



इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय  
विज्ञान विद्यापीठ

**BBCCL-112**  
**कला जीवविज्ञान और**  
**जैव-और्जिकी**  
**(प्रयोगशाला)**

**प्रयोगों की सूची**

---

- |  |    |
|--|----|
| 1. आर. बी. सी. अवशिष्ट कोशिका बनाना  | 5  |
| 2. झिल्ली पर अपमार्जक के प्रभाव का अध्ययन                                  | 11 |
| 3. हाइड्रिला पौधे में प्रकाश संश्लेषित ऑक्सीजन के उद्भव का अध्ययन          | 15 |
| 4. पालक के पत्तों से हरितलवक का पृथक्करण और संपूर्ण पर्णहरित का आकलन       | 19 |
| 5. विभाजन वर्णलेखिकी द्वारा प्रकाश संश्लेषक वर्णक का निष्कर्षण और पृथक्करण | 24 |
| 6. चूहे के यकृत से सूत्रकणिका का पृथक्करण                                  | 32 |
| 7. सूत्रकणिकीय चिन्हक किण्वक सक्सिनेट डिहाइड्रोजिनेज की क्रियाशीलता की परख | 36 |

---

## कार्यक्रम एवं पाठ्यक्रम अभिकल्प समिति

---

प्रो. बेचन शर्मा  
जैवरसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय

प्रो. रीना गुप्ता  
जैव प्रौद्योगिकी विभाग; एच.पी. विश्वविद्यालय, शिमला

प्रो. डी.वी. देवराज  
जैवरसायन विभाग; बंगलौर विश्वविद्यालय

प्रो. के. वली पाशा  
जैवरसायन विभाग; योगी विमाना विश्वविद्यालय, आन्ध्र प्रदेश

डॉ. सुनीता जोशी  
जैवरसायन विभाग, दौलत राम कॉलेज, दिल्ली विश्वविद्यालय

प्रो. रंजीत किशोर मिश्रा  
जैवरसायन विभाग, लखनऊ विश्वविद्यालय

प्रो. संजीव पुरी  
जैवचिकित्सीय विभाग, यू.आई.ई.टी., पंजाब विश्वविद्यालय

प्रो. सिमी फरहत बशीर  
जैवविज्ञान विभाग, जामिया मिलिया इस्लामिया विश्वविद्यालय

### संकाय सदस्य

प्रो. विजयश्री  
पूर्व निदेशक, विज्ञान विद्यापीठ,  
इग्नू, नई दिल्ली-110068

डॉ. परवेश बब्बर  
सहायक आचार्य, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. एम.अब्दुल करीम  
सहायक आचार्य, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. अरविंद कुमार शाक्या  
सहायक आचार्य, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. मनीषा पाण्डेय  
सहायक आचार्य, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. सीमा कालड़ा  
सहायक आचार्य, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

---

## पाठ्यक्रम निर्माण दल

---

प्रो. रंजीत किशोर मिश्रा  
संपादक  
जैवरसायन विभाग  
लखनऊ विश्वविद्यालय  
लखनऊ, उत्तर प्रदेश

### संकाय सदस्य

डॉ. नीरज श्रीवास्तव  
कंसल्टेंट, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू  
(प्रयोग 1, 2, 3 और 4)

डॉ. मनीषा पाण्डेय  
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू  
(प्रयोग 1, 5, 6 और 7, कवर डिजाइन एवं आर्टवर्क)

---

### हिन्दी अनुवाद

:

डॉ. अवैद्य नाथ सिंह  
बी.एन.एस. महिला महाविद्यालय  
अखरी बाईपास  
वाराणसी

डॉ. मनीषा पाण्डेय  
विज्ञान विद्यापीठ, इंदिरा गांधी राष्ट्रीय  
मुक्त विश्वविद्यालय  
नई दिल्ली

---

### पाठ्यक्रम समन्वयक

:

डॉ. मनीषा पाण्डेय (Email: maneesha@ignou.ac.in)

---

## सामग्री मुद्रण दल

---

श्री सुनील कुमार  
एस.ओ. (पी.), विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

आभार : श्रीमती रश्मिता, शब्द प्रक्रमण।

जुलाई, 2021

© इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय, 2021

ISBN: .....

सर्वाधिकार सुरक्षित। इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय की लिखित अनुमति के बिना इस पुस्तक के किसी भी अंश को मिमियोग्राफ अथवा किसी अन्य साधन द्वारा पुनः प्रस्तुत करने की अनुमति नहीं है।

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय के पाठ्यक्रमों के विषय में अधिक जानकारी विश्वविद्यालय के मैदान गढ़ी, नई दिल्ली स्थित कार्यालय और इग्नू वेब साइट [www.ignou.ac.in](http://www.ignou.ac.in) से प्राप्त की जा सकती है।

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय की ओर से कुलसचिव सामग्री निर्माण एवं वितरण प्रभाग द्वारा मुद्रित एवं प्रकाशित।  
मैसर्स :

## कला जीवविज्ञान और जैव-और्जिकी

प्रिय शिक्षार्थियों का कला जीवविज्ञान और जैव-और्जिकी (मेम्ब्रेन बायोलॉजी और बायोएनर्जेटिक्स) के प्रयोगात्मक सत्रों में स्वागत है। इस पुस्तिका/मैनुअल में दिए गए प्रयोगशाला अभ्यास और प्रयोग उस पाठ्यक्रम पर आधारित हैं जिसका आपने बीबीसीसीटी-111 में अध्ययन किया है। कला जीवविज्ञान और जैव-और्जिकी सैद्धांतिक पाठ्यक्रम में आपने जिन अवधारणाओं का अध्ययन किया है, उनका अनुभव इन प्रयोगों के दौरान किया जाएगा।

यह प्रयोगशाला पाठ्यक्रम 2 क्रेडिट का है और इसमें सात प्रयोग शामिल हैं। प्रयोगों को इस तरह से अभिकल्पित डिज़ाइन किया गया है कि आप अब तक बताई गई सैद्धांतिक अवधारणाओं का अनुभव और जुड़ाव महसूस कर सकें। यहां उन मूलभूत अवधारणाओं पर भी चर्चा की गई है जिन पर प्रयोगात्मक प्रक्रियाएं आधारित हैं।

### अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोगशाला पाठ्यक्रम का व्यापक उद्देश्य आपको निम्न में सक्षम बनाना है :

- रक्त के नमूने से आरबीसी को अलग करना;
- फॉस्फोलिपिड घटक को घोलकर जैवकला पर अपमार्जक जैसे अणुओं के विघटनकारी प्रभाव का मूल्यांकन करना;
- सिद्ध कर सकें कि प्रकाश संश्लेषण के दौरान ऑक्सिजन का विकास होता है;
- प्रकाश संश्लेषक वर्णक को अलग करना और उनका आकलन करना;
- चूहे के जिगर से सूत्रकणिका/माइटोकॉन्ड्रिया का अलगाव; और
- सूत्र कणिकीय चिन्हक किण्वक (माइटोकॉन्ड्रियल मार्कर एंजाइम) सक्सिनेट डीहाइड्रोजीनेज की परख।

### अध्ययन नियमावली

हम आपको सलाह देते हैं कि आप प्रायोगिक सत्र में भाग लेने के लिए आने से पहले बीबीसीसीटी-111 के संबंधित इकाइयों को दोहरा लें। इससे आप प्रयोग करने के उद्देश्य और उनके अनुप्रयोगों को आसानी से समझ सकेंगे। प्रयोग शुरू करने से पहले आपको इस पाठ्यक्रम के प्रत्येक प्रयोग के सिद्धांत तथा क्रियाविधि को पढ़ना चाहिए। सभी अभिकर्मकों को नए सिरे से तैयार करना चाहिए और उन्हें पूर्व-व्यवस्थित भंडारण स्थितियों के तहत रखना हमेशा अच्छा होता है। सभी सुरक्षा उपायों का पालन करें और अभिकर्मकों को संभालते समय सुरक्षा निर्देशों का ध्यान रखें। अच्छी प्रयोगशाला पद्धतियों में से एक है अपनी लॉग बुक को अप-टू-डेट रखना अर्थात् प्रयोग करते समय किए गए प्रेक्षणों को दर्ज करना। प्रयोगशाला सत्रों के दौरान इस प्रयोगशाला पुस्तिका और अपनी लॉग बुक को साथ रखें।

अन्य सभी इग्नू प्रयोगशाला पाठ्यक्रमों की तरह यह एक गहन आवासीय अभ्यास है जिसमें 2 क्रेडिट पूरा करने के लिए एक सप्ताह की आवश्यकता होती है। प्रतिदिन चार-चार घंटे के दो प्रयोगशाला सत्र होंगे। इस तरह कुल 14 सत्र होंगे। पहला सत्र परिचयात्मक होगा और शेष दूसरे से 12 वॉ सत्र पाठ्यक्रम में दिए गए अभ्यासों पर आधारित होगा। पहले सत्र में आपको प्रयोगशाला अभ्यासों का एक

ब्यौरा दिया जाएगा। सत्र 1 से 12 में अकादमिक परामर्शदाता की देखरेख में निर्देशित अभ्यास होंगे। अंतिम दो सत्र यानी 13 वीं – 14 वीं बिना मार्गदर्शन/गाइड वाले सत्र होंगे और यह सत्रांत परीक्षा होगी। प्रत्येक सत्र में आपको 3 घंटे के लिए अभ्यास करना होगा और शेष एक घंटे में आपको अपनी प्रायोगिक नोटबुक को पूरा करने की सलाह दी जाती है। सुधार और ग्रेडिंग के लिए प्रयोगशाला नोटबुक परामर्शदाता को प्रस्तुत की जानी चाहिए। प्रयोगों को करने और इसे ठीक से रिकॉर्ड करने के लिए 70% अंक आवंटित किए गए हैं। आप जानते हैं कि समय की कमी है क्योंकि आपके पास प्रयोगशाला कार्य के लिए सीमित पहुंच होगी; इसलिए, आपको किसी भी प्रयोगशाला सत्र को नहीं छोड़ने की आवश्यकता है।

प्रयोगों के मूल्यांकन का आकलन किया जाएगा और आपको प्रयोगात्मक सत्र के अंत में मौखिक परीक्षा के लिए उपस्थित होना होगा। प्रयोगशाला के अंतिम सत्र में आपको नियत प्रयोग करना होगा, जिसका मूल्यांकन किया जाएगा और साथ ही प्रयोगशाला सत्रों के दौरान निरंतर प्रदर्शन, लॉग बुक और रिकॉर्ड के रखरखाव के आधार पर अंतिम मूल्यांकन होगा, जिसके बाद मौखिक परीक्षा होगी। निर्दिष्ट प्रयोगों के लिए 30% अंक आरक्षित हैं।

प्रयोगशाला उपकरण का उपयोग कैसे करें, इसकी बेहतर समझ के लिए उपलब्धता के अनुसार कुछ वीडियो लिंक प्रदान किए जाएंगे। इस स्व-निर्देशात्मक सामग्री में दी गई प्रक्रिया की तुलना में वीडियो में बताए जा रहे चरणों या प्रक्रिया में थोड़ा अंतर हो सकता है। हालांकि, सिद्धांत और अभिकर्मक समान रहते हैं। इसलिए, प्रक्रिया में अपनाए गए मामूली संशोधनों के बारे में चिंता करने की कोई आवश्यकता नहीं है। हम आपको इस प्रयास में शुभकामनाएं देते हैं।

#### महत्वपूर्ण सूचना

- आमतौर पर अध्ययन केंद्र में आयोजित प्रयोगशाला पाठ्यक्रम कार्य में उपस्थिति अनिवार्य है।
- 7 दिनों की अवधि में पूरा करने के लिए प्रयोगशाला पाठ्यक्रम 2 क्रेडिट का है।
- निर्देशित प्रयोगशाला कार्य के 6 दिन।
- बिना निर्देशित प्रयोगशाला कार्य के लिए 1 दिन।
- प्रयोगशाला पाठ्यक्रम को सफलतापूर्वक पूरा करने के लिए आपको निर्देशित एवं बिना निर्देशित घटकों में (कम से कम 35% अंक) अलग-अलग प्राप्त करना होगा।

हम आपको इस प्रयास में शुभकामनाएं देते हैं।

# आर.बी.सी अवशिष्ट कोशिका बनाना

## प्रयोग की रूपरेखा

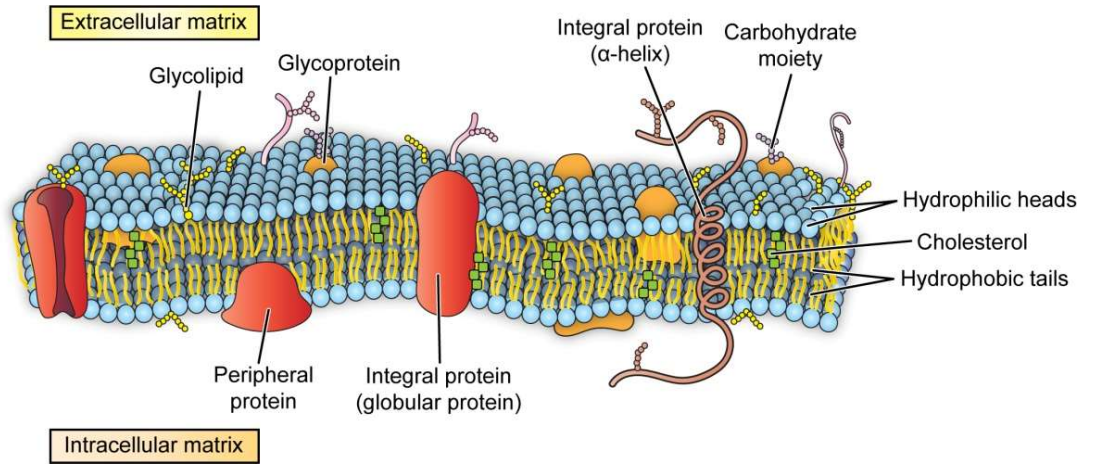
1.1 प्रस्तावना	1.5 अवलोकन और परिणाम
अपेक्षित अध्ययन परिणाम	1.6 सावधानियां
1.2 सिद्धांत	1.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न
1.3 आवश्यक सामग्री	
1.4 क्रियाविधि	

