

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
A01N 1/02
C12M 3/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01810748.6

[43] 公开日 2003 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 1433267A

[22] 申请日 2001.5.9 [21] 申请号 01810748.6

[30] 优先权

[32] 2000. 5. 9 [33] US [31] 60/203,089

[32] 2000. 10. 12 [33] US [31] 60/239,752

[32] 2001. 2. 10 [33] US [31] 60/267,571

[86] 国际申请 PCT/US01/15150 2001.5.9

[87] 国际公布 WO01/85913 英 2001.11.15

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.5

[71] 申请人 XY 公司

地址 美国科罗拉多州

[72] 发明人 肯尼思·M·埃文斯

埃里克·B·范·芒斯特

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

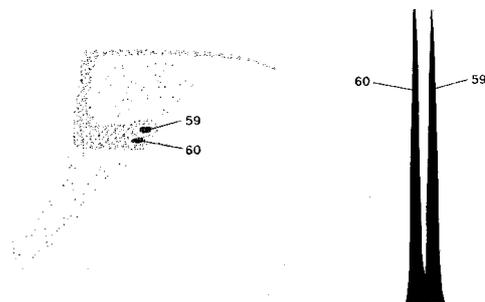
代理人 丁香兰

权利要求书 31 页 说明书 62 页 附图 28 页

[54] 发明名称 具有高纯度 X - 染色体和 Y - 染色体的精子群

[57] 摘要

筛选非天然产生的具有高纯度的精子细胞群(15)以及根据例如质量、体积、取向或发射光特征区分精子细胞(28)的技术,包括分析方法和装置,例如成形光束的光学装置(30)和检测器(32)。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，该方法包括如下步骤：

- a. 从雄性的哺乳动物物种中收集精子细胞；
- 5 b. 确定所述精子细胞的性区别特征；
- c. 根据所述的性区别特征区分所述精子细胞；
- d. 将区分的精子细胞分离成带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子细胞群；并且
- 10 e. 生产分离的带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子细胞群，每种精子细胞群的纯度大于 90%。

2. 如权利要求 1 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的根据所述性区别特征区分所述精子细胞的步骤包括，测定所述精子细胞的核 DNA 的量。

15 3. 如权利要求 1 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的根据所述性区别特征区分所述精子细胞的步骤包括，测定含有所述量的 DNA 的囊状物的体积。

4. 如权利要求 3 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述测定含有所述量的 DNA 的囊状物的体积的步骤包括，确定所述精子细胞内的核的体积。

20 5. 如权利要求 3 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的测定含有所述量的 DNA 的囊状物的体积的步骤包括，确定精子细胞头部的体积。

6. 如权利要求 5 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的测定含有所述量的 DNA 的囊状物的体积的步骤

骤还包括步骤:

- a. 产生具有初始波形特征的电磁辐射束;
 - b. 用所述电磁辐射束穿过具有所述体积的含有所述量的 DNA 的囊状物;
 - 5 c. 经穿过具有所述体积的囊状物而改变所述电磁辐射束的初始波形特征; 以及
 - d. 分析改变的波形特征。
7. 如权利要求 6 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其中经穿过具有所述体积的囊状物而改变所述电磁辐射束的初始波形特征的步骤包括, 移动所述电磁辐射束的初始波形的相位。
- 10 8. 如权利要求 6 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其还包括, 将具有移动相位的电磁辐射束与具有所述初始波形特征的所述电磁辐射束叠加的步骤。
9. 如权利要求 8 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其还包括, 将叠加的电磁辐射束的电磁辐射强度与具有初始波形特征的电磁辐射束的强度比较的步骤
- 15 10. 如权利要求 9 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其还包括, 根据所述叠加的电磁辐射束和具有初始波形特征的电磁辐射束之间的光强度的差异, 确定含有所述量的 DNA 的囊状物的体积的步骤。
- 20 11. 如权利要求 2 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其还包括步骤:
- a. 将精子细胞引入液流;
 - b. 分析所述液流中夹带的精子细胞;
 - 25 c. 形成液滴, 其多数液滴具有一个所述被夹带的精子细胞;
 - d. 根据所述液滴夹带的精子细胞的性区别特征, 使所述的每一个液

滴带上不同的电荷;

e. 使所述的每一个液滴发生偏转; 以及

f. 根据所述液滴夹带的精子细胞的性区别特征, 区分收集所述液滴。

5 12. 如权利要求 11 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其还包括, 保持所述精子细胞核内的所述量的 DNA 不被染色的步骤。

13. 如权利要求 11 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其还包括, 对所述精子细胞核内的所述量的 DNA 进行
10 染色的步骤。

14. 如权利要求 13 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其还包括, 对所述精子细胞核内的被染色的 DNA 进行照射的步骤。

15. 如权利要求 14 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的
15 精子细胞的方法, 其还包括, 检测经照射的所述精子细胞核内的被染色的 DNA 所发射的荧光的步骤。

16. 如权利要求 15 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其中所述的检测经照射的所述精子细胞核内的被染色的 DNA 所发射的荧光的步骤包括, 用光电倍增管生成信号。

20 17. 如权利要求 16 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其还包括, 在典型的操作电压以外操作光电倍增管的步骤。

18. 如权利要求 14 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其中对所述精子细胞核内的被染色的 DNA 进行照射的
25 步骤还包括, 产生具有降低高度的照射光束的图案。

19. 如权利要求 18 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的

精子细胞的方法，其中所述降低的高度为，等于所述精子细胞沿纵轴的长度至是所述的精子细胞沿纵轴的长度三倍。

20. 如权利要求 19 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的精子细胞沿纵轴的长度约为 9 微米，并且所述照射光束图案的高度约为 20 微米。

21. 如权利要求 18 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的形成液滴的步骤包括，形成具有足够大小的液滴以包封所述精子细胞。

22. 如权利要求 21 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其还包括，从具有管口的喷嘴中喷出所述液流的步骤，其中所述的管口具有 70 微米的直径。

23. 如权利要求 22 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其还包括步骤：

- a. 针对检测器，定向所述的精子细胞；
- b. 检测对精子细胞针对所述检测器的取向具有不同响应特征的光；
- c. 将对精子细胞的取向具有不同响应特征的所述光转换成至少一种包含精子细胞的取向信息的信号；和
- d. 确定所述精子细胞针对所述检测器的取向。

24. 如权利要求 23 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其还包括，根据所确定的精子细胞针对检测器的取向，区别收集所述液滴。

25. 如权利要求 1、6、12、13、17、18、21 或 23 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子细胞群的纯度为选自由约 90% 到约 100%之间，约 91% 到约 100%之间，约 92% 到约 100%之间，约 93% 到约 100%之间，约 94% 到约 100%之间，约 95% 到约 100%之间，约 96% 到

约 100%之间,约 97% 到约 100%之间,约 98% 到约 100%之间,约 99% 到约 100%之间所组成的组。

26. 如权利要求 1、6、12、13、17、18、21 或 23 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法,其还包括建立可分离事件
5 件的速率的步骤,该可分离事件的速率为选自由每秒至少 5000 个可分离事件,每秒至少 6000 个可分离事件,每秒至少 7000 个可分离事件,每秒至少 8000 个可分离事件,每秒至少 9000 个可分离事件,每秒至少 10,000 个可分离事件,每秒至少 11,000 个可分离事件,每秒至少 12,000 个可分离事件,每秒至少 13,000 个可分离事件,每秒至少 14,000 个可分离事件,每秒
10 至少 15,000 个可分离事件,每秒至少 16,000 个可分离事件,每秒至少 17,000 个可分离事件,每秒至少 18,000 个可分离事件,每秒至少 19,000 个可分离事件,每秒至少 20,000 个可分离事件,每秒至少 21,000 个可分离事件所组成的组。

27. 如权利要求 1、6、12、13、18、21 或 23 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法,其中所述的分离所述精子细胞
15 的步骤包括分离速率,该速率为选自由每秒至少 500 个分离物,每秒至少 1,000 个分离物,每秒至少 2,000 个分离物,每秒至少 3,000 个分离物,每秒至少 4,000 个分离物,每秒至少 5,000 个分离物,每秒至少 6,000 个分离物,每秒至少 7,000 个分离物,每秒至少 8,000 个分离物,每秒至少 9,000
20 个分离物,每秒至少 10,000 个分离物所组成的组。

28. 如权利要求 1、6、12、13、18、21 或 23 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法,其中所述的形成具有一个被夹带的精子细胞的液滴的步骤包括液滴形成速率,该速率选自由每秒至少
10,000 个液滴,每秒至少 20,000 个液滴,每秒至少 30,000 个液滴,每秒至少
25 少 40,000 个液滴,每秒至少 50,000 个液滴,每秒至少 60,000 个液滴,每秒至少 70,000 个液滴,每秒至少 80,000 个液滴,每秒至少 90,000 个液滴,

每秒至少 100,000 个液滴所组成的组。

29. 如权利要求 1 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的哺乳动物物种包括牛科哺乳动物。

30. 如权利要求 1 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的哺乳动物物种包括马科哺乳动物。

31. 如权利要求 1 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的哺乳动物物种包括羊科哺乳动物。

32. 分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，该装置包括：

10 a. 具有精子头部的精子细胞，其中在带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞之间，所述的精子头部具有体积差异；

b. 电磁辐射束，该电磁辐射束具有对所述带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的所述体积差异产生不同响应的初始波形特征；

15 c. 对改变的所述电磁辐射束的波形特征发生响应的检测器；

d. 与所述检测器连接的分析器，其中所述的分析器根据改变的所述波形特征区分带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞之间的体积差异。

20 33. 如权利要求 32 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其还包括，引入精子细胞的液流。

34. 如权利要求 33 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其还包括，从所述液流脱出的液滴，其多数液滴具有一个被夹带的精子细胞。

25 35. 如权利要求 34 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其中所述的从液流脱出的液滴具有足够的大小以使得一个精子细胞被包封在所述液滴内。

36. 如权利要求 35 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其还包括，具有直径约为 100 微米的管口的喷嘴。

37. 如权利要求 36 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其还包括，与所述分析器连接的液滴充电器，其中根据
5 带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞之间的体积差异，所述的液滴带上不同的电荷。

38. 如权利要求 37 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其还包括液滴分离器，其中所述的液滴分离器根据所述液滴的电荷分离所述液滴。

10 39. 如权利要求 38 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其还包括至少一个收集容器，其中装有收集的作为带 X-染色体的群体的含有带 X-染色体的精子细胞的液滴。

40. 如权利要求 38 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其还包括至少一个收集容器，其中装有被收集的作为带
15 Y-染色体的群体的含有带 Y-染色体的精子细胞的液滴。

41. 如权利要求 38 或 39 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其中所述的带 X-染色体的群体和所述的带 Y-染色体的群体的精子细胞的纯度为选自约 90%到约 100%之间，约 91%到约 100%之间，约 92%到约 100%之间，约 93%到约 100%之间，约 94%到约
20 100%之间，约 95%到约 100%之间，约 96%到约 100%之间，约 97%到约 100%之间，约 98%到约 100%之间，约 99%到约 100%之间所组成的组。

42. 如权利要求 41 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其还包括可分离事件的速率，其中所述的可分离事件的速率为选自由每秒至少 5000 个可分离事件，每秒至少 6000 个可分离事件，
25 每秒至少 7000 个可分离事件，每秒至少 8000 个可分离事件，每秒至少 9000 个可分离事件，每秒至少 10,000 个可分离事件，每秒至少 11,000 个可分离

事件，每秒至少 12,000 个可分离事件，每秒至少 13,000 个可分离事件，每秒至少 14,000 个可分离事件，每秒至少 15,000 个可分离事件，每秒至少 16,000 个可分离事件，每秒至少 17,000 个可分离事件，每秒至少 18,000 个可分离事件，每秒至少 19,000 个可分离事件，每秒至少 20,000 个可分离事件，每秒至少 21,000 个可分离事件所组成的组。

43. 如权利要求 42 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其还包括分离速率，该速率为选自由每秒至少 500 个分离物，每秒至少 1,000 个分离物，每秒至少 2,000 个分离物，每秒至少 3,000 个分离物，每秒至少 4,000 个分离物，每秒至少 5,000 个分离物，每秒至少 6,000 个分离物，每秒至少 7,000 个分离物，每秒至少 8,000 个分离物，每秒至少 9,000 个分离物，每秒至少 10,000 个分离物，每秒至少 11,000 个分离物所组成的组。

44. 如权利要求 43 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其还包括液滴形成的速率，该速率为选自由每秒至少 10,000 个液滴，每秒至少 20,000 个液滴，每秒至少 30,000 个液滴，每秒至少 40,000 个液滴，每秒至少 50,000 个液滴，每秒至少 60,000 个液滴，每秒至少 70,000 个液滴，每秒至少 80,000 个液滴，每秒至少 90,000 个液滴，每秒至少 100,000 个液滴所组成的组。

45. 如权利要求 44 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其中所述的检测器包括至少一个光电倍增管，该至少一个光电倍增管将所述的电磁照射转换成至少一种信号，并且所述的光电倍增管具有典型的操作电压范围，其中所述的光电倍增管是在所述典型的操作电压范围之外操作的。

46. 如权利要求 45 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其中所述的光电倍增管的典型的操作电压范围在约 400 伏特到 999 伏特之间。

47. 如权利要求 46 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其中所述的光电倍增管在约 0 伏特到约 300 伏特的范围内操作。

48. 如权利要求 41 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其中所述的哺乳动物物种包括牛科哺乳动物。

49. 如权利要求 41 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其中所述的哺乳动物物种包括马科哺乳动物。

50. 如权利要求 41 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的装置，其中所述的哺乳动物物种包括羊科哺乳动物。

51. 分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，该方法包括步骤：

- a. 从雄性哺乳动物物种中收集精子细胞；
- b. 测定含有所述精子细胞的核 DNA 的囊状物的体积；
- c. 根据所述含有精子细胞的核 DNA 的所述囊状物的体积，区分带

X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞。

52. 如权利要求 51 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的测定含有所述 DNA 的囊状物的体积的步骤包括，确定所述电磁辐射的相位移动。

53. 如权利要求 52 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的测定含有所述 DNA 的囊状物的体积的步骤包括：

- a. 产生具有初始波形特征的电磁辐射束；
- b. 用具有所述初始波形特征的电磁辐射束穿过具有所述体积的含有所述 DNA 的囊状物；

- c. 经穿过具有所述体积的囊状物而改变所述的初始波形特征；以及
- d. 分析改变的所述电磁辐射束的波形特征。

54. 如权利要求 53 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的经穿过具有所述体积的囊状物而改变所述初始波形特征的步骤包括，移动所述电磁辐射束的初始波形特征的相位。

55. 如权利要求 54 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其还包括，将所述初始波形特征和具有移动相位的波形特征的叠加的步骤。

56. 如权利要求 55 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其还包括，将所述初始波形特征的强度同叠加的波形强度相比较的步骤。

57. 如权利要求 56 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其还包括根据所述叠加的波形特征和所述初始波形特征之间的光强度的差异，确定含所述 DNA 的囊状物的体积的步骤。

58. 如权利要求 57 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其还包括步骤：

- a. 将所述精子细胞引入液流；
- b. 形成液滴，其多数液滴具有一个所述被夹带的精子细胞；
- c. 根据测定的含有所述精子细胞的核 DNA 的囊状物的体积，使所述的每一个液滴带上不同的电荷；
- d. 使所述的每一个液滴偏转；
- e. 根据含有所述 DNA 的囊状物的体积，区别收集每一个所述液滴；并且
- f. 生产带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子细胞群。

59. 如权利要求 58 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其还包括，保持所述精子细胞核内的所述量的 DNA 不被染色的步骤。

60. 如权利要求 59 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的

精子细胞的方法，其还包括，形成具有足够大小的液滴以使所述精子细胞被包封在液滴内的步骤。

61. 如权利要求 60 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其还包括，从具有管口的喷嘴中喷射所述液流的步骤，
5 其中所述的管口的直径为 100 微米。

62. 如权利要求 58 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其还包括步骤：

- a. 检测具有精子细胞取向特征的信号；
- b. 将具有精子细胞取向特征的所述信号当作具有定向的精子细胞特征
10 的信号；
- c. 确定具有未定向的精子细胞特征的所述精子细胞；以及
- d. 区别收集具有未定向的精子细胞特征的所述精子细胞。

63. 如权利要求 58 或 62 所述的分离带 X-染色体和带 Y-染色体的精子细胞的方法，其中所述的带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子
15 细胞群的纯度是选自由 90%到约 100%之间，约 91%到约 100%之间，约 92%到约 100%之间，约 93%到约 100%之间，约 94%到约 100%之间，约 95%到约 100%之间，约 96%到约 100%之间，约 97%到约 100%之间，约 98%到约 100%之间，约 99%到约 100%之间所组成的组。

64. 如权利要求 63 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的
20 精子细胞的方法，其还包括建立可分离事件的速率的步骤，该可分离事件的速率为选自由每秒至少 5000 个可分离事件，每秒至少 6000 个可分离事件，每秒至少 7000 个可分离事件，每秒至少 8000 个可分离事件，每秒至少 9000 个可分离事件，每秒至少 10,000 个可分离事件，每秒至少 11,000 个可分离事件，每秒至少 12,000 个可分离事件，每秒至少 13,000 个可分离
25 事件，每秒至少 14,000 个可分离事件，每秒至少 15,000 个可分离事件，每秒至少 16,000 个可分离事件，每秒至少 17,000 个可分离事件，每秒至少

18,000 个可分离事件, 每秒至少 19,000 个可分离事件, 每秒至少 20,000 个可分离事件, 每秒至少 21,000 个可分离事件所组成的组。

65. 如权利要求 64 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其中所述的分离所述精子细胞的步骤包括分离速率, 该速率为选自每秒至少 500 个分离物, 每秒至少 1,000 个分离物, 每秒至少 2,000 个分离物, 每秒至少 3,000 个分离物, 每秒至少 4,000 个分离物, 每秒至少 5,000 个分离物, 每秒至少 6,000 个分离物, 每秒至少 7,000 个分离物, 每秒至少 8,000 个分离物, 每秒至少 9,000 个分离物, 每秒至少 10,000 个分离物所组成的组。

66. 如权利要求 65 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其中所述的形成具有一个被夹带的精子细胞的液滴的步骤包括液滴形成的速率, 该速率选自每秒至少 10,000 个液滴, 每秒至少 20,000 个液滴, 每秒至少 30,000 个液滴, 每秒至少 40,000 个液滴, 每秒至少 50,000 个液滴, 每秒至少 60,000 个液滴, 每秒至少 70,000 个液滴, 每秒至少 80,000 个液滴, 每秒至少 90,000 个液滴, 每秒至少 100,000 个液滴所组成的组。

67. 如权利要求 51 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其中所述的哺乳动物物种包括牛科哺乳动物。

68. 如权利要求 51 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其中所述的哺乳动物物种包括马科哺乳动物。

69. 如权利要求 51 所述的分离带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的方法, 其中所述的哺乳动物物种包括羊科哺乳动物。

70. 一种区分粒子的方法, 该方法包括步骤:

- a. 收集不对称的粒子;
- b. 用流式细胞仪建立所述液流;
- c. 将所述非对称的粒子引入所述液流;

- d. 针对检测器, 定向所述非对称的粒子;
- e. 检测对非对称的粒子针对所述检测器的取向具有不同特征性响应的光;
- g. 将所述对非对称的粒子的取向具有不同特征性响应的光转化成为至少一种含有非对称的粒子的取向信息的信号;
- 5 h. 分析非对称的粒子的取向信息; 和
- i. 测定所述非对称的粒子针对所述检测器的取向。
71. 如权利要求 70 所述的区分粒子的方法, 其中所述的液流包括鞘液。
72. 如权利要求 70 所述的区分粒子的方法, 其中所述的检测器包括一个光电倍增管。
- 10 73. 如权利要求 72 所述的区分粒子的方法, 其中所述的光包括荧光。
74. 如权利要求 73 所述的区分粒子的方法, 其中所述的荧光发射自结合到所述非对称的粒子上的光发射材料。
75. 如权利要求 70 所述的区分粒子的方法, 其中所述的分析非对称的粒子的取向信息的步骤包括步骤:
- 15 a. 经过一段时间绘制电子信号图;
- b. 对相应于所述电子信号的图的面积求积分; 以及
- c. 将所述图的面积积分当作定向的非对称的粒子的集合。
76. 如权利要求 70 所述的区分粒子的方法, 其还包括, 根据确定的所述非对称的粒子针对所述检测器的取向, 区分收集所述非对称的粒子。
- 20 77. 如权利要求 70 所述的区分粒子的方法, 其中所述的非对称的粒子是来自雄性哺乳动物物种的精子细胞。
78. 如权利要求 70 所述的区分粒子的方法, 其还包括步骤:
- a. 测定含有所述精子细胞的核 DNA 的囊状物的体积; 和
- 25 b. 根据含有所述精子细胞的核 DNA 的囊状物的体积, 区分所述带 X-染色体精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞。

79. 如权利要求 78 所述的区分粒子的方法，其中所述的含有 DNA 的囊状物包括精子头部。

80. 如权利要求 78 所述的区分粒子的方法，其中所述的测定含有 DNA 的囊状物的体积的步骤包括：

- 5 a. 产生具有初始波形特征的电磁辐射束；
- b. 用具有初始波形特征的电磁辐射束穿过具有所述体积的含有 DNA 的囊状物；
- c. 经穿过具有所述体积的囊状物而改变所述电磁辐射束的初始波形特征；
- 10 d. 分析改变的波形特征。

81. 如权利要求 80 所述的区分粒子的方法，其中所述的经穿过具有所述体积的囊状物而改变所述电磁辐射束的初始波形特征的步骤包括，移动所述初始波形特征的相位。

82. 如权利要求 81 所述的区分粒子的方法，其还包括，将所述初始波形特征与所述移动了相位的波形特征进行叠加的步骤。

83. 如权利要求 82 所述的区分粒子的方法，其还包括，对所述初始波形特征的强度和叠加的波形特征的强度进行比较的步骤。

84. 如权利要求 83 所述的区分粒子方法，其还包括，根据所述强度的差异，确定含有所述 DNA 的囊状物的体积的步骤。

20 85. 如权利要求 80 所述的区分粒子的方法，其还包括步骤：

- a. 形成液滴，其多数液滴具有一个所述被夹带的精子细胞；
- b. 根据确定的含有所述精子细胞的核 DNA 的囊状物的体积，使每一个液滴带上不同的电荷；以及
- c. 偏转每一个所述液滴；
- 25 d. 根据所述液滴的电荷收集每一个液滴；以及
- e. 产生带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子细胞群。

86. 如权利要求 77 所述的区分粒子的方法，其还包括步骤：

- a. 形成液滴，其多数液滴具有一个所述被夹带的精子细胞；
- b. 根据所述精子细胞的核 DNA 的量，使每一个液滴带上不同的电荷；
- 5 c. 偏转每一个所述液滴；
- d. 根据所述液滴的电荷收集每一个液滴；以及
- e. 产生带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子细胞群。

87. 如权利要求 85 或 86 所述的区分粒子的方法，其中所述的形成具有一个所述被夹带的精子细胞的液滴步骤包括，形成的液滴具有足够的大小以包封所述精子细胞，其中所述的精子细胞包括一个完整的具有尾部的活精子细胞。

88. 如权利要求 87 所述的区分粒子的方法，其还包括，将所述液流从具有管口的喷嘴中喷射出来的步骤，其中所述的管口的直径为 100 微米。

89. 如权利要求 88 所述的区分粒子的方法，其中所述的带 X 染色体精子细胞群和所述的带 Y 染色体的精子细胞群的纯度为选自由 90%到约 100%之间，约 91%到约 100%之间，约 92%到约 100%之间，约 93%到约 100%之间，约 94%到约 100%之间，约 95%到约 100%之间，约 96%到约 100%之间，约 97%到约 100%之间，约 98%到约 100%之间，约 99%到约 100%之间所组成的组。

90. 如权利要求 88 所述的区分粒子的方法，其还包括，建立可分离事件的速率的步骤，其中所述的可分离事件的速率是选自由每秒至少 5000 个可分离事件，每秒至少 6000 个可分离事件，每秒至少 7000 个可分离事件，每秒至少 8000 个可分离事件，每秒至少 9000 个可分离事件，每秒至少 10,000 个可分离事件，每秒至少 11,000 个可分离事件，每秒至少 12,000 个可分离事件，每秒至少 13,000 个可分离事件，每秒至少 14,000 个可分离事件，每秒至少 15,000 个可分离事件，每秒至少 16,000 个可分离事件，每

秒至少 17,000 个可分离事件, 每秒至少 18,000 个可分离事件, 每秒至少 19,000 个可分离事件, 每秒至少 20,000 个可分离事件, 每秒至少 21,000 个可分离事件所组成的组。

5 91. 如权利要求 88 所述的区分粒子的方法, 其中所述的分离所述精子细胞的步骤包括分离速率, 该速率为选自由每秒至少 500 个分离物, 每秒至少 1,000 个分离物, 每秒至少 2,000 个分离物, 每秒至少 3,000 个分离物, 每秒至少 4,000 个分离物, 每秒至少 5,000 个分离物, 每秒至少 6,000 个分离物, 每秒至少 7,000 个分离物, 每秒至少 8,000 个分离物, 每秒至少 9,000 个分离物, 每秒至少 10,000 个分离物所组成的组。

10 92. 如权利要求 88 所述的区分粒子的方法, 其中所述的形成具有一个被夹带的精子细胞的液滴的步骤包括液滴形成速率, 该速率选自由每秒至少 10,000 个液滴, 每秒至少 20,000 个液滴, 每秒至少 30,000 个液滴, 每秒至少 40,000 个液滴, 每秒至少 50,000 个液滴, 每秒至少 60,000 个液滴, 每秒至少 70,000 个液滴, 每秒至少 80,000 个液滴, 每秒至少 90,000 个液滴, 每秒至少 100,000 个液滴所组成的组。

93. 如权利要求 77 所述的区分粒子的方法, 其中所述的哺乳动物物种包括牛科哺乳动物。

94. 如权利要求 77 所述的区分粒子的方法, 其中所述的哺乳动物物种包括马科哺乳动物。

20 95. 如权利要求 77 所述的区分粒子的方法, 其中所述的哺乳动物物种包括羊科哺乳动物。

96. 粒子区分装置, 该装置包括:

- a. 至少一种在液流内具有取向特征的非对称的粒子;
- b. 产生对所述非对称的粒子发生响应的辐射束的辐射源;
- 25 c. 聚焦所述辐射束的光学装置;
- d. 与所述非对称的粒子结合的光发射材料, 其中所述的光发射

材料发射对所述辐射束发生响应的光;

e. 根据所述粒子的取向特征,对从所述光发射材料中发射出的光产生不同响应的检测器;以及

5 f. 与所述检测器连接的分析器,其中所述的分析器根据所述液中粒子的取向,区分所述非对称粒子。

97. 如权利要求 96 所述的粒子区分装置,其中所述的至少一个非对称的粒子包括至少一个精子细胞。

98. 如权利要求 96 所述的粒子区分装置,其中所述的光学装置聚焦光束图案,该图案具有的高度为,等于所述非对称的粒子沿纵轴的长度至是
10 非对称的粒子沿纵轴的长度的约三倍。

99. 如权利要求 98 所述的粒子区分装置,其中所述的至少一个精子细胞具有头部,其沿纵轴的长度为约 9 微米,并且其中所述的辐射图案具有约 20 微米的高度。

100. 如权利要求 96 所述的粒子区分装置,其中所述的至少一个具有取向特征的非对称的粒子还包括,至少一个粒子的区别特征。
15

101. 如权利要求 96 中所述的粒子区分装置,其中所述的结合到至少一个非对称粒子上的光发射材料包括与雄性哺乳动物物种的精子细胞的核 DNA 相结合的染色剂。

102. 如权利要求 101 所述的粒子区分装置,其中所述的粒子区别特征
20 包括,在所述带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体精子细胞的核 DNA 上结合的染色剂的量的差异。

103. 如权利要求 96 所述的粒子区分装置,其中所述的检测器包括至少一个光电倍增管,该光电倍增管具有典型的操作电压范围,并且所述的光电倍增管是在典型的操作电压范围以外操作的。

25 104. 如权利要求 103 所述的粒子区分装置,其中所述的光电倍增管的典型的操作电压范围是从约 400 伏特到约 999 伏特。

105. 如权利要求 104 所述的粒子区分装置，其中所述的光电倍增管的操作范围从约 0 伏特到约 300 伏特。

106. 如权利要求 96 所述的粒子区分装置，其还包括从所述液流中脱出形成的液滴，其多数液滴具有至少一个所述被夹带的非对称的粒子。

5 107. 如权利要求 106 所述的粒子区分装置，其中所述的从液流中脱出的液滴具有足够的大小以包封一个所述的精子细胞，其中所述的精子细胞包括完整的带尾部的活精子细胞。

108. 如权利要求 107 所述的粒子区分装置，其还包括一个具有直径约为 100 微米管口的喷嘴。

10 109. 如权利要求 106 所述的粒子区分装置，其还包括与所述分析器连接的液滴充电器，其中根据结合到带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的核 DNA 上的染色剂的量的不同，所述的液滴带上不同的电荷。

15 110. 如权利要求 109 所述的粒子区分装置，其还包括与所述分析器连接的液滴充电器，其中根据所述粒子的体积的差异，所述的液滴带上不同的电荷，并且其中所述的粒子的体积差异包括带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞之间的差异。

111. 如权利要求 110 所述的粒子区分装置，其还包括液滴分离器，其中所述的液滴分离器根据所述液滴的电荷分离所述液滴。

20 112. 如权利要求 111 所述的粒子区分装置，其还包括至少一个收集容器，其中装有收集的作为带 X-染色体的群体的含有带 X-染色体的精子细胞的液滴。

113. 如权利要求 111 所述的粒子区分装置，其还包括至少一个收集容器，其中装有收集的作为带 Y-染色体的群体的含有带 Y-染色体的精子细胞
25 胞的液滴。

114. 如权利要求 112 或 113 所述的粒子区分装置，其中所述的带 X-染

色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子细胞群的纯度为选自由 90% 到约 100%之间, 约 91% 到约 100%之间, 约 92% 到约 100%之间, 约 93% 到约 100%之间, 约 94% 到约 100%之间, 约 95% 到约 100%之间, 约 96% 到约 100%之间, 约 97% 到约 100%之间, 约 98% 到约 100%之间, 约 99% 到约 100%之间所组成的组。

115. 如权利要求 114 所述的粒子区分装置, 其还包括, 建立可分离事件的速率的步骤, 其中所述的可分离事件的速率为选自由每秒至少 5000 个可分离事件, 每秒至少 6000 个可分离事件, 每秒至少 7000 个可分离事件, 每秒至少 8000 个可分离事件, 每秒至少 9000 个可分离事件, 每秒至少 10,000 个可分离事件, 每秒至少 11,000 个可分离事件, 每秒至少 12,000 个可分离事件, 每秒至少 13,000 个可分离事件, 每秒至少 14,000 个可分离事件, 每秒至少 15,000 个可分离事件, 每秒至少 16,000 个可分离事件, 每秒至少 17,000 个可分离事件, 每秒至少 18,000 个可分离事件, 每秒至少 19,000 个可分离事件, 每秒至少 20,000 个可分离事件, 每秒至少 21,000 个可分离事件所组成的组。

116. 如权利要求 115 所述的粒子区分装置, 其中所述的分离所述精子细胞的步骤包括分离速率, 该速率为选自由每秒至少 500 个分离物, 每秒至少 1,000 个分离物, 每秒至少 2,000 个分离物, 每秒至少 3,000 个分离物, 每秒至少 4,000 个分离物, 每秒至少 5,000 个分离物, 每秒至少 6,000 个分离物, 每秒至少 7,000 个分离物, 每秒至少 8,000 个分离物, 每秒至少 9,000 个分离物, 每秒至少 10,000 个分离物, 每秒至少 11,000 个分离物所组成的组。

117. 如权利要求 116 所述的粒子区分装置, 其中所述的形成具有一个被夹带的精子细胞的液滴的步骤包括液滴形成速率, 该速率为选自由每秒至少 10,000 个液滴, 每秒至少 20,000 个液滴, 每秒至少 30,000 个液滴, 每秒至少 40,000 个液滴, 每秒至少 50,000 个液滴, 每秒至少 60,000 个液

