Primary structure :- Protein के निर्माण में 20 α-amino acid इस्तेमाल होता है। amino acid में acidic carboxyl group और basic Amino group उपस्थित होता है। जिसके परिणाम स्वरूप एक amino acid का NH_2 और दूसरे amino acid के $-COOH$ समूह द्वारा Peptide bond ($-CONH$) bond का निर्माण होता है।

→ 50 से कम amino acid का श्रृंखला Peptide कहलाता है। जबकि लंबी श्रृंखला को Polypeptide या Protein कहा जाता है।

→ Protein एक या अधिक Polypeptide से बना होता है। Peptide का वह सिरा जिसमें Carboxyl समूह उपस्थित होता है C-terminus जबकि वह सिरा जो Amino समूह से समाप्त होता है N-terminus कहलाता है।

→ किसी भी Protein अणु की Polypeptide श्रृंखला में amino acid की संख्या और उसका क्रम उसकी प्राथमिक संरचना का निर्धारण करता है।

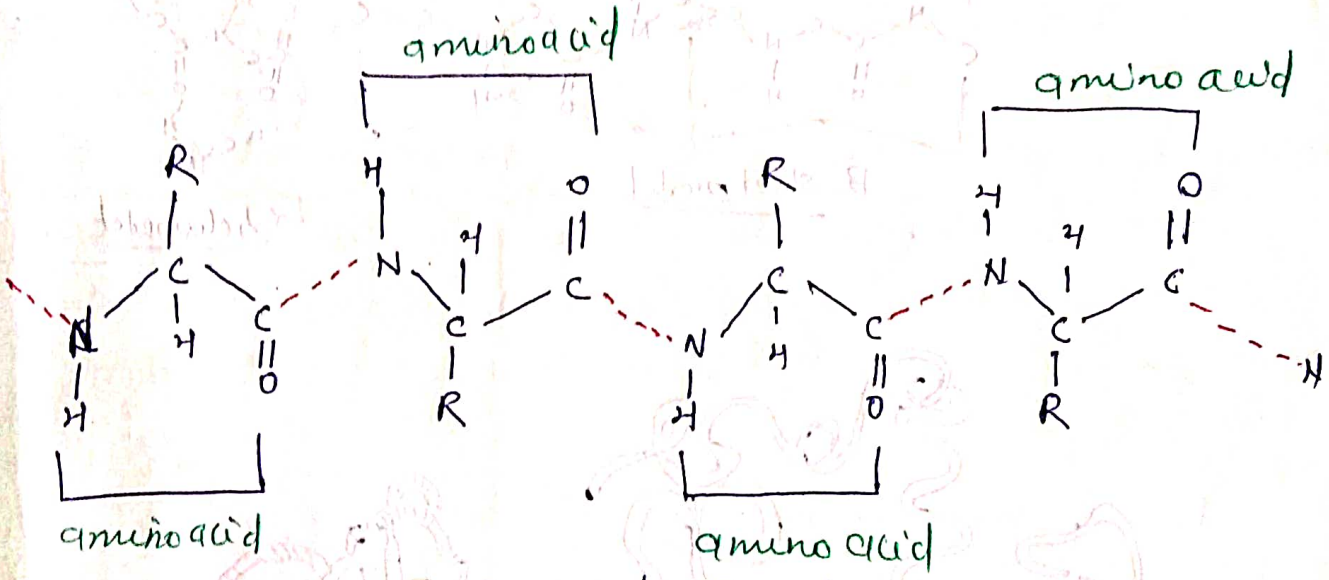


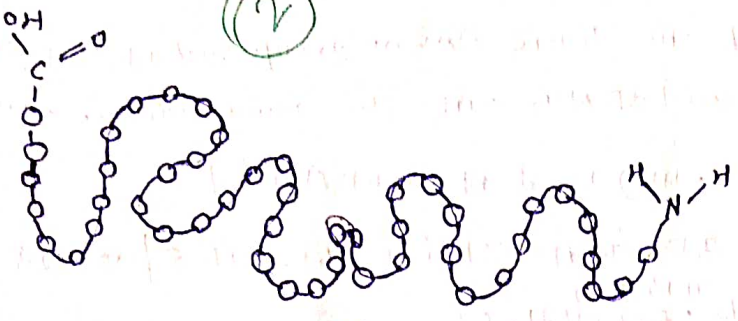
Fig: Primary structure of Protein

Secondary structure :- Protein के अणु में उपस्थित Polypeptide श्रृंखला आपस में कुंडलित हो जाती है और 3D संरचना द्वितीयक संरचना का निर्माण करती है जो दो प्रकार का होता है।

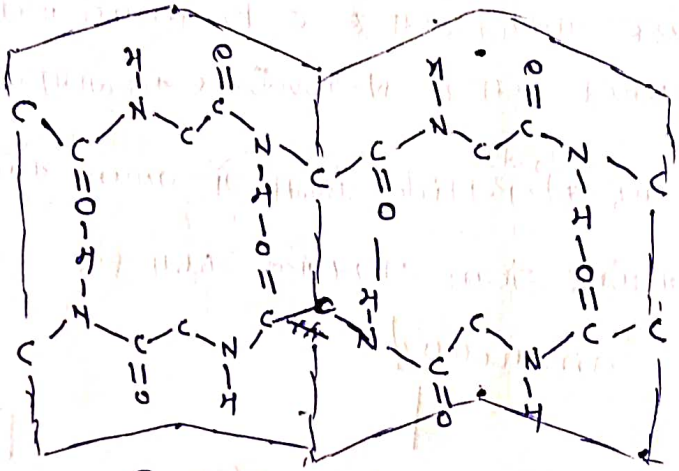
α-helix model - यह Protein के अणु के द्वितीयक संरचना का मुख्य भाग है जो कि दक्षिण हस्त चक्रीय (right-handed spiral) विन्यास है जिसमें प्रत्येक Amino acid श्रृंखला का N-H समूह amino acid के C=O समूह के मध्य हाइड्रोजन बंध का निर्माण होता है।

β pleated sheet - इसमें Protein अणु में उपस्थित दो पॉलीपेप्टाइड श्रृंखला के मध्य अन्तर आणविक हाइड्रोजन बंध का निर्माण होता है।

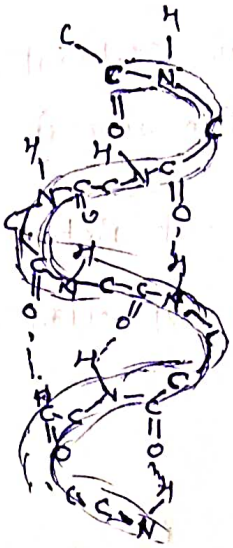
Level of Protein structure



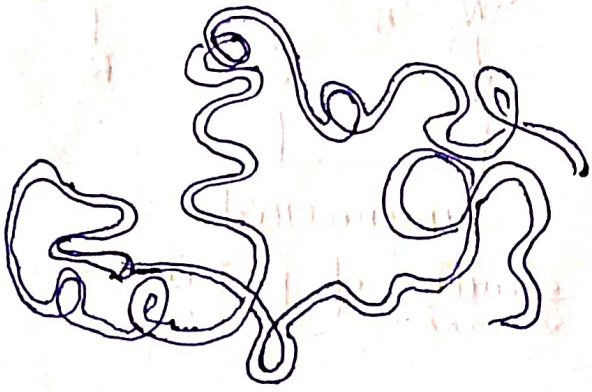
Primary structure



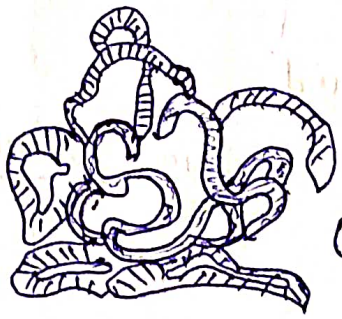
B sheet model



α helix model



Tertiary structure



Quaternary structure

Covalent bond :- यह मजबूत रासायनिक बंध है जो Protein की संरचना में योगदान देता है।
covalent bond का निर्माण दो परमाणु में electron के साझेदारी से बनता है।

→ covalent bond, Peptide bond एक एकल Amino acid के परमाणु में निर्मित होता है।

→ इसके अतिरिक्त cysteen के अणु आपस में बंध बनाकर Cystine का निर्माण करता है। जो Protein के अणु के स्थायित्व में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है।

$$-CH_2-S-S-CH_2-$$

disulphide bond

Electrostatic Interaction :-

(a) **Ionic Bonds** :- जब amino acid के विपरीत आवेश वाले अणु आपस में समीप आते हैं, आयनिक बंध Protein के अणु के अंदर नहीं बनता क्योंकि आवेशित अणु Protein के सतह पर उपस्थित होते हैं

(b) **water shell** :- प्रोटिन के सतह पर विद्युत आवेशित अमीनो अम्ल पाये जाते हैं, जो कि जल के अणु से क्रिया करते हैं। ये जल के अणु Protein अणु के चारो ओर आवरण का निर्माण करते हैं जो Protein अणु को स्थायित्व प्रदान करता है।

(c) **Hydrogen Bonds** :- जब आंशिक ऋणात्मक आवेश युक्त दो अणु धनात्मक आवेश युक्त हाइड्रोजन से भागीदारी करते हैं तब हाइड्रोजन बंध का निर्माण करते हैं। प्रोटिन अणु का 3-D संरचना म bond का निर्माण करता है। यह कई अणुओं के मध्य निर्मित होता है :-

1. दो भिन्न अमीनो अम्ल के पार्श्व श्रृंखला के परमाणु के मध्य
2. प्रोटिन के सतह में जल अणु और अमीनो अम्ल पार्श्व श्रृंखला के परमाणु के मध्य।
3. अमीनो अम्ल पार्श्व श्रृंखला के अणु व प्रोटिन के सतह के जल अणु के मध्य।
4. दो भिन्न अमीनो अम्ल के ~~अणु~~ परमाणुओं के मध्य।

Hydrophobic bond :- यह मुख्य बल है जो Protein को निश्चित घुमाव (folding) प्रदान करता है। अधिकतर Hydrophobic. पार्श्व श्रृंखलाओं के मध्य इस बंध का निर्माण होता है।

Vander walls Forces :- वाण्डरवाल्स बंध एक अणु का दूसरे अणुओं के मध्य दुर्बल वैद्युत आवेशित बंध है। यह आकर्षण दो परमाणुओं के मध्य पाया जाता है क्योंकि प्रत्येक परमाणु के चारों ओर आयन का मण्डल पाया जाता है जो दोलित होता है एवं जिससे वैद्युत द्विध्रुव का निर्माण करता है। जिससे दो परमाणु आपस में जुड़ जाते हैं।

(x)

तृतीयक संरचना :- तृतीयक संरचना किसी प्रोटिन अणु की 3D संरचना का निर्धारण करती है। प्रोटिन अणु के तृतीयक संरचना में निम्न बंध निर्मित होते हैं।

(a) Hydrogen bond
(b) covalent bond
(c) Ionic bond
(d) Vanderwalls bond
(e) Hydrophobic Interaction.

ये बंध प्रोटीन अणु को एक निश्चित संरचना एवं स्थायित्व प्रदान करते हैं।

चतुर्थक संरचना :- यह कई Polypeptide श्रृंखला युक्त प्रोटिन अणु में अनेक Polypeptide के मध्य अन्तर्क्रिया से निर्मित होता है। प्रत्येक पालीपेप्टाइड श्रृंखला एक इकाई की तरह प्रदर्शित होती है।

उदा० - Haemoglobin रक्त में उपस्थित Haemoglobin एक आयरन युक्त युक्त प्रोटिन है जो आक्सीजन अणु को बांधता है। जिसमें ~~दो~~ 4 subunit पाये जाते हैं। दो α subunit एवं दो β subunit.

Animal Tissue culture :- Animal के भी कोशिका (cell), उत्तक (Tissue) और अंग (organ) को नियंत्रित परिस्थिती में संश्लेषित माध्यम (Artificial media) में कल्चर किया जा सकता है। कोशिका विभाजित होकर विकसित होता है। आजकल कई उपयोगी चिकित्सकीय उत्पाद animal cell culture के द्वारा या Genetic Engineering के द्वारा उत्पादित होता है। उदा०- Monoclonal Antibodies, Vaccines.

History :- 1907 में सर्वप्रथम Ross Harrison नामक वैज्ञानिक ने जन्तु कोशिका को कल्चर करने का प्रयास किया, और मेंढक (Frog) के Embryonic nerve cell को hanging drop technique से कल्चर किया।

* 1966 में Ale Issacs ने cultured cell को virus से infect कर इन्टरफेरान (interferon) की खोज की।

1980 में

* Chinese Hamster ovary cell line ~~के~~ (CHO) को विकसित किया गया। और इसके द्वारा erythropoietins विकसित किया गया।

* बाद में stem cell ~~line~~ technology विकसित किया गया जो कि damaged और Dead cell को replace कर देता है।

* 1966 में Wilmut और उनके सहयोगियों ने nuclear transfer विधि के द्वारा Transgenic sheep. Dolly विकसित किया जो कि mammary cell (udder) को adult sheep के enucleated ovum में स्थानान्तरण से विकसित किया गया था।

* 2002 में फ्रांस के जीनोम सोसायटी Clonaid ने human baby EVe के clone की घोषणा की।

* भारत में National institute of immunology ने genetic engineering के द्वारा लगभग 17 प्रकार के mice को उत्पादित किया है जो health care और genetic improvement के प्रयोग में इस्तेमाल में लाये जाते हैं।

* centre for cellular and molecular biology (CCMB), Hyderabad ने transgenic fly विकसित किया है।

* National Dairy Research institute (NDRI) करनाल ने Transgenic ~~गाय~~ गाय विकसित किया है।

* Characteristics of Animal cell growth in culture :-

Plant और microbial cell के विपरीत Animal cell एक निश्चित पीढ़ी (Limited generation) तक विकसित होते हैं। इसके मुख्य लक्षण निम्न हैं :-

(1) Animal cell को सामान्य कांच (glass) या प्लास्टिक के पात्र (containers) में उचित पोषक माध्यम में उगाया जा सकता है परंतु वे एक निश्चित पीढ़ी (Limited generation) तक grow होते हैं।

(2) Animal cell अपने कल्चर में विभाजित होते हैं और वृद्धि प्रदर्शित करते हैं और पात्र के सतह को ढ़क लेते हैं उसके पश्चात् उनकी वृद्धि रुक जाती है यह Contact inhibition कहलाता है।

