

研究快报

人精子中性鞘糖脂抗体的制备及特性鉴定

刘建军 朱正美 崔肇春

(大连医学院生化教研室, 大连 116023)

最新的研究表明, 在原因不明性不孕夫妇中有 10—30% 可能由抗精子抗体 (AsAb) 引起。用精子特异性膜抗原 (如 FA-1, PH-20 蛋白等) 制备 AsAb 并研究其对受精及其过程的影响是当前生育调节研究中十分活跃的课题之一。用精子特异性抗原制备避孕疫苗被认为是目前最有希望用于计划生育的药物。已知鞘糖脂 (GSL) 具有抗原性, 而且它存在于质膜脂双层的外侧。有报道表明它们在精卵识别中可能具有重要作用。但迄今为止用人精子鞘糖脂 (hsGSL) 制备 AsAb 的研究在国内外都未开展, 这可能与 GSL 免疫原性低, 在人精子中含量甚微, 及大批量人精子标本获取困难等因素有关。本研究先后收集了人精液 300 份, 分离出精子于 -30°C 贮存备用。将 Ladisch 等 (Methods Enzymol, 1987, 138: 300) 及 Ledeen 等人 (Methods Enzymol, 1982, 83: 173,) 的方法加以综合, 制备纯化了人精子 GSL。

将人精子用氯仿-甲醇的盐溶液经长时搅拌、冷冻、及超声处理 (镜检精子细胞均已破碎), 提取的总脂再经 Ladisch 分配、硅胶层析等步骤纯化了人精子中性鞘糖脂 (hsNGSL)。由高效薄板层析和薄层扫描可知 hsNGSL 含有 6 种成分, 其中以 CTH、CMH、和 CDH 为主要组分。经 Noal 法测定 hsNGSL 中鞘氨醇的含量以表示 hsNGSL 的总量, 共得到 $409.6\mu\text{g}$ 的鞘氨醇。将 $82\mu\text{g}$ 鞘氨醇量的 hsNGSL 与 0.5% 的 *Salmonella minnesota* (以 0.5% 的甲基牛血清白蛋白配制) 及 Freund's 不完全佐剂, 三者按 1:1:2 的比例配制成乳剂, 经多点肌肉及脚掌注射免疫雄性家兔, 二周后经耳缘静脉

采血, 按常规制备抗血清。

用间接 ELISA 法检测抗 hsNGSL 抗体。用 hsNGSL 作为抗原包被 40 孔聚苯乙烯酶标反应板, 用制备的抗血清为一抗, HRP-羊抗兔 IgG 为二抗, 邻苯二胺 (OPD) 为底物, ELISA 检测仪读 A_{490} , 大于阴性对照组 (一抗用非免疫血清代替) A_{490} 均值 $+3\text{SD}$ 为阴性结果。结果表明抗 hsNGSL 抗体已经产生, 其效价为 1:80。用同法以完整人精子 (2.5×10^2 /孔) 作为包被抗原, 其效价为 1:160, 说明抗 hsNGSL 抗体能与完整精子反应。体外作抗 hsNGSL 抗体与人活精子凝集反应试验, 结果明胶凝集试验 (GAT) 呈阴性, 试管玻片凝集试验 (TSAT) 呈阳性, 效价 1:5。在精子制动试验中 (SIT) 中, 该抗体有明显的制动精子效应, 制动效价为 1:20。体外作特异性精子阻断试验证明该抗体与 hsNGSL 的结合位点能被人精子所封闭。免疫酶组化试验表明该抗体能结合完整人精子, 与人分泌期子宫内膜有交叉反应, 与人肺组织无交叉反应。间接免疫荧光试验 (IFT) 表明该抗体结合在人精子顶体部。

已知精子在获能、穿过卵丘和透明带、顶体反应和精卵融合的过程中, 顶体部质膜都起着关键的作用。我们制备的抗 hsNGSL 的 AsAb 能结合在人精子顶体部位, 这种结合对受精过程中的上述各个环节究竟有何影响, 值得进一步探索。