

蕨精子生活力保存的初步研究*

方 瑾 周云龙 刘 宁 陈令静

(北京师范大学生物系, 北京 100875)

蕨类植物配子体独立生活, 精子易大量获取, 但蕨类精子多在离开配子体后很短一段时间内有运动能力, 停止运动后不久死亡解体。因此以精子为目的的研究需要探索保存精子生活力的方法。

在人工无菌培养的蕨(*Pteridium aquilinum* var.*latiusculum*) 配子体上加无菌水, 待精子出后离心分离出精子。精子保存在以下保存液中: 1. 无菌蒸馏水; 2. 不同浓度(1%、2%、3%) 蔗糖溶液; 3. 配子体培养液; 4. 复合保存液: (1) 配子体培养液加2%蔗糖; (2) 配子体培养液加2%蔗糖和0.3%牛血清白蛋白(BSA), (3) 配子体培养液加2%蔗糖, 0.3% BSA和0.4%山梨醇。在4°C冰箱中保存。取样时先将样品混匀, 取出后定量加入FDA。以上过程均在无菌条件下进行。用OLYMPUS-BH2型显微镜分别在明场和紫外光激发条件下观察, 用血球计数板分别计数生活精子数目和精子总数。用下式计算:

$$\text{保存t日后精子生活力} = (\text{保存t日时生活精子数} / \text{保存起始时生活精子数}) \times 100\%$$

$$\text{相对生存百分比} = (\text{保存t日时生活精子数} / \text{保存t日时精子总数}) \times 100\%$$

实验结果 在各种保存液中随保存时间延长精子生活力下降, 保存4天后基本失去生活力。在无菌水中, 精子的荧光较弱, 保存1天时生活力下降最慢, 以后生活力下降略有增快, 呈直线下降。在蔗糖中保存的精子, 在保存1—2天内生活力下降较快, 以后生活力下降变缓, 其中2%蔗糖中的精子生活力下降速率低于1%和3%蔗糖。保存在配子体培养液中和配子体培养液加入2%蔗糖中的精子生活力下降速率均较快。在含BSA的复合保存液及含BSA和山梨醇的复合保存液中, 精子生活力下降速率较慢, 与保存在无菌水中相似。值得注意的是, 在含有山梨醇和BSA的保存液中, 约一半生活精子的荧光强度大大增加, 高于保存之前。这种强烈的荧光在保存3天后消失。

在以上各种保存条件下, 精子的相对生活百分率先下降, 再升高或缓慢下降, 最后又较快下降。说明在保存初期, 精子死亡后细胞未能立即解体。在保存中期, 死亡精子大量解体, 精子相对生活百分率有一定回升。在保存后期, 大量精子死亡使精子相对生活百分率又有下降。

无菌水保存精子生活力的效果较好, 但精子的活性略低。由于不含外源蛋白质, 不会改变精子的抗原性, 适用于保存精子制备抗体。含有BSA和山梨醇的复合保存液在较短时间内可能有稳定质膜增强精子活性的作用, 适宜保存用于细胞结构或细胞器分离方面的精子。

* 国家自然科学基金资助项目