

用曙红 B 活体染色法区别大鼠死活精子

许 焯 黄桂芳 钱绍祯

(江苏省计划生育研究所)

在雄性生殖生理研究中,有人用曙红 Y-黑色素(eosin Y-nigrosin)活体染色法^[1,2]评价存活精子的百分率。此法可以判断人精子是否存活,但不适于大鼠精子的判断。

本文扼要介绍我们摸索的判断大鼠精子死活的一种染色方法。

用一针头从雄性大鼠附睾管中括取约 20 μ l 附睾液,置于盛有 1ml 台氏液的培养板孔内,37℃ 孵育 5—10 分钟后染色。

用红细胞吸管分别吸取 5% 曙红 B、20% 苯胺蓝和精子悬液各 5 μ l,各置于同一载玻片的不同部位。用细玻棒先将曙红 B 与精液混匀,然后再与苯胺蓝混匀后推片,以 15 秒钟内为宜,推片后立即在酒精灯上烤干。在 200—400 倍附有 OLYMPUS 牌 45-G533 绿色滤片的显微镜下观察,死精子头部染红色,活者不染色。

用以上方法处理人的精液,死精子染成深红色,活精子无色,较大鼠更易区别。

取 5 只成年雄性 SD 大鼠,将其附睾悬液置 37℃ 温浴不同时间后,再用上法染色计算活精子率,并与常

规观察活动精子的方法做比较(表 1)。结果孵育 5—10 分钟活精子率为 86.0%,活动精子率为 80.5%,表明常规方法观察的不活动精子约有 $5.5 \pm 0.91\%$ 为活精子,与文献报道的结果近似^[3]。表 1 还表明,随着温孵时间延长,活精子率及活动精子率均逐渐下降。

实验用具必须清洗干净,配制试剂的水质应以去离子水再经双蒸馏后使用,台氏液须新鲜配制,染液的用量和浓度尽可能精确,稍有偏差即可影响结果。提高曙红 B 的用量可使死精率上升;而提高苯胺蓝的用量,则死精率下降。经多方摸索,以上面所提出的用量和浓度为最理想。

用本法区分死活精子,主要是曙红 B 的作用,苯胺蓝仅用来衬托背景的对比性,故应先将精液与曙红 B 混匀,再与苯胺蓝混匀。滤色片的型号和精子悬液涂片的厚度也影响镜下分辨率。推片用的玻片的边和角均应磨光,以减少精子的损伤,否则也可影响实验结果。

镜下观察时常可见到一些头部稍稍红染的精子,我们认为这些是濒死的“临界”精子,但并非死精。这可能是由于质膜通透性已开始发生变化,这部分精子应归在活精之列。

表 1 曙红 B 活体染色活精子率与常规法活动精子率比较

孵育时间(分)	5—10	30	60
活精子%(n=10)	86.0 $\pm$ 6.1	82.8 $\pm$ 8.1	76.1 $\pm$ 5.5
活动精子%(n=10)	80.5 $\pm$ 6.1	73.8 $\pm$ 9.6	69.8 $\pm$ 9.2
孵育时间(分)	180	300	
活精子%(n=10)	72.3 $\pm$ 10.4	68.8 $\pm$ 10.0	
活动精子%(n=10)	65.5 $\pm$ 9.7	59.3 $\pm$ 9.2	

种方法制备的 DNA 片段,做了各种酶切、修补和基因重组反应,都得到了良好的效果。

参 考 文 献

- [1] Dretzen, G. et al.: *Anal. Biochem.*, 1981, 112, 295.
- [2] Banner, D. B.: *Anal. Biochem.*, 1982, 125, 139.
- [3] Yang, R. et al.: *Methods In Enzymology*, v. 68, Academic, New York, 1979, 176.

参 考 文 献

- [1] WHO. Laboratory Manual For The Examination of Human Semen and Semen-cervical Mucus Interaction, Press Concern Singapore 1980, 11.
- [2] Dougherty, K. A. et al.: *Fertil Steril.*, 1975, 26, 700.
- [3] Talbot, P. et al.: *The Journal of Experimental Zoology*, 1981, 215, 201.

[本文 1987 年 9 月 7 日收到]

- [4] Thuring, R. W. J. et al.: *Anal. Biochem.*, 1975, 66, 213.
- [5] Tautz, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 1983, 132, 14.
- [6] Weislander, L.: *Anal. Biochem.*, 1979, 98, 305.
- [7] Vogelstein, B. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1979, 76, 615.

[本文于 1987 年 8 月 11 日收到]