



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108624552 B

(45) 授权公告日 2020.11.27

(21) 申请号 201810257972.7

CN 102250836 A, 2011.11.23

(22) 申请日 2018.03.27

CN 104403993 A, 2015.03.11

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 86101836 A, 1987.01.24

申请公布号 CN 108624552 A

CN 1821391 A, 2006.08.23

CN 107251892 A, 2017.10.17

(43) 申请公布日 2018.10.09

WO 0242767 A2, 2002.05.30

(73) 专利权人 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

朱培元 等. 小鼠睾丸精子细胞的分离与鉴定.《中华男科学》.2002,第8卷(第1期),第28-31页 摘要,材料与方法,结果与讨论部分.

地址 100019 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

Kathryn Harison et al. Percoll density gradient centrifugation technique isolates rooster sperm with low, medium and high mobility or fertility potential.《2018 International Poultry Scientific Forum》.2018,第57-58页 P194.

(72) 发明人 陈继兰 李云雷 孙研研 麻慧
叶建华 倪爱心 谢金防

J. A. Long. An Effective Method for Improving the Fertility of Glycerol-Exposed Poultry Semen.《Poultry Science》.2004,第83卷第1594-1601页.

(74) 专利代理机构 苏州言思嘉信专利代理事务所(普通合伙) 32385

代理人 刘巍

(51) Int. Cl.

C12N 5/076 (2010.01)

(56) 对比文件

CN 104195104 A, 2014.12.10

审查员 陈永强

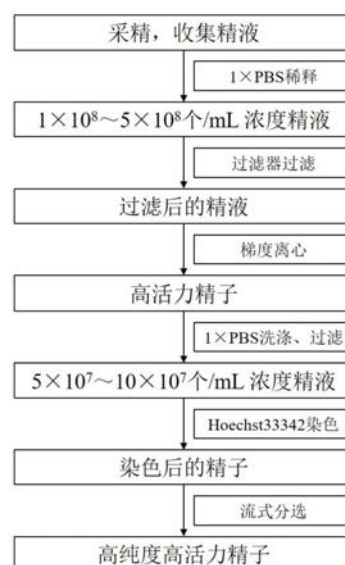
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种获得高纯度鸡精子的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种获得高纯度鸡精子的方法,包括以下步骤:1)将采集到的鸡精液稀释后,过滤;2)配制不连续的密度梯度离心介质,将过滤后的鸡精液小心地加入到密度梯度离心介质上层,离心收集鸡精子沉淀;3)将收集的鸡精子沉淀离心后,洗涤后稀释;4)将稀释后的鸡精液过滤,将工作液加入过滤后的鸡精液中进行染色;5)染色后的鸡精液过滤后,分装到无菌流式上样管中,通过流式细胞仪进行分选,收集纯化后的鸡精子。本发明采用Percoll不连续密度梯度离心法获取活力较高的精子的基础上,进一步使用流式技术,大大提高了精子的纯度,有效降低其他细胞的污染,最终获取了高纯度、高活力的活精子。



1. 一种获得高纯度鸡精子的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- 1) 将采集到的鸡精液用稀释液稀释后,通过无菌过滤器进行过滤;
- 2) 配制不连续的密度梯度离心介质,将过滤后的鸡精液小心地加入到不连续的密度梯度离心介质上层,离心后,收集鸡精子沉淀;
- 3) 将收集的鸡精子沉淀离心后,洗涤,然后用稀释液稀释;
- 4) 将稀释后的鸡精液通过无菌过滤器进行过滤,将工作液加入过滤后的鸡精液中进行染色;
- 5) 染色后的鸡精液通过无菌过滤器进行过滤后,分装到无菌流式上样管中,通过流式细胞仪进行分选,收集纯化后的鸡精子;

其中,

在步骤1)中,将采集到的鸡精液用 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液稀释至鸡精子浓度为 $1\times 10^8\sim 5\times 10^8$ 个/mL,无菌过滤器的孔径为 $70\mu\text{m}$ 或 $100\mu\text{m}$;

