



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111566203 A

(43)申请公布日 2020.08.21

(21)申请号 201880084953.7

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

(22)申请日 2018.12.03

代理人 康健 王思琪

(30)优先权数据

62/594,124 2017.12.04 US

62/594,153 2017.12.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2018/000243 2018.12.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/109123 EN 2019.06.13

(71)申请人 克罗莫依安私人有限公司

地址 澳大利亚昆士兰州

(72)发明人 S·C·德韦特 M·S·侯赛因

(51)Int.Cl.

C12N 5/073(2010.01)

C12N 5/076(2010.01)

C07K 16/40(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

权利要求书5页 说明书62页 附图9页

(54)发明名称

包括用于性别选择的材料和方法

(57)摘要

一种方法,包括以下步骤:1.任选地使精子经受处理步骤;2.使步骤1的所述精子经受性别选择步骤,以便选择目标雌性或雄性精子;3.使用步骤2的目标精子执行受精步骤,以产生至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎;4.在精子存在下,选择性地裂解步骤3中的所述至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,以便从至少一个裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放细胞物质;以及5.在至少一种下游应用中使用所释放的细胞物质。

受精卵母细胞的下游应用流程图:



1. 一种方法,包括以下步骤:

1. 任选地使精子经受处理步骤;

2. 使步骤1的所述精子经受性别选择步骤,以便选择目标雌性精子或目标雄性精子;

3. 使用步骤2的所述目标精子执行受精步骤,以产生至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎;

4. 在精子存在下选择性地裂解步骤3的所述至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,以便从至少一个裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放细胞物质;以及

5. 在至少一种下游应用中使用所述释放的细胞物质。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤1包括:使所述精子经受实验技术;使所述精子经受诱变剂或疑似诱变剂的作用;用重组技术操作所述精子;使所述精子经受分子例如抗体的作用;或者使所述精子暴露于辐射。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,任选地包括使步骤3的所述至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎经受步骤1所述的处理步骤的步骤。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,使用与雄性精子特异性结合的抗体执行步骤2。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述抗体是与哺乳动物雄性精子(雄性精细胞)的表面蛋白特异性结合和/或针对其产生的单克隆抗体或其片段。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述抗体与雄性精细胞的表面蛋白DEAD/DBY特异性结合;所述抗体与以下DBY的表位中的一者特异性结合:SFFFFEMESH (SEQ ID NO:353)、FSIFNRDGV (SEQ ID NO:354) 或SLNIFLDRW (SEQ ID NO:355);所述抗体包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含CDR1 (SEQ ID NO:363)、CDR2 (SEQ ID NO:364) 和CDR3 (SEQ ID NO:365) 的氨基酸序列,并且/或者所述抗体包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域包含CDR1 (SEQ ID NO:360)、CDR2 (SEQ ID NO:361) 和CDR3 (SEQ ID NO:362) 的氨基酸序列;所述抗体为本文中所述的RE5;所述抗体针对SEQ ID NO:352和84-159中的任一者的氨基酸序列或其一部分产生;或者所述抗体针对SEQ ID NO:347的氨基酸序列产生。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤2包括使含有精子的哺乳动物精液经受单克隆抗体或其片段的作用,使得所述抗体与所述精液的雄性精子特异性结合。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤3包括以下顺序的步骤:(1) 洗涤、(2) 采集、(3) 培养、(4) 受精、任选地(5) 洗涤以及任选地(6) 在除了通过在(1)至(6)的一个或多个步骤中选择性地补充至少一种补充剂逐步改变培养基的组成外基本相同的培养基中培养至少一个卵母细胞,从而改善所述至少一个受精卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎的生产。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤4包括使所述卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎经受裂解液的作用,以使所述卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎裂解,并从所述卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中释放细胞物质,但使得所述精子不被裂解。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述下游应用包括使用聚合酶在裂解缓冲液内选择性地复制所述释放的物质。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法:当用于表征遗传变化或基因型改变时;当

用于鉴定诱变剂时；或者，当用于诊断目的时。

12. 一种与哺乳动物雄性精子（雄性精细胞）的表面蛋白特异性结合和/或针对其产生的单克隆抗体或其片段。

13. 根据权利要求12所述的单克隆抗体或其片段，其中所述雄性精细胞的表面蛋白是DEAD/DBY。

14. 根据权利要求13所述的单克隆抗体或其片段，其中所述抗体或其片段与以下DBY的表位中的一者特异性结合：SFFFFEMESH (SEQ ID NO:353)、FSIFNRDGV (SEQ ID NO:354) 或SLNIFLDRW (SEQ ID NO:355)。

15. 根据权利要求13所述的单克隆抗体或其片段，其中所述抗体或其片段的轻链可变结构域包含CDR1 (SEQ ID NO:363)、CDR2 (SEQ ID NO:364) 和CDR3 (SEQ ID NO:365) 的氨基酸序列，并且/或者所述抗体或其片段的轻链可变结构域包含CDR1 (SEQ ID NO:360)、CDR2 (SEQ ID NO:361) 和CDR3 (SEQ ID NO:362) 的氨基酸序列。

16. 根据权利要求13所述的单克隆抗体或其片段，其中所述抗体或其片段的轻链可变结构域包含SEQ ID NO:350的氨基酸序列，或者其轻链可变结构域通过SEQ ID NO:350所示的氨基酸序列中的一个或若干个氨基酸的取代、缺失或添加而获得，其与SEQ ID NO:350具有至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性，且所述抗体或其片段具有与所述表面蛋白特异性结合的活性。

17. 根据权利要求13所述的单克隆抗体或其片段，其中所述抗体或其片段的轻链可变结构域包含SEQ ID NO:351的氨基酸序列，或者其轻链可变结构域通过SEQ ID NO:351所示的氨基酸序列中的一个或若干个氨基酸的取代、缺失或添加而获得，其与SEQ ID NO:351具有至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性，且所述抗体或其片段具有与所述表面蛋白特异性结合的活性。

18. 根据权利要求13所述的单克隆抗体或其片段，其中所述抗体或其片段能够与包括牛和猪物种的不同哺乳动物物种的DEAD/DBY结合。

19. 一种组合物，其包含有效量的权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段以及可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

20. 根据权利要求19所述的组合物，其为药物组合物形式、兽医用组合物形式，或用于研究目的的形式。

21. 根据权利要求19或20所述的组合物，其中所述可接受的载体、稀释剂或赋形剂是精液增量剂。

22. 一种试剂、试剂盒或芯片，其包含权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段或权利要求19-21中任一项所述的组合物。

23. 权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段或权利要求19-21中任一项所述的组合物作为诊断剂、试剂或工具的用途。

24. 根据权利要求23所述的用途，其中所述单克隆抗体或其片段被标记用于检测目的或能够与固体载体例如珠粒结合。

25. 一种处理哺乳动物精子（“精细胞”）的方法，所述方法包括以下步骤：使含有精子的哺乳动物精液经受权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段或权利要求19-21中任一项所述的组合物的作用，从而使得所述抗体与所述精液的雄性精子（“雄性精细胞”）

特异性结合。

26. 一种处理哺乳动物精子(‘精细胞’)以增加由其产生雌性后代的可能性的方法,所述方法包括使所述哺乳动物精子与权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段或权利要求19-21中任一项所述的组合物接触,从而使所述抗体或其片段与雄性精子特异性结合的步骤。

27. 一种对哺乳动物精液进行性别鉴定的方法,所述方法包括使所述精液的精子与权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段或权利要求19-21中任一项所述的组合物接触,从而使所述抗体或其片段与所述精液的雄性精子特异性结合的步骤。

28. 一种组合物,其包含用权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段或权利要求19-21中任一项所述的组合物处理的精液或精子。

29. 一种对哺乳动物人工授精以增加由其产生雌性后代的可能性的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用以下物质的步骤:

(i) 有效量的权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段;

(ii) 有效量的权利要求19-20中任一项所述的组合物;或

(iii) 有效量的权利要求21所述的组合物,

从而对所述哺乳动物人工授精。

30. 权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段或权利要求19-21中任一项所述的组合物与雄性精子(“雄性精细胞”)的偶联物。

31. 经处理的精子或经处理的精液,其包含权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段与雄性精子的偶联物,或者权利要求19-21中任一项所述的组合物与雄性精子的偶联物。

32. 权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段或权利要求19-21中任一项所述的组合物用于雄性精子(“雄性精细胞”)选择的用途,其中所述雄性精子选择任选地在大量精液中进行。

33. 权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体或其片段或权利要求19-21中任一项所述的组合物用于对哺乳动物精液或精子进行性别鉴定的用途。

34. 根据权利要求25、26、27和29中任一项所述的方法,其包括以下步骤:定量精子的量,然后加入适量的单克隆抗体或其片段,以优化所述抗体与所述雄性精细胞的结合。

35. 一种包含权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

36. 一种或多种分离、纯化或重组的核酸,其编码:

(i) 权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体的重链可变结构域;

(ii) 权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体的轻链可变结构域;

(iii) 权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体的重链可变结构域中的CDR1 (SEQ ID NO:363)、CDR2 (SEQ ID NO:364) 和CDR3 (SEQ ID NO:365);和/或

(iv) 权利要求11-18中任一项所述的单克隆抗体的轻链可变结构域中的CDR1 (SEQ ID NO:361)、CDR2 (SEQ ID NO:362) 和CDR3 (SEQ ID NO:363)。

37. 一种针对SEQ ID NO:347的氨基酸序列产生的分离的单克隆抗体。

38. 一种产生至少一个受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的方法,所述方法包括以下顺序的步骤:(1) 洗涤、(2) 采集、(3) 培养、(4) 受精、任选地(5) 洗涤、以及任选地(6) 在除了通

过在(1)至(6)中的一个或多个步骤中选择性地补充至少一种补充剂逐步改变培养基的组成外基本相同的培养基中培养至少一个卵母细胞,从而改善所述至少一个受精卵母细胞或预植入胚胎或囊胚的生产。

39.一种产生至少一个受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的方法,所述方法包括以下顺序的步骤:(1)洗涤卵丘-卵母细胞复合体(COC)以从所述COC中释放至少一个卵母细胞;(2)采集步骤(1)的所述至少一个卵母细胞;(3)培养步骤(2)的所述至少一个卵母细胞;(4)用精子使步骤(3)的所述至少一个卵母细胞受精以产生至少一个受精卵母细胞、胚胎或囊胚;任选地,(5)洗涤至少一个受精卵母细胞或胚胎;以及任选地,(6)培养来自步骤(5)的所述至少一个受精卵母细胞或胚胎,用于进一步的胚胎发育,其中,除了通过在步骤(1)至(6)中的一个或多个步骤中选择性地补充至少一种补充剂来逐步改变培养基的组成外,在步骤(1)至(6)中使用基本上相同的培养基,从而改进所述至少一个受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的产生。

40.一种产生至少一个受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的方法,所述方法包括以下步骤:

(1)用培养基将卵丘-卵母细胞复合体(COC)的制剂洗涤两次,并用培养基+补充剂1洗涤一次,以从所述COC中释放至少一个卵母细胞;

(2)采集步骤(1)的所述至少一个卵母细胞,并将所述至少一个卵母细胞在培养基+补充剂1中培养预定的时间段;

(3)将步骤(2)的所述至少一个卵母细胞在培养基+补充剂2中培养预定的时间段;

(4)在培养基+补充剂3中用精子使步骤(3)的所述至少一个卵母细胞受精,持续预定时间段,以产生至少一个受精卵母细胞;任选地

(5)用培养基+补充剂4洗涤所述至少一个受精卵母细胞或所得的胚胎;以及任选地

(6)在所述培养基+补充剂4中培养来自步骤(5)的所述至少一个受精卵母细胞或胚胎,以用于进一步的胚胎发育,

其中在步骤(1)至(6)中的每一步骤中使用基本上相同的培养基。

41.通过权利要求38、39或40的方法产生的至少一个受精卵母细胞、囊胚或预植入胚胎。

42.权利要求38、39或40中所述的或用于权利要求38、39或40所述的方法中的培养基或培养基加+补充剂。

43.一种用于产生根据权利要求38-41中任一项所述的至少一个预植入受精卵母细胞、囊胚或胚胎的高通量体外生产(IVP)方法。

44.一种在精子存在下选择性地裂解卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎的方法,所述方法包括以下步骤:

使所述卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎经受裂解液的作用,以使所述卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎裂解,并从所述卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中释放细胞物质,但使得所述精子不被裂解。

45.一种通过权利要求44所述的方法产生的释放的细胞物质。

46.一种裂解液,其用于在不被所述裂解液裂解的精子存在下选择性地裂解卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,且用于从所述裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中

选择性地释放细胞物质,从而使所述细胞物质和所述裂解液与下游应用相容。

47. 一种方法,其在精子存在下选择性地裂解卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,使得来自裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎的遗传物质能够使用聚合酶被选择性地复制,所述方法包括以下步骤:

(1) 使所述卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎经受裂解液的作用,以使所述卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎裂解,并从所述卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中释放遗传物质,但使得所述精子不被裂解;以及

(2) 使用聚合酶在裂解缓冲液中选择性地复制所述释放的遗传物质。

48. 通过权利要求47所述的方法产生的释放的遗传物质。

49. 一种裂解液,其用于在不被所述裂解液裂解的精子的存在下选择性地裂解卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,且用于从所述裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放遗传物质,从而使裂解缓冲液中所述释放的遗传物质能够使用聚合酶被选择性地复制。

包括用于性别选择的材料和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求均于2017年12月4日提交的第62/594124号和第62/594153号美国专利申请的优先权,这两个申请的全部内容各通过交叉引用的方式并入本文中。

[0003] 标题1

[0004] 繁殖方法

技术领域

[0005] 本发明大体涉及辅助繁殖方法。一方面,本发明涉及产生至少一个受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的方法,优选涉及在猪中产生预植入受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的方法。

背景技术1

[0006] 在过去的三十年中,人们对提高猪的体外生产(IVP)具有浓厚的兴趣,这不仅是为了研究生殖生理学,而且还作为其它生物技术和生物医学研究例如生产转基因猪的一部分(Gil等人,2010;Vajta和Callesen,2012;Liu等人,2011;Lopes等人,2007;Li等人,2013)。一些实验室中已经获得了可接受水平(30-35%)的囊胚生产(Kim等人,2008;Somfai等人,2005),但是与例如牛相比,猪IVP系统的差异和脆弱性清楚地表明仍有关键因素仍待解决。

[0007] 适当的卵母细胞成熟是成功受精的先决条件,对减数分裂成熟的暂时阻断允许最佳的胞质成熟,有利于提供更大的容量和随后的胚胎发育(Fouladi-Nashta等人,1998)。人们已经努力减少新鲜精液与冻融精液之间的体外受精(IVF)结果的差异,但是在大多数IVF实验室中,IVF的效率仍然保持在40-50%(Li等人,2003;Alminana等人,2005),而且,精液的最佳剂量尚不明了。尽管尝试使用不同类型的培养基补充剂和培养基条件来改善IVP系统,但是成功率仍然不是最佳的。常规IVP系统从卵母细胞采集到胚胎培养使用若干种培养基,这可能导致系统差异和缺乏再现性。

[0008] 由于不同实验室使用的IVP方案之间缺乏一致性,因此最优化的IVP系统可能远未实现。

发明内容1

[0009] 在本发明的一个方面,本发明人已经开发了一种用于改善受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的体外生产(IVP)的培养系统。

[0010] 另一方面,本发明人已经开发了一种使用基本单一的培养基的简化的IVP方法,用于改进受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的生产。

[0011] 另一方面,这种改进的胚胎培养基和方法可以用作不同实验室之间的标准,其具有较少的变异,从而实现高的再现性。

[0012] 另一方面,本发明人的IVP系统的简单性在不损害胚胎发育和质量的情况下有助于实现高通量,进而能够在例如生物医学研究中进一步应用。

[0013] 根据本发明的第一方面,提供了一种产生至少一个受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的方法,所述方法包括如下顺序的步骤:(1)洗涤,(2)采集,(3)培养,(4)受精,任选地(5)洗涤,以及任选地(6)在基本相同的培养基(除了通过在(1)至(6)中的一个或多个步骤中选择性地补充至少一种补充剂逐步改变培养基的组成之外)中培养至少一个卵母细胞,从而改进所述至少一个受精卵母细胞或预植入胚胎或囊胚的生产。

[0014] 优选地,提供了一种产生至少一个受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的方法,所述方法包括以下顺序的步骤:(1)洗涤卵丘-卵母细胞复合体(COC)以从所述COC中释放至少一个卵母细胞;(2)采集步骤(1)的至少一个卵母细胞,(3)培养步骤(2)的至少一个卵母细胞,(4)用精子使步骤(3)的至少一个卵母细胞受精以产生至少一个受精卵母细胞、胚胎或囊胚,任选地(5)洗涤至少一个受精卵母细胞或胚胎,以及任选地(6)培养来自步骤(5)的至少一个受精卵母细胞或胚胎,用于进一步的胚胎发育,其中在步骤(1)至(6)中使用基本相同的培养基(除了通过在步骤(1)至(6)中的一个或多个步骤中选择性地补充至少一种补充剂来逐步改变培养基的组成之外),从而改进所述至少一个受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的生产。

[0015] 根据本发明的第二方面,提供了一种产生至少一个受精卵母细胞、预植入胚胎或囊胚的方法,所述方法包括以下步骤:

[0016] (1)将卵丘-卵母细胞复合体(COC)的制剂用培养基洗涤两次,并用培养基+补充剂1洗涤一次,以从COC中释放至少一个卵母细胞;

[0017] (2)采集步骤(1)的至少一个卵母细胞,并将所述至少一个卵母细胞在培养基+补充剂1中培养预定的时间段;

[0018] (3)将步骤(2)的至少一个卵母细胞在培养基+补充剂2中培养预定的时间段;

[0019] (4)在培养基+补充剂3中用精子使步骤(3)的至少一个卵母细胞受精,持续预定时间段,以产生至少一个受精卵母细胞;任选地

[0020] (5)用培养基+补充剂4洗涤至少一个受精卵母细胞或所得胚胎;以及任选地

[0021] (6)在培养基+补充剂4中培养来自步骤(5)的至少一个受精卵母细胞或胚胎,用于进一步的胚胎发育,

[0022] 其中在步骤(1)至(6)中的每一步骤中使用基本上相同的培养基。

[0023] 根据本发明的第三方面,提供了通过第一或第二方面的方法产生的至少一个受精卵母细胞、囊胚或预植入胚胎。

[0024] 根据本发明的第四方面,提供了本发明第一或第二方面中所述的培养基或培养基+补充剂(1、2、3或4)。

[0025] 根据本发明的第五方面,提供了一种高通量体外生产(IVP)方法,用于产生根据本发明前述方面中任一方面所述的至少一个预植入受精卵母细胞、囊胚或胚胎。

[0026] 卵母细胞可以源自人或任何合适类型的动物。动物可以是哺乳动物。动物可以是农畜,例如猪、牛、马、绵羊或山羊。动物可以是伴侣动物,例如狗或猫。动物可以是实验室动物,例如兔子、小鼠或大鼠。优选地,卵母细胞来自猪。

[0027] 优选地,通过本发明的上述不同方面产生多于一个受精卵母细胞、胚胎或囊胚。更优选地,一次且同时产生许多受精卵母细胞、囊胚或胚胎。

[0028] 可以使用任何合适类型的培养基。尽管发明人已发现体外成熟(IVM)培养基M-199

是特别适合本发明第一、第二和第四方面的培养基,但是可以使用与M-199具有相似特性的任何培养基。

[0029] 培养基可以具有一种或多种以下类型的成分:营养成分或能量(例如葡萄糖、蛋白质、氨基酸);矿物质(例如氯化钠、氯化钙、氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸二氢钠一水合物、七水合硫酸镁、碳酸氢钠、乳酸钠、乳酸钙、九水合硝酸铁);维生素(例如维生素A、硫胺素、核黄素、吡哆醇、盐酸吡哆醛、PABA、烟酰胺、烟酸、抗坏血酸、生物素、右型泛酸钙、氯化胆碱、麦角钙化醇、叶酸、i-肌醇(i-inositol)、甲萘醌);pH指示剂(例如酚红);抗菌剂(例如青霉素G、链霉素);抗氧化剂(例如谷胱甘肽);以及其它合适的补充剂(例如猪卵泡液(PFF)、最小必需培养基、胎牛血清、孕马血清促性腺激素、人绒毛膜促性腺激素、丙酮酸钠和咖啡因)。

[0030] 通常,M-199具有下表1A中所示的特性。

[0031] 表1A.M-199的特性

组分	分子量	浓度(mg/L)	mM
氨基酸			
甘氨酸	75.0	50.0	0.6666667
L-丙氨酸	89.0	25.0	0.28089887
L-精氨酸盐酸盐	211.0	70.0	0.33175355
L-天冬氨酸	133.0	30.0	0.22556391
L-半胱氨酸盐酸盐-H ₂ O	176.0	0.1	5.681818E-4
L-胱氨酸 2HCl	240.0	26.0	0.108333334
[0032] L-谷氨酸	147.0	75.0	0.5102041
L-谷氨酰胺	146.0	100.0	0.6849315
L-组氨酸盐酸盐-H ₂ O	210.0	21.88	0.10419047
L-羟脯氨酸	131.0	10.0	0.07633588
L-异亮氨酸	131.0	40.0	0.3053435
L-亮氨酸	131.0	60.0	0.45801526
L-赖氨酸盐酸盐	183.0	70.0	0.38251367
L-蛋氨酸	149.0	15.0	0.10067114
L-苯丙氨酸	165.0	25.0	0.15151516

[0033]

L-脯氨酸	115.0	40.0	0.3478261
L-丝氨酸	105.0	25.0	0.23809524
L-苏氨酸	119.0	30.0	0.25210086
L-色氨酸	204.0	10.0	0.04901961
L-酪氨酸二钠盐脱水物	261.0	58.0	0.22222222
L-缬氨酸	117.0	25.0	0.21367522
维生素			
抗坏血酸	176.0	0.05	2.840909E-4
生物素	244.0	0.01	4.0983607E-5
氯化胆碱	140.0	0.5	0.0035714286
右型泛酸钙	477.0	0.01	2.096436E-5
叶酸	441.0	0.01	2.2675737E-5
甲萘醌(维生素 K3)	172.0	0.01	5.8139532E-5
烟酰胺	122.0	0.025	2.0491803E-4
尼克酸(烟酸)	123.0	0.025	2.0325204E-4
对氨基苯甲酸	137.0	0.05	3.6496352E-4
盐酸吡哆醛	204.0	0.025	1.2254903E-4
盐酸吡哆醇	206.0	0.025	1.21359226E-4
核黄素	376.0	0.01	2.6595744E-5
盐酸硫胺素	337.0	0.01	2.967359E-5
维生素 A(醋酸酯)	328.0	0.1	3.0487805E-4
维生素 D2(钙化醇)	397.0	0.1	2.5188917E-4
α 生育酚磷酸钠盐 (α Tocopherol phos. Na salt)	554.7	0.01	1.8027762E-5
i-肌醇	180.0	0.05	2.7777778E-4
无机盐			
氯化钙(CaCl_2)(无水)	111.0	200.0	1.8018018
硝酸铁($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	404.0	0.7	0.0017326733
硫酸镁(MgSO_4)(无水)	120.0	97.67	0.8139166
氯化钾(KCl)	75.0	400.0	5.3333335
碳酸氢钠(NaHCO_3)	84.0	2200.0	26.190475
氯化钠(NaCl)	58.0	6800.0	117.24138
磷酸二氢钠(单碱)($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	138.0	140.0	1.0144928
其它组分			
2-脱氧-D-核糖	134.0	0.5	0.0037313432
硫酸腺嘌呤	404.0	10.0	0.024752475
5'-磷酸腺苷	347.0	0.2	5.763689E-4
5'-三磷酸腺苷	605.0	1.0	0.0016528926
胆固醇	387.0	0.2	5.1679584E-4
D-葡萄糖(右旋糖)	180.0	1000.0	5.5555553
谷胱甘肽(还原型)	307.0	0.05	1.6286645E-4
盐酸鸟嘌呤	188.0	0.3	0.0015957447
次黄嘌呤钠	136.0	0.4	0.0029411765

[0034]	酚红	376.4	20.0	0.053134963
	核糖	150.0	0.5	0.0033333334
	醋酸钠	82.0	50.0	0.6097561
	胸腺嘧啶	126.0	0.3	0.0023809525
	吐温 80®		20.0	无穷大
	尿嘧啶	112.0	0.3	0.0026785715
	黄嘌呤钠	152.0	0.34	0.0022368422

[0035] 参考文献:Morgan, J.F. 和Campbell, M.E. (1955) J.Natl.Cancer Inst., 16:557; Morgan, J.F., Morton, H.J. 和Parker R.C. (1950) Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 73:1.

