مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
دوره سیزدهم ، شماره چهارم، پاییز 1384، صفحات 50 - 36

تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنتی‌ژنهای سطح اسپرم انسان

دکتر محمد مهدی آخوندی [*1]، ابراهیم ترک‌آبادی [2]، علی‌احمد بیات [3]، مهناز حیدری [4]، رویا قدس [5]، دکتر محمدرضا صادقی [6]، دکتر عبدالخالق دیزجی [7]، دکتر فاضل شکری [8]، دکتر محمود جدی‌تهرانی [9]

چکیده

مقدمه: از آنجا که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ابزارهای قدرتمندی جهت شناسایی آنتی ژن اختصاصی شان به صورت محلول و یا مستقر در سطح سلول می باشند، استفاده از آنها مدت هاست که در زمینه تحقیقات تولید مثل و نازایی‌جهت شناسایی مولکول های سطحی مستقر در غشای اسپرم مد نظر قرار گرفته است.

روش بررسی: در این تحقیق به منظور تولید کلون های اختصاصی علیه آنتی ژنهای سطحی‌اسپرماتوزوای انسانی، ابتدا پروتئین‌های سطحی غشای اسپرم انسان با تکنیک Solubilization به دست آمد. بعد محتوای پروتئینی حاصل شده به همراه ادجوانت فروند جهت تحریک کلون‌های اختصاصی در موش‌های Balb/c به کار گرفته شد. در ادامه تزریق‌های یادآور و اندازه گیری تیترآنتی بادی‌های ضد اسپرمی، موش‌های دارای بالاترین تیتر جهت استخراج سلول های لنفوسیتی از طحال، انتخاب شدند. سرانجام بعد از انجام فیوژن و تکنیک Limiting Dilution ، 5 کلون مثبت به دست آمد. جهت شناسایی کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادی‌های به دست آمده و شناسایی واکنش متقاطع با اسپرم گونه Rat از آزمون الایزا استفاده شد.

نتایج: یافته هلشان داد تمامی آنتی بادی‌های تولید شده از کلاس IgG بوده و ضمن ایجاد واکنش اختصاصی علیه اسپرم انسان، محصول دو کلون با اسپرم گونه Rat واکنش متقاطع نشان داده است.

نتیجه گیری: بدین ترتیب با استفاده از آنتی بادی‌های به دست آمده می‌توان در مطالعات بعدی ضمن انجام تحقیقات وسیع در زمینه شناسایی و تحلیل هر یک از آنتی ژنهای اختصاصی مستقر در سطح اسپرم انسان، نقش عملکردی این آنتی ژنها را در فرایند لقاح مورد بررسی قرار داد.

واژه های کلیدی: آنتی بادی مونوکلونال، آنتی ژنهای سطحی اسپرم انسان

مقدمه

سلول اسپرماتوزوای انسانی حاوی انواع مختلفی از ساختارهای مولکولی در غشای سیتوپلاسمی به صورت موزاییک های پروتئینی، اولیگو ساکاریدی و لیپیدی بوده که نقش بعضی از آنها در قالب گیرنده، لیگاند یا آنزیم در وقایع مسوول لقاح شناخته شده است .این وقایع شامل مراحل بلوغ غشای اسپرماتوزوا Capacitation تا رویارویی با تخمک، واکنش آکروزومی و الحاق دو غشای سیتوپلاسمی اسپرم و اوولما می باشد [1،2،3] اما از آنجایی که پیدایش سلول های اسپرماتوزای انسانی در زمان بلوغ فرد شروع می شود، بنابراین

[*] 1- نویسنده مسئول: استادیار، گروه غدد تولیدمثل و جنین‌شناسی پژوهشکده ابن سینا، تهران ، ایران
تلفن: 22402011 021 نمابر: 22403641 021
Email: Akhondi@avesina.ac.ir
2- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی. - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شهید بهشتی، تهران
3-کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال
4- مربی، گروه غدد تولیدمثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران
5- مربی، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران
6- استادیار، گروه غدد تولیدمثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران
7- استادیار، گروه بیوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
8- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت. - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران
9- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال، پژوهشکده ابن‌سینا،تهران
تاریخ دریافت:83/11/21 تاریخ پذیرش:84/3/26

Archive of SID
www.SID.ir

این سلول ها به همراه آنتی ژنهای جدیدشان قادرند پاسخ سیستم ایمنی میزبان را علیه خود برا نگیزند، چرا که این سلول ها مدتها بعداز ایجاد تحمل به خود Selftolerance به‌وجود آمده اند [4].

به دنبال بررسی های آسیب شناسی، ناشی از حضور آنتی بادی های ضد اسپرم در ترشحات واژن و سرم زنان و مایع سمینال در مردان نابارور، توجه محققین به مطالعه ساختارهای ماکرومولکولی مستقر در سطح سلول اسپرم معطوف گردید . در سال 1975 Jones WR. گزارش کرد حضور آنتی بادی های ضد اسپرم در سرم و موکوس زنان نابارور منجر به شناسایی آنتی ژنهایی می شوند که به طور فعال ویا بالقوه از طریق آگلوتیناسیون سلول های اسپرمی، قادر به ایجاد ناباروری هستند [26]. Karl Landsteiner برای اولین بار در سال 1899 و محققین دیگر بعد از وی، به ایمونوژنیک بودن اسپرماتوزای یک گونه برای گونه دیگر ویا برای همان گونه پی بردند. در ضمن Rumke و Hellinge نیز در سال 1950 برای نخستین بار حضور آنتی بادی های ضد اسپرم را بعنوان یکی از عوامل ناباروری در مردان گزارش کردند [5]. همین مشاهدات توجه محققین را در مورد آنتی ژنهای سطح اسپرم و آنتی بادی های علیه آنها، جلب نمود. در این رابطه بسیاری از محققین در سرم زنان نابارور آنتی بادی هایی را یافتند که ویژگی علیه اسپرماتوزوای انسانی داشت، بنابراین به مطالعه این ارتباط و آسیب شناسی آن پرداختند. در این مطالعات جهت شناسایی آنتی ژنهای القا کننده پاسخ آنتی بادی، تخلیص اجزای غشای سلول اسپرماتوزوا و پلاسمای سمینال حایز اهمیت بود . اما بدلیل دشواری روشهای فیزیوشیمی، جهت دستیابی به این هدف، تولید آنتی بادیهای مونوکلونال به منظور کاربرد آنها در کروماتوگرافی ایمونوافینیتی مد نظر قرار گرفت.

در سال 1979 Skrabei و Mettler با استفاده از آنتی ژنهای استخراج شده از غشای اسپرم به روش Solubilization با Triton X-100 و Haymine ، توانستند تأثیر آنتی بادی های ضد اسپرمی موجود در ترشحات فیزیولوژیک افراد نابارور را در مورد آگلوتیناسیون و جلوگیری از حرکت سلولهای اسپرمی را خنثی نمایند [27] بعد از کشف آنتی بادی های مونوکلونال و روش تولید آن، فعالیت‌های تحقیقاتی در زمینه تولید کلون های ویژه علیه شاخص های سطحی سلول های اسپرماتوزوا و بررسی نقش این شاخص ها آغاز گردید . در سال 1980 Shigeta و همکارانش با استفاده از سیمن افراد آزواسپرم (Azoospermia) تحریک ایمونولوژیک را در Rat های مورد استفاده شان انجام دادند. آنها بعد با ادغام Fusion لنفوسیت های اختصاصی با سلول های میلومایی P3/X63 ، توانستند 10 کلون تولید کننده آنتی بادی با ویژگی علیه سلول های اسپرماتوزوای انسانی از کلاس IgG تولید کنند [6]. بعد از آن، محققین دیگری نیز جهت القای کلون های ویژه، از سلول های اسپرماتوزوای انسانی استفاده کردند [28،29]. در این تحقیقات و انواع مشابه آن که جهت تحریک ایمونولوژیک، سلول کامل تزریق شده است، هر چند در این حالت، سلول ها ایمونوژن‌های قوی تری هستند و شاخص‌ها در حالت طبیعی‌تری قرار دارند، اما کلون هایی که بوجود می‌آیند، دیگر محدود به شاخص های سطحی نبوده، بلکه علیه شاخص‌های درون سلولی هم امکان تحریک ایمونولوژیک وجود خواهد داشت. بنابراین در این حالت دستیابی به کلون‌های مورد نظر با احتمال Fusion پایین‌تری همراه خواهد بود. ایجاد هیبریدومای تولید کننده آنتی بادی مونوکلونال علیه آنتی ژنهای پلاسمای سمینال و اسپرماتوزوای انسانی اولین بار توسط Shigeta و همکاران (1980)، Isojima، Koyoma & Fujiwara (1982)، Lee و همکاران (1982)، Isahakia & Alexander (1984) گزارش شد [۶،۷،8،9].

