

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 1201552 B
CN 104004710 B

[12]

STANDARD PATENT SPECIFICATION
標準專利說明書

[21] Application No. 申請編號
15101909.1

[51] Int.Cl.⁸ C12N

[22] Date of filing 提交日期
26.02.2015

[54] HIGH PURITY X-CHROMOSOME BEARING AND Y-CHROMOSOME BEARING POPULATIONS OF SPERMATOZOA 具有高純度 X-染色體和 Y-染色體的精子群

[30] Priority 優先權

09.05.2000 US 60/203,089
12.10.2000 US 60/239,752
10.02.2001 US 60/267,571

[43] Date of publication of application 申請發表日期
04.09.2015

[45] Publication of the grant of the patent 批予專利的發表日期
29.06.2018

CN Application No. & Date 中國專利申請編號及日期

CN 201410254362.3 09.05.2001

CN Publication No. & Date 中國專利申請發表編號及日期

CN 104004710 27.08.2014

Date of Grant in Designated Patent Office 指定專利當局批予專利日期

29.09.2017

[73] Proprietor 專利所有人

XY, LLC
22575 State Highway 6 South
Navasota, Texas 77868
UNITED STATES/UNITED STATES OF AMERICA
XY 有限責任公司
美國/美利堅合眾國

[72] Inventor 發明人

Kenneth M.Evans 肯尼思·M·埃文斯
Erik B.Van Munster 埃里克·B·范·芒斯特

[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址
SANYOU INTERNATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY (HONG
KONG) LIMITED

ROOM 601, 6/F., YUE XIU BUILDING
160-174 LOCKHART ROAD, WANCHAI
Hong Kong

三友國際知識產權代理(香港)有限公司
香港

灣仔駱克道 160-174 號
越秀大廈 6 樓 601 室



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104004710 B

(45)授权公告日 2017.09.29

(21)申请号 201410254362.3

(22)申请日 2001.05.09

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104004710 A

(43)申请公布日 2014.08.27

(30)优先权数据
60/203,089 2000.05.09 US
60/239,752 2000.10.12 US
60/267,571 2001.02.10 US

(62)分案原申请数据
01810748.6 2001.05.09

(73)专利权人 XY有限责任公司
地址 美国德克萨斯州

(72)发明人 肯尼思·M·埃文斯
埃里克·B·范·芒斯特

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 丁香兰

(51)Int.Cl.
G12N 5/076(2010.01)

(56)对比文件
CN 85109013 A,1986.07.30,
Lawrence A. Johnson et al..The
beltsville sperm sexing technology: high-
speed sperm sorting gives improved sperm
output for in vitro fertilization and AI.
《J Anim Sci》.1999,第77卷(第Suppl.2期),第
213页摘要、第214页左栏第2段、第217页左栏第
2-3段、第219页表1、第220页左栏第1段。

刘彦威等.精子分离方法的研究进展.《上海
畜牧兽医通讯》.1994,(第1期),第31页。

审查员 于婷

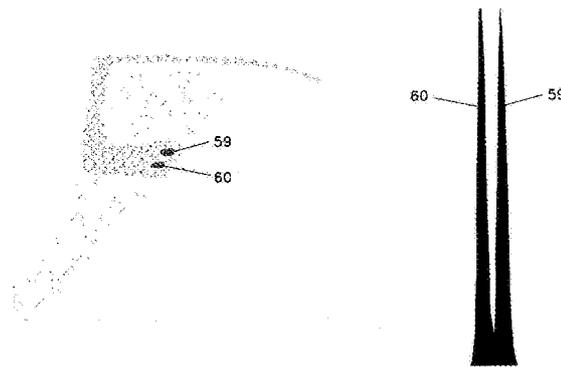
权利要求书2页 说明书31页 附图31页

(54)发明名称

具有高纯度X-染色体和Y-染色体的精子群

(57)摘要

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



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

a. 从雄性的哺乳动物物种中收集精子细胞;

b. 根据测定所述精子细胞的核DNA的量而确定所述精子细胞的性区别特征;

c. 通过下述步骤根据所述的性区别特征区分所述精子细胞:(i) 针对检测器,定向所述的精子细胞;(ii) 检测对精子细胞针对所述检测器的取向具有不同响应特征的光;将对精子细胞的取向具有不同响应特征的光转换成至少一种包含精子细胞的取向信息的信号;和(iii) 确定所述精子细胞针对所述检测器的取向;其中,所述检测器包括至少一个光电倍增管,所述光电倍增管具有400伏特到999伏特的典型的操作电压范围,并且所述光电倍增管是在从0伏特到300伏特的范围内操作的;

d. 将区分的精子细胞分离成带X-染色体的精子细胞群和带Y-染色体的精子细胞群;并且

e. 生产分离的带X-染色体的精子细胞群和带Y-染色体的精子细胞群,每种精子细胞群的纯度大于90%。

2. 如权利要求1所述的分离带X-染色体的精子细胞和带Y-染色体的精子细胞的方法,其还包括在权利要求1的步骤b和步骤c之间将所述精子细胞引入液流的步骤,并且其中步骤c还包括:

分析所述液流中夹带的精子细胞;

并且其中步骤d还包括:

形成液滴,所述液滴具有一个被夹带的精子细胞;

根据所述液滴夹带的精子细胞的性区别特征,使每一个液滴带上不同的电荷;

使每一个液滴发生偏转;以及

根据所述液滴夹带的精子细胞的性区别特征,区分收集所述液滴。

3. 如权利要求1所述的分离带X-染色体的精子细胞和带Y-染色体的精子细胞的方法,其还包括,在权利要求1的步骤a和步骤b之间对所述精子细胞的核内的DNA进行染色的步骤。

4. 如权利要求3所述的分离带X-染色体的精子细胞和带Y-染色体的精子细胞的方法,其还包括,在权利要求1的步骤c(i)和c(ii)之间对所述精子细胞核内的被染色的DNA进行照射的步骤。

5. 如权利要求4所述的分离带X-染色体的精子细胞和带Y-染色体的精子细胞的方法,其还包括,在权利要求1的步骤c(i)和c(ii)之间检测经照射的所述精子细胞核内的被染色的DNA所发射的荧光的步骤。

6. 如权利要求5所述的分离带X-染色体的精子细胞和带Y-染色体的精子细胞的方法,其中所述的检测经照射的所述精子细胞核内的被染色的DNA所发射的荧光的步骤包括,用光电倍增管生成信号。

7. 如权利要求4所述的分离带X-染色体的精子细胞和带Y-染色体的精子细胞的方法,其中对所述精子细胞核内的被染色的DNA进行照射的步骤还包括,对于核长度 $9\mu\text{m}$ 的牛精子产生具有高度 $20\mu\text{m}$ 的照射光束的图案。

8. 如权利要求2所述的分离带X-染色体的精子细胞和带Y-染色体的精子细胞的方法,

其中所述的形成液滴的步骤包括,形成包封所述精子细胞的液滴。

9. 如权利要求2所述的分离带X-染色体的精子细胞和带Y-染色体的精子细胞的方法,其还包括,从具有圆形管口的喷嘴中喷出所述液流的步骤,其中所述的管口具有70微米的直径。

10. 如权利要求1、3、7或8所述的分离带X-染色体的精子细胞和带Y-染色体的精子细胞的方法,其中所述的带X-染色体的精子细胞群和带Y-染色体的精子细胞群的纯度为选自90%到100%之间,91%到100%之间,92%到100%之间,93%到100%之间,94%到100%之间,95%到100%之间,96%到100%之间,97%到100%之间,98%到100%之间,99%到100%之间所组成的组。

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

12. 如权利要求8所述的分离带X-染色体的精子细胞和带Y-染色体的精子细胞的方法,其中形成具有一个被夹带的精子细胞的液滴的步骤包括液滴形成速率,该速率选自每秒至少10,000个液滴,每秒至少20,000个液滴,每秒至少30,000个液滴,每秒至少40,000个液滴,每秒至少50,000个液滴,每秒至少60,000个液滴,每秒至少70,000个液滴,每秒至少80,000个液滴,每秒至少90,000个液滴,每秒至少100,000个液滴所组成的组。

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

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

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

具有高纯度X—染色体和Y—染色体的精子群

[0001] 本申请是再次分案申请,其所针对的原分案申请的中国国家申请号为200810166001.8,申请日为2001年5月9日,发明名称为“具有高纯度X—染色体和Y—染色体的精子群”;该原分案申请的原申请的国际申请号为PCT/US01/15150,中国国家申请号为01810748.6,申请日为2001年5月9日,发明名称为“具有高纯度X—染色体和Y—染色体的精子群”。

技术领域

[0002] 分离的具有高纯度X—染色体或Y—染色体的精子群以及根据例如质量、体积、DNA含量等等区别特征分离精子、粒子、或事件的方法。

背景技术

[0003] 分离的具有高纯度X—染色体或Y—染色体的精子群可以被用于完成很多哺乳动物例如牛科动物、马科动物、羊科动物、山羊、猪、狗、猫、骆驼、大象、公牛、水牛等等的卵细胞或卵母细胞的体内或体外的授精或人工授精。另见,美国专利5,135,759,在此引入作为参考。

[0004] 但是,传统的将带有X—染色体和Y—染色体的精子群分离的方法会产生低纯度的精子群。不论何种方法,精子一直都没有被分离成具有例如90%,95%,或大于95%的高纯度的X—染色体或Y染色体的精子样品。

[0005] 有关直接或间接根据大小、质量、或强度差异将带有Y—染色体的精子同带有X—染色体的精子分开的一些方法已经被公开。如美国专利号4,474,875所公开的,对所有精子细胞同时应用一种浮力而使分离培养基中带有X—染色体或Y—染色体的精子分离到不同的位置。美国专利号5,514,537公开了一种技术,其中精子穿过装有两种规格珠子的层析柱。带有大的X—染色体的精子被分离到含有大珠子的层中,而带有较小的Y—染色体的精子被分离到含有较小珠子的层中。美国专利No.4,605,558公开了可以使精子对密度梯度差分敏感的方法。而美国专利No.4,009,260利用了带有X—染色体的精子和带有Y—染色体的精子在通过柱中阻碍介质的迁移速率或游动速率的差异。

[0006] 上面提到的每一项技术共同存在的问题是这些技术对精子以“大批量方式”起作用,意思是所有精子都在同一时间经受相同的处理,而带有Y—染色体的精子细胞比带有X—染色体的精子出来的更快更早,或处于不同的位置。这样,单个的精子细胞不能被鉴定并且不存在实际的体积、质量、密度或其它精子细胞特征的“量度”。逐个鉴定精子细胞在实际分离过程中所能带来的益处可以被检测到,并且甚至在分离过程中能够生成实物定量数据,和分离参数如所希望的变化。这些技术不能同流式细胞筛选装置一块使用。

[0007] 用于分离精子的流式细胞仪技术也已经被公开。利用这些技术时应当用荧光染色剂对精子染色并使其在一束狭窄的流或谱带—例如激光束一类的激发或照射源中流过。当被染色的颗粒或细胞经过激发或照射源时,荧光染色剂发出荧光。可以通过光学装置收集荧光,聚焦在象光电倍增管一类能够产生并倍增电信号的检测器上,然后用分析器进行分

析。接着用多参数或单一参数的色谱图或直方图显示这些数据。可以用细胞的数目以及每个细胞的荧光作为坐标。见美国专利No.5,135,759,在此引入作为参考。但是,针对这类技术仍然有大量没有解决的问题并且分离高纯度的带有X-染色体或Y-染色体的精子细胞是困难的。

[0008] 传统的流式细胞仪技术的一个显著问题是鞘液中的物质、颗粒、或者细胞的定向。当物质或者细胞相对于超过一个轴—例如精子—而使得形状不规则时候,这尤其成为问题。这一问题一个方面应当是在鞘液中建立物质的初始取向。这一问题的第二个方面是在被测物质发光期间保持物体相对于检测器(光电倍增管或其它类似的仪器)的取向。

[0009] 传统的流式细胞仪技术的另一个显著问题是不能将物质或细胞包裹在液滴中。尤其是,当在不规则形状物体的周围形成液滴时,液滴的大小不足以完全覆盖物质或细胞的所有部分。例如,在流式细胞仪作用期间,如上所述的液滴能够以很快的速度形成,甚至每秒10,000到90,000之多,在有些情况下每秒80,000个之多。当精子被包封在液滴中时,特别是以这样快的速率,精子的尾部或颈部的一部分没有被包封在液滴中。没有被包封在液滴中的尾和颈的那部分会以某种干扰后面液滴形成或液滴正确偏转的方式与喷嘴或液滴的周围环境起反应。因此有些精子根本没有被分析到从而降低了这一方法的效率,或者没有被消除到足以赋值给一个细胞群,或者偏离正常轨道,或者全部情况的组合发生。

