



(21)申請案號：104130832

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 09 月 17 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/68 (2006.01)**

(30)優先權：2014/09/17 美國 62/051,533

2014/09/17 美國 62/051,536

(71)申請人：美國康奈爾大學 (美國) CORNELL UNIVERSITY (US)

美國

(72)發明人：崔維斯 亞歷山大 J TRAVIS, ALEXANDER J. (US)；帕拉摩 簡佩羅 PALERMO, GIANPIERO (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 20100248302A1

Vairo, L., et al. "A novel, biomarker-based assay to screen for dysfunctional spermatozoa." Fertility and Sterility 100.3 (2013): S224-S225.

Neri, Q. V., et al. "Testing the effect of cryopreservation on a biomarker-based assay of sperm function: toward generating a standard for semen samples with known fertility." Fertility and Sterility 100.3 (2013): S451.

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：5 共 33 頁

(54)名稱

藉由測定精子獲能以鑑定雄性生殖力狀態

(57)摘要

本發明提供一種測定雄性生殖力狀態之方法。該方法包含測定經誘導之精子獲能後的 G_{M1} 分佈模式，鑑定各種模式之分佈頻率，且判定回應於經誘導之獲能的某些 G_{M1} 模式之頻率分佈是否改變。基於回應於單獨或與其他精子屬性組合之經誘導之獲能的某些模式之頻率分佈模式的改變，可鑑定雄性生殖力狀態。

This disclosure provides a method for determining male fertility status. The method comprises determining G_{M1} distribution patterns following induced sperm capacitation, identifying the frequency of distribution of various patterns, and determining if the frequency distribution of certain G_{M1} patterns in response to induced capacitation is altered. Based on the change in the frequency distribution patterns of certain patterns in response to induced capacitation, alone or in combination with other sperm attributes, male fertility status can be identified.

指定代表圖：

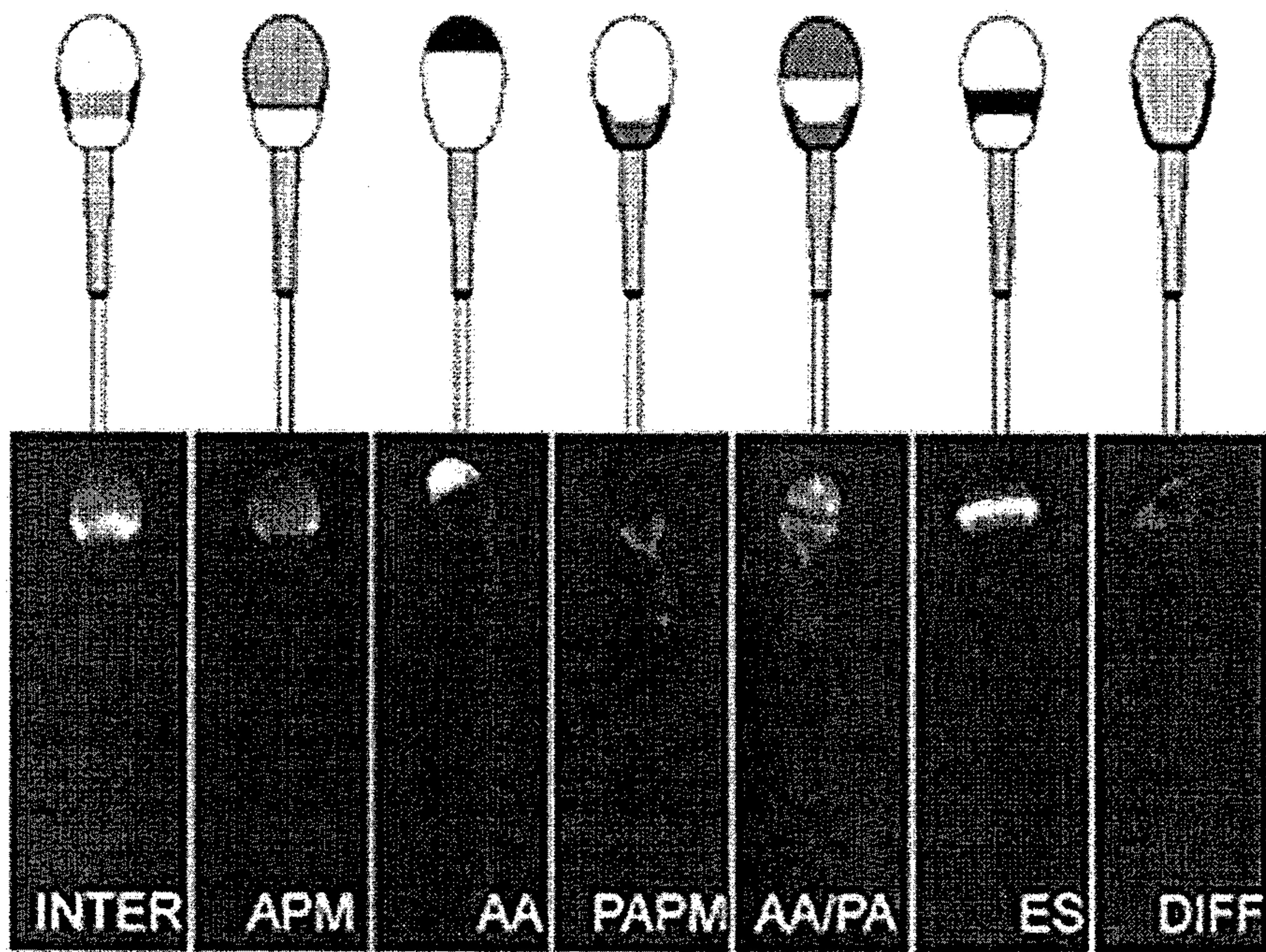


圖 1

I703326

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】

藉由測定精子獲能以鑑定雄性生殖力狀態

IDENTIFYING STATUS OF MALE FERTILITY BY
DETERMINING SPERM CAPACITATION

【中文】

本發明提供一種測定雄性生殖力狀態之方法。該方法包含測定經誘導之精子獲能後的 G_{M1} 分佈模式，鑑定各種模式之分佈頻率，且判定回應於經誘導之獲能的某些 G_{M1} 模式之頻率分佈是否改變。基於回應於單獨或與其他精子屬性組合之經誘導之獲能的某些模式之頻率分佈模式的改變，可鑑定雄性生殖力狀態。

【英文】

This disclosure provides a method for determining male fertility status. The method comprises determining G_{M1} distribution patterns following induced sperm capacitation, identifying the frequency of distribution of various patterns, and determining if the frequency distribution of certain G_{M1} patterns in response to induced capacitation is altered. Based on the change in the frequency distribution patterns of certain patterns in response to induced capacitation, alone or in combination with other sperm attributes, male fertility status can be identified.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

藉由測定精子獲能以鑑定雄性生殖力狀態

IDENTIFYING STATUS OF MALE FERTILITY BY
DETERMINING SPERM CAPACITATION

相關申請案的交叉參考

本申請案主張2014年9月17日申請之美國臨時申請案第62/051,533號及2014年9月17日申請之美國臨時申請案第62/051,536號的優先權，該等申請案之揭示內容以引用的方式併入本文中。

關於聯邦資助的聲明

此作品由以來自美國國立衛生研究院(National Institutes of Health)的撥款第 R01 HD-045664 號、第 K01-RR00188 號及第 DP1-EB016541 號資助支持。政府擁有本發明的一些權利。

【技術領域】

本發明大體上關於雄性生殖力領域，且更特定言之關於基於經誘導之精子獲能後 G_{MI} 神經節苷脂分佈模式來判定雄性生殖力狀態。

【先前技術】

在美國，10%夫婦有關於不育症的醫療預約，其中40%不育症與雄性相關聯。在全球範圍內，此轉換成超過七千三百萬對不育夫婦。典型的雄性生殖健康檢查評定精子數目、外觀及運動性。不幸的是，一半不育男性具有滿足此等描述準則之正常參數的精子，且在自然受孕及輔助生殖技術(諸如，子宮內授精(IUI))均反覆失敗之後，僅鑑定為具有「特發性不育症」。因為每個失敗週期對夫婦造成極大生理、情感及財務負擔，且其每年花費美國保健體系超過50億美元，所以對

精子功能的實用測試存在巨大的需求。關於精子功能的資料將允許臨床醫師向著將給予患者最佳受孕機會之輔助生殖技術引導其患者。

當進入雌性生殖道中時，精子不能立即使卵子受精。確切而言，其必須經歷稱為「獲能」之功能成熟的過程。此過程依賴於其藉由其細胞膜中產生特定改變來對特定刺激作出回應的能力，亦即回應於暴露於獲能之刺激的神經節苷脂 G_{M1} 之分佈模式的改變。

【發明內容】

揭示一種雄性生殖力狀態之診斷方法。該方法係基於在經誘導之精子獲能期間僅某些 G_{M1} 分佈模式指示雄性生殖力狀態的觀察結果。在一個態樣中，本發明提供一種基於回應於經誘導之獲能的某些 G_{M1} 模式之頻率分佈的改變來鑑定雄性生殖力狀態的方法。

在一個實施例中，該方法包含：自個體獲得精子樣品(諸如，精液樣品)；將該精子暴露於可誘發獲能的一或多種刺激；將該精子固定在固定劑(諸如，醛固定劑)中；在該固定精子中測定 G_{M1} 分佈模式；判定當暴露於獲能刺激時某些模式之頻率分佈是否存在改變或者某些 G_{M1} 模式之頻率分佈是否匹配某些預定準則；且基於該頻率分佈的改變及/或符合該分佈準則，鑑定該個體之生殖力狀態。

基於該等 G_{M1} 分佈模式，個體可鑑定為具有正常生殖力狀態或異常生殖力狀態，或可指定至生殖力類別中。舉例而言，個體可指定為「不育」、「低生育力」或「可育」，且此等結果可用於告知患者及其醫師是否嘗試自然受孕、進行IUI或著手活體外受精(IVF)或細胞質內精子注射(ICSI)。舉例而言，若個體指定為不育，則醫師可建議該個體不用繼續自然受孕及/或IUI。在另一實例中，若個體指定為低生育力且具有年輕雌性伴侶，則醫師可建議嘗試IUI。

