Unit -1

चरक संहिता (Charaka Samhita) जैसे आयुर्वेदिक ग्रन्थों में वर्णित *पारंपरिक एंज़ाइम-सदृश* उपचारों को आधुनिक एंज़ाइमोलॉजी (Enzymology) की दृष्टि से समझाया गया है।

🔹 1. पृष्ठभूमि: आयुर्वेद में "एंज़ाइम" शब्द नहीं, पर एंज़ाइम-सदृश अवधारणाएँ थीं

आधुनिक विज्ञान ES (Enzyme–Substrate) मॉडल, सक्रिय स्थल (active site) आदि के आधार पर एंज़ाइम समझाता है।
लेकिन **चरक संहिता** में एंज़ाइम शब्द नहीं मिलता—फिर भी *जैव-रासायनिक क्रियाओं को सक्रिय करने वाली प्रक्रियाएँ* वर्णित हैं जैसे—

- **अग्नि (Agni)** → जैव-रासायनिक परिवर्तन करने वाली शक्ति
- **जठराग्नि, धात्वाग्नि, भूतोऽग्नि** → digestion, metabolism, cellular transformations
- **पाचन-द्रव्य (Digestives)** → आधुनिक भाषाओं में enzyme enhancers
- **दोषों का पाचन-शमन** → metabolic regulation

इस प्रकार आयुर्वेद में "अग्नि" आधुनिक science के digestive enzymes के समकक्ष कार्य करती है।

🔹 2. पारंपरिक उपचार और आधुनिक एंज़ाइमोलॉजी का संबंध

⭑ 2.1 अम्ल (酸) / पचनीय औषधियाँ = Modern: Amylase, Protease Activators

आयुर्वेद:

चरक संहिता में *दीपन-पाचन* औषधियाँ बताई गई हैं—जो **भोजन का पाचन बढ़ाती हैं**। उदाहरण:

- पिप्पली (Piper longum)
- अदरक (शुण्ठी)

- मरिच (Black pepper)
- त्रिकटु (Pippali + Maricha + Shunthi)

कार्य:
अग्नि (जठराग्नि) को तीव्र करना, जिससे *अन्न का भेदन, पाचन, अवशोषण* बढ़ता है।

आधुनिक एंज़ाइमोलॉजी:

इन द्रव्यों में पाए जाते हैं—

- **पाइपरिन** → Pancreatic amylase और lipase secretion बढ़ाता है
- **जिंजरॉल** → gastric motility और enzyme release बढ़ाता है
- **Capsaicin-like action** (from black pepper) → saliva amylase में वृद्धि

➡ यह **कार्बोहाइड्रेट breakdown एंज़ाइमों** (जैसे amylase) को बढ़ाता है।

⋆ 2.2 तक्र (Buttermilk), काष्ठौषधियाँ = Modern: Lipase Modulation

चरक के अनुसार:

तक्र को श्रेष्ठ "पाचन-उत्तम" माना गया है—

- स्निग्ध अन्न के पाचन में सहायक
- आँतों के अवरोध को दूर करता है
- अग्नि को स्थिर करता है

आधुनिक विज्ञान:

तक्र में मौजूद:

- Lactic acid bacteria → gut flora सुधारकर **पैंक्रियाटिक lipase** को सक्रिय करते हैं
- Buttermilk phospholipids → fat emulsification बढ़ाती हैं → lipase efficiency ↑

➡ यह **लिपिड digestion** का आधुनिक equivalent है।

⭑ 2.3 हिंगु (Asafoetida) = Modern: Trypsin, Chymotrypsin Enhancer

आयुर्वेद:

- वातनाशक
- अन्नपाचन में सहायक
- "अजिर्ण (indigestion)" का इलाज

आधुनिक एंज़ाइम facts:

- हिंग में *resin acids + volatile oils* पाए जाते हैं
- ये pancreatic protease enzymes (trypsin, chymotrypsin) को stimulate करते हैं
- intestinal motility बढ़ाते हैं → digestion तेज

➡ चरक का हिंगु वर्णन आधुनिक protease activation से मेल खाता है।

⭑ 2.4 पाचन-तीक्ष्ण औषधियाँ = Modern: Proteolytic Enzymes (Papain, Bromelain)

चरक में—

- **फलं (Fruit-based)** औषधियाँ
- विशेष रूप से **कफजन्य अजीर्ण** में उपयोग
- अन्न को "सूक्ष्म" कर पचाने का वर्णन

आधुनिक correlate:

- **पपीता (Papaya)** – papain enzyme (protease)
- **अनानास (Pineapple)** – bromelain (protease)

ये सीधे *protein-digesting enzymes* हैं।

➡ चरक में "पाचन" के लिए फल-उपयोग का उल्लेख → आज papain/bromelain medicinal enzymes के रूप में उपयोग होते हैं।

⭑ 2.5 द्राक्षासव, अरिष्ट, आसव (Fermented preparations) = Modern: Fermentation Enzymes

चरक संहिता में आसव-अरिष्ट को—

- "दीपन"
- "हृद्य"
- "पाचन"

बताया गया है।

आधुनिक दृष्टि:

Fermentation में सक्रिय रहते हैं:

- **Yeast enzymes — Zymase complex**
- Ethanol → gastric juice secretion बढ़ाता है
- Mild acids → salivary & pancreatic secretions ↑

➡ आयुर्वेद के fermented tonics → digestion enzymes indirectly increase करते हैं।

⍰ 3. आयुर्वेदिक "अग्नि" और आधुनिक "एंज़ाइम" का तुलनात्मक विश्लेषण

आयुर्वेदिक अवधारणा	आधुनिक समकक्ष	व्याख्या
जठराग्नि	Digestive enzymes (amylase, pepsin, lipase)	भोजन को रसायनों में बदलने की शक्ति
धात्वाग्नि	Tissue-level metabolic enzymes	कोशिकीय metabolism एवं energy conversion
भूताग्नि	Cellular oxidative enzymes	O2 आधारित biochemical pathways
दीपन औषधि	Enzyme secretion stimulators	अग्नि को बढ़ाने वाले द्रव्य

आयुर्वेदिक अवधारणा	आधुनिक समकक्ष	व्याख्या
पाचन औषधि	Catalytic enzyme enhancers	पाचन भेदन शक्ति बढ़ाते हैं

➡ संक्षेप में, *अग्नि = जैव-रासायनिक एंज़ाइमों का सामूहिक शब्द।*

---

4. रोगानुसार एंज़ाइम-संबंधित आयुर्वेदिक उपचार (चरक अनुसार)

(A) अजीर्ण (Indigestion)

- पिप्पली
- अदरक
- हिंगु

Modern correlate:
↑ amylase, ↑ lipase, ↑ protease secretion → improved digestion.

(B) अतिसार (Diarrhea)

चरक में:

- बेल (Aegle marmelos)
- शुन्धि
- हस्ती-पिष्टी

Modern correlate:

- बेल में tannins → digestive enzymes को regulate करते हैं
- gut motility normalized
- carbohydrate fermentation control

(C) मन्दाग्नि (Low metabolic fire)

- त्रिकटु
- पंचकोल
- चव्य

Modern:

- thermogenic compounds → metabolic enzyme activity ↑
- salivary & pancreatic enzyme release ↑

---

1. Ribonuclease-A (RNase-A)

कार्य: RNA को काटने वाला एंज़ाइम (Endoribonuclease)

रचना (Structure):

- **सिंगल चेन प्रोटीन (124 amino acids)**
- **4 डिसल्फ़ाइड बांड (—S—S—)**
- α-helix और β-sheet दोनों उपस्थित
- अत्यधिक **स्थिर (heat-stable)** protein—डिसल्फ़ाइड बांडों के कारण
- Active site में प्रमुख residues:
  - **His12**
  - **His119**
  - **Lys41**

कार्य-विधि (Function):

RNase-A RNA की phosphodiester bond को तोड़ता है।

संरचना–कार्य संबंध

Structural Feature	Functional Outcome
His12 और His119	Acid–base catalysis करते हैं; RNA bond cleavage
Lys41	Transition-state stabilization
Disulfide bonds (4)	Protein को thermal stability देते हैं – boiling पर भी denature नहीं होता
Compact folding	Active site pocket perfect shape लेता है ताकि RNA bind कर सके

➡ **RNase-A का प्रसिद्ध "Anfinsen Experiment"** बताता है कि protein की **सही tertiary structure = सही function।**

---

2. Myoglobin

कार्य: मांसपेशियों में O_2 का भंडारण (oxygen storage protein)

रचना (Structure):

- **153 amino acids**
- केवल **एक polypeptide chain**
- **Globular structure**
- **8 α-helices (A–H helices)**
- Prosthetic group: **Heme (Fe^{2+} + Porphyrin ring)**
- **Hydrophobic pocket** जहाँ heme सुरक्षित रहता है

कार्य-विधि (Function):

- Fe^{2+} पर O_2 reversible bind करता है
- Myoglobin O_2 को मांसपेशियों तक पहुंचाए बिना **store** करता है

संरचना–कार्य संबंध

Structure Element	Function
Heme pocket (hydrophobic cavity)	Fe^{2+} को ऑक्सीकरण से बचाता है; O_2 का सुरक्षित बंधन

Structure Element	Function
Proximal Histidine (His F8)	Fe^{2+} से सीधे जुड़कर heme को स्थिर करता है
Distal Histidine (His E7)	O_2 binding को नियंत्रित करता है; CO binding को कम करता है
Compact α-helical fold	स्थिरता और specificity बढ़ाता है

➡ Myoglobin का structure **बहुत सुरक्षित (compact)** है → O_2 storage के लिए perfect.

---

3. Hemoglobin (Hb)

कार्य: फेफड़ों से ऊतकों तक O_2 ले जाना

रचना (Structure):

- **Tetrameric protein** (4 subunits)
  - 2 × α-chains
  - 2 × β-chains
- प्रत्येक chain में अपना **heme** → total 4 O_2 molecules bind कर सकते हैं
- Hb की विशेषता: **Cooperative Binding**

कार्य-विधि (Function):

- पहला O_2 bind होने पर शेष 3 O_2 को bind करना आसान हो जाता है
- यह **Sigmoid (S-shaped)** O_2 binding curve देता है

संरचना–कार्य संबंध

Structure	Function
Tetrameric quaternary structure	Cooperative O_2 binding संभव
T↔R transition	T-state (tense) → Low O_2 affinity

R-state (relaxed) → High O_2 affinity

Structure	Function
Salt bridges & ion pairs	T-state को स्थिर रखते हैं
Heme–heme interactions	Cooperative binding का आधार

Allosteric Regulation

- **H+ (Bohr effect)** → O_2 release ↑
- **CO_2** → O_2 release ↑
- **2,3-BPG (in RBCs)** → O_2 affinity ↓ → ऊतकों में O_2 release ↑

➡ Hemoglobin की complex architecture → oxygen transport के लिए optimized है, जो **myoglobin से बिलकुल अलग behavior** देती है।

---

4. Chymotrypsin (Serine Protease)

कार्य: Proteins (पेप्टाइड बॉन्ड) को काटने वाला पाचक एंज़ाइम
Location: Pancreas

रचना (Structure):

- 245 amino acids
- Three chains (A, B, C) formed after proteolytic activation
- **Catalytic Triad:**
  - **Ser195**
  - **His57**
  - **Asp102**
- Hydrophobic binding pocket (specific for aromatic amino acids)

कार्य-विधि (Function):

- Tyrosine, Phenylalanine, Tryptophan जैसे aromatic residues के बाद पेप्टाइड bond को तोड़ता है
- Mechanism:
  1. Ser195 nucleophilic attack
  2. Tetrahedral intermediate
  3. Acyl-enzyme complex

4. Deacylation → peptide cleavage

संरचना–कार्य संबंध

Structure Element	Function
Catalytic Triad (Ser-His-Asp)	Nucleophilic attack → peptide bond cleavage
Oxyanion hole	Reaction intermediate stabilize करता है
Hydrophobic pocket (S1 pocket)	Substrate specificity — aromatic AAs को ही bind करता है
Zymogen activation (Chymotrypsinogen → Chymotrypsin)	Digestion only in intestine, not pancreas

➡ Chymotrypsin का structure इस प्रकार evolved है कि वह aromatic amino acids के पास पेप्टाइड बॉन्ड को बहुत specific तरीके से काटे।

---

5. Summarized Comparison Table

Protein	Structure	Function	Structure–Function Logic
RNase-A	Single chain, disulfide bonds, His12/His119	RNA cleavage	Active site histidines + stability important
Myoglobin	Single chain, 8 helices, heme	O_2 storage	Heme pocket & histidines control O_2 binding
Hemoglobin	Tetramer ($\alpha_2\beta_2$), 4 heme	O_2 transport	Cooperative binding due to quaternary structure
Chymotrypsin	Ser-His-Asp triad	Protein digestion	Catalytic triad + binding pocket specificity

---

1: Physico-Chemical Characterization of Enzymes

एंज़ाइमों का *भौतिक-रासायनिक वर्णन* यह समझने के लिए किया जाता है कि वे कैसे काम करते हैं, किस वातावरण में स्थिर रहते हैं, किस प्रकार सक्रिय होते हैं और उनका आकार-आकृति तथा रासायनिक गुण क्या हैं।

आइए इसे बिंदुवार गहराई से समझें:

🔬 1. Molecular Nature (आणविक प्रकृति)

- एंज़ाइम मुख्यतः **प्रोटीन्स** होते हैं
- कुछ **RNA एंज़ाइम (ribozyme)** भी होते हैं
- प्रत्येक एंज़ाइम का एक **विशिष्ट अमीनो एसिड अनुक्रम** होता है जो उसका 3-D shape बनाता है

➡ **Structure = Function** (संरचना ही कार्य को निर्धारित करती है)

⚖️ 2. Molecular Weight (आणविक भार)

- एंज़ाइम कुछ हज़ार से लेकर कई लाख Dalton तक हो सकते हैं
- छोटे एंज़ाइम: ~10 kDa
- बड़े complex एंज़ाइम: ~500 kDa या ज़्यादा

उदाहरण:

- Lysozyme: 14.3 kDa
- Hexokinase: 100 kDa
- RNA polymerase: 450 kDa

➡ Molecular weight एंज़ाइम की स्थिरता और catalytic efficiency को प्रभावित करता है।

🔹 3. Nature of Active Site (सक्रिय स्थल की प्रकृति)

एंज़ाइम का **heart** = Active Site

- यह कुल protein का केवल 2–3% होता है
- यह amino acids का विशेष arrangement होता है
- substrate **विशिष्ट आकार** में bind होता है (lock–key / induced fit)

Active site की विशेषताएँ:

- catalytic residues (Ser, His, Asp, Lys etc.)
- binding pocket
- hydrophobic/hydrophilic interactions
- transition state stabilization

🔹 4. Coenzymes और Cofactors

कुछ एंज़ाइमों को activity के लिए अतिरिक्त गैर-प्रोटीन अणु चाहिए होते हैं:

Cofactors (धातु आयन)

जैसे—Mg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}

Coenzymes (जैविक अणु)

जैसे—NAD^{+}, FAD, CoA, Vitamins

Prosthetic group (मज़बूती से जुड़े cofactors)

जैसे—Heme, Biotin, Flavin

➡ Cofactors enzyme की catalytic efficiency कई गुना बढ़ा देते हैं।

🌡️ 5. Temperature Dependence (तापमान पर निर्भरता)

- एंज़ाइम **optimum temperature** पर सबसे तेज काम करते हैं
- सामान्यत: 37°C (मानव शरीर के एंज़ाइम)
- बहुत ज़्यादा ताप → enzyme denature
- कम ताप → reaction धीमी

🧪 6. pH Dependence (pH पर निर्भरता)

हर एंज़ाइम का अपना **optimum pH** होता है:

Enzyme	Optimum pH
Pepsin	2
Trypsin	8
Salivary amylase	7

pH बदलने से:

- amino acid residues का charge बदल जाता है
- active site distort हो सकता है
- substrate binding कम हो जाती है

📈 7. Kinetic Parameters: Km और Vmax

Michaelis–Menten kinetics के दो प्रमुख पैरामीटर:

Km (Michaelis constant)

- enzyme की **affinity** बताता है
- Km कम → substrate affinity अधिक
- Km अधिक → substrate binding कमजोर

Vmax

- एंज़ाइम की **अधिकतम गति**
- तब जब एंज़ाइम पूरी तरह saturated हो

➡ Km और Vmax एंज़ाइम characterization का सबसे महत्वपूर्ण हिस्सा हैं।

---

8. Specificity (विशिष्टता)

एंज़ाइम चार प्रकार की specificity दिखाते हैं:

1. **Absolute specificity**
   - एक ही substrate (e.g., urease → urea)
2. **Group specificity**
   - एक functional group (e.g., trypsin → lys/arg residues)
3. **Bond specificity**
   - एक विशेष bond (e.g., lipase → ester bond)
4. **Stereo-specificity**
   - सिर्फ़ L- या D-form molecules

---

9. Inhibitors (अवरोधक)

Competitive

Substrate की तरह दिखता है (Km ↑)

Non-competitive

Active site के अलावा bind करता है (Vmax ↓)

Uncompetitive

ES complex पर bind करता है (Km और Vmax दोनों ↓)

Inhibition enzyme की पहचान और mechanism समझने में बेहद महत्वपूर्ण है।

🔹 10. Stability (स्थिरता)

- Thermal stability
- pH stability
- Denaturants के प्रति resistance
- Disulfide bonds, hydrophobic core, salt bridges से आती है

2: Enzyme Classifications (एंज़ाइम वर्गीकरण)

Enzymes को अंतरराष्ट्रीय संस्था **IUBMB** छह मुख्य वर्गों में बांटती है।
हर enzyme का अपना **EC number** होता है (Enzyme Commission number)।

🔹 1. Oxidoreductases (EC 1)

कार्य: Oxidation–reduction प्रतिक्रियाएँ
उदाहरण:

- Dehydrogenase
- Oxidase
- Peroxidase
- Cytochrome oxidase

🔹 2. Transferases (EC 2)

कार्य: एक molecule से दूसरे में group transfer
उदाहरण:

- Kinase (phosphate transfer)
- Transaminase
- Methyltransferase

---

3. Hydrolases (EC 3)

कार्य: Water की उपस्थिति में bond टूटना (hydrolysis)

उदाहरण:

- Lipase
- Protease (trypsin, chymotrypsin)
- Nuclease
- Amylase

---

4. Lyases (EC 4)

कार्य: बिना hydrolysis या oxidation के bond टूटना

उदाहरण:

- Aldolase
- Decarboxylase
- Fumarase

---

5. Isomerases (EC 5)

कार्य: Molecular rearrangement (isomerization)

उदाहरण:

- Racemase
- Mutase
- Epimerase

---

6. Ligases (EC 6)

कार्य: Bond formation using ATP

उदाहरण:

- DNA ligase
- Carboxylase
- Synthetase

एंज़ाइम नामकरण (Nomenclature of Enzymes):

एंज़ाइमों का नामकरण मुख्यतः दो तरह से होता है—

1. **सामान्य (Common) नामकरण – पारंपरिक नाम**
2. **IUBMB प्रणाली (Systematic नामकरण और EC Number)**

---

1. सामान्य/पारंपरिक नाम (Common Names)

ये नाम पुराने समय से उपयोग में रहे हैं।
ये सीधे-सीधे बताते हैं:

- एंज़ाइम कौन-सी क्रिया करता है
- किस substrate पर काम करता है

A. नामकरण का सामान्य नियम

substrate का नाम + "ase" (एज़)

उदाहरण:

Substrate	Enzyme Name	Function
Urea	Urease	Urea को $CO_2 + NH_3$ में तोड़ता है

Substrate	Enzyme Name	Function
Lipid	Lipase	वसा को तोड़ता है
Lactose	Lactase	Lactose को glucose + galactose में तोड़ता है
Starch	Amylase	Starch → Maltose

---

2. क्रिया (Reaction type) पर आधारित नाम

कई एंज़ाइमों को उस प्रकार की *रासायनिक प्रतिक्रिया* के आधार पर नाम मिलता है जिसे वे catalyze करते हैं।

उदाहरण:

- Oxidase → oxidation कराता है
- Reductase → reduction कराता है
- Peptidase → peptide bond तोड़ता है
- Polymerase → polymers बनाता है
- Kinase → phosphate group जोड़ता है
- Dehydrogenase → hydrogen हटाता है
- Decarboxylase → CO_2 हटाता है

➡ Common names अक्सर **reaction + ase** रूप में होते हैं।

---

3. IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) द्वारा Systematic Nomenclature

एंज़ाइमों का आधिकारिक (systematic) नामकरण एक **वैज्ञानिक फार्मूले** पर आधारित है।

IUBMB हर एंज़ाइम को देती है:

✔ एक systematic name

✔ एक EC Number (Enzyme Commission Number)

✅ A. Systematic Name (सिस्टेमैटिक नाम)

सिस्टेमैटिक नाम में दो बातें साफ़ होती हैं:

1. **एंज़ाइम किस substrate पर काम करता है**
2. **किस प्रकार की प्रतिक्रिया करवाता है**

उदाहरण:

Lactate:NAD$^+$ oxidoreductase
यह बताता है कि एंज़ाइम lactate और NAD$^+$ के बीच oxidation–reduction reaction कराता है।

Peptidyl-Lysine deacetylase
बताता है कि यह peptide में lysine residue से acetyl group हटाता है।

➡ Systematic नाम भले लंबे हों, लेकिन reaction को पूरी तरह स्पष्ट करते हैं।

✅ B. EC Number (Enzyme Commission Number)

यह एंज़ाइमों की सबसे महत्वपूर्ण वर्गीकरण प्रणाली है।
हर enzyme को एक code दिया जाता है:

EC X.Y.Z.W

जहाँ चारों अंक अलग-अलग जानकारी देते हैं:

1st number (Class)

कुल 6 enzyme classes:

1. **Oxidoreductases**
2. **Transferases**
3. **Hydrolases**
4. **Lyases**
5. **Isomerases**
6. **Ligases**

2nd number (Subclass)

किस तरह की प्रतिक्रिया है
(जैसे – hydrogen transfer, group transfer)

3rd number (Sub-subclass)

कौन-सा substrate या bond

4th number (Serial number)

उस परिवार में विशिष्ट एंज़ाइम की संख्या

□ EC Number का Example: "EC 3.4.21.4"

यह **Chymotrypsin** का EC number है।

इसे समझते हैं:

- **3** → Hydrolase (जल द्वारा bond टूटता है)
- **4** → Peptide bond hydrolysis
- **21** → Serine protease family
- **4** → इस समूह का चौथा एंज़ाइम

➡ EC number एंज़ाइम की क्रिया को बिल्कुल सटीक रूप में दर्शाता है।

□ 4. Naming Based on Cofactors

कुछ एंज़ाइमों का नाम उनकी सहायता करने वाले cofactor पर आधारित होता है:

- NAD-dependent dehydrogenase
- FAD-dependent oxidase
- Biotin-dependent carboxylase
- PLP-dependent aminotransferase

➡ यह नामकरण enzyme-cofactor संबंध को दिखाता है।

---

5. Naming Based on Source (Protein origin)

कुछ एंज़ाइमों को उनके स्रोत के आधार पर भी नाम मिलता है:

- Trypsin → Pancreas (Trypsinogen से)
- Pepsin → Stomach (Pepsinogen से)
- Papain → Papaya से
- Bromelain → Pineapple stem से

---

6. Historical/Legacy Names

कुछ एंज़ाइमों के नाम पुराने समय से चले आ रहे हैं:

- Pepsin
- Trypsin
- Chymotrypsin
- Thrombin
- Fibrinogenase

इनमें "ase" suffix नहीं लगता—लेकिन ये modern नामकरण में स्वीकार्य हैं।

---

7. Summary Table: Enzyme Naming Systems

Naming Type	Example	Basis
Common Name	Amylase	Substrate
Reaction-based	Oxidase	Reaction type
Systematic Name	Lactate:NAD oxidoreductase	Substrate + reaction
EC Number	EC 3.4.21.4	Class + subclass
Cofactor-based	NAD-dependent DH	Cofactor

Naming Type	Example	Basis
Source-based	Papain	Organism
Historical	Pepsin	Classical names

? एंज़ाइम गतिकी (Enzyme Kinetics) क्या है?

एंज़ाइम गतिकी वह विज्ञान है जो यह अध्ययन करता है:

- एंज़ाइम किस गति से प्रतिक्रिया करवाते हैं
- प्रतिक्रिया की गति किन घटकों पर निर्भर करती है
- substrate की मात्रा, एंज़ाइम की मात्रा, pH, तापमान, inhibitors आदि गति को कैसे बदलते हैं

एंज़ाइम प्रतिक्रिया की दर समझने का आधार है → **Michaelis–Menten Kinetics**

? 1. Enzyme-Catalyzed Reaction

किसी सामान्य एंज़ाइम प्रतिक्रिया को ऐसे दर्शाया जाता है:

E + S ⇌ ES → E + P

जहाँ:

- **E = Enzyme**
- **S = Substrate**
- **ES = Enzyme–substrate complex**
- **P = Product**

एंज़ाइम खुद नहीं बदलता, बस प्रक्रिया को तेज करता है।

⁉ 2. Reaction Velocity (V) – प्रतिक्रिया की दर

प्रतिक्रिया की गति (V) = प्रति समय बनने वाला product

 शुरुआती velocity (V_0) सबसे महत्वपूर्ण होती है, क्योंकि उस समय substrate बहुत अधिक होता है और reverse reaction नगण्य होती है।

⁉ 3. Effect of Substrate Concentration [S]

जब substrate concentration कम से अधिक की तरफ बढ़ती है, तो एंज़ाइम की गति ऐसे बदलती है:

1. **कम [S] पर → V धीरे-धीरे बढ़ता है**
2. **जैसे [S] बढ़ता है → V तेज़ बढ़ता है**
3. **बहुत अधिक [S] पर → एंज़ाइम saturated हो जाता है**
4. अंत में → गति **Vmax** पर पहुँचकर स्थिर हो जाती है

इस संबंध को **Michaelis–Menten Curve (Hyperbolic curve)** कहते हैं।

⁉ 4. Vmax और Km (Michaelis Constant)

यह Enzyme kinetics की दो सबसे महत्वपूर्ण संकल्पनाएँ हैं।

Vmax (Maximum Velocity)

- वह अधिकतम गति जब एंज़ाइम के सभी active sites substrate से पूरी तरह भरे हों
- इस स्थिति में एंज़ाइम 'saturated' होता है
- इसे एंज़ाइम की **maximum capacity** कहते हैं

Km (Michaelis Constant)

Km = वह substrate concentration जहाँ एंज़ाइम की गति **Vmax का 50%** होती है।

Km बताता है:

- **enzymatic affinity (आकर्षण)**
- Km **कम** → एंज़ाइम का substrate के प्रति आकर्षण **ज्यादा**
- Km **ज़्यादा** → एंज़ाइम का आकर्षण **कम**

➡ Km केवल enzyme–substrate का गुण है, इसमें enzyme concentration का असर नहीं होता।

---

5. Michaelis–Menten Equation (गतिकीय समीकरण)

गति को मापने की मुख्य समीकरण:

$$
V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}
$$

यह दिखाती है कि प्रतिक्रिया की गति substrate concentration के साथ कैसे बदलती है।

---

6. Lineweaver–Burk Plot (Double Reciprocal Plot)

ग्राफ आधारित गणना के लिए Michaelis–Menten समीकरण का reciprocal लिया जाता है:

$$
\frac{1}{V}= \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}
$$

यह सीधी रेखा (linear graph) देता है।

इसका उपयोग:

- Km और Vmax सटीक निकालने में
- inhibition mechanism पहचानने में

---

7. Enzyme Inhibition (एंज़ाइम अवरोधन)

Inhibitors एंज़ाइम की गति को कम करते हैं।
तीन मुख्य प्रकार:

---

1. Competitive Inhibition (प्रतिस्पर्धी अवरोधन)

- inhibitor substrate जैसा दिखता है
- active site पर bind करता है
- substrate और inhibitor competition करते हैं

➡ **Effect:**

- Km ↑ बढ़ता है
- Vmax = same (नहीं बदलता)

Example: **Malonate → Succinate dehydrogenase inhibitor**

---

2. Non-Competitive Inhibition (गैर-प्रतिस्पर्धी)

- inhibitor active site के अलावा किसी और जगह bind करता है
- एंज़ाइम की activity को कम कर देता है

➡ **Effect:**

- Km = same
- Vmax ↓ कम हो जाता है

Example: **Heavy metals (Hg^{2+}, Ag^{+})**

---

3. Uncompetitive Inhibition

- inhibitor सिर्फ़ ES complex से जुड़ता है
- reaction pathway को बदल देता है

➡ **Effect:**

- Km ↓ कम
- Vmax ↓ कम

---

8. Effect of Enzyme Concentration

- एंज़ाइम concentration **दोगुना** → Vmax भी **दोगुना**
- Km नहीं बदलता

---

9. Effect of pH

- प्रत्येक एंज़ाइम का एक **optimum pH** होता है
- गलत pH → active site के residues ionization बदल जाते हैं
- activity कम हो जाती है

Examples:

- Pepsin → pH 2
- Trypsin → pH 8

---

10. Effect of Temperature

- ताप बढ़ाने से गति बढ़ती है
- बहुत अधिक ताप → एंज़ाइम **denature**
- प्रत्येक एंज़ाइम का अपना **optimum temperature** होता है (मानव के लिए ~37°C)

---

11. Turnover Number (Kcat)

Kcat = प्रति सेकंड एक एंज़ाइम कितने substrate molecules को product में बदलता है।

High Kcat = तेज enzyme

Example:
Catalase → 40 million molecules/second (सबसे तेज ज्ञात एंज़ाइम)

---

12. Catalytic Efficiency = Kcat / Km

यह एंज़ाइम की सबसे महत्वपूर्ण efficiency parameter है।

- Kcat ↑; Km ↓ → एंज़ाइम बहुत efficient
- Diffusion-controlled enzymes → catalytic efficiency लगभग perfect

---

I. एंज़ाइम कैटालिसिस का तंत्र (Mechanism of Enzyme Catalysis)

एंज़ाइम रासायनिक प्रतिक्रिया की गति को बढ़ाते हैं क्योंकि वे **Activation Energy (Ea) को कम** कर देते हैं। लेकिन वे reaction की **enthalpy (ΔG), equilibrium position** को नहीं बदलते।

नीचे एंज़ाइम कैटालिसिस के सभी प्रमुख तंत्र को step-by-step गहराई से समझाया गया है।

---

1. ES Complex Formation (एंज़ाइम–सब्सट्रेट परिसर का निर्माण)

प्रतिक्रिया का पहला चरण:

[
E + S \rightleftharpoons ES
]

जब substrate एंज़ाइम के **active site** में फिट हो जाता है, तब ES complex बनता है।
यही complex प्रतिक्रिया को **transition state** तक ले जाता है।

🔹 2. Active Site की Binding Models

Active site और substrate की binding दो मुख्य प्रकार से समझी जाती है:

A. Lock-and-Key Model

- एंज़ाइम का active site पहले से rigid shape में होता है
- substrate उसी shape के अनुसार fit होता है
- जैसे ताला और चाबी

🔸 यह specificity समझाने के लिए अच्छा मॉडल है लेकिन real mechanism simplistic है।

B. Induced-Fit Model (सही आधुनिक मॉडल)

- active site लचीला (flexible) होता है
- substrate के आने पर active site अपना shape बदलकर tightly bind करता है
- यह binding एंज़ाइम को catalytic action के लिए ready अवस्था में लाती है

🔸 यही मॉडल आज सबसे अधिक स्वीकार्य है।

🔹 3. Enzyme कैसे Activation Energy कम करते हैं?

एंज़ाइम चार मुख्य तरीकों से प्रतिक्रिया को तेज करते हैं:

🔹 A. Proximity and Orientation Effects (निकटता और अभिविन्यास प्रभाव)

- substrate molecules को एक-दूसरे के निकट लाना
- उन्हें सही orientation में रखना
  इससे reaction आसानी से होती है।

➡ बिना एंज़ाइम के reactants यादृच्छिक रूप से टकराते हैं।
➡ एंज़ाइम उन्हें नियंत्रित और सही alignment में रखता है।

⭕ B. Transition State Stabilization

सबसे महत्वपूर्ण catalytic mechanism।

- एंज़ाइम transition state को **सबसे अधिक स्थिर** करता है
- इससे activation energy (Ea) बहुत कम हो जाती है
- परिणाम: reaction लाखों गुना तेज

Transition state = reaction का सबसे ऊर्जावान intermediate
एंज़ाइम उसी को stabilize करके reaction को आसान बनाता है।

⭕ C. Acid–Base Catalysis

Active site पर मौजूद amino acids (His, Asp, Glu, Lys, Tyr) proton donate या accept करते हैं।

उदाहरण:
Chymotrypsin में His57 proton shuffle कराता है → peptide bond टूटता है।

⭕ D. Covalent Catalysis

सब्सट्रेट के साथ अस्थायी covalent bond बनता है → reaction का नया pathway बनता है।

उदाहरण:

- Ser195 (चाइमोट्रिप्सिन)
- Cys (cysteine proteases)

⚗️ E. Metal Ion Catalysis

Metal ions (Zn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}) reaction को stabilize करते हैं:

- negative groups stabilize
- electron transfer
- substrate को polarize करते हैं

उदाहरण:
Carbonic anhydrase (Zn^{2+} dependent)

⚗️ F. Electrostatic Catalysis

Active site की charged amino acids substrate को attract या repulse करके reaction आसान बनाते हैं।

⚗️ G. Desolvation Effect

एंज़ाइम substrate को पानी (solvent shell) से हटाकर reaction केंद्र में लाता है → reaction तेज।

⚗️ कुल मिलाकर, एंज़ाइम इन सभी तरीकों से **reaction** को **energetically** आसान बनाते हैं।

⚗️ II. एंज़ाइम अवरोधन (Enzyme Inhibition)

अब देखते हैं कि कैसे एंज़ाइमों की activity को रोका या कम किया जाता है।

Inhibition दो तरह की होती है:

- **Reversible (उलटी जा सकने वाली)**
- **Irreversible (स्थायी)**

यहाँ पहले reversible inhibition के प्रकार देखें।

---

1. Competitive Inhibition (प्रतिस्पर्धी अवरोधन)

- inhibitor substrate जैसा दिखता है
- active site पर ही bind करता है
- substrate और inhibitor competition करते हैं

➡ **Km बढ़ता है**
➡ **Vmax वही रहता है**

उदाहरण:
Malonate → Succinate dehydrogenase का inhibitor

Graph:
Lineweaver-Burk plot में slope बढ़ता है।

---

2. Non-Competitive Inhibition (गैर-प्रतिस्पर्धी अवरोधन)

- inhibitor active site के अलावा कहीं और bind करता है
- एंज़ाइम shape बदल जाता है
- substrate चाहे bind हो जाए, activity रुक जाती है

➡ **Km same**
➡ **Vmax कम**

उदाहरण:
Heavy metals (Ag^{+}, Hg^{2+})

---

3. Uncompetitive Inhibition

- inhibitor केवल **ES complex** से bind करता है

- reaction pathway को बदल देता है

➡ **Km कम होता है**
➡ **Vmax भी कम होता है**

उदाहरण:
Lithium → some enzymes

🔹 4. Irreversible Inhibition (स्थायी अवरोधन)

- inhibitor एंज़ाइम से covalent bond बनाता है
- एंज़ाइम स्थायी रूप से inactive हो जाता है

उदाहरण:

- **Organophosphates (nerve gases)** → acetylcholinesterase inhibit
- **Aspirin** → COX enzyme को permanently inhibit करता है
- **Iodoacetamide** → cysteine residue पर attack

🔹 5. Allosteric Inhibition (सर्वोच्च स्तर का नियंत्रण)

- inhibitor एंज़ाइम के *allosteric site* पर bind करता है
- active site का shape बदल जाता है
- काम रुक जाता है

ये inhibition metabolic regulation में महत्वपूर्ण है।

उदाहरण:
ATP → Phosphofructokinase (glycolysis) का allosteric inhibitor

---

6. Feedback Inhibition (जीवित कोशिकाओं का नियंत्रण तंत्र)

एक pathway का अंतिम product पहले enzyme को inhibit करता है।

उदाहरण:
Isoleucine → Threonine dehydratase को inhibit करता है।

➡ यही कोशिकाओं में metabolism control करने की natural method है।

भाग–1 : Proteins का Classification (वर्गीकरण)

प्रोटीनों को कई तरह से वर्गीकृत किया जाता है।
सभी प्रमुख वर्गीकरण नीचे गहराई से दिए जा रहे हैं।

---

1. Chemical Composition के आधार पर (रासायनिक संरचना के आधार पर)

A. Simple Proteins (सरल प्रोटीन)

- केवल **अमीनो एसिड** से बने होते हैं
- Hydrolysis पर सिर्फ़ amino acids ही मिलते हैं

उदाहरण:
Albumin, Globulin, Histone, Prolamin

B. Conjugated Proteins (संयुग्मित प्रोटीन)

- अमीनो एसिड + एक **non-protein group (prosthetic group)**
- यह prosthetic group प्रोटीन का विशेष कार्य तय करता है

प्रमुख प्रकार:

Conjugated Protein	Prosthetic Group	Example
Glycoprotein	Carbohydrate	Immunoglobulin
Lipoprotein	Lipid	HDL, LDL
Phosphoprotein	Phosphate	Casein
Metalloprotein	Metal ion	Cytochrome, Hemoglobin
Nucleoprotein	Nucleic acid	Ribosomes

C. Derived Proteins (उत्पन्न प्रोटीन)

- मूल प्रोटीन के Hydrolysis या denaturation से बनते हैं

उदाहरण: Metaproteins, Proteoses, Peptones

---

2. Shape (आकृति) के आधार पर

A. Fibrous Proteins (तंतु-आकार प्रोटीन)

- लंबे, धागे जैसे
- मजबूत और घुलनशीलता कम
- Structural role

उदाहरण:
Keratin, Collagen, Elastin, Myosin

B. Globular Proteins (गोलाकार प्रोटीन)

- गोल, compact
- पानी में अधिक घुलनशील
- Enzymes, hormones, antibodies इसी श्रेणी में

उदाहरण:
Hemoglobin, Enzymes, Albumin

---

3. Function (कार्य) के आधार पर

Class	Function	Examples
Enzymes	Reaction catalysis	Amylase, Lipase
Structural	शरीर संरचना	Collagen, Keratin
Transport	पदार्थों का परिवहन	Hemoglobin, Transferrin
Contractile	गति/संकोचन	Actin, Myosin
Hormonal	Signals	Insulin
Defensive	सुरक्षा	Antibodies
Storage	भंडारण	Ferritin

---

4. Solubility (घुलनशीलता) के आधार पर

Protein	Solubility
Albumin	Water soluble
Globulin	Salt solutions
Prolamin	Alcohol
Glutelin	Acids/base

---

5. Nutritional Value (पोषण) के आधार पर

Type	Meaning	Examples
Complete Proteins	सभी essential AAs	Egg, Milk
Incomplete Proteins	कुछ essential AAs की कमी	Wheat, Rice
Partially Complete	Growth नहीं, repair कर सकते	Gelatin

---

6. Genetic Origin के आधार पर

- **Coding Proteins** – genes द्वारा synthesized
- **Non-coding proteins** (post-translational products)

---

7. Structural Organization के आधार पर

Primary Structure

Amino acid sequence
→ mutation यहीं प्रभावित करता है

Secondary Structure

α-helix, β-sheet (H-bonds द्वारा)

Tertiary Structure

3D folding
→ enzyme activity, binding specificity

Quaternary Structure

एक से अधिक polypeptide chains
→ Hemoglobin ($\alpha_2\beta_2$)

🧪 भाग–2 : Proteins Separation Techniques (प्रोटीनों को अलग करने की तकनीक)

प्रोटीन अलग करना (separation) biochemical analysis और purification का मूल है।

नीचे सभी प्रमुख तकनीकों को गहराई से समझाया गया है।

🔹 1. Solubility-based Separation (घुलनशीलता पर आधारित)

A. Salt Precipitation (Salting Out)

- Ammonium sulfate का उपयोग
- Salt concentration बदलने पर प्रोटीन precipitate होते हैं
- हर प्रोटीन की "salting-out" concentration अलग होती है

➡ Purification का सबसे पहला चरण।

B. Isoelectric Precipitation

- pH = pI (isoelectric point) पर प्रोटीन की net charge शून्य
- इस pH पर solubility minimum → precipitation

उदाहरण:
Casein pH 4.6 पर precipitate हो जाता है।

🔹 2. Size-based Separation (आकार पर आधारित)

A. Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion)

- बड़े प्रोटीन **जल्दी** निकलते हैं
- छोटे प्रोटीन pores में जाकर **धीरे** निकलते हैं

➡ Protein size (molecular weight) का सबसे अच्छा तरीका।

B. Dialysis

- Semi-permeable membrane
- बड़े प्रोटीन membrane के अंदर रह जाते हैं
- छोटे अणु बाहर निकल जाते हैं

➡ Buffer exchange और desalting के लिए उपयोग।

---

3. Charge-based Separation (आवेश पर आधारित)

A. Ion-Exchange Chromatography

- प्रोटीन की charge (+ या –) के आधार पर separation
- दो प्रकार:
  - Cation Exchange → negatively charged resin
  - Anion Exchange → positively charged resin

➡ High resolution purification का तरीका।

B. Electrophoresis

1. SDS-PAGE

- SDS प्रोटीन को negative charge देता है
- separation only **size** के आधार पर
- molecular weight पता चलता है

2. Native PAGE

- protein की natural charge और shape के आधार पर separation

3. Isoelectric Focusing

- pH gradient बनता है

- प्रोटीन pH = pI पर स्थिर हो जाते हैं

➡ प्रोटीन की pI value ज्ञात करने का सर्वोत्तम तरीका।

---

4. Density-based Separation

A. Centrifugation

- Gravity के स्थान पर centrifugal force
- हल्के प्रोटीन ऊपर, भारी नीचे

B. Ultracentrifugation

- बहुत अधिक speed (1,00,000 rpm)
- subcellular fractions, large complexes separation

---

5. Polarity/Hydrophobicity-based Separation

A. Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)

- hydrophobic प्रोटीन matrix से bind करते हैं
- salt कम करने पर elute होते हैं

B. Reverse-Phase Chromatography

- बहुत hydrophobic proteins separation
- peptides purification में उपयोग

🔹 6. Affinity-based Separation (सबसे specific तकनीक)

Affinity chromatography = सबसे powerful और specific तरीका।

- ligand (substrate/antibody/metal) resin पर immobilize
- केवल वही प्रोटीन बंधेगा जिसे उससे affinity है
- बाकी wash हो जाते हैं
- elution by salt, pH change or competitive ligand

उदाहरण:

- His-tagged proteins → Ni^{2+}-NTA resin से purify
- Enzyme purification → substrate affinity column

🔹 7. Immunological Separation

A. Immunoprecipitation (IP)

- Specific antibody प्रोटीन को पकड़ती है
- बाकी सब wash होकर हट जाते हैं

B. Western Blotting

- separation + antibody-based detection
- specific proteins की पहचान

🔹 8. Chromatofocusing

- pH gradient के आधार पर separation
- pI differences के अनुरूप proteins अलग

🧪 भाग–1 : Protein Purification (प्रोटीन का शोधन / शुद्धिकरण)

प्रोटीन शोधन का उद्देश्य:

- किसी मिश्रण (सेल एक्सट्रैक्ट, टिश्यू हौमोजनेट, कल्चर) से
- **एक ही प्रकार का प्रोटीन**
- अधिकतम **शुद्धता (purity)** और **क्रियाशीलता (activity)** के साथ
- अलग (isolate) करना।

Protein purification में कई चरण होते हैं जिन्हें **stepwise strategy** कहते हैं।

🔹 (A) Protein Purification के मुख्य चरण

1. Preparation of Crude Extract (कच्चे एक्सट्रैक्ट की तैयारी)

सबसे पहला चरण है — **कोशिका/ऊतक को तोड़ना** ताकि प्रोटीन बाहर आ सके।

विधियाँ:

- Sonication
- Homogenization
- French press
- Detergent lysis
- Enzymatic digestion (lysozyme)

इसके बाद मिश्रण को centrifuge कर

- **cell debris नीचे**,
- **proteins ऊपर supernatant** में आ जाते हैं।

इस supernatant को **crude extract** कहते हैं।

🔹 2. Fractionation (छँटाई / विभाजन)

क्रूड mixture में सैकड़ों प्रोटीन होते हैं।
इन्हें न हटाकर सीधे pure करना असंभव है।
इसलिए पहली प्रक्रिया है — **fractionation**।

A. Salt Fractionation (Salting Out)

- सबसे आम → Ammonium sulfate precipitation
- अलग-अलग प्रोटीन अलग salt saturation पर precipitate होते हैं
- बड़े पैमाने पर purification में बहुत महत्वपूर्ण

➡ सस्ते और प्रारंभिक स्तर पर सबसे उपयोगी विधि।

B. Isoelectric Precipitation

- pH = pI होने पर प्रोटीन precipitate
- कुछ खास प्रोटीनों के लिए selective separation

उदाहरण: Casein (pH 4.6)

C. Thermal Fractionation

- Heat-stable proteins गर्मी में रहते हैं, अन्य denature हो जाते हैं
- DNA polymerases जैसी एंज़ाइम purification में उपयोग

🔹 3. Chromatographic Purification (सबसे सटीक विधियाँ)

A. Ion Exchange Chromatography

आवेश (charge) के आधार पर separation।

उदाहरण:

DEAE–cellulose (anion exchanger)

➡ High resolution purification।

B. Gel Filtration / Size-Exclusion Chromatography

आकार पर आधारित separation

- बड़े प्रोटीन पहले निकलते हैं
- छोटे बाद में

➡ Molecular weight estimation भी करता है।

C. Affinity Chromatography (सबसे Specific)

- स्तम्भ (column) में ligand लगा होता है
- वही प्रोटीन bind होगा जिसकी ligand से affinity है
- बाकी wash हो जाते हैं
- फिर pH/salt/competitive ligand से eluate किया जाता है

उदाहरण:

- His-tagged protein → Ni-NTA resin

➡ One-step purification में भी 90–99% purity।

D. Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)

- hydrophobic patches binding
- elution by salt gradient decrease

E. Reverse Phase Chromatography

- बहुत hydrophobic प्रोटीन और peptides purification के लिए
- High pressure (HPLC) इस्तेमाल होता है

🔹 4. Electrophoretic Methods

A. SDS-PAGE (Size-based)

- SDS प्रोटीन को linear और uniformly negative बनाता है
- केवल size आधार पर separation
- purity को assess करने में अत्यंत महत्वपूर्ण

B. Native PAGE

- native charge + shape दोनों पर separation
- activity बनाए रखने के लिए उपयोग

🔹 5. Ultracentrifugation

- बहुत भारी और complex proteins
- density gradient में अलग होते हैं
- ribosomes, membrane proteins, lipoproteins के लिए उपयोग

🔹 6. Dialysis and Desalting

- salts, solvents, और छोटे molecules हटाने के लिए
- protein purification steps के बीच buffer change

🧪 भाग–2 : Criteria of Homogeneity (शुद्धता के मानदंड)

जब हम कहते हैं कि किसी प्रोटीन को "pure" कर लिया,
तो वैज्ञानिक रूप से इसका मतलब:

- **नमूने में एक ही प्रकार का प्रोटीन मौजूद है**
- कोई contamination नहीं है
- activity stable और specific है।

होमोजेनिटी सिद्ध करने के कई मानदंड हैं:

---

1. Single Band on SDS-PAGE

यदि SDS-PAGE पर केवल **एक ही बैंड** दिखे →
यह सबसे मजबूत purity indicator है।

- बैंड sharp, single और साफ होना चाहिए
- molecular weight expected होना चाहिए

➡ अगर multiple bands → contamination अभी भी मौजूद।

---

2. Single Band on Native PAGE

Native PAGE charge + shape के अनुसार separation करता है।
यदि इसमें भी एक ही band → homogeneity प्रमाणित।

---

3. Single Peak in Chromatography

यदि purification के बाद analytical chromatography (HPLC, gel filtration) में:

- एक ही sharp peak → homogenously pure
- कई peaks → mixture

यह advanced purity check है।

---

4. Constant Specific Activity (सबसे वैज्ञानिक मानदंड)

Specific activity =
[
\text{Enzyme activity (units)} / \text{Protein amount (mg)}
]

Purification बढ़ने पर:

- specific activity बढ़ती है
- अंत में **constant value** पर stabilize हो जाती है

 जब specific activity अब और नहीं बढ़ती —
उसी को कहा जाता है **pure enzyme**।

➡ यह enzyme purification का *सबसे विश्वसनीय सूचक* है।

---

5. Uniform Amino Acid Composition

Amino acid analysis में एक ही pattern मिले → pure protein।

---

6. Ultracentrifugation (Single Sedimentation Coefficient)

यदि Svedberg unit (S value) एक ही मिले → homogeneous sample।

---

7. Immunochemical Homogeneity

- Single precipitin line in Ouchterlony
- Immunoblotting में एक ही band

➡ Antibody-based purity confirmation।

---

8. Mass Spectrometry (MS)

- Molecular mass precise और unique
- कोई contaminants नहीं

➡ आजकल अधिकांश labs में अंतिम confirmation MS से ही किया जाता है।

---

9. X-Ray Crystallography / NMR

यदि protein crystals साफ, single lattice बनाते हैं →
अत्यधिक शुद्ध प्रोटीन।

क्या है End Group Analysis?

