تخلیص Inhibin از مایع فولیکولی انسان با استفاده از آنتی‌بادی تک‌دودمانی

محمدرضا صادقی [۱*]، مهشید حجت [۲]، نیما ناصری [۳]، محمود جدی تهرانی [٤]، نریمان مصفا [٥]، محمدمهدی آخوندی [٦]، رویا قدس [۷]، علی‌احمد بیات [۸]

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 ارزنده‌ای 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 تخلیص 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 مراجعه‌کننده به مرکز درمانی ابن‌سینا، پس از فیلتراسیون توسط محلول سولفات آمونیوم اشباع، تغلیظ گردید. جهت جداسازی Inhibin، از روش ایمونوافینیتی بر روی ستون کروماتوگرافی جذبی به کمک آنتی‌بادی تک-دودمانی 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 کیلودالتونی بعد از رنگ‌آمیزی نقره موید حضور Inhibin بود. نتیجه‌ی آزمون وسترن بلات نشان‌دهنده‌ی شناسایی اپی‌توپ توسط آنتی‌بادی 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 بیوشیمیایی از راندمان بالایی برخوردار می‌باشد. با این حال به دلیل عدم دسترسی به مایع فولیکولی انسان در حجم انبوه، تخلیص 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، تخلیص، آنتی‌بادی تک‌دودمانی

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

۲- مربی گروه غدد و تولیدمثل و جنین‌شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی تولیدمثل و نازایی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن سینا

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

٤- دانشیار گروه آنتی‌بادی مونوکلونال مرکز تحقیقات آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن‌سینا

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

٦- دانشیار گروه غدد و تولیدمثل و جنین‌شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی تولیدمثل و نازایی، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن سینا

۷- مربی گروه آنتی‌بادی مونوکلونال مرکز تحقیقات آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ابن سینا

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

* **نویسنده مسوول:** محمدرضا صادقی

آدرس: تهران، اوین، صندوق پستی ۱۷۷-۱۹۸۳۵، پژوهشکده ابن سینا

پست الکترونیک : Sadeghi@avicenna.ac.ir

تلفن: ۰۲۱ ۲۲٤۳۲۰۲۰

دورنویس: ۰۲۱ ۲۲٤۳۲۰۲۱

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۲۱

تاریخ پذیرش نهایی: ۸٦/٦/۳۱

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

مقدمه

Inhibin گلیکوپروتئینی هترودایمر متشکل از دو زیرواحد α و β می‌باشد که بر اساس رشته β به دو نوع A و B تقسیم می‌گردد. این پروتئین توسط سلول‌های گرانولوزای تخمدان، سلول‌ها سرتولی بیضه و جفت، در پاسخ به اثر هورمون FSH تولید می‌شود [۱، ۲]. علاوه بر این مایعات بدن انسان محتوی فرم‌های آزاد زیرواحد α این پروتئین هستند که فاقد فعالیت زیستی است [۳]. شناخته شده‌ترین نقش این گلیکوپروتئین مهار تولید و ترشح FSH از هیپوفیز قدامی به صورت پس‌نورد منفی[1] می‌باشد [٤]. 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 هیپرتروفی هیپوفیز از طریق کاهش سطح FSH خون در موش‌های آزمایشگاهی می‌گردید [٥]. هیپرتروفی 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 تخمدان 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 kDa ۵۸ از مایع فولیکولی گاو استخراج و خالص گردید [٦]. 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 گلیکوپروتئینی نوع kDa ۳۲ آن می‌باشد. بر اساس مطالعات مختلف، غلظت Inhibin نوع A و B 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 فعال 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 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 تعیین‌کننده‌ی ذخیره تخمدانی قلمداد می‌شود. بر اساس نتایج موجود، میزان این گلیکوپروتئین در سرم مادران باردار، دارای جنین مبتلا به تریزومی۲۱ و پره‌اکلامپسی افزایش قابل توجهی داشته و لذا اندازه‌گیری غلظت این گلیکوپروتئین جهت تشخیص ابتلای جنین به سندروم داون و یا ابتلای مادر به پره‌اکلامپسی بسیار ارزشمند خواهد بود [۱۱-۹]. اندازه‌گیری غلظت این فاکتور در مردان نیز حایز اهمیت می‌باشد. به طوری که امروزه جهت بررسی اسپرماتوژنز 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 تهیه‌ی فرم خالص این پروتئین همواره وجود دارد. Inhibin خالص در تهیه آنتی‌بادی‌های تک‌دودمانی و پلی کلنال علیه آن، تهیه استاندارد کیت‌های تشخیصی و به طور کلی تهیه‌ی 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 directed mutagenesis در مورد Inhibin انجام داد. Inhibin برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ از مایع فولیکولی خوک تخلیص گردید [١٤] 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 (۱۰ng/ml) جهت تخلیص می‌باشد در این تحقیق از مایع فولیکولی زنان مراجعه‌کننده به مرکز درمانی ابن‌سینا استفاده شد. برای این منظور در زنانی که به دلایل مشکلات مردانه یا زنانه دچار ناباروری بوده و جهت درمان نیاز به یکی از روش‌های کمک‌باروری 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

