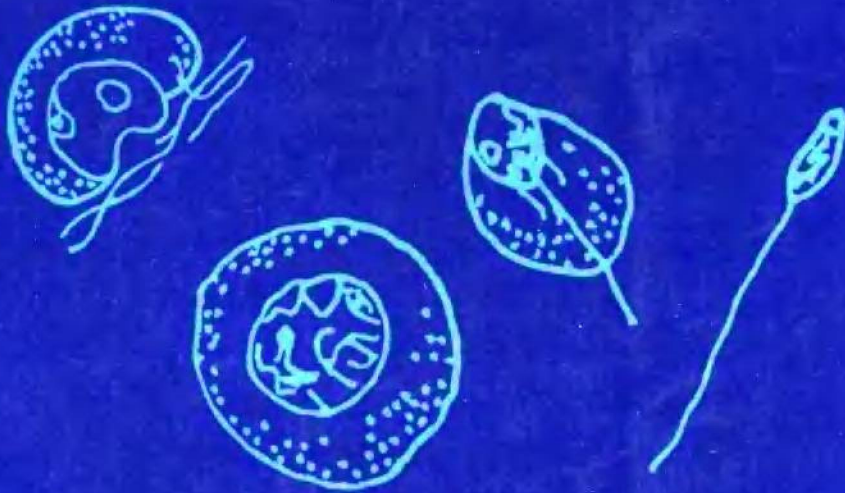


# 精子检测与分离

张秀成 编著



5.1

北京科学技术出版社

R441  
Z

# 精子检测与分离

张秀成 编著

1997.12



A0002681

北京科学技术出版社

(京)新登字207号

**精子检测与分离**

张秀成 编著

北京科学技术出版社出版

(北京西直门南大街16号)

邮政编码 100035

---

全国各地新华书店经销

一二〇一工厂印刷

\*

787×1092毫米 16开本 14.75印张 368千字 插图1页

1993年1月第一版 1993年1月第一次印刷

印数1—2000册

---

ISBN 7-5304-1181-0/R·191 定价: 11.40元

## 序

---

男性学是近年发展的一门新兴学科，已成为现代医学的重要组成部分。特别是有关精子的发育生成、形态、数量、功能、遗传和精液的生物化学、免疫学、病理学特征的研究及其检测手段发展极为迅速。我国对男性学的研究与技术先进国家比较，起步较晚，国内对男性学的研究文献与专著很少。为推动我国男性学的进步以及对精液、精子检测技术的普及与提高，作者将多年所收集的国内外文献与最新技术成果，结合日常实验工作及研究经验，编著了《精子检测与分离》一书。其中着重对精子的生成与发育、生理功能与病理、精液的分析、精子形态学与染色技术、精液的生物化学检测、酶学检测、免疫学检测、精液的细菌学检验以及精子的优选技术、精子的冷冻技术、XY精子分离技术等做了较详细、科学的论述。尤其是对精子的各种测试手段选用了技术先进、简便实用、灵敏可靠、易于掌握且城乡皆宜的方法，可供实验研究和日常临床检验应用。

本书可供男性学研究人员、基础医学教学人员、临床医护人员、医院检验技术人员参考。另外，对从事畜牧兽医、珍奇动物饲养繁殖的人员也很有参考价值。

姜永新

1991年4月

于北京中日友好医院

## 前 言

---

近几十年来，生殖医学有了突飞猛进的发展，人们对精子结构与功能已经有了相当深入的了解。然而，这一学科在临床发展中起步较晚，有关男性疾病，包括男性不育症的病因学、实验诊断学等近些年才开始受到重视。在我国，这方面的工作才刚刚起步，迄今临床检查大多还只限于精液常规分析。精液的临床生化、免疫等检测手段和分析方法，尚未得到普遍应用。近年来随着男性学的崛起，男性不育的诊治和人工授精技术已取得了可喜的进展，有关精子质量与功能变化的检测已成为临床工作必不可少的检查项目。精子检测技术日益受到从事男性学、泌尿外科、妇产科临床医生以及广大检验人员的关注。但目前国内尚缺乏全面介绍精子检测与临床应用的资料以资借鉴，这促使作者着手收集近年来国内外期刊发表的精子检测新技术和方法的有关文献和研究成果，同时结合作者多年从事临床与实验研究工作所积累的经验编著成《精子检测与分离》一书。