在步骤2)中,分别配制65%Percoll液和90%Percoll液,在离心管中先加入65%Percoll液,再从离心管底部缓缓加入90%Percoll液,90%Percoll液沉于离心管底部,65%Percoll液层缓缓上升,最终形成界面分离明显的不连续的密度梯度Percoll分离液;将过滤后的鸡精液小心地加入到不连续的密度梯度Percoll分离液上层,常温 $600\sim 800\text{g}$ 的转速下离心 $20\sim 30\text{min}$,收集鸡精子沉淀;

在步骤3)中,所述离心为在 3000g 的转速下离心 2min ,所述稀释液为 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液,用 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液稀释至鸡精子浓度为 $5\times 10^7\sim 10\times 10^7$ 个/mL;

在步骤4)中,无菌过滤器的孔径为 $70\mu\text{m}$ 或 $100\mu\text{m}$,所述染色为将Hoechst33342工作液加入过滤后的鸡精液中, 37°C 避光孵育 30min 进行染色,Hoechst33342工作液在过滤后的鸡精液中的终浓度为 $2.5\mu\text{g/mL}$;

在步骤5)中,无菌过滤器的孔径为 $70\mu\text{m}$ 或 $100\mu\text{m}$,无菌流式上样管中鸡精子的浓度为 $1\times 10^7\sim 5\times 10^7$ 个/mL。

一种获得高纯度鸡精子的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种获得高纯度鸡精子的方法。

背景技术

[0002] 鸡精液由精子、精清以及混入精液的体细胞组成。精液中的体细胞主要包括未成熟的生精细胞、输精管上皮细胞、白细胞和血细胞等。获取高纯度的鸡精子是对其形态结构和核酸水平研究的前提。鉴于直接采集的鸡精液中存在其他细胞污染,获取高纯度鸡精子是一项重要的技术。

[0003] 目前常用的鸡精液处理方法有上游法、梯度离心法和细胞裂解法。上游法是根据相对体细胞,精子具有游动性,利用精子的游动性来筛选出活力较高的精子。梯度离心法是根据精子与体细胞在形态、细胞成分和浮力密度不同,在离心介质中,在一定离心力的作用下,不同精子和体细胞各自沉降在不同区域,从而分离出精子。细胞裂解法是根据精子与体细胞裂解难度的差异,通过差速裂解,去除体细胞。但是现有技术中存在以下缺点:单一的现有方法难以实现高纯度鸡精子的分离;上游法精子回收率低,梯度离心法要求操作谨慎,获得的精子纯度低,仍有体细胞残留,细胞裂解法处理后精子全部死亡,不能获得活精子。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提出一种获得高纯度鸡精子的方法,该方法通过使用梯度离心法与流式分选技术相结合,获取可控数量的高纯度、高活力的活精子。

[0005] 基于上述目的,本发明提供一种获得高纯度鸡精子的方法,包括以下步骤:

[0006] 1) 将采集到的鸡精液用稀释液稀释后,通过无菌过滤器进行过滤;

[0007] 2) 配制不连续的密度梯度离心介质,将过滤后的鸡精液小心地加入到不连续的密度梯度离心介质上层,离心后,收集鸡精子沉淀;

[0008] 3) 将收集的鸡精子沉淀离心后,洗涤,然后用稀释液稀释;

[0009] 4) 将稀释后的鸡精液通过无菌过滤器进行过滤,将工作液加入过滤后的鸡精液中进行染色;

[0010] 5) 染色后的鸡精液通过无菌过滤器进行过滤后,分装到无菌流式上样管中,通过流式细胞仪进行分选,收集纯化后的鸡精子。

[0011] 在本发明的一些实施例中,在步骤1)中,将采集到的鸡精液用1×磷酸盐缓冲液(1×PBS)稀释至鸡精子浓度为 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 个/mL,无菌过滤器的孔径为70 μ m或100 μ m。

[0012] 在本发明的一些实施例中,分别配制65%Percoll液和90%Percoll液,在离心管中先加入65%Percoll液,再从离心管底部缓缓加入90%Percoll液,90%Percoll液沉于离心管底部,65%Percoll液层缓缓上升,最终形成界面分离明显的不连续的密度梯度Percoll分离液;将过滤后的鸡精液小心地加入到不连续的密度梯度Percoll分离液上层,常温600~800g的转速下离心20~30min,收集鸡精子沉淀。

