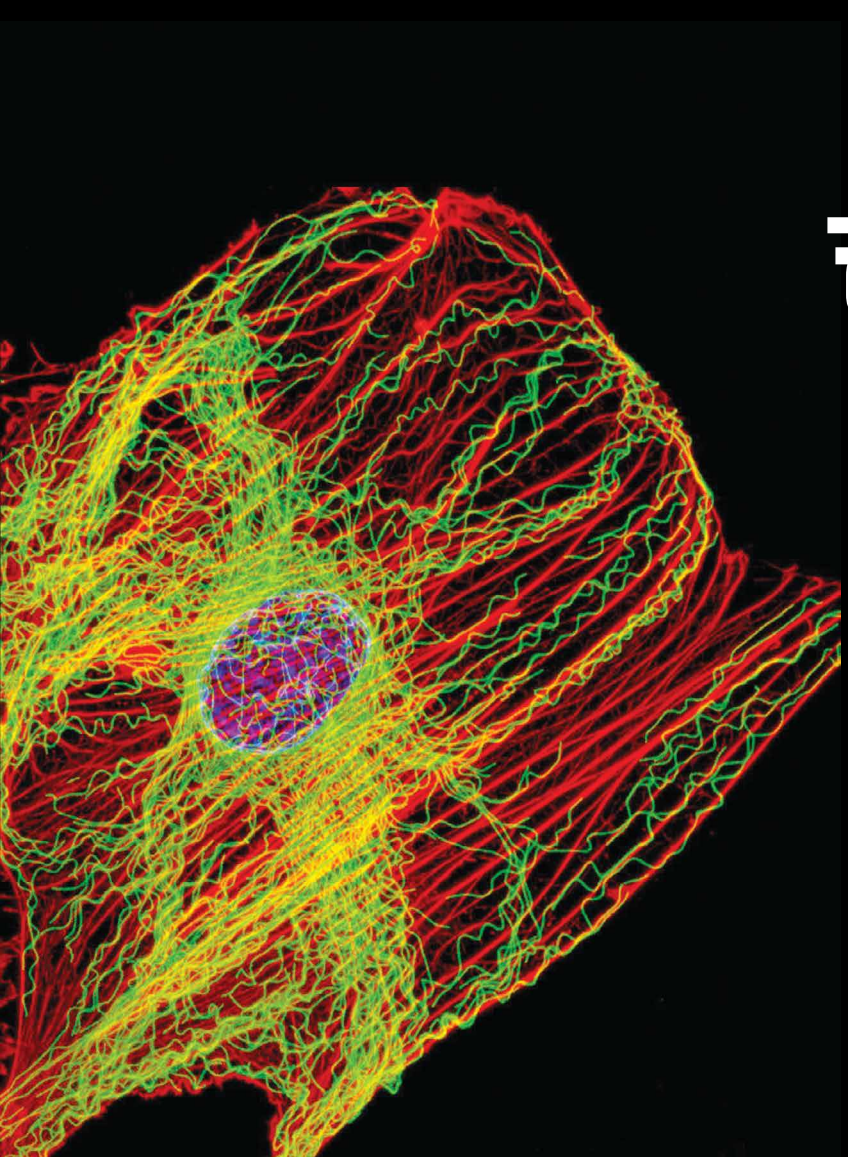


चमकते टैग : चिकित्सा शास्त्र का एक अपरिहार्य साधन

नीरजा दशपुत्रे

इमेजिंग तथा रोग निदान में प्रतिदीप्त टैग का उपयोग कई महत्त्वपूर्ण खोजों का हिस्सा रहा है। प्रतिदीप्ति क्या है? इसकी खोज कैसे हुई? रोग निदान में प्रतिदीप्त अणुओं का उपयोग कैसे किया जाता है?

वर्ष 2008 में रसायनशास्त्र का नोबल पुरस्कार ओसामू शिमोमुरा, मार्टिन चाफ़ी व रॉजर सिएन को संयुक्त रूप से दिया गया था। इन वैज्ञानिकों को यह पुरस्कार समुद्री जेली फिश में पाए जाने वाले एक प्रतिदीप्त प्रोटीन की खोज और उसका उपयोग कोशिकाओं के आन्तरिक कामकाज को समझने में करने के लिए दिया गया था।

