इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय
विज्ञान विद्यापीठ

BBCCT-105

प्रोटीन

खंड 1

प्रोटीन पृथक्करण और अलगाव 5

खंड 2

प्रोटीनों की विशेशता और विश्लेशण 77

खंड 3

प्रोटीन की संरचना 135

खंड 4

प्रोटीन कार्यविधि की विविधता 209

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

पाठ्यक्रम रचना समिति

प्रोफेसर बेचन शर्मा जैवरसायन विभाग इलाहाबाद विश्वविद्यालय.	प्रोफेसर रंजीत के. मिश्रा जैव रसायन विभाग लखनऊ विश्वविद्यालय.	संकाय सदस्य डॉ. परवेश बब्बर, सह–आचार्य, एस.ओ.एस.इग्न.
प्रोफेसर रीना गुप्ता जैव प्रौद्योगिकी विभाग एच.पी. विश्वविद्यालय, शिमला	प्रोफेसर संजीव पुरी जैवचिकित्सकीय विभाग यू.आई.ई.टी., पंजाब विश्वविद्यालय	डॉ. एम.अब्दुल करीम सहायक आचार्य, एस.ओ.एस., इग्नू.
प्रोफेसर डी.वी. देवराजू जैवरसायन विभाग बंगलौर विश्वविद्यालय	प्रोफेसर सिमी फरहत बशीर जैवविज्ञान विभाग जामिया मिलिया इस्लामिया विश्वविद्यालय	डॉ. अरविंद कुमार शाक्या, सहायक आचार्य, एस.ओ.एस., इग्नू.
प्रोफेसर के. वली पाशा जैवरसायन विभाग योगी विमाना विश्वविद्यालय आन्ध्र प्रदेश	प्रोफेसर विजयश्री पूर्व निदेशक विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू	डॉ. मनीषा पाण्डेय, सहायक आचार्य, एस.ओ.एस., इग्नू.
डॉ. सुनीता जोशी जैवरसायन विभाग दौलत राम कॉलेज दिल्ली विश्वविद्यालय		डॉ. सीमा कालरा, सहायक आचार्य, एस.ओ.एस., इग्नू.

खंड तैयारी समूह

प्रोफेसर बीधू शशीधर राव, (**सेवामुक्त**)
सामग्री संपादक जैवरसायन विभाग,
विज्ञान विद्यापीठ विश्वविद्यालय,
ओसमानिया विश्वविद्यालय.
हैदराबाद–500 007, तेलंगाना

डॉ. कामेश्वर शर्मा (इकाई 9)
श्री वेंकटरेश्वर कॉलेज, डी. यू.
डॉ. मनीषा पाण्डेय (इकाई 10)
एसओएस, इग्नू.

सामग्री लेखक
डॉ. पवरेश बब्बर (इकाई 1 एवं 8), इग्नू.
डॉ. एम. अब्दुल करीम (इकाई 1 से 5), इग्नू.
डॉ. नीरज कुमार श्रीवास्तव (इकाई 6, 7 एवं 13)
कंसल्टेंट, इग्नू.
डॉ. हेमलता (इकाई 11),श्री वेंकटरेश्वर कॉलेज, डी. यू.
डॉ. एन. विजय कुमार (इकाई 12 एवं 14) भास्कर आचार्य कॉलेज,
डी. यू.
हिन्दी अनुवाद: डॉ. कुमकुम चतुर्वेदी डॉ. ए. एन. सिंह, श्री. अमोध,
डॉ. सुरभी.

पाठ्यक्रम समन्वयक: डॉ. अब्दुल करीम, सह–आचार्य विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

प्रिंट प्रोडक्शन समूह

श्री सुनील कुमार
एस.ओ., इग्नू

श्री राजीव गिरधर
सहायक कुलसचिव एम.पी.डी.डी., इग्नू

श्री हेमंत
एस.ओ. एम.पी.डी.डी., इग्न.

श्री सुमित वर्मा (आभार ग्राफिक्स और शब्द प्रक्रमण)

इन्दिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय, 2021. आई.एस.बी.एन :...............अस्वीकृति : इस प्रस्तुत मॉड्यूल में, वेब आधारित संसाधनों से, जो सामग्री ली गई है, उनका उपयोग केवल शैक्षणिक उद्देश्यों के लिए ही तिकया जाएगा, न कि व्यवसायिक उद्देश्यों के लिए। सर्वाधिकार सुरिक्षित है। इस कार्य का कोई भी भाग (या हिस्सा) माइमोग्राफ या किसी अन्य माध्यम से किसी भी रूप में पुनः प्रस्तुतीकरण, प्रतिलिप्याधिकार की लिखित अनुमति के बिना नहीं किया जा सकता है। इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय के पाठ्यक्रमों के बारे में अधिक जानकारी विश्वविद्यालय के कार्यालय मैदानगढ़ी, नई दिल्ली–110068 से प्राप्त की जा सकती है या इग्नू के अधिकारिक वेबसाइट डब्लू.डब्लू.डब्लू. इग्नू.एसी. इन से प्राप्त की जा सकती है। प्रोफेसर सुजाता वर्मा, निदेशक, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू के द्वारा व इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय की ओर से मुद्रित व प्रकाशित। मुद्रण हुआ:

प्रस्तावना : प्रोटीन

प्रिय शिक्षार्थियों जैव रसायन बीएससी ऑनर्स के दूसरे सेमेस्टर में स्वागत है। हम उम्मीद करते हैं कि आपने आपके पिछले सेमेस्टर में जीवन के अणु और कोशिका जैविकी की बुनियादी अवधारणाओं को सीखने में मजा आया होगा। इस सेमेस्टर में आप जैव रसायन के दो वैकल्पिक पाठ्यक्रमों का अध्ययन करेंगे जिसमें प्रोटीन और एंजाइम शामिल हैं। हालांकि पहला कोर्स जो कि प्रोटीन है (बीबीसीटी–105) के इस पाठ्क्रम में विस्तार से पेश किया जाएगा। चूंकि आपने पहले सेमेस्टर में अमीनो अम्ल और उनकी परस्परक्रिया से प्रोटीन संरचनाओं के निर्माण के बारे में अध्ययन किया है। इसलिए इस पाठ्यक्रम में आप प्रोटीन संरचना जैव विश्लेषात्मक तकनीकों के उच्च क्रम के बारे में विस्तार से अध्ययन करेंगे जो निष्कर्षण, अलगाव और पृथक्करण के उद्देश्य से व्यापक रूप से उपयोग की जाती हैं। इन विषयों के अलावा इस पाठ्यक्रम को संरचनात्मक घटकों और प्रतिरक्षी अणुओं जैसे प्रोटीन के कुछ विशेष कार्यों को समझाने के लिए डिजाइन किया गया है। इस पाठ्यक्रम में प्रोटीन की वलन बुनियादी अवधारणाओं के बारे में भी चर्चा करेंगें।

इग्नू पाठ्यक्रमों को डिजाइन करने के मानक अभ्यास के रूप में हमने इस पाठ्यक्रम की 14 इकाइयों को 4 खं डमें व्यवस्थित किया है। इस पाठ्यक्रम का खंड एक प्रोटीन अलगाव और पृथक्करण के रूप में प्रदर्शित है। इस खं डमें चार इकाइयाँ हैं जो अमीनो अम्ल के बीच विभिन्न परस्परक्रियाओं पर चर्चा करती हैं, जो प्रोटीन संरचना के रखरखाव के साथ–साथ प्रोटीन द्वारा प्रदर्शित विविध कार्यों के लिए आवश्यक हैं। इसके साथ आप विभिन्न जैवभौतिकीय विधियों का उपयोग करके प्रोटीन क निष्कर्षण के बारे में अध्ययन करेंगे। इस खंड की अंतिम दो इकाइयाँ रल विभाजन से लेकर उन्नत वर्णलेखिकी तकनीकों तक की पृथक्करण के बारे में जानकारी मिलेगी।

इस पाठ्यक्रम का खंड प्रोटीन के लक्षण वर्णन और विश्लेषण से संबंधित है। इस खंड में तीन इकाइयाँ हैं जहाँ पहली इकाई वैद्युतकण संचालन का उपयोग करके प्रोटीन के लक्षण वर्णन के लिए समर्पित है। इस खंड की दूसरी इकाई एंजाइम और रासायनिक विधियों का उपयोग करके प्रोटीन की आवृत्ति और विश्लेषण के बारे में बताती है।

इस पाठ्यक्रम के तीसरे खंड में प्रोटीन के संरचनात्मक पहलुओं के बारे में बताया जाएगा, इस खंड की पहली इकाई में प्रोटीन की त्रिविमीय संरचना के बारे में बताया गया है, जहां आप युग्मन की लंबाई और विन्यास से जुड़े मुद्दों के बारे में सीखेंगे। इस इकाइ मेंआप रामचंद्रन प्लॉट के बारे में भी जानेंगे जो प्रोटीन की द्वितीयक संरचना को समझने में महत्वपूर्ण है। इस खंड की तीसरी इकाई प्रोटीन तह के बारे में बताती है। प्रोटीन वलन स्वास्थ्य और रोग के जीव विज्ञान में एक महत्वपूर्ण भूमिका निभाती है, प्रोटीन वलन और प्रसिद्ध बीमारी अल्जाइमर के बीच संबंध जानकर आपको आश्चर्य होगा। इस खंड की अंतिम इकाई जो कंप्यूटर आधारित कौशल का उपयोग कर प्रोटीन के क्षेत्र में अनुसंधान के संबंध में महत्वपूर्ण है। इस इकाई में विभिन्न प्रोटीन संरचना डेटाबेस के बारे में जानकारी मिलेगी।

इस पाठ्यक्रम का अंतिम खंड प्रोटीन प्रकार्य की विविधता के लिए समर्पित है। इस खंड की पहली इकाई परिवहन, भंडारण, ग्राही (रिसेप्टर) और संकेतन (सिग्नलिंग) अणुओं के रूप में प्रोटीन के बारे में है। इस खंड की दूसरी इकाई में मायोग्लोबिन और हीमोग्लोबिन जैसे महत्वपूर्ण प्रोटीनों के बारे में विस्तार से चर्चा की गई है। इस खंड की अंतिम इकाई पाठ्यक्रम विशिष्ट प्रोटीनों को समर्पित है जिसके अंतर्गत आप प्रतिरक्षी और एक्टिन मायोसिन तंतु (फिलामेंट्स) के बारे में अध्ययन करेंगे।

प्रिय शिक्षार्थियों यदि आप इस पाठ्यक्रम की संरचना को देखते हैं जो कुछ हद तक अद्वितीय और महत्वपूर्ण है। सबसे पहले हम आपसे अनुरोध करते हैं कि आप इकाइयों का अध्ययन करें और अपने सीखने और समझने की प्रगति की जांच करने के लिए नियमित अंतराल पर दिए गए बोध प्रश्नों के उत्तर दें।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस पाठ्यक्रम का अध्ययन करने के बाद आप निम्नलिखित में सक्षम होंगे

- स्थिरीकरण प्रोटीन संरचना अमीनो अम्ल के बीच परस्परक्रिया कर पायेंगे,
- प्रोटीन अलगाव और पृथक्करण तकनीकों के कार्य सिद्धांतों की व्याख्या कर सकेंगे,
- प्रोटीन के लक्षण, वर्णन की बुनियादी अवधारणाओं को स्पष्ट कर पायेंगे,
- प्रोटीन अनुक्रमण में शामिल चरणों का वर्णन कर सकेंगे,
- अलगाव और विश्लेषात्मक तकनीकों के बीच भेद कर पायेंगे,
- प्रोटीन वलन और संबंधित रोगों के बीच जैविक संबंध की व्याख्या कर सकेंगे,
- कम्प्यूटर जीव विज्ञान के विभिन्न प्रोटीन डेटाबेस और अनुप्रयोगों की सूची बना पायेंगे,
- प्रोटीन संरचनात्मक विविधता और विशिष्ट कार्यों का औचित्य सिद्ध कर सकेंगे, और

प्रोटीन की जैव रासायनिक और शारीरिक गतिविधियों का मूल्यांकन कर पायेंगे।

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय
विज्ञान विद्यापीठ

BBCCT-105

प्रोटीन

खंड 1

प्रोटीनों की विशेशता और विश्लेषण

इकाई 1 ऐमीनो अम्ल, पेप्टाइड और प्रोटीन	7
इकाई 2 प्रोटीनों का निष्कर्षण	30
इकाई 3 पृथक्करण तकनीकें: I	47
इकाई 4 पृथक्करण तकनीकें: II	55

खंड 1 : प्रोटीन पृथक्करण और अलगाव

इस खंड में 4 इकाइयाँ हैं, पहली इकाई अमीनो अम्ल, पेप्टाइड और प्रोटीन को समझाने के लिये समर्पित है। आपने पिछले सेमेस्टर में अमीनो अम्ल और प्रोटीन के बारे में चर्चा की है। इस खंड की पहली इकाई जैविक रूप से महत्वपूर्ण पेप्टाइड जैसे अतिरिक्त विषयों की व्याख्या करती है जो हर्मोन, प्रतिरक्षी और वृद्धि कारक के रूप में कार्य करते हैं। इकाई के अंत में आप प्रोटीन प्रकाग्र की विविधता के बारे में अध्ययन करेंगे।

दूसरी इकाई प्रोटीन के निष्कर्षण पर केंद्रित है जहां आप कोशिकाओं और उनके उपकोशिका स्थानों से प्रोटीन के निष्कर्षण के लिए नियोजित विभिन्न विधियों के बारे में अध्ययन करेंगे। इस इकाई में इन तकनीकों के अंतर्निहित सिद्धांतों की व्याख्या करने पर मुख्य ध्यान दिया जाएगा।

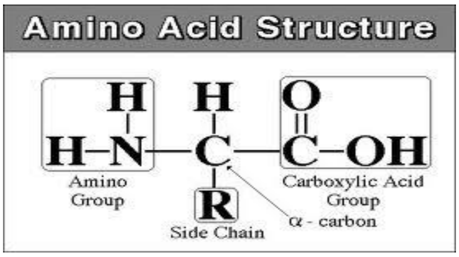
इस खंड की अगली 2 इकाइयाँ पृथक्करण तकनीकों पर अधिक जोर देती हैं और इसलिए उन्हें पृथक्करण तकनीक एक और पृथक्करण तकनीक 2 के रूप में नामित किया गया है। इकाई 3 प्राकृत प्रोटीन विभाजन तकनीकों और डायलिसिस (अपहीन) जैसी तकनीकों जो प्रोटीन जैव रसायन के क्षेत्र में व्यापक रूप से उपयोग की जाती हैं। अंतिम इकाई विविध वर्णलेखिकी (क्रोमैटोग्राफिक) तकनीकों के सिद्धांतों और बुनियादी कार्य तंत्र की व्याख्या करने के लिए समर्पित है, जो एक शोधकर्ता को प्रोटीन से वांछित प्रोटीन का अलगाव करने में मदद करती है।

शिक्षार्थियों के लिए यह जानना महत्वपूर्ण है कि इस खंड में प्रोटीन के पृथक्करण के बाद अलगाव के लिए विषयों को शामिल किया गया है, जिसका उपयोग करके आप विश्लेषात्मक तकनीकों की महत्वपूर्ण भूमिका समझ सकते हैं।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस खंड का अध्ययन करने के बाद आप निम्नलिखित प्रकार से सक्षम होंगे

- जैविक रूप से महत्वपूर्ण प्रोटीनों का प्रकाश हार्मोन प्रतिरक्षी के रूप में व्याख्या कर सकेंगे,
- प्रोटीन के निष्कर्षण के लिए उपलब्ध विभिन्न तकनीकों की सूची बना सकेंगे,
- प्रोटीन सांद्रण तकनीक के महत्व का वर्णन कर सकेंगे,
- विभिन्न वर्णलेखिकी (क्रोमैटोग्राफिक) तकनीकों के सिद्धांतों का वर्णन कर सकेंगे, और
- निष्कर्षण और पृथक्करण तकनीकों के बीच अंतर कर पायेगे।



इकाई 1

ऐमीनो अम्ल, पेप्टाइड और प्रोटीन

रूपरेखा

1.1 प्रस्तावना
संभावित अध्ययन परिणाम
1.2 ऐमीनो अम्ल
संरचना
त्रिविम समावयवता
ऐमीनो अम्लों का वर्गीकरण
गैर–स्टैन्डर्ड एमीनो अम्ल
1.3 ऐमीनो अम्लों के गुण
भौतिक गुण
ऐमीनो अम्लों के अनुपामन वक्र
रासायनिक गुण
1.4 पेप्टाइड
जैविक रूप से सक्रिय पेप्टाइड
1.5 प्रोटीनों की विशेषताएँ
1.6 सारांश
1.7 अंत में कुछ प्रश्न
1.8 उत्तर
1.9 अन्य सुझाई गई पुस्तकें

1.1 प्रस्तावना

पिछले पाठ्यक्रम BBCT-101, खंड I, इकाई–3 में आपने जैव अणुओं के एक महत्वपूर्ण वर्ग प्रोटीनों के विषय में जाना था। जैविक प्रक्रियाओं की क्रियाविधि को समझने के लिए एक जैव रसायनविज्ञानी को प्रोटीनों के विषय में पढ़ना होता है। प्रोटीनों को जानकारी प्रदान करने वाले वृहदाणु भी कहा जाता है क्योंकि ये वे आणविक साधन हैं जिनके द्वारा आनुवंशिक सूचना की अभिव्यक्ति होती है। प्रोटीन कोशिका का सबसे बड़ा भाग बनाते हैं (जल के अतिरिक्त)। सामान्य अथवा जटिल सभी प्रोटीन अपेक्षाकृत छोटी इकाइयों के बने होते हैं जिन्हें ऐमीनो अम्ल कहते हैं।

ये ऐमीनो अम्ल सहसंयोजी रूप से पेप्टाइड बंधों द्वारा रेखीय क्रम में जुड़े रहकर प्रोटीनों की मूल संरचना बनाते हैं। कोशिकाएं उन्हीं बीस ऐमीनो अम्लों के अनकों संयोजनों द्वारा विविध प्रकार के प्रोटीन बनाती हैं। इन ऐमीनो अम्लों को अक्षर माना जाता है जिनमें प्रोटीन संरचना को लिखा जाता है। प्रोटीन विविध आमापों में, छोटे पेप्टाइडों से लेकर कुछ ऐमीनो अम्ल बहुत अधिक बड़े बहुलक हो सकते हैं जिनका अणुभार किलोडाल्टनों (KDa) तक में हो सकता है। इन विविध प्रोटीनों में एन्जाइम, हार्मोन, एन्टीबॉडीज, वृद्धि कारक सम्मिलित हैं जिनके भिन्न जैविक गुण और क्रियाकलाप होते हैं। आइए हम इस

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

इकाई का आरंभ प्रोटीनों की मौलिक इकाई ऐमीनो अम्लों और उनके गुणों के विवरण के साथ करते हैं।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस इकाई का अध्ययन करने के बाद, आप :

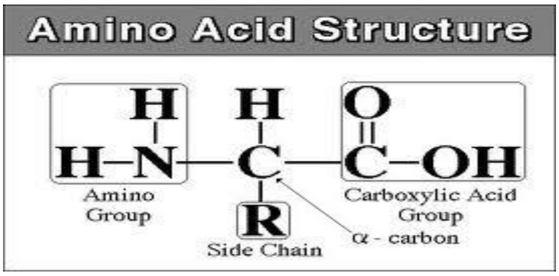
- ऐमीनो अम्ल के गुणों का वर्णन कर सकेंगे;
- ऐमीनो अम्लों का वर्गीकरण कर सकेंगे;
- जैविक महत्व के पेप्टाइडों और प्रोटीनों की चर्चा कर सकेंगे, और
- प्रोटीनों के विविध कार्यों को बता सकेंगे।

1.2 ऐमीनो अम्ल

आपको पिछली इकाई (इकाई-3, खंड-1, पाठ्यक्रम BBCCT-101) से ऐमीनो अम्लों की संरचना के विषय में दोहरा लेना चाहिए। ऐमीनो अम्ल प्रोटीनों की एकलक इकाई है। बीस ऐमीनो अम्ल जेनेटिक कोड (आनुवंशिक कूट) के त्रि कोडोनों द्वारा प्रत्यक्ष रूप से कूटलेखित होते हैं। इन्हें स्टैन्डर्ड ऐमीनो अम्ल कहा जाता है।

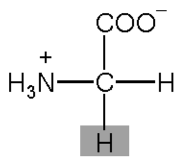
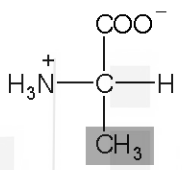
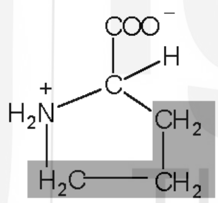
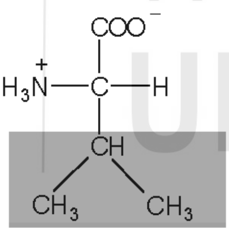
1.2.1 संरचना

ऐमीनो अम्ल कार्बन, हाइड्रोजन, ऑक्सीजन और नाइट्रोजन परमाणुओं के बने होते हैं। यद्यपि पार्श्व श्रृंखलाओं में अन्य परमाणु भी पाए जाते हैं। सभी बीस ऐमीनो अम्लों में समान संरचनात्मक विशेषताएं होती हैं। ये सभी α–ऐमीनो अम्ल होते हैं जिनमें एक एक एमीन समूह (-NH_2) और एक कार्बोक्सिलिक अम्ल क्रियात्मक समूह (-COOH) एक ही कार्बन परमाणु (α–कार्बन) से जुड़ा रहता है (चित्र 1.1)। लेकिन ऐमीनो अम्ल पार्श्व श्रृंखला (-R) में एक दूसरे से भिन्न होते हैं जो प्रत्येक ऐमीनो अम्ल के लिए विशिष्ट होती है। ऐमीनो अम्ल की पार्श्व श्रृंखला को प्रदर्शित करने वाला R-समूह सामान्य जैसे एक हाइड्रोजन परमाणु (H) अथवा मेथिल समूह (-CH_3) अथवा एक जटिल संरचना हो सकता है। अतः R–समूह संरचना, आमाप, वैद्युत आवेश के साथ ही ऐमीनो अम्लों की विलेयता में भिन्नता करता है। सभी बीस एमीनो अम्लों को सारणी 1.1 में सूचीबद्ध किया गया है। इनमें से कुछ ऐमीनो अम्लों की पहचान उनके प्रचलित नामों से की जाती है जो उन स्रोत से व्युत्पन्न होते हैं जिनसे उन्हें वियुक्त किया जाता है अथवा उनसे संबद्ध किसी अन्य गुण से व्युत्पन्न होते हैं। उदाहरण के लिए, टाइरोसीन का यह नाम उसके स्रोत जैसे दूध, प्रोटीन कैजीन (ग्रीक ट्रॉस माने चीज़/पनीर है) से लिया गया है।

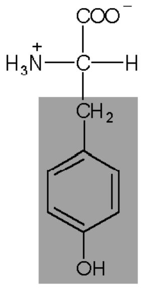
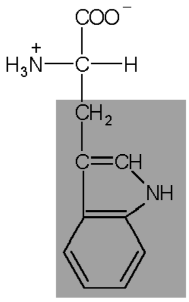
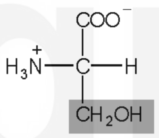
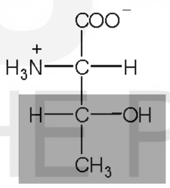


चित्र 1.1: एक ऐमीनो अम्ल की संरचना

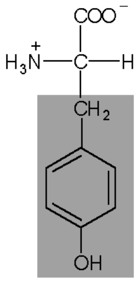
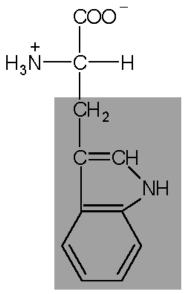
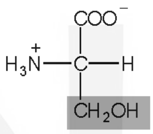
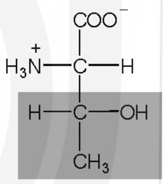
सारणी 1.1 : प्रोटीनों में पाए जाने वाले ऐमीनो अम्ल

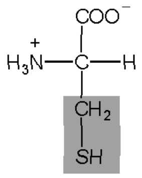
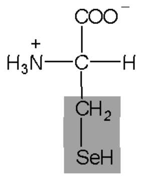
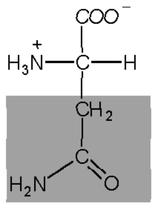
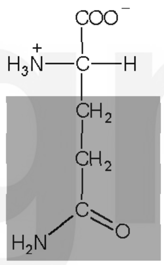
				pK_a values			
Amino acid	***Abbreviation/ Symbol***	***M_r***	***Structure***	***pK_1 (-COOH)***	***pK_R (-NH_3^+)***	***pK_R (R group)***	***pI***
Nonpolar, aliphatic R groups							
Glycine	Gly G	75	 Glycine	2.34	9.60		5.97
Alanine	Ala A	89	 Alanine	2.34	9.69		6.01
Proline (imino acid)	Pro P	115	 Proline	1.99	10.96		6.48
Valine	Val V	117	 Valine	2.32	9.62		5.97

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

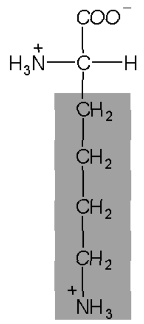
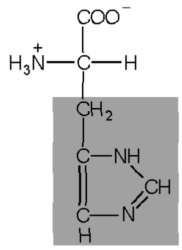
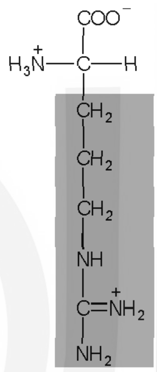
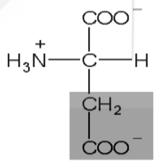
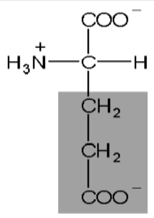
Tyrosine	Tyr Y	181	 Tyrosine	2.20	9.11	10.07	5.66
Tryptophan	Trp W	204	 Tryptophan	2.38	9.39		5.89
Polar, uncharged R groups							
Serine	Ser S	105	 Serine	2.21	9.15		5.68
Threonine	Thr T	119	 Threonine	2.11	9.62		5.87

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

Tyrosine	Tyr Y	181	 Tyrosine	2.20	9.11	10.07	5.66
Tryptophan	Trp W	204	 Tryptophan	2.38	9.39		5.89
Polar, uncharged R groups							
Serine	Ser S	105	 Serine	2.21	9.15		5.68
Threonine	Thr T	119	 Threonine	2.11	9.62		5.87

Cysteine	Cys C	121	 Cysteine	1.96	10.28	8.18	5.07
Selenocysteine	Sec U	168.05	 Selenocysteine				
Asparagine	Asn N	132	 Asparagine	2.02	8.80		5.41
Glutamine	*Gln Q*	146	 Glutamine	2.17	9.13		5.65
Positively charged R groups							

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

Lysine	Lys K	146	 Lysine	2.18	8.95	10.53	9.74
Histidine	His H	155	 *Histidine*	1.82	9.17	6.00	7.59
Arginine	Arg R	174	 Arginine	2.17	9.04	12.48	10.76
Aspartate	Asp D	133	 Aspartate	1.88	9.60	3.65	2.77
Glutamate	Glu E	147	 Glutamate	2.19	9.67	4.25	3.22

प्रमुख बातें : क्या आपने देखा कि प्रत्येक ऐमीनो अम्ल को तीन अक्षर का संक्षिप्त नाम (अंग्रेजी के बड़े या छोटे अक्षर) और एक अक्षर का कोड (बड़े अक्षर का) दिया गया है। तीन अक्षर के कोड में ऐमीनो अम्ल के नाम के पहले तीन अक्षर होते हैं। एक अक्षर का कोड प्रोटीनों में पाए जाने वाले ऐमीनों अम्लों की बड़ी संख्या के संयोजन और क्रम के सूचित करने के लिए आशुलिपि का काम करता है। संक्षिप्त नाम और एक अक्षर के कोड बायोइन्फोर्मेटिक्स में अत्यधिक महत्व के हैं क्योंकि इससे डाटाफाइलों का आमाप

कम हो जाता है और संकेतन/अंकन का काम आसान अधि त्वरित गति से हो जाता है और याद रखने में भी आसानी होती है।

1.2.2 त्रिविम समावयवता

आपको पिछली इकाई (इकाई-3, खंड-I, पाठ्यक्रम BBCT-101) से ऐमीनो अम्लों की त्रिविमसमावयवता के पाठ को दोहरा लेना चाहिए।

1.2.3 ऐमीनो अम्लों का वर्गीकरण

ऐमीनो अम्लों का वर्गीकरण उनकी संरचना, रासायनिक आवश्यकता और उपापचयी नियति के आधार पर किया जा सकता है।

ऐमीनो अम्लों की संरचना पर आधारित वर्गीकरण

पुनः पूर्व इकाई (इकाई-3, खंड-I, पाठ्यक्रम BBCT-101) से दोहराइए और ऐमीनो अम्लों की संरचनाओं को ध्यानपूर्वक देखिए। आपको उनकी संरचना में कुछ अन्तर दिखाई देंगे, जिनके द्वारा संरचनात्मक आधार पर उनका वर्गीकरण किया जाता है।

ऐलीफेटिक पार्श्व श्रृंखला वाले ऐमीनो अम्ल

ऐमीना अम्लों का ये वर्ग मोनोऐमीनो मोनोकार्बोक्सिलिक अम्लों का है जैसे कि ग्लाइसीन, एलानिन, वैलीन, ल्यूसीन और आइसोल्यूसीन। इन ऐमीनो अम्लों में एलीफेटिक पार्श्व श्रृंखलाए होती हैं। ग्लाइसीन सभी बीस ऐमीनो अम्लों में सबसे सरल है।