(3) कल्चर में animal cell के वृद्धि का नमूना भिन्न होता है। उदा०
   (i) इसमें cell-cell interaction और cell matrix interaction अनुपस्थित होता है।
   (ii) इसमें त्रीविमीय संरचना (Three dimensional structure) का निर्माण नहीं होता।
   (iii) वे जिस पात्र में वृद्धि प्रदर्शित करते हैं उस पर चिपके रहते हैं cell का Proliferation और आकार परिवर्तित होता है। और वे हार्मोन और पोषण भिन्नता प्रदर्शित करते हैं।
   (iv) प्रयोगशाला में वृद्धि का नियंत्रण Primary cell culture कहलाता है।

(4) कोशिका को उचक से यांत्रिक विधी और एन्जाइम जैसे प्रोटोलाईटिक एन्जाइम (Proteolytic enzyme) के उपयोग से प्राप्त करते हैं।

(5) कोशिका adherent cells (anchorage ~~cell~~ dependent) ~~और~~ या Suspension cultures (anchorage independent) की तरह वृद्धि प्रदर्शित करते हैं।

(6) Primary culture नये fresh media में कल्चर करते हैं जिससे secondary cultures प्राप्त होता है।

(7) cell line को दो तरह से मुख्य में वर्गीकृत किया जाता है Finite cell line और continuous cell line. Finit cell line वे कोशिका हैं जिनका एक निश्चित सीमा तक जीवन काल होता है और एक निश्चित पीढ़ी तक वृद्धि प्रदर्शित करता है। कोशिका सामान्यतः २० से 100 गुना तक विभाजित होते हैं। invitro परिस्थिती में cell line, continuous cell lines में परिवर्तित होते हैं। continuous cell line transformed, immortal और tumorigenic होते हैं।

(8) Animal cell culture के लिये सीरम (serum) की आवश्यकता होती है साथ ही साथ वृद्धि कारक (growth factor) भी इस्तेमाल में लाया जाता है जिसकी उपस्थिती में cell proliferation है।

(9) cell को बहुत कम तापमान $-1800^{\circ}C$ से $-196^{\circ}C$ पर (cryopreservation) पर संग्रहित (storage) की आवश्यकता होती है। DMSO का इस्तेमाल cell के हानि (damage) को रोकने के लिये इस्तेमाल में लाया जाता है।

(10) Aseptic condition को प्राप्त करने के लिये LAF hood का इस्तेमाल किया जाता है।

(11) उचित पर्यावरणीय परिस्थिती प्राप्त करने के लिये CO_2 incubator इस्तेमाल में लाये जाते हैं।

(12) cell culture को देखने के लिये inverted microscope का इस्तेमाल किया जाता है।

(13) अधिकतर animal cell culture में low speed centrifuge का उपयोग किया जाता है।

(14) वह कोशिका जो संयोजी ऊतक (connective tissue) से प्राप्त किया जाता है वह कुछ पीढ़ी (generation) तक वृद्धि करता है और मृत (dead) हो जाता है ये Fibroblast कहलाते हैं।

(15) तंत्रिका कोशिका (neuronal cell) जो तंत्रिकातंत्र बनाते हैं। कल्चर में विभाजित नहीं होते और उनमें वृद्धि नहीं पायी जाती।

Energy Transformation:

ऊर्जा रूपांतरण (Energy Transformation) वह प्रक्रिया है जिसमें ऊर्जा एक रूप से दूसरे रूप में परिवर्तित होती है। भौतिकी की परिभाषा अनुसार कार्य करने की क्षमता को ऊर्जा कहते हैं। सामान्यतः ऊर्जा को एक रूप से दूसरे रूप में परिवर्तित किया जा सकता परंतु इसे निर्मित या नष्ट नहीं किया जा सकता।

* ऊर्जा को कई रूपों में प्राकृतिक क्रियाओं में इस्तेमाल किया जा सकता है। साथ ही यह समाज को कई सेवा प्रदान करता है जैसे ताप (Heat), शीतलन (refrigeration), प्रकाश (lighting), मशीन को चलाने हेतु यांत्रिक ऊर्जा, उदा० घर को गर्म करने हेतु हम ईंधन जला सकते हैं जिसमें रासायनिक स्थितिज ऊर्जा तापीय ऊर्जा में परिवर्तित होता है जो घर में वायु में स्थानांतरित होकर उसके ताप को बढ़ाता है।

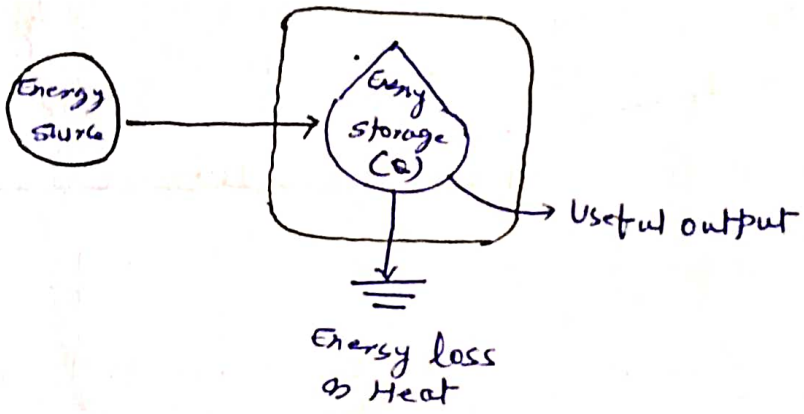


Fig:- Energy Transformation in Generic Energy system Language

* किसी भी ऊर्जा का परिवर्तन निम्न प्रकार व्यक्त किया जाता है।

$$\Delta E = q + w.$$

ΔE = change in internal energy of a system.
q = heat flowing into the system.
w = work being done by the system.

यदि q का मान धनात्मक होगा तब हम कह सकते हैं कि क्रिया ऊष्माशोषी है, और क्रिया में ऊष्मा बाहर से आ रही है $\Delta E = +$ve

यदि q का मान ऋणात्मक है तब क्रिया ऊष्माक्षेपी होगी एवं ऊष्मा उत्पन्न होगी $\Delta = -ve$

Energy transformation को समझने के लिए हम कुछ terms को ध्यान देते हैं। 2

Enthalpy → नियत दाब में किसी रासायनिक प्रक्रिया में स्थानांतरित ताप ऊर्जा की मात्रा enthalpy कहलाती है। किसी तंत्र की कुल enthalpy मापी नहीं जा सकती अतः enthalpy परिवर्तन ΔH मापी जाती है।

Enthopy : → किसी रासायनिक प्रक्रिया में बिखरा (dispersed) ऊर्जा की मात्रा Enthopy कहलाती है। जब कार्य होता है तब उपयोगी ऊर्जा अनुपयोगी ऊर्जा के रूप में स्थानांतरित होते हैं। सामान्यतः Enthopy अव्यवस्था (randomness) की माप के रूप में परिभाषित किया जाता है। Enthopy परिवर्तन को ΔS के रूप में व्यक्त किया जाता है।

Free energy → नियत ताप एवं दाब में किसी रासायनिक प्रक्रिया को आगे बढ़ने के लिये उपलब्ध ऊर्जा की मात्रा free energy कहलाती है।

स्वतः प्रक्रम $\Delta H > 0$ = उत्पाद की ऊर्जा क्रियाकारक से अधिक होती है।

$\Delta S > 0$ = अव्यवस्था बढ़ती है

$\Delta S < 0$ = प्रक्रम स्वतः होता है।

एन्थैल्पी, एण्ट्रापी और गिब्स मुक्त ऊर्जा के मध्य संबंध को निम्नानुसार प्रदर्शित किया जा सकता है।

$$\boxed{\Delta G = \Delta H - T\Delta S}$$

इसी से प्रक्रम की जानकारी इनके मान से की जा सकती है।

ΔH	ΔS	ΔG	comment on reaction
−	+	−	Always spontaneous
+	+	+ or −	spontaneous at high temperature
−	−	+ or −	spontaneous at low Temperature
+	−	+	Never spontaneous.

Bioenergetics: यह biochemistry का वह क्षेत्र है जो कि जीवित जीव के energy transformation और इस्तेमाल (use) से संबंधित होता है। सभी जीव को जीवित रहने के लिए मुक्त ऊर्जा (free energy) की आवश्यकता होती है। ऊर्जा का स्त्रोत केवल एक solar energy होता है। केवल पौधे सीधे इस ऊर्जा का इस्तेमाल करते हैं।

सर्वप्रथम सोलर ऊर्जा रासायनिक ऊर्जा में शर्करा अणु (sugar molecules) के रूप में होता है। यह क्रिया प्रकाश संश्लेषण (Photosynthesis) द्वारा होती है। प्रकाशसंश्लेषी जीव एवं पौधे सोलर ऊर्जा को ग्रहण करते हैं एवं कार्बनिक अणु (organic molecules) संश्लेषित करते हैं। जीव भोजन के रूप में इस रासायनिक ऊर्जा का इस्तेमाल करते हैं।
जीवों में श्वसन (Respiration) की क्रिया होती है और ATP के रूप में ऊर्जा संग्रहित होती है, यह ATP अणु catabolism और anabolism की क्रिया को जोड़ता है।

→ किसी भी chemical reaction में reactant और product परिवर्तित होते रहते हैं जब तक साम्य स्थापित ना हो जाए, साम्य अवस्था में अभिकारक एवं उत्पाद के सांद्रण में परिवर्तन नहीं होता, साम्य पर अभिकारक एवं उत्पाद की सांद्रता साम्य स्थिरांक (equilibrium constant) को परिभाषित करता है।

एक सामान्य अभिक्रिया

$$aA + bB \longleftrightarrow cC + dD$$

जहाँ a, b, c, d अणुओं की संख्या होती साम्य स्थिरांक जो निम्नानुसार व्यक्त किया जा सकते हैं।

$$K_{eq} = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

जहाँ [A], [B], [C] और [D] साम्य बिन्दु पर अभिकारक का मोलर सांद्रता (molar concentration) है।
जब अभिक्रिया तंत्र साम्य में नहीं होता, साम्य स्थापित होने के लिए एक साम्य स्थिरांक (Keq) को चालक बल (driving force) प्रदर्शित करता है जिसके परिमाण को अभिक्रिया के मुक्त ऊर्जा परिवर्तन, ΔG से प्रदर्शित करते हैं

मानक परिस्थिति (298K, 25°C) में जब क्रियाकारक और उत्पाद 1M सांद्रता पर एवं 1 atm दाब पर इसे मानक मुक्त ऊर्जा परिवर्तन (standered free energy change) ΔG° से प्रदर्शित करते हैं। जब हाइड्रोजन आयन सांद्रता $[H^+] = 1M$ होता है। अधिकतर जैव रासायनिक क्रिया 7 pH पर होती है अतः इसे $\Delta G^{\circ\prime}$ से प्रदर्शित करते हैं। अतः equillibrium constant को $\Delta G^{\circ\prime}$ के रूप में प्रदर्शित करते हैं, $\Delta G^{\circ\prime}$ एवं K'_{eq} को निम्न समीकरण से प्रदर्शित करते हैं।

$$\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln K'_{eq}$$

Standered condition में K'_{eq}, $\Delta G^{\circ\prime}$ एवं अभिक्रिया की दिशा में संबंध

When K'_{eq} is	$\Delta G^{\circ\prime}$ is	starting with 1M component the reac
> 1.0	Negative	Proceeds forward
1.0	zero	Is at equillibrium
< 1.0	Possitive	Proceed in reverse.

एक सामान्य अभिक्रिया जो α-जाइम Phosphoglucomutase के द्वारा होता है के standared free-energy परिवर्तन का अध्ययन करते हैं।

Glucose-1-Phosphate ⟷ Glucose-6-Phosphate

25°C एवं 7 pH पर equillibrium पर Glucose-1-Phosphate की सांद्रता 1mM एवं Glucose-6-Phosphate की सांद्रता 19mM होती है।

$$K'_{eq} = \frac{[\text{Glucose-6-Phosphate}]}{[\text{Glucose-1-Phosphate}]} = 19mM/1mM$$

अतः $\Delta G^{\circ\prime} = RT \ln K'_{eq}$

$= -7,296 J/mol$

$= -7.3 kJ/mol.$

$\Delta G^{\circ\prime}$ का मान ऋणात्मक है अतः अभिक्रिया में मुक्त ऊर्जा, मुक्त (Release) होती है।

Transformation of Host cell → Bacterial transformation को सर्वप्रथम 1928 में Griffith ने खोज किया। उन्होंने देखा कि Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae का दो strain पाया जाता है।

R-II strain, non-pathogenic होता है यह mutant strain है जो Rough colony बनाता है, जबकि S III strain wild strain होता है जिसका surface, smooth होता है और जिससे चूहे की मौत हो जाती है।

Heat killed, S III strain, R II strain की तरह कार्य करता है। और जब heat killed S III strain, R II strain के साथ मिश्र किया जाता है और चूहे में inject किया जाता है तब चूहे की मृत्यु हो जाती है। इस तरह R II strain का S III strain में परिवर्तित हो जाना transformation कहलाता है। Griffith ने सोचा कि transformation Protein के द्वारा होता है।

Avery, Macleod और Mccarty ने अपने परीक्षण से यह बताया कि Heat killed S III strain R II strain को Virulent form में परिवर्तित कर देता है जिससे चूहे की मृत्यु हो जाती है। Transformation की प्रक्रिया enzyme RNase के treatment के द्वारा प्रभावित नहीं होती जबकि DNase के द्वारा प्रतिरूप समाप्त हो जाती है जो यह प्रदर्शित करता है कि DNA में आनुवांशिक संरचनाएँ उपस्थित होती है।

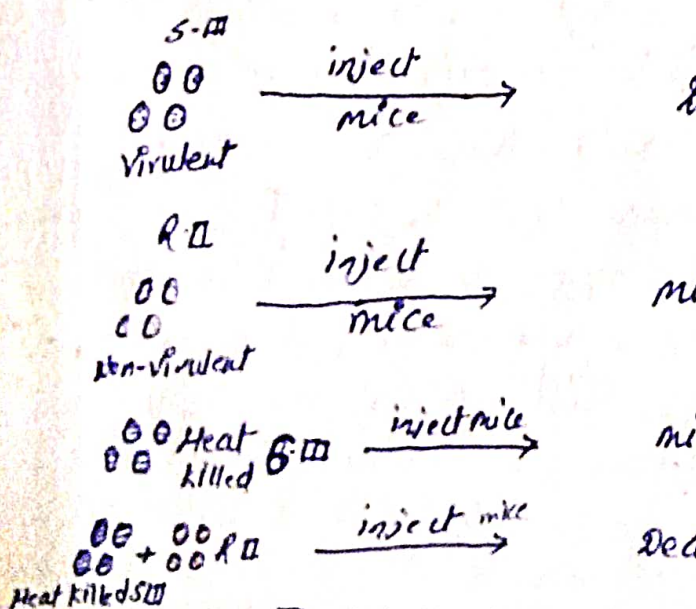


Fig: Griffith's Experiment on transformation.

