகல்களைச் சுமந்து செல்கின்றன.

2) ஒருமைப்பாட்டு நிலை இந்நிலையில் தாவர மரபகத்துடன் ஜீன் நகல்களின் செருகல் சாத்தியமாகிறது.

இவ்விருவகைச் செயல்பாடு தாவரப் பெருக்கத்திற்கு வசதியாக அமைகிறது. அடுத்தடுத்த தாக்கத்தின் வெற்றி

நெல், கோதுமை, மக்காச்சோளம் போன்ற தானியப் பயிர்களில் ஜீன் மாற்றம் வெற்றிகரமாகச் செய்து முடிக்கப்பட்டுள்ளது. உண்மையிலேயே முதன் முதலாக Bt- நச்சு ஜீன் அடங்கிய மக்காச் சோளப் பயிர் வியாபார ரீதியில் மரபியற் மாற்ற பயிர்கள் (GMM) போன்ற இந்நூட்பம் மூலம் தோற்றுவிக்கப்பட்டது குறிப்பிடத்தக்கது.

அடுத்தடுத்த தாக்குதலைப் பாதிக்கும் காரணிகள் பயன்மிசு விளைவினை எட்டுவதற்கு துகள் அடுத்தடுத்த தாக்கு முறையை உகந்ததாக அமைவிப்பது கடினமான காரியமாக உள்ளது. இவ்வெற்றியை பாதிக்கும் காரணிகளாவன,

1) நுண்மத்துக்கள்களின் தன்மை DNAவைத் தாங்குவதற்காக டங்க்ஸ்டன், தங்கம், பிளாட்டினம் போன்ற சட் உலோகங்கள் நுண்மத் துகள்களாகப் பயன்படுத்தப்படுகின்றன. அதிகப் பொருண்மை கொண்ட இத்துகள்கள் அடுத்தடுத்த தாக்குதலில் பொழுது விரைவாக நகர்வதற்கு வாய்ப்பாவதுடன் இவை திசுவினுள் ஊடுருவவும் ஏதுவாகின்றன.

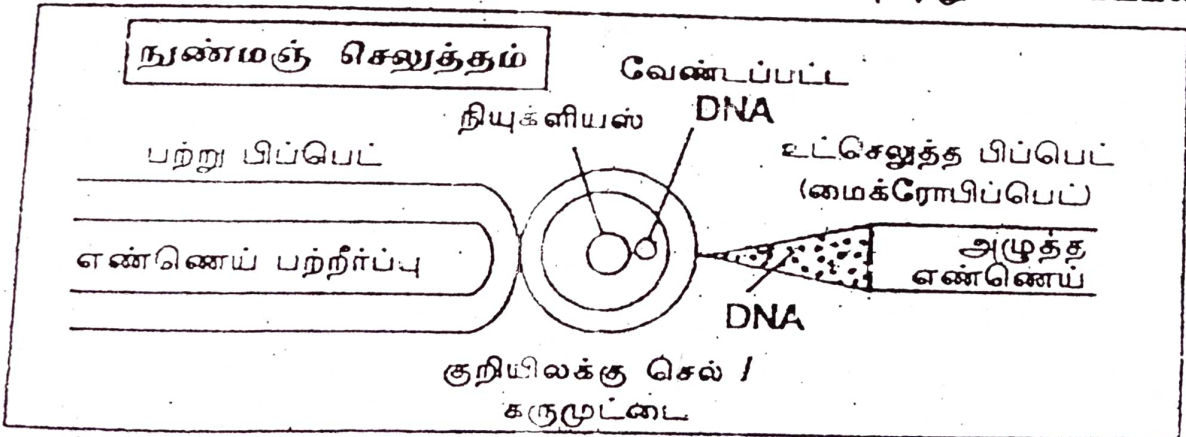
2) சிசுல்திசுக்களின் தன்மை நன்கு பகுப்படையும் திறன், செல்கள் மாற்றமைவுக்கு பொருத்தமானவை.

DNA அளவு (Amount of DNA) சிற்றளவு DNA பயன்படுத்தினால் மாற்றமைவு குறைந்து போய்விடு

அதிகளவு DNA பயன்படுத்தினால் வெகுவளவு DNA நகம் கிடைப்பதுடன் மரபணு மாற்றங்களின் மறுசீரமைவும் ஏற்படக்கூடும்.