[0036] 其它合适的培养基(即,具有与M-199相似的特性的任何培养基)可以表征为具有下表2A中所示的一般特性。

[0037] 表2A.M-199以外的合适培养基的一般特性

成分类型	浓度范围	具体实例和浓度范围
营养成分:		
能量源: 葡萄糖	2.5-10.5 mM	5.5 mM
蛋白质/氨基酸源: 胱氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、羟基 L-脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸	0.049-0.684 mM	参见表 1A
矿物质源: 氯化钠、氯化钙、氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸二氢钠一水合物、七水合硫酸镁、碳酸氢钠、乳酸钠、乳酸钙、九水合硝酸铁	0.001-117.24 mM	参见表 1A
维生素源: 维生素 A、硫胺素、核黄素、吡哆醇、盐酸吡哆醇、PABA、烟酰胺、烟酸、抗坏血酸、生物素、右型泛酸钙、氯化胆碱、麦角钙化醇、叶酸、i-肌醇、甲萘醌	0.003-6.81 mM	参见表 1A
pH 指示剂: 酚红	0.02-0.08 mM	0.053 mM
抗菌剂: 青霉素 G 链霉素	50-150 IU/ml 25-100 IU/ml	100 IU/ml 50 IU/ml
抗氧化剂: 谷胱甘肽	0.8-2.0 mM	1.62 M

[0039] 可以使用任何合适类型的补充剂。优选地,每种补充剂帮助所补充的培养基模拟或模仿从中获得卵母细胞的输卵管环境或在化学上与该环境更相似。一种或多种补充剂可以包括激素、生长促进剂和/或能量提供剂(例如cAMP)。如果卵母细胞来自猪,则可以使用猪源性分子,但这不是必须的。在某些情况下,可以使用猪相容性分子(合成的或源自不同物种)。

[0040] 例如,洗涤步骤的补充剂可以包含激素和生长促进剂,采集步骤的补充剂可以包

含激素、生长促进剂和能量提供剂,培养步骤的补充剂可以包含生长促进剂,受精步骤的补充剂可以包含能量提供剂,洗涤步骤的补充剂可以包含生长促进剂,并且/或者培养步骤的补充剂可以包含生长促进剂。

[0041] 下表3A中示出了本说明书中提及的+补充剂的进一步的优选特性。

[0042] 表3A.+补充剂的特性。

+补充剂 1		
成分类型	浓度范围	具体实例和浓度范围
猪卵泡液(PFF)	5-25% v/v	10-15% v/v
孕马血清促性腺激素(PMSG)	10-60 IU/ml	20-30 IU/ml
人绒毛膜促性腺激素(hCG)	5-30 IU/ml	10-15 IU/ml
cAMP(任选, 如果卵母细胞得自小母猪)	5-30 IU/ml	1 mM
	0.1-10 mM	
+补充剂 2		
猪卵泡液(PFF)	5-30% v/v	10-15% v/v
cAMP(任选, 如果卵母细胞得自小母猪)	0.1-10 mM	1-2 mM
+补充剂 3		
成分类型	浓度范围	具体实例和浓度范围
丙酮酸钠	1-10% v/v	2-3% v/v
咖啡因	0.1-10 mM	2-3 mM
葡萄糖	2.5-10.5 mM	5.5 mM
CaCl ₂	2-10 mM	5-7 mM
NaHCO ₃	15-30 mM	25-27 mM
BSA	0.1-0.5 %	0.1-0.2 %
+补充剂 4		
成分类型	浓度范围	具体实例和浓度范围
猪卵泡液(PFF)	5-30% v/v	10-15% v/v
牛血清白蛋白(BSA)	0.2-0.9%	0.3-0.4%

[0045] 参考文献:Eagle,H. (1959) Science 130:432。

[0046] 在步骤(1)中,COC的制剂可以是任何合适的形式。优选地,使用具有均匀卵质和至少两层紧密细胞团的COC。优选使用猪COC。

[0047] 在步骤(1)中,可以以任何合适的方式洗涤COC以获得至少一个卵母细胞。优选将COC在培养基+补充剂1中洗涤两次。培养基+补充剂1可以如表中所述。优选地,补充剂1包含15% (v/v) 猪卵泡液 (PFF)、15IU/ml人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 和30IU/ml孕马血清促性腺激素 (PMSG)。

[0048] 可以从直径约3-6mm的浅卵泡中采集PFF。采集到的PFF可以使用0.20μm针筒式过

滤器过滤,并在-20℃保存直至使用。

[0049] 该方法可以包括在步骤(1)之前采集卵巢的步骤。可以通过任何合适的方式从屠宰后的青春期前小母猪和母猪采集卵巢。

[0050] 可以将卵巢储存在盐溶液中,例如在30-38℃储存在约0.9%NaCl溶液中,直至按照步骤(1)处理。

[0051] 在进行步骤(2)之前,可以从直径约3-8mm的卵泡中抽出COC,并使其在38℃静置几分钟成为沉积物。

[0052] 在步骤(2)中,可以以任何合适的方式采集至少一个卵母细胞。通常,这将涉及到移液管,且借助显微镜进行采集。

[0053] 在步骤(2)中,可以采集任何合适数量的卵母细胞用于培养。优选采集约5至200个卵母细胞、更优选约10至70个卵母细胞、甚至更优选约25至30个卵母细胞进行培养。

[0054] 培养基+补充剂1可以如表中所述。优选地,补充剂2包含15%(v/v)猪卵泡液(PFF)、15IU/ml人绒毛膜促性腺激素(hCG)和30IU/ml孕马血清促性腺激素(PMSG)。

[0055] 对于从小母猪取得的卵母细胞,可以将浓度约1mM的cAMP(用于能量)添加到IVM培养基中。

[0056] 在步骤(2)中,可以以任何合适的方式培养至少一个卵母细胞。通常,这将涉及在38℃在培养箱例如在二氧化碳培养箱中培养至少一个卵母细胞。这可涉及将至少一个卵母细胞放入少量的培养基+补充剂1中,并用油例如温石蜡油将其覆盖以防止蒸发。

[0057] 在步骤(2)中,可以将至少一个卵母细胞培养任何适合的时间段。优选地,预定时间段为约22小时,但预定时间段可以为约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30小时(或甚至更短或更长时间)。

[0058] 在步骤(2)之后,可以除去培养基+补充剂1,并用培养基+补充剂2代替,从而除去两种促性腺激素。对于从小母猪取得的卵母细胞,可以将浓度为1mM的cAMP添加到IVM培养基中。

[0059] 培养基+补充剂2可以如表中所述。优选地,补充剂2包含1mM cAMP和15%(v/v)猪卵泡液(PFF)。

[0060] 在步骤(3)中,可以以任何合适的方式培养至少一个卵母细胞。通常,这将涉及如步骤(2)所述培养至少一个卵母细胞,持续如步骤(2)所述的预定时间段。

[0061] 在步骤(4)中,可以以任何合适的方式用精子(sperm/spermatozoa)使至少一个卵母细胞受精,以产生至少一个受精卵母细胞、囊胚或胚胎。

[0062] 在步骤(4)中,可以将至少一个卵母细胞与精子一起温育任何合适的时间段,以产生至少一个受精卵母细胞、囊胚或胚胎。优选地,预定时间段为约3.5至4小时,但预定时间段可以为约0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5或8小时(或甚至更短或更长时间)。

[0063] 培养基+补充剂3可以如表中所述。优选地,补充剂3包含2mM丙酮酸钠、2mM咖啡因、6mM CaCl₂、13mM NaHCO₃、0.1%BSA和5.5mM葡萄糖。对于从小母猪取得的卵母细胞,还可以包括浓度1mM的cAMP。

[0064] 该方法可以包括准备精子以用于步骤(4)中的受精的步骤。可将采集的精液或采集的稀释精液在管中离心(例如,在1500rpm离心5分钟)以除去上清液。所得的精子团粒

(sperm pellet) 可以任选地用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤并再次离心。所得的精子团粒可以任选地用表中所述的培养基+补充剂3洗涤。除去上清液后, 可以将精子团粒重新悬浮在培养基+补充剂3中。然后可以在使用精子之前将管以45°角放入培养箱中30分钟。精子浓度可以用血球计测定。

[0065] 步骤4中可以使用任何适合数量的精子。这可以取决于卵母细胞的总数量。优选地, 约60,000个精子可以用于对约20-30个卵母细胞进行授精, 比率为大约3000:1。

[0066] 该方法可以包括剥露 (denuding) 至少一个卵母细胞的步骤, 而这可以以任何合适的方式进行。例如, 可通过在少量培养基中反复轻柔地吸移卵母细胞而剥露卵母细胞。剥露可以在培养步骤 (3) 之后进行, 例如在IVF步骤 (4) 之前进行约44小时的成熟培养后进行。

[0067] 在步骤 (5) 中, 可以以任何合适的方式洗涤至少一个受精卵母细胞 (或所得的囊胚或胚胎)。优选地, 在培养基+补充剂4中洗涤至少一个受精卵母细胞。培养基+补充剂4可以如表中所述。优选地, 补充剂4包含15% (v/v) 猪卵泡液 (PFF) 和0.4% BSA。例如, 受精卵母细胞可用培养基+补充剂4洗涤两次。

[0068] 在步骤 (5) 中, 可以以任何合适的方式培养至少一个受精卵母细胞 (或胚胎)。通常, 这将涉及在37°C或38.5°C在培养箱例如二氧化碳培养箱中培养至少一个受精卵母细胞。这可涉及将至少一个受精卵母细胞置于如表中所述的培养基+补充剂4中。

[0069] 在步骤 (5) 中, 可以将至少一个受精卵母细胞 (或胚胎) 培养任何适合的时间段。优选地, 预定时间段为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15天 (或甚至更短或更长时间)。优选地, 预定时间段为约5至9天, 更优选地为7天。

[0070] 在一些实施方案中, 可以在38.5°C在CO₂培养箱中, 在培养基+补充剂4中以每滴约25-30个的组培养胚胎约7天。可以分别在培养开始后的第2天和第7天检查受精卵母细胞的卵裂和囊胚形成。发育成2、4、8个或更多个细胞的胚胎可用于进一步的下游处理。

[0071] 卵母细胞复原、体外成熟、精子制备、体外受精和体外培养的一般技术和方法可见于以下参考文献, 这些文献均通过交叉引用的方式全文并入本文中 (Bagg等人, 2006; Gil等人, 2008; Tanihara等人, 2013; Hossain等人, 2007; Nagai, 1996)。

[0072] 在本发明的范围内, 本文描述的任何特征可以与本文描述的任何个或多个其它特征以任何组合进行组合。

[0073] 本说明书中对任何现有技术的引用不是、也不应视为承认或以任何形式暗示现有技术形成公知常识的一部分。

附图说明1

[0074] 本发明的优选特征、实施方案和变型可以通过以下具体实施方式被了解, 所述具体实施方式为本领域技术人员提供了实施本发明的足够信息。所述具体实施方式不应视为以任何方式限制前述发明内容的范围。具体实施方式将参考以下多个附图:

[0075] 图1A是根据本发明的实施方案的、使用基本上单一的培养基 (M-199) 的简化高通量IVP系统的示意图。

具体实施方式1

[0076] 实施例1-简化的IVP方法, 其基本上使用单一培养基来提高猪胚胎的产量

[0077] 该实施例描述了适用于高通量IVP系统的植入前体外猪胚胎发育的简化方法。

[0078] 材料和方法

[0079] 除非另有说明,否则所有化学品均购自赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific)。通过在每个培养孔中以400 μ l矿物油的覆盖层制备所有体外培养物。在该实施例中使用的基础培养基是M-199。1950年,Morgan首先提出了一种化学定义的细胞培养营养源,而无需使用动物制品和/或组织提取物。使用这种培养基的优点在于其成分多种多样,以支持卵母细胞和胚胎在不同发育阶段的发育。

[0080] 卵母细胞复原和体外成熟

[0081] 从来自附近屠宰场(Highchester Meats Pty Ltd,Gleneagle,澳大利亚)的屠宰的青春前期小母猪和母猪采集卵巢,并于30-38 $^{\circ}$ C,在0.9%NaCl溶液中运送到实验室。从直径2-8mm的卵泡中抽吸卵丘-卵母细胞复合体(COC),并使其在38 $^{\circ}$ C下静置几分钟成为沉积物。将具有均匀卵质和至少两层紧密细胞团的COC在体外成熟(IVM)培养基(M-199)中洗涤两次,并在补充有15%(v/v)猪卵泡液(PFF)、1mM cAMP、15IU/ml人绒毛膜促性腺激素(hCG)(Intervet,荷兰)和30IU/ml孕马血清促性腺激素(PMSG)(Intervet,荷兰)的M-199中洗涤一次。从直径3-6mm的猪浅卵泡中采集PFF。之后,使用0.20 μ m针筒式过滤器将PFF过滤,并在-20 $^{\circ}$ C保存直至使用。将约25-30个卵母细胞在培养皿中置于每滴400 μ l IVM培养基中,并覆盖温石蜡油,然后在38 $^{\circ}$ C在CO₂培养箱中培养22小时。培养22小时后,除去培养基,并替换成含有两种促性腺激素的新鲜IVM培养基,再培养22小时。对于取自小母猪的卵母细胞,将1mM浓度的cAMP添加到IVM培养基中。

[0082] 精子制备和体外受精

[0083] 从附近的AI公司(Premier Genetics,Wacol,澳大利亚)采集稀释的精液,并立即置于约38 $^{\circ}$ C的隔热箱中运送到实验室。将精子轻轻混合,将其倒入2ml离心管中至恰好在管顶部下方,然后在1500rpm离心5分钟,以除去上清液。然后将精子再悬浮于2ml IVF培养基(补充有2mM咖啡因、2mM丙酮酸钠、505mM葡萄糖、0.1%BSA、6mM CaCl₂和26mM NaHCO₃的M-199)中并如前所述通过离心洗涤两次。弃去上清液后,将精子团粒重新悬浮于IVF培养基中。然后在使用精子之前将管以45 $^{\circ}$ 角放置于培养箱中30分钟。使用Neubauer血球计测定精子浓度。使用总共60,000个精子对液滴中的20-30个卵母细胞进行授精,并共同孵育4-6小时以完成受精。

[0084] 体外培养

[0085] 完成IVF后,将受精卵母细胞用体外培养(IVC)培养基(补充有15%猪卵泡液的M-199)洗涤两次。在38.5 $^{\circ}$ C在CO₂培养箱中,在培养皿中,将胚胎以每滴25-30个的组在400 μ l培养基中培养7天。分别在培养开始后的第2天和第7天对卵母细胞的卵裂和囊胚形成进行检查。将发育成2、4、8或更多个细胞的胚胎以2 μ l体积直接转移到200 μ l PCR管中以进行进一步处理。

[0086] 结果

[0087] 表4A示出简化的(一种基本的IVM培养基,M-199)对植入前胚胎发育的影响。

[0088] 表4A.使用含有补充剂的简化IVP系统的体外母猪和小母猪胚胎的逐步平均发育。

卵母细胞来源	卵母细胞数	卵裂(卵母细胞%)	8 细胞及以上(卵母细胞%)	囊胚(卵母细胞%)
[0089] 母猪	545	382 (70.0)	299 (54.8)	224 (41.1)
小母猪	463	247 (53.3)	131 (28.29)	ND (未检测到)
调整了 IVF 培养基中 NaHCO ₃ 、CaCl ₂ 和 BSA 水平后, 胚胎产生发生变化				
小母猪	1240	834 (67.2)	425 (34.3)	ND
平均数	2248	1463 (65.0)	855 (38.0)	ND

[0090] 在母猪和小母猪中均发现了显著水平的胚胎发育, 平均卵裂率为65%。调整IVF培养基中NaHCO₃、CaCl₂和BSA水平后, 胚胎产生发生了变化。卵裂率从平均62%变为67%。与母猪相比, 小母猪的卵裂率较低, 因此, 小母猪的囊胚发育率要低得多, 尽管在大多数情况下, 直到胚泡期才对胚胎进行评估。在所有实验中, 观察到大量的胚胎超过了8细胞阶段, 平均约38%。囊胚的平均发育为约41%, 这仍然与卵裂并通过8细胞阶段的胚胎数一致。

[0091] 在IVF培养基中添加CaCl₂、NaHCO₃和BSA导致更高的卵裂率和随后的发育, 从而使总体胚胎产生更加稳定。

[0092] 表5A中示出常用于体外成熟 (IVM) 培养基中的化学组成。

[0093] 表5A. 用于猪的不同体外成熟培养基的化学组成比较

成分	IVM 培养基(单位为mM)			
	M-199	TCM-199	NCSU-23	mWM

[0095]

NaCl	117.24	116.36	108.73	68.49
KCl	5.33	5.36	4.78	4.78
CaCl ₂	1.80	1.80	1.70	-
Fe (NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.001	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	1.19	1.19
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.014	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.81	0.81	1.19	1.19
NaHCO ₃	26.19	26.19	25.07	25.07
葡萄糖	5.55	5.55	5.55	5.56
谷胱甘肽(还原型)	1.62	-	-	-
酚红, 钠	0.053	-	-	-
乳酸钠	-	-	-	25.20
丙酮酸钠	-	-	-	0.33
乳酸钙	-	-	-	1.71
谷氨酰胺	0.684	0.68	1.0	-
牛磺酸	-	-	7.0	-
亚牛磺酸	-	-	5.0	-
青霉素 G(IU/ml)	-	100	100	100
链霉素(IU/ml)	-	50	50	50
PFF(% v/v)	-	10	10	10
BSA(mg/ml)	-	-	-	-
胱氨酸	0.108	0.57	0.57	0.57
抗坏血酸	2.84	-	-	-
生物素	4.09	-	-	-
右型泛酸钙	2.09	-	-	-
氯化胆碱	0.003	-	-	-
麦角钙化醇	2.51	-	-	-
叶酸	2.26	-	-	-
i-肌醇	2.77	-	-	-
甲萘醌	5.81	-	-	-
烟酸	2.03	-	-	-
烟酰胺	2.04	-	-	-
PABA	3.649	-	-	-
盐酸吡哆醛	1.225	-	-	-
盐酸吡哆醇	1.213	-	-	-
核黄素	2.659	-	-	-
盐酸硫胺素	2.967	-	-	-
维生素 A 醋酸酯	3.048	-	-	-
L-丙氨酸	0.280	-	-	-
L-精氨酸	0.331	-	-	-
L-天冬氨酸	0.225	-	-	-
L-谷氨酸	0.510	-	-	-
甘氨酸	0.666	-	-	-
L-组氨酸	0.104	-	-	-

[0096]	羟基 L-脯氨酸	0.347	-	-	-
	L-异亮氨酸	0.305	-	-	-
	L-亮氨酸	0.458	-	-	-
	L-赖氨酸	0.382	-	-	-
	L-蛋氨酸	0.100	-	-	-
	L-苯丙氨酸	0.151	-	-	-
	L-丝氨酸	0.238	-	-	-
	L-苏氨酸	0.252	-	-	-
	L-色氨酸	0.049	-	-	-
	L-酪氨酸	0.222	-	-	-
	L-缬氨酸	0.213	-	-	-

[0097] 讨论

[0098] 该实施例的主要发现示于表4A中,其中所得囊胚率为约41%,变化范围相当小。不管卵母细胞的来源如何,胚胎的卵裂率都比其它实验室的平均值(约50%)高得多(约65%)。我们相信,这种结果是由于步骤的逐步调整所致,其中每个培养步骤均使用单一的基本普通培养基作为主要作用。本研究还表明,本研究中使用的IVM培养基(M-199及其不同的补充剂)和遵循的步骤非常适合母猪以及小母猪胚胎的IVP,但是对于小母猪可能需要进一步的微调。针对小母猪的一种可能的选项是在卵母细胞IVM培养基中补充cAMP。从成年母猪获取的卵母细胞具有比从小母猪获取的卵母细胞更高的cAMP含量(Bagg等人,2006),并且cAMP处理通过瞬时提高其cAMP含量来增强小母猪卵母细胞的发育能力。在卵母细胞处理期间,精子和卵母细胞都会产生ROS,这可以通过添加碳酸氢盐抵消。我们观察到,当向IVF培养基中进一步补充碳酸氢盐、钙和BSA时,卵裂率和随后的胚胎发育显著提高。

[0099] 尽管有许多不同的专门培养基(TCM-199、NCSU-23、PZM-3、SOF)可用于猪胚胎操作,但很少能产生一致的结果,因此不具再现性。由于大多数实验室通常在4种或5种不同的培养基中处理猪胚胎,因此我们假定这会对卵母细胞/胚胎造成应激(在针对变化的化学环境做调整时),并导致不一致的差的产率。另一方面,M-199培养基是一种广泛使用的细胞培养基,尽管迄今为止它在哺乳动物胚胎培养中,尤其是在猪胚胎培养中的使用是有限的。

[0100] 总之,本研究中使用的猪IVP方法可在商业生产和未来的猪胚胎研究中发挥关键作用。所提出方法的简易性,可有促进其在高通量IVF系统中的应用以及作为IVP实验室的标准。

[0101] 参考文献1

[0102] **Almiñana, C., Gil, M. A., Cuello, C., Roca, J., Vazquez, J. M., Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A., 2005.** Adjustments in IVF system for individual boars: value of additives and time of sperm-oocyte co-incubation. *Theriogenology* 64:1783-1796.

[0103] **Bagg, M. A., Nottle, M. B., Grupen, C. G., Armstrong, D. T., 2006.** Effect of dibutyrylcAMP on the cAMP content, meiotic progression, and developmental potential of in vitro matured pre-pubertal and adult pig oocytes. *Mol Reprod Dev* 73:1326-1332.

- [0104] Fouladi-Nashta,A.A.,Waddington,D.,Campbell,K.H.S.,1998,Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development in vitro.A comparative evaluation of antral follicle culture with other methods.Biol Reprod 59:255-262.
- [0105] Gil,M.A.,Cuello,C.,Parrilla,I.,Vazquez,J.M.,Roca,J.,Martinez,E.A., 2008.Advances in swine in vitro embryo production technologies.Reprod Dom Anim 45:40-48.
- [0106] Kim,J.S.,Cho,Y.S.,Song,B.S.,Wee,G.,Park,J.S.,Choo,Y.K.,Yu,K.,Lee, K.K.,Han,Y.M.,Koo,D.B.,2008.Exogenous dibutyrylcAMP affects meiotic maturation via protein kinase A activation;it stimulates further embryonic development including blastocyst quality in pigs.Theriogenology 69:290-301.
- [0107] Li,R.,Liu,Y.,Pedersen,H.S.,Kragh,P.M.,Callesen,H.,2013.Development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos after removal of zonapellucida.Theriogenology80:58-64.
- [0108] Liu,Y.,Østrup,O.,Li,J.,Vajta,G.,Kragh,P.M.,Purup,S.,Callesen,H., 2011.Cell colony formation induced by Xenopus egg extract as a marker for improvement of cloned blastocyst formation in the pig.Cell Reprogram.13:521-526.
- [0109] Lopes,A.S.,Wrenzycki,C.,Ramsing,N.B.,Herrmann,D.,Niemann,H., **Løvendahl,P.**,Greve,T.,Callesen,H.,2007.Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts.Theriogenology 68:223-236.
- [0110] Somfai,T.,Kikuchi,K.,Onishi,A.,Iwamoto,M.,Fuchimoto,D.,Papp,A.B.,et al.,2003.Meiotic arrest maintained by cAMP during the initiation of maturation enhances meiotic potential and developmental competence and reduces polyspermy of IVM/IVF porcine oocytes.Zygote 11:199-206.
- [0111] Tanihara,F.,Nakai,M.,Kaneko,H.,Noguchi,J.,Otoi,T.,Kikuchi,K., 2013.Evaluation of zonapellucidafunction for sperm penetration during in vitro fertilization in pigs.J Reprod Dev.doi.org/10.1262/jrd.2013-021.
- [0112] Hossain,M.S.,Tareq,K.M.A.,Hamano,K.and Tsujii,H.(2007):The effect of the fatty acids on boar sperm motility,viability and acrosome reaction.Reproductive Medicine and Biology 6,235-239.
- [0113] Nagai T.,1996.In vitro maturation and fertilization of pig oocytes.Anim Reprod Sci,42:153-163.
- [0114] Vajta,G.,Callesen,H.,2012.Establishment of an efficient somatic cell nuclear transfer system for production of transgenic pigs.Theriogenology 77: 1263-1274.
- [0115] 标题2

[0116] 裂解法

[0117] 技术领域2

[0118] 本发明大体涉及在精子存在下选择性裂解卵母细胞、胚母细胞 (blastocyte) / 囊胚、卵子、胚细胞 (embryonic cell) 或胚胎。在优选实施方案中, 本发明涉及在精子存在下选择性地裂解卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎, 从而单独从裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中释放出遗传物质和其它细胞内容物, 同时保持精子完整。

[0119] 背景技术2

[0120] 卵母细胞或胚胎遗传组成的变化可能有多种来源, 因此希望能够识别和表征这些变化。例如, 诸如基因编辑 (规律成簇间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN)) 等技术可用于有意地修改卵母细胞/胚胎基因组, 并且希望能够确认仅进行了预期的基因编辑。精液处理可用于测试化学物质对胚胎的诱变作用, 并且希望能够识别出对基因组所做的任何和所有改变。精液的性别选择处理 (流式细胞仪、微流体装置、抗体处理等) 以及受精卵母细胞/胚胎的性别选择处理会潜在地导致受精卵母细胞/胚胎的遗传修饰, 因此希望能够识别出对基因组所做的任何和所有改变。

[0121] 聚合酶, 尤其是聚合酶链反应 (PCR) 技术已用于识别和表征胚胎的遗传修饰。然而, 当用于该目的时, 该技术遇到了挑战。举例而言, 由于该技术具有高灵敏性, 因此非胚胎 DNA 污染物 (例如来自于精子或上皮细胞) 的存在可容易产生错误的结果。例如, 用于卵母细胞/胚胎的洗涤液、裂解液和悬浮介质会导致 PCR 技术性能不佳或完全抑制该技术, 或引入污染性遗传物质。例如, 卵母细胞/胚胎的过度处理/多步骤处理可导致用于 PCR 扩增的次优遗传物质。

[0122] 如上所述, 在识别和表征胚胎基因组的潜在变化时, 需要仔细排除错误结果的可能性。例如, 错误的结果可能是由于受污染的 DNA 引起、由卵子受精后可能残留 (carried over) 的少量精子 DNA 或雄性体细胞 DNA 所引起。

[0123] 减少 DNA 污染/残留的常规技术包括通过洗涤卵母细胞最高达六或七次来完全去除透明带 (ZP) (Pomp, 1995)。第一次洗涤是在不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水 (DPBS) 中进行的。将卵母细胞转移至谷氏液 (Tyrodes solution) (137mM NaCl、2.7mM KCl、1mM MgCl_2 、1.8mM CaCl_2 、0.2mM Na_2HPO_4 、12mM NaHCO_3 、5.5mM D-葡萄糖) 中, 然后在不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 DPBS 中洗涤四次或更多次。然后在这个阶段储存卵母细胞。在用于 PCR 技术之前, 先用蛋白酶 K 消化卵母细胞过夜, 然后在 98°C 灭活蛋白酶 K 10 分钟 (Tor 2013)。

[0124] 这种多步骤常规技术的缺点在于它是繁琐的, 因为需要在立体显微镜下用细移液管反复拾取卵母细胞, 然后将其置于随后的合适洗涤液中, 等等。该常规技术本身不适合于发展成高通量测定。(好的高通量测定是需要尽可能少的步骤, 而同时又要产生可靠且一致的结果的测定。)

[0125] 选择性裂解是防止污染 DNA 被 PCR 扩增的另一种选择。选择性裂解方法并不新鲜, 已主要用于需要区分受害人 (上皮细胞) 和精子 (犯罪者细胞) 的性侵犯样品中 (Norris, 2007)。目前使用的优选方法是 Gill (1985) 和 Yoshida (1995) 开发的方法的变型。首先将样品用裂解液 (TNE 缓冲液: 10mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM 乙二胺四乙酸盐 (EDTA)、100mM NaCl 和 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 100pg/ml 蛋白酶 K) 在 70°C 处理 1-3 小时以裂解上皮细胞。重复该步骤几次以从基质例如棉签上释放上皮细胞。下一步是使用添加了 0.04M 二硫苏

糖醇 (DTT) 的相同裂解缓冲液, 在 56°C 在振荡水浴中裂解精子 8 小时以上。

[0126] 在高通量体外受精 (HT IVF) 系统中使用此过程的问题在于, 尽管能够选择性裂解卵母细胞, 但用于上皮细胞的 TNE 裂解缓冲液含有 PCR 抑制剂 (Rossen 等人, 1992)。随后需要通过苯酚提取并用 3M 乙酸钠和冰冷的无水乙醇沉淀 DNA 来去除这些物质。此外, 裂解过程可能需要 1-4 小时。

[0127] Qiagen 的单细胞 REPLIg 试剂盒已用于 PCR 的预扩增。然而, 试剂盒中所含的裂解缓冲液含有 DTT 和 KOH, 这两种成分虽然不具有 PCR 抑制性, 但会导致一起的精子发生不必要的裂解。Qiagen 方案要求在 65°C 温育 10 分钟后添加终止溶液。此步骤需要打开管以引入终止溶液的额外操作, 有引入污染物的风险。

