[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 35/52 (2006.01)
A61D 19/00 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480014519.X

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100379429C

[22] 申请日 2004.3.29
[21] 申请号 200480014519.X
[30] 优先权
[32] 2003.3.28 [33] US [31] 60/458,731
[86] 国际申请 PCT/US2004/009903 2004.3.29
[87] 国际公布 WO2004/087177 英 2004.10.14
[85] 进入国家阶段日期 2005.11.25
[73] 专利权人 孟山都技术公司
地址 美国密苏里州
[72] 发明人 M·安扎尔 C·L·路德维格
J·A·格雷厄姆
J·A·格伦策尔
[56] 参考文献
WO0241906A2 2002.5.30
WO0151612 A1 2001.7.19

sex preselection by flow cytometric separation of X and Ychromosome – bearing sperm based on DNA difference: Areview. johnson L. reproduction, fertility and development, Vol. 7 No. 4. 1995

sex preselection: high – speed flow cytometeric sorting of X andY sperm for maximum efficiency. johnson L A. theriogenology, Vol. 52 No. 8. 1999
审查员 李 伟

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 林柏楠

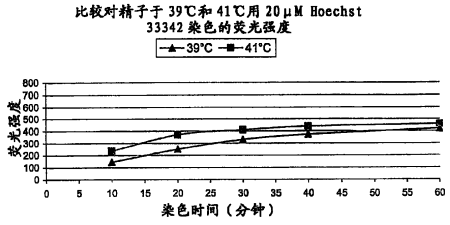
权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图 33 页

[54] 发明名称

用于精子染色的方法

[57] 摘要

根据将精细胞与 DNA 选择性荧光染料在约 40℃以上升高的温度组合的方法，对精细胞进行染色。此方法允许染色时间减少。此后根据常规分离方法包括流式细胞术可对细胞进行有效分选。



1. 用于染色精细胞的方法，所述方法包括形成含有完整的活精细胞和 DNA 选择性荧光染料的染色混合物，以及使染色混合物处于 40℃与 50℃之间的温度。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中染料为 UV 可激发或可见光可激发的染料。

3. 权利要求 2 所述的方法，其中染料选自双苯甲亚胺、SYBR-14 及其缀合物。

4. 权利要求 3 所述的方法，其中染料选自 Hoechst 33342、Hoechst 33258、SYBR-14 和 6-{[3-((2Z)-2-{[1-(二氟硼烷基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基]亚甲基}-2H-吡咯-5-基)丙酰基]氨基}-N-[3-(甲基{3-[({4-[6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H,3'H-2,5'-双苯并咪唑-2'-基]苯氧基}乙酰基)氨基]丙基}氨基)丙基]己酰胺。

5. 权利要求 1 所述的方法，其中染色混合物处于所述温度一段时间，足可允许染料结合 DNA，从而基于荧光可对携带 X 和 Y 的精细胞差异分选。

6. 权利要求 5 所述的方法，其中时间期间为自 1 分钟至 160 分钟。

7. 权利要求 5 所述的方法，其中时间期间为小于 60 分钟。

8. 权利要求 5 所述的方法，其中时间期间为小于 30 分钟。

9. 权利要求 5 所述的方法，其中染料浓度为自 0.1 μM 至 1000 μM。

10. 权利要求 9 所述的方法，其中染料浓度为自 100 μM 至 600 μM。

11. 权利要求 5 所述的方法，其中染色混合物处于 41℃与 50℃之间的温度。

12. 权利要求 11 所述的方法，其中染色混合物处于 41℃与 48℃之间的温度。

13. 权利要求 12 所述的方法，其中染色混合物处于 41℃与 47℃之间的温度。

14. 权利要求 13 所述的方法，其中染色混合物处于 42℃与 45℃之间的温度。

15. 权利要求 14 所述的方法，其中染色混合物处于 43℃的温度。

16. 权利要求 1 所述的方法，其中形成染色混合物的步骤包括将缓冲液与精细胞组合。

17. 权利要求 16 所述的方法，其中将缓冲液与精细胞组合以形成精子悬液，以及将精子悬液与 DNA 选择性染料组合以形成染色混合物。

18. 权利要求 1 所述的方法，其中形成染色混合物的步骤包括将缓冲液与 DNA 选择性染料组合以形成缓冲的染料溶液，以及将缓冲的染料溶液与精细胞组合以形成染色混合物。

19. 权利要求 1 所述的方法，所述方法还包括将猝灭剂与染色混合物组合的步骤。

20. 权利要求 19 所述的方法，其中猝灭剂选自 FD&C＃40 和碘化丙锭。

21. 权利要求 20 所述的方法，其中猝灭剂为 FD&C＃40。

22. 权利要求 20 所述的方法，其中猝灭剂为 FD&C＃40 且染料为 Hoechst 33342。

23. 权利要求 20 所述的方法，其中猝灭剂为碘化丙锭且染料为 SYBR-14。

24. 权利要求 1 所述的方法，其中染色混合物还包含活动能力抑制剂。

25. 权利要求 1 所述的方法，其中形成染色混合物的步骤包括将活动能力抑制剂与精细胞组合以形成受抑制的精子悬液，以及将受抑制的精子悬液与 DNA 选择性染料组合以形成染色混合物。

26. 权利要求 25 所述的方法，其中活动能力抑制剂包含基于碳酸盐的活动能力抑制剂。

27. 权利要求 26 所述的方法，其中基于碳酸盐的活动能力抑制剂包含 $NaHCO_3$、$KHCO_3$ 和 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$。

28. 权利要求 27 所述的方法，其中基于碳酸盐的活动能力抑制剂包含水溶解的 0.097 摩尔/升 $NaHCO_3$、0.173 摩尔/升 $KHCO_3$ 和 0.090 摩尔/升

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$。

29. 权利要求 1 所述的方法，其中染色混合物还包含调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物。

30. 权利要求 29 所述的方法，其中调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物选自丙酮酸、维生素 K、硫辛酸、谷胱甘肽、黄素、醌、超氧化物歧化酶和超氧化物歧化酶模拟物。

31. 权利要求 30 所述的方法，其中调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物选自丙酮酸、维生素 K 和硫辛酸。

32. 权利要求 31 所述的方法，其中调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物包含浓度自 0.5 μM 至 50 mM 的丙酮酸。

33. 权利要求 32 所述的方法，其中调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物包含浓度自 10 mM 至 15 mM 的丙酮酸。

34. 权利要求 33 所述的方法，其中调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物包含浓度 10 mM 的丙酮酸。

35. 权利要求 31 所述的方法，其中调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物包含浓度 1 μM 至 100 μM 的维生素 K。

36. 权利要求 35 所述的方法，其中调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物包含浓度 100 μM 的维生素 K。

37. 权利要求 31 所述的方法，其中调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物包含浓度自 0.1 mM 至 1.0 mM 的硫辛酸。

38. 权利要求 31 所述的方法，其中调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物包含浓度 1.0 mM 的硫辛酸。

用于精子染色的方法

发明背景

本发明总体上涉及能分离精子用于产生性别富集的精子的染色方法。

通过人工授精（AI）的动物受精及体外受精后的胚胎移植是已经建立的方法。在家畜生产工业中，影响具有一种或多种目的特征的后代的繁殖结果具有明显益处。以举例方式，在乳品工业中预选择雌性后代以保证乳牛的产生是有经济利益的。将精子分离为携带X及Y染色体细胞的富集群，也称为性别富集的精液或性别富集的精子，是获得预选择后代的一种方法。

Johnson等人（美国专利号5,135, 759）描述了根据DNA含量，用流式细胞仪/细胞分选器将携带完全X及Y染色体的精子群分离为携带X染色体的精子的富集群及携带Y染色体的精子富集群。如描述的，将精子与DNA选择性染料于30至39℃的温度混合1小时（39℃）至1.5小时（30℃）。然后当精子通过激光束时，用流式细胞仪测定发出的荧光量。由于根据物种的不同，携带X染色体的精子包含的DNA多于携带Y染色体的精子大约3至5%，携带X染色体的精子产生的荧光强度高于携带Y染色体的精子。包含预定荧光强度的单种精子的小滴带电荷并通过静电作用偏转到收集容器中，然后将收集的性别富集精子群用于显微注射或人工授精。

Seidel等人（WO 02/43574）也描述了用流式细胞仪将精子分离为携带X及Y染色体细胞的性别富集群。Seidel等人描述了在30℃及40℃之间的温度对细胞染色。

Didion等人（WO 02/41906）描述了在约17℃至30℃的温度对精细胞染色。根据Didion等人的描述，这些染色温度避免了在较高温度染色可导致的某些作用，如降低精子活力及功效。此外，认为在分选期间，较低温度染色对精子定向具有有益作用。

发明概述

本发明的多个方面提供了对精细胞染色的相对快速及有效的方法，并且提供了摄取染料所需时间减少的方法，因此减少了收集精液及产生携带X及Y染色体的精细胞的性别富集群之间消耗的时间。

简而言之，因此本发明涉及用于精细胞染色的方法，此方法包括形成包含完整活精细胞及DNA选择性荧光染料的染色混合物，以及将染色混合物置于至少约40℃的温度。

本发明的其它方面部分是显然的，且部分在下文中指出。

附图简述

图1A-1D图示了实施例1中研究的结果，其中测定了对精子在39℃及41℃用不同浓度Hoechst 33342染料染色的荧光强度。

图2A-2D图示了实施例2中研究的结果，其中测定了对精子在39℃及41℃用不同浓度Hoechst 33342染料染色的荧光强度。

图3A-3D图示了实施例3中研究的结果，其中测定了对精子在39℃及43℃用不同浓度Hoechst 33342染料染色的荧光强度。

图4A及4B图示了实施例4中研究的结果，其中测定了对精子在39℃及43℃用不同浓度Hoechst 33342染料染色的荧光强度。

图5A及5B图示了实施例5中研究的结果，其中测定了对精子在39℃及45℃用不同浓度Hoechst 33342染料染色的荧光强度。

图6A及6B图示了实施例6中研究的结果，其中测定了对精子在39℃及47℃用不同浓度Hoechst 33342染料染色的荧光强度。

图7A及7B图示了实施例7中研究的结果，其中测定了于41℃及43℃对未染色或用60μM Hoechst 33342染料染色的精子活动能力百分数(% motility)及前进活动能力百分数(% progressive motility)。

图8A及8B图示了实施例8中研究的结果，其中于39℃及45℃对未染色或用60μM Hoechst 33342染料对精子染色的精子活动能力百分数及

前进活动能力百分数进行测定。

图 9A-9C 图示了实施例 9 中研究的结果，其中于 41℃、43℃及 45℃对未染色或用 80μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子活动能力百分数及前进活动能力百分数进行测定。

图 10A-10C 图示了实施例 10 中研究的结果，其中于 41℃、43℃及 45℃对未染色或用 100 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子活动能力百分数及前进活动能力百分数进行测定。

图 11 图示了实施例 11 中研究的结果，其中于 47℃对未染色或用 100 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子活动能力百分数及前进活动能力百分数进行测定。

图 12 图示了实施例 12 中研究的结果，其中于 49℃对未染色或用 100 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子活动能力百分数及前进活动能力百分数进行测定。

图 13A 及 13B 图示了实施例 13 中研究的结果，其中于 43℃对未染色、用 125 μM Hoechst 33342 染料或用 150 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子活动能力百分数及前进活动能力百分数进行测定。

图 14A 及 14B 图示了实施例 14 中研究的结果，其中于 43℃对未染色、用 200 μM Hoechst 33342 染料或用 250 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子活动能力百分数及前进活动能力百分数进行测定。

图 15A 及 15B 图示了实施例 15 中研究的结果，其中于 45℃对未染色、用 125 μM Hoechst 33342 染料或用 150 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子活动能力百分数及前进活动能力百分数进行测定。

图 16A-16C 图示了实施例 16 中研究的结果，其中于 45℃对未染色、用 200 μM Hoechst 33342 或用 250 μM Hoechst 33342 对精子染色的精子活动能力百分数及前进活动能力百分数进行测定。

图 17A-17C 图示了实施例 17 中研究的结果，其中于 43℃对未染色、用 300 μM Hoechst 33342、用 350 μM Hoechst 33342 或用 400 μM Hoechst 33342 对精子染色的精子活动能力百分数及前进活动能力百分数进行测

定。

图 18A-18C 图示了实施例 18 中研究的结果，其中于 43℃对未染色、用 0.6 μM SYBR 14、用 6.0 μM SYBR 14 或用 60 μM SYBR 14 对精子染色的精子活动能力百分数及前进活动能力百分数进行测定。

图 19A-19B 图示了实施例 19 中研究的结果，其中于 39℃和 45℃对用 100 μM 双苯甲亚胺(bisbenzimide)-BODIPY 缀合物(BBC)或 6 μM SYBR 14 对精子染色的精子荧光强度进行测定。

图 20 图示了实施例 20 中研究的结果，其中于 41℃用在 TCA 缓冲液或在含 10 mM 丙酮酸的 TCA 缓冲液中的 400 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子前进活动能力百分数进行测定。

图 21 图示了实施例 21 中研究的结果，其中于 41℃用在 TCA 缓冲液或在含 10 μM 维生素 K 的 TCA 缓冲液中的 400 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子前进活动能力百分数进行测定。

图 22 图示了实施例 22 中研究的结果，其中于 41℃用在 TCA 缓冲液或在含 100 μM 维生素 K 的 TCA 缓冲液中的 400 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子前进活动能力百分数进行测定。

图 23 图示了实施例 23 中研究的结果，其中于 41℃用在 TCA 缓冲液或在含 1mM 硫辛酸的 TCA 缓冲液中的 400 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子前进活动能力百分数进行测定。

图 24 图示了实施例 24 中研究的结果，其中于 41℃用在包含 10 mM 丙酮酸的 TCA 中的 300 μM Hoechst 33342 染料对精子染色且然后用含 10 mM 丙酮酸的 TCA 或 pH 6.2 的基于碳酸盐的抑制剂稀释 3 倍后，对精子前进活动能力百分数进行测定。

图 25 图示了实施例 24 中研究的结果，其中于 41℃用在(1)包含 10 mM 丙酮酸的 TCA 中的 300 μM Hoechst 33342 染料对精子染色且然后用相同缓冲液稀释 3 倍的 TCA 或(2)用在 pH7.3 的基于碳酸盐的缓冲液中的 300 μM Hoechst 33342 染料对精子染色且然后用 pH 6.2 的基于碳酸盐的抑制剂稀释 3 倍后，对精子前进活动能力百分数进行测定。

图26图示了实施例24中研究的结果，其中于41℃用在包含10 mM 丙酮酸的 TCA 中或 pH 6.2 的基于碳酸盐的抑制剂中的 300 μM Hoechst 33342 染料对精子染色的精子前进活动能力百分数进行测定。

优选实施方案详述

令人惊讶的是，已经确定了在较高温度即在40℃以上的温度对细胞染色所需的时间低于在较低温度对细胞染色所需的时间，可用染料对精细胞染色用于流式细胞仪方法，而对精细胞的活力没有显著影响。在一个实施方案中，精细胞于至少41℃的温度暴露于染料。在另一实施方案中，精细胞于至少42℃的温度暴露于染料。在另一实施方案中，精细胞于至少43℃的温度暴露于染料。在另一实施方案中，精细胞于至少44℃的温度暴露于染料。在另一实施方案中，精细胞于至少45℃的温度暴露于染料。然而，通常将精细胞暴露于远高于 45℃以上的温度并经历一段有效时间段可有害地影响细胞成活力。因此，在一个实施方案中，精细胞于至少41℃但不超过50℃的温度暴露于染料。在另一实施方案中，精细胞于至少41℃但不超过48℃的温度暴露于染料。在另一实施方案中，精细胞于至少41℃但不超过47℃的温度暴露于染料。例如，在一个目前优选的实施方案中，精细胞于至少42℃但不超过47℃的温度暴露于染料。通过进一步举例的方式，在另一目前优选的实施方案中，精细胞于至少43℃但不超过45℃的温度暴露于染料。

本发明的方法可用于对牛、猪、马或其它哺乳动物的完整、活精细胞染色，所述精细胞来自新鲜获得精子样本或来自解冻的深低温保藏精子样本。多种收集活精子的方法是已知的并且包括例如人造阴道法或带手套法。取决于物种及物种内的具体动物，一般每毫升牛精子样本包含约5亿至约50亿个精细胞。

大体上，根据本发明的一方面，通过形成包含精细胞及 DNA 选择性染料的染色混合物对精细胞染色。精细胞对渗透压及 pH 的显著变化有些敏感。为降低对精子成活力的影响，因此，一般优选考虑此类因素而形成

的染色混合物。与此类考虑因素一致，染色混合物可以多种方式形成。

在一个实施方案中，纯精子与 DNA 选择性染料组合。因此例如以纯固体形式的染料，包括自由流动粉末或液体组合物可与纯精子组合。备选地，染料溶解或分散的非经缓冲液体可与纯精子组合。然而，在每种此类方法中，一般优选对于纯精子不引起精子受到足可本质上有害影响它们成活力的渗透压或 pH 显著改变的染色混合物。

在另一实施方案中，纯精子与缓冲液体组合，染料在所述缓冲液体中溶解或分散以形成染色混合物。有益地，对于纯精子而言，缓冲液有助于避免任何足可本质上有害影响它们成活力的作为形成混合物后果的渗透压或 pH 显著变化。

在另一实施方案中，精子源与缓冲液组合以形成精子悬液且精子悬液其后与染料组合以形成染色混合物。在与染料接触前将精细胞悬浮在经缓冲液体中可有益地保护精细胞免于受加入染料而导致的 pH 及渗透压的显著变化。在本实施方案中，精子源可为纯精子。备选地，精子源可为通过离心获得或应用其它将精子分离为级分的方法获得的包含精子的精液衍生物。

在另一实施方案中，DNA 选择性染料与缓冲液组合或作为缓冲液配方的一部分而包括，从而形成缓冲的染料溶液。因此，例如，纯固体形式的染料（包括自由流动粉剂）或液体组合物可与缓冲液或缓冲液配方的任何组分组合，然后再将各组分组合，以形成缓冲的染料溶液，所述缓冲的溶液然后可与纯精液或精子悬液组合。

可单一应用或组合应用多种生物学缓冲液以保护精细胞免受 pH 及渗透压的显著变化。一般地，此类缓冲液浓度约为 0.001M 至约 1.0M 且 pH 在约 4.5 至约 8.5 之间。常见的生物学缓冲液包括例如磷酸盐、二磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐及乳酸盐。此类缓冲液也可包含营养源，例如糖和/或抗生素，如链霉素。优选的缓冲液包括 TCA、TEST、柠檬酸钠、TL 及 HEPES。在本发明的某些实施方案中，将精液样本用表I中描述的一种或多种缓冲溶液稀释。例如，在一个实施方案中，精液样本用具有表I所述组分的 TCA

#1 缓冲液稀释。在另一实施方案中，精液样本用具有表I所述组分的 TCA #2 缓冲液稀释。在另一实施方案中，精液样本用具有表I中所述组分的 TEST 缓冲液稀释。在另一实施方案中，精液样本用具有表I 所述组分的柠檬酸钠缓冲溶液稀释。又在另一实施方案中，精液样本用具有表I 所述组分的 TL 缓冲溶液稀释。在另一实施方案中，精液样本用具有表I 所述组分的 HEPES 缓冲溶液稀释。又在另一实施方案中，精细胞可用每 25mL 纯水中包含 0.204g $NaHCO_3$、0.433g $KHCO_3$ 及 0.473g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 的缓冲溶液稀释（水中含 0.097 摩尔/升 $NaHCO_3$、0.173 摩尔/升 $KHCO_3$、0.090 摩尔/升 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$）以形成精子悬液。

表 I

缓冲液配方						
组分	TCA#1	TCA#2	TEST	柠檬酸钠	HEPES	TL
氯化钠（NaCl）					7.6g	5.84g
氯化钾（KCl）					0.3g	0.23g
碳酸氢钠（$NaHCO_3$）						2.1g
一碱价磷酸钠（$NaH_2PO_4.H_2O$）						0.04g
(+)-2-羟基丙酸（乳酸钠）						3.68ml
氯化镁（$MgCl_2$）					0.1g	0.08g
N-（2-羟乙基）哌嗪-N'-（2-乙磺酸）（HEPES）					2.38g	2.38g
三（羟甲基）氨基甲烷（TRIS 碱）	30.3g	32.02g	10.28g			
柠檬酸一水化物	15.75g	18.68g				
柠檬酸钠二水化物				29g		
2-[(2-羟基-1,1-二(羟甲基)乙基)氨基			43.25g			

乙磺酸(TES)						
果糖	12.5g	2.67g		10g	2.52g	
D-葡萄糖			2g			
链霉素			0.25g			
青霉素-G			0.15g			
水	1 升	1 升	1 升	1 升	1 升	1 升
目标 pH	7.35	7.35	7.35	7.35	7.35	7.35
目标重量克分子渗透浓度（微摩尔/千克 H_2O）	~314	~300	~302	~316	~298	~296