在一個態樣中，本發明提供用於測定雄性生殖力狀態之套組。該套組包含以下各者中之一或多者：非獲能培養基、獲能培養基、固定

劑、用於測定 G_{M1} 模式分佈的試劑、適用於判定生殖力狀態的 G_{M1} 模式之圖示以及提供該等模式與生殖力狀態之間的相關性資訊的比較圖表或預定準則。

【圖式簡單說明】

圖1. 在非獲能條件或獲能條件下在正常人類精子及來自不育雄性的精子中的 G_{M1} 之定位模式。

圖2A至圖2C展示在非獲能條件(正常精液-NC；圖2A)或獲能條件(正常精液-CAP；圖2B)下在正常人類精子中的 G_{M1} 之不同定位模式及在獲能條件(ICSI-CAP；圖2C)下在來自不育雄性之人類精子中的 G_{M1} 之定位模式的相對分佈。在正常精子中，記錄自INTER模式至APM模式及AA模式的偏移。與此等正常資料比較，亦使來自一組已知患有原因不明的不育症之男性的精子經受 G_{M1} 分析。在此等精子(ICSI-CAP)中，相對於在非獲能條件下培育的正常精子，APM或AA模式在獲能條件下幾乎不存在差異。患有原因不明的不育症的此等男性此前在自然受孕、IUI及/或經典IVF時反覆地失敗，且其提出使用ICSI。

圖3展示在獲能條件或非獲能條件下隨培育時間變化經組合之APM及AA模式的相對頻率。各組呈現樣品經指定為正常或異常之彼等男性的臨床結果。

圖4展示來自與促進獲能之刺激一起培育之已知可育供體的精子中的AA及APM模式百分比。41%之平均百分比用實線指示。高於或低於平均值兩個標準差(分別為55%及27%)用點劃線指示。在此實例中，將低於平均值兩個標準差選為不育症臨限值，亦即在低於27%比率處展示AA及APM模式的精子與不育症相關。

圖5比較來自懷疑低生育力/不育供體的精子中的AA及APM模式百分比與可育男性之統計臨限值。精子中的AA及APM模式百分比在獲能(彼等點在4 mM環糊精濃度處叢集)及非獲能條件(彼等點在0 mM

環糊精濃度處叢集)兩者下量測。在獲能條件下，精子與4 mM 2-羥基-丙基 β 環糊精一起培育。基於圖4中的資料，41%可育雄性中之具有AA及APM模式之精子的平均百分比用實線指示。高於或低於平均值兩個標準差(分別為55%及27%)用點劃線指示。在低於27%比率處展示AA及APM模式的精子與不育症相關。

【實施方式】

本發明係基於某些 G_{M1} 分佈模式可提供關於雄性生殖力狀態的資訊的觀察結果。 G_{M1} 模式之測定描述於美國專利第7,160,676號、第7,670,763號及第8,367,313號中，該等專利之揭示內容以引用的方式併入本文中。本發明提供用於測定雄性生殖力狀態的方法及套組。該方法係基於當暴露於獲能刺激時某些 G_{M1} 模式之頻率的改變。

在一個態樣中，本發明提供一種用於測定雄性生殖力狀態的方法。該方法包含：使來自個體的精子樣品經受獲能及非獲能條件；測定當暴露於獲能條件時某些 G_{M1} 模式之頻率的改變；且基於改變之水準，鑑定生殖力狀態。

術語「經獲能之」精子係指已在促進獲能過程之條件下培育的精子。確切而言，此需要培養基中存在碳酸氫根離子及鈣離子，且存在固醇接受體，諸如血清白蛋白或環糊精。經獲能之精子已獲得經歷頂體胞外分泌的能力，且已獲得超活化之運動性模式。因此，術語「非經獲能之」精子係指未與以上列出之用於獲能之刺激中之一或多者一起培育的精子。該精子不經歷由生理配位體(諸如，透明帶、來自透明帶的溶解蛋白質或孕酮)誘導之頂體胞外分泌。此外，在非獲能條件下培育的精子將亦不展現超活化運動性。

可藉由暴露於外部刺激(諸如碳酸氫根離子及鈣離子，以及固醇流出之介體，諸如2-羥基-丙基- β -環糊精、甲基- β -環糊精、血清白蛋白、高密度脂蛋白、磷脂囊泡、脂質體等)在活體外誘導獲能。當精

子在活體外暴露於此等刺激中之一或多者時，觀測到 G_{M1} 分佈模式之可鑑別的改變。

在收集之後，人類精液樣品通常以一些方法處理，包括以下各者中之一或多者：液化、洗滌及/或增濃。液化涉及使樣品在室溫下或在 37°C (或其間任何溫度)下液化各種時間段(通常15-20分鐘，但在10-60分鐘範圍內)。液化為經由其精漿自凝膠轉化成較流體/液體稠度的過程。精漿將通常在無任何操作之情況下但在尤其黏性的樣品情況下液化，或若需要加快過程或形成處理所有樣品之一致的液化方案，則亦可藉由添加各種試劑(諸如蛋白分解酶、還原劑或其他黏液溶解劑)來獲得此精漿。此等試劑包括(但不限於)： α -胰凝乳蛋白酶、 α -澱粉酶、二硫蘇糖醇、胰去氧核糖酶、鳳梨酶、番木瓜蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶、胰蛋白酶及二巰基蘇糖醇(sputolysin)。精子可藉由離心及再懸浮洗滌，且經受精液分析及/或經受一或多種選擇方法，包括：在頂部上分層，且經由密度梯度離心；在頂部上分層，且經由密度梯度離心，接著收集該精子增濃部分，接著再懸浮且洗滌；在頂部上分層，且經由密度梯度離心，接著收集該精子增濃部分，且在不太緻密培養基(運動的精子將上游至其中)之頂部上覆蓋；或在樣品之頂部上覆蓋不太緻密培養基，且使運動的精子上游至其中。

在初始處理之後，可對精子進行計數，且可接著將既定數目之精子置放至含有非獲能或獲能培養基的容器(諸如，試管)中以獲得所需最終濃度。在一個實施例中，精子之最終典型濃度為1,000,000個/ml (最終濃度範圍可在250,000個/ml-250,000,000個/ml之間變化)。用於在非獲能及獲能條件下培育精子之基礎培養基可為生理緩衝溶液，諸如(但不限於)人類輸卵管流體(HTF)；改良人類輸卵管流體(mHTF)；惠蒂爾式培養基(Whitten's medium)；改良惠蒂爾氏培養基；KSOM；磷酸鹽緩衝鹽水；HEPES緩衝鹽水；Tris緩衝鹽水；漢姆氏F-10 (Ham's

F-10)；台氏培養基(Tyrode's medium)；改良台氏培養基；TES-Tris (TEST)-卵黃緩衝液；或比格斯、惠滕及惠廷厄姆(Biggers, Whitten and Whittingham, BWW)培養基。基礎培養基可具有添加至其中之蛋白質及其他因子的一或多種成分確定的或複雜的來源，包括胎兒臍帶血清超濾液、人血漿蛋白粉(Plasmanate)、蛋黃、脫脂牛奶、白蛋白、脂蛋白、或脂肪酸結合蛋白質，以促進生存力或在足以幫助誘發獲能的濃度下。用於獲能之典型刺激包括以下各者中之一或多者：碳酸氫鹽(通常在20-25 mM，且在5-50 mM範圍內)、鈣(通常在1-2 mM，且在0.1-10 mM範圍內)及/或環糊精(通常在1-3 mM，且在0.1-20 mM範圍內)。環糊精可包含2-羥基-丙基- β -環糊精及/或甲基- β -環糊精。培育溫度通常為37°C (在30°C -38°C 範圍內)，且培育時間通常為1-4小時(在30分鐘至18小時範圍內)，然而在培育期開始時(「時間零點」)可獲得基線樣品。

為了生成G_{M1}模式，精子通常用標準基礎培養基(例如，磷酸鹽緩衝鹽水、改良惠蒂爾氏培養基或其他類似培養基)洗滌，且與G_{M1}之親和分子(其上具有可偵測部分)一起培育。由於G_{M1}具有可充當抗原決定基的細胞外糖殘基，故其可在不必固定且透化細胞之情況下觀察。然而，固定細胞使得樣本保藏較好、較易於觀察(與游泳精子中的辨別模式相比)且允許較長觀察時間，同時促進模式形成。已知用於精子之組織學研究的各種固定劑在熟習此項技術者之範圍內。適合之固定劑包括三聚甲醛、戊二醛、布安氏固定劑(Bouin's fixative)以及包含二甲胂酸鈉、氯化鈣、苦味酸、鞣酸及其類似物的固定劑。在一個實施例中，使用三聚甲醛、戊二醛或其組合。

固定條件可在0.004% (重量/體積)三聚甲醛至4% (重量/體積)三聚甲醛範圍內，但通常使用0.01%至1% (重量/體積)三聚甲醛。在一個實施例中，可使用0.005% (重量/體積)三聚甲醛至1% (重量/體積)三聚

甲醛。在一個實施例中，可使用含4%三聚甲醛(重量/體積)、0.1%戊二醛(重量/體積)及5 mM CaCl_2 之磷酸鹽緩衝鹽水。

活的或經固定之精子中的 G_{M1} 之分佈模式可藉由使用親和力結合技術獲得。可使用對 G_{M1} 神經節苷脂具有特定親和力的分子。親和分子可直接連接至可偵測標記(諸如，螢光團)，或可藉由第二親和分子(其上具有可偵測標記)偵測。舉例而言，霍亂毒素(cholera toxin)之b次單元已知特異性結合至 G_{M1} 。因此，經標記之(諸如，經螢光標記之)霍亂毒素b次單元可用於獲得 G_{M1} 之分佈模式。連接至螢光團之霍亂毒素b次單元的典型最終濃度為10-15 $\mu\text{g/ml}$ ，然而濃度可在0.1-50 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內。或者，可使用針對 G_{M1} 的經標記之抗體。在又另一替代方案中，針對霍亂毒素b次單元的經標記之抗體可用於觀察 G_{M1} 染色之模式。且在又另一替代方案中，可使用經標記之二級抗體，其與直接結合至 G_{M1} 的初級抗體或結合至霍亂毒素b次單元的初級抗體結合。如本文所用之術語「 G_{M1} 染色」或「 G_{M1} 之染色」或「標記」或相關術語意謂由於經標記之親和分子結合至 G_{M1} ，細胞中或細胞上所見染色，例如，當經螢光標記之霍亂毒素b次單元用於 G_{M1} 之定位時，信號或染色來自霍亂毒素b次單元，且指示 G_{M1} 之位置。術語「信號」及「染色」及「標記」可互換使用。可偵測標記使得其能夠產生可偵測信號。該等標記包括放射性核種、酶、螢光劑或發色團。精子中的 G_{M1} 分佈之標記(或染色)及觀察利用標準技術進行。亦可使用除霍亂毒素b次單元以外的親和分子。此等親和分子包括多株及單株抗體。針對 G_{M1} 神經節苷脂之特異性抗體可利用常規免疫接種方案生成，或可商業上購買(例如，Matreya, Inc., State College, PA)。抗體可針對 G_{M1} 產生，或可藉由使用 G_{M1} 分子之相關抗原決定基之肽模擬物生成。肽模擬物之鑑定及生成對熟習此項技術者為熟知的。此外，b次單元結合至霍亂毒素可利用小分子模擬。鑑定對既定試劑具有類似結

