

Πρωτόκολλο Κυτταρομετρίας Ροής Σπέρματος

Μπαράκου Ε.

Μονάδα Μοριακής Βιολογίας, Αιματολογικό Εργαστήριο, ΠΓΝ Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Acridine Orange

Σε 200μL σπέρματος προσθέτουμε 500μL TNE και 400μL λυτικού διαλύματος. Μετα από 30sec προσθέτουμε 1 mL Staining solution και 10μL Acridine Orange λίγο πριν την ανάλυση στον κυτταρομετρητή.

Propidium Iodine

Σε 200μL σπέρματος προσθέτουμε 500μL Buffer solution. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 10 min. Μετα την αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθέτουμε 100 μL Solution A. Ακολουθεί επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 100 μL Solution B. Ακολουθεί επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος προσθέτουμε 100μL Propidium Iodine και ακολουθεί ανάλυση στον κυτταρομετρητή.

TNE (for 1L)

8.7gr of 0.15M NaCl

1.576gr of 0.01M Tris HCl

0.372gr of 1mM EDTA pH 7.4 store at 4°C

Lysis Buffer (for 1L)

6.86 mL of 0.08N HCl

8.76gr of 0.15M NaCl

1 mL of 0.1% Triton-X pH 1.2 store at 4°C

Staining Solution (for 1L)

7.77gr of 0.037M Citrid Acid

17.89gr of 0.126M Na₂HPO₄

0.41gr of 0.0011M EDTA

8.7gr of 0.15M NaCl pH 6 store at 4°C