فعالیت این محققین مطابق با روش های معمول دستیابی به آنتی بادی مونوکلونال، شامل ایمونیزاسیون گزنوژنیک با سیمن انسانی و الحاق Fusion سلول های طحالی ایمونیزه با سلول های میلومایی موشی، در مرحله بعد بوده است . بدین ترتیب آنتی بادی های مونوکلونال به دست آمده کاربردهای متنوعی را در مطالعات آنتی ژنهای سطحی اسپرم به دست آورده است . تاکنون بدنبال تحقیقات انجام شده، به تأثیرهای مختلفی از آنتی بادی های مونوکلونال در حضور اسپرم از جمله بررسی اثر بی حرکت کنندگی اسپرم Immobilizing Effect توسط Shigeta و همکاران در سال 1980 [10]، بررسی های توپوگرافی

Archive of SID
www.SID.ir

وتعیین وزن آنتی ژنهای مربوط در سطح اسپرماتوزوا Schmeil ED[11،12] و Lee CY[8] در سال 1982 و Wolf DP در سال 1983[13] و..)، تخلیص آنتی ژنها با استفاده از ستونهای افینیتی کروماتوگرافی فعال شده با آنتی بادی مونوکلونال (Isojima و همکاران در سال 1982[7])، ردیابی حضور آنتی ژنهای مشابه در سطح سایر سلول ها در یک گونه وگونه های دیگر و بررسی های فیلوژنی (Prabhu G. در سال 1982[14]، Glassy MC. در سال 1984[15]) و نیز اثرات مهاری آنتی بادی های مونوکلونال بر عملکردهای فیزیولوژیک اسپرم و جلوگیری از باروری (Saling PM. در سال 1983[16]) برای اولین بار توسط آنها می توان اشاره کرد. در ضمن از آنجایی که شناسایی آنتی ژنهای دخیل در باروری و مهار این آنتی ژنها توسط آنتی بادی می تواند راه گشای شیوه های جدیدی در امر جلوگیری از بارداری به شکل ایمونوکنتراسپتیو باشد[17]، همین مساله، سازمان جهانی بهداشت WHO (World Health Organization) را بر آن داشته است تا بخشی از تحقیقات را بر واکسن های تنظیم کننده باروری معطوف سازد. بدین منظور این سازمان، مطالعات سیستمیک پروتئینهای سطحی اسپرم را جهت شناسایی مولکول های کاندید واکسنهای کنتراسپتیو به عنوان آنتی ژنهای اسپرمی پیشنهاد کرده است[18،19].

بنابراین هدف از این مطالعه تولید آنتی بادی‌های مونوکلونال به عنوان ابزار قدرتمند شناسایی و تحلیل آنتی ژن‌های اسپرمی مد نظر قرار گرفت. استفاده از این واکنشگرهای ایمونولوژیک به عنوان یکی از مؤثرترین راه های مطالعه سطح اسپرم جهت ایجاد تکنیک‌های ایمونولوژیک حساس و قابل اعتماد به منظور بررسی تغییرات آنتی‌ژنیک درطی دوره‌های اسپرماتوژنز، اسپرمیوژنز، بلوغ سلول های اسپرمی، ظرفیت‌یابی اسپرم (Capacitation) ونیز بررسی نقش آنها در حرکت، واکنش آکروزومی و بر هم کنش آن با زونا پلوسیدای تخمک حایز اهمیت می باشد[20،21] در ضمن با شناسایی آنتی ژنهای مؤثر، دستیابی به واکسنهای کنتراسپتیو محقق خواهد گشت.

روش‌بررسی

1- تهیه اسپرم: نمونه‌های سیمن مورد نیاز جهت انجام مطالعه و تحقیق بر روی سلول‌های اسپرم انسانی، از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان پارس و آزمایشگاه پاتوبیولوژی نور 72-48 ساعت بعد از آخرین انزال به دست آمد و آن دسته از نمونهایی که از لحاظ حجم، شمارش اسپرم، مورفولوژی و درصد اسپرم های متحرک مطابق با استانداردهای WHO[22] بودند، انتخاب شدند. بنابراین نمونه های انتخاب شده مربوط به افراد سالم بوده اند. این نمونه‌ها بعد از نگهداری به مدت 30 دقیقه در انکوباتور 37°c جهت تبدیل حالت لخته به مایع (Liquefaction)، با بافر PBS 0/15 مولار و pH=7/2 و سانتریفوژ با دور 1500g به مدت 10 دقیقه، سه بار شسته و رسوب سلول های اسپرمی جهت استخراج پروتیین های سطحی به کار گرفته شد.

2- استخراج پروتئین‌های غشای اسپرم به روش Solubilization:

استخراج پروتئین‌های غشای اسپرم به روش Solubilization یا محلول نمودن آنها در بافر استخراجی صورت گرفت. در این روش، استخراج ملایم پروتئین های غشایی با استفاده از NaCl 1 مولار در بافر PBS (0/15 مولار و pH=7/2) حاوی مهارکننده پروتئاز با نام Phenylmethylsulfonylfluoride (SERVA Company; PMSF) با غلظت 2mM انجام گردید. ابتدا تعداد 5×10^8 سلول اسپرم درهر میلی لیتر از بافر فوق به مدت 30 دقیقه در دمای $4^{O}C$ به طور یکنواخت مخلوط گردید. در انتهای این مرحله با انجام سانتریفوژ با دور 10000g به مدت 30 دقیقه در $4^{O}C$، ذرات غیر محلول از بافر فوق جدا و محلول رویی جهت انجام دیالیز تفکیک گردید. روند دیالیز با استفاده از کیسه‌هایی با قدرت جداسازی (Cut off) پایین تر از وزن مولکولی 10 کیلو دالتون، علیه بافر PBS در دمای $4^{O}C$ به مدت 24 ساعت همراه با دوبار تعویض PBS انجام شد[23]. بعد از پایان دیالیز، محلول‌های پروتئینی به دست آمده، لیوفیلیزه گردید. غلظت پروتیینی محتوای پودر لیوفیلیزه به روش برادفورد در مقایسه با وزن پودر به کار رفته، اندازه گیری شد.

Archive of SID
www.SID.ir

3- تولید آنتی بادی مونوکلونال علیه آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم انسان:

الف: ایمونیزاسیون موش علیه آنتی ژن‌های سطحی اسپرم انسان:
بعد از تهیه پروتئین های سطحی اسپرم به هر موش Balb/c ماده با سن 10-8 هفته، 50 میکروگرم پروتئین در هر تزریق به ازای هر موش از طریق داخل صفاقی در چهار مرحله انجام گردید. بدین شکل که در تزریق اول از ادجوانت کامل فروند و در تزریق های بعدی از ادجوانت ناقص فروند استفاده شد. فاصله تزریق اول و دوم، سه هفته و فاصله بین تزریق های یادآور دو هفته بود. بعد از تزریق چهارم به دنبال بررسی تیتر آنتی بادی تولید شده علیه اسپرم انسانی در سرم موش تزریق شده، به روش الایزا، موشی که بالاترین تیتر علیه اسپرم را داشت، جهت انجام فیوژن انتخاب شد.

ب: فیوژن لنفوسیت های مولد آنتی بادی مورد نظر:
روند فیوژن با استفاده از لنفوسیت های به دست آمده از طحال موش‌های انتخاب شده ، سلول‌های میلومایی SP 2/0 و محیط حاوی Polyethyene glycol-1500 (Sigma, USA; PEG-1500) انجام گردید. در ادامه با افزودن محیط حاوی (HAT) Hypoxanthine, Aminopterin and Thymidine (Sigma) با غلظت نهایی (M 1.0×10^{-4} Hypoxanthine، M 1.6×10^{-5} Thymidine و M 4.0×10^{-7} Aminopterin) شرایط جهت رشد و تثبیت سلول های هیبریدومای لنفوسیتی/توموری فراهم شد.

ج: انتخاب هیبریدومهای تولید کننده آنتی بادی ضد آنتی ژنهای سطح اسپرم انسان به روش الایزا:
بعد از ایجاد هیبریدومهای مولد آنتی بادی، جهت شناسایی کلون های اختصاصی علیه‌آنتی ژنهای سطح اسپرم ، آزمون الایزا با استفاده از مایع رویی کشت سلول های هیبریدوم انجام گردیدو این تست سلول های اسپرم انسانی با تعداد 10^6 در هر چاهک و آنتی ژنهای بدست آمده با غلظت $10\mu g/ml$ به میزان $50\mu l$ در هر چاهک هر یک به طور جداگانه به عنوان لایه اول الایزا کوت شدند (1 ساعت انکوباسیون در دمای 37̊c). بعد از انجام سه بار شستشو (با بافر PBS 0/15 مولار و pH= 7/2 حاوی 0/05 درصد Tween)، $50\mu l$ مایع رویی کشت سلول های هیبریدوم، حاوی آنتی بادی، به عنوان لایه دوم الایزا به ازای هر چاهک به مدت 1 ساعت در دمای 37̊c انکوبه گردید . در این مرحله به دنبال بر هم کنش اختصاصی آنتی بادی موجود در محیط کشت سلول با لایه اول الایزا صورت گرفت و افزودن لایه سوم شامل Rabbit Anti Mouse Ig-HRP (با رقت 1 به 3000 ، 1 ساعت انکوباسیون در دمای 37̊c) انجام شد . بعد از چهاربار شستشو، $50\mu l$ سوبسترای رنگزای OPD اضافه و به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردید . بعد از طی زمان اخیر و توقف واکنش رنگزایی با $15\ \mu l$ اسید سولفوریک 20% هر چاهک و اندازه گیری جذب چاهک ها در طول موج 492 نانومتر، کلون های مثبت انتخاب گردید . در مراحل بعد سلول‌های ترشح کننده این آنتی بادی‌ها به روش Limiting Dilution چهار بار ساب کلون گردیده و هر بار آزمون الایزا جهت شناسایی و انتخاب کلون های مورد نظر، به ترتیب فوق انجام شد . بعد از انجام مراحل اخیر هیبریدومهای مولد آنتی‌بادی مونوکلونال ضد اسپرم انتخاب گردید . بدین ترتیب 5 کلون تولیدکننده آنتی بادی مونوکلونال علیه اسپرم انسان به دست آمدبدنبال پاساژهای متوالی کلون های تولید کننده، محلول رویی محیط های کشت جهت تخلیص آنتی‌بادی ها جمع‌آوری شدند.