Transformation की प्रक्रिया कई bacterial species में देखने को मिलता है जैसे Haemophilus, Neisseria, Xanthomonas, Rhizobium, Bacillus, staphylococcus और salmonella.
E.coli में Transformation की प्रक्रिया नहीं पायी जाती परंतु जब calcium chloride ($CaCl_2$) का इस्तेमाल किया जाता है तब इनमें transformation की क्रिया प्रभावी हो जाती है।

ट्रान्सफार्मेशन की क्रियाविधि: transformation की प्रक्रिया निम्न पदों में होती है।

(a) DNA binding: Random collision के परिणामस्वरूप, सर्वप्रथम DNA Bacteria के सतह के संपर्क में आता है। DNA bacteria के cell surface में present receptor Protein से जुड़ते हैं। Haemophilus में जो कि mesosomes से जुड़ा हुआ पाया जाता है। Hinfluenzae में पाया जाने वाला Protein DNA में उपस्थित श्रंखला (5'AAGTGCGGTCA3') से bind करता है। binding के पश्चात् receptor Protein, Donor DNA को membrane से जुड़े हुए uptake site में ले कर जाता है।

(b) Penetration: DNA molecules जो bacteria के surface में स्थायित्व के साथ bind करता है वह bacterial cell में प्रवेश करता है। यह DNA DNase enzyme के स्राव से प्रतिरोध (Resistance) प्रदर्शित करता है। Recipient bacterial cell के सतह में उपस्थित nucleolytic enzyme Donor DNA पर क्रिया करता है। Recipient cell में present enzyme endonuclease-I, DNA पर attack करते हैं और उसे एक strand को नष्ट कर single stranded DNA में परिवर्तित कर देते हैं। अब single stranded DNA cell में प्रवेश करता है। Donor DNA का size transformation को प्रभावित करता है। सफलतम transformation 30,00,000 और 8 million dalton आण्विक भार वाले DNA के मध्य होता है। Penetration के पश्चात DNA, परिधि (Periphery) से bacterial DNA की ओर गति करते हैं। यह गति भिन्न-भिन्न bacteria में भिन्न होती है। जैसे B. subtilis में यह गति 16-60 minute में होती है। इस गति के दौरान DNA, mesosomes से जुड़े रहते हैं।

Synapsis – जब recipient chromosome DNA unwind होता है तब यह single strand donor DNA से Pairing करता है। यह Process synapsis कहलाता है। यह synapsis का निर्माण donor और recipient DNA के मध्य pairing से होता है। इस recombination के दौरान E.coli RecA Protein DNA pairing में मदद करता है। और जो Recipient cell के ds DNA के unwinding में भी मदद करता है। Recipient DNA का unwinding लगातार होता है, और base Pairing की मात्रा बढ़ती जाती है। यह प्रक्रिया branch migration कहलाता है।

Integration → endonuclease enzyme ~~donor~~ recipient DNA के unpaired DNA strand को दो स्थान से काटता है। अब Exonuclease Enzyme द्वारा SS-DNA strand नष्ट हो जाता है। अब repair synthesis के द्वारा उपस्थित gap बन्द होता है, और जो अन्त में ligase enzyme के द्वारा seal होता है। अब Transformed heteroduplex का replication होता है और दो homoduplex का निर्माण होता है, इसमें से एक normal duplex होता है जबकि दूसरा transformed duplex होता है। normal duplex, Recipient के समान होता है जबकि transformed duplex donor के समान होता है।

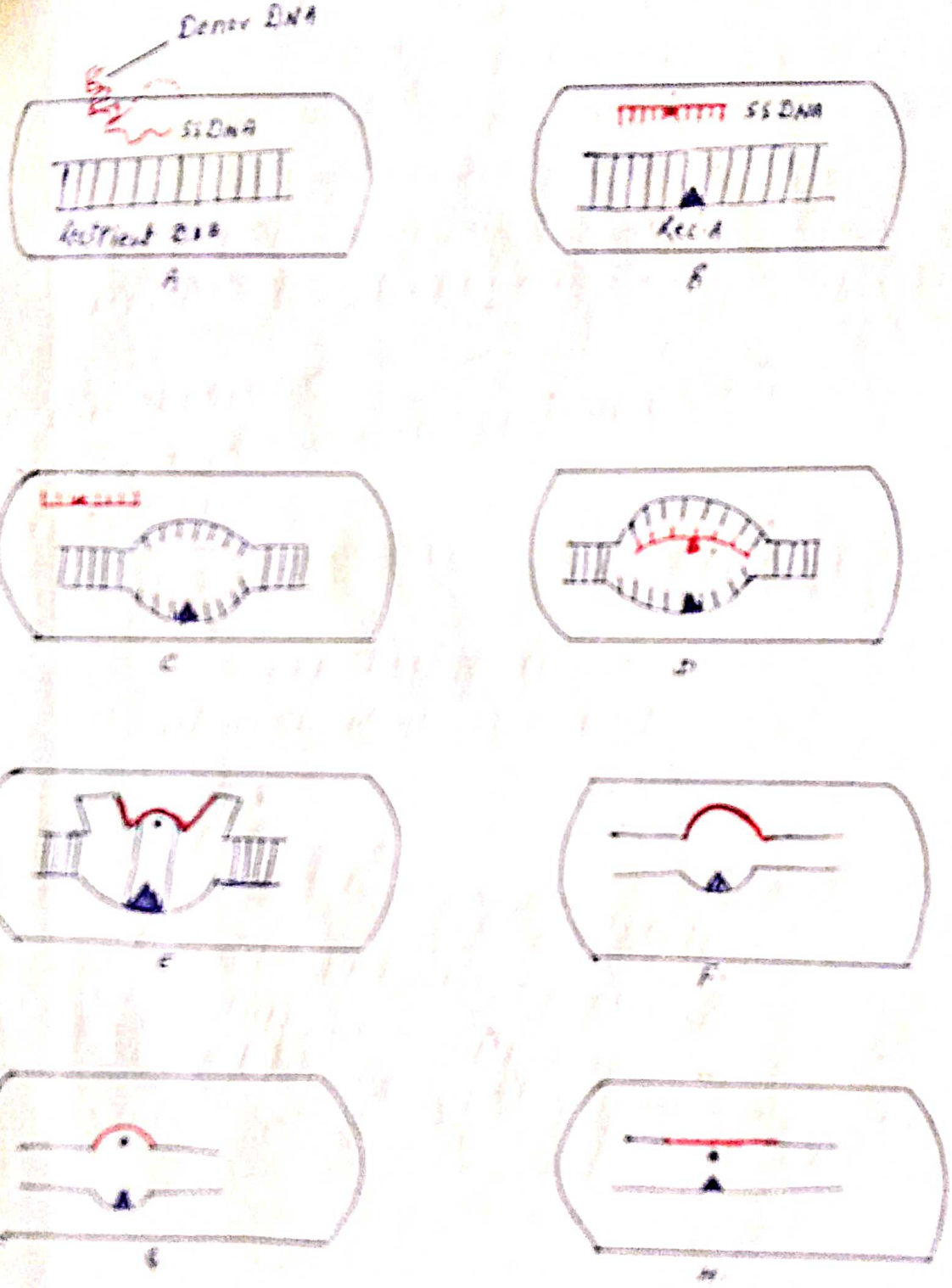


Fig: - Mechanism of transformation (A) Binding and penetration of donor DNA in recipient cell (B) Binding of SSB to donor SS DNA and Rec A to recipient DNA. C-D, Synapsis and assimilation (E) nicking of resident strand (F) Strand migration, trimming and integration (G) Sealing of nicks by DNA ligase (H) mismatch repair

Bacterial Plasmid; structure and Properties, replication, incompetability, Plasmid amplification,

Plasmids

1950 में conjugation की प्रक्रिया के अध्ययन में यह पाया गया कि बैक्टीरीया (bacteria) में दाता (Donor) या नर (male) का निर्धारण उसमें उपस्थित स्थानान्तरित अनुवांशिक पदार्थ (Transmissible genetic element) के द्वारा होता है। जब male और Female बैक्टीरीया संयुग्मित होते हैं प्रत्येक Female, male में परिवर्तित हो जाता है। male का यह अनुवांशिक गुण F (fertility) factor कहलाता है। जो कि एक कोशिका से दूसरे कोशिका में युग्मन के द्वारा स्थानांतरित होता है।

* 1952 में J. Lederberg ने इस अनुवांशिक पदार्थ के लिये एक नया नाम Plasmid दिया। अतः प्लाज्मिड को निम्नानुसार परिभाषित किया जा सकता है।

Plasmid छोटे, वृत्तीय (circular), स्वतः द्विगुणित (self replicating) और, दोहरे श्रृंखलीय (double stranded), डी॰ एन॰ ए॰ के अणु होते हैं जो कि बैक्टीरीया की कोशिका में उपस्थित होते हैं और जो कि उसके मुख्य क्रोमोसोम के अतिरिक्त उपस्थित होता है।

* यह कोशिका विभाजन के द्वारा स्वतंत्र रूप से द्विगुणित होते हैं।
* ये दोनो संतति कोशिका (daughter cell) में समान रूप से स्थानांतरित होते हैं।

* 1960 में Jacob Schaeffer और Wollman नें सर्वप्रथम ऐसे अतिरिक्त अनुवांशिक पदार्थ जो कि द्विगुणन (replication) की प्रक्रिया के दौरान बैक्टीरियल क्रोमोसोम से जुड़े होते हैं Episome कहा।

* प्रत्येक Bacteria की कोशिका में प्लाज्मिड की संख्या एक से लेकर सौ या उससे अधिक होते हैं।

* plasmid में 5-100 genes उपस्थित होते हैं और जो कई जैविक क्रियाओं को निर्धारित करता है।

* Plasmid वृत्तीय (circular) DNA अणु है परंतु ये सामान्य अवस्था में प्रत्येक 400-600 bp में ये दक्षिण ~~क्षिण्य~~ ~~कोटि~~ द्विशीय मुड़े रूप (right handed twist) के रूप में पाया जाता है और supercoil का निर्माण करते हैं। यह twisted रूप Covalently closed Circular (CCC) कहलाता है।

Cleavage के पश्चात यह मुक्त वृत्तीय रूप (open circular form) में परिवर्तित हो जाते हैं।

Types of Plasmid :-

(a) Sex factor or fertility (F) factor: सर्वप्रथम F factor को E.coli में खोजा गया। वह Plasmid जो कि host conjugation को निर्धारित करता है और donor cell से recipient cell में transfer होता है। F factor Plasmid कहलाता है।

कभी-कभी plasmid और bacterial chromosomes के मध्य डी. एन. ए. के टुकड़े (segment) की अदलाबदली (Exchange) होता है

cell जिसमें chromosomal DNA और Plasmid DNA ring उपस्थित होता है Hfr (High frequency of recombination) cell कहलाता है।

(b) R (resistance) Plasmids :- K. Ochiai और उनके सहयोगियों ने बताया कि अनुवांशिक पदार्थ जो कि drug resistant उत्पन्न करते हैं संयुग्मन (conjugation) की प्रक्रिया के द्वारा दूसरे bacterial cell में transfer होते हैं। अध्ययन के द्वारा यह पाया गया कि resistant gene Plasmid में उपस्थित होते हैं जो कि एक bacterial cell से दूसरे bacterial cell में स्थानांतरित होते हैं इन्हें R factor कहा जाता है। भिन्न भिन्न R. factor में भिन्न भिन्न resistant gene उपस्थित होते हैं।

R-factor DNA के दो segment से बना होता है एक Resistant transfer factor (RTF) और दूसरा resistant determinant (r- determinants)।

- RTF में replication और Plasmid के स्थानांतरण का gene उपस्थित होता है
- कुछ r. determinant स्वतः द्विगुणित होते हैं।

(c) Heavy - metal resistance Plasmids :- कई बैक्टिरीयल स्ट्रेन पाये जाते हैं, जो कि भारी धातु के प्रति resistant का निर्धारण करते हैं। उदा० Hg^{++}, Ag^{+}, Cd^{++}, Co^{++}, CrO_4, Cu^{++}, Ni^{++}, Pb^{+++}, Zn^{++} etc. ये determinant ~~Plasmids~~ सामान्यतः Plasmid और Transposones में पाये जाते हैं।

* भारी धातु प्रतिरोधक प्लाज्मिड (Heavy metal resistance plasmid) औद्योगिक अपशिष्ट से प्रदूषित नदियों में पाये जाने वाले E coli में पाये गये। बैक्टीरिया जो भारी धातु के प्रति प्रतिरोधक पाये गये निम्न हैं:-

E coli and S. aureus (As)
Pseudomonas aeruginosa (As)
P. fluorescens (Cr)
B. subtilis (Cd)
Alcaligens eutrophus (Cd)

*(d) Col. Plasmid: कुछ bacteria प्रोटीन युक्त toxins जिन्हे bacteriocine कहा जाता है उत्पन्न करते है जो कि ~~उस~~ bacteria के उसी genus के अन्य strain के लिये हानिकारक होते हैं। E. coli के strain के द्वारा उत्पन्न toxins colicines कहलाता है। जो कि संवेदी कोशिका को नष्ट कर देता है।

Amplification of plasmids

Amplification वह प्रक्रिया है जिसके द्वारा जीवाणु कोशिका (bacterial cell) में प्लाज्मिड की संख्या में वृद्धि की जाती है।

इस प्रक्रिया में प्लाज्मिड युक्त कोशिका को drug से उपचारित (treat) किया जाता है जिससे प्रोटीन संश्लेषण की क्रिया रुक जाती है और साथ ही साथ कोशिका में डी॰एन॰ ए॰ की पुनरावृत्ति (Replication) रुक जाती है। परंतु Plasmid में Replication की प्रक्रिया लगातार चलती रहती है, जिससे Plasmid में amplification होता है।

उदा॰ Plasmid, pBR-322 को Chloraamphenicol से उपचारित (treat) करने पर उसकी संख्या प्रत्येक कोशिका 3000 हो जाती है।

Chloramphenicol - amplification of Plasmids :

Chloraamphenic host में Protein synthesis को रोकता है और जिससे replication की क्रिया रुक जाती है। चूंकि Plasmid का replication नये निर्मित प्रोटीन से प्रभावित नही होता ~~और~~ अतः कुछ घण्टों तक चलता रहता है जब तक कि प्रत्येक कोशिका में Plasmid की संख्या 2000-3000 ना हो जाये। यह प्रक्रिया केवल उन्ही Plasmid में की जा सकती है जिसमें Chloramphenicol resistant gene नही होता है। साथ ही यह विधि low copy number वाले Plasmids में ही प्रभावी होती है।