ऐरोमेटिक ऐमीनो अम्ल

वे ऐमीनो अम्ल जिनमें पार्श्व श्रृंखला में ऐरोमेटिक वलय होता है, ऐरोमेटिक ऐमीनो अम्ल कहलाते हैं। फेनिलएलानिन, ट्रिप्टोफान, टाइरोसीन और हिस्टीडीन ऐरोमेटिक ऐमीनो अम्ल हैं।

हाइड्रोक्सिल समूह युक्त ऐमीनो अम्ल

तीन ऐमीनो अम्ल : सीरीन, थ्रिओनिन और टाइरोसीन की संरचना में हाइड्रोक्सिल समूह (-OH) होता है। एक अन्य ऐमीनो अम्ल में टाइरोसीन में हाइड्रोक्सिल समूह के साथ ही ऐरोमेटिक वलय भी होता है। अतः इसे ऐरोमेटिक ऐमीनो अम्लों के अंर्तगत् भी वर्गीकृत किया जाता है।

अम्लीय ऐमीनो अम्ल

अम्लीय ऐमीनो अम्लों में ऐमीनो समूहों की तुलना में अधिक संख्या में कार्बोक्सिल समूह होते हैं जैसेकि ऐस्पार्टिक अम्ल और ग्लूटामिक अम्ल। इन ऐमीनो अम्लों में दो कार्बोक्सिलिक समूह (-COOH) होते हैं और ये मोनो ऐमीनो डाइकार्बोक्सिलिक अम्ल कहलाते हैं।

क्षारकीय ऐमीनो अम्ल

लाइसीन, आर्जीनिन और हिस्टीडीन क्षारकीय ऐमीनो अम्ल हैं। इन ऐमीनो अम्लों में दो ऐमीनो समूह (NH_2) और एक कार्बोक्सिलिक समूह होता है और ये डाइऐमीनो मोनो कार्बोक्सिलिक अम्ल कहलाते हैं।

सल्फर युक्त ऐमीनो अम्ल

जिन ऐमीनो अम्लों में सल्फर होता है वे इस समूह में आते हैं। सिस्टीन और मीथिओनिन ऐमीनो अम्ल इस समूह के सदस्य हैं। सिस्टीन में एक सल्फीहाइड्रिल समूह होता है, जबकि मीथिओनिन में थायोएस्टर समूह होता है।

इमीनो अम्ल

इमीनो अम्लों में एमीनो समूह (NH_2) की अपेक्षा एमीनो समूह (=NH; द्वितीयक एमीन समूह) हाता है। प्रोलीन जिसमें पाइरोलीडीन वलय होता है इमीनो अम्ल का एक उदाहरण है। संरचनात्मक रूप से यह अन्य ऐमीनो अम्लों से भिन्न होता है क्योंकि इसका ऐमीनो समूह द्वितीयक है जो R-समूह और एमीनो नाइट्रोजन के बीच वलय संवृत्ति से बनता है। यह एकमात्र चक्रिक ऐमीनो अम्ल है।

ध्रुवता के आधार पर वर्गीकरण

आप पुनः पूर्व इकाई (इकाई-3, खंड-1, पाठ्यक्रम BBCCT-101) को दोहराइए जिससे ऐमीनो अम्लों की ध्रुवता के आधार पर वर्गीकरण का विवरण प्राप्त हो सके।

अ-ध्रुवीय ऐमीनो अम्ल

एलानिन, ल्यूसीन, आइसोल्यूसीन, वैलीन, मीथिओनिन, फेनिल एलानिन, ट्रिप्टोफान और प्रोलीन

ध्रुवीय ऐमीनो अम्ल अनावेशित R-समूह के साथ

ग्लाइसीन, सीरीन, थ्रिओनिन, सिस्टीन, ग्लूटामीन, ऐस्पार्जीन और टाइरोसीन

धनात्मक R समूह के साथ ध्रुवीय ऐमीनो अम्ल

लाइसीन, आर्जीनीन और हिस्टीडीन

ऋणात्मक R समूह के साथ ध्रुवीय ऐमीनो अम्ल

ऐस्पार्टिक अम्ल और ग्लूटामिक अम्ल।

ऐमीनो अम्लों का पोषक आधारित वर्गीकरण

अनिवार्य ऐमीनो अम्ल : वे ऐमीनो अम्ल जिनका संश्लेषण शरीर द्वारा नहीं होता है लेकिन वे अत्यधिक अनिवार्य होते हैं, अनिवार्य ऐमीनो अम्ल कहलाते हैं। इसलिए इन ऐमीनो अम्लों को आहार द्वारा प्रदान किया जाना चाहिए। इनकी आवश्यकता मानव शरीर की उचित वृद्धि और रखरखाव के लिए होती है। 20 ज्ञात ऐमीनो अम्लों में से, 10 को अनिवार्य ऐमीनो अम्ल माना जाता है। इनमें ल्यूसीन, आइसोल्यूसीन, लाइसीन, मेथिओनिन, फेनिलएलानिन, थ्रिओनिन, ट्रिप्टोफान और वैलीन हैं।

अर्ध-अनिवार्य ऐमीनो अम्ल : दो ऐमीनो अम्ल आर्जीनिन और हिस्टीडीन का संश्लेषण वयस्कों में होता है लेकिन बढ़ते बच्चों में नहीं होता है इसलिए इन्हें अर्ध-अनिवार्य ऐमीनो अम्ल माना जाता है।

गैर-अनिवार्य ऐमीनो अम्ल : वे ऐमीनो अम्ल जिनका संश्लेषण शरीर द्वारा होता है गैर-अनिवार्य ऐमीनो अम्ल कहलाते हैं। ग्लाइसीन, एलानिन, सीरीन, सिस्टीन, ऐस्पार्टेट, ऐस्पेरेजीन, ग्लूटामेट, ग्लूटामीन, टाइरोसीन और प्रोलीन का संश्लेषण शरीर के भीतर ही जैविक आवश्यकताओं को पूरा करने के लिए होता है।

उपापचयी नियति क आधार पर वर्गीकरण

ऐमीनो अम्लों का उपयोग हमारे शरीर में विभिन्न कार्यो के लिए होता है। इनमे से अधिकांश का उपयोग प्रोटीनों के निर्माण खंडों के रूप में किया जाता है। ऐमीनो अम्लों को शरीर में भंडारित नहीं किया जा सकता है। अतः कोई भी ऐमीनो अम्ल, जिसकी आवश्यकता तात्कालिक जैवसंश्लेषी आवश्यकताओं के लिए नहीं होती है, वे विएमिनीकरण के द्वारा उपापचयी रूप से विखंडित हो जाते हैं। ऐमीनो अम्लों के कार्बन कंकाल का उपयोग उपापचयी ईंधन के रूप में हो जाता है अथवा ये एसीटिल CoA के द्वारा वसा अम्लों में रूपांतरित हो जाते हैं। इसलिए, ऐमीनो अम्लों को उनके उपापचयी नियति के आधार पर भी वर्गीकृत किया जा सकता है क्योंकि इन ऐमीनो अम्लों का कार्बन कंकाल ग्लूकोजनी और कीटोजनी मध्यवर्तियों के संश्लेषण के लिए पूर्ववर्ती के रूप में काम करता है।

ग्लूकोजनी एमीनो अम्ल : वे ऐमीनो अम्ल जिनका उपापचयी विखंडन होता है और उनका कार्बन कंकाल ग्लूकोस, ग्लाइकोजन इत्यादि के निर्माण के लिए पूर्ववर्ती की भांति कार्य करते हैं, ग्लूकोजनी ऐमीनो अम्ल कहलाते हैं। ग्लूकोजनी ऐमीनो अम्ल हैं : एलानिन, आर्जीनिन, ऐस्पेरेजीन, ऐस्पार्टेट, सिस्टीन, ग्लूटामेट, ग्लाइसीन, हिस्टीडीन, मेथिओनिन, प्रोलीन, सीरीन और वैलीन।

कीटोजनी ऐमीनो अम्ल : वे ऐमीनो अम्ल जिनका उपापचयी विखंडन होने पर एसीटिल CoA अथवा एसीटोएसीटिल CoA प्राप्त होते हैं (वे ऐसे उपापचयज नहीं बनाते हैं जिन्हें ग्लूकोस में परिवर्तित किया जा सकता है), कीटोजनी ऐमीनो अम्ल कहलाते हैं। दो ऐमीनो अम्ल ल्यूसीन और लाइसीन कीटोजनी ऐमीनो अम्ल हैं।

ग्लूकोजनी और कीटोजनी ऐमीनो अम्ल : उपापचयन के समय इस श्रेणी के ऐमीनो अम्लों के कार्बन कंकाल का एक भाग एसीटिल CoA अथवा एसीटोएसीटिल–CoA (कीटोजनी पथ) प्रदान करता है और शेष ग्लूकोजनी पथ में चला जाता है। लाइसीन, आइसोल्यूसीन, फेनिलएलानिन, टाइरोसीन और ट्रिप्टोफान आंशिक रूप से कीटोजनी और आंशिक रूप से ग्लूकोजनी होते हैं।

बोध प्रश्न 1 : निर्देशानुसार हल कीजिए :

क) लाइसीन, आर्जीनिन डाइऐमीनो मोनो कार्बोक्सिलिक अम्ल हैं (सत्य / असत्य)

ख) ऐस्पार्टिक धनात्मक R समूह होता है (सत्य / असत्य)

ग) .... और .... अर्ध अनिवार्य ऐमीनो अम्ल हैं (रिक्त स्थानों को भरिए)।

घ) .... और .... कीटोजनी ऐमीनो अम्ल हैं (रिक्त स्थानों को भरिए)

1.2.4 गैर-स्टैन्डर्ड ऐमीनो अम्ल

आपको पूर्व इकाई (इकाई-3, खंड-1, पाठ्यक्रम BBCCT-101) से गैर-स्टैण्डर्ड ऐमीनो अम्लों अथवा अप्रचालित ऐमीनो अम्लों के विषय में दोहरा लेना चाहिए। ये ऐमीनो अम्ल प्राकृतिक रूप से कोशिकाओं में पाए जाते हैं लेकन प्रोटीन संश्लेषण में भागीदारी नहीं करते हैं। अतः ये गैर-स्टैण्डर्ड ऐमीनो अम्ल कहलाते हैं। ये या तो प्रोटीनो में अनुपस्थित होते हैं (कार्नीटीन, गाबा/GABA) अथवा स्टेण्डर्ड ऐमीनो अम्लों के पेप्टाइड अणु में रूपांतरण द्वारा बनते हैं (हाइड्रोक्सीप्रोलीन और सेलीनोमेथिओनिन)।

1.3 ऐमीनो अम्लों के गुण

1.3.1 भौतिक गुण

ऐमीनो अम्ल रंगहीन, क्रिस्टलीय ठोस है। उनका आकार नुकीले सूच्याकार (टाइरोसीन) से लेकर षट्फलकीय पट्टियों (सिस्टीन) तक विविध होता है। ऐमीनो अम्ल मीठे (ग्लाइसीन और एलानिन) से कड़वे (आर्जीनिन) अथवा स्वादहीन (टाइरोसीन) तक हो सकते हैं। ऐमीनो अम्लों का उच्च गलनांक होता है और ये ध्रुवीय विलायकों (जल और एथेनॉल) में अपने आवेशित क्रियात्मक समूहों के कारण घुलनशील होते हैं और अ–ध्रुवीय विलायकों जैसे बेन्जीन, हैक्सेन और ईथर में अघुलनशील होते हैं। कुछ ऐमीनो अम्लों का जलभीत (जल प्रतिकर्षी) और जलरागी क्रम नीचे दिया गया है :

जलभीत (अ–ध्रुवीय) ऐमीनो अम्ल :

Val > Leu ? Phe > Cys > Ala > Gly

जलरागी (ध्रुवीय) ऐमीनो अम्ल

Arg > Lys > Asp > Asn > Ser > Thr

ऐमीनो अम्ल दृश्य प्रकाश को अवशोषित नहीं करते हैं, अतः ये रंगहीन होते हैं। अवरक्त स्पैक्ट्रम में NH_3^+ (3100-3000 cm^{-1}) और COO^- (1600-1500 cm^{-1}) को विशिष्ट अवशोषण पट्टियां दिखाई देती हैं। फेनिल एलानिन, टाइरोसीन और ट्रिप्टोफान उच्च तरंगदैर्ध्य के पराबैंगनी प्रकाश क्षेत्र (250-290 nm) में अवशोषण दिखाते हैं। इन ऐमीनो अम्लों की उपस्थिति UV स्पैट्रम के मापन द्वारा प्रोटीन की मात्रा के निर्धारण में सहायक होती है। ऐमीनो अम्लों की क्रियात्मक समूहों के आधार पर पहचान करने के लिए NMR स्पैक्ट्रोस्कोपी का भी उपयोग किया जाता है।

ऐमीनो अम्ल उभयधर्मी होते हैं क्योंकि इनमें ऐमीनो और कार्बोक्सिल समूह दोनो पाए जाते हैं।

अम्लों और क्षारकों के रूप में ऐमीनो अम्ल

इस अनुभाग के लिए आपको पूर्व इकाई (इकाई-3, खंड-1, पाठ्यक्रम BBCCT-101) में से दोहरा लेना चाहिए।

1.3.2 ऐमीनो अम्लों के अनुमापन वक्र

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

ऐमीनो अम्लों के अनुमापन वक्रों पर आधारित इस अनुभाग के लिए कृपया पूर्व इकाई (इकाई-3, खंड-1, पाठ्यक्रम BBCCT-101) को दोहरा लीजिए।

बोध प्रश्न 5

वैलीन का pK, 2.2 है और pK_2 9.7 है। वैलीन के pI का पता लगाइए।

1.3.3 रासायनिक गुण

ऐमीनो अम्ल सामान्यतः तीन प्रकार की अभिक्रियाएं देते हैं : कार्बोक्सिल (-COOH) समूह के कारण अभिक्रियाएं, ऐमीनो समूह ($-NH_2$) के कारण अभिक्रियाएं और ऐमीनो अम्लों में उपस्थित पार्श्व श्रृंखला के कारण अभिक्रियाएं।

क) -COOH समूह के कारण अभिक्रियाएं

1. विकार्बोक्सिलीकरण

ऐमीनो अम्ल कार्बोक्सिल समूह को निकालने और संगत ऐमीन बनाने के लिए कार्बन डाइ ऑक्साइड निर्मुक्त करने के लिए विकार्बोक्सिलीकरण अभिक्रिया करते हैं। ये अभिक्रिया उन एन्जाइमों की उपस्थिति में होती है जिन्हें विकार्बोक्सीलेस कहते हैं। यह अभिक्रिया महत्वपूर्ण है क्योंकि इससे अनेक जैविक रूप से सक्रिय एमीन जैसे हिस्टामीन, टाइरेमीन, ट्रिप्टेमीन इत्यादि प्राप्त होते हैं।

टाइरोसीन $\rightarrow$ टाइरेमीन + CO_2

हिस्टीडीन $\rightarrow$ हिस्टामीन + CO_2

ट्रिप्टोफान $\rightarrow$ ट्रिप्टेमीन + CO_2

ग्लूटामिक $\rightarrow$ अम्ल गामा + CO_2

2. ऐमाइडों का बनना

ऐमीनो अम्ल ऐमीनो के साथ अभिक्रिया करके एमाइड बनाते हैं। इस अभिक्रिया में डाइकार्बोक्सिलिक अम्लों (α–कार्बोक्सिल के अतिरिक्त) के -COOH समूह अमोनिया के साथ अभिक्रिया करके संगत एमाइड को बनाते हैं।

ऐस्पार्टिक अम्ल + $NH_3 \rightarrow$ ऐस्पेरेजीन

ग्लूटामिक अम्ल + $NH_3 \rightarrow$ ग्लूटामीन

3. लवण निर्माण (क्षारकों के साथ अभिक्रिया

ऐमीनो अम्ल क्षारकों के साथ अभिक्रिया करके लवण बनाते हैं। क्षारकों के साथ अभिक्रिया में -COOH समूह H^+ आयन निर्मुक्त करके कार्बोक्सीलेट (COO-) आयन बनाता है जो धनायनों जैसेकि Na^+ और Ca^{2+} द्वारा उदासीनीकृत होकर लवण बनाते हैं। ग्लूटामिक अम्ल के सोडियम लवण का उपयोग सुस्वादु कर्मक के रूप में किया जाता है।

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COO\,\boxed{H + HO}\,Na \longrightarrow R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COO\,.\,Na + H_2O$$

4. ऐस्टरीकरण (ऐल्कोहॉलों के साथ अभिक्रिया)

ऐमीनो अम्ल ऐल्कोहॉलों के साथ अभिक्रिया करके संगत ऐस्टर बनाते हैं।

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COO\,\boxed{H + HO}-C_2H_5 \xrightarrow{\text{Acid Catalyst}} R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COO-C_2H_5 + H_2O$$

Ethyl ester
of amino acid

ख) -NH_2 समूह के कारण अभिक्रियाएं

1. विएमिनीकरण

विएमिनीकरण अभिक्रियाएं ऐमीनो अम्लों के प्रमुख निम्नीकरण पथों में से एक है और अनिवार्य ऐमीनो अम्लों को गैर-अनिवार्य ऐमीनो अम्लों में परिवर्तित करने में भी सहायता करता है। यकृत ऊतक विएमिनीकरण अभिक्रियाओं का एक प्रमुख स्थान है। ये अभिक्रियाएं अधिकांश ऐमीनो अम्लों का विएमिनीकरण करती हैं। विएमिनीकरण एक उत्क्रमणीय अभिक्रिया है जिसमें -NH_2 समूहों का अन्तर आणविक स्थानांतरण सम्मिलित होता है : एक ऐमीनो अम्ल का α-NH_2 समूह एक कीटो समूह पर स्थानांतरित हो जाता है जिससे नए ऐमीनो अम्ल और नए कीटो का निर्माण होता है। अतः -NH_2 समूह को ग्रहण करने के बाद ऐमीनो अम्ल नया कीटो अम्ल बन जाता है और ग्राही कीटों अम्ल नया ऐमीनो अम्ल बन जाता है।

दो प्रमुख ट्रांसएमीनेस हैं, जो चिकित्सीय महत्व के होते हैं

i) ग्लूटामेट ऑक्सेलोएसीटेट ट्रांसएमीनेस (SGOT) अथवा ऐस्पार्टेट ट्रांसएमीनेस

ऐस्पार्टेट + α–कीटोग्लूटारेट $\xrightarrow{\text{SGOT}}$ ऑक्सेलोएसीटेट + ग्लूटामेट

ii) ग्लूटामेट पाइरूवेट ट्रांसएमीनेस (SGPT) अथवा एलानिन ट्रांसएमीनेस एलानिन + α कीटोग्लूटारेट $\xrightarrow{\text{SGPT}}$ पाइरूवेट + ग्लूटामेट

2. ऑक्सीकारक विएमिनीकरण

विएमिनीकरण ऐमीनो अम्लों के अपचयन में एक प्रमुख चरण है। यकृत और गुर्दे ऑक्सीकारक विएमिनीकरण के प्रमुख स्थान हैं। इस अभिक्रिया प्रक्रिया में ऐमीनो अम्ल का नाइट्रोजन NH_3 (अमोनिया) के रूप में निकल जाता है और α–कीटो अम्ल निर्मित हो जाते हैं। ऑक्सीकारक विएमिनीकरण की प्रक्रिया दो चरणों में होती है :

ऐमीनो अम्ल α–इमीनो अम्ल बनाने के लिए विहाइड्रोजनीकृत हो जाता है, इसके बाद इसमें जल मिलाया जाता है, जिसके कारण यह इमीनो अम्ल α–कीटो अम्ल में परिवर्तित हो जाता है और अमोनिया के रूप में α–इमीनो नाइट्रोजन की हानि होती है।

L–ऐमीनो अम्ल $\xrightarrow{\text{L-ऐमीनो एसिड ऑक्सीडेस}}$ α–इमीनो अम्ल $\xrightarrow{H_2O}$ α–कीटो अम्ल + NH_3

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

3. कार्बएमीनो यौगिक का निर्माण

ऐमीनो अम्लों अथवा प्रोटीन (जैसे कि ग्लोबिन श्रृंखला हीमोग्लोबिन) के α–ऐमीनो समूह में कार्बन डाइऑक्साइड को मिलाने से कार्बऐमिनो यौगिक जैसे कार्बएमीनो हीमोग्लोबिन बनते हैं। यह अभिक्रिया क्षारकीय pH पर होती है और हीमोग्लोबिन द्वारा कार्बन डाइ ऑक्साइड के ऊतकों से फेंफड़ों में परिवहन के साधन का काम करती है।

Hb + NH_2 + CO_2 $\rightarrow$ Hb - NH - COOH (कार्बएमीनो -Hb)

4. निनहाइड्रिन के साथ अभिक्रिया

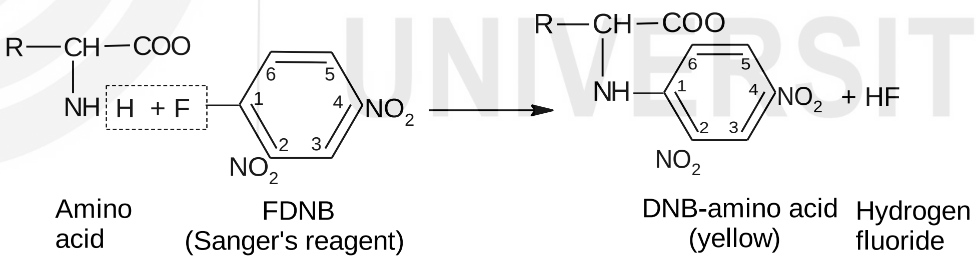
निनहाइड्रिन एक सशक्त ऑक्सीकारक कर्मक है जो α–ऐमीनो अम्लों का ऑक्सीकारक विकार्बोक्सलीकरण करके रूहमेन पर्पल नामक एक बैंगनी रंग का कॉम्प्लैक्स बनाता है। ये अभिक्रिया ऐमीनो अम्लें के गुणात्मक और मात्रात्मक आकलन का आधार बनाती है।

ऐमीनो अम्ल + निनहाइड्रिन $\longrightarrow$ कीटो अम्ल + NH_3 + CO_2 + हाइड्रिनडेन्टिन

हाइड्रिडेन्टिन + NH_3 + निनहाइड्रिन $\longrightarrow$ रूहमेन पर्पल कॉम्प्लैक्स

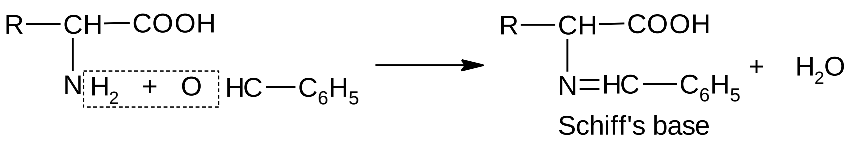
5. FDNB अथवा सेन्गर अभिकर्मक के साथ अभिक्रिया

FDNB [1-फ्लोरो–2, 4 डाइनाइट्रोबेन्जीन] (सामान्य रूप से सेन्गर अभिकर्मक कहलाता है) अल्प क्षारकीय विलयन में N–टर्मिनल ऐमीनो अम्लों के साथ अभिक्रिया करके एक पीले रंग का व्युत्पन्न, DNB-ऐमीनोअम्ल देता है। यह अभिक्रिया प्रोटीनों के क्रम के निर्धारण में सहायता करती है।



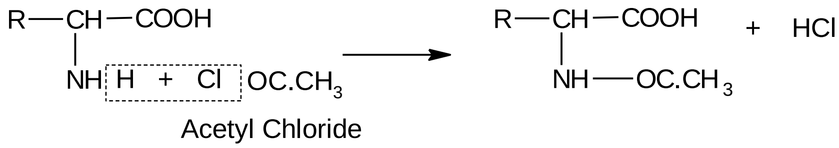
6. बेन्जल्डिहाइड के साथ अभिक्रिया

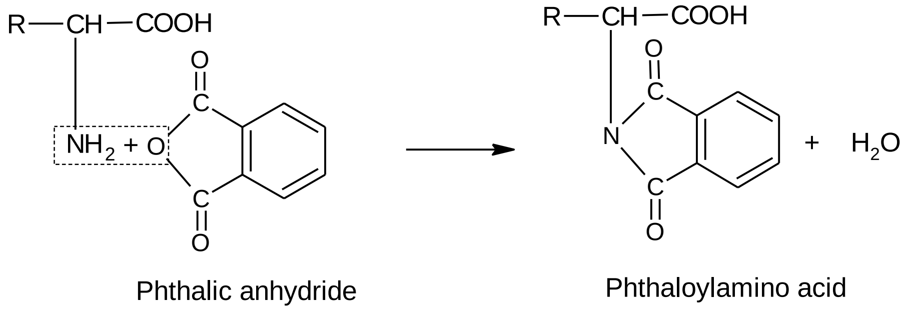
ऐमीनो अम्ल बेन्जेल्डिहाइड के साथ अभिक्रिया करके शिफ बेस बनाते हैं



7. एसिलीकरण

किसी क्षारकीय माध्यम में, ऐमीनो अम्ल क्लोराइड़ों (CH_3 COCL,C_6H_5COCL) के साथ अभिक्रिया करके एसिलीकरण करते हैं।

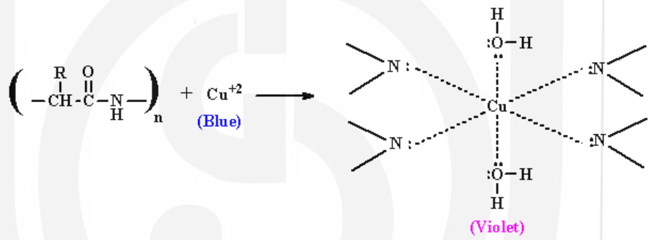




ग) पार्श्व श्रृंखलाओं के कारण अभिक्रियाएं

1. बाइयूरेट परीक्षण

प्रोटीन के पेप्टाइड बंध क्षारकीय स्थिति में क्यूप्रिक कॉपर के साथ अभिक्रिया करके बैंगनी रंग देते हैं (कृपया ऐमीनो अम्ल और प्रोटीनों के गुणात्मक विश्लेषण पर BBCCL102-परीक्षण सं. 6 में से देखिए।



पेप्टाइड बंध क्षारकीय 0.2% कॉपर सल्फेट विलयन (अथवा बाइयूरेट अभिकर्मक) के साथ उपचारित किए जाने पर एक विशिष्ट बैंगनी रंग उत्पन्न करते हैं। यह अभिक्रिया 'बाइयूरेट अभिक्रिया' कहलाती है। डाइ पेप्टाइडों के अतिरिक्त अन्य सभी प्रोटीन ये अभिक्रिया करते हैं। बाइयूरेट अभिक्रिया का उपयोग व्यापक रूप से प्रोटीनो का पता लगाने के लिए एक गुणात्मक परीक्षण और प्रोटीन सान्द्रता के मात्रात्मक मापन के लिए किया जाता है।

बाइयूरेट परीक्षण के अतिरिक्त मिलन, होमकिन्स, कोल, फोलिन, साकागूची, पॉली और एर्लिक परीक्षण भी होते हैं। इन परीक्षणों के विषय में और अधिक जानकारी के लिए कृपया ऐमीनो अम्ल और प्रोटीनों के गुणात्मक विश्लेषण पर BBCL-102 परीक्षण सं. 6 में देखिए।

2. ट्रांसमेथिलीकरण

जैसाकि नाम से पता चलाता है इस अभिक्रिया में मेथिल समूह का एक यौगिक से दूसरे में स्थानांतरण सम्मिलित होता है। मीथिओनिन के मेथिल समूह का स्थानांतरण इसके S–एडीनोसिल मेथिओनिन में सक्रियन के बाद होता है। ग्राही अणु मेथिलीकृत हो जाता है।

मेथिओनिन + ग्राही $\rightarrow$ मेथिलीकृत ग्राही + होमोसिस्टीन

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

इस अभिक्रिया के अनेक जैविक निहितार्थ हैं जैसे नोइएपीनेफ्रिन का एपीनेफ्रिन में इथेनॉल एमीन का कोलीन में हिस्टीडीन का मेथिल हिस्टीडीन, tRNA का मेथिलीकृत tRNA, एसीटिल सेरोटोनिन का मलाटोनिन में रूपांतरण है।

3. ऐस्टर निर्माण

सीरीन और थ्रिओनिन ऐमीनो अम्लों में एक हाइड्रोक्सिल समूह होता है जो फोस्फोरिक अम्ल के साथ ऐस्टर बना सकता है। ये अभिक्रियाएं फोस्फोप्रोटीन बनाने में सहायता करती है। -OH समूह कार्बोहाइड्रेट अवशिष्टों के साथ ग्लाइकोप्रोटीन बनाने के लिए O–ग्लाइसाइडिक बंध बना सकते हैं।

4. डाइसल्फाइड बंध निर्माण

डाइसल्फाइड बंध निर्माण दो सिस्टीन अवशिष्टों की सल्फहाइड्रिल (SH) पार्श्व श्रृंखलाओं के बीच अभिक्रिया में सम्मिलित होता है : एक 5 ऋणायन सल्फहाइड्रिल समूह से न्यूक्लीओफाइल (केन्द्रकरागी) की भांति कार्य करके एक दूसरे सिस्टीन की पार्श्व श्रृंखला पर आघात करके डाइसल्फाइड बंध बनाता है। सिस्टीन ऐमीनो अम्ल में सल्फहाइड्रिल समूह (-SH) होता है जो अन्य सिस्टीन अवशेष के साथ डाइसल्फाइड बंध (S-S) बनाकर सिस्टीन को बना सकता है। डाइसल्फाइड बंध निर्माण अनेक प्रोटीनों के उचित वलन/फोल्डिंग में सहायता करता है।