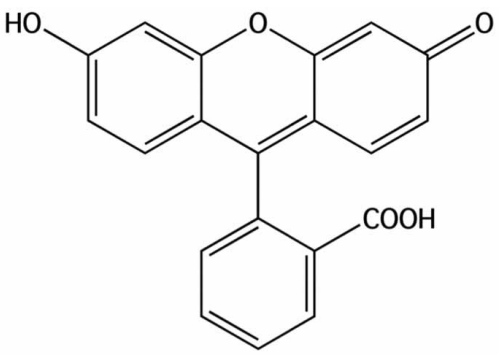
नोबल फ़ाउण्डेशन ने इस योगदान की अहमियत को स्थापित करते हुए कहा था कि इनके योगदानों से कोशिकाओं की कुछ ऐसी प्रक्रियाओं को देखना सम्भव हुआ है, "जो पहले ओझल थीं, जैसे कि हमारे मस्तिष्क की तंत्रिका कोशिकाओं की वृद्धि व केंसर कोशिकाओं का फैलाव।"[1]

फ़ाउण्डेशन ने यह भी कहा कि प्रतिदीप्त अणुओं की खोज और टैग के रूप में उनके अनुप्रयोग ने अन्य क्षेत्रों में भी त्वरित प्रगति का मार्ग प्रशस्त किया है, ख़ासतौर से जीवविज्ञान व चिकित्सा के क्षेत्र में।

प्रतिदीप्त टैग क्या हैं?

प्रतिदीप्ति एक भौतिक परिघटना है जिसमें कुछ पदार्थ प्रकाश उत्सर्जित करते हैं, जब उनका सम्पर्क विद्युत-चुम्बकीय विकिरण (दृश्य प्रकाश, पराबैंगनी विकिरण आदि) से होता है। इस प्रक्रिया के तीन चरण होते हैं। प्रतिदीप्त पदार्थों में ऐसे अणु (प्रमुख रूप से ऐरोमेटिक यौगिक) होते हैं, जिन्हें फ्लोरोफ़ोर कहते हैं। फ्लोरोफ़ोर विकिरण से फोटॉन (ऊर्जा) का अवशोषण करते हैं। इसके फलस्वरूप फ्लोरोफ़ोर के इलेक्ट्रॉन उच्च व अस्थिर ऊर्जा स्तर में पहुँच जाते हैं। यहाँ वे चन्द नेनोसेकंड

चित्र-1 : (क) फ्लोरेसीन की संरचना



Credits: Neeraja Dashaputre. License: CC-BY-NC.

(ख) लाल रंजक का पाउडर
Credits: Benjah-bmm27, Wikimedia Commons. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fluorescein-sample.jpg. License: Public Domain.

(ग) पराबैंगनी प्रकाश में देखने पर पानी में घुले फ्लोरेसीन की चटख हरी चमक
Credits: Bricksnite, Wikimedia Commons. URL: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5062089. License: CC-BY.

(10^{-9} second) से ज़्यादा समय तक नहीं टिक पाते और अपनी अतिरिक्त ऊर्जा को प्रकाश के रूप में वातावरण में त्यागते हुए निम्न स्थिर स्तर में लौट आते हैं। लिहाज़ा, लगता है कि ये पदार्थ अपने आप अन्दर से चमक रहे हैं।

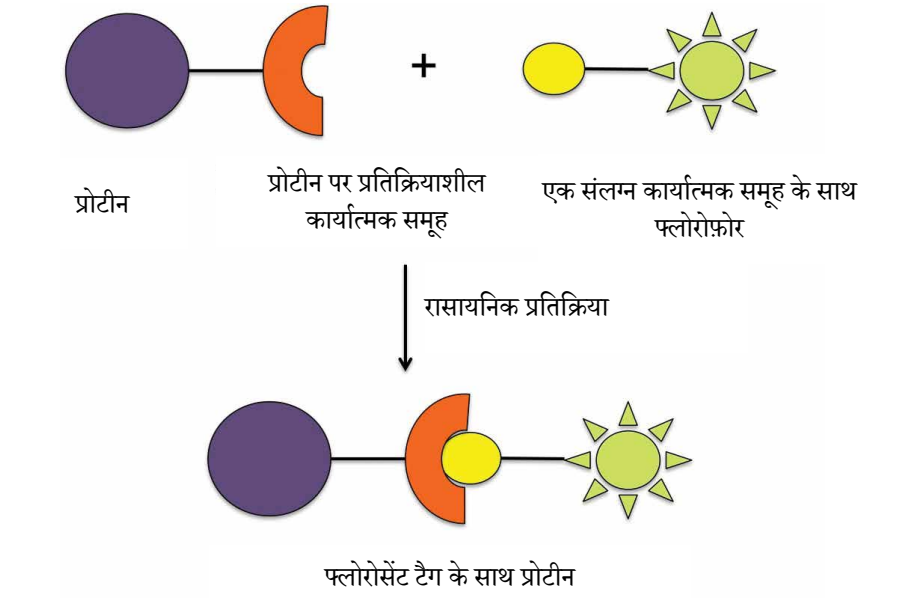
प्रतिदीप्ति के सन्दर्भ में सबसे पहला विवरण सन 1565 में स्पेन के चिकित्साविद व वनस्पति वैज्ञानिक निकोलस मोनार्डेस के अवलोकनों से प्राप्त होता है। मोनार्डेस ने देखा कि मेक्सिकन किडनीवुड (*Lignum nephriticum*) नामक एक पेड़ की छाल को पानी में रखने पर वह एक चमकीला नीला प्रकाश देती है। यह दीप्ति मैटलेलीन नामक एक फ्लोरोफ़ोर के कारण होती है। यह उस पेड़ की छाल में फ्लेवोनॉएड समूह के पदार्थों के ऑक्सीकरण से प्राकृतिक रूप से बनता है।

