

खंड 2

प्रोटीन पृथक्करण और अलगाव

इकाई 5

वैद्युत कण संचलन

79

इकाई 6

प्रोटीन का अनुक्रमण और विश्लेषण

95

इकाई 7

द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति

116

खंड 2 : प्रोटीनों की विशेषता और विश्लेषण

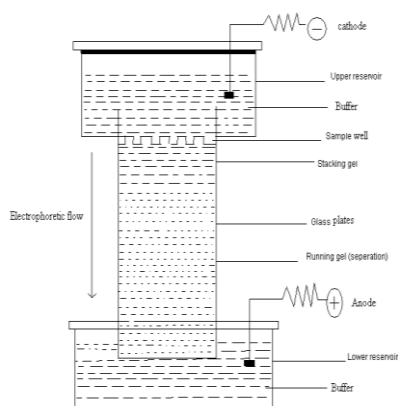
इस खंड में तीन इकाइयाँ शामिल हैं जो तकनीकों के सिद्धांतों और कार्य तंत्र की व्याख्या करेगी, जो व्यापक रूप से प्रोटीन के लक्षण का वर्णन और विश्लेषण के लिए उपयोग की जाती हैं। यह याद रखना आवश्यक है कि इस खंड में जिन तकनीकों पर चर्चा की जाएगी, वे प्रोटीन की विशिष्ट विशेषताओं और अध्ययन किए जा रहे प्रोटीन के अमीनो अम्ल की संरचना पर आधारित हैं। इस खंड की पहली इकाई प्रमुख वैद्युतकण संचलन तकनीकों के सिद्धांत के बारे में वर्णन करती है जो प्रोटीन के लक्षण वर्णन के लिए आवश्यक है। इस इकाई में योजनाबद्ध आरेखों की सहायता से वैद्युतकण संचलन की प्रमुख अवधारणाओं की व्याख्या की गई है। इस खंड की दूसरी इकाई रासायनिक और एंजाइमी विधियों का उपयोग करके प्रोटीन के अनुक्रमण को समझने के बारे में बताती है। इस इकाई का अध्ययन करने से पहले यह सलाह दी जाती है कि प्रोटीन संरचना की बुनियादी अवधारणाओं का अध्ययन करें जिनका अध्ययन बीबीसीटी-101 पाठ्यक्रम की तीसरी और चौथी इकाइयों में किया गया है। प्रोटीन रसायन विज्ञान के क्षेत्र में उनमें मौजूद अमीनो अम्ल की संरचना को जानने के लिए अनुक्रमण तकनीक प्रमुख रूप से योगदान करती है।

चूंकि यह खंड प्रोटीन के लक्षण वर्णन और विश्लेषण के लिए समर्पित है, इसलिए अंतिम इकाई विभिन्न प्रकार के मास स्पेक्ट्रोमेट्री के सिद्धांतों और संक्षिप्त कार्य तंत्र को कवर करेगी। एक प्रोटीन की मास स्पेक्ट्रोमेट्री हमें अज्ञात प्रोटीन की संरचना का विश्लेषण करने में मदद करती है।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस खंड का अध्ययन करने के बाद आप इस योग्य होंगे कि

- वैद्युतकण संचलन के सिद्धांत की व्याख्या कर सकेंगे,
- प्रकृत पेज और एसडीएज पेज वैद्युतकण संचलन के बीच अंतर कर पायेंगे,
- रासायनिक और एंजाइमी क्षरण द्वारा प्रोटीन अनुक्रमण का वर्णन कर सकेंगे,
- प्रोटीन रसायन विज्ञान में मास स्पेक्ट्रोमेट्री के महत्व को स्पष्ट कर पायेंगे।



वैद्युत कण संचलन

रूपरेखा

5.1 प्रस्तावना	ग्रेडिएन्ट जेल
संभावित अध्ययन परिणाम	समविभव फोकसन
5.2 वैद्युत कण संचलन	द्विविमी जेल वैद्युतकण संचलन
5.3 जेल मैट्रिक्स	5.5 वैद्युत कण संचलन के अनुप्रयोग
ऐगार	5.6 सारांश
पेलीएक्रिलेमाइड	5.7 अंत में कुछ प्रश्न
5.4 प्रोटीनों का वैद्युत कण संचलन	5.8 उत्तर
रासड्रिंसास (SDS-PAGE)	5.9 अन्य संदर्भ पुस्तकें
प्राकृत जेल	

5.1 प्रस्तावना

पिछले खंड में हमने सजीव कोशिकाओं से प्रोटीनों के पृथक्करण के लिए व्यापक रूप से उपयोग की जाने वाली प्रारंभिक तकनीकों के बारे में पढ़ा है। अध्ययन करते समय आपने परासरण, अवसादन गुणांक, विभाजन, अधिशोषण, संचल और स्थिर प्रावस्था जैसे शब्दों को जाना होगा। इन्हीं तकनीकों के समान इस खंड में हम प्रोटीनों के लक्षण चित्रण (characterization) और विश्लेषण की प्रमुख तकनीकों की चर्चा करेंगे जो वैद्युत कण संचलन (Electrophoresis) अनुक्रमण विधियों (Sequencing methods) और द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमिति (Mass spectrometry) कहलाती है और प्रोटीन के प्राकृत गुणों जैसे आवेश, आमाप और आकार पर आधारित हैं।

इस इकाई में, हम वैद्युतकण संचलन (इलेक्ट्रोफोरेसिस) तकनीक के प्रकारों और उपयोगों के बारे में जानेंगे जिसका उपयोग प्रोटीन के लक्षण चित्रण के लिए किया जाता है। हम प्रोटीन की प्रकृति के आधार पर तकनीक में अपनाए गए रूपांतरणों के बारे में भी पढ़ेंगे। जीवविज्ञान और चिकित्सा के क्षेत्र में विशेष रूप से चिकित्सीय जैवरसायन और निदान में होने वाले अन्वेषी अनुसंधान कार्यों की आवश्यकताओं को पूरा करने के लिए अनेक अनुप्रयोग विकसित किए गए हैं।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस इकाई का अध्ययन करने के बाद, आप :

- ❖ शुद्धता, अणुभाग और अवसादन गुणांक जैसे शब्दों को परिभाषित कर पाएंगे;
- ❖ वैद्युत कण संचलन की विभिन्न तकनीकों के सिद्धान्तों का वर्णन कर सकेंगे;
- ❖ विभिन्न प्रकार की वैद्युत कण संचलन तकनीकों के महत्व को जान सकेंगे; और
- ❖ वैद्युत कण संचलन की बहुविज्ञता को प्रोटीनों के लक्षण चित्रण के विशेष महत्व के साथ समझ सकेंगे।

वैद्युत कण संचलन का आरंभ 1861 में हुआ, जब विंके ने वैद्युतकण संचलनी परिघटना के मापनों को पहली बार रिकॉर्ड किया था।

टाइसेलियस ने जैवरासायन विज्ञान में वैद्युत कण संचलन की प्रायोगिकता को 1937 में अपने संचल सीमा उपकरण का वर्णन करके प्रचलित किया। शब्द वैद्युत कण संचलन उपयोग किए गए किसी वैद्युत क्षेत्र के प्रभाव के तहत आवेशित कण के गमन को प्रदर्शित करता है। पिछले खंडों में यह स्पष्ट कर दिया गया है कि जैवअणु जैसे ऐमीनो अम्लों पेप्टाइडों प्रोटीनों और न्यूक्लीक अम्ल में किसी दिए गए pH पर आवेश पाया जाता है और यह आवेश वैद्युत आवेश वाले अर्धार्शों (धनायनों अथवा श्रणायनों) के रूप में विलयन में पाए जाते हैं।

5.2 वैद्युत कण संचलन

प्रकृति में प्रोटीन मुक्त रूप में उपलब्ध होते हैं और अन्य अणु जैसे कार्बोहाइड्रेट और न्यूक्लिक अम्ल के साथ संयुग्मित भी होते हैं। हम सब जानते हैं कि शुद्धता हमेशा हमारा जीवन राक महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है, क्योंकि शुद्धता राक उत्पाद की गुणवत्ता का प्रतिनिधित्व करती है।

शुद्धता का निर्धारण

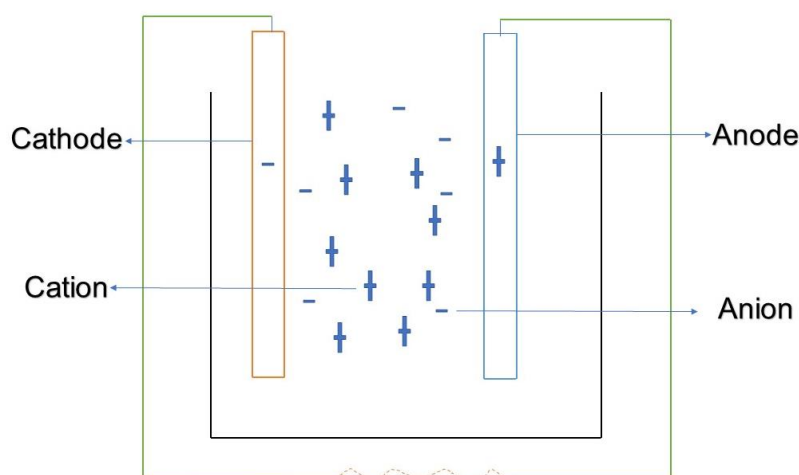
जैसा कि हम सभी जानते हैं शुद्धता सदैव हमारे जीवन में महत्वपूर्ण भूमिका निभाती है क्योंकि शुद्धता किसी उत्पाद की गुणवत्ता को प्रदर्शित करती है। लेकिन जब प्रोटीनों की शुद्धता के अध्ययन की बात आती है तो इसका निर्धारण उनके रासायनिक और भौतिक गुणों द्वारा जैसे कि ऐमीनो अम्लों का संयोजन, पीलीपेप्टाइड श्रृंखलाओं की संख्या, प्रोटीन के आयामों (लंबाई, चौड़ाई) और आमाप से होती है। यहां आपको यह याद रखना चाहिए कि प्रोटीनों की शुद्धता का निर्धारण उनको कोशिका और अपकोशिकीय अंगों से वियुक्त करने के बाद किया जाता है।

इस इकाई में, हम आपको वैद्युत कण संचलन की विभिन्न तकनीकों के बारे में बताने जा रहे हैं जिनका उपयोग प्रोटीनों के लक्षण चित्रण में अनुप्रयुक्त वैद्युत क्षेत्र में उनके व्यवहार के आधार पर किया जाता है। प्रोटीनों का यह व्यवहार प्रेमीना अम्लों के आकार, आमाप और संयोजन पर आधारित होता है। आइए हम वैद्युत कण संचलन के कार्यकारी सिद्धान्त और उसके प्रकारों के बारे में विशेष रूप से उनके अनुप्रयोगों के संदर्भ में जानते हैं।

मौलिक सिद्धान्त

वैद्युत कण संचलन मुख्यरूप से वैद्युत क्षेत्र की उपस्थिति में आवेशित कणों या अणुओं के पृथक्करण पर आधारित है। किसी अनुप्रयोग किए गए वैद्युत क्षेत्र में आयन विपरीत आवेश वाले इलेक्ट्रोडों की ओर गति करते हैं अर्थात् श्रणायन (-ve) धनात्मक आवेश वाले एनोड और धनायन (+ve) ऋणात्मक आवेश वाले कैथोड की ओर गति करते हैं (चित्र 5.1)। जैसा कि हमने अपनी खंड-1 की पिछली इकाई-2 में पढ़ा है, अधिकांश जैवअणुओं पर आवेश होता है जबकि कार्बोहाइड्रेट अनावेशित होने के कारण उद्भवन (derivatization) की प्रक्रिया के बाद पृथक्कृत किए जा सकते हैं। इस इकाई में हम

बताएंगे कि किस प्रकार आवेशित अणुओं को किसी अनुप्रयुक्त वैद्युत क्षेत्र में पृथक्कृत किया जाता है।



व्युत्पत्ति वह प्रक्रिया है जहां अनावेशित अणु को आवेशित अणु में बोरेंट और फॉस्फेट के साथ युग्मन द्वारा परिवर्तित किया जा सकता है, भले ही दो अणु समान भार के हों वे शायद एक साथ विस्थापित (माइग्रेट) न हों क्योंकि उनके आणविक भार में अंतर हो सकता है, जिससे कि उनका आवेश/भार अनुपात भिन्न हो सकता है। यह अंतर जेल वैद्युतकण संचलन के लिए महत्वपूर्ण है।

चित्र 5.1: वैद्युत कण संचलन के सिद्धान्त का प्रदर्शन

यह जानने के लिए कि आवेशित कण वैद्युत क्षेत्र में यथार्थ रूप से किस प्रकार पृथक् होते हैं, मान लीजिए कि एनोड और कैथोड पर विभव अन्तर (वोल्टेज) का उपयोग किया जाता है, जिस से विभव 'प्रवणता' E विकसित होती है जो अंतरग रूप से अनुप्रयुक्त वोल्टेज ' V ' होता है और इलैक्ट्रोडों के बीच की दूरी ' d ' से विभाजित होता है। जब E का अनुप्रयोग किया जाता है तो ' q ' कुलम्ब के आवेश वाले अणु पर बल ' Eq ' न्यूटन हो जाएगा। ये वह बल है जो आवेशित कण की इलैक्ट्रोड की ओर गति करता है।

लेकिन, एक घर्षणी प्रतिरोध पाया जाता है जो आवेशित कणों के गमन में अवरोध उत्पन्न करता है। यह बल कण के जलगतिक आमाप, उसके आकार, जेल के रंध्र आमाप और बफर की श्यानता का सूचक होता है।

इसलिए आवेशित कण के किसी वैद्युत क्षेत्र में वेग ' v ' को निम्न समीकरण द्वारा दिया जाता है।

$$v = Eq / f$$

जहां f घर्षणी गुणांक है।

किसी आयन की वैद्युत कण संचलनी संचलता (μ) को निम्न प्रकार से प्रदर्शित किया जाता है : v/E जो आयन के वेग और क्षेत्र सामर्थ्य का अनुपात है।

वैद्युत कण संचलन के प्रकार

वैद्युत कण संचलन को उपयोग किए गए आधारी माध्यमों के आधार पर तीन प्रकारों में विभाजित किया जा सकता है।

- ऐगार जेल वैद्युत कण संचलन
- पोलीएक्रिल ऐमाइड जेल वैद्युत कण संचलन

- सेलुलोज एसिटेट अथवा पत्र वैद्युत कण संचलन

वैद्युत कण संचलन का प्रकार चाहे कोई भी हो, आधारी माध्यम अनिवार्य होता है, जिसे प्रचलित रूप से जेल मैट्रिक्स कहते हैं। किसी वैद्युत कण संचलन इकाई के मौलिक घटक बफर रिजर्वायर, कांच की पट्टी कॉम्ब पट्टी, स्पेसर आर्म और एक पावर पैक हैं। उपयुक्त बफर तंत्र का उपयोग करना एक स्थिर आयनीकरण अवस्था को बनाए रखने के लिए अनिवार्य है। वैद्युत कण संचलन को ऊर्ध्वाधर अथवा क्षैतिज जेल तंत्रों के रूप में किया जा सकता है। जेल के प्रारूपिक आयाम 12 cm × 14 cm और 1-2 mm मोटाई के परास में होते हैं।

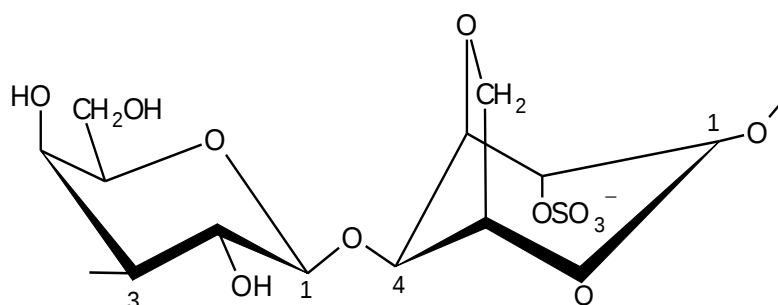
सम्पल पर आवेश आमाप और आकार जैसे कारक अणुओं की वैद्युत कण संचलन को गति को वैद्युत क्षेत्र और बफर की प्रकृति के साथ प्रभावित करते हैं।

5.3 जेल मैट्रिक्स

जेल सरंघ पदार्थ होते हैं, जैवअणुओं के सापेक्ष रंध्रों का आमाप यह निर्धारित करता है कि पृथक किया जाने वाला अणु रंध्र में प्रवेश करेगा और उसमें रोक लिया जाएगा अथवा उससे होकर निकल जाएगा। अतः, पृथक्करण न सिर्फ आवेश पर बल्कि अणु के आमाप पर भी निर्भर करता है। ऐगार और बहुलकीकृत ऐक्रिलएमाइड दो नियमित रूप से उपयोग किए जाने वाले मैट्रिक्स हैं।

5.3.1 ऐगेरोस

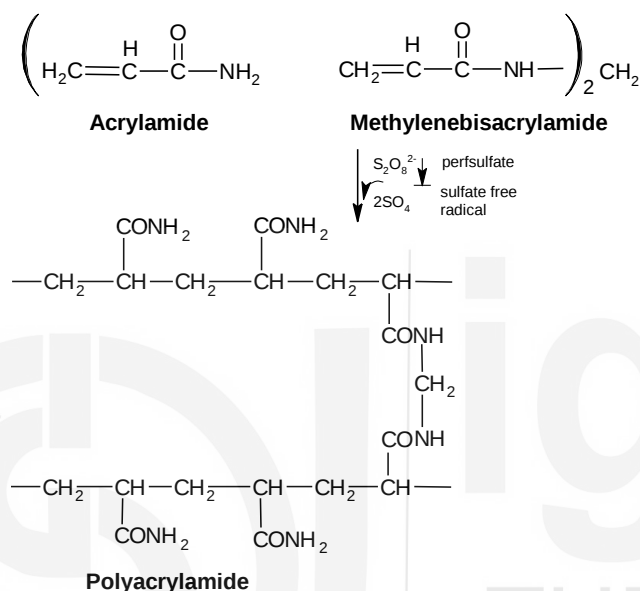
ऐगेरोस दो गैलेक्टोस आधारित बहुलकों का बना होता है। जैसे कि ऐगार और ऐगेरोपेक्टिन (चित्र 5.2)। एल्फेटीकृत ऐगोपेक्टिन वैद्युतपरासरण के विकास में प्रमुख तत्व है, जो वैद्युत कण संचलनी पृथक्करण के लिए निर्धारण कारक होता है। जलीय बफर के साथ 40°C पर उबालने से ऐगार घुल जाता है और ठंडा होने पर 38°C पर जेल बना लेता है। व्यवहारिक रूप से ऐगार की कम सान्द्रता से बड़े आमाप के रंध्र बनते हैं, अतः इसका उपयोग व्यापक रूप से उच्च अणुभार वाले अणुओं जैसे प्रोटीनो और न्यूक्लीक अम्लों को पृथक करने के लिए किया जाता है।



चित्र 5.2 : ऐगेरोस की संरचना

5.3.2 पोलीऐक्रिलऐमाइड

मैट्रिक्स को संश्लेषित करने के लिए उपयोग किए जाने वाले घटक ऐक्रिलऐमाइड मानोमर, N,N'-मेथिलीनबाइसैक्रिलऐमाइड (बिस), अमोनियम पर सल्फेट (APS) और टेट्रामेथिलीन डाइ ऐमीन (TEMED) है। जहां APS अपनी फ्री रेडीकल (मुक्त मूलक उत्पन्न करने की क्षमता द्वारा ऐक्रिलऐमाइड एकलकों को सक्रियित कर देता है और सक्रियित एकलक बहुलकीकृत होकर (बहुलक) पोलिमेर बनाते हैं और ये बिस की उपस्थिति में तिर्यक बंध बना लेते हैं। इस पूरी प्रक्रिया में TEMED एक उत्प्रेरक की भांति कार्य करता है (चित्र 5.3)। जेल के रंध्र आमाप को ऐक्रिलऐमाइड और बिस की मात्रा द्वारा नियंत्रित किया जा सकता है। विरचन को बनाने में उपयोग किए गए अधिकांश घटक न्यूरोटॉक्सिन हैं अतः इसको बनाने समय सावधानी बरतनी चाहिए।



चित्र 5.3: पोलिऐक्रिलऐमाइड का संश्लेषण

बोध प्रश्न 1

- वैद्युत कण संचलन के सिद्धान्त को बताइए।
- ऐगार और पोलिऐक्रिल ऐमाइड का संयोजन बताइए।

5.4 प्रोटीनों का वैद्युतकण संचलन

इस भाग में हम पोलिऐक्रिलऐमाइड वैद्युत कण संचलन समवैद्युत फोकसन और 2-D जेल वैद्युतकण संचलन के बारे में पढ़ेंगे। इस संदर्भ में, आइए हम किसी प्रोटीन की विशिष्ट विशेषताओं को वर्णित करने के लिए उपयोग की जाने वाली आवश्यक शब्दावली को जानने से शुरुआत करते हैं।

प्रोटीन का अणुभार : इसे किसी प्रोटीन विशेष में उपस्थित कुल ऐमीनों अम्लों के औसत भार का गुणन करके प्राप्त किया जाता है। उदाहरण : 300 ऐमीनो वाले किसी प्रोटीन में 33 kDa होते हैं अर्थात् किसी ऐमीनो अम्ल का औसत भार 110 Da होता है, अतः $300 \times 110 = 3300 \text{ Da}$ या 33 k Da होगा।

ग्राम अणु विलोपन गुणांक (Molecular extinction coefficient)

यह किसी भी दी गई तरंगदैर्घ्य पर किसी रासायनिक पदार्थ की प्रकाश अवशोषण क्षमता के मापन की इकाई है। यद्यपि, विलोपन गुणांक के मान का उपयोग किसी तरंगदैर्घ्य विशेष पर विलयन की ग्राम अणु सांद्रता के मापन के लिए किया जाता है। अभिव्यक्त करने के लिए उपयोग की जाने वाली इकाइयां हैं (mg/ml)-1 cm-1 यानी अवशोषिता का सांद्रता और पथ की लंबाई से विभाजन। लेकिन आप इन इकाइयों के विषय में और अधिक विस्तार से पाठ्यक्रम BBBS-183 का अध्ययन करते समय जानेंगे।

5.4.1 सोडियम डूडेसाइल सल्फेट-पोलीऐक्रिल एमाइडजेल (SDS-PAGE)

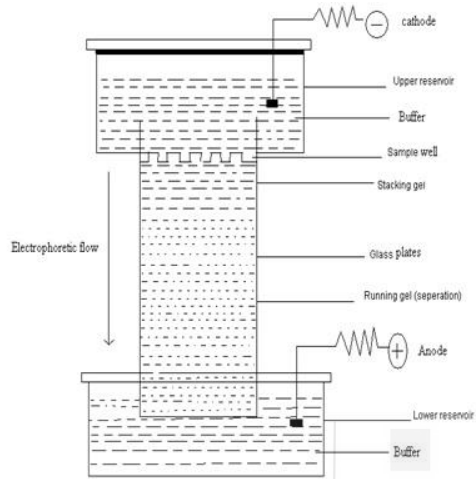
वैद्युत कण संचलन (SDS-PAGE) : प्रोटीन का पृथक्करण मुख्य रूप से पृथक् किए जाने वाले प्रोटीनों की प्रकृति पर निर्भर करता है। यहां हम वैद्युत कण संचलन करने के विषय में पढ़ेंगे जिनका व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है।

PAGE को करने के लिए SDS [$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2) - \text{CH}_2\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$] को मिलाने को SDSA-PAGE कहते हैं। जैसा कि हमने प्रोटीनों के बारे में पिछले खंडों में पढ़ा है प्रोटीनों की संरचना जलभीत परस्पर क्रियाओं, डाइसल्फेट बंधों और हाइड्रोजन बंधों द्वारा स्थिरीकृत हो जाती है। किसी प्रोटीन के अलग-अलग पोलीपेप्टाइडों के अध्ययन के लिए हमें उपर्युक्त बंधों को तोड़ने की आवश्यकता होती है। विलेयीकरण करने वाले कर्मक जैसे यूरिया, SDS और β -मर्कैप्टोएथेनॉल का उपयोग प्रोटीनों को उनके अलग-अलग पोलीपेप्टाइडों में पृथक् करने के लिए किया जाता है। जहां यूरिया हाइड्रोजन बंधों को तोड़ता है, SDS और β -मर्कैप्टोएथेनॉल क्रमशः जलभीत और डाइसल्फाइड सेतुओं को खंडित करते हैं।