[0128] 除遗传方面外, 希望在精子或体细胞存在下选择性裂解卵母细胞还有其它原因。这是因为卵母细胞包含其它目标细胞物质 (例如, 用于下游应用中, 特别是“组学 (Omics)” : 基因组学、转录组学、表观基因组学和蛋白质组学 [参见 Wang 和 Bodovitz, Trends Biotechnol. 2010 June; 28 (6) : 281-290])。与精子或卵母细胞相比, 上皮细胞非常脆弱。裂解体细胞和上皮细胞所用的相对温和的条件并不适用于裂解卵母细胞。

[0129] 发明内容 2

[0130] 在本发明的一个方面中, 发明人已经开发了一种裂解液, 用于在精子存在下选择性地裂解卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎, 并且仅从裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放细胞物质。

[0131] 在本发明的另一方面中, 发明人已经开发了一种裂解液, 用于在精子存在下选择性地裂解卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎, 并且仅从裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放细胞物质, 从而使裂解溶液中释放的细胞物质与下游应用相容。

[0132] 在本发明的又一方面中, 发明人已经开发了一种方法, 其在精子存在下选择性地裂解卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎, 使得来自裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎的细胞物质和裂解液与下游应用相容。

[0133] 根据本发明的第一方面, 提供了一种方法, 其在精子存在下选择性地裂解卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎, 所述方法包括以下步骤:

[0134] 使所述卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎经受裂解液的作用, 以使卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎裂解, 并从卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中释放细胞物质, 但使得精子不被裂解。

[0135] 根据本发明的第二方面, 提供了通过第一方面的方法产生的释放的细胞物质。

[0136] 根据本发明的第三方面, 提供了一种裂解液, 用于在不被所述裂解液裂解的精子的存在下选择性地裂解卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎, 并且从裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放细胞物质, 从而使细胞物质和裂解液与下游应用相容。

[0137] 优选地, “细胞物质”基本上是在不裂解的情况下不会以其它方式被释放的细胞内物质。术语“细胞物质”还包括以其它方式保持膜结合的物质。

[0138] “细胞物质”在其范围内包括遗传物质 (其所有形式, 包括核酸、多核苷酸, 更具体而言, 包括基因组、基因、基因转录物、基因产物和 RNA)、蛋白质物质 (其所有形式, 包括多

肽、蛋白质、肽和氨基酸)、脂质物质(其所有形式,包括脂肪和脂质)和碳水化合物(其所有形式)。

[0139] “细胞物质”在其范围内包括细胞系统中的所有组分或结构。

[0140] 下游应用包括任何和所有基于分子的方法和过程。此类方法和过程可以是定量的、定性的,以选择性表征、修饰、分离或扩增等。下游应用可以是筛选测试或诊断测试,以识别或确认卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞、胚胎或精子的细胞物质的任何一种或多种变化。

[0141] 下游应用可包含使细胞物质经受至少一种外源添加酶(例如基于蛋白质的酶或基于RNA的酶)的作用。

[0142] 下游应用可以用于例如针对基因(基因组学和表观基因组学)、转录物(转录组学)、蛋白质(蛋白质组学)、代谢物(代谢组学)、脂质(脂质组学)或相互作用(相互作用组学)的研究。

[0143] Wang和Bodovitz, Trends Biotechnol. 2010 June; 28(6): 281-290中描述了细胞物质的潜在下游应用,其全部内容通过交叉引用的方式并入本文中。其它潜在的下游应用在本说明书中的其它地方予以描述。

[0144] 术语“与下游应用相容”优选地是指下游应用可以在裂解液本身中进行,或在裂解液进行最小改变的情况下进行。该术语优选是指裂解液不抑制下游应用中使用的一种或多种酶的功能。

[0145] 在本发明的另一方面中,发明人已经开发了一种裂解液,用于在精子存在下选择性地裂解卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,并且仅从裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放遗传物质,从而使裂解缓冲液中释放的遗传物质能够使用聚合酶被选择性地复制。

[0146] 在本发明的又一方面中,发明人已经开发了一种方法,其在精子存在下选择性地裂解卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,使得来自裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎的遗传物质能够在所述裂解液中使用聚合酶被选择性地复制。

[0147] 在本发明的另一方面中,本发明人已经开发了一种方法,该方法只需要对卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎进行很少地处理和洗涤,并且可以通过聚合酶进行复制。这通过在精子存在下有差别地裂解卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,同时保持精子的完整性来完成。然后,可以在下游应用中复制来自单裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎的DNA,以例如产生足够的全基因组DNA,用于各种进一步的下游应用中。在一些实施方案中,该方法对于下游应用例如全基因组扩增、qPCR、微阵列或测序是稳健、一致、灵敏且非抑制性的。

[0148] 根据本发明的第四方面,提供了一种方法,其在精子存在下选择性地裂解卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,使得来自裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎的遗传物质能够使用聚合酶选择性地被复制,所述方法包括以下步骤:

[0149] (1) 使卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎经受裂解液的作用,以使卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎裂解,并从卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中释放遗传物质,但使得精子不被裂解;以及

[0150] (2) 使用聚合酶选择性地复制裂解缓冲液中的释放的遗传物质。

[0151] 根据本发明的第五方面,提供了通过第一方面的方法产生的释放的遗传物质。

[0152] 根据本发明的第六方面,提供了一种裂解液,用于在不被所述裂解液裂解的精子存在下选择性地裂解卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,且从裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放遗传物质,从而使裂解缓冲液中的释放的遗传物质能够使用聚合酶选择性地被复制。

[0153] 卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞、胚胎或精子可以先前已经(有意地或无意地)经过基因处理或诱变或没有经过这些处理。

[0154] 该方法可用作筛选测试或诊断测试的下游应用,以识别或确认卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞、胚胎或精子的遗传物质的任何变化。

[0155] 潜在的用途包括确定测试方案或处理改变由体外受精所产生的转基因动物或受精卵的基因型或对胚胎进行性别鉴别的能力。可以检测的基因包括SRY、1号染色体、12S、GAPDH、ACTB、Y染色体或在对昂贵的动物试验进行进一步处理之前的任何所需的基因产物。下游应用例如全基因组分析(例如微阵列)和种群研究可以使用此方法进行。

[0156] 通过对精子和/或卵母细胞进行如下处理可以带来基因产物的改变或缺失:CRISPR(规律成簇间隔短回文重复序列基因编辑);SMGT(精子介导的基因转移)(Rodriques 2013);TALEN(转录激活因子样效应物核酸酶);阻断精子上停泊位点的抗体;阻断卵母细胞上停泊位点(docking site)的抗体;任何化学物质,例如遮光剂、洗涤剂、滑石粉等;以及可具有诱变作用的化学物质。

[0157] 关于下游应用,可以使用任何合适类型的聚合酶。优选使用DNA聚合酶,但是在某些情况下可以使用RNA聚合酶。合适的DNA聚合酶的实例包括如下DNA聚合酶: ϕ 29DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶、热稳定Taq聚合酶(来自水生栖热菌(*Thermis aquaticus*))(天然或重组)、用于高保真度的Pfu DNA聚合酶(来自激烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*))、当使用多于一组引物时抑制非特异性产物扩增的热启动DNA聚合酶、具有校正活性的高保真聚合酶(Hi-Fi)。引物可以包括多聚胸腺嘧啶(Poly T)(如果靶向真核RNA)、随机六聚体、随机五聚体或随机八聚体。也可以选择具有特定属性的引物,例如具有核酸外切酶抗性或核酸内切酶抗性的引物。

[0158] 实际所使用的聚合酶的理由将取决于要复制的遗传物质,即进一步的下游应用。例如,进一步的下游应用可以是下一代测序、微阵列、单、双或多重PCR、或实时单、双或多重PCR。遗传物质可以进行预扩增以产生充足的全基因组DNA,以用于各种进一步的下游应用。

[0159] 该方法可用于对从单个未受精或受精卵到已发育成2、4、8、16个或更多细胞的胚胎进行裂解和扩增DNA,以用于PCR或实时PCR(qPCR)。优选的,该方法对于下游应用例如多重置换扩增(MDA)、全基因组扩增(WGA)、qPCR、微阵列或测序而言是稳健、一致、灵敏且非抑制性的。

[0160] 从裂解的卵母细胞、囊胚/胚母细胞、卵子、胚细胞或胚胎中释放的遗传物质优选是基因组脱氧核酸(DNA),但是也可以释放其它类型的多核苷酸/核酸,例如核糖核酸(RNA)。

[0161] 该方法可以包括在使卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞、胚胎或精子经受裂解液作用之前,对其进行基因处理的步骤。该方法可以包括在受精之前将精子/精液暴露于化学物质例如诱变剂的步骤。该方法可以包括使卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞、胚胎或精子经受IVF

技术的步骤,这将潜在地导致对遗传物质的修饰。

[0162] 卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞、胚胎或精子可以例如使用基因编辑技术规律成簇间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 进行处理。例如,精子/精液可暴露于化学物质,例如已知或疑似诱变剂中。精液的性别选择处理以及胚胎的性别选择处理可潜在地导致受精卵母细胞、囊胚、卵子或胚胎的遗传修饰。

[0163] 在某些实施方案中,该方法可用于高通量体外受精 (HT-IVF),如下所述:

[0164] • 在新开发的培养基中处理来自猪 (或其它) 卵巢的卵母细胞以增强其成熟 (如本说明书的第一部分中关于IVP所述的)。

[0165] • 用新鲜的、增量的猪 (或其它) 精液使其受精。

[0166] • 在新过程中生长到8-16个细胞,即>65%的卵母细胞成熟并生长 (行业标准为约40%)。

[0167] • 用新裂解液有差别地裂解卵母细胞和残余精液,从而使得卵母细胞DNA可以被提取,同时使精子保持完整。

[0168] • 通过REPLI g试剂盒SC聚合酶 (Qiagen) 使用qPCR扩增卵母细胞DNA。

[0169] • 稀释DNA以通过实时PCR (qPCR) 检测一系列基因型性状。

[0170] • 通过对精子和/或卵母细胞进行如下处理可以带来基因产物的改变或缺失:

[0171] ○CRISPR (规律成簇间隔短回文重复序列基因编辑)

[0172] ○SMGT (精子介导的基因转移) (Rodrigues 2013)

[0173] ○TALEN (转录激活因子样效应物核酸酶)

[0174] ○阻断精子上停泊位点的抗体

[0175] ○阻断卵母细胞上停泊位点的抗体

[0176] ○任何化学物质,例如遮光剂、洗涤剂、滑石粉等

[0177] ○可具有诱变作用的化学物质

[0178] • 用途:

[0179] ○确定测试方案或处理改变基因型的能力

[0180] ○转基因动物

[0181] ○体外受精

[0182] ○胚胎性别鉴别。

[0183] 检测的基因或基因区:SRY、1号染色体、12S、GAPDH、ACTB、Y染色体或在对昂贵的动物试验进行进一步处理之前的任何所需的基因产物。可以使用此方法进行全基因组分析 (例如微阵列) 和种群研究。

[0184] 卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎可以来自人或任何合适类型的动物。动物可以是哺乳动物。动物可以是农畜,例如猪、牛、马、绵羊或山羊。动物可以是伴侣动物,例如狗或猫。动物可以是实验室动物,例如兔子、小鼠或大鼠。

[0185] 可以使用任何合适类型的裂解液。合适的裂解液可具有以下一种或多种类型的成分:盐;裂解酶;去稳定剂 (destabiliser);金属螯合剂;还原剂;洗涤剂;缓冲剂;以及pH调节剂。合适的裂解液的一般特性示于下表1B中。

[0186] 表1B. 合适的裂解液的特性。

[0187]	成分类型	浓度范围(%w/v 或 mM 范围)	具体实例和浓度范围
	盐	10-200 mM NaCl	50 mM NaCl,
	其它成分 糖、EDTA、SDS、蛋白酶 K、二硫苏糖醇(DTT)、脱氧胆酸盐(胆汁盐)、胰蛋白酶、NaOH、KOH、溶菌酶、NaOH、KOH、牛血清白蛋白(BSA)	0.1-1 mM EDTA; 100 pg/ml-0.5 mg/ml 蛋白酶 K; 蔗糖 5-250 mM; DTT 10-40 mM; 胆汁盐 1.5-5 mM、5 µg/ml; NaOH 5-50 mM; KOH 5-50 mM; 溶菌酶 1-3 mg/ml; BSA(0.1-5%)	蔗糖 100 mM
[0188]	洗涤剂	0.001-10%NP40, 非离子型 0.001-10%吐温 20, 非离子型 0.001-10%SDS, 阴离子型 CHAPS 两性离子型 CTAB 0.001-0.01%两性离子型 TRITON X-100 0.001-10%非离子型	0.12% TRITON X-100
	缓冲液	1-250 mM Tris-HCL 10 mM 柠檬酸盐缓冲液 50 mM HEPES, RIPA	10 mM Tris-HCL
	pH	5.4-8.3	7.5

[0189] 通常,裂解液将具有下表2B中所示的特性。

[0190] 表2B. 优选的裂解液的特性

成分类型	浓度范围(%w/v 或 mM 范围)	具体实例和浓度范围
盐	50-150 mM NaCl、KCl、(NaH ₂ PO ₄) ₂ SO ₄	50 mM NaCl
溶解酶 (Lytic Enzyme)	蛋白酶 K 100 pg/ml-20 mg/ml; 溶菌酶 1-3 mg/ml; 透明质酸酶 100 pg/ml-0.5 mg/ml; 胰蛋白酶-EDTA 0.00005-50%	透明质酸酶 10 µg/ml 蛋白酶 K 20 mg/ml。 胰蛋白酶-EDTA 0.0005%
去稳定剂	1.5-25%糖 0.1-5% BSA	蔗糖 100 mM
金属螯合剂	0.1-2 mM EDTA 0.1-2 mM EGTA	
还原剂	以下全部为 1-10 mM: 二硫苏糖醇(DTT) DTE	

	2-巯基乙醇	
[0192] 洗涤剂	0.2-2% NP40, 非离子型 2-10%吐温 20, 非离子型 0.1-2% SDS, 阴离子型 CHAPS 两性离子型 CTAB 0.001-0.01%, 两性离子型 TRITON X-100 0.1-5%, 非离子型	Triton X-100 0.12%
缓冲液	10-150 mM Tris-HCL 10 mM 柠檬酸盐缓冲液 50 mM HEPES, RIPA	100 mM Tris-HCL
pH	5.4-8.3	7.5

[0193] 参见一般参考文献:ALCARAZ,C.,DE DIEGO,M.,PASTOR,M.J.&ESCRIBANO,J.M.1990.Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus.J Vet Diagn Invest,2,191-6。

[0194] 卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞或胚胎可以在裂解液之前悬浮在任何合适类型的溶液中。在一些实施方案中,卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎可以悬浮在培养基例如M-199、水、PBS或者如本说明书中标题为“繁殖方法”的第一部分中所述的其它方式悬浮。它可以悬浮在任何合适的体积中,但该体积通常在微升范围内。

[0195] 在步骤(1)或本文所述的其它类似的方法步骤中,裂解可以发生任何合适的时间段和在任何合适的温度发生。例如,合适的时间段可以是5秒至5小时的任何时间。例如,合适的温度可以是14℃至100℃的任何温度,但优选在约38℃持续10分钟,在55℃持续10分钟,以及在95℃持续5分钟。

[0196] 该方法可以包括将步骤(1)或本文所述的其它类似方法步骤的混合物加热至高温以选择性地活化和失活混合物中存在的酶的步骤。合适的温度可以为14℃至100℃的任何温度。优选温度为约85℃。优选地,将步骤(1)或本文所述的其它类似方法步骤的混合物在约38℃加热10分钟,在55℃加热10分钟,在95℃加热5分钟。

[0197] 在步骤(1)或本文所述的其它类似的方法步骤中,在裂解和失活之后,可以使混合物在冰上冷却直至进行步骤(2)或本文所述的其它类似的方法步骤。

[0198] 在步骤(2)或本文所述的其它类似方法步骤中,条件将取决于一种或多种感兴趣的聚合酶技术,即,进一步的一种或多种下游应用。例如,下游应用可以是下一代测序、微阵列、单、双或多重PCR,或实时单、双或多重PCR。遗传物质可以进行预扩增,以产生充足的全基因组DNA,以用于各种下游应用中。

[0199] 步骤(2)或本文所述的其它类似的方法步骤可用于对从单个未受精或受精卵子到已发育成2、4、8、16个或更多细胞的胚胎进行裂解和扩增DNA,以用于PCR或实时PCR(qPCR)。

[0200] 用于卵母细胞处理、精子处理、体外受精、胚胎处理的一般技术和方法可以参见以下参考文献,每篇参考文献均通过交叉引用的方式全文并入本文中:Fléchon等人,2003;

Bahnak等人,1988;Mao等人,2013;Garcia-Vazque等人,2016;Garcia-Vazquez等人,2015;Hennekens等人,2013;Rodriguez-Martinez,2013;Romar等人,2016;Broekhuijse等人,2012;Lopez Rodriguez等人,2017;Bredbacka等人,1995和Wieczorek等人,2015。

[0201] 用于合适的感兴趣的聚合酶技术的一般技术和方法可以参见以下参考文献,每篇参考文献均通过交叉引用的方式全文并入本文中:Jiang等人,2005;Chen和Kuo,2011;Martin等人,2009;Khamlor等人,2014;Li等人,2011;Bredbacka等人,1995;Hirayama等人,2004;Kirkpatrick和Monson,1993;Pomp等人,1995;以及Torner等人,2013。

[0202] 在本发明的范围内,本文描述的任何特征可以与本文描述的任何个或多个其它特征以任何组合方式进行组合。

[0203] 本说明书中对任何现有技术的引用均不是、也不应视为承认或以任何形式暗示现有技术形成公知常识的一部分。

[0204] 附图说明2

[0205] 本发明的优选特征、实施方案和变型可以通过以下具体实施方式被了解,所述具体实施方式为本领域技术人员提供了实施本发明的足够信息。所述具体实施方式不应视为以任何方式限制前述发明内容的范围。具体实施方式将参考以下多个附图:

[0206] 图1B:Y染色体的扩增图谱,指示阈值和具有Y染色体扩增子的孔。

[0207] 图2B:12S染色体的扩增图谱,指示阈值和具有12S染色体扩增子的孔。

[0208] 图3B:12S染色体和Y染色体(Chr Y)组合的扩增图谱,指示阈值和具有12S染色体和Y染色体扩增子的孔。

[0209] 具体实施方式2

[0210] 实施例1-在精子或精液存在下,胚胎或卵子的有差别的裂解,以用于聚合酶扩增。

[0211] 该实施例描述了将新的裂解缓冲液/溶液用于在精子或精液存在下有差别地裂解胚胎或卵子,以用于PCR扩增。然后通过PCR对来自单独裂解的胚胎或卵子的DNA进行预扩增,以产生充足的全基因组DNA,以用于各种下游应用。

[0212] 这里描述的高通量方法是一种快速的25分钟单管过程,其足够精巧,可以在精子存在下选择性地裂解卵母细胞,同时又足够灵敏,可以对从单个未受精卵子和已经发育成2、4、8、16个或更多细胞的胚胎进行裂解和预扩增DNA。此外,未引入可能抑制预扩增或下游应用的物质。该方法还与单细胞REPLIg试剂盒以及其它qPCR应用相容。

[0213] 材料和方法:

[0214] 预扩增

[0215] 将单个受精胚胎(两个或多个细胞阶段)+培养基以2 μ l体积转移至200 μ l PCR管中。加入表2B中所示的裂解液/缓冲液(4 μ l),在38 $^{\circ}$ C加热10分钟,在55 $^{\circ}$ C加热10分钟,在95 $^{\circ}$ C加热5分钟,然后在冰上冷却,其中所述裂解液/缓冲液由50mM NaCl、10 μ g/ml透明质酸酶、0.0005%胰蛋白酶-EDTA、20mg/ml蛋白酶K、100mM蔗糖、在100mM Tris-HCL(pH 7.5)中的0.12%Triton X-100组成。将由7.25 μ l REPLIg sc反应缓冲液和0.5 μ l REPLIg sc聚合酶组成的REPLIg反应混合物(master mi)(7.75 μ l)直接添加到同一管中的裂解细胞中。将管充分涡旋、旋转减慢以收集管底部的所有物质,并在30 $^{\circ}$ C温育8小时,然后在65 $^{\circ}$ C温育3分钟以使sc聚合酶变性。每次运行的对照包括未受精卵子、无模板对照、1 μ l精液和无试剂对照。

[0216] 预扩增的全基因组DNA此时可以用于多种应用中,例如PCR、qPCR或微阵列。

[0217] 裂解的卵母细胞和基因组物质也可以直接用作PCR、实时PCR的模板。向裂解物的总体积中加入九(9) μ l 反应混合物(由2XTaqMan基因表达反应混合物(Life Technologies)、Y染色体正向和反向引物各0.4 μ M、0.25 μ M Y染色体FAM探针、12S染色体或1号染色体正向和反向引物各0.4 μ M,以及0.25 μ M 1号染色体或12S染色体(Martin 2009)VIC探针组成)。12S染色体用作内部对照。使用以下条件进行试验:50 $^{\circ}$ C持续2分钟,接着95 $^{\circ}$ C持续10分钟,然后进行以下40个循环:95 $^{\circ}$ C持续15秒,接着60 $^{\circ}$ C持续60秒。除了用于预扩增的对照孔(未受精卵子、无模板对照(NTC)、1 μ l精液和无试剂对照)外,还添加了其它基因组DNA(gDNA)和NTC。参见表3B。

[0218] 实时PCR(qPCR)

[0219] 将预扩增的scDNA以1/100稀释,并将1 μ l在10 μ l PCR反应中用作模板。反应混合物,由2XTaqMan基因表达反应混合物(Life Technologies)、Y染色体正向和反向引物各0.4 μ M、0.25 μ M Y染色体FAM探针、12S染色体或1号染色体正向和反向引物各0.4 μ M以及0.25 μ M的1号染色体或12S染色体(Martin 2009)VIC探针组成。12S染色体用作内部对照。使用以下条件进行试验:50 $^{\circ}$ C持续2分钟,接着95 $^{\circ}$ C持续10分钟,然后进行以下40个循环:95 $^{\circ}$ C持续15秒,接着60 $^{\circ}$ C持续60秒。除了用于预扩增的对照孔(未受精卵子、无模板对照(NTC)、1 μ l精液和无试剂对照)外,还添加了其它基因组DNA(gDNA)和NTC。参见表3B。

[0220] 表3B. PCR引物/探针

12S				
	序列	Tm	GC%	扩增子
正向引物 (SEQ ID NO.366)	CACCCTCCTCAAGCATGTAGTA ATAA	59	42	86 bp
反向引物 (SEQ ID NO.367)	GCTTACCTTGTTACGACTTGTC TCTTC	59	44	
探针 (SEQ ID NO.368)	CTATATTCAATTACACAACCATG	69	30	
1号染色体				
	序列	Tm	GC%	扩增子
正向引物 1 (SEQ ID NO.369)	TGCCACACAAGGCATATTCTG	58	48	64 bp
反向引物 1 (SEQ ID NO.370)	CAACTCCAAACGTGCTCTACTT CA	59	46	
探针 1	ATCCGCCTCCTCC	68	69	
Y染色体				
	序列	Tm	GC%	扩增子
正向引物 2 (SEQ ID NO.371)	AATCCACCATACCTCATGGACC	70	50	
反向引物 2 (SEQ ID NO.372)	GCAGGAGGATACAGGAGAAA			
探针 2 (SEQ ID NO.373)	ACTTTCTTGGGAGAGCAC			

[0221]

[0222] 结果

[0223] 为了使试验结果作为正确的被接受,未受精的卵子对于Chr 1或12S应具有阳性信号,而缺少Chr Y信号。预期精液、无模板和无试剂对照呈阴性反应(无Chr 1、12S或Chr Y信号)。基因组DNA对Chr Y和Chr 1或12S均应呈阳性。Ct值<35.5被认为是阳性,如果Ct值>35.5,则结果作为阴性而不被理会。管中无扩增子,或缺少12S且存在Chr Y,表示扩增失败。

[0224] 图1B示出了Y染色体的扩增图谱,指示阈值和具有Y染色体扩增子的孔。图2B示出12S的扩增图谱,指示阈值和对12S染色体呈阳性的孔。图3B示出了12S染色体和Chr Y组合的扩增图谱,指示阈值和具有12S染色体和Chr Y扩增子的孔。

[0225] 表4B中示出来自用处理过的精液受精的卵母细胞的数据。目标基因是12S和Chr Y,其可以有效地对受精卵母细胞进行性别鉴定。对照组(n=8)有58%的雌性与42%的雌性;用管顶部的精液受精的卵母细胞(n=16)有84%的雌性和16%的雄性。用管底部的精液受精的卵母细胞(n=8)有75%雌性和25%雄性。

[0226] 表4B.来自用处理过的精液受精的卵母细胞的数据的实例。检测到两个基因、12S、以及内部对照和Chr Y。这两个结果的组合被用来确定胚胎的性别。

[0227]

孔	样品名称	目标名称	12S	ChrY
A1	gDNA	12S	1	1
A1	gDNA	Chr Y		
B1	NTC	12S	0	0
B1	NTC	Chr Y		
C1	精液	12S	0	0
C1	精液	Chr Y		
D1	UFO	12S	1	0
D1	UFO	Chr Y		
E1	NTCrep	12S	0	0
E1	NTCrep	Chr Y		
F1	C1	12S	1	0
F1	C1	Chr Y		
G1	C2	12S	1	1
G1	C2	Chr Y		
H1	C3	12S	1	1
H1	C3	Chr Y		
A2	C4	12S	1	1
A2	C4	Chr Y		
B2	C5	12S	1	1
B2	C5	Chr Y		
C2	C6	12S	1	0
C2	C6	Chr Y		
D2	C7	12S	1	0
D2	C7	Chr Y		
E2	C8	12S	0	1
E2	C8	Chr Y		
			7	5
			%雌性	% 雄性
		对照	58.33333	41.66667
F2	T1	12S	1	0
F2	T1	Chr Y		
G2	T2	12S	1	0
G2	T2	Chr Y		

[0228]

H2	T3	12S	1	0
H2	T3	Chr Y		
A3	T4	12S	1	0
A3	T4	Chr Y		
B3	T5	12S	1	0
B3	T5	Chr Y		
C3	T6	12S	1	1
C3	T6	Chr Y		
D3	T7	12S	1	0
D3	T7	Chr Y		
E3	T8	12S	1	0
E3	T8	Chr Y		
F3	T9	12S	1	1
F3	T9	Chr Y		
G3	T10	12S	1	0
G3	T10	Chr Y		
H3	T11	12S	1	0
H3	T11	Chr Y		
A4	T12	12S	1	0
A4	T12	Chr Y		
B4	T13	12S	1	0
B4	T13	Chr Y		
C4	T14	12S	1	1
C4	T14	Chr Y		
D4	T15	12S	1	0
D4	T15	Chr Y		
E4	T16	12S	1	0
E4	T16	Chr Y		
			16	3
			% 雌性	% 雄性
		顶部	84.21053	15.78947
F4	B1	12S	1	1
F4	B1	Chr Y		
G4	B2	12S	1	1
G4	B2	Chr Y		
H4	B3	12S	1	0
H4	B3	Chr Y		
A5	B4	12S	0	0
A5	B4	Chr Y		
B5	B5	12S	1	0
B5	B5	Chr Y		
C5	B6	12S	0	0
C5	B6	Chr Y		
D5	B7	12S	1	0
D5	B7	Chr Y		
E5	B8	12S	1	0
E5	B8	Chr Y		
F5	稀释液	12S	0	0

