



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2000120216/13**, **31.12.1998**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.12.1998(30) Конвенционный приоритет:
31.12.1997 US 09/001,394
29.01.1998 US 09/015,454(43) Дата публикации заявки: **27.07.2003**(45) Опубликовано: **27.07.2007 Бюл. № 21**(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 5135759 A**, **04.08.1992. SEIDEL, G.E. et al. Vterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa, Jheriogenology (Dec. 1997), vol. 48, no.8, p.9. 1255-1264. ПРОКОФЬЕВ М.И. Регуляция размножения сельскохозяйственных животных. - Л.: Наука, 1983, с.181-195.**(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
31.07.2000(86) Заявка РСТ:
US 98/27909 (31.12.1998)(87) Публикация РСТ:
WO 99/33956 (08.07.1999)Адрес для переписки:
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", Н.Н. Высоцкой

(72) Автор(ы):

СЕЙДЕЛ Джордж Э. (US),
ХЕРИКХОФФ Лайза (US),
ШЕНК Джон (US)

(73) Патентообладатель(и):

КСИ, ИНК. (US),
КОЛОРАДО СТЕЙТ ЮНИВЕРСИТИ тпу итс
эйджент КОЛОРАДО СТЕЙТ ЮНИВЕРСИТИ
РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШН (US)(54) ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ МАЛЫМ КОЛИЧЕСТВОМ
РАЗДЕЛЕННЫХ ПО ПОЛУ СПЕРМАТОЗОИДОВ

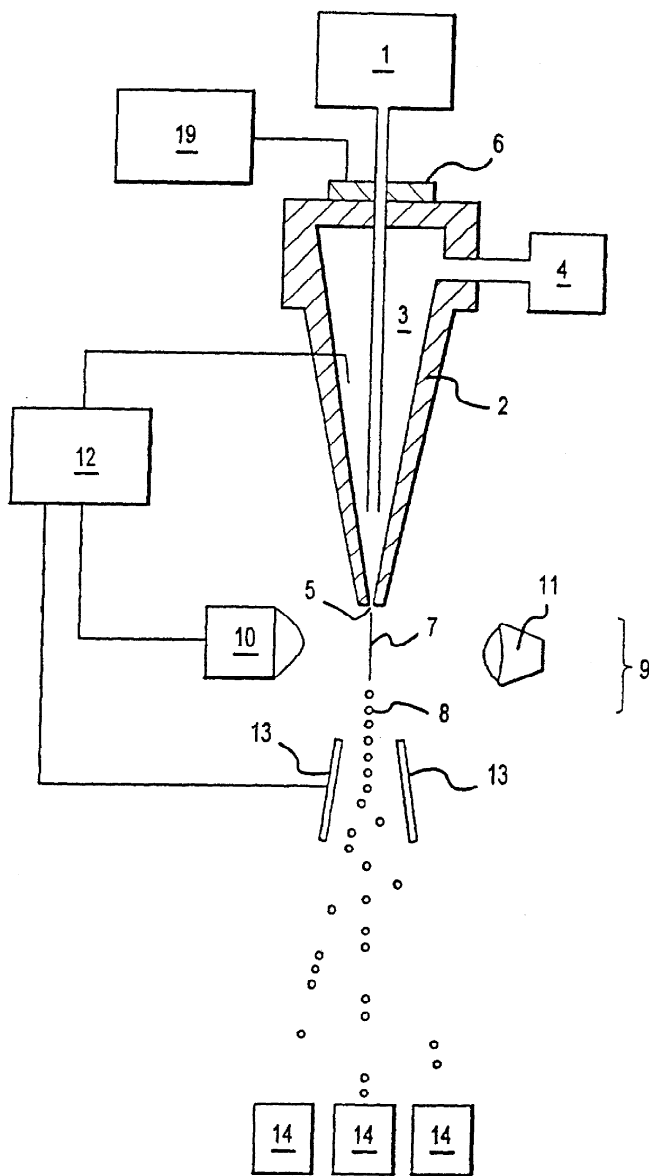
(57) Реферат:

Изобретение относится к области животноводства. Для получения сельскохозяйственных животных заданного пола берут сперматозоиды у самца, определяют половой признак у некоего множества сперматозоидов, сортируют сперматозоиды согласно определению их полового признака и собирают сперматозоиды в коллектор, снабженный амортизирующим элементом. После чего получают сортированную совокупность сперматозоидов и вводят ее самке данного вида млекопитающих и оплодотворяют по меньшей мере одну яйцеклетку

самки данного вида млекопитающих с уровнем результативности, составляющим по меньшей мере 50% по сравнению с уровнем результативности беременности, достигаемой с использованием обычной совокупности сперматозоидов для искусственного осеменения. Для разделения сперматозоидов создают источник клеток, поставляющий сперматозоиды для сортировки. Координируют химически капсульную жидкость для создания среды из капсульной жидкости для сперматозоидов, скоординированной с жидкой средой сперматозоидов как до, так и после сортировки. Распознают одно из свойств

сперматозоидов. Различают сперматозоиды в соответствии с их полом и разделяют сперматозоиды со скоростью по меньшей мере 1200 операций в секунду. Собирают сперматозоиды, имеющие признак нужного пола, в коллектор, снабженный амортизирующим элементом. Для получения множественных эмбрионов от самки одного из видов млекопитающих вызывают полиовуляцию у самки данного вида млекопитающих для получения по меньшей мере двух яйцеклеток. При этом способствующий полиовуляции фармацевтический препарат вводят с интервалом в 12 часов в любые

дни между 2-м и 18-м днями цикла эструса. Определяют пол у некоего множества сперматозоидов самца данного вида млекопитающих. Разделяют сперматозоиды по признаку пола и вводят разделенные сперматозоиды в матку самки данного вида млекопитающих после наступления эструса и оплодотворяют множество яйцеклеток в матке. Изобретение позволяет эффективно разделить сперматозоиды самца сельскохозяйственных животных, получить от них потомство заданного пола, а также получить множественные эмбрионы заданного пола, 5 с. и 65 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 табл.



Фиг. 1

RU 2303354 C2

RU 2303354 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2000120216/13, 31.12.1998**(24) Effective date for property rights: **31.12.1998**(30) Priority:
31.12.1997 US 09/001,394
29.01.1998 US 09/015,454(43) Application published: **27.07.2003**(45) Date of publication: **27.07.2007 Bull. 21**(85) Commencement of national phase: **31.07.2000**(86) PCT application:
US 98/27909 (31.12.1998)(87) PCT publication:
WO 99/33956 (08.07.1999)Mail address:
103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", N.N. Vysotskoj(72) Inventor(s):
SEJDEL Dzhordzh Eh. (US),
KhERIKKhOFF Lajza (US),
ShENK Dzhon (US)(73) Proprietor(s):
KSI, INK. (US),
KOLORADO STEJT JuNIVERSITI tru its ehjdzhent
KOLORADO STEJT JuNIVERSITI RISERCh
FAUNDEJShN (US)(54) **ARTIFICIAL INSEMINATION OF MAMMALIANS WITH LOW QUANTITY OF SEX-SEPARATED SPERMATOZOA**

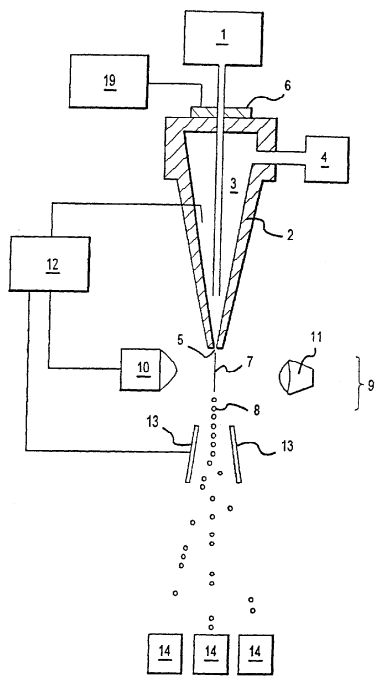
(57) Abstract:

FIELD: animal science.

SUBSTANCE: for the purpose to obtain farm animals of preset sex it is necessary to apply male spermatozoa to detect sex sign in certain multitude of spermatozoa and sort spermatozoa according to the detected sex sign and collect them into the collector supplied with a shock absorbing element. Then one should obtain a sorted combination of spermatozoa to introduce it for female of the given mammalian type to fertilize, at least, one female ovicell at resultativeness level being, at least, 50% against that of pregnancy achieved at applying conventional combination of spermatozoa for artificial insemination. For separating spermatozoa one should create the source of cells that supplies spermatozoa for sorting procedure. Chemically one should coordinate capsular liquid for creating the medium out of capsular liquid for spermatozoa being coordinated with liquid medium of spermatozoa both before and after sorting technique. Then it is important to identify one of spermatozoa's properties.

Spermatozoa should be differentiated in accordance to their sex and separated at the rate of, at least, 1200 operations/sec. Then spermatozoa with desired sex sign should be collected into the collector supplied with shock-absorbing element. To obtain multiple embryos it is necessary to induce polyovulation in a female of the given mammalian type to obtain, at least, two ovicells. Moreover, a polyovulation-favoring pharmaceutical preparation should be introduced at 12-h-long interval at any days between the 2nd and the 18th d of estrus cycle. It is necessary to detect sex in certain multitude of spermatozoa in a male of the given mammalian type to separate these spermatozoa according to sex sign and introduce separated spermatozoa into female uterus of the given mammalian type after estrus onset to fertilize multitude of ovicells in the uterus. The innovation enables to efficiently separate male spermatozoa in farm animals and obtain from them the offspring of desired sex and, also, obtain multiple embryos of the preset sex.

EFFECT: higher efficiency of artificial insemination.
70 cl, 4 dwg, 4 ex



Фиг. 1

I. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится в основном к области выбора пола в потомстве млекопитающих. Особенно оно касается аспектов искусственного осеменения низкими дозами спермы и увеличенного продуцирования яйцеклеток для обеспечения желаемого пола потомства. В частности, изобретение касается разработки искусственного осеменения низкими дозами разделенной по полу спермы, независимо от способов разделения спермы по полу, систем для разделения спермы по полу посредством проточной цитометрии для искусственного осеменения низкими дозами разделенной по полу спермы, а также способов достижения увеличенной овуляции, и т.п.

II. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Веками люди стремились научиться выбирать пол конкретного получаемого потомства. Помимо очевидных психологических аспектов, выбор пола для потомства млекопитающих имеет значительные экономические последствия, если его применять для животных, используемых для получения продуктов питания, таких как крупный рогатый скот, а также для призовых животных, таких как лошади и т.п. Это огромное стремление привело к различным попыткам получения потомства с выбранным полом. По-видимому, среди них наиболее близок к получению желаемых результатов способ, заключающийся в разделении и отборе X и Y-сперматозоидов перед осеменением.

Одна из трудностей, с которыми столкнулись при попытках разделения X и Y-сперматозоидов, заключается в том, что при этом требуется большое количество спермы. При естественном оплодотворении количество продуцируемых сперматозоидов у некоторых видов животных исчисляется миллиардами; при искусственном осеменении эта цифра меньше, но тем не менее используют весьма значительные количества сперматозоидов. Например, при искусственном осеменении обычно используют от десяти миллионов до пятисот миллионов сперматозоидов (в зависимости от вида животных). Таким образом, даже в условиях искусственного осеменения требуется значительное количество сперматозоидов.

Добиться разделения сперматозоидов, несущих X- и Y-хромосомы, пытались различными способами. Эти способы охватывают диапазон от магнитных способов, таких как описанный в патенте США №4276139, до способов с использованием колонок, таких как описанный в патенте США №5514537, и до гравиметрических способов, таких как обсуждаемый в патенте США №3894529, в заменяющем патенте №32350, в патентах США №4092229, 4067965 и 4155831. Предпринимали попытки использовать электрические свойства, как показано в патенте США №4083957, а также комбинацию электрических и гравиметрических свойств, что обсуждается в патентах США №4225405, 4698142 и 4749458. Предпринимались также попытки использовать различную подвижность сперматозоидов, как показано в патентах США №4009260 и 4339434. Разрабатывали также химические способы, такие как представленные в патентах США №4511661 и 4999283 (включающие использование моноклональных антител), в патентах США №5021244, 5346990, 5439362 и 5660997 (включающие использование мембранных белков) и в патентах США №3687803, 4191749, 4448767 и 4680258 (включающие использование антител), а также способы, включающие добавление компонентов сыворотки, такие, как представленный в патенте США №4085205. Хотя каждый из этих способов представлен как высокоэффективный, однако фактически в настоящее время ни один из них не дает желаемого уровня предварительного выбора пола. Независимо от фактически используемых способов разделения по полу, конкурирующие комбинации высоких количеств сперматозоидов, естественно присутствующих в сперме, и подхода, заключающегося в разделении сперматозоидов на несущие X- и Y-хромосомы, сделали желательной разработку способов, позволяющих добиться осеменения с использованием более низких количеств сперматозоидов.

В настоящее время единственным количественным способом, используемым для разделения сперматозоидов на несущие X- и Y-хромосомы, является способ, основанный на индивидуальных различиях и на разделении спермы с помощью методов проточной

цитометрии. Этот способ стал возможным в результате достижений и открытий, включающих дифференциальное поглощение красителей сперматозоидами, несущими X- и Y-хромосомы. Ранее это описано в патенте США №4362246 и было значительно дополнено способами, описанными Лоуренсом Джонсоном (Lawrence Johnson) в патенте США №5135759. Предложенный Джонсоном способ использования проточной цитометрии для 5 разделения сперматозоидов на несущие X- и Y-хромосомы настолько продвинул вперед изучение этого вопроса, что впервые стало возможным коммерческое применение способа разделения по полу такой спермы. Хотя разделение сперматозоидов по полу до сих остается экспериментальным, однако оно было существенно улучшено путем 10 использования высокоскоростных проточных цитометров, таких как проточный цитометр MoFlo®, выпускаемый компанией Cytomation Inc., и описанных в ряде других патентов, включая патенты США №5150313, 5602039, 5602349 и 5643796, а также в международной патентной публикации PCT WO 96/12171. Хотя использование цитометров MoFlo® 15 компании Cytomation позволило значительно увеличить скорость разделения сперматозоидов по полу и хотя это увеличение скоростей особенно важно при больших количествах спермы, которые часто используются, но все же остаются некоторые нерешенные проблемы. Несмотря на почти десятикратное увеличение скорости разделения сперматозоидов по полу благодаря использованию цитометра MoFlo®, по некоторым причинам все же требуется еще значительно более короткая 20 продолжительность времени разделения сперматозоидов по полу. Во-первых, установлено, что практически эффективность сперматозоидов очень зависит от времени их хранения. Чем дольше они остаются неиспользованными, тем больше они теряют свою эффективность. Во-вторых, время, требующееся для процессов сбора спермы, разделения сперматозоидов по полу и осеменения, делает скорость вопросом большого коммерческого 25 значения. Таким образом, природа сперматозоидов, связанная с зависимостью их эффективности от времени хранения, и время, требующееся для процессов, связанных с осеменением, делает скорость важным элементом для достижения высокой эффективности и высоких показателей результативности осеменения.

Существуют также и другие трудности как практические, так и теоретические. С 30 практической точки зрения, желательно добиться получения совокупностей разделенных по полу сперматозоидов с использованием недорогих расходуемых компонентов и веществ. С точки зрения уменьшения затрат желательно также, чтобы можно было осуществить разделение сперматозоидов по полу (а также взятие спермы и осеменение) с возможно 35 большей производительностью труда. Таким образом, для коммерческого производства и успеха в этой области, улучшения, которые могут давать только повышение эффективности, все же могут иметь существенное значение. Наряду с практическим аспектом, связанным с затратами, существует также и практический аспект, связанный с 40 тонкостью и чувствительностью всего процесса. В этом отношении желательно упростить способ и сделать его возможно более понятным, с тем, чтобы ошибка оператора или уровень его мастерства играли как можно меньшую роль. Способы могут быть также комбинированными, что делает осеменение малыми дозами еще более желательным.