परीक्षण आरंभ करने से पहले पृथक्कृत किए जाने वाले प्रोटीन सेम्पल को 5 मिनट तक ब्रोमोफीनोल ब्लू, SDS और β -मर्कैप्टोएथेनॉल युक्त सेम्पल बफर में उबाला जाता है, जो प्रोटीन को पूर्णतः विकृत कर देता है और पोलीपेप्टाइड श्रृंखलाओं को शुद्ध ऋणात्मक आवेश प्रदान करता है। ब्रोमोफीनोल ब्लू वैद्युत कण संचलनी पथ को मॉनीटर करने के लिए एक पथ का पता लगाने वाले रंजक की भांति कार्य करता है।

SDS-PAGE में जल के दो भाग होते हैं, जैसे पृथक्करण जेल (10-15% ऐक्रिलएमाइड, 10 cm) और अपेक्षाकृत छोटे स्टैक ढेरी का तेल (2-4 % ऐक्रिलएमाइड 1 cm)। कांच की पट्टियों के बीच में एक प्लास्टिक की कंधी लगा दी जाती है और जेल विलयन को उड़ला जाता है तथा बहुलकीकरण के बाद कंधी को निकाल दिया जाता है। यह सेम्पल के अनुप्रयोग के लिए भारण कूप प्रदान करते हैं। पृथक्करण जेल को पहले कांच की पट्टियों के बीच में उड़ला जाता है और बहुलकीकृत होने दिया जाता है, इसके बाद 1ml स्टैकिंग जेल डाला जाता है (चित्र 5.4)। यद्यपि जेल कांच की पट्टियों के बीच में बनता है जो एक साथ जुड़ी रहती हैं और स्पेसर आर्म्स (spacer arms) द्वारा एक दूसरे से अलग रहती हैं। पहले से उबाले हुए प्रोटीन सेम्पल को स्टैकिंग जेल के कूपों में भरा जाता है और वैद्युत क्षेत्र की उपस्थिति में पृथक् होने दिया जाता है। प्रोटीन ऐनोड की ओर जाने लगते हैं इनमें से अपेक्षाकृत छोटे प्रोटीन अधिक तेजी से गति करते हैं और बड़े वाले अपने अणु चालनी गुणों के कारण थोड़ा धीरे गति करते हैं। जब नीला रंजक जेल की तली में पहुंच जाता है तो धारा को बंद कर दिया जाता है। फिर जेल को

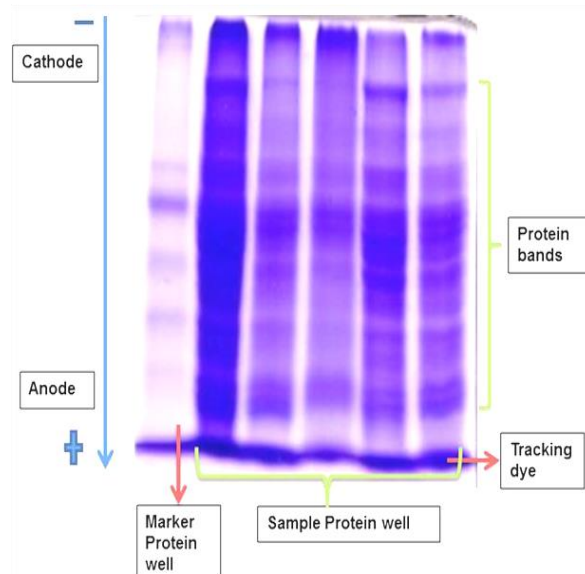
कांच की पट्टी से निकाल दिया जाता है और 2–3 घंटे के लिए विशिष्ट रंजन कर्मक (स्टेनर) के साथ अभिरंजित किया जाता है (सारणी 5.1)। फिर रात भर के लिए विरंजन विलयन (7% ऐसीटिक अम्ल) में निक्षालित किया जाता है इससे अबद्ध पृष्ठभूमि रंजक जेल से अलग हो जाता है जिससे प्रोटीन की स्पष्ट रूप से दिखने वाली नीली पट्टियां बची रह जाती है (चित्र 5.5)।



चित्र 5.4 क) : PAGE का आरेखी प्रदर्शन



चित्र 5.4 ख) A- पावर पैक B वैद्युत कण संचलन इकाई



चित्र 5.5 : SDS-PAGE के बाद पृथक्कृत नीली प्रोटीन पट्टियों के साथ जेल

सारणी 5.1: वैद्युत कण संचलन में उपयोग किए जाने वाले विभिन्न प्रकार के रंजक

यौगिक	रंजक	टिप्पणी
प्रोटीन	ब्रोमोफीनोल ब्लू	दृश्य
	क्यूमैसी ब्रिलिएन्ट ब्लू	दृश्य
	R-250	प्रतिदीप्त
	डेन्सिल क्लोराइड	प्रतिदीप्त
	जलीय एनीलिनोनैपथेलीन	दृश्य
	सल्फोनेट	दृश्य
न्यूक्लीक अम्ल	लिसऐमीन ग्रीन	प्रतिदीप्ति
	नाइग्रोसीन	दृश्य, RNA
	इटीडियम ब्रोमोइड	DNA-नीला RNA-लाल
	मेथिलीन ब्लू	DNA-RNA नारंगी लाल
	मेथिलग्रीन पाइरोनीन	दृश्य
लिपोप्रोटीन पोलिसेकेराइड	लैन्थेनम एसिटेट+	दृश्य
	एक्रीडीन	DNA-नील बैंगनी
	टोलुइडीन ब्लू	RNA-नीला, प्रोटीन-लाल
	60% एथेनॉल आयोडीन में	
	सूडान ब्लैक	

5.4.2 प्राकृत जेल

SDS के बगैर निर्मित किया गया पोलीएक्रिल एमाइड जेल प्राकृत जेल कहलाता है। इसका उपयोग एन्जाइमों के अध्ययन में व्यापक रूप से किया जाता है क्योंकि एन्जाइम SDS उपचार द्वारा विकृत हो जाते हैं और अपना उत्प्रेरकी गुण खो देते हैं अतः प्राकृत जेल वैद्युत कण संचलन में सभी प्रोटीनों पर अपना मूल आवेश होता है और ये अपनी वैद्युत कण संचलनी संचलता और जेल के चालनी प्रभाव के आधार पर गति करते हैं। इसमें सम्मिलित अन्य सभी चरण SDS-PAGE के समान होते हैं। प्राकृत जेल को एन्जाइम के लिए विशिष्ट क्रियाधार (substrate) युक्त विलयन में ऊष्मायित किया जाता है, जो एन्जाइम के स्थान पर जेल पर एक रंगीन धब्बा विकसित करता है।

5.4.3 ग्रेडिएंट जेल

इस जेल को बनाने के लिए पोलीएक्रिलएमाइड का उपयोग किया जाता है, जिसमें रंध्र का आमाप जेल की तली की ओर निरंतर घटता जाता है और ऐसा ऐक्रिलएमाइड की सान्द्रता को बढ़ाकर किया जाता है। जब बृहदाणुओं की किसी अनुप्रयुक्त वैद्युत क्षेत्र में पृथक होने की प्रवृत्ति होती है, तो आरंभ में बृहदाणु अपनी वैद्युत कण संचलनी संचलता के अनुसार गति करते हैं। जब वे जेल में नीचे पहुंचते हैं तो इनको छोटे रंध्र आमाप के द्वारा मंदित/अवरुद्ध कर दिया जाता है। अतः इस जेल में गमन वैद्युतकण संचलन संचलता की अपेक्षा रंध्र आमाप पर अधिक निर्भर करता है। इस विधि का उपयोग व्यापक रूप से अपरिष्कृत प्रोटीन सेम्पलों को पृथक करने के लिए किया जाता है।

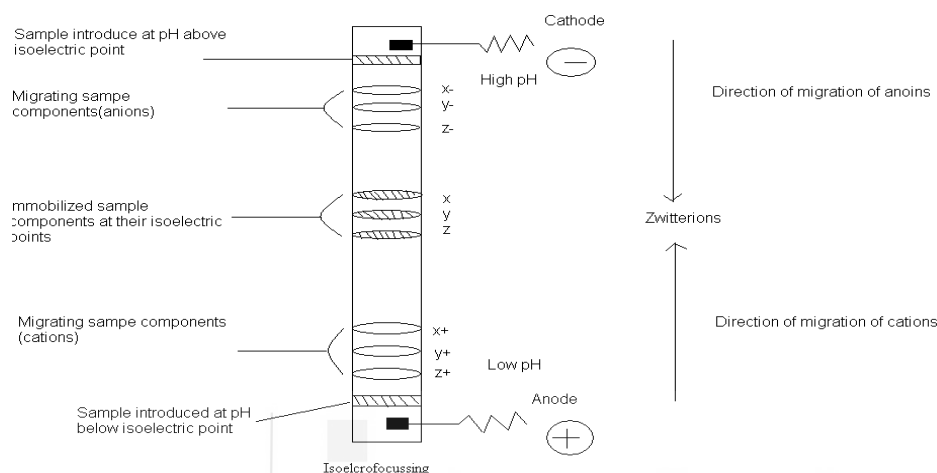
5.4.4 समविभव फोकसन (Isoelectric focusing)

इस को पढ़ने से पहले BBCCT-101 पाठ्यक्रम की इकाई-3 'ऐमीनो' अम्लों के गुण को पढ़ने की सलाह दी जाती है।

इस तकनीक का आविष्कार स्वीडन के एक वैज्ञानिक एच. स्वेन्सन द्वारा किया गया था, जिसमें उच्च विभेदन क्षमता होती है। इस तकनीक में प्रोटीनों का पृथक्करण उनकी उभयविष्ट आयन (zwitterion) अवस्था के आधार पर यानी समविभव बिंदु (isoelectric point) पर किया जाता है अतः इसे IEF कहते हैं। इसे करने के लिए रेडीमेड IEF पट्टियां विभिन्न pH परास और 7 cm से 11 cm तक की लंबाई में उपलब्ध हैं।

पारंपरिक वैद्युत कण संचलन में ऐनोड और कैथोड के बीच में pH स्थिर होता है और अणुओं की गति विपरीत आवेश वाले इलैक्ट्रोडों पर होती है (चित्र 5.1)। जबकि IEF में दोनों इलैक्ट्रोडों के बीच एक स्थिर pH ग्रेडिएन्ट (प्रवणता) पाया जाता है, जो ऐनोड से कैथोड की ओर क्रमिक रूप से बढ़ता जाता है। प्रोटीनों में अम्लीय pH पर शुद्ध धनात्मक आवेश होता है क्योंकि अधिकांश ऐमीनो समूह प्रोटोनित होते हैं और क्योंकि pH क्षारक की ओर बढ़ जाता है, अतः वहां ऋणात्मक आवेश युक्त कार्बोक्सिनिक समूह बढ़ जाते हैं जिसके कारण अधिकांश प्रोटीनों पर इस pH पर शुद्ध ऋणात्मक आवेश हो जाता है। समआयानी बिंदु पर पहुंचने पर प्रोटीन अणु का शुद्ध आवेश शून्य हो जाता है और वे अगतिशील हो जाते हैं (चित्र 5.6)। कल्पना कीजिए, यदि किसी प्रोटीन को कम pH पर प्रवेश कराया जाता है अर्थात् ऐनोड पर तो उस पर शुद्ध धनात्मक आवेश होगा

ऐसा मुक्त रूप से उपलब्ध प्रोटोनों के कारण होता है जो ऐमीनो (NH₂) समूह के साथ बद्ध हो सकते हैं और उसे अमोनिया से परिवर्तित कर सकते हैं। यह प्रोटीन फिर समविभव बिंदु पर पहुंच जाता है और विभवी रूप से उदासीन (उभयनिष्ठ) हो जाता है तथा अचल हो जाता है। IEF का उपयोग व्यापक रूप से प्लाज्मा और सीरम प्रोटीनों के पृथक्करण और पहचान के लिए किया जाता है।

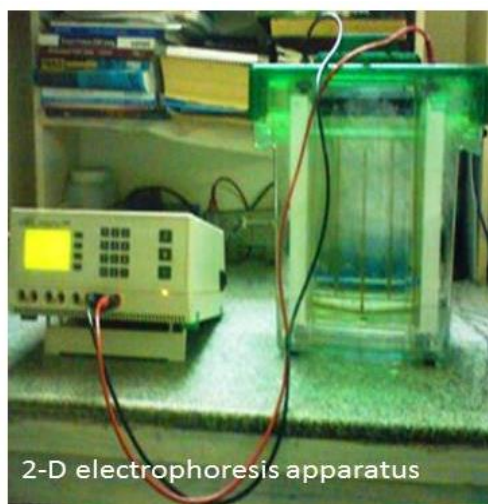


चित्र 5.6: IEF द्वारा प्रोटीनों के पृथक्करण को दर्शाता आरेखी प्रदर्शन

नोट : IEF की विभेदन क्षमता पारंपरिक वैद्युतकण संचलन से कहीं अधिक होती है। उदाहरण के लिए, IEF को करने से प्लाज्मा को 40 अलग-अलग पट्टियों में विभेदित किया जा सकता है, जबकि सामान्य पत्र वैद्युत कण संचलन में सिर्फ छह पट्टियों तक ही किया जा सकता है।

5.4.5 द्विविमी (2-D) जेल वैद्युत कण संचलन

इस तकनीक का विकास IEF और SDS-PAGE की विभेदन क्षमता को मिलाकर किया गया है। इसमें प्रोटीन के सेम्पल का पहले IEF किया जाता है फिर IEF जेल को पहले से निर्मित SDS जेल पर स्थानांतरित कर दिया जाता है, जिससे PAGE को संपन्न किया जा सके, अतः इसका नाम 2-D है (चित्र 5.7)। IEF और SDS-PAGE प्रोटीनों का उनके समविभव और अणु भाग बिंदु के आधार पर पृथक्करण कर देते हैं, ये दोनों ही गुण किसी प्रोटीन के लिए विशिष्ट होते हैं। अतः 2-D का प्रोटीनों के पृथक्करण के संदर्भ में वैद्युत कण संचलन की किसी भी अन्य तकनीक की तुलना में अतिरिक्त लाभ है। 2-D की विभेदन क्षमता इतनी अधिक होती है कि 5000 प्रोटीन युक्त मिश्रण को भी अलग-अलग बिंदुओं में पृथक्कृत किया जा सकता है। 2-D का उपयोग व्यापक रूप से अपरिष्कृत प्रोटीन सेम्पलों के विश्लेषण के लिए किया जाता है। सरल शब्दों में, 2-D को क्षैतिज दिशा में और उसी प्रोटीन सेम्पल के लिए SDS-PAGE को ऊर्ध्व दिशा में IEF संपन्न करना माना जा सकता है।



चित्र 5.7: 2-D वैद्युत कण संचलन उपकरण और जेल

बोध प्रश्न 2

- 1) प्राकृत और SDS - PAGE के बीच अन्तर बताइए।
- 2) निम्नलिखित का मिलान कीजिए :

a) उभयनिष्ठ आयन	1. IEF +SDS- PAGE
b) आमाप निर्भर	2. ग्रेडिएंट जेल
c) 2-D वैद्युतकण संचलन	3. IEF

पोलीएक्रिलामाइड जेलों का उपयोग भी DNA को पृथक करने के लिए किया जाता है। सामान्य रूप से 3.5% पोली एक्रिलामाइड जेलों का उपयोग 80-1000 nt के परास के DNA को पृथक करने के लिए किया जाता है और 12% और जेलों का उपयोग 20-100 nt तक के अंशों के लिए किया जाता है। 3.5% से 7.5% के परास के ग्रेडिएंट जेलों का उपयोग विभिन्न आमापों के DNA के लिए किया जाता है ये दर्शाता है, कि अपेक्षाकृत छोटे DNA अंशों के लिए रंध्र आमाप कम होगा।

नोट : वैद्युत कण संचलन करने के बाद DNA को निम्न द्वारा पुनर्प्राप्त किया जा सकता है:

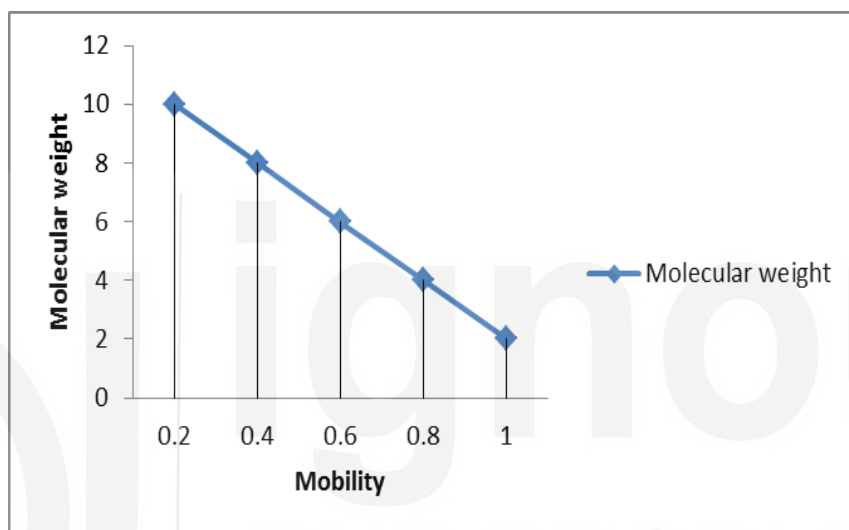
- i) वैद्युत अवक्षालन; ii) जेल पीस का बफर में डालकर उसे गलाकर अपकेन्द्रीकरण करना और प्लावी को (supernatant) एकत्रित करके लेकिन अंतिम रूप से DNA की पुनर्प्राप्ति प्लावी का एथेनॉल के साथ अवक्षेपण कराकर की जाता है।

5.5 वैद्युत कण संचलन के अनुप्रयोग

वैद्युत कण संचलन के चिकित्सा, रोग नैदानिक और औषधीय अनुसंधान में व्यापक अनुप्रयोग हैं। कुछ महत्वपूर्ण अनुप्रयोगों को यहां बताया गया है:

- पत्र वैद्युतकण संचलन रोगनैदानिक प्रयोगशाला में सीरम प्रोटीनों, लिपोप्रोटीनों, आइसोएन्जाइमों और हीमोग्लोबिन के पृथक्करण के लिए एक अनिवार्य तकनीक है।

- PAGE एक नवीन वैद्युतकण संचलन तकनीक है जिसका उपयोग प्रोटीनों तथा न्यूक्लीक अम्लों/RNA और DNA के छोटे अंशों के विश्लेषण और पृथक्करण के लिए किया जाता है।
- SDS- PAGE का उपयोग प्रोटीनों के उनके अणु आमाप और भार के आधार पर उसकी अलग-अलग पोलिपेप्टाइड शृंखलाओं (उपइकाइयों) में विभेदन के लिए किया जाता है।
- SDS- PAGE द्वारा प्रोटीनों के अणुभार का निर्धारण वैद्युत कण संचलन का अत्यधिक महत्वपूर्ण उपयोग है। SDS-प्रोटीन कॉम्प्लेक्स की संचलता और प्रोटीन के अणुभार के लघुगुणक में रेखीय संबंध पाया जाता है (चित्र 5.8)।



चित्र 5.8 : प्रोटीन और वैद्युतकण संचलन संचलता का रेखीय ग्राफ।

ग्राफ में स्पष्ट रूप से दिखाई देता है कि अणुभार जितना अधिक होता है संचलता उतनी ही कम होती है।

- किसी प्रोटीन के अणुभार के निर्धारण का एक अन्य तरीका प्रोटीन स्टैंडर्ड का अज्ञात सेम्पल के साथ वैद्युत कण संचलन करवाना है। इन पट्टियों की संचलता की तुलना करके आप आसानी से किसी अज्ञात प्रोटीन के अणुभार का पता लगा सकते हैं।
- IEF एक सर्वाधिक बहुमुखी तकनीक है जिसमें प्रोटीनों के मिश्रण को उनके समविभव बिंदुओं के आधार पर अलग अलग पट्टियों में विभेदित किया जा सकता है। 2-D वैद्युत कण संचलन में प्रोटीनों को उनके समविभव बिंदुओं के साथ-साथ अणु आमाप के आधार पर पृथक् किया जा सकता है। 2-D के उपयोग द्वारा प्रोटीन की शुद्धता का आकलन किया जा सकता है और प्रोटीन की अभिव्यक्ति में भिन्नताओं की स्क्रीनिंग का अध्ययन किया जा सकता है।

न्यूक्लीक अम्लों के लक्षण चित्रण में वैद्युत कण संचलन के उपयोग :

- बड़े गुणसूत्री जीनोम का पृथक्करण पल्स्ड फील्ड जेल/स्पंदित क्षेत्र जेल वैद्युतकण संचलन द्वारा प्राप्त किया जा सकता है।

- ऐगरोस जेल वैद्युतकण संचलन (AGE) का उपयोग व्यापक रूप से DNA क्रमण DNA अथवा RNA में उत्परिवर्तनों का पता लगाने, प्रोटीनों और DNA के अणुभार का निर्धारण करने में किया जाता है।
- AGE का अणु भार प्रतिरक्षा वैद्युतकण संचलन (इम्यूनोलेक्ट्रोफोरेसिस) में विशिष्ट एन्टीसेरा (किसी एन्टीजन विशेष के लिए उगायी गई एन्टीबॉडीज) की शुद्धता की जांच करने के लिए किया जाता है। साथ ही इसका उपयोग ब्लड बैंक में प्रति अभिक्रियाशीलता और एन्टीजन की सान्द्रता का पता लगाने के लिए भी किया जाता है।
- वैद्युतकण संचलन का उपयोग व्यापक रूप से कृ. फिंगरप्रिंटिंग और DNA रेस्ट्रिक्शन मैप (DNA अवरोधन मानचित्र) विकसित करने के लिए किया जाता है। ये दोनों उपयोग विभिन्न प्रजातियों के बीच अथवा एक ही प्रजाति में आनुवंशिक विश्लेषण के लिए सुविख्यात हैं।
- ब्लॉटिंग तकनीकें (संकरण तकनीकें) जैसे सदर्न, नौदर्न और वैस्टर्न जिनका उपयोग DNA, RNA और प्रोटीन की पहचान के लिए किया जाता है, पूरी तरह से वैद्युत कण संचलन पर निर्भर करती हैं।
- वैद्युतकण संचलन का एक उन्नत उपयोग AEMSA (वैद्युत कण संचलन संचलता स्थानांतरण आमापन, electrophoretic mobility shift assay) है, जो न्यूक्लीक अम्ल-प्रोटीन परस्पर क्रिया का अध्ययन करना है। यह कोशिका वृद्धि और व्यवहार में शामिल अध्ययनों की एक अनिवार्य तकनीक है। इस तकनीक को जेल अवमंदन (gel retardation) अथवा पट्ट स्थानांतरण आमापन (band shift assay) भी कहते हैं।

बोध प्रश्न 3

- i) SDS- PAGE में SDS की क्या भूमिका होती है?
- ii) IEF में ————— बिंदु पर प्रोटीन गति करना बंद कर देते हैं।
- iii) प्रोटीन की वैद्युत कण संचलन संचलता ————— के समानुपाती होती है (चित्र 5.8 को देखिए)।
- iv) 2-D वैद्युत कण संचलन में प्रोटीन अपने ————— और ————— के आधार पर पृथक्कृत होते हैं।

5.6 सारांश

आइए अब हम साररूप में इकाई में हमने जो पढ़ा है उसे दोहरा लेते हैं

- इसका सिद्धान्त अनुप्रयोग किए गए वैद्युत क्षेत्र की उपस्थिति में आवेशित कणों का पृथक्करण करना है।

- वैद्युत कण संचलन करने के लिए मूलभूत आवश्यकताएं ऐगरोस अथवा पोलीएक्रिलेमाइड के रूप में आधारी माध्यम का होना है। प्रोटीनों का पृथक्करण प्राकृत PAGE एवं SDS- PAGE के प्रयोग द्वारा होता है।
- SDS- PAGE की विशिष्ट प्रकृति प्रोटीनों को उसकी वैयक्तिक पोलीपेप्टाइड श्रृंखलाओं में पृथक् करना है।
- IEF का उपयोग व्यापक रूप से प्रोटीनों का उनके समविभव बिंदुओं के आधार पर पृथक्करण करने के लिए किया जाता है।
- 2-D वैद्युत कण संचलन को उसकी उच्च विभेदन क्षमता के लिए जाना जाता है।