[0013] Percoll密度梯度离心法是利用精子本身的主动游动能力和离心的被动分离作

用,根据正常精子与畸形精子、不活动精子及精液中的其他细胞成分在运动能力、运动轨迹和浮力密度等方面存在差异,在密度梯度溶液柱中运动的能力也有差异,离心后精液中的各种成分在密度梯度溶液柱中达到平衡,停留在各自的等浮力密度点上,从而分离出正常精子。离心过程中,正常精子下降速度快,体细胞、畸形精子和不活动精子下降速度慢,活力高的精子与畸形精子、不活动精子因此分开,同时可去除精液中的其他细胞成分,有利于获得纯度高、活力较高的精子。Percoll密度梯度离心法所使用的Percoll液是一种经过聚乙烯吡咯烷酮处理过的硅胶颗粒,Percoll液扩散常数低,所形成的梯度十分稳定。

[0014] 本发明的发明人通过多次试验,使用了65% (质量百分含量) Percoll液与90% (质量百分含量) Percoll液不连续密度梯度,常温600~800g离心20~30min,能够获取活力较高的精子,并具有较好的体细胞去除效果。

[0015] 在本发明的一些实施例中,所述离心为在3000g的转速下离心2min,所述稀释液为1×PBS缓冲液,用1×PBS缓冲液稀释至鸡精子浓度为 $5 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ 个/mL。

[0016] 在本发明的一些实施例中,无菌过滤器的孔径为70μm或100μm,所述染色为将Hoechst33342工作液加入过滤后的鸡精液中,37℃避光孵育30min进行染色,Hoechst33342工作液在过滤后的鸡精液中的终浓度为2.5μg/mL。

[0017] 在本发明的一些实施例中,无菌过滤器的孔径为70μm或100μm,无菌流式上样管中鸡精子的浓度为 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 个/mL。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0019] 本发明采用Percoll不连续密度梯度离心法获取活力较高的精子的基础上,进一步使用流式技术,大大提高了精子的纯度,有效降低其他细胞的污染,最终获取了高纯度、高活力的活精子。本发明获得高纯度鸡精子的方法高效、分离稳定度高,可以实现高纯度鸡精子的高效、快速分离。

附图说明

[0020] 图1为本发明实施例中获得高纯度鸡精子的工艺流程图;

[0021] 图2为纯化前后精液细胞组成的对比图,其中,图2A、2B、2C、2D、2E、2F、2G分别为实施例1~3、对比例1~4的细胞纯度分析结果。

具体实施方式

[0022] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,对本发明进一步详细说明。

[0023] 实施例1

[0024] 在本实施例中,获得高纯度鸡精子的工艺流程图如图1所示,具体包括以下步骤:

[0025] 1) 采用腹部按摩法采集正常公鸡的精液500μL,光学显微镜下统计精子密度,并根据精液密度加入1×磷酸盐缓冲液(1×PBS) 稀释至精子浓度为 1×10^8 个/mL,将稀释后的精液缓慢通过70μm的无菌过滤器进行过滤;

[0026] 2) 取Percoll原液用1×PBS缓冲液分别稀释成65% Percoll液和90% Percoll液,使用无菌巴氏管,在离心管中先加入1mL 65% Percoll液,再从离心管底部缓缓加入90% Percoll液,90% Percoll液沉于离心管底部,65% Percoll液层缓缓上升,最终形成界面分

离明显的不连续的密度梯度Percoll分离液；相对于传统方法，该方法降低了加样难度；

[0027] 将过滤后的鸡精液小心地加入到不连续的密度梯度离心Percoll分离液上层，常温600g的转速下离心30min，离心结束后取出离心管，在离心管中可观察到明显的分层，上层为体细胞等杂质、畸形精子和不活动精子，下层为高活力的精子，用吸管吸取下层高活力的鸡精子沉淀，该步骤具有较好的体细胞去除效果；

[0028] 3) 将收集的鸡精子在3000g的转速下离心2min，洗涤，然后用1×PBS缓冲液稀释至精子浓度为 5×10^7 个/mL；

[0029] 4) 将稀释后的鸡精液通过70 μ m的无菌过滤器进行过滤，将Hoechst33342工作液加入过滤后的鸡精液中，Hoechst33342终浓度为2.5 μ g/mL，37℃避光孵育30min进行染色；Hoechst 33342可以特异性地结合到DNA的AT富含区域；