प्रोटीन या पेप्टाइड में दो विशेष terminal (छोर) होते हैं—

1. **N-terminal (Amino-terminal)**
2. **C-terminal (Carboxyl-terminal)**

End group analysis वह तकनीक है जिससे प्रोटीन के इन दोनों छोर पर उपस्थित **पहले और अंतिम amino acid** की पहचान की जाती है।

➡ यह **Primary Structure Determination** का पहला चरण होता है।

End Group Analysis के उद्देश्य:

- प्रोटीन के **पहले amino acid (N-terminal residue)** की पहचान
- प्रोटीन के **अंतिम amino acid (C-terminal residue)** की पहचान

- प्रोटीन की **homogeneity जाँचना**
- **Sequence determination** में मदद करना
- प्रोटीन mixture की जिल्द पहचान

▯ भाग–1 : N-terminal End Group Analysis (N-छोर का विश्लेषण)

N-terminus = वह amino acid जो प्रोटीन के सबसे शुरुआत में होता है और जिसकी side पर **free –NH_2 group** होता है।

N-terminal पहचानने की कई classical और modern विधियाँ हैं।

▯ 1. Dansyl Chloride Method (Sanger's method का modified version)

यह सबसे पुरानी और प्रचलित N-terminal analysis तकनीक है।

Steps:

1. प्रोटीन को **dansyl chloride** (DNS-Cl) से treat किया जाता है।
2. DNS-Cl N-terminal amino group से react होकर **dansylated amino acid** बनाता है।
3. प्रोटीन को **acid hydrolysis** से तोड़ा जाता है।
4. सभी amino acids मुक्त हो जाते हैं, परन्तु सिर्फ़ N-terminal वाला **fluorescent** होता है।
5. इसे **chromatography** से पहचान लेते हैं।

Special Features:

- बहुत high sensitivity
- Fluorescent होने से detection आसान
- Peptides और proteins दोनों पर उपयोगी

▯ 2. Sanger's Reagent (DNP method)

पहली N-terminal sequencing तकनीक (Frederick Sanger द्वारा खोजी गई)।

Reagent:

2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB)

Mechanism:

- DNFB N-terminal amino group से react कर **DNP-amino acid** बनाता है।
- Acid hydrolysis से protein टूटता है → DNP-labelled amino acid बाहर निकलता है।
- Chromatography से amino acid की पहचान होती है।

🔹 3. Edman Degradation (Most powerful method)

यह N-terminal end group analysis का **सबसे modern और precise तरीका** है।
इसका उपयोग **sequencing** के लिए भी किया जाता है।

Reagent:

Phenylisothiocyanate (PITC)

Steps:

1. PITC N-terminal से react कर **Phenylthiocarbamyl derivative** बनाता है।
2. Mild acidic cleavage से N-terminal residue **एकल रूप में (PTH-aa)** बाहर आता है।
3. बाकी peptide chain sequence के लिए intact रहती है।

→ इसी प्रक्रिया को बार-बार दोहराकर पूरा sequence पढ़ा जा सकता है।

🔹 4. Fluorescamine Method

- Non-fluorescent reagent
- N-terminal amine से react कर fluorescent derivative बनाता है।
- बहुत sensitive → pico-mole स्तर तक detection संभव।

---

5. Derivatization with OPA (O-phthalaldehyde)

- OPA primary amines से fluorescent complex बनाता है
- HPLC analysis में उपयोग

भाग–2 : C-terminal End Group Analysis (C-छोर विश्लेषण)

C-terminus = वह amino acid जो प्रोटीन के अंत में होता है और जिसकी side पर **free –COOH group** होता है।

C-terminal analysis कुछ कठिन है क्योंकि carboxyl groups कई जगह मौजूद होते हैं।

---

1. Hydrazinolysis Method

यह C-terminal residue पहचानने की सबसे classical और effective तकनीक है।

Steps:

1. Protein को **anhydrous hydrazine** से treat किया जाता है।
2. सभी peptide bonds टूट जाते हैं, परंतु—
   C-terminal amino acid hydrazide नहीं बनाता
3. बाकी सभी amino acids hydrazides बन जाते हैं।
4. C-terminal residue intact बचता है → chromatography से पहचान।

➡ इस विधि से C-terminal amino acid की स्पष्ट पहचान मिलती है।

---

2. Enzymatic C-terminal Analysis (Carboxypeptidase विधि)

Carboxypeptidases वे एंज़ाइम हैं जो polypeptide chain को **C-terminal से amino acids को एक-एक करके काटते हैं**।

दो मुख्य प्रकार:

- **Carboxypeptidase A** → aromatic & hydrophobic aa हटाता है
- **Carboxypeptidase B** → basic aa (Lys, Arg) हटाता है

Procedure:

1. Protein को carboxypeptidase से incubate करते हैं
2. Time intervals पर निकलते हुए amino acids analyze करते हैं
3. सबसे पहले जो amino acid release होता है वही **C-terminal residue** है

➡ Biological और gentle method।

---

3. Ammonolysis / Esterification Methods

- C-terminal carboxyl group को esterify कर पहचान
- Peptide rest unreactive रहता है

भाग–3 : End Group Analysis का उपयोग (Applications)

✔ 1. Protein Structure Determination

- N- और C-terminal residue जानने से sequence की दिशा तय होती है
- Primary structure का पहला चरण

✔ 2. Protein Homogeneity जाँच

- यदि sample में multiple N-terminals → sample impure
- One terminal = homogeneous

✔ 3. Sequence Overlap Strategy

टुकड़ों में sequence पढ़ने (fragmentation) के बाद overlapping sequences N-terminal के आधार पर जोड़ते हैं।

✔ 4. Genetic mutations की पहचान

- Truncated proteins

- N-terminal methionine removal
- C-terminal stop-codon mutations

✔ 5. Protein Degradation Pathway का अध्ययन

भाग–4 : End Group Analysis क्यों महत्वपूर्ण है?

- प्रोटीन की **शुरुआत और अंत** जानने से
  उसकी पूरी संरचना समझने का रास्ता बनता है।
- recombinant protein synthesis में
  processing, modification, cleavage का पता चलता है।
- Enzyme mapping में catalytic domains की दिशा समझी जाती है।
- Modern proteomics analysis की मूलभूत तकनीक।

उपयोग

- Protein sequencing
- Homogeneity test
- Structural analysis
- Mutation studies

Protein Structure Hierarchy क्या है?

प्रोटीन की संरचना **चार स्तरों** में व्यवस्थित होती है:

1. **Primary Structure (प्राथमिक संरचना)**
2. **Secondary Structure (द्वितीयक संरचना)**
3. **Tertiary Structure (तृतीयक संरचना)**
4. **Quaternary Structure (चतुर्थक संरचना)**

इन सभी स्तरों का क्रमबद्ध होना ही **Hierarchy of Protein Structure** कहलाता है।

प्रोटीन की आकृति, स्थिरता, क्रियाशीलता (function), binding क्षमता, और enzymatic activity इन्हीं संरचनाओं पर निर्भर करती है।

---

1. Primary Structure (प्राथमिक संरचना)

यह प्रोटीन संरचना का सबसे आधारभूत स्तर है।

परिभाषा:

Primary structure =
Amino acids की क्रमिक व्यवस्था (sequence)
जो peptide bonds द्वारा जुड़ी होती है।

मुख्य विशेषताएँ:

- एक सीधी polypeptide chain
- covalent peptide bonds
- genetic code इसी sequence को निर्धारित करते हैं
- sequence बदलने से प्रोटीन का पूरा function बदल सकता है

उदाहरण:

Hemoglobin में Glu → Val mutation
→ Sickle Cell Anaemia

Primary structure बताने वाली तकनीक:

- Edman degradation
- Mass spectrometry
- DNA sequencing

➡ यह पूरा protein architecture का "नींव" है।

---

2. Secondary Structure (द्वितीयक संरचना)

Primary sequence जब fold होने लगता है तो उसकी local folding patterns बनते हैं, यही secondary structure है।

यह folding **Hydrogen bonds** द्वारा स्थिर रहती है।

Secondary structure के दो मुख्य प्रकार होते हैं:

A. α-Helix (अल्फ़ा हेलिक्स)

- दाएँ हाथ की कुंडली (right-handed coil)
- हर चौथे amino acid के बीच hydrogen bond होता है
- प्रति turn → 3.6 amino acids
- बहुत स्थिर संरचना

किन amino acids को पसंद है:

Ala, Leu, Met

कौन पसंद नहीं करता:

Proline (helix breaker), Glycine (बहुत flexible)

उदाहरण:

Keratin (बाल, नाखून), Myoglobin का बड़ा भाग

B. β-Pleated Sheets (बीटा शीट)

- फोल्डेड, चपटी, जालीदार संरचना
- Hydrogen bonds polypeptide chains के बीच
- parallel या antiparallel दोनों हो सकते हैं

उदाहरण:

Fibroin (रेशम में)

□ C. Random Coil / Turns / Loops

- rigid turns जैसे β-turn
- protein को 3D shape देने के लिए आवश्यक
- active site formation में महत्वपूर्ण

➡ Secondary structure प्रोटीन की local geometry बनाती है।

□ 3. Tertiary Structure (तृतीयक संरचना)

यह किसी एक polypeptide chain की **पूरी 3D आकृति (three-dimensional folding)** है।

क्या काम करता है?

- Active site बनती है
- Enzyme specificity यहीं से आती है
- Binding site, pocket, domain, motifs बनते हैं
- प्रोटीन soluble या membrane-bound बनता है

Stabilizing Forces (स्थिरता प्रदान करने वाली शक्तियाँ):

1. **Hydrogen bonds**
2. **Hydrophobic interactions** (सबसे महत्वपूर्ण)
3. **Disulfide bonds** (Cys–Cys)
4. **Ionic bonds** (salt bridges)
5. **Van der Waals forces**

Domains का निर्माण:

Tertiary structure में बड़े functional units बनते हैं जिन्हें **domains** कहते हैं।

उदाहरण:

- Myoglobin की पूरी आकृति
- Enzyme का catalytic domain
- Antibody का Fab region

➡ tertiary structure ही protein का **function निर्धारित** करती है।

---

4. Quaternary Structure (चतुर्थक संरचना)

जब दो या अधिक polypeptide chains (subunits) मिलकर एक बड़ा functional protein बनाते हैं, तो उसे **quaternary structure** कहते हैं।

उदाहरण:

- Hemoglobin = 4 subunits ($\alpha_2\beta_2$)
- Lactate dehydrogenase = tetramer
- DNA polymerase = multi-subunit complex

स्टेबिलाइजेशन:

- Hydrophobic interactions
- Ionic bonds
- Hydrogen bonds
- कभी-कभी disulfide bonds (inter-chain)

क्यों महत्वपूर्ण?

- Cooperativity → जैसे Hemoglobin में O_2 binding
- Allosteric regulation
- Enzyme complexes बनाना

➡ Multi-protein machines (ribosome, proteasome) इसी संरचना की वजह से काम करते हैं।

🔹 Protein Structure Hierarchy को एक लाइन में समझें:

1. **Primary:** amino acid sequence
2. **Secondary:** helix और sheets
3. **Tertiary:** पूरा 3D fold (एक chain)
4. **Quaternary:** कई chains मिलकर complex बनाते हैं

🔹 Hierarchy क्यों ज़रूरी है?

✔️ Structure ही function तय करता है

- Enzyme active site
- Antibody antigen-binding
- Hemoglobin oxygen transport

✔️ Mutations की effect समझना

Primary structure में हल्का सा परिवर्तन
→ tertiary + quaternary में बड़ा बदलाव
→ function बदल जाता है

✔️ Protein engineering

- domain swapping
- stability बढ़ाना
- catalytic efficiency बढ़ाना

✔️ Drug design

3D structure से inhibitor और ligand design किया जाता है।

🔹 सरल उदाहरण से समझें:

Trypsin enzyme की hierarchy

1. **Primary:** specific sequence of ~245 amino acids
2. **Secondary:** कई α-helices + β-sheets
3. **Tertiary:** catalytic triad (His, Asp, Ser) active site बनाती है
4. **Quaternary:** monomer, लेकिन activate होने के लिए zymogen cleavage चाहिए

🧠 Memory Trick (याद रखने का आसान तरीका)

1D → 2D → 3D → Multi-D

- Primary = 1-dimensional sequence
- Secondary = 2-dimensional local shape
- Tertiary = 3-dimensional fold
- Quaternary = multiple 3D units together

📝 समग्र सार (Summary)

Protein structure hierarchy =
एक-एक कदम पर बढ़ते हुए प्रोटीन की पूरी बनावट और कार्य को समझना।

Level	Meaning	Forces	Example
Primary	AA sequence	Peptide bonds	Insulin sequence
Secondary	Helix, sheet	H-bonds	α-helix in keratin
Tertiary	3D fold	Hydrophobic forces, disulfide	Myoglobin
Quaternary	Subunit assembly	Noncovalent + disulfide	Hemoglobin

---

1. रामचन्द्रन मानचित्र क्या है?

रामचन्द्रन मानचित्र एक **ग्राफिकल प्लॉट** होता है, जो यह दर्शाता है कि किसी प्रोटीन की **पॉलीपेप्टाइड शृंखला (polypeptide chain)** में अमीनो अम्लों के बीच कौन-कौन से **कोण (angles)** संभव (allowed) हैं और कौन-से असंभव (disallowed)।

यह मानचित्र मुख्य रूप से दो कोणों पर आधारित होता है:

- **φ (फाई / Phi) कोण**
- **ψ (साई / Psi) कोण**

---

2. प्रोटीन बैकबोन और कोणों की भूमिका

प्रोटीन की रीढ़ (backbone) इस क्रम में होती है:

–N–Cα–C–N–Cα–C–

यहाँ तीन मुख्य बंध (bonds) होते हैं:

1. **N–Cα** → φ (Phi) कोण
2. **Cα–C** → ψ (Psi) कोण
3. **C–N (पेप्टाइड बंध)** → ω (Omega) कोण

ω (ओमेगा) कोण

- यह लगभग हमेशा **180° (trans)** होता है
- पेप्टाइड बंध में **डबल बॉन्ड चरित्र** होने के कारण यह घूम नहीं सकता

 इसलिए, प्रोटीन की संरचना में लचीलापन मुख्यतः **φ और ψ** कोणों के कारण आता है।

---

3. रामचन्द्रन मानचित्र का अक्ष (Axes)

- **X-अक्ष (Horizontal axis)** → ψ (Psi) कोण
- **Y-अक्ष (Vertical axis)** → φ (Phi) कोण
- कोणों की सीमा: **–180° से +180°**

मानचित्र को कई क्षेत्रों (regions) में विभाजित किया जाता है।

---

4. अनुमत (Allowed) और निषिद्ध (Disallowed) क्षेत्र

कुछ φ और ψ कोणों के संयोजन पर:

- परमाणु आपस में टकरा जाते हैं (**Steric hindrance**)
- ऐसे कोण **असंभव** होते हैं

इसलिए मानचित्र में:

- **सफेद/हल्के क्षेत्र** → Allowed regions
- **गहरे क्षेत्र** → Highly allowed
- **खाली/निषिद्ध क्षेत्र** → Disallowed regions

---

5. प्रमुख द्वितीयक संरचनाएँ (Secondary Structures)

(A) α-हेलिक्स (Alpha Helix)

- $\varphi \approx -60°$
- $\psi \approx -45°$
- मानचित्र के **बाएँ निचले भाग** में स्थित
- सबसे सामान्य संरचना

(B) β-शीट (Beta Sheet)

- $\varphi \approx -120°$
- $\psi \approx +120°$
- मानचित्र के **ऊपरी बाएँ भाग** में
- समानांतर और विपरीतांतर (parallel & antiparallel) दोनों हो सकती है

(C) Left-handed α-helix

- $\varphi \approx +60°$
- $\psi \approx +45°$
- दुर्लभ संरचना
- अधिकतर **glycine** में पाई जाती है

---

6. Glycine और Proline का विशेष व्यवहार

Glycine

- साइड चेन = **H (हाइड्रोजन)**
- बहुत छोटा होने के कारण:
  - अधिक लचीलापन
  - रामचन्द्रन मानचित्र में **अधिक क्षेत्र अनुमत**

Proline

- साइड चेन N से जुड़ी होती है (ring structure)
- बहुत कठोर (rigid)
- φ कोण सीमित
- α-helix को तोड़ने वाला (helix breaker)

---

7. रामचन्द्रन मानचित्र का उपयोग

1. **प्रोटीन संरचना की शुद्धता जाँचने में**
   - यदि कई अमीनो अम्ल disallowed क्षेत्र में हों → संरचना गलत हो सकती है
2. **X-ray crystallography और NMR में validation tool**
3. **Protein folding** को समझने में
4. **Drug design और bioinformatics** में

---

8. महत्व (Importance)

- प्रोटीन की **स्थिरता (stability)** को समझने में सहायक
- द्वितीयक संरचना की भविष्यवाणी
- संरचनात्मक त्रुटियों की पहचान

Expressed Proteins को Characterize करने के Tools

(उत्पन्न / अभिव्यक्त प्रोटीनों के विश्लेषण की तकनीकें)

जब किसी gene को **express** करके प्रोटीन बनाया जाता है (जैसे E. coli, yeast, insect या mammalian cells में), तब यह जानना आवश्यक होता है कि:

- प्रोटीन **सही बना है या नहीं**
- उसकी **शुद्धता (purity)** कितनी है
- उसका **आकार (molecular weight)** सही है या नहीं
- वह **कार्यात्मक (functional)** है या नहीं
- उसकी **संरचना (structure)** कैसी है

इन्हीं प्रश्नों का उत्तर देने के लिए **protein characterization tools** का उपयोग किया जाता है।

---

1. SDS–PAGE

(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

सिद्धांत (Principle)

- SDS एक **detergent** है जो:
  - प्रोटीन को unfold (denature) कर देता है
  - सभी प्रोटीनों को **negative charge** देता है
- प्रोटीन gel में केवल **आकार (size)** के आधार पर अलग होते हैं

क्या जानकारी मिलती है?

- Molecular weight (kDa)
- Purity (single band या multiple bands)

उपयोग

- Expression confirmation
- Purification के हर step की जांच

---

2. Western Blotting

(Immunoblotting)

सिद्धांत

- SDS-PAGE के बाद प्रोटीन membrane पर transfer
- Specific **antibody** से पहचान

क्या जानकारी मिलती है?

- Target protein की **specific पहचान**
- सही protein express हुआ है या नहीं

उपयोग

- His-tag, GST-tag, FLAG-tag proteins की पुष्टि
- Low abundance proteins की पहचान

---

3. UV–Visible Spectroscopy

सिद्धांत

- प्रोटीन 280 nm पर absorb करता है
- कारण: Tryptophan, Tyrosine, Phenylalanine

क्या जानकारी मिलती है?

- Protein concentration
- Purification yield

फायदे

- तेज़ और सरल
- Non-destructive

---

4. Bradford / Lowry / BCA Assay

(Protein Quantification Methods)

Method	Principle
Bradford	Coomassie dye binding

Method	Principle
Lowry	Cu^{2+} reduction + Folin reagent
BCA	Biuret reaction

उपयोग

- Total protein concentration
- Expression level comparison

---

5. Mass Spectrometry (MS)

प्रकार

- MALDI-TOF
- ESI-MS
- LC-MS/MS

क्या जानकारी मिलती है?

- Exact molecular weight
- Amino acid sequence
- Post-translational modifications (PTMs)

उपयोग

- Protein identity confirmation
- Phosphorylation, glycosylation analysis

---

6. Circular Dichroism (CD) Spectroscopy

सिद्धांत

- Left और right circularly polarized light का अलग absorption

क्या जानकारी मिलती है?

- Secondary structure:
  - α-helix
  - β-sheet
  - Random coil

उपयोग

- Proper folding check
- Mutant vs wild-type comparison

---

7. Fluorescence Spectroscopy

सिद्धांत

- Tryptophan fluorescence environment पर निर्भर

क्या जानकारी मिलती है?

- Protein folding/unfolding
- Ligand binding

उपयोग

- Stability studies
- Protein–protein interaction

---

8. Enzyme Assays

(यदि expressed protein एक enzyme है)

क्या मापा जाता है?

- Enzyme activity
- Km, Vmax
- Substrate specificity

महत्व

- Functional confirmation
  □ प्रोटीन बना है **और काम भी कर रहा है**

---

9. Dynamic Light Scattering (DLS)

क्या जानकारी मिलती है?

- Particle size
- Aggregation status

उपयोग

- Protein aggregation जांच
- Crystallization से पहले quality check

---

10. X-ray Crystallography

क्या जानकारी मिलती है?

- 3D atomic structure
- Active site details

सीमाएँ

- Protein crystallization कठिन
- Time-consuming

---

11. NMR Spectroscopy

क्या जानकारी मिलती है?

- 3D structure (solution state)
- Protein dynamics

उपयोग

- Small proteins (<30 kDa)
- Flexible regions की पहचान

---

12. Cryo-Electron Microscopy (Cryo-EM)

क्या जानकारी मिलती है?

- Large protein complexes की संरचना

विशेषता

- Crystallization की जरूरत नहीं
- High-resolution structures

---

13. ELISA (यदि applicable)

उपयोग

- Quantification
- Antibody-based detection

---

14. Bioinformatics Tools (In-silico characterization)

- BLAST → identity
- ProtParam → MW, pI
- SWISS-MODEL → structure prediction
- Ramachandran plot → structure validation

संक्षेप तालिका (Exam-oriented)

Tool	Purpose
SDS-PAGE	Size & purity

Tool	Purpose
Western blot	Specific detection
UV / Bradford	Quantification
MS	Identity & PTMs
CD	Secondary structure
Enzyme assay	Function
DLS	Aggregation
X-ray / NMR	3D structure

Unit 2

□ 1. न्यूक्लिक एसिड क्या होते हैं?

न्यूक्लिक एसिड जीवित प्राणियों की कोशिकाओं में पाए जाने वाले बड़े जैव-अणु (biomolecules) हैं जो **अनुवांशिक सूचना (genetic information)** को संग्रहीत (store), संचारित (transmit) और व्यक्त (express) करते हैं।
न्यूक्लिक एसिड दो प्रकार के होते हैं:

1. **डीएनए (DNA)** – Deoxyribonucleic Acid
2. **आरएनए (RNA)** – Ribonucleic Acid

□ 2. डीएनए की मूल इकाई (Basic Unit: Nucleotide)

डीएनए कई **न्यूक्लियोटाइड्स (Nucleotides)** से मिलकर बना होता है।
हर **न्यूक्लियोटाइड** के तीन मुख्य भाग होते हैं:

1. **फॉस्फेट समूह (Phosphate group)** – (PO_4^{3-})
2. **डीऑक्सीराइबोज़ शुगर (Deoxyribose sugar)** – 5-कार्बन वाली शर्करा
3. **नाइट्रोजन युक्त क्षारक (Nitrogenous base)**

□ नाइट्रोजनयुक्त क्षारक (Nitrogenous Bases)

दो प्रकार के होते हैं:

प्रकार	बेस के नाम	संरचना
Purine (2 रिंग)	Adenine (A), Guanine (G)	बड़ी दोहरी रिंग
Pyrimidine (1 रिंग)	Thymine (T), Cytosine (C)	छोटी एकल रिंग

□ 3. डीएनए की रचना (Structure of DNA)

□ (a) Double Helix Model (Watson and Crick, 1953)

डीएनए की रचना को **वॉटसन और क्रिक** ने 1953 में समझाया था।
उन्होंने बताया कि डीएनए एक **दोहरी कुंडलित (Double Helix)** संरचना है —
जैसे कि **मुड़ी हुई सीढ़ी (spiral staircase)**।

□ (b) डीएनए की दो स्ट्रैंड्स (Two Strands)

1. डीएनए के दो **पॉलीन्यूक्लियोटाइड स्ट्रैंड्स (polynucleotide strands)** एक-दूसरे के चारों ओर कुंडलित (coiled) होते हैं।
2. दोनों स्ट्रैंड्स **एंटी-पैरेलल (antiparallel)** होते हैं —
   एक का सिरा **5' → 3'** दिशा में, दूसरा **3' → 5'** दिशा में।
3. दोनों स्ट्रैंड्स को एक-दूसरे से जोड़ने का कार्य **नाइट्रोजन बेस** करते हैं।

□ (c) बेस पेयरिंग (Base Pairing Rule)

चार्गाफ़ का नियम (Chargaff's Rule):
डीएनए में हमेशा:

- Adenine (A) = Thymine (T)
- Guanine (G) = Cytosine (C)

 इसका कारण यह है कि
A और T के बीच **2 हाइड्रोजन बॉन्ड**,
G और C के बीच **3 हाइड्रोजन बॉन्ड** बनते हैं।

बेस पेयर हाइड्रोजन बॉन्ड बंधन की मज़बूती

A = T	2	कम मज़बूत
G ≡ C	3	ज़्यादा मज़बूत

(d) Sugar–Phosphate Backbone

प्रत्येक स्ट्रैंड में:

- शुगर और फॉस्फेट मिलकर "**बैकबोन**" बनाते हैं।
- नाइट्रोजन बेस अंदर की ओर निकले होते हैं।
- हाइड्रोजन बॉन्ड बेसों के बीच जुड़ाव कराते हैं, जिससे डबल हेलिक्स बनती है।

---

4. डीएनए का विस्तृत स्ट्रक्चर (Detailed Structural Features)

विशेषता	विवरण
आकार (Shape)	दोहरी कुंडल (Double Helix)
लंबाई प्रति चक्कर (Pitch)	34 Å (एंगस्ट्रॉम)
एक चक्कर में बेस पेयर की संख्या	10
दो बेस पेयर के बीच की दूरी	3.4 Å
हेलिक्स की दिशा	दाएँ हाथ की कुंडल (Right-handed helix)
स्ट्रैंड्स की दिशा	एंटी-पैरेलल
हाइड्रोजन बंधन	बेस पेयर के बीच
कोवेलेंट बंधन	शुगर-फॉस्फेट बैकबोन में

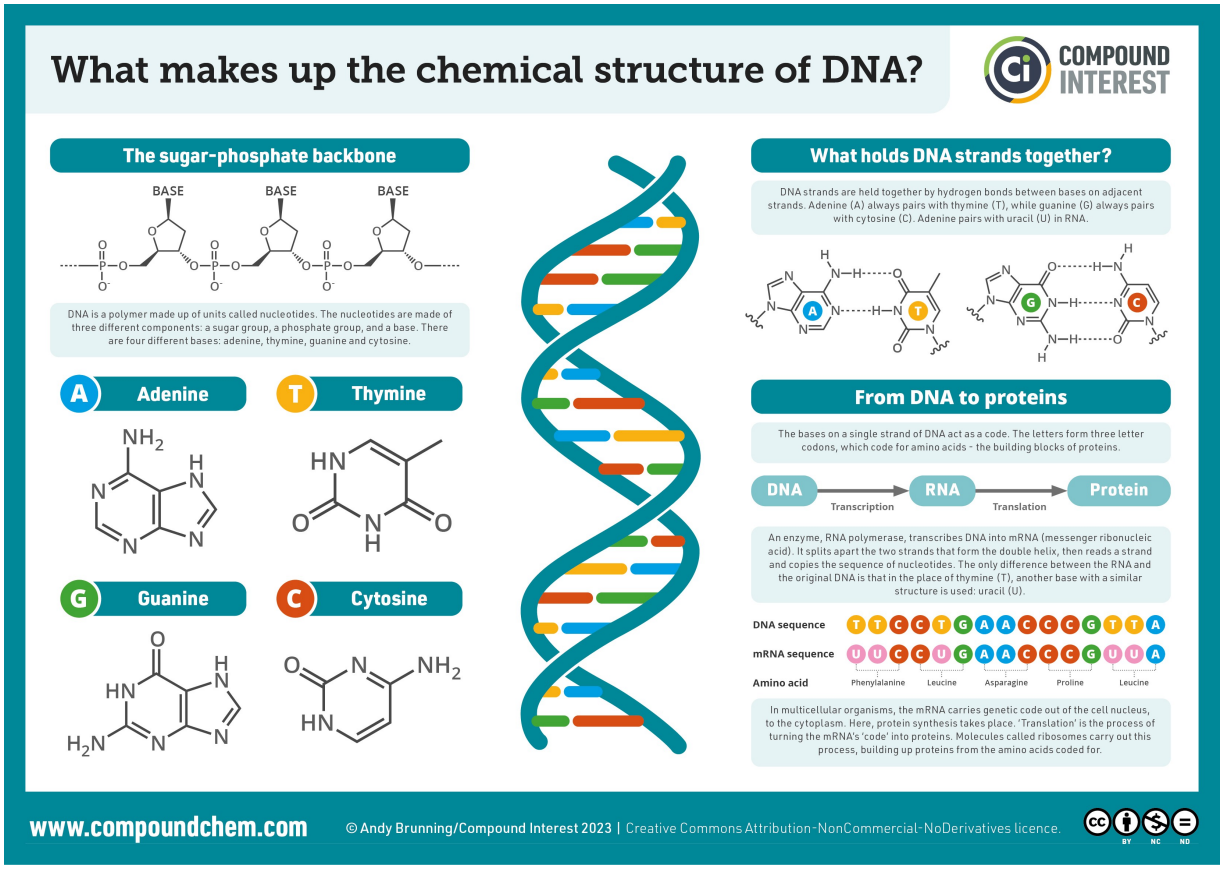
□□ 5. डीएनए के प्रकार

डीएनए की संरचना में कुछ विविधताएँ भी होती हैं:

प्रकार	विवरण
A-DNA	शुष्क परिस्थितियों में, मोटी व सख्त कुंडल
B-DNA	सबसे सामान्य, कोशिकाओं में पाया जाने वाला रूप
Z-DNA	बायीं दिशा में कुंडलित, दुर्लभ रूप

□ 6. डीएनए का जैविक महत्व (Biological Significance)

1. **अनुवांशिक सामग्री (Genetic Material):**
   डीएनए में जीवन की सभी आनुवांशिक सूचनाएँ होती हैं।
2. **Protein Synthesis:**
   डीएनए → RNA → Protein (Central Dogma of Molecular Biology)
3. **Replication:**
   डीएनए अपनी समान कॉपी बना सकता है (Self-replication)।
4. **Inheritance:**
   पीढ़ी दर पीढ़ी गुणसूत्रों के माध्यम से आनुवंशिक जानकारी का संचार।



डीएनए प्रतिकृति (DNA Replication) एक ऐसी जैविक प्रक्रिया है जिसके द्वारा कोशिका अपने डीएनए की *सटीक प्रति* (exact copy) बनाती है। यह प्रक्रिया सभी जीवित प्राणियों में होती है ताकि जब कोशिका विभाजित हो (cell division), तो प्रत्येक नई कोशिका को पूरा आनुवंशिक पदार्थ (genetic material) मिल सके।

आइए इसे सरल भाषा में चरणबद्ध समझें

🧬 डीएनए प्रतिकृति के मुख्य चरण (Main Steps of DNA Replication)

1. Initiation (आरंभिक चरण)

- प्रतिकृति की शुरुआत **origin of replication** नामक विशेष स्थल से होती है।
- **DNA हेलिकेज़ (Helicase)** नामक एंजाइम डबल हेलिक्स को खोलता है और दोनों स्ट्रैंड्स (धागे) को अलग करता है।
- इसके परिणामस्वरूप एक **replication fork** बनता है।
- **Single-strand binding proteins (SSBPs)** खुले हुए डीएनए स्ट्रैंड्स को स्थिर रखते हैं।

---

2. Elongation (वृद्धि चरण)

- **DNA polymerase** एंजाइम नए न्यूक्लियोटाइड्स जोड़ता है जो *complementary base pairing* के अनुसार जुड़ते हैं (A-T और G-C)।
- यह एंजाइम केवल 5′ → 3′ दिशा में कार्य करता है।
- इस कारण से एक स्ट्रैंड (leading strand) पर निरंतर संश्लेषण होता है, जबकि दूसरा (lagging strand) छोटे-छोटे **Okazaki fragments** में बनता है।
- **RNA primase** नामक एंजाइम छोटा RNA टुकड़ा (primer) जोड़ता है ताकि DNA polymerase शुरुआत कर सके।

---

3. Termination (समापन चरण)

- जब प्रतिकृति पूरी हो जाती है, तो **DNA ligase** एंजाइम ओकाज़ाकी टुकड़ों को जोड़कर एक सतत स्ट्रैंड बनाता है।
- परिणामस्वरूप दो समान डीएनए अणु बनते हैं — प्रत्येक में एक पुराना (parental) और एक नया (daughter) स्ट्रैंड।
- इसीलिए इसे **semi-conservative replication** कहा जाता है।

□ महत्व

- यह प्रक्रिया कोशिका विभाजन के लिए आवश्यक है।
- आनुवंशिक जानकारी की सटीक प्रतिलिपि बनाए रखने से वंशानुक्रम (heredity) स्थिर रहता है।

डीएनए रिपेयर

डीएनए रिपेयर एक कोशिका तंत्र है जो डीएनए को क्षति से बचाता है और आनुवंशिक जानकारी की अखंडता बनाए रखता है। यह प्रक्रिया बाहरी कारकों या चयापचय प्रक्रियाओं के कारण होने वाले आणविक घावों की पहचान और मरम्मत करती है। अगर मरम्मत विफल हो जाती है, तो इससे उत्परिवर्तन (mutations), जीनोमिक अस्थिरता, और कैंसर जैसे रोग हो सकते हैं।

डीएनए रिपेयर कैसे काम करता है

- **क्षति की पहचान:** कोशिकाएं डीएनए में हुए नुकसान की पहचान करती हैं, जो विकिरण, रसायनों या चयापचय क्रियाओं के कारण हो सकता है।
- **मरम्मत:** क्षति के प्रकार के आधार पर कई तंत्रों का उपयोग किया जाता है:
  - **एक्सिशन रिपेयर (Excision Repair):** क्षतिग्रस्त बेस को हटाया जाता है और उस खाली जगह को सही आधारों से भर दिया जाता है।
  - **डबल-स्ट्रैंड ब्रेक रिपेयर (Double-Strand Break Repair):** यह दो तरीकों से होता है: समजातीय पुनर्संयोजन (homologous recombination) और गैर-समजातीय अंत संयोजन (non-homologous end joining)।
- **अंतिम चरण:** मरम्मत का अंतिम चरण डीएनए की संरचना को सील करना होता है।

महत्व

- यह तंत्र कोशिका के सामान्य कार्य के लिए महत्वपूर्ण है और जीनोम की अखंडता सुनिश्चित करता है।
- विफल मरम्मत से उत्परिवर्तन हो सकते हैं, जो अगली पीढ़ियों को प्रभावित कर सकते हैं।
- अगर मरम्मत विफल हो जाती है और कोशिका खुद को ठीक नहीं कर पाती है, तो कोशिका आत्महत्या कर सकती है (एपोप्टोसिस) या अनियंत्रित रूप से विभाजित होना शुरू कर सकती है, जिससे कैंसर हो सकता है।

डीएनए Recombination

डीएनए रिकॉम्बिनेशन (Recombination) वह प्रक्रिया है जिसमें डीएनए के अलग-अलग टुकड़ों को मिलाया जाता है, जिससे आनुवंशिक विविधता आती है। इसके दो मुख्य प्रकार हैं: पहला, **सजातीय पुनर्संयोजन**, जो अर्धसूत्रीविभाजन (meiosis) के दौरान होता है और जीन के पुनर्वितरण का कारण बनता है। दूसरा, **रिकॉम्बिनेंट डीएनए तकनीक**, जो वैज्ञानिक प्रक्रियाओं का उपयोग करके दो अलग-अलग स्रोतों से डीएनए को जोड़ती है।

सजातीय पुनर्संयोजन (Homologous Recombination)

- यह प्रक्रिया तब होती है जब कोशिका विभाजन के दौरान एक ही गुणसूत्र के दो समान हिस्सों के बीच डीएनए के खंडों का आदान-प्रदान होता है।
- यह लैंगिक प्रजनन में एक महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है, जिससे अगली पीढ़ी में नए जीन के संयोजन (combination) के साथ संतानें पैदा होती हैं।

रिकॉम्बिनेंट डीएनए तकनीक

- इस प्रक्रिया में, वैज्ञानिक प्रयोगशाला में अलग-अलग स्रोतों से डीएनए को काटते और जोड़ते हैं।
- यह तकनीक जीन क्लोनिंग और जीन के कार्य को समझने के लिए बहुत उपयोगी है।
- उदाहरण के लिए, इंसुलिन जैसे महत्वपूर्ण प्रोटीन बनाने के लिए किसी जीव के डीएनए को बैक्टीरिया में डाला जा सकता है।

डीएनए रेप्लिकेशन (Replication) से अंतर:

- यह ध्यान रखना महत्वपूर्ण है कि **डीएनए रेप्लिकेशन (प्रतिकृति)** एक अलग प्रक्रिया है। रेप्लिकेशन में, कोशिका अपने पूरे डीएनए की एक सटीक प्रतिलिपि बनाती है ताकि कोशिका विभाजन के बाद बनने वाली नई कोशिकाओं को एक जैसा आनुवंशिक पदार्थ मिले।
- रेकॉम्बिनेशन में आनुवंशिक सामग्री का पुनर्वितरण होता है, जबकि रेप्लिकेशन में डीएनए की हूबहू नकल बनती है।

A-DNA, B-DNA और Z-DNA

— डीएनए (DNA) के तीन मुख्य संरचनात्मक रूप होते हैं: **A-DNA, B-DNA और Z-DNA**।
तीनों का मूल रासायनिक संघटन समान है (डबल हेलिक्स संरचना), लेकिन उनका आकार, दिशा और हेलिक्स की पिच में अंतर होता है।

□ डीएनए की विभिन्न संरचनाएँ (Forms of DNA)

विशेषता	A-DNA	B-DNA (सामान्य रूप)	Z-DNA
पहचानकर्ता	शुष्क (dry) अवस्था में बनता है	सामान्य जैविक डीएनए	विशेष परिस्थितियों में (G-C rich)
हेलिक्स की दिशा	दायाँ घूमने वाला (Right-handed)	दायाँ घूमने वाला (Right-handed)	बायाँ घूमने वाला (Left-handed)
प्रति टर्न बेस जोड़े (base pairs/turn)	लगभग 11	लगभग 10.5	लगभग 12
हेलिक्स की पिच (एक पूरी कुंडली की लंबाई)	28 Å (आंग्स्ट्रॉम)	34 Å	45 Å
व्यास (Diameter)	23 Å	20 Å	18 Å
बेस पेयर्स का झुकाव	लगभग 20°	लगभग 6°	लगभग 9°

विशेषता	A-DNA	B-DNA (सामान्य रूप)	Z-DNA
(Tilt)			
स्थिति	डीहाइड्रेटेड (पानी रहित) डीएनए या प्रयोगशाला परिस्थितियों में	कोशिका के अंदर पाया जाने वाला प्राकृतिक डीएनए	विशेष तनाव या उच्च नमक वाली परिस्थितियों में
महत्व	प्रयोगशाला में अध्ययन के लिए	कोशिकाओं में आनुवंशिक पदार्थ का सामान्य रूप	जीन नियमन (gene regulation) से संबंधित हो सकता है

□ संक्षिप्त वर्णन

1. A-DNA

- यह डीएनए का **सूखा रूप** है।
- इसमें हेलिक्स **थोड़ी चौड़ी और छोटी** होती है।
- यह आमतौर पर **कम आर्द्रता** (low humidity) पर बनता है।
- दोनों स्ट्रैंड्स दाएँ घूमते हैं (right-handed helix)।
-

---

2. B-DNA

- यह **सबसे सामान्य और प्राकृतिक** रूप है, जो हमारी कोशिकाओं में पाया जाता है।
- वॉटसन और क्रिक द्वारा खोजी गई संरचना यही है।
- यह **right-handed double helix** है।
- प्रत्येक हेलिक्स टर्न में लगभग 10.5 बेस पेयर्स होते हैं।

---

3. Z-DNA

- यह **left-handed helix** होती है — यानी घड़ी की उलटी दिशा में घूमती है।
- इसकी संरचना **zig-zag** जैसी दिखती है, इसलिए इसका नाम "Z-DNA" रखा गया।
- यह प्रायः **G-C rich** क्षेत्रों में बनती है।
- यह **जीन अभिव्यक्ति (gene expression)** को नियंत्रित करने में भूमिका निभा सकती है।

रेप्लिकेशन इनिशिएशन

रेप्लिकेशन इनिशिएशन (प्रतिकृति की शुरुआत), उस प्रक्रिया का पहला महत्वपूर्ण चरण है जिसके द्वारा एक कोशिका अपने डीएनए की दो प्रतियां बनाती है ताकि जब कोशिका विभाजित हो तो प्रत्येक नई कोशिका को डीएनए का एक पूरा सेट मिल सके।

यह प्रक्रिया प्रोकैरियोट्स (जैसे बैक्टीरिया) और यूकेरियोट्स (जैसे मानव) दोनों में कुछ अंतरों के साथ होती है, लेकिन मूल सिद्धांत समान हैं।

प्रतिकृति की शुरुआत के मुख्य चरण:

1. **उत्पत्ति की पहचान (Origin Recognition):**

1. डीएनए में विशिष्ट स्थान होते हैं जिन्हें **"प्रतिकृति की उत्पत्ति" (Origin of Replication)** कहा जाता है।

2. विशेष प्रोटीन इन स्थानों को पहचानते हैं और उनसे बंधते हैं। प्रोकैरियोट्स में आमतौर पर एक ही मूल होता है, जबकि यूकेरियोट्स में कई होते हैं।

डीएनए का खुलना (DNA Unwinding):

0. एक एंजाइम जिसे **हेलीकेस (Helicase)** कहा जाता है, डबल हेलिक्स के साथ चलता है और हाइड्रोजन बंधों को तोड़कर डीएनए के दो स्ट्रैंड्स को अलग करता है।

1. यह क्रिया "प्रतिकृति फोर्क" (replication fork) बनाती है, जो एक वाई (Y) आकार की संरचना है।

स्थिरीकरण (Stabilization):

0. जैसे ही स्ट्रैंड्स खुलते हैं, **सिंगल-स्ट्रैंड बाइंडिंग प्रोटीन (SSB proteins)** अलग हुए स्ट्रैंड्स से जुड़ जाते हैं। ये प्रोटीन स्ट्रैंड्स को वापस एक-दूसरे से जुड़ने से रोकते हैं।

प्राइमर संश्लेषण (Primer Synthesis):

0. डीएनए पोलीमरेज़ (DNA polymerase) नामक मुख्य एंजाइम, जो वास्तव में डीएनए बनाता है, अकेले काम शुरू नहीं कर सकता। इसे एक प्रारंभिक बिंदु की आवश्यकता होती है।

एक अन्य एंजाइम जिसे **प्राइमेज (Primase)** कहा जाता है, आरएनए (RNA) का एक छोटा टुकड़ा जोड़ता है जिसे **प्राइमर (Primer)** कहा जाता है। यह प्राइमर डीएनए पोलीमरेज़ के लिए शुरुआती बिंदु के रूप में कार्य करता है।

इन चरणों के बाद, डीएनए पोलीमरेज़ प्रतिकृति फोर्क के साथ आगे बढ़ना शुरू करता है और नए डीएनए स्ट्रैंड्स का संश्लेषण करता है (जिसे **इलोगेशन (Elongation)** चरण कहा जाता है), जिससे अंततः दो समान डीएनए अणु बनते हैं।