[0010] 传统的流式细胞仪技术以及其它技术的另一个显著问题是测量事件的巧合。这一问题一个方面是来自第一个事件的入射光通量在来自第二个事件的入射光通量开始产生信号后继续产生信号。这样,两个事件至少残留有一部分不能相互区分开来。这一问题的另一方面是两个或者更多的事件同时发生并且入射光通量包括了所有事件的贡献。这样,事件的多样性根本没有被解决并且针对事件多样性的物体被错误地赋值给某一个精子群或者根本没有赋值给精子群,或者两种情况都存在。尤其是,有关流式细胞仪,悬浮的单个颗粒、物体、细胞、或精子通过能够使它们相互反应的一束光时发生了一种可测量的反应,例如发射荧光。在传统的流式细胞仪中,Hoechst染色的精子经过一束激光时导致荧光发射。在实际发射事件结束之后,从被激发的结合到DNA上的荧光剂所发射的荧光的光亮度足以在传统光电倍增管中产生一段时间的电子流。而且,在传统的流式细胞仪中,激光束能够产生具有30 μm 高和约80 μm 宽的图案。含有同DNA结合的荧光染色剂的牛精子核可以是约9 μm 长,使激光束的高度比核大三倍。这种差别使得激光对激光束图案中多于一个的精子中结合的荧光染色剂同时进行刺激。这些存在于传统的流式细胞仪的每个问题降低了区分各个事件的能力。

[0011] 传统的流式细胞仪技术以及其它技术的另一个显著的问题是不规则形状物体,例如精子,根据激发/检测途径中它们的取向而产生不同的信号(形状、持续时间或总数)。这样,均质群体中的个体能够产生一个较宽的发射光谱,其特点是可能同另一个均质群体中的个体的发射特性重叠,避免或减少了分辨两个群体中个体的能力。

[0012] 传统的流式细胞仪技术以及其它技术的另一个显著问题是物体没有均一地暴露给激发源。当物体同光束周围接近时,传统光束成形光学不能提供均一的激光暴露。

[0013] 传统的流式细胞仪技术的另一个显著问题是,物体例如精子不必要地长时间暴露于激发源中。用激光对细胞,例如精子的辐射可能导致细胞或细胞中的DNA被破坏。

[0014] 传统流式细胞仪技术的另一个显著问题是可能会发生注射管破坏喷嘴中的片流

膜。片流膜的破坏会改变流体中不规则形状物体的取向并降低分类速度以及已被分类的带有X-染色体和Y-染色体的精子群体的纯度。

[0015] 用染色剂结合到精子细胞的核DNA上的技术也可能存在其它问题。首先,由于核中的DNA是高度浓缩的并且形状是平的,对DNA的化学计量染色是困难的或者不可能。其次,被染色的核具有较高的折射指数。第三,结合到DNA上的染色剂形成的DNA-染色剂复合物可能降低授精率或其后的胚胎的生存率。第四,DNA-染色剂复合物通常用紫外光照射以使染色剂发出荧光。这种照射可能影响精子的生存率。由于这些不同的问题,应当优选的使用一种染色剂需求更低或者不需要染色剂,或者更少紫外照射或者不需要紫外照射,或者两者的需要都更少或者都不需要的方法。

[0016] 针对产生高纯度的带有X-染色体或Y-染色体精子细胞群(无论是活的、固定的、有活力的、没有活力的、完整的、无尾的、或者作为核)的样品,或者一般地,针对在具有相当高的入射光通量的一系列事件之间的成像信号中检测微小的差异,或者是针对在流体中确定不规则形状物体的取向,或者在一个光学路径中消除偶然事件,或者从分析中去除不需要的定向物体,本发明以一种实际的方式说明了对上面提到的每个问题的解决。

发明内容

[0017] 本发明的一个显著的目的是提供分离的带有高纯度X-染色体和Y-染色体的精子群。分离的非天然存在的高纯度精子群具有很多用途,包括哺乳动物后代的性别选择,各种体外卵细胞授精方案,象人工授精一类的各种体内授精方案,商业上的方法包括繁殖珍稀动物或者是肉用动物,或者保护珍稀或濒临灭绝的动物,但是这只例举了高纯度精子细胞群的用途。

[0018] 本发明的另一个显著的目的涉及生产带有高纯度X-染色体和Y-染色体的精子样品的设备和方法。

[0019] 本发明描述的一个特别的实施例可以用于上述多种用途,可以用来成功地区分光发射事件的全部光通量中之微小可测量差异,在液流中确定不规则物体的取向,使一个光学路径中的偶然事件减低到最小限度,去除光学路径中由不需要的没有取向的物体所贡献的信号(包括物体本身的去除),以及液滴中不规则形状物体的包封。这样,本发明的具体目的应当非常广泛。

[0020] 本发明的另一个显著目的是提供具有高纯度X-染色体和Y-染色体的精子样品(活的、固定的、有活力的、没有活力的、完整的、无尾的、或者精子核),样品具有的高纯度梯度范围是80%、85%、90%、95%或者甚至大于95%。

[0021] 本发明的一个具体实施方案的另一个显著目的是甚至以高分离率分离带有高纯度X-染色体和Y-染色体的精子细胞群。高速分离以生产每一个性别的活精子的速率约为每秒500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000个或者甚至每秒10000个或者更高。

[0022] 本发明的一个具体实施方案的另一个显著目的是在流式细胞仪的流动路径的激发/检测部分完全消除或者去除具有不需要取向的精子(活的、固定的、有活力的、没有活力的、完整的、无尾的、或者精子核)。

[0023] 本发明的一个具体实施方案的另一个重要目的是提供具有高纯度X-染色体或者

Y-染色体的人工授精样品。

[0024] 本发明的一个具体实施方案的另一个重要目的是提供具有高纯度X-染色体或者Y-染色体的体外授精样品。

[0025] 本发明的一个具体实施方案的另一个重要目的是能够对经高纯度人工授精样品的雌性的后代的性别进行预选,用高纯度人工授精样品授精的授精卵的后代性别的选择成功率为80%、85%、90%、95%或者甚至大于95%。

[0026] 本发明的一个具体实施方案的另一个重要目的是区分总发射光通量具有较小差异的光发射事件。

[0027] 本发明的具体实施方案的另一个重要目的是能够完全消除或者降低由光电倍增管在暴露于高入射光通量中一段时间后,甚至在无光的情况下所产生的背景噪声量。

[0028] 本发明的具体实施方案的另一个重要目的是能够完全消除同流式细胞仪或者其它仪器一起使用的光电倍增管光电阴极的饱和度。

[0029] 本发明的具体实施方案的另一个重要目的是能够减少从光电倍增管光电阴极迁移到第一个二次发射极的电子数目。

[0030] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够减少光电倍增管中流向N极的电子总数。

[0031] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够在不相应地增加由光电倍增管产生的背景信号的情况下使光电倍增管光电阴极的光通量增加。

[0032] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够增加来自测量的光发射事件的信号在背景信号中的比率。

[0033] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够在高入射光通量事件或者连续高入射光通量事件期间使光电倍增管产生的放大信号强度增大而光电倍增管的阴极并不饱和。

[0034] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提高由于对用荧光染色的精子或其它细胞或其它物体的分类而得到的色谱图或者直方图的表现分辨率,对荧光染色剂的激发会产生具有微小差异的光通量。

[0035] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是在用分类流式细胞仪装置对精子进行分类时能够提高装置的校准。

[0036] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提高流式细胞仪系统的精子分类率。

[0037] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提高用流式细胞仪分类的精子样品的纯度。

[0038] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提供将带有X-染色体的精子从带有Y-染色体的精子中分离出来的技术,两种精子的核DNA总数中Y染色体的DNA和X染色体的DNA的量略有差别。

[0039] 本发明的一个具体实施方案的另一个重要目的是提供在用流式细胞仪将带X-染色体的精子同带Y-染色体的精子分离开的步骤中提高生成的直方图表现分辨率的技术。

[0040] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提供将激发/检测路径中目标的重叠降低到最小程度的成形光束的光学装置。

[0041] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够提供将物体暴露经过激发光束时的总流明数减少到最小的成形光束的光学装置。这一目的的一个方面是降低物体暴露到的光强的总流明数。该目的第二个方面是提高光源的强度而不提高被暴露物体的总流明数。

[0042] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是提供当物体通过光学路径时使之均匀暴露的成形光束的光学装置。

[0043] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是提供能够使液流中不规则物体定向的喷嘴。该目的的一个方面是使物体在相同方向上定向延长。该目的的第二个方面是使平板物体的背侧在相同方向定向。

[0044] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够在将不规则形状物体完全包封在一个液滴内。

[0045] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是能够将液流中不需要定向的物体同需要定向的物体区分开来。

[0046] 本发明具体实施方案的另一个重要目的是提供区分干扰对比技术,据此平面物体是由带有目标物体的液流组成的,以及据此平面图像可以用来测量来自经过物体的信号。

[0047] 本发明一个实施方案的另一个目的是能够提供一种光学装置以形成使每个物体的两个侧面分开的图像,以使一个用于测量物体的实际体积,而另一个用来确定物体的取向。这样,因取向不正确而不能精确测量其体积的物体能够被抛弃掉。这可以通过改进而完成,所以利用用图像平面中的两个针孔从而使由这些双图像产生的光脉冲被独立检测出来。调谐光学装置以使第一个图像产生的光脉冲同物体的体积成比例,并且第二个图像产生的光脉冲取决于物体在被测量时的取向。

[0048] 本发明的一个实施方案的另一个目的是能够提供一种补偿方式,因为物体被包含在液流之内。例如液流可以是一柱水,它起了柱面透镜的作用,因此使物体的图像扭曲。从光学上讲,这相当于柱体的折射指数(水)比它周围环境(空气)高。尽管其它不同形状和折射指数的补偿元件可以根据需要设定,但本发明中所公开的补偿能够由例如具有比它周围环境的折射指数低的柱体所组成。通过确保光通过这一补偿元件,可以由该补偿元件正好相反的行为来补偿液流的光学效果。

[0049] 通过说明书和权利要求书的其他部分公开了由本发明自然延伸的物体。

附图说明

[0050] 图1显示了一般的流式细胞仪。

[0051] 图2显示了一般的流式细胞仪的第二种视图。

[0052] 图3显示了没有放大器的发明(图3a)的单变量流式细胞仪的单变量直方图(#1,#2,以及#3)同相同流式细胞仪—利用了特定的放大作用的发明的实施方案的单变量直方图(图3b)之间的比较,说明了在带有X-染色和Y-染色体的牛精子细胞群之间分辨率的改善。

[0053] 图4显示的单变量和双变量直方图说明了带X-染色体和带Y-染色体的牛精子细胞群之间的常规分辨率。

[0054] 图5显示的单变量和双变量直方图说明了利用放大作用的发明的一个特定实施方案使带X-染色体和带Y-染色体的牛精子细胞群之间的分辨率提高。

[0055] 图6显示的单变量和双变量直方图的第二个例子说明了带X-染色体和带Y-染色体

的牛精子细胞群之间的常规分辨率。

[0056] 图7显示的单变量和双变量直方图的第二个例子说明了利用放大发明的一个特定实施方案使带X-染色体和带Y-染色体的牛精子细胞群之间的分辨率提高。

[0057] 图8显示的单变量和双变量直方图说明了带X-染色体和带Y-染色体的马精子细胞群之间的常规分辨率。

[0058] 图9显示的单变量和双变量直方图说明了利用放大作用的发明的一个特定实施方案使带X-染色体和带Y-染色体的马精子细胞群之间的分辨率提高。

[0059] 图10显示的单变量和双变量直方图说明了利用放大作用的发明的一个特定实施方案使带X-染色体和带Y-染色体的马精子核之间的分辨率提高。

[0060] 图11显示了一个改进的电路板的特定的实施方案将放大发明用于MoFlo[®]流式细胞仪。

[0061] 图12显示了针对MoFlo[®]流式细胞仪的一个放大发明的特定的实施方案的电路图。

[0062] 图13显示了用传统成形光束的光学装置(图13a)的激光束图案和用降低高度的成形光束的光学装置的激光束图案(图13b)。

[0063] 图14显示的条形图比较了用常规技术或者单独使用放大发明技术或者结合降低高度的成形光束的光学装置来分离的带X-染色体(图14a)的精子(图14b)的纯度的精子。

[0064] 图15显示了降低高度的成形光束的光学装置的正视图。

[0065] 图16显示了降低高度的成形光束的光学装置的俯视图。

[0066] 图17显示了物体定向喷嘴发明的透视图和两个交叉部分。

[0067] 图18显示了物体定向喷嘴发明的一系列分级交叉部分。

[0068] 图19显示了实施方案的斜面注射管发明的正视图和侧视图。

[0069] 图20描述了通过比较定向精子的信号(图20a和20b)和未定向精子的信号(图20c和20d)来去除不需要的未定向的精子(RUUS)的发明。

[0070] 图21显示了另一个实施方案的具有一个划槽状斜面叶片的斜面注射管发明的透视图。

[0071] 图22显示了同流式细胞仪配合的传统光学技术。

[0072] 图23a显示了典型的精子形状和大小,而图23b显示了正确取向和不正确取向的精子之间的差异。

[0073] 图24显示了本发明的实施方案所具有的能够测量例如体积和取向两种信号的一种构造。

[0074] 图25a和b显示了本发明的一个实施方案所具有的相应于每一个半圆的部分所具有的针孔,图25c显示了本发明的一个实施方案的一个平面图,图25d显示了本发明一个实施方案所具有的两个独立的可旋转偏振器。

[0075] 图26a和26b说明了本发明的一个实施方案的对液流的补偿方法,图26c显示了一个实施方案的补偿元件,26d显示了另一个补偿元件的实施方案,液流以及来自补偿元件的图像在平面图中彼此落在顶端。