应用的缓冲液的量一般取决于几个因素，例如，染色混合物中的特定缓冲液及目的精子浓度（个精子/毫升）。因此，应用足量的缓冲液以获得个精子/毫升的目的浓度。在一个实施方案中，加入缓冲液以获得包含低于纯精液样本中精子浓度的精子悬液。在另一实施方案中，加入缓冲液以获得包含自约 $1 X 10^6$ 个精子/毫升至约 $5 X10^9$ 个精子/毫升的精子悬液。在另一实施方案中，加入缓冲液以获得包含约 $200 X10^6$ 个精子/毫升以下的精子悬液。又在另一实施方案中，加入缓冲液以获得包含自约 $1 X10^6$ 个精子/毫升至约 $200 X10^6$ 个精子/毫升的精子悬液。又在另一实施方案中，加入缓冲液以获得包含自约 $20 X10^6$ 个精子/毫升至约 $200 X10^6$ 个精子/毫升的精子悬液。在另一实施方案中，加入缓冲液以获得包含自约 $30 X10^6$ 个精子/毫升至约 $175 X10^6$ 个精子/毫升的精子悬液。又在另一实施方案中，加入缓冲液以获得包含自约 $50 X10^6$ 个精子/毫升至约 $150X10^6$ 个精子/毫升的精子悬液。又在另一实施方案中，加入缓冲液以获得包含自约 $100 X10^6$ 个精子/毫升至约 $150X10^6$ 个精子/毫升的精子悬液。又在另一实施方案中，加入缓冲液以获得包含约 $150X10^6$ 个精子/毫升的精子悬液。

对染色混合物中染料浓度进行选择以使足量染料与 DNA 结合以将携带 X 及 Y 染色体的精子分选为性别富集群。此外，优选在合理短时期中足可提供对精子定量染色而不会有意影响细胞成活力的染料浓度。对特定应用而言，影响目的浓度的因素包括染料性质、染色混合物中精子浓度、染

色混合物的 pH、允许精细胞摄入染料的时间及在摄入期间的温度。但是通常染色混合物中的染料浓度一般为任何浓度范围，一般约 0.1 μM 至约 1000 μM 之间。例如，染料的浓度可维持“相对低”的浓度范围，即约 0.1μM 至约 250 μM 浓度；在本实施方案中，浓度优选自约 100 μM 至约 200 μM，更优选约 100 μM，又更优选约 200 μM，且甚至更优选约 150μM。备选地，染料浓度维持在“中间”浓度范围，即约 250 μM 至约 700 μM 的浓度；在本实施方案中，浓度优选自约 300 μM 至约 700 μM，更优选约 300 μM，又更优选约 400μM，且甚至更优选约 600 μM。此外，染料的浓度可维持在“相对高”浓度范围，即浓度约 700 μM 至约 1000 μM；在本实施方案中，浓度优选自约 800 μM 至约 1000 μM，更优选约 800 μM，又更优选约 900 μM，且甚至更优选约 1000 μM。因此，在一个实施方案中，染料浓度为约 100 μM 至约 200 μM。在另一实施方案中，染料浓度为约 10 μM 至约 100 μM。在另一实施方案中，染料浓度为约 20 μM 至约 80 μM。又在另一实施方案中，染色混合物中染料浓度为约 20 μM 至约 60 μM。此外，已报道对大部分物种染色的最佳浓度报道为约每 150 x 10^6 个精子为约 40 μg，即大约为 70 μM。参见，例如 L. A. Johnson 和 Glenn Welch，Theriogenology (1999)。

染色混合物的 pH 优选维持在约 6.0 至约 8.0 的范围。更优选地，染色混合物的 pH 保持在约 7.1 至约 7.6 的范围。又更优选地，染色混合物的 pH 保持在约 7.3 至 7.4 的范围。又更优选地，染色混合物的 pH 保持在约 7.35。

某些染料能通透精细胞并特异结合 DNA 而不需进一步干涉以增加细胞的通透性。然而，对另一些染料，在染色前处理精子以增加通透速率而不会令人不能接受地使成活力或活动能力降低是令人希望的。可应用本领域技术人员已知的任何合适方法。此类方法包括电穿孔、应用细胞通透增强溶液，例如温和表面活性剂或化学冲击。当应用其它或更严格技术是令人希望的或有益的时，此类处理可包括应用脂质体或以本领域技术人员应用的许多技术将染色剂、染料、基因或载体导入到活细胞中。这些方法包

括但不限于如通过 Gordon 等人（Proc. Natl. Acad. Sci.，1980）应用并自此之后扩展到兔、绵羊、牛及猪的显微注射；DEAE-葡聚糖-介导的转移；磷酸钙共沉淀及其它技术，所有所述技术是本领域技术人员公知的。又在其它情况下，离心精子并在其它培养基中重新悬浮经离心精子可是令人希望的，然而可基于相同或基本上相同的缓冲液系统以去除某些可干扰以后加工步骤的某些组分（所述某些组分之前可能已加至精子悬液）。

允许染色混合物中精细胞摄取染料持续足可获得目的程度 DNA 染色的一段时间。大体上，摄入期在约 1 分钟至 160 分钟之间。在一个实施方案中，摄入期低于 90 分钟。在另一实施方案中，摄入期低于 60 分钟。在另一实施方案中，摄入期低于 40 分钟。在另一实施方案中，摄入期低于 25 分钟。如以前谈及的，摄入期多少取决于一系列其它参数，包括摄取温度、染料性质及染料浓度。在某些实施方案中，摄入期为约 2 分钟至约 25 分钟。又在其它实施方案中，摄入期为约 5 分钟至 20 分钟。又在其它实施方案中，摄入期为约 2 分钟至约 10 分钟。在其它实施方案中，摄入期为约 2 分钟以下。

在整个摄入期或部分摄入期，染色混合物处于本发明的升高温度。因此，例如染色混合物可在 40℃以上维持约摄入期的至少 1%、5%、10%、20%或甚至更高百分率。在一个实施方案中，染色混合物的温度在摄入期升高。在另一实施方案中，染色混合物的温度在摄入期降低。然而，在每一这些实施方案中，对温度变化的速率进行控制以优选避免对精细胞成活力的任何显著负面影响。

在任何情况下，摄入期足可使染料与 DNA 结合以致可基于携带 X 及 Y 染色体的精子之间不同及可测定的荧光强度对携带 X 及 Y 染色体的精细胞进行分选。在一个实施方案中，染色程度足可允许基于携带 X 及 Y 染色体的精子各自的荧光而对携带 X 及 Y 染色体的精子区别分选为至少约 60％纯度的 X 及 Y 群。染色程度优选足可允许基于携带 X 及 Y 染色体的精子各自的荧光而将携带 X 及 Y 染色体的精子区别分选为至少约 70％纯度的携带 X 及 Y 染色体的精子群，更优选至少约 80%纯度，甚至更优选

至少约 85%纯度，且又更优选至少约 90%纯度。

一旦与 DNA 结合并用 UV 或可见光激发，本发明所述染料发出荧光。在一个实施方案中，染料为用紫外线辐射激发发出荧光的染料。此类染料包括例如双苯甲亚胺如 Hoechst 33342 及 Hoechst 33258，每种所述染料可自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)商品化获得。有益地，例如，Hoechst 33342 具有低毒性，足够的细胞通透性，对 DNA 特异，与 DNA 结合后可大大增强荧光，且在荧光强度和给定细胞或样本中存在的 DNA 量之间表现出线性关系。

在另一实施方案中，染料为用可见光激发后发出荧光的染料。此类染料包括例如可见光可激发染料，自 Molecular Probes, Inc.（Eugene, OR）可商业获得的 SYBR-14 及在 WO 02/41906 中描述的双苯甲亚胺-BODIPY®缀合物 6-{[3-((2Z)-2-{[1-(二氟硼烷基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基]亚甲基}-2H-吡咯-5-基)丙酰基]氨基}-N-[3-(甲基{3-[({4-[6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H,3'H-2,5'-双苯并咪唑-2'-基]苯氧基}乙酰基)氨基]丙基}氨基)丙基]己酰胺（“BBC”）。

在本发明的一个实施方案中，染料可通过与另一部分结合进行修饰。例如，根据本发明的特定方面，双苯甲亚胺（双苯并咪唑）可通过加入荧光团进行修饰，通过可见光激活缀合物导致荧光反应。由于与 DNA 结合增强它们的荧光，优选这些缀合物与双苯甲亚胺分子相似。并且由于缀合物对可见光反应发出荧光而优于双苯甲亚胺分子。

特别优选的荧光团为可见光可激发的二吡咯甲烷二氟化硼衍生物。二吡咯甲烷二氟化硼染料为如美国专利号 5,338,854 及 4,774,339（文中引用作为参考）中所描述、可自 Molecular Probes Inc 的商品名 BODIPYO 获得。示例的双苯甲亚胺-二吡咯甲烷二氟化硼缀合物的制备在 WO 02/41906 中描述。也可应用以前段落中描述的本类其它荧光团例如荧光素及其衍生物。

本领域技术人员理解此类经荧光团修饰染料可通过修饰或官能化而制备，从而使所述缀合物具有染色的其它适宜特性，这样使它们在目的 pH

及温度范围具有足够细胞通透性。例如，通过 (1)改变 DNA 染料的 pKa，(2) 通过加入适当接头连接的阳离子或阴离子的离子型增强通透的基团，或(3) 加入非离子型增强通透的基团如乙二醇或聚乙二醇部分，可进行化学修饰以增强适当细胞通透性。

在本发明范围中，双苯甲亚胺及可见波长荧光团可以许多不同方式连接。WO 02/41906 示例了它们可进行连接的一种方式；然而，本领域技术人员可易于选择许多其它荧光团及连接方法。协助此类选择的供应者及咨询机构对本领域技术人员是易于自从事制备及出售荧光团的商业实体例如 Molecular Probes Inc.（Eugene，OR）获得的。

优选地，选择不会对成活力、通透性、稳定性、摄取、细胞保存、流式细胞术、制剂或荧光特性导致显著负面作用的连接双苯甲亚胺及可见波长荧光团的化学物。优选地对连接物的化学官能性进行选择以增强特性如稳定性、通透性、成活力、摄取、细胞保存、流式细胞术、制剂或荧光特性。

文中公开的方法可应用于最近获自特定来源的精子（即，在染色前几分钟或几小时内获得自牛、猪或其它哺乳动物来源）或可应用于深低温保存并接着融化的精子。在每种情况下，细胞计数分选的结果可通过向染色溶液中加入猝灭剂以降低死精子荧光而改善。多种猝灭剂以及猝灭剂的用途是本领域公知的，如对于碘化丙锭（Garner 等人，Bio. of Reprod. , 53: 276-84 (1995) ）及 FD&C # 40（Johnson 等人，Theriogenology, 52: 1323-1341 （1999））所证实的那样。FD&C # 40 在本方法中特别有用，因为其在低浓度应用是无毒的。同样，SYBR-14 与碘化丙锭的组合是有益的，由于这使活精子与濒死细胞及死细胞可见并可使活精子自濒死细胞及死细胞分离。因此，在本发明的一个实施方案中，精细胞与染料及猝灭剂两者组合以形成染色混合物。在优选的实施方案中，精细胞与 Hoechst 33342 及 FD&C # 40 组合。又在另一实施方案中，精细胞与 SYBR-14 及碘化丙锭组合。当分选融化的深低温保藏精子样本时，猝灭剂是有用的，应当理解它们的用途不仅仅限于此，且它们可有益地用于新近获得的精子

样本。

除了缓冲剂外，染色混合物中也可包括其它添加剂以增强精子的成活力或活动能力；这些添加剂可作为精子源、染料源的一部分提供或单独提供给染色混合物。此类添加剂包括能源、抗生素、调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物、活动能力抑制剂及精浆。

一般而言，活动能力抑制剂通过刺激哺乳动物附睾或附睾管的流体环境，引起染色混合物中的细胞模仿哺乳动物例如公牛附睾中的精细胞；因此例如抑制剂抑制精子的代谢活性和/或活动能力。抑制剂可为对精子活动能力具有抑制作用的任何组合物，例如染色混合物中相对高钾离子的浓度趋于抑制精子活动能力。因此，在一个实施方案中，优选染色混合物包含钾离子源并且染色混合物中钾浓度至少为约 0.05 摩尔/升是优选的。更优选地，钾浓度至少为约 0.05 摩尔/升至约 0.5 摩尔/升。又更优选地，钾浓度至少约 0.1 摩尔/升至约 0.3 摩尔/升。最优选地，钾浓度为约 0.173 摩尔/升。此类染色混合物一般但不必要也包含钠离子源。当钠存在时，钾与钠的摩尔比值分别大于 1:1。优选地，钾与钠的摩尔比值为至少约 1.25 : 1。又更优选地，钾与钠的摩尔比值为至少约 1.5 : 1。又更优选地，钾与钠的摩尔比值为至少约 1.75 : 1。又更优选地，钾与钠的摩尔比值为至少约 1.78 : 1。在一个特定实施方案中，钾与钠的摩尔比值为至少约 2:1。

染色混合物又可包含能下调碳水化合物摄取的离子或二氧化碳源。在本实施方案中，二氧化碳源可为例如一种或多种碳酸盐。在一个实施方案中，染色混合物包含 NaHCO3 及 $KHCO_3$，因此提供了钾离子及钠离子源以及部分二氧化碳的压力。例如，在一个实施方案中，染色混合物包含在水溶液中的 $NaHCO_3$ 及 $KHCO_3$，优选水中包含 $NaHCO_3$、$KHCO_3$ 及 $C_6H_8O_7.H_2O$；通过进一步举例方式，染色混合物可用如 Salisbury & Graves，J. Reprod. Fertil., 6: 351-359（1963）中公开的水中包含 0.097 摩尔/升 $NaHCO_3$、0.173 摩尔/升 $KHCO_3$、0.090 摩尔/升 $C_6H_8O_7.H_2O$ 的抑制缓冲液形成。只要精细胞暴露于活动能力抑制剂，它们一般保持静止。

此种调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物的实例包括例如丙

酮酸、维生素 K、硫辛酸、谷胱甘肽、黄素、醌、超氧化物歧化酶（SOD）及 SOD 模拟物。如果包括在染色混合物中，此种组合物可以足可实施保护作用而不有害影响精子健康的浓度存在。取决于以下因素，如所应用的特定组合物或染色混合物中精子的浓度，示例的浓度范围包括自约 10 μM 至约 50 mM。例如，如果组合物中包括丙酮酸，它可在染色混合物中以自约 0.5 μM 至约 50 mM 的浓度存在，优选自约 1 mM 至约 40 mM，更优选自约 2.5 mM 至约 25 mM，又更优选自约 10 mM 至约 20 mM，甚至又更优选约 15 mM，且最优选约 10 mM。如果组合物中包括维生素 K，它可在染色混合物中以自约 1 μM 至约 100 μM 的浓度存在，优选自约 10 μM 至约 100 μM，优选自约 50 μM 至约 100 μM 的浓度存在，且最优选约 100 μM。如果组合物中包括硫辛酸，它可在染色混合物中以自 0.1 mM 至约 1 mM 的浓度存在，优选自约 0.5 mM 至约 1 mM，更优选约 0.5 mM，且最优选约 1 mM。染色混合物可包含任一以上实施方案的组合物或为以上列出浓度的任意组合。例如，染色混合物可包含调节细胞内或细胞外氧化/还原反应的组合物，所述组合物包含浓度约 10 mM 的丙酮酸及浓度约 100 μM 的维生素 K。备选地，染色混合物可包含这样的组合物，所述组合物包含浓度约 10 mM 的丙酮酸及浓度约 1 mM 的硫辛酸。又另一实例包括包含这样组合物的染色混合物，所述组合物包含浓度约 10 mM 的丙酮酸、浓度约 100 μM 的维生素 K 及浓度约 1 mM 的硫辛酸。

一旦根据本发明对精子进行染色，可对它们进行制备用于分选且然后使用允许根据基于荧光分离的任何已知方法进行分选。一般应用且公知的方法包括如在美国专利号 5,135, 759、5,985, 216、6, 071,689、6,149, 867 及 6,263, 745 以及 WO 99/33956 及 WO 01/37655 中示例及描述的流式细胞仪系统。在一个实施方案中，例如，在本发明的升高温度维持时，经染色细胞可与鞘液组合或制备用于分选。在另一实施方案中，例如，经染色细胞自升高温度冷却，其中染料摄取在较低温度如室温进行，其中后续加工步骤也在室温进行，以能在这个实施方案中达到目的程度的分离，然而，一般优选在本发明升高温度的温度以下没有显著染料摄入量发生。

实施例

实施例 1

用人工阴道自性成熟公牛收集公牛精液，并将样本在经温度控制容器中于 37℃运输到染色装置中。收到样本后，根据标准及公知方法（Farrell 等人，Theriogenology, 49 (4) : 871-9（1998 年 3 月））对精液浓度、视觉活动能力、pH 及膜完整性、活动能力及前进活动能力通过 Hamilton-Thorn 活动能力分析仪（IVOS）进行分析。基于精液浓度，制备 8 X 5mL 精子悬液。在 pH 7.35 的 41℃ TCA 缓冲液中悬浮精子而制备四个 5mL 150 X 10^6 个精子/毫升样本。再在 pH 7.35 的 39℃ TCA 缓冲液中悬浮精子而制备另外四个 5mL 150 X 10^6 个精子/毫升样本。对于精子悬液，加入水溶解的 10 mM 的 Hoechst 溶液以产生如在表 1 中看到的染料浓度（“Hoechst 的目标浓度（μM））。将精子悬液在 41℃及 39℃水浴中维持。通过自精子悬液样本中取出 500 μL 并通过流式细胞仪测定染料的摄取(即确定荧光强度）对精子悬液进行分析。

表 1

试管 #	温度（℃）	Hoechst 的目标浓度（μM）	向 5mL 精子悬液中加入 10mM Hoechst33342 的 μL 数
1	39℃	20 μM	10 μL
2	41℃	20 μM	10 μL
3	39℃	30 μM	15 μL
4	41℃	30 μM	15 μL
5	39℃	57 μM	28.5 μL
6	41℃	57 μM	28.5 μL
7	39℃	85 μM	42.5 μL
8	41℃	85 μM	42.5 μL

分析结果在图 1A-1D 中总结。

实施例 2

除了用于对精子染色的 Hoechst 33342 浓度外，如实施例 1 相同方式获得并制备精子样本。表 2 列出了实施例 2 中应用的浓度。将悬液在 41℃及 39℃水浴中维持。定时自每个样本中取出 500 μL 样本并通过流式细胞仪以确定荧光强度进行分析。

表 2

试管 #	温度（℃）	Hoechst 的目标浓度（μM）	向 5mL 精子悬液中加入 10mM Hoechst33342 的 μL 数
1	39℃	20 μM	10 μL
2	41℃	20 μM	10 μL
3	39℃	30 μM	15 μL
4	41℃	30 μM	15 μL
5	39℃	40 μM	20 μL
6	41℃	40 μM	20 μL
7	39℃	60 μM	30 μL
8	41℃	60 μM	30 μL

分析结果在图 2A-2D 中总结。

实施例 3

除了用于对精子染色的 Hoechst 33342 浓度及染色温度外，如实施例 1 相同的方式获得、制备、染色及分析精子样本。表 3 列出了实施例 3 中应用的浓度及温度。

表 3

试管 #	温度（℃）	Hoechst 的目	向 5mL 精子悬液中加入

		标浓度（μM）	10mM Hoechst33342 的 μL 数
1	39℃	60 μM	30 μL
2	43℃	60 μM	30 μL
3	39℃	40 μM	20 μL
4	43℃	40 μM	20 μL
5	39℃	30 μM	15 μL
6	43℃	30 μM	15 μL
7	39℃	20 μM	10 μL
8	43℃	20 μM	10 μL

分析结果在图 3A-3D 中总结。

实施例 4

除了用于对精子染色的 Hoechst 33342 浓度及染色温度外，如实施例 1 相同的方式获得、制备、染色及分析精子样本。表 4 列出了实施例 4 中应用的浓度及温度。

表 4

试管 #	温度（℃）	Hoechst 的目标浓度（μM）	向 5mL 精子悬液中加入 10mM Hoechst33342 的 μL 数
1	39℃	80 μM	40 μL
2	43℃	80 μM	40 μL
3	39℃	100 μM	50 μL
4	43℃	100 μM	50 μL

分析结果在图 4A 及 4B 中总结。

实施例 5

除了用于对精子染色的 Hoechst 33342 浓度及染色温度外，如实施例 1 相同的方式获得、制备、染色及分析精子样本。表 5 列出了实施例 5 中应用的浓度及温度。

表 5

试管 #	温度（℃）	Hoechst 的目标浓度（μM）	向 5mL 精子悬液中加入 10mM Hoechst33342 的 μL 数
5	39℃	80 μM	40 μL
6	45℃	80 μM	40 μL
7	39℃	100 μM	50 μL
8	45℃	100 μM	50 μL

分析结果在图 5A 及 5B 中总结。

实施例 6

除了用于对精子染色的 Hoechst33342 浓度及染色温度外，如实施例 1 相同的方式获得、制备、染色及分析精子样本。表 6 列出了实施例 6 中应用的浓度及温度。

表 6

试管 #	温度（℃）	Hoechst 的目标浓度（μM）	向 5mL 精子悬液中加入 10mM Hoechst33342 的 μL 数
1	39℃	60 μM	30 μL
2	47℃	60 μM	30 μL
3	39℃	150 μM	75 μL
4	43℃	150 μM	75 μL

分析结果在图 6A 及 6B 中总结。

实施例 7

用人工阴道自性成熟公牛收集公牛精子，并将样本在经温度控制容器中于 25℃运输到染色装置中。收到样本后，通过已知分析方法对精液的浓度、视觉活动能力、IVOS 活动能力及前进活动能力、pH 及膜完整性进行分析。基于精液浓度，制备 4 X 1mL 的 150 X 10^6 个精子/毫升的悬液。在 pH 7.35 的 41℃ TCA 缓冲液中悬浮精液而制备两个 1mL 150 X 10^6 个精子

