

Protocole GoldCyto Sperm DNA kit

KIT POUR ANALYSER LA FRAGMENTATION DE L'ADN DU SPERME

Application :

Le kit GoldCyto Sperm de Goldcyto Biotech corp. est un test simple permettant l'analyse de la fragmentation de l'ADN pour le sperme humain.

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 d'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 spermatozoïdes avec de grands halos de boucles d'ADN, émergeant d'un noyau central. En revanche, les spermatozoïdes avec l'ADN fragmenté ne développent pas un halo de dispersion ou bien celui-ci est minime.

Composition :

20 lames prétraitées
20 tubes Eppendorf contenant de l'agarose à bas point de fusion
1 flacon 50 ml de PBS
1 flacon 100 ml contenant une solution dénaturante (DA)
1 flacon 100 ml contenant une solution de lyse (LYS)

1 flacon de colorant -TA.25 ml
1 flacon de colorant -TB.50 ml

Matériel et équipement requis :

Microscope droit à champ 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 (type Petri). Eau distillée.

Éthanol 70 %, 90 %, 100 %.

Microonde.

Solutions nécessaires pour microscope à champ clair :

- Coloration Wright (Merck 1.01383.0500)
- Phosphate buffer solution pH 6.88 [Merck 1.07294.1000]
- Colle de montage : Eukitt® (Panreac 253681)

Mode d'utilisation :

1. Mettre la solution de lyse à température ambiante (22°). Attention à bien remuer afin d'éviter la précipitation du réactif.
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. Veillez à ne pas utiliser un milieu trop dense.
3. Fluidifier l'agarose en plongeant le tube Eppendorf pendant environ 5 minutes dans l'eau à 90° -100°C. Le flotteur doit être utilisé. Alternativement, l'agarose peut être fluidifié en utilisant la microonde.

4. Passer le tube Eppendorf avec le flotteur à un bain-marie à 37 °C pendant 5 minutes pour équilibrer la température.
5. Placer le plateau métallique, en verre ou plastique rigide à 4 °C.
6. Ajouter 30 µl de sperme au tube d'agarose et mélanger. 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. Prenez soin d'éviter les bulles d'air. Si le liquide ne se propage pas jusqu'au bord de la lamelle, appuyez doucement avec la pointe de la micropipette.
7. Placer la lame dans le plateau métallique, en verre ou plastique rigide à 4 °C dans le réfrigérateur pendant 5 minutes, temps nécessaire à la gélification de l'échantillon.
8. Sortir la lame du frigo, retirer la lamelle avec précaution en la faisant glisser de manière horizontale.
9. Plonger immédiatement la lame à l'horizontale dans la solution dénaturante et laisser incuber pendant 7 minutes à température ambiante.
10. Soulever la lame avec précaution (à l'aide d'une pipette pasteur ou pinces métalliques et muni de gants) et la déposer dans la boîte d'incubation suivante contenant de la solution de lyse à température ambiante. Laisser incuber pendant 25 minutes.
11. Rincer en plongeant la lame de façon horizontale dans une boîte contenant de l'eau distillée en abondance pendant 5 minutes à température ambiante.
12. Faire trois bains successifs de façon horizontale (2 minutes chacun) de 70 % d'éthanol, 90 % d'éthanol et 100 % d'éthanol (toujours à l'horizontal).
13. Laisser sécher à l'air. Une fois la lame sèche, vous pouvez la conserver dans des boîtes pour histologie (plusieurs mois) ou effectuer la coloration avant lecture.

NB : Si possible, l'échantillon à étudier doit être traité avec un échantillon dont on connaît le niveau de fragmentation (Contrôle de qualité interne).

