

•604

罗建华 著

不孕症

实验诊断技术
BU•YUN•ZHENG

95
R711.604
1
Z

不孕症实验诊断技术

罗建华 著



3 0092 0806 1

学林出版社



C

185066

(沪)新登字113号

责任编辑：褚大为

封面设计：沈兆荣

不孕症实验诊断技术

罗建华著

学林出版社出版

上海文庙路120号

新华书店上海发行所发行

吴县人民印刷二厂印刷

开本787×1092 1/32 印张9.75 字数205,000

1994年9月第1版1994年9月第1次印刷 印数1—3,600册

ISBN 7-80510-991-5/R·21

定价：8.80元

前 言

自八十年代以来,男、女不育(孕)症的实验诊断技术得到了较快的发展。但由于其方法技术广泛地分布在各种不同的出版物里,这对需查阅参考这方面资料的工作者来说,多感不便。鉴于此,作者潜心致载,试图把有关比较有价值的资料汇集在一本书中,俾能为从事不孕症实验室之工作者及有关临床医师提供方便,利于应用。也可作为不孕患者的常识读物,便于了解有关不孕症的各种实验诊断方法,以更好地配合医务人员对其进行的诊断与治疗。

本书是在参考了大量的公开发表的中、外资料的基础上,经过一定的筛选,结合作者的工作经验及科研成果编写而成的,部分内容曾于1992年6月在我院举办的全国生殖医学学习班上作为讲义印发,这次也作了一些删校。由于作者从事这方面工作的时间不长,水平有限,错处恐属难免,敬请同道教正。

在本书编写过程中,得到了医院领导和妇产科、实验诊断科领导的关怀和支持,还得到了罗时岚同志、李辉媛同志、罗刚同志、戴月娥同志、曹保国同志、黄超同志、李善国同志及朱晓洁同志的大力协助。书稿写完,又承蒙手把手扶着我涉入不孕症诊治领域的我敬爱的老师——上海第二军医大学附属长征医院妇产科主任,我国著名生殖医学专家张令浩教授多处匡正,提出了许多宝贵意见并为本书作序,特此致以深深的谢意!

作者一九九三年二月于上海

序

我院主管技师罗建华同志写就此书，请我作序。我在浏览全书后欣然命笔。

生殖医学是近20年来新发展起来的一门综合性学科，它集解剖学、生物学、生理学、生物化学、药理学、病理学、泌尿科学及妇产科学的知识于一体，以研究人类生殖为己任。对生殖医学领域中的基本课题，如生育的基本条件，不孕的原因与治疗，控制生育的主要环节进行研究。生殖医学的工作对象是人，但为揭示生殖的奥秘，在研究中尚需进行动物试验。在形成动物模型的基础上，对人类生殖中的某些问题，在动物实验中进行探索。

生殖医学随着人类第一个试管婴儿于1978年诞生后，迎来了蓬勃发展的年代。试管婴儿技术在全世界范围内推广。进入九十年代，单以美国为例，每年出生试管婴儿达三~五千人。从试管婴儿技术衍生出来的生殖技术层出不穷。美国礼物GIFT(即输卵管内配子移植)、贴邮票POST(腹腔内卵母细胞与精子移植)、捐卵、增胚、代孕、输卵管内人工授精、宫腔内人工授精、腹腔内人工授精、卵泡内人工授精及阴道内培育试管婴儿，相继成功。可以说，生殖医学从来没有像现在这样蓬勃发展。

我国是世界上人口最多的国家，计划生育是我国最基本的国策。控制人口数量，提高人口质量是党的号召，也是广大群众的呼声。在贯彻一对夫妇生育一个孩子的政策已深入人心、的今天，在实行计划生育已成为广大群众自觉行动的今天，一部分不孕人群的要求与呼声也日益强烈与迫切，约占育龄夫妇5%左右的不孕与不育的问题也日益突出。尤其是不少青年男女响应党和国家的号召，自觉推迟婚龄。而到结婚（他）们发现婚后久不怀孕时，年龄已偏大，成为大龄不孕患者。她（他）们期望早日生育的要求与心情是能理解的。

在为不孕夫妇，尤其是为大龄不孕夫妇诊治工作过程中，物理诊断技术如理学检查、光学检查、超声波检查、造影技术以及腹腔镜检查技术均有重要意义，对不孕原因的判断及治疗的指导均有很大价值。不孕症的诊治中，实验诊断同样具有重要意义。实验诊断技术的不断更新大大地推动了生殖医学的发展。

