Covalent chromatography

- The substance in mobile phase form covalent bonds with the stationary phase and elution is accomplished breakage of these bonds.
- (केवल पदार्थ के purification के लिए उपयोग किया जाता है जो स्थिर चरण के साथ disulfide bonds बना सकता है)।
- Activated thiol sepharose contains 2, 2'- dipyridyl disulfide which under mild conditions, forms mixed disulfides with the thiol group of proteins.

DNA – cellulose chromatography

- DBPs (DNA binding proteins) को दूसरों से अलग करने के लिए हम इसका उपयोग करते हैं। जिसमें मैट्रिक्स DNA-cellulose से बना होता है।
- कम ionic strength वाले बफर में प्रोटीन का मिश्रण (जिसमें DBPs को DNA के लिए adsorbed किया जाता है) कॉलम के माध्यम से pass किया जाता है। Column तब अनबाउंड प्रोटीन को हटाने के लिए धोया जाता है और बढ़ती आयनिक ताकत के एक ढाल के साथ eluted किए जाते है। प्रोटीन को हटा दिया जाता है, जो पहले से अधिक कमजोर रूप से बांधते हैं।
- Phage T4 से संक्रमित E.Coli में DNA-binding protein का पता लगाने के लिए Bruce Alberts द्वारा पहली बार उपयोग किया गया।

Methylated Albumin Kieselgur (MAK) Columns

मिथाइलएटेड सीरम एल्ब्यूमिन kieselgur (डायटोमेसियस अर्थ) से adsorb होता है और कसकर बांधता है। यह single and double-stranded DNA and RNA को बांधती है और उन्हे elute कर सकती है यदि वे आयनिक ताकत बढ़ाने के एक ग्रेडिएंट के साथ हो।

Uses:

1. M.W., base रचना और ग्लाइकोसिलेशन की डिग्री के अनुसार Native DNA को अलग करने के लिए
2. To separate dsDNA with single-stranded ends from those without such termini
3. rRNA से t-RNA को अलग करने के लिए।
4. अलग-अलग t-RNA को एक दूसरे से अलग करने के लिए।

विभिन्न base composition वाले DNA अंशों का separation:- दो affinity प्रणाली विकसित की गई है। दोनों एक बंधी हुई पॉलीकार्बामाइड का उपयोग करते हैं जिसमें एक बड़ा आकार का छिद्र होता है ताकि आणविक sieving कम से कम हो।

Hydroxylapatite chromatography

- Crystalline hydroxylapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) एक adsorbent है जिसका उपयोग प्रोटीन या न्यूक्लिक एसिड के मिश्रण को अलग करने के लिए किया जाता है।Hydroxylapatite क्रोमैटोग्राफी का सबसे महत्वपूर्ण applications में से एक separation of single-stranded from double-stranded DNA है।DNA के दोनों रूप कम फॉस्फेट बफर सांद्रता में बांधते हैं लेकिन बफर सांद्रता में वृद्धि के रूप में single-stranded DNA चुनिंदा रूप से desorbed हो जाते है।
- जैसे-जैसे बफर सांद्रता आगे बढ़ती है, double-stranded DNA release होता है।Cot analysis की तकनीक में इस व्यवहार का फायदा उठाया जाता है।

- Double-stranded DNA के लिए hydroxylapatite की affinity इतनी अधिक है कि इस प्रकार के क्रोमैटोग्राफी के उपयोग से सेल अर्क में RNA और proteins से चुनिंदा तरीके से हटाया जा सकता है। **फॉस्फेट बफर सांद्रता को 500mM तक बढ़ाकर elution प्राप्त की जाती है।**
- इस प्रकार की क्रोमैटोग्राफी का विकास उनकी सतह हाइड्रोफोबिसिटी का उपयोग करके प्रोटीन को शुद्ध करने के लिए किया गया था, जो गैर-ध्रुवीय अमीनो एसिड अवशेषों की उपस्थिति से संबंधित है।
- हाइड्रोफोबिक अवशेषों के समूह प्रोटीन की सतह पर इस तरह से बिखरे हुए हैं जो प्रत्येक प्रोटीन को विशेष गुण प्रदान करते हैं।
- एक जलीय घोल में, प्रोटीन पर इन हाइड्रोफोबिक क्षेत्रों को पानी के अणुओं की एक आदेशित फिल्म के साथ कवर किया जाता है जो प्रभावी रूप से हाइड्रोफोबिक समूहों को मास्क करते हैं। हालांकि, इन समूहों को हाइड्रोफोबिक क्षेत्रों से अवगत कराया जा सकता है और फिर एक-दूसरे के साथ interact कर सकते हैं और यह अम्मोनियम सल्फेट का उपयोग कर salting out के आधार है।

