

# 提高牦牛精子顶体染色效果的综合措施及注意事项

阿秀兰

(西藏自治区拉萨市畜牧兽医总站, 西藏 拉萨 850000)

**摘 要:** 精子畸形率的检查是评定牦牛冷冻精液品质的重要指标之一。笔者经过长时间反复染色, 在提高牦牛精子顶体染色效果方面积累有一点经验, 现总结出提高牦牛精子染色效果的综合措施及注意事项, 为相关技术人员通过精液常规形态染色观察顶体完整率客观评价提供借鉴与帮助。

**关键词:** 牦牛; 精子顶体; 染色效果; 综合措施; 注意事项

中图分类号: S826; S823.85

文献标识码: A

## Comprehensive Measures and Precautions to Improve Dyeing Result of Yak Acrosome

A Xiu-lan

(Lhasa Animal Husbandry and Veterinary Station, Tibet Lhasa 850000, China)

**Abstract:** The examination of malformation rate of the sperms is one of the important indexes for quality evaluation of frozen yak semen. The author accumulated some experiences to improve the dyeing result of yak acrosome through repeatedly dyeing for a long time. This paper concluded the comprehensive measures and attention matters used to improve the dyeing result of yak acrosome, and supply reference and help related technician to evaluate the integrity rate of acrosome objectively through observing the dyeing result of generic form of semen.

**Key words:** Yak; Acrosom; Dyeing result; Comprehensive measure; Precautions

精液品质是公畜禽繁殖力的一个重要指标<sup>[1]</sup>, 精液的畸形精子超过一定的比率时, 对受精率有明显影响<sup>[2]</sup>。牛精子畸形率应不超过 20 %, 优良公牛精子的畸形率应低于 15 %。精子顶体在受精过程中的作用很重要, 因为受精过程的第一个步骤就是精子穿过透明带, 精子的顶体会释放出顶体酶<sup>[3]</sup>, 溶解卵细胞的粘合基质<sup>[4]</sup>, 形成精子穿越放射冠的通路, 过放射冠的精子立即与透明带接触, 顶体酶随后将透明带溶出一条孔道, 精子借自身运动穿越透明带, 并接触卵黄膜。如果精子顶体结构受到损伤, 可导致受精率降低<sup>[5]</sup>, 甚至不受精<sup>[6]</sup>。精子顶体完整率已被纳入精液品质评定的指标之一<sup>[7]</sup>, 按照《牛冷冻精液国家标准》(以下简称“国标”)要求定期检查解冻后冻精的顶体完整率, 要求冻精解冻后精子顶体完整率 $\geq 40\%$ 。目前, 姬姆萨

染色法<sup>[8]</sup>是被证明适合用于牛精子形态染色和顶体着色观察的一种染色法。染色后精子顶体作色效果, 直接影响着通过精液常规形态染色观察顶替完整率客观评价精子质量, 为提高牦牛精子染色效果, 笔者通过反复染色试验, 总结出提高牦牛精子染色效果的综合措施及注意事项, 为相关技术人员提供借鉴与帮助。

### 1 药品及器材

为减少染液的杂质, 药品最好是 AR(分析纯); 为减少染色时所用器皿带入杂质, 所用器皿一定要干净, 尤其要注意载玻片的选择和清洁。载玻片以薄为好(0.8 ~ 1 mm), 以提高图像的分辨率。用前一定要洗干净, 否则片子会抹不上精子或精子分布不匀。载玻片可用潮湿的细纱布或海绵沾少许洗涤剂两面均匀轻轻擦拭, 然后用热水烫几下, 再用蒸馏水冲干净。亦可把载玻片置 5 % 稀盐酸中浸泡 1 d 后先用清水冲洗 2 ~ 3 遍, 然后再用蒸馏水冲净, 以

收稿日期: 2019 - 11 - 02

作者简介: 阿秀兰 (1975 - ), 女, 高级畜牧师, 主要从事动物繁殖, E-mail: 529191058@qq.com。

玻片上不挂水珠为标准,擦干备用。

## 2 试剂配置

### 2.1 中性福尔马林固定液的配置

准确称取 0.55 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和 2.25 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  用生理盐水约 50 mL 溶解后加入 8 mL 经  $\text{MgCO}_3$  饱和的  $\text{HCHO}$  (饱和  $\text{HCHO}$  液需静置 1 周后过滤备用) 溶液,再用生理盐水定容至 100 mL。定容时务必注意视线与溶液保持在一条水平线上,不可仰视或俯视。

### 2.2 姬姆萨原液的配置

准确量取甘油、甲醇各 66 mL 备用,取 1 g 姬姆萨染料置于研钵中,加入少量(约 2 mL)甘油充分研磨(可在 56 °C 水浴中研磨,研磨越充分越好,磨至看不见颗粒为止),然后将甘油全部倒入,置于 56 °C 恒温水浴箱中继续溶解 4 h,再加  $\text{CH}_3\text{OH}$  充分混匀过滤密封存于棕色瓶中,两周后使用,存放时间越长染色效果越好。研磨过滤不完全会使染色片背景不匀,呈现颜色偏红的颗粒或团块,从而影响染色效果。

### 2.3 磷酸缓冲液的配置

取 2.55 g 磷酸氢二钠及 0.55 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  用双蒸馏水定容至 100 mL,此液要保持新鲜,若发现有絮状物时不可使用。在实际中,最好现配现用。

### 2.4 姬姆萨染液的配置

取姬姆萨原液 2 份于小烧杯中加入 3 份  $\text{H}_3\text{PO}_4$  缓冲液,再加入 5 份蒸馏水,搅拌均匀,最好现用现配,否则染色效果锐减,一般 10 mL 染液可染 4 个片子。实际操作时,可提前算好需要染多少个片子,再根据 10 mL 染液可染 4 个片子的量现配姬姆萨染液。