本书内容包括精子功能检测、生化检测、酶学检测、微量元素检测、免疫学检测、精子表面标志的检测、精液过氧化脂质检测以及杀精效能检测等，并且较详尽地叙述了精子冷冻贮存、人工授精前精子优选和X、Y精子分离等先进技术，较全面地反映了人类精子检测分离这一领域近年的进展与最新研究成果。因而可作为临床检验人员、医生、人类生殖基础（如生殖生理、生殖免疫、男性计划生育等学科）研究、教学人员和法医学工作者的参考资料。书中涉及到的许多精子检查的方法与技术，相信对从事畜牧业以及珍奇动物的繁殖与保护的工作者也有裨益。

此书着重介绍简便、可靠且易于掌握的测试方法，所用化学试剂多为国产。所介绍的测试方法力求先进、实用，尽力将精子检测技术及其分离手段较全面地推荐给广大读者。由于作者经验不足，该书的内容还有待丰富和完善，恳望同道及读者们赐教。

张秀成

1990年3月于沈阳

1991年12月定稿于香港

# 目 录

---

<b>第一章 精子发生概论</b> .....	(1)
一、睾丸的形成 .....	(1)
二、睾丸构造与功能 .....	(2)
三、生精上皮的形成与分化 .....	(4)
四、生精上皮的构造与功能 .....	(5)
五、精子的生成过程 .....	(9)
六、精子的形成 .....	(10)
七、精子发生的内分泌调节 .....	(11)
八、精子的成熟 .....	(14)
九、精子成熟过程中形态与功能的变化 .....	(16)
十、精子的运行、获能与受精 .....	(17)
<b>第二章 精液分析</b> .....	(20)
一、概 述 .....	(20)
二、精液常规检查 .....	(21)
(一)精液标本的采集 .....	(21)
(二)精液标本采集的次数 .....	(21)
(三)精液一般性状的检测 .....	(22)
(四)精子密度及活力的检测 .....	(23)
(五)精子细胞形态学检查 .....	(26)
(六)精液的其他成分 .....	(28)
(七)精子的凝集 .....	(28)
三、常见精液的病理变化 .....	(29)
(一)精液量过少 .....	(29)
(二)无精与少精 .....	(30)
(三)弱精与死精 .....	(30)
(四)脓精与血精 .....	(30)

四、精液检查发生错误的常见原因 .....	(30)
<b>第三章 精子染色技术 .....</b>	<b>(32)</b>
一、概述 .....	(32)
二、普通染色 .....	(33)
(一)吉姆萨染色 .....	(33)
(二)革兰氏染色 .....	(34)
(三)改良巴氏染色 .....	(35)
(四)勃-利二氏染色 .....	(36)
三、活体染色 .....	(37)
(一)伊红染色 .....	(37)
(二)伊红-苯胺黑染色 .....	(38)
四、精子双链DNA染色 .....	(38)
五、精子顶体染色 .....	(39)
六、精液白细胞染色 .....	(40)
(一)正甲苯胺蓝过氧化物酶法 .....	(40)
(二)联苯胺法 .....	(41)
(三)邻甲苯胺法 .....	(41)
<b>第四章 精浆生化的检测 .....</b>	<b>(43)</b>
一、概述 .....	(43)
二、精浆果糖测定 .....	(44)
(一)果糖定性测定 .....	(44)
(二)果糖定量测定 .....	(45)
三、精浆肉毒碱测定 .....	(48)
四、精浆柠檬酸测定 .....	(49)
五、精浆甘油磷酸胆碱测定 .....	(50)
六、精液环腺苷酸测定 .....	(51)
七、精液三磷酸腺苷测定 .....	(53)
八、精浆C反应蛋白测定 .....	(54)
九、精浆白蛋白测定 .....	(56)
十、精浆转铁蛋白测定 .....	(57)
十一、精浆纤维连结蛋白测定 .....	(59)

