

# 实验室检测猪精液品质的新技术

朱士恩

中国农业大学动物科技学院

**摘要：**精子检测的主要目的就是快速准确地确定其受精能力。虽然精液常规检测方法应用广泛且很重要，但其在预测精子受精能力方面的缺点显而易见。而客观、准确的评价精子的功能状态，对于科研和生产实践具有重要的意义。本讲主要从活力、活率、顶体完整率、线粒体活性、获能状态、染色质结构和体外受精等方面介绍精液质量的评估方法及评估指标与受精能力的相关性，为实验室以及生产上的精液品质评估提供参考。

**关键词：**猪； 精液； 精液检测； 受精

猪的人工授精技术始于 20 世纪 30 年代，迄今为止其应用已有 70 多年的历史。人工授精不仅可以充分发挥优秀公猪的遗传潜力，同时还可以减少性传播疾病，提高生产效率，获得更高的经济效益。但随着精液保存技术的发展，尤其是冷冻保存、低温保存及性控精液技术的发展，传统的精液品质评估指标已经不能够满足人工授精的需要。急需新的精液质量评估技术指标，以进一步提高人工授精在养猪生产中的作用。

客观、准确的评价精子的功能状态，对于科研和生产实践具有重要的意义。在过去几十年里生产上对精子质量的评价主要是通过目测及光学显微镜来评价精液的常规指标，如精液的颜色、气味、pH、精液量、精子的密度、精子的运动能力、形态和活力等。这些方法虽然比较简单，但准确性不高。

精子检测的主要目的是快速准确地确定其受精能力。虽然常规检测方法很重要，但其在预测精子受精能力方面受主观和客观因素的影响偏差很大。

近年来，随着新的技术用于精液检测，可以更加细致地对精子的特性进行评估。利用荧光染色技术可以对精子的微观功能进行检测，包括质膜完整性、获能状态和顶体状态等。而联合使用荧光染料，则可以同时检测精子几种功能指标。流式细胞仪（flow cytometry, FCM）的应用，可以在短时间内分析大量的经荧光标记的精子，促进了荧光染色技术在精子质量评估中的应用。计算机辅助精子

分析系统（computer assisted sperm analysis, CASA）可以检测精子活力和形态学上的特征，消除了光学显微镜评估的主观性和可变性缺点。通过检测精子与透明带或输卵管上皮的附着、精子穿透卵母细胞的能力，可以获得精子更真实的受精能力的信息。

精子需要同时具备多种特性和功能才具有受精能力，因而任何单独一种检测指标都无法完全反映其受精能力。只能同时检测多个指标，才能更好地反映精子的受精能力。因此，未来的研究方向仍是继续寻找有效的预测精子受精能力的检测指标跟方法。

## 一、猪精子的特点及其体外处理过程中的注意事项

### （一）猪精液的理化特性

正常公猪的精液单次射精量为 200~500 ml，密度为 2~3 亿/ml，颜色为乳白色或浅灰色，呈云雾状，略带腥味，pH 值为 7.0~7.8。

### （二）猪精子的形态和结构

猪的精子分头部、颈部和尾部等三个主要部分，长度约为 50~60 $\mu\text{m}$ ，表面有质膜覆盖，是含有遗传物质并有活动能力的雄性配子。

#### 1. 头部

猪精子头部为扁卵圆形，长度约为 8.5 $\mu\text{m}$ ，长宽厚的比例约为 8:4:1，因而造成精子正面图像似蝌蚪，侧面似刮勺。猪精子的头主要由细胞核构成，内含遗传物质 DNA。核的前部，在质膜下为帽状双层结构的顶体（acrosome），也称核前帽。核的后部由核后帽包裹并与核前帽形成局部交叠部分，叫核环。猪的精子核与顶体之间的核膜前部形成一个锥形突起，叫做穿卵器（perforatorium），是核膜的变形体，有利于受精过程精子入卵。顶体内含多种与受精有关的酶，它的畸形、缺损或脱落会使精子的受精能力降低或完全丧失。

