इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय
विज्ञान विद्यापीठ

BBCCL-106

प्रोटीन

अभ्यास 1

पराबैंगनी (UV) स्पेक्ट्रोस्कोपीविधि का उपयोग करके प्रोटीन नमूने की सान्द्रता निर्धारण करना

अभ्यास 2

बाइयूरेट विधि से दिये गए प्रोटीन की सांद्रता सुनिश्चित करना

अभ्यास 3

लोरी विधि द्वारा प्रोटीन की मात्रा का निर्धारण

अभ्यास 4

ब्रैडफोर्डविधि द्वारा प्रोटीन सांद्रता की वधारणा रूपरेखा

अभ्यास 5

अवक्षेपण (pH) विधि द्वारा दूध से सिनका अलगाव

अभ्यास 6

अमोनियम सल्फेट प्रभाजन विधि द्वारा सीरम प्रोटीन का पृथक्करण

अभ्यास 7

कागज़ वैद्युतकणसंचलन के उपयोग से सीरमप्रोटीनपृथक्करण

अभ्यास 8

सोडियम डोडेसिल सल्फेट (एसडीईएस) पॉलीए क्रिलामाइड जेल वैद्युत कण संचलन (SDS&PAGE) के उपयोग से प्रोटीन का पृथक्करण

पाठ्यक्रम रचना समिति (Course Design Committee)

प्रोफेसर बेचन शर्मा जैवरसायन विभाग इलाहाबाद विश्वविद्यालय	प्रोफेसर रंजीत कुमार मिश्रा जैव रसायन विभाग लखनऊ विश्वविद्यालय	संकाय सदस्य (Faculty members)
प्रोफेसर रीना गुप्ता जैव प्रौद्योगिकी विभाग एच.पी. विश्वविद्यालय, शिमला	प्रोफेसर संजीव पुरी जैवचिकित्सकीय विभाग यू.आई.ई.टी., पंजाब विश्वविद्यालय	डॉ. प्रवेश बब्बर, सह–आचार्य, एस.ओ.एस., इग्नू
प्रोफेसर डी.वी. देवराजू जैवरसायन विभाग बंगलौर विश्वविद्यालय	प्रोफेसर सिमी फरहत बशीर जैवविज्ञान विभाग जामिया मिलिया इस्लामिया विश्वविद्यालय	डॉ.एम.अब्दुल करीम 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. अरविंद कुमार शाक्या, सहायक आचार्य, एस.ओ. एस., इग्नू
डॉ. सुनीता जोशी जैवरसायन विभाग दौलत राम कॉलेज दिल्ली विश्वविद्यालय		डॉ. मनीषा पाण्डेय, सहायक आचार्य, एस.ओ. एस., इग्नू
		डॉ. सीमा कालरा, सहायक आचार्य, एस.ओ. एस., इग्नू

बी.एस.सी. (प्रतिष्ठा) जैव रसायन कार्यक्रम विशेषज्ञ समिति के सुझावों के आधार पर यू.जी.सी. –सी.बी.सी.एस. के तहत रूपांकित किया गया है।

खंड तैयारी समूह

प्रोफेसर बीधू शशीधर राव, (सेवामुक्त) सामग्री संपादक जैवरसायन विभाग, विज्ञान विद्यापीठ विश्वविद्यालय, ओसमानिया विश्वविद्यालय? हैदराबाद–500 007, तेलंगाना	डॉ. कामेशवर शर्मा (प्रयोग 1 से 8 के लिए सामग्री लेखक) सह–आचार्य, जैव रसायन श्री वेंकटेश्वर विश्वविद्यालय, (दिल्ली विश्वविद्यालय) डॉ. तारकेश्वर, सह–आचार्य, केंद्रीय विश्वविद्यालय, हिमाचलय प्रदेश (अनुवादक)

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

प्रिंट प्रोडक्शन समूह

श्री सुनील कुमार — एस.ओ.(प्रिंटिंग), इग्नू

श्री राजीव गिरधर — सहायक कुलसचिव (प्रकाशन)

श्री हेमंत — एस.ओ. (Pub.) एम.पी.डी.डी., इग्नू

खण्ड प्रस्तुतिकरण
श्री सुनील कुमार
सहायक कुलसचिव (प्रकाशन)

श्री सुमित वर्मा
आभार ग्राफिक्स और शब्द प्रक्रमण

एस ओ एस, इग्न

मार्च, 2020

इन्दिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय, 2020

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।

लेजर टाइपसेटः राजश्री कम्प्यूटर्स, (निकट सेक्टर 2, द्वारका), वी–166ए, भगवती विहार, उत्तम नगर, नई दिल्ली – 110059

मुद्रण हुआ

BBCCL-106 प्रोटीन

प्रिय ि”ाक्षार्थियों प्रोटीन के प्रयोगशाला पाठ्यक्रम में आपका स्वागत है। इस प्रयोगशाला पाठ्यक्रम में दिए गए अभ्यास और प्रयोग उन इकाइयों पर आधारित हैं जिनका आपने BBCCT-105 पाठ्यक्रम में अध्ययन किया है। इस प्रयोगशाला पाठ्यक्रम के दौरान प्रोटीन (BBCCT-105) के पाठ्यक्रम में आपने जिन अवधारणाओं का अध्ययन किया है, वे प्रदर्शन और अनुभवी होंगे।

यह प्रयोगशाला पाठ्यक्रम 2 क्रेडिट का है और इसमें आठ प्रयोगशाला प्रयोग हैं। प्रयोगों को इस तरह से योजना किया गया है आप पराबैंगीन अवशोषण और बाइयूरेट विधि का उपयोग करके प्रोटीन का अनुमान कि प्रदर्शन करेंगे। इसके अलावा, अन्य दो लोकप्रिय तरीकों लोरी और ब्रैडफोर्ड विधि को शामिल किया गया है।

चूंकि आपने प्रोटीन के पाठ्यक्रम में प्रोटीन के निष्कर्षण, अलगाव और विश्लेषण के बारे में अध्ययन किया है, इसलिए आप समविभव बिन्दु ( ) विधि का उपयोग करके दूध से कैसिन के अलगाव का प्रदर्शन करेंगे। इसके अलावा आप सीरम प्रोटीन के अमोनियम सल्फेट अंश का प्रदर्शन करेंगे जिसके माध्यम से आप निष्कर्षण के बाद प्रोटीन के नमूने को सान्द्र करना सीखेंगे।

अंतिम दो प्रयोगों को इस तरह से योजना किया गया है कि, वे आपके कागज वैद्युत संचलन और एसडीएस–पेज का उपयोग करके सीरम प्रोटीन को अलग करने के तरीके पर अनुभव प्रदान करेंगे।

संभावित अध्ययन परिणाम

- ❖ विभिन्न प्रकार के सिद्धांतों और उपलब्धर प्रक्रियाओं को जानेंगे।
- ❖ प्रोटीन के अलगाव कौशल प्रदान पाएंगे;
- ❖ प्रोटीन अंश प्रक्रिया के साथ सक्षम होंगे;
- ❖ निष्कर्षण, अलगाव और जुदाई तकनीकों के बीच अंतर कर पाएंगे; और
- ❖ वैद्युत कण संचलन का उपयोग कर के प्रोटीन के अलगाव प्रदर्शन कर पाएंगे।

अध्ययन गाइड (निर्देश)

हम आपको प्रयोग”ााला में भाग लेने के लिए आने से पहले BBCCT-105 के संबंधित खण्डों के अध्ययन की सलाह देते हैं। इससे आप प्रयोग करने के उद्दे”य और उनके अनुप्रयोगों को आसानी से समझ सकेंगे। प्रयोग करना शुरू करने से पहले आपको प्रक्रिया के साथ–साथ इस पाठ्यक्रम के प्रत्येक प्रयोग के सिद्धांतों को भी पढ़ना चाहिए। सभी अभिकर्मकों को ताजा तैयार करें और उन्हें पूर्वनियोजित भंडाण स्थितियों के तहत स्टोर करना हमे”ाा अच्छा होता है। सभी सुरक्षा उपायों का पालन करें और अभिकर्मकों को संभालते समय सुरक्षा निर्दे”ाों का पालन करें।

संभावित अध्ययन परिणाम

अच्छी प्रयोग”ााला प्रथाओं कुछ ऐसे है कि अपनी लॉग बुक को आप ठीक से यानी प्रयोगों को करते समय की गई प्रेक्षण को दर्ज हमे”ाा करना चाहिए। प्रयोग”ााला सत्रों के दौरान इस प्रयोग”ााला मैनुअल और अपनी लॉग बुक साथ रखिये।

इं.गां.रा.मु.वि. के अन्य सभी प्रयोग”ााला पाठ्यक्रमों की भांति यह पाठ्यक्रम भी एक गहन आवासीय अभ्यास है जिसे पूरा करने में एक सप्ताह लगेगा। प्रति दिन चार–चार घंटे के दो प्रयोग”ााला सत्र होंगे। इस प्रकार कुल 14 सत्र बनेंगे। पहला सत्र परिचयात्मक होगा तथा शेष 2 से लेकर 12 वें तक के सत्र पाठ्क्रम में दिए गए अभ्यासों पर आधारित होंगे।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

प्रयोग”ाला अभ्यासों की कार्य–योजना आपको सत्र में ही दे दी जाएगी। सत्र 1 से 12 शैक्षिक पराम”ादाता के निर्दे”ान में किए जाने वाले अभ्यास होंगे। प्रत्येक सत्र में आप तीन घंटों में अभ्यास करेंगे तथा शेष एक घंटा अपनी प्रयोग”ाला लॉग–बुक को पूरा करने के लिए होगा।

अंतिम दो सत्र यानी 13 और 14 अनिर्दे”ित सत्र होंगे जिनमें सत्रांत परीक्षा होगी। जैसा कि आपको मालूम ही होगा प्रयोग”ाला नि”िचत समय के लिए ही उपलब्ध होती है, अतः ज़रूरी है कि आप से कोई भी प्रयोग”ाला सत्र छूट न जाए। आपके कार्य का प्रतिदिन मूल्यांकन किया जाएगा और अंतिम दिन आपकी सत्रांत परीक्षा ली जाएगी। इस परीक्षा में आपको उत्तीर्ण होना अनिवार्य होगा।

प्रयोगों का मूल्यांकन वर्गीकृत किया जाएगा और आपको व्यावहारिक सत्र के अंत में मौखिक परीक्षण के लिए प्रदर्”ित होना होगा। प्रयोग”ाला सत्र के अंत में आपको सौंपा गया प्रयोग करना चाहिए, जिसे वर्गीकृत किया जाएगा और प्रयोग”ाला सत्रों के दौरान निरंतर प्रद”ान, लॉग बुक्स के रखरखाव और विवा वोस के बाद रिकॉर्ड के आधार पर अंतिम मूल्यांकन किया जाएगा।

प्रयोग”ाला तंत्र का उपयोग करने के तरीके की बेहतर समझ के लिए कुछ वीडियो लिंक प्रदान किए गए हैं, पाठ्यक्रमों में प्रदान की गई प्रक्रिया की तुलना में वीडियो में समझाए जाने वाले चरणों या प्रक्रिया में थोड़ा अंतर हो सकता है। हालांकि, सिद्धांत एक ही रहते हैं। इसलिए, वीडियो में अपनाए गए प्रक्रिया सं”ाोधनों के बारे में चिंता करने की कोई आव”यकता नहीं है।

हम आपको इस प्रयास में शुभकामनाएँ देते है।

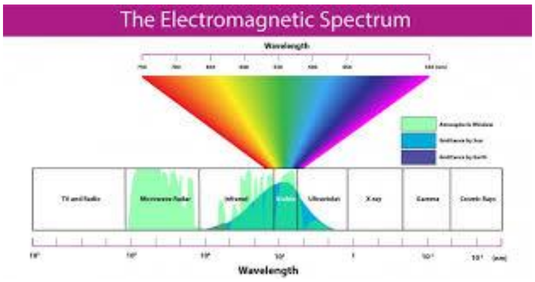
महत्वपूर्ण

अध्ययन केन्द्र में आम तौर पर आयोजित प्रयोग”ाला पाठ्यक्रम कार्य में उपस्थिति अनिवार्य है। 2 क्रेडिट के प्रयोग”ाला पाठ्यक्रम 7 दिनों की अवधि में पूरा होने के लायक है।

- 6 दिन निर्देष प्रयोग”ाला कार्य के लिए
- 1 दिन अनिर्दे”ित प्रयोग”ाला कार्य के लिए

प्रयोग”ाला पाठ्यक्रम को सफलतापूर्वक पूरा करने के लिए आपको निर्दे”ित और अनिर्दे”ित घटकों में अलग से (कम से कम 35ः अंक) पाना होगा।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY



अभ्यास1

पराबैंगनी (UV) स्पेक्ट्रोस्कोपीविधि का उपयोगकरकेप्रोटीननमूने की सान्द्रता निर्धारणकरना

संरचना

1.1 संभावित अध्ययन परिणाम

1.2 सिद्धांत

1.3 आवश्यकसामग्री

1.4 कार्यविधि

1.5 परिणाम

1.6 सावधानियाँ

1.1 प्रस्तावना

किसीदिए गए प्रोटीन के नमूनेमेंप्रोटीन की सांद्रता का निर्धारण करना जैवरसायन प्रायोगशाला में सबसे अधिक प्रदर्शन किए जाने वालेकार्योंमें से एक है। प्रोटीन सान्द्रता का आकलन करने के कईतरह के उपलब्ध हैं जैसेकिः

1. प्रोटीन के हाइड्रोलिसिस के बाद अमीनो के अम्ल का विश्लेषणः
2. प्रोटीन की उपस्थिति में कुछ रंगों के वर्णक्रमीय युगों में परिवर्तन का विश्लेषण, और
3. यूवी क्षेत्र मेंप्रोटीन का स्पेक्ट्रमीप्रकाशमिति ( ) अनुमान।

अंतिमविधि का उपयोग शुद्ध और प्रोटीन के अज्ञात मिश्रण दोनों के लिए प्रोटीन सांद्रता का आकलन करने के लिए कियाजासकता है। यूीव स्पेक्ट्रमी प्रकाशमितिपरिमाणी करणप्रमुख प्रोटीन की शुद्धता के अनुमान के लिए जाना जाता है, क्योंकि यह आसान, कम समय लेने वाला और विश्लेषण के हेतु लिए गए प्रोटीन नमूनों को भविष्य में उपयोग के लिए वापस प्राप्तकिया जासकता है।

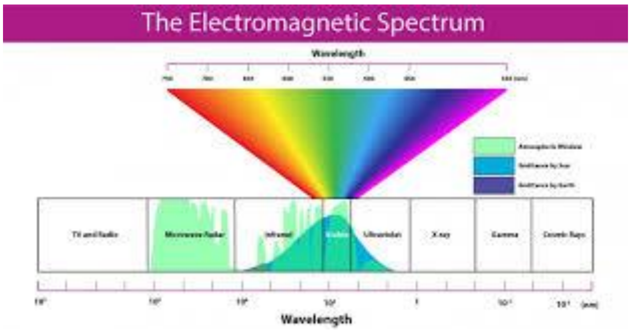
विद्युत–चुम्बकीय विकिरणः

पराबैंगनी विकिरण का अवशोषण, बायोएनालाईट्स (इपवंदसलजमे) के आकलन की एक सामान्य विधिहै, जिसका उपयोग बड़ी संख्या में किया जाता है।~ 10 - 400 **nm** के विद्युतचुम्बकीय विकिरण के क्षेत्र को पराबैंगनी क्षेत्र और पराबैंगनी क्षेत्र के विभिन्नऊर्जा के रूपमें पहचाना जाता है, इसे तीन क्षेत्रों में विभाजित किया जा सकता है (चित्र 1.1):

i. निकट पराबैंगनी क्षेत्र (पराबैंगनी क्षेत्र निकटतम दृश्य क्षेत्र;λ~ 250 - 400 nm)

ii. सुदूर पराबैंगनी क्षेत्र (पराबैंगनी क्षेत्र दृश्य क्षेत्र के आगे;(λ ~ 190 - 250 nm)

iii. निर्वात (vacuum) पराबैंगनी क्षेत्र (λ<190 nm)



चित्र 1.1: विद्युतचुंबकीय स्पेक्ट्रम/विकिरण की ऊर्जा के स्तर का आरेखीय चित्र।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस परीक्षण को करने के बाद, आपः

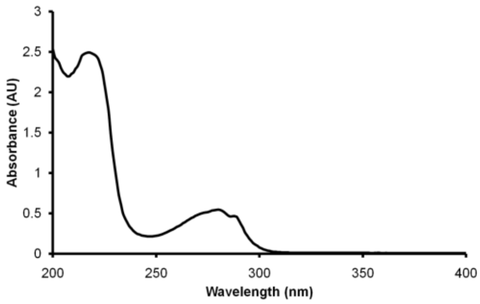
- तरंगदैर्ध्य और अवशोषण के बीच संबंध की व्याख्या कर सकेंगे;
- यू.वी. और दृश्यमान स्पेक्ट्रोफोटोमीटर के कार्य सिद्धांत का वर्णन कर सकेंगे; और
- प्रोटीन सांद्रता के अनुमान के लिए यू.वी. अवशोषण विधि की सीमाओं को सूचीबद्ध कर पाएंगे।

1.2 सिद्धांत

एक घोल में प्रोटीन 280 nm और 200 nm पर अवशोषण अधिकतम के साथ पराबैंगनी प्रकाश को अवशोषित करता है। अवशोषण के अधिकतम 280 nm पर होने का प्रमुख कारण अमीनो अम्लमें मौजूद सुगन्धित (aromatic) वलय हैं और 200 nm का अधिकतम अवशोषण पेप्टाइड आबंधों के कारण होता है। एक प्रोटीन की माध्यमिक, तृतीयक और चतुर्धातुक संरचना अवशोषण को प्रभावित करसकती है, इसके साथ ही pH, आयनिकशक्ति आदि जैसे कारक भी अवशोषण स्पेक्ट्रम को बदल सकते हैं ।