[0076] 图27显示了干涉光学装置发明的一个实施方案。

[0077] 图28显示了干涉光学装置发明的第二个视图。

具体实施方式

[0078] 本发明涉及分离带有高纯度X-染色体和Y-染色体的精子或者精子细胞群。根据需要,带有高纯度X-染色体和Y-染色体的精子群可以包括完整的活的精子,也可以包括无尾的精子群(精核),或者其它有活力的或者没有活力的精子群形式。当发明所提供的具体的实施例上下文中描述的每个分离的完整的活精子细胞都具有精子细胞的头部、颈部和尾部时,应当清楚所描述的技术也可以在精子核中有各种不同的应用。带有X-染色体和Y-染色体的精子群应当进一步理解为包括但是不限于来自任何雄性哺乳动物物种的精子,来自人的精子和来自象牛科动物、马科动物、羊科动物、犬科动物、猫、山羊或猪的公知动物,以及象大象、斑马、骆驼、或者条纹羚一样的公众较少知道的动物。这份动物清单的目的是举例说明其精子可以通过常规方法以90%或更高纯度分离的各种动物,而不是对本发明说明书中描述的精子可以来自任何哺乳动物的特定的种进行限制。

[0079] 从哺乳动物的不同的种所分离的高纯度精子可以成为产品并能够用于各种人工授精方案或者作为商业方法的一部分,例如在那些美国专利申请60/211,093、60/224,050或者PCT/US99/17165中所描述的那样;或者可以用于如PCT/US98/27909申请中所描述的低剂量授精方案,或者如美国专利申请60/253,785中所描述的用于给动物包括人的卵母细胞进行体外授精,每个上面描述的引用都在此引入作为参考。

[0080] 这里所用的术语纯度或者高纯度应当被理解为分离的具有特定区别特征或所需的各种特征的组合的精子群的百分比。例如,当精子群的分离是基于带有与Y-染色体相反的X-染色体,纯度为90%的带有X-染色体的精子群是指所含精子群中有90%的单个精子带有X-染色体而该精子群的其它10%可能是带有Y-染色体的精子。因此,带有高纯度X-染色体或者Y-染色体的精子群应当包括的纯度选自由90%到约100%之间,约91%到约100%之间,约92%到约100%之间,约93%到约100%之间,约94%到约100%之间,约95%到约100%之间,约96%到约100%之间,约97%到约100%之间,约97%到约100%之间,约98%到约100%之间,约99%到约100%之间所组成的组。

[0081] 重要的是,当本发明的许多实施方案描述分离的带有高纯度X-染色体和Y-染色体的精子群时,以及当说明书进一步公开用高纯度精子分离装置和方法如何分离以及如何利用分离的高纯度精子群时,应当清楚本发明的基本概念是可以用于其他类型的具有粒子区别特征的粒子或具有事物区别特征的事物。应当清楚本发明可以应用于各种各样的需要解决成像信号的微小差异的事项中,例如本领域技术人员容易理解的产品缺陷检测、场流分级分离法、液相色谱、电泳、计算机X线断层摄影术、 γ 摄像、飞行测试仪的时间检测等。

[0082] 另外,当这种公开提供了对流式分离带X-染色体的精子和带Y-染色体的精子的装置和方法的实施方案的描述时,对本发明中这些实施方案的描述并不意味着将本发明的范围缩小到仅仅是精子的流式分离或者仅仅是高纯度流式细胞仪精子分离系统,而是用这些实施例以一种实际的方式对本发明的基本概念进行举例说明以说明他们能够用于广泛的用途。

[0083] 现在参见图1和图2,图示的本发明实施方案的流式细胞仪包括一个起固定或提供用至少一种荧光染色剂染色的粒子或者细胞以用于分析作用的粒子或细胞源1。这些粒子

或细胞以一种方式被保藏在喷嘴2中,这种方式使得粒子或者细胞被引入液流或者鞘液3中。通常将一些鞘液从鞘液源4提供到鞘液3中从而当粒子或者细胞源1将粒子或细胞供给鞘液4时,他们并行地通过喷嘴2提供。

[0084] 从这种形式中可以容易地理解鞘液3是如何为粒子或细胞形成鞘液环境的。由于各种液体是以某种压力提供到流式细胞仪中的,它们流出喷嘴2并离开喷嘴口5。通过提供可以用振荡控制器7进行精确控制的某一类型振荡器6,可以在喷嘴2内建立压力波并将压力波传送到在喷嘴口5处离开喷嘴2的流体中。由于振荡器6在鞘液3上起作用,离开喷嘴口5的流体8最终形成规则排列的液滴9。由于粒子或细胞被液体流或鞘液环境所包围,液滴9可能在其内部带走单个分离的粒子或者细胞,这些粒子和细胞在本发明的某些实施方案中是精子细胞。

[0085] 由于液滴9能够带走粒子或细胞,因此根据粒子或细胞的特征,该流式细胞仪可被用于分离粒子、细胞、或者精子细胞等类似的物质。这可以通过粒子或细胞感应系统10来完成。这种粒子或细胞感应系统至少包含可以对液流8中所含有的粒子或细胞产生响应的某种类型的检测器或传感器11。粒子或细胞感应系统10可根据是否具有某一特征而产生响应,例如结合到粒子或细胞或细胞中的DNA上的荧光染色剂,荧光染色剂在被如激光励磁机12所产生的能够使粒子产生响应的光束的照射源激发后产生响应。当每种类型的粒子、细胞或精子细胞的核DNA被用至少一种荧光染色剂染色时,根据所用特定类型的荧光染色剂所能够结合到的所述部位的数量不同,结合到每一个单个粒子或细胞的荧光染色剂的量是不同的。对于精子细胞,Hoechst33342染色剂可以结合到的部位取决于每个精子细胞所含的DNA的量。由于带X-染色体的精子所含有的DNA的量比带Y-染色体的精子所含有的DNA的量多,因此,带X-染色体的精子比带Y-染色体的精子所结合的荧光染色剂的量就多。因此,通过激发后,通过测量结合的荧光染色剂所发出的荧光,就能够区别带X-染色体的精子和带Y-染色体的精子。

[0086] 为了根据粒子或细胞的特性而达到分离的目的,可以通过传感器11接收所发射的光并且反馈给某种类型的连接到液滴充电器上的分离辨别系统或分析器13,液滴充电器根据液滴9所含的粒子或细胞的特征而使每个液滴9带上不同的电荷。以这种方法根据液滴中是否含有合适的粒子或细胞,分离辨别系统或分析器13起到了让静电偏转极板14使液滴9偏移的作用。

[0087] 因此,流式细胞仪起到通过使粒子或细胞指向一个或多个收集容器15而达到使粒子或细胞16分离的作用。例如,当分析器基于精子细胞的特征区别精子细胞时,含有带X-染色体的精子液滴被带上正电并且因此在一个方向上偏移,而含有带Y-染色体的精子液滴被充上相反的负电荷并且因此向另一个方向偏移,并且废弃的液流(不带粒子或细胞或带有不需要的或者带有未筛选细胞的液滴)被留下而未被充电并且因此在未发生偏移的液流中被收集到抽吸管或者类似的容器中,如美国专利申请09/001,394中所论述的,在此引入作为参考。自然地,可以建立很多偏移轨道并同时收集。

[0088] 为了常规的将粒子、细胞、精子细胞或精子(完整的、活的、固定的、有活力的、没有活力的或者是核)分离成高纯度的带有X-染色体和Y-染色体的群体,所用的粒子鉴别装置或方法应当提供高分辨率的区分特征以作为分析和分离的基础。

[0089] 针对精子,如上面所述,对结合到带有X-染色体的精子细胞的核DNA上的荧光染色

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

[0090] 在许多应用中,由多个发射事件入射到可以是光电倍增管的检测器上的总发射光可以较高,而待区分的各发射事件的发射光之间的差别可以较小。

[0091] 当光发射事件以高速率连续发生并且光发射事件之间的间隔时间很短时,就象用流式细胞仪进行高速细胞筛选一样,这样的问题会加重。当根据所结合的荧光染色剂的区别来分离粒子、细胞或者精子细胞时,可以产生流过激发源的细胞并且每秒有大量的发光事件发生。因此,液流中能够发光的粒子、细胞或者精子细胞的数量可能很多。随着流速的增加,激发源的截取点变得非常明亮。光电倍增管光电阴极上的这种高水平的入射光会导致与背景信号比例非常低的信号。当使用象Hoechst33342一类的荧光染色剂标记精子细胞的核DNA时,背景信号的量会进一步加重。

[0092] 解决这一问题的许多方法集中在通过在光电倍增管前放置光学滤光片来降低光电阴极管的总光通量。这种方法并未改变信号与背景信号的比例,后来的提高光电倍增管的灵敏度的尝试产生了额外的背景信号,因为来自背景信号的数量使光电倍增管达到了饱和。

[0093] 典型地,光电倍增管的工作电压范围约为400伏特到约900伏特。由Hamamatsu公司提供的象光电倍增管R928以及R1477一类的标准光电倍增管的线性操作下限约为300伏特。因此,装配用光电倍增管的设备或装置在等于或大于400伏特下操作光电倍增管。即使阳极电子数减少到所需要的程度,如美国专利4,501,366和5,880,457所公开的,光电阴极和一号二次发射极之间的电压保持高伏特数并且通过降低剩余二次发射极的电压或者过滤掉电子所固有的暗噪声和散粒噪声来实现阳极电子的减少。

[0094] 出乎意料的,将光电倍增管的伏特数降低到低于400伏特到约280伏特,或者约250伏特,或者甚至到0伏特时,即使当从每一个光发射事件的总发射光量较高或者甚至当每秒发生的光系列事件数很多时,也可以使光发射的细微差别能够被区分开。针对照射结合到精子细胞的核DNA上的荧光染色剂所产生的光发射事件的速率,在分离带X-染色体的精子和带Y-染色体的精子期间,本发明允许光发射事件所能够达到的速率增加到每秒至少5000个可分离事件,每秒至少6000个可分离事件,每秒至少7000个可分离事件,每秒至少8000个可分离事件,每秒至少9000个可分离事件,每秒至少10,000个可分离事件,每秒至少11,000个可分离事件,每秒至少12,000个可分离事件,每秒至少13,000个可分离事件,每秒至少14,000个可分离事件,每秒至少15,000个可分离事件,每秒至少16,000个可分离事件,每秒至少17,000个可分离事件,每秒至少18,000个可分离事件,每秒至少19,000个可分离事件,每秒至少20,000个可分离事件,每秒至少25,000个可分离事件,每秒至少30,000个可分离事件,每秒至少35,000个可分离事件或者更高。

[0095] 作为一个具体的实施例,装配现有的Cytomation SXMoflo[®]流式细胞仪在400伏特下限下操作光电倍增管。可调整增益值在高压而不是在低压下操作光电倍增管。SXMoflo[®]流式细胞仪可以通过再装配光电倍增管调节器被改换。可以用2.0K的电阻器替换第三通道的R16C电阻器(2.49千欧姆)以改变放大器的增益值从而控制光电倍增管。这种转换使光电倍增管可在约280伏特下被操作。类似的转换可以是平行使用两个带3.75千欧姆

电阻器的SX MoFlo[®]流式细胞仪,或者使用一个可以使光电倍增管分别在约200伏特或略高于零伏特的电压下被操作的1.3千欧姆的电阻器。针对这种转换,由于在典型的操作电压范围之外操作光电倍增管,也可以去除在光电阴极前的中密度滤光片。

[0096] 出乎意料的是,由于通过光电倍增管将信号转换成电信号使这种转换提高了光发射事件的信号对噪声的比率,然后通过提高增益放大器到分析器13的模拟数字转换器的合适水平以放大更清晰的信号并且输出生产的单变量或双变量直方图。

[0097] 现在参考图3,在利用本发明(图3a)之前,比较三个不同的SX MoFlo[®](#1,#2,#3)流式细胞仪的单变量直方图,并且显示了用本发明(图3b)中有关分离完整的活的喷射出的牛精子。正如从单变量直方图中所能够理解的,利用本发明实质上可以提高完整的活的带X-染色体的精子17和活的带Y-染色体的精子18的分离度(由峰谷所代表的带X-染色体的精子和带Y-染色体的精子的表现差异)。

[0098] 在利用本发明实施方案之前用SX MoFlo[®]流式细胞仪对于带X-染色体的精子和带Y-染色体的精子的完整活精子分离速度或筛选速度约为 $17.9 \times 10^6 / 4.5$ 小时(即在两种流束中—第一种流束是带X-染色体的精子而第二种流束是带Y-染色体的精子的分离或筛选速度约为每秒1,100),纯度约为87%,范围是84%到93%。对于三种筛选的可分离事件的速率分别为22000,23000,以及20000。

[0099] 经过上述转换后活精子的平均筛选速率约为 $40.3 \times 10^6 / 4.5$ 小时(即约每流束每秒约为2,500),纯度为90.8%,范围是89%到92%。对于三种筛选的事件速率分别是每秒13000、15,000、以及19,500。