#### 2. 颈部

猪精子的颈部位于头的基部，是头和尾的连接部，也可作为精子头的部分，是由中心小体衍生而来。精子尾部的纤丝在该部与头相连接。颈部是精子最脆弱的部分，特别是精子在成熟、体外处理和保存过程中，某些不利因素的影响极易造成尾的脱离，形成无尾精子。

#### 3. 尾部

为精子最长的部分，是精子代谢和运动器官。根据其结构的不同又分为中段（约 10 $\mu\text{m}$ ）、主段（约 30 $\mu\text{m}$ ）和末段（约 2~5 $\mu\text{m}$ ）。中段由颈部延伸而来，其中的纤丝外围由螺旋状的线粒体鞘膜环绕，约为 65 圈，是精子分解营养物质，产生能量的主要部分。末段最短，是中心纤丝的延伸。精子主要靠尾部的鞭索状波动，推动精子向前运动。由于精子能量来自尾的中段，头部有缺陷或损伤的精子仍可能有运动的能力。

#### **4. 畸形精子和分类**

根据猪精子出现畸形的部位，可分为头部、中段和尾部三类畸形。

##### **(1) 头部畸形**

常见的有窄头、头基部狭窄、梨形头、圆头、巨头、小头、头基部过宽和发育不全等。头部畸形的精子多数是在睾丸内精子发生过程中，细胞分裂和精子细胞变形受某些不良环境影响引起的。对精子的受精能力和运动方式都有显著的影响。

##### **(2) 中段畸形**

包括中段肿胀，纤丝裸露和中段呈螺旋状扭曲等。中段畸形多数是在睾丸或附睾发生。中段畸形的直接影响是精子运动方式的改变和运动能力的丧失。

##### **(3) 尾部畸形**

包括尾部各种形式的卷曲、头尾分离、双尾、带有近端和远端原生质滴的不成熟精子。大部分尾部畸形的精子是精子通过附睾、尿生殖道和体外处理过程中出现的。尾部畸形对精子的运动能力和运动方式影响最为明显。

#### **(三) 精液体外处理过程中的注意事项**

##### **1. 精液稀释注意事项**

- (1) 精液稀释要求与精液直接接触的器材，必须经过严格消毒处理。
- (2) 未经品质检查或检查不合格（活率 $<0.7$ ）的精液不能稀释。
- (3) 精液采集后应尽快稀释，原精贮存时间不宜超过30min。
- (4) 稀释时严禁太阳光直射精液，应于较暗处操作。
- (5) 精液要求等温稀释。精液与稀释液的温差不能超过1 $^{\circ}\text{C}$ ，以精液温度为标准，来调节稀释液的温度。
- (6) 稀释时，将稀释液沿杯(瓶)壁缓慢加入到精液中，然后轻轻摇动或用消

毒玻璃棒沿一个方向缓慢搅拌，使其混合均匀。

(7) 高倍稀释时，应先进行低倍稀释（1:1~2），稍待片刻后再将余下的稀释液沿壁缓慢加入，以防造成“稀释打击”。

(8) 稀释倍数的确定：精液稀释的比例应根据原精液的品质，输精量，配种母猪的头数，以及是否需要运输和贮存而定。一般以每个输精剂量含有效精子数40亿以上，输精量为80~100ml，来确定稀释倍数。例如：某头公猪一次采精量是200 ml，活率为0.8，密度为2亿/ml，要求每个输精剂量是含40亿个有效精子，输精量为100 ml，则总精子数为 $200 \text{ ml} \times 2 \text{ 亿/ml} = 400 \text{ 亿}$ ，稀释份数为 $400 \text{ 亿} \times 0.8 / 40 \text{ 亿} = 8 \text{ 份}$ ，加入稀释液的量为 $8 \times 100 \text{ ml} - 200 \text{ ml} = 600 \text{ ml}$ 。

(9) 稀释后要求静置片刻再作精子活率检查。如果稀释前后精子活率无太大变化，即可进行分装与保存；如果活率下降过快，说明稀释液的配置或稀释操作有问题，不宜使用，并应查明原因加以改进。