罗建华主管技师在我院生殖医学工作中贡献良多。为配合生殖医学的开展，先后建立多项检测技术，如用于人工授精的精子提取技术，建立尿黄体生成素快速检测以判断排卵期，从而为腹腔镜检查，为性交后试验、注射促排卵药HCG及实施人工授精提供时间依据，开展宫颈粘液检查即直接与间接性交后试验；开展生殖内分泌激素的酶免疫检测技术等。这些技术的开展有力地配合了我院的生殖医学的开展，使我院在近5年内为数百对夫妇解决了困扰她（他）们多年的不孕，有了可爱的小宝宝，使家庭充满了温馨与和谐。

难能可贵的是罗建华主管技师在繁忙的实验诊断工作中，不断学习与探索，潜心于自己的专业，根据自己的学习

与实践，写出了这本专著，为从事这方面工作的同道提供一本理论联系实际、深入浅出、紧密配合临床工作的有益读物，可喜可贺。罗建华主管技师写成此书，应验了一句老话：有志者事竟成。伴随这本文字的是他顽强的意志，科学地安排时间，见缝插针地收集资料以及孜孜不倦的写作。我愿这本书成为一面镜子，使每一从事具体业务工作的同道，都能从中不但吸取技术经验，更可从中得到技术之外的启示。

张令浩 于1993年12月

（上海第二军医大学附属长征医院妇产科主任、教授）

目 录

前 言

序

第一章 精液概述	1
第二章 精液的物理检查	3
一、精液标本的收集与处理	3
二、肉眼检查	5
三、显微镜下检查	6
第三章 前列腺液的检查	25
一、标本采集	25
二、常规检查	26
三、细胞学检查	28
第四章 精子功能性试验	30
一、无透明带金黄地鼠卵穿透试验	30
二、精子尾部低渗膨胀试验	34
三、显微照相多次曝光测定精子的活力	36
四、精子直线前向运动速度试验	39
五、精子速度试验（计数板法）	41
第五章 精浆的生化检测	43
一、果糖的测定	44
二、精浆乳酸脱氢酶同功酶X（LDH-X）的测定	46
三、精浆肉毒碱的测定	49

四、精子膜 WGA 受体的测定	52
五、精浆 α -1,4 糖苷酶活力的测定	54
六、精浆酸性磷酸酶 (ACP) 的测定	57
七、精浆甘油磷酸胆碱 (GPC) 的测定	59
八、精浆柠檬酸的测定	61
九、不液化精液的体外处理	63
第六章 精子的化学染色检测	65
一、精子顶体染色检测	65
二、精子免疫荧光染色检测	66
三、精子核组蛋白的染色检测	68
第七章 抗精子抗体的检测	72
一、血清中抗精子抗体的检测	73
二、抗精子核抗体的检测	83
三、精子包被抗体的检测	87
第八章 抗透明带抗体的检测	91
一、间接荧光检测法	92
二、酶联免疫吸附 (ELISA) 检测法	93
第九章 精子——宫颈粘液的相互作用	96
一、宫颈粘液标本的采集、贮藏与评分	97
二、精子穿透宫颈粘液试验	98
三、评估宫颈因素不孕之步骤	110
第十章 生殖内分泌激素的测定	111
一、雌激素的测定	111
二、血清孕酮 (P) 的测定 (RIA 法)	128
三、血清睾酮 (T) 的测定 (RIA 法)	134
四、血清绒毛膜促性腺激素 (HCG) 的测定 (RIA 及 EIA 法)	137
五、血清促性腺激素 LH、FSH 的测定 (RIA 及 EIA 法)	142
六、血清泌乳素 (PRL) 的测定 (RIA 及 EIA 法)	149

七、尿中孕二醇的测定(比色法)	154
八、胎盘功能试验——血清胎盘催乳素(HPL)的测定 (RIA法)	157
第十一章 妊娠试验(尿液hCG定性试验)	163
一、单克隆抗体免疫微孔法	164
二、免疫膜式法	165
第十二章 女性生殖道脱落细胞学检查	168
一、标本的采集与制片	168
二、阴道分泌物检查	172
三、正常阴道脱落细胞的形态学特征	178
四、阴道脱落细胞激素水平测定法	180
第十三章 预测排卵日方法介绍	190
一、基础体温(BBT)监测法	193
二、尿液促黄体生成激素(LH)峰值监测法	193
三、B超监测卵泡发育法	197
四、宫颈粘液评分法	198
五、阴道细胞学检查法	201
六、唾液和尿液N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的测定法	203
第十四章 染色体检查	207
一、外周血染色体标本的制备方法	207
二、羊水细胞染色体标本的制备方法	212
三、绒毛细胞染色体标本的制备方法	216
四、人精子染色体标本的制备方法	219
五、人精液细胞染色体直接制备方法(单倍体)	223
六、精子的Y染色质检测	225
第十五章 胎儿成熟度的检查	226
一、卵磷脂与鞘磷脂比值(L/S)测定	226
二、泡沫试验(振荡试验)测定肺磷脂	229