合性質的小分子對熟習此項技術者為熟知的。

對於人類精子，觀測到7種不同模式(參看實例1下的詳情)。此等模式指定為INTER、APM、AA、PAPM、AA/PA、ES及DIFF。G_{M1}模式展示於圖1中且下文進一步描述：

- INTER：絕大部分螢光在圍繞赤道段的條帶中，且一些信號在覆蓋頂體的質膜中。通常存在信號梯度，其中在赤道段處最強，且接著朝向尖端逐漸地減小。在橫越赤道段的條帶中在精子頭部的邊緣上信號強度常常增加。

- APM (頂體質膜)：與INTER相比，此模式在赤道信號與其朝向頂尖移動之間的區別較小。亦即，在覆蓋頂體的質膜中的信號較均勻地分佈。所見APM信號自明亮的赤道INTER條帶朝著尖端向頂部移動，或其可進一步向上朝向尖端開始，且發現於較小區域中，因為其與AA為連續區。

- AA (頂部頂體)：在此模式中，螢光朝向頂尖變得愈來愈集中，亮度增加而區域中信號減少。

- PAPM (後頂體質膜)：信號專門位於後頂體質膜中。

- AA/PA (頂部頂體/後頂體)：信號在覆蓋頂體的質膜及後頂體質膜兩者中。信號自赤道段缺失。

- ES (赤道段)：明亮的信號僅在赤道段中可見。其可伴隨橫越該赤道區域精子頭部變厚。

- DIFF (漫射)：所見漫射信號遍及整個精子頭部。

觀測到，雖然INTER、AA、APM模式及此等模式之組合與具有正常精子膜架構且因此具有生殖力的活精子正相關，但PAPM、AA/PA、ES及DIFF模式不與生存力、正常膜架構及生殖力正相關。若在非獲能條件下培育，則大部分具有正常膜架構的活精子將展現INTER模式，其特徵為大部分標記接近赤道段，剩餘部分經由覆蓋頂

體的質膜延伸。當暴露於用於獲能之刺激時，APM及AA模式之頻率增加。APM模式在覆蓋頂體的質膜中展示較均一信號，然而AA模式在精子頭部之頭側部分、頂端頂體中展示信號強度增加，且自尾部朝向赤道段移動的信號減少。據認為不育個體的非經獲能之 G_{M1} 分佈模式類似於非經獲能之正常個體的模式。

在一個實施例中，該方法包含：將來自個體的精子樣品之等分試樣暴露於非獲能條件，而將來自相同個體之相同樣品或不同樣品的另一等分試樣暴露於獲能條件；固定兩組精子；將兩組精子染色以鑑定 G_{M1} 模式；測定兩組精子的某些 G_{M1} 模式之頻率；判定當暴露於獲能條件時某些模式之頻率是否存在改變(藉由與在非獲能條件下的頻率比較來進行)；且基於模式之頻率的改變來鑑定生殖力狀態。在一個實施例中，該等模式為AA、APM及INTER中之一或多者。

在一個實施例中，該方法包含：將來自個體的精子樣品暴露於獲能條件；固定精子；將精子染色以鑑定 G_{M1} 模式；測定某些模式之頻率，且將某些模式之頻率與對照(亦即，參考)進行比較；且基於該比較，鑑定生殖力狀態。對照可係來自可育個體，或可係來自已知低生育力或不育的個體。在一個實施例中，將對照暴露於相同的獲能刺激及固定劑。在一個實施例中，對照樣品可與測試樣品同時進行。在另一實施例中，可相對於在可育、低生育力或不育的男性群體之精子中發現的不同模式之相對頻率進行對照比較。

基於比較結果，可確立雄性樣品之生殖力狀態。臨床醫師可使用該生殖力狀態告知個體(或在非人類雄性之情況下告知持有者或負責當事人)關於利用不同受精方法達成受孕的可能性。

該雄性個體可為人類或非人類動物。在非人類動物之情況下，鑑定與生殖力狀態相關的模式可基於本文所提供之教示內容進行。非人類動物包括馬、牛、狗、貓、豬、山羊、綿羊、鹿、兔、雞、火雞、

各種品種的魚及各種動物物種。

在一個實施例中，本發明之方法提供一種用於指定雄性為很可能不育的方法，其包含：獲得已在獲能及非獲能條件下培育且視情況經固定的來自個體及來自正常對照之精子的 G_{M1} 分佈模式；且比較該等 G_{M1} 分佈模式。在正常對照中，將觀測到顯示某些模式之精子之百分比的統計學上顯著的改變。若在來自測試個體的精子中沒有觀測到相同改變，則將該個體指定為具有異常生殖力狀態。在一個實施例中，提供正常及異常生殖力狀態之資訊的模式為模式INTER、AA及/或APM。因此，在來自己知具有正常生殖力狀態之個體的樣品(其可用作對照)中，當暴露於獲能條件時，展現AA及/或APM模式之精子頻率增加，而展現INTER模式之精子頻率減少。若觀測到當暴露於獲能條件時此等模式中之一或多者之百分比無改變或無顯著改變，則將該個體指定為具有生殖力問題。

在以上實施例之變化形式中，對照可來自己知不育或低生育力的個體。在此實施例中，若當獲能時在INTER、AA及/或APM模式方面來自測試個體的 G_{M1} 模式的改變與對照相同，則可認為該個體為低生育力或不育。

在以上實施例之又另一變化中，來自測試個體的樣品可在沒有與對照比較之情況下進行評估。若觀測到當暴露於獲能條件時INTER、AA及/或APM分佈模式之頻率無改變或無顯著改變，則可認為該個體為異常的，且可指定以用於進一步測試，然而若觀測到改變，使得INTER減少，AA增加及/或APM增加，則該個體可指定為具有正常生殖力。

在一個實施例中，該方法包含分析 G_{M1} 分佈模式以鑑定暴露於獲能條件的精子中的AA及APM模式之頻率。頻率可表達為相對於總 G_{M1} 分佈模式，其中之一或多者之百分比。在一個實施例中，生殖力基於

AA及/或APM分佈模式之頻率與預定生殖力臨限值的比較來預測，例如歸類為不育及低生育力的個體之間的臨限值(亦即截止點)水準，或歸類為低生育力的個體及歸類為可育的個體之間的臨限值水準。臨限值亦可用於區分相對較高生殖力與相對較低生殖力。在一個實例中，對於AA及APM模式之總和大於或等於40%的相對百分比指示較高生殖力可能性，而小於40之水準指示較低生殖力幾率。在其他實施例中，生殖力臨限值水準在35-40範圍內(包括端點)(AA+APM之相對百分比)。在其他實施例中，生殖力臨限值為38、38.5、39或39.5。

在一個實施例中，可確立INTER模式、僅AA或APM模式或INTER、AA或APM模式之任何組合的類似臨限值。

一般而言，若達成受精/臨床受孕之可能性在3個或3個以下週期內大於例如50%，則認為對照為可育的。若達成受精/臨床受孕之可能性大於一些分類值，則可認為個體為可育的。舉例而言，若達成受精/臨床受孕之可能性在3個或3個以下週期內大於50%，則可將個體歸類為「可育」。在其他實施例中，可育截止幾率可為在50%-85%範圍內(包括端點)的值。

在其他實施例中，生殖力臨限值為群體之生殖力由於增加AA及/或APM之水準而停止實質上增加時的AA及/或APM之值。個體可基於AA及/或APM之個體水準而指定為「不育」、「低生育力」或「可育」。

在一些實施例中，不同生殖力指定之截止點自一組包含個體群體之AA及/或APM頻率及對應生殖力成功率(具有大於或等於對應值之AA及/或APM值的個體之成功受精百分比)的資料來測定。舉例而言，該組資料可包括AA+APM值40及AA+APM大於或等於40的個體之對應生殖力成功率。生殖力臨限值可藉由在該組資料中的趨勢及/或不連續性來測定。舉例而言，個體之生殖力成功率由於增加AA+APM

之水準而不實質上增加的區域可低於約14.5-18.5之水準而存在。在此實質上平坦區域(<14.5-18.5)中具有AA+APM之水準的個體可歸類為不育。個體之生殖力開始上升之AA及/或APM水準可視為不育症臨限值水準，亦即將歸類為不育的彼等臨限值水準與歸類為低生育力的彼等臨限值水準分隔的水準。展示生殖力顯著改變的區域在此不育症臨限值與約38-39之水準之間存在，其中生殖力再次達到穩定。此上限值可視為生殖力臨限值水準，亦即將歸類為低生育力的彼等臨限值水準與歸類為可育的彼等臨限值水準分隔的水準。以此方式，生殖力臨限值水準可為群體之生殖力由於AA及/或APM之水準增加而停止實質上增加時的AA及/或APM值。

在實施例中，若生殖力的改變(由於 G_{M1} 頻率點改變百分比)大於3%、4%、5%、10%或15%，則生殖力可視為實質上增加。其他視為實質性的改變根據本發明將對熟習此項技術者顯而易見，且視為在本發明之範疇內。

在其他實施例中，生殖力臨限值水準可為個體之生殖力為在60%-85%範圍內之至少一些值(其中所選擇之值指示個體歸類為可育)時的AA及/或APM之最小水準。雖然特別提及AA及/或APM之百分比或範圍，但顯而易見，可自INTER模式的改變或自INTER、AA及APM模式中之一或多者之組合的改變作出類似判定。

在其他實施例中，生殖力臨限值可藉由統計分析來自具有已知生殖力之男性群體(例如，10個或10個以上男性)的精子中發現的模式來測定。如圖4中所示，73個精液樣品獲自24名已知可育的男性。其精子與用於獲能之刺激(在此情況下為4 mM 2-羥基-丙基- β 環糊精)一起培育，用0.01%三聚甲醛(最終濃度)固定。評定具有指示已經獲能之模式(例如，AA+APM)的細胞百分比。具有AA及APM模式的精子之平均百分比為41%，且距平均值2個標準差計算為27%及55%。

在諸多診斷測試中，距平均值2個標準差用於區分正常值與異常值。在此情況下，將標誌低於平均值兩個標準差之值27%選擇為臨限值，從而與可育(評分在平均值之一個標準差內或高於其之樣品)相對，區分不育樣品(亦即，分數為27或低於27之樣品)與低生育力樣品(評分在28-34之間(其低於平均值一個標準差)的樣品)。因而，用以區分低生育力樣品與可育樣品的例示性生殖力臨限值可為低於平均AA+APM模式百分比一個標準差的AA+APM模式百分比。可選擇其他臨限值。舉例而言，不育/低生育力臨限值可選擇為低於平均值3個標準差，且低生育力/可育臨限值可為低於平均值2個標準差。

