

شناسایی پروتئین‌های مشترک بین ترشحات اپی‌تلیوم و اپی‌دیدیم و سطح اسپرماتوزوئید

دکتر محمدرضا صادقی*، دکتر محمدمهدی آخوندی** و دکتر مهین زهرائی***

* استادیار گروه آندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده این‌سینا- جهاد دانشگاهی

** استادیار گروه ژنتیک، بیوتکنولوژی و جنین‌شناسی پژوهشکده این‌سینا- جهاد دانشگاهی

*** استاد گروه بیوشیمی پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه

مقدمه. پس از خروج اسپرم از بیضه، مراحل تکاملی بیشتری لازم است که اسپرماتوزوئید کاملاً" قابلیت عبور از مجرای تناسلی مونث و بارور کردن تخمک را کسب کند. این مرحله را بلوغ اسپرماتوزوئید نامید که در اپی‌دیدیم صورت می‌گیرد. اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم محیط کوچک اختصاصی برای بلوغ اسپرم فراهم می‌آورد، این مراحل شامل تغییر شکل، جایگزینی، حذف یا تغییر در بسیاری از ترکیبات پروتئینی و لیپیدی غشای پلاسمائی اسپرم می‌باشد. ارزیابی چنین تغییراتی در درک ما از عملکرد اپی‌دیدیم نقش مهمی دارد.

مواد و روش‌ها. قطعات شسته شده بخش ابتدایی اپی‌دیدیم (Caput, Corpus) تحت هضم مکانیکی و آنزیمی به منظور برداشت بافت همبندی و تولید قطعاتی با طول کمتر از ۱ mm قرار گرفتند. قطعات اپی‌دیدیم به طور موفقیت‌آمیزی در محیط تغییر داده شده RPMI-1640 که به آن آندروژن و FCS اضافه شده بود کشت داده شدند. محیط کشت اپی‌دیدیم به طور متناوب با مخلوط اسید آمینه‌های ^{35}S CYS و ^{35}S Met نشاندار شدند. سنتز و ترشح پروتئین به وسیله SDS-PAGE و فلوروگرافی ارزیابی شد. تحریک تولید آنتی‌بادی بر علیه پروتئین‌های سطح سرم با تزریقات مکرر اسپرماتوزوئید زنده به یک خرگوش انجام شد. عیار پادتن به وسیله ELISA و شیوه

ایمونوفلورسانس غیرمستقیم سنجیده شد.

پروتئین‌های نشاندار در ترشحات اپی‌دیدیم و سطح اسپرم با Western blotting شناسایی شدند.

یافته‌ها، اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم در محیط کشت حدود ۲۰ باند مشخص پروتئین را آشکار کرد.

محکمترین باندها وزن ملکولی بین ۲۰-۲۰۰ KD داشتند. تعدادی از باندها به وضوح استحکام کمتری داشتند. آنتی سرم با پروتئین‌های ۲۰، ۲۴، ۵۴ و ۵۸ کیلودالتون که بین سطح اسپرم و ترشحات اپی‌تلیال اپی‌دیدیم مشترک بودند بعد از Western blotting واکنش نشان داد.

نتیجه‌گیری. سلولهای اپی‌تلیال اپی‌دیدیم پروتئین‌ها و گلیکوپروتئین‌هایی ترشح کنند که بعضی از آنها، به سطح اسپرم متصل می‌شوند و احتمالاً نقش حیاتی در تداخل اسپرم و تخمک با اتصالات غشایی بازی می‌کنند. ما ۴ پروتئین با وزن ملکولی ۲۰، ۲۴، ۵۴ و ۵۸ کیلودالتون که به وسیله اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم ترشح شده و به سطح اسپرم متصل می‌شدند شناسایی کردیم. تحقیق آینده ما روی خالص‌سازی این پروتئین‌ها و ارزیابی نقش آنها در روند باروری و توانایی بارورسازی اسپرم با شیوه IVF متمرکز خواهد بود.

واژگان کلیدی: اپی‌دیدیم، اسپرم، اسپرماتوزوئید

مقدمه

اسپرماتوزوئید پس از خروج از بیضه در قابلیت‌ها و عملکرد خود دچار تغییرات متوالی می‌شود و این تغییر با تغییراتی در سطح غشاء سلول همراه می‌باشد (۸ و ۲۰). تغییرات سطح اسپرم شامل تغییر در ترکیب و محتوای غشاء و یا تغییر در آرایش مولکول‌های لیپیدی و پروتئینی در سطح غشاء می‌باشد (۱۴).

از آنجا که در انتهای مسیر اسپرماتوزوئید تولید پروتئین جدید توسط اسپرم متوقف می‌شود، تولید پروتئین‌های جدید توسط اسپرم نمی‌تواند به عنوان منبعی برای تغییرات در سطح غشاء در نتیجه عملکرد

اسپرم مطرح باشد. بنابراین غالب دگرگونی‌هایی که در سطح اسپرم ایجاد می‌شود، نتیجه میانکنش اسپرم با محیطی است که در آن قرار دارد. در این محیطها اسپرم در تماس با مایعات و انواع جدیدی از سلولها، ممکن است بسیاری از مولکولهای سطح آن حذف، افزوده و یا دچار تغییرات فاحشی در ترکیب خود شوند (۱۹). پروتئین‌های غشاء اسپرم جزء مهمی از غشاء و به عنوان شاخص‌های پادگنی خاص آن گونه در سطح اسپرم مطرح می‌باشند (۱۶). تغییر، حذف یا افزایش این پروتئین‌ها باعث تغییر در عملکرد و قابلیت‌های اسپرم می‌گردد.

مسجرای اپی‌دیدیم یکی از محیطهایی است که

مولکولی لقاح شده، در صورت شناسایی پروتئینی با منشاء اپی‌دیدیم در سطح اسپرم که برای انجام لقاح نقش ضروری دارد کاندید مناسبی برای استفاده از آن به عنوان عامل کنترل باروری در جنس نر (Male Contraceptive) خواهد بود. به این جهت در این مطالعه ابتدا به شناسایی تمامی پروتئین‌های ترشحاتی اپی‌تلیال بخش ابتدایی اپی‌دیدیم در Rat پرداخته، سپس از میان، پروتئین‌هایی که به سطح اسپرم متصل می‌شوند را مورد شناسایی و بررسی بیشتر قرار خواهیم داد.

روش تحقیق

کشت اپی‌تلیال اپی‌دیدیم

محیط کشت (Gibco BRL Life Technologies, RPMI-1640 (USA)، به عنوان محیط پایه، ترکیبات افزودنی مطابق مطالعات قبلی بدان افزوده و آماده گردید. کشت اپی‌تلیال بخش ابتدایی اپی‌دیدیم (Caput Corpus) Rat نیز مطابق روش Akhondi انجام شد (۲). پس از کشت طی ۲-۳ روز بعد قطعات شروع به اتصال به کف پلیت و ایجاد پوشش تک لایه‌ای از سلول‌های اپی‌تلیال را می‌کنند. برای حفظ فعالیت طبیعی سلول‌ها در محیط کشت، قبل از اتصال، هر ۴۸ ساعت یک بار، ۵۰ درصد محیط روئی تعویض و پس از اتصال و ایجاد پوشش تک لایه‌ای می‌توان حدود ۹۰ درصد محیط کشت حاوی قطعات متصل نشده و سلول‌های مرده شناور را تعویض کرد.