1- Negative Fedback

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

جهت حذف سلول‌های گرانولوزا و سایر ذرات، مایع فولیکولی با دور rpm ٤۰۰۰ در دمای c°٤ برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی جمع‌آوری و تا زمان بررسی در دمای c°۲۰- نگهداری شد. در مجموع طی یک دوره‌ی زمانی شش‌ماهه از ابتدای مهر تا پایان اسفند ۱۳۸۳، میزان ml ۲۰۰۰ مایع فولیکولی از حدود ۵۰ خانم تحت درمان در مرکز درمانی ابن‌سینا، جمع‌آوری گردید.

الف) تغلیظ مایع فولیکولی با استفاده از روش Salting out: در این مرحله Inhibin و به طور احتمال سایر پروتئین‌های موجود در مایع فولیکولی به کمک سولفات آمونیوم رسوب و تغلیظ گردید. بدین منظور پس از ذوب و فیلتر نمودن مایع فولیکولی توسط کاغذ صافی(Whatman No. 1)، به حجم ml۵۰۰ از مایع مذکور، ml ٦۵۰ محلول سولفات آمونیوم اشباع اضافه شد. افزودن محلول نمکی سولفات آمونیوم اشباع به تدریج در عرض ۲ ساعت همراه با هم‌زدن مداوم (به کمک هم‌زن 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 مدت۲۰ دقیقه، در حجم‌های ml ۵۰ با سرعت rpm ٤۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. به منظور جلوگیری از آسیب و تخریب ساختمان پروتئین، تمام مراحل تخلیص در دمای c°٤ انجام گرفت. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی جمع‌آوری و به میزان هم حجم آن سولفات آمونیوم اضافه گردید و دوباره سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل به مدت یک شبانه‌روز در مقابل بافر PBS (M ۰/۱۵) در pH= ۷/٤ تحت دیالیز قرار گرفت.

ب) تایید حضور Inhibin **در مایع فولیکولی به روش الایزای غیرمستقیم:** در این مرحله غلظت مایع فولیکولی تغلیظ شده، به کمک روش برادفورد اندازه‌گیری شد [۱۵] و سپس غلظت mg/ml ۵ از محلول حاصل با رقت‌های سریال ۱/۱۲۸۰،..... ۱/۲۰، ۱/۱ تهیه و به عنوان لایه اول آزمون الایزا اضافه گردید. مراحل شستشو بین هر مرحله توسط محلول ۰/۰۵ درصد-PBS Tweenانجام شد. به منظور کاهش واکنش غیراختصاصی از محلول PBST حاوی BSA[2] ۱ درصد به عنوان محلول بلاک-کننده در هر حفره استفاده گردید. در لایه‌ی دوم آزمون الایزا از آنتی‌بادی تک‌دودمانی علیه زنجیره α Inhibin (anti-IgM human Inhibin) (پژوهشکده‌ی ابن‌سینا) با غلظت µg/ml ۱۰ در بافر PBS استفاده شد. لایه‌ی سوم شامل کونژوگه Rabbit-antimouse IgG HRP[3] با رقت ۱:۲۰۰۰ بود. در پایان میزان جذب نوری در طول موج nm ٤۵۰ توسط دستگاه الایزا ریدر (اتریش، Antho 2020) قرائت گردید.