### 1.1 प्रस्तावना

इस प्रयोगशाला अभ्यास में आप सीखेंगे कि आर.बी.सी (RBC) अवशिष्ट कोशिका (घोस्ट) कैसे तैयार किया जाता है। जैविक प्रणाली में मौजूद कला/झिल्ली को बायोमेम्ब्रेन के रूप में भी जाना जाता है। ये जैव कलाएँ कई विशेषताओं और संरचनात्मक घटकों को साझा करती हैं; हालांकि वे कोशिका या कोशिकांग की क्रियाशीलता के आधार पर संरचना और गुणों में भिन्न होती हैं। जैसा कि आप जानते हैं, जैविक कलाएँ/झिल्ली लिपिड, प्रोटीन और कार्बोहाइड्रेट से बनी होती हैं और अणुओं के प्रवाह में बाधा के रूप में कार्य करती हैं।

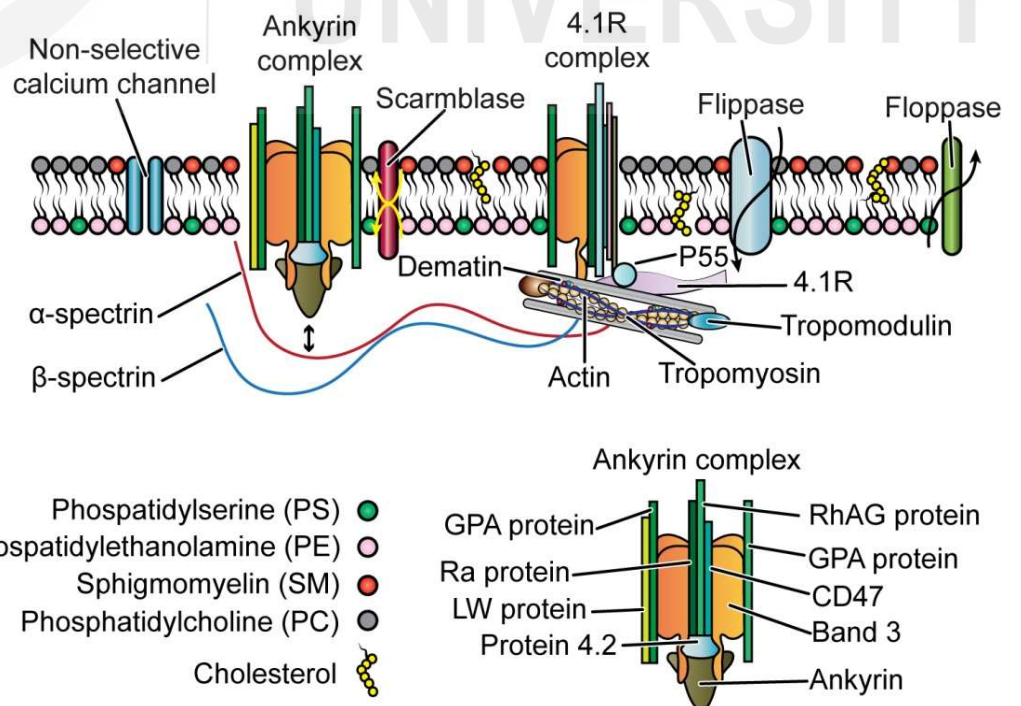
प्रोटीन, लिपिड द्विपरत में सतह पर मौजूद होते हैं और चैनल, वाहक, पंप, किण्वक/एंजाइम और ग्राही/रिसेप्टर्स के रूप में कार्य करते हैं। कार्बोहाइड्रेट बाहरी सतह पर लिपिड और/या प्रोटीन के साथ ओलिगोसेकेराइड के रूप में जुड़े होते हैं और कोशिकीय चिन्हक/सेलुलर मार्कर के रूप में कार्य करते हैं और पहचान में मदद करते हैं। लिपिड अधिकांश झिल्लियों में 6–10 nm की मोटाई का एक द्विपरत बनाते हैं और ध्रुवीय अणुओं के प्रवाह में बाधा के रूप में कार्य करते हैं (चित्र 1.1)। सामान्य तौर पर, झिल्ली में पांच प्रकार के लिपिड मौजूद होते हैं :

ग्लिसरोफास्फोलिपिड, स्फिंगोलिपिड, गैलेक्टोलिपिड, सल्फोलिपिड और स्टेरोल। ये सभी प्रकृति में उभयचर (amphiphilic) होते हैं।



चित्र 1.1 : झिल्ली संरचना: लिपिड द्विपरत एकीकृत प्रोटीन और प्रोटीन के साथ ग्राही के रूप में संलग्न कार्बोहाइड्रेट।

लाल रूधिर कोशिका (RBC) कला संरचना और कार्यों के अध्ययन के लिए अत्यधिक महत्वपूर्ण मॉडल है। अपने 4-माह के जीवनकाल में, मानव लाल रूधिर कोशिका कला में व्यापक उत्क्रमणीय विरूपण (reversible deformation) होते हैं फिर भी वह अपनी संरचनात्मक अक्षुण्णता को बनाए रखती है। यह अनुप्रयुक्त तरल तनावों (fluid stresses) के लिए त्वरित अनुक्रिया करती है और संरचनात्मक प्रतिरोधकता के संदर्भ में इस्पात से अधिक मजबूत होती है। लाल रूधिर कोशिका में तीन मूल घटक होते हैं : एक लिपिड द्विपरत, ट्रांसमेम्ब्रेन/पारकला (अभिन्न) प्रोटीन और एक कोशिका कंकाल तंत्र/संजाल। आर.बी.सी कला का एक आरेखीय प्रदर्शन चित्र 1.2 में दिया गया है। यदि दो अलग-अलग परते लिपिड संरचना में भिन्न होती हैं तो झिल्ली में विषमता को उपस्थित कहा जाता है। आर.बी.सी झिल्ली में झिल्ली विषमता प्रदर्शित होती है क्योंकि स्फिंगोमाइलिन और फॉस्फेटाईडिलकोलीन अधिमानतः द्विपरत के बाहरी पत्रक में स्थित होते हैं, जबकि फॉस्फेटाईडिल इथेनोलामीन और फॉस्फेटाईडिलसेरिन मुख्य रूप से आंतरिक पत्रक में मौजूद होते हैं।



चित्र 1.2 : आर.बी.सी. कला का आरेखीय प्रदर्शन।

दोनों पत्रक में कोलेस्ट्रॉल की एक महत्वपूर्ण मात्रा मौजूद होती है। प्रमुख ट्रांसमेम्ब्रेन/पारकला प्रोटीन ग्लाइकोप्रोटीन, बैंड 3 और ग्लाइकोफोरिन है। बैंड 3 एक बहु-फलकी आयन अभिगमन चैनल है और द्वितीय/चतुष्पय (dimer/tetramer) संतुलन में पाया जाता है। बैंड 3 चतुष्पय द्विपरत को आर.बी.सी कंकाल से जोड़ते/बांधते हैं। यह बंधन बैंड 3 के साइटोप्लाज्मिक डोमेन और एंकाइरिन के बीच परस्परक्रिया के माध्यम से होता है जो स्पेक्ट्रिन से जुड़ा होता है।

## अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

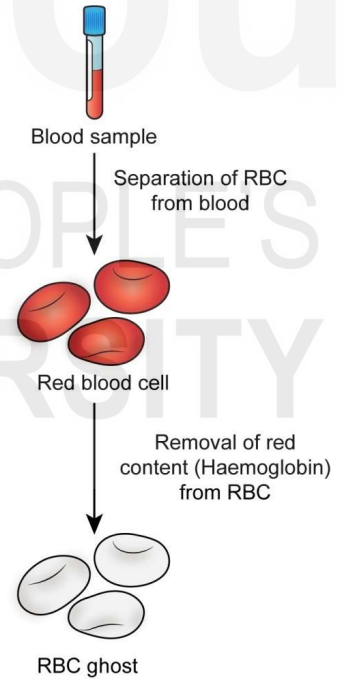
- ❖ झिल्ली के संघटन की व्याख्या कर सकेंगे;
- ❖ आरबीसी अवशिष्ट कोशिका की तैयारी के पीछे मूल सिद्धांत की व्याख्या कर सकेंगे;
- ❖ झिल्ली अध्ययन में आरबीसी अवशिष्ट कोशिका के महत्व की व्याख्या कर सकेंगे; और
- ❖ आरबीसी अवशिष्ट कोशिका तैयार कर सकेंगे।

## 1.2 सिद्धांत

आरबीसी अवशिष्ट (ghosts) लाल रक्त कोशिकाओं के पश्च-रुधिरलायी अवशेष (post & hemolytic residues) हैं। इसका मतलब यह है कि आरबीसी अवशिष्ट किसी भी अंतराकोशकीय (intracellular) संरचनाओं से रहित होते हैं और मुख्य रूप से कोशिका कला/झिल्ली से मिलकर बने हाते हैं। जब आर.बी.सी. कला को समपरासारी विलयन (isotonic solution) से संसाधित किया जाता है तो वह अपना हीमोग्लोबीन खो देता है, जिससे कि केवल कला/झिल्ली और मुक्त हीमोग्लोबीन बचता है। इन रिक्त कलाओं/झिल्लियों को आर.बी.सी. "अवशिष्ट" कोशिकाओं के रूप में जाना जाता है। लाल रक्त कोशिकाओं की संरचना, कार्य और संघटन के अध्ययन में अवशिष्ट कोशिकाओं का व्यापक रूप से उपयोग किया जाता है।

## 1.3 आवश्यक सामग्री

1. चूहे का ताजा रक्त या मानव रक्त आधान (transfusion) के लिए उपयोग किया जाने वाला समय-अवधि-समाप्त रक्त (2-3 मिली लीटर)
2. समपरासारी लवण (Isotonic saline) विलयन (8.9 ग्राम/लीटर)
3. ट्राइसोडियम साइट्रेट, (एक थक्का-रोधी) (4 ग्राम/100 मिली लीटर)
4. अपकेंद्रि नलिका (Centrifuge tubes) (10 मिली लीटर)
5. इन्क्यूबेटर/उष्मायित्र
6. अपकेंद्रित यंत्र



चित्र 1.3 : आर.बी.सी. अवशिष्ट कला बनाने में शामिल चरण।

### Finger stick method

<https://youtu.be/mC5tDCviBc>

7. वर्णमापी (Colorimeter) या स्पेक्ट्रोमी प्रकाशमापी (spectrophotometer)
8. आसुत जल (Distilled water)
9. लौरी (Lowry) विधि से प्रोटीन आकलन के लिए अभिकर्मक (वैकल्पिक—बीबीसीसीएल-106 देखें)

प्लाज्मा रक्त का स्पष्ट, पुआल रंग (हल्के पीले रंग) का तरल हिस्सा है जो लाल रक्त कोशिकाओं, सफेद रक्त कोशिकाओं, प्लेटलेट्स और अन्य कोशिकीय घटकों के हटाये जाने के बाद रहता है। इसमें पानी, लवण, एंजाइम/किण्वक, एंटीबॉडी (प्रतिरक्षी) और अन्य प्रोटीन होते हैं।

सीरम को रक्त प्लाज्मा के रूप में परिभाषित किया जा सकता है जिसमें फाइब्रिनोजेन नहीं होता है। सीरम में रक्त के थक्के में उपयोग नहीं होने वाले सभी प्रोटीन पाये जाते हैं जैसे कि इलेक्ट्रोलाइट्स (विद्युत अपघट्य) एंटीबॉडी (प्रतिरक्षी), एंटीजन (प्रतिजन) हार्मोन, और कोई भी बहिर्जात पदार्थ।

## 1.4 क्रियाविधि

1. रक्त का नमूना उंगली की छड़ी प्रक्रिया द्वारा ट्राइसोडियम साइट्रेट (ट्राइसोडियम साइट्रेट के 50 माइक्रोलीटर में 5 मिली लीटर रक्त डाला जाता है) युक्त नलिका में एकत्र कीजिए। धीरे-धीरे इस रक्त के नमूने को मिलाएं।
2. इसे 10 मिलीलीटर अपकेंद्रि नलिका में स्थानांतरित करें और 4 डिग्री सेल्सियस पर 10 मिनट के लिए 8000 g पर अपकेंद्रित करें।
3. अपकेंद्रण के बाद, प्लाज्मा अधिप्लवी (supernatant) के रूप में ऊपरी परत के रूप में देखाई देगा, जबकि लाल रक्त कोशिका नलिका के गुटिका (pellet) तल पर तलछट के रूप में होगी।
4. अधिप्लवी को निथार कर के निकालें और नलिका के तल पर तलछट, आरबीसी को पुनः 5 मिलीलीटर समपरासारी लवण विलयन में घोलें। 4 डिग्री सेल्सियस पर 10 मिनट के लिए 8000 g पर फिर से नलिका को अपकेंद्रित करें। इस धोने के चरण को एक बार फिर दोहराएं।
5. धीरे-धीरे 5 मिलीलीटर आसुत जल में धोये हुए आरबीसी को पुनः घोलें। एक वर्टेक्स मिक्सर का उपयोग करके नलिका की सामग्री को तेजी से मिलाएं जिससे लाल रक्त कोशिकाएं फट जायें।
6. 4 डिग्री सेल्सियस पर 5 मिनट के लिए 8000 g पर फिर से मिश्रण को अपकेंद्रित करें। गुटिका के पुनः प्राप्त करें जिसमें आरबीसी अवशिष्ट झिल्ली शामिल है, और आगे के उपयोग के लिए 0.5 मिली लीटर समपरासारी लवण विलयन में पुनः घोलें।

प्रक्रिया का प्रवाह चार्ट नीचे दिया गया है।

50  $\mu$ l ट्राइसोडियम साइट्रेट में 5 ml रक्त मिलाएं



धीरे धीरे हिलाएँ

10 ml की अपकेंद्रि नलिका में डालें और 8000 g, 4°C पर 10 मिनट के लिए अपकेंद्रित करें



अधिप्लवी को निथार कर निकाल दें, नलिका के तलछट पर गुटिका के रूप में लाल रक्त कणिकाएं प्राप्त होंगी

आर. बी. सी. को 5 ml समपरासारी लवण विलयन में पुनः घोलें 8000 rpm, 4°C पर 10 मिनट के लिए अपकेंद्रित करें

वार्टेक्स मिक्सर की सहायता से नलिका सामग्री को जोर से हिलाएं जिससे कि लाल रक्त कोशिकाएँ फट जाएँ

8000 g, 4°C पर 5 मिनट को अपकेंद्रित करें

पुनः उपयोग के लिए गुटिका को 0.5 ml समपरासारी लवण विलयन में पुनः घोलें जिसमें आर. बी.सी. अवशिष्ट कोशिका है।

