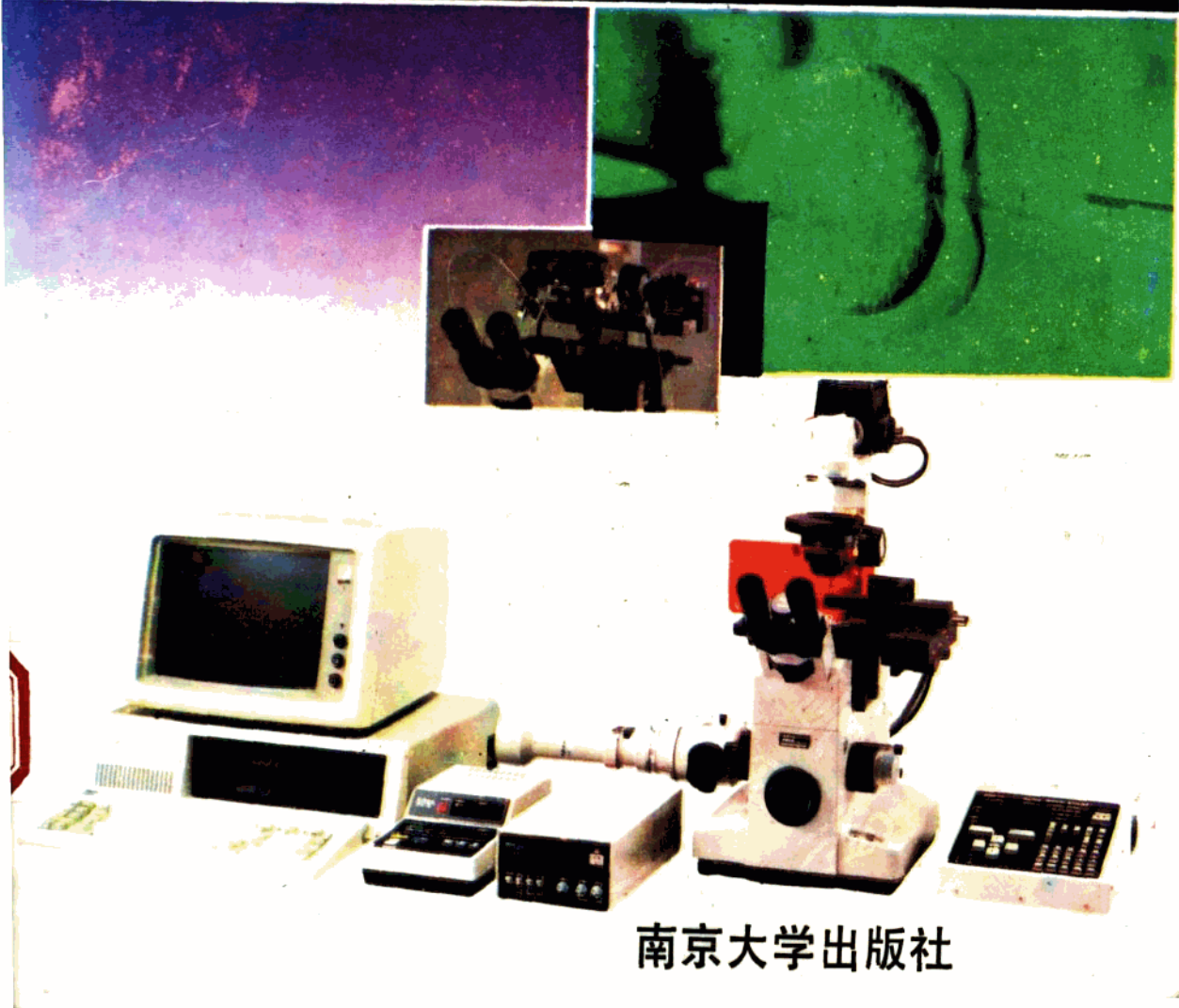


原 著 菅原七郎  
主 译 张志超 徐春生

# 哺乳动物 发育工程实验方法



南京大学出版社

## 序

生物科学领域中的生物工程,被誉为 21 世纪人类发展和繁荣的前沿科学而引人注目,其涉及的复盖面极其广泛。以前人们用生命科学解释自然规律,并且遵循这些规律对生物的有效利用、发育和生产等方面进行了研究。近年来,随着基因操作技术,特别是 DNA 重组技术的深入发展,其内容焕然一新。现在正利用这些技术进行人工操作,使之改造、创造出由人们的设计为目的的生物(生命体),生物科学正朝着这方面进行研究。

所谓生物工程,它包括行政管理、化学、工程、农业、医疗等领域的广泛内容,但从广义的基因作为对象时,其最终目的是为了创造出为人类利用的物质和生命体而导入最适合的基因,并使之表达。不用说,随着生物的对象不同可有各种各样的研究手段,譬如,在微生物和植物领域其代表性的手法就是细胞培养和 DNA 重组技术,但以哺乳动物作为对象的领域来说,是进行人工基因控制和表达技术,现在主要采用发育工程技术(配子操作)。这个领域在日本叫做“发育工程”。“发育工程”这一术语,是日本提出来的,研究对象是用动物初期发育时的卵子和受精卵。进行实验发育工程学的各种各样的操作(处理),以个体发育的基因操作为目的,所以它是对应于细胞工程、基因工程、生物工程而提出来的名称,现在这个名称已基本固定下来了。