प्रोटीन के अवशोषण स्पेक्ट्रम से पता चलता है कि प्रोटीन पराबैंगनी और सुदूर पराबैंगनी क्षेत्रों के पास अवशोषित हो सकते हैं (चित्र 1.2)।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY



चित्र 1.2: निकटऔरसुदूरपराबैंगनी क्षेत्रोंमें एकप्रोटीन का अवशोषणस्पेक्ट्रम।

यूवीवि किरण का अवशोषण, सामान्यतः अवशोषण और : संप्रेषण के संदर्भ में दर्शाया जाता हैः

अवशोषण $(A) = -log\ (I / I_0)$ … (1.1)

% संप्रेषण $(\%T) = I / I_0 \times 100$ … (1.2)

जहां, I_0 और I क्रमशः नमूने मेंप्रवेश करने और बाहर निकलने वालेप्रकाश की तीव्रता कोदर्शाते हैं।

एक विश्लेषक का अवशोषण विश्लेषक की सांद्रता और घोल की मार्ग–लंबाई परनिर्भर करता है (बीयर–लैंबर्टनियम, Beer-Lambert Law):

$A = \varepsilon cl$ … (1.3)

जहां, ε मोलर अवशोषण गुणांक है, c विश्लेषक की मोलर सांद्रता है और 'l' उस के रखेजाने वाले सेल (कोठरा) के विश्लेषक घोल की पथयुक्त लंबाई है। यदि विश्लेषण के मोलर अवशोषण गुणांक और नमूना सेल की पथलंबाई ज्ञात है, तो बीयर–लैंबर्ट नियम का उपयोग कर के सांद्रता को सीधेज्ञात किया जा सकता है। अन्य तरीकों में मान कों के रूपमें उपयोग के लिए गोजातीय सीरम एल्बुमिन (Bovine serum albumin, BSA)या अन्य शुद्ध प्रोटीन घोल के अंशांकन के लिए इस विधि का उपयोग किया जाना चाहिए।

1.3 आवश्यक सामग्री

कांच के पात्र और उपकरणः पिपेट, पिपेटटिप्स, डिस्पोजेबल माइक्रोफ्यूज टयूब, क्वाट्र्ज क्यूवेट (205 nm एनएम छोटेत रंगदैर्ध्य के लिए उपयुक्त), और पराबैंगनी/दर्शनीय स्पेक्ट्रोफोटोमीटर।

आवश्यक रसायन

I. 1 mg गोजातीय सीरम एल्बुमिन (BSA) को 100 ml बफर (या आसुतजल में) में भंग करें, अकेले बफर खाली (blank)के रूप में कार्य करेगा।

ii. ट्रिस (Tris) बफर की तैयारी (0.1 M, pH 7): 121.1 gm ट्रिस क्षार को तोल कर 800 ml आसुत जल में घोललें। विलयनको कमरेके तापमान पर आनेदें। इसके बाद सान्द्रत हाइड्रोक्लोरिक अम्ल डालकर pH=8 परस्थिरत करें (नियमित अंतराल पर pH की जांच करें)।

1.4 कार्यविधि

प्रोटीन अनुमान के लिए (केवल λ280 nmपर) चरण 1–4 दोहराएँ।

1. पराबैंगनी दीपक को गर्म करें (लगभग 15 मिनट या स्पेक्ट्रोफोटोमीटर सप्लाई करने वाला के निर्देश का पालन करें)
2. तरंग दैर्ध्य को 280nm तक समायोजित करें
3. केवल बफर घोल लेकर शून्य अवशोषण पर कैलिब्रेट (calibrate) करें
4. प्रोटीन घोल के अवशोषणकोमापें
5. तरंग दैर्ध्य को 260 nm तक समायोजित करें (यदि न्यूक्लिक अम्ल संदूषण है)।
6. केवल बफर घोल लेकर शून्य अवशोषन पर कैलिब्रेटकरें
7. प्रोटीन घोल के अवशोषण को मापें ।

1.5 परिणाम

अज्ञात प्रोटीन अथवा प्रोटीन मिश्रणः प्रोटीन सांद्रता का अनुमान लगाने के लिए निम्नसूत्र का उपयोग करें। अधिकांश स्पेक्ट्रोमीटर के लिए पथ की लंबाई 1 cm है।

$$\text{सांद्रता(mg/ml)} = \frac{\text{280 nmपर अवशोषण का मान}}{\text{मार्गलंबाई (cm)}}$$

ज्ञात अव शोषण गुणांक का शुद्ध प्रोटीन 1 cm की पथ लंबाई के लिए निम्न सूत्र का उपयोगकरें। किस प्रकार के गुणांक का उपयोग कियाजाता है, इसके आधार पर सांद्रता mg / ml,% या molarity होती है।

$$\text{सांद्रत} = \frac{\text{280 nm पर अवशोषण}}{\text{अवशोषण गुणांक}}$$

इकाइयों को परिवर्तित करने के लिए, इन संबंधों का उपयोग करें:

mg प्रोटीन/ ml, % प्रोटीन÷ 10= मोलेरिटी÷प्रोटीन आणविक भार

संभावित न्यूक्लिक अम्ल संदूषण के साथ अज्ञात प्रोटीन सांद्रता का अनुमान लगाने के लिए निम्नलिखित सूत्र का उपयोग करें:

सांद्रता (mg/ml)= (1.55 x A280) - (0.76 x A260)

1.6 सावधानियां

अज्ञात ठंडे घोल क्युवेट को धूमिल कर सकते हैं, जबकि गर्म घोल बुलबुलेछोड़ सकते हैं और रीडिंग में हस्त क्षेप कर सकते हैं। सांद्रित घोलों (2 से अधिक अवशोषण) के लिए घोल को पतला करें।

कुछ सामान्य प्रोटीन मानकों का अवशोषण गुणांकः

i. बोवाइन सीरम एल्ब्यूमिन (BSA): 63
ii. गोजातीय, मानव, या खरगोशIgG: 138
iii. कुक्कुटओवेलब्यूमिन: 70

लाभः

i. अवशोषित माप द्वारा प्रोटीन को सीधेमापना तीव्र और सुविधा जनक है, क्योंकि इसके लिए अतिरिक्त अभिकर्मकों या ऊष्मायन की आवश्यकता नहीं है।

ii. इस प्रक्रिया में प्रोटीन मानक आवश्यकन हीं है और यह प्रोटीन का उपभोग भी नहीं करती है।

iii. प्रोटीन सांद्रता और अवशोषण का संबंधरैखिक होता है।

iv. इस विधि के लिए सबसे अधिक उपयोग क्रोमैटोग्राफी कॉलम से अंशों की जाँच के लिए होता है, अथवा किसी भी समय यदि एक त्वरित अनुमान की आवश्यकता हो और प्रोटीन सांद्रता में त्रुटिचिंता का विषय नहीं हो।

हानियाँः

i. क्योंकि विभिन्न प्रोटीन और न्यूक्लिक अम्लमें व्यापक रूप से अलग–अलग अवशोषण विशेषताएंहो ती हैं, इसलिए विशेष रूप से अज्ञात या ज्ञात प्रोटीन मिश्रण के लिए काफी त्रुटि हो सकती है।

ii. पराबैंगनी प्रकाश को अवशोषित करने वाले घोल का कोईभी गैर–प्रोटीन घटक, माप के साथ हस्तक्षेप करेगा।

सेल और ऊतकविभाजन के नमूनों में अक्सर अघुलनशील या रंगीन घटक होते हैं, जोहस्तक्षेप कर सकते हैं।

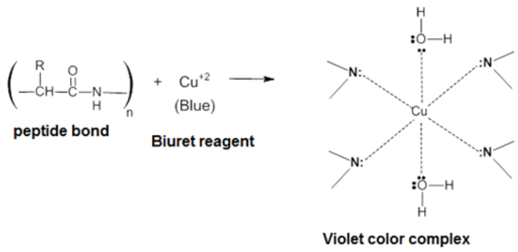
बोध प्रश्न 1

1. चुम्बकीय विकिरण को परिभाषित करें?

2. U.V अवशोषण स्पेक्ट्रोफोटोमीटर के पीछे के सिद्धांत को समझाएं।

3. प्रोटीन एकाग्रता व्यक्तकरने के लिए ....इकाइ यों का उपयोग किया जाता है?

4. ....तरंगदैर्ध्य पर सबसे अधिक प्रोटीन अवशोषण दिखाते हैं।



अभ्यास 2

बाइयूरेट विधि से दिये गए प्रोटीन की सांद्रता सुनिश्चित करना

संरचना

2.1 प्रस्तावना

संभावित अध्ययन परिणाम

2.2 सिद्धांत

2.3 आवश्यक सामग्री

2.4 कार्यविधि

2.5 प्रक्रिया

2.6 परिणाम

2.1 प्रस्तावना

वैज्ञानिकों के पास बहुत सारी अच्छी एवं अति संवेदनशील प्रोटीन परखने की विधियाँ उपलब्ध हैं। इनमे सरल और सबसे प्रचलित विधियों में से एक बाईयूरेट प्रोटीन विधि है। बायूरेट विधि प्रोटीन के पेप्टाइडक बॉन्ड में Cu^{2+} के कार्यात्मक समूहों की जटिलता पर आधारित है। प्रोटीन अध्ययन और प्रोटिओ मिक्त के सभी पहलुओं में प्रोटीन सांद्रता का निर्धारण कए आवश्यक तकनीक है। प्रत्येक विधि के अपने फायदे और सीमाएं हैं और सामान्यतः अनुसंधान अनुप्रयोगों के लिए प्रोटीन पर रखने की एक से अधिक प्रकार की विधियों का प्रयोग करना आवश्यक होता है।

इन विधियों के आधार पर प्रोटीन विश्लेषण को दो श्रेणियों में विभाजित किया गया है, (i) डाईबाइंडिंग प्रोटीन विश्लेषण और ii) एल्कलानइ कॉपर पर आधारित प्रोटीन विश्लेषण।

(i) डाईबाइंडिंग प्रोटीन विश्लेषण विधि

डाईबाइंडिंग प्रोटीन विश्लेषण अम्लीय परिस्थितियों में कोमास्सीडाई के प्रोटीन अणुओं से बंधन पर आधारित होते हैं। डाई में प्रोटीन के बंधने से वर्ण क्रमीय बदलाव होता है, कोमास्सी घोल का रंगभूरा (अर्क अधिकतम 465nm) से नीला (अर्क अधिकतम 610 nm) हो जाता है। रंग घनत्व में परिवर्तन 595nm पर पढ़ा जाता है और यह प्रोटीन सांद्रता के सीधे आनुपातिक होता है।

(ii) क्षारीय तांबे पर आधारित प्रोटीन विश्लेषण विधि

कॉपर आयन आधारित प्रोटीन परीक्षण में, प्रोटीन के घोल को कॉपर लवण, क्युप्रिक आयन (Cu^{2+}) के एक क्षारीय घोल के साथ मिलाया जाता है। प्रोटीन परीक्षण एक क्षारीय घोल में प्रोटीन के साथ क्युप्रिक आयनों की अन्योन्यक्रिया पर आधारित है और सामान्यतःपर इसे बाइयूरेट परीक्षण के रूप में जाना जाता है। क्युप्रिक आयनों (Cu^{2+}) की प्रोटीन के साथ अन्योन्यक्रिया होने पर बैंगनी रंग प्राप्त होता है जिसे 540 nm पर देखा जा सकता है। इस उत्पादित रंग की मात्रा प्रोटीन सांद्रता के सीधे आनुपातिक होती है।

प्रोटीन आकलन के विभिन्न विधियों की उपलब्धता होने पर भी,जो अध्ययन आप करते हैं उसका अनुप्रयोग,अध्ययन के लिए प्रासंगिक विषय है।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस परीक्षण को करने के बाद, आपः

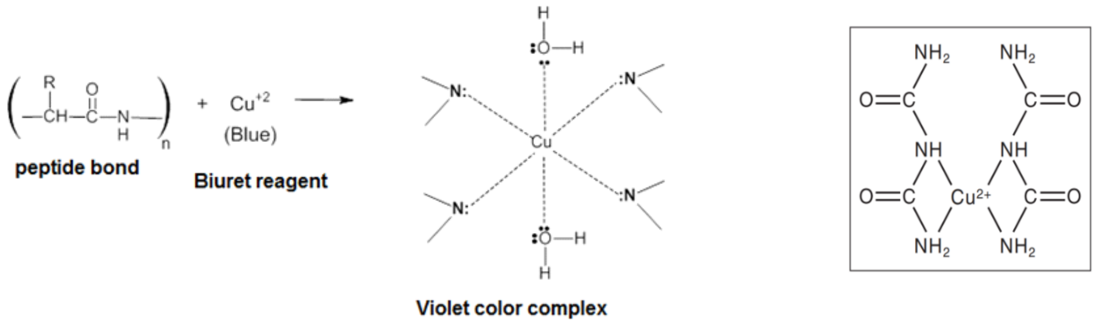
- बाइयूरेट विधि के सिद्धांत की व्याख्या कर सकेंगे ;
- बाइयूरेट विधि में उपयोग किए जाने वाले अभिकर्मकों की संरचना का वर्णन करें पाएंगे;
- एक परीक्षण नमूने में प्रोटीन सांद्रता को मापने के लिए मानक ग्राफ बना पाएंगे; और
- प्रोटीन यू.वी. अवशोषण और बाइयूरेट विधि के अनुमान के बीच अंतर करने में सक्षम होंगे।

2.2 सिद्धांत

बाइयूरेट एक छोटा यौगिक है जो यूरिया के गर्म होने पर,यूरिया के दो अणु जुड़ने से बनता है। अणु के केंद्र में इस तरह से जुड़े यूरिया के अणु,अमाइड समूह (-NH) का उत्पादन करते हैं जो एक क्षारीय pH के समकश में तांबे के आयनों से आबन्ध बनाते हैं। इस अन्योन्यक्रिया के परिणामस्वरूप बनने वाले कॉपर संकुल गहरे नीले रंग का उत्पादन करते हैं,जिसे स्पेक्ट्रोफोटोमीटर से मापा जा सकता है। प्रोटीन में एमाइड समूह भी होते हैं। जब एक एमिनो समूह और एक कार्बोक्सिल समूह पेप्टाइड बॉन्ड बनाने के लिए जुड़ते हैं, तब एमिनो समूह ($-NH_2$) तब एक एमाइड समूह (-NH) बन जाता है। क्षारीय pH पर प्रोटीन, कॉपरआयनों के साथ एक संकुल बनाता है। चूँकि यह प्रतिक्रिया पहली बार बाइयूरेट के साथ देखी गई थी, इसलिए इसे बाइयूरेट प्रतिक्रिया (चित्र 2.1) कहा जाता है, और जब इस प्रतिक्रिया का उपयोग प्रोटीन सांद्रता को मापने के लिए किया जाता है, तो इसे बाइयूरेट प्रोटीन परीक्षण कहा जाता है।

इस प्रकार, इस परीक्षण में आप प्रोटीन के नमूनों को बाइयूरेट अभिकर्मक के साथ संयोजित करते हैं, जिसमें कॉपर आयन एक क्षारीय घोल में उपस्थित रहते हैं। कॉपर आयन प्रोटीन में अमाइड समूहों के साथ संकुलित होते हैं और एक नीला रंग बनता है जिसे एक स्पेक्ट्रोफोटोमीटर का उपयोग कर के मापा जाएगा। इस प्रकार गठित रंग की

तीव्रता इस अभिक्रिया में भाग लेने वाले पेप्टाइड आबंधों की संख्या के सीधे आनुपातिक होती हैं और प्रोटीन की मात्रा में इनकी उपस्थित भी दर्शाता है, जिससे सांद्रता का आंकलन किया जा सकता है।



(अ) (ब)

चित्र 2.1:(अ): बाईयूरेट और कॉपर संकुल की प्रतिक्रिया, (ब) बाईयूरेट अभिकर्मक एक वायलेट कीलेट यौगिक बनाने के लिए CuSO4 के एक क्षारीय घोल के साथ अभिक्रिया करता है

2.3 सामग्री

कांच के पात्र और उपकरणः पिपेट, पिपेटटिप्स, क्वार्ट्जक्यूवेट,परखनलियाँ,परखनलीस्टैंड और पराबैंगनी/दर्शनीय स्पेक्ट्रोफोटोमीटर.