	F5	稀释液	Chr Y		
				6	2
[0229]				% 雌性	% 雄性
			底部	75	25

[0230] 讨论

[0231] Chr 1或12S的检测指示仅来自未受精卵子的信号。对于精液，阴性反应(没有Chr 1、12S或Chr Y信号)表明精液样品没有裂解，因此预期受精卵子孔中任何可能残留的精液均无基因贡献。Chr 1和12S是内部对照，因此即使存在Chr Y扩增子的情况下，该扩增子的缺失也作为扩增失败不理睬。

[0232] 基因组DNA对12S和Chr Y均呈阳性，而NTC、精液和来自REPLIg的NTC均未检测到DNA，由任何扩增子的缺失可见一斑。正如从猪基因组物质所预期的那样，未受精的卵母细胞对照(UFO)对12S呈阳性，但是未检测到本可能由意外裂解的精液产生的Chr Y。将该结果解释为“雌性”。

[0233] 这种高通量体外受精(HT IVF)方法可以有多种应用。参见图4B。卵子可以通过用SMGT(精子介导的基因转移)(Rodriques 2013)、流式细胞术、添加抗体或任何化学物质例如遮光剂、洗涤剂、滑石粉或疑似或已知的诱变剂处理的精液进行受精。在本实施例中，可以在单个基因例如Chr Y上测试对(在发生受精时可以转移的)精液的处理的影响。由于该方法使用全基因组扩增，因此可以确定精液处理对后代全基因组的影响。此外，由于多个卵母细胞可以接受相同的处理，因此可以确定对后代整个种群的影响。

[0234] 为了达到相同的效果，未经处理的精液可用于已通过诸如CRISPR(规律成簇间隔短回文重复序列(基因编辑))或TALEN(转录激活因子样效应物核酸酶)等技术进行基因处理的卵子上。可以在单个胚胎或胚胎群组上测试将抗体或化学物质例如遮光剂、去污剂、滑石粉或疑似或已知的诱变剂添加到卵子中的作用。

[0235] 参考文献2

[0236] 专利US 20160222375 A1, “Method, apparatus and kit for human identification using polymer filter means for separation of sperm cells from biological samples that include other cell types(用于使用聚合物过滤器装置从包括其它细胞类型的生物样品中分离出精细胞的人类识别的方法、装置和试剂盒)”

[0237] 专利EP 2 284 256A2, “Sperm cell insemination samples having selectably controlled sperm cell fertility characteristics produced through entrainment in a fluid stream having correspondingly selectably adjustable flow characteristics and methods of assessing comparative of sperm cell insemination sample fertility(通过在具有相应可选择性、可调节性流动特性的流体流中雾沫夹带所产生的具有可选择性控制的精细胞生育特性的精细胞授精样品，以及比较精细胞授精样品生育力的评估方法)”

[0238] 专利US 6,548,741 B2, “DEVELOPMENTAL COMPETENCE FOR ASSISTED REPRODUCTION AND NUCLEAR TRANSFER IN PIGS(用于猪体内辅助繁殖和核转移的发育能力)”

- [0239] 美国专利US 20150232917A1,“Differential lysis with aid of Alkali and pressure(借助碱和压力的差别化裂解)”
- [0240] Gill,Peter,Jeffreys,Alec J and Werrett,David J.(1985)Forensic application of DNA ‘fingerprints’.Nature Volume:318Issue:6046Pages:577-579
- [0241] Mao,Shihong,Goodrich,Robert J.,Hauser,Russ,Schrader,Steven M.,Chen,Zhen and Krawetz,Stephen A.(2013)Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling.Systems biology in reproductive medicine.Volume:59Issue:5Pages:287-295
- [0242] Martín,Irene,García,Teresa,Fajardo,Violeta,Rojas,María,Pegels,Nicolette,Hernández,Pablo E,González,Isabel and Martín,Rosario.(2009)SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs.Meat Science Volume:82Issue:2Pages:252-259
- [0243] Norris,Jessica V.,Manning,Kate,Linke,Sarah J.,Ferrance,Jerome P.and Landers,James P.Year:(2007)Expedited,Chemically Enhanced Sperm Cell Recovery from Cotton Swabs for Rape Kit Analysis.Journal of Forensic Sciences Volume:52 Issue:4 Pages:800-805
- [0244] Pomp,D,Good,B A,Geisert,R D,Corbin,C J and Conley,A J.(1995)Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or-11 pig embryos.Journal of animal science.Volume:73 Issue:5 Pages:1408-1415
- [0245] Rodriguez-Martinez,Heriberto.(2013)Sperm biotechnologies in domestic species:state of the art.Animal Reproduction Volume:10 Pages:268-276 Rossen,Lone,Nørskov,Pernille,Holmstrøm,Kim and Rasmussen,Ole F.(1992)Inhibition of PCR by components of food samples,microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions.International Journal of Food Microbiology.Volume:17 Issue:1 Pages:37-45
- [0246] Torner,Eva,Bussalleu,Eva,Briz,M.Dolors,Gutiérrez-Adán,Alfonso and Bonet,Sergi.(2013)Sex determination of porcine embryos using a new developed duplex polymerase chain reaction procedure based on the amplification of repetitive sequences.Reproduction,Fertility and Development.Volume:25 Issue:2 Pages:417-425
- [0247] Yoshida,Kanako,Sekiguchi,Kazumasa,Mizuno,Natsuko,Kasai,Kentaro,Sakai,Ikuko,Sato,Hajime and Seta,Sueshige(1995);The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen.Forensic Science International,Volume:72,Issue 1,Pages 25-33
- [0248] BAHNAK,B.R.,WU,Q.Y.,COULOMBEL,L.,DROUET,L.,KERBIRIOU-NABIAS,D.&MEYER,D.1988.A simple and efficient method for isolating high molecular weight DNA

from mammalian sperm. *Nucleic Acids Research*, 16, 1208–1208.

[0249] BREDBACKA, P., **KANKAANPÄÄ**, A. & PEIPPO, J. 1995. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. *Theriogenology*, 44, 167–176.

[0250] BROEKHUIJSE, M. L. W. J., FEITSMA, H. & GADELLA, B. M. 2012. Artificial insemination in pigs: predicting male fertility. *Veterinary Quarterly*, 32, 151–157.

[0251] CHEN, Y.-H. & KUO, Y.-H. 2011. Evaluation of different lysis buffers for improving resolution in proteomic analysis of porcine spermatozoa Yu-Hui Chen (, You-Hai Kuo (2), Meng-Ting Chung (, Yu-Fang Chiu (and San-Yuan Huang. *J. Chin. Soc. Anim. Sci*, 40, 183–189.

[0252] **FLÉCHON**, J. E., DEGROUARD, J., **KOPEČNÝ**, V., PIVKO, J., PAVLOK, A. & MOTLIK, J. 2003. The extracellular matrix of porcine mature oocytes: Origin, composition and presumptive roles. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 1, 124–124.

[0253] GARCIA-VAZQUEZ, F. A., GADEA, J., MATAS, C. & HOLT, W. V. 2016. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J Androl*, 18, 844–850.

[0254] GARCIA-VAZQUEZ, F. A., HERNANDEZ-CARAVACA, I., MATAS, C., SORIANO-UBEDA, C., ABRIL-SANCHEZ, S. & IZQUIERDO-RICO, M. J. 2015. Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract. *J Reprod Dev*, 61, 407–13.

[0255] GILL, P., JEFFREYS, A. J. & WERRETT, D. J. 1985. Forensic application of DNA ‘fingerprints’. *Nature*, 318, 577–579.

[0256] HENNEKENS, C. M., COOPER, E. S., COTTON, R. W. & GRGICAK, C. M. 2013. The effects of differential extraction conditions on the premature lysis of spermatozoa. *J Forensic Sci*, 58, 744–52.

[0257] HIRAYAMA, H., KAGEYAMA, S., MORIYASU, S., SAWAI, K., ONOE, S., TAKAHASHI, Y., KATAGIRI, S., TOEN, K., WATANABE, K., NOTOMI, T., YAMASHINA, H., MATSUZAKI, S. & MINAMIHASHI, A. 2004. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, 62, 887–896.

[0258] JIANG, Z., ZHANG, X., DEKA, R. & JIN, L. 2005. Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification. *Nucleic Acids Research*, 33, e91–e91.

[0259] KHAMLOR, T., PONGPIACHAN, P., SANGSRITAVONG, S. & CHOKESAJJAWATEE, N. 2014. Determination of Sperm Sex Ratio in Bovine Semen Using Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction. *Asian-Australas J Anim Sci*, 27, 1411–6.

[0260] KIRKPATRICK, B. W. & MONSON, R. L. 1993. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98, 335–340.

- [0261] LI,C.,SUN,Y.,YI,K.,LI,C.,ZHU,X.,CHEN,L.&ZHOU,X.2011.Detection of the SRY Transcript and Protein in Bovine Ejaculated Spermatozoa.Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,24,1358-1364.
- [0262] LOPEZ RODRIGUEZ,A.,VAN SOOM,A.,ARSENAKIS,I.&MAES,D.2017.Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen.Porcine Health Management,3,15.
- [0263] MAO,S.,GOODRICH,R.J.,HAUSER,R.,SCHRADER,S.M.,CHEN,Z.&KRAWETZ,S.A.2013.Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling.Systems biology in reproductive medicine,59,287-295.
- [0264] MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., ROJAS, M., PEGELS, N., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I. & MARTÍN, R. 2009. SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. Meat Science, 82, 252-259.
- [0265] POMP, D., GOOD, B.A., GEISERT, R.D., CORBIN, C.J. & CONLEY, A.J. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or-11 pig embryos. Journal of animal science, 73, 1408-1415.
- [0266] RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2013. Sperm biotechnologies in domestic species: state of the art. Anim Reprod, 10, 268-276.
- [0267] ROMAR, R., FUNAHASHI, H. & COY, P. 2016. In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. Theriogenology, 85, 125-34.
- [0268] TORNER, E., BUSSALLEU, E., BRIZ, M.D., GUTIÉRREZ-ADÁN, A. & BONET, S. 2013. Sex determination of porcine embryos using a new developed duplex polymerase chain reaction procedure based on the amplification of repetitive sequences. Reproduction, Fertility and Development, 25, 417-425.
- [0269] TRIANA, L.R., BABCOCK, D.F., LORTON, S.P., FIRST, N.L. & LARDY, H.A. 1980. Release of Acrosomal Hyaluronidase Follows Increased Membrane Permeability to Calcium in the Presumptive Capacitation Sequence for Spermatozoa of the Bovine and Other Mammalian Species. Biology of Reproduction, 23, 47-59.
- [0270] WIECZOREK, J., KOSENIUK, J., MANDRYK, I. & PONIEDZIALEK-KEMPNY, K. 2015. Piglets born after intrauterine laparoscopic embryo transfer. Pol J Vet Sci, 18, 425-31.
- [0271] 标题3
- [0272] 用于性别选择的单克隆抗体
- [0273] 技术领域3

[0274] 本发明涉及一种与携带Y染色体的精子特异性结合的单克隆抗体,以及使用该抗体进行性别特异性精子选择的方法。在一个实施方案中,本发明涉及一种与雄性精细胞的精子表面蛋白DBY/DEAD特异性结合的单克隆抗体。在另一实施方案中,本发明涉及在人工授精之前采集和处理含精子的精液,以增加获得雌性后代的可能性的方法。

[0275] 背景技术3

[0276] 哺乳动物后代的性别由精子(精子)细胞决定。带有X染色体的精子(“雌性精细胞”)在受精后会产生雌性(XX)后代,而带有Y染色体的精子(“雄性精细胞”)在受精后会产生雄性(XY)后代。

[0277] 当雄性或雌性精细胞穿透卵时,发生受精。与卵的结合主要是由精子表面蛋白介导的。这些蛋白质是独特、细胞特异性的、具有免疫原性且可被抗体接近。雌性和雄性精细胞的表面蛋白的所有组成成分不同。雄性精细胞特有的表面蛋白包括MEA 1、MEA 2、SRY、TSPY和DBY/DEAD。参见例如WO 2008/067651和US 2009/0208977,其通过引用方式并入本文中。

[0278] “性别选择”是有目的地选择雄性或雌性后代的能力,多年来在畜牧业中一直备受追捧。具体而言,已经获得选择雌性猪和牛后代的能力,并且已经提出了不同类型的技术。下面提出了一些较早提出的技术,这些技术在靶向哺乳动物精子(“精细胞”)表面上的性别特异性表位的抗体(多克隆、单克隆或部分)方面具有共性。

[0279] 美国专利3,687,806描述了与雄性或雌性精细胞反应的抗体的用途,并利用凝集步骤将结合的抗体与未受影响的抗体分离。

[0280] 美国专利4,191,749描述了使用与固相免疫吸附剂物质偶联的雄性特异性抗体来选择性地结合雄性精细胞,而雌性精细胞保持未结合。

[0281] 美国专利5,021,244描述了将针对特定膜蛋白的抗体用于产生富含雄性或雌性精细胞的亚群。

[0282] 美国专利6,153,373和6,489,092描述了将与磁性颗粒偶联的抗体用于分离雄性和雌性精细胞。

[0283] 美国专利申请US 2018/0201667描述了一种用于牛精液的抗体,该抗体在经受流式细胞术时分离雄性和雌性精细胞。

[0284] 加拿大专利申请CA 2610295描述了一种通过上游法和流式细胞术分离雄性和雌性公猪精细胞的多克隆兔抗体。

[0285] 然而,这些技术各有缺点,包括不能产生足够的可再现的性别选择结果。

[0286] 具体实施方式3

[0287] 发明人已经开发了能够与雄性精细胞(精子)选择性结合的抗体。发明人已经开发了一种处理精子并将雄性精细胞与雌性精细胞分离的方法。发明人已发现,在用抗体处理后,有活力的雌性精细胞可用于在哺乳动物中进行人工授精并产生雌性后代。因此,该方法通过使用抗体处理的精液进行人工授而精增加产生期望性别的哺乳动物后代的可能性。

[0288] 常规方法包括以下步骤:从雄性供体(例如,经过证明的人工授精公牛或公猪)采集精液,并以一定比例向精液中添加抗体,从而使得精液(即,“处理过的精液”)内或来自精液(即,“处理过的精液”)的携带不期望的雄性精细胞的精子能够灭活、凝集、去除或死亡。然后哺乳动物可以用处理过的精液进行人工授精以产生雌性后代。

[0289] 根据本发明的第一方面,提供了一种与哺乳动物雄性精子(雄性精子)的表面蛋白特异性结合和/或针对该表面蛋白产生的单克隆抗体或其片段。

[0290] 该抗体是非天然存在的。该抗体通过重组方式产生。抗体可以是任何合适的形式,例如分离、纯化或基本上纯化的形式。

[0291] 本文所用的术语“单克隆抗体”和“多种单克隆抗体”是指单一分子组成的抗体的制剂。单克隆抗体对靶抗原的特定表位表现出单一的结合特异性和亲和力。

[0292] 本文的“抗体”应解释为涵盖含有具备所需特异性的结合结构域的任何特异性结合因子。因此,该术语涵盖均质抗体片段、其衍生物和人源化抗体,以及抗体的功能等同物和同源物,并且还包括具有抗原结合结构域的任何天然或合成的多肽。抗体的实例是免疫球蛋白亚型(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)及其亚型和亚类;它还可以是包含抗原结合结构域的片段,例如Fab、scFv、Fv、dAb和Fd;以及双抗体。还包括与另一多肽融合并包含抗原结合结构域的嵌合分子或其等同物。

[0293] 根据本发明的单克隆抗体可以是例如单价或单链抗体、双链抗体、嵌合抗体、人源化抗体以及上述抗体的衍生物、功能等同物和同源物,并且可以进一步包括抗体片段以及包含抗原结合结构域的任何多肽。

[0294] 抗体可以通过多种方式进行修饰,可以使用DNA重组技术产生保留原始抗体特异性的其它抗体或嵌合分子。该技术可以将编码抗体的免疫球蛋白可变结构域或CDR的DNA引入不同免疫球蛋白的恒定结构域或恒定结构域+框架区中。可以对杂交瘤或产生抗体的其它细胞进行遗传突变或其它改变,这可能改变或不改变所产生抗体的结合特异性。

[0295] 除了重链和轻链中的高变结构域CDR1、CDR2和CDR3以及接头序列以外,根据本发明的单克隆抗体的其余部分是框架区。只要不影响结合所需的三维结构,可以用其它序列代替框架区。抗体特异性的分子基础主要来自其高变结构域CDR1、CDR2和CDR3,它们是与抗原结合的关键位置。为了保持优选的结合特异性,应尽可能保留CDR序列。但是,可能有必要改变一些氨基酸以优化结合特异性。本领域技术人员可以通过标准实践来实现该目标。

[0296] 靶抗体可以被入源化。一般而言,入源化抗体是通过在亲本抗体的框架区内进行氨基酸取代所修饰的抗体,并且与亲本抗体相比,入源化抗体具有较低的免疫原性。可以使用本领域众所周知的许多技术使抗体入源化。一般而言,这类入源化方法包括通过比较能够结合相同抗原的抗体序列来识别合适的位点,以及用在相似氨基酸的相同位点处的不同氨基酸取代所述位点上的氨基酸。根据这些方法,将亲本抗体的氨基酸序列与其它相关联抗体进行比较(例如序列比对),从而识别耐变异位置。一般将亲本抗体的可变结构域的氨基酸序列与人抗体数据库中的氨基酸序列进行比较,并选择具有与亲本抗体相似的氨基酸序列的入源化抗体。比较亲本抗体和入源化抗体的序列(例如序列比对),并将亲本抗体的一个或多个耐变异位置处的氨基酸用人源化抗体中相应位置处的氨基酸取代。

[0297] 上面讨论的耐变异位置的替换方法可以容易地与任何已知的人源化方法组合,并且可以容易地应用于产生包含CDR的入源化抗体,所述抗体的CDR在被修饰的同时忠于(loyal)亲本抗体的CDR。因此,本发明进一步提供了包含来自亲本抗体的修饰形式的多个CDR的入源化单克隆抗体。

[0298] 抗体可以通过多种方式修饰,可以使用DNA重组技术产生保留原始抗体特异性的其它抗体或嵌合分子。该技术可以将编码免疫球蛋白可变结构域或抗体的CDR的DNA引入不

同免疫球蛋白的恒定结构域或恒定结构域+框架区中。也可以对产生抗体的杂交瘤或其它细胞进行遗传突变或其它改变,这可以改变或不改变产生的抗体的结合特异性。

[0299] 本发明中使用的单克隆抗体也可以通过杂交瘤方法来制备。由于可以通过本领域技术人员已知的常规方法获得编码根据本发明的人源化抗体的DNA序列,例如人工合成本发明公开的氨基酸序列或PCR扩增,因此所述序列也可以用重组DNA方法和本领域已知的多种方法连接到合适的表达载体。最后,在适于表达根据本发明的抗体的条件下,培养并转化获得的宿主细胞,然后本领域技术人员采用众所周知的常规分离和纯化方法来纯化根据本发明的单克隆抗体。

[0300] 在制备单克隆抗体时,其可用本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法进行纯化,例如层析法(例如离子交换层析法、亲和层析法,特别是通过蛋白A对特定抗原的亲和层析法,以及其它柱层析法)、离心、溶解度差异或任何其它纯化蛋白质的标准技术。在许多实施方案中,抗体从细胞被分泌到培养基中,然后通过收集培养基并纯化获得抗体。

[0301] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文可互换使用。这些术语是本领域技术人员众所周知的,并且具体地是指由一种或多种能够与抗原特异性结合的多肽组成的蛋白质。抗体的一种形式构成抗体的基本结构单元,即四聚体。它由两对完全相同的抗体链组成,每一对都有轻链和重链。在每对抗体链中,轻链和重链的可变结构域连接在一起以负责与抗原结合,而恒定结构域负责抗体的效应子功能。

[0302] 目前已知的免疫球蛋白多肽包含 κ 和 λ 轻链,以及 α 、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ 、 ϵ 和 μ 重链或它们的其它等同物。免疫球蛋白“轻链”(约25kDa或约214个氨基酸)在其整个长度上包含由位于NH₂-端的约110个氨基酸组成的可变结构域,以及位于COOH-端的 κ 或 λ 恒定结构域。类似地,免疫球蛋白“重链”(约50kDa或约446个氨基酸)在其整个长度上包含可变结构域(约116个氨基酸)和一个重链恒定结构,例如 γ (约330个氨基酸)。

[0303] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”包含任何同种型抗体或免疫球蛋白;或仍与抗原特异性结合的抗体片段,包括但不限于Fab、Fv、scFv和Fd片段;嵌合抗体;人源化抗体;单链抗体;以及具有抗体和非抗体蛋白的抗原结合部分的融合蛋白。所述术语进一步包含Fab'、Fv、F(ab')₂和/或能够与抗原特异性结合的其它抗体片段和单克隆抗体。

[0304] 抗体也可以以多种形式存在,例如,包含Fv、Fab和(Fab')₂以及双功能混合抗体(例如,Lanzavecchia等人,Eur. J. Immunol, 1987;17, 10),以及以单链形式存在(例如Huston等人,Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A., 1988;85, 5879和Bird等人,Science, 1988;242, 423,其在这里作为参考被引用)。免疫球蛋白的重链或轻链的可变结构域由三个高变结构域(也称为“互补决定区”或CDR)组成。这些高变结构域由框架区(FR)隔开。FR和CDR的范围已被精确地定义(参见“Sequences of Proteins of Immunological Interest(具有免疫学意义的蛋白质序列)”,E. Kabat等人,U.S. Department of Health and Human Services, 1991)。本文讨论的所有抗体的氨基酸序列通过参考Kabat系统来分类。相同物种的不同轻链和重链FR序列相对保守。抗体FR用于定位和校准CDR。CDR主要负责与抗原表位结合。

[0305] 嵌合抗体是具有构造的重链和轻链基因的抗体,特别是具有经基因工程改造并属于不同物种的可变结构域和恒定结构域基因的抗体。例如,将小鼠单克隆抗体基因的可变结构域片段连接至人抗体的恒定结构域片段,例如 γ 1和 γ 3。嵌合抗体也可以使用其它哺乳动物物种的基因。

[0306] 术语“人源化抗体”和“人源化免疫球蛋白”具有相同的含义。与抗体的非人源化形式相比,其人源化抗体通常降低人宿主中的免疫反应。

[0307] 应当理解,根据本发明设计和生产的抗体可以替代一些保守氨基酸,这些氨基酸对抗原结合或抗体的其它功能基本上没有影响。换句话说,氨基酸可以以以下组合相互替换:gly和ala;val、ile和leu;asp和glu;asn和gln;ser和thr;lys和arg;phe和tyr。不在同一组中的氨基酸是“实质上不同”的氨基酸。

[0308] 在一些实施方案中,抗体与其靶点之间的亲和力由Kd(解离常数)表示,其低于 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或约 10^{-12} M,或更低。

[0309] 抗体的重链或轻链的“可变结构域”是在所述链的N末端的成熟区域。所有结构域、CDR和残基编号均通过序列比对并基于现有结构知识进行定义。基于Chothia和其他人所述(Chothia, Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain(免疫球蛋白可变结构域序列中的结构决定因素). J Mol Biol. 1998; 278, 457)进行FR和CDR残基的确定和编号。

[0310] VH是抗体重链的可变结构域。VL是抗体轻链的可变结构域,其可以包含 κ 和 λ 同种型。K-1抗体具有 κ -1同种型,而K-2抗体具有 κ -2同种型,且V λ 是可变 λ 轻链。

[0311] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用。它们两者均指任何长度的聚合氨基酸,其可包含编码和非编码氨基酸、化学或生物化学上修饰或衍生的氨基酸以及具有修饰的肽骨架的多肽。所述术语包括融合蛋白,包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白;具有异源和同源前导序列的融合蛋白,其具有或不具有N-末端蛋氨酸残基;具有免疫标记的蛋白质;具有可检测融合伴侣的融合蛋白,例如,可用作融合伴侣的融合蛋白,包括荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶、荧光素等。举例来说,融合伴侣氨基酸序列可有助于检测和/或纯化分离的融合蛋白。非限制性实例包括金属结合(例如,多组氨酸)融合伴侣、麦芽糖结合蛋白(MBP)、蛋白A、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、荧光蛋白序列(例如,GFP)、表位标签例如myc、FLAG以及血凝素标签。

[0312] 在这方面,对于与蛋白质的化学修饰有关的方法,本领域技术人员可以参考Coligan等人编辑的CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE(《精编蛋白质科学实验指南》)(John Wiley&Sons NY 1995-2008)。

[0313] 多肽可以具有任何长度,并且术语“肽”是指长度为8-50个残基(例如8-20个残基)的多肽。

[0314] “相应的氨基酸”是指在比较两个或更多个氨基酸序列时在相同位置的氨基酸残基(即它们彼此对应)。Chothia(参见上文)、Kabat(参见上文)等人已详细描述了抗体序列的比较和编号方法。本领域技术人员应明白(例如参见Kabat 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, DHHS, 美国华盛顿特区),有时可以在抗体的一个或两个氨基酸中形成1、2或3个间隙,并且/或者插入1、2、3或4个残基或最多约15个残基(特别是在L3和H3 CDR中),从而完成比较。

[0315] “可替换位置”是指抗体的特殊位置,其可以被不同的氨基酸取代而不会显著降低抗体的结合活性。下面将更详细地描述确定可替换位置以及如何替换它们的方法。可替换位置也可以称为“耐变异位置”。

[0316] 抗原蛋白或肽和/或其任何片段、变体或衍生物可以通过本领域已知的任何手段

产生,包括但不限于化学(肽)合成、重组DNA技术和蛋白酶水解以产生肽片段。

[0317] 化学合成包括固相和溶液相肽合成。此类方法在本领域中众所周知,但可以参考Nicholson编辑的SYNTHETIC VACCINES(《合成疫苗》)(Blackwell Scientific Publications)第九章以及Coligan等人编辑的CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE(《蛋白质科学中的最新规程》)(John Wiley&Sons,Inc.NY USA 1995-2008)第15章中提供的化学合成技术的实例。关于这方面,还可参考国际公开第WO 99/02550号和国际公开第WO 97/45444号。

[0318] 重组抗原蛋白或肽可以由本领域技术人员使用例如以下文献中所述的标准方案方便地制备: Sambrook等人, MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (分子克隆实验室手册) (Cold Spring Harbor Press, 1989), 尤其第16和17节; Ausubel等人编辑, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (分子生物学中的最新规程) (John Wiley&Sons, Inc. NY USA 1995-2008), 尤其第10和16章; 以及Coligan等人编辑, CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE (蛋白质科学中的最新规程) (John Wiley&Sons, Inc. NY USA 1995-2008), 尤其第1、5和6章。