## 1.5 अवलोकन और परिणाम

1. पुनः घोलें गए विलयन का अवशोषण 540 nm पर मापें। समपरासारी विलयन को आधार (Blank) के तौर पर इस्तेमाल करें।
2. इस नमूने में आप प्रोटीन की सांद्रता को भी माप सकते हैं। इसके लिए लौरी विधि का प्रयोग करें और 660 nm वर्णमापी या स्पेक्ट्रमी प्रकाशमापी की सहायता से अवशोषण मापें। विस्तृत ब्यारे के लिए बी बी सी सी एल-106 में प्रयोग 3 देखें।

## 1.6 सावधानियां

1. रक्तसंग्रह के दौरान रुधिर विघटन (hemolysis) की किसी भी संभावना से बचा जाना चाहिए।
2. थक्कारोधी को रक्त के नमूने के साथ धीरे-धीरे मिलाया जाना चाहिए।
3. अपकेंद्रण (centrifugation) से पहले गुटिका के मिश्रण को आहिस्ता/ धीरे-धीरे मिलाना चाहिए।
4. ऊतकों और शरीर के तरल पदार्थ के साथ काम करते समय संक्रमण हो सकता है। अतः इन पदार्थों का उपयोग करते समय सावधानी बरती जानी चाहिए।
5. विशेष रूप से इस उद्देश्य के लिए रखे गए उष्मायित्र (इन्क्यूबेटर) में अपशिष्ट (waste) को ठीक से निष्फल किया जाना चाहिए और फिर इसका निपटान (disposal) किया जाना चाहिए।

## 1.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न

---

1. सीरम को परिभाषित करें।
2. सीरम और प्लाज़्मा में विभेद करें।
3. समपरासारी विलयन क्या होता है?
4. थक्का रोधी क्या है? उदाहरण दें।
5. आर. बी. सी. अवशिष्ट बनाने के सिद्धांत का विवरण दें।
6. जैवकला के संघटन का विवरण दें।



ignou  
THE PEOPLE'S  
UNIVERSITY

## झिल्ली पर अपमार्जक के प्रभाव का अध्ययन

### प्रयोग की रूपरेखा

2.1 प्रस्तावना	2.5 अवलोकन और परिणाम
अपेक्षित अध्ययन परिणाम	2.6 सावधानियां
2.2 सिद्धांत	2.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न
2.3 आवश्यक सामग्री	
2.4 क्रियाविधि	

### 2.1 प्रस्तावना

अपमार्जक फॉस्फोलिपिड द्विपरत को भंग करके झिल्ली/कला के विघटन का कारण बनते हैं। झिल्ली प्रोटीन के अध्ययन के लिए उपकरण के रूप में अपमार्जक के महत्त्व को कम करके नहीं आंका जा सकता है। वे प्रोटीन के अलगाव और शृद्धिकरण में बड़े पैमाने पर उपयोग किए जाते हैं। आरबीसी अवशिष्ट कोशिकाओं के मामले में, अपमार्जक/डिटर्जेंट के प्रभाव को बाधित झिल्ली से मुक्त हीमोग्लोबिन द्वारा अवशोषण को मापकर मापा जाता है। इस प्रयोगशाला अभ्यास में आप आरबीसी अवशिष्ट कोशिका पर अपमार्जक/सांद्रता के प्रभाव को देखेंगे जिसे आपने पिछले प्रयोग में तैयार किया है। आप विभिन्न के अपमार्जकों के प्रभाव का भी इसी प्रकार अध्ययन कर सकते हैं।

### अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- ❖ प्रतिशत अपघटन की गणना कर सकेंगे;
- ❖ आर बी सी अवशिष्ट कोशिका पर अपमार्जक के प्रभाव का वर्णन कर सकेंगे;
- ❖ कला/झिल्ली पर अपमार्जक के प्रभाव का विवरण दे सकेंगे; और
- ❖ अवशोषण के रूप में कला/झिल्ली पर अपमार्जक के प्रभाव को माप सकेंगे।

## 2.2 सिद्धांत

अधिकांश अपमार्जक लिपिड द्विपरत को घोलकर कला/झिल्ली को बाधित करते हैं। इस प्रयोग में बाधित झिल्ली से निकलने वाले हीमोग्लोबिन द्वारा प्रकाश के अवशोषण को मापकर अवशिष्ट कोशिका कला पर डिटर्जेंट/अपमार्जक के प्रभाव की निगरानी की जाती है।

## 2.3 आवश्यक सामग्री

1. 0-5 ml समपरासारी लवण विलयन में घुला हुआ आर बी सी अवशिष्ट कोशिका (प्रयोग 1 से)
2. समपरासारी लवण (Isotonic saline) (8.9 ग्राम/लीटर) विलयन
3. अपमार्जक विलयन :
  - क) ट्राइटान एक्स – 100 (1 ग्राम/100 मिली लीटर)
  - ख) सोडियम डोडेसिल सल्फेट (1 ग्राम/100 मिली लीटर)
  - ग) लाइसोफॉस्फेटिडिल कोलीन (10 मिलीमॉल/लीटर)
4. अपकेंद्री नलिका (Centrifuge tubes) (10 मिली लीटर)
5. इन्क्यूबेटर/उष्मायित्र
6. अपकेंद्री यंत्र
7. वर्णमापी (Colorimeter) या स्पेक्ट्रमी प्रकाशमापी (spectrophotometer)
8. आसुत जल (Distilled water)

## 2.4 क्रियाविधि

1. आरबीसी अवशिष्ट कला का 0.5 मिलीलीटर लें और समपरासारी लवण विलयन का 4.5 मिलीलीटर आयतन मिलाकर 5 मिलीलीटर बनाएं। इसे अच्छी तरह मिला लें।
2. अपमार्जक विलयन (ट्राइटान एक्स – 100 या सोडियम डोडेसिल सल्फेट या लाइसोफॉस्फेटिडिल कोलीन) का 50 माइक्रोलीटर मिलाएं और घुमाते हुए धीरे-धीरे मिलाएं।
3. 37 डिग्री सेल्सियस पर 20 मिनट के लिए उष्मायित्र/इनक्यूबेटर में रखें।
4. ऊष्मान (incubation) पूरा होने के बाद, 8000 आर पी एम पर मिश्रण को डिग्री सेल्सियस पर 5 मिनट के लिए अपकेंद्रीत करें।
5. अधिप्लवी लें और वर्णमापी या स्पेक्ट्रमी प्रकाशमापी का उपयोग करके 540 nm पर अवशोषण (absorbance) मापें।

6. झिल्ली के "100% अपघटन" के बाद अवशोषण को मापने के लिए :

- i) आरबीसी अवशिष्ट झिल्ली के 0.5 मिलीलीटर (समपरासारी लवण में घुला हुआ) लें और ट्राइटान एक्स-100 विलयन का 4.5 मिलीलीटर डालें।
- ii) इसे अच्छी तरह से मिलाएं और 20 मिनट के लिए 37 डिग्री सेल्सियस पर उष्मायित (इनक्यूबेट) करें।
- iii) 4 डिग्री सेल्सियस पर 5 मिनट के लिए 8000 आर पी एम अपकेंद्रित करें।
- iv) अधिप्लवी लें और 540 nm पर अवशोषण मापें। यह तालिका में वर्णित "100% अपघटन" का प्रतिनिधित्व करता है।

## 2.5 अवलोकन और परिणाम

प्रतिशत में अपघटन का प्रतिनिधित्व करने के लिए अवशोषण के मान को परिवर्तित किया जाता है। सबसे पहले, अधिकतम और न्यूनतम झिल्ली अपघटन निर्धारित करने की आवश्यकता है। न्यूनतम सीमा रिक्त (blank) द्वारा निर्धारित की जाती है (इस मामले में यह समपरासारी लवण है) और अधिकतम 100% अपघटन को अपमार्जक के साथ।

$$\text{अपघटन \%} = (\text{परीक्षण नमूने का अवशोषण} / 100\% \text{ अपघटन का अवशोषण}) \times 100$$

अवलोकन को निम्नलिखित तरीके से दर्ज किया जा सकता है :

क्र. स.	घुले हुए आरबीसी अवशिष्ट झिल्ली का आयतन (ml)	समपरासारी विलयन का आयतन (ml)	डाले गए अपमार्जक (ट्राइटान X-100) विलयन का आयतन (ml)	मिलाएँ और 20 मिनट के लिए 5°C पर इनक्यूबेट / उष्मायित करें। अपकेंद्रित करें और अवशोषण को मापें	540 nm पर अवशोषण	% अपघटन	दानों का मध्य मान
जाँच वाला नमूना	0.5	4.5	0.05				
	0.5	4.5	0.05				
रिक्त (Blank) समपरासारी लवण	—	4.5	0.02 (distilled water)				
100%	0.5	0	4.5				
अपघटन	0.5	0	4.5				

आप इसी तरीके से जितने चाहें उतने अपमार्जक के प्रभावों की जांच कर सकते हैं। सबसे पहले, यह सलाह दी जाती है कि अपमार्जक ट्राइटन एक्स-100 की भिन्न सांद्रता की एक श्रृंखला (0.05, 0.10, 0.015, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, और 0.40 मिलीलीटर) की जांच करें और प्रतिशत झिल्ली अपघटन (हेमोलिसिस) का एक आरेख तैयार करें।

अन्य अपमार्जक जैसे लाइसोलेसिथिन, प्रोजेस्टेरोन, आदि के साथ प्रयोग को दोहराएं और झिल्ली के अपघटन पर इन अपमार्जक की सापेक्ष प्रभावशीलता पर टिप्पणी करें।

## 2.6 सावधानियां

1. अपकेन्द्रण से पहले मिश्रण को आहिस्ता से हिलाएँ।
2. विभिन्न अपमार्जकों का उपयोग करते समय संदूषण और दोषपूर्ण परिणामों से बचने के लिए स्वच्छ पिपेट और परखनली का उपयोग करें।

## 2.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न

1. झिल्ली पर अपमार्जक की भूमिका की व्याख्या कीजिए।
2. अपमार्जक क्या हैं?
3. 100 प्रतिशत अपघटन से क्या अभिप्राय है?

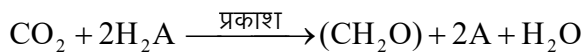
# हाइड्रिला पौधे में प्रकाश संश्लेषित ऑक्सीजन (O<sub>2</sub>) के उद्भव का अध्ययन

## प्रयोग की रूपरेखा

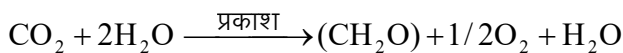
- |  |                           |
|--|---------------------------|
| 3.1 प्रस्तावना<br>अपेक्षित अध्ययन परिणाम | 3.5 अवलोकन और परिणाम      |
| 3.2 सिद्धांत                             | 3.6 सावधानियां            |
| 3.3 आवश्यक सामग्री                       | 3.7 स्व- मुल्यांकन प्रश्न |
| 3.4 क्रियाविधि                           |                           |

## 3.1 प्रस्तावना

प्रकाश संश्लेषण एक जैविक ऑक्सीकरण-अपचयन प्रक्रिया है जिसमें प्रकाश ऊर्जा, स्थिर रासायनिक उत्पादों में परिवर्तित होती है। इसे निम्नलिखित सामान्य समीकरण द्वारा समझा जा सकता :

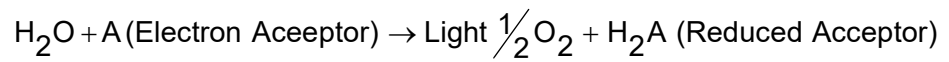


यहां CO<sub>2</sub> इलेक्ट्रॉन स्वीकर्ता (electron acceptor) है और H<sub>2</sub>A एक अपचयित यौगिक है जो इलेक्ट्रॉन दाता (electron donor) के रूप में काम कर सकता है। इस प्रक्रिया में CO<sub>2</sub>, कार्बोहाइड्रेट (CH<sub>2</sub>O) में अपचयित होता है, जबकि H<sub>2</sub>A, A में आक्सीकृत होता है। शैवाल और साइनोबैक्टीरिया (cyanobacteria) जैसे पादप ऑक्सीजनदायी प्रकाश संश्लेषण प्रदर्शित करते हैं जिसमें H<sub>2</sub>A के स्थान पर जल (H<sub>2</sub>O) का उपयोग किया जाता है, और इसके ऑक्सीकरण से आणविक ऑक्सीजन का उत्पादन होता है जिससे हमारे ग्रह पर जीवन सम्भव है।



हरे पादपों के हरितलवक (chloroplast) में प्रकाश संश्लेषण होता है। यह वातावरण से कार्बनडाई ऑक्साइड, जल और सौर ऊर्जा का उपयोग करता है। इस प्रक्रिया के दौरान जल अपघटन होता है। जिससे ऑक्सीजन उत्सर्जित होती है।

1930 के दशक में पादप शरीरक्रिया विज्ञानी (प्लांट फिजियोलॉजिस्ट / Plant Physiologist) रॉबर्ट हिल (Robert Hill) ने पृथक हरितलवक / क्लोरोप्लास्ट पर सरल और सुरुचिपूर्ण प्रयोग किए। उन्होंने दिखाया कि जब एक कृत्रिम इलेक्ट्रॉन स्वीकर्ता (जैसे कि फेरोआक्सेलेट या फेरिसाइनाइड, बाद में बेंजोक्विनोन और 2, 6 - डाइक्लोरोफेनॉल इंडोफेनॉल, DCPIP का भी उपयोग किया जाता है) की उपस्थिति में अलग-थलग हरितलवक / क्लोरोप्लास्ट का उपयोग किया जाता है, तो CO<sub>2</sub> के यौगिकीकरण (CO<sub>2</sub> fixation) नहीं होने पर भी H<sub>2</sub>O के विभाजन से आणविक O<sub>2</sub> विकसित हो सकता है। इस प्रयोग को व्यापक रूप से अपने खोजकर्ता के सम्मान में हिल प्रतिक्रिया के रूप में जाना जाता है। इसने प्रकाश प्रेरित इलेक्ट्रॉन हस्तांतरण (प्रकाश अभिक्रिया) और CO<sub>2</sub> यौगिकीकरण (अप्रकाशीय अभिक्रिया) के बीच संबंधों को समझने की शुरुआत को चिन्हित किया। रेडिओलेबलिंग अध्ययनों द्वारा बाद में यह प्रदर्शित किया गया कि हिल प्रतिक्रिया के दौरान विकसित ऑक्सीजन जल के अणुओं के ऑक्सीकरण से प्राप्त हुई थी।