<b>第五章 精液酶类的检测</b> .....	(61)
一、概 述 .....	(61)
二、精浆乳酸脱氢酶-X同功酶测定.....	(62)
(一)电泳法 .....	(62)
(二)比色法 .....	(63)
(三)间接免疫荧光法.....	(64)
(四)ABC免疫组织化学法 .....	(65)
(五)BA-ELISA法.....	(66)
三、精浆 $\alpha$ -抗胰蛋白酶测定.....	(67)
四、精浆酸性磷酸酶测定.....	(68)
五、精液顶体酶活力测定 .....	(68)
六、精液糖苷酶活力测定 .....	(70)
七、精子透明质酸酶活性测定 .....	(71)
<b>第六章 精液微量元素的检测</b> .....	(73)
一、概 述 .....	(73)
二、精液微量元素的测定 .....	(75)
(一)原子吸收光谱法.....	(75)
(二)阳极溶出伏安法.....	(76)
(三)分光光度法 .....	(77)
三、方法的评价 .....	(78)
<b>第七章 精子功能的检测</b> .....	(79)
一、概 述 .....	(79)
二、宫颈粘液的检查.....	(80)
(一)宫颈粘液的组成与特点 .....	(80)
(二)羊齿状结晶的形成 .....	(81)
(三)宫颈粘液的采集与保存 .....	(82)
(四)羊齿状结晶的分型 .....	(82)
三、体内穿透试验 .....	(83)
四、体外穿透试验 .....	(84)
(一)玻片定性试验.....	(84)
(二)玻片定量试验.....	(85)



(三)精子-宫颈粘液接触试验	(86)
(四)交叉试验	(87)
(五)毛细管-精子穿透试验	(87)
(六)无透明带金黄地鼠卵-精子穿透试验	(89)
(七)人卵-精子穿透试验	(92)
五、精子尾部低渗肿胀试验	(94)
六、精子顶体反应试验	(95)
七、精子速度试验	(97)
八、精子运动轨迹试验	(98)
<b>第八章 精液免疫学检测</b>	<b>(100)</b>
一、概述	(100)
二、精浆抗原的检测	(103)
(一)单向扩散试验	(103)
(二)双向扩散试验	(104)
(三)免疫电泳	(105)
(四)火箭电泳	(106)
三、精浆C <sub>3</sub> 测定	(106)
四、精浆免疫抑制因子(DE <sub>2</sub> )测定	(107)
五、精浆IgG、IgA、IgM与IgE测定	(108)
(一)双抗体夹心ELISA法	(108)
(二)火箭免疫电泳法	(109)
六、抗精子抗体的检测	(109)
(一)精子凝集试验	(109)
(二)精子制动试验	(112)
(三)精子细胞毒试验	(113)
(四)间接免疫荧光试验	(114)
(五)间接血凝试验	(116)
(六)酶联免疫吸附试验	(118)
(七)酶免疫斑点试验	(119)
(八)生物素-亲和素酶联免疫吸附试验	(121)
(九)生物素-亲和素复合物酶联免疫吸附试验	(122)

(十)免疫洗选法	·····	(123)
(十一)混合凝集反应	·····	(124)
(十二)免疫珠试验	·····	(125)
(十三)固相酶染色法	·····	(126)
(十四)ABC免疫组化法	·····	(127)
(十五)放射免疫测定	·····	(128)
(十六)免疫印染法	·····	(130)
七、细胞免疫的检测	·····	(132)
(一)白细胞粘附抑制试验	·····	(132)
(二)白细胞移动抑制试验	·····	(133)
(三)淋巴细胞亚群的检测——免疫荧光间接法	·····	(134)
八、方法的评价	·····	(135)
<b>第九章 精子染色体制备技术</b>	·····	<b>(137)</b>
一、概述	·····	(137)
二、精子染色体制备方法	·····	(138)
(一)睾丸精子染色体制备	·····	(138)
(二)精子单倍染色体制备	·····	(139)
(三)染色体分带制备	·····	(141)
(四)临床应用与评价	·····	(142)
<b>第十章 精子表面标志的检测</b>	·····	<b>(145)</b>
一、概述	·····	(145)
二、精子凝集素受体的检测方法	·····	(146)
(一)光学法	·····	(146)
(二)改良光学法	·····	(146)
(三)荧光染色法	·····	(147)
(四)酶染色法	·····	(147)
(五)分光光度法	·····	(148)
(六)ConA-HRP-G二步标记法	·····	(149)
(七)临床应用与评价	·····	(150)
<b>第十一章 精液脂质过氧化检测</b>	·····	<b>(152)</b>
一、概述	·····	(152)

