

SpermFlowEx Kit

Kat. č. ED7079

Popis

SpermFlowEx Kit je určen k analýze následujících parametrů lidského ejakulátu pomocí průtokové cytometrie:

- počet spermií
- počet leukocytů
- vitalita spermií
- integrita akrozomu spermií
- přítomnost intra-akrozomálního proteinu ve spermiích

Počty spermií a počty leukocytů

Měření počtu spermií a počtu leukocytů je založeno na přidání vnitřního standardu (fluorescenčních kuliček o známé koncentraci) ke vzorku ejakulátu. Detekce leukocytů ve vzorku je prováděna pomocí značené protilátky proti lidskému antigenu CD45 (CD45 PE-Cy5).

Vitalita spermií

Životaschopnost spermií je zkoumána pomocí propidium jodidu, který proniká narušenou membránou mrtvých buněk a váže se na DNA.

Integrita akrozomu

Měření integrity akrozomu je založeno na detekci intra-akrozomálního proteinu (IAP), který je přítomen v akrozomu. Pokud akrozom spermie není narušen, není tento protein možno detekovat. U spermií s narušenou membránou je tento protein dostupný pro protilátku proti IAP a je detekován.

Přítomnost intra-akrozomálního proteinu

Po permeabilizaci membrány spermií se intra-akrozomální protein (IAP) stává dostupným pro protilátku proti intra-akrozomálnímu proteinu a je detekován. V případě, že spermie neobsahují intra-akrozomální protein (IAP), není po permeabilizaci spermií protein přítokůvým cytometrem detekován.

Vyšetření je vhodné ještě doplnit o vyšetření motility a morfologie spermií pomocí světelného mikroskopu v souladu s doporučením WHO^[1]. V současné době je uváděno, že až 20 % párů trpí poruchami plodnosti. Z toho asi u 1/3 je příčina na straně muže. Neinvazivní vyšetření ejakulátu by proto mělo patřit mezi základní metody sloužící k vyloučení nebo potvrzení andrologické příčiny neplodnosti.

Vyšetření ejakulátu je převážně prováděno pomocí světelného mikroskopu a řídí se kritérii WHO z roku 2010^[1]. Takto provedené vyšetření je subjektivní a závisí na osobní zkušenosti. Při využití průtokové cytometrie se vyšetření objektivizuje, jelikož dochází k měření velkého počtu spermií a také k detekci buněk na základě specifického značení^[2]. Významnými parametry, které ovlivňují schopnost oplodnění, jsou počet spermií, jejich životnost, integrita akrozomu a přítomnost intra-akrozomálního vazebného proteinu (IAP)^[3].

Akrozom obsahuje enzymy hyaluronidasu a acrosin, které natráví vnější membránu vajíčka zvanou zona pellucida, čímž umožní průnik haploidního jádra spermie do vajíčka. Přítomnost leukocytů v ejakulátu může upozornit na eventuelně probíhající zánět či infekci pohlavního ústrojí.

Specifikace

Intra-acrosomal protein FITC obsahuje myši monoklonální protilátku proti intra-akrozomálnímu proteinu, značenou FITC (připraveno k použití).

CD45 PE-Cy5 obsahuje myši monoklonální protilátku proti CD45, značenou PE-Cy5TM5 (připraveno k použití).

Fluorescent Count Standard obsahuje fluorescenční kuličky, 1×10⁶ částic/ml (připraveno k použití).

Propidium Iodide obsahuje roztok propidium jodidu (připraveno k použití).

Permeabilizing Solution obsahuje permeabilizační roztok (připraveno k použití).

Poskytované materiály

ED7079-1 Intra-acrosomal protein FITC, 0,5 ml
ED7079-2 CD45 PE-Cy5, 0,25 ml
ED7079-3 Fluorescent Count Standard, 2,0 ml
ED7079-4 Propidium Iodide, 0,25 ml
ED7079-5 Permeabilizing Solution, 25 ml
Obsah kitu vystačí na 25 testů.

