

(11) 106731 A
7(51) A 01 N 1/02
C 12 N 5/06
A 61 D 19/02

(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Патентов № 106731		(71) Заявители(и):	
(22) Заявено на 21.05.2002		XY, INC., FORT COLLINS, CO (US)	
(24) Начало на действие			
на патента от:			
Приоритетни данни			
(31) 167423	(32) 24.11.99	(33) US	(72) Изобретатели(и):
478299	05.01.2000	US	John Schenk, Fort Collins, CO (US)
(41) Публикувана заявка в		(74) Представител по индустриална	
бюлетин № 5 на 30.05.2003		собственост:	
(45) Отпечатано на		Емилиия Александрова Новакова, 1505 София,	
(46) Публикувано в бюлетин №		ул. "Буняв" 31А	
на			
(56) Информационни източници:		(86) № и дата на РСТ заявка:	
		PCT/US00/30155, 22.11.2000	
(62) Разделена заявка от пер. №		(87) № и дата на РСТ публикация:	
		WO01/37655, 31.05.2001	

(54) МЕТОД ЗА КРИОКОНСЕРВИРАНЕ НА СЕЛЕКЦИОНИРАНИ СЕМЕННИ КЛЕТКИ

(57) Методът е полезен за замразяване на сперма, селекционирана по различни методи и със специфични характеристики, като се предпочитат селекциите чрез течна цитометрия. Изобретението се отнася и до замразена семенна проба, която е селекционирана със специфични характеристики, например човешка, говежда, конска, свинска, овнешка, лосова или бизонска сперма. Замразената селекционирана семенна проба има различно приложение, по-специално може да бъде утаена и използвана за оплождане. Изобретението включва също метод за използване на замразена селекционирана семенна проба за изкуствено осеменяване или in vitro оплождане.

37 претениии

BG 106731 A

МЕТОД ЗА КРИОКОНСЕРВИРАНЕ НА СЕЛЕКЦИОНИРАНИ СЕМЕННИ КЛЕТКИ

КРЪСТОСАНА СПРАВКА КЪМ СЪОТВЕТНИТЕ ЗАЯВКИ

Заявката обхваща постиженията съгласно US предварителна заявка № 60/167,423, подадена на 24 ноември 1999г.

ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Изобретението се отнася до метод за замразяване на сперма, селектирана със специфични характеристики, както и до замразена селектирана семенна проба и методи за използването на такава проба. В частност изобретението е полезно за съхраняване на полово селектирана сперма.

НИВО НА ТЕХНИКА

Преди повече от половин век изкуственото осеменяване е представено в Съединените Щати като търговска техника за размножаване при широк кръг видове бозайници. Въпреки това изкуственото осеменяване отначало е било ограничено в региони, които са сравнително близки до мястото на семенната колекция, прогрес в криоконсервацията и съхранение на сперма има широкото разпространение на облекчената дистрибуция и търговия на сперма във връзка с изкуственото осеменяване или ин витро оплождане.

По-нататъшни усъвършенствания в бозайникова семенна колекция, криоконсервация, съхранение и ръчни техники повишават способността на скотовъдите да отглеждат животни с желани качества. Например успехите в селекцията на бозайникова сперма, базирани на слаби различия във физическите характеристики правят възможно да се отделя сперма, базирана по полов тип, което значи да се селектира за клетки, съдържащи X или Y хромозом. Тази техника позволява скотовъдът да променя съответния процент от X- или Y- тип сперма в проба и по този начин да определи пола на потомството. Способността да се селектира сперма, базирана на полов тип или всякакви други желани характеристики осигурява важна техника за нарастване на генетичния прогрес, повишаване на продукционната ефективност и достигане на по-голяма подвижност в управлението на живата порода. Пълната експлоатация на тази техника, обаче зависи от способността да се замразява и съхранява селектирана сперма.

Възможни са различни методи за селектиране на клетки, обаче селекцията и последващото обработване на сперма крие уникални рискове от това спермата да е неспособна за ДНК възстановяване и поради семенната морфология. Всеки сперматозоид има акрозом, намиращ се на главата и опашката, които са важни за фертилитета (оплодителната способност) и които са съответно чувствителни към физическо нараняване. В допълнение семенната фертилност намалява с нарастване на времето между колекционирането и използването. Тъй като повечето от възможните селекционни методи включват физически стрес и отнемат време, селектираната сперма обикновено е по-някакъв начин компрометирана в сравнение с не-селектирани клетки. Оплодителната способност може допълнително да бъде намалена, ако селекционната техника включва значително разреждане. Предполага се, че този "разреждащ ефект" може да доведе до загуба на защитни компоненти в семенната плазма.

Течната цитометрия е специфичен ефективен селекционен метод, който може да се използва за сортиране на сперма по полов тип. Въпреки, че сортираната сперма е обект на стресово въздействие, то не се взима предвид обикновено при стандартно изкуствено осеменяване или в протоколите при "ин витро" оплождане. В частност течната цитометрия е време-емка и поради физическото напрежение на течни цитометри, спермата трябва да се разрежи за сортиране до нива, които не са оптимални за съхранение (обикновено до достигане на 10^5 до 10^6 / мл). Освен това, съхранената сперма за изкуствено осеменяване трябва да бъде концентрирана така, че да може да се използва конвенционалното пакетиране и оборудване за пренасяне. Необходимостта от концентриращ етап излага на допълнителни физически влияния компрометираната сперма, по- някакъв начин.

Замразяването на сперма също неопределено намалява фертилността, подвижността и/или изменчивостта, като техниките за замразяване на неселекционирана сперма са добре известни, но не са описани техники за криоконсервация на селекционирана сперма.

СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Натоящото изобретение се отнася до метод за криоконсервиране на сперма, която е селекционирана със специфични характеристики. Този метод в частност е полезен за криоконсервиране на сперма, селекционирана чрез метод, чрез който се получава разреждане на спермата, докато методът осигурява изолиране на сперма от селекционна семенна проба, последвано от добавяне на краен пълнител към изолираната сперма, до получаване на суспензия с желана концентрация на сперма. В препоръчано изпълнение методът обезпечава замразяване на полово селекционирана сперма. Въпреки това криоконсервационния метод съгласно изобретението може да бъде използван за замразяване на сперма, селекционирана чрез всеки от селекционните методи, като предпочитана е селекцията чрез цитометрия.

Настоящото изобретение също се отнася до замразена семенна проба, която е селектирана със специфични характеристики, като полов тип. В предпочитани изпълнения замразена семенна проба включва сперма от бозайник, като например, човешка, говежда, конска, свинска, овнешка, лосова или бизонска. Също в обхвата на изобретението е контейнер, включващ замразена семенна проба съгласно изобретението.

Замразената селектирана семенна проба може да бъде използвана при голям брой приложения. В частност пробата може да бъде утаена и използвана за оплождане. Съответно изобретението още включва метод за използване на замразената селектирана семенна проба за изкуствено осеменяване или "ин витро" оплождане.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение позволява криоконсервация на сперма, която е селектирана със специфични характеристики, облекчаващо съхранение и/или пренасяне на селектираните семенни проби до местата, отдалечени от мястото на колекцията. Утаените добиви жизнеспособна сперма, която може да бъде използвана в процедури, такива като изкуствено осеменяване (AI) и "ин витро" оплождане (IVF). Този резултат е очудващ, поради документираната неустойчивост на спермата. Предишни изследователи са демонстрирали, че стресовите, свързани с различни селекционни методи или с криоконсервация резултират в значителни загуби във фертилитета и/или жизнеспособността. Настоящите изобретатели демонстрират за първи път, че бременности могат да бъдат постигнати със сперма, която е селектирана и след това замразена.

Изобретението представя важно предимство в управлението на жива порода, където селекцията на сперма за използване в подобни процедури може да се използва за повишаване на продукцията на потомство, имащо желани черти. Например селекция за постигане сперма, носеща или X или Y хромозома позволява контрол над пола на потомството, което е предимство

за производителя на животни, като млечни крави или говеда. Половата селекция също намира приложение при породните стойности (например показни или расови коне) или безопасни животни. Способността да се замразява селектирана сперма, която предлага изобретението, ще направи възможно широко разпространено използването на такива селекционни методи за, например повишаване на ефикасността на продукцията на жизнена порода както и качеството.

Определения

Термина "акрозом" или "акрозомална шапка" се отнася до шапката, която покрива предната половина на главата на сперматозоида и, която съдържа ензими, необходими за пенетрация на яйцеклетката.

Терминът "полов-тип" се отнася до полов хромозом, присъстващ в спермата (например X и Y хромозомите).

Терминът "капацитация" се отнася до специфичните промени на сперма водещи до увеличаване на капацитета на фертилизирание на яйцеклетка, такива като ензимни промени върху повърхността на акрозома, което води до освобождаване на акрозомални ензими, които улесняват пенетрацията на сперматозоида в яйцеклетката.

Както е използвано в справка за сперма, терминът "криозащитен" се отнася до молекула, която предпазва спермата през времето на цикъл на замразяване-утаяване, подготвя съживяването и запазването на фертилизационния капацитет.

Терминът "ефект на разреждане" се отнася до бързия спад в подвижността и/или жизнеността на спермата, когато е силно рзредена.

Както е използвано тук, терминът "селекция" се отнася до метод, в който проба е разделена на две, на база на присъствие или отсъствие на специфични характеристики (освен ако контекстът определя друго). В този смисъл "селектирана семенна проба" е проба, получена чрез насочване на първоначална проба към селекция със специфични характеристики.

Селекционна семенна проба поради това е обогатена, в сравнение с началната проба по отношение на специфичните характеристики.

Терминът "сортиране" се използва за да се опише селекционен метод, проведен чрез флуоресцентно активиран клетъчен сортировач (FACS).

Терминът "пълнител" се отнася до всяка среда, която води до консервиране на семенна жизнеспособност. Терминът "разширение" се отнася до разреждането на сперма с пълнител.

Терминът "първоначален пълнител" се отнася до среда, използвана да разрежи спермата, преди етапа на изолиране на метода съгласно изобретението.

Терминът "краен пълнител" се отнася до среда, използвана да разрежи спермата, преди етапа на замразяване на метода съгласно изобретението.

"Органична субстанция" в пълнител, описан тук е всяка органична субстанция, която води до намаляване на шока от студа и консервира фертилитета на спермата.

"Енергиен източник" в пълнителя, описан тук е всяка субстанция или субстрат, който спермата може да използва за клетъчно стабилизиране и/или подвижност.

Терминът "осмоларитет" е използван тук, като мярка на осмотично налягане на разтворени течни частички във воден разтвор (напр. носител). Течните частички включват едновременно йони и не-йонизирани молекули. Осмоларитетът се проявява като концентрацията на осмотично активни частички (напр. осмоли), разтворени в 1 кг вода.

Криоконсервационен метод

Изобретението се отнася до метод на криоконсервиране на селектирана сперма, включваща следните етапи:

- (1) получаване на селектирана семенна проба;
- (2) охлаждане на селектирана семенна проба;
- (3) изолиране на сперма от селектираната семенна проба;

- (4) добавяне на краен пълнител към изолираната сперма за получаване на суспензия от сперма; и
- (5) замразяване на суспензия от сперма.

Получаване на селектирана семенна проба

Първият етап в криоконсервационния метод съгласно изобретението обхваща получаване на предварително селектирана семенна проба, както и определяне на начална проба за всеки подходящ селекционен метод. Сперма от всеки вид може да бъде селектирана и замразена съгласно метода на изобретението. Методът може да се провежда със сперма от домашни животни, по-специално жива порода, както и със сперма от диви животни (например безопасни видове). За предпочитане е селектираната семенна проба да съдържа сперма от бозайник. Човешка сперма, говежда, конска, свинска, овнешка, лосова и бизонова са за предпочитане.

Най-общо селектираната семенна проба съдържа нормални жизнеспособна сперма. Към края, еякулатът, от който е получена спермата обикновено съдържа поне 50%, за предпочитане поне 75% морфологически нормална сперма. В тези изпълнение, най-общо поне 40% и за предпочитане поне 60% от спермата в еякулата показва прогресивна подвижност.

Възможни са широк кръг методи за селектирани клетки от смесени популации, включително селекция, базирана на свързване на клетки или клетъчни компоненти с антитела, антитела-фрагменти или други свързващи партньори и диференциално оцветяване.

Изобретението е представено тук със селекция, базирана на полов тип и полово селектирана сперма съгласно изобретението може да бъде получена чрез използване на всяка селекционна стратегия, която има предимство от леки различия в характеристиките между X и Y тип сперма. Примерно полово селекционни методи включват магнитни техники (напр. US патент № 4,276,139), колонна техника (напр. US патент №5,5514,537),

гравиметрична техника(напр. US патент № 3,894,529, преиздаден патент № 32350, US патенти 4,092,229, 4,067,965 и 4,155,831). Полова селекция, базирана на разлики в електрическите свойства е разкрита в US патент № 4,083,957 и техники, които селектират на базата на разлики в електрически и гравитометрични свойства са разкрити в US патенти № 4,225,405, 4,698,142 и 4,749,458. US патенти 4,009,260 и 4,339,434, описващ селекция, базирана на подвижността. Виохимически техники отнасящи се до антитела са разкрити в US патенти 4,511,661, 4,999,283, 3,687,803, 4,191,749, 4,448,767, където US патенти № 5,021,244, 5,346,990, 5,439,362 и 5,660,997 описват селекция базирана на разлики в мембранни протеини.

Течната цитометрия е предпочитан метод за сепариране на клетки от смесени популации, базирани на диференциално оцветяване с флуоресцентни оцветители или свързващи агенти към флуорисцентно белязани молекули, такива като антитела или нуклеинови киселини. Във флуорисцентно активирани клетъчни сортировачки (FACS), клетките са сортирани в различни популации, базирани на флуорисцентната интензивност при ирадиация. FACS може да бъде използвано за полова селекция на сперма, защото X хромозомата съдържа малко повече DNA (ДНК) отколкото Y хромозомата. Когато сперма се оцветява с флуорисцентен DNA-свързващ оцветител, X- хромозома носеща сперма абсорбира повече багрило отколкото Y хромозомата, носеща сперма и двете популации могат да бъдат сепарирани чрез FACS. Тази стратегия е дискутирана в US патент № 4,362,246 и значително е развита в US патент №5,135,759 (Johnoson). Сепарацията е увеличена чрез използване на високо скоростна течна хроматография, като например MoFlo® течен цитометър, произведен от Cytomation, Inc.(Ft.Colins,CO) и описан в US патенти № 5,150,313, 5,602,039, 5,602,349 и 5,643,796 , както и в PCT публикация WO 96/12171.

