DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.002
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
1988 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)22-1988-03

# 人工合成的人精子抗原多肽抗体与人精子结合的生物学特性研究

李玉艳,梁志清,何 畏,李玉清,史常旭 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 对人工合成的精子多肽(35肽)抗原抗体与人精子的结合情况进行评价。方法 获得抗35肽抗体后,用荧光素直接进行标记,通过流式细胞仪检测抗体与精子的结合率,并在荧光显微镜下观察抗体与人精子的结合部位。结果 人精子抗35肽抗体阳性率为97.7%,荧光显微镜下见精子头颈部着色,部分见赤道板及头部顶端着色增强。结论 35肽在人精子头表面有高度表达,抗35肽抗体可与人精子表面高度特异结合。

关键词:精子;合成多肽;抗体;流式细胞术
中图法分类号:R321.1;R329.28;R392.11 文献标识码:A

## Biological characteristics of synthesized anti-sperm multiple peptide antibodies conjugated with human sperms

LI Yu-yan, LIANG Zhi-qing, HE Wei, LI Yu-qing, SHI Chang-xu (Department of Obstetric and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To evaluate the binding characteristics of the synthesized anti-sperm polypeptide (35 peptide) antibody on the surface of human sperms. Methods The anti-35 peptide antibody was obtained by kits, labeled with FITC, and then incubated with human sperms. The positive rate of stained sperms was detected by flow cytometry. The binding site on the human sperm was observed by fluorescence microscopy. Results The positive rate of sperms binding to FITC-anti-35 peptide antibody was 97.7%. The fluorescence stained site was on the sperm head and neck. Deep staining was observed around the equatorial plate and the top of head in some sperms. Conclusion On the surface of the sperm head, there is an epitope similar to the synthesized sperm antigen peptide, and the induced antibody could bind to sperms specially and excellently.

**Key words**: sperm; synthesized polypeptide; antibody; flow cytometry

利用精子抗原来制作避孕疫苗,有可能达到免疫避孕的效果,其中精子多肽疫苗的研究正是热点之一[1]。选自小鼠睾丸/精子特异性蛋白的关键性表位的氨基酸序列,人工合成的精子多肽(35肽)作为一种新型避孕疫苗,已在动物研究中证实有一定避孕效果,并且证实,与人有较好的同源性[2],本研究首先获得抗35肽抗体,再评价该抗体与人精子的结合情况。

## 1 材料与方法

人工合成的35肽(由本校全军免疫学研究所合成);BALB/c小鼠30只(上海实验动物中心);抗体纯化和制备试剂盒(美国Pierce公司);FITC标记试剂盒(美国Pierce公司);小鼠IgG、FITC标记羊抗人IgG、FITC标记羊抗鼠IgG(华美公司);人精子12份:采自25~35岁健康已生育自愿供精男性;流式细胞仪XL System II(美国bekman coulter公司)。

### 1.1 抗体制备和纯化

将2 mg mcKLH(钥孔戚血蓝素)加入200 μl超纯水中,将2 mg 35多肽溶于0.5 ml连接缓冲液中,然后将二者混合;在10 mg EDC(碳二亚酰氨)管内加入1 ml超纯水,并迅速取其中50 μl加入上述混合液中,室温孵育2 h,离心去除沉淀物;平衡葡聚糖凝胶过滤柱3~5次后,将混合物上柱,加1 ml纯化缓冲液,分管收集洗脱液;测定各管洗脱液的$A_{280}$,收集第1峰洗脱液获得偶连KLH的35多肽;35肽-KLH与等量完全弗氏佐剂混合,于BALB/c小鼠双后肢足垫及尾根部位行皮下注射免疫,共100 μl;14、21 d后2次追加免疫,这时佐剂改为不完全弗氏佐剂;免疫结束后1周取小鼠眼动脉血,分离血清;分别用2 ml含15 mg 35多肽以及0.5 ml含60 mg EDC的溶液过抗体纯化柱,经反复洗涤、平衡柱子后加入血清;室温静置1 h,用超纯水、连接缓冲液分别多次洗涤纯化柱;配制35多肽(10 mg/ml),测