## 2. 精液保存注意事项

(1) 将分装完的精液置22~25℃的室温1~2h后，放入17℃恒温箱贮存，也可将精液瓶用几层纱布或干毛巾包好后直接放置于17℃恒温箱中，让其温度缓慢下降，避免因温度下降过快，造成死精子数等增多。

(2) 保存过程中要求每12h将精液摇匀1次，防止精子沉淀而引起死亡，每次摇动时，动作要轻缓均匀，同时观察精液的色泽状态，并做好记录，发现异常及时处理。

(3) 保存过程中要切实注意冰箱内温度的变化(通过温度计的显示)，以免因意想不到的原因而造成电压不稳而导致温度升高或降低。

(4) 尽量减少精液保存箱开关次数，以减少对精子的影响。

(5) 使用前对保存的精液进行活率检查，活率低于0.6的精液应弃之不用。

(6) 用短效稀释液稀释的精液可保存3天，中效稀释液可保存4~6天，用长效稀释液稀释的精液可保存7天以上。但无论何种稀释液保存精液，都应尽快用完，否则会影响使用效果。

## 3. 精液运输应注意的事项

(1) 精液在运输前必须经过严格的检查，活率低于0.7的精液严禁调出；

(2) 包装瓶或包装袋中应尽量排出空气，以减少在运输过程中的震荡；

(3) 在运输过程中，应严格避光；

(4) 精液运输到达目的地后，检查精子活率，合格后方可接收。

#### 4. 精液检测注意事项

(1) 不仅要在宏观指标上对精液品质进行检测，例如精液的颜色、气味、pH、精液量、精子的密度、活力、活率等，而且要在微观上对精子的各个功能结构进行检测，例如质膜完整性、获能状态和顶体状态等。从而能够更好的预测精子的受精能力，为人工受精提供服务。

(2) 单独的精液品质检测指标无法完全反映精子的受精能力，因而对精液品质的检测应同时检测多个指标，才能更好地反映精子的受精能力。

## 二、实验室精液质量检测

精子上的结构单位对其自身的生存及受精都具有重要作用。其中完整的精子细胞膜与正常的顶体，是保证精子顺利发生顶体反应、完成受精的前提条件；线粒体是精子能量的主要来源，线粒体的功能与精子活率和能量状态密切相关；而获能是精子受精前所发生的一系列变化，包括精子膜蛋白重组、膜磷脂代谢以及超激活等，这些变化的适时发生是影响精子受精的关键事件。因此对精子进行质量评估，不仅要进行常规检测，例如精液颜色、气味、密度、pH、活力、活率、畸形率等检测指标，而且要对精子的质膜、顶体的状态、线粒体功能、获能和染色质状态等指标进行检测。

### (一) 颜色

正常的精液是乳白色或浅灰色，呈云雾状，精子密度越高，色泽愈浓，其透明度愈低。异常精液：如带有绿色或黄色是混有脓液或尿液；带有浅红色或红褐色是含有血液，表明精液中有炎症物，这样的精液应舍弃不用，并会同兽医寻找原因，及时治疗。

### (二) 气味

正常猪精液略带腥味，如有异常气味（恶臭味，炎症的一种表现），应废弃不用。

### (三) pH 值

以 pH 计或 pH 试纸测量。正常精液的 pH 值为 7.0~7.8，呈中性或弱碱性。一般来说，精液 pH 值越低，精子密度越大。

## （五）采精量的测定

测量精液量主要用电子天平称量法。按 $1\text{g} = 1\text{ml}$ 计，精液量（g）=（精子的质量+集精杯的质量）-集精杯子的质量。避免以量筒等转移精液盛放容器的方法测量精液的体积，减少精子的死亡。

猪的射精量因品种、年龄、使用频率不同有较大的差异，一般公猪的一次射精量为200~500 ml。公猪射精过多或过少，应分析原因。采精次数过多，公猪生殖机能衰退，日常管理不当，采精技术不熟练均可能造成一次采精量过少；一次采精量过多则可能是由于混入过多的副性腺分泌物及尿液等。