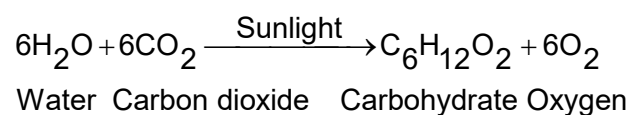
### अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- ❖ प्रकाश संश्लेषण की व्याख्या कर सकेंगे;
- ❖ यह साबित कर सकेंगे कि हरे पौधों में प्रकाश संश्लेषण के दौरान आक्सीजन का उद्भव होता है; और
- ❖ जल के प्रकाश अपघटन का वर्णन और ऑक्सीजन के उद्भव की व्याख्या कर सकेंगे।

### 3.2 सिद्धांत

कार्बोहाइड्रेट के उत्पादन के लिए वायुमंडलीय कार्बन डाइऑक्साइड को ऑक्सीजन युक्त प्रकाश संश्लेषण में जल के साथ जोड़ा जाता है जबकि ऑक्सीजन गैसीय रूप में विकसित होती है। यह प्रक्रिया हरितलवक के थायलेकोइड झिल्ली में होती है जिसमें प्रकाश संश्लेषक वर्णक जैसे कि क्लोरोफिल / पर्णहरित और प्रोटीन अंतर्निहित होते हैं। थायलेकोइड झिल्ली एक ऊर्जा पारगमन झिल्ली है जो सौर ऊर्जा को रासायनिक ऊर्जा में परिवर्तित करती है। प्रकाश संश्लेषण की समग्र अभिक्रिया निम्नानुसार है :



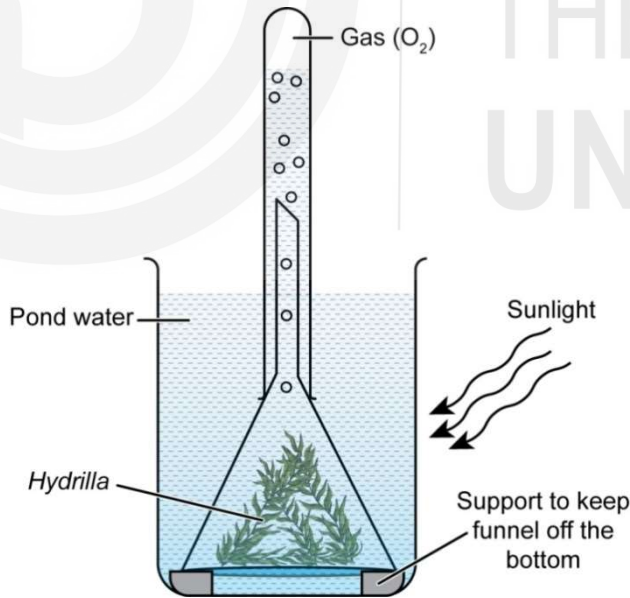
### 3.3 आवश्यक सामग्री

1. हाइड्रिला टहनियाँ
2. बीकर

3. ग्लास कीप
4. परखनली
5. तालाब का पानी
6. प्रज्वलित सुगन्धित छड़ी/अगरबत्ती

### 3.4 क्रियाविधि

1. एक बीकर लें और उसमें तीन चौथाई तालाब का पानी भरें।
2. ताजा कटी हुई कुछ हाइड्रिला टहनियों को लें और उन्हें बीकर में डुबोएं।
3. एक कांच की कीप लें और इसे बीकर में उल्टे स्थिति में रखें ताकि कीप का चौड़ा व्यापक हिस्सा हाइड्रिला टहनियों को ढक ले और साथ ही कीप की नोक पूरी तरह से पानी में डूबी रहें जैसा कि चित्र 3.1 में दिखाया गया है।
4. कीप का आधार और बीकर के तल के बीच में एक छत्रक व्यवस्था (beehive arrangement) का उपयोग किया जाता है।
5. तालाब के पानी से भरी एक परखनली लें और इसे कीप के तने पर उल्टी स्थिति में रखें।
6. इस संयोजन को खुले धूप में 2-3 घंटे के लिए रखें।



चित्र 3.1 : प्रकाश संश्लेषण के दौरान ऑक्सीजन के उद्भव को प्रदर्शित करने के लिए एक छत्रक व्यवस्था

### 3.5 अवलोकन और परिणाम

1. गैस के बुलबुले अर्थात् प्रकाश संश्लेषण के दौरान उत्पादित ऑक्सीजन इस व्यवस्था में परखनली के शीर्ष पर एकत्रित होगा।

2. परखनली को उल्टा रखते हुए धीरे-धीरे निकालें। उचित ख्याल रखें ताकि प्रकाश संश्लेषण से एकत्रित गैस परखनली से न निकल जाए।
3. एक प्रज्वलित सुगन्धित छड़ी/ अगरबत्ती डालकर परखनली में एकत्रित गैस का परीक्षण करें, जो आग की लपटों में बदल जाएगी।
4. इससे यह साबित होगा कि प्रकाश संश्लेषण के दौरान एकत्र की गई गैस ऑक्सीजन थी।
5. इस प्रयोग से यह साबित होता है कि सूर्य के प्रकाश की उपस्थिति में प्रकाश संश्लेषण के दौरान ऑक्सीजन का उद्भव होता है।

### 3.6 सावधानियां

---

1. हाइड्रिला टहनियाँ जितना संभव हो उतनी ताजा होनी चाहिए।
2. संयोजन को पर्याप्त समय के लिए सूर्य के प्रकाश के संपर्क में होना चाहिए।
3. बीकर में जल का स्तर उलटे कीप के तने के स्तर से अधिक होना चाहिए।
4. परखनली निकालते समय, गैस निकलने से बचाने के लिए अपने अंगूठे को परखनली के मुँह के पास रखें।

### 3.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न

---

1. जैव संश्लेषण को परिभाषित करें।
2. हरितलवक का जैवसंश्लेषण में भूमिका क्या है?
3. हिल अभिक्रिया का वर्णन करें।
4. जल-अपघटन क्या है?
5. पादपों में प्रकाश संश्लेषण की क्रिया की व्याख्या करें।
6. जैवसंश्लेषण में जल और कार्बन डाई ऑक्साइड की आवश्यकता क्यों होती है?

# पालक के पत्तों से हरितलवक का पृथक्करण और संपूर्ण पर्णहरित का आकलन

## प्रयोग की रूपरेखा

4.1 प्रस्तावना	हरितलवक का पृथक्करण
अपेक्षित अध्ययन परिणाम	पर्णहरित का आकलन
4.2 सिद्धांत	4.6 सावधानियां
4.3 आवश्यक सामग्री	4.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न
4.4 क्रियाविधि	
4.5 अवलोकन और परिणाम	

### 4.1 प्रस्तावना

इस प्रयोगशाला अभ्यास में, आप हरितलवक (chloroplast) के पृथक्करण (isolation) और पर्णहरित (chlorophyll) के आकलन को सीख सकेंगे। हरितलवक विशेष रूप से पत्तियों में मौजूद उप-कोशिकीय कोशिकांग (organelles) हैं जो प्रकाश संश्लेषण के प्रमुख स्थल हैं। वे आकार में 5–10  $\mu\text{m}$  के होते हैं। इसमें थायलेकोइड झिल्ली होती है जिनमें प्रकाश संश्लेषण वर्णक और प्रोटीन होते हैं जो प्रकाश संश्लेषण करते हैं। पर्णहरित प्रमुख प्रकाश संश्लेषक रंगद्रव्य (Pigment) है जिससे पत्तियां हरे रंग की दिखाई देती हैं।

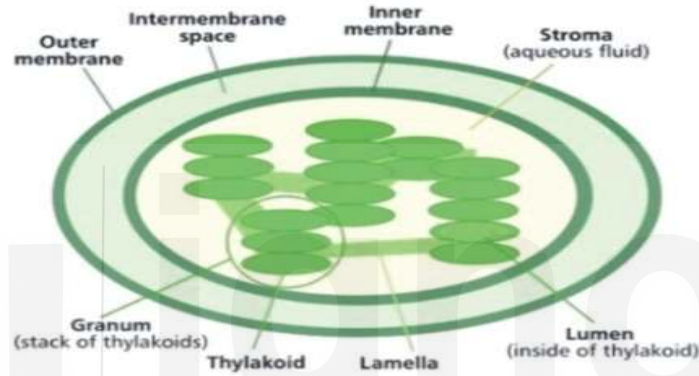
### अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- ❖ प्रयोग के लिए पत्तियों का सत्ता (extract) निकाल सकेंगे;
- ❖ पत्तियों से हरितलवक का पृथक्करण कर पायेंगे; और
- ❖ पर्णहरित का आकलन कर सकेंगे।

## 4.2 सिद्धांत

हरितलवक द्वि-झिल्ली आवरण से घिरा हुआ होता है। हरितलवक के अंदर में थायलेकोइड झिल्ली होती है जो संलग्न और गैर-संलग्न हिस्सों में संयोजित होती है जिसे ग्रेना और पीठिका पटलिका (stroma lamellae) के नाम से जाना जाता है। यह थायलेकोइड झिल्ली प्रणाली आधारक (मैट्रिक्स) में अंतःस्थापित (embedded) होती है जो प्रोटीन में समृद्ध है। थायलेकोइड झिल्ली प्रणाली के भीतर में भी बंद स्थान होता है जिसे थायलेकोइड अवकाशिका (thylakoid lumen) के रूप में जाना जाता है (चित्र 4.1)। हरितलवक को एक उभयरोधी (बफर) प्रणाली में पत्ती के ऊतकों के समांगीकरण (homogenization) और उसके बाद अपकेंद्रण (centrifugation) द्वारा पृथक किया जाता है।



चित्र 4.1 : हरितलवक का संरचनात्मक संगठन।

मिखाइल स्वेट, एक रूसी वनस्पति शास्त्री ने वर्णलेखिकी द्वारा हरितलवक रंगद्रव्य का पृथक्करण किया। उन्होंने दिखाया कि पत्तियों में चार प्रकार के प्रकाश संश्लेषी वर्णक होते हैं (सारणी 4.1)।

सारणी 4.1 : प्रकाश संश्लेषी वर्णक और उनके सक्रिय अवशोषण स्पेक्ट्रा।

वर्णक / रंगद्रव्य	रंग	प्रकाश अवशोषण
क्लोरोफिल ए	हरा	430 nm के पास और 662 nm
क्लोरोफिल बी	हरा	453 nm के पास और 642 nm
कैरोटीनॉयड (कैरोटीन) और जैन्थोफिल	पीला-नारंगी	460 nm से 550 nm तक

## 4.3 आवश्यक सामग्री

1. पालक का पत्ता (लगभग 30 ग्राम)
2. धारदार चाकू
3. काटने वाला फलक

4. रसोई सम्मिश्रक (Blender)
5. मलमल का कपड़ा
6. काँच का बीकर
7. अपकेंद्रित्र नलिका (50 मिलीलीटर)
8. अपकेंद्रित्र नलिका (1.5 मिलीलीटर)
9. सूक्ष्मपिपेट (micropipette)
10. ग्लास पिपेट
11. अपकेन्द्रण यंत्र (Centrifuge)
12. स्पेक्ट्रमी प्रकाशमापी

#### अभिकर्मक

1. हरितलवक पृथक्करण उभयरोधी/बफर (CIB) बिना बी.एस.ए. के (बोवाइन सीरम एल्ब्युमिन) : 0.33 M सॉर्बिटॉल, 0.1 M ट्रिस-क्लोराइड (pH = 7.8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA,
2. BSA के साथ हरितलवक पृथक्करण बफर (CIB) (0-1% w/v) 0.33 M सॉर्बिटॉल, 0.1 M ट्रिस-क्लोराइड (pH = 7.8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0-1% BSA,
3. 40% (v/v) परकॉल : BSA के साथ 4 ml परकॉल और 6 ml CIB बफर, 40% परकॉल को 10 ml बनाने के लिए (हरितलवक सस्पेंशन के 6 ml के लिए 40% परकॉल का 10 ml का उपयोग करें)। परकॉल में कोलॉइडी सिलिका कण होते हैं जो पॉलीविनाइलपायरोलिडोन (PVP) के साथ लेपित होते हैं। यह व्यावसायिक रूप से उपलब्ध है।
4. 80% (v/v) जलीय एसीटोन।

## 4.4 क्रियाविधि

सबसे पहले हम हरितलवक को पृथक् करना सीखेंगे और उसके बाद पर्णहरित का आकलन करेंगे।

### 4.4.1 हरितलवक का पृथक्करण

1. ताजे पालक के पत्तों को पहले नल के पानी से और फिर आसुत जल से अच्छी तरह धो लें। मध्यशिरा (मिडरिब) निकला दें और 30 ग्राम पत्तियां लें।
2. एक तेज धारदार चाकू या ब्लेड के साथ छोटे टुकड़ों में जल्दी से काट लें।

3. BSA के साथ CIB के 120 ml को इसमें डालें और एक रसोई के सम्मिश्रक (मिक्सी) में समांगीकरण करें, जिसमें जार पहले से द्रुतशीतित (prechilled) किया होना चाहिए। समांगीकरण आदर्श रूप से बटन को छोटे चरण में चालू और बंद करके किया जाना चाहिए।
4. मलमल के कपड़े (cheese cloth) की 8 परतों के माध्यम से समांगीकृत (homogenate) पत्तियों को छान लें।
5. निस्स्यंद (फिल्ट्रेट) को फिर समान रूप से अपकेंद्रित नलिकाओं के जोड़े में विभाजित कीजिए।
6. 250 g और 4°C पर 5 मिनट के लिए समांगीकृत को अपकेंद्रित करें। गुटिका (pellet) जिसमें कोशिका अवशेष और स्टार्च होता है उसे फेंक दिया जाता है।
7. अधिप्लवी (सुपरनेटेंट) को पहले से द्रुतशीतित अपकेंद्रित नलिकाओं में स्थानांतरित करें और 4°C पर 7 मिनट के लिए 1000 g पर अपकेंद्रित करें।
8. अधिप्लवी (सुपरनेटेंट) को फेंक दें और BSA के साथ 2ml CIB को हरे रंग के गुटिका (पैलेट) में डाल कर कांच की छड़ या किसी अन्य पेंट ब्रश की सहायता से पुनः घोले।
9. सभी अपकेंद्रित नलिकाओं से घुली हुयी गुटिका को इकट्ठा कर लें।
10. BSA के साथ CIB बफर के 6 ml के साथ 40% परकॉल सस्पेंशन का 4 ml मिलाएं। धीरे-धीरे परकॉल परत को हरितलवक मिश्रण के 6 ml से ढक दें।
11. 4°C पर 6 मिनट के लिए 1700 g पर अपकेंद्रित करें।
12. पूर्ण हरितलवक एक हरे रंग की गुटिका के रूप में नलिका के तल पर तलछट के रूप में जमा हो जायेगा और टूटा हुआ हरितलव अधिप्लवी में रहेगा।
13. गुटिका जिसमें पूर्ण हरितलवक होता है को छोड़ते हुये हरितलवक सस्पेंशन की ऊपरी परत को सावधानी पूर्वक हटा दें।
14. BSA के बिना CIB बफर के 0.5 ml के साथ गुटिका को मिलाएं। यह आपकी हरितलवक सामग्री है।