بررسی فعالیت سنتزی و ترشحاتی سلول‌های

اپی‌تلیال با استفاده از [³⁵S (Met, Cys)]

به محیط کشت RPMI-1640 فاقد اسیدهای آمینه گوگرددار (Sigma Chemical Co, USA)، مطابق مرحله قبل مواد مورد نیاز افزوده و آماده می‌گردد. پس از آماده سازی و کشت سلول‌ها در محیط معمولی

بیشترین تغییرات در پروتئین‌های غشاء اسپرم را باعث می‌شود. زیرا اسپرم پس از خروج از بیضه و قبل از انزال بیشترین زمان را در اپی‌دیدیم می‌گذراند. اسپرم بیشتر تغییرات لازم برای قدرت باروری و تحرک را طی عبور از اپی‌دیدیم کسب می‌کند. مجموعه این تغییرات روی اسپرم را بلوغ اپی‌دیدیمی اسپرم می‌نامند (۱۷).

اپی‌دیدیم به ویژه بخش‌های ابتدایی آن، برای روند بلوغ اسپرم محیط لازم را فراهم می‌سازد. محیط داخلی مجرای اپی‌دیدیم نتیجه عملکرد سلول‌های اپی‌تلیال آن می‌باشد. فعالیت این سلول‌ها تحت کنترل آندروژن‌ها و سایر عوامل حاصل از بیضه می‌باشد (۱۸). عمده فعالیت این سلول‌ها در تنظیم محیط داخل مجرا شامل جذب آب و الکترولیتها، ترشح H⁺ و بی‌کربنات، سنتز و ترشح مولکول‌های آلی با وزن مولکولی کم، انتقال مواد از خون به داخل مجرا و در نهایت سنتز و ترشح پروتئین‌ها و گلیکوپروتئین‌ها به داخل مجرا می‌باشد (۲۴). پروتئین‌های ترشحاتی اپی‌دیدیم دارای نقش‌های متعددی، شامل اتصال به سطح اسپرم، فعالیت آنزیمی برای تغییر لیپیدها و پروتئین‌های سطح اسپرم و یا دخالت در حفظ هموستاز و تنظیم محیط داخلی مجرای اپی‌دیدیم می‌باشد (۱۱). بسیاری از پروتئین‌های ترشحاتی که به سطح اسپرم متصل می‌شوند، پس از انزال در دستگاه تناسلی ماده، در سطح اسپرم باقی مانده، نقش ویژه‌ای در میانکشی، اتصال و ادغام غشاء اسپرم و تخمک بازی می‌کنند. در برخی گونه‌های پستانداران پادتن اختصاصی این پروتئین‌ها با اتصال به سطح اسپرم باعث می‌شود که قدرت باروری اسپرم مهار شود (۱۷). بنابراین شناسایی این پروتئین‌ها و بررسی خصوصیات آنها در شناخت نقش اپی‌دیدیم بلوغ اسپرم و روشن شدن سازوکار مولکولی بلوغ اسپرم در اپی‌دیدیم اهمیت ویژه‌ای دارد. علاوه بر این، شناخت مولکول‌های سطح اسپرم منجر به درک بهتر از مکانیسم

پشتاز به انتهای ژل انجام می‌گیرد. ژل را با کوماسی بلو R-250 رنگ‌آمیزی و رنگ اضافی حذف می‌شود. ژل را به مدت یک ساعت در محلول فلوروگرافی (۲۲ PPO درصد در اسید استیک گلاسیال) قرار داده، سپس برای جلوگیری از تخریب ژل طی خشک کردن بین ۱ تا ۲ ساعت، ژل در محلول گلیسرول ۵ درصد قرار داده می‌شود. ژل توسط Gel Slab Drier (LKB, Pharmacia, Sweden) طی ۴ ساعت خشک می‌شود. ژل خشک شده سریعاً داخل کاست پرتونگاری همراه با صفحات تقویت کننده در مسجاورت فیلم حساس به اشعه قرار گرفته، پس از ۳-۴ هفته در منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود و ظهور فیلم مذکور، محل باندهای نشاندار مشخص می‌شود و در مقایسه با مارکهای وزن مولکولی، وزن مولکولی پروتئین‌های ترشعی تعیین می‌شود.

تولید آنتی سرم علیه پروتئین‌های سطح اسپرم

تولید آنتی‌سرم بر علیه اسپرم در یک خرگوش نژاد NZW (انستیتو پاستور ایران) توسط چهار تزریق متوالی اسپرم‌های زنده و شسته شده rat تحریک گردید. اسپرم زنده شسته شده در ۱ میلی‌لیتر PBS استریل با ۱ میلی‌لیتر ادجوانت کامل فروند (Sigma chemical Co, USA) مخلوط شد و در ۱۰ نقطه پشت حیوان به صورت زیر جلدی تزریق گردید. تزریقات بعدی همان تعداد اسپرم با فاصله سه هفته به صورت IP تزریق گردید. قبل از هر تزریق عیار پادتن سنجیده شد. در صورت افزایش عیار پادتن، پس از آخرین تزریق، خونگیری نهایی انجام می‌شود. در بررسی عیار پادتن و پروتئین‌های ترشعی که به سطح اسپرم متصل می‌شوند، روش‌های مختلف ایمونوشیمی مورد استفاده قرار گرفت.

روش الایزا/ بررسی عیار پادتن به روش الایزا با

و اتصال کامل سلول‌ها، به هر چاهک پلیت ۲ میلی‌لیتر محیط کشت فاقد اسیدهای آمینه Met و Cys اضافه می‌شود. پلیت را ۶-۸ ساعت در انکوباتور قرار داده تا در طی سنتز پروتئین، تمامی اسیدهای آمینه غیرنشاندار Met و Cys مصرف شود و سلول‌ها از منبع اسیدهای آمینه فوق محروم شوند. سپس، محیط بالا را با ۲ میلی‌لیتر محیط تازه حاوی FCS تجدید کرده، به هر چاهک ۱۰ mCi از مخلوط Cys [35] و [35]Met نشاندار اضافه می‌شود.

[REDIVUE PRO-MIX(35S) Cell Labeling Mix, Amersham, UK]

پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 قرار داده، سپس محیط کشت رویی را برداشت و با دور ۵۰۰۰ RPM برای ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ می‌شود. محلول رویی فاقد سلول و ذرات معلق برای الکتروفورز و فلوروگرافی در منهای ۲۰ درجه سانتیگراد ذخیره می‌شود. علاوه بر آن مقداری از سلولهای کف پلیت را شستشو داده، جدا کرده و آنها را در ۲۰ درجه سانتیگراد ذخیره می‌کنیم.

الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید و فلوروگرافی

SDS-PAGE تحت شرایط احیاء کننده براساس روش Laemmli روی نمونه نشاندار انجام شد (Laemmli, et al 1970). نمونه محیط کشت به نسبت ۱:۱ با بافر نمونه ۲(x) مخلوط کرده، طی ۲-۳ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد (آب در حال جوش) قرار داده می‌شود. همین مراحل برای سلول‌های نشاندار جدا شده از کف پلیت انجام می‌شود. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌های ژل قرار داده می‌شود و الکتروفورز با شدت جریان ثابت ۲۰ میلی‌آمپر در مدت ۵ ساعت تا رسیدن رنگ مارکر

مشخص می‌گردد [محللول ۱/۵ mM DAB (۳ دی‌آمینوبنزی‌دین) در بافر فسفات ۰/۰۵ M (pH=۷/۴) در حضور ۰/۰۳٪ H₂O₂]. برای افزایش شدت رنگ و تیرگی باندها، کلرید نیکل با غلظت ۵ mM به مخلوط اضافه می‌شود. برای کاهش رنگ زمینه غشاء NC، سرم بز به میزان ۱ درصد به محللول کونژوگ HRP اضافه می‌شود.

نتایج

کشت سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم

۴۲ ساعت پس از کشت، تمامی قطعات لوله که طولی کمتر از ۱ میلی‌متر دارند معکوس شده، کروی شکل می‌گردند (شکل ۱-a و ۱-b). طی روزهای بعد این قطعات سریعاً به کف پلیت متصل شده، سلول‌های اپی‌تلیال از اطراف لوله گسترش می‌یابد. هرچه طول قطعه لوله بیشتر باشد معکوس شدن آن به علت عدم خروج اسپرم‌های درون لوله مشکل‌تر بوده، مدت زمان بیشتری طول می‌کشد تا متصل گردد. قطعاتی از اپی‌دیدیم با طولی بیش از ۳ میلی‌متر کمتر متصل شده، این قطعات طی روزهای ۴-۵ کشت به هنگام تعویض محیط کشت، برداشته و حذف می‌شوند.

شکل سلول‌های اپی‌تلیال، که پس از اتصال در اطراف قطعه لوله گسترش می‌یابد کاملاً مشخص است. سلول‌هایی کشیده و دوکی شکل می‌باشند (شکل ۱-d و ۱-c) و در مواردی که تعویض محیط کشت طولانی شود یا شرایط محیط کشت در حد مطلوب نباشد، درون این سلول‌ها واکنش‌های زیادی تشکیل می‌شود. با گذشت زمان از کشت لوله‌ها، رشد سلول‌های فیروبلاست غالب می‌گردد، که شکل آنها کاملاً از سلول‌های اپی‌تلیال متمایز است. در مورد rat حداکثر مدت زمانی که سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم عملکرد طبیعی

استفاده از اسپرم‌های زنده ناحیه دم اپی‌دیدیم Rat به عنوان پادگن‌های هدف مطابق روش Bouc و همکاران انجام شد (۴). پس از تعیین تیتراژ مناسب آنتی‌سرم، برای بررسی پروتئین‌های مشترک بین سطح اسپرم و محیط کشت روی سلول‌ها (پروتئین‌های ترشحاتی) مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط غیرنشاندار به چاهک‌های پلیت افزوده، در طول شب در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه می‌شود. پس از انجام مراحل الیزا، شدت رنگ، معرف اتصال پروتئین‌های ترشحاتی سلول‌های اپی‌تلیال به سطح اسپرم می‌باشد.

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس اسپرم‌ها.

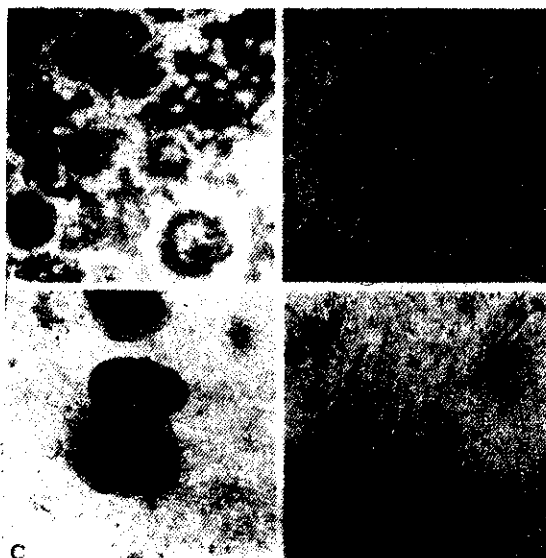
رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس روی اسپرم‌های زنده ناحیه دم اپی‌دیدیم rat مطابق Bouc و همکاران انجام شد (۴). پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از بزرگنمایی مناسب میکروسکوپ فلورسنت اسپرم‌های رنگ گرفته مشاهده شد.

روش ایمونوبلاتینگ پروتئین‌ها.

انجام SDS-PAGE روی نمونه محیط کشت غیرنشاندار، پروتئین‌های جدا شده از طریق الکتروبلاتینگ طبق روش Towbin به غشاء نیتروسلولز (NC) منتقل شد. انتقال با ولتاژ ۱۲ ولت در طول شب انجام گرفت. برای اطمینان از انتقال پروتئین‌ها، غشاء NC با پونسو S- رنگ‌آمیزی و پس از مشاهده باندها، رنگ فوق کاملاً حذف شد. جایگاه‌های فعال غشاء به وسیله ۳ درصد BSA یا TTBS (Tween Tris Buffer Salin) اشباع می‌گردد. غشاء با رقت مناسب از آنتی‌سرم خرگوش برای ۲ ساعت در حرارت محیط یا در طول شب در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه می‌شود. شستشوی غشاء با PBS (محللول ۰/۰۵٪ Tween 20 در PBS) انجام شده و غشاء با رقت ۱:۲۰۰۰ آنتی‌بادی ثانویه کونژوگ با HRP برای یک ساعت انکوبه می‌شود. در پایان غشاء را با TPBS شستشو داده، محل باندها با استفاده از سوبسترای HRP

جمع‌آوری محیط کشت را در هفته اول کشت انجام دادیم.

خود را در محیط کشت حفظ می‌کنند ۱۵ روز است. ولسی ما بیشتر مطالعات خود و



شکل (۱) کشت اپی‌تلیال اپی‌دیدیم rat

(a) قطعات کوتاه ابتدای اپی‌دیدیم در طول شب در محیط کشت معکوس شده، کره‌هایی را تشکیل می‌دهند.
 (b) یک کره حاصل از معکوس شدن لوله اپی‌دیدیم با بزرگسالی بالا که سلول‌های اپی‌تلیال در سطح کره مشخص می‌باشد.
 (c) پس از اتصال قطعات لوله به کف پلیت، سلول‌های اپی‌تلیال از اطراف آنها گسترش می‌یابند.
 (d) در پایان هفته اول کشت، تمام کف پلیت توسط سلول‌های اپی‌تلیال پوشیده می‌شود. سلول‌هایی که شکل کشیده دارند و دوکی شکل هستند.