5.7 अंत में कुछ प्रश्न

1. प्रोटीन की शुद्धता क्या है? वैद्युत कण संचलन के मौलिक सिद्धान्त को बताइए।
2. SDS- PAGE का वर्णन कीजिए और प्रोटीनों के लक्षण चित्रण में इसके महत्व को बताइए?
3. समझाइए कि 2-D वैद्युतकण संचलन किस प्रकार PAGE से अधिक लाभदायक है?
4. वैद्युतकण संचलन में उपयोग किए जाने वाले आधारी माध्यमों (मैट्रिक्स) पर लघु टिप्पणी लिखिए।
5. वैद्युतकण संचलन के उपयोग बताइए।

5.8 उत्तर

बोध प्रश्न 1

1. a) वैद्युत कण संचलन के प्रचालन का सिद्धान्त वैद्युत क्षेत्र की उपस्थिति में आवेशित कणों अथवा अणुओं के पृथक्करण पर आधारित है। किसी उपयोग किए गए वैद्युत क्षेत्र में आयन विपरीत आवेश वाले इलेक्ट्रोडों की ओर गति करते हैं।
b) ऐगार दो गैलेक्टोस आधारित बहुलकों जैसे ऐगरोस और ऐगरोपेक्टिन का बना होता है। पोलीएक्रिलेमाइड ऐक्रिलेमाइड (एकलक) मोनोमर N-N' मेथिलीन बिसऐक्रिलेमाइड (बिस) का बना होता है।
2. i) सोडियम इडेसाइल सल्फेट को मिलाया जाना SDS- PAGE और PAGE के बीच प्रमुख अन्तर है।
ii) 3, 2, 1,
3. i) सोडियम डूडेसाइल सल्फेट (SDS) प्रोटीनों की परस्पर क्रियाओं को तोड़ने और प्रोटीन पर शुद्ध ऋणात्मक आवेश विकसित करने के लिए उत्तरदायी

होता है। ये दोनों भूमिकाएं SDS- PAGE द्वारा प्रोटीनों के पृथक्करण के लिए बेहद आवश्यक है (उपभाग 5.4.1 को देखिए) ।

- ii) समविभ बिंदु
- iii) आमाप
- iv) आमाप और आवेश

अंत में कुछ प्रश्न

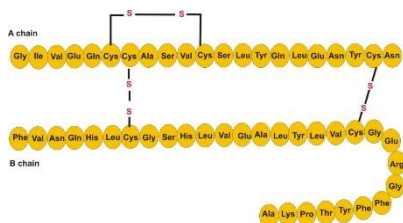
1. शुद्धता को पृथक् किए गए प्रोटीनों की गुणवत्ता के रूप में परिभाषित किया जाता है (पूर्ण विवरण के लिए भाग 5.2 को देखिए) ।
2. 'SDS- PAGE को सोडियम डूडेसाइल सल्फेट-पोली ऐक्रिलएमाइड जेल वैद्युतकण संचलन के रूप में जाना जाता है इसकी व्युत्पत्ति मौलिक PAGE से हुई है; जिसमें 'SDS को जलभीत परस्परक्रियाओं को खंडित करने और प्रोटीन पर शुद्ध ऋणात्मक आवेश प्रदान करने के लिए मिलाया जाता है। 'SDS- PAGE का उपयोग प्रोटीन की तत्वयोगमिति/रस समीकरण मीति (stoichiometry) के अध्ययन और अज्ञात प्रोटीन के अणुभार के निर्धारण के लिए किया जाता है। PAGE प्रोटीनों को सिर्फ उनके अणुभार के आधार पर पृथक् कर सकता है जबकि 2-D में पृथक्करण प्रोटीन के समविभव बिंदु और अणुभार दोनों के द्वारा किया जाता है। ये दोनों गुण किसी प्रोटीन के लिए विशिष्ट होते हैं। अतः ये PAGE से अधिक उपयोगी है। अधिक विवरण के लिए इस इकाई के उपभाग 5.4.1 को देखिए।
4. ऐगेरोस और पोलीऐक्रिलएमाइड सबसे सामान्य रूप से उपयोग किए जाने वाले जेल पदार्थ है (भाग 5.3 को देखिए)।
5. वैद्युतकण संचलन प्रोटीनों के लक्षण चित्रण के लिए व्यापक रूप से उपयोग की जाने वाली तकनीक है।

5.9 अन्य संदर्भ पुस्तकें

1. Practical Biochemistry: principles and techniques. Keith Wilson and John Walker. Cambridge low price editions: Fourth edition.1995.
2. Biophysical chemistry: Principles and techniques, Upadhyay, Upadhyay and Nath. Himalaya Publishing house. VIth edition. 2002.
3. Albert L. Lehninger: Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc.New York, 1984.
4. Lehninger: Principles of Biochemistry (2013) 6th ed., Nelson, D.L. andCox, M.M., W.H.Freeman and Company (New York), ISBN:13: 978-1-4641-0962-1 / ISBN:10:1-4292-3414-8.
5. Physical Biochemistry (2009) 2nd ed., Sheehan, D., Wiley-Blackwell (West Sussex), ISBN: 9780470856024 / ISBN: 9780470856031.

-
6. The Tools of Biochemistry (1977; Reprint 2011) Cooper, T.G., Wiley India Pvt. Ltd. (New Delhi), ISBN: 978-81-265-3016-8.





इकाई 6

प्रोटीन का अनुक्रमण और विश्लेषण

रूपरेखा

- | | |
|---|---|
| <p>6.1 प्रस्तावना</p> <p>संभावित अध्ययन परिणाम</p> <p>6.2 प्रोटीन अनुक्रमण</p> <p>प्रोटीन अनुक्रमण: सेंगर विधि</p> <p>N-टर्मिनल और C-टर्मिनल अमिनो अम्ल का अनुक्रमण</p> <p>6.3 खंडित प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला की उत्पत्ति</p> <p>प्रस्तावना</p> <p>प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के खंड की एंजाइम आधारित उत्पत्ति</p> | <p>रासायनिक यौगिकों या अभिकर्मकों पर आधारित प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के खंड की उत्पत्ति</p> <p>अतिच्छादी पेप्टाइड</p> <p>6.4 डाइसल्फाइड बंध और उसका स्थान निरूप</p> <p>डाइसल्फाइड बंध</p> <p>डाइसल्फाइड बंध का गठन</p> <p>प्रोटीन में डाइसल्फाइड बंध की पहचान</p> <p>6.5 सारांश</p> <p>6.6 अंत में कुछ प्रश्न</p> <p>6.7 उत्तर</p> <p>6.8 अन्य सुझाई गई पुस्तकें</p> |
|---|---|

6.1 प्रस्तावना

आप पिछली इकाइयों में अमीनो अम्ल, पेप्टाइड और प्रोटीन के बारे में अवगत हुये और ज्ञान अर्जित किये है। अब, आप इस इकाई में प्रोटीन अनुक्रमण की विधि सीखने जा रहे हैं। प्रोटीन के अमिनो अम्ल अनुक्रम (sequence) को निर्धारित करने के लिए सामान्य रणनीति इस बात पर निर्भर करती है कि क्या प्रोटीन में एक से अधिक पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला (chain) है ? यदि हाँ, और फिर श्रृंखला को अलग करने और शुद्ध करने की आवश्यकता है।

यह जानना महत्वपूर्ण है कि पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला में डाइसल्फाइड बंध को अलग किया जाना चाहिए। हालांकि अमीनो अम्ल की संरचना को जानना महत्वपूर्ण है जो प्रत्येक पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला में निर्धारित किया जाता है।

हमने पिछली इकाइयों में प्रोटीन के N और C टर्मिनलों के बारे में अध्ययन किया है, इसलिए प्रोटीन अनुक्रमण करते समय इन टर्मिनलों पर प्राप्त अमीनो अम्ल को जानना

और पहचानना आवश्यक है। प्रोटीन बृहदणु (macromolecule) है। हमें पेप्टाइड के छोटे खंडों को उत्पन्न करने की आवश्यकता है, ताकि विश्लेषण आसानी से किया जा सके। इकाई के अंत में हम प्रोटीन पुनर्योजन और खंडों के अतिच्छादीकरण के बारे में अध्ययन करेंगे।

शिक्षार्थियों को आगे बढ़ने से पहले प्रोटीन संरचना और व्यवस्था की मूल अवधारणाओं को याद करने की सलाह दी जाती है (इकाई 1, BBCCT-105)।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस इकाई का अध्ययन करने के बाद, आप :

- ❖ प्रोटीन अनुक्रमण की विधियों को सूचीबद्ध कर सकेंगे;
- ❖ प्रोटीन अनुक्रमण का महत्व स्पष्ट कर पायेंगे;
- ❖ डाइसल्फाइड बंध, प्रोटीन के विखंडन और अतिच्छादी पेप्टाइड के महत्व का वर्णन स्पष्ट कर सकेंगे; और
- ❖ प्रोटीन अनुक्रमण का वर्णन कर सकेंगे।

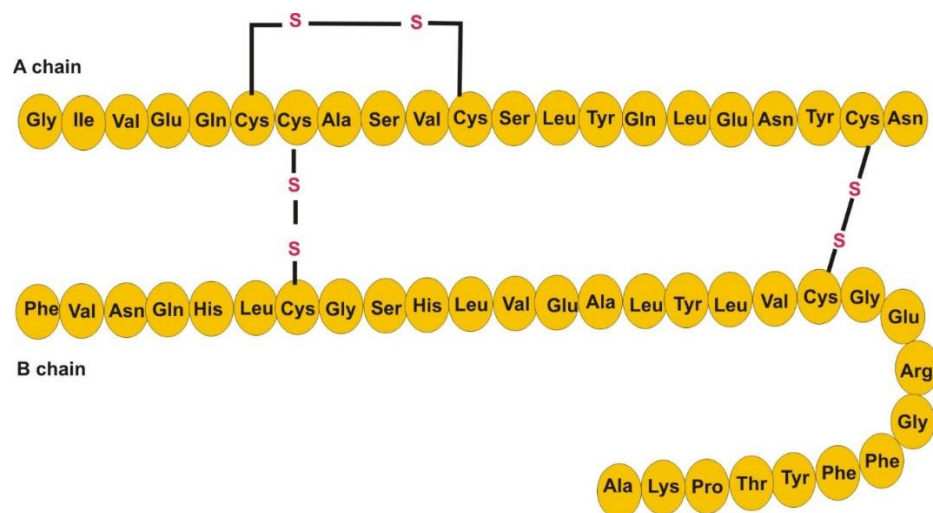
6.2 प्रस्तावना: प्रोटीन अनुक्रमण

प्रोटीन अनुक्रमण एक प्रोटीन के अमीनो अम्ल अनुक्रम को स्थापित करने के लिए लागू तरीकों या दृष्टिकोण या तकनीकों का एक संयोजन है। एक प्रोटीन का अमिनो अम्ल अनुक्रम (जिसे प्राथमिक संरचना भी कहा जाता है) प्रोटीन रैखिक श्रृंखला में अमीनो अम्ल का क्रम है।

प्रोटीन अनुक्रमण का इतिहास

सेंगर की पहली सफलता (triumph) 1951 में बोवाइन इंसुलिन, ए और बी के दो पॉलीपेप्टाइड श्रृंखलाओं के पूर्ण अमीनो अम्ल अनुक्रम का निर्धारण करना था। इससे पहले यह व्यापक रूप से माना जाता था कि प्रोटीन कुछ अनाकार (amorphous) थे। इन अनुक्रमों को निर्धारित करने में, सेंगर ने साबित किया कि प्रोटीन में एक परिभाषित रासायनिक संरचना है। 1958 में, उन्हें "विशेष रूप से इंसुलिन की प्रोटीन की संरचना पर उनके काम के लिए" रसायन विज्ञान में नोबेल पुरस्कार दिया गया है।

सेंगर को इंसुलिन के अमीनो अम्ल अनुक्रम को निर्धारित करने की चुनौती दी गई थी, जो पहले कभी नहीं किया गया था। रसायन विज्ञान और वर्ण लेखन (chromatography) का उपयोग करके, और इनके साथ मानक तकनीकों को मिलाकर, उन्होंने इंसुलिन के अमीनो अम्ल अनुक्रम को पढ़ने के लिए एक विधि विकसित की और पाया कि यह प्रोटीन वास्तव में डाइसल्फाइड बंध द्वारा एक साथ जुड़े दो पॉलीपेप्टाइड श्रृंखलाओं से बना है (चित्र 6.1)।

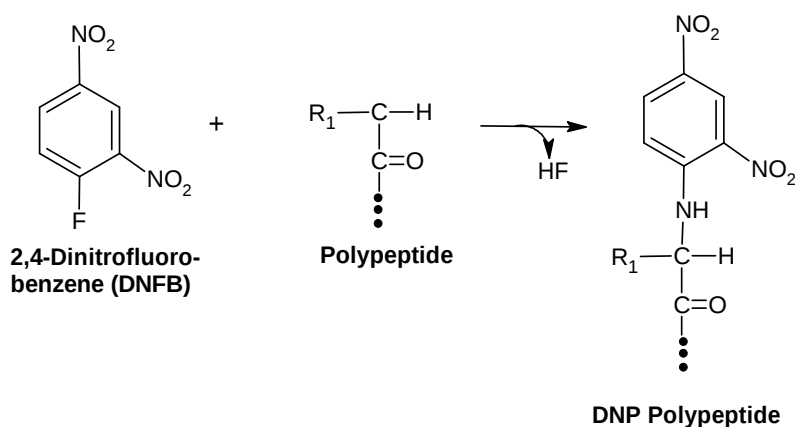


चित्र 6.1: बोवाइन सीरम इंसुलिन एक प्रोटीन हार्मोन है जो दो पेप्टाइड शृंखलाओं, ए (21 अमीनो अम्ल लंबा) और बी (30 अमीनो अम्ल लंबा) से बना है।

प्रत्येक शृंखला में, प्राथमिक संरचना को तीन-अक्षर के संक्षिप्तीकरण द्वारा दर्शाया जाता है जो अमीनो अम्लों के नामों का प्रतिनिधित्व करते हैं जिस क्रम में वे मौजूद हैं (BBCCT-101 कि इकाई -3 का संदर्भ)। अमीनो अम्ल सिस्टीन (cys) में पार्श्व शृंखला के रूप में एक सल्फीड्रिल (SH) समूह होता है। दो सल्फीड्रिल समूह ऑक्सीजन की उपस्थिति में एक डाइसल्फाइड (S-S) बंध बनाने के लिए अभिक्रिया कर सकते हैं। कुल तीन डाइसल्फाइड बंध होते हैं, पहले दो डाइसल्फाइड बंध ए और बी शृंखला को एक साथ जोड़ते हैं, और तीसरा बंध ए शृंखला को सही आकार में मोड़ने में मदद करता है।

6.2.1 प्रोटीन अनुक्रमण : सेंगर विधि

सेंगर को पहले इंसुलिन में स्वतंत्र अमीनो समूहों को चिह्नित करने की आवश्यकता थी। इसके लिए उन्होंने एक अभिकर्मक, डाइनाइट्रोफ्लोरोबेंजीन (DNFB or FDNB) (जिसे सेंगर का अभिकर्मक भी कहा जाता है) विकसित किया, जिसने प्रोटीन में मौजूद अमीनो समूहों के साथ मिलकर अम्ल-स्थिर डाइनाइट्रोफ्रेनिल (DNP) व्युत्पन्न बनाया (चित्र 6.2)।

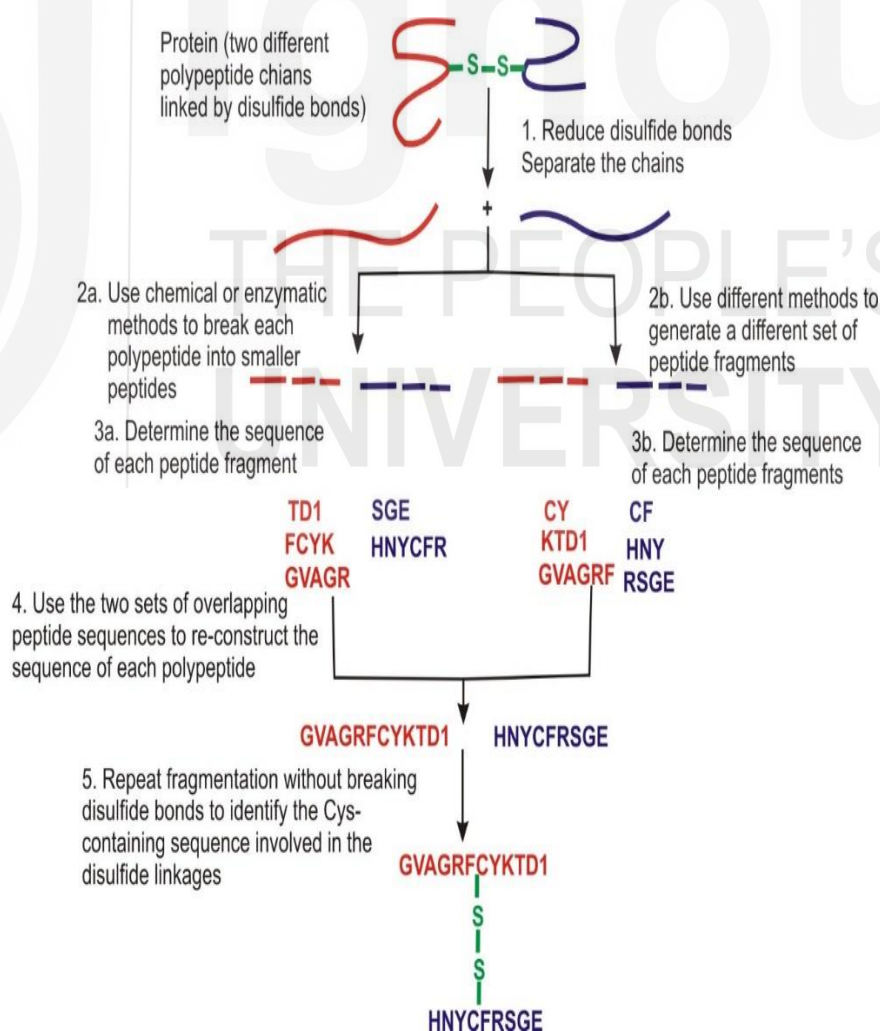


चित्र 6.2: पॉलीपेप्टाइड के साथ 2,4-डाइनाइट्रोफ्लोरोबेंजीन (DNFB) की अभिक्रिया और DNP पॉलीपेप्टाइड के परिणामी उत्पाद।

DNP प्रोटीन को पॉलीपेप्टाइड आधार को तोड़ने के लिए अम्ल के साथ उपचारित किया गया था, और विदित अमीनो अम्ल से तैयार मानकों की तुलना में स्वतंत्र DNP अमीनो अम्ल व्युत्पन्न को पृथक किया गया था। इस तरह, सेंगर ने निर्धारित किया कि इंसुलिन दो पेप्टाइड श्रृंखलाओं से बना है: एक (श्रृंखला ए) जिसमें एक अमिनो-टर्मिनल ग्लाइसिन अवशेष और दूसरा (श्रृंखला बी) एक अमिनो-टर्मिनल फेनिलएलनिन के साथ।

बाद के काम से पता चला कि श्रृंखला ए बीस और श्रृंखला बी इकतीस अमिनो अम्ल से बना था। विशिष्ट श्रृंखलाओं को छोटे घटकों में तोड़ा गया: अम्ल का उपयोग पॉलीपेप्टाइड आधार को तोड़ने के लिए किया जाता था, सिस्टीन डाइसल्फाइड बंध को तोड़ने के लिए परफॉर्मिक अम्ल का उपयोग किया जाता था, और श्रृंखला पर विशिष्ट साइटों पर पॉलीपेप्टाइड को हाइड्रोलाइज करने के लिए प्रोटियोलिटिक एंजाइमों का उपयोग किया जाता था। अभिक्रिया उत्पादों को एक दूसरे से अलग किया गया और उनके अनुक्रम का निर्धारण किया गया।

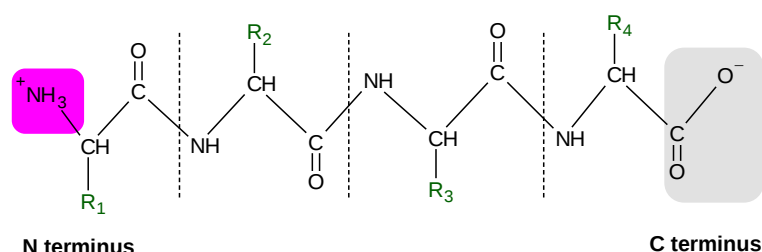
आज, कई शोधन (refinements) और सुधार (improvements) सेंगर की पद्धति में हुए हैं। इस संबंध में, प्रोटीन की केवल थोड़ी मात्रा या माइक्रोग्राम का उपयोग करके कुछ घंटों या दिनों के भीतर अधिकांश प्रोटीनों की अनुक्रमण किया जा सकता है। प्रोटीन अनुक्रमण का संक्षिप्त विवरण चित्र 6.3 द्वारा दर्शाया गया है।



चित्र-6.3: सेंगर की विधि द्वारा प्रोटीन अनुक्रमण का संक्षिप्त विवरण

6.2.2 N-टर्मिनल और C-टर्मिनल अमिनो अम्ल का अनुक्रमण

अमीनो अम्ल का अनुक्रम अनिश्चित है क्योंकि इसे बाएं-से-दाएं या दाएं-बाएं पढ़ने की अनिश्चितता है। यह अनुक्रम हमेशा N-टर्मिनस से लेकर प्रोटीन के C-टर्मिनस तक पढ़ा जाता है (चित्र-6.4)। तो, यह जानने की जरूरत है कि N-टर्मिनल और C-टर्मिनल अमिनो अम्ल क्या हैं और इसलिए इसे अमिनो अम्ल अनुक्रम विश्लेषण माना जाता है।



चित्र- 6.4 N-टर्मिनस और C-टर्मिनस को दर्शाने वाले प्रोटीन में अमीनो अम्ल की शृंखला

N-टर्मिनस (अमिनो-टर्मिनस, NH_2 -टर्मिनस, N-टर्मिनल छोर या अमीन-टर्मिनस के रूप में भी जाना जाता है) एक प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड की शुरुआत है जो पॉलीपेप्टाइड के अंत में स्थित स्वतंत्र अमीन समूह ($-\text{NH}_2$) से संबंधित है। C-टर्मिनस (जिसे कार्बोक्सिल-टर्मिनस, कार्बोक्स-टर्मिनस, C-टर्मिनल शिरा, C-टर्मिनल छोर या COOH -टर्मिनस के नाम से भी जाना जाता है) एक अमिनो अम्ल श्रृंखला (प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड) का अंत है, जिसमें एक स्वतंत्र कार्बोक्सिल समूह ($-\text{COOH}$) होता है। प्रोटीन संरचना के N-टर्मिनल पक्ष से शुरू होने वाले अमिनो अम्ल अनुक्रमण को N-टर्मिनल विश्लेषण के रूप में जाना जाता है। इसी तरह, प्रोटीन संरचना के C-टर्मिनल पक्ष से अनुक्रमण को C-टर्मिनल विश्लेषण के रूप में जाना जाता है।

N-टर्मिनल अमीनो अम्ल का विश्लेषण (Analysis of N-terminal amino acids):

N-टर्मिनल पर अमीनो अम्ल अवशेषों को कई तरीकों से पहचाना जा सकता है। तीन व्यापक रूप से इस्तेमाल N-टर्मिनल तरीके हैं:

(क) 2,4-डाइनाइट्रोफ्लोरोबेंजीन (DNFB) विधि-इसे 1945 में सेंगर (Sanger) ने विकसित किया था।

(ख) 1-डाइमेथिलअमीनो नेफथलीन सल्फोनील क्लोराइड (डांसिल क्लोराइड DNS-CL) विधि -इस विधि का आविष्कार 1972 में ग्रे (Gray) और हार्टले (Hartley) ने किया था।

