一种精子样品扫描电镜快速观察方法

宋丹丹1,郭建胜1,吴航军,朱贵珍1

(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 Dandan¹ Guo Jiansheng¹ Wu Hangjun¹ Zhu Guizhen¹

(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^[1, 2]。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^[3];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^[4, 5], 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^[6]、复发 性流产^[7]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^[5, 8, 9]。

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 µm,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^[10]。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^[11],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^[12]。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 最干净。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,

Ph 7.4); 1% 锇酸固定液(固定液由磷酸盐缓冲液配制,缓冲液终浓度为 0.1 M); 梯度乙醇 (50%, 70%, 90% 乙醇由纯水稀释)。 25% 戊二醛和无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司。

实验耗材: 15ml 离心管、1.5ml 离心管、吸管、枪头、牙签、手套、镊子、滤纸等购自 海门市亿禾实验器材经营部, 硅片、扫描电镜样品台、导电胶等购自南京中镜科仪技术有限 公司。

1.2 实验仪器

离心机(Sorvall Legend Micro 17, Thermo Fisher scientific 公司,美国),移液器(Eppendorf 公司,德国),体式显微镜(Olympus 公司,日本),辉光放电仪(PELCO easiGlowTM 91000, TED PELLA,美国),临界点干燥仪(CPD300, LEICA 公司,德国),离子溅射仪(Q150T ES Plus, QUORIM 公司,英国),扫描电镜(Nova nano 450 SEM, Thermo Fisher scientific 公司,美国)。

1.3 实验步骤

精子处理:取 10 mL 新鲜猪精液,离心(3000 rpm, 3 min,室温)去除上清,用 0.1 M PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 3 min,去上清,加入 10 mL 2.5%戊二醛,4 摄氏度固定 24h 以上,备用。

常规扫描电镜样品制备(梯度脱水—临界点干燥):取2mL固定后的精子,离心(3000 rpm,3min,室温)去除上清,用0.1 MPBS缓冲液漂洗3次,每次10min,每次需离心; 离心(3000 rpm,3min,室温)去除缓冲液,加入100μL锇酸(1%)室温固定1h;离心(3000 rpm,3min,室温)去除锇酸,0.1 MPBS缓冲液漂洗3次,每次10min,每次需离心;梯度乙醇脱水处理(50%,70%,90%各1次,每次10min;100%2次,每次10min,每次需离心),样品在100%乙醇中备用,无需重悬。移液器吸取精子离心团块(50μL),加入适量无水乙醇重悬,取10μL混悬液滴加到硅片上,自然干燥;管中余下部分精子吸入滤纸包,投入临界点干燥仪进行干燥。

Nanosuit 精子混悬液制备: 取 20 μL 固定后的精子,离心(3000 rpm, 3 min,室温)后 去除固定液(上清),用 10 μL Nanosuit 重悬,离心(3000 rpm, 3 min,室温)后去除上清, 再加入 10 μL Nanosuit 重悬备用。

样品涂布及干燥:取一片新的硅片,置于辉光放电仪中进行亲水化处理(10W, 30 sec), 移液枪吸取 1 μL Nanosuit 精子混悬液,滴加到硅片上,静置 5 min,用滤纸吸除表面液体; 于体式显微镜下观察硅片上样品残留情况,即时去除小液滴,处理完后自然晾干。

样品镀膜及电镜观察:用牙签挑取一块临界点干燥后的精子粉末,均匀涂布在导电胶上,

与自然干燥在硅片上的精子样品一同粘附于扫描电镜样品台上,放入高真空镀膜仪进行离子 溅射 (Pt, 5 nm),置于扫描电镜下观察(10 kV)。

2 实验结果与分析

2.1 常规扫描电镜样品制备(梯度脱水-临界点干燥)精子 SEM 结果分析

临界点干燥是生物样品最常用的扫描电镜样品制备方法,样品几乎不会受到表面张力的 作用,相较于液体环境干燥时张力对结构的影响,该方法更能反映精子真实超微结构。但临 界点干燥的精子呈粉末状,在涂布过程中易出现各种物理损伤,如断裂、刮蹭、挤压等,且 几乎所有精子相互缠绕,严重团聚,难以拍摄出完整单个精子,只能在高倍镜下观察局部特 征,如图1所示。高倍镜下可看到精子头部几乎无皱缩,饱满度优于其他方法,颈部和尾部 呈圆柱状,立体感好,颈部能隐约看到线粒体鞘结构。



图 1 临界点干燥后涂布的精子分布及放大图

不进行临界点干燥,在无水乙醇混悬液状态下滴片、自然干燥进行电镜观察,结果如图 2 所示,精子分散度好、各局部结构无明显物理损伤,可清晰分辨,是目前常用的单个精子 结构观察方法^[10]。但部分视野能看到一些类似囊泡状结构的背景,考虑可能是精浆中部分 残留,经十多步的离心洗脱留存下来,如图 3 所示,通常需要不断切换视野寻找背景干净、 结构完整的结果。此外,该方法步骤繁杂,每次置换液体都会丢失部分样品,对于少精症或 较难收集的状况,甚至可能完全丢失,无法观察。



