# تخلیص یوبی کوئیتین و تولید آنتی بادی اختصاصی علیه یوبی کوئیتین

مهشید حجت [۱] ، اصغرطالبیان [۲] ، رویا قدس [۳] ، اشرف شبانی [۱] ، محمد مهدی آخوندی [۲] ، محمد رضا صادقی [۳]

[۱] تهران، دانشگاه الزهر، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۲] تهران، پژوهشکده ابن سینا، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل

[۳] تهران، پژوهشکده ابن سینا، مرکز تحقیقات آنتی بادی مونوکلنال

تاریخ دریافت: ۸٤/۰٤/۰٦ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰۲/۳۰

## چکیده

روشهای ایمونوشیمی مانند الایزا ، رادیو ایمونواسی و ایمونوفلورسانس، روشهایی حساس و سریع جهت آنالیز یوبی کوئیتین و سایر مولکولهای زیستی ، بر پایه استفاده از آنتی بادی اختصاصی بعنوان شناساگر می باشند . لذا تهیه آنتی بادی اختصاصی علیه یوبی کوئیتین همواره یکی از ابزارهای مهم در بررسی و ردیابی این پروتئین است. هدف از این تحقیق تخلیص یوبی کوئیتین از گلبولهای قرمز انسان و تولید آنتی بادی اختصاصی علیه آن وکونژوگاسیون آنتی بادی بمنظور استفاده در مطالعات ایمونوشیمی می باشد . در این تحقیق ابتدا یوبی کوئیتین از گلبولهای قرمز خونی با دناتوراسیون حرارتی و یا بوسیله سولفات آمونیوم جدا و نهایتاً با کروماتوگرافی بر روی ژل DEAE-Sephadex تخلیص گردید. این پروتئین بکمک گلوتارآلدئید به پلی یوبی کوئیتین تبدیل و بعنوان ایمونوژن در دوزهای مناسب به خرگوش تزریق گردید . پس از تعیین تیتر آنتی‌بادی در سرم خرگوشی با روش الایزا و خونگیری در حجم مناسب، جداسازی آنتی‌بادیهای سرم خرگوشی ، از روش ایمونوافینیتی بر روی ستون کروماتوگرافی جذبی فعال شده با پروتئین A ، انجام شد. سپس با اتصال یوبی کوئیتین بعنوان لیگاند به ژل CNBr activated sepharose-4Bو عبورآنتی بادیهای خرگوشی مرحله قبل از ستون کروماتوگرافی جذبی متصل به یوبی کوئیتین ، آنتی‌بادی اختصاصی علیه یوبی‌کوئیتین خالص شد. سپس آنتی‌بادیهای اختصاصی ، با ماده فلورسانس فلورسئین ایزوتیوسیانات کونژوگه و در پایان جهت تأئید قابلیت آنتی بادیهای مذکور در شناسایی و اتصال به اپی توپهای پروتئین یوبی کوئیتین ، تستی به روش ایمونوفلورسانس طراحی شد. نتایج انجام SDS-PAGE بر روی یوبی‌کوئیتین تخلیص شده از ستون تعویض یونی و آنتی بادیهای سرمی تهیه شده از ستون جذبی ، بصورت تک باند بر روی ژل ظاهر گردید.همچنین بکمک تست الایزا ، ویژگی آنتی‌بادیهای اختصاصی تخلیص شده به پروتئین یوبی کوئیتین تأئید گردید . در هر بار تخلیص mg ۱ یوبی کوئیتین به ازای ml ۱۰۰ گلبول قرمز و ۰/ ٦mg آنتی‌بادی اختصاصی علیه یوبی کوئیتین ، به ازای ml ۸ سرم ایمن شده خرگوش حاصل گردید . در بررسی ایمونوفلورسانس اسپرمهای پوشیده از یوبی کوئیتین با توجه به اینکه یوبی کوئیتین محور بسیاری از تحقیقات زیستی است به کمک آنتی بادیهای کونژوگه با فلورسئین ایزوتیوسیانات ، فلورسانس قابل توجهی در مقایسه با کنترل منفی آزمایش مشاهده گردید لذا تهیه این ماده و آنتی بادی علیه آن ، و همچنین کونژوگه کردن این آنتی بادی با ملکولهای فلورکروم امکان بررسی بیشتر عملکرد آن را فراهم می سازد.

**واژه های کلیدی:** یوبی کوئیتین، آنتی بادی، کروماتوگرافی جذبی، خالص سازی



Archive of SID
www.SID.ir

## مقدمه

یوبی‌کوئیتین، پروتئینی کوچک با وزن مولکولی ۸/۵kDa با ۷۶ اسید آمینه است (۲۳)، که در انواع سلولهای یوکاریوتی وجود دارد. حضور وسیع این پروتئین در جایگاههای مختلف و ثابت ماندن ساختار مولکولی آن در گونه‌های مختلف، حاکی از نقش مهم یوبی‌کوئیتین در حیات سلولی می باشد. اتصال کولان یوبی‌کوئیتین به پروتئینها یکی از مهمترین راههای هدایت بسیاری از بیومولکولهای پروتئینی به سمت تجزیه پروتئوزومی بشمار می‌رود (۱٤).

یوبی‌کوئیتین برای اولین بار در اوایل دهۀ ۷۰ میلادی ، توسط Goldstain و همکارانش از تیموس گاو جدا گردید (۱۵) و بعنوان فاکتور پیش برنده تمایز لنفوسیتهای B و T از طریق رسپتورهای بتا آدرنرژیک و فعال‌سازی آدنیلات سیکلاز شناخته شد (۹). در نتیجه از همان ابتدا این پروتئین مورد توجه محققانی قرار گرفت که روند انتقال پیام بیومولکولها (signal transduction) به داخل سلول را مطالعه می نمودند. در اوایل دهه ۸۰میلادی، سیستم پروتئولیز غیر لیزوزومی وابسته به یوبی‌کوئیتین و ATP در سلول شناخته شد که طی آن پروتئینهای آسیب دیده و پروتئینهایی که نیمه عمر آنها به پایان رسیده بدون دخالت لیزوزوم تجزیه می‌گردند (۹و۱٦). در این روند یوبی‌کوئیتین طی یک مسیر آنزیمی چند مرحله‌ای به پروتئین هدف متصل ، و منجر به شناسایی و تجزیه پروتئین توسط پروتئوزوم 26S می‌گردد. در حقیقت غلظت بسیاری از پروتئینها در سلول تحت کنترل تجزیه وابسته به سیستم یوبی‌کوئیتین وATP است. از جمله این پروتئینها، می‌توان به تنظیم کننده‌های چرخه سلولی، تنظیم کننده رونویسی فاکتور $NF\text{-}_kB$ و مهار کننده آن $I_kB_\alpha$، پروتوانکوژن mos و بسیاری از فاکتورهای رونویسی دیگر اشاره نمود (۱۵). همچنین یوبی‌کوئیتین بعنوان نوعی ایمونوفیلین سلولی (٦)، تنظیم کننده پاسخ ایمنی (۱۲)، پروتئین شوک حرارتی (۸)، جزئی از ساختار (Paired Helical Filament) PHF در نورون بیماران مبتلا به آلزایمر و سندرم داون (۲۱,۲۰)، فاکتور مؤثر در پایداری کنفورماسیون کروماتین در ارتباط با هیستون $H_2A$ (۱۰,۱۸)، فاکتور مؤثر در پدیده budding ویروس HIV (۲۲)، مارکر پروتئینی جهت کنترل کیفیت اسپرم در مجرای اپی‌دیدیم (۲٤) و بسیاری دیگر از پدیده‌های سلولی شناخته شده است. با توجه به نقش گسترده یوبی‌کوئیتین ، در بسیاری از پدیده‌های زیستی، مطالعات و تحقیقات بیشتر جهت شناسایی عملکردهای جدید این پروتئین بویژه، درروند تولیدمثل و باروری از اهمیت زیادی برخوردار است. از طرف دیگر تکنیکهای ایمونوشیمی همواره روش مناسبی در بررسی و ردیابی پروتئینها در علوم زیستی بوده است و توانایی مطالعه جایگاه مولکول در سلول و شناسایی ساختمان و عملکرد آن را فراهم می‌آورند.