आवश्कयक रसायन

i. **बाइयूरेट अभिकर्मक:**
1-5 gm CuSO4 और 4.5gm सोडियम पोटेशियम टारट्रेट को 0.2 N NaOH के 250ml घोल में विलीन कर लीजिये। इसमे 2.5 gm पोटेशियम आयोडाइड (KI) डालें और 0.2N NaOH के साथ 500ml तक घोल की मात्रा बनाएं और एक अभिकर्मक बोतल में स्टोर करें।

ii. **0**.2N NaOH: 100 मिलीलीटर आसुत जल में 0.8 ग्राम NaOH को विलीन करें।

iii. बीएसए (BSA) स्टॉक घोल **(**10mg/ml**)**:50mgBSA को पाउडर को 5ml 0.01M NaOH के घोल में विलीन करें।

iv. आसुत जल।

2.4 प्रक्रिया

i. BSA प्रोटीन का स्टॉक घोल (10 mg/ml) तैयार करिये गया और एक लेबल लगे हुए बीकर में रखिये।

ii. परखनली में, तालिका 2.1 में उल्लिखित BSA। स्टॉक और पानी की उचित मात्रा को मिलाकर स्टॉक से अलग–अलग मात्रा के साथ प्रोटीन का तनुकरण करिये।

iii. सभी पर परखनलियों में 4ml बाईयूरेट अभिकर्मक मिलाया गया।

iv. एक परखनली में, 1उस अज्ञात नमूना लिया जाता है और उसमें 4 मिलीलीट रबाईयूरेट अभिकर्मक डाला गया।

v. कमरे के तापमान पर 30 मिनट के लिए सभी परखनलियों का ऊष्मायन किया।

vi. स्पेक्ट्रोफोटो मीटर के गहरे शून्य और रिक्त शून्य को सेट करें और इसे 20–30 मिनट के लिए छोड़ दें।

vii. ऊष्मायन समय समाप्त होने के बाद, स्पेक्ट्रोफोटोमीटर में नमूना युक्तक्युवेट रखकर अवशोषण रीडिंग लें और एक मानक ग्राफ तैयार करें। तालिका 2.1 में एक विशिष्ट प्रयोगात्मक अवलोकन आंकड़ा दर्शाया गया है।

तालिका 2.1. अवलोकन तालिका में मानक माप के विभिन्न तनुकृत और अज्ञात नमूनों के अवशोषण मान के साथ दिखाया गया है।

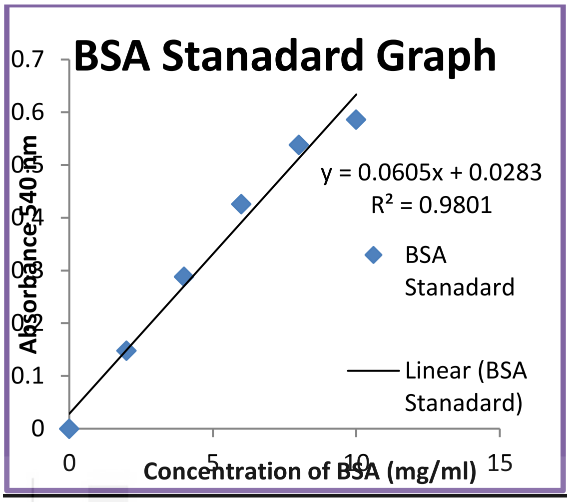
BSA सांद्रता (mg/ml)	BSA स्टॉक (ml)	आसुत जल (ml)	बाइयूरेट अभिकर्मक (ml)		अवशोषण मान (540nm)*
0	0	1	4	30 मिनट के लिए कमरे के तापमान पर ऊष्मायन करें	0
2	0.2	0.8	4		
4	0.4	0.6	4		
6	0.6	0.4	4		
8	0.8	0.2	4		
10	1	0	4		
अज्ञात	**1 (ml) (नमूना)**		4		

*बाद में कॉलम में दर्ज मानों को नोट करें।

2.5 परिणाम

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

अवलोकन तालिका 2.1 के अध्ययन से मानक ग्राफ को तैयार किया जा सकता है (MS excel (चित्र 2.2) का उपयोग करके या ग्राफ पेपर का उपयोग करके किया जा सकता है), BSA (मिलीग्राम/मिलीलीटर) की सांद्रता अवशोषण के विरुद्ध के दिये गए R^2 मान 0.980 के साथ रैखिक है।



चित्र 2.2: एकएसएक्सेल (MS Excel), (y = mx + c; y = 0.060 x + 0.028) का उपयोग करके बनाया गया BSA मानक ग्राम। जहां, ढलान (m) = 0.060 और अवरोधन (c) = 0.028।

अज्ञात नमूने के अवशोषण दिए गए मान को बहिर्वेशन करने या ग्राफ के रैखिक रिग्रेशन मूल्य (y = mx + c; y = 0.060 x + 0.028) से सीधी रेखा पर बनाया जा सकता है।

समीकरण 2.1 में मूल्यों को प्रतिस्थापित करके, प्रोटीन की अज्ञात एकाग्रता की गणना की जा सकती है।

एकाग्रता (mg / ml) = (अवशोषण–अवरोधन) /ढलान .... (समीकरण 2.1)

टिप्पणीः निम्नलिखित सूत्र अज्ञात समाधान के संगीत कार्यक्रम का आकलन करने के लिए इस्तेमाल किया जा सकता है।

$$\frac{\text{OD का परीक्षण}}{\text{OD का मानक}} \times \text{मानक की एकाग्रता}$$

अज्ञात समाधान में BSA की मात्रा_____mg है। (गणना पूरी करने के बाद मूल्य दर्ज करें)

2.6 चर्चा

BSA एक आसानी से उपलब्ध और लागत प्रभावी प्रोटीन है जो आसुत जल में आसानी से घुलनशील है। मानक ग्राफ एक सीधी रेखा बनाता है और जिसमें अंतिम अज्ञात प्रोटीन की मात्रा mg पायी गयी । रैखिक प्रतिगमन मूल्य (R^2) 1 के करीब है, इसलिए सबसे अच्छी फिट लाइन यह निष्कर्ष निकालती है कि मानक अच्छी गुणवत्ता का है।

हानिः

इस परीक्षण से केवल उन पॉलीपेप्टाइड का पता लगा सकते हैं जो लंबाई में

3 या अधिक अमीनो अम्ल के होते हैं।

बोध प्रश्न

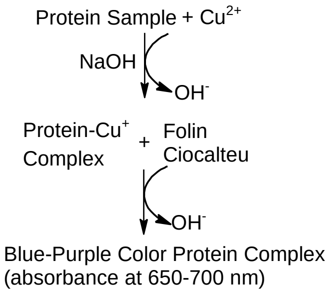
1. प्रोटीन में मौजूद ......बंध बाइयूरेट विधि में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है।

2. प्रयोग में चर्चा की विभिन्न प्रोटीन अनुमान विधियों की सूची करें ?

3. बाइयूरेट विधि में इस्तेमाल रसायनों को सूचीबद्ध करें।

4. क्षारीय घोला तैयार करने के लिए इस्तेमाल किए जाने वाले रसायन की पहचान करें।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY



अभ्यास 3

लोरी विधि द्वारा प्रोटीन की मात्रा का निर्धारण

संरचना

3.1 प्रस्तावना
संभावित अध्ययन परिणाम
3.2 सिद्धांत
3.3 आवश्यक सामग्री
3.4 कार्यविधि
3.5 परिणाम
3.6 सावधानियाँ

3.1 प्रस्तावना

लोरी विधि द्वारा दिये गए कुल प्रोटीन के आंकलन के लिए वर्णमिति परीक्षणों में सबसे अधिक इस्तेमाल किए जाने वाली विधियों में से एक है। यह एक सुग्राही, अत्यधिक प्रतिलिपि प्रस्तुत करने योग्य, सस्ती और आसान विधि है। यह विधि प्रोटीन के साथ तांबे (copper) की अभिक्रिया पर निर्भर करती है, लेकिन इस विधि में प्रोटीन के नमूनों का फॉलिन–सिकाल्ट्यु (Folin- Ciocaltaeu) अभिकर्मक के साथ ऊष्मायन भी किया जाता है। क्षारीय वातावरण में फॉलिन–सिकाल्ट्यू अभिकर्मक का अपचयन होता है जिससे एक गहरा नीला रंग (हेटेरोपायमोलिबेडेनमनीला) उत्पन्न होता है जो 750nm पर अवशोषित होता है। यह विधि 0.01-1mg/ml की सीमा के प्रोटीन की सांद्रता के आकलन करने के लिए सबसे अच्छा व उपयोगी विधि है।

प्रोटीन अनुमान की अधिकांश तकनीकें बोविन सीरमएल्ब्यूमिन (BSA) को इसकी कम लागत, उच्च शुद्धता और सुलभ उपलब्धता के कारण एक मानक प्रोटीन के रूप में सार्वभौमिक रूप से उपयोग करती हैं।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस परीक्षण कोकरने के बाद, आपः

- फॉलिन–सिकाल्ट्यु के विधि में काम करने वाले सिद्धांत का वर्णन कर पाएंगे;
- बाइयूरेट लोरी परीक्षण कर सकेंगे;

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

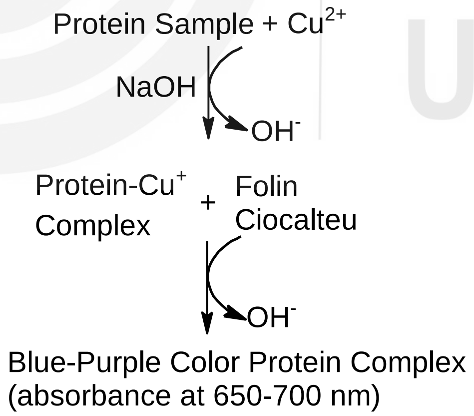
- विश्लेषणात्मक अभिकर्मकों की संरचना का वर्णन औतर तैयारी को सूचीबद्ध कर पाऐंगे; और
- सांद्रता को मापने के लिए मानक ग्राफ बता पाएंगे।

3.2 सिद्धांत

यह लोरी विधि दो अभिक्रियाओं पर आधारित है जो एक रंजित संकुल के गठन का प्रमुख कारण होता है। सबसे पहले, बाइयूरेट अभिक्रिया, जिसमें अभिक्रिया मिश्रण में उपस्थित Cu(II) प्रोटीन के पेप्टाइड आबन्ध के साथ क्षारीय वातावरण में अभिक्रिया करता है जिसके परिणामस्वरूप क्यूप्रस आयनों का अपचयन होता है [Cu (I)]।

दूसरे, लोरी अभिक्रिया में फॉलिन–सिकाल्ट्यू अभिकर्मक जिसमें फॉस्फोमोलेबिक सम्मिश्रण होता है जो सोडियम टंगस्टेट, सोडियम मोलिबडेट और फॉस्फेट के साथ–साथ कॉपर सल्फेट घोल और प्रोटीन का मिश्रण बनाते हैं, जिसके परिणामस्वरूप नीला बैंगनी रंग उत्पन्न होता है, और इसे अवशोषण के 650-700 nm पर मापा जा सकता है।

अमीनो अम्ल (टाइरोसिन और ट्रिप्टोफैन) के फेनोलिक समूह अवशेषों द्वारा नीले बैंगनी रंग का उत्पादन होता है, जो कि फॉस्फोमोलीबोड्टुंगस्टेट के अपचयन एवं एमिनो अम्ल के तांबा उत्प्रेरित ऑक्सीकरण द्वारा हेट्रोपोलीमोलीलिब्डेनम ब्लू बनने के कारण होता है, और इसकी तीव्रताघोल में उपस्थित एरोमेटिक एमिनो अम्लकी मात्रा पर निर्भर करती है। इस अभिक्रिया से उत्पन्न होने वाला नीला बैंगनी रंग एक प्रोटीन से दूसरे प्रोटीन में भिन्न होता है। इस नीले बैंगनी रंग का गठन ट्रिप्टोफैन और टायरोसिन की उपस्थिति के कारण होता है (चित्र 3.1)।



चित्र 3.1: लोरी की प्रतिक्रिया का प्रवाह दर्शाते हुए चित्र

3.3 आवश्यक सामग्री

BSA स्टॉक घोल, विश्लेषणात्मक अभिकर्मक, फोलिन अभिकर्मक (व्यावसायिक रूप से उपलब्ध), क्युवेट, स्पेक्ट्रोफोटोमीटर, परखनली स्टैंड, परखनलियाँ, आसुत जल, पिपेट, मापने वाला सिलेंडर।

अभिकर्मक तैयारी:

1) वि”लेषणात्मक अभिकर्मक:

a. 1% $CuSO_4$– 50ml
b. 2% सोडियम पोटेशियम टारट्रेट - 50ml (मि.ली.)[50mlH_2O में 1gm (ग्राम)]
c. क्षारीय Na_2CO_3 - 250ml (अर्थात्, NaOH = 1gm, Na_2CO_3= 5gm, कुल = 250ml)

नोट: उपयोग करने से पहले ही नवीन रूप में निम्न प्रकार से तैयार करें

: 196 ml (c) + 2 ml (a) + 2 ml (b) = 200 ml का वि”लेषणात्मक अभिकर्मक

2) फोलिन अभिकर्मक = 50ml (अर्थात्, अभिकर्मक का 25ml + आसुत जल 25ml)

3) बीएसए प्रोटीन पाउडर - 100mg/ml

3.4 कार्यविधि

I. बीएसए प्रोटीन का 100mg/ml उस स्टॉक घोल तैयार करें।

ii. विश्लेषणात्मक अभिकर्मक 200ml और फोलिन अभिकर्मक 50ml, के घोल तैयार करें। परखनलियों में, पिपेट की मदद से, आसुत जल को मिला कर प्रोटीन की [10µg (माइक्रोग्राम), 20µg, 30µg, 40µg, 50µg] बनाएं। 1ml अज्ञात प्रोटीन के घोल एक और परखनली में लें।

iii. 2.5ml उस विश्लेषणात्मक अभिकर्मक (AR) को सभी परखनलियों में डालें और परखनलियों को 10 मिनट के लिए कमरे के तापमान पर ऊष्मायन के लिए रखें।

iv. 0.25ml उस फॉलिन अभिकर्मक (FR) को सभी परखनलियों में डालें और परखनलियों को 30 मिनट के लिए कमरे के तापमान पर ऊष्मायन के लिए रखें।

v. इसके बाद, सभी परखनलियों के अवशोषण को माप करें और अज्ञात नमूना घोल में प्रोटीन की सांद्रता की गणना करने के लिए मानक ग्राफ को तैयार करें।

3.5 परिणाम

अवलोकन तालिका

बीएसए (mg/ml)	स्टॉक बीएसए का आयतन	आसुत जल (ml)	विश्लेषणात्मक अभिकर्मक	कमरे के	फोलिन अभिकर्मक (ml)	कमरे के	अवशोषण (660 nm)

	(ml)		(ml)	तापमान पर 10 मिनट के लिए ऊष्मायन के लिए रखें		तापमान पर 30 मिनट के लिए ऊष्मायन के लिए रखें।	
0	0	1	2.5		0.5		
20	0.2	0.8	2.5		0.5		
40	0.4	0.6	2.5		0.5		
60	0.6	0.4	2.5		0.5		
80	0.8	0.2	2.5		0.5		
100	1.0	0	2.5		0.5		

टिप्पणीः निम्नलिखित सूत्र अज्ञात समाधान के संगीत कार्यक्रम का आकलन करने के लिए इस्तेमाल किया जा सकता है।

$$\frac{\text{OD का परीक्षण}}{\text{OD का मानक}} \times \text{मानक की एकाग्रता}$$

परिणाम–अज्ञात में BSA / प्रोटीन की मात्रा ______µg/ml है ।

चर्चा–अमीनो अम्ल की उपस्थिति में फोलिन–सिकालट्यू अभिकर्मक के फॉस्फोमोलेबिक–फॉस्फोटुंगस्टिक घटकों के अपचयन से नीला रंग उत्पन्न होताहै। ट्रिप्टोफैन और टायरोसिन की प्रोटीन में उपस्थिति के कारण क्षारीय क्यूप्रिक टार्ट्रेट के साथ प्रोटीन अभिक्रिया होती है और इस अभिक्रिया सेविक सितरंग, लोरी विधि में मापा जाता है।

3.6 सावधानियाँ

गुणवत्ता युक्त परीक्षण हेतु ऊष्मायन समय विशेष रूप से बहुत महत्वपूर्ण है। सभी अभिक्रियाएँ उपयुक्त pH पर भी निर्भर है और इस pH की 9 से 10.5 की एक कार्य सीमा अति आवश्यक है।

लाभः

यह विधि लगभग 10µg/ml तक की सांद्रता के प्रति सुग्राही है और केवल एक सापेक्षिक विधि होने के बावजूद भी सबसे व्यापक रूप से इस्तेमाल किया जाने वाला प्रोटीन परीक्षण विधि है। हालांकि इस विधि में ट्रिसबफर, EDTA।, अनायनिक और धनायनी अपमार्जक, कार्बोहाइड्रेट, लिपिड, सल्फाइडरील अभिकर्मकों और कुछ लवणों के प्रतिक्रिया विचारणीय हैं ।

हानिः

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

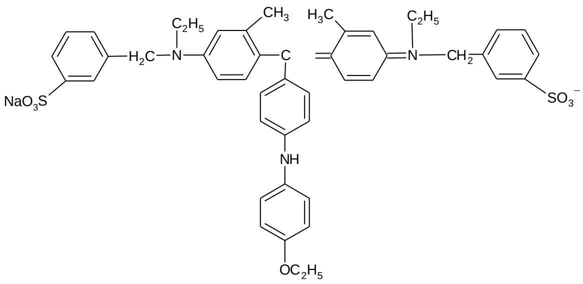
i लोरी विधि का प्रमुख कमी इसकी सूक्ष्म चभ सीमा है जिसके अंतर्गत या सटीक मान देता है। हालांकि, हम यदि बहुत कम मात्रा में नमूने का उपयोग करें, जिसका प्रतिक्रिया मिश्रण के चभ पर बहुत कम या कोई प्रभाव नहीं होगा।

ii विभिन्न प्रकार के यौगिक लोरी प्रक्रिया में हस्तक्षेप कर सकते हैं।

अमोनियम आयन, उभयनिष्ट आयनिक बर्फ़ अनायनिक बर्फ और थिओलयौगिक आदि भी लोरी प्रतिक्रिया में हस्तक्षेप कर सकते हैं। लोरी विधि से परीक्षण करने से पहले इन पदार्थों को हटा दिया जाना चाहिए या तनुकृत कर लेना चाहिए।

बोध प्रश्न 1

1. बाइयूरेट और लोरी की विधि के बीच अंतर करें।
2. लोरी की विधि का उपयोग करके प्रोटीन अनुमान के सिद्धांत को समझाएं।
3. लोरी की विधि में उपयोग किए जाने वाले अभिकर्मक तैयारी को सूचीबद्ध करें।
4. लोरी की विधि में उपयोग की जाने वाली अवशोषण तरंग दैर्ध्य क्या है?