Селекционният метод използван за да се получи селекционна семенна проба е за предпочитане такъв, който консервира семенната жизнеспособност. Поради съответната нетрайност на спермата, нормалните течни цитометрични техники трябва най-общо да бъдат променени за сортиране на сперма. По-специфично течната цитометрия води до оцветяване, разреждане и изпитване на клетките със светлина. Всички тези етапи представляват стрес, който може да намали семенната жизнеспособност. Чувствителността на спермата към тези стресове може да варира между видовете и дори между отделните индивиди във видовете. Такива чувствителности са документирани също или могат бързо да бъдат документирани чрез емпирични изследвания, като тези описани в примери от 1 до 5.

Изменения, които повишават жизнеността са описани в патентни публикации, дискутирани по-горе. Например процедури, които осигуряват подобрени обвиващи и колекторни системи за сортиране на сперма са описани в РСТ публикация № WO99/33956 (заявка № PCT/US98/27909). По-нататък примери 1-7 по-долу описват примерни процедури за оцветяване и сортиране на сперма. Пример 3 описва изследване на ефектите на лазерен интензитет и оцветяваща концентрация на подвижност след утаяване на сортирана замразена сперма. Това изследване показва, че използването на по-ниски лазерни интензитети по време на сортиране повишават подвижността след утаяване.

Селекционирана семенна проба може да съдържа различни компоненти освен спермата и често съдържа компоненти, прибавени за да предпазват спермата по време на селекционните процеси. В случай на FACS, селекционираната семенна проба може да съдържа компонент(и) на разтвори, използвани за оцветяване и сортиране (например обвиваща течност и захващащ буфер).

В допълнение селектираната семенна проба обикновено съдържа пълнител или фракция на пълнител. Например, дву- етапни пълнители, включващи "А" фракция, не съдържаща глицерол и "В" фракция, съдържаща глицерол са добре известни. "А" фракцията се добавя към спермата първо, последвана от добавяне на същия обем от "В" фракцията. За този етап, "В" фракцията често се разделя на поне две еднакви части и се добавя последователно, например втората част от "В" фракцията се добавя 15 минути след първата.

Ако не присъства пълнител в компонентите, обикновено се добавя пълнител или фракция от пълнител към селектираната семенна проба преди да се изолира спермата от пробата. Ако само някои пълнителни компоненти присъстват, допълнителни компоненти могат по желание да бъдат добавени така, че селектираната семенна проба да включва пълен пълнител или фракция на пълнителя преди етапа на изобиране. При екстремни изпълнения се сортира говежда сперма за да се получи селектирана семенна проба, включваща "А" фракция от пълнител (примери 2, 3 и 4). При желание, "В" фракцията може да бъде добавена след това към селектираната семенна проба преди етапа на изолиране (Пример 5). Пълнителят от пре-изолационния етап е наречен "начален пълнител" за разлика от крайния пълнител, използван за разреждане на изолираната сперма преди замразяване. Ако селектираната семенна проба е избрана чрез FACS, крайният пълнител може да бъде включен към обвиващата течност, използвана за сортиране. Примерните обвивни течности и пълнители са описани в детайли в пример 4.

Пълнител подходящ за използване в селектирана семенна проба представлява физиологично приемлив носител. Физиологично приемливият носител обикновено е воден и в предпочитани изпълнения включва дейонизирана вода. Подходящи пълнители най-общо са един или повече от следните допълнителни компоненти: криопротектант, който поддържа

осмоларитета и буфери рН, органична субстанция, която предпазва от студовия шок и консервира оплодителната способност на спермата, детергент, който действа синергистично с подобни органични субстанции за да повишава консервацията на спермата, енергиен източник, който може лесно да бъде усвоен от спермата, антиоксидант, който предпазва спермата от студовия шок, субстанция, която олеснява семенния капацитет и един или повече антибиотици.

Въпреки това криоконсервантите използвани в изобретението не се ограничават до тези, участващи в частния механизъм, най традиционните криоконсерванти участват поне частично, чрез редуциране на вътреклетъчна дехидратация. По-специално, замразяването е придружено от повишение в концентрацията на разтвора в средата, обкръжаваща спермата. Това повишение в концентрацията на разтвора извлича вода от клетките, което повишава интрацелуларната електролитна концентрация. Примерни криопротектанти са глицерол, диметил сулфоксид, етилен гликол, пропилен гликол и други. Криопротектанти подходящи за използване в даден пълнител могат да варират, в зависимост от видовете, от които произхожда спермата. Например, глицерол е подходящ за използване в криоконсервация на човешка и говежда сперма, но не се използва при криоконсервация на свинска или заешка сперма. Такива предпочитания са известни за много търговски разновидности на сперма и могат лесно да бъдат определени емперично за други типове сперма.

Пълнителят използван в изобретението по желание включва един или повече компонента, които помагат да се поддържа осмоларитета и осигуряват буферния капацитет. В предпочитано изпълнение съгласно изобретението, осмоларитетът на пълнителя приближава този на физиологичните течности. Най-предпочитано, осмоларитетът на пълнителя е в границата от около 280 mOsm до около 320 mOsm. За предпочитане

pH също е във физиологично приемлив диапазон, най-предпочитано в диапазон от около 6.5 до около 7.5.

Субстанции, използвани за поддържане на осмоларитета и pH в тези граници са добре познати в областта и могат да бъдат добавени към пълнителя като твърдо вещество или разтвор. Буфер, съдържащ сол, въглеродород или тяхна комбинация може да бъде използван за тази цел. Специфични примери включват натриев цитрат, трис[хидроксиметил]аминометан и TES (N-трис[хидроксиметил]метил-2-аминоетансулфонова киселина) и моноводороден глутаматни буфери; млеко; HEPES-буферна среда; и всякаква тяхна комбинация. Компонентът използван за да помогне да се поддържа осмоларитета и осигури буферния капацитет в отделно прилагане може да варира в зависимост от другите компоненти на пълнителя и в някои случаи от видовете, от които произхожда спермата. Селекцията на такъв компонент за използване в настоящото изобретение е по възможностите на специалист в областта.

Една или повече органични субстанции, които предпазват сперма от студов шок и помагат да се съхрани фертилизационния капацитет могат също да бъдат включени в пълнителя. Такива субстанции са добре известни и понякога са описани като "непроникващи криопротектанти". Специалист в областта може лесно да определи органична субстанция, подходяща за отделно приложение на криоконсервационен метод, описан тук. Например, органична субстанция, съдържаща предпазващи съставни части (напр. липопротеини, фосфолипиди, лецитин), които вероятно ще намалят влиянието на студовия шок и разреждащия ефект, могат да бъдат включени в пълнителя. Подходящи органични субстанции са дизахариди и тяхни комбинации. Примерни органични субстанции са екстракт от яйчен жълтък, млечен екстракт, казеин, албумин, лецитин, холестерол и техни комбинации.

Пълнителят може също да включва детергент. Алкил йонни детергенти, такива като натриев додецил сулфат (НДС) са докладвани, че

действат синергистично с яйчен жълтък като повишават защитата против студовия шок. Други детергенти използвани в криоконсервацията на клетки могат също да бъдат използвани в пълнителя и селекцията на отделен детергент за специфично прилагане е по силите на специалист в областта в светлината на ръководството, доказано тук. Както се вижда в Пример 5.

За предпочитане пълнителят включва енергиен източник, който лесно се усвоява от сперма. В отсъствие на енергиен източник, сперма може да окисли интрацелуларни фосфолипиди и други клетъчни компоненти. По този начин включването на енергиен източник в пълнителя предпазва интрацелуларни резерви и клетъчни компоненти. Както добре е известно, захари, в частност монозахариди осигуряват обичаен енергиен източник, въпреки че може да бъде използван всеки енергиен източник в пълнителя. Примерно монозахаридите използвани в пълнителя включват глюкоза, фруктоза и маноза.

Един или повече антиоксиданти могат по желание да бъдат включени в пълнителя за осигуряване на допълнителна защита срещу студов шок. Примерно антиоксиданти са бутилиран хидрокситолуен (БХТ), негови деривати и други подобни. Въпреки това, обаче други антиоксиданти използвани в криоконсервацията на клетки могат да бъдат използвани също в пълнителя и селекцията на отделния антиоксидант за специфично прилагане е във възможностите на специалист в областта в светлината на ръководството, доказано тук.

Пълнителят може също за предпочитане да включва субстанция, която олеснява семенния капацитет. Известни са видове капацитетни улеснители в нивото на техниката и всеки може да бъде използван в пълнителя. Примери са ензими като алфа амилаза, бета амилаза, бета глюкоронидаза, които могат да бъдат използвани в комбинация, ако е необходимо.

Накрая, пълнителят за предпочитане включва антибиотик, тъй като субстратният бактериален растеж може да заплашва семенната

жизнеспособност и да повишава риска от инфекции на гостоприемника при изкуственото осеменяване или ин витро оплождащи процедури. Всеки от множеството антибиотици, използвани в криоконсервацията на клетки може също да бъде използван в пълнителя. Изборът на подходящ антибиотик зависи от видовете, от които е получена спермата, процедурите за получаване и използване на семенната проба и специфичните микроорганизми към които е насочен. Примерни антибиотици са тилозин, гентамицин, линкомицин и спектиномицин, линко-спектин (комбинация на линкомицин и спектиномицин), пеницилин, стрептомицин и тикарцилин, които могат да бъдат използвани самостоятелно или в комбинация. Въпреки това, един специалист в областта може лесно да определи други антибиотици за използване в пълнителя.

Примерни пълнители са описани в подробности по-долу и в претенциите.

Семенната концентрация е обикновено по-ниска в селектираната семенна проба, отколкото в пробата от източника и както е отбелязано по-горе, когато е използвано FACS, разреждането е значително. Типичен вид, базиран на полов тип може да продуцира проба, съдържаща сперма от 6×10^5 клетки/мл захващащ буфер. Тъй като такава ниска концентрация не е оптимална за съхранение (поне за повечето изпитвани видове), криоконсервационният метод съгласно изобретението най-общо концентрира селекционната семенна проба.

Охлаждане на селекционната семенна проба

Вторият етап в криоконсервационния метод води до охлаждане на селекционната семенна проба, обикновено чрез намаляване на температурата на контролна степен. Твърде бързото охлаждане може да предизвика студов шок, който да доведе до загуба на мембранен интегритет и клетъчна функция. Силата на ефектите на студов шок варират от видове до видове и зависят от фактори, като степента на охлаждане и температурната разлика.

При подходящи контролирани условия на охлаждане, семенната течност може да се адаптира към термичните ефекти. Пример 2, между другото описва условия за охлаждане на говежда сперма и определени подходящи условия за охлаждане на сперма на други видове използвани от на специалист в областта.

В препоръчително изпълнение съгласно изобретението, обикновено селектирана семенна проба се охлажда при около 22° С до около 5°С и охлаждането най- общо се провежда за период от 60 минути до 24 часа, за предпочитане за период от 90 минути до около 240 минути, и най- добре за период от около 90 минути до около 120 минути. Охлаждането може да бъде проведено по всеки конвенционален метод, включващо просто поставяне на селектираната семенна проба при 5°С околна среда.

Изолиране на семенни клетки от селектирана семенна проба

След началното разреждане на селектираната семенна проба, спермата се изолира от проба чрез използване на мек изолиращ метод, който осигурява поне 50% възстановяване на спермата, по- предпочитано около 75% до около 90% възстановяване на сперма и най- добре около 80% възстановяване. По време на изолиращия етап, охладената сперма трябва най- общо да бъде запазена студена, например между 1 и 8°С и за предпочитане от 4 до 5°С.

Всеки от различните методи, подходящи за възстановяващи клетки от суспензия може да бъде използван за изолиране на сперма, например филтруване, утаяване и центрофугиране. В едно примерно предпочитано изпълнение, селектираната семенна проба се разпределя в 50 мл туби, при обеми не повече от 27 мл и за предпочитане между 20 и 27 мл. Центрофугирането се провежда при 4°С, при около 850x g за около 20 минути. За предпочитане е етапът на центрофугиране да осигурява поне 50% до 90% възстановяване на спермата, по- добре около 60% до 90% и най-

добре около 70 до 90% възстановяване на спермата. След изолирането супернатантът се отделя и пелетата се суспендира чрез леко вихрово движение или повторно аспириране при 4°C. Семенната концентрация след това обикновено се определя (например чрез хемацитометър).

Крайно разреждане на изолирани семенни клетки

След изолация спермата при желание се обединява и разрежда до подходяща концентрация за замразяване. Концентрацията на спермата след крайното разреждане и преди замразяването за предпочитане е в границите от около 1×10^6 /мл до около 300×10^6 /мл, още по-предпочитано от около 10×10^6 /мл до около 50×10^6 /мл и най-предпочитано от около 10×10^6 /мл до около 20×10^6 /мл.

Описанието на началния пълнител, по-горе също се отнася и до крайния пълнител, който може да бъде същия или различен от началния пълнител. В отделни изпълнения съставът на семенната проба, разреден с крайния пълнител е веществено подобен (ако не е същия) на състава на семенната проба след добавяне на началния пълнител.