از این رو تهیه آنتی‌بادی اختصاصی علیه یوبی‌کوئیتین و کونژوگاسیون آن با ترکیبات مختلف یکی از مهمترین ابزارها در مطالعات مولکولی بر روی یوبی‌کوئیتین خواهد بود. هدف از این تحقیق خالص‌سازی پروتئین یوبی‌کوئیتین از گلبولهای قرمز انسان و تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه آن در خرگوش و در ادامه نشاندار نمودن آنتی‌بادیها با مولکولهای فلورسانس می‌باشد.

## مواد و روشها

**تخلیص یوبی‌کوئیتین:** اریتروسیتهای خونی منبع مهمی برای یوبی‌کوئیتین می‌باشند. لذا جهت تخلیص این پروتئین از سلولهای خونی تهیه شده از خون افراد سالم اهداء کننده به سازمان انتقال خون استفاده گردید. در طول روند خالص‌سازی یوبی‌کوئیتین با توجه به وزن مولکولی پایین آن ، مراحل دیالیز توسط کیسه دیالیز با cut off در حد ۲ kDa (*sigma ,USA*) انجام گرفت. در ابتدا ۱۰۰ml



Archive of SID
www.SID.ir

سلول خونی (packed cell) سه مرتبه توسط بافر PBS شستشو داده شد. در مرحله بعد، سلولهای شسته شده با ۵ برابر حجم آب مقطر مخلوط و بمدت ۲۰ min همراه با هم زدن مداوم در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس سوسپانسیون حاصل سریعاً سرد و توسط کاغذ صافی*(whatman NO.1)* فیلتر گردید. در مرحله بعد محلول صاف شده ، جهت حذف بیشتر سایر پروتئینها، مجدداً تحت دناتوراسیون حرارتی بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت که در پایان پس از سرد شدن نمونه و فیلتراسیون آن، محلول زرد رنگی حاوی یوبی‌کوئیتین بدست آمد (۳و۱). جهت رسوب یوبی‌کوئیتین و احتمالاً سایر پروتئینها از نمک سولفات آمونیوم استفاده گردید. بدین منظور ۲۵۰ ml مایع فیلتره توسط افزودن این نمک ، به غلظت ۹۰ درصد اشباع رسانده شد. سپس محلول اشباع شده بمدت ۲ ساعت با قدرت g×۲۰۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. پس از جمع آوری رسوب و دیالیزآن در برابر بافر فسفات ۱۰mM(pH = ۷) نمکهای سولفات آمونیوم موجود ، از محلول پروتئینی حذف گردید. دیالیز بمدت ۱۲ ساعت طی ٤ مرتبه تعویض بافر انجام گردید. در مرحله بعد نمونه تحت سومین دناتوراسیون حرارتی قرار گرفت. پس از سانتریفوژ ، رسوب حاصل را دور ریخته و محلول رویی در حجم۳ml از ستون کروماتوگرافی DEAE-Sephadex A-25( *Amersham-pharmacia, sweden* ) عبور داده شد(۷,۱۳).

لازم بذکر است که قبل از تزریق نمونه ، ستون توسط بافر فسفات ۱۰ mM (pH = ۷) به تعادل رسید. در مرحله بعد ستون توسط ۱۵۰ml بافر فسفات ۱۰mMحاوی کلرید سدیم ۲۰mM (pH = ۷) شسته و با این شستشو پروتئینهای دارای پیوند یونی ضعیف به ذرات ژل سفادکس بصورت چندین پیک از ستون خارج گردید پس از جمع‌آوری فرکشنهای مورد نظر، آنها در بافر PBS دیالیز شدند. در پایان، بررسیهای الکتروفورزی در ژل پلی آکریل آمید ۲۰ درصد (SDS-PAGE) بمنظور تأیید حضور پلی پپتید یوبی‌کوئیتین و خلوص آن انجام گرفت. غلظت محلولهای پروتئینی با استفاده از روش لوری (۱۹) و برادفورد (۲۵) اندازه گیری شد .

**تولید پلی یوبی‌کوئیتین:** با توجه به وزن مولکولی پایین یوبی‌کوئیتین، این مولکول یک هاپتن بوده و قدرت ایمنی زایی آن پایین است لذا پس از تزریق، سریعاً از بدن حیوان حذف می‌شود. لذا جهت بالا بردن خاصیت ایمن زایی آن، اقدام به تهیه ایمونوژن پلی یوبی‌کوئیتین شد. بدین منظور ابتدا ۱mg یوبی‌کوئیتین خالص در حجم ۱ میلی لیتر بافر PBS توسط دستگاه لیوفیلیزاتور طی مدت ۲ ساعت بصورت پودر تهیه گردید . سپس یوبی کوئیتین لیوفیلیزه شده در داخل میکروتیوب به ٤۰۰µl بافر بورات ۰/۱ M (pH=۱۰ ) افزوده گردید. در مرحله بعد ۲۰µl محلول گلوتارآلدئید ۰/۳ درصد به محتوای پروتئینی اضافه و میکروتیوب بمدت ۵ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. در طول این مدت ۸۰ میکرولیتر دیگر از محلول گلوتارآلدئید ، هر بار به میزان ۲۰µl در فواصل زمانی یک ساعت به مجموعه اضافه شد. پس از پایان زمان آزمایش بمنظور خارج نمودن گلوتارآلدئیدهای اضافی، نمونه پروتئینی بمدت ۱۲ ساعت در برابر بافر PBS دیالیز گردید. سپس نمونه دیالیز شده را در حجم ۳۲۵۰µl به همراه ۲۵۰µl، ۲۰SDS درصد بمدت ۵ دقیقه جوشانده و پلی یوبی‌کوئیتین حاصل در حجمهای ۲۵۰µl تقسیم و برای تزریقات یادآور داخل فریزر، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۷,٤) .

