

تخالیص Inhibin از مایع فولیکولی انسان با استفاده از آنتی بادی تکدومنانی

*^۱ محمدرضا صادقی ، مهشید حجت ، نیما ناصری ، محمود جدی تهرانی ، نریمان مصفا ، محمد مهدی آخوندی ، رویا قدس ، علی احمد بیات

خلاصه

سابقه و هدف: Inhibin پروتئینی است که در پاسخ به اثر FSH توسط سلول‌های گرانولوزا و سرتولی ترشح می‌شود و باعث کنترل ترشح FSH از هیپوفیز قدامی می‌گردد. ارزیابی این پروتئین نقش ارزش‌های در آگاهی از وضعیت باروری در زنان و همچنین پیش‌آگهی از ابتلای جنین به سندروم داون و پره‌اکلامپسی دارد. اندازه‌گیری غلظت Inhibin در ارزیابی وضعیت باروری مردان نیز دارای اهمیت می‌باشد. تا کنون روش‌های مختلف و طولانی برای تخالیص Inhibin معرفی گردیده است. هدف از این تحقیق خالص‌سازی Inhibin از مایع فولیکولی با روش ایمونوافینیتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مایع فولیکولی جمع‌آوری شده از زنان مراجعه کننده به مرکز درمانی ابن‌سینا، پس از فیلتراسیون توسط محلول سولفات آمونیوم اشباع، تغییل گردید. جهت جداسازی Inhibin، از روش ایمونوافینیتی بر روی ستون کروماتوگرافی جذبی به کمک آنتی بادی تک-دومنانی علیه Inhibin استفاده شد. پس از عبور مایع فولیکولی از ستون کروماتوگرافی جذبی، محلول پروتئینی به دست آمده به کمک روش SDS-PAGE و وسترن بلات ارزیابی شد.

نتایج: وجود تک باند ۳۲ کیلو Daltonی بعد از رنگ‌آمیزی نقره موید حضور Inhibin بود. نتیجه‌ی آزمون وسترن بلات نشان‌دهنده شناسایی اپی‌توب توسط آنتی بادی علیه Inhibin می‌باشد. راندمان ستون در جداسازی Inhibin با استفاده از روش کروماتوگرافی افینیتی ۹۲ درصد می‌باشد.

نتیجه‌گیری: این روش در مقایسه با بسیاری از روش‌های بیوشیمیابی از راندمان بالایی برخوردار می‌باشد. با این حال به دلیل عدم دسترسی به مایع فولیکولی انسان در حجم انبوه، تخالیص Inhibin توسط روش ذکر شده در این مقاله بیشتر برای کاربردهای آزمایشگاهی در مقادیر کم بوده و در مقادیر انبوه تولید Inhibin نوترکیب توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: Inhibin، مایع فولیکولی، تخالیص، آنتی بادی تکدومنانی

۱- استادیار گروه غدد و تولیدمثل و جنین‌شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی تولیدمثل و نازایی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن‌سینا

۲- مریب گروه غدد و تولیدمثل و جنین‌شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی تولیدمثل و نازایی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن‌سینا

۳- دانشجوی گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۴- دانشیار گروه آنتی بادی مونوکلونال مرکز تحقیقات آنتی بادی مونوکلونال، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن‌سینا

۵- استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۶- دانشیار گروه غدد و تولیدمثل و جنین‌شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی تولیدمثل و نازایی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن‌سینا

۷- مریب گروه آنتی بادی مونوکلونال مرکز تحقیقات آنتی بادی مونوکلونال، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن‌سینا

۸- کارشناس گروه آنتی بادی مونوکلونال مرکز تحقیقات آنتی بادی مونوکلونال، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن‌سینا

*نویسنده مسؤول: محمدرضا صادقی

آدرس: تهران، اوین، صندوق پستی ۱۷۷-۱۹۸۳۵، پژوهشکده ابن‌سینا

پست الکترونیک: Sadeghi@avicenna.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۲۱