图 2 无水乙醇精子混悬液滴片自然干燥的精子分布及放大图



图 3 精子周围囊泡状结构污染

2.2 Nanosuit 处理过程中可能出现的问题及方法改善

通常购买的硅片通常是疏水性的, 悬液直接涂布会在载片上聚集, 用滤纸吸除多余液体 时会瞬时带走大量样品, 导致在电镜观察时无样品或样品堆叠, 无法观察到单个精子; 且疏 水载片上易残留微小液滴, 在扫描电镜下呈现为模糊团块或颗粒析出物, 如图4所示。为了 提高样品观测效率, 可将硅片置于辉光放电仪中进行亲水化处理(10W, 30 sec), 形成一层 等离子体表面, 可提高混悬液样品的附着范围、数量及均匀度, 如图 5-6 所示。但这种表面 改性仅可维持 1-2 天, 因此, 利用辉光放电仪做亲水化处理后需及时涂布样品。



图 4 Nanosuit 处理不当引起的不良示例



图 5 亲水化处理前 Nanosuit 精子悬液滴片的精子附着情况及滤纸吸附后样品残留情况



图 6 亲水化处理后 Nanosuit 精子悬液滴片的精子附着情况及滤纸吸附后样品残留情况

2.3 Nanosuit 精子混悬液扫描电镜成像结果

将 Nanosuit 处理好的精子样品置于扫描电镜下进行超微结构观察。低倍视野下,可观 察到精子分散度好,能看到背景干净的单个完整精子,且头部、颈、尾部等结构可清晰分辨。 对精子局部结构进行放大,其各部分结构能精确展示,无明显物理损伤,完整度、圆润度和 立体感均能良好展现出来,如图 7-8 所示,极少量样品即可快速获得理想结果。



图 7 Nanosuit 精子悬液滴片的精子低倍分布图



图 8 Nanosuit 精子悬液滴片的单个精子及局部放大图

3 结语

作为超微结构表征的重要工具之一,扫描电镜在精子形态对其功能影响等研究中起着重 要作用,但因精子样品结构的特殊性,与常规细胞、组织等生物结构研究所用的方法有所不 同,扫描电镜样品制备方法步骤繁杂,且易出现样品丢失严重、样品团聚、物理断裂等现象, 导致观察时较难判断精子超微结构。我们研究发现,Nanosuit处理可以获得高质量的精子扫 描电镜超微结构,且结构完整度高,立体感、圆润度好;该方法操作流程快捷,精子固定后, 经 Nanosuit 清洗、混悬即可滴片观察;对样品量要求很低,对于珍贵样品,几微升即可满 足制备要求,多余样品可以继保存在 2.5%戊二醛固定液中,留作备用或再观察;但制片过 程中对操作技巧有一定要求,残留量过多或过少都无法获得理想结果。后续研究中可针对该 方法进一步改进,提高样品制片效率,优化制备流程,减少干扰;此外,还可将 Nanosuit 扩展应用至其他微米级尺寸的样品中,如细菌、藻类等单细胞生物,为其原位扫描电镜观察 提供参考及借鉴。

参考文献(References):

- [1]KRUGER T F, COETZEE K. The role of sperm morphology in assisted reproduction [J]. Hum Reprod Update, 1999, 5(2): 172-8.
- [2]OMBELET W, MENKVELD R, KRUGER T F, et al. Sperm morphology assessment: Historical review In relation to fertility [J]. Hum Reprod Update, 1995, 1(6): 543-57.
- [3]VALLE R R, NAYUDU P L, LEAL C L V, et al. Sperm head morphometry in ejaculates of adult marmosets (Callithrix jacchus): A model for studying sperm subpopulations and among-donor variations [J]. Theriogenology, 2012, 78(5): 1152-65.
- [4]赖昱全, 孙瑜冲, 黄仔冠, et al. 精子特定形态学与部分精子动力学参数的相关性研究 [J].重庆医学, 2023, 52(07): 1000-3+8.
- [5]WANG J X, LIU X R, ZHANG C, et al. Patient with multiple morphological abnormalities of sperm flagella caused by a novel ARMC2 mutation has a favorable pregnancy outcome from intracytoplasmic sperm injection [J]. J Assist Reprod Gen, 2022, 39(7): 1673-81.
- [6]杨岳, 洪洋, 胡慧敏, et al. 精子形态畸形相关指数与夫精人工授精结局的关系 [J]. 浙江 中西医结合杂志, 2022, 32(01): 59-61.

[7]张馨月, 王晖, 钱云. 复发性流产相关精子因素的研究进展 [J]. 国际生殖健康/计划生育

杂志, 2019, 38(02): 137-41.

- [8]彭影, 刘雨生, 童先宏, et al. 扫描电镜下畸形精子增多症患者的精子形态观察 [J]. 中国 男科学杂志, 2007, 02): 37-42+5.
- [9]俞建军,陈昭典. 扫描电镜对不育症精子顶体的超微结构研究 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2002, 11): 13-4.
- [10]TIAN S, TU C, HE X, et al. Biallelic mutations in *CFAP54* cause male infertility with severe MMAF and NOA [J]. Journal of Medical Genetics, 2023, 60(8): 827-34.
- [11]TAKEHARA S, TAKAKU Y, SHIMOMURA M, et al. Imaging dataset of fresh hydrous plants obtained by field-emission scanning electron microscopy conducted using a protective NanoSuit [J]. Plos One, 2020, 15(5): e0232992.
- [12]HARIYAMA T, TAKAKU Y, SENOH C, et al. Living Organisms under an Electron Microscope: the NanoSuit (R) Method aiming for Medical and Industrial Applications [J]. J Photopolym Sci Tec, 2020, 33(5): 517-22.