**تولید آنتی‌بادی علیه یوبی‌کوئیتین و تخلیص آن :** جهت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلنال از خرگوش سفید نیوزلندی ( *انستیتو پاستور ایران*) استفاده شد برای این منظور ۱۰۰µg پلی یوبی‌کوئیتین حاصل از مرحله قبل، در حجم ۲۵۰µl با ۲۵۰µl ادجونت کامل فروند ( *sigma ,USA*) بصورت ترکیب امولسیونه تهیه گردید. تزریق اول بصورت



Archive of SID
www.SID.ir

زیرجلدی و تزریقهای بعدی داخل عضله ران خرگوش به فواصل زمانی هر دو هفته یکبار، همراه با ادجوانت ناقص فروند انجام گرفت. لازم بذکر است که جهت تعیین تیتر آنتی‌بادی از روش الایزای غیر مستقیم استفاده شد. درروش الایزای غیر مستقیم ابتدا یوبی کوئیتین تجاری بعنوان آنتی ژن لایه اول به سطح پلیت متصل می گردد . سپس رقتهای مختلف سرم خرگوش بعنوان لایه دوم اضافه می شود که در صورت وجود آنتی بادی اختصاصی علیه یوبی کوئیتین در سرم خرگوش به آنتی ژن متصل می شود . در مرحله بعد از آنتی بادیSheep anti rabbit کونژوگه با HRP (Horse Radish Peroxidase) استفاده می گردد . کونژوگه های مذکور اختصاصی علیه ناحیه FC آنتی بادیهای اولیه می باشند . در حقیقت دراین روش یوبی کوئیتین بطور غیر مستقیم توسط آنتی بادی ثانویه شناسایی می شود . غلظت یوبی کوئیتین تجاری جهت اتصال به کف پلیت الایزا ٦ µg /ml بود . برای لایه دوم رقتهای مختلف سرم خرگوش ایمن شده ( جدول ۱)و برای لایه سوم تیتر ۱/۱۵۰۰ از آنتی بادی کونژوگه با HRP (پژوهشکده ابن سینا) استفاده گردید .

خونگیری از خرگوش هر ۲ هفته یکبار در حجم‌های ٤٠-۳۰ میلی‌لیتری انجام شد و پس از جداسازی، سرمهای حاصل تا زمان تخلیص آنتی بادی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در مرحله بعد برای تخلیص آنتی بادیهای سرم خرگوش، از ستون کروماتوگرافی جذبی پروتئین A ، اختصاصی جهت اتصال به ناحیه FC آنتی‌بادی IgG استفاده گردید. بدین منظور در ابتدا ۸ ml سرم خرگوش ایمن شده علیه یوبی‌کوئیتین، توسط ۲٤ml از بافر Tris-HCl با غلظت۳۰mM حاوی کلرید سدیم M ۰/۱۵ (pH=۷/٦) رقیق گردید و از ستون کروماتوگرافی جذبی پروتئین A (حجم ۱۰ml) با سرعت ۱۲ml/h عبور داده شد. در مرحله بعد ستون توسط ۵۰ml بافر Tris-HCl با غلظت۳۰ mM ، حاوی کلرید سدیمM ۰/۱۵(pH=۷/٦) شستشو گردید. با عبور ۳۰ml بافرGlycin-HCl , M ۰/۱(pH= ۲/۵) اتصال بین ناحیه Fc آنتی‌بادیهای خرگوشی با پروتئینهای A سست شده و آنتی‌بادیها به همراه بافر از ستون خارج می‌شوند. سپس آنتی‌بادیهای مذکور جمع آوری و سریعاً بوسیله محلول ۲Nهیدروکسید سدیم pH آن خنثی گردید ودر بافر PBS دیالیز شد. پس از تعیین غلظت آنتی‌بادیهای خالص شده، بررسیهای الکتروفورزی توسط ژل پلی آکریل آمید انجام گرفت (۱۷).

**تخلیص آنتی‌بادی اختصاصی علیه یوبی‌کوئیتین:** در این مرحله یوبی‌کوئیتین خالص از مرحله قبل بعنوان لیگاند، طی چندین مرحله به ژل ( *Amersham-pharmacia, sweden*) CNBr activated sepharose-4B متصل گردید. برای این منظور ۱ گرم پودر فعال سفارز پس از سه مرتبه شستشو با اسید کلریدریک ۱mM، در بافر بی‌کربنات سدیم M ۰/۱ حاوی کلرید سدیم M ۰/۵ (pH=۸/۳)، با mg ۵ یوبی‌کوئیتین مخلوط گردید و بمدت ۲ ساعت در دمای اتاق بر روی دستگاه همزن قرار داده شد(نکته در این مرحله نباید از همزن مغناطیسی استفاده نمود ) .

پس از قرار دادن ژل داخل ستون کروماتوگرافی، بمنظور غیر فعال نمودن گروههای فعال آزاد سیانوژن بروماید از ۱۵ml بافر بلاک کننده که شامل بافرTris-HCl M ۰/۱ (pH=۸) استفاده گردید. ترکیب تریس با داشتن گروههای آمین قادر به غیر فعال نمودن گروههای فعال می باشد . در مرحله بعد، ژل مورد نظر ۳ مرتبه توسط دو بافر اسیدی و بازی شامل بافر استات M ۰/۱حاوی کلریدسدیمM ۰/۵ (pH=٤) و بافر Tris-HCl M ۰/۱ دارای کلرید سدیم M ۰/۵ (pH=۸) شستشو داده شد. در این مرحله بسیاری از لیگاندها که اتصال ضعیفی با ژل دارند، از ستون خارج می‌شوند. در آخرین مرحله آماده‌سازی، ستون توسط ۳۰ml بافر PBS شسته شد.

جهت تخلیص آنتی‌بادی اختصاصی علیه یوبی‌کوئیتین، ۲۰ml آنتی‌بادی خالص شده از مرحله قبل (۱٦mg) با سرعت ۲ml/h از ستون افینیتی CNBr activated



Archive of SID
www.SID.ir

sepharose-4B عبور داده شد. پس از شستشوی ستون با ٤٠ml بافر PBS و عبور ۲۰ml بافر Glycin-HCl از (pH=۲/۵) آنتی‌بادیهای اختصاصی از ستون جمع‌آوری و سریعاً pH آن با محلول ۲Nهیدروکسید سدیم خنثی گردید و در بافر PBS دیالیز شد.جهت تأیید اختصاصی بودن آنتی‌بادیهای خالص شده بر علیه یوبی‌کوئیتین، از روش الایزای غیر مستقیم استفاده گردید. همچنین در ادامه بکمک روش Western blot قابلیت اتصال آنتی بادیهای اختصاصی تخلیص شده به یو بی کوئیتین تجاری و یوبی کوئیتین خالص شده بر روی کاغذ نیتروسلولز (شکل ٤) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (۵).

**کونژوگه نمودن آنتی‌بادیهای اختصاصی علیه یوبی‌کوئیتین با فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC):** در این مرحله آنتی‌بادیهای اختصاصی تخلیص شده علیه یوبی‌کوئیتین با ماده فلورسانس فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) کونژوگه گردید. بدین منظور ابتدا آنتی‌بادیهای مذکور در برابر محلولی از ۹ حجم کلرید سدیم M ۰/۱۵ و یک حجم بافربی کربنات ۰/۵M (pH=۹/۵) بمدت یک شبانه روز در دمای ٤ درجه سانتی گراد دیالیز گردید. سپس ۵۰µg FITC به ازاء هر میلی‌گرم آنتی‌بادی به محلول پروتئینی دیالیز شده با غلظت ۱mg/ml افزوده گردید. مجموعه حاصل بمدت یک ساعت در دمای اتاق روی دستگاه روتاتور قرار داده شد. لازم بذکر است که در طول مراحل کار از رسیدن نور به کونژوگه‌ها و FITC ممانعت گردید. پس از مرحله کونژوگاسیون، نمونه در برابر بافر PBS دیالیز، و در پایان کونژوگه‌ها در محلولی از سرم آلبومین گاوی ۱ درصد و سدیم آزاید ۰/۱ درصد در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲).