(ग) फेनिलिसोथायोसाइनेट (PITC) विधि या एडमैन (Edman) अपघटन विधि-यह विधि 1975 में एडमैन द्वारा विकसित की गई थी।

ये तरीके अभ्यास में प्रोटीन अनुक्रम के निर्धारण के लिए सबसे महत्वपूर्ण उपकरण के रूप में रहे हैं। DNFB और DNS-CL का उपयोग केवल गुणात्मक (qualitativ) या

अर्ध-मात्रात्मक (semi-quantitative) तरीके से N-टर्मिनल विश्लेषण के लिए किया जाता है। इन दो तकनीकों को N-टर्मिनल से व्युत्पन्न अमीनो अम्ल स्वतंत्र करने के लिए संपूर्ण हाइड्रोलिसिस की आवश्यकता होती है। एडमैन की अपघटन विधि का उपयोग N-टर्मिनल विश्लेषण और विस्तारित अनुक्रम विश्लेषण दोनों के लिए किया जाता है। यह विधि DNFB और DNS-CL दोनों से अलग है, जिसमें PITC व्युत्पन्न N-टर्मिनस की मुक्ति के लिए संपूर्ण हाइड्रोलिसिस के बजाय अम्ल हाइड्रोलिसिस की आवश्यकता होती है। इस अभिक्रिया को निर्जल अम्ल विलयन में या जलीय अम्ल विलयन में किया जा सकता है।

N-टर्मिनल विश्लेषण (एडमैन अपघटन) (N-terminal analysis (Edman degradation))

समग्र अमीनो अम्ल अवयव का निर्धारण और प्रत्येक पेप्टाइड के लिए अमीनो-(N-) टर्मिनल अवशेषों की पहचान पूरे अणु के अनुक्रम की स्वीकृति है। एडमैन द्वारा एक वैकल्पिक दृष्टिकोण का वर्णन किया गया था। यह पेप्टाइड पूरे प्रोटीन के विस्तारित अनुक्रमों के निर्धारण की स्वीकृति देता है, और वर्तमान दिन तक व्यापक रूप से उपयोग किया गया है। विधि अमीनो अम्ल अवशेषों को हटाने और पहचानने के लिए रासायनिक अभिक्रियाओं की एक श्रृंखला को नियोजित करती है जो कि पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला के N-टर्मिनस पर है, यानी एक स्वतंत्र-अमीनो समूह के साथ अवशेष। इसी समय, अनुक्रम में अगला अवशेष उपलब्ध होता है और रासायनिक अभिक्रियाओं के समान दौर के अधीन होता है। इस प्रक्रिया के वापसी होने से पॉलीपेप्टाइड के अनुक्रम का पता चलता है।

एडमैन रसायन विज्ञान द्वारा पेप्टाइड अनुक्रमण को निम्न चरणों में विभाजित किया जा सकता है जैसा कि चित्र 6.5 में दिखाया गया है।

तीनों चरणों का विवरण नीचे दिया गया है:

चरण 1: युग्मन: फेनिल आइसोथायोसाइनेट (PITC) पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला के N-टर्मिनल सिरे पर एक अमीनो समूह (या अमीनो समूह के साथ प्रोलिल अवशेष के मामले में) के साथ अभिक्रिया करता है, ताकि टर्मिनल अवशेषों में फेनिलथायोकार्बमिल व्युत्पन्न हो सके। इस अभिक्रिया के लिए मूल स्थिति आवश्यक है।

चरण 2 क्लिवेज: प्रबल अम्ल की उपस्थिति में, क्लिवेज पहले पेप्टाइड बंध पर होती है, पेप्टाइड (पहले अवशेष को घटाकर) और स्वतंत्र रूप से पहले अवशेष को अनिलिनोथियाजोलिनोन (ATA) के रूप में देता है। एक बार अन्य अभिकारकों और उत्पादों को धोया जाने के बाद, छोटा पॉलीपेप्टाइड युग्मन और क्लिवेज के दूसरे दौर के माध्यम से लिया जा सकता है ताकि दूसरा अवशेष मुक्त किया जा सके, और एक चक्रीय फैशन में। वर्तमान में, इस क्लिवेज अभिक्रिया के लिए ट्राइफ्लुओरोएसिटिक अम्ल (TFA) का उपयोग किया जाता है

चरण 3 रूपांतरण: ATZ अवशेष को कार्बनिक विलायक (एथिल एसिटेट या क्लोरोफॉर्म) में निष्कर्षण (extraction) द्वारा पेप्टाइड से अलग किया जाता है, और फिर बेहतर विश्लेषण के लिए इसे और अधिक स्थिर रूप में परिवर्तित किया जाता है। अधिक स्थिर फेनिलथायोहाइडेंटोइन (PTH) रूप में रूपांतरण जलीय अम्ल (25% TFA, v/v पानी में) में किया जाता है।

PTH अवशेषों का विश्लेषण (Analysis of PTH residues): एडमैन रसायन विज्ञान के प्रत्येक चक्र द्वारा उत्पन्न PTH अवशेषों की पहचान आमतौर पर वर्णलेखन (chromatography), मूल रूप से पतली परत वर्णलेखन (thin-layer chromatography) और बाद में उल्टी-प्रावस्था उच्च प्रदर्शन तरल वर्णलेखन (reversed-phase high-performance liquid chromatography) द्वारा की जाती है। बदले में प्रत्येक चक्र से प्राप्त PTH अमीनो अम्ल अवशेषों की पहचान की जाती है और मानकों की तुलना में मात्रा निर्धारित की जाती है, और अनुक्रम को N-से C-टर्मिनस तक अवशेषों के क्रम द्वारा वर्णित किया जाता है।

C-टर्मिनल अमीनो अम्ल का विश्लेषण (Analysis of C-terminal amino acids) :

पॉलीपेप्टाइड के C-टर्मिनल अवशेषों की पहचान के लिए विश्लेषण के कम तरीके उपलब्ध हैं। सबसे व्यापक रूप से उपयोग की जाने वाली विधियाँ नीचे वर्णित हैं:

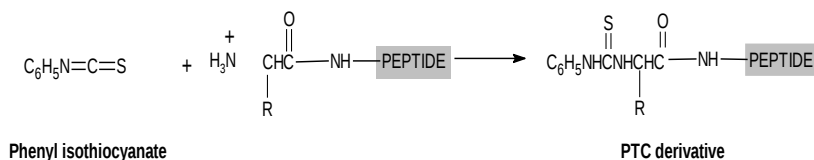
(क) **हाइड्रोजिनोलिसिस (Hydrazinolysis) :** प्रोटीन को 100°C पर निर्जल हाइड्रोजीन (H_2N-NH_2) के साथ संसाधित किया जाता है। इसलिए, पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला के सभी अमीनो अम्ल हाइड्रोजीन के साथ अभिक्रिया करते हैं और अमीनो अम्ल हाइड्रोजाइड में परिवर्तित हो जाते हैं। लेकिन, कार्बोक्सिल टर्मिनल से जुड़ा अमीनो अम्ल अभिक्रिया नहीं करता है और स्वतंत्र अमीनो अम्ल के रूप में रहता है। इस स्वतंत्र अमीनो अम्ल को वर्णलेखन विश्लेषण (इस पाठ्यक्रम के ब्लॉक I को देखें) द्वारा पृथक और पहचाना जा सकता है।

(ख) **लीथियम एल्युमीनियम हाइड्राइड ($LiAlH_4$) C-टर्मिनस का अपचयन :** प्रोटीन का विश्लेषण इस विधि द्वारा अपचयन की प्रक्रिया द्वारा किया जाता है। एक अलकोहल में पेप्टाइड श्रृंखला के अंत में स्वतंत्र α -अमीनो समूह का अपचयन $LiAlH_4$ द्वारा किया जाता है। इस अपचयन की प्रक्रिया को पूरा करने के बाद, प्रोटीन के बाह्य के अम्ल हाइड्रोलिसिस किया जाता है और एक एकल स्वतंत्र अलकोहल के साथ स्वतंत्र-अमीनो अम्ल प्राप्त किया जाता है। इस एकल स्वतंत्र अलकोहल ने C-टर्मिनल अवशेषों का दर्शाता है।

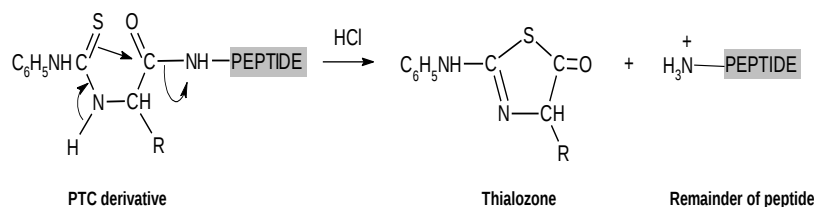
(ग) एंजाइमेटिक विश्लेषण या कार्बोक्सिपेप्टिडेज आधारित विश्लेषण (Enzymatic analysis or carboxypeptidase based analysis) :

प्रोटीन के C-टर्मिनस के विश्लेषण का सबसे और लोकप्रिय तरीका एंजाइमी विश्लेषण या कार्बोक्सिपेप्टाइडेज आधारित विश्लेषण है। एंजाइम कार्बोक्सिपेप्टाइडेज प्रोटीन के C-टर्मिनस से अमीनो अम्ल अवशेषों को क्रमबद्ध तरीके से हटाता है। प्रोटीन के C-टर्मिनस से स्वतंत्र अमीनो अम्ल को वर्णलेखन विश्लेषण द्वारा पृथक और पहचाना जा सकता है।

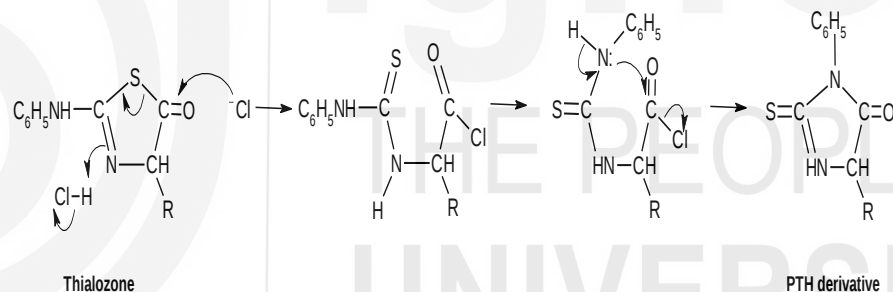
चरण 1: एक पेप्टाइड को फेनिलथायोकार्बामॉयल (PTC) व्युत्पन्न देने के लिए फेनिल I आइसोथायोसाइनेट से क्रिया किया जाता है।



चरण 2: निर्जल विलायक में हाइड्रोजन क्लोराइड के साथ अभिक्रिया पर, PTC व्युत्पन्न के थायोकार्बामॉयल सल्फर एन-छोर अमीनो अम्ल के कार्बामॉयल कार्बन पर हमला करते हैं। एन-छोर अमीनो अम्ल को पेप्टाइड के शेष से थियाजोलोन व्युत्पन्न के रूप में अलग किया जाता है।



चरण 3: एक बार बनने के बाद, थियाजोलोन व्युत्पन्न एक अधिक स्थिर फेनिलथायोहाइडेंटोइन (PTH) व्युत्पन्न के लिए समावयवित (isomerizes) होता है, जो पृथक किया गया और विशेषता रही है, जिससे एन-छोर अमीनो अम्ल की पहचान होती है। पेप्टाइड के शेष (चरण 2 में गठित) को अलग किया जा सकता है और एक दूसरे एडमैन अपघटन के अधीन किया जा सकता है।



चित्र 6.5 एडमैन के अपघटन के सभी चरणों का चित्रण

C-टर्मिनल विश्लेषण (कार्बोक्सिपेप्टाइडेज आधारित विधि)

कार्बोक्सिपेप्टाइडेज एंजाइम होते हैं जो क्रमिक रूप से पॉलीपेप्टाइड के C-टर्मिनी से अमीनो अम्ल के अवशेषों को तोड़ते हैं। चार कार्बोक्सिपेप्टाइडेज (ए, बी, सी, और वाई) सामान्य उपयोग में हैं। कार्बोक्सिपेप्टाइडेज A (बोवाइन अग्न्याशय से) प्रोलीन, आर्जिनिन और लाइसिन को छोड़कर सभी अवशेषों के C-टर्मिनल पेप्टाइड बंध को हाइड्रोलाइज करते हैं। कार्बोक्सिपेप्टाइडेज बी तभी प्रभावी होता है जब आर्जिनिन या लाइसिन अवशेष C-टर्मिनल पर स्थित हो। इस प्रकार, कार्बोक्सिपेप्टाइडेज ए और बी का मिश्रण प्रोलीन को छोड़कर किसी भी C-टर्मिनल अमीनो अम्ल को अलग करता है। निम्बू-वंश के पत्तों से कार्बोक्सिपेप्टाइडेज सी और यीस्ट से कार्बोक्सिपेप्टिडेस वाई किसी भी C-टर्मिनल अवशेषों पर क्रिया करता है (तालिक -6.1)।

तालिका— 6.1 स्रोत और कार्बोक्सिपेप्टाइडेज की विशिष्टता

किण्वक	स्रोत	विशेषता
कार्बोक्सीपेप्टिडेज A	बोवीन पेनक्रियाज	$R_n \neq \text{Arg, Lys, Pro}; R_{n-1} \neq \text{Pro}$
कार्बोक्सीपेप्टिडेज B	बोवीन पेनक्रियाज	$R_n \neq \text{Arg, Lys}, R_{n-1} \neq \text{Pro}$
कार्बोक्सीपेप्टिडेज C	सर्कस लीव्ज	All free C-terminal residues; pH optimum = 3.5
कार्बोक्सीपेप्टिडेज Y	यीस्ट	All free C-terminal residues, but slowly with $R_n = \text{Gly}$

कई कार्बोक्सिपेप्टाइडेज एंजाइमों में से एक द्वारा एंजाइमेटिक C-टर्मिनल अमीनो अम्ल क्लीवेज विश्लेषण का तीव्र और उचित तरीका है। क्योंकि छोटा पेप्टाइड उत्पाद भी एंजाइमी क्लीवेज के अधीन है, अभिक्रिया की स्थितियों को नियंत्रित करने के लिए ध्यान देना चाहिए ताकि क्रमिक दरार के उत्पादों की सही निगरानी हो सके। निम्नलिखित उदाहरण इस विशेषता को दिखाता है C-टर्मिनल अनुक्रम वाले पेप्टाइड: ग्लाइसिन-सेरीन-ल्यूसिन को कार्बोक्सिपेप्टाइडेज क्लीवेज के अधीन किया जाता है, और इस अभिक्रिया में स्वतंत्र अमीनो अम्ल का विश्लेषण बढ़ते समय अंतराल पर किया जाता है। ल्यूसिन को पहले, सेरीन दूसरे और ग्लाइसिन तीसरे, जैसा कि अनुक्रमिक विश्लेषण द्वारा प्रदर्शित किया गया है।

महत्व

प्रोटीन अनुक्रमण (संपूर्ण N-टर्मिनल और C-टर्मिनल विश्लेषण) सबसे महत्वपूर्ण जानकारी देता है। इस आकड़ों का उदाहरण नीचे दिया गया है:

- एक प्रोटीन के अनुक्रम की जानकारी इसकी कार्यविधि को समझने में बहुत आवश्यक है।
- प्रोटीन की त्रि-आयामी संरचना को अमीनो अम्ल अनुक्रम की जानकारी द्वारा समझाया गया है।
- अमीनो अम्ल अनुक्रम RNA में आनुवंशिक संदेश और त्रि-आयामी संरचना के बीच एक संबंध प्रदान करता है जो प्रोटीन जैविक कार्य करता है।
- अमीनो अम्ल अनुक्रम निर्धारण आणविक रोगविज्ञान का एक अनिवार्य हिस्सा है। अमीनो अम्ल अनुक्रम में परिवर्तन प्रोटीन के असामान्य कार्य का उत्पादन कर सकता है और इसके परिणामस्वरूप रोग का विकास हो सकता है, जैसे सिकल सेल एनीमिया और सिस्टिक फाइब्रोसिस।
- विकासमूलक इतिहास भी प्रोटीन अनुक्रमण द्वारा निर्धारित किया जाता है। प्रोटीन अन्य अमीनो अम्ल अनुक्रम से मिलता जुलता है, यदि उनके पास एक सामान्य पूर्वज है। इसलिए क्रमिक विकास में आणविक घटनाओं को अमीनो अम्ल अनुक्रमों से पता लगाया जा सकता है।

बोध प्रश्न 1

1. प्रोटीन अनुक्रमण क्या है?
2. प्रोटीन अनुक्रमण का आविष्कार करने वाला पहला वैज्ञानिक कौन है?
3. N-टर्मिनल और C-टर्मिनल विश्लेषण का अर्थ क्या है?
4. संकेत दें कि निम्नलिखित कथन सही हैं या गलत:
 - i. प्रोटीन को 100°C पर निर्जल हाइड्रोजन ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$) के साथ उपचारित किया जाता है। इसलिए, पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला के सभी अमीनो अम्ल हाइड्रोजन के साथ अभिक्रिया करते हैं और अमीनो अम्ल हाइड्रोजाइड में परिवर्तित हो जाते हैं।
 - ii. अलकोहल में पेप्टाइड श्रृंखला के अंत में मुक्त α -अमीनो समूह का अपचयन LiAlH_4 द्वारा की जाती है।
 - iii. प्रोटीन के C-टर्मिनस के विश्लेषण का सबसे आधुनिक और लोकप्रिय तरीका एंजाइमी विश्लेषण या कार्बोक्सिपेप्टाइडेज आधारित विश्लेषण है।
 - iv. कार्बोक्सिपेप्टाइडेज ए (बोवाइन अग्न्याशय से) प्रोलिन, आर्जिनिन और लाइसिन को छोड़कर सभी अवशेषों के C-टर्मिनल पेप्टाइड बंध को हाइड्रोलाइज करने के लिए अच्छी तरह से काम करता है।

6.3 खंडित प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला की उत्पत्ति

अब तक हमने सेंगर, एडमैन और कार्बोक्सिपेप्टाइडेज आधारित प्रोटीन अनुक्रमण के बारे में अध्ययन किया है। इकाई के इस भाग में आप प्रोटीन के टुकड़ों के निर्माण के लिए उपयोग किए जाने वाले विभिन्न तरीकों के बारे में अध्ययन करेंगे।

6.3.1 प्रस्तावना

प्रोटीन के विश्लेषण के दौरान, कई परिस्थितियां आती हैं जो पेप्टाइड के टुकड़ों में प्रोटीन को क्लीव करने की गुण होती है। प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड, जिसमें 40 से 100 से अधिक अमीनो अम्ल होते हैं, को सीधे आगे के तरीके से अनुक्रमित नहीं किया जा सकता है। प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड्स के क्लीवेज की आवश्यकता होती है, ऐसे क्लीवेज में प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के टुकड़े उत्पन्न होते हैं, जिनमें अमीनो अम्ल की संख्या कम होती है। प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड की तुलना में इन टुकड़ों में अमीनो अम्ल की संख्या हमेशा कम होती है, जिससे ये टुकड़े उत्पन्न होते हैं। पूरी प्रक्रिया को प्रोटीन के विखंडन या प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के टुकड़े के उत्पादन के रूप में जाना जाता है।

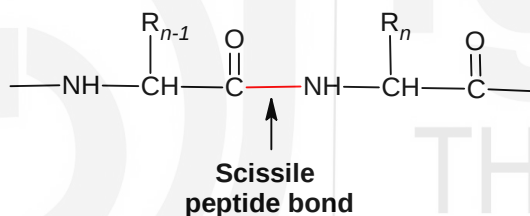
प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के टुकड़े को एंजाइमी क्लीवेज या मूल प्रोटीन के रासायन द्वारा उत्पादित किया जा सकता है। एंजाइमेटिक तरीकों में अधिक

सामान्य अमीनो अम्ल के निकट क्लीव करने की प्रवृत्ति होती है। इस संबंध में, ये विधियां एक प्रोटीन से 50 या अधिक पेप्टाइड का उत्पादन करती हैं। रासायनिक विधियों से बड़े टुकड़े उत्पन्न होने की संभावना है। ये विधियां कम सामान्य अमीनो अम्ल में क्लीवेज को क्रियान्वित करती हैं और दो या तीन बड़े पेप्टाइड का उत्पादन करती हैं।

6.3.2 प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के खंड की एंजाइम आधारित उत्पत्ति

प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के खंडों की उत्पत्ति के लिए कई विशिष्ट एंजाइमों का उपयोग किया जाता है। ये एंजाइम प्रोटीएज हैं, जिन्हें आगे एंडोपेप्टाइडेज और एक्सोपेप्टाइडेज में विभाजित किया गया है। एंडोपेप्टाइडेज वे एंजाइम होते हैं जो आंतरिक पेप्टाइड बंध के हाइड्रोलिसिस को उत्प्रेरित करते हैं। एक्सोपेप्टाइडेज वे एंजाइम होते हैं जो N या C-टर्मिनल अमीनो अम्ल अवशेषों के हाइड्रोलिसिस को उत्प्रेरित करते हैं (प्रति छोर)।

एक्सोपेप्टाइडेज और एंडोपेप्टाइडेज उनकी क्रिया के लिए बहुत विशिष्ट हैं। वे उस बंध पर क्रिया करते हैं जिसे विशिष्ट अमीनो अम्ल अवशेषों के साथ क्लीव और प्लैकिंग किया जाना है। इस बंध को कैची पेप्टाइड बंध के रूप में जाना जाता है (चित्र-6.6)।



चित्र-6.6 एक प्रोटीन का कैची पेप्टाइड बंध।

यहां, विशिष्टता का अर्थ अमीनो अम्ल अवशेषों के संदर्भ में है जो प्रोटीएज (एंडोपेप्टाइडेज और एक्सोपेप्टाइडेज) द्वारा मान्यता प्राप्त हैं और उनकी उपस्थिति प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड्स में आवश्यक है। प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड में इन अमीनो अम्ल अवशेषों की उपस्थिति के बिना, एंडोपेप्टाइडेज और एक्सोपेप्टाइडेज द्वारा कोई क्रिया नहीं की जाती है।

एंडोपेप्टाइडेज (Endopeptidases)

कई एंडोपेप्टाइडेज का उपयोग प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के टुकड़ों के उत्पत्ति के लिए किया जाता है। ट्रिप्सिन, काइमोट्रिप्सिन, इलास्टेज, पेप्सिन, थर्मोलाइसिन और एंडोपेप्टाइडेज हैं। इन एंजाइमों के बारे में अधिक जानने के लिए तालिका 6.2 का सन्दर्भ लें।

तालिका 6.2: स्रोत और एंडोपेप्टाइडेज की विशिष्टता

किण्वक	स्रोत	विशेषता	टिप्पणी
ट्रिप्सिन	बोवीन पेनक्रियाज	R_{n-1} = positively charged residues: Arg, Lys; $R_n \neq$ Pro	Highly specific
काइमोट्रिप्सिन	बोवीन पेनक्रियाज	R_{n-1} = bulky hydrophobic residues: Phe, trp, Tyr; $R_n \neq$ Pro	Cleave more slowly for R_{n-1} = Asn, His, Met, Leu
इलास्टेज	बोवीन पेनक्रियाज	R_{n-1} = small neutral residues: Ala, Gly, Ser, Val; $R_n \neq$ Pro	
थर्मोलाइसिन	बेकीलस थर्मोप्रोटोलाइटिक्स	R_n = Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, val; $R_{n-1} \neq$ Pro	Occasionally cleave at R_n = Ala, Asp, His, Thr: heat stable
पेप्सिन	बोवीन गैस्ट्रिक मुकोसा	R_n = Leu, Phe, Trp, Tyr; $R_{n-1} \neq$ Pro	Also others; quite nonspecific; pH optimum = 2
एंडोपेप्टाइडेज	स्टेफिलोकोकस ऑरस	R_{n-1} = Glu	

एक्सोपेप्टाइडेज (Exopeptidases)