二、精液LPO测定 .....	(154)
(一)TBA法 .....	(154)
(二)改良TBA法 .....	(155)
(三)荧光微量测定法 .....	(156)
(四)临床应用与评价 .....	(157)
三、精液SOD测定 .....	(157)
(一)改良邻苯三酚法 .....	(157)
(二)ELISA法 .....	(160)
(三)单向扩散法 .....	(161)
<b>第十二章 精液细菌学的检测</b> .....	(162)
一、概 述 .....	(162)
二、精液细菌培养方法 .....	(163)
<b>第十三章 杀精效能的检测</b> .....	(165)
一、概 述 .....	(165)
二、采精器的制作及家兔精液的采集 .....	(166)
(一)采精器的制作 .....	(166)
(二)采精器的使用方法 .....	(167)
(三)家兔精液的采集 .....	(167)
三、家兔精液的检测与评价 .....	(167)
(一)家兔精液常规检查 .....	(167)
(二)精子抗力测定 .....	(168)
四、杀精药效测定 .....	(168)
(一)体外杀精试验 .....	(168)
(二)体内杀精试验 .....	(170)
(三)阴道局部刺激试验 .....	(171)
(四)致畸试验 .....	(172)
<b>第十四章 精子冷冻技术</b> .....	(174)
一、概 述 .....	(174)
二、精子超低温冷冻的机理与冷冻保护剂类型 .....	(176)
(一)冷冻机理 .....	(176)
(二)冷冻保护剂类型 .....	(176)

三、精子超低温冷冻程序 .....	(178)
(一)速冻法 .....	(178)
(二)缓冻法 .....	(179)
(三)简易速冻法 .....	(179)
(四)生物冷冻机慢速降温法 .....	(179)
四、精子冷冻技术结果解释 .....	(179)
五、临床应用与评价 .....	(181)
<b>第十五章 精子优选技术 .....</b>	<b>(183)</b>
一、概 述 .....	(183)
二、精子分离方法 .....	(184)
(一)洗涤法 .....	(184)
(二)游泳法 .....	(185)
(三)改良游泳法 .....	(186)
(四)离心-游泳-沉降法 .....	(187)
(五)玻璃纤维过滤法 .....	(189)
(六)密度梯度离心法 .....	(191)
<b>第十六章 X、Y精子分离技术 .....</b>	<b>(194)</b>
一、概 述 .....	(194)
二、X、Y精子分离方法 .....	(195)
(一)电泳分离法 .....	(195)
(二)蛋白柱法 .....	(197)
(三)凝胶过滤法 .....	(199)
(四)密度梯度离心法 .....	(201)
(五)免疫过滤法 .....	(203)
<b>附录一 精子营养液、培养液与常用溶液的制备 .....</b>	<b>(208)</b>
<b>附录二 本书所用词汇英汉对照 .....</b>	<b>(215)</b>

# 第一章 精子发生概论

---

男性生殖是维系人类繁衍的基础。研究雄性生殖细胞的发育、成熟及生理变化是生殖医学的重要内容。近十余年随着生殖细胞的形态学、生理学、病理学、生殖内分泌学以及男性生育调节等方面研究的深入，人们对精子发生过程已经有了更多的了解。从而促进了男性学这一新学科的发展，有关男性生育与不育的基础和临床工作开始受到重视。