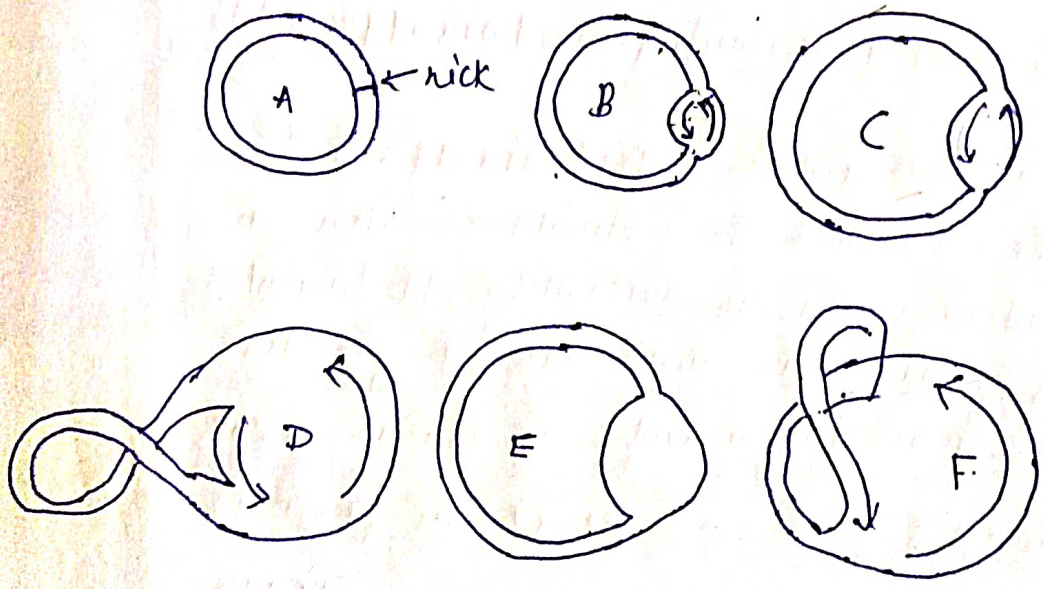
* Chloramphenicol, पाउडर के रूप में पाया जाता है जिसे 4°C पर संग्रहित करके रखते है।

Replication in Plasmids : Plasmid में मुख्यतः तीन क्रियाविधि के द्वारा replication होता है:

(a) Theta type replication (b) Strand displacement

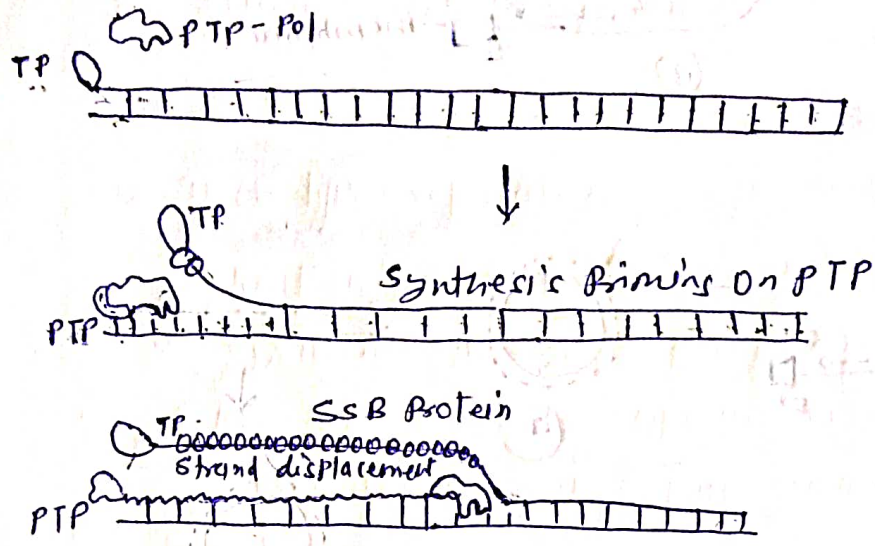
(c) Rolling circle mechanism.

(a) **Theta type replication** ÷ यह Circular DNA के replication के दौरान मध्य में बनी संरचना है। जब replication की प्रक्रिया में स्वतः दो replication fork का निर्माण हो जाता है तब इसे ऊपर से देखने पर ग्रीक अक्षर Theta (θ) के समान दिखाई देता है जिसे सर्वप्रथम John Cairns ने खोजा।



θ model of replication

(b) DNA strand displacement replication: इस replication में एकबार में केवल एक strand में replication होता है जिसके परिणामस्वरूप single stranded DNA मुक्त होता है जो double stranded DNA में copy हो जाता है।



(c) Rolling Circle mechanism :- इस model में सर्वप्रथम duplex ring का एक strand cut होता है जिसके परिणामस्वरूप 3' और 5' end उत्पन्न होता है। उत्पन्न 3' end नये DNA के निर्माण के लिये Primer की तरह कार्य करता है, जबकि वह DNA strand जिसमें cut उत्पन्न नहीं होता इसके लिये Template की तरह कार्य करता है और complementry strand का निर्माण करता है।

* 5' end Plasma membrane से जुड़ा रहता है। अब मुक्त strand जिसमें cut नहीं रहता है वह घूमता (roll) है और जिससे एक tail उत्पन्न होता है जो कि host के membrane से जुड़ा रहता है। इस tail से अब 5' → 3' दिशा में नये DNA का निर्माण होता है।

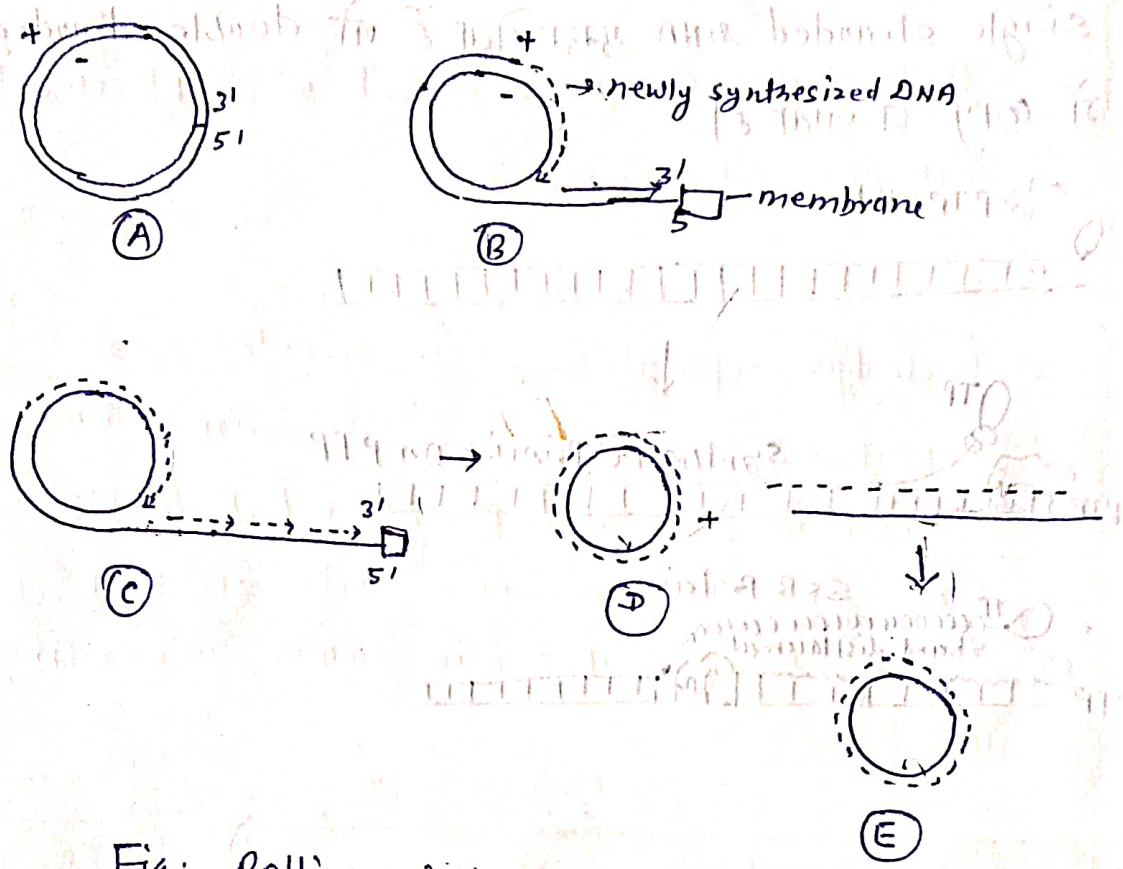


Fig: Rolling circle mechanism.

Transposable Elements

सामान्यतः लम्बे समय से यह सोचा जाता रहा है कि chromosomes में genes का स्थान निश्चित होता है। अनुवांशिक पुनर्योजन (Genetic recombination) एक सामान्य प्रक्रिया है जिसमें homologous chromosome में ~~अक्सर~~ Gene की अदला-बदली (exchange) होता है।

1940 में McClintock Barbara ~~के~~ मक्का में अपने अनुवांशिक प्रयोग में पाया कि कुछ निश्चित अनुवांशिक पदार्थ नियमित रूप से एक स्थान से नये स्थान में स्थानांतरित (jump) होता है। और ये जीन अभिव्यक्ति (Gene expression) को प्रभावित करता है। 1970 में बैक्टीरिया में भी यह प्रक्रिया देखी गयी परंतु इसकी आवृत्ति (frequency) बहुत कम $10^{-7} - 10^{-2}$ तक होती है। ये स्थानांतरित होने वाले जेनेटिक पदार्थ को भिन्न नाम Jumping genes, movable gene, Transposones और Transposable element कहा जाता है।

Mcclintock Barbara को maize में Jumping gene की खोज के कारण 1983 में Nobel Prize दिया गया।

Transposable element का एक chromosomes site से दूसरे chromosome site में स्थानांतरण को निम्नानुसार प्रदर्शित किया जा सकता है :-

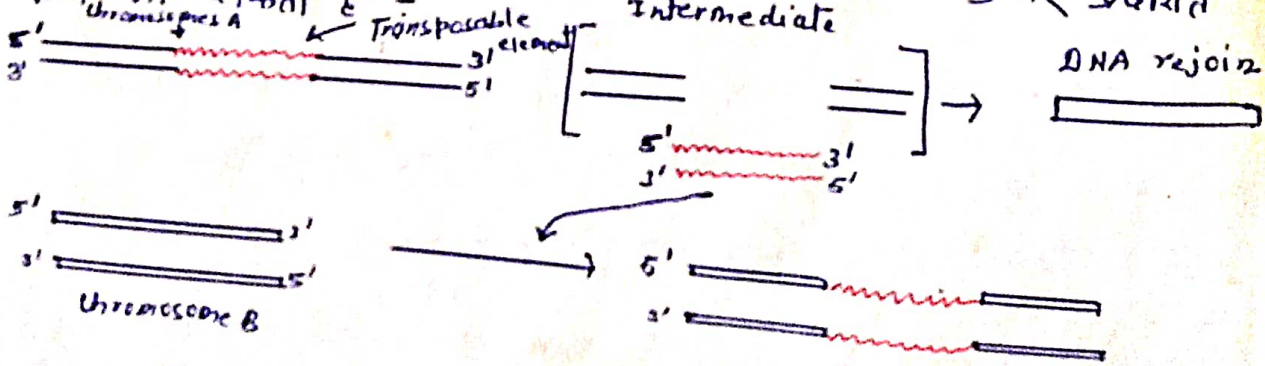


Fig - movement of a transposable element from one chromosomal site to another.

सामान्यत: Temprate Phage (e.g. λ and Mu phage) का insertion sequence Transposable element कहा जाता है जबकि bacteria के insertion sequence को Transposones कहते हैं।

अत: Transposable element एक ऐसा DNA sequence है जो कि genome के कई site में प्रवेश (insert) कर सकता है। यह प्रक्रिया Transposition कहलाता है।

characterstics :- ① ये DNA के molecules है जो Enzyme को code करता है जो अपने प्रतिरूप (identical copy) को नये DNA site में प्रवेश (insert) कराता है।

② Transposition की प्रक्रिया में Recombination और replication दोनों प्रक्रिया होती है जिससे original Transposible element के दो copy का निर्माण होता है एक copy पैतृक site में रहता है जबकि दूसरा target site में प्रवेश करता है।

③ Transposable element का प्रवेश (insertion) उसके target gene की व्यवस्था (integrity) को प्रभावित करता है।

④ कुछ Transposable element में RNA संश्लेषण का सूचना संचालित रहता है अत: कभी-कभी Target DNA के कुछ सुप्त (dormant) gene उत्तेजित हो जाते हैं।

⑤ Transposable element Replicon नहीं है अर्थात ये host chromosomes से अलग replicate नहीं होता है।