[0100] 从数据中可以看出本发明这一实施方案不仅能导致分离的精子群的纯度提高而且能使分离或者筛选速率超过一倍,而可分离事件的速率实际上降低了。

[0101] 类似的,现在参见图4和图5,它们显示了在利用本发明之前(图4)和按照上述转换之后(图5)利用SX MoFlo[®]流式细胞仪#1对牛的完整的活精子筛选的双变量直方图。在利用本发明之前,先于440伏特下在光电阴极处将激光调整到135MW,1倍的增益以及1.0中密度滤光片(1/10振幅)操作SX MoFlo[®]流式细胞仪,每秒约10,000事件。接着用本发明,在光电阴极处于约262伏特下操作SX MoFlo[®]流式细胞仪,将激光调整到大约100MW,4倍增益并且不用中密度滤光片,每秒约10,000可分离事件。由这些数据中可以理解,带X-染色体群体19和带Y-染色体的群体20之间峰谷深度的增加证明了分辨率有很大的提高。

[0102] 类似的,现在参考图6和图7,分别显示了在如图3和图4所示的相同参数下,在用本发明实施方案之前用SX MoFlo[®]流式细胞仪#2对公牛完整的活精子筛选得到的双变量直方图(图6)以及使用本发明实施方案进行操作的直方图(图7)。又一次通过带X-染色体群体21和带Y-染色体的群体22之间峰谷的深度证明了分辨率有大幅度提高。

[0103] 现在参见图8和图9,显示了在利用本发明实施方案前(图8)和之后(图9)用SX MoFlo[®]流式细胞仪对完整的活马精子分离或筛选得到的双变量直方图。当用本发明的实施方案时,用光电倍增管在低于300伏特的电压下在100mW功率的激光下分离或筛选活马精子时,分离速率或筛选速率超过每秒4,800,平均每秒12,000事件。带X-染色体的群体23和带Y-染色体的群体24提高的分辨率是惊人的。数据显示同不用本发明实施例的5个分离通

道之间的峰值相比较,利用本发明实施方案可以达到约8到9个分离通道,已被筛选的带X-染色体的群体和带Y-染色体的群体的纯度约为93%。

[0104] 现在参见图10,它显示了用本发明实施方案筛选的分离的用Hoechst33342染色的种马精子核(S-05400)点绘制的单变量和双变量直方图。精子核是由新射出的种马精子制备的。通过离心,超声处理洗涤精子并且所得到的用Percoll密度梯度离心分离头部和尾部。用2%的福尔马林洗涤,固定分离的头部,然后用Hoechst33342染色。用叠氮化钠(0.5%)固定被染色的核。样品在每秒5000事件下流出以制得直方图。然后染色的核被用于对按照上述本发明的实施方案所转化的合并了光电倍增管的SXMoFlo[®]流式细胞仪进行校准。补偿被用于校准两种群体的双变量绘制中(染色的X和染色的Y)。注意马精子核的两个群体如单变量绘制所示,几乎完全被基线消除。

[0105] 现在参考图11,对SXMoFlo[®]流式细胞仪的特别改进包括平行使用两个电阻器以提供1.8K的修正值。两个3.57K的电阻器25和26相当于约1.785K,足够接近有效值。利用这种改进,在这一特定的仪器上的光电倍增管可以在200伏特下运行。自然的,可以对用光电倍增管的其它流式细胞仪或其它仪器进行改进以测量来自特定事件的发射光量。图12提供了本发明特定实施方案的电子概要图。

[0106] 本发明的另一个重要的实施方案是降低了光束的光学图案的高度。如图13a所示,形成常规的照射光束的光学装置产生的光束图案27的高度比通过光束的精子细胞头部28更高或高很多。因此,有多于一个的含有结合到DNA上的荧光染色剂的精子头部同时进入光束图案中。在这种情况下,多个含有结合到DNA上的荧光染色剂的精子头部可以同时被激发而在单一发射事件中发出荧光。这样,在先前或后来的发射事件可能包括了光束图案27中其它精子头部所贡献的偶然光通量。这导致能够辨别带X-染色体的精子和带Y-染色体的精子的光发射事件之间平均光通量的差异降低。这也使得带X-染色体的精子或带Y-染色体的精子的比较光发射事件之间的平均光通量的差异降低。重要的是,结合到多个DNA上的荧光染色剂被同时激发提高了事件的平均亮度,使得事件之间的可测量光通量差异占总发射光通量的百分比更小。这使得对事件之间的差异进行定量更加困难。

[0107] 如图13b所示,通过减少光束形状的高度,在同一测量事件期间高度降低了的光束图案29中多个精子头部重合的情况减少。这导致区别带X-染色体的精子和带Y-染色体的精子的光发射事件之间的平均差异变大。这也能够使所测量的每一个发射事件的总平均光通量减少。对于用于对具有约9 μ m的牛精子进行筛选的本发明的特定的实施方案,发现光束的高度可以约为20 μ m。在本申请中,发现小于20 μ m的垂直光束高度不能提供分辨率的额外的增益。

[0108] 参见图14,应当理解利用降低了光束图案高度的光学装置可以提高已经用Hoechst33342染色的筛选的带X-染色体的牛精子群(图14a)和筛选的带Y-染色体的精子群(图14b)的纯度。这对于单变量峰的25%和40%的筛选通道都是正确的。正如可以从图14中进一步理解的,不依赖本发明的任何其它方面只降低了光束图案高度的光学装置就可以提高分离精子的纯度,例如上述本发明实施方案中对光电倍增管电路系统的改进(新PMT),或者可以结合使用本发明实施方案的改进的光电倍增管以进一步提高分离精子样品的纯度。

[0109] 降低了光束图案高度的光学部件的另一个优点是精子通过激发激光束或者照射光束的时间可以减少。减少激发激光束的照射时间可以减少对精子的压力和破坏。

[0110] 再次参考图14b,可以理解降低了高度的光束图案可以结合比常规使用的具有更大面积的照射光束图案一起使用。例如,如图14a所示的常规椭圆型光束图案27约 $30\mu\text{m}\times 80\mu\text{m}$,而本发明用于使带X-染色体的精子和带Y-染色体的精子之间产生最佳分辨率以对牛精子分类的光束具有 $20\mu\text{m}\times 160\mu\text{m}$ 的光束图案29。 $20\mu\text{m}\times 160\mu\text{m}$ 的光束图案的面积是 $30\mu\text{m}\times 80\mu\text{m}$ 光束图案的1.3倍。这时,入射点的能量损失成反比。这使得在不考虑加强照射对精子的破坏的情况下能够提高激发激光的强度。例如,如果具有常规光束图案的光学装置产生 $30\mu\text{m}\times 80\mu\text{m}$ 放射光束图案并且常规的以150mW对励磁激光器充电,然后以300mW对本发明特定实施方案中具有 $20\mu\text{m}\times 160\mu\text{m}$ 光束图案的励磁激光器进行充电而不增加入射点的总强度。另外,励磁激光器可以在150mW下运行以得到降低单位面积照射能量,减少照射损害,延长激光器寿命等的好处。

[0111] 同传统成形光束的光学装置以及传统的光电倍增管放大设备相比较,降低了高度的光束图案的光学装置的发明以及光电倍增管放大作用的发明能够将带X-染色体和带Y-染色体的精子群的纯度提高约4%或者更多。

[0112] 可将成形光束的光学装置30安装到如图15和图16所示的流式细胞仪上。正如可以理解的,通过激光激发结合到精子所含DNA上的荧光染色剂所发出的光31能够用相对于精子头部平面28为0度和90度的光电倍增管32在其流经励磁激光器光束图案时进行检测。

[0113] 正如所能够理解的,必须以精确的形式抽吸染色的精子以通过激发光束或者照射束从而使每个精子的头部同精子头部的表平面取向一致朝向光电倍增管零度检测器。对精子的DNA含量的精确检测只可以通过测量浆形精子头部28的表面来测定。这样,只有那些能够以合适的取向进入激发光束的精子群可以根据DNA含量被精确测量并被分类。

[0114] 现在参见图17,18和19,本发明特定实施方案也可以由粒子或精子细胞的定向喷嘴33在精子经过光电倍增管前面时通过液压力迫使扁平的精子头部取向正确。如图17所示,定向喷嘴具有内表面34形成类似圆锥形状。内部的锥形从入口端35的圆形逐渐变成流出口尖端管口36的非常椭圆的形状。管口36应当是圆形而不是椭圆形。因此,定向喷嘴34的内部样貌(internal aspect)由一个圆形入口到一个狭窄的椭圆形再到一个紧靠管口36前面的圆形出口。可以通过图18所示的定向喷嘴的交叉部分进一步阐明内部形状。

[0115] 如图19和21所示,注射管37直径约为0.061英寸可以同定向喷嘴(或者常规喷嘴)33一起使用,注射管可以在末端附近倾斜以形成叶片38。扁平叶片38以与定向喷嘴33中椭圆的最大径向成90度角定向。注入针的内径可以约为0.010英寸以扁平针管叶片38中心形成圆形的管口39。

[0116] 在倾斜的注射管的特定实施方案中通过图21说明了倾斜叶片可以浆形安装。浆形倾斜的叶片可有助于在喷嘴(常规喷嘴或定向喷嘴)中保持鞘液层流。这样,通过浆形倾斜叶片保持液体层流而显示出对注入其中的物质的破坏更少。通过本发明的一个特别实施方案中的具有浆形倾斜叶片的注射器管保持了引入鞘液层流的精子,并使精子分类速率比用常规注射管技术提高了20%、30%、40%、50%或者甚至更高。高速的精子分类速率可以实现每秒每种性别的分类速率约为4,000到10,000。甚至可以在这样高的分类速率下产生高纯度(90%或者甚至更高)的带X-染色体和带Y-染色体群体。具有倾斜浆形顶端的注射器管的发明可以独立使用或者结合使用这里所描述的其它发明如美国专利申请09/454,488或PCT/US00/42350中所描述的其它技术,在此引入作为参考。

[0117] 如图21所示,倾斜的叶片注射管发明或者倾斜的浆形叶片发明的实施方案可以还包括层流增强凹槽40。层流增强凹槽40有助于保持层流流入注射器管的管口。再一次,增强的层流使更多的精子在层鞘液中保持正确的取向从而导致可分类事件速率更高接着导致每一个性别或精子的分类速率提高。

[0118] 在本发明的另一个实施方案中,可以调整定向喷嘴口39或其它常规喷嘴口大小使形成的液滴包封离开管口39的完整的活精子。在常规的精子细胞夹带技术中没有包封精子细胞的技术。相当一部分精子细胞的尾部留在液滴外。例如当液流的压力为约每平方英寸50磅时牛精子细胞具有约13.5微秒的长度(即完整长度的精子细胞以每平方英寸50磅的液流压力通过照射光束的时间长度)。用于夹带牛精子细胞的常规液滴成形技术从直径约为70微米管口的喷嘴中形成一个14微秒液滴(即在液流中形成一个液滴波形所需要的时间),该液滴可以对35千赫下运转的振荡器产生响应。因此,一部分精子细胞尾易于从液滴中伸出。为了防止精子细胞尾从液滴中伸出,液滴包封发明中的一个实施方案提供了一个约100微米的管口,它在约30千赫下,每平方英寸约50磅下,产生一个约28微秒的液滴。通过对完整活精子细胞的完全包封,包括尾部,精子细胞同喷嘴之间的因液滴充电造成的相互影响更小并且液滴的偏转更加精确。这导致带X-染色体的精子和带Y-染色体的精子之间减少了交叉污染并且也使偏移的精子被更均一的收集。偏移一致的精子指向由不同液体缓冲的收集面。如美国专利申请09/001,394中所描述的,对分离的精子进行缓冲对于减少压力是重要的,在此引入作为参考。针对来自其它哺乳动物物种的精子,可以改变本发明以产生各种大小的液滴来包封不同长度的精子细胞。根据精子的长度和液流的压力,液滴包封的发明仍然能够达到液滴形成速率至少为每秒10,000个液滴,每秒至少20,000个液滴,每秒至少30,000个液滴,每秒至少40,000个液滴,每秒至少50,000个液滴,每秒至少60,000个液滴,每秒至少70,000个液滴,每秒至少80,000个液滴,每秒至少90,000个液滴,每秒至少100,000个液滴,等等直到在液滴包封发明的一些实施方案中达到约每秒200,000个液滴。

[0119] 即使用定向喷嘴发明,光束图案中仍然有一定量的取向不正确的精子或者粒子。如上面所描述的,如果精子头的取向不正确,那么根据发射光测定的DNA含量就不准确。本发明的特定实施方案提供了去除液流中不需要的取向不正确的精子(RUUS)或者粒子。

[0120] 现在参见图16和20a,可以理解对精子DNA含量的精确测定取决于浆形精子头部28表面对于检测器的取向是正确的。因此,只有那部分如图16和20a所示的以正确取向进入了激发光束的精子可以被精确测定并且根据DNA含量被分成带X-染色体和带Y-染色体的群体。如图20a和20b所示,以正确取向通过激发光束的精子产生一个定向的发射信号图40,其形状同图20d所示的由未定向的精子产生的未定向的发射信号图41不同。自然,由未定向的精子产生未定向发射信号图41的变化是取决于激发光束中精子的不正确取向的程度。这些不正确的取向包括图20c所示的取向,但是也包括转动精子头部取向的所有形式,任何一部分旋转使得浆形头部表面的取向没有同检测器对准(正确的对准如图16所示),或者任何一种使得精子头部的轴42的取向转到流向准线外的旋转。自然地,对不同物种之间的正确取向的定义是不同的。对于某些精子头部不是浆形的物种,可以通过其它解剖学特性或者信号特性,对激发光束中精子的正确取向,或者相对于检测器的正确取向或相反进行定义。不过,可以将激发窗口内取向正确的不同物种精子生成的最佳信号作为后面与之比较的一系列发光事件的标准发射信号图。