एक्सोपेप्टाइडेज का उपयोग प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के टुकड़े की उत्पत्ति के लिए भी किया जाता है। ल्यूसिन अमीनो पेप्टाइडेज N-टर्मिनल अमीनो अम्ल ल्यूसिन को क्लीव करता है और N-टर्मिनल पर स्थित प्रोलीन को क्लीव नहीं करता है। अमीनो पेप्टाइडेज एम सभी N-टर्मिनल अवशेषों को क्लीव करता है। कार्बोक्सिपेप्टाइडेज ए, आर्जिनीन, लाइसिन और प्रोलीन को छोड़कर सभी N-टर्मिनल अवशेषों को क्लीव करता है। कार्बोक्सिपेप्टाइडेज बी अगले अवशेष के रूप में प्रोलीन की अनुपस्थिति की स्थिति में C-टर्मिनल आर्जिनीन और लाइसिन को क्लीव करता है। कार्बोक्सिपेप्टाइडेज सी क्लीव C-टर्मिनल अवशेष।

6.3.3 रासायनिक यौगिकों और अभिकर्मकों पर आधारित प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के खंड की उत्पत्ति

प्रोटियोलिसिस के कई उच्च विशिष्ट रासायनिक तरीके उपलब्ध हैं, सबसे व्यापक रूप से सायनोजेन ब्रोमाइड (CNBr) क्लीवेज का उपयोग किया जाता है। CNBr मेथिओनिन अवशेषों पर क्रिया करता है। कई अन्य रासायनिक विधियां पॉलीपेप्टाइड का विशिष्ट

विखंडन देती हैं, जिसमें pH 9 में हाइड्रॉक्सिल अमीन (NH_2OH) द्वारा ऐस्पेराजीन-ग्लाइसिन बंध पर क्लीवेज और हल्के अम्लीय परिस्थितियों में एस्पार्टिल-प्रोलिल बंधों में चयनात्मक हाइड्रोलिसिस शामिल हैं (तालिका 6.3)।

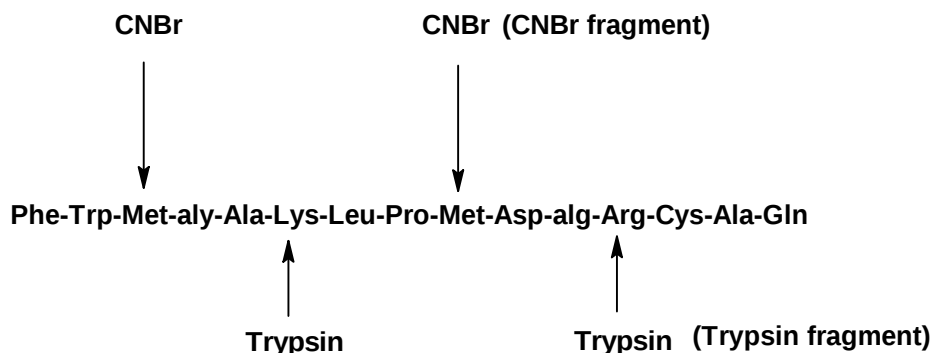
तालिका 6.3 पॉलीपेप्टाइड क्लीवेज के लिए यहां वर्णित विभिन्न प्रक्रियाओं का सारांशित दृश्य।

रासायनिक यौगिक	क्लीवेज साइट
BNPS स्कैटोल	ट्रिप्टोफैन अवशेषों का C-टर्मिनल पक्ष
एन- ब्रोमोसक्सिनिमाइड	
o- आयोडोसोबेन्जोएट	
सायनोजेन ब्रोमाइड	मेथियोनिन अवशेषों का C-टर्मिनल पक्ष
हाइड्रॉक्सिलअमीन	ऐस्पेराजीन-ग्लाइसिन बंध
2-नाइट्रो-5-थायोसायनोबेन्जोएट	सिस्टीन अवशेषों का N-टर्मिनल पक्ष

6.3.4 अतिच्छादी पेप्टाइड

प्रोटीन के प्राथमिक अनुक्रम के निर्धारण में, एंजाइमैटिक और या रासायनिक जैसे तरीकों का व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है। ऐसा करने से अतिच्छादी पेप्टाइड (Overlapping peptide) प्राप्त किया जा सकता है। यह पॉलीपेप्टाइड में विभिन्न साइटों पर विभिन्न एजेंटों की विशिष्ट क्रिया के कारण है। अमीनो अम्ल अनुक्रम का निर्धारण करने में अतिच्छादी पेप्टाइड बहुत उपयोगी होते हैं। अतिच्छादी पेप्टाइडेज या प्रोटीन के खंडों के दो सेट ट्रिप्सिन का उपयोग करके इसके आर्जिनीन या लाइसिन अवशेषों को पॉलीपेप्टाइड को क्लीव करने के लिए किए जाते हैं और एक अलग अभिक्रिया में, CNBr का उपयोग करके इसके सभी मेथियोनिन अवशेष को छोड़ देते हैं (चित्र -6.7)।

प्रोटीन के प्राथमिक अनुक्रम के निर्धारण में, एंजाइमैटिक और या रासायनिक जैसे तरीकों का व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है। ऐसा करने से अतिच्छादी पेप्टाइड (Overlapping peptide) प्राप्त किया जा सकता है। यह पॉलीपेप्टाइड में विभिन्न साइटों पर विभिन्न एजेंटों की विशिष्ट क्रिया के कारण है। अमीनो अम्ल अनुक्रम का निर्धारण करने में अतिच्छादी पेप्टाइड बहुत उपयोगी होते हैं। अतिच्छादी पेप्टाइडेज या प्रोटीन के खंडों के दो सेट ट्रिप्सिन का उपयोग करके इसके आर्जिनीन या लाइसिन अवशेषों को पॉलीपेप्टाइड को क्लीव करने के लिए किए जाते हैं और एक अलग अभिक्रिया में, CNBr का उपयोग करके इसके सभी मेथियोनिन अवशेष को छोड़ देते हैं (चित्र -6.7)।



चित्र -6.7 CNBr और ट्रिप्सिन उपचारित प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड द्वारा अतिच्छादी पेप्टाइड का उत्पादन

बोध प्रश्न 2

1. एकसोपेप्टाइडेज और एंडोपेप्टाइडेज को परिभाषित करें?
2. एंडोपेप्टाइडेज के तीन उदाहरण दीजिए?
3. कैंची बंध (scissile bond) क्या है?
4. संकेत दें कि निम्नलिखित कथन सही हैं या गलत:
 - i. ट्रिप्सिन, काइमोट्रिप्सिन और पेप्सिन पाचन एंजाइम होते हैं।
 - ii. एकसोपेप्टाइडेज और एंडोपेप्टाइडेज उनकी क्रिया के लिए विशिष्ट नहीं हैं।
 - iii. प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड जिसमें 40 से 100 से अधिक अमीनो अम्ल होते हैं, उन्हें सरल तरीके से अनुक्रमित नहीं किया जा सकता है।
 - iv. एंडोपेप्टाइडेज ट8 बोवाइन अग्नाशय से उत्पादित होता है।
 - v. पेप्सिन का उत्पादन बोवाइन आमाशय श्लेष्मल झिल्ली (gastric mucosa) से होता है।

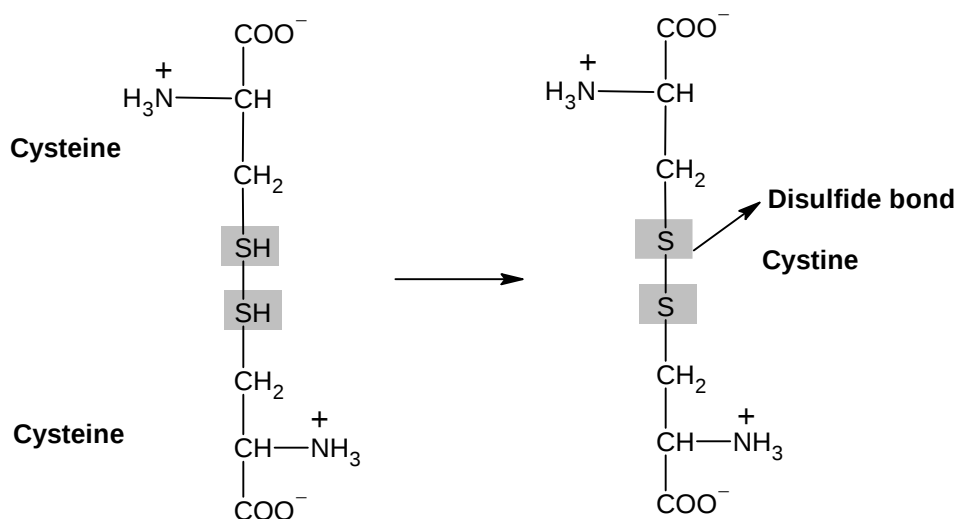
6.4 डाइसल्फाइड बंध और उसकी अवस्थिति

अब तक हमने प्रोटीन के विखंडन के एंजाइमेटिक और रासायनिक तरीकों का अन्वेषण किया है। इस खंड में हम डाइसल्फाइड बंध की पहचान करने और प्रोटीन अनुक्रमण के संबंध में इसे तोड़ने की आवश्यकता के बारे में जानेंगे।

6.4.1 डाइसल्फाइड बंध (Disulfide bond)

डाइसल्फाइड बंध एक सहसंयोजक बंध है। एक डाइसल्फाइड ($-S-S-$) दो सिस्टीन अवशेषों के सल्फहाइड्रिल समूहों ($-SH$) द्वारा निर्मित होता है। प्रोटीन में डाइसल्फाइड बंध के गठन के बाद, दो सिस्टीन अवशेषों को सिस्टीन में बदल दिया जाता है (चित्र-6.8)। डाइसल्फाइड बंध एक एकल पेप्टाइड श्रृंखला के साथ-साथ विभिन्न

पॉलीपेटाइड श्रृंखलाओं के बीच में बनता है। डाइसल्फाइड बंध प्रोटीन के संरचनात्मक रचना और स्थिरता के लिए जिम्मेदार है (BBCCT-101 के इकाई -4 का संदर्भ लें)।



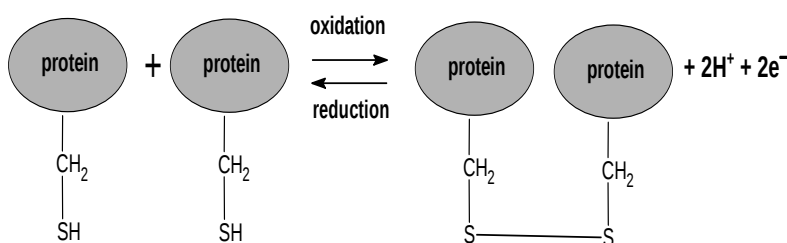
चित्र- 6.8 दो सिस्टीन अवशेष डाइसल्फाइड बंध के माध्यम से एक साथ जुड़ते हैं और एक सिस्टीन अणु बनाते हैं।

6.4.2 डाइसल्फाइड बंध का गठन

डाइसल्फाइड बंध दो सिस्टीन अवशेषों के बीच थायोल समूहों ($-\text{SH}$) के ऑक्सीकरण द्वारा बनते हैं। प्रोटीन में डाइसल्फाइड बंध गठन एक प्रकार का सहसंयोजक संशोधन है। यह एक उत्क्रमणीय प्रक्रिया (reversible process) है। डाइसल्फाइड बंध के गठन के लिए ऑक्सीकरण की आवश्यकता होती है और अपचयन अभिक्रिया इस बंध को तोड़ने के लिए जिम्मेदार है (चित्र-6.9)। ऑक्सीकरण अभिक्रिया एक ही प्रोटीन (अंतः-आणविक) के भीतर या विभिन्न प्रोटीन (अंतर-आणविक) के भीतर की जाती है।

अंतः आणविक डाइसल्फाइड अनुबद्ध प्रोटीन राइबोन्यूक्लियोज, इंसुलिन, लाइसोजाइम आदि होते हैं जबकि अंतर-आणविक डाइसल्फाइड अनुबद्ध प्रोटीन एंटीबॉडी की हल्की और भारी श्रृंखलाएं होती हैं। बाह्य कोशिकीय प्रोटीन आमतौर पर डाइसल्फाइड-अनुबद्ध होते हैं क्योंकि कोशिकाविलेय (cytosol) के अंदर की स्थिति कम हो रही है और यह सिस्टीन के अस्तित्व के लिए एक आवश्यक स्थिति है। बाह्य कोशिकीय प्रोटीन के कुछ उदाहरण क्षारीय फॉस्फेटेज, hGH (मानव वृद्धि हॉर्मोन), ग्लूकोज -1 फॉस्फेटेज, IGF-I (इंटरफेरॉन जैसे वृद्धि कारक I), BPTI (बोवाइन अग्नाशयी ट्रिप्सिन अवरोधक और ऊतक प्लाज्मिनोजेन उत्प्रेरक) हैं। उचित और त्रुटि मुक्त डाइसल्फाइड बंध गठन को कोशिकीय एंजाइमों जैसे प्रोटीन डाइसल्फाइड आइसोमरेजेज द्वारा सहायता प्रदान की जाती है। बहुत अधिक प्रचुर मात्रा में कोशिकीय प्रोटीन डाइसल्फाइड-अनुबद्ध होते हैं।

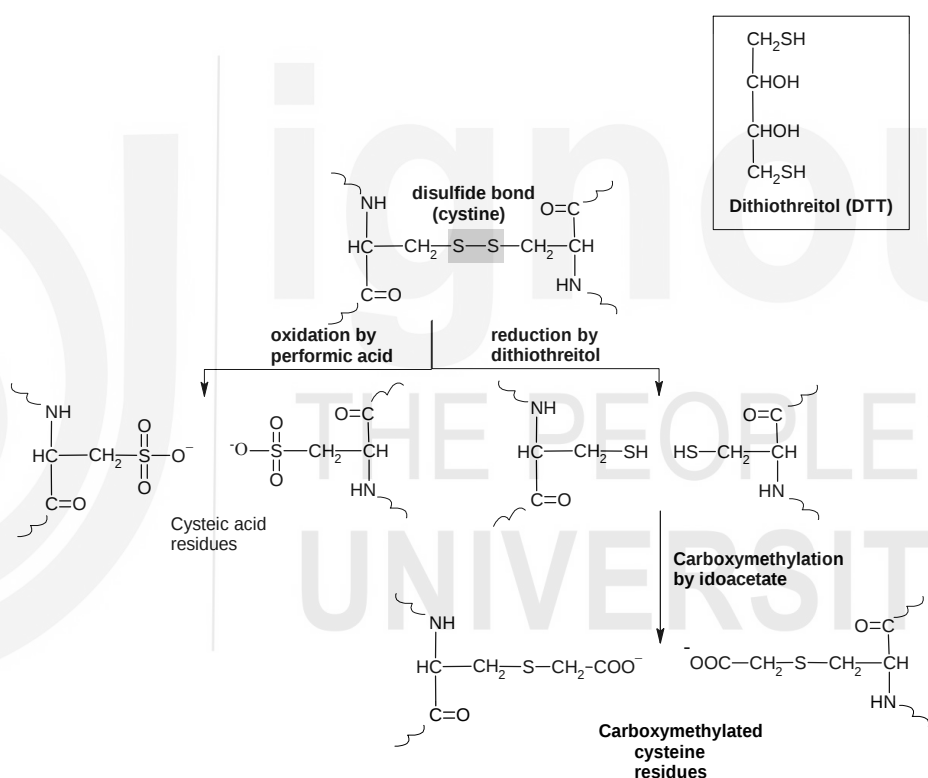
The disulfide bond



चित्र— 6.9 डाइसल्फाइड बंध गठन ऑक्सीकरण प्रक्रिया के माध्यम से होता है।

6.4.3 डाइसल्फाइड बंध का निर्धारण

प्रोटीन अनुक्रम विश्लेषण में, डाइसल्फाइड बंध की अवस्थिति और संख्या को निर्धारित करना महत्वपूर्ण है। मूल प्रोटीन (यानी पूर्ण डाइसल्फाइड सेतु के साथ) को कई छोटे पेप्टाइड का उत्पादन करने के लिए प्रोटीयोलिटिक एंजाइम (जैसे ट्रिप्सिन) से क्लीव किया जाता है। इन प्रक्रियात्मक चरणों के बाद, प्रोटीन के उचित अनुक्रमण के लिए डाइसल्फाइड बंधों को तोड़ना आवश्यक है। यह तोड़ने की प्रक्रिया परफॉर्मिक अम्ल, 2-मर्केप्टोएथेनॉल और DTT (डाइथायोथ्रीटोल) द्वारा की जाती है। परिणामस्वरूप स्वतंत्र सल्फीड्रिल समूह तब ऑक्सीजन द्वारा ऑक्सीकरण के माध्यम से डाइसल्फाइड बंधों को फिर से बनने से रोकने के लिए आमतौर पर आयोडोएसिटेट (ICH_2COOH) के साथ उपचार द्वारा अल्काइलेट किया जाता है। पूरी प्रक्रिया को चित्र 6.10 में दर्शाया गया है। अब, पॉलीपेप्टाइड के पृथक्करण और अनुक्रमण को किर्यान्वित किया जाता है।



चित्र— 6.10 डाइसल्फाइड बंध गठन ऑक्सीकरण प्रक्रिया के माध्यम से होता है।

डाइसल्फाइड बंध का महत्व (Significance of disulfide bond)

प्रोटीन और पेप्टाइड की मूल संरचनाओं का स्थिरीकरण कई प्रकार के अंतः क्रियाओं (interactions) द्वारा किया जाता है। इन अंतः क्रियाओं को प्रत्यक्ष या अप्रत्यक्ष रूप से अणु के वलन (folding), रचना (conformation) और लोच (flexibility) के लिए जिम्मेदार बताया जाता है। इन अंतः क्रियाओं में से अधिकांश, उदाहरण के लिए हाइड्रोजन बंध और हाइड्रोफोबिक अंतः क्रियाएं गैर-सहसंयोजक और अपेक्षाकृत नाजुक हैं। दूसरे पक्ष में, सहसंयोजक अंतःक्रिया आमतौर पर मजबूत होती है। ये अंतःक्रिया मुख्य रूप से पेप्टाइड में स्थिरता और रचना पर एक बड़ा प्रभाव लागू करने के लिए उत्तरदायी हैं, जिनके छोटे आकार के कारण कम और कमजोर हाइड्रोफोबिक अंतःक्रिया करने की

प्रवृत्ति होती है। एक सहसंयोजक अंतःक्रिया का सबसे व्यापक चित्रण डाइसल्फाइड बंध है।

प्रोटीन में डाइसल्फाइड बंध की विभिन्न महत्वपूर्ण भूमिकाएँ हैं। इनमें से कुछ नीचे वर्णित हैं:

1. सामान्य महत्व के तहत, प्रोटीन के ऊष्मागतिकीय (thermodynamic) स्थिरता बढ़ाने के लिए डाइसल्फाइड बंध उत्तरदायी होते हैं। यह ऊष्मागतिकीय स्थिरता उन्हें बाह्य कोशिकीय वातावरण में विकृतीकरण और अपघटन के प्रति कम संवेदनशील बनाती है और साथ ही तापमान और pH के चरम सीमाओं के खिलाफ अधिक प्रतिरोध (resistance) प्रदान करती है।
2. डाइसल्फाइड एंजाइम की उत्प्रेरक भूमिका में भी भाग लेता है। यह भूमिका थायोरेडॉक्सिन जैसे एंजाइम में दिखाई देती है। थायोरेडॉक्सिन में, यह अपने पूँछ समूहों के ऑक्सीकरण स्थिति के माध्यम से कोशिकीय रेडॉक्स संवेदक के रूप में कार्य करता है।
3. प्रोटीन में कई डाइसल्फाइड में कोई प्रत्यक्ष कार्यात्मक भूमिका शामिल नहीं है, कुछ हद तक उनका प्रमुख लक्ष्य प्रोटीन के संरचना को संरक्षित करना है। निश्चित मामलों में, संरचनात्मक परिवर्तन इन बंधों के अपचयन और ऑक्सीकरण से जुड़े होते हैं जो प्रोटीन को विविध गतिविधियों या कार्यों के बीच ले जाने (shuttle) की अनुमति देते हैं।

बोध प्रश्न 3

1. प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड में डाइसल्फाइड बंध को परिभाषित करें?
2. डाइसल्फाइड बंध बनाने के लिए कौन सा अमीनो अम्ल जिम्मेदार है?
3. दो रासायनिक यौगिकों का नाम बताइए जो प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड में डाइसल्फाइड को अपचयित करने के लिए उपयोग किए जाते हैं?
4. संकेत दें कि निम्नलिखित कथन सही हैं या गलत:
 - i. डाइसल्फाइड बंध का क्लीवेज 2-मर्केप्टोएथेनॉल द्वारा किया जा सकता है।
 - ii. आयोडोएसिटेट का उपयोग डाइसल्फाइड बंधों के पुनः बनने से रोकने के लिए किया जाता है।
 - iii. मेथियोनीन प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड में डाइसल्फाइड बंध को बनाने के लिए जिम्मेदार है।
 - iv. अमीनो अम्ल युक्त सभी सल्फर प्रोटीन या पेप्टाइड में डाइसल्फाइड बंध बनाने के लिए जिम्मेदार होते हैं।

6.5 सारांश

- प्रोटीन अनुक्रमण एक विधि या दृष्टिकोण या तकनीक है जो प्रोटीन के अमीनो अम्ल अनुक्रम को स्थापित करने के लिए लागू किया जाता है। एक प्रोटीन का अमीनो अम्ल अनुक्रम (जिसे प्राथमिक संरचना भी कहा जाता है) प्रोटीन श्रृंखला में अमीनो अम्ल का क्रम है।
- सेंगर की पहली सफलता क्रमशः 1952 और 1951 में बोवाइन इंसुलिन, ए और बी के दो पॉलीपेप्टाइड श्रृंखलाओं के पूर्ण अनुक्रम को निर्धारित करना था। इससे पहले यह व्यापक रूप से माना जाता था कि प्रोटीन कुछ अनाकार (amorphous) थे।
- इन अनुक्रमों को निर्धारित करने में, सेंगर ने साबित किया कि प्रोटीन में एक निश्चित रासायनिक संरचना है। 1958 में, उन्हें विशेष रूप से इंसुलिन की प्रोटीन की संरचना पर उनके काम के लिए 'रसायन विज्ञान' में नोबेल पुरस्कार दिया गया। प्रोटीन संरचना के N-टर्मिनल पक्ष से अमीनो अम्ल अनुक्रमण N-टर्मिनल विश्लेषण के रूप में जाना जाता है। इसी तरह, प्रोटीन संरचना के C-टर्मिनल पक्ष से अनुक्रमण को C-टर्मिनल विश्लेषण माना जाता है।
- N-टर्मिनल पर अमीनो अम्ल अवशेषों को कई तरीकों से पहचाना जा सकता है। तीन व्यापक रूप से उपयोग किए जाने वाले N-टर्मिनल कार्य-प्रणाली हैं: 2,4-डाइनाइट्रोफ्लोरोबेंजीन (DNFB) विधि, 1-डाइमेथिलअमीनो नेफ्थलीन सल्फोनील क्लोराइड (डेंसिल क्लोराइड; DNS-CL) विधि और फेनिलिसोथायोसाइनेट (PITC) विधि या एडमैन अपघटन विधि।
- पॉलीपेप्टाइड के C-टर्मिनल अवशेषों की पहचान के लिए विश्लेषण के कम तरीके उपलब्ध हैं। सबसे व्यापक रूप से इस्तेमाल की जाने वाली विधियां हाइड्रोजिनोलिसिस और LiAlH_4 (लिथियम एल्यूमीनियम हाइड्राइड) C-टर्मिनस का अपचयन हैं। समग्र अमीनो अम्ल पदार्थ का निर्धारण और प्रत्येक पेप्टाइड के लिए अमीनो - (N-) टर्मिनल अवशेषों की पहचान ने पूरे अणु के अनुक्रम में कटौती की अनुमति दी।
- एक वैकल्पिक दृष्टिकोण था कि एडमैन द्वारा वर्णित है। यह पेप्टाइड या पूरे प्रोटीन के विस्तारित अनुक्रमों के निर्धारण की अनुमति दी है, और व्यापक रूप से वर्तमान दिन तक इस्तेमाल किया गया है।
- विधि अमीनो अम्ल अवशेषों को हटाने और पहचानने के लिए रासायनिक अभिक्रियाओं की एक श्रृंखला को नियोजित करती है जो कि पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला के N-टर्मिनस पर है, यानी अवशेष एक स्वतंत्र ए-अमीनो समूह के साथ। साथ ही, अनुक्रम में अगले अवशेष उपलब्ध कराए जाते हैं और रासायनिक अभिक्रियाओं के उसी क्रम के अधीन होते हैं।
- कार्बोक्सिपेप्टाइडेज C-टर्मिनल से अमीनो अम्ल अवशेषों को विरलित (trimming) करने के लिए अपनी उत्प्रेरक गतिविधि के लिए अच्छी तरह से जाना जाता है। सुपरिचित कार्बोक्सिपेप्टाइडेज चार की संख्या में हैं जैसे: ए, बी, सी, और वाई। कार्बोक्सिपेप्टाइडेज ए (बोवाइन अग्न्याशय से) प्रोलिन, आर्जिनिन और लाइसिन को छोड़कर सभी अवशेषों के C-टर्मिनल पेप्टाइड बंध को हाइड्रोलाइज करता