[0319] 雄性精细胞的表面蛋白可以是任何合适类型的表面蛋白。例如, 表面蛋白可以是DBY/DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 盒多肽3 ('DEAD')、雄性增强抗原 ('MEA') 1、MEA 2、性别决定区域Y ('SRY')。对雄性精细胞具有特异性的其它抗原的非限制性实例可以参见WO 2008/067651和US 2009/0208977, 其通过引用方式并入本文中。

[0320] 抗体可以与表面蛋白的任何适合部分结合和/或对其产生。合适序列的实例在表1C中示出。

[0321] 表1C. 基于或衍生自抗原DBY/DEAD、MEA 1、MEA 2和SRY的肽序列。

[0322]

抗原	抗原肽序列-SEQ ID NO:1-346(连续排序)
MEA1	SEQ ID NO:1: PTEGTGDWISEEPEEEQTETG
	SEQ ID NO:2: PTEGTQDWYREEPEEEQEETG
	SEQ ID NO:3: PHEGTGDWSNEEPEEEMFETG
	SEQ ID NO:4: PTEGIGLWSSEEPEEEYEMTG
	SEQ ID NO:5: PTEGRGDWSWEEPKEHQSEPG
	SEQ ID NO:6: FTEETGDWSSEEPRTEAEETR
	SEQ ID NO:7: PMEGTGYHSSEEPIIEMETG
	SEQ ID NO:8: PHEITGDWSWAEEPECQEQTG
	SEQ ID NO:9: PQEGTGDRNVNLPREEQEAPM
	SEQ ID NO:10: LQRRLEEFEGERERLQRMADSAA
	SEQ ID NO:11: PDEGTGDWSSTYPEREVESTG
	SEQ ID NO:12: PTHGTGWISSAEPSENQAETM
	SEQ ID NO:13: TTIDTGAWVLEEPTLQNYNG
	SEQ ID NO:14: PREDGFDCSSEETAYEQEVTG
	SEQ ID NO:15: WHGYTGPWSSLEKALELVEPW
	SEQ ID NO:16: PHPTTGDWGRRQPILLTEELG
	SEQ ID NO:17: GTCGTGANYSQYRLCQVEYY
	SEQ ID NO:18: PSKATQTHNTEGWREEMHESC
	SEQ ID NO:19: FEICMGVGSCEEPETEAEYTE
	SEQ ID NO:20: CTCAEGVWVVTPEEHQGETM
	SEQ ID NO:21: PNEFELDWWSAHEVEEASCRD
	SEQ ID NO:22: ATDLTGNWMEEAHELQMTIM
	SEQ ID NO:23: CYGGGQDITIFRYILYQEAIG
	SEQ ID NO:24: AMEPTGMAESMPISEVQKMGD
	SEQ ID NO:25: FDAEFQDASETCNEIVQCEDM
	SEQ ID NO:26: FTCGHITGPSNEPERMQMCMG
	SEQ ID NO:27: ITAGPADFSLHPHNAKMNEY Y
	SEQ ID NO:28: PKEKGGVVKLDNFMNNQWENI
	SEQ ID NO:29: GVFFTKRQENESRRKQHQPTA
	SEQ ID NO:30: PKMVCMIESERETEEMNCCHV

[0323]

SEQ ID NO:31: PDTGRWDWSHEGVDEYSRKIR
SEQ ID NO:32: PTQGNCARSLTDLNIKQSELK
SEQ ID NO:33: PGAGCPPASSEYEYEGEQEEFG
SEQ ID NO:34: PHEVDGQGSWCWDEEWSTEGT
SEQ ID NO:35: PTAGTGDWSSEEPEEEQEETG
SEQ ID NO:36: PDLINADLSTELQALAAEKTG
SEQ ID NO:37: PSFGLGDINSGNPKEEVEWWA
SEQ ID NO:38: PIAPLRDSSIIEDMEEYEAHG
SEQ ID NO:39: PTQWIPQMEEDENMREQCKAG
SEQ ID NO:40: PIELTRKCVWGSNDEWQEKPK
SEQ ID NO:41: PLLGPVPSQNEPPDEVEAFQ
SEQ ID NO:42: PTKTCGDPQGIQPMERYSTV
SEQ ID NO:43: PKYKYTVWMLQEHIFVQNAMD
SEQ ID NO:44: PVAMTRDWKRGDMEMEDAEDG
SEQ ID NO:45: PTFRTFDWIFEPAADYGFIE
SEQ ID NO:46: PCERMGVWSSEEPEELQNEYS
SEQ ID NO:47: PTRDEVMPSSDPPEEHWKTS
SEQ ID NO:48: PTMGGGLSSEEHGWEVEKFM
SEQ ID NO:49: PLECTVDMCCESPEGWQEETG
SEQ ID NO:50: PTEVCGDMSSLEPKEVAEETP
SEQ ID NO:51: PHESDNQRSSESPEEEQRSTG
SEQ ID NO:52: HVRQRDEWVGRFEILDFRYIVKC
SEQ ID NO:53: FVELNTEPEDEAMMLIVEMDYHM
SEQ ID NO:54: QVRRVEYLCGHCEDLQRFASIA
SEQ ID NO:55: AMRRSKEGWNEEYRVQRMSKSAM
SEQ ID NO:56: LARPCSWSYCWRRERLVRMAKCDP
SEQ ID NO:57: TQTILFEFSGEHHRLIRSSKMVR
SEQ ID NO:58: CDRRVFKEEGCEHTYQDMNRDKP
SEQ ID NO:59: LRLMTNLIPGTTKLSRAAKIAA
SEQ ID NO:60: LMRTFEESEGERPEDQRTAMSGN
SEQ ID NO:61: LQRLLLEEFHWAVNSVQFFNDCAM
SEQ ID NO:62: LQRRLEYAKCERFRLVRDDDYEA
SEQ ID NO:63: WHIPLSENNGCRERLGREAVRCL
SEQ ID NO:64: GQRRLECFCDTRLRGYCMWDSAA
SEQ ID NO:65: LQRHSEQTHGKQEHLKRHADDMC
SEQ ID NO:66: LQRFMEEHSGDRERLPSMNVSKA
SEQ ID NO:67: EQKSLPEQKGERARLQRMRSAG
SEQ ID NO:68: LQRRMEESEREHEFLQRMADSAA
SEQ ID NO:69: GQERLTEREGEFERQERMHDGRA
SEQ ID NO:70: LARFLEETEGKEENLQRRADSIK
SEQ ID NO:71: LQKDREEFEKTRHRLMKMTDHW
SEQ ID NO:72: LQNSPEEFAGYRQRCQRMADAAA
SEQ ID NO:73: LQRRLEEWNGERHRLHRMEDIMV

[0324]

	SEQ ID NO:74: WQRRLSEFRREREETWRMAYSAA
	SEQ ID NO:75: TQRKLEEFEGEGERERCSKMAVSVA
	SEQ ID NO:76: LQRRLEDFDWSLQRLQRMADSAA
	SEQ ID NO:77: LQRRLEEFEWERHRLGMMACSGA
	SEQ ID NO:78: LQRRLELFEGEYERLQVMALSAA
	SEQ ID NO:79: LIRRLEEFEGEGERERLQRPADSGA
	SEQ ID NO:80: LQKRDEEFEGEGERERLQRMADTAA
	SEQ ID NO:81: LQRRLEEFEGEGERERLQRMATSDA
	SEQ ID NO:82: LARRLEEFEGEGERERLQRMADSAA
	SEQ ID NO:83: NELYGEEAADESENAQRFQDTAH
DBY, 也称为 DEAD	SEQ ID NO:84: EMSSHIMTQAGVQWPDLSLEV
	SEQ ID NO:85: EMESHVSRQAVVQWWDCGSLEV
	SEQ ID NO:86: ENESHSVTIAGEQWPDMDGRLEV
	SEQ ID NO:87: EMESWSVPQAGVQVPFVGSLED
	SEQ ID NO:88: EMETHSDLQALQQWGDHGSLEV
	SEQ ID NO:89: EMFSHSQTQLNTQWPDLGTHEV
	SEQ ID NO:90: ESESRSVTQDRRVWPFLGSLEP
	SEQ ID NO:91: EMASYSVVQAGVQWPSFGDNEF
	SEQ ID NO:92: ELESMEVITGGVQWPSWYKLWV
	SEQ ID NO:93: EMESHSCMQPGHHWDRGLNPQ
	SEQ ID NO:94: EHFEQSVTQAGHGWSDWGSMEE
	SEQ ID NO:95: ESVSTAVTQAGISWPELFEGGR
	SEQ ID NO:96: EMYIHSVTCNGDQRRCLGSGDQ
	SEQ ID NO:97: EMVSFWVRFIYVMWPVLMSCSY
	SEQ ID NO:98: EHEYYSVCQAGVVPWDSGLREV
	SEQ ID NO:99: EMESTMVNGRPWQWYKLCHLEI
	SEQ ID NO:100: EMESHSVTQAGVQWPDLSLEV
	SEQ ID NO:101: EMSCHYVKQSPNSWDDDASYEV
	SEQ ID NO:102: EMGGHSLVQAGVQSENLLCWLS
	SEQ ID NO:103: EMEHLLQRFCYPQFLDTNSHID
	SEQ ID NO:104: EMDSCDVCEQGLRWK DAGSLTR
	SEQ ID NO:105: EFERCHVTAAGEHKCDACSLEN
	SEQ ID NO:106: EMCQHKVHDGCVQRCKLAHVRV
	SEQ ID NO:107: EFPTTIVGQAMRQIMMTQCLNP
	SEQ ID NO:108: EAAVVSVHCICVKLPDRQQKCV
	SEQ ID NO:109: ESCKHTQNQSAYTWSPHWGEV
	SEQ ID NO:110: EMNLPSMNL MCVSCLDPCSIGV
	SEQ ID NO:111: EMDEHSNTVALMQEFKSWIYTA
	SEQ ID NO:112: EMCFHCGRQTGGQM QSLSLEV
	SEQ ID NO:113: ECGYRSVTPFWEQEMNHCSLHG
	SEQ ID NO:114: ECISAPQMRVYQQPFAYNLEE
	SEQ ID NO:115: EMTSIIWMCSWAQMKDDMDLSV
	SEQ ID NO:116: ENGCENSKSGQQDSWVQQLEL

[0325]

SEQ ID NO:117: ETYPVYLVQRQSNIEDLVQVLQ
SEQ ID NO:118: EMPSFRPTMYRVRESVYRAANK
SEQ ID NO:119: EGNNPKLTFQIVQWPHDESTRW
SEQ ID NO:120: EMKQIQVQEFQKCVQRATSHPV
SEQ ID NO:121: EKVPVMATYTGAVWVRGGKEIV
SEQ ID NO:122: ESEFHEVEQAVKCKGFVATLSV
SEQ ID NO:123: NMSAAVTFSASWQTPFRAPFPG
SEQ ID NO:124: EMESHSTVQAGVQMPDLGILEV
SEQ ID NO:125: YLHSCVVNQEWNLFLYLTLLY
SEQ ID NO:126: TYEAHGVQTEYCRSNISQWDRD
SEQ ID NO:127: LCEHKVTGDEETDASNGTCAEP
SEQ ID NO:128: IMDSFSIKITDWWSPDSDEVKN
SEQ ID NO:129: NQWAWFVPVSSQPSYLEYRKEV
SEQ ID NO:130: EWQQYSVFLGWMLGVDWGLRR
SEQ ID NO:131: THYQISVCDLKYPIYDFDYNVV
SEQ ID NO:132: FDWSHSGFHAGSQMVQCFLWLG
SEQ ID NO:133: GMLSQAHEAYVWMMKPYFNLM
SEQ ID NO:134: EMVCWPRTEAIVIKYGVFSREE
SEQ ID NO:135: WADCQDVTQVYVDGYDHKSWIR
SEQ ID NO:136: MTASQSQTPLCKQVWDLCEHKL
SEQ ID NO:137: HHESWSCMPAEVMKTGLAKGAS
SEQ ID NO:138: IMDATCVTNVGYQDHDEQMINV
SEQ ID NO:139: RMECHCTGEMGVRVIFIGGTEE
SEQ ID NO:140: PTTEHTPTDTGYFKHHNASLEH
SEQ ID NO:141: RLQSLYATQQGYRDPWTGHEEV
SEQ ID NO:142: EMESQKMFDCRMQGPVVVGEEV
SEQ ID NO:143: PGESHQFRNYDLVRYTILQEV
SEQ ID NO:144: CMMNHSLTAILQGMKHELDW
SEQ ID NO:145: EMFCQSESQACVAIPQTGCHLV
SEQ ID NO:146: TMHKSNNKVSVPWCDRGSLTV
SEQ ID NO:147: EMHCHPYYGARVQYPKLYSDEV
SEQ ID NO:148: EMEDTWETQLPVRWHDLDPDYMV
SEQ ID NO:149: SMECHSCCQKLMMWRALRSLEA
SEQ ID NO:150: DMTSMTRQAFFQWPLPGWADV
SEQ ID NO:151: YKEYHSVYSPTVVEPPLVSLEW
SEQ ID NO:152: VCTSQQVLIQVAVLQMSADIQEV
SEQ ID NO:153: IQLSPSVTQAGFVMPDLGSREV
SEQ ID NO:154: EMEHHSWPLFDVQWHHLNPLEG
SEQ ID NO:155: DMLEHIITQADVQIPDVGSLEF
SEQ ID NO:156: EGLSHGFTQAIQWPDLGSMWV
SEQ ID NO:157: HMESHVHQQGVQRPRLGWEEC
SEQ ID NO:158: MMESHVSVASAGVQWKKNP TLIV
SEQ ID NO:159: EMESHVAQHGVQWSGNSSMGV

[0326]

MEA2	SEQ ID NO:160: LQRHLEEFEGERERLQRMADSAA
	SEQ ID NO:161: LQRRLEEFEGERERLQRVADSKA
	SEQ ID NO:162: LDRRLEEFEGERGRLQRMADSNA
	SEQ ID NO:163: LQRRCEEFHGEYERLQPMADSAA
	SEQ ID NO:164: LERRFEFWGERVRLQRMADSAL
	SEQ ID NO:165: LQRRLEMFEHGGERLQRYADFAA
	SEQ ID NO:166: LPRRTEEPVGERERLQRCMDSAA
	SEQ ID NO:167: LQKR DAGFEGERERFQRMASAA
	SEQ ID NO:168: LQRRGEEQEGERERLQRVSDSSS
	SEQ ID NO:169: LQRRGHEFEMERRRLQRMAYHAF
	SEQ ID NO:170: LLNELQVFEFERFHLQRMADSIA
	SEQ ID NO:171: LQGRVNEFNRRERLDRMIRFAG
	SEQ ID NO:172: LQRYQEEVMNEDERVQEMEDSAH
	SEQ ID NO:173: LERVLEEFYTERHKAPKMAHTFA
	SEQ ID NO:174: LQRCLEEFEDTRCRLGHMPISDA
	SEQ ID NO:175: LIAHLEKFCYERTILMDMIKSAA
	SEQ ID NO:176: LQYCLERFRGLRERWGRSKDSYH
	SEQ ID NO:177: LQRTLMMFEGNRKLMSVMAMYTA
	SEQ ID NO:178: LCRFLKEGKGDREVVVRGAMSKQ
	SEQ ID NO:179: LARLLEEGEWVILRLWELRTGFA
	SEQ ID NO:180: LFRYLKEQNAEPECGVSFYTHAA
	SEQ ID NO:181: LQHRLAEFELYIEERQDPAKRWC
	SEQ ID NO:182: LPRIIAEFGLRE MAGRMANSRP
	SEQ ID NO:183: LTRFYHYFDGMGYRATWYQYGMA
	SEQ ID NO:184: LERRKECTQGDRFPYLMADQVC
	SEQ ID NO:185: LRRHLTEIPGHNAECQDFKWWKW
	SEQ ID NO:186: LQMRLEWKKHMRNKLVIPDPECA
	SEQ ID NO:187: LHTNCMVEEQIAEPLYAKADYNG
	SEQ ID NO:188: LFRS WILDTEDEASGSVTPAMT
	SEQ ID NO:189: LFRMTEGGYDCPWHLARTGDS DG
	SEQ ID NO:190: LIRWRYPDEGMRTQAAAMAFQGI
	SEQ ID NO:191: LNTLSVMDEVKGYNMQWEATSAA
	SEQ ID NO:192: QEIRLSVP EMTEVRMSRCTDMAD
SEQ ID NO:193: CWRPSWECEGLHHGAVRS DHTWT	
SEQ ID NO:194: KQRNGAEFEGFPEQLWRPADYVV	
SEQ ID NO:195: MSPRLWETLVELETTQRCSLTRH	
SEQ ID NO:196: EAGRTFTYKYS LWRGYTFSDSAN	
SEQ ID NO:197: LQRRLEEFEGERERLQRMADSAA	
SEQ ID NO:198: SNGLEEEPFVRGHTRECFDIAA	
SEQ ID NO:199: DGCRLDEVEGEFRKISPWKDVLA	
SEQ ID NO:200: LFERLAMFEHWYHDKFKAKDSDA	
SEQ ID NO:201: TPRRHNFYHQKERLQDNGDFMA	

	SEQ ID NO:202: LQPLLPIWEGERMRELRLMYDSEA	
	SEQ ID NO:203: LQLNLEGFCGECPRPVMAKSAY	
	SEQ ID NO:204: HQRRLSFFEVRLNKHRYAHSCA	
	SEQ ID NO:205: LSRRLTEQEGTFERSQKFFDMA	
	SEQ ID NO:206: SQMRRKHFIHEREYLYRMLDSIQ	
	SEQ ID NO:207: LQRHMEDEEDKRDQVQRMADTAA	
	SEQ ID NO:208: KYRNHEEFEGENIRYQVWADHKH	
	SEQ ID NO:209: LCRGLEREEGEREEFHRMATQAI	
	SEQ ID NO:210: YMRKLEEWGHEIRRHQPLADFAA	
	SEQ ID NO:211: TLVGREEFEGEGQMLQRMADSAD	
	SEQ ID NO:212: LQRRFENFEGGRERLIRMADFAA	
	SEQ ID NO:213: FVRFREEFEGWRERLQRMADSAA	
	SEQ ID NO:214: LQRRVAHFEGERARLQRMADSAA	
	SEQ ID NO:215: KQRRLEEFEGECEQLQRIAPSAK	
	SEQ ID NO:216: LQRRLEEFEGERYALSRMAASEA	
	SEQ ID NO:217: MQRVLAEFEGERQRLQRMADSAA	
	SEQ ID NO:218: LQRILEEFEGERERLQREADSAA	
	SEQ ID NO:219: LQRRLEEFEDERERLQRMAQSAA	
	SEQ ID NO:220: LQRRLEEFFGERERLQRMADSAA	
	[0327]	MEA2
		SEQ ID NO:221: RKWLEEQLKQYRVKVQQRSSQ
	SEQ ID NO:222: RAWLEKQLKQYRVKRQQRSSQ	
	SEQ ID NO:223: RSWLEEQLKQMRKRQQRSSQ	
	SEQ ID NO:224: RKWSEEQLKQYRVKRQQEWSSR	
	SEQ ID NO:225: RKALEQQLKQYRVKRQQSRSSQ	
	SEQ ID NO:226: RKWLEEWLKSyrKhrQQERSAQ	
	SEQ ID NO:227: RKWSEEQLKGYYSKRQQERMSQ	
	SEQ ID NO:228: RRFLEKELKQYRHGRQQERSSR	
	SEQ ID NO:229: RDWLETQLKQCIVKRNQNSSMQ	
	SEQ ID NO:230: RKWLEGVLKGYLVKSQLESSSG	
	SEQ ID NO:231: RFWLKEQLKQYRVKGTVELSRQ	
	SEQ ID NO:232: RDWHIEELKQFRVKIQGTRSSN	
	SEQ ID NO:233: RKWCEEQLIQFRVFEQGSRYRQ	
	SEQ ID NO:234: RKWLEMALKHFKMSRQSEISSQ	
	SEQ ID NO:235: RKNLEDQMKGLRVFPGDCGSAQ	
	SEQ ID NO:236: RKWLEEQLKQYRVKRQQRSSQ	
	SEQ ID NO:237: RKWRDYCLKQYDFDISLERLVR	
	SEQ ID NO:238: RKWKGMHDSLYRVKYQGEMNSG	
	SEQ ID NO:239: RIWLYWQIKQWVFLGHQKRSSE	
	SEQ ID NO:240: RKIIEINMLYMKKRIDEHSSQ	
	SEQ ID NO:241: RKWVEMLRDGFVKNARWFGPD	
	SEQ ID NO:242: RVWEALRRKGERYSAQQHSSSE	

[0328]

	SEQ ID NO:243: RILAIERKGRYDDKTQQQDYFT
	SEQ ID NO:244: RKHRSMCLPQNRCLMGSEDIQQ
	SEQ ID NO:245: RHYCFEIGKQCQHKMANASCPM
	SEQ ID NO:246: RSDIEPHFSAYDFTDKDNC SHQ
	SEQ ID NO:247: RECLERFMVDYDMCDHQARSGQ
	SEQ ID NO:248: RKYLIEILKLF RPWAQQCRHHL
	SEQ ID NO:249: RIYTLDCIKQQRQFTQWGMSQA
	SEQ ID NO:250: RGRDCCAINQKHNNFNVEPCSS
	SEQ ID NO:251: RELLEAQVNQH DYKYLQQQS FQ
	SEQ ID NO:252: RKELRSWSAWYKPEEEQSRSCI
	SEQ ID NO:253: RGQQMEHLRRCLPIRQAEYCDA
	SEQ ID NO:254: HIKCEPMPKQCMVKASMRYSN
	SEQ ID NO:255: DFGVWEWGKQTPYKRQQWPLDD
	SEQ ID NO:256: TRWSEGQAKFWLNQIVQEWSST
	SEQ ID NO:257: GWAGITGDPERVESQADFFVP
	SEQ ID NO:258: RKT FEGWLYPYNTKIFEERSQG
	SEQ ID NO:259: NKWLMMIGYNYDLCEYHECNR
	SEQ ID NO:260: QKWWEYLTQEDVGRWQKASYW
	SEQ ID NO:261: QKWSEYQHHVYEGPRYEMFFQR
	SEQ ID NO:262: FFMLEVKLETMRAGHQPEDETW
	SEQ ID NO:263: MKVLGEEVFQYRVINGQQCSYT
	SEQ ID NO:264: GTWGPEQGKMYRGKFRQNASYQ
	SEQ ID NO:265: MKWDIAQLKTKCVDHGTNPCSN
	SEQ ID NO:266: SAWLTEQLVQYRVKGOAEKSSQ
	SEQ ID NO:267: LCWHEEYLKQCRVKRQICNSLP
	SEQ ID NO:268: RCWGEEQDKQLAVSRQDEIMQQ
	SEQ ID NO:269: EKQLEKETHQLSVKRQQPRLNF
	SEQ ID NO:270: EKKEENQLKMNPAKRQPERSVR
	SEQ ID NO:271: HKTTEEWLKQYWVKVQQERSQ
	SEQ ID NO:272: TDWFNEQLKVYREKRQQERTHQ
	SEQ ID NO:273: RKQAEDQLAQYRVKRWQERSAI
	SEQ ID NO:274: VKFP EEQQGMYRWKRQFERSSQ
	SEQ ID NO:275: GWLEEDFKITRVKRTQERSSQ
	SEQ ID NO:276: RWLEEQQLYRVTRGQGRSSQ
	SEQ ID NO:277: RWLEEQGQGYRVERQQEWSSQ
	SEQ ID NO:278: RWLEEQLLWHEVKRQQERSSQ
	SEQ ID NO:279: RWLEEQ LKSYKVKRQQERSHQ
	SEQ ID NO:280: RWLELQLKQYRVKRQQERYSQ
	SEQ ID NO:281: RWLEEQ LKQYRVHRQQERSSQ
SRY	SEQ ID NO:282: RDQRRKMVLENPRMRNSEISKQ
	SEQ ID NO:283: RDQRRQMALENIRMRNSEISKQ
	SEQ ID NO:284: RDQRRRMALENPRMRWSNISKQ

[0329]

SEQ ID NO:285: RDQRRKMRLNPRMGNSEISWY
SEQ ID NO:286: RDQRRKVLREPPMRNSEISKQ
SEQ ID NO:287: RDQRSKFCLECPMRNNSCISKR
SEQ ID NO:288: RDQRRLMAFENPRMKNHELSKA
SEQ ID NO:289: RMDRIKMAKEHPQSRNSEISKQ
SEQ ID NO:290: RDQRGKMTEENPCMRNFEISKW
SEQ ID NO:291: RDQYRKMRLNIFRRMSEIQKI
SEQ ID NO:292: RNQRRGQAPENYYMRNSDISDQ
SEQ ID NO:293: RPQRSEQSLENPRMRYDEGSKW
SEQ ID NO:294: RDTRKTDALHPRMRNREGSRQ
SEQ ID NO:295: RNHRRKMRLLNPRMRMSEIQGA
SEQ ID NO:296: RDYRTKMSLIVPRQRYEIWKM
SEQ ID NO:297: RMKRRFCDVENMRMRGYLISEI
SEQ ID NO:298: RIMRYSGAHKNPHMWRSEYSNQ
SEQ ID NO:299: RGQMRRTWCENWQTRSSRIRPQ
SEQ ID NO:300: RDNRRMMALTYPPGRNKWKLDK
SEQ ID NO:301: RPQHDEMLIINPIMRDSNLTKQ
SEQ ID NO:302: RDKRRKMPNVNEQCQDAQISLL
SEQ ID NO:303: RDQKAEQDNENPKMRMVECHGQ
SEQ ID NO:304: RDEGDKVL DLCNRMMNSRKM IQ
SEQ ID NO:305: RDVRMKMTRPHCRRRCGEASVV
SEQ ID NO:306: RKQHYSPL ENKCARKTCQSKI
SEQ ID NO:307: RLIRCLFCLEMPRIYIPEIHWL
SEQ ID NO:308: RLIRCLFCLEMPRIYIPEIHWL
SEQ ID NO:309: RCNWRKCNEEPPNYMHSMFGCQ
SEQ ID NO:310: RDQRRKMALENPRMRNSEISKQ
SEQ ID NO:311: RQCRKRWRDNNNPMACSYIRKQ
SEQ ID NO:312: REQKRPVDVETDFTLRTPHKKK
SEQ ID NO:313: RHQKVPDAIENPRMRWNGWDTA
SEQ ID NO:314: RIFRRKVYLERN SYRGDWIWTR
SEQ ID NO:315: RKQGRPMDCMYPNMHRGYHMHP
SEQ ID NO:316: RYKSPMTLINRGQIRDTPCSDR
SEQ ID NO:317: CRQDDIKLLHEGEMEKGR LWKH
SEQ ID NO:318: RDARCWWTTHGYHHGNCEWY LK
SEQ ID NO:319: DDQDRKMYTDAPINRLRKALKQ
SEQ ID NO:320: CRADSWKAKEYPENRPSEIPIQ
SEQ ID NO:321: RDAYRPVAVHNCMMRMGMIWAE
SEQ ID NO:322: HTQRNFCFI ENTQYWNLEDSWT
SEQ ID NO:323: HDQRRDHRVGVPRMERGTPAKK
SEQ ID NO:324: RMFCRHVAYDLPRMRFSYISVQ
SEQ ID NO:325: RDMIREQAQEK PRLRLSHRWKQ
SEQ ID NO:326: YDPRINYPLEHIRMSNPEIAKE
SEQ ID NO:327: EDARVNMALELARPRKSFRMSH