分析來自尋求醫療評估生殖力狀態之14名男性的14個樣品中的 G_{M1} 定位模式。將具有AA+APM定位模式的精子之相對百分比與自己已知可育男性之群體鑑定的統計臨限值進行比較(圖5)。在基線(非刺激、非獲能條件)下培育的樣品中觀測到不存在差異。然而，當與4 mM 2-羥基-丙基 β 環糊精一起培育時，14名男性中之5名產生展示具有AA+APM模式之精子之低百分比的樣品。此等5個樣品均低於距平均值2個標準差。咸信，約30-50%之受孕困難的夫婦具有雄性因素的成分。此等資料屬於預期範圍內。

在一個態樣中，本發明提供用於測定雄性生殖力狀態之套組。該套組包含以下各者中之一或多者：可充當用於獲能之刺激的試劑、獲能培養基、非獲能培養基、固定劑、用於測定 G_{M1} 模式分佈的試劑、適用於測定生殖力狀態的 G_{M1} 模式之圖示以及提供在該等模式與生殖力狀態之間的相關性資訊的比較圖表、或提供在測試值與生殖力狀態之間的相關性資訊的預定準則。在一個實施例中，該套組包含非獲能及獲能培養基、模式圖表(諸如圖1)、容器等。在一個實施例中，該套組包含具有4%環糊精的試劑以刺激獲能。

在一個實施例中，獲能培養基包含：添加有2-羥基-丙基 β 環糊精

以便獲得3 mM最終濃度的改良人類輸卵管流體；非獲能培養基包含改良人類輸卵管流體；固定劑為1%三聚甲醛；且用於測定G_{M1}模式之試劑為霍亂毒素b次單元(15 µg/ml最終濃度)。在其他實施例中，三聚甲醛之最終濃度為0.01%。

例示性套組包含用HEPES (Irvine Scientific，參考90126)緩衝之具有慶大黴素(gentamicin)的改良HTF培養基。在G_{M1}定位分數、生存力或精子恢復中不存在差異，且不論使用經碳酸氫鹽緩衝還是經HEPES緩衝之培養基，均觀測到獲能。因此，亦可使用經碳酸氫鹽緩衝的培養基。使用HEPES緩衝液使得分析能夠在診所中使用空氣培育箱或水浴進行，與僅與CO₂培育箱相容相反。類似地，添加補充蛋白質(不論市售的(HTF-SSS™，Irvine Scientific或人血漿蛋白粉)還是粉末狀的白蛋白)不改變恢復或生存力，且有利地增強獲能狀態。

例示性套組可進一步包含細胞分離培養基(諸如，Enhance S-Plus細胞分離培養基，90%來自Vitrolife，參考：15232 ESP-100-90%)。例示性試劑、消耗品及程序證實會得到人類精子上G_{M1}之有利標記。

例示性套組可進一步包含大孔口吸管尖頭(200 µl大孔口尖頭，USA scientific，1011-8400)。例示性套組可進一步包含大孔口移液管(通用移液管，標準球管(Standard Bulb)參考號：202-20S. VWR目錄號14670-147)。

例示性套組可進一步包含1.5 ml試管(處理帽，noncap，CD) (USA Scientific14159700)，一個含有呈粉末形式之環糊精以刺激獲能，且一個為空的以用於僅培養基之非獲能條件。在一些實施例中，有可能將在另一試管中發現環糊精，培養基將添加至該管以形成儲備溶液，其自身將添加至獲能試管。

當自精漿分離精子時，人類男科學實驗室經常使用密度梯度收集精子。例示性套組可進一步包含密度梯度材料及/或說明，以自該密

度梯度移除精漿，且接著使用新的移液管收集所集結的精子。

例示性套組可進一步包含固定劑(諸如，0.1% PFA)，且視情況包含資訊表(諸如，患者申請表)、標記及適用於裝運、儲存或調整目的的容器/袋/小袋及其類似物。舉例而言，該套組可含有箔袋、用於郵寄患者樣品之具有吸收劑的生物危害袋、具有吸收劑之可再密封袋及發泡管位置固持器。

在另一態樣中，提供一種用於量測雄性個體生殖力之方法。 G_{M1} 定位分析可展示精子是否可獲能，且因此變得勝任使卵子受精。如上所述，該分析可以在精子頭部中具有 G_{M1} 定位之特定模式的形態正常精子之百分比形式評分。APM及AA模式隨著精子對用於獲能之刺激作出回應而增加。可使用截止點來區分射出精液之相對生殖力，基於雄性生殖力將精液樣品分組(亦即，區分可育男性與低生育力男性與不育男性)。然而，因為精子數目、運動性及形態亦可影響雄性生殖力，故本發明提供用於建立雄性生殖力之指數(「雄性生殖力指數」或「MFI」)的方法，該雄性生殖力之指數涵蓋CAP分數及一或多種相關精液參數(例如，數目、運動性及形態等)，CAP分數(亦稱為 G_{M1} 分數)為一或多種 G_{M1} 分佈模式之頻率。舉例而言，CAP分數可為INTER、AA及APM中之一或多者之頻率。可生成強調特定精液參數的不同指數。舉例而言，根據本發明之指數包括：

- CAP分數×前向運動性%×絕對數；
- CAP分數×形態正常精子%×絕對數；
- CAP分數×總運動性%×絕對數×形態正常精子%；且
- CAP分數及此等參數或其他特定參數之其他變化或組合，包括使用CASA (電腦輔助精子分析)所獲得之參數，諸如：VSL (直線速度)；STR (前向性)；LIN (直線性)；VCL (曲線速度)；VAP (平均軌道速度)；運動性%；運動性之持續時間；LHA (頭側擺幅度)；WOB (擺

動性)；PROG (前向運動)；及BCF (交打頻率)等。參看例如，世界衛生組織(World Health Organization), 「WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Sperm」, (第五版2010)。

雄性生殖力指數可具化為量測雄性個體之生殖力狀態的方法。獲得精子樣品，其中該精子樣品來自所量測的個體，且其中該精子樣品之至少一部分已如上所述暴露於獲能條件、暴露於固定劑且經染色以用於G_{M1}。獲得該精子樣品的一或多種精液參數之值，諸如來自個體的原始樣品之體積及/或樣品之精子之濃度、運動性及/或形態。自一或多種G_{M1}分佈模式之頻率(亦即，「CAP」分數)及一或多種所獲得之精液參數值來測定MFI。在本文中所用之實例中，CAP分數為在獲能條件下在三小時下一或多種G_{M1}分佈模式之頻率，但CAP分數之其他變化形式根據本發明將顯而易見(例如，在其他時間間隔下的頻率、相對於非經獲能在經獲能中G_{M1}模式之頻率的改變等)。

在一實例中，男性樣品之雄性生殖力指數分數使用AA+APM之CAP分數、體積、濃度、運動性及形態，根據以下方程式來計算：

$$MFI = CAP \text{ 分數} \times \text{體積} \times \text{濃度} \times \frac{\text{運動性}\%}{100} \times \frac{\text{形態}\%}{100},$$

其中運動性%為運動的精子百分比，且形態%為形態正常的精子百分比。在測試中，在3小時下G_{M1}分數<40(亦即，針對合格/不合格使用40截止點)的26名個體之平均MFI為0.37，在0.04-0.95範圍內。此組中僅2名之值為0.75或0.75以上。在3小時下G_{M1}分數>=39.5 (亦即，針對合格/不合格使用40截止點)之7名個體的平均MFI為1.02，在0.23-2.79範圍內。此組中四名個體分數均高於0.75。其中，三名個體在三週期內可育，且第4名個體在第4此嘗試時可育。在兩個組之間在精子數目或其他精液分析參數中不存在顯著差異：(不合格的26名中之10716萬個精子/射出精液相較於合格的7名中之12770萬個精子/射出精

液；不合格的彼等中的3.73之平均形態分數相較於合格的彼等中的3.14；以及不合格的彼等中的46.89之平均運動性相較於合格的彼等中的51.86)。

雄性生殖力指數可藉由讀取G_{M1}定位分析的實驗室來生成。實驗室可自一或多個設施(例如，生殖力診所、精子庫等)獲得精子樣品及對應於該精子樣品的精液分析。精液分析資訊可包括於G_{M1}定位分析套組所包括的卡片上、以電子方式發送至實驗室及/或以其他方式提供。在另一例示性實施例中，實驗室獲得精子樣品之CAP分數且亦獲得關於該精子樣品的精液分析資訊。實驗室基於所獲得之CAP分數及所獲得之精液分析資料來計算雄性生殖力指數。

一種用於鑑定人類雄性個體之生殖力狀態的例示性方法包含將來自該個體的精子樣品暴露於非獲能及獲能條件。固定精子，且在該固定精子中測定所選擇之G_{M1}模式之頻率。比較暴露於非獲能及獲能條件的精子中之不同G_{M1}模式之頻率分佈。相較於暴露於非獲能條件的精子，暴露於獲能條件的精子中的一或多種所選擇之G_{M1}模式之頻率分佈的改變指示個體之生殖力狀態。所選擇之G_{M1}模式可為INTER、AA及/或APM。

一種用於鑑定人類雄性個體之生殖力狀態的例示性方法包含將來自該個體的精子樣品暴露於獲能條件。固定精子，且在該固定精子中測定所選擇之G_{M1}模式之頻率。將不同G_{M1}模式之頻率分佈與來自對照的頻率分佈進行比較，其中該對照精子樣品已暴露於相同獲能條件及相同固定劑。相對於對照的改變，一或多種所選擇之G_{M1}模式之頻率分佈的改變指示與對照之生殖力狀態相比該個體之不同生殖力狀態。G_{M1}模式可為INTER、AA及/或APM。

在該例示性方法中，對照可為來自己知具有正常生殖力狀態之個體或已知具有異常生殖力狀態之個體的精子樣品。對照可為自包含複

數個個體之資料集(例如，包含至少50名個體的資料集)獲得的值。

一種用於將人類雄性個體之生殖力狀態鑑定為不育、低生育力或可育的例示性方法包含將來自該個體的精子樣品暴露於獲能條件。測定該樣品中的 G_{M1} 分佈模式。將一或多種 G_{M1} 模式之頻率與生殖力臨限值進行比較，其中小於生殖力臨限值的頻率指示生殖力問題。舉例而言，小於生殖力臨限值的頻率可指示生殖力狀態為不育或低生育力。 G_{M1} 分佈模式可為INTER、AA及/或APM。

在該等例示性方法中的獲能條件可包括暴露於i)碳酸氫根離子及鈣離子，及ii)固醇流出之介體，諸如2-羥基-丙基 β 環糊精、甲基- β -環糊精、血清白蛋白、高密度脂蛋白、磷脂囊泡、胎兒臍帶血清超濾液、脂肪酸結合蛋白質或脂質體。在該等例示性方法中，將對照暴露於獲能或非獲能條件可與測試樣品同時進行。