## 3 顶体染色方法

### 3.1 取样推片标记

左手平持载玻片两端将所要检测的精液(原精可用 2.9 %  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  液)进行稀释后,轻轻摇匀,在精液中层取 1 滴(约 20  $\mu\text{L}$ )样品,滴在载玻片的一端,距离载玻片的右端 0.5 cm 处,右手大拇指和食指斜持另一边光滑的载玻片(最好是凹玻片),自样品的左侧 0.2 cm 处同时夹住左手所持玻片两边,使两玻片成一夹角,减少夹角度数,样品即可呈条状均匀分布在两玻片之间,调节玻片间的夹角呈 35 °C 左右,右手随即向左平稳地推动玻片,擦去两端多余的精液,便得到薄而均匀的精液涂片。推片时,切不可从精液的右侧向左侧推,以免使精液

造成机械损伤。另取一小滴样品用此法再制一涂片,在涂片背面两端用玻璃记号笔注明批次、牛号、日期。

涂片的厚薄由两玻片间夹角调节,夹角小,涂片厚,反之则薄,可视精液浓度大小而定而确定夹角。一般情况下,薄涂片染色效果优于厚涂片。

### 3.2 风干

一般情况下应采用自然风干,当空气湿度大,温度低时,可置于 37 °C 恒温箱中风干,也可用电吹风的微热风吹干,风干时间越短越好。

### 3.3 固定

用滴管吸取 2 mL 固定液在涂片一端使用固定液缓缓铺满涂片,静置固定 15 min 后弃去固定液,斜持涂片,让清水缓冲涂片一端,使水流带净涂片的固定液,沥一下水,干燥与否对染色效果无影响。

### 3.4 染色

将固定后的涂片平铺(涂面朝下)在带有槽的有机玻璃染色板上,将现配的姬姆萨染液注于槽和涂片之间,使其充满槽,并使涂面确实浸上染液,静染 90 min,此法比染液直接滴于涂面上的染色可以减少染液颗粒在涂面上的沉积,提高染色效果。在冬季切勿使染色板置于冰冷的水泥操作台面上,这样温度太低。适宜的环境温度是 10 ~ 20 °C,染色时间冬季可略长些,夏季可略短些。如同时染数个涂片时,可分数个不同的染色时间,以顶脊清晰可见的时间为宜。

### 3.5 水洗

到一定时间后取出染片即刻冲洗,冲洗方法如前述,水洗可略大些,以冲净染液为度。染色效果好的涂片,初略看是一片干净的玻片,在光亮处细看,玻片有一层均匀的淡红颜色,洗净后立于玻片架中,待干后即可镜检。

## 4 操作过程注意事项

### 4.1 所选载玻片宁薄勿厚

薄玻片在镜检时其图像的分辨率优于厚玻片,且玻片一定要干净无脂。

### 4.2 所推的玻片宁薄勿厚

涂片过厚,风干时间延长,染色效果锐减,有时表层虽干燥,但其深层尚未完全干燥,染色后出现无精片、精子稀少片或涂片上只留下精子脱落后的轮廓。推片时一定要平衡而快捷,一气呵成,切勿抖动、晃动、中途停等和两手指用力不均。

### 4.3 风干时宁干勿潮

在自然风干的同时加一些辅助手段使其快速风

干,对提高染色效果有显著作用。如一味追求快速风干,以缩短风干时间,而在其尚未完全干燥时固定,染色后出现无精片和精子轮廓片。

#### 4.4 固定时间宁长勿短

固定的目的在于:杀死精子以改变其染料的通透性,使其易于着色;使精子能固着于玻片上,不致在染色时被冲洗掉。固定时间略长一些利于染色,不致于发生无精片等情况。固定后的涂片如此时镜检一下,可了解推片、风干、固定的效果,及时发现问题,及时采取补救措施。

#### 4.5 染色时间宁长勿短

染色时间不足,顶脊等结构不明显,时间略长些顶体轮廓厚实、清晰易辨。

#### 4.6 冲洗时水流宁大勿小,时间宁短勿长

在固定确实的涂片一端冲洗(实质是让水滴过涂片而带走染液),水流大一点是带不走已固定的精子和杂质的,只能冲带走附着不牢固的染液而使背景清楚,提高分辨率。冲洗时间过长,染片相当于

在水中浸泡,会影响染片质量。冲洗数秒钟就能把染液带净,关键在于染片离开染液后要尽快冲带尽染液,以达到满意的染色效果。

#### 参考文献:

- [1]杨增明,孙青原,夏国良,等. 生殖生物学[M]. 北京:科学出版社, 2004:425.
- [2]陈大元. 受精生物学:受精机制与生殖工程[M]. 北京:科学出版社, 2000:5.
- [3]石其贤. 精子获能[J]. 浙江省医学院科学院学报,1990(1):60-65.
- [4]王根林. 养牛学[M]. 北京:中国农业出版社, 2000:138.
- [5]王肖克,杨健. 影响家畜冷冻精液质量的因素[J]. 内蒙古畜牧科学, 2002(6):20-21.
- [6]李乃顺. 牛冷冻精液质量检验的方法[J]. 草食动物, 2017(3):59-60.
- [7]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 发布中华人民共和国国家标准 牛冷冻精液[GB4143-2008][S]. 中国国家标准化管理委员会,2008:2,7.
- [8]郑海. 改进姬姆萨氏染色法[J]. 中国兽医杂志, 2005(9):57.