

halosperm® G2

Cod. 50.HT-HSG2 - 10 det.

Versione 05/2016 03

Applicazione

Halosperm G2® è stato sviluppato da Halotech DNA in risposta alle esigenze degli utenti del test SCD (Sperm Chromatin Dispersion test) per la valutazione della frammentazione del DNA spermatico umano.

Principio del metodo

Gli spermatozoi non contaminati intatti (campioni diluiti freschi, congelati / non schiariti) vengono immersi in un microgel di agarosio inerte su di un vetrino pretrattato. Un trattamento acido iniziale denota il DNA in quelle cellule spermatiche con DNA frammentato. Dopo di ciò, la soluzione di lisi rimuove la maggior parte delle proteine nucleari. In assenza di rotture massicce nel DNA, i nucleoidi di spermatozoi con DNA frammentato non mostrano aloni o mostrano aloni minimi.

Descrizione del kit di reagenti

- Ogni kit è sufficiente per effettuare 10 determinazioni:
- Agarose Cel Support (ACS); 1 provetta con tappo a vite
- Vetrini pre-trattati (SCS); 10 unità
- Provette Eppendorf (ETP); 10 unità
- Soluzione 1 (DA) Denaturant Agent, una bottiglia a goccia da 10 ml
- soluzione soluzione Lysis Solution 2 (LS), una bottiglia a goccia da 10 ml
- Soluzione 3 (SSA) Soluzione colorante A Eosina, una bottiglia a goccia da 10 ml
- Soluzione 4 (SSB) tiazina soluzione colorante B Tiazina, una bottiglia a goccia da 10 ml
- Galleggianti.

Materiali e strumentazioni richieste non fornite con il kit

Microscopio a campo luminoso o fluorescenza, frigorifero a 4°C, bagno maria a 37°C e 95-100°C, guanti in plastica, vetrini (24 x 24 mm), micropipette, piastre Petri o simili, pipette usa e getta, acqua distillata, etanolo al 70% e al 100%. Forno a microonde e cappa aspirante.

Campione

Campioni di liquido seminale devono essere raccolti in un recipiente sterile, Il test di frammentazione del DNA spermatico dovrebbe essere eseguita immediatamente una volta che il campione è stato ottenuto, oppure non appena scongelato in caso di campione crioconservato crioconservazione.

Classificazione degli spermatozoi.

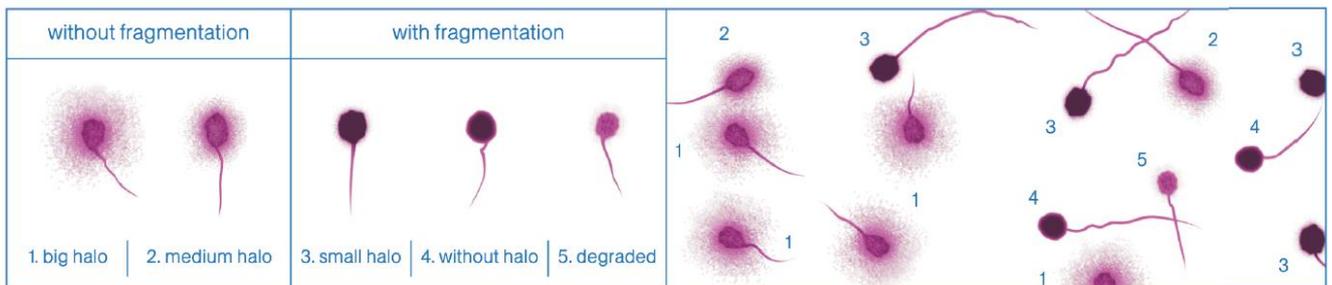
Conti almeno 300 spermatozoi per campione in base a questi criteri:

Spermatozoi senza frammentazione del DNA:

- 🌐 **Spermatozoi con grande alone:** quelli la cui larghezza dell'alone è simile o superiore al diametro minore del nucleo. (Figure 1).
- 🌐 **Spermatozoi con alone di media grandezza:** quelli la cui dimensione dell'alone è fra quelle con aloni molto grandi e molto piccole (Figure 2).

Spermatozoi con DNA frammentato:

- 🌐 **Spermatozoi con alone piccolo:** la larghezza dell'alone è simile o inferiore a 1/3 del diametro minore del nucleo (Figure 3).
- 🌐 **Spermatozoi senza alone:** (Figure 4).
- 🌐 **Spermatozoi senza alone e degradati:** Quelli che non mostrano alcun alone e presentano un nucleo irregolarmente o debolmente macchiato (Figure 5).



Controlli Positivi e Negativi

Controlli positivi: tutte le cellule spermatiche sono mostrate con alone. Seguire l'istruzione per l'uso, saltando il passo 7.

Controlli Negativi: tutte le cellule spermatiche vengono mostrate senza alone. Seguire le istruzioni per l'uso, saltando il passo 8.