है। मूल प्रोटीन के रासायनिक या एंजाइमीय क्लीवेज द्वारा प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड के टुकड़े का उत्पादन किया जा सकता है।

- रासायनिक विधियों से बड़े टुकड़े बनने की संभावना है। ये विधियां कम सामान्य अमीनो अम्ल में क्लीवेज को क्रियान्वित करती हैं और दो या तीन बड़े पेप्टाइड का उत्पादन करती हैं।
- एंजाइमेटिक विधियों में अधिक सामान्य अमीनो अम्ल के निकट क्लीव करने की प्रवृत्ति होती है। इस संबंध में, ये विधियां एक प्रोटीन से 50 या अधिक पेप्टाइड का उत्पादन करती हैं। डाइसल्फाइड बंध एक सहसंयोजक बंध है। एक डाइसल्फाइड (-S-S-) दो सिस्टीन अवशेषों के सल्फीड्रिल समूहों (-SH) द्वारा निर्मित होता है। प्रोटीन में डाइसल्फाइड बंध के गठन के बाद, दो सिस्टीन (cysteine) अवशेषों को सिस्टीन (cystine) में बदल दिया जाता है।
- डाइसल्फाइड बंध एक एकल पेप्टाइड श्रृंखला के साथ-साथ विभिन्न पॉलीपेप्टाइड श्रृंखलाओं के बीच में बनता है। डाइसल्फाइड बंध प्रोटीन के संरचनात्मक संरचना और स्थिरता के लिए जिम्मेदार है। प्रोटीन अनुक्रम विश्लेषण में, यह डाइसल्फाइड बंधों की स्थिति और संख्या को निर्धारित किया है। मूल प्रोटीन (यानी पूर्ण डाइसल्फाइड बंध) को कई छोटे पेप्टाइड का उत्पादन करने के लिए प्रोटियोलिटिक एंजाइम (जैसे ट्रिप्सिन) से क्लीव किया जाता है। इन प्रक्रियात्मक चरणों के बाद, प्रोटीन के वास्तविक अनुक्रमण के लिए डाइसल्फाइड बंधों को तोड़ना आवश्यक है। यह तोड़ने की प्रक्रिया परफॉर्मिक अम्ल, 2- मर्कप्टोएथेनॉल और DTT (डाइथायोथ्रीटोल) द्वारा की जाती है। जिसके परिणामस्वरूप स्वतंत्र-सल्फीड्रिल समूहों को ऑक्सीजन द्वारा ऑक्सीकरण के माध्यम से डाइसल्फाइड बंध के पुनः बनने से रोकने के लिए आयोडोएसिटेट (ICH₂COOH) के साथ उपचार द्वारा क्षारित किया जाता है।

6.6 अंत में कुछ प्रश्न

1. प्रोटीन अनुक्रमण पर विस्तृत चर्चा करें और N-टर्मिनल और C-टर्मिनल विश्लेषण को स्पष्ट करें।
2. एडमैन अपघटन विधियों के सभी चरणों पर चर्चा करें।
3. प्रोटीन के C-टर्मिनल विश्लेषण पर आधारित कार्बोक्सिपेप्टाइडेज में शामिल चरणों का चित्रण करें।
4. प्रोटीन अनुक्रमण का महत्व लिखिए।

6.7 उत्तर

बोध प्रश्न 1

1. प्रोटीन अनुक्रमण एक विधि या दृष्टिकोण या तकनीक है जो प्रोटीन के अमीनो अम्ल अनुक्रम को स्थापित करने के लिए लागू किया जाता है। एक प्रोटीन का अमीनो

अम्ल अनुक्रम (जिसे प्राथमिक संरचना भी कहा जाता है) प्रोटीन श्रृंखला में अमीनो अम्ल का क्रम है।

2. सेंगर द्वारा प्रोटीन अनुक्रमण का आविष्कार किया गया है।
3. प्रोटीन संरचना के N-टर्मिनल पक्ष से अमीनो अम्ल अनुक्रमण N-टर्मिनल विश्लेषण के रूप में जाना जाता है। इसी तरह, प्रोटीन संरचना के C-टर्मिनल पक्ष से अनुक्रमण को C-टर्मिनल विश्लेषण माना जाता है।
4. (i) सही (ii) सही (iii) सही (iv) सही।

बोध प्रश्न 2

1. एंडोपेप्टाइडेज जो एंजाइम होते हैं जो आंतरिक पेप्टाइड बंध के हाइड्रोलिसिस को उत्प्रेरित करते हैं। एक्सोपेप्टाइडेज वे एंजाइम होते हैं जो N या C-टर्मिनल अमीनो अम्ल अवशेषों के हाइड्रोलिसिस को उत्प्रेरित करते हैं।
2. ट्रिप्सिन, काइमोट्रिप्सिन और इलास्टेज।
3. एक्सोपेप्टाइडेज और एंडोपेप्टाइडेज अपने क्रिया के लिए बहुत विशिष्ट हैं। वे उस बंध पर क्रिया करते हैं जिसे विशिष्ट अमीनो अम्ल अवशेषों के साथ क्लीव और फ्लैंक किया जाता है। इस बंध को कैची पेप्टाइड बंध के रूप में जाना जाता है।
4. (i) सही (ii) गलत (iii) गलत, (iv) सही।

बोध प्रश्न 3

1. डाइसल्फाइड बंध एक सहसंयोजक बंध है। एक डाइसल्फाइड (-S-S-) प्रोटीन या पॉलीपेप्टाइड में दो सिस्टीन अवशेषों के सल्फीड्रिल समूहों (-SH) द्वारा निर्मित होता है।
2. सिस्टीन अम्ल डाइसल्फाइड बंध बनाने के लिए जिम्मेदार है।
3. प्रोटीन और पॉलीपेप्टाइड में डाइसल्फाइड का अपचयन करने के लिए 2-मर्कैप्टोएथेनॉल और DTT (डाइथायोथ्रीटोल) का उपयोग किया जाता है।
4. (i) सही (ii) सही (iii) गलत, (iv) गलत।

अंत में कुछ प्रश्न

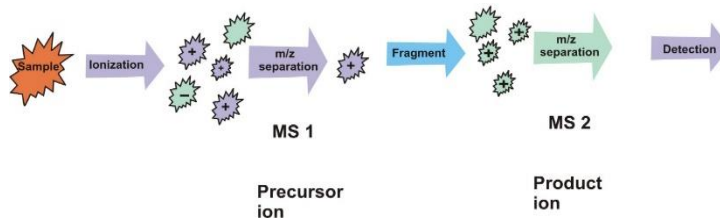
1. खंड 6.2 का सन्दर्भ लें।
2. खंड 6.2.2 का सन्दर्भ लें।
3. खंड 6.2.3 का संदर्भ लें।
4. खंड 6.2.4 का सन्दर्भ लें।

5. खंड 6.3 का संदर्भ लें।
6. खंड 6.4.3 का संदर्भ लें।

6.8 अन्य सुझाई पुस्तकें

1. Creighton, T. E., 1983. Proteins: Structure and Molecular Properties. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 515 pp.
2. Creighton, T. E., ed., 1997. Protein Function—A Practical Approach, 2nd ed. Oxford: IRL Press at Oxford University Press.
3. Dayhoff, M. O., 1972–1978. The Atlas of Protein Sequence and Structure, Vols. 1–5. Washington, DC: National Medical Research Foundation.
4. Deutscher, M. P., ed., 1990. Guide to Protein Purification. Vol. 182, Methods in Enzymology. San Diego: Academic Press, 894 pp.
5. Goodsell, D. S., and Olson, A. J., 1993. Soluble proteins: Size, shape and function. Trends in Biochemical Sciences 18:65–68.

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY



द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति

रूपरेखा

7.1 प्रस्तावना	अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी (क्रियाविधि)
संभावित अध्ययन परिणाम	
7.2 द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मीट्रिक विश्लेषण अथवा द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति	उपयोग
द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति दर्शिता : प्रस्तावना	7.4 ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण
द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति दर्शिता के सिद्धांत	प्रस्तावना
द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के अवयव	ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण के सिद्धांत
द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी : संपूर्ण उपकरण	ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण की क्रियाविधि
उपयोग	उपयोग
7.3 अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति	7.5 सारांश
प्रस्तावना	7.6 पाठांत प्रश्न
अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी सिद्धांत	7.7 उत्तर
अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी (उपकरण)	7.8 अन्य सुझाई गई पुस्तकें

7.1 प्रस्तावना

पिछली इकाई में आपने प्रोटीन के विभिन्न अलगाव और पृथक्करण के विषय में ज्ञान प्राप्त किया। अब अप इस इकाई में द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी, अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी तथा ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण के विषय में पढ़ने जा रहे हैं। वर्तमान में द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति वह विधि है जिसके द्वारा प्रोटीन के विशेष गुणों को जल्दी और भली प्रकार बिना किसी त्रुटि के जाना जा सकता है। प्रोटीन के आणविक द्रव्यमान ज्ञात करने तथा उनकी प्राथमिक संरचनाओं को जानने के लिए अन्य विधियों की तुलना में यह तकनीक अधिक लाभप्रद है (अमीनो अम्ल के क्रम की सूचनाएं)। आप समझ सकते हैं कि प्रोटीन के विशेष गुण कितने अधिक महत्वपूर्ण हैं क्योंकि प्रोटीन सभी कोशिकाओं/ऊतक का एक प्रमुख अवयव है तथा प्रोटीन के यह विशेष गुण/लक्षण, प्रोटीन की संरचना, स्थिरता तथा विभिन्न भौतिक एवं रासायनिक परिस्थितियों में प्रोटीनों की क्रियाविधि से संबंधित हमारे वर्तमान ज्ञान पर निर्भर करते हैं। अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमिति का प्रयोग भी संरचना के व्याख्यान में किया जाता है। ठोस प्रवस्था

संश्लेषण, पेप्टाइड के संश्लेषण में प्रयोग होने वाली एक सामान्य तकनीक है। सामान्यतः पेप्टाइड का संश्लेषण की इस विधि में अमीनो अम्ल श्रृंखला के कार्बोऑक्सेल समूह के शीर्ष से अमीनो समूह की ओर (N-शीर्ष) की ओर होता है, जबकि कोशिका में पेप्टाइड का जैविक संश्लेषण विपरीत दिशा में होता है। इस इकाई में हम द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के सिद्धांत, उसके अवयव तथा उसके उपयोगों के विषय में पढ़ेंगे। यहां हम अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी तथा ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण के विषय में भी जानेंगे।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस इकाई का अध्ययन करने के बाद, आप :

- ❖ द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के सिद्धांत को जान पाएंगे;
- ❖ द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के उपयोग सीख पाएंगे;
- ❖ अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के सिद्धांत की व्याख्या कर सकेंगे; और
- ❖ ठोस प्रवस्था संश्लेषण के उपयोग के बारे में जान सकेंगे।

7.2 द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मीट्रिक विश्लेषण अथवा द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति

7.2.1 द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति दर्शिता : प्रस्तावना

द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति वह तकनीक है जिसके द्वारा किसी भी अणु के रासायनिक संगठन तथा उसकी संरचना का निर्धारण किया जा सकता है। ऐसा करने के लिए सर्वप्रथम अणु को आयनीकरण अवस्था में परिवर्तित करते हैं तथा उसके द्रव्यमान की गणना आवेश अनुपात के रूप में की जाती है।

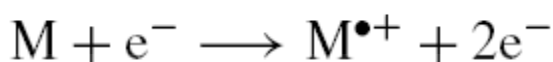
द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति का इतिहास

द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति की कहानी, जे जे थॉमसन नामक एक अंग्रेज वैज्ञानिक के खोज कार्यों के साथ ही प्रारंभ हो गई थी। इन्होंने विलहेल्म वीन के शोध में सुधार किया तथा प्रथम कैनल किरणों पर आधारित द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति का विकास किया। द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति का प्रयोग 1958 में अमीनो अम्ल के विश्लेषण के लिए प्रारंभ किया गया। यद्यपि कार्लो एंडरसन प्रथम व्यक्ति थे जिन्होंने मैथिल एस्टर के आयनीकरण में प्रयुक्त प्रमुख आयन खोजक पर ध्यान केंद्रित किया। द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति का वास्तविक मॉडल 1918 तथा 1919 में क्रमशः आरथर जैफरी डंपस्टर तथा एफ डब्ल्यू एस्टन ने विकसित किया। इसके अतिरिक्त हैंस डेमेल्ट तथा वोल्फगैंग पॉल ने 1950 तथा 1960 में आयन ट्रैप तकनीक की खोज की तथा भौतिकी के क्षेत्र में 1989 में इन्हें नोबेल पुरस्कार से सम्मानित किया गया। किसी भी जैविक अणु के द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति विश्लेषण की अद्भुत विधि जॉन बेनेट तथा कोईचि तनाका के द्वारा विकसित की गई, जिन्हें 2002 में रसायन विज्ञान के क्षेत्र में नोबेल पुरस्कार दिया गया।

7.2.2 द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के सिद्धांत

अन्य स्पेक्ट्रमदर्शी तकनीकों की तुलना में द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के सिद्धांत बहुत व्यापक है। चुंबकीय क्षेत्र से गुजरने वाले आवेशित कण, गोलाकार पथ की त्रिज्या पर विचलित हो जाते हैं, यह विचलन द्रव्यमान से आवेश अनुपात (m द्रव्यमान/ e /आवेश) के समानुपाती होता है। किसी अणु से इलेक्ट्रॉन को विचलित करने के लिए इलेक्ट्रॉनों के उच्च ऊर्जा वाले बीम का उपयोग किया जाता है जिससे बनने वाला कैट आयन, आणविक आयन कहलाता है। आणविक आयन का पुनः विखंडन हो जाता है तथा यह छोटे आयनों में परिवर्तित हो जाता है। इस प्रकार, एकत्रित आयनों को एक बीम के रूप में फोकस कर चुंबकीय क्षेत्र में भेजा जाता है, यहां यह आयनों के द्रव्यमान के अनुसार गोलाकार पथ पर विचलित हो जाते हैं। आयनों को खोजक पर फोकस कर सकते हैं तथा चुंबकीय क्षेत्र को समायोजित कर रिकॉर्ड कर लेते हैं।

किसी अणु के द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति अन्वेषण में प्रथम पद गैस फेस आयनों का उत्पादन है। इसका सर्वोत्तम उदाहरण इलेक्ट्रॉनिक आयनीकरण है :



सामान्यतः इस आणविक आयन का विखंडन हो जाता है। विषम संख्या वाले इलेक्ट्रॉन उपस्थित होने के कारण यह एक **रेडिकल** कैट आयन होता है, जो सम संख्या वाले इलेक्ट्रॉनों के साथ या तो **रेडिकल** बनाते हैं या फिर आयन अथवा एक अणु तथा एक नए रेडिकल कैट आयन का निर्माण करते हैं। यहां आयनों के दो प्रकारों के बीच महत्वपूर्ण अंतरों की व्याख्या करना आवश्यक है। संदर्भ में यह आयन एक उपर्युक्त अवस्था में प्रदर्शित किए जाते हैं।

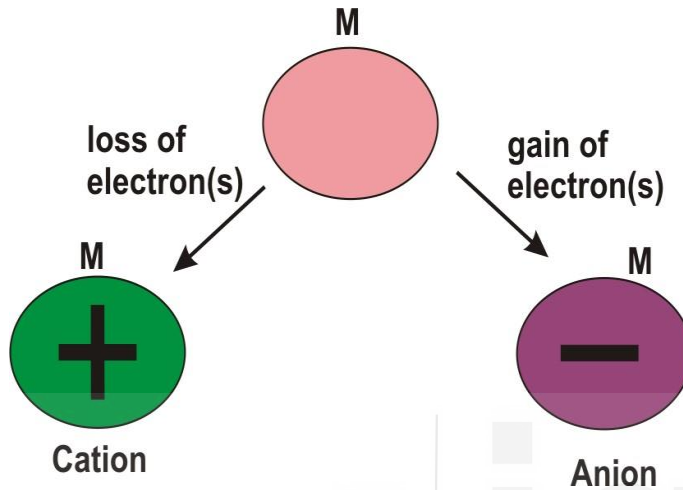


इन दो प्रकार के आयनों के रासायनिक गुण भी अलग-अलग होते हैं। आणविक अणु से उत्पन्न प्रत्येक प्राथमिक उत्पाद आयन का लगातार विघटन होता रहता है। द्रव्यमान से आवेश अनुपात के आधार पर द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के द्वारा इन आयनों का पृथक्करण किया जाता है तथा इनकी प्रचुरता का प्रभाज निकाला जाता है।

द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति : क्रियाविधि (यह कैसे कार्य करता है?)

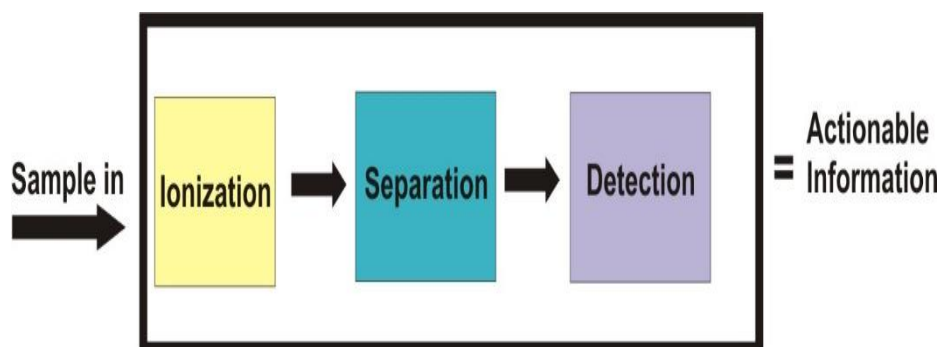
संपूर्ण द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति तकनीक का एक समरूप अवयव होता है। द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति तकनीक के विभिन्न प्रकार इन अवयवों की विभिन्न प्रकृति पर निर्भर करते हैं। परंतु इन सभी द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी औजारों के यांत्रिक कार्य एक विशेष प्रकार से किए जाते हैं। द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी तीन कार्यों को आवश्यक रूप से करता है।

1. **आयनों का उत्पादन** : आयनों का उत्पादन या तो किसी अणु से इलेक्ट्रॉनों को अलग करके धन आवेशित धनायन अथवा इलेक्ट्रॉनों को जोड़कर ऋणायन आवेशित का निर्माण कर किया जाता है। किसी अणु के द्वारा धनायनों तथा ऋणायन का निर्माण चित्र 7.1 में दिखाया गया है।



चित्र 7.1 : किसी अणु का इलेक्ट्रॉन देकर धनायन तथा इलेक्ट्रॉन ग्रहण कर ऋण आयन का निर्माण ऊपर व्याख्या किए गए प्रक्रम को आप सभी भली प्रकार जानते हैं क्योंकि इलेक्ट्रॉन ऋण आवेशित होते हैं। ऋण आवेश को पृथक करने पर अणु धन आवेश का वहन करते हैं तथा धन आयन अथवा केटायन के रूप में जाने जाते हैं। इसी प्रकार यदि कोई अणु इलेक्ट्रॉन ग्रहण करता है तो वह ऋण आवेशित आयन धनायन में परिवर्तित हो जाता है।

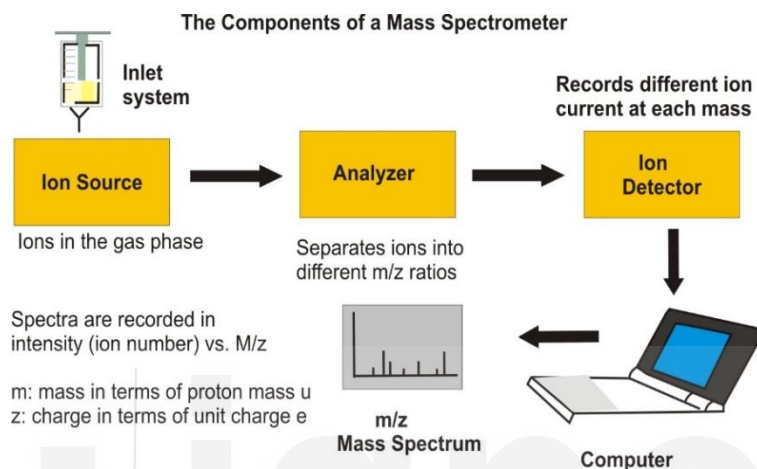
2. **आयनों का पृथक्करण** : आयनों का पृथक्करण (प्रमुख रूप से केटायन) द्रव्यमान तथा आवेश अनुपात के आधार पर किया जाता है जहां M द्रव्यमान अनुपात तथा Z आवेश होता है। आयनों का पृथक्करण विद्युत क्षेत्र के द्वारा त्वरण लगाकर तथा विद्युत चुंबक के द्वारा किया जाता है।
3. **आयनों की पहचान** : आयनों का गुणात्मक (किसी विशेष आयन की पहचान) तथा मात्रात्मक (किसी विशेष आयन की मात्रा) विश्लेषण आयनों की पृथक मात्रा में ही किया जा सकता है। आयनों की पहचान के बाद प्राप्त डाटा को एकत्र कर आगे की क्रियाविधि की जाती है तथा अंत में प्राप्त परिणामों के द्वारा उचित सूचनाएं प्राप्त होती हैं। चित्र 7.2, द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी तीनों कार्यों की रूपरेखा को प्रदर्शित करता है।



चित्र 7.2.: द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के आपस में संबंधित तीनों कार्य (आयनीकरण, पृथक्करण तथा पहचान) जो अंत में प्रयोग करने योग्य सूचनाएं देते हैं।

7.2.3 द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के अवयव

द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के तीन प्रमुख अवयव होते हैं। यह अवयव आयन स्रोत, द्रव्यमान विश्लेषक तथा खोजक हैं। निम्नलिखित चित्र इन तीनों अवयवों को प्रदर्शित करता है।

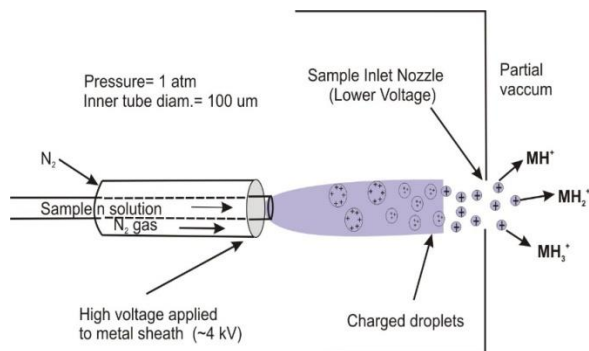


चित्र 7.3 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के 3 अवयव — आयन स्रोत, द्रव्यमान विश्लेषक तथा खोजक

(1) आयन स्रोत

द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के आयन स्रोत के द्वारा नमूने का आयनीकरण किया जाता है। आणविक आयनों को उत्पन्न करने की विभिन्न विधियां उपलब्ध हैं। यह विधियां इलेक्ट्रॉन आयनीकरण (EI), रासायनिक आयनीकरण (CI), फोटोआयनीकरण (PI) तथा इलेक्ट्रोस्प्रे हैं। इनमें से प्रोटीन विश्लेषण के लिए सबसे अधिक प्रयुक्त विधियां इलेक्ट्रोस्प्रे विधि तथा फोटोआयनीकरण हैं। विधियों की व्याख्या इस प्रकार है :