[0330]	SEQ ID NO:328: FKQRRFMAMEEPLSRLSERHSC
	SEQ ID NO:329: VTERRKMALKFPPDDAVQISHQ
	SEQ ID NO:330: RPQRRYTGEYNVRFRC EEISHA
	SEQ ID NO:331: TKQTFKMAVGNNGTSRNVEINKA
	SEQ ID NO:332: RDQRRVVALVKANHYASLIAKG
	SEQ ID NO:333: RKQKNKMAKENPRMRHSETNKP
	SEQ ID NO:334: RDQRQPMNLWPAAMRNSRIYRQ
	SEQ ID NO:335: RDQQRKKALENPRHRNSAKHTK
	SEQ ID NO:336: NDQRRKFAWGPPMRNEPISSE
	SEQ ID NO:337: RRQRRKMAWEQPRMQTSVIWRD
	SEQ ID NO:338: SDQRMHMALENARWRNSYIWKQ
	SEQ ID NO:339: RDQGRKMCLNPRQRNKPIKKQ
	SEQ ID NO:340: RDQRMLMTLENPRMRNRAYSQW
	SEQ ID NO:341: RDQTRAAALENPRMRYSEISKY
	SEQ ID NO:342: RDQRRKNALEPPMRHSECSKQ
	SEQ ID NO:343: RDQRRKMGLEQPRMRNSEIMKQ
	SEQ ID NO:344: RDQRRKMALENPKMSNSEISMQ
SEQ ID NO:345: RDQRRKMALENPKMSNSEISMQ	
SEQ ID NO:346: RDQRRKMAKENPRMRNSEISKQ	

[0331] 在一些实施方案中,表面蛋白是DBY/DEAD。

[0332] 在一些实施方案中,抗体与DBY/DEAD特异性结合。

[0333] 在一些实施方案中,抗体针对DBY/DEAD或其抗原部分产生。

[0334] 在一些实施方案中,抗体针对SEQ ID NO:347、352以及84至159中的任一个或其一部分的氨基酸序列产生。

[0335] 在一些实施方案中,抗体与SEQ ID NO:347、352、353、354、355以及84至159中的任一个的氨基酸序列的表位结合。

[0336] 在一些实施方案中,抗体与SEQ ID NO:353、354和355中的任一个,优选353的表位结合。

[0337] 在一些实施方案中,抗体与SEQ ID NO:353、354和355中的任一个的表位结合,或与具有一个或多个氨基酸取代的表位结合。

[0338] 在一些实施方案中,抗体与具有核心序列EMESH(源自SEQ ID NO:353)的表位结合或与具有一个或多个氨基酸取代的表位结合。

[0339] 在一些实施方案中,抗体重链可变结构域包含CDR1(SEQ ID NO:363)、CDR2(SEQ ID NO:364)和CDR3(SEQ ID NO:365)的氨基酸序列。

[0340] 在一些实施方案中,抗体轻链可变结构域包含CDR1(SEQ ID NO:360)、CDR2(SEQ ID NO:361)和CDR3(SEQ ID NO:362)的氨基酸序列。

[0341] 在一些实施方案中,抗体重链可变结构域包含SEQ ID NO:350的氨基酸序列或其重链可变结构域通过对SEQ ID NO:350所示的氨基酸序列进行一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加而获得,与SEQ ID NO:350具有至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性,且所述抗体具有与表面蛋白特异性结合的活性。

[0342] 在一些实施方案中,抗体重链可变结构域由SEQ ID NO:348的核苷酸序列编码。

[0343] 在一些实施方案中,抗体轻链可变结构域包含SEQ ID NO:351的氨基酸序列或其轻链可变结构域通过对SEQ ID NO:351所示的氨基酸序列进行一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加而获得,与SEQ ID NO:351具有至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性,且所述抗体具有与表面蛋白特异性结合的活性。

[0344] 在一些实施方案中,抗体轻链可变结构域由SEQ ID NO:349的核苷酸序列编码。

[0345] 尽管DBY/DEAD是人源的,但由于它是在不同哺乳动物物种中高度保守的蛋白质,因此抗体能够与不同哺乳动物物种,包括牛和猪物种的DBY/DEAD结合。

[0346] 术语“哺乳动物”包括但不限于人、农畜、家畜、实验室动物、伴侣动物和宠物。该术语包括但不限于猪、牛、马、驴、海豚、豚鼠、仓鼠、小鼠、大鼠、狗和猫。优选地,哺乳动物是猪或牛科动物。

[0347] 根据本发明的第二方面,提供了一种组合物,其包含有效量的第一方面的单克隆抗体和可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0348] 该组合物可以是例如药物组合物形式、兽医用组合物形式或用于研究目的的形式(例如试剂或研究工具)。

[0349] 可接受的载体、稀释剂或赋形剂对精子无害或无损。描述可接受的载体、稀释剂或赋形剂的有用参考文献为Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药物科学)(Mack Publishing Co.N.J.USA,1991),其通过引用的方式并入本文中。

[0350] 在一些实施方案中,可接受的载体、稀释剂或赋形剂是精液增量剂(semen extender)。精液增量剂或稀释剂通常是用于增加哺乳动物射精体积的水溶液。精液增量剂通常将为精细胞的代谢维持提供营养物(例如,葡萄糖)、提供抗冷休克的保护(例如,BSA)、维持培养基的pH(例如,碳酸氢盐、Tris、Hepes)和渗透压(例如,NaCl、KCl)并抑制微生物生长(例如,抗生素)。精液增量剂可以包括本领域已知的任何精液增量剂,包括市售的精液增量剂(例如,Minitube的Androstar Boar Semen Extender(BSE))。精液增量剂通常配制成为对从其中获得精子的特定物种而言是适合或相容的。

[0351] 根据本发明的第三方面,提供了一种试剂、试剂盒或芯片,其包含第一方面的单克隆抗体或第二方面的组合物。

[0352] 所述试剂、试剂盒或芯片可包含以下一种或多种:单克隆抗体、编码所述抗体的核酸、或含有所述抗体的真核细胞、原核细胞和病毒。

[0353] 试剂、试剂盒或芯片的其它可选成分包括:限制性内切核酸酶、引物和质粒、缓冲液等,以用于进行抗体活性检测实验。所述试剂、试剂盒或芯片的核酸可进一步包含限制性核酸内切酶位点、多克隆位点、引物位点等,以使其与非兔抗体核酸连接。所述试剂、试剂盒或芯片的所有组分可以单独存储在单独的容器中,或者可以根据需要将一些相容的组分预先组装到单个容器中。

[0354] 根据本发明的第四方面,提供了第一方面的单克隆抗体或第二方面的组合物作为诊断剂、试剂或工具的用途。

[0355] 在这方面,单克隆抗体可以例如通过放射性同位素、能够产生可测定(assayable)物质的酶、荧光蛋白和生物素来标记和检测。此外,单克隆抗体可以与固体载体结合,所述固体载体包括但不限于(聚苯乙烯)板或珠。

[0356] 根据本发明的第五方面,提供了一种处理哺乳动物精子(“精细胞”)的方法,所述

方法包括以下步骤:使含有精子的哺乳动物精液经受第一方面的单克隆抗体或第二方面的组合物的作用,使得抗体与所述精液的雄性精子(“雄性精细胞”)特异性结合。

[0357] 使精液经受单克隆抗体的作用会产生“处理过(或经处理)的精液”、“处理过的精子”或“处理过的精细胞”。

[0358] 根据本发明的第六方面,提供了一种处理哺乳动物精子(“精细胞”)以增加由其产生雌性后代的可能性的方法,所述方法包括以下步骤:使所述哺乳动物精子与第一方面的单克隆抗体或第二方面的组合物接触,从而使抗体与雄性精子特异性结合。

[0359] 根据本发明的第七方面,提供了一种对哺乳动物精液进行性别鉴定的方法,所述方法包括以下步骤:使所述精液的精子与第一方面的单克隆抗体或第二方面的组合物接触,从而使抗体与精液的雄性精子特异性结合。

[0360] 根据本发明的第八方面,提供了一种组合物,其包含用第一方面的单克隆抗体或第二方面的组合物处理时的精液或精子。

[0361] 根据本发明的第九方面,提供了一种对哺乳动物人工授精以增加由其产生雌性后代的可能性的方法,其包括向所述哺乳动物施用以下物质的步骤:

[0362] (i)有效量的第一方面的单克隆抗体;

[0363] (ii)有效量的第二方面的组合物;或

[0364] (iii)有效量的第八方面的组合物,

[0365] 从而对所述哺乳动物进行人工授精。

[0366] 根据本发明的第十方面,提供了第一方面的单克隆抗体或第二方面的组合物与雄性精子(“雄性精细胞”)的偶联物。

[0367] 根据本发明的第十一方面,提供了处理过的精子或处理过的精液,其包含第一方面的单克隆抗体与雄性精子的偶联物或第二方面的组合物与雄性精子的偶联物。

[0368] 根据本发明的第十二方面,提供了第一方面的单克隆抗体或第二方面的组合物用于雄性精子(“雄性精细胞”)选择的用途,其中所述雄性精子选择任选地在大量精液中进行。

[0369] 根据本发明的第十三方面,提供了第一方面的单克隆抗体或第二方面的组合物用于鉴定哺乳动物精液或精子性别的用途。

[0370] 使精子或精液与单克隆抗体或组合物接触足以在单克隆抗体或组合物与多个雄性精细胞之间形成偶联物的时间段,然后用所述处理过的精子或处理过的精液对一个或多个雌性受试者进行人工授精。为了描述的目的,参考5至600分钟的范围,但是在授精之前的接触时间可以更短,例如1、2、3或4分钟,或者更长,例如700、800、900、或1000分钟。5至600分钟的范围当然包括6、7、8分钟以及5至600之间的所有一分钟增量。

[0371] 精液或精子可以新鲜收获,或可以被事先冷冻然后解冻。优选地,精液或精子是新鲜收获的。

[0372] 通常,但不完全如此,精液或精子在与单克隆抗体或组合物接触之前未经洗涤。

[0373] 可以在精液样品中体外执行所述方法或用途,通过将单克隆抗体或组合物以及待处理的精子同时或依次引入雌性动物的生殖道而在体内执行所述方法或用途。优选地,该方法体外执行,以确保精子与单克隆抗体或组合物之间足够的接触时间,以在它们之间形成一种或多种偶联物。

[0374] 在上述本发明的方面的一些实施方案中,单克隆抗体和/或组合物降低或抑制雄性精子的运动性和/或活性。可以使用实现此目的的任何合适方法。合适的实例包括磁珠分离、凝集、过滤和流式细胞术。优选地,此类方法不降低或改变剩余雌性精子的运动性、生存力和/或活性。

[0375] 本文中描述雄性精细胞的运动性和/或活性的术语“降低”和“抑制”是指所述运动性和/或活性,和/或所述运动性和/或活性的量或水平与对照样品或来自受试者的其它生物样品相比降低。在一些实施方案中,如果雄性精细胞的运动性和/或活性水平低于对照样品或来自受试者的其它生物样品中的雄性精细胞的运动性和/或活性水平的约95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%,或甚至低于其约5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.01%、0.001%或0.0001%,则其运动性和/或活性降低。

[0376] 确定精子运动性和/或活性可以包括本领域已知的任何方法或其组合。此类方法的非限制性实例包括光学显微镜检查、相差显微镜检查、计算机辅助精子分析(例如,Hobson精子跟踪仪)、上游法和迁移/沉淀室。在这方面,精子运动性的测量可以是定量或定性的测量。

[0377] 在上述本发明方面的一些实施方案中,所述方法或用途包括从处理过的精液或精子中去除结合了抗体的雄性精子的步骤。可以使用用于去除结合抗体的雄性精子的任何合适方法。合适的实例包括磁珠分离、凝集、过滤和流式细胞术。优选地,所述方法不降低或改变剩余雌性精子的运动性、生存力和/或活性。

[0378] 在一些实施方案中,流式细胞术、体外受精、定量PCR(qPCR)检测、荧光抗体、荧光原位杂交(FISH)和/或蛋白G覆盖的磁珠可用于检查处理过的精液中的与抗体结合的雄性精子,或者处理过的精液中是否不含或基本不含与抗体结合的雄性精子,或者处理过的精液中是否富含雌性精子。

[0379] 雌性精子的选择或精液的性别鉴定可以大量进行。在上述方法或用途的一些实施方案中,对物种的类型和产生的精液的体积没有限制。例如,猪、海豚和马产生大量/高体积的精液,从250毫升到数升,而狗、牛和其它反刍动物则产生毫升级的体积。

[0380] 在特定的实施方案中,单克隆抗体或组合物可以包括在处理溶液中,以直接添加到采集的精子或精液中,和/或与任选的一种或多种靶向雄性精细胞的抗体或试剂一起被直接添加到待被授精的雌性动物的生殖道中。

[0381] 另外,第一方面的单克隆抗体可以通过例如涂敷采集(coating collection)、储存和其它人工授精设备在体外使用。

[0382] 合适地,精子制剂包含以生物学上可接受的浓度和/或活力用于对哺乳动物进行人工授精的多个精子。如本领域技术人员所理解的,这可因例如待被人工授精的哺乳动物的年龄和/或物种而有很大不同。使用者可以根据多个精子的形态和/或运动性来改变该浓度。

[0383] 在(i)的上下文中,“有效量”是指足以对多个精子产生所需药理、生理和/或治疗作用,从而增加所述哺乳动物在人工授精后产生雌性后代的可能性的上述单克隆抗体和/或组合物的量或浓度。因此,有效量的基本上纯化的抗体或组合物是足以与精子中许多雄性精细胞上的相关表面蛋白结合并对其产生抑制作用(例如对所结合的雄性精子的活性、功能和/或运动性产生抑制作用),从而促使用处理过的精子/处理过的精液进行人工授精

所产生的雌性后代的可能性增加的量。在(ii)的上下文中,“有效量”是指足以在雌性哺乳动物的人工授精后产生后代的精子制剂的量或浓度。

[0384] 有效量可以变化,这具体取决于各种因素,例如哺乳动物的年龄、品种、物种、体重、生育力和总体健康状况、精子状况以及单克隆抗体、组合物和/或精子制剂被施用的方式。

[0385] 合适地,同时或顺序地添加单克隆抗体和/或组合物和多个精子。在这方面,可以首先向哺乳动物施用单克隆抗体和/或组合物,然后施用多个精子。或者,可在单克隆抗体和/或组合物之前将多个精子施用给哺乳动物。

[0386] 合适地,以a)安全;b)不干扰生育力;c)不会引起任何致畸作用;和d)不会损害雌性的健康的量向雌性动物施用单克隆抗体和/或组合物和多个精子。

[0387] 应明白,所用的多个精子可以是新鲜收获的,或可以事先被冷冻然后解冻。优选地,精子是新鲜收获的。

[0388] 众所周知,人工授精是从雄性哺乳动物中采集精子/精液,然后在适当的时间借助仪器将其引入雌性哺乳动物生殖道的技术。就本发明的方法而言,单克隆抗体和/或组合物与精子可以通过本领域已知的任何人工授精方法施用给哺乳动物。通常,在适当的时间(例如,雌性哺乳动物处于发情期)并且在卫生条件下,将单克隆抗体和/或组合物与精子/精液或处理过的精子/处理过的精液通过机械方法将其一部分放入子宫颈和/或子宫内而对雌性哺乳动物授精。

[0389] 在上述方法或用途的一些实施方案中,可以大量进行精细胞的选择或精液的性别鉴定。在上述方法或用途的一些实施方案中,对物种的类型和产生的精液的体积没有限制。例如,猪、海豚和马产生大量/高体积的精液,从250毫升到数升,而狗、牛和其它反刍动物则产生毫升级的体积。本发明的一些实施方案可以应用于两种情况。

[0390] 根据本发明的第十四方面,提供了一种包含第一方面的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0391] 根据本发明的第十五方面,提供了一种或多种分离、纯化或重组的核酸,其编码:

[0392] (i) 第一方面的单克隆抗体的重链可变结构域;

[0393] (ii) 第一方面的单克隆抗体的轻链可变结构域;

[0394] (iii) 第一方面的单克隆抗体的重链可变结构域的CDR1 (SEQ ID NO:363)、CDR2 (SEQ ID NO:364)和CDR3 (SEQ ID NO:365);和/或

[0395] (iv) 第一方面的单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR1 (SEQ ID NO:360)、CDR2 (SEQ ID NO:361)和CDR3 (SEQ ID NO:362)。

[0396] 根据本发明的第十六方面,提供了针对SEQ ID NO:347的氨基酸序列产生的单克隆抗体。

[0397] 在本发明的范围内,本文描述的任何特征可以与本文描述的任何个或多个其它特征以任何组合方式进行组合。

[0398] 整个说明书的目的是描述本发明的优选实施方案,而不是将本发明限制为任何一个实施方案或特征的特定集合。因此,本领域技术人员应明白,根据本公开,可以在特定实施方案中进行各种修改和改变。

[0399] 为了使本发明更容易理解并付诸实践,本领域技术人员可参考以下非限制性实

例。

[0400] 附图说明3

[0401] 图1C:带注释的单克隆抗体SdW1 RE5.B7.F9b(也称为“克隆RE5”或“RE5抗体”)的VH和VL氨基酸序列,其示出框架区(FWR)和互补决定区(CDR)。

[0402] 图2C:使用抗体mAb735(PDB 3wbd)作为模板并以RE5抗体为靶标构建的同源性模型。

[0403] 图3C:预测的抗体RE5的3D结构。该结构中圈出了CDR环。

[0404] 图4C:预测的根据N/C末端染色的DBY表面蛋白(在雄性精细胞上)的3D结构。N端区域为蓝色,并且C端区域为红色。22-mer肽着色为白色。

[0405] 图5C:围绕RE5抗体的CDR区域的三个代表性基团(苯、乙酸根离子和Mgua)的MCSS最小值分布。

[0406] 图6C:如下官能团及其对应的括号中的氨基酸的MCSS最小值的分布: BENZ (Phe)、PHEN (TYR)、IMIA (His)、ACET (GLU/ASP) 和MGUA (ARG)。

[0407] 图7C:RE5抗体和DBY蛋白的复合体结构,其预测的结合肽以橙色着色。以白色表面显示抗体。用于开发RE5抗体的肽以蓝色着色。

[0408] 图8C:单克隆抗体RE5的三个预测的肽结合物/表位/停泊位点,如下划线所示。

[0409] 图9C:流程图,其示出产生、选择和表征单克隆抗体的方法。该方法包括以下步骤:1.产生抗体;2.通过凝集、荧光二抗、FISH或磁珠技术确定抗体对精液的作用;3.使用高通量体外受精(HT IVF)或选择性裂解和qPCR测试抗体对精液的作用;和4.通过测序、构建3D结构和确定表位来表征抗体。

[0410] 表2C.SEQ ID NO.列表

[0411]

SEQ ID No.	简要说明	序列
1-346	基于或来自抗原DBY/DEAD、MEA 1、MEA 2 和 SRY 的肽序列	参见表 1C
347	抗原 SdW1a(游离肽)	EMESHSVTQAGVQWPD LGSLEV
348	单克隆抗体克隆RE5 的重链可变区(VH)(核苷酸序列)	GAAGTGAAGGTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCT TGGTGCAACCTGGGGGATCCATGAAAATCTCC TGTGTTGCCTCTGGATTCACTTTCAAGAACTAC

[0412]

		TGGATGAACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAA GGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATCGA AATCTAATAATAATGAAAAACATTATGCGGAGT CTGTGAAAGGGAGGTTCCACCATCTCAAGAGAT GATTTTAAAAGTAGTGTGTACCTGCAAATGAA CAACTTAAGAACTGAAGACACTGGCATTATT ACTGTACGGGGGGGACCTTTGACTACTGGGGC CAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
350	单克隆抗体克隆 RE5 的重链可变区 (VH)(氨基酸序列)	EVKVEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFKNYW MNWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSNNNEKHYES VKGRFTISRDDFKSSVYLQMNLRTEDTGIYYC TGGTFDYWGQTTTLTVSS
351	单克隆抗体克隆 RE5 的轻链(κ)可变 区 (VL)(氨基酸序 列)	DVVVTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSHSLVHSDG NTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCS QTTHVPPYTFGGGTQLEIK
352	DBY(智人)。来自 NIH 的基因 ID G49469 的氨基酸翻 译。	DBYIDKVVVPAVLALVLVAEAAAAVVEVVTATA EDLVEVMLIFLLGRAFCFSFFFFFEMESHSVTQA GVQWPDLSLEVTLLPQPPKVLQVGGNMPSSF FSIFNRDGVSPCWPGWSLPPDLMIHTPWPEVLG LQAATVPGLGSLFFLRVLFKAFIGEIFLRDTKSN SRLLLLVLCSTEKKGINELNFSLNIFLDRWLWRL LQWIWRKLLPGGLVGQLN
353	被单克隆抗体 RE5 识别的 DBY 的实际 肽结合物/表位/停 泊位点	SFFFFEMESH
354	预测的单克隆抗体 在 DBY 上的最佳肽 结合物/表位/停泊 位点	FSIFNRDGV
355	预测的单克隆抗体 在 DBY 上的最佳肽 结合物/表位/停泊 位点	SLNIFLDRW
356	对 1 号染色体特异 的正向引物	GTTGCACTTTCACGGACGCAGC
357	对 1 号染色体特异 的反向引物	CTAGCCCATGCTCGCCATAGC
358	对 Y 染色体特异的 正向引物	AATCCACCATACCTCATGGACC
359	对 Y 染色体特异的 反向引物	TTTCTCCTGTATCCTCCTGC
360	单克隆抗体克隆 RE5 的轻链可变区	HSLVHSDGNTY

	(VH)CDR1(氨基酸序列)	
361	单克隆抗体克隆 RE5 的轻链可变区 (VH)CDR2(氨基酸序列)	KVS
362	单克隆抗体克隆 RE5 的轻链可变区 (VH)CDR3(氨基酸序列)	SQTTHVPPYT
[0413] 363	单克隆抗体克隆 RE5 的重链(κ)可变区 (VH)CDR1(氨基酸序列)	GFTFKNYW
364	单克隆抗体克隆 RE5 的重链(κ)可变区 (VH)CDR2(氨基酸序列)	IRSKSNNNEK
365	单克隆抗体克隆 RE5 的重链(κ)可变区 (VH)CDR3(氨基酸序列)	TGGTFDY
336-373	PCR 引物&探针	参见表 3B

[0414] 具体实施方式3

[0415] 本发明的优选特征、实施方案和变型可以从本具体实施方式部分中得到了解,本具体实施方式为本领域技术人员提供了实施本发明的足够信息。具体实施方式不应视为以任何方式限制前述发明内容的范围。

[0416] 抗原制备

[0417] 定制合成了一些肽,并将其与钥孔血蓝蛋白 (KLH-肽) 偶联。KLH是一种金属蛋白,其存在于巨型钥孔虫戚 (keyhole limpet) [钥孔青贝 (Megathura crenulata)] 的血淋巴中。该蛋白质较大、携带氧,并具有多个亚基,因此是肽的理想载体。

[0418] 单克隆抗体的生产

[0419] 免疫和血清滴度:用50 μ g抗原 (SEQ ID NO:347) 与免疫佐剂 (Sigma-Aldrich cat# S6322) 联合甲基化CpG的组合,经皮下途径使两只罗伯逊 (Robertsonian) 小鼠免疫,以两周为间隔进行3次。从被免疫的小鼠采集血清样品,以1:250和1:1250的稀释度,通过ELISA测试对抗原的反应性,并与免疫前样品进行比较。两只动物都显示出阳性滴度,并且被选择以融合。

[0420] 杂交瘤融合:为了产生杂交瘤细胞,切除小鼠脾脏,将其解离成单细胞悬浮液,并使用聚乙二醇使其与SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞融合。使所得的杂交瘤细胞在20x 96孔组织培养板中的含有重氮丝氨酸次黄嘌呤 (Azaserine Hypoxanthine) 的培养基中生长。

[0421] 筛选:使杂交瘤细胞生长10天,此时确定阳性杂交瘤菌落的数量,再温育3天后,取等分的抗体上清液用于筛选。检测上清液对抗原SdW1a (游离肽-SEQ ID NO.347) 和SdW1b

(KLH-肽)的反应性,首先使用IgG特异性二抗进行抗原微阵列,然后进行上清液ELISA确认产生阳性抗体的任何克隆。

[0422] 扩展和冷冻:然后将响应最高的ELISA阳性克隆扩增至24孔组织培养板中,持续3-4天,这时将它们扩增至6孔组织培养板中。以1:5(上清液孔)和1:25(细胞孔)的比率接种细胞。一旦细胞达到80%融合,就收获这些细胞并将其低温保存在10%DMSO中,并储存在液氮中。还收获每一克隆的上清液,并在-20℃冷冻。

[0423] 亚克隆:选择用于亚克隆的ELISA阳性的克隆中的一者,即SdW1RE5.B7.F9b(克隆RE5')进行2轮连续稀释。在每个稀释阶段之后,让细胞生长4-5天,并通过上清液ELISA确定产生对抗原呈阳性的抗体的单菌落,并将顶部的2个克隆扩增至用于进一步的轮次。将最终的单克隆细胞系扩增至6孔细胞培养板中,持续4-5天,提取上清液并与细胞一起冷冻。

[0424] 分型:亚克隆细胞系的上清液通过市售检测试剂盒测试以确定所产生的单克隆抗体的同种型。在五种抗体同种型中,最常见的两种是IgG和IgM。在IgG mAb中,有五个潜在的亚类(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3)。此外,每个mAb可具有κ或λ轻链。命名为克隆RE5的特别感兴趣的单克隆抗体,具有同种型小鼠IgG2a,κ(IgG2a K)。

[0425] 对单克隆抗体克隆RE5' 测序,同种型:小鼠IgG2a,κ

[0426] 对单克隆抗体克隆RE5' 的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)进行测序。简而言之,抗体测序涉及以下步骤:使细胞系的细胞生长;从这些细胞中纯化总RNA;从总RNA中进一步纯化信使RNA;使用VH和VL基因特异性反应进行cDNA合成;对cDNA进行dGTP加尾;对VH和VL的cDNA产物进行PCR扩增;凝胶纯化PCR产物,并将其克隆到pCR™2.1中;使用PCR进行菌落筛选;对目标PCR产物或质粒进行DNA测序;以及,分析DNA测序结果。