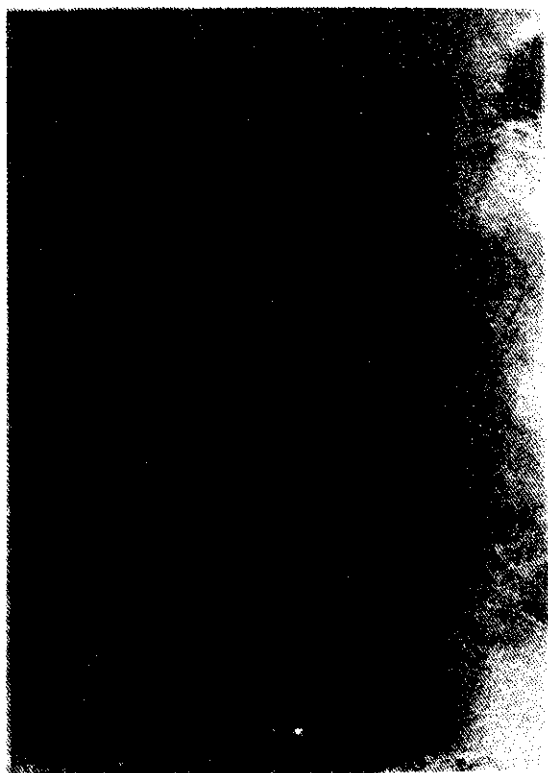
FCS پوشیده می‌شود (شکل ۲-a). امکان تغلیظ نمونه‌ها قبل از انجام الکتروفورز هم وجود ندارد، زیرا پروتئین‌های FCS هم تغلیظ شده، طی تغلیظ ممکن است برخی از پروتئین‌های ترشحی نیز از دست برود. از رنگ‌آمیزی نقره هم نمی‌توان استفاده کرد زیرا دوباره پروتئین‌های FCS مزاحم می‌باشد. استفاده از اسیدهای آمینه گوگرددار نشاندار در محیط کشت و انجام فلوروگرافی روی محیط کشت این مشکل را حل کرد (شکل ۲-b).

بررسی باندهای حاصل از سلول‌های اپی‌تلیال

بررسی فعالیت سنتزی و ترشحی اپی‌تلیال اپی‌دیدیم در محیط کشت

فعالیت سنتزی و ترشحی سلول‌ها از طریق SDS-PAGE و فلوروگرافی روی محیط کشت روی سلول‌ها انجام گرفت ولی از آنجا که برای حفظ عملکرد طبیعی سلول‌ها به محیط کشت FCS اضافه می‌شود، در رنگ‌آمیزی کوماسی بلو، باندهای حاصل از پروتئین‌های FCS شدیداً پررنگ می‌گردد ولی به علت مقدار کم پروتئین‌های ترشحی باندهای حاصل از رنگ‌نگرفته یا بسیار کم‌رنگ است که به وسیله باندهای

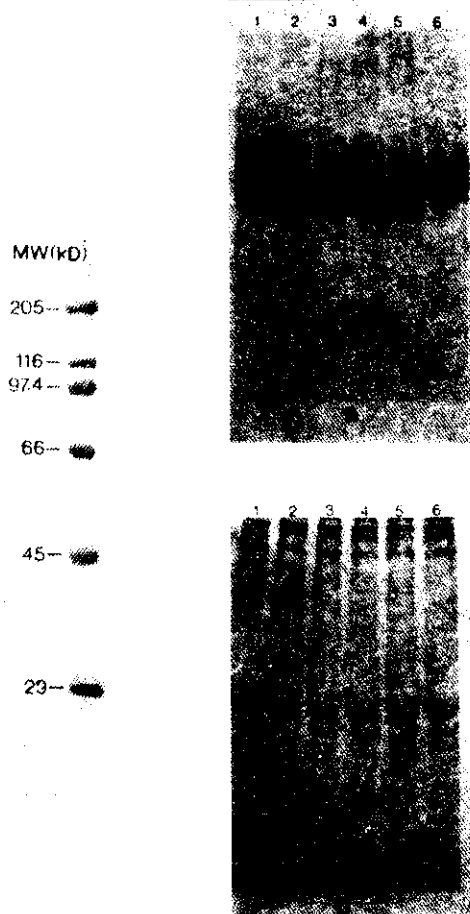
پروتئین‌های ترشچی. پروتئین‌های ترشچی در پروتئین‌های داخل سلول دیده می‌شوند و شدت رنگ آنها در سلول‌های اپی‌تلیال از پروتئین‌های ساختمانی بیشتر می‌باشد. که این امر معرف ستر فعال پروتئین‌های ترشچی در مقایسه با پروتئین‌های ساختمانی در سلول‌های اپی‌تلیال می‌باشد. فعالیت ترشچی سلول‌های اپی‌تلیال پس از اتصال به کف پلیت تا هفته دوم کشت مورد مقایسه قرار گرفته است و در فعالیت ترشچی آنها در محیط *In vitro* کاهش محسوسی مشاهده نمی‌شود. (۱ روز چهارم؛ ۲ روز ششم؛ ۳ روز هشتم؛ ۴ روز دهم؛ ۵ روز دوازدهم؛ و ۶ روز چهاردهم.



شکل ۳) SDS-PAGE و فلوروگرافی سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم

(۱) مارکرهای وزن مولکولی؛ (۲) ژل رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو R-250-۳ فیلم حاصل از فلوروگرافی همان ژل برای مشخص شدن پروتئین‌های ساخته شده توسط سلول‌های اپی‌تلیال پس از افزودن اسیدهای آمینه نشاندار.

(شکل ۳) و باندهای محیط کشت رویی سلولها نشان می‌دهد که تعداد باندها در محیط کشت رویی سلولها کمتر از خود سلولها است و این، معرف پروتئین‌های ترشچی می‌باشد. این در حالی است که درون سلول مجموع پروتئین‌های ترشچی و پروتئین‌های ساختمانی وجود داشته باشد. مقایسه باندهای حاصل از پروتئین‌های ترشچی طی روزهای مختلف تا هفته دوم از کشت تفاوت محسوسی را نشان نمی‌دهند (شکل ۲). محدوده وزن مولکولی پروتئین‌های ترشچی و پروتئین‌های حاصل از سلول‌های اپی‌تلیال از حدود ۲۰ تا ۲۰۰ کیلو دالتون می‌باشد. تمامی



شکل ۲) SDS-PAGE و فلوروگرافی محیط کشت رویی سلول‌های اپی‌تلیال

(a) رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو- R 250
(b) فیلم حاصل از فلوروگرافی همان ژل برای مشخص شدن

انجام الیزا روی سرم حاصل از خونگیری نهایی نشان داد که رقت ۱:۱۰۰۰ عیار مناسبی برای انجام آزمایشهای بعدی شامل ایمونوفلورسانس و ایمونوبلاتینگ می باشد.