تلفن: ۰۲۱ ۲۲۴۳۲۰۲۰

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۶/۶/۳۱

دورنويس: ۰۲۱ ۲۲۴۳۲۰۲۱

جهت تشخیص ابتلای جنین به سندروم داون و یا ابتلای مادر به پره‌اکلامپسی بسیار ارزشمند خواهد بود [۹-۱۱]. اندازه‌گیری غلظت این فاکتور در مردان نیز حائز اهمیت می‌باشد. به طوری که امروزه جهت بررسی اسپرماتوژن در افراد مبتلا به آزواسپرمی شاخص دقیق‌تری نسبت به هورمون FSH به شمار می‌رود [۱۲، ۱۳]. با توجه به اهمیت و نقش Inhibin در فیزیولوژی تولید مثل، ارزیابی و اندازه‌گیری آن به عنوان یک آزمون تشخیصی در مطالعات بالینی بسیار دارای اهمیت می‌باشد. در تمامی این مطالعات نیاز به تهیی فرم خالص این پروتئین همواره وجود دارد. Inhibin خالص در تهیی آنتی بادی‌های تک‌دودمانی و پلی کلتال علیه آن، تهیی استاندارد کیت‌های تشخیصی و به طور کلی تهیی کیت‌های آزمایشگاهی بسیار کاربرد دارد. همچنین دسترسی به Inhibin خالص در مطالعات تحقیقاتی در ارتباط با خواص فیزیکوشیمیایی، ساختاری و عملکردی پروتئین ضروری می‌باشد. با در دست داشتن مقادیر کافی Inhibin خالص، می‌توان مطالعات بیوانفورماتیک، اتصال گیرنده با گیرنده و مطالعات Site Inhibin directed mutagenesis برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ از مایع فولیکولی خوک تخلیص گردید [۱۴] و جهت تخلیص از سه روش کروماتوگرافی شامل کروماتوگرافی افینیتی، ژل فیلتراسیون و HPLC استفاده شد. به طور کلی اکثر روش‌های معرفی شده جهت تخلیص Inhibin بسیار طولانی بوده و نیاز به استفاده از دستگاه‌های خاص و پرهزینه می‌باشد. لذا هدف از این تحقیق خالص‌سازی Inhibin از مایع فولیکولی طی یک مرحله‌ی کروماتوگرافی، به منظور کاربردهای بعدی در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی، تولیدی و سایر کاربردهای احتمالی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

با توجه به اینکه مایع فولیکولی مهم‌ترین منبع Inhibin (۱۰ ng/ml) جهت تخلیص می‌باشد در این تحقیق از مایع فولیکولی زنان مراجعه‌کننده به مرکز درمانی این‌سینا استفاده شد. برای این منظور در زنانی که به دلایل مشکلات مردانه یا زنانه دچار نایاروری بوده و جهت درمان نیاز به یکی از روش‌های کمباروری داشتند، تحریک تخمک‌گذاری انجام گردید. بدین طریق قبل از تخمک‌گذاری از طریق سوزنهای مخصوص، با هدایت سونوگرافی، محتویات فولیکول‌های بالغ حاوی تخمک تخلیه شد. به طور معمول پس از برداشت تخمک مایع فولیکول جمع‌آوری شده و دور ریخته می‌شود. لذا در این تحقیق از مایع فولیکولی این افراد استفاده گردید. پس از دریافت مایع فولیکولی

مقدمه

Inhibin گلیکوپروتئینی هترودایمر مشکل از دو زیروحد α و β می‌باشد که بر اساس رشته β به دو نوع A و B تقسیم می‌گردد. این پروتئین توسط سلول‌های گرانولوزای تخدمان، سلول‌ها سرتولی بیضه و جفت، در پاسخ به اثر هورمون FSH تولید می‌شود [۱، ۲]. علاوه بر این مایعات بدن انسان محتوى فرم‌های آزاد زیروحد α این پروتئین هستند که فاقد فعالیت زیستی است [۳]. شناخته شده ترین نقش این گلیکوپروتئین مهار تولید و ترشح FSH از هیپوفیز قدامی به صورت پس‌نورد منفی^۱ می‌باشد [۴]. واژه‌ی Inhibin برای اولین بار در سال ۱۹۳۳ توسط McCullagh و همکارانش، روی فاکتور فرضی موجود در عصاره‌ی آبی بیضه نام‌گذاری گردید. تزریق عصاره‌ی مذکور باعث مهار هیپوتروفی هیپوفیز از طریق کاهش سطح FSH خون در موش‌های آزمایشگاهی می‌گردید [۵] هیپوتروفی به وجود آمده در موش‌های مذکور به دنبال تابش اشعه‌ی X بر بیضه ایجاد شده بود. در سال‌های بعد، حضور گلیکوپروتئین Inhibin در مایع فولیکولی تخدمان نیز به اثبات رسید. بدین ترتیب مایع فولیکولی به عنوان مهم‌ترین منبع حاوی Inhibin معرفی شد. در سال ۱۹۸۵ برای اولین بار Inhibin با وزن مولکولی ۵۸ kDa از مایع فولیکولی گاو استخراج و خالص گردید [۶]. به دلیل تنوع تعداد واحدهای قندی در ساختار این گلیکوپروتئین تاکنون انواعی از Inhibin با اوزان مولکولی مختلف شناسایی شده است [۷]. کوچک‌ترین فرم فعال این هورمون گلیکوپروتئین نوع ۳۲ kDa آن می‌باشد. بر اساس مطالعات مختلف، غلظت Inhibin نوع A در زنان، طی دوران نوزادی، بلوغ، حاملگی و یائسگی دچار تغییرات فراوانی می‌گردد که در روند فیزیولوژی تولید مثل با اهمیت می‌باشد. پس از تولد به دلیل فعل شدن محور هیپوتالاموس، هیپوفیز، گنادها و شروع فعالیت و رشد فولیکول‌ها، غلظت Inhibin نوع A و B دچار تغییرات فراوانی می‌شود. در زمان بلوغ به دلیل رشد و فعالیت گنادها، غلظت Inhibin نوع B از آن با شروع فعالیت جسم زرد غلظت Inhibin نوع A و پس از آن با شروع فعالیت جسم زرد غلظت Inhibin نوع A افزایش می‌یابد. بنابراین اندازه‌گیری غلظت Inhibin می‌تواند جهت بررسی وضعیت بلوغ گنادها در دختران مورد استفاده قرار گیرد [۸]. غلظت Inhibin در روز سوم سیکل قاعدگی به عنوان یک فاکتور نسبی تعیین‌کننده ذخیره تخدمانی قلمداد می‌شود. بر اساس نتایج موجود، میزان این گلیکوپروتئین در سرم مادران باردار، دارای جنین مبتلا به تربیومی ۲۱ و پرهاکلامپسی افزایش قابل توجهی داشته و لذا اندازه‌گیری غلظت این گلیکوپروتئین