Aadhar Institute iguruji

CHAPTER : 6
ELECTROPHORESIS

- अधिकांश जैविक पॉलिमर electrically charged होते हैं और इसलिए एक विद्युत क्षेत्र में चल जाएंगे। एक विद्युत क्षेत्र द्वारा एक solvent के माध्यम से कणों के परिवहन को एलेक्ट्रोफोरीसिस कहा जाता है। अपने net charge या उनके आकार के आधार पर अणुओं को भेद करने के लिए, uncharged residues या इसके विपरीत अमीनो एसिड परिवर्तनों का पता लगाने के लिए, और विभिन्न आणविक प्रजातियों को अलग करने के लिए quantitatively electrophoresis का उपयोग किया जाता है। यदि एक इन्सुलेट माध्यम में चार्ज वाला एक कण एक विद्युत क्षेत्र, E में है, तो कण एक निरंतर velocity से आगे बढ़ेगा, v, जो विद्युत बल, Eq और viscous drag, fv के बीच संतुलन द्वारा निर्धारित होता है, जिसमें f, frictional coefficient है, जो कि Eq = fv है
- यह ध्यान रखना महत्वपूर्ण है कि velocity वोल्टेज के लिए आनुपातिक है और electrical current समीकरण में प्रकट नहीं होता है। mobility, u, को प्रति इकाई क्षेत्र, या u = v / E = q / f के velocity के रूप में परिभाषित किया गया है
- क्योंकि mobility frictional coefficient पर निर्भर करती है, जो अणुओं के भौतिक मापदंडों में से एक फ़ंक्शन f है, सिद्धांत रूप में u के मूल्य को अणु के आकार के बारे में जानकारी देनी चाहिए।

Types of Electrophoresis

There are two Types of Electrophoresis **(i) Moving-boundary and (ii) Zone.**

(i) Moving-boundary Electrophoresis: Moving-boundary electrophoresis में, मैक्रोमोलेक्यूल एक solution के दौरान मौजूद होते हैं और अणुओं की position (वास्तव में, solvent से solution को अलग करने वाली सीमा) समय के एक फ़ंक्शन के रूप में निर्धारित की जाती है। इस पद्धति का उपयोग मुख्य रूप से प्रोटीन की गतिशीलता और isoelectric points के निर्धारण के लिए किया गया है।

(ii) Zone Electrophoresis: Zone electrophoresis में एक स्पॉट या एक बैंड के रूप में एक solution apply किया जाता है, और कण एक solvent के माध्यम से पलायन करते हैं जो लगभग हमेशा रासायनिक रूप से निष्क्रिय और homogeneous medium द्वारा समर्थित होता है जैसे कागज या जेल में मिश्रण का विश्लेषण किया जाता है, शुद्धता का निर्धारण, mobility और रचना में परिवर्तन, और शुद्धि के लिए परख करने के लिए।

वर्तमान में उपयोग में zone electrophoresis सबसे आम प्रकार की एलेक्ट्रोफोरीसिस है। कुछ प्रकार के एलेक्ट्रोफोरीसिस में supporting medium का प्रमुख कार्य यांत्रिक गड़बड़ी और संवहन (convection) को रोकना है जो तापमान परिवर्तन और concentrated macromolecular solutions के उच्च घनत्व दोनों से उत्पन्न होता है।