[0030] 5) 染色后的鸡精液通过70 μ m的无菌过滤器进行过滤后，分装到无菌流式上样管中，精子浓度控制在 1×10^7 个/mL，通过流式细胞仪进行分选，收集纯化后的鸡精子，再次通过流式细胞仪，确认分选纯度。

[0031] 实施例2

[0032] 在本实施例中，获得高纯度鸡精子的工艺流程图如图1所示，具体包括以下步骤：

[0033] 1) 采用腹部按摩法采集正常公鸡的精液500 μ L，显微镜下统计精子密度，并根据精液密度加入1×PBS缓冲液稀释至精子浓度为 5×10^8 个/mL，将稀释后的精液缓慢通过100 μ m的无菌过滤器进行过滤；

[0034] 2) 取Percoll原液用1×PBS缓冲液分别稀释成65%Percoll液和90%Percoll液，使用无菌巴氏管，在离心管中先加入1mL 65%Percoll液，再从离心管底部缓缓加入90%Percoll液，90%Percoll液沉于离心管底部，65%Percoll液层缓缓上升，最终形成界面分离明显的不连续的密度梯度Percoll分离液；相对于传统方法，该方法降低了加样难度；

[0035] 将过滤后的鸡精液小心地加入到不连续的密度梯度离心Percoll分离液上层，常温800g的转速下离心20min，离心结束后取出离心管，在离心管中可观察到明显的分层，上层为体细胞等杂质、畸形精子和不活动精子，下层为高活力的精子，用吸管吸取下层高活力的鸡精子沉淀，该步骤具有较好的体细胞去除效果；

[0036] 3) 将收集的鸡精子在3000g的转速下离心2min，洗涤，然后用1×PBS缓冲液稀释至精子浓度为 10×10^7 个/mL；

[0037] 4) 将稀释后的鸡精液通过100 μ m的无菌过滤器进行过滤，将Hoechst33342工作液加入过滤后的鸡精液中，Hoechst33342终浓度为2.5 μ g/mL，37℃避光孵育30min进行染色；Hoechst 33342可以特异性地结合到DNA的AT富含区域；

[0038] 5) 染色后的鸡精液通过100 μ m的无菌过滤器进行过滤后，分装到无菌流式上样管中，精子浓度控制在 5×10^7 个/mL，通过流式细胞仪进行分选，收集纯化后的鸡精子，再次通过流式细胞仪，确认分选纯度。

[0039] 实施例3

[0040] 在本实施例中，获得高纯度鸡精子的工艺流程图如图1所示，具体包括以下步骤：

[0041] 1) 采用腹部按摩法采集正常公鸡的精液500 μ L，显微镜下统计精子密度，并根据精液密度加入1×PBS缓冲液稀释至精子浓度为 3×10^8 个/mL，将稀释后的精液缓慢通过70 μ m的无菌过滤器进行过滤；

[0042] 2) 取Percoll原液用1×PBS缓冲液分别稀释成65%Percoll液和90%Percoll液,使用无菌巴氏管,在离心管中先加入1mL 65%Percoll液,再从离心管底部缓缓加入90%Percoll液,90%Percoll液沉于离心管底部,65%Percoll液层缓缓上升,最终形成界面分离明显的不连续的密度梯度Percoll分离液;相对于传统方法,该方法降低了加样难度;

[0043] 将过滤后的鸡精液小心地加入到不连续的密度梯度离心Percoll分离液上层,常温700g的转速下离心25min,离心结束后取出离心管,在离心管中可观察到明显的分层,上层为体细胞等杂质、畸形精子和不活动精子,下层为高活力的精子,用吸管吸取下层高活力的鸡精子沉淀,该步骤具有较好的体细胞去除效果;

[0044] 3) 将收集的鸡精子在3000g的转速下离心2min,洗涤,然后用1×PBS缓冲液稀释至精子浓度为 8×10^7 个/mL;

[0045] 4) 将稀释后的鸡精液通过70 μ m的无菌过滤器进行过滤,将Hoechst33342工作液加入过滤后的鸡精液中,Hoechst33342终浓度为2.5 μ g/mL,37℃避光孵育30min进行染色;Hoechst 33342可以特异性地结合到DNA的AT富含区域;