⑥ Transposones और उसके Target site में कोई समानता (homology) नहीं पायी जाती है।

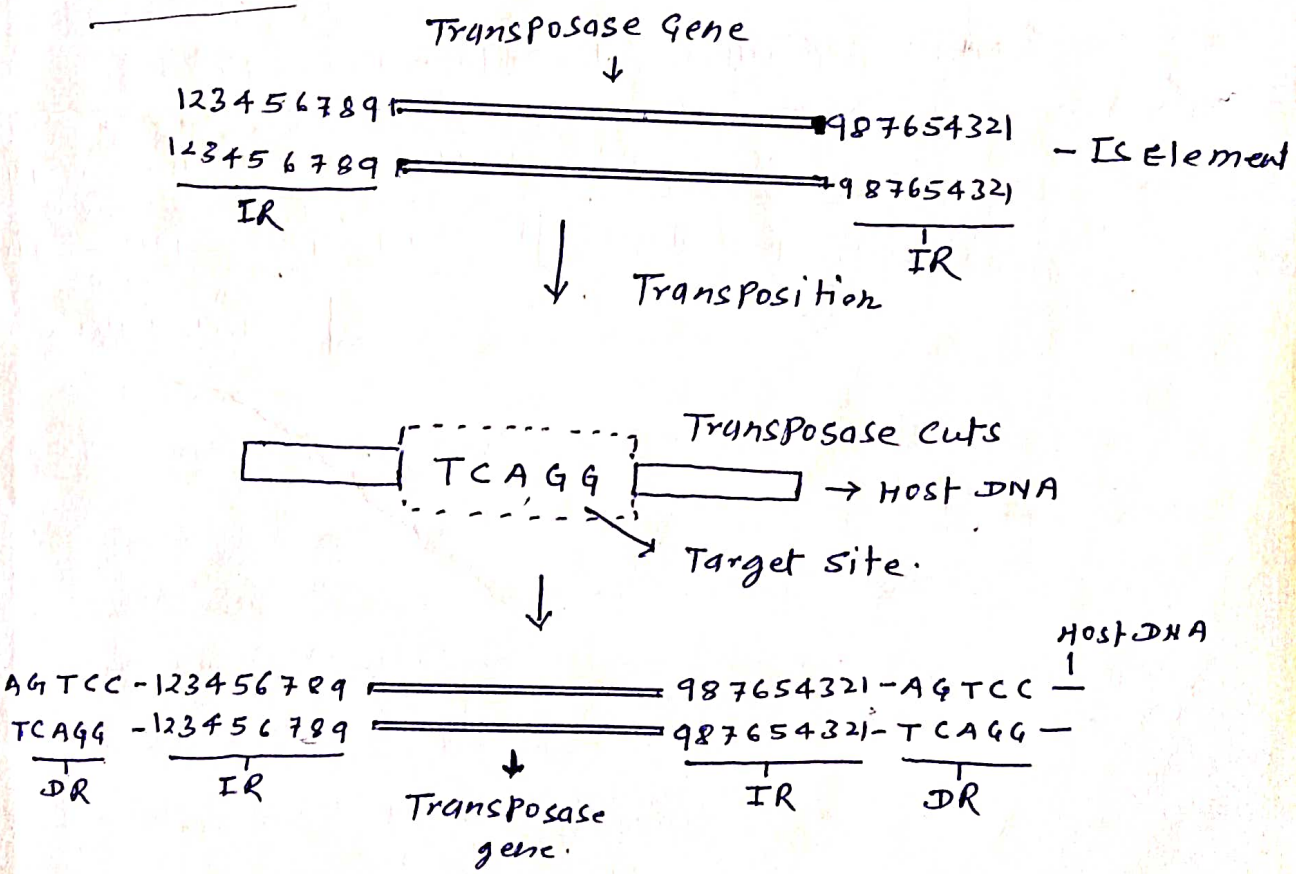
Classes of Transposable Elements

Prokaryotes का Transposable element सामान्यतः Transposons कहा जाता है। सामान्यतः इसे तीन classes में विभाजित किया जाता है। (a) Insertion sequences or IS elements :- इन्हे सामान्य Transposones कहा जाता है जिसमें Transposition के लिये आवश्यक DNA sequence के अलावा कोई अन्य DNA sequence नहीं पाया जाता। साथ ही इनमें host gene अनुपस्थित होता है।

(b) Transposones जिसमें antibiotic resistant gene उपस्थित होता है और जिनके सिरे में IS element present या absent होते हैं।

(c) इनके अंतर्गत Transposable जीवाणुभोजी (Phage) आते हैं जो कि लाइसोजेनिक (lysogenic) Phage होते है और अपने जीवन चक्र (life cycle) में इस प्रक्रिया का इस्तेमाल करते हैं।

① Insertion sequence (IS Element): ये सरल (simple) transposable element होते हैं जिन्हे IS से प्रदर्शित करते हैं जिसे संख्या e.g - IS1, IS2, IS3 etc. यह IS element बैक्टीरीया क्रोमोसोम और प्लाज्मिड का सामान्य भाग है। ~~अब~~ एक सामान्य E.coli का strain में ~~10~~ IS element के 10 कापी पाया जाता है। ये IS element केवल उन प्रोटीन को code करता है जो कि स्वयं के Transposition के लिये आवश्यक होता है। प्रत्येक IS element ~~अपना~~ अपने sequence में भिन्नता प्रदर्शित करते हैं। ये लगभग 1000 bp लंबा होता है और जिसके सिरे में लगभग 10-40 bp लंबा inverted terminal repeat पाया जाता है।



Diagrammatic presentation of insertion sequence (IS Element) and its transposition into host chromosome; IR, inverted repeats; DR, direct repeat of Target DNA.

Insertion sequence को दो तरह से पहचाना जा सकता है।

(a) वे प्रवेश (insert) करने वाले host gene से क्रिया कर निष्क्रिय (inactive) कर देते हैं।

(b) इसमें Promotor उपस्थित हो सकता है जो कि RNA Polymerase को Transcribe कर पास के gene को उत्तेजित (active) कर सकता है।

Bacteria के जीनोम में IS element के कई कापी उपस्थित हो सकते हैं। उदा० E.coli chromosome में IS_1 element का 8 copy और IS_2 element का 5 कापी उपस्थित होता है।

(ii) **Transposons** :- Transposones में genetic सूचनाओं (genetic information) को code करने के लिये अतिरिक्त सूचना जैसे Drug resistance का सूचना उपस्थित होता है। जिसके दोनों सिरों में IS element उपस्थित या अनुपस्थित होता है। यह दो प्रकार का होता है :- (a) composite transposones (b) complex transposones.

(a) **Composite transposones** :- इस transposones में antibiotic resistant gene present होता है और जिसके दोनो सिरों में IS element उपस्थित होता है। इन्हें Tn से प्रदर्शित किया जाता है यह Transposones का बड़ा क्लास है। तीन अधिक अध्ययन किया जाने वाला transposons <u>Tn5</u>, <u>Tn9</u> और <u>Tn10</u> है।

<u>Tn5 elements</u>, kanamycine resistance (kan^r) प्रदर्शित करता है। और जो <u>54000</u> bp से मिलकर बना होता है। और जिसके दोनों सिरों में <u>1,450</u> bp का inverted repeat उपस्थित होता है।

यह transposons Phage λ से E.coli chromosomes या E.coli chromosomes के एक locus से दूसरे locus में स्थानांतरित हो जाता है। जब यह gene में insert होता है तो mutation उत्पन्न होता है।

Tn9 Transposones में R factor से प्राप्त Chloram-Phenicol resistance gene उपस्थित होता है (cam^r). enzyme जो कि drug resistant उत्पन्न करता है वह 890 bp लंबा होता है और Tn9 के मध्य में उपस्थित होता है। और जिसके दोनों सिरों में 768 bp लंबा IS$_1$ element उपस्थित होता है।

यह cam^r भाग (segment) Phage P$_1$ के द्वारा R-factor से F-episome और Phage λ में Translocate होता है।

Tn10 tetracycline resistant gene से बना होता है (tet^R) यह 9300 bp लंबा होता है और जिसके दोनों सिरों में 1400 bp लंबा inverted repeat उपस्थित होता है। Tn10 R-222 से Phage P22 में Translocate होता है।

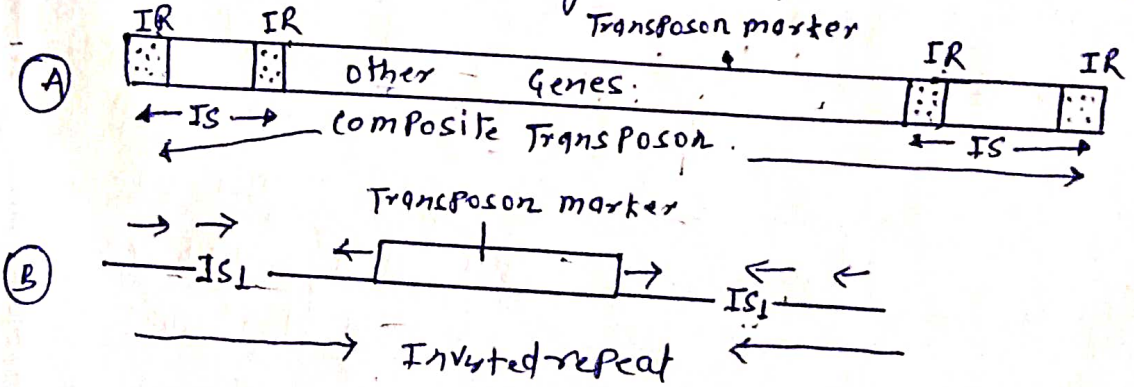
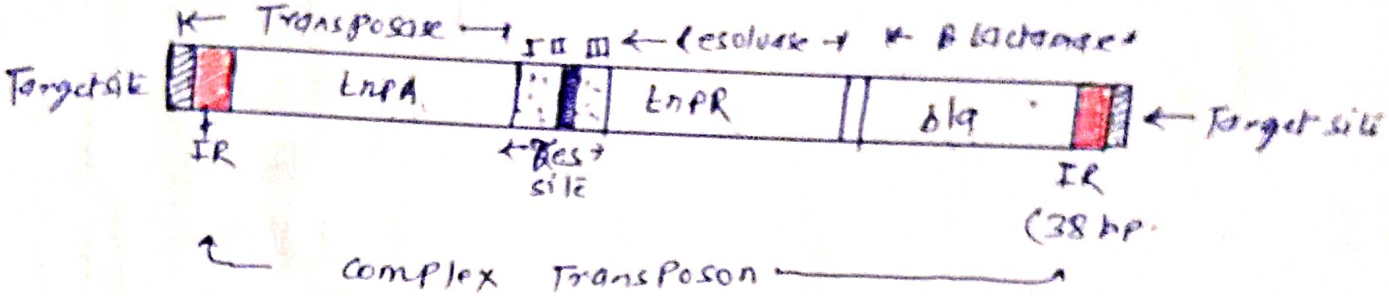


Fig (A) Composite Transposones
(B) Direct repeats.

ⓑ Complex transposons (TnA transposon Family) :- TnA family के अंतर्गत Tn1, Tn2 और Tn3 आते है। इन Transposones में transposition के लिये gene और drug resistant gene present होता है। TnA family को Tn3 family कहा जाता है क्यों कि Tn3 Transposones 1974 में Hedges और Jacob ने सर्वप्रथम खोजा।



eg. The structure of Tn3.

TnA family के transposones में 38 bp inverted terminal repeat present होता है। इनमें आंतरिक res site उपस्थित होता है और तीन ज्ञात gene eg. tnpA, tnpR and amp^r उपस्थित होता है। tnpA - transposase को encode करता है और tnpR resolvase को encode करता है। amp^r gene (5 bp long) target site में direct repeat की तरह उत्पन्न होता है और β lactamase उत्पन्न करता है और जो Penicilline के प्रति resistant प्रदान करता है। res site तीन subunit I, II और III से मिलकर बना होता है।

U.V

Ni (1)

~~MECHANISM OF~~ DNA REPAIR :-

जीवों में एक पीढ़ी से दूसरे पीढ़ी में DNA में पाये जाने वाले nucleotide की श्रृंखला (sequence) स्थायी होती है। रासायनिक उत्परिवर्तक कारक (mutagen) और रेडियेशन (Radiation) की उपस्थिती में DNA में damage उत्पन्न होता है, यदि replication की प्रक्रिया में गलत nucleotide प्रवेश कर जाते हैं तब ये DNA Polymerase-I और DNA Polymerase-III Enzyme की editing तंत्र के द्वारा सही (correct) कर लिये जाते हैं।

कोशिका में इस तंत्र से अलग तंत्र भी पाया जाता है जो कि पालीमरेज (Polymerase I-III) के अतिरिक्त गलती (errores) को ठीक (correct) करता है। इसे mismatch repair कहा जाता है।

Mechanism of DNA Repair :- कोशिका में DNA repair की चार Pathway पायी जाती है

(a) **Photoreactivation** :-

(i) U.V light के द्वारा उत्पन्न damage, visible light के द्वारा Repair होता है। जो Photo-reactivation कहलाता है। इस क्रियाविधि में Photolyase T-T dimer को काटता है। जिसमें Thymine अपने प्रारंभिक रूप में आ जाता है। यह एन्जाइम तभी उत्तेजित (active) होता है जब उस पर दृश्य प्रकाश (visible light) पड़ता है।

यह Enzyme energy को अवशोषित करता है और DNA में निर्मित cyclobutane ring से जुड़कर T-T के मध्य निर्मित cyclobutane ~~ring~~ को covalent bond को तोड़ता है।

यह Enzyme कई बैक्टिरिया और placental mammals में पाया जाता है।

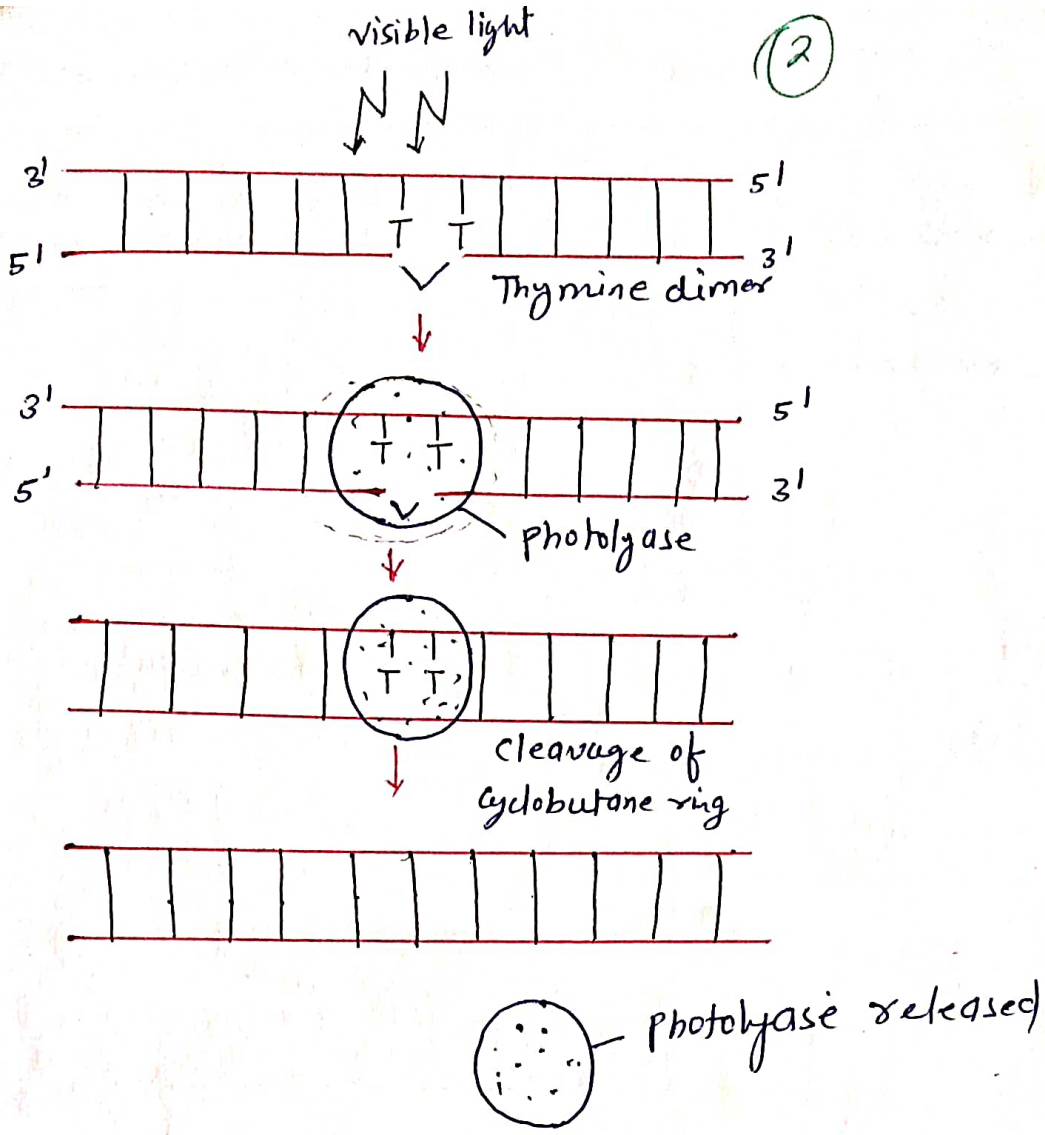


Fig: Photoreactivation for repair of thymine dimer

(ii) Excision Repair:- इस प्रक्रिया में damage भाग अलग हो जाता है और नये DNA का भाग उस पर ~~स्थानांतरित~~ संश्लेषित हो जाता है। नये DNA के निर्माण के लिये दूसरा DNA strand Templet की तरह कार्य करता है। Excision repair निम्न प्रकार का होता है।

