تهیه ماکزیمم مقدار پروتئین از سلول های اسپرم مردان بارور و نابارور

آنا میفور[*1]، مصطفی رضایی طاویرانی[1،2]، محمدرضا صادقی[2]، غلام بساطی[3]، منصور امرایی[4]

1) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
2) مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال، پژوهشکده فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی -ابن سینا تهران
3) گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
4) گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: 91/8/9 **تاریخ پذیرش: 91/11/12**

چکیده

مقدمه: ناباروری در لغت به معنای عدم توانائی در بروز باروری، بعد از یکسال مقاربت بدون جلوگیری می‌باشد. حدود 15-10 درصد زوجین در سنین باروری با این مشکل مواجه می‌باشند(WHO, 1999) و عدم برخورد صحیح با آن می‌تواند منجر به بروز مشکلات و معضلات روحی، روانی و اجتماعی گردد. مطالعه پروتئین های سلول های اسپرم امروزه از مباحث مورد علاقه محققان و متخصصان باروری و ناباروری است و با توجه به اهمیت بالای عملکرد پروتئین ها، شرایط بهینه برای جداسازی و محلول سازی آن ها برای این که بتوان مخلوطی کامل از آن ها داشت، لازم است.

مواد و روش ها: در طرح پیشنهادی به دلیل معضل موضوع ناباروری و ابهامات مکانیسم های دخیل در آن، علاوه بر بررسی مورفولوژی سلول های اسپرم افراد بارور و نابارور، از دو روش گرادیان پرکل و swim up برای جداسازی سلول های اسپرم افراد بارور و نابارور استفاده شد تا روشی بهینه برای استخراج حداکثر پروتئین راه اندازی شود و بتوان از آن در مطالعات آتی بر روی پروتئین های اسپرم استفاده کرد.

یافته های پژوهش: غلظت پروتئین اسپرم در روش گـــــرادیان پرکل برای افراد نابارور و بارور به ترتیب برابر 5 و 8 میلی گرم بر هر میلی لیتر لایزت نمونه و در روش swim up برای افراد نابارور و بارور به ترتیب برابر 1 و 2/5 میلی گرم بر میلی لیتر بود.

بحث و نتیجه گیری: با مقایسه دو روش جداسازی به این نتیجه می توان رسید که روش گرادیان پرکل به دلیل جداسازی سلول اسپرم بیشتر و به طبع آن کسب غلظت پروتئینی بیشتر، روش بهتری در مطالعات بررسی پروتئین اسپرم خواهد بود.