В предпочитано изпълнение съгласно изобретението се използва яйчен жълтък-Трис пълнител. След добавяне на пълнителя, семенната суспензия съдържа глицерол (криопротектант), лимонена киселина и Трис[хидроксиметил]аминометан (буфер); яйчен жълтък (органична субстанция); фруктоза (енергиен източник); тилозин, гентамицин и линкоспектин (антибиотик). Типични приблизителни концентрации на тези компоненти след добавяне на краен пълнител към изолираната сперма са:

Компоненти на яйчен жълтък-Трис пълнител

Глицерол	4-8% об./об.
Лимонена киселина	55-75 mM
Трис[хидроксиметил]аминометан	190-210 mM
Яйчен жълтък	5-25% об./об.
Фруктоза	45-65 mM

Тилозин	25-100 µg/ml
Гентамицин	200-300 µg/ml
Линко-спектин	100-400 µg/ml*
*100-400 µg/ml линкомицин и 100-400 µg/ml спектиномицин	

При различни вариации на това изпълнение, частично подходящи за замразяване на говежда сперма, концентрациите на тези компоненти след добавяне на крайния пълнител към изолираната сперма са около 6% (об./об.) глицерол, около 65 mM лимонена киселина, около 200 mM Трис[хидроксиметил]аминометан, около 20% об./об. яйчен жълтък, около 56 mM фруктоза, около 50 µg/ml тилозин, около 250 µg/ml гентамицин и около 150-300 µg/ml линко-спектин (150 µg/ml линкомицин и 300 µg/ml спектиномицин) в дейонизирана вода.

В алтернативно изпълнение, се използва яйчено жълтъчен цитратен пълнител. След добавяне на пълнителя, семенната суспензия съдържа глицерол (криопротектант); натриев цитрат(буфер); яйчен жълтък (органична субстанция); тилозин, гентамицин и линко-спектин (антибиотици). Типични прилизителни концентрации на тези компоненти след добавяне на крайния пълнител към избраната сперма са:

Компоненти на яйчено жълтъчно цитратен пълнител

Глицерол	4-8% об./об.
Натриев цитрат	60-80 mM
Яйчен жълтък	5-25% об./об.
Тилозин	25-100 µg/ml
Гентамицин	200-300 µg/ml
Линко-спектин	100-400 µg/ml*
*100-400 µg/ml линкомицин и 100-400 µg/ml спектиномицин	

Примерно, предпочитани концентрации за замразяване на говежда сперма са около 7% (об./об.) глицерол, около 72 mM натриев цитрат, около 20% об./об. яйчен жълтък, около 50 µg/ml тилозин, около 250 µg/ml гентамицин и около 250-300 µg/ml линко-спектин.

В друго алтернативно изпълнение се използва яйчено жълтъчен -TES-Tris("EY TEST") пълнител. След добавяне на пълнителя семенната суспензия съдържа глицерол (криопротектант); яйчен жълтък и нагрятото мляко,, например хомогенизирано мляко, съдържащо 1.25 % фруктоза с 10% глицерол (органични субстанции); тилозин, гентамицин и линко-спектин (антибиотици). Типични приблизителни концентрации на тези компоненти след добавяне на крайния пълнител към избраната сперма са:

Компоненти на яйчено жълтъчен TES-Tris пълнител

Глицерол	3-7% об./об.
Лимонена киселина	55-75 mM
Трис[хидроксиметил]-2-аминоетан сулфонова киселина	140-170 mM
Трис[хидроксиметил]-2-аминометан	60-80 mM
Яйчен жълтък	5-25% об./об.
Фруктоза	5-12 mM
Тилозин	50-150 µg/ml
Гентамицин	400-600 µg/ml
Линко-спектин	200-700 µg/ml*

*200-700 µg/ml линкомицин и 200-400 µg/ml спектиномицин

Примерно, предпочитани концентрации за замразяване на говежда сперма са около 5% (об./об.) глицерол, около 158 mM Трис[хидроксимети метил]2-аминоетан сулфонова киселина, около 72 mM Трис[хидроксиметил]аминометан, 20% об./об. яйчен жълтък, около 8mM

фруктоза, около 100 µg/ml тилозин, около 500 µg/ml гентамицини около 300-600 µg/ml линко-спектин.

В още по- друго алтернативно изпълнение съгласно изобретението, се използва млечен пълнител. След добавяне на пълнителя, семенната суспензия съдържа глицерол (криопротектант); нагрятото хомогенизирано мляко(органична субстанция), фруктоза (енергиен източник); тилозин, гентамицин и линко-спектин (антибиотици). Типични приблизителни концентрации на тези компоненти след добавяне на крайния пълнител към избраната сперма са:

Компоненти на млечен пълнител

Хомогенизирано мляко	90% об./об.
Глицерол	3-7% об./об.
Фруктоза	1.25% об./об
Тилозин	50µg/ml
Гентамицин	250 µg/ml
Линко-спектин	250-300 µg/ml*

•

•

*250-300 µg/ml линкомицин и 250-300 µg/ml спектиномицин

Примерни препоръчани концентрации за замразяване на говежда сперма са около около 90% мляко, около 5% (об./об.) глицерол, около 1.25% фруктоза (тегл/об.), около 50 µg/ml тилозин, около 250 µg/ml гентамицин и около 250-300 µg/ml линко-спектин.

Други пълнители използвани стандартно за замразяване на сперма могат да бъдат използвани като крайни пълнители при замразяване на селектирана сперма. Описани са множество пълнители, оптимизирани за използване при замразяване на сперма от различни видове и много от тях са търговско достъпни. Замразяващи пълнители за еднакви сперми обикновено

съдържат мляко, яйчен жълтък, различни захари, електролити и криопротектант. Примерно замразяващи пълнители са описани от Squires, E.L. et al., Cooled and Frozen Stallion Semen Animal Reprod. And Biotechnology Laboratory, Bulletin No 69, Chapter 8, "Seminal Extenders" pp. 49-51 (юли 1999).

Равновесие и замразяване на сперма

Разширението на семенната проба образува семенна суспензия, която след това се прехвърля в контейнери за замразяване. Ако спермата следва да се използва за оплождане, клетките се разделят подходящократно в индивидуални дози достатъчно за достигане на оплождането. Препоръчаната доза може да варира специфично от един вид до следващия и е добре известна също (например за рогат добитък и коне) или може лесно да бъде определена. В случая на полово селектирана говежда сперма, подходящите дози варират от около 1.0×10^6 до около 3.0×10^6 сперма.

Всеки подходящ контейнер може да бъде използван за замразяване, например ампула, епруветка и специални резервоари. Сперма предназначена за ИО обикновено е замразена в специални резервоари под формата на зърна (напр. 0.25 мл и 0.50 мл), създадени за да се използват в пистолет за осеменяване. Болус от пълнител, за предпочитане е вкаран в специалния резервоар, следвано в последователност от въздух, сперма, въздух и пълнител, така, че спермата да е поместена към единия край, отделена с въздушно пространство от болуса на пълнителя в същия край на резервоара.

Преди замразяване, спермата най-общо позволява да бъде уравновесена при 5°C . За предпочитане е спермата да бъде уравновесена за период от 1 час до 18 часа, по-предпочитано между 3 и около 18 часа и най-добре между 3 часа и около 6 часа (виж Пример 2).

Следващото равновесие, може да бъде използван всеки стандартен метод, осигурява стъпката на замразяване да не бъде твърде бърза (напр. не повече от около $0.5^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$). За предпочитане стъпката на замразяване да е

около 0.5°C /минута. В едно примерно предпочитано изпълнение спермата се поставя в неподвижна течна азотна среда и замразяването се провежда в три отделни стадия за период от около 10 минути. В първия стадий на замразяване спермата се охлажда от около 5°C до около -15°C при стъпка от 40°C /минута до 65°C /минута. Във втория стадий на замразяване спермата се охлажда от -15°C до около -69°C при стъпка от 25°C /минута до около 35°C /минута. В третия стадий спермата се включва в течен азот при около -100°C .

Селекционирани семенни проби

В допълнение към метода за замразяване, изобретението се отнася до замразена семенна проба, включваща сперма, селектирана от проба от източник с частични характеристики. Спермата може да бъде от всеки вид, включително всеки от тези, дискутирани по-горе в справка към метода за замразяване. Изобретението обхваща замразена сперма, селектирана за всякакви характеристики чрез всеки подходящ метод, като тези описани по-горе. Предпочитани изпълнения са: замразена полово селектирана човешка, говежда, конска, свинска, овнешка, лосова или бизонска сперма. Половата селекция се провежда, за предпочитане чрез течна цитометрия, както е описано по-горе.

Също в обхвата на изобретението е контейнер, съдържащ замразена семенна проба съгласно изобретението. Контейнерът може да бъде образуван от всякакъв материал, който не реагира със замразената семенна проба и може да има всякаква форма или други качества, които улесняват използването на пробата за желаната употреба. За проби за използване в ИО, например контейнерът е конвенционален резервоар (т.н. 0.25 мл или 0.5мл), създаден за използване с пистолет за осеменяване. Контейнерът се залепя по всеки подходящ начин за съхранения на пробата при исканата температура на съхранение, която обикновено е под -80°C . Резервоари-0.25 мл могат да

бъдат запечатани, например ултразвуково с пудра PVC или памук-поливинилен кран и/или закалена стоманена топка (ЗТ).

Тъй като замразената семенна проба, съгласно изобретението обикновено е утаечна преди употреба, изобретението също се отнася и до утаечна, предварително замразена селектионирана семенна проба и контейнер, включващ такава утаечна проба.

Метод за използване на селектионираната семенна проба

Замразената селектионирана семенна проба съгласно изобретението е подходяща за използване при всеки метод, в който се използва сперма. Пробата може да бъде утаечна и използвана във всяко конвенционален метод на оплождане, като изкуствено осеменяване или ин витро оплождане. Утаяването се провежда по същия начин, както за замразяване на не- селектионирана сперма. Накратко, резервоарът, съдържащ замразена сперма се смесва във водна баня, поддържана при температура от около 35°C до около 37 °C за период от около 20 до 30 секунди. След утаяването, семенната депозиция (т.н. осеменяване) се провежда съгласно стандартни процедури, като се внимава да се предпази спермата от колебанията на околната среда.

ПРИМЕРНИ ИЗПЪЛНЕНИЯ

Пример 1

Ефекти на разреждане на сперма

Цел: да се определи ефекта на семенна концентрация върху семенната подвижност за не-замразена, не- съхранявана, но силно разрежена сперма.

А. Ефекти на разреждане върху не- промита сперма

1. *Събиране на пробата от източник.* Спермата се събира от бикове по рутинна събирателна методика чрез изкуствена вагина, както е описано в Scchenc J., Proc 17th NAAB, p.48-58(1998) and Saacke RG, Proc.NAAB Tech Conf AI Reprod. 41:22-27(1972). Всички използване еякулати съдържат

повече от 50% прогресивно подвижна и повече от 75% морфологично нормална сперма. Добавят се антибиотици към суровия еякулат, както е описано от Shin S., Proc NAAB Tech Conf AI Rprod. 11:33-38 (1986) 15 минути след събирането и концентрацията на спермата се определя чрез спектрофотометър.

2. Методи. Сперма от 4 бика се разрежда до 1.25, 2.5, 5, 10, 15 и 20×10^6 /мл чрез яйчено жълтъчен цитратен пълнител (ЯЖЦ) получен с 20% яйчен жълтък (об./обл) в 72 в 72 mM натриев цитрат, 50 Tg/ml тилозин, около 250 Tg/ml гентамицин и около 250-300 Tg/ml линко-спектин. Всяка проба се получава в дупликат (2 туби/разреждане/бик) и съдържа 8 мл общ обем за туба. Всички проби се инкубират за 60 минути при 22°C, след което те се центрофугират чрез люлееща се едноместна центрофуга (Eppendorf, Model#5810R) при 600x за 10 минути до концентриране на спермата. След центрофугирането супернатанта от единия комплект на дупликатните туби не се премества; спермата се ресуспендира в същата среда, при оригиналната концентрация чрез повторна внимателна аспирация чрез 5-мл серологична пипета. (Вторият комплект на дупликатните туби се използва в пример 1B). Семенните проби след това се охлаждат до 5° C при 0.2°C/мин. за над 90 минути. Тази сперма се нарича "не-промиа сперма". Всички проби се инкубират при 5° C за 24 или 48 часа след събирането.

3. Изчисляване на подвижността. След инкубацията, пробите се за топят до 37°C чрез сух блоков инкубатор за 10 минути преди определяне на подвижността. За този експеримент се определя единичен сляп опит от процент на прогресивната подвижност на спермата за всяка проба. Прогресивната семенна подвижност се определя отделно за всеки подклас чрез единичен наблюдател (x200, фазово-контрастна микроскопия); друга личност приготвя микроскопски отрязъци по произволен начин така, че наблюдаващият да е неосведомен за третирането.

4. Статистически анализ. Данните се анализират чрез анализ на варианта (SAS Institute, Cary, Nort Carolina) с факторни бикове и начална разреждаща концентрация. Отделните анализи се провеждат за всяко инкубационно време. Разреждащите тенденции се изследват чрез (log) линейни контрасти.

5. Резултати. Данните за не-промита сперма (Таблица 1) показват линейно съотношение ($P < 0.1$) за двете инкубационни времена. Процентът на подвижна сперма се повишава както концентрацията на сперма се повишава от 1.25×10^6 /мл до 10×10^6 /мл, но съществува малка разлика след това. Кубичният период е значителен ($P < 0.5$ за 24 часа) и незначително важен ($P < 0.1$) за 48 часа инкубации. Наблюдава се необичаен ефект ($P < 0.01$) при двете времена.

ТАБЛИЦА 1

Ефекти на охлаждане върху подвижността на не- промита сперма (%) след охлаждане до 5°C .

Разреждаща концентрация (10 ⁶ /мл)	Инкубация при 5°C	
	24 h ^a	48 h ^b
1.25	18 ^c	12 ^c
1.5	38 ^{c,d}	25 ^c
2.5	56 ^d	38 ^c
5.0	61 ^d	45 ^c
10.0	55 ^d	48 ^c
20.0	58 ^d	45 ^c
50.0	5.6	4.5

a(log) линейен ($P < 0.01$) и кубичен ефекти ($P < 0.05$).

b(log) линейен ($P < 0.01$) и кубичен ефекти ($P < 0.1$).

cd,e значения в колоните без общи различия ($P < 0.05$).

