

## 大熊猫精子体外获能的研究\*

费立松<sup>1</sup> 陈红卫<sup>1</sup> 何光昕<sup>1</sup> 张志和<sup>1</sup> 张安居<sup>1</sup> 李丹<sup>2</sup> 王喜忠<sup>3</sup>

1. 成都动物园 610081 2. 四川省计划生育科学研究所 3. 四川联合大学

**摘要** 本文通过16次大熊猫精子体外获能和精子穿透试验,建立起一套大熊猫精子体外获能的有效方法,特别是促获能物质的筛选,将为今后开展大熊猫胚胎移植提供可靠的参考资料。

**关键词** 大熊猫 精子获能

近几年来,大熊猫的就地保护和迁地保护都取得了不同程度的成效,但大熊猫物种仍没脱离绝灭的危险。目前,在大熊猫人工授精和人工育幼技术日趋成熟的情况下,进一步提高大熊猫繁殖率的手段就是“试管熊猫”技术了。大熊猫精子体外获能是“试管熊猫”诞生必须经过的第一个关口,首先从事这方面研究的是英国的 Moorc, H. D. M. (1984), 尔后中国科学院动物所的陈大元等(1989)也进行了类似研究,但两位先驱均未披露大熊猫精子体外获能的技术方法。为此,作者将着重介绍本实验对大熊猫精子体外获能研究的过程,供今后从事大熊猫胚胎移植研究的同行参考。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验材料** 大熊猫冷冻精液来自成都动物园、成都大熊猫繁育研究基地的珍稀野生动物精子库。金黄地鼠购于四川省计划生育科研所实验动物中心。

## 1.2 方 法

**1.2.1 精子的获能方法** 将大熊猫冷冻精子颗粒置于40℃的TCM199解冻液中解冻,然后离心(2000 rpm),去上清液,加入盛有2ml改进BWV的试管底部,直立于37℃培养箱孵育1h,使具有高度活力的精子游入溶液上层。吸取上层活力较好的上游精子离心,分二组,分别加入咖啡因、钙离子载体(Calcium Ionophore A23187)二种不同的促获能物质,刺激获能处理10min左右,再离心、洗涤一次。加入少量BWV(1.5% HSA或1.5% BSA)获能液,放入37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中获能3—4h。

**1.2.2 金黄地鼠卵的收集和处理** 选8—10周的雌性金黄地鼠,注射50IU孕马血清(PMSG),48—56h后注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)50IU。16—17h后,断颈处死,切开腹腔,取出输卵管,刺破膨大的输卵管壶腹挤出地鼠卵丘,先后用0.1%透明质酸酶和0.1%胰酶处理后供精子穿透用。

**1.2.3 精子穿透试验** 将一定浓度已获能的大熊猫

精子作成精子悬液,覆石蜡油,每个精子悬液加入20—30个经处理的金黄地鼠卵子,置37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中受精1h。

## 2 结 果

通过16次大熊猫精子体外获能和精子穿透试验得出以下结果:

**2.1 大熊猫精子体外获能液是整个获能过程的关键,试验证明:**经促精子获能物质 Calcium Ionophore A23187处理,由HSA组成的改进BWV获能液对大熊猫精子体外获能效果最佳,大熊猫精子穿透金黄地鼠卵的百分率为100%。咖啡因促获能处理和由BSA组成的获能液精子获能效果稍差,精子穿透率为36.8%—60%。取受精卵压片,在相差显微镜下观察见穿透金黄地鼠卵的大熊猫精子头部膨大,有些已形成雄性原核。另外,配合其它研究项目,成功进行了大熊猫精子染色体的制备。

**2.2 在显微镜下观察获能处理后的大熊猫精子,可见已获能的精子前向运动活跃,尾部摆动幅度增大。同时可见精子间头对头的凝集增多。**

**2.3 获能后的大熊猫精子对地鼠卵的粘附力极强,无运动能力的精子同样粘附卵子。**

**2.4 获能的死活精子共同制成小滴进行异种受精,其穿透率提高较显著。**

## 3 讨 论

大多数动物的精子均要经过获能才能完成受精,精子获能不仅可在同种或异种动物的雌性生殖道内取得,而且可在体外人工获能培养液中完成,未获能的精子是不可能与卵受精的。由于大熊猫精子的种属特异性,它对获能液、渗透压、温度、pH值等条件的要求不同于其它动物的精子。因此,本研究除保持BWV体外获能液中能源基质葡萄糖外,则对丙酮酸盐、乳酸盐、血清白蛋白以及促获能物质进行了调整。钙离子在激发大熊猫精子鞭毛活动与迅速增加精子内cAMP