انجام الیزا روی نمونه محیط کشت روی سلولها با استفاده از رقت ۱:۱۰۰۰ آنتی سرم فوق نشان داد که تعدادی از پروتئینهای موجود در این محیط کشت با پروتئینهای سطح اسپرم مشترک بوده، توسط آنتی سرم فوق شناسایی می گردد که ماهیت این پروتئینها بایستی به روش ایمونوبلاتینگ بررسی شود.

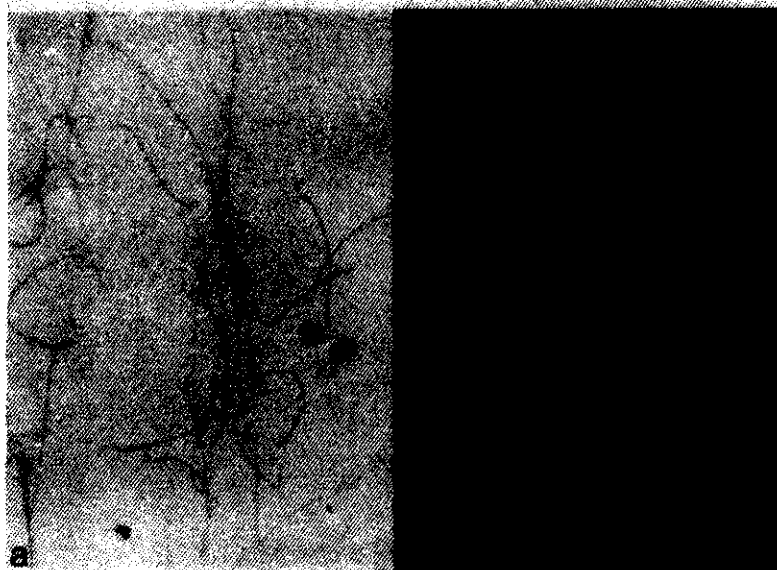
رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس اسپرمها. رنگ آمیزی فلورسانس اسپرمهای زنده Rat با تیتراژ ۱:۱۰۰۰ آنتی سرم خرگوش باعث می شود که در تمامی سطح اسپرم رنگ یکنواختی پدید آید که شدت رنگ در ناحیه خلفی سر اسپرم بیشتر از سایر نواحی سر اسپرم می باشد (شکل ۴).

می شوند و شدت رنگ آنها در سلولهای اپیتلیال از پروتئینهای ساختمانی بیشتر می باشد. که این امر معرف سنتز فعال پروتئینهای ترشحی در مقایسه با پروتئینهای ساختمانی در سلولهای اپیتلیال می باشد.

بررسی آنتی سرم علیه پروتئینهای سطح سرم

در بررسی میزان تحریک سیستم ایمنی خرگوش توسط پروتئینهای غشاء اسپرم و شناسایی پروتئینهای مشترک بین غشاء اسپرم و پروتئینهای ترشحی اپی دیدیم و در نهایت شناخت پروتئینهای ترشحی اپی دیدیم که به سطح اسپرم متصل می گردند از روشهای مختلفی استفاده شد.

روش الیزا، در بررسی سرم خرگوش قبل از تزریق و قبل از هر بوستر عیار فزاینده پادتن مشاهده شد.

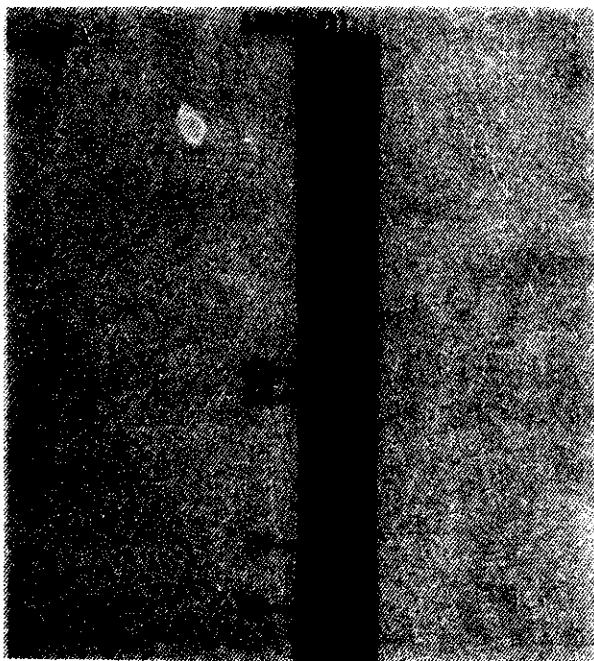


شکل ۴) رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس اسپرمهای ناحیه دمی اپی دیدیم Rat

(a) تصویر میکروسکوپ نوری (b) تصویر میکروسکوپ فلورسانس در رنگ آمیزی فلورسانس اسپرم Rat با آنتی سرم حاصل از خرگوش، ناحیه خلفی سر اسپرم و تمامی نواحی دم اسپرم شدت رنگ بیشتری را نشان می دهند.

ایمونوبلاتینگ. برای شناسایی پروتئین‌های ترشحات سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم که به سطح اسپرم متصل می‌شوند، ایمونوبلاتینگ با رقت ۱:۱۰۰۰ آنتی سرم خرگوش انجام شد. شکل ۵ مشخص کننده محل این باندهای پروتئینی می‌باشد. ۴ پروتئین با وزن مولکولی ۲۰، ۲۴، ۵۴ و ۵۸ کیلودالتون از ترشحات سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم به سطح اسپرم متصل می‌شوند و پهنای باند حاصل از پروتئین ۲۴ KD بیشتر از سایر پروتئین‌ها می‌باشد. نتایج فوق ماهیت دقیق هر یک از این پروتئین‌ها، جایگاه ترشح آنها در طول اپی‌دیدیم و ترشح احتمالی آنها توسط سایر اندامها را مشخص نمی‌کند بلکه برای این موارد احتیاج به داشتن آنتی‌سرم اختصاصی برای هر کدام می‌باشد. با مشخص شدن وزن مولکولی این پروتئین‌ها توسط این تحقیق امکان انجام موارد بالا به راحتی میسر می‌باشد.

سایر نواحی سطح اسپرم دارای رنگ یکنواختی است که معرف تولید پادتن علیه تمامی پروتئین‌های سطح اسپرم بوده، یا اینکه یک یا چند پروتئین سیستم ایمنی خرگوش را بیشتر از سایرین تحریک کرده‌اند و این پروتئین‌ها در تمام سطح اسپرم قرار دارند. بررسی و تایید مطلب بالا نیاز به جداسازی غشاء اسپرم و تخلیص پروتئین‌های آن دارد. پس از انجام SDS-PAGE و Western Blotting روی این پروتئین‌ها با استفاده از آنتی سرم بالا می‌توان پادگن‌های سطح اسپرم را شناسایی کرد که بیشترین اثر تحریک کنندگی برای سیستم ایمنی خرگوش را دارا می‌باشد. در بررسی میکروسکوپی شدت رنگ حاصل از اسپرم‌های نواحی مختلف اپی‌دیدیم (Caput, Corpus, Cauda) اختلاف چندانی مشاهده نشد. با توجه به تزریق اسپرم‌های ناحیه دمی اپی‌دیدیم برای تهیه آنتی سرم، بایستی با استفاده از روش‌های کمی، شدت رنگ اسپرم‌های هر ناحیه را بررسی کرد.