Кроме тонкости процесса, всегда было известно, что сами сперматозоиды чрезвычайно чувствительны к внешним воздействиям. Хотя на первый взгляд этот фактор кажется легко понятным, но фактически вся степень чувствительности этих клеток еще не вполне 45 исследована. В контексте проточной цитометрии, как правило, большинство разделяемых клеток или частиц часто имеют сферическую форму и поэтому физиологически способны выдерживать ряд вредных воздействий. Но это не относится к сперматозоидам. Фактически, как описывает настоящее изобретение, обычные способы проточной цитометрии по существу могут оказаться непригодными для цитометрического разделения 50 сперматозоидов в некоторых применениях. Чувствительность связана с различными моментами, начиная от проблем, связанных с разбавлением и с присущей проточному цитометру необходимостью выделения и распознавания каждой клетки по отдельности, а также с давлением и другими стрессами, которые при обычной проточной цитометрии до

настоящего изобретения воздействовали на разделяемые клетки или на вещества. Чувствительность может представлять собой особо важный фактор для сперматозоидов, поскольку, повидимому, несмотря на то, что сперматозоиды могут пройти через проточный цитометр и быть разделенными по полу без видимых вредных побочных эффектов, но сами клетки могут оказаться до такой степени пострадавшими от стресса, что их поведение в процессе осеменения будет ниже оптимального. Таким образом, очевидно, имеет место взаимодействие факторов, которое вызывает возникновение необычных проблем, связанных с перспективами разделения сперматозоидов по полу и использованием их для искусственного осеменения.

10 Еще одна трудность заключается в том, что несмотря на большие достижения, полученные в результате использования патента Джонсона и связанной с ним технологии, фактически до настоящего изобретения было чрезвычайно трудно добиться осеменения пониженными дозами разделенной по полу спермы, независимо от используемого способа разделения клеток. Хотя история этого вопроса имеет некоторые достижения в осеменении 15 низкими дозами, но выяснилось, что эти достижения скорее существуют в теории или в лабораторной практике, а не в тех условиях, которые обычно имеют место при применении способа в производстве. В этом отношении важно не просто осуществить осеменение низкими дозами, но осуществить осеменение низкими дозами с такими показателями результативности, определяемой процентом наступившей стельности, которые сравнимы с 20 показателями существующих обычных способов искусственного осеменения высокими дозами спермы, без разделения сперматозоидов по полу. Таким образом, достижения, полученные авторами настоящего изобретения в искусственном осеменении как разделенными по полу сперматозоидами, так и низкими дозами спермы, представляют собой значительный прогресс, который впервые может сделать возможным применение 25 этого способа в производстве.

Следующая проблема, с которой сталкиваются специалисты на практике - и тоже несмотря на большой прогресс, достигнутый патентом Джонсона и связанной с ним технологией - состоит в том, что сама по себе проблема искусственного осеменения с 30 высокой результативностью осеменения имеет статистическую природу, в которой, повидимому, взаимодействуют множество факторов. Таким образом, предлагаемые решения могут до некоторой степени включать в себя комбинацию факторов, которые после тщательного статистического изучения будут определены как необходимые, либо по отдельности, либо в комбинации с другими факторами. Такое определение еще более осложняется тем, что сами результаты варьируют в зависимости от вида животного, и 35 может быть трудно подтвердить их достоверность из-за того, что тестирование и статистический отбор образцов в достаточно больших базах данных на начальных стадиях исследования требуют очень больших усилий. По этим причинам настоящее изобретение может также включать комбинацию факторов, которые могут, по отдельности или в сочетании, представлять собой решения, соответствующие данным применениям. 40 Настоящее описание, таким образом, следует рассматривать как достаточно широкое, охватывающее различные комбинации и перестановки описываемых способов. Могут существовать не открытые к настоящему времени синергические взаимодействия с другими факторами. Сюда относятся такие факторы, которые имеют место в процессах разделения по полу, или, возможно, в проточной цитометрии, и в стадиях, таких как 45 стадия сбора спермы, а также стадия осеменения. К настоящему времени первые исследования проведены на крупном рогатом скоте, однако это не значит, что эти способы ограничиваются только этим видом животных или только сперматозоидами. Очевидно, что использованные способы могут найти применение не только для сперматозоидов, но и в других областях, где требуется разделить чувствительные 50 элементы либо просто свести к минимуму стрессы, вызываемые влиянием проточной цитометрии на сортируемые элементы.

Интересно, что в то время, как настоящее изобретение применяет подход, направленный на минимизацию вредного влияния процесса разделения спермы или

стрессов на сперматозоиды, другие способы фактически применяют подходы, уводящие в обратную сторону от этого направления, увеличивая давление, повышая требования к скорости и прочее в этом духе. По существу, сдвиг в сторону осеменения низкими дозами и высокоскоростной обработки, по отдельности или взаимосвязанным образом, по-видимому, поднял проблемы, лимитирующие друг друга. Таким образом, несмотря на то, что долгое время существовала неудовлетворенная необходимость в высокоскоростном осеменении низкими дозами разделенной по полу спермы, и хотя уже давно имелись способы и элементы для его осуществления, но до настоящего изобретения специалисты в данной области техники, по-видимому, просмотрели достижения или, может быть, комбинации достижений, позволяющих его осуществить. Возможно, им до некоторой степени не удалось оценить тот факт, что данная проблема включает взаимодействие факторов, а также особые требования для определенных типов клеток (сперматозоиды или, возможно, видоспецифичные сперматозоиды), используемых в данной области техники. Интересно, что как показывает перечень ранее предпринятых попыток, приведенный в настоящем описании, были приложены существенные усилия, но они явно не дали возможности понять проблему, присущую такой области, как искусственное осеменение низкими дозами разделенной по полу спермы, и по-видимому, был сделан вывод, что поскольку естественное оплодотворение требует миллиардов сперматозоидов, то, видимо, существуют физические ограничения для осуществления искусственного осеменения количествами сперматозоидов, которые на целых четыре порядка меньше. Таким образом, неудивительно, что существовало до некоторой степени фактическое учение, которое стояло в стороне от того направления, в котором шли авторы настоящего изобретения. Возможно, полученные ими результаты могут даже считаться до некоторой степени неожиданными, поскольку они показали, что можно добиться искусственного осеменения низкими дозами разделенной по полу спермы с высокой результативностью, сравнимой с получаемой при обычном искусственном осеменении высокими дозами не разделенной по полу спермы. Некоторым может также показаться удивительным, что способы и достижения по настоящему изобретению фактически объединены, чтобы получить представленные высокие результаты. Хотя результат каждого отдельного способа некоторые могут рассматривать как незначительный, фактически небольшие изменения ведут в конечном счете к получению значительного прогресса в конечном результате - рассматривать ли их по отдельности или в комбинации с другими небольшими изменениями.

Таким образом, до настоящего изобретения было невозможно достижение высокой результативности при искусственном осеменении низкими дозами разделенной по полу спермы, с необходимыми уровнями показателей или упрощенными процедурами, необходимыми для применения в производственных условиях. Помимо достигнутого на производственном уровне искусственного осеменения низкими дозами разделенной по полу спермы, настоящее изобретение также описывает способы, позволяющие добиться улучшенных показателей, и тем самым улучшения желаемого конечного результата, а именно искусственного осеменения низкими дозами разделенной по полу спермы на коммерческой основе.

III. ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Соответственно, настоящее изобретение претендует на достижение, на коммерческом уровне, осеменения низкими дозами спермы и результатов его применения для получения заданного пола у млекопитающих. Оно также касается улучшенных капсулы и коллекторной системы для разделения сперматозоидов с целью определения их пола с помощью способа проточно-цитометрического разделения. При этом способе разделения обычно используемую в капсуле проточного цитометра жидкость (далее кратко называемую «капсульной жидкостью») заменяют жидкостью, которая сводит к минимуму стрессовое воздействие на сперматозоиды во время их разделения. Кроме того, система сбора разделенных по полу сперматозоидов улучшена таким образом, чтобы свести к минимуму как физические, так и химические стрессы, которым подвергаются сперматозоиды.

Представлены различные способы и вещества, но специалисты в данной области техники могут легко понять, что можно использовать различные комбинации и перестановки, таким образом, чтобы оптимизировать осуществление способа для различных видов животных, методов разделения, целей работы и других параметров, связанных с конкретным применением способа.

5 Цель изобретения, таким образом, состоит в том, чтобы просто добиться осуществления искусственного осеменения пониженными дозами разделенной по полу спермы способом, работающим в реальных производственных условиях. Цель также состоит в достижении
10 улучшенного разделения для таких элементов, как сперматозоиды. Связанная с этим цель состоит в том, чтобы свести к минимуму вредное воздействие, которое оказывает сама операция разделения на клетки или на другие чувствительные элементы, которые могут подвергаться разделению. Для способа проточно-цитометрического разделения конкретная
15 цель состоит в том, чтобы свести к минимуму вредное воздействие, оказываемое капсульной жидкостью на клетки, и предложить капсульную жидкость, которая положительно влияет на клетки, улучшая условия работы с ними в условиях различных
20 связанных с проточной цитометрией стрессов. Параллельная цель состоит в том, чтобы предложить вещества и способы, которые особо пригодны для сперматозоидов вообще, а также для сперматозоидов быков, для сперматозоидов жеребцов, и для разделения таких сперматозоидов на компоненты, несущие X- и Y-хромосомы. Подобным же образом цель
25 состоит в том, чтобы свести к минимуму вредные воздействия, которые оказывает на клетки фаза сбора (например, после разделения), а также свести к минимуму как физические, так и химические вредные воздействия на такие разделенные по полу клетки. Таким образом, цель состоит в том, чтобы добиться такого результата разделения, при котором клетки как можно меньше были бы повреждены.

30 Другая цель изобретения состоит в том, чтобы добиться осуществления искусственного осеменения пониженными дозами разделенной по полу спермы на таких уровнях, которые сопоставимы с уровнями, получаемыми для обычного искусственного осеменения высокими дозами не разделенной по полу спермы. С этой целью настоящее изобретение предлагает общую систему искусственного осеменения, с помощью которой можно
35 достигнуть этой цели на практике, в производственных условиях. Таким образом, вышеуказанные цели, состоящие в минимизации стрессов или возможных повреждающих воздействий на сперму, являются важными. Разделение таким способом, который позволяет иметь как высокие скорости, так и разделение при низком уровне стрессов, и который особо приспособлен для разделения сперматозоидов в контексте низких доз их
40 применения, также является важной целью изобретения. Важной целью также является предложить такие капсульные и иные жидкости для проточной цитометрии, которые не оказывают отрицательного влияния на фертильность спермы и которые пригодны для искусственного осеменения.

Другие цели изобретения описываются в других разделах настоящего описания и формулы изобретения.

IV. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 представляет собой схематическое изображение сортерной системы в соответствии со способом проточно-цитометрического разделения по настоящему изобретению.

45 Фигура 2 представляет собой схематическое изображение захваченных клеток в зоне свободного падения обычного проточного цитометра.

Фигура 3 представляет собой концептуальную, схему, на которой показаны отличия, являющиеся результатом настоящего изобретения.

Фигура 4 представляет собой схематическое изображение потока разделенных клеток,
50 собранных в зоне оседания.

V. НАИЛУЧШИЙ РЕЖИМ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как будет видно из нижеследующего, основные концепции настоящего изобретения можно объединять и осуществлять различными путями. Изобретение включает просто

осуществимое в производственной практике искусственное осеменение низкими дозами разделенной по полу спермы и его результаты. Для способов проточно-цитометрического разделения изобретение также включает как улучшенные системы проточной цитометрии, так и системы создания совокупностей сперматозоидов заданного пола, которые можно

5 использовать в искусственном осеменении, а также животных, полученных такими способами. Изобретение включает комбинированные способы, с помощью которых можно добиться высокой результативности осеменения в производственных условиях. Кроме того, способы описаны в общем виде, для того, чтобы их можно было использовать для конкретных систем и применений, на основе разработанных общих принципов. Что
10 касается описания усовершенствования устройств, то при этом следует иметь в виду, что эти усовершенствования относятся не только к определенным способам, но их также можно варьировать и комбинировать многими различными способами. Важно иметь в виду, и это касается всего вышеизложенного, что каждый из этих аспектов охватывается настоящим описанием.

15 Как упоминалось, основная цель заключается в отделении сперматозоидов, несущих X-хромосомы, от сперматозоидов, несущих Y-хромосомы. Это осуществляют способом, с помощью которого выделяют эти два типа сперматозоидов, так что каждый тип можно упаковать отдельно и отдельно с ним работать. В настоящее время выделение предпочтительно осуществляют с помощью проточной цитометрии. Проточная цитометрия
20 в общем представляет собой хорошо известный способ. Например, его основные аспекты представлены и обсуждены в ряде патентов фирмы Cytomation, Inc., таких как патенты США и другие ранее перечисленные публикации. Все эти патенты или ссылки, цитированные в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки; таким образом, специалисты в данной области техники могут легко понять основные используемые
25 принципы.

По существу, проточная цитометрия включает разделение элементов, таких как клетки, которые поступают в прибор проточный цитометр из какого-либо типа источника клеток. Концептуальный прибор показан на фигуре 1. Прибор проточный цитометр включает источник (1) клеток, подающий клетки или другого типа элементы, подлежащие анализу в
30 проточном цитометре. Клетки располагаются внутри сопла (2) таким образом, что эти клетки окружены капсульной жидкостью (3). Капсульную жидкость (3) обычно подает какой либо источник (4) капсульной жидкости так, что когда источник (1) клеток подает клетки, капсульная жидкость (3) одновременно подается через сопло (2). Таким образом, легко понять, как капсульная жидкость (3) образует внешнюю среду для клеток,
35 состоящую из капсульной жидкости. После того, как в проточный цитометр поступили несколько жидкостей под некоторым давлением, они вытекают из сопла (2) и выходят через отверстие (5) сопла. Путем включения в прибор устройства типа осциллятора (6), которым можно очень точно управлять с помощью устройства (19) управления осциллятором, внутри сопла (2) можно создавать волны давления и передавать их
40 жидкости, вытекающей из сопла (2) через отверстие (5) сопла. Поскольку осциллятор (6) таким образом воздействует на капсульную жидкость (3), то струя (7), вытекающая из отверстия (5) сопла, время от времени и регулярно образует капли (8). Поскольку клетки окружены средой, представляющей собой капсульную жидкость, то капли (8) могут содержать внутри себя индивидуально выделенные клетки или другие элементы.

45 Поскольку капли (8), как правило, содержат изолированные клетки, проточный цитометр может различать и разделять капли, основываясь на том, содержатся или не содержатся определенные клетка или клетки внутри данной капли. Это осуществляется с помощью системы (9) распознавания клеток. Система распознавания клеток включает по меньшей мере какой-либо тип сенсора (10), реагирующего на клетки, содержащиеся внутри каждой
50 капли (8), как подробно описано в работе Ларри Джонсона, а именно, в патенте США №5135759. Как описывает патент Джонсона для сперматозоидов, система (9) распознавания клеток может оказывать воздействие, зависящее от относительного присутствия или относительного отсутствия определенного красителя, который может быть

возбужден каким-либо стимулятором, таким как лазерный возбудитель (11). Хотя краситель окрашивает все типы сперматозоидов, но разная длина X-хромосомы и Y-хромосомы создает разные уровни окрашивания. Таким образом, путем распознавания степени окрашивания, присутствующего в сперматозоидах, можно отличить клетки, несущие X-хромосомы, от клеток, несущих Y-хромосомы, на основе их разных уровней эмиссии.

Для того чтобы добиться полного разделения и выделения соответствующих клеток при способе проточно-цитометрического разделения, сигналы, получаемые сенсором (10), подаются в какого-либо типа сортерную распознающую систему (12), которая очень быстро принимает решение и может по-разному заряжать каждую каплю (8), в зависимости от того, содержится или не содержится в данной капле (8) желаемая клетка. Таким образом, сортерная распознающая система (12) позволяет электростатическим отражателям (13) отклонять капли (8) на основании того, содержат ли они или не содержат соответствующую клетку или другой элемент. В результате этого проточный цитометр разделяет клетки, заставляя их опуститься в один или более коллекторов (14). Таким образом, путем распознавания некоторых свойств клеток или других элементов проточный цитометр может различать клетки на основе их конкретных характеристик и помещать их в соответствующий коллектор (14). В системе, используемой в настоящее время для разделения сперматозоидов, капли со сперматозоидами, содержащими X-хромосомы, заряжаются положительно и таким образом отклоняются в одном направлении, а капли со сперматозоидами, содержащими Y-хромосомы, заряжаются отрицательно и отклоняются в другом направлении, а поток отбракованных клеток (т.е. тех, которые не удалось разделить по полу) не заряжается и поэтому собирается в неотклоненной струе, поступая во всасывающую трубку или тому подобное устройство.