واژه های کلیدی: پروتئین، اسپرم، ناباروری، تهیه نمونه

* **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

E-mail: meyfour_a@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

مقدمه

باروری در لغت به معنای توانائی در بروز باروری است و ناباروری به معنای عدم توانائی در بروز باروری، بعد از یکسال مقاربت بدون جلوگیری می‌باشد. حدود 15-10 درصد زوجین در سنین باروری با این مشکل مواجه می‌باشند(WHO, 1999) و عدم برخورد صحیح با آن می‌تواند منجر به بروز مشکلات و معضلات روحی، روانی و اجتماعی گردد،(1). طیف وسیعی از عوامل مردانه و زنانه در ناباروری نقش دارند. علل ناباروری مردان شامل طیف وسیعی از عوامل وراثتی، هورمونی، محیطی، فیزیولوژیک، مواد سمی و داروئی می باشد که سبب بروز علائمی از قبیل عدم تولید اسپرم، تعداد بسیار کم یا کیفیت بد اسپرم های تولید شده می‌گردد،(2)، که می تـــوان به عـــوامل پیـش بیضه ای(Pre-testicular)، بیضه‌ای(Testicular) و پس بیضه ای(Post-testicular) تقسیم بندی نمود. سلول اسپرم به عنوان یک سلول جنسی در عین حال که مسئولیت اصلی خود، تمدید نسـل را به انجـــام می رساند، از شرایط و ویژگی های خاصی نیز برخوردار می باشد. شکل منحصر به فرد، سیتوپلاسم تقلیل یافته، ژنوم به شدت هتروکروماتینه و قدرت تحرک بالای این سلول، ویژگی هایی هستنـــد که هر کدام می توانند در جای خود بحث برانگیز باشند. یکی از پیچیده ترین مسائلی که بیش از همه مطالعه در مورد این سلول را ضروری می سازد، روند تنظیم ژن ها و پروتئین ها در اسپرم می باشد،(۳،۴). به ویژه استفاده از مکانیســـم فســفریلاسیون در تنـــظیم فعالیت های پروتئین های اسپرم از اهمیت بالایی برخوردار است. این اختلال، منجر به اختلال در تحرک، واکنش های آکروزومی، شناسایی زوناپلوسیدا و اتصال به تخمک شده و در نتیجه می تواند باعث ناباروری شود. از آن جا که مهم ترین فعالیت های بیولوژیکی در سلول بر عهده پروتئین هاست، شـــناسایی پروتئـــین های سلول های اسپرم افراد بارور و نابارور و یافتن وجه تمایز آن ها امروزه از مباحث مورد علاقه محققان و متخصصان باروری و ناباروری است،(5). با توجه به اهمیت بالای عملکرد پروتئین ها، شرایط بهینه برای جداسازی و محلول سازی آن ها برای این که بتوان مخلوطی کامل از آن ها داشت، لازم است. چون در هر صورت در هر جداسازی یک کاهش مقدار پروتئین وجود دارد. در هنگام تهیه پروتئین باید به نکاتی مثل نوع بافت، نوع پروتئین های هدف برای تخلیص، مثل تهیه whole protein یا یک گروه خاص و کاربرد پروتئین های تخلیص شده مورد توجه قرار گیرد(۷،۸). تهیه عصاره پروتئینی از نمونه هایی که دارای ترکیب نمکی، قندی و چربی بالایی هستند هم چون خون و seminal fluid بسیار مشکل تر از تهیه عصاره پروتئینی از بافت یا سلـــول می باشـــد،(۹،۱۰). طرح پیشنهادی به دلیل اهمیت موضوع نابـــاروری و مکانیسم های دخیل در آن و به منظور راه اندازی روشی بهینه برای استخراج حداکثر پروتئین از سلول اسپرم افراد بارور و نابارور با بیشترین غلظت می باشد. در عین حال در حین عصاره گیری آلودگی پروتئازی و فاکتورهای مداخله گر هم چون DNA و نمک ها باید حذف شوند تا عصاره پروتئینی تهیه شده در مطالعات آتی بر روی پروتئین های اسپرم هم چون تهیه پروفایل پروتئینی سلول اسپرم،(14-11)، بتواند مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه

در این مطالعه نمونه های منی مورد نیاز از افراد مراجعه کننده به مراکز درمان ناباروری به دست آمد. معمول‌ترین روش جمع‌آوری منی از روش خودارضایی و جمع آوری تمام منی به داخل ظرف استریل مخصوص است. در کل تعداد 4 نمونه مایع منی، 2 نمونه بارور و 2 نمونه نابارور، در این مطالعه بررسی شد.

آنالیز مایع منی

در مرحله بعد هر یک از نمونه ها طبق روش های معمول آزمایشگاهی ارزیابی منی(روش های استاندارد شده سازمان جهانی بهداشت مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر این اساس بلافاصله پس از سیال شدن مایع منی بررسی های اولیه ماکروسکوپی نظیر تعیین pH، حجم، ویسکوزیته، ظاهر(Appearance) و بررسی های اولیه میکروسکوپی به انجام رسید.

آنالیز مایع منی به عنوان اولین و مهم ترین روش تشخیص قدرت باروری در مردان می‌باشد که اطلاعات

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

زیادی را درباره باروری یا علل ناباروری مردان در اختیار قرار می‌دهد. از جمله پارامترهایی که در آنالیز مایع منی اندازه‌گیری می‌شوند عبارتند از: تعداد اسپرم، تحرک، مورفولوژی، حجم و بسیاری پارامترهای ماکروسکپی و میکروسکپی دیگر و نیز در صورت نیاز پارامترهای بیوشیمیایی. طبق معیار WHO حجم بالای 2 میلی لیتر نرمال مایع منی نرمال محسوب می‌شود.

