

بررسی واکنش آکروزومی

(Acrosome reaction)

محلولهای بافری مورد نیاز رنگ آمیزی

۱. محیط Ham's F10
۲. سرم آلبومین انسانی
۳. محلول تریپان بلو ۲٪
۴. گلوکارآلدهید ۳٪ محلول در بافر کاکودیلات ۰/۱ مولار
۵. بیسماک براون ۰/۸ درصد (PH نهایی ۱/۸)
۶. رزبنگال ۰/۸ درصد در تریس بافر ۰/۱ مولار با PH نهایی ۵/۳
۷. الکل‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد

نمونه گیری و بررسی اولیه مایع سمن :

الف) هر نمونه انزالی پس از اینکه بمدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور نگهداری شد با محیط Ham's F10 به نسبت ۱ به ۳ مخلوط و در دور ۴۰۰g بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس به روش پروتکل اسپرمهای متحرک جداسازی می شود.

ب) به ته نشین حاصل از سانتریفوژ ، یک سی سی محیط Ham's F10 حاوی ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر سرم آلبومین انسانی اضافه شود.

رنگ آمیزی سه گانه (triple staining)

روش رنگ آمیزی سه گانه (Procedure)

- ۱) اضافه کردن حجمهای مساوی از محیط با محلول تریپان بلو ۰.۲٪ به سوسپانسیون اسپرم
- ۲) نگهداری سوسپانسیون بمدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور 37°C
- ۳) سانتیفیوژ بمدت ۵ دقیقه در 600g در دمای آزمایشگاه
- ۴) شستشوی مجدد (۱ الی ۴ بار) در محیط فاقد سرم آلبومین انسانی تا سوسپانسیون اسپرم شفاف شود.
- ۵) فیکس اسپرم ها در گلو تار آلدهید ۳٪ محلول در بافر کاکودیلات 0.1M با $\text{PH}=7.4$ بمدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه
- ۶) سانتیفیوژ اسپرم و سپس تهیه سوسپانسیون در آب مقطر و سانتیفیوژ مجدد (۲ مرتبه)
- ۷) اضافه کردن 50 میکرولیتر آب مقطر به ته نشین لوله و تهیه سوسپانسیون
- ۸) تهیه اسمیر و نگهداری لام بمدت یک شب در دمای آزمایشگاه به منظور خشک شدن
- ۹) رنگ آمیزی با بیسماک براون 0.8 درصد در آب مقطر به اضافه ۲ قطره اسید کلریدریک نرمال با PH نهایی $1/8$ در دمای 40 درجه بمدت ۵ دقیقه
- ۱۰) شستشو در آب مقطر برای چند ثانیه
- ۱۱) رنگ آمیزی با رزبنگال 0.8 درصد در تریس بافر 0.1 مولار با PH نهایی $5/3$ در دمای 24 درجه بمدت ۲۰ تا ۴۵ دقیقه
- ۱۲) شستشو در آب مقطر بمدت چند ثانیه (در بار هر بار ده ضربه)
- ۱۳) آبیگری در الکلهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد (هر کدام ۵ دقیقه)
- ۱۴) شفاف سازی لامها در زایلن و مونت کردن
- ۱۵) مشاهده با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $1000\times$

اسپرم ها بر اساس رنگ آمیزی به چهار دسته تقسیم می شوند :

A. اسپرمهای مرده بدون واکنش آکروزومی (مرده با آکروزوم سالم)
هسته این اسپرمها به رنگ آبی تیره و ناحیه آکروزوم صورتی رنگ می باشد.

B. اسپرمهای مرده با واکنش آکروزومی (مرده بدون آکروزوم)
هسته اسپرمها به رنگ آبی تیره و ناحیه آکروزومی به رنگ آبی کمرنگ یا بدون رنگ می باشد.

C. اسپرمهای زنده بدون واکنش آکروزومی (زنده با آکروزوم سالم)
هسته به رنگ قهوه ای و ناحیه آکروزوم به رنگ صورتی می باشد.

D. اسپرمهای زنده با واکنش آکروزومی (زنده بدون آکروزوم)
هسته به رنگ قهوه ای و ناحیه آکروزومی به رنگ آبی کمرنگ یا بدون رنگ می باشد.

رنگ آمیزی دو گانه (Double staining)

مراحل رنگ آمیزی دوگانه مانند مراحل رنگ آمیزی سه گانه است با این تفاوت که در این روش، رنگ آمیزی حیاتی یا تریپان بلو وجود ندارد.

روش رنگ آمیزی دو گانه (Procedure)

مراحل روش رنگ آمیزی دو گانه به ترتیب زیر می باشد:

- (۱) فیکس اسپرم ها در گلو تار آلدهید ۳٪ محلول در بافر کاکودیلات ۰/۱M با $\text{PH}=7/4$ بمدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه
- (۲) سانتریفوژ در ۱۰۰۰g بمدت ۳ دقیقه (دو بار)
- (۳) اضافه کردن ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر به ته نشین لوله و تهیه سوسپانسیون
- (۴) تهیه اسمیر و خشک کردن لام در دمای اتاق
- (۵) رنگ آمیزی با بیسماک براون ۰/۸ درصد در آب مقطر به اضافه ۲ قطره اسید کلریدریک نرمال با PH نهایی ۱/۸ در دمای ۴۰ درجه بمدت ۱۰ دقیقه
- (۶) شستشو در آب مقطر بمدت چند ثانیه (در هر بار ده ضربه)
- (۷) رنگ آمیزی با رزبنگال ۰/۸ درصد در تریس بافر ۰/۱ مولار با PH نهایی ۵/۳ در دمای ۲۴ درجه بمدت ۲۰ تا ۴۵ دقیقه
- (۸) شستشو در آب مقطر برای چند ثانیه
- (۹) آبگیری در الکلهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد (هر کدام ۵ دقیقه)
- (۱۰) شفاف سازی لامها در زایلن و مونت کردن
- (۱۱) مشاهده با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $1000\times$

اسپرم ها بر اساس رنگ پذیری ناحیه آکروزومی به دو دسته تقسیم می شوند:

- A. اسپرم های واکنش داده که ناحیه آکروزومی در آنها بدون رنگ است.
- B. اسپرم های واکنش نداده که ناحیه آکروزومی در آنها به رنگ قرمز روشن است.

