

HL14015.1.1

精子顶体形态花生凝集素荧光标记（PNA-FITC）染色试剂盒产品说明书

主要用途

精子顶体形态花生凝集素荧光标记（PNA-FITC）染色试剂是一种旨在使用荧光素标记的花生凝集素和赫斯特 33258 双重荧光染色技术，分析生理性反应性或病理性退化性顶体缺失的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。适用于各种动物或人体精子细胞以及冻存精子细胞，以及受精时的精子细胞。产品严格无菌，即到即用，操作简便，性能稳定，荧光清晰。

技术背景

在男科学（Andrology）中，精子（spermatozoa）分析提供了精子生成（spermatogenesis）、精子寿命、以及生育能力的基础信息。其中精子的活力（vitality）、运动能力（motility）、授精潜力（fertilizing potential）、膜结构或染色质结构完整性（integrity）、顶体反应（acrosomal reaction）功能的评价是精子分析的重要指标，也是决定人工受孕或体外授精（in vitro fertilization; IVF）的重要参数。其中顶体反应，是指当精子接近卵子实施授精时，精子头部前半端的帽状结构顶体，释放出溶解酶，以便精子和卵子的膜融合。顶体反应测试是一项稳定的精子功能参数，可以用于预测受精成功率。因此顶体的结构完整性（intact）是评价的主要标志，也是不育症和避孕药物研究的对象。使用荧光素标记的花生凝集素（Isothiocyano-fluoresceinated peanut Arachis hypogaea agglutinin; PNA-FITC）和赫斯特33258（Hoechst 33258）双重荧光染色技术，是精子顶体反应分析和授精效率评价的最常用的方法。首先使用赫斯特33258染色，分析精子活力，基于赫斯特33258具有有限的膜通透性特点，受到活体精子细胞（包括游动性和非游动性精子）的排斥，而容易进入死亡精子细胞。其次使用荧光素标记的花生凝集素染料，与顶体外膜糖蛋白上的半乳糖残基（ β -D-galactosyl residue）的结合，显示完整性（未反应性unreacted）顶体，同时可以应用于受精时的精卵反应。双染的作用，以帮助区分生理性反应性顶体缺失（loss）或病理性退化性顶体缺失。通过常用的荧光显微镜（激发波长488nm，散发波长530nm）便可清晰观察到绿色顶体状态（status）。

产品内容

保存液（Reagent A）	毫升
染色液 A（Reagent B）	微升
清理液（Reagent C）	毫升
固着液（Reagent D）	毫升
染色液 B（Reagent E）	毫升
产品说明书	1 份

保存方式

保存在-20℃冰箱里；染色液 A 和 B（Reagent B 和 E）避免光照，有效保证 6 月

用户自备

碘化丙啶：用于精子细胞染色

1.5 毫升离心管：用于样品操作的容器

微型台式离心机：用于样品染色操作的容器

血细胞计数器：用于细胞计数

载玻片和盖玻片：用于精子细胞爬片

（共聚焦）荧光显微镜：用于观察染色的精子细胞

细胞流式仪：用于分析染色的精子细胞

实验步骤

一、荧光显微镜分析

1. 移取新鲜获得的 1 毫升精液（48 小时内）到 1.5 毫升离心管
2. 放进 37 培养箱孵育 30 分钟
3. 放进微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 600g
4. 小心抽去上清液
5. 加入 xx 毫升**保存液（Reagent A）**，混匀颗粒群
6. 在血细胞计数器上进行精子细胞计数，并调整到 2×10^7 精子细胞/毫升
7. 移取 100 微升精子细胞到新的 1.5 毫升离心管
8. 加入 xx 微升**染色液 A（Reagent B）**，混匀
9. 室温下孵育 5 分钟，避免光照
10. 放进微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 600g
11. 小心抽去上清液
12. 加入 xx 微升**清理液（Reagent C）**，混匀颗粒群
13. 放进微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 600g
14. 小心抽去上清液
15. 重复实验步骤 12 至 14 一次
16. 加入 xx 微升**保存液（Reagent A）**，混匀颗粒群
17. 即刻移取 20 微升到洁净的载玻片一端
18. 用盖玻片或另一个载玻片推片
19. 置于空气中凉干
20. 加上 xx 微升预冷的**固着液（Reagent D）**，覆盖样品表面
21. 室温下孵育 1 分钟
22. 小心抽去固着液
23. 小心加上 xx 微升**染色液 B（Reagent E）**，覆盖样品表面
24. 室温下孵育 20 分钟，避免光照
25. 小心抽去染色液
26. 小心加上 xx 微升**清理液（Reagent C）**，覆盖样品表面
27. 小心抽去清理液
28. 盖上盖玻片或封片液
29. 即刻在（共聚焦）荧光显微镜下观察并计数（注意：每个视野计数 200 个精子）