哺乳动物的发育工程是以小动物,特别是小鼠的实验发育学研究成果为基础,其目的是将实验发育学技术应用于畜牧学、医学、兽医学、实验动物学等领域。现在发育工程学技术已开始应用于解释和治疗遗传病,制作疾患模型动物、发育品种、创造新品种,繁殖等尖端技术,而且,即使在基础生物学方面,作为将来研究和分析的方法也是不可缺少的。

本书是鉴于上述背景,为大学生、研究生以及有志于该领域的研究者,作为实验入门书而编写的。在内容上,主要以哺乳动物配子操作的基本技术为重点,从设备、器具,试剂的准备到最新的应用技术,本书尽可能示以图解,使读者从总体上能理解具体的实验方法。另外,在本书最后部分还附有各种培养液组成、资料记录表格的样本以及重要术语解释等,汇集而成“资料篇”,便于实验中查考。希望通过本书使读者能对哺乳动物发育工程学的研究领域有深刻了解,并在进行实际的研究方面能得到有效地利用。

菅原七郎

1986 年 9 月

## 译 者 说 明

一、 这本书在编排形式上,根据我国读者习惯,把原著的“术语集”译成“名词解释”,并和书后的“索引”栏目均按我国的汉语拼音字母的顺序排列。书中最后一节“常用缩写生化词汇”,按英文字母顺序排列。

二、 极个别的原著中的外来语,日本国的商品名仍按原文排版。

三、 原著中各章节的参考文献都集中到“资料篇”的后部。读者要查寻参考文献目录,可按某篇某章节到资料篇参考文献栏目(P. 319)中去查找有关的参考文献。文献中的外文,包括日文汉字,不加翻译,以便读者按资料篇中的原文的文献目录去查找文章。

四、 原著中的日本汉字,其字、意与汉文相同的,在译文中改用我国简化字,极少数字,意不同的仍保留日本原字。

五、 原著中有极个别词句的意思,我们在翻译中作了简要解释和修改,并在其后面括号内注明“译注”字样。

六、 资料篇最后的“常用缩写生化词汇”,是在翻译中收集加以整理,把常用的摘出后编排于该篇的,以便参阅。

徐春生

1992年10月

## 目 录

## 第一篇 绪 论

<b>第一章 哺乳动物的精子</b> .....	3		
第一节 引 言.....	3	一、受精前精子 .....	5
第二节 精子的构造和功能.....	3	二、睾丸精子 .....	5
一、精子头部 .....	3	三、附睾精子 .....	6
二、精子尾部 .....	4	四、射出精子 .....	6
三、原生质膜 .....	4	五、雌性生殖道内精子 .....	7
第三节 精子的生存环境和生理.....	5		
<b>第二章 哺乳动物的卵子</b> .....	9		
第一节 引 言.....	9	三、排卵.....	13
第二节 卵子的形态 .....	10	第四节 卵子的构造及其组成 .....	14
一、一般形态(基本构造).....	10	卵子的微细构造和细胞器 .....	14
二、卵子的大小.....	10	第五节 卵子的生理 .....	17
第三节 卵子的形成和排卵 .....	10	一、卵子的物质通透性.....	17
一、卵子形成.....	10	二、卵细胞膜的性质和机能.....	18
二、卵泡的发育(卵子的发育和卵泡 的关系).....	12	三、卵子的代谢.....	18

## 第二篇 基本操作

<b>第一章 配子处理的准备工作</b> .....	21		
第一节 引 言 .....	21	一、无菌操作的必要性.....	21
第二节 处理配子的必须条件 .....	21	二、环境条件的要求.....	21
<b>第二章 处理配子必要的实验室、设备和器具</b> .....	23		
第一节 实验室的功能和构造 .....	23	第二节 实验器具 .....	24
一、更衣室.....	24	一、用于培养室内的器具.....	24
二、洗涤室、实验小动物 解剖及手术室 .....	24	二、用于培养室外的器具.....	26
三、培养准备室.....	24	三、玻璃器具类.....	28
四、培养室.....	24	四、塑料器具类.....	29
		五、其它器具、器材类 .....	29

<b>第三章 实验的准备</b> .....	30
第一节 仪器的检查和调试 .....	30
第二节 器具的洗涤 .....	30
第三节 器具的包装 .....	31
第四节 器具的消毒 .....	32
<b>第四章 器具硅化法</b> .....	35
第一节 设备、器具 .....	35
一、设备 .....	35
二、器具、器材 .....	35
第二节 试剂 .....	35
一、试剂的种类 .....	35
二、试剂的配制 .....	35
第三节 操作方法 .....	35
一、表面皿的硅化 .....	35
二、处理卵子用毛细玻璃吸管的硅化法 .....	36
三、注入用毛细吸管的硅化法 .....	36
四、洗涤和灭菌 .....	36
<b>第五章 培养液配制法和血清处理法</b> .....	37
第一节 引言 .....	37
第二节 无机盐类溶液 .....	37
一、配制盐类溶液必要的器具、器材 .....	37
二、配制方法 .....	37
第三节 粉末培养液 .....	38
一、配制粉末培养液必要的器具、器材 .....	38
二、培养液配制法 .....	38
第四节 液体培养基 .....	39
第五节 特殊培养基 .....	39
第六节 血清 .....	39
一、血清购入和质量鉴定 .....	39
二、血清的灭活 .....	39
三、灭活血清的保存 .....	40
第七节 用于精子、卵子实验的培养基的组成 .....	40