/毫升样本。再在 pH 7.35 的 43℃ TCA 缓冲液中悬浮精液而制备另外两个 1mL 150 X 10^6 个精子/毫升样本。向每个温度的一个样本中加入 6 μL 10 mM Hoechst 溶液以产生 60 μM 的染料浓度。悬液在 41℃及 43℃水浴中维持。定时自精子悬液样本中取出 50 μL，转移到锥形管并加入 200 μL 适当温度的 TCA 缓冲液，以产生浓度为 30 X 10^6 个精子/毫升的最终精子悬液。将 30 X 10^6 个精子/毫升精子悬液样本立即通过 IVOS 进行分析。对活动能力百分率及前进活动能力（Prog Mot）百分率的 IVOS 结果在图 7A 及 7B 显示。

实施例 8

除了以下各项不同外，如实施例 7 对公牛精液进行收集、分析、在缓冲液中悬浮、用 Hoechst 33342 染色以及通过 IVOS 分析。将样本在 60 μM 浓度染色并在 39℃及 45℃的温度维持。IVOS 分析结果在图 8A 及 8B 中显示。

实施例 9

除了以下各项不同外，如实施例 7 对公牛精子进行收集、分析、在缓冲液中悬浮、用 Hoechst 33342 染色以及通过 IVOS 分析。将样本在 80 μM 浓度染色并在 41℃、43℃及 45℃的温度维持。IVOS 分析结果在图 9A-9C 中显示。

实施例 10

除了以下各项不同外，如实施例 7 对公牛精液进行收集、分析、在缓冲液中悬浮、用 Hoechst 33342 染色以及通过 IVOS 分析。将样本在 100 μM 浓度染色并在 41℃、43℃及 45℃的温度维持。IVOS 分析结果在图 10A-10C 中显示。

实施例 11

除了以下各项不同外，如实施例 7 对公牛精液进行收集、分析、在缓冲液中悬浮、用 Hoechst 33342 染色以及通过 IVOS 分析。将样本在 100 μM 浓度染色并在 47℃的温度维持。IVOS 分析结果在图 11 中显示。

实施例 12

除了以下各项不同外，如实施例 7 对公牛精液进行收集、分析、在缓冲液中悬浮、用 Hoechst 33342 染色以及通过 IVOS 分析。将样本在 100 μM 浓度染色并在 49℃的温度维持。IVOS 分析结果在图 12 中显示。

实施例 13

除了以下各项不同外，如实施例 7 对公牛精液进行收集、分析、在缓冲液中悬浮、用 Hoechst 33342 染色以及通过 IVOS 分析。将样本在浓度 125 μM 及 150 μM 染色，且每个样本在水浴 43℃的温度维持。IVOS 分析结果在图 13A 及 13B 中显示。

实施例 14

除了以下各项不同外，如实施例 7 对公牛精液进行收集、分析、在缓冲液中悬浮、用 Hoechst 33342 染色以及通过 IVOS 分析。将样本在 200 μM 及 250 μM 浓度染色，且每个样本在水浴 43℃的温度维持。IVOS 分析结果在图 14A 及 14B 中显示。

实施例 15

除了以下各项不同外，如实施例 7 对公牛精液进行收集、分析、在缓冲液中悬浮、用 Hoechst 33342 染色以及通过 IVOS 分析。将样本在 125 μM 及 150 μM 浓度染色，且每个样本在水浴 45℃的温度维持。IVOS 分析结果在图 15A 及 15B 中显示。

实施例 16

除了以下各项不同外，如实施例 7 对公牛精液进行收集、分析、在缓冲液中悬浮、用 Hoechst 33342 染色以及通过 IVOS 分析。将样本在 200 μM、250 μM 及 300 μM 浓度染色，且每个样本在水浴 45℃的温度维持。IVOS 分析结果在图 16A-16C 中显示。

实施例 17

除了以下各项不同外，如实施例 7 对公牛精液进行收集、分析、在缓冲液中悬浮、用 Hoechst 33342 染色以及通过 IVOS 分析。将样本在 300 μM、350 μM 及 400 μM 浓度染色，且每个样本在水浴 43℃的温度维持。IVOS 分析结果在图 17A-17C 中显示。

实施例 18

用人工阴道自性成熟公牛收集公牛精液，并将样本在经温度控制容器中于 25℃运输到染色装置中。收到样本后，通过已知分析方法对精液的浓度、视觉活动能力、IVOS 活动能力及前进活动能力、pH 及膜完整性进行分析。基于精液浓度，通过将精液在 pH 7.35 的 43℃ TCA 缓冲液中悬浮制备 4 X 1mL 的 150 X 10^6 个精子/毫升的悬液。向三个样本中加入 SYBR 14 染料溶液以产生 0.6μM、6μM 及 60μM 的染料浓度。悬液在 43℃水浴中维持。定时将 50 μL 样本转移到锥形管并加入 200 μL 适当温度的 TCA 缓冲液，以产生 30 X 10^6 个精子/毫升的最终精子浓度。将样本立即在 IVOS 上进行分析。对活动能力百分率及前进活动能力（Prog Mot）百分率的 IVOS 结果在图 18A-18C 中显示。

实施例 19

除了应用的染料及浓度外，如实施例 1 相同的方式获得、制备、染色及分析精子样本。浓度 100 μM 的 BBC 及浓度为 6 μM 的 SYBE 14 用于染色精子悬液并将温度在 45℃水浴中维持。表 7 列出了实施例 19 中应用的浓度及温度。

表 7

试管 #	温度（℃）	SYBR14 的目标浓度（μM）	向 5mL 精子悬液中加入 1mM SYBR14 的 μL 数
1	39℃	6 μM	30 μL
2	45℃	6 μM	30 μL
		BBC	10mM BBC 的 μL 数
3	39℃	100 μM	50 μL
4	45℃	100 μM	50 μL

分析结果在图 19A 及 19B 中总结。

实施例 20

用人工阴道自性成熟公牛收集公牛精液并将样本用 2 份碳酸盐缓冲液稀释用于在经温度控制容器中于 25℃运输到染色装置中。收到样本后，根据标准及公知方法（Farrell 等人，Theriogenology, 49 (4) : 871-9（1998

年3月））对精液的浓度、活动能力及前进活动能力通过Hamilton-Thorn活动能力分析仪（IVOS）进行分析。基于精液浓度，取出一份碳酸盐精子悬液，对精子悬液于500 X g离心5分钟，弃去上清液并用pH 7.3的41℃TCA缓冲液重新悬浮沉淀物，从而制备1mL 150 X 10^6个精子/毫升的悬液。再在pH 7.3的包含10 mM丙酮酸的41℃ TCA缓冲液中悬浮精液制备另一1mL 150 X 10^6个精子/毫升的悬液。对于精子悬液，加入水溶解的10 mM的Hoechst溶液以产生400 μM Hoechst的染料浓度。染色期间将精子悬液在41℃水浴中维持。通过自染色精子悬液中取出50 μL，在相同温度加入200 μL相同缓冲液并通过IVOS分析以测定前进活动能力百分率（% Prog Mot）对精子悬液进行分析。IVOS分析结果在图20中总结。

实施例21

除了以下各项不同外，如实施例20中相同的方式获得并制备精子样本。悬浮精子并用于染色及IVOS分析的缓冲液为TCA及包含10 μM维生素K的TCA。IVOS分析结果在图21中总结。

实施例22

除了以下各项不同外，如实施例20中相同的方式获得并制备精子样本。悬浮精子并染色及IVOS分析的缓冲液为TCA及包含100 μM维生素K的TCA。IVOS分析结果在图22中总结。

实施例23

除了以下各项不同外，如实施例20中相同的方式获得并制备精子样本。悬浮精子并染色及IVOS分析的缓冲液为TCA及包含1mM硫辛酸的TCA。IVOS分析结果在图23中总结。

实施例24

用人工阴道自性成熟公牛收集公牛精液并将样本在经温度控制容器中于25℃运输到染色装置中。收到样本后，根据标准及公知方法（Farrell 等人，Theriogenology, 49 (4) : 871-9（1998年3月））对精液的浓度、活动能力及前进活动能力通过Hamilton-Thorn活动能力分析仪（IVOS）进行分析。基于精液浓度，通过在TCA缓冲液或在基于碳酸盐的抑制剂中悬浮精液而制备几管450 X 10^6个精子/毫升悬液。以下表III图示了应用的

组分及染色条件。

表III

样本名称	缓冲液	pH	Hoechst 浓度（μM）	温度（℃）
10mM 丙酮酸 TCA	TCA 中含 10mM 丙酮酸	7.3	300 μM	41℃
碳酸盐 6.2	基于碳酸盐的抑制剂 pH6.2	6.2	300 μM	41℃
碳酸盐 7.3	基于碳酸盐的抑制剂 pH7.3	7.3	300 μM	41℃

对于精子悬液，加入水溶解的 10 mM Hoechst 溶液以产生 300 μM Hoechst 的浓度。精子悬液在 41℃水浴中维持 30 分钟，然后如每个图中特别指出稀释到一般用于分选的浓度，用含 10mM 丙酮酸的 TCA 或 pH6.2 的基于碳酸盐的抑制剂稀释到 150 X 10^6 个精子/毫升。通过在每个图中指定的时间期限自经染色且经稀释悬液中取出 50 μL 并加入 200 μL 25℃pH 7.3 的含 10mM 丙酮酸 TCA 以启动静止期的逆转，允许至少 5 分钟的平衡期且通过 IVOS 分析以测定前进活动能力百分数，对精子悬液进行分析。IVOS 前进活动能力百分数的比较参见图 24-26。

图 1A

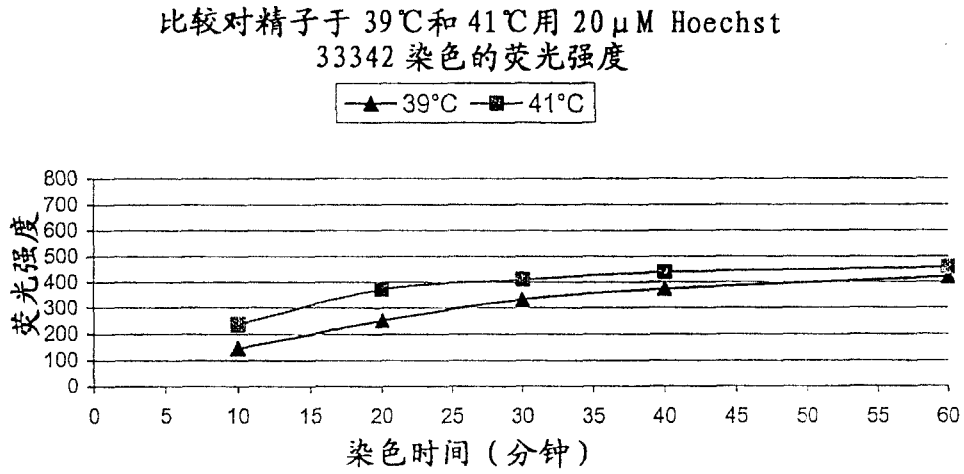

比较对精子于 39℃和 41℃用 20μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
41°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 1B

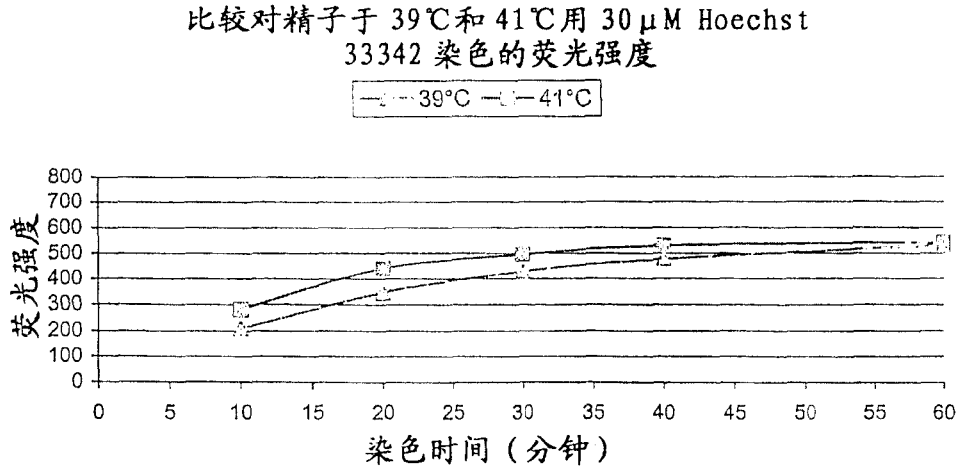

比较对精子于 39℃和 41℃用 30μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
41°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 1C

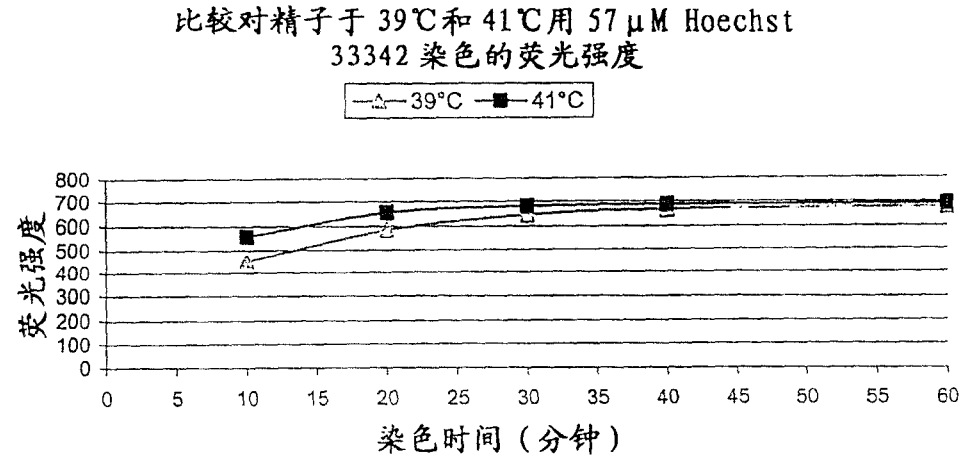

比较对精子于 39℃和 41℃用 57μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
41°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 1D

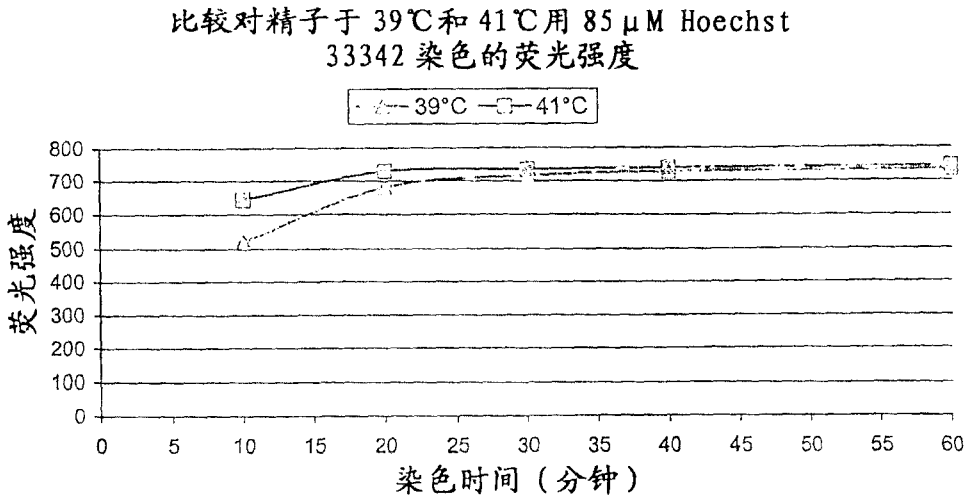

比较对精子于 39℃和 41℃用 85μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
41°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 2A

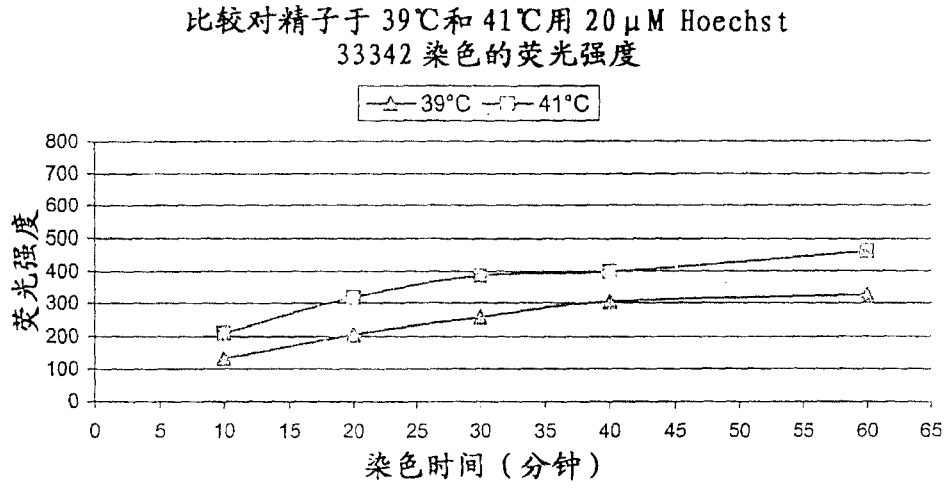

比较对精子于 39℃和 41℃用 20μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
41°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
染色时间（分钟）

图 2B

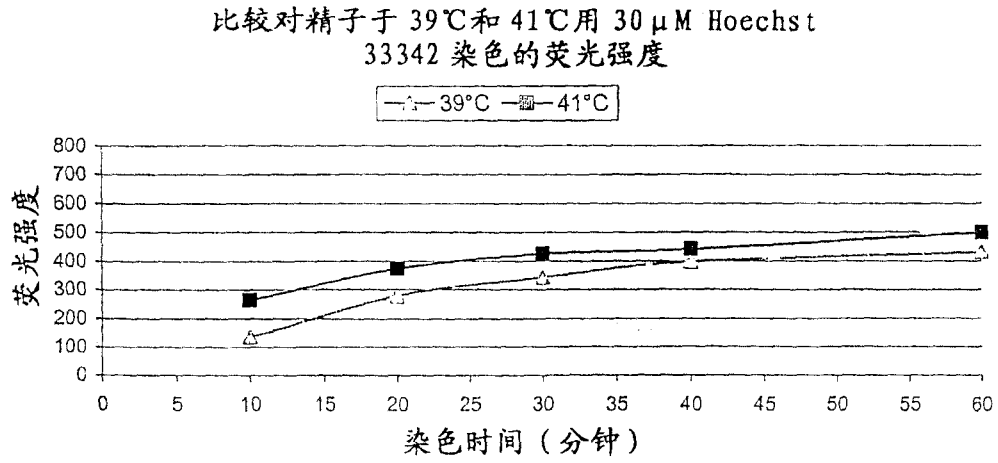

比较对精子于 39℃和 41℃用 30μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
41°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 2C

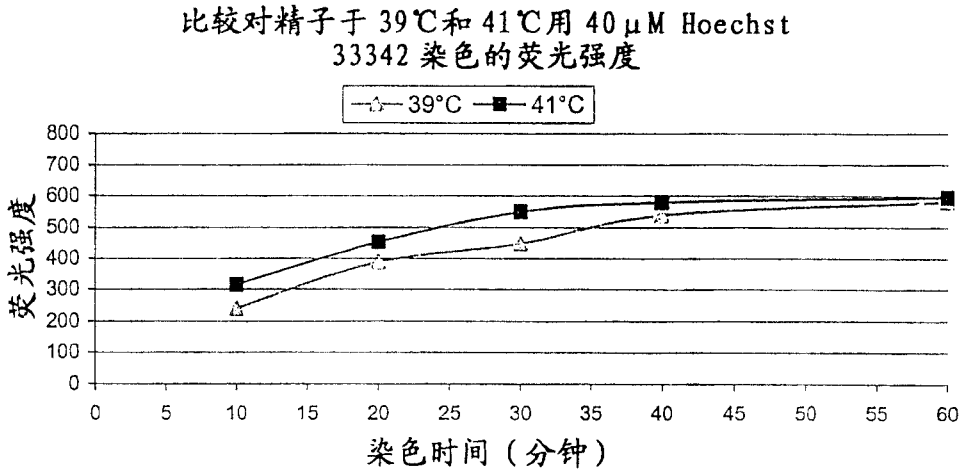

比较对精子于 39℃和 41℃用 40μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
41°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 2D

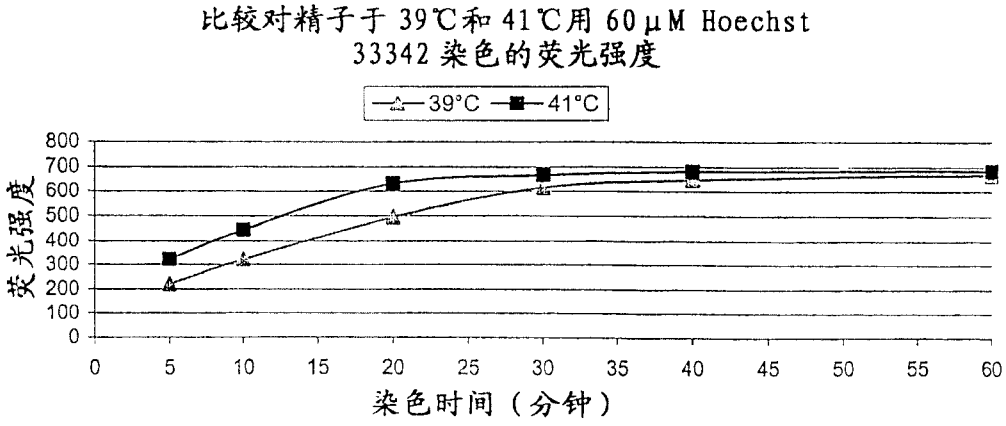

比较对精子于 39℃和 41℃用 60μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
41°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 3A