[0121] 通过每一个发射信号图(或完整区域或者两者同时比较)与定向的哺乳动物精子确定的标准发射信号图(或标准完整区域或者两者同时比较)的形状比较,可鉴定未定向的精子,从单变量或者双变量直方图中减去未定向精子的信号,并且如果需要可以确定地去除未定向的精子,从而未定向的精子既没有被收集到带X-染色体的群体中也没有被收集到带Y-染色体的群体中。

[0122] 重要的是,本发明提高了要分离的两种精子群之间的分辨率从而提高了从一种群体中分离出另一种群体的速率,并且提高了分离群体的纯度。因此,现在就可以以极高的速度对精子分类。可分类或者可分离事件的速率可以到达每秒约35,000个(不包括同时发生事件—多个精子同时在激发/检测窗口)。与可分类或者可分离事件的速率相关的高分离或分类速率可以为每秒约5000到约11,000个每种性别的完整活精子,并具有90%、92%、93%、95%或者更高的纯度。上面描述的发明可以通过将分类或分离速率降低到每秒约2000个每种性别的活精子而使得甚至更高纯度的带X-染色体和带Y-染色体群体能够以约97%到约98%或者甚至更高的纯度获得。

[0123] 正如可以理解的,上面描述的发明对于达到最高可能分类或分离事件的速率以及最高可能获得的分离速率是特别重要的,分离速率可以为每种性别每秒至少1,000个分离物,每秒至少2,000个分离物,每秒至少3,000个分离物,每秒至少4,000个分离物,每秒至少5,000个分离物,每秒至少6,000个分离物,每秒至少7,000个分离物,每秒至少8,000个分离物,每秒至少9,000个分离物,每秒至少10,000个分离物或者更高。

[0124] 如上所述,本发明可以供精子的高速分类之用,即使当对这些精子染色困难,或者由于具有其它解剖学或化学特性而使得区分带X-染色体和带Y-染色体群体之间的差别更加困难。即使在这些困难的情况下,仍然能够按如上所述通过使可分离事件的速率为约每秒15,000-20,000个可分离事件而达到将高纯度的带X-染色体和带Y-染色体牛精子群以92%到93%的纯度分离,并且每种性别(带X-染色体以及带Y-染色体)分类或分离完整的活精子的速率为每秒2000个每种性别的完整活精子。

[0125] 现在参见图23和24,本发明的一个实施方案利用差别干扰对比技术以测量粒子或囊状物的体积。本发明的一个基本的实施方案可以包括具有不同体积的粒子,例如带X-染色体以及带Y-染色体的精子细胞的头部28的体积差异。电磁辐射源43产生具有对粒子或者精子细胞头部28之间的体积差异产生不同的响应的初始波形特征的电磁辐射或者电磁辐射光束44。电磁辐射可以是激光,但是也可以是各种类型的电磁辐射,包括但是不限于微波辐射、紫外辐射等。当穿过含有相位移动材料的粒子或囊状物或精子头部的体积时,电磁辐射通过物镜45聚焦到对电磁辐射波形特征产生响应的检测器上46。检测器可以同分析器47联合使用。分析器可以根据穿过粒子体积前后的波形特征的变化区分粒子并且能够根据积分面积或者信号形状或者根据两者对信号进行分析。在本发明的特定实施方案中,对波形特征的分析包括当穿过粒子、囊状物或者精子细胞头部的体积时,将初始波形特征同改变的波形特征叠加。将初始波形特征和相位移动的波形特征叠加能够以同电磁辐射穿过的相移介质的量相关的形式分别调整电磁辐射束的强度。本发明也应当包括有色滤光片一类的附加过滤设备48。

[0126] 现在参见图24,光学装置发明的实施方案涉及到使用差别干扰对比光学装置,同常规的与显微镜分辨率限度一致的DIC显微镜检测相比较,能够使实际距离超过光裂缝。在

本发明的这一实施方案中,诱导裂缝比物体的尺寸大,因此导致产生侧面分开的源自一个物体的两个独立图像。第二个改进涉及在离开物镜的位置用双折射材料板,例如Savart板。由于双折射材料不需要放置在物镜盒中,因此本发明实施方案易于构建。常规DIC显微镜中用的双折射材料是被称作Wollaston的棱镜,它必须放置于物镜盒中,这就不得不使用为这一目的特别生产的昂贵的物镜镜片。

[0127] 本发明实施方案的组件可以互相之间排成一行并且由电磁辐射源43,例如水银弧光灯;光谱调节部件,例如带通滤波器;偏振调整部件49,例如薄层起偏器53和对可旋转载片发生响应的光波板54;能够使光线聚集到粒子或者精子细胞上的聚光器51,例如聚光透镜,或者一套透镜,或者是显微镜物镜;含有粒子或精子细胞28的液流8,例如在压力下由喷嘴喷出的液体;收集来自粒子或细胞的光线的光线收集器45,例如50倍高工作距离的显微镜物镜以及管透镜;将光束分成两部分或者更多种成分的束分离设备50,例如Savart板形式的一片双折射材料,以取向和位置能够被精确控制的形式装配;只选择相应于粒子或精子细胞的光的图像光选择器,例如一系列的针孔,每个针孔53针对每个形成的图像,所组成。

[0128] 在本发明的一个实施方案中,可以将部件以通常被称作Kohler式照明的形式安装,即光源43或其图像位于聚光器45的后聚焦面上。物体的平面图像最好同物体的光线选择器55或者针孔53相符合,以捕获来自单个粒子或精子的光。如图27和28所示,可以用配件、支柱、和支架将部件安装在稳定的光学桌或光学台上。部件可以以某种形式安装以使物体平面可以被精确地聚焦。这可以通过用流束位置控制器装液流来完成,例如测微仪,从而使流束转向以进入焦点或从焦点出来。另外可以给聚光器51装配一个聚光器位置控制器61以使其在物体平面上聚焦。需要特别注意的使有关双折射部件或者束分离器50的装配,优选的是三轴旋转部件。

[0129] 现在参见图25,本发明实施方案也可以包括利用两个生成的图像以确定液流中不对称粒子的取向,包括但是不限于牛精子细胞一类的精子。本发明的取向测定的实施方案包括便于对进入能使两个独立生成图像的系统的光偏振化状态进行控制的光学装置。干涉光学装置的发明可以进一步提供控制进入装置的光的偏振化状态的偏振调节元件56。对于取向检测发明,对偏振调节元件56的选择可以由两部分组成,它们在本发明一个实施方案中带针孔53的图像光选择器55上成像。这可以通过在图像平面55的结合面中间放置偏振调节部件56来完成,或者使用其它光学装置来完成相同的事情。这种部件的一个简单的例子是一种‘半影板’片,例如由两个偏振材料的半圆部分组成的,例如可以独立选择朝向角度的薄片起偏器。图像平面中的每个针孔可以落入到所述半球中的一个。可以这样选择偏振角从而使一个针孔信号53对应所述体积,并且与经过的物体的方向角度相对独立,而其它针孔所具有的信号53则在很大程度上取决于这一方向角。可以用分析器47对这两种信号进行处理,方式同用常规多通道流式细胞仪相似,但是仅仅作为一个例子。对于这一实施例,可以制作双变量点状图,并且允许使用者也可以在这一图上选孔。

[0130] 如上面描述的对‘半影板’片的一种改进可以是如图25d所示的构造。所述的两个相同的半球部分被投影到图像平面上但是其产生的方式是不同的。反射镜57将光44分裂成半圆形,并且使它们背靠背再次结合。每一个半圆穿过一个控制其偏振状态的分离工具。本实施方案的优点是可以连续独立的控制偏振角,因此便于对装置进行调整。本实施方案所

用的材料可以由标准的光学供应厂商提供,并且能够用类似用于干涉光学装置的装配材料安装在设备中。

[0131] 现在参见图26,为了修正由于让光线通过了透明物质的非平面区域而引入的人为假相,例如一个大体上是圆柱形但是也包括了其它几何形状的液流,本发明的实施方案公开了将一个同非平面区域形状相似但是相对折射指数相反的结合部件。流式细胞仪中的特定情况是一个近似圆柱的形状。由于事实上要把将要被测评的物体置于柱状水流内,对因此引入的人工假相进行修正是在折射指数更高的透明材料59中合并放置一个能够形成透明柱面形状的光学部件58。优选的是液流和补偿元件的图像相互落在各自图像平面的顶端。这可以通过在物镜和图像平面之间放置补偿元件并结合使用辅助透镜来完成。

[0132] 光学部件58的一个实施方案是放置于具有更高折射指数的透明材料的薄片内59,例如玻璃或者有机玻璃,在材料上钻一个柱形孔。有机玻璃的好处是比较容易在其上钻一个圆形通道。可以用透明材料填充柱形孔,填充的透明材料的折射指数低于周围的材料。该材料与其周围材料之间折射指数的差异同某些应用中流束中的水和周围空气之间折射指数的差异一样但是相反。只要所用透镜的放大率能够使图像平面中得到图像的大小一样,就没有必要使柱面的大小同水流相同。在一些应用中,希望或需要调整折射指数的差异以补偿这种放大。用有机玻璃制造这种元件十分简单,并且可以由众多的对有机玻璃或者所挑选材料进行机械加工具有经验的机械工场完成。可以将其规格制备成符合光学装配零件的标准以便于结合到光学装置中。

[0133] 完全匹配的折射指数是困难的。本发明的一个便于调整的实施方案是使得有机玻璃,或其它所选择的材料中的物质—即一种透明折射指数液体58—可以是有机油类,或者是具有同想要的折射指数相近的油类的混合物,但这些仅仅是举例。由于许多液体的折射指数比固体或玻璃更容易随温度变化,有可能通过温度对折射指数的差异进行精细调整。这可以通过连接一个温度控制器60来完成。

[0134] 光学部件58的透明液体或者折射指数液体可以由化学供应厂商提供。这些厂商通常有其可供液体折射指数的数据。有些厂商甚至提供专门用于折射液体的液体,并且具有保证和稳定的折射指数。许多厂商提供温度控制器和恒温器。对折射指数液体应用热量的一种实际方式是由热传导材料,例如金属(仅是举例),所制备的中空装置,其中含有折射指数液体。利用许多实验室拥有的常规浸式恒温循环控制装置,可以通过该装置抽水从而保持元件的温度稳定并且可以被控制。

[0135] 在本PCT申请中所做的讨论的目的是作为一个基本的说明。读者应当清楚具体的讨论没有详细描述所有可能的实施方案;许多替代方式没有说明。也没有对本发明的一般性质做出充分的说明并且没有清楚地显示每一个特征或者元件如何能够实际代表广泛的功能或者各种替代或者等同元件。这些又一次隐含在本公开中。本发明以功能取向的术语描述的地方,功能的每一个方面是通过装置、子程序、或者程序而实现的。装置的权利要求不应当仅仅包括在描述过的装置中,也应当包括方法或者步骤权利要求以说明本发明和每个元件行使的功能。说明书或者术语的目的都不是要限制权利要求所没有包括的范围。

[0136] 此外,本发明和权利要求的每一个不同元件也可以通过多种方式完成。应当理解本公开包括了每一个种类似的改变,可以是实施方案中的任何装置实施方案的变化,一种方法或步骤实施方案的变化,或者甚至仅仅是其中任何元件的改变。尤其是,应当理解由于

本公开涉及到本发明的元件,对每种元件所用的文字可以用相当的装置术语或者方法术语来表达—即使仅仅功能或结果是一样的。这些相等的,更广泛的,或者甚至更一般的术语应当被认为是包括在每一个元件或者作用的说明书中。在需要对隐含在本发明权利中所覆盖的广泛范围进行详细说明的地方,这样的术语可以被替换。作为但是仅仅一个实施例,应当理解所有的作用应当以实施该作用的方法或者导致该作用的元件来表述。类似的,应当理解所公开的每一个种物理元件都包括了该物理元件所促进的作用。针对这最后一方面,作为但是仅仅是一个实施例,应当理解“液滴分离器”的公开包括了“分离液滴”作用的公开—不管是否详细讨论过—并且相反的,如果仅仅公开了“转化液体—气体”的作用,应当理解这样的公开包括了“液滴分离器”的公开以及甚至“分离液滴”的方法的公开。应当理解这样的术语的替换和改变显然包括在本说明书中。

[0137] 另外,可以建立和出现对所有元件或者应用进行各种的组合以及改变。所有这些都可用于优化一个具体应用的设计或性能。

[0138] 本申请为取得专利权所提到的任何法律,法令,条例,或者规则的行为:专利,或者公开出版物,或者其他本申请为取得专利权所提及的参考材料在此引入作为参考。具体地说,美国专利申请60/267571,60/239,752,以及60/203,089都在此引入作为参考,这里包括任何数据或者附件,并且引入下面表格中的每一篇参考材料作为参考。

[0139]