$\sqrt{\text{грешна стойност на квадрат от ANOVA} + \sqrt{N}}$

(SAS Institute, Cary, NC, USA)

В. Ефекти на разтваряне върху промита сперма

1. Събиране на проба източник. Вторият комплект на дупликатните туби, съдържащ проби получени в Пример 1А се използва в този експеримент.
2. Методи. Спермата се разрежда, инкубира се и се концентрира чрез центрофугиране както е пример 1А. Следва центрофугиране, 7.1 мл от супернатанта се аспирират от всяка една туба, отстранява се по-голямата част от семенната плазма и оставащата сперма в 900 μ l пелета. Спермата се разрежда с ЕУС (виж пример 1А) до получаване на 10×10^6 /мл или 20×10^6 /мл семенна суспензия.
3. Оценяване на подвижността. Пробите се затоплят и измерват за прогресивна подвижност както в Пример 1А.
4. Статистически анализ. Данните се анализират както в пример 1А. В допълнение, данните в пример 1В се анализират за инкубационна концентрация при 5°C.
5. Резултати. Данни за промита сперма (Таблица 2) показват липса на значими ефекти при третиране, когато спермата се измерва след 24 часа. Въпреки това, след съхранение от 48 часа при 5°C има бик, начално разреждане, инкубационна концентрация и бик при инкубационни ефекти ($P < 0.05$). Повече сперма остава подвижна, когато е взета при 20×10^6 /мл отколкото при 10×10^6 /мл (31% vs. 20%; $P < 0.05$). Начални разреждания на 1.25, 2.5 и 5×10^6 сперма/мл водят до по-ниска прогресивна подвижност отколкото 10×10^6 сперма/мл ($P < 0.05$), със съответно главни стойности на ефекта от 19, 20, 27 и 37% подвижна сперма.

ТАБЛИЦА 2

Сборни ефекти на промиване, разреждане, концентриране и охлаждане върху прогресивната семенна подвижност (%)

Съхранение при 5° С семенна концентрация и разреждане

	24	48
	20x10 ⁶ /мл	20x10 ⁶ /мл
Бикове	45	24
2-годишни	51	29
3-годишни	54	32
4-годишни	51	40
5-годишни	60	41
6-годишни	55	40

^a концентрация до 20x10⁶ клетки/мл е по-добра (P<0.05) от 10x10⁶ клетки/мл след 48 часа съхранение.

Също така, начално разреждане до 10x10⁶ е по-добро от ниски концентрации (P<0.05).

Установените стандартни грешки ($\sqrt{\text{грешна стойност на квадрат от ANOVA} + \sqrt{N}}$) са 4.0 за 24 часа и 2.8 за 48 часа инкубации.

^b значима (log) линейна тенденция (P<0.06).

С. Изводи

Силното семенно разреждане и охлаждане води до субстанциална редукция в процента на семенната подвижност, независимо от присъствието или отстраняването на семенна плазма. Въпреки това, този разреждащият ефект значително се намалява чрез концентриране на разреждана сперма до 10x10⁶/мл и дори повече, до 20x10⁶/мл преди съхранение при 5° С. Сперма от някои бикове се отразява по-добре на разреждането отколкото от други

бикове; Въпреки това, установените различия между бикове са типични. Прекалено разредената сперма може да бъде изложена на риск по време на съхранение, в случай на премахване на защитни съединения в семенната плазма.

Пример 2

Ефекти на равновесно време преди замразяване на сортираната сперма

Цел: Да се измери ефекта на равновесните времена (3, 6 и 18 часа, 5°C) преди замразяване на течно сортирана сперма.

Следващият експеримент повтаря в пълна степен използването на същите бикове.

1. Събиране на проба от източник. Сперма от 4 бика се събира и обработва, както е описано в пример 1А.

2. Методи.

а) Оцветяване и обработка за сортиране.

i) Получаване на оцветен родов разтвор: родов разтвор на 8.89 mM Hoechst 33342 (бис- бензамид Н-33342; #190305, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) се приготвя в де-йонизирана среда.

ii) Семенна оцветяваща процедура: Спермата се разрежда в модифициран TALP буфер (Таблица 3) до 400×10^6 кл./мл. Следващо разреждане след което се добавя Hoechst 33342 към семенната суспензия при концентрация от 224 μ M.. След като оцветителят се добавя към семенната суспензия, пробите се инкубират за 60 минути при 34°C. Следва инкубация, спермата се разрежда до 100×10^6 /мл с TALP, съдържащ 2.67% избистрен яйчен жълтък и 0.002% оцветяваща хранителна субстанция (FD&C#40), която неутрализира флуоресценцията на Hoechst 33342 в спермата с компрометирани клетъчни мембрани, позволяващи да бъдат отстранени по време на процеса на сортиране. Точно преди течното сортиране, пробите се филтрират при частна

уравновесеност през 40-µm размер найлонов филтър до отстраняване на всякакви остатъци и/или смачкани семенни клетки.

б) Сортиране. Дву-линеен аргонов лазер, опериращ при 351 и 364 nm и 150mW се използват за да възбудят Hoechst 33342 багрилно вещество. Течният цитометър/клетъчен сортировач използван тук е SX MoFlo®(Cytomation, Inc.Fort Collins, CO,USA), опериращ при 50 psi. Използваният Трис-базиран обвиващ флуид, съдържащ Трис(хидроксиметил) аминокетан (Трис; 197.0 mM;# T-1503,Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO,USA), монохидрат на лимонена киселина (55.4 mM;# C-7129,Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO,USA) и фруктоза (47.5mM;# F-0127,Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO,USA). Добавя се базелинов антибиотик към Трис-базиран флуид, съдържащ 0.58 г/л от пеницилин и 0.05 г/л стептомицин сулфат.

Спермата се сортира чрез процес, отбелязан като "основно сортиране", което позволява бързо акумулиране на голямо количество сперма, така, че голям брой примери могат да бъдат проведени за разумно време. Спермата минава през течния цитометър при стандартни условия на провеждане с изключение на това, че всички капки, съдържащи жизнеспособна сперма се събират в единична туба, по-често отколкото сортиране в две туби, базирани на специфични характеристики (например сортиране по полов тип). Спермата се сортира на база на жизнеспособност, следователно спермата, която има компрометирана плазмена мембрана се изключва по време на "основното сортиране".

Оцветената сперма се поддържа при $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ по време на сортирането. Основно сортираната сперма се събира в 50-мл пластмасови туби, съдържащи 2 мл 20% яйчено жълтъчен -Трис пълнител, получен с 20% яйчен жълтък (об./об.) в 200 mM Трис, 65 mM лимонена киселина, 56 mM фруктоза, 50 Tg/ml тилозин, 250 Tg/ml гентамицин и 150-300 Tg/ml линко-спектин в дейонизирана вода. Яйчено жълтъчния Трис пълнител е наречен

"Трис-А-фракция" за да означава липсата на глицерол на този етап в процедурата. Спермата се събира в туби със съдържание 12мл и приблизително 6×10^6 сперма. Спермата се инкубира последователно при 22°C за 1 до 3 часа за да се симулират условия на сортиране по полов тип.

В) Подготовка за замразяване. Следваща инкубация и сортираната сперма се охлажда до 5°C за период от 70 минути. След охлаждане съдържанието на двете туби се поставя и премества в хладилна, въртяща се козя центрофужна конфигурация при 5°C и се центрофугира при 850x за 20 минути. След отстраняването на супернатанта, процеса продължава при 5°C след добавяне на около 150 μ l от Трис-А фракционен пълнител до около 150 μ l от семенна пелета за да се получи семенна концентрация до около 40×10^6 /мл. Спермата на отделни бикове се поставя и се разрежда веднага със същия обем яйчено жълтъчен-Трис пълнител, съдържащ 12% (об/об) глицерол ("Трис-В фракция"). Добавя се Трис-В фракция към семенната суспензия като 2 еднакви обема при 15 минутни интервали до установяване на крайната семенна концентрация до 20×10^6 /мл. Крайната концентрация на глицерола от пълния яйчено жълтъчен-Трис пълнител, съдържащ сперма е 6%(об/об).

г) Уравновесяване и замразяване. Разредената сперма се пакетира в 0.25мл поливинилхлоридни резервоари за да бъде замразена чрез рутинни процедури на поставки в неподвижна азотна атмосфера. Два резервоара от всички от 4-те бика се замразяват след 3, 6 и 18 часа на пълно равновесно време при 5°C.

3) Оценяване на след-утаячна подвижност. Резервоарите се утаяват в 37°C водна баня за 30 секунди. Слепи изчисления на прогресивна подвижност са направени след инкубиращи проби при 37°C на 0, 1 и 2 часа след-утаяване. Всеки от двата наблюдателя измерва семенната подвижност

на спермата от всеки от двата резервоара. Тези четири слепи опити за всяка експериментална част представляват под-примери.

4) Статистически анализ. Статистически, под-примерите се анализират като под-плот към главния плот поне квадрат от ANOVA изследване за да се анализират ефектите от всички анализатори и наблюдавани въздействия на третиране. N се отнася до броя на експерименталните части, не под-примери, стандартните грешки се преброяват на база на стойности от 4-те под-примери от грешка означаваща квадрат от ANOVA и броят на експерименталните части; представени са поне квадратни стойности. Ефектите на третиране се измерват чрез отделни ANOVA за всяко инкубационно време. Модел, включващ бикове като среден ефект и равновесното време и наблюдател като фиксирани ефекти; под-плот, съдържащ наблюдателен период и съответни интервали.

5. Резултати. Равновесните времена на 3- и 6- час са по- добри от 18- час (Таблица 4), базирани на процента на прогресивна подвижна сперма на 0 и 1 час ($P < 0.01$), но не 2 час от след-утаечна инкубация. Ефектите при бикове са очевидни при 1 и 2 час на инкубационното време ($P < 0.05$), но не при 0 час. Няма бик, специфично значим по равновесно време ($P < 0.01$), но има значим наблюдателен ефект при всеки отговор.

ТАБЛИЦА 3

Модифициран TALP буфер

Ингредиенти	Концентрация
NaCl	95.0 mM
KCl	3.0 mM
NaHPO ₄	0.3 mM
NaHCO ₃	10.0 mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.4 mM
Na пируват	2.0 mM
Глюкоза	5.0 mM
Na лактат	25.0 mM
HEPESa	40.0 mM
Говежди серумен албумин b	3.0 mg/ml
Гентамицин сулфат	30.0 µg/ml

a #H3375, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

b #US70195, fraction V; Amsterdam/Life Science, Cleveland, OH, USA

ТАБЛИЦА 4

Ефекти на равновесно време на предварителното замразяване върху пост-утаечна прогресивна подвижност (%)

Равновесие при 5 °C	Пост-утаечна инкубация при 37°C		
	0 час	1 час	2 час
3 час	41 ^a	36 ^{a,b}	16
6 час	41 ^a	37 ^a	18
18 час	35 ^b	31 ^b	12
S.E. °	1.5	0.8	2.0

a, b Стойностите без общо означение се различават с (P, 0.05), Tukey, s HSD

с Общи стандартни грешки

√ грешна стойност на квадрат от ANOVA + √N

6. Заклучения. Резултатите показват липса на разлики при пост-утаечна семенна подвижност между 3 и 6 час от общото равновесно време при 5°C, но има значително намаляване на семенната подвижност през следващите 18 часа на равновесие при 5°C преди замразяване. Степента от 3-тия до 6 час позволява складиране на 2 последователни 3-часово сортиращи бани за замразяване на сперма без намаляване на пост-утаечна подвижност.

Бикът по отношение на взаимодействието при равновесното време няма специфичност, и 3 до 6 часа равновесие са адекватни, само с изключение при 4 от използваните бикове. Оптималното равновесно време за по-малката част от биковете се очаква да бъде повече от 6 часа.

ПРИМЕР 3

Ефекти на оцветена концентрация и лазерна сила върху сортирана семенна течност

Цел: да се оценят ефектите на Hoechst 33342 багрилна концентрация в комбинация с лазерна интензивност на течно- сортирана сперма.

1. Събиране на проба от източник. Сперма от 6 бика се събира и обработва както е описано в Пример 1А.

2. Методи.

а) Експериментално моделиране. Един еякулат (2 бика) и 2 еякулата от различни дни (4 бика) са използвани в 2 по 2 модела плюс контрола.

б) Оцветяване и сортиране. Оцветяване, обработване за сортиране и сортиране на сперма се постига както е описано в Пример 2, с изключение на това, че се добавя Hoechst 33342 багрило към семенната суспензия при финална концентрация от 149 ТМ или 224 ТМ; Спермата се сортира обобщено с лазер, опериращ при 100 mW или 150 mW от силата в случая. Обобщено сортираната сперма се събира в 50 мл пластмасови туби, както е описано в Пример 2. Четири туби, съдържащи приблизително 15×10^6 общо сперма/туба се събират за 1 час от всеки бик. Сортираната сперма се инкубира за 1 час при 22°C за да се получи по- дълго време на сортиране.

в) Подготовка за замразяване. След следваща инкубация, спермата се охлажда както в Пример 2. Спермата след това се концентрира чрез центрофугиране при 5°C при 850x за 20 минути. След отстраняване на супернатанта се добавят 150 µl пълнител от Трис-А фракция към всяка 150 µl семенна пелета при 5°C. Всички семенни пелети се суспендират чрез внимателна повторна аспирация и спермата на отделните бикове се склада. Трис-В фракционен пълнител се добавя на етапи, както е описано в Пример 2. Не-оцветена, не- сортирана контрола за всеки бик се обработва при 20×10^8 сперма/мл в Трис пълнител, съдържащ 6% глицерол и се охлажда при 5°C, докато общо сортираната сперма се приготви.

г) Уравновесяване и охлаждане. Контролната и сортираната сперма се пакетират в 0.25 мл поливинилхлоридни резервоари, както е описано в Пример 2, уравновесено при 5°C за 3 часа и след това се замразяват конвенционално.

3. Оценяване на пост-утаечна подвижност. Резервоарите се утаяват и се измерват както е описано в Пример 2.