#### 4.4.2 पर्णहरित का आकलन

1. 990  $\mu$ l 80% एसीटोन में हरितलवक सस्पेंशन का 10  $\mu$ l का डाले, और धीरे-धीरे मिलायें। 2 मिनट के लिए 3000 g पर अपकेंद्रित करें।
2. एक अलग नलिका में अधिप्लवी निथार लें। इस अर्क/निचोड़ में घोल का कुल पर्णहरित होगा, जिसका उपयोग पर्णहरित अनुमान के लिए किया जाएगा।
3. एक ग्लास क्युवेट में 80% एसीटोन अर्क (extract) की पर्याप्त मात्रा लें, और स्पेक्ट्रोमी प्रकाशमापी का उपयोग करके 650 nm पर अवशोषण को मापें।

4. संदर्भ या खाली के रूप में 80% एसीटोन का उपयोग करके अवशोषण को मापा जाना है।
5. हर बार ताजा अधिप्लवी का उपयोग करके दो-से तीन बार अवशोषण को मापें।

## 4.5 अवलोकन और परिणाम

निम्नलिखित सूत्र का उपयोग करके दो से तीन अवशोषण मान द्वारा गणना करें :

$$\text{कुल पर्णहरित} = (A_{650} \times 100)/36 \text{ mg/ml}$$

30 ग्राम पालक की पत्तियों से प्राप्त कुल पर्णहरित = ..... ग्राम

## 4.6 सावधानियां

1. सभी प्रारंभिक चरणों को 4°C और अंधेरे (कम रौशनी) में किया जाना चाहिये।
2. हरितलवक की निष्क्रियता को कम करने के लिए सभी प्रारंभिक कदम त्वरित क्रम में किए जाने चाहिये।
3. गुटिका के साथ किसी भी मिश्रण से बचने के लिए अधिप्लवी के पृथक्करण के दौरान सावधानी बरतनी चाहिये।
4. एसीटोन अर्क को विशेषतः ग्लास नलिका में अपकेंद्रित करना चाहिए।
5. एसीटोन वाष्पशील होता है, इसलिए वाष्पीकरण से बचने के लिए एसीटोन अर्क को कुशलता से नियंत्रित किया जाना चाहिए। एसीटोन के वाष्पीकरण से अवशोषण में परिवर्तन होगा और आकलन गलत हो सकता है।
6. एसीटोन अंतः श्वसन (inhalation) से बचने के लिए मुखावरण (Face mask) का उपयोग किया जाना चाहिए।

यह विधि कुल पर्णहरित का आकलन करती है जिसमें पर्णहरित ए और पर्णहरित बी दोनों होते हैं क्योंकि अवशोषण को 650 nm पर मापा जाता है जो पर्णहरित a और पर्णहरित b के अवशोषण अधिकतम का माध्य (mean) है। विशेष पर्णहरित और अन्य प्रकाश संश्लेषक वर्णक जैसे कि कैरोटीनॉयड के आवलन में अधिक विस्तृत माप शामिल हैं।

## 4.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न

1. प्रकाश संश्लेषण में हरितलवक की भूमिका को समझाइए।
2. विभिन्न प्रकाश संश्लेषी वर्णक के नाम बताइए।
3. अपकेंद्रिकरण क्या है।

# विभाजन वर्णलेखिकी द्वारा प्रकाश संश्लेषक वर्णकों का निष्कर्षण और पृथक्करण

## प्रयोग की रूपरेखा

5.1 प्रस्तावना	TLC प्लेट की तैयारी और सक्रियन
अपेक्षित अध्ययन परिणाम	नमुना अनुप्रयोग
5.2 सिद्धांत	विलायक प्रणाली की तैयारी
5.3 आवश्यक सामग्री	वर्णलेख की क्रमागत उन्नति
5.4 क्रियाविधि	5.6 सावधानियां
5.5 अवलोकन और परिणाम	5.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न
प्रकाश संश्लेषक वर्णकों का निष्कर्षण	

## 5.1 प्रस्तावना

प्रकाश संश्लेषक वर्णक हरितलवक (chloroplast) में मौजूद होते हैं और वे सौर विकिरण को अवशोषित करते हैं जो प्रकाश संश्लेषण में उपयोग किया जाता है। प्रकाश संश्लेषक वर्णक के विवरणों की चर्चा BBCCT-111 के इकाई 10 (खंड 10.5) में की गई है। प्रकाश संश्लेषक वर्णक कार्बनिक विलायकों (organic solvents) में घुलनशील होते हैं, और उनमें से कई का उपयोग उनके निष्कर्षण के लिए किया जा सकता है। इन वर्णकों के रूप में पौध-अर्क (plant extract) को अलग करने का काम सबसे पहले मिखाइल त्स्वेट (Mikhail Tswett) ने किया था, जिन्होंने लेखिकी (chromatography) नामक प्रयोगशाला तकनीक का इस्तेमाल किया था। तब से वर्णलेखी तकनीकों (chromatographic techniques) के कई रूप विकसित किए गए हैं, और उनमें से एक को विभाजन वर्णलेखिकी (partition chromatography) के रूप में जाना जाता है जिसका उपयोग आमतौर पर इस उद्देश्य के लिए किया जाता है।

## अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- ❖ पत्तियों जैसे जैविक नमूनों से प्रकाश संश्लेषक वर्णक निकाल सकेंगे;
- ❖ विभाजन वर्णलेखिकी के अंतर्निहित सिद्धांत को समझ सकेंगे;
- ❖ विभाजन वर्णलेखिकी के साथ पतली परत/तनुस्तर वर्णलेखिकी (TLC) और कागज वर्णलेखिकी में संबंध स्थापित कर पाने में; और
- ❖ वर्णलेखिकी द्वारा प्रकाश संश्लेषक वर्णकों को अलग कर सकेंगे।

## 5.2 सिद्धांत

जैसा कि पहले चर्चा की गई है कि हरे पौधों में कई प्रकार के प्रकाश संश्लेषक वर्णक मौजूद होते हैं जिनमें पर्णहरित ए (chlorophyll a) पर्णहरित बी, कैरोटीनॉयड और जेंथोफिल शामिल हैं। इन वर्णकों की रासायनिक प्रकृति, उन्हें ध्रुवीय विलायको (nonpolar solvents) में घुलनशील बनाती है। एसीटोन, मेथनॉल, डाइएथिल ईथर, पेट्रोलियम ईथर जैसे कई ध्रुवीय कार्बनिक विलायको और उनके संयोजनों का उपयोग पौधों के ऊतकों से वर्णकों के निष्कर्षण के लिए किया गया है। ये सभी विधियाँ पौधों से उन सभी प्रकाश संश्लेषक वर्णकों को विलय करके निकालती हैं।

विभाजन वर्णलेखिकी अशोधित अर्क (crude extract) से प्रकाश संश्लेषक वर्णक के पृथक्करण के लिए सबसे अधिक प्रयोग की जाने वाली विधि है। यह एक विलायक प्रणाली का उपयोग करता है जो कई कार्बनिक विलायको और पानी का मिश्रण होता है तथा ध्रुवीयता (polarity) में भिन्न होता है। रासायनिक संघटन में अंतर के कारण, प्रकाश संश्लेषक वर्णकों के ध्रुवीयता में अंतर होता है। नतीजतन, प्रत्येक वर्णक विलायक प्रणाली के एक विशेष घटक में रहना पसंद करता है जिसमें ध्रुवीयता वर्णक के नजदीक होती है। इसे **विभाजन (partitioning)** कहते हैं। यह प्रभाव एक वर्णलखी प्रणाली में अतिरंजित (exaggerated) हो जाता है जहाँ एक ठोस आधार कि ग्लास प्लेट पर लिपटे सिलिका जेल की पतली परत/तनुस्तर (जैसे Thin layer chromatography / TLC में) या बस एक फिल्टर पेपर का उपयोग होता है। यहाँ महत्वपूर्ण विशेषता सिलिका जेल (TLC) के कणों के बीच या सेल्यूलोज तंतुओं (पेपर वर्णलेखिकी में) के बीच मौजूद छिद्रों की एक जाल (meshwork) की उपस्थिति है। TLC प्लेट या वर्णलेखिकी में प्रयुक्त कागज का एक छोटा सा हिस्सा, आखिरी सिरे से विलायक प्रणाली में डूबा हुआ होता है। यह विलायक को वर्णलेखिकी के लिए उपयोग किए जाने वाले TLC प्लेट या कागज में मौजूद छिद्रों द्वारा केशिका क्रिया (capillary action) से खड़ी चढ़ाई करने की अनुमति देता है। एक अन्य महत्वपूर्ण बिंदु यह है कि विलायको के अलग-अलग घटक अलग-अलग ऊंचाइयों तक पहुंचते हैं क्योंकि उनके भौतिक गुणों में अंतर होता है जैसे कि पृष्ठ-तनाव (surface tension) के कारण गतिशीलता की विभिन्न दरें होती हैं। अब, चूंकि प्रत्येक वर्णक विलायक प्रणाली के एक विशेष घटक के साथ रहना चाहता है, और जैसा कि प्रत्येक घटक प्लेट या कागज पर विभिन्न गतिशीलता के साथ बढ़ रहा होगा, प्रकाश संश्लेषक वर्णक का पृथक्करण आसानी से

प्राप्त किया जा सकता है। तकनीकी शब्दों में, जिस घटक में न्यूनतम सापेक्ष गतिशीलता होती है, उसे स्थिर अवस्था (stationary phase) के रूप में जाना जाता है, जबकि अन्य को गतिशील अवस्था (mobile phase) माना जाता है यह स्पष्ट रूप से समझा जाना चाहिए कि ग्लास प्लेट (TLC में प्रयुक्त) पर सिलिका जेल की परत, या कागज (पेपर वर्णलेखिकी में प्रयुक्त) ठोस आधार है, न कि स्थिर अवस्था। अतः  $R_f$  मान के रूप में जाना जाने वाला मापदण्ड विभाजन वर्णलेखिकी में विशेष विश्लेष्य (analyte) अणुओं (वर्णक) की एक विशेषता के रूप में उपयोग किया जाता है जो कि विलायक अग्रभाग (solvent front) के सामान्य गति के सन्दर्भ में एक विशेष विश्लेष्य के गति का माप है (विलायक प्रणाली के सबसे तेज गति से चलने वाले घटक द्वारा निर्धारित)। यह भी ध्यान दिया जाना चाहिए कि  $R_f$  मान एक विलायक प्रणाली, वर्णलेखी चेंबर में वाष्प संतृप्ति की सीमा, तापमान आर्द्रता आदि जैसे कारकों के आधार पर एक सीमित सीमा के भीतर भिन्न हो सकता है। हालाँकि,  $R_f$  मान किसी विशेष वर्णलेखी व्यवस्था में स्थिर रहता है, और विभिन्न विश्लेष्यों के  $R_f$  मानों में सापेक्ष अंतर हमेशा स्पष्ट रहेगा। वर्णलेखी तकनीकों का विवरण बीबीसीसटी-105 प्रोटीन के इकाई 4, पाठ्यक्रम में देखा जा सकता है।

### 5.3 आवश्यक सामग्री

1. ताजा पत्ते (पालक)
2. खल-बट्टा (Mortar & Pestle)
3. व्हाटमैन नंबर 1 फिल्टर पेपर
4. एसीटोन
5. पेट्रोलियम ईथर
6. आइसोप्रोपेनॉल
7. निर्जल मैग्नीशियम सल्फेट
8. आसुत जल
9. केशिका नलिका (capillary tube)
10. कांच वर्णलेखी टंकी/जार तथा कवर करने के लिए कांच फलक
11. कांच फलक (लंबाई 20 cm, चौड़ाई 20 या 10 cm, मोटाई 3 mm) TLC प्लेट बनाने हेतु

### 5.4 क्रियाविधि

हम इस प्रयोग को पाँच चरणों में पूरा करेंगे। आइए सभी चरण को एक एक कर सीखते हैं।

### 5.4.1 प्रकाश संश्लेषक वर्णक का निष्कर्षण

1. ताजी पालक की पत्तियां लें और मध्यशिरा को हटा दें। पहले नल के पानी से और फिर आसुत जल से पत्तियों को अच्छी तरह से धो लें।
2. जल्दी से उन्हें एक तेज धारदार चाकू या ब्लेड से छोटे टुकड़ों में काट लें।
3. कटी हुई पत्तियों का 5 ग्राम लें और 5 ग्राम निर्जल मैग्नीशियम सल्फेट और 10 ग्राम रेत (सिलिका) मिलाएं।
4. मिश्रण को तब तक पीसें जब तक कि एक महीन सूखा पाउडर न मिल जाए। निर्जल मैग्नीशियम सल्फेट एक निर्जलीकरण कारक के रूप में कार्य करता है और पत्तियों से पानी के निष्काशन में मदद करता है।
5. इस पाउडर को एक छोटी परखनली में स्थानांतरित करें और 90% (v/v) जलीय एसीटोन की पर्याप्त मात्रा डालें। एक डाट (stopper) से परखनली के मुँह को ढकें और एक मिनट के लिए अच्छे से हिलाएं ताकि यह सुनिश्चित हो सके कि प्रकाश संश्लेषक वर्णक विलायक में घुल गए हैं।
6. इस मिश्रण को 10 मिनट के लिए छोड़ दें, और फिर स्थिर हो गए तलछट के ऊपर मौजूद विलायक को स्थानांतरित कर लें। वैकल्पिक रूप से मिश्रण को कम गति पर अपकेंद्रित भी किया जा सकता है और हरे रंग के अधिप्लवी (supernatant) को एकत्र किया जा सकता है।
7. यह प्रकाश संश्लेषक वर्णक का अर्क (extract) है। TLC या कागज वर्णलेखिकी द्वारा पृथक्करण के लिए उपयोग किए जाने तक इसे ढक कर रखें।