(a) Base excision Repair: इस repair system के द्वारा DNA के किसी एकल (single) nucleotide में उत्पन्न damage को Repair किया जाता है। Base excision repair ⇒ DNA glycosylation की क्रिया से शुरू होता है। DNA glycosylase एन्जाइम गलत base को हटाता है। अब A-P endonuclease और phosphodiesterase, sugar और phosphate को हटाता है।

DNA में एक nucleotide का रिक्त स्थान (gap) निर्मित हो जाता है जिस पर DNA Polymerase DNA का निर्माण करता है और अंत में D.N.A ligase Gap को seal कर देता है। (3)

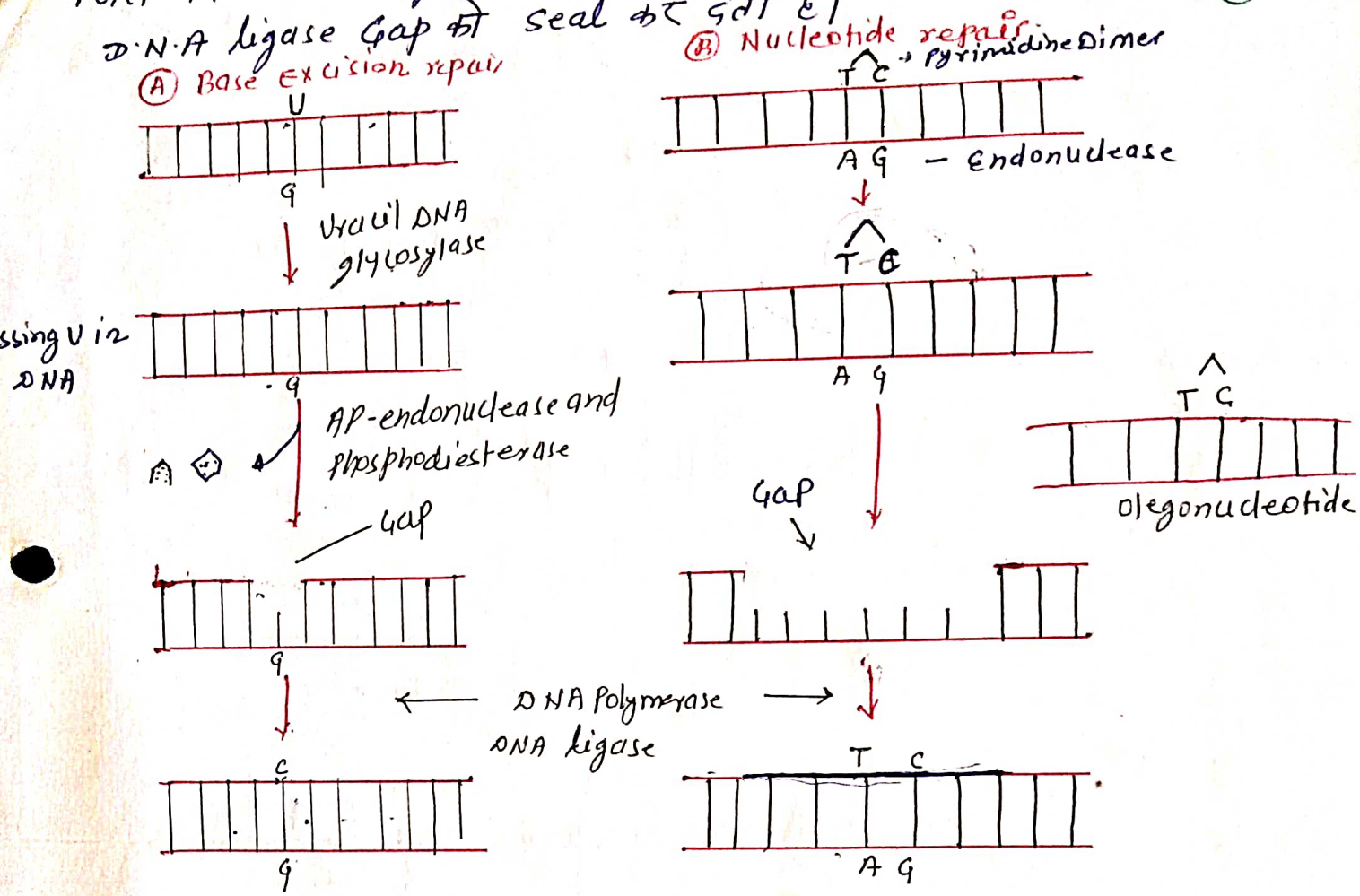


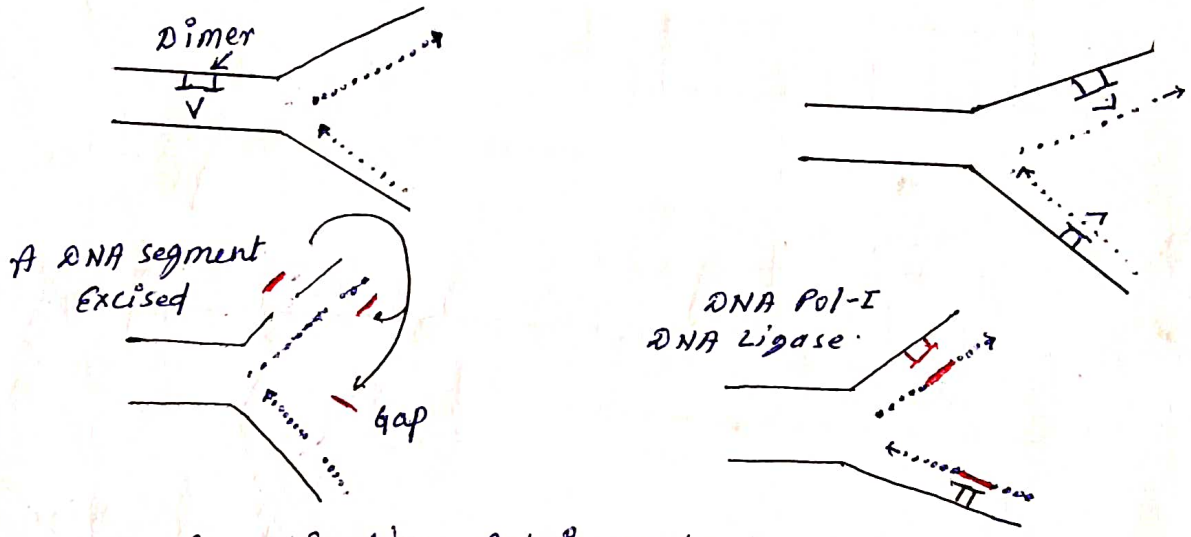
Fig: Excision repair pathways : (A) base excision repair (B) nucleotide excision repair.

(b) Nucleotide excision Repair :- यदि DNA में damage में कुछ ज्यादा परिवर्तन होता है और DNA के संरचना में परिवर्तन होता है तब इस क्रिया के द्वारा repair होता है। इस प्रकार का damage Pyrimidine dimers (T-T, T-C और C-C) के द्वारा उत्पन्न होता है और जो बड़े हाइड्रोकार्बन जैसे benzopyrane (carcinogen) से जुड़ जाता है। E.coli में सर्वप्रथम endonuclease enzyme सर्वप्रथम damage की पहचान करता है और damage के दोनों ओर कटाव (cut) उत्पन्न करता है। अब DNA helicase enzyme, damage युक्त olegonucleotide को हटा देता है। DNA Polymerase-III और DNA ligase enzyme उत्पन्न रिक्त स्थान (~~seals~~ gap) को सील (seal) कर देता है।

(4)

① Recombination Repair :- जब excision repair mechanism असफल हो जाता है तब इस क्रियाविधि का इस्तेमाल Repair में किया जाता है। इस mechanism में RecA Protein भाग लेता है। यह Repair क्रियाविधि Replication के तुरंत बाद होता है। अतः इसे Post replication repair भी कहा जाता है।

इस क्रियाविधि में Replication fork में से सामान्य DNA श्रंखला का टुकड़ा अलग (excised) होता है और यह Thymine dimer के excision से निर्मित रिक्त स्थान (Gap) में जुड़ जाते हैं। DNA Polymerase-I, और DNA ~~Polymerase~~ ligase जुड़े हुए टुकड़े को पूर्णतः जोड़ देता है।



Recombination Repair mechanism

SOS (save our soul)

SOS Repair: इसे आपातकालीन रिपेयर (emergency repair) भी कहा जाता है। Damaged DNA स्वयं SOS system को उत्तेजित (induce) करता है। SOS कई DNA repair प्रक्रिया को उत्तेजित करता है। और यह DNA Templet की अनुपस्थिती में Repair करता है अतः कई प्रकार के गलती को Repair किया जा सकता है। सामान्यतः LexA Protein के प्रभाव से SOS ~~gu~~ System में भाग लेने वाले जीन निष्क्रिय (inactive) रहते हैं। DNA damage के पश्चात RecA Protein RecA Protease में परिवर्तित हो जाता है। RecA ~~Protease~~ Protease LexA Protein को तोड़ देता है जिससे DNA Repair gene (uvrA और umuD) उत्तेजित (active) हो जाते हैं।

जब DNA Repair की प्रक्रिया पूर्ण हो जाती है तब RecA Protein की Proteolytic activity समाप्त हो जाती है। तब LexA Protein का जमाव होता है और वह SOS operator में बंध जाता है। और प्रक्रिया समाप्त हो जाती है।

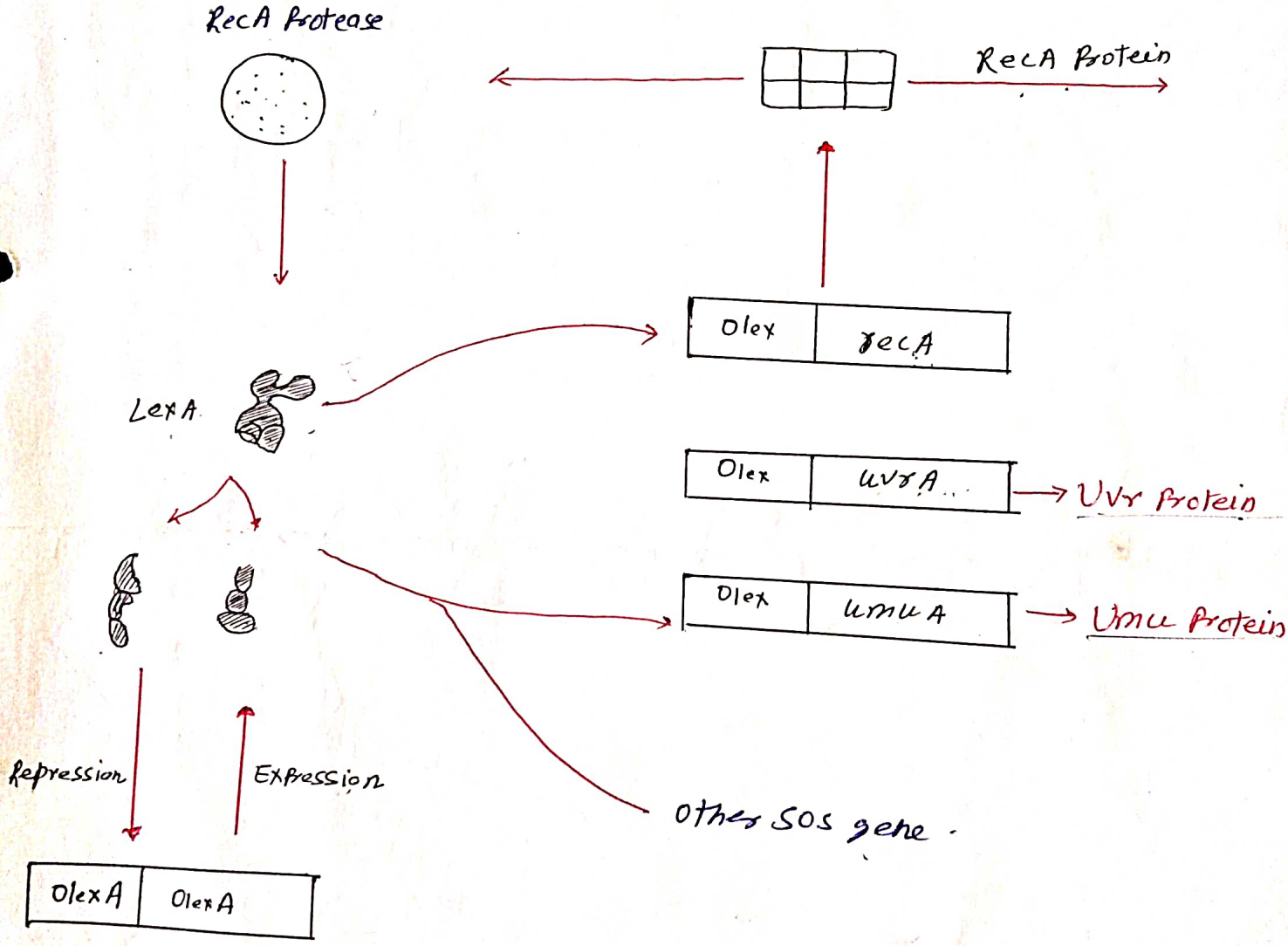


Fig:- Mechanism of SOS repair system. Olex - lex operator lexA - Protein expressed by lexA gene, RecA - Protein expressed by gene recA; UvrA - protein expressed by gene uvrA