Рассматривая фигуру 2, можно еще более ясно представить себе этот процесс. Как показано на этой фигуре, из сопла (2) выходит струя (7), которая благодаря осциллятору (6) (на фигуре 2 не показанному) образует капли (8). Поскольку источник (1) клеток (на фигуре 2 не показанный) может подавать сперматозоиды (15), окрашенные по методу Джонсона, сенсор (10) дифференциально определяет световую стимуляцию, возникшую под воздействием лазерного возбудителя (11), так что проточный цитометр может управлять наличием или отсутствием заряда в каждой капле, когда она отделяется от струи (7). Такое управление приводит к получению положительно заряженных, отрицательно заряженных и незаряженных капель (8) на основе их содержимого. На фигуре 2 некоторые капли показаны как отклоненные капли (16). Эти отклоненные капли (16) представляют собой капли, содержащие сперматозоиды (15) одного или другого пола. Затем их помещают в соответствующий коллектор (14) для дальнейшего использования.

Одним из аспектов проточной цитометрии, особенно важных для ее применения для разделения сперматозоидов, является высокоскоростная работа проточного цитометра. Достижения в этом направлении сделаны, в частности, компанией Cytomation, которая выпускает проточные цитометры под торговой маркой MoFlo®. Эти проточные цитометры имеют очень увеличенные скорости разделения, что делает проточную цитометрию способом, позволяющим применять разделение спермы по полу в производственных условиях (среди других коммерческих применений данного способа). Эти проточные цитометры работают при очень высокой скорости разделения, то есть при скорости, которая значительно выше используемых приборами другой марки. Конкретно, проточные цитометры марки MoFlo® компании Cytomation работают при частотах осциллятора, составляющих выше, чем около пяти килогерц, а более конкретно, они могут работать при частоте в интервале от 10 до 30 и даже 50 килогерц. Таким образом, капли образуются при очень высоких частотах, и клетки, находящиеся в среде капсульной жидкости, могут очень быстро вылетать из сопла (2). В результате каждый из компонентов, а именно сопло (2), осциллятор (6) и т.п., составляющих часть системы проточного цитометра, можно сконфигурировать или выбрать так, чтобы в результате получился высокоскоростной клеточный сортер. В этом применении высокоскоростного клеточного

сортера для разделения сперматозоидов достигают скоростей разделения, составляющих более 500 операций в минуту. Фактически высокоскоростные клеточные сортеры уже достигают скоростей разделения в интервале от 1000 до 1200 операций в минуту. Очень важно, и это следует иметь в виду, что термин «высокая скорость» является

5 относительным, поэтому в случае, если будут разработаны иные усовершенствования проточного цитометра или его конкретных применений, аспект, обозначенный термином «высокий», может либо измениться, либо его значение может остаться абсолютным. При любом определении, главный принцип состоит в том, что разделение может происходить при скоростях, при которых параметры и физические характеристики проточного цитометра
10 являются существенными для самих клеток при разделении конкретных видов клеток, таких как сперматозоиды.

Один из аспектов высокоскоростного разделения, который, повидимому, играет определенную роль при разделении сперматозоидов с помощью проточно-цитометрического способа, состоит в том, что находясь в проточном цитометре, клетки
15 подвергаются давлению и другим стрессовым воздействиям. Например, при работе на высоких скоростях (или, в альтернативной дефиниции, «на высокой скорости») проточные цитометры могут работать при давлении в 344,80 Па и даже 413,86 Па. Эти показатели давления можно считать высокими, поскольку они могут привести к воздействию на разделяемые клетки. Ключевой момент, как указывается в настоящем описании, для этого
20 аспекта изобретения состоит в том, что пороговые значения стрессовых воздействий для конкретных клеток являются определяющим фактором. Кроме того, как выяснилось позднее, пороговые значения стрессовых воздействий могут быть функцией объединенных эффектов, таких как конкретный вид животных или конкретные операции, проводившиеся с клетками до или после стрессовых воздействий. Ключевым моментом здесь является то,
25 что стресс, воздействующий на клетки, может изменить их жизнеспособность и их способность давать желаемые результаты. В случае давления, может случиться так, что только воздействие на сперматозоиды повышенного давления в результате работы при этом давлении проточного цитометра может привести к понижению жизнедеятельности клеток. Настоящее изобретение в одном из своих аспектов направлено на сведение к
30 минимуму этих стрессов, и таким образом, приводит к получению повышенной эффективности, а также к возможности использования пониженных доз спермы, как описывается ниже.

Что касается аспекта, связанного со стрессовыми воздействиями на клетки, то настоящее изобретение действует таким образом, что оно сводит эти стрессы к минимуму.
35 Эти стрессы можно свести к минимуму в любой точке всего цикла сбора и разделения спермы и даже осеменения животных. Важно, что стресс, вызванный обработкой клеток внутри проточного цитометра, является существенным для данного применения. В одном из вариантов осуществления изобретения специально подбирают капсульную жидкость так, чтобы она была скоординирована с жидкой средой, в которой находятся клетки до
40 разделения, и/или с жидкой средой, в которой находятся клетки после разделения. Хотя, конечно, можно отрегулировать состав либо жидкой среды, в которой находятся клетки до разделения, либо жидкой среды, в которой находятся клетки после разделения, но в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения регулируют состав капсульной жидкости (3) таким образом, чтобы она оказывала существенно меньшее
45 стрессовое воздействие на клетки, чем это имело место до настоящего изобретения. Настоящее изобретение примечательно тем, в частности, что оно фокусирует внимание не на технических аспектах работы проточного цитометра, а на обработке самих клеток и снятии стрессовых воздействий на них. Например, хотя известно использование жидкостей, имеющих определенное значение рН или осмотического давления, настоящее
50 изобретение устанавливает, что могут быть определенные химические композиции, к которым клетки могут проявлять сверхчувствительность. Такие сверхреактивные химические композиции, конечно, могут варьировать в зависимости от клеток или даже в зависимости от предшествующей обработки клеток. В настоящее время представляется

важным, что для сперматозоидов существуют определенные метаболические химические композиции, такие как цитраты, которые, повидимому, предотвращают необычно высокие уровни стрессовых воздействий на клетки. Таким образом, сверхреактивные химические композиции можно определить как такие композиции, по отношению к которым клетки

5 проявляют особую реактивность в контексте их функциональной активности и способов обработки клеток. Что касается сперматозоидов, то выяснилось, что метаболические композиции, в частности основанные на цитратах композиции для сперматозоидов быков и основанные на *heres*-буфере композиции для сперматозоидов жеребцов, могут быть очень важными. Таким образом, настоящее изобретение действует так, что путем определенного

10 типа операций или подбора веществ оно сводит к минимуму изменения, происходящие с клетками.

Что касается капсульной жидкости, то в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения выбирают вещество, химически скоординированные таким образом, чтобы оно вызывало минимум изменений. Таким образом, путем выбора

15 соответствующей капсульной жидкости не только в контексте параметров проточной цитометрии, но скорее также в контексте параметров самих клеток, можно улучшить ситуацию с изменениями, происходящими с клетками, и конечный результат разделения клеток. Это концептуально представлено на фигуре 3. На фигуре 3 показан некоторый тип химического фактора (такого, как цитрат или другие факторы), как он может

20 существовать в течение различных фаз описываемого процесса. Например, четыре показанные на фигуре фазы могут представлять собой нижеследующее для способа проточно-цитометрического разделения, не ограничиваясь этим: фаза I может представлять собой пребывание клеток в источнике (1) клеток, фаза II может показывать пребывание клеток в среде капсульной жидкости во время их разделения, фаза III может

25 представлять собой клетки, собранные после разделения, и фаза IV может представлять собой восстановленные клетки в среде для хранения после разделения. Эти четыре фазы, как они показаны для прототипа, могут представлять собой широко варьирующие в отношении химического фактора условия внешней среды. Однако, как концептуально показано на фигуре, в условиях настоящего изобретения клетки могут претерпевать очень

30 мало изменений, и особо примечательно то, что перепад между фазами I и II может практически отсутствовать. Это является результатом выбора соответствующей капсульной среды, как упоминалось выше. Таким образом, в результате того, что клетки подвергаются воздействию подходящей капсульной среды, клетки по настоящему изобретению могут испытывать значительно меньший уровень стресса.

35 Одна из потенциальных неопределенностей, которая может существовать для этого явления, состоит в том, что некоторые химические композиции могут быть в большей степени сверхреактивными, чем другие химические композиции. Хотя, конечно, это может варьировать в зависимости от биологического вида спермы, ее обработки, и даже от типа используемых клеток, но выяснилось, что жизнеспособность клеток для целей их

40 предполагаемого использования (в данном случае для искусственного осеменения) очень сильно варьирует, либо по естественным причинам, либо в результате разделения, либо вследствие обеих этих причин, и поэтому клетки проявляют сверхчувствительность по отношению к определенной химической композиции. Путем выбора определенных метаболических химических композиций, наиболее предпочтительно цитратов или

45 химических веществ из цикла лимонной кислоты, возможно получение больших преимуществ. Так, для спермы быков капсульную жидкость (3) выбирают и координируют таким образом, чтобы она представляла собой композицию с содержанием около 2,9% цитрата натрия. Конкретно, 2,9%-ный раствор цитрата натрия можно получить следующим образом:

50 1. Поместите 29,0 граммов дигидрата цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в мерную колбу на 1000 мл.

а. Растворите цитрат натрия в 3/4 порции воды, а затем добавьте воду до полного объема.

2. Добавьте деионизированную или очищенную с помощью устройства Naporige воду, доведя до окончательного объема в 1000 мл.

3. Перенесите полученный раствор в бутылки и проавтоклавируйте при давлении 1,021 атм (118,3°C) в течение по меньшей мере 30 минут.

5 а. Автоклавируйте раствор при условиях, сводящих испарение к минимуму (с неплотно закрытой крышкой).

b. Следите за тем, чтобы вода не выкипела.

4. Медленно охладите при комнатной температуре.

5. Храните в запечатанном виде в холодном помещении с температурой 5°C.

10 Далее, для применения в качестве капсульной жидкости раствор цитрата натрия можно профильтровать.

6. Асептически профильтруйте через фильтр с отверстиями 0,22 микрон.

Интересно отметить, что для сперматозоидов жеребцов такая композиция не является настолько хорошей, как для сперматозоидов быков. Было установлено, что для

15 сперматозоидов жеребцов хорошо подходит среда с hepes-буфером, такая, как hepes-среда для гамет быков, в частности среда HBGM3, ранее разработанная J.J.Parrish для сперматозоидов быков. Эта среда обсуждается в статье "Capacitation of Bovine Sperm by Heparin", 38 Biology of Reproduction 1171 (1988), которая включена в настоящее

20 описание в качестве ссылки. Это удивительно не только потому, что она представляет собой не тот самый тип вещества, которое используется для сперматозоидов быков, но

фактически буфер, который первоначально был разработан для применения для сперматозоидов быков. Таким образом, для применения для сперматозоидов жеребцов

выбирают такую капсульную жидкость, которая содержит hepes-буфер. Этот раствор может иметь величину pH при комнатной температуре около 7,54 (pH при 39°C = 7,4) и

25 следующий состав:

Химическое вещество	Сухая масса (г/500 мл)
CaCl ₂	0,145
KCl ₂	0,115
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,004
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,018
NaCl	2,525
Пируват натрия	0,011
Молочная кислота (60%)	1,84 мл
HEPES	4,765
NaHCO ₃	0,420
BSA (альбумин бычьей сыворотки) (фракция V)	3,0

Один из других аспектов, который может играть роль в настоящем изобретении, состоит в том, что используемые в нем клетки могут проявлять необычную чувствительность. С

40 одной стороны, это может быть обусловлено тем, что сперматозоиды относятся к классу невосстанавливающихся клеток. Это означает, что они не обладают свойством самовосстановления и вследствие этого они требуют гораздо более бережного обращения,

предназначенного для работы с клетками. Таким образом, можно полагать, что предлагаемое изобретением улучшение особо применимо, когда проточный цитометр или

45 другое разделяющее устройство формирует источник сперматозоидов. Другим потенциально связанным с настоящим изобретением аспектом, который может иметь уникальное значение для такого класса клеток, как сперматозоиды, является тот факт,

50 что их ДНК являются нерепарируемой, нереплицирующейся и нетранскрибируемой. Любой из этих факторов может вступить в действие, и поэтому их можно рассматривать либо по отдельности, либо вместе. Таким образом, положения настоящего изобретения могут быть применимы для всех гамет или даже для вирусов и подобных им объектов, которые представляют собой нерепарирующие, нетранслирующие и нетранскрибирующие клетки.

Отдельный аспект проточной цитометрии, который также может быть важным, состоит в

правильном обращении с клетками как в химическом, так и в физическом смысле, после их разделения. Как показано на фигуре 4, когда находящиеся внутри капель (8) клетки опускаются на дно коллектора (14), может быть очень важным, чтобы контейнер, представляющий собой часть коллектора, имел правильный размер, так, чтобы он работал в качестве средства, не допускающего взаимного повреждения клеток друг другом и самим контейнером. Хотя известно размещение исходной коллекторной жидкости (17) на дне контейнера, чтобы собирать клетки так, чтобы они не ударялись о дно контейнера, но выяснилось, что для улучшения результата можно просто расширить контейнер так, чтобы он соответствовал различным вариациям в характеристиках струи, а также учитывал неизбежное разбрызгивание, происходящее из-за ударов клеток о контейнер. С одной стороны, это может действовать как амортизирующий элемент, способствующий осторожному обращению с клетками, которые могут быть механически хрупкими, т.е. они могут разбиться или повредиться под воздействием удара. Таким образом, когда из источника цитометра поступают физически хрупкие клетки, подлежащие разделению, может быть очень важным создание некоторого типа амортизирующего элемента, такого, как широкая коллекторная пробирка, ширина (18) отверстия которой служит для позиционирования стенок контейнера таким образом, чтобы не допустить контакта с клетками. Таким образом, эта пробирка устроена так, что ее боковые стенки расположены не настолько близко друг к другу, чтобы имелся сколько-нибудь значительный контакт между разделяемыми клетками и стенками пробирки. Таким образом, кроме применения коллекторной жидкости (17), может быть также желательным иметь широкую коллекторную пробирку. Возможно, достаточно будет просто сделать широким отверстие контейнера, являющегося частью коллектора (14). Для применений использующих высокие скорости разделения сперматозоидов установлено, что достаточно иметь контейнер с внутренним диаметром отверстия, составляющим по меньшей мере 15 мм. Конкретно, установили, что при использовании для такого применения 14-миллилитровой испытательной пробирки Фалькона происходит минимальное повреждение клеток в коллекторе (14).

Следует отметить, что даже 14-миллилитровая испытательная пробирка Фалькона может оказаться не оптимальной. Конкретно, полагают, что дизайн коллекторного контейнера, соответствующий геометрии струи (т.е. «контейнер, соответствующий струе»), может быть оптимальным. Такой соответствующий струе контейнер может иметь любую или все из нижеуказанных характеристик: относительно широкое отверстие, отверстие эллиптической формы, отношение высоты к ширине меньшее, чем используется в настоящее время, расположение сторон под углом или иначе скоординированным способом, например, боковые стенки могут быть расположены параллельно падающим струям, и т.п. Может быть также желательным иметь монтажный элемент, такой как подвижный элемент или среда, такие как шарикоподшипники или т.п., позволяющие изменять ориентацию падающей струи, которую хотят собрать. Кроме того, физические характеристики такого класса контейнеров, как существующая пробирка (описанная как испытательная пробирка «типа Фалькона»), могут включать не только ширину пробирки, но также и материал (такой как полистирол, к которому клетки не прилипают), из которого изготовлен контейнер, и т.п. (Эти варианты материала хорошо известны для 14-миллиметровой пробирки Фалькона). Таким образом, контейнер и находящаяся в нем коллекторная жидкость могут также служить амортизирующими элементами для минимизации физических повреждений клеток. Он может также служить, за счет своего размера, облегчению сбора соответствующих количеств спермы без значительного ее разбавления.