### 第三篇 基本技术篇〔1〕 精子

<b>第一章 精液和精子</b> .....	43
第一节 处理精液的特殊器具和设备 .....	43
一、采取精液用器具和设备 .....	43
二、精液的处理、检查和保存用器材和设备 .....	44
三、其它 .....	45
第二节 采精 .....	45
一、假阴道法 .....	46
二、电采精法 .....	47
第三节 精液的处理 .....	48
一、用于一般性状检查的精液 .....	48
二、用于受精的精液 .....	48
三、用于分析的精液 .....	48
第四节 精液的保存 .....	50
一、家畜精液的液态保存 .....	50
二、家畜精液的冷冻保存 .....	52

<b>第二章 精子实验</b> .....	57
<b>第一节 精子的获能法</b> .....	57
一、自然交配法 .....	57
二、离体子宫内孵育法 .....	58
三、完全合成培养基内法 .....	59
<b>第二节 精子获能判定法</b> .....	60
一、仓鼠精子向去除透明带的 卵子的侵入能 .....	60
二、精子活力评定法 .....	63
<b>第三节 精子的顶体反应(三重染色法)</b> .....	65
一、设备、器具 .....	65
二、试剂 .....	65
三、操作方法 .....	66
 <b>第四篇 基本技术篇〔2〕 卵子</b> 	
<b>第一章 采卵法</b> .....	71
<b>第一节 采卵前的诱导排卵</b> .....	71
一、各实验动物的超数排卵诱导法 .....	71
二、各实验动物诱导排卵法 .....	72
<b>第二节 处理卵子的器具、器材和试剂     的准备</b> .....	73
一、设备、器具 .....	73
二、试剂 .....	74
<b>第三节 采卵方法</b> .....	74
一、输卵管内采卵 .....	74
二、子宫内采卵 .....	78
三、卵泡内采卵 .....	80
<b>第四节 输卵管、子宫内分裂卵的阴道     回收法</b> .....	81
一、设备、器具 .....	82
二、阴道冲洗液 .....	82
三、操作方法 .....	82
四、阴道冲洗采卵示例 .....	85
<b>第五节 牛受精卵的回收</b> .....	86
一、用于牛子宫冲洗的冲卵器种类 和操作方法 .....	87
二、受精卵回收的实际操作方法 .....	88
<b>第二章 卵子的检查法——正常性和发育能力的判定</b> .....	94
<b>第一节 引言</b> .....	94
<b>第二节 判定标准</b> .....	94
<b>第三节 卵子的分类</b> .....	95
<b>第四节 检查卵子时的注意点</b> .....	96
<b>第三章 卵子的保存</b> .....	110
<b>第一节 引言</b> .....	110
<b>第二节 冷冻、解冻方法概要</b> .....	110
一、装置、器具 .....	110
二、冷冻液 .....	111
三、植冰(ice seeding) .....	111
<b>第三节 冷冻、解冻实际操作</b> .....	112
一、小鼠、大鼠 .....	112
二、牛 .....	114
<b>第四节 冷冻操作新技术</b> .....	115
一、甘油十蔗糖法 .....	115
二、Vitrification 法 .....	115
<b>第四章 卵子培养法</b> .....	116

第一节 引言.....	116	一、设备、器具.....	116
第二节 卵子体外培养.....	116	二、试剂.....	117
第三节 Brinster 氏操作方法.....	116	三、培养步骤.....	119
<b>第五章 胚胎移植法</b> .....	121		
第一节 实验小动物的胚胎移植.....	121	二、非手术胚胎移植法.....	132
.....	121	第三节 猪胚胎移植.....	134
一、设备、器具.....	121	一、设备、器具.....	134
二、试剂.....	122	二、试剂.....	135
三、操作方法.....	123	三、操作方法.....	135
第二节 草食家畜胚胎移植.....	127		
一、手术胚胎移植法.....	127		
<b>第六章 卵子核相判定法</b> .....	140		
第一节 引言.....	140	一、装置、器具.....	140
第二节 卵子全形封片法判断核相.....	140	二、试剂.....	140
.....	140	三、操作方法.....	141
<b>第七章 免疫手术法——内细胞团分离法</b> .....	143		
第一节 引言.....	143	二、试剂.....	146
第二节 抗体制作方法.....	143	三、操作方法.....	146
一、装置、器具.....	143	四、说明.....	148
二、试剂.....	143	第四节 免疫手术法	
三、动物.....	144	(内细胞团分离法).....	148
四、操作方法.....	144	一、装置、器具.....	148
第三节 抗体效价测定法.....	146	二、试剂.....	148
一、装置、器具.....	146	三、操作方法.....	148
<b>第八章 卵子组织学</b> .....	152		
第一节 引言.....	152	一、透射式电子显微镜标本制作.....	157
第二节 光学显微镜标本制作法.....	152	.....	157
一、一般组织标本.....	152	二、扫描电子显微镜标本制作.....	159
二、组织化学标本.....	153	.....	159
三、免疫组织化学标本.....	156	三、电子显微镜组织化学标本制作.....	160
第三节 电子显微镜标本制作法.....	157	.....	160