ج) کروماتوگرافی افینیتی: در این مرحله با استفاده از آنتی‌بادی تک‌دودمانی علیه Inhibin اقدام به خالص‌سازی این پروتئین از مایع فولیکولی گردید برای این منظور نیاز به تهیه‌ی ستون کروماتوگرافی افینیتی می‌باشد. برای تهیه‌ی این ستون ۲ گرم پودر CNBr activated sepharose-4B (Amersham-pharmacia,sweden) طبق روش معرفی شده در Amersham-pharmacia فعال و با ۱۰mg آنتی‌بادی تک-دودمانی IgM علیه Inhibin انسانی (پژوهشکده‌ی ابن‌سینا) به عنوان لیگاند آماده‌سازی شد. جهت تخلیص پروتئین Inhibin از مایع فولیکولی تغلیظ شده، حجم ml۵۰ از محلول پروتئینی مذکور از ستون جذبیCNBr activated Sepharose-4B تهیه شده عبور داده شد. پس از شستشوی ستون توسط ml۱۰۰ بافر PBS و عبور ml ۲۰ بافر اسیدی Glycin-HCl (pH=۲/۵)، پروتئین دارای افینیتی به آنتی‌بادی‌های تک‌دودمانی از ستون جمع‌آوری گردید و در برابر بافر PBS دیالیز و تغلیظ گردید.

د) تعیین خلوص Inhibin **حاصل از ستون کروماتوگرافی افینیتی:** برای تایید خلوص Inhibin از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد [۱٦]. در این روش جهت تایید پروتئین Inhibin، قسمتی از نمونه در شرایط احیا با ترکیب 2-ME[4] (Merck,Germany) الکتروفورز گردید. در پایان باندهای پروتئینی به کمک روش رنگ‌آمیزی نقره مشخص گردید.

ز) تایید خلوص Inhibin **به روش** Western Blot**:** به منظور تایید بیشتر پروتئین خالص‌سازی شده و نحوه‌ی اتصال پروتئین به آنتی‌بادی تک‌دودمانی، از روش ایمونوبلاتینگ استفاده شد [۱۷، ۱۸]. در این روش پس از الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE باندهای پروتئینی تحت جریان الکتریکی روی کاغذ PVDF[5] منتقل گردید. جهت تعیین محل باند Inhibin روی کاغذ، از آنتی‌بادی تک‌دودمانی موش علیه Inhibin با غلظت µg/ml ۱۰ و کونژوگه Rabbit Anti Mouse-HRP (پژوهشکده‌ی ابن‌سینا) با رقت ۱:۲۰۰۰ استفاده شد.

نتایج

تغلیظ مایع فولیکولی با استفاده از روش Salting out**:** در این مطالعه نمونه به حجم‌های ml۵۰۰ تقسیم گردید و پس از مراحل رسوب توسط سولفات آمونیوم اشباع و دیالیز، حجم

2 -Bovine Serum Albumin
3 -Horse Radish Peroxidase
4 - Mercaptoethanol
5 - Polyvinylidene Difluoride

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

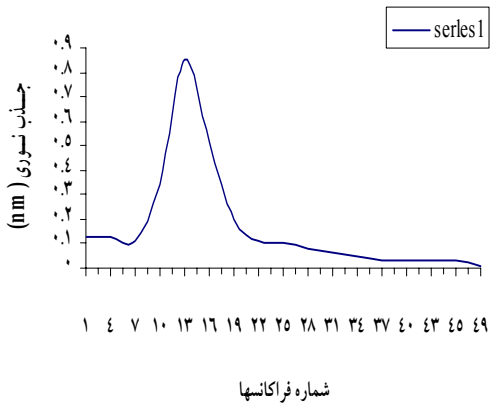
محلول پروتئینی به دست آمده ۱۲۰ ml اندازه‌گیری شد. غلظت محلول پروتئین با روش برادفورد ۵/۵ mg/ml بود که نتایج آن در جدول شماره‌ی ۱ ارایه گردیده است.