सन 1871 में एडॉल्फ़ वॉन बेयर ने पहली बार यह दर्शाया कि संश्लेषित पदार्थ भी प्रतिदीप्ति पैदा कर सकते हैं। बेयर ने फ्लोरेसीन नामक एक लाल रंग का रंजक बनाया जो पानी में डालने पर चमकीला हरा हो जाता है (**चित्र-1**)।

फ्लोरेसीन की संरचना की पड़ताल से पता चला है कि इसमें एकल व द्विबन्ध एक के बाद एक पाए जाते हैं, जिसे 'संयुग्मन' कहा जाता है। रसायनविदों ने इस जानकारी का प्रयोग करके कई संयुग्मित प्रतिदीप्त रंजकों का संश्लेषण किया है जो कई रंगों को प्रदर्शित करते हैं।

फ्लोरेसीन के सबसे मशहूर उपयोग की खोज द्वितीय विश्व युद्ध के दौरान हुई थी। जर्मन विमान चालकों को निर्देशित किया जाता था कि यदि उनके विमान को समुद्र में मार गिराया जाए तो वे अपने आपातकालीन किट में फ्लोरेसीन की शीशियों से फ्लोरेसीन को समुद्र में फैला दें ताकि उनकी स्थिति का अन्दाज़ लग सके। तनुकृत होने पर फ्लोरेसीन चमकीले आस-पास के पानी में हरे रंग की दीप्ति पैदा करता है जिससे काफ़ी दूरी से ही हवाई बचाव अभियान के लिए स्थिति देखना सम्भव होता है।

कुछ प्रतिदीप्त पदार्थों के इसी गुण यानी एक टैग के रूप में कार्य करने की क्षमता का व्यापक अनुप्रयोग हुआ है। उदाहरण के लिए न केवल समुद्री बचाव अभियान हेतु अपितु तेल व पानी के रिसाव की पड़ताल में भी आज-कल इसका व्यापक प्रयोग होता है।



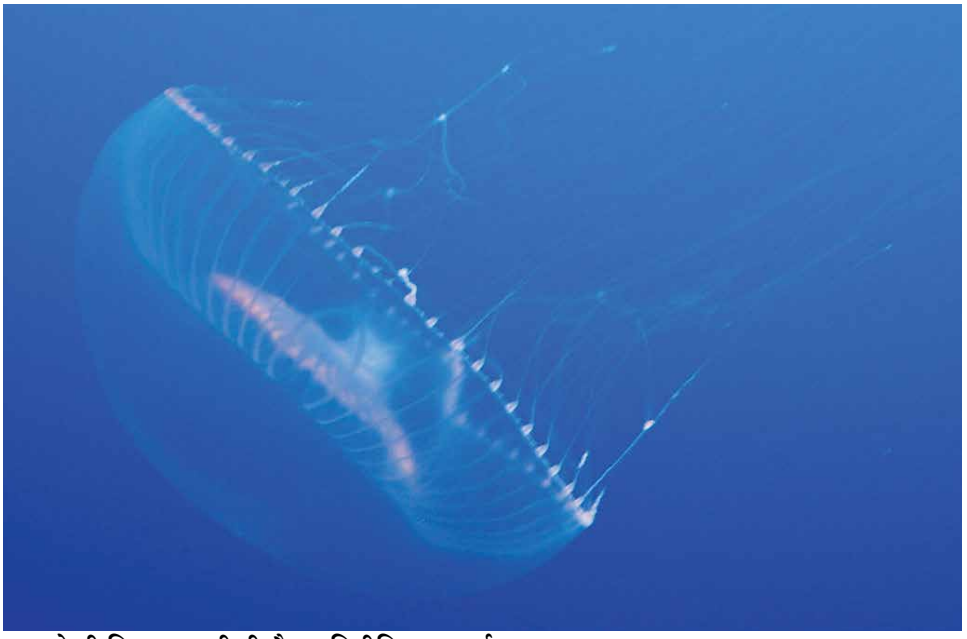
चित्र-2 : प्रतिदीप्त टैग किए गए प्रोटीन के संश्लेषण को दर्शाने वाली एक योजना।
Credits: Neeraja Dashaputre. License: CC-BY-NC.