## 第五篇 应用技术

<b>第一章 卵子体外成熟</b> .....	165		
第一节 引 言.....	165	四、 动物 .....	166
第二节 小鼠卵子的体外成熟.....	165	五、 培养方法 .....	166
一、 装置、器具.....	165	六、 卵子的检查 .....	167
二、 试剂 .....	166	七、 结果 .....	168
三、 培养基配制 .....	166	八、 存在问题 .....	168
<b>第二章 体外受精法</b> .....	169		
第一节 实验小动物.....	169	第二节 家畜.....	172
一、 装置、器具.....	169	一、 引言 .....	172
二、 培养基 .....	169	二、 体外受精用成熟卵子的准备.....	172
三、 体外受精步骤 .....	170	三、 获得受精能精子的准备 .....	176
四、 检查 .....	171	四、 卵子体外受精及其后的发育培	177
五、 体外胚胎的培养 .....	171	养.....	177
六、 体外胚胎的移植 .....	171	五、 卵子的标本制作法 .....	179
七、 小鼠以外实验动物的体外受精	172		
.....	172		
<b>第三章 胚胎分割生产双生仔</b> .....	181		
第一节 引 言.....	181	二、 试剂 .....	182
第二节 分割的胚胎在活体内培养法	181	三、 操作方法 .....	182
.....	181	第三节 胚胎分割法.....	184
一、 装置、器具.....	181		
<b>第四章 卵子聚合法制作嵌合体胚胎和个体</b> .....	187		
第一节 引 言.....	187	二、 试剂 .....	187
第二节 人工嵌合体动物的制作法 .....	187	三、 动物 .....	188
.....	187	四、 操作方法 .....	188
一、 装置、器具.....	187		
<b>第五章 多倍体胚胎制作法</b> .....	191		
第一节 引 言.....	191	二、 试剂 .....	192
第二节 二倍体单性发育胚及体外	191	三、 动物 .....	192
受精法制三倍体胚胎法.....	191	四、 操作方法 .....	192
一、 设备、器具.....	191	第三节 卵裂球电融合法制作多倍体	



.....	196	二、试剂 .....	197
一、设备、器具 .....	196	三、操作方法 .....	197
<b>第六章 利用 H-Y 抗体进行胚胎性别鉴别 .....</b>	<b>200</b>		
第一节 引 言 .....	200	一、装置、器具 .....	203
第二节 大鼠 H-Y 抗体的制作		二、试剂 .....	203
和部分精制法 .....	200	三、操作方法 .....	203
一、设备、器具 .....	200	第四节 H-Y 抗体鉴别胚胎性别的操	
二、试剂 .....	201	作法 .....	205
三、操作方法 .....	202	一、设备、器具 .....	205
第三节 H-Y 抗体效价的尾上皮细胞		二、试剂 .....	205
的细胞损害检查法 .....	202	三、操作方法 .....	206
<b>第七章 染色体解析和基因表达机构的分析 .....</b>	<b>208</b>		
第一节 引 言 .....	208	三、操作方法 .....	209
第二节 染色体解析 .....	208	第三节 X 染色体的活性变化 .....	214
一、设备、器具 .....	208	一、细胞遗传学方法 .....	214
二、试剂 .....	208	二、生物化学方法 .....	216
<b>第八章 卵子显微注入法 .....</b>	<b>218</b>		
第一节 引 言 .....	218	四、注入操作法 .....	222
第二节 显微注入法的基本事项 .....	218	五、处理卵子的培养 .....	224
第三节 显微注入法的实践 .....	218	六、处理卵子的移植 .....	224
一、设备、器具 .....	218	例 1. 将牛精子头部向体外成熟卵的	
二、试剂 .....	220	注入法 .....	225
三、器具的制作和调试 .....	220	例 2. 牛卵原核显微注入法 .....	225
<b>第九章 外源基因导入的基本操作法 .....</b>	<b>227</b>		
第一节 研究现状 .....	227	二、试剂和酶类 .....	233
第二节 mRNA 的分离法 .....	228	三、操作方法 .....	234
一、设备、器具 .....	229	第四节 mRNA 和 cDNA	
二、试剂 .....	229	克隆的 <sup>32</sup> P 标记法 .....	238
三、操作方法 .....	230	一、mRNA <sup>32</sup> P-标记法 .....	239
第三节 cDNA 的合成和纯株培养 .....	232	二、cDNA 克隆切口转译的 <sup>32</sup> P-标记	
一、设备、器具 .....	233	法 .....	240
		第五节 基因文库的筛选 .....	241
用重组 DNA 实验制作导入重组分子的动物个时的物理性封锁方法的见解 .....	242		

