科学通报
第40卷 第18期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1995年9月

一种简便快速鉴别大熊猫等哺乳动物精子顶体反应的方法*

李明文 宋祥芬 张福祥** 陈大元***
(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室，北京 100080)

关键词 大熊猫 哺乳动物 精子 顶体反应 鉴别 植物凝集素

大熊猫由于其分布范围狭窄、生育能力低和对生态环境的特殊要求，目前已濒于绝种边缘．拯救大熊猫的有效措施之一是进行人工饲养繁殖，但在人工饲养条件下多数雄猫不和雌猫交配或缺乏交配能力，必须进行人工采精、精液冻存和人工授精，因此精液质量评价是大熊猫人工繁殖中不可缺少的重要一环．

大熊猫和其他哺乳动物一样，其精子只有经过获能和顶体反应才能使卵受精，因此精子顶体反应能力的大小可作为精液质量评价的指标之一，另外还可反映冻存液和培养液的优劣．但大熊猫精子和大多数哺乳动物精子的顶体很小，无法在光镜下直接从形态上判断顶体反应．传统的判断小顶体精子顶体反应的方法是透射电镜观察，但这种方法具有需要时间长、成本高、技术复杂以及不易区别真、假顶体反应等缺点，因此近年来人们一直在寻找快速、简便的在光镜水平判断哺乳动物和人精子顶体反应的方法．目前已经有用金霉素(亦称氯四环素，CTC，一中膜结合 Ca^{2+} 荧光探针)判断小鼠和人精子顶体反应[1]、用三染色法(triple stain technique)判断人和猪等动物精子顶体反应[2]、用 FITC-PSA 判断人精子顶体反应[3]和用单克隆抗体间接免疫荧光法判断哺乳动物和人精子顶体反应的报道．本文报道的是我们建立的以 FITC-ConA 或 FITC-LCA 判断大熊猫、小鼠等哺乳动物精子顶体反应的方法，另外还对 CTC 法和三染色法的优缺点进行了讨论．

1 材料和方法

1.1 精子的获得和培养

(1)大熊猫精子．氯胺酮肌注麻醉后直肠电刺激法采精，集精杯收集精液，精液用 PSCM 培养液(pH7.4)[4]洗涤和离心两次(400×g, 5 min)，然后在 37℃，100% 空气和石蜡油覆盖条件下分管培养．精子密度为 5.2×10^7/mL.

(2) 小鼠、金黄地鼠和豚鼠精子．颈椎脱位法处死动物后取出附睾尾剪断之，在 TALP-HEPES 培养液(未加聚乙烯醇)中孵育 10 min 后双层纱布过滤(小鼠和金黄地鼠)或用温热的改良 Tyrode 氏培养液逆向冲洗豚鼠输精管获得附睾尾精子，然后在相应培养液中于

1995-01-14 收稿，1995-04-26 收修收稿
* 国家自然科学基金和国家"八五"重点攻关资助项目
** 成都大熊猫繁育基地
*** 联系人

37℃, 5%CO_2, 95% 空气和石蜡油覆盖条件下分管培养. 精子密度为(3.0～4.5) ×10^7/mL.

1.2 Hoechst 33258 标记死精子

在精子培养至一定时间时加入用 TALP-HEPES 配制的 Hoechst 33258(H258, Sigma) 使精子悬液中该荧光染料的浓度为 1 μg/mL, 并在 37℃温度下避光培养 15 min, 然后离心去上清液和用培养液洗 1～2 次, 去掉多余 H258. 大熊猫精子分别在培养 3 和 6 h, 小鼠精子分别在培养 1.5, 2.5 和 3.5 h, 豚鼠和金黄地鼠精子均分别在培养 6 h 时加入 H258.

1.3 涂片和酒精固定

H258 标记后吸取精子涂抹在干净载片上, 室温干燥后放在含 95% 酒精的染色缸中 4℃ 固定 0.5～1.0 h. 酒精固定的目的是脱脂, 增加膜的通透性, 以利于 ConA 或 LCA 穿过. 涂片固定后在空气中让酒精挥发掉. 各部骤均避光操作.