बोध प्रश्न 2

निर्देशानुसार कार्य कीजिए :

क) ऐमीनो अम्ल दृश्य प्रकाश को अवशोषित करते हैं और रंगीन ठोस होते हैं (सत्य/असत्य)।

ख) ननहाइड्रिन एक अपचायी कर्मक है जो α–ऐमीनो अम्लों का ऑक्सीकारक विकार्बोक्सिलीकरण करता है (सत्य/असत्य)।

ग) बाइयूरेट परीक्षण प्रोटीनों का गुणात्मक और मात्रात्मक परीक्षण दोनों है (सत्य/असत्य)।

घ) डाइसल्फाइड बंध (5-5) अभिक्रिया में सिस्टीन ऐमीनो अम्ल सम्मिलित होते हैं (सत्य/असत्य)।

1.4 पेप्टाइड

आपको पूर्व इकाई (इकाई-4, खंड-1, पाठ्यक्रम BBCCT-101) के अनुभाग 4.2.1 से पेप्टाइड बंधों और पेप्टाइडों के विषय में दोहरा लेना चाहिए। पेप्टाइड बंध एक ऐमीनो अम्ल के α–ऐमीनो समूह और दूसरे के α–कार्बोक्सिल समूह के बीच एक सहसंयोजी बंध होता है जो एमाइड अनुबंध (CO-NH) बनाता है। पेप्टाइड बंध निर्माण एक संघनन अभिक्रिया है जिसमें जल का निष्कासन (निर्जलीकरण) सम्मिलित होता है। पेप्टाइडों को ऐसे अणुओं के रूप में परिभाषित किया जाता है जिसमें 2–50 ऐमीनो अम्ल होते हैं जबकि प्रोटीन 50 अथा अधिक ऐमीनो अम्लों के बने होते हैं। पेप्टाइड संरचना में प्रोटीनों से कम सुस्पष्ट होते हैं।

1.4.1 जैविक रूप से सक्रिय पेप्टाइड

जैविक रूप से सक्रिय पेप्टाइड अनेक शरीरक्रियात्मक प्रक्रियाओं में प्रमुख भूमिका निभाते हैं जिनमें न्यूरोट्रांसमिटर, हार्मोन और एन्टीबायोटिक्स की क्रियाएं सम्मिलित हैं। ये विविध आमाप और संयोजनों में पाए जाते हैं। प्राकृतिक रूप से पाए जाने वाले पेप्टाइड दो से हजारों तक के विस्तार में ऐमीनो अम्ल अवशिष्ट है। कुछ सुज्ञात पेप्टाइड हैं :

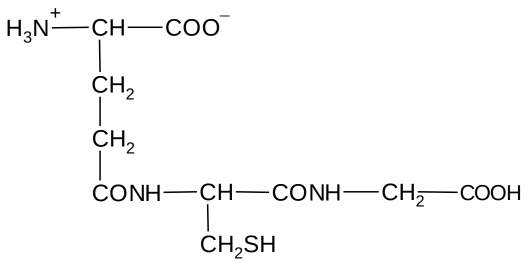
क) ऑक्सीटोसिन : ये नौ ऐमीनो अम्लों वाला एक पेप्टाइड हार्मोन और न्यूरोपेप्टाइड है। यह हाइपोथैलेमस क्षेत्र में (Magnocellular) तंत्रिकास्त्रावी कोशिकाओं द्वारा उत्पन्न होता है। यह पीयूष ग्रंथि से रक्त में निर्मुक्त होता है। इसके अतिरिक्त, यह मस्तिष्क तथा अन्य ऊजकों जैसे अंडाशय और वृषण में भी स्त्रावित होता है। संरचनात्मक रूप से इस पेप्टाइड में नौ ऐमीनो अम्ल होते हैं जिसमें पेप्टाइड श्रृंखला में 1 और 6 स्थान पर सिस्टीन अवशिष्टों के बीच एक अतिरिक्त डाइसल्फाइड अनुबंध होता है।

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH_2

चित्र 1.2 : ऑक्सीटोसिन

ऑक्सीटोसिन बच्चे के जन्म के समय गर्भाशयी संकुलचन और स्तन ग्रंथियों से दुग्ध उत्पादन में सहायक होता है। यह लैंगिक जनन और सामाजिक बंधन को सुगम बनाने में भूमिका निभाता है।

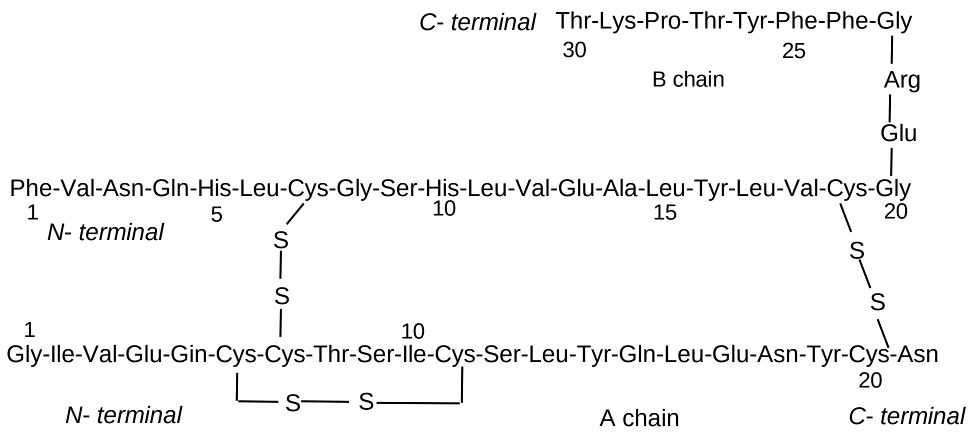
ख) ग्लूटाथियॉन : ग्लूटाथियॉन एक कम अणुभार का थायोल – ट्राइपेप्टाइड है जो अन्तराकोशिकीय रेडॉक्स संतुलन बनाए रखने में प्रमुख भूमिका निभाता है। इसका अणुसूत्र $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ है। इसमें तीन ऐमीनो अम्ल (सिस्टीन, ग्लूटामिक अम्ल और ग्लाइसीन) होते हैं (चित्र 1.2) तथा ये सभी पादप और जंतु कोशिकाओं तथा सूक्ष्मजीवों में पाया जाता है। यह एक सुज्ञात प्रतिऑक्सीकारक है और मुक्त मूलकों को कोशिका के वृहदाणुओं की क्षति करने से रोकता है। यह औषधियों के साथ संयुग्मित होकर उन्हें उत्सर्जन के लिए अधिक घुलनशील बनाता है। यह कुछ एन्जाइमों के लिए सहकारक की भांति कार्य करता है, प्रोटीन डाइसल्फाइड बंध पुनर्व्यवस्थ में सम्मिलित होता है और परऑक्साइडों को अपघटित करता है।



चित्र 1.3 : ग्लूटाथियॉन

ग) इन्सुलन : इन्सुलिन एक सुज्ञात अंतःस्रावी उपचायी हार्मोन है जो अग्न्याशय में आइलेट ऑफ लैंगरहेन्स द्वारा स्रावित होता है। इसमें 51 ऐमीनो अम्ल होते हैं (चित्र 1.3)

और इसका अणुभार 5808 डाल्टन होता है। संरचनात्मक रूप से यह एक A–श्रृंखला और B–श्रृंखला का द्विलक होता है जो डाइसल्फाइड बंधों द्वारा एक दूसरे से जुड़ी रहती है। इसका मुख्य कार्य रक्त ग्लूकोस के स्तर को नियंत्रित करना है। इसलिए, यह कार्बोहाइड्रेटों, वसाओं और प्रोटीन के उपापचयन को नियंत्रित करता है।

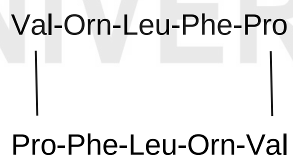


चित्र 1.4 : इन्सुलिन

घ) ब्रेडीकाइनिन : यह नौ ऐमीनो अम्ल अवशिष्टों युक्त पेप्टाइड है। इसका मूलानुपाती सूत्र ($50H_{73}N_{15}O_{1}$) है। यह एक सुज्ञात शिराविस्तारक और एक मूत्रवर्धक कारक है।

Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg

च) ग्रैमीसिन S : ग्रैमीसिन S ग्रैमीसिडीन का एक व्युत्पन्न है और इसका संश्लेषण एक मल्टीएन्जाइम कॉम्प्लैक्स ग्रैमिसिडिन सिन्थेटेस द्वारा होता है। यह एक एन्टीबायोटिक पेप्टाइड है। संरचनात्मक रूप से यह एक चक्रिक डेकापेप्टाइड है जिसमें दो एकसमान पेन्टा पेप्टाइड होते हैं। यह कुछ ग्रैम ग्राही और ग्रैम अग्राही जीवाणुओं और कवकों के विरुद्ध क्रिया करता है।



चित्र 1.5 : ग्रैमीसिन S

1.5 प्रोटीन

आपको प्रोटीनों पर पिछली इकाई (इकाई-4, खंड-1, पाठ्यक्रम BBCCT-101) के अनुभाग 4.3 से प्रोटोनों के विषय में दोहरा लेना चाहिए। ऐमीनो अम्ल अवशिष्ट प्रोटीनों की निर्माण इकाइयां हैं। प्रोटीनों का वर्गीकरण उनकी निम्न विशेषताओं के आधार पर किया जा सकता है :

i) संयोजन
ii) आकार और संरूपण
iii) क्रियात्मक गुण

संयोजन के आधार पर वर्गीकरण

आपको पूर्व इकाई (इकाई-4, खंड-1, पाठ्क्रम BBCCT-101) के अनुभाग 4.4 से प्रोटीनों के उनके संयोजन के आधार पर वर्गीकरण के विषय में दोहरा लेना चाहिए।

आकार और संरूपण के आधार पर वर्गीकरण

प्रत्येक प्रोटीन का उसकी मूल अवस्था में विशिष्ट त्रिविम आकार होता है जो उसका संरूपण कहलाता है। इस संरूपण के आधार पर प्रोटीनों को दो प्रमख वर्गों में वर्गीकृत किया जाता है; तंतुमय प्रोटीन और गोलिकामय प्रोटीन।

तंतुमय प्रोटीन

तंतुमय प्रोटीन कोशिका की संरचनात्मक अखंडता को बनाए रखने में भूमिका निभाते हैं। इन प्रोटीनों में बहुत कम अथवा कोई तृतीयक संरचना नहीं होती है और द्वितीयक संरचनत्मक तत्वों के रूप में सिर्फ लंबी, समान्तर पोलीपेप्टाइड श्रृंखलाएं होती हैं। पोलीपेप्टाडों के तिर्यक बंध अंतरालों पर उपस्थित रहते हैं जो लंबे रेशे अथवा परतें बनाती हैं। इन रेशों की अत्यधिक तनन सामर्थ्य होती है और ये बहुत स्थायी संरचनाऐं होती हैं। तंतुमय प्रोटीन सामान्यतः जल में अघुलनशील होते हैं। इनके उदाहरणों में बालों के किरेटिन और त्वचा की बाहरी परत संयोजी ऊतकों के कोलाजन सम्मिलित हैं। बालों के किरेटिन प्रोटीनों में α–कुंडलिनियां होती हैं, लेकिन नाखूनों में β–परत होती है जो बालों को मृदु और नाखूनों को कठोर संरचना बनाते हैं।

गोलिकामय प्रोटीन

गोलिकामय प्रोटीनों मे जटिल तृतीयक और कभी–कभी चतुर्थ संरचनाएं होती हैं। इनका नियत वलित गोल (गोलिका) आकार होता है। गोलिकामय प्रोटन तापगतिक रूप से सीमान्त रूप से स्थायी होते हैं। इनकी भित्तिम संरचना को आसानी से पयावरण में थोड़े से परिवर्तन से आन्दोलित/विक्षुब्ध किया जा सकता है। ये जलीय माधमों में अत्यधिक घुलनशील होते हैं क्योंकि जलभीत पार्श्व श्रृंखलाएं प्राथमिक संरचना में वलन के समय प्रोटीन के कोर/केन्द्र में दबी रहती है, उदाहरण के लिए रक्त में हीमोग्लोबिन।

क्रियात्मक आधार–प्रोटीनों की क्रियात्मक विविधता पर आधारित वर्गीकरण

प्रोटीन शरीर में अनेक कार्य करते हैं। क्रियात्मक आधार पर इन्हें निम्न प्रकार से वर्गीकृत किया जाता है (सारणी 1.2) :

सारणी 1.2 : प्रोटीनों का वर्गीकरण

क्र. सं.	वर्गीकरण	उदाहरण	कार्य
1.	एन्जाइम	हैक्सोकाइनेस DNA पोलीमरेस साइटोक्रोम C लैक्टेट डीहाइड्रोजिनेस	ग्लूकोस को फोस्फोरिलकृत करता है प्रतिकृति और DNA की मरम्मत करता है। इलैक्ट्रोन स्थानांतरण करता है। कैक्टेट को विहाइड्रोजनीकृत करता है।
2.	भंडारण प्रोटीन	ओवएल्बूमिन कैसीन फैरीटीन ज़ीन ग्लैडिन	अंडे की सफेदी का प्रोटीन दुग्ध प्रोटीन तिल्ली में आयरन भंडारण मक्का का बीप प्रोटीन गेहूं का बीज प्रोटीन
3.	परिवहन	हीमोग्लोबिन	रक्त में O_2 का परिवहन करता है पेशी

	प्रोटीन	मायोग्लोबिन सीरम एल्यूबिन B-I लिपोप्रोटीन सेरूलोप्लास्मिन	कोशिकाओं मे O_2 का परिवहन करता है मुक्त वसा अम्लों का परिवहन करता है रक्त में लिपिडों का परिवहन करता है रक्त में कॉपर का परिवहन करता है
4	संकुचनशील प्रोटीन	मायोसिन एक्टिन डाइनीन	मायोफाइब्रिल (पेशीतंतु) का स्थूल तंतु मायोफाइब्रिल (पेशीतंतु) का पतला तंतु पक्ष्माभ और कशाभ
5.	सुरक्षात्मक प्रोटीन	इम्यूनोग्लोबुलिन फाइब्रिनोजन थ्रॉम्बिन	एन्टीजनों के साथ कॉम्प्लैक्स बनाते हैं फाइब्रिन का पूर्ववर्ती रक्त का थक्का जमने में एक संघटक
6.	आविष	डिप्थीरिया आविष राइसिन	जीवाणवीय आविष एरंड के बीज में आविष प्रोटीन
7.	हार्मोन	इन्सुलिन ACTH वृद्धि हार्मोन	ग्लूकोस उपापचयन का नियंत्रण करता है कोर्टिकोस्टेरॉइड संश्लेषण का नियंत्रण करता है हड्डियों की वृद्धि को प्रेरित करता है
8.	संरचनात्मक प्रोटीन	A–किरेटिन कैलेजन इलैस्टिन फाइब्रिन स्कलैरोटिन	त्वचा, नाखून, पंख, खुर तंतुमय संयोजी ऊतक प्रत्यास्थ संयोजी ऊतक कोकून का रेशम, मकड़ी का जाल कीटों का बाह्य कंकाल

1.5.1 प्रोटीनों की विशेषताएं

रंग, स्वाद और विलेयता

प्रोटीन सामान्यतः रंगहीन और स्वादहीन होते हैं। अधिकांश प्रोटीन जल और ऐल्कोहॉल में अघुलनशील होते हैं। सामान्य रूप से ये कौलोइडी विलयन बनाते हैं। यद्यपि, ये तुन अम्लों और क्षारकों में घुलनशील होते हैं। कुछ प्रोटीन पूर्णतः अघुलनशील होते हैं।

अणुभार

प्रोटीनें का अणुभार परिवर्ती होता है जो उसके आमाप को बनाने वाले ऐमीनो अम्लों की संख्या पर निर्भर करता है। सामान्य रूप से, इनका अणुभार 5000 से 1×10^6 के विस्तार में होता है। प्रोटीनों के अणु द्रव्यमान का निर्धारण अणु चालनी वर्णलेखन, एक्सरे विवर्तन अथवा द्रव्यमान स्पैक्ट्रममिति द्वारा किया जा सकता है।

उभयवर्धी प्रकृति

प्रोटीनों की ऐमीनो अम्लों की भांति उभयधर्मी (amphoteric) प्रकृति होती है अर्थात् ये अम्ल अथवा क्षारक दोनों की भांति कार्य करते हैं। धनायन अथवा ऋणायन के रूप में इनका व्यवहार विलयन के pH पर निर्भर करता है। प्रोटीनों पर आवेश होता है और ये वैद्युत क्षेत्र में अपने आवेश के आधार पर गति करते हैं। जब किसी pH पर प्रोटीनों में धनात्मक और ऋणात्मक आवेश दोनों यथार्थ रूप से संतुलित हो जाते हैं, तो ये वैद्युत क्षेत्र में गति नहीं करते हैं। यह अवस्था समवैद्युत बिंदु कहलाती है। प्रत्येक प्रोटीन का एक विशिष्ट pH होता है, जिस पर यह सबसे कम घुलनशील होता है और अवक्षेपित हो जाता है। प्रोटीन विलयन की श्यानता और परासरणी दाब उसके समवैद्युत बिंदु पर न्यूनतम होता है। कैसीन और जिलेटिन के समवैद्युत बिंदु क्रमशः 4.6 और 4.8 है।

विकृतीकरण और पुर्नप्रकृतीकरण

अब हम दो महत्वपूर्ण प्रक्रियाओं अर्थात् विकृतीकरण (denaturation) और पुर्नप्रकृतीकरण (renaturation) की चर्चा करेंगे जो प्रोटीन की संरचना के अवलन और पुनर्वलन से संबन्धित है। विकृतीकरण का अभिप्राय पोलीपेप्टाइड श्रृंखला के अवलन/खुलन से है। प्रोटीन विकृतीकरण के कारण अपनी द्वितीयक, तृतीयक और चतुर्थ संरचना को खो देते हैं। विकृतीकरण से प्रोटीनों में हाइड्रोजन और डाइसल्फाइड बंध टूट जाते हैं और आयनीकरणीय समूहों में वृद्धि हो जाती है। विकृत प्रोटीन की श्यानता बढ़ जाती है क्योंकि सतह तनाव कम हो जाता है। इससे प्रोटीन के भौतिक, रासायनिक और जैविक गुणों में भी परिवर्तन हो जाता है। विकृतीकरण से सामान्य रूप से प्रोटीन की विलेयता कम और अवक्षेपणता बढ़ जाती है और अक्सर जैविक क्रिया की हानि होती है। 8 M यूरिया युक्त मर्कप्टोइथेनॉल से प्रोटीन को उपचारित करने पर वह पूर्णतः विकृत हो जाता है। ताप, एक्सरे और पराबैंगनी विकिरण सुज्ञात विकृतीकरण कर्मक है। अन्य रासायनिक कर्मकों में अम्ल, भारी धातुएं (लैड और मरकरी), यूरिया और सैलीसिलेट सम्मिलित हैं।

ऐसे विकृतीकृत प्रोटीन जो अपनी मूल अवस्था को पुनः प्राप्त नहीं कर पाते हैं वे अनुत्क्रमणीय विकृत प्रोटीन कहलाते हैं। जबकि, उत्क्रमणीय विकृत प्रोटीन अपने सामान्य प्रोटीन गुणों को पुनः प्राप्त कर लेते हैं। ये प्रक्रिया पुर्नप्रकृतीकरण अथवा पुर्नवलयन कहलाती है। पुनर्प्रकृतीकरण को पुर्नरूपांतरण अथवा अवलित प्रोटीन का उसकी त्रिविम संरचना में वलन भी कहते हैं। पुनर्प्रकृति प्रोटीन की पुर्नप्राप्ति कभी पूर्ण नहीं होती है। उदाहरण के लिए, ट्रिप्सिन प्रोटीन को जब 80-90°C के उच्च तापमान पर उद्भासित किया जाता है तो यह विकृत हो जाता है। विलयन को 37°C पर ठंडा कर देने पर इसकी विलेयता और अन्य गुण प्राप्त हो जाते हैं।

बोध प्रश्न 3 : निर्देशानुसार हल कीजिए :

क) ग्लूटाथियॉन अन्तराकोशिकीय रैडॉक्स संतुलन को बनाए रखने में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है (सत्य/असत्य)

ख) ब्रेडीकमाइनिन में 10 ऐमीनो अम्ल होते हैं (सत्य/असत्य)।

ग) किरेटिन प्रोटीन (गोलिकामय/तंतुमय) प्रोटीन है (एक विकल्प चुनिए)।

घ) एक्टिन और मायोसिन .... प्रोटीन है (रिक्त स्थान को भरिए)।

1.6 सारांश

- ऐमीनो अम्ल प्रोटीन की सबसे मूल मौलिक इकाई है। प्रोटीनों को बनाने वाले बीस ऐमीनो अम्लों में एक α–कार्बोक्सिल समूह, एक α–ऐमीनो समूह और एक विशिष्ट R समूह होता है। इन ऐमीनो अम्लों के अवशिष्टों को उनकी संरचना, ध्रुवता, पोषण आवश्यकताओं और उपापयी नियति के आधार पर श्रेणीकृत किया जाता है। ऐमीनो अम्ल स्विटर आयन (एम्फोलाइट) के रूप में पाए जा सकते हैं जो अम्लों और क्षारकों दानों के गुणों को प्रदर्शित करते हैं। ये विशिष्ट अनुमापन वक्र भी प्रदर्शित करते हैं। ऐमीनो अम्लों की सामान्य अभिक्रियाएं -COOH, $-NH_2$, और पार्श्व श्रृंखला समूहों के कारण होती है। ऐमीनो अम्ल उनके बीच बने CO-NH (पेप्टाइड) बंध द्वारा एक दूसरे से जुड़े रहते हैं। ऑक्सीटोसिन, इन्सुलिन, ग्लूटाथियॉन कुछ सुज्ञात जैविक रूप से महत्वपूर्ण

पेप्टाइड हैं। प्रोटीन ऐमीनो अम्लों के बहुलक हैं। इन्हें इनके संयोजन, आकार और संरूपण तथा क्रियात्मक गुणों के आधार पर भी वर्गीकृत किया जा सकता है। इनके विभिन्नि प्राथमिक, द्वितीयक, तृतीयक और चतुर्थ स्तरों के विन्यास होते हैं।

1.7 अंत में कुछ प्रश्न

1. ग्लूकोजेनिक ऐमीनो अम्लों और कीटोजनी ऐमीनो अम्लों के बीच अन्तर कीजिए।
2. ऐमीनो अम्लों के -NH_2 समूह के कारण क्या अभिक्रियाएं होती हैं?
3. किन्हीं दो जैविक रूप से सक्रिय पेप्टाइडों की चर्चा कीजिए।
4. प्रोटीनों को क्रियात्मक आधार पर वर्गीकृत कीजिए।

1.8 उत्तर

बोध प्रश्न

1. क) सत्य ख) असत्य ग) आर्जीनिन और हिस्टीडीन घ) ल्यूसीन और लाइसीन
2. क) असत्य ख) असत्य ग) सत्य घ) सत्य
3. क) सत्य ख) असत्य ग) तंतुमय घ) संकुचनशीन

अंत में कुछ प्रश्न

1. अनुभाग 1.2.3 में देखिए
2. अनुभाग 1.3.3 में देखिए
3. अनुभाग 1.4 में देखिए
4. सारणी 1.2 में देखिए

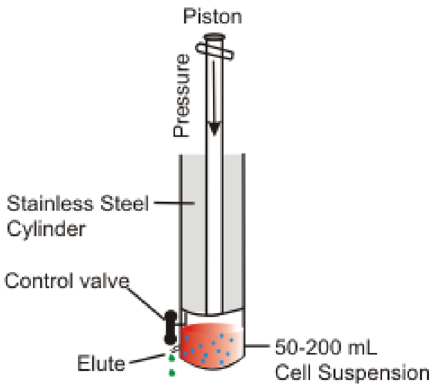
1.9 अन्य संदर्भ पुस्तकें

1. Albert L. Lehninger: Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc. New York, 1984.
2. Harper's Illustrated Biochemistry, 29e. Robert K. Murray, David A Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, Victor W. Rodwell, P. Anthony Weil, USA.
3. Donald J Voet Principles of Biochemistry, John Wiley and Sons, Inc, USA.
4. J. L. Jain: Fundamentals of Biochemistry, S. Chand & Company Ltd.

India.

5. U. Satyanarayana and U. Chakrapani: Biochemistry, UBS publishers Distributors Pvt Ltd. Kolkatta, India.
6. Thomas M. Devlin: Textbook of Biochemistry, John Wiley and Sons, Inc.Danvers, MA.

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY



इकाई 2

प्रोटीनों का निष्कर्षण|

रूपरेखा

2.1 प्रस्तावना

संभावित अध्ययन परिणाम

2.2 कोशिका विघटन विधियां

2.3 अ–यांत्रिक विधियां

रासायनिक विधियां

अपमार्जक

एन्जाइमी

परासरणी आघात

2.4 यांत्रिक विधियां

ठोस अपरूपण विधियां

द्रव अपरूपण विधियां

2.5 अपकेन्द्रीकरण

2.6 सारांश

2.7 अंत में कुछ प्रश्न

2.8 उत्तर

2.9 अन्य सुझाई गई पुस्तकें

2.1 प्रस्तावना

पिछली इकाई में हमने हार्मोन, एन्टीबॉडी और अन्य विविध महत्वपूर्ण शरीरक्रियात्मक कार्यों के लिए प्रोटीनों की संरचना, कार्य और जैविक महत्व के बारे में चर्चा की थी। चिकित्सीय कर्मकों के रूप में इन प्रोटीनों का उपयोग करने के लिए ओर साथ ही इन प्रोटीनों की प्रकृति का अध्ययन करने और विश्लेषण करने के लिए हमें प्रोटीनों को उनके उपकोशिकीय स्थान से निष्कर्षित करने की आवश्यकता होती है। ये उपकोशिकीय स्थान जैविक कलाएं, प्रमुख उपकोशिकीय अंग जैसे माइटोकॉन्डिया, गॉल्जी कॉम्प्लेक्स, एन्डोप्लास्मिक रेटीकुलम इत्यादि हो सकते हैं। यही नहीं जीवन विभिन्न रूपों में पाया जाता है जैसे ससीमकेन्द्रकी और पूर्व केन्द्रकी या असीमकेन्द्रकी कोशिकाएं ससीमकेन्द्रकी और पूर्वकेन्द्रकी जीवों दोनों में ही ये कोशिकाएं विभिन्न प्रकार की सुरक्षात्मक परतों जैसे कलाओं अथवा कोशिका भित्तियों की बनी होती है, जिससे इनकी संरचनात्मक अक्षुण्णता बनी रहती है।

इन कोशिकाओं के अंदर पाए जाने वाले प्रोटीनों को बाहर निकालने के लिए हमें कोशिकाओं को कुछ रासायनिक कर्मकों अथवा ऐन्जाइमों से उपचारित करने अथवा कुछ बाह्य बलों का प्रयोग करने की आवश्यकता होती है जो परिवर्तनों को प्रेरित करते है और बाद में पूरी कोशिका कला को विखंडित कर देते अथवा कोशिका भित्ति में सूक्ष्म

रंध्र उत्पन्न कर देते हैं जिससे कोशिका भित्ति के अंदर पाया जाने वाला साइटोसोल प्रोटीनों तथा अन्य जैव अणुओं के साथ बाहर आ जाए।

प्रोटीन उत्पाद कोशिकाइतर (extracellular) और अन्तराकोशिकीय रूपों और स्थानों दोनों में उपलब्ध होते हैं। कोशिका विघटन अथवा लयन करके हम कोशिका से वांछित जैविक उत्पाद को निष्कर्षित करके प्राप्त करने के बारे में जानेंगे। ये निष्कर्षण विधियां प्राकृतिक के साथ ही पुर्नयोजी जैविक उत्पादों (कृत्रिम/संश्लेषित) जैसे प्रोटीनों, एन्जाइमों हार्मोनों को प्राप्त करने के लिए अत्यधिक उपयोगी है।

इस इकाई का प्रारंभ हम प्रोटीनों के विलेयीकरण (solbilization) से कर रहे है, इसके बाद कुछ सरल अ-यांत्रिक और यांत्रिक विधियों की चर्चा करेंगे जिनका उपयोग व्यापक रूप से कोशिकाओं के अपरिष्कृत निष्कर्ष (crude extract) निकालने के लिए किया जाता है। आप नियमित विधियों जैसे समांगीकरण (homogenization) और प्रेषण (पिसाई) के बारे में भी पढ़ेंगे जिनका उपयोग कोशिका निष्कर्षों को बनाने के लिए किया जाता है। इकाई के अंत में हम पराध्वनिकीकरण (uttrusonication) फ्रेंच प्रैस और अपकेन्द्रीकरण के विषय में भी बताएंगे जिनके द्वारा कोशिकाओं तथा उनके उपकोशिकीय स्थानों से प्रोटीनों का निष्कर्षण किया जाता है।

संभावित अध्ययन परिणाम

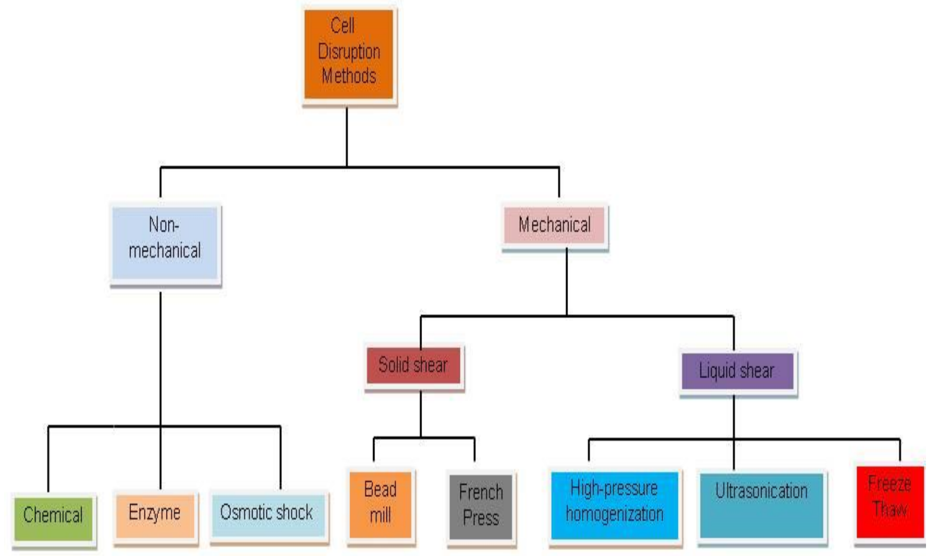
इस इकाई का अध्ययन करने के बाद, आप :

- प्रोटीन निष्कर्षण के उद्देश्य का वर्णन कर पाएंगे;
- निष्कर्षण की अ-यांत्रिक और यांत्रिक विधियों को सूचीबद्ध कर सकेंगे;
- निष्कर्षण की प्रत्येक विधियों के निहित सिद्धान्त की व्याख्या की सकेंगे; और
- निष्कर्षण विधियों को उनके उपयोगों के संदर्भ में विभेदित कर सकेंगे।

2.2 कोशिका विघटन विधिया

कोशिका विघटन विधियों को व्यापक रूप से दो प्रकारों में विभाजित किया जा सकता है, एक अ-यांत्रिक (non-mechinical) और दूसरी यांत्रिक विघटन (mechanial disruption) की है (चित्र 2.1)। आइए हम कोशिका विघटन की अ-यांत्रिक विधि से चर्चा आरंभ करते हैं। अतिरिक्त जानकारी के लिए विद्यार्थियों को इस दिए गए वीडियो लिंक के देखने की सलाह दी जाती है (http://www-youtube.com/watch?V=1kotq/LfvOkA.)