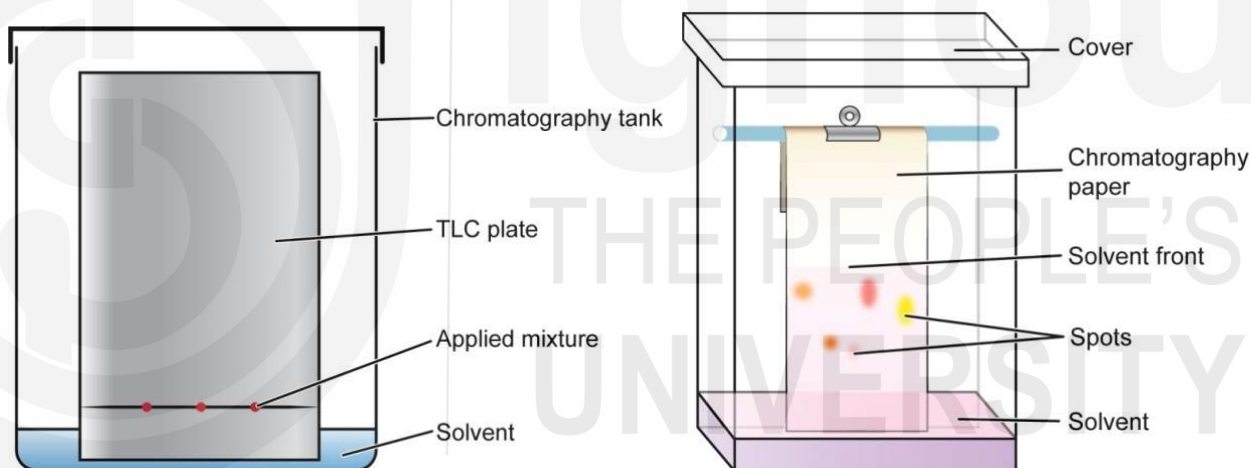
### 5.4.2 TLC प्लेट की तैयारी और सक्रियन

8. एक बीकर में 12 ग्राम सिलिका जेल-जी (Gel-G) लें और 30 ml आसुत जल डालें। एकसार घोल तैयार करने के लिए कांच की छड़ की मदद से मिलाएं।
9. एक साफ और सूखी TLC प्लेट (कांच की प्लेट लंबाई और चौड़ाई में 20 cm और मोटाई में 2-3 mm) लें। फलक को क्षैतिज रखें और उस पर घोल डालें।
10. पूरी तरह से प्लेट को ढकने के लिए इसे या तो कांच की छड़ से या व्यावसायिक रूप से उपलब्ध अनुप्रयोजित (applicator) के साथ फैलाएं। ध्यान रखें कि घोल की परत की मोटाई एक समान हो (लगभग 1 mm)।
11. हवादार जगह पर प्लेट को हवा में सूखने के लिए छोड़ दें।
12. प्लेट को सक्रिय करने के लिए उपयोग से पहले 30 मिनट के लिए 80-100° C पर ओवन में रखें। सिलिका जेल परत में मौजूद जल इस चरण में हटा दिया जाता है, जिससे छिद्रों का एक जाल बन जाता है, जिसके माध्यम से पृथक्करण के दौरान विलायक आगे बढ़ता जाता है।

### 5.4.3 नमूना अनुप्रयोग (Sample Application)

13. एक उपयुक्त विलायक (90% v/v एसीटोन) में तैयार किए गए वर्णक अर्क को लें।

14. सक्रिय TLC प्लेट को एक सफेद कागज पर क्षैतिज रूप से रखें, जिस पर एक तरफ से लगभग 1 सेमी दूरी पर आधार रेखा चिह्नित हो। इससे TLC प्लेट पर एक सीधी क्षैतिज रेखा में नमूना लगाने में मदद मिलेगी।
15. नमूना अनुप्रयोग के लिए, एक कांच केशिका नलिका लें और एक छोर के साथ वर्णक अर्क को स्पर्श करें ताकि अर्क की थोड़ी मात्रा केशिका में बढ़ जाए।
16. हल्का सा प्लेट पर लाइन के एक बिंदु पर केशिका के छोर को स्पर्श करें। विलायक को वाष्पित होने के लिए कुछ सेकंड के लिए प्रतीक्षा करें और पुनः उसी स्थान पर संकेंद्रित करने के लिए और अधिक नमूना लगाएँ जिससे जाँच में मदद मिले।
17. क्षैतिज रेखा पर बिन्दुओं को समान रूप से फैलाकर अधिक नमूने उपयोग किए जा सकते हैं।
18. उसी प्रकार वर्णलेखी कागज़ ले और उसके एक शिरे पर 1 cm ऊपर हल्की पेंसिल से आधार रेखा बनाएं। रेखा पर छोटे बिन्दु बना लें जहां नमूना लगाना हो (चित्र 5.1b) क्रम संख्या 15–17 दोहराएँ।



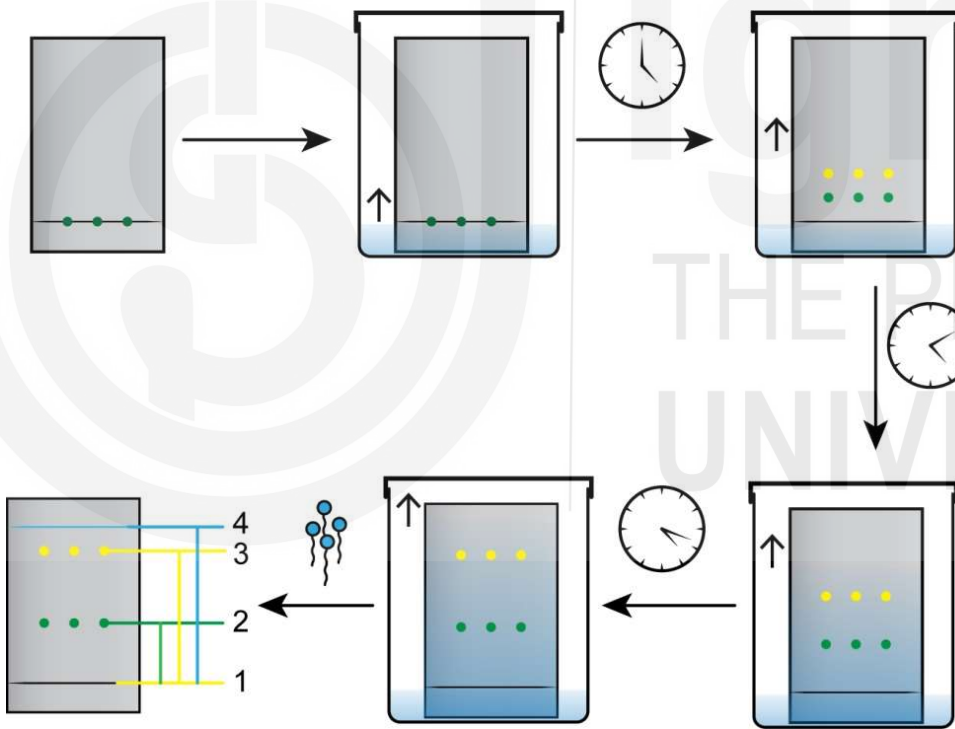
चित्र 5.1 : a) पतली परत / तनुस्तर वर्णलेखिकी और b) कागज वर्णलेखिकी के लिए प्रायोगिक रूपरचना।

#### 5.4.4 विलायक प्रणाली की तैयारी (Preparation of Solvent System)

19. 100: 10: 0.25 (v / v / v) अनुपात में पेट्रोलियम ईथर, आइसोप्रोपेनॉल और जल को लेकर विलायक प्रणाली बनाएं और उसे अच्छी तरह से गोल घुमाते हुए मिलाएं।
20. एक TLC टंकी/जार लें और इस विलायक प्रणाली की पर्याप्त मात्रा डालें ताकि तल से लगभग 1 सेमी की ऊंचाई तक वह भर जाये।
21. कांच की फलक से जार को ढके और इसे विलायक प्रणाली के वाष्प के साथ संतृप्त होने के लिए छोड़ दें।

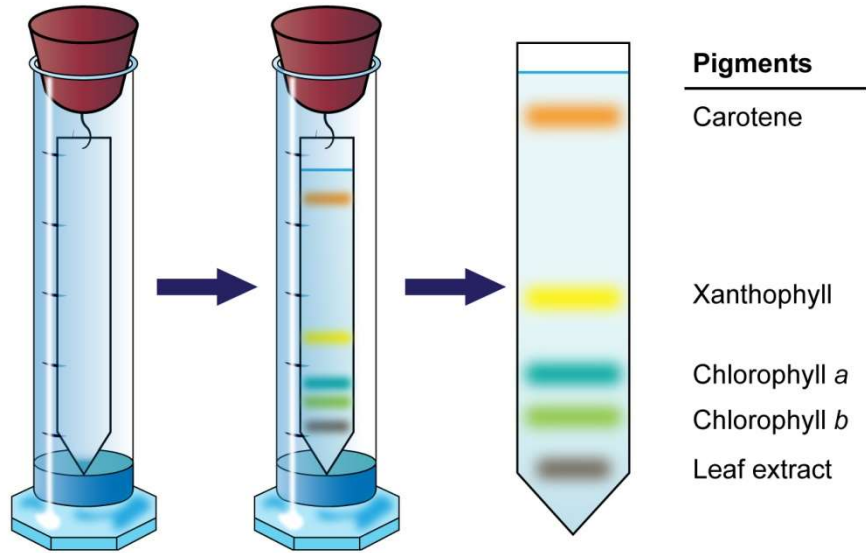
### 5.4.5 वर्णलेख की क्रमागत उन्नति (Development of Chromatogram)

22. TLC प्लेट, जिस पर नमूना लगाया गया था उसे TLC टंकी में लंबवत रूप से रखें ताकि निचला भाग विलायक प्रणाली में डूबा हुआ हो और जिस रेखा पर नमूना लगाया गया था वह विलायक प्रणाली की सतह के ऊपर बनी रहे। TLC टंकी की दीवार के सहारे इस स्थिति में प्लेट को छोड़ दें। फिर से कांच की फलक/प्लेट के साथ TLC टंकी को ढकें और इसे क्रमागत उन्नति के लिए छोड़ दें।
23. विलायक केशिक क्रिया (capillary action) द्वारा सक्रिय प्लेट पर लंबवत बढ़ेगा। विलायक प्रणाली के विभिन्न घटकों में अलग-अलग गतिशीलता होगी। भौतिक-रासायनिक गुणों के आधार पर प्रत्येक वर्णक विलायक प्रणाली के एक विशेष घटक में विभाजित (रहना चाहता है) होगा, और इसलिए प्लेट क्रमागत उन्नति के दौरान विभिन्न ऊंचाइयों तक बढ़ जाएगा। यही TLC में पृथक्करण का आधार है और इसी कारण से TLC को विभाजन वर्णलेखिकी भी कहा जाता है (चित्र 5.2)।



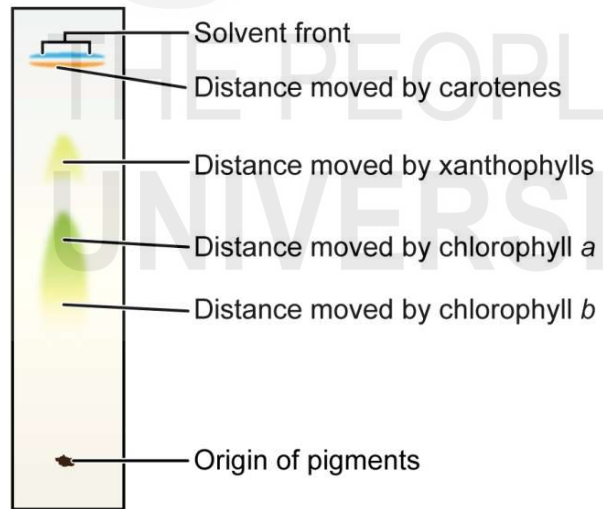
चित्र 5.2 : पतली परत वर्णलेखिकी के दौरान वर्णलेखी की क्रमागत उन्नति।

24. TLC प्लेट के ऊपर से लगभग 1.0 cm की दूर पर जब विलायक हो तब टंकी से TLC प्लेट निकालें।
25. एक पेंसिल से विलायक के अग्र भाग (विलायक द्वारा सबसे अधिक तय की गयी दूरी) को चिह्नित करें, इससे पहले कि विलायक वाष्पीकृत और अदृश्य हो जायें।
26. आप विलायक गति की दिशा में विशेष वर्णकों के धम्बों को देख पाएंगे। प्रत्येक धम्बों के केंद्र को चिह्नित करें ताकि प्रत्येक धम्बों की दूरी, मूल धम्बे जहां नमूना शुरू में उपयोग किया गया था (मूल) को मापा जा सके (चित्र 5.3)।



चित्र 5.3 : वर्णलेखिकी के दौरान वर्णलेख के क्रमागत विकास का चित्रण।

27. अब विलायक के अग्र भाग की दूरी और मूल से प्रत्येक धब्बे के केंद्र को मापें।
28. आपका कागज वर्णलेखी कुछ इस तरह से दिखेगा (चित्र 5.4)। साथ ही आप TLC प्लेट की फोटो खींच कर भी यहाँ चिपका सकते हैं।



29. सूत्र का उपयोग करके  $R_f$  मान की गणना करें।

## 5.5 अवलोकन और परिणाम

अलग-अलग वर्णको की पहचान उनके  $R_f$  मान की तुलना संदर्भ मानकों से की जाती है। नीचे दिए गए सूत्र का उपयोग करके अलग-अलग प्रकाश संश्लेषक वर्णक के  $R_f$  मान की गणना करें।

$$R_f = \frac{\text{मूल से प्रकाश संश्लेषक वर्णक द्वारा तय की गई दूरी}}{\text{मूल से विलायक द्वारा तय की गई दूरी}}$$

वर्णक	रंग	मानक $R_f$ मान	प्राप्त $R_f$ मान
पर्णहरित ए	नीला-हरा	0.59	
पर्णहरित बी	पीला-हरा	0.42	
कैरोटीन	नारंगी	0.98	
जैथोफिल	पीला	0.35	