Coomassive G-250

अभ्यास 4

ब्रैडफोर्डविधि द्वारा प्रोटीन सांद्रता की वधारणा रूपरेखा

संरचना

4.1 संभावित अध्ययन परिणाम
4.2 सिद्धांत
4.3 आवश्यकसामग्री
4.4 कार्यविधि
4.5 परिणाम
4.6 सावधानियाँ

4.1 प्रस्तावना

अबतक, हमने प्रोटीन का निर्धारण करने के विभिन्न तरीकों का प्रदर्शन किया है, हालांकि, उनका उपयोग अमीनोअम्ल के व्यक्तिगत गुणों पर निर्भर करता है। प्रोटीन के सांद्रता निर्धारण मे कई अलग–अलग विधियों का उपयोग कि याजाता है और ये सभी उस प्रोटीन मेंउपस्थित अमीनोअम्ल के विभिन्न गुणों परनिर्भर करते हैं। ब्रैडफोर्ड विधि एक अज्ञात प्रोटीन की सांद्रता का निर्धारण करने का एक तीव्र और काफी सटीकतरीका है; हालाँकि यह प्रोटीन की शुद्धता पर निर्भर करता है। इस विधिमें कोमास्सीब्रिलिएंटब्लूG-250 (CBB) नामक अभिरंजक का उपयोग किया जाता है। यह अभिरंजक धन आवेशीय अमीनो अम्ल और एक सीमित सीमा में एरोमेटिक अमीनोअम्ल के साथ अभिक्रिया करके नीलेरंग का उत्पादन करता है।

एमिनोअम्ल की पार्श्व शृंखला भी CBB के साथ अभिक्रिया की सीमा निर्धारित करती है, क्योंकि प्रत्येक पार्श्वश्रृंखला का एक अलग pKa होता है, जिस पर इनका प्रोटोन नहोता है और ये धनावेश अर्जित करतेहै। ब्रैडफोर्ड विधि का उपयोग भंग कोशिकाओं की प्रोटीन सामग्री का निर्धारण करते समय या वैद्युत कण संचलन के लिए सांद्रता निर्धारण के लिए उपयोग करने के लिए किया जाता है।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस परीक्षणकोकरने के बाद, आपः

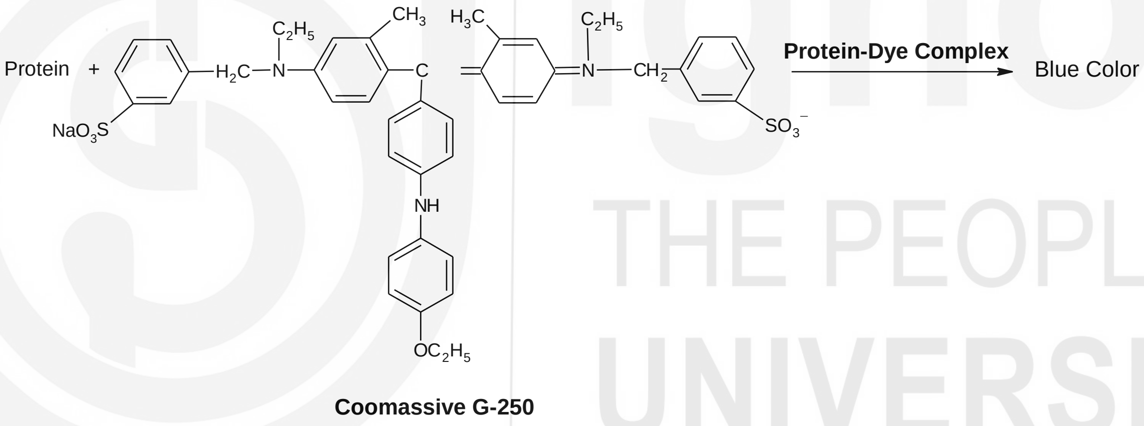
- ब्रैडफोर्ड के विधिमेंउपयुक्तसिद्धांत का वर्णनकरपाएंगे;
- विभिन्नप्रकार के प्रोटीनअनुमानविधियों के बीचअंतरकरसकेंगे; और

- प्रोटीनअनुमान के लिए बुनियादीचरणसूचीबद्ध करपाएंगेऔरबुनियादीगणनाएंकरसकेंगे।

4.2 सिद्धांत

कोमास्सीब्रिलिएंटG-250 दो अलग–अलग रंगों के रूपों मेंउपलब्ध रहता है, लाल और नीला। जब प्रोटीन कोमास्सीब्लू के साथ अम्लीय घोल में आबंधन करते हैं तो उनके धनात्मक आवेश प्रोटोनन की प्रक्रिया को रोकते हैं जिस के परिणाम स्वरूप लालरूप (प्रोटॉनित स्थिति), नीलेरूप (अप्रोटॉनित स्थिति) में परिवर्तित हो जाता है, जिससे नीलेरंग का निर्माण हो ता है। यह प्रक्रिया घोल में उपस्थित रंजक (ब्रिलियंटब्लू-G) और प्रोटीन के बीच एक संकुल के गठन पर आधारित होती है। प्रोटीन–रंजक संकुल का बनना ही इस रंजक के मूल अधिकतम अवशोषण में465 से 595 nm तक बदलाव का कारण बनता है। प्रोटीन के बिना, अम्लीय घोल में यह रंजक घोल समान्यतः लाल–भूरा रहता है।

अभिक्रिया के दौरान प्रोटीन इस रंजक से आबन्ध बनाता है और रंजक का रंग लाल से नीलेरंग में परिवर्तित हो जाता है। यह रंजक 595 nm पर मापा जाता है। यह रंजक प्रोटीन में उपस्थित आर्जिनिन, हिस्टिडीन, लाइसिन, टाइरोसिन, ट्रिप्टोफैनऔरफेनिलएलीनिनअवशेषों के साथअन्योन्यक्रियाकरताहै (चित्र 4.1)।



चित्र 4.1 प्रोटीन के नीले रंग संकुल के गठन को दर्शाते हुए प्रतिक्रिया

4.3 आवश्यक सामग्री

कांच के पात्र और उपकरण: पिपेट, पिपेटटिप्स, क्वार्ट्ज क्यूवेट, परखनलियाँ, परखनली स्टैंड और परा बैंगीन / दर्शनीय स्पेक्ट्रोफोटोमीटर।

आवश्यक रसायन

कोमास्सी ब्रिलिएंट ब्लू G-250, 95%इथेनॉल, 85%फॉस्फोरिक अम्ल, बीएसए

अभिकर्मक तैयारी

1. बीएसए (Bovine serum albumin, BSA)**:** BSA प्रोटीन का 1mg/ml. स्टॉक घोल तैयार करें।

2. कार्यशील ब्रैडफोर्ड घोल: 100mg कोमास्सी ब्रिलिएंट ब्लू, 100ml ऑर्थोफोस्फोरिक अम्ल, 50 ml 95%इथेनॉल ले और नीचे दिए गए चरणों का पालन करें:

i. एक ढंके हुए बीकर में इथेनॉल और कोमास्सी ब्रिलिएंट ब्लू को, लग भग 3 घंटे के लिए मध्यम वेग से घोलें।

ii. इस घोल में फॉस्फोरिक अम्ल मिलाएँ और पांच घंटे के लिए लगातार आडोलन पर रखें।

iii. आसुत जल मिलाते हुए इस घोल को 1 लीटर तक बनाएं।

iv. उपर्युक्त घोल को व्हाट्मेन नंबर 1फिल्टर पेपर के माध्यम से छानें।

v. इस घोल को अब निर्वातन के माध्यम से 0.45µMझिल्ली फिल्टर के माध्यम से छानें। ध्यान रहे कि घोल का रंग भूरा रहे। अब इस घोल को एक इसे एम्बर (amber)बोतल में भंडारण करें।

3. **बीएसए (BSA)कार्यशीलघोल :** कार्यशील बीएसए घोल बीएसए (100µg/ml) का कार्यशील घोल बनाने के लिए आसुत जल के साथ बीएसए (1 µg/ml) के स्टॉक घोल को 10 बार तनुकृत करें।

4.4 प्रक्रिया

i. साफ और सूखी परखनलियाँ लें, पिपेट की मदद से .... से ... बीएसए प्रोटीन का तनुकरण करें और आसुत जल को मिलाते हुए ..... बनाये (तालिका 4.1)।

ii. 1ml उस अज्ञात प्रोटीन के घोल एक और परखनली में लें (7वीं परखनली)।

iii. कार्यशील ब्रैडफोर्डअभिकर्मक का 1.0 मिलीलीटर घोल सभी परखनलियों में डालें और बाद में भ्रमिलित करें। तत्पश्चात 5 मिनट के लिए कमरे के तापमान पर ऊष्मायन के लिए रखेँ।

iv. इसके बाद, सभी नलियों का 595 nmपर अवशोषण माप करें। एक मानक ग्राफ को आरेखित करें, जिससे अज्ञात प्रोटीन की सांद्रता की गणना की जा सके।

अवलोकन तालिका 4.1

बीएसए (mg/ml)	**स्टॉक बीएसए का आयतन** (ml)	**आसुत जल** (ml)	**ब्रेडफोर्ड अभिकर्मक** (ml)		**अवशोषण (595nm)**
0	0	1	1.0	**कमरे के**	

20	0.2	0.8	1.0	तापमान पर 05 मिनट के लिए ऊष्मायन के लिए रखें।	
40	0.4	0.6	1.0		
60	0.6	0.4	1.0		
80	0.8	0.2	1.0		
100	1.0	0	1.0		
अज्ञात T1	1.0	0	1.0		

4.5 परिणाम

निम्नलिखित सूत्र अज्ञात घोल के प्रोटीन का आकलन करने के लिए इस्तेमाल किया जा सकता है।

$$\frac{\text{OD का परीक्षण}}{\text{OD का मानक}} \times \text{मानक की एकाग्रता}$$

परिणाम–मानक ग्राफ से अज्ञात नमूने मेंBSAकी मात्रा ––––––µgहै।

चर्चा–ब्रैडफोर्ड पद्धति का उपयोग करके प्रोटीन की अज्ञात सांद्रताको निर्धारित करने का लक्ष्य हासिल किया गया। यह विधि एक अज्ञातप्रोटीन की सांद्रता के अवशोषण को निर्धारित करने के लिए एक आसान और त्वरित तरीका है और साथ ही बीअर के नियम के अनुकरण से इस प्रकार एक प्रोटीन की सांद्रताको निर्धारित करना आसान है।

4.6 सावधानियाँ

गुणवत्ता युक्त परीक्षण हेतु ऊष्मारसायन विशेष रूप से बहुत महत्वपूर्ण है।

लाभः

i. इस अभिकर्मक का उपयोग 0.1 से 1.4 मिलीग्राम/मि.ली. तक सांद्रता सीमा की प्रोटीन की मात्रा निर्धारित करनेके लिए किया जा सकता है।

ii. ब्रैडफोर्डपरीक्षण डाइथिओथृटोल जैसेअपपाचयीअभिकरणकों के साथभी उपयोग संगतहै; हालांकियहकेवलबहुतकमसांद्रताके अपमार्जकों केसाथ ही उपयोग संगतहै।

iii. यह एक तीव्र एवं सरल परीक्षण विधि है।

कमियाँ:

i. ब्रैडफोर्ड रंजक का प्रमुख नुकसान कई यौगिकों जैसेरू अमोनियम आयन, उभयानिष्ठ आयनिक बफर, गैर–आयनिक बफर आदि के साथ इसका हस्तक्षेप है। कुछ थिओली यौगिक भी लोरीअभिक्रिया में हस्तक्षेप कर सकते हैं।

ii. प्रोटीन के साथ रंजक आबंधन से बनने वाला रंग 15 मिनट के बाद स्थिर नहीं रहता है।

बोध प्रश्न 1

1. ब्रैडफोर्डकी विधि का उपयोग करके प्रोटीन अनुमान के सिद्धांत को समझाएं।

2. ब्रैडफोर्डकीविधिमेंउपयोगकिएजाने वाले अभिकर्मकतैयारी कोसूचीबद्धकरें।

3. ब्रैडफोर्डऔरलोरीकीविधिकेबीचअंतरकरें।

4. ब्रैडफोर्ड की विधि में उपयोग की जाने वाली अवशोषण तरंगदैर्ध्य क्या है?

अभ्यास 5

अवक्षेपण (pH) विधि द्वारा दूध से कैसिन का अलगाव

संरचना

5.1 संभावित अध्ययन

संभावित अध्ययन परिणाम

5.2 सिद्धांत

5.3 आवश्यक सामग्री

5.4 कार्यविधि

5.5 परिणाम

5.6 सावधानियाँ

5.1 प्रस्तावना

पिछले प्रयोगों में आपने विभिन्न तरीकों का उपयोग करके प्रोटीन सान्द्रता का अनुमान लगाया है। इस प्रयोग में आप दूध से प्रोटीन कैसिन का अलगाव करेंगे। स्थिर वैद्युत आवेश प्रोटीन घुलनशीलता के कारकों में से एक महत्वपूर्ण योगदान करने वाला कारक है। जलीय उभयप्रतिरोधियों में प्रोटीन की घुलनशीलता प्रोटीन की सतह पर जलरागी व जलविरागी अमीनो अम्लों के अवशेषों के वितरण पर निर्भर करती है। जिन प्रोटीन की सतह पर अधिक जलविरागी अमीनो अम्ल होते हैं, उनमें जलीय विलायक में कम घुलनशीलता होती है। आवेशित और ध्रुवीय सतह के अवशेष विलायक में उपस्थित समूहों के साथ अन्योन्यक्रिया करते हैं और उनकी घुलनशीलता को बढ़ाते हैं। एक प्रोटीन अणु का शुद्ध आवेश सभी आवेशों का अंकगणितीय औसत होता है। एक निश्चित विलायक pH पर, प्रोटीन का शुद्ध आवेश शून्य होता है इसे समविभव **(आइसोइलेक्ट्रिक)** बिंदु कहा जाता है।

एक विलयन जिसका pH अपने pI सेऊपर है, प्रोटीन की सतह मुख्य रूप से ऋण आवेशित होती है और इस प्रकार समान आवेशित हुए अणुओं में प्रतिकारक बल होगा। दूसरीओर, यदि प्रोटीन की सतह मुख्यतः धनावेशित हों और एक विलयन जिसका pH उसके pI के नीचे होता है, तो प्रोटीन यौगिकों के बीच प्रतिकर्षण होता है। इसलिए, इस pH में प्रोटीन घुलनशील होगा। जबकि, (समविभव बिन्दु) pI पर ऋणात्मक और धनात्मक आवेश समाप्त हो जाते, प्रतिकारक स्थिर वैद्युत बल कम हो जाते हैं और परिक्षेपी बल एकत्रीकरण और अवक्षेपण करते हैं। अधिकांश प्रोटीनों काच pI4 से 6 के बीच होता है।

कैसीन जैसे प्रोटीन की घुलनशीलता गर्मी से प्रभावित नहीं होती है क्योंकि इसमें डाइसल्फ़ाइड आबन्ध नहीं होते हैं और तृतीयक संरचना की कमी भी होती है । कैसीन

की घुलनशीलता अधिकतर किसी द्रव्य माध्यम के pH पर निर्भर करती है। एक मध्यवर्ती pH जिस पर किसी प्रोटीन के अणु पर शून्य आवेश होता है, वह उस प्रोटीन का समविभव बिन्दु (pH 4.8) कहलाता है। इस बिंदु पर प्रोटीन की घुलनशीलता न्यूनतम होती है, लेकिन यह बढ़ती अम्लता या क्षारीयता के साथ बढ़ जाती है। कम pH पर दूग्ध प्रोटीन कैसीन का अवक्षेपण या स्कंदन की घटना होती है, जहाँ दूध खराब हो जाता है, pH में परिवर्तन के कारण प्रोटीन विगलन का सबसे आम उदाहरण है।

प्रयोग शुरू करने से पहले आपको निम्नलिखित YouTube लिंक पर उपलब्ध वीडियो देखने की सलाह दी जाती है।

https://www.youtube.com/watch?v=HN4jD2MCKfg.

तालिका 5.1: कुछ महत्वपूर्ण प्रोटीन के आइसोइलेक्ट्रिक अंक

समविभव बिन्दु (Isoelectric point) (pH)	प्रोटीन
7.0	समविभव बिन्दु
6.8	हीमोग्लोबिन
4.8	जिलेटिन
4.9	बीएसए (BSA)
4.8	कैसीन
4.6	अंडाश्वेतक
1.0	पेप्सिन

संभावित अध्ययन परिणाम

इस परीक्षण को करने के बाद, आप:

- ❖ कैसिन को कम करने में pH की भूमिका का वर्णन करपाएंगे;
- ❖ घुलनशीलता पर पीएच और पीआई के महत्व को समझा सकेंगे; और
- ❖ और पीएच मीटर के उपयोग का प्रदर्शन कर सकेंगे।

5.2 सिद्धांत

एक प्रोटीन का समविभव बिन्दु (pI) वह pH है जहां प्रोटीन पर शुद्ध आवेश शून्य होता है। प्रोटीन अपने चप पर एकत्रित और अवक्षेपित होते हैं क्योंकि उन्हें इस अवस्था में रखने के लिए कोई स्थिर वैद्युत प्रतिकर्षण नहीं होता है। चूंकि अलग–अलग अमीनो

अम्लीय शृंखला (अर्थात, ऋणायनी व धनायनी समूहों की सापेक्ष संख्या) इसलिए हर प्रोटीन का अलग–अलग pI होता है और इसलिए उन्हें किसी घोल के pH को समायोजित करके उनका पृथक्करण किया जा सकता है। जब विशेष प्रोटीन के pH को उसके pI तक समायोजित किया जाता है, तो यह घोल में उपस्थित अन्य प्रोटीनों को छोड़ कर अवक्षेपित हो जाता है। कुछ अभिकर्मकों, जैसेकि इथेनॉलजो अणु को निर्जलित करके उनके आवेश को निष्प्रभावी कर देता है, को घोल में मिलाकर एक समविभव बिन्दु पर अधिकतम अवक्षेपण प्राप्त किया जा सकता है ।

किसी भी घोल के pH की गणना हैंडर्सन–हेसलबेक समीकरण से की जा सकती है (Refer unit-2 of BBCCT-101 for more details)।

pH = pKa + log {(कैसीन एसीटेट सोडियम) ÷ (एसिटिक अम्ल)} समीकरण- (i)

5.3 आवश्यक सामग्री

1कांच के पात्र और उपकरणः परखनलियाँ, परखनलीस्टैंड, आसुत जल, पिपेट, मापने वाला सिलेंडर। बीकर, 50 मिली, और जार अपकेंद्रित्र नली, 50 मिलीलीटर की क्षमता, अपकेंद्रित्र, और pH मीटर.

