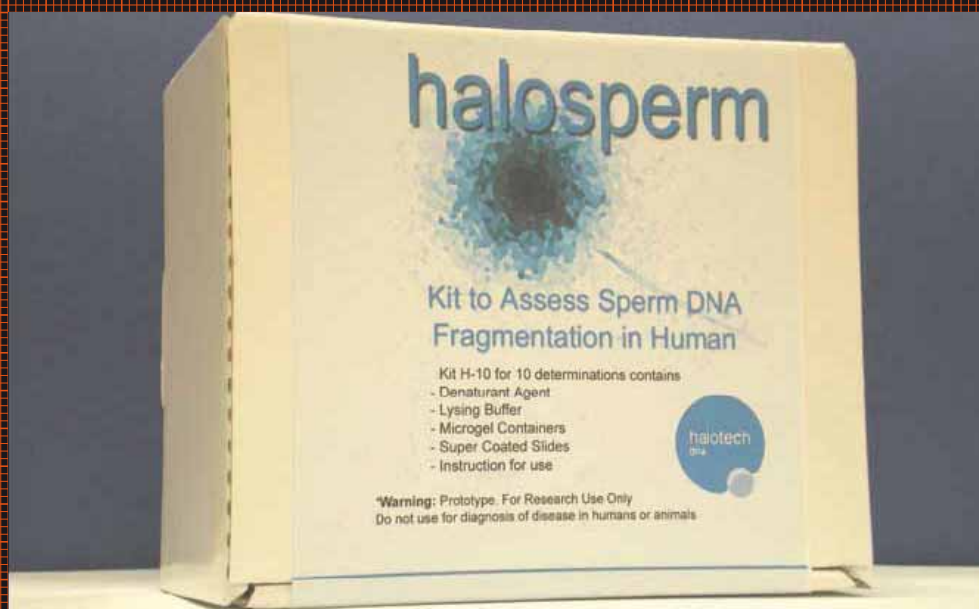


HALOSPERM®

TEST DE QUANTIFICATION DE LA FRÉQUENCE
DE SPERMATOZOÏDES HUMAINS AVEC UN ADN FRAGMENTÉ



COMPOSITION//////////

10 lames prétraitées /
10 tubes Eppendorf contenant de l'agarose
à bas point de fusion /
1 tube 1 ml contenant une solution
dénaturante (AD) /
1 flacon 125 ml contenant une solution
de lyse /

HALOSPERM DISTINGUE L'ADN FRAGMENTÉ DU NON FRAGMENTÉ DANS LES SPERMATOZOÏDES HUMAINS.

IL PERMET DE CALCULER LE DFI (INDICE DE FRAGMENTATION DE L'ADN : LE POURCENTAGE DE SPERMATOZOÏDES AVEC ADN FRAGMENTÉ).

TEST EN TROIS ÉTAPES

1. Inclusion des spermatozoïdes dans un microgel sur des lames en verre prétraitées fournies dans le kit. Les spermatozoïdes non fixés et intacts (frais, congelés/décongelés, dilués ou purs) sont immergés dans un microgel d'agarose inerte, sur la lame prétraitée.
2. Traitement de la lame: les lames sont facilement traitées avec les solutions incluses dans le kit.
3. Coloration de la lame: les lames traitées sont directement colorées à l'aide de fluorochromes spécifiques pour la visualisation de l'ADN sous microscope droit à fond clair (gauche: Wrigth) ou avec fluorescence (type DAPI).

CONSERVATION

1 an à température ambiante.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Cette méthode est basée sur le test de dispersion de la chromatine spermatique (SCD: Sperm Chromatin Dispersion; Fernández et al., J. Androl 24: 59 – 66, 2003; Fertile Steril 84: 833-842, 2005). Des spermatozoïdes intacts non fixés (frais, congelés/décongelés, dilués ou non) sont immergés dans un microgel agarose inerte sur une lame prétraitée. Un traitement initial à l'acide dénature l'ADN de ces spermatozoïdes à l'ADN fragmenté. La solution de lyse supprime ensuite la plupart des protéines nucléaires et, en l'absence de rupture massive d'ADN, produit des nucléotides avec de grands halos de boucles d'ADN, émergeant d'un noyau central. En revanche, les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté ne développent pas un halo de dispersion ou bien celui-ci est minime.



JCD
LABORATOIRES

4 BIS QUAI JEAN-JACQUES ROUSSEAU
69350 LA MULATIERE
TÉL. 04 72 98 04 84 / FAX 04 72 98 31 48



MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT REQUIS

Microscope droit à fond clair ou à fluorescence. Réfrigérateur -4°C. Bain-marie à 90 – 100°C et 37°C. Gants. Lamelles en verre (18 x 18 mm ou 22 x 22 mm) pour recouvrir les lames. Micropipettes. Boîtes d'incubation horizontales. Eau distillée. Éthanol 70 %, 90 %, 100 %.

Solutions nécessaires pour microscope à fond clair :

- Solution de Wright (Merck 1.01383.0500)
- Tampon phosphate pH 6.88 (Merck 1.07294.1000)
- Milieu de montage : Eukitt® (Panreac 253681)

Solution nécessaire pour microscope à fluorescence :

- DAPI, Iodure de Propidium, Hoeschst 33258

MODE D'UTILISATION

1. Mettre la solution de lyse à température ambiante
2. Diluer ou concentrer l'échantillon de sperme (frais, après migration ou décongélation) dans un milieu de culture ou le PBS pour obtenir une concentration moyenne de 5 à 10 millions/ml.
3. Fluidifier l'agarose en plongeant le tube eppendorf pendant environ 5 minutes dans l'eau à 90° -100°C.
4. Passer le tube eppendorf à une étuve sèche ou bain-marie à 37 °C pendant 5 minutes pour équilibrer la température.
5. Ajouter 60 µl de sperme au tube d'agarose et mélanger.
6. Placer la lame prétraitée sur une surface froide (plaque métallique, verre ou plastique rigide) à 4 °C pendant 5 minutes.
7. Une fois la lame refroidie, déposer une goutte (20 µl) de la suspension cellulaire sur le côté traité de la lame et poser une lamelle par-dessus. On utilisera une lamelle de 22x22 de préférence. Tout au long de ce processus, la lame doit rester à l'horizontale.
8. La lame froide avec la suspension doit être à nouveau placée dans le réfrigérateur pendant 5 minutes, temps nécessaire à la gélification de l'échantillon.
9. Pendant ce temps, préparer la solution dénaturante. Pour cela, ajouter 80 µl du contenu du tube AD dans 10 ml d'eau distillée, mélanger et placer dans la boîte d'incubation.
10. Retirer la lamelle avec précaution en la faisant glisser de manière verticale. Plonger immédiatement la lame à l'horizontale dans la solution dénaturante et laisser incuber pendant 7 minutes à température ambiante.
11. Soulever la lame avec précaution (à l'aide d'une pipette pasteur ou pince et muni de gants) et la déposer dans l'autre boîte d'incubation contenant 10 ml de la solution de lyse à température ambiante. Laisser incuber pendant 25 minutes.
12. Rincer en plongeant la lame dans une boîte contenant de l'eau distillée en abondance. Laisser reposer la lame pendant 5 minutes à température ambiante.
13. Faire trois bains successifs (2 minutes chacun) de 70 % d'éthanol, 90 % d'éthanol et 100 % d'éthanol (toujours à l'horizontal).
14. Laisser sécher à l'air. Une fois la lame sèche, vous pouvez la conserver dans des boîtes en carton pour histologie (plusieurs mois) ou effectuer la coloration avant lecture.

NB : Si possible, l'échantillon à étudier doit être traité avec un échantillon contrôle connu en tant que témoin.