डीएनए प्रतिकृति (DNA replication) के **Elongation (वृद्धि)** और **Termination (समापन)** चरण को **Prokaryotes (प्रोकैरियोट्स)** और **Eukaryotes (यूकैरियोट्स)** —

□ 1. Elongation (वृद्धि चरण)

यह वह चरण है जिसमें नया डीएनए स्ट्रैंड बनता है।

विशेषता	Prokaryotes (जैसे E. coli)	Eukaryotes (जैसे मनुष्य की कोशिका)
मुख्य एंजाइम	DNA polymerase III	DNA polymerase α, δ, और ε
दिशा	नया डीएनए 5′ → 3′ दिशा में बनता है	समान – 5′ → 3′ दिशा में
प्राइमर (Primer)	RNA primase द्वारा RNA प्राइमर बनता है	DNA polymerase α + primase मिलकर RNA-DNA प्राइमर बनाते हैं
लीडिंग स्ट्रैंड (Leading strand)	निरंतर (continuous) संश्लेषण होता है	निरंतर (continuous) संश्लेषण
लैगिंग स्ट्रैंड (Lagging strand)	टुकड़ों में बनता है — Okazaki fragments	टुकड़ों में — Okazaki fragments (छोटे होते हैं)
फ्रैगमेंट जोड़ना	DNA polymerase I RNA प्राइमर हटाकर DNA जोड़ता है; फिर DNA ligase जोड़ता है	RNase H और FEN1 RNA प्राइमर हटाते हैं; DNA ligase जोड़ता है
गति (Rate)	बहुत तेज़ — लगभग 1000 nucleotides/sec	धीमी — लगभग 100 nucleotides/sec
Proofreading (त्रुटि सुधार)	DNA polymerase III का 3′ → 5′ exonuclease activity	DNA polymerase δ और ε में proofreading होती है

□ 2. Termination (समापन चरण)

यह वह चरण है जब डीएनए प्रतिकृति समाप्त होती है और दोनों नई डीएनए प्रतियाँ अलग हो जाती हैं।

विशेषता	Prokaryotes	Eukaryotes

विशेषता	Prokaryotes	Eukaryotes
समापन स्थान	विशेष **termination (Ter) sites** होते हैं, जहाँ **Tus protein** हेलिकेज़ को रोक देता है	कोई निश्चित Ter site नहीं; जब दो replication forks मिलते हैं, प्रतिकृति रुक जाती है
DNA अणु का प्रकार	वृत्ताकार (circular DNA)	रैखिक (linear DNA)
समापन के बाद	दो वृत्ताकार डीएनए आपस में फंसे रहते हैं — **topoisomerase II** उन्हें अलग करता है	प्रत्येक क्रोमोसोम के अंत (telomere) पर समस्या होती है क्योंकि DNA polymerase अंत तक नहीं पहुँच पाता
टेलोमेरेज़ (Telomerase)	अनुपस्थित	उपस्थित — यह एंजाइम टेलोमियर को बढ़ाकर DNA की लंबाई बनाए रखता है
अंतिम परिणाम	दो पूर्ण वृत्ताकार DNA अणु	दो पूर्ण रैखिक DNA अणु जिनके टेलोमियर संरक्षित रहते हैं

डीएनए प्रतिकृति (DNA Replication) में केवल **DNA polymerase** ही नहीं, बल्कि कई अन्य **एंज़ाइम (enzymes)** और **सहायक प्रोटीन (accessory proteins)** भी शामिल होते हैं,

□ डीएनए प्रतिकृति में प्रयुक्त एंजाइम और सहायक प्रोटीन (Enzymes and Accessory Proteins in DNA Replication)

क्रमांक	एंजाइम / प्रोटीन का नाम	कार्य (Function)	प्रोकैरियोट / यूकैरियोट में उपस्थिति
1. DNA हेलिकेज़ (DNA Helicase)	डीएनए की डबल हेलिक्स को खोलता है और दोनों स्ट्रैंड्स को अलग करता है ताकि प्रतिकृति शुरू हो सके।	दोनों में	
2. सिंगल-स्ट्रैंड बाइंडिंग प्रोटीन (SSBPs)	अलग हुए डीएनए स्ट्रैंड्स को स्थिर रखता है ताकि वे दोबारा न जुड़ें।	दोनों में (Eukaryotes में RPA कहा जाता है — Replication Protein A)	
3. DNA गाइरेज़ / टोपोइसोमेरेज़ (DNA Gyrase /	डीएनए खुलने पर बनने वाले "सुपरकॉइल" तनाव को कम करता है।	दोनों में (Eukaryotes में Topoisomerase I और II)	

क्रमांक	एंजाइम / प्रोटीन का नाम	कार्य (Function)	प्रोकैरियोट / यूकैरियोट में उपस्थिति
Topoisomerase)			
4. RNA प्राइमेज़ (RNA Primase)	छोटा RNA टुकड़ा (primer) बनाता है ताकि DNA polymerase नया डीएनए संश्लेषण शुरू कर सके।	दोनों में (Eukaryotes में यह DNA polymerase α के साथ कार्य करता है)	
5. DNA पॉलिमरेज़ (DNA Polymerase)	नए न्यूक्लियोटाइड्स जोड़कर नया डीएनए स्ट्रैंड बनाता है।	प्रोकैरियोट्स में: DNA Pol I, II, III; यूकैरियोट्स में: DNA Pol α, δ, ε	
6. DNA लिगेज़ (DNA Ligase)	लैगिंग स्ट्रैंड के ओकाज़ाकी टुकड़ों को जोड़कर एक सतत डीएनए स्ट्रैंड बनाता है।	दोनों में	
7. RNase H / DNA Polymerase I	RNA प्राइमर को हटाता है और उसकी जगह डीएनए न्यूक्लियोटाइड्स जोड़ता है।	प्रोकैरियोट्स में DNA Pol I, यूकैरियोट्स में RNase H और FEN1	
8. स्लाइडिंग क्लैम्प (Sliding Clamp)	DNA polymerase को डीएनए स्ट्रैंड से मजबूती से बाँधकर रखता है ताकि वह प्रक्रिया से न गिरे।	प्रोकैरियोट्स में β-clamp, यूकैरियोट्स में PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)	
9. क्लैम्प लोडर (Clamp Loader Complex)	स्लाइडिंग क्लैम्प को डीएनए पर लोड करने का कार्य करता है।	प्रोकैरियोट्स में γ-complex, यूकैरियोट्स में RFC (Replication Factor C)	
10. टेलोमेरेज़ (Telomerase)	यूकैरियोट्स में क्रोमोसोम के सिरों (telomeres) को बढ़ाता है ताकि डीएनए छोटा न हो।	केवल यूकैरियोट्स में	
11. Tus प्रोटीन (Termination Utilization Substance)	प्रोकैरियोट्स में टर्मिनेशन साइट (Ter site) पर हेलिकेज़ को रोक देता है।	केवल प्रोकैरियोट्स में	
12. टोपोइसोमेरेज़ II / DNA गाइरेज़	दो प्रतिकृत वृत्ताकार डीएनए को अलग करता है (decatenation)।	दोनों में उपस्थित (रूप अलग-अलग)	

□ जीन स्थिरता (Gene Stability) क्या है?

जीन स्थिरता का अर्थ है — किसी जीव की कोशिकाओं में मौजूद आनुवंशिक पदार्थ (DNA या जीनोम) की **संरचना, क्रम (sequence)** और **कार्य** को लंबे समय तक स्थिर और सुरक्षित बनाए रखना।

यह सुनिश्चित करता है कि:

- जीन की जानकारी सही बनी रहे,
- DNA की प्रतिकृति (replication) सही तरह से हो,
- और कोशिकाएँ ठीक ढंग से विभाजित (divide) होती रहें।

□□ जीन स्थिरता क्यों ज़रूरी है?

DNA लगातार विभिन्न स्रोतों से क्षतिग्रस्त (damage) होता रहता है।
अगर यह नुकसान ठीक न किया जाए तो जीनोम अस्थिर हो जाता है — इसे **Genomic Instability** कहा जाता है।
यह अस्थिरता कई बीमारियों जैसे **कैंसर**, **बुढ़ापा (aging)**, और **आनुवंशिक विकारों (genetic disorders)** का कारण बनती है।

□ DNA को नुकसान पहुँचाने वाले कारण (Sources of DNA Damage)

प्रकार	विवरण	उदाहरण
आंतरिक (Endogenous)	कोशिका के भीतर होने वाली रासायनिक क्रियाएँ	Reactive oxygen species (ROS), replication errors
बाहरी (Exogenous)	पर्यावरणीय प्रभाव	UV rays, ionizing radiation, chemicals, pollutants

---

□ DNA में होने वाले मुख्य नुकसान (Types of DNA Damage)

1. **बेस परिवर्तन (Base modification):**
   जैसे cytosine → uracil या guanine का oxidation

2. **स्ट्रैंड ब्रेक (Strand break):**
   DNA की एक या दोनों स्ट्रैंड टूट जाना
3. **थाइमिन डाइमर (Thymine dimer):**
   UV किरणों से दो थाइमिन आपस में जुड़ जाते हैं
4. **क्रॉसलिंक (Crosslink):**
   दो DNA स्ट्रैंड या DNA और प्रोटीन के बीच covalent लिंक

□ जीन स्थिरता बनाए रखने के प्रमुख तंत्र (Mechanisms Maintaining Gene Stability)

1. **□ DNA रिपेयर सिस्टम (DNA Repair System)**
   - DNA में होने वाली सभी क्षतियों को पहचानकर ठीक करता है।
   - प्रमुख प्रकार:
     - **Base Excision Repair (BER)**
     - **Nucleotide Excision Repair (NER)**
     - **Mismatch Repair (MMR)**
     - **Homologous Recombination (HR)**
     - **Non-Homologous End Joining (NHEJ)**
     - **Direct Repair**
2. **□ सटीक DNA प्रतिकृति (Accurate DNA Replication)**
   - DNA polymerase proofreading के माध्यम से गलत बेस हटाता है।
   - इससे नई DNA स्ट्रैंड में गलती की संभावना बहुत कम हो जाती है।
3. **□□ DNA Damage Checkpoints**
   - ATM, ATR, p53 जैसे प्रोटीन DNA क्षति को पहचानते हैं।
   - अगर DNA खराब है तो कोशिका को विभाजित होने से रोकते हैं, जब तक कि मरम्मत पूरी न हो जाए।
4. **□ Chromosome Segregation Accuracy**
   - कोशिका विभाजन के दौरान क्रोमोसोम सही तरीके से अलग होने चाहिए।
   - इसमें दोष आने से Aneuploidy (क्रोमोसोम की संख्या बदलना) जैसी समस्या हो सकती है।

□ DNA रिपेयर एंज़ाइम्स और जीन स्थिरता का संबंध

मरम्मत प्रणाली	मुख्य एंज़ाइम	कार्य
BER	DNA glycosylase, AP endonuclease,	छोटे बेस परिवर्तन ठीक करता है

मरम्मत प्रणाली	मुख्य एंज़ाइम	कार्य
	Ligase	
NER	XPA–XPG, Ligase	UV से हुए नुकसान ठीक करता है
MMR	MSH, MLH, PMS	रेप्लिकेशन की गलतियाँ ठीक करता है
HR/NHEJ	RAD51, BRCA1/2, Ku70/80	डबल-स्ट्रैंड ब्रेक्स ठीक करता है
Direct Repair	Photolyase, MGMT	छोटे रासायनिक नुकसान सीधे ठीक करता है

इन सभी एंज़ाइम्स की समन्वित क्रिया से DNA की **संरचनात्मक और आनुवंशिक स्थिरता** बनी रहती है।

□ अगर जीन स्थिरता टूट जाए तो क्या होता है?

जब DNA मरम्मत ठीक से काम नहीं करती, तो परिणाम होते हैं:

- **म्यूटेशन का बढ़ना**
- **क्रोमोसोम टूटना या जुड़ना**
- **कैंसर का विकास**
- **विकासात्मक दोष (developmental disorders)**

□ जीन स्थिरता से जुड़ी बीमारियाँ

रोग	प्रभावित मार्ग	परिणाम
Xeroderma Pigmentosum (XP)	NER	सूर्य की रोशनी से संवेदनशीलता, त्वचा कैंसर
Lynch Syndrome (HNPCC)	MMR	कोलोन और एंडोमेट्रियल कैंसर
BRCA1/2 म्यूटेशन	HR	स्तन और अंडाशय कैंसर
Ataxia Telangiectasia	DNA damage response defect	तंत्रिका और प्रतिरक्षा विकार

□ DNA रिपेयर एंज़ाइम्स क्या होते हैं?

DNA रिपेयर एंज़ाइम्स वे विशेष **प्रोटीन** हैं जो DNA में हुई क्षति (damage) या गलती (error) को पहचानते, काटते, ठीक करते और पुनः जोड़ते हैं।

DNA को लगातार नुकसान पहुँचता रहता है —

- **भीतर से (endogenous)**: Reactive oxygen species, replication errors
- **बाहर से (exogenous)**: UV किरणें, विकिरण (radiation), रसायन (chemicals)

अगर ये नुकसान न सुधारे जाएँ, तो म्यूटेशन, कैंसर, और अन्य आनुवंशिक विकार हो सकते हैं।
इसीलिए DNA रिपेयर एंज़ाइम्स **जीन स्थिरता (gene stability)** के रक्षक हैं।

□□ DNA रिपेयर एंज़ाइम्स के प्रमुख कार्य

1. **DNA में क्षति को पहचानना (Damage recognition)**
2. **गलत या क्षतिग्रस्त भाग को हटाना (Excision / Cleavage)**
3. **सही न्यूक्लियोटाइड जोड़ना (Repair synthesis)**
4. **DNA स्ट्रैंड को जोड़ना (Ligation)**

इन चरणों में कई एंज़ाइम मिलकर काम करते हैं।

□ DNA रिपेयर के मुख्य प्रकार और उनके एंज़ाइम्स

1. □ Base Excision Repair (BER) – बेस एक्सिशन रिपेयर

क्षति का प्रकार:
छोटे, सामान्य रासायनिक परिवर्तन — जैसे डीयमिनेशन, ऑक्सीकरण, अल्किलेशन।

मुख्य एंज़ाइम्स और उनकी भूमिका:

एंज़ाइम	कार्य
DNA Glycosylase	क्षतिग्रस्त या गलत बेस को पहचानकर हटा देता है।

एंज़ाइम	कार्य
AP Endonuclease	उस जगह DNA की शुगर–फॉस्फेट रीढ़ को काट देता है (AP site बनती है)।
DNA Polymerase β	सही नया न्यूक्लियोटाइड जोड़ देता है।
DNA Ligase	नई स्ट्रैंड को जोड़कर DNA को सील कर देता है।

➡ **परिणाम:** छोटा सा बेस दोष पूरी तरह ठीक हो जाता है।

---

2. Nucleotide Excision Repair (NER) – न्यूक्लियोटाइड एक्सिशन रिपेयर

क्षति का प्रकार:
बड़े या bulky lesions जैसे – UV rays से बना **Thymine dimer**, या chemical adducts।

मुख्य एंज़ाइम्स:

- **XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG** (मानव में)
- **DNA Polymerase δ/ε**
- **DNA Ligase I**

प्रक्रिया:

1. क्षति पहचानना (XPC द्वारा)
2. हेलिकेज़ (XPB, XPD) DNA को खोलता है
3. XPF और XPG DNA को दोनों ओर से काटते हैं (लगभग 30 न्यूक्लियोटाइड्स)
4. DNA polymerase नया हिस्सा जोड़ता है
5. Ligase सील करता है

➡ **रोग:**
अगर यह pathway खराब हो जाए → **Xeroderma pigmentosum (XP)**
(सूर्य की रोशनी से अत्यधिक संवेदनशीलता, त्वचा कैंसर)

---

3. Mismatch Repair (MMR) – मिस्टमैच रिपेयर

क्षति का प्रकार:
DNA replication के दौरान गलत बेस जोड़ जाना या insertion/deletion errors।

मुख्य एंज़ाइम्स:

प्रणाली	एंज़ाइम्स
बैक्टीरिया में	MutS, MutL, MutH
मानव में	MSH2, MSH6, MLH1, PMS2

प्रक्रिया:

1. MutS / MSH गलत बेस को पहचानता है।
2. MutL / MLH उस क्षेत्र को निकालता है।
3. DNA polymerase सही बेस जोड़ता है।
4. Ligase DNA को सील करता है।

➡ रोग:
MMR pathway की गड़बड़ी से **Lynch Syndrome (HNPCC)** – कोलोन और एंडोमेट्रियल कैंसर।

---

4. Double-Strand Break Repair (DSBR)

DNA की दोनों स्ट्रैंड टूट जाएँ तो दो प्रमुख रास्ते हैं:

(a) Homologous Recombination (HR) – सटीक तरीका

एंज़ाइम्स:
RAD51, BRCA1, BRCA2, ATM, ATR

मेकैनिज़्म:

- टूटे DNA के सिरों को RAD51 प्रोटीन पहचानता है
- समान DNA (sister chromatid) को टेम्पलेट बनाकर सही DNA बनाता है

➡ यह तरीका **error-free** है।

(b) Non-Homologous End Joining (NHEJ) – तेज़ लेकिन गलतियाँ संभव

एंज़ाइम्स:
Ku70, Ku80, DNA-PKcs, Ligase IV

मेकैनिज़्म:

- Ku70/80 टूटे सिरों को पकड़ते हैं
- DNA-PKcs उन्हें stabilize करता है
- Ligase IV सिरों को जोड़ देता है

➡ यह तरीका **error-prone** है (कुछ न्यूक्लियोटाइड खो सकते हैं)।

रोग:
BRCA1/2 में खराबी → **स्तन और अंडाशय कैंसर**

---

5. Direct Repair (सीधा सुधार)

क्षति का प्रकार:
छोटे रासायनिक परिवर्तन जो सीधे उलटे जा सकते हैं।

मुख्य एंज़ाइम्स:

एंज़ाइम	कार्य
Photolyase	UV से बने Thymine dimer को सीधे ठीक करता है (सूर्य की नीली रोशनी की मदद से)।
O^6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT)	मिथाइल ग्रुप हटाकर गुआनिन को सामान्य अवस्था में लौटाता है।

➡ यह सबसे सरल और तेज़ DNA मरम्मत तरीका है।

अन्य सहायक एंज़ाइम्स और प्रोटीन

एंज़ाइम / प्रोटीन	भूमिका
DNA Helicase	DNA को खोलता है ताकि रिपेयर एंज़ाइम्स काम कर सकें
Single-Strand Binding Proteins (SSBPs)	DNA स्ट्रैंड को स्थिर रखते हैं
Topoisomerase	DNA के तनाव (supercoiling) को हटाता है
DNA Polymerase I/δ/ε	नया DNA संश्लेषित करता है
DNA Ligase	नए टुकड़ों को जोड़कर सील करता है

□□ DNA रिपेयर एंज़ाइम्स की खराबी के परिणाम

दोष	प्रभावित एंज़ाइम/पाथवे	परिणाम
XP जीन की खराबी	NER	सूर्य से संवेदनशीलता, त्वचा कैंसर
MSH/MLH जीन की खराबी	MMR	Lynch Syndrome
BRCA1/2 जीन की खराबी	HR	स्तन/अंडाशय कैंसर
ATM जीन की खराबी	Checkpoint defect	Ataxia telangiectasia

- DNA रिपेयर एंज़ाइम्स हमारे **जीनोम की अखंडता (genomic integrity)** की रक्षा करते हैं।
- ये एंज़ाइम DNA की क्षति को पहचानकर उसे ठीक करते हैं, ताकि म्यूटेशन और कैंसर से बचाव हो सके।
- बिना इन एंज़ाइम्स के, कोशिका में **जीन अस्थिरता (genomic instability)** बढ़ती है, जिससे **आनुवंशिक रोग**, **कैंसर** और **कोशिका मृत्यु** होती है।

□ Recombination (रिकॉम्बिनेशन) क्या है?

रिकॉम्बिनेशन (Recombination) एक जैविक प्रक्रिया है जिसमें दो DNA अणुओं के बीच **आनुवंशिक पदार्थ (genetic material)** का आदान–प्रदान (exchange) होता है।

इससे नए **जीन संयोजन (gene combinations)** बनते हैं जो **आनुवंशिक विविधता (genetic variation)** का आधार हैं।

➡ सरल शब्दों में —
रिकॉम्बिनेशन वह प्रक्रिया है जिसमें **DNA के टुकड़े (segments)** एक-दूसरे के साथ **क्रॉस होकर बदल जाते हैं**, जिससे **नया जीनोमिक पैटर्न** बनता है।

रिकॉम्बिनेशन के मुख्य प्रकार (Types of Recombination)

प्रकार	विवरण	उदाहरण
1. Homologous Recombination (समान गुणसूत्रीय पुनर्संयोजन)	समान या लगभग समान DNA अनुक्रमों के बीच पुनर्संयोजन	मीयोसिस (meiosis) में crossing-over
2. Non-Homologous Recombination (असमान पुनर्संयोजन)	अलग या असमान DNA अनुक्रमों के बीच	Transposons का स्थानांतरण
3. Site-Specific Recombination (स्थल-विशिष्ट पुनर्संयोजन)	DNA के विशिष्ट अनुक्रमों (specific sites) पर होता है	बैक्टीरियोफेज़ DNA का बैक्टीरियल जीनोम में जुड़ना
4. Illegitimate Recombination (अनियमित पुनर्संयोजन)	किसी समानता की आवश्यकता नहीं — यादृच्छिक (random) recombination	DNA टूटने के बाद गलत जोड़

---

1. Homologous Recombination (समान पुनर्संयोजन)

Homologous Recombination क्या है?

Homologous Recombination (HR) एक ऐसी जैविक प्रक्रिया है जिसमें दो **समान या लगभग समान DNA अनुक्रमों (homologous DNA sequences)** के बीच **आनुवंशिक पदार्थ (genetic material)** का आदान-प्रदान होता है।

यह वह प्रक्रिया है जिसमें DNA के दो समान अंश **cross-over (क्रॉसिंग ओवर)** करते हैं और **जीनों का नया संयोजन** बनाते हैं।

□□ मुख्य उद्देश्य (Functions)

1. **DNA Double-Strand Breaks की मरम्मत (Repair of DSBs)**
   – जब DNA की दोनों स्ट्रैंड टूट जाती हैं, तो HR उन्हें सटीक रूप से ठीक करता है।
2. **Meiosis में Crossing Over**
   – यह प्रक्रिया जीनों के नए संयोजन बनाकर आनुवंशिक विविधता (genetic variation) उत्पन्न करती है।
3. **Genomic Stability**
   – HR, जीनोम की अखंडता बनाए रखने में मदद करता है।

□ कहाँ होती है Homologous Recombination?

परिस्थिति	उद्देश्य
Meiosis (मीयोसिस)	Crossing over द्वारा जीन विविधता उत्पन्न करना
Mitosis (माइटोसिस)	DNA क्षति (damage) की मरम्मत करना
DNA Replication के बाद	जब replication fork टूट जाता है, तो HR उसकी मरम्मत करता है

□ Homologous Recombination की प्रक्रिया (Steps of HR)

Homologous recombination कई चरणों में होती है। आइए इन्हें विस्तार से समझते हैं □

□ Step 1: Double-Strand Break (DSB) Formation)

DNA के दोनों स्ट्रैंड्स किसी कारण से टूट जाते हैं।

- यह **ionizing radiation**, **रासायनिक एजेंट्स**, या **replication fork collapse** से हो सकता है।

□ Step 2: Resection (टूटे सिरों की सफाई)

- टूटे हुए सिरों से **Exonuclease एंज़ाइम** कुछ न्यूक्लियोटाइड्स हटाता है।
- इससे **single-stranded 3’ overhangs** बनते हैं।

□ Step 3: Strand Invasion (स्ट्रैंड का प्रवेश)

- अब यह single-stranded सिरा **समान DNA (homologous DNA)** पर जाकर उससे जुड़ता है।
- इसमें मदद करते हैं —
  - **RecA** (बैक्टीरिया में) या
  - **RAD51** (यूकेरियोट्स में) प्रोटीन।
- यह damaged DNA को एक **template** के रूप में intact DNA का उपयोग करने में मदद करता है।

□ Step 4: Holliday Junction Formation

- दोनों DNA अणु अब आपस में जुड़ जाते हैं और "X" के आकार की संरचना बनाते हैं — इसे **Holliday junction** कहा जाता है।
- यह junction DNA strands के क्रॉसओवर को दर्शाता है।

□ Step 5: Branch Migration

- Holliday junction DNA के साथ आगे बढ़ सकता है (migrate कर सकता है),
  जिससे DNA के लंबे हिस्से एक-दूसरे से विनिमय (exchange) कर लेते हैं।
- यह चरण **RuvA** और **RuvB** प्रोटीन द्वारा संचालित होता है।

□ Step 6: Resolution (समाधान / काटना)

- अंत में **RuvC nuclease** Holliday junction को काट देता है।
- इससे दो DNA अणु बनते हैं जिनमें नए जीन संयोजन होते हैं।

□ मुख्य एंज़ाइम्स (Key Enzymes in HR)

एंज़ाइम / प्रोटीन	कार्य
RecA (Bacteria) / **RAD51 (Eukaryotes)**	स्ट्रैंड इन्वेज़न कराता है

एंज़ाइम / प्रोटीन	कार्य
Exonuclease (RecBCD complex)	टूटे सिरों की सफाई करता है
RuvA / RuvB	Holliday junction को stabilize और migrate करते हैं
RuvC (Endonuclease)	Holliday junction को काटकर समाधान करता है
DNA Polymerase	सही DNA को पुनर्निर्मित करता है
DNA Ligase	स्ट्रैंड्स को जोड़कर सील करता है

□ Holliday Model (हॉलिडे मॉडल)

इस मॉडल को **Robin Holliday (1964)** ने प्रस्तावित किया था।
यह बताता है कि कैसे homologous chromosomes के बीच crossing-over होती है।

मुख्य बिंदु:

1. दो homologous DNA स्ट्रैंड्स एक-दूसरे के साथ संरेखित (align) होते हैं।
2. एक स्ट्रैंड दूसरे में प्रवेश करता है।
3. Junction बनता है।
4. Junction resolve होने पर recombined DNA बनता है।

□ Homologous Recombination के जैविक महत्व

उद्देश्य	महत्व
DNA मरम्मत	DSB की सटीक मरम्मत करता है
Genetic Variation	मीयोसिस में crossing over द्वारा नए जीन संयोजन
Evolution	नए आनुवंशिक संयोजनों से विकास में योगदान
Genome Stability	जीनोम की संरचना और अखंडता को सुरक्षित रखता है

□□ अगर HR ठीक से न हो तो क्या होता है?

जब HR pathway में गड़बड़ी होती है, तो DNA मरम्मत सही नहीं होती →
इससे **Genomic Instability**, **Mutation accumulation**, और **कैंसर** का खतरा बढ़ जाता है।

जीन / प्रोटीन	दोष	रोग
BRCA1 / BRCA2	HR में खराबी	स्तन और अंडाशय कैंसर
RAD51 की कमी	स्ट्रैंड इन्वेज़न असफल	DNA मरम्मत दोष
ATM / ATR म्यूटेशन	DSB sensing दोष	Ataxia Telangiectasia

□ 2. Non-Homologous Recombination (असमान पुनर्संयोजन)

बहुत अच्छा □
अब हम **Non-Homologous Recombination (असमजात पुनर्संयोजन)** को विस्तार से, चरणबद्ध और वैज्ञानिक रूप से **हिंदी में गहराई से** समझेंगे।

□ Non-Homologous Recombination क्या है?

Non-Homologous Recombination वह प्रक्रिया है जिसमें **दो DNA अणुओं के बीच पुनर्संयोजन (recombination)** होता है **भले ही उनके अनुक्रम (sequences) समान या मिलते-जुलते न हों**।

➡□ सरल शब्दों में:
जब DNA के अलग-अलग (असमान) हिस्से एक-दूसरे से जुड़ जाते हैं, या DNA के टूटे हुए सिरे बिना किसी समानता के जोड़ दिए जाते हैं — उसे **Non-Homologous Recombination** कहा जाता है।

□□ मुख्य विशेषताएँ (Key Features)

विशेषता	विवरण
DNA समानता की आवश्यकता	नहीं होती
प्रकार का पुनर्संयोजन	असमजात (non-homologous)
सटीकता (Accuracy)	त्रुटिपूर्ण (error-prone)
मुख्य कार्य	Double-strand break repair (DSB repair)

विशेषता	विवरण
प्रमुख प्रणाली	Non-Homologous End Joining (NHEJ) pathway

□ कहाँ होती है Non-Homologous Recombination?

1. **DNA Damage Repair में:**
   जब DNA के दोनों स्ट्रैंड टूट जाते हैं (Double-Strand Break – DSB), और समान DNA टेम्पलेट उपलब्ध नहीं होता, तो कोशिका DNA के सिरों को सीधे जोड़ देती है।
   इसे **Non-Homologous End Joining (NHEJ)** कहते हैं।
2. **Transposons और Viral DNA Integration में:**
   जब कोई DNA टुकड़ा (जैसे ट्रांसपोसॉन या वायरस) यादृच्छिक रूप से किसी भी जीनोमिक स्थान पर जुड़ता है।
3. **Chromosomal Rearrangements:**
   कभी-कभी क्रोमोसोम टूटने और गलत जुड़ने से बड़े स्तर पर DNA पुनर्संरचना (translocation, inversion) हो सकती है।

□ Non-Homologous Recombination के प्रकार (Types)

प्रकार	विवरण	उदाहरण
1. Non-Homologous End Joining (NHEJ)	DNA के टूटे सिरों को सीधे जोड़ना	DNA double-strand break repair
2. Transpositional Recombination	Transposon का किसी भी जगह DNA में जुड़ना	Bacterial transposons
3. Illegitimate Recombination	यादृच्छिक पुनर्संयोजन, बिना किसी समानता के	Mutations, chromosomal rearrangements

---

□ 1□ Non-Homologous End Joining (NHEJ)

यह सबसे महत्वपूर्ण और सामान्य प्रकार है।
इसमें DNA की दो टूटी हुई स्ट्रैंड्स को सीधे जोड़ दिया जाता है **बिना किसी homologous template के**।

□□ NHEJ की प्रक्रिया (Steps)

Step 1: DNA Break Detection (टूटे DNA की पहचान)

- DNA में double-strand break होने पर इसे **Ku70 और Ku80 प्रोटीन** पहचानते हैं।
- ये दोनों टूटे सिरों से जुड़कर उन्हें स्थिर करते हैं।

Step 2: DNA End Binding and Alignment

- Ku70/Ku80 टूटे सिरों को जोड़कर रखते हैं ताकि DNA दोबारा जुड़ सके।
- **DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)** इन सिरों को align करता है।

Step 3: End Processing (सिरों की तैयारी)

- अगर सिरों पर अतिरिक्त या क्षतिग्रस्त न्यूक्लियोटाइड हैं, तो उन्हें **Artemis nuclease** द्वारा काटकर साफ किया जाता है।
- कभी-कभी छोटे complementary बेस बनाए जाते हैं ताकि सिर जुड़ सकें।

Step 4: DNA Ligation (सिरों को जोड़ना)

- अंत में **DNA Ligase IV** और **XRCC4 प्रोटीन** मिलकर DNA की दोनों स्ट्रैंड्स को जोड़ देते हैं।
- इस प्रक्रिया में एक या दो बेस हट सकते हैं या गलत जोड़ हो सकता है → इसलिए यह **error-prone** है।

□ मुख्य एंज़ाइम्स (Key Enzymes in NHEJ)

एंज़ाइम / प्रोटीन	कार्य
Ku70 / Ku80	टूटे DNA सिरों को पहचानना और बांधना
DNA-PKcs	सिरों को align करना और phosphorylate करना

एंज़ाइम / प्रोटीन	कार्य
Artemis	सिरों को काटकर साफ करना
XRCC4 / XLF	Ligase को स्थिर करना
DNA Ligase IV	DNA सिरों को जोड़ना (ligation)

□□ NHEJ की सीमाएँ (Limitations)

- यह बहुत **तेज़** लेकिन **त्रुटिपूर्ण (error-prone)** प्रक्रिया है।
- कभी-कभी न्यूक्लियोटाइड खो जाते हैं या गलत बेस जुड़ जाते हैं → इससे **mutation** या **chromosomal translocation** हो सकता है।

□ 2□ Transpositional (Mobile Element) Recombination

इसमें DNA के **transposable elements (jumping genes)** किसी भी स्थान पर जुड़ सकते हैं, भले ही अनुक्रम समान न हो।

- इसे **Barbara McClintock** ने खोजा था।
- यह **Non-homologous recombination** का उदाहरण है क्योंकि जुड़ने के लिए homologous region की आवश्यकता नहीं होती।

मुख्य एंज़ाइम:
Transposase — जो DNA को काटकर और जोड़कर उसे नए स्थान पर स्थापित करता है।

□ 3□ Illegitimate Recombination

यह बिल्कुल यादृच्छिक (random) पुनर्संयोजन है जिसमें कोई समानता या विशिष्ट साइट नहीं होती।

- यह अक्सर DNA नुकसान या गलत मरम्मत के समय होती है।
- इससे **mutations**, **gene duplications**, या **chromosomal abnormalities** हो सकती हैं।

□ Non-Homologous Recombination का जैविक महत्व

उद्देश्य	विवरण
DNA मरम्मत (Repair)	जब homologous DNA template उपलब्ध न हो तब DSBs की मरम्मत करता है
तेज़ प्रतिक्रिया (Rapid response)	DNA क्षति के तुरंत बाद कार्य करता है
प्रतिरक्षा प्रणाली (Immunity)	V(D)J recombination में NHEJ का उपयोग होता है, जिससे एंटीबॉडी विविधता बनती है
जीन इंजीनियरिंग (Genetic Engineering)	CRISPR-Cas9 editing में NHEJ का उपयोग करके gene knockout किया जाता है

□□ NHEJ और रोग (Diseases due to Defective NHEJ)

दोष	प्रभावित प्रोटीन	परिणाम
LIG4 syndrome	DNA Ligase IV	इम्यूनोडेफिशिएंसी, विकास संबंधी विकार
Artemis deficiency	Artemis nuclease	Severe Combined Immunodeficiency (SCID)
Ku70/Ku80 defect	Ku proteins	जीन अस्थिरता, कैंसर का खतरा

□ Homologous vs Non-Homologous Recombination तुलना

विशेषता	Homologous Recombination	Non-Homologous Recombination
DNA समानता आवश्यक	हाँ (homologous DNA जरूरी)	नहीं
मुख्य कार्य	सटीक DNA मरम्मत, meiosis में crossing-over	त्वरित DNA जोड़, DNA damage repair
सटीकता	बहुत सटीक (error-free)	त्रुटिपूर्ण (error-prone)

विशेषता	Homologous Recombination	Non-Homologous Recombination
मुख्य एंज़ाइम्स	RAD51, BRCA1/2, RecA	Ku70/80, DNA-PKcs, Ligase IV
उपयोग	Genetic diversity, precise repair	Immune gene rearrangement, CRISPR editing
बीमारी से संबंध	BRCA mutation → Cancer	LIG4 / Artemis defect → Immunodeficiency

---

- **Non-Homologous Recombination** DNA मरम्मत का एक तेज़ लेकिन कम सटीक तरीका है।
- इसका मुख्य रूप **Non-Homologous End Joining (NHEJ)** है, जो DNA के टूटे सिरों को सीधे जोड़ता है।
- यह प्रणाली **DNA स्थिरता**, **प्रतिरक्षा प्रणाली के विकास**, और **जीन इंजीनियरिंग** में महत्वपूर्ण भूमिका निभाती है।
- हालांकि यह सटीक नहीं होती, फिर भी जब कोई homologous टेम्पलेट उपलब्ध नहीं होता, तब यही कोशिका की जीवनरक्षक प्रक्रिया होती है।

□ 3. Site-Specific Recombination (स्थल-विशिष्ट पुनर्संयोजन)

बहुत अच्छा प्रश्न □
अब हम **Site-Specific Recombination (स्थल-विशिष्ट पुनर्संयोजन)** को **गहराई से (deeply)** और **सरल हिंदी में वैज्ञानिक रूप से** समझते हैं।

□ Site-Specific Recombination क्या है?

Site-Specific Recombination (स्थल-विशिष्ट पुनर्संयोजन) एक ऐसी **DNA पुनर्संयोजन प्रक्रिया (recombination process)** है जिसमें DNA अणुओं के बीच **विशेष (specific)** स्थानों पर **एंज़ाइमों की सहायता से** आनुवंशिक पदार्थ (genetic material) का **सटीक और नियंत्रित आदान–प्रदान** होता है।

➡ **सरल शब्दों में:**
यह एक ऐसी प्रक्रिया है जिसमें DNA के दो विशिष्ट अनुक्रम (specific sequences) एक-दूसरे से जुड़ते हैं या अदल–बदल होते हैं, और यह सब **विशेष एंज़ाइम (recombinase)** द्वारा नियंत्रित होता है।

मुख्य विशेषताएँ (Key Features)

विशेषता	विवरण
DNA समानता आवश्यक?	नहीं, केवल विशेष "recognition sites" की आवश्यकता होती है
सटीकता (Accuracy)	बहुत सटीक और नियंत्रित
मुख्य एंज़ाइम	Recombinase (जैसे Cre, Integrase, FLP आदि)
प्रमुख कार्य	DNA integration, excision, inversion आदि
उदाहरण	बैक्टीरियोफेज़ λ DNA का बैक्टीरियल जीनोम में जुड़ना

Site-Specific Recombination कैसे होती है?

यह प्रक्रिया **DNA के दो विशिष्ट अनुक्रमों (recombination sites)** के बीच होती है।
ये अनुक्रम सामान्यतः 20–50 बेस पेयर लंबे होते हैं।

इन साइट्स को **Recombination Sites** या **Attachment Sites (att sites)** कहा जाता है।

सामान्य Recombination साइट्स के उदाहरण:

- **attP (phage DNA)** — बैक्टीरियोफेज़ का साइट
- **attB (bacterial DNA)** — बैक्टीरियल जीनोम का साइट

जब ये दोनों साइट्स एक साथ आती हैं, तब recombinase एंज़ाइम उन्हें पहचानकर पुनर्संयोजन कराता है।

मुख्य चरण (Steps of Site-Specific Recombination)

Step 1: Recognition (पहचान)

- **Recombinase enzyme** DNA में **specific recognition sites** को पहचानता है।
- ये साइट्स palindromic sequence या short consensus sequences होती हैं।

□ Step 2: Synapsis (साइट्स का जुड़ना)

- दो DNA अणु या एक ही DNA के दो भाग इन साइट्स पर जुड़ते हैं।
- Recombinase इन साइट्स को एक साथ लाकर **synaptic complex** बनाता है।

□ Step 3: Cleavage (DNA कटना)

- Recombinase DNA की दोनों स्ट्रैंड्स को **specific points** पर काटता है।
- यह कटने की क्रिया **Tyrosine recombinase** या **Serine recombinase** के active site से होती है।

□ Step 4: Strand Exchange (स्ट्रैंड का अदला–बदली)

- अब DNA के टुकड़ों का अदल–बदल (strand exchange) होता है।
- इससे DNA के दो हिस्से नए संयोजन में जुड़ जाते हैं।

□ Step 5: Ligation (DNA जोड़ना)

- Recombinase DNA स्ट्रैंड्स को फिर से जोड़ देता है (ligate)।
- अंत में नया DNA बना होता है जिसमें जीनोमिक संरचना बदल चुकी होती है।

□ Recombinase एंज़ाइमों के प्रकार

प्रकार	मुख्य उदाहरण	क्रिया
Tyrosine Recombinase	Cre, λ Integrase, FLP	Tyrosine का उपयोग करके DNA को काटना और जोड़ना
Serine Recombinase	γδ resolvase, Hin, Gin	Serine residue द्वारा DNA को काटना

□ Site-Specific Recombination के प्रकार (Types)

प्रकार	विवरण	उदाहरण

प्रकार	विवरण	उदाहरण
1. Integration (सम्मिलन)	DNA का एक टुकड़ा दूसरे DNA में जुड़ता है	Bacteriophage λ का DNA बैक्टीरियल जीनोम में जुड़ना
2. Excision (हटाना)	पहले से जुड़े DNA टुकड़े का निकलना	Phage DNA का बैक्टीरिया से अलग होना
3. Inversion (उलट जाना)	DNA का कोई टुकड़ा अपनी दिशा बदल लेता है	Salmonella में flagella जीन की दिशा बदलना

□ 1□ Integration Example – Bacteriophage λ

यह **सबसे प्रसिद्ध उदाहरण** है site-specific recombination का।

प्रक्रिया:

1. λ फेज का DNA (virus का DNA) बैक्टीरिया में प्रवेश करता है।
2. Phage DNA में **attP site**, और बैक्टीरिया में **attB site** होती है।
3. **λ Integrase (recombinase enzyme)** इन दोनों साइट्स को पहचानता है।
4. DNA कटकर एक–दूसरे से जुड़ जाते हैं →
   attL और **attR** junction sites बनती हैं।
5. इस प्रकार फेज DNA अब **बैक्टीरिया के जीनोम** में **इंटीग्रेट (जुड़)** हो जाता है।

➡□ यह प्रक्रिया "Lysogeny" कहलाती है।

□ 2□ Excision Example – Phage DNA का बाहर निकलना

जब परिस्थितियाँ बदलती हैं (जैसे बैक्टीरिया को तनाव होता है), तो वही फेज DNA जीनोम से निकल जाता है।
यह प्रक्रिया **Excisionase enzyme** और **Integrase** की मदद से होती है।

□ 3□ Inversion Example – Salmonella flagellar gene inversion

- **Salmonella typhimurium** में **Hin recombinase** DNA के एक टुकड़े को उलट देता है।

- इससे flagellar protein (H1 → H2) का उत्पादन बदल जाता है।
- परिणामस्वरूप बैक्टीरिया अपनी surface antigenicity बदल सकता है → जिससे immune system से बच निकलता है।

□ Site-Specific Recombination की जैविक भूमिका (Biological Importance)

कार्य	विवरण
1. DNA Integration	Virus (जैसे λ phage) अपने DNA को host genome में जोड़ सकता है
2. Gene Regulation	DNA inversion द्वारा जीन की अभिव्यक्ति नियंत्रित होती है
3. Genetic Engineering	Cre-LoxP या FLP-FRT system द्वारा targeted DNA modification
4. Antigenic Variation	Bacteria में immune escape हेतु DNA inversion
5. Evolution	नए DNA संयोजन बनाकर आनुवंशिक विविधता बढ़ाना

□ Molecular Tools Derived from Site-Specific Recombination

प्रणाली	उपयोग
Cre-LoxP system	किसी जीन को सटीक रूप से हटाना या जोड़ना (gene knockout/knockin)
FLP-FRT system	Yeast में genetic manipulation
Integrase systems (φC31)	Transgenic DNA को genome में स्थायी रूप से जोड़ना

उदाहरण:
Cre recombinase LoxP sites के बीच DNA को excise या invert कर सकता है।
□ यह तकनीक **transgenic mice** बनाने में बहुत उपयोगी है।

□□ त्रुटियाँ और परिणाम (Errors and Consequences)

- अगर recombination गलत साइट पर हो जाए तो **mutation** या **chromosomal rearrangement** हो सकते हैं।

- कभी-कभी यह **viral integration** की वजह से **cancer** भी उत्पन्न कर सकता है (जैसे – HPV DNA का host genome में जुड़ना)।

□ Homologous vs Site-Specific Recombination तुलना

विशेषता	Homologous Recombination	Site-Specific Recombination
DNA समानता की आवश्यकता	हाँ	नहीं, केवल specific sites
मुख्य एंज़ाइम	RecA / RAD51	Recombinase (Cre, Integrase)
सटीकता	बहुत सटीक	अत्यंत सटीक (highly controlled)
मुख्य कार्य	DNA repair, crossing-over	Integration, inversion, excision
स्थान	पूरे genome में कहीं भी	केवल निश्चित (specific) साइट पर

- **Site-Specific Recombination** DNA के विशेष स्थानों पर होने वाली अत्यंत नियंत्रित और सटीक प्रक्रिया है।
- इसमें **recombinase enzymes** DNA को पहचानकर, काटकर और जोड़कर नई जीन संरचना बनाते हैं।
- यह प्रक्रिया **virus integration**, **gene regulation**, और **genetic engineering** के लिए अत्यंत महत्वपूर्ण है।
- आधुनिक तकनीक जैसे **Cre-LoxP** और **FLP-FRT** इसी सिद्धांत पर आधारित हैं, जिनका प्रयोग जीन एडिटिंग और बायोटेक्नोलॉजी में किया जाता है।

□ 4. Illegitimate Recombination (अनियमित पुनर्संयोजन)

बहुत अच्छा □
अब हम **Illegitimate Recombination (अनियमित पुनर्संयोजन)** को **गहराई से (deeply)** और **सरल हिंदी में वैज्ञानिक तरीके से** समझते हैं।

□ Illegitimate Recombination क्या है?

Illegitimate Recombination (अनियमित या अवैध पुनर्संयोजन) वह प्रक्रिया है जिसमें **DNA के दो अणु या हिस्से** एक-दूसरे के साथ **बिना किसी समानता (homology)** या **विशिष्ट पुनर्संयोजन साइट (site)** के **जुड़ जाते हैं** या **अदल-बदल करते हैं**।

➡ **सरल शब्दों में:**
जब DNA के टुकड़े **यादृच्छिक (random)** रूप से और **बिना किसी समान अनुक्रम** के आपस में जुड़ जाते हैं, तो उसे **Illegitimate Recombination** कहा जाता है।

मुख्य विशेषताएँ (Key Features)

विशेषता	विवरण
DNA समानता आवश्यक?	नहीं
पुनर्संयोजन का स्थान	यादृच्छिक (random)
सटीकता (Accuracy)	बहुत कम (error-prone)
मुख्य परिणाम	Mutation, Gene duplication, Chromosomal rearrangement
एंज़ाइम शामिल	DNA Ligase, Endonuclease, Topoisomerase आदि

Illegitimate Recombination की परिभाषा (Scientific Definition)

यह वह पुनर्संयोजन है जिसमें **दो DNA अनुक्रमों** के बीच **बहुत कम या कोई भी समानता नहीं होती**,
और यह प्रायः DNA मरम्मत या प्रतिकृति (replication) की त्रुटियों के कारण होती है।

Illegitimate Recombination कब होती है?