据有关文献报告，在正常育龄夫妇中，不育症的发病率约为15%，其中因男方原因所致不孕者高达50%。近年对男性不育的诊断和治疗日益为人们所关注。很多研究表明，男性生殖器官的解剖异常、生殖系统组织结构的改变、生殖生理功能障碍、生殖内分泌、免疫功能紊乱、机械损伤、感染以及精神心理因素都可导致男性不育的发生。而因精子生成、成熟障碍、精子输运管道阻塞及附属性腺异常所致的精液和精子异常则是男性不育最常见的病因。临床上，少精症与弱精症大约占男性不育的70%。显然，精液质量、精子变化是判断男性生育力的重要依据。为此，了解精子发生过程及生理功能，无疑有助于男性不育症的诊治或男性计划生育的研究。

男性生殖器官分为内生殖器 and 外生殖器两部分，内生殖器由睾丸、附睾、输精管、射精管以及附属性腺，例如精囊、前列腺、尿道球腺、尿道旁腺所组成；外生殖器由阴茎和阴囊组成。精子产生于睾丸，在附睾内发育成熟，输精管、射精管等管道系统是精子排出的重要通道。在男性生殖过程中，精子的产生、成熟、运输和获能等生理变化是通过中枢神经系统、下丘脑、垂体、睾丸性腺轴的内分泌激素调节实现的。

## 一、睾丸形成

从人胚胎发育第4周起，位于腹后壁左、右中肾嵴的内侧的腹膜上皮和间充质开始增生，并密集形成两条纵嵴，称为生殖嵴，继续增生变厚则成为腹膜上皮，

又叫生殖上皮。生殖上皮于第6周向深部的间充质内增生,导致上皮细胞索形成,其间充质内的原始生殖细胞亦被包入索内,此发育阶段的胚胎还不能辨认出睾丸和卵巢,故称为原始生殖腺。睾丸分化出现于第7周,生殖细胞索已深入到原始生殖腺的髓质内,在生殖上皮下分布的生殖细胞随之减少,并形成纤维膜。此膜由结缔组织构成,叫做白膜。进入第8周,生殖细胞索出现分支,相互吻合在一起,称之为睾丸索。与此同时,在睾丸内形成内侧带、中间带和外侧带三个带。内侧带渐形成睾丸网,中间带则形成直细精管,外侧带索间吻合逐渐形成曲细精管。构成曲细精管管壁的细胞进一步分化为生精上皮。

迄今,对性腺分化机理的研究尚未明了。过去主要以性腺分化的诱导学说对此加以解释,这种学说认为性腺的皮质和髓质分别产生皮质素与髓质素,以后诱导皮质和髓质分化为卵巢和睾丸,而性腺的分化,取决于皮质和髓质哪一方占有优势。近年随着细胞遗传学的发展,人们发现在Y染色体的短臂上近着丝点区存在着控制性腺向睾丸分化的基因,称为睾丸决定基因(testis determining gene)。并且受该基因控制而合成一种为雄性个体所特有的特异性糖蛋白,分布于雄性细胞的细胞膜上,即组织相容性Y抗原(histocompatibility Y antigen)简称H-Y抗原。有的学者称为器官发生定向抗原(organogenesis-directing antigen)。现已清楚,H-Y抗原是由分子量为18 000的亚单位构成的分子,该蛋白质疏水性很强,通过 $\beta_2$ 微球蛋白和组织相容性抗原固定于细胞膜上。

目前认为胚胎期原始生殖细胞来自卵黄囊内胚层,而原始生殖腺的生殖细胞索内的大型细胞,即是生殖腺的原始生殖细胞。

## 二、睾丸构造与功能

睾丸位于阴囊内,左右各一,呈卵圆形,其表面有坚韧的白膜。睾丸鞘膜构成最外层。睾丸内有许多纤维纵隔。将睾丸实质分隔成很多睾丸小叶,有250个左右。小叶中有曲细精管构成睾丸实质。曲细精管很细,直径约0.3~0.4毫米,每条长为30~70厘米。每个睾丸小叶中有2~3条曲细精管合并为精直小管,到达睾丸纵隔后经多次分支,曲细精管互相交织成睾丸网。然后由输出小管与附睾相延续(图1-1)。