**اتصال یوبی کوئیتین به سطح اسپرم :** در این مرحله مولکول گلوتارآلدئید از طریق گروههای آلدئیدی خود در شرایط قلیایی باعث اتصال عوامل لیزین یوبی کوئیتین به عامل آمینی آمینواسیدهای پروتئینهای سطح اسپرم می شود . برای این منظور از نمونه سیمن تازه افراد مراجعه کننده به مرکز درمانی ابن سینا که از لحاظ حجم ، غلظت و تعداد منطبق با استانداردهای WHO استفاده گردید . جهت جداسازی اسپرمهای سالم از مایع سمینال ، ابتدا ml ۱ محیط کشت Hams F10 *(Sigma -USA)* به آرامی به ml ۰/۱ از نمونه مایع سمینال داخل لوله آزمایش اضافه شد و نمونه بمدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت . پس از اتمام زمان مذکور، فاز رویی بکمک پیپت پاستور برداشت گردید. این فاز حاوی اسپرمهای متحرک سالم می باشد . در مرحله بعد از نمونه اسپرمهای تهیه شده رقت $٤\times١٠^{٦}$ اسپرم در µl ۹۰۰ بافر بورات M ۰/۱ ( pH=۸ ) تهیه شد و سپس یوبی کوئیتین خالص ( ٤ mg/ml) ، همراه با µl ۱۰۰ گلوتارآلدئید ۰/۳ درصد به محتوای لوله افزوده و مجموعه بمدت ۳ ساعت در دمای اطاق بر روی دستگاه همزن قرار گرفت. در پایان اسپرمهای پوشیده از یوبی کوئیتین سه مرتبه توسط بافر PBS شستشو شد.

**بررسی عملکرد آنتی بادیهای کونژوگه با فلورسئین ایزو تیوسیانات توسط رنگامیزی ایمونوفلورسانس اسپرم :** جهت بررسی کارایی آنتی بادیهای کونژوگه با FITC علیه یوبی کوئیتین، از اسپرمهای متصل به پروتئین یوبی کوئیتین مرحله قبل استفاده شد. بدین منظور از رقت ml/اسپرم $١٠^{٦}\times$ ۱ اسپرمهای مذکور توسط دستگاه سایتوسپین در قدرت g ۵۰۰ بمدت ۳ دقیقه گسترشی بر روی لامها تهیه شد، و سپس لامها بمدت ۳ ساعت در مجاورت هوا خشک شد. جهت فیکس نمودن لامها از فرمالدئید ۲ درصد بمدت min ٤٠ استفاده شد. در مرحله بعد نمونه ها بمدت ۲ ساعت در مجاورت µl ۵۰ آنتی بادی کونژوگه با FITC در رقت µg/ml ۲۵ قرار گرفت. در پایان پس از شستشو لامها توسط بافر PBS ( دو مرتبه ، هر بار بمدت ۵ دقیقه ) اسپرمها جهت بررسی بکمک میکروسکوپ اپی فلورسانس مطالعه شد.



Archive of SID
www.SID.ir

## نتایج

**تخلیص یوبی کوئیتین** : یوبی کوئیتین پروتئینی پایدار در برابر شوکهای حرارتی می باشد ، لذا از این ویژگی در روند خالص سازی یوبی کوئیتین استفاده گردید.

طی سه مرحله حرارت دهی اریتروسیتهای لیز شده، بسیاری از پروتئینها دناتوره وحذف می گردند. بطوریکه در آخرین مرحله دناتوراسیون حرارتی ، میزان کل پروتئین اندازه گیری شده حاصل از۱۰۰ میلی لیتر سلول به ۱۵٤mg رسید . اندازه گیری غلظت محلولهای پروتئینی در هر مرحله با استفاده از روش لوری انجام گرفت (جدول ۱).

جدول ۱: تخلیص یوبی کوئیتین ازاریتروسیتهای خونی انسان و میزان پروتئینهای اندازه گیری شده حاصل از ml ۱۰۰ سلول خونی

| مراحل تخلیص | پروتئین توتال ( mg) |
|---|---|
| ۱- اولین دناتوراسیون حرارتی | ۷۳۱۰ |
| ۲- رسوب دهی $(NH_4)_2SO_4$ ،دیالیز و دومین دناتوراسیون حرارتی | ۳۱۲ |
| ۳- سومین دناتوراسیون حرارتی | ۱۵۴ |
| ۴-DEAE-SEPHADEX و دیالیز | ۱/۰۲ |

جهت تخلیص یوبی کوئیتین از کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی ژل دی اتیل آمینو اتیل سفادکس استفاده گردید. در pH خنثی و قدرت یونی پائین، اکثر پروتئینهای غیر هموگلوبینی به رزین متصل می شوند (۳) . این در حالی است که یوبی کوئیتین به همراه تعداد دیگری از پروتئینها از ستون خارج می شود . نتیجه الکتروفورز SDS-PAGE مربوط به جمع آوری فرکشنهای۵۰-٤۰ بصورت تک باند بر روی ژل SDS PAGE شناسائی گردید که در مقایسه با استاندارد تجاری یوبی کوئیتین دارای وزن مولکولی مشابه می باشد (شکل ۱) . بدین ترتیب در نهایت ۱۰ml پروتئین یوبی کوئیتین با غلظت g/lit ۰/۱ تهیه گردید.

**تولید پلی یوبی کوئیتین** : نتیجه پلیمریزاسیون یوبی کوئیتین با استفاده از گلوتارآلدئید با نسبت مولی ۲٦ : ۱ (گلوتارالدئید: یوبی کوئیتین) بصورت باندهائی با وزن مولکولی مختلف الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید مشخص شد که در شکل ۲ نشان داده شده است.

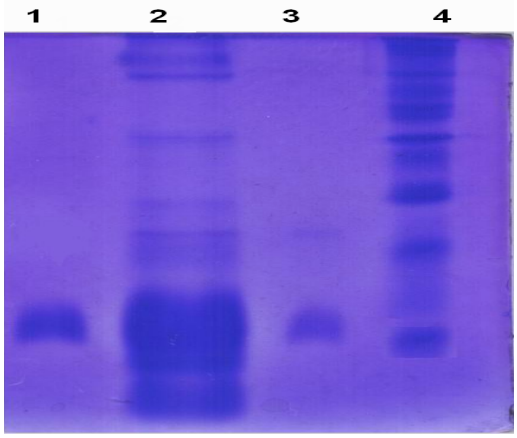
**تولیدو تخلیص آنتی بادی علیه یوبی کوئیتین** : ارزیابی میزان پاسخ ایمنی در سرم خرگوش، با مقایسه آنتی بادی قبل از هر مرحله تزریق خونگیری و پس از آن با سرم جمع آوری شده قبل از اولین تزریق ، بعنوان سرم preimmune ، انجام شد و مقایسه تست الایزا ی سرم خرگوش پس از چهارمین تزریق با سرم preimmune، تأئیدی بر افزایش تیتر آنتی بادی ضد یوبی کوئیتین در خرگوش ایمن شده است ( جدول ۲) .

