

# МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИСПЕРМАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG C ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАТЕКСНЫХ ЧАСТИЦ

## **BS-MAR-G, MARSCREEN® IgG**

Каталог. № : **BS-MAR-G** Методика от **5-30-2014**  
Количество : **~ 70**  
Производитель: **Bioscreen Inc.**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

**Только для исследовательских целей  
НЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР**

### Принцип:

Метод **MarScreen®** может быть использован для определения наличия или отсутствия антител класса G на поверхности сперматозоидов с использованием в комбинации с антисывороткой к IgG человека и конъюгированных с частицами (бусинами) IgG-антител человека.

В **Прямом MarScreen®** тесте живые подвижные сперматозоиды смешиваются с суспензией сорбированных IgG частиц на предметном стекле.

Во втором шаге анализа добавляется антисыворотка против IgG и затем перемешивается со смесью частицы/сперматозоиды. Антисыворотка связывает IgG на поверхности частиц и, если есть, IgG на поверхности сперматозоидов. В результате образуются комплексы частица-частица и частица-сперматозоид, которые можно наблюдать в микроскоп. Если на мембране сперматозоидов находятся антитела, то при движении сперматозоидов в реакционной смеси происходит связывание этих антител с частицами. Таким образом, сперматозоиды, имеющие IgG на своей мембране, будут связываться с частицами. Частицы будут также формировать агрегаты друг с другом.

В **Непрямом MarScreen®** тесте живые подвижные сперматозоиды, не имеющие IgG-антител на своей мембране, инкубируются с разбавленной сывороткой. Любые антитела, присутствующие в сыворотке, будут связываться со сперматозоидами.

В следующем шаге протокола смесь сперматозоиды/ сыворотка смешивается с суспензией латексных частиц, сорбированных IgG, на стекле, и далее протокол выполняется аналогично **Прямому тесту MarScreen®**.

### Реагенты:

**Латексные частицы, конъюгированные с IgG:** 0.8 мл реагента, состоящего из голубых латексных частиц, конъюгированных с IgG-антителами человека в белковом буфере с 0.1% азидом натрия. Готовы для использования. Обращаться с осторожностью.

**Антисыворотка:** 0.8 мл козьих антител против IgG человека в белковом буфере с 0.1% азидом натрия. Готовы для использования. Обращаться с осторожностью.

### Необходимые, но не поставляемые материалы:

1. Микроскоп со светлым полем и увеличением 100X - 400X.
2. Центрифуга на 500 - 600g.
3. Инкубатор на 37 °C.
4. Тестовые пробирки и штатив.
5. Дозаторы и наконечники.
6. Предметные и покровные стёкла.
7. Камера для подсчёта сперматозоидов.
8. Инкубатор на 56 °C.
9. Среда для отмывки сперматозоидов.
10. Контейнеры для сбора образцов.

### Хранение и стабильность:

Хранить при 2-8 °C. Необходимо использовать до указанного на этикетке срока годности. Обычный срок годности – 18 месяцев со дня выпуска.

**Латексные частицы, конъюгированные с IgG,** следует хранить в вертикальном положении.

### Предосторожности:

Все образцы спермы и сыворотки следует считать потенциально инфекционно опасными и обращаться с ними как с образцами, предположительно инфицированных ВИЧ или вирусами гепатитов. Образцы утилизируйте в соответствии с национальными руководствами по утилизации потенциально инфекционно опасных биологических образцов.

Избегайте соприкосновения крышки и горлышка флакона с латексными или пластиковыми перчатками, на поверхности которых находятся порошок или химические реагенты, способные загрязнить содержимое флакона.

### Сбор образцов:

Образцы спермы необходимо собрать в чистые контейнеры. Образцы следует хранить при комнатной температуре до использования. Используйте образцы спермы для анализа не позднее 3 часов после сбора.

Образцы крови соберите, отделите сыворотку и храните при 2 °C до 7 дней. Если необходимо хранить дольше, можно хранить в морозильнике, однократно заморозив. Не рекомендуются повторные циклы замораживания-размораживания. Позвольте замороженным образцам полностью оттаять перед использованием.

### Ограничения:

**Прямой тест MarScreen®:** Образцы спермы с низким содержанием подвижных сперматозоидов (менее 10 миллионов/мл), или с неподвижными сперматозоидами не могут быть использованы в этом тесте.

### Подготовка реагентов и сперматозоидов для Прямого теста MarScreen®:

1. Позвольте реагентам достичь комнатной температуры.
2. Осторожно ресуспендируйте частицы, вращая флакон с **латексными частицами, конъюгированными с IgG,** избегая пенообразования.

### Протокол прямого теста MarScreen®

1. Добавьте 10 мкл суспензии сперматозоидов на предметные стёкла.
2. Добавьте 10 мкл **латексных частиц, конъюгированных с IgG,** в сперму. Тщательно смешайте сперматозоиды и латексные частицы с помощью наконечника дозатора.
3. Добавьте 10 мкл **Антисыворотки** в смесь спермы с частицами.
4. Закройте реакционную смесь покровным стеклом.
5. Через 2 - 3 минуты просмотрите препарат под микроскопом.
6. Подсчитайте 100 свободно движущихся сперматозоидов, отметив отдельно сперматозоиды, связавшие любое число латексных частиц на своей поверхности.

### Подготовка реагентов и сыворотки для непрямого теста MarScreen®:

1. Позвольте реагентам достичь комнатной температуры.
2. Осторожно ресуспендируйте частицы, вращая флакон с **латексными частицами, конъюгированными с IgG,** избегая пенообразования.
3. Подготовка сперматозоидов:
  - 3.1 Позвольте сперме достичь разжижения.
  - 3.2 Добавьте в определённый объём разжиженной спермы двойной объём среды для отмывки, перемешайте. К примеру, к 2 мл спермы добавьте 4 мл среды для отмывки сперматозоидов.
  - 3.3 Центрифугируйте при 600 g в течение 6 минут, удалите супернатант и ресуспендируйте сперматозоиды в примерно 3 мл среды для отмывки сперматозоидов.
  - 3.4 Центрифугируйте при 600 g в течение 6 минут, удалите супернатант и ресуспендируйте сперматозоиды в небольшом объёме среды для отмывки сперматозоидов.
  - 3.5 Подсчитайте отмывые сперматозоиды и определите число подвижных сперматозоидов.

- 3.6 Разбавьте отмытые сперматозоиды до конечной концентрации 10-100 миллионов сперматозоидов/мл.
4. Подготовка сыворотки:
- 4.1 Инактивируйте сыворотку нагреванием при 56 °С в течение 30 минут.
- 4.2 Разбавьте сыворотку 1:16 средой для отмытки сперматозоидов, например, добавьте 20 мкл сыворотки в 300 мкл среды.

**Протокол непрямого теста MarScreen® в сыворотке:**

1. Добавьте по 50 мкл образца разбавленной сыворотки в соответствующие опытные пробирки.
2. Добавьте по 50 мкл суспензии донорской спермы во все пробирки. Осторожно перемешайте. Закройте каждую пробирку и инкубируйте 60 минут при 37°С.
3. Добавьте 10 мкл смеси сперматозоидов с сывороткой на предметные стёкла.
4. Добавьте 10 мкл латексных частиц, конъюгированных с IgG в смесь сперматозоидов с сывороткой. Тщательно смешайте реагенты с помощью наконечника дозатора.
5. Добавьте 10 мкл Антисыворотки в смесь сыворотка/сперматозоиды/частицы. Тщательно смешайте реагенты с помощью наконечника дозатора.
6. Закройте реакционную смесь покровным стеклом.
7. Через 2 - 3 минут просмотрите препарат под микроскопом.
8. Подсчитайте 100 свободно движущихся сперматозоидов, отметив отдельно сперматозоиды, связавшие любое число латексных частиц на своей поверхности.

**Расчёт процента общего связывания:**

Подсчитайте количество подвижных сперматозоидов следующим образом:

- ◆ Свободные сперматозоиды = нет связанных латексных частиц
- ◆ Связанные = сперматозоиды, связанные с латексными частицами

Расчёт процента общего связывания:

% общ. связывания =  $\frac{\text{число связанных частиц сперматозоидов}}{\text{общее количество сперматозоидов}} \times 100\%$

Пример: при увеличении 400X получены следующие данные для неизвестного образца, смешанного с латексными частицами:

Свободные подвижные сперматозоиды = 60  
Связанные подвижные сперматозоиды = 40

Рассчитываем по формуле:

$$\frac{40}{100} \times 100\% = 40\% \text{ общего связывания}$$



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)