<b>第十章 发育机制解析法</b> .....	243		
第一节 引 言.....	243	一、 设备、器具.....	243
第二节 细胞的排列和分化解析法 .....	243	二、 试剂 .....	243
.....	243	三、 操作方法 .....	244
<b>第十一章 药效试验的应用</b> .....	247		
第一节 引 言.....	247	二、 试剂 .....	248
第二节 染色体标本制作方法.....	248	三、 操作方法 .....	249
一、 设备、器具.....	248		
<b>第六篇 资料篇</b>			
<b>第一章 用于精子、卵子实验的各种溶液、培养液的组成</b> .....	257		
第一节 一览表.....	257	四、 卵子发育培养基 .....	258
一、 用于精子的各种溶液 .....	257	五、 用于细胞培养的溶液 .....	258
二、 用于卵子的各种溶液 .....	257	第二节 各种溶液、培养液的组成.....	259
三、 精子受精能获得培养基 和受精培养基.....	257		
<b>第二章 特殊试剂、药物、器材、器具的购置地址</b> .....	273		
<b>第三章 精子、卵子资料</b> .....	276		
第一节 一览表.....	276	二、 副性腺分泌液的化学成分.....	287
第二节 一览表内容.....	277		
一、 性机能资料 .....	282	三、 精液和精子资料 .....	287
		四、 卵子资料 .....	290
<b>第四章 名词解释</b> .....	299		
<b>第五章 其 他</b> .....	312		
一、 离心机的半径、离心力、旋转速度一览表 .....	312		
二、 各种资料记录表格 .....	313		
三、 处理哺乳动物配子最低限度的设施、设备、器材和器具类 .....	317		
四、 实验动物处理方法参考书 .....	318		
<b>参 考 文 献</b> .....	319		
<b>索 引</b> .....	328		
<b>常用缩写生化词汇</b> .....	337		
<b>跋</b> .....	339		

# 第一篇 绪 论



## 第一章 哺乳动物的精子

### 第一节 引言

精子为雄性动物的配子,并具有受精能力和运动能力,上述两种机能是精子进入卵子完成受精所不可缺少的。在睾丸的曲精细管内形成的精子,呈游离的细胞群,并通过生殖系统细长管道,经射精排出体外。睾丸内精子形成的天数随动物种类而异,但哺乳动物天数大致为 35~75 天(Monesi, 1972)。主要家畜牛和绵羊分别为 55 天和 50 天。所以,一般认为到射精至少需要两个月。

精子中确实有些精子在射精前已被破坏或是无用而被排出。对牛而言,产生的精子约有半数是以此种方式丢失。但在牛射出的精液中,仍可达百亿个精子。其中,由于发生受精作用精子只不过一个而已,所以其它的精子不起生殖细胞的作用大多在雌性生殖道内被破坏而消失。在雌性生殖道内,子宫颈与子宫输卵管连接部是阻止精子上行的关卡。例如,即使给家兔注入 1000 万—2000 万个精子,能到达输卵管的精子也不过 5000 个左右。雌性哺乳动物每个性周期排卵数不过一至数十个而已。但雄性动物为了使其受精,实际上排出的精子数为卵子数的 10 亿倍以上。

### 第二节 精子的构造和功能

精子的形态特征,是在精子形成的过程中慢慢形成的。此过程中,精子细胞的构造发

生显著的变化,核染色质浓缩,细胞质成分逐渐消失。作为精子所特有的构造顶体(acrosome)和尾部分别由高尔基体和中心粒形成,中段被线粒体鞘(mitochondrial Sheath)所围绕。发育成熟的精子的构造,大致可分为头部和尾部(图 1-1-1),头部相当于细胞核的部分,其前半部被顶体呈帽状复盖,尾部可分为颈段、中段、主段以及末段。中段是线粒体鞘呈螺旋状排列包围的尾部构造。按其机能划分,往往可将精子分为头部、中部和尾部。现将精子各部分的构造及机能方面的特征叙述如下。

#### 一、精子头部

头部的形态随动物种类而异,而家畜的精子一般呈平滑的卵圆形,人的精子呈平滑

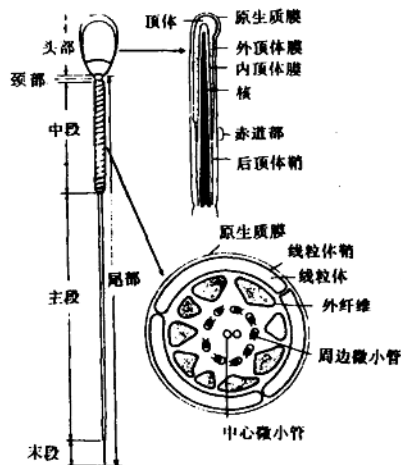


图 1-1-1 精子的构造(正木,1982)

的西洋梨状。牛的精子长  $8\mu\text{m}$ ，宽  $4\mu\text{m}$  左右，人的精子长  $5\mu\text{m}$ ，宽  $2.5\mu\text{m}$  左右。与此相反，小鼠(小白鼠)、大鼠(大白鼠)、仓鼠的精子则呈镰形。构成头部主体的核，是参与受精最重要部分，含有体细胞半数的 DNA。这种 DNA 和碱性蛋白质结合，形成脱氧核糖核蛋白。

