

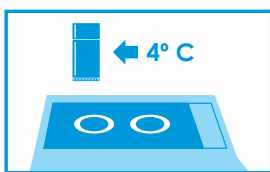
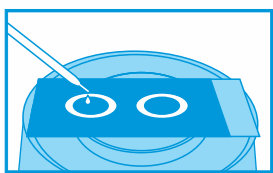


Sperm
DNA
KIT

Ensayo de la dispersión de la cromatina espermática y fragmentación de DNA espermático.

Para este protocolo diluir la muestra espermática a 8×10^6 / ml .

- 1) Atemperar la solución de lisis.
- 2) Colocar el tubo eppendorf que contiene agarosa en baño maría a punto de ebullición ($90-100^{\circ}\text{C}$) durante 5 minutos.
- 3) Una vez diluida la agarosa se le añade $40\mu\text{l}$ de la dilción previa espermática, homogenizar a la agarosa fundida y mezclar.
- 4) Colocar 2 gotas de $25\mu\text{l}$ de esta mezcla, sobre el porta objetos pretratado, es decir una gota en cada extremo del mismo y cubrir con un cubreobjetos de $22 \times 22\text{ mm}$, mantenerlo a 4°C hasta gelificar. (5 min) *(Vease figura anexa.)*

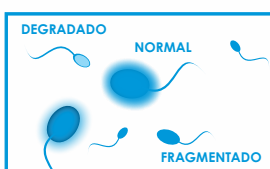


- 5) Cuidadosamente retirar el cubre objetos deslizándolo hacia las orillas.

Dejar la capa de agarosa intacta.



- 6) Preparar la solución desnaturalizante HCL al 37%, $80\mu\text{l}$ HCL (solución ácida + 10 ml de H_2O) y sumergir el portaobjetos en esta solución durante 7 minutos.
- 7) Retirar el portaobjetos de la solución desnaturalizante y cambiarlo a la solución de lisis, durante 5 minutos.
- 8) Retirar el portaobjetos de la solución de lisis y sumergir en H_2O durante 5 minutos.
- 9) Retirar el portaobjetos de la solución de H_2O y continuar las inmersiones a las soluciones de etanol durante 2 minutos respectivamente. Etanol al 70% por 2 minutos, etanol al 90% por 2 minutos y etanol al 100% durante 2 minutos.
- 10) Dejar secar.
- 11) Preparar la solución de wright.
- 12) Colocar 20 gotas del reactivo colorante wright sobre el cubreobjetos y dejarlo reposar 5 minutos, no debe derramarse por los bordes.
- 13) Posteriormente agregar sobre el portaobjetos 30 gotas de solución buffer wright, reposar durante 7 minutos hasta que aparezca una capa verdosa metálica brillante sobre la superficie de la mezcla.
- 14) Enjuagar el portaobjetos con agua destilada, durante 30 segundos y dejar secar.
- 15) Observar el microscopio de inmersión $100\times$



- 16) Contar menos de 500 células.
- 17) Evaluar el DFI (índice de fragmentación de DNA).

VALORES DE REFERENCIA DFI

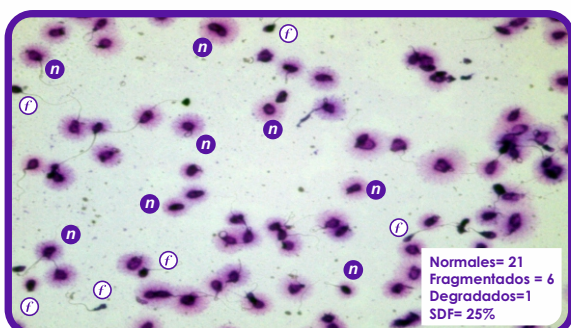
Deterioración $\leq 15\%$ = DNA espermático de buena calidad.

Deterioración $16-30\%$ = DNA espermático heterogéneo

Deterioración $\geq 31\%$ = AND espermático dañado

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

DFI (Índice de fragmentación)



(n) Espermatozoides normales

(f) Espermatozoides con AND fragmentado

$$\text{DFI (\%)} = \frac{6 + 1}{28} \times 100$$

$$\text{DFI (\%)} = 25\%$$