पर सबसे महत्त्वपूर्ण बात यह है कि विज्ञान में प्राकृतिक व संश्लेषित दोनों तरह के प्रतिदीप्त पदार्थों का व्यापक अनुप्रयोग टैग, प्रोब व लेबल के रूप में हो रहा है।

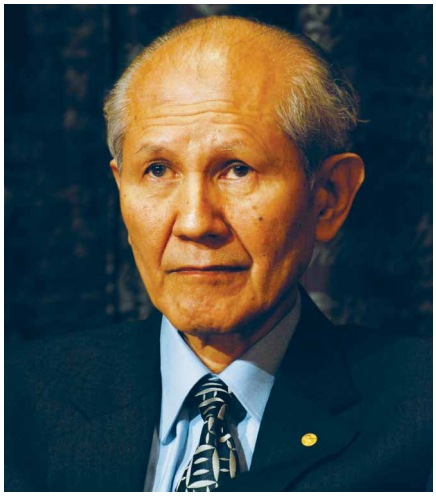
इन टैग को रासायनिक अथवा एंज़ाइमी तरीक़ों से जैव अणुओं (जैसे एमीनो अम्ल, प्रोटीन, एंटीबॉडी एवं न्यूक्लिक अम्ल) से जोड़ा जा सकता है। किसी विशेष तरंगदैर्ध्य के प्रकाश की उपस्थिति में ये टैग चमककर कोशिकाओं, ऊतकों व अंगों में इनसे जुड़े जैव-अणुओं की उपस्थिति, स्थान व पैटर्न बता देते हैं (**चित्र-2**)।

सन 1962 में प्राकृतिक रूप से पाए जाने वाले प्रतिदीप्त प्रोटीन की खोज प्रतिदीप्ति इमेजिंग में एक महत्त्वपूर्ण सफलता थी। एक जापानी जैवरसायनविद व समुद्र जीवविज्ञानी ओसामू शिमोमुरा जेली फिश की एक प्रजाति *Aequorea Victoria,* की नीली-हरी दीप्ति का अध्ययन कर रहे थे। इस जेली फिश से एक जैव प्रतिदीप्त प्रोटीन (रासायनिक अभिक्रिया से ऊर्जा अवशोषित कर प्रकाश पैदा करने वाला) को पृथक करते समय उन्हें एक अन्य प्रोटीन मिल गया जो लगता था कि उस प्रतिदीप्त प्रोटीन से जुड़ा था। उन्होंने इस जैव-प्रतिदीप्त प्रोटीन का नाम जेली फिश के वंश के आधार पर एक्वोरिन (Aequorin) रखा। दूसरे प्रोटीन का नाम उन्होने 'ग्रीन फ्लोरेसेन्ट प्रोटीन' (जीएफपी) रखा क्योंकि वह पराबैंगनी प्रकाश में चमकीली हरी प्रतिदीप्ति देता था। आगे चलकर यह पाया गया कि जेली फिश की नीली हरी चमक एक्वोरिन व जीएफपी का मिला-जुला प्रभाव था – एक्वोरिन से नीला रंग जैव सन्दीप्त से पैदा होता है जबकि जीएफपी इसी नीले प्रकाश को अवशोषित कर हरे रंग का प्रतिदीप्ति पैदा करता है। चूँकि यह अमीनो अम्लों की शृंखला से बना एक प्राकृतिक फ्लोरोफ़ोर है, इसलिए संश्लेशित फ्लोरोफ़ोर की तुलना में इसे कोशिकाओं में आसानी से जोड़ा जा सकता है। अलबत्ता, जेली फिश से शुद्ध रूप में इस प्रोटीन के निष्कर्षण की दिक़्क़तों की वजह से इसका अनुप्रयोग सीमित बना रहा। सन 1992 में डगलस प्राशीर नामक एक अमरीकी आणविक जीवविज्ञानी ने जीएफपी के जीन का क्लोनिंग किया। जिससे इसके उपयोग की व्यापक सम्भावनाओं का रास्ता खुल गया। अब इसे प्रोटीन या कोशिकांगों के साथ एक टैग के रूप में जोड़ा जा सकता था या जीनोम में जोड़कर ज़रूरत पड़ने पर अभिव्यक्त करवाया जा सकता था। 1994 में गोलकृमि (*Caenorhabditis elegans)* में तंत्रिकाओं के विशेष परिपथों की पहचान सम्बन्धी प्रयोगों की शृंखला के आधार पर अमरीकी तंत्रिका जीवविज्ञीनी मार्टिन चाफ़ी ने प्रयोग करके सर्वप्रथम इसके व्यापक अनुप्रयोग की सम्भावनाओं को उजागर किया। उदाहरण के लिए, अपने एक पहले-पहले प्रयोग में चाफ़ी ने