1. जब **DNA में टूट (double-strand break)** हो जाती है।
2. जब **DNA replication fork** अटक जाता है या टूट जाता है।
3. जब **DNA मरम्मत एंज़ाइम** टूटे सिरों को गलत तरीके से जोड़ देते हैं।
4. जब **virus या transposon DNA** यादृच्छिक रूप से genome में जुड़ जाता है।

□ Illegitimate Recombination की संभावित परिस्थितियाँ

परिस्थिति	उदाहरण
Double-strand break के बाद गलत जोड़	Non-homologous end joining के दौरान गलत सिरे जुड़ना
Viral DNA का गलत Integration	HPV, HBV DNA का host genome में जुड़ना
Transposon insertion	Mobile DNA element का random स्थान पर जुड़ना
Chromosomal rearrangement	Translocation, Deletion, Inversion आदि

□ Illegitimate Recombination की प्रक्रिया (Mechanism)

Illegitimate recombination किसी विशेष अनुक्रम पर निर्भर नहीं होती।
यह मुख्यतः **DNA के टूटने और गलत जुड़ने (misrepair)** से होती है।

Step-by-Step प्रक्रिया:

1. **DNA Damage / Break (DNA में टूट)**
   – किसी कारण से DNA की स्ट्रैंड टूट जाती है (जैसे कि radiation, chemical mutagen)।
2. **Exonuclease Activity (DNA सिरों की सफाई)**
   – टूटे सिरों से कुछ न्यूक्लियोटाइड्स हट जाते हैं।
3. **DNA End Joining (गलत सिरों का जोड़)**
   – मरम्मत प्रणाली (जैसे DNA ligase) DNA के गलत सिरों को जोड़ देती है।
   – क्योंकि यहां homologous sequence नहीं होता, जोड़ **यादृच्छिक** होता है।
4. **Insertion or Rearrangement**
   – परिणामस्वरूप नए DNA टुकड़े **गलत स्थान** पर जुड़ जाते हैं।
   – इससे gene disruption, duplication या translocation हो सकता है।

□ Illegitimate Recombination के प्रमुख उदाहरण

उदाहरण	विवरण
1. Viral Integration	कुछ DNA viruses (HPV, HBV) host genome में किसी भी स्थान पर जुड़ जाते हैं। इससे cancer gene activate हो सकता है।

उदाहरण	विवरण
2. Transposon Movement	Transposons (jumping genes) बिना किसी समानता के किसी भी जगह genome में जुड़ सकते हैं।
3. Chromosomal Rearrangement	दो अलग-अलग क्रोमोसोम टूटकर आपस में जुड़ जाएँ → **translocation** (जैसे Burkitt lymphoma)।
4. Gene Amplification	किसी जीन के गलत जुड़ाव से उसकी कई copies बन सकती हैं।

□□ Illegitimate Recombination के परिणाम (Consequences)

परिणाम	विवरण
1. Mutation (म्यूटेशन)	गलत DNA जुड़ने से जीन का अनुक्रम बदल जाता है।
2. Gene Inactivation	किसी कार्यशील जीन के बीच में DNA जुड़ने से वह निष्क्रिय हो जाता है।
3. Chromosomal Rearrangement	DNA टुकड़ों के गलत जोड़ से deletion, inversion, या translocation हो सकती है।
4. Cancer Formation	Viral integration या oncogene activation से कैंसर हो सकता है।
5. Evolutionary Variation	कभी-कभी यह प्रक्रिया नई आनुवंशिक विविधता भी उत्पन्न करती है।

□ Illegitimate Recombination और रोग (Diseases Associated)

रोग	संबंधित प्रक्रिया
Burkitt's Lymphoma	Chromosomal translocation (c-myc gene)
HPV-mediated Cervical Cancer	HPV DNA का यादृच्छिक रूप से host genome में जुड़ना
Hepatocellular Carcinoma	HBV DNA का liver genome में integration
SCID (कुछ मामलों में)	DNA मरम्मत की गलत प्रक्रिया से gene disruption

---

□ Illegitimate Recombination में शामिल प्रमुख एंज़ाइम

एंज़ाइम	कार्य
DNA Ligase	DNA के सिरों को जोड़ता है (भले ही अनुक्रम समान न हो)
Endonuclease / Exonuclease	DNA को काटता या सिरों की सफाई करता है
DNA Polymerase	Missing nucleotides को भर सकता है

एंज़ाइम	कार्य
Topoisomerase	DNA के तनाव (supercoiling) को दूर करता है

□ Homologous vs Illegitimate Recombination तुलना

विशेषता	Homologous Recombination	Illegitimate Recombination
DNA समानता की आवश्यकता	हाँ (homologous sequences जरूरी)	नहीं
सटीकता (Accuracy)	बहुत सटीक	यादृच्छिक और त्रुटिपूर्ण
मुख्य उपयोग	DNA repair, meiosis में crossing-over	DNA rearrangements, viral integration
मुख्य एंज़ाइम	RecA, RAD51, BRCA1/2	Ligase, Endonuclease
परिणाम	Genetic diversity, stable repair	Mutation, translocation, cancer

---

□ Illegitimate Recombination का जैविक महत्व (Biological Importance)

लाभ	हानि
- कभी-कभी नए जीन संयोजन बनते हैं जो विकास (evolution) में योगदान करते हैं।	- गलत जोड़ से कैंसर, म्यूटेशन और क्रोमोसोमल असामान्यता होती है।
- Genetic engineering में कभी-कभी इसका उपयोग transgene insertion के लिए किया जाता है।	- DNA स्थिरता को खतरा होता है।

- **Illegitimate Recombination** वह DNA पुनर्संयोजन है जो **बिना किसी समानता या specific site** के होता है।
- यह प्रायः **DNA मरम्मत की त्रुटियों**, **viral integration**, या **transposon movement** के कारण होता है।
- यद्यपि यह अक्सर **mutations और कैंसर** जैसी समस्याएँ पैदा करता है, फिर भी कभी-कभी यह **आनुवंशिक विविधता और विकास** में सहायक हो सकता है।
- यह पुनर्संयोजन प्रकार **genome instability** का प्रमुख कारण भी माना जाता है।

Unit 3

□ Post-Transcriptional Modifications क्या हैं?

जब **DNA** से **RNA** बनता है, उस प्रक्रिया को **Transcription (प्रतिलेखन)** कहते हैं।
Transcription के बाद जो RNA बनता है, वह **Primary Transcript (या hnRNA / pre-mRNA)** कहलाता है।
लेकिन यह RNA सीधे प्रोटीन में नहीं बदलता — पहले इसके ऊपर कई प्रकार के **संशोधन (modifications)** किए जाते हैं ताकि यह **परिपक्व RNA (mature mRNA)** बन सके।

इन्हीं संशोधनों को **Post-Transcriptional Modifications** कहा जाता है।

□ मुख्य प्रकार के Post-Transcriptional Modifications

मुख्यतः तीन प्रकार के संशोधन होते हैं:

1. **5′ Capping (5 प्राइम कैपिंग)**
2. **Polyadenylation (Poly-A Tail जोड़ना)**
3. **RNA Splicing (स्प्लाइसिंग)**

इसके अलावा कुछ विशेष RNA (जैसे tRNA, rRNA) में **Base Modification** और **RNA Editing** भी देखी जाती है।

1□ 5′ Capping (5 प्राइम कैपिंग)

- यह प्रक्रिया RNA के **5′ (फाइव प्राइम)** छोर पर होती है।
- Transcription शुरू होने के थोड़ी देर बाद, जब RNA की लंबाई लगभग 20–30 न्यूक्लियोटाइड होती है, तब **Guanosine Triphosphate (GTP)** अणु उल्टा (inverted) जुड़ता है — जिसे **7-Methyl Guanosine Cap (m^{7}G cap)** कहते हैं।

महत्व:

- यह mRNA को **nuclease enzymes** द्वारा टूटने से बचाता है।

- यह mRNA को **राइबोसोम (ribosome)** द्वारा पहचानने में मदद करता है (translation के दौरान)।
- यह mRNA की **stability (स्थिरता)** बढ़ाता है।

---

2 Polyadenylation (Poly-A Tail जोड़ना)

- यह प्रक्रिया RNA के **3′ (थ्री प्राइम)** छोर पर होती है।
- सबसे पहले **AAUAAA** नामक एक विशेष अनुक्रम (signal sequence) पहचाना जाता है।
- इसके कुछ न्यूक्लियोटाइड बाद RNA काटा जाता है (cleavage)।
- फिर enzyme **Poly-A Polymerase** लगभग 100–250 **Adenine (A)** न्यूक्लियोटाइड जोड़ता है।

महत्व:

- यह mRNA को **degradation (विघटन)** से बचाता है।
- यह mRNA के **न्यूक्लियस से साइटोप्लाज्म में ट्रांसपोर्ट** में मदद करता है।
- यह translation को भी प्रभावित करता है (efficiency बढ़ाता है)।

---

3 RNA Splicing (स्प्लाइसिंग)

- Eukaryotic genes में coding और non-coding दोनों अनुक्रम होते हैं:
    - **Exons (एक्सॉन्स):** जो प्रोटीन कोड करते हैं
    - **Introns (इंट्रॉन्स):** जो प्रोटीन कोड नहीं करते

Splicing के दौरान:

- **Introns हटाए जाते हैं**
- **Exons आपस में जोड़ दिए जाते हैं**

यह प्रक्रिया **spliceosome** नामक RNA-Protein complex द्वारा की जाती है।

महत्व:

- केवल उपयोगी (coding) भागों को जोड़ा जाता है जिससे सही प्रोटीन बने।

- एक ही जीन से अलग-अलग प्रकार के mRNA बन सकते हैं — इसे **Alternative Splicing** कहते हैं (इससे एक जीन से कई प्रकार के प्रोटीन बन सकते हैं)।

□ अन्य Post-Transcriptional Modifications

a) RNA Editing

- कुछ RNA अणुओं में न्यूक्लियोटाइड्स के रासायनिक परिवर्तन होते हैं (जैसे Cytidine → Uridine)।
- इससे mRNA का कोड बदल सकता है, जिससे अलग प्रोटीन बन सकता है।

b) Base Modification (tRNA और rRNA में)

- tRNA और rRNA में कुछ न्यूक्लियोटाइड्स methylation या pseudouridylation जैसे परिवर्तन से गुजरते हैं।
- इससे उनकी संरचना स्थिर होती है और कार्य क्षमता बढ़ती है।

□□ संक्षेप में (Summary Table)

संशोधन	स्थान	एंजाइम / प्रक्रिया	कार्य
5′ Capping	5′ छोर	Guanylyl Transferase, Methyl Transferase	सुरक्षा, translation में सहायता
Poly-A Tail	3′ छोर	Poly-A Polymerase	स्थिरता, ट्रांसपोर्ट
Splicing	मध्य भाग	Spliceosome	Introns हटाना, Exons जोड़ना
RNA Editing	पूरे RNA में	Deaminase enzymes	Coding बदलना
Base Modification	tRNA, rRNA	Methylase आदि	संरचनात्मक स्थिरता

Post-Transcriptional Modifications RNA को परिपक्व, स्थिर और translation के लिए तैयार बनाते हैं। यदि ये संशोधन न हों, तो RNA अस्थिर रहेगा, जल्दी नष्ट हो जाएगा और सही प्रोटीन नहीं बन पाएगा।

□ RNA Editing क्या है?

RNA Editing (आरएनए सम्पादन) एक ऐसी **पोस्ट-ट्रांसक्रिप्शनल प्रक्रिया (post-transcriptional modification)** है जिसमें **mRNA, tRNA, या rRNA** के **न्यूक्लियोटाइड अनुक्रम** (sequence) में **परिवर्तन (changes)** किए जाते हैं, **ट्रांसक्रिप्शन के बाद** लेकिन **translation से पहले**।

यानी DNA से जो RNA ट्रांसक्राइब हुआ था, उसका अनुक्रम (sequence) एडिटिंग के बाद वैसा नहीं रहता जैसा DNA में था।

यह एडिटिंग **बेस परिवर्तन (base modification)**, **न्यूक्लियोटाइड जोड़ने (insertion)** या **हटाने (deletion)** के रूप में हो सकती है।

□□ RNA Editing की आवश्यकता क्यों पड़ती है?

RNA Editing का मुख्य उद्देश्य है:

1. **प्रोटीन विविधता (Protein Diversity)** बढ़ाना — एक ही जीन से कई प्रकार के प्रोटीन बन सकते हैं।
2. **Functional Adjustment** — कभी-कभी एडिटिंग से बना प्रोटीन विशेष ऊतकों (tissues) में अलग कार्य करता है।
3. **Correction Mechanism** — कुछ जीवों में DNA अनुक्रम अपूर्ण होता है, तो एडिटिंग से उसे कार्यात्मक RNA में बदला जाता है।

□ RNA Editing के प्रकार

RNA Editing के दो मुख्य प्रकार माने जाते हैं:

1□ Substitution Editing (बेस परिवर्तन एडिटिंग)

इसमें RNA के किसी एक न्यूक्लियोटाइड बेस को दूसरे बेस में **रासायनिक रूप से बदला** जाता है।

मुख्य दो प्रकार के Substitution Editing:

प्रकार	परिवर्तन	एंजाइम	उदाहरण

प्रकार	परिवर्तन	एंजाइम	उदाहरण
C → U Editing	Cytidine (C) → Uridine (U)	Cytidine Deaminase	APOB जीन का mRNA (मनुष्य में)
A → I Editing	Adenosine (A) → Inosine (I)	Adenosine Deaminase (ADAR)	Glutamate receptor mRNA (मस्तिष्क में)

🔹 *1. C → U Editing (Cytidine Deamination)*

- यह एडिटिंग **Cytidine Deaminase** enzyme द्वारा की जाती है।
- Cytidine (C) को Uridine (U) में बदल दिया जाता है।
- इसका सबसे प्रसिद्ध उदाहरण **ApoB gene** है:
  - **ApoB-100** (लिवर में) — बिना एडिटिंग वाला प्रोटीन
  - **ApoB-48** (आंत में) — एडिटिंग के कारण स्टॉप कोडॉन बन जाता है और छोटा प्रोटीन बनता है

यानी RNA एडिटिंग के कारण एक ही जीन से दो अलग प्रोटीन बनते हैं।

🔹 *2. A → I Editing (Adenosine Deamination)*

- यह एडिटिंग **ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA)** एंजाइम द्वारा की जाती है।
- Adenosine (A) को **Inosine (I)** में बदल दिया जाता है।
- Translation के दौरान राइबोसोम **Inosine को Guanosine (G)** की तरह पढ़ता है।

महत्व:

- यह एडिटिंग **न्यूरॉन्स (neurons)** में बहुत आम है।
- इससे **आयॉन चैनल (ion channel)** और **न्यूरोट्रांसमीटर रिसेप्टर्स** की activity बदल जाती है।
- यह **ब्रेन फंक्शन, सीखने और याददाश्त** से जुड़ी होती है।

---

2 Insertion / Deletion Editing (न्यूक्लियोटाइड जोड़ना या हटाना)

इस प्रकार की एडिटिंग में RNA के अनुक्रम में **कुछ न्यूक्लियोटाइड्स जोड़े या हटाए** जाते हैं।
यह आमतौर पर **माइटोकॉन्ड्रिया (mitochondria)** और **प्रोटोजोआ (protozoa)** जैसे जीवों में पाया जाता है।

🔹 *उदाहरण: Trypanosoma (परजीवी प्रोटोजोआ)*

- इसके माइटोकॉन्ड्रियल RNA में कई जगह **U न्यूक्लियोटाइड्स** जोड़े जाते हैं।
- यह कार्य **Guide RNA (gRNA)** की मदद से होता है।
- gRNA, mRNA से complementary होता है और एडिटिंग का मार्गदर्शन करता है।

Mechanism:

1. gRNA mRNA से जुड़ता है।
2. जहां mismatch होता है, वहां U न्यूक्लियोटाइड जोड़े जाते हैं या हटाए जाते हैं।
3. इससे functional mRNA बनता है।

यह एडिटिंग इतनी बड़ी हो सकती है कि mRNA का पूरा sequence DNA से अलग हो जाता है।

🧬 RNA Editing के प्रमुख Enzymes

एंजाइम	कार्य	उदाहरण
Cytidine Deaminase	C → U परिवर्तन	ApoB mRNA
ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA)	A → I परिवर्तन	Glutamate receptor RNA
gRNA Complex (Guide RNA)	U जोड़ना / हटाना	Trypanosoma mitochondria

---

🧠 RNA Editing के जैविक महत्व

1. **प्रोटीन विविधता (Protein Diversity)** — एक ही जीन से कई प्रकार के प्रोटीन बन सकते हैं।
2. **ऊतक-विशिष्टता (Tissue Specificity)** — कुछ ऊतकों में एडिटिंग होती है, कुछ में नहीं।
3. **नियमन (Regulation)** — एडिटिंग से gene expression को नियंत्रित किया जा सकता है।
4. **विकासीय महत्व (Evolutionary Significance)** — RNA एडिटिंग से जीवों में जटिलता और अनुकूलन बढ़ता है।
5. **रोगों से सम्बन्ध (Disease Relation)** —

- गलत एडिटिंग से **neurological disorders**,
- **cancer**, और
- **metabolic diseases** हो सकती हैं।

□ सारांश तालिका (Summary Table)

प्रकार	परिवर्तन	उदाहरण	एंजाइम	महत्व
C → U Editing	Cytidine → Uridine	ApoB mRNA	Cytidine Deaminase	अलग-अलग प्रोटीन रूप
A → I Editing	Adenosine → Inosine	Glutamate receptor RNA	ADAR	न्यूरल फंक्शन
Insertion / Deletion	U न्यूक्लियोटाइड जोड़ना या हटाना	Trypanosoma mRNA	gRNA Complex	Functional mRNA बनना

RNA Editing एक अत्यंत महत्वपूर्ण प्रक्रिया है जो **DNA से सीधे प्राप्त सूचना को बदल सकती है**, जिससे **mRNA का कोड** और **प्रोटीन की प्रकृति** दोनों बदल जाते हैं।
यह **जीन अभिव्यक्ति (gene expression)** को अधिक लचीला बनाती है और **प्रोटीन विविधता** तथा **विकासीय अनुकूलन** में योगदान देती है।

□ mRNA का Nuclear Export (नाभिकीय निकास)

□ परिचय (Introduction)

Eukaryotic (यूकेरियोटिक) कोशिकाओं में जीन का ट्रांसक्रिप्शन (DNA से RNA बनना) **न्यूक्लियस (nucleus)** के अंदर होता है,
जबकि **ट्रांसलेशन (translation)** यानी प्रोटीन का निर्माण **साइटोप्लाज़्म (cytoplasm)** में होता है।

इसलिए न्यूक्लियस में बने **mRNA** को **साइटोप्लाज़्म तक पहुँचाया जाता है**,
जहाँ यह **राइबोसोम (ribosome)** से जुड़कर प्रोटीन संश्लेषण करता है।

इस पूरी प्रक्रिया को कहते हैं
"Nuclear Export of mRNA"
(यानि mRNA का न्यूक्लियस से साइटोप्लाज्म की ओर निर्यात।)

---

mRNA Export की आवश्यकता क्यों होती है?

- न्यूक्लियस में बना mRNA **translation नहीं कर सकता**।
- केवल साइटोप्लाज्म में मौजूद राइबोसोम ही mRNA को पढ़ सकते हैं।
- इसलिए mRNA को न्यूक्लियर झिल्ली (nuclear membrane) से **गुजरना पड़ता है।**

---

mRNA के Nuclear Export की प्रक्रिया (Steps of mRNA Export)

---

1 mRNA का पूर्ण प्रोसेस होना (Processing Completion)

mRNA के export से पहले उसका **maturation** (परिपक्व होना) पूरा होना आवश्यक है:

- **5′ Cap** लग चुकी हो
- **Splicing** पूरी हो चुकी हो (Introns हटे हों, Exons जुड़े हों)
- **3′ Poly-A tail** जुड़ चुकी हो

केवल "**Mature mRNA**" को ही न्यूक्लियस से बाहर जाने की अनुमति मिलती है।
अधूरा या गलत RNA न्यूक्लियस के अंदर ही रोक लिया जाता है।

---

2 mRNP (Messenger Ribonucleoprotein Complex) का निर्माण

- Mature mRNA अकेला नहीं निकलता।

- यह कई **RNA-binding proteins** से मिलकर एक **mRNP complex** बनाता है।
- ये प्रोटीन mRNA को **सुरक्षा** और **दिशा-निर्देशन (guidance)** प्रदान करते हैं।

---

3 Export Factors का जुड़ना

- mRNP से **Export Receptors (Transport Proteins)** जुड़ते हैं, जैसे:
  - **NXF1 (Nuclear Export Factor 1)**
  - **NXT1 (Nuclear Transport Factor 1)**
- ये दोनों मिलकर mRNA को **Nuclear Pore Complex (NPC)** तक ले जाते हैं।

---

4 Nuclear Pore Complex (NPC) के माध्यम से पारगमन

- न्यूक्लियर झिल्ली में हजारों **Nuclear Pore Complexes (NPCs)** होते हैं।
- ये प्रोटीन चैनल होते हैं जिनसे RNA और प्रोटीन का नियंत्रित आदान-प्रदान होता है।
- mRNP, Export Factors की मदद से NPC के माध्यम से साइटोप्लाज्म में निकल जाता है।

---

5 Cytoplasm में पहुँचने पर mRNA का रिलीज़ होना

- Cytoplasm में आने के बाद Export Factors mRNA से अलग हो जाते हैं।
- अब mRNA अनावश्यक प्रोटीनों से मुक्त होकर **translation (प्रोटीन निर्माण)** के लिए तैयार हो जाता है।

Nuclear Export में Quality Control System

- कोशिका यह सुनिश्चित करती है कि **केवल सही और परिपक्व mRNA ही बाहर निकले।**
- यदि mRNA में कोई गलती (जैसे intron शेष रह गया हो, cap न लगी हो आदि) हो,
  तो ऐसे RNA को **न्यूक्लियस में ही रोक लिया जाता है** और बाद में **degrade (विघटित)** कर दिया जाता है।

यह प्रणाली जीन अभिव्यक्ति की शुद्धता (accuracy) बनाए रखती है।

□ मुख्य घटक (Major Components of mRNA Export)

घटक (Component)	कार्य (Function)
mRNP (Messenger Ribonucleoprotein)	mRNA को स्थिर बनाना और export के लिए तैयार करना
NXF1 / NXT1	Export receptors — mRNA को Nuclear Pore तक ले जाते हैं
Nuclear Pore Complex (NPC)	न्यूक्लियस और साइटोप्लाज्म के बीच मार्ग
RNA-binding Proteins	mRNA की पहचान और सुरक्षा में मदद करते हैं
ATP / GTP Energy	Transport के लिए ऊर्जा प्रदान करते हैं

□ mRNA Export का जैविक महत्व (Biological Significance)

1. **Gene Expression का नियंत्रण:**
   - यह तय करता है कि कौन-सा mRNA translation के लिए उपलब्ध होगा।
2. **Protein Synthesis की तैयारी:**
   - Cytoplasm में पहुँचने के बाद ही mRNA से प्रोटीन बन सकते हैं।
3. **Quality Control:**
   - केवल सही तरीके से processed mRNA ही बाहर जा सकता है।
4. **विकासीय महत्व (Evolutionary Importance):**
   - Nuclear-cytoplasmic विभाजन से gene regulation अधिक परिष्कृत हुआ।

□ सारांश (Summary Table)

चरण	विवरण	मुख्य प्रोटीन / घटक
1	mRNA processing का पूर्ण होना	Cap, Tail, Splicing
2	mRNP complex का निर्माण	RNA-binding proteins
3	Export factors का जुड़ना	NXF1, NXT1

चरण	विवरण	मुख्य प्रोटीन / घटक
4	Nuclear pore से गुजरना	NPC
5	Cytoplasm में रिलीज़	Translation प्रारंभ

---

mRNA का Nuclear Export यूकेरियोटिक कोशिका में एक अत्यंत महत्वपूर्ण प्रक्रिया है,
जो यह सुनिश्चित करती है कि केवल **सही और परिपक्व mRNA** ही न्यूक्लियस से बाहर जाकर **प्रोटीन निर्माण** के लिए उपयोग में आए।

यह प्रक्रिया **Gene Expression Regulation** का एक अनिवार्य चरण है,
जो कोशिका की कार्यक्षमता और जीवन के संतुलन को बनाए रखती है।

⍰ mRNA Stability (mRNA की स्थिरता)

□ परिचय (Introduction)

mRNA Stability का अर्थ है —
mRNA अणु **कितनी देर तक जीवित (stable)** रहता है और translation के लिए उपलब्ध रहता है,
इससे पहले कि वह **degrade (टूट)** जाए।

दूसरे शब्दों में,

mRNA की स्थिरता यह तय करती है कि किसी जीन से **कितनी मात्रा में प्रोटीन** बनेगा और **कितनी देर तक** बनेगा।

□□ mRNA Stability का महत्व

1. **Gene expression का नियंत्रण (Regulation of Gene Expression)**
   – स्थिर mRNA लंबे समय तक translation कर सकता है → अधिक प्रोटीन बनेगा।
   – अस्थिर mRNA जल्दी degrade होगा → कम प्रोटीन बनेगा।

2. **प्रोटीन संश्लेषण की मात्रा नियंत्रित करना**
   – कोशिका अपनी आवश्यकताओं के अनुसार mRNA की उम्र को बढ़ा या घटा सकती है।
3. **विकास और रोगों में भूमिका**
   – असामान्य स्थिरता से कई बीमारियाँ (जैसे कैंसर, न्यूरोलॉजिकल विकार) उत्पन्न हो सकती हैं।

□ mRNA Stability को प्रभावित करने वाले मुख्य कारक

1□ 5′ Cap की उपस्थिति

- mRNA के 5′ छोर पर **7-Methyl Guanosine Cap (m^7G Cap)** जुड़ी होती है।
- यह Cap mRNA को **5′ exonuclease enzymes** द्वारा टूटने से बचाती है।
- जब यह Cap हटाई जाती है (decapping), mRNA अस्थिर होकर degrade हो जाता है।

□ **निष्कर्ष:**

5′ Cap की उपस्थिति = अधिक स्थिरता

5′ Cap हटना = mRNA का विघटन शुरू

2□ 3′ Poly-A Tail की लंबाई

- Polyadenylation के दौरान mRNA के 3′ छोर पर **Poly-A Tail (100–250 Adenine)** जोड़ी जाती है।
- यह Tail mRNA को exonucleases से बचाती है और स्थिरता बढ़ाती है।
- जब यह Tail धीरे-धीरे छोटी होती जाती है (deadenylation), तो mRNA अस्थिर होकर टूटने लगता है।

□ **Tail जितनी लंबी होगी → mRNA उतना अधिक स्थिर होगा।**

3□ UTR (Untranslated Regions) के Sequence Motifs

- mRNA के 5′ और 3′ सिरों पर **Untranslated Regions (UTRs)** होती हैं।
- इन UTRs में विशेष **signal sequences** होते हैं जो mRNA की stability को नियंत्रित करते हैं।

उदाहरण:

- **AU-rich elements (AREs)** – ये अस्थिरता बढ़ाते हैं।
  (जैसे cytokine और growth factor mRNA में)
- **Stabilizing sequences** – ये mRNA को अधिक समय तक स्थिर रखते हैं।

---

4 RNA-Binding Proteins (RBPs)

- कुछ प्रोटीन mRNA के UTRs से जुड़कर उसकी उम्र को बढ़ाते या घटाते हैं।

प्रोटीन	कार्य
HuR	mRNA को stabilize करता है
AUF1	mRNA को degrade करता है
TTP (Tristetraprolin)	AU-rich mRNA को तोड़ता है

 ये प्रोटीन कोशिका में विभिन्न परिस्थितियों (जैसे तनाव, संक्रमण, वृद्धि) के अनुसार कार्य करते हैं।

---

5 MicroRNAs (miRNAs) और siRNAs

- ये छोटे regulatory RNA अणु हैं (~22 nt लंबाई के)।
- ये mRNA के complementary sequence से जुड़ते हैं।
- जुड़ने के बाद वे translation को रोकते हैं या mRNA को degrade कर देते हैं।

इस प्रक्रिया को **RNA Interference (RNAi)** कहते हैं।

 इस तरह miRNA और siRNA gene expression को *post-transcriptional level* पर नियंत्रित करते हैं।

---

6 Translation Activity

- जो mRNA **सक्रिय रूप से translation** में भाग लेते हैं (ribosome से जुड़े होते हैं), वे अधिक स्थिर रहते हैं।

- जबकि जो mRNA translation नहीं कर रहे, वे जल्दी degrade हो जाते हैं।

Translation machinery mRNA को nucleases से बचाती है।

7️⃣ Cellular Conditions (कोशिकीय परिस्थितियाँ)

- Stress, हार्मोन, तापमान, संक्रमण आदि mRNA की स्थिरता को प्रभावित कर सकते हैं।
- जैसे heat shock या oxidative stress के दौरान कुछ mRNAs की स्थिरता बढ़ जाती है ताकि कोशिका जीवित रह सके।

🧬 mRNA Degradation (mRNA का विघटन) के मार्ग

mRNA टूटने के तीन मुख्य मार्ग होते हैं 👇

1️⃣ Deadenylation-dependent decay

- Poly-A tail धीरे-धीरे छोटी होती जाती है।
- Tail बहुत छोटी होने पर mRNA अस्थिर हो जाता है।
- फिर दो संभावनाएँ होती हैं:
    - **5′ → 3′ degradation** (decapping के बाद exonuclease तोड़ता है)
    - **3′ → 5′ degradation** (exosome complex तोड़ता है)

2️⃣ Decapping Pathway

- पहले 5′ Cap हटा दी जाती है (Dcp1, Dcp2 enzymes द्वारा)।
- इसके बाद 5′ → 3′ दिशा में mRNA degrade होता है (Xrn1 enzyme द्वारा)।

3️⃣ Endonucleolytic Cleavage

- कुछ mRNAs को बीच से काटा जाता है (endonuclease enzymes द्वारा)।
- फिर बने हुए टुकड़े exonucleases से degrade हो जाते हैं।
- यह तरीका miRNA-mediated cleavage में भी देखा जाता है।

□ mRNA Stability का जैविक महत्व (Biological Significance)

महत्व	विवरण
Gene expression का नियंत्रण	mRNA का जीवनकाल तय करता है कि जीन कितनी देर तक सक्रिय रहेगा
Protein synthesis का नियमन	स्थिर mRNA → अधिक प्रोटीन उत्पादन
पर्यावरणीय प्रतिक्रिया	Stress और hormonal signals से mRNA stability बदल सकती है
रोगों में भूमिका	Abnormal mRNA stability → कैंसर, सूजन, metabolic disorders

---

□ सारांश (Summary Table)

कारक	प्रभाव	उदाहरण / तंत्र
5′ Cap	mRNA को exonuclease से बचाता है	Cap हटने पर degradation
Poly-A Tail	स्थिरता बढ़ाता है	Tail घटने पर अस्थिरता
AU-rich Elements	अस्थिरता बढ़ाते हैं	Cytokine mRNA
RNA-binding Proteins	स्थिरता या अस्थिरता दोनों	HuR, AUF1
miRNA Binding	Translation को रोकता या degrade करता है	RNA interference
Translation Activity	Stability बढ़ती है	Polysome-associated mRNA

□ निष्कर्ष (Conclusion)

mRNA Stability कोशिका के **जीन अभिव्यक्ति नियंत्रण (Gene Expression Regulation)** का एक महत्वपूर्ण अंग है।
यह तय करती है कि mRNA कितनी देर तक translation के लिए उपलब्ध रहेगा और कितनी मात्रा में प्रोटीन बनेगा।

यदि mRNA स्थिर है → अधिक प्रोटीन बनेगा।
यदि mRNA अस्थिर है → कम या बिल्कुल नहीं बनेगा।

इस प्रकार, mRNA स्थिरता कोशिका के विकास, नियंत्रण और अनुकूलन (adaptation) में अत्यंत महत्वपूर्ण भूमिका निभाती है।

⍰ Catalytic RNA (उत्प्रेरक RNA)

□ परिचय (Introduction)

आम तौर पर हम जानते हैं कि जैविक अभिक्रियाओं (biochemical reactions) में **enzyme** के रूप में **प्रोटीन** कार्य करते हैं।
लेकिन 1980 के दशक में वैज्ञानिकों ने पाया कि **कुछ RNA अणु भी स्वयं रासायनिक अभिक्रियाओं को उत्प्रेरित (catalyze)** कर सकते हैं।

ऐसे RNA अणु जिन्हें **enzymatic activity** होती है, उन्हें कहा जाता है □ **Catalytic RNA** या **Ribozyme (राइबोज़ाइम)**।

□ Catalytic RNA की खोज (Discovery)

Catalytic RNA की खोज 1980 के दशक में दो प्रमुख वैज्ञानिकों ने की:

1. **Thomas Cech (थॉमस सेच)** — *Tetrahymena thermophila* नामक प्रोटोजोआ के rRNA में self-splicing RNA पाया।
2. **Sidney Altman (सिडनी ऑल्टमैन)** — *RNase P* एंजाइम में RNA घटक को catalytic पाया।

इन दोनों को इस खोज के लिए **1989 में नोबेल पुरस्कार (Nobel Prize in Chemistry)** मिला।

□□ Catalytic RNA क्या करता है?

Catalytic RNA (Ribozyme) ऐसे RNA अणु हैं जो **रासायनिक अभिक्रियाओं को तेज़ (Catalyze)** करते हैं —
जैसे:

- RNA को काटना (cleavage)
- RNA को जोड़ना (ligation)
- Splicing (Introns निकालना)
- Peptide bond बनाना (Translation के दौरान)

ये कार्य आम तौर पर प्रोटीन एंजाइम करते हैं, लेकिन कुछ RNA स्वयं भी यह कर सकते हैं।

□ Catalytic RNA की प्रमुख विशेषताएँ (Key Features)

विशेषता	विवरण
संरचना (Structure)	एकल-सूत्रीय RNA (single-stranded RNA) जो जटिल 3D संरचना बनाता है
कार्य (Function)	RNA को काटना, जोड़ना, या ट्रांसफर RNA को process करना
सक्रिय स्थल (Active Site)	RNA का वह हिस्सा जो अभिक्रिया को catalyze करता है
धातु आयन की भूमिका	Mg^{2+} जैसे आयन संरचना स्थिर करते हैं और अभिक्रिया में सहायक होते हैं
स्वयं-संचालित (Self-catalytic)	कुछ RNA अपने ही sequence पर कार्य कर सकते हैं (self-splicing)

□ Catalytic RNA के प्रकार (Types of Ribozymes)

Catalytic RNA कई प्रकार के होते हैं, जिन्हें उनके कार्य के आधार पर बाँटा गया है □

---

1 Group I Introns

- ये RNA **self-splicing** होते हैं — यानी अपने ही अंदर के introns को बिना किसी प्रोटीन की मदद के निकाल देते हैं।
- **Guanosine nucleotide** इस प्रक्रिया की शुरुआत करता है।
- खोज: *Tetrahymena thermophila* (थॉमस सेच द्वारा)

 कार्य: RNA Splicing (Introns हटाना, Exons जोड़ना)

---

2 Group II Introns

- ये भी **self-splicing RNA** हैं लेकिन **Lariat (फंदा जैसी)** संरचना बनाते हैं।
- ये यूकेरियोट्स में **pre-mRNA splicing** के समान हैं।
- माना जाता है कि **spliceosome machinery** का विकास इन्हीं से हुआ है।

---

3 RNase P RNA

- यह एक **ribonucleoprotein complex** है (RNA + Protein)।
- इसका RNA हिस्सा **tRNA precursors** को काटने का कार्य करता है (catalytic होता है)।
- खोज: **Sidney Altman** द्वारा।

 कार्य: tRNA के maturation में मदद।

---

4 Hammerhead Ribozyme

- यह RNA विशेष **motif** रखता है जो RNA को **cleave (काट)** सकता है।
- बहुत छोटे ribozymes होते हैं।
- कुछ वायरसों और viroids में पाए जाते हैं।

 कार्य: RNA replication और gene regulation में।

---

5 Hairpin Ribozyme

- यह RNA को **cut और ligate** (जोड़) दोनों कर सकता है।
- मुख्यतः **plant virus satellites** में पाया जाता है।

---

6 Peptidyl Transferase Ribozyme

- यह **ribosome** का एक हिस्सा है — विशेषकर **rRNA**।
- यह translation के दौरान **peptide bond formation** को catalyze करता है।
- यह RNA आधारित catalytic क्रिया का एक शानदार उदाहरण है।

 यह बताता है कि **ribosome स्वयं एक ribozyme है।**

Catalytic RNA के कार्य (Functions of Ribozymes)

कार्य	विवरण
RNA Splicing	Introns हटाकर Exons को जोड़ना
RNA Cleavage	RNA को काटना (जैसे hammerhead ribozyme करता है)
RNA Ligation	RNA टुकड़ों को जोड़ना
Peptide Bond Formation	राइबोसोम द्वारा किया गया कार्य (rRNA catalyzes peptide bond)
RNA Processing	tRNA को mature करना (RNase P द्वारा)

Catalytic RNA का महत्व (Significance)

1. **RNA World Hypothesis का समर्थन**
   – यह सिद्ध करता है कि प्राचीन जीवन में RNA ही genetic material और catalyst दोनों था।
2. **Enzyme Evolution की समझ**
   – यह बताता है कि protein enzymes से पहले RNA-based enzymes थे।

3. **Biotechnology और Gene Therapy में उपयोग**
   – Ribozymes को **targeted RNA cleavage** के लिए प्रयोग किया जा सकता है (वायरस RNA को काटने में)।
4. **Ribosome की catalytic भूमिका का प्रमाण**
   – Ribosome का RNA हिस्सा ही peptide bond बनाता है, न कि उसका protein भाग।

□ उदाहरण सारांश (Summary Table)

प्रकार	कार्य	उदाहरण	खोजकर्ता
Group I Intron	Self-splicing	Tetrahymena rRNA	Thomas Cech
Group II Intron	Self-splicing	Mitochondrial RNA	—
RNase P RNA	tRNA maturation	Bacterial RNase P	Sidney Altman
Hammerhead Ribozyme	RNA cleavage	Viroids	—
Hairpin Ribozyme	RNA ligation/cleavage	Plant virus satellites	—
Peptidyl Transferase Ribozyme	Peptide bond formation	Ribosome (rRNA)	—

Catalytic RNA (Ribozyme) यह प्रमाण है कि **RNA केवल genetic material नहीं, बल्कि enzyme की तरह catalytic भूमिका भी निभा सकता है।**
इससे यह विचार बल मिलता है कि जीवन की शुरुआत में RNA ही सबसे पहले *self-replicating और catalytic* अणु था —
जिसे कहते हैं □ **RNA World Hypothesis**।

□ "Every cell carries in its ribosomes the living proof that RNA can act as an enzyme."

□ RNA Splicing (आरएनए स्प्लाइसिंग)

□ परिचय (Introduction)

जब **DNA** से **pre-mRNA (या hnRNA)** बनता है,
तो उसमें दो प्रकार के अनुक्रम (sequences) होते हैं:

1. **Exons (एक्सॉन्स)** → जो **प्रोटीन को कोड करते हैं** (coding regions)
2. **Introns (इंट्रॉन्स)** → जो **प्रोटीन को कोड नहीं करते** (non-coding regions)

RNA Splicing वह प्रक्रिया है जिसमें —

Introns (अप्रासंगिक भाग) को **निकाल दिया जाता है**,
और **Exons (महत्वपूर्ण भाग)** को आपस में जोड़ दिया जाता है,
ताकि एक **परिपक्व mRNA (mature mRNA)** बन सके, जो translation के लिए तैयार हो।

□□ कहां होती है (Location)

- RNA Splicing केवल **Eukaryotic cells (सुसंगठित कोशिकाओं)** में होती है।
- यह प्रक्रिया **न्यूक्लियस (nucleus)** के अंदर होती है, transcription के तुरंत बाद।

□ Splicing की आवश्यकता क्यों है?

- DNA में मौजूद **introns** प्रोटीन कोड नहीं करते।
- यदि ये हटाए न जाएँ, तो translation के दौरान गलत (non-functional) प्रोटीन बन जाएगा।
- इसलिए RNA से introns हटाकर सही coding sequence बनाया जाता है।

□ RNA Splicing की प्रक्रिया (Mechanism of Splicing)

RNA splicing के दो प्रमुख प्रकार हैं:
1□ **$pliceosomal Splicing (स्प्लाइसोजोम द्वारा)**
2□ **$elf-Splicing (स्वतः-स्प्लाइसिंग)**

---

1 Spliceosomal Splicing

यह **अधिकांश eukaryotic genes** में होता है।
इसमें एक बड़ा RNA-Protein Complex शामिल होता है जिसे कहते हैं **Spliceosome (स्प्लाइसोजोम)**।

Spliceosome क्या है?

- यह एक विशाल molecular complex है जो RNA को पहचानकर introns निकालता है।
- इसमें पाँच छोटे RNA और कई प्रोटीन होते हैं।
- ये छोटे RNA कहलाते हैं **snRNA (small nuclear RNA)**
  और प्रोटीन के साथ मिलकर बनाते हैं **snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins)**।

मुख्य snRNPs:
U1, U2, U4, U5, U6

Splicing के चरण (Steps of Splicing)

(Step 1) Recognition (पहचान)

- U1 snRNP mRNA के **5′ splice site (GU sequence)** को पहचानता है।
- U2 snRNP **branch point (A nucleotide)** से जुड़ता है।

(Step 2) Complex Formation

- U4, U5, U6 snRNPs जुड़कर एक **complete spliceosome** बनाते हैं।

(Step 3) Cleavage and Lariat Formation (काटना और फंदा बनना)

- mRNA का पहला exon और intron के बीच का बंधन टूट जाता है।
- Intronic region का 5′ छोर **branch point A** से जुड़ जाता है, जिससे एक **लैरिएट (lariat loop)** संरचना बनती है।

(Step 4) Exon Joining (जोड़ना)

- दूसरा exon पहले exon से जुड़ जाता है।
- Intronic lariat को spliceosome निकाल देता है और बाद में degrade कर दिया जाता है।

परिणाम: एक **continuous coding mRNA sequence** तैयार होता है।

---

2 Self-Splicing RNA

कुछ RNA स्वयं ही अपने introns निकाल सकते हैं —
बिना किसी spliceosome या प्रोटीन की सहायता के।

इनमें दो प्रकार शामिल हैं:

- **Group I Introns**
- **Group II Introns**

Group I Introns

- Guanosine nucleotide की सहायता से स्प्लाइसिंग करते हैं।
- *Tetrahymena thermophila* में खोजे गए (Thomas Cech द्वारा)।

Group II Introns

- "Lariat" संरचना बनाकर स्वयं स्प्लाइस होते हैं।
- माना जाता है कि spliceosome इन्हीं से विकसित हुआ।

Alternative Splicing (वैकल्पिक स्प्लाइसिंग)

यह RNA Splicing की एक विशेष प्रक्रिया है जहाँ **एक ही pre-mRNA** से **विभिन्न प्रकार के mRNA** बन सकते हैं।

कैसे?

- सभी exons को जोड़ने के बजाय, कोशिका कुछ exons को **शामिल या हटाती** है।
- इससे एक ही जीन से **कई प्रकार के प्रोटीन** बन सकते हैं।

उदाहरण:

- मानव का **Tropomyosin gene** → अलग-अलग ऊतकों में अलग-अलग रूप के प्रोटीन बनाता है।
- **Immunoglobulin genes** में भी alternative splicing आम है।

महत्व:

- Protein diversity (विविधता) बढ़ाता है।
- सीमित संख्या के जीनों से अनगिनत प्रोटीन बनाए जा सकते हैं।

□ Splicing के अनुक्रम संकेत (Splicing Signals)

प्रत्येक intron के दोनों सिरों पर विशेष **consensus sequences** होती हैं □

स्थान	अनुक्रम (Sequence)	भूमिका
5′ splice site	**GU**	Splicing की शुरुआत
Branch point	**A** (Adenine)	Lariat बनाना
3′ splice site	**AG**	Splicing समाप्ति

इसलिए introns को कभी-कभी "GU–AG introns" भी कहा जाता है।

□□ Splicing का जैविक महत्व (Biological Importance)

महत्व	विवरण
Gene Expression Control	केवल mature mRNA ही translation के लिए तैयार होता है।
Protein Diversity	Alternative splicing से अनेक प्रकार के प्रोटीन बनते हैं।
Mutation Effects	गलत स्प्लाइसिंग से कई आनुवंशिक रोग (जैसे थैलेसीमिया) हो सकते हैं।
Evolutionary Advantage	Exon shuffling से नए प्रोटीन डोमेन विकसित होते हैं।

□ सारांश तालिका (Summary Table)

चरण	विवरण	घटक
1	5′ और 3′ splice site पहचान	U1, U2 snRNPs
2	Spliceosome का निर्माण	U1–U6 snRNPs
3	Lariat संरचना बनना	Branch-point A
4	Exons का जुड़ना	RNA ligase activity
5	Introns का हटना	Degradation

RNA Splicing एक अत्यंत महत्वपूर्ण **Post-Transcriptional Modification** है,
जो यह सुनिश्चित करती है कि केवल **coding sequence (exons)** ही mRNA में बने रहें।
यह न केवल gene expression को नियंत्रित करती है,
बल्कि **alternative splicing** के माध्यम से प्रोटीन विविधता और विकास (evolution) में भी महत्वपूर्ण भूमिका निभाती है।

 "Splicing is the molecular editor that turns raw RNA into a meaningful genetic message."

