استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال HS80 جهت شناسایی پروتئین آنتی‌ژنیک آن در سطح اسپرم انسان

ابراهیم ترک‌آبادی[۱]، دکتر محمدمهدی آخوندی[۱*]، دکتر پرویز پاکزاد[۲]، سید احمدرضا محمودی[۳]، علی‌احمد بیات[۳]، دکتر محمدرضا صادقی[۱]، دکتر محمود جدی تهرانی[۳]، مهناز حیدری[۴]

۱. گروه غدد، تولیدمثل و جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا ۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۳- مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا ۴- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی زیستی، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا

دریافت: ۸۴/۱۲/۲۰ پذیرش: ۸۵/۱۲/۷

Title: *Characterization of HS80 monoclonal antibody for detection of its antigen on the surface of human sperm*

Authors: *Torkabadi E, (MSc); Akhoondi MM, (PhD); Pakzad P, (PhD); Mahmoodi SAR, (MSc); Bayat A, (BS); Sadeghi MR, (PhD); Jeddi Tehrani M, (PhD).*

Introduction: *Since interaction between sperm and ovum results in fertilization, determination of molecular events and glycoproteins involved in this interaction may clear the cause of infertilitiy due to molecular defects or immunologic reasons. Thus we studied the properties of mentioned antigens in views of antigenic site and determination of its molecular weight and cross reactivity with other antigens by antisperm monoclonal antibody (HS80).*

Methods: *Surface sperm antigens were extracted by NaCl and Lithium diiodosalicylate (LIS) separately. At the next stage, the location of mentioned antigen was determined by indirect immunofluorescence using HS80 monoclonal antibody. Meanwhile, molecular weight of mentioned antigen was measured by immunoblotting. Finally, ELISA was used to study the cross reactivity of monoclonal antibody with human peripheral blood leukocytes, semen proteins and other mammalian sperms (from rat and mouse).*

Results: *Sub-equatorial and collar regions of all sperms had shiny fluorescence after immunofluorescence staining. Likewise, molecular weight range of the antigen was 80±4. Meanwhile, there was not any cross-reactivity among the antibody and other antigens except a 80 kD human leukocyte surface antigen.*

Conclusion: *The presence of the antigen with 80 kD on sub-equatorial region may increase the possibility of its role in vital processes of sperm such as sperm/oocyte membrane fusion and fertilization. Thus,it is recommended to study the role of this antigen in fertilization, in the presence and absence of HS80 monoclonal antibody, sperm interaction with zona pellucida and Oolema using sperm functional studies.*

Keywords: *Monoclonal antibody, human surface spermatozoa antigens.*

Hakim Research Journal 2007; 9(4): 65- 75.

* نویسنده مسؤول: تهران، بزرگراه شهید چمران، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده ابن‌سینا. تلفن: ۲۲۴۳۲۰۲۰ نمابر: ۲۲۴۳۲۰۲۱

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]

پست الکترونیک: akhondi@avesina.ac.ir

چکیده

مقدمه: *از آنجایی‌که وقوع یک لقاح موفق نتیجه برهم کنش مناسب گیرنده‌ها و لیگاندهای مستقر در غشای دو سلول اسپرم و تخمک می‌باشد، بنابراین شناسایی وقایع مولکولی و گلیکوپروتئین‌های دخیل در این برهم کنش، با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال می‌تواند اطلاعات موجود در زمینه مکانیسم‌های دخیل در لقاح را افزایش داده و از طرف دیگر علت ناباروری‌های ناشی از نقایص مولکولی و یا ناباروری‌های با علت ایمونولوژیک را روشن سازد.*

روش کار: *بعد از تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال علیه آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرماتوزوای انسانی، جهت تولید انبوه آنتی‌بادی با کشت سلول هیبریدوم در صفاق موش و ایجاد آسیت، مقادیر زیادی آنتی‌بادی تولید گردید. آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم‌های نرمال با استفاده از دو ترکیب NaCl و LIS به‌طور جداگانه استخراج شد. جهت تعیین محل آنتی‌ژن مورد نظر، آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌بادی HS80 صورت گرفت. در ضمن به‌منظور تعیین وزن مولکولی آنتی‌ژن مورد نظر، آزمون ایمونوبلاتینگ پروتئین‌های استخراجی انجام شد.*

یافته‌ها: *بعد از تزریق سلول هیبریدوم HS80 به صفاق هر موش حدود ۱۳/۵ mg آنتی‌بادی ازمجموع پنج موش به‌دست آمد. به‌دنبال رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس در ناحیه آکروزومی و در قسمت کوچکی از ناحیه گردن، فلورسانس درخشانی بین تمام جمعیت سلول‌های اسپرمی مشخص گردید. در عین حال بعد از آزمون ایمونوبلاتینگ، وزنی در محدوده ٤ ±۸۰ کیلو دالتون برای آنتی‌ژن مورد نظر (HS80) محاسبه شد.*

نتیجه‌گیری: *حضور آنتی‌ژن مزبور در ناحیه تحت استوایی سر اسپرم، احتمال داشتن نقشی در فرایندهای حیاتی اسپرم از جمله اتصال به غشای سیتوپلاسمی تخمک را در مورد این آنتی‌ژن افزایش می‌دهد و امکان دارد اتصال این آنتی‌بادی به اسپرم بتواند در شرایط فیزیولوژیک بر روند لقاح تأثیر محسوسی داشته باشد که می‌تواند این امر موضوع تحقیقات بعدی قرار گیرد.*

گل‌واژگان: *آنتی‌بادی منوکلونال، آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم انسان.*

مقدمه

سلول اسپرماتوزوای انسانی حاوی انواع مختلفی از ساختارهای مولکولی در غشای سیتوپلاسمی خود به‌صورت موزاییک‌های پروتیینی، اولیگو ساکاریدی و لیپیدی بوده که نقش بعضی از آنها در قالب گیرنده، لیگاند یا آنزیم در وقایع مسؤول لقاح شناخته شده است. این وقایع شامل مراحل بلوغ غشای اسپرم[1] تا رویارویی با تخمک، واکنش آکروزومی و الحاق دو غشای سیتوپلاسمی اسپرم و اوولما[2] می‌باشد (۴ -۱). در این ارتباط یک شیوه مطالعه نقش مولکول‌های غشای اسپرم در باروری، استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال تولید شده علیه اسپرم می‌باشد که جهت مطالعات توپوگرافی و عملکردی (با استفاده از ویژگی مهاری mAb) و نیز تخلیص پروتئین مورد نظر جهت تعیین سکانس پپتید و بررسی‌های جزئیات مولکولی کاربرد دارد. در ضمن تاکنون به‌دنبال تحقیقات انجام شده، به تأثیرهای مختلفی از آنتی‌بادی‌های منوکلونال در حضور اسپرم از جمله بررسی اثر توقف حرکت اسپرم[3] (۵)، بررسی‌های توپوگرافی و تعیین وزن آنتی‌ژن‌های مربوط در سطح اسپرم (۹ -۶)، تخلیص آنتی‌ژن‌ها با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی جذبی فعال شده با آنتی‌بادی منوکلونال(۱۰)، ردیابی حضور آنتی‌ژن‌های مشابه در سطح سایر سلول‌ها در یک گونه و گونه‌های دیگر و بررسی‌های فیلوژنی (۱۱ و ۱۲) و نیز اثرات مهاری آنتی‌بادی‌های منوکلونال بر عملکردهای فیزیولوژیک اسپرم و جلوگیری از باروری (۱۳) را می‌توان اشاره کرد. در ضمن از آنجایی‌که شناسایی آنتی‌ژن‌های دخیل در باروری و مهار این آنتی‌ژن‌ها توسط آنتی‌بادی می‌تواند راه‌گشای شیوه‌های جدیدی در امر جلوگیری از بارداری به شکل ایمونوکنتراسپتیو باشد (۱۴)، همین مسأله، سازمان جهانی

[1] Spermatozoa
[2] Oolema
[3] Immobilizing Effect

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]

بهداشت[1] را بر آن داشته است تا بخشی از تحقیقات را بر واکسن‌های تنظیم‌کننده باروری معطوف سازد. بدین‌منظور این سازمان، مطالعات سیستمیک پروتئین‌های سطحی اسپرم را جهت شناسایی مولکول‌های کاندید واکسن‌های کنتراسپتیو به‌عنوان آنتی‌ژن‌های اسپرمی پیشنهاد کرده است (۱۵ و ۱۶).