## （六）精子运动能力的检测

### 1. 目测估测法检测活率

精子的活率是指精液在 $37^{\circ}\text{C}$ 条件下呈直线运动的精子占全部精子总数的百分率，它与精子受精能力密切相关，是评定精液品质的重要指标。精子活率的评定一般用目测估测法在显微镜下观察精子活率，按0.1~1.0的十级评分法进行评估。检查活率时应在 $37^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

### 2. 计算机辅助分析法（CASA）检测精子运动参数。

利用精子品质计算机辅助分析仪可以直接对猪精子进行活率、活力以及其它运动参数进行检测，主要包括轨迹速度（curvilinear velocity, VCL）、平均路径速度（average path velocity, VAP）、直线运动速度（straight-line velocity, VSL）、直线性（linearity, LIN）、精子侧摆幅度（amplitude of lateral head displacement, ALH, LHD）等。这种检测方法具有迅速、准确、重复性高等优点。

## （七）精子密度检查

精子密度指每毫升精液中含有的精子数量，是确定精液稀释倍数、评定精液品质的一个重要指标，正常公猪的精子密度为2~3亿/ml，有的可高达5亿/ml。检测精子密度的方法主要有估测法、精子密度仪法、血细胞计数方法等。目前生产上主要以精子密度仪法为主。

### 1. 估测法

在显微镜下观察精子的分布，精子与精子之间的距离少于一个精子长度为“密”，其距离相当于一个精子的长度为“中”，其距离大于一个精子的长度为“稀”。此种方法主观性强，误差大，只能进行粗略的估计。

## 2. 精子密度仪法和 CASA 法

这两种方法使用方便，检查所需时间短，重复性好，结果比较准确，是目前人工授精中测定精子密度最适用的方法。

## 3. 血细胞计数方法

该方法最准确，但速度太慢，生产实践中主要用于校正精子密度仪的读数。

血细胞计数方法：①以微量加样器取具有代表性原精液 200 $\mu$ L，用 3%NaCl 稀释 10 倍；②在血细胞计数板上放一盖玻片，取 1 滴稀释液后精液置于计数板的槽中，靠虹吸将精液吸入计数室内；③在高倍镜下计数 5 个中方格内的精子总数，将该数乘以 50 万，即得原精液每毫升的精子数（即精液密度）。

### （八）精子畸形率检测

精子的畸形率的大小对精子的受精能力存在一定的影响。先前的研究指出，精液中畸形的精子比率过高将会减少精液的受精能力(Saacke, 1970; Lavara et al., 2005)。但对于畸形率过高的精液通过增加精液的用量也可以提高其受精效果(Saacke et al., 1994, 1998, 2000; Walters et al., 2005)。

精子畸形率的测定可以用伊红或姬姆萨等染料对精子进行染色后用普通显微镜观察，或者用相差显微镜直接观察活精子的畸形率。

### （九）精子质膜完整性检测

精子质膜是精子的基本组成部分。质膜的破裂会引起细胞内代谢酶、ATP 等组分的流失，最终导致精子死亡(Graham and Moce, 2005)。因此，质膜在维持完整的细胞内环境和保持精子活力上起着重要作用。目前能够用来对精子质膜完整性进行检测的染料很多，根据染色后的荧光性可分为非荧光染料和荧光染料两大类。

#### 1. 非荧光染料

非荧光染料对精子质膜完整性进行检测的染色组合主要包括伊红—苯胺黑(eosin-nigrosin)染色、伊红—苯胺蓝(eosin-aniline blue)染色和苔盼兰—吉姆萨(trypan blue-giemsa)染色等。

#### 2. 荧光染料

检测精子质膜完整性的荧光染料根据染色原理的不同又可分为两类：死精子特异性荧光染料和活精子特异性荧光染料。

(1) 死精子特异性荧光染料的原理是当精子质膜具有完整的功能时，染料不能进入精子内部，精子不能发出荧光；当精子的质膜受损时，染料才能进入精子内部与DNA结合发出荧光。死精子特异性荧光染料主要包括碘化丙锭(propidium iodide, PI)、bisbenzimidazole (Hoechst33258)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)、溴乙吡啶二聚体(ethidium homodimer-1, EthD-1)和Yo-Pro-1等，其中PI最为常用。