一種用於將人類雄性個體之生殖力狀態鑑定為不育、低生育力或可育的例示性方法包含將來自該個體的精子樣品暴露於獲能條件。測定樣品中的 G_{M1} 分佈模式。將一或多種 G_{M1} 模式之頻率與不育症臨限值進行比較，其中小於不育症臨限值的頻率指示生殖力問題。舉例而言，小於不育症臨限值的頻率可指示不育的生殖力狀態。在該例示性方法中的獲能條件可包括暴露於i)碳酸氫根離子及鈣離子，及ii)固醇流出之介體，諸如2-羥基-丙基 β 環糊精、甲基- β -環糊精、血清白蛋白、高密度脂蛋白、磷脂囊泡、胎兒臍帶血清超濾液、脂肪酸結合蛋白質或脂質體。一或多種 G_{M1} 模式可為INTER、AA及/或APM。

在該等例示性方法中的生殖力臨限值可為群體之生殖力停止實質上增加時的AA+APM模式頻率。舉例而言，該生殖力臨限值可為：超過50%之群體為可育時的AA+APM之水準；超過60-85%之群體為可育時的AA+APM之水準；或在35-40範圍內(包括端點)(總 G_{M1} 模式之相對百分比)的AA+APM之水準。生殖力臨限值可為38、38.5、39或39.5%

AA + APM (相對於總 G_{M1} 模式)。

例示性方法可進一步包含將一或多種 G_{M1} 模式之頻率與不育症臨限值進行比較，其中小於不育症臨限值的頻率指示不育症。舉例而言，不育症臨限值可為：群體之生殖力開始實質上增加時的AA+APM模式頻率；小於50%之群體為可育時的AA+APM之水準；超過60-85%之群體為可育時的AA+APM之水準；或在14-18範圍內(包括端點)(總 G_{M1} 模式之相對百分比)的AA+APM之水準。不育症臨限值可為14、14.5、15或15.5% AA + APM (相對於總 G_{M1} 模式)。

一種用於鑑定人類雄性個體之生殖力狀態的例示性方法包含獲得精子樣品，其中精子樣品來自該個體，且其中精子樣品已暴露於非獲能或獲能條件，固定且染色以用於 G_{M1} 。測定精子中的所選擇之 G_{M1} 模式之頻率。比較暴露於非獲能及獲能條件的精子中之不同 G_{M1} 模式之頻率分佈。相較於暴露於非獲能條件的精子，暴露於獲能條件的精子中的一或多種所選擇之 G_{M1} 模式之頻率分佈的改變指示個體之生殖力狀態。 G_{M1} 模式可選自由AA、APM、INTER及其組合組成之群。

一種用於鑑定雄性個體之生殖力狀態的例示性方法包含獲得精子樣品，其中該精子樣品來自該個體，且其中該精子樣品已暴露於獲能條件，固定且染色以用於呈現 G_{M1} 。測定該精子中的所選擇之 G_{M1} 模式之頻率。將一或多種不同 G_{M1} 模式之頻率分佈與來自對照或預定準則的頻率分佈進行比較。對照精子樣品已暴露於相同獲能條件及相同固定劑。相對於對照的改變，一或多種所選擇之 G_{M1} 模式之頻率分佈的改變指示與對照之生殖力狀態相比該個體之不同生殖力狀態。

一種用於鑑定雄性個體之生殖力狀態的例示性方法包含獲得精子樣品，其中該精子樣品來自該個體，且其中該精子樣品已暴露於獲能條件，固定且染色以用於 G_{M1} 模式。測定該樣品中的 G_{M1} 分佈模式。將一或多種 G_{M1} 模式之頻率與不育症臨限值進行比較，其中小於不育

症臨限值的頻率指示生殖力問題。

一種用於鑑定雄性個體之生殖力狀態的例示性套組包含以下各者中之一或多者：獲能培養基、非獲能培養基、固定劑組合物、用於測定 G_{M1} 染色模式的試劑、比較圖表、預定準則、用於比較的 G_{M1} 模式之圖示或臨限值。

一種用於量測雄性個體之生殖力狀態的例示性方法包含獲得精子樣品，其中該精子樣品來自該個體，且其中該精子樣品已暴露於獲能條件，暴露於固定劑，且染色以用於 G_{M1} 。獲得原始樣品之體積及該原始樣品中的精子之濃度、運動性及形態中之一或多者的值。測定精子樣品之CAP分數作為該樣品中的一或多種 G_{M1} 分佈模式之頻率。基於經測定之CAP分數及一或多個所獲得之體積、濃度、運動性及形態來計算個體之雄性生殖力指數(MFI)值。舉例而言，MFI值可藉由使CAP分數、體積、濃度、運動性值及形態值相乘來計算。運動性可為運動之精子百分比。形態可為形態正常之精子百分比。

一種用於量測雄性個體之生殖力狀態的例示性方法包含獲得該個體之精子樣品之CAP分數作為該樣品中的一或多種 G_{M1} 分佈模式之頻率。獲得原始樣品之體積及該原始樣品中的精子之濃度、運動性及形態中之一或多者的值。基於經測定之CAP分數及一或多個所獲得之體積、濃度、運動性及形態來計算個體之雄性生殖力指數(MFI)值。

本發明進一步經由以下說明性實例描述，該等實例不應解釋為限制性的。

實例1

此實例提供用人類精子獲得之 G_{M1} 分佈模式之展示。自雄性供體收集射出精子，且使其在37°C下液化20 min，且接著進行體積、初始數量、運動性及形態評定將1 ml精液樣品在15 ml錐形管中的1 ml密度梯度(90% Enhance-S；Vitrolife, San Diego, California, USA)之頂部上

分層。將試管以 $300\times g$ 離心10分鐘。將底部1 ml部分轉移至新的15 ml 試管，且接著再懸浮於4 ml mHTF中。將此以 $600\times g$ 離心10分鐘。移除上澄液，且將精子之集結粒再懸浮於0.5 ml mHTF中。接著評估經洗滌之精子的濃度及運動性。接著將相同體積之精子添加至兩個試管中，使得每個試管之最終體積為300 μ l，且精子之最終濃度為1,000,000個/ml。第一試管含有mHTF(非獲能條件)，且第二試管含有mHTF加最終濃度為3 mM之2-羥基-丙基- β -環糊精(獲能條件)。培育精子持續不同時間長度，但通常使用3小時。此等培育在 37°C 下進行。

在培育期結束時，平緩地混合每個試管之內含物，且自每個試管移出18 μ l且轉移至單獨的微量離心管。添加2 μ l 1% (重量/體積)三聚甲醛，獲得0.1%最終濃度。在另一實施例中，添加0.1% (重量/體積)三聚甲醛，獲得0.01%最終濃度。將此等試管平緩地混合，且在室溫下培育15分鐘，此時添加0.3 μ l 1 mg/ml霍亂毒素b次單元。將兩個試管之內含物再次平緩地混合，且使其在室溫下再培育5分鐘。自每個試管移出5 μ l且置放於玻璃載片上以便藉由螢光顯微法進行評估。為了提供對比染色，加速測定焦平面，且增加螢光信號之壽命，有時添加3 μ l DAPI/抗衰減劑(Antifade)。

如圖2中所示，正常人類精子中的 G_{M1} 之定位模式反映對獲能條件作出的回應。充分回應僅可見於具有正常生殖力的男性中；先前在子宮內授精(IUI)或活體外受精(IVF)上的嘗試已失敗之患有原因不明的不育症之男性中，回應性模式很大程度上減少或不存在。圖1展示人類精子中的 G_{M1} 模式。然而，出於診斷分析之目的，可對反映異常之模式(諸如PAPM、AA/PA、ES及DIFF)進行分組以易於分析。圖2A至圖2C展示在非獲能條件(NC；圖2A)或獲能條件(CAP；圖2B)下培育的正常精液中之不同模式之相對分佈。當暴露於CAP時在正常精液中可見INTER模式減少(圖2C)，而亦可見AA模式及APM模式顯著增

加。與此等正常資料比較，亦使來自一組已知患有原因不明的不育症之男性的精子經受 G_{M1} 分析。在此等精子中，在獲能條件下AA模式或APM模式幾乎無增加。

實例2

在此實例中，相對於曾經達成受孕之臨床跡象的病史，研究34名患者之臨床病史以密切分析其 G_{M1} 分析分數。若患者夫婦在3個或3個以下週期內達成一些受精/臨床受孕之跡象(即使限於生物化學跡象或在超音波上無心跳之孕囊)，則雄性患者定義為「可育」。

對此等34名患者的資料之分析揭示，若對在3小時時間點下經獲能之樣品的分數應用40% (APM+AA)之截止點，則發現「合格」(具有39.5%或39.5%以上之分數)之7/8已指定「可育」(87.5%)。在「不合格」(具有39.4或39.4以下之分數)的26名中，僅3/26具有臨床受孕跡象(11.5%)。(參看以下表1)

若降低截止點，則將預測，更多臨床上低生育力的人將得到合格分數及分析合格之百分比，且在3個週期內可育的人應減少。有趣的是，結果在生殖力(如由 ≤ 3 個週期準則所定義)方面不為平滑的梯度或連續曲線。亦即，如所定義不論在40還是35下分析不合格與始終較低生殖力幾率的任何顯著改變(在11.5-14.3%之間)不相關。相反地，在35對40下分析合格與生殖力幾率的極大差異(分別在53.8-87.5%範圍內)對應。為了強化且重申此點，5%經合併之APM+AA百分比的改變與生殖力病史之超過30%改變對應。

此等結果表明，雄性生殖力更像「階梯函數」，其中雄性生殖力分析之分數範圍與「可育」、「低生育力」或「不育」之分類對應，並非與和雄性生殖力之相對應較小但連續的改變相等的分數的較小改變(達成臨床受孕之幾率)對應。此等資料強烈指示，約38.5-40之分數應為在指定「低生育力」或「可育」之間的截止點。進一步檢驗資料表

明，<14.5%之截止點可用作指定可能「不育」。

截止點	基於≤3個週期內受孕所定義的可育	
39.5	合格	8 (7/8可育= 87.5%)
	不合格	26 (3/26可育= 11.5%)
38.5	合格	8 (7/8可育= 87.5%)
	不合格	26 (3/26可育= 11.5%)
37.5	合格	11 (7/11可育= 63.6%)
	不合格	23 (3/23可育= 13.0%)
36.5	合格	11 (7/11可育= 63.6%)
	不合格	23 (3/23可育= 13.0%)
35.5	合格	13 (7/13可育= 53.8%)
	不合格	21 (3/21可育= 14.3%)