4- بررسی کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادی مونوکلونال:
در این مرحله با به کارگیری آنتی‌بادی های مونوکلونال ضد ایمونوگلوبولین‌های موشی با منشأ بزی Goat anti mice immunoglobulin ، ساخت Sigma کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادی های مونوکلونال کلون‌های تثبیت شده به روش الایزا تعیین گردید. چاهک‌های الایزا با استفاده از آنتی‌بادیهای ضد IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgM[Fc], IgA[Fc] (با منشأ Goat) با غلظت $2\ \mu g/ml$ به میزان 50 میکرولیتر درهر چاهک به مدت 1/5 ساعت در 37̊c کوت گردید . بعد از آن چاهک‌های الایزا با استفاده از بافر PBS 0/15 مولار و pH= 7/2 حاوی 0/05 درصد Tween تحت سه بار شستشو قرار گرفتند . لایه دوم الایزا شامل آنتی‌بادی مونوکلونال موشی موجود در

Archive of SID
www.SID.ir

محلول رویی محیط کشت هر کلون، به طور جداگانه به میزان 50μl به هر چاهک اضافه شد. در این تست جهت کنترل $\frac{1}{100}$ مثبت 50μl سرم طبیعی موش با رقت و جهت کنترل منفی 50μl محیط کشت فاقد هر گونه سرم اضافه و به مدت 1/5 ساعت در دمای 37°c انکوبه گردید . بعد از انجام شستشو مطابق روش فوق، جهت لایه سوم 50μl از آنتی‌بادی خرگوشی علیه ایمونوگلوبولین های موش کونژوگه با (HRP)، Rabbit anti mice Ig-Horse Redish Peroxidase onjugated با رقت 1 به 3000 (تولید پژوهشکده ابن سینا- شماره ARC-901) اضافه و به مدت 1/5 ساعت در دمای 37°c انکوبه گردید. بعد از طی این مدت و انجام شستشو 50μl سوبسترای رنگزای حاوی Ortho Phenylen Diamine (OPD) (Sigma) اضافه و به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی واکنش رنگزایی صورت گرفت . بعد از توقف واکنش با اسید سولفوریک 20% 15μl به ازای هر چاهک، جذب نوری در طول موج 492 نانومتر خوانده شد.

5- تخلیص آنتی‌بادی های مونوکلونال به دست آمده در محتوای سوپ سلولی:

در این مرحله با توجه به کلاس آنتی بادی های مونوکلونال تولید شده (IgG)جهت تخلیص این آنتی بادی ها از محتوای محلول رویی کشت، از ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G (Pharmacia, SWEDEN) که جهت اتصال به قطعه FC ایمونوگلوبولین IgG ویژگی دارد، استفاده شد. بعد از عبور محلول رویی کشت به طور جداگانه برای هر رده مونوکلونال، با سرعت 50ml در ساعت، مرحله شستشوی ستون جهت جداسازی پروتئین‌های باند نشده، تحت جریان بافر PBS (0/15 مولار و pH=7/2) قرار گرفت. در مرحله بعد جهت جداسازی آنتی‌بادیهای باند شده با عبور بافر Glycine-HCl(0/1مولار و pH=2/5) به میزان 24ml، جریان خروجی در تفکیک های 2ml درهر لوله جمع آوری گردید. سپس جذب نوری تفکیک های بدست آمده در طول موج 280 nm خوانده شد. تفکیک‌های دارای بیشترین جذب نوری حاوی آنتی‌بادی با هم مخلوط و در برابر بافر PBS (0/15 مولار و pH=7/2) دیالیز شد. پس از انجام دیالیز، محتوای حاوی آنتی بادی با دور 4000g به مدت 10 دقیقه در 4 ^{o}C سانتریفوژ و جذب نوری در طول موج 280 nm مجدداً خوانده و آنتی‌بادی ها در 20^{o}C- نگهداری گردید[24,25].

6-بررسی واکنش متقاطع احتمالی آنتی بادی مونوکلونال با آنتی‌ژنهای دیگر با استفاده از آزمون الایزا:

در این بررسی واکنش متقاطع هر یک از آنتی بادی مونوکلونال $3D_3$ D_6 و$1C_3C_{11}$,$3B_{12}$ F_{10}, $3B_6$ F_{11}, $2B_2$ B_{10}، با آنتی ژنهای موجود در مایع سیمن ، سلولهای مستقر در سطح لکوسیت های خون محیطی وسلول های اسپرمی دو گونه Rat و Mice مد نظر قرار گرفت . ابتدا برای جداسازی لکوسیت های خون محیطی در دو تفکیک گرانولوسیتی و سلول های تک هسته ای(مونوسیتی و لنفوسیتی)،لایه بافی کوت (محل تجمع لکوسیت‌های خون محیطی در مرز بین پلاسما و حجم متراکم اریتروسیت‌ها) خون محیطی فرد سال بر روی گرادیان غلظتی Opti prep (Axis-Shield AS,Oslo,Norway) برده شد[48,47,49]. در این روش طی سانتریفوژ لایه بافی کوت بر روی گرادیان غلظتی با دانسیته های 1/077 g/ml درفاز رویی و 1/099 g/ml در فاز زیرین، با سرعت 800g به مدت 25 دقیقه در دمای 18-22^{o}c باعث جدا شدن سلول های تک هسته ای بر روی دانسیته 1/077g/ml و سلول های گرانولوسیتی در بین دو فاز اخیر می گردد .جهت تهیه سلول های اسپرمی دو گونه Rat و Mice مجرای اپیدیدیم دو گونه اخیر با RPMI شستشو شد . برای جداسازی اسپرم های متحرک، روند Swim up در محیط RPMI در زاویه 45^{o} در انکوباتور 37^{o}c به همراه 5 درصد CO_2 وانکوباسیون 2 ساعت انجام گردید. هر یک از سلول های لکوسیتی و سلول‌های اسپرم انسانی و اسپرم های موشی بعد از تهیه بلافاصله شمارش شده به تعداد 10^6 سلول اسپرمی و 500هزار سلول لکوسیتی و 100 µl از غلظت پروتیینی 20µg/ml سیمن در چاهک‌های مربوطه جهت Coating افزوده گردید. عمل blocking با استفاده از Skim milk 5 درصد در دمای 37^{o}c به مدت 1 ساعت انجام گردید .لایه دوم با افزودن 100µl آنتی بادی مونوکلونال با غلظت 10 µg/ml درهر چاهک

Archive of SID
www.SID.ir

به مدت 1 ساعت در دمای $37\ ^{o}c$ تکمیل گردید. بعد از افزودن لایه سوم شامل آنتی بادی Rabbit anti Mouse Ig کونژوگه با HRP ،افزودن سوبسترایOPD جذب نوری چاهک ها بعد از افزودن محلول 1 نرمال اسید سولفوریک جهت توقف واکنش خوانده شد.

7- تعیین وزن مولکولی آنتی ژن مورد نظر با استفاده از ایمونوبلاتینگ پروتئین‌های استخراجی:

بدین جهت ابتدا پروتئین های استخراجی در مقایسه با استانداردهای وزن مولکولی تحت الکتروفورز SDS-PAGE آکریل آمید- بیس آکریل آمید با شدت جریان 40 میلی آمپر قرار گرفتند. بعد از پایان عمل الکتروفورز ژل حاصل به آرامی بر روی کاغذ Poly vinyidene difluoride (PVDF) انتقال داده شد و بعد از قرار دادن در کاست بلاتینگ با ولتاژ 50 ولت به مدت 12 ساعت در تانک بلاتینگ عمل الکتروترانسفر پروتئین‌ها از ژل بر روی کاغذ انجام گرفت . بعد از پایان عمل الکتروترانسفر پروتئین‌ها، کاغذ بلات شده تحت رنگ آمیزی پانسواس قرار گرفت. بعد از مشاهده باندهای مورد نظر، شستشو در بافر PBSانجام شد . جهت پوشاندن فضاهای خالی در سطح کاغذ، Blocking با استفاده از Skim milk 5 درصد صورت گرفت. بعد از انجام عمل اخیر نوارهای بلات شده با آنتی بادی منوکلونال در غلظت 2/5µl/ml به همراه BSA یک درصد به مدت 1/5ساعت تحت تکانه های Shaking یکنواخت قرار گرفت. بعد از انتهای زمان اخیر و انجام شستشو کاغذهای بلات شده تحت مجاورت آنتی‌بادی Rabbit anti Mouse Ig کونژوگه با HRP(تولید پژوهشکده ابن سینا-شماره ARC-901) قرار گرفتند و در زمان مجاورت با سوبسترای رنگزای DAB (diaminobenzidine-sigma) باند پروتئینی مورد نظر مشخص گردید و در مقایسه با باندهای پروتئینی استاندارد وزن مولکولی، محدوده وزنی آنتی ژن مورد نظر با استفاده از محاسبه Rf و رسم منحنی استاندارد، وزن مولکولی آنتی ژن مورد نظر محاسبه گردید.(فاصله طی شده توسط باند پروتئینی مورد نظر: d، فاصله طی شده توسط رنگ نشانه:D; $Rf = \frac{d}{D}$)