Другим аспектом коллекторной жидкости (17) может быть то, что она также может служить для минимизации химических стрессовых воздействий на клетки. С одной стороны, поскольку может быть важным обеспечить подачу питательных веществ к клеткам как до, так и после разделения, коллекторную жидкость (17) можно выбрать так, чтобы она обеспечивала скоординированный уровень содержания питательных веществ, так, чтобы эти уровни были сбалансированными как до, так и после разделения. Для сперматозоидов

быка, для которых в качестве питательного вещества используют цитрат яичного желтка, при содержании яичного желтка, составляющем два процента, установили, что использование уровня содержания цитрата яичного желтка, составляющего шесть процентов (т.е. шесть процентов содержания яичного желтка в растворе цитрата) обеспечивает хорошие результаты. Это является результатом влияния объемов, существующих до и после операции разделения. Первоначальный объем коллекторной жидкости (17) может составлять (перед разделением) от около 2 мл. Операция разделения может добавить примерно в два раза больший объем (в результате чего к концу разделения объем жидкости составляет в три раза больше первоначального объема), при очень небольшом содержании цитрата яичного желтка в растворе (из-за того, что он собирается в хлопья и по другим причинам, связанным с проточным цитометром). Таким образом, конечный результат в отношении содержания цитрата яичного желтка может быть эквивалентным первоначальному значению, а именно, двум процентам содержания яичного желтка в растворе цитрата, благодаря используемым объемам. Таким образом, коллекторную жидкость (17) можно выбрать такой, чтобы она обеспечивала создание конечной коллекторной жидкой среды, сбалансированной с первоначальным содержанием питательных веществ или с другими условиями жидкой среды. За счет этого она может служить для минимизации времени и степени изменения содержания композиции, действию которой подвергаются клетки. Естественно, что такие жидкие среды могут находиться внутри проточного цитометра или могут существовать в течение некоторого времени до поступления в него, причем важным моментом является минимизация стресса, которому подвергаются клетки в любое время их жизненного цикла. Кроме того, поскольку первоначальное содержание химического вещества можно варьировать (например, содержание яичного желтка в цитрате можно изменять в сторону увеличения или уменьшения), то и условия первоначальной коллекторной жидкости или ее различные объемы также можно варьировать так, чтобы конечный результат был таким же самым. Таким образом, перед началом процесса разделения коллекторная жидкость имеет содержание яичного желтка в шесть процентов в растворе цитрата, а после завершения разделения коллекторная жидкость - с разделенной по полу спермой - может иметь содержание яичного желтка в растворе цитрата, составляющее два процента, т.е. такое же, как и первоначальное содержание питательного вещества.

Обратите внимание, что при дальнейшем использовании эти сперматозоиды могут быть в других целях обработаны раствором цитрата с 20% яичного желтка, однако эти изменения не оказывают стрессового воздействия на клетки, поскольку это всего лишь часть известного процесса искусственного осеменения. Хотя, естественно, уровни содержания могут варьировать, что вполне понятно специалистам в данной области техники, нитратный буфер с 20% яичного желтка может иметь следующий состав:

I. КОНЕЧНАЯ КОМПОЗИЦИЯ:

80% раствора цитрата натрия (72 мМ)

20% (по объему) яичного желтка

II. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ДЛЯ 1 ЛИТРА:

A. Раствор цитрата натрия

1. Поместите 29,0 граммов дигидрата цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в мерную колбу на 1000 мл.

2. Добавьте деионизированную или очищенную с помощью устройства Naporige воду, доведя до окончательного объема в 1000 мл.

3. Перенесите полученный раствор в бутылки и проавтоклавируйте при давлении 1,021 атм (118,3°C) в течение по меньшей мере 30 минут.

a. Автоклавируйте раствор при условиях, сводящих испарение к минимуму (с неплотно прикрытой крышкой).

b. Следите за тем, чтобы вода не выкипела.

4. Медленно охладите при комнатной температуре.

5. Храните в запечатанном виде в холодном помещении с температурой 5°C.

В. ПОДГОТОВКА ЯИЦ

1. Приобретите свежие куриные яйца в надежном коммерческом предприятии.

2. Помойте яйца, чтобы очистить их от грязи (не используйте при этом слишком много моющего средства) и ополосните их.

5 3. Погрузите яйца в 70% этанол на 2-5 минут.

4. Выньте яйца из этанола и дайте им обсохнуть (или вытрите насухо) и храните на чистом полотенце.

С. ПОЛУЧЕНИЕ РАЗБАВИТЕЛЯ

1. Возьмите стерильную чистую стеклянную посуду.

10 2. А-фракция (фракция без глицерина)

a. Поместите 800 мл 2,9% раствора цитрата натрия в градуированный цилиндр на 1000 мл.

b. Уровни содержания антибиотиков для фракции разбавителя, не содержащей глицерин (фракции А) могут быть следующими:

15 i. Тилозин = 100 мкг/мл

ii. Гентамицин = 500 мкг/мл

iii. Линко-спектин = 300/600 мкг/мл

c. Добавьте 200 мл свежего яичного желтка, как описано ниже (раздел D).

i. Очень тщательно перемешайте.

20 d. В результате получится А-фракция разбавителя на основе 2,9%-го раствора цитрата натрия, с 20% яичного желтка и с антибиотиками в концентрациях, известных как нетоксичные для спермы быков.

e. Разбавитель можно хранить до следующего дня при 5°C.

f. На следующий день декантируйте надосадочную жидкость (верхние 800 мл).

25 g. Нагрейте до 37°C, прежде, чем использовать на следующий день.

D. Чтобы добавить яичный желток к буферному раствору, используйте следующую процедуру:

1. Помойте и обсушите яйца (см. раздел В выше).

30 2. Разбейте яйцо и отделите желток от белка с помощью отделителя желтка. В качестве альтернативы, 2-3 раза перелейте желток из одной половинки скорлупы в другую. Не нарушайте оболочку вокруг желтка.

3. Поместите желток на стерильный кусок фильтровальной бумаги размером 15 см.

35 4. Держите фильтровальную бумагу над градуированным цилиндром, содержащим буфер, выдавите желток (нарушив его оболочку) и дайте желтку стечь по фильтровальной бумаге в цилиндр. Обычно из одного яйца можно получить около 12-15 мл желтка.

Другой аспект, который может взаимодействовать с различными факторами настоящего

изобретения, состоит в использовании низких доз спермы для искусственного осеменения

и тому подобного. Дополнительное обоснование этого аспекта искусственного осеменения

40 разделенной по полу спермой можно найти в публикации "Prospects for Sorting Mammalian Sperm" by Rupert P. Amman and George E. Seidel, Jr., Colorado Associated University

Press (1982), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Как

упоминалось, при естественном оплодотворении расходуется большое количество спермы, составляющее порядка миллиарда сперматозоидов. Обычное искусственное осеменение в

настоящее время осуществляют с использованием миллионов сперматозоидов для

45 крупного рогатого скота и сотен миллионов сперматозоидов для лошадей. Под термином

«низкая доза» имеется в виду, что количество используемой при проведении одного

осеменения спермы составляет менее половины, или предпочтительно менее 10% от

количества спермы, расходуемой при обычном искусственном осеменении. Таким образом,

термин «низкая доза» следует рассматривать в контексте доз, используемых при обычном

50 искусственном осеменении или как абсолютное количество. Для бычьей спермы, для

которой в настоящее время расходуется от 1 до 10 миллионов сперматозоидов, способом с

низкой дозой считают такой способ, при котором абсолютное количество расходуемых

сперматозоидов составляет около 500000 и возможно даже 300000 сперматозоидов.

Фактически при использовании способов по настоящему изобретению показана возможность достижения хорошей результативности искусственного осеменения при использовании количеств спермы, составляющих 100000 и 250000 сперматозоидов (с процентами наступления стельности 41% и 50%, соответственно), что описано в работе
5 "Uterine Horn Insemination of Heifers With Very Low Numbers of Non-frozen and Sexed Spermatozoa", опубликованной в 48 Theriogenology 1255 (1997), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Поскольку сперматозоиды, очевидно, проявляют чувствительность к разбавлению, то эти результаты могут оказать особое влияние на использование образцов спермы с низкими дозами сперматозоидов, в контексте различных
10 способов по настоящему изобретению. Абсолютные количества сперматозоидов могут зависеть от вида животных. Для лошадей низкими можно считать дозы, составляющие менее чем двадцать пять, десять, пять или даже один миллион сперматозоидов.

Следующий аспект, который может иметь важное значение, заключается в том, что в системе искусственного осеменения используют сперму, разделенную по полу способами
15 по настоящему изобретению или иными способами. Таким образом, в случае, когда при способе проточной цитометрии коллектор (14) используют для получения спермы для искусственного осеменения, способы по настоящему изобретению особо применимы. Кроме того, возможно также, что комбинация как применения для искусственного осеменения, так и применения низких доз могут вместе создать такие взаимодействия,
20 которые делают различные способы по настоящему изобретению особенно подходящими. Конечно, разделенную по полу сперму можно использовать не только для искусственного осеменения, но и для других способов, таких как оплодотворение *in vitro* и т.п.

Способ сбора, разделения сперматозоидов и необязательно осеменения животных с помощью использования проточной цитометрии или других способов разделения спермы,
25 включает ряд стадий. В контексте осеменения коров, сначала у быка забирают сперму посредством использования искусственной вагины. Это происходит с выходом примерно 1,5 миллиарда сперматозоидов/мл. Эту бычью сперму можно проверить с помощью спектрофотометра для установления ее концентрации, а также можно исследовать микроскопически для того, чтобы убедиться, что она отвечает стандартам в отношении
30 подвижности и жизнеспособности сперматозоидов. Затем можно добавить антибиотики. В результате первоначальный образец может иметь примерно от 60 до 70 процентов сперматозоидов с увеличивающейся подвижностью на эякулят. Для обработки спермы можно использовать разбавление каким-либо типом TALP (тиродальбуминлактатпирувата), для того, чтобы получить рабочие концентрации спермы (для проточно-цитометрического
35 анализа), составляющие примерно 100 миллионов сперматозоидов на мл. TALP не только питает сперматозоиды, но и может делать их сверхактивированными для стадии окрашивания. Перед окрашиванием для сперматозоидов некоторых видов животных, например, лошадей, можно провести центрифугирование. Окрашивание можно осуществлять в соответствии с методом многократного или однократного окрашивания,
40 причем последний метод является предметом патента Джонсона и связанной с ним технологии. Окрашивание можно осуществлять при одновременной корректировке содержания разбавителя, чтобы получить соответствующую питательную среду. В применении для спермы быков при этом можно добавлять примерно 20% яичного желтка в растворе цитрата сразу же после окрашивания. Далее, при окрашивании сперматозоидов
45 было установлено, что лучшие результаты можно получить при использовании более высоких количеств красителя, чем можно было бы ожидать. Высокая концентрация красителя может включать использование количеств красителя, составляющих десятки микромолей, как описано в нижеприведенных примерах, где использовали 38 микромолей красителя Hoechst 33342.

50 После добавления красителя можно использовать инкубационный период, такой как инкубацию в течение 1 часа при 34°C, чтобы ускорить поглощение красителя, при концентрациях около 100 миллионов сперматозоидов на мл. Затем можно профильтровать, чтобы удалить комочки сперматозоидов, а затем разбавить до желаемой концентрации для

разделения сперматозоидов по полу, примерно 100 миллионов сперматозоидов на мл.

После этого можно проводить разделение сперматозоидов по полу в соответствии с различными способами, обсуждавшимися выше, после чего сперматозоиды поступают в фазу выгрузки (сбора). Как упоминалось выше, после сбора сперматозоидов можно

5 получить образцы, содержащие примерно 2% цитрата яичного желтка (для спермы быков). Затем этот образец можно сконцентрировать до около 3-5 миллионов сперматозоидов на мл, посредством центрифугирования, после которого капсульную жидкость и предохранительную жидкость можно удалить. Затем можно провести окончательное разбавление путем добавления либо 20% цитрата яичного желтка, либо корнелльского

10 универсального разбавителя или тому подобного. Корнелльский универсальный разбавитель может иметь следующий состав на 1000 мл:

14,5 г дигидрата цитрата натрия

2,1 г NaHCO_3

0,4 г KCl

15 3,0 г глюкозы

9,37 г глицина

0,87 г лимонной кислоты

Для композиции с 20% яичного желтка можно использовать 800 мл вышеуказанного состава и около 200 мл яичного желтка.

20 После этого последнего разбавления можно получить от 3 до 5 миллионов сперматозоидов на мл (для спермы быков). Затем этот образец (совокупность сперматозоидов) можно охладить, чтобы замедлить метаболизм сперматозоидов, что позволит использовать его в течение более длительного периода времени. Для лошадей образец после этого можно использовать для яйцепроводного или другого способов

25 осеменения, хорошо известных специалистам в данной области техники. Для спермы быков образцы можно еще раз разбавить до желаемого уровня дозы. Установлено, что разбавление может повлиять на жизнеспособность сперматозоидов, и поэтому желательно избегать слишком сильного разбавления за счет использования меньшего объема образцов. Независимо от используемых способов разделения спермы по полу, в

30 настоящее время можно добиться получения примерно 300000 сперматозоидов на 0,184 мл. Кроме того, может оказаться желательным поддерживать содержание семенной плазмы примерно на уровне пяти процентов, хотя результаты выполнения этого требования в настоящее время противоречивы. Образцы сперматозоидов после этого

35 можно поместить в соломинки для дальнейшего использования их в искусственном осеменении и транспортировать к подлежащим осеменению коровам и телкам.

Для того, чтобы добиться удобных сроков искусственного осеменения, можно синхронизировать наступление эструса у коров и телок с помощью известных способов,

таких, как использование простогландина $\text{F}_{2\alpha}$, в соответствии с методами, хорошо

известными в данной области техники. Последнее вещество может быть особенно ценным,

40 поскольку в последнее время появились сообщения, что оно, возможно, повышает фертильность у телок, что обсуждается в статье "Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ - A Fertility Drug in Dairy Cattle?", 18 Theriogenology 245 (1982), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Хотя полученные в последнее время результаты не подтвердили этого предположения, возможно, настоящее изобретение демонстрирует, что оно особо

45 правомерно в ситуациях искусственного осеменения низкими дозами разделенной по полу спермы. Для коров искусственное осеменение можно произвести посредством использования оборудования для пересадки эмбрионов, помещая сперматозоиды глубоко в рога матки. Это можно осуществить не в момент пика, как обычно делается при искусственном осеменении, а несколько позже, примерно 12 часов после этого времени,

50 поскольку существует некоторая возможность, что фертильность для искусственного осеменения разделенной по полу спермой может наступить несколько позже.

Оборудование для пересадки эмбрионов рекомендуется использовать потому, что стенки матки могут быть высокочувствительными к такому искусственному осеменению низкими

дозами разделенной по полу спермы.

Кроме того, способы можно объединить также и для того, чтобы добиться повышенной продуктивности. В частности, способы по настоящему изобретению, позволяющие осуществлять высокоскоростное разделение и осеменение низкими дозами разделенных

5 по полу сперматозоидов, также возможны для животных с множественной овуляцией (полиовуляцией). Полиовуляции можно добиться путем использования способствующих полиовуляции фармацевтических препаратов или любым другим способом. Способствующие полиовуляции фармацевтические препараты могут действовать

10 напрямую или не напрямую, например, через последовательность реакций, достигая увеличенной по сравнению с нормальной выработки яйцеклеток. Комбинация с полиовуляцией является неожиданной, поскольку ранее предполагали, что полиовуляция препятствует осуществлению такой комбинации. Транспорт спермы у животных с полиовуляцией затруднен, поэтому животных часто искусственно осеменяли по несколько раз и/или несколькими дозами спермы. Кроме того, раньше процедуры разделения спермы

15 по полу были сравнительно медленными; поэтому было интересно определить результативность оплодотворения после однократного осеменения у скота с полиовуляцией, стимулированной фармацевтическим средством, таким, как FSH (гормон, стимулирующий фолликулы), с использованием всего 600000 общего количества незамороженных сперматозоидов, с помощью этих новых комбинаций способов.