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY



चित्र 2.1 : कोशिका निष्कर्ष बनाने के लिए प्रयोग की जाने वाली विभिन्न विधियों का आरेखी प्रदर्शन।

2.3 अ–यांत्रिक विधियां

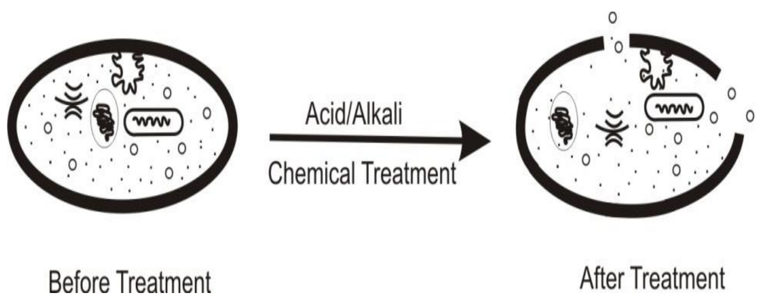
पहले प्रकार की अ-यांत्रिक कोशिका विघटन विधियों में अम्ल अथवा क्षारक कार्बनिक विलायक से उपचार सम्मिलित है।

2.3.1 रासायनिक विधियां

इस विधि के अंदर तीन उप प्रकार हैं, जो रासायनिक (अम्ल/धारक/अपमार्जक), एन्जाइम और परासरणी आघात हैं

अम्ल अथवा क्षारक : इसमें सामान्यतः 10-12 के pH परास में क्षारकीय विलयन में निलंबित कोशिकाओं अथवा ऊतकों को देखा जाता है। यह क्षारकीय विलयन कुछ ही मिनटों में कोशिका कलाओं का पाचन करके कोशिका के बाहर साइटोसोल के प्रवाह को संभव बनाता हैं।

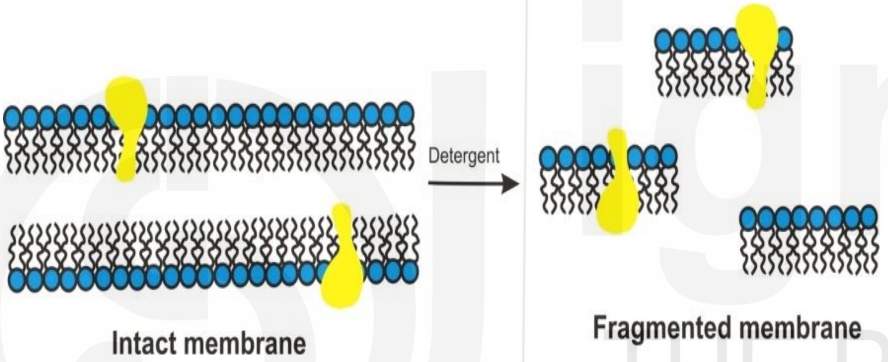
कुछ अन्य स्थितियों में कार्बनिक विलायक जैसे ऐल्कोहॉल, डाइमेथिल सल्फोक्साइड, मेथिल एथिल कीटोन अथवा टॉलुईन को मिलाया जा सकता है। ये विलायक भी बाह्य कोशिका कला पर क्रिया करके कलाओ को घोलकर साइटोसोल तथा अन्य कोशिकीय अंर्तवस्तुओं का कोशिका के बाहर आना संभव बनाते हैं (चित्र 2.2)।



चित्र 2.2 : रासायनिक उपचार के प्रयोग द्वारा कोशिका विघटन की विधि।

2.3.2 अपमार्जक

कोशिका कला का विघटन करने की अन्य विधि अपमार्जकों (detergents) को मिलाना है। ट्रिटोन x100, सोडियम डूडेसाइल सल्फेट (SDS) तथा एथिल डाइमेथिल अमोनियम ब्रोमाइड अपमार्जकों द्वारा कोशिका विघटन करने के लिए उपयोग किए जाने वाले सामान्य अपमार्जक है। ट्रिटोन x100 एक गैर-आयनी अपमार्जक है जो कला प्रोटीन का घोल सकता है। जबकि सोडियम डूडेसाइल सल्फेट गैर आयनी अपमार्जक होने के कारण प्रोटीन-प्रोटीन परस्परक्रियाओं को विघटित करके कोशिका कला को पहचनाता है। अतः इस अपमार्जक का उपयोग वैद्युत कण संचलन (electrophoresis) में SDS पेज वैद्युत कण संचलन करने के लिए किया जाता है जिससे प्रोटीन-प्रोटीन परस्पर क्रियाएं विघटित हो जाएं और प्रोटीन अलग–अलग उपइकाइयों में पृथक हो जाएं। एथिल डाइमेथिल अमोनियम ब्रोमाइड एक धनायनी अपमार्जक होने के कारण कोशिका कला विशेष रूप से लिपोपोलीसैकैराइडों और फोस्फोलिपिडों पर क्रिया करता है और सूक्ष्म रंध्र बनाना संभव बनाता है जिनसे फिर परासरणी दाब में अन्तर पैदा होते हैं और कोशिका का विघटन संभव हो पाता है (चित्र 2.3)।



चित्र 2.3: अपमार्जक से उपचारित करने के बाद जैव कला का विघटन

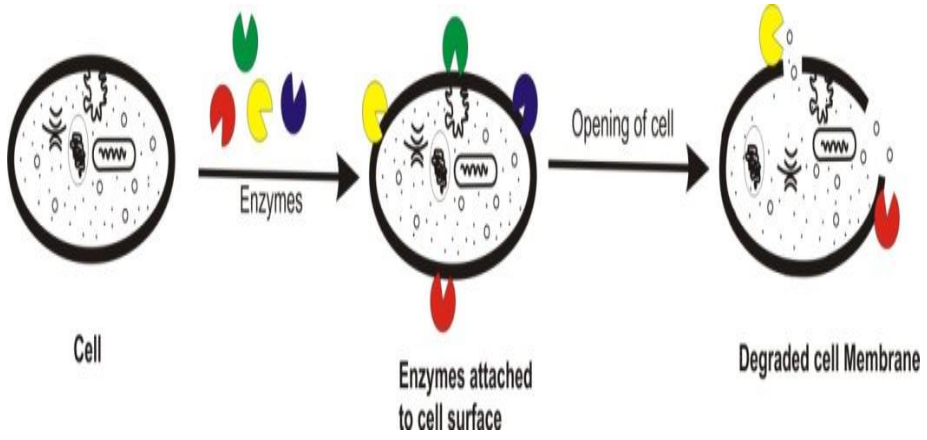
2.3.3 एन्जाइमी

अ-यांत्रिक कोशिका विघटन की दूसरी श्रेणी एन्जाइमी विधि है। आइए हम कुछ सामान्य रूप से उपयोग किए जाने वाले एन्जाइमों के उदाहरण द्वारा इस विधि के बारे में जानते हैं।

सेलुलेस प्रचलित रूप से पादप कोशिका भित्ति में पाए जाने वाले सेलुलोस के पाचन के लिए जाने जाते हैं। ऐन्जाइम के इस गुण का उपयोग करके आप पादप कोशिका की सतह पर इस ऐन्जाइम को लगाकर उसे कुछ समय के लिए ऊष्मायित कर सकते हैं (चित्र 2.4)। वांछित ऊष्मायन अवधि के बाद हमें आंशिक रूप से पाचित कोशिका भित्ति दिखाई देती है। इससे कोशिका भित्ति का विघटन और आंतरिक उपकोशिकीय अंगकों और प्रोटीनों समेत अन्य जैवअणुओं का पादप कोशिका क बाहर निकलना संभव हो जाता है।

पैक्टीनेस, जाइलेनेस, काइटिनिसेस जैसे एन्जाइमों का उपयोग यीस्ट और कवक कोशिकाओं के विघटन के लिए किया जाता है। लाइसोजाइम ग्रैम ग्राही जीवाणुओं की कोशिका भित्ति का पाचन करने वाले एन्जाइम का एक अन्य श्रेष्ठ उदाहरण है।

लाइसोजाइम जीवाणवीय कोशिका भित्ति की कोशिका भित्ति परत के β-1,4- ग्लाइकोसाइडी बंधों को जलअपघटित कर देता है। इसी प्रकार जाइमोलेस एन्जाइम का उपयोग यीस्ट और कवक कोशिका भित्ति के अपघटन के लिए किया जाता है।

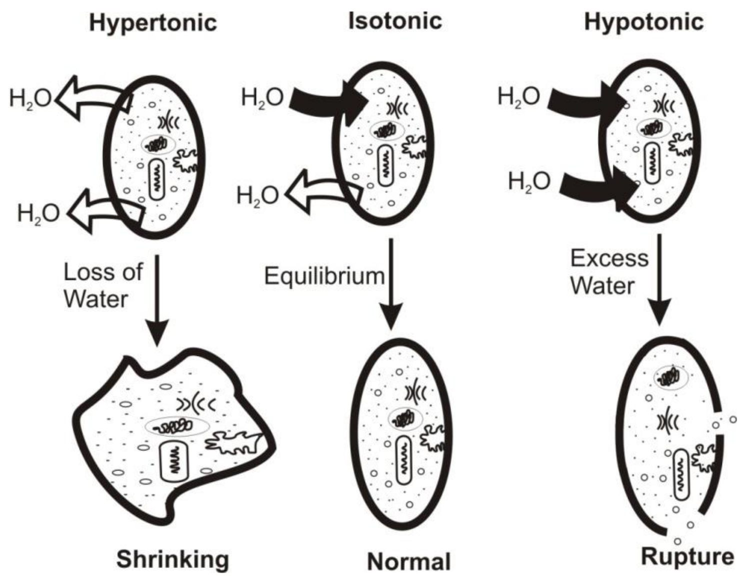


चित्र 2.4 : किसी कोशिका की जैविक कला पर एन्जाइम का प्रभाव

लेकिन, रासायनिक पाचन की कुछ सीमाएं है। जैसे कि रासायनिक पाचन करने के बाद एन्जाइमों अथवा रसायनों के प्रभाव को उदासीनीकृत करने के लिए अनुप्रवाह प्रसंस्करण (जैविक उत्पादकों की पुर्नप्राप्ति) की लागत एक अवांछित व्युय है। इसके अतिरिक्त एन्जाइमों के जैव उत्प्रेरक होने के कारण वे कोशिका के अन्य उत्पादों अथवा अणुओं पर क्रिया कर सकते है जिससे फिर वे कोशिकाएं और अणु विखंडित हो सकते है जिससे समग्र उत्पाद की मात्रा कम हो सकती है और इससे फिर अंत उत्पाद की मात्रा प्रभावित हो सकती है।

2.3.4 परासरणी आघात

यह अ-यांत्रिक कोशिका विघटन की तीसरी विधि है। इस विधि में कोशिका के विघटन के लिए परासरण (उच्च सन्द्रता से कम सान्द्रता की ओर आयनों/अणुओं के प्रवाह की प्रक्रिया) के सिद्धान्त का उपयोग किया जाता है (चित्र 2.5) उदाहरण के लिए जब किसी कोशिका को अति परासारी विलयन में निलंबित किया जाता है तो कोशिका से जल के अणु और अन्य अनिवार्य आयन लुप्त होने आरंभ हो जाते हैं। जिसके कारण कोशिका संकुचित होने लगती है और अंत में विघटित हो जाती है। दूसरी तरफ जब कोशिकाओं को अल्प परासारी (hypotonic) विलयन में निलंबित किया जाता है तो परिवेशी माध्यम से जल और आयन कोशिका में प्रवेश करने लगते है जिससे फिर कोशिका का आन्तरिक आयतन बढ़ जाता है और अंततः कोशिका का लयन हो जाता है।



चित्र 2.5: विभिन्न प्रकार के लवण विलयनों के लिए उद्भासित कोशिकाएं (परासरणी आघात)

बोध प्रश्न 1

1. कोशिका लयन के लिए सामान्य रूप से उपयोग किए जाने वाले अपमार्जकों के नाम बताइए।

2. लाइसोजाइम जीवाणवीय कोशिका भित्ति के ----- बंध को जल अपघटित कर देता है।

3. जब किसी कोशिका को समपरासी विलयन से अल्प परासारी विलयन में स्थानान्तरित किया जाता है जो क्या होता है?

4. यीस्ट कोशिकाओं की कोशिका भित्ति के पाचन के लिए ------- एन्जाइमों का उपयोग किया जाता है।

2.4 यांत्रिक विधियां

निष्कर्षण की यांत्रिक विधियों को व्यापक रूप से दो प्रकारों में विभाजित किया जा सकता है -ठोस अपरूपण (solid shear) और द्रव अपरूपण (liquid shear) । इन दोनों विधियों में बाहरी तनाव और गति को ठोस कणों अथवा द्रव परतों के उपयोग द्वारा निर्मित किया जाता है।

कोशिका विघटन विधियों की दोनों श्रेणियों में कोशिकाओं पर उच्च दाब डाला जाता है जो बाहय बलों जैसे पराध्वनि और भौतिक बलों जैसे मनकों (beads) के साथ त्वरित विक्षोभ करके निर्मित किया जाता है।

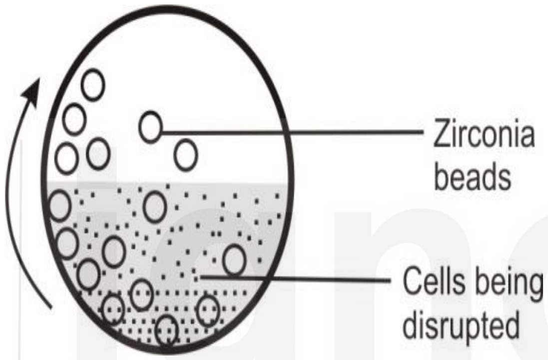
2.4.1 ठोस अपरूपण विधियां

आइए हम चर्चा का आरंभ कोशिका विघटन की पहले प्रकार की यांत्रिक विधियों अर्थात् ठोस अपरूपण से करते हैं जिसमें सबसे पहले बीडमिल विधि के बारे में जानेंगे।

बीडमिल विधि

इस उपकरण में एक छोटा घूर्णी बेलन होता है जो आंशिका रूप से छोटे मनकों/बीड से भरा रहता है, सामान्यतः ये मनके जिकोर्निया के बने होते हैं। जब हम बेलन को दक्षिणावर्त घुमाते हैं जैसाकि चित्र 2 .6 में दिखाया गया है तो बेलन उसमें उपस्थित मनकों के द्वारा गतिक ऊर्जा को यांत्रिक ऊर्जा के रूप में स्थानान्तरित कर देता है। यह यांत्रिक ऊर्जा एक अपरूपण बल निर्मित करती है और मनकों तथा घूर्णी बेलन में उपस्थित कोशिकाओं के बीच टक्करें होने लगती हैं। विघटन की आवश्यकता के अनुसार आप बड़े या छोटे मनको का चयन कर सकते हैं। लेकिन इस बीड मिल की इष्टतम भारण क्षमता लगभग 80-85% होती है। बीड मिल विधि का एक लाभ यह है कि इसका उपयोग उच्च विघटन क्षमता, नियंत्रित बाह्य तापमान नियंत्रण और उच्च जीवमात्रा भारण क्षमता के लिए किया जाता है।

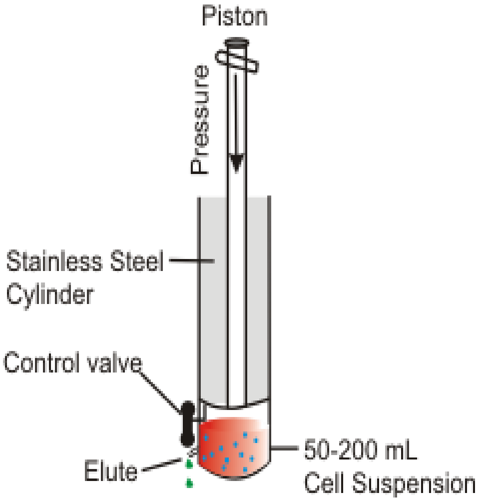
खरल और मूसल का उपयोग सामान्य रूप से हमारी रसोई में अल्प मात्रा में मसालों को पीसने के लिए किया जाता है। इसका उपयोग प्रयोगशाला में ऊतक का समांग मिश्रण बनाने के लिए नियंत्रित तापमान पर कोई उपयुक्त बफर मिलाकर किया जाता है।



चित्र 2.6: बीड मिल का आरेखी प्रदर्शन

फ्रेंच प्रैस

यह ठोस अपरूपण निष्कर्षण की दूसरी विधि हे। पिस्टन द्वारा उत्पन्न होने वाला दाब इस अपरूण विधि के लिए कार्य करने वाला बल है। स्टील बेलन के अंदर दाब में आकस्मिक कमी अथ्वा दाब स्तरों में उतार चढ़ाव से कोशिकाएं फट जाती है। इस में 1500 बार तक के दाब का उपयोग किया जा सकता हैं। चित्र 2.7 में इस विधि में प्रयोग किए जाने वाले बेलन को उसके पिस्टन के साथ दिखाया गया है। पात्र के तले में कोशिका निलंबन के भारण के लिए स्थान दिया गया है और पिस्टन के द्वारा दाब दिया जाता है और दाब के आकस्मिक रूप से मुक्त होने से कोशिकाओं पर कुछ दबाव पड़ता है जिससे वो फंट जाती हैं। कोशिका निष्कर्ष निकास नली से बाहर निकलता है (चित्र 2.7 देखिए)। इस विधि का उपयोग व्यापक रूप से डेयरी उद्योग में समांगी मिश्रण बनाने के लिए किया जाता है।



चित्र 2.7: फ्रेंच प्रैस

2.4.2 द्रव अपरूपण विधियां

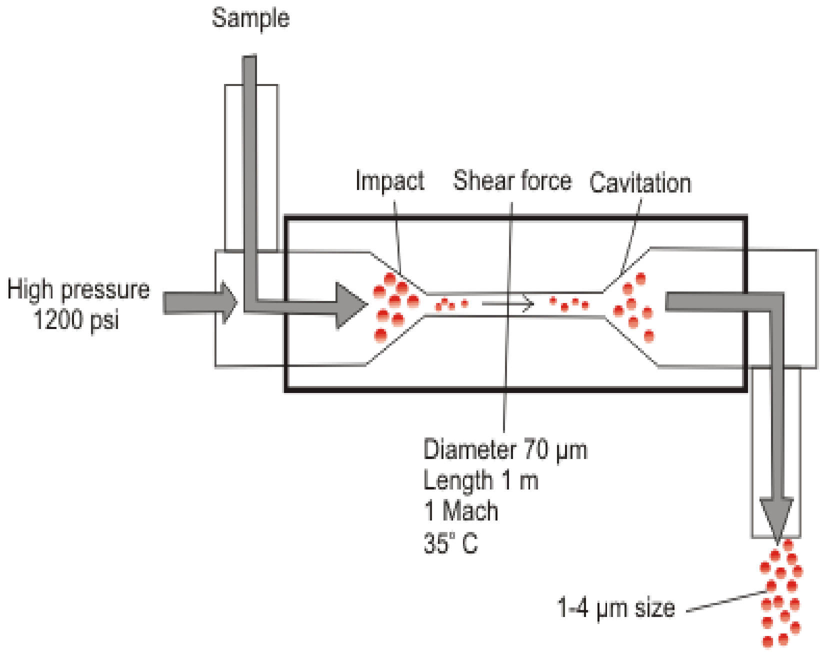
अभी तक हमने ठोस अपरूपण विधि की चर्चा की है। अब हम उन द्रव अपरूपण विधियों के बारे में जानेंगे जिनका उपयोग सामान्य रूप से अनुसंधान कार्यों और साथ में उद्योगों में भी किया जाता है। कोशिका भित्तियों अथवा कलाओं के लयन को प्रेरित करने के लिए बाह्य द्रव बल अथक तनाव को आरोपित किया जाता है। आइए पहले हम उच्च दाब द्वारा समांगीकरण के बारे में चर्चा करते हैं।

समांगीकरण

'समांगी' (homogenous) शब्द का शंब्दिक अर्थ 'एकरूप या समान प्रकृति का' है अर्थात् इस विधि के द्वारा हम कोशिकाओं अथवा ऊतकों का एकरूप मिश्रण बनाने जा रहे हैं। इसकी तुलना पिसाई मिल से की जा सकती है जिसमें दानों को पीसकर मृदु एक रूप आटा प्राप्त किया जाता है।

यह उद्योग में सबसे व्यापक रूप से उपयोग किए जाने वाले यांत्रिक कोशिका विघटन के तरीकों में से एक है। यह जीवाणुओं अथवा यीस्ट कोशिकाओं के अंदर निर्मित होने वाले पुर्नयोजी प्रोटीनों के पृथक्करण की प्रचलित विधि हैं। चिकित्सीय उद्योगों में इस विधि का उपयोग उत्पाद की पुर्न प्राप्ति के लिए अपप्रवाह प्रसंस्करण में किया जाता हैं। चित्र 2.8 को देखिए जिसमें लक्ष्य कोशिकाओं को एक पतली टनल से निकाला जाता है जिसके दोनों सिरों पर चौड़े मुख और एक संकरा पथ होता है। लगभग 1200psi का बाह्य दाब डाला जाता है जिससे एक अपरूपण बल का सेट निर्मित होता हैं, जब कोशिकाएं इन पतली टनल से होकर गुजरती है। जब कोशिकाएं टनल के दूसरे सिरे पर पहुंच जाती है तो कोशिकाएं विस्तारित होने लगती हैं (कोशिका के भीतर गुहा का बनना)। आप कोशिका निष्कर्ष के लगभग 1-4μm के आमाप के छोटे कणों को टनल से बाहर आते देख सकते हैं जैसाकि चित्र 2.8 में दिखाया गया है।

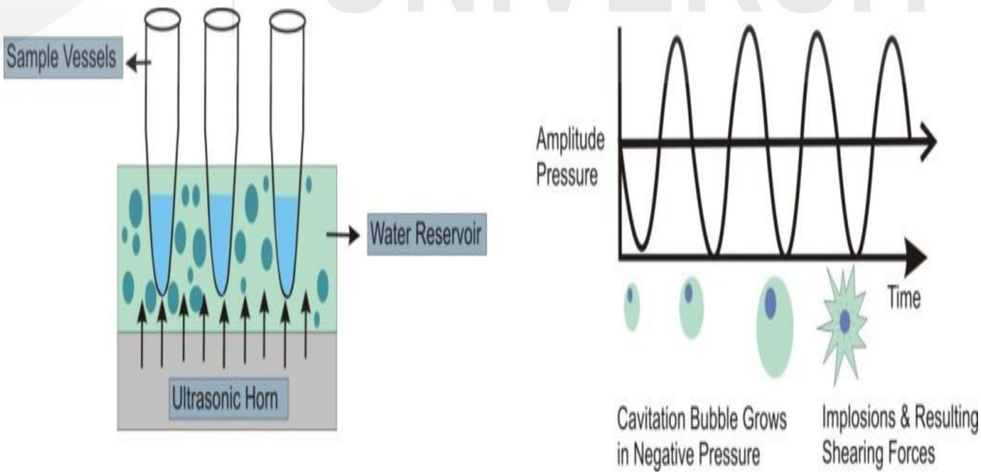
इस विधि का लाभ इसकी गति और/बगैर किसी बाधा के आसान प्रचालन है। लेकिन इस विधि की ताप अस्थिर उत्पादों/अणुओं जैसे एन्जाइमों के पृथक्करण के संदर्भ में कुछ हानियां भी है।



चित्र 2.8 : उच्च दाब समांगित्र (होमोजिनाइजर) के अंदर कोशिकाओं का प्रवाह।

पराध्वनिकरण

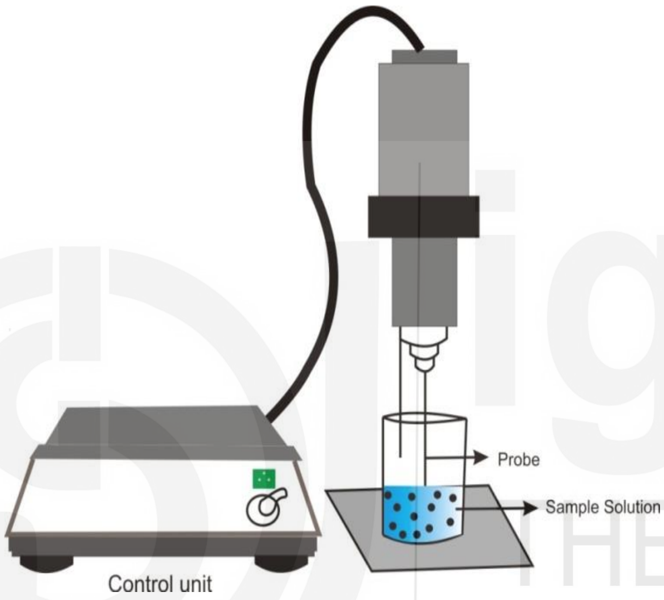
ऊपर के भाग में हमने उस विधि के विषय मे पढ़ा है जो बाह्य पंप द्वारा निर्मित दाब पर आधारित है। इस भाग में हम ध्वनिकरण (sonification) के विषय में पढ़ेंगे जो अल्ट्रासाउन्ड/ पराध्वनि (25Hz की ध्वनि तरंगें) द्वारा निर्मित दाब तरंगों पर निर्भर करता है। यह दाब तरंग आगे गुहिकायन (cavitation) का प्रभाव उत्पन्न करती हे। दोलनकारी गुहिकायन अंतः स्फोटों (implosion) द्वारा कुछ समय बाद धराशायी/नष्ट हो जाते हैं। ये अंतः स्फोट स्थानीकृत आघात तरंग उत्पन्न करके तापमान बढ़ा देते हैं (चित्र 2.9) ध्वनीकरण का उपयोग कम आयतन के लगभग 1ml से 2 L तक के सेम्पलों के लिए किया जाता है।



चित्र 2.9: गुहिकायन बुलबुले द्वारा पराध्वनिक तरंगों का प्रभाव।

चित्र 2.10 को देखिए जहां आप एक कंट्रोल इकाई को ब्लैन्डर जैसी संरचना से जुड़ा देख सकते हैं जिसे सोनिकेटर/ध्वनित्र कहते हैं। यह ध्वनित्र कंपन को आवर्धित करके

विलयन में संचारित करता है। यहां ये याद रखना महत्वपूर्ण है कि हमें ध्वनीकरण करते समय उपकरण को ठंडा रखना चाहिए जिससे निर्मित होने वाले ताप से प्रोटीन क्रिया की हानि को रोका जा सके। ध्वनिकरण उपकरण की तुलना रसोई में उपयोग किए जाने वाले ब्लैन्डर से की जा सकती है जिसमें मृदु फलों को कुचल कर फल का रस या सत् बनाया जाता है। लेकिन ब्लैन्डर में नुकीले ब्लेड होते है जबकि ध्वनिकरण पराध्वनिक तरंगों पर आधारित है। लेकिन व्यापक रूप से इनका काम समान प्रतीत होता है, जहां ब्लैन्डर का उपयोग फल काटकर उनका रस प्राप्त करने के लिए किया है जबकि ध्वनिकरण युक्ति का उपयोग कोशिकाओं का लयन करके कोशिका निष्कर्ष प्राप्त करने के लिए किया जाता है।