## 5.6 सावधानियां

1. विलायक वाष्पीकरण को रोकने के लिए नलिका को ढँक कर रखें।
2. विलायक वाष्पीकरण को रोकने के लिए TLC जार को ढँक कर रखें अन्यथा विलायक प्रणाली की संरचना बदल सकती है।
3. क्रमिक विकसित धब्बों का आकार उचित रूप से बड़ा हो सकता है। वर्णक द्वारा तय की गई दूरी की माप के लिए स्थान के केंद्र बिन्दु को लें।
4. धब्बों को गोल घेरें ताकि भाग की गणना की जा सके। एक धब्बा का भाग वर्णक की मात्रा के सीधे आनुपातिक होता है। इसकी आवश्यकता विशेष वर्णक की प्रचुरता निर्धारित करने के लिए की जाती है।

## 5.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न

1. पादप वर्णकों के बारे में आपके ज्ञान के आधार पर, नमूने में कौन से वर्णक मौजूद होने की संभावना है?
2. किस वर्णक ने सबसे अधिक दूरी तय की और क्यों?
3.  $R_f$  मानों के आधार पर हम यह निष्कर्ष निकाल सकते हैं कि दो भिन्न नमूनों में उपस्थित वर्णक समान हो सकते हैं। समझाइए।
4. स्थिर और गतिशील प्रावस्थाओं का वर्णन कीजिए।
5. कागज और पतली परत/तनुस्तर क्रोमैटोग्राफी के बीच अंतर करें।

# चूहे के यकृत से सूत्रकणिका का पृथक्करण

## प्रयोग की रूपरेखा

- |                        |                          |
|------------------------|--------------------------|
| 6.1 प्रस्तावना         | 6.5 अवलोकन और परिणाम     |
| अपेक्षित अध्ययन परिणाम | 6.6 सावधानियां           |
| 6.2 सिद्धांत           | 6.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न |
| 6.3 आवश्यक सामग्री     |                          |
| 6.4 क्रियाविधि         |                          |

### 6.1 प्रस्तावना

ससीमकेन्द्रकी कोशिका (eukaryotic cell) में प्रत्येक उप-कोशिकीय खंड/कोशिकांग एक विशिष्ट जैवरासायनिक कार्य करता है। पूर्णतया कोशिका की संरचना और कार्य को समझने के लिए उप-कोशिकीय कोशिकांगों की भूमिका को स्पष्ट करना महत्वपूर्ण होता है। किसी कोशिकांग के जैवरासायनिक कार्य को निर्धारित करने का एक तरीका यह है कि अखण्ड कोशिकांग को अलग किया जाए और उसके कार्य का अध्ययन किया जाए। उप-कोशिकीय कोशिकांगों को उनके अखण्ड रूप में अलग करने की प्रक्रिया को उप-कोशिकीय प्रभाजन (sub-cellular fractionation) के रूप में जाना जाता है। उप-कोशिकीय कोशिकांग को अलग करने की विधि पहली बार **अल्बर्ट क्लाउड (Alber Claude)**, **क्रिश्चियन डी ड्यूबे (Christian de Duve)** और उनके सहयोगियों द्वारा 1940 के दशक में विकसित की गई थी। प्रक्रिया में अनिवार्य रूप से दो अलग-अलग चरण शामिल हैं। पहले चरण में, कोशिकाओं को उनकी अंतर्वस्तु (content) को मुक्त करने के लिए अपघटित/विखंडित किया जाता है, और दूसरे चरण में अलग-अलग उप-कोशिकीय कोशिकांगों और कणों को प्रभाजन द्वारा अलग किया जाता है। इस तरह के विधियों से अलग किए गए कोशिकांग अक्सर अन्य कोशिकांगों की उपस्थिति के कारण सम्मिश्रित होते हैं। एंजाइमों की गतिविधियों को परखकर सम्मिश्रण (contaminated) का पता लगाया जाता है, विशेष रूप से उन कोशिकांगों की उपस्थिति का जिन्हें अलग नहीं किया जा रहा हो।

## अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आप को निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- ❖ कोष्ठीकरण अवधारणा की व्याख्या कर सकेंगे;
- ❖ उपकोशिकीय प्रभाजन प्रक्रिया को समझा सकेंगे; और
- ❖ चूहे के यकृत से सूत्रकणिका का पृथक्करण कर सकेंगे।

## 6.2 सिद्धांत

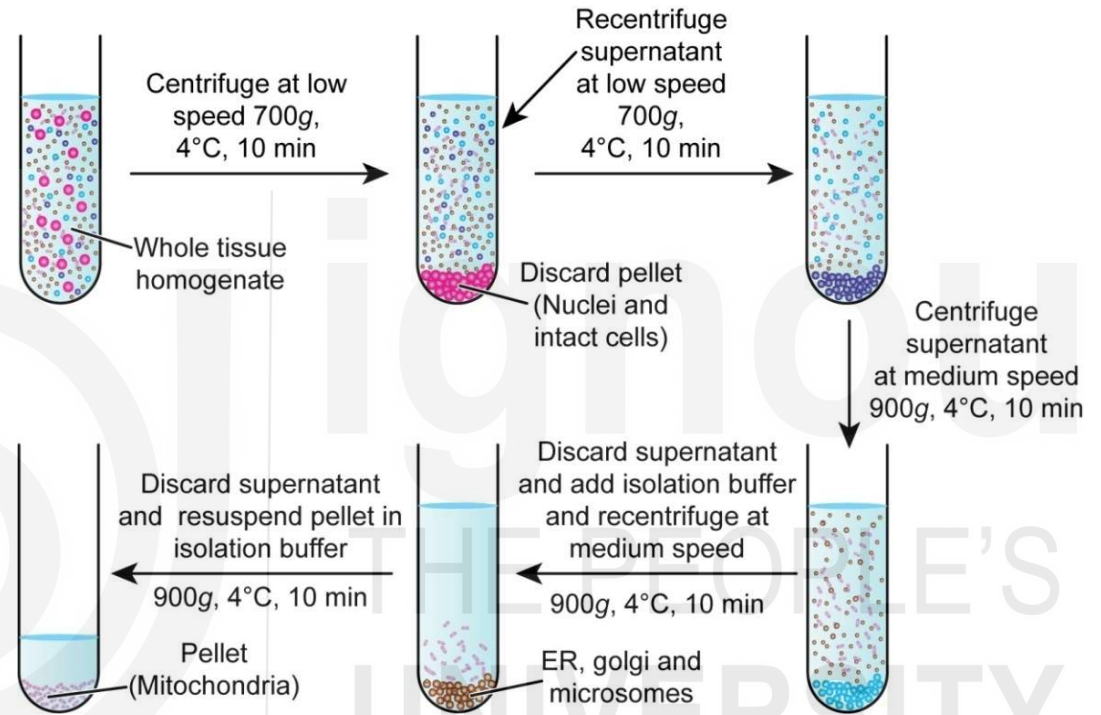
कोशिकाओं से सूत्रकणिका का पृथक्करण विशेषक विभेदी अपकेन्द्रण (differential centrifugation) के सिद्धांत पर आधारित होता है जिसमें उपकोशिकीय घटकों (subcellular components) और कोशिकांगों के विजातीय मिश्रण (heterogeneous mixture) वाले समांगीकृत (homogenate) को प्रचक्रणी (spinning) करना शामिल है। अपकेन्द्रण को प्रत्येक क्रमिक अपकेन्द्रण चरण में, अपकेन्द्री क्षेत्र (centrifugal field) को बढ़ाते हुए चरणबद्ध तरीके से अपकेन्द्रण किया जाता है। पहले अपकेन्द्रण चरण से सबसे बड़े कोशिकांग/घटक अवसादन (sedimentation) में परिणित हो जाते हैं। बाद के अपकेन्द्रण चरण छोटे और लघु घटकों/कोशिकांगों को अवसादित करते हैं इसलिए विभेदी अपकेन्द्रण की तकनीक हमें घटकों को माप (size) के आधार पर अपार्जित समांगीकृत (crude homogenate) को अलग करने की सुविधा देती है। प्रत्येक अपकेन्द्रण चरण से प्राप्त अवसाद (गुटिका) की पहचान विभिन्न उपकोशिकीय कोशिकांगों के चिन्हक एंजाइमों की गतिविधियों को परखकर प्रमाणित की जाती है। चिन्हक एंजाइम गतिविधियों को परखकर भी सामग्री की शुद्धता का पता लगाया जा सकता है। उदाहरण के लिए, एक शुद्ध सूत्रकणिकीय सामग्री में उच्च SDH क्रियाशीलता का प्रदर्शन होना चाहिए, लेकिन इसमें अन्य उप-कोशिकीय कोशिकांग के चिन्हक एंजाइम की गतिविधियों का प्रदर्शन नहीं होना चाहिए। आप SDH की क्रियाशीलता की परख अगले प्रयोग में करेंगे।

## 6.3 आवश्यक सामग्री

1. चूहे का ताजा यकृत
2. पॉटर-एल्वेजेम समांगित (Potter-Elvehjem homogenizer)
3. अपकेंद्रित मशीन
4. स्पेक्ट्रोमी प्रकाशमापी/वर्णमापी
5. अभिकर्मक :
  - क) लवणयुक्त घोल : 0.9% (w/v) NaCl विलयन
  - ख) पृथक्करण उभयरोधी घोल (buffer) : 0.25 M सुक्रोज, 5 mM HEPES उभयरोधी घोल, pH 7.2, और 1 mM EDTA

## 6.4 क्रियाविधि

1. एक चूहे से यकृत को बाहर निकालें, इसे 0.9% ठंडे लवणयुक्त घोल के साथ धोएं। यकृत को तौलें और लगभग 4 ग्राम यकृत उतक ले लें।
2. तेज ब्लेड की मदद से इसे छोटे टुकड़ों में काट लें। यह कार्य बहुत ठंडे परिस्थितियों (ice cold) में करें।
3. कटे हुए यकृत में 20ml पृथक्करण उभयरोधी (isolation buffer) घोल डालें, और इसे एक पूर्व शीतित पॉटर-एल्वेजेम समागित का उपयोग करके समांगिकृत (homogenize) करें।



चित्र 6.1 : यकृत से सूत्रकणिका पृथक्करण का आरेखीय प्रदर्शन।

4. 4°C तथा 700 g पर 10 मिनट के लिए एक प्रशीतित अपकेंद्रित्र में समांगिकृत को अपकेंद्रित करें।
5. छूसरे साफ अपकेंद्रित नालिका में अधिप्लवी (supernatant) को निकाल लें और गुटिका (pellet) को फेंक दें। जिससे बड़े उतक टुकड़े, कोशिका अवशेष और केन्द्रक हैं (चित्र 6.1)।
6. अधिप्लवी लें और इसे 4°C पर 10 मिनट के लिए 700 g पर पुनः अपकेंद्रित करें। यह चरण यह सुनिश्चित करता है कि सभी अवांछित पदार्थ, जैसे बड़े उतक टुकड़े, कोशिका अवशेष और केन्द्रक, पूरी तरह से हटा दिए गये हैं।
7. एक साफ पूर्व शीतित अपकेंद्रित नालिका में सावधानी पूर्वक अधिप्लवी लें और 4°C पर 10 मिनट के लिए 9000 g पर अपकेंद्रित करें।
8. अधिप्लवी और गुटिका की ढीली ऊपरी परत को सावधानी पूर्वक आहिस्ता करके फेंक दें।

9. 15 ml पृथक्करण उभयरोधी घोल में गुटिका को पुनः (washing step) धो लें और 4°C पर 10 मिनट के लिए 9000 g पर अपकेंद्रित करें। इसे धुलाई चरण कहते हैं। पुनः अधिप्लवी और गुटिका की सतह पर उपस्थित अधिप्लवी की ढीली ऊपरी परत को फेंक दें।
10. गुटिका को ले लें और पृथक्करण उभयरोधी घोल की न्यूनतम संभव मात्रा में इसे पुनः धो लें। यह आपकी सूत्रकणिका सामग्री है जिसे सक्सिनेट डिहाइड्रोजिनेज क्रियाशीलता के परख के लिए उपयोग किया जाना है।

## 6.5 अवलोकन और परिणाम

पृथक्करण उभयरोधी घोल में घुली हुयी गुटिका प्राप्त होती है जिसका उपयोग सक्सिनेट डिहाइड्रोजिनेज की क्रियाशीलता को परखने के लिए किया जायेगा।

## 6.6 सावधानियां

1. प्रयोग के लिए चूहे के ताजा यकृत/जिगर के ऊतकों का उपयोग किया जाना चाहिए।
2. ऊतक का समांगीकरण/समरूपीकरण ठीक से किया जाना चाहिए।
3. सूत्रकणिका के अलगाव के दौरान, तापमान 4 डिग्री सेल्सियस पर बनाए रखा जाना चाहिए।
4. निष्कर्षण उभयरोधी/बफर का पीएच 7.4 पर तय किया जाना चाहिए।
5. अपकेंद्रण से पहले गुटिका मिश्रण कोमल होना चाहिए।
6. परख के लिए न्यूनतम संभव पृथक्करण उभयरोधी घोल में फिर से गुटिका को घोलना चाहिए।

## 6.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न

1. अपकेंद्रण को परिभाषित कीजिए।
2. विभेदी अपकेंद्रण (डिफरेंशियल सेंट्रीफ्यूगेशन) क्या है?
3. समांगीकरण/समरूपीकरण क्या है?
4. कोशिका में कोष्ठीकरण/कंपार्टमेंटलाइजेशन का क्या महत्त्व है?