20 Например, у двенадцати кроссбредных ангусских телок вызвали полиовуляцию с помощью стандартных способов: 6, 6, 4, 4, 2, 2, 2 и 2 мг FSH вводили внутримышечно с интервалами в полсутки, начиная между 9-ыми и 12-ыми сутками цикла эструса; 25 и 12,5 мг простогландина F-2 альфа вводили внутримышечно вместе с 6-ой и 7-ой инъекциями FSH. Сперму от быков неизвестной фертильности окрашивали красителем Hoechst 33342,

25 а затем разделяли по полу с помощью проточного цитометра MoFlo®/клеточного сортера, получая по 700-800 живых сперматозоидов каждого пола в секунду. Средняя чистота разделения составляла 89% желаемого пола. Разделенную по полу сперму концентрировали до $3,36 \times 10^6$ сперматозоидов/мл путем центрифугирования при 650 g в течение 10 минут, охлаждали до 5°C и хранили 4 часа. Затем по 184 мкл загружали в

30 пластиковые соломинки на 0,25 мл; половину дозы вводили в каждый рог матки через 20-24 часа после наступления эструса, с помощью автоматических капсул с боковыми отверстиями для пересадки эмбрионов. Эмбрионы извлекали с помощью стандартных нехирургических методов на 7 или 16 сутки после эструса. Результаты были одинаковыми для эмбрионов, взятых на 7-е и 16-е сутки, и одинаковыми для X- и Y-сперматозоидов.

35 Эмбрионы брали у 9 телок. Всего было 52 эмбриона (в среднем по 4,3+/-5,3 на донора) в нормальных стадиях развития, 13 эмбрионов с задержкой развития и 31 неоплодотворенная яйцеклетка. У сорока шести эмбрионов определили пол с помощью ПЦР, используя праймеры для последовательности ДНК, специфичной для Y-хромосомы; 43 (93%) из них оказались ожидаемого пола. Хотя в этом исследовании участвовало

40 небольшое количество животных, выяснилось, что осеменение телок с полиовуляцией с использованием всего лишь 600000 (живых) разделенных по полу незамороженных сперматозоидов дало результаты, сходные с результатами обычных способов. Можно также осуществить вариации вышеописанного способа, включая, но не ограничиваясь этим,

45 разделение спермы иным, чем проточно-цитометрический, способом, достижение полиовуляции другими путями, увеличение фертильности другими путями, и т.п.

Далее, согласованное применение способов разделения сперматозоидов по полу, основанных на содержании ДНК, высокоскоростных проточных цитометров/клеточных сортеров, а также способов осеменения телок количеством спермы, составляющим менее 500000 общего количества сперматозоидов, без снижения фертильности, позволило всего

50 лишь за несколько лет добиться промышленного получения жизнеспособных разделенных по полу сперматозоидов крупного рогатого скота. Существует огромное количество применений для сперматозоидов, разделенных по полу с точностью >85%. По-видимому, наиболее очевидным из них является искусственное осеменение одной субпопуляции

крупного рогатого скота (как молочного, так и мясного) для ремонта состоящего из самок стада, и создания противоположной субпопуляции (как молочного, так и мясного скота), состоящей из совершенно другого типа быков, для выращивания бычков на мясо. Очень важным моментом вышеизложенного является осеменение телок сперматозоидами, несущими X-хромосомы, для получения от них телочек, при рождении которых бывает меньше случаев затрудненных родов, чем при рождении бычков, по-видимому, из-за меньшего размера телочек. Кроме того, оценка молодых производителей молочного скота гораздо более эффективна при преобладании среди телят телочек. Наличие среди телят более 85% телочек также делает осуществимым такое разведение молочных коров, при котором от них в среднем получают менее двух выживших телят за период их жизни, что привлекательно, поскольку при этом уменьшаются проблемы, связанные с беременностью и родами. Становятся также осуществимыми однополые системы разведения мясного скота, при которых каждая женская особь производит замену себе, и в возрасте между 2 и 3 годами ее забивают, за счет чего гораздо более высокий процент корма используется на рост животных, и меньший процент - на поддержание выросших животных. Разделенные по полу сперматозоиды полезны также для оплодотворения *in vitro* и для осеменения коров с полиовуляцией для пересадки эмбрионов. Часто один пол телят более ценен, чем другой пол, и хотя существуют точные способы разделения эмбрионов по полу, но они требуют большого количества времени, и половина получаемых эмбрионов при этом будет менее ценного пола. Высказывается предположение, что точно разделенная по полу сперма будет хорошо приспособлена для искусственного осеменения скота, в том случае, если нагрузки при разделении сперматозоидов по полу были низкими, и фертильность нарушена лишь в минимальной степени. Вероятно, значительно увеличится процент мясного скота, искусственно осемененного разделенными по полу сперматозоидами.

Неожиданно выяснилось, что лучшие результаты можно получить при осеменении не путем помещения спермы внутрь тела матки, как это обычно делается, а при помещении ее глубоко в рог матки. Возможно, покажется также неожиданным, что в исследованных образцах не выявили различий между результатами ипсилатерального и контралатерального осеменения, если оно осуществлялось глубоко в роге матки. Под словом «глубоко» следует понимать, что инструмент для осеменения надежно вводят внутрь рога матки с помощью инструмента для пересадки эмбрионов. Тот факт, что результаты ипсилатерального и контралатерального осеменения различаются несущественно, привел авторов настоящего изобретения к предложению использовать осеменение обоими этими способами, так что процесс идентификации соответствующего рога матки может оказаться уже не нужным.

В результате осеменения, конечно, желательно получить животное нужного пола. Это животное можно получить с помощью обсужденных ранее систем, посредством использования совокупностей разделенных по полу сперматозоидов. Следует также иметь в виду, что способы по настоящему изобретению могут найти применение в других методах, таких как лапроскопическое осеменение, яйцепроводное осеменение и т.п.

В качестве примеров провели описываемые ниже эксперименты. Хотя не во всех из них использованы все аспекты описанного здесь изобретения, но они убедительно демонстрируют преимущества, получаемые с помощью различных аспектов изобретения. Кроме того, краткое изложение некоторых экспериментов содержится в статье "Uterine Horn Insemination of Heifers With Very Low Numbers of Non-frozen and Sexed Spermatozoa", цитированной ранее. Эта статья подводит итоги некоторых исследований, показывающих эффективность настоящего изобретения. Что касается экспериментов, один из них провели с использованием разделенной по полу незамороженной спермой, и при этом добились высокой результативности, как описано ниже:

ПРИМЕР I

Ангусских телок в возрасте 13-14 месяцев, умеренной упитанности, синхронизировали путем введения 25 мг простогландина F-2 альфа через 12-дневные интервалы и осеменяли через 6-26 часов после того, как у них отмечали установившийся эструс. Свежесобранную

сперму, полученную от трех быков в возрасте 14-26 месяцев, инкубировали в 38 мкМ Hoechst 33342 при концентрации 75×10^6 сперматозоидов/мл в среде TALP в течение 1 часа при 34°C. Сперму разделяли по половым хромосомам на основе эпифлуоресценции, возбужденной лазером, при 351 и 364 нм, при 150 мВ, с помощью проточного цитометра MoFlo®/клеточного сортера, работающего при давлении 344,74 кПа, и при использовании 2,9%-го цитрата натрия в качестве капсульной жидкости. Сперматозоиды, несущие X-хромосомы (с чистотой $\approx 90\%$, что проверяли путем повторного деления обработанных ультразвуком аликвот спермы) собирали со скоростью ≈ 500 живых сперматозоидов/сек, в пробирки Эппендорфа на 2 мл, содержащие 100 мкл корнелльского универсального разбавителя (CUE) с 20% яичного желтка. Собранные сперматозоиды центрифугировали при 600 g в течение 10 минут и ресуспендировали до $1,63 \times 10^6$ живых сперматозоидов/мл в CUE. Для получения контрольной жидкой неразделенной по полу спермы окрашенную красителем Hoechst 33342 сперму разбавляли капсульной жидкостью до 9×10^6 сперматозоидов/мл, центрифугировали, а затем ресуспендировали до $1,63 \times 10^6$ сперматозоидов с увеличивающейся подвижностью на мл, в CUE. Разделенную по полу и жидкую контрольную сперму охлаждали до 5°C в течение 75 минут и загружали в 0,25-миллилитровые соломинки (по 184 мкл на соломинку). Соломинки транспортировали при температуре от 3 до 5°C в устройстве для охлаждения напитков с контролируемой температурой, на расстояние 240 км/ для осеменения, которое осуществляли спустя от 5 до 9 часов после деления спермы. Осеменение разделенной по полу и жидкой контрольной спермой проводили с помощью голубых капсул с боковыми отверстиями (IMV), используя по половине каждой соломинки в каждый рог матки (по 3×10^5 живых сперматозоидов на телку). В качестве стандартного контроля, сперму от тех же самых быков замораживали в соломинках объемом 0,5 см³ с помощью стандартных методов (в среднем по $15,6 \times 10^6$ подвижных сперматозоидов на дозу, после оттаивания), оттаивали при 35°C в течение 30 сек, а затем вводили в тело матки. Варианты были распределены между 3 быками и 2 операторами искусственного осеменения в отношении 3:2:2 осеменений для варианта разделенной по полу спермы и двух контролей. Стельность определяли ультразвуковым способом через 31-34 суток после осеменения и подтверждали через 64-67 суток после осеменения, когда у плодов уже можно было определить пол (слепым методом). Данные представлены в таблице.

Вариант	Количество осемененных телок	Количество стельных телок на 31-34 сутки	Количество стельных телок на 64-67 сутки	Количество плодов женского пола
Разделенная по полу сперма	45	20 (44%)	18 (42%)	18 (95%) ^a
Жидкий контроль	28	15 (54%)	15 (54%)	8 (53%) ^b
Замороженный контроль	29	16 (55%)	15 (52%)	12 (80%) ^c

a, b Соотношения полов у показателей с различными буквенными индексами различаются ($P < 0,02$).

Хотя процент стельности при осеменении разделенной по полу спермой составлял только 80% от контролей, но это различие было статистически незначимым ($>0,1$). Одна стельность в каждой группе, т.е. на варианте с осеменением разделенной по полу спермой и на контролях с жидкой и замороженной спермой, к 64-67 суткам оказалась потерянной; 18 из 19 плодов (95%) на варианте с осеменением разделенной по полу спермой были женского пола, а в контрольных группах 20 из 30 плодов (67%) были женского пола. В контроле с осеменением жидкой спермой результаты по проценту стельности были практически идентичны результатам, полученным в контроле с осеменением замороженной спермой, содержащей более чем в 50 раз большее количество подвижных сперматозоидов (более чем в 120 раз большее общее количество сперматозоидов), что демонстрирует эффективность осеменения низкими дозами спермы, введенной в рога матки. Авторам изобретения удалось значительно изменить соотношение полов посредством использования проточно-цитометрической технологии и искусственного осеменения.

Подобным же образом провели эксперимент с осеменением не разделенными по полу незамороженными сперматозоидами, результаты которого излагаются ниже:

ПРИМЕР 2

Целью эксперимента было определить результативность осеменения (процент
 5 стельности) в случае, когда телок осеменяли чрезвычайно низкими количествами
 замороженной спермы в идеальных производственных условиях. Сперму, полученную от
 трех гольштейнских быков, имеющую вышеуказанную среднюю фертильность, разбавляли
 в гомогенизированном молоке плюс 7% глицерола (CSS) плюс 5% гомологичной семенной
 10 плазмы до концентраций 2×10^5 , 5×10^5 и 10×10^6 (контроль) общего количества
 сперматозоидов на французскую соломинку объемом 0,25 мл и замораживали в
 движущихся парах жидкого азота. Сперму подвергали оттаиванию в воде при 37°C в
 течение 20 сек. Гольштейнским телкам в возрасте 13-15 месяцев с весом в 350-450 кг
 путем инъекции вводили по 25 мг простогландина F-2 альфа (Lutalyse®), дважды, с
 15 интервалом в 12 суток и осеменяли их, используя катетер для пересадки эмбрионов и
 капсулу с боковым отверстием, вводя по половине количества спермы глубоко в каждый
 рог матки через 12 или 24 часа после обнаружения эструса. Эксперимент выполняли в
 пяти повторностях, через 5 месяцев, со сбалансированным использованием двух
 операторов искусственного осеменения. Внешние температуры при разведении животных
 часто составляли от -10 до -20°C, поэтому предпринимались меры для того, чтобы держать
 20 оборудование для осеменения в тепле. Стельность определяли путем обнаружения
 видимого плода при ультразвуковом исследовании на 40-44-е сутки после эструса, и
 подтверждали ее на 55-62-е сутки; 4 из 202 плодов за промежуток между этими двумя
 исследованиями были потеряны. Проценты наступления стельности на 55-62-е сутки
 составили 55/103 (53%), 71/101 (70%) и 72/102 (71%), для вариантов, соответственно,
 25 с 2×10^5 , 5×10^5 и 10×10^6 (контроль) общего количества сперматозоидов ($P < 0,1$). Проценты
 стельности различались ($P < 0,05$) при использовании спермы разных быков (59, 62 и 74%),
 но не различались при использовании разных операторов (64 и 65%) и разных сроков
 осеменения после наступления эструса (65% для варианта с 12 час и 64% для варианта с
 30 24 час, N=153 в каждом случае). Для описываемых способов проценты стельности телок
 были практически одинаковыми при дозах 5×10^5 и 10×10^6 общего количества
 сперматозоидов на осеменение.

Провели также эксперимент с осеменением разделенной по полу незамороженной
 спермой, результаты которого излагаются ниже:

ПРИМЕР 3

Сперму брали у быков в кооперативе Atlantic Breedres, разбавляли в соотношении 1:4
 разбавителем на основе HEPES-буфера + 0,1% BSA (альбумина бычьей сыворотки) и
 транспортировали на расстояние в 160 км (около 2 часов) в Besville, Maryland, где ее
 разделяли по полу при температуре окружающей среды способом проточной цитометрии в
 40 20%-ном разбавителе "TEST", используя ранее описанные способы (Biol. Reprod. 41:199).
 Достигали скоростей разделения, составляющих до 2×10^6 сперматозоидов каждого пола за
 5-6 часов, с чистотой $\approx 90\%$. Сперму концентрировали путем центрифугирования (300 г в
 течение 4 минут) до 2×10^6 сперматозоидов/мл. Некоторую часть спермы разделяли в
 разбавителе, содержащем гомологичную семенную плазму (с окончательной
 45 концентрацией 5%). Разделенную по полу сперму отправляли воздушным транспортом в
 Колорадо (на расстояние $\approx 2,600$ км) и хранили либо при температуре окружающей среды,
 либо при 5°C (охлажденную во время перевозки в течение более 6 часов в
 теплоизолированном устройстве модели Equitainer, имеющем отделение для льда). Телок
 или сухостойных коров, у которых за 11-36 часов до этого был определен эструс,
 50 осеменяли в интервале от 9 до 29 часов после конца операции разделения спермы.
 Сперму (от 1 до 2×10^5 сперматозоидов в 1 мл) вводили глубоко в рог матки,
 расположенный ипсилатерально по отношению к яичнику, в котором находился самый
 большой фолликул, что определялось с помощью ультразвука в момент осеменения.