आवश्यक रसायन

0.5 N हाइड्रोक्लोरिक अम्ल, इथेनॉल, डायथिल ईथर

नमूनाः गाय या भैंस का दूध

5.4 कार्यविधि

निर्देशक के अनुसार निम्नलिखित चरणों का पालन करें:

निर्देश के अनुसार निम्नलिखित चरणों का पालन करें:

i. दूध की मथन(स्किमिंग):100 उस दूध लें और कमरे के तापमान पर करीब 25 मिनट तक 4000 आरपीएम पर अपकेंद्रित्र (centrifuge) करें। बाद में साफ स्पैटुला (लेपनी) का इस्तेमाल करते हुए अपरवसाया क्रीम पटल को हटा दें।

ii. मथन दूध को 500ml के बीकर में स्थानांतरित करें और इसके बाद आसुत जल की बराबर मात्रा डालकर अच्छी तरह से मिलाएं।

iii. pH 4.8 तक पहुंचने तक लगातार 0.5 N हाइड्रोक्लोरिक अम्ल को बुरेट का उपयोग से बूंदबूंद करके मिलाइये। इस pH (आइसोइलेक्ट्रिक पॉइंट/समविभव बिन्दु) पर केसिन तेज़ी अवक्षेपित होती है।

iv. कमरे के तापमान पर 30 मिनट के लिए मिश्रण को बगैर हिलाये छोड़ दीजिये । इससे अवक्षेपित पूरी होती है।

v. बाद में, सुपरनैंट (ऊपरी स्पष्ट तरल) को हटादे और सावधानी पूर्वक निलंबन (सस्पेन्शन) को फ़िल्टर करें व्हातमान (Whatman) नंबर 1 फिल्टर पेपर का उपयोग करके करें।

vi. अवक्षेपित को आसुत जल के साथ 2-3 बार धोना चाहिए । इसके बाद प्रत्येक 100 ml उस डायथिलईथर और इथेनॉल के साथ दो धोना चाहिए।

vii. परखनली बगैर हिलाएं छोड़ दीजिये और 10 मिनट तक इंतजार करें।

viii. छर्रा (pellet) को रात भर के लिए कमरे के तापमान पर सूखने दें।

ix. केसिन की मात्रा का वजन करें, गणना करें और उपज का प्रतिशत रिकॉर्ड करें।

5.5 परिणाम

100 ml दूध से प्राप्त केसिन———————gm

चर्चा:

जलरागी अमीनो अम्ल में आर्जिनिन, एस्परजिन, एस्पार्टेट, ग्लूटामाइन, ग्लूटामेट, हिस्टिडीन, लाइसिन, सेरीन और थ्रेओनीन शामिल हैं। जबकि जलविरागी अमीनो अम्ल मेंवेलिन, टायरोसिन, ट्रिप्टोफैन, प्रोलिन, फेनिलएलनिन, मेथियोनीन, ल्यूसीन, आईसोल्यूसिन, सिस्टीन और एलनिन शामिल हैं।

5.6 सावधानियां

1. ठण्ड डायथिल ईथर का प्रयोग करें और बोतल को आंच से दूर रखें।
2. प्रयोग के साथ प्रारम्भ करने से पहले मानक बफर के साथ pH मीटर को अंशशोधित करें। सुनिश्चित करें कि pH मीटर ठीक से काम कर रहा है
3. आसुत जल के साथ pH इलेक्ट्रोड को अच्छी तरह से धोएं और पारभाषी कागज से इलेक्ट्रोड को सुचारू रूप से पोंछ लें। ध्यानपूर्वक यह सुनिश्चित करें कि pH इलेक्ट्रोड को पोंछने के लिए लिंटमुक्त पारभाषी कागज का ही उपयोग किया गया है।
4. 20 मिमी से अधिक गहराई में घोल में इलेक्ट्रोड को विसर्जित न करें।
5. जब इलेक्ट्रोड को घोल में डुबोया जाता है, तो pH के मान में उतार–चढ़ाव होगा, इसलिए पठन को स्थिर करने के लिए लंबे समय तक प्रतीक्षा करना सुनिश्चित करें।

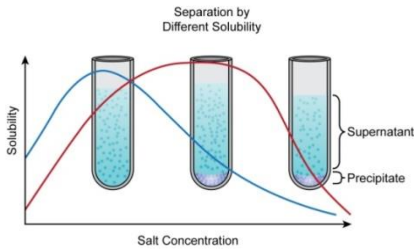
बोध प्रश्न

1. आइसोइलेक्ट्रिक पॉइंट को परिभाषित करें।

2. जवित्तेर (zwitter) आयन क्या है?

3. प्रोटीन अवक्षेपित पर समविभव बिन्दु की भूमिका की व्याख्या करें।

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY



अभ्यास 6

अमोनियम सल्फेट प्रभाजन विधि द्वारा सीरम प्रोटीन का पृथक्करण

संरचना

6.1 संभावित अध्ययन परिणाम
6.2 सिद्धांत
6.3 आवश्यक सामग्री
6.4 कार्यविधि
6.5 परिणाम
6.6 सावधानियाँ

6.1 प्रस्तावना

पिछले प्रयोगों में आपने प्रोटीन सांद्रता और निष्कर्षण का अनुमान लगाया है। इस प्रयोग में आप सीरम के नमूने से प्रोटीन को अलग करने का तरीका प्रदर्शन करेंगे। प्रोटीन को रक्तसीरमया प्लाज्मा के प्रमुख घटकों में से एक माना जाता है। हालांकि, अधिकांश सीरम प्रोटीन जैवरासायनिक रूप से अशुद्ध/संयुग्मी होते हैं क्योंकि वे कार्बोहाइड्रेट जैसे अन्य पदार्थों के संयोजन में पाए जाते हैं, जो रक्त संचलन में ग्लाइको प्रोटीन के रूप में उपस्थित होते हैं। प्रोटीन एक जीव के भीतर होने वाली लगभग सभी अभिक्रियाओं का एक हिस्सा है जिसमें जैवरासायनिक उत्प्रेरक अभिक्रियाएं, उभयप्रतिरोधी अम्ल– क्षार संतुलन, कोलाइडीपरासरण संरचनाकारखरखावआदिशामिलहैं।

कुछ प्रोटीन संचार प्रणाली में लिपिड, हार्मोन, विटामिन और खनिजों क`वाहक के रूप में भी कार्य करते हैं, और कोशिकीय गतिविधियों और प्रतिरक्षा प्रणाली के नियमन में भाग लेते हैं। कुछ रक्त प्रोटीन रक्त स्तंभन के लिए आवश्यक हैं और प्लेटलेट आसंजन और एकत्रीकरण में महत्वपूर्ण कार्य करते हैं, इसके साथ–साथ ही स्कंदन में भी सहायक है (अधिक विस्तृत जानकारी के लिए BBCCT-105 की इकाई-1 को उल्लेख करें)।

लगभग सभी सीरम प्रोटीन यकृत कोशिकाओं द्वारा उत्पादित और स्रावित होते हैं। इम्युनोग्लोबुलिन जैसे कुछ प्रमुख अपवाद स्वरूप प्रोटीन हैं जो रेटिकुलोएन्डोथेलियल ऊतकों, लसिकाभ्र और प्लाज्मा कोशिकाओं से मिलकर प्रतिरक्षा प्रणाली द्वारा निर्मित होते हैं।

अधिक भार प्रतिनिधित्व वाले सीरम प्रोटीन में एल्बुमिन, इम्युनोग्लोबुलिन, हैप्टोग्लोबिन (heptoglobin) स्थानांतरण और लिपोप्रोटीन शामिल हैं, और इनकी सांद्रता ग्राम/मि.ली. में मापी जा सकती है।

प्रोटीन प्रभाजन महत्व

व्यक्तिगत सीरम प्रोटीन या प्रोटीन के समूहों की पहचान और प्रमात्रकीकरण के लिए, सीमर या प्लाज्मा में प्रोटीन का या पृथक्करण किया जाना चाहिए अथवा व्यक्तिगत प्रोटीन को स्वतंत्र रूप से मापा जाना चाहिए। प्रोटीन विश्लेषण में प्रभाजन तकनीकें सबसे महत्वपूर्ण चरणों के साथ–साथ नैदानिक जीव विज्ञान में एबायोमार्कर की खोज में भी उपयोगी हैं। वर्तमान में उपलब्ध पृथक्करण प्रौधोगिकियां से सीरम में उपस्थित प्रोटीन संकुलों की बड़ी संख्या के कारण किसी सरल चरण में पूरे प्रोटीन संकुलों के विश्लेषण संभव नहीं।

केवल अमोनियम सल्फेट ही क्यों?

प्रोटीन प्रभाजन उद्देश्य के लिए अमोनियम सल्फेट सबसे अधिक उपयोग किया जाने वाला आम लवण है क्योंकि यह ठंडे बफ़ में असामान्य रूप से घुलनशील है (क्योंकि हमें प्रोटीन को ठंडा रखना है!) औरआर्थिक रूप से व्यवहार्य है। अमोनियम सल्फेट के प्रभाजन का उपयोग आमतौर पर अनुसंधान प्रयोगशालाओं में प्रोटीन शुद्धि के पहले चरण के रूप में किया जाता है क्योंकि यह गैर–प्रोटीन से कुछ प्रोटीन का शुद्ध शोधन प्रदान करता है और कुछ प्रोटीनों को अलग भी करता है। अमोनियम सल्फेट प्रभाजित प्रोटीन कर्दम भी का उत्पादित करता है जो आमतौर पर बहुत स्थिर होता है, इसलिए शुद्धिकरण को कुछ घंटों के लिए रोका जा सकता है ।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस परीक्षण को करने के बाद, आपः

- ❖ प्रोटीन घुलनशीलता पर आयनिक शक्ति के प्रभाव का वर्णन कर पाएंगे;
- ❖ अमोनियम सल्फेट प्रभाजन में उपयोग किए जाने वाले अभिकर्मकों की तैयारी का प्रदर्शन करें पाएंगे;
- ❖ प्रोटीन प्रभाजन के विभिन्न चरणों को सूचीबद्ध कर सकेंगे; और
- ❖ प्रोटीन के पृथक्करण में अमोनियम सल्फेट अंश के महत्व की व्याख्या कर पाएंगे

6.2 सिद्धांत

प्रोटीन आमतौर पर पानी के घोल में घुलनशील होते हैं क्योंकि उनकी सतहों पर जलरागी हाइड्रोफोबिक अमीनो अम्ल होते हैं जो पानी के अणुओं को आकर्षित करते हैं और उनके साथ अन्योन्यक्रिया करते हैं। यह घुलनशीलता इनकी आयनिक शक्ति और विलयन के pH पर आधारित होता है। प्रोटीनों में सम विभव बिंदु होते हैं, जिस पर उनके अमीनों अम्ल के पार्श्व समूहों के आवेश एक–दूसरे को संतुलित करते हैं। यदि किसी विलयन की आयनिक शक्तियां तो बहुत अधिक है या बहुत कम तो प्रोटीन उनके समविभव बिंदु की ओर प्रवृत्त होगा। आयनिक शक्ति किसी प्रोटीन की घुलनशीलता का प्रमुख कारक भी और जैसे ही आप इसमें कोई लवण डालकर आयनिक शक्ति बढ़ाते हैं, प्रोटीन का अवक्षेपण प्रबल होगा।

6.3 आवश्यक सामग्री

कांच के पात्र और उपकरण: पिपेट, बीकर, 50 ml, मापने का सिलिंडर, डायलिसिस थैली औरजार

अपकेंद्रित्र नली, 50 ml की क्षमता, अपकेंद्रित्र, चुम्बकीय विडोलक और टेफ्लॉन में लपेटा हुआ चुम्बकीय **pH** मीटर.

आवश्यक रसायन

सीरम (खरगोश / मनुष्य), अमोनियमसल्फेट लवण , फॉस्फेटबफर–सलाइन **(0.1M, pH7.4)**

6.4 कार्यविधि

1. पीबीएस (PBS, फॉस्फेट बफर सलाइन) के साथ प्रोटीन नमूने को **1: 5** अनुपात में तनुकरण (dilute) करें और प्रारम्भिक सामग्री या नमूना के रूप अंकित करें (प्रक्रिया प्रवाह चार्ट में भी दर्शाया गया है, चित्र 6.1)।

2. उपरोक्त नमूने में **20%** संतृप्ति के लिए अमोनियमसल्फेटलवण को कोमल मिश्रण करते हुए मिलाएँ । बर्फ अवगाह में अथवा **4^{0}C** पर **15** मिनट के लिए मिश्रण जारी रखें। संबंधित संतृप्ति के लिए मिलाये जाने वाले लवण की मात्रा को नॉमोग्राम (चित्र 6.2;11gm/100ml विलयन) के अनुसार गणना करें।

3. **4^{0}C** पर **30** मिनट के लिए **10000 rpm** पर अपकेंद्रित्र (centrifuge) करें। अधिप्लव (supernatant) को फेंक दें (विलयन 1) और पीबएस (प्रभाज्य 1) की न्यूनमत मात्रा के साथ गुटिकाओं (पेलेट्स) को डालें।

4. **50%** (अर्थात् **20-50%**) तक अमोनियम सल्फेट को चरण 2 (नामांकचित्र **2; 19** ग्राम / **100** मिली. विलयन) के अनुसार डालें। चरण 3 को दोहराएँ और गुटिकाओं (पेलेट्स) को प्रभाज्य **2** के रूप में और प्राप्त अधिप्लव को विलयन **2** के रूप में अंकित करें।

5. चरणों 2 और 4 के अनुसार अमोनियम सल्फेट को विलयन 2 में **100%** संतृप्ति (अर्थात **50-100%)** होने तक डालें (नामांक; **38 gm/100 ml** विलयन चित्र **6.2**)।

6. चरण 3 व 4 को दोहराएँ और गुटिकाओं(पेलेट्स) प्रभाज्य 3 के रूप में एवं विलयन को क्रमांक 3 में अंकित करें।

7. इस प्रकार, अंत में हम अमोनियम सल्फेट संतृप्ति **(%)** द्वारा सीरम नमूने से अलग किए गए तीन प्रभाजन प्राप्त अंश करेंगेंरू

   प्रभाज्य1 **(0-20)** – फाइब्रिनोजेन

   प्रभाज्य 2 **(20-50)** – ग्लोबुलिन

   प्रभाज्य 3 **(50-100)** –एल्बूमिन

8. इन प्रभाज्यों (प्रभाजन **1, 2, 3**) में से अतिरिक्त लवण को समाप्त करने के लिए फॉस्फेट बफर लवण के विरुद्ध अपोहनकिया जा सकता है।

9. इस प्रयोग अभ्यास के अवक्षेपित प्रभाज्यों (चित्र 6.3) को कागज और एसडीएस पेज (SDS-PAGE) वैद्युत कण संचलन (प्रयोग नंबर 7– 8) का उपयोग करके पहचान के लिए आगे संसाधित किया जा सकता है।

प्रारंभिक सामग्री (सीरम नमूना) को 1:5 अनुपात में तनूकृत करें

↓

अमोनियम सल्फेट को 20 % संतृप्ति के लिए 40C पर 15 मिनट तक कोमल मिश्रण करें तत्पश्चात 40C पर 30 मिनट के लिए 10000 rpm पर अपकेंद्रित्र करें।

↓

प्रभाज्य 1 (20% अंतक गुटिका (पेलेट्स) फाइब्रिनोजेन | विलयन 1 (अधिप्लव)

↓

अमोनियम सल्फेट को 50 % संतृप्ति (20–50%) के लिए 40C पर 15 मिनट तक कोमल मिश्रण करें. 40C पर 30 मिनट के लिए 10000 rpm पर अपकेंद्रित्र करें।

↓

प्रभाज्य **2 (20-50%** अंतक गुटिका (पेलेट्स) ग्लोबुलिन | विलयन 2 (अधिप्लव)

↓

अमोनियम सल्फेट को **100 %** संतृप्ति **(50-100%)** के लिए **4^0C** पर **15** मिनट तक कोमल मिश्रण करें। **4^0C** पर **30** मिनट के लिए **10000 rpm** पर अपकेंद्रित करें।

