کیت ارزیابی شکست DNA اسپرم

(Sperm DNA Fragmentation Assay Kit)

آنالیز روتین مایع منی اولین روش در ارزیابی وضعیت باروری مردان می‌باشد. این روش اطلاعات مفیدی را راجع به تعداد، حرکت، مورفولوژی، میزان زنده بودن اسپرم‌ها و عملکرد گنادها در اختیار قرار می‌دهد. با این وجود، این ارزیابی هیچ اطلاعاتی راجع به یکی از مهم‌ترین پارامترها یعنی یکپارچگی مولکول DNA که برای قدرت باروری اسپرم و رشد جنین ضروری می‌باشد ارائه نمی‌دهد. میزان اسپرم‌های دارای DNA سالم در مایع منی می‌تواند به عنوان یک فاکتور پیش‌گویی کننده در ارزیابی باروری مردان و احتمال حاملگی مد نظر قرار گیرد. در واقع وجود شکست‌های DNA با کاهش قدرت باروری مردان، ناباروری و سقط جنین همراه است.

کیت ارزیابی شکست DNA اسپرم (SDFA) با ارزیابی وضعیت یکپارچگی مولکول DNA اسپرم و محاسبه ایندکس شکست DNA (DFI) اطلاعات با ارزشی در رابطه با وضعیت بیماران مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهت انتخاب پروتکل درمانی مناسب در اختیار پزشک معالج قرار می‌دهد.

اندیکاسیون‌ها

اولیگو استنو تراتو زواسپرمی، ناباروری مردانه با علت نامشخص، سابقه سقط مکرر جنین، واریکوسل، تماس با سموم و آلاینده‌ها، بررسی کارایی درمان‌های دارویی، توقف رشد جنین، کیفیت نامطلوب جنین، ارزیابی باروری پس از درمان‌های سرطان.

با توجه به اینکه انجام سیکل‌های کمک باروری (ART) پرهزینه و زمانبر می‌باشند، ارزیابی میزان شکست DNA اسپرم قبل از شروع سیکل‌های درمانی برای همه زوجین توصیه می‌گردد.

اصول آزمون

این آزمون بر پایه میزان گسترش کروماتین اسپرم بنا شده است. در این روش پس از قرار دادن اسپرم‌ها در بستری از میکروژل بر روی لام‌های مخصوص، از اسید برای دناتوره کردن استفاده می‌شود. در ادامه با استفاده از محلول لیز، پروتئین‌های اسپرم حذف می‌گردند. در نهایت توسط محلول رنگ‌آمیزی میزان گسترش مولکول DNA اسپرم به صورت هاله در اندازه‌های مختلف (بر اساس میزان یکپارچگی DNA) در اطراف هسته قابل رویت می‌شود.

محتویات کیت

هر کیت دارای محتویات مورد نیاز جهت انجام آزمون برای ۲۵ نمونه می‌باشد.

اجزای کیت عبارتند از:

* ۲۵ عدد لام کوت شده
* ۵۰ عدد میکروتیوب حاوی میکروژل
* محلول A (۳۰ میلی‌لیتر)
* محلول B (۳۰ میلی‌لیتر)
* محلول C (۳۰ میلی‌لیتر)
* محلول D (۳۰ میلی‌لیتر)
* فوم جهت شناورسازی میکروتیوب‌ها
* بروشور

سایر مواد و وسایل مورد نیاز جهت انجام آزمون

- میکروسکوپ نوری
- هود شیمیایی
- یخچال
- بن ماری
- سمپلر و سر سمپلر
- لامل
- پتری دیش
- اتانول ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد
- آب مقطر
- بافر فسفات سالین (PBS) با pH ۷/۴ - ۷/۲
- دستکش و ماسک

آماده‌سازی نمونه

ابتدا نمونه تازه مایع منی در ظرف استریل جمع‌آوری شود (از نمونه ذوب شده مایع منی نیز می‌توان استفاده کرد). پس از آب شدن نمونه (Liquefaction) و ارزیابی غلظت اسپرم، دو بار شستشو با PBS با دور g ۴۰۰-۳۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام شود. در نهایت رسوب حاصل با استفاده از PBS تا میزان ۱۰-۵ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق گردد.

کنترل‌های مثبت و منفی

کنترل مثبت: به منظور تهیه کنترل مثبت می‌توان یک نمونه اسپرم را در بن ماری جوش به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه کرد و یا آن را در معرض اشعه فرابنفش (UV) و یا محلول بازی هیدروکسید سدیم (NaOH) قرار داد.

کنترل منفی: به منظور تهیه کنترل منفی می‌توان از نمونه اسپرم پروسس شده فرد دارای DFI طبیعی استفاده نمود.

نکات ایمنی

۱- از تماس محتویات کیت با پوست و چشم و نیز استنشاق آن‌ها اکیدا خودداری شود.

۲- در زمان آزمون از دستکش و ماسک استفاده گردد.

۳- محل انجام آزمون دارای تهویه هوای مناسب باشد.

۴- دفع پسماندها با رعایت اصول ایمنی آزمایشگاه صورت گیرد.

۵- از خوردن و آشامیدن در حین آزمون اکیدا خودداری شود.

شرایط نگهداری کیت

پس از دریافت و هربار استفاده، اجزای کیت در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.

مراحل انجام آزمون

۱- قرار دادن میکروتیوب حاوی ژل در فوم تعبیه شده در کیت و غوطه‌ورسازی آن در بن‌ماری ۹۵-۸۵ درجه به مدت ۵ دقیقه یا تا زمانیکه ژل کاملا ذوب گردد

۲- قرار دادن میکروتیوب حاوی ژل ذوب شده در دمای محیط به منظور هم دما شدن با محیط (در حدود ۳-۲ دقیقه)

۳- اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم آماده‌سازی شده به میکروتیوب حاوی ژل و همگن کردن آن

۴- قرار دادن ۲۰ میکرولیتر از مخلوط فوق بر روی لام مخصوص و بلافاصله قرار دادن لامل روی آن (از ایجاد حباب پرهیز شود)

۵- قرار دادن لام در یخچال ۸-۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه

۶- برداشتن لامل به آهستگی از روی لام

۷- قرار دادن لام در داخل پتری دیش و افزودن محلول A و نگهداری آن در تاریکی به مدت ۷ دقیقه در دمای محیط

۸- تخلیه آهسته محلول A و افزودن محلول B و نگهداری آن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط

۹- تخلیه آهسته محلول B و افزودن آب مقطر و نگهداری به مدت ۳ دقیقه

۱۰- تخلیه آهسته آب مقطر و افزودن اتانول ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد به ترتیب هر کدام به مدت ۲ دقیقه

۱۱- خشک کردن کامل لام در دمای محیط

۱۲- افزودن محلول C (۳-۲ قطره) و بلافاصله محلول D (۳-۲ قطره)، تکان دادن آهسته لام جهت مخلوط شدن دو محلول و نگهداری به مدت ۱۵ دقیقه

۱۳- شستشوی لام با جریان آهسته PBS

۱۴- خشک کردن لام و مشاهده با میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی ×۱۰۰۰

۱۵- شمارش حداقل ۴۰۰ اسپرم و محاسبه DFI

تفسیر نتایج

اسپرم سالم بدون شکست DNA:

۱- اسپرم دارای هاله بزرگ (Large halo): هاله‌ای که عرض آن مشابه و یا بزرگتر از قطر هسته می‌باشد (b).

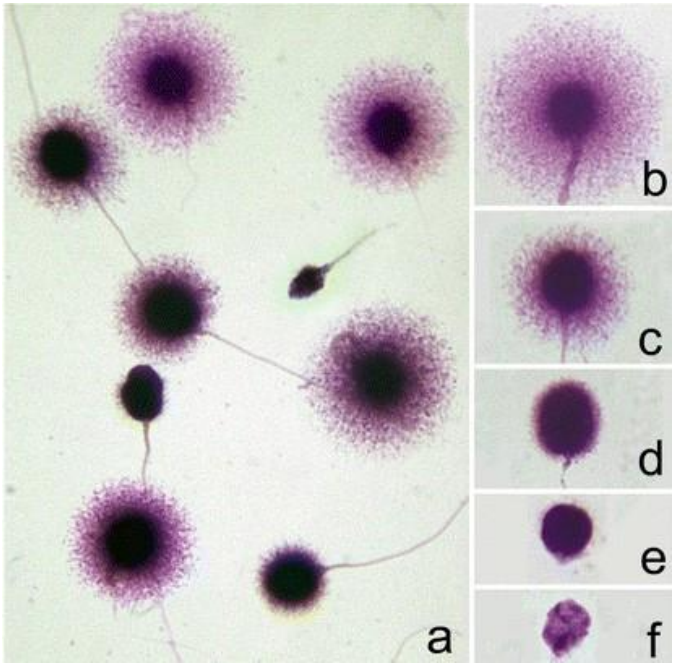
۲- اسپرم دارای هاله متوسط (Medium halo): هاله‌ای که عرض آن بین هاله بزرگ و کوچک است (c).

اسپرم دچار شکست DNA:

۱- اسپرم دارای هاله کوچک (Small halo): هاله‌ای که عرض آن کوچک‌تر و یا برابر یک سوم قطر هسته می‌باشد (d).

۲- اسپرم فاقد هاله (No halo) (e).

۳- اسپرم فاقد هاله با هسته تخریب شده، نامنظم و با رنگ‌پذیری ضعیف (Degraded) (f).



https://doi.org/10.1007/978-3-319-71815-6_8

نحوه محاسبه ایندکس شکست DNA (DFI)

$$DFI\ (\%) = \frac{\text{Small halo} + \text{No halo} + \text{Degraded}}{\text{Total counted}} \times 100$$

مقادیر مرجع

- ٪ ۱۵ ≥ DFI: طبیعی
- ٪ ۳۰-۱۵ ~ DFI: حد واسط
- ٪ ۳۰≤ DFI: غیر طبیعی

Glossary of symbols:

REF	شماره کاتالوگ
LOT	شماره سری ساخت
	تاریخ تولید
	تاریخ انقضا
	هشدار، راهنمای محصول مطالعه شود
+8°C +2°C	دمای نگهداری و انبارش
	محل تولید
	دور از نور خورشید نگهداری شود
Σ n	قابل استفاده برای(n) نمونه تست
IVD	تشخیص آزمایشگاهی

RS MEDICAL

تولید شده در: شرکت دانش بنیـان راون سـازه

تهران، جاده دماوند، پارک فناوری پردیس،

نبش نوآوری ششم، ساختمان شماره ۶۱

تلفن: ۷۰-۰۲۱۷۶۲۵۰۱۶۵

www.rsmedical.ir info@rsmedical.ir

ISO 13485 RN: 1944.2019