در این مسیر پروتئین‌های سطحی تخلیص شده یا نوترکیب ممکن است در مطالعات بیان‌کننده مکانیسم‌های مولکولی عملکرد اسپرم و باروری و نیز در بررسی‌های بالینی جهت شناسایی ناباروری‌های ایمونولوژیک مناسب باشد. بنابراین در این تحقیق با به‌کارگیری یکی از آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضداسپرم تولید شده در مرکز پژوهشی آنتی‌بادی منوکلونال پژوهشکده ابن‌سینا، شناسایی آنتی‌ژن اختصاصی آن هدف اصلی این تحقیق قرار گرفت. از این‌رو با شناسایی آنتی‌ژن‌های مستقر در سطح اسپرم و بررسی نقش آنها در عملکردهای فیزیولوژیک این سلول، ضمن افزایش دانش خود در زمینه مکانیسم‌های لقاح، می‌توانیم اطلاعات خود را در ردیابی نقایص مولکولی یا ایمونولوژیکی مسؤول ناباروری افزایش دهیم. در عین حال می‌توان با شناسایی آنتی‌ژن‌های مؤثر در لقاح، تحقیقاتی را در زمینه القای ناباروری، با به‌کارگیری روش‌های ایمونوکنتراسپتیو انجام داد. هر چند با استفاده از آنتی‌ژن‌های شناسایی شده و یا آنتی‌بادی‌های منوکلونال و پلی‌کلونال آنها می‌توان به تولید کیت‌های تخصصی تشخیص آزمایشگاهی در زمینه شناسایی ناباروری مبادرت ورزید.

روش کار

تهیه اسپرم: نمونه‌های مایع منی[2] مورد نیاز جهت انجام مطالعه و تحقیق بر روی سلول‌های اسپرم انسانی، از افراد مراجعه‌کننده به مرکز درمانی ابن‌سینا، ۷۲ –۴۸ ساعت بعد از آخرین انزال به‌دست آمد و آن دسته از نمونه‌هایی که از لحاظ حجم، شمارش اسپرم، مورفولوژی و درصد اسپرم‌های متحرک مطابق با استانداردهای WHO (۱۷) بودند، انتخاب شدند. بعد از نگهداری نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور $37^{\circ}C$، جهت تبدیل حالت لخته به مایع[3]، جداسازی اسپرم‌های متحرک به روش سانتریفوژ بر روی گرادیان غلظت انجام گردید (۱۸).

در این روش محلول ذخیره Pure Sperm (نیداکون سوئد[4]) با دانسیته بالا در دو غلظت ۴۰٪ و ۸۰٪ درون لوله، در دو فاز هر کدام به حجم ۲ml تهیه شد. بدین‌ترتیب که در لایه زیرین غلظت ۸۰٪ و در لایه رویی غلظت ۴۰٪ قرار گرفت. در انتها نیز ۲ml از سیمن مایع شده[5]، به‌عنوان لایه سوم به آرامی ریخته شده و مجموعه در دور ۶۰۰g به‌مدت ۲۰ –۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. بدین‌ترتیب اسپرم‌های متحرک در ته لوله جمع شد که با خارج کردن مایع رویی، رسوب اسپرم بعد از مخلوط شدن با ۲ml از محیط Ham's F10 (سیگما) دو بار شستشو داده شد.

استخراج پروتئین‌های غشای اسپرم: جهت بررسی خصوصیات آنتی‌ژن ویژه آنتی‌بادی منوکلونال تحت مطالعه، آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم انسانی با به‌کارگیری دو تکنیک ملایم استخراج، با استفاده از NaCl (مِرک، آلمان) ۱ مولار و لیتیم ۳ و ۵ دی یدو سالیسیلات[6] (سیگما) ۰/۳ مولار انجام گردید. مکانیسم این دو روش محلول نمودن[7] پروتئین‌های غشایی در بافر استخراجی بوده است.

الف) محلول نمودن پروتئین‌های غشای اسپرم با استفاده از NaCl ۱مولار: استخراج آرام[8] پروتئین‌های غشایی با استفاده از NaCl ۱مولار در بافر PBS حاوی یک مهارکننده پروتئاز به نام فنیل متیل سولفونیل فلوراید[9] (Company- PMSF SERVA) با غلظت ۲mM انجام گردید.

در این روش تعداد 5×10^{8} سلول اسپرم در هر میلی‌لیتر از بافر فوق در دمای $4^{\circ}C$ به‌مدت ۳۰ دقیقه به‌طور یکنواخت مخلوط گردید. در انتهای این مرحله با انجام سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰g به‌مدت ۳۰ دقیقه در $4^{\circ}C$، ذرات غیرمحلول از بافر فوق جدا و محلول رویی جهت انجام دیالیز تفکیک گردید. روند دیالیز با استفاده از کیسه‌هایی با قدرت جداسازی[10] مولکول‌های با وزن مولکولی بالاتر از وزن مولکولی ۱۰ کیلودالتون، علیه بافر PBS (۰/۱۵ مولار و pH= ۷/۲) در دمای $4^{\circ}C$ به‌مدت ۲۴ ساعت همراه با دو بار تعویض PBS انجام شد (۱۹). بعد از پایان دیالیز، محلول‌های پروتئینی به‌دست آمده، لیوفیلیزه گردید. غلظت پروتئینی محتوای پودر لیوفیلیزه به‌روش برادفورد در مقایسه با وزن پودر به‌کار رفته، اندازه‌گیری شد.

ب) محلول نمودن پروتئین‌های غشایی با استفاده از بافر ۰/۳ مولار LIS: جهت استخراج پروتئین‌های سطح اسپرم به این روش، به‌ازای ۲ml از رسوب اسپرم، ۱۰ml از محلول ۰/۳ مولار LIS در بافر Tris با غلظت ۱۰mM و pH= ۷/۲ اضافه و بعد از

[1] World Health Organization (WHO)
[2] Semen
[3] Liquefaction
[4] Nidacon-Sweden

[5] Liquefied
[6] Lithium 3,5 diiodosalicylate (LIS)
[7] Solubilization
[8] Gentle
[9] Phenylmethylsulfonylfluride
[10] Cut off

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]

مخلوط نمودن با رسوب اسپرم، سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C به‌طور یکنواخت مخلوط گردید. بعد از انجام روند اخیر سوسپانسیون فوق در دور ۱۰۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴°C سانتریفوژ شده و محلول رویی جهت دیالیز در بافر ۱۰ میلی‌مولار Tris با pH= ۷/۲ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C همراه با ۲ بار تعویض بافر جدا گردید (۲۰). بعد از پایان دیالیز مراحل فوق محلول‌های پروتئینی به‌دست آمده به‌طور جداگانه لیوفیلیزه شدند.