شکل ۵) Western Blotting پروتئین‌های ترشحات اپی‌تلیال اپی‌دیدیم

ایمونوبلاتینگ پروتئین‌های ترشحات سلول‌های اپی‌تلیال با استفاده از آنتی سرم خرگوش ایمن شده با اسپرم Rat چهار پروتئین با وزن مولکولی تقریبی ۲۰، ۲۴، ۵۴ و ۵۸ کیلودالتون توسط اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم ترشح شده، در سطح اسپرم نیز وجود دارند.

بحث

در بررسی پروتئین‌های ترش‌چی به روش فلوروگرافی - همان گونه که در شکل ۲-b مشاهده می‌شود- در حدود ۲۰ باند مشخص می‌باشد که تعدادی از آنها دارای مقادیر ناچیز بوده، باند بسیار کم‌رنگی را ایجاد می‌کنند؛ در صورتی که در رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو هیچ گونه باندهای ظاهر نمی‌شود. در رنگ‌آمیزی نقره نیز به علت شدت رنگ حاصل از پروتئین‌های FCS، باندهای کم‌رنگ پروتئین‌های ترش‌چی را می‌پوشاند. روی فیلم حدود ۱۵ باند دارای وضوح نسبتاً خوبی است. باندهای حاصل از نظر وزن مولکولی تقریباً مشابه تحقیقاتی است که در محیط *In vivo* روی Rat انجام شده است (۲۳ و ۲۴). ذکر این نکته ضروری است که روش‌های اتورادیوگرافی و فلوروگرافی روش‌های نیمه کمی است زیرا شدت رنگ هر باند به دو عامل بستگی دارد: یکی مدت زمان قرار گرفتن ژل در معرض فیلم حساس و دیگری محتوای اسیدهای آمینه نشان‌دار (در اینجا Met و Cys) در ساختمان اول پلی‌پپتیدها و پروتئین‌های ترش‌چی می‌باشد. ممکن است میزان ترش‌چی یک پروتئین ناچیز باشد ولی به علت محتوای زیاد اسیدهای آمینه فوق، باند بسیار پررنگ و متراکمی را ایجاد کند. چنین پروتئین‌هایی را در ترشحات سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم شناسایی کرده‌اند که تحت عنوان پروتئین‌های ترش‌چی غنی از Cys (CRISP) نامیده شده، شامل CRISPI-3 می‌باشند و غالباً توسط نواحی *corpus* و *cauda* اپی‌دیدیم ترش‌چی می‌شوند (۹).

غالب سلول‌های کف پلیت را سلول‌های اپی‌تلیال درون مجرا تشکیل می‌دهند ولی سلول‌های دیگری از جمله فیبروبلاست‌ها هم وجود دارند و با توجه به فعالیت ترش‌چی این سلول‌ها، امکان دارد برخی از باندها حاصل پروتئین‌های ترش‌چی فیبروبلاست‌ها باشد. در این کشتها هرچه از زمان کشت بگذرد درصد

سلول‌های اپی‌تلیال کاهش می‌یابد. در یک کشت خوب، ۵ روز پس از شروع کشت و اتصال سلول‌ها به کف پلیت، ۸۰ درصد سلول‌های کف پلیت را سلول‌های اپی‌تلیال تشکیل می‌دهند ولی ۳ هفته پس از کشت این درصد به ۴۰ درصد کاهش یافته، در عوض میزان سلول‌های فیبروبلاست غالب می‌گردد (۱).

امکان جداسازی و کشت تک لایه‌ای سلول‌های اپی‌تلیال به طور خالص و منفرد وجود دارد ولی مطالعات نشان می‌دهد که در غیاب سلول‌های فیبروبلاست، شکل سلول‌های اپی‌تلیال و سایر ویژگی‌های ساختمانی آنها حفظ می‌گردد ولی طی ۱-۲ روز پس از کشت- حتی در حضور آندروژن‌ها- فعالیت ترش‌چی خود را از دست می‌دهند. ولی زمانی که سلول‌های اپی‌تلیال در حضور فیبروبلاست‌ها و آندروژن‌ها کشت داده شوند فعالیت ترش‌چی طبیعی آنها حفظ می‌شود. از طرف دیگر حذف آندروژن‌ها حتی در حضور فیبروبلاست‌ها باعث اختلال در عملکرد سلول‌ها شده، سلول‌های اپی‌تلیال مرفولوژی و عملکرد خود را از دست می‌دهند (۵). چنین تصور می‌شود که فیبروبلاست‌های اپی‌دیدیم در حضور آندروژن‌ها عواملی را ترشح می‌کنند که به طریق پاراکرین روی سلول‌های اپی‌تلیال مجاور اثر گذاشته و منجر به عملکرد ترش‌چی طبیعی این سلول‌ها می‌گردند. به همین دلیل به جای استفاده از سلول‌های اپی‌تلیال منفرد، از قطعات لوله فاقد بافت همبند و چربی اضافی با طولی در حد ۱ میلی‌متر و کمتر استفاده کردیم.

هرگاه تمام این پروتئین‌ها نیز توسط سلول‌های اپی‌تلیال ترشح شود تمامی آنها به غشاء اسپرم متصل نمی‌شوند زیرا روندهای بلوغ اسپرم در اپی‌دیدیم تنها شامل اتصال یا جدا شدن یک سری پروتئین از غشاء اسپرم نمی‌باشد. بلکه در محیط داخلی مجرای اپی‌دیدیم تعداد زیادی آنزیم‌های گلیکوزیداز و

گلیکوزیل ترانسفراز وجود دارد که باعث تغییر واحدهای قندی گلیکوپروتئین‌های سطح اسپرم می‌گردند (۶). همچنین تخریب تعداد زیادی از اسپرم‌های در حال عبور، باعث آزاد شدن آنزیم‌های هیدرولیتیک اکروزومی شده که عدم مهار آنها باعث آسیب به سایر اسپرم‌ها و سلول‌های اپی‌تلیال می‌گردد. بسیاری از این آنزیم‌ها به وسیله ترشحات اپی‌تلیال اپی‌دیدیم مهار می‌شوند (۱). تخریب اسپرم‌های درون مجرا باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌گردند زیرا در اسپرم سالم نیز مقادیر زیادی از این رادیکالها تولید می‌شود که سریعاً توسط آنزیم‌های موجود در اسپرم حذف می‌شوند. سلول‌های اپی‌تلیال نیز آنزیم‌هایی را مانند GGT, GRD, SOD, GXP ترشح می‌کنند که باعث غیرفعال شدن این رادیکال‌ها می‌گردند (۱۱) و (۱۲).