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

مقدار پروتئین (mg)	حجم (mg)	غلظت پروتئین (mg/ml)	نمونه مورد آزمایش
٦٦٠	۱۲۰	۵/۵	مایع فولیکولی

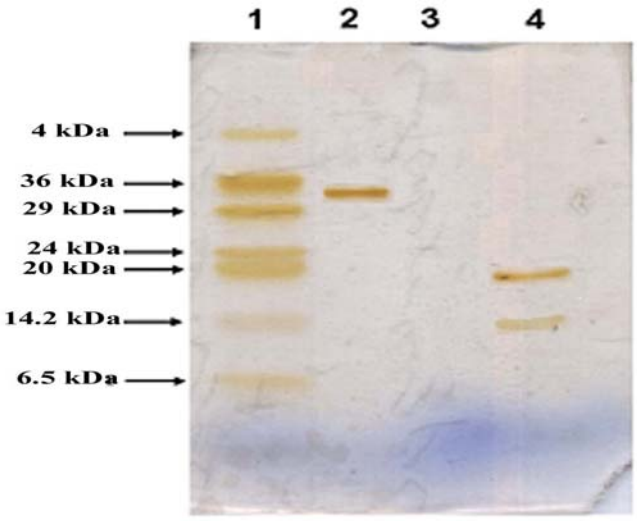
تایید حضور Inhibin در مایع فولیکولی به روش الایزای غیرمستقیم: جهت تایید حضور Inhibin در مایع فولیکولی و در حقیقت اثبات وجود اپی‌توپ‌های مربوط به این پروتئین آزمون الایزا با کمک رقت‌های سریال از مایع فولیکولی طراحی گردید که نتایج جذب نوری به دست آمده در مقایسه با کنترل منفی، نشان‌دهنده‌ی واکنش آنتی‌بادی با پروتئین Inhibin بود. در این آزمایش بالاترین جذب نوری ۱/۳٤ و به ترتیب با رقیق شدن مایع فولیکولی جذب نوری پایین‌تر مشاهده گردید. (جدول شماره‌ی۲)

کروماتوگرافی افینیتی: پس از تهیه ستون افینیتی حاوی آنتی‌بادی علیه Inhibin، محاسبات لازم جهت تعیین تقریبی ظرفیت ستون کروماتوگرافی برای تخلیص Inhibin صورت گرفت.28 =900 kDa (IgM MW)/ 32 kDa (Inhibin MW) از آنجا که مولکول IgM وزن مولکولی معادل ۲۸ برابر یک مولکول Inhibin دارد. هرگاه به هر مولکول IgM به طور فرضی تنها دو مولکول Inhibin متصل گردد و با توجه به اینکه ۱۰ mg آنتی‌بادی در ساخت ستون به کار گرفته شده بنابراین قابلیت جذب تقریبی ستون ۷۰۰ µg خواهد بود. شکل شماره‌ی ۱ مربوط به جمع‌آوری فراکسیون‌های پس از عبور محلول پروتئینی تغلیظ شده مایع فولیکولی می‌باشد.



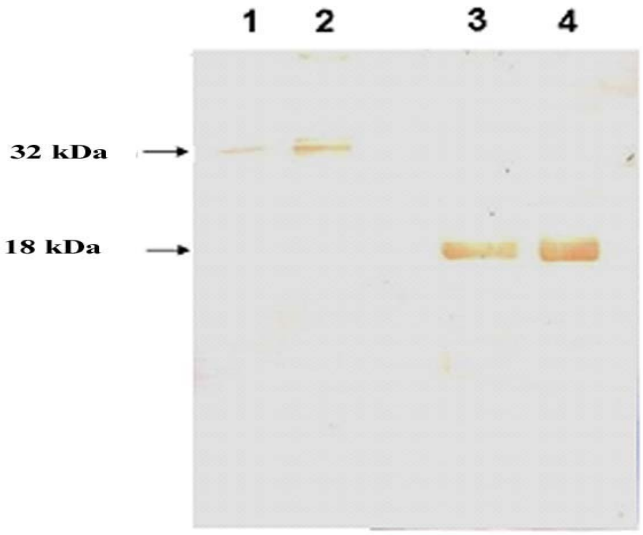
نمودار ۱- کروماتوگرافی Inhibin بر روی ژل CNBr activated sepharose-4B

