بسم الله الرحمن الرحیم

رنگ آمیزی اقتراقی جنین با رنگ

PI/Hoechst

تهیه و تنظیم: فاطمه انباری

آزمایشگاه تحقیقاتی ART

تابستان ۹۳

رنگ آمیزی افتراقی PI/Hoechst جهت شمارش سلول های ICM و تروفوکتودرم

مقدمه

اولین هدف در برنامه IVF این است که بلاستوسیست هایی با حداقل آنرمالی تولید شوند و جنین هایی به مادر ترنسفر شوند که در نهایت منجر به حاملگی گردد. بنابراین شناسایی بهترین وسایل و روش های جهت بهبود نتایج ART الزامی می باشد تا بدین وسیله تعداد جنین هایی را که جهت ترنسفر مناسب می باشند افزایش داده شوند. یک ارزیابی مناسب از کیفیت بلاستوسیست ها یک چالش مهم برای محققانی که می خواهند بهترین بلاستوسیست ها را جهت ترنسفر انتخاب کنند باقی مانده است. یکی از روش های مناسب جهت بررسی کیفیت جنین شمارش افتراقی ICM و تروفوکتودرم می باشد. رنگ آمیزی PI/Hoechst می تواند نتایج مناسبی به ما عرضه نماید.

مواد:

۱) تریتون X-100 (به غلظت ۰/۱ ٪ تهیه شود)

۲) پودر هوخست ۳۳۲۵۸ (۵ میکروگرم در ۱ میلی لیتر PBS)

۳) پودر PI (۲۵ میکروگرم در ۱ میلی لیتر PBS)

۴) لام و لامل

۵) گلیسرول

۶) میکروسکوپ فلورسنت

روش کار:

۱) ۵-۴ بلاستوسیت را در ۵۰۰ میکرولیتر از محلول هوخست به مدت ۴۰ دقیقه قرار دهید.

۲) بعد از انکوبه شدن در هوخست جنین ها را در PBS دو مرتبه شستشو دهید.

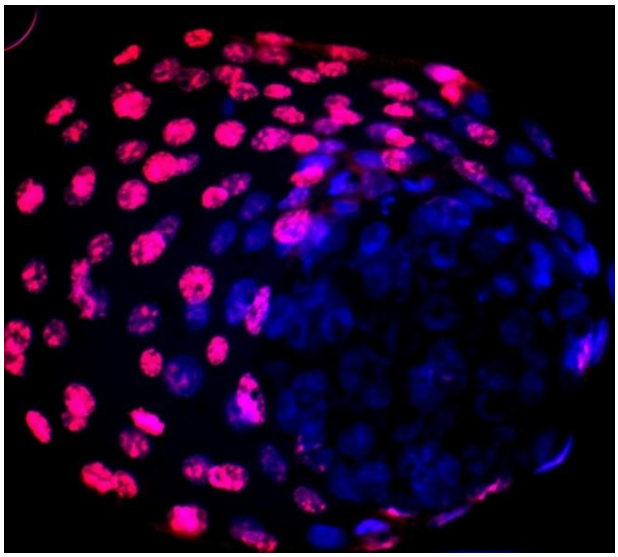
۳) سپس جنین ها را به ۵۰۰ میکرولیتر محلول تریتون در دمای اتاق به مدت ۱ دقیقه انتقال دهید.

۴) دو مرتبه با PBS شستشو دهید.

۵) جنین ها در محیط PI به مدت ۴۰-۳۵ ثانیه قرار دهید و سپس در PBS شستشو دهید.

۶) جنین ها در گلیسرول قرار داده شوند و توسط لامل مونت شوند.

۷) لام را با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده کنید.



شکل ۴-۱: رنگ آمیزی دوگانه PI/Hoechst. سلول های ICM به رنگ آبی و تروفوکتودرم به رنگ قرمز دیده می شوند.

رفرنس:

1.Selokar, N.L., Saha, A.P., Saini, M, *et al*. A protocol for differential staining of inner cell mass and trophectoderm of embryos for evaluation of health status. Scientific Correspondence. 2012;102: 1256-7