8- بررسی محل حضور آنتی‌ژن ویژه هر یک از آنتی‌بادی به دست آمده، در سطح اسپرم انسان:

جهت این بررسی از تکنیک رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده شده است به منظور تهیه لام های کوت‌شده با اسپرم انسانی، سلولهای متحرک اسپرمی مطابق آنچه که در قسمت 1شاره شد، بدست آمد . این سلولها سه بار در بافر PBS (0/15 مولار و pH=7.2) به صورت Centrifugation- Resuspension در دور 700g به مدت 10دقیقه شسته شد . در مرحله بعد رسوب سلولها در محلول پار افورمالدهید 1 در صد در PBS در دمای اتاق فیکس شدند. جهت مهار نمودن (Blocking) اثر آلدهید های آزاد سلولها دو بار با محلول گلایسین 0/2درصد شسته شدند . بعد از شمارش، سوسپانسیون اسپرمی به نحوی تنظیم شد که هر 100µl حاوی 10^5 سلول اسپرم باشدبعد با استفاده از دستگاه سایتواسپین در دور 800RPM به مدت 5 دقیقه 100µl از سوسپانسیون اسپرمی بر روی لام کوت گردید. بعد از طی 6 ساعت در شرایط آزمایشگاه لام ها کاملاً خشک شده و به دو صورت یا ادامه مراحل جهت رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس با آنتی بادی مونوکلونال و یا نگهداری در 20- درجه سانتی گراد می توان اقدام نمود[42]. در مرحله بعد، جهت فراهم آمدن شرایط یونی مناسب، لام‌ها تحت بافر PBS به مدت 2 دقیقه قرار گرفته و شسته شدند. 50µlاز هر یک از آنتی بادی مونوکلونال $1C_3C_{11}$، $2B_2\ B_{10}$، $3B_6\ F_{11}$، $3B_{12}\ F_{10}$ و$3D_3\ D_6$ با غلظت 10µg/mlبر روی محل کوتینگ اضافه شده و 2 ساعت در دمای اتاق و در محفظه مرطوب انکوبه گردید . بعد از پایان 2ساعت لام‌ها به آرامی تحت 3 بار شستشو با بافر PBS قرار گرفتند و بعد بر روی هر لام 50µl آنتی‌بادی Sheep Anti Mouse Ig کونژوگه با FITC (تولید پژوهشکده ابن سینا)قرار داده و به مدت یک ساعت در محفظه مرطوب و تاریک انکوبه گردید . بعد از 1ساعت لام ها تحت 3 بار شستشو، با قرار گرفتن یک قطره محلول PBS - گلیسرول (V/V) بر روی لام و استفاده از لامل در زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

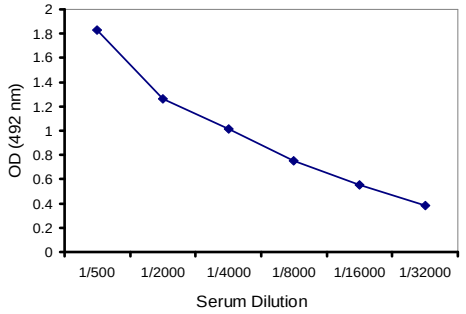
نتایج

1-یافته های مربوط به استخراج پروتئین های غشای اسپرم به روش Solubilization:

بعد از استخراج پروتئین های سطحی اسپرم با استفاده از NaCl 1 مولار، محلول پروتئینی به دست آمده تحت بافر PBS (0/15 مولار و pH=7/2) ، دیالیز گردید. در ادامه، محلول پروتئینی تحت روش لیوفیلیزاسیون به صورت پودر به دست آمد و در دمای 4c̊ نگهداری شد. در ضمن بعد از اندازه‌گیری محتوای پروتئینی پودر به دست آمده، به روش برادفورد مشخص شد که به ازای $10^9 \times 6$ سلول اسپرمی، 176/1 میلی گرم پودر لیوفیلیزه حاصل شده که حدود 21 درصد وزن آن ترکیبات نمکی می باشد.

2- یافته های مربوط به تولید آنتی بادی مونوکلونال:

بدنبال پروتکل تهیه آنتی بادی مونوکلونال، تیتر سرم موش مورد استفاده در فیوژن، با استفاده از آزمون الایزا تعیین گردید . بدین ترتیب که بعد از تزریق چهارم، آنتی‌بادی ضد اسپرمی از رقت $\frac{1}{500}$ تا $\frac{1}{32000}$ جذب نوری قابل ملاحظه‌ای را به طور کاهنده از 1/8 تا 0/3 نشان می‌داد (نمودار 1).



نمودار 1: بررسی تیتراسیون سرم موش ایمن شده در پاسخ به آنتی ژنهای سطحی اسپرم انسان

بعد از انجام فیوژن، استفاده از محیط انتخابی HAT و انجام تکنیک Limiting Dilution جهت به دست آوردن تک کلون تولید کننده آنتی‌بادی مونوکلونال، آزمون الایزایی جهت شناسایی آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین‌های سطحی اسپرم انجام گردید و به دنبال آن مشخص شد که، 5 کلون مثبت با اسامی $2B_2\ B_{10}$، $3B_6\ F_{11}$، $3B_{12}\ F_{10}$ $1C_3C_{11}$ و $3D_3\ D_6$ به دست آمده است.

3- یافته های مربوط به تعیین ایزوتایپ آنتی بادی های به دست آمده:

در ادامه جهت شناسایی ایزوتایپ آنتی بادی های مونوکلونال تولیدشده مطابق با مراحل گفته شده ، کلاس و زیرکلاس هر یک از کلونها با روش الایزای ساندویچ تعیین شد . یافته‌های این قسمت در مقایسه با نمونه کنترل های مثبت و منفی، بر اساس اندازه‌گیری جذب نوری برای هر یک از انواع آنتی ایزوتایپ‌های بکار گرفته شده، در نمودارهای زیر برای هر کلون به دست آمد (نمودار 2).

جدول1: یافته های مربوط به تعیین ایزوتایپ کلونهای تولید کننده آنتی بادی علیه آنتی ژنهای سطح اسپرم

	نام کلون	غلظت آنتی‌بادی به دست آمده	غلظت آنتی بادی در هر میلی لیتر محیط کشت
1	$2B_2\ B_{10}$	14.5 *mg*	14.2 *µg/ml*
2	$3B_6\ F_{11}$	15 *mg*	16.3 *µg/ml*
3	$3B_{12}\ F_{10}$	24.8 *mg*	25.7 *µg/ml*
4	$1C_3\ C_{11}$	17.2 *mg*	17.2 *µg/ml*
5	$3D_3\ D_6$	30 *mg*	23.9 *µg/ml*

4- یافته های مربوط به به غلظت آنتی بادی های مونوکلونال در محیط کشت و بعد از تخلیص:

به دنبال اندازه‌گیری جذب نوری (OD) هر یک از محلولهای آنتی‌بادی در طول موج 280 نانومتر با استفاده از ضریب خاموشی IgG Extinction Coefficient (EC_{IgG}=13.6) غلظت کلی آنتی‌بادی های مونوکلونال حاصل از تخلیص ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتیین G به‌دست آمد . در ضمن با توجه به مشخص بودن حجم محلول رویی کشت سلول های هیبریدوما غلظت آنتی بادی مونوکلونال در واحد حجم محیط کشت تخمین زده شد(جدول1).