4. Статистически анализ. Общо описание на статистически анализ е представено в Пример 2. По- специално ефектите на третиране са измерени чрез ANOVA. Моделната включена багрилна концентрация, лазерният интензитет и бикове в главния плот, и наблюдател и съответни взаимодействия в под.плота. Биковете се считат за случаен ефект, а другите фактори са фиксирани.

5. Резултати. Ефектите на бика са значими за определяне на процента на прогресивно подвижна сперма веднага след утаяване ($P < 0.1$) и след 1 час и 2 часа инкубация при 37°C ($P < 0.1$). Не се наблюдава ефект на багрилна концентрация или ефект на бика чрез багрилна концентрация върху семенната подвижност при всяко инкубационно време. С бикове, считани за случаен ефект, 150 mW лазерна сила се отразява в понижена пост- утаечна

подвижност на сперма, отколкото 100 mW при 1 час инкубация ($P<0.1$), но не при други инкубационни времена (Таблица 5). Ако биковите се считат за фиксирани ефекти 150 mW лазерна сила ще се отрази в понижена семенна подвижност, в сравнение със , 100 mW лазерна сила ($P<0.1$) при всичките 3 инкубационни времена. Няма ефект на бика чрез лазерна сила ($P<0.5$) върху семенната подвижност за 1 час, но не при 0 час или 2-час инкубационно време. Също така по- високата лазерна сила води до понижена семенна подвижност, отколкото контролата ($P<0.5$) при 0 и 1-час инкубационни времена (Таблица 5). Има значителен ефект от наблюдателя при 1-час, но не при 0 час или 2 час инкубационно време. Няма наблюдател при взаимодействие на третирането ($P<0.1$).

ТАБЛИЦА 5

Ефекти на лазерния интензитет и багрилна концентрация върху пост-утаечна подвижност(%)

Значения на главния ефект	Инкубация при 37°C		
	0 час	1 час	2 час
Контрола	49	44	33
Багрилна концентрация			
149 μ M	41	39	30
224 μ M	42	39	30
лазерен интензитет			
100 mW	46	42	33
150 mW	38 ^a	35 ^b	27
S.E. c	2.2	1.2	1.3

a Значителен главен ефект ($P<0.1$) и разлики от контрола ($P<0.5$).

b Разлики от контрола ($P<0.5$).

c Общи стандартни грешки

$\sqrt{\text{грешна стойност на квадрат от ANOVA} + \sqrt{N}}$

6. Заклучения. Процентът на прогресивно подвижната сперма след утаяване се намалява чрез процеси на оцветяване и сортиране. По-високият лазерен интензитет е по-увреждащ, отколкото по-ниският лазерен интензитет. Не се наблюдава ефект на багрилна концентрация върху пост-утаечна семенна подвижност. По-този начин възбуждане на семенно свързано багрило при нисък лазерен интензитет е по-малко увреждащо и такава оцветена сперма при висока багрилна концентрация няма определящ ефект върху пост-утаечната подвижност. Наблюдаваните увреждания са възможни за апарат за семенна подвижност.

ПРИМЕР 4

Оценяване на пред-сортировъчни оцветяващи процедури и селекция на пълнители за криоконсервиране на сперма

Цел: (1) Да се оценят три пре-сортировъчни третириания на сперма; и (2) и да се оценят обвиващия флуид и комбинации от пълнителе за криоконсервиране на течно сортирана сперма.

Следващите експерименти се повтарят в тяхната цялост:

1. Събиране на проба от източник. Сперма от 4 бика се събира и обработва както е описано в Пример 1А.

2. Методи.

а) Експериментално моделиране. А3 (пре-сортировъчни третириания, чрез 3 пълнителя, чрез 2 обвивни флуида, чрез 4 бика, 2 наблюдателя) факториален експеримент се моделира, да определи най-добрата процедура за да се вземе сперма, преди сортиране и да се оценят три пълнителя за криоконсервиране на сортирана сперма.

б) Пробна обработка и оцветяване. Прясно събрана сперма от всеки от 4 бика се обработва по следния начин:

- (1) разреждана до 400×10^6 /мл в модифициран (виж Пример 2, Таблица 3, оцветена за 1 час при 37°C преди общото сортиране ("Разреждане- 0 часа")
- (2) инкубирана (бик) при 22°C за 3 часа преди разреждане, оцветяване и сортиране (вол -3 часа); или
- (3) разреждана и оцветена като ("Разреждане- 0 часа") и след това инкубирана при 22°C за 3 часа преди общото сортиране ("Разреждане- 3 часа")

в) Пълнители. Следващите замразяващи пълнители са сравнени:

ЯЖЦ (виж Пример 1), съдържаща 7% глицерол, яйчен жълтък-Трис (виж Пример 2), съдържащ 6% глицерол и яйчено жълтъчен TES-Трис(TEST), съдържаща 5% глицерол. ЯЖЦ "А фракция" се отнася до ЯЖЦ пълнител, не съдържащ глицерол и ЯЖЦ "В фракция" се отнася до ЯЖЦ пълнител, съдържащ двойната крайна, желана глицеролна концентрация (например 14%). По този начин, когато ЯЖЦ-А и В фракции са комбинирани в еднакъв обем, като крайният ЯЖЦ пълнител съдържа 7% глицерол. Трис А и В фракции са подобно наименовани и описани в Пример 2. TEST пълнителя се приготвя както цялостен пълнител, съдържащ 5% глицерол; следователно няма "А" и "В" фракции на TEST.

г) Обвивен флуид. Обвивният флуид е както 98.6 mM натриев цитрат (#S279-3, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) и Трис, както е описано в Пример 2. Двата типа обвивен флуид са нагласени на pH 6.8; осмоларитета е около 270 до 280 mOsm/kg Трис обвивен флуид се използва за събиране на сперма, която по-късно се прибавя в яйчено жълтъчен -Трис и TEST замразяващ пълнители. Обвивен флуид, съдържащ 98.6 mM натриев цитрат дихидрат се използва за събиране на сперма по-късно прибавяне в ЯЖЦ замразяващ пълнител.

д) Сортиране. Приблизително 58×10^6 сперма за всяка комбинация от пре- сортирана обработка, обвивен флуид и пълнител се сортират общо,

както е описано в Пример 2, чрез използване на 150mW лазерна сила в случая. За всяко сортиране сперма се събира за около 1 час. След сортиране, пробите се инкубират при 22°C за 2 часа за симулиране на 3 часа сортиране.

е) Подготовка за замразяване. Следваща инкубация се извършва както е описано в пример 2 и спермата се охлажда. След охлаждане пробите се центрофугират при 5°C при 850x за 20 минути. Всяка проба съдържа около 28 мл общ обем и се поставя в 50-мл пластмасова туба.

След като се отстранява супернатанта, спермата се връща в 5°C стая за разреждане. Пробите се допълват до 40×10^6 /мл, чрез запазване на 131 семенна суспензия в 69 от А-фракция ЯЖЦ, А-фракция яйчено жълтъчен - Трис или TEST пълнител. Незабавно суспензиите се установяват на 20×10^6 сперма/мл с допълване на съответстващия глицерол, съдържащ пълнител (например В-фракция ЯЖЦ, В-фракция Трис) или TEST. В- фракционни пълнители се добавят към техните съответни проби на етапи (2X) при 15-минутни интервали, както е описано в Пример 2. Добавя се TEST към спермата на етапи по същия начин, както В-фракция ЯЖЦ и Трис-пълнители.

ж) Оценяване и замразяване. Спермата се пакетира в 0.25-мл поливинилхлоридни резервоари, уравновесени за 3 часа при 5°C и след това замразени в статична течна азотна атмосфера.

3. Оценяване на след-утаечна подвижност. Утаяването и след утаено оценяване на сперма се извършва, както е описано в Пример 2.

4. Статистически анализ. Общо описание на статистически анализ е представено в пример 2. По-специално ефектите на третиране се оценяват чрез отделни анализи на варианти за всяко след-утаечно инкубационно време. Главният плот включва предварително сортировъчно третиране, пълнители и бикове; под-плотът се състои от наблюдатели и свързани взаимодействия. Биковете се считат за случаен ефект, а останалите

други фактори са фиксирани. Целият експеримент се повтаря два пъти. Tukey,s HSD тест се използва за отделни значения.

5. Резултати. След -утаечна прогресивна подвижност на общо сортирана сперма се възбужда ($P<0.05$) чрез пълнител и бикове при всяко след-утаено инкубационно време и чрез предварително сортировъчни процедури при 0 часа от инкубацията (Таблица 6). Няма разлики по отношение на обвивни флуиди ($P<0.05$). При 0.часа след-утаечна инкубация, използване на 3-часово третиране на вол води в по-висока подвижност на сперма след замразяване и утаяване, отколкото на другите 2 предварителни сортировъчно оцветяващи третираня ($P<0.05$; Таблица 6). Въпреки това предварителните сортировъчни процедури не са статистически значими след след-утаечна инкубация на сперма за 1 или 2 часа с бикове, считани като случаен ефект. Важно е при тези 2 инкубационни времена, че има значимо преди сортировъчно обработване чрез бикови взаимодействия ($P<0.05$). Освен това, преди сортировъчното обработване дали би имало значим ефект при всички след-утаечни инкубационни времена, ако бикове се считат за фиксирани ефекти.

Незабавно след утаяване (0часа) TEST е най- добър пълнител, но след 1 или 2 часа инкубация при 37°C най- добрият пълнител е Трис. Съществено е, че няма предварително сортировъчно обработване чрез взаимодействие на пълнители за всеки отговор. Има ефекти на наблюдателя ($P<0.01$) при всичките инкубационни времена, но няма наблюдател за взаимодействията на обработването. Има бик за отделно взаимодействие на пълнител ($P<0.05$) при всички 3 инкубационни времена.

ТАБЛИЦА 6

Главни ефекти на пълнители от пре-сортировъчна обработка и замразяване върху след утаечна прогресивна подвижност (%)

Инкубация при 37°C				
Пре-сорт. процедура	пълнител	0 часа	1 час	2 часа
Разреждане-0 часа	Среден	39a	32	22
Бик- 3 часа	Среден	43b	36	25
Разреждане-3 часа	Среден	38a	31	19
Средно	ЯЖЦ	36 ^a	29 ^a	17 ^a
Средно	Трис	40 ^b	39 ^b	29 ^b
средно	TEST	44 ^c	33 ^c	20 ^a
S.E. ^d		0.8	0.8	0.7

a,b,c Значенията в гланите ефекти, без общо означение се различават с (P,0.05),

d Общи стандартни грешки

$\sqrt{\text{грешна стойност на квадрат от ANOVA} + \sqrt{N}}$

6. Заклучения. Това изследване показва, че държаната 3 часа преди разреждане, оцветяване и сортиране, сперма от бик е по- добра от веднага разредена и оцветена на 0 час или 3 часа по- късно. Ето защо, 3 часа преди сортиране, е по- добре да се продължи с нова част от оригиналния еякулат, който е държан 3 часа и след това оцветен, отколкото продължаване с оригинална проба на сперма, оцветена и държана при 400×10^6 сперма/мл.

Дори посредством TEST пълнител се предлага по- висока след-утаечна подвижност при 0 часа, Трис е по- добър пълнител, когато спермата е изложена на стрес при инкубация при 37°C. Един и същ обвивен флуид работи добре за всеки пълнител. Базирано на тази резултати, ние обединихме

използването на Трис обвивен флуид в комбинация с Трис -замразителен пълнител в нашата стандартна процедура.

ПРИМЕР 5

Ефекти на пълнителни добавки върху сортирана сперма

Цел: да оцени ефекта на добавяне на натриев додецил сулфат (НДС) към замразяващ пълнител върху течно-сортирана сперма.

А. *Оценяване на ефект на концентрацията на НДС в замразяващ пълнител.*

1. Събиране на проба от източник. Сперма от 6 бика се събира и обработва както е описано в Пример 1А.

2. Методи. Сперма от всеки един от 6 бика се разрежда до 20×10^6 мл в 20% цял яйчен Трис ("ЦЯТ") пълнител, съдържащ 0, 0.03, 0.06, 0.09 или 0.12 процента НДС, пакетирани в резервоари и замразени. ЦЯТ пълнител се получава чрез използване на 3.028г от Трис[хидроксиметил]аминометан, 1.78г лимонена киселина монохидрат и 1.25 г фруктоза за 100 мл от двойно дестилирана вода, към която се прибавя 20% цяло яйце (об./об). ЦЯТ пълнителят се получава при рН от около 7.0 и съдържа крайна концентрация от около 6%(об./об.). ЦЯТ пълнителят също съдържа 1000 IU пеницилин "G" натрий и 100 Tg стрептомицин сулфат/мл.

3. Резултати. Респективно стойностите ($n=1$ проба от всеки от 6 бика) са 51, 50, 51 и 48% прогресивно подвижна сперма приблизително 10 минути след утаяване. Базирано на тези резултати се използва 0.06 процента НДС в Пример 5В.

Б. *Оценяване на ефектите на 0.06 процента НДС в различни замразителни пълнители върху след- утаечната подвижност на течно сортирана сперма*

1. Събиране на проба от източник. Сперма от 8 бика се събира и преработва както е описано в Пример 1А.

2. Методи. След утаечна подвижност се изследва за замразена сперма в яйчено жълтъчен -Трис (виж Пример 2) и ЦЯТ пълнители (виж Пример 5А) с

и без 0.06% НДС. Крайното съдържание на глицерол за двата пълнителя е 6%.

а) Оцветяване. Подготовка за сортиране. Сортиране. Оцветени семенни проби се приготвят от еякулат от всеки от 8 бика, както е описано в Пример 2. Оцветена сперма е общо сортирана чрез Трис обвивен флуид, както е описано в Пример 2, с изключение на това, че сортът се постига чрез използване на 135 mW на лазерна сила. Сортираната сперма се събира в 50-мл пластмасова туба, съдържаща 2 мл А-фракционен замразяващ буфер за всеки пълнител, 15×10^6 общо сортирана сперма (25 мл) за всяко третиране се събира и инкубира за 1 час при 22°C за симулиране по-дълго сортиране.