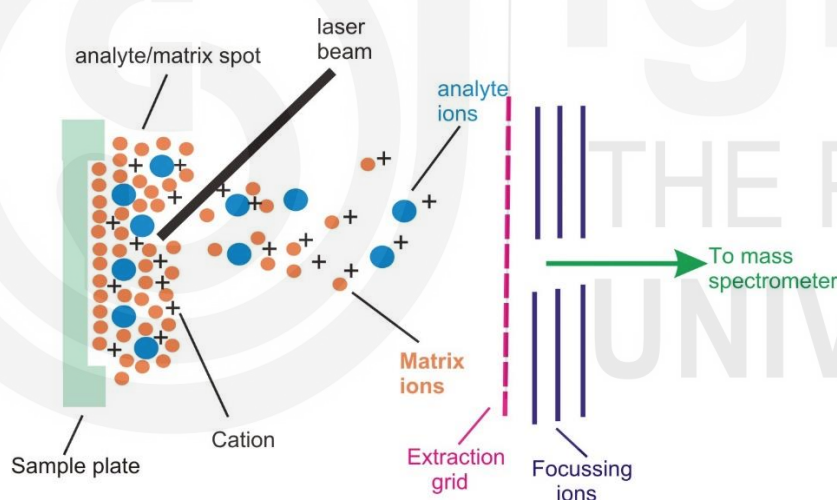
इलेक्ट्रोस्प्रे आयनीकरण (ESI) : किसी अणु का इलेक्ट्रोस्प्रे आयनीकरण, कम प्रवाह केशिका नली में से गुजरने वाले तरल पदार्थ पर अधिक विद्युत क्षेत्र (4kV) लगाकर किया जाता है। अगले पद में 1 atm दाब पर नाइट्रोजन गैस प्रवाह (N₂) द्वारा अथवा 100°C-300°C पर केशिका को भली प्रकार गर्म करके विलेयता प्रक्रम किया जाता है। सामान्यतः आयनों का निर्माण विनाश विलयन में विशोषण के प्रक्रम से पहले किया जाता है। अन्य विधियों की तुलना में यह विधि अधिक लाभदायक है क्योंकि इसका प्रयोग छोटे तथा बड़े दोनों प्रकार के आलो ओ पर किया जा सकता है तथा इसके द्वारा अनेक प्रोटॉन युक्त आयनों का निर्माण होता है। इस विधि में बहुत कम ऊर्जा स्थानांतरण की आवश्यकता होती है (चित्र 7.2.4)



चित्र 7.4 : दिए गए किसी नमूने के अणु का आयनीकरण दर्शाता हुआ इलेक्ट्रोस्प्रै आयनीकरण प्रक्रम।

फोटोआयनीकरण विधि :

इस विधि में नमूने (M) धूसर (X) के साथ मिलाकर प्लेट पर शुष्क कर लेते हैं। धूसर के अब वो पर लेजर प्रकाश की दीप्ति डालते हैं, ऐसा करने पर धूसर के अणु आयनीकृत हो जाते हैं। नमूने के अणु पुनः धूसर के अणु (X) के प्रोटॉन स्थानांतरण द्वारा आयनीकृत हो जाते हैं (चित्र 7.2.5)। यह निम्नलिखित अभिक्रिया के रूप में होती है :



चित्र 7.5 : नमूने के अणुका फोटो आयनीकरण प्रक्रम द्वारा आयनीकरण

(2) द्रव्यमान विश्लेषक

आयनीकरण प्रक्रम के समाप्त होने के बाद आयनों का पृथक्करण आवश्यक है। द्रव्यमान विश्लेषक के द्वारा आयनों का मापा जाने वाला भौतिक गुण, उनका द्रव्यमान से आवेश का अनुपात (m/z) होना चाहिए ना केवल उनका द्रव्यमान। यह लगातार प्रकट होना चाहिए की बहुआवेशित आयनों के लिए दिखाई देने वाले m/z मान, उनके वास्तविक द्रव्यमान के प्रभाज भाग होते हैं। विभिन्न प्रकार के स्रोत के उपलब्ध होने के कारण विभिन्न प्रकार के द्रव्यमान विश्लेषक विकसित किए गए। आयनों का पृथक्करण निश्चित रूप से द्रव्यमान से आवेश अनुपात पर आधारित होता है जो पुनः विभिन्न सिद्धांतों पर स्थापित होते हैं (सारणी 7.1) सभी प्रकार के द्रव्यमान विश्लेषक स्थैतिक अथवा गतिशील विद्युत क्षेत्र तथा चुंबकीय क्षेत्रों से संबंधित होते हैं। समान प्रकार के द्रव्यमान विश्लेषकों

में अधिकांश मूलभूत अंतर यह है कि पृथक्करण के लिए किस क्षेत्र का प्रयोग किया जाता है।

सारणी 7.1 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति में प्रयुक्त विश्लेषकों के प्रकार

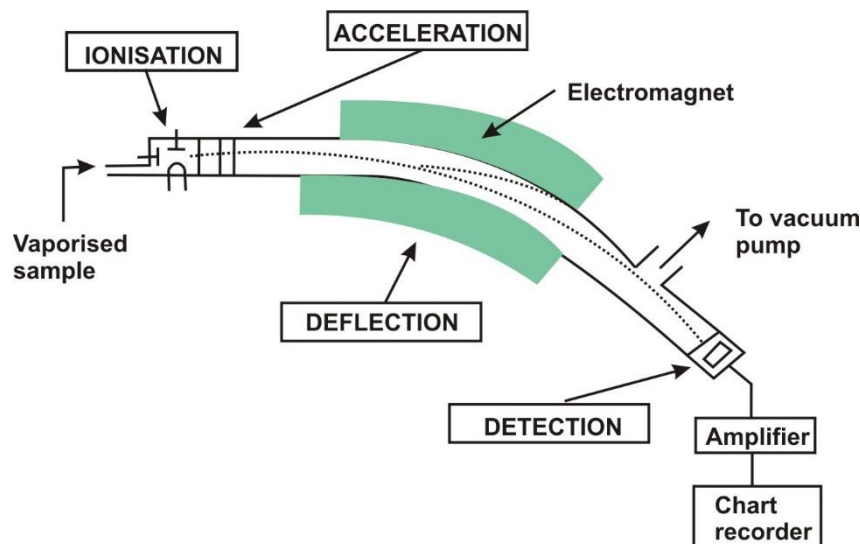
विश्लेषक का प्रकार	संकेत	पृथक्करण का सिद्धांत
विद्युत विभाग	E or ESA	गतिज ऊर्जा
चुंबकीय विभाग	B	गति
क्वांड्रूपोलक्वांड्रूपोल ओर्बिट्रैप	Q	m/z (ट्राजेक्टरी स्टेबिलिटी)
आयन ट्रैप	IT	m/z (अनुनाद पुनरावर्ति)
उड्डयन काल	TOF	गति (उड्डयन काल)
फोरियर ट्रांसफॉर्म आयन साइकलोट्रोन	FTICR	m/z (अनुनाद पुनरावर्ति)
फोरियर ट्रांसफॉर्म ओर्बिट्रैप	FT-OT	m/z (अनुनाद पुनरावर्ति)

(3) खोजक

द्रव्यमान विश्लेषक के पश्चात आयनों को खोजक के द्वारा एक उपयोगी सिग्नल में बदल दिया जाता है। खोजक पड़ने वाले आयनों से विद्युत तरंग उत्पन्न करने के लिए सक्षम होते हैं, विद्युत तरंगों की संख्या आयनों के समानुपाती होती है। वर्तमान में विभिन्न प्रकार के खोजक उपलब्ध हैं। प्रयुक्त खोजक का प्रकार उपकरण की संरचना तथा उपकरण की विश्लेषण योग्यता पर निर्भर करता है। कुछ खोजक आवेश तरंग की सापेक्ष मात्रा पर आधारित होते हैं। विद्युतदर्शी आयन खोजक, पड़ने वाले आयनों के किसी सतह पर टकराने के बाद उत्पन्न गतिज ऊर्जा के स्थानांतरण पर आधारित होते हैं जिससे बाद में द्वितीयक इलेक्ट्रॉन उत्पन्न होते हैं जो बाद में परिवर्धन के द्वारा विद्युत तरंग उत्पन्न करते हैं। अन्य खोजक जैसे फोटोग्राफिक प्लेट, प्रतिबिंब तरंग खोजक अथवा अरे खोजक में बहुत सारे द्रव्यमान को गिनने की क्षमता होती है इसके साथ ही यह नेट पर एक साथ पड़ने वाले आयनों को पहचान भी सकते हैं। द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के उपयोग में खोजक अत्यंत प्रभावी होते हैं।

7.2.4 द्रव्यमान स्पेक्ट्रममापी : संपूर्ण उपकरण

अब आप द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के सभी अवयवों के बारे में भली प्रकार जानते हैं। यह सभी अवयव एक साथ संयुक्त होकर द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी नामक उपकरण बनाते हैं। निम्नलिखित चित्र (7.6) द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का रेखीय निरूपण करते हैं।



चित्र 7.6 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का रेखीय चित्र

द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के प्रक्रम के चार प्रमुख बिंदु हैं। यह बिंदु आयनीकरण, त्वरण, विचलन तथा खोज करना हैं। गर्म तंतु से मुक्त इलेक्ट्रॉन अणु के ऊपर प्रहार करते हैं। यह इलेक्ट्रॉन कैथोड तथा एनोड के मध्य एक धारा के रूप में प्रवाहित होते हैं। इलेक्ट्रॉनों की यह धारा अरुण में से होकर गुजरती है जिससे आयन उत्पन्न होते हैं। त्वरण सरल प्रक्रिया है, जहां आयन दो समानांतर आवेशित प्लेटों के सेट के मध्य रखे जाते हैं। इन प्लेटों पर छोटा सा कटाव होता है जिसके द्वारा आयन प्लेट पर आकर्षित होते हैं तथा आयनों के मध्य आकर्षण तथा प्रतिकर्षण बल एक त्वरण दर से कार्य करता है। त्वरण की दर प्लेट पर लगने वाले आवेश को परिवर्तित कर प्रतिस्थापित की जा सकती है। उपकरण को चारों ओर से घेरने वाले चुंबकीय क्षेत्र के द्वारा आयन विचलित हो जाते हैं। विचलन का यह मान आयनों के द्रव्यमान तथा आवेश पर निर्भर करता है। भारी आयन तथा दो या दो से अधिक आवेश वाले धनायन कम विचलित होते हैं। हल्के आयन तथा एक धनात्मक आवेश वाले आयन अधिक विचलित होते हैं। सह द्रव्यमान तथा आवेश वाले आयन खोजक की ओर गति करते हैं। द्रव्यमान तथा आवेश अनुपात (m/z) का निर्धारण खोजक पर टकराने वाले आयन के द्वारा होता है। आयनों की धारा खोजक पर पहुंचकर एक तार से टकराती है। तार से टकराने पर यह इलेक्ट्रॉन के धातु तार से आयन पर चले जाने के कारण उदासीन हो जाते हैं। तार तथा आयन के मध्य उत्पन्न इस धारा को प्रवर्धक पकड़ लेता है तथा संकेत को खोज कर इसका प्रवर्धन कर देता है। कंप्यूटर इसे ग्रहण कर द्रव्यमान/आवेश अनुपात में बदल देता है जिससे एक स्पेक्ट्रम उत्पन्न होता है।

7.2.5 उपयोग

द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री का उपयोग अनेक क्षेत्रों जैसे फॉरेंसिक विष विज्ञान, उपापचय विज्ञान, प्रोटियोमिक्स, फार्मा तथा क्लीनिकल रिसर्च में किया जाता है। विशेष रूप से द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री का प्रयोग दवाइयों की टेस्टिंग उनकी खोज, भोजन में उपस्थित संदूषकों की खोज, कीटनाशकों के अवशेषों के विश्लेषण, समरूप अनुपात निर्धारण, प्रोटीन के अभी निर्धारण तथा कार्बन डेटिंग के लिए किया जाता है। यहां नीचे द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री के अन्य महत्वपूर्ण उपयोगों का वर्णन किया गया है।

1. **प्रोटियोमिक्स में द्रव्यमान स्पेक्ट्रो मीटरी का उपयोग :** इसके द्वारा प्रोटीनो तथा प्रोटीन कांप्लेक्स के लक्षण, पेप्टाइड की सीक्वेंसिंग तथा अनुलेखन के पश्चात् हुए परिवर्तनों को पहचाना जा सकता है।
2. **उपापचय विज्ञान में द्रव्यमान स्पेक्ट्रो मीटरी का उपयोग :** इसके द्वारा कैंसर की स्क्रीनिंग तथा डायग्नोसिस, वैश्विक मेटाबॉलिक फिंगर प्रिंटिंग का विश्लेषण, जैविक मारकर की खोज, जैविक इंधन का निर्माण एवं उनका उपयोग, लिपिड संबंधित अध्ययन तथा उपापचय संबंधित रोगों की पहचान की जाती है।
3. **पर्यावरण विश्लेषण में द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री का उपयोग :** इसके द्वारा पेय जल का परीक्षण, कीटनाशकों की स्क्रीनिंग तथा उनकी मात्रा का ज्ञान, मृदा संदूषण की जांच, कार्बन डाइऑक्साइड तथा प्रदूषण की जांच और भारी धातुओं से बह कर निकलने वाले तत्वों के विश्लेषण में किया जाता है।
4. **औषधीय विश्लेषण में द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री का उपयोग :** इसके द्वारा औषधि के निर्माण तथा अवशोषण, वितरण, उपापचय तथा उसके निष्कासन संबंधित, औषधि की गतिविधि तथा इसकी गतिशीलता से संबंधित अध्ययनों को किया जाता है। इसी के साथ द्रव्यमान स्पेक्ट्रो मीटरी के द्वारा उपापचय स्क्रीनिंग तथा प्रीक्लिनिकल विकास को भी जाना जाता है।
5. **फॉरेंसिक विश्लेषण में द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का उपयोग :** इसके द्वारा सूक्ष्म से सूक्ष्म प्रमाण (जैसे कालीनो पर उपस्थित रेशों, पेंट में उपस्थित बहुलकों) का विश्लेषण, अर्सोन की खोज (अग्नि को बढ़ावा देने वाले), अधिक मात्रा में नशीले पदार्थों तथा विस्फोटकों के अवशेषों की पहचान (बम संबंधी खोज) की जाती है।
6. **द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का क्लीनिकल उपयोग :** क्लीनिकल औषधि का निर्माण, कला अध्ययन, क्लीनिकल परीक्षण, रोगों की स्क्रीनिंग, औषधीय उपचारों की देखरेख, विश्लेषण परीक्षणों में प्रयुक्त पेप्टाइड पेप्टाइड के विश्लेषण तथा संवर्धित कारकों के लक्ष्य उपचारों के अभीनिर्धारण में द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का प्रयोग किया जाता है।

बोध प्रश्न 1

- 1 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति क्या है?
- 2 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति की खोज किसने की?
- 3 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के तीन कार्य क्या हैं?
- 4 : नीचे दिए गए रिक्त स्थानों को भरे –
 - (i) में से होकर गुजरने वाला आवेशित कण, एक गोलाकार पथ के साथ त्रिज्या पर विचलित हो जाता है जोकि के समानुपाती होती है।
 - (ii) किसी अ नो के द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमीट्रिक अन्वेषण का प्राथमिक चरण, का निर्माण है।

- (iii) द्रव्यमान विश्लेषक के द्वारा अनुमानित आयनों का भौतिक गुण, उनकी द्रव्यमान तथा आवेश अनुपात (m/z) होता है ना कि ।
- (iv) सभी प्रकार के द्रव्यमान विश्लेषक स्थैतिक अथवा गतिक क्षेत्रों से संबंधित होते हैं ।

7.3 अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति (Mass Spectrometry)

7.3.1 प्रस्तावना

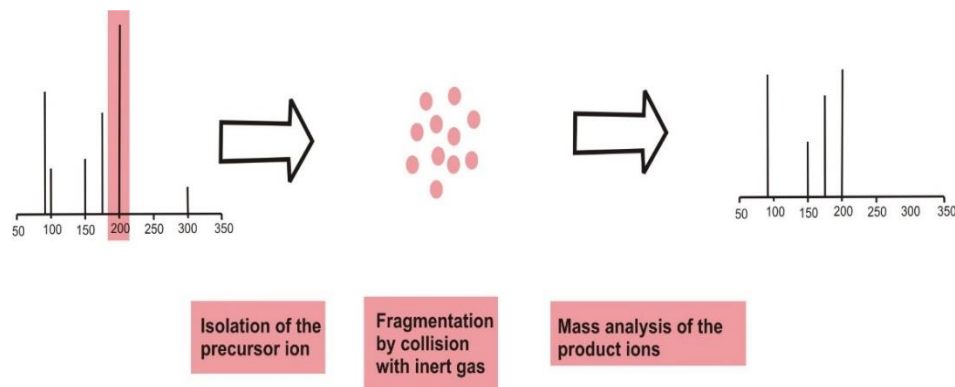
अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति की व्याख्या एक व्यापक स्पेक्ट्रम विधि के रूप में की जा सकती है जिसमें द्रव्यमान विश्लेषक के कम से कम दो पद संबंधित होते हैं। यह पद या तो विखंडन प्रक्रम के साथ संयुग्मन अथवा रासायनिक अभिक्रिया है। रासायनिक अभिक्रिया में आयन के द्रव्यमान अथवा आवेश में परिवर्तन हो जाता है। अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति को MS/MS अथवा MS² के रूप में भी जाना जाता है।

द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के पिता के रूप में जे जे थॉमसन को जाना जाता है। उन्हें अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के पूर्व पिता के रूप में भी जाना जाता है। थॉमसन ने सबसे पहला MS/MS उपकरण बनाया, जिसमें दो चुंबक क्रमिक रूप से उपस्थित होते हैं। यह दोनों चुंबक इस प्रकार उपस्थित होते हैं एक चुंबक के द्वारा उत्पन्न क्षेत्र दूसरी चुंबक के द्वारा उत्पन्न क्षेत्र के लंबरूप होता है।

7.3.2 अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के सिद्धांत

अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के सिद्धांत का अनुपालन दो प्रकार से किया जा सकता है: अंतरिक्ष में दो द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के युग्मन से अथवा किसी आयन भंडारण युक्ति में से किसी निश्चित समय में होने वाले उचित घटनाक्रम के द्वारा। इसके द्वारा लगातार उपकरणों के दो समूहों निर्देशित होते रहते हैं जो अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के परीक्षणों के लिए अनुमति प्रदान करते हैं (चित्र 7.7)। अंतरिक्ष अथवा किसी समय में अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति।

चित्र 7.7 में MS/MS का सिद्धांत दर्शाया गया है। प्रथम आयन को, प्रथम द्रव्यमान विश्लेषक के द्वारा प्रथक किया गया है। यह विखंडन अक्रिय गैस के साथ बार-बार टकराव से उत्पन्न होता है तथा इसके द्वारा उत्पन्न आयनों का विश्लेषण द्वितीयक द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के द्वारा किया जाता है।



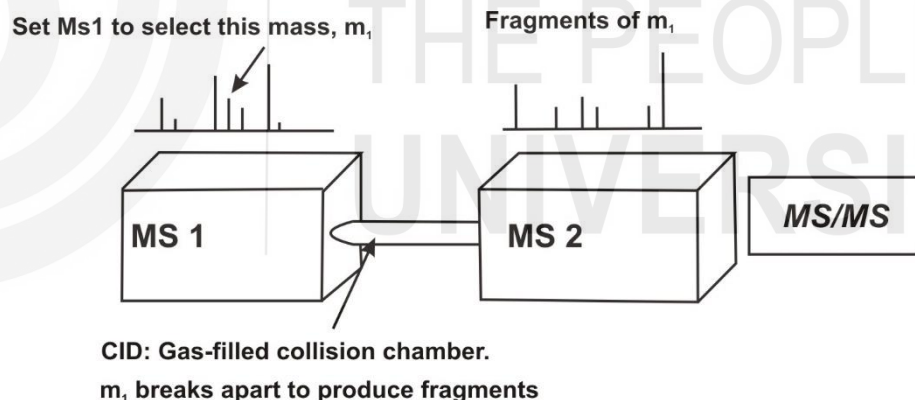
चित्र 7.7 : डैड्डे का सिद्धांत दर्शाया गया है

ज्यादातर सामान्य अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रममिति के प्रयोगों में प्रथम विश्लेषक का प्रयोग प्रथम आयन ($mp+$) को पृथक करने में किया जाता है। यह प्रथक आयन विखंडन के द्वारा उत्पाद आयनों ($mf+$) तथा उदासीन खंडो (mn) को उत्पन्न करता है। इनका विश्लेषण पुनः द्वितीयक द्रव्यमान विश्लेषक के द्वारा किया जाता है। इस अभिक्रिया की व्याख्या निम्नलिखित समीकरण के द्वारा की जा सकती है :



7.3.3 अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी (उपकरण)

अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का सरल एवं रेखीय प्रारूप, चित्र 7.8 के द्वारा प्रदर्शित किया गया है।



चित्र 7.8 : अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का रेखीय निरूपण

अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी, दो द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का समायोजन है। प्रथम द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का प्रयोग प्रारंभिक द्रव्यमान का चयन करने में किया जाता है जोकि मिश्रण में दिए गए विश्लेषक का महत्वपूर्ण है। द्रव्यमान चयनित आयन ऐसे क्षेत्र से होकर गुजरते हैं जहां वे अनेक प्रकार से सक्रिय हो जाते हैं। यह सक्रियता, खंडो अथवा भागों के उत्पादन के लिए अथवा उत्पाद आयनों के निर्माण के लिए महत्वपूर्ण है। सामान्यतः यह प्रक्रिया आपस में टकराने वाले आयनों के द्वारा उदासीन गैस के साथ होती है, यह प्रक्रम कॉलेजन सक्रियता (CA) कोलेजन प्रेरित विखंडन (CID) कहलाती है। द्वितीयक द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का प्रयोग द्रव्यमान के अनुसार टूटे हुए आयनों को पृथक करने में किया जाता है। परिणामस्वरूप प्राप्त “MS/MS” स्पेक्ट्रम में केवल चयनित प्रथम उत्पाद के उत्पाद आयन उपस्थित होते हैं।

7.3.4 अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी (क्रियाविधि)

अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी की क्रियाविधि चित्र 7.9 के द्वारा प्रदर्शित की गई है। नमूनों का आयनीकरण, आयनों के मिश्रण को उत्पन्न करने के लिए किया जाता है। इसके लिए विशिष्ट द्रव्यमान आवेश अनुपात वाले प्रारंभिक आयनों का चयन किया जाता है। इसके पश्चात्, उचित परिणाम के लिए विखंडन द्वारा उत्पाद आयन उत्पन्न किए जाते हैं। चयन विखंडन परिणाम के क्रम का प्रयोग प्रथम वंश उत्पाद आयनों को उत्पन्न करने में किया जा सकता है। इस प्रकार, MS₂ में उत्पन्न चयनित उत्पाद आयनों का दोबारा प्रयोग उत्पाद आयनों के अन्य समूहों को उत्पन्न करने में किया जाता है।

द्रव्यमान विश्लेषण पृथक्करण के अनेक चरणों को एक स्थान में प्रथक द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी तत्व के द्वारा प्राप्त किया जा सकता है अथवा एक दिए गए समय अंतराल में MS चरणों के साथ एकल द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के प्रयोग द्वारा प्राप्त किया जा सकता है।

किसी दिए गए स्थान में अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी :

किसी दिए गए स्थान में अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी में पृथक् दिए गए तत्व भौतिक रूप से अलग तथा पृथक् होते हैं परंतु उनके बीच में एक भौतिक संबंधता पाई जाती है जिससे उच्च निर्वात उत्पन्न हो सके। यह तत्व खण्ड, संचरण पांडुपोल तथा उड्डयन काल हैं। बहु पांडुपोल के प्रयोग के दौरान, ये द्रव्यमान संश्लेषक तथा कॉलेजन चैंबर दोनों के रूप में कार्य करते हैं।