\* 本研究为成都大熊猫繁育基金会资助项目

促进顶体反应等方面起到了重要作用。从大熊猫精子穿透率来看,改进的 BWV 获能液适合大熊猫精子的体外获能。

不同动物或同种动物不同个体精子获能所需时间存在较大差异。为了加速精子获能和由于体外获能时间的个体差异,本实验采用钙离子载体(Calcium Ionomophore A23187)促获能处理,收到了很好的效果。由 18 小时的长时间获能,缩短为 3—4 小时即可获能,这在以前的大熊猫精子获能研究中是没有见到的。但张嘉保(1992)在进行黑熊和棕熊精子获能研究时,用咖啡因—钙离子载体协同刺激精子获能,也取得了与本研究类似的效果。

精子穿透试验时,在显微镜下可见大量大熊猫精子粘附于金黄地鼠卵的周围,其中大部分为无运动能力精子和死亡精子。这在人、兔、鼠的体外受精中是不多见的,是否与大熊猫精子顶体大、边缘延伸较长有

关,作者推断围绕卵四周粘附的无运动能力精子多为提早顶体反应的精子,这些精子释放出的大量水解酶,利于真正发生受精作用的精子穿入卵内。

#### 4 参考文献

- 1 日本 NAME 学会. 哺乳动物的发育工程[日]. 湖南科学技术出版社,1986
- 2 马建章. 第二届东亚熊类会议论文集. 东北林业大学出版社,1992
- 3 刘斌. 体外受精与胚胎移植. 人民卫生出版社,1990
- 4 张树成. 异种体外受精与精子穿透试验. 生物学通报,1992
- 5 冯文和,张安居. 大熊猫饲养繁育与疾病研究. 四川科学技术出版社,1991
- 6 陈大元等. 大熊猫精子获能与体外受精成功初报. 兽类学报,1989;(1):49

1997-11-17 收稿

## STUDY ON *IN VITRO* SPERM CAPACITATION OF GIANT PANDA

Fei Lisong<sup>1</sup> Chen Hongwei<sup>1</sup> He Guangxin<sup>1</sup> Zhang Zhihe<sup>1</sup> Zhang Anjiu<sup>1</sup> Li Dan<sup>2</sup> Wang Xizhong<sup>3</sup>

1. Chengdu Zoo 610081 2. Sichuan Institute of Family Planning 3. Sichuan Union University

### ABSTRACT

Efficient method for *in vitro* sperm capacitation has been established in laboratory after 16 experiments on giant panda's sperm capacitation and penetration. The results especially the success in screening the promoting sperm capacitation substances will provide reliable scientific reference in embryo transplantation of giant panda in the future.

**Key words** Giant panda sperm capacitation

## 四川省动物学会分类区系和自然生态保护专委会 组织考察唐家河自然保护区

在四川省林业厅和唐家河自然保护区管理处的大力支持下,四川省动物学会区系分类和自然生态保护专委会组织十余名科技工作者于 1998 年 9 月 18—21 日考察了唐家河自然保护区。唐家河国家级自然保护区位于四川北部青川县境内,距成都约 320 公里,幅员 4 万公顷,区内青山苍翠,流水淙淙,是以保护大熊猫、羚牛、金丝猴等珍稀野生动物为主的自然保护区。我国与世界野生生物基金会(WWF)合作建立的、著名的白熊坪大熊猫观察站就在这里。由于国家的关怀和重视,居住在保护区内的居民已经全部迁出,使唐家河成为全国少有的没有居民的独特的保护区之一。参加考察的专家们参观了“岷山系动植物博物馆”,考察了水池坪等处,发现了羚牛的活动踪迹,观察到了豪猪、菜花原矛头蝮、中国林蛙、大嘴乌鸦、山斑鸠等两栖爬行动物和鸟兽。四川联合大学张俊范教授向保护区工作人员介绍了中国鸟类研究概述。在与保护区的同志座谈时,专家们充分肯定了唐家河保护区建立二十年来在管理建设和保护野生动物方面取得的成绩,并希望能针对自己的特点和优势,加强规划、科研和保护工作,坚持“保护第一,开发第二”,正确处理好野生动物保护与旅游开发的关系,祝愿唐家河自然保护区取得更大的成绩。与会者也肯定了专委会组织考察的这种学术活动形式。

(松子)