Restriction Endonuclease Enzymes

Restriction enzyme को आणविक कैंची (Molecular scissors) कहा जाता है। ये Enzyme bacteria में उपस्थित होते हैं और एक प्रकार का रक्षात्मक क्रियाविधि (defence mechanism) उत्पन्न करते हैं जिसे Restriction modification system कहा जाता है। जिसे सर्वप्रथम 1965 में Werner Arber ने खोजा। Restriction enzyme DNA में एक विशिष्ट न्यूक्लियोटाइड क्रम (sequence) की पहचान करते हैं और उसको cut करते हैं।

Examples: Restriction Enzymes के कुछ उदाहरण निम्न हैं :-

Bam H1, Bgl III, EcoRI, EcoRII, Hind-III, HindII, HpaI, HpaII, Pst I, Sal I, Sau3AI

Types of Restriction Enzymes: Restriction Enzyme मुख्यतः 3 प्रकार के होते हैं।

(a) Type-I restriction Enzyme :- ये ~~काम्प्लेक्स~~ जटिल (complex) होते हैं जो कि Endonuclease और methylase का गुण प्रदर्शित करते हैं। ये क्रिया के दौरान DNA में गति करते हैं। और इसे Mg^{++}, S-adenosyl methionine और ATP, cofactor की आवश्यकता होती है। ये तीन भिन्न उपइकाई से मिलकर बनें होते हैं।

(a) Restrictive subunit (b) modification subunit (c) Specificity subunit

Specificity subunit restriction enzyme के पहचान बिन्दु (recognition site) का निर्धारण करता है।

यह ~~En~~ एन्जाइम पहचान (Recognition) में तो विशिष्टता प्रदर्शित करता है परंतु कटाव (~~cut~~ cleavage) में विशिष्टता प्रदर्शित नहीं करता। अर्थात एन्जाइम DNA के एक विशिष्ट बिन्दु की पहचान तो करता है लेकिन उसे उस बिन्दु पर नहीं काटता अतः विभिन्न आकार के DNA प्राप्त होते हैं।

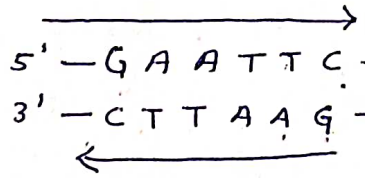
(37) (2)

Type-I प्रकार के restriction enzyme का पहचान बिन्दु (Recognition site) 15bp लंबा होता है, जबकि cleavage site, पहचान बिन्दु (Recognition site) के 5' end में उपस्थित TCA से 1000 bp दूर होता है। e.g - EcoK.

(b) Type-II Restriction Enzyme :- इस ~~Enzyme~~ Enzyme को सर्वप्रथम Hamilton नामक वैज्ञानिक ने isolate किया। ये सरल होते हैं और एकल पालीपेप्टाईड श्रृंखला से बने होते हैं। और इसे अपनी क्रिया के लिये ATP की आवश्यकता नही होती। ये बहुत ही स्थायी (stable) एन्जाइम हैं। और जिसको अपनी क्रिया के लिये Mg^{++} cofactor की आवश्यकता होती है।

* Type-II restriction enzyme, DNA को उसके पहचान बिन्दु (Recognition site) पर ही cut करता है। और दो ~~एकल~~ एकल श्रृंखला ~~कमम~~ टुकड़ा (single strands break) उत्पन्न करता है। जो प्रत्येक ~~श्रृं~~ श्रृंखला में एक होता है।

* Type-II restriction enzyme DNA में उपस्थित ~~Pallind~~ palindromic sequence की पहचान करता है। ~~Pal~~ Palindromic sequence वह श्रृंखला होता है, जिसमें DNA के दोनों strand के 5' → 3' दिशा में समान nucleotide क्रम ~~Present~~ उपस्थित होते हैं।

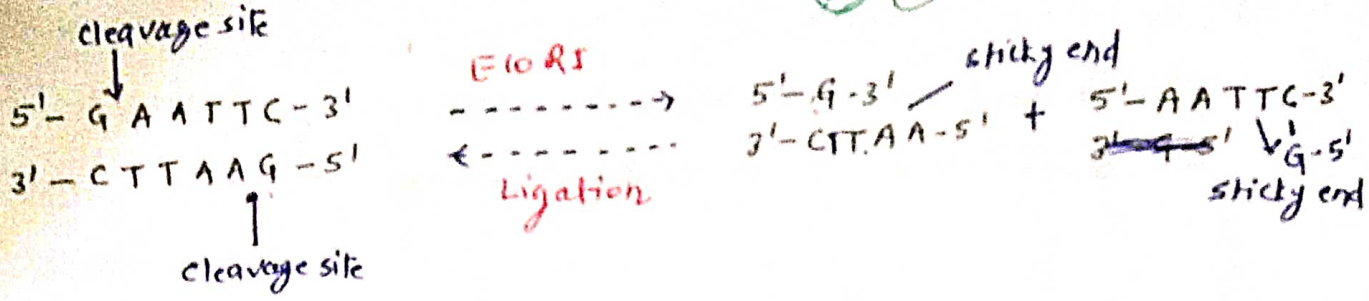


$$\begin{array}{c} \longrightarrow \\ 5'-G\ A\ A\ T\ T\ C-3' \\ 3'-C\ T\ T\ A\ A\ G-5' \\ \longleftarrow \end{array}$$ Palindromic sequence

Types of Restriction (Cleavage) Produced by Restriction Endonuclease

Restriction enzyme द्वारा दो प्रकार का cleavage उत्पन्न होता है।

(a) Sticky end cleavage :- EcoR-I Enzyme विशिष्ट palindromic sequence को bind करता है जिसकी लंबाई 6bp होती है। यह प्रत्येक strand के G और A के बीच cut करता है, और दो single strand complementary cut end उत्पन्न करता है। इस end को sticky end या cohesive end कहा जाता है।



(38) (3)

cleavage site

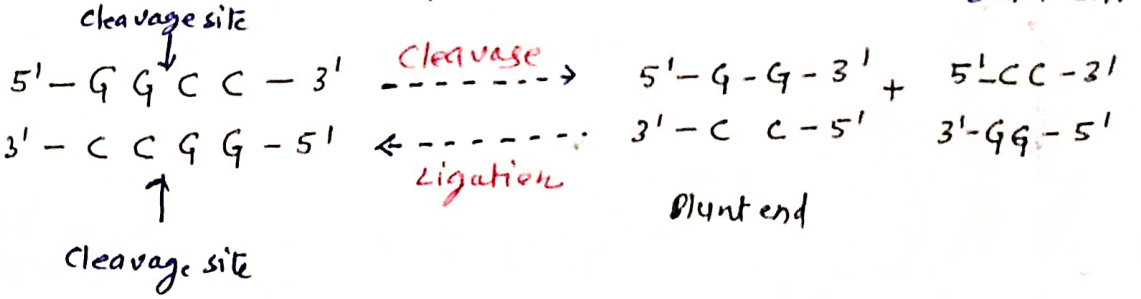
5'- G↓AATTC-3' —EcoRI→ 5'-G-3' (sticky end) + 5'-AATTC-3'

3'-CTTAAG-5' ←Ligation— 3'-CTTAA-5' + G-5' (sticky end)

cleavage site

(B) Blunt end cleavage :- कुछ प्रकार के Type-II restriction enzyme DNA के दोनों strand में आपस में सामने cut करता है जिससे blunt end या flush end उत्पन्न करता है।

उदा० HaeIII चार nucleotide लंबा Palindromic sequence को पहचान करता है, और दोनों DNA strand को एक दूसरे के सामने G–C के मध्य कट करता है।



cleavage site

5'-GG↓CC-3' —Cleavage→ 5'-G-G-3' + 5'-CC-3' (Blunt end)

3'-CCGG-5' ←Ligation— 3'-C C-5' 3'-GG-5' (Blunt end)

cleavage site

Nomenclature of Restriction Enzymes:- Restriction Enzyme का नामकरण निम्न आधार पर किया जाता है:-

(a) नामकरण के लिये Genus नाम का प्रथम letter लेकर उसे बड़ा अक्षर में लिखते हैं फिर species का प्रथम दो letter लेकर उसे छोटे अक्षर में लिखकर तीन अक्षर का नाम लिखते हैं।

E coli = Eco and H. influenzae = Hin आदि।

(b) Bacteria के strain को subscript से प्रदर्शित करते हैं।

e.g. Eco_K for E.coli strain K, Hind for E.coli strain H. influenzae strain Rd.

(c) जब Restriction और modification system अनुवांशिक रूप से Virus या Plasmid के द्वारा प्रदर्शित होता है तब host के species का नाम लिखा जाता है। EcoRI, EcoPI

(d) जब किसी निश्चित host strain में कई प्रकार का restriction और modification system पाया जाता है तब उसे Roman अक्षर से प्रदर्शित करते हैं। उदा० के लिए H. influenzae strain Rd के भिन्न strain को निम्नानुसार प्रदर्शित करते हैं।

Hind I, Hind II, Hind III.

चूंकि इस प्रकार का नामकरण असुविधाजनक होता है अतः इसे subscript में ना लिखकर एक लाईन में लिखते हैं।

Enzyme Purification And Assay Techniques: (1)

व्यापारिक रूप से Enzyme, Bioreactor में निर्माण किया जाता है। यह Enzyme crude (अपरिष्कृत) रूप में रहता है। अतः इसे भविष्य में इस्तेमाल करने के लिये Purify किया जाता है। Enzyme के गुण (Property) और इस्तेमाल किये जाने वाले विधि (method) के आधार पर तीन प्रकार के Purification Method स्तेमाल में लाये जाते हैं।

1. एन्जाइम के आयनिक गुण के आधार पर (Based on Ionic Property of Enzyme.)

2. अधिशोषित होने की क्षमता के आधार पर (Based on the ability to get adsorbed)

3. अणु के आकार की विभिन्नता के आधार पर (Based on difference in size of molecules.) (www.biotecharticles.com/Applications-Article/methods-of-Purification-of-Enzymes-583.html)

1. एन्जाइम के आयनिक गुण के आधार पर (Based on Ionic Property of Enzyme):

(a) साल्ट आऊट (salting out): इस method में घोल (solution) के PH को परिवर्तित किया जाता है या रसायन का स्तेमाल किया जाता है जिससे अवक्षेपण (Precipitation) प्राप्त होता है।

आइसोइलेक्ट्रिक PH (PI) पर Protein या Enzyme की विलेयता (solubility) न्यूनतम होती है। अतः ये Pure crystal के रूप में अवक्षेपित (Precipitate) हो जाते हैं।

→ इस विधि के द्वारा पाचक एन्जाइम पेप्सिन (Pepsin) को Purify किया जाता है।

Salting out की क्रिया कुछ रसायन जैसे Ammonium Sulphate, Acetone आदि डालकर भी की जा सकती है।

कुछ आयन उनके अवक्षेपण क्षमता के घटते हुए क्रम में निम्नानुसार है-

Anions: citrate, Tartrate, sulphate, Acetate, chloride etc.

Cations: Th^{4+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, NH_4^+

इस series को Hofmeister series के नाम से जाना जाता है।

जब इन रसायन को विलयन में डाला जाता है, तब Protein अणु आपस में क्रिया करते हैं और जल के अणु मुक्त होते हैं और Protein के अणु अवक्षेपित हो जाते हैं।

(b) ~~Electro~~ इलेक्ट्रोफोरेसिस (Electrophoresis):

इलेक्ट्रिक फिल्ड के प्रभाव से आवेशित कण की गति Electrophoresis कहलाती है। Negative charge युक्त प्रोटीन Anode की ओर और Possitive charge Protein, कैथोड की ओर गति करते हैं। प्रोटीन को पृथक करने की सबसे प्रभावी विधि Isoelectric focusing है। इस विधि में Protein का mixture को ऐसे Electric field में रखा जाता है। जिसमें PH विभव (PH gradient) पहले से स्थापित होता है। अब प्रत्येक Protein अणु गति करते हैं और उस स्थान पर Band बनाते हैं जहाँ का PH, Protein के isoelectric PH के बराबर हो जाता है।

→ इस विधि के द्वारा मनुष्य के रक्त के प्लाज्मा का 40 या अधिक बैंड प्राप्त होता है।

(c) आयन एक्सचेंज क्रोमेटोग्राफी (Ion Exchange chromatography)

प्रोटीन के क्रोमेटोग्राफी (chromatography) के लिये सामान्यतः सेल्युलोज के रसायनिक रूप से तैयार व्युत्पन्न इस्तेमाल में लाये जाते हैं।

* Diethyl aminoethyl cellulose (DEAE-cellulose) जिसमें PH 7 पर धनात्मक आवेश युक्त समूह उपस्थित होते हैं

अतः ये anion Exchanger की तरह इस्तेमाल में लाये जाते हैं।

~~Ca~~ carboxymethylcellulose (CM-cellulose) इसमें PH-7 पर ऋणात्मक आवेश युक्त समूह उपस्थित होते हैं। अतः ये cation Exchanger की तरह इस्तेमाल में लाये जाते हैं।

(2) * एन्जाइम के अधिशोषित होने की क्षमता के आधार पर (Based on ~~Ionic Property of Enzyme~~) Ability to get Adsorbed:

(a) Adsorption chromatography → प्रोटीन के अणु रासायनिक रूप से अक्रिय (inert) पदार्थ पर अधिशोषित हो जाते हैं और जिन्हें पुनः प्राप्त किया जाता है। इनके अंतर्गत अध्रुवीय पदार्थ जैसे - चारकोल एवं ध्रुवीय पदार्थ जैसे सीलिकाजेल था एलुमिना आते हैं।

अधिशोषक के रूप में मुख्य रूप से हाइड्रॉक्सीएपेटाइट (hydroxy-apatite) इस्तेमाल में लाये जाते हैं। प्रोटिन में उपस्थित ऋणात्मक आवेश युक्त समूह Ca^{+2} आयन से जुड़ जाते हैं। अतः प्रोटीन के अणु हाइड्रॉक्सी एपेटाइट कॉलम से फास्फेट बफर ~~a~~ के इस्तेमाल से पृथक होते हैं।