文献号	日期	名称	类	亚类	申请日
32,350	02/10/87	Bhattacharya	204	180.1	11/22/74
3,687,806	08/29/72	Van den Bovenkamp	195	1.3	11/04/69
3,829,216	08/13/74	Persidsky	356	36	10/02/72
3,894,529	07/15/75	Shrimpton	128	1R	04/10/69
4,009,260	02/22/77	Ericsson	424	561	10/11/74
4,067,965	01/10/78	Bhattacharya	424	105	12/17/75
4,083,957	04/11/78	Lang	424	78	02/04/76
4,085,205	04/18/78	Hancock	424	105	01/24/77
4,092,229	05/30/78	Bhattacharya	204	180R	10/20/76
4,155,831	05/22/79	Bhattacharya	207	299R	02/23/78
4,191,749	03/04/80	Bryant	424	105	10/11/77
4,225,405	09/30/80	Lawson	204	180R	08/16/78
4,276,139	06/30/81	Lawson	204	180R	10/09/79
4,339,434	07/13/82	Ericsson	424	561	08/17/81
4,362,246	12/07/82	Adair	209	3.3	07/14/80
4,448,767	05/15/84	Bryant	424	85	02/15/80
4,474,875	10/02/84	Shrimpton	435	002	08/18/80
4,501,366	02/26/85	Thompson	209	556	12/14/82
4,511,661	04/16/85	Goldberg	436	503	12/30/83
4,605,558	08/12/86	Shrimpton	424	561	04/20/84
4,660,971	04/28/87	Sage等	356	39	05/03/84

4,680,258	07/14/87	Hammerling等	435	7	08/09/83
4,698,142	10/06/87	Muroi等	204	182.3	07/31/85
4,749,458	06/07/88	Muroi等	204	182.3	03/02/87
4,988,619	01/29/91	Pinkel	435	30	11/30/87
4,999,283	03/12/91	Zavos等	435	2	08/18/89
5,021,244	06/04/91	Spaulding	424	561	05/12/89
5,135,759	08/04/92	Johnson	424	561	04/26/91
5,346,990	09/13/94	Spaulding	530	350	03/12/91
5,371,585	12/06/94	Morgan等	356	246	11/10/92
5,439,362	08/08/95	Spaulding	424	185.1	07/25/94
5,466,572	11/14/95	Sasaki等	435	2	04/25/94
5,483,469	01/09/96	Van den Engh等	364	555	08/02/93

[0140]

5,503,994	04/02/96	Shear等	436	90	10/08/93
5,514,537	05/07/96	Chandler	435	002	11/28/94
5,589,457	12/31/96	Wiltbank	514	12	07-03-95
5,602,039	02/11/97	Van den Engh	436	164	10/14/94
5,602,349	02/11/97	Van den Engh	73	864.85	10/14/94
5,660,997	08/26/97	Spaulding	435	7.21	06/07/95
5,690,895	11/25/97	Matsumoto等	422	73	12/06/96
5,700,692	12/23/97	Sweet	436	50	09/27/94
5,726,364	03/10/98	Van den Engh	73	864.85	02/10/97
5,819,948	10/13/98	Van den Engh	209	158	08/21/97
5,880,457	03/09/99	Tomiyama等	250	207	06/16/97
5,985,216	11/16/99	Rens等	422	073	07/24/97
6,071,689	06/06/00	Seidel等	435	2	01/29/98
W096/12171	13/10/95				
W098/34094	06/08/98				
W099/05504	07/24/98				
W099/33956	08/07/99				
W099/38883	05/08/99				
W099/42810	26/08/99				
W000/06193	10/02/00				

[0141]

Akhtar, S.等, "家畜的性别预选:田间试验" ("Sex Preselected in Cattle: a Field Trial"), Veterinary Record 136, 1995, p. 495-496.
Akhtar, S.等, "巴基斯坦 Rambouillet 羊群中流行的五种立体型蓝舌病毒" ("Prevalence of Five Stereotypes of Bluetongue Virus in a Rambouillet Sheep Flock in Pakistan"), Veterinary Record 136,1995, p. 495.
Amann, R. P. 等, "对哺乳动物精子性别的堪察"("Prospects For Sexing Mammalian Sperm,")Colorado Associated University Press, Animal Reproduction Laboratory College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, ForCollins, CO, 80523,1982
Amoah, E. A. 和 Gelaye, S. 1996. 山羊繁殖的生物技术进展(Biotechnological advances in goat reproduction.) J. Anim. Sci. 75 (2): 578-585.
Anderson, V. K., Aamdal, J. 和 Fougner, J. A. 1973. Intrauterine und tiefzervikale Insemination mit Gefriersperma beim Schaf. Zuchthygiene. 8: 113-118.
Baker, R. D., Dziuk, P. J. 和 Norton, H. W. 1968. 精子体积, 数量以及药物对精子在人工授精小母猪内运输的影响(Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts.)J. Anim. Sci. 27: 88-93.
Barnes, F. L. 和 Eyestone, W. H., "牛胚胎中的早期卵裂以及母核子转变"("Early Cleavage and the Maternal Zygotic Transition in Bovine Embryos"), Theriogenology, Vol. 33, No. 1, January 1990, pp. 141-149
Becker, S. E. 和 Johnson, A. L. 1992. 促性腺激素以连续或者间断的形式释放的激素对母马血清促性腺激素浓度和排卵的影响(Effects of gonadotropin releasing hormone infused in a pulsatile or continuous fashion on serum gonadotropin concentrations and ovulation in the mare.) J. Anim. Sci. 70: 1208-1215.
Bedford, S. J. 和 Hinrichs, K. 1994. 授精体积对小母马妊娠率的影响 The effect of insemination volume on pregnancy rates of pony mares. Theriogenology 42: 571-578.
Berger, G. S. 1987. Intratubal insemination. Fert. Steril. 48: 328-330.
Beyhan, Z., 等, "产自用高速流式细胞仪分类的带 X-染色体和带 Y-染色体的 IVM-IVF 牛胚胎中的雌雄两性"("Sexual Dimorphism in IVM-IVF Bovine Embryos Produced from X and Y Chromosome-bearing Spermatozoa Sorted by High Speed Flow Cytometry",) Theriogenology 52,1999, pp. 35-48.
Blanchard, T. 和 Dickson, V., "种马管理"("Stallion Management"), The Veterinary Clinics of North

[0142]

America, Equine Practice, Vol. 8, No. 1, April 1992, pp 207-218.
Bracher, V. 和 Allen, W. R.,“母马子宫的内窥镜检测: 正常可生育母马中的发现”(“Videoendoscopic Examination of the Mare's Uterus: Findings in Normal Fertile Mares”), Equine Veterinary Journal, Vol. 24 (1992), pp. 274-278
Braselton, W. E. 和 McShan, W. H. 1970. 刺激和黄体化马垂体腺激素的卵泡的纯化和特性 (Purification and properties of follicle stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands.) Arch. Biochem. Biophys. 139: 45-48.
Brethour, J. R. 和 Jaeger, J. R.,“单一的小母牛体系”(“The Single Calf Heifer System”), Kansas Agric. Sta. Rep of Progress 570,1989.
Bristol, S. P. 1982. 牧场种马和 20 头母马处于同时发情期的生殖行为(Breeding behavior of a stallion at pasture with 20 mares in synchronized oestrus.) J. Reprod. Fert. Suppl. 32: 71.
Buchanan, B. R., 等,“用少量的无性征或者有性征的精子使母马授精”(“Insemination of Mares with Low Numbers of Either Unsexed or Sexed Spermatozoa”), Theriogenology, Vol. 53, pp 1333-1344, (2000)
Burwash, L. D., Pickett, B. W., Voss, J. L. 和 Back, D. G. 1974. 非哺乳母马正常循环中受孕率同储存时间的关系(Relationship of duration of estms to pregnancy rate in normally cycling, non-lactating mares.) J. A. V. M. A. 165: 714-716.
Caslick, E. A.,“外阴和阴道口及其同健康良种母马的关系”(“The Vulva and the Vulvo-vaginal Orifice and its Relation to Genital Health of the Thoroughbred Mare”), Cornell Veterinarian, Vol. 27,1937, pp. 178-187
Catt, 等,在用流式细胞仪对羊和猪的精子进行分类期间的评价(“Assessment of Ram and Boar Spermatozoa During Cell-Sorting by Flow Cytometry”), Reproduction Dom Animal, Vol. 32,1997, pp 251-258.
Catt, S. L., 等,“用细胞质内注射单一预期雄性精子在体外使成熟卵母细胞授精而获得的雄性羊羔的生产”(“Birth of a Male Lamb Derived from an In Vitro Matured Oocyte Fertilized by Intracytoplasmic Injection of a Single Presumptive Male Sperm”), Veterinary Record 139,1996, pp. 494-495.
Chandler, J. E., 等,“牛精子头部尺寸差异以及对根据这种尺寸的分选技术的评价”(“Bovine Spermatozoal Head Size Variation and Evaluation of a Separation Technique Based on this Size”), Theriogenology 52, p. 1021-1034 (1999)
Chandler, J. E.,“牛精子和同性别有关的白细胞染色体区域的显微影像比较”(“Videomicroscopic Comparison of Bull Sperm and Leukocyte Chromosome Areas as Related to Gender”), J Dairy Sci 73, pp. 2129-2135, (1990)
Chin, W. W. 和 Boime, I. 1990. In : 糖蛋白激素(Glycoprotein Hormones.) Serona Symp. Norwell, MA. pp. 19-20
Chung, Y. G., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A. 和 Seidel, G. E. Jr. 1998. 用 600,000 有性精子对排卵过度的小母牛进行人工授精(Artificial insemination of superovulated heifers with 600,000 sexed sperm.) J Anim. Sci. Suppl. 1. 836: 215. abstr.
Clement, F., Vincent, P., Mahla, R., Meriaux, J. C. 和 Palmer, E. 1998. 排卵前进行几次连续授精时哪一种授精受孕(Which insemination fertilizes when several successive inseminations are performed before ovulation.) 7th Int. Symp. Eq. Repro. 151. abstr.
Cran, D. G., 等,用流式细胞仪分类和未分类的精子进行低剂量子宫内授精生产羊羔(“Production of Lambs by Low Dose Intrauterine Insemination with Flow Cytometrically Sorted and Unsorted Semen”), Theriogenology, Vol. 47, pp. 267, (Abstract), (1997)
Cran, D. G., 等,“在将带 X-染色体和带 Y-染色体的精子进行分类并在体外授精后生产小牛”(“Production of Bovine Calves Following Separation of X-and Y-Chromosome Bearing Sperm and In Vitro Fertilisation”), Veterinary Record 132,1993, pp. 40-41.
Cran, D. G., Johnson, L. A. 和 Polge, C., 1995,“家畜的性别预选: 田间试验”(“Sex preselection in cattle: a field trial”), Vet. Rec. 136 : 495-496.
Cui, K.,“人 X 精子和 Y 精子的大小差异以及预授精的诊断”(“Size Differences between human X and Y Spermatozoa and prefertilization diagnosis”), Molecular Humai Reproduction, Vol. 3, No. 1, pp. 61-67, (1997)

[0143]