曲细精管(seminiferous tubule)由复层上皮构成,即生精上皮。其最深层为一

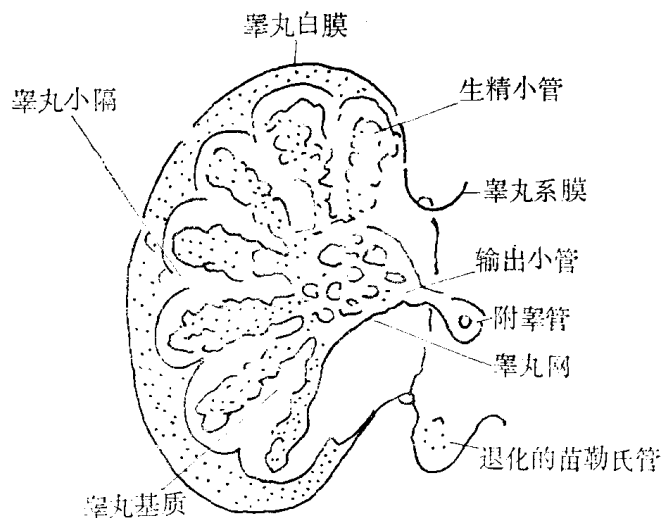


图1-1 睾丸结构特征

2微米厚的管壁。生精上皮是由不同发育阶段的生精细胞(spermatogenic cell)和支持细胞组成的。生精上皮的基底分布一层基膜，其外是一层固有膜，该膜内分布有胶原纤维网和类肌细胞。可协助精子进入睾丸网。在基膜上存在着支持细胞，而基膜的侧面和管腔面形成的不规则的凹窝镶嵌着各级生精细胞。同时支持细胞的近底部相邻支持细胞的穹窿状突起相互接触，使贴近的细胞膜之间联接紧密，从而阻止大分子物质通过。由此形成生精小管腔内外物质交换的可透性屏障，称为血-睾屏障(blood-testis barrier)。血-睾屏障可阻挡大分子物质流入生精上皮的近管腔处，防止雄性激素结合蛋白(androgen binding protein, ABP)及其结合的雄激素外逸，并保证细胞间的离子交换，使近管腔处的生精过程在适宜的内环境中得以顺利进行。此外，可将生精小管中精子附着的抗原性物质与机体循环系统隔离，从而阻止机体免疫反应的发生。

支持细胞直接参加精子的形成，可将外周结缔组织中的营养物质转运至无血管的生精上皮上，起保护和营养生精细胞的作用，并协助生精上皮中生精细胞的移动和精子的释放。支持细胞内含有溶酶体，能吞噬、消化退化的生精细胞及残余小体。同时还能合成分泌ABP，甚至少量雄激素以及LH-RH类似物。

间质是指位于睾丸曲细精管之间的疏松结缔组织，即除生精小管外皆为睾丸间质。间质中分布有丰富的血管、淋巴管、生殖管道以及大量的间质细胞、胶原纤维束及弹性纤维，并散见有少量的巨噬细胞和肥大细胞。间质细胞(interstitial cells)也叫Leydig细胞。此类细胞在结缔组织中成群存在，细胞形态不一，多为圆形，直径15~20 $\mu\text{m}$ 。胞体大而圆，核仁1~2个，细胞质丰富，胞质内含有丰富的

线粒体、滑面内质网、大量的脂滴以及发达的高尔基复合体。此外，还含有中心体、微丝、微管、过氧化物酶体、溶酶体及Reinke结晶等。间质细胞能合成分泌雄激素。胞质的滑面内质网与线粒体含有大量合成雄激素所需要的酶，如多种羟化酶、侧链分裂酶、脱氢酶及异构酶等。脂滴则含有合成雄激素所必需的胆固醇。在间质细胞内胆固醇被转运到线粒体后，经20~22羟化酶碳链酶转变为孕烯醇酮，后者再转运至滑面内质网内，在多种酶参与下合成雄激素。

