

تولید آنتی بادی مونوکلونال علیه آنتی ژنهای سطح اسپرم انسان

دکتر محمد مهدی آخوندی^{1*}، ابراهیم ترک آبادی²، علی احمد بیات³، مهناز حیدری⁴، رویا قدس⁵، دکتر محمدرضا صادقی⁶، دکتر عبدالخالق دیزجی⁷،
دکتر فاضل شکری⁸، دکتر محمود جدی تهرانی⁹

چکیده

مقدمه: از آنجا که آنتی بادی های 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 نازایی جهت 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 سطحی اسپرماتوزوای انسانی، ابتدا پروتئین های سطحی غشای اسپرم انسان با تکنیک Solubilization به دست آمد. بعد محتوای پروتئینی حاصل شده به همراه ادجوانت فروند جهت تحریک کلون های اختصاصی در موش های Balb/c به کار گرفته شد. در ادامه تزییتهای یادآور و اندازه گیری تیتراژ آنتی بادی های ضد اسپرمی، موشهای دارای بالاترین تیتراژ 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 زیر کلاس آنتی بادی های به دست آمده و شناسایی واکنش متقاطع با اسپرم گونه Rat از آزمون الیزا استفاده شد.

نتایج: یافته هایشان داد تمامی آنتی بادی های 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 بادی های به دست آمده می توان 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 موزایک 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 اسپرماتوزوای Capacitation تا رویارویی با تخمک، واکنش آکروزومی و الحاق دو غشای سیتوپلاسمی اسپرم و اولوما می باشد^(۱،۲،۳) اما از آنجایی که پیدایش سلول های اسپرماتوزوای انسانی در زمان بلوغ فرد شروع می شود، بنابراین

* نویسنده مسئول: استادیار، گروه غدد تولیدمثل و جنین شناسی

پژوهشکده ابن سینا، تهران، ایران

تلفن: 021 22402011 نامبر: 021 22403641

Email: Akhondi@avesina.ac.ir

2- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی.

3- کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال

4- مربی، گروه غدد تولیدمثل و جنین شناسی، پژوهشکده ابن سینا، تهران

5- مربی، مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال، پژوهشکده ابن سینا، تهران

6- استادیار، گروه غدد تولیدمثل و جنین شناسی، پژوهشکده ابن سینا، تهران

7- استادیار، گروه بیوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

8- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت.

9- دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

این سینا، تهران

تاریخ دریافت: 83/11/21 تاریخ پذیرش: 84/3/26

پژوهشکده

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 سیمین افراد آزواسپرم (Azoospermia) تحریک ایمونولوژیک را در Rat های مورد استفاده شان انجام دادند. آنها بعد با ادغام Fusion لئوسیت 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 ایمونوژن های قوی تری هستند و شاخص‌ها در حالت طبیعی تری قرار دارند، اما کلون هایی که بوجود می‌آیند، دیگر محدود به شاخص های سطحی نبوده، بلکه علیه شاخص های درون سلولی هم امکان تحریک ایمونولوژیک وجود خواهد داشت. بنابراین در این حالت دستیابی به کلون های مورد نظر با احتمال Fusion پایین تری همراه خواهد بود. ایجاد هیبریدومای تولید کننده آنتی بادی مونوکلونال علیه آنتی ژنهای پلاسما سیمینال و اسپرماتوزوای انسانی اولین بار توسط Shigeta و همکاران (1980)، Lee و همکاران (1982) Isojima, Koyoma & Fujiwara، (1984) Isahakia & Alexander گزارش شد^(۶,۷,۸,۹). فعالیت این محققین مطابق با روش های معمول دستیابی به آنتی بادی مونوکلونال، شامل ایمونیزاسیون گزنوژنیک با سیمین 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 بفعال تحقیقات انجام شده، به تاثیرهای 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

این سلول ها به همراه آنتی ژنهای جدیدشان قادرند پاسخ سیستم ایمنی میزبان را علیه خود برانگیزند، چرا که این سلول ها مدت‌ها بعد از ایجاد تحمل به خود Selftolerance به وجود 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 و یا 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 اسپرماتوزوای یک گونه برای گونه دیگر و یا 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 پلاسما سیمینال حایز اهمیت بود. اما بدلیل دشواری روشهای فیزیوشیمی، جهت دستیابی به این هدف، تولید آنتی بادهای مونوکلونال به منظور کاربرد آنها در کروماتوگرافی ایمونوفینیتی مد نظر قرار گرفت. در سال 1979 Mettler و Skrabei با استفاده از آنتی ژنهای استخراج شده از غشای اسپرم به روش Solubilization با Haymine و Triton X-100، 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 بررسی

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 نمونه‌هایی که از لحاظ حجم، شمارش اسپرم، مورفولوژی و درصد اسپرم‌های متحرک مطابق با استانداردهای WHO (22) بودند، انتخاب شدند. بنابراین نمونه‌های انتخاب شده مربوط به افراد سالم بوده‌اند. این نمونه‌ها بعد از نگهداری به مدت 30 دقیقه در انکوباتور 37°C جهت تبدیل حالت لخته به مایع (Liquefaction)، با بافر 0/15 PBS مولار و $\text{pH}=7/2$ و سانتریفوژ با دور 1500 به مدت 10 دقیقه، سه بار شسته و رسوب سلول‌های اسپرمی جهت استخراج پروتئین‌های 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 پروتئین‌های غشایی با استفاده از NaCl 1 مولار در بافر 0/15 PBS مولار و $\text{pH}=7/2$ حاوی مهارکننده پروتئاز با نام Phenylmethylsulfonylfluoride (SERVA Company; PMSF) با غلظت 2mM انجام گردید. ابتدا تعداد 5×10^8 سلول اسپرم در هر میلی لیتر از بافر فوق به مدت 30 دقیقه در دمای 4°C به طور یکنواخت مخلوط گردید. در انتهای این مرحله با انجام سانتریفوژ با دور 10000g به مدت 30 دقیقه در 4°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°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 پروتئینی محتوای پودر لیوفیلیزه به روش برادفورد در مقایسه با وزن پودر به کار رفته، اندازه گیری شد.

و تعیین وزن آنتی‌ژنهای مربوط در سطح اسپرماتوزوا Schmeil ED (11,12) و Lee CY (8) در سال 1982 و Wolf DP در سال 1983 (13) و...، تخلیص آنتی‌ژنها با استفاده از ستونهای افینیتی کروماتوگرافی فعال شده با آنتی‌بادی مونوکلونال (Isojima) و همکاران در سال 1982 (7)، ردیابی حضور آنتی‌ژنهای مشابه در سطح سایر سلول‌ها در یک گونه و گونه‌های دیگر و بررسی‌های فیلوژنی (Prabhu G. در سال 1982 (14)، Glassy MC. در سال 1984 (15)) و نیز اثرات مهاری آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بر عملکردهای فیزیولوژیک اسپرم و جلوگیری از باروری (Saling PM. در سال 1983 (16)) برای اولین بار توسط آنها می‌توان اشاره کرد. در ضمن از آنجایی که شناسایی آنتی‌ژنهای دخیل در باروری و مهار این آنتی‌ژنها توسط آنتی‌بادی می‌تواند راه گشای شیوه‌های 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 واکسن‌های تنظیم کننده باروری معطوف سازد. بدین منظور این سازمان، مطالعات سیستمیک پروتئین‌های سطحی اسپرم را جهت شناسایی مولکول‌های کاندید واکسنهای کنتراسپتیو به عنوان آنتی‌ژنهای اسپرمی پیشنهاد کرده است (18,19).

بنابراین هدف از این مطالعه تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به عنوان ابزار قدرتمند شناسایی و تحلیل آنتی‌ژن‌های اسپرمی مد نظر قرار گرفت. استفاده از این واکنشگرهای ایمونولوژیک به عنوان یکی از مؤثرترین راه‌های مطالعه سطح اسپرم جهت ایجاد تکنیک‌های ایمونولوژیک حساس و قابل اعتماد به منظور بررسی تغییرات آنتی‌ژنیک در طی دوره‌های اسپرماتوژنز، اسپرمیوژنز، بلوغ سلول‌های اسپرمی، ظرفیت‌یابی اسپرم (Capacitation) و نیز بررسی نقش آنها در حرکت، واکنش آکروزومی و برهم کنش آن با زونا پلوسیدای تخمک حایز اهمیت می‌باشد (20,21) در ضمن با شناسایی آنتی‌ژنهای مؤثر، دستیابی به واکسنهای کنتراسپتیو محقق خواهد گشت.

3- تولید آنتی بادی مونوکلونال علیه آنتی ژن های سطحی اسپرم

انسان:

الف ایمونیزاسیون موش علیه آنتی ژن های سطحی اسپرم انسان: بعد از تهیه پروتئین های سطحی اسپرم به هر موش Balb/c ماده با سن 8-10 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 تیتراژ آنتی بادی تولید شده علیه اسپرم انسانی در سرم موش تزریق شده، به روش الایزا، موشی که بالاترین تیتراژ 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 موش های انتخاب شده، سلول های میلومایی SP 2/0 و محیط حاوی Polyethylene glycol-1500 (Sigma, USA; PEG-1500) انجام گردید. در ادامه با افزودن محیط حاوی (HAT) Hypoxanthine, Aminopterin and Thymidine (Sigma) با غلظت نهایی $(M) 1.0 \times 10^{-4}$ Hypoxanthine، $(M) 1.6 \times 10^{-5}$ Thymidine و $(M) 4.0 \times 10^{-7}$ 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 علیه آنتی ژنهای سطح اسپرم، آزمون الایزا با استفاده از مایع رویی کشت سلول های هیبریدوم انجام گردید و این تست سلول های اسپرم انسانی با تعداد 10^6 در هر چاهک و آنتی ژنهای بدست آمده با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ به میزان $50 \mu\text{l}$ در هر چاهک هر یک به طور جداگانه به عنوان لایه اول الایزا کوت شدند (1 ساعت انکوباسیون در دمای 37°C). بعد از انجام سه بار شستشو (با بافر PBS 0/15 مولار و $\text{pH} = 7/2$ حاوی

0/05 درصد Tween)، $50 \mu\text{l}$ مایع رویی کشت سلول های هیبریدوم، حاوی آنتی بادی، به عنوان لایه دوم الایزا به ازای هر چاهک به مدت 1 ساعت در دمای 37°C انکوبه گردید. در این مرحله به دنبال برهم 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 37°C) انجام شد. بعد از چهاربار شستشو، $50 \mu\text{l}$ 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 $15 \mu\text{l}$ اسید سولفوریک 20% هر چاهک و اندازه گیری جذب چاهک ها در طول موج 492 نانومتر، کلون های مثبت انتخاب گردید. در مراحل بعد سلول های ترشح کننده این آنتی بادی ها 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 آنتی بادی مونوکلونال ضد اسپرم انتخاب گردید. بدین ترتیب 5 کلون تولید کننده آنتی بادی مونوکلونال علیه اسپرم انسان به دست آمدند با پاساژهای متوالی کلون های تولید کننده، محلول رویی محیط های کشت جهت تخلیص آنتی بادی ها جمع آوری شدند.

4- بررسی کلاس و زیر کلاس آنتی بادی مونوکلونال:

در این مرحله با به کارگیری آنتی بادی های مونوکلونال ضد ایمونوگلوبولین های موشی با منشأ بزی Goat anti mice immunoglobulin، ساخت کلاس و زیر کلاس آنتی بادی های مونوکلونال کلون های تثبیت شده به روش الایزا تعیین گردید. چاهک های الایزا با استفاده از آنتی بادی های ضد IgG_1 ، IgG_2a ، IgG_2b ، IgG_3 ، $\text{IgM}[\text{Fc}]$ ، $\text{IgA}[\text{Fc}]$ (با منشأ Goat) با غلظت $2 \mu\text{g/ml}$ به میزان 50 میکرولیتر در هر چاهک به مدت 1/5 ساعت در 37°C کوت گردید. بعد از آن چاهک های الایزا با استفاده از بافر PBS 0/15 مولار و $\text{pH} = 7/2$ حاوی 0/05 درصد Tween تحت سه بار شستشو قرار گرفتند. لایه دوم الایزا شامل آنتی بادی مونوکلونال موشی موجود در

محلول رویی محیط کشت هر کلون، به منظور جداگانه به میزان $50\mu\text{l}$ به هر چاهک اضافه شد. در این $\frac{1}{100}$ تست جهت کنترل مثبت $50\mu\text{l}$ سرم طبیعی موش با رقت و جهت کنترل منفی $50\mu\text{l}$ 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 $50\mu\text{l}$ از آنتی‌بادی خرگوشی علیه ایمونوگلوبولین‌های 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 $50\mu\text{l}$ 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% $15\mu\text{l}$ به ازای هر چاهک، جذب نوری در طول موج 492 نانومتر خوانده شد.

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

در این مرحله با توجه به کلاس آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده (IgG) جهت تخلیص این آنتی‌بادی‌ها از محتوای محلول رویی کشت، از ستون افینیتی کرماتوگرافی 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 (0/1 مولار و pH=2/5) به میزان 24ml، جریان خروجی در تفکیک‌های 2ml در هر لوله جمع آوری گردید. سپس جذب نوری تفکیک‌های به دست 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

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

در این بررسی واکنش متقاطع هر یک از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال 3D_3 D₆ و 1C_3 C₁₁, 3B_{12} F₁₀, 3B_6 F₁₁, 2B_2 B₁₀ آنتی‌ژنهای موجود در مایع سیمین، سلولهای مستقر در سطح لکوسیت‌های خون محیطی و سلول‌های اسپرمی دو گونه Rat و Mouse مد نظر قرار گرفت. ابتدا برای جداسازی لکوسیت‌های خون محیطی در دو تفکیک گرانولوسیتی و سلول‌های تک هسته‌ای (لنفوسیتی 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 دانسیته‌های $1/077 \text{ g/ml}$ در فاز رویی و $1/099 \text{ g/ml}$ در فاز زیرین، با سرعت 800g به مدت 25 دقیقه در دمای 22°C - 18°C جدا شدن سلول‌های تک هسته‌ای بر روی دانسیته $1/077 \text{ g/ml}$ و سلول‌های گرانولوسیتی در بین دو فاز اخیر می‌گردد. جهت تهیه سلول‌های اسپرمی دو گونه Rat و Mice مجرای اپیدیدیم دو گونه اخیر با RPMI شستشو شد. برای جداسازی اسپرم‌های متحرک، روند Swim up در محیط RPMI در زاویه 45° در انکوباتور 37°C به همراه 5 درصد CO_2 وانکوباسیون 2 ساعت انجام گردید. هر یک از سلول‌های لکوسیتی و سلول‌های اسپرم انسانی و اسپرم‌های موشی بعد از تهیه بلافاصله شمارش شده به تعداد 10^6 سلول اسپرمی و 500 هزار سلول لکوسیتی و $100 \mu\text{l}$ از غلظت پروتئینی $20\mu\text{g/ml}$ سیمین در چاهک‌های مربوطه جهت Coating افزوده گردید. عمل blocking با استفاده از Skim milk 5 درصد در دمای 37°C به مدت 1 ساعت انجام گردید. لایه دوم با افزودن $100\mu\text{l}$ آنتی‌بادی مونوکلونال با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ در هر چاهک

8- بررسی محل حضور آنتی ژن ویژه هر یک از آنتی بادی به دست آمده، در سطح اسپرم انسان:

جهت این بررسی از تکنیک رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس غیوستقیم استفاده شده است به منظور تهیه لام های کوت شده با اسپرم انسانی، سلولهای متحرک اسپرمی مطابق آنچه که در قسمت اشاره 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 10 دقیقه 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 آلدئیدهای آزاد سلولها دو بار با محلول گلاسیین 0/2 درصد شسته شدند. بعد از شمارش، سوسپانسیون اسپرمی به نحوی تنظیم شد که هر 100µl حاوی 10⁵ سلول اسپرم باشد بعد با استفاده از دست گاه 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. 50µl از هر یک از آنتی بادی مونوکلونال 1C₃C₁₁، 1B₁₀، 2B₂، 3B₆، 3B₁₂، 3D₃، 3D₆، 3F₁₀، 3F₁₁، 10µg/ml بر روی محل کوی رنگ اضافه شده و 2 ساعت در دمای اتاق و در محفظه مرطوب و انکوبه گردید. بعد از پایان 2 ساعت لامها به آرامی تحت 3 بار شستشو با بافر PBS قرار گرفتند و بعد بر روی هر لام 50µl آنتی بادی Sheep Anti Mouse Ig کونژوگه با FITC (تولید پژوهشگاه ابن سینا) قرار داده و به مدت یک ساعت در محفظه مرطوب و تاریک انکوبه گردید. بعد از 1 ساعت لامها 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.

به مدت 1 ساعت در دمای 37 °C تکمیل گردید. بعد از افزودن لایه سوم شامل آنتی بادی Rabbit anti Mouse Ig کونژوگه با HRP، افزودن سوبسترای OPD جذب نوری چاهک هـ۱ 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 vinylidene 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 PBS انجام 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 مونوکلونال در غلظت 2/5µl/ml به همراه BSA یک درصد به مدت 1/5 ساعت تحت تکانه های Shaking یکنواخت قرار گرفت. بعد از انتهای زمان اخیر و انجام شستشو کاغذهای بلات شده تحت مجاورت آنتی بادی Rabbit anti Mouse Ig کونژوگه با HRP (تولید پژوهشگاه 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:

$$d, \text{ فاصله طی شده توسط رنگ نشانه}; D; Rf = \frac{d}{D}$$

نتایج

3- یافته‌های مربوط به تعیین ایزوتایپ آنتی‌بادی‌های به دست

آمده:

در ادامه جهت شناسایی ایزوتایپ آنتی‌بادی‌های 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 کنترل‌های مثبت و منفی، بر اساس اندازه‌گیری جذب نوری برای هر یک از انواع آنتی‌ایزوتایپ‌های بکار گرفته شده، در نمودارهای زیر برای هر کلون به دست آمد (نمودار 2).

جدول 1: یافته‌های مربوط به تعیین ایزوتایپ کلونهای تولیدکننده آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژنهای سطح اسپرم

نام کلون	غلظت آنتی‌بادی به دست آمده	غلظت آنتی‌بادی در هر میلی‌لیتر محیط کشت
2B ₂ B ₁₀ 1	14.5 mg	14.2 µg/ml
3B ₆ F ₁₁ 2	15 mg	16.3 µg/ml
3B ₁₂ F ₁₀ 3	24.8 mg	25.7 µg/ml
1C ₃ C ₁₁ 4	17.2 mg	17.2 µg/ml
3D ₃ D ₆ 5	30 mg	23.9 µg/ml

4- یافته‌های مربوط به به غلظت آنتی‌بادی‌های 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 Extinction Coefficient IgG (EC_{IgG}=13.6) غلظت کلی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال حاصل از تخلیص ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G به دست آمد. در ضمن با توجه به مشخص بودن حجم محلول رویی کشت سلول‌های هیبریدوما غلظت آنتی‌بادی مونوکلونال در واحد حجم محیط کشت تخمین زده شد (جدول 1).

5- یافته‌های 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 سلول‌های اسپرماتوزوای انسانی و آنتی‌ژن‌های استخراجی از

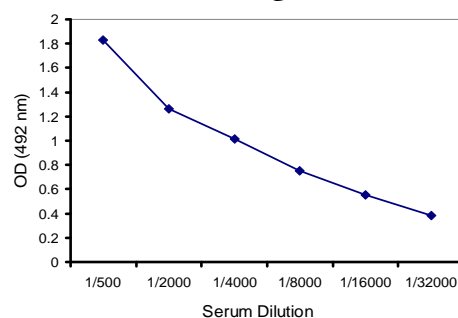
1- یافته‌های مربوط به استخراج پروتئین‌های غشای اسپرم به

روش Solubilization:

بعد از استخراج پروتئین‌های 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 4°C نگهداری شد. در ضمن بعد از اندازه‌گیری محتوای پروتئینی پودر به دست آمده، به روش برادفورد مشخص شد که به ازای 6×10^9 سلول اسپرمی، 176/1 میلی‌گرم پودر لیوفیلیزه حاصل شده که حدود 21 درصد وزن آن ترکیبات نمکی می‌باشد.

2- یافته‌های مربوط به تولید آنتی‌بادی مونوکلونال:

بدنبال پروتکل تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال، تیترا 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).



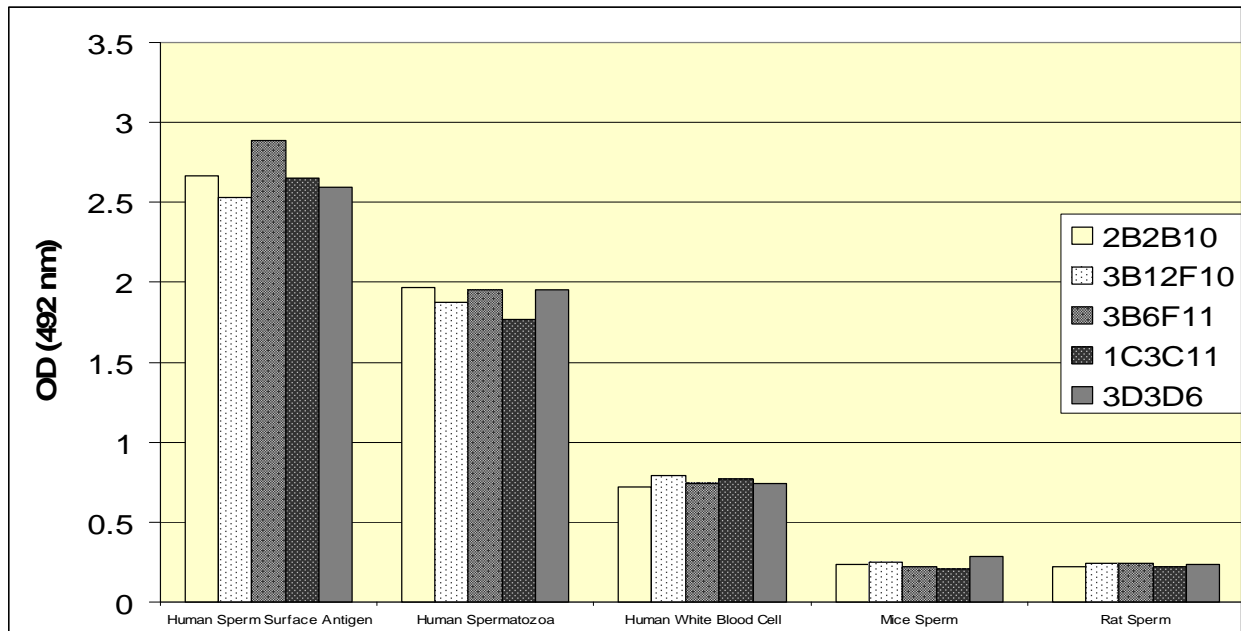
نمودار 1: بررسی تیتراسیون سرم موش ایمن شده در پاسخ به آنتی‌ژنهای سطحی اسپرم انسان

بعد از انجام فیوژن، استفاده از محیط انتخابی HAT و انجام تکنیک Limiting Dilution جهت به دست آوردن تک کلون تولیدکننده آنتی‌بادی مونوکلونال، آزمون الایزایی جهت شناسایی آنتی‌بادی تولیدشده علیه پروتئین‌های سطحی اسپرم انجام گردید و به دنبال آن مشخص شد که، 5 کلون مثبت با اسامی 3D₃ D₆، 1C₃ C₁₁، 3B₁₂ F₁₀، 3B₆ F₁₁، 2B₂ B₁₀ به دست آمده است.

غشای سیتوپلاسمی اسپرم انسانی به عنوان کنترل مثبت، تستی به روش الایزا طراحی گردید. هدف از این تست تنها بررسی کیفی (Qualitative) واکنش آنتی ژن و آنتی بادی در مقایسه با کنترل های مثبت و منفی بوده است (نمودار ۲). یافته های حاصل از این آزمون نشان داد که واکنش متقاطع قابل توجهی در مورد گلبول های سفید خون محیطی انسانی با تمام آنتی بادی های مونوکلونال دیده می شود.

جدول ۲: 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



نمودار ۲: بررسی واکنش متقاطع احتمالی آنتی بادی مونوکلونال با آنتی ژن های دیگر

جدول ۳: بررسی واکنش متقاطع هر یک از آنتی بادی های مونوکلونال با آنتی ژن های مذکور به صورت گزارش میانگین OD با SD

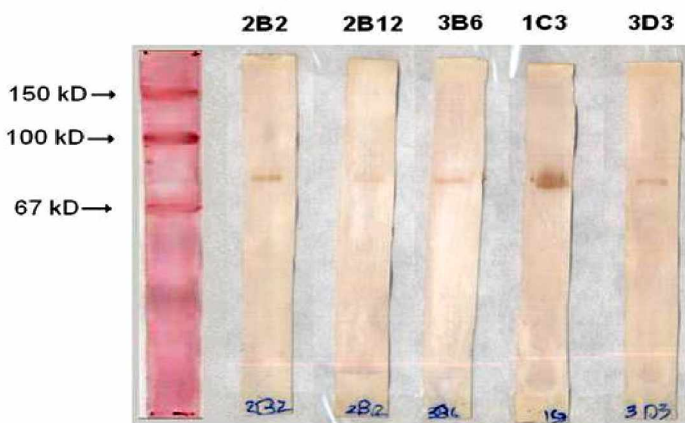
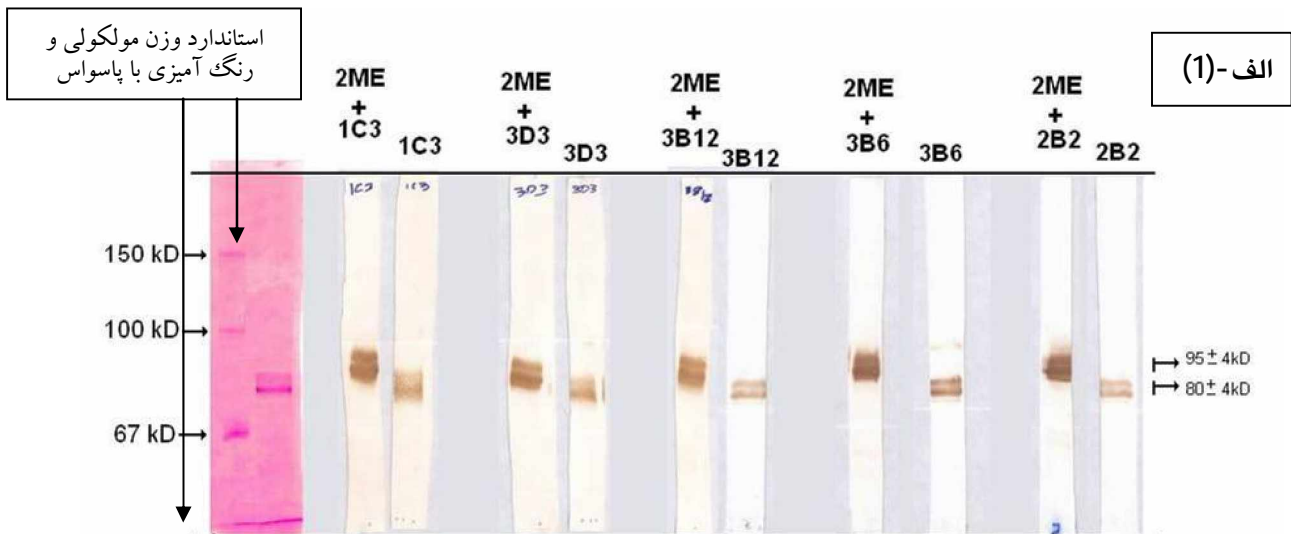
Clone	Human Sperm Surface Antigen	Human Spermatozoa	Human White Blood Cell	Mice Sperm	Rat Sperm
2B2B10	2.667±0.131	1.965±0.081	0.721±0.042	0.238±0.033	0.224±0.034
3B12F10	2.533±0.143	1.877±0.067	0.789±0.044	0.246±0.035	0.239±0.037
3B6F11	2.887±0.128	1.955±0.063	0.743±0.052	0.224±0.037	0.243±0.036
1C3C11	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

6- یافته‌های حاصل از آزمون ایمونوبلاتینگ پروتئین‌های

غشای سیتوپلاسمی اسپرماتوزوا:

بعد از انتقال پروتئین‌های مورد بررسی به کاغذ PVDF و رنگ آمیزی باند اختصاصی به طور جداگانه توسط هر یک از آنتی‌بادی‌های 3D₃D₆ و 1C₃C₁₁، 3B₆F₁₁، 3B₁₂F₁₀، 2B₂B₁₀ مشخص شد که تمام آنتی‌بادی‌های مورد مطالعه دارای ویژگی مشابهی در الگوی بلاتینگ می‌باشند. بدین ترتیب که هر آنتی‌بادی سه باند پروتئینی را در محدوده 80 ± 4 کیلو دالتون از پروتئین‌های استخراجی سطح سلول اسپرماتوزوا شناسایی می‌کند (شکل الف-1)، در عین حال تمامی این آنتی‌بادی‌ها تک باند پروتئینی مشابهی را از مجموعه پروتئین‌های به دست آمده از سطح لکوسیت‌های خون محیطی انسان، در این ناحیه وزنی مورد شناسایی قرار می‌دهد (شکل ب-1). نکته مهم اینکه پروتئین‌های سطحی استخراج شده از سطح اسپرم در

مجاورت 2- مرکاپتواتانل (2-ME) ضمن احیای باندهای اینکه پروتئین‌های سطحی استخراج شده از سطح اسپرم در مجاورت 2- مرکاپتواتانل (2-ME) ضمن احیای باندهای دی‌سولفیدی، همچنان واکنش آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با اپی‌توپ مورد نظر حفظ شده هرچند پروتئین مورد نظر در ناحیه اپی‌بالاتر در محدوده وزنی 95 ± 4 کیلو دالتون متوقف شده است (شکل الف-1). اما این واکنش در مورد آنتی‌ژنهایی از سطح گلبولهای سفید که در مجاورت 2- مرکاپتواتانل (2-ME) قرار داشتند اتفاق نیفتاد که به دلیل عدم واکنش تصاویر ایمونوبلاتینگ آن نشان داده نشده است. بنابراین اپی‌توپهایی از گلبولهای سفید انسانی که در حالت غیراحیا در محدوده وزنی 80 ± 4 کیلو دالتون واکنش نشان دادند در حالت احیا فاقد هرگونه واکنش مشخص با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تحت مطالعه بودند.



ب- (1)

شکل 1: ایمونوبلاتینگ آنتی‌ژنهای سطح اسپرماتوزوا و آنتی‌ژنهای سطحی لکوسیت‌های خون محیطی انسان

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

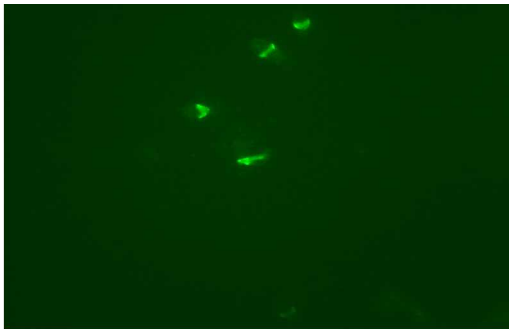
ب-1: یافته‌های حاصل از ایمونوبلاتینگ آنتی‌ژنهای غشای لکوسیت‌های خون محیطی انسانی تنها در حالت غیر احیا

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

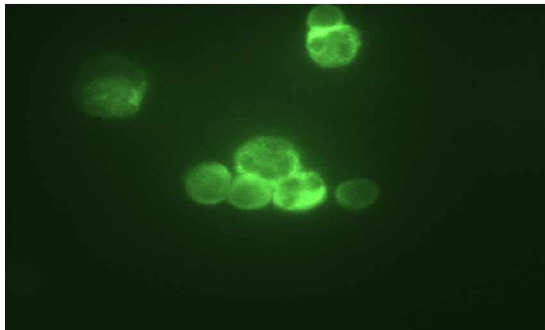
یافته های حاصل از رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم با استفاده از هر پنج آنتی بادی مونوکلونال $1C_3C_{11}$, $3B_{12} F_{10}$, $3D_3 D_6$ و $3B_6 F_{11}$, $2B_2 B_{10}$ آنتی ژن مورد نظر در مورد هر پنج آنتی بادی در ناحیه تحت استوایی Subequatorial سلول اسپرماتوزوای قرار دارد. در عین حال تمامی لکوسیت های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



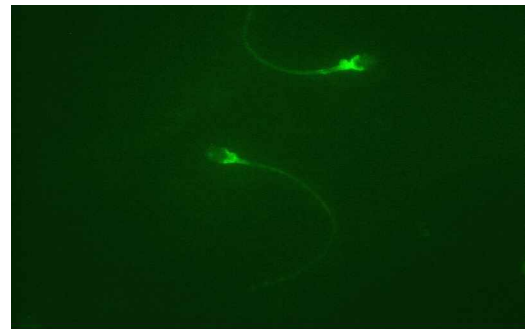
شکل 5: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال $1C_3C_{11}$ و سلول اسپرماتوزوای انسانی



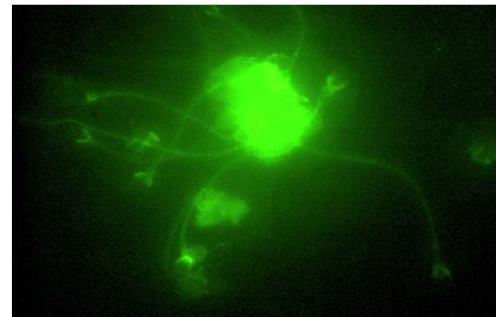
شکل 6: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال $3D_3 D_6$ و سلول اسپرماتوزوای انسانی



شکل 7: 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.



شکل 2: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال $2B_2B_{10}$ و سلول اسپرماتوزوای انسانی



شکل 3: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال $3B_6F_{11}$ و سلول اسپرماتوزوای انسانی



شکل 4: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال $3B_{12} F_{10}$ و سلول اسپرماتوزوای انسانی

بحث

Shetty و همکارانش در سال 2001⁽²³⁾، با به کارگیری $1 NaCl$ مولار استخراج پروتیین های سطحی اسپرم انسانی را با مکانیسم Solubilization انجام دادند. آنها برای نشان دادن منشأ پروتیین ها، سلولهای اسپرمی را قبل از استخراج پروتیین های سطحی، با بیوتین مجاور کردند. بدین ترتیب گلیکوپروتیین های سطحی با اتصال کووالان به بیوتین، بعد از استخراج و انجام الکتروفورز دو بعدی (Two Dimensional (2-D)، با استفاده از

اوویدین کونژوگه با HRP بر روی وسترن بلائینگ 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 NaCl مولار، 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 ژن های سطحی اسپرم می باشد در ضمن روش استخراج آنتی ژن نیز از اهمیت به سزایی برخوردار است. اگر استخراج آنتی ژن به ترتیبی باشد که شاخص های آنتی ژنیک در طی استخراج دچار تغییر و حذف گردند (از جمله روش های تهاجمی مثل جوشاندن، سونیکاسیون، تأثیر دترژنت های قوی مثل SDS) تولید آنتی‌بادی های 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 پروتیین های غشایی لود سازد حائز اهمیت می باشد. در این مطالعه با اجرای این شیوه، گلوبول با ویژگی علیه آنتی ژنهای سطحی اسپرم انسان به دست آمد. در ضمن جهت بررسی واکنش متقاطع آن با اسپرم های 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 آنتی بادی مونوکلونال اپی توپ های مشابهی را در سطح اسپرم انسان و گلوبول 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 ماکول شده که در حال انجام است.

بر طبق گزارشاتی که مبنی بر شناسایی آنتی ژن های غشای اسپرم انجام شده، شاخص های متفاوتی در فعالیت های فیزیولوژیک و عملکردی اسپرم دارای نقش مؤثر می باشند. به نحوی که اتصال این آنتی ژن ها با آنتی بادی های ویژه شان، توانسته است عملکرد خاص این پروتیینها 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 ± 2 kD 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 ناباروری ایجاد نماید^(30,31). مشابه این تحقیقات گزارشات دیگری مبنی بر شناسایی آنتی ژن های 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 و ثبوت تولید 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، پروتیین مشابهی را در آزمون ایمونوبلائینگ در ناحیه 80 ± 4 kD شناسایی می کند. در ضمن این آنتی بادیها آنتی ژنهای خود را در شرایط احیا (مجاورت با 2- مرکا پتواتانل) 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 برهم 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 پروتیین های احیا شده اسپرمی در آزمون ایمونوبلائینگ، در محدوده وزنی 95 ± 4 kD صورت پذیرفته است. که در مقایسه با پروتیین های احیا نشده که محدوده وزنی 80 ± 4 kD را به خود اختصاص داده اند، به اندازه 15 کیلو دالتون بالاتر قرار گرفته است، که این سنگینی کاذب احتمالاً به دلیل رشته ای شدن و از دست رفتن حالت گلوبولار پروتیین بوده است که حرکت آن را به داخل ژل در مقایسه با پروتیین احیا نشده کندتر نموده است.

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

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 موزوکلونال 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 موزوکلونال 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 ای آن را تعیین و به مقایسه و بررسی عملکرد این دو پروتئین از دو منشأ جداگانه پرداخت. در این رابطه با انتخاب آنتی ژن های مسئول در روند باروری (حرکت، ظرفیت یابی اسپرم، اتصال اسپرم با زوناپلوسیدا، واکنش آکروزومی و لقاح با اوولمای تخمک) می توان علاوه بر افزایش اطلاعات در مورد مکانیسم های مولکولی لقاح، در زمینه مطالعات Phylogenetic و Ontogenic، شناسایی ارتباطات تکاملی بین گونه ای فعالیت قابل توجهی را انجام داد. در عین حال می توان روش های 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 واکنش های کنتیراسپتیو از جمله پروتئین های نو ترکیب و DNA واکنش ها، روشهایی را جهت کنترل باروری به کار برد (40,41).

سپاسگزاری

بدینوسیله مراتب قدردانی و سپاس خود را از پژوهشگرده این سینا وابسته به جهاد دانشگاهی 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 نمایم.

احیا با 2-ME خاصیت آنتی ژنیک خود را برای پروتئین 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 احتمالاً این اپی توپ ساختار فضایی داشته که با آنتی بادی موزوکلونال واکنش متقاطع نشان می دهد. یافته های به دست آمده از آزمون الایزا نشان داد که میزان برهم کنش آنتی بادی موزوکلونال در غلظت مساوی با سلول های اسپرم انسانی و آنتی ژنهای استخراج شده از سطح این سلول ها در مقایسه با تأثیر آنتی بادی موزوکلونال 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 موزوکلونال کنترل مشخص شد که آنتی بادی های موزوکلونال هیچگونه ویژگی علیه سلول های اسپرماتوزوای 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 موزوکلونال با سلولهای اسپرماتوزوا و گلبولهای سفید انسانی و اسپرم اتوزوای دو گونه Rat و Mice پیدا کننده یافته های قبلی می باشد. همانطور که در شکل های 1 تا 5 مشخص است تمامی آنتی بادی های موزوکلونال 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 ای و چند هسته ای) فلورسانس مشخصی در ناحیه غشای سیتوپلاسمی این سلول ها مشاهده شد. اما در مورد سلول های اسپرماتوزوای دو گونه Rat و Mice هیچگونه فلورسانس درخشانی مشاهده نگردید. مزیتی که آزمون ایمونوفلورسانس به کار رفته در این مطالعه نسبت به سایر

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. Brewis & 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, Adhesion and fusion in mammalian sperm-egg interaction*. 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*

- 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, Giancesello 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., Skrabai 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*

- 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.