? Nuclear Splicing (न्यूक्लियर स्प्लाइसिंग)

परिचय (Introduction)

जब **eukaryotic cells (सुसंगठित कोशिकाएँ)** में DNA से **pre-mRNA** (जिसे **hnRNA** भी कहते हैं) बनता है,
तो उसमें **Exons (coding sequences)** और **Introns (non-coding sequences)** दोनों मौजूद होते हैं।

 Nuclear splicing वह प्रक्रिया है जिसमें:

Pre-mRNA से **Introns (अनावश्यक अनुक्रम)** हटाए जाते हैं
और **Exons (प्रोटीन कोडिंग भाग)** आपस में जोड़ दिए जाते हैं
ताकि **mature mRNA** बने, जो फिर **न्यूक्लियस से बाहर निकलकर** translation के लिए cytoplasm में जाए।

□ कहां होती है (Location)

जैसा नाम बताता है —
Nuclear Splicing न्यूक्लियस के अंदर होती है,
transcription के तुरंत बाद, यानी mRNA के बनने के दौरान या उसके बाद।

इसे **Co-transcriptional modification** भी कहा जा सकता है क्योंकि यह transcription के साथ-साथ भी हो सकती है।

□□ स्प्लाइसिंग का उद्देश्य (Purpose)

- Pre-mRNA में मौजूद **introns को हटाना**
- Exons को **सही क्रम में जोड़ना**
- एक **functional, continuous coding mRNA sequence** बनाना

यह सुनिश्चित करता है कि translation के दौरान केवल सही प्रोटीन ही बने।

□ Nuclear Splicing की प्रमुख प्रणाली (Main System)

न्यूक्लियर स्प्लाइसिंग **Spliceosome** नामक जटिल संरचना के माध्यम से होती है।
यह RNA और प्रोटीन दोनों से मिलकर बना होता है।

□ Spliceosome (स्प्लाइसोज़ोम)

- यह एक **molecular machine** है जो pre-mRNA पर कार्य करता है।
- यह पाँच छोटे RNA अणुओं (snRNA) और कई प्रोटीनों से मिलकर बना होता है।
- ये छोटे RNA कहलाते हैं □ **snRNA (small nuclear RNA)**
  और प्रोटीन के साथ मिलकर बनाते हैं **snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins)**।

मुख्य snRNPs:
U1, U2, U4, U5, U6

ये सभी **nucleus** में स्थित रहते हैं, इसलिए इस प्रक्रिया को **nuclear splicing** कहा जाता है।

□ Nuclear Splicing की प्रक्रिया (Steps of Nuclear Splicing)

यह चार मुख्य चरणों में पूरी होती है □

---

1 □ Splice site पहचान (Recognition of splice sites)

- U1 snRNP **5′ splice site (GU sequence)** को पहचानता है।
- U2 snRNP **branch point (A nucleotide)** को पहचानता है।

---

2 □ Complex बनना (Formation of Spliceosome)

- U4, U5 और U6 snRNP जुड़ते हैं।
- पूरा complex बनकर **spliceosome** तैयार होता है, जो pre-mRNA के intron को घेरे रहता है।

---

3 □ Cleavage और Lariat बनना (Cutting and Lariat formation)

- Intron का 5′ छोर कट जाता है और **branch point A** से जुड़कर एक **लैरिएट (फंदा)** संरचना बनाता है।
- इससे exon 1 और exon 2 अलग हो जाते हैं।

---

4 □ Exons का जुड़ना और Introns का हटना (Joining of exons and removal of intron)

- Exon 1 और Exon 2 आपस में जुड़ जाते हैं (ligation)।
- लैरिएट intron को हटाकर nucleus में degrade कर दिया जाता है।

अब बना हुआ mRNA "**Mature mRNA**" कहलाता है,
जो फिर **nucleus से cytoplasm में export** किया जाता है।

□ Splicing Signal Sequences (स्प्लाइसिंग संकेत अनुक्रम)

हर intron के सिरों पर कुछ **विशेष अनुक्रम (consensus sequences)** होते हैं □

स्थान	अनुक्रम	कार्य
5′ splice site	**GU**	स्प्लाइसिंग की शुरुआत
Branch point	**A (Adenine)**	लैरिएट बनाता है
3′ splice site	**AG**	स्प्लाइसिंग का अंत

इसलिए nuclear introns को "**GU–AG introns**" भी कहा जाता है।

□ Alternative Nuclear Splicing (वैकल्पिक स्प्लाइसिंग)

कभी-कभी एक ही pre-mRNA अलग-अलग तरीकों से splice होकर
विभिन्न प्रकार के mRNA बना सकता है।

इसे कहा जाता है □ **Alternative Splicing**

महत्व:

- इससे एक ही जीन से कई प्रकार के प्रोटीन बन सकते हैं।
- यह **प्रोटीन विविधता (protein diversity)** बढ़ाता है।

उदाहरण:

- **Tropomyosin gene** → मांसपेशी, यकृत, और मस्तिष्क में अलग-अलग रूप के प्रोटीन बनाता है।

□□ Nuclear Splicing के प्रकार

प्रकार	विवरण
Spliceosomal Splicing	Spliceosome द्वारा नियंत्रित (मुख्य eukaryotic तंत्र)
Self-Splicing (Autocatalytic)	RNA स्वयं splicing करता है (Group I और Group II introns)

□ Nuclear Splicing का महत्व (Importance of Nuclear Splicing)

महत्व	विवरण
Gene Expression का नियंत्रण	केवल mature mRNA translation में भाग लेता है
Protein Diversity	Alternative splicing से अनेक प्रोटीन बनते हैं
RNA गुणवत्ता नियंत्रण	गलत splicing वाले RNA nucleus से बाहर नहीं निकलते
Evolutionary Advantage	Exon shuffling से नए जीन विकसित होते हैं

□□ यदि Nuclear Splicing में गलती हो जाए तो

- गलत या अधूरी splicing से **असामान्य प्रोटीन** बनते हैं।
- इससे कई **आनुवंशिक रोग** उत्पन्न हो सकते हैं, जैसे:
  - β-Thalassemia
  - Spinal Muscular Atrophy
  - Cystic Fibrosis

□ सारांश (Summary Table)

चरण	विवरण	घटक

चरण	विवरण	घटक
1	Splice site पहचान	U1, U2 snRNP
2	Spliceosome निर्माण	U1–U6 snRNP
3	Lariat बनना	Branch point A
4	Exons का जुड़ना	RNA ligase
5	Introns हटना	Lariat degradation

Nuclear Splicing एक अत्यंत महत्वपूर्ण **post-transcriptional modification** है,
जो pre-mRNA से introns हटाकर उसे mature mRNA में बदलता है।

यह पूरी प्रक्रिया **nucleus में spliceosome** द्वारा होती है।
इसके बिना सही प्रोटीन नहीं बन सकता।

 "Nuclear splicing ensures that only the meaningful genetic message leaves the nucleus."

Translation machinery (Ribosomes) और **Wobble hypothesis**

? Translation and Transport (अनुवाद एवं परिवहन)

परिचय (Introduction)

Translation (अनुवाद) वह प्रक्रिया है जिसमें **mRNA** के **genetic code** को पढ़कर
प्रोटीन (protein) बनाया जाता है।

सरल शब्दों में —
Translation = mRNA → Protein

यह प्रक्रिया मुख्य रूप से **cytoplasm (प्रोटोप्लाज़्म)** में होती है,
जहाँ **ribosomes** translation machinery के रूप में कार्य करते हैं।

□ Translation की सामान्य परिभाषा

Translation वह प्रक्रिया है जिसमें **mRNA** में उपस्थित **codon sequence (त्रिक)** को **tRNA** द्वारा पढ़ा जाता है,
और प्रत्येक codon के अनुसार एक **specific amino acid** जोड़कर **polypeptide chain (protein)** का निर्माण किया जाता है।

□□ Translation की मुख्य आवश्यकताएँ (Requirements of Translation)

1. **mRNA (messenger RNA)** — कोड लेकर आता है (template)
2. **tRNA (transfer RNA)** — amino acids लाता है
3. **Amino acids** — प्रोटीन के building blocks
4. **Ribosomes** — translation machinery
5. **Enzymes** — aminoacyl-tRNA synthetases
6. **Energy (ATP & GTP)** — ऊर्जा की आवश्यकता
7. **Initiation, Elongation और Termination factors**

□ Translation Machinery — Ribosomes (राइबोसोम)

□ Ribosome क्या है?

Ribosome एक **बहुत बड़ा RNA-Protein Complex** है,
जो translation के दौरान **mRNA को पढ़कर amino acids जोड़ने** का कार्य करता है।

इसे "**Protein factory of the cell (कोशिका की प्रोटीन फैक्ट्री)**" कहा जाता है।

Ribosome (राइबोसोम) कोशिका के अंदर पाया जाने वाला एक **सूक्ष्म, गोलाकार, बिना झिल्ली वाला (non-membranous)** कण है,
जो **प्रोटीन संश्लेषण (Protein Synthesis / Translation)** का कार्य करता है।

सरल शब्दों में —
Ribosome वह यंत्र है जो mRNA को पढ़कर प्रोटीन बनाता है।

हर जीवित कोशिका में ribosome पाए जाते हैं — चाहे वह **Prokaryote (असंवर्गित कोशिका)** हो या **Eukaryote (सुसंवर्गित कोशिका)**।

? Ribosome की खोज (Discovery)

- **1955 में George Emil Palade** ने सबसे पहले राइबोसोम की खोज की थी।
- इसलिए इन्हें कभी-कभी **Palade particles** भी कहा जाता है।

Palade को उनके कोशिकीय अनुसंधान कार्यों के लिए **Nobel Prize (1974)** भी मिला।

? Ribosome के दो मुख्य उपखंड (Subunits)

कोशिका प्रकार	छोटा उपखंड (Small Subunit)	बड़ा उपखंड (Large Subunit)	कुल आकार
Prokaryotes	30S	50S	70S
Eukaryotes	40S	60S	80S

"S" = Svedberg unit, जो अवसादन दर (sedimentation rate) दर्शाती है।

? Ribosome के कार्य (Functions)

1. **mRNA को पकड़ना (Binding mRNA)**
2. **tRNA को पढ़ना (Reading codons via tRNA anticodons)**
3. **Amino acid जोड़ना (Forming peptide bonds)**
4. **Polypeptide को रिलीज़ करना (Releasing the protein chain)**

□ Ribosome के Sites (स्थान)

Ribosome के बड़े उपखंड में **तीन sites** होती हैं □

Site	पूरा नाम	कार्य
A-site	Aminoacyl site	नया tRNA (amino acid सहित) आता है
P-site	Peptidyl site	Peptide bond बनता है
E-site	Exit site	खाली tRNA निकलता है

□ Translation के चरण (Steps of Translation)

Translation तीन मुख्य चरणों में पूरी होती है □

1□ Initiation (आरंभ)

- mRNA का **Start codon (AUG)** पहचाना जाता है।
- Initiator tRNA (जो **methionine** लेकर आता है) ribosome के P-site से जुड़ता है।
- Small और large ribosomal subunits जुड़कर **initiation complex** बनाते हैं।

Initiation factors (IFs) और GTP इस चरण में सहायक होते हैं।

2□ Elongation (वृद्धि)

- नया aminoacyl-tRNA A-site पर आता है।
- Peptide bond बनता है (Peptidyl Transferase enzyme द्वारा)।
- Ribosome आगे बढ़ता है (Translocation)।
- यह प्रक्रिया बार-बार दोहराई जाती है जब तक पूरा protein बन न जाए।

यह चरण ऊर्जा (GTP) पर निर्भर करता है।

---

3 Termination (समापन)

- जब ribosome किसी **Stop codon (UAA, UAG, UGA)** पर पहुँचता है,
  तो कोई tRNA नहीं आता।
- Release factors जुड़ते हैं और polypeptide chain को ribosome से मुक्त करते हैं।
- Ribosomal subunits अलग हो जाती हैं।

Peptidyl Transferase Activity

- यह **rRNA** द्वारा संचालित catalytic क्रिया है (RNA enzyme की तरह)।
- यह **amino acids के बीच peptide bond बनाती है।**
- यह प्रमाण है कि **rRNA एक catalytic RNA (ribozyme)** है।

Wobble Hypothesis (वॉबल सिद्धांत)

परिचय

Francis Crick (फ्रांसिस क्रिक) ने 1966 में "**Wobble Hypothesis**" दिया था,
जिसने यह समझाया कि 61 coding codons के लिए केवल ~45 tRNAs ही पर्याप्त क्यों हैं।

Wobble Hypothesis का प्रस्ताव **Francis Crick ने 1966** में दिया था।
यह **translation (प्रोटीन संश्लेषण)** में **tRNA और mRNA के codon-anticodon pairing** की विशेषता को समझाने के लिए बनाया गया था।

सरल शब्दों में —
"tRNA का anticodon mRNA के codon से जुदा होने में तीसरे बेस में थोड़ी लचीलापन रख सकता है।"

Wobble Hypothesis कहता है कि —
mRNA के codon का **तीसरा आधार (3rd base)** और tRNA के anticodon का **पहला आधार (1st base)** **थोड़ा ढीला (flexible)** pairing कर सकता है।

यानी, **पहले दो बेस "सटीक" (strict pairing)** करते हैं,
लेकिन तीसरे बेस में **थोड़ी लचीलापन (wobble)** होता है।

□ उदाहरण द्वारा समझें

मान लीजिए codon है: **UUU** और **UUC**
दोनों **Phenylalanine (Phe)** कोड करते हैं।

tRNA का anticodon **AAA** दोनों codons से जुड़ सकता है,
क्योंकि तीसरे बेस में "wobble" की अनुमति है।

□ Wobble Base Pairing Rules

Anticodon का पहला बेस	**Codon के तीसरे बेस से जुड़ सकता है**
G	C या U
U	A या G
I (Inosine)	U, C या A

Inosine (I) एक विशेष बेस है जो tRNA के anticodon में पाया जाता है,
और यह तीन अलग-अलग codons से जुड़ सकता है।

□ महत्व (Significance)

1. **tRNA की संख्या घटती है** — कम tRNA से कई codons पढ़े जा सकते हैं।
2. **Translation तेज़ और लचीली होती है।**
3. **Mutation का प्रभाव कम होता है** — तीसरे बेस के परिवर्तन से अमीनो अम्ल नहीं बदलता।

यही कारण है कि genetic code “degenerate but not ambiguous” कहलाता है।

□ Transport of mRNA and Protein

1. **mRNA Transport:**
   - Transcription nucleus में होता है।
   - Mature mRNA **nuclear pores** से होकर **cytoplasm** में जाता है।
   - वहाँ यह ribosome से जुड़कर translation करता है।
2. **Protein Transport:**
   - यदि प्रोटीन cytoplasm में काम करना है → वहीँ बना रहता है।
   - यदि प्रोटीन secretory है → ribosome ER (endoplasmic reticulum) पर जुड़ जाता है और वहाँ से Golgi apparatus की ओर transport होता है।

□ सारांश तालिका (Summary Table)

चरण	प्रक्रिया	प्रमुख घटक
Initiation	Start codon पहचान, complex निर्माण	mRNA, tRNA, IFs
Elongation	Peptide bond निर्माण	Ribosome, GTP
Termination	Stop codon पर protein रिलीज़	Release factors
Wobble Hypothesis	tRNA anticodon में लचीलापन	Inosine, pairing flexibility
Ribosome	Translation machinery	70S / 80S complex

Translation वह महत्वपूर्ण प्रक्रिया है जिसके द्वारा DNA में छिपी आनुवंशिक सूचना अंततः **प्रोटीन के रूप में व्यक्त** होती है।
इस पूरी प्रक्रिया का संचालन **Ribosome** करता है,
जबकि **Wobble Hypothesis** यह समझाता है कि सीमित संख्या के tRNAs किस प्रकार अनेक codons को पहचान सकते हैं।

□ “Ribosomes read the message, tRNAs bring the tools, and the cell builds life’s machinery — the proteins.”

यह **प्रोटीन संश्लेषण (Protein Synthesis)** का सबसे पहला और सबसे महत्वपूर्ण चरण है।

⁉ Translation Initiation

Translation तीन मुख्य चरणों में होती है:

1. **Initiation (आरंभ)**
2. **Elongation (लंबाई बढ़ाना / amino acids जोड़ना)**
3. **Termination (समापन / Stop codon पर खत्म)**

🔹 परिचय (Introduction)

- Initiation वह चरण है जिसमें **ribosome, mRNA और initiator tRNA** मिलकर **translation complex** बनाते हैं।
- यह **start codon (AUG)** पर प्रोटीन संश्लेषण शुरू करता है।
- Prokaryotes और Eukaryotes में **initiation mechanism अलग-अलग होता है।**

🧬 Prokaryotic Initiation (70S Ribosome)

1️⃣ Components Required (आवश्यक घटक)

घटक	विवरण
mRNA	संदेश RNA जो प्रोटीन के लिए कोडिंग करता है
Initiator tRNA (fMet-tRNA^fMet)	फॉर्मिल मीथियोनिन से जुड़े tRNA, start codon से जुड़ता है
Ribosome subunits	30S (small) और 50S (large)
Initiation Factors (IF1, IF2, IF3)	Ribosome assembly और accuracy के लिए
GTP	ऊर्जा के लिए

---

2 Steps of Initiation (चरण)

Step 1: Small subunit binding

- 30S subunit mRNA के **Shine-Dalgarno sequence** से जुड़ता है।
- **IF3** 30S को free रहने में मदद करता है, जिससे premature binding न हो।

Step 2: Initiator tRNA binding

- **fMet-tRNA^fMet** start codon (AUG) से base-pairing करता है।
- **IF2-GTP** इस प्रक्रिया को सुनिश्चित करता है।

Step 3: Large subunit joining

- 50S subunit 30S-mRNA-tRNA complex से जुड़ता है।
- **IF1, IF2, IF3** release होते हैं।
- **GTP hydrolysis** ऊर्जा प्रदान करता है।

Step 4: Formation of 70S initiation complex

- Ribosome तैयार है, **initiator tRNA P-site में** है।
- Translation शुरू होने के लिए तैयार।

Key Points (महत्वपूर्ण बातें)

- Start codon **AUG** → Formyl Methionine (fMet) in Prokaryotes
- Small subunit पहले mRNA से जुड़ता है।
- Initiation factors (IF1, IF2, IF3) जरूरी हैं।
- GTP hydrolysis ऊर्जा प्रदान करता है।

Eukaryotic Initiation (80S Ribosome)

Eukaryotic initiation थोड़ा अधिक जटिल है।

1 Components Required

घटक	विवरण

घटक	विवरण
mRNA	5’ cap structure और poly-A tail वाला
Initiator tRNA (Met-tRNAi^Met)	Met attached tRNA, start codon से जुड़ता है
Ribosome subunits	40S (small), 60S (large)
eIFs (eukaryotic initiation factors)	eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4 complex, eIF5
GTP	ऊर्जा के लिए

---

2 Steps of Initiation

Step 1: Formation of 43S pre-initiation complex

- 40S subunit eIF1, eIF1A, eIF3 के साथ जुड़ता है।
- **eIF2-GTP + Met-tRNAi^Met** complex 40S से जुड़ता है।

Step 2: mRNA binding (Cap recognition)

- eIF4 complex (eIF4E, eIF4G, eIF4A) mRNA के **5’ cap** को पहचानता है।
- mRNA को 43S complex से जोड़ता है → **48S complex** बनता है।

Step 3: Scanning for start codon

- Ribosome mRNA पर **5’→3’ scan** करता है।
- AUG (start codon) मिलने पर **base-pairing** Met-tRNAi^Met से होता है।

Step 4: Formation of 80S initiation complex

- 60S subunit जुड़ता है।
- eIFs release होते हैं।
- GTP hydrolysis ऊर्जा प्रदान करता है।
- Ribosome तैयार है translation elongation के लिए।

Differences: Prokaryotes vs Eukaryotes

Feature	Prokaryotes	Eukaryotes
Ribosome	70S (30S + 50S)	80S (40S + 60S)
Start Codon	AUG (fMet)	AUG (Met)
mRNA recognition	Shine-Dalgarno sequence	5’ cap structure
Initiation factors	IF1, IF2, IF3	eIFs (multiple)
Scanning	नहीं	हाँ, 5’→3’ scanning
Energy source	GTP	GTP

□ Flowchart: Translation Initiation (Step-wise)

1. Small subunit binds mRNA
2. Initiator tRNA binds start codon
3. Large subunit joins
4. Initiation factors release
5. GTP hydrolysis provides energy
6. Ribosome ready → elongation starts

□ महत्वपूर्ण बातें (Key Points)

- Initiation determines **accuracy of translation**।
- Start codon AUG को सही tRNA से जोड़ना जरूरी है।
- Energy (GTP) और initiation factors आवश्यक हैं।
- Prokaryotes और Eukaryotes में mechanisms अलग हैं।

Initiation translation का पहला और सबसे नियंत्रित चरण है।
यह सुनिश्चित करता है कि:

1. Ribosome mRNA पर सही स्थान पर assemble हो।
2. Correct initiator tRNA start codon से जुड़े।
3. Translation सही reading frame में शुरू हो।

Initiation के बिना कोई भी प्रोटीन नहीं बन सकता। यह protein synthesis की “ignition key” की तरह है।

▯ Translation Elongation

Elongation वह चरण है जिसमें **ribosome mRNA codons को पढ़कर amino acids को जोड़ता है और polypeptide chain बनाता है।**

▯ परिचय (Introduction)

- Initiation के बाद ribosome तैयार होता है।
- Elongation में **tRNA anticodon और mRNA codon का क्रमिक base-pairing**, **peptide bond formation**, और **polypeptide chain का लंबा होना** शामिल है।
- Prokaryotes (70S ribosome) और Eukaryotes (80S ribosome) में basic mechanism लगभग समान है।

▯ Elongation के मुख्य घटक (Components Required)

घटक	विवरण
Ribosome	70S (prokaryote) / 80S (eukaryote)
mRNA	Codons के साथ template
Aminoacyl-tRNAs (aa-tRNAs)	Specific amino acids ले जाने वाले tRNA
Elongation Factors	EF-Tu, EF-G (prokaryote), eEF1, eEF2 (eukaryote)
GTP	ऊर्जा के लिए
Initiator tRNA	P-site में पहले से जुड़ा हुआ

▯ Ribosome में Functional Sites

Ribosome में तीन मुख्य sites होती हैं:

Site	पूरा नाम	कार्य
A-site	Aminoacyl site	Incoming aa-tRNA आता है
P-site	Peptidyl site	Polypeptide chain वाले tRNA को पकड़े रखता है
E-site	Exit site	खाली tRNA ribosome से बाहर निकलता है

□ Elongation के चरण (Step-wise Mechanism)

Step 1: Aminoacyl-tRNA binding to A-site

- Ribosome का A-site खाली होता है।
- **EF-Tu (GTP bound)** aa-tRNA को A-site में लाता है।
- **mRNA codon** और tRNA anticodon base-pairing द्वारा match होता है।
- सही tRNA आने पर GTP hydrolysis होती है और EF-Tu release हो जाता है।

Step 2: Peptide Bond Formation

- Peptidyl transferase (rRNA का catalytic site) P-site में मौजूद polypeptide chain को A-site वाले amino acid से जोड़ता है।
- **Peptide bond** बनता है और polypeptide chain अब A-site वाले tRNA पर रहती है।

Step 3: Translocation (Ribosome Movement)

- Ribosome **mRNA पर एक codon आगे बढ़ता है**।
- Polypeptide chain अब P-site में, और खाली tRNA E-site में चली जाती है।
- **EF-G (GTP bound)** translocation में मदद करता है।
- E-site से tRNA बाहर निकलता है।

इस प्रक्रिया से ribosome A → P → E sites में क्रमिक रूप से tRNA और polypeptide chain को संचालित करता है।

Step 4: Cycle Repeats

- Next aminoacyl-tRNA A-site में आता है।
- Peptide bond बनता है।

- Ribosome codon को एक step आगे बढ़ाता है।
- यह प्रक्रिया **stop codon** मिलने तक चलती है।

□ Elongation Factors (Prokaryotes)

Factor	Function
EF-Tu	aa-tRNA को A-site में लाता है और proofreading करता है
EF-G	Ribosome translocation (codon advance) करता है

Eukaryotes में:

- **eEF1** → aa-tRNA binding
- **eEF2** → translocation

---

1. **Elongation stepwise process** है — प्रत्येक codon के लिए दो main events होती हैं:
    - tRNA binding (A-site)
    - Peptide bond formation और translocation
2. **Energy Requirement**:
    - हर tRNA binding के लिए 1 GTP
    - Translocation के लिए 1 GTP
3. **Accuracy**:
    - Correct tRNA anticodon-codon pairing ensures correct amino acid incorporation.
4. **Polypeptide Synthesis**:
    - Ribosome polypeptide chain को N-terminus से C-terminus तक जोड़ता है।

□ Elongation का सारांश

Step	Description
1	aa-tRNA A-site में bind होता है
2	Peptide bond P-site tRNA → A-site tRNA

Step	Description
3	Ribosome translocates; polypeptide chain P-site में
4	E-site tRNA exits
5	Next aa-tRNA binds → cycle repeats

Elongation translation का सबसे लंबा चरण है जिसमें ribosome **codons को पढ़कर sequentially amino acids जोड़ता है।**
यह प्रक्रिया **energy-intensive, highly accurate और cyclic** होती है।

 “Elongation is the assembly line of protein synthesis — codon by codon, amino acid by amino acid, the protein grows.”

? Translation Termination

Termination वह चरण है जिसमें ribosome **stop codon** पर पहुँचता है और **polypeptide chain ribosome से release होती है।**

□ परिचय (Introduction)

- Translation में जब ribosome **mRNA का stop codon (UAA, UAG, UGA)** पढ़ता है, तो **elongation रुकता है।**
- Stop codon के लिए कोई tRNA नहीं होता।
- इस समय **Release Factors (RFs)** polypeptide को ribosome से निकालते हैं।

सरल शब्दों में —
Termination = “Protein assembly line का अंत, और newly synthesized protein को free करना।”

□ Termination के मुख्य घटक (Components Required)

घटक	विवरण
Ribosome	70S (prokaryote) / 80S (eukaryote)
mRNA	जिसमें stop codon हो
Release Factors (RF)	Proteins जो stop codon को पहचानते हैं
GTP	Energy के लिए
Polypeptide chain	जो P-site tRNA से जुड़ी है

□ Termination का Mechanism (Mechanism of Termination)

Step 1: Stop codon recognition

- Ribosome mRNA पर A-site में **UAA, UAG या UGA** पढ़ता है।
- Stop codon के लिए कोई tRNA नहीं होता।
- **Release Factor (RF)** A-site में bind होता है।
  - Prokaryotes: RF1, RF2 (UAA/UAG, UAA/UGA)
  - Eukaryotes: eRF1

Step 2: Polypeptide chain release

- RF ribosome के **peptidyl transferase site** को activate करता है।
- Polypeptide chain **tRNA P-site से cleave होकर release होती है।**

Step 3: Ribosome disassembly

- GTP hydrolysis की मदद से **ribosome subunits (30S/50S या 40S/60S) अलग हो जाते हैं।**
- mRNA और empty tRNA ribosome से निकलते हैं।

इस प्रक्रिया के बाद ribosome reuse के लिए free हो जाता है।

□ Termination Steps (Summary Table)

Step	Description

Step	Description
1	Ribosome A-site पर stop codon पढ़ता है
2	Release Factor (RF) A-site में bind करता है
3	Peptidyl transferase polypeptide को cleave करता है
4	Polypeptide chain ribosome से release होती है
5	Ribosome subunits, mRNA और tRNA disassemble होते हैं

□ Release Factors (RF) का विवरण

Organism	RF	Stop codon specificity
Prokaryote	RF1	UAA, UAG
Prokaryote	RF2	UAA, UGA
Eukaryote	eRF1	सभी stop codons (UAA, UAG, UGA)

- **RF3 (prokaryote)** और **eRF3 (eukaryote)** GTP-dependent factors हैं जो RF को ribosome से release करने में मदद करते हैं।

□ महत्वपूर्ण बातें (Key Points)

1. Stop codon के लिए कोई tRNA नहीं होता।
2. Termination release factors (RF) द्वारा होती है।
3. GTP hydrolysis Ribosome disassembly में मदद करता है।
4. Polypeptide chain release के बाद ribosome पुनः translation के लिए free हो जाता है।
5. यह प्रक्रिया protein synthesis की **accuracy और efficiency** सुनिश्चित करती है।

□ Termination का सारांश (In Short)

- Translation complete → Stop codon → RF bind → Polypeptide release → Ribosome disassembly
- यह चरण ensures करता है कि **newly synthesized protein सही तरीके से कोशिका में उपलब्ध हो।**

Termination ही वह चरण है जो translation को **exact point पर रोकता है**। बिना termination के ribosome mRNA पर अटकी रहती और polypeptide chain अधूरी रहती।

⍰ Co- and Post-Translational Modifications (सह-अनुवाद और अनुवादोपरांत संशोधन)

प्रोटीन का **translation** होने के बाद भी वह functional (कार्यशील) रूप में नहीं होता।
प्रोटीन को **folding, chemical modification और targeting** की आवश्यकता होती है।

□ 1. Co-translational Modifications (सह-अनुवाद संशोधन)

Definition:

- जब protein **translation के दौरान** ही modify होता है।
- यह mostly **N-terminal modifications और signal sequences processing** में होता है।

मुख्य प्रकार:

1. **N-terminal Methionine removal (Formyl Met removal in Prokaryotes)**
   - Prokaryotes: fMet remove होता है translation शुरू होते ही।
   - Eukaryotes: Met को remove किया जा सकता है।
2. **N-terminal Acetylation**
   - Eukaryotic proteins में N-terminal acetyl group attach होता है।
   - Protein stability और localization में मदद करता है।
3. **Signal Peptide cleavage**
   - Secretory proteins और membrane proteins में **N-terminal signal peptide** translation के दौरान ER में target करते समय cleave होता है।
4. **Folding by Chaperones**
   - Ribosome से बाहर आने के तुरंत बाद, molecular chaperones polypeptide को सही folding में मदद करते हैं।

Summary:

- Co-translational modifications → translation के दौरान
- Mostly **N-terminal modifications, folding, targeting**

□ 2. Post-translational Modifications (अनुवादोपरांत संशोधन)

Definition:

- जब protein **translation पूरा होने के बाद** chemically modify होता है।
- यह protein की **function, localization, stability, activity** में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है।

मुख्य प्रकार:

Modification	Function / Example
Phosphorylation	Ser, Thr, Tyr residues पर phosphate जोड़ना; signal transduction और enzyme regulation
Glycosylation	Asn (N-linked), Ser/Thr (O-linked) sugar addition; membrane proteins और secretory proteins के लिए
Methylation	Lys, Arg residues; histone modification, gene regulation
Acetylation	Lys residues; transcription regulation
Lipidation (Myristoylation, Prenylation)	Membrane anchoring के लिए
Ubiquitination	Lys residues पर ubiquitin attach; protein degradation के लिए
Proteolytic cleavage	Pro-peptide cleavage; insulin जैसे inactive precursor को active form में convert करना
Disulfide bond formation	Cysteine residues; protein stability और tertiary/quaternary structure में मदद

□ Differences: Co- vs Post-translational Modifications

Feature	Co-translational	Post-translational
Timing	Translation के दौरान	Translation के बाद
Examples	Signal peptide cleavage, N-terminal acetylation	Phosphorylation, Glycosylation, Ubiquitination
Function	Folding, targeting, N-terminal modification	Function regulation, stability, localization, activation
Location	Mostly ribosome/ER	Cytoplasm, ER, Golgi, nucleus

□ Importance of Protein Modifications

1. Protein को **functional और active** बनाना।
2. **Stability** और **degradation control** करना।
3. Cellular **signaling pathways** को regulate करना।
4. Proteins को **correct cellular compartment** में target करना।

सरल शब्दों में –
Co-translational → "translation के समय protein तैयार करना"
Post-translational → "translation के बाद protein को पूरा functional बनाना"

□ Mitochondrial Genetic Code (माइटोकॉन्ड्रियल आनुवंशिक कोड)

□ परिचय (Introduction)

- **Mitochondria** में अपने DNA (mtDNA) के लिए **translation machinery** होता है।
- यह mitochondrial proteins (mostly oxidative phosphorylation के enzymes) बनाने के लिए RNA और ribosomes का उपयोग करता है।
- **Mitochondrial genetic code** nuclear code से अलग है।
- यह code **codons और amino acids के बीच mapping** को define करता है।

Nuclear code universal है, लेकिन mitochondria में कुछ codons अलग meaning देते हैं।

□ Mitochondrial Codon Differences

1. Stop Codon Reassignment

Codon	Nuclear Code	Mitochondrial Code
UGA	Stop	Trp (Tryptophan)
AGA	Arg	Stop (Human mitochondria)
AGG	Arg	Stop (Human mitochondria)

UGA, जो nuclear genome में stop codon है, mitochondria में **Tryptophan** code करता है।

---

2. Start Codon Reassignment

- Nuclear genome में **AUG = Start (Methionine)**
- Mitochondria में additional start codons: **AUU, AUA** → Methionine के लिए initiate कर सकते हैं।

---

3. Codon Reassignments (Humans, Vertebrates)

Codon	Nuclear Amino Acid	Mitochondrial Amino Acid
AUA	Ile (Isoleucine)	Met (Methionine)
UGA	Stop	Trp (Tryptophan)
AGA	Arg	Stop
AGG	Arg	Stop

कुछ अन्य जीवों (yeast, invertebrates) में codon reassignment अलग हो सकती है।

□ Special Features of Mitochondrial Code

1. **Reduced set of tRNAs**
    - Mitochondria में tRNA की संख्या nuclear genome से कम होती है।
    - Wobble base pairing का इस्तेमाल ज्यादा होता है।
2. **Compact genome**
    - Overlapping genes और shortened intergenic regions।
3. **Polyadenylation**
    - Stop codons को post-transcriptionally complete किया जा सकता है।
4. **Deviation from universal code**
    - Evolutionary adaptation के कारण codon usage nuclear genome से अलग है।

□ Significance

1. Mitochondrial genetic code की अलग पहचान **mitochondrial translation को nuclear translation से अलग करने** में मदद करती है।
2. यह code **mitochondrial disease mutations** और **tRNA mutations** की समझ में महत्वपूर्ण है।
3. Evolutionary studies में mitochondrial codon differences **phylogenetic markers** के रूप में इस्तेमाल होते हैं।

- Mitochondrial code nuclear code से slightly अलग है।
- Stop codons, start codons और कुछ amino acid codons reassigned हैं।
- Mitochondrial translation machinery इसमें specialize है।

□ Transport of Proteins and Molecular Chaperones (प्रोटीन का परिवहन और अणु शैपरोन)

सेल में प्रोटीन का निर्माण **ribosome** पर होता है, लेकिन अधिकांश प्रोटीन अपनी target जगह (जैसे nucleus, mitochondria, ER, Golgi, lysosome, plasma membrane या extracellular space) में जाकर function करते हैं।
इसके लिए **protein transport mechanisms और molecular chaperones** की आवश्यकता होती है।

□ 1. Protein Transport (प्रोटीन का परिवहन)

Definition:

- Protein Transport = Ribosome पर बनने वाले polypeptides का **सही cellular compartment** में पहुँचना।

प्रकार (Types of Protein Transport)

1. **Co-translational transport (Translation के दौरान)**
   - Secretory proteins और membrane proteins ER में translation के दौरान ही targeted होते हैं।
   - **Signal sequence** polypeptide को ER membrane से पहचानने में मदद करता है।
2. **Post-translational transport (Translation के बाद)**
   - Cytosol में बने proteins को mitochondria, nucleus, peroxisome या chloroplast में बाद में भेजा जाता है।

मुख्य Target Compartments और Mechanism

Target Organelle	Signal / Mechanism	Detail
Nucleus	Nuclear localization signal (NLS)	Importins protein को nucleus में ले जाते हैं
Mitochondria	Mitochondrial targeting sequence	TOM (outer membrane) और TIM (inner membrane) complex के द्वारा import
ER	Signal peptide (N-terminal)	SRP (Signal recognition particle) ribosome को ER membrane से जोड़ता है; Co-translational translocation
Golgi / Lysosome / Secretory vesicles	Signal sequence + vesicular transport	COPI/COPII coated vesicles द्वारा transport
Peroxisome	Peroxisomal targeting signal (PTS)	PEX proteins द्वारा import

---

□ 2. Molecular Chaperones (अणु शैपरोन)

Definition:

- Molecular Chaperones = Proteins जो **अन्य proteins को सही folding** में मदद करते हैं और aggregation रोकते हैं।
- यह transport और folding दोनों में महत्वपूर्ण हैं।

मुख्य प्रकार (Major Types)

1. **Hsp70 (Heat shock protein 70)**
   - Ribosome से newly synthesized polypeptide को bind करता है।
   - Folding और organelle import में मदद करता है।
2. **Hsp60 (Chaperonins)**
   - Cytosol और mitochondria में protein folding सुनिश्चित करता है।
   - Barrel-like structure में protein को encapsulate करके सही folding करता है।
3. **Hsp90**
   - Signal transduction proteins और steroid receptors को stabilize करता है।
4. **Small Hsps**
   - Stress conditions (heat, oxidative stress) में aggregation रोकते हैं।

Chaperones का Transport में Role

1. Proteins को **unfolded state में बनाए रखना** ताकि organelle membrane से गुजर सकें।
2. Membrane translocation के दौरान protein को **misfolding और aggregation से बचाना।**
3. Imported proteins को **final native conformation में fold करना।**

Example: Mitochondrial proteins

- Cytosolic Hsp70 protein → mitochondria import के दौरान unfolded protein को stabilize करता है।
- Matrix Hsp60 → protein को correctly fold करता है।

□ Mechanism of Protein Transport (Simplified)

A. Co-translational ER transport

1. Ribosome translation शुरू करता है।
2. N-terminal **signal peptide** बनता है।
3. **SRP** bind करता है → ribosome-polypeptide-SRP complex ER membrane पर जाकर **SRP receptor** से bind करता है।

4. Protein **translocon (Sec61)** से ER lumen में enter करता है।
5. Signal peptide cleaved होता है और protein folding ER lumen में होती है।

B. Post-translational mitochondrial transport

1. Protein unfolded state में cytosol में रहता है।
2. N-terminal **mitochondrial targeting signal** दिखाई देता है।
3. TOM/TIM complexes द्वारा matrix में transport।
4. Signal peptide cleaved और Hsp60 द्वारा folding complete।

□ Importance of Protein Transport & Chaperones

1. Proteins को **सही location** में पहुंचाना → functional activity।
2. **Misfolding और aggregation** रोकना।
3. Stress conditions में protein stability maintain करना।
4. Mitochondria, ER, nucleus, Golgi जैसे organelles की proper function सुनिश्चित करना।
5. Protein trafficking defects → कई **diseases** (neurodegenerative diseases, cystic fibrosis, mitochondrial disorders)।

- **Protein transport** = Ribosome से protein का target compartment में safely पहुँचाना।
- **Molecular chaperones** = Folding और transport के दौरान protein को protect और stabilize करना।
- दोनों मिलकर **cellular protein homeostasis** सुनिश्चित करते हैं।

Unit 4

□ Cell Disruption Techniques (कोशिका टूटने की तकनीकें)

Definition:

- **Cell disruption** = प्रक्रिया जिसके द्वारा किसी जीवित या मृत **कोशिका (cell) की दीवार/मेम्ब्रेन तोड़कर उसके अंदर मौजूद contents (जैसे proteins, nucleic acids, organelles) को बाहर निकाला जाता है।**
- इसे **cell lysis** भी कहते हैं।

□ Cell Disruption के उद्देश्य (Objectives)

1. Intracellular components को **extract करना**।
    - Proteins, enzymes, DNA, RNA, metabolites
2. **Subcellular organelles** (mitochondria, nuclei, chloroplasts) को अलग करना।
3. Biochemical और molecular biology experiments के लिए **sample preparation**।

□ Cell Disruption Techniques के प्रकार (Types of Cell Disruption)

A. Mechanical Methods (यांत्रिक विधियाँ)

1. **Homogenization (हॉमोज़नाइजेशन)**
    - Cells को **blender, mortar-pestle, Potter-Elvehjem homogenizer** में grind किया जाता है।
    - Mostly soft tissues और mammalian cells के लिए।
2. **Ultrasonication (अल्ट्रासोनिक शोर)**
    - High-frequency sound waves → cavitation → cells rupture।
    - Advantage: Efficient for bacteria और yeast।
    - Disadvantage: Heat generation → proteins degrade हो सकते हैं।
3. **French Press (फ्रेंच प्रेस)**
    - Cells को high pressure में compress → sudden release → cell rupture।
    - Mostly bacterial और yeast cells के लिए।
4. **Bead Milling / Bead Beater (बीड मिलिंग)**
    - Cells + small beads → vigorous shaking → mechanical collision → rupture।
    - Bacteria, fungi, और plant cells में effective।
5. **Grinding in Liquid Nitrogen**
    - Plant tissues (hard cell wall) → liquid nitrogen में freeze → tissue brittle → grind करना आसान।

B. Chemical Methods (रासायनिक विधियाँ)

1. **Detergents (सर्फ़ैक्टेंट)**

- Triton X-100, SDS → cell membrane dissolve करते हैं।
- Mostly **membrane proteins extraction** में उपयोग।

2. **Osmotic Shock (अस्मोटिक झटका)**
   - Cells hypotonic solution में डालना → water influx → cells swell और rupture।
   - Mostly **gram-negative bacteria** और red blood cells।
3. **Enzymatic Digestion (एंज़ाइमेटिक पद्धति)**
   - Lysozyme, cellulase, pectinase → cell wall degrade करते हैं।
   - Especially bacteria और plant cells के लिए।

C. Physical / Non-Mechanical Methods

1. **Freeze-Thaw Method (फ्रीज़-थॉ)**
   - Cells को ice में freeze → thaw → ice crystals → membrane rupture।
   - Gentle method; enzyme activity preserve।
2. **Microwave / Electric Field**
   - High-energy microwaves → membrane rupture।
   - Electropermeabilization / electroporation → temporary pores create → molecules exit।

□ Selection of Cell Disruption Method

Factors to consider:

1. **Type of cell**:
   - Bacteria, yeast, plant → tough cell wall → mechanical + enzymatic methods
   - Animal cells → soft membrane → chemical or gentle mechanical methods
2. **Target molecule**:
   - Proteins → avoid heat denaturation → gentle methods
   - Nucleic acids → avoid nucleases → buffer + cold conditions
3. **Yield and activity**:
   - Method का choice **max yield + biological activity retain** करना चाहिए।

□ Comparison of Common Methods

Method	Pros	Cons	Suitable for

Method	Pros	Cons	Suitable for
Homogenization	Simple, cheap	Not for tough cells	Soft tissues
Ultrasonication	Efficient, fast	Heat generation	Bacteria, yeast
French Press	High efficiency	Expensive	Bacteria
Bead Milling	High efficiency	Wear & tear, heating	Fungi, yeast, bacteria
Detergents	Gentle, membrane proteins	Can denature proteins	Animal cells, membrane proteins
Freeze-Thaw	Gentle	Low yield	Lab-scale, enzyme preservation
Enzymatic	Gentle, specific	Expensive, slow	Bacteria, plants

□ Precautions During Cell Disruption

1. Temperature control (ice or cold buffer) → protein denaturation रोकने के लिए।
2. Protease inhibitors → proteolysis रोकने के लिए।
3. Gentle handling → enzyme activity बचाने के लिए।
4. Buffer selection → pH और ionic strength maintain करना।

□ Summary (सारांश)

- **Cell disruption** = "कोशिका खोलना ताकि intracellular components extract किए जा सकें।"
- **Techniques:** Mechanical, Chemical, Physical
- **Choice factors:** Cell type, target molecule, yield, activity
- **Purpose:** Biochemical studies, enzyme assays, protein purification, organelle isolation

---

- Plant cells के लिए **liquid nitrogen + grinding** और **enzymatic digestion** combination सबसे effective है।
- Bacteria और yeast → **ultrasonication या bead milling**।
- Mammalian cells → **chemical detergents या freeze-thaw**।

⁉ Cell Disruption Techniques (Mechanical vs Non-Mechanical)

Definition:

- **Cell disruption** = कोशिका की दीवार या मेम्ब्रेन तोड़कर अंदर मौजूद **proteins, nucleic acids, organelles** आदि को बाहर निकालना।
- यह दो मुख्य श्रेणियों में आता है:
    1. **Mechanical Methods (यांत्रिक विधियाँ)**
    2. **Non-Mechanical Methods (गैर-यांत्रिक विधियाँ)**

⁉ Mechanical Methods of Cell Disruption (यांत्रिक कोशिका टूटने की विधियाँ)

- इस विधि में **physically force** लगाकर cells rupture किए जाते हैं।
- Mostly tough cells (bacteria, yeast, fungi, plant cells) के लिए effective।

Definition:

- Mechanical methods में **physically force या shear stress** का उपयोग करके cells को rupture किया जाता है।
- यह method **tough cells** (जैसे bacteria, yeast, fungi, plant cells) के लिए बहुत effective है।
- इसमें cell wall/membrane को तोड़ा जाता है ताकि intracellular contents (proteins, nucleic acids, organelles) निकल सकें।

□ प्रमुख Mechanical Methods

1 □ Homogenization (हॉमोज़नाइजेशन)

- **Principle:** Grinding या shearing force द्वारा cells rupture।
- **Equipment:** Mortar-pestle, Potter-Elvehjem homogenizer, blender
- **Suitable for:** Soft tissues, mammalian cells
- **Pros:** Simple, inexpensive
- **Cons:** Not effective for tough cell walls

---

2 Ultrasonication (अल्ट्रासोनिक शोर / Sonication)

- **Principle:** High-frequency sound waves → cavitation → microbubbles implode → cell rupture।
- **Suitable for:** Bacteria, yeast, small volume lab samples
- **Pros:** Fast, efficient, scalable for small volumes
- **Cons:** Heat generation → protein denaturation; not suitable for large volumes without cooling

---

3 French Press (फ्रेंच प्रेस)

- **Principle:** Cells को high pressure में compress किया जाता है → sudden release → cell rupture
- **Suitable for:** Bacteria, yeast
- **Pros:** High efficiency, reproducible
- **Cons:** Expensive equipment; lab-scale mostly

---

4 Bead Milling / Bead Beater (बीड मिलिंग / बीड बीटर)

- **Principle:** Cells + small beads → vigorous shaking या stirring → mechanical collision → rupture
- **Suitable for:** Bacteria, yeast, fungi, plant cells
- **Pros:** High efficiency, scalable
- **Cons:** Heat generation, wear & tear of beads

---

5 Grinding in Liquid Nitrogen (तरल नाइट्रोजन में पीसना)

- **Principle:** Tissue को liquid nitrogen में freeze → tissue brittle → grind with mortar-pestle → cell rupture
- **Suitable for:** Plant cells, hard tissues
- **Pros:** Gentle, preserves protein/enzyme activity
- **Cons:** Labor-intensive, limited scale

Mechanical Methods के Advantages और Disadvantages

Feature	Advantages	Disadvantages
Efficiency	High yield, effective for tough cells	Can damage sensitive proteins due to heat/shear
Scale	Lab-scale to industrial	Some methods expensive or labor-intensive
Protein activity	Can preserve if cooled properly	Heat/abrasion can denature proteins
Equipment	Simple to specialized	Cost varies from low to high

□ Key Points

1. Mechanical methods **physical force** पर आधारित हैं।
2. **Soft cells (animal cells)** → Homogenization, Freeze-Thaw
3. **Tough cells (bacteria, yeast, plant cells)** → Ultrasonication, French Press, Bead Milling, Liquid Nitrogen Grinding
4. Protein denaturation रोकने के लिए **cold conditions** और **protease inhibitors** का उपयोग करना चाहिए।

□ **Summary:**

- Mechanical methods are **fast, high-yield techniques** for cell disruption.
- Proper method selection depends on **cell type, target molecule, and sensitivity of proteins**.