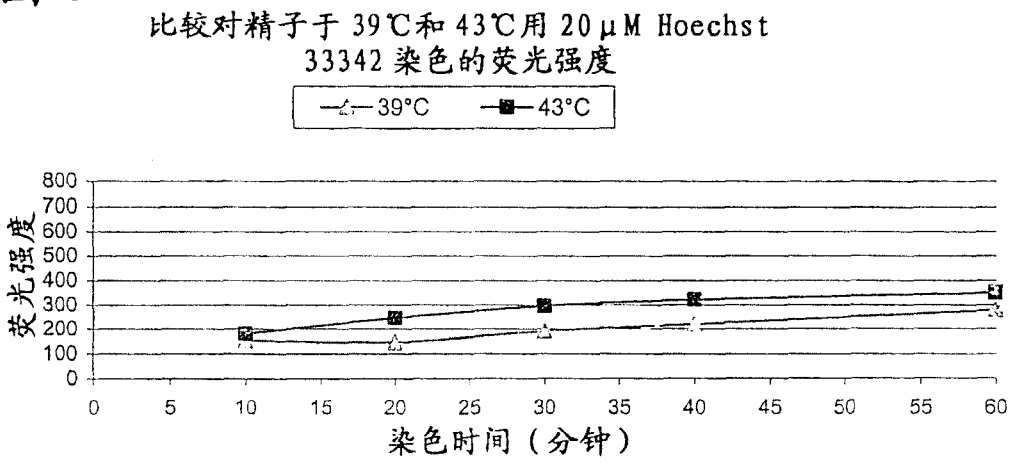

比较对精子于 39℃和 43℃用 20μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
43°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 3B

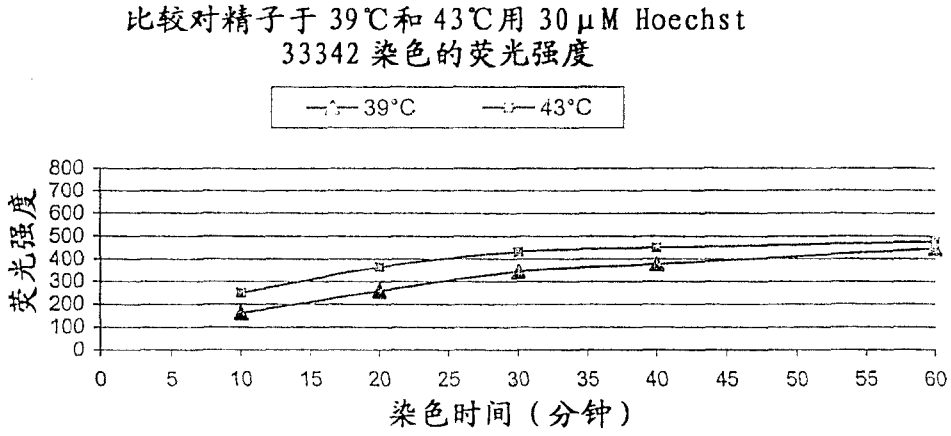

比较对精子于 39℃和 43℃用 30μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
43°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 3C

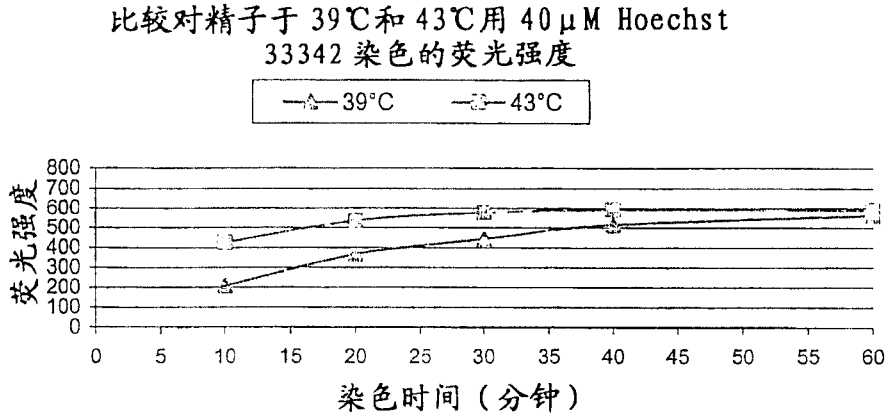

比较对精子于 39℃和 43℃用 40μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
43°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 3D

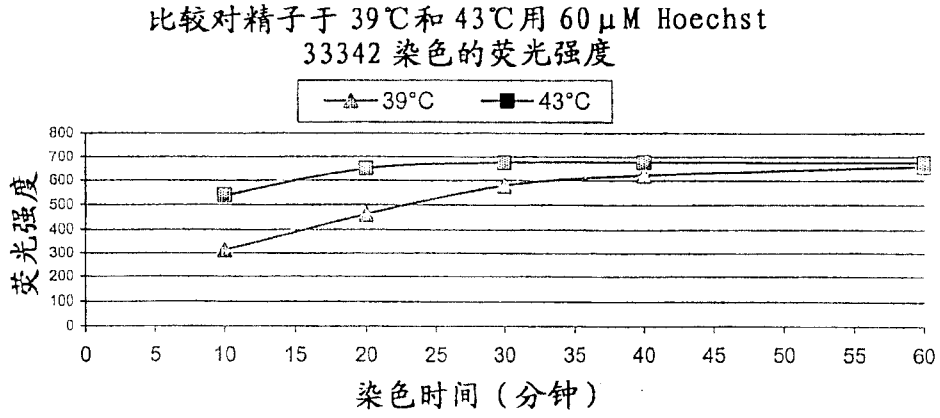

比较对精子于 39℃和 43℃用 60μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
39°C
43°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
染色时间（分钟）

图 4A

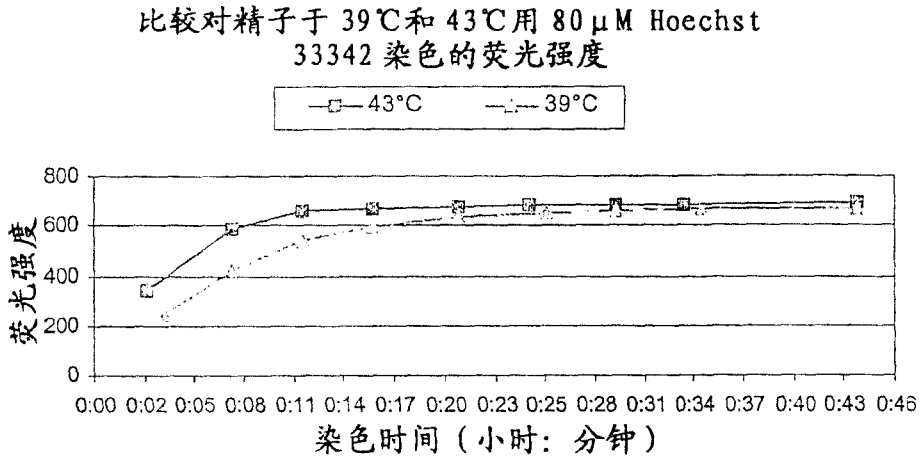

比较对精子于 39℃和 43℃用 80μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
43°C
39°C
荧光强度
800
600
400
200
0
0:00 0:02 0:05 0:08 0:11 0:14 0:17 0:20 0:23 0:25 0:28 0:31 0:34 0:37 0:40 0:43 0:46
染色时间（小时：分钟）

图 4B

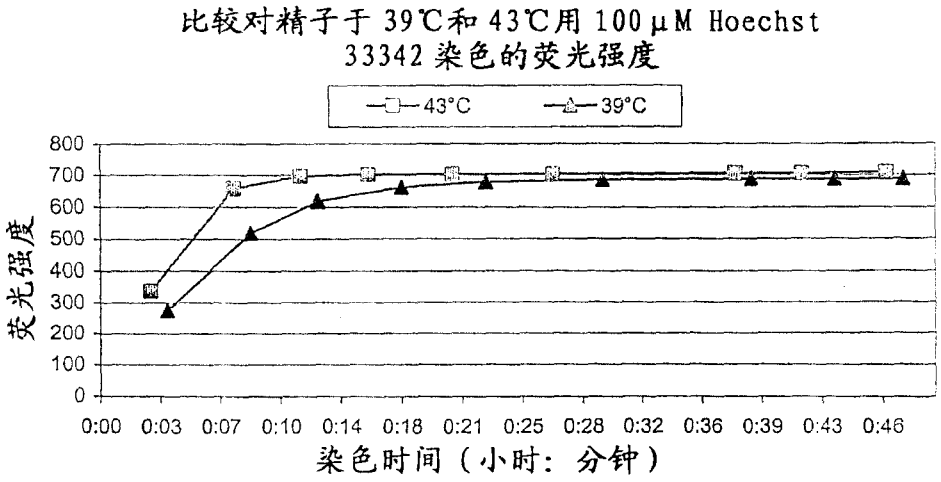

比较对精子于 39℃和 43℃用 100μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
43°C
39°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0:00 0:03 0:07 0:10 0:14 0:18 0:21 0:25 0:28 0:32 0:36 0:39 0:43 0:46
染色时间（小时：分钟）

图 4A

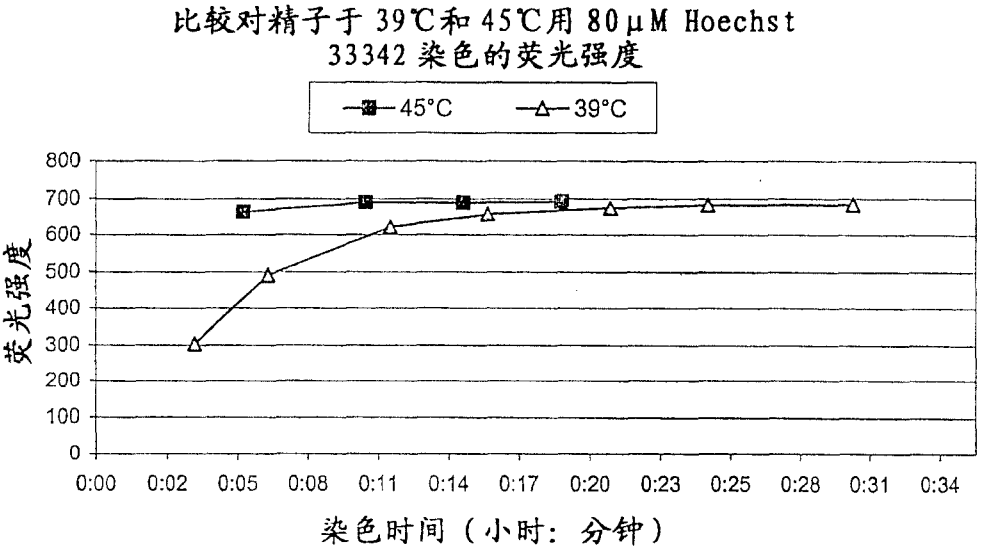

比较对精子于 39℃和 45℃用 80μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
45°C
39°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0:00
0:02
0:05
0:08
0:11
0:14
0:17
0:20
0:23
0:25
0:28
0:31
0:34
染色时间（小时：分钟）

图 4B

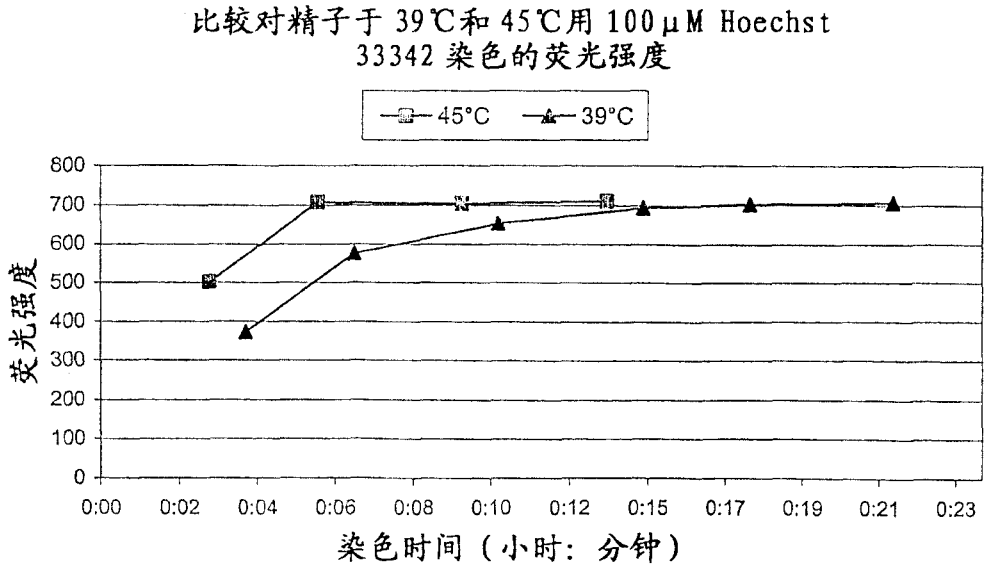

比较对精子于 39℃和 45℃用 100μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
45°C
39°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0:00
0:02
0:04
0:06
0:08
0:10
0:12
0:15
0:17
0:19
0:21
0:23
染色时间（小时：分钟）

图 6A

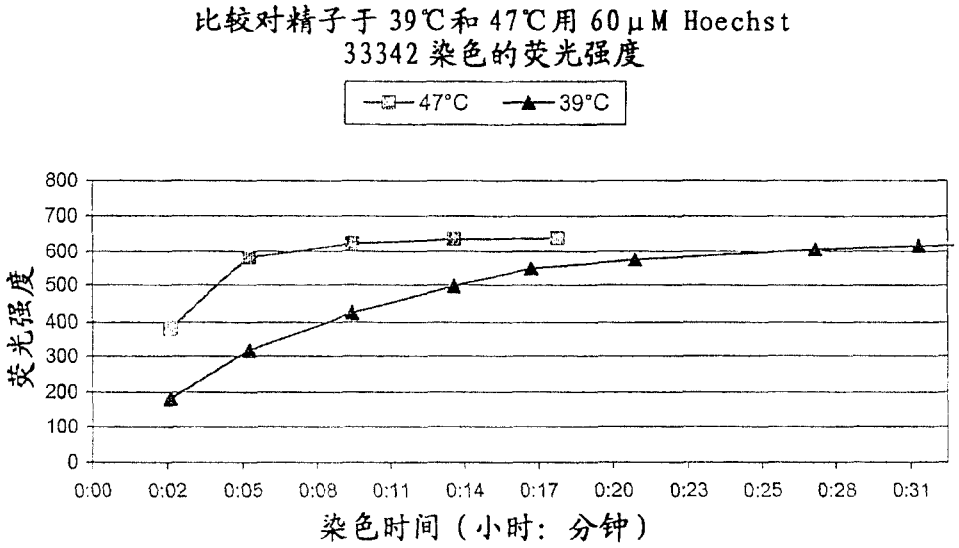

比较对精子于 39℃和 47℃用 60μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
47°C
39°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0:00
0:02
0:05
0:08
0:11
0:14
0:17
0:20
0:23
0:25
0:28
0:31
染色时间（小时：分钟）

图 6B

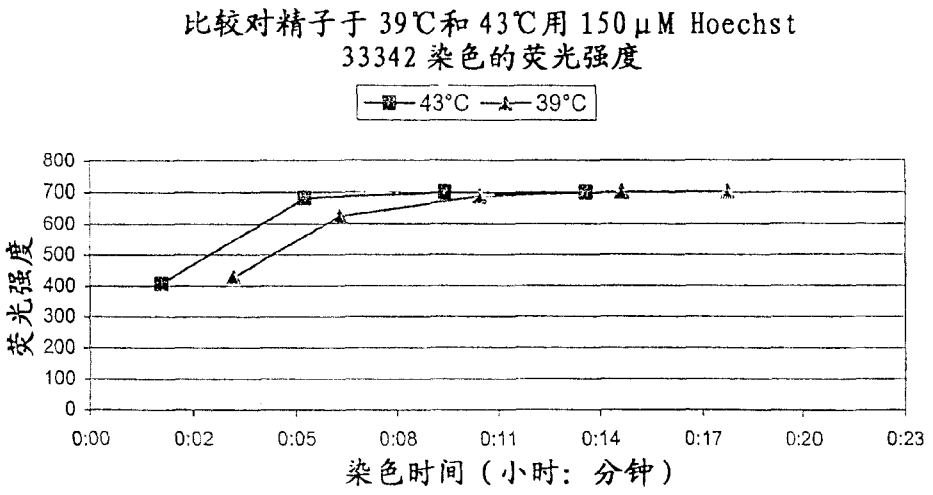

比较对精子于 39℃和 43℃用 150μM Hoechst 33342 染色的荧光强度
43°C
39°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0:00
0:02
0:05
0:08
0:11
0:14
0:17
0:20
0:23
染色时间（小时：分钟）

图 7A

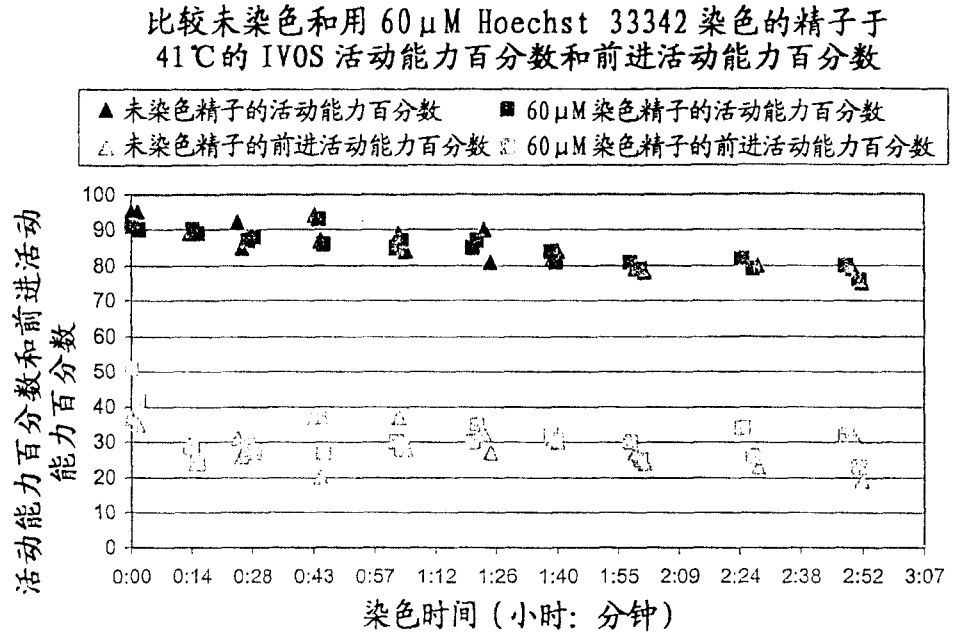

比较未染色和用 60μM Hoechst 33342 染色的精子于
41℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■ 60μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□ 60μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:14 0:28 0:43 0:57 1:12 1:26 1:40 1:55 2:09 2:24 2:38 2:52 3:07
染色时间（小时：分钟）

图 7B

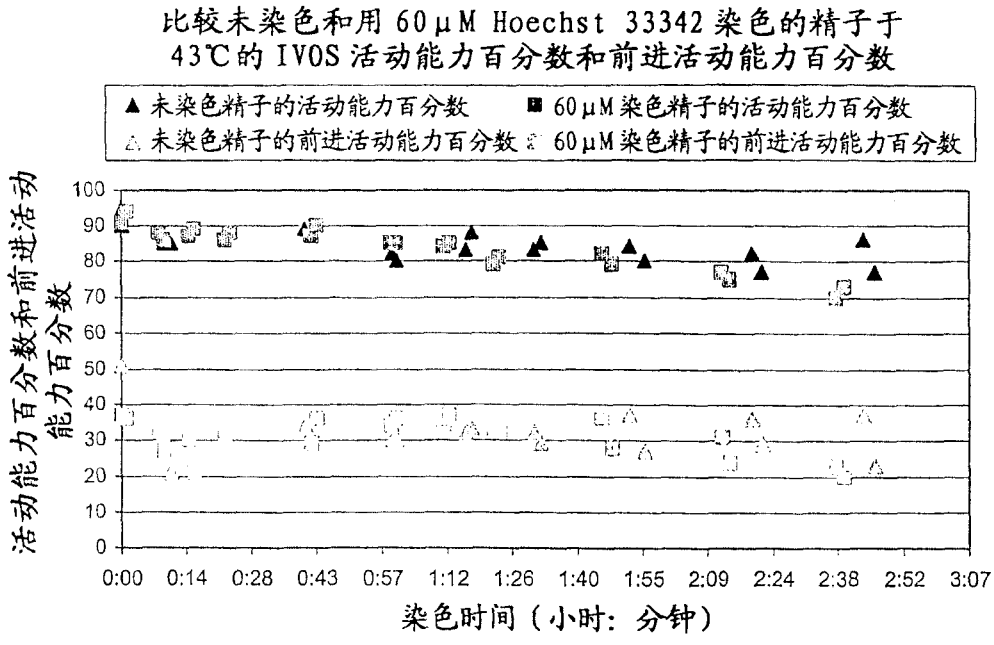

比较未染色和用 60μM Hoechst 33342 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■ 60μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□ 60μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:14 0:28 0:43 0:57 1:12 1:26 1:40 1:55 2:09 2:24 2:38 2:52 3:07
染色时间（小时：分钟）