1.4 FITC-ConA 或 FITC-LCA 标记

酒精固定后涂片放在暗湿盒内, 在涂有精子处滴一滴以 PBS 配制的浓度为 100 μg/mL 的 FITC-ConA 或 FITC-LCA (Sigma), 盖上盖片, 在室温黑暗条件下标记 20～30 min, 然后用荧光显微镜观察和统计顶体反应百分率. 也可将片子放在暗湿盒内保存于 4℃ 冰箱, 待方便时再观察统计.

1.5 电镜法统计顶体反应百分率

大熊猫和小鼠精子在培养至一定时间时(平行管 H258 标记结束时)离心去上清液(400×g, 5 min), 精子沉淀块以 3% 戊二醛(内含 1.4% 蔗糖和 0.09 mol/L KH_2PO_4 缓冲液, pH7.8) 4℃ 固定 1.5 h, 缓冲液浸洗, 0.09 mol/L KH_2PO_4 缓冲的 1% 锇酸后固定 2 h, 之后梯度酒精脱水, Epon 812 包埋. 超薄切片经醋酸双氧铀和铅盐染色, JEM2000EX 电镜观察和统计顶体反应百分率. 为避免重复, 一个载网上只计数一个切片上的精子, 每个样品至少计数 150 个精子. 统计结果进行显著性 t 检验.

2 实验结果

2.1 FITC-ConA 和 FITC-LCA 在精子上的分布

FITC-ConA 主要分布在大熊猫精子顶体内, 顶体前区和赤道段均有强烈的翠绿色荧光, 而精子顶体后区和其它部位荧光很弱. 顶体反应的精子由于其项体前区脱落或顶体内容物释放而使精子头前半部荧光消失. 也有一部分顶体反应的精子因有一部分顶体内容物残留在顶体内膜外面而使头前半部具有较弱的荧光, 但由于其荧光分布不匀和荧光强度较弱, 因而与未发生顶体反应的精子有明显的区别(图 1(a)). 小鼠精子的荧光分布状态与大熊猫有别, 其荧光主要分布在顶体前区, 赤道段荧光相对较弱. 顶体反应后精子头部荧光消失或只剩下赤道段微弱的荧光. 也有一部分顶体反应的小鼠精子因顶体内容物残留而具有分布不匀的较弱的荧光. 另外, 小鼠精子尾部胞质小体也被 FITC-ConA 强烈标记(图 1(b), (c)).

为了进一步观察 FITC-ConA 在精子的分布位置和本法的适用范围, 我们还对豚鼠和金黄地鼠精子进行了标记, 发现 FITC-ConA 在豚鼠和地鼠精子的分布位置和小鼠精子相同, 即主要分布在顶体前区. 金黄地鼠和豚鼠精子尾部胞质小体也具有强烈的荧光(图 1(d), (e)).

FITC-LCA 和 FITC-ConA 具有相似的标记效果.