Cui, K., "X 比 Y 大"("X Larger than Y"), <i>Nature</i> 366, p. 177-118, (1993)
Curran, S. 1998. In: 马的超声波诊断 胎儿性别确定 (Equine Diagnostic Ultrasonography. Fetal gender determination.) Rantanen & McKinnon. 1 set Ed. Williams and Wilkins. pp. 165-169.
Day, B. N., Abeydeera, L. R., Johnson, L. A., Welch, G. R., Wang, W. H., Cantley, T. C. 和 Rieke, A. 1998.用高速流式细胞仪分类的带 X 和带 Y 的染色体对成年猪的卵母细胞进行体外或者体内授精从而对出生的猪进行性别预选(Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry.) <i>Theriogenology</i> . 49 (1) : 360. abstr.
Dean, P. N., Pinkel, D. 和 Mendelsohn, M. L. 1978. 用于流式细胞仪的精子头部水动力学定向 (Hydrodynamic orientation of spermatozoa heads for flow cytometry.) <i>Biophys. J.</i> 23: 7-13.
Demick, D. S., Voss, J. L. 和 Pickett, B. W. 1976. 精子的冷却, 储藏, 糖基化以及数量对马授精的影响(Effect of cooling, storage, glycerization and spermatozoal numbers on equine fertility.) <i>J. Anim. Sci.</i> 43: 633-637.
DenDaas, J. H. G., De Jong, G., Lansbergen, L. M. T. E. 和 Van Wagendonk-De Leeuw, A. M. 1998. 精子授精数量和奶牛生殖效率之间的关系(The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of dairy bulls.) <i>J Dairy Sci.</i> 81 : 1714-1723.
Dinnyes, A., 等,授精后第一次卵裂的时间选择对体外生产的牛胚胎的冷存活的影响("Timing of the First Cleavage Post-insemination Affects Cryosurvival of In Vitro-produced Bovine Blastocysts"), <i>Molec Reprod develop</i> 53,1999, pp 318-324.
Donaldson, L. E.,授精方法对产卵过度的母牛的胚胎生产的影响("Effect of Insemination Regimen on Embryo Production in Superovulated Cows"), <i>The Veterinary Record</i> , July 13,1985, pp. 35-37
Donoghue, 等, 1996.促性腺素诱导后排卵时间的选择及其对老虎子宫内授精成功的重要性("Timing of ovulation after gonadotropin induction and its importance to successful intrauterine insemination in the tiger (<i>Panthera tigris</i>)"), <i>J. Reprod. Fert.</i> 107: 53-58.
Douglas, R. H. 1979.马的超排卵和胚胎转移的回顾("Review of superovulation and embryo transfer in the equine"), <i>Theriogenology</i> . 11: 33-46.
Douglas, R. H., Nuti, L. 和 Ginther, O. J. 1974. 通过马垂体部分诱导季节性不排卵的母马诱导排卵并且多排卵(Induction of ovulation and multiple ovulation on seasonally anovulatory mares with equine pituitary fractions.) <i>Theriogenology</i> . 2 (6): 133-142.
Duchamp, G., Bour, B., Combamous, Y. 和 Palmer, E. 1987. 在母马中诱导 hCG 的供选择的解决方法 (Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare.) <i>J. Reprod. Fert. Suppl.</i> 35: 221-228.
Evans, M. J. 和 Irvine, C. H. G. 1977. 给非排卵期的母马施用促性腺素释放的激素以诱导卵泡发育, 成熟并排卵(Induction of follicular development, maturation and ovulation by gonadotropin releasing hormone administration to acyclic mares.) <i>Bio. Reprod.</i> 16 : 452-462.
Fitzgerald, B. P., Peterson, K. D. 和 Silvia, P. J. 1993. 固定施用促性腺素释放的激素拮抗剂对母马生殖活性的影响: 在繁殖季节对排卵抑制的早期现象(Effect of constant administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist on reproductive activity in mares: Preliminary evidence on suppression of ovulation during the breeding season.) <i>Am. J. Vet. Res.</i> 54: 1746-1751.
Fluharty, F. L., 等,断奶年龄和饮食对小牛生长的影响("Effects of Age at Weaning and Diet on Growth of Calves"), <i>Ohio Agri. Res. and Dev. Circular</i> , 1996, 156 : 29.
Foulkes, J. A., 等, 1977.用不同数量的精子对家畜进行人工授精("Artificial insemination of cattle using varying numbers of spermatozoa"), <i>Vet. Rec.</i> 101: 205.
Franco, M. 和 Yamamoto, T., "Un Nouveau et tres simple dispositif interferentiel applicable as microscope", <i>Optica Acta</i> 9, p. 395-408 (1962)
Fugger, E. F., "用流式细胞技术分离人的带 X-和带 Y-染色体的临床经验"("Clinical Experience with Flow Cytometric Separation of Human X-and Y-Chromosome Bearing Sperm"), <i>Theriogenology</i> , Vol. 52, pp. 1435-1440 (1999)
Fulwyler, M. J. 1965."利用体积对生物细胞进行电子分离"("Electronic separation of biological cells by volume"), <i>Science</i> . 150: 910.
Fulwyler, M. J. 1977."细胞的水动力学定向"("Hydrodynamic orientation of cells"), <i>J Histochem. Cytochem.</i> 25: 781-783.

[0144]

Garner, D. L., 等, 1983.“用流式细胞仪对家畜的带 X 和带 Y-染色体的精子定量”(“Quantification of the X and Y chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry”), <i>Biol. Reprod.</i> 28: 312-321.
Ginther, O. J. 1971.改变母马发情周期的一些因素(“Some factors which alter estrus cycle in mares”), <i>J. Anim. Sci.</i> 33: 1158. abstr.
Ginther, O. J. 1983.“在一群母马中引入种马后的性行为”(“Sexual behavior following introduction of a stallion into a group of mares”), <i>Theriogenology.</i> 19: 877.
Ginther, O. J. 1992.“母马的生殖生物学”(“In: Reproductive Biology of the Mare”), (2nd Ed.) Equiservices, Cross Plains, WI.
Gledhill, B. L. 1988. 性别预选: 历史, 技术以及伦理透视(Gender preselection: historical, technical and ethical perspective.) <i>Semin Reprod. Endocrinol.</i> 6: 385-395.
Gourley, D. D. and Riese, R. L. 1990. 绵羊的人工授精的腹腔镜检(Laparo scopic artificial insemination in sheep.) <i>Vet. Clin. N. Amer: Food Anim. Prac.</i> 6 (3): 615-633.
Grondahl, C., 等,“马胚胎的体外生产”(“In Vitro Production of Equine Embryos”), <i>Biology of Reproduction, Monograph Series I</i> , pp.299-307 (1995)
Guillou, F. 和 Combamous, Y. 1983. 马促性腺素的纯化和它们酸性解离以及受体结合特异性的比较研究(Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid dissociation and receptor-binding specificity.) <i>Biochem. Biophys. Acta.</i> 755: 229-236.
Gurnsey, M. P., 和 Johnson, L. A.,“流式细胞技术对家畜带 X-染色体和带 Y-染色体的精子进行分类的效率的最新进展: 一个回顾”(“Recent improvements in efficiency of flow cytometric sorting of X and Y chromosome bearing sperm of domestic animals: a review”), 1998, <i>New Zealand Society of Animal Protection</i> , 3 页.
HAMAMATSU, 光电倍增管 (Photomultiplier Tubes)", web page, http://www. optics.org/hamamatsu/pmt. Html , printed out on 4/15/00, 共 4 页.
HAMAMATSU, 技术信息 (Technical Information)", web page, http ://www. optics.org/hamamatsu/photodiode. html , printed out on 4/15/00, 共 6 页.
Hamano, K., 等,“利用细胞质内注射流式细胞技术分类的精子头部预选家畜性别”(“Gender Preselection in Cattle with Intra cytoplasmically Injected, Flow Cytometrically Sorted Sperm Heads”), <i>Biology of Reproduction</i> 60,1999, pp. 1194-1197.
Harrison, L. A., 等, 1991. 用于诱导周期母马排卵的 hCG, 乙基酰胺和鲁前列腺素的比较 (Comparison of hCG, busarelin and luproliol for induction of ovulation in cycling mares.) <i>Eq. Vet. Sci.</i> 3: 163-166.
Hawk, H. W., 等,“子宫输卵管结合处附近的精子沉淀后或者用大量的精子授精后过量排卵母牛的授精率”(“Fertilization Rates in Superovulating Cows After Deposition of Semen on the Infundibulum Near the Uterotubal Junction or After Insemination with High Numbers of Sperm”), <i>Theriogenology</i> , May 1988, Vol. 29, No. 5, pp 1131-1142.
Hofferer, S., Lecompte, F., Magallon, T., Palmer, E. 和 Combamous, Y. 1993. 用疏水作用层析法分离的马 LH 和 FSH 诱导母马排卵以及过度排卵 (Induction of ovulation and superovulation in mares using equine LH and FSH separated by hydrophobic interaction chromatography.) <i>J.Reprod. Fert.</i> 98: 597-602.
Holtan, D. W., Douglas, R. H. 和 Ginther, O. J. 1977. 在矮种母马中使用了孕酮, 前列腺素 F2 ct 和人绒毛促性腺素后的发情, 排卵和妊娠 (Estrus, ovulation and conception following synchronization with progesterone, prostaglandin F2 ct and human chorionic gonadotropin in pony mares.) <i>J. Anim. Sci.</i> 44: 431-437.
Householder, D. D., Pickett, B. W., Voss, J. L. and Olar, T. T. 1981. 膨胀剂, 精子的数量以及 hCG 对马生育力的影响(Effect of extender, number of spermatozoa and hCG on equine fertility.) <i>J. Equine Vet. Sci.</i> 1: 9-13.
Howard, J. G., 等, 1991.“在用冻融精子腹腔镜技术子宫内授精后白鼬(<i>Mustela putorius furo</i>)精子冷藏和妊娠的比较”(“Comparative semen cryopreservation in ferrets (<i>Mustela putorius furo</i>) and pregnancies after laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa.”) <i>J. Reprod. Fert.</i> 92: 109-118.
Howard, J. G., 等, 1997.“外源促性腺素对云豹和 theetab 的排卵和腹腔镜人工授精敏感

[0145]

性”(Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard). <i>Biol. Reprod.</i> 56: 1059-1068.
Hunter, R. H. F. 1980. 在雌性生殖道内精子的运输和储存(Transport and storage of spermatozoa in the female reproductive tract.) <i>Proc 4th Int. Congr. Artira. Repro. and A. I.</i> 9: 227-233.
Hyland, J. H., 等, 1988.“通过持续给非发情期的母马注入传送促性腺素释放的激素而诱导发情期”(Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) delivered by continuous infusion induces fertile estrus in mares during seasonal acyclicity). <i>Proc. Amer. Assoc. Eq. Prac.</i> 181-190.
Irvine, C. H. G. 和 Alexander, S. L., 马的生殖 (In : <i>Equine Reproduction.</i>) Edited by McKirmon and Voss. Lea and Febiger. Philadelphia, London. pp. 37. (1993)
Jafar, 等, “哺乳动物性别选择回顾”(Sex Selection in Mammals: A Review), <i>Theriogenology</i> , Vol. 46, pp 191-200 (1996)
Jasko, D. J., Martin, J. M. 和 Squires, E. L. 1992. 精子的体积和浓度对母马胚胎恢复的影响(Effect of volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares.) <i>Theriogenology</i> , 37: 1233-1239
Johnson, A. L. 1986.“促性腺素释放的激素的搏动释放促进发情期的母马排卵”(Pulsatile release of gonadotropin releasing hormone advances ovulation in cycling mares). <i>Biol. Reprod.</i> 35: 1123-1130.
Johnson, A. L. 和 Becker, S. E. 1988.“利用促性腺素释放的激素(GnRH)处理以诱导发情期的母马大量排卵”(Use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment to induce multiple ovulations in the anestrus mare), <i>Eq. Vet. Sci.</i> 8: 130-134. (1988)
Johnson, L. A., “对猪的性别预选的进展”(Advances in Gender Preselection in Swine) <i>Journal of Reproduction and Fertility Supplement</i> , Vol. 52, pp. 255-266 (1997)
Johnson, L. A., “猪的性别预选: 用流式分类的带 X-和 Y-的精子进行外科授精后改变后代性别比例”(Sex Preselection in Swine: Altered Sex Ratios in Offspring Following Surgical Insemination of Flow Sorted X-and Y-Bearing Sperm), <i>Reproduction in Domestic Animals</i> , Vol. 26, pp. 309-314 (1991)
Johnson, L. A. 和 Welch, G. R. “性别预选: 达到最高效的高速流式细胞仪分类的 X 和 Y 精子”(Sex Preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency), <i>Theriogenology</i> , Vol. 52, (1999), pp. 1323-1341
Johnson, L. A. 和 Schulman, J. D. “用流式细胞仪选择精子的安全性”(The safety of sperm selection by flow cytometry), <i>Hum. Reprod.</i> 9 (5): 758. (1994)
Johnson, L. A., 和 Pinkel, D., 对用于哺乳动物精子的高分辨率 DNA 分析的基于激光的流式细胞仪的改进(Modification of a Laser-Based flow Cytometer for High-Resolution DNA Analysis of Mammalian Spermatozoa), <i>Cytometry</i> 7, pp 268-273. (1986)
Johnson, L. A., 等, “兔子的性别预选: 通过对 DNA 和细胞分类而分离的来自 X 和 Y 精子的活性分选”(Sex Preselection in Rabbits: Live Births from X and Y Sperm Separated by DNA and Cell Sorting), <i>Exceptional Paper-Rapid Publication</i> , XP-002103476, <i>Biology of Reproduction</i> 41, pp. 199-203 (1999)
Johnson, L. A., 等, “用改进的制备方法并用 Hoechst 33342 染色的对带 X 染色体和带 Y 染色体的精子进行流式分离”(Flow sorting of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342), <i>Gam. Res.</i> 17: 1-9., (1987)
Johnson, L. A., 等, “改进的流式细胞技术筛选哺乳动物 X 和 Y 精子: 人工授精的高速筛选和定向”(Enhanced flow cytometric sorting of mammalian X and Y sperm: high speed sorting and orienting no77. 1e for artificial insemination.) <i>Theriogenology</i> , 49 (1) : 361. Abstr. (1988)
Johnson, L. A., 等, “猪的性别预选: 流式细胞技术筛选带 X-和带 Y-染色体的精子以生产后代”(Sex Preselection in Swine: Flow Cytometric Sorting of X-and Y-Chromosome Bearing Sperm to Produce Offspring), <i>Boar Semen Preservation IV</i> , pp. 107-114 (2000)
Johnson, L. A., 等, “用双重染色和死细胞选通提高流式筛选带 X-和带 Y-染色体的活精子的分辨率”(Improved flow sorting resolution of X-and Y-chromosome bearing viable sperm separation using dual staining and dead cell gating.) <i>Cytometry</i> 17 (suppl 7): 83. (1989)
Johnson, L. A., “用流式细胞技术对精子的性别比率进行限定是为了富集带 X 或 Y 的精子”(Flow cytometric determination of spermatozoa sex ratio in semen purportedly enriched for X or Y bearing spermatozoa.) <i>Theriogenology</i> , 29: 265. abstr. (1988)
Johnson, L. A. “用流式细胞筛选的精子对家畜动物进行性别预选”(Gender preselection in domestic