5- یافته های حاصل از بررسی واکنش متقاطع احتمالی آنتی‌بادی مونوکلونال با آنتی‌ژنهای دیگر با استفاده از آزمون الایزا:

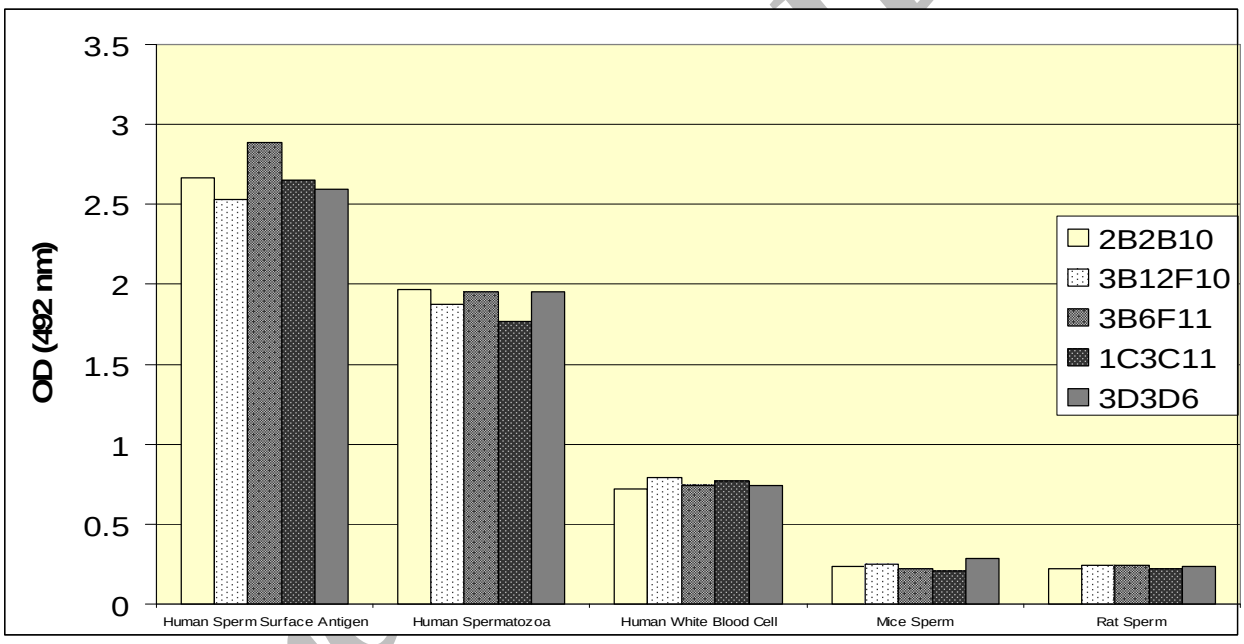
جهت بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی مونوکلونال با آنتی‌ژن‌های دیگر شامل آنتی‌ژن‌های سطح گلبول‌های سفید و آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم‌های دو گونه (rat و mice) در مقایسه با سلول های اسپرماتوزوای انسانی و آنتی ژن های استخراجی از

Archive of SID
www.SID.ir

جدول2: غلظت کلی آنتی بادی های مونوکلونال تولید شده توسط هر یک از کلون ها بعد از عبور از ستون پروتیین G و غلظت تقریبی آن در هر میلی لیتر محیط کشت

	نام کلون	ایزوتایپ آنتی بادی
1	$2B_2\ B_{10}$	IgG2a
2	$3B_6\ F_{11}$	IgG2a
3	$3B_{12}\ F_{10}$	IgG1
4	$1C_3\ C_{11}$	IgG2b
5	$3D_3\ D_6$	IgG2b

غشای سیتوپلاسمی اسپرم انسانی بـ ه عنوان کنترل مثبت، تستی بـه روش الایزا طراحی گردید . هدف از این تست تنها بررسی کیفی (Qualitative) واکـنش آنتـی‌ژن و آنتـی‌بـادی در مقایسـه بـا کنترلهای مثبت و منفی بوده است (نمودار2). یافته هـای حاصـل از این آزمون نشان داد که واکنش متقاطع قابل توجهی در مـورد گلبول های سفید خون محیطی انسانی بـا تمـام آنتـی بـادی هـای مونوکلونال دیده می شود.



نمودار1: بررسی واکنش متقاطع احتمالی آنتی بادی مونوکلونال با آنتی زنهای دیگر

جدول3: بررسی واکنش متقاطع هر یک از آنتی بادی های مونوکلونال با آنتی ژنهای مذکور به صورت گزارش میانگین OD با SD

Clone	Human Sperm Surface Antigen	Human Spermatozoa	Human White Blood Cell	Mice Sperm	Rat Sperm
2B2B10	2.667±0.131	1.965±0.081	0.721±0.042	0.238±0.033	224±0.034.0
3B12F10	2.533±0.143	1.877±0.067	0.789±0.044	0.246±0.035	0.239±0.037
3B6F11	2.887±0.128	1.955±0.063	0.743±0.052	0.224±0.037	0.243±0.036
1C3C11	2.654±0.127	1.765±0.072	0.772±0.043	0.209±0.041	0.223±0.045
3D3D6	2.595±0.135	1.955±0.082	0.739±0.047	0.284±0.028	0.232±0.041
mAb-Control (Anti Ferritin)	0.231±0.023	0.208±0.043	0.189±0.042	0.247±0.041	0.245±0.022

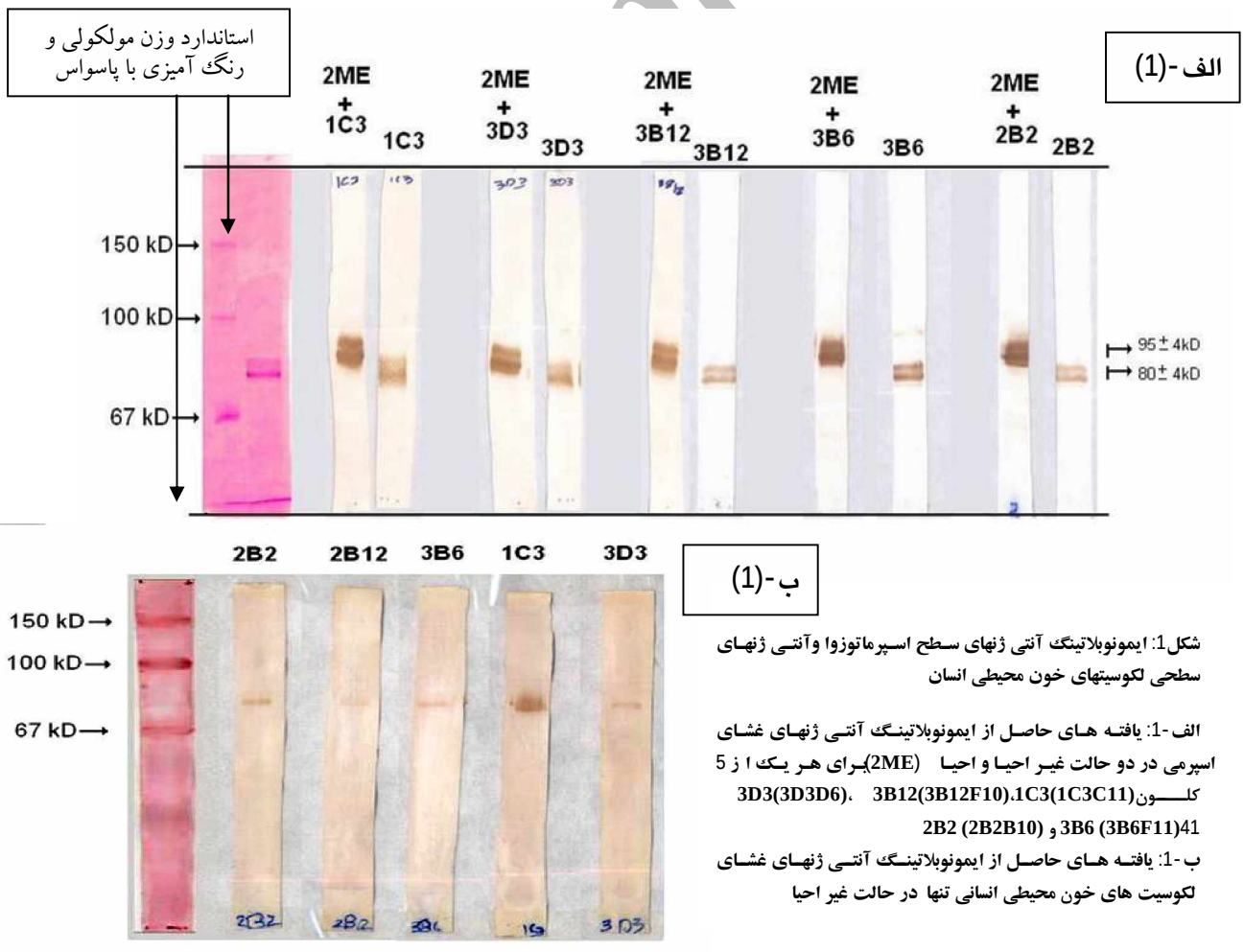
www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

6- یافته های حاصل از آزمون ایمونوبلاتینگ پروتیین های غشای سیتوپلاسمی اسپرماتوزوا:

بعد از انتقال پروتئین های مورد بررسی به کاغذ PVDF و رنگ آمیزی باند اختصاصی به طور جداگانه توسط هر یک از آنتی بادی های $2B_2B_{10}$، $3B_{12}F_{10}$، $3B_6F_{11}$، $1C_3C_{11}$ و $3D_3D_6$، مشخص شد که تمام آنتی بادی های مورد مطالعه دارای ویژگی مشابهی در الگوی بلاتینگ می باشند. بدین ترتیب که هر آنتی بادی سه باند پروتئینی را در محدوده 4±80 کیلو دالتون از پروتئین های استخراجی سطح سلول اسپرماتوزوا شناسایی می کند(شکل الف-1)، در عین حال تمامی این آنتی بادی ها تک باند پروتیینی مشابهی را از مجموعه پروتئین های به دست آمده از سطح لکوسیت های خون محیطی انسان، در این ناحیه وزنی مورد شناسایی قرار می دهد(شکل ب-1). نکته مهم اینکه پروتئین های سطحی استخراج شده از سطح اسپرم در مجاورت 2- مرکاپتواتانل (2-ME) ضمن احیای باندهای اینکه پروتئین های سطحی استخراج شده از سطح اسپرم در مجاورت 2- مرکاپتواتانل (2-ME) ضمن احیای باندهای دی سولفیدی، همچنان واکنش آنتی بادی های مونوکلونال با اپی توپ مورد نظر حفظ شده هرچند پروتئین مورد نظر در ناحیه ایی بالاتر در محدوده وزنی 4±95 کیلو دالتون متوقف شده است(شکل الف-1). اما این واکنش در مورد آنتی ژنهایی از سطح گلبولهای سفید که در مجاورت 2- مرکاپتواتانل(2-ME) قرار داشتند اتفاق نیفتاد که به دلیل عدم واکنش تصاویر ایمنوبلاتینگ آن نشان داده نشده است. بنابراین اپی توپهایی از گلبولهای سفید انسانی که در حالت غیراحیا در محدوده وزنی 4±80 کیلو دالتون واکنش نشان دادند در حالت احیا فاقد هرگونه واکنش مشخص با آنتی بادی های مونوکلونال تحت مطالعه بودند.



شکل1: ایمونوبلاتینگ آنتی ژنهای سطح اسپرماتوزوا وآنتی ژنهای سطحی لکوسیتهای خون محیطی انسان

الف-1: یافته های حاصل از ایمونوبلاتینگ آنتی ژنهای غشای اسپرمی در دو حالت غیر احیا و احیا (2ME)برای هر یک ا ز 5 کلون(1C3(1C3C11)، 3B12(3B12F10)، 3D3(3D3D6)، 41(3B6F11) 3B6 و (2B2B10) 2B2

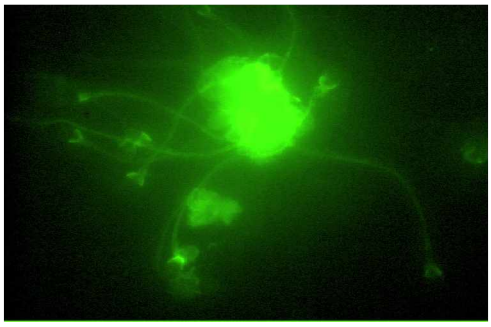
ب-1: یافته های حاصل از ایمونوبلاتینگ آنتی ژنهای غشای لکوسیت های خون محیطی انسانی تنها در حالت غیر احیا

www.SID.ir

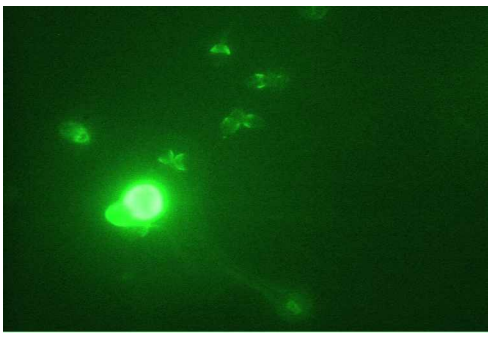
7- یافته های رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم با استفاده از پنج آنتی بادی مونوکلونال:

یافته های حاصل از رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم با استفاده از هر پنج آنتی بادی مونوکلونال $1C_3C_{11}$, $3B_{12}$ F_{10}, $3B_6$ F_{11}, $2B_2$ B_{10} و $3D_3$ D_6 نشان می دهد موقعیت استقرار آنتی ژن مورد نظر در مورد هر پنج آنتی بادی در ناحیه تحت استوایی Subequatorial سلول اسپرماتوزوا قرار دارد . در عین حال تمامی لکوسیت های خون محیطی انسانی نیز دارای استقرار این آنتی ژن در سطح خود می باشند (شکل های2 تا 7)

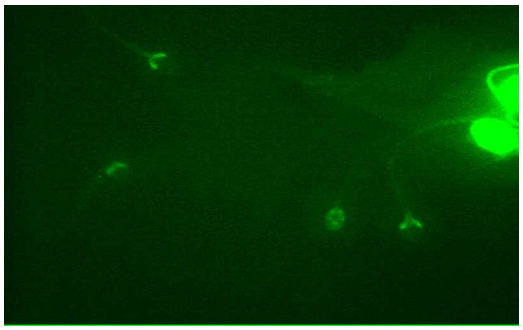
شکل2: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال 2B2B10و سلول اسپرماتوزوای انسانی



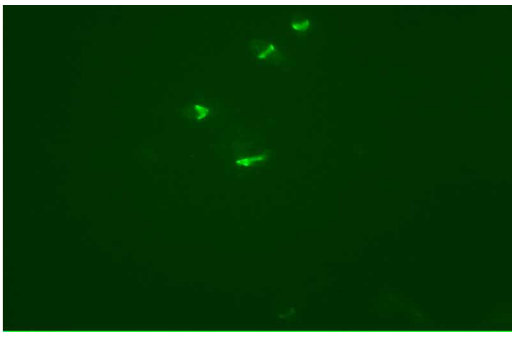
شکل3: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال 3B6F11 و سلول اسپرماتوزوای انسانی



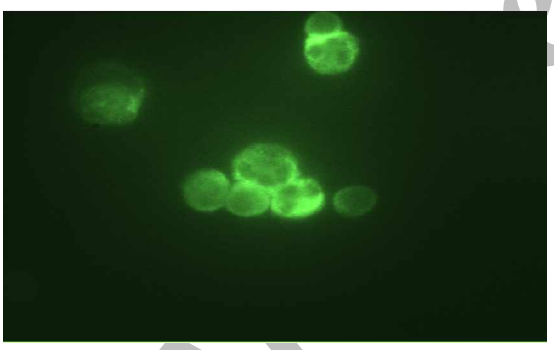
شکل4: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال $3B_{12}$ F_{10} و سلول اسپرماتوزوای انسانی



شکل5: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال $1C_3C_{11}$و سلول اسپرماتوزوای انسانی



شکل6: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال $3D_3$ D_6 و سلول اسپرماتوزوای انسانی



شکل7: :نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از هر یک از آنتی بادی مونوکلونال که با سلول های لکوسیتی خون محیطی انسان به صورت کاملا مشابه بوده است.

بحث

Shetty و همکارانش در سال 2001[23]،با بـه کـارگیری NaCl 1 مولار استخراج پروتیین های سطحی اسپرم انسـانی را بـا مکانیسم Solubilization انجام دادند. آنها برای نشان دادن منشـا پروتیین ها، سلولهای اسپرمی را قبل از استخراج پـروتیین هـای سطحی،با بیوتین مجاو ر کردند. بدین ترتیب گلیکوپروتیین های سطحی با اتصـال کـووالان بـه بیـوتین، بعـد از اسـتخراج و انجـام الکتروفورز دو بعدی(Two Dimensional (2-D ، بـا اسـتفاده از

www.SID.ir

اوویدین کونژوگه با HRP بر روی وسترن بلاتینگ پروتیین های استخراجی ثابت کردند این روش قابلیت بالایی در جدا نمودن پروتیین های غشایی دارد.

در این تحقیق برای اولین بار، با به کارگیری آنتی ژنهای استخراج شده با 1 مولار NaCl، ایمونیزاسیون موش های گونه Balb/c جهت القای کلونهای ویژه ی آنتی ژنهای به دست آمده، انجام گردید. وجه تمایز این روش در القای کلون های لنفوسیتی B با روش های دیگر در بکار گیری سلول کامل، محدود بودن کلونهای القا شونده به آنتی ژن‌های سطحی اسپرم می باشد در ضمن روش استخراج آنتی‌ژن نیز از اهمیت به سزایی برخوردار است. اگر استخراج آنتی ژن به ترتیبی باشد که شاخص‌های آنتی‌ژنیک در طی استخراج دچار تغییر و حذف گردند (از جمله روش های تهاجمی مثل جوشاندن، سونیکاسیون، تأثیر دترژنت‌های قوی مثل SDS) تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با ویژگی مورد نظر با احتمال کمتری همراه بوده و کلون‌های غیر مفید تولید می شدند. بنابراین روش استخراجی که کمترین صدمه را بر ویژگی پروتئین های غشا وارد سازد حائز اهمیت می باشد. در این مطالعه با اجرای این شیوه، 5 کلون با ویژگی علیه آنتی ژنهای سطحی اسپرم انسان به دست آمد. در ضمن جهت بررسی واکنش متقاطع آن با اسپرم‌های گونه Rat و Mice تستی به روش الایزا طراحی گردید، که هیچکدام از آنتی بادی های تولید شده واکنش متقاطعی نشان ندادند. هر چند که تمامی آنتی بادی ها با لکوسیت های خون محیطی واکنش واضحی را نشان دادند. بنابراین، تمامی آنتی‌بادی مونوکلونال اپی توپ‌های مشابهی را در سطح اسپرم انسان و گلبول های سفید خون محیطی شناسایی می کنند. هر چند بررسی های بیشتر در ارتباط با بررسی ویژگی آنتی بادی های به دست آمده به مرحله بعدی مطالعه موکول شده که در حال انجام است.