نمونه منی بعد از انزال در 37 درجه سانتی گراد نگهداری شده و در فواصل 15 دقیقه ای بررسی می‌شود تا فرایند مایع شدن(تبدیل حالت ژله ای به حالت مایع) انجام شود. این فرایند ممکن است 60 دقیقه طول بکشد. سپس تعداد سلول های اسپرم شمارش می‌شود. در حالت نرمال تعداد 20 تا 150 میلیون اسپرم در یک میلی لیتر مایع منی وجود دارد. در مایع منی نرمال بیش از 30 درصد اسپرم ها شکل و ساختار طبیعی دارند. غیرطبیعی بودن مورفولوژی اسپرم ممکن است شامل موارد متفاوتی باشد از جمله داشتن دو سر یا دو دم، سر کوچک و یا گرد باشد. در نمونه نرمال 60 درصد سلول های اسپرم حرکت رو به جلوی طبیعی دارند. حرکت رو به جلوی اسپرم توانایی جلو رفتن در دهانه رحم و دستیابی به تخمک را فراهم می‌کند.

pH مایع منی مطابق معیار WHO می بایست 7/2-7/8 باشد در غیر این صورت سلول های اسپرم زنده نمی مانند یا توانایی حرکت و نفوذ به تخمک را از دست می‌دهند. مایع منی نرمال عاری از باکتری و گلبول های سفید است. حضور باکتری یا مقادیر بسیار زیاد گلبول سفید نشانه عفونت می باشد. در این مطالعه برای افراد بارور نمونه های با بیش از 30 درصد مورفولوژی نرمال و افراد نابارور با کمتر از 30 درصد نرمال انتخاب شدند.

جداسازی سلول های اسپرم

دو روش مجزای جداسازی سلول های اسپرم از مایع منی در نظر گرفته شد. در روش اول برای جدا کردن اسپرم از مایع منی از روش سانتریفیوژ گرادیان Percoll (Percoll gradient centrifugation) استفاده شد. با استفاده از این روش سلول های اسپرم زنده از مایع منی و سایر آلودگی ها مثل سلول های اسپرم مرده، سلول های زایای نابالغ و گلبول های سفید جدا می شوند. روش گردایان Percoll بر پایه تفاوت در چگالی(Density) عمل می کند. سلول های اسپرم که تحرک نرمال دارند، سنگین تر هستند و در گرادیان سنگین تر Percoll تجمع می کنند. سلول هایی تحرک خوبی ندارند سبک تر هستند، بنا بر این نمی توانند به لایه سنگین تر مهاجرت کنند و در بین دو لایه گرادیان تجمع می کنند. گلبول های سفید و سلول های زایای نابالغ نیز بین دو لایه تجمع می کنند.

سلول های اسپرم از مایع منی توسط سانتریفیوژ گرادیان Percoll (Percoll gradient centrifugation) جدا شدند. در یک لوله فالکون استریل، ابتدا 1 میلی لیتر از Percoll 90 درصد با استفاده از سمپلر ریخته شد. سپس یک میلی لیتر از Percoll 45 درصد با استفاده از سمپلر به صورت مورب و به آرامی به روی Percoll 90 درصد اضافه شد. در آخر، مایع منی به بالای Percoll 45 درصد اضافه شد. در هیچ مرحله نباید حباب تشکیل گردد. مجموعه فوق با دور 300xg به مدت نیم ساعت در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. بعد از نیم ساعت سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته و رسوب باقی مانده در انتهای لوله فالکون با استفاده از پیپت پاستور جمع شده و به لوله فالکون دیگری منتقل شد. یک میلی لیتر محلول(1X) Ham's F-10 به رسوب اضافه شد و با دور 450xg در دمای اتاق، سه بار و هر بار به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب نهائی در دمای 70- درجه سانتی گراد برای مراحل بعدی نگهداری شد.

روش دوم جداسازی، روش swim up می باشد. در این روش پس از مراحل اولیه گرفتن نمونه و آنالیز آن که در بالا شرح داده شد، مایع منی برای سه بار با محیط کشت(1X) Ham's F-10 شستشو داده شد. سپس به 1/5 میلی لیتر نمونه، 1 میلی لیتر محیط کشت اضافه شد و در زاویه 45 درجه به مدت 30 دقیقه گذاشته شد. سپس 30-20 میکرولیتر از سطح محیط نمونه برداشته شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

استخراج پروتئین

مقدار 1 میکرو لیتر از رسوب به دست آمده از هر دو روش را بر روی لام نئوبار گذاشته و شمارش شد. سپس به رسوب به دست آمده از هر دو روش لایزیز بافر اضافه شد و یک ساعت در دمای محیط ماند. لایزیز بافر شامل 7M Urea، 2M Thiourea، 40mM Tris و 0.2% Biolyte می باشد،(15). نمونه سانتریفیوژ شده و در نهایت تعیین غلظت پروتئین توسط روش Bradford انجام شد. لازم به ذکر است جهت تکرار کار و بالا رفتن اطمینان تعیین غلظت پروتئین توسط روش Bradford برای هر نمونه دو بار انجام شد.(16)

