天净沙系列

CAT#:4-250312

常温运输，2-8℃保存

天净沙

精子染色质扩散染色试剂盒

Sperm Chromatin Diffusion Staining Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本试剂盒基于改良精子染色质扩散（Sperm Chromatin Dispersion, SCD）实验技术，用于检测人精子 DNA 碎片（DNA 碎片化指数 DFI）。DNA 完整的精子核在裂解后，其 DNA 环向周围扩散，形成大光晕或中光晕；而存在 DNA 碎片的精子，因 DNA 断裂无法形成特征性扩散环，表现为小光晕或无光晕（或着色很淡的退化迹象）。精子 DNA 损伤升高与男性不育、胚胎发育异常、早期自然流产密切相关；少弱精子症、畸形精子症患者精子 DNA 碎片率显著高于正常生育男性。它具有下列特点：

1. 采用中草药皂角提取液替代传统 Triton X-100 裂解组分，无毒无污染。
2. 无需昂贵荧光设备，操作简便、重复性好。
3. 可用于新鲜精液、经皮附睾穿刺（PESA）获取精子标本检测。
4. 本产品足够 250 次样本检测。每次可处理 0.3 mL 的精液和 0.7 mL 的低熔点琼脂糖。
5. 本产品仅适用于科研。

规格及成分

本产品用大扁盒包装

成份	编号	规格	包装
10×样本稀释液	4-250312a	50 mL	50 mL 本色瓶
10×变性液	4-250312b	25 mL	30 mL 本色瓶
裂解液	4-250312c	250 mL	250 mL 棕色瓶
10×洗涤缓冲液	4-250312d	25 mL	30 mL 本色瓶
Wright 染色液	5-a159	50 mL	50 mL 棕色瓶
Giemsa 染色液	4-241703	25 mL	30 mL 棕色瓶
琼脂糖	CAS:9012-36-6B	2.0 g	2.0 mL 本色管
低熔点琼脂糖	CAS:9012-36-6	2.0 g	2.0 mL 本色管
使用手册	4-250312sc	1 份	无

运输及保存

常温运输，2-8℃保存，两种琼脂糖常温保存；染色液和裂解液需避光；裂解液低温运输，4℃保存 2 周，其他有效期一年。

自备物品

70%、90%、100%无水乙醇、蒸馏水，DAPI 染色液等。

使用流程

全程载玻片尽量保持水平，避免凝胶层流动；实验室温控制 22℃左右

一、样本预处理

1. 使用前，先将 10×的样本稀释液、10×变性液和 10×洗涤缓冲液用纯水稀释（10 倍稀释）成 1×样本稀释液、1×变性液和 1×洗涤缓冲液。以下使用的样本稀释液、变性液和洗涤缓冲液均表示 1×浓度的。
2. 精液标本：使用样本稀释液调整精子浓度至 10 × E6 /mL。如精子浓度过高进行稀

释；浓度过低进行离心富集。

3. 严重少精症标本及经皮附睾精子抽吸术（PESA）后精液：1000 ×g 离心 10 min，弃精浆，沉淀用样本稀释液重悬至 1 × E6 ~ 10 × E6 /mL。

二、琼脂糖-精子凝胶制备

4. 预处理：用样本稀释液或纯水配制 1%（w/v）低熔点琼脂糖（例如 0.1 g 低熔点琼脂糖粉末加 10 mL 的样本稀释液或纯水）；1%低熔点琼脂糖凝胶管 70-80℃水浴加热完全融化；之后转移至 37℃水浴平衡至少 5 min，维持 37℃。

   注：配制好的低熔点琼脂糖母液每次取用后，剩下的可以放 4℃保存（会凝固），下次用前重新加热融化并降温至 37℃即可。

5. 取 0.3 mL 处理好的精子悬液，与 0.7 mL 融化后 37℃的 1%低熔点琼脂糖充分混匀，保持 37℃孵育。

三、铺制微凝胶

6. 预处理：用样本稀释液或纯水配 0.65%（w/v）正常熔点琼脂糖（例如 0.065 g 正常熔点琼脂糖粉末加 10 mL 的样本稀释液或纯水），加热融化后薄层涂布/浸涂载玻片，室温或 4℃干燥成膜；