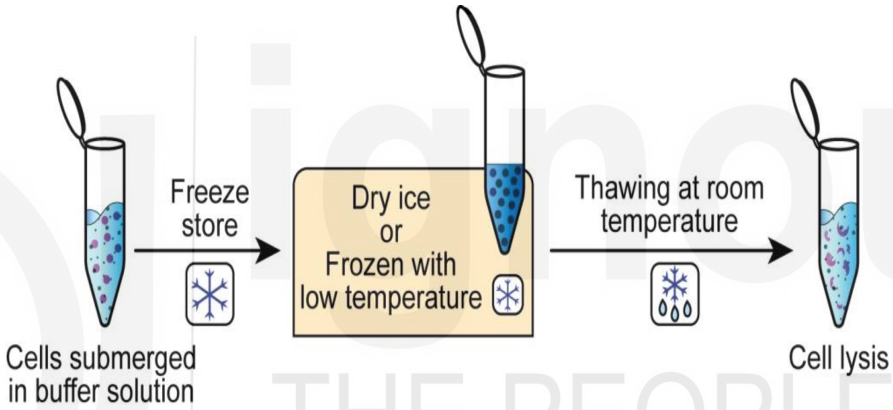
चित्र 2.10 : सोनिकेटर/ध्वनित्र।

ध्वनिकरण के कोशिका विघटन की अन्य विधियों की तुलना में अधिक लाभ होते हैं जैस प्रचालन की कम लागत और कोशिकीय निष्कर्ष का कम विकृतीकरण क्योंकि हम इस विधि को कम तापमान पर संपन्न कर सकते हैं। इसके अतिरिक्त निष्कर्षण पश्चात् अथवा प्राप्ति (अनुप्रवाह प्रसंस्करण) की आवश्यकताएं अन्य विधियों की तुलना में शून्य होती है अर्थात् इसमें किसी अवांछित रसायन को निकालने की आवश्यकता नहीं होती है क्योंकि कोशिकाओं के पाचन के लिए मनकों का उपयोग किया जाता है। लेकिन, सतत् ध्वनिकरण से अतिरिक्त ताप उत्पन्न हो सकता है और कुछ मुक्त मूलक निर्मित हो सकते हैं जो निष्कर्ष में उपस्थित जैव अणुओं को क्षति पहुंचा सकते हैं अतः ध्वनिकरण को इष्टतम स्थितियों में अन्तरालों में करने की सलाह दी जाती है।

हिम द्रवण

इस विधि को तापमान प्रेरित लयन माना जा सकता है क्योंकि तापमान में आकस्मिक परिवर्तन से कोशिका विघटन हो जाता है। संक्षेप में जीवाणवीय और स्तनधारीय कोशिकाओं को उपयुक्त कोशिका भंडारण विलयन/बफर में डुबोकर शुष्क बर्फ अथवा ऐथेनॉल में रखा जाता है अथवा विशेष रूप से निर्मित वायल/शीशियों में (छोटे

पात्र/इपेन्ड्रोफ) अत्यधिक कम तापमानों पर डीपफ्रीजर में रखा जाता है। हिम द्रवण करने के लिए इन वायलों को बाहर निकाल कर कमरे के तापमान पर द्रवित किया जाता है। ऐसा करने से तापमान में वृद्धि होती है और आप तापमान में आकस्मिक परिवर्तन को प्रेरित करके उनका विघटन कर सकते है। लेकिन सतत् हिमद्रवण की सलाह नहीं दी जाती है क्योंकि इससे तापमान बढ़ सकता है और ताप संवेदी अणुओं जैसे प्रोटीनों, एन्जाइमों और न्यूक्लीक अम्लों का विकृतीकरण हो सकता है। अतः प्रभावी रूप से पृथक्करण के लिए इस प्रक्रिया को अनेक चक्रों में दोहराने की आवश्यकता होती है जिनमें ''हिमीकरण के बाद हिमद्रवण'' किया जाता है (चित्र 2.11)। इस प्रक्रिया में कोशिका फूल जाती है और अंततः वह टूट जाती है तथा आन्तरिक उपकोशिकीय घटक साइटोसोल समेत बाहर निकल आते हैं। इस विधि में काफी समय लगता है क्योंकि इसे अनेक चक्रों में संपन्न करने की आवश्यकता होती है जिससे प्रभावी रूप से कोशिकालयन हो सके। इसका उपयोग अणु जीवविज्ञान में अनुसंधान कार्य करते समय पुर्नयोजी प्रोटीनों को सामान्यतः क्लोन की गई अथवा संवर्धित की गई कोशिकाओं से पृथक करने के लिए किया जाता है।



चित्र 2.11: हिम–द्रवण प्रक्रिया में सम्मिलित चरण

Potter-Eljvehem सममित्र : ऊतकों पीसने के लिए और कोशिकाओं को कर्तन के लिए इस्तेममाल किया जा सकता है। टेफ्लॉन ;च्ज्थ्म्द्ध मूसल प्रभावी ढंग से एक कतरनी के रूप में प्रयोग किया जाता है (चित्र 2.12)। कतरनी के लिए, मूसल को एक वेरिएबल स्पीड लैब मोटर से जोड़ा जा सकता है। नमूनो प्रौद्योगिकी के लिए, नरम ऊतक को टेफ्लॉन में रखा जाता है और मूसल को 600–750 आरपीएम पर घुमाया जाता है। च्वजजमत.म्सरअमीमउ सस्ती है। वे उपयोग और साफ करने में आसान है और नमूनों प्रौद्योगिकी के दौरान बर्फ पर ठंडा रखा जा सकता है। समांगित्र नरम ऊतकों और पशु कोशिकाओं को जोड़ने के लिए प्रभावी है।

चित्र 2.12: सेन्ट्राफ्यूज (स्रोत विकीमीडिया कॉमन्स)

2.5 अपकेन्द्रकीकरण

अभी तक अपने कोशिका विघटन करने और कोशिका निष्कर्ष बनाने की अ-यांत्रिक और यांत्रिक विधियों के विषय में पढ़ा है। अब इस भाग में हम 'अपकेन्द्रीकरण तकनीक' के बारे में पढ़ेंगे, जिसका उपयोग व्यापक रूप से कोशिकाओं और उपकोशिकीय अंगकों के पृथक्करण और उनको वियुक्त करने के लिए किया जाता है। विशेष रूप से द्रव निलंबन में उपस्थित ठोस कणों को पृथक करने के लिए इसका उपयोग किया जाता है।

यद्यपि आपने कोशिका जीवविज्ञान पाठ्यक्रम BBCCT-103 की इकाई-2 में इस तकनीक के विषय में पढ़ा है। इस भाग में हम इस तकनीक के सिद्धान्त और उपयोगों को संक्षेप में दोहराएंगे और उन पर चर्चा करेंगे। सेन्ट्रीफ्यूज (अपकेन्द्रित्र) एक यंत्र है जिसका उपयोग इस तकनीक में किया जाता है और जैसाकि ऊपर बताया गया है इसका उपयोग जैविक नमूनों के मिश्रण को पृथक करने और उनके शोधन में किया जाता है। सेन्ट्रीफ्यूज के एक टेबिल टॉप मॉडल को चित्र 2.13 में दिखाया गया है। आपने किसी रोग निदान प्रयोगशाला में ऐसे अपकेन्द्रीकरण यंत्र को संभवतः देखा भी होगा जहां तकनीशियन रक्त से सीरम को पृथक करते है। आगे पढने से पहले विद्यार्थियों को सलाह दी जाती है कि वे निम्नलिखित यूटयूब लिंक पर वीडियो को देखें (copy.fram eng.)।

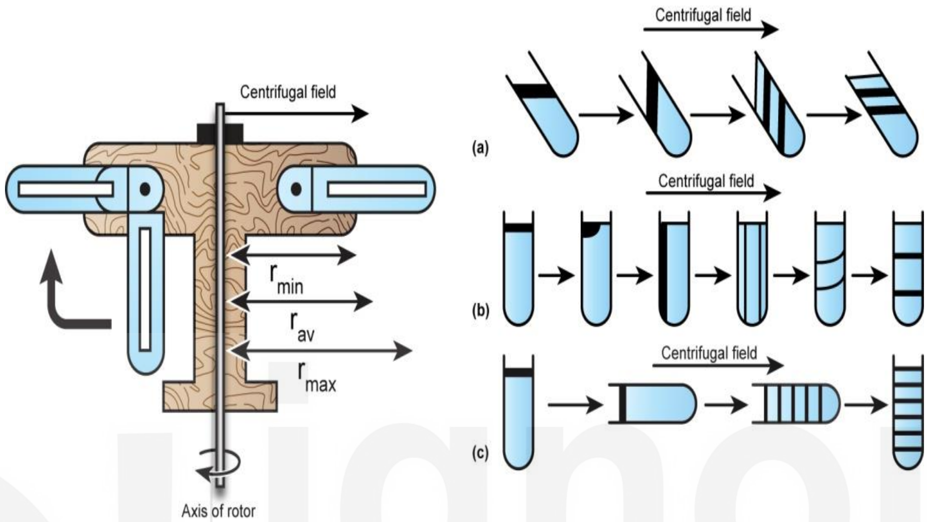
आरपीएम को आरसीएफ में बदलने के लिए, निम्नलिखित सूत्र है प्रयुक्त :RCF = (rpm)^2 x 1.118 x 10^5 x r. आरसीएफ, आरपीएम पर निर्भर है और चक्कर केन्द्र से कणों की दूरी और गति पर।

वर्ष 1920 में स्वेडवर्ग नामक वैज्ञानिक ने इस तकनीक को विकसित किया था। सापेक्ष अपकेन्द्री क्षेत्र (g) (Relative Centirigugal Field) जिसे संपेक्ष में RCF कहते है, इस तकनीक के पीछे कार्य करने वाला प्रमुख बल है। RCF को मापने के लिए चक्र प्रति मिनट (revolution per minute, rpm) इकाई का उपयोग किया जाता है। विभिन्न प्रकार के अपकेन्द्रित्र होते हैं जैसे प्रारंभिक (preparative), विश्लेषणात्मक (analytical) और पराअपकेन्द्रित्र/अल्ट्रासेन्ट्रीफ्यूज विश्लेषणात्मक और पराअपकेन्द्रित्र दोनों में कम तापमानों पर प्रचालन करने का प्रावधान होता है जिससे उच्च गति से होने वाले घूर्णनों द्वारा उत्पन्न ताप के कारण प्रोटीनों की क्रिया की हानि को रोका जा सके।

चित्र. 2.13: सेन्ट्रीफ्यूज (अपकेन्द्रित्र) (source Wikimedia commons).

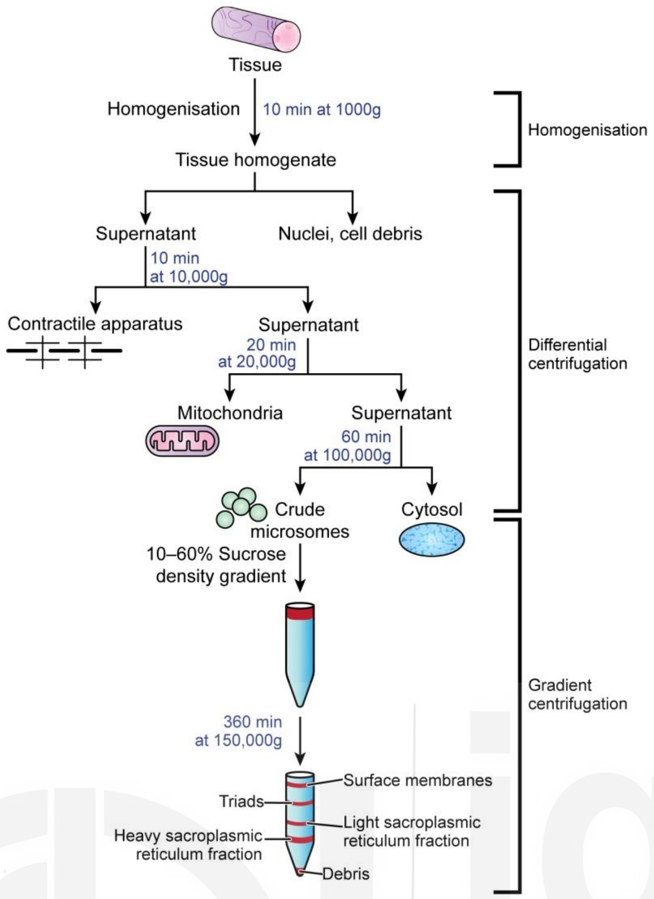
अपकेन्द्रीकरण तकनीक में किसी अन्य यांत्रिक अथवा अ-यांत्रिक विधि द्वारा तैयार किए गए कोशिका निष्कर्ष को अपकेन्द्रित्र नली में लिया जाता है (चित्र 2.14क)। इस

अपकेन्द्रित्र नली को रोटर में रखा जाता है जो मिश्रण विलयन का उच्च गति से घूर्णन संभव बनाता हैं। इस प्रक्रिया के समय ठोस कण नली की तली में अपने घनत्वों के अनुसार बैठते जाते है (चित्र 2-14 ख)। सरल शब्दों में उच्च घनत्व वाले कण पहले तली में बैठते है, जिसके बाद मध्यम घनत्व वाले कण बैठते है और उसके बाद कम घनत्व वाले कण सबसे ऊपरी परत बनाते हैं।



चित्र 2.14 क) सेन्ट्रीफ्यूज की आंतरिक व्यवस्था ख) कणों का अवसादन

टेबिल टॉप सेन्ट्रीफ्यूज का उपयोग व्यापक रूप से रोग निदान प्रयोगशाला में रक्त कोशिकाओं और यीस्ट कोशिकाओं को पृथक करने के लिए किया जाता है। जबकि उच्च गति सेन्ट्रीफ्यूज का उपयोग उपकोशिकीय अंगकों जैसे माइटोकॉन्ड्रिया, गॉल्जी कॉम्प्लैकस तथा अन्य कोशिका अवक्षेपों जैसे एन्टीजन-एन्टीबॉडी कॉम्प्लैक्सों को पृथक करने के लिए किया जाता है (चित्र 2.15)। विश्लेषणात्मक अपकेन्द्रीकरण में प्रोटीनों के वियुक्त होते समय उनके अणु संरूपणों में होने वाले परिवर्तनों का परीक्षण करने के लिए एक अन्य प्रावधान भी होता है।



चित्र 2.15: अपकेन्द्रीकरण के उपयोग द्वारा उपकोशिकीय प्रभाजीकरण के चरण

बोध प्रश्न 2

1. बीड मिल विधि में बेलन द्वारा निर्मित ----- बल--------बल में परिवर्तितत हो जाता है।

2. फ्रेंच प्रेस विधि ------------ प्रकार की अपरूपण तकनीक में आती है।

3. अनुप्रवाह प्रसंस्करण के संदर्भ में ध्वनिकरण का अन्य विधियों की तुलना में क्या प्रमुख लाभ है?

4. ----- कार्बनिक विलायक का उपयोग हिम द्रवण विधि में किया जाता है।

5. अपकेन्द्रीकरण के पीछे ---------- बल कार्य करता है।

6. rpm का पूरा नाम लिखिए।

2.6 सारांश

- इस इकाई में आपने कोशिका निष्कर्ष बनाने में उपयोग की जाने वाली विभिन्न विधियों के विषय में पढ़ा है। इन विधियों में सामान्य पिसाई से लेकर पराध्वनिकरण तक सम्मिलित है। हमने देखा कि विभिन्न प्रकार की कोशिकाओं

को वियुक्त करने के लिए किए जाने वाले अनुसंधान कार्य की आवश्यकता के अनुसार विभिन्न विधियां उपलब्ध है। लाल रूधिर कोशिकाओं के लयन के लिए परासरणी आघात विधि उपयुक्त होती है।

- जबकि जीवाणवीय और पादप कोशिकाओं को विघटित करने के लिए आप विशिष्ट एन्जाइमों का उपयोग कर सकते हैं। इसी प्रकार औद्योगिक उपयोगों के लिए हमारे पास उच्च दाब समांगीकरण और बीड मिल विधि है। जबकि किसी अनुसंधान प्रयोगशाला के स्तर पर कोशिका विघटन करने के लिए हिम द्रवण और पराध्वनिकरण दोनों ही विधियां अत्यधिक उपयोगी हैं।

- इकाई के अंत में हमने अपकेन्द्रीकरण की तकनीक के बारे में चर्चा की है जिसका उपयोग प्रचलित रूप से कोशिकाओं और अंगकों को पृथक करने और अणुओं का उनके घनत्व के आधार पर शोधन करने के लिए किया जाता है।

- ये याद रखना महत्वपूर्ण है कि ये सभी तकनीकें आरंभिक कोशिका निष्कर्षों को बनाने और कुछ हद तक अपकोशिकीय अंगकों और जैव अणुओं के पृथक्करण के लिए उपयोगी हैं। अगली दो इकाइयों में हम जिन तकनीकों की चर्चा करने जा रहे है वे प्रोटीनों तथा अन्य अनिवार्य जैव अणुओं के पृथक्करण और शोधन की आवश्यकताओं को पूरा करेंगी।

2.7 अंत में कुछ प्रश्न

1. कोशिका विघटन की यांत्रिक और अ-यांत्रिक विधियों के बीच अन्तर बताइए।

2. द्रव अपरूपण विधियों का उनके लाभों के विशेष उल्लेख के साथ वर्णन कीजिए।

3. जीवाणवीय कोशिका भित्ति के β–1,4-ग्लाइकोसाइडिक बंधों के लयन के लिए उपयोग की जाने वाली अ-यांत्रिक विधि पर टिप्पणी लिखिए।

4. यदि हम 500 kDa, 350 kDa, 280 kDa और 200 kDa युक्त प्रोटीन मिश्रण को अपकेन्द्रीकण तकनीक के उपयोग से पृथक करते हैं, तो क्या होता है?

2.8 उत्तर

बोध प्रश्न 1

1. ट्रिटोन X-100, SDS तथा एथिल ट्राइमेथिल अमोनियम ब्रोमाइड का उपयोग सामान्य रूप से कोशिका लयन के लिए किया जाता है।

2. β–1,4-ग्लाइकोसाइडिक बंध

3. परिवेशी विलयनों से जल और आयनों को ग्रहण करके फूल जाती है और अंततः फट जाती है।

4. जाइमोलेस

बोध प्रश्न 2

1. गतिक, यांत्रिक
2. ठोस अपरूपण
3. उपयोग में आसान और सस्ती
4. ऐथेनॉल
5. सापेक्ष अपकेन्द्री बल
6. चक्र प्रति मिनट

अंत में कुछ प्रश्न

1. अ-यांत्रिक विधियां मुख्य रूप से रसायनों/ऐन्जाइमों/अपमार्जकों पर निर्भर करती है जबकि यांत्रिक विधियां ठोस और द्रव अपरूपण बलों पर निर्भर करती है (भाग 2.1 और भाग 2.2 को देखिए)।

2. समांगीकरण और ध्वनिकरण दोनों विघटन की द्रव अपरूपण विधियों के अंतर्गत आती हैं। तेजी से कार्य करना और सस्ता होना समांगीकरण और ध्वनिकरण दोनों के प्रमुख लाभ है (भाग 2.4.2 को देखिए)।

3. लाइसोजाइम ऐन्जाइम, (ऐन्जाइमी विधि, भाग 2.3.3 को देखिए) का उपयोग जीवाणवीय कोशिका भित्ति के β–1,4-ग्लाइकोसाइडिक बंध को तोड़ने के लिए किया जाता है।

4. जब 500 kDa, 350 kDa, 280 kDa और 200 kDa युक्त किसी प्रोटीन मिश्रण का अपकेन्द्रीकरण किया जाता है तो प्रोटीन अपने घनत्वों के अनुसार अवसादित या तली में बैठते हैं अर्थात 500 kDa सबसे उच्च घनत्व का प्रोटीन होने के कारण सबसे पहले नली की तली में पहुंचता है, उसके बाद 350 kDa, 280 kDa और 200 kDa के प्रोटीन एक के ऊपर एक परत बनाते हैं (भाग 2.5 को देखिए)

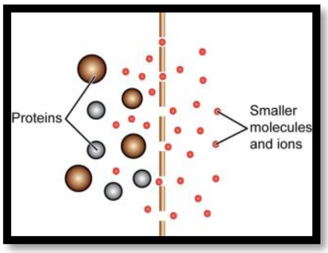
2.9 अन्य सुझाई गई पुस्तकें

1. Practical Biochemistry: principles and techniques. Keith Wilson and John Walker. Cambridge low price editions: Cambridge University Press; 5th edition.
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. and Cox, M.M., W.H.
5. Freeman and Company (New York), ISBN: 13: 978-1-4641-0962-1 / ISBN: 10:1-4292-3414-8.

6. Physical Biochemistry (2009) 2nd ed., Sheehan, D., Wiley-Blackwell (West Sussex),ISBN: 9780470856024 / ISBN: 9780470856031.

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

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY



इकाई 3

पृथक्करण तकनीकें-I

रूपरेखा

3.1 प्रस्तावना
    संभावित अध्ययन परिणाम
3.2 अमोनियम सल्फेट अवक्षेपण
3.3 डायलिसिस
3.4 प्रोटीन अवक्षेपण (विलायक प्रभाजन)
3.5 हिमशुष्कन
3.6 सारांष
3.7 अंत में कुछ प्रष्न
3.8 उत्तर
3.9 अन्य सुझाई गई पुस्तकें

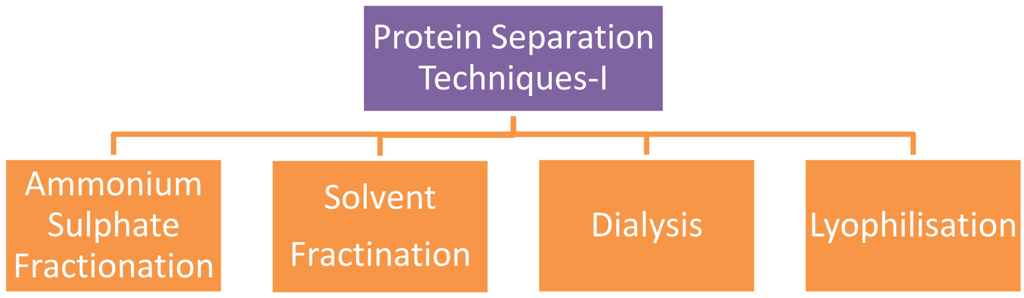
3.1 प्रस्तावना

पिछली इकाइयों में हमने प्रोटीनों के मौलिक गुणों, प्रमुख कार्यों और विविधता के विषय में पढ़ा था। आप जानते है कि ये सभी प्रोटीन सजीव कोशिका के अंदर स्थिति होते हैं और ये जीवन के अस्तित्व और परिरक्षण के लिए अनेक जैव अणुओं में से एक हैं। इकाई–2 में व्यापक रूप से आरंभिक निष्कर्षण के लिए उपयोग की जाने वाली मौलिक विधियों जैसे विलायकीकरण, समांगीकरण और अपकेन्द्रीकरण इत्यादि के विषय में बताया गया है। जो कोशिका के बाह्य और अन्तराकोशिकीय स्थानों से उपकोशिकीय घटकों और अन्य जैव अणुओं के पृथक्करण को संभव बनाती हैं।

वैज्ञानिक अध्ययन करने के लिए इन जैव अणुओं को पृथक करके उसका शोधन करना बहुत आवश्यक है। जैव अणुओं को वियुक्त करने और उनके पृथक्करण के लिए हमें ये ध्यान रखना चाहिए कि उनके मौलिक गुण जैसे आमाप, आकार और आवेश विरूपित नहीं होने चाहिए। उनकी स्थानीय जैविक क्रिया/कार्य बने रहने चाहिए। प्रोटीनों के पृथक्करण का चिकित्सा, उद्योग तथा आणविक स्तर पर जीवन को समझने में प्रमुख महत्व है।

इस इकाई में हम कुछ विशिष्ट तकनीकों का उपयोग करके अपरिष्कृत कोशिका निष्कर्ष में उपस्थित प्रोटीन सेम्पल/नमूने को पृथक करके सान्द्रित करने के लिए सामान्य रूप से उपयोग की जाने वाली तकनीकों के बारे में चर्चा करने जा रहे है। इन तकनीकों में अमोनियम सल्फेट प्रभाजन, डायलिसिस (अपोहन) और हिमशुष्कन (lyophilisation) सम्मिलित हैं (चित्र 3.1) इन तकनीकों को करने का मौलिक उद्देश्य प्रोटीनों की विलयता को सीमित करके विलायक तंत्र में प्रोटीनों की उपलब्धता को बढ़ाना है। इस इकाई को पढ़ते समय हम तकनीकों के सिद्धान्त, संक्षिप्त कार्यविधि और उपयोगों के विषय में पढ़ेंगे। इन तकनीकों को संपन्न करने के बाद प्राप्त होने वाला प्रोटीन सेम्पल अथवा प्रभाज आगे वर्णलेखन (chromatography) तथा वैद्युत कण संचलन (Electrophoresis) के स्रोत (सेम्पल) का काम करेंगे।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY



चित्र 3.1: प्रोटीन पृथक्करण तकनीकों का आरेखी प्रदर्शन

संभावित अध्ययन परिणाम

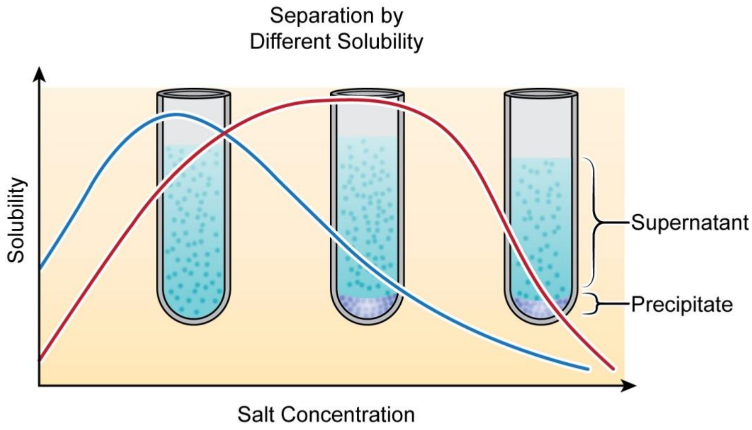
इस इकाई का अध्ययन करने के बाद, आप :

- लवणक्षेपण (saltingout), डायलिसिस और हिमशुष्कन के मौलिक सिद्धान्तों को परिभाषित कर सकेंगे;
- डायलिसिस और हिमशुष्कन तकनीकों के उपयोगों को बता सकेंगे;
- अमोनियम सल्फेट और विलायक प्रभाजन तकनीकों के बीच अन्तर कर सकेंगे; और
- प्रोटीन विश्लेषण के संदर्भ में इन तकनीकों के महत्व को समझा सकेंगे।

3.2 अमोनियम सल्फेट अवक्षेपण

यह संपूर्ण तकनीक एक भौतिक कारक 'विलेयता' के इर्दगिर्द घूमती है, लेकिन दिलचस्प रूप से यह कारक लवणवा पर अर्थात विलयन में लवणों की मात्रा पर निर्भर करता हैं प्रोटीनों की विलेयता भिन्न लवण सान्द्रताओं पर भिन्न होती है और इसलिए उच्च लवण सान्द्रता (आपनी सामर्थ्य चित्र 3.2 को देखिए) पर पृथक्करण (अवक्षेपण) कहीं आसान हो जाता है। अमोनियम सल्फेट [$(NH_4)_2SO_4$] का चयन करने के पीछे कारण यह है कि यह विलयन के pH को प्रभावित नहीं करता है जिसके कारण प्रोटीन की संरचना अप्रभावित रहती है। ये सस्ता भी है और आसानी से घुलनशील होता है। (प्रयोगशाला पाठ्यक्रम BBCCL-102 के परीक्षण–6 को याद कीजए जिसमें हमने पढ़ा था कि अम्लीय pH प्रोटीन के अस्थिरीकरण को बढ़ावा देता है)।

इसके विस्तृत सिद्धान्त, कार्य विधि और महत्व को इस पाठ्यक्रम के BBCCL-106 के परीक्षण–6 में बताया जा चुका है। अतः यहां पर हम इस तकनीक से संबंधित कुछ पहलुओं की ही चर्चा करेंगे। अतिरिक्त जानकारी के लिए आपको नीचे दिए गए लिंक पर वीडियो को देखने की सलाह दी जाती है
(https://www.youtube.com/watch?v=KNlhQSSECK4&lc=UgxmaK0IVE5bHLWoex94AaABAg.)