(2) 活精子特异的荧光染料是膜通透性的染料，能进入细胞膜完整的精子。主要包括烟酸己可碱 33342 (Hoechst 33342)、SYBR-14、羧基荧光素双醋酸盐(carboxy fluorescein diacetate, CFDA)、羧基二甲基荧光素双醋酸盐(carboxy dimethyl fluo-rescein diacetate, CMFDA)、Carboxy-SNARF-1 和 SYTO-17 等。

但是精子质膜是覆盖于整个精子表面上的一层完整的膜，其在精子上分为三个不同的区域：覆盖于顶体外膜区域上的质膜、覆盖于精子头部非顶体区的质膜以及覆盖于尾部中段和主段部分的质膜，因此对精子不同部位质膜完整性的检测就需要不同的分析方法。传统染色，例如伊红—苯胺黑染色和伊红—苯胺蓝染色等，和荧光染色，例如碘化丙锭(propidium iodide, PI)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)和 bisbenzimidazole (Hoechst 33258)等，只能通过精子头部的非顶体覆盖区进入精子与精子DNA结合发生染色反应，它们只能检测覆盖于精子头部非顶体区的质膜的完整性，而不能检测覆盖于顶体外膜和尾部中段以及主段部分的质膜的完整性，因而对于精子质膜完整性的检测是不完整的。目前对于覆盖于精子尾部主段上质膜完整性的检测可以通过精子的低渗肿胀实验(hypo-osmotic swelling test, HOST)进行(Jeyendran et al., 1984; Neild et al., 2000; Colenbrander et al., 2003)。低渗肿胀试验法的原理是在低渗溶液中，具有生物活性的精子质膜会使水分子进入质膜中，直到精子胞质内环境和外环境达到平衡为止。由于水的内流，精子尾部的质膜就要向外周膨胀并且尾部质膜内的鞭毛会发生弯曲。通过相差显微镜就可以观测到精子质膜对低渗液的反应。但是如果精子损伤或者质膜失去生物活性就会允许液体自由通过质膜，在胞质内不会积聚液体从而不会出现明显的肿胀和尾部弯曲。HOST方法简单、迅速，对检验质膜的完整性非常实用。而对于覆盖于顶体外膜区域上质膜完整性的检测通常与顶体外膜完整性的检测联合起来



进行。对于顶体外膜的检测，可以利用荧光和非荧光染料通过染色在显微镜和流式细胞仪等进行检测（Cross and Meizel, 1989; Graham, 2001; Colenbrander et al., 2003; Silva and Gadella, 2006）。

目前主要采用SYBR-14和PI的联合染色再加上HOST检测对精子质膜进行检测。同时精子活力通常采用SYBR-14和PI染色法（Garner et al., 1994; 1995）进行检测。

#### （十）线粒体功能检测

线粒体的功能状态对精子起着重要作用，因为精子的运动能力与线粒体的活性密切相关，整个精子代谢所需的能量主要由线粒体提供（Graham and Moce 2005）。线粒体活性的改变会影响精子的能量潜力（Ericsson et al., 1993; Gravance et al., 2000; vander Giezen and Tovar, 2005）。因此线粒体的功能状态是精子功能质量的一个关键指标。

活精子的线粒体上存在着跨膜电位，因此对线粒体活性的检测主要通过检测线粒体的跨膜电位变化进行。目前检测精子线粒体活性的荧光探针主要有R123（Rhodamine123）、MITO（MitoTracker Green FM）和JC-1（5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide）等。R123 是一种能渗透入细胞且带阳离子的荧光探针，发绿色荧光，当用R123 孵育线粒体正常的精子时R123 能渗透入细胞并沉积在细胞的线粒体上发出绿色荧光。如果精子线粒体损坏则不会发绿色荧光。R123 可检测精子线粒体有无功能，但不能区别线粒体膜电位的高低。