在平均精液參數方面均類似的此等男性之概述資料表明以下範圍(基於絕對分數)：不育：<14.5；低生育力：14.5-38.4；可育：≥38.5。

或者，可藉由比較在獲能條件下歷經培育時間的APM及/或AA模式之相對頻率的改變，或與在非獲能條件下觀測到的相對頻率比較，評估樣品之生殖力。舉例而言，可將在獲能條件中培育3小時之後的APM+AA相對頻率與在開始培育時彼等模式之相對頻率進行比較。在又另一實施例中，可比較APM及/或AA頻率的改變與自連續時間點(諸如，1、2及3小時)獲得之結果。實際上，可將相對頻率繪製在Y軸上，且時間點繪製在X軸上，且評估在非獲能及獲能條件下INTER、APM及/或AA樣品中之一或多者之增加頻率之斜率或改變率。當在一組63名患者中進行此分析方法時，以分別17%-22%-28%於非獲能培養基中及26%-31%-38%於獲能培養基中之基線G_{M1}模式，歷經1、2及3小時之培育(參看圖3)，鑑定具有匹配正常參考組之分數的31名男性。鑑定具有15%-20%-24%於非獲能培養基中及20%-25%-29%於獲能培養基中之低於參考值的32名男性。在兩組之間，數目、運動性及

正常形態%(使用嚴格WHO準則)之精液分析參數為可比較的。具有正常範圍 G_{M1} 模式的群體之子宮內授精(IUI)受孕率為45.2% (14/31)，其中8名(25.8%)產生至少一次胎兒心跳。此組中的另外三對夫婦自行受孕。對於具有低於參考 G_{M1} 模式的男性，IUI臨床受孕率僅為6.3% (2/32； $P=0.03$)。在此群組中，13名經受ICSI，且6名受孕(46.2%)。

儘管本發明已根據一或多個特定實施例描述，但應瞭解，本發明之其他實施例可在不偏離本發明之精神及範疇之情況下進行，且該等其他實施例意欲在本發明之範疇內。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種用於鑑定人類雄性個體之生殖力狀態的方法，其包含：
將來自該個體的精子樣品之第一部分暴露於非獲能條件以獲得非經獲能之精子；
將該精子樣品之第二部分暴露於獲能條件以獲得經獲能之精子；
用固定劑固定該經獲能之精子及該非經獲能之精子；
將該經獲能之精子及該非經獲能之精子染色以鑑定 G_{M1} 模式；
測定在該經獲能之精子及該非經獲能之精子中所選擇之 G_{M1} 模式之頻率；且
將在該經獲能之精子中所選擇之 G_{M1} 模式之頻率與在該非經獲能之精子中所選擇之 G_{M1} 模式之頻率進行比較，其中與該非獲能精子相比，該經獲能之精子中所選擇之 G_{M1} 模式中之一或多者之頻率的改變指示該個體之生殖力狀態。
2. 如請求項1之方法，其中該等所選擇之 G_{M1} 模式為中間體(INTER)、頂端頂體(AA)及後頂體質膜(APM)中之一或多者。
3. 如請求項1之方法，其中該固定劑包含三聚甲醛、戊二醛或其組合。
4. 一種用於鑑定人類雄性個體之生殖力狀態的方法，其包含：
獲得經獲能及非經獲能之精子，其中該精子係來自該個體，且其中該精子已暴露於非獲能或獲能條件，固定且染色以用於 G_{M1} ；
測定在該經獲能之精子及該非經獲能之精子中所選擇之 G_{M1} 模式之頻率；且
將在該經獲能之精子中所選擇之 G_{M1} 模式之頻率與在該非經獲

能之精子中所選擇之 G_{M1} 模式之頻率進行比較，其中與該非獲能精子相比，該經獲能之精子中所選擇之 G_{M1} 模式中之一或多者之頻率的改變指示該個體之生殖力狀態。

5. 一種將人類雄性個體之生殖力狀態鑑定為不育、低生育力或可育的方法，其包含：

將來自該個體之精子樣品暴露於獲能條件，以獲得經獲能之精子；

用固定劑固定該經獲能之精子；

將該經獲能之精子染色以鑑定 G_{M1} 模式；

測定在該經獲能之精子中AA+APM百分比之 G_{M1} 模式；且

將該AA+APM百分比與參考進行比較以判定該個體之生殖力狀態，其中該參考為生殖力臨限值，且其中小於該生殖力臨限值的頻率指示生殖力狀態為不育或低生育力。

6. 如請求項5之方法，其中該生殖力臨限值為低於已知可育個體之群體的經獲能之精子中的平均AA+APM模式百分比一個標準差的AA+APM模式百分比。
7. 如請求項5之方法，其中該生殖力臨限值為群體之生殖力停止實質上增加時的AA+APM模式頻率。
8. 如請求項5之方法，其中該生殖力臨限值為該群體中超過50%為可育時的AA+APM之水準。
9. 如請求項5之方法，其中該生殖力臨限值為在該等總 G_{M1} 模式之35-40%範圍內(包括端點)的AA+APM之水準。
10. 一種用於鑑定雄性個體之生殖力狀態的方法，其包含：

獲得精子樣品，其中該精子樣品係來自該個體，且其中該精子樣品已暴露於獲能條件，固定且染色以用於 G_{M1} 模式；

測定在該精子樣品中的AA+APM百分比之 G_{M1} 模式；且

將AA+APM百分比之 G_{M1} 模式與參考進行比較以判定該個體之生殖力狀態，其中該參考為生殖力臨限值，且其中小於該生殖力臨限值的頻率指示生殖力狀態為不育或低生育力。