[0046] 5) 染色后的鸡精液通过70 μ m的无菌过滤器进行过滤后,分装到无菌流式上样管中,精子浓度控制在 3×10^7 个/mL,通过流式细胞仪进行分选,收集纯化后的鸡精子,再次通过流式细胞仪,确认分选纯度。

[0047] 对比例1

[0048] 在本对比例中,直接获取鸡精液,具体方法为:用腹部按摩法采集正常公鸡的精液500 μ L。

[0049] 对比例2

[0050] 在本对比例中,采用上游法进行鸡精子的获得,具体方法为:采用腹部按摩法采集正常公鸡的精液500 μ L,取精液500 μ L与1mL洗精液(ART-1006)混匀,300g离心15min,留管底精子团,再用0.5mL洗精液(ART-1006)混匀,300g离心10min,去除上清液后,留底部沉淀精子,加入1.0mL平衡液(ART-1020),倾斜45度角,置CO₂培养箱孵育45min,待精子充分上游后,吸取上层含精子的悬液0.5mL于无菌试管中,获得鸡精子。

[0051] 对比例3

[0052] 在本对比例中,获得高纯度鸡精子的方法中步骤2)与实施例1不同,其余步骤均与实施例1中的步骤相同,本对比例中步骤2)具体为:

[0053] 2) 取Percoll原液用1×PBS缓冲液分别稀释成40%Percoll液和80%Percoll液,使用无菌巴氏管,在离心管中先加入1mL 80%Percoll液,其上方加入1mL 40%Percoll液,然后将过滤后的鸡精液小心地加入密度梯度离心Percoll分离液上层,常温600g的转速下离心30min,离心结束后取出离心管,在离心管中可观察到明显的分层,上层为体细胞等杂质、畸形精子和不活动精子,下层为高活力的精子,用吸管吸取下层高活力的鸡精子沉淀。

[0054] 对比例4

[0055] 在本对比例中,获得高纯度鸡精子的方法中步骤2)与实施例1不同,其余步骤均与实施例1中的步骤相同,本对比例中步骤2)具体为:

[0056] 2) 取Percoll原液用1×PBS缓冲液分别稀释成45%Percoll液和90%Percoll液,使用无菌巴氏管,在离心管中先加入1mL 90%Percoll液,其上方加入1mL 45%Percoll液,然后将过滤后的鸡精液小心地加入密度梯度离心Percoll分离液上层,常温600g的转速下

离心30min,离心结束后取出离心管,在离心管中可观察到明显的分层,上层为体细胞等杂质、畸形精子和不活动精子,下层为高活力的精子,用吸管吸取下层高活力的鸡精子沉淀。

[0057] 试验例1流式分选前后精液细胞组成和精子活力的对比

[0058] 将实施例1~3、对比例1~4中获得的鸡精子的纯度进行确认,实施例和对比例精液以Hoechst33342工作液染色,流式细胞仪分析结果图2。其中图2A、2B、2C、2D、2E、2F、2G分别为实施例1~3、对比例1~4的细胞纯度分析结果。根据图2D可知,荧光信号在50K和100K出现两个峰值,其中荧光信号在50K左右的精子细胞约占88.7%,荧光信号在100K左右的体细胞约占11.3%。实施例1~3对和比例2~4分析结果可知,荧光信号在50K出现峰值,100K峰值较小,说明精子得到了较有效纯化,实施例1~3荧光信号100K处细胞群百分比约为1.52%左右,显著低于对比例2~4荧光信号100K处细胞群百分比。

[0059] 采用Markler记数板检查实施例1~3和对比例1~4中获得的鸡精子的活力,应用SPSS10.0统计软件进行t检验或方差分析,数据用均数±标准差表示, $P<0.05$ 表示差异有显著性,试验结果如表1所示。

[0060] 表1纯化后精子细胞纯度和精子活力

[0061]

组别	精子细胞百分比(%)	精子活力(%)
实施例1	$98.48 \pm 0.1^*$	$97.5 \pm 4.8^*$
实施例2	$98.17 \pm 0.2^*$	$98.2 \pm 5.7^*$
实施例3	$98.33 \pm 0.2^*$	$98.9 \pm 4.3^*$
对比例1	90.68 ± 0.8	53.3 ± 19.4
对比例2	96.14 ± 0.2	89.2 ± 7.6
对比例3	94.44 ± 0.4	80.5 ± 8.9
对比例4	95.23 ± 0.4	78.5 ± 10.2