滴，每秒至少 70,000 个液滴，每秒至少 80,000 个液滴，每秒至少 90,000 个液滴，每秒至少 100,000 个液滴所组成的组。

118. 如权利要求 102 所述的粒子区分装置，其中所述的哺乳动物物种包括牛科哺乳动物。

5 119. 如权利要求 102 所述的粒子区分装置，其中所述的哺乳动物物种包括马科哺乳动物。

120. 如权利要求 102 所述的粒子区分装置，其中所述的哺乳动物物种包括羊科哺乳动物。

121. 粒子区分装置，该装置包括：

10

a. 液流；

b. 被引入到所述液流中的完整的活精子细胞；

c. 具有管口的喷嘴，所述液流从管口流出；

d. 对所述液流产生响应的振荡器；以及

15 e. 从所述液流脱出的液滴，其多个液滴夹带所述完整的活精子细胞，并且其中所述的液滴具有足够的大小以包封所述活精子细胞。

122. 如权利要求 121 所述的粒子区分装置，其中所述的管口具有 100 微米的直径。

123. 如权利要求 122 所述的粒子区分装置，其中所述的液滴从所述液流中脱出的速率为选自每秒至少 10,000 个液滴，每秒至少 20,000 个液滴，
20 每秒至少 30,000 个液滴，每秒至少 40,000 个液滴，每秒至少 50,000 个液滴，每秒至少 60,000 个液滴，每秒至少 70,000 个液滴，每秒至少 80,000 个液滴，每秒至少 90,000 个液滴，每秒至少 100,000 个液滴所组成的组。

124. 如权利要求 123 所述的粒子区分装置，其还包括产生光的光发射源。

25 125. 如权利要求 124 所述的粒子区分装置，其还包括对所述光产生响应的检测器。

126. 如权利要求 125 所述的粒子区分装置, 其中所述的完整的活精子细胞具有至少一个性区别特征。

127. 如权利要求 126 所述的粒子区分装置, 其中所述的至少一个性区别特征包括所述完整的活精子细胞的头部的体积差异。

5 128. 如权利要求 127 所述的粒子区分装置, 其中所述的光发射源发射电磁辐射束, 该电磁辐射束穿过具有所述体积的所述精子细胞的头部, 并且所述的电磁辐射束具有对所述精子细胞头部的体积差异产生不同响应的初始波形特征。

129. 如权利要求 128 所述的粒子区分装置, 其还包括对所述检测器产生响应的分析器, 其中所述的分析器根据所述精子细胞头部的体积差异区分所述完整的活精子细胞。

130. 如权利要求 129 所述的粒子区分装置, 其中所述的精子细胞头部的体积差异包括带 X-染色体的完整的活精子细胞和带 Y-染色体的完整的活精子细胞之间的差异。

15 131. 如权利要求 126 所述的粒子区分装置, 其还包括辐射源, 该辐射源生成对所述完整的活精子细胞产生响应的辐射束。

132. 如权利要求 131 所述的粒子区分装置, 其还包括光学装置, 该光学装置聚焦形成辐射束图案, 辐射束图案具有的高度为等于所述精子细胞头部沿纵轴的长度至是所述精子细胞头部沿纵轴的长度的约三倍。

20 133. 如权利要求 132 所述的粒子区分装置, 其中所述精子细胞头部沿纵轴的长度约为 9 微米, 并且装置所述的辐射图案的高度约为 20 微米。

134. 如权利要求 131 所述的粒子区分装置, 其中所述的至少一个性区别特征包括所述完整的活精子细胞的核 DNA 的量, 并且其中所述的光发射源包括结合到核 DNA 的光发射材料, 其中根据所述核 DNA 的量的差异, 25 光发射材料发射的不同的光, 并且其中所述的检测器产生至少一种对所述光产生响应的信号。

135. 如权利要求 134 所述的粒子区别装置, 其还包括对所述检测器产生响应的分析器, 其中所述的分析器根据所述核 DNA 的量的差异, 区分所述至少一个完整的活精子细胞。

136. 如权利要求 135 所述的粒子区分装置, 其中所述的核 DNA 的量的差异包括带 X-染色体精子细胞和带 Y-染色体精子细胞之间的差异。

137. 如权利要求 136 所述的粒子区分装置, 其还包括与所述分析器连接的液滴充电器, 其中所述的液滴充电器根据所述核 DNA 的量的差异而使所述液滴带上不同的电荷。

138. 如权利要求 129 所述的粒子区分装置, 其还包括与所述分析器连接的液滴充电器, 其中所述的液滴充电器根据所述精子细胞头部的体积差异而使液滴带上不同的电荷, 并且其中所述精子细胞头部的体积差异包括带 X-染色体精子细胞和带 Y-染色体精子细胞之间的差异。

139. 如权利要求 137 或 138 所述的粒子区分装置, 其还包括液滴分离器, 其中所述的液滴分离器根据所述液滴的电荷分离所述液滴。

140. 如权利要求 139 所述的粒子区分装置, 其还包括至少一个收集容器, 其中装有收集的作为带 X-染色体的群体的含有带 X-染色体的精子细胞的液滴。

141. 如权利要求 139 所述的粒子区分装置, 其还包括至少一个收集容器, 其中装有收集的作为带 Y-染色体的群体的含有带 Y-染色体的精子细胞的液滴。

142. 如权利要求 125 所述的粒子区分装置, 其中所述的检测器包括至少一个光电倍增管, 该至少一个光电倍增管将从所述光发射源发出的光转换成至少一个信号, 并且其中所述的光电倍增管具有典型的操作电压范围, 并且其中所述的光电倍增管在所述典型的操作电压范围以外操作。

143. 如权利要求 142 所述的粒子区分装置, 其中所述的光电倍增管的所述典型的操作电压范围是从约 400 伏特到 999 伏特。

144. 如权利要求 143 所述的粒子区分装置, 其中所述的光电倍增管是在 0 伏特到 300 伏特的范围内操作的。

145 如权利要求 140 或 141 所述的粒子区分装置, 其中所述的带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子细胞群的纯度为选自由 90%到约
5 100%之间, 约 91% 到约 100%之间, 约 92% 到约 100%之间, 约 93% 到约 100%之间, 约 94% 到约 100%之间, 约 95% 到约 100%之间, 约 96% 到约 100%之间, 约 97% 到约 100%之间, 约 98% 到约 100%之间, 约 99% 到约 100%之间所组成的组。

146. 如权利要求 145 所述的粒子区分装置, 其还包括, 建立可分离事
10 件的速率的步骤, 其中所述的可分离事件的速率为选自由每秒至少 5000 个可分离事件, 每秒至少 6000 个可分离事件, 每秒至少 7000 个可分离事件, 每秒至少 8000 个可分离事件, 每秒至少 9000 个可分离事件, 每秒至少 10,000 个可分离事件, 每秒至少 11,000 个可分离事件, 每秒至少 12,000 个可分离事件, 每秒至少 13,000 个可分离事件, 每秒至少 14,000 个可分离
15 事件, 每秒至少 15,000 个可分离事件, 每秒至少 16,000 个可分离事件, 每秒至少 17,000 个可分离事件, 每秒至少 18,000 个可分离事件, 每秒至少 19,000 个可分离事件, 每秒至少 20,000 个可分离事件, 每秒至少 21,000 个可分离事件所组成的组。

147. 如权利要求 146 所述的粒子区分装置, 其中所述的分离所述精子
20 细胞的步骤包括分离速率, 该速率为选自由每秒至少 500 个分离物, 每秒至少 1,000 个分离物, 每秒至少 2,000 个分离物, 每秒至少 3,000 个分离物, 每秒至少 4,000 个分离物, 每秒至少 5,000 个分离物, 每秒至少 6,000 个分离物, 每秒至少 7,000 个分离物, 每秒至少 8,000 个分离物, 每秒至少 9,000 个分离物, 每秒至少 10,000 个分离物, 每秒至少 11,000 个分离物所组成的
25 组。

148. 粒子区分装置, 该装置包括:

- a. 具有至少一个粒子区别特征的粒子;
- b. 对所述粒子的区别特征产生不同响应的光发射源;
- c. 至少一个光电倍增管, 该至少一个光电倍增管将来自所述光发射源的光转换成至少一个信号, 并且其中所述光电倍增管具有典型的操作电压范围, 并且所述的光电倍增管是在所述典型的操作电压范围以外操作的; 以及
- d. 对所述至少一个信号产生响应的分析器, 该信号根据所述粒子的区别特征区分粒子。

149. 如权利要求 148 所述的粒子区分装置, 其中所述的光电倍增管的所述典型的操作电压范围是从约 400 伏特到约 999 伏特。

150. 如权利要求 149 所述的粒子区分装置, 其中所述的光电倍增管在从约 0 伏特到 300 伏特的范围内操作。

151. 如权利要求 148 所述的粒子区分装置, 其还包括生成对所述粒子产生响应的辐射束的发射源。

152. 如权利要求 151 所述的粒子区分装置, 其中所述的光发射源包括结合到所述粒子上的能对所述辐射束产生响应的光的光发射材料。

153. 如权利要求 152 所述的粒子区分装置, 其中所述的结合到所述粒子上的光发射材料包括结合到精子细胞的核 DNA 上的染色剂。

154. 如权利要求 153 所述的粒子区分装置, 其中所述的粒子区别特征包括结合到带 X-染色体的精子细胞的核 DNA 上的染色剂的量与结合到带 Y-染色体的精子细胞的核 DNA 上的染色剂的量的差异。

155. 如权利要求 152 所述的粒子区分装置, 其中所述的粒子包括非对称的粒子。

156. 如权利要求 155 所述的粒子区分装置, 其还包括光学装置, 该光学装置聚焦对所述粒子产生响应的辐射束形成辐射图案, 该图案具有的高度为等于所述非对称的粒子沿纵轴的长度至是所述非对称的粒子沿纵轴的

长度的约三倍。

157. 如权利要求 156 所述的粒子区分装置, 其还包括将所述粒子引入的液流。

158. 如权利要求 157 所述的粒子区分装置, 其中所述的至少一个粒子的区别特征包括在所述液流中的非对称的粒子的取向, 并且其中所述光电倍增管根据所述粒子的取向特征, 对所述光发射材料发射的光产生不同响应, 并且其中与所述光电倍增管连接的所述分析器根据所述液流中粒子的取向区分所述非对称粒子。

159. 如权利要求 158 所述的粒子区分装置, 其中所述的非对称的粒子包括具有粒子细胞头部的精子细胞。

160. 如权利要求 159 所述的粒子区分装置, 其中所述的精子细胞的所述精子细胞头部沿纵轴的长度约为 9 微米, 并且其中所述的辐射图案的高度为约 20 微米。

161. 如权利要求 148 所述的粒子区分装置, 其中所述的粒子具有一个体积, 并且其中所述的至少一个粒子的区别特征包括所述粒子的体积差异。

162. 如权利要求 161 所述的粒子区分装置, 其中所述的光发射源发射电磁辐射束, 该电磁辐射束穿过具有所述体积的粒子, 并且其中所述的电磁辐射束具有经所述粒子的体积而改变的初始波形特征。

163. 如权利要求 162 所述的粒子区分装置, 其中所述的光电倍增管对经所述粒子的体积改变的波形特征产生响应。

164. 如权利要求 163 所述的粒子区分装置, 其中所述的分析器对所述至少一种信号产生响应, 所述信号根据所述粒子的体积差异的区别特征区分所述粒子。

165. 如权利要求 164 所述的粒子区分装置, 其中所述的体积差异包括带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞之间的差异。

166. 如权利要求 160 所述的粒子区分装置, 其还包括从所述液流脱出

的液滴，其多数液滴具有一个所述被夹带的精子细胞。

167. 如权利要求 165 所述的粒子区分装置，其还包括从所述液流脱出的液滴，其多数液滴具有一个所述被夹带的精子细胞。

168. 如权利要求 166 所述的粒子区分装置，其中所述的从液流脱出的液滴具有足够的大小以包封所述的一个精子细胞。

169. 如权利要求 168 所述的粒子区分装置，其还包括具有直径约 100 微米的管口的喷嘴。

170. 如权利要求 166 所述的粒子区分装置，其还包括与所述分析器连接的液滴充电器，其中根据结合到带 X-染色体的精子细胞的核 DNA 上和带 Y-染色体的精子细胞的核 DNA 上的所述染色剂的量的差异，所述的液滴带上不同的电荷。

171. 如权利要求 167 所述的粒子区分装置，其还包括与所述分析器连接的液滴充电器，其中根据所述精子细胞头部的体积差异，所述的液滴带上不同的电荷，并且其中所述精子细胞的体积差异包括带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞之间的差异。

172. 如权利要求 170 所述的粒子区分装置，其还包括液滴分离器，其中所述的液滴分离器根据所述液滴的电荷分离所述液滴。

173. 如权利要求 171 所述的粒子区分装置，其还包括液滴分离器，其中所述的液滴分离器根据所述液滴的电荷分离所述液滴。

174. 如权利要求 172 所述的粒子区分装置，其还包括对所述液滴分离器产生响应的收集容器，其中收集带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子细胞群。

175. 如权利要求 173 所述的粒子区分装置，其还包括对所述液滴分离器产生响应的收集容器，其中收集带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体的精子细胞群。

176. 如权利要求 174 或 175 所述的粒子区分装置，其中所述的带 X-染

染色体精子细胞群和所述的带 Y-染色体的精子细胞群的纯度为选自由 90% 到约 100%之间, 约 91% 到约 100%之间, 约 92% 到约 100%之间, 约 93% 到约 100%之间, 约 94% 到约 100%之间, 约 95% 到约 100%之间, 约 96% 到约 100%之间, 约 97% 到约 100%之间, 约 98% 到约 100%之间, 约 99% 到约 100%之间所组成的组。

177. 如权利要求 176 所述的粒子区分装置, 其还包括, 建立可分离事件的速率的步骤, 其中所述的可分离事件的速率为选自由每秒至少 5000 个可分离事件, 每秒至少 6000 个可分离事件, 每秒至少 7000 个可分离事件, 每秒至少 8000 个可分离事件, 每秒至少 9000 个可分离事件, 每秒至少 10,000 个可分离事件, 每秒至少 11,000 个可分离事件, 每秒至少 12,000 个可分离事件, 每秒至少 13,000 个可分离事件, 每秒至少 14,000 个可分离事件, 每秒至少 15,000 个可分离事件, 每秒至少 16,000 个可分离事件, 每秒至少 17,000 个可分离事件, 每秒至少 18,000 个可分离事件, 每秒至少 19,000 个可分离事件, 每秒至少 20,000 个可分离事件, 每秒至少 21,000 个可分离事件所组成的组。

178. 如权利要求 177 所述的粒子区分装置, 其中所述的分离所述精子细胞的步骤包括分离速率, 该速率为选自由每秒至少 500 个分离物, 每秒至少 1,000 个分离物, 每秒至少 2,000 个分离物, 每秒至少 3,000 个分离物, 每秒至少 4,000 个分离物, 每秒至少 5,000 个分离物, 每秒至少 6,000 个分离物, 每秒至少 7,000 个分离物, 每秒至少 8,000 个分离物, 每秒至少 9,000 个分离物, 每秒至少 10,000 个分离物, 每秒至少 11,000 个分离物所组成的组。

179. 如权利要求 178 所述的粒子区分装置, 其中所述的形成具有一个所述被夹带的精子细胞的液滴的步骤包括液滴形成速率, 该速率为选自由每秒 10,000 个液滴, 每秒至少 20,000 个液滴, 每秒至少 30,000 个液滴, 每秒至少 40,000 个液滴, 每秒至少 50,000 个液滴, 每秒至少 60,000 个液

滴，每秒至少 70,000 个液滴，每秒至少 80,000 个液滴，每秒至少 90,000 个液滴，每秒至少 100,000 个液滴所组成的组。

180. 如权利要求 179 所述的粒子区分装置，其中所述的精子细胞包括来自牛科哺乳动物的精子细胞。

5 181. 如权利要求 179 所述的粒子区分装置，其中所述的精子细胞包括来自马科哺乳动物的精子细胞。

182. 如权利要求 179 所述的粒子区分装置，其中所述的精子细胞包括来自羊科哺乳动物的精子细胞。

183. 粒子区分装置，该装置包括：

- 10 a. 非对称的粒子；
- b. 产生对所述非对称的粒子响应的辐射束的辐射源；
- c. 聚焦对所述非对称的粒子产生响应的辐射束的光学装置，其中所述光学装置聚焦的光束图案的高度为等于非对称粒子沿纵轴的长度至是非对称的粒子沿纵轴的长度的三倍；
- 15 d. 与所述非对称的粒子结合的光发射材料，其中所述的光发射材料对所述辐射束响应产生发射光；
- e. 对所述光产生响应的检测器。

184. 如权利要求 183 所述的粒子区分装置，其中所述的至少一个非对称的粒子包括至少一个精子细胞。

20 185. 如权利要求 184 所述的粒子区分装置，其中所述的至少一个精子细胞具有头部，其沿纵轴的长度为约 9 微米，并且其中所述的辐射图案的高度约为 20 微米。

186. 如权利要求 183 所述的粒子区分装置，其中所述的至少一个非对称的粒子具有至少一个粒子的区别特征。

25 187. 如权利要求 186 所述的粒子区分装置，其还包括液流。

188. 如权利要求 187 所述的粒子区分装置，其中所述的至少一个粒子

的区别特征包括在所述液流中的所述非对称粒子的取向，并且其中根据所述粒子的取向特征，所述的检测器对从所述光发射材料发出的光产生不同的响应。

189. 如权利要求 188 所述的粒子区分装置，其还包括与所述检测器连
5 接的分析器。

190. 如权利要求 189 所述的粒子区分装置，其中所述的分析器根据所述液流中的非对称粒子的取向来区分所述非对称粒子。

191. 如权利要求 190 所述的粒子区分装置，其中结合到所述至少一种
10 非对称粒子上的所述光发射材料包括结合到精子细胞的核 DNA 上的染色剂。

192. 如权利要求 191 所述的粒子区分装置，其中所述的粒子区别特征包括结合到带 X-染色体的精子细胞和带 Y-染色体的精子细胞的核 DNA 上的染色剂的量的差异。

193. 如权利要求 192 所述的粒子区分装置，其中所述的检测器包括至
15 少一个光电倍增管，该光电倍增管具有典型的操作电压范围，并且其中所述的光电倍增管是在所述典型的操作电压范围以外操作的。

194. 如权利要求 193 所述的粒子区分装置，其中所述的光电倍增管的所述典型的操作电压范围是从约 400 伏特到约 999 伏特。

195. 如权利要求 194 所述的粒子区分装置，其中所述的光电倍增管是
20 在从 0 伏特到约 300 伏特的范围内操作的。

196. 如权利要求 193 所述的粒子区分装置，其还包括从所述液流脱出的液滴，每一个液滴具有一个所述被夹带的粒子。

197. 如权利要求 196 所述的粒子区分装置，其中所述的从液流脱出的液滴具有足够的大小以包封一个所述的精子细胞，其中所述的精子细胞包
25 括具有至少一个头部和颈部和尾部的完整的活精子细胞。

198. 如权利要求 197 所述的粒子区分装置，其还包括喷嘴，该喷嘴具

有约 100 微米直径的管口。

199. 如权利要求 196 所述的粒子区分装置, 其还包括与所述分析器连接的液滴充电器, 其中根据所述结合到带 X-染色体的精子细胞的核 DNA 和带 Y-染色体的精子细胞的核 DNA 上的所述染色剂的量的差异, 所述的液滴带上不同的电荷。

200. 如权利要求 199 所述的粒子区分装置, 其还包括液滴分离器, 其中所述的液滴分离器根据所述液滴的电荷分离所述液滴。

201. 如权利要求 200 所述的粒子区分装置, 其还包括至少一个收集容器, 其中装有收集的作为带 X-染色体的群体的含有带 X-染色体的精子细胞的液滴。

202. 如权利要求 200 所述的粒子区分装置, 其还包括至少一个收集容器, 其中装有收集的作为带 Y-染色体的群体的含有带 Y-染色体的精子细胞的液滴。

203. 如权利要求 201 或 202 所述的粒子区分装置, 其中所述的带 X-染色体的精子细胞群和带 Y-染色体精子细胞群的纯度是选自由 90%到约 100%之间, 约 91% 到约 100%之间, 约 92% 到约 100%之间, 约 93% 到约 100%之间, 约 94% 到约 100%之间, 约 95% 到约 100%之间, 约 96% 到约 100%之间, 约 97% 到约 100%之间, 约 98% 到约 100%之间, 约 99% 到约 100%之间所组成的组。

204. 如权利要求 203 所述的粒子区分装置, 其还包括, 建立可分离事件的速率的步骤, 其中所述的可分离事件的速率为选自由每秒至少 5000 个可分离事件, 每秒至少 6000 个可分离事件, 每秒至少 7000 个可分离事件, 每秒至少 8000 个可分离事件, 每秒至少 9000 个可分离事件, 每秒至少 10,000 个可分离事件, 每秒至少 11,000 个可分离事件, 每秒至少 12,000 个可分离事件, 每秒至少 13,000 个可分离事件, 每秒至少 14,000 个可分离事件, 每秒至少 15,000 个可分离事件, 每秒至少 16,000 个可分离事件, 每

秒至少 17,000 个可分离事件, 每秒至少 18,000 个可分离事件, 每秒至少 19,000 个可分离事件, 每秒至少 20,000 个可分离事件, 每秒至少 21,000 个可分离事件所组成的组。

205. 如权利要求 204 所述的粒子区分装置, 其中所述的分离所述精子
5 细胞的步骤包括分离速率, 该速率为选自由每秒至少 500 个分离物, 每秒
至少 1,000 个分离物, 每秒至少 2,000 个分离物, 每秒至少 3,000 个分离物,
每秒至少 4,000 个分离物, 每秒至少 5,000 个分离物, 每秒至少 6,000 个分
离物, 每秒至少 7,000 个分离物, 每秒至少 8,000 个分离物, 每秒至少 9,000
个分离物, 每秒至少 10,000 个分离物, 每秒至少 11,000 个分离物所组成的
10 组。

206. 如权利要求 205 所述的粒子区分装置, 其中所述的形成具有一个
所述被夹带的精子细胞的液滴的步骤包括液滴形成速率, 该速率为选自由
每秒 10,000 个液滴, 每秒至少 20,000 个液滴, 每秒至少 30,000 个液滴,
每秒至少 40,000 个液滴, 每秒至少 50,000 个液滴, 每秒至少 60,000 个液
15 滴, 每秒至少 70,000 个液滴, 每秒至少 80,000 个液滴, 每秒至少 90,000
个液滴, 每秒至少 100,000 个液滴所组成的组。

207. 如权利要求 206 所述的粒子区分装置, 其中所述的精子细胞包括
牛科哺乳动物的精子细胞。

208. 如权利要求 206 所述的粒子区分装置, 其中所述的精子细胞包括
20 马科哺乳动物的精子细胞。

209. 如权利要求 206 所述的粒子区分装置, 其中所述的精子细胞包括
羊科哺乳动物的精子细胞。

具有高纯度 X-染色体和 Y-染色体的精子群

I. 技术领域

分离的具有高纯度 X-染色体或 Y-染色体的精子群以及根据例如质量、体积、DNA 含量等等区别特征分离精子、粒子、或事件的方法。

II. 背景技术

分离的具有高纯度 X-染色体或 Y-染色体的精子群可以被用于完成很多哺乳动物例如牛科动物、马科动物、羊科动物、山羊、猪、狗、猫、
10 骆驼、大象、公牛、水牛等等的卵细胞或卵母细胞的体内或体外的授精或人工授精。另见，美国专利 5,135,759，在此引入作为参考。

但是，传统的将带有 X-染色体和 Y-染色体的精子群分离的方法会产生低纯度的精子群。不论何种方法，精子一直都没有被分离成具有例如
15 90%，95%，或大于 95%的高纯度的 X-染色体或 Y-染色体的精子样品。

有关直接或间接根据大小、质量、或强度差异将带有 Y-染色体的精子同带有 X-染色体的精子分开的一些方法已经被公开。如美国专利号 4,474,875 所公开的，对所有精子细胞同时应用一种浮力而使分离培养基中带有 X-染色体或 Y-染色体的精子分离到不同的位置。美国专利号
20 5,514,537 公开了一种技术，其中精子穿过装有两种规格珠子的层析柱。带有大的 X-染色体的精子被分离到含有大珠子的层中，而带有较小的 Y-染色体的精子被分离到含有较小珠子的层中。美国专利 No. 4,605,558 公开了可以使精子对密度梯度差分敏感的方法。而美国专利 No. 4,009,260 利用了带有 X-染色体的精子和带有 Y-染色体的精子在通过柱中阻碍介质的迁移速率或游动速率的差异。

25 上面提到的每一项技术共同存在的问题是这些技术对精子以“大批量方

式”起作用，意思是所有精子都在同一时间经受相同的处理，而带有 Y-染色体的精子细胞比带有 X-染色体的精子出来的更快更早，或处于不同的位置。这样，单个的精子细胞不能被鉴定并且不存在实际的体积、质量、密度或其它精子细胞特征的“量度”。逐个鉴定精子细胞在实际分离过程中所能带来的益处可以被检测到，并且甚至在分离过程中能够生成实物定量数据，和分离参数如所希望的发生变化。这些技术不能同流式细胞筛选装置一块使用。

用于分离精子的流式细胞仪技术也已经被公开。利用这些技术时应当用荧光染色剂对精子染色并使其在一束狭窄的流或谱带 - 例如激光束一类的激发或照射源中流过。当被染色的颗粒或细胞经过激发或照射源时，荧光染色剂发出荧光。可以通过光学装置收集荧光，聚焦在象光电倍增管一类能够产生并倍增电信号的检测器上，然后用分析器进行分析。接着用多参数或单一参数的色谱图或直方图显示这些数据。可以用细胞的数目以及每个细胞的荧光作为坐标。见美国专利 No. 5,135,759，在此引入作为参考。

但是，针对这类技术仍然有大量没有解决的问题并且分离高纯度的带有 X-染色体或 Y-染色体的精子细胞是困难的。

传统的流式细胞仪技术的一个显著问题是鞘液中的物质、颗粒、或者细胞的定向。当物质或者细胞相对于超过一个轴 - 例如精子 - 而使得形状不规则时候，这尤其成为问题。这一问题一个方面应当是在鞘液中建立物质的初始取向。这一问题的第二个方面是在被测物质发光期间保持物体相对于检测器(光电倍增管或其它类似的仪器)的取向。

传统的流式细胞仪技术的另一个显著问题是不能将物质或细胞包裹在液滴中。尤其是，当在不规则形状物体的周围形成液滴时，液滴的大小不足以完全覆盖物质或细胞的所有部分。例如，在流式细胞仪作用期间，如上所述的液滴能够以很快的速度形成，甚至每秒 10,000 到 90,000 之多，在有些情况下每秒 80,000 个之多。当精子被包封在液滴中时，特别是以这

样快的速率，精子的尾部或颈部的一部分没有被包封在液滴中。没有被包封在液滴中的尾和颈的那部分会以某种干扰后面液滴形成或液滴正确偏转的方式与喷嘴或液滴的周围环境起反应。因此有些精子根本没有被分析到从而降低了这一方法的效率，或者没有被消除到足以赋值给一个细胞群，

5 或者偏离正常轨道，或者全部情况的组合发生。

传统的流式细胞仪技术以及其它技术的另一个显著问题是测量事件的巧合。这一问题的一方面是来自第一个事件的入射光通量在来自第二个事件的入射光通量开始产生信号后继续产生信号。这样，两个事件至少残留有一部分不能相互区分开来。这一问题的另一方面是两个或者更多的事件同时发生并且入射光通量包括了所有事件的贡献。这样，事件的多样性根本没有被解决并且针对事件多样性的物体被错误地赋值给某一个精子群或者根本没有赋值给精子群，或者两种情况都存在。尤其是，有关流式细胞仪，悬浮的单个颗粒、物体、细胞、或精子通过能够使它们相互反应的一束光时发生了一种可测量的反应，例如发射荧光。在传统的流式细胞仪

10 中，Hoechst 染色的精子经过一束激光时导致荧光发射。在实际发射事件结束之后，从被激发的结合到 DNA 上的荧光剂所发射的荧光的光亮度足以在传统光电倍增管中产生一段时间的电子流。而且，在传统的流式细胞仪中，激光束能够产生具有 $30\ \mu\text{m}$ 高和约 $80\ \mu\text{m}$ 宽的图案。含有同 DNA 结合的荧光染色剂的牛精子核可以是约 $9\ \mu\text{m}$ 长，使激光束的高度比核大三

15 倍。这种差别使得激光对激光束图案中多于一个的精子中结合的荧光染色剂同时进行刺激。这些存在于传统的流式细胞仪的每个问题降低了区分各个事件的能力。

传统的流式细胞仪技术以及其它技术的另一个显著的问题是不规则形状物体，例如精子，根据激发/检测途径中它们的取向而产生不同的信号（形状、持续时间或总数）。这样，均质群体中的个体能够产生一个较宽的发射光谱，其特点是可能同另一个均质群体中的个体的发射特性重叠，避免

25

或减少了分辨两个群体中个体的能力。

传统的流式细胞仪技术以及其它技术的另一个显著问题是物体没有均一地暴露给激发源。当物体同光束周围接近时，传统光束成形光学不能提供均一的激光暴露。

- 5 传统的流式细胞仪技术的另一个显著问题是，物体例如精子不必要地长时间暴露于激发源中。用激光对细胞，例如精子的辐射可能导致细胞或细胞中的 DNA 被破坏。

传统流式细胞仪技术的另一个显著问题是可能会发生注射管破坏喷嘴中的片流膜。片流膜的破坏会改变流体中不规则形状物体的取向并降低分
10 类速度以及已被分类的带有 X-染色体和 Y-染色体的精子群体的纯度。

用染色剂结合到精子细胞的核 DNA 上的技术也可能存在其它问题。首先，由于核中的 DNA 是高度浓缩的并且形状是平的，对 DNA 的化学计量染色是困难的或者不可能。其次，被染色的核具有较高的折射指数。第三，结合到 DNA 上的染色剂形成的 DNA-染色剂复合物可能降低授精率
15 或其后的胚胎的生存率。第四，DNA-染色剂复合物通常用紫外光照射以使染色剂发出荧光。这种照射可能影响精子的生存率。由于这些不同的问题，应当优选的使用一种染色剂需求更低或者不需要染色剂，或者更少紫外照射或者不需要紫外照射，或者两者的需要都更少或者都不需要的方法。

针对产生高纯度的带有 X-染色体或 Y-染色体精子细胞群（无论是
20 活的、固定的、有活力的、没有活力的、完整的、无尾的、或者作为核）的样品，或者一般地，针对在具有相当高的入射光通量的一系列事件之间的成像信号中检测微小的差异，或者是针对在流体中确定不规则形状物体的取向，或者在一个光学路径中消除偶然事件，或者从分析中去除不需要的定向物体，本发明以一种实际的方式说明了对上面提到的每个问题的解
25 决。

III. 发明内容

本发明的一个显著的目的是提供分离的带有高纯度 X-染色体和 Y-染色体的精子群。分离的非天然存在的高纯度精子群具有很多用途，包括哺乳动物后代的性别选择，各种体外卵细胞授精方案，象人工授精一类的各种体内授精方案，商业上的方法包括繁殖珍稀动物或者是肉用动物，或者保护珍稀或濒临灭绝的动物，但是这只例举了高纯度精子细胞群的用途。

本发明的另一个显著的目的涉及生产带有高纯度 X-染色体和 Y-染色体的精子样品的设备和方法。

本发明描述的一个特别的实施例可以用于上述多种用途，可以用来成功地区分光发射事件的全部光通量中之微小可测量差异，在液流中确定不规则物体的取向，使一个光学路径中的偶然事件减低到最小限度，去除光学路径中由不需要的没有取向的物体所贡献的信号（包括物体本身的去除），以及液滴中不规则形状物体的包封。这样，本发明的具体目的应当非常广泛。

本发明的另一个显著目的是提供具有高纯度 X-染色体和 Y-染色体的精子样品(活的、固定的、有活力的、没有活力的、完整的、无尾的、或者精子核)，样品具有的高纯度梯度范围是 80%、85%、90%、95% 或者甚至大于 95%。