11. 一種用於鑑定雄性個體之生殖力狀態的套組，其包含：

圖表，其具有用於比較的 G_{M1} 模式之圖示或用於指示生殖力狀態之 G_{M1} 模式頻率的預定準則；且

一或多個以下各者：獲能培養基、非獲能培養基、固定劑組合物、用於測定 G_{M1} 之試劑及染色模式。

圖式

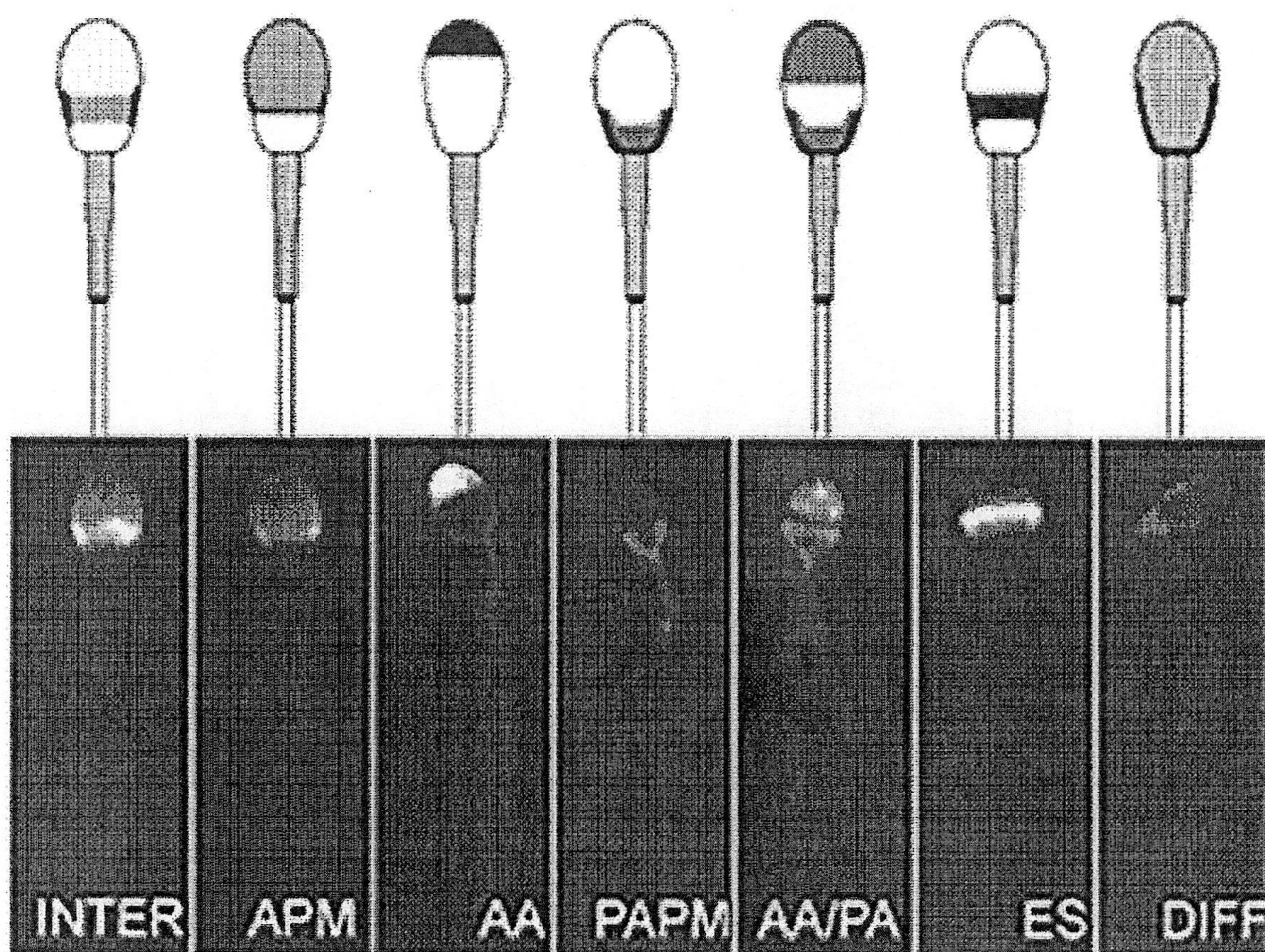


圖1

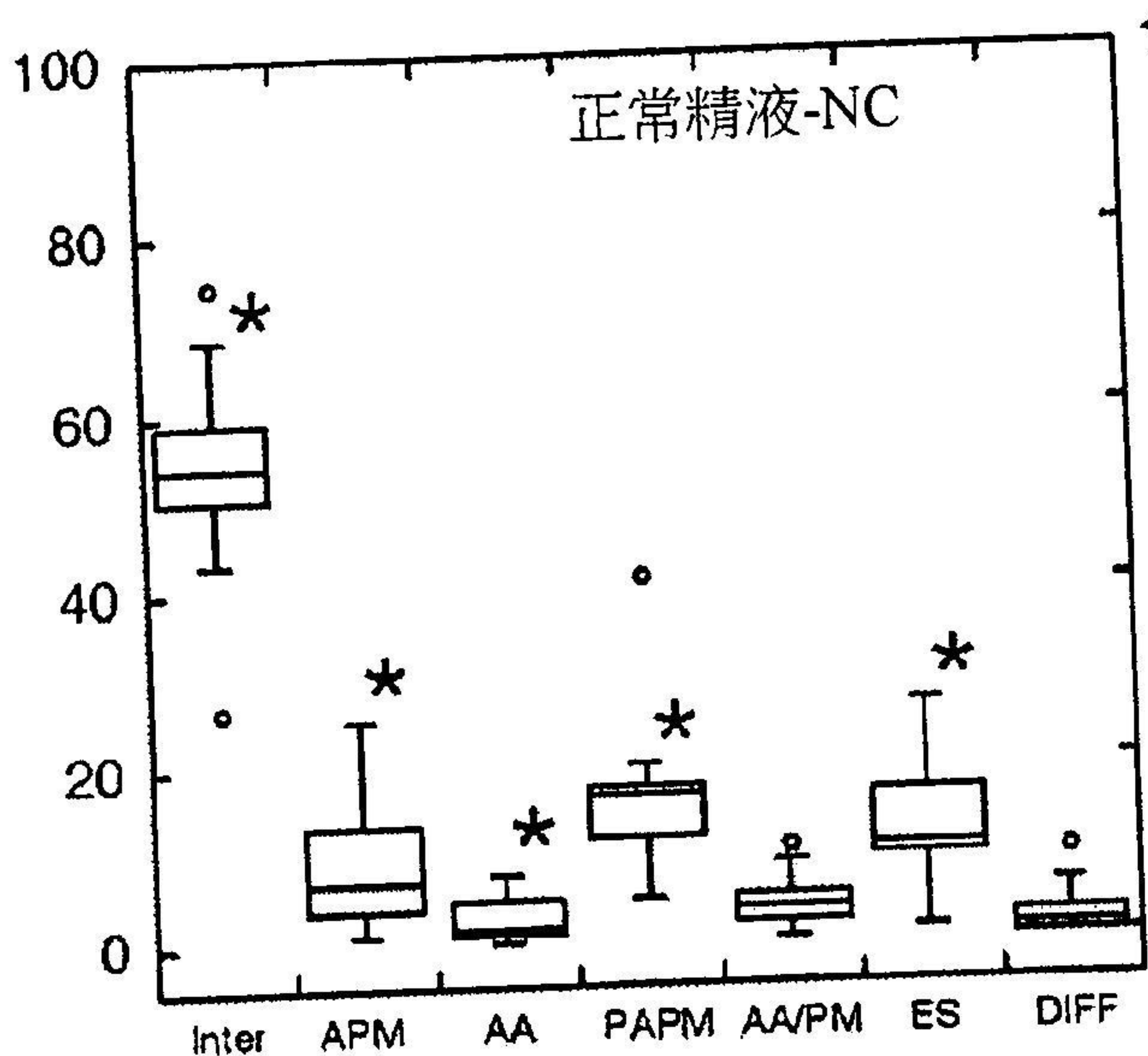


圖2A

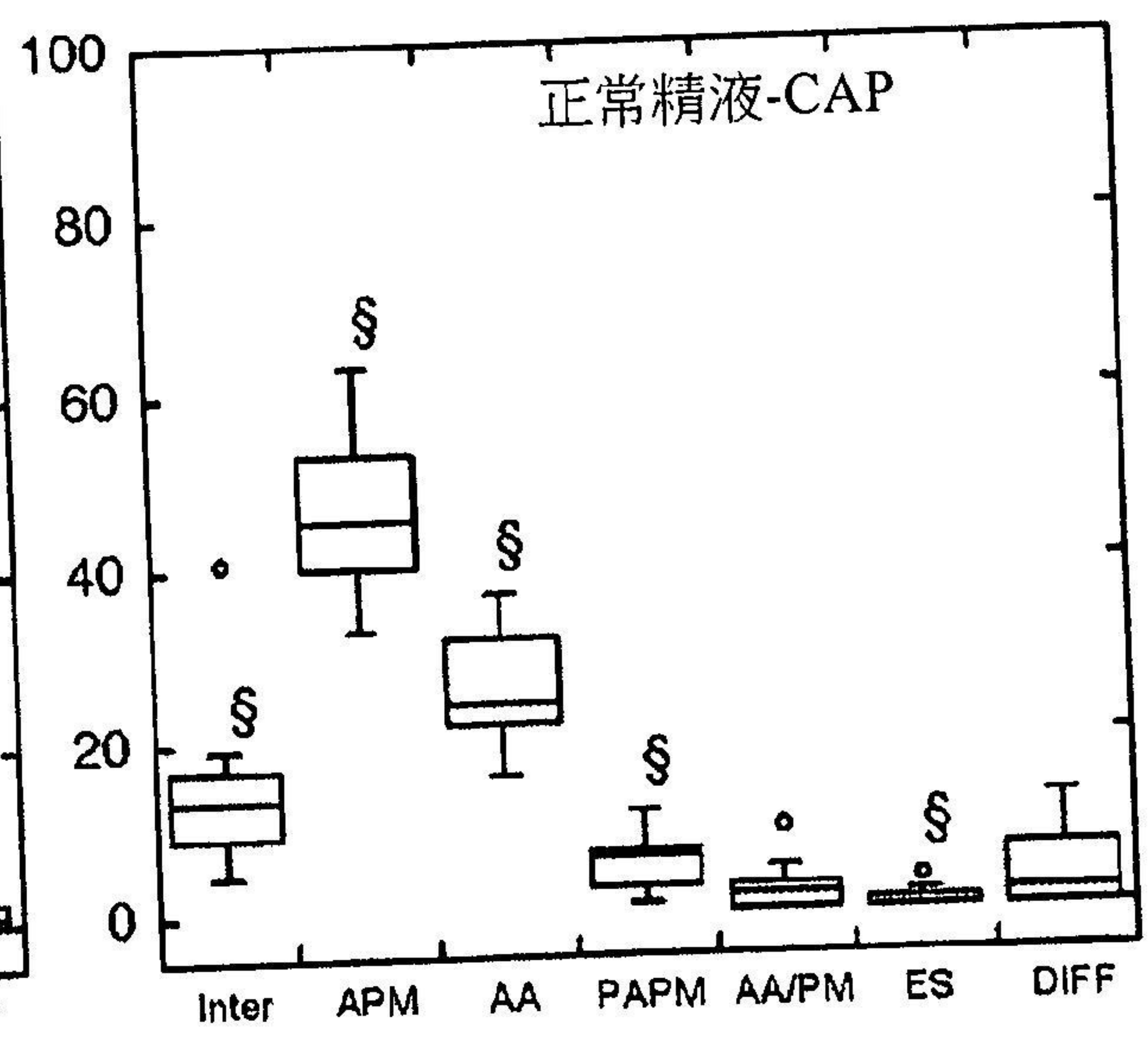