بر طبق گزارشاتی که مبنی بر شناسایی آنتی ژن‌های غشای اسپرم انجام شده، شاخص های متفاوتی در فعالیت‌های فیزیولوژیک و عملکردی اسپرم دارای نقش مؤثر می باشند. به نحوی که اتصال این آنتی‌ژن‌ها با آنتی‌بادی های ویژه‌شان، توانسته است عملکرد خاص این پروتئین‌ها را در مسیر باروری مهار نماید. از جمله Naz و همکارانشان که در سال 1987 توانستند آنتی ژن FA-1 (مولکولی دایمر با وزن 49±2kD) شناسایی کنند و آنتی بادی علیه آن را در سرم افراد نابارور جدا نمایند. آنها در تحقیق موازی دیگری نشان دادند که همین آنتی بادی می تواند در خرگوش نابارووری ایجاد نماید[30،31]. مشابه این تحقیقات گزارشات دیگری مبنی بر شناسایی آنتی ژنهای مسوول در امر باروری در سالهای اخیر صورت گرفته است[32،39]. در این مطالعه به دنبال تحریک آنتی ژنیک کلون های لنفوسیتی B علیه آنتی ژنهای سطحی استخراج شده از سطح اسپرم انسانی 5 کلون پایدار وثوتولید کننده آنتی بادی علیه اسپرم انسان به دست آمد. در ادامه مطالعه جهت تحلیل (Characterization) آنتی ژنهای ویژه این آنتی بادی ها در سطح اسپرم مشخص شد محصول هر یک از 5 کلون، پروتئین مشابهی را در آزمون ایمونوبلاتینگ در ناحیه 80±4kD شناسایی می کند. در ضمن این آنتی بادیها آنتی ژنهای خود را در شرایط احیا (مجاورت با 2- مرکاپتواتانل) شناسایی نمودند و این نشان دهنده این موضوع است که اپی توپ مورد نظر خطی باشد، چرا که تغییر ساختار پروتیین طی احیای پیوند های دی سولفیدی داخل زنجیره ای نقشی در شکل اپی توپ نداشته است. بنابراین بر هم کنش آنتی بادی مونوکلونال با توالی مورد نظر همچنان برقرار بوده است. همانطور که در شکل (1) مشاهده می شود برهم کنش هر یک از آنتی بادی های مونوکلونال با پروتئین های احیا شده اسپرمی در آزمون ایمونوبلاتینگ، در محدوده وزنی 95±4kD صورت پذیرفته است. که در مقایسه با پروتئین های احیا نشده که محدوده وزنی 80±4kD را به خود اختصاص داده اند، به اندازه 15 کیلو دالتون بالاتر قرار گرفته است، که این سنگینی کاذب احتمالا به دلیل رشته ای شدن و از دست رفتن حالت گلبولار پروتئین بوده است که حرکت آن را به داخل ژل در مقایسه با پروتیین احیا نشده کندتر نموده است.

همانطور که در آزمون ایمونوبلاتینگ با پروتیین های سطحی اسپرماتوزوا مشخص شده است، هر یک از آنتی بادی های مونوکلونال سه پروتئین مجاور هم را چه در شرایط احیا و چه در شرایط غیراحیا شناسایی می کند. اما به دنبال ایمونوبلاتینگ آنتی ژنهای به دست آمده از گلبول های سفید انسان مشخص شد که تمامی آنتی بادی های مونوکلونال تنها یک پروتیین را در ناحیه 80±4kD شناسایی می کند. که این پروتئین در شرایط

Archive of SID
www.SID.ir

احیا با 2-ME خاصیت آنتی ژنیک خود را برای پروتیین مورد نظر از دست می دهد، بنابراین تفاوت این اپی توپ با اپی توپ موجود بر سطح اسپرم، حضور پیوند دی سولفید داخل زنجیره ای می باشد و می توان نتیجه گرفت احتمالا این اپی توپ ساختار فضایی داشته که با آنتی بادی مونوکلونال واکنش متقاطع نشان می دهد .یافته های به دست آمده از آزمون الایزا نشان داد که میزان بر هم کنش آنتی بادی مونوکلونال در غلظت مساوی با سلول های اسپرم انسانی و آنتی ژنهای استخراج شده از سطح این سلول ها در مقایسه با تأثیر آنتی بادی مونوکلونال ضد فریتین به عنوان یک آنتی بادی کنترل علیه یک شاخص غیره با $p<0.05$ دارای حداکثر جذب نوری به عنوان یک واکنش غیراختصاصی در نظر گرفته شده است . در ضمن برهم کنش این آنتی بادی ها بر آنتی ژنهای سطحی گلبول های سفید انسانی در مقایسه با آنتی بادی کنترل با نشان دهنده یک واکنش مثبت ولی در حد متوسط و به صورت یک واکنش متقاطع مشاهده می گردد . با مقایسه جذب های نوری آنتی بادی های تحت مطالعه با سلول های اسپرم دو گونه Rat و Mice و اثر آنتی بادی مونوکلونال کنترل مشخص شد که آنتی بادی های مونوکلونال هیچگونه ویژگی علیه سلول های اسپرماتوزوآی این دو گونه ندارد ($P>0.05$). مطابق با یافته های حاصل از آزمون ایمونوبلاتینگ و الایزا، یافته های حاصل از آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم آنتی بادی های مونوکلونال با سلولهای اسپرماتوزوا و گلبولهای سفید انسانی و اسپرماتوزوای دو گونه Rat و Mice تأیید کننده یافته های قبلی می باشد . همانطور که در شکل های 1 تا 5 مشخص است تمامی آنتی بادی های مونوکلونال به طور مشابه و اختصاصی گردن و منطقه تحت استوایی (Sub-equatorial) سر اسپرم انسان را شناسایی می کند و در مورد گلبول های سفید (هر دوسلول های تک هسته ایی و چند هسته ایی) فلورسانس مشخصی در ناحیه غشای سیتوپلاسمی این سلول ها مشاهده شد. اما در مورد سلول های اسپرماتوزوآی دو گونه Rat و Mice هیچگونه فلورسانس درخشانی مشاهده نگردید . مزیتی که آزمون ایمونوفلورسانس به کار رفته در این مطالعه نسبت به سایر آزمون های فلورسانس داشته است اعمال کمترین تغییر در آنتی ژنهای سطحی و تخریب غشایی هنگام تهیه اسلاید و ثبوت (Fixation)می باشد بطوری که نمونه های تهیه شده با این روش تا مدت 6 ماه از لحاظ مورفولوژی و قابلیت واکنش پذیری با آنتی بادی مونوکلونال تفاوتی را در مقایسه با نمونه های تازه نشان نداده اند . یافته های حاصل از این مطالعه نشان می دهد که هر 5 کلون دارای ویژگی مشابه می باشند . اما می توان با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال به طور جداگانه ستون های افینیتی کروماتوگرافی را طراحی نمود تا بتوان آنتی ژن ویژه آن را تخلیص نمود در این حالت می توان با خالص نمودن آنتی ژن مورد نظر، توالی اسید آمینه ای پروتئین مورد نظر را مشخص نمود (Sequencing). در عین حال می توان با تخلیص پروتئین واکنش دهنده در سطح لکوسیت های توالی اسید آمینه ایی آن را تعیین و به مقایسه و بررسی عملکرد این دو پروتئین از دو منشا جداگانه پرداخت . در این رابطه با انتخاب آنتی‌ژن‌های مسئول در روند باروری (حرکت، ظرفیت‌یابی اسپرم، اتصال اسپرم با زوناپلوسیدا، واکنش آکروزومی ولقاح با اوولمای تخمک) می‌توان علاوه بر افزایش اطلاعات در مورد مکانیسم‌های‌مولکولی لقاح، در زمینه مطالعات Phylogenic و Ontogenic، شناسایی‌ارتباطات تکاملی بین گونه ای فعالیت قابل توجهی را انجام داد. در عین حال می توان روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی جدیدی را جهت غربال ناباروری ها با علل نامشخص طراحی نمود . با شناسایی آنتی ژنهای دخیل در باروری و تعیین توالی اسید آمینه ای آن در زمینه تولید واکسن های کنتیراسپتیو از جمله پروتئین های نوترکیب و DNA واکسن ها، روشهایی را جهت کنترل باروری به کار برد [40,41].

سپاسگزاری

بدینوسیله مراتب قدردانی وسپاس خود را از پژوهشکده ابن سینا وابسته به جهاد دا نشگاهی علوم پزشکی شهید بهشتی که در کلیه مراحل این مطالعه صمیمانه همکاری نموده اند به جا می آوریم. در ضمن از آزمایشگاه بیمارستان پارس و آزمایشگاه نور جهت تأمین نمونه های پژوهشی واز سرکار خانم فاطمه سادات شاکری به جهت تایپ کمال تشکر و قدردانی می نمائیم.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Osmond J. D'Cruz: ***Adhesion Molecules in Human Sperm-Oocyte Interaction: Relevance to Infertility.*** Frontiers in Bioscience 1996 Aug 1:161-176, 1 August 1996.