б) Подготовка за замразяване Разредената сперма след това се охлажда до 5°C за 90 минути. Еднакъв обем от подходящ В-фракционен пълнител се добавя на етапи (2х) при 15 минутни интервали към всяка 50-мл пластмасова туба, съдържаща сортирана сперма. Кратни на 25 мл/пълнител се концентрират чрез центрофугиране за 20 минути при 850 xg в хладилна центрофуга. Супернатантът се отстранява като 600 ПІ семенна пелета, която се суспендира чрез внимателно разклащане за 15 минути. Не се добавя допълнителен пълнител към семенната пелета, като суспензията, съдържаща пелетата, вече съдържа глицерол. Концентрацията на семенната суспензия е приблизително 20×10^6 /мл. Не- оцветена, не- сортирана контрола за всеки бик се приготвя при 20×10^6 сперма/мл м яйчено жълтъчен-Трис пълнител, съдържащ 6% глицерол. Контролата се поставя при 5°C стая, докато се провежда общото сортиране.

б) Уравновесяване и замразяване. Всичката контролна и общо сортирана сперма се пакетира и замразява по същото време. Спермата се пакетира в 0.25 мл поливинилхлоридни резервоари, уравновесени за около 3 часа до около 6 часа при 5°C и след това замразени в неподвижна течна азотна атмосфера.

3. Оценяване на след-утаечна подвижност. Утаяване и след-утаечни оценки на сперма се извършват както е описано в Пример 2 с изключение, че прогресивната подвижност се оценява 0.5 и 2.0 часа след инкубация.
4. Статистически анализ. Общо описание на статистическия анализ се представено в Пример 2. По- специфично ефектите на третиране се оценяват чрез отделен анализ на варианти за всяко едно инкубационно време; включените в модела бик и пълнител в главния плот и наблюдател и съответни взаимодействия в под-плот. Разликите в значенията се определят чрез тест за значима разлика.
5. Резултати. Възбудена от пълнител ($P<0.05$) прогресивна подвижност на сперма след 0.5 или 2 часа след-утаечна инкубация (Таблица 7). При 0.5 часа, ЦЯТ плюс НДС води до понижена подвижност, в сравнение с Трис с НДС. При 2 часа, всички третираня с общо сортирана сперма са по- лоши, отколкото не- сортирана контролна сперма. Наблюдават се значим бик и наблюдателни ефекти ($P<0.01$) при две инкубационни времена, но няма наблюдател за взаимодействията на третиране.

ТАБЛИЦА 7

Ефект на пълнител върху след-утаечна прогресивна подвижност(%)

Инкубация при 37°C		
Пълнител	0.5 часа	2 часа
Трис(не-сортиран)	42 ^a	41 ^a
Трис w/o НДС	40 ^{a,b}	35 ^b
Трис w/ НДС	42 ^a	37 ^b
ЦЯТ w/o НДС	40 ^{a,b}	35 ^b
ЦЯТ w/ НДС	38 ^b	35 ^b
S.E. ^c	1.0	1.2

a,b Значеният, без общо означение се различават с ($P,0.05$),

$\sqrt{\text{грешна стойност на квадрат от ANOVA} + \sqrt{N}}$

6. Заключение. Включването на НДС в Трис или ЦЯТ пълнители не подобрява семенното качество, което се определя чрез визуална оценка на подвижността след утаяване. Освен това, резултатите чрез ЦЯТ и Трис пълнители са подобни, следователно ЦЯТ са подходящи за ефикасност, докато Трис за криоконсервиране на сортирана говежда сперма.

ПРИМЕР 6

Качество на сперма, определена полово чрез течно сортиране за полеви опити

Цел: да се оцени след-утаечно качество на сортирана сперма, на база на акрозомален интегритет.

1. Събиране на проба от източник. Сперма от 3 бика се събира и обработва както е описано в Пример 1А.
2. Методи. Сортирана и не- сортирана контролна сперма от същия еякулат се оцветява, обработва и сортира както е описано в Пример 2, с изключение на това, че спермата се сортира за полов тип при 90% ниво на чистота. Сортираната сперма се събира до обем от приблизително 20 мл и се охлажда до 5С за 90 минути (0.2С/мин.). След охлаждането еднакъв обем яйчено жълтъчен-Трис В пълнител (виж Пример 2) се добавя към сортираната сперма в 2 еднакви обема на 15-минутни интервали. Центрофугиране и аспириране на супернатанта се достига, както е описано в Пример 5. След центрофугирането и аспирирането се добавя яйчено жълтъчен-Трис пълнител, съдържащ 6% глицерол (об/об) към семенната пелета за да се постигне концентрация на спермата до около 20x 10⁶/мл.

Замразяване и утаяване се извършва, както е описано в Пример 2, с изключение на това, че равновесното време е около 3 часа.

3. Оценяване на след-утаечна подвижност. Визуалните оценки на процента прогресивно подвижна сперма при 37°C са направени приблизително 10 минути след утаяване. Акрозомалният интензитет на спермата се определя чрез диференциална интерферентно-контрастна микроскопия. (x1000) след 2 часа на инкубация при 37°C. Спермата се третира с 4 mM натриев флуорид, постига се определена влажност и се изследва 100 семена за едно третиране. Акрозомите се класифицират като: (а) интактна акрозома, (б) раздута или наранена акрозома или (в) липса на акрозома (не-интактна).
4. Статистически анализ. Анализираните данни са от 19 различни замразени дати, балансирани от 3 използвани бика в полеви опити. Ефектите на третиране (сорт, контрол) са оценени чрез анализ на варианта с бикове като фиксиран ефект.
5. Резултати. Процентът прогресивно подвижна сперма, след-утаиване е значително по- висок ($P < 0.05$) за не- сортирана сперма (50%), отколкото за сортирана сперма (40%; Таблица 8), независимо отстраняването на умряла сперма по време на сортиране. Въпреки това, процентът на сперма с интактна акрозома не е различен. Сортирането повишава процента сперма без акрозома, но също намалява процента сперма с увредена акрозома, съответно към контролната сперма ($P < 0.05$). Има бик случайно сортиращ ефект за след-утаечна подвижност ($P < 0.01$), но не за други отговори. От бик А и В, разликите в след-утаечната подвижност между сортирана и несортирана сперма са около нула.; за бик С, сортираната сперма е 10

процентни пункта (19%) по-ниска подвижност, отколкото контролната сперма.

ТАБЛИЦА 8

Ефект на сортиране върху след-утаечна подвижност (%) и акрозомален статус(%)

		Акррозомален статус		
	Интактна	Наранена	Не-интактна	След-утаечна подвижност
Контрола	64 ^a	20 ^a	15 ^a	50 ^a
сортирана	65 ^a	14 ^b	21 ^b	46 ^b

a, b значенията в колоните с различни означения се различават ($P < 0.01$).

6. Извод. Визуалните оценки на прогресивна подвижност на сортирана замразена сперма осреднено са леко по-ниски (4 процентни пункта; 8%), отколкото на контролната сперма, въпреки че тази разлика е много по-голяма за един бик. Тези оценки са направени приблизително 10 минути след утаяване. Малката средна разлика е постоянна с тази за не-интактни акрозоми след 2 часа инкубация. Сперма с увредени или липсващи акрозоми е подобна на неподвижна. Повишеният процент сперма с не-интактна акрозома, за сортирани проби показва увреждания, свързани със сортиране или с криоконсервиране преди или след актуалното сортиране. Вероятно сортирането превръща увредените акрозоми на липсващи акрозоми. На база на стандартни процедури за оценяване на качеството на спермата не съществува база за предвиждане, че оплодителният потенциал на тази течност

сортирана сперма би била строго компрометирана за болшинството бикове.

ПРИМЕР 7

Полова селекция и криоконсервиране на бича сперма чрез използване на 20% яйчено жълтъчен-Трис пълнител

Цел: да представи програма за криоконсервиране на течно- сортирана бича сперма.

1. Събиране и оценка на еякулат. Събират се и се обработват еякулати, както е описано в Пример 1А. Селекционираният еякулат от тези бикове са с $> 75\%$ морфологично нормална сперма. Визуално оценяване на процента прогресивно подвижна сперма (еякулати, които имат прогресивна подвижност с $> 60\%$ са по- добри за сортиране). Добавят се антибиотици към соромите семена, както следва: тилозин при крайна концентрация 100 $\mu\text{g}/\text{мл}$, гентамицин при крайна концентрация 500 $\mu\text{g}/\text{мл}$ и линко-спектин при крайна концентрация 300/600 $\mu\text{g}/\text{мл}$.
2. Оцветяване и подготовка за сортиране. Следващото добавяне на антибиотици към сурова семенна проба е позволено 15-20 минути преди оцветяване. Оцветената проба е както е описано в Пример 2.
3. Сортиране. Сортиране за двата X и Y- типа сперма се извършва при поставяне на отвори за 90% чистота. Сортира се сперма в 50-мл Фалкон туби, съдържащи 2 мл 20% яйчено жълтъчен-Трис А фракционен пълнител (виж Пример 2), докато всяка туба съдържа максимум от 20 мл общ обем (или максимум от 2 часа за сорт) и крайната семенна концентрация след сортиране е $6 \times 10^5/\text{мл}$. Отбележи, че допълнителният 20% яйчено жълтъчен-Трис-А фракционен захващащ буфер трябва да бъде добавен след сортиране и преди да се охлади, така че крайният процент на яйчен жълтък е поне 3%.

4. Подготовка за замразяване. Следващото сортиране, охлаждане на сортираните проби до 5°C е за период от 90 минути. След охлаждане, се добавя 20% яйчено жълтъчен-Трис -В фракционен пълнител (виж Пример 2) на етапи (2х) при 15 минутни интервали. Крайният обем на Трис-В фракционен пълнител, добавено към семенната проба трябва да бъде еднакво с обема на Трис А фракционен пълнител . Общият обем на семенната проба след Трис-В фракционен пълнител е добавен , но да не надминава 27 мл общ обем.

След като Трис В фракционен пълнител е добавен към семенна проба се концентрира пробата чрез центрофугиране за 20 минути при 850x g. Аспирира се супернатанта, отделящ приблизително 150 μ I семенна пелета. Ресуспендира се спермата и се отделя за всеки отделен бик.

5. Замразяване. Добавя се цял яйчено жълтъчен-Трис пълнител (6% глицерол до достигане на крайна семенна концентрация от 20 x 10⁶/мл. Пакетира се разредената сперма в 0.25-мл поливинилхлоридни резервоари за замразяване, както е описано в Пример 2.

ПРИМЕР 8

Оценяване на фертилитета на течно сортирана замразена бича сперма при полеви изследвания

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Семенна колекция и обработване

Събират се семена от млади бикове с неизвестна фертилност чрез изкуствена вагина (виж Пример 1А). След определяне на семенната концентрация със спектрофотометър и предметно оценяване на прогресивната семенна подвижност, семената се поставят и сортират, както е описано в Пример 2, с изключение на

това, че спермата се сортира по полов тип при 90% чистота чрез използване на лазерна сила на случая от около 135 до около 159mW. Обработването и замразяването се провеждат както в Пример 2, с изключение на това, че равновесното време е около 3 часа. Използва се Cornell Universal пълнител (Seidel GE Jr., Theriogenology 1997; 48:1255-1264) за течно семе при полеви опити 1, 2 и 3. За замразено семе при полеви опити 2 и 3, пълнителят, който се използва е 2.9% натриев цитрат + 20% яйчен жълтък с крайна глицеролна концентрация от 7% (виж Пример 1). За полеви опити 4 до 11, спермата се замразява в Трис-базиран пълнител, който съдържа 200mM Трис, 65 mM лимонена киселина, 56 mM фруктоза, 20% яйчен жълтък и крайна концентрация на глицерол от 6% (виж Пример 2). Обвивният флуид, използван в течния цитометър е 2.9% натриев цитрат (виж Пример 4) за опити 1, 2 и 3, и Трис буфер за останалите опити (виж Пример 2).

Спермата се пакетира в 0.25-мл Френски резервоари в колона, толкова малки колкото 50 в центъра на резервоара. За да се намалят разреждащите ефекти се използват ниски обеми, като такива при 10 7 сперма/мл. В по- голямата част от изследванията, колона от пълнител без сперма се аспирира в резервоар, първо да овлажни памучната запушалка, последвано от малка колона от въздух и след това полови сортирана сперма. Когато спермата се охлади, едно резервоарче от всяка проба се утаява в 35°C вода за 30 секунди за качествен контрол и пробите с по- малко от 25% след- утаечна прогресивна подвижност се премахват. Проба от полови селектирана сперма от всеки опит се изследва чрез ултразвук и анализира чрез течна цитометрия за определяне точността на половото сортиране.

Управление на отелването и изкуствено осеменяване

Използваните отелвания се провеждат при 6 много разгонени продукционни единици с различни практики на управление. Сезонни и поредови разлики водят по-нататък до хетерогенност на експериментите (Таблица 9). Колкото е възможно, обработките и контролите се сменят систематично в бикове за осеменяване, като отелващите влизат в осеменителите условия.

Еструса се синхронизира по един от 4 начина (Таблица 9): (1) 500мг меленгестерол ацетат (MGA) се захранва един път дневно в доза 2.3 кг на дажба за 14 дни, след което i.m.инжекция от 25 мг простагландин F2 α (Lutalyse, Upjohn, Kalamazoo, MI, USA) 17, 18 или 19 дена след последния ден на захранването MGA (MGA/PG); (2) единични инжекции от 25 мг простагландин F2 α (PG); (3) 20 или 25 мг простагландин F2 α , инжектиран i.m. на 12- дневни интервали (PG/PG) или (4) 50 или 100Tг от GnRH, инжектиран i.m, последвано от 25 мг простагландин F2 α , седем дни по- късно (GnRH/PG).

Отелваните се инспектират визуално за състоянието на еструса сутрин и вечер, въпреки че осеменяване се извършва само вечер след 16.00, приблизително 1/2 ил 1 ден след установяване на еструс. Осеменяването се извършва конвенционално в матката или по половина във всеки маточен рог чрез използване на нетравматични ембрионални преносни обвивки (IMV, Minneapolis, MN,USA). По-късен случай, семето се складира между голямата извивка на маточния рог, тъй като предния би могъл да бъде нарушен от травма, идентично като не-хирургичен ембрионален трансфер. В повечето случаи семето се складира между предна третина и средна обвивка.