圖2B

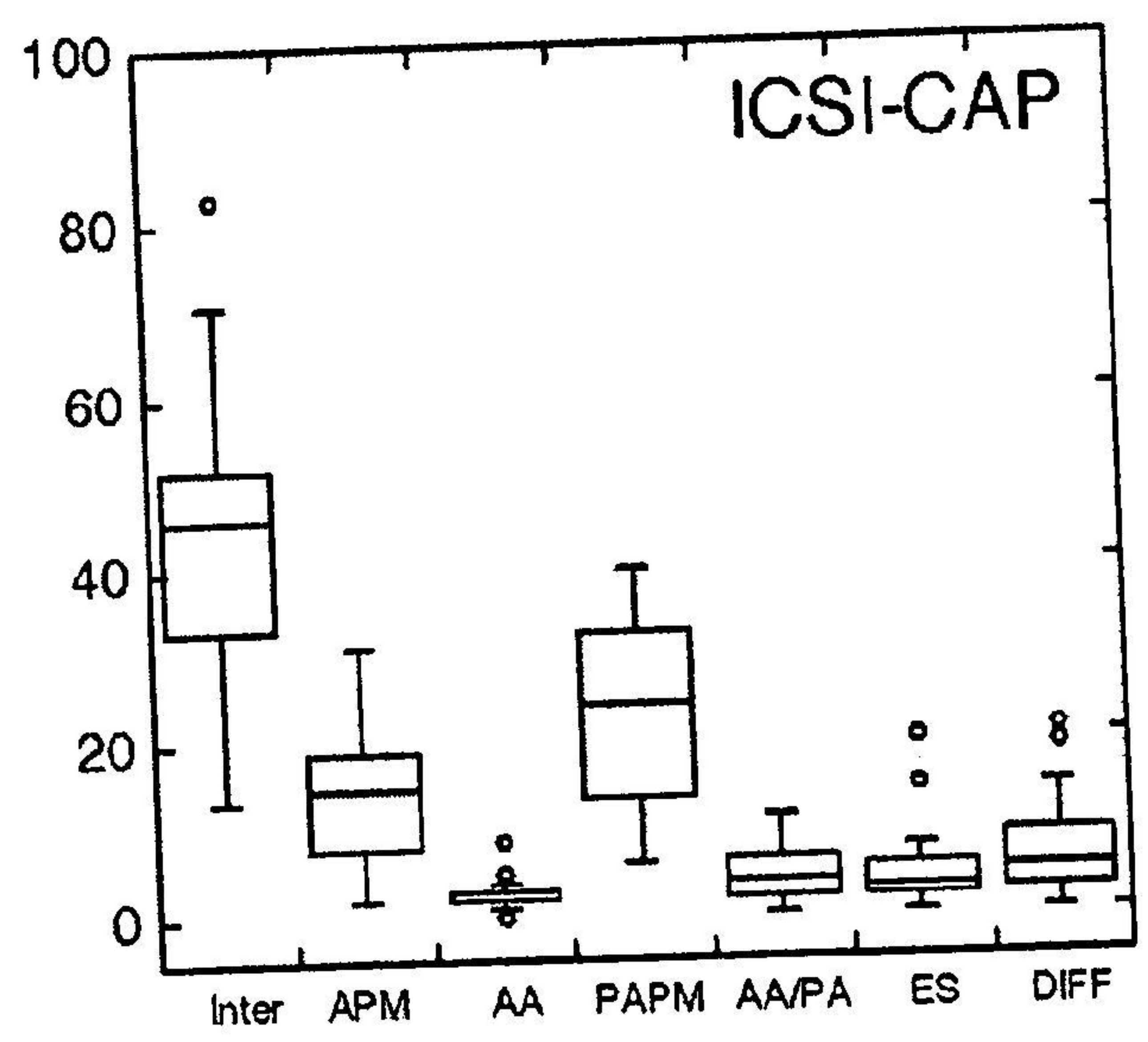


圖2C



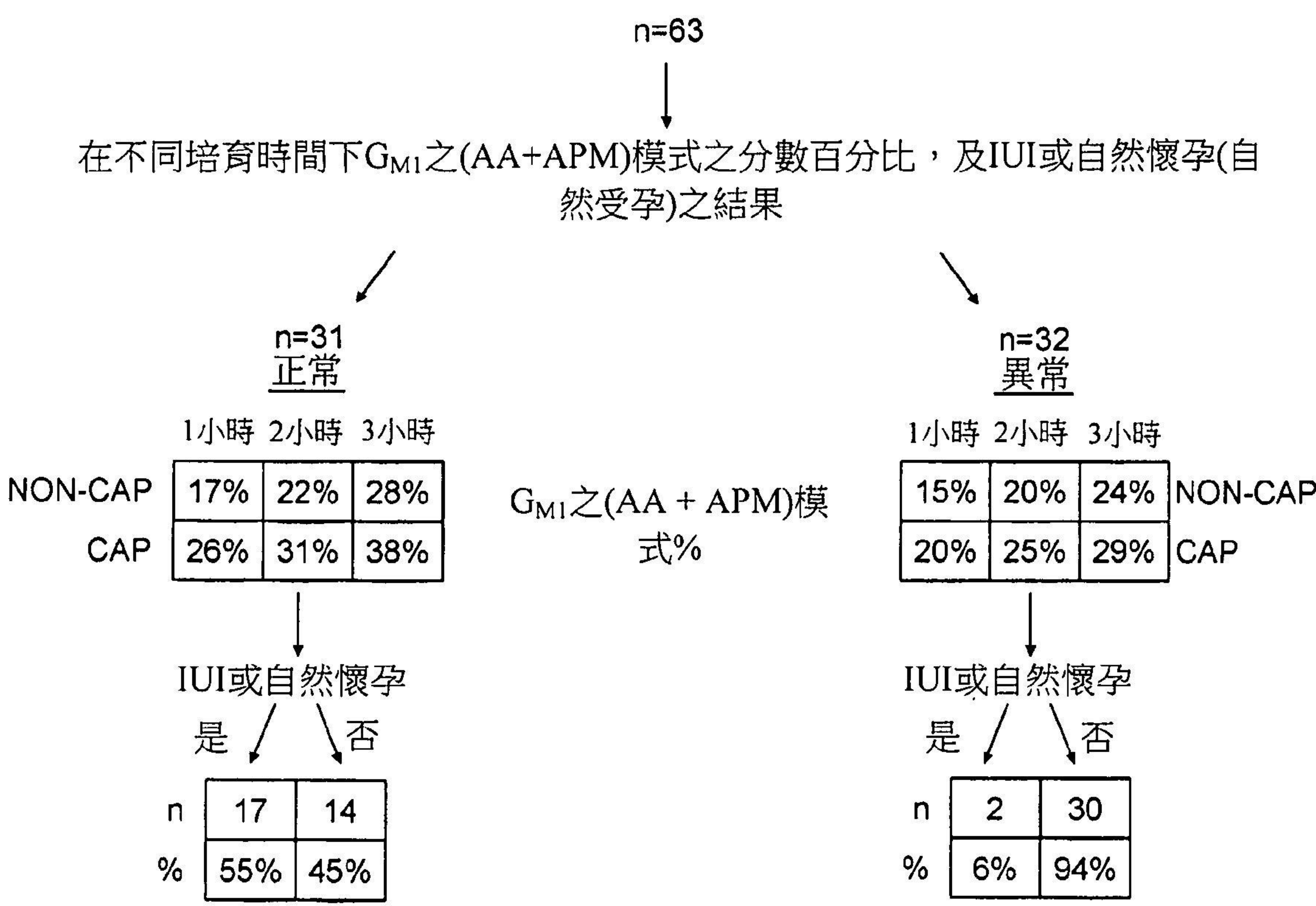


圖3

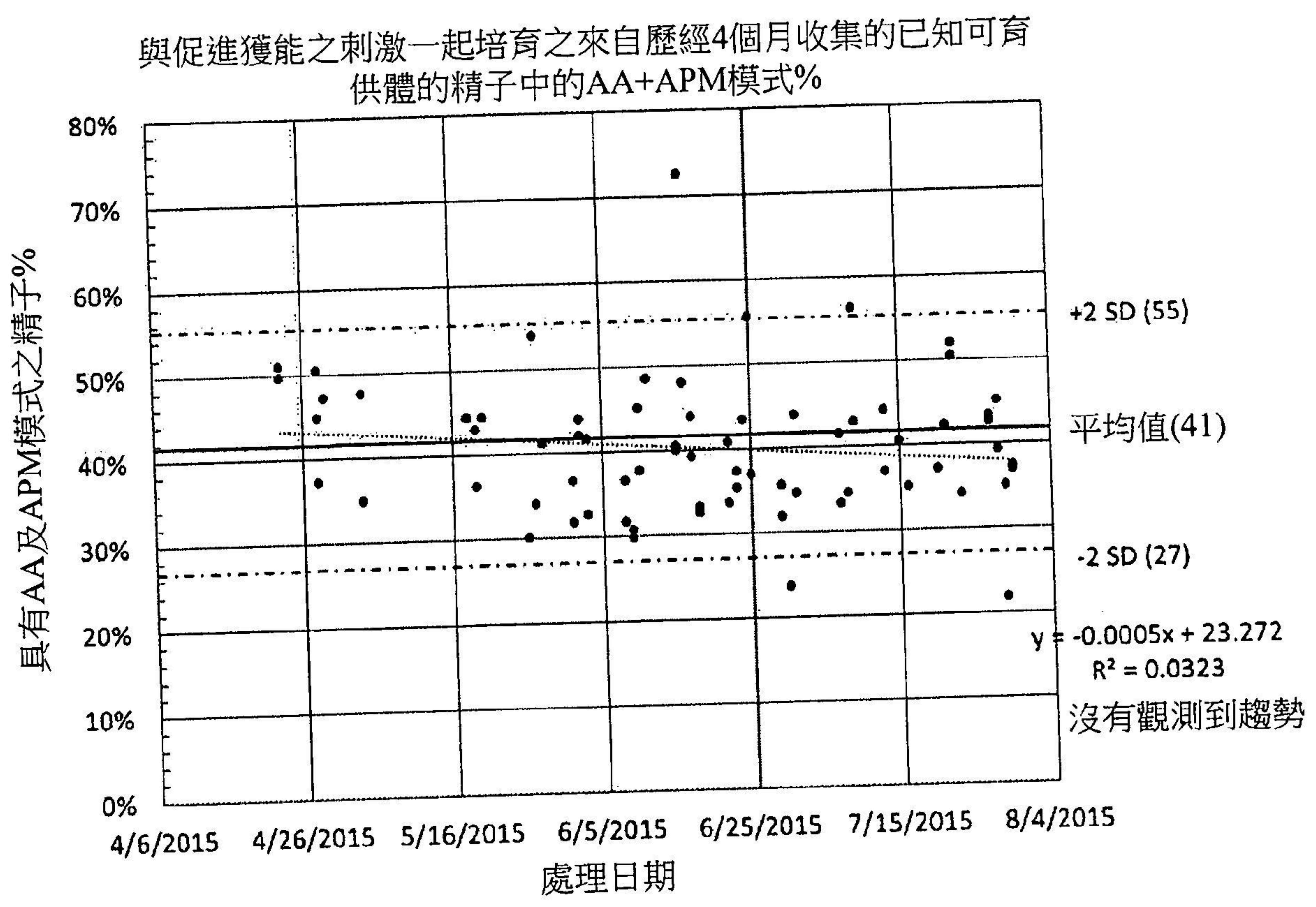


圖4

與來自可育男性的資料比較的在非獲能或獲能條件(具有環糊精)下培育之來自懷疑低生育力/不育供體的精子中的AA+APM模式%

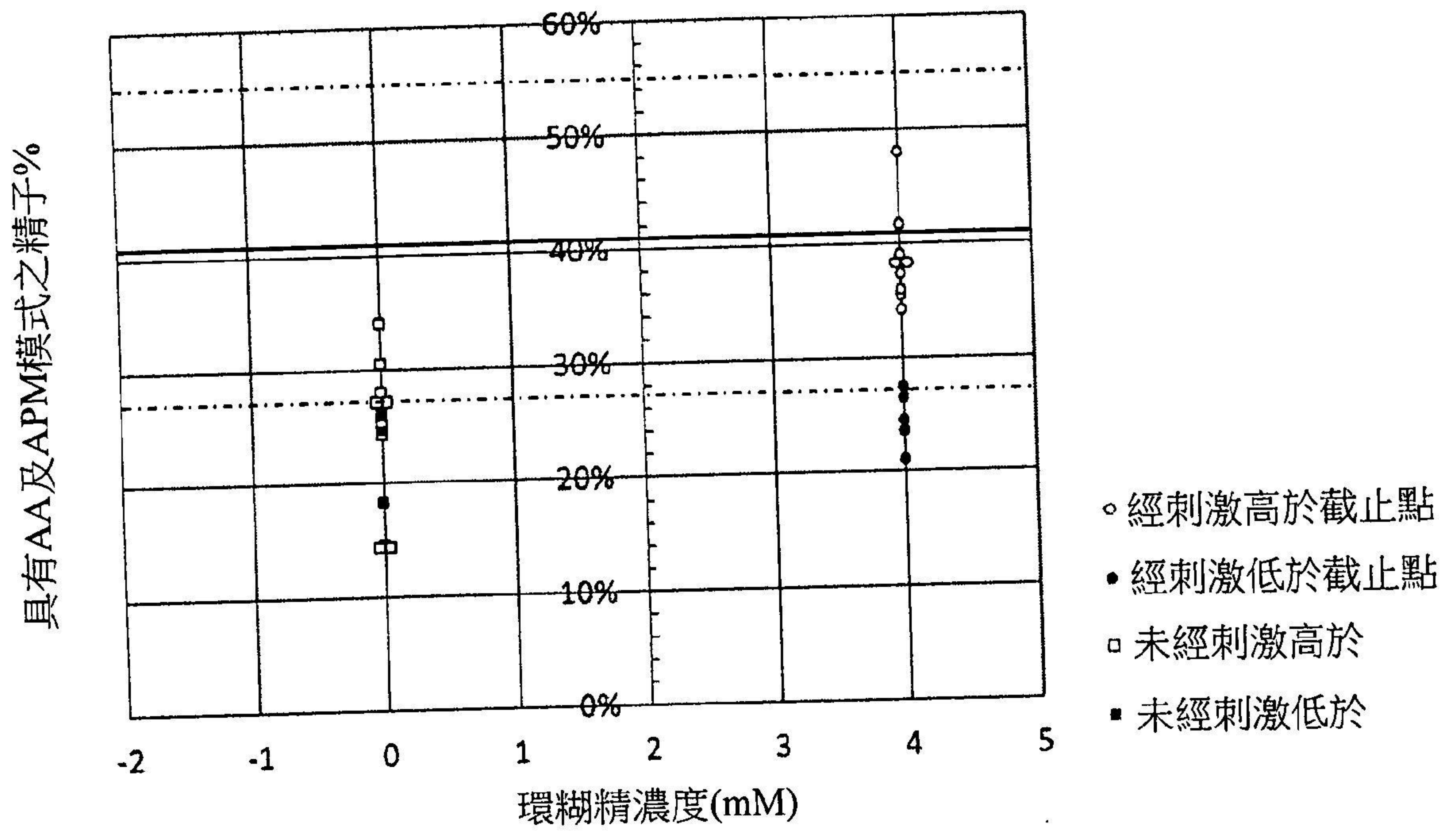


圖5