Sicurezza e ambiente

- 🌐 Prestare attenzione ad evitare il contatto con la pelle o con gli occhi e per prevenire l'inalazione. La soluzione acida (DA) contiene acido cloridrico e la soluzione di lisi (LS) contiene Dithiothreitol e Triton X. Lavorare in ambiente con rimozione dell'aria e seguire le istruzioni indicate dal produttore nella scheda di sicurezza per quanto riguarda la manipolazione sicura.
- 🌐 Non rilasciare i prodotti utilizzati nell'ambiente. Seguire le specifiche norme di sicurezza del vostro laboratorio per quanto riguarda lo smaltimento dei prodotti chimici e lo smaltimento dei prodotti tossici nonché l'esposizione a questi.

Precauzioni

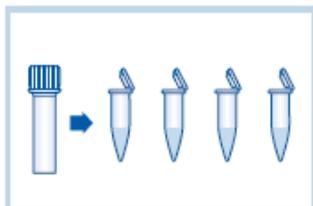
Solo per uso professionale.

- 1) Tutti i campioni dei pazienti ed i reagenti devono essere trattati come potenzialmente infettivi e l'utente deve indossare guanti protettivi, protezione degli occhi e giacche di laboratorio durante l'esecuzione del test.
- 2) Il test dovrebbe essere smaltito in un contenitore biologico adeguato dopo il test.
- 3) Non mangiare, bere o fumare nell'area dove sono maneggiati campioni e reagenti.
- 4) Non utilizzare dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.
- 5) Si raccomanda l'utilizzo di guanti e maschera protettiva.
- 6) La scheda di sicurezza relativa è disponibile su richiesta.

Condizioni di conservazione

Una volta ricevuto il kit, conservare a 2-8°C.

Istruzioni per l'uso.



1.1 Posizionare la provetta di agarosio (ACS) nel galleggiante in un bagno d'acqua (o un bicchiere con acqua su una piastra calda) a 95-100°C per 5 minuti fino al completo scioglimento del contenuto. Altrimenti, se preferite fondere l'agarosio usando un forno a microonde, riempite un bicchiere con 100 ml di acqua. Quindi posizionare ACS leggermente aperto con il galleggiante all'interno del bicchiere e scaldare alla

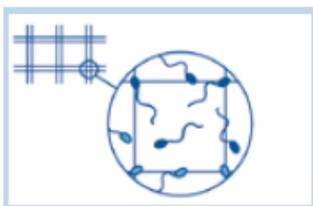
massima potenza per 15 minuti. Guardare costantemente e interrompere il processo non appena l'acqua inizia a bollire. Non mantenere l'ACS in ebollizione all'interno del forno a microonde!

Aliquotare 10 provette Eppendorf (ET) con 100 microlitri di agarosio sciolto. Subito dopo, mantenere il le provette Eppendorf da utilizzare a 37°C per 5 minuti per evitare la gelificazione.

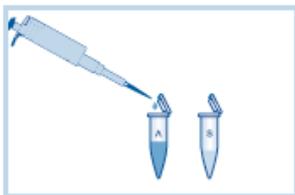
1.2 Le rimanenti provette Eppendorf che non utilizzate in quel momento possono essere conservate nel frigorifero insieme al kit.

1.3 Impostare le soluzioni 1 e 2 a temperatura ambiente (22 ° C) durante l'intero processo.

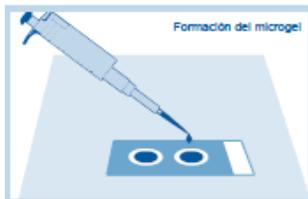
1.4 Preparare e selezionare i vetrini pre-trattati (SCS) da utilizzare.



2.1 Diluire il campione di liquido seminale ad una appropriate estensione umana o in PBS fino ad un massimo di 20 Milioni di spermatozoi per ml.



3.1 Immediatamente dopo, trasferire 50 ml del campione in un tubo Eppendorf e mescolare delicatamente con una micropipetta. Evitare formazione di bolle..



4.1 Posizionare una goccia di 8 μ l della sospensione cellulare al centro del pozzetto del campione ("S"). Coprire con un copri-vestrino. Premere delicatamente, evitando la formazione di bolle d'aria. I vetrini devono essere tenuti in posizione orizzontale per tutto il processo. Utilizzare il pozzo "C" per elaborare un eventuale controllo campione.



5.1 Posizionare il vetrino su una superficie fredda (ad esempio una lastra di metallo o vetro pre-raffreddato a 4 ° C) e trasferire nel frigorifero a 4 ° C per 5 minuti per solidificare l'agarosio.



6.1 Togliere il vetrino dal frigorifero e togliere il copri-vestrino facendolo scivolare delicatamente. Tutta la lavorazione deve essere eseguita a temperatura ambiente (22°C).