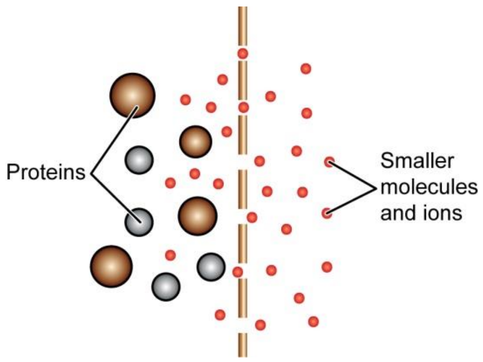


चित्र 3.2: प्रोटीन की विलेयता पर लवणता का प्रभाव

प्रोटीन के पृथक्करण में लवण क्षेपण (saltingout) की क्या भूमिका है? सामान्य रूप से अणुओं (विलेयों) की विलेयता उनकी रासायनिक प्रकृति अर्थात् ध्रुवीय का अ–ध्रुवीय (जलरागी या जलभीत) के साथ ही माध्यम (विलायक) की आयनी सामर्थ्य पर निर्भर करती है। उच्च लवण सान्द्रताओं पर विलायक की आयनी सामर्थ्य अधिक होती है अतः यह अणुओं को विलेयित नहीं करता है जिससे वे अवक्षेपित हो जाते हैं। यदि आप उपर्युक्त संकल्पना को अमोनियम सल्फेट के अवक्षेपण के लिए लागू करते हैं तो प्रोटीन विलयन में अमोनियम लवण मिलाने से प्रोटीन का अवक्षेपण सुगम हो जाता है (विलयन से बाहर निकलना)। अतः इसे 'लवण क्षेपण' कहते हैं। यह विलयन में उपस्थित प्रोटीन को सान्द्रित करने का और उसी विलयन (कोशिका निष्कर्ष) में DNA से प्रोटीन को पृथक करने का श्रेष्ठ तरीका है। लेकिन, प्रोटीन से लवण को डायलिसिस (इस इकाई का भाग 3.4 देखिए) करके निकाला जा सकता है।

3.3 डायलिसिस

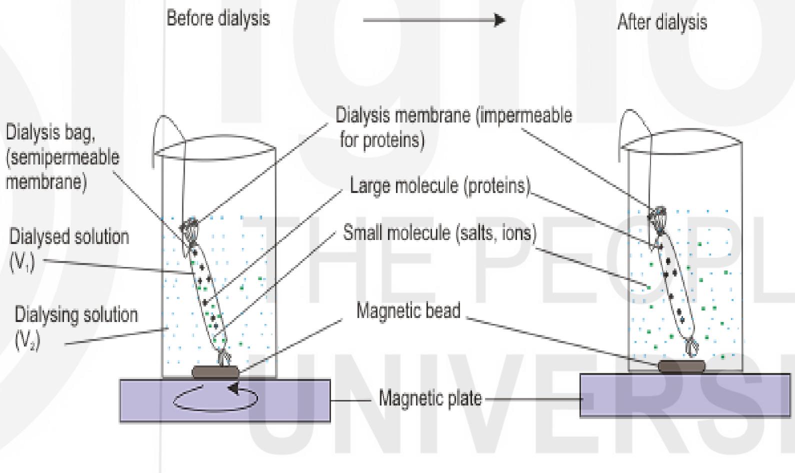
यह प्रक्रिया, जिसमें भिन्न सान्द्रताओं के दो विलयन एक अर्धपारगम्य झिल्ली द्वारा पृथक्कृत रहते है, और विलेय के अणु उच्चतर सान्द्रता से अर्धपारगम्य झिल्ली द्वारा कम सान्द्रता के विलयन की ओर गति करते है, डायलिसिस (अपोहन) कहलाती है (चित्र 3.3)। अर्ध पारगम्य झिल्लियों में सूक्ष्म छिद्र होते हैं जो अणुओं के विसरण को संभव बनाते हैं। यह अर्थपारगम्य झिल्ली एक छोटी थैली अथवा नली के रूप में उपवलब्ध होती है। अतः विसरण इस तकनीक में निहित कार्यबल है।



चित्र 3.3: अर्धपारगम्य झिल्ली से होकर विलेय अणुओं का प्रवाह

डायलिसिस को अमोनियम सल्फेट अवक्षेपण के बाद प्रोटीन विरचन में से लवण को निकालने के लिए किया जाता है। प्रोटीन के आमाप का लाभ लेते हुए इसे अपरिष्कृत निष्कर्ष में से प्रोटीनों के और अधिक शोधन के लिए किया जाता हैं। सामान्य रूप से, प्रोटीन का आमाप अपरिष्कृत निष्कर्ष में उपस्थित लवण अणुओं के से कहीं अधिक होता है।

संक्षेप में, इसकी प्रक्रिया में 'अर्धपारगम्य झिल्ली की नली में अपरिष्कृत प्रोटीन निष्कर्ष को भरकर उसके दोनों सिरों को बांध कर नली को बीकर में उपयुक्त आयनी सामर्थ्य के बड़ी मात्रा में उपस्थित बफर विलयन में निलंबित कर दिया जाता है। जिसमें चुंबकीय मनका/बीड होते हैं)। बीकर को चुबंकीय विलोडक पट्टी (magnetic stirrer plate) के ऊपर रखा जाता है जिससे बफर विलयन मे ंधीमी गति होती है (चित्र 3.4)। झिल्ली के भीतर की ओर अपरिष्कृत निष्कर्ष (उच्च सान्द्रता) और झिल्ली के बाहर बफर विलयन (कम सान्द्रता) की परासरण सान्द्रताओं के बीच अन्तर के कारण, लवण कण (विलेय) तब तक झिल्ली के बाहर आते रहते हैं जब तक वे बफर विलयन (सिल्ली से बाहर) में उपस्थित लवण के कणों के साथ साम्य स्थापित नहीं कर लेते हैं। प्रोटीन आमाप में बड़े होने के कारण झिल्ली के अंदर रहते हैं। झिल्लियां 1-1000,000 kDa तक के परास वाले भिन्न ''अणुभार–कटऑफ (MCO)'' मे ंपाई जाती हैं और ये झिल्लियां सामान्यतः सेलुलोस और सेलुलोस ऐस्टरों की बनी होती हैं। बाजार में भिन्न छिद्र आमाप और ब्रान्ड की झिल्लियां बनाने वाले अनेक निर्माता हैं।



चित्र 3.4: अपरिष्कृत प्रोटीन की डायलिसिस

बोध प्रश्न 1

1. लवण क्षेपण को परिभाषित कीजिए।

2. लवण क्षेपण के लिए अमोनियम सल्फेट के उपयोग को उचित ठहराइए।

3. डायलिसिस के लिए निहित सिद्धान्त———————— है।

4. एक प्रारूपिक झिल्ली ——————— पदार्थ की बनी होती है।

3.4 प्रोटीन अवक्षेपण (विलायक प्रभाजन)

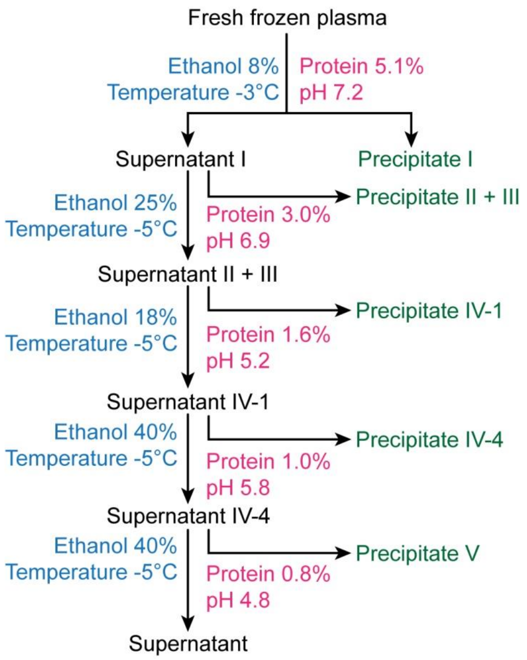
प्रभाजन (fractionation) एक पृथक्करण की प्रक्रिया है जिसमें मिश्रण में उपस्थित घटकों को उनके विशिष्ट गुणों के आधार पर अलग–अलग प्रभाजों अथवा घटकों में विभाजित किया जाता है। प्रभाजन करने का मुख्य उद्देश्य मिश्रण अथवा अपरिष्कृत पदार्थ से शुद्ध अथवा सक्रिय घटकों को प्राप्त करना हैं। आइए अब हम प्रोटीनों के लिए उपयोग की जाने वाले विलायक प्रभाजन विधि की चर्चा करते हैं।

इस विधि में प्रोटीनों को विलयन की ध्रुवणा (potarity) को परिवर्तित करके पृथक किया जाता है। इसके लिए विलयन में कम ध्रुवीय कार्बनिक विलायकों को मिलाया जाता हे। सामान्य रूप से प्रोटीन विलयन के जलरागी समूहों के साथ क्रिया करते हैं और घुलनशील रहते हैं। BBCCT-101 पाठ्यक्रम की इकाई–4 में प्रोटीन संरचना का अध्ययन करते समय हमने देखा था जलरागी और जलभीत दोनों प्रकार के ऐमीनों अम्ल और उनकी परस्पर क्रियाएं प्रोटीन की संरचना की स्थिरता को बनाए रखने मे ंप्रमुख भूमिका निभाते हैं। विलायक प्रभाजन में बाह्य विलायक को मिलाने से 20 एमीनों अम्लों का वितरण परिवर्तित हो जाता है और प्रोटीन की संरचना अस्थिर हो जाती है। अनुसंधान परीक्षणों को करते समय स्थिति को ठंडा बनाए रखना महतवपूर्ण भूमिका निभाता है और प्रोटीनों के विकृतीकरण को कम करता है।

ऐसीटोन और एथेनॉल प्रोटीन अवक्षेपण करने के लिए सामान्य रूप से उपयोग किए जाने वाले दो विलायक है। चिकित्सीय निदान मे ंएथेनॉल का उपयोग प्रोटीनों का प्रभाजन करने के लिए किया जाता है; जबकि ऐसीटोन का उपयोग प्रोटीन पाउडर (चूर्ण) बनाने के लिए किया जाता है जिसे 'ऐसीटो पाउडर' कहते है और इसको प्रोटीनों के आगे विश्लेषण के लिए परिरक्षित किया जा सकता है (चित्र 3.5)।

प्रोटीन प्रभाजन करने से पहले सेम्पल (नमूने) को 0^oC पर और विलायक को -20^oC पर ठंडा कर लेना चाहिए। प्रोटीन का स्पष्ट प्रभाज प्राप्त करने के लिए आपको ये सलाह दी जाती है कि विलायक को धीरे–धीरे बूंद–बूंद करके विलयन को लगातार चलाते हुए डाले। यदि रखिए यह पूरी प्रक्रिया ठंडी स्थिति में करनी चाहिए, यही नहीं कॉलौइडी निलंबन के बनने से बचने के लिए इसमें एक चुटकी NaCl मिलाया जा सकता है।

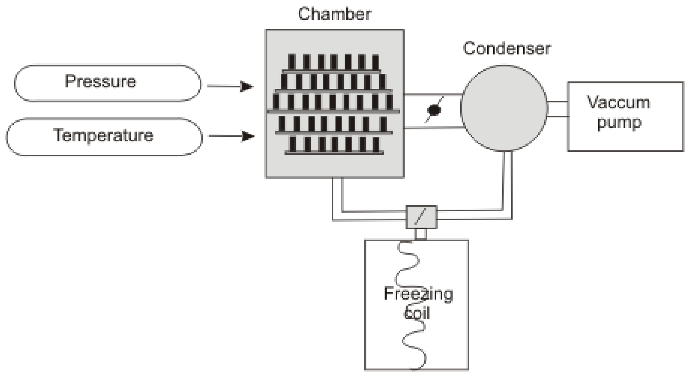
नोट : ऐसीटोन के अवक्षेपण के बाद प्राप्त होने वाले प्रोटीन अवक्षेप को कमरे के तापमान पर वायु में सुखाया जाता है जहां वाष्पीकरण की गुप्त ऊष्मा शुष्कन की प्रक्रिया के समय प्रोटीन को ठंडा रखती है। कार्बनिक विलायकों द्वारा प्रोटीन प्रभाजन करते समय अत्यधिक सावधनी बरतने के बाद भी प्रोटीन की अल्प मात्रा विकृत हो जाती है।



चित्र 3.5: कार्बनिक विलायकों के उपयोग द्वारा प्रोटीन का अवक्षेपण

3.5 हिमशुष्कन

ऊर्ध्ववातन (sublincation) प्रोटीनों के हिमशुष्कन के पीछे कार्य करने वाला मूल सिद्धान्त है। ऊर्ध्वपातन में ठोस पदार्थ को द्रव स्थिति में आए बिना गैस अथवा वाष्प में परिवर्तित किया जाता है। अतः हिमीकृत प्रोटीन सेम्पल को जल को निकालने के लिए उच्च निर्वात दाब में रखा जाता है जिससे प्रोटीन सेम्पल सान्द्रित हो जाता है। दूसरे शब्दों में हम जलवाष्प के द्वारा जल को निकाल कर प्रोटीन को सान्द्रित करते हैं। इस प्रक्रिया को हिमशुष्कन भी कहते हैं। इसका उपयोग व्यापक रूप से जैविक नमूनों को निर्जलीकृत अवस्था में परिरक्षित करने के लिए किया जाता है। चित्र 3.6 में दिए गए प्रवाह चित्र को देखिए, मध्य कक्ष वह स्थान है, जहां प्रोटीन सेम्पल (नमूने) को रखा जाता है और बहुत कम तापमान पर निर्वात पंत की सहायता से ऋणात्मक दाब डाला जाता है; इससे ऊर्ध्वपातन की प्रक्रिया संपन्न होती है। हिमशुष्कित प्रोटीन सेम्पल आरंभिक हिमीकृत प्रोटीन सेम्पल की तुलना में हल्का होता हैं। इस विधि का उपयोग व्यापक रूप से ताप संवेदी जैविक नमूनों जैसे प्लाज्मा, एन्टीबायोटिक्स, सूक्ष्मजीवों, DNA और प्रोटीन को हिमीकृत करने के लिए किया जाता है। इस तकनीक का यह लाभ है कि हम प्रोटीन की मूल जैविक क्रिया को शुष्क अवस्था में परिरक्षित रख सकते हैं।



चित्र 3.6: हिमशुष्मन की प्रक्रिया का प्रवाह चित्र

बोध प्रश्न 2

1. प्रोटीन के अवक्षेपण के लिए उपयोग किए जाने वाले कार्बनिक विलायकों के नाम बताइए।
2. जब हम प्रोटीन विलयन में कार्बनिक विलायक मिलाते है जो क्या होता है?
3. हिमशुष्कन के लिए निहित सिद्धान्त क्या है?

3.6 सारांश

- इस इकाई में उपयोग की गई तकनीकें प्रोटीनों को उनके उपकोशिकीय घटकों से निष्कर्षित कर लेने के बाद आगे शोधन करने में सहायक होंगी। यदि आप ध्यानपूर्वक देखें तो अमोनियम सल्फेट प्रभाजन और विलायक प्रभाजन दोनों की तकनीकें पूरी तरह से दिए गए विलयन में प्रोटीनों की लवणता और विलेयता पर निर्भर करती हैं।
- लवण की सान्द्रता बढ़ाकर हम प्रोटीन का अवक्षेपण कर लेते हैं, जिसको 'लवणक्षेपण' कहते हैं। विलायक आधारित प्रोटीन अवक्षेपण में कुछ कार्बनिक विलायकों को मिलाकर हम प्रोटीन की ध्रुवणा को परिवर्तित कर देते हैं यानी अप्रत्यक्ष रूप से हम प्रोटीनों की विलेयता को कम करते है और उनका अवक्षेपण संभव बनाते हैं।
- एक अन्य तकनीक जिसकी इस इकाई में चर्चा की गई है, वह डायलिसिस है जिसमें हम प्रोटीन के अपरिष्कृत निष्कर्ष के अंदर उपस्थित अवांछित लवण कणों अथवा विलेय अणुओं को निकालते या निष्कासित करते हैं। इस इकाई में चर्चा की गई अंतिम तकनीक यानी हिमशुष्कन प्रोटीन सेम्पल के निर्जलीकरण द्वारा प्रोटीन की सान्द्रता को बढ़ाने में सहायक होती है।

3.7 अंत में कुछ प्रश्न

1. समझाइए कि किस प्रकार लवणता प्रोटीन की विलेयता को प्रभावित करती है?
2. प्रोटीन सान्द्रण की उस तकनीक की चर्चा कीजिए जो हिम शुष्कन के सिद्धान्त पर आधारित है।
3. डायलिसिस के कार्यकारी सेटअप को दर्शाते हुए स्पष्ट आरेख बनाइए।
4. मानव प्लाज़्मा प्रोटीन के विभाजन में शामिल चरणों का वर्णन करें।

3.8 उत्तर

बोध प्रश्न 1

1. घुलनशील प्रोटीन युक्त विलयन में लवण मिलाने की प्रक्रिया द्वारा प्रोटीन अवक्षेपित हो जाते हैं। यह परिघटना लवण क्षेपण कहलाती है।

2. अमोनियम सल्फेट प्रोटीन संरचना को प्रभावित नहीं करता है और यह एक सरल और सस्ती प्रक्रिया है।

3. विसरण

4. सेलुलोस और सेलुलोस ऐस्टर

बोध प्रश्न 2

1. ऐथेनॉल और ऐसीटोन

2. प्रोटीन की जलरागिता को कम कर देता है

3. ऊर्ध्वपातन

अंत में कुछ प्रश्न

1. प्रोटीन की विलेयता भिन्न लवण सान्द्रताओं पर भिन्न होती है और इससे उच्च लवण सान्द्रता पर पृथक्करण (अवक्षेपण) कहीं अधिक आसान हो जाता है। भाग 3.2 को देखिए।

2. हिमीकरण द्वारा शुष्कन की तकनीक को हिमशुष्कन भी कहते हैं। यह तकनीक ऊर्ध्वपातन के सामान्य सिद्धान्त पर आधारित है। पूर्ण विवरण के लिए भाग 3.5 को देखिए।

3. पूर्ण विवरण के लिए चित्र 3.4 को देखिए

4. यह बर्फ के ठंडे इथेनॉल को विलायक के रूप में उपयोग करके प्राप्त किया जा सकता है।

3.9 अन्य सुझाई गई पुस्तकें

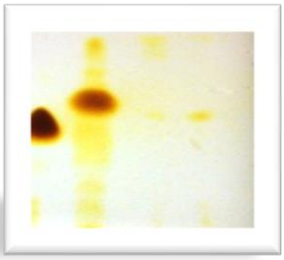
1. Practical Biochemistry: principles and techniques. Keith Wilson and John Walker. Cambridge low price editions: Cambridge University Press; 5th edition edition.2005

2. Biophysical chemistry: Principles and techniques, Upadhyay, Upadhyay and Nath. Himalaya Publishing house. VIth edition. 2002.

3. Lehninger: Principles of Biochemistry (2013) 6th ed., Nelson, D.L. and Cox, M.M., W.H.Freeman and Company (New York), ISBN:13: 978-1-4641-0962-1 / ISBN:10:1-4292-3414-8.

4. Physical Biochemistry (2009) 2nd ed., Sheehan, D., Wiley-Blackwell (West Sussex), ISBN: 9780470856024 / ISBN: 9780470856031.

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



इकाई 4
पृथक्करण तकनीकें-II

रूपरेखा

4.1 प्रस्तावना

संभावित अध्ययन परिणाम

4.2 वर्णलेखन के मौलिक सिद्धान्त

4.3 विभाजन वर्णलेखन

पत्र वर्णलेखन

पतली परत वर्णलेखन

4.4 स्तम्भ वर्णलेखन

जेल निस्पंदन (अणु बहिष्करण) वर्णलेखन

बंधुता वर्णलेखन

आयन विनिमय वर्णलेखन

गैस वर्णलेखन

उच्च प्रदर्शन द्रव वर्णलेखन

फास्ट (पक्व) प्रोटीन द्रव वर्णलेखन

प्रतिलोम प्रावस्था वर्णलेखन

4.5 सारांश

4.6 अंत में कुछ प्रश्न

4.7 उत्तर

4.8 अन्य सुझाई गई पुस्तकें

4.1 प्रस्तावना

पिछली इकाइयों में आपने ऐमीनो अम्लों और जैविक रूप से महत्वपूर्ण प्रोटीनों के गुणों, कोशिका और उनके उप–कोशिकीय खंडों से प्रोटीनों के निष्कर्षण और निष्कर्ष में उपस्थित प्रोटीन को सान्द्रित करने की विधियों के विषय में पढ़ा है। आप जानते हैं कि ये सभी जैवअणु सजीव कोशिका के भीतर पाए जाते हैं और ये जीवन का अस्तित्व और परिरक्षण के लिए प्रमुख मशीनरी है जब आप पढ़ रहे थे तो आपने संभवतः जैवअणुओं की प्रमुख विशेषताओं जैसे उनके आकार, आमाप और आवेश (पाठ्यक्रम BBCCT-101) के विषय में भी पढ़ा होगा। जैव रसायन विज्ञान में वैज्ञानिक अनुसंधान करने के लिए इन जैव अणुओं को पृथक करके इनका शोधन करना अनिवार्य है। जैवअणुओं का पृथक्करण और शोधन करते समय हमें इस बात का ध्यान रखना चाहिए कि इनकी मौलिक विशेषताएं विरूपित अथवा परिवर्तित न हों।

इस इकाई में 'पृथक्करण तकनीकें-II' में हम विभिन्न वर्णलेखन तकनीकों के सिद्धान्त, प्रकारों, संक्षिप्त कार्यविधि और उपयोगों के बारे में जानेंगे। हम इस तकनीक में सम्मिलित विभिन्न घटकों का अध्ययन करेंगे। हम इसकी भी चर्चा करेंगे कि ये तकनीकें किस प्रकार हमारे दैनिक जीवन को अपने व्यापक उपयोगों के द्वारा प्रभावित कर रही हैं। इस इकाई का सबसे रोचक भाग ये है कि किस प्रकार हम जैवआणुओं की विशेषताओं का उपयोग पृथक्करण, शोधन और विश्लेषण के अपने उद्देश्यों को पूरा करने के लिए करते हैं।

संभावित अध्ययन परिणाम

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

इस इकाई का अध्ययन करने के बाद, आप :

- ❖ वर्णलेखन (क्रोमेटोग्राफी) के मौलिक सिद्धान्तों को परिभाषित कर सकेंगे;
- ❖ विभिन्न प्रकार की वर्णलेखन तकनीकों के बीच अन्तर कर सकेंगे;
- ❖ विभिन्न वर्णलेखन तकनीकों के उपयोगों को सूचीबद्ध कर सकेंगे; और
- ❖ दैनिक जीवन में वर्णलेखन तकनीकों की भूमिका को समझा सकेंगे।

4.2 वर्णलेखन के मौलिक सिद्धान्त

एक मिश्रण में अणुओं का अलग होना उनके घुलनशीलता पर निर्भर करता है।

शाब्दिक रूप से क्रोमेटोग्राफी (वर्णलेखन) का अर्थ–क्रोमो–वर्ण/रंग, ग्राफी–लेखन/लिखना है। एम. स्वेट (1906), जोकि एक रूसी वनस्पति विज्ञानी थे, ने इस तकनीक की खोज पहली बार पादप वर्णकों जैसों पर्णहरितों (क्लोरोफिल) और कैरोटिनॉइडों को उनके अलग–अलग घटकों में पृथक करने के लिए की थी। प्राप्त होने वाले परिणाम अधिकतर रंगीन रूप में थे अतः खोज के बाद जल्दी ही इसका वर्णलेखन (chromatography) नाम पड़ गया। वर्णलेखन तंत्रों में एक स्थिर प्रावस्था (stationary phase) होती है जो ठोस अथवा जेल या द्रव अथवा ठोस/द्रव मिश्रण के रूप में हो सकती है जो अचल होता है और दूसरी सचल प्रावस्था (mobile phase) होती है, जो द्रव या गैस हो सकती है जो स्थिर प्रावस्था के ऊपर प्रवाहित होती है।

Mikhail Tswett
(source:http://en.wikipedia.org)

सिद्धान्त

पृथक्करण उस दर पर निर्भर करता है जिससे किसी मिश्रण के घटक सहायक माध्यम से होकर जिसे स्थिर प्रावस्था (x) कहते हैं, विलायक तंत्र अथवा वाहक गैस जिसे संचल प्रावस्था (γ) कहा जाता है के प्रभाव के तहत् गति करते है (सारणी 4.1)। सामान्यतः दोनों प्रावस्थाएं अमिश्रणीय होती है। जो कारक पृथक्करण में मुख्य भूमिका निभाते है उनमें विभाजन, अधिशोषण, बंधुता और आयन विनिमय सम्मिलित हैं विभाजन को वितरण गुणांक (Kd) के रूप में अभिव्यक्त किया जा सकता है, जो दिए गए तापमान पर एक स्थिरांक है और इसे निम्न रूप से प्रदर्शित किया जा सकता है।

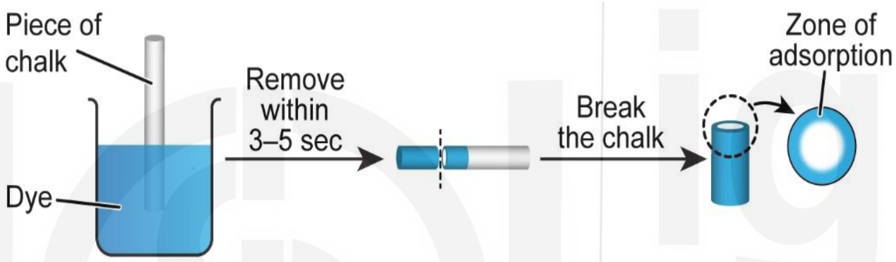
सारणी 4.1: वर्णलेखन के प्रकार

स्थिर प्रावस्था	सचल प्रावस्था	तकनीक का प्रकार
द्रव	द्रव	पत्र वर्णलेखन
द्रव	द्रव	पतली परत वर्णलेखन (TLC)
द्रव	द्रव	उच्च्य प्रदर्शन द्रव वर्णलेखन (HPLC)
ठोस	द्रव	अधिशोषण स्तंभ वर्णलेखन
ठोस (आयन विनिमयकारी	द्रव	आयन विनिमय वर्णलेखन (IEC)

ठोस मैट्रिक्स	द्रव	जेल पारगमन (अपवर्जन) वर्णलेखन (IEC)
ठोस	गैस	गैस–ठोस वर्णलेखन (GSC)
द्रव	द्रव	द्रव–द्रव वर्णलेखन (LLC)
	गैस	गैर–द्रव वर्णलेखन (GLC)

अधिशोषण एक भौतिक प्रक्रिया है जिसमें 'सतह क्षेत्र पर सान्द्रता में वृद्धि' होती है।

स्वयं करकें देखें : एक चॉक के टुकड़े को लंबवत् स्याही अथवा किसी रंजक विलयन में 1–2 सैकिन्ड के लिए डुबोएं और बाहर निकाल लें। चॉक को तोड़े और देखें। मध्य भाग में आपको दो स्पष्ट रूप से भिन्न क्षेत्र दिखाई देंगे। बाहरी क्षेत्र जिसमें स्याही की अधिक सान्द्रता पाई जाती है और भीतरी क्षेत्र जिसमें स्याही अधिशोषित नहीं होती हैं। यह परिघटना अधिशोषण कहलाती है।



4.3 विभाजन वर्णलेखन

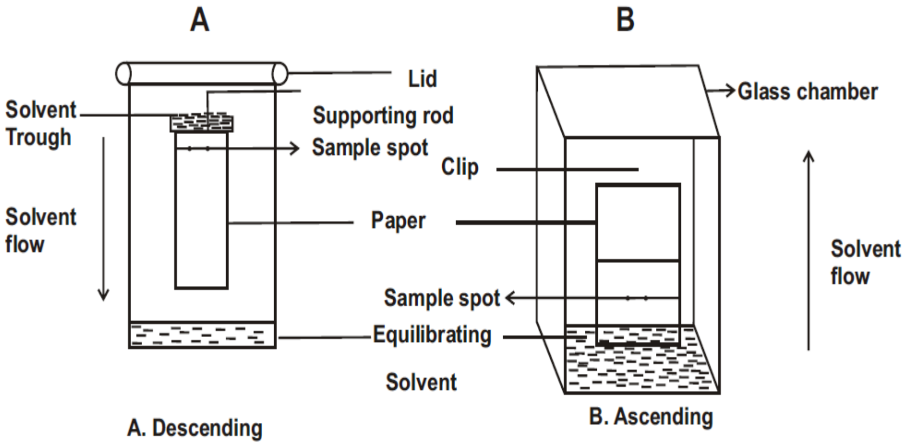
इस तकनीक का निहित सिद्धान्त वितरण गुणांक है, जिसमें पृथक किए जाने वाले पदार्थों को पहले स्थित प्रावस्था द्रव में वितरित किया जाता है जो पत्र के तंतुओं में रहता है और दूसर संचल विलायक या विकासशील विलायक तंत्र को संलच प्रावस्था माना करता है। पत्र और पतली पतर वर्णलेखन इसके दो प्रकार है जिसका उपयोग व्यापक रूप से प्रारंभिक विश्लेषण के लिए किया जाता है।

इस तकनीक के लिए आवश्यक मूलभत उपकरण/यंत्र वाटमेन नं. 1 के निस्यंद पत्र (filter paper), वर्णलेखन कक्ष जोकि सामान्यतः एक वायुरोधी बेलनाकार कांच का जार होता है, विलायक तंत्र, कोशिका नलिया, छिड़काव यंत्र (spraying gun) छिड़काव अभिकर्मक (sqraying reagent) और तप्त वायु भट्टी (hot air oven) है।

4.3.1 पत्र वर्णलेखन (paper chromatography)

आरंभ करने के लिए वाटमेन नं. 1 के निस्यंद पत्र को वांछित आयाम (लंबाई और चौड़ाई) की पट्टियों में काट लेते हैं। फिल्टर पत्र की सम सतह पर नीचे से 5 cm स्थान छोड़ते हुए पेन्सिल से एक रेखा खींच लेते हैं (स्पाइकी/कांटेदार सतह का उपयोग न करें, क्योंकि ये स्पाइक सेम्पल (नमूने) के प्रवाह को बाधित करते है (चित्र 4. 1)। पेन्सिल से खींची रेखा पर केशिका नली से सेम्पल की बूंद, प्रत्येक सेम्पल के बीच कम से कम 2 cm की दूरी रखते हुए डाले (प्रत्येक सेम्पल की बूद डालने के लिए नई केशिका नली का प्रयोग करें)। प्रयोगशाला व्ययों को कम करने के लिए प्लेटीनम तार के छल्ले का उपयोग किया जा सकता है, क्योंकि इसका ताप द्वारा रोगाणुनाशन करके