روند آزاد شدن پروتئین‌های ترشحاتی در سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم، وزیکول، سمینال و پروستات به صورت مروکین (Merocrine) است یعنی مواد به صورت وزیکول‌های محدود به غشاء آزاد می‌گردند. پس هرگاه این وزیکولها به غشاء اسپرم‌های در حال عبور از اپی‌دیدیم ملحق شوند پروتئین‌های مذکور جزئی از غشاء اسپرم شده، غالباً به عنوان یک پروتئین غشائی (Integral) در سرتاسر غشاء دو لایه‌ای اسپرم ادامه می‌یابند (۱۳). چنین پروتئین‌هایی در طی مراحل آماده‌سازی و شستشوی اسپرم برای تزریق به خرگوش و نیز در طی ظرفیت‌پذیری اسپرم (Capacitation) از آن جدا نمی‌شوند. در صورتی که اگر پروتئینی از طریق نیروهای مولکولی ضعیف به سطح اسپرم متصل شده باشد طی شستشو و آماده‌سازی از آن جدا شده و در بدن خرگوش بر علیه آن آنتی‌سرمی ایجاد نخواهد گردید. در پروتئین‌های ترشحاتی ۴ باند با وزن مولکولی ۲۰، ۲۴، ۵۴ و ۵۸ کیلودالتون توسط آنتی‌سرم بر علیه آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم شناسایی

می‌گردد. با این نتیجه نمی‌توان عنوان کرد که در Rat تنها همین چهار پروتئین ترشحاتی به غشاء اسپرم متصل می‌شود. زیرا احتمال دارد تعداد بیشتری از پروتئین‌ها وارد غشاء شوند ولی وضعیت قرار گرفتن آنها به گونه‌ای باشد که شاخص‌های آنتی‌ژنی آنها از سیستم ایمنی مخفی بماند و قادر به تحریک سیستم ایمنی ماده ناشناخته نباشد. زیرا همان طور که می‌دانیم آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم هر گونه برای سیستم ایمنی آن گونه در جنس نر و ماده ناشناخته است، هرگاه این آنتی‌ژن‌ها در معرض سیستم ایمنی قرار گیرد، علیه آنها آنتی‌بادی ایجاد شده و با اتصال به غشاء اسپرم باعث جلوگیری از عملکرد طبیعی اسپرم در اتصال با تخمک و لقاح آن می‌شود؛ به گونه‌ای که حدود ۱۰ درصد از علل ناباروری زوجین ناشی از اتواسپرم آنتی‌بادی (ASA) در زن و مرد می‌باشد (۱۶). برای به حداقل رساندن شناسایی آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم توسط سلول‌های ایمنی هرگونه، یک پوشش گلیکوکالیکس با تعداد زیادی واحدهای قندی در سطح اسپرم ایجاد می‌شود که باعث پوشاندن شاخص‌های آنتی‌ژن سطح اسپرم و حداقل رساندن تحریک سیستم ایمنی در دستگاه تناسلی نر و ماده می‌شود (۱۳). یکی از گلیکوپروتئین‌های ایجاد کننده این پوشش گلیکوکالیکس، CD52 است که به میزان زیاد توسط سلول‌های اپی‌تلیال بخش انتهایی اپی‌دیدیم در Rat و انسان بیان می‌شود (۲۸). پس امکان دارد تعداد پروتئین‌های بیشتری به غشاء اسپرم متصل شوند ولی در بدن خرگوش بر علیه آنها پادتن تولید نشود؛ برای مثال یکی از گلیکوپروتئین‌های شناخته شده غشاء اسپرم Rat که توسط بخش ابتدایی اپی‌دیدیم ترشح می‌شود گلیکوپروتئین D/E است که با عنوان AGE یا DE/AGE نیز ذکر شده است. این پروتئین با وزن مولکولی ۳۲ KD به طور محکم به غشاء اسپرم متصل می‌شود و در روند لقاح اسپرم - تخمک نقش مهمی دارد. به

فوق دارای فعالیت هیالورونیدازی است و در بخش خلفی سر اسپرم قرار دارد که فعالیت آن در طول اپی‌دیدیم افزایش می‌یابد. توزیع پروتئین بر سطح اسپرم در ناحیه Caput اپی‌دیدیم صورت می‌گیرد ولی این پروتئین ابتدا در سطح اسپرماتید ظاهر می‌شود که معرف تولید آن توسط بیضه است (۷).

آنزیم فوکوزیداز نیز توسط محلول غلیظ کلرورسدیم از سطح اسپرم جدا شده، دو باند ۵۰ و ۵۴ کیلودالتون ایجاد می‌کند ولی پادتن ضد آن با اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتید واکنش نشان می‌دهد که معرف منشاء بیضه‌ای آن است (۳). با توجه به نتایج حاصل از این مرحله برای تعیین بیشتر ماهیت هر یک از این پروتئین‌ها، در ادامه بایستی چهار پروتئین بالا به طور کاملاً خالص از ترشحات اپی‌دیدیم جدا شود. از یک طرف با تولید آنتی سرم اختصاصی علیه هر کدام، محل پروتئین مذکور در سطح اسپرم و تغییراتی را که در طی بلوغ اسپرم و فرایند لقاح بر روی آنها صورت می‌گیرد و در نهایت نقش هر یک در فرایند لقاح به طور دقیق مورد ارزیابی قرار گیرد. از سوی دیگر، چون پروتئین مذکور به طور کاملاً خالص در دسترس است بایستی به بررسی ساختمان آن (توالی اسیدهای آمینه و واحدهای قندی) و نهایتاً "ژن کد کننده و سایر خواص فیزیکوشیمیایی آن پرداخت. در صورت تعیین تمامی موارد فوق می‌توان هر یک از آنها را به عنوان کاندیدی برای مهار فرایند لقاح در محیط In Vitro و In Vivo مورد بررسی قرار داد و یا بتوان از این پروتئین‌ها و یا پادتن اختصاصی آنها برای تشخیص و درمان ناشناخته ناباروری مردان استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود فرض می‌دانند که از مسئولان و کارکنان پژوهشکده رویان به ویژه حوزه معاونت پژوهشی و بخش تحقیقات که در اجرای این پروژه

طوری که افزودن پادتن علیه آن به محیط لقاح باعث کاهش معنی‌داری در میزان لقاح تخمک می‌گردد (۱۰)، ولی پروتئین مذکور در ۴ پروتئین شناسایی شده وجود ندارد.