[0062] 注:与其他对比例比较, $*P<0.05$

[0063] 由表1可知,实施例1~3中获得的鸡精子的活力远远高于对比例1~4中获得的鸡精子的活力,这也说明,虽然对比例2~4中的方法也能获得高纯度的鸡精子,但是获得的鸡精子的活力远远低于实施例1~3。因此,65%Percoll液和90%Percoll液形成的不连续的密度梯度Percoll分离液,能够获得高活力的鸡精子,而其它浓度的Percoll液形成的不连续的密度梯度Percoll分离液,尽管也能获得高活力的鸡精子,但体细胞占比仍较高,本申请的方法相对于现有技术,最终能够获取高纯度、高活力的活精子。

[0064] 综上所述,本发明采用Percoll不连续密度梯度离心法获取活力较高的精子的基础上,进一步使用流式技术,大大提高了精子的纯度,有效降低其他细胞的污染,最终获取了高纯度、高活力的活精子。本发明获得高纯度鸡精子的方法高效、分离稳定度高,可以实现高纯度鸡精子的高效、快速分离。

[0065] 所属领域的普通技术人员应当理解:以上任何实施例的讨论仅为示例性的,并非旨在暗示本公开的范围(包括权利要求)被限于这些例子;在本发明的思路下,以上实施例或者不同实施例中的技术特征之间也可以进行组合,并存在如上所述的本发明的不同方面的许多其它变化,为了简明它们没有在细节中提供。因此,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何省略、修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

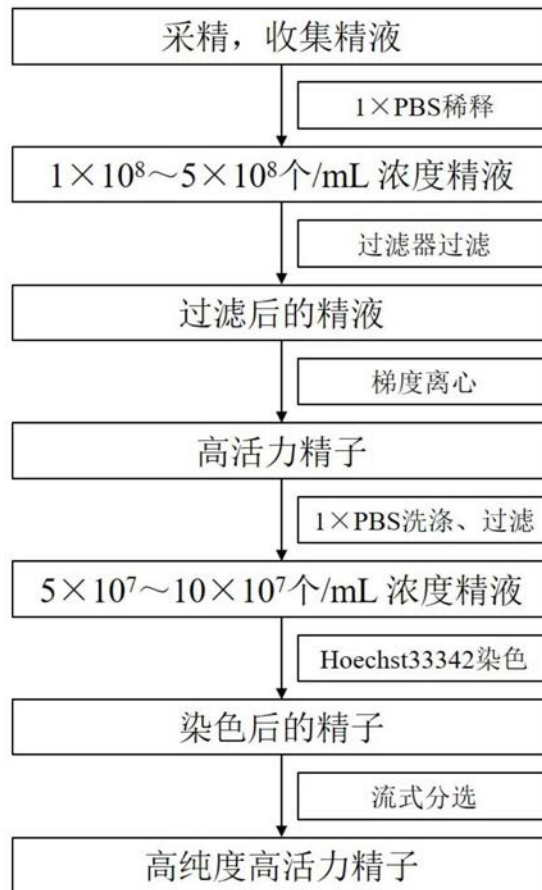
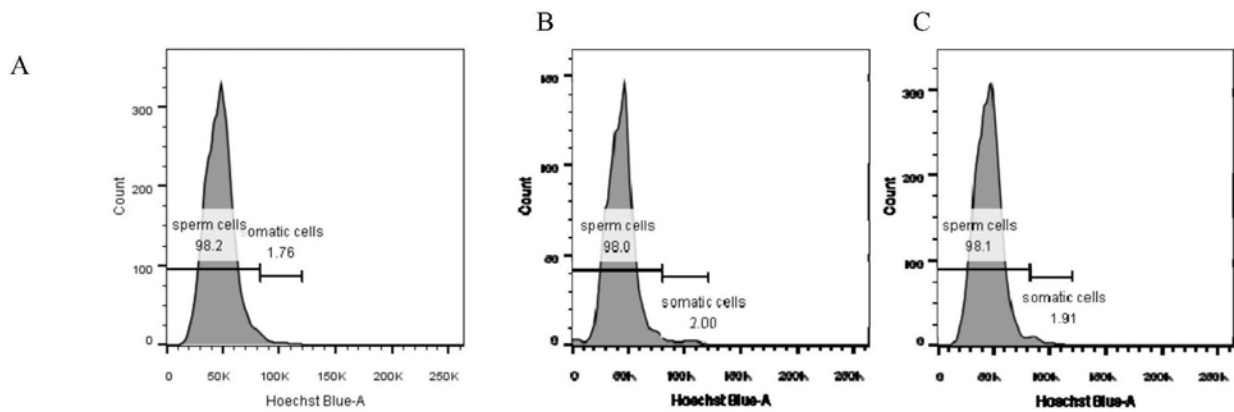