Coloration :

14. Placez la lame horizontalement à l'intérieur de la boîte type Pétri.
15. Appliquer la Solution A -TA (0.5-0.8 ml) sur la lame en vous assurant qu'il est complètement immergé, incuber pendant 1 minute, ne pas vider !
16. Appliquer la solution B -TB = (2 or 3) x TA sur la lame en vous assurant qu'il est pleinement immergé, incuber pendant 3-10 minutes.
17. Retirer la solution de coloration, laver rapidement et soigneusement dans l'eau (du robinet), laisser sécher à température ambiante verticalement.
18. Vérifier le niveau de coloration sous le microscope. Une forte coloration est préférable. Si le résultat de coloration est très faible, en particulier sur la région des halos de dispersion de la chromatine, la lame peut être re-colorée avec une solution type Wright. Si la coloration est trop forte, la lame peut être décolorée en lavant doucement dans l'eau du robinet, ou 10% d'éthanol si l'on préfère. Après séché à l'air, elle peut être teint à nouveau, mais il faudra réduire le temps de coloration. Une fois que le niveau de coloration souhaitée soit obtenu et la lame soit complètement sèche, monter avec la colle de montage Eukitt afin d'obtenir des lames permanentes (étape optionnelle).

Classification des spermés :

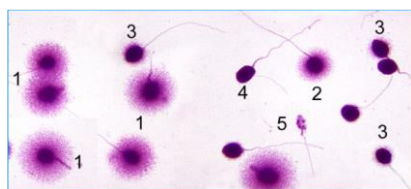
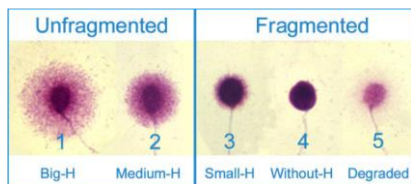
Analyser un minimum de 300 spermatozoïdes par échantillon en suivant les critères ci-dessous :

SPERMES SANS FRAGMENTATION D'ADN

- Spermatozoïdes à gros halo : ceux dont la largeur du halo est similaire ou supérieure au petit diamètre du noyau (Figure 1).
- Spermatozoïdes à halo de taille moyenne : leur taille d'halo se situe entre ceux à halo grand et très petit (Figure 2).

SPERMES À L'ADN FRAGMENTÉ

- Spermatozoïdes avec petit halo : la largeur du halo est similaire ou inférieure à 1/3 du petit diamètre du noyau (Figure 3).
 - Spermatozoïdes sans halo (Figure 4).
 - Spermatozoïdes sans halo et dégradés : ceux qui ne présentent pas d'halo et présentent un noyau irrégulièrement ou faiblement coloré (Figure 5).
- « Autres »: noyaux cellulaires qui ne correspondent pas aux spermatozoïdes. L'une des caractéristiques morphologiques qui les distinguent est l'absence de queue.



Interprétation des résultats :

Calculez le pourcentage de spermatozoïdes avec de l'ADN fragmenté. Les résultats doivent être évalués en tenant compte tous les résultats liés à l'échantillon de sperme. Les seuils de fréquence de fragmentation de l'ADN du sperme (SDF) ont été suggérés par Evenson et al. [J. Androl 23: 25-43,1999]

SDF	Evaluation
<15%	Basse
Entre 15 et 30%	Moyenne
>30%	Haute

Securité :

Attention ! Il est recommandé d'effectuer le traitement des lames sous une hotte ou une hotte à flux.

Évitez l'inhalation et le contact avec les solutions fournies. La solution acide contient de l'acide chlorhydrique et la solution de lyse du dithiothréitol et du Triton X-100. Consultez les spécifications fournies par les fabricants.

Ne relâchez pas les produits utilisés dans l'environnement. Suivez les directives du centre pour le stockage et l'élimination des substances toxiques. Les échantillons biologiques doivent être traités comme potentiellement infectieux.

Conservation et stabilité :

Il est recommandé de conserver la solution de lyse à 4 ° C et à l'abri de la lumière. Les produits du kit peuvent être conservés à température ambiante pendant plusieurs jours sans problème.

Expiration : les réactifs fournis sont stables pendant une période minimale de 12 mois. Il est recommandé de garder les solutions bien scellées et sans air autant que possible.