↓

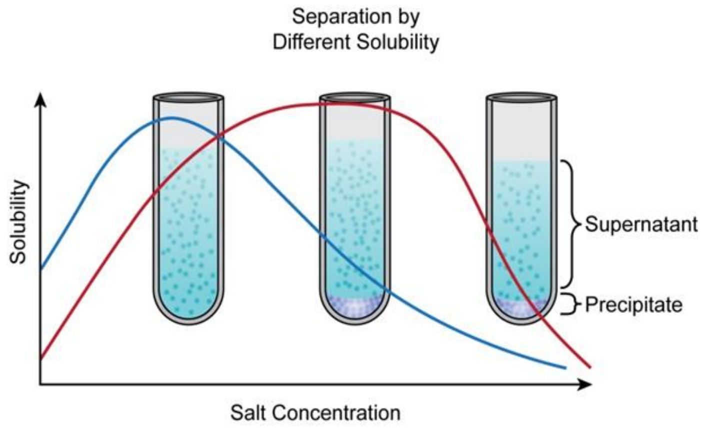
प्रभाज्य **3 (20-50%** अंतक गुटिका (पेलेट्स) एल्बूमिन | विलयन 3 (अधिप्लव)

चित्र 6.1.अमोनियम सल्फेट के साथ अवक्षेपण द्वारा सीरम प्रोटीन के प्रभाजन के लिए प्रवाह चार्ट। अतिरिक्त लवण को समाप्त करने के लिए सभी प्रभाज्यों (1,2,3) और विलयन 3 को फॉस्फेट बफर सलाइन के साथ मिलाया जाना चाहिए।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

Initial concentration of ammonium sulphate, (% saturation)	Final concentration of ammonium sulphate % saturation																
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
	Grams solid ammonium sulphate to be added to 1 L of solution																
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79

चित्र 6.2: संतृप्ति के संबंधित प्रतिशत प्राप्त करने के लिए तथा अमोनियम सल्फेट की मात्रा निर्धारित करने के लिए नामांक चित्र A (Source: https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com)



चित्र 6.3: प्रोटीन घुलनशीलता पर लवणता का प्रभाव ।

अमोनियम सल्फेट की प्रारंभिक और अंतिम सांद्रता, प्रतिशत संतृप्ति के रूप में व्यक्त की गयी है, जो क्रमशः ऊर्ध्वाधर और क्षैतिज मापकों पर है । इन बिंदुओं से खींची गई दो रेखाओं के प्रतिच्छेदन का बिंदु अंतिम आवश्यक सांद्रता की ओर ले जाने के लिए प्रारंभिक सांद्रता पर प्रत्येक लीटर घोल में डाले जाने वाले लवण की संख्या को इंगित करता है।

6.5 परिणाम

तीन प्रभाजनों **F1, F2, F3** और विलयन **3** को अमोनियम सल्फेट प्रक्षेपण विधि द्वारा प्राप्त किया जाता है।

अमोनियम सल्फेट लवण अवक्षेपण विधि द्वारा द्वारा पृथक सीरम प्रोटीन प्रभाजनों को ठीक से अंकित करने के पश्चात अगले विश्लेषणतक **–20°C** में संग्रहीत किया जा सकता है।

चर्चा

प्रोटीन को प्रक्षेपण के लिए अमोनियम सल्फेट लवण की उच्च सांद्रता की आवश्यकता होती है। 21-28% लवण एकाग्रता के आस पास ग्लोबुलिन की प्रक्षेपण को प्राप्त करने के लिए आवश्यक है।

प्राप्त प्रोटीन अंशों को प्रोटीन नमूने के आगे शुद्धिकरण के लिए अपोहन (डायलिसिस) के अधीन किया जा सकता है।

6.6 सावधानियाँ

1. इस प्रयोग में **pH** और तापमान दोनों ही महत्वपूर्ण हैं।

2. अमोनियम सल्फेट लवण,जो प्रोटीन को अवक्षेपित करता है, को मिलाते समय गांठ के गठन न बनें इसका ध्यान रखना चाहिए।

उपयोग और सीमाएं:

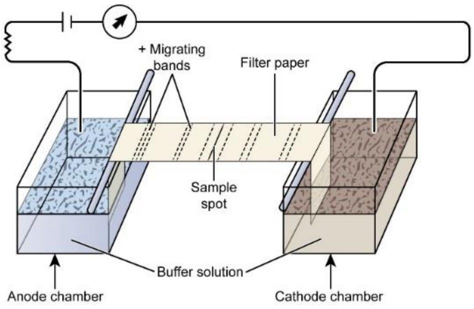
हालांकि इस पद्धति को मानव या खरगोश के ग्लोब्युलिन प्राप्त करने के लिए सफलतापूर्वक लागू किया गया है, वहीं ये विधि घोड़े या अन्य सीरम प्रोटीन के प्रभाजन के लिए उपयोग किए जाने पर समान परिणाम नहीं देगी।

माना जाता है कि अल्फा और बीटा क्षेत्र के घटक कुछ प्रतिरक्षा विकृति प्रतिक्रियाओं (जैसे त्वचा–संवेदी अभिकर्मकों) में भाग लेते हैं। उनके अलगाव के लिए, अधिक परिष्कृत प्रक्रियाएं आवश्यक हैं, लेकिन यहां प्राप्त ग्लोब्युलिन तैयारी एक अच्छी प्रारम्भिक सामग्री है।

बोध प्रश्न 1

1. ब्रैअमोनियम सल्फेट प्रक्षेपण विधि का सिद्धांत को समझाएं।
2. अमोनियम सल्फेट अंश के फायदों को सूचीबद्ध करें।
3. प्रोटीन घुलनशीलता पर लवणता के प्रभाव का वर्णन करें।
4. किस अंश में ग्लोबुलिन प्रोटीन होते हैं?

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY



अभ्यास7

कागज़ वैद्युतकणसंचलन के उपयोग से सीरमप्रोटीनपृथक्करण

संरचना

7.1 प्रस्तावना

संभावित अध्ययन परिणाम

7.2 सिद्धांत

7.3 आवश्यकसामग्री

7.4 कार्यविधि

7.5 परिणाम

7.6 सावधानियाँ

7.1 प्रस्तावना

पिछलेप्रयोगमेंआपनेसीरमप्रोटीन के कुल (पूरे अंश) पृथक्करण के लिए प्रक्रिया का प्रदर्शनकियाहैं।हालांकि, इस प्रयोग में आप सीरम प्रोटीन क` अलग प्रोटीन बैंड मे पृथक्करण किया जाने के बारे मे सीखेंगे।

सीरममें एक सौ से अधिकव्यक्तिगतप्रोटीनहोतेहैं, जिनमें से प्रत्येकप्रोटीन एक विशिष्टकार्यसमूह के साथविभिन्नरोगस्थितियोंमेंअपनीसांद्रतामेंविशिष्टभिन्नताकरसकतेहैं। यहअध्याय हमेंविभिन्नतकनीकों का एक सर्वेक्षणप्रस्तुतकरताहैऔर उन सिद्धांतोंको समझने मेंमददकरताहैजिनपरकागजवैद्युतकणसंचलनपृथक्करणआधारितहै, हमेंइसकीसंभावनाओंको समझने औरइसकीअधिकतमकार्यक्षमतातथाविभिन्न त्रुटियोंको समझने में सक्षमबनाताहै।

कागज वैद्युतकणसंचलन की तकनीकसरल और सस्ती है और इसमें पृथक्करण के लिए केवल सूक्ष्म मात्रा मेंही प्लाज्मा की आवश्यकता हो तीहै। इस विधिमें निस्यंदक कागज एक माध्यम की तरह कार्य करता है। सरलतम रूपमें वैद्युतकण संचलन तंत्र में दो कुंडहोते हैं जिसमे बफर घोल डाला जाता है, जिसकेमाध्यम से विद्युत प्रवाहपारितकियाजाता है (इलेक्ट्रोफोरेसिस उपकरण के बारे में अधिक जानने के लिए बीबीसीसीटी-105 की यूनिट-5 का उल्लेख करें)। सामान्यत: इसकाउपयोगप्रोटीन, अमीनो अम्ल और ऑलिगो पेप्टाइड को अलग करने में उपयोग कियाजाता है। यह किफायती और उपयोग में आसान है। प्रयोग शुरू करने से पहले आपको दिए गए YouTube लिंक पर उपलब्ध वीडियो देखने की सलाह दी जाती है । https://www.youtube.com/watch?v=FKxQxt2vAK4.

संभावित अध्ययन परिणाम

इस परीक्षण को करने के बाद, आप:

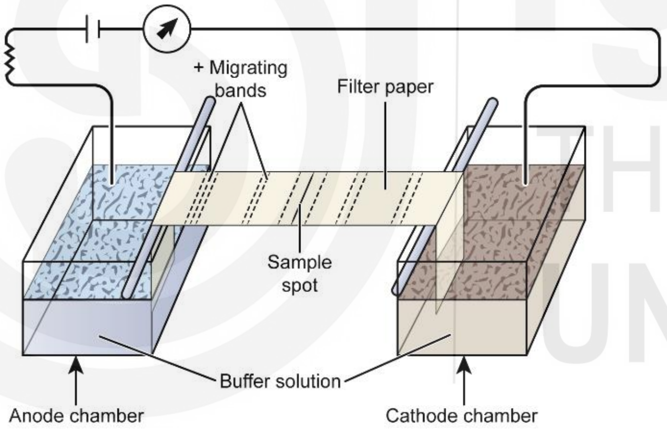
❖ कागज वैद्युतकणसंचलन में काम करने वाले सिद्धांत का वर्णन कर पाएंगे;

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

- ❖ कागज वैद्युतकणसंचलन में उपयोग किए जाने वाले अभिकर्मकों की तैयारी का प्रदर्शन कर पाएंगे;
- ❖ कागज वैद्युतकणसंचलन का उपयोग करके सीरम प्रोटीन के पृथक्करण का प्रदर्शन कर पाएंग; और
- ❖ अलगाव और पृथक्करण के बीच अंतर कर सकेंगे।

7.2 सिद्धांत

यह तकनीक छोटे आवेशित अणुओं जैसे अमीनो अम्ल और छोटे प्रोटीन के पृथक्करण के लिए उपयोगी है। निश्यंदक पेपर की एक पट्टी कोबफर (वेरोनल) के साथ सिक्तकिया जाता है और पट्टी के सिरोंको इलेक्ट्रोड (चित्र 7.1) वाले बफरकुंडों में निमज्जित (डुबा) करदियाजाता है। नमूनों को कागज के केंद्रमें बिन्दुकृत किया जाता है, इस पर उच्च वोल्टेज लगायाजाता है, और बिन्दुओं का उनके आवेशों के अनुसार अभिगमन हो जाता हैं। वैद्युतकणसंचलन के बाद, अलग–अलग घटकोंको विभिन्न प्रकार की अभिरंजन तकनीकों से पता लगायाजा सकता है, जोउनकी रासायनिक पहचान पर निर्भर करता है (अधिक विस्तृत जानकारी के लिए BBCCT-105 की इकाई-5 को उल्लेख करें)।



चित्र 7.1. कागज वैद्युतकण संचलन (एक आयामी) तंत्र।

7.3 आवश्यक सामग्री

1. कांच के पात्र औरउपकरण: व्हाटमैन (whatman) 3 मिमीपेपर की 6 x 9 cm पट्टी, इलेक्ट्रोडऔर कक्षों के साथपेपरवैद्युतकणसंचलन, मिक्रोपिपेट।

2. आवश्यकरसायन:

i. **कोमास्सीब्रिलिएंटब्लू (CBB) रंजित घोल:** कोमास्सीब्रिलिएंटब्लू, (0.08%) मेथनॉल : आसुत जलः ग्लेशियल एसिटिक अम्ल 5:5:1 के अनुपात में मिश्रण में तैयार करें। (0.8 g सीबीबी, 500 ml मेथनॉल, 500 ml आसुत जल, 100 ml ग्लेशियल एसिटिकअम्ल)।

ii. विरंजकविलयनः CBB (500 ml मेथनॉल, 500 ml आसुत जल, 100 ml ग्लेशियल एसिटिक अम्ल) के बिनारंजित घोल के विलायक मिश्रण जैसी ही रचना करें।

iii. वेरोनल बफर, pH8.6 (5mMबार्बिटल और 145mMNaCl), 100 ml.

iv. सीरम नमूना

7.4 कार्य विधि

1. व्हाटमैन3 की 6 x 9 cm की निस्यंदक पट्टी को वांछित pH, वेरोनल बफर, pH8.6 (5mM बार्बिटल और 45 mMNaCl) के एक उपयुक्त बफर घोल में सिक्त है।

2. नमूना (अतनुकृत सीरम, 20 - 50 μl) पट्टी के मध्य भाग में अनुप्रस्थदिशा लगायें।

3. पट्टी के दोनोंकोछोरोंकुंडोंमेंबफर घोल में डालकर स्थिर करें ओर इलेक्ट्रोड लगेदो ।

4. लगभग 20 वोल्ट/सेमी का विद्युत क्षेत्र स्थापित करें।

5. नमूने के आवेशितकण, ठोस आवेश के साथ शुद्ध आवेश, आकार और परस्परक्रियाओं के अनुसार, विपरीतध्रुवीयता के संबंधित इलेक्ट्रोड की ओर पट्टी के साथ विस्थापितहोते हैं।

6. कणों का सजातीय समूह एक अलग बैंड के रूपमें विस्थापितकरता है।

7. वैद्युतकण संचलन16-18 घंटे के लिए करें।

8. पृथक्कृत प्रोटीन एसीटोन या मेथनॉल जैसे एक स्थायीकर का उपयोग करके एक ठोस माध्यम परस्थिर करें।

9. प्रोटीन को देखने के लिए उन्हे (सीबीबी का उपयोग करके) रंजित करें। विरंजन करने के लिए विरंजक घोल का उपयोगकरें।

10. पृथक प्रोटीन अलग–अलग बैंड के रू॰ में दिखाई देंगें।

7.5 परिणाम

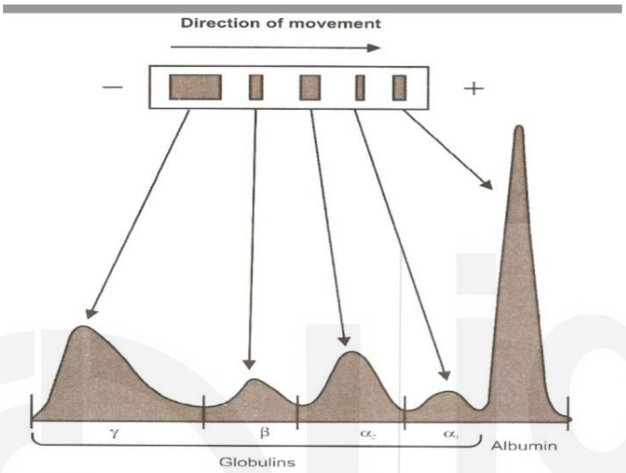
1. अलग–अलग प्रभाज्य निस्यंदक पट्टीपर प्रारम्भिक सीमा से पीछे की ओर चलते हुए नीलेरंग के बैंड के रूप में दिखाई देते हैं।

2. यदि प्रत्येक प्रभाजन के लिए एक मात्रात्मक अनुमान आवश्यक हो, तो बैंडको सावधानी पूर्वक काटकर क्षालन किया जा सकता है, या बैंडको डेंसिटोमीटर में वैकल्पिक रूप से क्रमवीक्षण किया जासकता है।

3. मानव प्लाज्मा में पांच अलग–अलग बैंडको पट्टी वैद्युतकणसंचलन (चित्र 7.2) पर पहचाना जासकता है।

4. अमोनियम सल्फेट लवण अवक्षेपण द्वारा पृथक सीरमप्रोटीन प्रभाजनों को (जिन्हे अच्छे से अंकित कर के संग्रहीत-20^0C, प्रयोग नंबर 6, कियागया था) भी इस विधिसे प्रयोग कियाजासकता है। तीनभिन्न प्रभाजनों F1, F2, F3 और विलयन 3में अलग–अलग बैंडिंग प्रतिरूप हैं जैसाकि चित्र 7.2 में दिखायागया है (उन परिणामोंको इस अभ्यास में प्रयोग कियाजाना है)।

5. इन प्रोटीनों की पहचान एसडीएस PAGE (सोडियम डोडेसिल पॉलीएक्रिलामाइड जेल वैद्युतकणसंचलन, प्रयोग संख्या 8) द्वाराभी की जासकती है।



चित्र 7.2:सामान्य सोरमप्रोटीन का क्रमवीक्षण (संदर्भ,Killingsworth, 1979)

चर्चा:–वैद्युतकणसंचलनसीरमप्रोटीन के बाद एल्बुमिन, α_1, α_2, β_1, β_2 और γ ग्लोबुलिन जैसे व्यक्तिगत बैंड में अलगहोजाते हैं। प्लाज्मा के नमूने के रूप में उपयोग किए जाने पर इसीतरह के फाइब्रिनोजेन सहित पैटर्नबैंड पाए जाता है।

7.6 सावधानियां

1. वैद्युतकणसंचलन के बाद पट्टियों को हवामें सुखाना चाहिए।

2. वैद्युतकणसंचलन तंत्र को सीधे छूने से बचें ।

3. रंजन और विरंजनकरने के समय प्रयोग शालाकी स्थिति और प्रोटीन की प्रकृति (लक्षण) के अनुसार मानकीकृत करने की जरूरत है।

बोध प्रश्न

1. कागज वैद्युतकणसंचलन में उपयोग की जाने वाली स्थिर (stationary)सामग्री क्याहै?

2. कागज वैद्युतकणसंचलन करने में उपयोग किए जानेवाले रसायनोंको सूचीबद्ध करें।

3. कागज वैद्युतकणसंचलन के बाद कितने प्रोटीन बैंड प्राप्तकिए जाते हैं और एनोड से कैथोड तक अपना ऑर्डर देते हैं?