در ارتباط با ماهیت احتمالی این پروتئین‌ها، پروتئینی با وزن مولکولی ۲۰ KD اولین بار از ناحیه دم اپی‌دیدیم خرگوش تحت عنوان DF-20 جدا شد و ژن کد کننده آن نیز مشخص گردید (۲۷). پادتن ضد آن قادر به مهار اتصال اسپرم خرگوش به تخمک فاقد زونای هامستر می‌شود (۲۸). علاوه بر این در انسان نیز یک سیالوگلیکوپروتئین با همین وزن مولکولی و با منشاء اپی‌دیدیم شناسایی شده است که به ناحیه سر و قطعه میانی اسپرم متصل می‌شود و در طی ظرفیت‌پذیری اسپرم نیز از آن جدا نمی‌گردد. این گلیکوپروتئین برای نفوذ اسپرم در تخمک فاقد زونای هامستر ضروری می‌باشد (۸). چنین پروتئینی در Rat و سایر جونندگان گزارش نشده است. در رابطه با پروتئین دارای وزن مولکولی ۲۴ KD، اولین بار پروتئین مشابهی در ناحیه Caput اپی‌دیدیم موش شناسایی شد که ترشح آن تحت کنترل آندروژن‌ها بوده، به سطح اسپرم متصل می‌گردد (۱۵). مطالعات اخیر نشان داد که این پروتئین دارای فعالیت آنزیم گلوکونیداز پراکسیداز (GPX) است و عمل آن حذف رادیکال‌های آزاد بواسطه گلوکونیداز می‌باشد (۲۵). وجود این آنزیم در اپی‌دیدیم اکثر گونه‌های جونندگان و پستانداران گزارش شده است. در مورد دو پروتئین دیگر با وزن مولکولی ۵۴ و ۵۸ کیلودالتون گزارش اختصاصی وجود ندارد. البته پروتئینی تحت عنوان PH20 یا Spaml با وزن مولکولی تقریبی ۷۴ کیلودالتون در سطح اسپرم شناسایی شده است. پادتن ضد آن با پپتیدهای دیگری با وزن مولکولی ۷۰، ۶۷ و ۵۶ کیلودالتون در اپی‌دیدیم واکنش نشان می‌دهد که معرف تغییرات ساختمانی آن در طول عبور اسپرم از اپی‌دیدیم می‌باشد. پروتئین

دانشگاهی که بخشی از اعتبارات این پروژه را تامین کردند قدردانی کنند.

صمیمانه همکاری کردند و نیز اعتبار مالی آن را تامین کردند و همچنین از معاونت پژوهشی دفتر مرکزی جهاد

مراجع

1. Akhondi MA. The in vitro culture of epididymal epithelium from the rat and human. in : The role of the human and rat epididymis during sperm maturation and storage. Ph.D. Thesis University of Sheffield, UK, 1996, p45.
2. Akhondi MA, Chapple C, Moore HDM. Prolonged survival of human spermatozoa when co-incubated with epididymal cell cultures. Hum Reprod 1997; 12: 514-22.
3. Aviles M, Abascal I, Martinz-Menarguez JA, et al. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of a novel plasma membrane-associated, neutral pH optimum L-Fucosidase from rat testis and epididymal spermatozoa. Biochem J 1996; 318: 821-831.
4. Boue F., Duquenne C, Lassalle B, et al. FLBI a human protein of epididymal origin that is involved in the sperm-oocyte recognition process. Biol Reprod 1995; 52: 267-78.
5. Carballada R, Saling PM. Regulation of mouse epididymal epithelium in vitro by androgens, temperature and fibroblasts. J Reprod Fertil 1997; 110: 171-81.
6. Castellon EA, Huidobro Cc. Androgen regulation of glycosidase secretion in epithelial cell cultures from human epididymis. Hum Reprod 1999; 14: 1522-7.
7. Deng X, Czymbek K, Martin-Deleon PA. Biochemical maturation of Spam 1 (PH-20) during epididymal transit of mouse sperm involves modification of N-linked oligosaccharides. Mol Reprod Dev 1999; 59: 196-206.
8. Focarelli R, Giuffrida A, Capparelli S, et al. Specific localization in the equatorial region of gp20, a 20 kDa sialylglycoprotein of the capacitated human spermatozoon acquired during epididymal transit which is necessary to penetrate zonal-free hamster eggs. Mol Hum Reprod 1998;4:119-25.
9. Haendler B, Habenicht UF, Schwidetzky U, et al. Differential androgen regulation of the murine genes for Cystein-Rich-Secretory-Proteins (CRISP). Eur J Biochem 1997; 250: 440-6.
10. Hall JC, Tubbs CE. Purification and characterization of protein D/E a putative sperm-binding protein involved fertilization. Prepar Biochem Biotechnol 1997; 27: 239-51.
11. Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Labus JC. The epididymis and protector of maturing spermatozoa. Report Fertil Dev 1995; 7: 731-45.
12. James PS, Wolfe CA, Ladhe S, Jones R. Lipid diffusion in the plasma membrane of ram and boar spermatozoon during maturation in the epididymis measured by fluorescence recovery after photobleaching. Mol Reprod Dev 1999;52:207-15.
13. Kirchoff C, Hale G. Cell-to-Cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein during sperm maturation. Mol Hum Reprod 1996; 2: 177-84.
14. Ladha S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. J Membrane Biol 1998; 165: 1-10.
15. Lefrancois AM, Jimenez C, Dufaure JP. Developmental expression and androgen regulation of 24 kDa secretory proteins by the murine epididymis. Int J Androl 1993; 16: 147-154.

16. Matson PL. Sperm antibodies, of formation and significance, in : Gametes-The spermatozoa. Cambridge Reviews in Human Reproduction. Crudzinskas & Yovich. 1995; pp 238-249.
17. Moore HDM. Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage. *Andrologia* 1998;30:233-9.
18. Moore HDM, Akhondi MA: In Vitro maturation of mammalian spermatozoa. *Rev Reprod* 1996; 1:54-60.
19. Myles DG, Koppel DE, Cowan AE, et al. Rearrangement of sperm surface antigens prior to fertilization. *Ann New York Acad Science* 1987;513:262-73.
20. Nolan JP, Hammerstedt RH. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J* 1997;11:670-82.
21. Rigaudiere N, Ghyselinck NB, Faure J, Dufaure JP. Regulation of the epididymal glutathione peroxidase-like protein in the mouse: dependence upon androgens and testicular factors. *Mol Cell Endocrine* 1992; 89:67-77.
22. Tramer F, Rocco F, Micali F, et al. Antioxidants systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59:753-8.
23. Turner TT, Avery EA, Sawchuk TJ. Assessment of protein synthesis and secretion by rat seminiferous and epididymal tubules in vivo. *Int J Andro* 1994; 17:205-13.
24. Turner TT, Miller DW, Avery EA. Protein synthesis and secretion by the rat caput epididymis in vivo, Influence of the luminal microenvironment. *Biol Reprod* 1995; 52:1012-19.
25. Vernet P, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR. Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to Spermatozoa GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol Reprod Dev* 1997; 47:87-98.
26. Xu WD, Mial SY, Zhang ML, et al. Expression of the BE-20 epididymal protein gene: In situ hybridization. *Arch Androl* 1997; 38:1-6.
27. Xu WD, Wang LF, Mial SY, et al. Identification of a rabbit epididymal protein gene. *Arch Androl* 1996; 37:135-41.
28. Yeung CH, Cooper TG, Nieschiag E. Human epididymal secreted protein CD52 one jaculated spermatozoa: correlations with semen characteristics and effect of its antibody. *Mol Hym Reprod* 1997; 3:1045-51.