图 8A

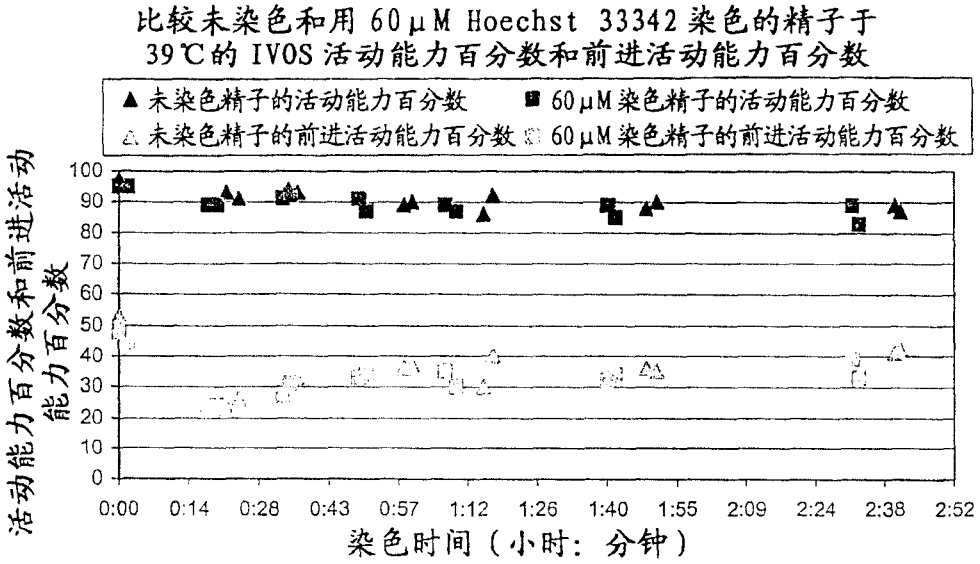

比较未染色和用 60μM Hoechst 33342 染色的精子于
39℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
未染色精子的活动能力百分数
60μM染色精子的活动能力百分数
未染色精子的前进活动能力百分数
60μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:14
0:28
0:43
0:57
1:12
1:26
1:40
1:55
2:09
2:24
2:38
2:52
染色时间（小时：分钟）

图 8B

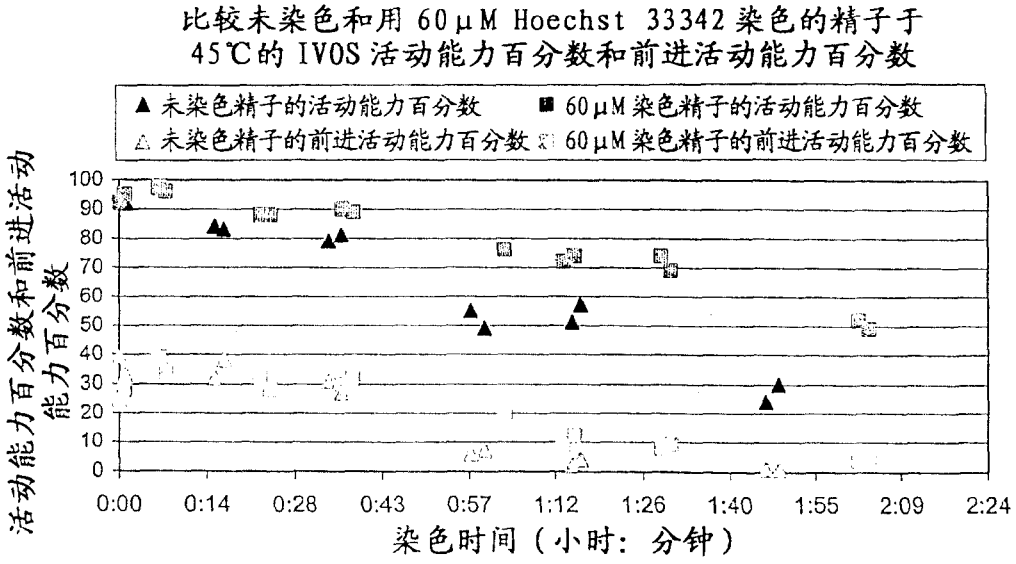

比较未染色和用 60μM Hoechst 33342 染色的精子于
45℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
未染色精子的活动能力百分数
60μM染色精子的活动能力百分数
未染色精子的前进活动能力百分数
60μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:14
0:28
0:43
0:57
1:12
1:26
1:40
1:55
2:09
2:24
染色时间（小时：分钟）

图 9A

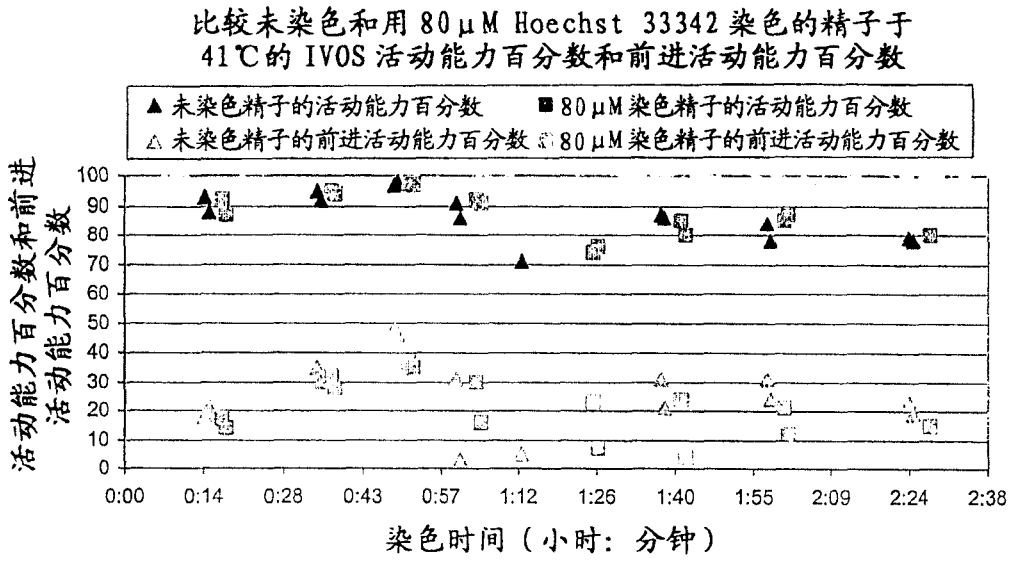

比较未染色和用 80μM Hoechst 33342 染色的精子于
41℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■ 80μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□ 80μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:14
0:28
0:43
0:57
1:12
1:26
1:40
1:55
2:09
2:24
2:38
染色时间（小时：分钟）

图 9B

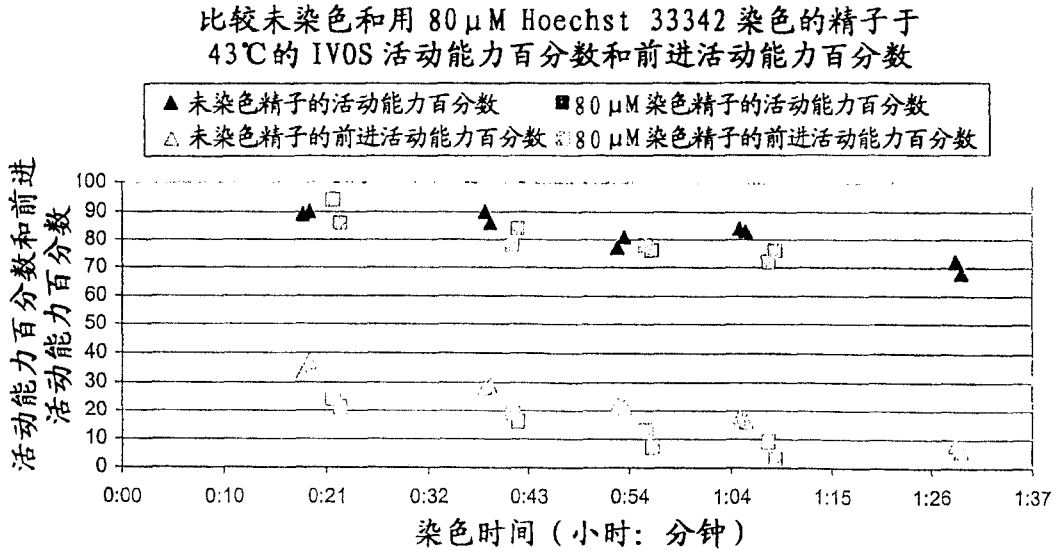

比较未染色和用 80μM Hoechst 33342 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■ 80μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□ 80μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:10
0:21
0:32
0:43
0:54
1:04
1:15
1:26
1:37
染色时间（小时：分钟）

图 9C

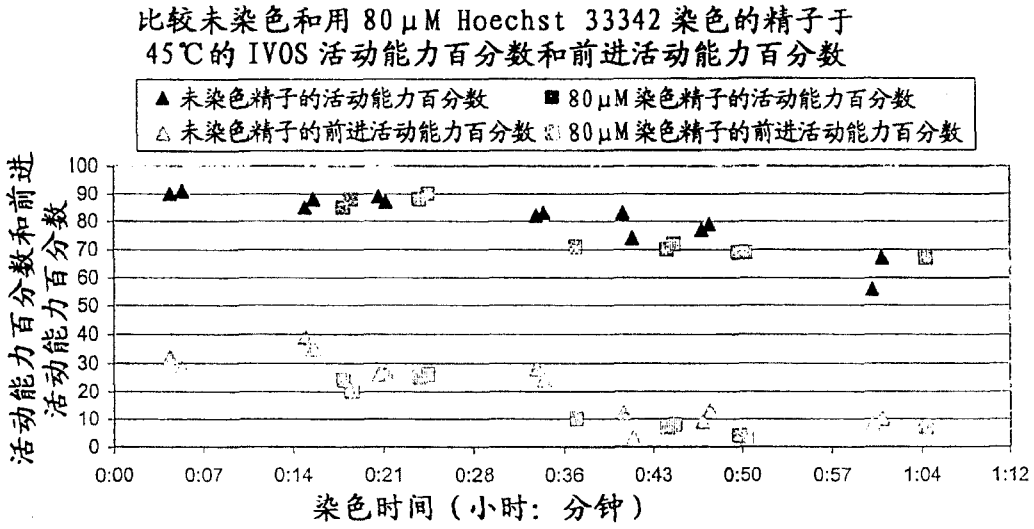

比较未染色和用 80 μM Hoechst 33342 染色的精子于
45℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■ 80μM 染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□ 80μM 染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:07
0:14
0:21
0:28
0:36
0:43
0:50
0:57
1:04
1:12
染色时间（小时：分钟）

图 10A

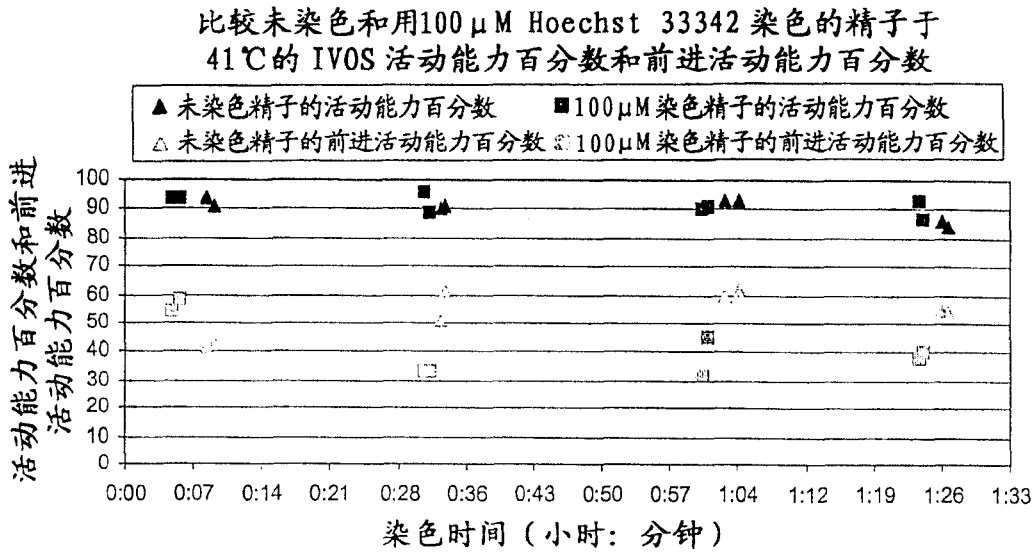

比较未染色和用100μM Hoechst 33342染色的精子于
41℃的IVOS活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲未染色精子的活动能力百分数
■100μM染色精子的活动能力百分数
△未染色精子的前进活动能力百分数
□100μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:07 0:14 0:21 0:28 0:36 0:43 0:50 0:57 1:04 1:12 1:19 1:26 1:33
染色时间（小时：分钟）

图 10B

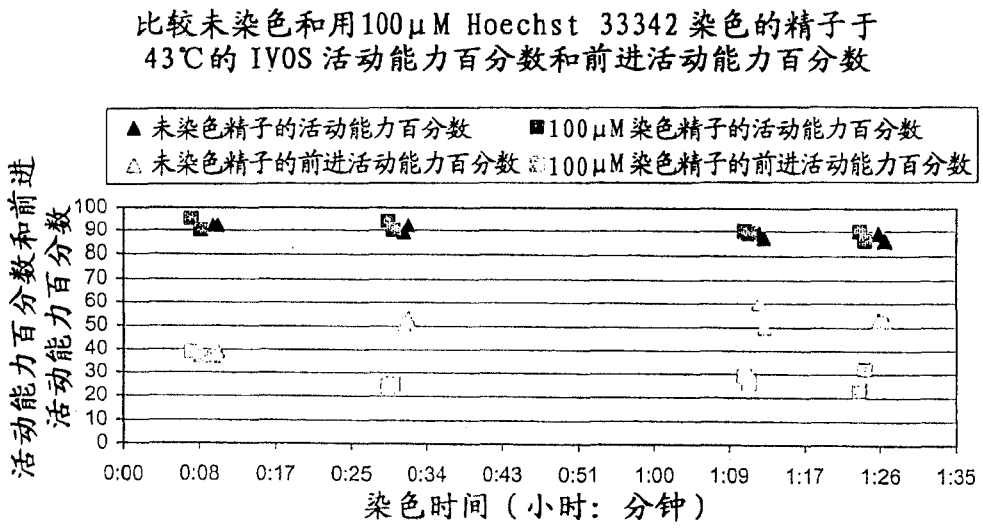

比较未染色和用100μM Hoechst 33342染色的精子于
43℃的IVOS活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲未染色精子的活动能力百分数
■100μM染色精子的活动能力百分数
△未染色精子的前进活动能力百分数
□100μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:08 0:17 0:25 0:34 0:43 0:51 1:00 1:09 1:17 1:26 1:35
染色时间（小时：分钟）

图 10C

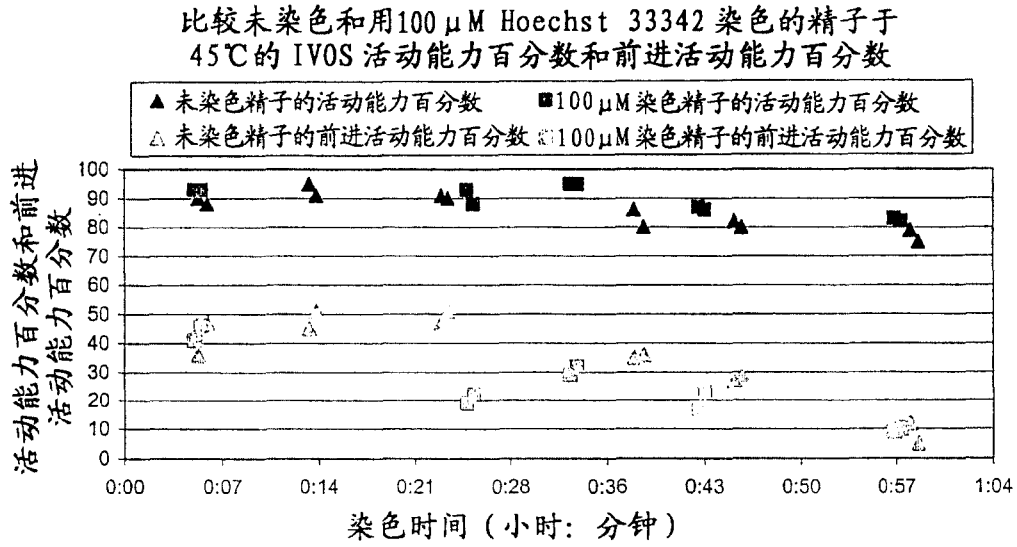

比较未染色和用100μM Hoechst 33342染色的精子于
45℃的IVOS活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲未染色精子的活动能力百分数
■100μM染色精子的活动能力百分数
△未染色精子的前进活动能力百分数
□100μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:07
0:14
0:21
0:28
0:36
0:43
0:50
0:57
1:04
染色时间（小时：分钟）

图 11

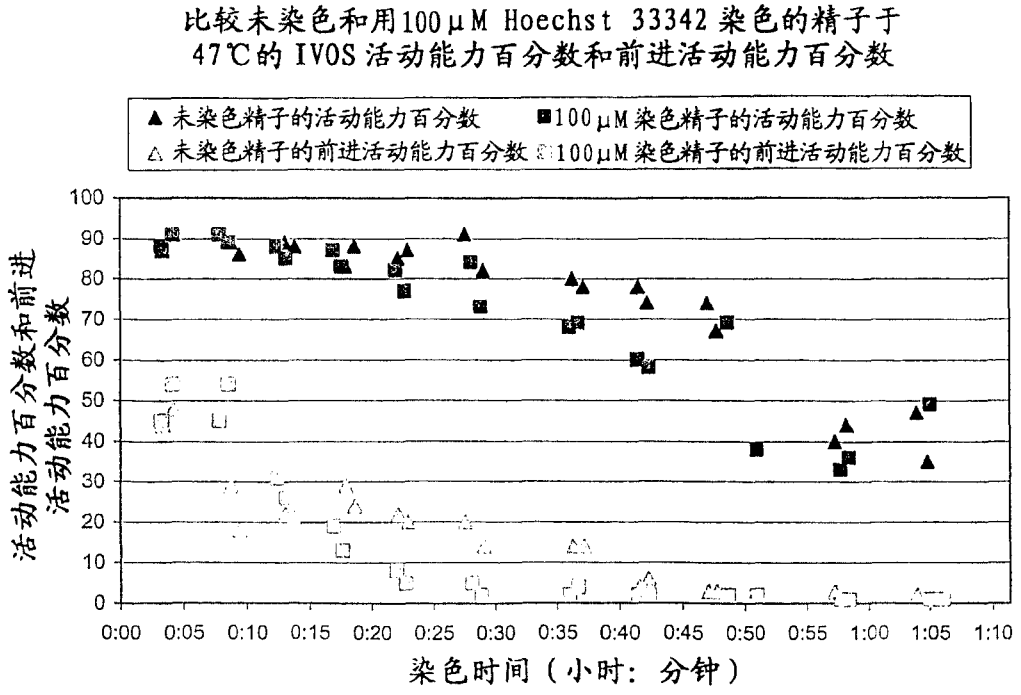

比较未染色和用100μM Hoechst 33342染色的精子于
47℃的IVOS活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲未染色精子的活动能力百分数
■100μM染色精子的活动能力百分数
△未染色精子的前进活动能力百分数
□100μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:05
0:10
0:15
0:20
0:25
0:30
0:35
0:40
0:45
0:50
0:55
1:00
1:05
1:10
染色时间（小时：分钟）

图 12

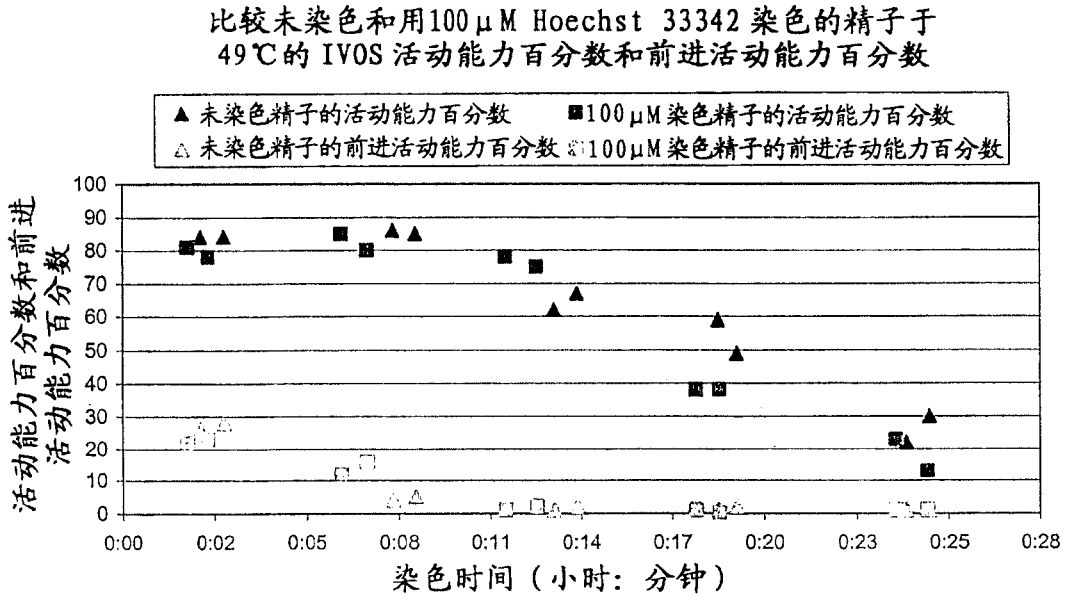

比较未染色和用100μM Hoechst 33342染色的精子于
49℃的IVOS活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■100μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□100μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:02
0:05
0:08
0:11
0:14
0:17
0:20
0:23
0:25
0:28
染色时间（小时：分钟）