प्रमुख प्रकार:

Method	Principle	Suitable Cells	Pros	Cons
Homogenization	Grinding / shearing force	Soft tissues, animal cells	Simple, cheap	Not effective for tough cell walls
Ultrasonication	High-frequency sound waves → cavitation → membrane	Bacteria, yeast	Fast, efficient	Heat generation, protein denaturation

Method	Principle	Suitable Cells	Pros	Cons
	rupture			
French Press	High pressure → sudden release → cells burst	Bacteria, yeast	High efficiency	Expensive, specialized equipment
Bead Milling / Bead Beater	Cells + small beads → vigorous shaking → collision → rupture	Bacteria, fungi, yeast	Effective, scalable	Heat, wear & tear
Grinding in Liquid Nitrogen	Freeze → brittle tissue → grind	Plant cells, hard tissues	Gentle, preserves proteins	Labor-intensive, lab-scale

Summary:

- Mechanical methods = **force or shear stress** से cells को तोड़ना।
- Advantage: Efficient, high yield
- Disadvantage: Heat और shear damage से protein/activity को नुकसान

□ 2. Non-Mechanical Methods (गैर-यांत्रिक विधियाँ)

- इस विधि में **chemical, enzymatic या physical changes** का उपयोग करके cells rupture किए जाते हैं।
- Mostly soft cells और membrane proteins के लिए suitable।

बिलकुल! अब हम **Non-Mechanical Methods of Cell Disruption (गैर-यांत्रिक कोशिका टूटने की विधियाँ)** को **गहराई से हिंदी में** समझते हैं।

□ Non-Mechanical Methods of Cell Disruption (गैर-यांत्रिक विधियाँ)

Definition:

- Non-mechanical methods में **कोशिका को physical force की बजाय chemical, enzymatic, osmotic या physical changes** से rupture किया जाता है।
- यह **soft cells और sensitive proteins** के लिए ज्यादा suitable है।
- इसका मुख्य उद्देश्य है **cell contents को gentle तरीके से extract करना**।

□ प्रमुख Non-Mechanical Methods

1 □ Chemical Methods (रासायनिक विधियाँ)

Detergents / Surfactants (सर्फेक्टेंट)

- **Principle:** Lipid bilayer dissolve → cell membrane rupture
- **Common chemicals:** Triton X-100, SDS, NP-40
- **Suitable for:** Animal cells, membrane proteins extraction
- **Pros:** Gentle, preserves organelles
- **Cons:** Harsh detergents protein denature कर सकते हैं

Osmotic Shock (अस्मोटिक झटका)

- **Principle:** Cells को hypotonic solution में डालना → water influx → cells swell → rupture
- **Suitable for:** Red blood cells, gram-negative bacteria
- **Pros:** Gentle, simple, inexpensive
- **Cons:** Not effective for cells with thick cell walls

---

2 □ Enzymatic Methods (एंज़ाइम आधारित)

- **Principle:** Enzymes cell wall को degrade करके rupture कर देते हैं
- **Common enzymes:** Lysozyme (bacteria), Cellulase / Pectinase (plant cells)
- **Suitable for:** Bacteria, fungi, plant cells
- **Pros:** Gentle, specific
- **Cons:** Slow, expensive

---

3 □ Physical Non-Mechanical Methods

Freeze-Thaw Method (फ्रीज़-थॉ विधि)

- **Principle:** Cells को repeatedly freeze → thaw करना → ice crystals → membrane rupture
- **Suitable for:** Lab-scale, enzyme preservation
- **Pros:** Gentle, preserves protein/enzyme activity
- **Cons:** Low yield, time-consuming

Electroporation / Electric Field (इलेक्ट्रोपोरेशन / विद्युत क्षेत्र)

- **Principle:** High voltage electric pulses → transient pores in membrane → intracellular molecules exit
- **Suitable for:** Bacteria, mammalian cells
- **Pros:** Can introduce molecules into cells
- **Cons:** Requires specialized equipment

□ Non-Mechanical Methods के Advantages और Disadvantages

Feature	Advantages	Disadvantages
Protein activity	Gentle, preserves enzymes	Yield lower than mechanical methods
Cell type	Soft cells, membrane proteins	Not effective for tough cell walls
Simplicity	Simple, inexpensive (osmotic shock, detergents)	Enzymatic methods expensive & slow
Equipment	Minimal required	Electroporation requires specialized setup

---

□ Key Points

1. Non-mechanical methods **force पर निर्भर नहीं हैं**।
2. **Soft cells** (animal, RBCs) और **sensitive proteins** के लिए ideal।
3. Often combined with mechanical methods for **higher yield**।
4. **Temperature control और protease inhibitors** का उपयोग protein/activity बचाने के लिए आवश्यक।

 Summary:

- Non-mechanical methods = **chemical, enzymatic, osmotic या freeze-thaw methods**
- Advantage: Gentle, preserves protein function
- Disadvantage: कभी-कभी yield कम, slow

-

प्रमुख प्रकार:

Method	Principle	Suitable Cells	Pros	Cons
Detergents / Surfactants	Lipid bilayer dissolve → membrane rupture	Animal cells, membrane proteins	Gentle, preserves organelles	Can denature proteins if harsh
Osmotic Shock	Hypotonic solution → water influx → cell swell → burst	Red blood cells, gram-negative bacteria	Gentle, cheap	Not for cells with thick walls
Enzymatic Digestion	Enzymes (lysozyme, cellulase) degrade cell wall	Bacteria, plant cells	Gentle, specific	Slow, expensive
Freeze-Thaw	Ice crystals formation → membrane rupture	Lab-scale, enzyme preservation	Gentle, preserves activity	Low yield, time-consuming
Electroporation / Electric Field	High voltage → transient pores → molecule exit	Bacteria, mammalian cells	Can introduce molecules	Requires specialized equipment

Summary:

- Non-mechanical methods = **chemical, enzymatic, osmotic, freeze-thaw या electric field** का उपयोग।
- Advantage: Gentle, preserves protein function
- Disadvantage: Sometimes low yield, slow

□ Comparison: Mechanical vs Non-Mechanical

Feature	Mechanical	Non-Mechanical
Principle	Physical force / shear / pressure	Chemical, enzymatic, osmotic, freeze-thaw
Suitable for	Tough cells (bacteria, yeast, plant)	Soft cells (animal), sensitive proteins
Efficiency	High	Moderate to low
Effect on proteins	Risk of denaturation	Gentle, preserves activity
Equipment	Blender, French press, Ultrasonicator, Bead beater	Detergents, enzymes, hypotonic solutions, electric pulse

---

- **Mechanical Methods** → High yield, tough cells, risk of protein damage
- **Non-Mechanical Methods** → Gentle, preserves activity, suitable for soft cells
- Choice depends on **cell type, target molecule, yield, and protein stability**

अपकेंद्रीकरण (Centrifugation) क्या है?

अपकेंद्रीकरण एक प्रयोगशाला तकनीक है जिसमें मिश्रण (mixture) को तेज़ी से घुमाकर (spin करके) उसके कणों को उनके **आकार**, **आकार-प्रकार (shape)**, **घनत्व (density)** और **तैरने/डूबने की क्षमता (buoyancy)** के आधार पर अलग किया जाता है।

जब किसी ट्यूब को बहुत तेज़ी से घुमाया जाता है, तो भारी कण बाहर की ओर (नीचे) चले जाते हैं, और हल्के कण ऊपर की ओर रह जाते हैं।
इसी सिद्धांत पर कोशिकाएँ, ऑर्गेनेल्स, प्रोटीन, DNA, वायरस आदि अलग किए जाते हैं।

★ अपकेंद्रीकरण का मूल सिद्धांत (Principle)

स्पिन करते समय अपकेंद्रीय बल (centrifugal force) लगता है:

अपकेंद्रीय बल ∝ घुमाव की गति (rpm) × कण का द्रव्यमान (mass)

- भारी कण → जल्दी नीचे बैठ जाते हैं → पेलेट (pellet) बनाते हैं
- हल्के कण → ऊपर तरल में रह जाते हैं → सुपरनेटन्ट (supernatant)

Centrifuge मशीन के मुख्य भाग

1. **Rotor (रोटर)** – sample tubes को पकड़ कर घुमाता है
2. **Motor** – घुमाने वाला हिस्सा
3. **Refrigeration system** – ताप को नियंत्रित करता है
4. **Control panel** – rpm, समय, तापमान सेट करने के लिए
5. **Tubes** – नमूनों को रखने के लिए

Centrifugation के प्रकार (Types) — विस्तृत व्याख्या

---

1. Differential Centrifugation (अन्तरक अपकेंद्रीकरण)

यह सबसे मूल तकनीक है। इसमें sample को **क्रमशः बढ़ते rpm** पर घुमाया जाता है।
हर बार अलग-अलग कण अलग होते जाते हैं।

प्रक्रिया:

1. Sample को कम गति पर स्पिन करें → सबसे भारी कण नीचे आ जाएँ (जैसे nucleus)
2. Supernatant को नई ट्यूब में लें
3. rpm बढ़ाएँ → अगले ऑर्गेनेल्स पेलेट बनाएँ
4. बार-बार दोहराएँ

इसका उपयोग:

- कोशिका fractionation
- nucleus, mitochondria, lysosome, ribosome अलग करना

---

2. Density Gradient Centrifugation (घनत्व-ढाल अपकेंद्रीकरण)

इसमें नमूने को एक ऐसी ट्यूब में रखा जाता है जिसमें **घनत्व के अनुसार परतें** (जैसे sucrose gradient) होती हैं।

इसके दो प्रकार हैं:

2A. Rate-Zonal Centrifugation

- Separation **size और shape** पर आधारित
- हल्के कण उपरी परतों में रुकते हैं
- भारी कण नीचे जाते हैं
- लेकिन कणों को gradient पार नहीं कर सकते (क्योंकि घनत्व सीमा होती है)

उपयोग:

- वायरस का अलगाव
- RNA, ribosomes का पृथक्करण
- प्रोटीन complexes अलग करना

2B. Isopycnic Centrifugation (Equilibrium Centrifugation)

- Separation **घनत्व** पर आधारित
- हर कण तब तक ट्यूब में चलता रहता है जब तक वह gradient में **अपने बराबर घनत्व वाली परत** न पा ले
- वहाँ जाकर स्थिर हो जाता है → equilibrium

उपयोग:

- DNA separation (विशेषकर Meselson-Stahl experiment)
- प्लाज्मिड DNA purify करना
- लिपोप्रोटीन fractionation

---

3. Ultracentrifugation (अति-तीव्र अपकेंद्रीकरण)

बहुत तेज़ गति (40,000–100,000 rpm तक) से स्पिन किया जाता है।
रोटर के लिए मजबूत धातु (Titanium या Carbon fiber) उपयोग होती है।

उपयोग:

- वायरस particles का अलगाव
- रिबोसोम, सबयूनिट्स, प्रोटीन complexes
- DNA, RNA sedimentation
- सूक्ष्मतम कणों का विश्लेषण

---

4. Analytical Centrifugation

यह एक विशेष तकनीक है जिसमें sample को स्पिन करते समय real-time optical systems से उसकी **sedimentation rate** मापी जाती है।

उपयोग:

- प्रोटीन के molecular weight का निर्धारण
- binding interactions का अध्ययन
- polymer size की गणना

---

5. Preparative Centrifugation

यह बड़ी मात्रा में sample को अलग करने के लिए उपयोग होता है।
मुख्य उद्देश्य → **पृथक्करण**
न कि विश्लेषण।

■ Rpm और RCF में अंतर

- **RPM (rotations per minute)** – मशीन कितनी तेज़ घूम रही है
- **RCF (Relative Centrifugal Force)** – नमूने पर वास्तविक बल (g में)
  RCF नमूने की दूरी (radius) पर निर्भर करती है, इसलिए वैज्ञानिक RCF का प्रयोग करते हैं।

⍰ Centrifuge के मुख्य रोटर प्रकार

1. Fixed-angle rotor – ट्यूब त्रिकोण पर झुकी होती है

- पेलेट जल्दी बनता है
- differential centrifugation के लिए अच्छा

2. Swinging-bucket rotor – ट्यूब स्पिन करते समय सीधी खड़ी हो जाती है

- Density gradient centrifugation के लिए उपयुक्त

3. Vertical rotor – gradient separation के लिए

- ultracentrifugation में उपयोगी

सुरक्षा सावधानियाँ

- ट्यूबों को संतुलित (balance) करें
- ढक्कन सही से बंद करें
- rpm सीमा से बाहर न जाएँ

- सही प्रकार के ट्यूब उपयोग करें
- रेफ्रिजरेटेड centrifuge में तापमान 4°C रखें (यदि जैव नमूने हैं)

अपकेंद्रीकरण एक अत्यंत महत्वपूर्ण जैव-रासायनिक तकनीक है जो कणों को उनके घनत्व, आकार और आकार-प्रकार के आधार पर अलग करती है। इसका उपयोग कोशिकाएँ, ऑर्गेनेल्स, प्रोटीन, DNA, वायरस और अन्य जैविक कणों को अलग करने तथा उनका विश्लेषण करने में किया जाता है।

⋆ **1. Basic Principle (मूल सिद्धांत)**

अपकेंद्रीकरण (Centrifugation) का सिद्धांत यह है कि जब किसी मिश्रण (mixture) को बहुत तेज़ी से घुमाया जाता है, तो उस पर अपकेंद्रीय बल (centrifugal force) लगता है, जिसके कारण कण अपने *द्रव्यमान (mass)*, *आकार (size)* और *घनत्व (density)* के आधार पर अलग-अलग दर (sedimentation rate) से नीचे बैठते हैं।

- **भारी और अधिक घनत्व वाले कण** → तेज़ी से बाहर/नीचे की ओर जाते हैं → **Pellet** बनाते हैं
- **हल्के और कम घनत्व वाले कण** → ऊपर तरल में रह जाते हैं → **Supernatant**

यानी separation का आधार है:
✔ द्रव्यमान (Mass)
✔ आकार (Size/Shape)
✔ घनत्व (Density)
✔ माध्यम की चिपचिपाहट (Viscosity)
✔ और लगने वाला RCF (Relative Centrifugal Force)

⋆ 2. Components of a Centrifuge (सेंट्रीफ्यूज के मुख्य घटक)

सेंट्रीफ्यूज कई महत्वपूर्ण हिस्सों से मिलकर बना होता है, और हर भाग नमूने (sample) को सुरक्षित, तेज़ और प्रभावी तरीके से घुमाकर अलग करने में भूमिका निभाता है।

1. Rotor (रोटर)

रोटर सेंट्रीफ्यूज का हृदय (heart) माना जाता है।
यही वह हिस्सा है जिसमें ट्यूबें लगाई जाती हैं और जो उच्च गति से घूमता है।

रोटर की विशेषताएँ:

- अत्यंत मजबूत धातुएँ (एल्युमिनियम, टाइटेनियम, कार्बन फाइबर)
- उच्च गति सहन करने में सक्षम
- घूर्णन के दौरान केंद्र से बाहर की ओर भारी बल उत्पन्न करता है

रोटर के प्रकार:

(a) Fixed-Angle Rotor

- ट्यूबें 25–40° के कोण पर झुकी होती हैं
- कण जल्दी नीचे-किनारे पर जमा होते हैं
- **Differential centrifugation** के लिए सर्वश्रेष्ठ

(b) Swinging-Bucket Rotor

- शुरुआत में ट्यूबें नीचे लटकी रहती हैं
- घूमते समय सीधी (horizontal) हो जाती हैं
- **Density gradient centrifugation** के लिए आदर्श
- ग्रेडिएंट की परतों को डिस्टर्ब नहीं करता

(c) Vertical Rotor

- ट्यूब रोटर में सीधी लगी रहती है
- अति-तेज़ स्पिन में उपयोगी
- जल्दी equilibrium बनता है
- **Isopycnic centrifugation** में उपयोग

---

2. Motor (मोटर)

मोटर रोटर को शक्ति प्रदान करती है और उसे तेजी से घुमाती है।

विशेषताएँ:

- variable speed motor (विभिन्न rpm पर चल सकती है)
- बिना कंपन के smooth rotation
- high-torque design

भूमिका:

- rpm (rotations per minute) उत्पन्न करना
- स्थिर घूर्णन बनाए रखना
- अत्यधिक ताप से बचाने के लिए thermal protection

---

3. Control Panel (कंट्रोल पैनल)

यह सेंट्रीफ्यूज का मस्तिष्क (brain) है।

इसमें क्या नियंत्रित किया जाता है?

- **RPM / RCF (g-force)**
- **समय (time)**
- **तापमान (temperature)**
- **Acceleration / deceleration rate**
- त्रुटि संदेश (door error, imbalance error आदि)

डिजिटल कंट्रोल पैनल आधुनिक सेंट्रीफ्यूज में सामान्य है।

---

4. Refrigeration System (रेफ्रिजरेशन या कूलिंग सिस्टम)

जैविक नमूने (DNA, प्रोटीन, एंज़ाइम, कोशिकाएँ) गर्मी के प्रति संवेदनशील होते हैं।
उच्च rpm के दौरान मोटर और रोटर गर्मी पैदा करते हैं।

इसलिए कूलिंग सिस्टम का कार्य:

- तापमान को **4°C** या सेट किए गए मान पर बनाए रखना
- sample degradation रोकना
- एंज़ाइमेटिक गतिविधि को कम करना
- virus, cells, organelles की संरचना सुरक्षित रखना

कूलिंग **compressor** आधारित या **thermoelectric (Peltier)** आधारित हो सकती है।

---

5. Centrifuge Tubes (सेंट्रीफ्यूज ट्यूबें)

ये नमूना रखने के लिए विशेष प्रकार की ट्यूबें होती हैं।

विशेषताएँ:

- हाई-स्ट्रेंथ सामग्री:
    - Polypropylene (सबसे सामान्य)
    - Polycarbonate
    - Glass (कम उपयोग)
- leak-proof
- high-speed compatible
- अलग-अलग क्षमता: 0.2 mL से 50 mL एवं 100 mL तक

आवश्यकता:

- ट्यूबों को संतुलित (balance) रखना आवश्यक है
- सही सामग्री का चयन rpm पर निर्भर करता है

---

6. Lid and Locking System (ढक्कन और लॉकिंग सिस्टम)

सुरक्षा का सबसे महत्वपूर्ण भाग।

इसकी भूमिका:

- स्पिन के दौरान ट्यूबों को उड़ने से बचाना
- दबाव में विस्फोट/टूटने से रोकना
- accident होने पर rotor को रोकने में मदद
- ढक्कन बंद न हो तो मशीन चालू नहीं होती (safety interlock)

---

7. Safety Systems (सेफ्टी मैकेनिज़्म)

आधुनिक सेंट्रीफ्यूज सुरक्षा के लिए कई सिस्टम से लैस होते हैं—

इनमें शामिल:

- **Imbalance detection** — ट्यूब सही से balance न हों तो मशीन स्वतः बंद हो जाती है
- **Overheating protection** — मोटर तापमान बढ़ने पर बंद
- **Overspeed control** — rpm सीमा से ऊपर जाने नहीं देता
- **Emergency brake** — आपातकाल में रोटर को रोकता है
- **Shock-absorber base** — कंपन रोकता है

---

8. Chamber (चेंबर)

रोटर के चारों ओर की धातु-निर्मित जगह।

कार्य:

- रोटर को सुरक्षित घेरना
- दुर्घटना होने पर flying debris को रोकना
- शोर और कंपन कम करना
- ठंड (cooling) का तापमान अंदर बनाए रखना

---

9. Drive Shaft / Spindle (ड्राइव शाफ्ट)

मोटर और रोटर के बीच लिंक।
मोटर की घूर्णन ऊर्जा रोटर तक इसी से पहुँचती है।

★ संक्षिप्त सार (Exam-Ready Summary)

Component	मुख्य कार्य

Component	मुख्य कार्य
Rotor	नमूने को तेज़ी से घुमाना; separation संभव बनाना
Motor	रोटर को घुमाने की शक्ति देना
Control Panel	rpm, समय, तापमान नियंत्रित करना
Refrigeration System	नमूने को ठंडा रखना; गर्मी से बचाना
Tubes	नमूना रखने वाले कंटेनर
Lid/Lock System	सुरक्षा सुनिश्चित करना
Safety Systems	imbalance, overheating, overspeed रोकना
Chamber	रोटर को सुरक्षित रूप से ढकना

नीचे **Centrifugation के Types (Differential/Velocity और Density Gradient)** का **गहन लेकिन सरल, परीक्षा-उपयुक्त** विस्तृत हिंदी विवरण दिया गया है:

⋆ Types of Centrifugation (अपकेंद्रीकरण के प्रकार)

मुख्यतः **दो प्रमुख प्रकार** हैं:

1. **Differential / Velocity Centrifugation (अंतरक / वेग अपकेंद्रीकरण)**
2. **Density Gradient Centrifugation (घनत्व-ढाल अपकेंद्रीकरण)**

⋆ 1. Differential / Velocity Centrifugation (अंतरक/वेग अपकेंद्रीकरण)

यह सबसे बुनियादी और सबसे अधिक उपयोग किया जाने वाला प्रकार है।
इसमें कणों को **उनके आकार, द्रव्यमान और sedimentation velocity** के आधार पर अलग किया जाता है।

✔ सिद्धांत (Principle)

जब मिश्रण को क्रमशः बढ़ती हुई rpm पर घुमाया जाता है, तो भारी कण पहले और हल्के कण बाद में नीचे बैठते हैं।
हर बार बनने वाले **pellet** और **supernatant** से अलग-अलग कण प्राप्त होते हैं।

✔ प्रक्रिया (Steps)

1. Sample को कम गति पर स्पिन →
   सबसे भारी कण (जैसे nucleus) नीचे आकर **pellet** बनाते हैं।
2. ऊपर का **supernatant** नई ट्यूब में ले लिया जाता है।
3. rpm बढ़ाई जाती है →
   अब हल्के लेकिन बड़े कण (mitochondria, lysosomes) नीचे आते हैं।
4. यह प्रक्रिया कई बार दोहराई जाती है
   → हर बार एक अलग ऑर्गेनेल का pellet मिलता है।

✔ किस आधार पर separation होता है?

- आकार (size)
- द्रव्यमान (mass)
- density
- sedimentation velocity

✔ उपयोग (Applications)

- Cell fractionation
- Nucleus, mitochondria, lysosomes अलग करना
- Ribosomes और अन्य subcellular components प्राप्त करना

⋆ 2. Density Gradient Centrifugation (घनत्व-ढाल अपकेंद्रीकरण)

इस तकनीक में sample को एक ऐसी ट्यूब में रखा जाता है जिसमें **विभिन्न घनत्व की परतें** (जैसे sucrose, CsCl) बनी होती हैं।
कण gradient में नीचे की ओर चलते हैं और **अपने घनत्व, आकार या गति** के आधार पर अलग होते हैं।

द्वि-प्रकार (सबसे महत्वपूर्ण):

A. Rate-Zonal Centrifugation

B. Isopycnic (Equilibrium) Centrifugation

⋆ A. Rate-Zonal Centrifugation (रेट-ज़ोनल अपकेंद्रीकरण)

✔ सिद्धांत:

कणों को **उनके आकार (size) और shape** के आधार पर अलग किया जाता है।
घनत्व-ढाल कणों को फैलने (diffusion) से रोकती है।

विशेषताएँ:

- separation मुख्यतः **sedimentation rate** पर आधारित
- हल्के और छोटे कण ऊपर रहते हैं
- बड़े और भारी कण नीचे की ओर जाते हैं
- समय नियंत्रित होना आवश्यक है (overtime pellet न बनें)

उपयोग:

- वायरस (viruses) का पृथक्करण
- Ribosomes / mRNA complexes
- Protein subunits

⋆ B. Isopycnic (Equilibrium) Centrifugation (सम-घनत्व अपकेंद्रीकरण)

✔ सिद्धांत:

कण gradient में तब तक चलते हैं जब तक वे **अपने समान घनत्व (isopycnic point)** वाली परत तक न पहुँच जाएँ।
वहीं स्थिर हो जाते हैं → equilibrium बनता है।
यह पूरी तरह **density-based separation** है।

विशेषताएँ:

- कणों का आकार/आकार-प्रकार मायने नहीं रखता
- separation समय पर निर्भर नहीं
- कण pellet नहीं बनाते
- सबसे शुद्ध (highly pure) separation प्रदान करता है

उपयोग:

- DNA separation (Meselson-Stahl experiment)
- Plasmid DNA isolation
- Lipoprotein fractionation
- बहुत छोटे कणों का ultra-purification

⋆ सारणी (Quick Comparison Table)

प्रकार	Principle	आधार	उपयोग
Differential / Velocity	अलग-अलग rpm पर heavy/light कण अलग होते हैं	Size, mass	Cell organelles
Rate-Zonal	gradient में size/shape के अनुसार गति	Size + shape	Viruses, ribosomes
Isopycnic (Equilibrium)	कण अपने density point पर रुकते हैं	Density	DNA, lipoproteins

---

⋆ Difference between g-value (RCF) and RPM

1. RPM (Rotations Per Minute)

- यह बताता है कि **रोटर एक मिनट में कितनी बार घूमता है**।
- यह केवल **गति (speed)** मापता है।
- यह नमूने पर लगने वाला वास्तविक बल नहीं बताता।
- **हर सेंट्रीफ्यूज में एक ही RPM पर अलग-अलग बल लग सकता है**, क्योंकि रोटर का radius अलग होता है।

✔ RPM किस पर निर्भर करता है?

- केवल **मोटर की घूमने की गति** पर।

⋆ 2. g-value / RCF (Relative Centrifugal Force)

- यह बताता है कि नमूने पर **कितना वास्तविक अपकेंद्रीय बल** लग रहा है।
- g-value = पृथ्वी के गुरुत्व (1 g = 9.8 m/s²) के कितने गुना बल के बराबर है।
- यह **नमूने की स्थिति (radius)** और **RPM दोनों** पर निर्भर करता है।

✔ यह अधिक विश्वसनीय माप है क्योंकि:

- हर प्रयोग में आवश्यक बल को ठीक-ठीक नियंत्रित किया जा सकता है।
- दुनिया की किसी भी मशीन पर समान RCF = समान परिणाम।

⋆ 3. संबंध (Relationship between RPM & RCF)

RCF (g) = $\mathbf{1.118 \times 10^{-5} \times r \times (RPM)^2}$
जहाँ r = रोटर का radius (cm में)

□ इसका मतलब:

- **RPM बढ़ेगा → g-value तेजी से बढ़ेगा (square relation)**

- radius बड़ा होगा → g-value भी बढ़ेगा

⋆ 4. मुख्य अंतर तालिका

विशेषता	RPM	g-value (RCF)
पूरा नाम	Rotations per minute	Relative Centrifugal Force
अर्थ	रोटर कितनी तेजी से घूम रहा है	नमूने पर लगने वाला वास्तविक बल
निर्भरता	केवल गति	गति + रोटर की रेडियस
मशीन-विशिष्ट?	हाँ (हर मशीन पर अलग)	नहीं (हर मशीन पर समान)
वैज्ञानिक प्रयोगों में कौन अधिक महत्वपूर्ण?	कम	**अधिक**, क्योंकि बल सटीक मिलता है
गणना	सीधा पढ़ा जाता है	सूत्र से गणना करनी पड़ती है

⋆ 5. आसान भाषा में अंतर:

- **RPM = चक्के की घूमने की रफ्तार**
- **g-value = नमूने पर लगने वाला वास्तविक खिंचाव/दबाव**

⋆ 1. Preparative Centrifugation (तैयारी / पृथक्करण अपकेंद्रीकरण के उपयोग)

Preparative centrifugation का मुख्य उद्देश्य **किसी मिश्रण से बड़ी मात्राओं में कणों या जैव-अणुओं को अलग (isolate) और शुद्ध (purify) करना** है।
इसका उपयोग हमेशा *preparation* या *purification* के लिए किया जाता है।

✔ A. Cell Fractionation (कोशिकीय भागों को अलग करना)

- Nucleus
- Mitochondria

- Lysosomes
- Chloroplasts
- Ribosomes
  को अलग करने के लिए differential centrifugation का व्यापक उपयोग।

✔ B. Biomolecule Purification (जैव-अणुओं की शुद्धि)

- DNA, plasmid DNA
- RNA
- Proteins
- Enzyme complexes

इनको high-purity में प्राप्त करने के लिए preparative density-gradient centrifugation उपयोग होती है।

✔ C. Virus Isolation (वायरस का पृथक्करण)

- वायरस particles को संक्रमित कोशिकाओं से अलग करना
- रेट-ज़ोनल तथा equilibrium centrifugation दोनों उपयोगी

✔ D. Large-scale Separation

- Blood components (RBC, WBC, platelets, plasma) का पृथक्करण
- Industrial biotechnology में cells / biomass recovery
- Vaccine production में viral particles collect करना

✔ E. Lipoproteins Separation

HDL, LDL, VLDL को density-gradient centrifugation से अलग करना।

✔ F. Organellar and Membrane Isolation

- Cell membrane, nuclear membrane
- Endoplasmic reticulum / microsomes
- Golgi bodies fractionation

⋆ 2. Analytical Centrifugation (विश्लेषणात्मक अपकेंद्रीकरण के उपयोग)

Analytical centrifugation का उद्देश्य **कणों के भौतिक और रासायनिक गुणों का अध्ययन (analysis)** करना होता है, न कि उन्हें अलग करना।

मुख्यतः उच्च-प्रसिशन (high precision) शोध कार्यों में उपयोग होती है।

✔ A. Molecular Weight Determination (अणुभार निर्धारण)

Proteins, nucleic acids आदि के molecular weight का सटीक निर्धारण *sedimentation coefficient* के माध्यम से किया जाता है।

✔ B. Sedimentation Coefficient (S-value) मापना

किसी कण की sedimentation velocity का मापन →
इससे उसके आकार, घनत्व, द्रव्यमान का पता चलता है।

✔ C. Protein–Protein Interaction Studies

- Complex formation
- Oligomerization
- Association–dissociation kinetics
  का अध्ययन real-time optical detection से।

✔ D. Shape and Conformation Analysis

मॉलिक्यूल की shape / conformation में बदलाव (folding–unfolding) का विश्लेषण।

✔ E. Nucleic Acid Analysis

- DNA और RNA की purity
- अलग-अलग density forms (supercoiled, linear, circular)
- Heterogeneity का अध्ययन

✔ F. Polymer और Nanoparticle Characterization

- Particle size distribution
- Aggregation properties
- Stability और sedimentation behavior

✔ G. Thermodynamics और Binding Studies

- Binding constants
- Stoichiometry
- Stability of complexes

ये studies खासकर शोध एवं biophysics प्रयोगशालाओं में की जाती हैं।

⋆ संक्षिप्त सारणी (Exam-Ready Table)

प्रकार	उद्देश्य	मुख्य उपयोग
Preparative Centrifugation	बड़ी मात्रा में पृथक्करण / शुद्धि	Cell organelles, DNA/RNA, proteins, viruses, blood components
Analytical Centrifugation	भौतिक-रासायनिक गुणों का विश्लेषण	Molecular weight, sedimentation coefficient, interactions, shape, nanoparticles

---

⋆ Chromatography (क्रोमैटोग्राफी) क्या है?

क्रोमैटोग्राफी एक विश्लेषणात्मक (analytical) और पृथक्करण (separation) तकनीक है, जिसमें मिश्रण (mixture) के कणों को **दो phases**—

1. **Stationary Phase (स्थिर अवस्था)**
2. **Mobile Phase (गतिशील अवस्था)**
   के साथ उनकी **अलग-अलग affinity (आकर्षण)** के आधार पर अलग किया जाता है।

⋆ Basic Principle (मूल सिद्धांत)

मिश्रण के विभिन्न अवयव

- स्थिर अवस्था (stationary phase) से कितनी देर चिपकते हैं
- चल अवस्था (mobile phase) में कितनी तेजी से आगे बढ़ते हैं
  इन दोनों के अंतर के आधार पर अलग हो जाते हैं।

✔ अधिक affinity → धीमी गति → पीछे रह जाता है
✔ कम affinity → तेज़ गति → आगे निकल जाता है

⋆ Chromatography के मुख्य प्रकार (Major Types of Chromatography)

Chromatography को कई आधारों पर वर्गीकृत किया जाता है:

---

1. Adsorption Chromatography (एडसॉर्प्शन क्रोमैटोग्राफी)

- Stationary phase: Solid
- Mobile phase: Liquid / Gas

- Separation **adsorption/affinity** पर आधारित
  उदाहरण: Column chromatography, TLC

---

2. Partition Chromatography (पार्टिशन क्रोमैटोग्राफी)

- Stationary phase: Liquid (solid पर coat किया हुआ)
- Mobile phase: Liquid
- Separation **solubility** तथा दो liquids में partition पर आधारित
  उदाहरण: Paper chromatography

---

3. Ion-Exchange Chromatography (आयन एक्सचेंज क्रोमैटोग्राफी)

- Stationary phase: charged resin (cation/anion exchangers)
- Separation: **charge** (धनायन/ऋणायन) के आधार पर
  उदाहरण: Protein purification, water softening

---

4. Gel Filtration / Size Exclusion Chromatography

- Stationary phase: porous beads
- Separation: **size (आकार)**
  ✔ बड़े molecule → पहले निकलते हैं
  ✔ छोटे molecule → पोर्स में प्रवेश कर देर से निकलते हैं

उपयोग:

- प्रोटीन, कार्बोहाइड्रेट्स, polymers

---

5. Affinity Chromatography (विशिष्टता आधारित क्रोमैटोग्राफी)

- Stationary phase में ligand होता है
- Ligand विशेष रूप से target molecule को bind करता है

उदाहरण:

- एंटीबॉडी–एंटीजन
- एंजाइम–सब्सट्रेट
- His-tag proteins purification

सबसे उच्च-सटीक (highly specific) तकनीक।

---

6. Gas Chromatography (GC)

- Mobile phase: Carrier gas (He, N_2)
- Stationary phase: Liquid/polymer on column
- Volatile compounds के लिए उपयोग

---

7. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

- High-pressure pumps
- High-resolution
- Pharmacy, food, water testing में सबसे अधिक उपयोग

टाइप:

- Normal phase
- Reverse phase (सबसे आम)
- Ion exchange
- Size exclusion

⋆ Column Chromatography (कॉलम क्रोमैटोग्राफी)

Column chromatography एक महत्वपूर्ण *adsorption–based separation* तकनीक है, जिसमें मिश्रण को एक **column** के अंदर भरे हुए **stationary phase** से गुज़ारा जाता है और mobile phase (solvent) बहने पर अवयव उनकी **affinity (आकर्षण)** के आधार पर अलग हो जाते हैं।

⋆ 1. Principle (सिद्धांत)

Column chromatography **adsorption** एवं **differential affinity** के सिद्धांत पर कार्य करती है:

- जिन अवयवों का **stationary phase** (जैसे silica, alumina) से आकर्षण अधिक होता है → वे धीरे निकलते हैं।
- जिनका आकर्षण कम होता है → वे पहले बाहर निकलते हैं।

इस प्रकार mixture के components अलग-अलग बैंड बनाकर column से अलग-अलग समय पर निकलते हैं।

⋆ 2. Components (मुख्य भाग)

✔ (i) Column (स्तंभ)

- काँच / प्लास्टिक की लंबी ट्यूब
- नीचे टेपर्ड end (narrow) होता है ताकि flow smooth रहे

✔ (ii) Stationary Phase (स्थिर अवस्था)

- सबसे सामान्य:
  - **Silica gel (SiO_2)**
  - **Alumina (Al_2O_3)**
- सामान्यतः polar nature की होती है
- powder या gel form में

✔ (iii) Mobile Phase (गतिशील अवस्था)

- उपयुक्त organic solvents:
  - Hexane
  - Ethyl acetate
  - Chloroform
  - Methanol
- Non-polar से polar तक gradients का उपयोग

✔ (iv) Sample

- मिश्रण जिसे अलग करना हो
- Solution form में column के ऊपर डाला जाता है

✔ (v) Fraction Collector / Beaker

- Column से बहकर निकलने वाले अलग-अलग fractions collect किए जाते हैं

⋆ 3. Procedure (प्रक्रिया – stepwise)

Step 1: Column Packing

- Column में stationary phase (silica/alumina) को dry pack या slurry pack method से भरा जाता है।
- Column में कोई air bubble न रहे, uniform packing आवश्यक है।

Step 2: Equilibration

- Mobile phase column से गुजारी जाती है
- ताकि column flow stable हो जाए

Step 3: Sample Loading

- Sample को column के top पर सावधानी से डाला जाता है
- ऊपर से solvent डालकर इसे stationery phase में adsorb होने दिया जाता है

Step 4: Elution (धुलाई/निकास)

- Mobile phase लगातार column से गुजरती है

- Mixture के components उनकी polarity एवं affinity के अनुसार अलग-अलग बाहर निकलते जाते हैं

Step 5: Fractions Collection

- अलग-अलग समय पर बाहर निकलने वाले fractions अलग-अलग test tubes में collect किए जाते हैं

Step 6: Analysis

- Fractions को TLC, spectrophotometry या अन्य विधियों से जांचते हैं
- इस तरह pure components प्राप्त होते हैं

⋆ 4. Types of Column Chromatography (प्रकार)

✔ (1) Adsorption Column Chromatography

- सबसे मूल प्रकार
- Silica / alumina stationary phase
- Separation polarity/adsorption पर

✔ (2) Partition Column Chromatography

- Stationary phase liquid होती है जो एक ठोस पर coat रहती है
- Separation solubility पर आधारित

✔ (3) Ion Exchange Column Chromatography

- Stationary phase में charged resin
- Separation charge के आधार पर
- Proteins, amino acids purification

✔ (4) Gel Filtration / Size Exclusion Column Chromatography

- Stationary phase: porous beads
- Separation size पर आधारित

- बड़े molecules पहले निकलते हैं

✔ (5) Affinity Column Chromatography

- Stationary phase में specific ligand
- Target molecule विशेष रूप से bind करता है
- सबसे specific और powerful technique

⋆ 5. Applications (उपयोग)

✔ Organic/Plant compounds की purification

- Alkaloids
- Pigments
- Essential oils
- Natural products

✔ Proteins और enzymes purification

(विशेषकर affinity, ion exchange और size-exclusion columns में)

✔ Pharmaceutical analysis

- Drugs का isolation
- Impurities हटाना

✔ Biochemical separations

- Sugars
- Peptides
- Lipids
- Polymers

✔ Industrial applications

- Dye purification
- Chemical refining
- Food industry (flavor compounds purification)

नीचे **TLC (Thin Layer Chromatography)** का **सटीक, सरल, गहराई से — परीक्षा-उपयुक्त** विवरण दिया गया है:

⭑ Thin Layer Chromatography (TLC)

TLC एक *adsorption chromatography* तकनीक है जिसमें पदार्थों को एक **पतली परत (thin layer)** पर फैले हुए stationary phase पर उनकी *polarity और affinity* के आधार पर अलग किया जाता है।

⭑ 1. Principle (सिद्धांत)

TLC **adsorption** तथा **differential affinity** के सिद्धांत पर काम करती है।

- **Stationary phase:** silica gel / alumina की पतली परत
- **Mobile phase:** solvent या solvent मिश्रण

जब solvent ऊपर चढ़ता है, तो मिश्रण के molecule stationary phase से

- **जिनका आकर्षण अधिक** → धीमे चलते हैं
- **जिनका आकर्षण कम** → तेज़ी से चलते हैं

इस प्रकार अलग-अलग molecules अलग जगह पर रुक जाते हैं → spots बनते हैं।

⭑ 2. Components (मुख्य भाग)

✔ (i) TLC Plate

- काँच, प्लास्टिक या एल्युमिनियम शीट
- ऊपर silica gel / alumina की 0.1–0.25 mm मोटी परत

✔ (ii) Stationary Phase

- Silica gel (polar)
- Alumina (polar)
  इनकी polarity separation का आधार बनती है।

✔ (iii) Mobile Phase (Solvent System)

- Hexane, Ethyl acetate, Chloroform, Methanol आदि
- अक्सर solvent mixtures (hexane:ethyl acetate) प्रयोग होते हैं

✔ (iv) Chamber (Developing Jar)

- जिसमें TLC plate रखकर solvent को ऊपर चढ़ाया जाता है
- Lid आवश्यक है ताकि solvent vapour escape न हो

✔ (v) Sample

- घोला हुआ मिश्रण
- Capillary tube से spot लगाया जाता है

⋆ 3. Procedure (प्रक्रिया)

Step 1 — Plate Preparation

- TLC plate पर baseline (pencil से) खींचते हैं
- Capillary tube से sample को छोटी spot के रूप में लगाया जाता है

Step 2 — Chamber Preparation

- Chamber में mobile phase solvent डाला जाता है
- Filter paper लगाया जाता है ताकि chamber saturated हो जाए

Step 3 — Development

- Plate को धीरे से chamber में खड़ा रखते हैं
- Solvent ऊपर की ओर capillary action से चढ़ता है
- Compounds अपनी affinity के अनुसार अलग-अलग distance तक जाते हैं

Step 4 — Drying

- Solvent front तक पहुँचने पर plate बाहर निकालकर सुखाते हैं

Step 5 — Visualization

- Colorless compounds को UV light, iodine chamber, या specific spray से visualize किया जाता है

Step 6 — Rf Value Calculation

Rf =
[
\frac{\text{Distance traveled by solute}}{\text{Distance traveled by solvent}}
]

⋆ 4. Interpretation (परिणाम का विश्लेषण)

- **कम polarity वाले compound** → ऊपर तक जाते हैं → High Rf
- **अधिक polarity वाले compound** → नीचे रहते हैं → Low Rf

Rf मूल्य **0–1** के बीच होता है।

⋆ 5. Types of TLC

- **Normal Phase TLC** — silica/alumina (polar)
- **Reverse Phase TLC** — non-polar stationary phase
- **Preparative TLC** — बड़े पैमाने पर purification के लिए
- **HPTLC (High Performance TLC)** — उच्च resolution, quantitative analysis

---

⋆ 6. Applications (उपयोग)

✔ 1. Purity Test (शुद्धता जांच)

Drug, chemical, extract में impurity मौजूद है या नहीं।

✔ 2. Reaction Monitoring

Chemical reaction पूरी हुई या नहीं।

✔ 3. Natural Product Analysis

Plant pigments, essential oils, alkaloids का पृथक्करण।

✔ 4. Drug Identification

Pharmaceutical analysis में identity check के लिए।

✔ 5. Amino Acids / Sugars Separation

विशेष visualization reagents का उपयोग करके।

✔ 6. Forensic Applications

- Ink, poison, dyes, drugs का विश्लेषण
- Crime investigation में उपयोग

✔ 7. Food Industry

- Preservatives
- Coloring agents
- Lipids का detection

⋆ 7. Advantages (फायदे)

- तेज़ (rapid)
- सस्ता (low cost)
- कम sample की आवश्यकता
- कई samples एक साथ analyze कर सकते हैं
- आसान visualization

⋆ 8. Disadvantages (कमियाँ)

- कम separation efficiency
- quantitative analysis कठिन
- solvent चुनना महत्वपूर्ण

⋆ Paper Chromatography (पेपर क्रोमैटोग्राफी)

Paper chromatography एक *partition chromatography* technique है जिसमें **कागज़ (filter paper)** का उपयोग **stationary phase** के रूप में और उपयुक्त **solvent** का उपयोग **mobile phase** के रूप में होता है।

यह technique मुख्यतः **small molecules जैसे amino acids, sugars, pigments** के पृथक्करण और पहचान के लिए उपयोग होती है।

⋆ 1. Principle (सिद्धांत)

- पेपर chromatography का principle **partition** पर आधारित है।
- Stationary phase: **Water molecules adsorbed on cellulose fibers** of paper
- Mobile phase: **Solvent (liquid)**

जब solvent ऊपर की ओर चढ़ता है, तो मिश्रण के molecules अपनी **solubility और partition coefficient** के आधार पर अलग-अलग दूरी तक चलते हैं।

- अधिक water-soluble compounds → cellulose में adsorb होकर धीरे चलते हैं
- कम water-soluble / more solvent-soluble compounds → जल्दी ऊपर जाते हैं

⋆ 2. Components (मुख्य भाग)

(i) Stationary Phase

- Filter paper / Whatman paper
- Polar cellulose fibers

(ii) Mobile Phase (Solvent)

- Water, ethanol, acetone, hexane, mixtures
- Choice depends on polarity of compounds

(iii) Sample

- Dissolved in small volume of solvent
- Spotting with capillary tube

(iv) Developing Chamber

- Jar / beaker with solvent at bottom
- Lid necessary for vapor saturation

(v) Visualization Methods

- UV light
- Iodine vapors
- Ninhydrin (amino acids के लिए)
- Specific dyes

⋆ 3. Procedure (प्रक्रिया stepwise)

Step 1: Spotting

- Paper पर baseline pencil से खींचें
- Sample को small spot के रूप में apply करें

Step 2: Developing

- Paper को jar में vertically रखें, baseline solvent में न डूबे
- Solvent ऊपर की ओर capillary action से चढ़ता है
- Compounds अलग-अलग distances तक चलते हैं

Step 3: Drying and Visualization

- Paper को solvent front तक पहुँचने पर बाहर निकालकर सुखाएं
- Spots visualize करने के लिए appropriate method use करें

Step 4: Rf Value Calculation

[
Rf = \frac{\text{Distance traveled by solute}}{\text{Distance traveled by solvent front}}
]

- Rf value हमेशा **0–1** के बीच होती है
- Compounds की पहचान और comparison में प्रयोग होती है

⋆ 4. Types of Paper Chromatography

1. **Ascending Chromatography**
   - Solvent नीचे से ऊपर की ओर move करता है
   - सबसे common method
2. **Descending Chromatography**
   - Solvent top to bottom gravity assisted
   - Large molecules के लिए उपयोग
3. **Radial / Circular Chromatography**
   - Circular paper plate
   - Solvent center से outward चलता है