جدول ۲ : مقایسه نتیجه الایزای سرم پری ایمیون و سرم ایمن علیه یوبی کوئیتین در خرگوش

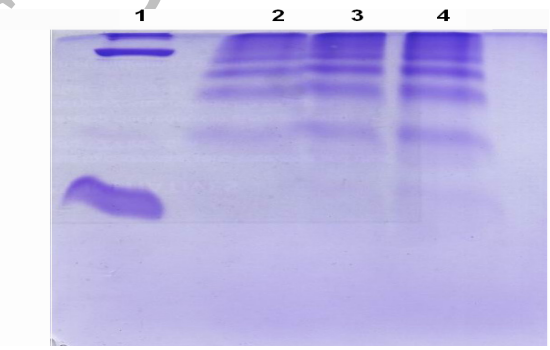
| رقت سرم / جذب نوری | ۱/۵۰ | ۱/۲۰۰ | ۱/۸۰۰ | ۱/۳۲۰۰ | کنترل منفی (بدون لایه اول) | کنترل منفی (بدون لایه دوم) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| سرم پری ایمیون | ۰/۲۲۷ | ۰/۱۶۴ | ۰/۱۳۲ | ۰/۱۱۳ | ۰/۱۶۱ | ۰/۱۰۲ |
| سرم ایمن علیه یوبی کوئیتین | ۰/۸۰۹ | ۰/۴۳۱ | ۰/۲۰۶ | ۰/۱۰۱ | ۰/۱۵ | ۰/۰۹ |



Archive of SID
www.SID.ir

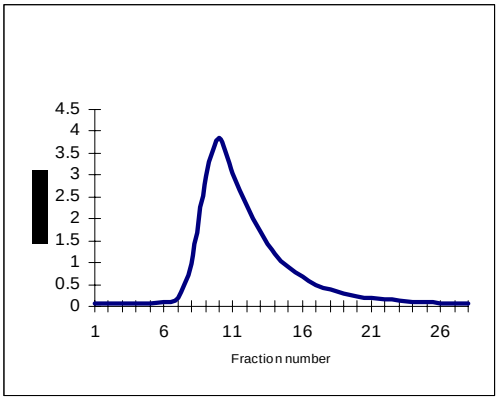



شکل ۱ : الکتروفورزیوبی کوئیتین بر روی ژل پلی آکریل آمید۲۰٪ ( رنگامیزی کوماسی بلو) نوار شماره ۱ : یوبی کوئیتین تجاری با وزن مولکولی ۸/۵kDa نوارشماره ۲ : نمونه قبل از تزریق برروی ستون *دی اتیل آمینواتیل سفادکس*،نوارشماره ۳: باندیوبی کوئیتین خالص شده ،نوار شماره ٤ : مارکر بااوزان مولکولی مختلف



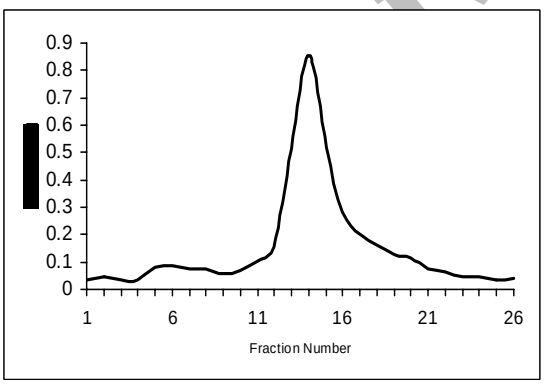

شکل۲: الکتروفورز پلی یوبی کوئیتین بر روی ژل پلی آکریل آمید ۲۰٪( رنگامیزی کوماسی بلو ). ردیف۱ : یوبی کوئیتین تجاری با وزن مولکولی ۸/۵ kDa وIgG باوزن مولکولی ۱۵۰ kDa و شماره ۲و ۳و ٤ : غلظتهای مختلف پلی یوبی کوئیتین تهیه شده را نشان می دهند.

نتایج حاصل از جداسازی آنتی بادی فوق الذکر با کروماتوگرافی جذبی بر روی ستون فعال شده با پروتئین A ۱٦ mg به ازای ۸ میلی لیتر سرم خرگوش پس از دیالیز سرم در بافر PBS است (نمودار ۱). شکل ۳ الکتروفورز آنتی بادیهای تخلیص شده با SDS – PAGE را بصورت تک باندی نشان می دهد.




نمودار ۱ : کروماتوگرافی آنتی بادیهای سرم خرگوشی بر روی ژل جذبی پروتئین A ( حجم ستون = ۱۰ ml ) . سرعت حرکت سرم خرگوش و عبور بافر ۰/۱ mM glycin-HCl (pH= ۲/۵) از ستون ۱۲ ml/h و حجم فرکشنهای ۱/۵ml است .( نمونه های دارای جذب نوری بالاتر از ۲ رقیق شد) .

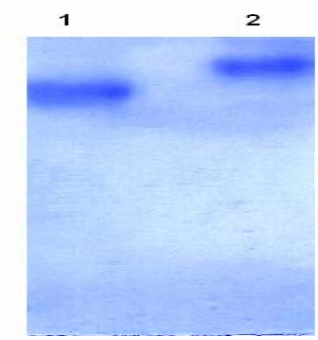
در مرحله بعد برای تخلیص آنتی بادی اختصاصی علیه یوبی کوئیتین از کروماتوگرافی جذبی CNBr activated sepharose 4B متصل به لیگاند یوبی کوئیتین استفاده شد . میزان آنتی یوبی کوئیتین اختصاصی تخلیص شده از ۱٦mg آنتی بادی خرگوشی توسط این ستون ، ۰/٦۲ mg اندازه گیری گردید (نمودار ۲) .




نمودار ۲ :کروماتوگرافی آنتی بادی اختصاصی علیه یوبی کوئیتین بر روی ژلCNBr activated sepharose 4B (حجم ستون= ۳/۵ml ) . نمونه آنتی بادیهای خرگوش با سرعت ۲ ml/h از ستون عبور داده شد با عبور بافر ۰/۱ mM glycin-Hcl (pH=۲/۵)از ستون ، آنتی بادیها در فرکشنهای ۰/۵ml جمع آوری گردید .



www.SID.ir




شکل ۳: الکتروفورز آنتی بادیهای تخلیص شده از ستون کروماتوگرافی جذبی پروتئین A . ردیف ۱ : آنتی بادی خرگوشی تخلیص شده ، ردیف ۲ : مارکر با وزن مولکولی ۱۵۰kDa

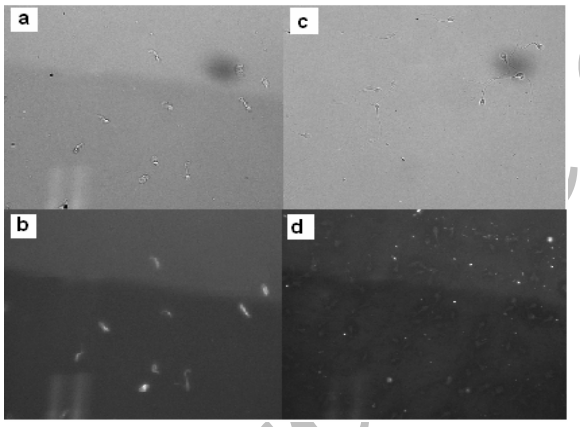
کاربرد مقادیر مساوی آنتی بادیها، قبل و بعد از خالص سازی فوق در روش الایزا ، تأئید کننده افزایش اختصاصی بودن آنتی بادیهای این مرحله جهت یوبی کوئیتین بود . همچنین نتایج مربوط به روش وسترن بلات نیز تأئیدی بر اختصاصی بودن آنتی بادیهای تخلیص شده علیه یوبی کوئیتین تجاری و یوبی کوئیتین خالص شده از گلبولهای قرمز خونی می باشد (شکل ٤) .