Nutné, ale neposkytované materiály

5ml testovací zkumavky (12 × 75 mm)
Deionizovaná voda (dH₂O)
Fosfátový pufr (PBS)

Skladování a manipulace

SpermFlowEx Kit skladujte při 2–8 °C. Doba použitelnosti je vyznačena na etiketách vialek a na vnějším obalu soupravy.

Výstrahy, předběžná opatření a omezení

- Určeno pouze pro výzkumné účely.
- Nepoužívejte reagenty po uplynutí doby

použitelnosti.

- Zabraňte kontaminaci roztoků.
- Reagencie nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- **Permeabilizing Solution** obsahuje ethanol (<50%).

Roztok je klasifikován jako nebezpečný podle nařízení (ES) č. 1272/2008.
H vĕty
H225 Vysoce hořlavá kapalina a páry.
H226 Hořlavá kapalina a páry.

P vĕty

P210 Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.

P260 Nevdechujte aerosoly.

P301+P312 PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře.

P302+P352 PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkými množstvím vody a mýdla.

P305+P351+P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

P403+P235 Skladujte na dobře větraném místě. Uchovávejte v chladu.

P501 Odstraňte obsah/obal podle místních předpisů.

Úplné informace o potenciálních nebezpečích a o tom, jak s produktem bezpečně pracovat, naleznete v bezpečnostním listu produktu.

- Vzorky ejakulátu jsou považovány za potenciálně infekční materiál, a proto s nimi musí být náležitě nakládáno.
- Průtokový cytometr pravidelně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Složení komponent soupravy bylo optimalizováno s cílem dosáhnout nejlepšího poměru specifického signálu k nespecifickému signálu. Z tohoto důvodu je důležité dodržovat doporučený poměr objemu reagenty a objemu vzorku v každém testu.
- Monoklonální protilátku proti intra-akrozomálnímu proteinu nelze použít pro specifickou detekci lidských spermií kvůli její vazbě na buněčnou drť (debris) i kvůli potenciální reaktivitě s jinými izozomy cílového antigenu (sperm-specific glycerinaldehyde phosphate dehydrogenase), které jsou přítomné i v jiných typech buněk.
- V případě pozorování jakéhokoliv zhoršení vlastností reagentů nebo v případě, že získaná data vykazují odchylky, kontaktujte prosím výrobce na e-mailové adrese: technical@exbio.cz.

Použití

Analýza lidského ejakulátu

Vzorek

Vzorky ejakulátu zpracujte do 8 hodin po odběru. Před měřením skladujte vzorky při laboratorní teplotě.

Zkontrolujte počet spermií pomocí světelného mikroskopu. Naředte sperma 1:1 nebo 1:9 pomocí PBS podle počtu spermií (čím větší počet, tím větší ředění).

U vzorků s počtem spermií nižším než 10 × 10⁶ /ml doporučujeme provést kontrolní přepočítání spermií na mikroskopu z důvodů možného zkreslení výsledku v důsledku vyššího relativního zastoupení buněčné drtě v regionu ohraničujícím spermie.

Nutná zařízení

Automatické pipety s jednorázovými špičkami
Vortex
Centrifuga s rotorem pro 5ml zkumavky
Světelný mikroskop
Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm a vhodně emisní filtry

Postup

Počty spermií a počty leukocytů

1. Do zkumavky napipetujte 50 μl naředěných spermií.
2. Přidejte 10 μl CD45 PE-Cy5 reagenty.
3. Směs promíchejte a inkubujte 20 minut za laboratorní teploty.
4. Ke vzorku přidejte 50 μl **Fluorescent Count Standard** (nejprve odkapejte potřebné množství dobře promíchaného standardu z kapátka a pak pipetujte přesné množství ke vzorku spermií).
5. Přidejte 0,5 ml PBS, vzorek promíchejte a změřte průtokovým cytometrem

Vitalita spermií

1. Do zkumavky napipetujte 50 μl naředěných spermií.
2. Přidejte 10 μl roztoku Propidium Iodide.
3. Směs promíchejte a inkubujte 20 minut za laboratorní teploty.
4. Přidejte 0,5 ml PBS, vzorek promíchejte a změřte průtokovým cytometrem.