Ни одна из 10 самок не забеременела после осеменения спермой, которую транспортировали и хранили при температуре окружающей среды. Из 29 самок, осемененных спермой, которую во время транспортировки охлаждали до 5°C, через 4 недели после осеменения стельными оказались 14 самок и 12 (41%) были стельными через 8 недель после осеменения. Одинадцать из 22 самок, осемененных спермой, взятой не позже, чем через 10 часов после окончания разделения ее по полу, были стельными при обследовании через 8 недель после осеменения, и только 1 из 7 самок, осемененных спермой, взятой через 17-24 часа после окончания разделения ее по полу, оказалась стельной. Добавление семенной плазмы не оказало существенного влияния. Один из 12 плодов оказался не того пола, который ожидался на основе разделения спермы, пол одного плода оказался невыясненным, и 10 плодов были ожидаемого пола, что определяли с помощью ультразвука в момент 60-70 суток стельности.

После этого еще 33 телок осеменили с использованием 0,05 мл спермы (разбавленной, как описано выше), с введением ее в каждый рог под контролем ультразвука; только 3 из них оказались стельными при обследовании через 4 недели после осеменения, и только 1 оставалась стельной спустя 8 недель после осеменения. Однако в этой группе использовали не тех быков, которые были использованы для предыдущей группы, и все осеменения производились спустя 18-29 часов после разделения спермы по полу. Подобным же образом осеменили еще 38 телок (примерно через 22 часа после разделения спермы) в 200 км от лаборатории авторов настоящего изобретения, разделенной по полу спермой, взятой от другого быка; ни одна из этих телок не была стельной при обследовании через 8 недель после осеменения.

Подводя итоги, можно сказать, что у крупного рогатого скота можно добиться стельности посредством искусственного осеменения спермой, разделенной по половым хромосомам с помощью проточной цитометрии, и при этом соотношение полов у получаемых плодов примерно соответствует предсказанному по результатам повторного анализа разделенных по полу сперматозоидов на содержание ДНК (90%). Однако проценты стельности в этих предварительных экспериментах, требовавших транспортировки спермы на большие расстояния, сильно варьировали. Фертильность резко уменьшалась при использовании спермы, взятой спустя 17 часов после разделения по полу, однако чистота эксперимента была несколько нарушена тем, что в разные сроки взятия спермы использовали сперму разных быков. Необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы определить, были ли наблюдавшиеся вариации в процентах стельности обусловлены происхождением спермы от разных быков, или они явились результатом способов осеменения, интервалов между разделением сперматозоидов по полу и осеменением, либо других факторов.

И наконец, провели также эксперимент с осеменением неразделенной по полу незамороженной спермой, результаты которого излагаются ниже:

ПРИМЕР 4

Целью было определение процентов стельности в случае, когда телок осеменяли очень малыми количествами сперматозоидов в идеальных экспериментальных условиях. Сперму, взятую у трех гольштейнских быков, разбавляли в корнелльском универсальном разбавителе плюс 5% гомологичной семенной плазмы, до концентрации 1×10^5 или $2,5 \times 10^6$ сперматозоидов в 0,1 мл; $2,5 \times 10^6$ общего количества сперматозоидов в 0,25 мл использовали в качестве контроля. Полностью разбавленную сперму упаковывали в пластиковые французские соломинки объемом 0,25 мл, в которые помешали дозы спермы для осеменения, составлявшие 0,1 или 0,25 мл. Сперму охлаждали до 5°C и использовали через 26-57 часов после ее сбора. Гольштейнским телкам в возрасте 13-15 месяцев с весом в 350-450 кг путем инъекции вводили по 25 мг простогландина F-2 альфа (Lutalyse®), с интервалами в 12 суток, и осеменяли их, используя катетер для пересадки эмбрионов и капсулу с боковым отверстием, вводя сперму в рог матки через 12 или 24 часа после обнаружения эструса. Осеменение осуществляли ипсилатерально по отношению к стороне, на которой с помощью ультразвука через 12 часов после эструса

обнаружили самый большой фолликул; сторону овуляции уточняли путем обнаружения желтого тела с помощью ультразвука через 7-9 суток после эструса. Стельность определяли путем обнаружения плода с помощью ультразвука через 42-45 суток после эструса. Эксперимент выполняли в четырех повторностях, со сбалансированным использованием трех операторов искусственного осеменения. Сторону овуляции точно определяли у 205 из 225 телок (91%); при этом неожиданно выяснилось, что проценты стельности были почти идентичны для ипсилатерального и контралатерального осеменения. Проценты наступления стельности составили 38/93 (41%), 45/87 (52%) и 25/45 (56%), для вариантов, соответственно, с 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$ и $2,5 \times 10^6$ сперматозоидов на осеменение ($P > 0,1$). Проценты стельности существенно различались ($P < 0,05$) при использовании разных операторов, но не различались при использовании спермы разных быков. С помощью описанных способов можно уменьшить количество спермы, требующейся на одно осеменение, в достаточной степени для того, чтобы применение разделенной по полу с помощью проточного цитометра спермы имело коммерческое значение.

Как упоминалось и как видно из различных экспериментов, наблюдаемые различия статистически значимы и поэтому можно провести еще ряд дополнительных экспериментов, чтобы определить подходящие комбинации и ограничительные стратегии. Так, далее будут определены взаимосвязи между различными воздействиями, например, можно изучать случаи воздействия красителя и объединенного воздействия красителя и лазерного возбуждения.

Обсуждение, включенное в настоящее описание, служит в качестве базового описания. Читатель должен отдавать себе отчет, что конкретное описание изобретения не может исчерпывающе охватить все возможные варианты его осуществления; подразумевается возможность наличия многих альтернативных вариантов. Описание также не может полностью объяснить общую сущность изобретения и не может исчерпывающе показать, как каждый признак и элемент может фактически быть представителем более широкой функции или большого разнообразия альтернативных или эквивалентных элементов. И это также подразумевается в настоящем описании. В тех случаях, когда изобретение описывается в терминах, ориентированных на устройства, подразумевается, что каждый элемент устройства выполняет функцию. Пункты формулы изобретения, касающиеся аппарата, могут относиться не только к описанному устройству, но также пункты формулы изобретения, касающиеся способа или процесса, могут относиться к функциям, осуществляемым изобретением и каждым его элементом. Ни описание, ни терминология не ограничивают объем формулы изобретения, пункты которой могут быть подчиненными. Следует иметь в виду, что можно выполнить ряд изменений, которые не выходят за пределы сущности изобретения. Такие изменения также по умолчанию включены в настоящее изобретение. Тем не менее, они не выходят за пределы объема изобретения. Широкое описание, охватывающее как полностью раскрытые в нем вариант(ы) изобретения, так и большое разнообразие подразумеваемых альтернативных вариантов осуществления, а также широкий спектр способов и процессов и тому подобного также охватываются настоящим описанием.

Кроме того, каждый из различных элементов настоящего изобретения и его формулы также можно осуществить многими различными путями. Настоящее описание следует рассматривать как охватывающее каждую из таких вариаций, будь это вариация способа осуществления любого варианта устройства, способа или процесса, или даже просто вариация их любого элемента. В частности, следует иметь в виду, что поскольку настоящее описание касается элементов изобретения, то слова, описывающие каждый элемент, могут быть выражены эквивалентными терминами, относящимися к устройству или терминами, относящимися к способу - даже в том случае, если одинаковыми являются только функция и результат. Такие эквивалентные, расширенные или даже обобщенные термины следует считать охватывающими в описании каждого элемента или действия. Такие термины могут быть заменены другими, когда желательно сделать более ясными

подразумеваемые под ними значения для настоящего изобретения. В качестве только одного примера, следует иметь в виду, что все действия могут быть выражены в виде способов для выполнения этих действий, или в качестве элементов, вызывающих это действие. Подобным же образом, каждый описанный физический элемент следует

5 рассматривать как охватывающий описание действия, которое данный физический элемент позволяет выполнить. В качестве только одного примера этого аспекта, описание «коллектора» (устройства для сбора сперматозоидов) следует понимать как охватывающее описание действия «сбора» - независимо от того, описано ли это или только

10 подразумевается - и наоборот, в случае, если имеется только описание действия «сбора», то такое описание следует понимать как охватывающее описание «коллектора». Такие изменения и альтернативные термины следует рассматривать как по умолчанию включенные в описание. Далее, следует иметь в виду, что кроме первоначально

15 представленной формулы изобретения, формула изобретения может варьировать так, чтобы она более полно представляла по меньшей мере: i) устройства, как они здесь представлены и описаны; ii) связанные с ними способы, представленные и описанные; iii) подобные, эквивалентные или даже подразумеваемые вариации этих устройств и способов; iv) альтернативные решения, выполняющие каждую из описанных и

представленных функций, v) альтернативные решения и способы, выполняющие каждую из описанных функций, показанных в качестве выполняющих по умолчанию то, что

20 представлено и описано; vi) каждый признак, компонент и стадию, показанные как отдельные и независимые изобретения, и vii) различные комбинации и перестановки каждого из вышеуказанного.

Для понимания настоящего изобретения могут оказаться полезными ряд опубликованных ссылочных материалов. Они перечислены ниже и тем самым включены в

25 качестве ссылки; однако, что касается утверждений, которые можно рассматривать как несогласующиеся с патентованием этого/этих изобретения(ий), то такие утверждения безусловно не следует рассматривать, как сделанные заявителем (заявителями).

Потенциально полезные ссылки включают: патенты США №: 5660997; 5589457; 5514537; 5439362; 5346990; 5135759; 5021244; 4999283; 4749458; 4698142; 4680258; 4511661;

30 4448767; 4362246; 4339434; 4276139; 4225405; 4191749; 4155831; 4092229; 4085205; 4083957; 4067965; 4009260; 3894529; 3687806; RE32350. Полезные ссылки могут также включать следующие публикации: "Insemination of Holstein Heifers With Very Low Numbers Of Unfrozen Spermatozoa." G.E.Seidel, Jr., C.H.Alien, Z.Brink, J.K.Graham, and M.B.Cattell, Colorado State University, Fort Collins, Atlantic Breeders

35 Cooperative, Lancaster, PA., DUO Dairy, Loveland, CO. July 1995; "Artificial Insemination With X-and Y-Bearing Bovine Sperm", G.E.Seidel, Jr., L.A.Johnson, C.A.Alien, G.R.Welch, M.D.Holland, Z.Brink and M.B.Cattell, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO; Germplasm and Gamete Physiology Lab, ARS, USDA, Beltsville, MD; Atlantic Breeders Coop, Lancaster,

40 PA; DUO Dairy, Loveland, CO, USA January 1996; "Insemination of Heifers with Very Low Numbers of Frozen Spermatozoa." G.E.Seidel, Jr., C.H.Alien. Z.Brink, M.D.Holland, and M.B.Cattell, Colorado State University, Fort Collins, Atlantic Breeders Cooperative, Lancaster, PA, DUO Dairy, Loveland, CO, July 1996; "Production of Lambs by Low Dose Intrauterine Insemination With Flow Cytometrically Sorted and Unsorted Semen,"

45 D.G.Cran, W.A.C.McKelvey, M.E.King, D.F.Dolman, T.G.McEvoy, P.J.Broadbent and J.J.Robinson, Mastercalf, Craibstone, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9TN, UK Scottish Agricultural College, Craibstone, Bucksburn, Aberdeen. AB21 9YA, UK, Theriogenology, Page 267; "Uterine Horn Insemination of Heifers With Very Low Numbers of Nonfrozen and Sexed Spermatozoa," G.E.Seidel, Jr., C.H.Alien, L.A.Johnson, M.D.Holland,

50 Z.Brink, G.R.Welch, J.K.Graham and M.B.Cattell, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Colorado State University, Atlantic Breeders Cooperative, Lancaster, PA 17601, Germplasm and Gamete Physiology Laboratory ARS, USDA, Beltsville, MD 20705, DUO Dairy, Loveland, CO 80538, Theriogenology 48: 1255-1264, 1997; "Capacitation of

- Bovine Sperm by Heparin," J.J.Parrish, J.Susko-Parrish, M.A.Winer, and N.L.First, Department of Meat and Animal Science, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, Biology Of Reproduction 38, 1171-1180 (1988); "Prostaglandin F2a - A Fertility Drug In Dairy Cattle?", K.L.Macmillan and A.M.Day, Ruakura Animal Research Station,
 5 Private Bag, Hamilton, New Zealand, Theriogenology, September 1982, VOL.18 No.3, pages 245-253; "Prospects For Sexing Mammalian Sperm," Colorado Associated University Press, Animal Reproduction Laboratory College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, CO, 80523 Edited by Rupert P. Amann and George E. Seidel, Jr., 1982; "Effects of Egg Yolk-Citrate and Milk
 10 Extenders on Chromatin Structure and Viability of Cryopreserved Bull Sperm", J Dairy Sci 74:3836, D.S.Karabinus and D.P.Evenson and M.T.Kaproth; "Assessment of Ram and Boar Spermatozoa during Cell-sorting by Flow Cytometry", Reprod. Dom Anim 32:251; "Superovulation of Goats with Purified pFSH Supplemented with Defined Amounts of pLH", Therio. 43:797, M.A.Nowshari, J.F.Beckers, and W.Holtz; "Gender Preselection in
 15 Mammals: An Overview", Dtsch. tierarztl. Wschr. 103:285, L.A.Johnson.

Везде в этом описании, в случаях, если контекст не требует иного, слово «включают» или его вариации, такие, как «включает», «включающий» и т.п., следует понимать, как обозначающее включение указанного элемента или составляющей или группы элементов или составляющих, но не исключение никакого иного элемента или составляющей или
 20 группы элементов или составляющих.

Формула изобретения

1. Способ получения крупного рогатого скота заданного пола, включающий стадии
 - a. взятия сперматозоидов быка;
 - 25 b. определения полового признака у некоего множества сперматозоидов быка;
 - c. сортировки сперматозоидов быка согласно определению их полового признака со скоростью по меньшей мере 1200 операций в секунду и сбора разделенных сперматозоидов в коллектор, снабженный амортизирующим элементом, причем среда из капсульной жидкости для сперматозоидов быка содержит около 2,9% цитрата натрия;
 - 30 d. получения сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения, содержащей от не более 100000 до не более 300000 сортированных сперматозоидов быка;
 - e. введения совокупности сперматозоидов для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, а именно крупного рогатого скота;
 - 35 f. оплодотворения по меньшей мере одной яйцеклетки в самке млекопитающего, представителя крупного рогатого скота, с уровнем результативности, составляющим по меньшей мере 50% по сравнению с уровнем результативности беременности, достигаемой с использованием обычной совокупности сперматозоидов для искусственного осеменения;
 - g. получения потомства нужного пола млекопитающего, представителя крупного
 40 рогатого скота.
2. Способ по п.1, в котором стадия оплодотворения по меньшей мере одной яйцеклетки в самке данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, включает стадию оплодотворения по меньшей мере одной яйцеклетки в самке млекопитающего, представителя крупного рогатого скота, с уровнем результативности, составляющим по
 45 меньшей мере 90%.
3. Способ по п.1 или 2, в котором стадии введения сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, и оплодотворения по меньшей мере одной яйцеклетки в самке данного вида млекопитающих.
- 50 4. Способ по п.1, в котором стадии введения сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, и оплодотворения по меньшей мере одной яйцеклетки в самке данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота,

с уровнем результативности по меньшей мере 50%, в полевых условиях, включают стадии повторяющегося подряд введения значительного числа совокупностей сортированных сперматозоидов быка для искусственного осеменения значительному числу самок данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, в условиях фермы или

5 скотоводческого хозяйства.

5. Способ по любому из пп.1-3, в котором млекопитающее, представитель крупного рогатого скота, имеет рога матки, и в котором стадия введения сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, включает стадию введения

10 сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения как ипси-, так и контралатерально в рога матки млекопитающего, представителя крупного рогатого скота.

6. Способ по любому из пп.1-3, в котором млекопитающее, представитель крупного рогатого скота, имеет по меньшей мере один рог матки, и в котором стадия введения

15 сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, включает стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения глубоко в рог матки.

7. Способ по п.4, в котором стадия введения сортированной совокупности

20 сперматозоидов быка для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, включает стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения глубоко в рога матки.

8. Способ по п.5, в котором стадия введения сортированной совокупности

25 сперматозоидов быка для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, дополнительно включает стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения в рог матки с помощью инструмента для пересадки эмбрионов.