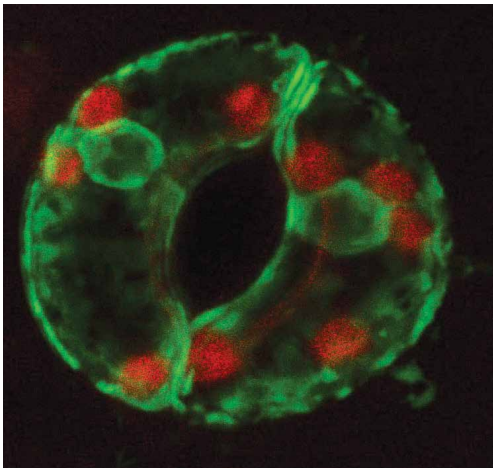
चित्र-3 : हरा प्रतिदीप्त प्रोटीन



(क) जेली फिश द्वारा नीली जैव-प्रतिदीप्ति का प्रदर्शन
Credits: Mnolf, Wikimedia Commons.
URL: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=727670. License: CC BY-SA.



(ख) ओसामू शिमोमूरा
Credits: Prolineserver, Wikimedia Commons.
URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Osamu_Shimomura-press_conference_Dec_06th,_2008-2.jpg. License: CC-BY-SA.



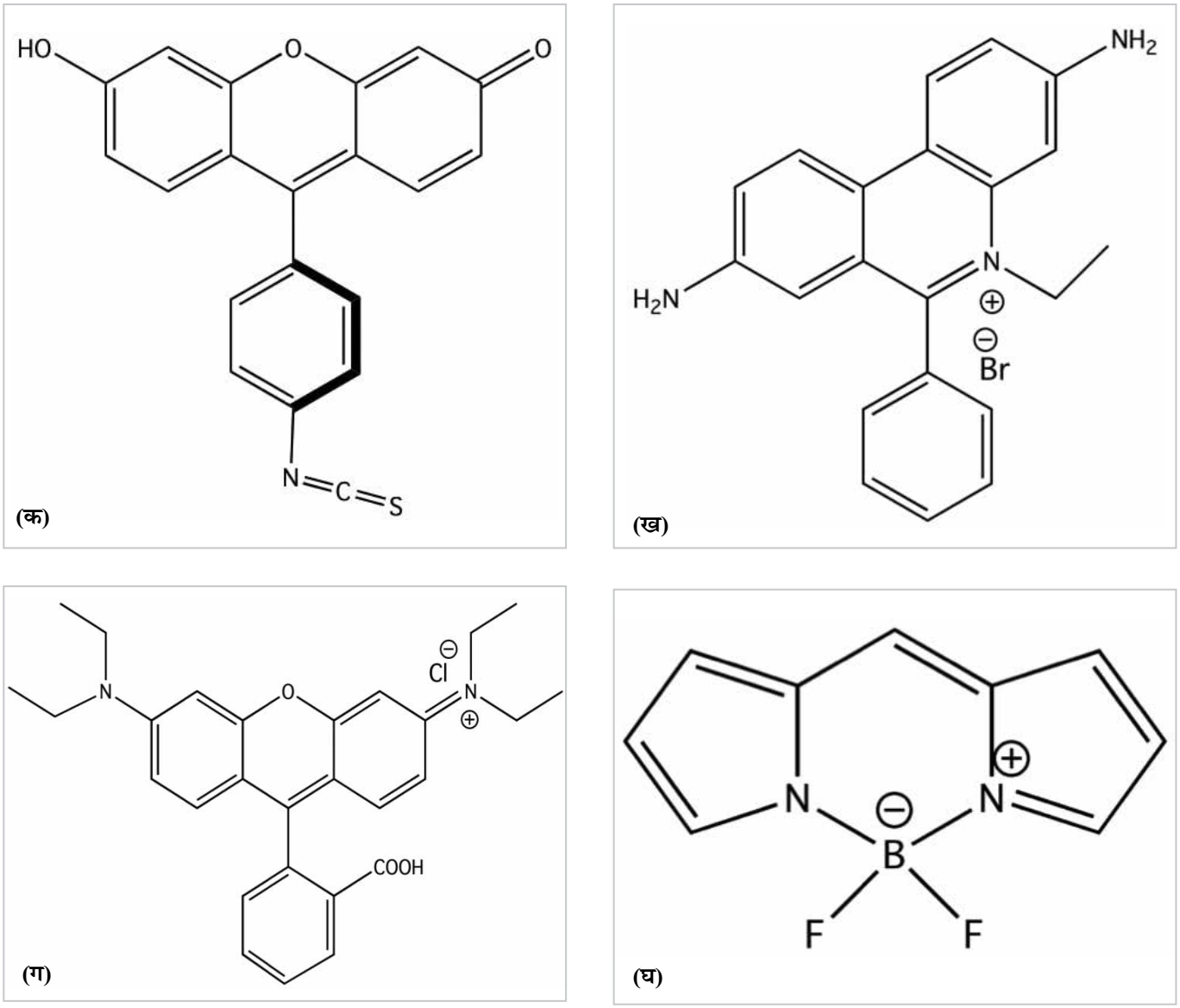
(स) कोशिका में प्रतिदीप्त प्रोटीन से जुड़े ट्यूबुलिन, माइटोकॉण्ड्रिया व केन्द्रक
Credits: A. Baker, Flickr. URL: https://www.flickr.com/photos/71183136@N08/6985213264. License: CC-BY-NC-SA