نمونه: مایع فولیکولی، فاز متحرک: بافر ۰/۱ mM glycin-Hcl (pH=2/5)، فاز ساکن: CNBr activated sepharose-4B حاوی لیگاند، یوبی کوئیتین، سرعت فاز متحرک: ml/h ۱۲، حجم فراکسیون‌های جمع آوری شده: ml ۱، حجم ستون: ٦



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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]



شکل ۲- الگوی ایمونوبلاتینگ Inhibin

۱و۲- Inhibin تخلیص شده (در عدم حضور 2-ME)، ۳و٤ زنجیره‌های آلفا و بتا مولکول Inhibin (در حضور 2-ME)

جدول۲- واکنش آنتی‌بادی تک‌دودمانی با رقت سریال مایع فولیکولی

رقتهای مایع فولیکولی	۱/۱۰	۱/۲۰	۱/٤۰	۱/۸۰	۱/۱٦۰	۱/۳۲۰	۱/٦٤۰	۱/۱۲۸۰	کنترل منفی (بدون لایه اول)	کنترل منفی (بدون لایه دوم)
جذب نوری* ٤٥۰ (OD)	۱/۳٤	۱/۱۳	۱/۰۷	۰/۸۵	۰/٦۸	۰/۵۱	۰/۲۳	۰/۱٦۱	۰/۰۲۲	۰/۰۱۳

* میزان جذب نوری بر حسب نانومتر می باشد

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

نمونه مورد آزمایش	غلظت پروتئین (µg/ml)	حجم (ml)	مقدار پروتئین تخلیص شده (µg)
نمونه پروتئینی حاصل از ستون افینیتی	۳/۳	۱/٤	٤/٦۲

مقدار پروتئین تخلیص شده از ستون µg ٤/٦۲ بود که نتایج آن در جدول شماره ۲ ارایه گردیده است. از آنجا که غلظت Inhibin در مایع فولیکولی ng/ml ۱۰ می‌باشد، میزان Inhibin موجود در ml ۵۰۰ مایع فولیکولی مورد استفاده در تحقیق حاضر µg ۵ خواهد بود. با توجه به مقدار نهایی µg ٤/٦۲، راندمان روش تخلیص در این مطالعه ۹۲ درصد می‌باشد. نتایج بررسی الکتروفورز SDS PAGE حاکی از خالص بودن باند پروتئینی استخراج شده بود (شکل شماره‌ی ۲) نتیجه‌ی حاصل از اثر 2ME به صورت دو باند پروتئینی بر روی ژل الکتروفورز ظاهر گردید. نتایج آزمایش وسترن‌بلات نشان می‌دهد که آنتی‌بادی اختصاصی علیه Inhibin قادر به شناسایی اپی‌توپ مربوط می‌باشد. پس از احیای زنجیره‌های دی‌سولفید و جداسازی دو زیرواحد ß و α در مولکول، نتایج آزمون ایمونوبلات به صورت تک باند مشخص گردید.

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. هم‌اکنون در کشور ما نیز تحقیقات گسترده‌ایی روی این هورمون درحال انجام است. در بسیاری از این تحقیقات از تکنیک‌هایی نظیر الایزا، ایمونوفلورسانس، رادیوایمونواسی، فلوسایتومتری و ایمونوهیستوشیمی و .... استفاده می‌شود که در آنها نیاز به وجود پروتئین خالص Inhibin می‌باشد [۱۹، ۲۰]. 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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