9. Способ по п.6, в котором стадия введения сортированной совокупности

30 сперматозоидов быка для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, включает также стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения в рог матки с помощью инструмента для пересадки эмбрионов.

10. Способ по п.4, в котором стадия введения сортированной совокупности

35 сперматозоидов быка для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, включает стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения через 12 ч после того времени, которое обычно считается оптимальным для однократного искусственного осеменения крупного рогатого скота.

11. Способ по п.8, в котором стадия получения сортированной совокупности

40 сперматозоидов быка для искусственного осеменения включает стадию получения незамороженной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения, причем стадию сортировки сперматозоидов быка согласно определению их полового признака осуществляют во время сортировки, и при этом стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов быка для искусственного осеменения самке данного вида

45 млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, осуществляют не позднее, чем через 17 ч со времени сортировки.

12. Способ по п.8, в котором стадия получения сортированной совокупности

50 сперматозоидов для искусственного осеменения включает стадию получения незамороженной сортированной совокупности сперматозоидов для искусственного осеменения, причем стадию сортировки сперматозоидов согласно определению их полового признака осуществляют во время сортировки, а стадию введения совокупности сперматозоидов для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих осуществляют не позднее, чем через 10 ч со времени сортировки.

13. Способ по п.12, в котором стадия определения полового признака у некоего множества сперматозоидов быка включает стадию окрашивания сперматозоидов быка при содержании красителя по меньшей мере 38 мкМ.

5 14. Способ по п.1, в котором стадии определения полового признака у некоего множества сперматозоидов быка и сортировки сперматозоидов быка согласно определению их полового признака, причем среда из капсульной жидкости для сперматозоидов быка содержит около 2,9% цитрата натрия, включают стадии

- a. создания источника клеток, поставляющего сперматозоиды быка для сортировки;
- b. химического координирования капсульной жидкости для создания среды из
- 10 капсульной жидкости для сперматозоидов быка, скоординированной с жидкой средой сперматозоидов как до, так и после сортировки;
- c. распознавания одного из свойств сперматозоидов быка;
- d. различения сперматозоидов быка, имеющих признак нужного пола; и
- e. собирания сперматозоидов быка, имеющих признак нужного пола.

15 15. Способ по п.2, в котором стадии определения полового признака у некоего множества сперматозоидов быка и сортировки сперматозоидов быка согласно определению их полового признака, причем среда из капсульной жидкости для сперматозоидов быка содержит около 2,9% цитрата натрия, включают стадии

- a. создания источника клеток, поставляющего сперматозоиды быка для сортировки;
- 20 b. химического координирования капсульной жидкости для создания среды из капсульной жидкости для сперматозоидов быка, скоординированной с жидкой средой сперматозоидов как до, так и после сортировки;
- c. распознавания одного из свойств сперматозоидов быка;
- d. различения сперматозоидов быка, имеющих признак нужного пола; и
- 25 e. собирания сперматозоидов быка, имеющих признак нужного пола.

16. Способ по п.1, в котором стадии определения полового признака у некоего множества сперматозоидов быка и сортировки сперматозоидов согласно определению их полового признака, причем среда из капсульной жидкости для сперматозоидов быка содержит около 2,9% цитрата натрия, включают стадии

- 30 a. создания источника клеток, поставляющего сперматозоиды быка для сортировки;
- b. создания среды из капсульной жидкости для сперматозоидов быка;
- c. распознавания одного из свойств сперматозоидов быка;
- d. различения сперматозоидов быка, имеющих признак нужного пола; и
- e. собирания сперматозоидов быка, имеющих признак нужного пола, при этом ограждая
- 35 сперматозоиды быка от столкновения с коллектором тем, что амортизирующий элемент включает исходную коллекторную жидкость на дне коллектора и при этом коллектор имеет достаточно большую конфигурацию, не допускающую столкновения сперматозоидов с коллектором.

17. Способ по п.1, в котором стадии определения полового признака у некоего множества сперматозоидов быка и сортировки сперматозоидов согласно определению их полового признака, причем среда из капсульной жидкости для сперматозоидов быка содержит около 2,9% цитрата натрия, включают стадии

- a. создания источника клеток, поставляющего сперматозоиды быка для сортировки;
- b. создания среды из капсульной жидкости для сперматозоидов быка;
- 45 c. распознавания одного из свойств сперматозоидов быка;
- d. различения сперматозоидов быка, имеющих признак нужного пола; и
- e. собирания сперматозоидов быка, имеющих признак нужного пола, в коллекторную жидкость на основе цитрата, содержащую около 6% яичного желтка перед началом стадии сбора.

50 18. Способ по п.1, дополнительно включающий стадию применения способствующего полиовуляции фармацевтического препарата, вызывающего выработку множественных яйцеклеток самкой данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, в котором стадия оплодотворения по меньшей мере одной яйцеклетки в самке данного

вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, осуществляемая с уровнем результативности, составляющим по меньшей мере 50%, включает стадию оплодотворения множества яйцеклеток, вырабатываемых самкой данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, для получения множественных эмбрионов заданного пола.

19. Способ по п.18, в котором стадия применения способствующего полиовуляции фармацевтического препарата, вызывающего выработку множественных яйцеклеток самкой данного вида млекопитающих, представителя крупного рогатого скота, включает стадию многократного введения дозы фолликулостимулирующего гормона по несколько раз в день, причем способствующий полиовуляции фармацевтический препарат вводят с интервалом в половину суток, в любые дни между 2-м до 18-м днем цикла эструса.

20. Способ по п.19, в котором стадия многократного введения дозы фолликулостимулирующего гормона включает стадию введения фолликулостимулирующего гормона с интервалами, составляющими примерно половину суток, в дозах 6, 6, 4, 4, 2, 2, 2, и 2 мг между 9 и 12 днями цикла эструса включительно, а также включает стадию введения 25 и 12,5 мг простагландина F-2-альфа вместе с шестой и седьмой дозами, соответственно, фолликулостимулирующего гормона.

21. Способ по п.1, в котором стадия сортировки клеток со скоростью по меньшей мере 1200 операций в секунду включает работу проточного цитометра в диапазоне от 5 до 50 кГц.

22. Способ по п.16, в котором стадия ограждения сперматозоидов быка от столкновения с контейнером для сбора включает контейнер для сбора, имеющий физические характеристики, соответствующие струе.

23. Способ по п.16, в котором стадия ограждения сперматозоидов быка от столкновения с контейнером для сбора включает стадию установки контейнера для сбора, имеющего диаметр по меньшей мере 15 мм.

24. Способ получения лошадей заданного пола, включающий стадии

a. взятия сперматозоидов жеребца у самца млекопитающего, представителя лошадиных;

b. определения полового признака у некоего множества сперматозоидов жеребца;

c. сортировки сперматозоидов жеребца согласно определению их полового признака со скоростью по меньшей мере 1200 операций в секунду и сбора разделенных сперматозоидов в коллектор, снабженный амортизирующим элементом, причем среда из капсульной жидкости для сперматозоидов жеребца содержит hepes-буфер;

d. получения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения, содержащей от не более 1 до не более 25 млн сортированных сперматозоидов жеребца;

e. введения совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя лошадиных;

f. оплодотворения по меньшей мере одной яйцеклетки в самке данного вида млекопитающих, представителя лошадиных, с уровнем результативности беременности, составляющим по меньшей мере 35%, по меньшей мере 41%, по меньшей мере 50% и по меньшей мере 90% по сравнению с уровнем результативности беременности, достигаемой с использованием обычной совокупности сперматозоидов для искусственного осеменения;

g. получения потомства нужного пола млекопитающего, представителя лошадиных.

25. Способ по п.24, в котором стадии введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя лошадиных, и оплодотворения по меньшей мере одной яйцеклетки в самке данного вида млекопитающих, представителя лошадиных, с уровнем результативности по меньшей мере 35%, осуществляются в полевых условиях.

26. Способ по п.24, в котором стадии введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя лошадиных, и оплодотворения по меньшей мере одной

яйцеклетки в самке данного вида млекопитающих, представителя лошадиных, с уровнем результативности по меньшей мере 35%, в полевых условиях, включают стадии повторяющегося подряд введения значительного числа совокупностей сортированных сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения значительному числу самок
5 данного вида млекопитающих, представителя лошадиных, в условиях фермы или скотоводческого хозяйства.

27. Способ по п.24, в котором лошадь имеет рога матки, и в котором стадия введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя лошадиных, включает стадию
10 введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения как ипси-, так и контралатерально в рога матки самки млекопитающего, представителя лошадиных.

28. Способ по п.24, в котором млекопитающее, представитель лошадиных, имеет по меньшей мере один рог матки, и в котором стадия введения сортированной совокупности
15 сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения самке млекопитающего, представителя лошадиных, включает стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения глубоко в рог матки.

29. Способ по п.27, в котором стадия введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения самке данного вида
20 млекопитающих, представителя лошадиных, включает также стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения глубоко в рога матки.

30. Способ по п.28, в котором стадия введения по меньшей мере части сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения самке данного вида
25 млекопитающих, представителя лошадиных, дополнительно включает стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения в рог матки с помощью инструмента для пересадки эмбрионов.

31. Способ по п.29, в котором стадия введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения самке данного вида
30 млекопитающих, представителя лошадиных, дополнительно включает стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения в рог матки с помощью инструмента для пересадки эмбрионов.

32. Способ по п.28, в котором стадия введения сортированной совокупности сперматозоидов для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих
35 включает стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов для искусственного осеменения через 12 ч после того времени, которое обычно считается оптимальным для одновременного искусственного осеменения.

33. Способ по п.31, в котором стадия получения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения включает стадию получения
40 незамороженной сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения, причем стадию сортировки сперматозоидов жеребца согласно определению их полового признака осуществляют во время сортировки, а стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя лошадиных, осуществляют не позднее,
45 чем через 17 ч со времени сортировки.

34. Способ по п.31, в котором стадия получения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения включает стадию получения
50 незамороженной сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения, причем стадию сортировки сперматозоидов жеребца согласно определению их полового признака осуществляют во время сортировки, а стадию введения сортированной совокупности сперматозоидов жеребца для искусственного осеменения самке данного вида млекопитающих, представителя лошадиных, осуществляют не позднее, чем через 10 ч со времени сортировки.

35. Способ по п.25, в котором стадия определения полового признака у некоего множества сперматозоидов жеребца включает стадию окрашивания сперматозоидов жеребца при содержании красителя по меньшей мере 38 кМ.

5 36. Способ по п.24, в котором стадии определения полового признака у некоего множества сперматозоидов жеребца и сортировки сперматозоидов жеребца на основании их полового признака, причем среда из капсульной жидкости для сперматозоидов жеребца содержит hepes-буфер, включают стадии

- a. создания источника клеток, поставляющего сперматозоиды жеребца для сортировки;
- b. химического координирования капсульной жидкости для создания среды из 10 капсульной жидкости для сперматозоидов жеребца, скоординированной с жидкой средой сперматозоидов как до, так и после сортировки;
- c. распознавания одного из свойств сперматозоидов жеребца;
- d. различения сперматозоидов жеребца, имеющих признак нужного пола; и
- e. собирания сперматозоидов жеребца, имеющих признак нужного пола.

15 37. Способ по п.24, в котором стадии определения полового признака у некоего множества сперматозоидов жеребца и сортировки сперматозоидов жеребца согласно определению их полового признака, причем среда из капсульной жидкости для сперматозоидов жеребца содержит hepes-буфер, включают стадии

- a. создания источника клеток, поставляющего сперматозоиды жеребца для сортировки;
- b. получения капсульной жидкости для сперматозоидов жеребца;
- c. распознавания одного из свойств сперматозоидов жеребца;
- d. различения сперматозоидов жеребца, имеющих признак нужного пола; и
- e. собирания сперматозоидов жеребца, имеющих признак нужного пола, при этом 20 ограждая сперматозоиды от столкновения с коллектором тем, что амортизирующий элемент включает исходную коллекторную жидкость на дне коллектора и при этом коллектор имеет достаточно большую конфигурацию, не допускающую столкновения 25 сперматозоидов с коллектором.

38. Способ по п.24, в котором стадии определения полового признака у некоего множества сперматозоидов жеребца и сортировка сперматозоидов жеребца согласно 30 определению их полового признака включают стадии

- a. создания источника клеток, поставляющего сперматозоиды жеребца для сортировки;
- b. получения капсульной жидкости для сперматозоидов жеребца;
- c. распознавания одного из свойств сперматозоидов жеребца;
- d. различения сперматозоидов жеребца, имеющих признак нужного пола; и
- e. собирания сперматозоидов жеребца, имеющих признак нужного пола, в коллекторную 35 жидкость на основе цитрата, содержащую около 6% яичного желтка перед началом стадии сбора.

39. Способ по п.24, дополнительно включающий стадию применения способствующего полиовуляции фармацевтического препарата, вызывающего выработку множественных 40 яйцеклеток самкой данного вида млекопитающих, представителя лошадиных, которая включает стадию введения дозы фолликулостимулирующего гормона по несколько раз в день, причем способствующий полиовуляции фармацевтический препарат вводят с интервалом в половину суток, в любые дни между 2-м и 18-м днями цикла эструса.

40. Способ по п.39, в котором введение дозы фолликулостимулирующего гормона по 45 несколько раз в день включает введение фолликулостимулирующего гормона с интервалами, составляющими примерно половину суток, в дозах 6, 6, 4, 4, 2, 2, 2 и 2 мг между 9 и 12 днями цикла эструса включительно, а также включает стадию введения 25 и 12,5 мг простагландина F-2-альфа вместе с шестой и седьмой дозами соответственно фолликулостимулирующего гормона.

50 41. Способ по п.40, в котором стадия сортировки сперматозоидов жеребца со скоростью выше или равной 1200 операций в секунду включает работу проточного цитометра в диапазоне от 5 до 50 кГц.

42. Способ по п.41, в котором стадия собирания сперматозоидов жеребца, имеющих

нужный признак, включает стадию ограждения сперматозоидов жеребца от столкновения с контейнером для сбора, причем стадия амортизации включает исходную коллекторную жидкость на дне коллектора и при этом коллектор имеет достаточно большую конфигурацию, не допускающую столкновения сперматозоидов с коллектором.

5 43. Способ по п.42, в котором стадия ограждения сперматозоидов жеребца от столкновения с контейнером для сбора, имеющим достаточно большую конфигурацию, не допускающую столкновения с ним сперматозоидов жеребца, включает стадию установки контейнера для сбора, имеющего диаметр по меньшей мере 15 миллиметров.

44. Способ разделения сперматозоидов, включающий стадии

10 a. создания источника клеток, поставляющих сперматозоиды для сортировки;

b. химического координирования капсульной жидкости для создания среды из капсульной жидкости для сперматозоидов, скоординированной с жидкой средой сперматозоидов как до, так и после сортировки;

c. распознавания одного из свойств сперматозоидов;

15 d. различения сперматозоидов в соответствии с их полом;

e. разделения сперматозоидов со скоростью по меньшей мере 1200 операций в секунду;

и

f. сбора сперматозоидов, имеющих признак нужного пола, в коллектор, снабженный амортизирующим элементом.

20 45. Способ по п.44, в котором стадия химического координирования коллекторной жидкости для создания конечной среды из коллекторной жидкости для сперматозоидов скоординирована с жидкой средой до сортировки.

46. Способ по п.44, в котором стадия создания источника клеток включает создание источника сперматозоидов быка.

25 47. Способ по п.44, в котором стадия создания источника клеток включает стадию создания источника сперматозоидов жеребца.

48. Способ по п.44, в котором стадия химического координирования капсульной жидкости для создания среды из капсульной жидкости для сперматозоидов, скоординированной с жидкой средой сперматозоидов как до, так и после сортировки, 30 включает стадию создания источника клеток, поставляющего сперматозоиды быка для сортировки, и получения капсульной среды, содержащей около 2,9% цитрата натрия.

49. Способ по п.47, в котором стадия химического координирования капсульной жидкости для создания среды из капсульной жидкости для сперматозоидов, скоординированной с жидкой средой сперматозоидов как до, так и после сортировки, 35 включает стадию создания источника клеток, поставляющего сперматозоиды жеребца для сортировки, и получения капсульной среды, содержащей hepes-буфер.

50. Способ по п.44, в котором стадия создания источника клеток включает стадию обеспечения первоначального питательного вещества для клеток, а также включает стадию обеспечения питательного вещества коллекторной жидкости для клеток, причем 40 стадия собирания имеющих нужный признак клеток в коллекторную жидкость включает стадию балансирования количества первоначального питательного вещества и питательного вещества коллекторной жидкости по завершении стадии сбора клеток.

51. Способ по п.44, в котором стадия собирания имеющих нужный признак клеток в коллекторную жидкость включает стадию получения коллекторной жидкости на основе 45 цитрата, содержащей около 6% яичного желтка перед началом стадии сбора.

52. Способ по п.51, в котором стадия создания источника клеток включает стадию создания источника сперматозоидов быка.

53. Способ по п.44, дополнительно включающий стадию осеменения млекопитающего с использованием сортированной совокупности сперматозоидов для осеменения.

50 54. Способ по п.44, дополнительно включающий стадию собирания сперматозоидов, имеющих признак нужного пола, которая включает амортизацию для защиты сперматозоидов от столкновения с коллектором, причем защита сперматозоидов включает сбор сперматозоидов в исходную коллекторную жидкость на дне коллектора и при этом

коллектор имеет достаточно большую конфигурацию, не допускающую столкновения сперматозоидов с коллектором.

5 55. Способ по п.54, в котором стадия собирания сперматозоидов в исходную коллекторную жидкость на дне коллектора, причем коллектор имеет достаточно большую конфигурацию, не допускающую столкновения сперматозоидов с коллектором, включает стадию установки контейнера для сбора.

56. Способ по п.55, в котором стадия установки контейнера для сбора включает установку контейнера для сбора, имеющего диаметр по меньшей мере 15 мм.

10 57. Способ по п.44, в котором стадия сортировки клеток со скоростью по меньшей мере 1200 операций в секунду включает стадию работы проточного цитометра в диапазоне от 5 до 50 кГц.

58. Способ сортировки сперматозоидов, включающий стадии

a. создания источника клеток, поставляющего сперматозоиды для сортировки;

15 b. получения капсульной жидкости для создания среды из капсульной жидкости для сперматозоидов;

c. распознавания одного из свойств сперматозоидов;

d. различения сперматозоидов в соответствии с их полом;

e. сортировки сперматозоидов со скоростью по меньшей мере 1200 операций в секунду;

и

20 f. собирания сперматозоидов, имеющих признак нужного пола, включающего стадию амортизации для защиты сперматозоидов от столкновения с коллектором, причем амортизирующий элемент включает исходную коллекторную жидкость на дне коллектора и при этом коллектор имеет достаточно большую конфигурацию, не допускающую столкновения сперматозоидов с коллектором.

25 59. Способ по п.58, в котором стадия амортизации для защиты сперматозоидов от столкновения с коллектором включает стадию установки контейнера для сбора.

60. Способ по п.58, в котором стадия установки контейнера для сбора включает установку контейнера для сбора, имеющего диаметр по меньшей мере 15 мм.

30 61. Способ по п.60, дополнительно включающий стадию получения сортированной совокупности сперматозоидов для искусственного осеменения.

62. Способ получения множественных эмбрионов заданного пола от самки одного из видов млекопитающих, включающий

35 a. достижение полиовуляции у самки данного вида млекопитающих для получения по меньшей мере двух яйцеклеток, причем способствующий полиовуляции фармацевтический препарат вводят с интервалами в 12 ч, в любые дни между 2-м и 18-м днями цикла эструса;

b. определение пола у некоего множества сперматозоидов самца данного вида млекопитающих;

c. разделение сперматозоидов по признаку пола согласно способу по п.44 или 58;

40 d. введение разделенных сперматозоидов в матку самки данного вида млекопитающих после наступления эструса; и

e. оплодотворение множества яйцеклеток в матке для получения множественных эмбрионов заданного пола.

45 63. Способ по п.62, в котором введение фармацевтического препарата, способствующего полиовуляции, проводят с помощью по меньшей мере семи инъекций, проводимых с интервалами в 12 ч, из которых по меньшей мере шестая и седьмая инъекции синхронизированы с эструсом.

64. Способ по п.63, в котором введение сортированных сперматозоидов в матку включает введение сперматозоидов в оба рога матки.

50 65. Способ по п.64, в котором введение сперматозоидов в оба рога матки включает введение сперматозоидов приблизительно между 20 и 24 ч после наступления эструса.

66. Способ по п.62, в котором введение фармацевтического препарата, способствующего полиовуляции и вызывающего образование множественных яйцеклеток, включает введение фолликулостимулирующего гормона несколько раз в день.

67. Способ по п.66, в котором достижение полиовуляции у данного млекопитающего с целью получения по меньшей мере двух яйцеклеток дополнительно включает совместное введение фолликулостимулирующего гормона и простагландина F-2-альфа, причем указанное введение синхронизируют с экстрасом.

5 68. Способ по п.67, в котором фолликулостимулирующий гормон вводят с интервалами примерно в 12 ч в дозах 6, 6, 4, 4, 2, 2, 2 и 2 мг между 9 и 12 днями цикла гормону при шестой и седьмой инъекции фолликулостимулирующего гормона в дозах 25 и 12,5 мг.

69. Способ по п.62, дополнительно включающий стадии

10 а. окрашивания сперматозоидов самца млекопитающего с помощью 38 мкМ красителя;
б. сортировки сперматозоидов в соответствии с полом со скоростью по меньшей мере 1200 операций в секунду; и
с. концентрирования сортированных сперматозоидов.

15 70. Способ по п.62, в котором введение сортированных сперматозоидов включает использование сортированной совокупности сперматозоидов для искусственного осеменения.

Приоритет по пунктам:

31.12.1997 по пп.1-17, 21-38, 41-57,

29.01.1998 по пп.18-20, 39-40, 58-70.

20

25

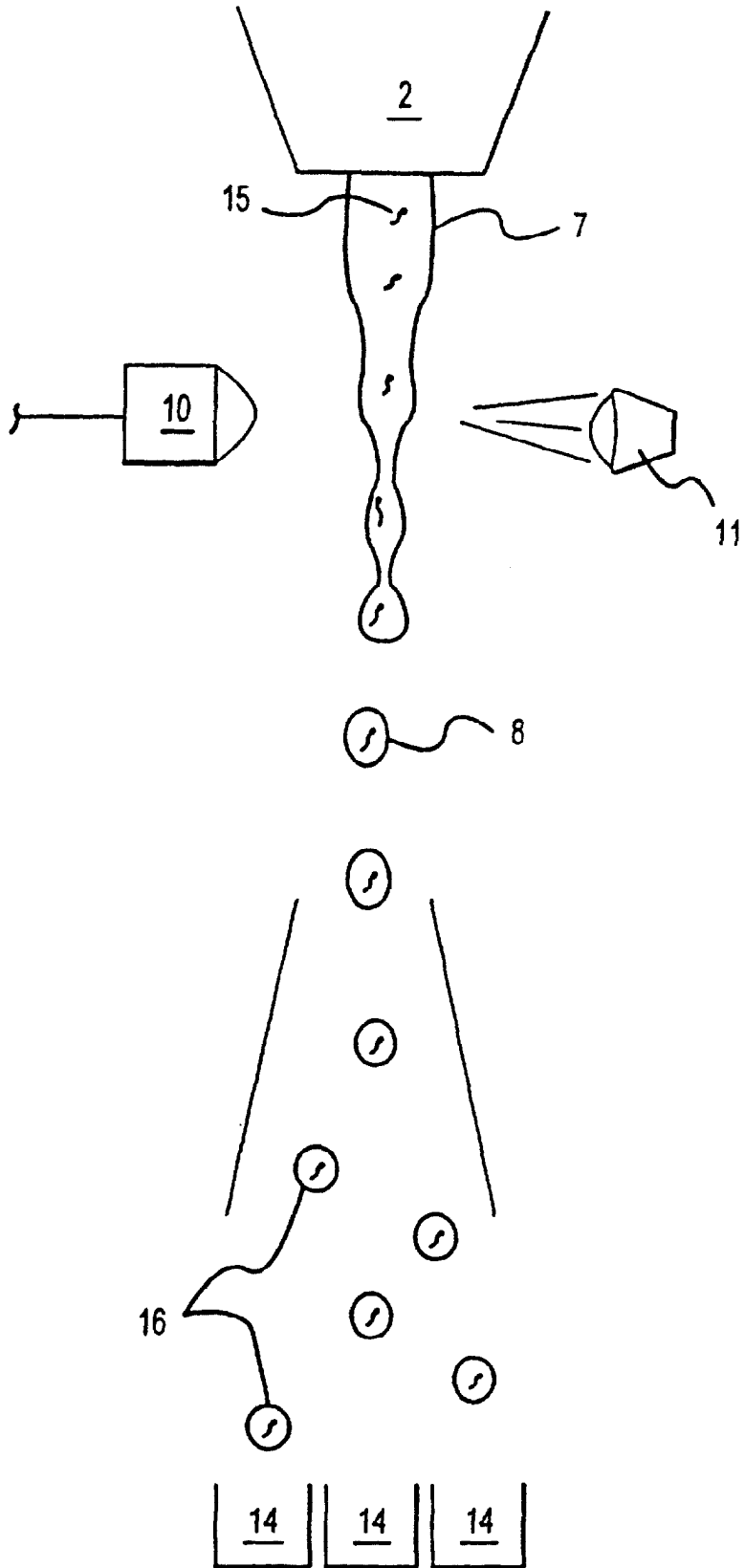
30

35

40

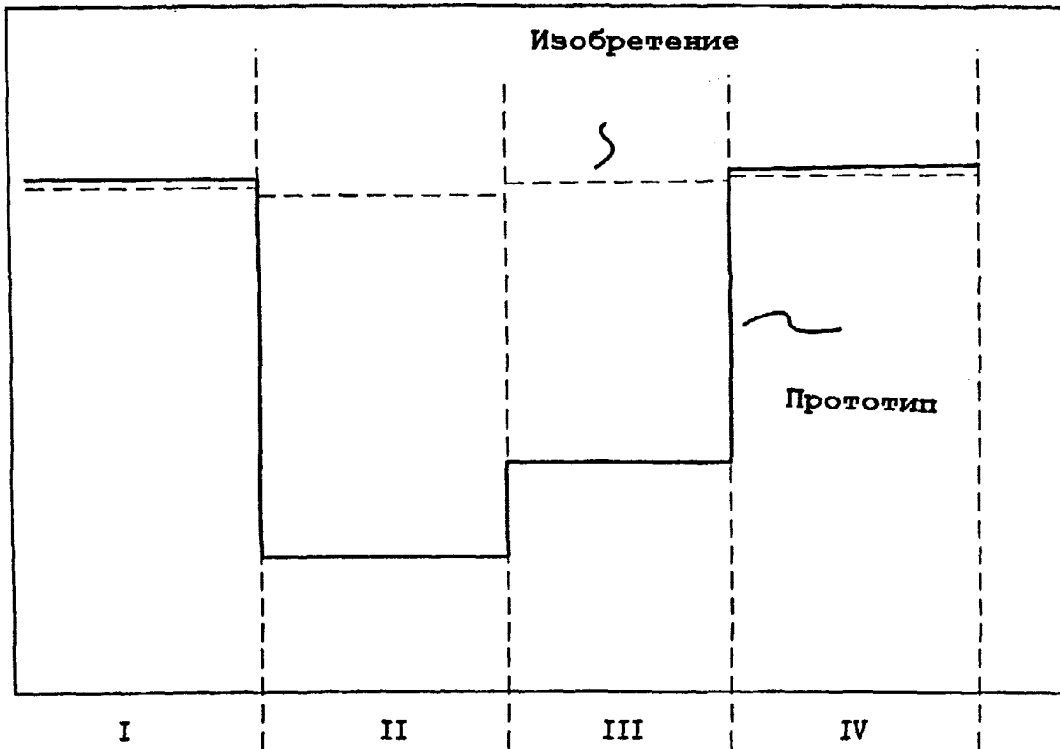
45

50



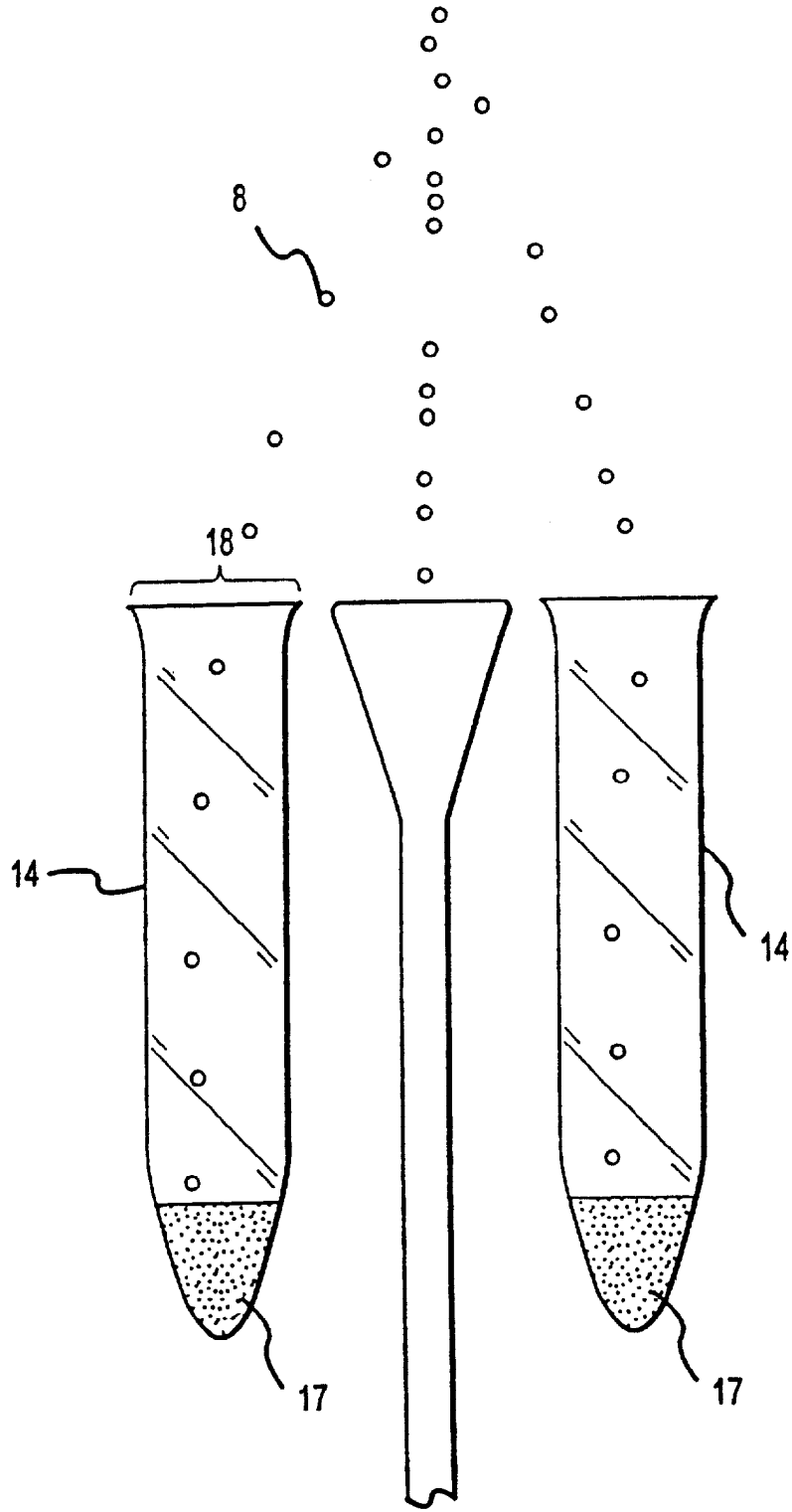
Фиг. 2

Химический фактор



Фиг. 3

фаза / Время



Фиг. 4