本发明的一个具体实施方案的另一个显著目的是甚至以高分离率分离带有高纯度 X-染色体和 Y-染色体的精子细胞群。高速分离以生产每一个性别的活精子的速率约为每秒 500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000 个或者甚至每秒 10000 个或者更高。

本发明的一个具体实施方案的另一个显著目的是在流式细胞仪的流动路径的激发/检测部分完全消除或者去除具有不需要取向的精子(活的、固定的、有活力的、没有活力的、完整的、无尾的、或者精子核)。

本发明的一个具体实施方案的另一个重要目的是提供具有高纯度 X-染色体或者 Y-染色体的人工授精样品。

本发明的一个具体实施方案的另一个重要目的是提供具有高纯度 X-染色体或者 Y-染色体的体外授精样品。

本发明的一个具体实施方案的另一个重要目的是能够对经高纯度人工授精样品的雌性的后代的性别进行预选，用高纯度人工授精样品授精的授精卵的后代性别的选择成功率为 80%、85%、90%、95% 或者甚至大于 95%。

本发明的一个具体实施方案的另一个重要目的是区分总发射光通量具有较小差异的光发射事件。

本发明的具体实施方案的另一个重要目的是能够完全消除或者降低由光电倍增管在暴露于高入射光通量中一段时间后，甚至在无光的情况下所产生的背景噪声量。

本发明的具体实施方案的另一个重要目的是能够完全消除同流式细胞仪或者其它仪器一起使用的光电倍增管光电阴极的饱和度。

本发明的具体实施方案的另一个重要目的是能够减少从光电倍增管光电阴极迁移到第一个二次发射极的电子数目。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够减少光电倍增管中流向 N 极的电子总数。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够在不相应地增加由光电倍增管产生的背景信号的情况下使光电倍增管光电阴极的光通量增加。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够增加来自测量的光发射事件的信号在背景信号中的比率。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够在高入射光通量事件或者连续高入射光通量事件期间使光电倍增管产生的放大信号强度增大而光电倍增管的阴极并不饱和。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提高由于对用荧光染色的精子或其它细胞或其它物体的分类而得到的色谱图或者直方图的表现分辨率，对荧光染色剂的激发会产生具有微小差异的光通量。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是在用分类流式细胞仪装置对精子进行分类时能够提高装置的校准。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提高流式细胞仪系统的精子分类率。

- 5 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提高用流式细胞仪分类的精子样品的纯度。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提供将带有 X-染色体的精子从带有 Y-染色体的精子中分离出来的技术，两种精子的核 DNA 总数中 Y 染色体的 DNA 和 X 染色体的 DNA 的量略有差别。

- 10 本发明的一个具体实施方案的另一个重要目的是提供在用流式细胞仪将带 X-染色体的精子同带 Y-染色体的精子分离的步骤中提高生成的直方图表现分辨率的技术。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提供将激发/检测路径中目标的重叠降低到最小程度的成形光束的光学装置。

- 15 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提供将物体暴露经过激发光束时的总流明数减少到最小的成形光束的光学装置。这一目的的一个方面是降低物体暴露到的光强的总流明数。该目的第二个方面是提高光源的强度而不提高被暴露物体的总流明数。

- 20 本发明具体实施方案的另一个重要目的是提供当物体通过光学路径时使之均匀暴露的成形光束的光学装置。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是提供能够使液流中不规则物体定向的喷嘴。该目的的一个方面是使物体在相同方向上定向延长。该目的的第二个方面是使平板物体的背侧在相同方向定向。

- 25 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够在将不规则形状物体完全包封在一个液滴内。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够将液流中不需要定向的

物体同需要定向的物体区分开来。

本发明具体实施方案的另一个重要目的是提供区分干扰对比技术, 据此平面物体是由带有目标物体的液流组成的, 以及据此平面图像可以用来测量来自经过物体的信号。

- 5 本发明一个实施方案的另一个目的是能够提供一种光学装置以形成使每个物体的两个侧面分开的图像, 以使一个用于测量物体的实际体积, 而另一个用来确定物体的取向。这样, 因取向不正确而不能精确测量其体积的物体能够被抛弃掉。这可以通过改进而完成, 所以利用用图像平面中的两个针孔从而使由这些双图像产生的光脉冲被独立检测出来。调谐光学装置以使第一个图像产生的光脉冲同物体的体积成比例, 并且第二个图像产生的光脉冲取决于物体在被测量时的取向。

- 10 本发明的一个实施方案的另一个目的是能够提供一种补偿方式, 因为物体被包含在液流之内。例如液流可以是一柱水, 它起了柱面透镜的作用, 因此使物体的图像扭曲。从光学上讲, 这相当于柱体的折射指数(水)比它周围环境(空气)高。尽管其它不同形状和折射指数的补偿元件可以根据需要设定, 但本发明中所公开的补偿能够由例如具有比它周围环境的折射指数低的柱体所组成。通过确保光通过这一补偿元件, 可以由该补偿元件正好相反的行为来补偿液流的光学效果。

- 20 通过说明书和权利要求书的其他部分公开了由本发明自然延伸的物体。

IV. 附图说明

图 1 显示了一般的流式细胞仪。

图 2 显示了一般的流式细胞仪的第二种视图。

- 25 图 3 显示了没有放大器的发明(图 3a)的单变量流式细胞仪的单变量直方图(# 1, # 2, 以及 # 3) 同相同流式细胞仪 - 利用了特定的放大作用的发明的实施方案的单变量直方图(图 3b)之间的比较, 说明了在带有 X-染色

和 Y-染色体的牛精子细胞群之间分辨率的改善。

图 4 显示的单变量和双变量直方图说明了带 X-染色体和带 Y-染色体的牛精子细胞群之间的常规分辨率。

图 5 显示的单变量和双变量直方图说明了利用放大作用的发明的一个
5 特定实施方案使带 X-染色体和带 Y-染色体的牛精子细胞群之间的分辨率提高。

图 6 显示的单变量和双变量直方图的第二个例子说明了带 X-染色体和带 Y-染色体的牛精子细胞群之间的常规分辨率。

图 7 显示的单变量和双变量直方图的第二个例子说明了利用放大发明
10 的一个特定实施方案使带 X-染色体和带 Y-染色体的牛精子细胞群之间的分辨率提高。

图 8 显示的单变量和双变量直方图说明了带 X-染色体和带 Y-染色体的马精子细胞群之间的常规分辨率。

图 9 显示的单变量和双变量直方图说明了利用放大作用的发明的一个
15 特定实施方案使带 X-染色体和带 Y-染色体的马精子细胞群之间的分辨率提高。

图 10 显示的单变量和双变量直方图说明了利用放大作用的发明的一个特定实施方案使带 X-染色体和带 Y-染色体的马精子核之间的分辨率提高。

图 11 显示了一个改进的电路板的特定的实施方案将放大发明用于
20 MoFlo[®]流式细胞仪。

图 12 显示了针对 MoFlo[®]流式细胞仪的一个放大发明的特定的实施方案的电路图。

图 13 显示了用传统成形光束的光学装置(图 13a)的激光束图案和用降低高度的成形光束的光学装置的激光束图案(图 13b)。

图 14 显示的条形图比较了用常规技术或者单独使用放大发明技术或者
25 结合降低高度的成形光束的光学装置来分离的带 X-染色体(图 14a)的精子

和带 Y-染色体(图 14b)的精子的纯度。

图 15 显示了降低高度的成形光束的光学装置的正视图。

图 16 显示了降低高度的成形光束的光学装置的俯视图。

图 17 显示了物体定向喷嘴发明的透视图和两个交叉部分。

5 图 18 显示了物体定向喷嘴发明的一系列分级交叉部分。

图 19 显示了实施方案的斜面注射管发明的正视图和侧视图。

图 20 描述了通过比较定向精子的信号(图 20a 和 20b)和未定向精子的信号(图 20c 和 20d)来去除不需要的未定向的精子(RUUS)的发明。

10 图 21 显示了另一个实施方案的具有一个划槽状斜面叶片的斜面注射管发明的透视图。

图 22 显示了同流式细胞仪配合的传统光学技术。

图 23a 显示了典型的精子形状和大小, 而图 23b 显示了正确取向和不正确取向的精子之间的差异。

15 图 24 显示了本发明的实施方案所具有的能够测量例如体积和取向两种信号的一种构造。

图 25a 和 b 显示了本发明的一个实施方案所具有的相应于每一个半圆的部分所具有的针孔, 图 25c 显示了本发明的一个实施方案的一个平面图, 图 25d 显示了本发明一个实施方案所具有的两个独立的可旋转偏振器。

20 图 26a 和 26b 说明了本发明的一个实施方案的对液流的补偿方法, 图 26c 显示了一个实施方案的补偿元件, 26d 显示了另一个补偿元件的实施方案, 液流以及来自补偿元件的图像在平面图中彼此落在顶端。

图 27 显示了干涉光学装置发明的一个实施方案。

图 28 显示了干涉光学装置发明的第二个视图。

25 V. 具体实施方式

本发明涉及分离带有高纯度 X-染色体和 Y-染色体的精子或者精子细胞

群。根据需要，带有高纯度 X-染色体和 Y-染色体的精子群可以包括完整的活的精子，也可以包括无尾的精子群(精核)，或者其它有活力的或者没有活力的精子群形式。当发明所提供的具体的实施例上下文中描述的每个分离的完整的活精子细胞都具有精子细胞的头部、颈部和尾部时，应当清楚所描述的技术也可以在精子核中有各种不同的应用。带有 X-染色体和 Y-染色体的精子群应当进一步理解为包括但是不限于来自任何雄性哺乳动物物种的精子，来自人的精子和来自象牛科动物、马科动物、羊科动物、犬科动物、猫、山羊或猪的公知动物，以及象大象、斑马、骆驼、或者条纹羚一样的公众较少知道的动物。这份动物清单的目的是举例说明其精子可以通过常规方法以 90%或更高纯度分离的各种动物，而不是对本发明说明书中描述的精子可以来自任何哺乳动物的特定的种进行限制。

从哺乳动物的不同的种所分离的高纯度精子可以成为产品并能够用于各种人工授精方案或者作为商业方法的一部分，例如在那些美国专利申请 60/211,093、60/224,050 或者 PCT/US99/17165 中所描述的那样；或者可以用于如 PCT/US98/27909 申请中所描述的低剂量授精方案，或者如美国专利申请 60/253,785 中所描述的用于给动物包括人的卵母细胞进行体外授精，每个上面描述的引用都在此引入作为参考。

这里所用的术语纯度或者高纯度应当被理解为分离的具有特定区别特征或所需的各种特征的组合的精子群的百分比。例如，当精子群的分离是基于带有与 Y-染色体相反的 X-染色体，纯度为 90%的带有 X-染色体的精子群是指所含精子群中有 90%的单个精子带有 X-染色体而该精子群的其它 10%可能是带有 Y-染色体的精子。因此，带有高纯度 X-染色体或者 Y-染色体的精子群应当包括的纯度选自由 90% 到约 100%之间，约 91% 到约 100%之间，约 92% 到约 100%之间，约 93% 到约 100%之间，约 94% 到约 100%之间，约 95% 到约 100%之间，约 96% 到约 100%之间，约 97% 到约 100%之间，约 97% 到约 100%之间，约 98% 到约 100%之间，约 99%

到约 100%之间所组成的组。

重要的是，当本发明的许多实施方案描述分离的带有高纯度 X-染色体和 Y-染色体的精子群时，以及当说明书进一步公开用高纯度精子分离装置和方法如何分离以及如何利用分离的高纯度精子群时，应当清楚本发明的基本概念是可以用于其他类型的具有粒子区别特征的粒子或具有事物区别特征的事物。应当清楚本发明可以应用于各种各样的需要解决成像信号的微小差异的事项中，例如本领域技术人员容易理解的产品缺陷检测、场流分级分离法、液相色谱、电泳、计算机 X 线断层摄影术、γ 摄像、飞行测试仪的时间检测等。

10 另外，当这种公开提供了对流式分离带 X-染色体的精子和带 Y-染色体的精子的装置和方法的实施方案的描述时，对本发明中这些实施方案的描述并不意味着将本发明的范围缩小到仅仅是精子的流式分离或者仅仅是高纯度流式细胞仪精子分离系统，而是用这些实施例以一种实际的方式对本发明的基本概念进行举例说明以说明他们能够用于广泛的用途。

15 现在参见图 1 和图 2，图示的本发明实施方案的流式细胞仪包括一个起固定或提供用至少一种荧光染色剂染色的粒子或者细胞以用于分析作用的粒子或细胞源 1。这些粒子或细胞以一种方式被保藏在喷嘴 2 中，这种方式使得粒子或者细胞被引入液流或者鞘液 3 中。通常将一些鞘液从鞘液源 4 提供到鞘液 3 中从而当粒子或者细胞源 1 将粒子或细胞供给鞘液 4 时，
20 他们并行地通过喷嘴 2 提供。

从这种形式中可以容易地理解鞘液 3 是如何为粒子或细胞形成鞘液环境的。由于各种液体是以某种压力提供到流式细胞仪中的，它们流出喷嘴 2 并离开喷嘴口 5。通过提供可以用振荡控制器 7 进行精确控制的某一类型振荡器 6，可以在喷嘴 2 内建立压力波并将压力波传送到在喷嘴口 5 处离
25 开喷嘴 2 的流体中。由于振荡器 6 在鞘液 3 上起作用，离开喷嘴口 5 的流体 8 最终形成规则排列的液滴 9。由于粒子或细胞被液体流或鞘液环境所

包围，液滴 9 可能在其内部带走单个分离的粒子或者细胞，这些粒子和细胞在本发明的某些实施方案中是精子细胞。

由于液滴 9 能够带走粒子或细胞，因此根据粒子或细胞的特征，该流式细胞仪可被用于分离粒子、细胞、或者精子细胞等类似的物质。这可以通过粒子或细胞感应系统 10 来完成。这种粒子或细胞感应系统至少包含可以对液流 8 中所含有的粒子或细胞产生响应的某种类型的检测器或传感器 11。粒子或细胞感应系统 10 可根据是否具有某一特征而产生响应，例如结合到粒子或细胞或细胞中的 DNA 上的荧光染色剂，荧光染色剂在被如激光励磁机 12 所产生的能够使粒子产生响应的光束的照射源激发后产生响应。当每种类型的粒子、细胞或精子细胞的核 DNA 被用至少一种荧光染色剂染色时，根据所用特定类型的荧光染色剂所能够结合到的所述部位的数量不同，结合到每一个单个粒子或细胞的荧光染色剂的量是不同的。对于精子细胞，Hoechst 33342 染色剂可以结合到的部位取决于每个精子细胞所含的 DNA 的量。由于带 X-染色体的精子所含有的 DNA 的量比带 Y-染色体的精子所含有的 DNA 的量多，因此，带 X-染色体的精子比带 Y-染色体的精子所结合的荧光染色剂的量就多。因此，通过激发后，通过测量结合的荧光染色剂所发出的荧光，就能够区别带 X-染色体的精子和带 Y-染色体的精子。

为了根据粒子或细胞的特性而达到分离的目的，可以通过传感器 11 接收所发射的光并且反馈给某种类型的连接到液滴充电器上的分离辨别系统或分析器 13，液滴充电器根据液滴 9 所含的粒子或细胞的特征而使每个液滴 9 带上不同的电荷。以这种方法根据液滴中是否含有合适的粒子或细胞，分离辨别系统或分析器 13 起到了让静电偏转极板 14 使液滴 9 偏移的作用。

因此，流式细胞仪起到通过使粒子或细胞指向一个或多个收集容器 15 而达到使粒子或细胞 16 分离的作用。例如，当分析器基于精子细胞的特征区别精子细胞时，含有带 X-染色体的精子液滴被带上正电并且因此在一个

方向上偏移,而含有带 Y-染色体的精子液滴被充上相反的负电荷并且因此向另一个方向偏移,并且废弃的液流(不带粒子或细胞或带有不需要的或者带有未筛选细胞的液滴)被留下而未被充电并且因此在未发生偏移的液流中被收集到抽吸管或者类似的容器中,如美国专利申请 09/001,394 中所论述的,在此引入作为参考。自然地,可以建立很多偏移轨道并同时收集。

为了常规的将粒子、细胞、精子细胞或精子(完整的、活的、固定的、有活力的、没有活力的或者是核)分离成高纯度的带有 X-染色体和 Y-染色体的群体,所用的粒子鉴别装置或方法应当提供高分辨率的区别特征以作为分析和分离的基础。

10 针对精子,如上面所述,对结合到带有 X-染色体的精子细胞的核 DNA 上的荧光染色剂所发出的光和结合到带有 Y-染色体的精子细胞的核 DNA 上的荧光染色剂所发出的光之间的区别进行鉴定可能是困难的。

在许多应用中,由多个发射事件入射到可以是光电倍增管的检测器上的总发射光可以较高,而待区分的各发射事件的发射光之间的差别可以较小。

15 当光发射事件以高速率连续发生并且光发射事件之间的间隔时间很短时,就象用流式细胞仪进行高速细胞筛选一样,这样的问题会加重。当根据所结合的荧光染色剂的区别来分离粒子、细胞或者精子细胞时,可以产生流过激发源的细胞并且每秒有大量的发光事件发生。因此,液流中能够发光的粒子、细胞或者精子细胞的数量可能很多。随着流速的增加,激发源的截取点变得非常明亮。光电倍增管光电阴极上的这种高水平的入射光

20 会导致与背景信号比例非常低的信号。当使用象 Hoechst 33342 一类的荧光染色剂标记精子细胞的核 DNA 时,背景信号的量会进一步加重。

解决这一问题的许多方法集中在通过在光电倍增管前放置光学滤光片来降低光电阴极管的总光通量。这种方法并未改变信号与背景信号的比例,

25 后来的提高光电倍增管的灵敏度的尝试产生了额外的背景信号,因为来自背景信号的数量使光电倍增管达到了饱和。

典型地，光电倍增管的工作电压范围约为 400 伏特到约 900 伏特。由 Hamamatsu 公司提供的象光电倍增管 R928 以及 R1477 一类的标准光电倍增管的线性操作下限约为 300 伏特。因此，装配用光电倍增管的设备或装置在等于或大于 400 伏特下操作光电倍增管。即使阳极电子数减少到所需
5 要的程度，如美国专利 4,501,366 和 5,880,457 所公开的，光电阴极和一号二次发射极之间的电压保持高伏特数并且通过降低剩余二次发射极的电压或者过滤掉电子所固有的暗噪音和散粒噪声来实现阳极电子的减少。

出乎意料的，将光电倍增管的伏特数降低到低于 400 伏特到约 280 伏特，或者约 250 伏特，或者甚至到 0 伏特时，即使当从每一个光发射事件的总
10 发射光量较高或者甚至当每秒发生的光系列事件数很多时，也可以使光发射的细微差别能够被区分开。针对照射结合到精子细胞的核 DNA 上的荧光染色剂所产生的光发射事件的速率，在分离带 X-染色体的精子和带 Y-染色体的精子期间，本发明允许光发射事件所能够达到的速率增加到每秒
15 至少 5000 个可分离事件，每秒至少 6000 个可分离事件，每秒至少 7000 个可分离事件，每秒至少 8000 个可分离事件，每秒至少 9000 个可分离事件，每秒至少 10,000 个可分离事件，每秒至少 11,000 个可分离事件，每秒至少 12,000 个可分离事件，每秒至少 13,000 个可分离事件，每秒至少 14,000 个可分离事件，每秒至少 15,000 个可分离事件，每秒至少 16,000 个可分离事件，每秒至少 17,000 个可分离事件，每秒至少 18,000 个可分离事件，每
20 秒至少 19,000 个可分离事件，每秒至少 20,000 个可分离事件，每秒至少 25,000 个可分离事件，每秒至少 30,000 个可分离事件，每秒至少 35,000 个可分离事件或者更高。

作为一个具体的实施例，装配现有的 Cytomation SX MoFlo[®]流式细胞仪在 400 伏特低限下操作光电倍增管。可调整增益值在高压而不是在低压下
25 操作光电倍增管。SX MoFlo[®]流式细胞仪可以通过再装配光电倍增管调节器被改换。可以用 2.0K 的电阻器替换第三通道的 R16C 电阻器（2.49 千欧

姆)以改变放大器的增益值从而控制光电倍增管。这种转换使光电倍增管可在约 280 伏特下被操作。类似的转换可以是平行使用两个带 3.75 千欧姆电阻器的 SX MoFlo[®]流式细胞仪,或者使用一个可以使光电倍增管分别在约 200 伏特或略高于零伏特的电压下被操作的 1.3 千欧姆的电阻器。针对
5 这种转换,由于在典型的操作电压范围之外操作光电倍增管,也可以去除在光电阴极前的中密度滤光片。

出乎意料的是,由于通过光电倍增管将信号转换成电信号使这种转换提高了光发射事件的信号对噪声的比率,然后通过提高增益放大器到分析器
13 的模拟数字转换器的合适水平以放大更清晰的信号并且输出生产的单
10 变量或双变量直方图。

现在参考图 3,在利用本发明(图 3a)之前,比较三个不同的 SX MoFlo[®](#1, #2, #3)流式细胞仪的单变量直方图,并且显示了用本发明(图 3b)中有关分离完整的活的喷射出的牛精子。正如从单变量直方图中所能够理解的,利用本发明实质上可以提高完整的活的带 X-染色体的精子 17 和
15 活的带 Y-染色体的精子 18 的分离度(由峰谷所代表的带 X-染色体的精子和带 Y-染色体的精子的表观差异)。

在利用本发明实施方案之前用 SX MoFlo[®]流式细胞仪对于带 X-染色体的精子和带 Y-染色体的精子的完整活精子分离速度或筛选速度约为 $17.9 \times 10^6/4.5$ 小时(即在两种流束中-第一种流束是带 X-染色体的精子而第二种
20 流束是带 Y-染色体的精子的分离或筛选速度约为每秒 1,100),纯度约为 87%,范围是 84% 到 93%。对于三种筛选的可分离事件的速率分别为 22000, 23000, 以及 20000。

经过上述转换后活精子的平均筛选速率约为 $40.3 \times 10^6/4.5$ 小时(即约每流束每秒约为 2,500),纯度为 90.8%,范围是 89%到 92%。对于三种筛选
25 的事件速率分别是每秒 13000、15,000、以及 19,500。

从数据中可以看出本发明这一实施方案不仅能导致分离的精子群的纯

度提高而且能使分离或者筛选速率超过一倍，而可分离事件的速率实际上降低了。

类似的，现在参见图 4 和图 5，它们显示了在利用本发明之前(图 4)和按照上述转换之后(图 5)利用 SX MoFlo[®]流式细胞仪 # 1 对牛的完整的活精子筛选的双变量直方图。在利用本发明之前，先于 440 伏特下在光电阴极处将激光调整到 135 MW，1 倍的增益以及 1.0 中密度滤光片(1/10 振幅)操作 SX MoFlo[®]流式细胞仪，每秒约 10,000 事件。接着用本发明，在光电阴极处于约 262 伏特下操作 SX MoFlo[®]流式细胞仪，将激光调整到大约 100MW，4 倍增益并且不用中密度滤光片，每秒约 10,000 可分离事件。由
5 10 15 20 25 这些数据中可以理解，带 X-染色体群体 19 和带 Y-染色体的群体 20 之间峰谷深度的增加证明了分辨率有很大的提高。

类似的，现在参考图 6 和图 7，分别显示了在如图 3 和图 4 所示的相同参数下，在用本发明实施方案之前用 SX MoFlo[®]流式细胞仪 # 2 对公牛完整的活精子筛选得到的双变量直方图(图 6)以及使用本发明实施方案进行
15 操作的直方图(图 7)。又一次通过带 X-染色体群体 21 和带 Y-染色体的群体 22 之间峰谷的深度证明了分辨率有大幅度提高。

现在参见图 8 和图 9，显示了在利用本发明实施方案前(图 8)和之后(图 9)用 SX MoFlo[®]流式细胞仪对完整的活马精子分离或筛选得到的双变量直方图。当用本发明的实施方案时，用光电倍增管在低于 300 伏特的电压下
20 在 100 mW 功率的激光下分离或筛选活马精子时，分离速率或筛选速率超过每秒 4,800，平均每秒 12,000 事件。带 X-染色体的群体 23 和带 Y-染色体的群体 24 提高的分辨率是惊人的。数据显示同不用本发明实施例的 5 个分离通道之间的峰值相比较，利用本发明实施方案可以达到约 8 到 9 个分离通道，已被筛选的带 X-染色体的群体和带 Y-染色体的群体的纯度约
25 为 93%。

现在参见图 10，它显示了用本发明实施方案筛选的分离的用 Hoechst

33342 染色的种马精子核(S-05400) 点绘制的单变量和双变量直方图。精子核是由新射出的种马精子制备的。通过离心, 超声处理洗涤精子并且所得到的用 Percoll 密度梯度离心分离头部和尾部。用 2%的福尔马林洗涤, 固定分离的头部, 然后用 Hoechst 33342 染色。用叠氮化钠(0.5%)固定被染色的核。样品在每秒 5000 事件下流出以制得直方图。然后染色的核被用于对按照上述本发明的实施方案所转化的合并了光电倍增管的 SX MoFlo[®]流式细胞仪进行校准。补偿被用于校准两种群体的双变量绘制中(染色的 X 和染色的 Y)。注意马精子核的两个群体如单变量绘制所示, 几乎完全被基线消除。

10 现在参考图 11, 对 SX MoFlo[®]流式细胞仪的特别改进包括平行使用两个电阻器以提供 1.8K 的修正值。两个 3.57K 的电阻器 25 和 26 相当于约 1.785K, 足够接近有效值。利用这种改进, 在这一特定的仪器上的光电倍增管可以在 200 伏特下运行。自然的, 可以对用光电倍增管的其它流式细胞仪或其它仪器进行改进以测量来自特定事件的发射光量。图 12 提供了本
15 发明特定实施方案的电子概要图。

本发明的另一个重要的实施方案是降低了光束的光学图案的高度。如图 13a 所示, 形成常规的照射光束的光学装置产生的光束图案 27 的高度比通过光束的精子细胞头部 28 更高或高很多。因此, 有多于一个的含有结合到 DNA 上的荧光染色剂的精子头部同时进入光束图案中。在这种情况下, 多个含有结合到 DNA 上的荧光染色剂的精子头部可以同时被激发而在单一发射事件中发出荧光。这样, 在先前或后来的发射事件可能包括了光束图案 27 中其它精子头部所贡献的偶然光通量。这导致能够辨别带 X-染色体的精子和带 Y-染色体的精子的光发射事件之间平均光通量的差异降低。这也使得带 X-染色体的精子或带 Y-染色体的精子的比较光发射事件之间的
25 平均光通量的差异降低。重要的是, 结合到多个 DNA 上的荧光染色剂被同时激发提高了事件的平均亮度, 使得事件之间的可测量光通量差异占总

发射光通量的百分比更小。这使得对事件之间的差异进行定量更加困难。

如图 13b 所示, 通过减少光束形状的高度, 在同一测量事件期间高度降低了的光束图案 29 中多个精子头部重合的情况减少。这导致区别带 X-染色体的精子和带 Y-染色体的精子的光发射事件之间的平均差异变大。这也能够使所测量的每一个发射事件的总平均光通量减少。对于用于对具有约 $9\ \mu\text{m}$ 的牛精子进行筛选的本发明的特定的实施方案, 发现光束的高度可以约为 $20\ \mu\text{m}$ 。在本申请中, 发现小于 $20\ \mu\text{m}$ 的垂直光束高度不能提供分辨率的额外的增益。

参见图 14, 应当理解利用降低了光束图案高度的光学装置可以提高已经用 Hoechst 33342 染色的筛选的带 X-染色体的牛精子群(图 14a)和筛选的带 Y-染色体的精子群(图 14b)的纯度。这对于单变量峰的 25% 和 40% 的筛选通道都是正确的。正如可以从图 14 中进一步理解的, 不依赖本发明的任何其它方面只降低了光束图案高度的光学装置就可以提高分离精子的纯度, 例如上述本发明实施方案中对光电倍增管电路系统的改进(新 PMT), 或者可以结合使用本发明实施方案的改进的光电倍增管以进一步提高分离精子样品的纯度。

降低了光束图案高度的光学部件的另一个优点是精子通过激发激光束或者照射光束的时间可以减少。减少激发激光束的照射时间可以减少对精子的压力和破坏。

再次参考图 14b, 可以理解降低了高度的光束图案可以结合比常规使用的具有更大面积的照射光束图案一起使用。例如, 如图 14a 所示的常规椭圆型光束图案 27 约 $30\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$, 而本发明用于使带 X-染色体的精子和带 Y-染色体的精子之间产生最佳分辨率以对牛精子分类的光束具有 $20\ \mu\text{m} \times 160\ \mu\text{m}$ 的光束图案 29。 $20\ \mu\text{m} \times 160\ \mu\text{m}$ 的光束图案的面积是 $30\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$ 光束图案的 1.3 倍。这时, 入射点的能量损失成反比。这使得在不考虑加强照射对精子的破坏的情况下能够提高激发激光的强度。例如,

如果具有常规光束图案的光学装置产生 $30\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$ 放射光束图案并且常规的以 150mW 对励磁激光器充电, 然后以 300mW 对本发明特定实施方案中具有 $20\ \mu\text{m} \times 160\ \mu\text{m}$ 光束图案的励磁激光器进行充电而不增加入射点的总强度。另外, 励磁激光器可以在 150mW 下运行以得到降低单位面积照射能量, 减少照射损害, 延长激光器寿命等的好处。

同传统成形光束的光学装置以及传统的光电倍增管放大设备相比较, 降低了高度的光束图案的光学装置的发明以及光电倍增管放大作用的发明能够将带 X-染色体和带 Y-染色体的精子群的纯度提高约 4% 或者更多。

可将成形光束的光学装置 30 安装到如图 15 和图 16 所示的流式细胞仪上。正如可以理解的, 通过激光激发结合到精子所含 DNA 上的荧光染色剂所发出的光 31 能够用相对于精子头部平面 28 为 0 度和 90 度的光电倍增管 32 在其流经励磁激光器光束图案时进行检测。

正如所能够理解的, 必须以精确的形式抽吸染色的精子以通过激发光束或者照射束从而使每个精子的头部同精子头部的表平面取向一致朝向光电倍增管零度检测器。对精子的 DNA 含量的精确检测只可以通过测量浆形精子头部 28 的表面来测定。这样, 只有那些能够以合适的取向进入激发光束的精子群可以根据 DNA 含量被精确测量并被分类。

现在参见图 17, 18 和 19, 本发明特定实施方案也可以由粒子或精子细胞的定向喷嘴 33 在精子经过光电倍增管前面时通过液压动力迫使扁平的精子头部取向正确。如图 17 所示, 定向喷嘴具有内表面 34 形成类似圆锥形状。内部的锥形从入口端 35 的圆形逐渐变成流出口尖端管口 36 的非常椭圆的形状。管口 36 应当是圆形而不是椭圆形。因此, 定向喷嘴 34 内表面由一个圆形入口到一个狭窄的椭圆形再到一个紧靠管口 36 前面的圆形出口。可以通过图 18 所示的定向喷嘴的交叉部分进一步阐明内部形状。

如图 19 和 21 所示, 注入口 37 直径约为 0.061 英寸可以同定向喷嘴(或者常规喷嘴)33 一起使用, 喷嘴可以在顶端附近倾斜以形成叶片 38。扁平

叶片 38 以与定向喷嘴 33 中椭圆的最大径向成 90 度角定向。注入针的内径可以约为 0.010 英寸以扁平针管叶片 38 中心形成圆形的管口 39。

在倾斜的注射管的特定实施方案中通过图 21 说明了倾斜叶片可以槽形安装。槽形倾斜的叶片可有助于在喷嘴(常规喷嘴或定向喷嘴)中保持鞘液
5 层流。这样,通过槽形倾斜叶片保持液体层流而显示出对注入其中的物质的破坏更少。通过本发明的一个特别实施方案中的具有槽形倾斜叶片的注射器管保持了引入鞘液层流的精子,并使精子分类速率比用常规注射管技术提高了 20%、30%、40%、50%或者甚至更高。高速的精子分类速率可以实现每秒每种性别的分类速率约为 4,000 到 10,000。甚至可以在这样高的
10 分类速率下产生高纯度(90%或者甚至更高)的带 X-染色体和带 Y-染色体群体。具有倾斜槽形顶端的注射器管的发明可以独立使用或者结合使用这里所描述的其它发明如美国专利申请 09/454,488 或 PCT/US00/42350 中所描述的其它技术,在此引入作为参考。