MITO 是一种新型线粒体探针，其原理是MITO 在水溶液中并不发荧光，而当积聚在线粒体内，不论其膜电位如何皆发绿色荧光。

JC-1 在检测精子线粒体膜电位方面具有重要作用，在精子线粒体膜电位低时，以单体形式存在，发绿色荧光；当膜电位高时，形成二聚体，发橙色荧光（Garner et al., 1997）。JC-1 染色的特异性最好，仅在线粒体部位发黄色或绿色荧光，而R123 在精子头部和尾部有非特异性染色，MITO在精子头部有非特异性染色。目前认为JC-1 是检测精子线粒体功能最适合的荧光探针。

#### （十一）获能和顶体检测

##### 1. 获能检测

评判精子功能的另一个重要的指标是精子的获能状态。精子膜的获能状改变很容易引起顶体反应的提前发生，以及精子受精能力的丧失（Harrison,1996；Maxwell and Johnson,1999）。尤其在精液冷冻过程中，温度、渗透压和冷冻稀释剂等因素会破坏精子膜和精子结构的稳定性，引起精子的获能状变化（Watson, 1996；Maxwell and Johnson,1997）。

目前主要采用金霉素（chlortetracycline, CTC）对精子进行获能检测。CTC 染色可以检测精子质膜的稳定程度。CTC 进入精子后可以结合游离的钙离子（ $\text{Ca}^{2+}$ ），这些CTC- $\text{Ca}^{2+}$  复合物能够结合在质膜的疏水区并且在荧光显微镜下激发出黄绿色荧光。除了能够确定顶体的状态，CTC 染色能够区分获能和未获能的精子。在CTC 染色后，精子表现出3 种荧光类型：① F型，整个精子头部有均一荧光，为未获能，顶体完整的精子；② B型，精子头部顶体后区，在靠近尾部的部分无荧光或非常弱的荧光，而头前部为均一荧光，为获能且顶体完整的精子；③ AR型，整个精子头部无荧光或非常弱的荧光，为顶体不完整的精子，即发生了顶体反应的精子或顶体缺损的精子。

## 2. 顶体检测

精子顶体是覆盖于精子核前2/3 以上区域的囊性结构，囊的内外层分别称为顶体内膜和顶体外膜。顶体内富含多种蛋白水解酶（顶体酶），在精子穿过卵子放射冠、透明带等受精过程中，顶体酶发挥主要作用。顶体反应是精子成功穿入卵母细胞所必需的过程。完整的精子顶体是保证精子受精的前提条件

（Waterhouse et al., 2004）。精子要穿过透明带必须有正常的顶体，顶体异常通常伴随顶体酶质和量的改变，故精子顶体完整性与精子功能相关，也是精子功能指标之一。

目前对顶体的状态进行检测的荧光探针主要有两类。一类主要是金霉素（chlortetracycline, CTC）以及一些与细胞外暴露的抗原结合的抗体。金霉素(CTC) 顶体染色法，是荧光显微镜检测的常用方法，可客观而定量地评价精子获能、顶体反应（Das Gupta et al.,1993），但这种染料在FCM（flow cytometry）检测时不能很好地将获能与未获能的精子分开，而且样品要固定，所以CTC 染色法不适用于FCM。另一类主要是外源植物凝集素及一些与精子内顶体抗原结合的抗体，其中的外源植物凝集素常被用来评价顶体的状态。现在用的最多的是异硫氰酸荧

光素(FITC)与豌豆凝集素(PSA)、花生凝集素(PNA)或伴刀豆凝集素(ConA)结合使用。其中PNA 和PSA 较常用, PNA 效果最好。经电子显微镜观察证实, PNA 能特异结合顶体外膜( Szasz et al,2000)。这类染色组合比较适合FCM检测。