شکل ٤ : نمایش ایمونوبلات مربوط به ژل SDS-PAGE. ردیف ۱: یوبی کوئیتین تجاری ، ردیف ۲: نمونه قبل از تزریق برروی ستون *دی اتیل آمینو اتیل سفادکس* ، ردیف ۳: باند یوبی کوئیتین خالص شده

**کونژوگاسیون آنتی بادیها ی اختصاصی علیه یوبی کوئیتین با فلورسئین ایزوتیوسیانات** : در این روش ۰/٤mg آنتی بادی مرحله قبل با ماده فلورکروم ، فلورسئین ایزوتیوسیانات کونژوگه گردید . با فرض بر اینکه تمام آنتی بادیهای بکار رفته در فرایند کونژوگاسیون ، به مولکول FITC متصل شده باشند، نسبت مولی فلورسئین به پروتئین با فرمول ذیل محاسبه و نسبت ٤/٥ بدست آمد.

$$F/P=3/1A(495_{nm}) /[ A( 280_{nm})- 0.31 A (495_{nm} )]=4/5$$

**عملکرد آنتی بادیهای کونژوگه با فلورسئین ایزو تیوسیانات با رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس اسپرم:** جهت بررسی عملکرد آنتی بادیهای کونژوگه با FITC در شناسایی اپی توپهای یوبی کوئیتین بر سطح سلولها ، آزمون ایمونوفلورسانسی طراحی گردید . نتایج نشان داد اسپرمهای پوشیده از یوبی کوئیتین دارای فلورسانس یکنواختی در ناحیه سر ، گردن و دم می باشند (شکل ٥).




شکل ٥ : رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس اسپرمهای پوشیده از یوبی کوئیتین : a) بررسی اسپرمهای پوشیده از یوبی کوئیتین با میکروسکوپ نوری b ) بررسی اسپرمهای پوشیده از یوبی کوئیتین با میکروسکوپ اپی فلورسانس c ) و d) بررسی کنترل منفی تست ، با میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ اپی فلورسانس

## بحث

امروزه یوبی‌کوئیتین محور بسیاری از تحقیقات زیستی در زمینه‌های مختلف بالینی و پایه قرار گرفته است و تلاش جهت شناسایی هرچه بیشتر نقشهای جدید آن بویژه در



Archive of SID
www.SID.ir

ارتباط با بیماریهایی چون آلزایمر، سندرم داون ، سندرم نقص سیستم ایمنی و همچنین مباحث تولیدمثل و باروری اهمیت ویژه‌ای پیدا نموده است. هم اکنون در کشور ما نیز تحقیقات گسترده‌ایی بر روی این بیو مولکول زیستی در حال انجام می‌باشد. در اکثر این مطالعات از تکنیکهای ایمونوشیمی بکمک آنتی‌بادیهای مونو و پلی‌کلنال اختصاصی علیه یوبی‌کوئیتین بعنوان ابزار اولیه استفاده می‌شود. در حقیقت بکمک این آنتی‌بادیها، امکان مطالعه دقیق ساختمان و عملکرد این مولکول فراهم می‌آید. علی‌رغم در اختیار بودن فرم تجاری این آنتی‌بادیها درخارج کشور، مشکلات فراوانی بدلیل صرف زمان و هزینه بسیار در دستیابی به این آنتی‌بادیها وجود دارد. لذا بدلیل محدودیتهای موجود همواره نیاز به تولید و تهیه این آنتی‌بادی و کونژوگه های فلوئورسانس و آنزیمی آن وجود دارد. در این تحقیق با تخلیص پروتئین یوبی‌کوئیتین از اریتروسیتهای خون و تولید و خالص سازی آنتی‌بادی اختصاصی پلی‌کلنال علیه آن زمینه لازم جهت نیل به این هدف فراهم گردید. روشی که جهت تخلیص یوبی‌کوئیتین بکار گرفته شد ، در حقیقت تغییر یافته روشهای خالص‌سازی (۳).Ciechanover A Hass A.L. (۱۳ ) می‌باشد.

در این روشها از تکنیکهای کروماتوگرافی تعویض یونی آنیونی ، کاتیونی و ژل فیلتراسیون جهت کسب راندمان بالاتر استفاده گردید. در حالیکه در این تحقیق تنها از تکنیک کروماتوگرافی بر روی ژل DEAE-Sephadex استفاده شد .کوتاه بودن و کاهش تعداد مراحل روند تخلیص از مزیتهای این روش می باشد بطوریکه علی‌رغم پایین بودن میزان یوبی‌کوئیتین تخلیص شده در مقایسه با روشهای دیگر، استفاده از این روش بدلیل نیاز به مقادیر کم پروتئین کاملا خالص جهت تولید آنتی بادی ، ترجیح داده می‌شود.

بدلیل آنکه در طی مراحل تخلیص روش دقیقی برای اندازه گیری میزان پروتئین یوبی کوئیتین در هر مرحله نداشتیم ، لذا تعیین درصد خلوص و راندمان تخلیص یوبی کوئیتین در هر مرحله امکان پذیر نبود .با این حال براساس اطلاعاتی که در مقالات آمده است (۱۳) ، در ۱۰۰ml سلول خونی حدود ۱۰mg یوبی کوئیتین وجود دارد که از این مقدار ۱/۰۲ mg با روش حاضر خالص گردید . این در حالیست که میزان یوبی کوئیتین تخلیص شده با استفاده از روش .Ciechanover A (۳)و .Hass A.L (۱۳) حدود ٤ mg می باشد .

روش اندازه گیری برادفورد جهت تعیین غلظت محلولهای پروتئینی همواره از جمله دقیق ترین روشهای بیو شیمیایی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر بوده است . در طول مراحل تخلیص یوبی کوئیتین مشخص گردید که این روش علی رغم حساسیت بالا ، روش مناسبی جهت تعیین غلظت کل محلولهای پروتئینی حاوی یوبی کوئیتین نمی باشد ، بطوریکه میزان جذب نوری ($A_{595nm}$) غلظت مشخص یوبی کوئیتین خالص در مقایسه با جذب نوری غلظت مشابه از استاندارد (Bovine Serum Albomin) در اندازه گیری برادفورد بسیار پایین بود . بنظر می رسد واکنش اسیدهای آمینه آرژنین ولیزین با رنگ کوماسی بلو که اساس روش اندازه گیری برادفورد می باشد در مورد یوبی کوئیتین ممانعت می شود . بدنبال یافتن روش مناسب جهت تعیین غلظت محلولهای پروتئینی حاوی یوبی کوئیتین ، مشخص گردید که روش اندازه گیری Lowry از دقت بالایی برخوردار است بطوریکه می توان غلظت محلولهای پروتیینی را به درستی از روی منحنی استاندارد BSA با این روش تعیین نمود . شاید وجود اسیدهای آمینه آروماتیک هیدروفوب چون فنیل آلانین و تیروزین بر سطح ساختار سه بعدی یوبی کوئیتین . با توجه به درگیر بودن آنها در روش اندازه گیری Lowry دلیلی بر دقت بالاتر این روش نسبت به روش برادفورد باشد .