顶体是复盖核的前半部的部分，在雄性生殖道内的精子和射出的精子呈完整状态，而引起顶体反应即将受精的精子其顶体破坏并消失，发现在其中含有磷脂质、糖蛋白复合体和溶酶体中的酶系统。在顶体酶系中，有精虫头粒蛋白(acrosin)和透明质酸酶。精子头粒蛋白是胰蛋白酶样的蛋白分解酶，能局部性地溶解卵子的透明带，有为精子进入卵子开辟前进道路的作用。雄性动物体内的精子与即将射出的精子，以非活性的状态存在，在雌性动物生殖道内或即将受精前而被激活。受精前精子的顶体反应，其目的主要是释放精子头粒蛋白。与精子头粒蛋白相比，透明质酸酶是一种容易渗出细胞外的酶，其作用是溶解附着于卵子的卵丘细胞群的透明质酸结合部，使细胞离散，从而有助于精子接近卵子。顶体的后缘称赤道部或称赤道节，为原生质膜所复盖，顶体反应后仍然残存。据观察，通过透明带的精子进入卵细胞质内时，最先接触的就是这个部位。

## 二、精子尾部

精子尾部的长度与动物的体长无关，人的精子长约  $50\mu\text{m}$ (其中，中段  $5\sim 7\mu\text{m}$ )。家畜精子长度多在  $50\sim 70\mu\text{m}$ ，而啮齿类动物精子长达  $150\sim 250\mu\text{m}$ 。

尾部是与精子运动有关的部分，并存在与其运动相关的构造和成分。在尾的内部，有数组轴丝呈规则，整齐地排列。亦即用电子显微镜观察尾部的横断面，在中心部有一对微小管，在它的周围有 9 组微小管呈圆周排列，这 9 组微小管称周边微小管。2 根微小管构

成一组亚纤维。从其中 1 根伸出 2 只臂。在周边微小管的外周，有 9 根不定形的电子密度高的外致密纤维纵向通过。这种轴丝的构造以“ $9+2$ ”或“ $9+9+2$ ”表达。在哺乳动物的精子，中段和主段呈“ $9+9+2$ ”，末段呈“ $9+2$ ”构造。在微小管中，发现有与肌肉的肌动蛋白-肌球蛋白系统不相同的收缩性蛋白质。亦即精子尾部的鞭毛与纤毛虫的纤毛运动相同，是借助微管蛋白-纤毛蛋白系统的蛋白质推进的(毛利, 1979)。微管蛋白存在于微小管中，在亚纤维性臂中则含有纤毛蛋白。并认为纤毛蛋白具有 ATP 酶活性，有把化学能转变为运动能的作用。现已知道，精子的尾部运动不是微管的收缩作用引起，而是由纤毛蛋白“臂”的滑动作用产生的。

中段由线粒体鞘呈螺旋状包围的外致密纤维组成。螺旋的旋回数在人和牛的精子只有  $10\sim 12$  转，但啮齿类动物的精子旋回数较多，小鼠精子约 90 转，大鼠多达 350 转左右。在线粒体中含有用于产生精子运动能量的基质和有关物质。

精子通过呼吸和糖酵解进行物质代谢，从而获得生存和运动的能量，与精子的运动有关的物质中，同 ATP 相关的环化腺苷酸(cAMP)的作用特别引人注目(Mann & Lutwak-Mann, 1981)。

## 三、原生质膜

原生质膜是复盖整个精子头部和尾部的连续的细胞膜，其构造和一般细胞膜基本相同，其表面为带电荷的多糖-蛋白质复合物(glycocalyx)，膜基质由脂质和蛋白质构成。脂质主要是磷脂。原生质膜和细胞外液接触，是调节物质进出的重要部分。特别是精子生存环境要经历体内体外的剧烈变化，因此质膜的作用显得更为重要。对精液原液进行冷休克和冷冻解冻等处理时，如原生质膜产生损伤，则精子成份漏出，就失去其细胞机能。

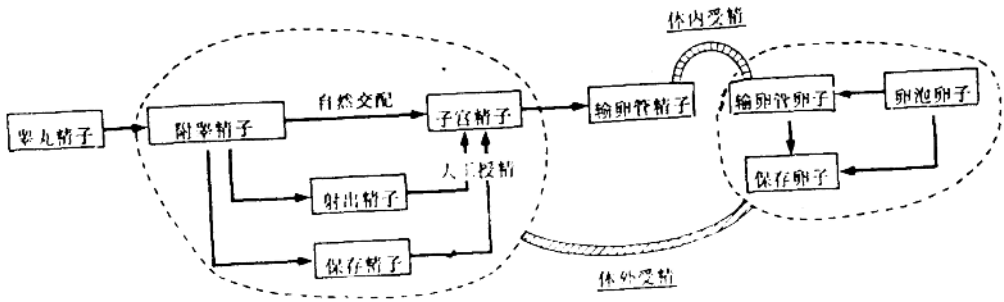


图 1-1-2 哺乳动物精子和卵子的关系

### 第三节 精子的生存环境和生理

#### 一、受精前精子

哺乳动物的生殖本来是自然交配和体内受精,但现在,包括家畜在内大多数动物采用人工授精,并且已试验进行体外受精。就精子而言,有用人工方法从活体采取射出的精子或从附睾尾直接采取精子的方法,然后用人工授精输入雌性动物体内或供体外受精(图 1-1-2)。