[0427] 单克隆抗体克隆RE5的重链可变区(VH)具有SEQ ID No:348的核苷酸序列。

[0428] 单克隆抗体克隆RE5的轻链可变区(VL)具有SEQ ID NO:349的核苷酸序列。

[0429] 单克隆抗体克隆RE5的重链可变区(VH)具有SEQ ID NO:350的多肽序列。

[0430] 单克隆抗体克隆RE5的轻链可变区(VL)具有SEQ ID NO:351的多肽序列。

[0431] 单克隆抗体克隆RE5的重链可变区(VH)的CRD具有SEQ ID NO:363、364和365的多肽序列。

[0432] 单克隆抗体克隆RE5的轻链可变区(VL)的CDR具有SEQ ID NO:360、361和362的多肽序列。

[0433] 使用IMGT/V-Quest程序(国际免疫遗传学信息系统;http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest),对重链和轻链抗体可变区基因序列进行了分析。表3C示出克隆RE5的VH和VL序列与(未重排)生殖系小鼠抗体基因的相似性。

[0434] 表3C. 克隆RE5的VH和VL与未重排生殖系小鼠抗体序列的相似性(使用IMGT/V-Quest程序)。N/A=不适用。

	V 基因和等位基因 (nt 同一性)	J 基因和等位基因 (nt 同一性)	D 区和等位基因
[0435] VL(κ)	<u>Musmus</u>	<u>Musmus</u> IGKJ2*01	N/A

	IGKV1-110*01 F (97.96%)	F (94.74%)	
[0436]	VH Musmus IGHV6-6*02 F (95.58%)	Musmus IGHJ2*01 F (91.67%)	Musmus IGHD3-3*01 F

[0437] 图1C中示出带注释的抗体RE5的VH和VL氨基酸序列,其示出框架区(FWR)和互补决定区(CDR)。

[0438] 抗体RE5的3D结构

[0439] 根据抗体RE5(靶标)的序列,使用抗体mAb735(PDB 3wbd)作为模板构建同源性模型,如图2C所示。

[0440] 抗体RE5的3D结构

[0441] 从图3C可见,成功构建了抗体RE5的3D结构。应注意,靶标序列与模板略有不同,并且RE5抗体的精确3D结构是通过手动构造不同氨基酸的侧链而构建的。

[0442] DBY与抗体的结合表位的预测

[0443] 在表征RE5的VH和VL区的序列后,确定抗体与蛋白质DBY的结合区。使用文献(Zhang,W,Zeng,X,Zhang,L,Peng,H,Jiao,Y,Zeng,J,Treutlein,HR,(2013)“Computational identification of epitopes in the glycoproteins of novel bunyavirus(SFTS virus)recognized by a human monoclonal antibody(Mab 4-5)”,J.Comput.Aided Mol.Des.27:539-550)中公开的方法确定与抗体结合的抗原的表位。

[0444] 简而言之,使用以下步骤来识别DBY的潜在结合区/表位:

[0445] 1) 求解出RE5单克隆抗体序列。使用该序列构建抗体的同源性模型。

[0446] 2) 对DBY蛋白的3D结构建模。

[0447] 3) 对抗体上的官能团进行MCSS定位(mapping)。

[0448] 4) 根据MCSS最小值识别结合的肽序列模式,并搜索蛋白质DBY序列上的模式以识别蛋白质与抗体的结合区域。

[0449] 5) 进行抗体对DBY蛋白的锚定(docking)。

[0450] 6) 预测抗体-DBY复合体在水中的分子动力学。

[0451] DBY蛋白质-蛋白质的3D结构

[0452] 没有蛋白质DBY可用的实验结构(“DBY2人类雄性智人STS基因组,序列标记位点:689bp基因组DNA;性别:雄性;克隆库(Clone_lib):人类男性;登记号:G49469.1;GI:5114028)。使用来自NIH的核苷酸序列(基因ID G49469),首先将其翻译成蛋白质序列,如SEQ ID No:352所示。

[0453] DBY本质上是高度保守的。它的氨基酸序列在不同的哺乳动物物种,包括人类、牛和猪物种之间高度保守。因此,预期单克隆抗体RE5与大多数(如果不是全部的话)哺乳动物物种的DBY结合。

[0454] 根据DBY的蛋白质序列,使用InFold算法(McGuffin,L.J.,Shuid,A.M.,Kempster,R.,Maghrabi,A.H.A.,Nealon J.O.,Salehe,B.R.,Atkins,J.D.&Roche,D.B.(2017) Accurate Template Based Modelling in CASP12 using the IntFOLD4-TS,ModFOLD6 and ReFOLD methods.Proteins:Structure,Function,and Bioinformatics,86Suppl 1, 335-344,doi:10.1002/prot.25360;McGuffin,L.J.,Atkins,J.,Salehe,B.R.,Shuid,

A.N.&Roche,D.B.(2015) IntFOLD:an integrated server for modelling protein structures and functions from amino acid sequences.Nucleic Acids Research,43,W169-73; Buenavista,M.T.,Roche,D.B.&McGuffin,L.J.(2012);Improvement of 3D protein models using multiple templates guided by single-template model quality assessment.Bioinformatics,28,1851-1857;Zhang,W,Zeng,X,Zhang,L,Peng,H,Jiao,Y,Zeng,J,Treutlein,HR,(2013)“Computational identification of epitopes in the glycoproteins of novel bunyavirus (SFTS virus) recognized by a human monoclonal antibody (Mab 4-5)”,J.Comput.Aided Mol.Des.27:539-550)对蛋白质的结构建模。

[0455] 图4C示出所得DBY蛋白的3D结构。

[0456] RE5抗体表面上的MCSS最小值

[0457] 图5C示出围绕RE5抗体的CDR区域的三个代表性基团(苯、乙酸根离子和Mgua)的MCSS最小值分布。图6C中进一步示出所有MCSS最小值分布。对应于氨基酸Phe的侧链的BENZ最小值仅位于B1处。MGUA(Arg)和PHEN(Tyr)基团也发现了类似的特征。对于与氨基酸ASP或GLU侧链相对应的带负电荷的ACET基团,分别在B1和B2处识别出两个簇。对于官能团IMIA(His),也发现了类似的特征。应注意到,在位点B1与B2之间存在深腔(cavity),并且发现了大多数MCSS最小值。由于对抗体进行同源建模,该腔可能是伪像,因此忽略该腔内的最小值。

[0458] DBY的肽与RE5抗体的结合

[0459] 基于MCSS最小值,使用X-Z的序列模式搜索DBY蛋白质的序列,其中XX=R、Y、F、H、D/E,且Z=Y、D/E。图7C示出DBY中的肽结合物(橙色),以及它们在抗体和DBY之间的锚定构象(docked conformation)中的位置。

[0460] 单克隆抗体RE5的三个预测的肽结合物/表位/停泊位点在图8C中以下划线显示并显示在SEQ ID NO.353至355中。实际结合位点/表位为SFFFEMESH(SEQ ID NO:353)。其它两个表位(SEQ ID No:354和355)是用于进一步抗体产生的主要候选物。

[0461] 抗体验证

[0462] 产生单克隆抗体克隆后,通过使用确定凝集或其缺失的相差显微镜检查、荧光二抗染色、FISH和磁珠分离来确定抗体对精子的作用。

[0463] 针对精液的IgG的滴定

[0464] 用Androstar Boar Semen Extender(Androstar公猪精液增量剂)(BSE)将纯化的IgG或培养上清液稀释成25mg/ml的标准液。将抗体进一步稀释十倍,然后将100 μ l体积/稀释液加入ELISA板的孔中。将标准体积(200 μ l)的BSE中的新鲜(<5天龄)公猪精液以 10^7 细胞/ml(等于每剂量 10^9 个细胞)的密度添加到抗体稀释液中,并保持在37 $^{\circ}$ C。在30分钟至4小时的时间段内,以100倍放大倍率目视检查每个样品,并确定凝集百分比。开发了对精子凝集的主观评分:0(无凝集)、1+(<50%)、2+(50%)和3+(100%)凝集。

[0465] 荧光抗体测试

[0466] 为了证明抗体附着到精子上,通过使用荧光(Alexa Fluor 488)山羊抗小鼠二抗(Jackson Immunologicals)来追踪一抗。用一抗处理后,精液用PBS洗涤3次。以1/20稀释度加入二抗,在37 $^{\circ}$ C温育60分钟,然后用3X PBS洗涤。使用图森(Tucson)相机和软件(Scope

Scientific, 布里斯班) 在光照和荧光条件下对精子计数。使用在光照条件下荧光精子数量与精子总数的比率来计算每一处理的Y-CCSP (雄性精子) 和X-CCSP (雌性精子) 的百分比。在可能的情况下, 每个样品计数总共750个精子。

[0467] 荧光原位杂交 (FISH)

[0468] FISH用于确认荧光抗体结果, 并证明荧光精子携带Y染色体 (雄性精细胞)。该方法是Parilla等人 (2003) 所述方法的变型。简而言之, 从猪肌肉、血液和精子中提取DNA。使用PCR扩增对应于1号染色体和Y染色体的两种产物, 分别为244和377bp。引物序列示于表4C和序列列表中。

[0469] 表4C.1号染色体和Y染色体的引导 (priming) 寡核苷酸序列。

靶标	方向	序列
1号染色体	正向	5' -GTTGCACTTTCACGGACGCAGC-3' (SEQ ID NO:356)
1号染色体	反向	5' -CTAGCCCATTGCTCGCCATAGC-3' (SEQ ID NO:357)
Y染色体	正向	5' -AATCCACCATACCTCATGGACC-3' (SEQ ID NO:358)
Y染色体	反向	5' -TTTCTCCTGTATCCTCCTGC-3' (SEQ ID NO:359)

[0471] PCR反应的反应混合物由以下组成: 4dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP, 各2mmol/l) 的0.4 μ l混合物; 1号 (-) 染色体和Y染色体的引物各2.5 μ l (来自10pmol μ l/l原液); 50-500ng猪DNA; 5 μ l的10X PCR缓冲液 (100mmol Tris-HCL 1/l, pH 8.3, 500mmol KCL 1-1, 15mmol MgCl₂ 1-10.01% (w/v) 明胶); 和0.5 μ l的5U Taq DNA聚合酶 μ l/l。用不含DNase的水使反应的总体积达到50 μ l。使用3步骤进行扩增, 在95 $^{\circ}$ C初始变性5分钟后; 随后执行变性 (95 $^{\circ}$ C, 15秒)、退火 (60 $^{\circ}$ C, 1分钟) 和延伸 (72 $^{\circ}$ C, 15秒) 的循环, 35次; 最后, 以延长步骤 (72 $^{\circ}$ C, 7分钟) 结束该循环。

[0472] 汇集PCR产物并用PicoPure PCR柱 (Qiagen) 清洗, 测定DNA浓度并用于切口平移。使用Abbot切口平移试剂盒将修饰的脱氧尿苷三磷酸 (dUTP) 掺入到PCR产物中。使用SpectrumGreenTMdUTP标记1号染色体探针, 并将SpectrumRedTMdUTP掺入到Y染色体探针中。这为1号染色体提供了绿色荧光信号, 并且为Y染色体提供了红色荧光信号。按照针对切口平移列出的顺序将各组分添加到管中, 然后将管简单离心并涡旋, 然后添加酶 (最后的组分): 17.5-x μ l无核酸酶的水; x μ l的1 μ g提取的DNA; 2.5 μ l的0.2mM SpectrumGreen、SpectrumOrange或SpectrumRed dUTP; 5 μ l的0.1mM dTTP; 10 μ l dNTP混合物; 5 μ l 10X缺口平移缓冲液; 10 μ l缺口平移酶, 产生50 μ l的总体积。

[0473] 将样品在15 $^{\circ}$ C温育过夜。在80 $^{\circ}$ C 10分钟的步骤使反应停止。使用PicoPure PCR柱 (Qiagen), 用5 μ l Tris-EDTA (0.2mmol 1/l) 和5 μ l FISH杂交缓冲液组成的最终洗脱缓冲液再次清洗产品。

[0474] 将用于FISH的精液样品用KCl (75mM) 洗涤两次, 然后用Tris-EDTA (1M) 洗一次。将3 μ l精液悬浮液涂布在干净的载玻片上用碳化物铅笔在玻璃上画出的直径7mm的圆中。将载玻片风干并在冰冷的甲醇:冰醋酸 (3:1) 中固定。杂交前, 通过将载玻片浸入2X柠檬酸钠盐水 (SSC) 缓冲液中除去多余的固定剂、通过使其通过一系列乙醇浴 (70%、80%和100%) 而脱水并风干。用1M NaOH溶液冲洗载玻片3分钟, 在2X SSC中洗涤、脱水并风干。通过在每个圆环上滴加2 μ l杂交缓冲液 (Vysis, Abbott) 进行变性, 用玻璃盖玻片覆盖, 并在75 $^{\circ}$ C温育5分钟。

[0475] 探针混合物由等量的绿色(1号染色体)、红色(Y染色体)和杂交缓冲液组成。将其在75℃变性5分钟。通过将载玻片浸入2X柠檬酸钠盐水(SSC)缓冲液中再次洗涤载玻片,通过使其通过一系列乙醇浴(70%、80%和100%)而脱水并风干。加入变性的探针混合物(每个样品1.2μl),盖上玻璃片,并且边缘用橡胶胶水密封以防止干燥。将载玻片再次加热至75℃持续5分钟,然后在37℃在黑暗潮湿的容器中温育过夜。杂交后,将载玻片在75℃在0.4x SSC+0.1%NP-40溶液中洗涤2分钟,然后在2x SSC+(0.3%NP-40)中在室温下洗涤。通过乙醇系列脱水和风干完成该方法。用5μl的4',6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)防褪色溶液(Vysis)对载玻片进行复染,并在配有3个滤波器的荧光显微镜下进行检查。(针对DAPI、FITC和Texas Red优化的Brightline全多波带滤波器组,其以立方体安装在立方体(cube)中)。所有细胞均含有绿色标记,表明存在1号染色体。将其用作阳性对照。另外含有红色(针对Y染色体)信号的细胞被视为Y-CCSP(雄性精细胞)。仅含有绿色信号的细胞被视为X-CCSP(雌性精细胞)。

[0476] 将精液样品与抗体混合,并使雄性精子沉淀。当凝集的精子能够沉到底部时,回收顶部自由游动的精子并进行处理以确定各个精子的性别。每个样品平均计数750个细胞。

[0477] 使用磁珠评估抗体的特异性

[0478] 蛋白G磁珠是用于小规模分离和纯化抗体的亲和基质。我们知道,通过抗马或小鼠荧光抗体检测到我们的抗体附着在50%的精子。这项研究的目的是在磁珠的帮助下分离附着有抗体的精子并对其进行性别鉴定,以确定不同单克隆抗体克隆对雄性的特异性。对保留在磁珠上的经抗体处理的精子进行FISH,以确定通过磁珠除去的雄性是否多于雌性。

[0479] 该过程需要以下步骤:

[0480] 1. 从2头公猪中采集新鲜精液。

[0481] 2. 计数并确定要添加的抗体体积。

[0482] 3. 将抗体添加到2ml精液中,并在37℃温育1小时。

[0483] 4. 用PBS洗涤精液3次以去除未附着的抗体。

[0484] 5. 将50μl的珠悬浮液与500μl的结合缓冲液混合。涡旋、施加磁珠、弃去上清液,然后再次重复此过程。

[0485] 6. 将160μl结合缓冲液添加到50μl洗过的精液中。

[0486] 7. 混合并在4℃保持30分钟。

[0487] 8. 应用磁铁以去除上清液。

[0488] 9. 加入500μl结合缓冲液,充分混合并弃去上清液;重复此过程两次。

[0489] 10. 储存一半的样品,原样用于FISH分析。

[0490] 11. 对于其余样品:通过如下方式破坏抗体/精液结合来剥离精液:向编号11的珠粒中添加100μl洗脱缓冲液,涡旋并在4℃温育5分钟。应用磁铁,将精子转移到新管中,重复此过程并且汇集洗脱的精液。加入40μl 1M Tris-HCl (pH 9),第二天早晨在采集的精液上继续进行FISH。

[0491] HT IVF用于评估针对克隆RE5的精液处理后抗体对性别比率偏移的影响。

[0492] 使总共828个卵母细胞受精(对照数=376并且处理数=452)。使胚胎裂解并确定每一个的性别。

[0493] 计算要添加到精液中的抗体的体积

[0494] 开发了用于确定每剂量精液中精子与抗体确切比率的公式。由于供体动物的每一次单一射精在运动力、生存力和每体积的精子总数方面都有所不同,因此必须开发一种方法来标准化每剂量的体积,以优化Y精子的凝集。

[0495] 使用以下公式确定最佳的抗体与精子比率:将每剂量精子的总数除以系数1或0.1或0.09或0.08或0.075或0.06或0.05或0.045或0.03或0.025或0.015或0.01,得到每剂量抗体的毫克数。然后将其换算为每剂量每毫升的体积。在22°C或23°C或25°C或27°C或30°C或32°C或33°C或35°C或37°C或38.5°C或39°C将所需体积添加到精子中。将精液在此温度保持5至240分钟,然后使其缓慢冷却至室温、过滤、包装并在15°C至17°C送至农场(用于授精)。

[0496] 考虑到上述情况,将理解如何在实践中执行本发明的如下实例:

[0497] 在母猪中进行测试

[0498] 采用使50%精子凝集的抗体与精液比率对母猪授精。试验了每剂量不同的总精液数(1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 和 4×10^9)。采集公猪精液并将其立即与预热(22°C或23°C或25°C或27°C或30°C或32°C或33°C或35°C或37°C或38.5°C或39°C)的Androstar公猪精液增量剂混合。将精液与先前在Androstar公猪精液增量剂中稀释的抗体进一步混合,其全部保持在22°C或23°C或25°C或27°C或30°C或32°C或33°C或35°C或37°C或38.5°C或39°C。使抗体和精液置于22°C或23°C或25°C或27°C或30°C或32°C或33°C或35°C或37°C或38.5°C或39°C,反应5至240分钟。将精液分成80毫升剂量,并置于室温下,以从22°C或23°C或25°C或27°C或30°C或32°C或33°C或35°C或37°C或38.5°C或39°C缓慢冷却下来。将样品在15°C运送到农场,在该农场中对每头母猪施用2剂量。精液样品在采集后的5天内使用。

[0499] 磁珠

[0500] (单克隆抗体的)不同克隆对磁珠的亲合力不同。根据所测试的克隆,珠上保留的样品中有74.5%至30.5%是雄性。通过使用FISH确定精子的性别。表5C中呈现了13个克隆的结果。

[0501] 表5C.用来自每个克隆的抗体处理2种不同公猪精液样品后,磁珠所捕获的雄性精子的百分比。

	保留样品(磁珠)中的雄性%			
	敏感度			
样品编号				
Mab	公猪 1	公猪 2	平均值	
RF6	72	77	74.5	
RF3	72	68	70	
RC6	72	66	69	
RF4	67	68	67.5	
[0502] RE6	67	68	67.5	
RE5	65	66	65.5	
RB2	67	61	64	
RC5	67	60	63.5	
RG3	60	65	62.5	
RA6	58	63	60.5	
RA1	59	59	59	
RF2	54	57	55.5	
RE3	23	38	30.5	

[0503] 荧光原位杂交

[0504] 通过FISH确定每个精子的性别。雄性具有红色 (Y染色体) 和绿色 (1号染色体) 标记物。雌性只有绿色标记物, 缺少Y染色体。凝集的荧光精子证实大部分为雄性精子 (绿色+红色信号)。表6C示出用各种抗体处理精液后上清液中雌性的百分比。

[0505] 表6C. 用来自不同克隆的抗体处理精液后上清液中雌性的百分比。通过FISH确定每个精子的性别。

抗体克隆	雌性%
RB2	66
RF4	63
RE5	63
RE6	58
[0506] RC5	56
RA6	54
RF6	53.3
RE3	52
RG3	52
RF2	52
RF3	46
[0507] RA1	45
RC6	39

[0508] 高通量体外受精

[0509] 表7C中示出针对25组卵母细胞, 处理组的雌性精子百分比相对于对照的雌性精子百分比 (总数=828, 对照数=376以及处理数=452)。处理组的雌性平均百分比为71%, 对照为45%。与对照组的均值偏移为25%。处理组的95%CI为0.64-0.78, 对照为0.17-32。

[0510] 表7C. 针对25组卵母细胞, 处理组中通过IVF产生的雌性胚胎的百分比相对于对照

中的雌性百分比。用受精前向其中添加抗体的精液使处理组的卵母细胞受精。对照组在受精前添加了PBS。百分比偏移表示在对照组和处理组之间朝向雌性的百分点增加。

[0511]

处理编号	处理组中的雌性%	对照组中的雌性%	与对照组相比的偏移%
1	25	13	12
2	40	13	27
3	50	17	33
4	52	14	38
5	67	67	0
6	73	67	6
7	77	44	33
8	50	17	33
9	78	58	20
10	80	80	0
11	82	40	42
12	86	25	61
13	90	75	15
14	100	94	6
15	100	94	6
16	72	54	18
17	22	0	22
18	54	7	47
19	78	25	53
21	77	20	57
22	59	45	14
23	72	54	18
24	91	91	0
25	87	43	44

[0512] 标题4

[0513] 包括用于性别选择的材料和方法

[0514] 技术领域4

[0515] 除其它方面之外,本发明涉及在前面的部分(第1至3部分的发明)中所述的材料和方法(包括其与彼此的组合)用于精液性别鉴定、性别选择、HT-IVF、遗传学上表征所产生的后代和/或增加获得期望后代的可能性的用途。

[0516] 背景技术4

[0517] 过去对用于精液性别鉴定的免疫方法的批评之一是“不一致”。实际上,已知技术在精液性别鉴定、性别选择、HT-IVF、遗传表征产生的后代和/或增加获得期望后代的可能性方面已存在许多问题。

[0518] 具体实施方式4

[0519] 发明人现在已经开发出用于尽量减少上述一个或多个问题的材料和方法。

[0520] 根据本发明的第一方面,提供了包括以下步骤的方法:

[0521] 1. 任选地使精子经受处理步骤;

[0522] 2. 使步骤1的精子经受性别选择的步骤,以便选择目标雌性或雄性精子;

[0523] 3. 使用步骤2的目标精子执行受精步骤,以产生至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎;

[0524] 4. 在精子存在下,选择性地裂解步骤3中的至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,以便从至少一个裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放细胞物质;以及

[0525] 5. 在至少一种下游应用中使用所释放的细胞物质。

[0526] 精子可以处于任何合适的纯化、半纯化或未纯化形式。例如,精子可以在精液内或与精液部分或完全分离。例如,可以将精子或精液与精液增量剂混合。精子可以如本专利说明书其它部分中所述。

[0527] 步骤1可以包括例如利用精子,无论其是否已接受特定处理步骤。步骤1是任选的,因为精子根本不需要被处理。在一些实施方案中,使用至少一种下游应用(例如检查遗传变化)来表征源自步骤1的未处理精子的释放的细胞物质。

[0528] 任何合适的处理步骤或处理步骤的组合都可以在步骤1中使用。

[0529] 在一些实施方案中,处理可涉及使精子经受实验技术,例如流式细胞术、冷藏、冷冻、长期保存等。即,经受此类处理的精子可以在遗传上发生变化或以其它方式改变,并且可以使用下游应用来检查或表征这些变化。

[0530] 在一些实施方案中,处理可以涉及使精子经受诱变剂或疑似诱变剂(无论其本质是化学还是非化学的)的作用。在一些实施方案中,诱变剂或潜在的诱变剂可以是化学物质,例如遮光剂、洗涤剂、滑石粉等,或可具有诱变作用或疑似诱变作用的任何其它化学物质。

[0531] 在一些实施方案中,处理步骤可以包括使用CRISPR(规律成簇间隔短回文重复序列基因编辑)、SMGT(精子介导的基因转移)、TALEN(转录激活因子样效应物核酸酶)或其它重组技术来处理精子,或使精子经受生物分子,尤其是结合分子例如抗体的作用。

[0532] 在一些实施方案中,处理步骤可包括使精子暴露于一种或多种形式的辐射,例如紫外线辐射、微波辐射或高温。

[0533] 应当理解,处理步骤可以如本专利说明书的任何其它部分中所述。

[0534] 方法任选地包括使步骤3的至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎经受处理步骤的步骤。处理步骤可以是针对步骤1所述的,也可以与针对步骤1所述的不同。

[0535] 步骤2的性别选择步骤可以以任何合适的方式进行。在一些实施方案中,可以使用精子特异性抗体。例如,可使用如本专利说明书另一部分所述的抗体进行性别选择。同样,可以使用在本专利说明书的另一部分中描述的性别选择方法。

[0536] 步骤2可用于选择雄性精子或雌性精子。优选地,如本专利说明书另一部分所述,使用雄性特异性抗体结合并灭活雄性精细胞。

[0537] 受精步骤3可以以任何合适的方式进行。优选地,如本专利说明书另一部分所述,使用HT-IVF进行步骤3。如果需要的话,该步骤包括如本专利说明书的另一部分中所述培养受精细胞。

[0538] 在步骤4中,在精子存在下选择性裂解至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,以便从至少一个裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放细胞物质,其可以以任何合适的方式进行。优选地,使用本专利说明书另一部分中描述的裂解缓冲液和方法进行步骤4。

[0539] 如本说明书中其它地方所提及的,“细胞物质”优选基本上在不裂解的情况下不会以其它方式被释放的细胞内物质。术语“细胞物质”还包括以其它方式保持膜结合的物质。

[0540] 如本说明书中其它地方所提及的,“细胞物质”在其范围内包括遗传物质(其所有形式,包括核酸、多核苷酸,更具体而言,包括基因组、基因、基因转录物、基因产物和RNA)、蛋白质物质(其所有形式,包括多肽、蛋白质、肽和氨基酸)、脂质物质(其所有形式,包括脂肪和脂质)和碳水化合物(其所有形式)。如本说明书中其它地方所提及的,“细胞物质”在其范围内包括细胞系统中的所有组分或结构。

[0541] 在步骤5中,可以使用任何合适的下游应用。如本说明书中其它地方所提及的,下游应用包括任何和所有基于分子的方法和过程。此类方法和过程可以是定量的、定性的,以选择性表征、修饰、分离或扩增等。下游应用可以是筛选测试或诊断测试,以识别或确认卵母细胞、胚母细胞/囊胚、卵子、胚细胞、胚胎或精子的细胞物质的任何变化。

[0542] 下游应用可包括使细胞物质经受至少一种外源添加酶(例如基于蛋白质的酶或基于RNA的酶)的作用。

[0543] 下游应用可以用于例如针对一种或多种基因(基因组学和表观基因组学)、一种或多种转录物(转录组学)、一种或多种蛋白质(蛋白质组学)、一种或多种代谢物(代谢组学)、一种或多种脂质(脂质组学)或一种或多种相互作用(相互作用物组学)的研究。

[0544] Wang和Bodovitz,Trends Biotechnol.2010June;28(6):281-290中描述了细胞物质的潜在下游应用,其全部内容通过交叉引用的方式并入本文中。其它潜在的下游应用在本说明书中的其它地方予以描述。

[0545] 根据本发明的第二方面,提供了一种表征基因变化的方法,其包括以下步骤:

[0546] 1. 任选地使精子经受处理步骤;

[0547] 2. 使步骤1的精子经受性别选择步骤,以便选择目标雌性或雄性精子;

[0548] 3. 使用步骤2的目标精子执行受精,以产生至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎;

[0549] 4. 在精子存在下选择性裂解步骤3的至少一个卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎,以便从至少一个裂解的卵母细胞、囊胚、卵子、胚细胞或胚胎中选择性地释放细胞物质;以及