图1



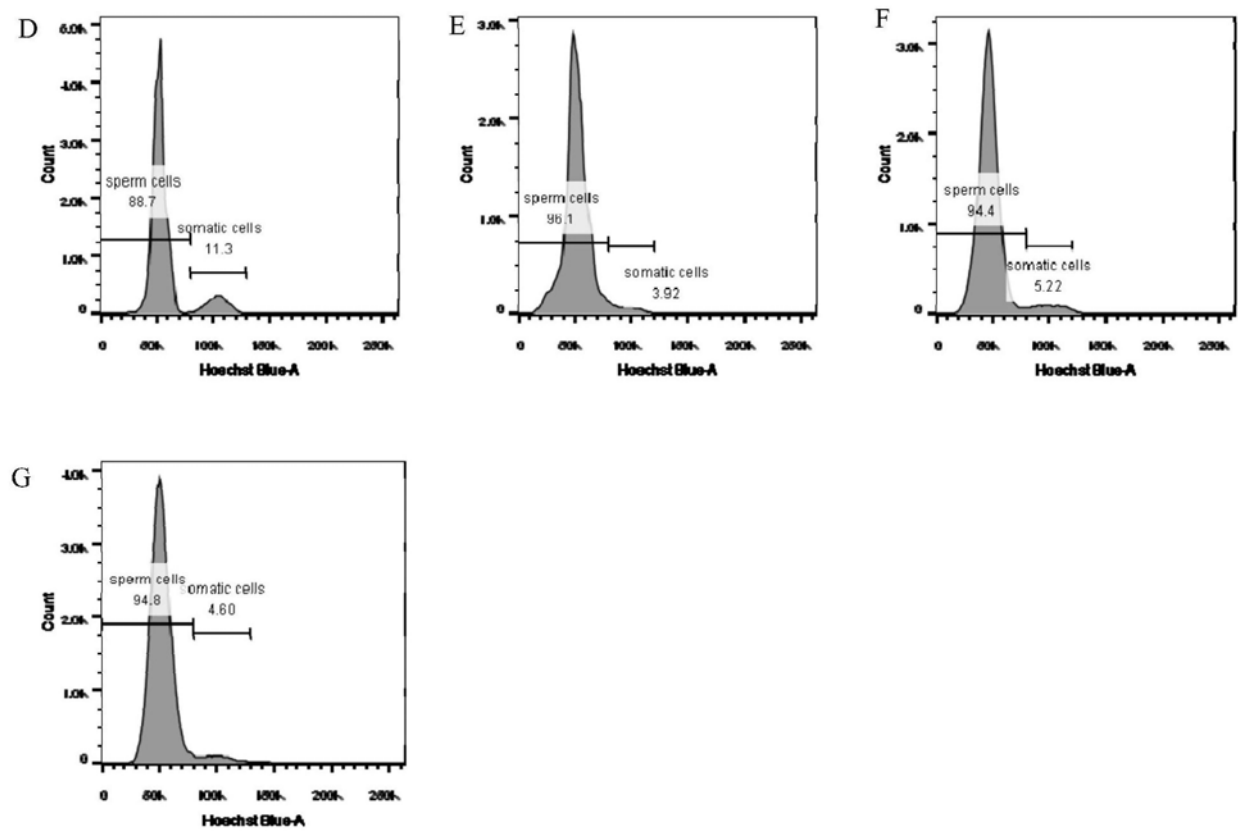


图2