Integrita akrozomu

1. Do zkumavky napipetujte 50 μl naředěných

spermií.

2. Přidejte 1 ml PBS, směs promíchejte a centrifugujte 5 minut při 150 g. Odstraňte supernatant.
3. Sediment ještě jednou promyjte (zopakujte krok 2).
4. K sedimentu přidejte 10 μl protilátky Intra-acrosomal protein FITC.
5. Směs promíchejte a inkubujte 20 minut za laboratorní teploty.
6. Přidejte 0,5 ml PBS, vzorek promíchejte a změřte pomocí průtokového cytometru.

Přítomnost intra-akrozomálního proteinu

1. Do zkumavky napipetujte 50 μl naředěných spermií.
2. Přidejte 1 ml Permeabilizing Solution, který byl předem vytemperován na laboratorní teplotu (20–25 °C).
3. Směs promíchejte a inkubujte 15 minut za laboratorní teploty.
4. Směs centrifugujte 5 minut při 150 g. Odstraňte supernatant.
5. K sedimentu přidejte 1 ml PBS a centrifugujte 5 minut při 150 g.
6. Sediment ještě jednou promyjte (zopakujte krok).
7. K sedimentu přidejte 10 μl protilátky Intra-acrosomal protein FITC.
8. Směs promíchejte a inkubujte 20 minut za laboratorní teploty.
9. Přidejte 0,5 ml PBS, vzorek promíchejte a změřte průtokovým cytometrem.

Analýza průtokovým cytometrem

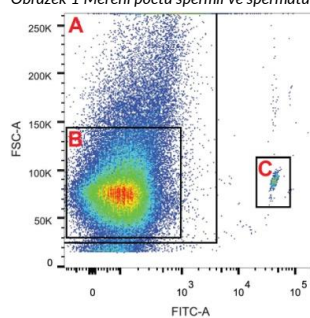
Vzorky analyzujte pomocí průtokového cytometru vybaveného excitačním laserem 488 nm a vhodnými filtry.

Fluorescence vnitřního standardu (Fluorescent Count Standard) stejně jako značené protilátky proti intra-akrozomálnímu proteinu je detekována v kanále pro FITC. Fluorescence propidium jodidu a fluorescenční značky PE-Cy5TM5 je detekována v kanále pro PC5 nebo PerCP.

Počty spermií a počty leukocytů

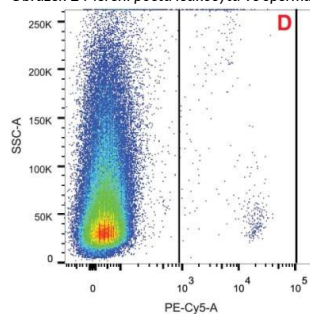
Naměřená data zobrazte v dot-plotu, kde na ose X je intenzita fluorescence ve FITC kanálu a na ose Y forward-scatter (FSC) (Obr. 1). V grafu nastavte regiony (gate), jak je ukázáno na obrázku 1. Gate A ohraničuje populaci všech buněk, gate B ohraničuje spermie a gate C vnitřní standard (Fluorescent Count Standard).

Obrázek 1 Měření počtu spermií ve spermatu



Poté zobrazte leukocyty v ejakulátu vnesením události z gate A do dot-plotu, kde na ose X je intenzita fluorescence PE-Cy5TM5 a na ose Y je side-scatter (SSC). Populaci leukocytů, která je označena protilátkou CD45 PE-Cy5, ohraničte pomocí gate D (Obr. 2).

Obrázek 2 Měření počtu leukocytů ve spermatu



Vypočítejte koncentrace spermií a leukocytů pomocí následujících vztahů:

$$S = \frac{\text{gateB}}{\text{gateC}} \times \text{ředění} [10^6 \text{ spermií/ml}]$$

$$L = \frac{\text{gateD}}{\text{gateC}} \times \text{ředění} [10^6 \text{ leukocytů/ml}]$$

- S představuje počet spermií v ejakulátu
L představuje počet leukocytů v ejakulátu
gate B představuje počet událostí v gate B
gate C představuje počet událostí v gate C
gate D představuje počet událostí v gate D

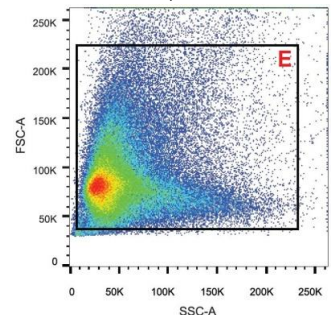
Vitalita spermií

Naměřená data zobrazte jako bodový graf forward-scatter (FSC) versus side-scatter (SSC). Nastavte ohraničení kolem spermií, jak je znázorněno na obrázku 3.

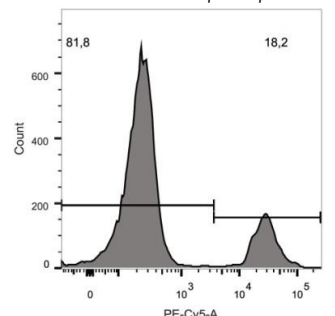
Události z gate E poté zobrazte v histogramu (Obr. 4), kde na ose X je vynesena intenzita fluorescence propidium jodidu (PE-Cy5 nebo PerCP kanál).

Pomocí vhodné umístění gate oddělte v histogramu pozitivní a negativní populace spermií. Negativní populace představuje životaschopné spermie, zatímco pozitivní populace reprezentuje neživotné spermie. Životaschopnost spermií je vyjadřována v procentech životaschopných spermií ze všech spermií.

Obrázek 3 Ohraničení spermií



Obrázek 4 Měření životaschopnosti spermií

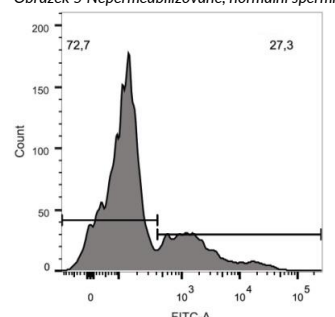


Integrita akrozomu a přítomnost intra-akrozomálního proteinu

Naměřená data permeabilizovaného a nepermeabilizovaného vzorku obarveného protilátkou proti intra-akrozomálnímu proteinu zobrazte v grafu forward-scatter (FSC) versus side-scatter (SSC). Nastavte gate E ohraničující spermie, jak je ukázáno na obrázku 3. Události z gate E poté zobrazte v histogramu (Obr. 5-7), kde na ose X je vynesena intenzita fluorescence v detektoru pro FITC. Pomocí vhodné umístění gate oddělte v histogramu pozitivní a negativní populace spermií.

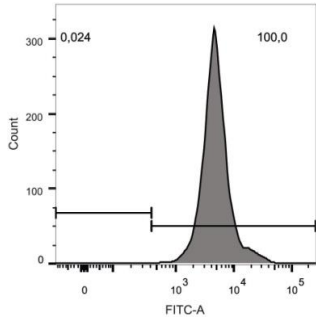
Obrázek 5 ukazuje nepermeabilizované normální spermie s nízkým zastoupením (< 30 %) pozitivních událostí. Negativní události představují spermie s neporušeným akrozomem a pozitivní události představují spermie s poškozenou akrozomální membránou.

Obrázek 5 Nepermeabilizované, normální spermie



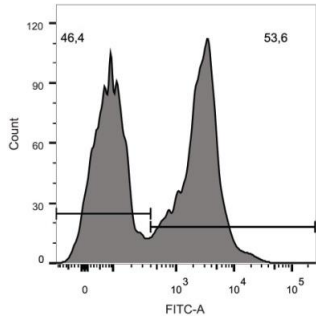
Permeabilizované normální spermie (Obr. 6) jsou v převážně většině pozitivní, což je důkaz přítomnosti intra-akrozomálního proteinu ve spermiích.

Obrázek 6 Permeabilizované, normální spermie



Nepermeabilizované patologické spermie (Obr. 7) vykazují vysoké zastoupení pozitivních spermií s poškozeným akrozomem (> 30 %).

Obrázek 7 Nepermeabilizované patologické spermie



Očekávané hodnoty

Normální hodnoty dle WHO^[1]

Počet spermií v ejakulátu > 15×10^6 /ml
Počet leukocytů v ejakulátu < 1×10^6 /ml
Vitalita spermií > 58 %

Normální hodnoty akrozomu

Integrita akrozomu spermií < 30%
(=procento pozitivních spermií v nepermeabilizovaném vzorku)
Přítomnost intra-akrozomálního proteinu > 90%
(=procento pozitivních spermií v permeabilizovaném vzorku)

Odkazy

[1] WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. World Health Organization, 5th edition, 2010

[2] Gilan L, Evans G, Maxwell WM (2005) Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology. 63: 445-57

[3] Peknicova J, Chladek D, Hozak P (2005) Monoclonal antibodies against sperm intra-acrosomal antigens as markers for male infertility diagnostics and estimation of spermatogenesis. Am J Reprod Immunol. 53(1): 42-9

Výrobce

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 50 Vestec
Czech Republic

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

Ochranné známky

Cy™ a CyDye™ jsou registrované ochranné známky společnosti Cytiva.

Historie revizí

- Verze 1, ED7079_TDS_v1
První vydání
- Verze 2, ED7079_TDS_v2
Byla aktualizována prohlášení o nebezpečnosti a upozornění.
- Verze 3, ED7079_TDS_v3
Vloženo nové omezení/doporučení s ohledem na vzorky s nízkým počtem spermií.
- Verze 4, ED7079_TDS_v4
Vloženo nové omezení k použití s ohledem na specifickou monoklonální protilátku proti intra-akrozomálnímu proteinu.
- Verze 5, ED7079_TDS_v5
Logo společnosti se změnilo. Rozvržení TDS se změnilo. Poštovní směrovací číslo výrobce se změnilo z 25242 na 25250.
- Verze 6, ED7079_TDS_v6
V sekci Ochranné známky došlo ke změně z GE Healthcare na Cytiva.

Symbole

- REF** Katalogové číslo
- LOT** Kód dávky
- Použit do data
- Omezení teploty
- Čtěte návod k použití
- Chránit před slunečním zářením
- Výrobce
- RUO** Pouze pro výzkumné účely

exbio

SpermFlowEx Kit

25 testů | Kat. č. ED7079

Pouze pro výzkumné účely

Nepoužívat pro diagnostické a terapeutické procedury.

Technický list

Verze: ED7079_TDS_v6_CS

Datum vydání: 11-01-2021



Produkt je určen pro In Vitro diagnostické použití. In vivo diagnostické nebo terapeutické aplikace jsou zakázány.

Výrobky nesmějí být použity k dalšímu prodeji nebo převodu třetím osobám ani jako samostatný výrobek, ani jako součást výroby jiného výrobku bez písemného souhlasu EXBIO Praha, a.s. EXBIO Praha, a.s. nenese odpovědnost za porušení patentu ani za žádné další porušení práv duševního vlastnictví, ke kterým může dojít při používání těchto produktů. Objednávky na všechny produkty jsou přijímány v souladu s pravidly a podmínkami dostupnými na www.exbio.cz. EXBIO, EXBIO Logo a všechny ostatní ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti EXBIO Praha, a.s..