प्राशर के क्लोन की मदद से गोलकृमि के पारदर्शी शरीर में 6 एकल कोशिकाओं को अभिरंजित कर उनकी स्थितियों का पता लगाया। चीनी-अमरीकी जैवरसायनज्ञ रॉजर सिएन ने 1994 में जीएफपी की प्रतिदीप्ति के रासायनिक आधार का पता लगाया। इस समझ के आधार पर रॉजर सिएन व उनके साथियों ने जीएफपी के कई आनुवंशिक व संरचनात्मक प्रकार बनाए। इससे जीएफपी की प्राकृतिक प्रतिदीप्ति तीव्र हुई और रंगों में विविधता बढ़ गई (जैसे गुलाबी, पीली, लाल व नीली प्रतिदीप्ति)। आजकल जीएफपी व उनके व्युत्पन्न पदार्थों का प्रयोग नियमित रूप से इमेजिंग में हो रहा है व इसने कई वैज्ञानिक खोजों में यह अहम भूमिका निभाई है (**चित्र-3**)।

प्रतिदीप्त टैग के अनुप्रयोग

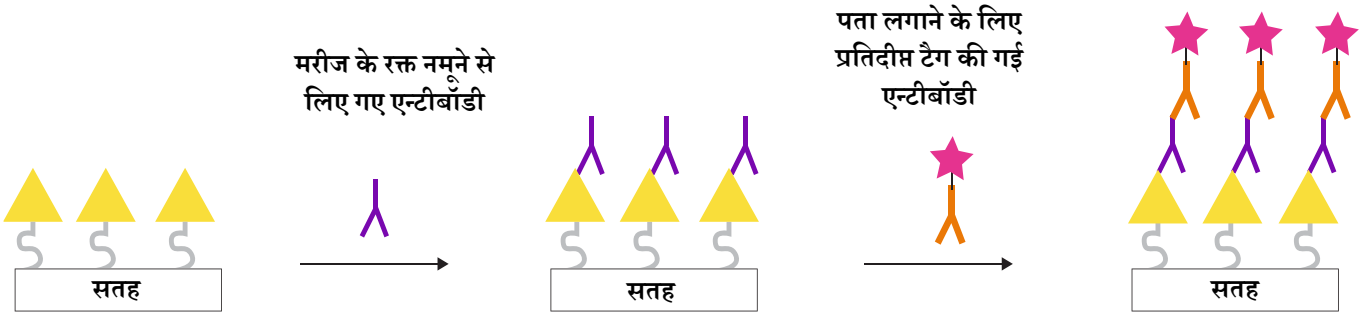
(क) शोध कार्य में : कोशिका कैसे कार्य करती है? किसी कोशिका में विभिन्न कोशिकांग आपस में संवाद कैसे करते हैं? कोशिका किसी रोगजनक के आक्रमण की प्रतिक्रिया कैसे देती है? ये कुछ ऐसे सवाल हैं जिन्होंने हमेशा वैज्ञानिकों को उलझाया है। हालाँकि सूक्ष्मदर्शी से कोशिकाओं का अवलोकन करना सम्भव है परन्तु चलती हुई कोशिकीय प्रक्रियाओं एवं अति सूक्ष्म स्तर पर होने वाली आणविक अन्तःक्रियाओं का अवलोकन करना केवल सूक्ष्मदर्शी से सम्भव नहीं है। यहीं पर प्रतिदीप्त टैग की भूमिका महत्त्वपूर्ण हो जाती है।