3. நுண்மஞ்செலுத்தம் (Microinjection)

இது ஒரு நேரடி இயற்பியற் முறை. வேண்டப்பட்ட DNAயினை குறியிலக்கு செவ்வில் இயந்திரவியற் செருகுதலை இந்நுட்பம் விளக்குகிறது. செவ் கருமுட்டை, ஊசை, விலங்கின கருக்கள் போன்ற வாழும் செவ்களினுள் அந்நிய DNAயினை விடுவிப்பதற்கு இந்நுட்பம் தகுதி வாய்ந்தது. நுண்மஞ்செலுத்தம் ஒரு கண்ணாடிப் பிப்பெட்டின் மூலம் நிகழ்த்தப்படுகிறது. இப்பிப்பெட்டின் ஒருமுனை சூடேற்றப்படுவதால் அம்முனை ஓரளவு திரவமாக மாறக்கூடும். இம்முனையினை உடனடியாக நீட்டிடும் பொழுது நன்கு கூர்வான முனையாகிறது. இப்பொழுது இம்முனையின் குறுக்களவு $0.5\mu\text{m}$ இருக்கக்கூடும். நன்கு உருப்பெருக்கு திறன் கொண்ட நுண்ணோக்கியில் அயல் DNA விடுவிக்கும் செயல்முறை மேற்கொள்ளப்படுகிறது. நுண்மஞ்செலுத்த வேண்டிய செவ்கள் ஒரு சிறு கலனில் எடுத்துக் கொள்ளப்படுகின்றன. பற்று பிப்பெட்டினை நுண்ணோக்கி புலத்தின் (field) மீது வைக்க வேண்டும். இப்பற்று பிப்பெட்டினை இலேசாக உறிஞ்சும் பொழுது இதன் நுனி செவ்வினைப் பற்றிக் கொள்கிறது. நுண்ம பிப்பெட்டின் நுனி, செவ் சவ்வினைத் துளைத்துக் கொண்டு உள் செல்கிறது. இப்பிப்பெட்டியில் இருக்கும் அந்நிய DNA, ஏற்பு செவ்வின் சைட்டோபிளாசத்தை அல்லது நியூக்ளியசை அடைகிறது. பின்பு இப்பிப்பெட்டி பெறுகிறது. அயல் DNAவுடன் மாறியமைந்த செவ் வளர்க்கப்பட்டு மரபணு மாற்றத் தாவரமாக தோற்றுவிக்கப்படுகிறது. புகையினை, ப்ராஸ்ஸிகா நேப்பஸ் போன்ற தாவரங்கள் இந்நுட்பத்தால் தோற்றுவிக்கப்பட்டவையாகும். ட்ரோஸோபைலா ஊசைட்டில் நுண்மஞ்செலுத்த நுட்பத்தின் மூலம் பெற்றோர் சந்ததி போலவே ரோஸ் நிறங்கண்டொண்ட ஈக்கள் தேர்துவிக்கப்பட்டன.



லிப்போசோம் - இடைமீட்டு மாற்றுருவாக்கம் (தோற்றமாற்றம்) (Liposome mediated transformation)

லிப்போசோம்கள் செயற்கையாக உற்பத்தி செய்யப்பட்ட விபிடு வெஸிக்கிள் ஆகும். இவ்வெஸிக்கிள் வட்ட வடிவத்தில் காணப்படும். இதன் சவ்வு பாஸ்போலிபிடால் ஆனது. புரதங்கள், மருந்துகள் போன்றவற்றை விடுவிப்பதற்கு பாலூட்டி செவ்களில் இந்நுட்பம் வெற்றிகரமாகப்

உயைப்படுத்து விப்போலோம் தாயியூன்களை புரோட்டோபிளாஸ்டுகளில்
 யோருநத வவப்பதற்குமூலீன மாற்றதிறமும் இந்நுட்பம் தகுதி வாய்ந்ததாக
 உள்ளது. பிரவினத்திலே சிலவகையான (PEG) ஈரிணைவு செயல்முறை
 கொண்டுசெல்தம் பொழுது மாற்றருவாக்கத் திறன் அதிகரிக்கிறது.
 இம்மாற்றருவாக்கத்திற்கு முதல்படியாக விப்போலோம்
 புரோட்டோபிளாஸ்டுகள் ஒட்டிற்ற புரோட்டோபிளாச புறப்பரப்பின் ஒட்டு
 வகையில்து சாதியமாக்கிறது. பின்பு விப்போலோமினுள்ள பிளாஸ்மிடுகள்
 செவ்வகை சைடோபிளாஸ்தில் விடுவிககப்படுகின்றன.

விப்போலோம் இணைதலின் அலகலாயகள்

1. பொதியுறை உருவத்தில் இருக்கும் விப்போலோம்கள், சுற்றுச்சூழல்
 பாதிப்பிலிருந்து DNA பாதுகாக்கப்படுவதற்கு உதவுகின்றன. 2. DNA
 நிலையாக இருப்பதால் சிறிதுகாலம் சேமிக்கவும் முடிகிறது. 3. பல தாவர
 செல்களுக்கு இந்நுட்பம் உபயோகிக்கத்தக்கதாக உள்ளது. 4. இந்நுட்பம் நல்ல
 பலன் தருவதாக உள்ளது.