1- Negative Feedback

جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm توسط دستگاه الایزا ریدر (اتریش، ۲۰۲۰) قرائت گردید.

ج) کروماتوگرافی افینیتی: در این مرحله با استفاده از آنتی بادی تکدودمانی Inhibin اقدام به خالص سازی این پروتئین از مایع فولیکولی گردید برای این منظور نیاز به تهیه ایستون کروماتوگرافی افینیتی می باشد. برای تهیه ایستون ۲ گرم پودر Amersham- CNBr activated sepharose-4B (pharmacia, sweden) طبق روش معرفی شده در Amersham-pharmacia فعال و با ۱۰ mg آنتی بادی تک- دودمانی IgM علیه Inhibin انسانی (پژوهشکده این سینا) به عنوان لیگاند آماده سازی شد. جهت تخلیص پروتئین Inhibin از مایع فولیکولی تغليظ شده، حجم ۵۰ ml از محلول پروتئینی مذکور از ستون جنبی CNBr activated Sepharose-4B عبور داده شد. پس از شستشوی ستون توسط ۱۰۰ ml باfer PBS و عبور ۲۰ ml باfer اسیدی Glycin-HCl (pH=۲/۵)، پروتئین دارای افینیتی به آنتی بادی های تکدودمانی از ستون جمع آوری گردید و در برابر باfer PBS دیالیز و تغليظ گردید.

(د) تعیین خلوص Inhibin حاصل از ستون کروماتوگرافی افینیتی: برای تایید خلوص Inhibin از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد [۱۶]. در این روش جهت تایید پروتئین Inhibin، قسمتی از نمونه در شرایط احیا با ترکیب 2-ME⁴ (Merck, Germany) الکتروفورز گردید. در پایان باندهای پروتئینی به کمک روش رنگ آمیزی نقره مشخص گردید.

(ز) تایید خلوص Inhibin به روش Western Blot: منظور تایید بیشتر پروتئین خالص سازی شده و نحوه اتصال پروتئین به آنتی بادی تکدودمانی، از روش ایمونوبلاستینگ استفاده شد [۱۷]. در این روش پس از الکتروفورز بر روی ژل- PAGE باندهای پروتئینی تحت جریان الکتریکی روی کاغذ PVDF⁵ منتقل گردید. جهت تعیین محل باند Inhibin روی کاغذ، از آنتی بادی تکدودمانی موش علیه Inhibin با غلظت Rabbit Anti Mouse-HRP ۱۰ µg/ml و کونزوگ⁶ (پژوهشکده این سینا) با رقت ۱:۲۰۰۰ استفاده شد.

نتایج

تغليظ مایع فولیکولی با استفاده از روش Salting out: در این مطالعه نمونه به حجم های ۵۰ ml تقسیم گردید و پس از مراحل رسوب توسط سولفات آمونیوم اشباع و دیالیز، حجم

جهت حذف سلول های گرانولوزا و سایر ذرات، مایع فولیکولی با دور rpm ۴۰۰۰ در دمای ۴°C برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی جمع آوری و تا زمان بررسی در دمای ۲۰°C نگهداری شد. در مجموع طی یک دوره ای شش ماهه از ابتدای مهر تا پایان اسفند ۱۳۸۳، میزان ۲۰۰۰ ml مایع فولیکولی از حدود ۵۰ خانم تحت درمان در مرکز درمانی این سینا، جمع آوری گردید.