对精子顶体状态进行检测时,死亡降解的精子也会出现顶体丢失,因而检测顶体反应必须同时检测精子的活力,即要联合应用检测顶体状态和检测精子活力的荧光染料。

目前对精子顶体状态的检测主要是应用精子活力染料PI(或Hoechst33258、EthD-1)和FITC-PNA 标记后,在荧光显微镜下,PI标记死精子的细胞核呈现红色荧光,可以区分死精子跟活精子,而发生顶体反应或顶体膜破损的精子又可被FITC-PNA 标记,呈现绿色顶体,从而区分出精子顶体的完整性;也可进行FCM检测,其结果PI<sup>+</sup>(阳性)为死精子;PI<sup>-</sup>/PNA<sup>+</sup>(PI阴性/PNA阳性)为顶体反应活精子;PI<sup>-</sup>/PNA<sup>-</sup>(PI阴性/PNA阴性)为顶体完整的活精子。

## (十二) 精子染色质完整性的检测

精子染色质结构完整性对于精确传递遗传物质至关重要。精子核高度致密,其DNA 与鱼精蛋白紧密结合,这样可以将公畜遗传信息准确无误地导入卵母细胞中,继而传给后代。在自然环境中就有许多因素可以导致畸形精子的产生,如各种有毒的药剂以及阴囊内温度的偏差等。而在精液保存过程中,特别是冷冻过程中,对精子染色质结构的完整性也会造成损伤。异常染色质的结构会导致受精后胚胎发育的异常,最终会对母猪的妊娠率及产仔率产生影响。因此,对精子染色质结构完整性的检测也是评估精子质量的重要指标之一。

测定精子的染色质完整性,目前主要使用吖啶橙(acridine orange, AO)染色方法进行染色质结构试验(SCSA)。其原理是DNA 的变性位点具有感光性,用异源性的染料AO 染色,在荧光的激发下,可以看到插入没变性的双链DNA 的AO 染料发绿色荧光,而与变性的单链DNA 结合的AO 染料发红色荧光。SCSA是一种比较灵敏的试验,用SCSA 来确定DNA 的变性程度,可以作为预测精子受精能力的一种手段。

其次还可以利用单细胞凝胶电泳或称为彗星试验来检测精子DNA 损伤程度。试验原理:DNA 损伤后会影响到DNA 的高级结构,使其超螺旋松散。这种细胞经过试验中细胞原位裂解、DNA 解链等过程后,电泳时损伤的DNA 从核

中溢出，朝阳极方向泳动，产生一个尾状带，而未损伤的DNA 部分保持球形，二者共同形成“慧星”。在一定范围内，“慧星”的长度（代表DNA 迁移距离）和经荧光染色后“慧星”荧光强度（代表DNA 的量）与DNA 损伤程度具有相关性，这样就可以定量检测精子中的DNA 损伤。

### （十三）卵母细胞结合能力和受精

#### 1. 透明带结合检测

精子结合到透明带上是受精的关键步骤。因此，精子结合到同种透明带上的能力可能用于预测精子受精能力。由于透明带结合是由受体和配体介导的，所以透明带结合检测是检测精子分子水平上的损伤，而这是常规精子检测分析技术无法实现的（Strom Holst等，2001）。目前检测精子结合透明带能力有两种方法，一种是使用卵母细胞（透明带结合检测，zona binding assay, ZBA），另外一种是使用分离出半透明带（半透明带检测，hemizona binding assay, HZA）（Ivanova等，1999）。

在ZBA中，使用屠宰场的卵巢分离出卵母细胞与精子共同培养（Strom Holst等，2000），然后使用相差显微镜或者荧光显微镜计算结合到透明带上的精子数量。这种检测方法的缺点是不同卵母细胞之间精子结合存在差异，所以需要大量的卵母细胞和多次重复来消除差异（Strom Holst等，2000）。而这些差异可以部分的通过HZA 来克服。在HZA中，利用显微操作方法卵母细胞被切割两半，并去掉细胞质。然后两半透明带分别与对照组和实验组的精液样本孵育，最后使用相差显微镜计算结合的精子数量（Ivanova等，1999）。HZA 的优点是可以比较对照组和实验组精子的结合能力，而且透明带可以冷藏和冷冻保存。新鲜精液和冷冻精液都可以使用HZA 方法（Mastromonaco等，2002）。但是，HZA 的缺点是费时和需要复杂的技术（Strom Holst等，2001）。