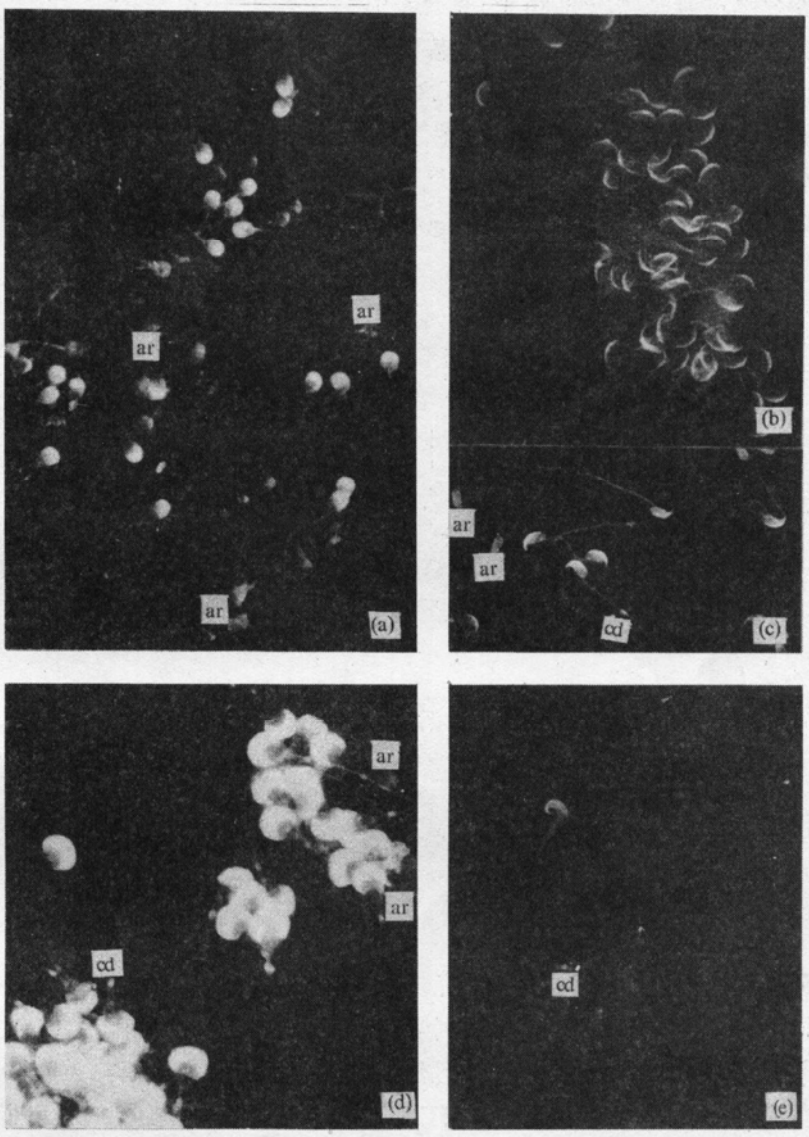

图 1　用 FITC-ConA 标记的大熊猫及其它几种哺乳动物精子的荧光显微镜照片

(a)大熊猫精子，×539, (b)和(c)小鼠精子，(b)×536, (c)×357, (d)豚鼠精子，×504. (e)金黄地鼠精子，×413.

ar 为顶体反应精子，cd为胞质小体

2.2　真、假顶体反应的判断

H258 是一种 DNA 特异性荧光染料，与 DNA 结合后发蓝色荧光．由于它能很快穿过死细胞膜系统，而不易穿过活细胞膜系统，故可用来鉴别精子死活，且比台盼蓝染色具有更易区别的优点，因为 H258 的蓝色荧光很强，而台盼蓝的染色有时较浅，区别精子死活较费力．

因为死精子核具有蓝色荧光，因此凡是核无蓝色荧光而顶体前区有翠绿色荧光的为活的未顶体反应的精子；凡是核无蓝色荧光、顶体前区无翠绿色荧光的为正常(真)顶体反应的精子，而那些核具蓝色荧光、顶体前区无翠绿色荧光的为假顶体反应的精子．但要注意区别那

些残留有顶体内容物的顶体反应的精子(见上述).

2.3 三种方法统计的大熊猫和小鼠精子顶体反应百分率的比较

分别用 H258 和 FITC-ConA 双标法、FITC-ConA 单标法和电镜法三种方法统计的大熊猫和小鼠精子顶体反应百分率的结果比较如图 2 所示. 从该图可以看出,电镜法统计的数值和 FITC-ConA 单标法统计的数值相近(t 检验无显著性差异),且均比 H258 和 FITC-ConA 双标法统计的数值高,原因是电镜法和 FITC-ConA 单标法均不考虑精子死活,统计的值内包括假顶体反应的精子.

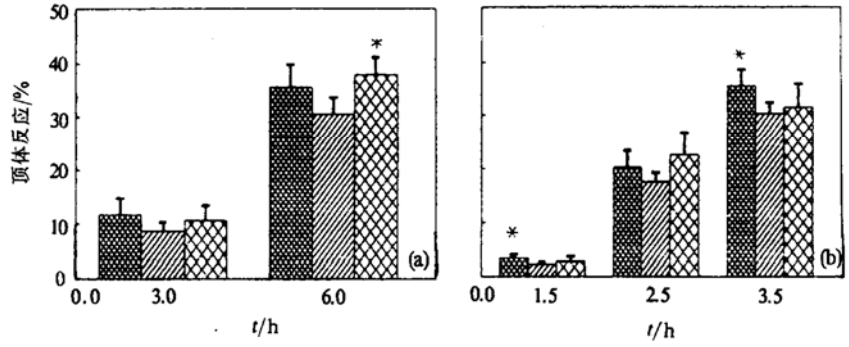

图 2 分别用电镜法(EM)、H258-FITC-ConA 双标法(H258-FITC)和 FITC-ConA 单标法(FITC)统计的大熊猫精子(a)和小鼠精子(b)顶体反应的动态变化比较

