

Leukocytes slides SCA Протокол

НАБОР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПЕРОКСИДАЗ-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК В СПЕРМЕ (ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ОКРАШИВАНИЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГРАНУЛОЦИТОВ) *ТОЛЬКО ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ*

Принцип:

Метод окрашивания позволяет выявить в клетках фермент пероксидазу.

Образец спермы смешивают с раствором, чувствительным к ферменту пероксидазе. Если пероксидаза присутствует, то она расщепляет перекись водорода в субстрате. В то же время происходит окисление диаминобензидина (ДАБ) с окрашиванием клеток в коричневый цвет.



Зная концентрацию сперматозоидов, используя формулу, можно рассчитать количество пероксидаз-положительных клеток в каждом образце спермы.

Реагенты:

Буфер: 7 мл буфера, pH 7.4. Готов к использованию.

ДАБ: 1 мл раствора диаминобензидина. Готов к использованию. Внимание: Диаминобензидин является потенциальным канцерогеном.

Перекись: 1 мл раствора перекиси водорода. Готов к использованию.

Фиксатор: 12 мл разбавленного этанола. Готов к использованию.

Пероксидаза: 0.5 мл суспензии пероксидазы. Готов к использованию.

Необходимые материалы, не включенные в набор:

1. Деионизированная вода.
2. Пипетки и наконечники.
3. Пробирки и штативы для них.

Меры предосторожности:

Все образцы спермы следует считать потенциально контагиозными. Все манипуляции с образцами должны проводиться с учетом того, что они могут быть заражены ВИЧ или гепатитом. Образцы должны быть утилизированы в соответствии с рекомендациями OSHA.

Хранение и стабильность:

Храните реагенты при температуре от 2 °C до 8 °C. Их можно использовать до истечения срока годности, указанного на каждой этикетке. Срок годности составляет 18 месяцев с даты изготовления.

Сбор образца:

Сперму следует собирать в чистый контейнер. До использования образцы спермы можно хранить при комнатной температуре.

Подготовка:

1. Доведите все реагенты до комнатной температуры.
2. Приготовьте свежий субстрат, добавив в пробирку:
 - 1 мл воды
 - 250 мкл буфера
 - 40 мкл ДАБстрого 1 каплю перекиси
3. Аккуратно размешайте. Утилизируйте после использования.

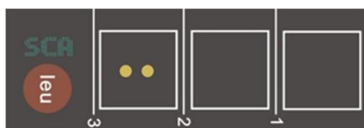
Процедура окрашивания:

1. Подождите, пока сперма разжижится.
2. Подсчитайте сперматозоиды.
3. С помощью пипетки перенесите 20 мкл спермы в пробирку.
4. С помощью пипетки перенесите 20 мкл пероксидазы во вторую пробирку (положительный контроль).

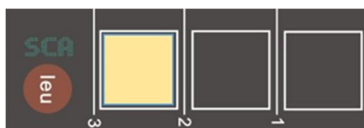
5. С помощью пипетки перенесите 20 мкл воды в третью пробирку (отрицательный контроль).
6. Добавьте строго 1 каплю фиксатора в каждую пробирку.
7. С помощью пипетки добавьте 60 мкл свежего субстрата в каждую пробирку и быстро перемешайте.
8. Осмотрите пробирки с пероксидазой и водой и отметьте любое изменение цвета. Пробирка с пероксидазой должна стать темно-коричневой. Это указывает на то, что свежий субстрат работает правильно. Перейдите к следующему шагу, если свежий субстрат работает правильно.

Анализ:

- a. Поместите две капли окрашенного образца (2 мкл) в центр одного квадрата на стекле:



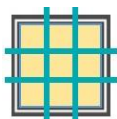
- b. Аккуратно положите одно покровное стекло (15 x 15 мм) на квадрат (форма покровного стекла и напечатанный квадрат должны совпадать). Образец должен равномерно распределиться по всей поверхности:



- v. Поместите стекло под микроскоп и проанализируйте.

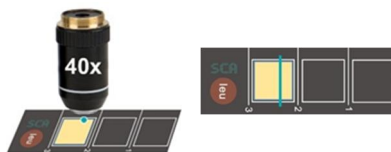
Анализ с SCA:

Полный анализ образца состоит из 4 линий обзора, как показано ниже:



Для этого:

- Просмотрите образец, начиная с горизонтальной кромки стекла, следуйте вертикально (перемещайте столик микроскопа только по оси «Y»).

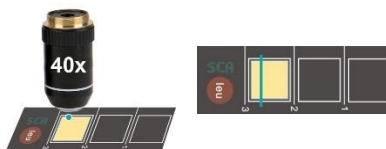


- Захватите круглые клетки, которые наблюдаются вдоль этой линии. SCA распознает присутствие пероксидазной активности на них (если таковая присутствует).

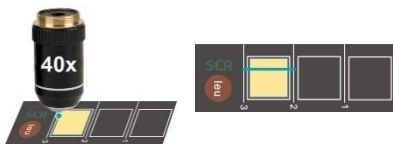
Не включайте в анализ клетки, которые частично выходят за пределы обзора. Ни в коем случае не следует перемещать объектив из сектора, чтобы захватить клетку за его пределами.



- Переместите объектив к противоположному краю стекла и просмотрите образец по второй вертикальной линии.



- Переместите объектив к вертикальному краю покровного стекла и повторите процесс, сделав два горизонтальных просмотра (для каждого прохождения следует перемещать столик только по оси «X»).



Анализ с SCA SCOPE:

Поместите стекло в SCA SCOPE и введите в систему номер образца и позицию (номер квадрата) образца для анализа. Начните анализ.

Расшифровка результатов:

- < 0,5 млн пероксидаз-позитивных клеток на мл: очень низкий риск инфекции.
- 0,5-0,9 млн пероксидаз-позитивных клеток на мл: риск инфекции.
- > 1 млн пероксидаз-позитивных клеток на мл: инфекция.

Selected References:

Vujisic S, Lepej SZ, *et al.* Antisperm antibodies in semen, sera and follicular fluids of infertile patients: relation to reproductive outcome after in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol* 2005;54:13-20.

World Health Organization. *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.* 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1999.

Bioscreen Inc. www.bioscreeninc.com 212.260.6692

Distributed by:

Microptic S.L.

Av. Josep Tarradellas, 8, 1º 6ª – 08029 Barcelona

Phone: +34 93 419 29 10 Fax +34 93 419 94 26

www.micropticsl.com