अपनी रुचि को जैव-अणु की उपस्थिति और अन्तर्क्रियाओं का अध्ययन उसकी प्रतिदीप्ति निशानदेही की मदद से किया जा सकता है, जिसके लिए सहसंयोजी बन्धन के ज़रिए



चित्र-4 : प्रोटीन टैग जैसा उपयोग किए जाने वाले विभिन्न प्रकार के फ्लोरोफ़ोर। (क) फ्लोरीसीन आइसोथायोसायनेट **(ख)** इथिडियम ब्रोमाइड **(ग)** रोडामाइन रंजकें **(घ)** BODIPY रंजकें+

Credits: Neeraja Dashaputre. License: CC-BY-NC.



चित्र-5 : एन्टीबॉडी की उपस्थिति का पता लगाने के लिए एन्टीबॉडी-एन्टीजन परख का योजना आरेख।
Credits: Neeraja Dashaputre. License: CC-BY-NC.

उसे फ्लोरोफ़ोर (यानी रंजक के प्रतिदीप्त हिस्से) से जोड़ा जाता है। उदाहरण के लिए किसी चयनित प्रोटीन व एमिनो अम्लों के क्रियात्मक समूहों; जैसे एमीन, हाईड्रॉक्सिल व थाइऑल्स के साथ रासायनिक रूप से संशोधित फ्लोरोफ़ोर को जोड़ा जा सकता है (**चित्र-4**)। इस प्रकार, इथिडियम ब्रोमाईड (EtBr) डीएनए अणुओं के बीच-बीच में हाईड्रोजेन बन्ध द्वारा एक के ऊपर एक व्यवस्थित हो जाती है जिससे पराबैंगनी प्रकाश में चमकीला नारंगी दीप्ति प्राप्त होता है।

विशेष जैव अणुओं की चयनात्मक टैगिंग द्वारा किसी कोशिकीय प्रक्रिया को वास्तविक समय सीमा में देखा जा सकता है। उदाहरण के लिए जीएफपी को जब विषाणु के जीनोम के साथ संलग्नित किया जाता है तब संक्रमित कोशिका में ऐसे रोगाणु; विषाणु की गतिविधि पर नज़र रखी जा सकती है। ऐसे ज़बरदस्त व आसानी से निगरानी रखे जा सकने वाले तरीक़ों का व्यापक अनुप्रयोग कई प्रकार के फ्लोरोफ़ोर के साथ सम्भव है।

(ख) रोग के निदान में : कोई रोगी किस रोगाणु से ग्रस्त है, पैथोलॉजी के क्षेत्र में रोग के निदान सम्बन्धी ऐसे तरीक़े, चिकित्सकों एवं चिकित्सा सेवा से जुड़े विशेषज्ञों की मदद करते हैं। ऐतिहासिक रूप से, रोग की पहचान एक समय आधारित प्रक्रिया है जो कुछ दिनों से लेकर कई हफ़्ते तक के अन्तराल में हो सकती है। रोगी के शरीर से रोग ग्रस्त नमूने का संग्रह कर, शरीर के बाहर कृत्रिम रूप से रोगाणुओं की वृद्धि करवाई जाती है जिससे उनकी प्रकृति व उपस्थिति सुनिश्चित हो सके। रोग के निदान में रफ़्तार व सुनिश्चितता उपचार के प्रभाव पर असर डालती है।

आज-कल, निश्चित प्रतिरक्षी – प्रतिजन अभिक्रियाओं की पहचान हेतु अधिक रफ़्तार से की जा सकने वाली रोग निदान तकनीकों का प्रयोग किया जा रहा है। हमारे शरीर में बी लिम्फोसाईट नामक विशेष कोशिकाएँ, रोगाणुओं के सम्पर्क में आने से, Y के आकार के प्रोटीन पदार्थों का निर्माण करती हैं जिन्हें प्रतिरक्षी कहा जाता है। प्रतिरक्षी विशेष प्रकार के अणुओं के साथ संलग्नित हो सकता है जिनको प्रतिजन कहा जाता है। प्रतिजन, रोगाणुओं की सतह पर पाई जाने वाली विशेष शर्कराओं की शृंखला, प्रोटीन या लिपिड अणु हैं। प्रतिरक्षियों का संश्लेषण व प्रतिजन के साथ संयुग्मन विशिष्ट होता है एवं यह प्रक्रिया बहुत तेज़ी से होती है।