⋆ 5. Applications (उपयोग)

✔ 1. Amino Acids Separation

- Ninhydrin reagent से visualize

✔ 2. Sugars Separation

- Molisch reagent या other stains use

✔ 3. Plant Pigments

- Chlorophyll, carotenoids, anthocyanins

✔ 4. Drug Analysis

- Drug purity, identification

✔ 5. Food Industry

- Dyes, additives, preservatives

✔ 6. Forensic Science

- Ink, dye, poison identification

⋆ 6. Advantages (फायदे)

- Simple and cheap
- Small sample required
- Rapid analysis possible
- Multiple samples एक साथ analyze कर सकते हैं

⋆ 7. Disadvantages (कमियाँ)

- Limited separation efficiency
- Quantitative analysis कठिन
- Only suitable for small molecules

⋆ 8. Exam Tips / Key Points

Feature	Paper Chromatography
Stationary phase	Water adsorbed on cellulose (polar)
Mobile phase	Solvent / solvent mixture
Principle	Partition between stationary and mobile phase
Visualization	UV light, iodine, ninhydrin

Feature	Paper Chromatography
Applications	Amino acids, sugars, pigments, drugs, inks

⋆ Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion Chromatography)

Gel filtration chromatography को **Size Exclusion Chromatography (SEC)** भी कहते हैं। यह technique **molecule के आकार और आकर (size / molecular weight)** के आधार पर अलगाव करती है।

---

1. Principle (सिद्धांत)

- **आधार:** Molecules का **size / आकार** और **stationary phase में pore (छिद्र) में प्रवेश** करने की क्षमता।
- **Mechanism:**
  1. Column में porous beads (gel matrix) भरी होती हैं।
  2. छोटे molecules beads के **pores में फंसते हैं**, इसलिए उनका column से निकलने का समय ज्यादा होता है।
  3. बड़े molecules pores में प्रवेश नहीं कर पाते → जल्दी elute होते हैं।

Key Point:

Molecule का elution time inversely proportional है उनके आकार के साथ।

- बड़े molecules → जल्दी बाहर निकलते हैं
- छोटे molecules → देर से बाहर निकलते हैं

Note: इसमें **chemical interaction नहीं होती**, केवल **physical size separation** होती है।

---

2. Components (घटक)

Component	Role	Examples / Notes
Column	Gel matrix को hold करना	Glass / Plastic column

Component	Role	Examples / Notes
Stationary Phase (Gel Beads / Matrix)	Molecules को size के आधार पर अलग करना	Agarose, Sephadex, Polyacrylamide beads
Mobile Phase (Eluent / Buffer)	Molecules को column में carry करना	Phosphate buffer, Saline, Water
Sample	Mixture जिसे separate करना है	Proteins, Polysaccharides, Nucleic acids
Fraction Collector	Eluted fractions collect करना	Tubes, automated collector
Detector / Monitoring System	Molecules की presence detect करना	UV absorbance at 280 nm (proteins), refractive index

---

3. Working (कार्यप्रणाली)

Stepwise Process:

1. **Column Preparation**
   - Column में porous gel beads को carefully pack किया जाता है।
   - Gel को buffer से equilibrate किया जाता है।
2. **Sample Application**
   - Sample को column के top पर carefully load किया जाता है।
   - Sample beads के pores में प्रवेश करने वाला और न करने वाला अलग-अलग होता है।
3. **Elution (Fraction Collection)**
   - Buffer / Mobile phase को column में flow कराया जाता है।
   - Large molecules → pores में प्रवेश नहीं कर पाते → जल्दी elute
   - Small molecules → pores में फंसते हैं → धीरे धीरे elute
   - Fraction collector में separate fractions collect किए जाते हैं।
4. **Detection / Analysis**
   - UV absorbance (proteins) या refractive index द्वारा eluted fractions detect किए जाते हैं।
   - Molecular weight estimation भी possible है।

---

4. Applications (उपयोग)

1. **Protein Purification**
   - Proteins को molecular weight के अनुसार separate करने में।
2. **Polysaccharides / Carbohydrates Separation**
   - Polysaccharides को अलग-अलग size के आधार पर fractionate करने में।
3. **Molecular Weight Estimation**
   - Proteins और polysaccharides का approximate molecular weight पता करने में।
4. **Removal of Salt / Small Molecules**
   - Dialysis या buffer exchange के लिए small molecules को separate किया जा सकता है।
5. **Virus Purification**
   - Viruses और viral particles को proteins से अलग करने में।
6. **Analytical & Preparative Purpose**
   - Lab scale: Molecular separation
   - Industrial scale: Biopharmaceutical purification

---

5. Advantages (फायदे)

- Gentle method (proteins/activity सुरक्षित रहती है)
- No chemical interaction → protein structure damage नहीं होता
- Molecular weight estimation possible
- High reproducibility

---

6. Limitations / Disadvantages (कमियाँ)

- Resolution कम होती है अगर molecules size में बहुत similar हों
- Large volume sample से time-consuming
- Only size-based separation, chemical property नहीं consider होती

Summary Table

Parameter	Gel Filtration Chromatography

Parameter	Gel Filtration Chromatography
Principle	Separation based on size; large molecules elute first
Stationary Phase	Porous beads (Agarose, Sephadex, Polyacrylamide)
Mobile Phase	Buffer / Solvent
Separation Basis	Molecular size / shape
Applications	Protein purification, polysaccharide fractionation, molecular weight estimation
Advantages	Gentle, no chemical interaction, reproducible
Limitations	Resolution limited for similar-sized molecules

⋆ Ion-Exchange Chromatography (IEC)

Ion-Exchange Chromatography एक **separation technique** है जो **molecule के charge (आयन चार्ज)** के आधार पर separation करती है। इसे **cation-exchange** और **anion-exchange** chromatography में बांटा जा सकता है।

---

1 Principle (सिद्धांत)

- Column में **charged resin (stationary phase)** भरी होती है।
- Molecules अपने charge के अनुसार resin से **electrostatic interaction** करते हैं।
- **Mechanism:**
    1. Oppositely charged molecules resin से bind होते हैं।
        - Cation exchange → positively charged molecules bind (resin negatively charged)
        - Anion exchange → negatively charged molecules bind (resin positively charged)
    2. Bound molecules को **buffer में ionic strength या pH gradient बदलकर** sequentially elute किया जाता है।

Key point: Molecules resin के साथ **charge interaction की strength** के अनुसार अलग-अलग समय पर column से बाहर निकलते हैं।

---

2 Components (घटक)

Component	Role	Examples / Notes
Column	Resin को hold करना	Glass / Plastic column
Stationary Phase (Resin)	Charged molecules bind करना	DEAE-cellulose (anion), CM-cellulose (cation)
Mobile Phase (Buffer / Eluent)	Molecules carry करना और elute करना	Buffer with variable pH / salt gradient
Sample	Mixture जिसे separate करना है	Proteins, Peptides, Amino acids, Nucleotides
Fraction Collector	Eluted fractions collect करना	Tubes / Automated collector
Detector / Monitoring System	Molecules detect करना	UV absorbance, Conductivity meter

---

3 Working (कार्यप्रणाली)

Stepwise Process:

1. **Column Preparation**
   - Resin (charged beads) column में pack किया जाता है।
   - Column buffer से equilibrate किया जाता है।
2. **Sample Loading**
   - Sample column के top पर carefully load किया जाता है।
   - Oppositely charged molecules resin से bind हो जाते हैं।
3. **Elution**
   - Buffer gradient (pH या salt) apply करके molecules sequentially elute होते हैं।
   - Weakly bound molecules पहले, strongly bound molecules बाद में elute होते हैं।
4. **Detection / Analysis**
   - Eluted fractions UV absorbance, conductivity, या अन्य suitable detector से monitor किए जाते हैं।

---

4 Applications (उपयोग)

1. **Protein Purification**
   - Proteins को उनकी charge के अनुसार fractionate करने में।
2. **Amino Acid / Peptide Separation**
   - Amino acids और small peptides को अलग करने में।
3. **Enzyme Purification**
   - Active enzymes को impurities से अलग करने में।
4. **Nucleotide / DNA Separation**
   - Negatively charged nucleotides को separate करने में।
5. **Removal of Impurities**
   - Industrial scale protein purification और pharmaceutical preparations में।

Summary Table

Feature	Ion-Exchange Chromatography
Principle	Separation based on charge (electrostatic interaction)
Stationary Phase	Charged resin (DEAE, CM-cellulose)
Mobile Phase	Buffer with salt or pH gradient
Elution	Sequential based on charge interaction strength
Applications	Protein, peptide, amino acid purification, enzyme purification
Interaction Type	Electrostatic / ionic

⋆ Partition Chromatography (पार्टिशन क्रोमैटोग्राफी)

Partition Chromatography एक प्रकार की chromatography है जिसमें **मॉलिक्यूल्स का separation उनकी solubility और partition coefficient के आधार पर होता है**। इसे **Liquid-Liquid Chromatography** भी कहा जाता है।

---

1 Principle (सिद्धांत / मूल सिद्धांत)

- Separation **दो असमिश्रणीय चरणों (Immiscible Phases)** में molecules की **vibhajan प्रवृत्ति (Partition Coefficient, K)** पर आधारित होती है।
- एक phase **Stationary Phase (स्थिर अवस्था)** होती है, जो आमतौर पर **liquid layer coated on solid support** होती है।
- दूसरा phase **Mobile Phase (गतिशील अवस्था)** होता है, जो molecules को carry करता है।

Mechanism (कार्यविधि)

1. Molecules अपनी **solubility और partition coefficient (K = C_stationary / C_mobile)** के अनुसार अलग-अलग गति से move करते हैं।
2. Molecules जो **stationary phase में अधिक soluble** होते हैं → धीरे चलते हैं।
3. Molecules जो **mobile phase में अधिक soluble** होते हैं → जल्दी move करते हैं।

Key Point: यह method **chemical interaction नहीं**, बल्कि केवल **solubility और partition coefficient** पर आधारित है।

---

2 Components (घटक)

Component	Role (भूमिका)	Examples / Notes
Stationary Phase	Molecules को अलग करने के लिए liquid layer	Liquid coated on solid support (e.g., water on cellulose paper)
Mobile Phase (Eluent)	Molecules को carry करना	Organic solvents, buffers
Sample	Mixture जिसे separate करना है	Amino acids, sugars, dyes, vitamins
Support / Column / Paper	Stationary phase को hold करना	Paper (TLC, Paper Chromatography), Column
Fraction Collector / Detector	Eluted molecules detect और collect करना	UV light, Iodine vapors, Ninhydrin, Fraction tubes

---

3 Working (कार्यप्रणाली / कार्यविधि)

Stepwise Process (चरणबद्ध प्रक्रिया)

1. **Preparation of Stationary Phase**
   - Column / Paper पर stationary phase को coat किया जाता है।
   - Column / Paper को mobile phase से equilibrate किया जाता है।
2. **Sample Application (नमूना लगाना)**
   - Mixture को stationary phase के top पर लगाया जाता है।
3. **Elution / Development (Elution / विकास)**
   - Mobile phase (solvent) को stationary phase में flow कराया जाता है।
   - Molecules अपनी **partition coefficient** के अनुसार अलग-अलग गति से move करते हैं।
4. **Separation (अलगाव)**
   - Molecules जो stationary phase में अधिक soluble हैं → धीरे move करते हैं।
   - Molecules जो mobile phase में अधिक soluble हैं → जल्दी move करते हैं।
5. **Detection / Analysis (पता लगाना और विश्लेषण)**
   - Eluted molecules को detect किया जाता है।
   - **Rf value (Paper/TLC):**

$$
Rf = \frac{\text{Distance travelled by solute}}{\text{Distance travelled by solvent}}
$$

- Fraction collection (Column) के द्वारा molecules को अलग-अलग collect किया जा सकता है।

---

4 Applications (उपयोग)

1. **Amino Acids Separation**
   - Biological samples में amino acids को अलग करने के लिए।
2. **Sugars Separation**
   - Mono- और disaccharides को fractionate करने में।
3. **Dye Separation**
   - Plant pigments और synthetic dyes को अलग करने में।
4. **Purification of Small Molecules**

- Vitamins, alkaloids, antibiotics के purification में।

5. **Analytical and Preparative Uses**
   - Analytical → Identification and quantification
   - Preparative → Isolation of pure compounds for further studies

---

5 Advantages (फायदे)

- सरल और आसान method
- Mild technique → biological molecules (proteins, amino acids) सुरक्षित रहते हैं
- Multiple components को एक साथ separate किया जा सकता है

---

6 Limitations (कमियाँ)

- Resolution कम हो सकती है अगर molecules का partition coefficient बहुत समान हो
- Column या paper preparation time-consuming हो सकता है
- Large-scale separation में slow

Summary Table (सारणी)

Parameter	Partition Chromatography
Principle	Separation based on solubility / partition coefficient
Stationary Phase	Liquid coated on solid support (paper, silica, cellulose)
Mobile Phase	Organic solvent, buffer
Basis of Separation	Partition coefficient (K)
Applications	Amino acids, sugars, dyes, vitamins separation
Detection	UV, Iodine vapors, Ninhydrin, fraction collection

⋆ Affinity Chromatography (एफिनिटी क्रोमैटोग्राफी)

Affinity Chromatography एक **highly specific separation technique** है, जिसमें **biomolecules को उनकी biological interaction (affinity) के आधार पर अलग किया जाता है**। यह technique विशेष रूप से **proteins, enzymes, antibodies, और nucleic acids** के purification के लिए उपयोगी है।

---

1 Principle (सिद्धांत / मूल सिद्धांत)

- Separation **biomolecule और ligand के specific binding interaction** पर आधारित होती है।
- **Ligand** → Molecule जो target biomolecule के साथ high affinity binding करता है।
- **Mechanism:**
    1. Stationary phase (resin) पर ligand immobilized होता है।
    2. Sample में target biomolecule ligand से **specific binding** करता है।
    3. Non-specific molecules wash buffer से **elute** हो जाते हैं।
    4. Target biomolecule को **elution buffer** (जो binding को disrupt करता है) द्वारा elute किया जाता है।

Key Point: यह technique **extremely selective** होती है क्योंकि केवल target molecule ही ligand से bind करता है।

---

2 Components (घटक)

Component	Role (भूमिका)	Examples / Notes
Column	Resin hold करना	Glass / Plastic column
Stationary Phase (Resin + Ligand)	Target biomolecule से specific binding	Agarose beads / Sepharose + ligand (e.g., antibody, substrate, lectin, metal ion)
Mobile Phase (Buffer / Wash buffer)	Non-specific molecules remove करना	Phosphate buffer, saline, pH maintained
Sample	Mixture जिसे purify करना है	Proteins, enzymes, antibodies, nucleic acids
Elution Buffer	Target molecule release	High salt, pH change, competitive ligand

Component	Role (भूमिका)	Examples / Notes
	करना	
Fraction Collector / Detector	Eluted molecules collect और detect करना	Tubes, UV absorbance, SDS-PAGE analysis

---

3 Working (कार्यप्रणाली / कार्यविधि)

Stepwise Process (चरणबद्ध प्रक्रिया)

1. **Column Preparation**
   - Resin beads में specific **ligand immobilize** किया जाता है।
   - Column buffer से equilibrate किया जाता है।
2. **Sample Loading (नमूना लगाना)**
   - Sample column में load किया जाता है।
   - Target biomolecule ligand से bind करता है।
   - Non-target molecules wash buffer से बहा दिए जाते हैं।
3. **Washing (धोना)**
   - Non-specifically bound molecules को remove किया जाता है।
4. **Elution (निकास / बहिर्गमन)**
   - Target biomolecule को elution buffer से release किया जाता है।
   - Elution buffer या तो **competitive ligand** या **pH/salt change** use करता है।
5. **Detection / Collection (पता लगाना और संग्रह करना)**
   - Eluted fractions collect करके detect किया जाता है।
   - UV absorbance, SDS-PAGE या activity assay के द्वारा target biomolecule की purity confirm की जाती है।

---

4 Applications (उपयोग)

1. **Protein Purification**
   - Specific enzymes और proteins को अन्य contaminants से अलग करने में।
2. **Antibody Purification**
   - Monoclonal और polyclonal antibodies purification में।

3. **Enzyme Purification**
    - Substrate-specific enzymes purification में।
4. **Nucleic Acid Purification**
    - DNA/RNA binding proteins के लिए specific purification।
5. **Biotechnology & Pharmaceutical Industry**
    - Therapeutic proteins, vaccines, hormones की purification में।

---

5 Advantages (फायदे)

- High specificity और selectivity
- High purity achieved in **single step**
- Gentle method → biomolecule structure/activity preserved

---

6 Limitations (कमियाँ)

- High cost due to specific ligands
- Ligand preparation complex हो सकता है
- Elution condition biomolecule के लिए harsh हो सकता है (activity loss)

Summary Table (सारणी)

Parameter	Affinity Chromatography
Principle	Separation based on specific biological interaction (ligand-biomolecule)
Stationary Phase	Resin immobilized with specific ligand
Mobile Phase	Wash buffer to remove non-specific molecules
Elution	Target biomolecule released using competitive ligand, pH or salt change
Applications	Protein, enzyme, antibody, nucleic acid purification
Advantages	High specificity, single-step purification, preserves activity

Parameter	Affinity Chromatography
Detection	UV absorbance, SDS-PAGE, activity assay

⭑ Adsorption Chromatography (एडसॉर्प्शन क्रोमैटोग्राफी)

Adsorption Chromatography एक प्रकार की chromatography है जिसमें **substances का separation उनकी surface adsorption क्षमता पर आधारित होता है।** यह method **solid-liquid या solid-gas system** में molecules के surface interaction पर आधारित है।

---

1 Principle (सिद्धांत / मूल सिद्धांत)

- Separation **adsorption पर आधारित होती है**, यानी molecules का **stationary phase की सतह पर adsorb होना**।
- Molecules **surface interaction** (van der Waals forces, hydrogen bonding, dipole interaction) के आधार पर stationary phase से अलग-अलग **binding strength** के साथ adsorb होते हैं।
- Molecules जो **strongly adsorb** होते हैं → column में धीरे चलते हैं।
- Molecules जो **weakly adsorb** होते हैं → जल्दी move करते हैं।

Key Point: यह method **chemical affinity नहीं**, बल्कि **physical adsorption** पर आधारित होती है।

---

2 Components (घटक)

Component	Role (भूमिका)	Examples / Notes
Column / Support	Stationary phase hold करना	Glass / Plastic column, TLC plate, Paper
Stationary Phase	Molecules adsorb करना	Silica gel, Alumina, Activated charcoal
Mobile Phase (Eluent / Solvent)	Molecules को carry करना	Organic solvents, aqueous buffers

Component	Role (भूमिका)	Examples / Notes
Sample	Mixture जिसे separate करना है	Dyes, pigments, drugs, small organic molecules
Fraction Collector / Detector	Eluted molecules collect और detect करना	UV light, Iodine vapors, Colorimetric assay

---

3 Working (कार्यप्रणाली / कार्यविधि)

Stepwise Process (चरणबद्ध प्रक्रिया)

1. **Column / Plate Preparation**
   - Stationary phase (silica/alumina) को column में pack किया जाता है।
   - Column को mobile phase से equilibrate किया जाता है।
2. **Sample Application (नमूना लगाना)**
   - Mixture को column/plate के top पर carefully load किया जाता है।
3. **Elution / Development (Elution / विकास)**
   - Mobile phase (solvent) flow किया जाता है।
   - Molecules की **adsorption strength** के आधार पर column में अलग-अलग गति से move करते हैं।
     - Strongly adsorbed → Slowly
     - Weakly adsorbed → Quickly
4. **Separation / Fraction Collection (अलगाव / संग्रह)**
   - Molecules अलग-अलग zones में elute होते हैं।
   - Fractions collect कर UV, color reaction, या TLC spot से analyze किया जाता है।

---

4 Applications (उपयोग)

1. **Separation of Dyes and Pigments**
   - Plant pigments, inks और synthetic dyes को separate करने में।
2. **Purification of Drugs**
   - Small organic molecules और pharmaceutical compounds purification में।
3. **Separation of Amino Acids / Sugars**

- Certain amino acids और sugars को अलग करने में।

4. **Analytical and Preparative Purpose**
   - Analytical → Component identification
   - Preparative → Pure compound collection
5. **Environmental Analysis**
   - Pollutants और pesticides detection में।

---

5 Advantages (फायदे)

- Simple and widely used method
- Applicable to a variety of compounds
- Mild conditions → sensitive molecules सुरक्षित रहते हैं

---

6 Limitations (कमियाँ)

- Resolution कम हो सकती है अगर molecules की adsorption strength समान हो
- Large-scale separation slow हो सकता है
- Sometimes requires multiple steps for complete purification

---

Summary Table (सारणी)

Parameter	Adsorption Chromatography
Principle	Separation based on physical adsorption on stationary phase
Stationary Phase	Silica gel, Alumina, Activated charcoal
Mobile Phase	Organic solvents, buffers
Basis of Separation	Adsorption strength on stationary phase
Applications	Dyes, pigments, drugs, amino acids, environmental analysis
Detection	UV light, Iodine, colorimetric assay

⭑ Electrophoretic Techniques (इलेक्ट्रोफोरेटिक तकनीकें)

Electrophoresis एक **analytical and preparative technique** है, जिसका उपयोग **molecules (जैसे proteins, nucleic acids, amino acids, DNA, RNA) को उनकी charge, size और shape के आधार पर अलग करने के लिए** किया जाता है।

---

1 Principle (सिद्धांत / मूल सिद्धांत)

- Electrophoresis में **charged molecules को electric field के अंतर्गत move** किया जाता है।
- **Molecules का गति (mobility)** उनके **charge-to-mass ratio** पर निर्भर करती है।
- **Positive molecules → Cathode (negative electrode) की ओर**
- **Negative molecules → Anode (positive electrode) की ओर**

Key Point: Molecules का migration rate उनकी **charge density और molecular size** पर निर्भर करता है।

$$
\text{Electrophoretic mobility} (\mu) = \frac{v}{E}
$$

- (v) = velocity of molecule
- (E) = applied electric field

---

2 Components (घटक)

Component	Role (भूमिका)	Examples / Notes
Support Medium	Molecules को separate करना	Agarose gel, Polyacrylamide gel, Starch gel, Cellulose acetate
Buffer	pH maintain करना, conductivity प्रदान करना	Tris-Glycine, TBE, TAE buffers

Component	Role (भूमिका)	Examples / Notes
Sample	Mixture जिसे separate करना है	Proteins, DNA, RNA, amino acids
Electrophoresis Chamber	Electric field apply करना	Horizontal or vertical gel tank
Power Supply	Electric field प्रदान करना	DC source, constant voltage/current
Staining / Detection	Molecules visualize करना	Ethidium bromide (DNA), Coomassie blue (Proteins), Silver stain
Marker / Ladder	Size estimation के लिए	DNA ladder, Protein marker

---

3 Working (कार्यप्रणाली / कार्यविधि)

Stepwise Process (चरणबद्ध प्रक्रिया)

1. **Gel Preparation**
   - Agarose या polyacrylamide gel तैयार किया जाता है।
   - Gel को buffer में set किया जाता है।
2. **Sample Loading**
   - Sample को gel के wells में carefully load किया जाता है।
   - Marker/ladder भी load किया जाता है।
3. **Electric Field Application**
   - Gel tank में electrodes connect करके **DC voltage apply** किया जाता है।
   - Molecules अपनी **charge और size के अनुसार migrate** करते हैं।
4. **Migration / Separation**
   - छोटे molecules तेज़ migrate करते हैं।
   - बड़े molecules धीरे migrate करते हैं।
   - Negatively charged molecules → Anode की ओर
   - Positively charged molecules → Cathode की ओर
5. **Staining / Visualization**
   - Gel को stain करके separated molecules को detect किया जाता है।
   - DNA → Ethidium bromide, UV light
   - Protein → Coomassie blue या Silver stain
6. **Analysis**
   - Band pattern से molecular size, purity और concentration estimate किया जाता है।

---

4 Types of Electrophoresis (इलेक्ट्रोफोरेटिक प्रकार)

1. **Agarose Gel Electrophoresis (AGE)**
   - Mainly **DNA and RNA** separation के लिए।
   - Large molecules के लिए suitable।
2. **Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)**
   - Mainly **Proteins** separation के लिए।
   - High resolution separation।
   - **SDS-PAGE:** Proteins को **size based** separate करता है।
3. **Isoelectric Focusing (IEF)**
   - Proteins को उनके **isoelectric point (pI)** के आधार पर separate करता है।
4. **Capillary Electrophoresis (CE)**
   - High efficiency separation, very small sample required।
5. **Two-dimensional Electrophoresis (2D-E)**
   - Proteins को **pI और molecular weight दोनों** के आधार पर separate करता है।

---

5 Applications (उपयोग)

1. **DNA / RNA Analysis**
   - Restriction digestion, PCR product verification, RFLP, Northern blot
2. **Protein Analysis and Purification**
   - SDS-PAGE, Western blot, protein isoform detection
3. **Clinical Diagnostics**
   - Hemoglobin variants, serum proteins, enzyme patterns
4. **Research & Biotechnology**
   - Gene expression studies, protein profiling, recombinant protein purification
5. **Forensic Science**
   - DNA fingerprinting, paternity testing

---

6 Advantages (फायदे)

- High resolution separation
- Can separate molecules based on **size, charge, and pI**
- Requires small sample quantity
- Widely applicable in research and diagnostics

7️⃣ Limitations (कमियाँ)

- Requires staining/detection step
- Large-scale preparative electrophoresis time-consuming
- Some biomolecules sensitive to electric field/heat

Summary Table (सारणी)

Parameter	Electrophoretic Techniques
Principle	Separation based on charge, size, and shape under electric field
Support	Agarose, Polyacrylamide, Starch gel
Mobile Phase	Buffer solution
Separation Basis	Electrophoretic mobility ((\mu = v/E))
Detection	Staining (Ethidium bromide, Coomassie blue)
Applications	DNA/RNA analysis, protein purification, clinical diagnostics, forensic studies

---

⭐ Gel Electrophoresis (जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस)

Gel Electrophoresis एक **analytical technique** है जिसका उपयोग **biomolecules जैसे DNA, RNA, और proteins को उनके आकार, आकार और charge के आधार पर अलग करने** के लिए किया जाता है।

1️⃣ Theory (सिद्धांत / थ्योरी)

- **Principle:**
  Gel electrophoresis का मूल सिद्धांत है कि **charged molecules एक electric field में migrate करती हैं।**

- **Mechanism:**
    1. Molecules जो **negative charge** रखते हैं (जैसे DNA, RNA) → **anode (positive electrode)** की ओर migrate करते हैं।
    2. Molecules जो **positive charge** रखते हैं → **cathode (negative electrode)** की ओर migrate करते हैं।
    3. Molecules का migration **size और charge ratio** पर निर्भर करता है।
        - छोटे molecules → gel matrix में तेजी से चलते हैं।
        - बड़े molecules → धीरे चलते हैं।
- **Electrophoretic mobility ((\mu))**:

[
\mu = \frac{v}{E}
]

जहाँ,

- (v) = migration velocity
- (E) = applied electric field strength
- **Gel as a molecular sieve:**
    - Agarose और polyacrylamide gels एक **porous matrix** प्रदान करते हैं।
    - छोटे molecules आसानी से pores से गुजरते हैं।
    - बड़े molecules pores में फंस जाते हैं और धीरे migrate करते हैं।
- **Denaturing agents:**
    - Proteins के लिए SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) इस्तेमाल होता है ताकि **shape और charge uniform हो जाए**, जिससे separation केवल **size पर आधारित** हो।
    - DNA और RNA आमतौर पर **negatively charged** होते हैं, इसलिए वे straight migration दिखाते हैं।

---

2 Applications (उपयोग / Applications)

1. DNA Analysis

- PCR products का verification
- Restriction fragment analysis (RFLP)
- Plasmid DNA या genomic DNA की purity check

2. RNA Analysis

- Northern blotting के लिए RNA separation
- RNA integrity assessment

3. Protein Analysis

- SDS-PAGE (denatured proteins)
- Native PAGE (protein activity preserved)
- Western blotting (antibody detection)

4. Clinical Diagnostics

- Hemoglobin variants (HbA, HbS)
- Serum protein analysis (albumin, globulin patterns)

5. Research Applications

- Gene expression studies
- Recombinant protein purification
- Mutation detection

6. Forensic and Biotechnology Applications

- DNA fingerprinting
- Paternity testing
- Pathogen identification

---

3 Advantages

- High resolution separation
- Small sample volume sufficient
- Quantitative and qualitative analysis possible
- Can separate molecules based on size and charge

---

4 Limitations

- Time-consuming for large-scale separation
- Requires staining for visualization
- Proteins or nucleic acids sensitive to electric field or heat may degrade

---

Summary Table (सारणी)

Parameter	Gel Electrophoresis
Principle	Separation based on charge, size, and shape in an electric field
Support Medium	Agarose gel (DNA/RNA), Polyacrylamide gel (proteins)
Basis of Separation	Molecular size and charge-to-mass ratio
Detection	Staining (Ethidium bromide, Coomassie blue)
Applications	DNA/RNA analysis, protein separation, diagnostics, research, forensics

---

⋆ Spectroscopy Techniques (स्पेक्ट्रोस्कोपी तकनीकें)

Spectroscopy एक analytical technique है जिसमें **molecules और atoms के द्वारा electromagnetic radiation (प्रकाश / ऊर्जा) को absorb, emit या scatter करने की क्षमता** का अध्ययन किया जाता है। यह technique **chemical composition, structure और concentration** का निर्धारण करने में उपयोगी है।

---

1 Principle (सिद्धांत / मूल सिद्धांत)

- किसी भी molecule के पास निश्चित **energy levels** होते हैं।
- जब molecules **electromagnetic radiation (UV, visible, IR, etc.)** के संपर्क में आते हैं:
  - Molecules **energy absorb करते हैं → excitation to higher energy level**
  - Molecules **energy emit करते हैं → fluorescence, phosphorescence**
- **Absorption/Emission का pattern** molecule की **structure और concentration** पर निर्भर करता है।

Key Point: Spectroscopy molecules और atoms की **unique light interaction fingerprint** देती है।

---

2 Components (घटक)

Component	Role (भूमिका)	Examples / Notes

Component	Role (भूमिका)	Examples / Notes
Radiation Source	Electromagnetic radiation provide करना	UV lamp, Tungsten lamp, Laser, IR source
Sample Holder / Cell	Sample रखकर radiation pass करना	Quartz cuvette, Glass cell
Monochromator / Filter	Specific wavelength select करना	Prism, diffraction grating
Detector	Absorbance / emission detect करना	Photodiode, Photomultiplier tube (PMT)
Readout / Recorder	Data display करना	Digital display, Computer software

---

3 Types of Spectroscopy Techniques (स्पेक्ट्रोस्कोपी के प्रकार)

A. UV-Visible Spectroscopy (अल्ट्रावायलेट-विज़िबल स्पेक्ट्रोस्कोपी)

- **Principle:** Molecules में $\pi \rightarrow \pi^*$ और $n \rightarrow \pi^*$ transitions detect करता है।
- **Application:**
  - Nucleic acids, proteins, dyes, drugs की concentration measurement
  - Purity analysis of compounds

B. Infrared (IR) Spectroscopy (इन्फ्रारेड स्पेक्ट्रोस्कोपी)

- **Principle:** Molecules में **bond vibrations (stretching, bending)** absorb infrared radiation।
- **Application:**
  - Functional groups identification (OH, NH, C=O, etc.)
  - Organic compound structure elucidation

C. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy (नाभिकीय चुंबकीय अनुनाद)

- **Principle:** NMR active nuclei (^1H, ^{13}C) **magnetic field में resonance absorb** करते हैं।
- **Application:**
  - Molecular structure determination
  - Protein, nucleic acid, organic compound analysis

D. Fluorescence Spectroscopy (फ्लोरेसेंस स्पेक्ट्रोस्कोपी)

- **Principle:** Molecules **excitation → higher energy level → emission** of light at longer wavelength।
- **Application:**
  - Biomolecule detection (proteins, DNA probes)
  - Cellular imaging

E. Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) (परमाणु अवशोषण स्पेक्ट्रोस्कोपी)

- **Principle:** Atoms specific wavelength absorb करते हैं → concentration measure किया जाता है।
- **Application:**
  - Metal ions detection in water, blood, soil
  - Environmental monitoring

F. Mass Spectroscopy (MS) (द्रव्यमान स्पेक्ट्रोस्कोपी)

- **Principle:** Molecules ionize होते हैं और mass-to-charge ratio (m/z) detect होती है।
- **Application:**
  - Molecular weight determination
  - Structural elucidation
  - Proteomics और metabolomics

---

4 Working (कार्यप्रणाली / सामान्य कार्यविधि)

1. **Sample Preparation**
   - Solution, solid या gas form में sample ready करना।
2. **Radiation Interaction**
   - Electromagnetic radiation (UV, IR, visible) sample से pass किया जाता है।
3. **Detection**
   - Molecules द्वारा absorbed या emitted radiation detect की जाती है।
4. **Data Analysis**
   - Spectrum plot: Absorbance / Emission vs Wavelength
   - Peaks और patterns से molecule की पहचान और concentration estimate किया जाता है।

---

5 Applications (उपयोग / Applications)

1. **Biochemistry & Molecular Biology**

    - Protein, nucleic acid, enzyme analysis
    - DNA/RNA quantification
2. **Pharmaceutical Industry**
    - Drug analysis और quality control
3. **Environmental Science**
    - Water pollutants और heavy metals detection
4. **Structural Chemistry**
    - Functional groups और molecular structure elucidation
5. **Clinical Diagnostics**
    - Blood analysis, enzyme activity, hormone quantification
6. **Food and Agriculture**
    - Nutrient analysis, pesticide residue detection

---

6 Advantages (फायदे)

- Non-destructive method
- High sensitivity
- Quantitative और qualitative दोनों analysis possible
- Rapid and reproducible

---

7 Limitations (कमियाँ)

- Expensive instruments
- Requires trained personnel
- Sample interference (impurities) affect accuracy
- Some techniques require special conditions (vacuum, inert atmosphere)

Summary Table (सारणी)

Spectroscopy Type	Principle	Major Application
UV-Vis	π → π*, n → π* transitions	Concentration, purity analysis
IR	Molecular vibrations	Functional group identification

Spectroscopy Type	Principle	Major Application
NMR	Nuclear spin resonance	Molecular structure elucidation
Fluorescence	Light emission after excitation	Biomolecule detection, imaging
AAS	Atomic absorption of specific wavelength	Metal ion detection
MS	Mass-to-charge ratio detection	Molecular weight, structure

---

प्रकाश के अवशोषण (Light Absorption) का मूल सिद्धांत –

प्रकाश का अवशोषण वह प्रक्रिया है जिसमें कोई पदार्थ (material) प्रकाश की ऊर्जा को **सोख लेता है** और उसे किसी अन्य रूप में **परिवर्तित** कर देता है—जैसे ऊष्मा (heat), रासायनिक ऊर्जा, या इलेक्ट्रॉनिक ऊर्जा।

1. प्रकाश क्या है?

प्रकाश एक **विद्युतचुम्बकीय तरंग (electromagnetic wave)** है, जिसमें ऊर्जा होती है।
प्रकाश ऊर्जा को "फोटॉन (photon)" नाम के छोटे ऊर्जा पैकेट वहन करते हैं।

हर फोटॉन की ऊर्जा उसकी **तरंगदैर्घ्य (wavelength)** पर निर्भर करती है।

---

2. पदार्थ प्रकाश क्यों अवशोषित करता है?

किसी भी पदार्थ में **परमाणु (atoms)** और **अणु (molecules)** होते हैं, जिनमें **इलेक्ट्रॉन (electrons)** मौजूद रहते हैं।

इन इलेक्ट्रॉनों के पास कुछ निश्चित **ऊर्जा स्तर (energy levels)** होते हैं।

जब किसी फोटॉन की ऊर्जा किसी इलेक्ट्रॉन के ऊर्जा स्तरों के अंतर से मेल खाती है,
तो इलेक्ट्रॉन उस फोटॉन को **अवशोषित** कर लेता है और उच्च ऊर्जा स्तर पर चला जाता है।

इसी घटना को **प्रकाश अवशोषण** कहते हैं।

---

3. प्रकाश अवशोषण की मुख्य शर्त

फोटॉन की ऊर्जा = इलेक्ट्रॉन के ऊर्जा स्तरों के बीच का अंतर
अगर यह ऊर्जा मेल नहीं खाती → प्रकाश **अवशोषित नहीं** होगा और पदार्थ प्रकाश को परावर्तित या प्रसारित कर देगा।

---

4. अवशोषण के बाद क्या होता है?

जब इलेक्ट्रॉन ऊपर उठ जाता है (excited state), तो यह स्थिति स्थायी नहीं होती।

कुछ समय बाद इलेक्ट्रॉन वापस अपने मूल स्थान पर लौट आता है। तब वह:

- **ऊष्मा** छोड़ता है,
- या **दूसरी तरंगदैर्घ्य का प्रकाश** छोड़ता है (यह फ्लोरोसेंस/फॉस्फोरसेंस हो सकता है),
- या **रासायनिक प्रतिक्रिया** प्रारंभ कर देता है (जैसे photosynthesis)।

---

5. पदार्थ का रंग क्यों दिखता है?

जो रंग पदार्थ **अवशोषित नहीं करता**, वही रंग वह **परावर्तित** करता है।
उदाहरण:

- हरी पत्ती **हरा प्रकाश परावर्तित** करती है और बाकी प्रकाश **अवशोषित** करती है।
- इसलिए पत्ती हमें हरी दिखती है।

---

6. प्रकाश अवशोषण कहाँ-कहाँ होता है? (Applications)

1. **Photosynthesis (प्रकाश संश्लेषण)**
   पौधे प्रकाश अवशोषित कर उसे रासायनिक ऊर्जा में बदलते हैं।
2. **Solar Cells (सौर सेल)**
   सूर्य का प्रकाश अवशोषित कर इलेक्ट्रॉनों को मुक्त किया जाता है जिससे बिजली बनती है।

3. **Human Vision (दृष्टि)**
   हमारी आंखों की रेटिना फोटॉनों को अवशोषित कर संकेत दिमाग तक भेजती है।
4. **Spectroscopy (स्पेक्ट्रोस्कोपी)**
   पदार्थ की पहचान उसके अवशोषण पैटर्न से की जाती है।
5. **Heating (ऊष्मीय प्रभाव)**
   काला रंग अधिक प्रकाश अवशोषित कर गर्म होता है।

---

7. प्रकाश अवशोषण का नियम (Beer–Lambert Law)

यह बताता है कि प्रकाश का अवशोषण:

- पदार्थ की **मात्रा (concentration)**
- और **पथ लंबाई (path length)**
  पर निर्भर करता है।

अवशोषण ∝ सांद्रता × परत की मोटाई

⋆ Jablonski Diagram (जैब्लोन्स्की आरेख)

Jablonski Diagram एक ग्राफिकल तरीका है जिससे यह दिखाया जाता है कि कोई **मॉलिक्यूल प्रकाश अवशोषित करने के बाद किस तरह ऊर्जा स्तरों के बीच चलता है**।
यह फ्लोरोसेंस, फॉस्फोरसेंस, नॉन-रेडिएटिव डिके आदि सभी प्रक्रियाओं को एक ही आरेख में समझाता है।

1. इसके अक्ष (Axes) क्या दर्शाते हैं?

- **ऊर्ध्वाधर (Vertical) अक्ष:** ऊर्जा स्तर (Energy Levels)
- **क्षैतिज (Horizontal) अक्ष:** अलग-अलग अवस्थाएँ (States) जैसे
  - Singlet States (S_0, S_1, S_2 …)
  - Triplet States (T_1, T_2 …)

---

2. Jablonski Diagram में मुख्य ऊर्जा स्तर

1) S_0 — Ground State (मूल अवस्था)

मॉलिक्यूल की सबसे कम ऊर्जा अवस्था।

2) S_1, S_2 — Excited Singlet States (उत्तेजित एकल अवस्थाएँ)

यह तब बनती हैं जब प्रकाश अवशोषित होता है।

3) T_1 — Triplet State (त्रिगुण अवस्था)

यह एक लंबी आयु वाली अवस्था है → इससे **फॉस्फोरसेंस** निकलता है।

---

3. मुख्य प्रक्रियाएँ (Processes shown in Jablonski Diagram)

A. Absorption (अवशोषण)

मॉलिक्यूल S_0 से सीधे S_1/S_2 में जाता है

- बहुत तेज (10^{-15} सेकंड)
- रेडिएटिव और नॉन-रेडिएटिव ट्रांज़िशन दोनों दिखते हैं

B. Vibrational Relaxation (कंपनशील विश्राम)

ऊपर के स्तर से नीचे के कंपन स्तरों में ऊर्जा गंवाना (Heat के रूप में)

C. Internal Conversion (IC — आंतरिक रूपांतरण)

एक ही spin-state के अंदर ऊर्जा का नष्ट होना

- $S_2 \rightarrow S_1$
- Radiative नहीं होता (No light emission)

D. Fluorescence (फ्लोरोसेंस)

$S_1 \rightarrow S_0$ वापस आने पर प्रकाश उत्सर्जन

- तेज़ ($\sim 10^{-8}$ सेकंड)

E. Intersystem Crossing (ISC — स्पिन परिवर्तन)

Singlet से Triplet में जाना

- $S_1 \rightarrow T_1$

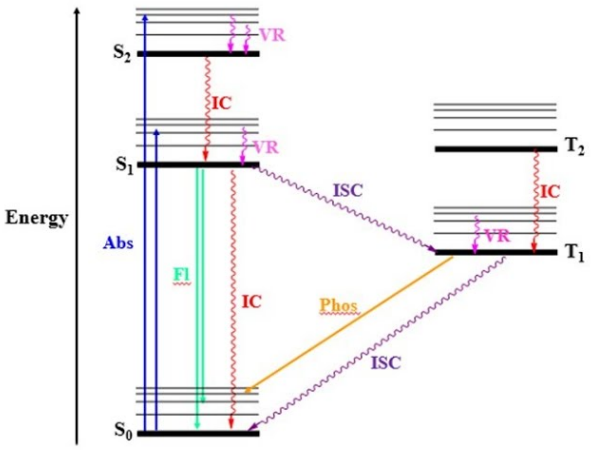
F. Phosphorescence (फॉस्फोरसेंस)

$T_1 \rightarrow S_0$ वापस

- धीमा ($\sim 10^{-3}$ से 10 सेकंड तक)

प्रक्रिया	अवस्था परिवर्तन	प्रकृति
Absorption	$S_0 \rightarrow S_1/S_2$	प्रकाश अवशोषित
Vibrational Relaxation	$S_2 \rightarrow S_1$(वाइब्रेशन)	तेज, ऊष्मा
Internal Conversion	$S_2 \rightarrow S_1$	नॉन-रेडिएटिव
Fluorescence	$S_1 \rightarrow S_0$	तेज प्रकाश
Intersystem Crossing	$S_1 \rightarrow T_1$	स्पिन परिवर्तन
Phosphorescence	$T_1 \rightarrow S_0$	धीमा प्रकाश

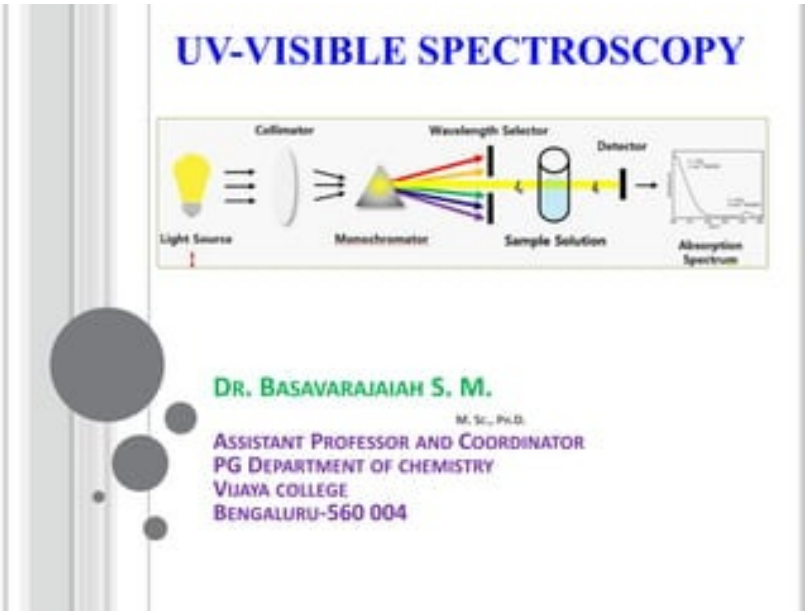
Jablonski Diagram



- Absorption (Abs)
- Fluorescence (Fl)
- Phosphorescence (Phos)
- Internal conversion (IC)
- Intersystem crossing (ISC)
- Vibrational relaxation (VR)

UV–Visible Spectroscopy (अल्ट्रावायलेट–दृश्य स्पेक्ट्रोस्कोपी)

यह एक विश्लेषणात्मक तकनीक है जिसमें किसी पदार्थ द्वारा **Ultraviolet (200–400 nm)** और **Visible Light (400–800 nm)** के **अवशोषण** का अध्ययन किया जाता है।
इससे पदार्थ की **संरचना**, **केंद्रीय तत्वों का इलेक्ट्रॉनिक व्यवहार**, **सांद्रता** और **शुद्धता** जानी जाती है।



---

1. PRINCIPLES (सिद्धांत)

UV–Visible Spectroscopy का सिद्धांत इस बात पर आधारित है कि—

जब कोई पदार्थ UV या दृश्यमान प्रकाश को अवशोषित करता है, तो उसके इलेक्ट्रॉन निम्न ऊर्जा स्तर (Ground State) से उच्च ऊर्जा स्तर (Excited State) में पहुँच जाते हैं।

इस प्रक्रिया को **Electronic Transition** कहा जाता है।

इलेक्ट्रॉनिक ट्रांज़िशन के प्रकार

UV–Vis में मुख्यतः 4 प्रकार के इलेक्ट्रॉनिक ट्रांज़िशन देखे जाते हैं:

1. σ → σ*

- उच्च ऊर्जा (High energy)
- एल्केन जैसे यौगिकों में
- कठिन अवशोषण

2. n → σ*

- मध्यम ऊर्जा
- हैलोजनयुक्त यौगिकों में (C–Cl, C–Br)

3. π → π*

- सबसे महत्वपूर्ण
- डबल-बॉन्ड, एरोमेटिक कंपाउंड
- कम ऊर्जा → आसानी से अवशोषण

4. n → π*

- एल्डिहाइड, कीटोन
- मध्यम ऊर्जा

□ Beer–Lambert Law (बीयर-लैम्बर्ट नियम)

UV–Vis स्पेक्ट्रोस्कोपी इसी नियम पर आधारित है।

A = ε c l

जहाँ—

- **A = Absorbance (अवशोषण)**
- **ε = Molar absorptivity (धनत्वीय अवशोषण क्षमता)**
- **c = Concentration (सांद्रता)**
- **l = Path length (क्यूवेट की चौड़ाई, सामान्यतः 1 cm)**

➡ **Absorbance सांद्रता के अनुपाती होती है** — इसी से solutions की concentration निकाली जाती है।

---

2. INSTRUMENTATION (उपकरण/यंत्र-विन्यास)

UV–Vis स्पेक्ट्रोफोटोमीटर कई भागों से मिलकर बनता है।

नीचे हर भाग को गहराई से समझें:

---

1. Light Source (प्रकाश स्रोत)

दो प्रकार:

1. **Deuterium Lamp**

- UV क्षेत्र (200–350 nm) के लिए
- स्थिर और निरंतर प्रकाश

2. **Tungsten-Halogen Lamp**

- Visible क्षेत्र (350–800 nm) के लिए

---

2. Monochromator (मोनोक्रोमेटर)

- यह सफेद प्रकाश को "एक ही तरंगदैर्ध्य (single wavelength)" में बदलता है
- इसमें **Diffraction Grating** या **Prism** होता है।

कार्य → **विशिष्ट λ (wavelength) चुनना**

---

3. Sample Holder (क्यूवेट)

- काँच (visible),

- क्वार्ट्ज (UV)

क्योंकि काँच UV को अवशोषित कर लेता है।

क्यूवेट की path length सामान्यतः **1 cm**।

□ 4. Detector (डिटेक्टर)

मुख्यतः दो प्रकार:

- **Photodiode**
- **Photomultiplier Tube (PMT)** – अत्यधिक संवेदनशील

कार्य →
प्रकाश की तीव्रता को विद्युत सिग्नल में बदलना।

□ 5. Readout/Computer System

- Absorbance vs. Wavelength का ग्राफ देता है → जिसे **Absorption Spectrum** कहते हैं।
- Peak से λmax तय की जाती है।

□ UV–Vis Spectrophotometer का सरल आरेख (ASCII रूप):

```
Light Source → Monochromator → Sample → Detector → Display
```

□ 3. APPLICATIONS (उपयोग)

UV–Visible spectroscopy विज्ञान और उद्योग के लगभग हर क्षेत्र में उपयोगी है।

□ 1. Quantitative Analysis (मात्रात्मक विश्लेषण)

- किसी घोल की सांद्रता मापने के लिए
- Beer–Lambert Law आधारित
- फार्मा कंपनियाँ दवाओं की strength जाँचने में उपयोग करती हैं।

□ 2. Qualitative Analysis (गुणात्मक विश्लेषण)

- किसी यौगिक की संरचना की पहचान
- λmax से functional groups की जानकारी
  जैसे:
  - एरोमैटिक रिंग → 260–300 nm
  - कॉन्जुगेटेड डबल बॉन्ड → लंबी λ max

□ 3. Reaction Kinetics (प्रतिक्रिया की गति मापना)

- समय के साथ absorbance बदलती है
- इससे reaction rate निकाला जाता है।

□ 4. Purity Testing (शुद्धता परीक्षण)

- दवाओं, खाद्य पदार्थों, रसायनों की purity जाँची जाती है।

□ 5. DNA/RNA Quantification

- DNA → 260 nm पर absorb करता है
- Pure DNA का ratio: A260/A280 ≈ 1.8

- बायोटेक्नोलॉजी / microbiology में दैनिक उपयोग।

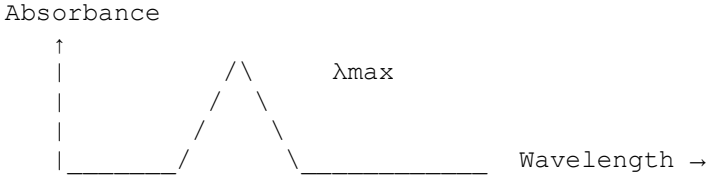
□ 6. Color Measurement

- डाई, पेंट, खाद्य रंग, वस्त्र उद्योग में उपयोग।

□ 7. Environmental Testing

- पानी में nitrate, phosphate, heavy metals etc. मापने के लिए।

? 4. UV–Vis Spectrum कैसा दिखता है?