Archive of SID

www.SID.ir

جهت ایمن نمودن خرگوش اقدام به تهیه پلیمرهای مصنوعی یوبی‌کوئیتین شد. بدین منظور مولکولهای یوبی‌کوئیتین بمدت ۵ ساعت بصورت مرحله به مرحله در مجاورت مولکولهای گلوتارآلدئید قرار گرفت. زمان پلیمریزاسیون و نسبت مولی گلوتارآلدئید مصرفی به مولکولهای یوبی‌کوئیتین، اثر مستقیمی در وزن مولکولی پلیمرهای تشکیل شده دارد، بطوریکه با کاهش زمان پلیمریزاسیون و کاهش تعداد مولهای گلوتارآلدئید ،تشکیل زنجیره‌های کوتاهتر پلی یوبی‌کوئیتین محتمل‌تر خواهد بود. با توجه به کوچک بودن مولکول یوبی کوئیتین و خطی بودن اکثر اپی توپهای آن ، در اثر پلی مریزاسیون ایجاد اپی توپهای جدید فضایی در ساختار یوبی کوئیتین می شود که تولید آنتی بادی بر علیه آنها و از طرفی عدم وجود این اپی توپها در ساختمان طبیعی یوبی کوئیتین ، باعث عدم واکنش آنتی بادیهای تولید شده با مولکول اصلی می شود. لذا جهت رفع این مشکل، پلی یوبی کوئیتین در مجاورت SDS تحت دناتوراسیون حرارتی قرار گرفت تا تمامی اپی توپهای فضایی آن به اپی توپهای خطی تبدیل شود و آنتی بادیها ی تولید شده قادر به شناسایی مولکول طبیعی باشند (۱۷) . از طرفی با این دناتوراسیون ممانعت فضایی بین مولکولها کاهش یافته و زنجیرههای طویلتری از پلی یوبی کوئیتین تشکیل می شود (۷).

در مرحله بعد پس از خالص‌سازی یوبی‌کوئیتین اقدام به تولید آنتی‌بادی پلی‌کلنال علیه این مولکول، در خرگوش گردید. با وجود آنکه در استفاده از آنتی‌بادیهای مونوکلونال احتمال میانکشهای غیر اختصاصی در تستها بسیار کاهش می‌یابد، بدلیل محدودیتهای موجود در تکنولوژی تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال، شامل مشکلاتی در رابطه با دستیابی به لنفوسیتهای ایمن مناسب، عدم وجود سلولهای میلوم کارآمد، کارایی پایین پروسه نامیراسازی و مقادیر کم ایمونوگلوبولینهای ترشحی (۱۱). تهیه نوع پلی‌کلنال آنتی یوبی‌کوئیتین هدف این پژوهش قرار گرفت. در تحقیق حاضر با استفاده از روش الایزا میانکنش یوبی کوئیتین تجاری با آنتی بادیهای خالص سازی شده از سرم خرگوش ایمن علیه پروتئین تزریقی نیزمورد بررسی قرار گرفت که نتیجه حاصل بیانگر واکنش اختصاصی آنتی بادیهای مذکور با یوبی کوئیتین بود . این آزمون از دو جنبه حائز اهمیت می باشد . اولاً آنتی بادیهای پلی کلنال تخلیص شده ، آنتی بادی اختصاصی علیه یوبی کوئیتین بود، ثانیاً با توجه به اینکه آنتی بادیهای مذکور قادر به شناسایی یوبی کویئتین تجاری می باشند لذا پروتئین تزریق شده دارای اپی توپهای مشابه پروتئین یوبی کوئیتین بوده که خود تأئیدی بر خالص سازی یوبی کوئیتین می باشد .

طی مطالعات و تحقیقاتی که برروی یوبی کوئیتین و بررسی عملکردهای آن انجام می گیرد ، تعیین و بررسی جایگاه این مولکول در درون و بیرون سلول هدف اصلی می باشد بطوریکه اندازه گیری کمی یوبی کوئیتین در درجه کمتری از اهمیت قرار می گیرد . بر این اساس بکارگیری تکنیکهایی چون ایمونوسیتوشیمی بکمک آنتی بادیهای اختصاصی علیه یوبی کوئیتین ، بسیار کاربردی می باشد . کونژوگاسیون آنتی بادی با آنزیم (ALP, HRP) ، مواد رادیواکتیو ($I^{125}$) و مواد فلوروکروم (FITC) امکان تعیین جایگاه اتصال یوبی کوئیتین در سطح سلول و یا ارگانهای داخل سلول را میسر می سازد . دراین تحقیق مبادرت به کونژوگه نمودن آنتی یوبی کوئیتین با ماده فلوروکروم ، فلورسئین ایزوتیوسیانات گردید . این ماده بر خلاف سایر مواد فلوروکروم ، به آسانی از طریق باند کولان به ایمونوگلبولینها متصل می شود و هیچ ماده حد واسطی برای اتصال آن مورد نیاز نمی باشد . بعلاوه کونژوگه حاصل با ثبات می باشد.

در پایان قابلیت کونژوگه آنتی یوبی کوئیتین- FITC در شناسایی و اتصال به پروتئین یوبی کوئیتین و امکان استفاده از این کونژوگه ها در روشهای ایمونوفلورسانس ، مورد بررسی قرار گرفت . از آنجا که گامتهای جنسی نر در جانداران از لحاظ ساختاری نسبت به سایر سلولها ، در



Archive of SID
www.SID.ir

برابر شرایط محیطی مقاومتر می باشند لذا در تحقیق حاضر از این سلولها جهت اتصال به پروتئین یوبی کوئیتین در pH قلیایی استفاده گردید . برای این منظور ، پروتئین یوبی کوئیتین بطور مصنوعی بوسیله ترکیب گلوتارآلدئید به پروتئینهای سطح اسپرم متصل شد و اثر کونژوگه بر اسپرم در مقایسه با کنترل منفی آزمایش مورد بررسی قرار گرفت . رنگ فلورسانس آشکار شده در تمام سطح اسپرم معرف قابلیت اتصال و کارایی آنتی بادیهای کونژوگه در شناسایی اسپرمهای نشاندار با پروتئین یوبی کوئیتین است. لذا می توان از این آنتی بادیها در روشهای ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری استفاده نمود.

## منابع


۱) قره گزلو ، سهیلا (۱۳۸۲) تولید آنتی بادی مونوکلنال انسانی . ماهنامه علمی تخصصی آنتی بادی منوکلنال ;. شماره۱۲ صفحات۲-۳ .