如图 21 所示,倾斜的叶片注射管发明或者倾斜的槽形叶片发明的实施
15 方案可以还包括层流增强凹槽 40。层流增强凹槽 40 有助于保持层流流入注射器管的管口。再一次,增强的层流使更多的精子在层鞘液中保持正确的取向从而导致可分类事件速率更高接着导致每一个性别或精子的分类速率提高。

在本发明的另一个实施方案中,可以调整定向喷嘴口 39 或其它常规喷
20 嘴口大小使形成的液滴包封离开管口 39 的完整的活精子。在常规的精子细胞夹带技术中没有包封精子细胞的技术。相当一部分精子细胞的尾部留在液滴外。例如当液流的压力为约每平方英寸 50 磅时牛精子细胞具有约 13.5 微秒的长度(即完整长度的精子细胞以每平方英寸 50 磅的液流压力通过照射光束的时间长度)。用于夹带牛精子细胞的常规液滴成形技术从直径约为
25 70 微米管口的喷嘴中形成一个 14 微秒液滴(即在液流中形成一个液滴波形所需要的时间),该液滴可以对 35 千赫下运转的振荡器产生响应。因此,

一部分精子细胞尾易于从液滴中伸出。为了防止精子细胞尾从液滴中伸出，液滴包封发明中的一个实施方案提供了一个约 100 微米的管口，它在约 30 千赫下，每平方英寸约 50 磅下，产生一个约 28 微秒的液滴。通过对完整活精子细胞的完全包封，包括尾部，精子细胞同喷嘴之间的因液滴充电造成的相互影响更小并且液滴的偏转更加精确。这导致带 X-染色体的精子和带 Y-染色体的精子之间减少了交叉污染并且也使偏移的精子被更均一的收集。偏移一致的精子指向由不同液体缓冲的收集面。如美国专利申请 09/001,394 中所描述的，对分离的精子进行缓冲对于减少压力是重要的，在此引入作为参考。针对来自其它哺乳动物物种的精子，可以改变本发明以产生各种大小的液滴来包封不同长度的精子细胞。根据精子的长度和液流的压力，液滴包封的发明仍然能够达到液滴形成速率至少为每秒 10,000 个液滴，每秒至少 20,000 个液滴，每秒至少 30,000 个液滴，每秒至少 40,000 个液滴，每秒至少 50,000 个液滴，每秒至少 60,000 个液滴，每秒至少 70,000 个液滴，每秒至少 80,000 个液滴，每秒至少 90,000 个液滴，每秒至少 100,000 个液滴，等等直到在液滴包封发明的一些实施方案中达到约每秒 200,000 个液滴。

即使用定向喷嘴发明，光束图案中仍然有一定量的取向不正确的精子或者粒子。如上面所描述的，如果精子头的取向不正确，那么根据发射光测定的 DNA 含量就不准确。本发明的特定实施方案提供了去除液流中不需要的取向不正确的精子(RUUS)或者粒子。

现在参见图 16 和 20a，可以理解对精子 DNA 含量的精确测定取决于浆形精子头部 28 表面对于检测器的取向是正确的。因此，只有那部分如图 16 和 20a 所示的以正确取向进入了激发光束的精子可以被精确测定并且根据 DNA 含量被分成带 X-染色体和带 Y-染色体的群体。如图 20a 和 20b 所示，以正确取向通过激发光束的精子产生一个定向的发射信号图 40，其形状同图 20d 所示的由未定向的精子产生的未定向的发射信号图 41 不同。自

然,由未定向的精子产生未定向发射信号图 41 的变化是取决于激发光束中精子的不正确取向的程度。这些不正确的取向包括图 20c 所示的取向,但是也包括转动精子头部取向的所有形式,任何一部分旋转使得浆形头部表面的取向没有同检测器对准(正确的对准如图 16 所示),或者任何一种使得精子头部的轴 42 的取向转到流向准线外的旋转。自然地,对不同物种之间的正确取向的定义是不同的。对于某些精子头部不是浆形的物种,可以通过其它解剖学特性或者信号特性,对激发光束中精子的正确取向,或者相对于检测器的正确取向或相反进行定义。不过,可以将激发窗口内取向正确的不同物种精子生成的最佳信号作为后面与之比较的一系列发光事件的标准发射信号图。

通过每一个发射信号图(或完整区域或者两者同时比较)与定向的哺乳动物精子确定的标准发射信号图(或标准完整区域或者两者同时比较)的形状比较,可鉴定未定向的精子,从单变量或者双变量直方图中减去未定向精子的信号,并且如果需要可以确定地去除未定向的精子,从而未定向的精子既没有被收集到带 X-染色体的群体中也没有被收集到带 Y-染色体的群体中。

重要的是,本发明提高了要分离的两种精子群之间的分辨率从而提高了从一种群体中分离出另一种群体的速率,并且提高了分离群体的纯度。因此,现在就可以以极高的速度对精子分类。可分类或者可分离事件的速率可以到达每秒约 35,000 个(不包括同时发生事件 - 多个精子同时在激发/检测窗口)。与可分类或者可分离事件的速率相关的高分离或分类速率可以为每秒约 5000 到约 11,000 个每种性别的完整活精子,并具有 90%、92%、93%、95%或者更高的纯度。上面描述的发明可以通过将分类或分离速率降低到每秒约 2000 个每种性别的活精子而使得甚至更高纯度的带 X-染色体和带 Y-染色体群体能够以约 97%到约 98%或者甚至更高的纯度获得。

正如可以理解的,上面描述的发明对于达到最高可能分类或分离事件的

速率以及最高可能获得的分离速率是特别重要的，分离速率可以为每种性别每秒至少 1,000 个分离物，每秒至少 2,000 个分离物，每秒至少 3,000 个分离物，每秒至少 4,000 个分离物，每秒至少 5,000 个分离物，每秒至少 6,000 个分离物，每秒至少 7,000 个分离物，每秒至少 8,000 个分离物，每秒至少 9,000 个分离物，每秒至少 10,000 个分离物或者更高。

如上所述，本发明可以供精子的高速分类之用，即使当对这些精子染色困难，或者由于具有其它解剖学或化学特性而使得区分带 X-染色体和带 Y-染色体群体之间的差别更加困难。即使在这些困难的情况下，仍然能够按如上所述通过使可分离事件的速率为约每秒 15,000-20,000 个可分离事件而达到将高纯度的带 X-染色体和带 Y-染色体牛精子群以 92% 到 93% 的纯度分离，并且每种性别(带 X-染色体以及带 Y-染色体)分类或分离完整的活精子的速率为每秒 2000 个每种性别的完整活精子。

现在参见图 23 和 24，本发明的一个实施方案利用差别干扰对比技术以测量粒子或囊状物的体积。本发明的一个基本的实施方案可以包括具有不同体积的粒子，例如带 X-染色体以及带 Y-染色体的精子细胞的头部 28 的体积差异。电磁辐射源 43 产生具有对粒子或者精子细胞头部 28 之间的体积差异产生不同的响应的初始波形特征的电磁辐射或者电磁辐射光束 44。电磁辐射可以是激光，但是也可以是各种类型的电磁辐射，包括但是不限于微波辐射、紫外辐射等。当穿过含有相位移材料的粒子或囊状物或精子头部的体积时，电磁辐射通过物镜 45 聚焦到对电磁辐射波形特征产生响应的检测器上 46。检测器可以同分析器 47 联合使用。分析器可以根据穿过粒子体积前后的波形特征的变化区分粒子并且能够根据积分面积或者信号形状或者根据两者对信号进行分析。在本发明的特定实施方案中，对波形特征的分析包括当穿过粒子、囊状物或者精子细胞头部的体积时，将初始波形特征同改变的波形特征叠加。将初始波形特征和相位移动的波形特征叠加能够以同电磁辐射穿过的相移介质的量相关的形式分别调整电磁辐

射束的强度。本发明也应当包括有色滤光片一类的附加过滤设备 48。

现在参见图 24，光学装置发明的实施方案涉及到使用差别干扰对比光学装置，同常规的与显微镜分辨率限度一致的 DIC 显微镜检测相比较，能够使实际距离超过光裂缝。在本发明的这一实施方案中，诱导裂缝比物体的尺寸大，因此导致产生侧面分开的源自一个物体的两个独立图像。第二个改进涉及在离开物镜的位置用双折射材料板，例如 Savart 板。由于双折射材料不需要放置在物镜盒中，因此本发明实施方案易于构建。常规 DIC 显微镜中用的双折射材料是被称作 Wollaston 的棱镜，它必须放置于物镜盒中，这就不得不使用为这一目的特别生产的昂贵的物镜镜片。

10 本发明实施方案的组件可以互相之间排成一系列并且由电磁辐射源 43，例如水银弧光灯；光谱调节部件，例如带通滤波器；偏振调整部件 49，例如薄层起偏器 53 和对可旋转载片发生响应的光波板 54；能够使光线聚集到粒子或者精子细胞上的聚光器 51，例如聚光透镜，或者一套透镜，或者是显微镜物镜；含有粒子或精子细胞 28 的液流 8，例如在压力下由喷嘴喷出的液体；收集来自粒子或细胞的光线的光线收集器 45，例如 50 倍高工作距离的显微镜物镜以及管透镜；将光束分成两部分或者更多种成分的束分离设备 50，例如 Savart 板形式的一片双折射材料，以取向和位置能够被精确控制的形式装配；只选择相应于粒子或精子细胞的光的图像光选择器，例如一系列的针孔，每个针孔 53 针对每个形成的图像，所组成。

20 在本发明的一个实施方案中，可以将部件以通常被称作 Kohler 式照明的形式安装，即光源 43 或其图像位于聚光器 45 的后聚焦面上。物体的平面图像最好同物体的光线选择器 55 或者针孔 53 相符合，以捕获来自单个粒子或精子的光。如图 27 和 28 所示，可以用配件、支柱、和支架将部件安装在稳定的光学桌或光学台上。部件可以以某种形式安装以使物体平面
25 可以被精确地聚焦。这可以通过用流束位置控制器装液流来完成，例如测微仪，从而使流束转向以进入焦点或从焦点出来。另外可以给聚光器 51

装配一个聚光器位置控制器 61 以使其在物体平面上聚焦。需要特别注意的使有关双折射部件或者束分离器 50 的装配，优选的是三轴旋转部件。

现在参见图 25，本发明实施方案也可以包括利用两个生成的图像以确定液流中不对称粒子的取向，包括但是不限于牛精子细胞一类的精子。本
5 发明的取向测定的实施方案包括便于对进入能使两个独立生成图像的系统的光偏振化状态进行控制的光学装置。干涉光学装置的发明可以进一步提供控制进入装置的光的偏振化状态的偏振调节元件 56。对于取向检测发明，对偏振调节元件 56 的选择可以由两部分组成，它们在本发明一个实施方案中带针孔 53 的图像光选择器 55 上成像。这可以通过在图像平面 55
10 的结合面中间放置偏振调节部件 56 来完成，或者使用其它光学装置来完成相同的事情。这种部件的一个简单的例子是一种‘半影板’片，例如由两个偏振材料的半圆部分组成的，例如可以独立选择朝向角度的薄片起偏器。图像平面中的每个针孔可以落入到所述半球中的一个。可以这样选择偏振角从而使一个针孔信号 53 对应所述体积，并且与经过的物体的方向角度相
15 对独立，而其它针孔所具有的信号 53 则在很大程度上取决于这一方向角。可以用分析器 47 对这两种信号进行处理，方式同用常规多通道流式细胞仪相似，但是仅仅作为一个例子。对于这一实施例，可以制作双变量点状图，并且允许使用者也可以在这一图上选孔。

如上面描述的对‘半影板’片的一种改进可以是如图 25d 所示的构造。
20 所述的两个相同的半球部分被投影到图像平面上但是其产生的方式是不同的。反射镜 57 将光 44 分裂成半圆形，并且使它们背靠背再次结合。每一个半圆穿过一个控制其偏振状态的分离工具。本实施方案的优点是可以连续独立的控制偏振角，因此便于对装置进行调整。本实施方案所用的材料可以由标准的光学供应厂商提供，并且能够用类似用于干涉光学装置的装
25 配材料安装在设备中。

现在参见图 26，为了修正由于让光线通过了透明物质的非平面区域而

引入的人为假相，例如一个大体上是圆柱形但是也包括其它几何形状的液流，本发明的实施方案公开了将一个同非平面区域形状相似但是相对折射指数相反的结合部件。流式细胞仪中的特定情况是一个近似圆柱的形状。由于事实上要把将要被测评的物体置于柱状水流内，对因此引入的人工假相进行修正是在折射指数更高的透明材料 59 中合并放置一个能够形成透明柱面形状的光学部件 58。优选的是液流和补偿元件的图像相互落在各自图像平面的顶端。这可以通过在物镜和图像平面之间放置补偿元件并结合使用辅助透镜来完成。

光学部件 58 的一个实施方案是放置于具有更高折射指数的透明材料的薄片内 59，例如玻璃或者有机玻璃，在材料上钻一个柱形孔。有机玻璃的好处是比较容易在其上钻一个圆形通道。可以用透明材料填充柱形孔，填充的透明材料的折射指数低于周围的材料。该材料与其周围材料之间折射指数的差异同某些应用中流束中的水和周围空气之间折射指数的差异一样但是相反。只要所用透镜的放大率能够使图像平面中得到图像的大小一样，就没有必要使柱面的大小同水流相同。在一些应用中，希望或需要调整折射指数的差异以补偿这种放大。用有机玻璃制造这种元件十分简单，并且可以由众多的对有机玻璃或者所挑选材料进行机械加工具有经验的机械工场完成。可以将其规格制备成符合光学装配零件的标准以便于结合到光学装置中。

完全匹配的折射指数是困难的。本发明的一个便于调整的实施方案是使得有机玻璃，或其它所选择的材料中的物质 - 即一种透明折射指数液体 58 - 可以是有机油类，或者是具有同想要的折射指数相近的油类的混合物，但这些仅仅是举例。由于许多液体的折射指数比固体或玻璃更容易随温度变化，有可能通过温度对折射指数的差异进行精细调整。这可以通过连接一个温度控制器 60 来完成。

光学部件 58 的透明液体或者折射指数液体可以由化学供应厂商提供。

这些厂商通常有针对其可供液体折射指数的数据。有些厂商甚至提供专门用于折射液体的液体，并且具有保证和稳定的折射指数。许多厂商提供温度控制器和恒温器。对折射指数液体应用热量的一种实际方式是由热传导材料，例如金属（仅是举例），所制备的中空装置，其中含有折射指数液体。利用许多实验室拥有的常规浸式恒温循环控制装置，可以通过该装置抽水从而保持元件的温度稳定并且可以被控制。

在本 PCT 申请中所做的讨论的目的是作为一个基本的说明。读者应当清楚具体的讨论没有详细描述所有可能的实施方案；许多替代方式没有说明。也没有对本发明的一般性质做出充分的说明并且没有清楚地显示每一个特征或者元件如何能够实际代表广泛的功能或者各种替代或者等同元件。这些又一次隐含在本公开中。本发明以功能取向的术语描述的地方，功能的每一个方面是通过装置、子程序、或者程序而实现的。装置的权利要求不应当仅仅包括在描述过的装置中，也应当包括方法或者步骤权利要求以说明本发明和每个元件行使的功能。说明书或者术语的目的都不是要限制权利要求所没有包括的范围。

此外，本发明和权利要求的每一个不同元件也可以通过多种方式完成。应当理解本公开包括了每一个种类的改变，可以是实施方案中的任何装置实施方案的变化，一种方法或步骤实施方案的变化，或者甚至仅仅是其中任何元件的改变。尤其是，应当理解由于本公开涉及到本发明的元件，对每种元件所用的文字可以用相当的装置术语或者方法术语来表达 - 即使仅仅功能或结果是一样的。这些相等的，更广泛的，或者甚至更一般的术语应当被认为是包括在每一个元件或者作用的说明书中。在需要对隐含在本发明权利中所覆盖的广泛范围进行详细说明的地方，这样的术语可以被替换。作为但是仅仅一个实施例，应当理解所有的作用应当以实施该作用的方法或者导致该作用的元件来表述。类似的，应当理解所公开的每一个种物理元件都包括了该物理元件所促进的作用。针对这最后一方面，作为

但是仅仅是一个实施例，应当理解“液滴分离器”的公开包括了“分离液滴”作用的公开 - 不管是否详细讨论过 - 并且相反的，如果仅仅公开了“转化液体 - 气体”的作用，应当理解这样的公开包括了“液滴分离器”的公开以及甚至“分离液滴”的方法的公开。应当理解这样的术语的替换和改变显然包括在本说明书中。

另外，可以建立和出现对所有元件或者应用进行各种的组合以及改变。所有这些都可用于优化一个具体应用的设计或性能。

本申请为取得专利权所提到的任何法律，法令，条例，或者规则的行为：专利，或者公开出版物，或者其他本申请为取得专利权所提及的参考材料在此引入作为参考。具体地说，美国专利申请 60/267571，60/239,752，以及 60/203,089 都在此引入作为参考，这里包括任何数据或者附件，并且引入下面表格中的每一篇参考材料作为参考。

文献号	日期	名称	类	亚类	申请日
32,350	02/10/87	Bhattacharya	204	180. 1	11/22/74
3,687,806	08/29/72	Van den Bovenkamp	195	1. 3	11/04/69
3,829,216	08/13/74	Persidsky	356	36	10/02/72
3,894,529	07/15/75	Shrimpton	128	1 R	04/10/69
4,009,260	02/22/77	Ericsson	424	561	10/11/74
4,067,965	01/10/78	Bhattacharya	424	105	12/17/75
4,083,957	04/11/78	Lang	424	78	02/04/76
4,085,205	04/18/78	Hancock	424	105	01/24/77
4,092,229	05/30/78	Bhattacharya	204	180 R	10/20/76
4,155,831	05/22/79	Bhattacharya	207	299 R	02/23/78
4,191,749	03/04/80	Bryant	424	105	10/11/77
4,225,405	09/30/80	Lawson	204	180 R	08/16/78
4,276,139	06/30/81	Lawson	204	180 R	10/09/79
4,339,434	07/13/82	Ericsson	424	561	08/17/81
4,362,246	12/07/82	Adair	209	3.3	07/14/80
4,448,767	05/15/84	Bryant	424	85	02/15/80
4,474,875	10/02/84	Shrimpton	435	002	08/18/80
4,501,366	02/26/85	Thompson	209	556	12/14/82
4,511,661	04/16/85	Goldberg	436	503	12/30/83
4,605,558	08/12/86	Shrimpton	424	561	04/20/84
4,660,971	04/28/87	Sage 等	356	39	05/03/84
4,680,258	07/14/87	Hammerling 等	435	7	08/09/83
4,698,142	10/06/87	Muroi 等	204	182. 3	07/31/85
4,749,458	06/07/88	Muroi 等	204	182. 3	03/02/87
4,988,619	01/29/91	Pinkel	435	30	11/30/87
4,999,283	03/12/91	Zavos 等	435	2	08/18/89
5,021,244	06/04/91	Spaulding	424	561	05/12/89
5,135,759	08/04/92	Johnson	424	561	04/26/91

5,346,990	09/13/94	Spaulding	530	350	03/12/91
5,371,585	12/06/94	Morgan 等	356	246	11/10/92
5,439,362	08/08/95	Spaulding	424	185.1	07/25/94
5,466,572	11/14/95	Sasaki 等	435	2	04/25/94
5,483,469	01/09/96	Van den Engh 等	364	555	08/02/93
5,503,994	04/02/96	Shear 等	436	90	10/08/93
5,514,537	05/07/96	Chandler	435	002	11/28/94
5,589,457	12/31/96	Wiltbank	514	12	07-03-9
				5	
5,602,039	02/11/97	Van den Engh	436	164	10/14/94
5,602,349	02/11/97	Van den Engh	73	864.85	10/14/94
5,660,997	08/26/97	Spaulding	435	7.21	06/07/95
5,690,895	11/25/97	Matsumoto 等	422	73	12/06/96
5,700,692	12/23/97	Sweet	436	50	09/27/94
5,726,364	03/10/98	Van den Engh	73	864.85	02/10/97
5,819,948	10/13/98	Van den Engh	209	158	08/21/97
5,880,457	03/09/99	Tomiyama 等	250	207	06/16/97
5,985,216	11/16/99	Rens 等	422	073	07/24/97
6,071,689	06/06/00	Seidel 等	435	2	01/29/98
WO96/12171	13/10/95				
WO98/34094	06/08/98				
WO99/05504	07/24/98				
WO99/33956	08/07/99				
WO99/38883	05/08/99				
WO99/42810	26/08/99				
WO00/06193	10/02/00				

Akhtar, S.等, "家畜的性别预选:田间试验" ("Sex Preselected in Cattle: a Field Trial"), Veterinary Record 136, 1995, p. 495-496.

Akhtar, S.等, "巴基斯坦 Rambouillet 羊群中流行的五种立体型蓝舌病毒" ("Prevalence of Five Stereotypes of Bluetongue Virus in a Rambouillet Sheep Flock in Pakistan"), Veterinary Record 136,1995, p. 495.

Amann, R. P. 等, "对哺乳动物精子性别的堪察" ("Prospects For Sexing Mammalian Sperm,") Colorado Associated University Press, Animal Reproduction Laboratory College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, ForCollins, CO, 80523,1982

Amoah, E. A. 和 Gelaye, S. 1996. 山羊繁殖的生物技术进展 (Biotechnological advances in goat reproduction.) J. Anim. Sci. 75

(2): 578-585.
Anderson, V. K., Aamdal, J. 和 Fougner, J. A. 1973. Intrauterine und tiefzervikale Insemination mit Gefriersperma beim Schat. Zuchthygiene. 8: 113-118.
Baker, R. D., Dziuk, P. J. 和 Norton, H. W. 1968. 精子体积, 数量以及药物对精子在人工授精小母猪内运输的影响 (Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts.) J. Anim. Sci. 27: 88-93.
Barnes, F. L.. 和 Eyestone, W. H., “牛胚胎中的早期卵裂以及母核子转变” (“Early Cleavage and the Maternal Zygotic Transition in Bovine Embryos”), Theriogenology, Vol. 33, No. 1, January 1990, pp. 141-149
Becker, S. E. 和 Johnson, A. L. 1992. 促性腺激素以连续或者间断的形式释放的激素对母马血清促性腺激素浓度和排卵的影响 (Effects of gonadotropin releasing hormone infused in a pulsatile or continuous fashion on serum gonadotropin concentrations and ovulation in the mare.) J. Anim. Sci. 70: 1208-1215.
Bedford, S. J. 和 Hinrichs, K. 1994. 授精体积对小母马妊娠率的影响 The effect of insemination volume on pregnancy rates of pony mares. Theriogenology 42: 571-578.
Berger, G. S. 1987. Intratubal insemination. Fert. Steril. 48: 328-330.
Beyhan, Z., 等, “产自用高速流式细胞仪分类的带 X-染色体和带 Y-染色体的 IVM-IVF 牛胚胎中的雌雄两性” (“Sexual Dimorphism in IVM-IVF Bovine Embryos Produced from X and Y Chromosome-bearing Spermatozoa Sorted by High Speed Flow Cytometry”,) Theriogenology 52,1999, pp. 35-48.

Blanchard, T. 和 Dickson, V., “种马管理” ("Stallion Management"), The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice, Vol. 8, No. 1, April 1992, pp 207-218.

Bracher, V. 和 Allen, W. R., “母马子宫的内窥镜检查: 正常可生育母马中的发现” ("Videoendoscopic Examination of the Mare's Uterus: Findings in Normal Fertile Mares"), Equine Veterinary Journal, Vol. 24 (1992), pp. 274-278

Braselton, W. E. 和 McShan, W. H. 1970. 刺激和黄体化马垂体腺激素的卵泡的纯化和特性 (Purification and properties of follicle stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands.) Arch. Biochem. Biophys. 139: 45-48.

Brethour, J. R. 和 Jaeger, J. R., “单一的小母牛体系” ("The Single Calf Heifer System"), Kansas Agric. Sta. Rep of Progress 570,1989.

Bristol, S. P. 1982. 牧场种马和 20 头母马处于同时发情期的生殖行为(Breeding behavior of a stallion at pasture with 20 mares in synchronized oestrus.) J. Reprod. Fert. Suppl. 32: 71.

Buchanan, B. R., 等, “用少量的无性征或者有性征的精子使母马授精” ("Insemination of Mares with Low Numbers of Either Unsexed or Sexed Spermatozoa"), Theriogenology, Vol. 53, pp 1333-1344, (2000)

Burwash, L. D., Pickett, B. W., Voss, J. L. 和 Back, D. G. 1974. 非哺乳母马正常循环中受孕率同储存时间的关系 (Relationship of duration of estms to pregnancy rate in normally cycling, non-lactating mares.) J. A. V. M. A. 165: 714-716.

Caslick, E. A., “外阴和阴道口及其同健康良种母马的关系” ("The Vulva and the Vulvo-vaginal Orifice and its Relation to Genital

Health of the Thoroughbred Mare"), Cornell Veterinarian, Vol. 27,1937, pp. 178-187

Catt, 等,在用流式细胞仪对羊和猪的精子进行分类期间的评价 ("Assessment of Ram and Boar Spermatozoa During Cell-Sorting by Flow Cytometry"), Reproduction Dom Animal, Vol. 32,1997, pp 251-258.

Catt, S. L., 等, “用细胞质内注射单一预期雄性精子在体外使成熟卵母细胞授精而获得的雄性羊羔的生产” ("Birth of a Male Lamb Derived from an In Vitro Matured Oocyte Fertilized by Intracytoplasmic Injection of a Single Presumptive Male Sperm"), Veterinary Record 139,1996, pp. 494-495.

Chandler, J. E., 等, “牛精子头部尺寸差异以及对根据这种尺寸的分离技术的评价” ("Bovine Spermatozoal Head Size Variation and Evaluation of a Separation Technique Based on this Size"), Theriogenology 52, p. 1021-1034 (1999)

Chandler, J. E., “牛精子和同性别有关的白细胞染色体区域的显微影像比较” ("Videomicroscopic Comparison of Bull Sperm and Leukocyte Chromosome Areas as Related to Gender"), J Dairy Sci 73, pp. 2129-2135, (1990)

Chin, W. W. 和 Boime, I. 1990. In : 糖蛋白激素(Glycoprotein Hormones.) Serona Symp. Norwell, MA. pp. 19-20

Chung, Y. G., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A. 和 Seidel, G. E. Jr. 1998. 用 600,000 有性精子对排卵过度的小母牛进行人工授精 (Artificial insemination of superovulated heifers with 600,000 sexed sperm.)J Anim. Sci. Suppl. 1. 836: 215. abstr.

Clement, F., Vincent, P., Mahla, R., Meriaux, J. C. 和 Palmer, E. 1998. 排卵前进行几次连续授精时哪一种授精受孕 (Which

insemination fertilizes when several successive inseminations are performed before ovulation.) 7th Int. Symp. Eq. Repro. 151. abstr.

Cran, D. G., 等,用流式细胞仪分类和未分类的精子进行低剂量子宫内授精生产羊羔 ("Production of Lambs by Low Dose Intrauterine Insemination with Flow Cytometrically Sorted and Unsorted Semen"), *Theriogenology*, Vol. 47, pp. 267, (Abstract), (1997)

Cran, D. G., 等,“在将带 X-染色体和带 Y-染色体的精子进行分类并在体外授精后生产小牛” ("Production of Bovine Calves Following Separation of X-and Y-Chromosome Bearing Sperm and In Vitro Fertilisation"), *Veterinary Record* 132,1993, pp. 40-41.

Cran, D. G., Johnson, L. A. 和 Polge, C., 1995, “家畜的性别预选: 田间试验” ("Sex preselection in cattle: a field trial",) *Vet. Rec.* 136 : 495-496.

Cui, K., “人 X 精子和 Y 精子的大小差异以及预授精的诊断” ("Size Differences between human X and Y Spermatozoa and prefertilization diagnosis"), *Molecular Human Reproduction*, Vol. 3, No. 1, pp. 61-67, (1997)

Cui, K., “X 比 Y 大” ("X Larger than Y"), *Nature* 366, p. 177-118, (1993)

Curran, S. 1998. In: 马的超声波诊断 胎儿性别确定 (*Equine Diagnostic Ultrasonography. Fetal gender determination.*) Rantanen & McKinnon. 1 set Ed. Williams and Wilkins. pp. 165-169.

Day, B. N., Abeydeera, L. R., Johnson, L. A., Welch, G. R., Wang, W. H., Cantley, T. C. 和 Rieke, A. 1998.用高速流式细胞仪分类的带 X 和带 Y 的染色体对成年猪的卵母细胞进行体外或者体内授精从而对出生的猪进行性别预选(Birth of piglets preselected

for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry.) Theriogenology. 49 (1) : 360. abstr.

Dean, P. N., Pinkel, D. 和 Mendelsob. n, M. L. 1978. 用于流式细胞仪的精子头部水动力学定向 (Hydrodynamic orientation of spermatozoa heads for flow cytometry.) Biophys. J. 23: 7-13.

Demick, D. S., Voss, J. L. 和 Pickett, B. W. 1976. 精子的冷却, 储藏, 糖基化以及数量对马授精的影响 (Effect of cooling, storage, glycerization and spermatozoal numbers on equine fertility.) J. Anim. Sci. 43: 633-637.

DenDaas, J. H. G., De Jong, G., Lansbergen, L. M. T. E. 和 Van Wagendonk-De Leeuw, A. M. 1998. 精子授精数量和奶牛生殖效率之间的关系 (The relationshi between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of dairy bulls.) J Dairy Sci. 81 : 1714-1723.

Dinnyes, A., 等, 授精后第一次卵裂的时间选择对体外生产的牛胚胎的冷存活的影响 ("Timing of the First Cleavage Post-insemination Affects Cryosurvival of In Vitro-produced Bovine Blastocysts"), Molec Reprod develop 53, 1999, pp 318-324.

Donaldson, L. E., 授精方法对产卵过度的母牛的胚胎生产的影响 ("Effect of Insemination Regimen on Embryo Production in Superovulated Cows"), The Veterinary Record, July 13, 1985, pp. 35-37

Donoghue, 等, 1996. 促性腺素诱导后排卵时间的选择及其对老虎子宫内授精成功的重要性 ("Timing of ovulation after gonadotropin induction and its importance to successful intrauterine insemination in the tiger (Panthera tigris)"), J. Reprod. Pert. 107:

53-58.

Douglas, R. H. 1979. 马的超排卵和胚胎转移的回顾("Review of superovulation and embryo transfer in the equine"), *Theriogenology*. 11: 33-46.

Douglas, R. H., Nuti, L. 和 Ginther, O. J. 1974. 通过马垂体部分诱导季节性不排卵的母马诱导排卵并且多排卵(Induction of ovulation and multiple ovulation on seasonally anovulatory mares with equine pituitary fractions.) *Theriogenology*. 2 (6): 133-142.

Duchamp, G., Bour, B., Combamous, Y. 和 Palmer, E. 1987. 在母马中诱导 hCG 的供选择的解决方法 (Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare.) *J. Reprod. Fert. Suppl.* 35: 221-228.

Evans, M. J. 和 Irvine, C. H. G. 1977. 给非排卵期的母马施用促性腺素释放的激素以诱导卵泡发育, 成熟并排卵(Induction of follicular development, maturation and ovulation by gonadotropin releasing hormone administration to acyclic mares.) *Bio. Reprod.* 16 : 452-462.

Fitzgerald, B. P., Peterson, K. D. 和 Silvia, P. J. 1993. 固定施用促性腺素释放的激素拮抗剂对母马生殖活性的影响: 在繁殖季节对排卵抑制的早期现象(Effect of constant administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist on reproductive activity in mares: Preliminary evidence on suppression of ovulation during the breeding season.) *Am. J. Vet. Res.* 54: 1746-1751.