三、羊水中脂肪细胞的检查	232
四、羊水肌酐测定	233
五、羊水磷脂类物质光度测定	235
六、轻叩试验	235
七、羊水荧光偏振度预测胎肺成熟度	236
第十六章 精子分离技术——精液中高活力精子的分离	238
一、精子的上游分离技术	238
二、玻璃纤维过滤分离技术	239
三、密度梯度离心分离技术	240
第十七章 冷冻精子库的建立	242
一、设立冷冻精子库的目的	242
二、精液冷冻的基本原理	244
三、人类精液冷冻贮存的方法及复苏	245
四、冻精的管理	247
五、附表——精液冷冻记录表	247
第十八章 人工授精的基本操作及精液的处理	249
一、配制精子洗涤保养液及获能液	251
二、人工授精的实施	251
第十九章 胎儿性别的早期预测	254
一、绒毛膜细胞X染色质检查法	254
二、绒毛膜细胞染色体分析法	257
三、羊水细胞X染色质检查法	257
四、羊水细胞染色体分析法	259
五、绒毛膜细胞Y染色质检查法	260
六、孕妇外周血Y染色体特异性DNA片段PCR扩增法	261
第二十章 常用试剂的配制	265
一、磷酸缓冲液的配制	265
二、精子改良巴氏(Papanicolaou)染色液	266

三、精子简化巴氏染色液	270
四、精子形态涂片勃一利 (Bryan—Leishmen)	
二氏染色液	271
五、瑞氏 (Wright) 染色液	273
六、改良 Ham's F ₁₀ 培养液	274
七、Tyrode 氏溶液及 Dulbecco 溶液	274
八、吉姆萨 (Giemsa) 染色液	275
九、革兰氏染色液	275
第二十一章 附录	277
附录一 离心转速与相对离心力 (g) 的换算	277
附录二 旋转半径、离心力和每分钟转速速查图	278
附录三 常用元素原子量表	279
附录四 不同浓度的酒精稀释表	281
附录五 常用英汉词汇	282
附录六 主要参考文献	290
附录七 美国伯乐 (BIO-RAO) 公司 部分诊断试剂 与仪器介绍	293

第一章 精液概述

精液是由男性生殖道射出的一种有特殊气味的乳白色液体。精液由精浆和悬浮于精浆中的精子组成。精子产生于睾丸，而精浆是由附睾、精囊、前列腺和尿道球腺等附属腺分泌物组成的混合液。精子的总量约占精液总量的5%。

精液在刚射出的极短的时间内变成凝冻状。正常精液约在离体20分钟~30分钟左右才能液化成米汤样液体，液化以后的精液，精子可在精浆中自由活动，如将精液存放在36.5℃的孵箱中，大部分精子可存活10小时以上。

精子形似蝌蚪，分头、体、尾三部分，平均长度为47~64微米，平均重量约 37×10^{-12} 克。精子头部有顶体，在受精时，顶体可释放出顶体酶作用于卵表面，为精子的穿透开辟道路。精子的基本形态是典型的，但也有各种各样的变态，即使正常之精液中也有一定百分率的畸形精子。精液中除了精子外，也有少量非精子细胞成分。尚若精液中的非精子细胞成分显著增多，则是某些疾病的重要参考指征。

精浆对精子具有保护作用，它既含有可被精子直接利用的能量又能与女性阴道中的酸性分泌物起到缓冲作用，还有利于精子的存活、运动和受精等。由于精浆占射精总量

的95%以上，所以，精液的化学、物理性质主要取决于精浆。精浆含有血浆中发现的许多物质，比如钾、钠、锌离子、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶等。此外，它还包含有一些“特异性物质”，如前列腺素、蛋白酶抑制因子、水解酶、二胺氧化酶、精胺和去能因子等。这些物质都与精子的活力、运动和受精能力有重要的关系。