تولید انبوه آنتی‌بادی منوکلونال HS80: جهت به‌دست آوردن مقادیر بالای آنتی‌بادی منوکلونال HS80 (بعد از تولید کلون مولد)، شرایط رشد کلون تولیدکننده این آنتی‌بادی به‌واسطه تزریق به‌درون صفاق موش Balb/c فراهم گردید. بدین‌ترتیب که موش‌های Balb/c که از ۱۰ روز قبل جهت تضعیف سیستم ایمنی و فراهم آمدن رشد مناسب هیبریدوم تحت تزریق ۰/۵ml از ماده پریستان[1] (سیگما) به‌طور داخل صفاقی[2] قرار گرفته بودند، تعداد ۵×۱۰[6] سلول هیبریدوم تولیدکننده آنتی‌بادی منوکلونال HS80 به‌طور داخل صفاقی تزریق شد. در نتیجه رشد سلول‌های هیبریدوم به ازای هر موش بعد از گذشت حدود ۱۰ روز حدود ۳ml –۲ مایع آسیتی تشکیل گردید. بعد از آسپیراسیون مایع آسیتی، فیلتراسیون آن برای ذرات بزرگ‌تر از ۰/۲ میکرومترصورت گرفت (۲۱).

بررسی واکنش سریال رقت مایع آسیت به‌دست آمده با سلول‌های اسپرمی و آنتی‌ژن‌های استخراجی با استفاده از آزمون الایزا: در این مرحله جهت شناسایی واکنش اختصاصی مایع آسیت تولید شده علیه اسپرم و بررسی میزان غلظت نسبی آنتی‌بادی منوکلونال، تستی به‌روش الایزای غیرمستقیم طراحی گردید. در مرحله اول، Coating با استفاده از دو محلول آنتی‌ژن استخراج شده به دو روش NaCl و LIS با غلظت ۱۰µg/ml به‌طور جداگانه و استفاده از سوسپانسیون اسپرمی با غلظت ۱۰[6] سلول در هر چاهک به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C انجام گردید. بعد از پایان زمان اخیر تمامی چاهک‌ها ۳ بار با بافر PBS-Twean -20 شستشو شده و جهت پوشاندن فضاهای خالی کف پلیت[3] از محلول شیرخشک بدون چربی[4] ۲٪ به‌مدت یک‌ساعت در دمای ۳۷°C استفاده شد. بعد از پایان زمان اخیر و انجام ۳ بار شستشو، لایه دوم الایزا شامل سریال رقت مایع آسیت از رقت‌های ۱:۵۰۰۰، ۱:۱۰۰۰ تا ۱:۶۴۰۰۰ به میزان ۱۰۰µl به ازای هر چاهک به‌مدت یک‌ساعت در دمای ۳۷°C استفاده شد.

مرحله بعد شامل افزودن لایه سوم یعنی آنتی‌بادی Rabbit anti mouse Ig کونژوگه با HRP (تولید پژوهشکده ابن‌سینا- شماره ARC-901) به‌میزان ۱۰۰µl با رقت ۱:۴۰۰۰ بعد از انجام ۳ بار شستشو بود. در مرحله آخر بعد از انجام سه بار شستشو ۱۰۰µl از سوبسترای رنگ‌زای ارتو- فنیل دیامین (سیگما)[5] که شامل ۵mg OPD در ۶/۵ ml بافر Na_2HPO_4 ۰/۲ مولار، حاوی ۶ml اسید سیتریک ۰/۱ مولار و ۵µl H_2O_2 ۳۰٪ به‌ازای هر چاهک اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در شرایط دور از نور در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از زمان اخیر با افزودن ۵۰M اسید سولفوریک ۱ نرمال واکنش رنگ‌زایی متوقف گردید و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۹۰nm به‌دست آمد.

تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال به‌دست آمده در محتوای آسیت: در این مرحله با توجه به کلاس آنتی‌بادی منوکلونال HS80 که IgG_1 مشخص شده است، جهت تخلیص این آنتی‌بادی از محتوای مایع آسیت، از ستون افینیتی کرماتوگرافی پروتئینG (فارماسیا، آمرشام بیوساینس[6] سوئد) استفاده شد (۲۲ و ۲۳). بدین‌ترتیب که بعد از عبور مایع آسیت فیلتر شده با سرعت ۵۰ml در ساعت، مرحله شستشوی ستون جهت جداسازی آنتی‌بادی‌های باند نشده و دیگر پروتئین‌ها تحت جریان بافر PBS (۰/۱۵ مولار و pH= ۷/۲) قرار گرفت. در مرحله بعد جهت جداسازی آنتی‌بادی‌های باند شده با عبور بافرGlycine- HCl (۰/۱مولار و pH= ۲/۵) به‌میزان ۲۴ml جریان خروجی در تفکیک‌های ۲ml در هر لوله جمع‌آوری گردید. سپس تفکیک‌های دارای بیشترین جذب نوری در طول موج ۲۸۰nm به‌سرعت جهت جلوگیری از تخریب آنتی‌بادی تحت دیالیز علیه بافر PBS به‌مدت ۲۴ ساعت همراه با ۳ بار تعویض بافر در دمای ۴°C قرار گرفت (کیسه دیالیز با Cut off وزن مولکولی ۱۰ کیلودالتون انتخاب شد). بعد از انجام دیالیز، غلظت آنتی‌بادی منوکلونال با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۸۰nm اندازه‌گیری شد. آنتی‌بادی‌های به‌دست آمده ضمن تقسیم در حجم‌های کوچک در ۲۰°C- نگهداری گردید.

بررسی محل حضور آنتی‌ژن ویژه آنتی‌بادی HS80 در سطح اسپرم انسان، لکوسیت‌های خون محیطی انسان و اسپرم‌های دو گونه موش سوری[7] و رت[8]: جهت بررسی

[1] Pristane
[2] Intrapritoneal (IP)
[3] Blocking
[4] Skim milk
[5] Ortho-phenylenediamine-Sigma (OPD)
[6] Pharmacia Amersham Biosciences
[7] Mouse
[8] Rat

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]

جایگاه آنتی‌ژن HS80 در سطح اسپرم از تکنیک رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده شده است. به‌منظور تهیه اسلایدهای کوت شده با اسپرم انسانی، لکوسیت‌های خون محیطی انسان و اسپرم‌های دو گونه موش سوری و رت در مورد سلول‌های اسپرمی مطابق آنچه که در قسمت تهیه اسپرم اشاره شد و در مورد لکوسیت‌های انسانی استفاده از سلول‌های جدا شده در لایه بافی کوت خون محیطی جهت این بررسی استفاده شد. این سلول‌ها هر یک جداگانه، سه بار در بافر PBS (۰/۱۵ مولار و pH= ۷/۲) به‌صورت Centrifugation-Resuspension در دور ۷۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه شسته شد. در مرحله بعد رسوب سلول‌ها در محلول پارافورمالدهید ۱٪ در PBS در دمای اتاق فیکس شدند. جهت مهار نمودن[1] اثر آلدهیدهای آزاد سلول‌ها دو بار با محلول گلایسین ۰/۲٪ شسته شدند. بعد از شمارش، سوسپانسیون‌های سلولی به‌نحوی تنظیم شد که هر ۱۰۰µl حاوی 10^5 سلول باشد. بعد با استفاده از دستگاه سایتواسپین (Shandon Cytospin 4-Thermo) در دور ۸۰۰RPM به‌مدت ۵ دقیقه ۱۰۰µl از هر یک از سوسپانسیون‌های سلولی به‌طور جداگانه بر روی اسلاید کوت گردید. بعد از طی ۶ ساعت در شرایط آزمایشگاه اسلایدها کاملاً خشک شدند. اسلایدهای به‌دست آمده به دو صورت، یا ادامه مراحل جهت رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس با آنتی‌بادی مونوکلونال و یا نگهداری در $-20^{\circ}C$ قابل استفاده هستند (۳۴).

در مرحله بعد، جهت فراهم آمدن شرایط یونی مناسب، اسلایدها تحت بافر PBS به مدت ۲ دقیقه قرار گرفته و شسته شدند. ۵۰µl از آنتی‌بادی منوکلونال HS80 با غلظت ۱۰µg/ml بر روی محل کوتینگ اضافه شده و ۲ ساعت در دمای اتاق و در محفظه مرطوب انکوبه گردید. بعد از پایان ۲ ساعت اسلایدها به‌آرامی تحت ۳ بار شستشو با بافر PBS قرار گرفتند و بعد بر روی هر اسلاید ۵۰µl آنتی‌بادی Sheep Anti Mouse Ig کونژوگه با FITC (تولید پژوهشکده ابن‌سینا) قرار داده و به‌مدت یک‌ساعت در محفظه مرطوب و تاریک انکوبه گردید. بعد از یک‌ساعت اسلایدها تحت ۳ بار شستشو، با قرار گرفتن یک قطره محلول PBS- گلیسرول (V/V) بر روی اسلاید و استفاده از اسلایدل در زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند.

تعیین وزن مولکولی آنتی‌ژن مورد نظر با استفاده از ایمونوبلاتینگ پروتئین‌های استخراجی: ابتدا پروتئین‌های استخراجی سطح اسپرم در مقایسه با استانداردهای وزن مولکولی تحت الکتروفورز SDS-PAGE در شرایط احیا و غیراحیا با شدت جریان ۴۰ میلی‌آمپر قرار گرفتند. بعد از پایان عمل الکتروفورز ژل حاصل به آرامی بر روی کاغذ[2] انتقال داده شد و بعد از قرار دادن در کاست بلاتینگ با ولتاژ ۵۰ ولت به‌مدت ۱۲ ساعت در تانک بلاتینگ عمل الکتروترانسفر پروتئین‌ها از ژل بر روی کاغذ انجام گرفت. بعد از پایان عمل الکتروترانسفر پروتئین‌ها، کاغذ بلات شده تحت رنگ‌آمیزی پانسواس قرار گرفت. بعد از مشاهده باندهای مورد نظر، شستشو در بافر PBS انجام شد. جهت پوشاندن فضاهای خالی در سطح کاغذ، مهار کردن با استفاده از Skim milk ۵٪ صورت گرفت. بعد از انجام مهار، نوارهای بلات شده با آنتی‌بادی منوکلونال در غلظت ۱۰µl/ml به‌همراه BSA یک‌درصد به‌مدت ۱/۵ ساعت تحت تکان‌های[3] 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 ابن‌سینا- شماره ARC-901) قرار گرفتند و در زمان مجاورت با سوبسترای رنگ‌زای[4] باند پروتئینی مورد نظر مشخص گردید و در مقایسه با باندهای پروتئینی استاندارد وزن مولکولی، محدوده وزنی آنتی‌ژن مورد نظر با استفاده از محاسبه Rf و رسم منحنی استاندارد، وزن مولکولی آنتی‌ژن مورد نظر محاسبه گردید (۲۵).

(d: فاصله طی شده توسط باند پروتئینی مورد نظر D: فاصله طی شده توسط رنگ نشانه $Rf=\frac{d}{D}$)

بررسی واکنش متقاطع احتمالی آنتی‌بادی منوکلونال HS80 با آنتی‌ژن‌های دیگر با استفاده از آزمون الایزا: در این بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی منوکلونال HS80، با پروتئین‌های موجود در مایع سیمن، آنتی‌ژن‌های مستقر در سطح لکوسیت‌های خون محیطی و سلول‌های اسپرمی دو گونه موش سوری و رت مد نظر قرار گرفت. ابتدا برای جداسازی لکوسیت‌های خون محیطی در دو تفکیک گرانولوسیتی و سلول‌های تک‌هسته‌ای (مونوسیتی و لنفوسیتی)، لایه بافی‌کوت خون محیطی فرد سالم بر روی گرادیان غلظتی Optiprep (Axis-Shield PoC AS,Oslo,Norway) برده شد (۲۸ -۲۶). در این روش طی سانتریفوژ لایه بافی کوت بر روی گرادیان غلظتی با دانسیته‌های ۱/۰۷۷ g/ml در فاز رویی و ۱/۰۹۹g/ml در فاز زیرین، با سرعت ۸۰۰g به‌مدت ۲۵ دقیقه در

[1] Blocking

[2] Poly vinyliden difluoride (PVDF)

[3] Shaking

[4] diaminobenzidine- sigma(DAB)

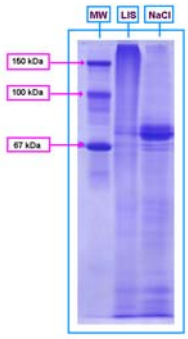
[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]

دمای $^{\circ}C$ ۲۲ –۱۸ باعث جدا شدن سلول‌های تک‌هسته‌ای بر روی دانسیته ۱/۰۷۷g/ml و سلول‌های گرانولوسیتی در بین دو فاز اخیر می‌گردد. جهت تهیه سلول‌های اسپرمی دو گونه موش سوری و رت مجرای اپیدیدیم دو گونه اخیر با RPMI شستشو شد. برای جداسازی اسپرم‌های متحرک، روش Swim up در محیط RPMI در زاویه ۴۵° در انکوباتور $^{\circ}C$ ۳۷ به‌همراه ۵٪ CO_2 و انکوباسیون ۲ ساعت انجام گردید (۲۹).

هر یک از سلول‌های لکوسیتی و سلول‌های اسپرم انسانی، موشی و رت بعد از تهیه بلافاصله شمارش شده به تعداد 10^6 سلول اسپرمی و ۵۰۰ هزار سلول لکوسیتی و ۱۰۰ µl از غلظت پروتئینی ۲۰µg/ml سیمن در چاهک‌های مربوطه جهت Coating افزوده گردید. عمل مهار کردن با استفاده از Skim milk ۲٪ در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ به‌مدت یک‌ساعت انجام گردید. سپس چاهک‌ها سه‌بار با بافر PBS (۰/۱۵ مولار و pH= ۷/۲) به‌همراه BSA ۰/۱٪ شسته شدند. لایه دوم با افزودن۱۰۰µl آنتی‌بادی منوکلونال HS80 با غلظت ۱۰ µg/ml در هر چاهک به‌مدت ۱ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ تکمیل گردید. بعد از این مرحله مطابق قبل چاهک‌ها شسته شدند. بعد از افزودن لایه سوم شامل آنتی‌بادی Rabbit anti Mouse Ig کونژوگه با HRP و انکوباسیون به‌مدت یک‌ساعت و سه‌بار شستشو، سوبسترای OPD افزوده جذب نوری چاهک‌ها بعد از افزودن محلول ۱ نرمال اسید سولفوریک جهت توقف واکنش، در طول موج ۴۹۲nm خوانده شد.

نتایج

بعد از استخراج پروتئین‌های غشا به دو روش NaCl و LIS از حدود ۶×۱۰۹ سلول اسپرمی برای هر دو روش ۱۷۶/۱mg پودر به‌روش NaCl و ۵۶/۴mg پودر به‌روش LIS بعد از عمل لیوفیلیزاسیون به‌دست آمد، که جهت انجام تست الایزا و الکتروفورز– ایمونوبلاتینگ در مراحل بعدی به‌کار گرفته شد. بعد از انجام الکتروفورز SDS-PAGE بخشی از ژل، جهت رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو استفاده گردید که باندهای پروتئینی به دو روش LIS و NaCl در مقایسه با استاندارد وزن مولکولی مشخص شد (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین‌های استخراجی سطح اسپرم به دو روش NaCl و LIS در شرایط غیر احیا و رنگ‌آمیزی کوماسی بلو

بعد از آسپیره کردن مایع آسیت تولید شده به‌دنبال تزریق داخل صفاقی، سلول‌های هیبریدوم HS80 حدود ۳ml –۲ مایع آسیت به‌ازای هر موش به‌دست آمد. در این مرحله قبل از بردن مایع آسیت بر روی ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G، واکنش سریال رقت مایع آسیت با آنتی‌ژن‌های استخراجی به دو روش LIS و NaCl و سلول‌های اسپرمی کوت شده در پلیت الایزا بررسی گردید، که نتایج جذب نوری آن در طول موج ۴۹۲nm در مقایسه با کنترل‌های منفی و مثبت مقایسه شد. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود میانگین و انحراف معیار جذب نوری‌های به‌دست آمده از رقت ۱:۵۰۰ تا حدود رقت ۱:۳۲۰۰ واکنش مثبتی در مورد آنتی‌ژن‌های کوت شده و سلول‌های اسپرمی نشان می‌دهد.

در عین حال مشاهده می‌شود که جذب نوری به‌دست آمده از واکنش مایع آسیت با آنتی‌ژن‌های تخلیص شده به روش LIS در تمام رقت‌ها بیشتر از واکنش با آنتی‌ژن‌های تخلیص شده به روش NaCl می‌باشد.

جدول ۱- مقایسه رقت‌های سریال مایع آسیت آنتی‌بادی منوکلونال HS80 با آنتی‌ژن‌های استخراجی به دو روشNaCl، LIS و سلول‌های اسپرمی به‌صورت میانگین و انحراف معیار جذب نوری‌های به‌دست آمده

	رقت سریال مایع آسیت									
	۱:۵۰۰	۱:۱۰۰۰	۱:۳۰۰۰	۱:۴۰۰۰	۱:۸۰۰۰	۱:۱۶۰۰۰	۱:۳۲۰۰۰	۱:۶۴۰۰۰	کنترل منفی	کنترل آنتی‌بادی پلی‌کلونال
آنتی‌ژن استخراج شده به روش LIS	۲/۳۶ ± ۰/۳۵	۱/۹۳۲ ± ۰/۲۹	۱/۵۳۸ ± ۰/۲۳	۱/۲۳۴ ± ۰/۱۸	۰/۹۷۲ ± ۰/۱۵	۰/۷۵۲ ± ۰/۷۵	۰/۵۳۲ ± ۰/۰۹	۰/۲۳۱± ۰/۰۵	۰/۰۸۴ ± ۰/۰۱	۱/۳۰۴ ± ۰/۱۹
آنتی‌ژن استخراج شده به روش NaCl	۲/۱۰۶ ± ۰/۳۱	۱/۷۶۲ ± ۰/۲۶	۱/۲۶۲ ± ۰/۱۹	۱/۰۲۶ ± ۰/۱۵	۰/۷۷۲ ± ۰/۱۲	۰/۶۰۴ ± ۰/۰۹	۰/۴۴۸ ± ۰/۰۷	۰/۲۰۸ ± ۰/۰۳	۰/۰۷ ± ۰/۰۱	۱/۰۶۴± ۰/۱۶
سلول کامل اسپرماتوزوای انسانی	۱/۸۷۲ ± ۰/۲۸	۱/۴۳۶ ± ۰/۲۱	۱/۰۲۶ ± ۰/۱۵	۱/۷۶۴ ± ۰/۱۱	۰/۵۷۲ ± ۰/۰۸	۰/۴۷ ± ۰/۰۷	۰/۳۷ ± ۰/۰۵	۰/۱۰۲ ± ۰/۰۱	۰/۰۶۳ ± ۰/۰۱	۱/۹۷۸ ± ۰/۳

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]

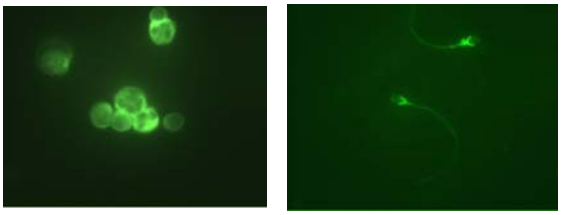
بعد از جمع‌آوری جریان خروجی حاصل از عبور بافر Gly-HCl از ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G که بر اساس دستورالعمل شرکت فارماسیا انجام گردید، جذب نوری هر یک از این فراکسیون‌ها در طول موج ۲۸۰nm خوانده شد. فراکسیون‌های دارای بیشترین جذب نوری انتخاب و جهت انجام روند دیالیز با هم مخلوط شدند. بعد از روند دیالیز غلظت نهایی آنتی‌بادی منوکلونال با استفاده از دو فاکتور، جذب نوری در طول موج ۲۸۰ nm و ضریب خاموشی[1] مولکول IgG مساوی ۱۳/۶ محاسبه شد.

بعد از محاسبه مشخص شد در هر موش به‌طور متوسط حدود ۱/۰۹۲mg آنتی‌بادی به‌ازای هر میلی‌لیتر مایع آسیت تولید شده است.

$$\text{غلظت آنتی‌بادی منوکلونال (mg/ml)} = \frac{\text{OD Total in ۲۸۰nm}}{\text{EC IgG}} \times ۱۰$$

$$\frac{۱/۳۳۸}{۱۳/۶} \times ۱۰ = ۰/۹۳۶۶ \text{ mg/ml}$$

یافته‌های حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال HS80 نشان می‌دهد موقعیت استقرار آنتی‌ژن مورد نظر در ناحیه تحت استوایی[2] سلول اسپرماتوزوا قرار دارد. در عین حال لکوسیت‌های خون محیطی انسانی نیز دارای استقرار این آنتی‌ژن در سطح خود می‌باشند (شکل ۲ و ۳).

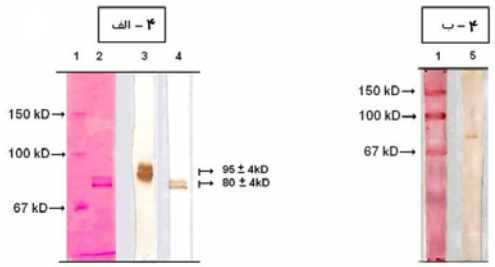


شکل ۲ شکل۳

شکل۲- نتیجه آزمون غیرمستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال HS80 وسلول اسپرماتوزای انسانی

شکل۳- نتیجه آزمون غیرمستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونالHS80 با سلول‌های لکوسیتی خون محیطی انسان(چند هسته‌ای و تک هسته‌ای) به‌صورت کاملاً مشابه بوده است.

بعد از انتقال پروتئین‌های مورد بررسی به کاغذ PVDF و رنگ‌آمیزی باند اختصاصی توسط آنتی‌بادی HS80، مشخص شد آنتی‌بادی دو باند پروتئینی را در محدوده ۴±۸۰ کیلودالتون از پروتئین‌های استخراجی سطح سلول اسپرماتوزوا شناسایی می‌کند (شکل الف-۴)، در عین حال این آنتی‌بادی تک باند پروتئینی مشابهی را از مجموعه پروتئین‌های به‌دست آمده از سطح لکوسیت‌های خون محیطی انسان، در این ناحیه وزنی مورد شناسایی قرار می‌دهد (شکل ب-۴).



شکل ۴- ایمونوبلاتینگ آنتی‌ژن‌های سطح اسپرماتوزوا وآنتی‌ژن‌های سطحی لکوسیت‌های خون محیطی انسان

۴- الف: یافته‌های حاصل از ایمونوبلاتینگ آنتی‌ژن‌های غشای اسپرمی در دو حالت غیر احیا و احیا: تصویر نوارهای کاغذ بلاتینگ در ارتباط با آنتی‌بادی منوکلونال HS80 و پروتئین‌های استخراجی به‌روش NaCl در دو حالت احیا و غیر احیا: * ۱: باندهای پروتئینی وزن‌های استاندارد ۲: پروتئین‌های غشایی رنگ‌آمیزی شده با پانسواس، ۳: باند مربوط به آنتی‌ژن به‌دست آمده به‌روش NaCl در شرایط احیا (2ME)، ۴: باند مربوط به آنتی‌ژن به‌دست آمده به‌روش NaCl در شرایط غیراحیا.

۴- ب: یافته‌های حاصل از ایمونوبلاتینگ آنتی‌ژن‌های غشای لکوسیت‌های خون محیطی انسانی تنها در حالت غیراحیا. ۵: باند مربوط حاصل واکنش آنتی‌ژن‌های به‌دست آمده از سطح لکوسیت‌های انسانی وHS80 می‌باشد. (تصویر واکنش اخیر در حالت احیا با 2ME به‌دلیل عدم واکنش آورده نشده است.)

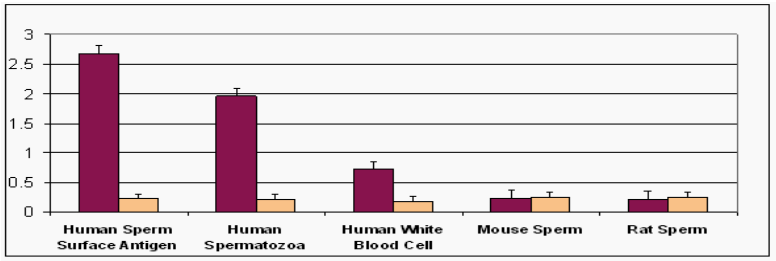
نکته مهم این‌که پروتئین‌های سطحی استخراج شده از سطح اسپرم در مجاورت ۲- مرکاپتواتانل (2-ME) ضمن احیای باندهای دی‌سولفیدی، همچنان واکنش آنتی‌بادی منوکلونال با اپی‌توپ مورد نظر حفظ شده هرچند پروتئین مورد نظر در ناحیه‌ای بالاتر در محدوده وزنی ۴±۹۵ کیلودالتون متوقف شده است (شکل الف-۴). اما این واکنش در مورد آنتی‌ژنی از سطح گلبول‌های سفید که در مجاورت 2-ME قرار داشتند اتفاق نیفتاد (به‌دلیل عدم واکنش تصاویر ایمنوبلاتینگ آن نشان داده نشده است). بنابراین اپی‌توپی از گلبول‌های سفید انسانی که در حالت غیراحیا در محدوده وزنی ۴±۸۰ کیلودالتون واکنش نشان دادند

[1] Extinction Coefficient
[2] Subequatorial

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]

در حالت احیا فاقد هرگونه واکنش مشخص با آنتی‌بادی منوکلونال تحت مطالعه بودند.

جهت بررسی واکنش متقاطع آنتی‌بادی HS80 با آنتی‌ژن‌های دیگر شامل آنتی‌ژن‌های سطح گلبول‌های سفید و آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم‌های دو گونه موش سوری و رت در مقایسه با سلول‌های اسپرماتوزوای انسانی و آنتی‌ژن‌های استخراجی از غشای سیتوپلاسمی اسپرم انسانی به‌عنوان کنترل مثبت، تستی به‌روش الایزا طراحی گردید. هدف از این تست تنها بررسی کیفی واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در مقایسه با کنترل‌های مثبت و منفی بوده است (شکل۵). یافته‌های حاصل از این آزمون نشان داد که واکنش متقاطع قابل توجهی در مورد گلبول‌های سفید خون محیطی انسانی با آنتی‌بادی HS80 دیده می‌شود. در جدول ۱ میانگین OD همراه با انحراف معیار واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌های منوکلونال HS80 و آنتی‌بادی کنترل (آنتی‌فریتین) با آنتی‌ژن‌های مذکور ذکر شده است.



	آنتی‌ژن سطحی اسپرم انسان	اسپرماتوزوای انسانی	گلبول‌های سفید خون محیطی انسانی	اسپرم موش سوری	اسپرم رت
آنتی‌بادی منوکلونالHS80	۲/۶۶۷±۰/۱۳۱	۱/۹۶۵±۰/۰۸۱	۰/۷۲۱±۰/۰۴۲	۰/۲۳۸±۰/۰۳۳	۰/۲۲۴±۰/۰۳۴
آنتی‌بادی منوکلونال کنترل (آنتی‌فریتین)	۰/۲۳۱±۰/۰۲۳	۰/۲۰۸±۰/۰۴۳	۰/۱۸۹±۰/۰۴۲	۰/۲۴۷±۰/۰۴۱	۰/۲۴۵±۰/۰۲۲

شکل۵- بررسی واکنش متقاطع احتمالی آنتی‌بادی منوکلونالHS80 با آنتی‌ژن‌های دیگر

* ستون‌های تیره واکنش آنتی‌بادی مونوکلونال HS80 و ستون‌های روشن واکنش آنتی‌بادی مونوکلونال ضد فریتین انسانی می‌باشد که به‌عنوان کنترل استفاده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

آنچه که در ارتباط با رویارویی اسپرم و تخمک و برهم‌کنش بین آنها در جهت لقاح حایز اهمیت است شناسایی این دو سلول گامت از طریق اتصال گیرنده‌ها و لیگاندهایی است که در سطح غشای اسپرم و تخمک وجود دارد. بنابراین جهت شناسایی این مکانیسم‌ها مطالعه بر روی پروتئین‌های غشای اسپرم و تخمک حایز اهمیت است. در این تحقیق، به‌منظور مطالعه بر روی پروتئین‌های سطحی غشای اسپرم انسان، یکی از آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده علیه شاخص‌های آنتی‌ژنیک سطح اسپرم انسان در پژوهشکده ابن‌سینا، به‌کار گرفته شد. چرا که آنتی‌بادی‌های منوکلونال ابزار قدرتمندی در شناسایی و بررسی نقش آنتی‌ژن‌های نامبرده در عملکردهای فیزیولوژیک اسپرم و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنها می‌باشند. البته شناسایی دقیق‌تر این پروتئین‌ها مستلزم استخراج آنها از غشا اسپرم و انجام آزمون‌های اختصاصی به‌منظور تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنها می‌باشد. در ارتباط با استخراج پروتئین‌های غشا، تا به‌حال روش‌های مختلفی توسط محققین به‌کار گرفته شده، اما آنچه که اهمیت دارد استفاده از روش‌هایی است که کمترین آسیب را به غشا و پروتئین‌های آن وارد سازد. بنابراین با استفاده از موادی از جمله ترکیبات یونی مثل NaCl، KCl و یا دترژنت‌هایی از جمله TX-100، TX-114 به‌دنبال محلول‌سازی پروتئین‌های غشا با اعمال کمترین آسیب، مولکول‌های سطحی از غشا خارج می‌شوند. در ضمن این ترکیبات بدون نیاز به استفاده از حرارت و صدمات فیزیکی (سونیکاسیون) قابل استفاده می‌باشند. بنابراین آنتی‌ژن‌هایی که بدین‌ترتیب به‌دست می‌آیند اکثراً منشا غشایی خواهند داشت (نه درون سلولی).

در این ارتباط به‌دنبال تحقیقی که توسط شِتی[1] و همکاران (۱۹) انجام شده، بعد از بیوتینیله کردن پروتئین‌های غشا و استخراج این پروتئین‌ها به‌روش محلول‌شدن[2] و انجام بلاتینگ پروتئین‌های سطحی با استفاده از «استرپتاویدین» کونژوگه نشان دادند که منشأ این پروتئین‌های محلول شده سطح غشا

[1] Shetty
[2] Solubilization

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]

است. این محققین در آزمون بلاتینگ آنتی‌ژن‌های استخراجی، با به‌کارگیری آنتی‌بادی ضدپروتئین آلفا توبولین که از پروتئین‌های درون سلولی (سایتواسکلتال) است، نشان دادند هیچ‌گونه باندی به مفهوم حضور پروتئین درون سلولی شناسایی نشده است. بنابراین در این مطالعه بر اساس روش‌های مختلفی که آنها مورد استفاده قرار داده بودند، روش NaCl ۱ مولار به‌کار رفته جهت استخراج پروتئین‌های غشا انتخاب شد.

علاوه بر روش فوق از تکنیک دیگری با استفاده از ترکیب LIS جهت استخراج پروتئین‌های سطحی اسپرم نیز استفاده گردید. LIS ترکیبی کائوتروپ بوده و به‌عنوان یک دترژنت غیریونی با غلبه بر پیوندهای هیدروفوب بین پروتئین‌های سطحی غشای اسپرم و غشای دو لایه فسفولیپیدی سبب جدا شدن این پروتئین‌ها از غشا و حل شدن در بافر استخراجی LIS می‌گردد. ویژگی مهمی که محلول شدن پروتئین‌های غشایی به‌وسیله ترکیب LIS نسبت به سایر روش‌های استخراجی دارد، حفظ خصوصیات آنتی‌ژنیک پروتئین‌های استخراجی می‌باشد. در این رابطه سومینن[1] و همکارانش (۲۰) نشان دادند که دترژنت‌های یونی از جمله دی‌اکسیکلات و سیتل پیریمیدیوم کلراید هر چند، در محلول‌سازی پروتئین‌ها بازدهی بسیار بالایی دارند، اما آنتی‌ژنیسیته پروتئین‌ها را بسیار کاهش می‌دهند. در مقابل LIS و دیگر دترژنت‌های غیریونی از جمله مؤثرترین محلول‌سازهای پروتئین در عین حفظ خصوصیات آنتی‌ژنیک آنها به‌حساب می‌آیند.

مؤید این مطلب یافته‌های حاصل از الایزای مایع آسیت بود. در الایزای اخیر مقادیر مساوی آنتی‌ژنی‌های استخراجی به‌روش LIS و NaCl در لایه اول، کوت شدند. در لایه دوم رقت سریال مایع آسیت اضافه شد و بعد از افزودن سوبسترا بیشترین ODها مربوط به چاهک‌هایی بودند که در لایه اول آنها آنتی‌ژن به‌دست آمده به روش LIS کوت شده بود. در ضمن ایمونوبلاتینگ پروتئین‌هایی که به‌روش LIS به‌دست آمدند در غلظت‌های مشابه آنتی‌بادی منوکلونال، واکنش رنگ‌زایی شدیدتری نسبت به پروتئین‌های به‌دست آمده به‌روش NaCl داشت. هر چند که این مشاهدات جهت اثبات این مطلب کافی نیست و باید آنتی‌ژن اختصاصی با استفاده از ستون افینیتی کروماتوگرافی جهت آزمون‌های تکمیلی تخلیص گردد.

در مرحله بعد جهت تولید انبوه آنتی‌بادی منوکلونال HS80، روش تولید آسیت مد نظر قرار گرفت (۳۱)، چرا که این روش نسبت به تهیه آنتی‌بادی به‌روش کشت سلول هیبریدوم در فلاسک، چندین مزیت دارد اول این‌که غلظت آنتی‌بادی تولید شده به‌روش آسیت (۱۰-۱mg/ml) بسیار بالاتر از روش کشت در فلاسک (در اغلب موارد حدود ۱۰μg/ml) خواهد بود. دوم این‌که امکان آلوده شدن که در روش فلاسک وجود دارد، در روش تهیه آسیت تقریبا به صفر می‌رسد.

یافته‌های به‌دست آمده از آزمون الایزا نشان داد که میزان برهم‌کنش آنتی‌بادی منوکلونال در غلظت مساوی با سلول‌های اسپرم انسانی و آنتی‌ژن‌های استخراج شده از سطح این سلول‌ها در مقایسه با تأثیر آنتی‌بادی مونوکلونال ضدفریتین (آنتی‌بادی کنترل) علیه یک شاخص غیره مرتبط با $p< ۰/۰۵$ دارای حداکثر جذب نوری به‌عنوان یک واکنش اختصاصی در نظر گرفته شده است. در ضمن برهم‌کنش این آنتی‌بادی بر آنتی‌ژن‌های سطحی گلبول‌های سفید انسانی در مقایسه با آنتی‌بادی کنترل نشان‌دهنده یک واکنش مثبت ولی در حد متوسط و به‌صورت یک واکنش متقاطع مشاهده می‌گردد. با مقایسه p جذب‌های نوری آنتی‌بادی‌های تحت مطالعه با سلول‌های اسپرم دو گونه موش سوری و رت و اثر آنتی‌بادی منوکلونال کنترل ($p> ۰/۰۵$) مشخص شد که آنتی‌بادی‌های منوکلونال هیچ‌گونه ویژگی علیه سلول‌های اسپرماتوزوآی این دو گونه ندارد (۲۹ و ۳۰).

در این مطالعه به‌دنبال تحلیل خصوصیات[2] آنتی‌ژن ویژه این آنتی‌بادی، در آزمون ایمونوبلاتینگ ناحیه ۸۰±۴ kD پروتئینی توسط این آنتی‌بادی شناخته می شود. در ضمن این آنتی‌بادی آنتی‌ژن خود را در شرایط احیا (مجاورت با 2- ME) شناسایی نمود و این نشان‌دهنده این موضوع است که اپی‌توپ مورد نظر خطی باشد، چرا که تغییر ساختار پروتئین طی احیای پیوندهای دی‌سولفیدی داخل زنجیره‌ای نقشی در شکل اپی‌توپ نداشته است. بنابراین برهم‌کنش آنتی‌بادی منوکلونال با توالی مورد نظر همچنان برقرار بوده است. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود برهم‌کنش آنتی‌بادی HS80 با پروتئین احیا شده اسپرمی در آزمون ایمونوبلاتینگ، در محدوده وزنی ۹۵±۴ kD صورت پذیرفته است. که در مقایسه با پروتئین احیا نشده که محدوده وزنی ۸۰±۴ kD را به خود اختصاص داده‌اند، به اندازه ۱۵ کیلودالتون بالاتر قرار گرفته است، که این سنگینی کاذب احتمالاً به‌دلیل رشته‌ای شدن و از دست رفتن حالت گلبولار پروتئین بوده است که حرکت آن را به داخل ژل در مقایسه با پروتئین احیا نشده کندتر نموده است. این یافته وجود باندهای دی‌سولفیدی متعدد را در مولکول پیشنهاد می‌نماید.

[1] Suominen

[2] Characterization

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]

همان‌طور که در آزمون ایمونوبلاتینگ با پروتئین‌های سطحی اسپرماتوزوا مشخص شده است، آنتی‌بادی HS80 دو پروتئین مجاور هم را چه در شرایط احیا و چه در شرایط غیراحیا شناسایی می‌کند. اما به‌دنبال ایمونوبلاتینگ آنتی‌ژن‌های به‌دست آمده از گلبول‌های سفید انسان مشخص شد که تنها یک پروتئین را در ناحیه ۸۰±۴ kD شناخته می‌شود. آنچه که جالب توجه است عدم واکنش این پروتئین لکوسیتی در شرایط احیا با 2-ME بوده، بنابراین تفاوت این اپی‌توپ لکوسیتی با اپی‌توپ موجود بر سطح اسپرم، وابسته بودن ساختار اپی‌توپ لکوسیتی به حضور پیوند دی‌سولفیدی می‌باشد. یافته‌های حاصل از آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم آنتی‌بادی‌های منوکلونال با سلول‌های اسپرماتوزوا و گلبول‌های سفید انسانی و اسپرماتوزوای دو گونه موش سوری و رت تأییدکننده یافته‌های حاصل از آزمون ایمونوبلاتینگ و الایزا می‌باشد. همان‌طور که در شکل‌های ۲ و ۳ مشخص است تمامی آنتی‌بادی‌های منوکلونال به‌طور مشابه و اختصاصی گردن و منطقه تحت استوایی[1] سر اسپرم انسان را شناسایی می‌کند و در مورد گلبول‌های سفید (هر دوسلول‌های تک هسته‌ای و چند هسته‌ای) فلورسانس مشخصی در ناحیه غشای سیتوپلاسمی این سلول‌ها مشاهده شد. اما در مورد سلول‌های اسپرماتوزوای دو گونه موش سوری و رت هیچ‌گونه فلورسانس درخشانی مشاهده نگردید (نتایج آن ارایه نشده است).

مزیتی که آزمون ایمونوفلورسانس به‌کار رفته در این مطالعه نسبت به سایر آزمون‌های فلورسانس داشته است اعمال کمترین تغییر در آنتی‌ژن‌های سطحی و تخریب غشایی هنگام تهیه اسلاید و ثبوت[2] می‌باشد به‌طوری که نمونه‌های تهیه شده با این روش تا مدت ۶ ماه از لحاظ مورفولوژی و قابلیت واکنش‌پذیری با آنتی‌بادی مونوکلونال تفاوتی را در مقایسه با نمونه‌های تازه نشان نداده اند (نتایج آن ارایه نشده است).

بدین‌ترتیب زمینه برای تحقیقات بعدی از جمله بررسی تأثیر این آنتی‌ژن در رویارویی اسپرم و تخمک و عملکرد لقاح در حضور آنتی‌بادی منوکلونال HS80 آماده می‌باشد. از طرف دیگر این‌که آنتی‌بادی اخیر بتواند در مورد عملکرد لقاح ایجاد اختلال نماید یا نه جای تحقیق وجود دارد، بنابراین این تأثیر باید در حضور اسپرم و تخمک بررسی شود. در این رابطه با انتخاب آنتی‌ژن‌های مسؤول در روند باروری (حرکت، ظرفیت‌یابی اسپرم، اتصال اسپرم با زونا‌پلوسیدا، واکنش آکروزومی و لقاح با اوولمای تخمک) می‌توان علاوه بر افزایش اطلاعات در مورد مکانیسم‌های مولکولی لقاح، در زمینه مطالعات فیلوژنیک و اتوژنیک، شناسایی ارتباطات تکاملی بین‌گونه‌ای فعالیت قابل توجهی را انجام داد. در عین حال می‌توان روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی جدیدی را جهت غربال ناباروری‌ها با علل نامشخص طراحی نمود. با شناسایی آنتی‌ژن‌های دخیل در باروری و تعیین توالی اسید آمینه‌ای آن در زمینه تولید واکسن‌های کنتراسپتیو از جمله پروتئین‌های نوترکیب و DNA واکسن‌ها، روش‌هایی را جهت کنترل باروری به‌کار برد (۳۲ و ۳۳).

تشکر و قدردانی

این مطالعه به‌عنوان طرح تحقیقاتی مصوب در پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا انجام شد و هزینه آن توسط مرکز ملی تحقیقات علوم پزشکی کشور به‌عنوان سازمان حمایت‌کننده این تحقیق تأمین گردید.

[1] Sub Equatorial
[2] Fixation
[3] Phylogenic
[4] Ontogenic

References

1- D'Cruz OJ. Adhesion Molecules in Human Sperm-oocyte Interaction: relevance to infertility. Frontiers in Bioscience 1996; 1:d161-176.
2- Ian A, Brewis1, Wong CH. Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. Reviews of Reproduction 1999; 4: 135–142.
3- Primakoff P, Myles DG. Penetration, adhesion and fusion in mammalian sperm-egg intraction. Science 2002; 296: 21.
4- Xu C, Rigney DR, Anderson DJ. Two-dimensional electrophoretic profile of human sperm membrane proteins. J Androl 1994; 15(6): 595-602.
5- Shigeta M, Watanabe T, Maruyama S, et al. Sperm-immobilizing monoclonal antibody to human seminal plasma antigens. Clin Exp Immunol 1980; 42(3):458-62.
6- Schmell ED, Gulyas BJ, Yuan LC, et al. 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; 4(2):91-106.
7- Schmell ED, Yuan LC, Gulyas BJ, et al. Identification of mammalian sperm surface antigens. I. Production of monoclonal anti-mouse sperm antibodies. Fertil Steril 1982; 37(2):249-57.
8- Lee CY, Huang YS, Huang CH, et al. Monoclonal antibodies to human sperm antigens. J Reprod Immunol 1982; 4(3):173-81.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]

and protein G affinity chromatography. Cytotechnology 1994; 16(2):79-87.

۲۴- زرنانی اح، موذنی س‌م، شکری ف و همکاران. بهینه‌سازی تخلیص سلول‌های دندریتیک طحال موش، به‌منظور استفاده در تخلیص و مطالعه سلول‌های دندریتیک ارگان‌های تولیدمثل. فصلنامه پزشکی باروری و ناباروری ۱۳۸۱؛ ۴ (۱): ۲۹-۱۷.

۲۵- ترک‌آبادی ا. شناسایی آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم انسان با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال و بررسی تأثیر آن بر عملکردهای حرکت، ظرفیت‌پذیری و واکنش آکروزومی اسپرم انسان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی. تهران: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی؛ ۱۳۸۲.

26- Frevert CW, Goodman RB, Kinsella MG, et al. Tissue-specific mechanisms control the retention of IL-8 in lungs and skin. J Immunol 2002; 168: 3550-3556.

27- Matute-Bello G, Frevert CW, Kajikawa O, et al. Septic shock and acute lung injury in rabbits with peritonitis: failure of the neutrophil response to localized infection. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 234-243.

28- Channon JY, Seguin RM, Kasper LH. Differential infectivity and division of Toxoplasma gondii in human peripheral blood leukocytes. Infection and Immunity 2000; 68: 4822-4826.

29- Naz KR. Invovlment of protein tyrosine phosphorylation of human sperm in capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding. Frontiers in Bioscience 1996; 1: d206-213.

30- Vanage G, Lu YA, Tam JP, et al. Infertility induced in rats by immunization with synthetic peptide segments of a sperm. Protein Biochem Biophys Res Commun 1992; 183(2):538-43.

31- Yan YC, Wang LF, KoideS S. Characterization of sperm agglutinating monoclonal antibody and purification of the human sperm antigen. Int J Fertil 1986; 31(1):77-85.

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

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

34- Wolf DP, Boldt J, Byrd W, et al. Acrosomal Status Evaluation in Human Ejaculated Sperm with Monoclonal Antibodies. Biology of Reproduction 1985; 32: 1157-1162.

9- Wolf DP, Sokoloski JE, Dandekar P, et al. Characterization of human sperm surface antigens with monoclonal antibodies. Biol Reprod 1983; 29(3):713-23.

10- 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; 49(2):449-56.

11- 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; 2(5):243-5.

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

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

14- Naz RK. Application of Sperm Antigens in Immunocontraception. Frontiers in Bioscience 1996; 1:e 87-95.

15- 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; 31:3-19.

16- Anderson DJ, Johnson PM, Alexander NJ, et al. Monoclonal antibodies to human trophoblast antigens and sperm antigens: Report of two WHO-sponsored workshops. J Reprod Immunol 1987; 10:231-257.

17- WHO. *Laboratory manual for examination of human semen-cervicus mucus interaction*. 3rd ed. Cambridge University Press; 1992.

18- Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol. 2003; 14;1(1):108.

19- Shetty J, Diekman AB, Jayes FC, et al. Differential extraction and enrichment of human sperm surface proteins in a proteome: identification of immunocontraceptive candidates. Electrophoresis 2001; 22(14):3053-66.

20- Kallajoki M, Virtanen I, Suominen J. Isolation of human spermatozoa membrane antigens binding sperm-immobilizing and sperm-agglutinating antibodies. Int J Fertil 1979; 24(1):44-8.

21- Johnstone A, Thorpe R. *Immunochemistry in Practice*. 3rd ed. USA: Blackwell Science; 1996: 2-3.

22- Bill E, Lutz U, Karlsson BM, et al. Optimization of protein G chromatography for biopharmaceutical monoclonal antibodies. J Mol Recognit 1995; 8(1-2):90-4.

23- Zamboni A, Giuntini I, Gianesello D, et al. Production of mouse monoclonal antibodies using a continuous cell culture fermenter

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2025-02-02]