图 13A

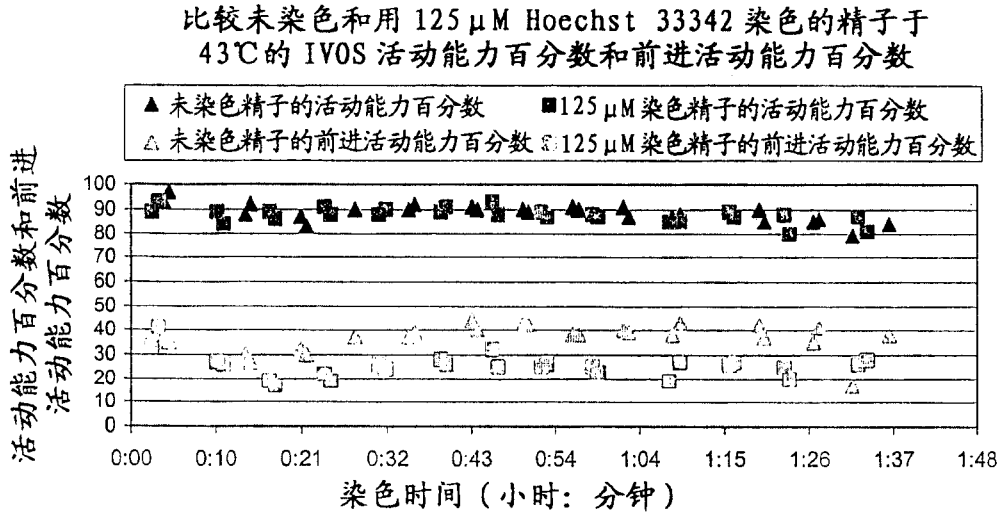

比较未染色和用 125μM Hoechst 33342 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■125μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□125μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进
活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:10
0:21
0:32
0:43
0:54
1:04
1:15
1:26
1:37
1:48
染色时间（小时：分钟）

图 13B

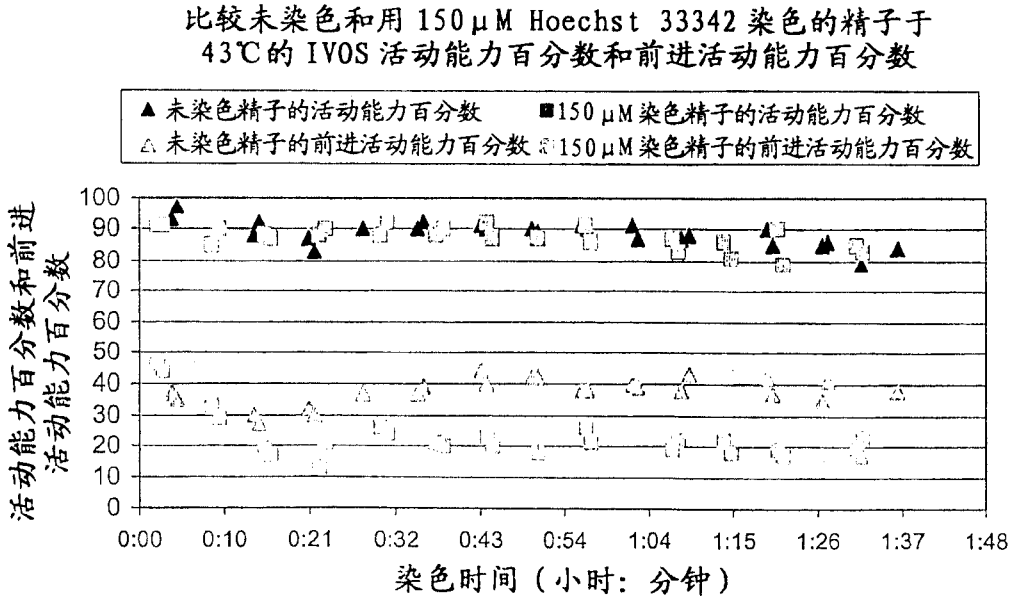

比较未染色和用 150μM Hoechst 33342 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■150μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□150μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进
活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:10
0:21
0:32
0:43
0:54
1:04
1:15
1:26
1:37
1:48
染色时间（小时：分钟）

图 14A

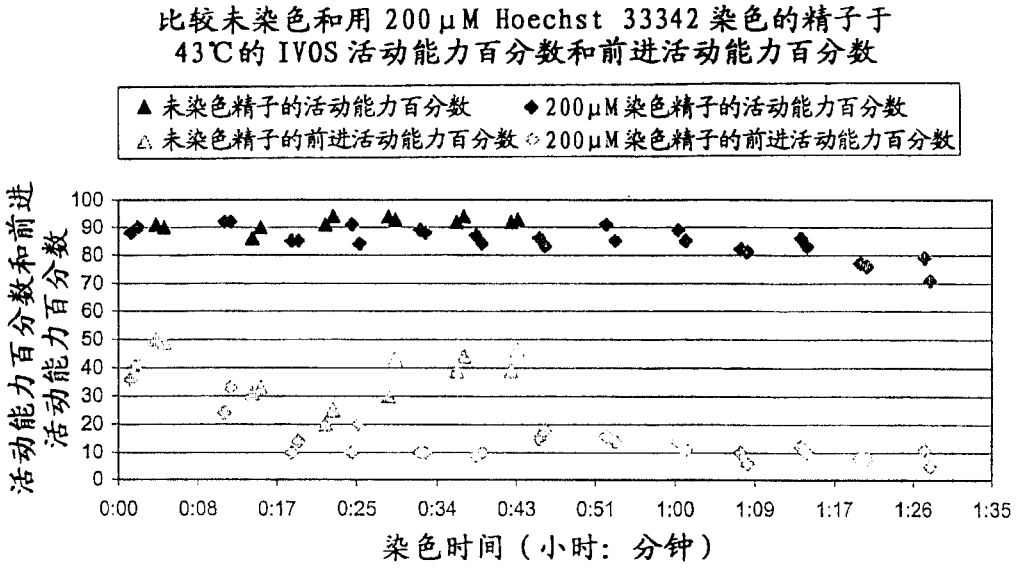

比较未染色和用 200μM Hoechst 33342 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
◆ 200μM 染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
◇ 200μM 染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:08
0:17
0:25
0:34
0:43
0:51
1:00
1:09
1:17
1:26
1:35
染色时间（小时：分钟）

图 14B

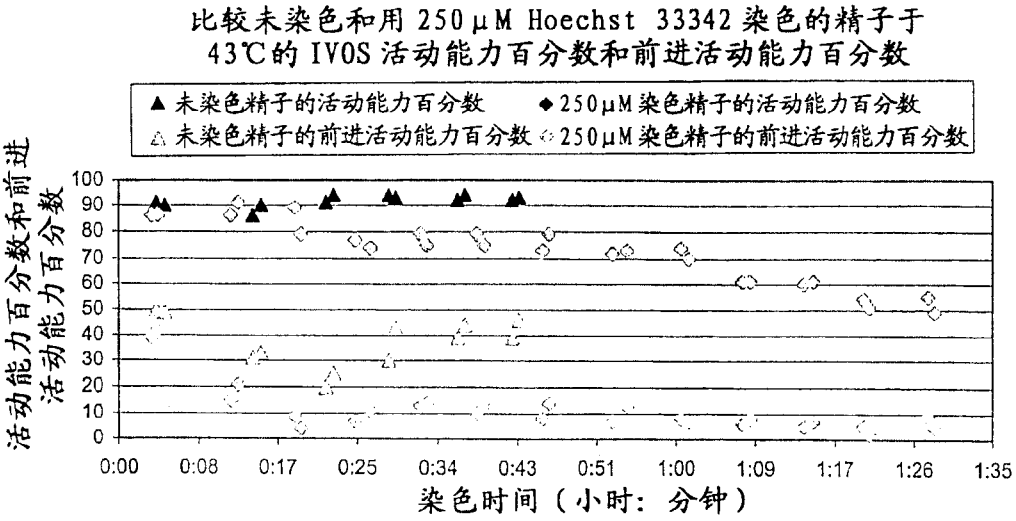

比较未染色和用 250μM Hoechst 33342 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
◆ 250μM 染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
◇ 250μM 染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:08
0:17
0:25
0:34
0:43
0:51
1:00
1:09
1:17
1:26
1:35
染色时间（小时：分钟）

图 15A

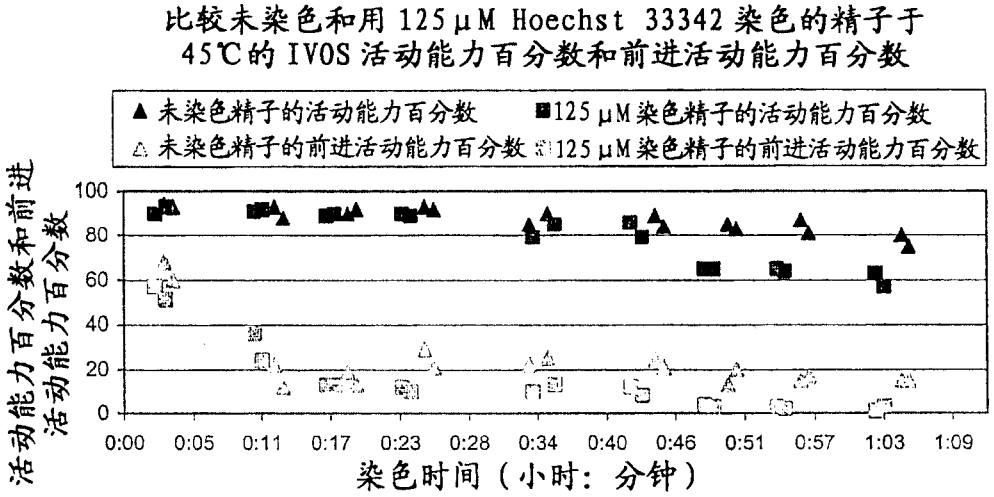

比较未染色和用 125 μM Hoechst 33342 染色的精子于
45℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■125 μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□125 μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
80
60
40
20
0
0:00 0:05 0:11 0:17 0:23 0:28 0:34 0:40 0:46 0:51 0:57 1:03 1:09
染色时间（小时：分钟）

图 15B

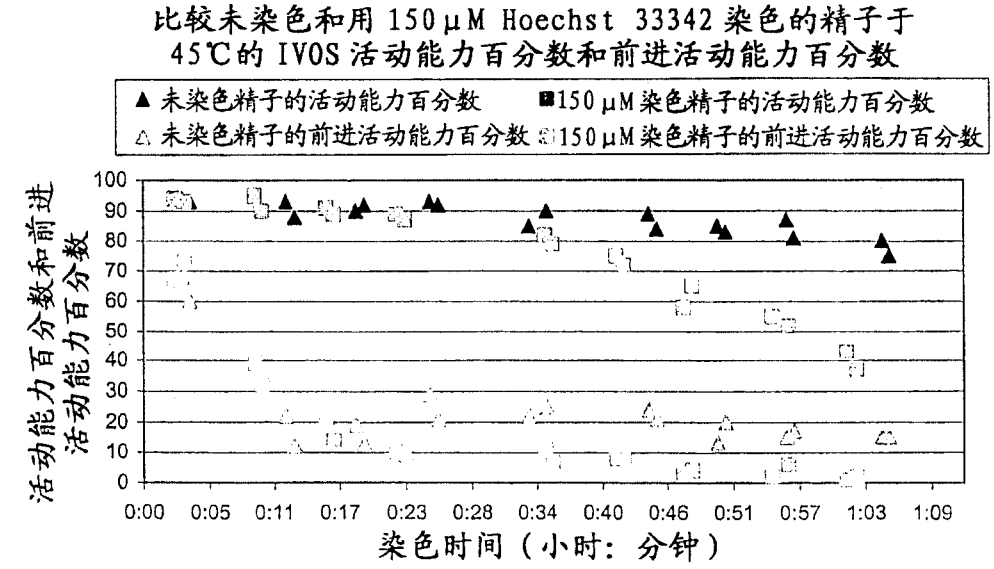

比较未染色和用 150 μM Hoechst 33342 染色的精子于
45℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■150 μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□150 μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:05 0:11 0:17 0:23 0:28 0:34 0:40 0:46 0:51 0:57 1:03 1:09
染色时间（小时：分钟）

图 16A

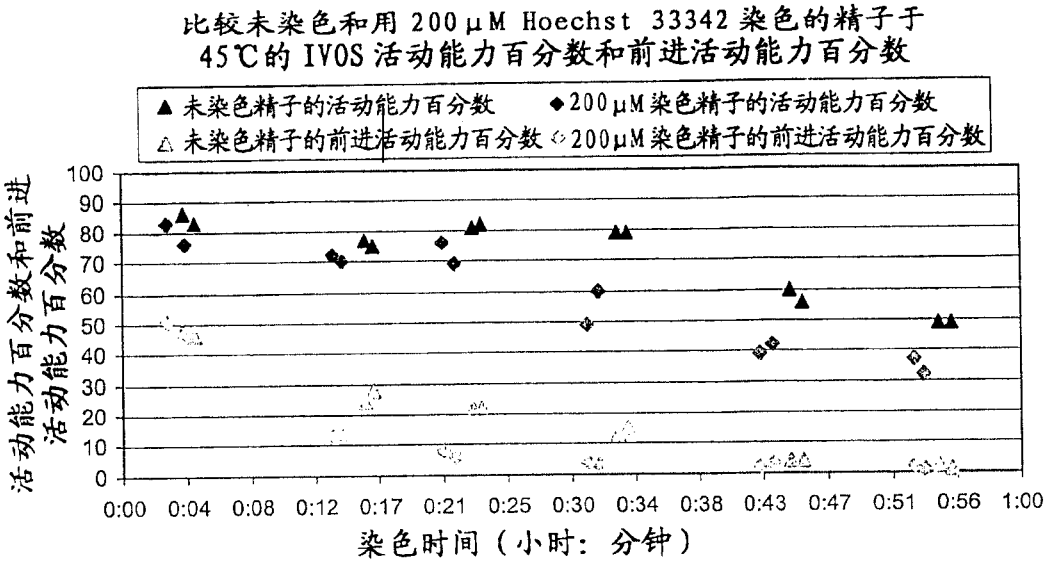

比较未染色和用 200μM Hoechst 33342 染色的精子于
45℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
◆ 200μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
◇ 200μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:04 0:08 0:12 0:17 0:21 0:25 0:30 0:34 0:38 0:43 0:47 0:51 0:56 1:00
染色时间（小时：分钟）

图 16B

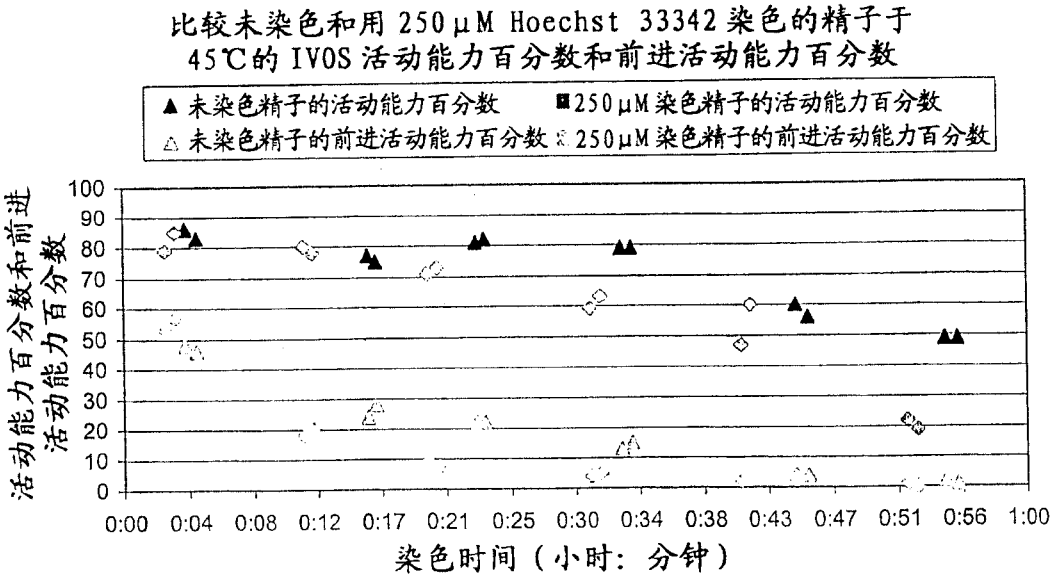

比较未染色和用 250μM Hoechst 33342 染色的精子于
45℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■ 250μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
◇ 250μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:04 0:08 0:12 0:17 0:21 0:25 0:30 0:34 0:38 0:43 0:47 0:51 0:56 1:00
染色时间（小时：分钟）

图 16C

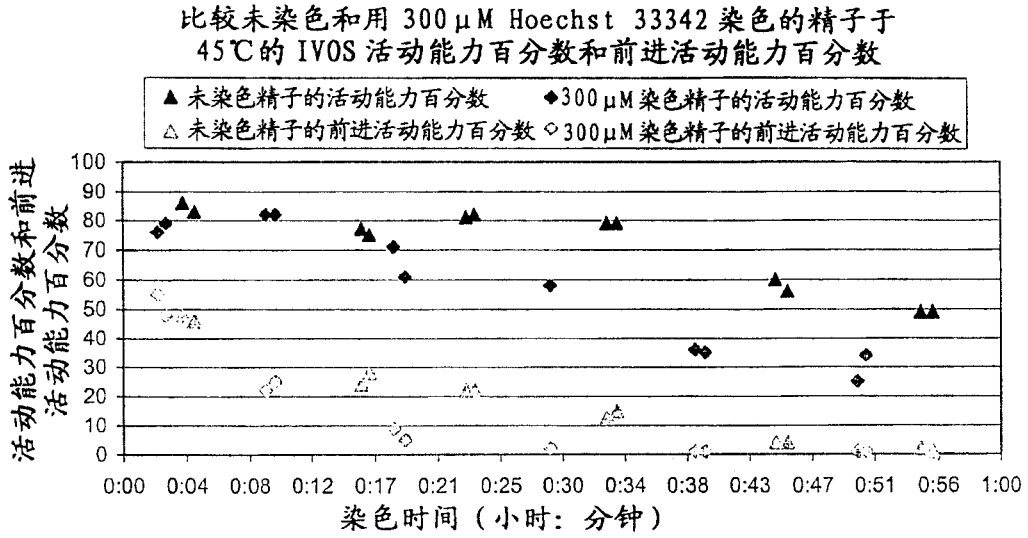

比较未染色和用 300μM Hoechst 33342 染色的精子于
45℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
◆300μM染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
◇300μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:04 0:08 0:12 0:17 0:21 0:25 0:30 0:34 0:38 0:43 0:47 0:51 0:56 1:00
染色时间（小时：分钟）

图 17A

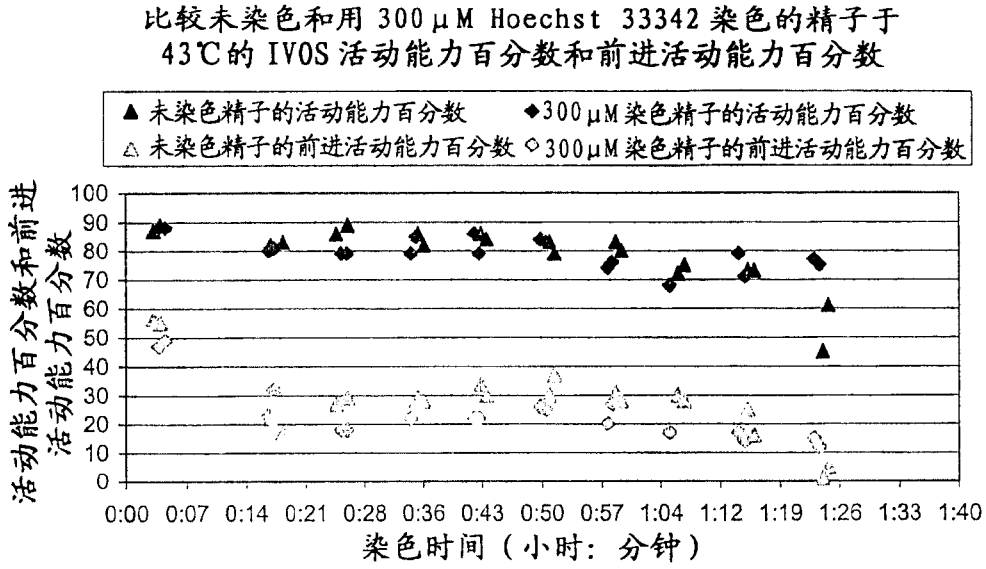

比较未染色和用 300 μM Hoechst 33342 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
◆300 μM 染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
◇300 μM 染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:07 0:14 0:21 0:28 0:36 0:43 0:50 0:57 1:04 1:12 1:19 1:26 1:33 1:40
染色时间（小时：分钟）