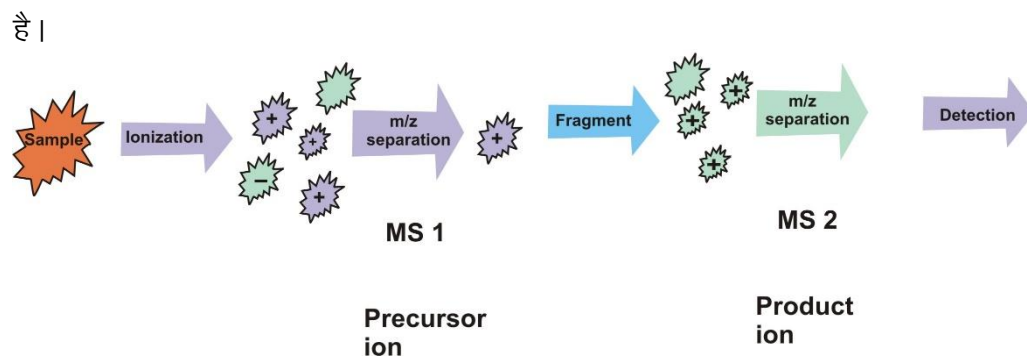
सामान्य रूप से प्रयोग किए जाने वाले द्रव्यमान विश्लेषक, क्वाड्रो पोल द्रव्यमान विश्लेषक, रेडियो आवृत्ति कोलेजन पांडुपोल, उड्डयन काल द्रव्यमान विश्लेषक, चुंबकीय क्षेत्र तथा विद्युत क्षेत्र हैं।

किसी दिए गए समय में अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी :

किसी दिए गए समय में अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी में पृथक्करण की क्रिया उसी स्थान पर आयनों को पकड़ने के साथ, अत्यधिक समय में होने वाले अनेक पृथक्करण चरणों के साथ प्रारंभ होती है। इस प्रकार की खोज के लिए फोरियर ट्रांसफॉर्म साइक्लोट्रॉन रेजोनेंस (FTICR) नामक उपकरण का प्रयोग किया जा सकता है।

विखंडन :

अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के लिए गैस फेस आयनों का विखंडन अति आवश्यक है। यह प्रक्रिया द्रव्यमान विश्लेषण के विभिन्न पदों में संपन्न होती है। आयनों के विखंडन के लिए अनेक विधियों का प्रयोग किया जाता है, जिसके द्वारा अनेक प्रकार के खंडों का निर्माण होता है तथा किसी की संरचना तथा उसके संगठन से संबंधित विभिन्न प्रकार की सूचनाएं प्राप्त होती हैं। सामान्यतः टेंडर मां द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के प्रयोगों में पश्च-स्रोत विखंडन का प्रयोग होता है। कोलेजन प्रेरित विघटन () को कॉलेजन सक्रिय विघटन भी कहते हैं। इसमें एक आयन का कोलेजन गैसीय अवस्था में उदासीन अणु या परमाणु के साथ होता है तथा आयन का विघटन निम्न प्रकार से होता



चित्र 7.9 : अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी : क्रियाविधि का रेखीय निरूपण

7.3.5 उपयोग

अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री का प्रयोग प्रोटीन के विश्लेषण में किया जाता है। इस विश्लेषण के द्वारा प्रोटीन के अमीनो अम्ल की सीक्वेंस का पता लगाना ही प्रमुख सूचना है। इसमें प्रोटीन को द्रव्यमान विश्लेषक में डाला जाता है जिसे टॉप डाउन प्रोटीयोमिक्स कहते हैं। इसमें प्रोटीनों को छोटे-छोटे पेप्टाइड में बदल कर इन्हें द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी में डाला जाता है जिसे बॉटम अप प्रोटीयोमिक्स कहते हैं।

ओलिगोसैकेराइड्स का विश्लेषण :

प्रोटीन सीक्वेंसिंग के समान, ओलिगोसैकेराइड्स का विश्लेषण अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का प्रयोग कर किया जाता है। विखंडन प्रायः ग्लाइकोसिडिक बंध के किसी भी ओर देखा जा सकता है, परंतु इसके लिए क्रॉस रिंग क्लीवेज में शर्करा रिंग संरचना के द्वारा अधिक ऊर्जा वाली अवस्थाएं होनी चाहिए। पुनः आगामी सबस्क्रिप्ट का प्रयोग श्रृंखला पर क्लीवेज के स्थान को पहचानने के लिए किया जाता है।

ओलिगो न्यूक्लियोटाइड का विश्लेषण :

अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री का प्रयोग डीएनए तथा आरएनए के विश्लेषण के लिए किया जाता है। इस प्रकार के विश्लेषण के द्वारा सीक्वेंस के विषय में सूचनाएं प्राप्त होती हैं।

नवजात शिशुओं की स्क्रीनिंग :

नवजात शिशु की स्क्रीनिंग के द्वारा उनमें अनुवांशिक, उपापचय तथा हीमेटोलॉजिक रोगों का पता लगाया जा सकता है। इस प्रकार की तकनीकों का विकास 1990 में हुआ तथा इनका प्रयोग जन्मजात उपापचय से संबंधित रोगों का पता लगाने के लिए किया गया जो कार्बनिक अम्ल के रक्त स्तर को प्रभावित करते हैं।

बोध प्रश्न 2

- 1 : अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी क्या है?
- 2 : अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री की खोज किसने की?
- 3 : कोलेजन सक्रियता अथवा कोलेजन प्रेरित विघटन का क्या अर्थ है?

4 : दिया गया कथन सही है अथवा गलत बताएं।

- (i) जेजे थॉमसन को अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी का पिता माना जाता है (सही/गलत)।
- (ii) अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी दो द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमीटरों का संयोजन है (सही/गलत)।
- (iii) किसी दिए गए स्थान में अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी में विभक्त तत्व भौतिक रूप से पृथक तथा अलग होते हैं (सही/गलत)।
- (iv) अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी में किसी दिए गए समय में पृथक्करण उसी स्थान में प्रयुक्त आयनों के साथ होता है जिसमें पृथक्करण के विभिन्न पद समान समय में होते हैं (सही/गलत)।
- (v) अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के लिए गैस फेस आयनों का विखंडन होना आवश्यक है (सही/गलत)।

7.4 ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण (SPSS)

7.4.1 परिचय :

ठोस प्रवस्था अप्टाइड पेप्टाइड संश्लेषण एक सामान्य तकनीक है जिसका प्रयोग पेप्टाइड संश्लेषण के लिए किया जाता है। यह संश्लेषण सामान्यतः एक ठोस सतह पर किया जाता है। ठोस सतह नामक संज्ञा का प्रयोग प्रायः उस धूसर को व्यक्त करने के लिए किया जाता है जिस पर सभी रासायनिक अभिक्रियाएं होती हैं। इस विधि में अदृश सॉलिड सपोर्ट पदार्थों पर सह संयोजी रूप से बंध जाते हैं तथा उनका संश्लेषण पद अनुसार एक ही अभिक्रिया कंटेनर में चयनित सुरक्षित समूह के प्रयोग द्वारा होता है।

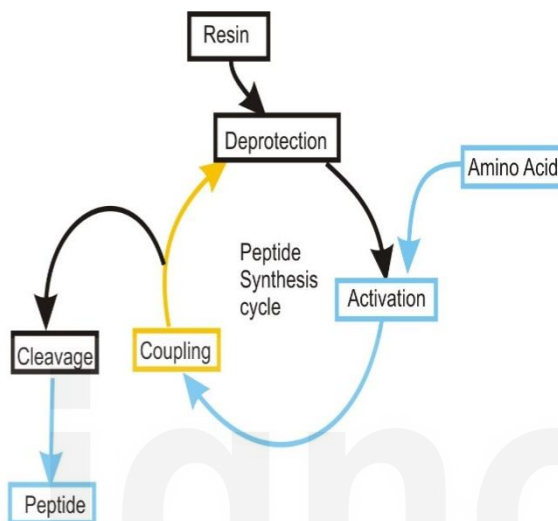
खोज :

1963 में ब्रूस मेरी फील्ड ने क्रॉस पोलिस्टीरीन के मोतियों पर ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण की विधि को विकसित किया। इस कार्य के लिए उन्हें नोबेल पुरस्कार से सम्मानित किया गया। वे जैव रासायनिक विज्ञान के ज्ञाता थे। ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण के विकास तथा इसके सर्वमान्य होने के विषय में ब्रूस के समक्ष तीन निम्नलिखित मुख्य चुनौतियां थी – (1) अघुलनशील सतह पर अभ्यास के लिए पेप्टाइड संश्लेषण की अवधारणा को कम करना, (2) दृष्टिकोण के द्वारा कृत्रिम रसायनों की रोधकता को कम करना तथा (3) इस बात को स्थापित करना की किसी जैव रसायन विज्ञ में वे सभी वैज्ञानिक क्षमताएं हैं जिससे वह रसायन संश्लेषण में संभावित परिवर्तनों को कर सके।

7.4.2 ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण के सिद्धांत

ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण का सिद्धांत असुरक्षित वॉश कप्लिंग के बारंबार चक्र पर आधारित है (चित्र 7.10)। ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण का आरंभ, प्रथम अमीनो अम्ल

के C-टर्मिनल की कप्लिंग सक्रिय सॉलिड आधार पर होने से होती है। यह सॉलिड आधार रासायनिक रूप से निष्क्रिय पोलिस्टीरोल है। रेजिन, C-टर्मिनल के सुरक्षात्मक समूह के रूप में कार्य करते हैं, निर्यंदन की विधि में अचल प्रोटीन भी भाग लेते हैं। संश्लेषण के ठोस प्रवस्था अभिकर्मक तथा उप-उत्पाद बाहर निकल जाते हैं। N-सुरक्षित अमीनो अम्ल की एक इकाई, ठोस प्रवस्था से जुड़ी हुई पेप्टाइड के मुक्त N-टर्मिनल ऐमीन के साथ युग्मित होती है। इस अवस्था में यह घटक असुरक्षित होता है तथा एक नये N-टर्मिनल को जन्म देता है जिससे पुनः एक एमिनो अम्ल जुड़ जाता है।



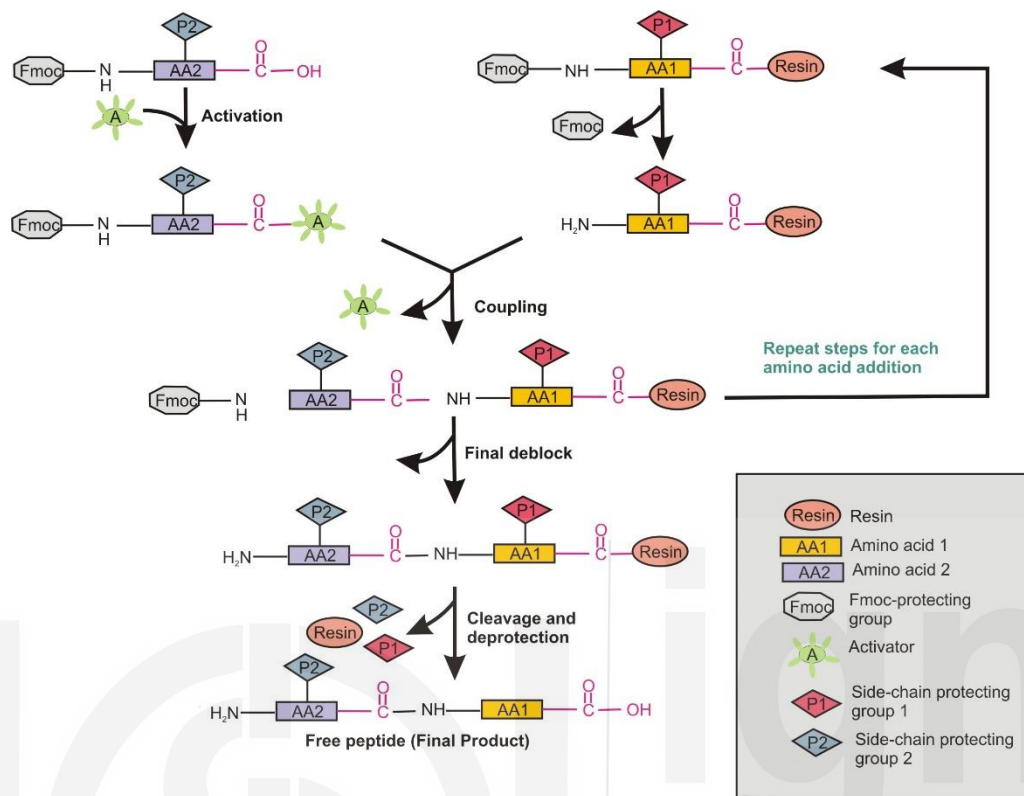
चित्र 7.10 : (1) असुरक्षित, (2) एमिनो अम्लों की सक्रियता, (3) युग्मन तथा (4) परिपक्व पेप्टाइड का हटना के ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण चक्र।

7.4.3 ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण की विधि

ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण की विधि ठोस आधार के प्रयोग के द्वारा शुरू हुई (चित्र 7.11)। ठोस आधार छोटे, रेजिन के बहुलक मोतियों से बनी होती है। इन मोतियों में सक्रिय समूह (जैसे अमीन या हिड्रोक्सिल समूह) होते हैं जो नवजात पेप्टाइड श्रृंखला से जुड़े रहते हैं। अत्यधिक अभिकर्मकों तथा उप-उत्पादों को धवन तथा छनन के द्वारा बाहर निकला जा सकता है। पेप्टाइड सहसंयोजी आधार के द्वारा, पूरे संश्लेषण में जुड़े रहते हैं। पेप्टाइड श्रृंखला के N टर्मिनल के साथ युग्मित प्रत्येक एमिनो अम्ल, N टर्मिनल पर सुरक्षित होता है और पार्श्वीय श्रृंखला में, उनकी पार्श्वीय श्रृंखला तब सुरक्षा के लिए उचित सुरक्षात्मक समूह जैसे Boc (अम्ल घुलनशील) या Fmoc (क्षार घुलनशील) का प्रयोग होता है।

ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण, N टर्मिनल असुरक्षा तथा युग्मित अभिक्रियाओं के एकांतरित चक्रों के बार बार होने से होता है। प्रत्येक पद में रेजिन को धोया जाता है। सबसे पहले रेजिन के साथ अमीनो अम्ल का युग्मन पूर्ण होता है। इसके बाद अमीन खुलता है तथा इसका युग्मन दूसरे अमीनो अम्ल के मुक्त अम्लीय समूह के साथ होता है। जरूरत के अनुसार क्रम प्राप्त करने के लिए यह चक्र बार-बार दोहराया जाता है। ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण चक्रों में बंद करने का पद भी आता है जो अमीनो अम्लों के सिरों को बंद कर देता है, जिससे अभिक्रिया रुक जाती है। संश्लेषण के पूरा होने पर, नया बना पेप्टाइड ठोस आधार से पृथक हो जाता है तथा इसके साथ ही सभी सुरक्षात्मक समूहों को प्रबल अम्लीय अभिकर्मक जैसे ट्राईफ्लूरो एसिटिक अम्ल के प्रयोग

द्वारा बाहर निकाल दिया जाता है। नया बना पेप्टाइड, अम्लीय विलयक जैसे डाई एथाईल ईथर के द्वारा कार्बनिक विलेयशील उप उत्पादों को पृथक करने के लिए अवक्षेप हो जाती है।



चित्र 7.11 : ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण की विधि का रेखीय तथा पदानुसार प्रदर्शन

7.4.4 उपयोग

ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण का प्रयोग प्रमुख रूप से विभिन्न प्रकार के पेप्टाइड के संश्लेषण के लिए किया जाता है। ठोस प्रवस्था विधि के द्वारा डीएनए, आरएनए के छोटे खंड तथा रूपांतरित ओलिगोन्यूक्लियोटाइड का संश्लेषण भी होता है। ठोस प्रवस्था पर ओलिगोन्यूक्लियोटाइड का संश्लेषण DNA/RNA संश्लेषक के उपयोग से हो सकता है।

बोध प्रश्न 3

- 1 : ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण का क्या अर्थ है?
- 2 : ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण की खोज किसने की?
- 3 : ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण का प्रमुख उपयोग क्या है?
- 4 : बताएं की निम्नलिखित कथन सत्य हैं या असत्य।
 - (i) सामान्य रूप से ठोस प्रवस्था टेक्टाइल संश्लेषण का प्रयोग सॉलिड पदार्थ के लिए होता है। (सत्य/असत्य)
 - (ii) ब्रूस मेरीफील्ड ने क्रॉस बंधीय पॉलीएस्टीरिन मोतियों पर ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण की तकनीक विकसित की। (सत्य/असत्य)

- (iii) ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण का सिद्धांत असुरक्षित ध्वन कप्लिंग ध्वन के बार-बार चक्रों पर आधारित है। (सत्य/असत्य)
- (iv) ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण का प्रक्रम N टर्मिनल असुरक्षा तथा युग्मन अभिक्रियाओं के एकांतरित चक्रों के बार-बार होने से पूर्ण होता है। (सत्य/असत्य)
- (v) नव संश्लेषित पेप्टाइड, अधुवीय विलायक जैसे डाईएथाईलईथर के द्वारा अवक्षेपित हो जाता है जिससे कार्बनिक विलयशील उप उत्पाद पृथक हो जाते हैं। (सत्य/असत्य)

7.5 सारांश

द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी एक तकनीक है जिसका प्रयोग किसी अणु के रासायनिक संगठन तथा संरचना का निर्धारण करने में किया जाता है। इस तकनीक में अणु को उसकी आयनीकृत अवस्था में परिवर्तित कर उसके द्रव्यमान आवेश के अनुपातों का मापन करते हैं। द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के विषय में जानकारी, एक अंग्रेज वैज्ञानिक जेजे थॉमसन के खोज कार्य से प्रारंभ हुई। उन्होंने विल्हेम वीन के द्वारा किए गए कार्य में सुधार किया तथा नलिकीय किरणों पर आधारित प्रथम द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी को विकसित किया। द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के तीन प्रमुख कार्य आयनों को उत्पन्न करना, आयनों को पृथक करना तथा आयनों को पहचानन है। अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी की व्याख्या एक ब्रॉड स्पेक्ट्रम विधि के रूप में की जाती है, जिसमें द्रव्यमान विश्लेषण के कम से कम दो पद समाहित होते हैं जिनमें एक या तो विघटन प्रक्रम के साथ सन्तुलन में अथवा रासायनिक अभिक्रिया में जो द्रव्यमान में एकांतरित हो अथवा एक आयन का आवेश हो। जेजे थॉमसन को अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के पिता के रूप में जाना जाता है। अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री के सिद्धांत के दो उद्देश्य इस प्रकार से हैं : किसी दिये गये स्थान में दो द्रव्यमान स्पेक्ट्रम मापी के युग्मन से या किसी दिये गये समय में किसी आयन संचय युक्ति में घटनाओं के उचित क्रम द्वारा। अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री का प्रयोग प्रोटीन के विश्लेषण में किया जाता है। इस विश्लेषण के द्वारा प्राप्त सूचना, प्रोटीनों के अमीनो अम्लों के क्रम का प्राप्त होना है। श्रीमान ब्रूस मेरीफील्ड ने क्रॉस बंधीय पॉली स्टेरेने के मोतियों पर सॉलिड फेज पेप्टाइड संश्लेषण विकसित किया। यह संश्लेषण प्रायः ठोस माध्यम पर होता है। ठोस माध्यम या सॉलिड सपोर्ट नामक संज्ञा का प्रयोग ऐसे धूसर को व्यक्त करने के लिए किया जाता है, जिस पर रासायनिक अभिक्रियाएं संपन्न होती हैं। इस विधि में अणु ठोस माध्यम पर सह संयोजी रूप से बंधे रहते हैं तथा उनका पदानुसार संश्लेषण एक ही अभिक्रिया पात्र में चयनित सुरक्षात्मक समूह के प्रयोग द्वारा होता है। इसे SPSS विधि भी कहते हैं।

7.6 पाठांत प्रश्न

- 1 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री की विस्तृत व्याख्या करें।
- 2 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री की कार्यविधि के प्रक्रम की व्याख्या करें।
- 3 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री के प्रमुख अवयवों की व्याख्या करें।

- 4 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री के प्रमुख उपयोगों की व्याख्या करें।
- 5 : अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री के सिद्धांत की विस्तृत व्याख्या करें।
- 6 : अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री के प्रमुख उपयोग बताएं।
- 7 : ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण के सिद्धांत की विस्तृत व्याख्या कीजिये।

7.7 उत्तर

बोध प्रश्न 1

- 1 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री एक तकनीक है, जिसका प्रयोग किसी अणु की संरचना तथा रासायनिक संगठन का निर्धारण करने में किया जाता है। इसमें अणु को रासायनिक अवस्था में परिवर्तित कर उसका द्रव्यमान आवेश अनुपात मापा जाता है।
- 2 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री की कहानी एक अंग्रेज वैज्ञानिक जे जे थॉमसन की खोज से प्रारंभ हुई जिन्होंने द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री की तकनीक की खोज की।
- 3 : द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री के तीन कार्य : आयनों का उत्पादन, आयनों का पृथक्करण तथा आयनों की खोज है।
- 4 : (i) चुम्बकीय क्षेत्र, द्रव्यमान-आवेश अनुपात (ii) गैस फेज आयन, (iii) उनका द्रव्यमान (iv) वैद्युत तथा चुम्बकीय।

बोध प्रश्न 2

- 1 : अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री (MS/MS) को ब्रॉड स्पेक्ट्रम विधि के रूप में परिभाषित किया जा सकता है जिसमें द्रव्यमान विश्लेषण के कम से कम दो पद जुड़े होते हैं जो या तो विघटन प्रक्रम के साथ संयोजन के रूप में या द्रव्यमान अथवा आयन के आवेश के रूप में रासायनिक अभिक्रिया में एकांतरित होते हैं।
- 2 : अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री की खोज जे जे थॉमसन ने की।
- 3 : पश्च-स्रोत विखंडन का प्रयोग प्रायः अनुबंध द्रव्यमान स्पेक्ट्रोमेट्री के प्रयोग में किया जाता है। कॉलेजन प्रेरित विघटन, कॉलेजन उत्प्रेरित विघटन के रूप में भी जाना जाता है, जिसमें उदासीन अणु के साथ आयन का कॉलेजन, गैस फेज में होता है तथा आयन विघटन होता है।
- 4 : (i) सत्य, (ii) सत्य, (iii) सत्य, (iv) सत्य, (v) सत्य

बोध प्रश्न 3

- 1 : सॉलिड फेज पेप्टाइड संश्लेषण एक सामान्य तकनीक है जिसका प्रयोग पेप्टाइड संश्लेषण के लिए किया जाता है। यह संश्लेषण प्रायः ठोस आधार पर होता है। ठोस आधार नामक संज्ञा का प्रयोग ऐसे धूसर को व्यक्त करने के लिए किया जाता है जिन पर रासायनिक अभिक्रियाएं संपन्न होती हैं।

2 : 1963 में श्रीमान ब्रूस मेरीफील्ड ने क्रॉस बंधीय पॉलीस्टरीन मोतियों पर ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण का विकास किया।

3 : ठोस प्रवस्था पेप्टाइड संश्लेषण का प्रयोग प्रमुख रूप से विभिन्न प्रकार के पेप्टाइडों के लिए किया जाता है। ठोस प्रवस्था विधि के द्वारा DNA, RNA के छोटे खंड तथा रूपांतरित ओलिगो न्यूक्लियोटाईड का संश्लेषण होता है। सॉलिड फेज पर DNA/RNA संश्लेषक के प्रयोग द्वारा ओलिगो न्यूक्लियोटाईड का संश्लेषण होता है।

4 : (i) सत्य, (ii) सत्य, (iii) सत्य, (iv) सत्य, (v) सत्य

पाठांत प्रश्नों के उत्तर :

1 : खंड 7.2.2 देखें।

2 : खंड 7.2.1 देखें।

3 : खंड 7.2.3 देखें।

4 : खंड 7.2.5 देखें।

5 : खंड 7.3.2 देखें।

6 : खंड 7.3.5 देखें।

7 : खंड 7.4.2 देखें।

7.8 अन्य सुझाई पुस्तकें

1. Introduction to protein mass spectrometry. Ghosh PK. Academic Press, USA, 2015.
2. Protein Analysis using Mass Spectrometry: Accelerating Protein Biotherapeutics from Lab to Patient. Mike S. Lee, Qin C. Ji. John Wiley & Sons, -2017.
3. Protein and Peptide Analysis by Mass Spectrometry. J. R. Chapman. Humana Press, 1996.
4. Protein Mass Spectrometry. Whitelegge J. Elsevier, 2008.
5. Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. Michael Kinter, Nicholas E. Sherman. John Wiley & Sons, -2005.