精液的各种特性，诸如射出精液的量、颜色、稠度、pH、精子密度、活率、活力、精液凝固速度和液化速度、精子凝集反应的表现和类型、异常精子的形态和百分比、非精子细胞成分、生化成分等，都与男性的某些疾病尤其是生殖生理方面的疾病紧相关连。对精液进行物理、化学与免疫等方面的分析，是生殖医学中最具意义的参考指标之一。尤其是在对男性不育症的诊断和治疗方面，用得最多。

第二章 精液的物理检查

一、精液标本的收集与处理

(一) 采集时机

精液的射出是一个非常复杂的生理过程，它受到时间、情绪、环境、身体状况等诸多因素的影响，尤其是情绪的变化，往往会在很大程度上影响精液的采集。一般建议，最好选在精神状态最佳之时采集。对于已婚夫妇，也可由配偶配合采集精液。

在采集精液标本前必须禁欲3~7天左右，其禁欲的时间，随着年龄的增大而要适当延长。根据我们的临床观察，25岁以下者禁欲3天即可，25~35岁之间，应禁欲5天，35岁以上者禁欲7天。当然这个要求也并非绝对的，有的人体质好，其禁欲时间可适当缩短些，体质差者可能还要延长些。

(二) 采集次数

由于精子生成的数目有时变化的范围较大，许多偶然的因素，比如机体酸碱度的变化、体温的变化、生活环境的变化及某些化学物质的影响等，都有可能影响到精子的生成及精子的活力、活率，影响结果真值，所以，进行精液分析，不

能仅凭一次检验就作出判断，一般应间隔1~2周复查一次，如果两次的结果明显不一样，应该再次复查。

（三）采集地点

最好在实验室附近的房间里进行，不然应在1小时内（最好在半小时内）将标本送达实验室。在标本的运送过程中，应尽量做到保温（以18~36.5℃为宜）。否则将会影响精子的活力和活率的正确结果。

（四）采集方法

1. 自己手淫（有条件时或必要时也可借助配偶的帮助）方法采集，将精液射入采集容器中。所用容器，一般是广口玻璃瓶，如用塑料容器，必须经鉴定对精子无毒性作用。为慎重起见，用于人工授精的精液盛器，一般不用塑料的。

2. 对手淫采集有困难者，可使用振子精液引射器或用性生活辅助器采集。

（五）注意事项

1. 避免用性交中断法采集精液，因为此法往往容易失去射精的前一部分，而这一部分精液中，精子的密度最高。此外，样品也可能被阴道的细胞和微生物污染。再是不要使用普通避孕套收集精液，因为它可能干扰精子的存活力。特殊情况必须使用避孕套采集时，应将避孕套反复洗净晾干，精液射出后尽快倒出来。

2. 采集精液的容器最好是温热的（但最高温度不能超过37℃），至少应用手将盛器捂一会，尤其是在冬天。以减少精子冷休克的发生。

3. 检验室接到精液标本时，应立即贴上标签，注明姓

名，采集（离体）时间及禁欲时间等。

4. 每位检验技术人员都应懂得，精液标本可能具有生物性危害，比如含有某些有害病毒（诸如肝炎病毒、衣原体、爱滋病（AIDS）病毒等），应慎重对待。标本检验完后，应妥善处理。

二、肉眼检查

（一）量

测定精液量可用刻度量筒、刻度离心管、刻度注射器、移液管等。正常为2~6毫升。一般来说，节欲时间长者，量要多些，节欲时间短者量要少些。但每次精液量少于1毫升或多于8毫升可视为异常。

（二）色

正常为乳白色或灰白色，如节欲过长可呈淡黄色。若呈鲜红色、暗红色、脓样精液，则示出现炎症或生殖道有病变、损伤等。

（三）稠度

刚射出的精液有高度的粘稠性，放置约20~30分钟后，即自行液化为透明乳白色浆液状。若刚射出时精液粘稠度很低，似米汤状，说明精量少。生殖道有炎症的病人的精液，稠度常低。液化现象如不发生，则可抑制精子活动，影响生育。若在室温25℃ 1小时不液化，则应视为异常。测定精液的粘稠度一般应在射出后的30分钟~60分钟内进行。其方法一种是：将液化后的精液轻轻地从注射针头（ $6\frac{1}{2}^{\circ}$ 针头，内径约为0.8mm）推出，观察精液丝长度。正常标本离开注射