图 17B

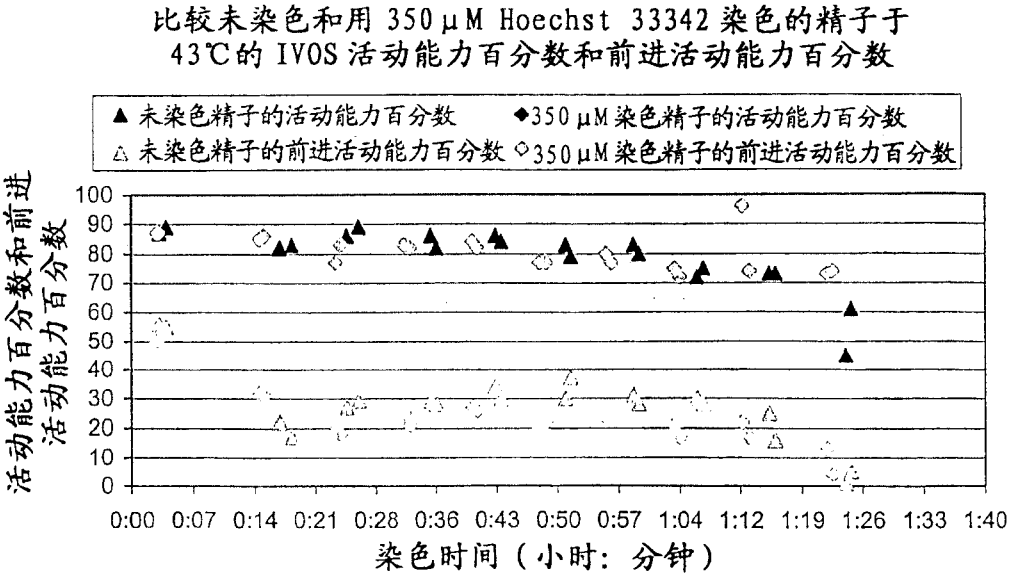

比较未染色和用 350 μM Hoechst 33342 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
◆350 μM 染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
◇350 μM 染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:07 0:14 0:21 0:28 0:36 0:43 0:50 0:57 1:04 1:12 1:19 1:26 1:33 1:40
染色时间（小时：分钟）

图 17C

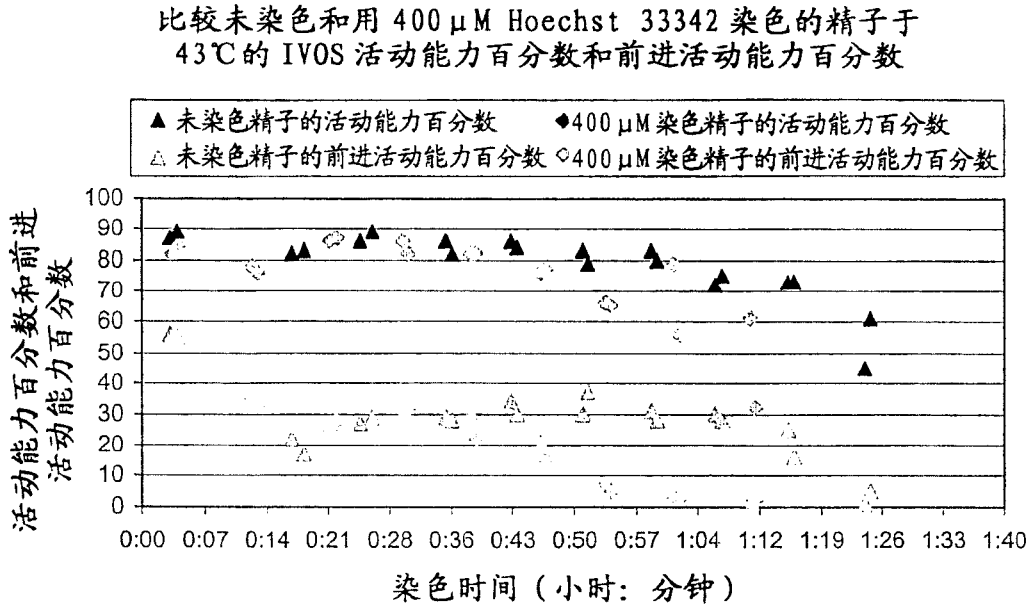

比较未染色和用 400 μM Hoechst 33342 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
◆400 μM 染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
◇400 μM 染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00 0:07 0:14 0:21 0:28 0:36 0:43 0:50 0:57 1:04 1:12 1:19 1:26 1:33 1:40
染色时间（小时：分钟）

图 18A

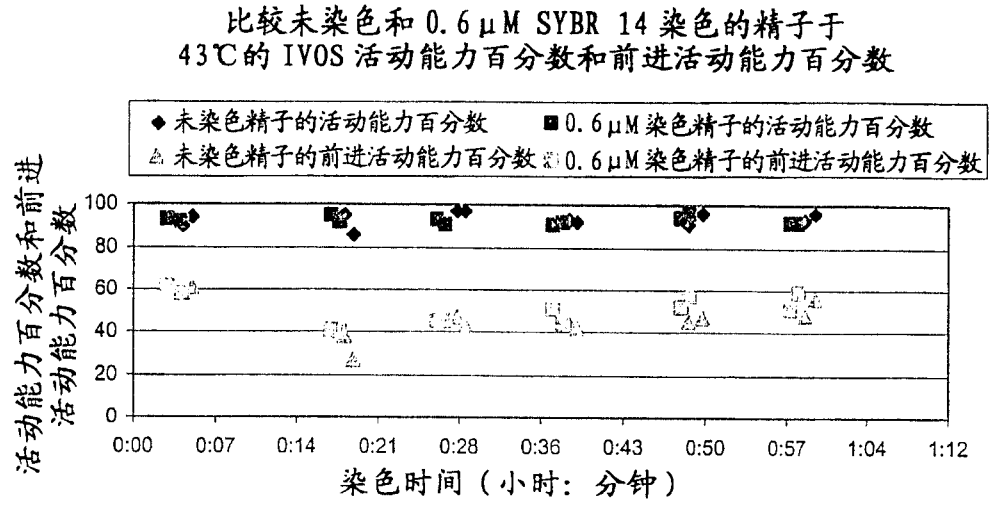

比较未染色和 0.6μM SYBR 14 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
未染色精子的活动能力百分数
0.6μM染色精子的活动能力百分数
未染色精子的前进活动能力百分数
0.6μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
80
60
40
20
0
0:00
0:07
0:14
0:21
0:28
0:36
0:43
0:50
0:57
1:04
1:12
染色时间（小时：分钟）

图 18B

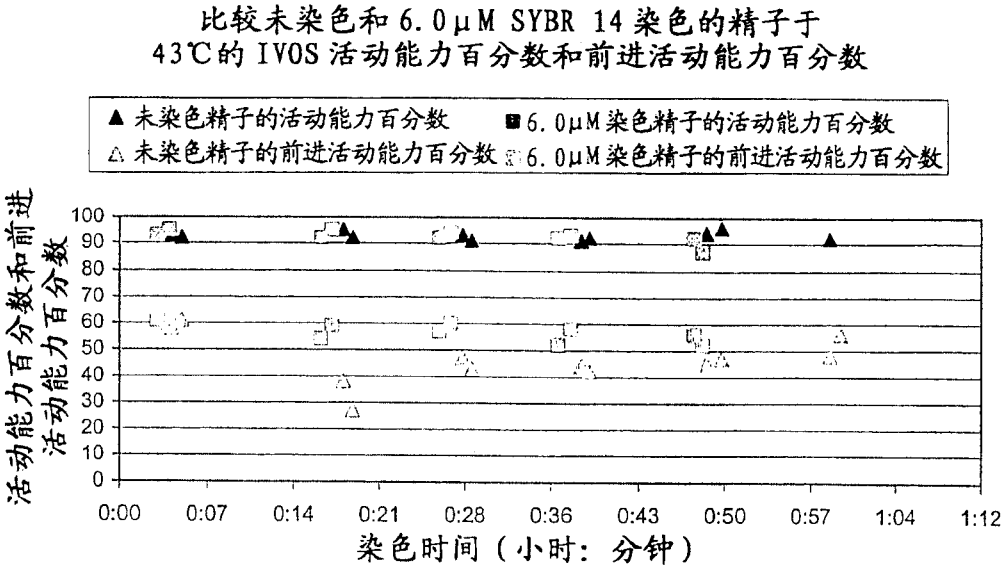

比较未染色和 6.0μM SYBR 14 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
未染色精子的活动能力百分数
6.0μM染色精子的活动能力百分数
未染色精子的前进活动能力百分数
6.0μM染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:07
0:14
0:21
0:28
0:36
0:43
0:50
0:57
1:04
1:12
染色时间（小时：分钟）

图 18C

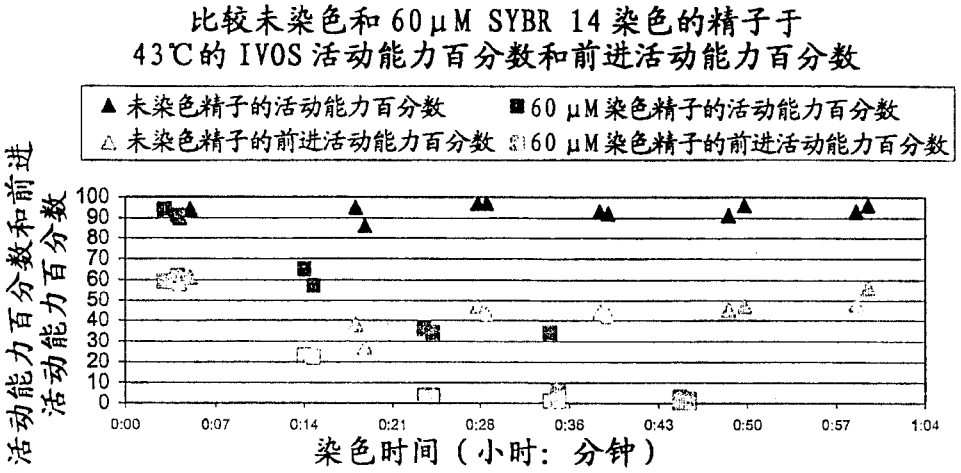

比较未染色和 60μM SYBR 14 染色的精子于
43℃的 IVOS 活动能力百分数和前进活动能力百分数
▲ 未染色精子的活动能力百分数
■ 60 μM 染色精子的活动能力百分数
△ 未染色精子的前进活动能力百分数
□ 60 μM 染色精子的前进活动能力百分数
活动能力百分数和前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:07
0:14
0:21
0:28
0:36
0:43
0:50
0:57
1:04
染色时间（小时：分钟）

图 19A

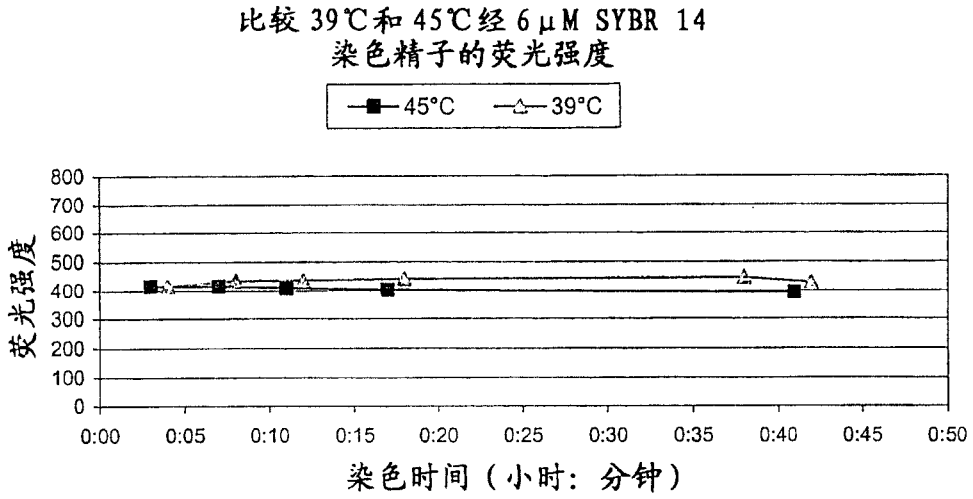

比较 39℃和 45℃经 6μM SYBR 14
染色精子的荧光强度
45°C
39°C
荧光强度
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0:00
0:05
0:10
0:15
0:20
0:25
0:30
0:35
0:40
0:45
0:50
染色时间（小时：分钟）

图 19B

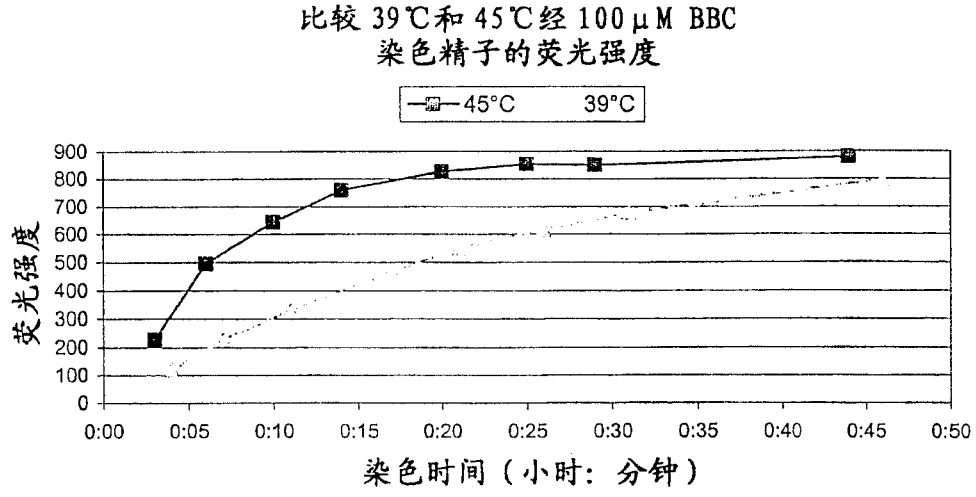

比较 39℃和 45℃经 100μM BBC
染色精子的荧光强度
45°C
39°C
荧光强度
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0:00
0:05
0:10
0:15
0:20
0:25
0:30
0:35
0:40
0:45
0:50
染色时间（小时：分钟）

图 20

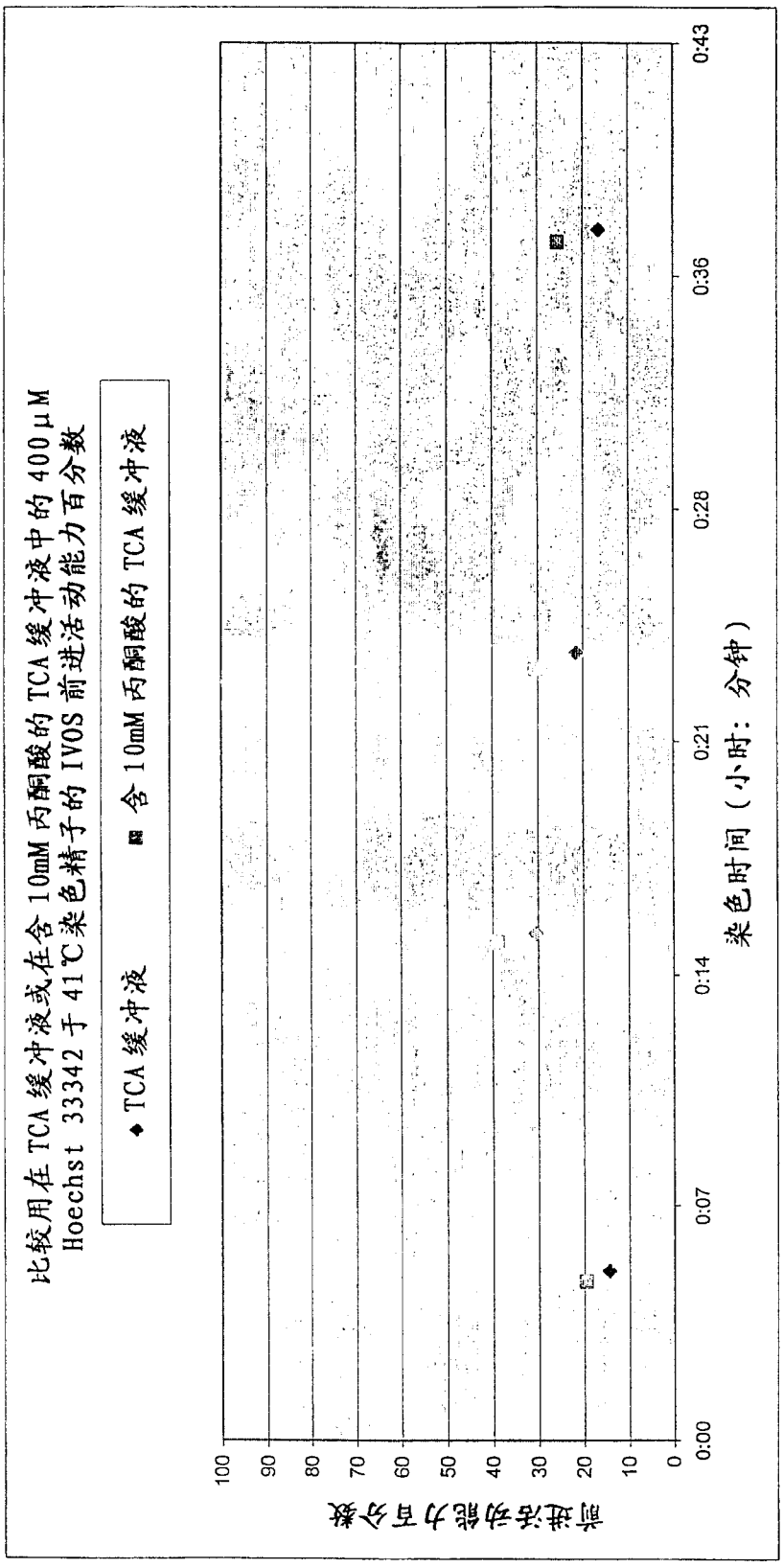

比较用在 TCA 缓冲液或在含 10mM 丙酮酸的 TCA 缓冲液中的 400μM Hoechst 33342 于 41℃染色精子的 IVOS 前进活动能力百分数
◆ TCA 缓冲液
■ 含 10mM 丙酮酸的 TCA 缓冲液
前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:07
0:14
0:21
0:28
0:36
0:43
染色时间（小时：分钟）

图 21

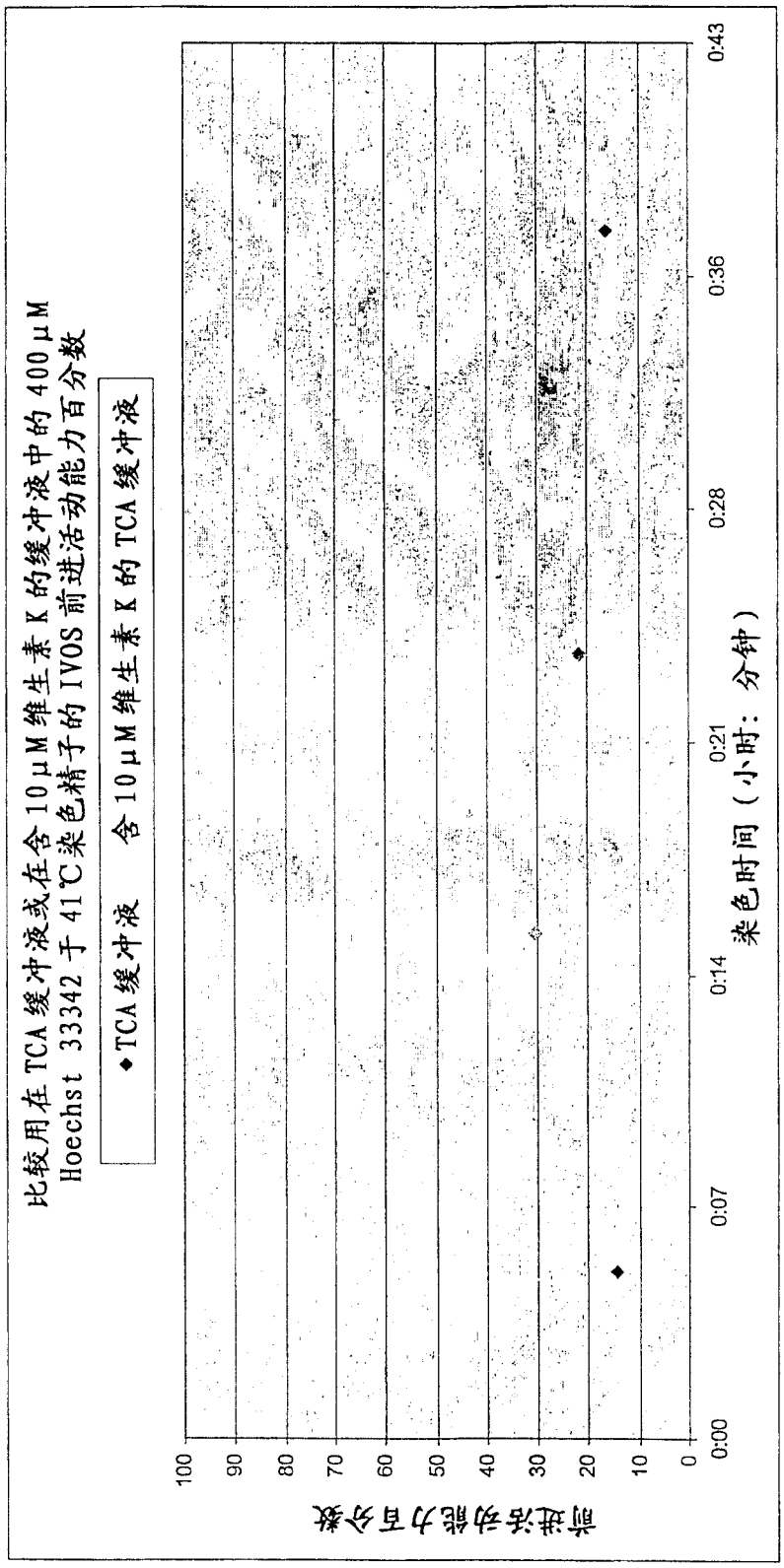

比较用在TCA缓冲液或在含10μM维生素K的缓冲液中的400μM Hoechst 33342于41℃染色精子的IVOS前进活动能力百分数
◆TCA缓冲液
含10μM维生素K的TCA缓冲液
前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:07
0:14
0:21
0:28
0:36
0:43
染色时间（小时：分钟）