7. 吸取 50 μL 精子-琼脂糖混合液，滴在经过 0.65%正常熔点琼脂预处理过的载玻片上；轻轻盖上 22 × 22 mm 盖玻片，避免气泡。载玻片水平放置，4℃冰箱放置 5 min，凝胶凝固。

四、变性与裂解

8. 小心水平侧滑移除盖玻片，不要刮擦凝胶层。载玻片水平浸入变性液，室温（约 22℃）变性 7 min。

9. 取出载玻片，浸入裂解液室温 20 min。移入洗涤缓冲液浸泡 3 min，洗去裂解液残留。

五、梯度脱水

10. 将载玻片依次浸入 70%乙醇、90%乙醇、100%无水乙醇，每级脱水 1－2 min 或至玻片透明，取出，室温水平风干。风干玻片密封盒避光可保存数月，待染色。

六、染色：两种染色，选择其一即可

11. 普通光学显微镜观察

    a. 风干标本滴加 Wright 染色液完全覆盖标本面，孵育 30 s－1 min；

    b. 滴加 Giemsa 染色液 1-2 滴；稍等 1～2 min 后。缓慢滴加样本稀释液，至染色液形成表面张力；染色 10 min；蒸馏水缓慢冲洗至少 2 min，水平风干，立即观察。

12. 荧光显微镜观察

a. 在标本上滴加 50 μL（2 μg/mL）DAPI 染色液（自备），立即在荧光显微镜下观察。

七、镜检计数

13. 每张玻片计数≥500 个完整精子。观察精子光晕大小，根据光晕与精子头部横径的比例，分为大、中、小和无光晕 4 个等级：

大光晕：光晕直径 > 精子头直径的 2/3；

中光晕：光晕直径 > 1/4 且 ≤ 2/3 精子头直径；

小光晕：光晕直径 ≤ 1/4 精子头直径；

无光晕：无扩散光晕或着色很淡（退化迹象）。

14. 结果统计：

DNA 完整率 =（大光晕 + 中光晕精子数）/总精子数× 100%

DNA 碎片率 DFI =（小光晕 + 无光晕精子数）/总精子数× 100%

15. 注意：精液中圆形生精细胞、白细胞，无精子尾部，不要计入精子计数。

八、结果判读参考：

16. 正常生育对照组参考：DNA 碎片率约 12.0±5.2%；

17. 少弱精子症组参考：DNA 碎片率约 26.6±9.7%；

18. 畸形精子症组参考：DNA 碎片率约 41.5±12.3%；

19. 少弱精、畸精不育患者碎片率显著高于正常对照组，P＜0.001。提示：碎片率＞30%提示精子 DNA 损伤明显，可能增加不育、早期流产风险。

九、注意事项：

20. 裂解液 4℃保存，需避光，保存最多放两周，用前必须提前 1.5 小时拿出来，置入 22℃室温内。

21. 所有操作过程中载玻片须保持水平状态，避免琼脂糖凝胶脱落或厚度不均。

22. 去除盖玻片时动作轻柔，防止凝胶损伤。

23. 标本必须充分（WHO 液化时间<60 min）；凝固、坏死严重精液不适合检测；尽量检测新鲜精液。精液标本建议采集后尽快检测，避免反复冻融。

24. 变性、裂解时间严格控制；温度变化会影响光晕形态。变性、裂解、染色均要求 20－25℃，记录实测室温。

25. 全程载玻片保持水平，凝胶层不可流动；移除盖玻片动作轻柔，凝胶破损标本作废。

26. 计数时注意区分白细胞、生精细胞，仅统计有精子头部（可伴尾部）的精子。

	27. 荧光显微镜下染料对精子尾部不着色，不能观察精子尾部；如需观察尾部及区分其他精液细胞，建议采用普通光学显微镜观察染色。 28. 本实验单独用 Wright 染色液并未观察到精子光晕，必须 Wright 染色液-Giemsa 染色液联合染色才能看到光晕与精子尾部 29. 变性液含酸性物质，避免接触皮肤眼睛；染色废液、实验废液按生物危险废弃物处理。
关联产品	死细菌活细菌染色试剂盒（SkyGreen 9-PI 法）

20261026sxl