睾丸间质细胞出现于胚胎期第7~10周，并在HCG作用下，合成大量雄激素，于胎龄100天左右睾酮分泌达到高峰，从而促进了男性胚胎的正常性分化及其生殖器官的发育。在胎龄12周，性分化已完成，间质细胞分泌功能开始减退，睾酮分泌逐渐减少，至出生前间质细胞处于静止状态。出生后由于HCG作用中断，而下丘脑还处于不成熟状态，不能合成释放促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, Gn-RH)刺激垂体促性腺功能，因此睾酮分泌降至最低水平。青春期中下丘脑开始释放Gn-RH，作用于垂体分泌促性腺激素，刺激睾丸间质细胞发育，并合成分泌睾酮，经血循环与多种蛋白结合遍布全身。睾酮在睾丸内的运行依赖于ABP，大量睾酮通过睾丸淋巴系统转运至精小管，以保证精子合成的需要，并促进附属性腺发育成熟，维持男性第二性征与性功能。雄激素的分泌受到垂体前叶释放的促性腺激素的调控，而睾丸间质细胞分泌的雄激素经代谢转化为E<sub>2</sub>和5 $\alpha$ 还原产物后，又可对垂体激素进行反馈调节。由此形成下丘脑—垂体—睾丸轴系统。

### 三、生精上皮的形成与分化

人类睾丸，从生后至6岁其体积无增加，此后睾丸索渐大，10岁后增大更为显著，其中心区相继坏死，形成管腔连成小管，称为生精小管。随小管增加而弯曲成袢，管壁上的生精上皮分别来自原始生殖腺表面复膜上皮的支持细胞及卵黄囊内胚层的原始生殖细胞。支持细胞自生后至青春期无明显变化，而原始生殖细胞在生后则形成为A型精原细胞，其余逐渐退化。

青春期生精上皮分化程度不同。9~12岁生精上皮已分化，出现很多精原细胞和精母细胞，生精上皮外层已形成基膜和固有膜。12~15岁生精小管直径增大，上皮中已见有精子形成。15~17岁上皮内出现各级生精细胞——精原细胞、精母



细胞、精子细胞和精子。生精上皮中固有膜层完全分化，已具备成人生精上皮的  
结构与功能。

#### 四、生精上皮的构造与功能

曲细精管又叫生精小管，其管内衬以生精上皮，上皮内层由结构和功能不同的  
生精细胞和支持细胞两种细胞构成。生精细胞附着在支持细胞之上，各期生精  
细胞不断发育成精子。支持细胞可支持、保护生精细胞，并为生精细胞转运营养  
物质。上皮外层为基底膜(图1-2)。

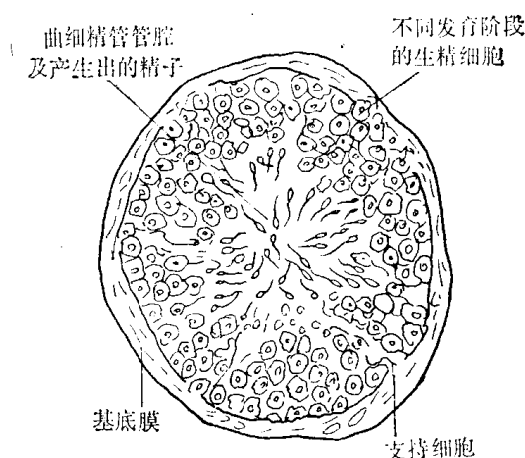


图1-2 曲细精管内部结构

##### (一) 支持细胞(sustentacular cells)

支持细胞附着于基膜上，分布于不同发育阶段的生精细胞之间。支持细胞形  
态极不规则，有很多突起，呈高柱状。其顶端直达管腔，在侧面和管腔面的凹窝  
中嵌入各级生精细胞。其形态随嵌入的生精细胞而变化。细胞核较大，位于细胞  
的基部，可见1~2个规整的核仁。胞质含有线粒体、内质网。高尔基复合体。溶  
酶体、核糖体、脂滴和类晶体等，同时排列有微丝，并在细胞核周围形成微丝网，  
将核与其它细胞器隔开，核上部有丰富的微管。上述结构可能有助于支持细胞的  
胞质运动和外形改变，以促进生精细胞向管腔移动和精子向管腔内的释放。

支持细胞有下列功能：①支持细胞构成的支撑网架，对生精细胞有支持、保