Fluharty, F. L., 等, 断奶年龄和饮食对小牛生长的影响("Effects of Age at Weaning and Diet on Growth of Calves"), *Ohio Agri. Res. and Dev. Circular*, 1996, 156 : 29.

Foulkes, J. A., 等, 1977. 用不同数量的精子对家畜进行人工授

<p>精 ("Artificial insemination of cattle using varying numbers of spermatozoa"), Vet. Rec. 101: 205.</p>
<p>Franco, M. 和 Yamamoto, T., "Un Nouveau et tres simple dispositif interferentiel applicable as microscope", Optica Acta 9, p. 395-408 (1962)</p>
<p>Fugger, E. F., “用流式细胞技术分离人的带 X-和带 Y-染色体的临床经验” ("Clinical Experience with Flow Cytometric Separation of Human X-and Y-Chromosome Bearing Sperm"), Theriogenology, Vol. 52, pp. 1435-1440 (1999)</p>
<p>Fulwyler, M. J. 1965. “利用体积对生物细胞进行电子分离” ("Electronic separation of biological cells by volume"), Science. 150: 910.</p>
<p>Fulwyler, M. J. 1977. “细胞的水动力学定向” ("Hydrodynamic orientation of cells"), J Histochem. Cytochem. 25: 781-783.</p>
<p>Garner, D. L., 等, 1983. “用流式细胞仪对家畜的带 X 和带 Y-染色体的精子定量” ("Quantification of the X and Y chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry"), Biol. Reprod. 28: 312-321.</p>
<p>Ginther, O. J. 1971. 改变母马发情周期的一些因素 ("Some factors which alter estrus cycle in mares"), J. Anim. Sci. 33: 1158. abstr.</p>
<p>Ginther, O. J. 1983. “在一群母马中引入种马后的性行为” ("Sexual behavior following introduction of a stallion into a group of mares"), Theriogenology. 19: 877.</p>
<p>Ginther, O. J. 1992. “母马的生殖生物学” ("In: Reproductive Biology of the Mare"), (2nd Ed.) Equiservices, Cross Plains, WI.</p>
<p>Gledhill, B. L. 1988. 性别预选: 历史, 技术以及伦理透视 (Gender preselection: historical, technical and ethical</p>

perspective.)Semin Reprod. Endocrinol. 6: 385-395.
Gourley, D. D. and Riese, R. L. 1990. 绵羊的人工授精的腹腔镜检(Laparo scopic artificial insemination in sheep.) Vet. Clin. N. Amer: Food Anim. Prac. 6 (3): 615-633.
Grondahl, C., 等, “马胚胎的体外生产” (“In Vitro Production of Equine Embryos”), Biology of Reproduction, Monograph Series I, pp.299-307 (1995)
Guillou, F. 和 Combamous, Y. 1983. 马促性腺素的纯化和它们酸性解离以及受体结合特异性的比较研究(Purification of equine gonadotropins and comparative study of their aciddissociation and receptor-binding specificity.) Biochem. Biophys. Acta. 755: 229-236.
Gurnsey, M. P., 和 Johnson, L. A., “流式细胞技术对家畜带 X-染色体和带 Y-染色体的精子进行分类的效率的最新进展: 一个回顾” (“Recent improvements in efficiency of flow cytometric sorting of X and Ychromosome bearing sperm of domestic animals: a review”), 1998, New Zealand Society of Animal Protection, 3 页.
HAMAMATSU, 光电倍增管(Photomultiplier Tubes)", web page, http://www.optics.org/hamamatsu/pmt.html , printed out on 4/15/00, 共 4 页.
HAMAMATSU, 技术信息(Technical Information)", web page, http://www.optics.org/hamamatsu/photodiode.html , printed out on 4/15/00, 共 6 页.
Hamano, K., 等, “利用细胞质内注射流式细胞技术分类的精子头部预选家畜性别” (“Gender Preselection in Cattle with Intracytoplasmically Injected, Flow Cytometrically Sorted Sperm Heads”), Biology of Reproduction 60,1999, pp. 1194-1197.
Harrison, L. A., 等, 1991. 用于诱导周期母马排卵的 hGG, 乙基

酰胺和鲁前列腺素的比较(Comparison of hCG, buserelin and luprostirol for induction of ovulation in cycling mares.) Eq. Vet. Sci. 3: 163-166.

Hawk, H. W., 等, “子宫输卵管结合处附近的精子沉淀后或者用大量的精子授精后过量排卵母牛的授精率” (“Fertilization Rates in Superovulating Cows After Deposition of Semen on the Infundibulum Near the Uterotubal Junction or After Insemination with High Numbers of Sperm”), Theriogenology, May 1988, Vol. 29, No. 5, pp 1131-1142.

Hofferer, S., Lecompte, F., Magallon, T., Palmer, E. 和 Combamous, Y. 1993. 用疏水作用层析法分离的马 LH 和 FSH 诱导母马排卵以及过度排卵 (Induction of ovulation and superovulation in mares using equine LH and FSH separated by hydrophobic interaction chromatography.) J.Reprod. Fert. 98: 597-602.

Holtan, D. W., Douglas, R. H. 和 Ginther, O. J. 1977. 在矮种母马中使用了孕酮, 前列腺素 F2 ct 和人绒毛促性腺素后的发情, 排卵和妊娠 (Estrus, ovulation and conception following synchronization with progesterone, prostaglandin F2 ct and human chorionic gonadotropin in pony mares.) J. Anim. Sci. 44: 431-437.

Householder, D. D., Pickett, B. W., Voss, J. L. and Olar, T. T. 1981. 膨胀剂, 精子的数量以及 hCG 对马生育力的影响(Effect of extender, number of spermatozoa and hCG on equine fertility.) J. Equine Vet. Sci. 1: 9-13.

Howard, J. G., 等, 1991. “在用冻融精子腹腔镜技术子宫内授精后白鼬 (*Mustela putorius furo*) 精子冷藏和妊娠的比较” (“Comparative semen cryopreservation in ferrets (*Mustela putorius*

<p>furo) and pregnancies after laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa".) J. Reprod. Fert. 92: 109-118.</p>
<p>Howard, J. G., 等, 1997. “外源促性腺素对云豹和 theetab 的排卵和腹腔镜人工授精敏感性” (“Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation and laparoscopic artificial insemination in the theetab and clouded leopard”). Biol. Reprod. 56: 1059-1068.</p>
<p>Hunter, R. H. F. 1980. 在雌性生殖道内精子的运输和储存 (Transport and storage of spermatozoa in the female reproductive tract.) Proc 4th Int. Congr. Artira. Repro. and A. I. 9: 227-233.</p>
<p>Hyland, J. H., 等, 1988. “通过持续给非发情期的母马注入传送促性腺素释放的激素而诱导发情期” (“Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) delivered by continuous infusion induces fertile estrus in mares during seasonal acyclicity”). Proc. Amer. Assoc. Eq. Prac. 181-190.</p>
<p>Irvine, C. H. G. 和 Alexander, S. L., 马的生殖 (In : Equine Reproduction.) Edited by McKirmon and Voss. Lea and Febiger. Philadelphia, London. pp. 37. (1993)</p>
<p>Jafar, 等, “哺乳动物性别选择回顾” (“Sex Selection in Mammals: A Review”), Theriogenology, Vol. 46, pp 191-200 (1996)</p>
<p>Jasko, D. J., Martin, J. M. 和 Squires, E. L. 1992. 精子的体积和浓度对母马胚胎恢复的影响 (Effect of volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares.) Theriogenology. 37: 1233-1239</p>
<p>Johnson, A. L. 1986. “促性腺素释放的激素的搏动释放促进发情期的母马排卵” (“Pulsatile release of gonadotropin releasing hormone advances ovulation in cycling mares”). Biol. Reprod. 35: 1123-1130.</p>
<p>Johnson, A. L. 和 Becker, S. E. 1988. “利用促性腺素释放的激</p>

素 (GnRH) 处理以诱导发情期的母马大量排卵” (“Use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment to induce multiple ovulations in the anestrus mare”), Eq. Vet. Sci. 8: 130-134. (1988)

Johnson, L.. A., “对猪的性别预选的进展” (“Advances in Gender Preselection in Swine”) Journal of Reproduction and Fertility Supplement, Vol. 52, pp. 255-266 (1997)

Johnson, L.. A., “猪的性别预选: 用流式分类的带 X-和 Y-的精子进行外科授精后改变后代性别比例” (“Sex Preselection in Swine: Altered Sex Ratios in Offspring Following Surgical Insemination of Flow Sorted X-and Y-Bearing Sperm”), Reproduction in Domestic Animals, Vol. 26, pp. 309-314 (1991)

Johnson, L. A. 和 Welch, G. R. “性别预选: 达到最高效的高速流式细胞仪分类的 X 和 Y 精子” (“Sex Preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency”), Theriogenology, Vol. 52, (1999), pp. 1323-1341

Johnson, L. A. 和 Schulman, J. D. “用流式细胞仪选择精子的安全性” (“The safety of sperm selection by flow cytometry”), Ham. Reprod. 9 (5): 758. (1994)

Johnson, L. A., 和 Pinkel, D., 对用于哺乳动物精子的高分辨率 DNA 分析的基于激光的流式细胞仪的改进 (“Modification of a Laser-Based flow Cytometer for High-Resolution DNA Analysis of Mammalian Spermatozoa”), Cytometry 7, pp 268-273. (1986)

Johnson, L. A., 等, “兔子的性别预选:通过对 DNA 和细胞分类而分离的来自 X 和 Y 精子的活性分娩” (“Sex Preselection in Rabbits: Live Births from X and Y Sperm Separated by DNA and Cell Sorting”, Exceptional Paper-Rapid Publication,) XP-002103476, Biology of Reproduction 41, pp. 199-203 (1999)

Johnson, L. A., 等, “用改进的制备方法并用 Hoechst 33342 染色的对带 X 染色体和带 Y 染色体的精子进行流式分离” (“Flow sorting of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342”), *Gam. Res.* 17: 1-9., (1987)

Johnson, L. A., 等, “改进的流式细胞技术筛选哺乳动物 X 和 Y 精子: 人工授精的高速筛选和定向” (“Enhanced flow cytometric sorting of mammalian X and Y sperm: high speed sorting and orienting for artificial insemination.”) *Theriogenology*. 49 (1) : 361. Abstr. (1988)

Johnson, L. A., 等, “猪的性别预选: 流式细胞技术筛选带 X-和带 Y-染色体的精子以生产后代” (“Sex Preselection in Swine: Flow Cytometric Sorting of X-and Y-Chromosome Bearing Sperm to Produce Offspring”), *Boar Semen Preservation IV*, pp. 107-114 (2000)

Johnson, L. A., 等, “用双重染色和死细胞选通提高流式筛选带 X-和带 Y-染色体的活精子的分辨率” (“Improved flow sorting resolution of X-and Y-chromosome bearing viable sperm separation using dual staining and dead cell gating.”) *Cytometry* 17 (suppl 7): 83. (1989)

Johnson, L. A., “用流式细胞技术对精子的性别比率进行限定是为了富集带 X 或 Y 的精子” (“Flow cytometric determination of spermatozoa sex ratio in semen purportedly enriched for X or Y bearing spermatozoa.”) *Theriogenology*. 29: 265. abstr. (1988)

Johnson, L. A. “用流式细胞筛选的精子对家畜动物进行性别预选” (“Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm.”) *J Anim. Sci. Suppl* 1.70: 8-18. (1992)

Johnson, L. A., “哺乳动物的性别预选：回顾” (“Gender preselection in Mammals : An overview”), *Deutsch. Tierarztl. Wschr.*, Vol. 103, pp 288-291 (1996)

Johnson, L. A. 分离带 X 和带 Y 的精子用于性别预选 (“Isolation of X-and Y-bearing spermatozoa for sex preselection. li7): *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Ed. HH Charlton. Oxford University Press. 303-326 (1994)

Johnson, L. A., “对耕作动物成功的性别预选” (“Successful Gender Preselection in Farm Animals”), *Agricultural Biotechnology*, 1998, pp. 439-452.

Kachel, V., 等, “流式通过系统中平面粒子在流力作用下的统一测向取向” (“Uniform Lateral Orientation, Cused by Flow Forces, of Flat Particles in Flow-Through Systems”), *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1997, Vol. 25, No. 7, pp 774-780.

Kanayama, K., 等. “通过输卵管授精以及其后的自然妊娠的兔子受孕” (“Pregnancy by means of tubal insemination and subsequent spontaneous pregnancy in rabbits”), *J. Int. Med. Res.* 20: 401-405. (1992)

Karabinus, 等, “卵黄 - 柠檬酸盐和乳汁膨胀剂对冷藏的牛精子染色质结构活性的影响” (“Effects of Egg Yolk-Citrate and Milk Extenders on Chromatin Structured Viability of Cryopreserved Bull Sperm”), *Journal of Dairy Science*, Vol. 74, No. 11, 1999, pp 3836-3848.

Kilicarlan, M. R., Horoz, H., Senunver, S. C., Konuk, S. C., Tek, C. and Carioglu, B. 1996. GrnRH 和 hCG 对母马排卵和妊娠的影响 (Effect of GrnRH and hCG on ovulation and pregnancy in mares.) *Vet. Rec.* 139: 119-120.

Lapin, D. R. 和 Ginther, O. J. 1977. 用马垂体提取物对季节性不排卵和排卵母马的排卵和大量排卵的诱导(Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract.) J. Anim. Sci. 44: 834-842.

Lawrenz, R. 1985. “用冻融的精子进行非外科子宫内授精的初期结果”(Preliminary results of non-surgical intrauterine insemination of sheep with thawed frozen semen.) J S Afr. Vet. Assoc. 56 (2): 61-63.

Levinson, G., 等, “基于 DNA 的富含 X 的精子分离物作为辅剂用于与 X 相关疾病的标本的植入前的遗传检测”(“DNA-based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the preparation of X-linked disease”), Mol. Human Reprod. 10: 979-982. (1995)

Lindsey, A., 等, “用未冷冻的低剂量无性或者性别筛选的精子对母马进行子宫镜授精”(“Hysteoscopic Insemination of Mares with Nonfrozen Low-dose Unsexed or Sex-sorted Spermatozoa”), Currently unpublished, pp. 1-15.

Linge, F. "Faltforsok med djupfrost sperma 用冷冻精子的田间试验(field trials with frozen sperm)", Farskotsel. 52: 12-13. (1972)

Lonergan, P., 等, “从授精到第一次卵裂的间隔时间对体内和体外牛胚胎发育的影响”(“Effect of Time Interval from Insemination to First Cleavage on the Development of Bovine Embryos In Vitro and In Vivo”), Theriogenology, 1999, p. 326

Long, C. R., 等, Theriogenology. 49 (1) : 363. abstr. (1998)

Loy, R. G. 和 Hughes, J. P. “人绒毛促性腺素对母马排卵, 发情期长度, 以及生育力的影响”(“The effects of human chorionic gonadotropin on ovulation, length of estrus, and fertility in the

mare"). Cornell Vet. 56: 41-50. (1965)
Lu, K. H., 等, “用流式细胞分离技术筛选的牛精子进行体外授精” (“In Vitro Fertilization with Flow-Cytometrically-Sorted Bovine Sperm”), Theriogenology 52,1999, pp. 1393-1405.
Macmillan, K. L. 和 A. M. Day, “前列腺素 F2a-是奶牛的生育药物吗?” (“Prostaglandin F2a-A Fertility Drug In Dairy Cattle?”), Rualcura Animal Research Station, Private Bag, Hamilton, New Zealand, Theriogenology, September 1982, Vol. 18 No. 3, pages 245-253
Matsuda, Y. 和 Tobari, I. “同暴露于紫外光(UV)和甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯中的精子对鼠卵子进行体外授精的染色体分析” (“Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light (UV) and methyl and ethyl methanesulfonate (MMS and EMS)”), Mutat. Res. 198: 131-144. (1988)
Maxwell, W. 和 Johnson, L., “温育, 流式细胞筛选, 冷却, 或者冷藏后对野猪精子进行金霉素分析” (“Chlortetracycline Analysis of Boar Spermatozoa after Incubation, Flow Cytometric Sorting, Cooling, or Cryopreservation”), Molecular Reproduction and Development 46, 1997, pp. 408-418.
Maxwell, W., 等, “用少量的新鲜或者冻融的精子进行子宫内或者输卵管内授精后的过度排卵的母羊的生育力” (“Fertility of Superovulated Ewes after Intrauterine or Oviductal Insemination with Low Numbers of Fresh or Frozen-Thawed Spermatozoa”), Reprod. Fertil. Dev. 5: 57-63. (1993)
McCue, P. M., 等, “母马的输卵管内授精” (“Oviductal insemination in the mare”), 7th Int Symp. Eq. Reprod. 133. abstr.

(1997)
McCue, P. M., “过量排卵” (“Superovulation”), <i>Vet. Clin. N. Amer. Eq. Prac.</i> 12: 1-11. (1996)
McDonald, L. E., “垂体腺激素” (“Hormones of the pituitary gland”), In: <i>Veterinary Pharmacology and Therapeutics</i> . 6th ed., Ames, Iowa State Univ. Press. pp. 590. (1988)
McKeuna, T., 等, “用子宫体或者 comual 给奶牛授精后的未回转率” (“Nonreturn rates of dairy cattle following uterine body or comual insemination”), <i>J. Dairy Sci.</i> 73: 1179-1783. (1990)
McKinnon, A. 和 Voss, J., “马的繁殖” (“Equine Reproduction”) Lea & Febiger, Philadelphia, pp 291,299-302,345-348,739 -797. (1993)
McKinnon, A. 等, “用 GnRH 类似物 deslorelin 处理的母马的可预测排卵” (“Predictable ovulation in mares treated with an implant of the GnRH analogue deslorelin”), <i>Eq. Vet. J.</i> 25: 321-323. (1993)
McKinnon, A. O. 等, “重复使用 GnRH 类似物 deslorelin (Ovuplant) 加速过渡期母马的排卵” (“Repeated use of a GnRH analogue deslorelin (Ovuplant) for hastening ovulation in the transitional mare”), <i>Eq. Vet. J.</i> 29: 153-155. (1996)
McNutt, T. L. 和 Johnson, L. A., “流式细胞技术筛选精子: 对兔子的生育和胚胎/胎儿发育的影响” (“Flow cytometric sorting of sperm : influence on fertilization and embryo/fetal development in the rabbit”), <i>Mol. Reprod. Dev.</i> 43: 261-267. (1996)
Meinert, C., 等, “用释放 GnRH 类似物 deslorelin 的短期移植物提高母马的排卵时间” (“Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin”), <i>Equine Veterinary Journal</i> , 25,1993, pp 65-68.

Merton, J., 等, “流式细胞技术筛选的冷冻/融化精子对体外牛胚胎生产成功率的影响” (“Effect of Flow Cytometrically Sorted Frozen/Thawed Semen on Success Rate of In Vitro Bovine Embryo Production”), *Theriogenology* 47,1997, pp. 295.

Meyers, P. J., Bowman, T., Blodgett, G., Conboy, H. S., Gimenez, T., Reid, M. P., Taylor, B. C., Thayer, J., Jochle, W. 和 Trigg, T. E. 1997. 利用缓释移植物中 GnRH 类似物醋酸 deslorelin 加速发情期母马的排卵 (Use of the GnRH analogue, deslorelin acetate, in a slow release implant to accelerate ovulation in oestrous mares.) *Vet. Rec.* 140: 249-252.

Michaels, Charles, “Beef A. I. 便于那项工作” (“Facilities that work”), *Proc. Fifth N. A. A. B Tech. Conf. A. I. Reprod. Columbia, MO.* pp. 20-22.

Michel, T. H., 等, “人类绒毛膜促性腺激素和促性腺素释放方激素对加速良种母马排卵的功效率” (“Efficacy of human chorionic gonadotrophin and gonadatrophin releasing hormone for hastening ovulation in Thoroughbred mares”), *Eq. Vet. J.* 6: 438-442. (1986)

Miller, S. J., “羊的人工繁殖技术” (“Artificial Breeding Techniques in Sheep”), In Morrow D. A. (ed): *Current Therapy in Theriogenology 2 Philadelphia, WB Saunders.* (1986)

Mirskaja, L. M. 和 Petrapavlovskii, V. V., “通过施用绒毛膜促性腺激素的母马生殖高潮的一般持续时间” (“The reproduction of normal duration of heat in the mare by the administration of Prolan”), *Probl. Zivotn. Anim. Breed. Abstr.* 5: 387. (1937)

Molinia, F. C., Gibson, R. J., Brown, A. M., Glazier, A. M. 和 Rodger, J. C. 1998. 对 brushtail possum, *Triclzosurus vulpecula*, and tammar wallaby, *Macropus eugenii* 进行腹腔镜子宫内和超速排卵

授精后受孕成功 (Successful fertilization after superovulation and laparoscopic intrauterine insemination of the brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*, and tammar wallaby, *Macropus eugenii*). *J. Reprod. Fert.* 112: 9-17.

Morcom, C. B. 和 Dukelow, W. R. “用腹腔镜检对猪输卵管授精的研究方法” (“A research technique for the oviductal insemination of pigs using laparoscopy”), *Lab. Anim. Sci.* 1030-I031. (1980)

Morris, L. H., 等, “少量精子对排卵期前母马的子宫输卵管结合处进行子宫镜授精” (“Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares”), *Journal of Reproduction and Fertility*, Vol. 118, pp. 95-100 (2000)

Mullet, W. 和 Gautier, F., “杂环化合物同核酸的相互作用” (“Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids”) *Euro. J Biochem.* 54: 358 (1975)

Munne, S., “流式细胞分离的 X 和 Y 精子可能对人胚胎有害” (“Flow cytometry separation of X and Y spermatozoa could be detrimental to human embryos”), *Hum. Reprod.* 9 (5): 758, (1984)

Nowshari, 等, “添加一有定量 pLH 的纯化的 pFSH 与山羊的超量排卵” (“Superovulation of Goats with Purified pFSH Supplemented with Defined Amounts of pLH”), *Theriogenology*, Vol 43, pp 797-802 (1995)

Olson, S. E. 和 Seidel, G. E. Jr., “减少的氧气压力和 EDTA 促进化学定义培养基中的牛授精卵的发育” (“Reduced Oxygen Tension and EDTA improve Bovine Zygote Development in a Chemically Defined Medium”), *Journal of Animal Science* 78,2000, pp. 152-157.

Pace, M. M. 和 Sullivan, J. J., “授精时间, 精子数量以及膨胀

剂组分对用冷冻种马精液授精母马的妊娠率的影响” (“Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on pregnancy rates in mares inseminated with frozen stallion semen”), J Reprod. Fert. Suppl. 23: 115-121 (1975)

Parrish, J. J., 等, “通过肝素使牛精子获得能量” (“Capacitation of bovine sperm by heparin”), Biology of Reproduction, Vol. 38, pp. 1171-1180 (1988)

PCT application PCT/US99/17165, filed 28 July 1999, entitled “非外科人工授精的马系统” (“Equine System for Non-Surgical Artificial Insemination”).

PCT application PCT/US98/27909, filed 31 December 1998, entitled “哺乳动物特定性别授精的商业实践” (“Commercially Practical Sex-Specific Insemination of Mammals”).

Peippo, J., 等, “用聚合酶链式反应对马预植胚胎性别的诊断” (“Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction”), Theriogenology, Vol. 44 619-627 (1995)

Perry, E. J. “历史背景: 田间动物的人工授精” (“Historical Background In: The Artificial nsemination of Farm Animals”), 4th ed. Edited by E. J. Perry. New Brunswick, Rutgers University Press, pp. 3-12., (1968)

Petersen, G. A., 等, “母牛和小牛行为以及早期断奶对牛肉的经济考虑” (“Cow and Calf Performance and Economic Considerations of Early Weaning of Fall-Born Beef Claves”), J. Anim. Sci., 1987,64: 15, pp 15-22.

Piclcett, B. W., 等, “在 A.I.方案中影响种马精子生育力的因素” (“Factors influencing the fertility of stallion spermatozoa in an A. I. program”), Proc. 8th Internat. Congr. Anim. Reprod. A. I. Krakow, Poland. 4: 1049-1052. (1976)

Pickett, B. W., 和 Shiner, K. A., “马人工授精的最新进展” (“Recent developments in artificial insemination in horses”), *Livestock Production Science*, 40,1994, pp 31-36.

Pickett, B. W. 和 Back, D. G., “种马精子的制备, 收集, 评估以及授精方法” (“Procedures for preparation, collection, evaluation and insemination of stallion semen”). *C. S. U. Exp. Sta. Artira. Reprod. Lab. Gen. Series Bull.* 935. (1973)

Pickett, B. W., 等, “精子膨胀剂对马授精的影响” (“Effect of seminal extenders on equine fertility”), *J. Anim. Sci.* 40: 1136-1143. (1975)

Pickett, B. W., 等, “精子添加剂和包装系统对牛精子授精的影响” (“Influence of seminal additives and packaging systems on fertility of bovine spermatozoa”), *J. Anim. Sci. Suppl. II.* 47: 12. (1978)

Pickett, G. W., 等, “对最大生殖率的母马的经营” (“Management of the mare for maximum reproductive efficiency”) *Bulletin No. 6 Colorado State University, Ft. Collins CO.* (1989)

Pinkel, D., 等, “哺乳动物精子高分辨率 DNA 的测定” (“High resolution DNA measurements of mammalian spermatozoa”). *Cytometry.* 3: 1-9. (1982)

Pinkel, D., 等, “流式细胞技术鉴定分离的牛精子样品中带 X 染色体和带 Y 染色体精子的比例” (“Flow Cytometric Determination of the Proportions of X-and Y-Chromosome-Bearing Sperm in Samples of Purportedly Separated Bull Sperm”), *Journal of Animal Science*, Vol. 60, No. 5,1985, pp 1303-1307.

Polge, E. J., “AI 的历史透视: 生产特定性别精子的商业方法, IVF 步骤” (“Historical Perspective of AI : Commercial Methods of

Producing Sex Specific Semen, IVF Procedures"), Proceedings of the 16th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction, Cambridge, England, 1996, pp. 7-11.

Preza, C. 等, “用多向旋转发光差分干涉比较(DIC)图像测定细胞的不依赖于方向的光学路径长度分布” (“Determination of Direction-Independant Optical Path-Length Distribution of Cells Using Rotational-Diversity Transmitted-Light Differential Interference Contrast (DIC) Images”), Presented at the Multidimensional Microscopy: Image Aquisition and Processing V, p. 1-11 (1998)

Rath, D., 等, “在用流式细胞技术筛选的带 X 和带 Y 染色体的精子进行体外授精后进行性别预选以生产小猪” (“Production of Piglets Preselected for Sex Following in Vitro Fertilization with X and Y Chromosome-Bearing Spermatozoa Sorted by Flow Cytometry”), Theriogenology, 47,1997, pp 795-800.

Rath, D., 等, “猪的低剂量授精技术” (“Low Dose Insemination Technique in the Pig”), Boar Semen Preservation IV, 2000, pp. 115-118.

Reiling, B. A., 等, “产前雄性化对行为, 位置, 以及屠体的影响和感觉特征对单一牛母牛的小母牛的影响” (“Effect of Prenatal Androgenization on Preformance, Location, and Carcass and Sensory Traits on Heifers in Single Calf Heifer System”), J. Anim. Sci., 1995,73: pp 986-992.

Rens, W., 等, “改进的流式细胞仪筛选带 X 和带 Y 染色体精子: 大大提高了有性精子的回收率” (“Improved Flow Cytometric Sorting of X-and Y-Chromosome Bearing Sperm: Substantial Increase in Yield of Sexed Semen”), Molecular Reproduction and Development, 1999, pp 50-56.

Rens, W., 等, “用于更高效精子定向以提高带 X 和带 Y 染色体精子的筛选效率的新式喷嘴” (“A Novel Nozzle for More Efficient Sperm Orientation to Improve Sorting Efficiency of X and Y Chromosome-Bearing Sperm”), Technical Notes, Cytometry 33,1998, pp 476-481.

Rieger, D., 等, “授精家畜卵母细胞的第一次分裂和它们发育到胚泡阶段之间的关系” (“The Relationship Between the Time of First Cleavage of Fertilized Cattle Oocytes and Their Development to the Blastocyst Stage”), Theriogenology, 1999, pp. 190.

Ritar, A. 和 Ball, A. “腹腔镜授精后的山羊绒用幼山羊的生殖力” (“Fertility of young cashmere goats after laparoscopic insemination”). J. Agr. Sci. 117: 271-273.(1991)

Roberts, J. R. 兽医产科和生殖疾病(In: Veterinary Obstetrics and Genital Diseases). Ithaca, New York. pp. 740-749. (1971)

Roser, JF., 等, “用抗 hCG 抗体对母马生殖率影响” (“Reproductive efficiency in mares with anti-hCG antibodies”), Proc 9th Int. Congr. Artira. Repro. and A. I. 4: 627. abstr. (1980)

Roth, T. L., 等, “马绒膜促性腺素, 人类绒膜促性腺素, 以及腹腔镜人工授精胚胎, 内分泌物, 以及卵黄特征对家猫的影响” (“Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat”), Bio Reprod. 57: 165171. (1997)

Rowley, H-S., 等, “母马授精量对胚胎回收的影响” (“Effect of insemination volume on embryo recover}'in mares", J. Equine Vet. Sci. 10: 298-300.(1990)

Salamon, S. “绵羊的人工授精” (“Artificial Insemination of

<p>Sheep"). Chippendale, New South Wales. Publicity Press. p. 83-84. (1976)</p>
<p>Salisbury, G. W. 和 VanDemark, N. L. “家畜人工授精和生殖的生理学” (“Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle”), San Francisco: Freeman and Company. (1961)</p>
<p>SAS, SAS/STAT 0 User's Guide (Release 6.03), SAS Inst. Inc., Cary, NC., 1988.3 pages</p>
<p>Schenk, J. L. 和 Seidel, Jr., G. E., “有牛性别选择的商业化的来临” (“Imminent Commercialization of Sexed Bovine”), Proceedings, The Range Beef Cow Symposium XVI, 1999, pp 89-96.</p>
<p>Schenk, J. L., 等, “流式筛选的牛细胞精子的冷藏” (“Cryopreservation of Flow-Sorted Bovine Spermatozoa”), Theriogenology 52,1999, pp. 1375-1391.</p>
<p>Schmid R. L., 等, “以胞质内精子注射和输卵管授精用有性马精子进行妊娠” (“Fertilization with Sexed Equine Spermatozoa Using Intracytoplasmic Sperm Injection and Oviductal Insemination”), 7th International Symposium On Equine Reproduction, pp. 139 (Abstract) (1998)</p>
<p>Seidel, G. Jr., “利用有性牛精子进行体外受孕和超量排卵” (“Use of Sexed Bovine Sperm for In Vitro Fertilization and Superovulation”), Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Proceedings of the 2000 CETA/ACTE Convention, Charlottetown, Prince Edward Island, August 2000, pp. 22-24.</p>
<p>Seidel, G. E. 和 Johnson, L. A., “有性的哺乳动物精子 - 回顾” (“Sexing Mammalian Sperm-Overview”), Theriogenology 52: 1267-1272, (1999)</p>
<p>Seidel, G. E. Jr, 等, “用有性精子对小母牛授精” (“Insemination</p>

of Heifers with Sexed Sperm"), Theriogenology, Vol. 52, pp. 1407-1421 (1999)
Seidel, G. E. Jr, 等, “用冷却的, 未冷冻的有性精子给小母牛人工授精” (“Artificial Insemination of Heifers with Cooled, Unfrozen Sexed Semen”), Theriogenology, Vol. 49 pp. 365 (Abstract) (1998)
Seidel, G. E. Jr., 等, “用有性冷冻或者液体精子给小母牛授精” (“Insemination of heifers with sexed frozen or sexed liquid semen”), Theriogenology. 51. (in press). abstr. (1999)
Seidel, G. E., Jr., 等, “用很低剂量的未冷冻有性精子给小母牛进行子宫角授精” (“Uterine Horn Insemination of Heifers With Very Low Numbers of Nonfrozen and Sexed Spermatozoa,”), Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Colorado State University, Atlantic Breeders Cooperative, Theriogenology (1997), pp. 1255-1264
Seidel, G. E., “用于肉用家畜的有性精子的情况” (“Status of Sexing Semen for Beef Cattle”), Texas A & M University 45 th Annual Beef Cattle Short Course and Trade Show Proceedings, August 9-11, 1999; pp. III 24-III 27
Seidel, Jr., G. E., “用带 X 和 Y 的牛精子进行人工授精” (“Artificial Insemination With X-and Y-Bearing Bovine Sperm”), Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, (1996)
Seidel, Jr., G. E., 等, “用很低剂量的未冷冻精子给 Holstein Heifers 授精” (“Insemination of Holstein Heifers With Very Low Numbers Of Unfrozen Spermatozoa”), Colorado State University, Atlantic Breeders Cooperative, (1995)
Senger, P.L., 等, “子宫角授精对奶牛妊娠率的影响” (“Influence of cornual insemination on conception rates in dairy cattle”). J Anim.