الف) تغليظ مایع فولیکولی با استفاده از روش Salting out: در این مرحله Inhibin و به طور احتمال سایر پروتئین های موجود در مایع فولیکولی به کمک سولفات آمونیوم رسوب و تغليظ گردید. بدین منظور پس از ذوب و فیلتر نمودن مایع فولیکولی توسط کاغذ صافی (Whatman No. 1)، به حجم ۵۰ ml از مایع مذکور، ۶۰۰ ml محلول سولفات آمونیوم اشباع اضافه شد. افزودن محلول نمکی سولفات آمونیوم اشباع به تدریج در عرض ۲ ساعت همراه با همزدن مداوم (به کمک هم زن مغناطیسی) انجام گرفت. پس از اتمام افزودن نمک، سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط گردید. در مرحله بعد محلول پروتئینی به مدت ۲۰ دقیقه، در حجم های ۵۰ ml با سرعت rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. به منظور جلوگیری از آسیب و تخرب ساختمان پروتئین، تمام مراحل تخلیص در دمای ۴°C انجام گرفت. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی جمع آوری و به میزان هم حجم آن سولفات آمونیوم اضافه گردید و دوباره سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل به مدت یک شبانه روز در مقابل باfer PBS (pH=۷/۴) در ۰/۱۵ M در pH=۷/۴ تحت دیالیز قرار گرفت.

ب) تایید حضور Inhibin در مایع فولیکولی به روش الایزای غیرمستقیم: در این مرحله غلظت مایع فولیکولی تغليظ شده، به کمک روش برادرورد اندازه گیری شد [۱۵] و سپس غلظت ۵ mg/ml از محلول حاصل با رقت های سریال ۱/۱۲۸۰، ۱/۲۰، ۱/۱۰۰ تهیه و به عنوان لایه اول آزمون الایزا اضافه گردید. مراحل شستشو بین هر مرحله توسط محلول ۰/۰۵ درصد-Tween PBST حاوی BSA² درصد به عنوان محلول بلاک- کننده در هر حفره استفاده گردید. در لایه دوم آزمون الایزا از آنتی بادی تکدودمانی علیه زنجیره IgM anti-(Inhibin α) (human Inhibin (پژوهشکده این سینا) با غلظت ۱۰ µg/ml در باfer PBS استفاده شد. لایه سوم شامل کونزوگه-Rabbit antimouse IgG³ HRP با رقت ۱:۲۰۰۰ بود. در پایان میزان

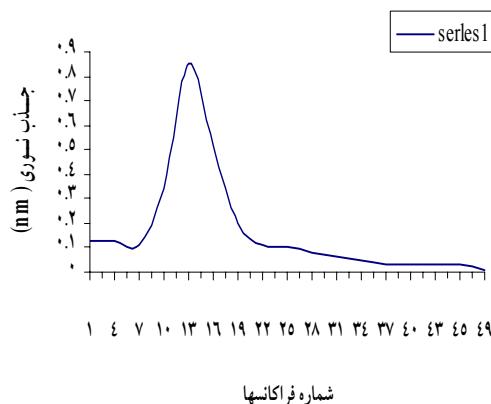
4 - Mercaptoethanol

5 - Polyvinylidene Difluoride

2 -Bovine Serum Albumin

3 -Horse Radish Peroxidase

تنها دو مولکول Inhibin متصل گردد و با توجه به اینکه ۱۰ mg آنتی بادی در ساخت ستون به کار گرفته شده بنابراین قابلیت جذب تقریبی ستون μg ۷۰۰ خواهد بود. شکل شماره‌ی ۱ مربوط به جمع‌آوری فراکسیون‌های پس از عبور محلول پروتئینی تغليظ شده مایع فولیکولی می‌باشد.



نمودار ۱- کروماتوگرافی Inhibin بر روی ژل CNBr activated sepharose-4B

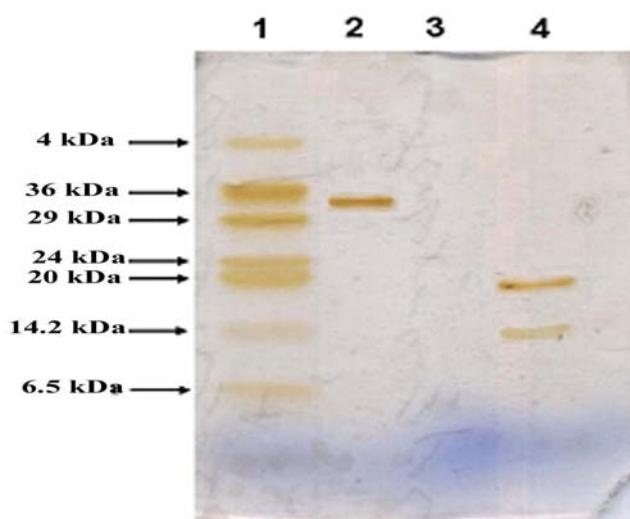
نمونه: مایع فولیکولی، فاز متحرک: بافر ۰/۱ mM glycine-HCl، فاز ساکن: CNBr activated sepharose-4B (pH=2/5)، فاز ساکن: حاوی لیگاند، یوبی کوئیتین، سرعت فاز متحرک: ۱۲ ml/h، حجم فراکسیون‌های جمع‌آوری شده: ۱ ml، حجم ستون: ۶

محلول پروتئینی به دست آمده ۱۲۰ ml اندازه‌گیری شد. غلظت محلول پروتئین با روش برادرافورد ۵/۵ mg/ml بود که نتایج آن در جدول شماره‌ی ۱ ارایه گردیده است.