۲) قدس ، رویا (۱۳۷۷) تولید آنتی بادی پلی کلنال بر علیه ایزوتیپهای IgM و IgD انسان و نشاندار کردن آن با ماده فلورسانس. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

3–Ciechanover A., Elias S ., Heller H., Ferber S., Hershko A. (1980). Characterization of the Heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from Reticulocytes . J Biol Chem. 255 (16):7525-7528 .

4– Ciechanover A., Hod Y. , Hershko A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from Reticulocytes .Biochem Biophys com. 81(4 ):1100-1105 .

5– Coligan J.E. , Magulies D. (1994). Shevachem. *Current protocols in immunology* .wiley J.press, pp.44.

6– Davis D. L. , Soldin S. Y. (2002). Protein ubiquitin is an immunophilin .Ther Drug Monit. 24( 1): 32-5 .

7– Deutsch H. F. (1987) Simplified Methods for Isolation of ubiquitin from erythrocytes . Generation of ubiquitin polymers. Int J Biochem. 19 (11):1055-1061.

8– Ferguson D. L. , Guikema J. A. , Paulsen G. M. (1999). Ubiquitin pool modulation and protein degradation in wheat roots during high temperature stress. Plant physiol . 92:740-746 .

9– Goldstein G. , Scheid M. , Hammerling U. , Schlesinger D.H. , Nial H. D. , Boyse E. S. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte differentiation properties and is probably represented universally in living cells. Proc Natl Acad Sci USA. 72: 11-15.

10– Goldknopf IL, Busch H. (1977). Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. Proc Natl Acad Sci U S A. 74(3): 864-8 .

11– Harris E.L.V., Angel S. (1989). Protein purification methods :a practical approach.

12- Haas AL, Ahrens P, Bright PM, Ankel H. (1987). Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. J. Biol. Chem. 262(23):11315-23.

13– Hass A. L. , Wilkinson K. D. (1985). The large scale purification of ubiquitin from human erythrocytes. Pre Biochem. 162 (15): 49-60. Oxford university press ,pp. 65-98 .

14– Hershko A. Ciechanover A (1998). The Ubiquitin system. Annu. Rev. Biochem . 3:425-479.

15) Hershko A. (1996). Lessons from the discovery of the ubiquitin system.Trends Biol Sci. 21: 445–449.

16– Hershko A. (1983). Ubiquitin roles in protein modification and breakdown .Cell. 34(1):11-2 .

17– Hershko A. , Eytan E. , Ciechanover A. (1982). Immunochemical Analysis of the Turnover of Ubiquitin-protein Conjugates in Intact Cells. J Biol Chem. 257(23):13964-13979 .

18– Hunt L.t. , Dayhaff Mo. (1977). Amino-terminal sequence identity of ubiquitin and the




Archive of SID
www.SID.ir

nonhistone component of nuclear protein A24 . Biochem Biophys Res Commun. 74(2): 650-655 .

19) Lowy O.H. , Rosebrough N.J. , Farr A. L. , Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent . J Bio Chem. 193: 265-275.

20– Manetto V. , Perry G. , Tabaton M., Autilio-Gambetti L. , Autilio- Gambetti P. (1989). Selective presence of ubiquitin in intracellular inclsions . Am J Pathol. 134(3):503-13 .

21– Mari H. , Koho Y. , Ihara Y. (1987). Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimers disease . Science. 235(4796):1641-1644 .

22– Pklinger p., Schubert U. (2005). The ubiquitin-protesome system in HIV replication : Potential targets for antiretrovirus therapy. Expert Rev Anti Infect Ther. 3(1):1-79 .

23– Schlesinger D.H. , Goldstein G. , Nial H. D (1975). The complete amino acid Sequence of ubiquitin , an adenylated cyclase stimulating polypeptide probably universl in living cell. Biochem. 14:2214-2218 .

24– Sutovsky P. , Moreno R., Ramalho-Santos S., Dominko T., Thompson TW. Schatten G.A (2001). Putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis . J Cell Sci. 114 (9):1665 -1675.

25– Walker J.M. (1996). *The Protein Protocols Handbook* . Humana Press, pp.15.

Archive of SID



www.SID.ir

# Purification of Ubiquitin and production of specific antibody directed against it

**Hodjat M.[1],Talebian A.[2] , Ghods R.[3] , Shabani A.[1], Akhondi M.M.[2], Sadeghi M.R.[3]**

[1]**Biology Dept. , Faculty of Basic Science , Alzahra Univ., Tehran, Iran.**

[2]**Scientific Committee in Reproductive Biotechnology Research Center, Avesina Institute, Tehran , Iran .**

[3]**Scientific Committee in Monoclonal Antibody Research Center, Avesina Institute, Tehran, Iran.**

## Abstract:

Ubiquitin is a small protein of 76 amino acid residues that has attracted the concern of researchers of different science due to its multiple functions in the most biological process. It contributes in process such as cellular proteolysis, replication control and gene expression, maintenance of chromatin structure, cell differentiation, gametogenesis and etc., which shows numerous function of this vital protein. The immunochemical methods (ELISA, radioimmunoassay, Immunofluorecence) are sensitive and rapid techniques for the analysis of Ubiquitin and other such biological molecules which all use specific antibodies as detector. Therefore preparation of specific antibody directed against Ubiquitin is a valuable tool in detecting and assessing of this protein. In this study we attempted to purify Ubiquitin from human red blood cells and produce specific antiubiquitin antibody and conjugate these antibodies in order to employ in immunochemical studies. In this study Ubiquitin was first purified from packed blood cells by several steps including rapid denaturation of protein at $90^{\circ c}$, precipitation of Ubiquitin and other protein in 90% saturated ammonium sulfate and chromatography on DEAE-Sephadex . In the next step to increase the immunogenecity of Ubiquitin, cross linking of this protein to form polyubiquitin was attempted by employing glutaraldehyde .The prepared immunogenic polyubiquitin , were injected multiportally in to the rabbit .The reactive antibody was detected against polyubiquitin , using enzyme linked immunoassay . In order to isolate rabbit serum antibody, Protein A affinity chromatography was employed .Free Ubiquitin was coupled to CNBr-activated Sepharose 4B so that by passing rabbit antiserum over the column antiubiquitin antibody was purified. Specificity of antibodies was also examined using enzyme linked immunoassay. Finally antiubiquitin antibodies were conjugated with Flourscein Isothiocyanate. Results on SDS-Gel Electrophoresis of purified Ubiquitin and antiubiquitin antibody from Ion exchange column and affinity column appeared as a single band, indicating protein purity. It has also confirmed the specificity of purified antibodies referred to antiubiquitin antibodies by using ELISA. Use of such purification methods gave a yield of 1mg Ubiquitin from 100ml packed blood cell and 0/6 mg antiubiquitin antibodies from 8 ml immune serum. Study and identification of Ubiquitin function, play an important roles in biological research therefore preparation of antiubiquitin antibodies as an initial tool of these researches in immunochemistry studies is very important and there has been much interest in the production of these antibodies. The offered method in the preset study for purification of Ubiquitin and antiubiquitin antibodies is a reliable way to achieve this aim. Access to Antibodies conjugated with Fluorochrome molecules in this study; provide a tool in Ubiquitin studies by Immunofluorecence methods.

**Key words:** Ubiquitin, purification, antiubiquitin antibody, Flourscein Isothiocyanate

Archive of SID



www.SID.ir