Sci. 66:30103016. (1988)
Shelton, J. N. 和 Moore, N. W. 1967. 母羊对妊娠母马的促性腺素以及马前垂体提取物的反应(The response of the ewe tot pregnant mare gonadotropin and to horse anterior pituitary extract.) J. Reprod. Fert. 14: 175-177.
Shilova, A. V., Platov, E. M. 和 Lebedev, S. G. 1976. 利用人绒毛膜促性腺素对母马的排卵期进行调节(The use of human chorionic gonadotrophin for ovulation date regulation in mares). VIIIth Int. Congr. On Anim. Repro. and A. I. 204-208.
Squires, E., “用流式细胞仪对多种精子的同时分析” (“Simultaneous Analysis of Multiple Sperm Attributes by Flow Cytometry”), Diagnostic Techniques and Assisted Reproductive Technology, The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice, Vol. 12, No. 1, April 1996, ppl27-130.
Squires, E. L, 等, “GnRH 类似物对母马排卵的有效剂量” (“Effect of dose of GnRH analogue on ovulation in mares”), Theriogenology. 41: 757-769. (1994)
Squires, E. L., “早期胚胎死亡” (“Early Embryonic Loss”)in Equine Diagnostic Ultrasonography, 1 st Ed. pp 157-163 Eds Rantanen & McKinnon. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland (1998)
Squires, E. L., 等, “种马精子的冷却和冷冻” (“Cooled and frozen stallion semen”), Bulletin No. 9, Colorado State University, Ft. Collins, CO. (1999)
Sullivan, J. J., Parker, W. G. 和 Larson, LL. 1973. 在三个连续发情期施用人绒毛膜促性腺素后不分泌乳汁的母马的发情期和排卵期的持续时间 (Duration of estrus and ovulation time in

nonlactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous periods.) J. A. V. M. A. 162: 895-898.

Sumner, A. T. 和 Robinson, J. A., “带 X 和带 Y 的人精子头部干物质之间的差异”(“A Difference in Dry mass between the heads of X and Y-bearing human Spermatozoa”), J Reprod Fert 48, p. 9-15 (1976)

Taljaard, T. L., Terblanche, S. J., Bertschinger, H. J. 和 Van Vuuren, L. J. 1991. 发情期母羊腹腔镜授精技术的效果(The effect of the laparoscopic insemination technique on the oestrus cycle of the ewe.) J. S Afr. Vet. Assoc. 62 (2) : 60-61.

Taylor, C. S., “用传统和性别控制系统的肉牛业的食物利用率”(“Efficiency of Food Utilization in Traditional and Sex-Controlled Systems of Beef Production”), AFRC Animal Breeding Research Organization, West Mains Road, Edinburg EH9 3JQ, pp 401-440.

Tervit, H. R., 等, “绵羊和家畜卵细胞的成功体外培养”(“Successful Culture In Vitro of Sheep and Cattle Ova”), Agricultural Research Council, Unit of Reproduction Physiology and Biochemistry, University of Cambridge, 1972, p. 493-497.

US application 09/015, 454 filed January 29,1998, entitled “用于提高哺乳动物有性胚胎收率的系统”(“System for Improving Yield of Sexed Embryos in Mammals”).

US application 09/001, 394, filed December 31,1997, entitled “用于筛选特定性别精子的鞘液和收集系统”(“Sheath Fluids and Collection Systems for Sex Specific Cytometer Sorting of Sperm”).

US Application, 09/454,488, entitled “改进的流式细胞仪喷嘴和流式细胞仪样品的处理方法”(“Improved Flow Cytometer Nozzle and Flow Cytometer Sample Handling Methods”), filed December

3,1999.
US Application, 09/448, 643, entitled “哺乳动物的多性别胚胎生产系统” ("Multiple Sexed Embryo Production System for Mammals"), filed November
US Application, 09/511,959 entitled “用于改进细胞仪筛选的特定性别精子的鞘液和收集系统的方法” ("Methods For Improving Sheath Fluids and Collection Systems For Sex Specific Cytometer Sorting of Sperm"), filed February 23,2001.
US Application, 60/094, 720, entitled “马的低剂量授精系统” ("System for Low Dose Insemination of Equines"), filed July 30,1998.
US Application, 60/224, 050., entitled “使用有性精子的带有终端交互程序的用于兽群管理的集成系统” ("Integrated System for Herd Management With Terminal-Cross Program Using Sexed Semen"), filed August 9,2000.
US Application, 60/113,143, entitled “马的授精系统” ("Equine Insemination System"), filed December 18,1998.
US Application, 60/203,089, entitled “用于分辨图像生产信号中微小差异的检测系统” ("Detector System for Resolving Small Differences in Photo-generated Signal"), filed May 9,2000.
US Application, 60/238,294, entitled “母马的子宫镜授精” ("Hysteroscopic Insemination of Mares")filed October 5,2000.
US Application, entitled “将冻融精子细胞分离成带 X 染色体和带 Y 染色体群体的系统” ("System For Separating Frozen-Thawed Sperm Cells Into X-Chromosome And Y Chromosome Bearing Populations"), filed November 28,2000.
US Application, entitled “用分成带 X-染色体和带 Y-染色体群体

的精子进行体外授精的系统” (“A System for In-vitro Fertilization with Spermatozoa Separated into X-chromosome and Y-chromosome Bearing Populations”), filed November 28,2000.

Van Munster E. B., 等, “由模拟差分干涉对比图像对基于测量评价的光学路径分布进行重建” (“Measurement-based evaluation of optical pathlength distributions reconstructed from simulated differential interference contrast images”), *Journal of Microscopy* 192, Pt. 2, p. 170-176 (1998)

Van Munster, E. B., 等, “以精子头部体积差异作为理论基础筛选带 X 和带 Y 的精子” (“Difference in Sperm Head Volume as a Theoretical Basis for Sorting X & Y-Bearing Spermatozoa : Potentials and Limitations”), *Theriogenology* 52, pp. 1281-1293, (1999)

Van Munster, E. B., 等, “由宽视野差分干涉对比显微镜获得的光学路径分部形成图像的改建” (“Reconstruction of optical pathlength distributions form images obtained by a wide field differential interference contrast microscope”), *Journal of Microscopy* 188, Pt. 2, p. 149-157 (1997)

Van Munster, E. B., “Geslachtsbepaling met interferometrie”, *Derde prijs NtvN-prijsvraag voor pas-gepromoveerden 65/4*, p. 95-98 (1999)

Van Munster E. B., 等, “带 X 染色体和带 Y 染色体的牛精子头部的体积差异于 DNA 含量差异相符合” (“Difference in Volume of X-and Y-chromosome Bearing Bovine Sperm Heads Matches Difference in DNA Content”) *Cytometry* 35 p. 125-128 (1999)

Vazquez, J., 等, “猪 A.I.; 以少量的精子用非外科手术方法进行深入授精的新策略” (“A. I. in Swine; New Strategy for Deep

Insemination with Low Number of Spermatozoa Using a Non-surgical Methodology"), 14th International Congress on Animal Reproduction, Vol. 2, Stockholm, July, 2000, p. 289.

Vazquez, J., 等, “非外科手术深入子宫内部授精技术的发展” (“Development of a Non-surgical Deep Intra Uterine Insemination Technique”), IV International Conference on Boar Semen Preservation, Maryland, August, 1999, p 35 and photo of display board.

Vazquez, J., 等, “纤维内窥镜技术成功对母猪低剂量授精” (“Successful Low-Dose Insemination by a Fiberoptic Endoscope Technique in the Sow”), Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Netherlands, Theriogenology, Vol.

53, January, 2000, pp. 201.

Vazquez, J., 等, “Hyposematic Swelling 试验预测猪精子完整性” (“Hyposematic Swelling Test as Predictor of the Membrane Integrity in Boar Spermatozoa”), Boar Semen Preservation IV, IVth International Conference on Boar Semen Preservation, Maryland, pp. 263.

Vazquez, J. 等, “母马的非外科子宫输卵管授精” (“Nonsurgical Uterotubal Insemination in the Mare”), Proceedings of the 44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Baltimore, Maryland, December 6-9, 1998, Vol. 44, pp 68-69

Vidament, M., Dupere, A. M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P. and Palmer, E. 1997. 马冷冻精子的耐冻力和生育田间试验结果 (Equine frozen semen freezeability and fertility field results.) Theriogenology. 48: 907.

Voss, J. L. 等,“母马的生育管理” (“Reproductive management of the broodmare”). C. S. U. Exp. Sta. Anim. Reprod. Lab. Gen. Series.Bull. 961. (1976)

Voss, J. L., 等,“授精量和授精频率对母马生育力的影响” (“Effect of number and frequency of inseminations on fertility in mares”, J. Reprod. Fertil. Suppl. 32: 53-57. (1982)

Voss, J. L.,“人绒毛膜促性腺激素对母马发情周期和正常周期非分泌期的影响” (“Effect of human chorionic gonadotropin on duration oestrous cycle and fertility of normally cycling, non-lactating mares”). J. A. V. M. A. 165: 704-706. (1974)

Welch, G., 等,“带 X 和带 Y 染色体的牛精子的流式细胞技术筛选以及 PCR 鉴定” (“Flow Cytometric Sperm Sorting and PCR to Confirm Separation of X-and Y-Chromosome Bearing Bovine Sperm”), Animal Biotechnology, 6 (2), 131-139,1995, pp 131-139.

Welch G. R., 等,“用 FACS IV 流式筛选基于 DNA 的带 X 和带 Y 染色体的精子进行流体和光学改进” (“Fluidic and optical modifications to a FACS IV for flow sorting of X-and Y-chromosome bearing sperm based on DNA”), Cytometry 17 (suppl. 7): 74. (1994)

Wilson, C. G., 等,“重复注射 hCG 对母马生殖效率的影响” (“Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares”), Eq. Vet. Sci. 4: 301308. (1990)

Wilson, M.S., “用冷冻精子对母狗进行非外科子宫内人工授精” (“Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen”), J.Reprod. Fert Suppl. 47:307-311. (1993)

Windsor, D.P., 等,“通过分离带 X 染色体和带 Y 染色体精子进行性别预选: 回顾” (“Sex Predetermination by Separation of X and Y Chromosome-bearing Sperm: A Review”), Reproduction of

Fertilization and Development 5, pp. 155-171, (1993)
Woods, J. 和 Ginther, O. J., “收集母马多数胚胎的最新相关研究” (“Recent studies related to the collection of multiple embryos in mares”). Theriogenology. 19: 101-108. (1983)
Woods, J., 等, “排卵的授精时间对母马妊娠率和胚胎死亡率的影响” (“Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares”). Eq. Vet. J. 22 (6) : 410-415. (1990)
XP-002103478, File Biosis, (1988), 一页

另外,应当理解所用的每个术语除非同本申请中的应用具有不一样的解释,应当理解为在此引入的通常字典中对每个术语及所有定义,可替代术语,以及同义词,例如在此引入作为参考的蓝登书屋韦氏字典的第二版中所编入的。但是,就以上的每一项而言,在此引入作为参考的这样的信息或者声明所能够延伸的程度应当被认为同这一/这些发明的授权是不一致的,这些声明显然不能被认为是申请人所做出的。

另外,除非上下文中有其它需要,应当理解术语“含有”或者其它动词形式的目的是为了说明包括阐明的元件或者步骤或者一组元件或一组步骤而不排除任何其它元件或者步骤或者一组元件或者一组步骤。这样的术语应当被解释为其最广泛的形式以赋予申请人在澳大利亚等国最大范围的法律许可。

因此,应当清楚申请人的权利要求至少已经支持了 I)这里描述的每种液气转换设备, ii)公开和描述的相关方法, iii) 类似的,相当的,以及实际上隐含有改变的这些设备和方法, iv)公开和描述的能够完成所示的每种功能的可供替换的设计, v)那些可以完成或者意味着能够完成上面描述和公开的所示每种功能的可替换的设计和方法, vi)所示的分离和独立发明的特

征, 组件和步骤, vii) 用公开的不同系统或者组件改进的申请, viii) 由这样的系统或者组件获得的产品, ix) 本质上如本文上面以及同任何有关附加的实施例所描述的一样的方法和装置, 以及 x) 每种公开的元件的各种组合和置换。

5 另外, 除非上下文有其它需要, 应当理解术语“包含”或者动词的其它形式的目的是为了说明包括阐明的元件或者步骤或者一组元件或一组步骤而不排除任何其它元件或者步骤或者一组元件或者一组步骤。这样的术语应当被解释为其最广泛的形式以赋予申请人在澳大利亚等国最大范围的法律许可。

10 说明书中所阐明的权利要求在此引入作为本发明说明书的一部分作为参考, 并且申请人明确地保留权利以用引入所有这些权利要求的部分或全部内容作为支持全部或部分权利要求或者其任何部分或组成的附加说明, 并且申请人进一步明确地保留了将引入的这些权利要求的部分或全部或其任何部分或组成从说明书中移动到权利要求中的权利或者相反作为本申请

15 或者任何后继申请, 分案申请, 或者其部分继续申请要求的需要而定义要求保护的物质, 或者根据任何国家的专利法, 细则, 或者条约的规定获得任何减少费用的利益, 这些在此引入作为参考的内容在本申请包括任何后继申请, 分案申请, 或者部分后继申请或者在其上进行修改或者扩充的整个期间应当是有效的。

20

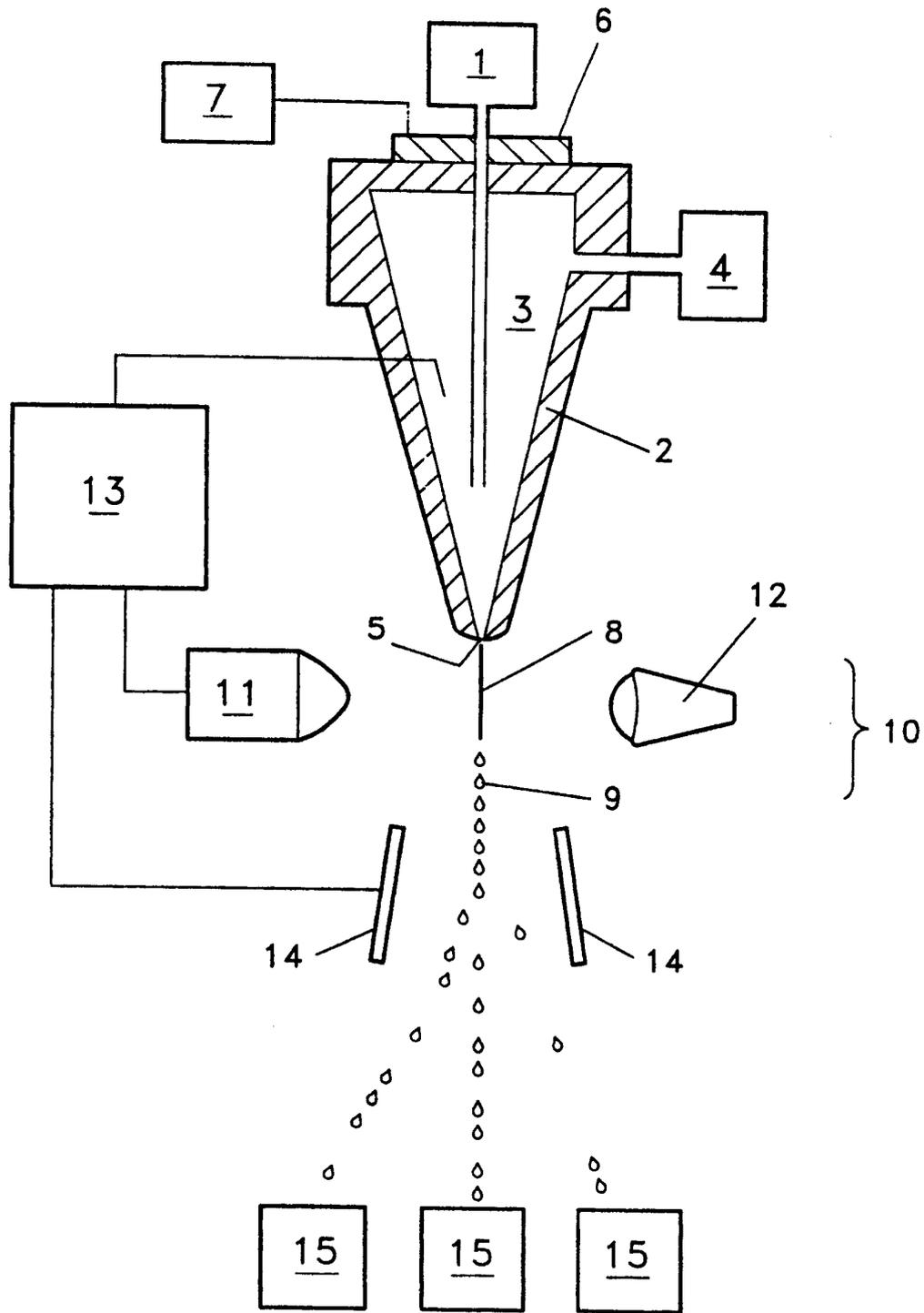


图 1

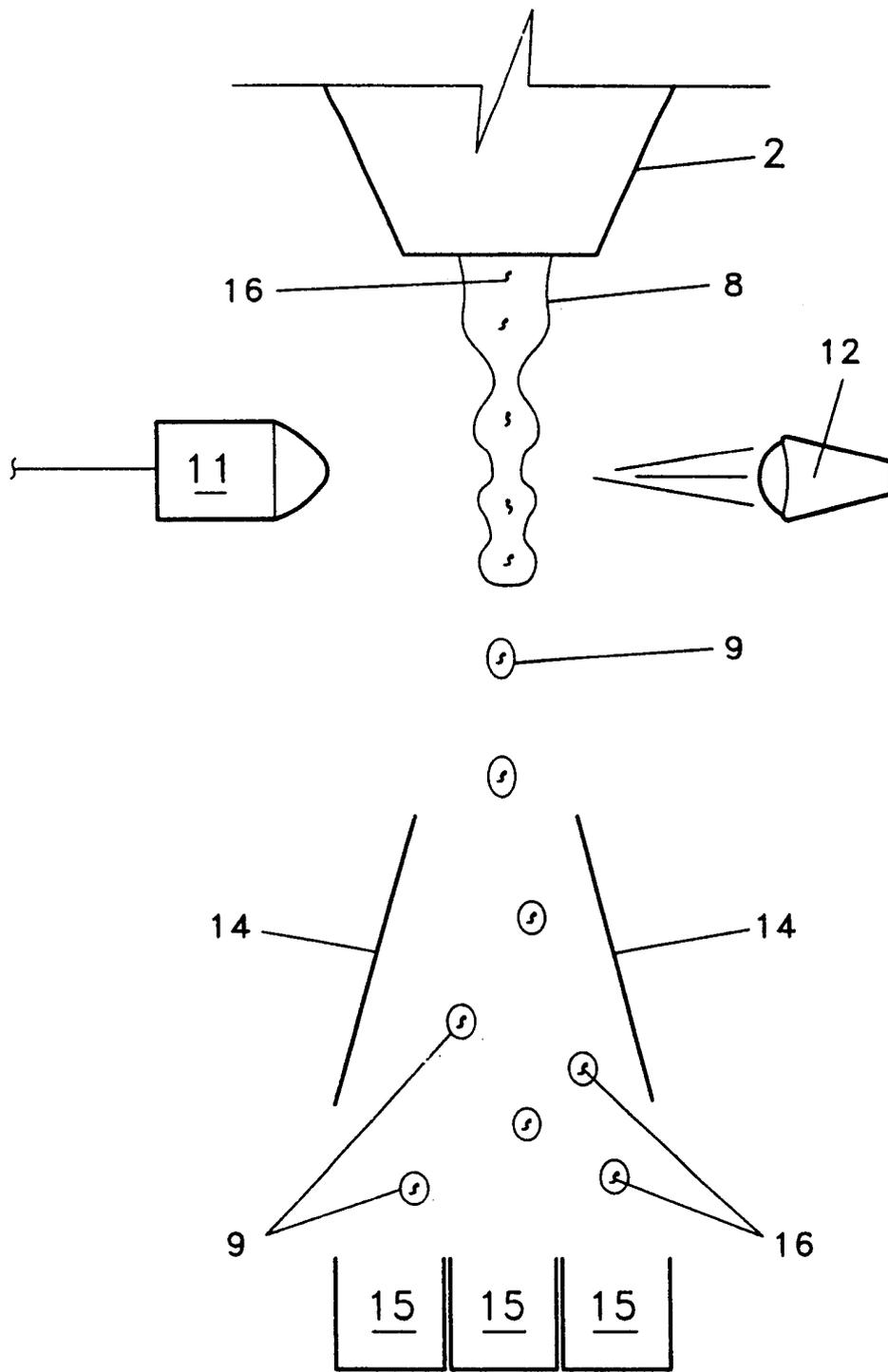


图 2

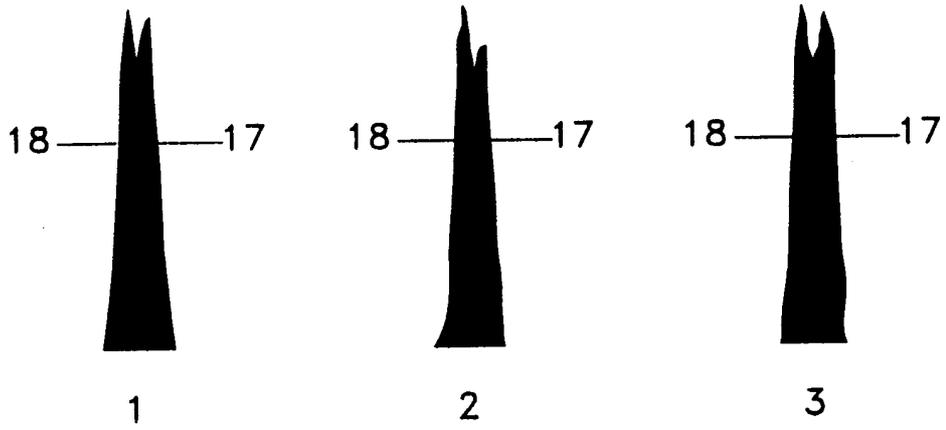


图 3a

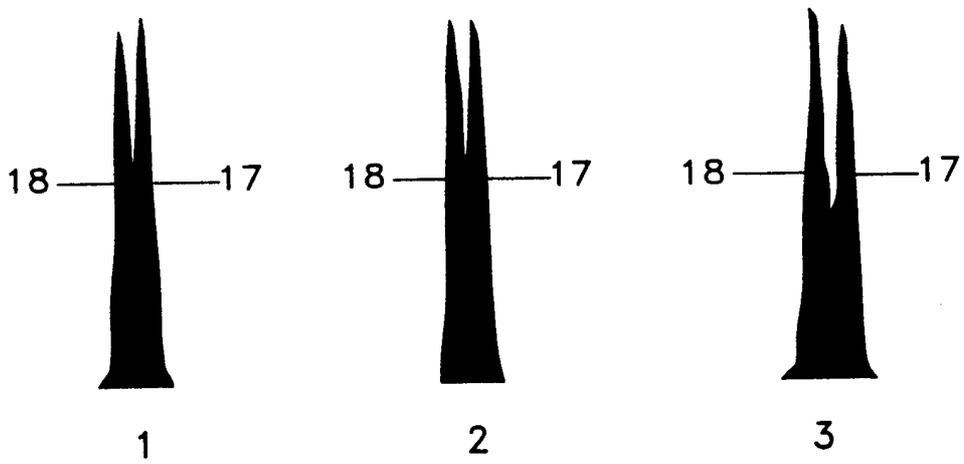


图 3b

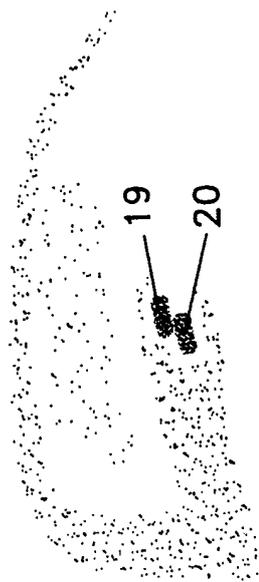


图 4

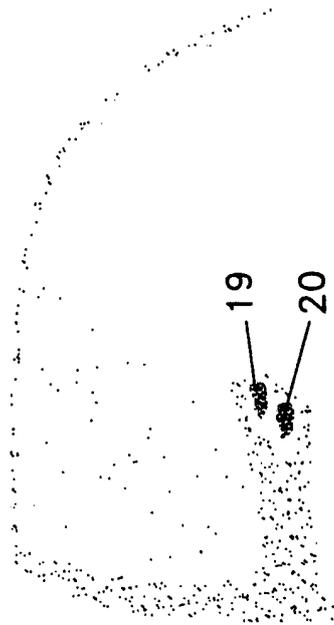


图 5

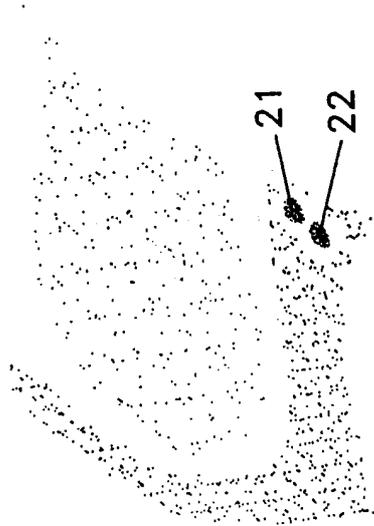


图6

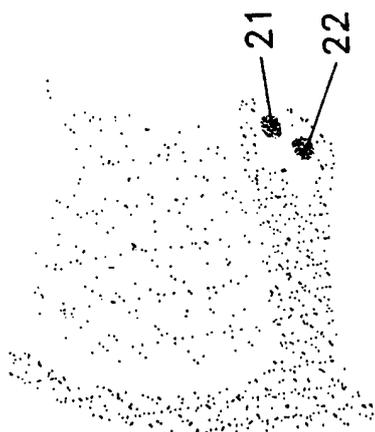
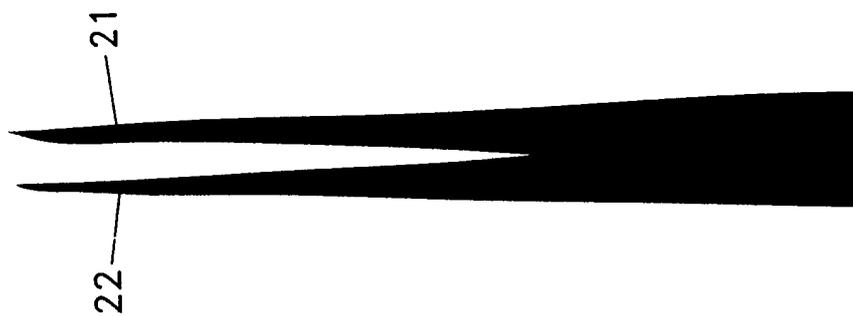


图 7

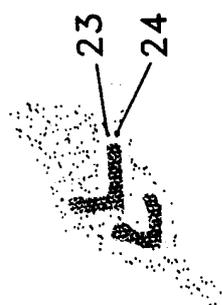
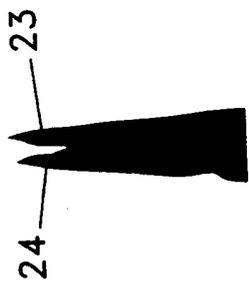


图 8

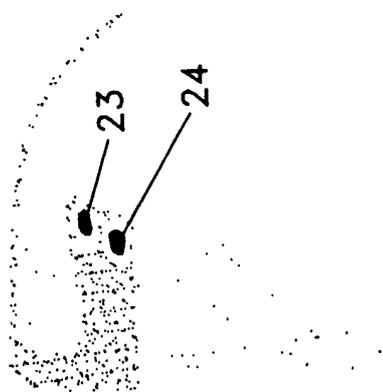


图 9

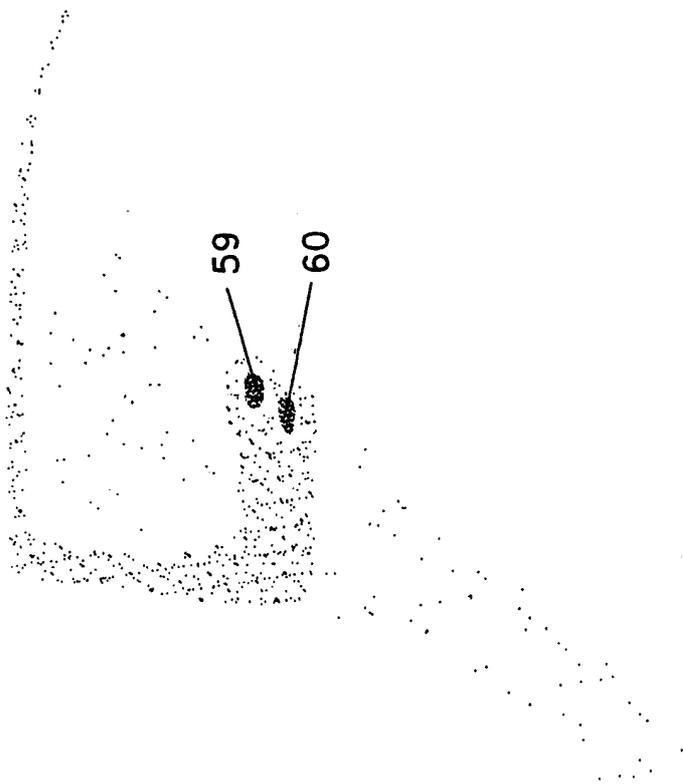
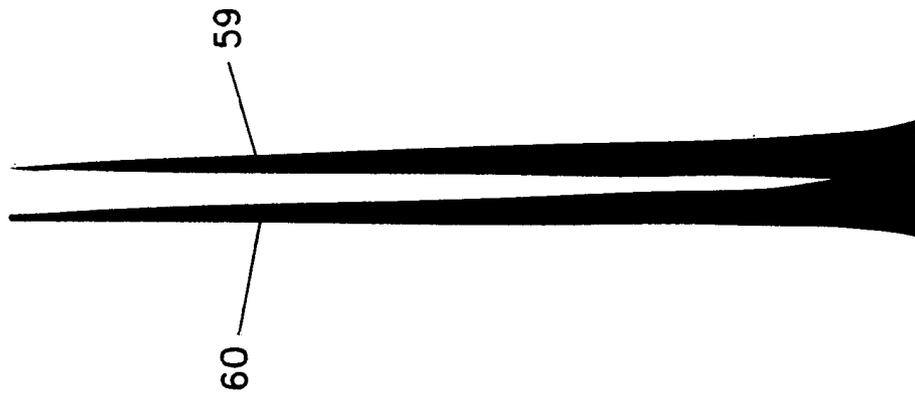