पुनः उपयोग किया जा सकता है। पत्र पर नमूने की बूंदे गिराने का कार्य पूरा करके उसे कुछ देर के लिए सूखने दीजिए।



चित्र 4.1: पत्र वर्णलेखन के प्रकार

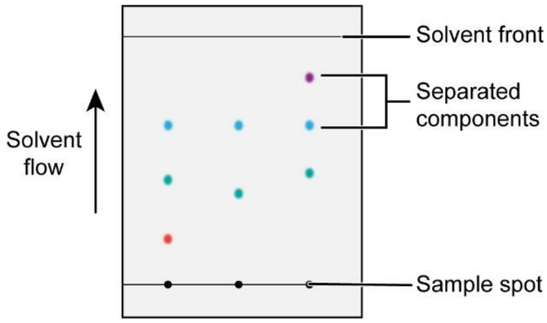
फिल्टर पत्र की पट्टी को वर्णलेखन कक्ष में रख दीजिए जिसका विलायक तंत्र से साम्यीकरण किया गया है (सारणी 4.2)। ये सुनिश्चित कर लें कि फिल्टर पत्र की पट्टी का सिरा (पेन्सिल से खींची गई रेखा की ओर वाला) कक्ष के तले में विलायक मिश्रण के संपर्क में रहें। निस्यंद पत्र को इस प्रकार कक्ष में रखना चाहिए जिससे वह वर्णलेखन कक्ष की दीवारों को स्पर्श किए बगैर मुक्त रूप से लटका रहे। अब, विलायक ऊपर की ओर गति करता है, अतः इसे आरोही/अग्रगामी वर्णलेखन कहते हैं। दूसरी तरफ पत्र के उसी सिरे को एक संकरी द्रोणी में स्थित विलायक तंत्र में पात्र के शीर्ष भाग के निकट रखा जा सकता हैं। इसमें, विलायक नीचे की ओर पत्र में गति करेगा अतः इसे अवरोही वर्णलेखन कहते हैं।

सारणी 4.2: पत्र वर्णलेखन में उपयोग किए जाने वाले विभिन्न विलायक तंत्र

विलायक तंत्र (v/v)	अनुपात	यौगिक
ब्यूटेन–1–ओल/एटसीटिक अम्ल/जल	(40/10/150)	ऐमीनो अम्ल
ब्यूटेन–1–ओल/पाइरीडीन/जल	(33/33/33)	ऐमीनो अम्ल
मीथेनॉल/पाइरीडीन/जल	(25/12/63)	ऐमीनो अम्ल
ब्यूटेन–1–ओल/पाइरीडीन/जल	(150/28/22)	मोनो और डाइसैकेराइड
प्रोपेन–1–ओल/पेट्रोलियम ईथर	(4 /96)	पादप वर्णक
क्लोरोफॉर्म/पेट्रोलियम ईथर	(30/70)	पादप वर्णक

जब विलायक फिल्टर पत्र पर अधिकतम उपलब्ध स्थान पर पहुंच जाता है, तो पत्र को कक्ष से बाहर निकाल लें, तत्काल पेन्सिल से जितनी दूरी तक विलायक पत्र पर गया है, उसको चिन्हित कर लें और उसे सूखने दें। अब, पत्र रंगहीन दिखता है (अविकसित

क्रोमेटोग्राम) पृथक्कृत यौगिकों की पहचान करने के लिए छिड़काव यंत्र की सहायता से छिड़काव अभिकर्मक को दोनों पेन्सिल की रेखाओं के बीच छिड़क दीजिए (चित्र 4.2)। बाद में पत्र को तप्त वायु भट्टी में (80-100°C) कुछ देर के लिए सुखा लीजिए (अधिक शुष्कन से पत्र जल सकता है)। समय के साथ पृथक्कृत यौगिकों और अभिरंजन अभिकर्मक के बीच अभिक्रिया होती है और विभेदित यौगिकों के रंगीन धब्बे स्पष्ट रूप से दिखाई देते हैं (विकसित क्रोमेटोग्राम)।



चित्र 4.2: क. छिड़काव यंत्र **(स्प्रेइंग गन).** ख. विकसित क्रोमेटोग्राम

पृथक्कृत यौगिकों की पहचान करना

यौगिक की पहचान करना विभेदन अग्रांत (Resolution front: Rf) मान के प्रयोग द्वारा कही आसान हो जाता है। ये Rf मान प्रत्येक ऐमिनो अम्ल के लिए भिन्न होते हैं (सारणी 4.3)। Rf मान पृथक्कृत यौगिक और उपयोग किए गए विलायक तंत्र के बीच का अनुपात होता हे, इसे निम्नलिखित तरीके से प्रदर्शित किया जाता है।

$$R_f = \frac{\text{यौगिक द्वारा मूल उत्पत्ति स्थल से तय की गई दूरी}}{\text{विलायक द्वारा मूल उत्पत्ति स्थल से तय की गई दूरी}}$$

यौगिक का परिमाणन किसी उपयुक्त विलायक द्वारा बिंदु को काटकर उसको अवक्षलित (बाहर निकालकर) करके उसका वर्णभिति आकलन करके किया जाता है।

सारणी 4.3: कुछ ऐमिनो अम्लों के R_f मान

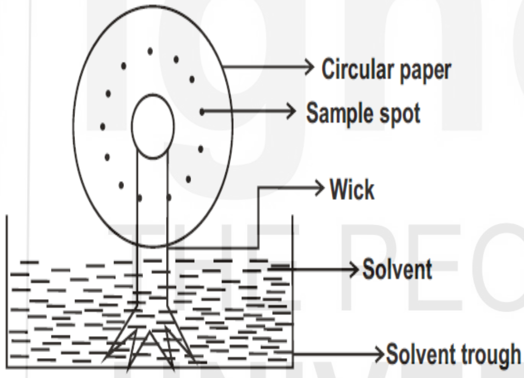
ऐमीनो अम्ल	**R_f मान**	
पाइरीडीन	**n-ब्यूटेनोल एसीटिक अम्ल जल (4:1:5)**	**n-ब्यूटेनोल जल (1:1:1)**
ऐस्पार्टिक अम्ल	23	20
ऐलानिन	30	37
ग्लाइसीन	23	29
हिस्टीडीन	11	24
ल्यूसीन	70	60
लाइसीन	12	13
टाइरोसीन	45	60

पत्र वर्णलेखन के भिन्न रूप

ऊपर बताई गई वर्णलेखन की तकनीक को ऊर्ध्ववर्ती (वर्टिकल) कहा जाता है और यह एक आयामी वर्णलेखन तकनीक कहलाती हैं। घटकों के बेहतर पृथक्करण के लिए दो–आयामी तकनीक को अपनाया जाता है। इसमें एक चौकोर पत्र की आवश्यकता होती हे और सेम्पल को बिंदु के रूप में एक कोने में डाला जाता है और फिर पहले विलायक तंत्र के साथ विकसित किया जाता है, उसके बाद दूसरे विलायक तंत्र के द्वारा पुनः विकसित किया जाता है, जो पहले विकसित किए गए के समकोण पर होता हैं इस तकनीक को दोनों दिशाओं में समान प्रकार के विलायक का उपयोग करके भी प्राप्त किया जा सकता है।

गोलाकार पत्र वर्णलेखन

इसे अरीय पत्र वर्णलेखन भी कहते हैं। इस तकनीक में हम व्यावसायिक रूप से उपलब्ध गोल वाटमेन नं. 1 निस्यंद पत्र का उपयोग करते हैं। विश्लेषित किए जाने वाले सेम्पल को पत्र के मध्य में रखा जाता है और सूखने दिया जाता है। सामान्य सोख्ता कागज से बनी बाती/वर्तिका विलायक (पेट्री–डिश में उपस्थित) और निस्यंद पत्र के बीच संयोजी अवरोध का काम करती है (चित्र 4.3)। विलायक कागज की बाती से गति करता है। जब विलायक पर्याप्त दूरी पर पहुंच जाता है तो सेम्पल में उपस्थित घटक संकेन्द्री गोल क्षेत्रों में पृथक हो जाते हैं। आगे का क्रोमेट्रोग्राम विकास और बिंदु की पहचान ऊर्ध्ववर्ती वर्णलेखन के जैसी ही होती है।



चित्र 4.3: गोलाकार पत्र वर्णलेखन

बोध प्रश्न 1

1. वर्णलेखन में कार्य करने वाले निहित कारकों के नाम बताइए।

2. Kd और Rf मान का पूरा नाम बताइए।

3. पत्र वर्णलेखन के प्रकार बताइए।

4.3.2 पतली परत वर्णलेखन (TLC)

T.L.C. (Thirilayer Chromatography) को सबसे पहले दो रूसी वैज्ञानिकों इज्मेलोव एवं श्रेबर द्वारा 1930 में प्रस्तुत किया गया था। उन्होंने इस तकनीक का उपयोग पादप वर्णकों और निष्कर्षों के पृथक्करण के लिए किया था, जिनका एक कांच की पट्टी पर 2 mm मोटी एलुमिना दृढ़ आसंजक आलेपन पर पृथक किया गया था।

TLC का निहित कार्यकारी सिद्धान्त स्थिर और सचल प्रावस्थाओं के बीच वितरण गुणांक है। जबकि, व्यवहार में वितरण अधिशोषण, विभाजन, आयन विनिमय अथवा अणु अपवर्जन वर्णलेखन पर निर्भर हो सकता हैं। क्योंकि यह परत इतनी पतली होती है कि परत के आरपार सचल प्रावस्था की गति सामान्य केशिका क्रिया द्वारा होती है, जो प्रवाह के लिए अपेक्षाकृत कम प्रतिरोध के कारण त्वरित होती है। अधिशोषण सामग्री के रूप में सिलिका जेल G (60-120 जाली) एलूमिना, सेलुलोस, मैग्नीशियम सिलिकेट, कैल्सियम सिलिकेट, सक्रियित चारकोल, प्राकृतिक डायटमी मृत्तिका, आयन विनिमय रेजिन जैसे डोवैक्स-50W, डोवेक्स–1 और कीसेलघर का उपयोग व्यापक रूप से किया जाता है, जो स्थिर प्रावस्था की भांति कार्य करता है और द्रव परत के लिए आधार का काम करता है। TLC को विकसित करने के लिए उपयोग किया जाने वाला विलायक तंत्र संचल प्रावस्था की भांति कार्य करता है। जल में अघुलनशील गैर–आयनी यौगिको जैसे वसा अम्लों, ट्राइग्लिसराडडों, वसा में घुलनशील विटामिनों और अनेक औषधियों को पृथक करने के लिए अधिशोषण सिद्धान्त का उपयोग किया जाता है, TLC के लिए कांच की पट्टियों (2.5×10 से लेकर 2.5×20 cm आमाप की), स्प्रैडर (विस्तारक यंत्र) केशिका नलियों अथवा माइक्रोपिपेट TLC विकसित करने का कक्ष और विलायक तंत्र की आवश्यकता होती है।

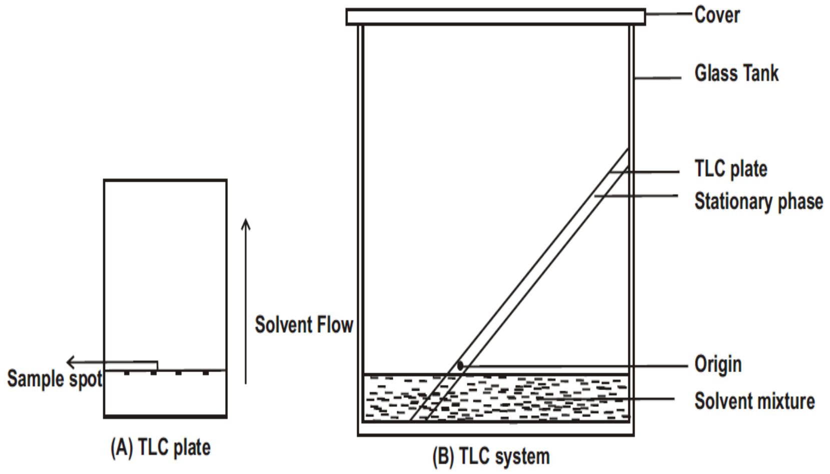
क) TLC पट्टी का बनाना

चूर्णित आधार पदार्थ की जल में लेई बनाई जाती है और एकरूप परत के रूप में कांच या प्लास्टिक की पट्टी या फाइल पर उपयोग की जाती है। परत को पट्टी पर या तो हाथ से अथवा व्यावसायिक रूप से उपलब्ध स्प्रैडर (विस्तारक यंत्र) के उपयोग द्वारा फैलाया जाता है। परत की मोटाई सामान्यतः पृथक्करण की प्रकृति पर निर्भर करती है, 0.1 से 0.25 mm मोटी परत विश्लेषणात्मक (विश्लेषण) और 2 mm तक की परत प्रारंभिक (आरंभिक चरणों) पृथक्करणों के लिए उपयोग की जाती है। बंधनकारी पदार्थ जैसे कि कैल्सियम सल्फेट को लेई बनाते समय मिलाया जाता है जिससे सहाय/आधारी सामग्री का पट्टी से आसंजन बढ़ जाए। प्लेटों का सक्रियन आतोपित पट्टियों को तप्त वायु भट्टी में 100-120°C पर 1-2 घंटे के लिए रखकर किया जाता है, जिससे विलायक वाष्पित हो जाता है। पूर्व–आलेपित तत्काल उपयोग की जा सकने वाली पट्टियां और परतें भी व्यावसायिक रूप से उपलब्ध हैं।

ख) सेम्पल (नमूने) को पट्टी पर डालना और पट्टी विकास

यह मात्रात्मक TLC का एक महत्वपूर्ण चरण हे। सामान्य रूप से सेम्पल को 0.1% से कम सान्द्रता पर वांछित विलायक में घोला जाता है और पट्टी के किनारे से 2.0 cm का अन्तराल रखते हुए केशिका नली या माइक्रोपिपेट से बिंदु के रूप में डाला जाता है। सेम्पल के बिंदुओं को सूखने दिया जाता है जैसे कि पत्र वर्ण लेखन में करते हैं। जब बिंदु सूख जाता है, तो पट्टी को लंबवत् एक बंद TLC कक्ष में रख देते हैं जिसमें पहले से ही विलायक (सचल प्रावस्था) से पूर्व संतृप्त (साम्यीकृत) होता है जैसा कि चित्र 4.4 और 4.5 में दिखाया गया हैं। पट्टी को उसके सेम्पल सिरे को संचल प्रावस्था के रिर्जवॉयर में एक उपयुक्त वार्ता द्वारा मिलाकर उसे क्षैजित तल में विकसित करना भी संभव है। जब संचल प्रावस्था सेम्पल बिंदु तक पहुंच जाती है, तो वह सेम्पल को घोल देती है और उसे पट्टी में ऊपर ले जाती है। फिर सेम्पल सचल प्रावस्था और स्थिर प्रावस्था के बीच वितरित हो जाता है। पट्टी विकास की पूरी प्रक्रिया के समय, असामान्य विलायक प्रवाह से बचने के लिए स्थिर तापमान बनाए रखने की सलाह दी जाती है। जब सचल प्रावस्था पट्टी की लंबाई के दो–तिहाई भाग तक पहुंच जाती है,

तो पट्टी को TLC कक्ष के बाहर निकाल लेते हैं और 2–3 मिनट के लिए तप्त वायु भट्टी में रखकर सुखा लेते हैं। बाद में इसमें से सेम्पलों की पहचान की जाती है।



चित्र 4.4: TLC पट्टी विकास: TCC पट्टी पर विलायक के प्रवाह को देखिए

चित्र 4.5: TLC पट्टियों के साथ TLC कक्ष

ग) सेम्पल (नमूने) की पहचान

एक सामान्य गैर विशिष्ट तकनीक पट्टी को एथेनॉल में सल्फ्यूरिक अम्ल के साथ 50% या 25% (v/v) के अनुपात में छिड़काव करके 110°C पर गर्म करना है जिसमें झुलसे भूरे धब्बे निर्मित होंगे। इस विधि को अत्यधिक सावधानी और विशेषज्ञता के साथ किया जाना चाहिए। अन्य विधियों में सम्मिलित हैं :

- UV (परागैबनी) प्रकाश में पट्टी को देखने पर पराबैंगनी अवशोषण या प्रतिदीप्त यौगिक दिखाई देते हैं (चित्र 4.6)।
- व्यावसायिक रूप से उपलब्ध पट्टियों में प्रतिदीप्ति रंजक होते हैं इसलिए जब पट्टियों को पराबैंगनी प्रकाश में देखा जाता है तो पृथक्कृत यौगिक नीले, हरे या काले धब्बों के रूप में प्रकट होते हैं।

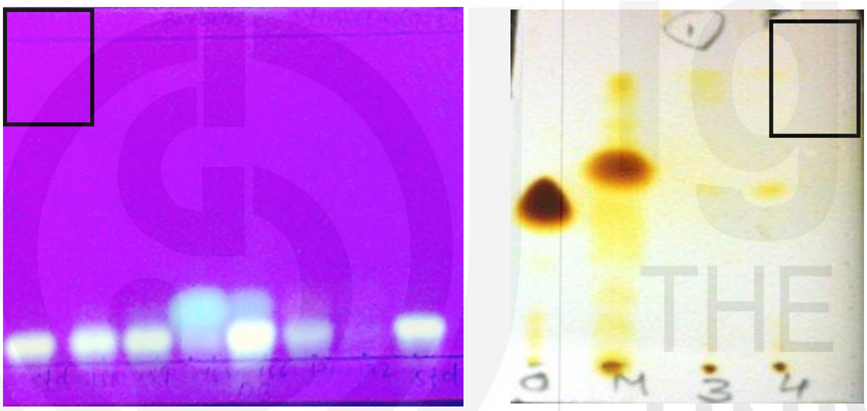
- पट्टी को आयोडीन वाष्प के लिए उद्भासित करना तब उपयोगी होता है जब असंतृप्त वसा अम्लों का पता लगाया जाता है जो भूरे धब्बे निर्मित करते हैं (चित्र 4.6)।

- यदि यौगकों को रेडियो लेबिल किया जाता है तो TLC पट्टियों की ऑटोरेडियोग्राफी (स्वविकिरणी चित्रण) की जाती है।

- R_f मानों का मापनक करके पत्र वर्णलेखन की भांति ही ऐमीनो अम्लों की उपस्थित का पता लगाया जा सकता है।

- यौगिकों का परिमाणन बिंदु को खुरच कर किसी उपयुक्त विलायक में उसे घोलकर किया जा सकता है। फिर विलयन की सान्द्रता को वर्णमिति और प्रतिदीप्तिमिति (fluorimitry) द्वारा निर्धारित किया जा सकता है।

  पत्र वर्णलेखन की अपेक्षा TLC के कुछ प्रमुख लाभ अपेक्षाकृत तीव्र गति से बढ़ना, बेहतर पृथक्करण, यथार्थता और भिन्न स्थिर प्रावस्थाओं का चयन है।



चित्र 4.6: TLC पट्टी का दृश्य प्रदर्शन : पेराबैंगनी A (UV) प्रकाश के लिए उद्भासित B आयोडीन वाष्प के लिए उद्भासित

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

बोध प्रश्न 2

i. TLC में उपयोग किए जाने वाले विभिन्न स्थिर प्रावस्था पदार्थों को सूचीबद्ध कीजिए।

ii. निम्नलिखित का मिलान कीजिए

a)	UV प्रकाश	1.वसा अम्ल	( )
b)	ऑटोरेडियोग्राफी	2.परिमाणन	( )
c)	आयोडीन वाष्प	3.प्रतिदीप्ति	( )
d)	वर्णमिति (कलरीमीट्री)	4.रेडियोलेबिल्ड	( )

4.4 स्तंभ वर्णलेखन

इस तकनीक में, स्थिर प्रावस्था ठोस और सचल प्रावस्था द्रव/गैस होती है। स्थिर प्रावस्था मैट्रिक्स (एक अक्रिय, अघुलनशील आधार) से जुड़ा होता है और कांच या धातु के स्तंभ में पैक होता है। सचल प्रावस्था या तो गुरूत्व अथवा पंपिंग तंत्र के उपयोग द्वारा स्तंभ से होकर प्रवाहित होती है। यह इस तकनीक के लिए आवश्यक मौलिक सेटअप है। इसकी गति, विशिष्टता, और यथार्थता को बेहतर बनाने के लिए अनेक विकास और रूपातंरण किए गए है, जिनकी चर्चा निम्नलिखित उप–भागों में की गई है।

4.4.1 जेल निस्पंदन (अणु बहिष्करण) वर्णलेखन

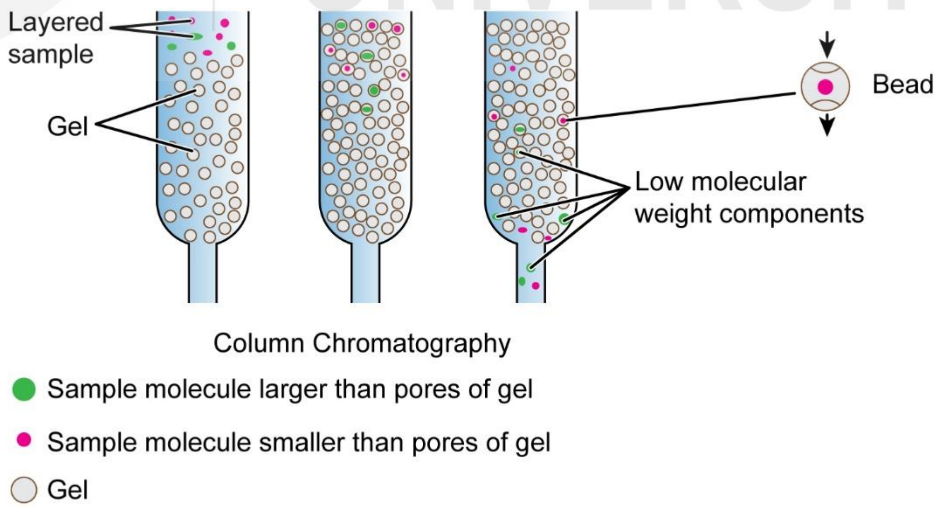
विभिन्न सरंध्र पदार्थों के चालनी (निस्पंदन) गुणों के उपयोग द्वारा अणुओं का उनके अणु आमाप और आकार के आधार पर पृथक्करण जेल पृथक्करण वर्णलेखन कहलाता है।

रंध्रों के त्रिविम नेटवर्क वाला एक कार्बनिक यौगिक जिसमें जेल के गुण होते हैं का उपयोग व्यापक रूप से किया जाता है। (सारणी 4.4)। शब्द जेल निस्पंदन अथवा आणविक चालनी का उपयोग बहिष्करण अथवा पारगमन के साथ व्यापक रूप से आणविक चालनियों के उपयोग द्वारा सभी आणविक पृथक्करण प्रक्रियाओं का वर्णन करने के लिए किया जाता है।

इस तकनीक का मूलभूत सिद्धान्त एक उपयुक्त सचल प्रावस्था (विलासक) का साथ साम्य में जेल कणों का स्तंभ है। बड़े अणु जो रंध्रों से पूर्णतः अलग रहते हैं अधिक तेजी से गति करते हैं और बहिस्राव (स्तंभ से बाहर आने वाले विलायक) में पहले पहुंचते है। अपेक्षाकृत छोटे अणु जेल कणों में और उनके आसपास वितरित रहते हैं और फिर स्तंभ से होकर अपेक्षाकृत धीमी गति से बाहर निकलते हैं तथा बहिस्राव में बाद में पहुंचते है। (चित्र 4.7)।

बफरों के प्रति स्थिरता वाले क्रियात्मक रासायनिक समूह युक्त मैट्रिक्स सामग्री जो निर्बल रूप से वांछित यौगिकों के साथ परस्परक्रिया कर सकती हो और जिसका प्रवाह अच्छा हो का चयन किया जा सकता है। कुछ नियमित रूप से प्रयोग किए जाने वाले प्रदार्थ सेलुलोस, सिलिका, सीफैक्रिल S, सीफैरोल बायोजेल A, बायोजल P और बायोबीड्स Sहैं।

पृथक किए जाने वाले सेम्पल को स्तंभ के शीर्ष भाग से भरा जाता है। (5 cm से 50 cm व्यास और 5 cm से 1m उंचाई)। विलायक को स्तंभ में ऊपर सेम्पल संस्तरों (परतों) को छेड़े बगैर उड़ेला जाता है। सेम्पल मिश्रण के घटक विलायक के साथ नीचे आ जाते हैं और उनको अलग–अलग परखनलियों में एकत्रित कर लिया जाता है (10 ml) ऐसा स्वायत्त प्रभाज संग्राहक (automated fraction collector) की सहायता से किया जा सकता है। प्रत्येक परखनली में लगभग समान आमापों के पृथक्कृत घटक होते हैं।



चित्र 4.7 : जेल निस्यंदन वर्णलेखन

उपयोग

- पोलीसैकेराइडों, प्रोटीनों, एन्जाइमों, हार्मोनों एटीबायोटिक्स और न्यूक्लीइक अम्लों जैसे जैवअणुओं का पृथक्करण और शोधन के लिए।
- प्रोटीन के विलवणीकरण और न्यूक्लीइक अम्ल विरचनों से फीनोल के निष्कासन के लिए।
- सापेक्ष अणु द्रव्यमान के निर्धारण और प्रोटीन विलयन को सान्द्रित करने के लिए।
- प्रोटीन बंधनकारी अध्ययनों के लिए।

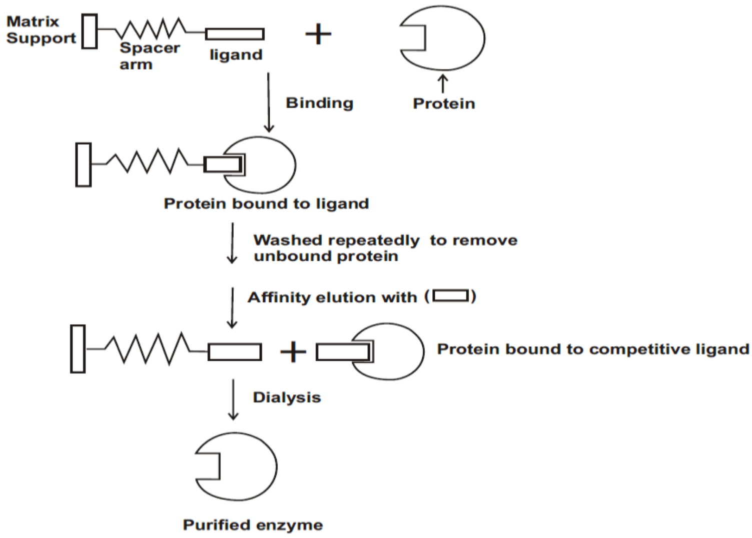
सारणी 4.4: सामान्य रूप से प्रयोग किए जाने वाले जेल पदार्थ

बहुलक	नाम
डैक्सट्रान	सीफैडैक्स (G 10, 25, 50, 100, 200) सीफैक्रिल (S 200, 300, 400)
ऐगैरोस	सीफैरोस (2B, 4B, 6B) बायोजेल (A5, 15, 50, 150)
पोलीएक्रिलएमाइड	बायोजेल (P2, 6, 30, 100, 300)

4.4.2 बंधुता वर्णलेखन

अधिकांश जैविक सामग्रियों के बीच पाई जाने वाली विशिष्ट बंधुता इस विशिष्ट तकनीक का निहित सिद्धान्त हैं। अन्य स्तंभ वर्णलेखन विधियों का लाभ उसके एक चरण शोधन में निहित है।

मौलिक आवश्यकता यह है कि पृथक्कत की जाने वाली सामग्री उत्क्रमणी रूप से एक विशिष्ट लिगान्ड से बद्ध होने में सक्षम होनी चाहिए जो एक अघुलनशील मैट्रिक्स से जुड़ा होता है (चित्र 4.8)। इस तकनीक की मुख्य आवश्यकता शोधित किए जाने वाले यौगिक की संरचना और जैविक विशिष्टता के बारे में व्यापक प्रारंभिक जानकारी का होना हैं। जब पृथक्कृत किए जाने वाले विशिष्ट अणु अथवा यौगिक युक्त मिश्रण को अचल लिगान्ड में मिलाया जाता है, जो सिर्फ विशिष्ट यौगिक ही लिगान्ड से बद्ध होते हैं। जबकि अन्य अविशिष्ट यौगिक (अबद्ध) बहिस्राव में बाहर आ जाते हैं। बाद में, बद्ध यौगिक को डायलिसिस अथक विभिन्न pH सामर्थ्य के बफरों के उपयोग द्वारा लिगान्ड से प्रतिस्थापित करके उनकी पुर्नप्राप्ति कर ली जाती है।



चित्र 4.8 : बंधुता वर्णलेखन

उपयोग

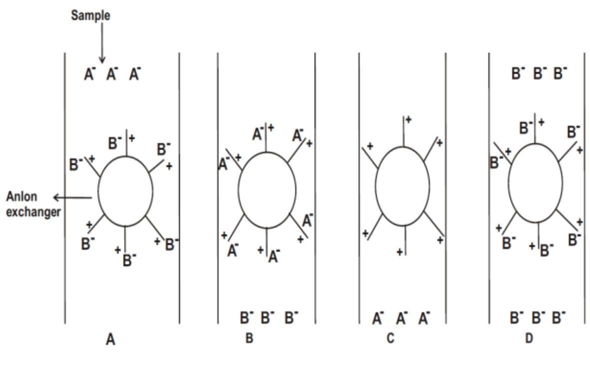
- प्रोटीनों, एन्जाइमों न्यूक्लीइक अम्लों और एन्टीबॉडीज का शोधन। कोशिकाओं के मिश्रण से समांगी कोशिकाओं को बनाना।
- पूर्ण RNA विरचन (tRNA, rRNA और mRNA) से ओलिगो का (डॉआक्सी थाइमीडाइलिक अम्ल) के प्रयोग द्वारा जिसे एगेरोसमैट्रिक्स पर अचल किया गया हो, mRNA का पृथक्करण।
- धातु–बंधनकारी प्रोटीनों का पृथक्करण
- अचल एन्जाइमों को बनाना और उद्योग में उनका उपयोग इस तनकीक का एक अन्य विस्तार है।