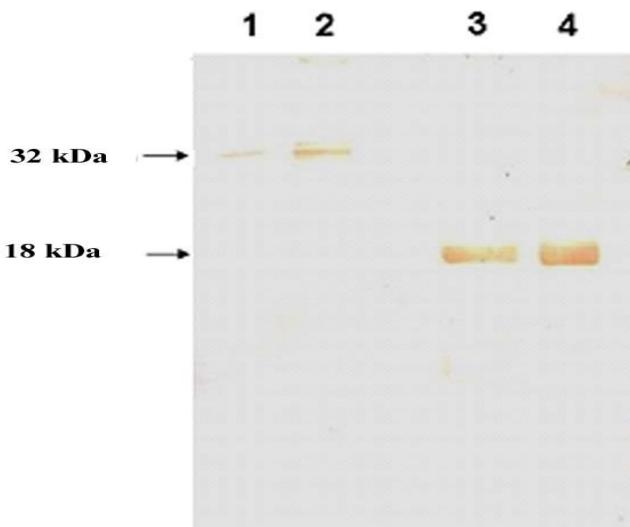
جدول ۱- مقدار پروتئین تغليظ شده از مایع فولیکولی پس از رسوب توسط سولفات آمونیوم

مقدار پروتئین	غلظت پروتئین	حجم	مقدار پروتئین
آزمایش	(mg/ml)	(mg)	(mg)
مایع فولیکولی	۵/۵	۱۲۰	۶۶۰

تایید حضور Inhibin در مایع فولیکولی به روش الایزای غیرمستقیم: جهت تایید حضور Inhibin در مایع فولیکولی و در حقیقت اثبات وجود اپی‌توب‌های مربوط به این پروتئین آزمون الایزا با کمک رقت‌های سریال از مایع فولیکولی طراحی گردید که نتایج جذب نوری به دست آمده در مقایسه با کنترل منفی، نشان-دهنده‌ی واکنش آنتی بادی با پروتئین Inhibin بود. در این آزمایش بالاترین جذب نوری $1/34$ و به ترتیب با رقیق شدن مایع فولیکولی جذب نوری پایین‌تر مشاهده گردید. (جدول شماره‌ی ۲) **کروماتوگرافی افینیتی:** پس از تهیه ستون افینیتی حاوی آنتی بادی علیه Inhibin، محاسبات لازم جهت تعیین تقریبی ظرفیت ستون کروماتوگرافی برای تخلیص Inhibin صورت گرفت. ۹۰۰ kDa (IgM MW)/ 32 kDa (Inhibin MW)= 28. آنجا که مولکول IgM وزن مولکولی معادل ۲۸ برابر یک مولکول Inhibin دارد. هرگاه به هر مولکول IgM به طور فرضی



شکل ۱- الگوی SDS-PAGE پروتئین Inhibin تخلیص شده با روش کروماتوگرافی افینیتی ۱- استانداردها با اوزان مولکولی مختلف، ۲- Inhibin-2-ME تخلیص شده (در عدم حضور ۲-ME)، ۳- زنجیره‌های آلفا و بتا مولکول Inhibin (در حضور ۲-ME)



شکل ۲- الگوی ایمونوبلاتینگ Inhibin

۱ و ۲- Inhibin تخلیص شده (در عدم حضور 2-ME)، ۳ و ۴ زنجیره‌های آلفا و بتا مولکول Inhibin (در حضور 2-ME)

جدول ۲- واکنش آنتی‌بادی تک‌دودمانی با رقت سریال مایع فولیکولی

رقت‌های مایع فولیکولی	۱/۱۰	۱/۲۰	۱/۴۰	۱/۸۰	۱/۱۶۰	۱/۳۲۰	۱/۶۴۰	۱/۱۲۸۰	۱/۲۵۶۰	کنترل منفی (بدون لایه دوم)	کنترل منفی (بدون لایه اول)
(OD) جذب نوری * ۴۵۰	۱/۳۴	۱/۱۳	۱/۰۷	۰/۸۵	۰/۶۸	۰/۵۱	۰/۲۳	۰/۱۶۱	۰/۰۲۲	۰/۰۱۳	