## सूत्रकणिकीय चिन्हक किण्वक सक्सिनेट डिहाइड्रोजिनेस की क्रियाशीलता की परख

### प्रयोग की रूपरेखा

7.1 प्रस्तावना	7.4 क्रियाविधि
अपेक्षित अध्ययन परिणाम	7.5 अवलोकन और परिणाम
7.2 सिद्धांत	7.6 सावधानियां
7.3 आवश्यक सामग्री	7.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न

### 7.1 प्रस्तावना

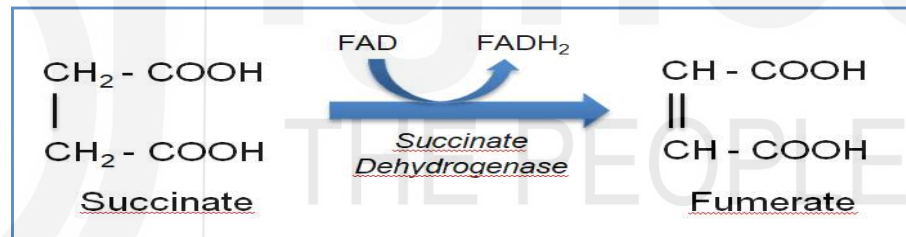
एक आणविक चिन्हक (जैव चिन्हक) किसी जीव से लिए गए नमूने में मौजूद अणु होता है। पृथक किए गए अंशों की शुद्धता का निर्धारण करने के लिए दो प्रकार के चिन्हक (marker) का उपयोग किया जाता है : आकृतिक (morphological) और जैव रासायनिक (biochemical)। पृथक किए गये खंड की सूक्ष्मदर्शीय परीक्षण द्वारा आकृतिक चिन्हक की जाच की जाती है। जैव रासायनिक चिन्हक, जैसे चिन्हक किण्वक/एंजाइम को अलग किये गये खंड में एंजाइम की क्रियाशीलता की परख द्वारा परीक्षण किया जाता है। दूसरे शब्दों में, चिन्हक एंजाइम विशिष्ट रूप से और विशेष रूप से किसी विशेष अंतराकोशकीय खंड से जुड़े होते हैं, और इसका उपयोग उस विशिष्ट उपकोशकीय घटक की उपस्थिति का पता लगाने के लिए किया जा सकता है। पौधों और जानवरों की कोशिकाओं के कुछ उप-कोशकीय कोशिकांगों के चिन्हक एंजाइम निम्नलिखित तालिका में दिए गए हैं।

तालिका 7.1 : विभिन्न कोशिकांगों के लिए उपयोग किए जाने वाले जैव रासायनिक चिन्हक।

कोशिकांग	चिन्हक एंजाइम/किण्वक	
	वनस्पति कोशिका	पशु कोशिका
केन्द्रक	NADP पायरोफॉस्फोराइलेज	NADP पायरोफॉस्फोराइलेज

हरितलवक	राइबुलोज-1,5-बिस्फॉस्फेट कार्बोक्सिलेज	....
सूत्रकणिका (Mitochondria)	सक्सिनेट डिहाइड्रोजिनेस, साइटोक्रोम c ऑक्सीडेज	सक्सिनेट डिहाइड्रोजिनेस साइटोक्रोम c ऑक्सीडेज
परॉक्सिसोम	कैटलेज, डी-अमिनो एसिड ऑक्सीडेज	कैटलेज डी-अमिनो एसिड ऑक्सीडेज
रसधानी (Vacuoles)	राइबोन्यूक्लियोज, फॉस्फोडाइएस्टरेज	-
लाइसोसोम	..	एसिड फॉस्फेटेज

सक्सिनेट डिहाइड्रोजिनेस (SDH) या सक्सिनेट-कोएंजाइम क्यू रिडक्टेज या श्वसन संकुल II एक किण्वक संकुल है जो कई बैक्टीरियाई कोशिकाओं और ससीमकेन्द्रीयों में पाया जाता है। यह एकमात्र किण्वक है जो साइट्रिक अम्ल चक्र और इलैक्ट्रान अभिगमन श्रृंखला दोनों में भाग लेता है और सूत्रकणिका के लिए चिन्हक एंजाइम है। यह आंतरिक सूत्रकणिका झिल्ली में अवस्थित होता है, और TCA चक्र में भाग लेता है। इसलिए इसे सूत्रकणिकीय चिन्हक किण्वक भी कहते हैं। यह कोफैक्टर FAD से दृढ़ता से जुड़ा हुआ होता है और निम्नलिखित अभिक्रिया को उत्प्रेरित करता है।



## अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

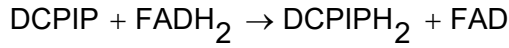
- ❖ चिन्हक और इसके महत्व की व्याख्या कर सकें; और
- ❖ सक्सिनेट डिहाइड्रोजिनेस (SDH) की क्रियाशीलता की परख कर सकें।

## 7.2 सिद्धांत

विभेदी अपकेन्द्रण (डिफरेंशियल सेंट्रीफ्यूगेशन) की तकनीक हमें अपरिष्कृत समांगीकृत घटकों का आकार के आधार पर प्रभाजन करने की अनुमति देती है। हालांकि, प्रत्येक अपकेन्द्रण चरण से प्राप्त तलछट गुटिका की पहचान विभिन्न उपकोशिकीय कोशकांग के चिन्हक एंजाइमों की क्रियाशीलता को परखकर स्थापित की जाती है। चिन्हक किण्वक की क्रियाशीलता परखकर सामग्री की शुद्धता का भी पता लगाया जा सकता है। उदाहरण के लिए, एक शुद्ध माइटोकॉन्ड्रियाई सामग्री में उच्च एसडीएच (SDH) क्रियाशीलता प्रदर्शित होनी चाहिए, लेकिन इसमें अन्य किण्वक की क्रियाशीलता प्रदर्शित नहीं होनी चाहिए जो अन्य उप-कोशिकीय कोशिकांग के चिन्हक हैं।

एंजाइम क्रियाशीलता को मापने का उद्देश्य आम तौर पर एंजाइम की उपस्थिति या अनुपस्थिति की जांच करना या परिभाषित परिस्थितियों में मौजूद एंजाइम की मात्रा निर्धारित करना है, ताकि नमूनों के बीच गतिविधि की तुलना की जा सके।

इस प्रयोग में SDH की गतिविधि की परख नीले रंग के रंजक डाइक्लोरोफीनॉल इंडोफीनॉल की उपस्थिति में किया जाता है। यदि सक्सिनेट डिहाइड्रोजिनेज सक्रिय है तो FADH<sub>2</sub> का उत्पादन होगा, जो बदले में DCPIP को अपचयित करेगा। अपचयित DCPIP रंगहीन है, और DCPIP अपचयन की दर, जो SDH क्रियाशीलता गतिविधि के आनुपातिक होगी, स्पेक्ट्रोमी प्रकाशमापी द्वारा मापी जा सकती है।



(Oxidised) (Reduced)

(Blue) (Colorless)

यह वर्तमान वर्णमिति परख (colorimetric assay) का आधार बनता है। एंजाइड को DCPIP के बजाय इलेक्ट्रॉन अभिगमन श्रृंखला में आगे इलेक्ट्रॉनों के प्रवाह को अवरुद्ध करने के लिए डाला जाता है।

### 7.3 आवश्यक सामग्री

1. पृथक किया हुआ सूत्रकणिकीय खंड/अंश
2. अपकेंद्रित मशीन
3. परख नलिका
4. स्पेक्ट्रोमी प्रकाशमापी/वर्णमापी
5. अभिकर्मक :
  - क) पृथक्करण उभयरोधी घोल (buffer) : 0.25 M सुक्रोज, 5 mM HEPES उभयरोधी घोल, pH 7-2, और 1 mM EDTA ।
  - ख) NaOH के साथ pH 7.2 में अनुकूलित 120 mM सोडियम सक्सिनेट विलयन
  - ग) पृथक्करण उभयरोधी घोल में बनाया गया 200 mM सोडियम एंजाइड विलयन
  - घ) आसुत जल में बनाया गया 1 mg/ml DCPIP

### 7.4 क्रियाविधि

1. स्पेक्ट्रोमी प्रकाशमापी/वर्णमापी को 600 nm के तरंग दैर्घ्य पर सेट करें।
2. संदर्भ के रूप में पृथक्करण उभयरोधी घोल का उपयोग करके शून्य नियमित करें (जिसे रिक्त भी कहा जाता है)।

किण्वक/एंजाइम क्रियाशीलता की एस. आई (SI) इकाई (katal) कैटल है जो क्रियाधार के 9 मोल प्रति सेकंड के परिवर्तन को दर्शाता है

1 U = 1 μ मोल/मि.

1 कैटल = 1 मोल/सेकंड

किसी भी स्पेक्ट्रोफोटोमेट्रिक आधारित परख में इकाइयों की गणना करने के लिए, बीयर के नियम का उपयोग किया जाता है :

जहाँ  $A$  = अवशोषण ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),

$b$  = नलिका की तय दूरी (1 cm),

$c$  = अवशोषण करने वाली प्रजाती की सांद्रता (M), और

$\epsilon$  = मोल (ग्राम अणुक) विलुप्ति गुणांक

3. एक परखनली लें और इसमें 2.5 ml पृथक्करण उभयरोधी घोल, 0.1 ml सोडियम एजाइड विलयन, 0.1 ml DCPIP विलयन डालें और अच्छी तरह मिलाएँ।
4. फिर 0.2 ml समांगीकृत डालें, तुरंत मिलायें, और इसे एक क्युवेट में स्थानांतरित करें, तथा हर 30 सेकंड में OD (अवशोषण) को अंतर्जात (endogenous) क्रियाशीलता के लिए दर्ज करें। यह आधारी गतिविध को दर्शाता है जो बहिर्जात रूप (exogenously) से डाले गए क्रियाधार/सब्सट्रेट की अनुपस्थिति में हैं।
5. अब 0.1 ml सोडियम सक्सिनेट (क्रियाधार/सब्सट्रेट) विलयन डालें, तुरंत मिलाएं और 10 मिनट के लिए हर 30 सेकंड में अवशोषण को मापें।
6. अवशोषण बनाम समय को प्लॉट करें और औसत ढलान निर्धारित करें।

## 7.5 अवलोकन और परिणाम

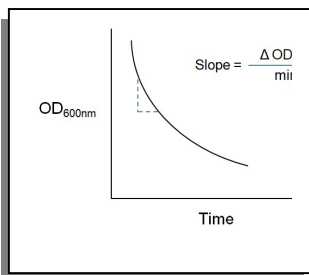
हर 30 सेकंड पर अवशोषण को नीचे दिए गए तालिका में दर्ज करें :

अभिकर्मक		600 nm पर अवशोषण (ओ.डी) (समय मिनट में)								
क्रिया धार से पहले	समय	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
	OD									
	समय	5.5	6.0	6.5	7.0	8.0	8.5	9.5	9.5	1.0
	OD									
क्रिया धार डालने के बाद	समय	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
	OD									
	समय	5.5	6.0	6.5	7.0	8.0	8.5	9.5	9.5	1.0
	OD									

**गणना :**

आपको अपने परख में प्राप्त उत्पाद के अवशोषण को मानक उत्पाद वक्र के साथ सहसंबंधित करने की आवश्यकता होती है। अपने (मानक वक्र) से  $Y=mx+C$  का उपयोग करके, आपको माइक्रो ग्राम में गठित उत्पाद की सांद्रता (अपचायित डीसीपीआईपी जो इस मामले में रंगहीन है) या बचे हुए क्रियाधार की जाँच करने की आवश्यकता है।

OD बनाम समय प्लॉट करें और औसत ढलान निर्धारित करें।



यदि सक्सेनेट अपचयित डिहाइड्रोजेनेज सक्रिय है, तो  $FADH_2$  का उत्पादन होगा, जो बदले में DCPIP को अपचयित करेगा। अपचयित डीसीपीआईपी रंगहीन होता है, जबकि डीसीपीआईपी (डाक्लोरोफेनॉल इंडोफेनॉल) एक नीले रंग का डाई होता है। जैसा कि उल्लेख किया गया है, डीसीपीआईपी अपचयन की दर एसडीएच क्रियाशीलता के समानुपाती होगी जिसे आपने स्पेक्ट्रमी प्रकाश मापी से दर्ज किया है। अब, सूत्र का उपयोग करके क्रियाशीलता की गणना करें।

**Enzyme activity (units/ml extract) =**

$$\frac{\Delta OD \times \text{Total vol of assay (ml)} \times \text{dilution factor}}{\text{Time of incubation (min)} \times \text{extinction coefficient} \times \text{Vol of enzyme extract (ml)}}$$

यहाँ  $\Delta OD = 600 \text{ nm}$  पर अवशोषण बनाम समय प्लॉट से प्राप्त ढलान है डीसीपीआईपी का  $600 \text{ nm}$  पर मोलर विलुप्ति गुणांक या मोलर अवशोषिकता =  $19.1 \text{ m M}^{-1} \text{ CM}^{-1}$

सम्पूर्ण अभिकर्मक आयतन  $3 \text{ ml}$  है

$$\begin{aligned} \text{तनुता गुणांक} &= \frac{\text{कुल आयतन का योग}}{\text{समांगीकृत का आयतन}} \\ &= 3/0.2 = 15 \text{ गुणां} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{अतः SDH क्रियाशीलता} &= \frac{\Delta OD \times 3 \times 15}{10 \times 19.1 \times 0.2} \\ &\text{यूनिट / ml अर्क।} \end{aligned}$$

**7.6 सावधानियां**

1. सामग्री को प्रयोगशाला बेंच पर कोमल घुमाव के साथ फिर से घोला जाना चाहिए।
2. एंजाइम को  $-20^\circ\text{C}$  पर संग्रहित किया जाना चाहिए।
3. अवशोषण की माप में किसी भी देरी से बचने के लिए स्पेक्ट्रमी प्रकाश मापी को पहले से चालू करें।
4. एंजाइम तब ही डालें जब आप घड़ी शुरू कर मान दर्ज करने को तैयार हों।

मोलर विलुप्ति होने का गुणांक (ε) या मोलर अवशोषकता इस बात का माप है कि एक रासायनिक प्रजाति या पदार्थ किसी विशेष तरंग दैर्ध्य पर प्रकाश को कितनी दृढ़ता से अवशोषित करता है। यह रासायनिक प्रजातियों का एक आंतरिक गुण है जो उनकी रासायनिक संयोजन और संरचना पर निर्भर है।

**7.7 स्व-मुल्यांकन प्रश्न**

1. एंजाइम गतिविधि को परिभाषित करें।
2. मोलर विलुप्ति गुणांक क्या है?
3. चिह्नक किण्वक/मार्कर एंजाइम का क्या महत्त्व है?
4. SDH की क्रियाशीलता की परख के लिए कौन सी डाई/रंजक प्रयोग की जाती है।

## अन्य सुझायी गई पुस्तकें

---

1. An Introduction to Practical Biochemistry by David T. Plummer (Third Edition).
2. Laboratory Manual of Microbiology, Biochemistry and Molecular Biology by Jyoti Saxena, Mamta Baunthiyal and Indu Devi (Scientific Publishers, INDIA).
3. Mohandas, N. & Gallagher, P. G. Red Cell Membrane: Past, Present, and Future. Blood. 112, 3939–3948 (2008).