#### 2. 体外受精检测

一些哺乳动物的成熟卵母细胞体外受精(*in vitro* fertilization, IVF) 技术已经很成熟。因此，利用IVF技术来检测精子对卵母细胞的体外受精能力，更接近体内的受精过程，能更好的检测出精子的真实质量水平。但是有些动物则不可行，例如犬的卵母细胞体外成熟和体外受精很难实现（Luvoni等，2005），因此犬卵母细胞的体外受精不能够用来检测精液质量（Zhou等，2004）。与此同时，IVF

技术还存在费时费力、实验条件复杂以及成本过高等缺点。

### 三、实验室评估与精液质量、受精之间的关系

以上实验室对精子的检测指标与精子的受精能力均有密切的关系，但是与人工授精后最终受胎率之间的关系却并不稳定，不同的实验室所得到的实验结果是不一致的。例如，在活力方面，精子活力与受精能力的相关性范围可以从最低的0.15到最高的0.83(Kjaestad et al.,1993; Bailey et al.,1994; Stalhammar et al.,1994; Januskauskas et al.,2003); 在精子膜的完整性方面，精子膜的完整性与受精能力之间具有显著但可变的相关性(Alm et al.,2001:  $r = 0.05$ , Januskauskas et al., 2001:  $r = 0.39\sim 0.57$ )。在顶体状态方面，在牛上，先前的研究显示顶体反应的程度与受精能力之间具有显著但可变的相关性( $r = 0.60\sim 0.84$ ) (Withfield and Parkinson 1995; Januskauskas et al.,2000)。同时精子与透明带的结合能力与人工授精后其受精能力之间也具有显著的相关性( $r = 0.50$ ) (Zhang et al.,1998)。而在体外受精(IVF)方面，精子体外受精与体内受精也具有显著的相关性( $r = 0.35\sim 0.59$ ) (Zhang et al., 1997; Schneider et al.,1999)，但是这种相关结果可重复性差，并不稳定，这说明了IVF对实验室的稳定性具有很大依赖 (rev. by Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000)。

实验室检测分析仅是针对精子本身的质量分析，虽然部分分析指标与受精存在一定的相关性，但仅是单一指标的相关性。精子的检测指标与受精能力之间相关性不仅受精液本身的影响，还要受以下几个方面的影响：

#### 1. 实验室差异

实验室对精子分析评估的基本要求是客观性、可重复性以及准确性，但并不是每一个实验室都能够同时具备以上三个条件。例如，应用显微镜目测与应用计算机辅助分析系统对精子的活力、活率进行评估所得到的结果在客观性、可重复性以及准确性方面是存在差异的。

#### 2. 生产操作差异

在生产方面，人工授精操作差异、不同的季节以及输精量等的不同等都会造成受精结果的差异。

#### 3. 母畜差异

母畜方面，体质的不同、年龄胎次的不同以及饲养管理的差异均会影响到人工授精的效果。

受精过程对精子的要求应该是多方面的。精子是复杂的生殖细胞，只有在结构和功能上具备多方面的特性才会具有受精能力。因此，同时评估精子的多个特性，如活力、活率、顶体完整率、线粒体活性、获能状态和染色质结构的完整性等，对于精确评估精液质量，探究精子受精能力下降的原因以及生产应用都具有重要的意义。

#### 四、小结

精子检测的主要目的就是快速、准确地确定其受精能力，以满足科研及生产的需要。利用目测及光学显微镜来评价精液的常规指标，方法虽然比较简单，但准确性不高。分析过程存在主观性、可变性、分析的样本量少和检测指标与受精能力相关性差等缺点。因而，在传统精液检测手段基础上，还应推广新技术（FCM、CASA 以及荧光染色）用于精液检测，从而更加细致地对精子的特性进行评估，以提高检测的准确性。精子需要同时具备多种特性和功能才能具有受精能力，因而单独的检测指标无法完全反映其受精能力。同时检测多个指标，才能更好地反映精子的受精能力。精子质量评估未来的研究方向仍是继续寻找有效的预测精子受精能力的检测指标跟方法。

（参考文献略）