观察蓝色荧光—**染色液 A（Reagent B）**：滤波器激发波长 350nm，散发波长 460nm ——可见蓝色荧光，表

明死亡精子细胞

观察绿色荧光—**染色液 B (Reagent E)**: 滤波器激发波长 490nm, 散发波长 530nm ——可见绿色荧光, 表明精子顶体区域

30. 分析结果

二、细胞流式仪分析

1. 移取新鲜获得的 1 毫升精液 (48 小时内) 到 1.5 毫升离心管
2. 放进 37 培养箱孵育 30 分钟
3. 放进微型台式离心机离心 5 分钟, 速度为 600g
4. 小心抽去上清液
5. 加入 xx 毫升**保存液 (Reagent A)**, 混匀颗粒群
6. 在血细胞计数器上进行精子细胞计数, 并调整到 2×10^7 精子细胞/毫升
7. 移取 100 微升精子细胞到新的 1.5 毫升离心管
8. (选择步骤) 加入 xx 微升**染色液 A (Reagent B)**, 混匀
9. (选择步骤) 室温下孵育 5 分钟, 避免光照
10. (选择步骤) 放进微型台式离心机离心 5 分钟, 速度为 600g
11. (选择步骤) 小心抽去上清液
12. (选择步骤) 加入 xx 微升**清理液 (Reagent C)**, 混匀颗粒群
13. (选择步骤) 放进微型台式离心机离心 5 分钟, 速度为 600g
14. (选择步骤) 小心抽去上清液
15. 加入 xx 微升**染色液 B (Reagent B)**, 混匀颗粒群
16. 室温下孵育 20 分钟, 避免光照
17. 放进微型台式离心机离心 5 分钟, 速度为 600g
18. 小心抽去上清液
19. 加入 xx 毫升**清理液 (Reagent A)**, 混匀颗粒群
20. 放进微型台式离心机离心 5 分钟, 速度为 600g
21. 小心抽去上清液
22. 加入 200 微升用户自备的碘化丙啶 (propidium iodide; PI; 0.4 微克/毫升), 混匀颗粒群
23. 室温下孵育 5 分钟, 避免光照
24. 放进微型台式离心机离心 5 分钟, 速度为 600g
25. 小心抽去上清液
26. 加入 xx 毫升**清理液 (Reagent A)**, 混匀颗粒群
27. 放进微型台式离心机离心 5 分钟, 速度为 600g
28. 小心抽去上清液
29. 重复实验步骤 26 至 28 一次
30. 加入 xx 毫升**清理液 (Reagent A)**, 混匀颗粒群
31. 即刻进行细胞流式仪分析: 观察 10000 个细胞以上, 200 细胞/秒

激发波长	488nm	488nm	350nm
染料	染色液 B (Reagent E)	用户自备的碘化丙啶 (propidium iodide; PI)	染色液 A (Reagent B)

匹配荧光染料	异硫氰酸荧光素 (FITC)	藻红蛋白 (phycoerythrin; PE)	
荧光颜色	绿色	红色	蓝色
散发波长	530nm	630nm	460nm
流式仪通道	FL2	FL3	FL1
荧光增强	精子顶体完整性	精子膜完整性	死亡精子细胞

32. 三色标记细胞流式仪检测参考图像如下 (X 轴: FL2—绿色荧光; Y 轴: FL3—红色荧光)

象限	荧光结果	结果分析
左下象限	PI—PNA—HOUGHST—	完整顶体和膜的活体精子细胞
左上象限	PI+PNA—HOUGHST+	完整顶体而不完整膜的死亡精子细胞
右下象限	PI—PNA+HOUGHST—	顶体损坏而膜完整的活体精子细胞
右上象限	PI+PNA+HOUGHST+	顶体损坏和不完整膜的死亡精子细胞

注意事项

1. 本产品为 20 次操作
2. 操作时须戴手套
3. 样品检测前, 建议在血细胞计数器上进行精子细胞计数
4. 精子细胞计数时乘上稀释倍数 10^4 。标准血细胞计数器 (Hemocytometer) 的计算方法是:
1 毫米方块的细胞计数 $\times 10^4$ (稀释倍数) = 实际细胞数/毫升
5. 染色完成后, 即刻进行检测分析
6. 用户可以使用钙离子载体 A23187 或 Ionomycin 诱导精子顶体缺失
7. 用户可以使用 SYBR-14 替代 HOUGHST33258, 进行细胞流式仪分析
8. 通常使用 PSA-FITC 和 PI 双染用于细胞流式仪分析
9. 完整顶体 (intact/whole acrosome) 参考图像如下:
10. 顶体赤道部分 (Equatorial segment) 参考图像如下:
11. 本公司提供系列发育生物学相关检测试剂产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定荧光清晰