7.1 Posizionare il vetrino orizzontalmente in una posizione elevata come indicato nella figura in una piastra Petri o similare. Applicare Soluzione 1 (DA) sul pozzetto, assicurandosi che sia **completamente coperto dal reattivo durante l'intero processo**. Incubare per 7 minuti. Quindi, rimuovere il reattivo inclinando il vetrino fino alla completa essiccazione e posizionare il vetrino orizzontalmente in una posizione elevata come suggerito nella figura. **È molto importante rimuovere il reattivo senza scuotere. Effettuare la rimozione Inclinando e lasciandolo scivolare.**



8.1 Applicare Soluzione 2 (LS) sul pozzetto assicurandosi che sia completamente immerso. Incubare per 20 minuti. Quindi, rimuovere il reattivo inclinando fino a completare l'asciugatura e posizionare il vetrino orizzontalmente In posizione elevata come suggerito nella figura. E 'molto importante rimuovere il reattivo senza scuotere. **Effettuare la rimozione inclinando e lasciandolo scivolare.**



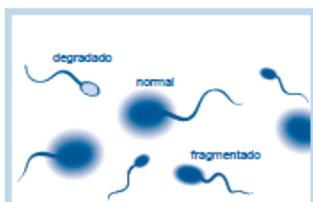
9.1 Sciacquare il vetrino per 5 minuti con abbondante acqua distillata e utilizzando una pipetta usa e getta. Quindi, rimuovere il reattivo inclinando fino a completare l'asciugatura e posizionare il vetrino orizzontalmente. In posizione elevata come suggerito nella figura. Deidratare con etanolo 70% utilizzando una pipetta monouso ed incubare per 2 minuti. Scaricare e

applicare l'etanolo al 100% per 2 minuti. Scaricare e lasciare asciugare orizzontalmente su carta filtrante o simili. Dopo essiccazione, i vetrini elaborati possono essere tenuti nelle scatole per vetrini a temperatura ambiente in un luogo asciutto ed al riparo dalla luce per diversi mesi.



10.1 Posizionare il vetrino orizzontalmente in una posizione elevata in una piastra Petri o similare. Applicare Soluzione 3 (SSA) sui pozzetti assicurandoti che questi siano completamente immersi. Incubare per 7 minuti. Quindi rimuovere la macchia inclinando fino a completare l'asciugatura e posizionare orizzontalmente il vetrino in una posizione elevata.

11.1 Applicare la soluzione 4 (SSB) sui pozzetti, assicurandoti che questi siano completamente immersi. Incubare per 7 minuti. Quindi rimuovere la macchia inclinando. Rimuovere l'eccesso di macchia e lasciare asciugare temperatura ambiente.



12.1 Visualizzare sotto microscopia a campo luminoso. Se la colorazione è troppo intensa, la diapositiva potrebbe essere lavata in acqua di rubinetto. Se la colorazione è troppo debole, immergere la diapositiva in etanolo al 100%, lasciare asciugare e Ripetere il passaggio 10). Per la colorazione della microscopia a fluorescenza contattare il rivenditore autorizzato.

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

13.1 Calcolare la percentuale di spermatozoi con DNA frammentato. I risultati dovrebbero essere valutati tenendo conto di tutti i risultati clinici e di laboratorio relativi al campione spermatico. Le soglie per la frequenza della frammentazione del DNA di liquido seminale (SDF) sono state suggerite dal Dott. Evenson et al. (Evenson e Nixon, Reprod Biomed Online 12: 466-472, 2006).

PER I TEST FUTURI

Prendere in considerazione tante provette eppendorf quanti i campioni da valutare ed avviare il protocollo al punto 1.2. In precedenza, mettere la provetta di agarosio (ACS) nel galleggiante e far sciogliere il contenuto usando un bagno d'acqua (o un bicchiere con acqua su una piastra calda) a 95-100 ° C per 5 minuti o fino a completo scioglimento del contenuto. Altrimenti, se si preferisce sciogliere l'agarosio usando un forno a microonde, riempire un bicchiere di 100 ml di acqua. Quindi, mettere l'ACS leggermente aperto con il galleggiante all'interno del bicchiere e riscaldarlo alla

massima potenza per 1,5 minuti. Osservare costantemente e fermare il processo non appena l'acqua inizia a bollire.

¡Non mantenere l'ACS in ebollizione all'interno del forno a microonde!

Halosperm G2® è un marchio di Halotech DNA, S.L.

Halotech DNA, S.L.

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

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

Prodotto distribuito in Italia da:

M.B.T. S.r.l.

Via Noalese, 69/31100 Treviso

Tel. +39 0422 210 568 / www.mbt-srl.com / info@mbt-srl.com

M.B.T. - Medical Biological Technologies S.r.l.

P. IVA e Cod. Fisc. 03785310966

Via Noalese 69 - 31100 Treviso (TV)

Tel +39 0422 210568 - Fax +39 0422 230916

e-mail: info@mbt-srl.com - PEC: mbtsrl@lamiapec.it

www.mbt-srl.com