4. रंजित घोल की संरचना दें।

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

अभ्यास 8

सोडियम डोडेसिल सल्फेट (एसडीएस) पॉलीए क्रिलामाइड जेल वैद्युत कण संचलन (SDS–PAGE) के उपयोग से प्रोटीन का पृथक्करण

संरचना

8.1 प्रस्तावना

संभावित अध्ययन परिणाम

8.2 सिद्धांत

8.3 आवश्यक सामग्री

8.4 कार्यविधि

8.5 परिणाम

8.6 सावधानियाँ

8.7 अन्य सुझावित पुस्तकें

8.1 प्रस्तावना

एसडीएस पॉलीएक्रिलामाइड जेल वैद्युत कण संचलन प्रोटीन को उनके आकार के आधार पर अलग करता है, जो बदले में उनके सापेक्ष आणविक द्रव्यमान से संबंधित होता है। यह प्रोटीन के जटिल मिश्रण के पृथक्करण, लक्षण वर्णन के लिए और एक प्रोटीन के सापेक्ष आणविक भार (M_r) के आकलन के लिए व्यापक रूप से उपयोग की जाने वाली तकनीक है। इसमें जेल के माध्यम से प्रत्येक मार्कर प्रोटीन की दूरी को मापा जाता है और विस्थापित भार का log (M_r) बनाम दूरी का एक अंशांकन वक्र आरेखित किया जाता है। अज्ञात भार के प्रोटीन से दूरी भी मापी जाती है, और ग्राफ से इसके log (M_r) का तथा अंततः इसके भार log (M_r) की गणना की जाती है। यह विधि प्रोटीनों की एक बड़ी भार (M_r) सीमा (10000-300000 kDa) कोव्याप्त करने के लिए उपयुक्त है।

संभावित अध्ययन परिणाम

इस परीक्षण को करने के बाद, आपः

- एसडीएस–पेज के संचालन के सिद्धांत की वर्णन कर पाएंगे;
- कागज और एसडीएस–पेज वैद्युत कण संचलन के बीच अंतर कर पाएंगे;
- प्रोटीन वैद्युतकण संचलन में एसडीएस के महत्व को पहचान सकेंगे;
- वैद्युतकण संचलन उपकरण की जमाव का प्रदर्शन कर पाएंगे; और
- पॉलीएक्रीलामाइड जेल तैयार कर पाएंगे।

8.2 सिद्धांत

सोडियम डोडेसिलसल्फेट (एसडीएस)–पॉलीएक्रिलामाइड जेल वैद्युत कण संचलन, एसडीएस–पॉलीएक्रिलामाइड जेल वैद्युत कण संचलन (एसडीएस-PAGE) गुणात्मक रूप से प्रोटीन मिश्रण का विश्लेषण करने के लिए सबसे व्यापक रूप से इस्तेमाल किया जाने वाला तरीका है। यह एक अनायनिक अपमार्जक है जो लंबे समय से प्रोटीन के जल विरागी क्षेत्रों से आबन्ध करने के लिए और उनमें से अधिकांश को उनके घटक उपइकाइयों में अलग करने के लिए जाना जाता SDS [CH_3- $(CH_2)_{10}$-CH_2OSO-$_3Na^+$] का बंधन पॉलीपेप्टाइड श्रृंखलाको एक बड़ा ऋणात्मक आवेश भी प्रदान करता है। मूल प्रोटीन की घटक उपइकाइयों को डाइसल्फ़ाइड आबन्ध एक साथ बांध कर रखता है, जिनके नमूनों को एसडीएस और बीटा–मर्कैप्टो एथेनॉल की उपस्थिति में उपयुक्त रूप से तनुकृत और गर्म कर के वैद्युत कण संचलन से पहले ही पृथक्कृत कर दिया जाता है, क्योंकि ये (एसडीएस और β–मर्कैप्टोएथेनॉल) डाइसल्फ़ाइड आबंधों का अपचयन करके सल्फाइड्रिल समूहों में परिवर्तित कर देतें हैं।

वैद्युत कण संचलन,पॉलीएक्रिलामाइड जेल में किया जाता है, ये एक स्थिर माध्यम है जो संवहन को कम करता है, और नमूनों से अभिक्रिया या आबंधन नहीं करता है। अमोनियम पर सल्फेट $S_2O_8^{2-}$ द्वारा उत्पन्न मुक्त कणों (SO_4) द्वारा मिश्रण में सक्रिय एक्रिलामाइड– जब पानी में घुल जाता है, तो लंबे बहुलक श्रृंखला का उत्पादन करने के लिए क्रमिक एक्रिलामाइड अणुओं के साथ अभिक्रिया करता है। इस प्रकार बनी लंबी श्रृंखलाएं, N. N'- मिथाइलीन – बिस (एक्रिलामाइड) द्वारा एक दूसरे से जुड़ती हैं, ऐसा माना जाता है कि ये यौगिकए क्रिलामाइड अणुओं के अपने गैर–अभिकृत छोरों पर सिर से सिर जुडने से बनते हैं।

टेट्रामेथिलीनडायमाइन (ज्डम्क्) या प्रोपियोनाइट्रिलयाबीटा–(डाइमिथाइलैमिनो) प्रोपियोनाइट्रिल को आमतौर पर 0.4% की सांद्रता में, मुक्त मूलक रूप में उपस्थित रहने वाले अणुओं को उनकी क्षमता के आधार पर, बहुलकीकरण के लिए उत्प्रेरक के रूप में मिलाया जाता है। जेल में छिद्र का आकार मुख्य रूप से त्रियक बंधन की मात्रा पर निर्भर करता है।

एसडीएस–पॉलीएक्रिलामाइड जेल में प्रोटीन की गतिशीलता उनके आणविक भार के लघु गणक का एक रैखिकमान है। वर्तमान अध्ययन के लिए उपयोग की जाने वाली विधि को असंतत ('डिस्क') जेल वैद्युत कण संचलन कहते हैं। इस पद्धति में दो जेल परतें हैं; एक निचली या विभेदन क्षमता वाली जेल परत और एक ऊपरी या चट्टेदार (स्टेकिंग) जेल होती हैं। दोनों जेल परतों को तैयार करने के लिए अलग–अलग आयनिक शक्ति और pH के बफ़र उपयोग किए जाते हैं । चट्टेदार(स्टैकिंग) जेल में एक्रिलामाइड की सांद्रता कम होती है, इसलिए इसके रोम कूप बड़े होते हैं।

नमूने को ग्लाइसीन हाइड्रोक्लोराइड बफर, pH 8.0 में घोला जाता है। जब वोल्टेज पारित किया जाता है, तो नमूना चट्टेदार (स्टैकिंग) जेल में प्रवेश करता है। इस pH (6.8) में, ग्लाइसीन मुख्य रूप से एक उभयाविष्ट आयन $(H_3N + CH_2COO^-)$ के रूप में मौजूद है, और यह अचल होता है। स्टैकिंग जेल में जाने के लिए इन

उभयाविष्ट आयनों की विफलता चलायमान आयनों की कमी पैदा करती है जिससे वर्तमान स्थिति में धारा प्रवाह कम हो जाता है।

पूरे कार्यकारी तंत्र में एक निरंतर धारा प्रवाह बनाए रखने के लिए एक बहुत ही उच्च स्थानीयकृत वोल्टेज प्रवणता विकसित की जाती है, जिससे अनुगामीग्ला इसी निकृत आयनों और क्लोराइड आयनों के बीच जो अत्यधिक ऋणात्मक आवेशित होता है वो तेजी से आगे बढ़ता है। संदर्भ के रूप में नमूने में एक ट्रेकिंग अभिरंजक, ब्रोमोफेनोलनीला, डाला जाता है जो इनमे उपस्थित बृहदणुओं की तुलना में अधिक तेजी से पलायन करता है। इस प्रकार,सापेक्ष आयन की गतिशीलता में वरीयतानुसार ग्लाइसीनेट <प्रोटीन<ब्रोमोफेनोल ब्लू<क्लोराइड आते हैं। उच्च स्थानीय विद्युत क्षेत्र में, सभी आयनिक प्रोटीन तेजी से पलायन करते हैं। इसमें चट्टेदार (स्टैकिंग) जेल के बड़े आकार के छिद्र उनकी अभिगमन को बाधित नहीं करते हैं। यदि प्रोटीन नमूनों में से कोई भी तेजी से चलता है, तो यह क्लोराइड आयनों के क्षेत्र तक पहुंचता है जहां ऋणायनों की उपस्थिति के कारण वोल्टेज कम होता है और इसलिए मंदित हो जाता है और बदले में पिछड़े प्रोटीन के अणु आगे निकल जाते हैं। दूसरी ओर, यदि कोई प्रोटीन पीछे रहता है, तो यह ग्लाइसीनेट क्षेत्र में आता है जहां आवेशित प्रजातियों की कमी के कारण उच्च वोल्टेज होता है। इसलिए, वे तुरंत आगे बढ़ जाते हैं। इसके परिणामस्वरूप ग्लाइसीनेट और क्लोराइड आयनों के बीच एक तंग डिस्क में प्रोटीन के नमूनों का एकत्रीकरण हो जाता है।

सभी नमूने डालने के बाद, एक धारा को जेल में प्रवाहित किया जाता है। वास्तव में, अलग किए जाने वाले नमूनों को मुख्य पृथक्करण जेल में सीधे नहीं भरा जाता है। जब मुख्य पृथक्करण जेल (आमतौर पर लगभग 5 सेमी लंबा) को ग्लास प्लेटों के बीच डाला जाता है और जमने के लिए छोड़ जाता है, तो इस पृथक्करण करने वाले जेल के शीर्ष पर एक छोटा (लगभग 0.8 सेमी) चट्टेदार (स्टैकिंग) जेल डाला जाता है और इस जेल में छोटे कूप बनाए जाते हैं जिनमें प्रोटीनभरे जाते हैं। इस चट्टेदार (स्टैकिंग) जेल का उद्देश्य मुख्य नमूने को पृथक्करण करने वाले जेल में प्रवेश करने से पहले प्रोटीन के नमूने को एक गाढ़े बैंड में केंद्रित करना है। यहउद्देश्य वैद्युत कण संचलन बफर और चट्टेदार (स्टैकिंग)जेल बफर के बीच आयनिक शक्ति और चभ में अंतर का उपयोग करके प्राप्त किया जाता है और इस प्रक्रिया को 'आइसोटैकोफोरेसिस'(प्ज्च) के रूप में जाना जाता है। चट्टेदार (स्टैकिंग) जेल में एक बहुत बड़े आकार के छिद्र (4% एक्रिलामाइड) होते हैं, जो प्रोटीन को स्वतंत्र रूप से स्थानांतरित करने और विद्युत क्षेत्र के प्रभाव में, या एकत्रित होने देते हैं। इसमे बैंड–शार्पिंग प्रभाव इस तथ्य पर निर्भर करता है कि ऋणात्मक रूप से आवेशित ग्लाइसीनेट आयन (वैद्युत कण संचलन बफर में) प्रोटीन–एसडीएस संकुल की तुलना में कम वैद्युत कण संचलन गतिशील होते हैं, जिससे ये लोडिंग बफर और स्टैकिंग जेल बफर के क्लोराइड आयनों (Cl^-) की तुलना में कम गतिशील हो जाते हैं।

जब कोई नमूना विभेदन जेल (pH8.6) में प्रवेश करता है, तो ग्लाइसीन ऋणायनी ($NH_2CH_2COO^-$)बन जाता है और प्रोटीन से आगे निकल जाता है। इस जेल में छोटे छिद्र का आकार प्रोटीन अणुओं की गति को बाधित करता है। इस पूरे जेल में निरंतर विद्युत धारा क्षेत्र की शक्ति रहती है क्योंकि यहाँ आयनों की कमी नहीं होती है और प्रोटीन का पृथक्करण उनके आणविक भार के अनुसार होता जाता है।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

नमूने कैथोड से एनोड की ओर बढ़ते हैं। इलेक्ट्रोड बफर में ग्लाइसिन, ट्रिस और एसडीएस होते हैं। परिचालन बलमुख्य रूप से पानी का वैद्युत अपघटन करता है जिससे कैथोड पर हाइड्रोजन और एनोड पर ऑक्सीजन का उत्पादन होता है।

नमूने कैथोड से एनोड की ओर बढ़ते हैं। इलेक्ट्रोड बफर में ग्लाइसिन, ट्रिस और एसडीएस होते हैं। परिचालन बलमुख्य रूप से पानी का वैद्युत अपघटन करता है जिससे कैथोड पर हाइड्रोजन और एनोड पर ऑक्सीजन का उत्पादन होता है।

कैथोड अभिक्रियाएँ (ऊपरी कोष्ठ)

$$2e^- + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,OH- + H_2$$

$$HA + OH^- \longrightarrow A^- + H_2O$$

एनोड अभिक्रियाएँ (निचला कोष्ठ)

$$H_2O \longrightarrow 2\,H+ + 2O_2 + 2e^-$$

$$H^+ + A^- \longrightarrow HA$$

धारा प्रवाह की प्रक्रिया पूरी होने के बाद, जेल को मेथनॉलः आसुत जलः ग्लेशियल एसिटिक अम्ल को 5: 5: 1 के अनुपात में तैयार 0.08% को मास्सी ब्रिलियंटब्लू घोल अभिरंजन के लिए चार घंटे के लिए छोड़ दें । फिर, इसे उसी विलायक मिश्रण (सीबीबीरहित) द्वारा विरंजित दिया जाता है जिसे विरंजक घोल कहा जाता है।

8.3 आवश्यक सामग्री

कांच के पात्र और उपकरणः

बीकर्स, वॉल्यूमेट्रिक पिपेट, माइक्रोपिपेट, कांच प्लेट्स, स्पेसर्स, वैद्युत कण संचलन उपकरण, pH मीटर, इलेक्ट्रोड और कक्षों के वैद्युत कण संचलन, मिक्रोपिपेट।

आवश्यक सायनः

1. **30% एक्रिलामाइड**: 29 ग्राम एक्रिलामाइड और 1 ग्राम N, N -मिथाइलिन बिस्एक्रिलामाइड तौल लें। इनको 60 मिलीलीटर गर्म विआयनीकृत पानी डालें और इसे 37^0C तापमान तक गर्म करें और इस घोल का आयतन 100 मिलीलीटर की अंतिम मात्रा बनाने के लिए और विआयनीकृत पानी मिलाएँ; फिल्टर; अब हमारे पास 30% (w/v) एक्रिलामाइड स्टॉक घोल तैयार है; एक्रिलामाइड और बिस–एक्रिलामाइड को भंडारण के दौरान ऐक्रेलिक अम्ल धीरे–धीरे डबल ऐक्रेलिक अम्लमें बदल जाता है, इसलिए घोल का pH7.0 से अधिक नहीं होना चाहिए और इसे एम्बर काँच की बोतल में 4^0C र रखा जाना चाहिए।

2. **10% सोडियम डोडेसिल सल्फेट (एसडीएस)**: 10 ग्राम एसडीएस और 90 मिलीलीटर विआयनीकृत पानी लें; इसे मिलाकर 68^0C तक गर्म करें और इसमें तब

तक सांद्रित हाइड्रोक्लोरिक अम्ल की कुछ बूंदें डालें जब तक घोल का pH7.2 हो जाता है; तत्पश्चात 100 मिलीलीटर तक बनाने के लिए पानी मिलाएँ; इस सारी प्रक्रियाओं के बाद, हमारे पास 10% (w/v) एसडीएस है।

3. **चट्टेदार (स्टैकिंग) जेल बफर (1 mol / L Tris– HCl pH6.8)**: 80 मिलीलीटर विआयनीकृत पानी में 12.12 ग्रा.ट्रिसको घोलें। सांद्रित हाइड्रोक्लोरिक अम्ल के साथ pH 6.8 तक समायोजित करें; 100 मिलीलीटर की मात्रा बनाने के लिए विआयनीकृत पानी मिलाएँ और 4^0C पर भंडारित करें।

4. **विभेदन जेल बफर (1.5 mol / L Tris – HCl pH8.8)**: 80 मिलीलीटर विआयनीकृत पानी में 18.16g ट्रिस घोलें; सांद्रित हाइड्रोक्लोरिक अम्ल के साथ pH8.8 तक समायोजित करें; 100 मिलीलीटर की मात्रा बनाने के लिए विआयनीकृत पानी मिलाएँ और 4^0C पर भंडारित करें।

5. **10% अमोनियम परसल्फेट (AP)**: एक्रिलामाइडऔर बिस–एक्रिलामाइड के बहुलकीकरण के लिए अमोनियम परसल्फेट, मुक्त मूलक उपलब्ध करता है;10% की लघु मात्रा (w/v) का घोल तैयार करने के लिए विआयनीकृत पानी का उपयोग करें और 4^0C पर भंडारित करें। चूँकि अमोनियम परसल्फेट धीरे–धीरे विघटित होता है, इसलिए इसे हर दूसरे सप्ताह में नए सिरे से तैयार किया जाना चाहिए।

6. **TEMED (N, N, N, N – टेट्रामिथाइलिनडाई अमीन)**: मुक्त मूलक बनाने के लिए अमोनियम सल्फेट को उत्प्रेरित कर, TEMED ने एक्रिलामाइड और बाइस–एक्रिलामाइड के बहुलकीकरण करता है। चूंकि TEMED केवल एक मुक्त क्षार रूप में कार्य करता है, इसलिए pH कम होने पर बहुलकीकरण बाधित होता है।

7. **ट्रिस–ग्लाइसिन वैद्युतकण संचलन बफर (5X) या इलेक्ट्रोड बफरः** 15.1 ग्रा. ट्रिस और 94 ग्रा.ग्लाइसिन वजन करें; और 900 मिलीलीटर विआयनीकृत पानी में घोल लें; फिर 50 मिली. 10% (w/v) एसडीएस में विआयनीकृत पानी 1000 मिली. की मात्रा होने तक मिलाएँ। उपयोग करते समय 5 गुना तनुकरण करें। अंतिम सांद्रता इस अनुसार तैयार होगीः ट्रिस, 25 मिमी/ली.; ग्लाइसिन, 250 मिमी/ली.; एसडीएस, 0.1% और बफर का pH8.3 है।

8. **कोमास्सीब्रिलियंटब्लू** (CBB) **अभिरंजन घोलः** 0.08% :कोमास्सी ब्रिलियंट ब्लू घोल, मेथनॉलः आसुत जलरू ग्लेशियल एसिटिक अम्ल के 5:5:1 के अनुपात के मिश्रण में 4घंटे के लिए रखने से तैयार होता है। इसके लिए 0.8 ग्राम सीबीबी, 500 मिलीलीटर मेथनॉल, 500 मिलीलीटर आसुत जल, 100 मिलीलीटर ग्लेशियल एसिटिक अम्ल लें ।

9. विरंजन घोलः CBB (मेथनॉल, 500 मिलीलीटर आसुत जल, 100 मिलीलीटर ग्लेशियल एसिटिक अम्ल) के बिना अभिरंजन घोल के विलायक मिश्रण की ही रचना है।

10. नमूना बफर या **2x** एसडीएस–लोडिंग बफरः 2% एसडीएस, 10% ग्लिसरॉल, 0.01% ब्रोमोफेनॉल ब्लू, 50mM ट्रिस हाइड्रोक्लोरिक अम्ल (pH6.8) में 5% बीटा–मर्केप्टोएथेनोल।

11. व्यावसायिक रूप से उपलब्ध प्रोटीन आणविक भार मार्कर (सोपान)।

12. जेल संकचन इकाई के साथ अंतरालक, एक नोकदार ग्लास प्लेट और दूसरे पूर्ण आयताकार ग्लास प्लेट, कुंड की तैयारी के लिए कंघी। स्थानांतरक विंदुक टिप, आदि।

13. जेल संकचन इकाई के साथ अंतरालक, एक नोकदार ग्लास प्लेट और दूसरे पूर्ण आयताकार ग्लास प्लेट, कुंड की तैयारी के लिए कंघी। स्थानांतरक विंदुक टिप, आदि।

8.4 कार्यविधि

प्रयोग शुरू करने से पहले आपको दिए गए You Tube लिंक पर उपलब्ध वीडियो देखने की सलाह दी जाती है।

https://www.youtube.com/watch?v=i_6y6Z5UvwE.

