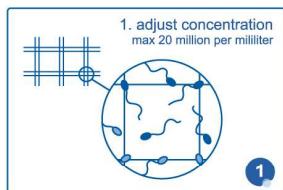
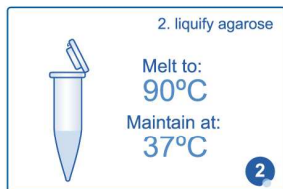


Návod k použití

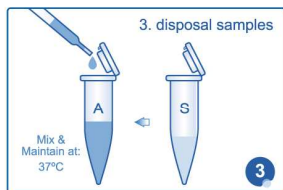
- Zahřejte zkumavku s agarózou v mikrovlnné troubě (2 min) nebo ve vodní lázni (95°C - 100°C po dobu 5 min). Rozpuštěnou agarózu rozdělte na 10 aliquotů po 100 µl do eppendorf zkumavek.
- Roztoky 1 a 2 musí být během zpracování vzorku udržovány při pokojové teplotě (22°C).



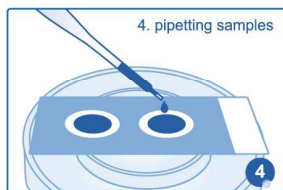
1. Naředte semeno na koncentraci maximálně 20 milionů/ml. Použijte kultivační médium, PBS nebo ředidlo na spermie, použitý roztok ale nesmí být příliš hustý.



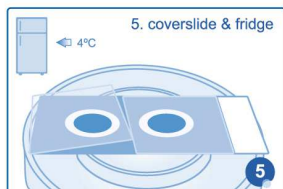
2. Zahřejte eppendorf zkumavku s agarózou v mikrovlnné troubě nebo ve vodní lázni (95 - 100°C po dobu 5 min), dokud není agaróza v celém objemu rozpuštěná. Umístěte zkumavku na 5 minut do vodní lázně teplé 37°C.



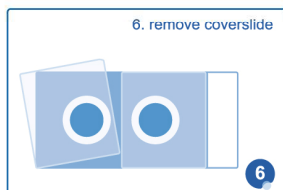
3. Přidejte 50 µl semene ke 100 µl agarózy a jemně promíchejte pipetou. Udržujte zkumavku při 37°C a rychle postupte k dalšímu kroku, aby agaróza neztuhla.



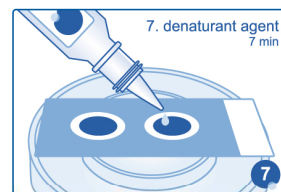
4. Kápněte 8 µl směsi do středu kruhu S na podložním skle a přikryjte krycím sklíčkem. Sklíčko opatrně stlačte, aby se nevytvořily bubliny. Sklo musí být po celou dobu udržováno v horizontální poloze. Firma Halotech doporučuje pravidelně kontrolovat funkčnost testu na referenčním vzorku (kruh C).



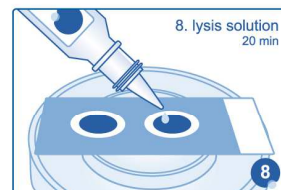
5. Položte sklíčko na chladný povrch (např. kovovou nebo skleněnou destičku předchladenou na 4°C) a dejte na 5 minut do lednice (4°C), aby agaróza ztuhla.



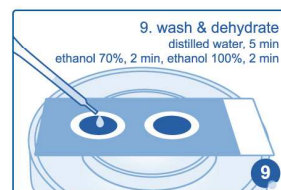
6. Vyndejte sklo z lednice a odstraňte krycí sklíčko jemným tahem do strany. Celý další postup je prováděn při pokojové teplotě (22°C).



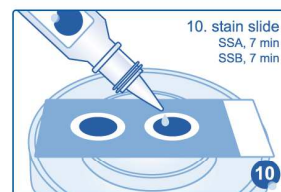
7. Položte sklíčko v horizontální poloze např. na petriho misku nebo jiné vyvýšené místo. Kápněte **Roztok 1** do kruhu na skle tak, aby byl vzorek celý roztokem zakrytý. Inkubujte 7 minut. Poté roztok slejte nakloněním skla a sklo vraťte zpět do vyvýšené horizontální polohy.



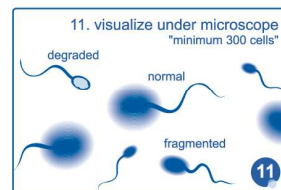
8. Kápněte **Roztok 2** do kruhu na skle tak, aby byl vzorek celý roztokem zakrytý. Inkubujte 20 minut. Poté roztok slejte nakloněním skla a sklo vraťte zpět do vyvýšené horizontální polohy.



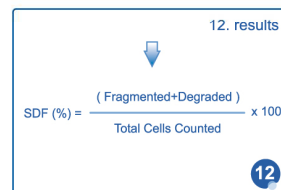
9. Vzorek promyjte zakápnutím větším množstvím destilované vody. Vodu naneste jednorázovou pipetou a inkubujte 5 minut. Poté roztok slejte nakloněním skla a sklo vraťte zpět do vyvýšené horizontální polohy. Dehydrujte vzorek přelitím 70 % alkoholem, inkubujte 2 minuty. Slejte a inkubujte v 100 % alkoholu 2 minuty. Použijte pokaždé jednorázovou pipetu. Slejte a nechte vzorek zcela uschnout. Takto zpracované vzorky mohou být uchovávány v krabičkách na suchém a tmavém místě při pokojové teplotě po několik měsíců.



10. Položte sklíčko v horizontální poloze např. na petriho misku nebo jiné vyvýšené místo. Kápněte **Roztok 3** do kruhu na skle tak, aby byl vzorek celý roztokem zakrytý. Inkubujte 7 minut. Poté roztok slejte nakloněním skla a sklo vraťte zpět do vyvýšené horizontální polohy. Kápněte **Roztok 4** do kruhu na skle tak, aby byl vzorek celý roztokem zakrytý. Inkubujte 7 minut. Poté roztok slejte nakloněním skla a nechte sklo uschnout při pokojové teplotě.



11. Vzorek prohlížejte pod mikroskopem ve světlém poli. Pokud je vzorek příliš obarven, je možné ho opláchnout pod vodou z kohoutku. Pokud je obarvení příliš slabé, ponořte sklo do 100 % alkoholu, nechte uschnout a zopakujte krok 10. Pro barvení fluorescenčními barvivami kontaktujte jejich výrobce.



12. Spočítejte procento spermií s fragmentovanou DNA za použití vzorce (fragmentované a degenerované spermie/všechny spočítané buňky) * 100.