یافته های پژوهش

نمونه های مایع منی پس از جمع آوری آنالیز شدند. نتایج حاصل از آنالیز مایع منی این افراد که شامل غلظت اسپرم، تعداد کل اسپرم، حرکت اسپرم با درجه های a (حرکت خوب)، b (حرکت کند)، مورفولوژی اسپرم با حالت های طبیعی و غیرطبیعی(دم کوتاه، دم شکسته، دم پیچ خورده، گردن شکسته، CD گردن، سر سنجاقی شکل، سر هرمی شکل، سر گرد، سر باریک)، سن و طول مدت ناباروری در جدول شماره 1 نشان داده شده است.

جدول شماره 1. آنالیز پارامترهای مایع منی در افراد بارور و نابارور

پارامتر اسپرم	نابارور	بارور
غلظت اسپرم(106/ml×)	68 ± 21	79 ±40
تعداد کل اسپرم(106/ml×)	70 ± 30	185 ±92
مورفولوژی طبیعی اسپرم(%)	6 ±1	30 ±7
مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم-کل(%)	93 ±9	70±8
طول مدت ناباروری(سال)	8 ± 4	6 ± 3
سن(سال)	34 ± 6	43 ± 6
pH	7/5±2	7/5±1
حجم	3 ± 1	3/5 ± 1
سلول های زایای نابالغ	1 ± 1	0/9 ±0/7
حرکت با درجه a (%)	11± 7	15 ± 8
حرکت با درجه b (%)	22 ± 5	26 ± 7

پس از آنالیز نمونه ها، اسپرم های هر کدام با دو روش مختلف جداسازی شد. در روش اول که اسپرم ها با گرادیان پرکل جداسازی شدند، پس از شستشو با میکرسکوپ شمارش شدند. تعداد اسپرم های افراد نابارور از 70 میلیون در هر میلی لیتر به 40 میلیون و افراد بارور از 185 میلیون در هر میلی لیتر به 70 میلیون رسید.

در روش دوم swim up تعداد سلول های اسپرم افراد نابارور از 70 میلیون در هر میلی لیتر 3 میلیون و افراد نابارور از 185 میلیون در هر میلی لیتر به 7 میلیون رسید.

پس از جداسازی سلول های اسپرم در هر دو روش به رسوب سلول ها لایزیز بافر اضافه شد و یک ساعت در دمای محیط نگه داشته شدند. پس از آن با روش Bradford تعیین غلظت شدند، غلظت ها به دست آمده(همان طور که در جدول شماره 2 نشان داده شده است) در روش گرادیان پرکل برای افراد نابارور و بارور به ترتیب برابر 5 و 8 میلی گرم در هر میلی لیتر لایزت نمونه و برای روش swim up برای افراد نابارور و بارور به ترتیب برابر 1 و 2/5 بود.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

جدول شماره 2. مقادیر پروتئینی به دست آمده از دو روش جداسازی پروتئین

روش استخراج	مقدار پروتئین افراد بارور*	مقدار پروتئین افراد نابارور*
Swim up	2,5	1
گرادیان پرکل	8	5

*** مقدار پروتئین بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر می باشد.**

بحث و نتیجه گیری

جمعیت جهان با سرعت زیاد در حال افزایش است و تخمین زده می‌شود که تا سال 2050 به 9 میلیارد نفر برسد. با این وجود، 15 درصد زوج ها در سراسر جهان نابارور هستند. به نظر می رسد عوامل مولکولی نقش مهمی در ناباروری با علل ناشناخته دارند.(17)

در مطالعه حاضر، خصوصیات سلول اسپرم به عنوان یک سلول جنسی از جمله مورفولوژی آن که نقش مهمی در بقای نسل و انتقال صفات والد به فرزند دارد مورد بررسی قرار گرفت. در ارزیابی باروری مردان، انجام اسپرموگرام اولین و ساده ترین تست تشخیصی است و با وجود تمامی پیشرفت هایی که در تشخیص و درمان ناباروری صورت گرفته جایگاه خود را به عنوان اولین تست تشخیص حفظ کرده است. هر چند این تست قادر به تعیین قدرت باروری فرد نمی‌باشد ولی پیش آگهی مناسبی از وضعیت باروری مردان در اختیار قرار می‌دهد. در آنالیز مایع سمینال 3 فاکتور اصلی شامل میزان و تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم اهمیت اساسی دارد. مطالعات مختلفی در بررسی ارزش تشخیصی و ارتباط هر یک از این پارامترها با قدرت باروری اسپرم انجام پذیرفته است. از این میان مورفولوژی اسپرم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مواردی که مورفولوژی اسپرم از کیفیت مناسبی برخوردار نبوده و پائین تر از حد طبیعی است، افزایش سایر پارامترها شامل تعداد سلول های اسپرم و تحرک آن ها تأثیر چندانی در افزایش قدرت باروری ندارند،(18). به همین دلیل ارزیابی مورفولوژی اسپرم از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این مطالعه هم از نمونه های مایع منی افرادی استفاده شد که مورفولوژی اسپرم آن ها زیر 7 بود.(19)

همواره در مطالعات مختلف بررسی دقیق مورفولوژی اسپرم بر اساس معیارهای خاصی مورد توجه قرار گرفته است. برای اولین بار در سال 1987 سازمان بهداشت جهانی(WHO) برای یکسان سازی و استاندارد نمودن ارزیابی پارامترهای اسپرم، دستورالعملی را ارائه نمود که در آن ضمن اشاره به مورفولوژی اسپرم نرمال(سربیضوی که بیش از یک سوم آن را آکروزوم تشکیل می‌دهد)، ابعاد سر، دم، قطعه میانی و وضعیت قرارگیری آن ها نسبت به هم را نیز مشخص نمود. به دنبال آن با توجه به اهمیت مورفولوژی اسپرم و مطالعات انجام شده در سال 1992 ویرایش دوم این دستورالعمل انتشار یافت که در آن علاوه بر دقت بیشتر بر معیارهای اسپرم نرمال، میزان وجود واکوئل در اسپرم طبیعی نیز مشخص گردید. به دنبال آن در ویرایش سال 1999 علاوه بر موارد فوق میزان وجود بقایای سیتوپلاسمی، ویژگی های قطعه میانی و دم اسپرم نیز به وضوح مشخص گردیده است(WHO, 1999). در مورد با اهمیت مورفولوژی اسپرم و ارتباط آن با عملکرد و قدرت باروری اسپرم و موفقیت روش هایART، مطالعات گسترده‌ای انجام شده است. انجام واکنش آکروزومی و موفقیت لقاح ارتباط تنگاتنگ با مورفولوژی اسپرم دارد به طوری که اندازه آکروزوم در اسپرم به طور بالقوه معرف عملکرد و قدرت باروری اسپرم است. بر اساس معیار WHO میزان مورفولوژی طبیعی،30 درصد بیان گردید. مطالعات مختلف در بررسی میزان ارتباط بین مورفولوژی و پیش آگهی لقاح خارج رحمی اختلاف معنی داری در بین گروه طبیعی و گروه دارای مورفولوژی غیرطبیعی مشاهده نکردند،(20). در صورتی که زمانی که این اختلاف یا مورفولوژی در گروه غیرطبیعی به 10 درصد تقلیل یابد اختلاف میزان موفقیت باروری در گروه طبیعی و غیرطبیعی کاملاً مشخص و متمایزاست،(۲۱،۲۲). علاوه بر این، ارتباط تنگاتنگی بین میزان لقاح، تقسیمات جنینی، لانه گزینی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

و میزان سقط طی ماه های اول با کیفیت مورفولوژی اسپرم وجود دارد.(۲۳،۲۴)

در این مطالعه پس از انجام آنالیز نمونه و انتخاب نمونه بارور و نابارور نوبت به جداسازی سلول های اسپرم رسید. استخراج کامل پروتئین های سلول اسپرم و به دست آوردن حداکثر غلظت پروتئین یک مرحله بسیار حساس و ضروری می باشد. در این مطالعه از دو روش برای جداسازی اسپرم استفاده شد تا مشخص شود کدام روش می تواند حداکثر غلظت پروتئینی را ارائه دهد. با توجه به این که در کارهای پروتئینی به دست آوردن حداکثر غلظت پروتئینی از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

در روش اول برای جداسازی اسپرم از مایع منی از روش گرادیان Percoll (Percoll gradient centrifugation) استفاده شد. با استفاده از این روش سلول های اسپرم زنده از مایع منی و سایر آلودگی ها مثل سلول های اسپرم مرده، سلول های زایای نابالغ و گلبول های سفید جدا می شوند. پس از استفاده از Percoll برای جداسازی اسپرم افراد نابارور، رسوب باقی مانده در ته لوله فالکون که حاوی سلول اسپرم می باشد رقیق شده و سلول های اسپرم زیر میکروسکوپ نوری از لحاظ آلودگی و تحرک مورد بررسی قرار گرفت. رسوب هایی برای این مطالعه انتخاب شدند که تحرک از نوع a (تحرک بالا) اسپرم بیش از 90 درصد و عاری از هرگونه گلبول سفید و سلول های زایای نابالغ بودند. نتایج حاصل از تاثیر Percoll بر تحرک اسپرم، گلبول سفید و سلول های زایای نابالغ با نتایج حاصل از قبل از استفاده از آن در مقایسه شد. پس از استفاده از Percoll درصد تحرک از نوع a (تحرک خوب) اسپرم در هر سه گروه به بیش از 90 درصد افزایش یافت و تعداد گلبول سفید و سلول های ژرمینال نارس به صفر رسید. تحرک بالا از این نظر حائز اهمیت می باشد که مطمئن شویم که اسپرم هیچ گونه اختلالی در تحرک نداشته و عدم وجود گلبول سفید و سلول های زایای نابالغ به این دلیل است که پروتئین حاصل از لیز این سلول ها که باید در تحقیقات آتی هم چون تهیه پروفایل اسپرم مورد استفاده قرار گیرد منجر به اختلال در تفسیر نتایج حاصله نشود.

در روش دوم برای جداسازی سلول های اسپرم از روش swim up استفاده شد. یکی از حسن های این روش جداسازی اسپرم های نرمال با حرکت بسیار خوب و مورفولوژی نسبتاً خوب است. از مزیت های دیگر این روش استفاده از مواد کمتر و صرفه اقتصادی آن است. اما یکی از معایب آن جداسازی تعداد کم اسپرم است که این برای انجام آزمایشات پروتئینی عیب بزرگی است که نتایج شمارش میکروسکوپی هم این موضوع را نشان داد.

پس از جداسازی سلول های اسپرم با دو روش، نمونه ها لیز شدند و با روش برادفورد تعیین غلظت شدند. آنالیز نتایج نشان می دهند که روش جداسازی اسپرم به صورت گرادیان پرکل در مقایسه با روش swim up قابلیت جداسازی تعداد بسیار بیشتری از سلول های اسپرم را دارد و به طبع آن غلظت پروتئینی به دست آمده با این روش برای انجام آزمایشات پروتئینی، بسیار بیشتر و مناسب تر است و می توان اظهار داشت که استخراج پروتئین به خوبی صورت گرفته است،(25). از عصاره پروتئینی به دست آمده می توان در تحقیقات آتی هم چون انجام ایزوالکتریک فوکوسینگ، SDS-PAGE، تهیه پروفایل پروتئینی سلول های اسپرم،(۲۶،۲۷)، افراد بارور و نابارور استفاده کرد.

References

1-Bae SH, Harris AG, Hains PG, Chen H, Garfin DE, Hazell SL, et al. Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. Proteomics 2003;3:569-79.

2-Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. Front Biosci 2000;5:E110-23.

3-Lunenfeld B, Van Steirteghem A; Bertarelli Foundation. Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: condensed meeting report from the Bertarelli Foundation's second

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

global conference. Hum Reprod Update 2004;10:317-26.
4-Brugh VM 3rd, Lipshultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. Med Clin North Am 2004;88:367-85.
5-Suryawanshi AR, Khan SA, Gajbhiye RK, Gurav MY, Khole VV. Differential proteomics leads to identification of domain-specific epididymal sperm proteins. J Androl 2011;32:240-59.
6-Oxenham SK. Sperm proteomics: thinking outside the collision cell. J Androl 2010;31:431-3.
7-Aresta A, Calvano CD, Palmisano F, Zambonin CG, Monaco A, Tommasi S, et al. Impact of sample preparation in peptide/ protein profiling in human serum by MALDI-TOF mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal 2008;46:157-64.
8-Tan AA, Azman SN, Abdul Rani NR, Kua BC, Sasidharan S, Kiew LV,et al. Optimal protein extraction methods from diverse sample types for protein profiling by using Two-Dimensional Electrophoresis (2DE). Trop Biomed 2011;28:620-9.
9-Nalesnik JG, Sabanegh ES Jr, Eng TY, Buchholz TA. Fertility in men after treatment for stage 1 and 2A seminoma. Am J Clin Oncol 2004;27:584-8.
10-Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. J Chromatogr A 2004;1023:317-20.
11-Oliva R, Martínez-Heredia J, Estanyol JM. Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. Syst Biol Reprod Med 2008;54:23-36.
12-Aitken RJ, Baker MA. The role of proteomics in understanding sperm cell biology. Int J Androl 2008;31:295-302.
13-Chu DS, Liu H, Nix P, Wu TF, Ralston EJ, Yates JR 3rd et al. Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conesrved fertility factors. Nature 2006;443:101-5.
14-Choe LH, Lee KH. Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. Electrophoresis 2003;24:3500-7.
15-Weiss W, Görg A. Sample solublization buffers for two-dimensional electrophoresis. Methods Mol Biol 2008;424:35-42.
16-Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
17-Aarabi M, Modarressi MH, Soltanghoraee H, Behjati R, Amirjannati N, Akhondi MM. Testicular expression of synaptonemal complex protein 3 (SYCP3) messenger ribonucleic acid in 110 patients with nonobstructive azoospermia. Fertil Steril 2006;86:325-31.
18-Ramm SA, McDonald L, Hurst JL, Beynon RJ, Stockley P. Comparative proteomics reveals evidence for evolutionary diversification of rodent seminal fluid and its functional significance in sperm competition. Mol Biol Evol 2009;26:189-98.
19-Dorus S, Wasbrough ER, Busby J, Wilkin EC, Karr TL. Sperm proteomics reveals intensified selection on mouse sperm membrane and acrosome genes. Mol Biol Evol 2010;27:1235-46.
20-Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod Update 2003;9:331-45.
21-Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. Nat Cell Biol 2002;Suppl:s41-9.
22-Karabinus DS, Gelety TJ. The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. Fertil Steril 1997;67:536-41.
23-Wainer R, Albert M, Dorion A, Bailly M, Bergère M, Lombroso R, et al. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. Hum Reprod 2004;19:2060-5.
24-Lee RK, Hou JW, Ho HY, Hwu YM, Lin MH, Tsai YC, et al. Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination. Int J Androl 2002;25:277-80.
25-Challapalli KK, Zabel C, Schuchhardt J, Kaindl AM, Klose J, Herzel H. High reproducibility of large-gel two-dimens-ional electrophoresis. Electrophoresis 2004;25: 3040-7.
26-Brewis IA, Gadella BM. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. Mol Hum Reprod 2010;16:68-79.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

27-Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM. Sperm cell proteomics. Proteomics 2009;9: 1004-17.

Total Protein Extraction With High Concentration From The Sperm Cells of Fertile and Infertile Men

Meyfour A[1], Rezaie Tavirani M[1,2], Sadeghi M.R[2], Basati Gh[3], Amraei M[4]*

(Received: 30 Oct. 2012 Accepted: 31 Jan. 2013)

Abstract

Introduction: Infertility refers to the inability of the incidence of pregnancy after one year of unprotected intercourse. Approximately 15-10% of couples encounter infertility problem in reproductive age (WHO, 1999) and lack of proper treatment can lead to complications and mental and social problems. Today, researchers are interested in Identification of sperm cell proteins. Regards to the importance of proteins and their functions, the optimal conditions of their separation and making them solution are important.

Materials & Methods: This study was performed for finding optimal protocol of maximum protein extraction from sperm cell. After taking seminal plasma from fertile men and semen analysis, the sperm cells were separated using two methods: Gradient percoll and swim up. Then samples were washed three times and lysed with lysis buffer. Protein concentration was determined by Bradford method.

Findings: The amount of protein were 5 and 8.5 mg per mL sperm lysate, respectively with percoll method, however the amount were 1 and 2.5 mg per mL sperm lysate, respectively with swim up method in fertile and infertile subjects.

Discussion & Conclusion: It can be concluded with comparing the two methods, how much more sperm cells can be isolated, then it will be higher protein concentrations and this protocol can be used in future studies on sperm proteins.

Keywords: infertility, sperm, protein, sample preparation

1. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran
3. Dept of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
4. Dept of Physiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**(corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]