

# 一种精子样品扫描电镜快速观察方法

宋丹丹<sup>1</sup>, 郭建胜<sup>1</sup>, 吴航军, 朱贵珍<sup>1</sup>

(1.浙江大学医学院, 浙江省杭州市 310000)

**摘要:** 精子形态是评估雄性生育率的重要指标。扫描电镜可观察精子表面超微结构, 进而判断精子是否畸形及具体表征, 是精子形态分析的重要方法之一。常规扫描电镜样品制备方法对精子量要求较高, 且易出现精子团聚、部分断裂、形变等结构表征缺陷。通过探索并改善精子扫描电镜样品制备方法, 大幅改善成像效果, 且该方法对样品量要求低, 操作流程简单, 可作为一种快速观察精子样品表面超微结构的方法。

**关键词:** 精子; 扫描电镜; 样品制备

## A Fast Scanning Electron Microscopy Imaging Method for Sperm

Song Dandan<sup>1</sup> Guo Jiansheng<sup>1</sup> Wu Hangjun<sup>1</sup> Zhu Guizhen<sup>1</sup>

(1. Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** Sperm morphology is an important indicator for male fertility. As one of the important methods of sperm morphological analysis, scanning electron microscope can be used to observe the morphology of sperm, and then to evaluate the quality of sperm. Conventional sample preparation methods of scanning electron microscopy have high requirements for sperm volume, and are prone to structural representation defects, such as sperm agglomeration, structural breaks, and deformation. The imaging quality of sperm scanning electron microscopy is dramatically improved by sample preparation exploring and optimizing. In addition, this method requires less sample and easier preparation. It can be used as a way to fast observation of sperm morphology by scanning electron microscope.

**Keywords:** Sperm; Scanning Electron Microscopy; Sample preparation

精子形态分析是精液质量检测的重要组成部分, 是评估体内外受精的重要指标, 在动物繁殖生产、人类临床生殖中起着重要作用<sup>[1, 2]</sup>。精子形态异常包括头部和尾部。头部异常表现为形状异常、尺寸异常、膜结构不完整等现象, 同时往往出现核染色质异常, 导致受精率下降<sup>[3]</sup>; 尾部异常多表现为无尾、短尾、卷尾、折尾、不规则尾等, 导致精子运动受限<sup>[4, 5]</sup>,

在体内受精时无法正常到达卵子周围。此外，有研究表明，精子畸形率与人工授精<sup>[6]</sup>、复发性流产<sup>[7]</sup>有关联。由于常规检测通常局限于光学显微镜范畴，受分辨率影响，往往只能观察到精子结构的大致形态，无法精确判断精子畸变等超微结构变化。扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscopy, SEM)通过收集电子束轰击样品时产生的二次电子、背散射电子信号等获取样品表面超微结构，图像分辨率高、景深大、操作简单且结果直观，弥补了光学显微镜的分辨局限，可表征精子发生畸变种类、位置及具体形态，辅助判断精子功能，为配子研究提供支撑<sup>[5, 8, 9]</sup>。

常规生物样品扫描电镜制备方法已近成熟，样品需经固定、漂洗、梯度脱水及临界点干燥等流程。临界点干燥是利用二氧化碳在临界值状态下可随意转换气液态、表面张力为零的原理，使样品达到干燥的同时，保持其原有形态。但干燥后样品多为粉状，在扫描电镜观察前需要将粉状样品涂抹在导电胶上，进行镀膜后上镜观察。由于这种制样流程耗时长且步骤多，部分样品在洗脱过程中容易丢失，对样品量有一定要求，对于少精症或弱精症，在检测上较难得到充足结果。且精子形态多为蝌蚪状，尾部长度一般可达 60  $\mu\text{m}$ ，制样过程中易卷曲成团，经临界点干燥后无法观察到单个整体精子。此外，干燥后精子韧性降低，易出现物理断裂。

针对精子样品，目前研究中常用的方法是在临界点干燥前，将处于无水乙醇中的精子吹打混匀，滴于载片上自然干燥，进行 SEM 观察<sup>[10]</sup>。但受到液体表面张力的作用，精子会出现皱缩、局部断裂等现象，干扰超微结构判断。Nanosuit 是一种生物相容性聚合物，由多元醇、水、糖类、盐类等组成，可在电子束辐照时在样品表面形成一层具有导电性的纳米级薄膜，可减少样品水分流失，降低高真空环境对样品的损伤，在扫描电镜中获得更接近原始状态的结构。调研发现昆虫、植物叶片等较大体积的生物样品可直接用 Nanosuit 处理<sup>[11]</sup>，但目前其在单一细胞的应用较少，且表面结构支撑效果较差<sup>[12]</sup>。考虑到精子结构的特殊性，及操作流程的便捷性，在精子扫描电镜样品制备过程中，探索引入了 Nanosuit 多元醇聚合物，对比发现，该聚合物处理后的精子超微结构保存效果较其他方法更好，且流程便捷，背景干净。该方法为精子扫描电镜样品制备及超微结构观察提供一种全新的思路和方向。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

实验样品及试剂：新鲜猪精液（附近猪养殖场）；Nanosuit（Nanosuit III，南京中镜科仪技术有限公司）；2.5%戊二醛固定液（固定液由磷酸盐缓冲液配制，缓冲液终浓度为 0.1 M，