图 22

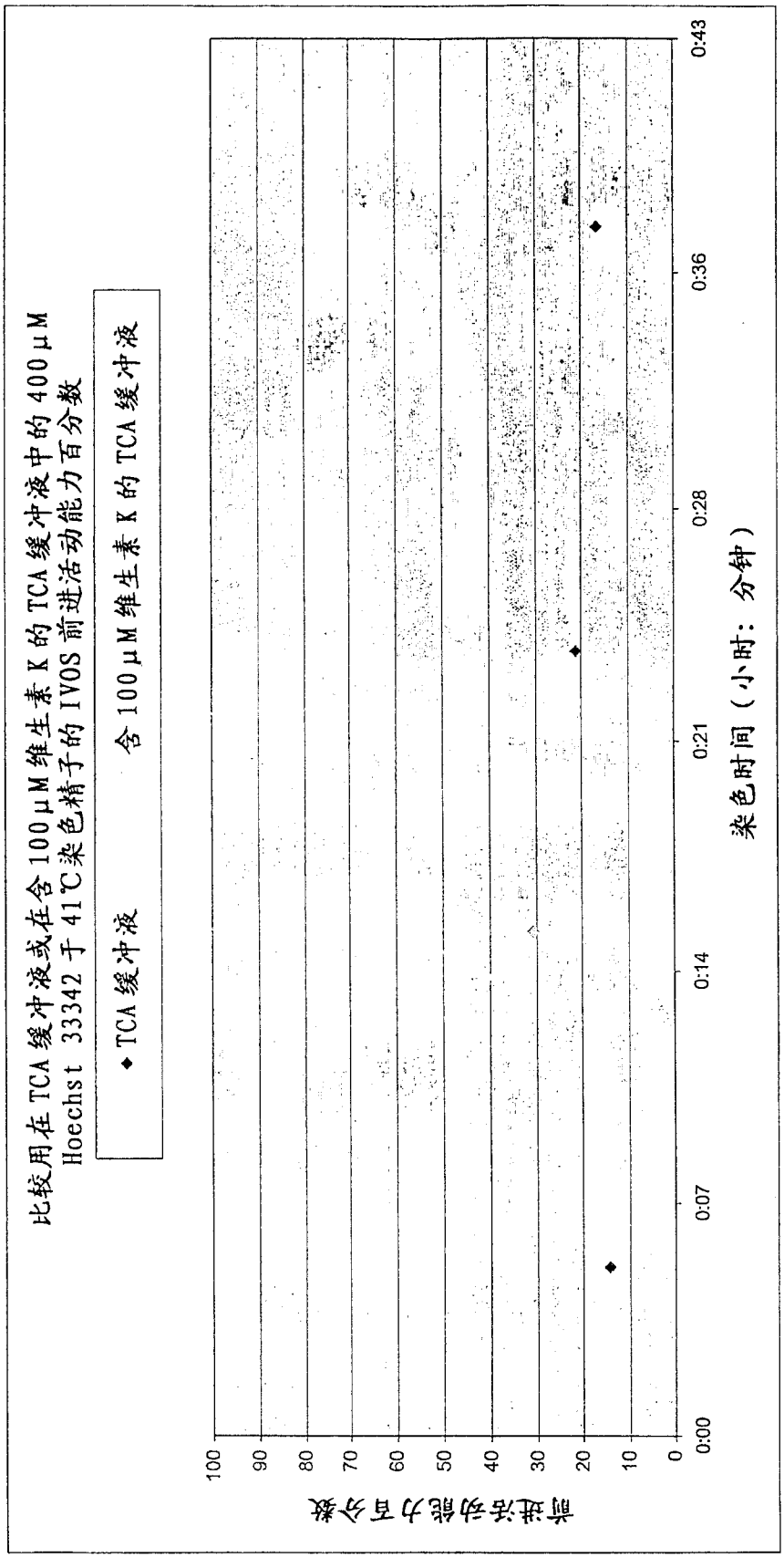

比较用在 TCA 缓冲液或在含 100μM 维生素 K 的 TCA 缓冲液中的 400μM Hoechst 33342 于 41℃染色精子的 IVOS 前进活动能力百分数
◆TCA 缓冲液
含 100μM 维生素 K 的 TCA 缓冲液
前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:07
0:14
0:21
0:28
0:36
0:43
染色时间（小时：分钟）

图 23

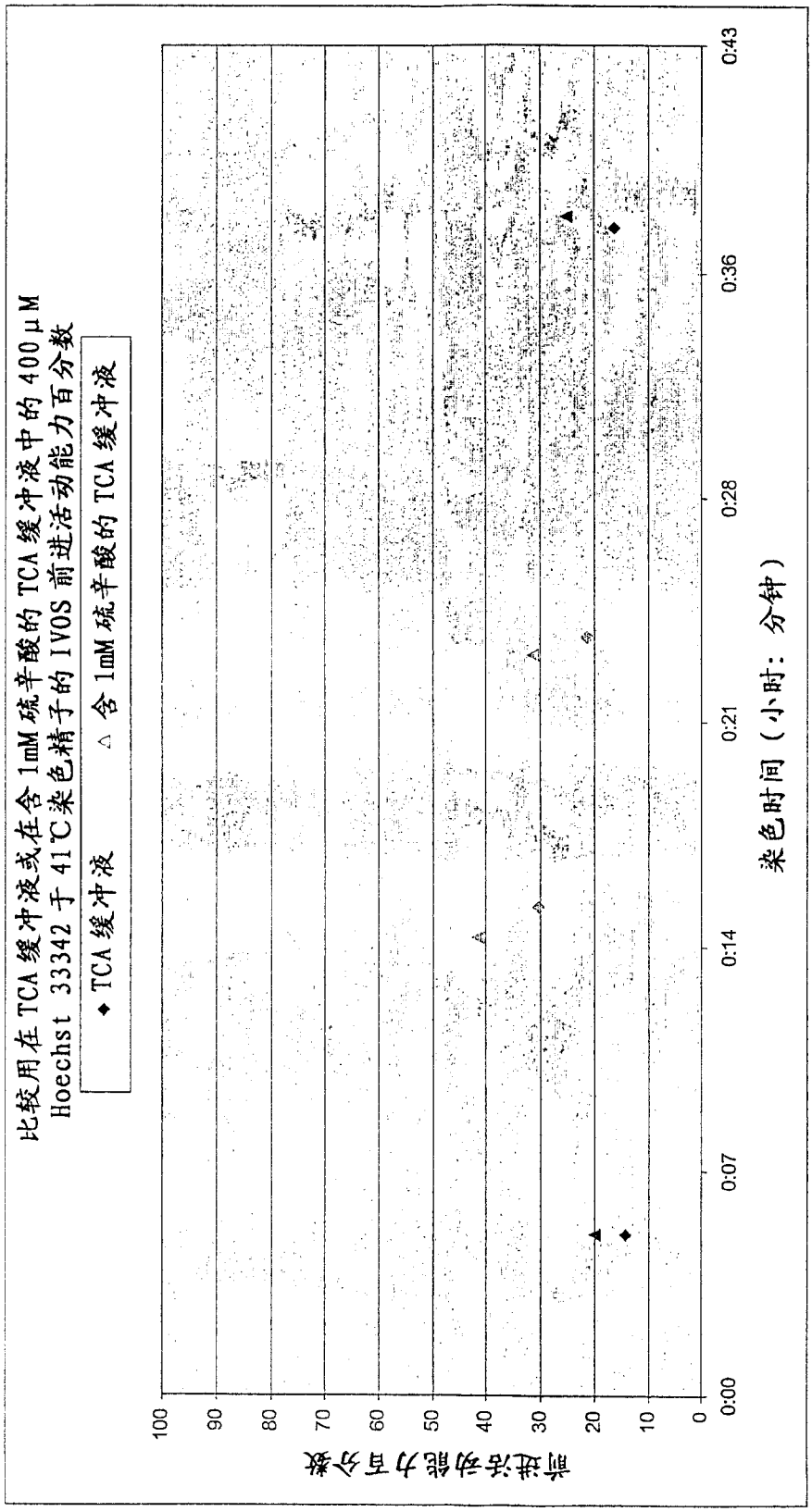

比较用在 TCA 缓冲液或在含 1mM 硫辛酸的 TCA 缓冲液中的 400μM Hoechst 33342 于 41℃染色精子的 IVOS 前进活动能力百分数
◆ TCA 缓冲液
△ 含 1mM 硫辛酸的 TCA 缓冲液
前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:07
0:14
0:21
0:28
0:36
0:43
染色时间（小时：分钟）

图 24

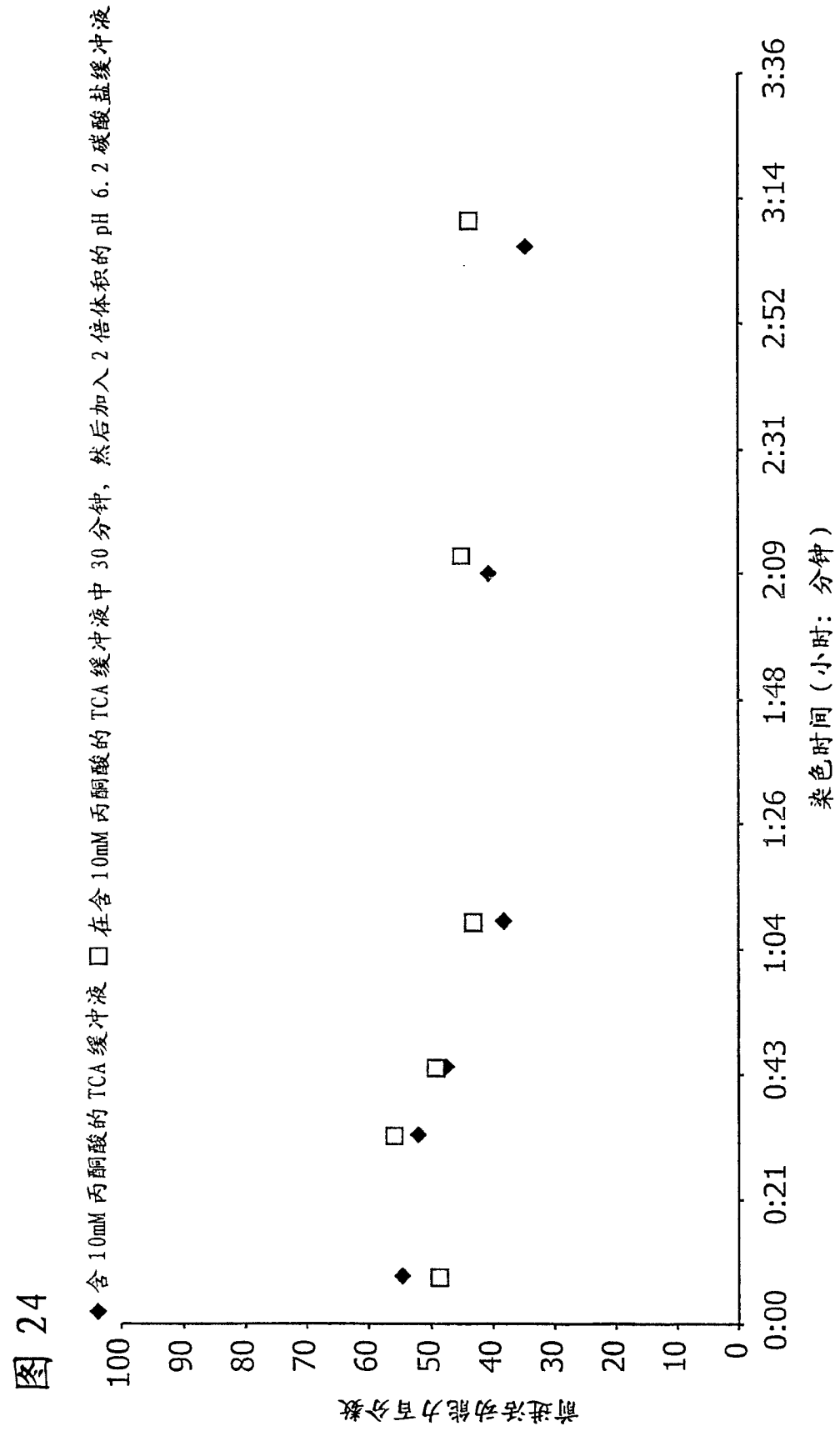

◆ 含 10mM 丙酮酸的 TCA 缓冲液 □ 在含 10mM 丙酮酸的 TCA 缓冲液中 30 分钟，然后加入 2 倍体积的 pH 6.2 碳酸盐缓冲液
前进活动能力百分数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:21
0:43
1:04
1:26
1:48
2:09
2:31
2:52
3:14
3:36
染色时间（小时：分钟）

图 25

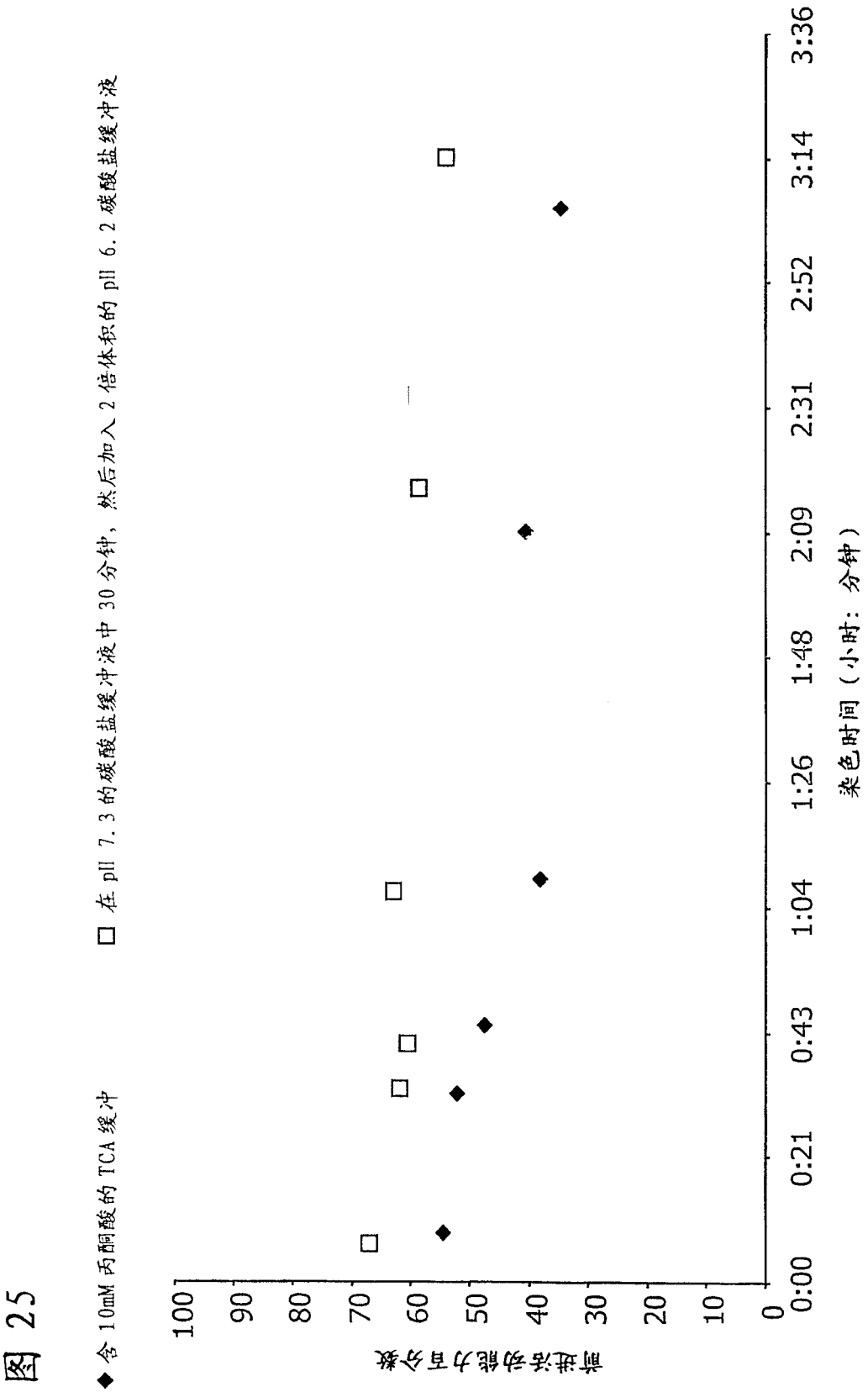
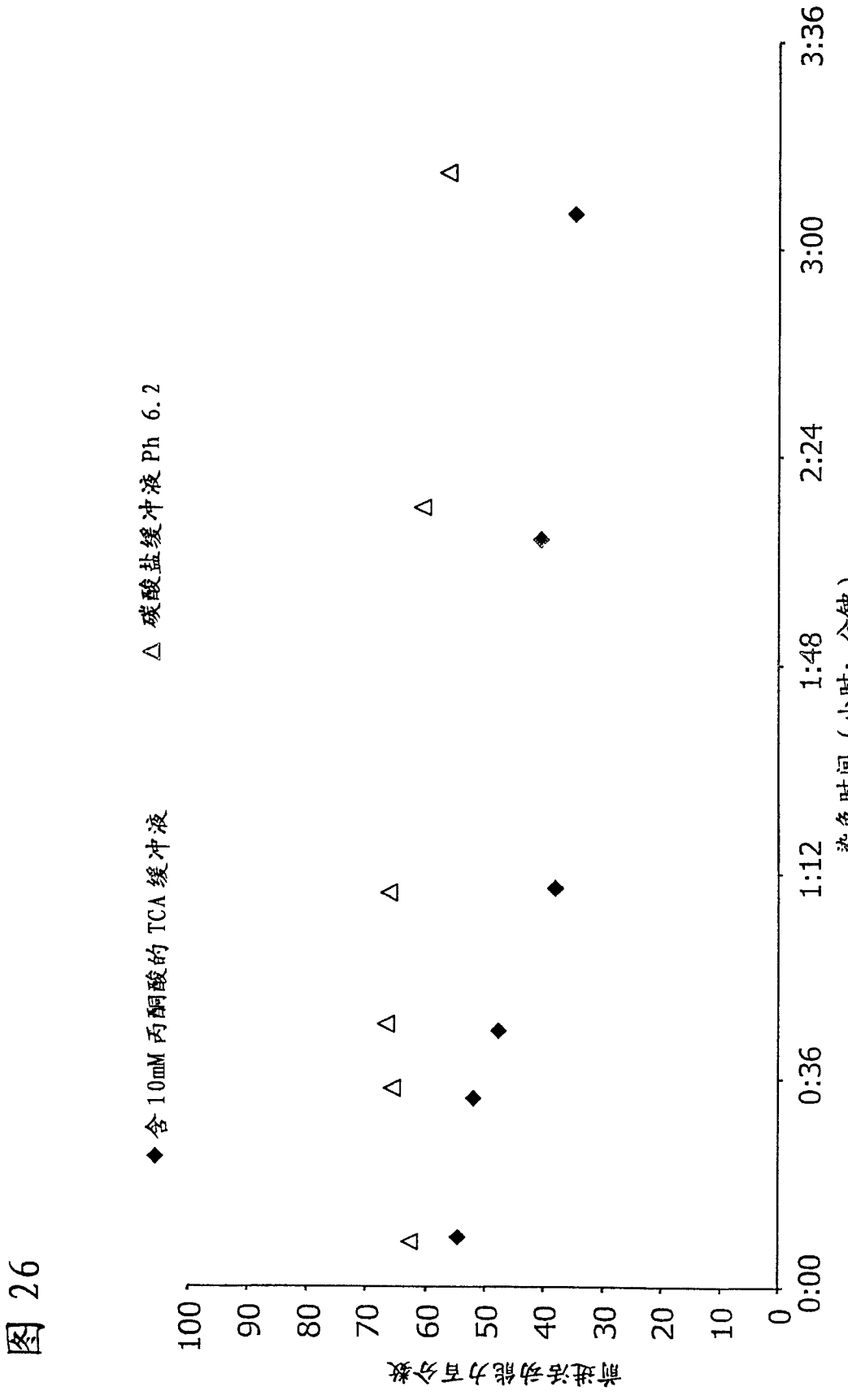

◆ 含 10mM 丙酮酸的 TCA 缓冲
□ 在 pH 7.3 的碳酸盐缓冲液中 30 分钟，然后加入 2 倍体积的 pH 6.2 碳酸盐缓冲液
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0:00
0:21
0:43
1:04
1:26
1:48
2:09
2:31
2:52
3:14
3:36
荧光活动能力百分数
染色时间（小时：分钟）

图 26


◆ 含 10mM 丙酮酸的 TCA 缓冲液
△ 碳酸盐缓冲液 Ph 6.2
前进活动能力百分数
染色时间（小时：分钟）
0:00
0:36
1:12
1:48
2:24
3:00
3:36
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100