क. एसडीएस–**PAGE** जेल की तैयारीः

1. आकृति 1 में दिखाए गए अनुसार जेल संकचन के लिए कांच की प्लेटों को समुच्चयन करें (चित्र 8.1)।

2. एक टेप से या पिघले हुए अगार के साथ 3 पक्षों को सील करें और समुच्चय को कसकर जकड़ें। प्लेटों के बीच में पानी भरकर सुनिश्चित करें कि समुच्चय रिसाव प्रतिरोधी है। कांच की प्लेटें साफ और ग्रीस मुक्त होनी चाहिए

3. पृथक्करण करने वाले जेल की सांद्रता और मात्रा निर्धारित करें;Tris-ग्लाइसिन SDS-Polyacrylamide जेल वैद्युत कण संचलन (तालिका 8.1) की तैयारी के लिए सूचीबद्ध सामग्री के अनुसार वांछित पृथक्करण जेल तैयार करें। **विभेदन जेल की ऊंचाई पर एक मार्कर के साथ एक प्लेट को अंकित करें (नीचे से लगभग 5.0 सेमी)।**

4. स्टैकिंग जेल (कंघी की दांत की लंबाई जमा 1 सेमी) के दुर्गलन के लिए जगह छोड़कर;दो ग्लास शीटों के मध्य में शीघ्रता से पृथक्करण जेल को अंतःक्षेपित करें,।

5. आइसोबूटानोल या पानी (2 मिमी गहराई) के साथ विभेदन करने वाले जेल को उपरिशायी करें। यह आवरण परत जेल में ऑक्सीजन के प्रसार को रोक सकती है और जेल के बहुलककरण कोभी रोकती है; जेल को कमरे के तापमान पर लंबवत रखें।

6. कमरे के तापमान पर बहुलकीकरण के लिए 15 से 20 मिनट तक छोड़ें।

7. पृथक्करण जेल के बहुलकीकरण के बाद, आवरण तरल डालें;जेल के शीर्ष को कई बार धोएं ताकि जिन एक्रिलामाइड का बहुलकीकरण नहीं हुआ उन्हेंहटाया जा सके; जहाँ तक संभव हो जेल पर फैले तरल को बाहर निकाल दें।

8. आवश्यकतानुसार चट्टेदार (स्टैकिंग) जेल की मात्रा निर्धारित करें; चट्टेदार(स्टैकिंग) जेल (तालिका 8.2) के ट्रिस– ग्लाइसिन एसडीएस–पॉलीएक्रिलामाइड जेल वैद्युतकणसंचलन की तैयारी के लिए सूचीबद्ध सामग्री के अनुसार वांछित चट्टेदार(स्टैकिंग) जेल तैयार करें।

9. स्टैकिंग जेल को पृथक्करण जेल पर सीधे पिपेट करें, फिर धीरे–धीरे विभेदन जेल से लगभग 1 सेमी ऊपर स्वच्छ सहायक कंघी डालें; हवा के बुलबुलों से बचाने के लिए, अंत में कंघी के बीच के अंतरों को स्टैकिंग जेल डालकर भरें।

10. कमरे के तापमान पर लगभग 15 मिनट तक बहुलकीकरण के लिए छोड़ें। स्टेकिंग जेल के बहुलकीकरणहोने के बाद कंघी निकालें, जिससे की नमूने भरने ले कूप तैयार हों सके।

ख. एसडीएस–PAGE के लिए नमूने की तैयारीः

1. नमूना ए, बी, सी के 15 माइक्रोलीटर मात्रा को अलग–अलग सूक्ष्म अपकेंद्रित्र नलियों में डालें।

2. प्रत्येक नमूने में 15 माइक्रोलीटर 2X एसडीएस नमूना बफर या एसडीएस नमूना लोडिंग बफर डालें। अच्छी तरह से मिलाएं (भ्रमिल करें)।

3. 5 मिनट के लिए 100^0C (उबलते जल ऊष्मक) पर गर्म करें।

4. इनको कमरे के तापमान पर ठंडा करें और अब नमूने भरने के लिए तैयार हैं।

5. व्यावसायिक रूप से उपलब्ध प्रोटीन आणविक भार मार्कर या सोपान के साथ तैयार रहें।

ग. कोष्ठक और वैद्युतकण संचलन का समुच्वयः

1. जेल से संकचन संलग्नक निकालें करें (चित्र 8.2)।

2. जेल को वैद्युतकण संचलक कोष्ठक में,जिसमें नोकदार पृष्ठ अंदर की तरफ हो, से क्लैंप से जकड़ें।

3. ऊपरी कक्ष और निचले कक्ष को 1X इलेक्ट्रोड बफरसे भरें।

नोटरू ऊपरी कक्ष में बफर का स्टैकिंग जेल से संपर्क होना चाहिए। सुनिश्चित करें कि कोई लीक नहीं हैं। नीचे सतह पर हवा के बुलबुले के फंसने से बचें।

4. ध्यान से नमूने ए, बी और सी को अलग–अलग नमूना कुपों के तल में भरें। एक कूप में, प्रोटीन आणविक भार मानक या मार्कर के 5-10 माइक्रोलीटर मात्रा को भरें। लोडिंग (नमूनों के भरने) का क्रम ध्यान रखें/अंकित करें।

5. इलेक्ट्रोड और विद्युत आपूर्ति के लिए तारों को संलग्न करें, निचले बफर कोष्ठ को लाल (धनावेश)तार और ऊपरी बफर कोष्ठ को काले (ऋणावेश) तार के साथ जोड़ें।

6. विद्युत आपूर्ति को 100 वाट पर स्थिर करें और वैद्युतकणसंचलन करें जब तक कि अभिरंजक का अग्रछोर जेल के नीचे से 0.5 सेमी न पहुँच जाए।

7. विद्युत आपूर्ति बंद करें, तारों को अलग करें, और ग्लास प्लेटों को जेल से ध्यान से हटा दें।

घः जेल का अभिरंजनः

1. धीरे–धीरे कांच की प्लेटें सुखाकर स्लैब जेल हटाएँ। कांच की प्लेटों को अलग करने के लिए एक स्पैटुला का उपयोग करें।

2. बाद के अभिविन्यास के लिए विभेदन जेल के एक निर्दिष्ट कोने को काटें।

1. एक आवरित प्लास्टिक या कांच की ट्रे में 100x1 कोसमासी ब्रिलियंट ब्लू अभिरंजक घोल में जेल रखें।

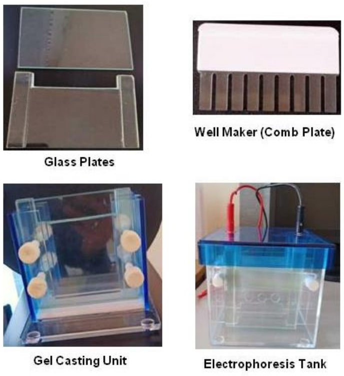
2. मिश्रण पटल रॉकर पर अभिरंजक मिलने के लिए 30 से 60 मिनट रखें।

3. इस्तेमाल किए गए अभिरंजक घोल को एक अलग बर्तन में डालें (अभिरंजक घोल को कई बार इस्तेमाल किया जा सकता है, करें चित्र 8.2b)।

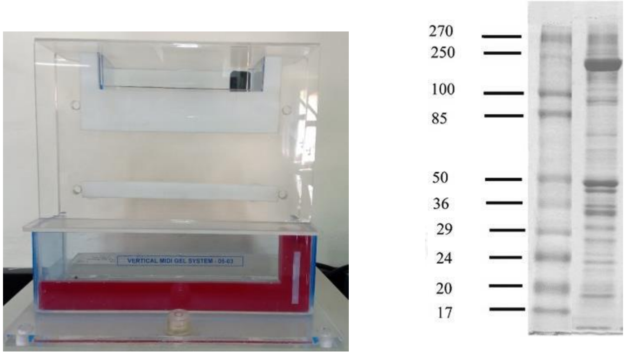
4. विरंजन के लिए 1x विरंजक घोल में मिलाने हेतु छोड़ें। जब विरंजक घोल नीला हो जाए तो इसे नए विरंजक घोल से बदलें और तब तक हिलाएँ जब तक कि जेल की पृष्ठभूमि स्पष्ट नहीं हो जाती।

3. एक सफेद पृष्ठभूमि के आने पर जेल का निरीक्षण करें।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY



चित्र 8.1 ए. कांच प्लेटों का समुच्च्य और एसडीएस-PAGE की इकाई



8.2. बीः स्लैब जेल वैद्युतकणसंचलन तंत्र और पृथक्कृत प्रोटीन की छवि (लेन 1–सोपान और लेन 2–पृथक्कृत प्रोटीन

सारणी 8.1. विभेदन जेल (8 मिली): विभिन्न जेल प्रतिशत रचनाओं के लिए विभेदन जेल या पृथक्करण जेल करने की संरचना (Ref: Sambrook, *J. et al*), 2012.

संघटक	7.50%	10%	12%	15%	18%
1.5M ट्रिस -HCl(pH 8.8) ml	2	2	2	2	2
30% एक्रिलमाइड ml	2	2.67	3.2	4	4.8
आटोक्लेव आसुत जल ml	3.8	3.2	2.6	1.8	1
10%एस डी एस µl	80	80	80	80	80
40% ए पी एस µl	20	20	20	20	20
TEMED µl	8	8	8	8	8

सारणी 8.2. चट्टेदार (स्टेकिंग) जेल (5 मिली.)रू 1 और 2 जैल के लिए 5% संरचना के स्टैकिंग जेल की संरचना

(Ref: Sambrook, *J. et al,* 2012)

संघटक	1 जेल	2 जेल
0.5M ट्रिस-HCl(pH 6.8)	1.25 मिली.	2.5 मिली.
30% एक्रिलमाइड	670 माइक्रोली.	1.34 मिली.
आटोक्लेव आसुत जल	2.975 मिली.	5.95 मिली.
10%एस डी एस	50 माइक्रोली.	100 माइक्रोली.
40%ए पी एस	25 माइक्रोली.	50 माइक्रोली.
TEMED	5 माइक्रोली.	10 माइक्रोली.

8.5 परिणाम

विरंजन होने के बाद, सफेद पृष्ठ भूमि में जेल का निरीकक्षण किया गया। विभिन्न आणविक भार वाले प्रोटीन एसडीएस–PAGE के दौरान अलग–अलग विस्थापन करते हैं और इसलिए मौजूद बैंड की संख्या नमूने में मौजूद प्रोटीन की संख्या से मे लखाती है।

नमूने में अज्ञात प्रोटीन और उनके आणविक भार का पता लगाने के लिए भी जेल डेन्सिटोमीटर (BioRad) में जेल का निरीक्षण किया जा सकता है।

1. **प्रोटीनमानकयामार्कर/सोपानः** व्यावसायिक रूप से उपलब्ध प्रोटीन आणविक भार मार्कर में प्रोटीन के निम्नलिखित मिश्रण शामिल हैं।

चर्चा

जेल में तय की गयी दूरी (मिमी) के साथ मानक आणविक भार (Mr) और उसकी सीमा को पुस्तक (Principles and Techniques of biochemistry and molecular biology; Wilson and Walker) से एक मानक सदर्भ से सूचीबद्ध संदर्भ से सूचीबद्ध (तालिका 3) किया गया है।

तालिका 8.3. ज्ञात आणविक द्रव्यमान (Mr) के मार्कर प्रोटीन की एक श्रृंखला के द्वारा एसडीएस–पॉलिए क्रीलामाइड जेल में तय की दूरी। संदर्भः Wilson Walker

प्रोटीन	M_r (Da)	तय दूरी (मिमी.)
ट्रांसफेरिन	78 000	6.0
बोवाइन सीरम एल्बुमिन (BSA)	66 000	12.5
ओवलब्यूमिन (अंडा एल्बुमिन)	45 000	32.0
ग्लिसराल्डिहाइड –3–फॉस्फेट डिहाइड्रोजनेज	36 000	38.0
कार्बोनिक एनहाइड्रेज़	29 000	50.0
ट्रिप्सिनोजेन	24 000	54.0
सोयाबीन ट्रिप्सिन अवरोधक	20 100	61.0
मायोग्लोबीन	17 800	69.0
लाइसोजाइम	14 300	79.0
साइकोक्रोम सी	12 400	86.5

8.6 सावधानियां

प्रक्रिया के चल रहे पाठ और **बोल्डफ़ॉन्ट** में अभिकर्मकों की तैयारी में महत्वपूर्ण सावधानियों का उल्लेख किया गया है।

बोध प्रश्न

1. वैद्युतकण संचलन तंत्र मेंकाम करने वाला सिद्धांत की व्याख्या करें।

2. एसडीएस और इसका महत्व क्या है?

3. चट्टेदार (स्टेकिंग) और विभेदन जेल के बीच अंतर करें।

4. एसडीएस–पेज में अमोनियम पर सुलफाट और temed की भूमिका का वर्णन करें।

8.7 अन्य सुझावित पुस्तकें

1. In Wilson, K., In Walker, J. M., In Hofmann, A., & In Clokie, S. (2018). Wilson and Walker's principles and techniques of biochemistry and molecular biology.

2. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2012). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

3. Cooper, T. G., & Cooper, T. G. (1977). The tools of biochemistry. New York: J. Wiley.

4. Layne, E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology 3:* 447-455. 1957.

5. Stoscheck, CM. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology 182:* 50-69. 1990.

6. Layne, E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology 3:* 447-455. 1957.

7. Stoscheck, CM. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology 182:* 50-69. 1990.

8. Noble JE. Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes.Methods Enzymol. 2014;536:17-26. doi: 10.1016/B978-0-12-420070-8.00002-7.

9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem 193: 265 (The original method).

10. Hartree E.E. (1972). Anal. Biochem. 48:422 (This modification makes the assay linear over a larger range than the original assay)

11. Wilson, K. and Walker, J. (2000) "Practical Biochemistry: Principles and Techniques", Cambridge University Press.

12. Bradford, M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254, (1976).

13. http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html

14. McMaster University Chem Lab Manual

15. Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Microscale Approach, Pavia, Lampman, Kriz And Engel, Saunders.

16. http://lincoln.pps.k12.or.us/lscheffler/ProteinMilk.html

17. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem 193: 265 (The original method).

18. Hartree E.E. (1972). Anal. Biochem. 48:422 (This modification makes the assay linear over a larger range than the original assay)

19. Wilson, K. and Walker, J. (2000) "Practical Biochemistry: Principles and Techniques", Cambridge University Press.

20. T. G. Cooper (1977) *The Tools of Biochemistry*, 1st Edition, pp. 355–405, John Wiley & Sons, New York.

21. Stockham SL, Scott MA (2002): Fundamentals of veterinary clinical pathology. Iowa State Press, Ames. 251–276.

22. Meyer DJ, Harvey JW (eds) (2004): Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis. 3rd edn. Saunders, Philadelphia. 156–168.

23. Burtis CA, Ashwood ER (eds) (2001): Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 5th edn. WB Saunders Company, Philadelphia. 1091 pp.

24. Lodish, H., et al. *Molecular Cell Biology.* 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co., 2000.

25. Killingsworth, L.M., Plasma Protein Patterns in Health and Disease, CRC Crit Rev in Clin Lab Sci, 1-30, August, 1979.

26. Westheimer, Reiner. *Electrophoresis in Practice.* 3rd ed. New York: Springer Verlag, 2001.

27. www.nptel.ac.in

28. Online Educational Resources.

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY