

## تولید آنتی بادی مونو کلونال علیه آنتی ژنهای سطح اسپرم انسان

دکتر محمد مهدی آخوندی<sup>۱\*</sup>، ابراهیم ترک آبادی<sup>۲</sup>، علی احمد بیات<sup>۳</sup>، مهناز حیدری<sup>۴</sup>، رویا قدس<sup>۵</sup>، دکتر محمدرضا صادقی<sup>۶</sup>، دکتر عبدالخالق دیزجی<sup>۷</sup>،  
دکتر فاضل شکوری<sup>۸</sup>، دکتر محمود جدی تهرانی<sup>۹</sup>

### چکیده

مقدمه: از آنجا که آنتی بادی های مونو کلونال 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 غشاء اسپرم مدل نظر قرار گرفته است.

روش برسی ذر این تحقیق به منظور تولید کلون های اختصاصی علیه آنتی ژنهای سطحی اسپرم اتوزوای انسانی، ابتدا پرتو میان های سطحی غشاء 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 تزریق های یادآور و اندازه گیری تیتر آنتی بادی های ضد اسپرمی، موشهای دارای بالاترین تیتر جهت استخراج سلول های لنفوцитی از طحال، انتخاب شدند. سرانجام بعد از انجام فیوژن و تکنیک Limiting Dilution، ۵ کلون مثبت به دست آمد. جهت شناسایی کلاس و زیر کلاس آنتی بادی های به دست آمده و شناسایی واکنش مقاطع با اسپرم گونه Rat از آزمون الایزا استفاده شد.

نتایج: یافته هلشن 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 مقاطع نشان داده است.

نتیجه گیری: دین 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 ژنهای را در فرایند لقاح مورد بررسی قرار داد.

### واژه های کلیدی: آنتی بادی مونو کلونال، آنتی ژنهای سطحی اسپرم انسان

#### مقدمه

سلول اسپرم اتوزوای انسانی حاوی انواع مختلفی از ساختارهای مولکولی در غشاء سیتوپلاسمی به صورت موزاییک های پروتئینی، 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 غشاء اسپرم اتوزوای Capacitation تا رویارویی با تخمک، واکنش آکروزومی و الحاق دو غشاء سیتوپلاسمی اسپرم و اولما می باشد<sup>(۱،۲،۳)</sup> اما از آنجایی که پیدایش سلول های اسپرم اتوزوای انسانی در زمان بلوغ فرد شروع می شود، بنابراین

\*- نویسنده مسؤول: استادیار، گروه غدد تولید مثل و جنین شناسی پژوهشکده ابن سینا، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱ ۲۲۴۰۳۶۴۱ نامبر: ۰۲۱ ۲۲۴۰۱۱

Email: Akhondi@avesina.ac.ir

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پوشکی.
- ۲- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شهید بهشتی، تهران
- ۳- کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات آنتی بادی مونو کلونال
- ۴- مریبی، گروه غدد تولید مثل و جنین شناسی، پژوهشکده ابن سینا، تهران
- ۵- مریبی، مرکز تحقیقات آنتی بادی مونو کلونال، پژوهشکده ابن سینا، تهران
- ۶- استادیار، گروه غدد تولید مثل و جنین شناسی، پژوهشکده ابن سینا، تهران
- ۷- استادیار، گروه بیوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژئوتک و زیست فناوری، تهران
- ۸- استاد، گروه پاتوفیولوژی، دانشکده بهداشت.
- ۹- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران
- ۱۰- استادیار، گروه ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات آنتی بادی مونو کلونال، پژوهشکده ابن سینا، تهران

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۴/۳/۲۶

روش تولید آن، فعالیت‌های تحقیقاتی در زمینه تولید کلون های ویژه علیه شاخص های سطحی سلول های اسپرماتوزوا و بررسی نقش این شاخص ها آغاز گردید . در سال 1980 Shigeta و همکارانش با استفاده از سیمن افراد آزواسپرم (Azoospermia) تحریک ایمونولوژیک را در Rat های مورد استفاده شان انجام دادند. آنها بعد با ادغام Fusion لفوسیت های اختصاصی با سلول های میلومایی P3/X63 ، توانستند 10 کلون تولید کننده آنتی بادی با ویژگی علیه سلول های اسپرماتوزوا انسانی از کلاس G IgG تولید کنند<sup>(6)</sup>. بعد از آن، محققین دیگری نیز جهت القای کلون های ویژه، از سلول های اسپرماتوزوا انسانی استفاده کردند<sup>(28,29)</sup> . 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 هیریدومای تولید کننده آنتی بادی مونوکلونال علیه آنتی ژنهای پلاسمای سینیال و اسپرماتوزوا انسانی اولین بار توسط Shigeta و همکاران (1980)<sup>(7)</sup> گزارش شد<sup>(8,9)</sup> .

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

این سلول ها به همراه آنتی ژنهای جدیدشان قادرند پاسخ سیستم ایمنی میزبان را علیه خود برا نگذیند، چرا که این سلول ها مدت‌ها بعداز ایجاد تحمل به خود Selftolerance به وجود آمده اند<sup>(4)</sup>. به دنبال بررسی های آسیب شناسی، ناشی از حضور آنتی بادی های ضد اسپرم در ترشحات واژن و سرم زنان و مایع سینیال در مردان نابارور، توجه محققین به مطالعه ساختارهای ماکرولهکولی مستقر در سطح سلول اسپرم معطوف گردید . در سال 1975 Jones WR. گزارش کرد حضور آنتی بادی های ضد اسپرم در سرم و موکوس زنان نابارور منجر به شناسایی آنتی ژنهایی می شوند که به طور فعال ویا بالقوه از طریق آگلوتیناسیون سلول های اسپرمی، قادر به ایجاد ناباروری هستند<sup>(26)</sup> . Karl Landsteiner برای اولین بار در سال 1899 و محققین دیگر بعد از وی، به ایمونوژنیک بودن اسپرماتوزای یک گونه برای گونه دیگر ویا برای همان گونه پی بردن. در ضمن Hellinge و Rumke نیز در سال 1950 برای نخستین بار حضور آنتی بادی های ضد اسپرم را بعنوان یکی از عوامل ناباروری در مردان گزارش کردند<sup>(5)</sup> . 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 یافته که ویژگی علیه اسپرماتوزوا انسانی داشت، بنابراین به مطالعه این ارتباط و آسیب شناسی آن پرداختند. در این مطالعات جهت شناسایی آنتی ژنهای القا کننده پاسخ آنتی بادی، تخلیص اجزای غشای سلول اسپرماتوزوا و پلاسمای سینیال حائز اهمیت بود . اما بدلیل دشواری روشهای فیزیوشیمی، جهت دستیابی به این هدف، تولید آذتی بادیهای مونوکلونال به منظور کاربرد آنها در کروماتوگرافی ایمونوافینیتی مدنظر قرار گرفت.

در سال 1979 Skrabai با استفاده از آنتی ژنهای استخراج شده از غشای اسپرم به روش Solubilization با Triton X-100 و Haymine ، توانستند تأثیر آنتی بادی های ضد اسپرمی موجود در ترشحات فیزیولوژیک افراد نابارور را در مورد آگلوتیناسیون و جلوگیری از حرکت سلولهای اسپرمی را خشی نمایند<sup>(27)</sup> بعد از کشف آنتی بادی های مونوکلونال و

### روش بررسی

۱- تهیه اسپرم : نمونه های سیمین مورد نیاز جهت انجام مطالعه و تحقیق بر روی سلول های اسپرم انسانی، از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان پارس و آزمایشگاه پاتوپیولوژی نور ۷۲-۴۸ ساعت بعد از آخرین ارزال به دست آمد و آن دسته از نمونه ای که از لحاظ حجم، شمارش اسپرم، مورفو لولوژی و درصد اسپرم های متحرک مطابق با استانداردهای WHO<sup>(22)</sup> بودند، انتخاب شدند . بنابراین نمونه های انتخاب شده مربوط به افراد سالم بوده اند . این نمونها بعد از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷°C چهت تبدیل حالت لخته به مایع (Liquefaction)، با بافر 0/15 PBS مولار و pH=7/2 و سانتریفیوژ با دور g ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، سه بار شسته و رسوب سلول های اسپرمی جهت استخراج پروتئین های سطحی به کار گرفته شد.

### ۲- استخراج پروتئین های غشای اسپرم به روش :Solubilization

استخراج پروتئین های غشای اسپرم به روش Solubilization یا محلول نمودن آنها در بافر استخراجی صورت گرفت . در این روش، استخراج ملایم پروتئین های غشایی با استفاده از NaCl ۱ مولار در بافر PBS (0/15 مولار و pH=7/2) حاوی مهار کننده SERVA (Phenylmethylsulfonylfluoride) با نام پروتئاز با نام (Company; PMSF) با غلظت 2mM انجام گردید . ابتدا تعداد ۱۰×۵ سلول اسپرم در هر میلی لیتر از بافر فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C به طور یکنواخت مخلوط گردید . در انتهای این مرحله با انجام سانتریفیوژ با دور g 10000 به مدت ۳۰ دقیقه در ۴°C، ذرات غیر محلول از بافر فوق جدا و محلول رویی جهت انجام دیالیز تفکیک گردید . روند دیالیز با استفاده از کیسه هایی با قدرت جدا سازی (Cut off) (پایین تراز وزن مولکولی ۱۰ کیلو دالتون، علیه بافر PBS در دمای ۰°C به مدت ۲۴ ساعت همراه با دوبار تعویض PBS انجام شد<sup>(23)</sup> . بعد از پایان دیالیز، محلول های پروتئینی به دست آمده، لیوفیلیزه گردید . غلظت پروتئینی محتوای پودر لیوفیلیزه به روش برادرور در مقایسه با وزن پودر به کار رفته، اندازه گیری شد .

و تعیین وزن آنتی ژنهای مربوط در سطح اسپرم اتوزوا Schmeil ED<sup>(11,12)</sup> و Lee CY<sup>(8)</sup> در سال ۱۹۸۲ و Wolf DP در سال ۱۹۸۳<sup>(13)</sup> و ...، تخلیص آنتی ژنهای با استفاده از ستونهای افینیتی کروماتوگرافی فعال شده با آنتی بادی مونوکلونال Isojima و همکاران در سال ۱۹۸۲<sup>(7)</sup>، ردیابی حضور آنتی ژنهای مشابه در سطح سایر سلول ها در یک گونه و گونه های دیگر و بررسی های فیلوزنی (G. Prabhu در سال ۱۹۸۲<sup>(14)</sup>، Glassy MC. در سال ۱۹۸۴<sup>(15)</sup>) و نیز اثرات مهاری آنتی بادی های مونوکلونال بر عملکردهای فیلوزنیک اسپرم و جلوگیری از باروری (Saling PM. در سال ۱۹۸۳<sup>(16)</sup>) برای اولین بار توسط آنها می توان اشاره کرد در ضمن از آنجایی که شناسایی آنتی ژنهای دخیل در باروری و مهار این آنتی ژنهای توسط آنتی بادی می تواند راه گشای شیوه های جدیدی در امر جلوگیری از بارداری به شکل ایمونوکتراسپتیو باشد<sup>(17)</sup>، همین مساله، سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization) WHO تا بخشی از تحقیقات را برابر واکسن های تنظیم کننده باروری معطوف سازه بدمین منظور این سازمان، مطالعات سیستمیک پروتئین های سطحی اسپرم را جهت شناسایی مولکول های کاندید واکسن های کتراسپتیو به عنوان آنتی ژنهای اسپرمی پیشنهاد کرده است<sup>(18,19)</sup>.

بنابراین هدف از این مطالعه تولید آنتی بادی های مونوکلونال به عنوان ابزار قدرتمند شناسایی و تحلیل آنتی ژنهای اسپرمی مدد نظر قرار گرفت استفاده از این واکنشگرهای ایمونولوژیک به عنوان یکی از مؤثر ترین راه های مطالعه سطح اسپرم جهت ایجاد تکیک های ایمونولوژیک حساس و قابل اعتماد به منظور بررسی تغییرات آنتی ژنیک در طی دوره های اسپرم اتوژن، اسپرمیوژن، بلوغ سلول های اسپرمی، ظرفیت یابی اسپرم (Capacitation) و نیز بررسی نقش آنها در حرکت، واکنش آکروزومی و بر هم کنش آن با زونا پلوسیدای تخمک حایز (20,21) در ضمن با شناسایی آنتی ژنهای مثبت، دستیابی به واکسن های کتراسپتیو محقق خواهد گشت .

۰/۰۵ درصد Tween ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  مایع رویی کشت سلول‌های هیریدوم، حاوی آنتی‌بادی، به عنوان لایه دوم الیزا به ازای هر چاهک به مدت ۱ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه گردید. در این مرحله به دنبال بر هم کنش اختصاصی آنتی‌بادی موجود در محیط کشت سلول با لایه اول الیزا صورت گرفت و افزودن لایه سوم شامل Rabbit Anti Mouse Ig-HRP (با رفت ۱ به ۳۰۰۰، ۱ ساعت انکوباسیون در دمای  $37^\circ\text{C}$ ) نجام شد. بعد از چهاربار شستشو،  $50\mu\text{l}$  سوپرستراɪ رنگزایی OPD اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردید. بعد از طی زمان اخیر و توقف واکنش رنگزایی با  $1\mu\text{l}$  ۱۵ اسید سولفوریک  $20\%$  هر چاهک و اندازه گیری جذب چاهک‌ها در طول موج  $492\text{nm}$ ، کلون‌های مثبت انتخاب گردید. در مراحل بعد سلول‌های ترشح کننده این آنتی‌بادی‌ها به روش Limiting Dilution آزمون الیزا جهت شناسایی و انتخاب کلون‌های مورد نظر، به ترتیب فوق انجام شد. بعد از انجام مراحل اخیر هیریدومهای مولد آنتی‌بادی مونوکلونال ضد اسپرم انتخاب گردید. بدین ترتیب ۵ کلون تولید کننده آنتی‌بادی مونوکلونال علیه اسپرم انسان به دست آمبلیدنبال پاساژهای متوالی کلون‌های تولید کننده، محلول رویی محیط‌های کشت جهت تخلیص آنتی‌بادی‌ها جمع‌آوری شدند.

#### ۴- بورسی کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادی مونوکلونال:

در این مرحله با به کار گیری آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد ایمونوگلوبولین‌های موشی با منشأ بزری Sigma، Goat anti mice immunoglobulin Zیرکلاس آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کلون‌های تشییت شده به روش الیزا تعیین گردید. چاهک‌های الیزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد IgA[Fc], IgM[Fc], IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>1</sub> (Goat) با غلظت  $2\mu\text{g/ml}$  به میزان  $50\text{ میکرولیتر}$  در هر چاهک به مدت  $1/5$  ساعت در  $37^\circ\text{C}$  کوت گردید. بعد از آن چاهک‌های الیزا با استفاده از بافر PBS  $0/15\text{ Molar}$  و  $\text{pH}=7/2$  حاوی  $0/05$  درصد Tween تحت سه بار شستشو قرار گرفتند. لایه دوم الیزا شامل آنتی‌بادی مونوکلونال موشی موجود در

۳- تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنتی‌زن‌های سطحی اسپرم انسان:

الف! یمونیزاسیون موش علیه آنتی‌زن‌های سطحی اسپرم انسان: بعد از تهیه پروتئین‌های سطحی اسپرم به هر موش Balb/c ماده با سن  $10-12$  هفته،  $50\text{ میکروگرم}$  پروتئین در هر تزریق به ازای هر موش از طریق داخل صفاقی در چهار مرحله انجام گردید. بدین شکل که در تزریق اول از ادجوانات کامل فروند و در تزریق‌های بعدی از ادجوانات ناقص فروند استفاده شد. فاصله تزریق اول و دوم، سه هفته و فاصله بین تزریق‌های یادآور دو هفته بود. بعد از تزریق چهارم بدلنبال بررسی تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه اسپرم انسانی در سرم موش تزریق شده، به روش الیزا، موشی که بالاترین تیتر علیه اسپرم را داشت، جهت انجام فیوژن انتخاب شد.

#### ب: فیوژن لنفوسيت‌های مولد آنتی‌بادی مورد نظر:

روندهای فیوژن با استفاده از لنفوسيت‌های به دست آمده از طحال موش‌های انتخاب شده، سلول‌های میلومایی  $2/0$  SP و محیط (Sigma, USA; PEG-1500) Polyethyene glycol-1500 (HAT) انجام گردید. در ادامه با افزودن محیط حاوی (Sigma) Hypoxanthine, Aminopterin and Thymidine غلاظت نهایی  $1.0 \times 10^{-4}\text{ M}$  (Aminopterin:  $4.0 \times 10^{-7}\text{ M}$  Thymidine:  $1.6 \times 10^{-5}\text{ M}$ ) شرایط جهت رشد و تثییت سلول‌های هیریدومهای لنفوسيتی/توموری فراهم شد.

#### ج: انتخاب هیریدومهای تولید کننده آنتی‌بادی ضد

##### آنتی‌زن‌های سطح اسپرم انسان به روش الیزا:

بعد از ایجاد هیریدومهای مولد آنتی‌بادی، جهت شناسایی کلون‌های اختصاصی علیه آنتی‌زن‌های سطح اسپرم، آزمون الیزا با استفاده از مایع رویی کشت سلول‌های هیریدوم انجام گردید و این تست سلول‌های اسپرم انسانی با تعداد  $10^6$  در هر چاهک و آنتی‌زن‌های بدست آمده با غلظت  $10\mu\text{g/ml}$  به میزان  $50\mu\text{l}$  هر چاهک هر یک به طور جداگانه به عنوان لایه اول الیزا کوت شدند ( $1$  ساعت انکوباسیون در دمای  $37^\circ\text{C}$ ). بعد از انجام سه بار شستشو (با بافر PBS  $0/15\text{ Molar}$  و  $\text{pH}=7/2$ ) حاوی

و pH=7/2 دیالیز شد. پس از انجام دیالیز، محتوای حاوی آنتی بادی با دور 4000g به مدت 10 دقیقه در ۰°C سانتریفیوژ و جذب نوری در طول موج 280 nm مجدداً خوانده و آنتی بادی ها در ۲۰°C- نگهداری گردید.

۶- بررسی واکنش متقاطع احتمالی آنتی بادی مونو-کلونال با آنتی زنهای دیگر با استفاده از آزمون الایز:

در این بررسی واکنش مقاطع هر یک از آنتی بادی مونو کلولنال آنتی زنهای موجود در مایع سیمین، سلولهای مستقر در سطح لکوسیت های خون محیطی و سلول های اسپرمی دو گونه Rat و Mice مد نظر قرار گرفت. ابتدا برای جداسازی لکوسیت های خون محیطی در دو تفکیک گرانولوسیتی و سلول های تک هسته ای (مونوسیتی و لنفوسيتی)، لایه بافی کوت (محل تجمع لکوسیت های خون محیطی در مرز بین پلاسما و حجم متراکم اریتروسیت ها) خون محیطی فرد سال بر روی گرادیان غلطی شد (48.47.49). در این روش طی سانتی‌متر گوت بر رده Axis-Shield AS, Oslo, Norway) Opti prep در فاز زیرین، با سرعت 800g به مدت 25 دقیقه در دمای 18-22°C از جداسازی سلول های گرانولوسیتی در بین دو فاز اخیر می گردد. جهت تهیه سلول های اسپرمی دو گونه Rat و Mice مجرای اپیدیدیم دو گونه اخیر با RPMI شستشو شد. برای جداسازی اسپرم های متحرک، روند up Swim در محیط RPMI در زاویه 45° در انکوباتور 37°C به همراه 5 درصد CO<sub>2</sub> وانکوباسیون 2 ساعت انجام گردید. هر یک از سلول های لکوسیتی و سلول های اسپرم انسانی و اسپرم های موشی بعد از تهیه بلا فاصله شمارش شده به تعداد 10<sup>6</sup> سلول اسپرمی و 500 μm از سلول لکوسیتی و 100 μm از غاظت پروتئینی 20 μg/ml سیمین در چاهک های مربوطه جهت افزوده Coating milk 5 درصد در گردید. عمل blocking با استفاده از Skim milk 37°C به مدت 1 ساعت انجام گردید. لایه دوم با افزودن 100 μm آنتی بادی مونو کلولنال با غاظت 10 μg/ml در هر چاهک

محلول رویی محیط کشت هر کلون، به مطرور جداگانه به میزان  $50\mu\text{l}$  به هر چاهک اضافه شد. در این  $\frac{1}{100}$  تست جهت کنترل  $50\mu\text{l}$  سرم طبیعی موش با رقت و جهت کنترل  $50\mu\text{l}$  منفی / مثبت کشت فاقد هر گونه سرم اضافه و به مدت  $1/5$  ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه گردید. بعد از انجام شستشو مطابق روش فوق، جهت لایه سوم  $50\mu\text{l}$  از آنتی بادی خرگوشی علیه ایمونوگلوبولین های موش کوثر و گه با (HRP)، Rabbit anti mice Ig-Horse Redish Peroxidase onjugated با رقت ۱ به ۳۰۰۰ (ولید پژوهشکده ابن سینا- شماره ARC-901) اضافه و به مدت  $1/5$  ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه گردید. بعد از طی این مدت و انجام شستشو  $50\mu\text{l}$  سویستوای رنگزای حاوی (OPD) Ortho Phenyl Diamine (Sigma) اضافه و به مدت ۱۵ 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  $492\text{ nm}$  خوانده شد.

5- تخلیص آنتیبادی های مونوکلونال ب ۴ دست آمده در محتوای سوب سلوژی:

در این مرحله با توجه به کلامس آنتی بادی های مونوکلونال تولید شده (IgG) جهت تخلیص این آنتی بادی ها از محتوای محلول رویی کشت، از ستون افینیتی کرماتوگرافی پروتئین FC Pharmacia, SWEDEN) G ایمونو گلوبولین 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 PBS جداسازی پروتئین های باند نشده، تحت جریان بافر 0/15 (pH=7/2) مولار و قرار گرفت. در مرحله بعد جهت جداسازی آنتی بادی های باند شده با عبور بافر Glycine-HCl (pH=2/5) مولار و 0/1 (pH=2/5) میزان 24ml، جریان خروجی در تفکیک های 2ml رهر لوله جمع آوری گردید. سپس جذب نوری تفکیک های بلاست آمده در طول موج 280 nm خوانده شد. تفکیک های دارای بیشترین جذب نوری حاوی آنتی بادی با هم مخلوط و در پرایر بافر PBS (0/15) مولار

۸- بررسی محل حضور آنتیژن ویژه هر یک از آنتی‌بادی به دست آمده، در سطح اسپرم انسان: جهت این بررسی از تکنیک رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس غیوستقیم استفاده شده است به منظور تهیه لام‌های کوت‌شده با اسپرم انسانی، سلولهای متحرک اسپرمی مطابق آنچه که در قسمت آشاره شد، بدست آمد. این سلولها سه بار در بافر PBS Centrifugation- ۰/۱۵ مولار و pH=7.2 (به صورت Resuspension در دور 700g به مدت ۱۰ دقیقه شسته شد. در مرحله بعد رسوب سلولها در محلول پار افورمالدھید ۱ درصد در PBS در دمای اتاق فیکس شدند. جهت مهار نمودن گلایسین ۰/۲ درصد شسته شدند. بعد از شمارش، سوسپانسیون اسپرمی به نحوی تنظیم شد که هر ۱ml ۱۰۵ حاوی ۱ml اسپرم باشد بعد با استفاده از دست گاه سایتواسپین در دور روی لام کوت گردید. بعد از طی ۶ ساعت در شرایط آزمایشگاه لام‌ها کاملاً خشک شده و به دو صورت یا ادامه مراحل جهت رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس با آنتی‌بادی مونوکلونال و یا نگهداری در ۲۰ درجه سانتی گراد می‌توان اقدام نمود.<sup>(42)</sup> در مرحله بعد، جهت فراهم آمدن شرایط یونی مناسب، لام‌ها تحت بافر PBS به مدت ۲ دقیقه قرار گرفته و شسته شدند. ۱ml ۵۰az هر یک از آنتی‌بادی مونوکلونال ۳D<sub>3</sub> با ۳B<sub>12</sub>, F<sub>10</sub>, ۳B<sub>6</sub>, ۲B<sub>2</sub>, B<sub>10</sub>, ۱C<sub>3</sub>C<sub>11</sub> غلظت ۱۰µg/ml بر روی محل کوتی نگ اضافه شده و ۲ ساعت در دمای اتاق و در محفظه مرط وب انکوبه گردید. بعد از پایان ۲ ساعت لام‌ها به آرامی تحت ۳ بار شستشو با بافر PBS قرار گرفتند و بعد بر روی هر لام ۵۰µl آنتی‌بادی Sheep Anti Mouse Ig Kونژوگه با FITC (تولید پژوهشکده ابن سينا) قرار داده و به مدت یک ساعت در محفظه مرطوب و تاریک انکوبه گردید. بعد از ۱ ساعت لام‌ها تحت ۳ 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 ۱ ساعت در دمای ۳۷°C تکمیل گردید. بعد از افزودن لایه سوم شامل آنتی‌بادی Rabbit anti Mouse Ig Kونژوگه با HRP، افزودن سوبسٹرای OPD جذب نوری چاهک ها بعد از افزودن محلول ۱ نرمال اسید سولفوریک جهت توقف واکنش خوانده شد.

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

بدین جهت ابتدا پروتئین‌های استخراجی در مقایسه با استاندارهای وزن مولکولی تحت الکتروفسورز SDS-PAGE آکریل آمید- بیس آکریل آمید با شدت جریان ۴۰ میلی آمپر قرار گرفتند. بعد از پایان عمل الکتروفسورز ژل حاصل به آرامی بر روی کاغذ Poly vinyldene difluoride (PVDF) انتقال داده شد و بعد از قرار دادن در کاست بلاستینگ با ولتاژ ۵۰ ولت به مدت ۱۲ ساعت در تانک بلاستینگ عمل الکتروترانسفر پروتئینها از ژل بر روی کاغذ انجام گرفت. بعد از پایان عمل الکتروترانسفر پروتئینها، کاغذ بلاست شده تحت رنگ‌آمیزی پانسوس انجام گرفت. بعد از مشاهده باندهای مورد نظر، شستشو در بافر PBS انجام شد. جهت پوشاندن فضاهای خالی در سطح ۵ Skim milk Blocking با استفاده از گرفت. بعد از انجام عمل اخیر نوارهای بلاست شده با آنتی‌بادی منوکلونال در غلظت ۲/۵µl/ml به همراه BSA یک درصد به مدت ۱/۵ ساعت تحت تکانه‌های Shaking یکنواخت قرار گرفت. بعد از انتهای زمان اخیر و انجام شستشو کاغذهای بلاست شده تحت مجاورت آنتی‌بادی Rabbit anti Mouse Ig (ARC-901) کونژوگه با HRP (تولید پژوهشکده ابن سينا-شماره diaminobenzidine-sigma) DAB 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:  $Rf = \frac{d}{D}$ )، فاصله طی شده توسط رنگ نشانه: D; D: شد.

## نتایج

## ۳- یافته های مربوط به تعیین ایزوتاپ آنتی بادی های به دست

آمده:

در ادامه جهت شناسایی ایزوتاپ آنتی بادی های مونوکلونال تولید شده مطابق با مراحل گفته شده، کلاس و زیر کلاس هر یک از کلوها با روش الایزای ساندوج تعیین شد. یافته های این قسمت در مقایسه با نمونه کنترل های مثبت و منفی، بر اساس اندازه گیری جذب نوری برای هر یک از انواع آنتی ایزوتاپ های بکار گرفته شده، در نمودارهای زیر برای هر کلون به دست آمد (نمودار ۲).

## جدول ۱: یافته های مربوط به تعیین ایزوتاپ کلونهای تولید کننده

آنٹی بادی علیه آنتی ژنهای سطح اسپرم

نام کلون	دست آمده	غلظت آنتی بادی به در هر میلی لیتر	غلظت آنتی بادی به محیط کشت
2B <sub>2</sub> B <sub>10</sub>	1	14.2 $\mu\text{g/ml}$	14.5 mg
3B <sub>6</sub> F <sub>11</sub>	2	16.3 $\mu\text{g/ml}$	15 mg
3B <sub>12</sub> F <sub>10</sub>	3	25.7 $\mu\text{g/ml}$	24.8 mg
1C <sub>3</sub> C <sub>11</sub>	4	17.2 $\mu\text{g/ml}$	17.2 mg
3D <sub>3</sub> D <sub>6</sub>	5	23.9 $\mu\text{g/ml}$	30 mg

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

به دنبال اندازه گیری جذب نوری (OD) هر یک از محلولهای آنتی بادی در طول موج 280 نانومتر با استفاده از ضریب خاموشی (EC<sub>IgG</sub>=13.6) IgG Extinction Coefficient کلی آنتی بادی های مونوکلونال حاصل از تخلیص ستون افینیتی کروماتو گرافی پروتئین G به دست آمد. در ضمن با توجه به مشخص بودن حجم محلول رویی کشت سلول های هیبریدوما غلظت آنتی بادی مونوکلونال در واحد حجم محیط کشت تخمین زده شد (جدول ۱).

## ۵- یافته های حاصل از بررسی واکنش متقاطع احتمالی آنتی بادی مونوکلونال با آنتی ژنهای دیگر با استفاده از آزمون الایزای:

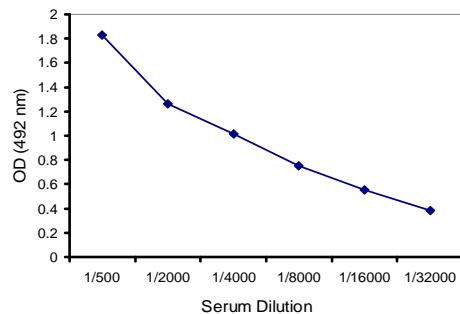
جهت بررسی واکنش متقاطع آنتی بادی مونوکلونال با آنتی ژنهای دیگر شامل آنتی ژنهای سطح گلbulول های سفید و آنتی ژنهای سطح اسپرم های دو گونه (mice و rat) در مقایسه با سلول های اسپرم اتوژنی انسانی و آنتی ژن های استخراجی از

## ۱- یافته های مربوط به استخراج پروتئین های غشای اسپرم به روش Solubilization

بعد از استخراج پروتئین های سطحی اسپرم با استفاده از NaCl ۱ مولار، محلول پروتئینی به دست آمده تحت بافر PBS ۰/۱۵ مولار و pH=۷/۲، دیالیز گردید. در ادامه، محلول پروتئینی تحت روش لیوفیلیزاسیون به صورت پودر به دست آمد و در دمای ۴°C نگهداری شد. در ضمن بعد از اندازه گیری محتوای پروتئینی پودر به دست آمده، به روش برادفورد مشخص شد که به ازای  $10^9 \times 6$  سلول اسپرمی، ۱/۱۷۶ میلی گرم پودر لیوفیلیز حاصل شده که حدود ۲۱ درصد وزن آن ترکیبات نمکی می باشد.

## ۲- یافته های مربوط به تولید آنتی بادی مونوکلونال:

بدنبال پروتکل تهیه آنتی بادی مونوکلونال، تیتر سرم موش مورد استفاده در فیوژن، با استفاده از آزمون الایزا تعیین گردید. بدین ترتیب که بعد از تزریق چهارم، آنتی بادی ضد اسپرمی از رقت  $\frac{1}{32000}$  تا  $\frac{1}{500}$  جذب نوری قابل ملاحظه ای را به طور کاهنده از  $1/8$  تا  $1/3$  نشان می داد (نمودار ۱).



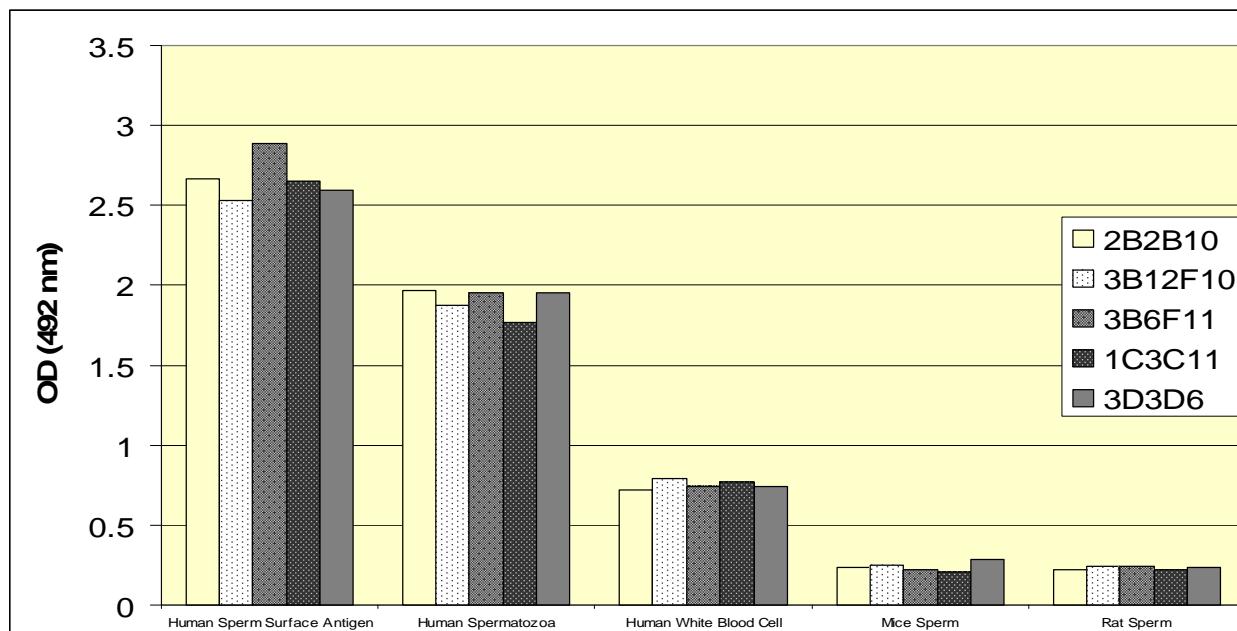
نمودار ۱: بررسی تیتراسیون سرم موش ایمن شده در پاسخ به آنتی ژنهای سطحی اسپرم انسان

بعد از انجام فیوژن، استفاده از محیط انتخابی HAT و انجام تکنیک Limiting Dilution جهت به دست آوردن تک کلون تولید کننده آنتی بادی مونوکلونال، آزمون الایزایی جهت شناسایی آنتی بادی تولید شده علیه پروتئین های سطحی اسپرم انجام گردید و به دنبال آن مشخص شد که، ۵ کلون مثبت با اسامی ۳D<sub>3</sub> D<sub>6</sub> و ۱C<sub>3</sub> C<sub>11</sub> ۳B<sub>12</sub> F<sub>10</sub>, ۳B<sub>6</sub> F<sub>11</sub>, ۲B<sub>2</sub> B<sub>10</sub>, ۱C<sub>3</sub> C<sub>11</sub> ۳B<sub>12</sub> F<sub>10</sub>, ۳B<sub>6</sub> F<sub>11</sub>, ۲B<sub>2</sub> B<sub>10</sub> به دست آمده است.

غشای سیتوپلاسمی اسپرم انسانی به عنوان کنترل مثبت، تستی به روش الیزا طراحی گردید. هدف از این تست تنها بررسی کیفی (Qualitative) واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در مقایسه با کنترلهای مثبت و منفی بوده است (نمودار ۲). یافته‌های حاصل از این آزمون نشان داد که واکنش متقطع قابل توجهی در مورد گلبول‌های سفید خون محیطی انسانی با تمام آنتی‌بادی‌های مونوکلونال دیده می‌شود.

جدول ۲: غلظت کلی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده توسط هر یک از کلون‌ها بعد از عبور از ستون پروتین G و غلظت تقریبی آن در هر میلی‌لیتر محیط کشت

نام کلون	ایزووتایپ آنتی‌بادی	
IgG2a	2B <sub>2</sub> B <sub>10</sub>	1
IgG2a	3B <sub>6</sub> F <sub>11</sub>	2
IgG1	3B <sub>12</sub> F <sub>10</sub>	3
IgG2b	1C <sub>3</sub> C <sub>11</sub>	4
IgG2b	3D <sub>3</sub> D <sub>6</sub>	5



نمودار ۱: بررسی واکنش متقطع احتمالی آنتی‌بادی مونوکلونال با آنتی‌ژنهای دیگر

جدول ۳: بررسی واکنش متقطع هر یک از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با آنتی‌ژنهای مذکور به صورت گزارش میانگین OD با SD

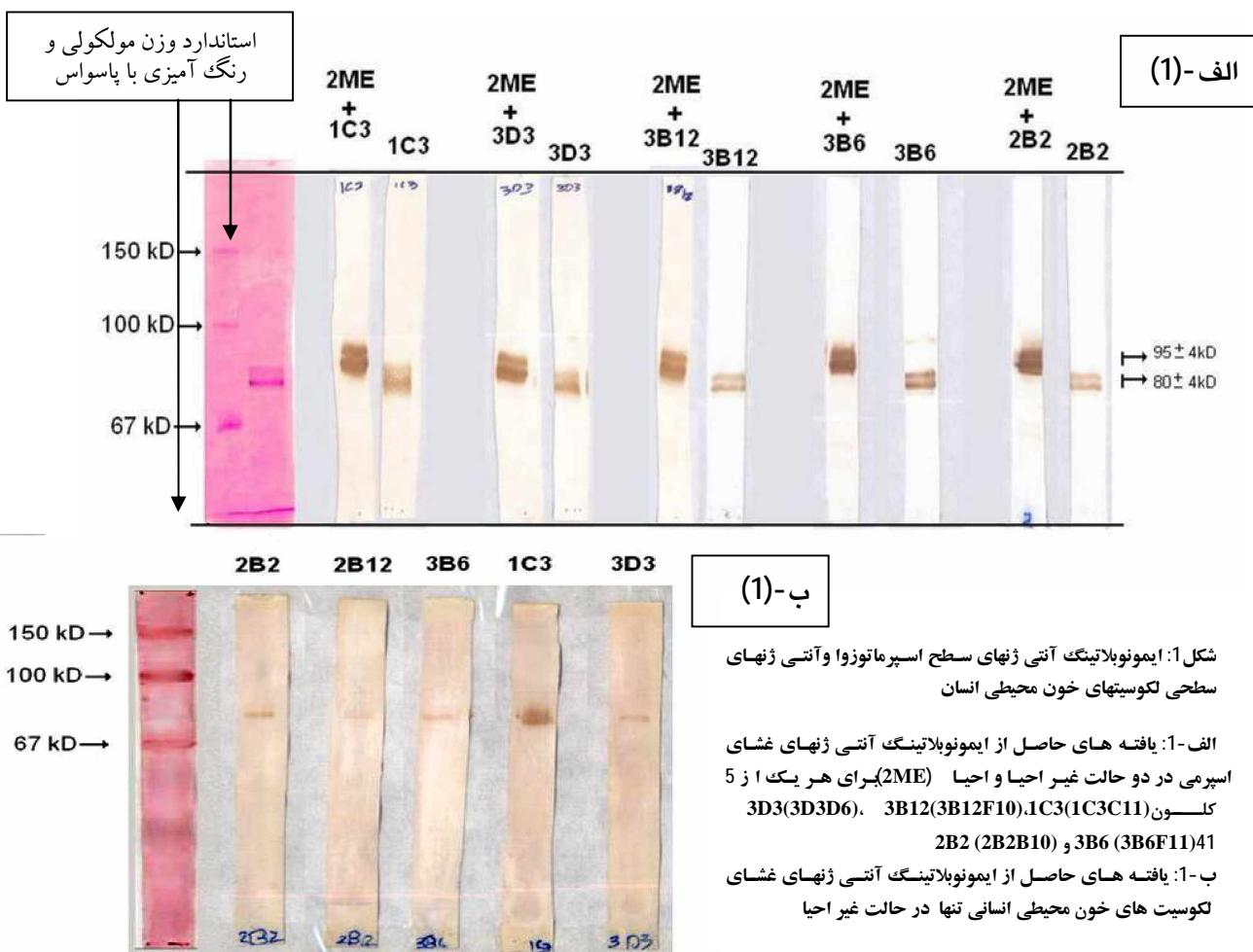
Clone	Human Sperm Surface Antigen	Human Spermatozoa	Human White Blood Cell	Mice Sperm	Rat Sperm
2B2B10	2.667±0.131	1.965±0.081	0.721±0.042	0.238±0.033	224±0.0340
3B12F10	2.533±0.143	1.877±0.067	0.789±0.044	0.246±0.035	0.239±0.037
3B6F11	2.887±0.128	1.955±0.063	0.743±0.052	0.224±0.037	0.243±0.036
1C3C11	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



مجاورت ۲- مرکاپتواتانل (2-ME) ضمن احیای باندهای اینکه پروتئین های سطحی استخراج شده از سطح اسperm در مجاورت ۲- مرکاپتواتانل (2-ME) ضمن احیای باندهای اینکه سولفیدی، همچنان واکنش آنتی بادی های مونوکلونال با اپی توب مورد نظر حفظ شده هرچند پروتئین مورد نظر در ناحیه ایی بالاتر در محدوده وزنی  $95 \pm 4$  کیلو دالتون متوقف شده است(شکل الف-1). اما این واکنش در مورد آنتی ژنهای از سطح گلوبولهای سفید که در مجاورت ۲- مرکاپتواتانل (2-ME) قرار داشتند اتفاق نیفتاد که به دلیل عدم واکنش تصاویر ایمونوبلاتینگ آن نشان داده نشد. بنابراین اپی توپهایی از گلوبولهای سفید انسانی که در حالت غیراحیا در محدوده وزنی  $80 \pm 4$  کیلو دالتون واکنش نشان دادند در حالت احیا فاقد هرگونه واکنش مشخص با آنتی بادی های مونوکلونال تحت مطالعه بودند.

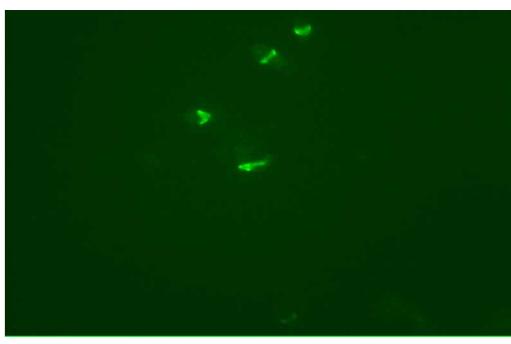
#### ۶- یافته های حاصل از آزمون ایمونوبلاتینگ پروتئین های غشای سیتوپلاسمی اسپرماتوزوا:

بعد از انتقال پروتئین های مورد بررسی به کاغذ PVDF و رنگ آمیزی باند اختصاصی به طور جداگانه توسط هر یک از آنتی بادی های  $3D_3D_6$ ,  $1C_3C_{11}$ ,  $3B_6F_{11}$ ,  $2B_2B_{10}$ ,  $3B_{12}F_{10}$ ,  $3D_3$  مشخص شد که تمام آنتی بادی های مورد مطالعه دارای ویژگی مشابهی در الگوی بلاتینگ می باشند. بدین ترتیب که هر آنتی بادی سه باند پروتئینی را در محدوده  $80 \pm 4$  کیلو دالتون از پروتئین های استخراجی سطح سلول اسپرماتوزوا شناسایی می کند(شکل الف-1)، در عین حال تمامی این آنتی بادی ها تک باند پروتئینی مشابهی را از مجموعه پروتئین های به دست آمده از سطح لکوسیت های خون محیطی انسان، در این ناحیه وزنی مورد شناسایی قرار می دهد(شکل ب-1). نکته مهم اینکه پروتئین های سطحی استخراج شده از سطح اسperm در

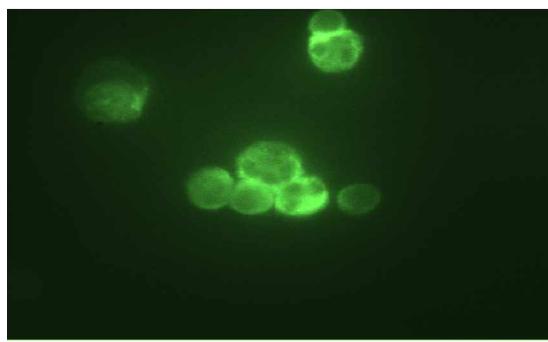




شکل ۵: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال  $1C_3C_{11}$  و سلول اسپرماتوزوای انسانی



شکل ۶: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال  $3D_3 D_6$  و سلول اسپرماتوزوای انسانی



شکل ۷: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از هر یک آنتی بادی مونوکلونال که با سلول های لکوسیتی خون محیطی انسان به صورت کاملا مشابه بوده است.

### بحث

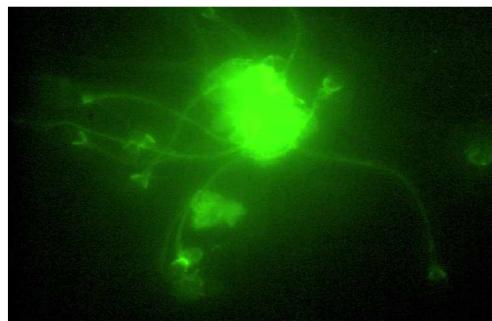
Shetty و همکارانش در سال 2001<sup>(23)</sup>، با به کارگیری  $1\text{ NaCl}$  مولار استخراج پروتئین های سطحی اسperm انسانی را با مکانیسم Solubilization انجام دادند. آنها برای نشان دادن منشا پروتئین ها، سلولهای اسpermی را قبل از استخراج پروتئین های سطحی، با بیوتین مجاو ر کردند. بدین ترتیب گلیکوپروتئین های سطحی با اتصال کووالان به بیوتین، بعد از استخراج و انجام الکتروفورز دو بعدی (2-D) Two Dimensional، با استفاده از

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

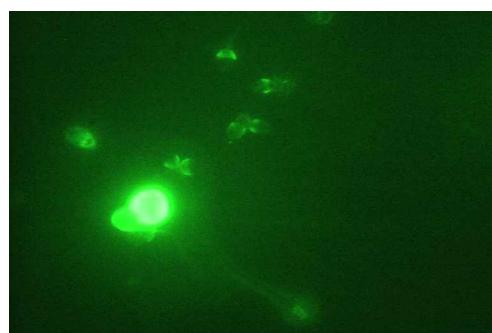
یافته های حاصل از رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم با استفاده از هر پنج آنتی بادی مونوکلونال  $1C_3C_{11}$ ,  $3B_{12} F_{10}$ ,  $3D_3 D_6$  و  $3B_6 F_{11}$ ,  $2B_2 B_{10}$  آنتی ژن مورد نظر در مورد هر پنج آنتی بادی در ناحیه تحت استوایی Subequatorial سلول اسپرماتوزوا قرار دارد. در عین حال تمامی لکوسیت های خون محیطی انسانی نیز دارای استقرار آین آنتی ژن در سطح خود می باشند (شکل های ۲ تا ۷)



شکل ۲: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال  $2B_2 B_{10}$  و سلول اسپرماتوزوای انسانی



شکل ۳: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال  $3B_6 F_{11}$  و سلول اسپرماتوزوای انسانی



شکل ۴: نتیجه آزمون غیر مستقیم ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال  $10 F_{12} 3B_1$  و سلول اسپرماتوزوای انسانی

**مولکولی دایمر با وزن  $49 \pm 2\text{kD}$**  موناسایی کند و آنتی بادی علیه آن را در سرم افراد نابارور جدا نمایند. آنها در تحقیق موازی دیگری نشان دادند که همین آنتی بادی می‌تواند در خرگوش ناباروری ایجاد نماید<sup>(30,31)</sup>. مشابه این تحقیقات گزارشات دیگری مبنی بر شناسایی آنتی ژنهای مسؤول در امر باروری در سالهای اخیر صورت گرفته است<sup>(32,39)</sup>. در این مطالعه به دنبال تحریک آنتی ژنیک کلون های لنفوسيتی B علیه آنتی ژنهای سطحی استخراج شده از سطح اسپرم انسان ۵ کلون پایدار و ثبوتوالید 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 ۵ کلون، پروتئین مشابهی را در آزمون ایمونوبلاتینگ در ناحیه  $80 \pm 4\text{kD}$  شناسایی می کند. در ضمن این آنتی بادیها آنتی ژنهای خود را در شرایط احیا (مجاورت با ۲-مر کاپتواتانل) شناسایی نمودند و این نشان دهنده این موضوع است که ابی توپ مورد نظر خطی باشد، چرا که تغییر ساختار پروتئین طی احیای پیوند های دی سولفیدی داخل زنجیره ای نقشی در شکل اپی توپ نداشته است. بنابراین بر هم کنش آنتی بادی مونوکلونال با توالی مورد نظر همچنان برقرار بوده است. همانطور که در شکل (۱) مشاهده می شود بر هم کنش هر یک از آنتی بادی های مونوکلونال با پروتئین های احیا شده اسپرمی در آزمون ایمونوبلاتینگ، در محدوده وزنی  $95 \pm 4\text{kD}$  صورت پذیرفته است. که در مقایسه با پروتئین های احیا نشده که محدوده وزنی  $80 \pm 4\text{kD}$  را به خود اختصاص داده اند، به اندازه ۱۵ کیلو دالتون بالاتر قرار گرفته است، که این سنگینی کاذب احتمالاً به دلیل رشتہ ای شدن و از دست رفتن حالت گلوبولار پروتئین بوده است که حرکت آن را به داخل ژل در مقایسه با پروتئین احیا نشده کنتر نموده است.

همانطور که در آزمون ایمونوبلاتینگ با پروتئین های سطحی اسپرماتوزوا مشخص شده است، هر یک از آنتی بادی های مونوکلونال سه پروتئین مجاور هم را چه در شرایط غیراحیا شناسایی می کند. اما به دنبال ایمونوبلاتینگ آنتی ژنهای به دست آمده از گلوبول های سفید انسان مشخص شد که تمامی آنتی بادی های مونوکلونال تنها یک پروتئین را در ناحیه  $80 \pm 4\text{kD}$  شناسایی می کند. که این پروتئین در شرایط

اوویدین کونزوگه با HRP بر روی وسترن بلاستینگ پروتئین های استخراجی ثابت کردند این روش قابلیت بالایی در جدا نمودن پروتئین های غشایی دارد.

در این تحقیق برای اولین بار، با به کار گیری آنتی ژنهای استخراج شده با NaCl **c** بلهت القای کلونهای ویژه ای آنتی ژنهای به دست آمده، انجام گردید. وجه تمایز این روش در القای کلون های لنفوسيتی B با روش های دیگر در بکار گیری سلول کامل، محدود بودن کلونهای القا شونده به 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 گردد (از جمله روش های تهاجمی مثل جوشاندن، سونیکاسانیون، تأثیر دترژنات های قوی مثل SDS) تولید آنتی بادی های مونوکلونال با ویژگی مورد نظر با احتمال کمتری همراه بوده و کلونهای غیر مفید تولید می شوند. بنابراین روش استخراجی که کمترین صدمه را بر ویژگی پروتئین های غشا لود سازد حائز اهمیت می باشد. در این مطالعه با اجرای این شیوه، گلکون با ویژگی علیه آنتی ژنهای سطحی اسپرم انسان به دست آمد. در ضمن جهت بررسی واکنش مقاطعه آن با اسپرم های گونه Rat و Mice تستی به روش الایزا طراحی گردید، که هیچ کدام از آنتی بادی های تولید شده واکنش مقاطعی نشان ندادند. هر چند که تمامی آنتی بادی ها با لکوسیت های خون محیطی واکنش واضحی را نشان دادند. بنابراین، تمامی آنتی بادی مونوکلونال ابی توپ های مشابهی را در سطح اسپرم انسان و گلوبول های سفید خون محیطی شناسایی می کندها چند بررسی های بیشتر در ارتباط با بررسی ویژگی آنتی بادی های به دست آمده به مرحله بعدی مطالعه موکول شده که در حال انجام است.

بر طبق گزارشاتی که مبنی بر شناسایی آنتی ژنهای غشای اسپرم انجام شده، شاخص های متفاوتی در 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 پروتئینها را در مسیر باروری مهار نماید. از جمله FA-1 و همکارانشان که در سال ۱۹۸۷ توانستند آنتی ژن Naz

آزمون های فلورسانس داشته است اعمال کمترین تغییر در آنتی‌ژنهای سطحی و تخریب غشایی هنگام تهیه اسلاید و ثبوت (Fixation) می‌باشد بطوری که نمونه های تهیه شده با این روش تا مدت ۶ ماه از لحاظ مورفولوژی و قابلیت واکنش پذیری با آنتی‌بادی مونوکلونال تفاوتی را در مقایسه با نمونه های تازه نشان نداده اند . یافته های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که هر گلوبول دارای ویژگی مشابه می‌باشند . اما می‌توان با استفاده از آنتی‌بادی های مونوکلونال به طور جداگانه ستون های افینیتی کروماتوگرافی را طراحی نمود تا بتوان آنتی‌ژن ویژه آن را تخلیص نمود در این حالت می‌توان با خالص نمودن آنتی‌ژن مورد نظر، توالی اسید آمینه ای پروتئین مورد نظر را مشخص نمود (Sequencing). در عین حال می‌توان با تخلیص پروتئین واکنش دهنده در سطح لکوست های توالی اسید آمینه ای آن را تعیین و به مقایسه و بررسی عملکرد این دو پروتئین از دو منشا جداگانه پرداخت . در این رابطه با انتخاب آنتی‌ژنهای مسئول در روند باروری (حرکت، ظرفیت یابی اسپرم، اتصال اسپرم با زوناپلوسیدا، واکنش آکروزومی و لفاح با اوولمای تخمک) می‌توان علاوه بر افزایش اطلاعات در مورد Phylogenetic و Ontogenetic، شناسایی ارتباطات تکاملی بین گونه ای فعالیت قابل توجهی را انجام داد. در عین حال می‌توان روش های تشخیصی آزمایشگاهی جدیدی را جهت غربال ناباروری ها با علل نامشخص طراحی نمود . با شناسایی آنتی‌ژنهای دخیل در باروری و تعیین توالی اسید آمینه ای آن در زمینه تولید واکسن های کتیراسپیتو از جمله پروتئین های نوترکیب و DNA واکسن ها، روش هایی را جهت کنترل باروری به کار برد (40,41).

### سپاسگزاری

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

احیا با ME-2 خاصیت آنتی‌ژنیک خود را برای پرتوین مورد نظر از دست می‌دهد، بنابراین تفاوت این اپی‌توب با اپی‌توب موجود بر سطح اسپرم، حضور پیوند دی سولفید داخل زنجیره ای می‌باشد و می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً این اپی‌توب ساختار فضایی داشته که با آنتی‌بادی مونوکلونال واکنش متقاطع نشان می‌دهد . یافته های به دست آمده از آزمون الیزا نشان داد که میزان بر هم کنش آنتی‌بادی مونوکلونال در غلظت مساوی با سلول های اسپرم انسانی و آنتی‌ژنهای استخراج شده از سطح این سلول ها در مقایسه با تأثیر آنتی‌بادی مونوکلونال ضد فریتین به عنوان یک آنتی‌بادی کنترل علیه یک شاخص غیره با  $P < 0.05$  از حداکثر جذب نوری به عنوان یک واکنش غیراختصاصی در نظر گرفته شده است . در ضمن بر هم کنش این آنتی‌بادی ها بر آنتی‌ژنهای سطحی گلوبول های سفید انسانی در مقایسه با آنتی‌بادی کنترل با نشان دهنده یک واکنش مثبت ولی در حد متوسط و به صورت یک واکنش متقاطع مشاهده می‌گردد . با مقایسه جذب های نوری آنتی‌بادی های تحت مطالعه با سلول های اسپرم دو گونه Rat و Mice و اثر آنتی‌بادی مونوکلونال کنترل مشخص شد که آنتی‌بادی های مونوکلونال هیچگونه ویژگی علیه سلول های اسپرماتوزوآی این دو گونه ندارد ( $P > 0.05$ ). مطابق با یافته های حاصل از آزمون ایمونوبلاتینیگ و الیزا، یافته های حاصل از آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم آنتی‌بادی های مونوکلونال با سلول های اسپرماتوزوا و گلوبول های سفید انسانی و اسپرم اتوزوا دو گونه Rat و Mice می‌باشد کننده یافته های قبلی می‌باشد . همانطور که در شکل های ۱ تا ۵ مشخص است تمامی آنتی‌بادی های مونوکلونال به طور مشابه و اختصاصی گردن و منطقه تحت استوایی (Sub-equatorial) سر اسپرم انسان را شناسایی می‌کند و در مورد گلوبول های سفید (هر دو سلول های تک هسته ای و چند هسته ای) فلورسانس مشخصی در ناحیه غشای سیتوپلاسمی این سلول ها مشاهده شد. اما در مورد سلول های اسپرماتوزوا دو گونه Rat و Mice هیچگونه فلورسانس درخشنایی مشاهده نگردید . مزینی 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. Brewis1&Chi H. Wong: *Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida.* Reviews of Reproduction (1999) 4, 135–142.
3. Paul Primakoff & Diana G. Myles: *Penetration, 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, Egoscue J, Andolz P, Bielsa MA.: *Detection of induced anti-sperm antibodies by an improved enzyme-linked immunosorbent assay.* Int J Fertil. 1991 Jan-Feb; 36(1):48-56.
22. WHO *laboratory Manual for Examination of Human semen-Cervicus Mucus Interaction*, 3rd ed. 1992; Cambridge University press.
23. Shetty J., Diekman AB, Jayes FC, Sherman NE, Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC. (2001): *Differential extraction and enrichment of human sperm surface proteins in a proteome: identification of immunocontraceptive candidates.* Electrophoresis. 2001 Aug; 22(14):3053-66.
24. Zamboni A, Giuntini I, Gianesello D, Maddalena F, Rognoni F, Herbst D: *Production of mouse monoclonal antibodies using a continuous cell culture fermenter and protein G affinity chromatography.* Cytotechnology. 1994; 16(2):79-87.
25. Bill E, Lutz U, Karlsson BM, Sparrman M, Allgaier H: *Optimization of protein G chromatography for biopharmaceutical monoclonal antibodies.* J Mol Recognit. 1995 Jan-Apr; 8(1-2):90-4.
26. Jones WR.: Immunologic infertility--fact or fiction? Fertil Steril. 1980 Jun; 33(6):577-86.
27. Mettler L., 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.