रोग निदान के लिए परीक्षण किए जाने की विधि के विकास के लिए, रोगाणु विशिष्ट प्रतिरक्षी व प्रतिजन को या तो अलग कर प्राप्त किया जाता है या संश्लेषित किया जाता है। रोगाणु विशिष्ट प्रतिरक्षियों को किसी ठोस सतह पर सोख लिया जाता है/ स्थगित किया जाता है। इस पर किसी रोगी के रक्त या सीरम के नमूनों को लगाया जाता है। रोगी यदि रोगाणु द्वारा संक्रमित है, तो उसके ख़ून में मौजूद प्रतिजन, ठोस सतह पर स्थगित की गई प्रतिरक्षी के साथ संयोजित हो जाता है। ऐसे किसी प्रतिजन को धोकर निकाल दिया जाता है जो प्रतिरक्षी से नहीं जुड़ा हो।

अब प्रतिदीप्त टैग लगे हुए एक और ऐसे प्रतिरक्षी को डाला जाता है, जोकि संयोजित प्रतिजन की पहचान कर सके। विशेष उपकरणों का प्रयोग, प्रतिदीप्ति की उपस्थिति व तीव्रता का पता लगाने व नापने के लिए किया जाता है। इससे हमें रोगी के रक्त में रोगाणु की उपस्थिति व मात्रा का पता चलता है।

इसे 'सेन्डविच' इम्यूनोएडसोरबेन्ट एसे परीक्षण कहा जाता है जो कि पारम्परिक परीक्षणों की तुलना में काफ़ी तीव्र गति से सम्पन्न होता है। विषाणु संक्रमण में, ठोस परीक्षण सतह पर सोखकर, विषाणु सम्बधित प्रतिजन का पता लगाया जाता है। संक्रमित रोगी के रक्त में उपस्थित विषाणु के प्रतिजन विशिष्ट प्रतिरक्षी से जुड़ जाते हैं। ऐसे किसी प्रतिरक्षी को धोकर निकाल दिया जाता है जो प्रतिजन से नहीं जुड़ा हो।

अब प्रतिदीप्ति टैग लगा हुआ एक और ऐसे प्रतिरक्षी का प्रयोग किया जाता है, जो कि संयोजित प्रतिरक्षी की पहचान कर सके ताकि विषाणु की उपस्थिति का पता लग सके। (**चित्र-5**)

निष्कर्ष

चिकित्सा क्षेत्र व रोगों के निदान के लिए प्रतिदीप्त टैगों के कई अनुप्रयोगों से उनका

स्वास्थ्य के क्षेत्र में महत्त्वपूर्ण योगदान रहा है। प्रतिदीप्त टैग द्वारा कई जैविक प्रक्रियाओं के बारे में हमें पता चला है। इनकी मदद से हमें कई प्रोटीनों की कार्यप्रणाली का भी पता चला है। प्रतिदीप्त टैग का प्रयोग करने वाले सामान्य विलयन आधारित परीक्षण विधियों के बनिस्बत, इम्यूनोसोरबेन्ट जैसी परीक्षण विधियों के कई फ़ायदे हैं क्योंकि यह बहुत कम मात्रा के नमूनों पर भी कारगर हैं एवं कम समय में ज़्यादा सटीक निष्कर्ष देती हैं। पर अभी भी प्रतिदीप्त टैगों की व्यापक क्षमता का उपयोग किया जाना बाक़ी है। इनका उपयोग भविष्य में व्यापक रूप से परीक्षण विधियों के लिए किया जाना बेशक़ ही अपरिहार्य है।

Note: Credits for the image used in the background of the article title: Fluorescent image of a fibroblast. James J. Faust and David G. Capco, Wikimedia Commons. URL: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fluorescent_image_fibroblast.jpg. License: CC-BY.

References

1. Chemistry Nobel Glows Fluorescent Green. Larry Greenemeier, Scientific American, October 8, 2008. URL: https://www.scientificamerican.com/article/chemistry-nobel-glows-green/.

नीरजा दशपुत्रे इंडियन इंस्टिट्यूट ऑफ़ साइंस एजुकेशन एंड रिसर्च (IISER) पुणे के रसायनशास्त्र विभाग में सहायक प्रोफ़ेसर हैं। ये पिछले आठ साल से शिक्षण कार्य से जुड़ी हुई हैं व रसायनशास्त्र सम्बन्धी कई प्रदर्शनियाँ कर चुकी हैं। नीरजा विद्यार्थियों से संवाद करना व उनके अध्यापन हेतु शिक्षण में नवाचार करना पसन्द करती हैं।

अनुवाद : अमलान कुमार दास **पुनरीक्षण :** सुशील जोशी **कॉपी एडिटर :** अनुज उपाध्याय