下面论述精子从睾丸内出现至受精的环境推移和生理变化。

#### 二、睾丸精子

在成熟动物的精细管内,通过精原细胞产生大量的睾丸精子,9~14月龄的家兔一日产生的精子数为  $147 \times 10^6$ ,但至射精时约失去 55% 的精子(Orgebin-Crist, 1968)。各种哺乳动物一日最高射精数如表 1-1-1 所示,但产生的精子数远远地超出这个数字。

精子形成过程中脱离的细胞质,成为残余小体(residual body)被足细胞消化。但是,一部分细胞质形成小滴附着在精子的颈部。

刚形成的独立的精子生存于曲精细管内,里面充满了足细胞的分泌液。曲精细管液

的性质与血浆和淋巴细胞的性质有显著差异(Setchell, 1982)。含量与血浆比:高钾、低钠、低蛋白、低糖,但肌醇和谷氨酸显著高。而且,发现存在雄激素载体蛋白质(ABP)和精子头粒蛋白的抑制素。精子沿着曲精细管向睾丸网运送,其电解质浓度和血浆大致相同。睾丸网液中精子浓度,绵羊约为  $1 \times 10^8/ml$  (约为射出精液浓度的 1/3)。因睾丸精子的受精能力和运动能力尚未成熟,而没有前进运动的表现。但根据体外观察,发现呼吸能力和糖酵解能力明显,认为细胞外基质有被利用的

表 1-1-1 哺乳动物每日射出精子数  
(Mann & Lutwak-Mann, 1981)

动物	每日射出精子数( $\times 10^6$ )	报告者
人	500	Zimmerman 等. (1965)
牛	5828	Hahn 等. (1969)
绵羊	5500	Ortavant (1958)
马	7000	Gebauer 等.
猪	14520	Swierstra (1968)
	5670	Wierzbowski & Wierzos (1969)
家兔	88	Desjardins 等. (1965)
	97	Amann (1966)

可能。但在睾丸内,细胞外液中几乎没有葡萄糖和果糖等能源性物质。实际上,因为精子本身也几乎不能进行运动,为生存进行的代谢活性极低。另一方面,因为睾丸精子的磷脂含

量比射出的精子多,所以表明磷脂可能作为内因性呼吸基质而被利用。

### 三、附睾精子

睾丸精子浮游在睾丸液内,通过睾丸输出管的纤毛运动和管壁平滑肌的收缩运动输送至附睾。附睾由头、体和尾三部分组成。作为精子通路的附睾管,在人全长约 20 米,牛约 40 米。精子通过附睾的天数,受射精次数的影响而有所变化,但一般在数天到十天左右。这个部位的精子移动也主要是由管壁平滑肌的收缩运动而产生。在此过程中,精子的受精能力和运动能力的成熟度增加,已经能看到到达附睾尾部的精子和射出的精子机能大体相同。随着精子成熟的变化,也表现在形态和细胞的性质方面。作为形态方面的变化,知道较多的是细胞质小滴的移动。这种小滴含有从高尔基体产生的酶,随着精子通过附睾,从颈部渐渐移动至中段的末端,精子射出时脱落。在物理和化学性质方面的变化表现为精子因脱水比重增加,核的 DNA-蛋白复合体性质的变化,磷脂质的减少等。与精子运动的能力有关方面,表现为从附睾分泌的诱发精子向前运动的蛋白质的附着 (Acott & Hoskins, 1978) 以及精子内 cAMP 的蓄积 (Hoskins & Casillas, 1975) 等。例如,牛的附睾精子从头部向尾移行期间, cAMP 的蓄积量增加一倍。

附睾也是贮存精子的场所,到达附睾尾部的精子长期贮留而不失去受精能力和活力。但是,为了每日输送睾丸产生的精子,剩余精子和老化精子在包括输精管的生殖道内被分解,或被排出使之净化。一般认为附睾内的精子与成熟程度无关,几乎呈静止状态,精子的物质代谢即使在活体内也不活泼。在附睾液中同睾丸液一样,几乎不含精子能利用的葡萄糖和果糖。所以能量的产生主要利用细胞内基质,磷脂则作为辅助能源。

在附睾为了选择性地吸收水分和离子,附睾尾部的精子浓度显著增高,  $K^+/Na^+$  也比睾丸液中高得多。另一方面,附睾能分泌其它部位未查到的高浓度的甘油磷酸胆碱 (GPC) 和肉毒碱,为精子生存提供特异性环境,在这种条件下,附睾尾部贮留的精子受精能力和活力能保持数周 (雌性生殖道内通常为 1~2 天)。附睾的这些机能,受睾丸雄激素的调节。

### 四、射出精子

附睾尾部贮留的精子,射精时与副性腺分泌液混合而排出体外,作为射出精子介质的精浆,它和睾丸液及附睾液的组成不同,并且通常含有血液中不常见的成分 (表 I-1-2)。作为代表性成分有果糖、柠檬酸、山梨糖醇、肌醇、GPC 等,并有血液中相同的成分,

