

МЕТОД
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИСПЕРМАЛЬНЫХ
АНТИТЕЛ КЛАССА G С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЛАТЕКСНЫХ ЧАСТИЦ

BS-MAR-G, MARSCREEN® IgG

Каталог. № : **BS-MAR-G** Методика от 02-27-2010
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 агломераты 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 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.
Положительная и отрицательная контрольные сыворотки.
3. Инкубатор на 37°C.
4. Конические центрифужные 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 4°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 отмытые 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°C 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°C.
3. Добавьте 10 мкл смеси сперматозоидов с сывороткой на предметные стёкла.
4. Добавьте 10 мкл латексных частиц, конъюгированными 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:

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

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:

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

Литература:

World Health Organization. 1992. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press. Third Edition.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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