图 10

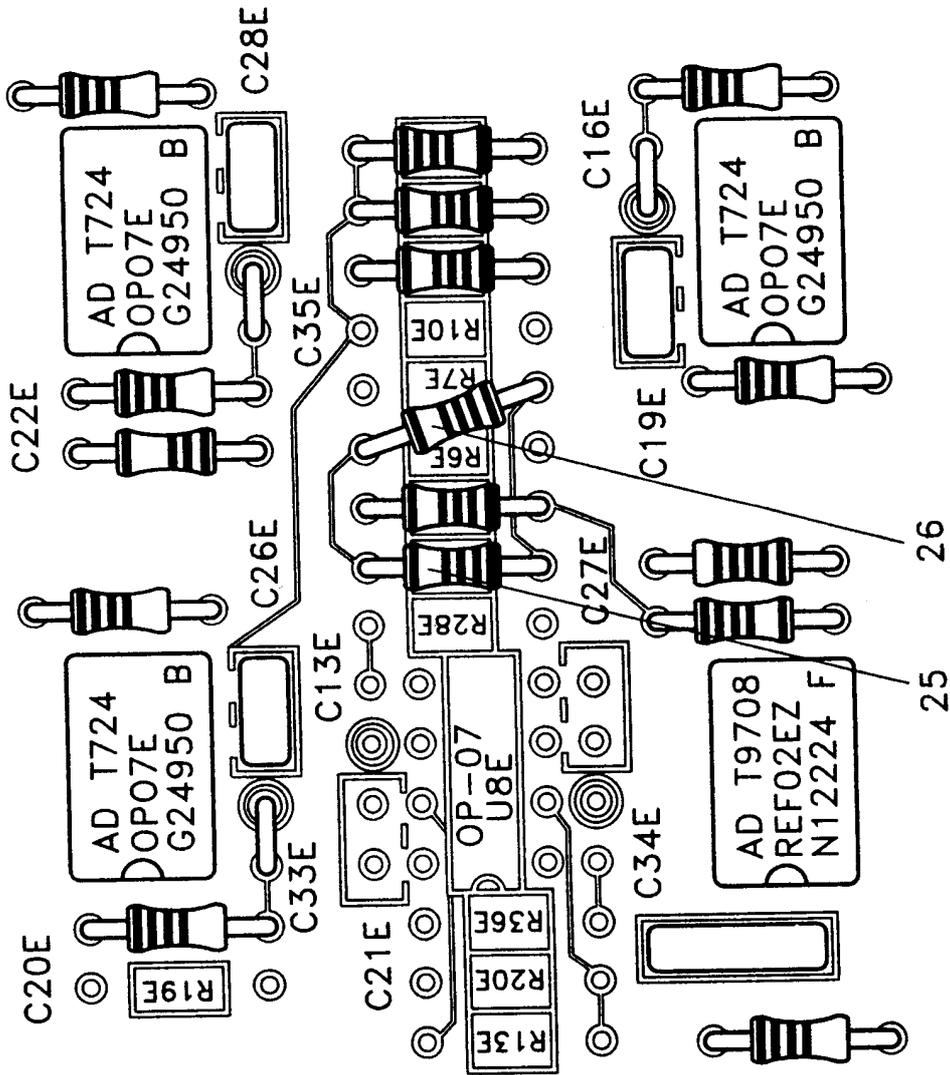


图 11

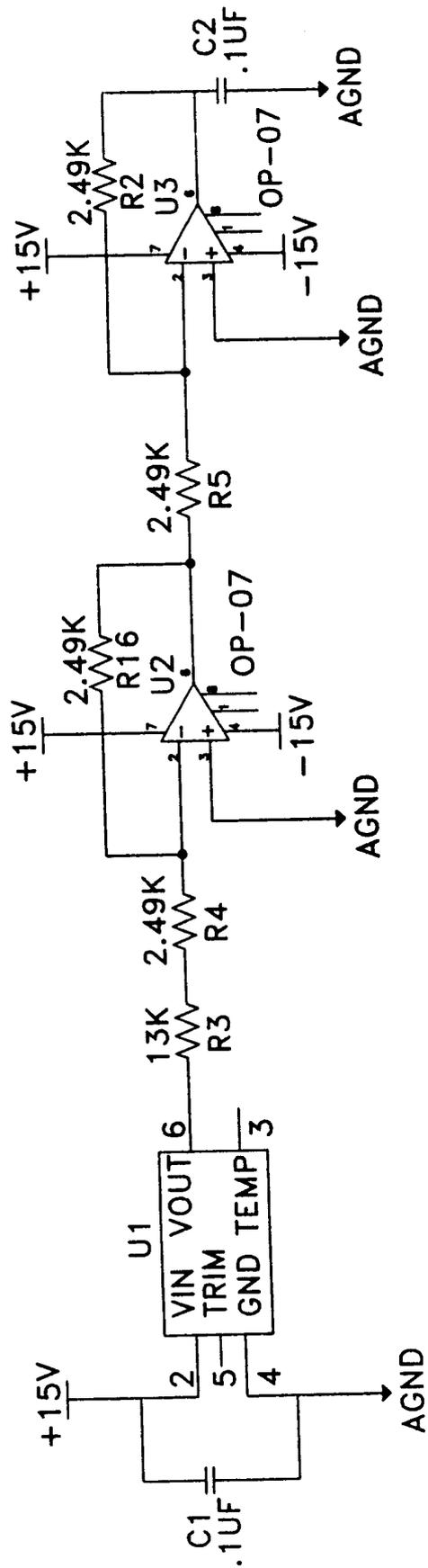


图 12a

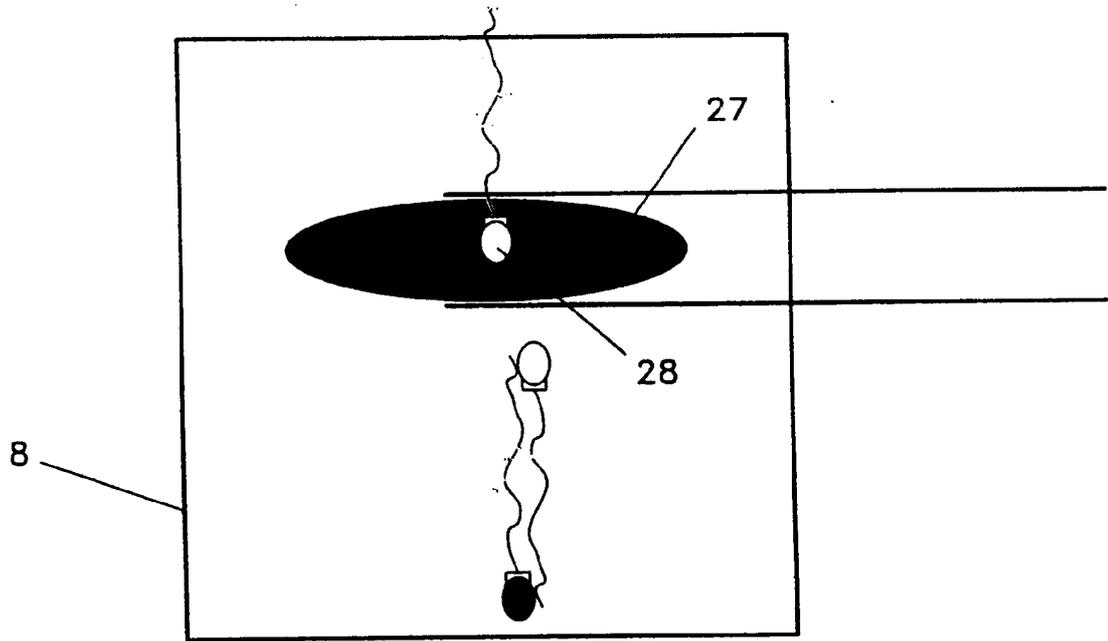


图 13a

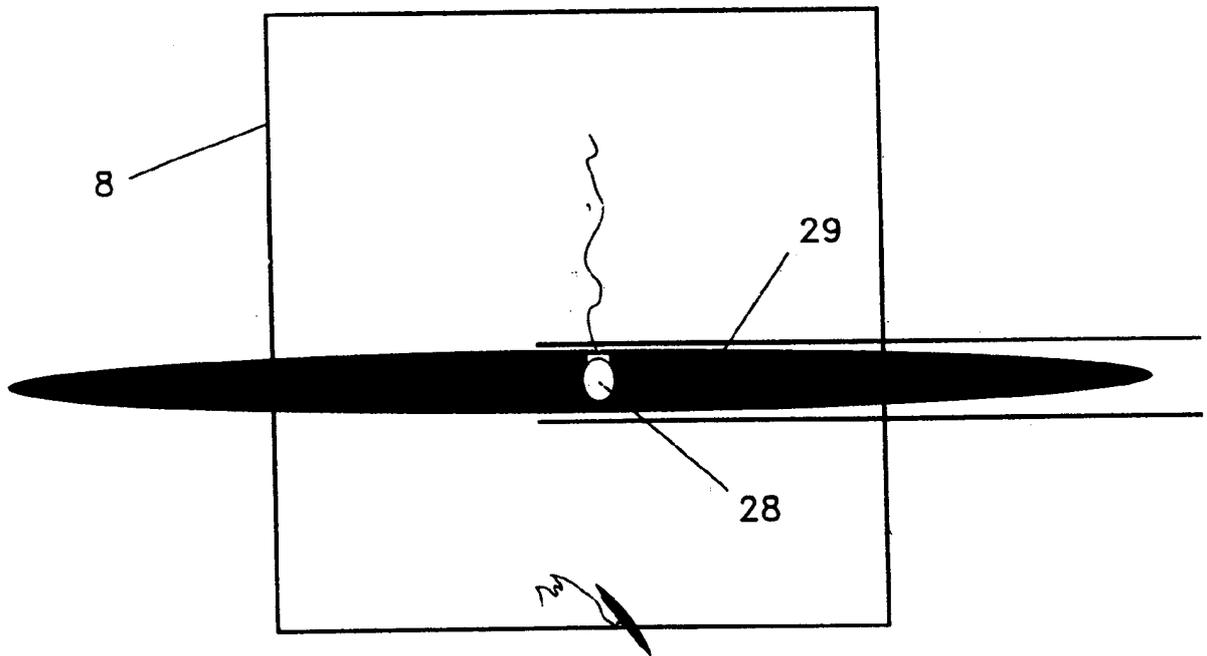


图 13b

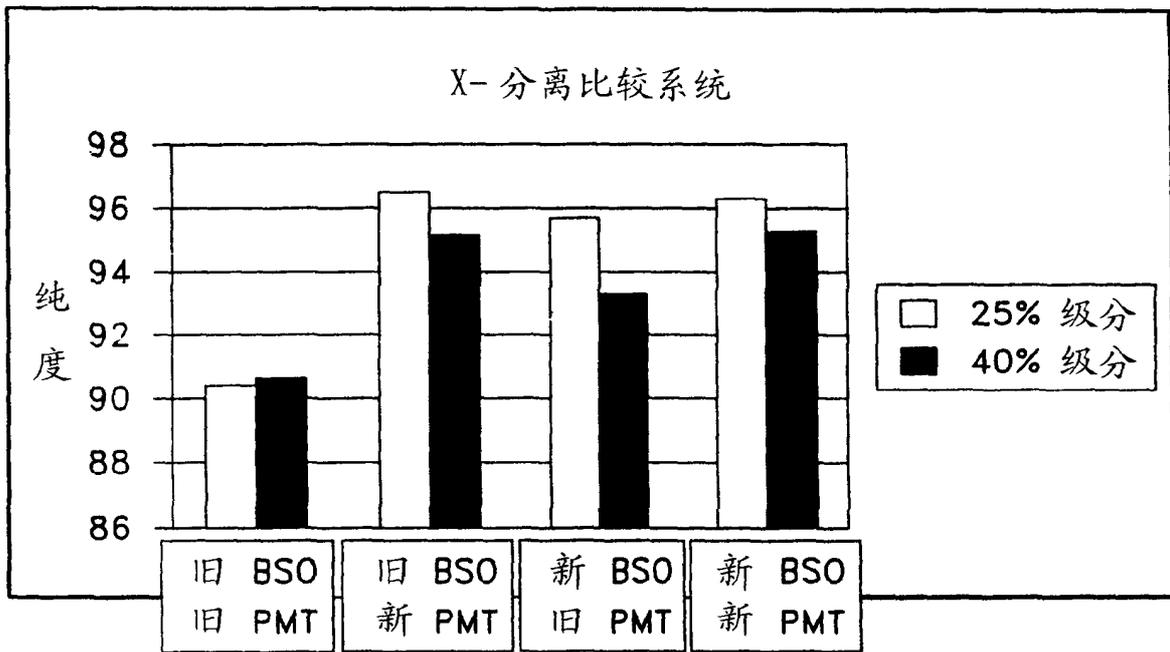


图 14a

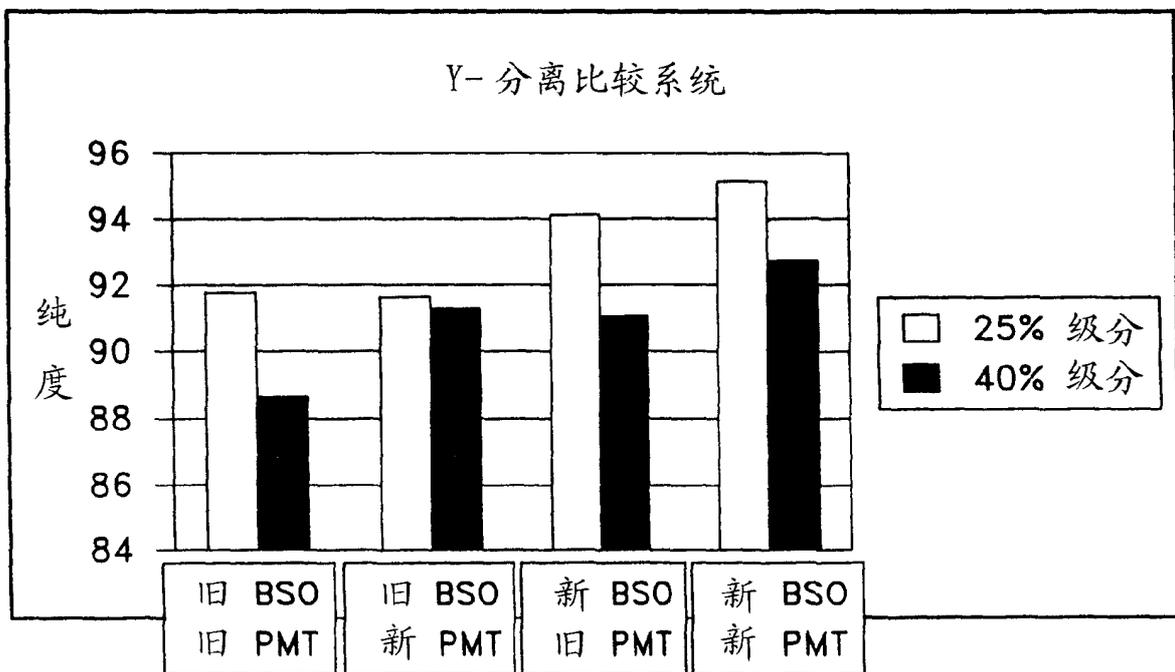


图 14b

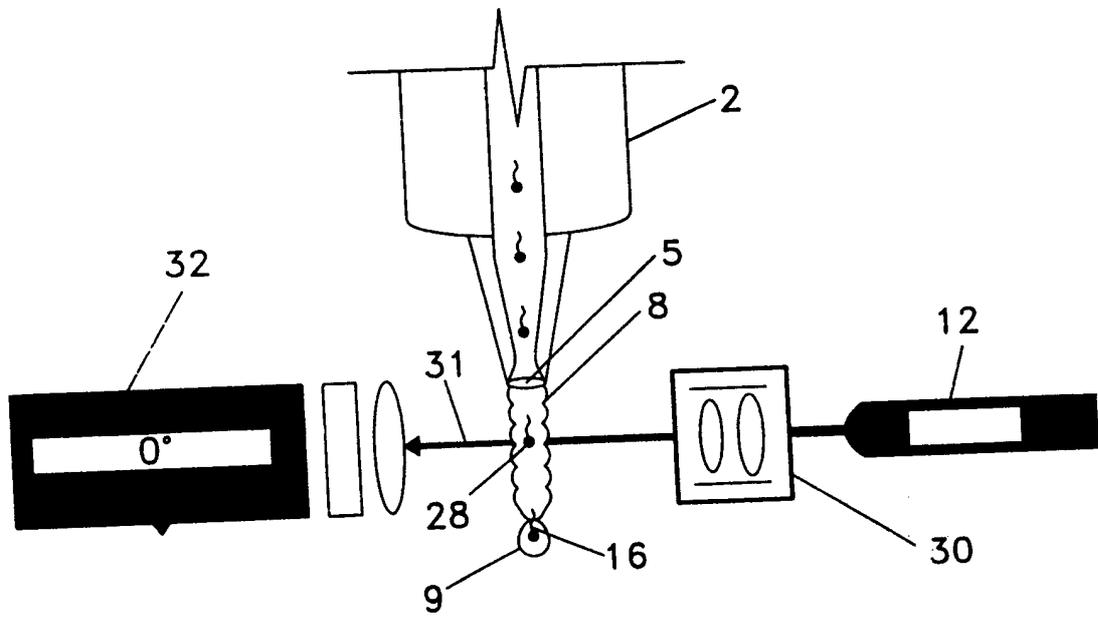


图 15

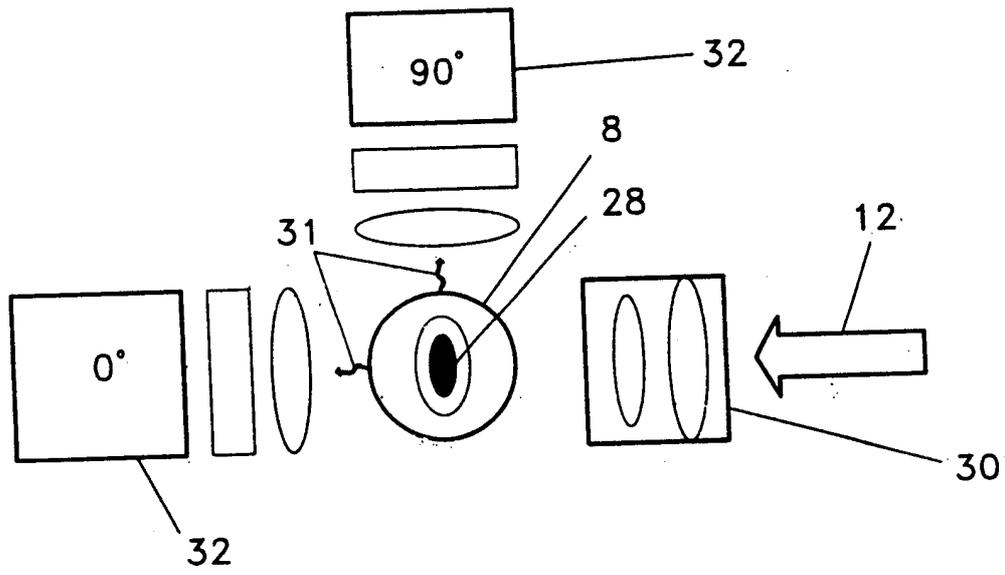


图 16

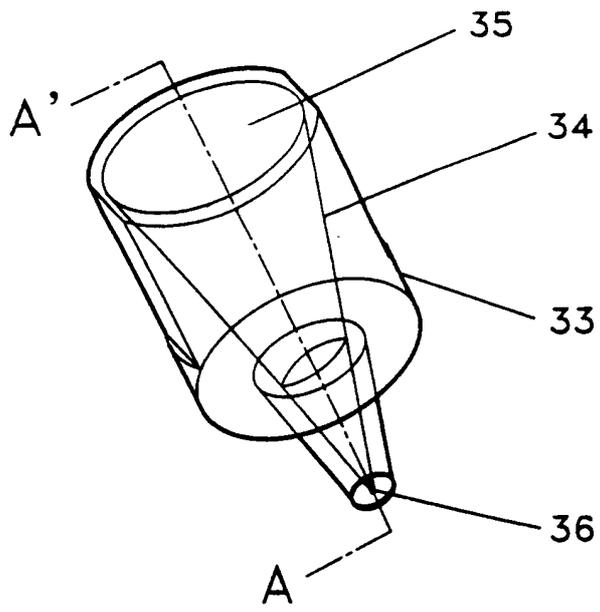
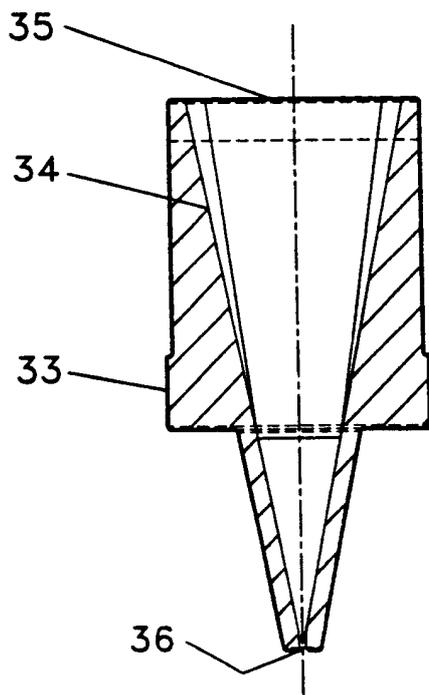


图 17a



剖面 A-A'

图 17b

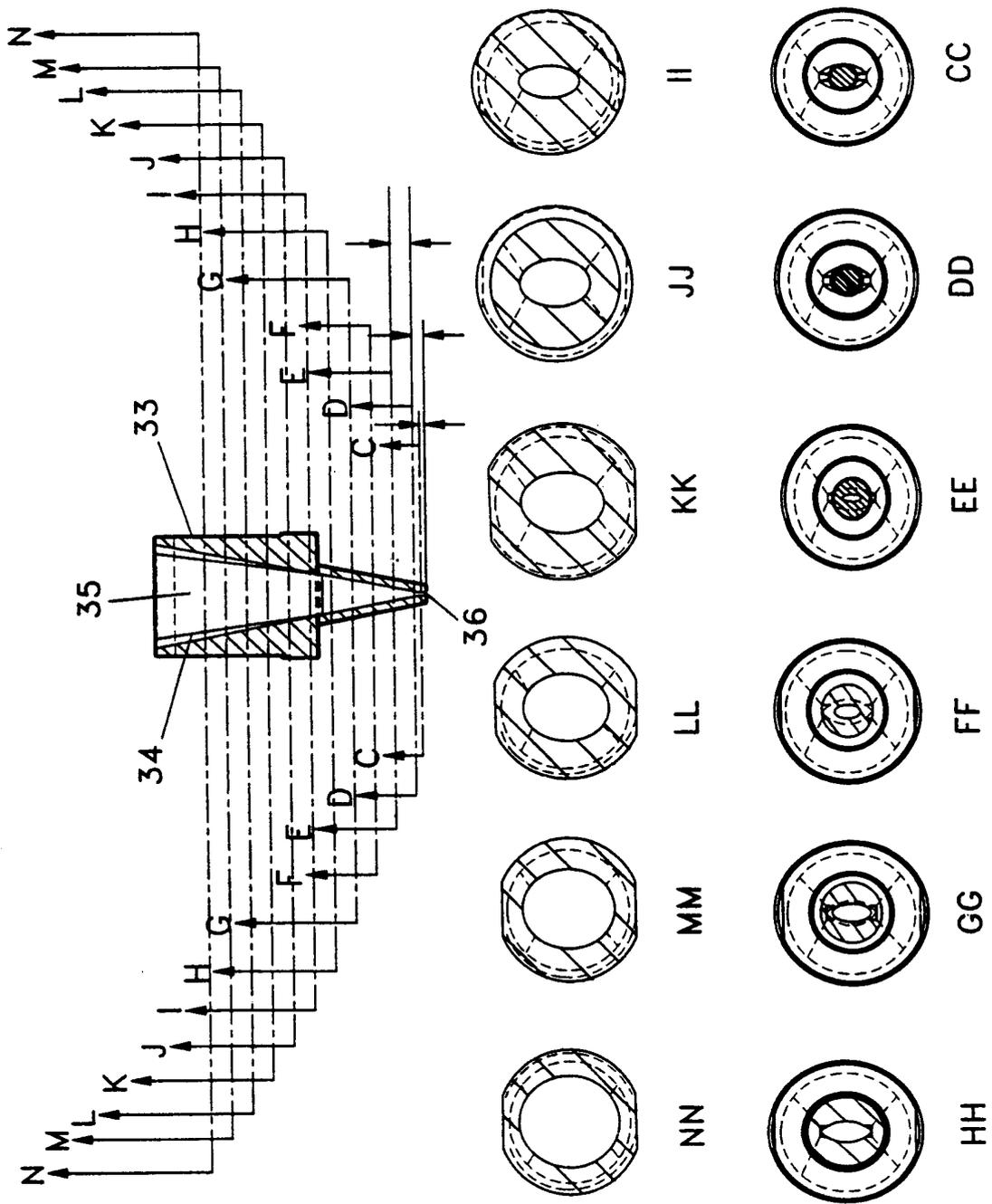


图 18

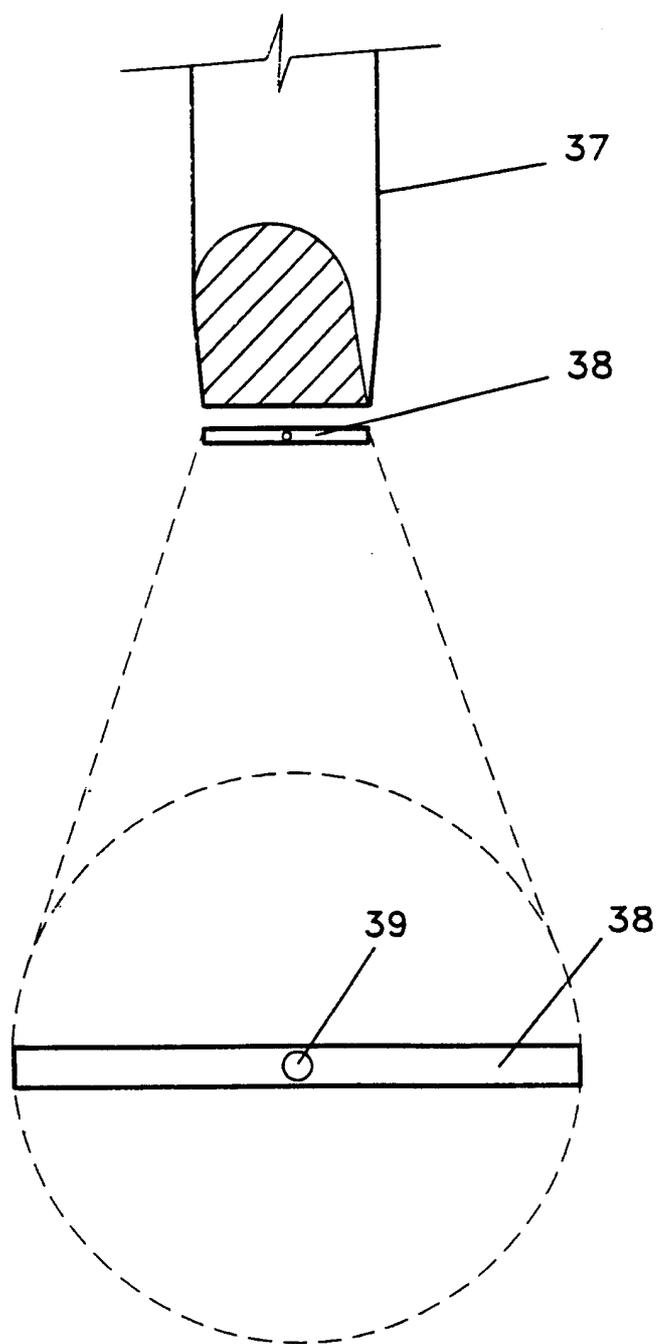


图 19

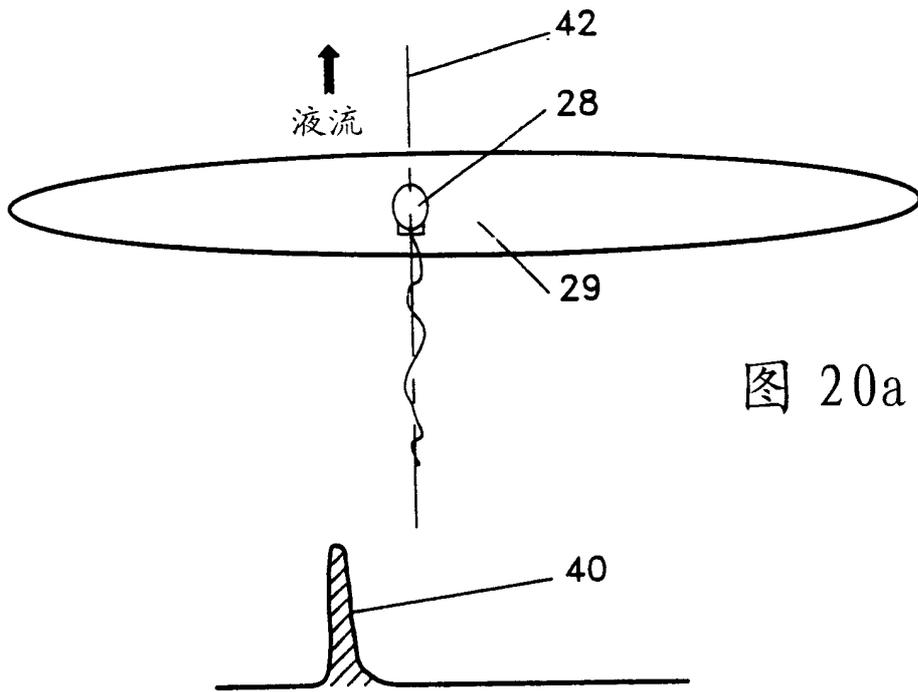


图 20a

图 20b

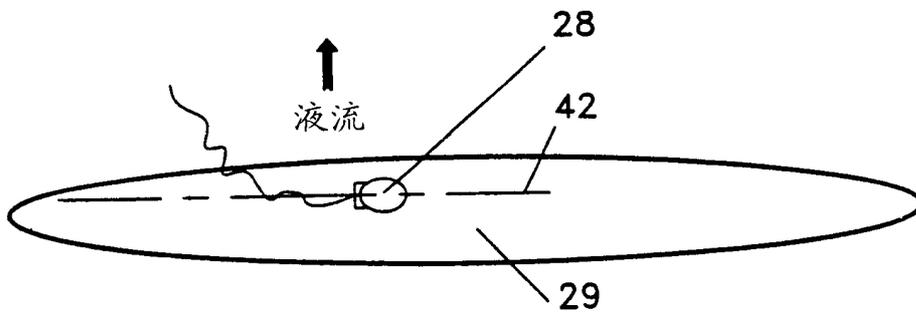


图 20c

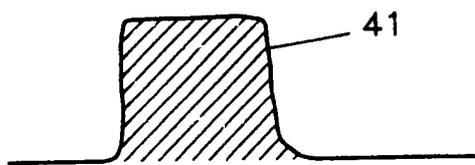
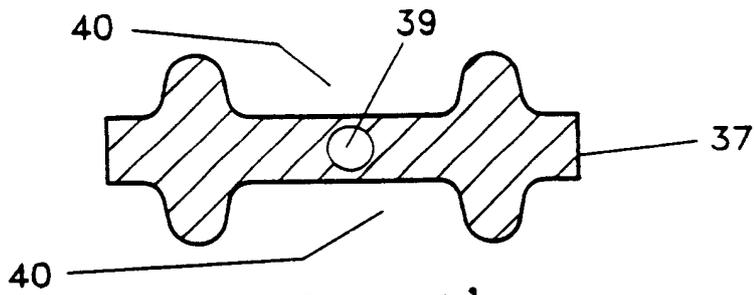


图 20d



剖面 A-A'

图 21b

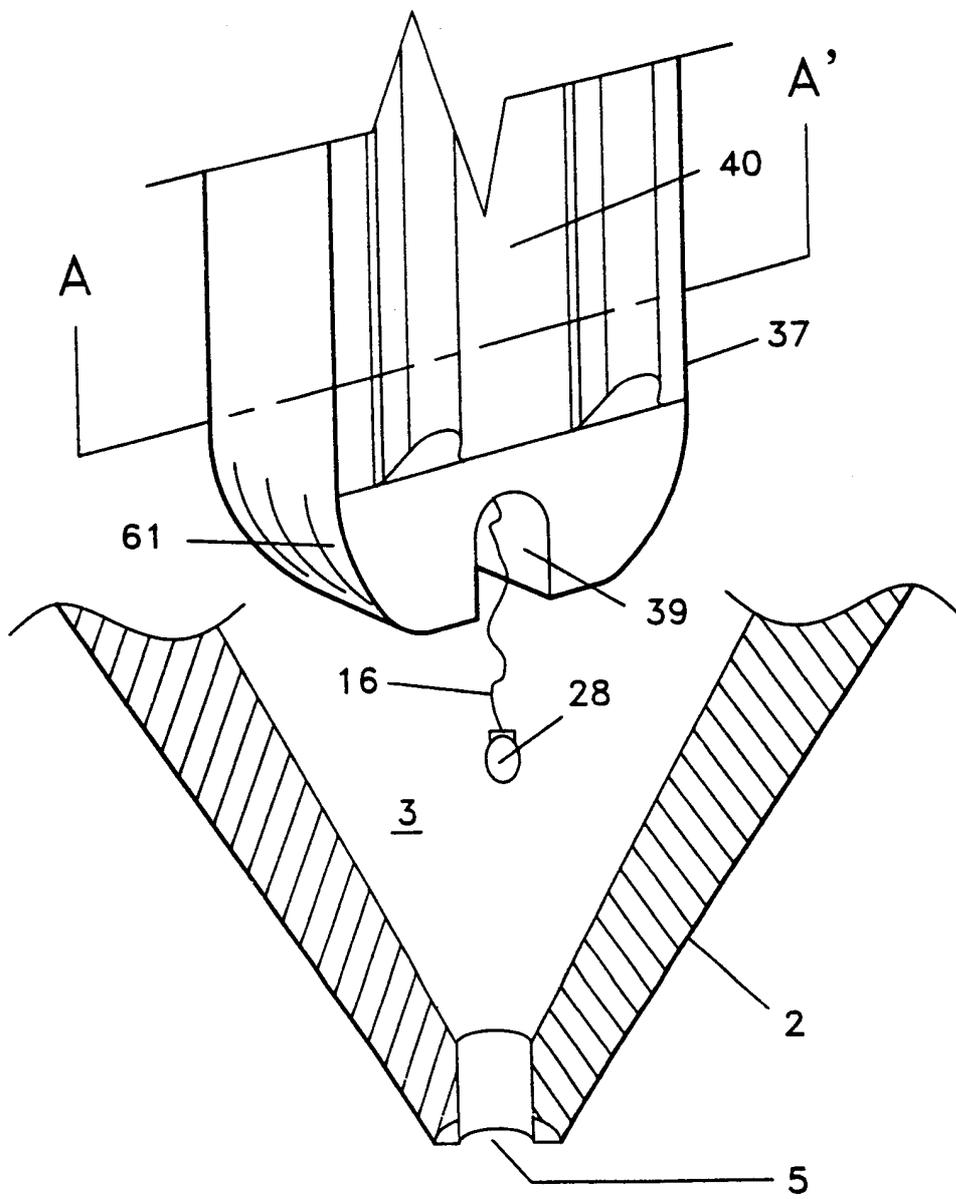


图 21a

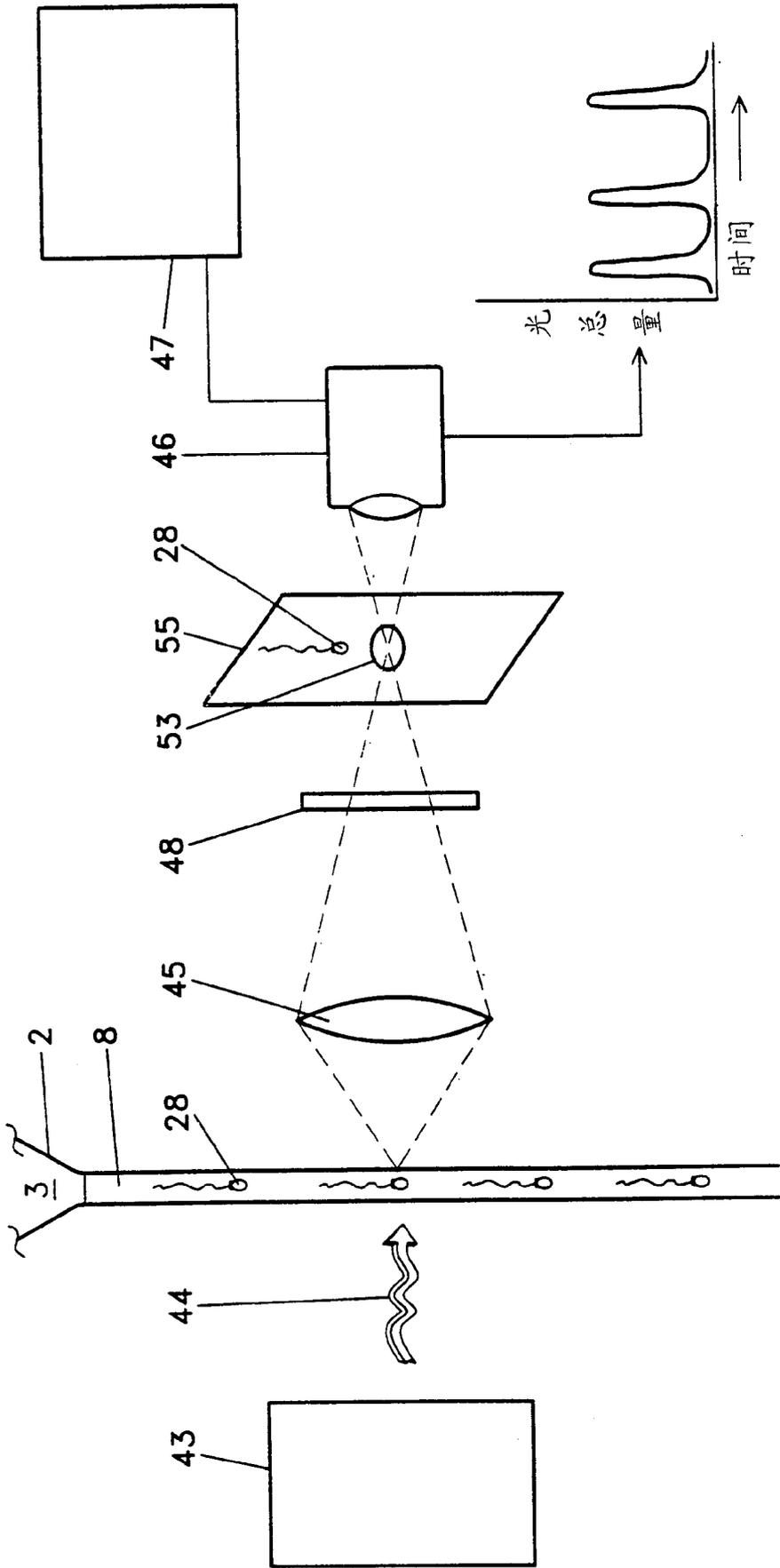


图 22

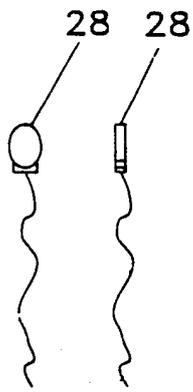
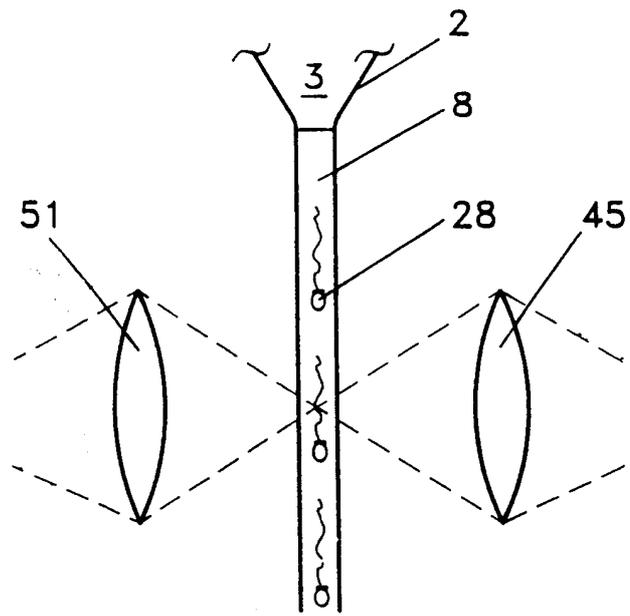
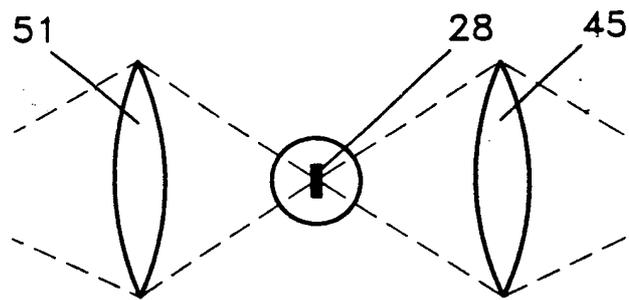


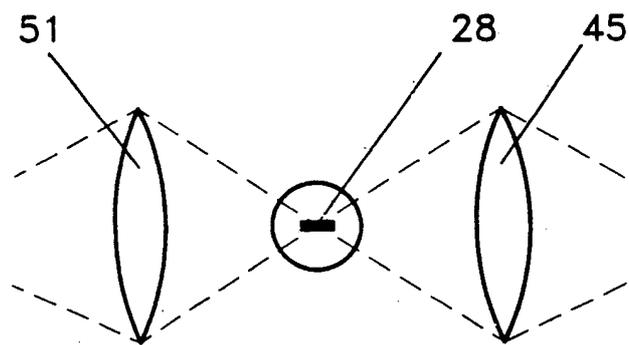
图 23a



侧视图



正确取向



不正确取向

俯视图

图 23b

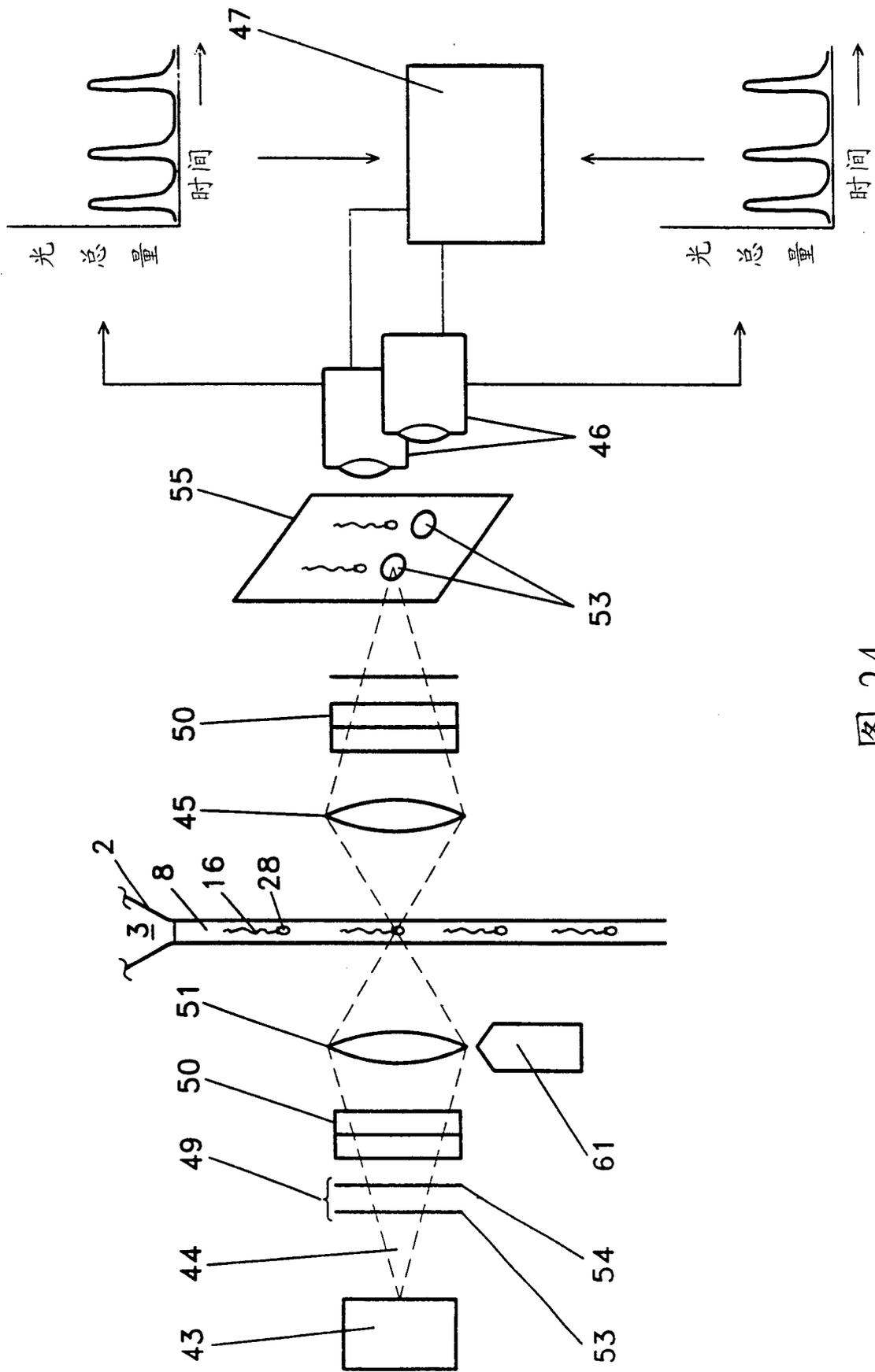


图 24

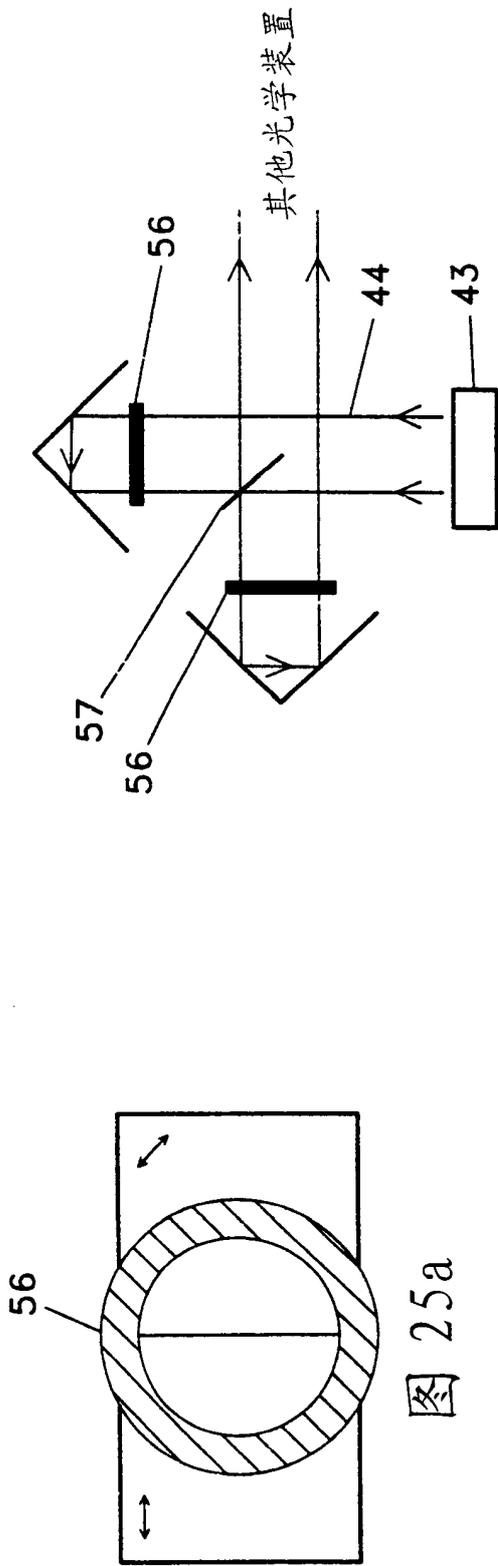


图 25a

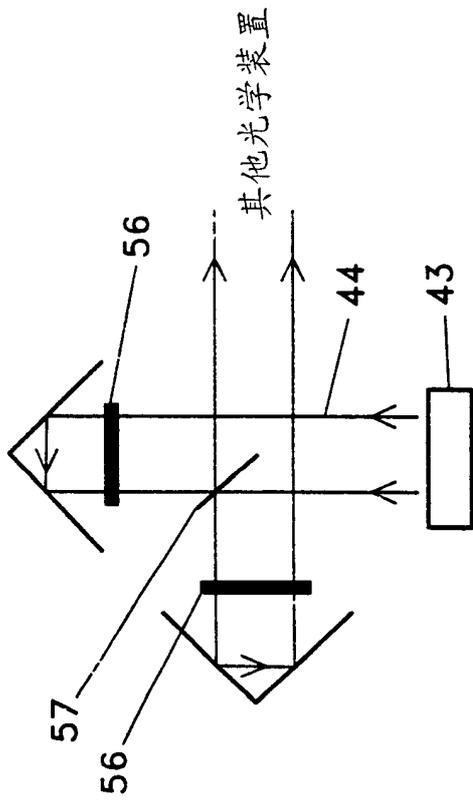


图 25d

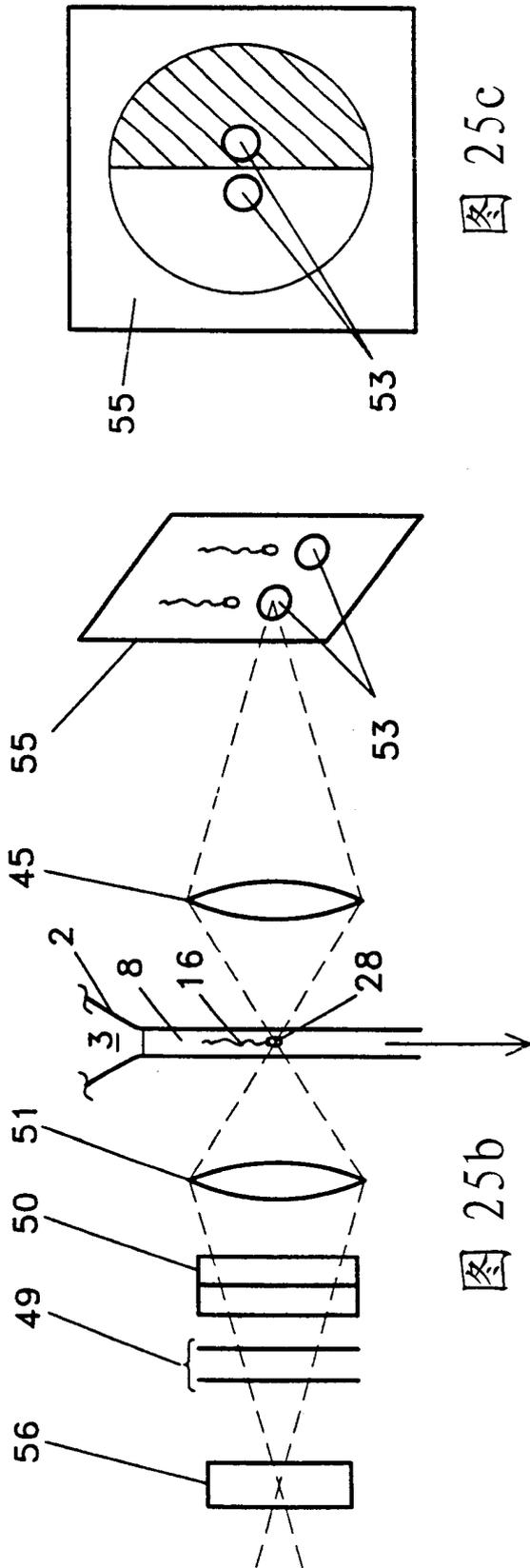


图 25b

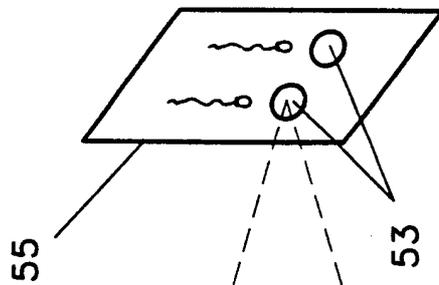


图 25c

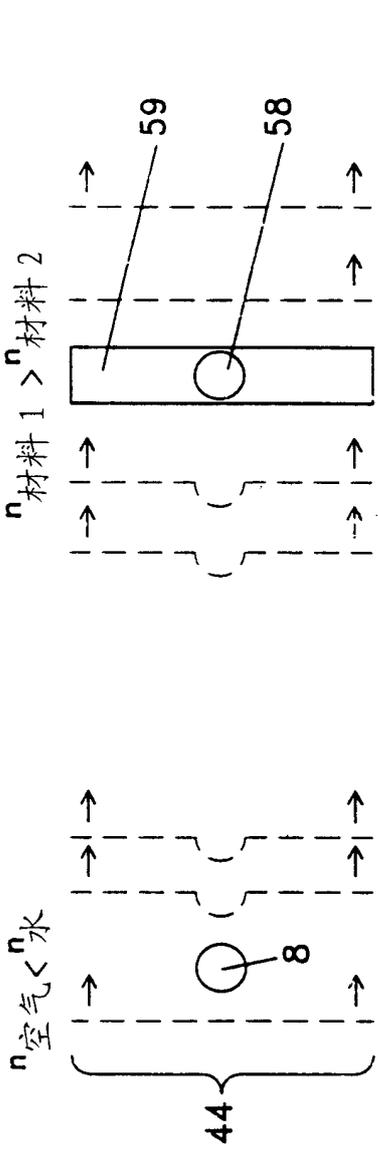


图 26a

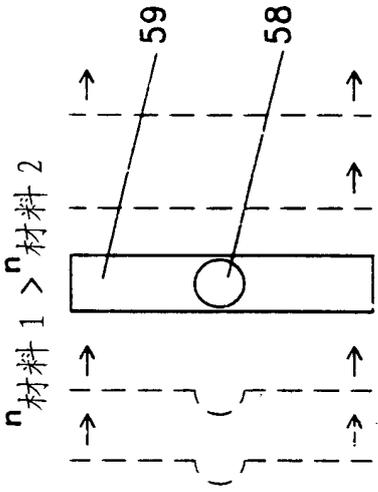
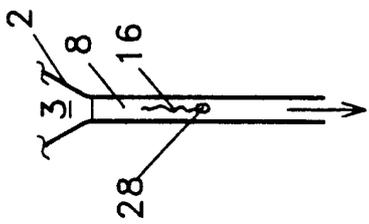


图 26b



侧视图

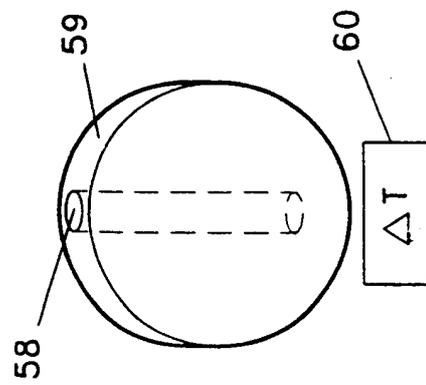


图 26c

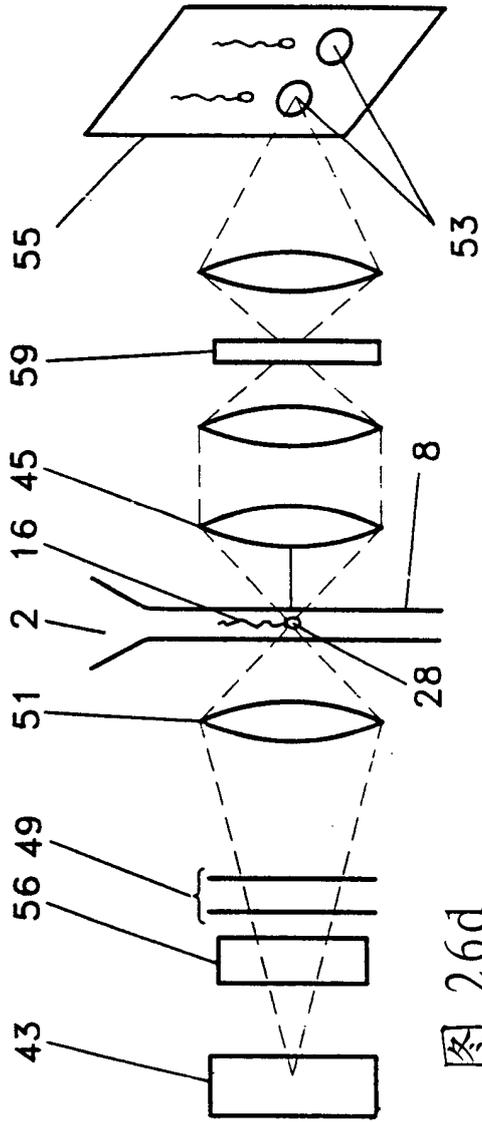


图 26d

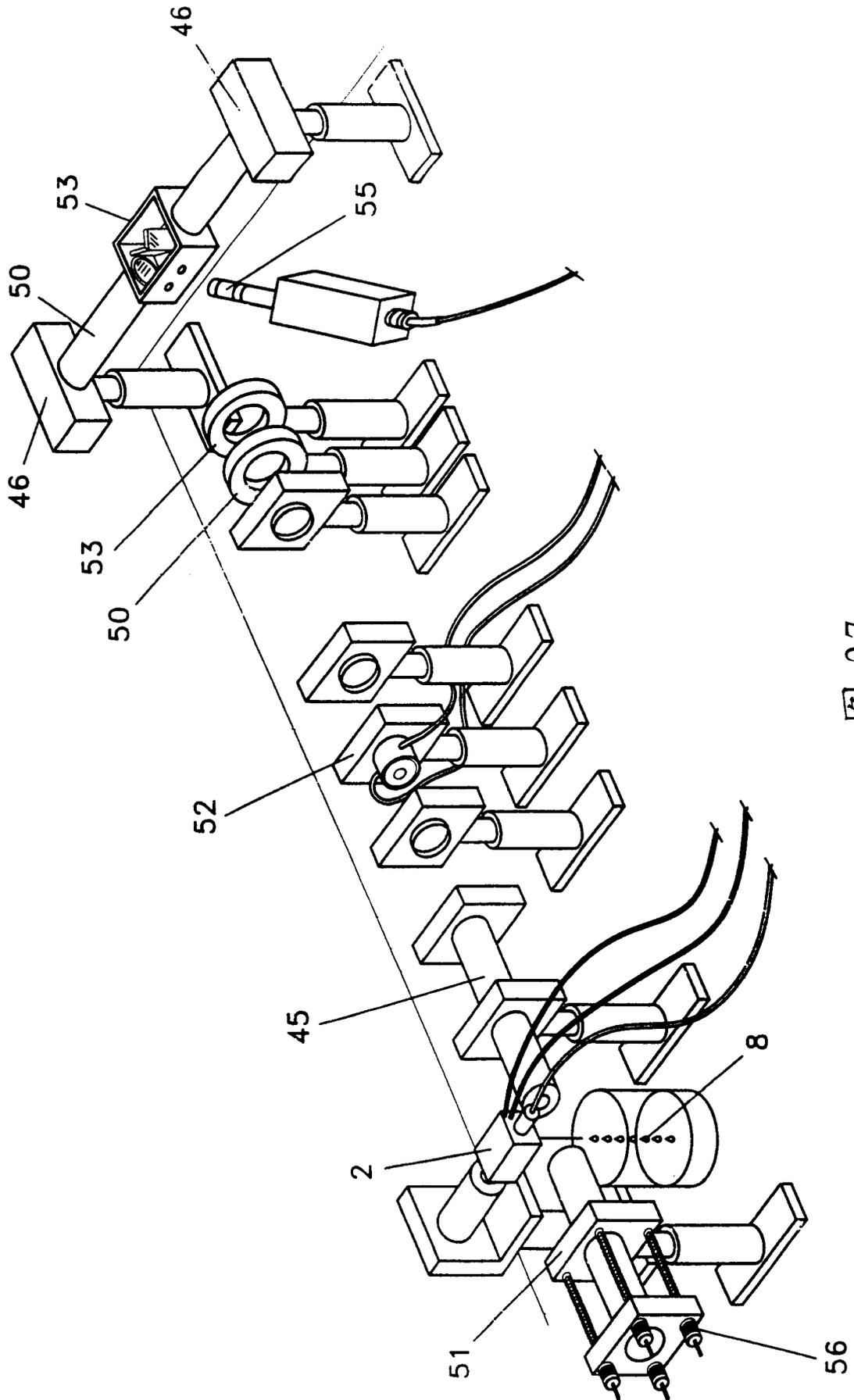


图 27

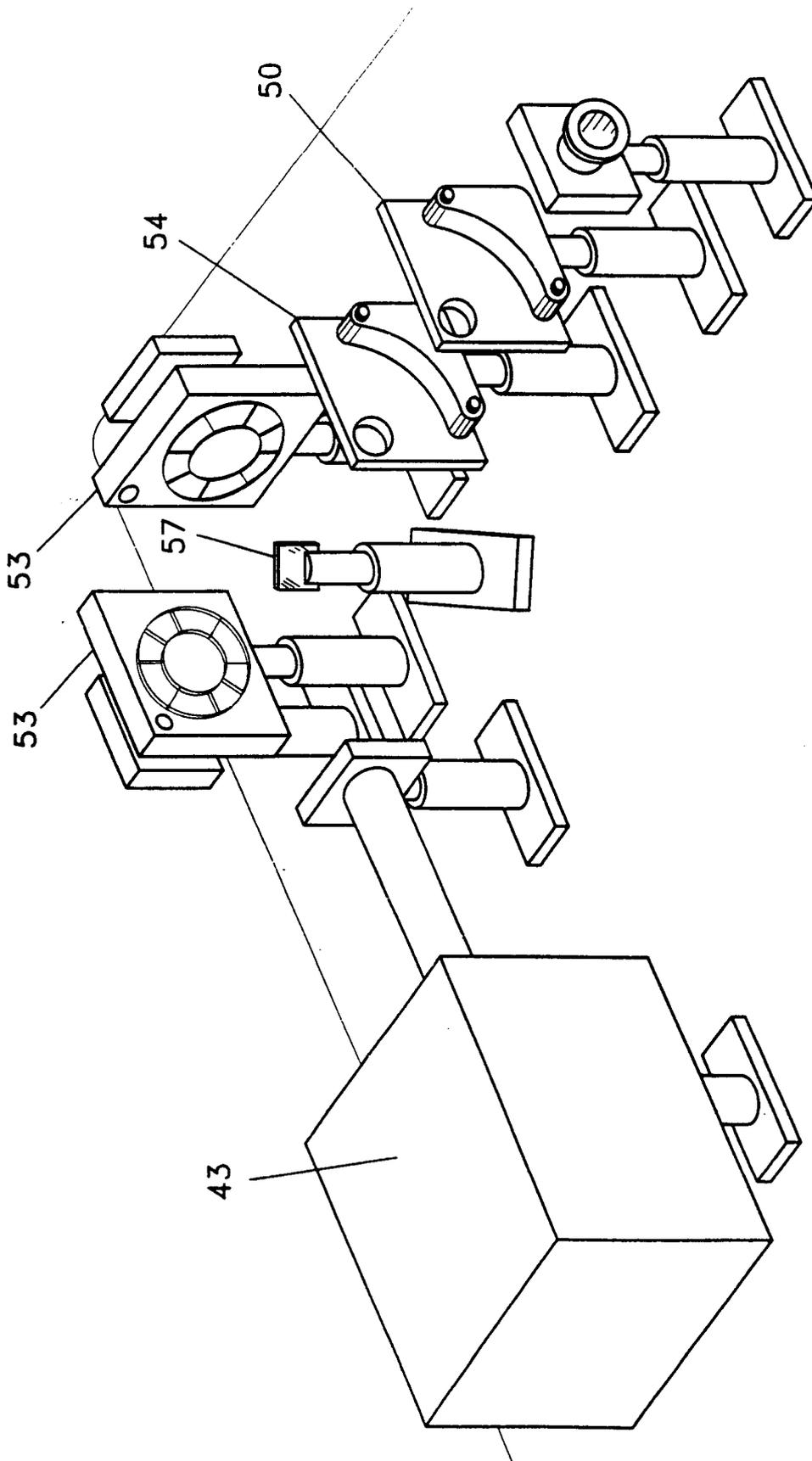


图 28