सारणी 4.5: जैविक सामग्री विशिष्ट लिगान्डो के उदाहरण

लिगान्ड	जैविक सामग्री
हिपेरिन	स्कंदन कारक, लिपोप्रोटीन लाइपेसेस
कामोड्यूलिन	कामोड्यूलिन बंधनकारी ऐन्जाइम
एविडिन	बायोटिन युक्त एन्जाइम
प्रोटीन A एवं G	एन्टीबायोटिक्स
सोयाबीन लेक्टिन	N-एसीटिल -αβD-गैलेस्टोपाइरेनेसिल युक्त ग्लाइकोप्रोटीन
पोली-A टेल	पोल U क्रमों युक्त RNA
लाइसीन	वसा अम्ल बंधनकारी प्रोटीन
5' AMP	NAD^+डीहाइड्रोजिनेसेस
2' 5' ADP	$NADP^+$डीहाइड्रोजिनेसेस

4.4.3 आयन–विनिमय वर्णलेखन

आयनी आवेश और विपरीत आवेश के कणों के लिए उनका आकर्षण इस तकनीक का मूल भाव है (चित्र 4.9)। जैसा कि हमने पिछली इकाइयों में पढ़ा है, जैविक सामाग्रियों जैसे ऐमीनो अम्ल, प्रोटीन तथा न्यूक्लीइक अम्ल इस परिघटना को दर्शाने के लिए श्रेष्ठ उदाहरण है।



चित्र 4.9: आयन विनिमय वर्णलेखन

A-श्रणायन एक्सचेंजर स्थिर नमूने का अनुप्रयोग, B-श्रयायन A B को प्रतिस्थापित करके A^- से बद्ध हो जाता है। C- कम pH बफर के उपयोग द्वारा क्षालन A-आवेशहीन हो जाता है और निर्मुक्त हो जाता है D-मैट्रिक्स को B के अतिरिक्त आयतन के साथ पुर्नआवेशित करना।

सामान्य रूप से दो प्रकार के एक्सचेन्जर (विनिमयकर्ता) उपलब्ध है, जैसे धनायन (ऋणात्मक आवेश) और श्रणायन (धनात्मक आवेश के) एक्सचेन्तर जो विपरीत आवेश के कणों को आकर्षित करते हैं यह तकनीक किसी एक प्रकार के आयन–एक्सचेन्जर पदार्थ से पैक कॉलमों/स्तंभों में की जाती है (सारणी 4.6)। इस तकनीक में सम्मिलित चरण हैं, आयन एक्सचैन्जर को तैयार करना कॉलम (स्तभ) को पैक करना, सेम्पल बनाना, सेम्पल को कॉलम में डालना क्षालन और प्रवणता जनन। बेहतर क्षालन प्राप्त करने के लिए यह सलाह दी जाती है कि सेम्पल की आविलता 10 ppm से कम रहे।

संक्षिप्त कार्यविधि में सम्मिलित है, आवेशित रेजिन से सेम्पल अणु को बद्ध करना और रेजिन से सेम्पल अणु का क्षालन या प्रतिस्थापन करना। ऊपर बताए गए दोनों चरणों के लिए बफर का pH और आयनी सामर्थ्य प्रमुख कारक है।

उपयोग

- जैविक सामग्रियों जैसे ऐमीनो अम्लों, पेप्टाइडों, प्रोटीनों, शर्कराओं, न्यूक्लीइक अमलों का पृथक्करण
- विटामिनों, एन्जाइमों, आइसोएन्जाइमों, इम्यूनोग्लोबिनों (एन्टीबॉडीज) का पृथक्करण
- पोलीपेप्टाइडो और पोलीन्यूक्लीओटाइडों का पृथक्करण। चारग्राफ ने 'चारग्राफ नियमों' को स्थापित करने के लिए व्यापक रूप से इस तकनीक का उपयोग कियाथा।
- पुर्नयोजी DNA प्रौद्योगिकी उत्पादों जैसे वृद्धि कारकों का पृथक्करण,

- एल्बूनिन और IgG जैसे रूधिर घटको का पृथक्करण
- पेजयल (जल शोधन इकाइयों) से (Ca^{2+}, Mg^{2+}) आयनों को निकालन
- ऐमीनो अम्ल ऑटोएनालाइजर जो प्रोटीन रसायन कार्यों विज्ञान में आश्चर्यजनक परिणाम दे रहा है, इस सिद्धान्त पर आधारित है।

सारणी 4.6: सामान्य रूप से उपयोग किए जाने वाले आयन एक्सचेन्जर और उनके क्रियात्मक समूह

आयन प्रकार	सामग्री	क्रियात्मक समूह
धनायनी एक्सचैन्जर	ऐगेरोस, सेलुलोस डैक्स्ट्रान	- COO–
निर्बल रूप से अम्लीय	पोलीसक्रिलेट	- $CH_2COO–$
प्रबल रूप से अम्लीय	सेलुलोस डैक्स्ट्रान पोलीस्टाइरीन	- $SO_3\ CH_2\ SO–_3$ - $CH_2\ CH_2\ CH_2\ SO–_3$
श्रणायनी एक्सचैन्जर		
निर्बल रूप से क्षारीय	ऐगेरोस, सेलुलोस डैक्स्ट्रान पोलीस्टाइरीन	- $CH_2\ CH_2\ NH–_3$ - $CH_2\ CH_2\ NH^+CCH_2CCH_3CH_3)_2$
चुबल रूप से क्षारकीय	सेलुलोस डैक्स्ट्रान पोलीस्टाइरीन	- $CH_2\ N^+(CH_3)_3$ - $CH_2\ CH_2\ N^+\ (CH_2\ CH_2)_3$

बोध प्रश्न 3

i. जेल निस्यंदन के समय किस प्रकार के अणु सबसे पहले क्षालन करते है?

ii. एकल चरण शोधन तकनीक का नाम बताइए।

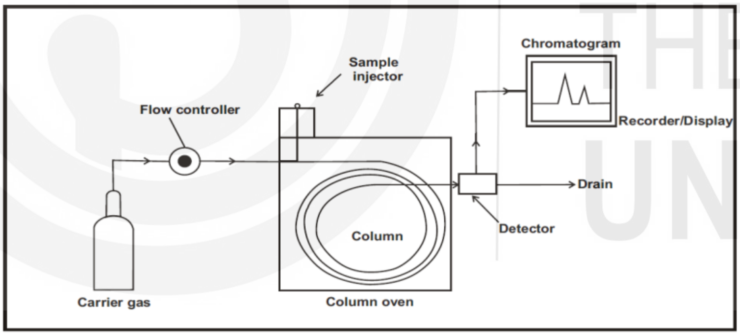
iii. निम्नलिखित का मिलान कीजिए

क)	प्रोटीन विलवणीकरण	i)	ऋणात्मक रूप से अवेशित
ख)	प्रबल रूप से अम्लीय	ii)	अपवर्जन वर्णलेखन
ग)	जल शोधन	iii)	आयन विनियम वर्णलेखन
घ)	धनायन एक्सचेन्जर	iv)	सेलुलोस

4.4.4 गैस वर्णलेखन (Gas Chromatography; GC)

गैस वर्णलेखन (GC) में पृथक्करण स्थिर प्रावस्था और सचल प्रावस्था (गैस) के बीच विलेयों (सेम्पल) के वितरण पर आधारित होता है। GC के दो मौलिक भिन्न रूप गैस–ठोस वर्णलेखन (GSC) जिसमें स्थिर प्रावस्था ठोस होती है और गैस द्रव वर्णनलेखन है जिसमें स्थिर प्रावस्था के रूप में एक पतली परत के रूप में आलेपित द्रव कार्य करता है। स्थिर प्रावस्था के रूप में पोलीएथिलीन ग्लाइकोल, मेथिलफेनिल और मेथिलविनाइल सिलिकोन गोंद; एपीजोन L और एडीपिक, एक्सीनिक और थैलिक अम्लों के ऐस्टरों का उपयोग किया जाता है।

स्थिर प्रावस्था की सामग्री को लंबी या कुंडलित कॉलम/स्तंभ में पैक किया जाता है जो कांच या धातु का बना होता है। कॉलम/स्तंभ GC का सबसे संवेदनशील और अनिवार्य भाग है। विश्लेषणात्मक स्तंभ 1 से 3m लंबे होते हैं और इनका व्यास 0.25 mm से 50 mm या अधिक तक होता है। व्यवहारिक रूप से कॉलम/स्तंभ या व्यास जितना कम होता है, उसकी दक्षता उतनी ही अधिक होती है। पृथक किए जाने वाले सेम्पल को सेम्पल अंतःक्षेपित करने वाले स्थान पर अतःक्षेपित किया जाता है और वाहक गैस (सचल प्रावस्था) के साथ गति करने दिया जाता है। फिर सेम्पल 200^{o}C तक के उच्च तापमान पर वाष्पीकृत हो जाता है और स्तंभ पर से एकत्रित कर लिया जाता है। सेम्पल के घटक स्थिर प्रावस्था के प्रति अपनी बंधुता के अनुसार वितरित या अधिशोषित अथवा विभाजित हो जाते हैं। अपेक्षाकृत कम बंधुता वाले घटक अधिक तेजी से गति करते हैं और स्तंभ में अधिक बंधुता वाले घटकों की अपेक्षा पहले बाहर आ जाते हैं भिन्न समय अन्तरालो पर बाहर वाले घटक डिटेक्टर (संसूचक) पर पहुंचकर रिकॉर्डर पर शिखरों (peaks) के रूप में अपने क्रमिक क्रोमेटोग्राम बनाते हैं जैसाकि चित्र 4.10 में दिखाया गया है।



GC instrument in a laboratory

चित्र 4.10 : गैस वर्णलेखन

उपयोग

- स्टैन्डर्ड के साथ तुलना में अज्ञात यौगिकों का पता लगाना
- वाष्पशील पदार्थों जैसे वसा अम्लों का विश्लेषण करना विशेषरूप से खाद्य मिलावटी पदार्थों का;
- खाद्य मिलावटी पदार्थों की पहचान और गुणवत्ता नियंत्रण,
- कृषि डेयरी उत्पादों में कीटनाशियों का विश्लेषण;

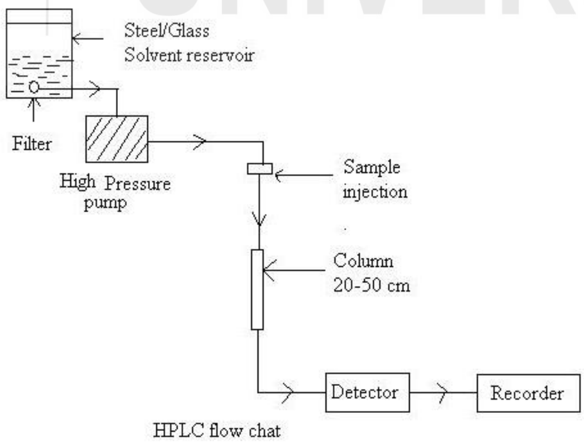
- चिकित्सीय जैवरसायन विज्ञान में इसका उपयोग रूधिर ऐल्कोहॉल, प्लास्मा लिपिड और मूत्रीय स्टेरॉइडों की पहचान करने के लिए किया जाता है।

4.4.5 उच्च प्रदर्शन द्रव वर्णलेखन (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

इस तकनीक का नाम स्वयं ही इसकी दक्षता, तीव्रता और यर्थाथता को परिलक्षित करता हैं। इन गुणों ने HPLC को सबसे प्रचलित सशक्त और बहुमुखी वर्णलेखन तकनीक बनाया है। HPLC में इस कार्य के लिए अधिशोषण; विभाजन, आयन विनिमय और अपवर्जन को अपनाया जा सकता है।

खाद्य विश्लेषण खाद्य पदार्थ के प्राकृतिक संयोजन का पता लगाने के लिए महत्वपूर्ण है। साथ ही यह खाद्य पदार्थ में प्राकृतिक अथवा मानवजनित मिलावटी पदार्थों के कारण होने वाले रूपांतरणों का अध्ययन करने के लिए भी आवश्यक है। उदाहरणः रंजक, इमल्सीकारक मीठा करने वाले पदार्थ और स्वाद कर्मक सामान्य संदूषक होते हैं रासायनिक संदूषक जैसे पीड़क जीव और कीटनाशी भी जंतु खाद्य मिलावटी पदार्थों में सामान्य संदूषक है। यूरोप में आहार श्रृंखला आपूर्ति में घोड़े के मास का घोटाला खाद्य मिलावट का नवीनतम उदाहरण है।

व्यापक बोध में HPLC द्रव–द्रव वर्णलेखन के अंतर्गत आती है (अधिशोषण सिद्धान्त के अलावा) जिसमें ठोस आधार पर उपस्थित द्रव की पतली परत स्थिर प्रावस्था की भांति कार्य करती है और स्तंभ के क्षालन के लिए उपयोग किया जाने वाला विलायक सचल प्रावस्था की भांति व्यवहार करता है। HPLC के लिए उपयोग जाने वाले स्तंभ सीधे और स्टेनलेस स्टील के बने होते हैं जो 5.5×10^7 Pa का उच्च दाब सहन कर सकते है। इनका आयाम लंबाई में 15-50 cm और व्यास में 1-4 mm होता है। व्यवहार में स्थिर प्रावस्था का कण आमाप जितना छोटा होता है, विभेदन उतना ही अधिक होता है। सेम्पल का उपयोग इस तकनीक का महत्वपूर्ण चरण है जो इस तकनीक के विभेदन को प्रभावित करता है। यह दो तरीकों से किया जा सकता है; रोक प्रवाह अंतःक्षेपण (stop flow injection) जिसमें दाब वायुमंडलीय दाब के लगभग बराबर होता हैं दूसरा तरीका छल्ले के द्वारा जिसमें दाब अपरिवर्तित रहता हैं। सेम्पल को स्तंभ में विलायक के साथ डाला जाता है (चित्र 4.11) स्तंभ से बाहर आने वाले बहिःस्राव की मात्रा बहुत कम होती है, अतः डिटेक्टर (संसूचक) अत्यधिक संवेदनशील और अत्यधिक स्थिर होना चाहिए जिससे बहिःस्राव में विश्लेषित किए गए प्रत्येक घटक की सान्द्रता का परिवीक्षण किया जा सके। पराबैंगनी–दृश्य परास डिटेक्टरों को अन्य की अपेक्षा वरीयता दी जाती है शिखरों के रूप में प्राप्त क्रोमटोग्राफ का X-अक्ष पर समय और Y-अक्ष पर अवशोषिता को रखते हुए ग्राफ बनाया जाता है।



चित्र 4.11: HPLC प्रवाह का आरेखी प्रदर्शन

उपयोग

HPLC के व्यापक उपयोग हैं क्योंकि ये अनेक वर्णलेखन सिद्धान्तों को अपना सकती है। इनमें से कुछ प्रमुख नीचे दिए गए हैं:

- ऐमीनो अम्लों, प्रोटीनों और पेप्टाइडो का पृथक्करण
- औद्योगिक उपयोग जैसे मौलिक औषधियों, एन्टीबायोटिक्स स्टेरॉइ्डस, रंजकों और कीटनाशियों का पृथक्करण और विश्लेषण;
- चिकित्सीय और औषधीय उपयोग जैसे औषधियों, विषों और उपापयजों का पृथक्करण।
- GC की तुलना में HPLC का उपयोग अ–वाष्पशील यौगिकों के लिए किया जा सकता है।
- पर्यावरणीय प्रदूषकों जैसे बहुचक्रिक हाइड्रोकार्बनों का पता लगाना।

GC अथवा HPLC जब मास स्पैक्ट्रोमीट्री के साथ संयुक्त होती है। तो GC-MS अथवा LC-MS (द्रव वर्णलेखन–मास स्पैकमिट्री) कहलाती है। इन दोनों तकनीकों का सामूहिक उपयोग नमूनों में सूक्ष्म मात्रा में पदार्थो की पहचान को संभव बनाता है। MS इसमें (कॉलम) से बाहर आने वाले प्रत्येक अणु को आयनीकृत खंडों में खंडित करके पता लगाता है। GC-MS का उपयोग व्यापक रूप से न्यायिक, विस्फोटक और औषधि जांचों में किया जाता है। जबकि LC-MS का उपयोग प्राकृतिक उत्पाद रसायन, नई औषधि जांचों अध्ययनों, औषणीय और कृषिरसायन उद्योगों में किया जाता है। इन दोनों तकनीकों पर अधिक जानकारी के लिए निम्न वेब लिंक पर जाइए।

सारणी 4.7: HPLC में उपयोग की जाने वाली स्थिर प्रावस्थाएं

सिद्धान्त	व्यापारिक नाम	स्थिर प्रावस्था की प्रकृति
अधिशोषण	माइक्रोपैक AI	ऐलुमिना
	पार्टीसिल	सिलिका
विभाजन	पेलुमिना	ऐलुमिना
आयन विनिमय बॉन्ड	अल्टिया (ULTEA)	एल्किल ऐमीन
C-18 पैक / कोरेसिल	पैक TSK-NH_2	
ओक्टाडेसिलसाइलेन		

4.4.6 प्रतिलोम प्रावस्था वर्णलेखन (Reverse phase Chromatography (RPC)

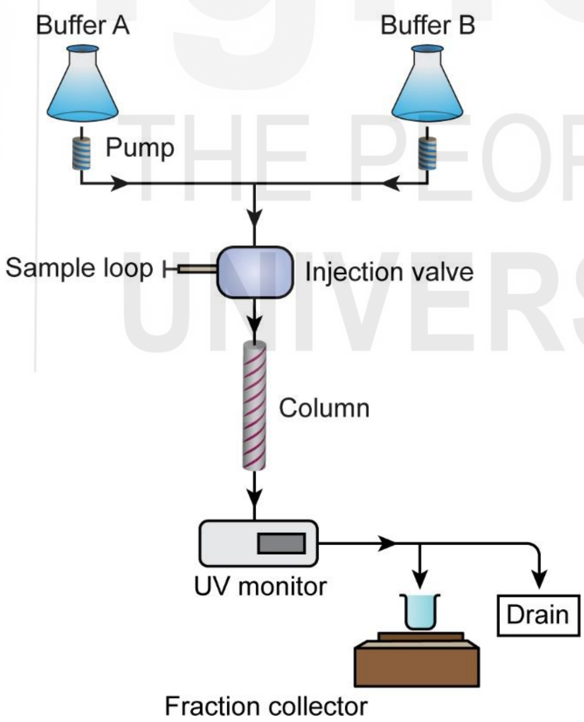
प्रोटीन के विश्लेषण के क्रम में हमें उसमें उपस्थित ऐमीनो अम्ल संयोजन को जानने की आवश्यकता होती है और यह तकनीक इस कार्य को श्रेष्ठ तरीके से करती है। ऐमीनो अम्लों के वर्गीकरण (इकाई 3-BBCCT-101) को याद कीजिए, जहां हमने ऐमीनो अम्लों को ध्रुवीय और अध्रुवीय के साथ ही अन्य वर्गों में वर्गीकृत किया था।

सामान्य रूप से सामान्य वर्णलेखन में ध्रुवीय अणु अ–ध्रुवीय अथवा चिपकने वाले अणुओं की तुलना में बाद में क्षालन करते हैं। लेकिन RPC में, चिपचिपे अणु बाद में क्षालन करते है जबकि ध्रुवीय अणु पहले कर लेते हैं ऐसा जलभीत स्थिर प्रावस्था (ऐल्किल श्रृंखलाओं की बनी हुई) की उपस्थिति के कारण होता है, जो अ–ध्रुवीय (जलभीत) अणुओं के बंधन के लिए अनुकूल सतह बना देती है और उनके प्रति अधिक प्रबल बंधुता

दिखाती है। इस कार्य के लिए उपयोग किया जाने वाला विलायक तंत्र उच्च ध्रुवीय से आरंभ होकर निम्न ध्रुवीय तक जाता है क्योंकि उच्च ध्रुवीय विलायक ध्रुवीय अणुओं की विलेयता को संभव बनाता है और उनका त्वरित क्षालन करता है तथा अ–ध्रुवीय अणुओं को स्थिर प्रावस्था से बद्ध करता है जो बाद में क्षालन करते हैं कुछ प्रचिलत रूप से उपयेाग किए जाने वाले स्थिर प्रावस्था पदार्थों में C-18 और C- 8 सिलिका स्तंभ (कॉलम) सम्मिलित है तथा सचल प्रावस्थाएं एसीटोनाइट्राइल तथा टेट्राहाइड्रोफ्यूरोन और कार्बनिक विलायक जैसे मीथेनॉल है। ये ध्यान देना महत्वपूर्ण है कि सामान्य वर्णलेखन और RPC में प्रमुख अन्तर स्तंभ सामग्री का है जबकि शेष परीक्षण स्थितियां जैसे दाब, विभेदन इत्यादि RPC पर भी लागू होती है।

4.4.7 फास्ट (पक्व) प्रोटीन द्रव वर्णलेखन (FPLC)

FPLC तकनीक HPLC का एक व्युत्पन्न है। इसका एक लाभ कम व्यास के स्तंभों की उपलब्धता के कारण उच्च विभेदन करना है (चित्र 4.12)। इस तकनीक का सबसे अच्छा भाग यह है कि इसमें सबसे प्रचलित वर्णलेखन प्रकारों की स्थिर प्रावस्था सामग्री से कार्य करने का विकल्प होता है जैसे बंधुता जेल पारगमन और आयन विनिमय। जबकि जलीय बफर FPLC का एक अन्य लाभ है जिसमें भारण क्षमता (परीक्षण नमूने का आयन) HPLC की तुलना में अधिक होती हे और इसका उपयोग व्यापक रूप से प्रोटीन मिश्रणों के पृथक्करण और विश्लेषण के लिए किया जाता है।



चित्र 4.12: FPLC का आरेखी प्रदर्शन

बोध प्रश्न 4

i. सत्य या असत्य

i) HPLC को करने के लिए उच्च दाब की आवश्यकता होती है। ( )

ii) वाष्पशील यौगिकों को पृथक करने के लिए GC का उपयोग किया जाता है। ( )

iii) GC द्रव–द्रव वर्णलेखन की श्रेणी में आता है। ( )

iv) HPLC के उपयोग GC की अपेक्षा सीमित है। ( )

v) RPC प्रोटीनों के पृथक्करण के लिए उपयुक्त नहीं है। ( )

4.5 सारांश

- आइए अब हम सार रूप में इस इकाई वर्णलेखनी तकनीकों के उपयोग द्वारा जैवअणुओं के पृथक्करण के विषय में जो पढ़ा है उसे दोहरा लेते हैं विभाजन और अधिशोषण वर्णलेखन के दो प्रमुख सिद्धान्त है। R_c मान के साथ–साथ इन तकनीकों में उपयोग की जाने वाली विभिन्न संसूचन विधियों की जानकारी बेहतर पृथक्करण और जैवअणुओं की पहचान करना संभव बनाती है।
- वर्णलेखन (क्रोमेटोग्राफी) की विशिष्टता इस तथ्य में निहित है कि इसमें उपयोग किए जाने वाले सभी सिद्धान्त जैवअणुओं के जैविक गुणों जैसे आमाप बंधुता और आयनी आवेश पर आधारित होते हैं। जेल निस्यंदन, बंधुता और आयन विनियम वर्णलेखन तकनीकों का प्रचालन इन्ही गुणों पर आधारित है।
- ये नोटिस किया गया है कि GC एक नवीन तकनीक के रूप में विशेष रूप से वाष्पशील यौगिकों के लिए उपयोग की जाती है, जिसका उपयोग खाद्य उद्योग में तेलों की मिलावट का पता लगाने के लिए व्यापक रूप से किया जाता है।
- HPLC का अध्ययन विज्ञान में बढ़ती मांगों को पूरा करने के लिए यथार्थता और त्वरित गति से संपन्न होने दोनों के लिए इसके बहुमुखी उपयोग के लिए किया जाता हैं।
- इस इकाई का एक रोचक भाग ये है कि इसमें जीवविज्ञानियों की अधिकांश आवश्यकताओं को उचित रूप से संबोधित किया गया है। वर्णलेखन की बहुमुखी प्रकृति किसी भी जैवअणु के प्रति उसकी उत्पत्ति और उपलब्धता से अप्रभावित अनुकूलन करने में निहित है।

4.6 अंत में कुछ प्रश्न

1. TLC के पीछे कौन सा सिद्धान्त कार्य करता है, समझाइए कि पत्र वर्णलेखन के स्थान पर TLC को वरीयता क्यों दी जाती हैं?

2. प्रोटीनों के मिश्रण (40 kd, 80 kd और 120 kd) को पृथक करने के लिए किस तकनीक को वरीयत दी जाती है और बताइए कि क्यों 120 kd प्रोटीन सबसे पहले स्तंभ से क्षालन करके बाहर आता है?

3. GC और HPLC के बीच अन्तर कीजिए।

4. सामान्य वर्णलेखन और प्रतिलोम प्रावस्था वर्णलेखन क बीच तुलना कीजिए और उनके बीच अन्त बताइए

4.7 उत्तर

बोध प्रश्न 1

1. i) विभाजन और अधिशोषण

2. ii) K4- वितरण गुणांक और R_f मान = विभेदन अग्र मान; iii) एक आयामी, दो आयामों और गोल।

3. i) सिलिका जेल G (60-120 जाली); ऐलुमिना, सेलुलोस मैग्नीशियम सिलिकेट, कैल्सियम सिलिकेट, सक्रियित चारकोल, प्राकृतिक डायटमी मृत्तिका, आयन विनिमय रेजिन जैसे डोवैक्स-50W, डोवैक्स–1 और कीसेलघर।

   ii) A-3, B-4, C-1 D-2 ।

4. i) बड़ा, ii) बंधुता, CG; iii) A-2, B-4, C-3, D ।

5. सत्य, सत्य, असत्य, असत्य, असत्य।

अंत में कुछ प्रश्न

1. TLC के लिए कार्यकारी सिद्धान्त स्थिर और सचल प्रावस्थाओं के बीच वितरण गुणांक है। वर्णलेखन की अपेक्षा TLC को वरीयता देने का कारण इसके तेजी से गति करने, बेहतर पृथक्करण, यथार्थता और भिन्न स्थिर प्रावस्थाओं के चयन में निहित है। इसके अतिरिक्त TLC की विश्लेषाणत्मक और प्रारंभिक दोनों प्रकारें उपलब्ध हैं।

2. यह सेम्पल (नमूने) में प्रोटीनों का ऐसा मिश्रण है जो अपने अणुभार और आमाप में भिन्न है। अतः जेल पारगमन वर्णलेखन सबसे अुनकूल तकनीक होगी। इस

तकनीक में अपेक्षाकृत छोटे अुण मनकों (beads) के रंध्रों में प्रवेश करके मंद गति से क्षालन करते हैं। 120 kd प्रोटीन आमाप में बड़े होने के कारण मनकों में प्रवेश कर लेते हैं और मनकों के बीच उपस्थित आंतरायिक अवकाशों से होकर क्षालन करते हैं। इसलिए 120 kd प्रोटीन अन्य प्रोटीनों की अपेक्षा पहले क्षालन करके बाहर आएंगे।

3.

GC	HPLC
इसका सिद्धान्त विभाजन है	वर्णलेखन के किसी भी सिद्धान्त को अपनाने में सक्षम है।
दाब का प्रयोग नही होता है।	5.5×10^7 तक के उच्च दाब का उपयोग किया जाता है।
50 mm तक के स्तंभों का का उपयोग किया जाता है	1-4 mm के स्तंभों उपयोग किया जाता है
सिर्फ वाष्पशील पदार्थो के लिए है	अ–वाष्पशील पदार्थों के लिए भी उपयोग किया जा सकता है।

4. सामान्य और RPC दोनों ही स्तंभ वर्णलेखन (कॉलम क्रोमेटोग्राफी) के भिन्न रूप है। साथ ही इन दोनों तकनीकों का उपयोग सामान्यतः जैवअणुओं के पृथक्करण के लिए किया जाता है। यही नहीं इनके लिए आवश्यक सामग्री जैसे कि स्थिर प्रावस्था और सचल प्रावस्था भी एक जैसी ही होती है। कुछ समानताओं के साथ ही इन दोनों तकनीकों के बीच कुछ अन्तर भी है जैसे, सामान्य वर्णलेखन में ध्रुवीय अणु अ–ध्रुवीय अथवा चिपचिपे अणुओं की तुलना में बाद में क्षालन करते हैं। लेकिन RPC में चिपचिपे अणु बाद में क्षालन करते हैं और ध्रुवीय अणु पहले करते हैं। ये ध्यान देना महत्वपूर्ण है कि सामान्य वर्णलेखन और RPC के बीच प्रमुख अन्तर स्तंभ सामग्री का होता है जबकि अन्य परीक्षण की स्थितियां जैसे दाब, विभेदन आदि RPC पर भी समान रूप से लागू होते हैं। (उपभाग 4.4.7 को देखिए)।

4.8 अन्य सुझाई गई 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.

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY