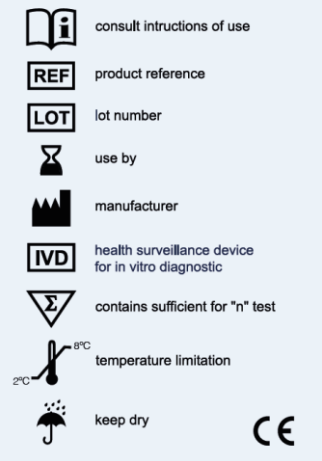




halosperm® G2

Kit **REF** HT - HSG2
for 10 determinations

Version 08.1 / 2018



Halosperm® G2 a été développé par Halotech DNA en réponse aux besoins des utilisateurs du test SCD. (Test de Dispersion de la Chromatine de Sperme) pour évaluer la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez l'homme.

Principe de la méthode

Les spermatozoïdes intacts non fixés (frais, congelés / non dilués, échantillons dilués) sont immergés dans un microgel d'agarose inerte, sur une lame prétraitée. Un traitement acide initial dénature l'ADN dans ces spermatozoïdes avec de l'ADN fragmenté.

Suite à cela, la solution de lyse enlève la plupart des protéines nucléaires. Lorsqu'il n'y a pas de rupture massive d'ADN, les nucléoïdes spermatiques avec de l'ADN fragmenté ne montrent pas de halo de dispersion (ou le halo est minime).

Description des réactifs du kit

Chaque kit contient le nécessaire pour effectuer 10 tests. Les composants sont :

- Agarose Cel Support (ACS) ;
- Lames Super-Coated (SCS) ; 10 unités
- Tubes Eppendorf (ETP) ; 10 unités
- Solution 1 (DA) Agent Dénaturant, une bouteille de 10 ml
- Solution 2 (LS) Solution de lyse, une bouteille de 10 ml
- Solution 3 (SSA) Solution de coloration à l'éosine A, une bouteille de 10 ml
- Solution 4 (SSB) Solution de coloration à la thiazine B, une bouteille de 10 ml
- Flotteur

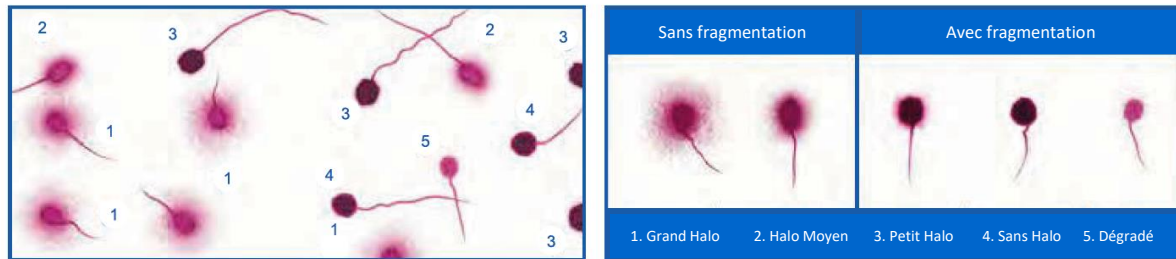
Matériel et équipement requis, non fournis avec le kit

Veiller à ce que tous ces équipements soient étalonnés.

- Microscope à champ clair ou à fluorescence
- Réfrigérateur à 4° C
- Bain(s) marie à 37° C et 95-100° C
- Gants en plastique
- Lamelles en verre (24 x 24 mm)
- Micropipettes
- Boîtes de Pétri
- Pipettes jetables
- Eau distillée
- Ethanol à 70% et 100%
- Micro-ondes
- Hotte

Échantillon de sperme

Les échantillons de sperme frais doivent être prélevés dans un récipient stérile. Le test de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes doit être effectué immédiatement après l'obtention ou la décongélation de l'échantillon de sperme après cryoconservation.



Classification du sperme

Comptez un minimum de 300 spermatozoïdes par échantillon selon ce critère :

- **Spermatozoïdes sans fragmentation de l'ADN :**
 - Spermatozoïdes à grand halo : ceux dont la largeur du halo est similaire ou supérieure au diamètre du noyau (figure 1).
 - Spermatozoïdes avec halo de taille moyenne : leur taille est comprise entre ceux à halo de grande taille et ceux à halo de très petite taille (figure 2).
- **« Autres » :** nucléides cellulaires qui ne correspondent pas aux spermatozoïdes L'une des caractéristiques morphologiques qui les distinguent est l'absence de queue : ces cellules ne doivent pas être incluses dans l'estimation de la fréquence des spermatozoïdes dont l'ADN est fragmenté.
- **Spermatozoïdes avec l'ADN fragmenté :**
 - Spermatozoïdes avec un petit halo : la largeur du halo est similaire ou inférieure à $\frac{1}{3}$ du diamètre du noyau (figure 3).
 - Spermatozoïdes sans halo : (Fig. 4).
 - Spermatozoïdes sans halo et dégradés : ceux qui ne montrent pas de halo et qui présentent un noyau irrégulièrement ou faiblement coloré (figure 5).

Contrôles positifs et négatifs

Contrôle positif : tous les spermatozoïdes présentent un halo. Suivez les instructions d'utilisation en sautant l'étape 7.

Contrôle négatif : tous les spermatozoïdes sont sans halo. Suivez les instructions d'utilisation en sautant l'étape 8.

Sécurité et environnement

- Des précautions doivent être prises pour éviter tout contact avec la peau ou les yeux et éviter l'inhalation. La solution d'acide (DA) contient de l'acide chlorhydrique et la solution de lyse (LS) contient du dithiothréitol et du Triton X-100. Travailler dans un environnement d'extraction d'air et suivre les consignes de sécurité du fabricant concernant la manipulation en toute sécurité.
- Ne pas libérer les produits utilisés dans l'environnement. Veuillez suivre les règles de sécurité spécifiques de votre laboratoire en ce qui concerne le stockage des produits chimiques et l'élimination des produits toxiques, ainsi que l'exposition à ceux-ci.

Précautions

- Tous les échantillons de patients et les réactifs doivent être traités comme potentiellement infectieux. L'utilisateur doit porter des gants de protection, des lunettes de protection et une blouse de laboratoire lors de l'exécution du test.
- Le test doit être jeté dans un récipient de danger biologique approprié après le test.
- Ne pas manger, boire ou fumer dans la zone où sont manipulés les échantillons et les réactifs du kit.
- Ne pas utiliser au-delà de la date d'expiration, qui apparaît sur l'étiquette de l'emballage.
- L'utilisation de gants et d'un masque facial est recommandée.
- La fiche de données de sécurité est disponible sur demande.

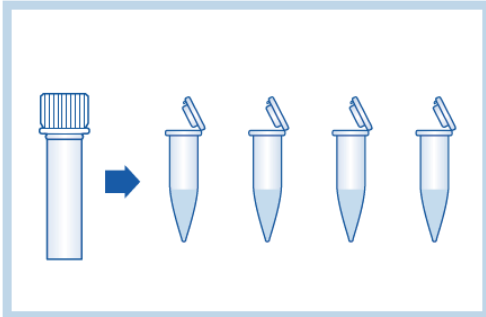
Condition de conservation

Après avoir reçu le kit, le stocker entre 2° et 8°C.

Le kit reste stable pendant 9 mois après ouverture.

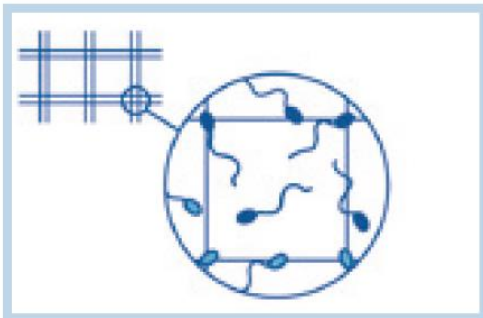
Instructions d'utilisation

1



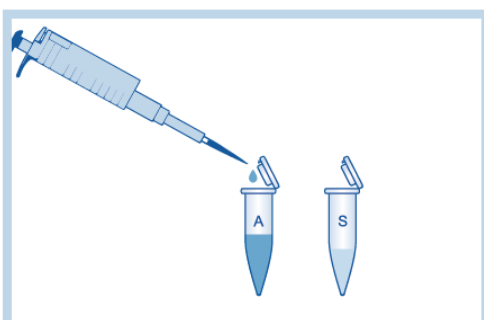
1. Placer le tube à agarose « Agarose Cel Support » (ACS) dans le flotteur et faire fondre en utilisant un bain marie (ou un b cher avec de l'eau sur une plaque chaude)   95-100 C pendant 5 minutes (ou jusqu'à ce qu'il soit compl ttement fondu). Il est également possible de faire fondre l'agarose en utilisant un four à micro-ondes. Remplir 100 ml d'eau dans un b cher. Ensuite, placer l'ACS légèrement ouvert avec le flotteur à l'intérieur du b cher et le chauffer à puissance maximale pendant 1,5 minute. Surveiller constamment et arrêter le processus dès que l'eau commence à bouillir. S'il vous plaît ne gardez pas l'ACS bouillant dans le micro-ondes ! Faire 10 aliquots de 100  L d'agarose fondu à l'aide des tubes Eppendorf (ET). Placer Immédiatement les aliquots Eppendorf   37 C pendant 5 minutes (pour éviter la gélification).
2. Les tubes Eppendorf restants qui ne seront pas utilisés à ce moment seront stockés dans le réfrigérateur avec le kit.
3. Faire revenir les solutions 1 et 2 à température ambiante (22 C) pendant tout le processus.
4. Préparer et sélectionner les lames Super-Coated (SCS) qui vont être utilisées.

2



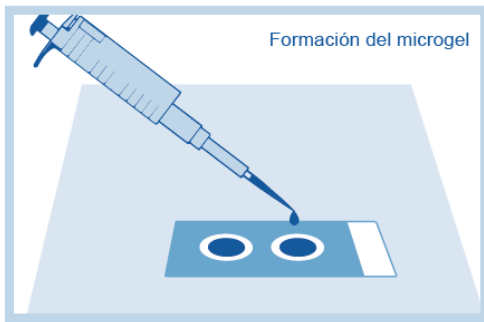
Diluer l'échantillon de sperme dans un milieu de lavage approprié (ou du PBS)   un maximum de 20 millions de spermatozo ides par millilitre.

3



Immédiatement après, transférer 50  l de l'échantillon de sperme dans un aliquot (tube Eppendorf) et mélanger doucement avec une micropipette. La formation de bulles doit être évitée.

4



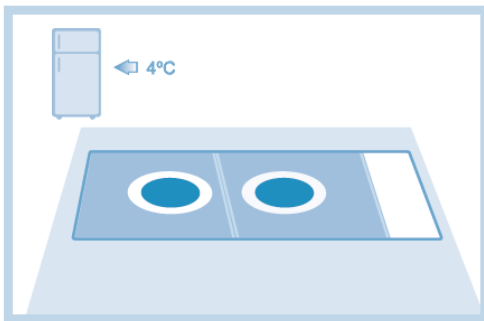
Placer ensuite une goutte de 8 μ L de suspension cellulaire sur le centre du puit « échantillon » ("S"). Couvrir avec une lamelle.

Appuyer doucement, en évitant la formation de bulles d'air.

Les lames doivent être maintenues **en position horizontale** tout au long du processus.

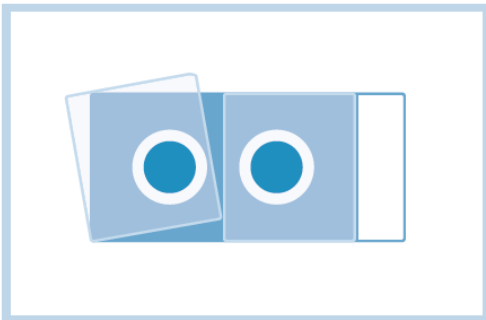
Utiliser le puit "C" pour traiter un échantillon témoin.

5



Placer la lame sur une surface froide (par exemple, une plaque de métal ou de verre pré-refroidie à 4°C) et transférer dans le réfrigérateur à 4°C, pendant 5 minutes pour solidifier l'agarose

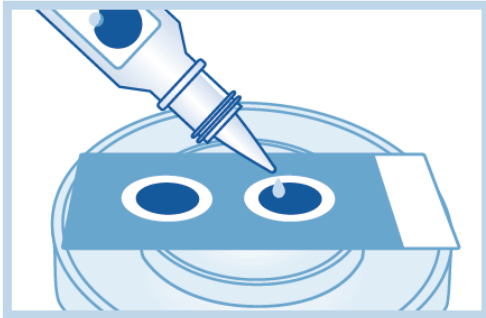
6



Sortir la lame du réfrigérateur et retirer la lamelle **en la faisant glisser doucement**.

Tout le processus doit se faire à température ambiante (22 °C).

7



Placer la lame horizontalement dans une position élevée (sur une boîte de Pétri par exemple, comme sur la figure ci-contre).

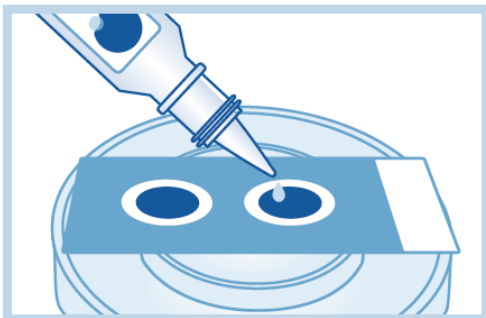
Appliquer la Solution 1 (DA) sur les **puits en s'assurant qu'ils sont entièrement recouverts par le réactif pendant tout le processus.**

Incuber pendant 7 minutes.

Ensuite, retirer le réactif en inclinant la lame jusqu'à la fin du séchage, puis replacer la lame horizontalement dans une position élevée comme précédemment.

Il est très important d'éliminer les réactifs sans secouer les lames. L'élimination du réactif se fera en l'inclinant et en le laissant glisser.

8



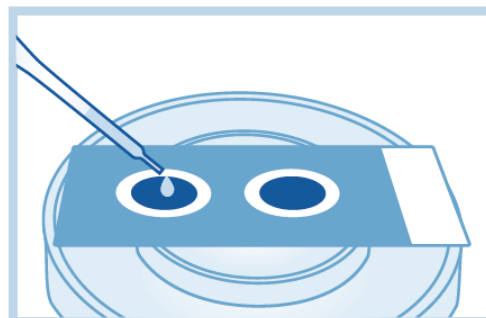
Appliquer la Solution 2 (LS) sur les puits en s'assurant qu'ils sont complètement immergés.

Incuber pendant 20 minutes.

Retirer ensuite le réactif en l'inclinant la lame jusqu'à la fin du séchage, puis replacer la lame horizontalement dans une position élevée comme précédemment.

Il est très important d'éliminer les réactifs sans secouer les lames. L'élimination du réactif se fera en l'inclinant et en le laissant glisser.

9



Laver la lame pendant 5 min en la recouvrant abondamment avec de l'eau distillée (en utilisant une pipette jetable)

Retirer ensuite le réactif en inclinant la lame jusqu'à la fin du séchage, puis replacer la lame horizontalement dans une position élevée comme précédemment.

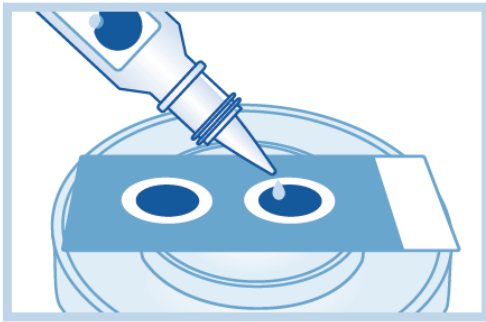
Déshydrater en inondant avec de l'éthanol à 70%, en utilisant une pipette jetable et laisser incuber pendant 2 minutes.

Égoutter puis appliquer l'éthanol à 100%. Laisser incuber pendant 2 minutes.

Égoutter puis laisser sécher horizontalement sur du papier filtre ou similaire.

Après séchage, les lames traitées peuvent être conservées dans des boîtes à diapositives à température ambiante dans un endroit sec et sombre pendant plusieurs mois.

10



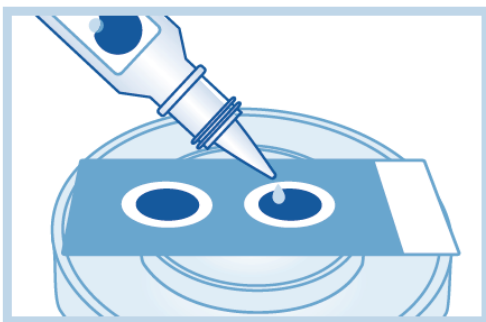
Placer la lame horizontalement dans une position élevée (sur une boîte de Pétri par exemple, comme sur la figure ci-contre).

Appliquer la Solution 3 (SSA) sur les puits en s'assurant qu'ils sont complètement immergés.

Incuber pendant 7 minutes.

Retirer ensuite le réactif en inclinant la lame jusqu'à la fin du séchage, puis replacer la lame horizontalement dans une position élevée comme précédemment.

11



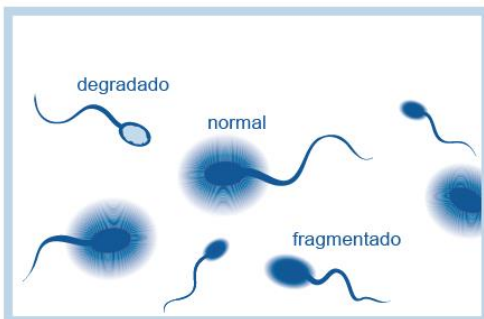
Appliquer la solution 4 (SSB) sur les puits en s'assurant qu'ils sont complètement immergés.

Incuber pendant 7 minutes.

Retirer ensuite le réactif en inclinant la lame.

Enlever l'excès de colorant et laisser sécher à température ambiante.

12



Observer sous microscopie à champs clair.

Si la coloration est trop intense, la lame peut être lavée à l'eau du robinet.

Si la coloration est trop faible, immerger la lame dans de l'éthanol à 100%, laisser sécher et répéter l'étape 10.

Pour la coloration par microscopie de fluorescence, merci de contacter le revendeur agréé.

13

$$\text{SDF (\%)} = \frac{\text{Fragmentado + degradado}}{\text{Total de células cuantificadas}} \times 100$$

Calculer le pourcentage de spermatozoïdes avec de l'ADN fragmenté.

Les résultats doivent être évalués en tenant compte de tous les résultats cliniques et de laboratoire liés à l'échantillon de sperme.

Des seuils pour la fréquence de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (SDF) ont été suggérés par Dr.Evenson et al. (Evenson et Nixon, Reprod Biomed Online 12: 466-472, 2006).

Pour les tests futurs

Placer autant de tubes Eppendorf que d'échantillons de sperme à évaluer et commencer le protocole au point 1.2.

C/ Faraday, 7 Parque Científico de Madrid / Edificio CLAID / Campus de Cantoblanco / 28049 Madrid

Tel : +34 91 279 69 50 - www.halotechdna.com - info@halotechdna.com