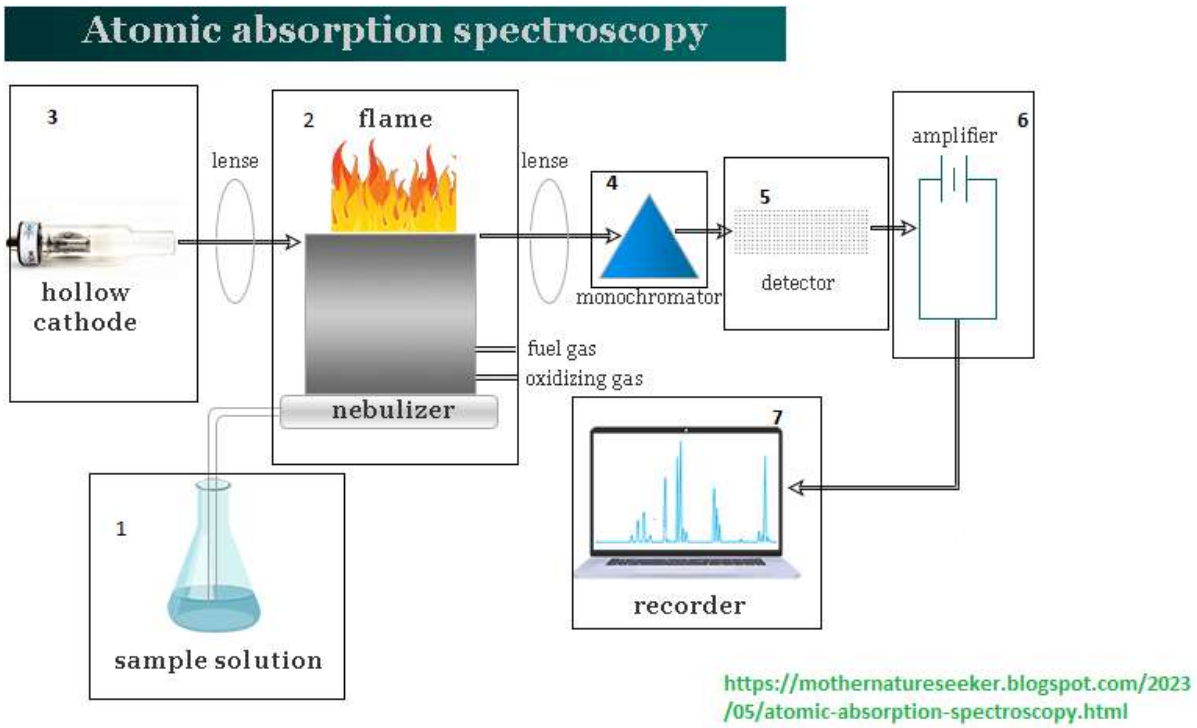
λmax (लैम्ब्डा-मैक्स)
वह तरंगदैर्ध्य जिस पर पदार्थ सबसे अधिक प्रकाश अवशोषित करता है।
यह पदार्थ की पहचान का "फिंगरप्रिंट" माना जाता है।

UV–Visible Spectroscopy एक तेज़, सस्ता और अत्यधिक भरोसेमंद तरीका है—

- पदार्थ की सांद्रता मापने
- संरचनात्मक जानकारी प्राप्त करने
- केमिकल, बायोलॉजिकल, फार्मास्यूटिकल और एनवायरनमेंटल विश्लेषण करने के लिए।

🔬 Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)

AAS एक विश्लेषणात्मक तकनीक है जिसमें गैसीय अवस्था के **मुक्त परमाणु (free atoms)** द्वारा विशिष्ट तरंगदैर्ध्य की **प्रकाश ऊर्जा का अवशोषण** मापा जाता है।
यह मुख्यतः **धातुओं (metals)** और कुछ **metalloids** की सांद्रता ज्ञात करने के लिए उपयोग होती है।



🔬 1. PRINCIPLES (सिद्धांत)

AAS का मूल सिद्धांत:

जब किसी तत्व के *मुक्त परमाणु* उस तत्व की **विशिष्ट तरंगदैर्ध्य** (characteristic wavelength) वाली प्रकाश किरणों पर पड़ते हैं,
तो वे उन तरंगदैर्ध्यों को **अवशोषित** करते हैं।
अवशोषण की मात्रा उस तत्व की **सांद्रता** के समानुपाती होती है।

क्यों केवल मुक्त परमाणु?

क्योंकि:

- मुक्त परमाणु के **इलेक्ट्रॉनिक स्तर अच्छी तरह परिभाषित होते हैं**,
- इसलिए वे **निर्धारित λ (wavelength)** पर अवशोषण करते हैं।

□ इलेक्ट्रॉनिक ट्रांज़िशन

AAS में निम्न ट्रांज़िशन होता है:

Ground State (E_1) → Excited State (E_2)
एक ही तत्व के द्वारा, एक सटीक λ पर अवशोषण।

उदाहरण:

- Sodium (Na) ~ 589 nm
- Copper (Cu) ~ 324.7 nm
- Lead (Pb) ~ 283.3 nm

इसलिए AAS तत्व-विशिष्ट (element-selective) है।

□ Beer–Lambert Law (AAS में प्रयोग होने वाला नियम)

$A = \varepsilon cl$

जहाँ—

- A = absorbance
- ε = molar absorptivity
- c = concentration
- l = optical path length

➡ absorbance ∝ concentration
इसी सिद्धांत से unknown samples की concentration निकाली जाती है।

---

2. INSTRUMENTATION (यंत्र-विन्यास)

AAS का उपकरण निम्न प्रमुख भागों से बना होता है:

---

1. Radiation Source (Hollow Cathode Lamp)

यह AAS का सबसे महत्वपूर्ण भाग है।

Hollow Cathode Lamp (HCL)

- हर तत्व के लिए अलग-अलग लैम्प
- लैम्प के कैथोड में वही धातु होती है जिसका विश्लेषण किया जाना है
  (जैसे Cu → Copper lamp)
- इसीलिए AAS अत्यंत **विशिष्ट (selective)** है।

यह लैम्प उस तत्व की विशिष्ट λ पर प्रकाश उत्सर्जित करता है।

---

2. Atomizer (एटोमाइज़र)

Sample को **मुक्त परमाणुओं** में बदलने का कार्य।

दो प्रकार सबसे आम हैं:

(A) Flame Atomizer

- Air–Acetylene या Nitrous oxide–Acetylene flame
- तापमान ~ 2300–3000°C
- सामान्य धातुओं के लिए उपयुक्त

(B) Graphite Furnace Atomizer (GFAAS)

- बिजली से गर्म किया जाने वाला ग्रेफाइट ट्यूब
- तापमान 2500–3000+ °C

- संवेदनशीलता 100 गुना अधिक
- बहुत कम सैंपल (μL) की आवश्यकता
  ➡ ट्रेस एलिमेंट विश्लेषण के लिए सर्वोत्तम

□ 3. Monochromator

- फ्लेम से निकलने वाले प्रकाश में अन्य अवांछित λ होती हैं
- Monochromator केवल विशिष्ट λ को चुनकर detector तक पहुँचाता है
- प्रायः **diffraction grating** उपयोग होता है

□ 4. Detector (PMT—Photomultiplier Tube)

- बेहद संवेदनशील
- प्रकाश → विद्युत संकेत में बदलता है
- absorbance मापता है

□ 5. Readout/Computer System

- Absorbance का डिजिटल प्रदर्शन
- कैलिब्रेशन curve
- सांद्रता की गणना

□ AAS का सरल ब्लॉक-आरेख (ASCII):

```
Hollow Cathode Lamp → Atomizer → Monochromator → Detector → Readout
```

---

3. APPLICATIONS (उपयोग)

AAS आधुनिक विश्लेषणात्मक प्रयोगशालाओं की सबसे विश्वसनीय तकनीकों में से एक है।

---

1. पानी और पर्यावरण विश्लेषण

- Lead (Pb)
- Cadmium (Cd)
- Mercury (Hg)
- Arsenic (As)
- Chromium (Cr)

पीने के पानी, नदी, झील, वायु प्रदूषण नियंत्रण।

---

2. खाद्य उद्योग (Food Safety)

- दूध में भारी धातु
- चाय, अनाज, सब्जी में trace metals
- खाद्य अपद्रव्यों का नियंत्रण

---

3. चिकित्सा व फार्मा क्षेत्र

- रक्त व मूत्र में धातुएँ
- दवाओं में impurities

---

4. धातु उद्योग और धातुकर्म

- धातु मिश्रधातु में composition
- खनिजों में metal-content पता करना

□ 5. क्लिनिकल टॉक्सिकोलॉजी

- Heavy metal poisoning
  जैसे → Pb, As, Hg

□ 6. कृषि और मिट्टी परीक्षण

- मिट्टी में Fe, Mn, Zn, Cu
- खाद व उर्वरक नियंत्रण

□ 7. फार्मास्यूटिकल क्वालिटी कंट्रोल

- दवाओं में धातु अशुद्धियाँ (elemental impurities)

□ 4. AAS की विशेषताएँ (Advantages)

- अत्यधिक संवेदनशील (ppb स्तर तक)
- अत्यंत विशिष्ट
- सरल संचालन
- अधिक सटीकता

□ कुछ सीमाएँ (Limitations)

- हर तत्व के लिए अलग लैम्प चाहिए
- एक समय में केवल एक ही तत्व मापा जा सकता है

- non-metallic elements (C, N, O, S, etc.) नहीं मापे जा सकते
- नमूना तरल होना चाहिए

Atomic Absorption Spectroscopy एक विश्वसनीय, अत्यधिक संवेदनशील और तत्व-विशिष्ट तकनीक है, जो धातुओं के trace-level विश्लेषण के लिए व्यापक रूप से उपयोग होती है।
इसके सिद्धांत व यंत्र-विन्यास इसे उद्योग, पर्यावरण, चिकित्सा और वैज्ञानिक अनुसंधान में अत्यंत महत्वपूर्ण बनाते हैं।

⍰ Microscopy – Basic Principle (मूल सिद्धांत)

Microscopy वह तकनीक है जिसमें अत्यंत छोटे वस्तुओं, कोशिकाओं, जीवाणुओं, ऊतकों या सूक्ष्म संरचनाओं को बड़ा करके देखने के लिए *Microscope* का उपयोग किया जाता है।

□ मूल सिद्धांत (Basic Principle):

Microscopy का मुख्य सिद्धांत यह है कि सूक्ष्म वस्तुओं को उनके वास्तविक आकार से कई गुना बढ़ाकर (Magnification) स्पष्ट (Resolution) रूप में दिखाया जाता है।

Microscope दो मुख्य ऑप्टिकल सिद्धांतों पर काम करता है:

⍰ 1. Magnification (विस्तारण / आवर्धन)

यह किसी वस्तु की छवि को **बड़ा** करके दिखाने की क्षमता है।
यानी वास्तविक आकार की तुलना में छवि कितनी गुना बड़ी दिखेगी।

उदाहरण:

- 10× = वस्तु 10 गुना बड़ी
- 100× = 100 गुना बड़ी

उद्देश्य:
छोटे कण, कोशिकाएँ, बैक्टीरिया आदि को मानव-नेत्र से दिखाई देने योग्य बनाना।

✅ 2. Resolution (विवर्तन क्षमता / विभेदन क्षमता)

Resolution वह क्षमता है जिसके द्वारा दो बहुत पास स्थित बिंदुओं को **अलग-अलग** और **स्पष्ट** पहचाना जा सके।

Microscope का असली कौशल यही है—
सिर्फ बड़ी छवि बनाना पर्याप्त नहीं, बल्कि उसे स्पष्ट दिखाना जरूरी है।

Resolution जितना अच्छा → छवि उतनी स्पष्ट।

✅ Microscopy इन दो सिद्धांतों को कैसे प्राप्त करता है?

🔹 Optical Lenses (काँच या क्वार्ट्ज लेंस)

प्रकाश को मोड़कर (refraction) वस्तु की बढ़ी हुई और उलटी छवि बनाते हैं।

🔹 Illumination (प्रकाश व्यवस्था)

नमूने पर प्रकाश डालकर कंट्रास्ट (contrast) बढ़ाया जाता है।

🔹 Numerical Aperture (NA)

लेंस का प्रकाश एकत्र करने की क्षमता।
NA जितना अधिक → Resolution उतना अच्छा।

🔹 Interaction of light or electrons

Microscopy दो आधारों पर काम कर सकता है:

1. **Light Microscopy → प्रकाश का उपयोग**
2. **Electron Microscopy → इलेक्ट्रॉनों का उपयोग**
   इलेक्ट्रॉन का λ बहुत छोटा → resolution बहुत ही अधिक।

? विभिन्न प्रकार के माइक्रोस्कोपी के सिद्धांत

1. Light Microscopy

- दृश्य प्रकाश को लेंस से मोड़कर छवि बनाना
- Magnification ~1000–2000×

2. Electron Microscopy

- प्रकाश के बजाय इलेक्ट्रॉन बीम का उपयोग
- इलेक्ट्रॉन का wavelength बहुत छोटा → Nanometer level resolution
- SEM, TEM इत्यादि

3. Fluorescence Microscopy

- नमूने को fluorescent dyes से रंगकर
- UV प्रकाश डालने पर dye चमकती है
- संरचनाएँ हाई-कॉन्ट्रास्ट में दिखती हैं

4. Phase Contrast Microscopy

- पारदर्शी कोशिकाओं को बिना रंगे स्पष्ट दिखाना
- phase differences को प्रकाश-कॉन्ट्रास्ट में बदलता है

एक Microscopy का उद्देश्य बहुत छोटी वस्तुओं को प्रकाश/इलेक्ट्रॉन के साथ इंटरैक्शन करवाकर उनकी बड़ी, स्पष्ट और अलग-अलग पहचान योग्य छवि बनाना है।

🔬 FACTORS AFFECTING IMAGE FORMATION AND MAGNIFICATION

(छवि निर्माण और आवर्धन को प्रभावित करने वाले कारक)

Microscope में स्पष्ट, सही और बड़ी छवि बनने के लिए कई ऑप्टिकल और भौतिक कारक जिम्मेदार होते हैं। इन्हें दो भागों में समझें:

1️⃣ **Image Formation को प्रभावित करने वाले कारक**
2️⃣ **Magnification को प्रभावित करने वाले कारक**

🔹 1. Factors Affecting Image Formation

(छवि निर्माण को प्रभावित करने वाले कारक)

Image formation, अर्थात *छवि कितनी स्पष्ट, तेज, उजली और वास्तविक दिखेगी*, यह निम्न कारकों पर निर्भर करता है:

🔹 1. Resolution (विभेदन क्षमता)

Resolution यह निर्धारित करता है कि दो पास स्थित बिंदुओं को अलग-अलग देखा जा सकता है या नहीं।
उच्च resolution → अत्यंत स्पष्ट छवि।

Resolution को प्रभावित करने वाले उप-कारक:

🔸 (a) Numerical Aperture (NA)

लेंस की प्रकाश एकत्र करने की क्षमता

- NA अधिक → resolution बेहतर
- NA घटे → छवि धुँधली

🔸 (b) Wavelength of Light (λ)

λ जितनी छोटी → resolution उतना बेहतर
उदाहरण:

- Blue light (450 nm) → बेहतर
- Red light (650 nm) → कम

□ 2. Contrast (विपरीतता)

नमूने और पृष्ठभूमि (background) के बीच चमक का अंतर।

- High contrast → संरचनाएँ साफ दिखेंगी
- Low contrast → छवि धुंधली

Contrast को बढ़ाने के तरीके:

- Staining (रंगाई)
- Phase-contrast
- Dark-field illumination
- Fluorescence

□ 3. Illumination (प्रकाश व्यवस्था)

सही मात्रा और दिशा का प्रकाश छवि निर्माण में अत्यंत महत्वपूर्ण।

अधिक प्रकाश → image wash out
कम प्रकाश → dark/unclear image

Illumination को नियंत्रित करने वाले उपकरण:

- Condenser
- Diaphragm
- Light source intensity

□ 4. Optical Aberrations (दोष)

लेंस में imperfection होने से छवि बिगड़ सकती है।
जैसे:

- Chromatic aberration
- Spherical aberration
- Astigmatism
- Field curvature

High-quality achromatic / apochromatic lenses में aberration कम।

□ 5. Sample Preparation

कभी-कभी छवि की गुणवत्ता sample पर निर्भर करती है:

- Thickness of specimen (पतला होना चाहिए)
- Staining (contrast बढ़ाता है)
- Mounting medium
- Air bubbles (छवि खराब)

□ 2. Factors Affecting Magnification (आवर्धन को प्रभावित करने वाले कारक)

Magnification वह क्षमता है जिससे वस्तु बड़ी दिखाई जाए। यह निम्न चीज़ों से प्रभावित होता है:

□ 1. Objective Lens Power (मुख्य लेंस का आवर्धन)

Microscope का सबसे महत्वपूर्ण magnifying element।

Objective lens के सामान्य power:

- 4× (scanning)
- 10× (low power)
- 40× (high power)
- 100× (oil immersion)

जितना high-power objective → उतना अधिक magnification।

□ 2. Eyepiece Lens (Ocular lens)

Eyepiece आमतौर पर 10× या 15× magnification देता है।

Total Magnification = Objective × Eyepiece

उदाहरण:
40× objective × 10× eyepiece = **400× Total magnification**

□ 3. Tube Length / Optical Path Length

लेंसों के बीच की दूरी उपयुक्त होनी चाहिए।
बहुत कम या बहुत अधिक दूरी magnification को प्रभावित करती है और image distortion हो सकता है।

□ 4. Numerical Aperture (NA)

→ NA बढ़े तो effective magnification बढ़ता है
→ कम NA पर magnification बढ़ाने से image सिर्फ "बड़ी" दिखती है, लेकिन "धुंधली" हो जाती है।
इसे **empty magnification** कहते हैं।

□ 5. Illumination and Condenser

सही प्रकाश magnification के दौरान clarity और detail को बनाए रखता है।
High magnification पर condenser को up position में रखा जाता है।

□ 6. Use of Oil Immersion

100× objective पर oil immersion का उपयोग किया जाता है।
Oil का refractive index काँच जैसा होता है → प्रकाश बिखरता नहीं →

- magnification बढ़ता है
- resolution भी बढ़ता है
- image sharpness सुधरती है

□ Summary Table (Quick Revision)

Factor	Image Formation	Magnification
Numerical Aperture	✔ बेहतर	✔ बढ़ती
Wavelength	✔ प्रभाव	✖
Lens Quality	✔ प्रभाव	✔ प्रभाव
Illumination	✔ बहुत महत्वपूर्ण	✔ सहायता
Contrast	✔ आवश्यक	✖
Objective Lens	✔	✔ मुख्य
Eyepiece Lens	✖	✔
Sample Preparation	✔ प्रभावित	✖

Microscopy में छवि निर्माण clarity, resolution, NA, प्रकाश और sample preparation पर निर्भर करता है; जबकि magnification मुख्यतः objective व eyepiece lens की शक्ति और NA पर निर्भर करता है।

नीचे **Compound Microscope** और **Phase-Contrast Microscope** के
Principles (सिद्धांत), Instrumentation (यंत्र-विन्यास) और **Applications (उपयोग)** को
बहुत सरल, स्पष्ट और परीक्षा-उपयुक्त **हिंदी** में गहराई से समझाया गया है।

---

1. COMPOUND MICROSCOPE

(सम्बद्ध / संयुक्त सूक्ष्मदर्शी)

⋆ A. Principle (सिद्धांत)

Compound microscope का सिद्धांत **दो सेट लेंसों**— **Objective lens** और **Eyepiece lens**— के संयोजन से *छवि को कई गुना बढ़ाने* पर आधारित है।

मूल सिद्धांत:

1. **Objective lens** नमूने की **वास्तविक, उलटी और आवर्धित छवि** बनाता है (intermediate image)।
2. **Eyepiece lens** इस छवि को **और अधिक बढ़ाकर** अंतिम छवि देता है, जो बड़ी और देखने योग्य होती है।

➡ **Total Magnification = Objective magnification × Eyepiece magnification**

⋆ B. Instrumentation (यंत्र-विन्यास)

Compound microscope के मुख्य भाग:

1. Light Source (प्रकाश स्रोत)

- Mirror या LED/Lamp
- नमूना देखने के लिए प्रकाश प्रदान करता है।

2. Condenser

- प्रकाश को नमूने पर केंद्रित करता है
- Resolution और contrast बढ़ाता है।

3. Diaphragm / Iris

- प्रकाश की मात्रा नियंत्रित करता है।

4. Stage

- नमूना रखने की जगह
- Mechanical stage → स्लाइड को x-y direction में चलाने की सुविधा

5. Objective Lenses

आमतौर पर 4 लेंस—

- 4× (Scanning)
- 10× (Low power)
- 40× (High power)
- 100× (Oil immersion)

6. Eyepiece (Ocular)

- 10× या 15× magnification
- intermediate image को बड़ा करता है।

7. Coarse & Fine Focus Knob

- छवि को साफ करने के लिए फोकस एडजस्टमेंट।

8. Body Tube / Optical Tube

- Objective और eyepiece के बीच सही दूरी बनाए रखता है।

⋆ C. Applications (उपयोग)

Biology & Microbiology

- कोशिकाएँ, ऊतक (tissues)

- बैक्टीरिया, फंगस
- पौधों की संरचना

Medical Diagnostics

- Blood smear
- Urine analysis
- Parasite examination

Education

- स्कूल/कॉलेज प्रयोगशालाएँ

Material Science

- पतले पदार्थों के कट सेक्शन
- Basic structural examination

➡ Compound microscope **सामान्य और विस्तृत cellular observations** के लिए उपयुक्त है।

🔬 2. PHASE CONTRAST MICROSCOPE

(फेज कॉन्ट्रास्ट माइक्रोस्कोप)

Phase-contrast microscope एक विशेष प्रकार का *optical microscope* है।

⭐ A. Principle (सिद्धांत)

Phase contrast microscopy का मूल सिद्धांत है—
पारदर्शी, बिना रंगे (unstained) कोशिकाओं में प्रकाश के **phase differences** को **contrast differences** में बदलना।

क्यों ज़रूरी?

जीवित कोशिकाएँ अधिकांशतः **पारदर्शी** होती हैं।
Normal (bright-field) microscope में वे धुंधली और बिना विवरण वाली दिखती हैं।

Phase contrast इस समस्या को हल करता है।

यह कैसे काम करता है?

जब प्रकाश किसी कोशिका में प्रवेश करता है, तो—

- कुछ भाग **धीमी गति** से गुजरते हैं → phase shift
- कुछ भाग **तेज़** गुजरते हैं → कम phase shift

ये phase differences → नग्न आँख को दिखते नहीं हैं।

Phase plate + Annular diaphragm इन phase बदलों को bright–dark contrast में बदलते हैं → नमूना बिना रंगे ही साफ दिखाई देता है।

➡ **Key Principle:**
Phase differences → Amplitude differences → Visible contrast

⋆ B. Instrumentation (यंत्र-विन्यास)

Phase contrast microscope में compound microscope जैसे सभी भाग होते हैं,
लेकिन दो विशेष अतिरिक्त components जो इसे अलग बनाते हैं:

---

1. Annular Diaphragm (Condenser Annulus)

- Condenser में विशेष रिंग-आकार का diaphragm
- Hollow-cone of light बनाता है
- नमूने पर विशेष pattern में प्रकाश डालता है

---

2. Phase Plate (in Objective lens)

- Objective lens के भीतर एक पारदर्शी प्लेट

- यह direct और diffracted light में phase shift उत्पन्न करता है
- Phase changes → contrast differences में परिवर्तित करता है

⋆ C. Applications (उपयोग)

□ 1. Live Cell Imaging (जीवित कोशिकाओं का अध्ययन)

- कोशिकाओं को मारे/रंगे बिना देखा जा सकता है
- Cell division (mitosis), movement, growth

□ 2. Microbiology

- बैक्टीरिया, प्रोटोजोआ, फंगस की बिना रंगे स्पष्ट छवि

□ 3. Tissue Culture / Cell Culture

- जीवित कोशिकाओं के व्यवहार का निरीक्षण
- Morphology changes

□ 4. Medical diagnosis

- Sperm motility
- Blood cell morphology

□ 5. Transparent Samples

- Thin sections
- Algae, protozoa, yeast

➡ Phase-contrast microscopy **live, unstained, transparent samples** के लिए सर्वोत्तम तकनीक है।

⋆ SUMMARY: Compound vs Phase-Contrast

Parameter	Compound Microscope	Phase-Contrast Microscope

Parameter	Compound Microscope	Phase-Contrast Microscope
Principle	Light refraction + magnification	Phase shift → contrast
Visibility	Stained samples बेहतर दिखते	Unstained & live samples clearly
Key parts	Objective + Eyepiece + Condenser	Annular diaphragm + Phase plate
Application	General cell study, stained tissues	Live cells, transparent samples
Contrast	कम	बहुत अधिक

ELECTRON MICROSCOPY

Electron Microscopy एक उन्नत सूक्ष्मदर्शी तकनीक है जिसमें **प्रकाश की जगह इलेक्ट्रॉन बीम** का उपयोग किया जाता है।
इलेक्ट्रॉन की तरंगदैर्ध्य (wavelength) बहुत छोटी होती है, इसलिए यह प्रकाश सूक्ष्मदर्शी से **1000 गुना अधिक resolution** प्रदान करता है।

1. PRINCIPLE (सिद्धांत)

Electron microscopy का मुख्य सिद्धांत:

Electron beam + Electromagnetic lenses → High-resolution image

विशेष रूप से:

1. **इलेक्ट्रॉनों का wavelength प्रकाश से बहुत कम होता है**
   λ (electron) ≈ 0.005 nm
   λ (visible light) ≈ 400–700 nm

➡ छोटी λ → बहुत उच्च resolution → nanometer स्तर की संरचनाएँ भी दिखती हैं।

2. **इलेक्ट्रॉनों को electromagnetic lenses द्वारा नियंत्रित किया जाता है**
   काँच के लेंस नहीं, बल्कि
   electromagnets इलेक्ट्रॉन बीम को केंद्रित (focus) और बड़ा करते हैं।

3. **Sample और electrons की interaction** से छवि बनती है:
    - Transmission (इलेक्ट्रॉन नमूने से गुजरते हैं – TEM)
    - Scattering (इलेक्ट्रॉन नमूने से टकराते हैं – SEM)

2. TYPES OF ELECTRON MICROSCOPY

मुख्यतः दो प्रकार:

⋆ 1. TEM (Transmission Electron Microscope)

- इलेक्ट्रॉन **नमूने को पार** करते हैं
- अत्यधिक resolution (0.1–0.2 nm)
- Internal structure देखने के लिए

⋆ 2. SEM (Scanning Electron Microscope)

- इलेक्ट्रॉन **नमूने की सतह को स्कैन** करते हैं
- 3D surface image
- Resolution (2–5 nm)

3. INSTRUMENTATION (यंत्र-विन्यास)

Electron microscope के प्रमुख भाग नीचे दिए हैं:

⋆ 1. Electron Source (Electron Gun)

- इलेक्ट्रॉन बीम का उत्पादन
- Types:
    - **Thermionic gun** (Tungsten filament)
    - **Field emission gun (FEG)** (high brightness)

⋆ 2. Condenser Electromagnetic Lenses

- इलेक्ट्रॉन बीम को पतला और फोकस करते हैं
- Sample पर सही मात्रा में electron पहुँचाते हैं

⋆ 3. Specimen Chamber

- Sample को vacuum में रखा जाता है
- Vacuum इसलिए महत्वपूर्ण है क्योंकि:
    - हवा के कण इलेक्ट्रॉनों को बिखेर देते हैं
    - Electron path साफ रहना चाहिए

⋆ 4. Objective Lens (Electromagnet)

- छवि निर्माण और magnification का प्रमुख लेंस
- TEM में सबसे महत्वपूर्ण

⋆ 5. Vacuum System

- हाई vacuum (10^{-5} to 10^{-7} torr) आवश्यक
- Components: Rotary pump + Diffusion/Turbo pump

⋆ 6. Detector System

- TEM: Fluorescent screen, CCD camera
- SEM:
    - Secondary electron detector
    - Backscattered electron detector
    - X-ray detectors (EDX analysis)

⋆ 7. Display / Computer System

- Digital image capture
- Magnification control
- Image processing

⍰ 4. APPLICATIONS (उपयोग)

Electron microscopy विज्ञान, उद्योग, चिकित्सा और नैनो-तकनीक का मुख्य उपकरण है।

⋆ 1. Biological Sciences

- Viruses, bacteria की ultrastructure
- Cell organelles: mitochondria, ER, ribosomes
- Proteins & macromolecules

⋆ 2. Medical Diagnosis

- Viral diagnosis (e.g., poxvirus)
- Renal biopsies (TEM ultrastructure)
- Cancer research

⋆ 3. Material Science

- Metals, alloys, composites
- Crystals, microstructure
- Defects, grain boundaries

⋆ 4. Nanotechnology

- Nanoparticles
- Nanotubes
- Quantum dots
- Surface topology (SEM)

⋆ 5. Semiconductor Industry

- Microchips
- Circuit patterns
- Failure analysis

⋆ 6. Forensic Science

- Gunshot residue
- Paint chips
- Fiber identification

⋆ 7. Environmental Science

- Dust particles
- Pollutants
- Soil ultrastructure

——————————————————————————

5. ADVANTAGES (फायदे)

- अत्यधिक उच्च resolution (0.1–2 nm)
- 3D images (SEM)
- Internal and surface both visualization possible
- Chemical analysis (EDX) संभव

---

6. LIMITATIONS (सीमाएँ)

- बहुत महंगा

- Vacuum आवश्यक
- Biological samples को विशेष तैयारी चाहिए (fixation, dehydration)
- Sample जीवित नहीं रह सकता
- Radiation damage हो सकता है

Electron microscopy एक अत्याधुनिक सूक्ष्मदर्शन तकनीक है जो इलेक्ट्रॉन बीम और electromagnetic lenses का उपयोग करके अत्यंत उच्च resolution पर sample की **आंतरिक (TEM)** और **सतही (SEM)** संरचना दिखाती है।
यह आधुनिक विज्ञान, चिकित्सा, उद्योग और especially nanotechnology में अत्यंत महत्वपूर्ण योगदान देती है।

TEM (Transmission Electron Microscope)

TEM एक उन्नत इलेक्ट्रॉन माइक्रोस्कोप है जिसमें **इलेक्ट्रॉन बीम नमूने के आर-पार होकर** उसकी **आंतरिक सूक्ष्म संरचना** (ultrastructure) की उच्च-रिज़ॉल्यूशन छवि बनाता है।

TEM की resolution लगभग **0.1–0.2 nm** होती है, जो प्रकाश सूक्ष्मदर्शी से लगभग **1000 गुना बेहतर** है।

——————————————————————————

1. PRINCIPLE (सिद्धांत)

TEM का सिद्धांत **इलेक्ट्रॉनों के नमूने से गुजरने (transmission)** और उनके **scattering** पर आधारित है।

मुख्य सिद्धांत:

1. उच्च-ऊर्जा इलेक्ट्रॉनों को sample पर फेंका जाता है।
2. कुछ इलेक्ट्रॉन sample से **सीधे गुजर जाते हैं** (unscattered)।
3. कुछ इलेक्ट्रॉन sample के परमाणुओं से **टकराकर बिखर जाते हैं** (scattered)।
4. इन दोनों प्रकार के इलेक्ट्रॉनों से contrast बनता है:

- जहाँ sample **घना (dense)** → अधिक scattering → **dark areas**
- जहाँ sample **कम घना (light)** → कम scattering → **bright areas**

➡ इस तरह sample की **अंदरूनी, ultrastructural details** दिखाई देती हैं।

——————————————————————————

🔬 2. INSTRUMENTATION (यंत्र-विन्यास)

TEM के मुख्य भाग नीचे दिए हैं:

⭑ 1. Electron Gun (इलेक्ट्रॉन स्रोत)

उच्च-ऊर्जा इलेक्ट्रॉनों का उत्पादन करता है।
Types:

- **Tungsten filament** (थर्मायोनिक)
- **LaB_6 filament**
- **Field Emission Gun (FEG)** → high brightness

Voltage: **60–300 kV**

⭑ 2. Condenser Lens (Electromagnetic)

- इलेक्ट्रॉन बीम को पतला करता है
- Sample पर सही मात्रा में electrons फोकस करता है

⭑ 3. Specimen Holder & Stage

- Sample एक बहुत **पतली फिल्म** के रूप में रखा जाता है (50–100 nm)
- Stage को tilt, rotate और move किया जा सकता है

⋆ 4. Objective Lens (Electromagnet)

- TEM का सबसे महत्वपूर्ण फोकसिंग लेंस
- Primary magnified image बनाता है
- Resolution निर्धारित करता है

⋆ 5. Objective Aperture

- Unwanted scattered electrons को रोकता है
- Contrast बढ़ाता है

⋆ 6. Intermediate and Projector Lenses

- Image को और अधिक magnify करते हैं
- Total magnification: **10,000× से 1,000,000×**

⋆ 7. Imaging System

- Fluorescent screen
- CCD/CMOS camera
- Digital imaging panel

⋆ 8. Vacuum System

TEM में high vacuum (10^{-5}–10^{-7} torr) आवश्यक होता है ताकि:

- इलेक्ट्रॉन हवा से टकराएँ नहीं
- Electron beam सीधा और स्थिर रहे
- Contamination न हो

——————————————————————————

🔹 3. WORKING (कार्यप्रणाली)

TEM का कार्य सरल क्रम में:

1. Electron generation:

Electron gun → उच्च ऊर्जा इलेक्ट्रॉन बीम बनाता है।

2. Beam focusing:

Condenser lenses → बीम को नमूने पर फोकस करते हैं।

3. Transmission through sample:

इलेक्ट्रॉन sample से गुजरते हैं:

- Unscattered electrons → bright area
- Scattered electrons → dark area

4. Image formation:

Objective lens → primary magnified image बनाता है।
Projector lenses → अंतिम छवि को बड़ा करते हैं।

5. Detection:

Fluorescent screen / Camera → image दिखाती और रिकॉर्ड करती है।

——————————————————————————

🔹 4. SAMPLE PREPARATION (नमूना तैयारी)

TEM की सबसे महत्वपूर्ण और जटिल प्रक्रिया।

नमूना **बहुत पतला (50–100 nm)** और **सूखा** होना चाहिए।

प्रक्रिया:

⋆ 1. Fixation

- Glutaraldehyde
- Osmium tetroxide

ताकि कोशिका संरचनाएँ सुरक्षित रहें।

⋆ 2. Dehydration

Alcohol/acetone → पानी को हटाने के लिए।

⋆ 3. Embedding

Sample को resin (epoxy) में embed किया जाता है।

⋆ 4. Ultrathin Sectioning

Ultramicrotome से 50–100 nm मोटाई के सेक्शन काटे जाते हैं।

⋆ 5. Staining

Heavy metals से stain:

- Uranium acetate
- Lead citrate

➡ Contrast बढ़ता है क्योंकि electron scattering बढ़ती है।

——————————————————————————

5. APPLICATIONS (उपयोग)

TEM biological, medical और material research का मुख्य उपकरण है।

⋆ 1. Cell Biology

- Cell organelles (mitochondria, chloroplast, ribosomes, ER)
- Membrane studies
- Virus morphology
- DNA-protein complexes

⋆ 2. Medical Diagnosis

- Viral infections
- Kidney biopsies (GBM changes)
- Cancer ultrastructure

⋆ 3. Microbiology

- Bacteria, viruses, fungi की detailed structure
- Phage studies

⋆ 4. Material Science

- Crystal defects
- Grain boundaries
- Nanoparticles
- Metals and alloys

⋆ 5. Nanotechnology

- Carbon nanotubes
- Nanowires
- Quantum dots
- Atomic-level imaging

⋆ 6. Semiconductor Industry

- Microchip analysis

- Failure analysis
- Thin film characterization

——————————————————————————

6. ADVANTAGES (फायदे)

- Highest resolution (0.1–0.2 nm)
- Ultra-thin internal structure दिखाई देती है
- Atomic-level details
- Chemical analysis (EDX) संभव

---

7. LIMITATIONS (सीमाएँ)

- बहुत महंगा
- नमूना जीवित नहीं रह सकता
- लंबी sample-preparation
- Radiation damage हो सकता है
- Vacuum अनिवार्य

TEM एक अत्याधुनिक माइक्रोस्कोपी तकनीक है जिसमें इलेक्ट्रॉनों को नमूने के आर-पार भेजकर उसकी **अत्यंत सूक्ष्म (ultrastructural) आंतरिक संरचना** का उच्च-रिज़ॉल्यूशन चित्र प्राप्त किया जाता है।
यह modern biology, medicine, materials science और nanotechnology में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है।

SEM (Scanning Electron Microscope)

SEM एक इलेक्ट्रॉन माइक्रोस्कोप है जो **sample की सतह (surface) को high-resolution 3D image** में दिखाता है।
यह TEM की तरह internal structure नहीं बल्कि **सतही संरचना और topography** के लिए उपयोगी है।

Resolution: **2–5 nm**, Magnification: **10× – 500,000×**

🔬 1. PRINCIPLE (सिद्धांत)

SEM का मुख्य सिद्धांत:

1. **Electron beam scanning:**

- High-energy electron beam sample की सतह पर scan करता है।
- Beam छोटे छोटे points पर sequentially जाता है।

2. **Electron-sample interaction:**

- Surface पर इलेक्ट्रॉन टकराते हैं और विभिन्न signals उत्सर्जित होते हैं:
    - **Secondary electrons (SE):** सतह की topography दिखाते हैं (bright-dark contrast)
    - **Backscattered electrons (BSE):** Elemental contrast (atomic number difference) दिखाते हैं
    - **Characteristic X-rays:** EDX (Elemental composition)

3. **Signal detection:**

- Detectors surface से आने वाले electrons/X-rays को detect करके image बनाते हैं।

मुख्य सिद्धांत: Surface topography + electron interaction → high-resolution 3D image

---

🔬 2. INSTRUMENTATION (यंत्र-विन्यास)

SEM के मुख्य भाग:

⭐ 1. Electron Gun (इलेक्ट्रॉन स्रोत)

- High-energy electron beam उत्पन्न करता है (Voltage: 5–30 kV)
- Types:
    - Tungsten filament (thermionic)

- Field emission gun (FEG) → high brightness

⋆ 2. Condenser Lens (Electromagnetic)

- Electron beam को focus करता है
- Beam diameter घटाकर fine scanning spot बनाता है

⋆ 3. Scanning Coils (Deflecting Coils)

- Beam को raster scan pattern में sample पर ले जाते हैं
- Beam को x और y direction में move कराते हैं

⋆ 4. Specimen Stage

- Sample को tilt, rotate और translate किया जा सकता है
- High vacuum chamber में रखा जाता है

⋆ 5. Objective Lens (Electromagnet)

- Beam को sample पर focus करता है
- Resolution और magnification नियंत्रित करता है

⋆ 6. Detectors

- **Secondary electron detector (SE):** surface detail
- **Backscattered electron detector (BSE):** atomic number contrast
- **X-ray detector (EDX):** elemental analysis

⋆ 7. Display / Computer System

- Signal को digital image में बदलता है
- Image capture और analysis

⋆ 8. Vacuum System

- High vacuum (10^{-5}–10^{-7} torr) → electrons को scatter होने से रोकता है

🔹 3. WORKING (कार्यप्रणाली)

1. Electron gun → Electron beam उत्पन्न करता है
2. Condenser lens → Beam को narrow focus करता है
3. Scanning coils → Beam को raster pattern में sample पर scan करता है
4. Electrons interact with surface → Secondary electrons, BSE, X-rays उत्सर्जित होते हैं
5. Detectors signal detect करते हैं → 3D surface image बनती है
6. Display/Computer → High-resolution image दिखाती है

🔹 4. SAMPLE PREPARATION (नमूना तैयारी)

SEM में sample preparation TEM के मुकाबले सरल है।
मुख्य steps:

1. **Fixation (optional, biological samples)**

- Glutaraldehyde, Osmium tetroxide

2. **Dehydration (biological samples)**

- Alcohol series (30% → 100%)

3. **Drying**

- Critical point drying → Surface collapse रोकता है

4. **Coating**

- Conductive coating: Gold (Au), Platinum (Pt), Carbon
- ताकि electrons accumulate न हों (charge build-up)

5. **Mounting**

- Sample stub पर चिपकाया जाता है

Note: Non-conductive samples coating के बिना charge artifact उत्पन्न कर सकते हैं

---

5. APPLICATIONS (उपयोग)

⋆ 1. Biology / Medicine

- Cell surface morphology
- Bacteria, viruses
- Tissue structure

⋆ 2. Material Science

- Metals, alloys, composites
- Microstructure, fractures
- Nanoparticles, nanotubes

⋆ 3. Nanotechnology

- Nanowires, quantum dots
- Surface morphology analysis

⋆ 4. Semiconductor Industry

- Microchip defects
- Circuit patterns

⋆ 5. Environmental Science

- Dust particles, aerosols
- Soil microstructure

⋆ 6. Forensic Science

- Paint, fiber, gunshot residue analysis

---

6. ADVANTAGES (फायदे)

- 3D surface imaging
- High resolution (2–5 nm)
- Elemental analysis (EDX) possible
- Less demanding sample thickness compared to TEM

---

7. LIMITATIONS (सीमाएँ)

- Biological samples जीवित नहीं रह सकते
- High vacuum और coating जरूरी
- Expensive
- Internal structure नहीं दिखाता

SEM एक शक्तिशाली तकनीक है जो इलेक्ट्रॉनों के सतह पर interaction पर आधारित है।
यह **sample की surface morphology और topography** को high-resolution 3D image में दिखाती है और modern biology, material science, nanotechnology और forensic science में महत्वपूर्ण है।