[0550] 5. 对于所释放的细胞遗传物质使用至少一种下游应用,以表征遗传变化。

[0551] 如本发明的第一方面所述,第二方面的特征可以从本专利说明书的任何其它部分中发现。

[0552] 在一些实施方案中,本文所述的方法可以适用于任何人类或非人类动物或哺乳动物,其中MEA 1、MEA 2、SRY、DBY/DEAD和/或TSPY可以通过其Y染色体精子被选择性或特异性地表达。在特定实施方案中,术语“哺乳动物”包括但不限于猪、牛、马、驴、狗和猫。优选地,哺乳动物的物种是猪或牛。

[0553] 在上述方法或用途的一些实施方案中,可以大量进行精细胞的选择或精液的性别

鉴定。

[0554] 在上述方法或用途的一些实施方案中,对物种的类型和产生的精液的体积没有限制。例如,猪、海豚和马产生大量/高体积的精液,从250毫升到数升,而狗、牛和其它反刍动物则产生毫升级的体积。

[0555] 本说明书第2部分图4B中示出了本发明的一些优选实施方案。

[0556] 在某些实施方案中,该方法可用于高通量体外受精(HT-IVF),如下所述:

[0557] 在新开发的培养基中处理来自猪(或其它)卵巢的卵母细胞以增强其成熟度(如本说明书其它部分中关于IVP所述)。

[0558] 用新鲜、增量的猪(或其它)精液进行受精。

[0559] 在新过程中生长到8-16个细胞,即>70%的卵母细胞成熟并生长,行业标准约为40%。

[0560] 用新裂解液有差别地裂解卵母细胞和残余精液,从而使得卵母细胞DNA可以被提取,而使精子保持完整。

[0561] 通过REPLI g试剂盒SC聚合酶(Qiagen)使用qPCR扩增卵母细胞DNA。

[0562] 稀释DNA以通过实时PCR(qPCR)检测一系列基因型性状。

[0563] 通过对精子和/或卵母细胞进行如下处理可以带来基因产物的改变或缺失:

[0564] CRISPR(规律成簇间隔短回文重复序列基因编辑);

[0565] SMGT(精子介导的基因转移)(Rodrigues 2013);TALEN(转录激活因子样效应物核酸酶)

[0566] 阻断精子上停泊位点的抗体;阻断卵母细胞上停泊位点的抗体

[0567] 任何化学物质,例如遮光剂、洗涤剂、滑石粉等;或

[0568] 可具有诱变作用的化学物质

[0569] 用途:

[0570] 确定测试方案或处理改变基因型的能力;

[0571] 转基因动物;

[0572] 体外受精;或

[0573] 胚胎性别鉴别。

[0574] 在整个说明书中,对“一个实施方案”或“实施方案”的引用是指结合该实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,在整个说明书的各处出现的短语“在一个实施方案中”或“在实施方案中”不一定都指同一实施方案。此外,可以以任何合适的方式以一种或多种组合来组合特定特征、结构或特性。

[0575] 根据法规,已经以或多或少特定于结构或方法特征的语言描述了本发明。应当理解,本发明不限于所示出或描述的具体特征,因为本文所述的手段包括使本发明实现的优选形式。因此,以其在本领域技术人员恰当理解的所附权利要求书的适当范围内的任何形式或修改要求保护本发明。

[0576] 应当清楚地理解,如果在本文中引用现有技术出版物,则该参考文献并不构成承认该出版物形成澳大利亚或任何其它国家的本领域公知常识的一部分。

[0577] 除非上下文另外要求,如本文所使用,否则术语“包含(comprise)”和该术语的变体,例如“包含(comprising、comprises和comprised)”并不旨在排除其它元素、组分、整数

或步骤,而是可以包括一个或多个未声明的其它元素、组分、整数或步骤。

[0578] 所附权利要求书中定义了本说明书的第1至第4部分的发明的优选实施方案。

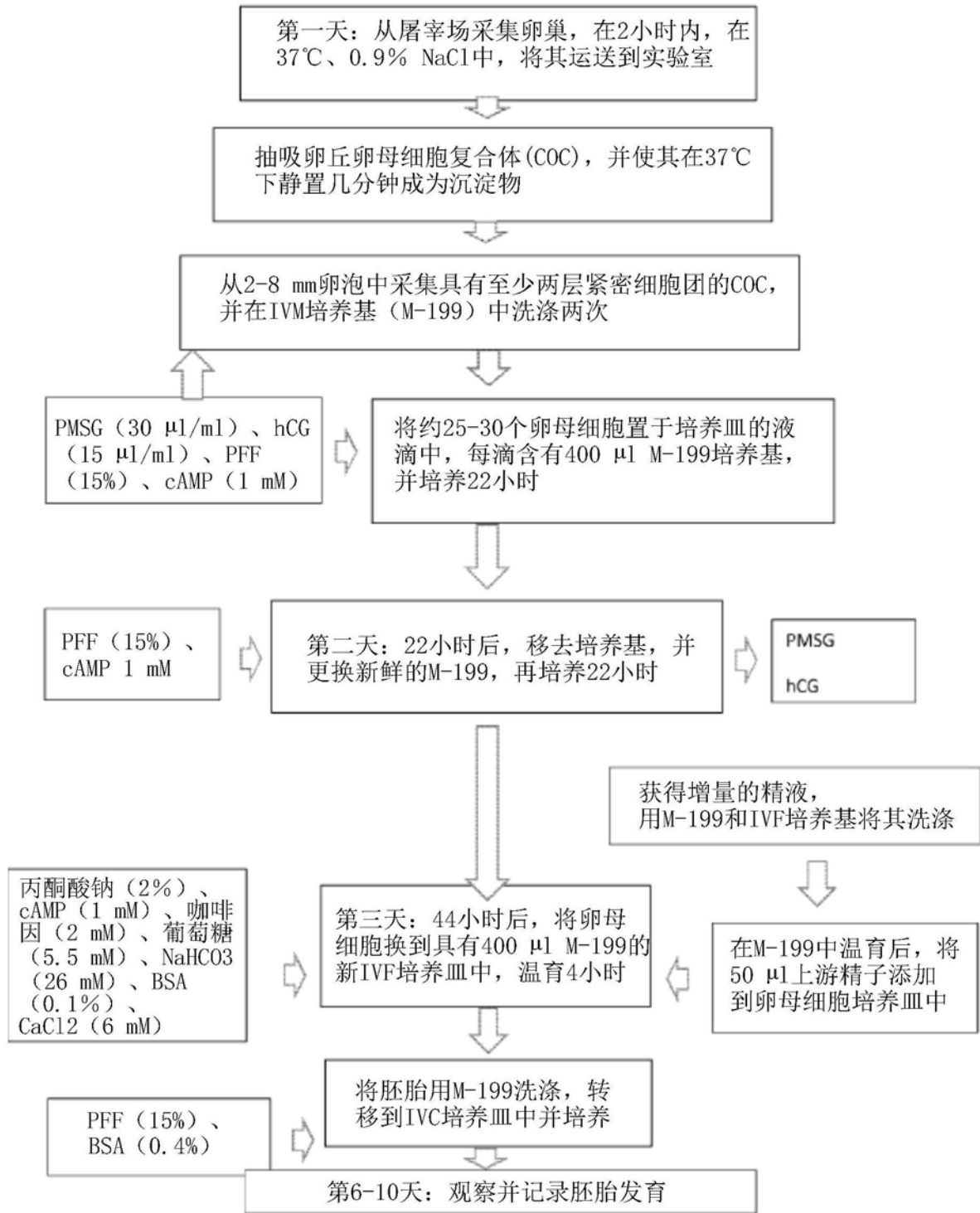


图1A



图1B



图2B

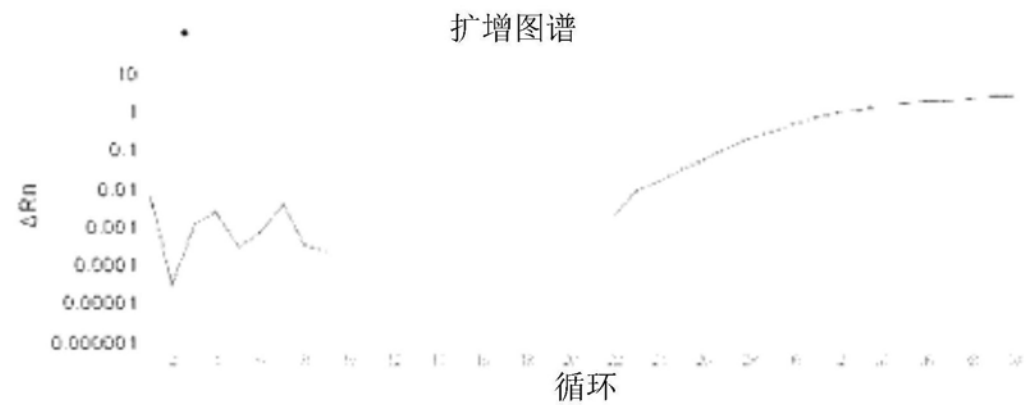


图3B

受精卵母细胞的下游应用流程图：

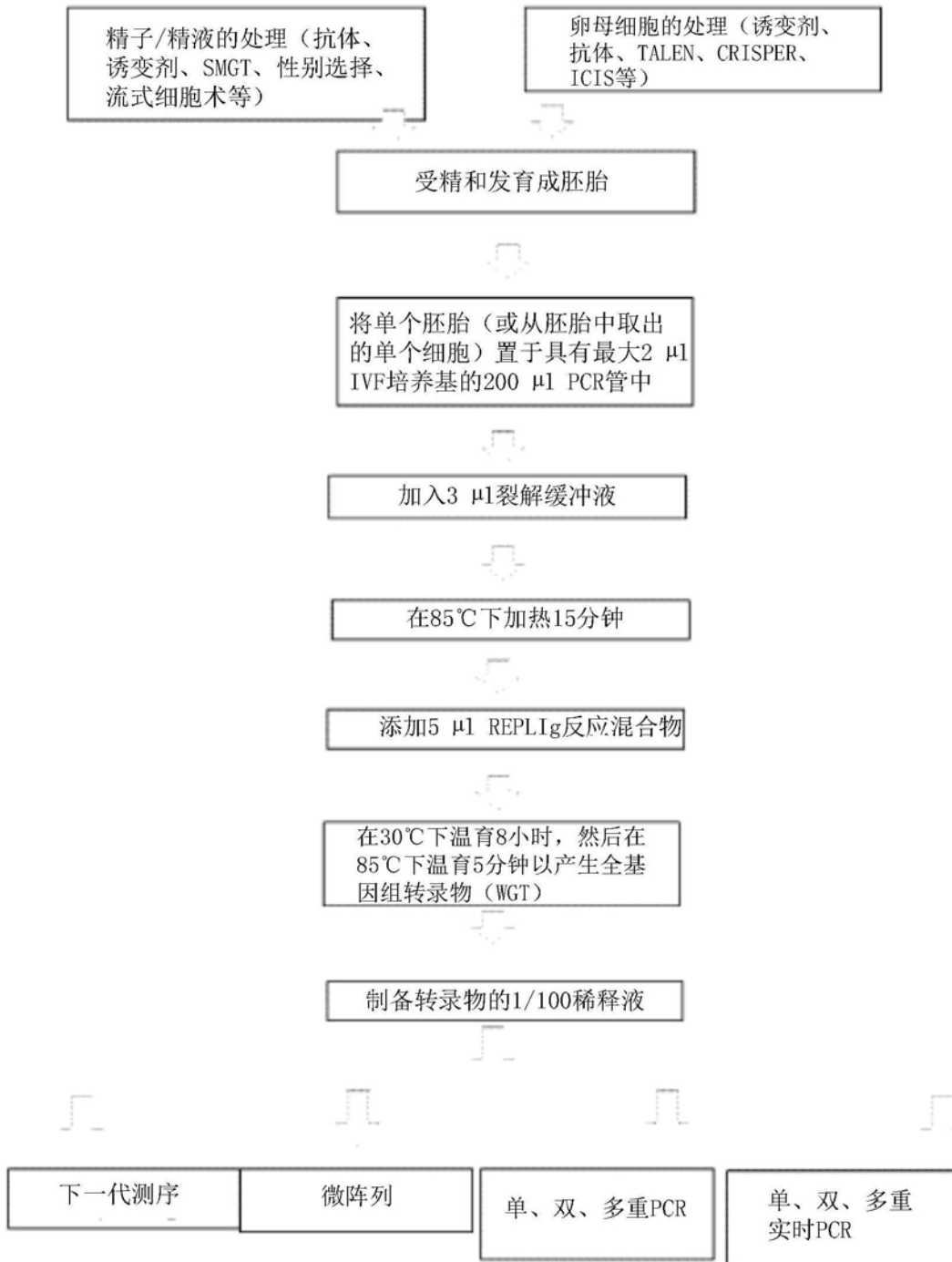


图4B



图3C

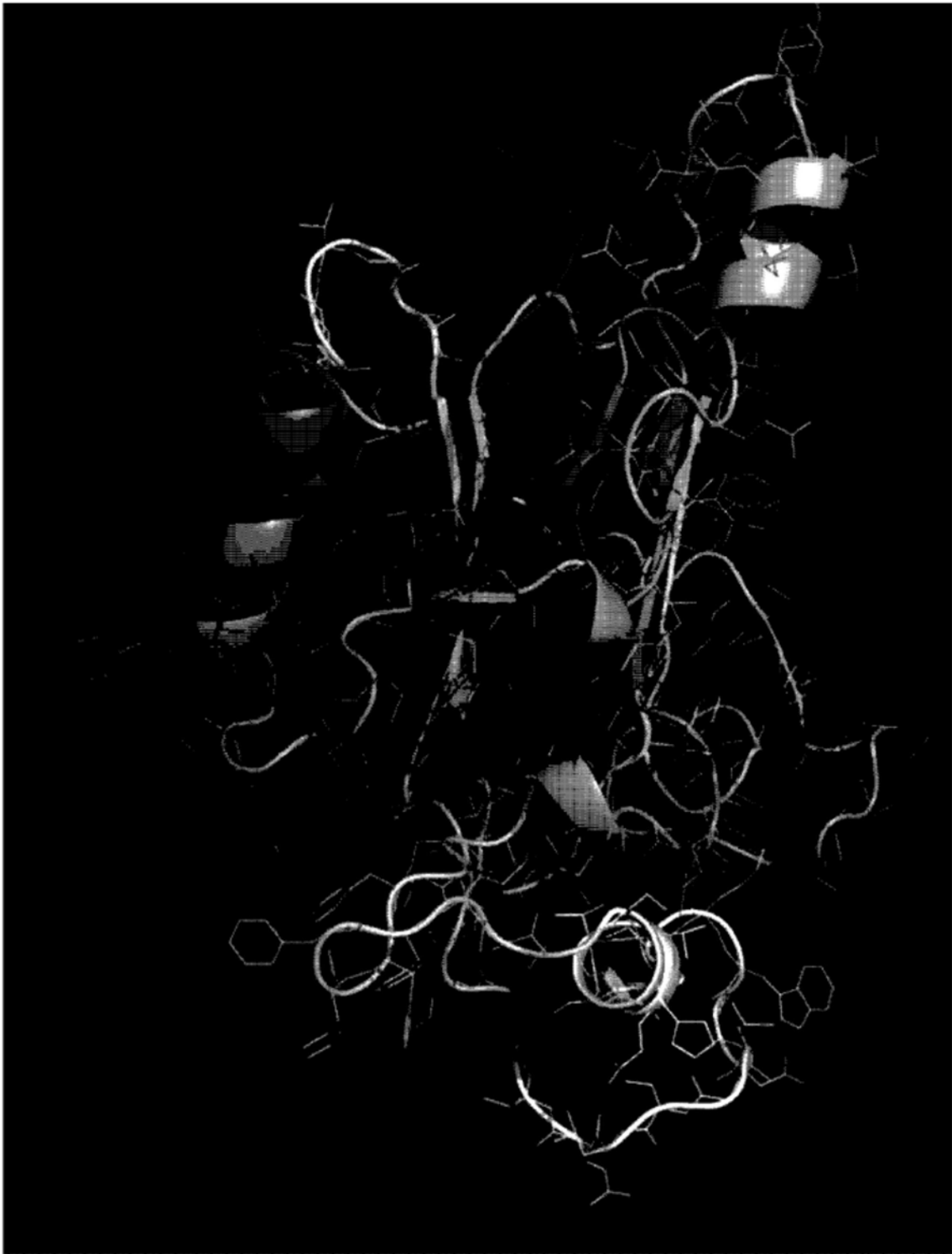


图4C

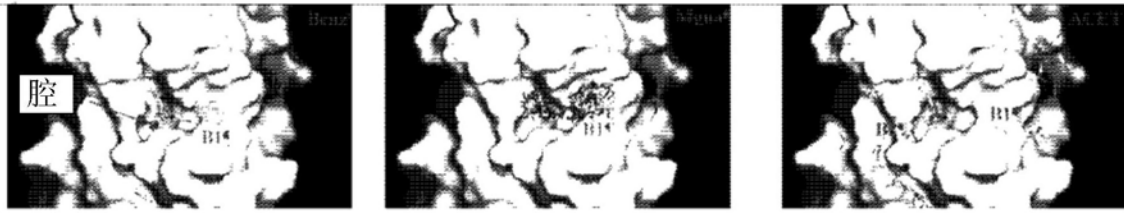


图5C

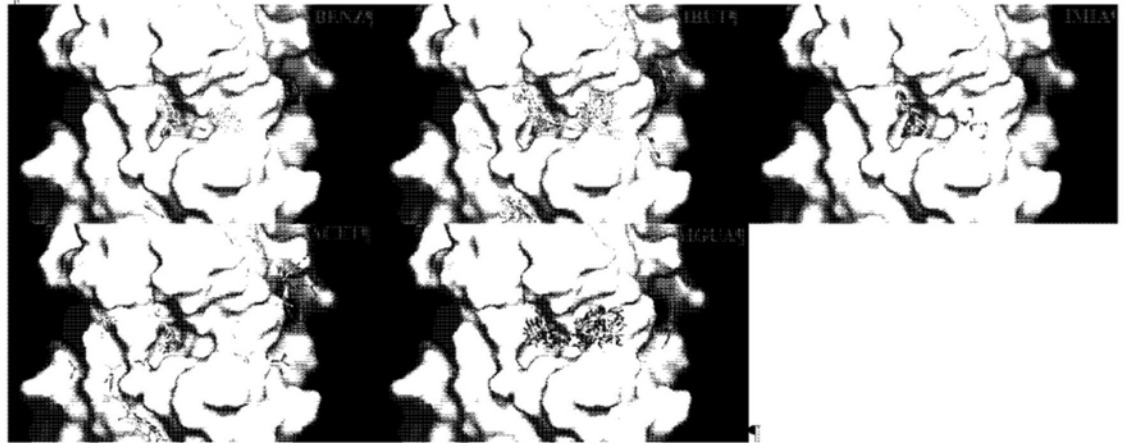


图6C

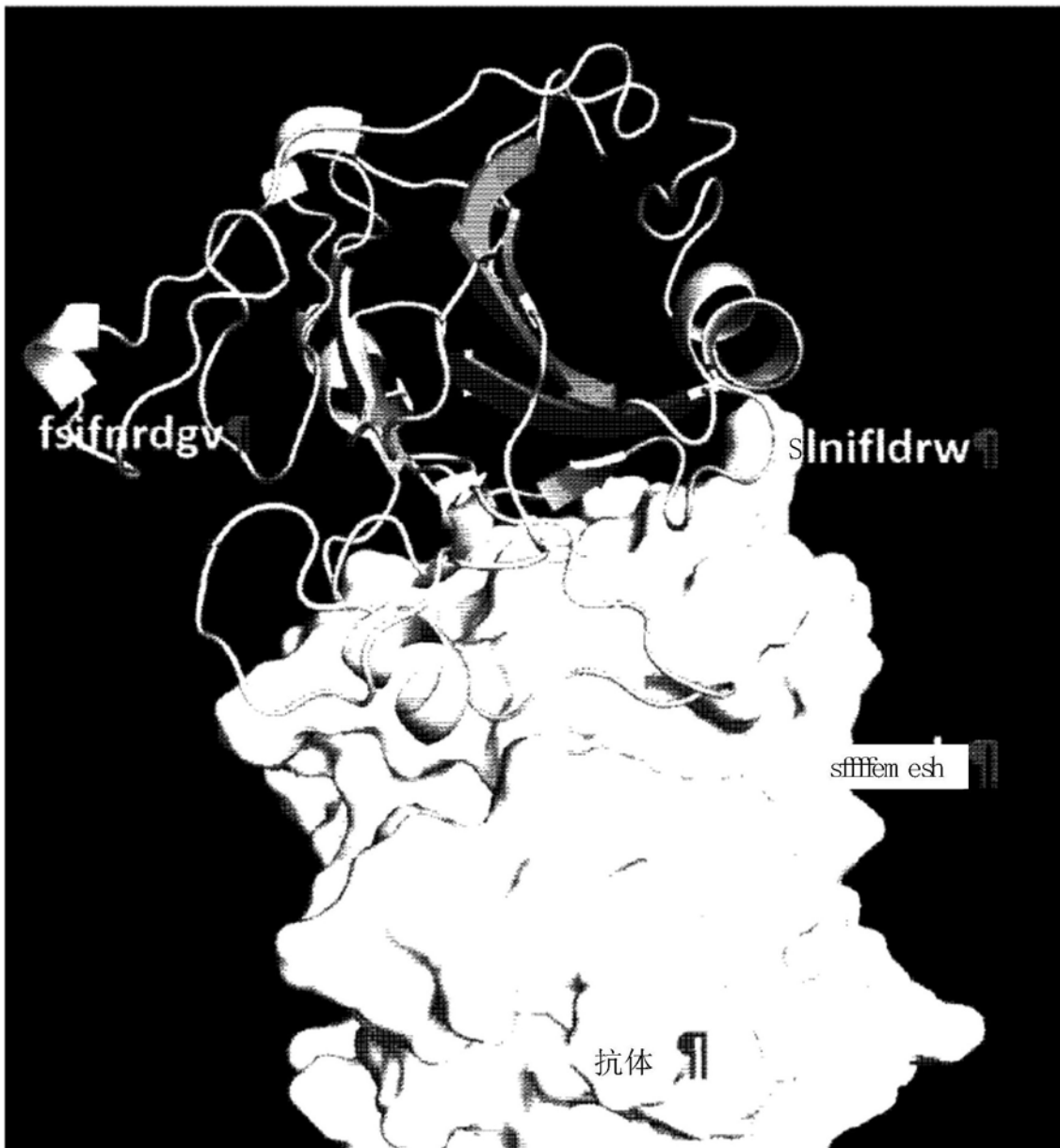


图7C

IDKVVVPAVLALVLAEEAAA VVEVVTATAEDLVEVMLIFLLGRAFCFSFFFEMESHSVTQA
 GVQWPDLSLEVTLPPQPKVGLQVGGNMPSSFFSIFNRDGVSPCWPGWSLPPDLMIHTPWPE
 VLGLQAATVPGLGSLFFLRVLFKAFIGEIFLRDTKSNSRFLLLVLCSTEKKGINELNFSLNIFLDR
WLWRLLQWIWRKLLPGGLVGQLN

图8C

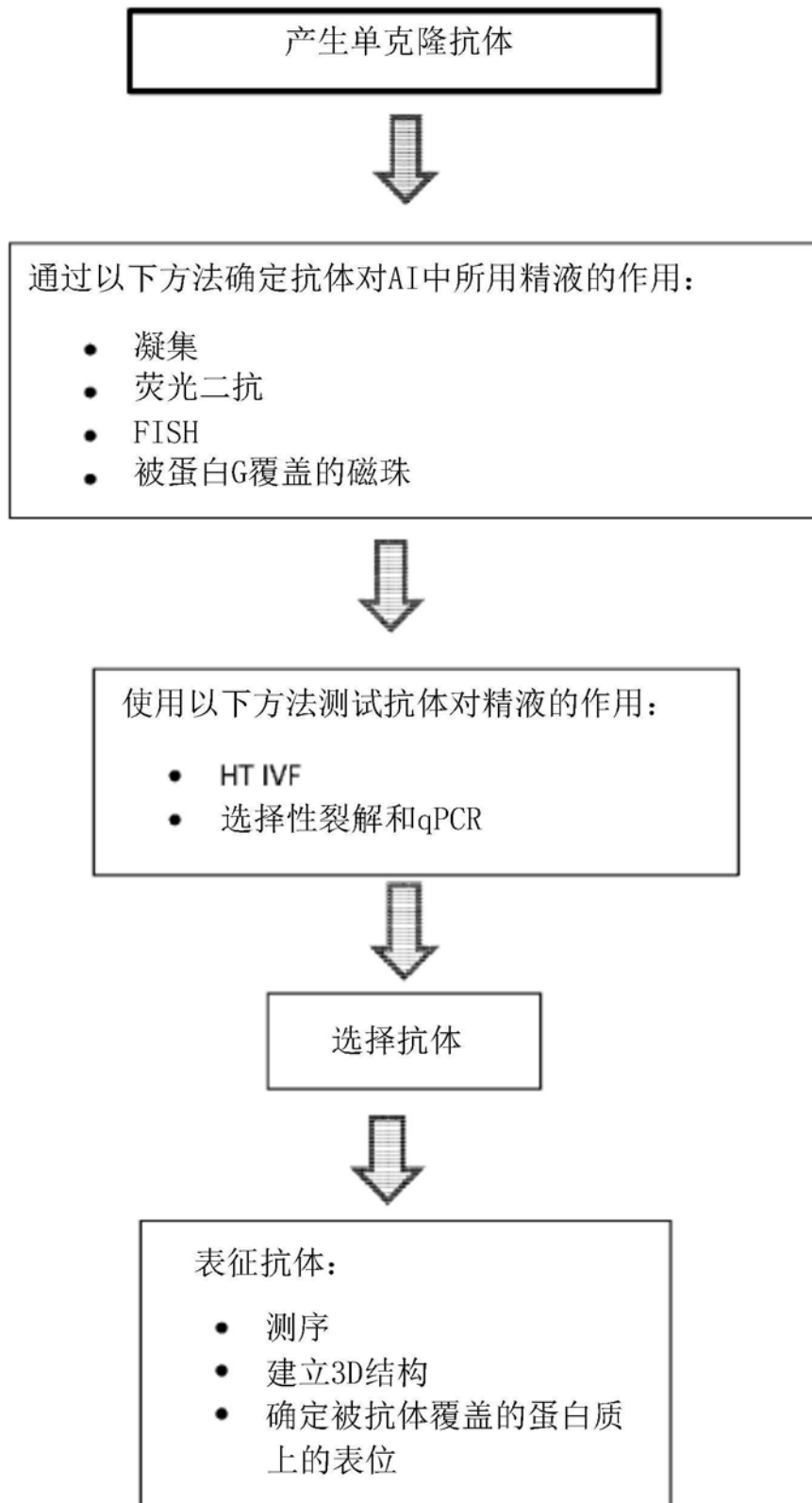


图9C