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000183)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000183)
作者简介:李玉艳(1972-),女,重庆市江津县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事生殖医学方面的研究。电话:(023)68754409
收稿日期:2003-08-05;修回日期:2004-05-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

定 $A_{280}$ 后, 上柱, 并垂直旋转, 充分混匀; 配制 EDC 溶液(120 mg/ml柱连接缓冲液), 也加入纯化柱内; 室温垂直旋转混匀3 h; 洗涤、平衡纯化柱后, 置填塞片, 并加入血清和 1.2 ml PBS, 室温孵育 1 h; 用 16 ml 样品缓冲液反复洗涤纯化柱, 收集每毫升洗涤液, 并监测 $A_{280}$, 含最大 $A_{280}$ 值的第 2、3、4 管收集备用。

### 1.2　FITC 标记抗体

按试剂盒说明进行, 将标记的结合物上柱, 用 2.5 ml PBS 液冲洗, 按每管 0.25 ml 收集, 在 280 nm 检测每管吸光度, 有 2 个带出现, 结合物出现在第 1 带, 注意勿收集 $A_{280}<0.2$ 的管; 将第 1 洗脱峰内收集液进行合并, 用 1% BSA+0.1% 叠氮钠保存。

### 1.3　精液的制备

手淫法收集精液, 待充分液化后按上游法收集精子, 用等体积含 0.3% HAS 的 EBSS 液离心洗涤 2 次, 调节精子密度为 $50\times10^6$/ml, 制成精子悬液备用。

### 1.4　流式细胞仪检测

取 a、b、c、d、e 5 只空试管, 每管加入 50 μl 精子悬液, a 管加入 10 μl 小鼠 IgG(原浓度为 1 mg/ml 和 40 μl EBSS 液, b、c 管加入 50 μl EBSS 液, d、e 管分别加入 10 μl 抗 35 肽鼠血清和 40 μl EBSS 液, 孵育 40 min, 取出, 每管加入 PBS 液 1 ml, 1 000 r/min 离心, 连续洗涤 2 次, 用 EBSS 液 50 μl 上悬, a、e 管按 1∶25 稀释度加入 FITC-羊抗鼠 IgG(原浓度 5 mg/ml), c 管按 1∶5 稀释度加入 FITC 标记的抗 35 肽抗体, b、d 管按 1∶25 稀释度加入 FITC 标记的羊抗人 IgG(原浓度 5 mg/ml), 暗室孵育 40 min, 用 PBS 液 1 ml, 1 000 r/min 离心洗涤 2 次, PBS 液混悬后送流式细胞仪检测。分别装样后用前向和直角光散射, 每管检测 5 000 个以上细胞, 通过 a 管作为阴性对照进行门控, 获得二维点图和单指标直方图。并经机带电脑系统直接计算各管阳性率。

### 1.5　荧光显微镜观察

将上述 b 管剩余精子细胞涂片后直接在荧光显微镜下观察。

## 2　结果

### 2.1　纯化的抗体浓度

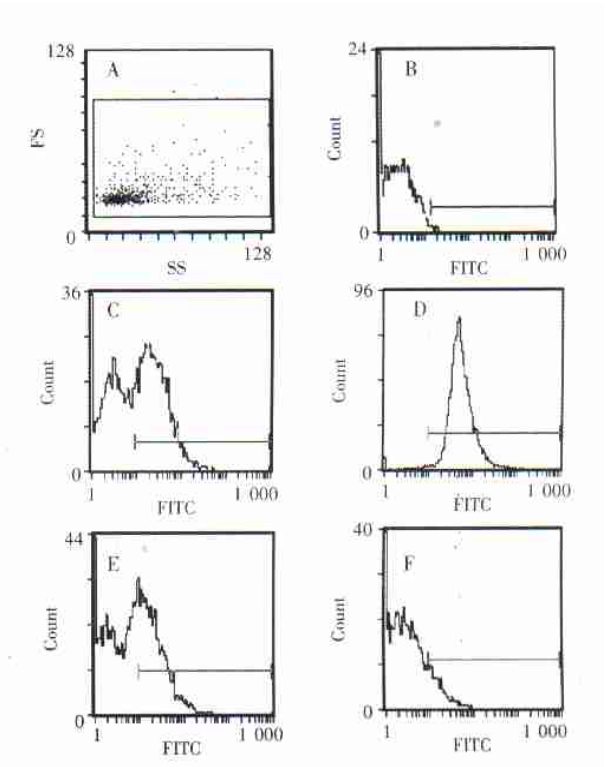
获得的 35 肽-KLH 浓度约为 500 μg/ml, 纯化后的特异性抗 35 肽抗体的最大 $A_{280}$ 为1.541 6, 用 FITC 标记后测 $A_{280}$ 为1.557 0, $A_{495}$ 为 0.091 9, 利用公式 IgG(mg/ml)=[ $A_{280}-(0.35\times A_{495})$ ]/1.4, 计算 IgG 浓度为 1.089 mg/ml, 约计为 1 mg/ml。

### 2.2　流式细胞仪检测结合率

所有二维点图见细胞多密集于左下角(图 1), 计算 a、b、c、d、e 5 管阳性率分别为 1.52%、49.2%、97.7%、36.4%、8.45%, 说明35 肽在精子细胞表面有高度表达, 抗35 抗体制备、纯化和标记较成功, 且该抗体与人精子表面可高度特异结合。

### 2.3　抗体结合部位

荧光显微镜下见精子头颈部着色, 部分见赤道板及头部顶端着色增强(图 2)。




A: Distribution of sperms; B: Negative control; C: FITC-goat anti-human IgG; D: FITC-anti-35P Ab; E: Anti-35P serum+FITC-goat anti-human IgG; F: Anti-35P serum+FITC-goat anti-mouse IgG

图 1　精子通过流式细胞仪检测的阳性率

**Fig 1　Positive percentage of sperms detected by flow cytometry**



图 2　FITC 标记的抗 35 肽抗体结合于精子头、颈部　(免疫荧光×1 000)

**Fig 2　FITC-anti-35 peptide antibody bound to the head and neck of sperms**　(immunofluorescence×1 000)

## 3　讨论

人工合成的 35 肽片段含位于精子顶体部位的 SP17 和精子顶体跨膜蛋白 Cyritestin 的特异表位, SP17 可特异性与卵子透明带糖蛋白、葡聚糖、糖酐脂等结合。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Cyritestin定位于顶体反应后或有穿透能力的精子顶体内膜、顶体完整活精子和顶体反应后精子的赤道区域。在体外受精条件下，抗Cyritestin去整合素结构域的抗体与精子孵育后，可降低精-卵的结合和融合，因此它们均在精子与卵子透明带结合及精-卵膜的结合和融合过程中发挥了重要作用。

多肽是一种较小分子量的半抗原，与适当载体分子连接后就成为完全抗原，可刺激机体产生较强的免疫应答。本研究选择了在载体蛋白中应用得最广泛、分子较大、免疫原性较强、富含赖氨酸的KLH作为载体，用EDC作为连接剂，在结合时EDC媒介体的水解是一个依赖于温度、pH和buffer浓度的大的竞争反应。本研究使用的KLH是一种巨型体，含20个亚单位，分子量约8 000 000。尽管KLH作为载体蛋白增强了多肽的免疫原性，然而也生成了抗KLH的抗体，需要从抗血清中清除；选择EDC固定柱，将多肽吸附在柱上成为多肽亲合柱；当血清通过时，可与其特异性抗体结合，使得特异性抗体容易从众多的无关抗体中得以分离。实验证实了整个连接反应迅速、操作简便、分离效果较好。

为了观察抗体和精子的结合特征，本实验采用流式细胞仪对抗体与精子结合特性进行检查，方法快速准确，并且减少了标本误差[3~5]。在本研究中应用FITC直接标记所获得的纯化的抗35肽抗体IgG，用小鼠IgG加FITC标记的羊抗鼠IgG结合精子作为阴性对照，阳性百分率控制在2%左右；用羊抗人IgG作为阳性对照，测阳性率为49.2%，直方图为双峰显示，提示非特异性结合较多；直接用FITC-抗35抗体标记精子细胞，测阳性率为97.7%，直方图为单一锐性峰，提示抗体与精子有高水平特异结合。本研究还将含抗35抗体鼠血清结合精子后，用羊抗人IgG再次进行检测，发现阳性率下降至36.4%，提示该抗体有一定的抑制作用。抗体血清与精子孵育后，用羊抗鼠IgG作为二抗进行检测，发现间接检测的阳性率为8.45%，与直接法相差较大，考虑可能与血清效价有关。

同时采用荧光显微镜观察见精子头颈部着色，部分见赤道板及头部顶端着色增强，提示该抗35肽抗体靶向精子头部，35肽抗原在精子头表面有表达。

该研究结果提示，该实验所制备的35肽抗体可与之高度结合，且结合率较高，而荧光显微镜提示精子在头部着色，说明肽与抗体的制备是成功的，且35肽在人精子头表面表达，特异性抗体可与之高度结合。该35肽可能与人精子受精功能有关，将其作为一种避孕疫苗，有一定的研究前景，值得进行进一步的研究和开发。

参考文献：

[1] Naz R K, Chauhan S C. Human sperm-specific peptide vaccine that causes long-term reversible contraception[J]. Biol Reprod, 2002, 67(2): 674—680.

[2] 何 畏，梁志清，史常旭，等. 一种多价精子抗原表位肽的设计与合成[J]. 生殖与避孕，2002，22(2)：67—69.

[3] Nicholson S C, Robinson J N, Sargent I L, *et al*. Detection of antisperm antibodies in seminal plasma by flow cytometry: comparison with indirect immunobead binding test[J]. Fertil Steril, 1997, 68(6): 1114—1119.

[4] Ke R W, Dockter M E, Majumdar G, *et al*. Majumdar, Flow cytometry provides rapid and accurate detection of antisperm antibodies[J]. Fertil Steril, 1995, 63(4): 902—906.

[5] 何 畏，梁志清，吴玉章，等. 多价精子抗原表位肽的设计与免疫效应研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(7)：796—798.

（编辑 刘洪娥）


## 欢迎订阅《检验医学与临床》杂志

《检验医学与临床》杂志经国家新闻出版署、科技部批准为正式刊物，该杂志系重庆市卫生局主管，重庆市卫生信息中心、重庆市临床检验中心联合主办的检验医学与临床相结合为主要特色和专业性学术期刊。在新的一年里本刊将继续奉行作用与学术、临床与实验室结合，普及与提高并重的宗旨，重点报道检验医学与相关学科领域内的领先科技成果和先进工作经验，坚持临床、实验室和仪器试剂开发、供应商三结合的方针，不断完善自我，提高办刊水平。

本刊标准刊号为ISSN 1672—9455·CN 50—1167/R，全国公开发行，大16开本，季刊，每期定价5元，全年20元。衷心希望您能继续订阅本刊。

地 址：重庆市渝中区长江一路30号广璐大厦4楼《检验医学与临床》编辑部 邮 编：400014

联系人：陈开红 杨庆华 电 话：(023)63616134

E-mail：gwyxcq@163.com 传 真：(023)63621994


?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net