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 مراجعه‌کننده جهت درمان ناباروری و همچنین افراد تحت درمان به روش تحریک تخمک‌گذاری استفاده گردید. با توجه به محاسبات به عمل آمده، ظرفیت ستون کروماتوگرافی افینیتی تهیه شده ۷۰۰ میکروگرم می‌باشد. از آنجا که غلظت Inhibin موجود در مایع فولیکولی در حدود ۱۰ng/ml می‌باشد، لذا می‌توان در هر مرتبه استخراج از ۷۰lit مایع فولیکولی تغلیظ شده استفاده نمود. البته مقدار به دست آمده، یک ظرفیت تئوریک و محاسباتی است. زیرا اولا در اتصال آنتی‌بادی به ژل، راندمان ۱۰۰ درصد نبوده و تمامی آنتی‌بادی‌های مورد استفاده به ژل متصل نمی‌شوند. ثانیا در مورد بسیاری از آنتی‌بادی‌های متصل شده به ستون، وضعیت اتصال نامناسب بوده به طوری که ناحیه Fab آنتی‌بادی‌ها جهت اتصال به مولکول‌های Inhibin آزاد نمی‌باشد. علاوه بر این به علت ماهیت پنتامری IgM، ممانعت فضایی موجود در پروتئین‌ها نیز مانع از اتصال مناسب آنتی‌بادی به ژل و همچنین اتصال Inhibin به آنتی‌بادی می‌گردد، با در نظر گرفتن تمامی این موارد، در این تحقیق ۵۰۰ml مایع فولیکولی تغلیظ شده از ستون عبور داده شد که در نهایت ٤/٦٢μg Inhibin خالص به دست آمد. بنابراین میزان موفقیت یا راندمان ستون در جداسازی Inhibin با استفاده از کروماتوگرافی افینیتی حدودا ۹۲ درصد می‌باشد. که در مقایسه با راندمان به دست آمده توسط Chari S 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 [٢٤]. با این حال نسبت به راندمان تخلیص ۹۵ درصد توسط Leversha در سال ۱۹۸۷ کمتر بود [۲۵]. در روش این محقق از تکنیک حساس HPLC استفاده شده بود. به طور کلی در خالص‌سازی 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 زیرواحدهای مولکول Inhibin و تنوع گزارش وزن مولکولی برای Inhibin و زیرواحدهای آن [٢٦]، مقایسه‌ی بین نتایج به دست آمده در مورد جداسازی و تخلیص Inhibin توسط محققین مختلف را دشوار می‌سازد. روش کروماتوگرافی امروزه کاربرد فراوانی در حیطه‌ی تحقیقات و تولید داشته و به لحاظ راندمان بالا و تکرارپذیری از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. در تحقیق حاضر از آنتی‌بادی‌های تک‌دودمانی دسته IgM علیه Inhibin برای تهیه‌ی ستون کروماتوگرافی افینیتی استفاده گردید. آنتی‌بادی‌های تک‌دودمانی دارای افینیتی بالایی علیه یک اپی‌توپ خالص از آنتی‌ژن هدف بوده و از نظر دسته، ساب‌دسته و میل ترکیبی به آنتی‌ژن، نسبت به آنتی‌بادی‌های چنددودمانی یکنواخت و هموژن می‌باشند. آنتی‌بادی‌های دسته‌ی IgM دارای افینیتی کمتری نسبت به نوع IgG بوده ولی با توجه به ۵ ظرفیتی بودن دسته‌ی IgM از اولویتی بالاتر نسبت به آنتی‌بادی‌های نوع IgG دوظرفیتی 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 تهیه‌ی ستون افینیتی کروماتوگرافی استفاده گردید [۲۸] . در آزمایش وسترن‌بلات مشخص گردید که آنتی‌بادی تک‌دودمانی قادر به شناسایی مولکول Inhibin تخلیص شده و زنجیره با وزن مولکولی ۲۰ kDa ، نشان‌دهنده‌ی اتصال اختصاصی آنتی‌بادی با زنجیره‌ی α در Inhibin می‌باشد. هر چند آنتی‌بادی مورد استفاده در تحقیق حاضر، به منظور انجام تخلیص مناسب است ولی به علت تشابه زیرواحد α در هر دو نوع Inhibin A و Inhibin B 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 آنتی‌بادی تک‌دودمانی اختصاصی بر علیه زنجیره β استفاده نمود. در بین گزارشات در زمینه‌ی 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 تهیه‌ی حجم انبوه آن می‌باشد. از طرفی با توجه به اندازه‌ی کوچک ژن تولیدکننده Inhibin و امکان کلون نمودن آن در وکتورهای بیانی مختلف (سیستم‌های باکتریایی، مخمر 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 تهیه‌ی Inhibin نوترکیب توصیه می‌گردد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

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] FraserRF 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 اینهیبین سرم به عنوان نشانگر مطمئن پیش بینی وجود اسپرم در مردان آزواسپرمیک. ***مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان*** ۱۳۸۳: دوره ۵۱، شماره ۱۳: صفحات ٤٥ 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 U S A*** 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. Ganesan 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. McClintock 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 chromoatographic IgM column. ***Immunological Journal*** 1999; 16: 15-19.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]