* میزان جذب نوری بر حسب نانومتر می‌باشد

جدول ۳- مقدار پروتئین تخلیص و تغلیظ شده بعد از عبور مایع فولیکولی از ستون کروماتوگرافی افینیتی

نمونه مورد آزمایش	غلهای پروتئین (μg/ml)	حجم (ml)	مقدار پروتئین تخلیص شده (μg)
نمونه پروتئینی حاصل از ستون افینیتی	۳/۳	۱/۴	۴/۶۲

بحث

امروزه Inhibin محور بسیاری از تحقیقات بالینی و پایه در حیطه باروری و ناباروری قرارگرفته است و تلاش جهت شناسایی هرچه بیشتر نقش‌های آن و کاربرد آن در تشخیص‌های بالینی اهمیت ویژه‌ای یافته است. همانکنون در کشور ما نیز تحقیقات گستره‌داری روی این هورمون در حال انجام است. در بسیاری از این تحقیقات از تکنیک‌هایی نظیر الایزا، ایمونوفلورسانس، رادیوایمونواسی، فلوسایتوometری و ایمونوھیستوشیمی و استفاده می‌شود که در آنها نیاز به وجود پروتئین خالص Inhibin می‌باشد [۲۰، ۱۹]. با توجه به تحقیقات که تاکنون توسط محققین در جهت تخلیص Inhibin از منابع گوناگون صورت گرفته است مایع فولیکولی گاو غنی‌ترین منبع شناخته شده برای Inhibin می‌باشد. به طوری که غلظت

مقدار پروتئین تخلیص شده از ستون $4/62 \mu\text{g}$ بود که نتایج آن در جدول شماره ۲ ارایه گردیده است. از آنجا که غلظت Inhibin در مایع فولیکولی 10 ng/ml می‌باشد، میزان Inhibin موجود در 500 ml مایع فولیکولی مورد استفاده در تحقیق حاضر $50 \mu\text{g}$ خواهد بود. با توجه به مقدار نهایی $4/62 \mu\text{g}$ راندمان روش تخلیص در این مطالعه 92 درصد می‌باشد. نتایج بررسی الکتروفورز SDS PAGE حاکی از خالص بودن باند پروتئینی استخراج شده بود (شکل شماره ۲) نتیجه‌ی حاصل از اثر 2ME به صورت دو باند پروتئینی بر روی ژل الکتروفورز ظاهر گردید. نتایج آزمایش وسترن‌بلاس نشان می‌دهد که آنتی‌بادی اختصاصی علیه Inhibin قادر به شناسایی اپی‌توب مربوط می‌باشد. پس از احیای زنجیره‌های دی‌سولفید و جداسازی دو زیر واحد β و α در مولکول، نتایج آزمون ایمونوبلات به صورت تک باند مشخص گردید.

مختلف را دشوار می‌سازد. روش کروماتوگرافی امروزه کاربرد فراوانی در حیطه تحقیقات و تولید داشته و به لحاظ راندمان بالا و تکرارپذیری از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. در تحقیق Inhibin حاضر از آنتی بادی‌های تک دودمانی دسته IgM علیه Inhibin برای تهیه ستون کروماتوگرافی افینیتی استفاده گردید. آنتی بادی‌های تک دودمانی دارای افینیتی بالایی علیه یک اپی‌توپ خالص از آنتی ژن هدف بوده و از نظر دسته، ساب دسته و میل ترکیبی به آنتی ژن، نسبت به آنتی بادی‌های چند دودمانی یکنواخت و هموژن می‌باشند. آنتی بادی‌های دسته IgM دارای افینیتی کمتری نسبت به نوع IgG بوده ولی با توجه به ۵ ظرفیتی بودن دسته IgM از اولویتی بالاتر نسبت به آنتی بادی‌های نوع IgG دو ظرفیتی برخوردار می‌باشند [۲۷]. در بررسی که توسط Changhui و همکارانش جهت تخلیص ایمونوگلوبولین به کمک ستون افینیتی تهیه شده با IgM صورت گرفت، از IgM به عنوان مولکولی مناسب در تهیه ستون افینیتی کروماتوگرافی استفاده گردید [۲۸]. در آزمایش وسترن‌بلات مشخص گردید که آنتی بادی تک دودمانی قادر به شناسایی مولکول Inhibin تخلیص شده و زنجیره با وزن مولکولی ۲۰ kDa، نشان‌دهنده اتصال اختصاصی آنتی بادی با زنجیره α در Inhibin می‌باشد. هر چند آنتی بادی مورد استفاده در تحقیق حاضر، به منظور انجام تخلیص مناسب است ولی به علت تشابه زیر واحد α در هر دو نوع Inhibin A مولکول تخلیص شده با توجه به منبع آن می‌تواند شامل هر یک از دو نوع Inhibin باشد. لذا در مواردی که نیاز به تخلیص یکی از دو نوع مولکول Inhibin می‌باشد با توجه به اختلاف دو مولکول در زنجیره β باید از آنتی بادی تک دودمانی اختصاصی بر علیه زنجیره β استفاده نمود. در بین گزارشات در زمینه تخلیص Inhibin از مایع فولیکولی انسان و گاو، ملاحظه می‌شود که میزان موفقیت در موارد انسانی کمتر بوده و این به دلیل عدم دسترسی به مایع فولیکولی انسان و همچنین مشکلات فراوان در تهیه حجم انبوه آن می‌باشد. از طرفی با توجه به اندازه کوچک ژن تولید کننده Inhibin و امکان کلون نمودن آن در وکتورهای ییانی مختلف (سیستم‌های باکتریایی، مخمیر و رده‌های سلولی مختلف) تولید Inhibin نوترکیب همواره از اهمیت بالاتری برخوردار بوده است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی تخلیص Inhibin توسط روش ارایه شده در این مقاله بیشتر برای کاربردهای آزمایشگاهی در مقادیر کم توصیه می‌شود و برای کاربردهای تولیدی و نیمه صنعتی تهیه Inhibin نوترکیب توصیه می‌گردد.