Болшинството експерименти включват замразена семенна контрола, приложена в тялото на матката с 20 или 40 x 10⁶ сперма/доза от същите бикове за полов тип ("полово сортирани"). Тази

контрола се предлага като смесена оценка на свойствения нормален фертилитет на отелваните при специфични полево-опитни условия както и фертиритетът на използваните бикове и опитността на осеменителите. Някои изследвания също включват ниска доза, неполово сортирана контролна група. Понякога част от контролните осеменявания се планират да бъдат $1/2$ или $2/3$ използвани за всяко третиране до получаване на повече информация върху сортираната полово сперма. Замразена полово сортирана и контролна сперма се утаяват за 20 до 30 секунди до 37°C водна баня. Различни други детайли са събрани в Таблица 9.

Бременност се диагностицира чрез ултразвук 28 до 34 дни след осеменяването и/или 56 до 92 дни след осеменяването, при което време се определя пола на плода в повечето опити, както е описано в Cattan, S., Theriogenology 1991; 36:809-814, без операторски известни осеменителни третираня или контроли. Пола на родените животни е приблизително еднакъв на диагнозите за пол на плода. Данните се анализират чрез единично степенно освобождаване на квадрат изследване на χ^2 , съответстващо на непрекъснатостта; 2-кратни изследвания се използват, въпреки, че 1-кратното е специфично. Повече от 5% от осеменяванията са брак, водещи до грешки на осеменителните третираня, пряка инжекция на репродуктивния тракт, нарушение по протежение на цервикалния канал и т.н. Решения за бракувани животни от експерименти се правят кратко след осеменяването и никога не се базират на диагноза за бременност.

ТАБЛИЦА 9

Процедурни детайли при полеви опити

Изследвания	Осеменителни данни	Порода отелвани	Използвани бикове	осемнятели	Еструсна синхронизация	Коментари
1	5/20-23, 1977	Angus	N1,N2, AN4	A, B	MGA/PG	Включени ниска-доза контроли
2	2/18-5/22 1998	Angus кръстоска	N3,N4, N5,N6	C, D	PG/PG	Ниска доза, но без нормални контроли; някои случаи абортират при синхронизиране
3	6/2-6/5, 1998	Angus	AN4, A N5, N7, N8	B, D	MGA/PG	
4	2/10-13, 1999	Holstein	J2, J4	C, D	PG	Много мръсотия, сняг, вятър и студ, непрекъснат дъжд
5	2/24-26, 1999	Holstein	J2, J4, J5	C, B, D	PG/PG	
6	4/14-16 1999	Holstein	J2, J3, J4, J5	C, D	PG	Някои отелвани са репродуктивен брак
7	4/27-5/1, 1999	Hereford & Angus Кръстоска	AN1, A N4	C	MGA/PG	Семена за 1 бик се превозват 6 часа преди сортиране, лошо време
8	4/21-23 1999	Angus Кръстоска	H1, H2	E	MGA/PG	Добре хранени отелвани
9	5/5-8, 1999	Червено Angus	AR1, A R2	C, F	MGA/PG	
10	5/31-6/2, 1999	Angus	AN4, A N7, AN8	B, D	GnRH/PG	
11	7/28-30, 1999	Holstein	H2, H3	C, D	PG/PG	Първа репликация е възможна в много обширно изследване

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Данните представени от 11 последователни хетерогенни полеви изследвания, извлечени чрез логически аспекти на изследванията, такива като използващи бикове за генетични нужди на стадата, нежизненоспособност на оплодителна информация на бикове, ограничен брой стада, неспособност на същите осеменители по време на опитите, сурово време в някои опити, ограничени количества от полово сортирани семена в пълните изследвания, 2 набора отелвани, които се връщат обратно за да забременеят до около 55 дни по време на еструс синхронизация ит.н. До 4 бика и 3 осеменители са включени във всеки опит; това прави възможно да се проверят популациите за да е сигурно, че резултатите са приложени към повече от един бик или техник; въпреки това данните са получени за да се оценят разликите при фертилността от бик до бик точно.

Повечето комплекти на отелвани са от породисти стада, разположени от 140 до 250 км от нашата лаборатория. Няма значими разлики в нива на бременност в зависимост от осеменителите във всеки опит, но броя на породите за един осеменител е нисък и разлики лесно могат да бъдат открити в голям брой осеменявания.

Еструсно синхронизационните методи не са сравнени в опитите, тъй като не е възможно да се сравнят нивата на забременяване в тези методи. Нивата на забременяване се предполага, че са задоволителни при всички четири използвани синхронизационни процедури.

Тъй като осеменяванията могат да бъдат провеждани един път дневно, отелваните в еструс вечер се осемяват приблизително 24 часа след като бъде установен еструса. Нивото на забременяване за тези отелвани с полово сортирана сперма, следено през всички опити е 203/414 (49%), което не е достатъчно различно ($P < 0.1$) от това на отелвани в еструс сутрин и по този начин осеменяването е половин

ден след еструсното откриване 266/586 (45%). Тази тенденция за висока фертилност при по-късно осеменяване е във връзка с установеното от други изследвания, което е за предпочитане да се извършва по-късно, отколкото нормално, но с предложените с по-ниска фертилност бикове, когато се използват малко на брой семена или условията не са оптимални.

Нивата на забременяване чрез третиране и, когато е възможно, плод или теле полово селектирано, са в Таблица 10 до 20. Целта е да се постигне женско оплождане, с изключение в опит 8; точността е съответно 95%, 83%, 90%, 83%, 82% и 94% в опити 1, 3, 8, 9, 10 и 11. В останалите опити, плода и родените полово селектирани не са отразени, поради това, че: диагнозата за бременност не е поставена на време; неопитността на специалистите в половото сортиране на плода и/или защото животните още не са родени. Това не е основната концепция, защото главната цел на това изследване е да се определи фертиритета на течно-сортирана сперма, осеменена при ниска доза.

Точността на половото разпределение може да бъде нагласена по всяко желано виртуално ниво между 50 и 95+% чрез нагласяване на сортиращите параметри. Въпреки това, по-високата точност води до по-малък брой сперма, сортирана за единица време, в частност за Y-хромозомна сперма, 90% точност е значима за рутинна работа.

Големите открития от всеки полеви опит се обединяват в изводи. Отбелязва се, че общите семенни бройки са взети в таблици; броят на прогресивно подвижна сперма обикновено е от 30 до 50% от тези степени. Полеви опит 1 (Таблица 10) потвърждава, че нивата на забременяване при рогово маточно осеменяване чрез малък брой не-селектирана сперма са подобни на контролните с нормален брой сперма. 64 до 67-дневна бременност с незамразена полова сперма (42%) е 12 процентни пункта под не-половата течна контрола със

сперма, разрежена, оцветена и центрофугирана подобно на сортираната сперма. Точността на полово определяне е 95%; пола на родените животни от полово сперма отбелязва диагноза на пола на плода точно; има една грешка в полово селектиран плод на контролите. Няма аборти между 2 месеци на бременността и термина и всички 19 животни от полово спермено третиране са нормални и оживяват. За половото семенно третиране, дву-месечните нива на бременност на бикове N1, N2 и N3 са съответно 41, 44 и 40%; 39% (13/33) на отелвани в сутрешен еструс и 50% (6/12) в вечерен еструс са забременели.

Таблица 10

Резултати от полеви опит 1- Angus отелвани в Йоминг, 1997

Третирани/място	Брой семена	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 31 до 33	Бр.бременни Ден 31 до 33	Брой + животни
Полови, 5° С/рога	3x10 ⁵	45	20(44%)	19(42%)	18 (95%) ^a
Контрола, 5° С/рога	3x10 ⁵	28	15(54%)	15(54%)	5(53%) ^b
Замразена, Контрола/тяло	40x10 ⁶	29	16(55%)	15(52%)	11(73%) ^{ab}

a,b съотношенията на пола без общо означение се различават (P<0.02).

Полеви опит 2 (Таблица 11) предлага първото доказателство, че резултатите с полово селектирана замразена сперма са подобни на половата, незамразена сперма, ако нагласяването е извършено за броя семена, убити по време на криоконсервирането. Също не съществува разлика в нивата на забременяване между половата сперма, съхранена при -18°C. Нивата на забременяване при 2-месеца след осеменяването за полови семена от отделни бикове са от 22 до 42%

бременност ($P < 0.05$). Ембрионни загуби между 1 и 2 месеца бременност са много подобни за полови и контролни бременности. Данни за родените са възможни от 39 отелвани от този опит; всеки от тези отелвани (30 полови селектирани бременности, 9 контроли) са бременни 2 месеца след нормално продължаваща бременност.

Таблица 11

Резултати от полеви опит 2. Кръстосани говеда -отелвани в Колорадо, 1998

Третирано/място	Брой семена	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 30 до 35	Бр.бременни Ден 59 до 92a
Контрола, 5°C/рога	5×10^5	58	27(47%)	24(41%)
полови, 5°C/рога	5×10^5	51	17(33%)	16(31%)
полови, 18°C/рога	5×10^5	46	16(35%)	12(26%)
полови, замразени/рога	10^6	87	29(33%)	28(32%)

а няма значителни разлики, χ^2

Полеви опит 3 (Таблица 12) потвърждава това, че полово замразена сперма води до предвидими нива на забременяване. Точността на половото поределяне на сперма отново се потвърждава; въпреки това има 4 грешки в определянето на плода, отнасящи се до родени животни, представени са точните полове на родените животни. Отново, няма аборти между 2 месечна бременност и термина. Нивата на забременяване варират при полови, незамразени и полови, замразени семена за бикове N8, N9, AN5 и AN4 са 24, 31, 50 и 60% съответно ($P < 0.1$).

ТАБЛИЦА 12

Резултати от полеви опит 3- Angus отелвани в Йоминг, 1998

Третирани/място	Брой семена	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 62 до 65	Брой О животни
полови, 18°C/рога	5x10 ⁵	37	1(30%)	24(41%)
полови, замразени/рога	5x10 ⁶	35	18(51%)	16(31%)
замразени, контрола/тяло	40x10 ⁶	37	16(35%)	12(26%)
			27(73%)	28(32%)

a,b значения без обща разлика (P<0.05)

c,d процентът родени от полови третираня (83%), различни от контролната група,

P<0.05, 1-опашка, χ^2

Полеви опити 4, 5 и 6 (Таблицы 13, 14, 15) са направени на същото място с 3 различни групи отелвани. Неочаквано, но не е възможно да се повтори правдоподобно всеки опит, дължащо се на спецификата на полевите опити, такива като личностният списък, способността на половите семена на всеки бик и други. Големите различия в нивата на забременяване между 5 и 6 опит илюстрират, че условията са различни при тях. Някои от отелваните в опит 6 са способни, защото те успяват да забременеят след месец от естественото покриване. При условията на тези опити нивата на забременяване са много подобни между 1.5 и 3.0 x10⁶ полова замразена сперма/доза. Освен това не се наблюдава предимство за маточно-рогово осеменяване. Няма значими разлики (P<0.05) в нивата на забременяване между бикове, с изключение на опит 5, при който нивото на забременяване на J2, 20/28 (71%) е по-високо от това на J4, 15/39 (38%)(P<0.05). Тази разлика не е постоянна от опит до опит, като J4 има бройно по-високи нива на забременяване, но не значителни(P<0.1), отколкото J2 в опит 4 и 6.

ТАБЛИЦА 13

Резултати от полеви опит 4-- Holstein отелвани в Колорадо, 1999

Третирани/място	Брой семена	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 30 до 33	Брой бременни Ден 64 до 67*
полови, замразени/тяло	1.5×10^6	55	136(65%) ^{a,b}	36(65%) ^{a,b}
полови, замразени/тяло	3×10^6	52	27(52%) ^a	26(50%) ^a
контрола, замразени /тяло	20×10^6	55	45(82%) ^b	43(78%) ^b
			27(73%)	28(32%)

a,b значения без обща разлика ($P < 0.05$)

* шест отелвани, бременни на 30 до 33 ден са продадени преди втората диагноза за бременност; те се счита, че са останали бременни.

ТАБЛИЦА 14

Резултати от полеви опит 5-- Holstein отелвани в Колорадо, 1999

Третирани/място	Брой семена	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 33 до 35а	Брой бременни Ден 64 до 67*
полови, замразени/тяло	1.5×10^6	23	123(52%)	12(52%)
полови, замразени/тяло	3.0×10^6	25	15(60%)	14(56%)
полови, замразени/рога	1.5×10^6	25	15(60%)	12(48%)
полови, замразени/рога	3.0×10^6	25	17(68%)	15(60%)
контрола, замразени /тяло	20×10^6	30	20(67%)	19(63%)

а няма значими различия

ТАБЛИЦА 15

Резултати от полеви опит 6-- Holstein отелвани в Колорадо, 1999

Третирани/място	Брой семена	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 31 до 34	Брой бременни Ден 60 до 63
полови, замразени/тяло	1.5×10^6	27	11(41%) ^a	9(33%) ^a
полови, замразени/тяло	3.0×10^6	25	10(40%) ^a	9(36%) ^a
полови, замразени/рога	1.5×10^6	24	8(33%) ^a	7(29%) ^a
полови, замразени/рога	3.0×10^6	24	10(42%) ^a	8(33%) ^a
контрола, замразени /тяло	20×10^6	24	18(75%) ^b	17(71%) ^b

a,b значения без обща разлика ($P < 0.05$)

За опит 7 (таблица 16), само един осеменител е бил на разположение. Това е единствения опит, който показва убедителното предимство на маточно-рогово пред маточно-тяло осеменяване. За такова осеменяване при условията на опита, повече от 55% отелвани (22 процентни пункта) забременяват с полово замразено семенно осеменяване в маточни рога, в сравнение с маточно тяло. Истинската разлика би могла да бъде по-малка, защото няма широки сигурни интервали при тези значения. При всички други опити (5, 6, 9 и 11), в които тяло и рог-осеменяване са сравнени, нивата на забременяване са много подобни за двата метода за тези специалисти, както и за други специалисти.