表 I-1-2 牛睾丸液、附睾液、精浆、血浆的化学成份比较 (Mann & Lutwak-Mann, 1981)

成份 (mg/100ml)	睾丸液	附睾液	精浆	血浆
Na	306	145	259	318
K	35	120	172	17
Ca	2	1	37	8
Mg	1	3	8	2
Cl	434	280	371	331
无机磷	0.1	2	8	7
GPC	9	585	182	
蛋白质	210	3400	5500	8997
葡萄糖	微量	微量	10	83
果糖		7	550	微量
乳酸	16	30	35	13
谷氨酸	20	17	3	7
尿素	35	35	34	36
渗透压 (mOsm/kg)	281	281	281	281

例如甾类激素、肽激素、前列腺素等各种酶。它们大部分是从精囊腺、前列腺、尿道球腺、附睾和输精管膨大部分分泌的。各副生殖腺液在精浆中所占的比例,对人而言,精囊腺液占 60%,前列腺液占 30%。家畜一般以精囊腺的分泌液为主,由于狗、猫没有精囊腺,所以前列腺液占大部分,也有一部分精浆成分



来自于精子。

精浆的化学成分在动物种间有显著差异,而且个体差异也很大。精浆能满足精子生理必须的物理条件。在精浆中刚射精后的精子活跃,向前运动。精浆中的果糖是精子糖酵解基质的重要成分,但山梨糖醇和乳酸等也能被利用产生能量。精浆的蛋白质可影响精子膜的性质,或是削弱对冷休克的抵抗性,或是改变膜的电荷,而且,一般认为在精浆中存在去能因子(decapacitation factor,即DF),附着去能因子的精子,除非通过获得受精能(Capacitation)除去它,否则就不能参与受精。

表1-1-3是精子成熟过程以及同精浆接触后引起精子质膜性质变化的概要情况(Yanagimachi,1981)。

表1-1-3 精子质膜的性质变化

精子成熟过程	抗原的吸附(睾丸、附睾、输精管) 表面电荷变化(睾丸、附睾) 膜内颗粒分布变化(附睾) 脂质构成的变化(睾丸) 肉碱、乙酰肉碱、GPC、脂质的吸附(附睾) 表面ATP酶活性变化(附睾) 表面SH基减少(附睾)
射精后	含DF的巨大分子,ABO血型物质等的吸附表面电荷变化 外源凝集结合部位变化 细胞外物质吸附能力的下降 精浆成分的暴露

精子在体外长期保存时,必须用培养基代替精浆作人工保存液(精液稀释液)。为此,需要用精液稀释液对原精液进行稀释,精液稀释液要保持同精浆相同的pH,渗透压和缓冲作用。而且必须含有保护精子膜所必需的卵黄等脂蛋白成分,并须添加抗生素。除以上各点外,作冷冻保存时,还须加入防止细胞冷冻损害的保护剂(甘油等)。长期保存时,把稀释精液置于 $-196^{\circ}\text{C}$ 的超低温下,使精子的代谢几乎处于停止状态。

## 五、雌性生殖道内精子

注入或是射精而进入雌性生殖道内的精子,在雄性生殖道内及体外保存时,代谢能是被抑制的,进入雌性生殖道,在短时间内仍处于不能充分发挥其代谢能的境地。亦即与附睾尾部内相比,精子浓度变稀,环境温度上升,并利用存在于细胞内外的物质产生能量。但是,精子到达受精部位的移动,几乎是靠雌性生殖系统的收缩运动来进行的。

自然交配时,精液排出至阴道(人、猴、牛、绵羊、兔等)或子宫(马、猪、犬、小鼠、大鼠等)。在阴道内射精的动物,精子最初的任务是通过子宫颈,子宫分泌的粘液,在雄激素的控制下,成水样性物质而使精子容易输送。精子通过子宫颈,除阴道壁和子宫颈壁的肌肉运动外,还与精子的自身运动有关。子宫颈内存在许多腺窝。暂时潜入腺窝内的精子,由于避免了白细胞的吞噬作用,从而延长了保持受精能力的时间。

子宫分泌液含有包括葡萄糖等可被精子利用的物质。但是,从白细胞的吞噬作用开始比较早这点来看,认为参与受精的精子能在比较短的滞留时间内通过子宫,到达输卵管(Harper,1982)。精子向输卵管内的移动主要是靠子宫平滑肌的收缩,此机制可能和脑下垂体后叶的催产素以及精浆中的前列腺素有关。

子宫和输卵管接合部,除在发情及卵子在子宫内下降时外,几乎处于闭锁状态。精子到达输卵管的时间,快的在受精后数分钟。到达输卵管上部受精部位的精子,由于“受精能获得”,其尾部表现特有的激烈振动。“受精能获得”为精子进入卵子前必须进行的过程。除以子宫、输卵管为主的雌性生殖道外,即使在体外条件下亦能诱发此过程。“受精能获得”的机制很复杂,似乎与 $\text{Ca}^{++}$ 的通透性增加,膜性质的变化,cAMP的增加,顶体的原精子