Inhibin در مایع فولیکولی گاو چندین برابر مایع فولیکولی در انسان می‌باشد [۲۱]. با این حال به دلیل در دسترس بودن مایع فولیکولی انسان در تحقیق حاضر از مایع فولیکولی زنان مراجعه کننده جهت درمان نایاروری و همچنین افراد تحت درمان به روش تحریک تخمک‌گذاری استفاده گردید. با توجه به محاسبات به عمل آمده، ظرفیت ستون کروماتوگرافی افینیتی تهیه شده ۷۰ میکروگرم می‌باشد. از آنجا که غلظت Inhibin موجود در مایع فولیکولی در حدود 10 ng/ml می‌باشد، لذا می‌توان در هر مرتبه استخراج از 70 lit مایع فولیکولی تغليظ شده استفاده نمود. البته مقدار به دست آمده، یک ظرفیت توریک و محاسباتی است. زیرا اولاً در اتصال آنتی بادی به ژل، راندمان 100 ml درصد نبوده و تمامی آنتی بادی‌های مورد استفاده به ژل متصل نمی‌شوند. ثانیاً در مورد بسیاری از آنتی بادی‌های متصل شده به ستون، وضعیت اتصال نامناسب بوده به طوری که ناجیه Fab آنتی بادی‌ها جهت اتصال به مولکول‌های Inhibin آزاد نمی‌باشد. علاوه بر این به علت ماهیت پتامری IgM، ممانعت فضایی موجود در پروتئین‌ها نیز مانع از اتصال مناسب آنتی بادی به ژل و همچنین اتصال Inhibin به آنتی بادی می‌گردد، با در نظر گرفتن تمامی این موارد، در این تحقیق 500 ml مایع فولیکولی تغليظ شده از ستون عبور داده شد که در نهایت $4/62\mu\text{g}$ Inhibin خالص به دست آمد. بنابراین میزان موفقیت یا راندمان ستون در جداسازی Inhibin با استفاده از کروماتوگرافی افینیتی حدوداً 92 ml درصد می‌باشد. که در مقایسه با راندمان به دست آمده توسط Chari و همکاران از مایع فولیکولی انسان به کمک دو روش ژل کروماتوگرافی و کروماتوگرافی تعویض یونی راندمان بسیار بالایی برخوردار می‌باشد [۲۲، ۲۳]. همچنین نتایج ما راندمان بالاتر و روش ساده‌تری را نسبت به نتایج River [۲۳] و همچنین Knight و همکارانش در سال ۱۹۹۰ در تخلیص از مایع فولیکولی گاو معرفی نمود [۲۴]. با این حال نسبت به راندمان تخلیص 95 ml درصد توسط Leversha در سال ۱۹۸۷ کمتر بود [۲۵]. در روش این محقق از تکنیک حساس HPLC استفاده شده بود. به طور کلی در خالص سازی با استفاده از روش‌های پیشین احتمال حضور ناخالصی همواره وجود دارد و در نتیجه نیاز به انجام روش‌های کروماتوگرافی متعددی برای تهیه Inhibin خالص می‌باشد. از طرفی با افزایش تعداد مراحل تخلیص، راندمان تخلیص کاهش می‌یابد. توضیح آنکه به دلیل وجود چندین جایگاه گلیکوزیلاسیون در زیر واحدهای مولکول Inhibin و تنوع گزارش وزن مولکولی برای Inhibin و زیر واحدهای آن [۲۶]. مقایسه بین نتایج به دست آمده در مورد جداسازی و تخلیص Inhibin توسط محققین

Reference:

- [1] Burger HG. Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. *J Endocrinol* 1988; 117: 159-160.
- [2] Ying SY. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 1988; 9: 267-293.
- [3] Billiar RB. Smith P. Falcone T. Identification of immunoreactive inhibin in human and baboon fetal serum at term as free alpha-subunit (s). *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3173-3179.
- [4] Halvorson LM. DeCherney AH. Inhibin, activin, and follistatin in reproductive medicine. *Fertil Steril* 1996; 65: 459-469.
- [5] McCullagh DR. Dual Endocrine Activity of the Testes. *Science* 1932; 76: 19-20.
- [6] Robertson DM. Foulds LM. Leversha L. Morgan FJ. Hearn MT. Burger HG. et al. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 126: 220-226.
- [7] Good TE. Weber PS. Ireland JL. Pulaski J. Padmanabhan V. Schneyer AL. et al. Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. *Biol Reprod* 1995; 53: 1478-1488.
- [8] Sehested A. Juul AA. Andersson AM. Petersen JH. Jensen TK. Muller J. et al. Serum inhibin A and inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1634-1640.
- [9] Spencer K. Liao AW. Ong CY. Geerts L. Nicolaides KH. Maternal serum levels of dimeric inhibin A in pregnancies affected by trisomy 21 in the first trimester. *Prenat Diagn* 2001; 21: 441-444.
- [10] Fraser RF 2nd. McAsey ME. Coney P. Inhibin-A and pro-alpha C are elevated in preeclamptic pregnancy and correlate with human chorionic gonadotropin. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40: 37-42.
- [11] Ciarmela P. Florio P. Battistini S. Grasso D. Amato T. Boschi S. et al. Mutational analysis of the inhibin alpha gene in preeclamptic women. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 30-33.
- [12] Klingmuller D. Haidl G. Inhibin B. in men with normal and disturbed spermatogenesis. *Hum Reprod* 1997; 12: 2376-2378.
- [۱۳] حمیدی مدنی علی، شیری حسن. بررسی اینھیبین سرم به عنوان نشانگر مطمئن پیش بینی وجود آسپرم در مردان آزواسپرمیک. مجله دانشکده پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان ۱۳۸۳؛ دوره ۵۱، شماره ۳: صفحات ۴۵ تا ۵۱.
- [14] Ling N. Ying SY. Ueno N. Esch F. Denoroy L. Guillemin R. Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7217-7221.
- [15] Braunstein JD. Halwer M. Bradford protein assay and determination of estrogen and progesterone receptors. *Clin Chem* 1986; 32: 1588-1589.
- [16] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- [17] Kurien BT. Scofield RH. Protein blotting: a review. *J Immunol Methods* 2003; 274: 1-15.
- [18] Gershoni JM. Palade GE. Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* 1983; 131: 1-15.
- [19] Groome NP. Illingworth PJ. O'Brien M. Cooke I. Ganeshan TS. Baird DT. et al. Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 40: 717-723.
- [20] Kosmahl M. Wagner J. Peters K. Sipos B. Kloppel G. Serous cystic neoplasms of the pancreas: an immunohistochemical analysis revealing alpha-inhibin, neuron-specific enolase, and MUC6 as new markers. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 339-346.
- [21] McLachlan RI. Robertson DM. Burger HG. de Kretser DM. The radioimmunoassay of bovine and human follicular fluid and serum inhibin. *Mol Cell Endocrinol* 1986; 46: 175-185.
- [22] Chari S. Hopkinson CR. Daume E. Sturm G. Purification of "inhibin" from human ovarian follicular fluid. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1979; 90: 157-166.
- [23] Rivier J. Spiess J. McClintonck R. Vaughan J. Vale W. Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133: 120-127.
- [24] Knight PG. Castillo RJ. Glencross RG. Beard AJ. Wrathall JH. Isolation of bovine ovarian inhibin, its immunoneutralization in vitro and immunolocalization in bovine ovary. *Domest Anim Endocrinol* 1990; 7: 299-313.
- [25] Leversha LJ. Robertson DM. de Vos FL. Morgan FJ. Hearn MT. Wettenhall RE. et al. Isolation of inhibin from ovine follicular fluid. *J Endocrinol* 1987; 113: 213-221.
- [26] Sugino K. Nakamura T. Takio K. Miyamoto K. Hasegawa Y. Igarashi M. et al. Purification and characterization of high molecular weight forms of inhibin from bovine follicular fluid. *Endocrinology* 1992; 130: 789-796.
- [27] Wiersma EJ. Collins C. Fazel S. Sholman MJ. Structural and functional analysis of J chain-deficient IgM. *J Immunology* 1998; 160: 5979-5989.
- [28] Changhui G. Dongme Z. Hanfa Z. Zhengmei Z. Preparation of a novel High performance membrane chromatographic IgM column. *Immunological Journal* 1999; 16: 15-19.