(b) Affinity chromatography → इस विधि में एन्जाइम-क्रियाकारक ~~बाइंडिंग~~ के बंध का इस्तेमाल किया जाता है। लिगान्ड युक्त मैट्रिक्स को कॉलम में भरा जाता है। जब एन्जाइम का सान्द्रण कालम से गुजरता है तब एन्जाइम का अणु लिगान्ड से जुड़ जाता है। अब उसे उपयुक्त विलायक की सहायता से मुक्त कर लिया जाता है।

→ इस विधि का इस्तेमाल प्लाज्मा झिल्ली के रिसेप्टर अणु को पृथक करने में किया जाता है।

5

③ अणु के आकार कि भिन्नता के आधार पर (Techniques depending on the size of enzymes :

(a) जेल फिल्ट्रेशन विधि (Gel Permeation Chromatography)

इस विधि में सपोर्टिंग मेट्रिक्स के रूप में जेल का इस्तेमाल किया जाता है। छोटे अणु मेट्रिक्स के पोर में प्रवेश कर जाते हैं। जबकि बड़े अणु जेल के मध्य के पोर से होकर गुजरते हैं। अतः बड़े अणु पहले एवं छोटे अणु बाद में पृथक होते हैं।

(b) अल्ट्राफिल्ट्रेशन (Dialysis) - इस विधि का इस्तेमाल एन्जाइम के सांद्रता में वृद्धि करने एवं एन्जाइम के Purification में किया जाता है।

* Enzyme Assay Techniques. (Enzyme Assay Techniques)

* Enzyme के द्वारा उत्प्रेरित होने वाले क्रिया की दर ज्ञात करना Enzyme Assay कहलाता है। Enzyme kinetics में Enzyme Assay का बहुत अधिक महत्व है। अभिक्रिया के दर की जानकारी से किसी क्रिया की क्रियाविधी जानी जा सकती है।

Michaelis - menten kinetics : Enzyme activity के अंतर्गत यह ज्ञात किया जाता है कि क्रिया में कितनी मात्रा में Enzyme Present है। Enzyme की क्रियाशीलता (activity) के निर्धारण के दो तरीके है।

* Substrate क्रियाकारक की सांद्रता में कमी एवं उत्पाद (Product) की सांद्रता में वृद्धि। इसमें उत्पाद की सांद्रता में वृद्धि का निर्धारण करना अपेक्षाकृत अधिक परिशुद्ध (accurate) है। क्यों कि [P] में परिवर्तन का निर्धारण आसान है। Michaelis - menten kinetics के द्वारा किसी विशेष substrate के लिये Enzyme के Km का निर्धारण किया जाता है।

निर्धारक कारक (Control factor) : जब enzyme की क्रियाशीलता का निर्धारण किया जाता है तो उचित परिणाम की प्राप्ति के लिये निम्न factor को ध्यान में रखा जाता है।

(a) लवण सांद्रता (Salt concentration) : अधिक लवण की सांद्रता Enzyme की Folding में भाग लेने वाले दुर्बल बंध को भंग कर देता है। अतः यह क्रिया की गति को प्रभावित करता है।

(b) PH निर्भरता (PH Dependence) : कई enzyme एक उचित PH (optimum PH) पर अपनी क्रियाशीलता प्रदर्शित करते है। सामान्यतः enzyme उस स्थिती में अधिकतम क्रियाशीलता प्रदर्शित करते है जहाँ PH enzyme के सक्रिय साइट (active site) के Pka' बराबर होती है।

ⓒ संदमन (Inhibition) : inhibitor molecules, enzyme के active site में बंधा बनाते हैं और उसकी activity को कम कर देते हैं। Enzyme के inhibitors को हटाने के लिये सामान्यतः Dialysis का इस्तेमाल किया जाता है।

ⓓ Activators : ये अणु enzyme की क्रियाशीलता को बढ़ा देते हैं। ऐक्टिवेटर की निश्चित मात्रा को प्राप्त करने के लिये रसायन का इस्तेमाल किया जाता है।

ⓔ तापक्रम निर्भरता (Temprature dependence): enzyme एक निश्चित तापक्रम पर ही अपनी क्रियाशीलता प्रदर्शित करते हैं। सामान्यतः अधिक तापक्रम पर एन्जाइम की क्रियाशीलता समाप्त हो जाती है।

Types of Assay → substrate या Product की सांद्रता के निर्धारण के लिये कई method इस्तेमाल में लाये जाते हैं। लेकिन सभी Enzyme Assay Techniques को दो प्रकार में विभाजित किया जाता है।

ⓐ Fixed-Timed : इस प्रकार के assay में एक ~~निर्धारित~~ नियत समय अंतराल में Enzyme के सांद्रता की गणना की जाती है। कई विलयन की सांद्रता के निर्धारण के लिये microplate Reader इस्तेमाल में लाया जाता है। microplate के wells में multiple dilution series (substrate, enzyme, या Enzyme+substrate) को रखा जाता है। इस assay को शुरू करने के लिये well में start solution डाला जाता है। जब Reaction शुरू हो जाती है तब solution को एक नियत समय के लिये incubate कर दिया जाता है। reaction को रोकने के लिये stop solution डाला जाता है।

Fix time Assay के द्वारा कई assay को एक साथ निर्धारित किया जाता है।

Continuous assay: इस प्रकार के assay में Product की सांद्रता निर्धारित करने के लिये spectrophotometer इस्तेमाल में लाया जाता है| उचित परिणाम प्राप्त करने के लिये assay के पहले enzyme का optimum pH निर्धारित किया जाता है| इस assay विधि की सबसे बड़ी कमजोरी यह है कि इसके द्वारा एक समय में केवल एक क्रिया की गणना की जा सकती है| लेकिन लाभ यह है कि इसकी गणना विधि सरल है|

उदा० सामान्यतः Enzymatic oxidation, reduction क्रिया के लिये NADH/NAD^+ का इस्तेमाल किया जाता है| इस क्रिया के दौरान NADH, NAD^+ में आक्सीकृत होता है और NAD^+, NADH में reduce होता है| NADH 340 nm में Light को absorb करता है जबकि NAD^+ में यह गुण नही पायी जाती| अतः ~~Pho~~ spectrophotometer का इस्तेमाल 340 nm light के absorbance में परिवर्तन को ज्ञात करने में किया जाता है| जो कि $NADH^+$ के मात्रा में परिवर्तन को प्रदर्शित करता है|

Coupling Reaction: कई Reaction में, substrate या Product में परिवर्तन spectrophotometry के द्वारा दिखाई नही देता क्यों कि यह light को absorb नही करता। इन क्रियाओं का निर्धारण करने के लिये उसे ऐसे enzyme के साथ couple किया जाता है जो light को absorb करते हैं| ऐसे substrate और Product जो light को absorb नही करते उनके लिये Light absorb करने वाला substrate या Product का निर्माण किया जाता है|

- Mutation (suppression, ames test)
- Transcription
- Translation
- Genetic code
- Controll of gene expression
- Restrictn modification system
- M13 Phage
- DNA sequencing.
- Protein seperation & identification

Holliday model for General Recombination.

Holliday ने 1974 में recombination की प्रक्रिया को प्रदर्शित करने के लिये एक model दिया इस model के अनुसार recombination की प्रक्रिया निम्न पांच पदों में होती है।

(a) strand breakage
(b) strand pairing
(c) strand invasion/assimilation
(d) chiasma (crossing over) formation
(e) breakage and reunion and mismatch repair.

(a) Strand breakage:- सामान्यतः recombination की प्रक्रिया DNA duplex के complementry single strand के मध्य crossing over से होती है। DNA double helix के homologous region के मध्य exchange reaction होता है। E.coli में recombination के लिये rec BCD या J gene के Rec BCD Protein की आवश्यकता होती है। यह Protein DNA में एक सिरे से प्रवेश करता है और DNA double helix पर 300 nucleotide प्रति सेकेण्ड की दर से घुमता है। और इस दौरान यह SS-DNA का loop निर्मित करता है। इस क्रिया में ATP अणु के hydrolysis से ऊर्जा उत्पन्न करता है।

(b) Strand pairing :- Rec BCD Protein DNA helicase की तरह कार्य कार्य करता है क्यों कि यह DNA helix से घुमता है और ATP का इस्तेमाल करता है। अतः Rec BCD Protein ~~s~~ single stranded whisker का निर्माण करता है जो कि helix में displaced रहते हैं। यह प्रक्रिया दो complementry sequence के मध्य pairing interaction की शुरुआत करता है।

(c) Strand invasion/assimilation:- एक DNA helix में उत्पन्न single strand whisker दूसरे double helix में प्रवेश करता है। इस प्रक्रिया में recA Protein और SSB Protein मदद करता है। जब homologous region समीप आते हैं और ~~s~~ single strand whisker, double strand में प्रवेश करता है तब एक स्थायी D loop का निर्माण होता है।

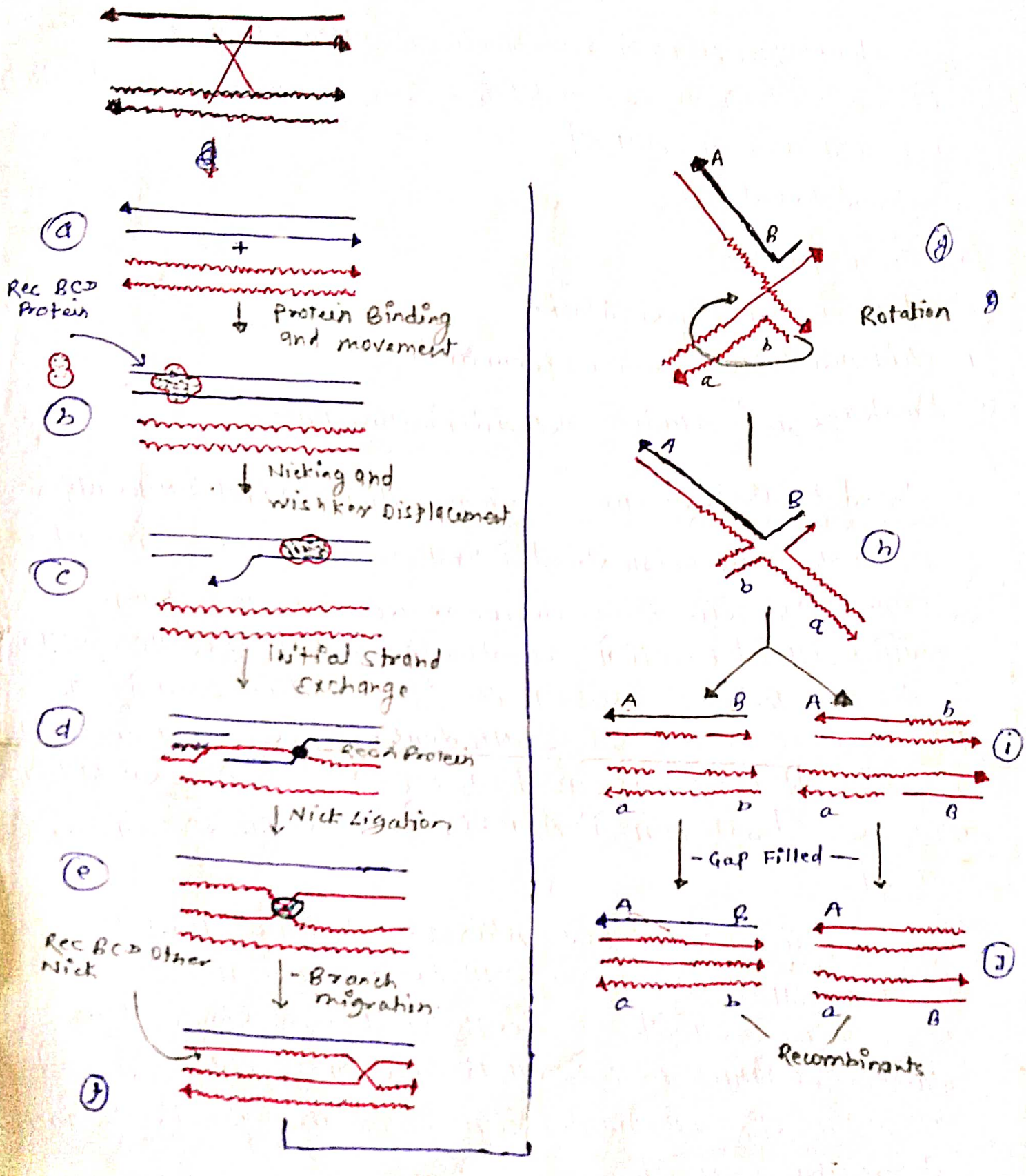


Fig: The Holliday model for reciprocal general Recombination

(d) Branch migration: अगले पद में strand strand जुड़ जाता है और कटाव (nick) seal हो जाता है। donor strand धीरे-धीरे recipient strand को स्थानांतरित (displaced) कर देता है जो कि branch migration कहलाती है। इस प्रक्रिया में synapsis के निर्माण के पश्चात् hetroduplex region बड़ा हो जाता है और recA protein एक समान दर से एक दिशीय (unidirection) branch migration की क्रिया को आगे बढ़ाता है। branch migration की क्रिया किसी भी बिन्दु पर जहाँ दो single strand समान complementry strand में बंध बनाने का प्रयास करते हैं हो सकता है।

(e) Chiasma or crossing over formation :- दो double helices में single strand का exchange होता है और nuclease protein DNA loop को कुछ बिन्दु से cleave कर देता है। इस पद में भिन्न भिन्न organism में भिन्न प्रक्रिया होती है। परंतु अधिकतर परिस्थिती में cross strand exchange जिससे Holliday juncture या chi form या chiasma का निर्माण होता है। इसमें चार strand में दो strand exchange होते हैं। chi form की दो मुख्य विशेषता होती है।

(a) exchange point ~~तेज़ी~~ तीव्रता से वापस migrate हो सकता है और double branch migration के द्वारा आगे की ओर निकल सकता है।

(b) इसमें strand का दो pair होता है एक crossing strand और दूसरा non-crossing strand.

(f) Breakage and reunion:- chi संरचना कई घुमाव (rotation) के पश्चात् isomeric form का निर्माण करता है। जो कि दोनों non crossing strand और crossing strand के मध्य फेरबदल (alteration) से उत्पन्न होता है। अब isomerization की प्रक्रिया के पश्चात् Breakage और reunion होता है। यह दो प्रकार का हो सकता है।

* यदि breakage horizontaly होता है तब recombinants में AB/ab genotype होगा

* और breakage vertical होने की स्थिती में recombinants का genotype Ab/aB होगा।

इस पद में ruvC और recG protein endonuclease क्रिया में भाग लेता है।