Семе от един от бикове от Опит 7 е пренесено без разреждане от Монтана по въздуха в изолиран контейнер при -20°C преди сортиране; времето на пренасяне е 6 часа. Нивата на забременяване за половата сперма от двата бика са видимо еднакви, 49% за не-пренесеното и 52% за пренесеното семе. Семето не е разрежено с пълнител и не е охладено за пренасяне, защото свойствата при оцветяване с Hoechst 33342 са различни при разреждане и с пълнители. Освен това при други изследвания (виж Пример 4) е установено, че сортираното семе при стайна температура между събирането и течното сортиране е по-добро при разреждането му.

ТАБЛИЦА 16

Резултати от полеви опит 7-- Кръстоска говеда отелвани в Колорадо, 1999

Третиране/място	Брой семе	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 33 до 37
полови, замразени/тяло	1.5×10^6	86	34(40%) ^a
полови, замразени/рога	1.5×10^6	86	53(62%) ^b
контрола, замразени /тяло	20×10^6	35	18(51%) ^{a,b}

a,b значения без обща разлика ($P < 0.01$)

Полеви опит 8 (Таблица 17) се отнася плодови отелвани, не-имплантирани с растежни промотанти; по време на диагностицирането на бременността те абортират, така, че дата на раждане е невъзможна. Този експеримент илюстрира, че ефикасното полово сортиране също може да бъде направено в посока на мъжки животни. Нивата на забременяване при 2 бика е 50 и 61%.

ТАБЛИЦА 17

Резултати от полеви опит 8-- Angus отелвани в Небраска, 1999

Третиране/място		Брой семена	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 74 до 76	Брой О Плода
полови, замразени	72mW	1×10^6	18	7(39%)	6(86%)
лазер/тяло					
полови, замразени	72mW	1×10^6	18	13(78%)	12(92%)
лазер/тяло					

а няма значими разлики

Полеви опит 9(Таблица 18) е единственият опит, който показва убедително предимството на 3.0 срещу 1.5×10^6 полово замразено семе/ осеменителна доза. Предимството е валидно за двете осеменявания. Нивата на забременяване за полова сперма от 2 бика са 62 и 75%.

ТАБЛИЦА 18

Резултати от полеви опит 9-- Червен Angus отелвани в Небраска, 1999

Третирани/място	Брой семе	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 60 до 63а	Брой О плода
полови, замразени/тяло	1.5x10 ⁶	15	8(53%)	7(88%)
полови, замразени/рога	3.0x10	14	12(86%)	9(75%)
полови, замразени/рога	1.5x10	16	9(56%)	7(78%)
полови, замразени/рога	3.0x10	16	12(75%)	11(92%)
контрола, замразени /тяло	20x10	30	21(70%)	13(62%)

а 3.0x10⁶ полова сперма има по- високо ниво на забременяване (80%), отколкото 1.5x10⁵ полова сперма (55%), $p < 0.05$, 1- предаване χ^2 .

Нива на забременяване в полеви опит 10 (Таблица 19) с полово замразено семе, са подобни на контролите; точността на полово определена сперма в този опит е само 82%, което обаче не е достатъчно различно от целената точност 90%. Нивата на забременяване за полово определено семе са 54, 66 и 50% за бикове AN4, AN7 и AN8, респективно ($P < 0.1$). Осемнайсет от отелваните, осеменени в този опит са животни, получени от полово семе в опит 1.

ТАБЛИЦА 19

Резултати от полеви опит 10-- Angus отелвани в Уоминг, 1999

Третирани/място	Брой семе	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 60 до 63а	Брой О плода
полови, замразени/тяло	1x10 ⁶	44	26(59%)	23(85%)
полови, замразени/тяло	3x10 ⁶	43	23(53%)	17(74%)
контрола, замразени /тяло	20x10 ⁶	35	20(57%)	12(57%)

а Няма значими разлики.

ТАБЛИЦА 20**Резултати от полеви опит 11-- Holstein отелвани в Колорадо, 1999**

Третираны/място	Брой семе	Брой отелвани	Бр.бременни Ден 28 до 30а	Бр. бременни ден 56 до 58а,b
полови, замразени/тяло	1x10 ⁶	12	8(67%)	7(88%)
полови, замразени/тяло	3x10 ⁶	12	6(50%)	9(75%)
полови, замразени/рога	1x10 ⁶	7	4(57%)	7(78%)
полови, замразени/рога	3x10 ⁶	7	4(57%)	11(92%)
контрола, замразени /тяло	20x10 ⁶	9	4(44%)	13(62%)

А Няма значими разлики, χ^2

В 16 от 17(94%) плода от полово семенни третирания са женски; 2 са прекалено дълбоко в животинската кухня за да се определят с ултразвук.

Данните от опитите са комбинирани с идентични третирания, с изключение на 1x10 и 1.5x10 семенни дози (Таблица 21).

Таблица 21

Мета сбор от комбинирани опити с полеви замразени семена и замразени контроли.

Комбинирани опити	Брой семена/място	Брой отелвани	Брой бременни
5,6,9,11	1.0-1.5x10 ⁶ /тяло	77	36(47%)
	3.0 x10 ⁶ /тяло	76	38(50%)
	1.0-1.5x10 ⁶ /рога	72	32(44%)
	3.0 x10 ⁶ /рога	72	39(54%)
	20x10 ⁶ /тяло,контрола	93	61(66%)
4,5,6,9,10,11	1.0-1.5x10 ⁶ /тяло	176	98(56%)
	3.0x10 ⁶ /тяло	171	88(51%)
	20x10 ⁶ /тяло,контрола	183	124(68%)
5,6,7,9,11	1.5x10 ⁶ /тяло	163	70(43%)
	1.5 x10 ⁶ /рога	158	85(54%)
	20x10 ⁶ /тяло,контрола	128	79(62%)

Нивата на забременяване с полова сперма са най-общо 70-90% от неполовите контроли при експерименти с 7 до 20 пъти повече сперма. Тази разлика е по-малка в повечето настоящи опити, вероятно от рефлектиращо подобрените полови и семенно-обработващи процедури.

В някои опити, отелването се изследва за бременност чрез ултразвук на 1 и 2 месец след осеменяването. Прекъсването на бременността в този интервал е подобна ($P < 0.1$) за полови (23/261; 8.8%) срещу контролни (9/145; 6.2%) семенни третираня, което е един знак, че генетичната увреда при половото определяне е минимална.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Половото съотношение може да бъде променено до около 90% от всеки пол чрез сортиране на сперма на базата на DNA съдържание с течен цитометър/ клетъчно сортиране, последвано от криоконсервиране и съответно рутинно изкуствено осеменяване. Родените животни от полово сортирана сперма са нормални. За повечето бикове в тези изследвания, нивата на забременяване с 1.0 до 1.5×10^6 полова замарзена сперма са 70 до 90% от неполова контрола с 20 или 40×10^6 замразена сперма, приложена конвенционално. Тези резултати отговарят на добре организирани отелвания, провеждани от добре тренирани осеменители чрез добре обработени семена. Може да има малко предимство за осеменителната полова сперма приложена билатерално в маточните рога, сравнено със стандартното осеменяване в маточното тяло.

Необходимо е настоящото изобретение да бъде дискутирано тук чрез справки към специфични методи и материали. Ще бъде разбрано, че дискусията на тези специфични методи и материали по никакъв начин не установява ограничение в обхвата на настоящото изобретение, което обхваща всеки и всички алтернативни материали и методи, подходящи за провеждане на завършването на настоящото изобретение.

Всички описани патенти и публикации са включени в описанието чрез справки.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Метод за криоконсервиране на сперма съдържаща:
 - а) получаване на селектионирана семенна проба;
 - б) охлаждане на селектионираната семенна проба;
 - в) изолиране на сперма от селектионираната семенна проба за получаване на изолирана сперма;
 - г) добавяне на краен пълнител към изолираната сперма за получаване на суспензия от сперма; и
 - д) замразяване на суспензията от сперма.
2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че селектионираната семенна проба съдържа част от спермата, присъстваща в проба от източник, която сперма е селектионирана с характерни свойства и семенната концентрация в селектионираната семенна проба е по-ниска, отколкото в пробата от източник.
3. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че селектионираната семенна проба съдържа полово-селектионирана сперма.
4. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че селектионираната семенна проба съдържа сперма от бозайници.
5. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че селектионираната семенна проба съдържа сперма от бик.
6. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че селектионираната семенна проба съдържа конска сперма.
7. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че селектионираната семенна проба съдържа свинска сперма.
8. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че селектионираната семенна проба съдържа сперма,

селекционирана чрез метод от групата, съдържаща течна цитометрия, магнитна техника, колонна техника, гравитометрична техника, биохимична техника, техника базирана на подвижността на спермата, техника базирана на електрическите свойства на спермата и всякакви техни комбинации.

9. Метод съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че селекционираната семенна проба е селекционирана чрез течна цитометрия.
10. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че охлаждането се извършва чрез намаляване на температурата на селекционираната семенна проба до около 5°C.
11. Метод съгласно претенция 10, характеризиращ се с това, че охлаждането се извършва за период от около 60 минути до около 240 минути.
12. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че крайният пълнител добавен към селекционираната семенна проба всеки съдържа в допълнение към криопротектант, един или повече от следващите компоненти: компонент, който поддържа осмоларитета и буфери pH, органична субстанция, която намалява студовия шок и предпазва оплодителната способност на спермата, енергиен източник, субстанция, която олеснява семенната капацитация и антибиотик.
13. Метод съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че криопротектантът е избран от групата, съдържаща дизахариди, тризахариди и всякакви техни комбинации.
14. Метод съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че криопротектантът е избран от групата, съдържаща глицерол,

диметил сулфоксид, етилен гликол, пропилен гликол, и всякакви техни комбинации.

15. Метод съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че компонентът, който поддържа осмоларитетът и буфери рН е избран от групата, съдържаща буфер-съдържаща сол, буфер-съдържащ въглеродород и всякакви техни комбинации.
16. Метод съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че компонентът, който поддържа осмоларитета и буферите рН е избран от групата , съдържаща натриев цитрат, Трис [хидроксиметил]аминометан, N-Трис[хидроксиметил]метил-2-аминоетансулфонова киселина, монопотриев глутамат, мляко, HEPES-буферна среда и всякакви техни комбинации.
17. Метод съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че органичната субстанция е избрана от групата , съдържаща яйчен жълтък, екстракт от яйчен жълтък, мляко, млечен екстракт, казеин, албумин, лецитин и всякакви техни комбинации.
18. Метод съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че енергийният източник е избран монозахарид, избран от групата, съдържаща глюкоза, фруктоза, маноза и всякакви техни комбинации.
19. Метод съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че антибиотикът е избран от групата , съдържаща тилозин, гентамицин, линкомицин, линко-спектин, спектиномицин, пеницилин, стрептомицин и всякакви техни комбинации.
20. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че след добавяне на крайния пълнител, семенната проба и съответно семенната суспензия, съдържат глицерол, натриев цитрат, Трис

[хидроксиметил]аминометан, яйчен жълтък, фруктоза и един или повече антибиотици.

21. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че след добавяне на крайния пълнител, семенната проба и съответно семенната суспензия, съдържат глицерол, натриев цитрат, яйчен жълтък и един или повече антибиотици.
22. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че след добавяне на крайния пълнител, семенната проба и съответно семенната суспензия, съдържат глицерол, яйчен жълтък, мляко, фруктоза и един или повече антибиотици.
23. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че пълнителят има рН в диапазона от 6.5 до около 7.5.
24. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че спермата е изолирана от селектираната семенна проба чрез центрофугиране.
25. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че центрофугирането води до поне около 50% до около 90% възстановяване на спермата.
26. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че концентрацията на спермата в суспензията преди замразяване е около 1×10^6 /мл до около 300×10^6 /мл.
27. Замразена селектирана семенна проба, съдържаща част от спермата, присъстваща в проба от източник, частта от спермата е избрана със характеристики.
28. Замразена селектирана семенна проба съгласно претенция 27, характеризираща се с това, че замразената селектирана семенна проба съдържа полово селектирана сперма.

29. Замразена селектионирана семенна проба съгласно претенция 27, характеризираща се с това, че замразената селектионирана семенна проба съдържа бозайникова сперма.
30. Замразена селектионирана семенна проба съгласно претенция 27, характеризираща се с това, че замразената селектионирана семенна проба съдържа сперма от бик.
31. Замразена селектионирана семенна проба съгласно претенция 27, характеризираща се с това, че замразената селектионирана семенна проба съдържа сперма от кон
32. Замразена селектионирана семенна проба съгласно претенция 27, характеризираща се с това, че замразената селектионирана семенна проба съдържа свинска сперма.
33. Замразена селектионирана семенна проба съгласно претенция 27, характеризираща се с това, че методът, използван да селектионира семенната проба, съдържа техники от групата, съдържаща течна цитометрия, магнитна техника, колонна техника, гравиметрична техника, биохимична техника, техника базирана на подвижността на спермата, техника базирана на електрическите свойства на спермата и всякакви техни комбинации.
34. Замразена селектионирана семенна проба съгласно претенция 33, характеризираща се с това, че замразената селектионирана семенна проба съдържа сперма, която е селектионирана чрез течна цитометрия.
35. Замразена селектионирана семенна проба съгласно претенция 27, характеризираща се с това, че замразената селектионирана семенна проба се получава по метод включващ:
 - а) получаване на селектионирана семенна проба;
 - б) охлаждане на селектионираната семенна проба;

- в) изолиране на сперма от селектираната семенна проба за получаване на изолирана сперма;
 - г) добавяне на краен пълнител към изолираната сперма за получаване на суспензия от сперма; и
 - д) замразяване на суспензията от сперма.
36. Метод съдържащ използване на замразена селектирана семенна проба съгласно претенция 27 за изкуствено осеменяване или ин витро оплождане.
37. Метод съгласно претенция 36, съдържащ използване на замразената селектирана семенна проба за ниско дозово изкуствено осеменяване.