$M \pm S$ D, $n=3$(a) 或 $n=4$(b). * 表示和同一时间双标法统计结果相比, $p<0.05$

▩ 为 eM, ▨ 为 H-FITC, ⊠ 为 FITC

3 讨论

顶体反应百分率统计是受精生物学研究、临床检验和动物繁殖生产实践中的一项重要指标. 传统的判断小顶体精子顶体反应的透射电镜法因需要时间长、成本高、技术复杂和需要电镜设备以及不易区别精子死活等缺点而无法满足需要. Cross 等建立的用 FITC-PSA 判断人精子顶体反应的方法[3],以及我们建立的 FITC-ConA 或 FITC-LCA 判断大熊猫和小鼠精子顶体反应的方法弥补了电镜法的不足. 本法具有简便、快速、稳定、反差大和容易掌握等优点. Cross 等首先在人精子以及我们在大熊猫、小鼠、豚鼠和金黄地鼠精子的研究结果说明植物凝集素荧光标记法可广泛适用于哺乳动物精子顶体反应的判断. 本法的原理是哺乳动物精子顶体内富含大分子糖基物质,如糖蛋白和透明质酸酶等[6],可结合大量植物凝集素. Cross 等已经在电镜水平证实 PSA 确实主要结合于人精子顶体内[3].

目前已经有报道应用的在光镜水平判断精子顶体反应的方法还有 CTC 法和三染色法. CTC 法的原理是 CTC 与膜结合 Ca^{2+} 结合后发射黄绿色荧光,由于精子顶体反应后质膜和顶体外膜脱落,故顶体反应精子头部荧光消失. 根据我们的经验,CTC 法的缺点是荧光较弱,易褪色,且会由于膜结合 Ca^{2+} 分布不稳定而使 CTC 荧光分布状态也不稳定. 特别是由于我们用焦锑酸钾原位定位法发现一些顶体反应的精子的顶体内膜上也结合有大量 Ca^{2+}[6],因此我们认为 CTC 法不一定可靠. 目前 CTC 法只见在小鼠和人精子有应用的报道[1].

三染色法是应用台盼蓝、俾斯麦棕和玫瑰红三种染料先后对精子染色[2]. 台盼蓝可使死精子顶体后区着蓝色，玫瑰红使顶体着粉红色，俾斯麦棕使活精子顶体后区着淡褐色以增加顶体前、后区反差和避免玫瑰红在顶体后区的非特异性着色. 不需要荧光显微镜而只需要普通显微镜是本法最大的优点. 但和 FITC- 植物凝集素法相比，三染色法具有需要时间较长、反差较小和鉴别较费力等缺点.

参　考　文　献

1 Ward C R, Storey B T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. Dev Biol, 1984, 104: 287～296

2 Talbot P, Chacon R S. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. J Exp Zool, 1981, 215: 201～208

3 Cross, N L, Morales P, Overstreet J W *et al*. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamete Res, 1986, 15: 213～226

4 陈大元，宋祥芬，冯文和等. 大熊猫精液冷冻颗粒的解冻液研究，动物学杂志，1992, 27(3): 63

5 Gould S E, Bernstein M H. In: Hafez E S E ed. Technique of Human Andrology. Amsterdam: North-Holland Publishing Co, 1977. 189～202

6 李明文，陈大元，仉杯林等. 猕猴精子获能和顶体反应过程中 Ca^{2+} 和 Ca^{2+}-ATPase 定位及咖啡因和 dbcAMP 对顶体反应的影响. 解剖学报，1995, 26(2): 147～151