2. Ian A. Brewis1&Chi H. Wong: ***Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida.*** *Reviews of Reproduction* (1999) 4, 135–142.

3. Paul Primakoff & Diana G. Myles: ***Penetration, Adhision and fusion in mammalian sperm-egg intraction.*** Science, Vol 296, 21 June 2002.

4. Mark P. Hedger:Testicular Leukocyte: What are they doing? Journal of Reproduction and Fertility. 1997; 2, 38-47.

5. Mazumdar S. Levine AS: ***Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment.*** Fertil Steril. 1998 Nov; 70(5):799-810.

6. Shigeta M, Watanabe T, Maruyama S, Koyama K, Isojima S: ***Sperm-immobilizing monoclonal antibody to human seminal plasma antigens.*** Clin Exp Immunol. 1980 Dec; 42(3):458-62.

7. Isojima S, Koyama K, Fujiwara N.: ***Purification of human seminal plasma no. 7 antigen by immunoaffinity chromatography on bound monoclonal antibody***. Clin Exp Immunol. 1982 Aug; 49(2):449-56.

8. Lee CY, Huang YS, Huang CH, Hu PC, Menge AC.: ***Monoclonal antibodies to human sperm antigens.*** J Reprod Immunol. 1982 Jul; 4(3):173-81.

9. Isahakia M, Alexander NJ: ***Interspecies cross-reactivity of monoclonal antibodies directed against human sperm antigens.*** Biol Reprod. 1984 May; 30(4):1015-26.

10. Shigeta M, Watanabe T, Maruyama S, Koyama K, Isojima S: ***Sperm-immobilizing monoclonal antibody to human seminal plasma antigens. Clin Exp Immunol.*** 1980 Dec; 42(3):458-62.

11. Schmell ED, Gulyas BJ, Yuan LC, August JT: ***Identification of mammalian sperm surface antigens: II. Characterization of an acrosomal cap protein and a tail protein using monoclonal anti-mouse sperm antibodies.*** J Reprod Immunol. 1982 May; 4(2):91-106.

12. Schmell ED, Yuan LC, Gulyas BJ, August JT.: ***Identification of mammalian sperm surface antigens. I. Production of monoclonal anti-mouse sperm antibodies.*** Fertil Steril. 1982 Feb; 37(2):249-57.

13. Wolf DP, Sokoloski JE, Dandekar P, Bechtol KB: ***Characterization of human sperm surface antigens with monoclonal antibodies.*** Biol Reprod. 1983 Oct; 29(3):713-23.

14. Prabhu G, Hegde UC.: ***Use of monoclonal antibodies for the detection of HLA and DR antigens on spermatozoa of different species.*** Am J Reprod Immunol. 1982 Oct; 2(5):243-5.

15. Glassy MC, Surh CD, Sarkar S: ***Murine monoclonal antibodies that identify antigenically distinct subpopulations of human sperm. Hybridoma***. 1984 Winter ; 3(4):363-71.

16. Saling PM, Raines LM, O'Rand MG.: ***Monoclonal antibody against mouse sperm blocks a specific event in the fertilization process.*** J Exp Zool. 1983 Sep; 227(3):481-6.

17. Rajesh K. Naz: ***Application of Sperm Antigens in Immunocontraception.*** Frontiers in Bioscience 1 Sep. 1996:1, e87-95.

18. Anderson DJ, Griffin PD, Johnson PM. ***Report of the third WHO-sponsored workshops on monoclonal antibodies to human sperm and trophoblast antigens***.J Reprod Immunol 1994; in press.

19. Anderson DJ, Johnson PM, Alexander NJ, Jones WR, Griffin PD; ***Monoclonal antibodies***

Archive of SID
www.SID.ir

to human trophoblast antigens and sperm antigens: Report of two WHO-sponsored workshops on. J Reprod Immunol 1987; 10:231-257.

20. Topfer-Petersen E, Auerbeck J, Weiss A, Friess AE, Schill WB: ***The sperm acrosome: immunological analysis using specific polyclonal and monoclonal antibodies directed against the outer acrosomal membrane of boar spermatozoa.*** Andrologia. 1986 May-Jun; 18(3):237-51.

21. Benet-Rubinat JM, Martinez P, Lepp WA, Egozcue J, Andolz P, Bielsa MA.: ***Detection of induced anti-sperm antibodies by an improved enzyme-linked immunosorbent assay***. Int J Fertil. 1991 Jan-Feb; 36(1):48-56.

22. WHO ***laboratory Manual for Examination of Human semen-Cervicus Mucus Interaction,*** 3rd ed. 1992; Cambridge University press.

23. Shetty J., Diekman AB, Jayes FC, Sherman NE, Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC. (2001): ***Differential extraction and enrichment of human sperm surface proteins in a proteome: identification of immunocontraceptive candidates.*** Electrophoresis. 2001 Aug; 22(14):3053-66.

24. Zamboni A, Giuntini I, Gianesello D, Maddalena F, Rognoni F, Herbst D: ***Production of mouse monoclonal antibodies using a continuous cell culture fermenter and protein G affinity chromatography.*** Cytotechnology. 1994; 16(2):79-87.

25. Bill E, Lutz U, Karlsson BM, Sparrman M, Allgaier H: ***Optimization of protein G chromatography for biopharmaceutical monoclonal antibodies. J Mol Recognit.*** 1995 Jan-Apr; 8(1-2):90-4.

26. Jones WR.: Immunologic infertility--fact or fiction? Fertil Steril. 1980 Jun; 33(6):577-86.

27. Mettler L., Skrabei H: ***Isolation of human spermatozoa membrane antigens binding sperm-immobilizing and sperm-agglutinating antibodies.*** Int J Fertil 1979; 24(1):44-48.

28. Koo GC: Serology of H-Y antigen. Hum Genet. 1981; 58(1):18-20.

29. Schmell ED, Gulyas BJ, Yuan LC, August JT: ***Identification of mammalian sperm surface antigens: II. Characterization of an acrosomal cap protein and a tail protein using monoclonal anti-mouse sperm antibodies***. J Reprod Immunol. 1982 May; 4(2):91-106.

30. Naz RK: ***Involvement of fertilization antigen (FA-1) in involuntary immunoinfertility in humans.*** J Clin Invest 1987 Nov; 80(5):1375-83.

31. Naz RK, Bhargava KK: ***Antibodies to sperm surface fertilization antigen (FA-1): their specificities and site of interaction with sperm in male genital tract.*** Mol Reprod Dev 1990 Jun; 26(2):175-83.

32. Vanage G, Lu YA, Tam JP, Koide SS: ***Infertility induced in rats by immunization with synthetic peptide segments of a sperm protein.*** Biochem Biophys Res Commun 1992 Mar 16; 183(2):538-43.

33. Seya T, Hara T, Matsumoto M, Kiyohara H, Nakanishi I, Kinouchi T, Okabe M, Shimizu A, Akedo H: ***Membrane cofactor protein (MCP, CD46) in seminal plasma and on spermatozoa in normal and "sterile" subjects.*** Eur J Immunol 1993 Jun; 23(6):1322-7.

34. Naz RK, Ahmad K: ***Molecular identities of human sperm proteins that bind human zona pellucida: nature of sperm-zona interaction, tyrosine kinase activity, and involvement of FA-1.*** Mol Reprod Dev 1994 Dec; 39(4):397-408.

35. Brucker C, Loser C, Hinrichsen M, Berg FD: ***Sperm acrosome antigen-1, a molecule intimately involved in the regulation of the acrosome***

Archive of SID
www.SID.ir

reaction: analysis of expression on spermatozoa from infertile couples. Andrologia 1997 Mar-Apr; 29(2):91-6.

36. Tripathi D, Sharma NC, Singh SK, Gupta LK: ***Identification of bovine sperm specific polypeptides reactive with antisperm antibodies.*** Indian J Exp Biol 1999 Jul; 37(7):655-61.

37. Yeung CH, Cooper TG, Schroter S, Kirchhoff C, Nieschlag E: ***Epididymal secretion of CD52 as measured in human seminal plasma by a fluorescence immunoassay.*** Mol Hum Reprod 1998 May; 4(5):447-51.

38. Diekman AB, Norton EJ, Klotz KL, Westbrook VA, Shibahara H, Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC: ***N-linked glycan of a sperm CD52 glycoform associated with human infertility.*** FASEB J 1999 Aug; 13(11):1303-13.

39. Dimitrova DK, Marinova TsTs: ***CD8-like molecules on human spermatozoa.*** Folia Biol (Praha) 2001; 47(5):176-9.

40. McLaughlin EA, Holland MK, Aitken RJ: ***Contraceptive vaccines. Expert Opin Biol Ther***. 2003 Aug; 3(5):829-41.

41. Chen Y, Liu Z, Yang Y, Chen YZ, Peng JP: ***Infertility in mice induced by the rhesus monkey chorionic gonadotropin beta-subunit glycoprotein (rmCGbeta) using DNA immunization.*** Mol Cell Biochem. 2002 Feb; 231(1-2):89-96.

Archive of SID

www.SID.ir