[0146]

animals using flow cytometrically sorted sperm.) <i>J Anim. Sci. Suppl</i> 1.70: 8-18. (1992)
Johnson, L. A., "哺乳动物的性别预选: 回顾"("Gender preselection in Mammals : An overview"), <i>Deutsch. Tierarztl. Wschr</i> , Vol. 103, pp 288-291 (1996)
Johnson, L. A. 分离带 X 和带 Y 的精子用于性别预选("Isolation of X-and Y-bearing spermatozoa for sex preselection. li7): <i>Oxford Reviews of Reproductive Biology</i> . Ed. HH Charlton. Oxford University Press. 303-326 (1994)
Johnson, L. A., "对耕作动物成功的性别预选"("Successful Gender Preselection in Farm Animals"), <i>Agricultural Biotechnology</i> , 1998, pp. 439-452.
Kachel, V., 等, "流式通过系统中平面粒子在流力作用下的统一测向取向"("Uniform Lateral Orientation, Cused by Flow Forces, of Flat Particles in Flow-Through Systems"), <i>The Journal of Histochemistry and Cytochemistry</i> , 1997, Vol. 25, No. 7, pp 774-780.
Kanayama, K., 等, "通过输卵管授精以及其后的自然妊娠的兔子受孕"("Pregnancy by means of tubal insemination and subsequent spontaneous pregnancy in rabbits"), <i>J. Int. Med. Res.</i> 20: 401-405. (1992)
Karabinus, 等, "卵黄-柠檬酸盐和乳汁膨胀剂对冷藏的牛精子染色质结构活性的影响"("Effects of Egg Yolk-Citrate and Milk Extenders on Chromatin Structured Viability of Cryopreserved Bull Sperm"), <i>Journal of Dairy Science</i> , Vol. 74, No. 11, 1999, pp 3836-3848.
Kilicarslan, M. R., Horoz, H., Senunver, S. C., Konuk, S. C., Tek, C. and Carioglu, B. 1996. GmRH 和 hCG 对母马排卵和妊娠的影响(Effect of GmRH and hCG on ovulation and pregnancy in mares.) <i>Vet. Rec.</i> 139: 119-120.
Lapin, D. R. 和 Ginther, O. J. 1977. 用马垂体提取物对季节性不排卵和排卵母马的排卵和大量排卵的诱导(Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract.) <i>J. Anim. Sci.</i> 44: 834-842.
Lawrenz, R. 1985. "用冻融的精子进行非外科子宫内授精的初期结果"(Preliminary results of non-surgical intrauterine insemination of sheep with thawed frozen semen.) <i>J S Afr. Vet. Assoc.</i> 56 (2): 61-63.
Levinson, G., 等, "基于 DNA 的富含 X 的精子分离物作为辅剂用于与 X 相关疾病的标本的植入前的遗传检测"("DNA-based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the preparation of X-linked disease"), <i>Mol. Human Reprod.</i> 10: 979-982. (1995)
Lindsey, A., 等, "用未冷冻的低剂量无性或者性别筛选的精子对母马进行子宫镜授精"("Hysteroscopic Insemination of Mares with Nonfrozen Low-dose Unsexed or Sex-sorted Spermatozoa"), Currently unpublished, pp. 1-15.
Linge, F. "Faltforsok med djupfrost sperma 用冷冻精子的田间试验(field trials with frozen sperm)", <i>Farskotsel.</i> 52: 12-13. (1972)
Loneragan, P., 等, "从授精到第一次卵裂的间隔时间对体内和体外牛胚胎发育的影响"("Effect of Time Interval from Insemination to First Cleavage on the Development of Bovine Embryos In Vitro and In Vivo"), <i>Theriogenology</i> , 1999, p. 326
Long, C. R., 等, <i>Theriogenology</i> . 49 (1) : 363. abstr. (1998)
Loy, R. G. 和 Hughes, J. P. "人绒毛促性腺素对母马排卵, 发情期长度, 以及生育力的影响"("The effects of human chorionic gonadotropin on ovulation, length of estrus, and fertility in the mare"). <i>Cornell Vet.</i> 56: 41-50. (1965)
Lu, K. H., 等, "用流式细胞分离技术筛选的牛精子进行体外授精"("In Vitro Fertilization with Flow-Cytometrically-Sorted Bovine Sperm"), <i>Theriogenology</i> 52, 1999, pp. 1393-1405.
Macmillan, K. L. 和 A. M. Day, "前列腺素 F2a-是奶牛的生育药物吗?"("Prostaglandin F2a-A Fertility Drug In Dairy Cattle?"), <i>Rualcura Animal Research Station, Private Bag, Hamilton, New Zealand, Theriogenology</i> , September 1982, Vol. 18 No. 3, pages 245-253
Matsuda, Y. 和 Tobari, I. "同暴露于紫外光(UV)和甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯中的精子对鼠卵子进行体外授精的染色体分析"("Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light (UV) and methyl and ethyl methanesulfonate (MMS and EMS)"), <i>Mutat. Res.</i> 198: 131-144. (1988)
Maxwell, W. 和 Johnson, L., "温育, 流式细胞筛选, 冷却, 或者冷藏后对野猪精子进行金霉素分析"("Chlortetracycline Analysis of Boar Spermatozoa after Incubation, Flow Cytometric Sorting,

[0147]

Cooling, or Cryopreservation"), <i>Molecular Reproduction and Development</i> 46, 1997, pp. 408-418.
Maxwell, W., 等,“用少量的新鲜或者冻融的精子进行子宫内或者输卵管内授精后的过度排卵的母羊的生育力”(“Fertility of Superovulated Ewes after Intrauterine or Oviductal Insemination with Low Numbers of Fresh or Frozen-Thawed Spermatozoa”), <i>Reprod. Fertil. Dev.</i> 5: 57-63. (1993)
McCue, P. M., 等,“母马的输卵管内授精”(“Oviductal insemination in the mare”), 7th Int Symp. Eq. Reprod. 133. abstr. (1997)
McCue, P. M.,“过量排卵”(“Superovulation”), <i>Vet. Clin. N. Amer. Eq. Prac.</i> 12: 1-11. (1996)
McDonald, L. E.,“垂体腺激素”(“Hormones of the pituitary gland”), In: <i>Veterinary Pharmacology and Therapeutics</i> . 6th ed., Ames, Iowa State Univ. Press. pp. 590. (1988)
McKeuna, T., 等,“用子宫体或者 comual 给奶牛授精后的未回转率”(“Nonreturn rates of dairy cattle following uterine body or comual insemination”), <i>J. Dairy Sci.</i> 73: 1179-1783. (1990)
McKinnon, A. 和 Voss, J.,“马的繁殖”(“Equine Reproduction”)Lea & Febiger, Philadelphia, pp 291,299-302,345-348,739 -797. (1993)
McKinnon, A. 等,“用 GnRH 类似物 deslorelin 处理的母马的可预测排卵”(“Predictable ovulation in mares treated with an implant of the GnRH analogue deslorelin”), <i>Eq. Vet. J.</i> 25: 321-323. (1993)
McKinnon, A. O. 等,“重复使用 GnRH 类似物 deslorelin (Ovuplant) 加速过渡期母马的排卵”(“Repeated use of a GnRH analogue deslorelin (Ovuplant) for hastening ovulation in the transitional mare”), <i>Eq. Vet. J.</i> 29: 153-155. (1996)
McNutt, T. L. 和 Johnson, L. A.,“流式细胞技术筛选精子: 对兔子的生育和胚胎/胎儿发育的影响”(“Flow cytometric sorting of sperm : influence on fertilization and embryo/fetal development in the rabbit”), <i>Mol. Reprod. Dev.</i> 43: 261-267. (1996)
Meinert, C., 等,“用释放 GnRH 类似物 deslorelin 的短期移植提高母马的排卵时间”(“Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin”), <i>Equine Veterinary Journal</i> , 25,1993, pp 65-68.
Merton, J., 等,“流式细胞技术筛选的冷冻/融化精子对体外牛胚胎生产成功率的影响”(“Effect of Flow Cytometrically Sorted Frozen/Thawed Semen on Success Rate of In Vitro Bovine Embryo Production”), <i>Theriogenology</i> 47,1997, pp. 295.
Meyers, P. J., Bowman, T., Blodgett, G., Conboy, H. S., Gimenez, T., Reid, M. P., Taylor, B. C., Thayer, J., Jochle, W. 和 Trigg, T. E. 1997. 利用缓释移植中 GnRH 类似物醋酸 deslorelin 加速发情期母马的排卵 (Use of the GnRH analogue, deslorelin acetate, in a slow release implant to accelerate ovulation in oestrous mares.) <i>Vet. Rec.</i> 140: 249-252.
Michaels, Charles,“Beef A. I. 便于那项工作”(“Facilities that work”), <i>Proc. Fifth N. A. A. B Tech. Conf. A. I. Reprod. Columbia, MO.</i> pp. 20-22.
Michel, T. H., 等,“人类绒毛膜促性腺激素和促性腺素释放方激素对加速良种母马排卵的功效率”(“Efficacy of human chorionic gonadotrophin and gonadotrophin releasing hormone for hastening ovulation in Thoroughbred mares”), <i>Eq. Vet. J.</i> 6: 438-442. (1986)
Miller, S. J.,“羊的人工繁殖技术”(“Artificial Breeding Techniques in Sheep”), In Morrow D. A. (ed): <i>Current Therapy in Theriogenology 2 Philadelphia</i> . WB Saunders. (1986)
Mirskaja, L. M. 和 Petrapavlovskii, V. V.,“通过施用绒毛膜促性腺激素的母马生殖高潮的一般持续时间”(“The reproduction of normal duration of heat in the mare by the administration of Prolan”), <i>Probl. Zivotn. Anim. Breed. Abstr.</i> 5: 387. (1937)
Molinia, F. C., Gibson, R. J., Brown, A. M., Glazier, A. M. 和 Rodger, J. C. 1998. 对 brushtail possum, <i>Triczosurus vulpecula</i> , and tammar wallaby, <i>Macropus eugenii</i> 进行腹腔镜子宫内和超速排卵授精后受孕成功 (Successful fertilization after superovulation and laparoscopic intrauterine insemination of the brushtail possum, <i>Triczosurus vulpecula</i> , and tammar wallaby, <i>Macropus eugenii</i>). <i>J. Reprod. Fert.</i> 112: 9-17.
Morcom, C. B. 和 Dukelow, W. R.“用腹腔镜检对猪输卵管授精的研究方法”(“A research technique for the oviductal insemination of pigs using laparoscopy”), <i>Lab. Anim. Sci.</i> 1030-1031. (1980)
Morris, L. H., 等,“少量精子对排卵期前母马的子宫输卵管结合处进行子宫镜授精”(“Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares”), <i>Journal of Reproduction and Fertility</i> , Vol. 118, pp. 95-100 (2000)
Mullet, W. 和 Gautier, F.,“杂环化合物同核酸的相互作用”(“Interactions of heteroaromatic

[0148]

compounds with nucleic acids")Euro. J Biochem. 54: 358 (1975)
Munne, S.,“流式细胞分离的 X 和 Y 精子可能对人胚胎有害”(“Flow cytometry separation of X and Y spermatozoa could be detrimental to human embryos”), Hum. Reprod. 9 (5): 758, (1984)
Nowshari, 等,“添加一有定量 pLH 的纯化的 pFSH 与山羊的超量排卵”(“Superovulation of Goats with Purified pFSH Supplemented with Defined Amounts of pLH”), Theriogenology, Vol 43, pp 797-802 (1995)
Olson, S. E. 和 Seidel, G. E. Jr.,“减少的氧气压力和 EDTA 促进化学定义培养基中的牛授精卵的发育”(“Reduced Oxygen Tension and EDTA improve Bovine Zygote Development in a Chemically Defined Medium”), Journal of Animal Science 78,2000, pp. 152-157.
Pace, M. M. 和 Sullivan, J. J.,“授精时间, 精子数量以及膨胀剂组分对用冷冻种马精液授精母马的妊娠率的影响”(“Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on pregnancy rates in mares inseminated with frozen stallion semen”), J Reprod. Fert. Suppl. 23: 115-121 (1975)
Parrish, J. J., 等,“通过肝素使牛精子获得能量”(“Capacitation of bovine sperm by heparin”), Biology of Reproduction, Vol. 38, pp. 1171-1180 (1988)
PCT application PCT/US99/17165, filed 28 July 1999, entitled“非外科人工授精的马系统”(“Equine System for Non-Surgical Artificial Insemination”).
PCT application PCT/US98/27909, filed 31 December 1998, entitled“哺乳动物特定性别授精的商业实践”(“Commercially Practical Sex-Specific Insemination of Mammals”).
Peippo, J., 等,“用聚合酶链式反应对马预植胚胎性别的诊断”(“Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction”), Theriogenology, Vol. 44 619-627 (1995)
Perry, E. J.“历史背景: 田间动物的人工授精”(“Historical Background In: The Artificial nsemination of Farm Animals”), 4th ed. Edited by E. J. Perry. New Brunswick, Rutgers University Press, pp. 3-12., (1968)
Petersen, G. A., 等,“母牛和小牛行为以及早期断奶对牛肉的经济考虑”(“Cow and Calf Performance and Economic Considerations of Early Weaning of Fall-Born Beef Claves”), J. Anim. Sci., 1987,64: 15, pp 15-22.
Pickett, B. W, 等,“在 A.I.方案中影响种马精子生育力的因素”(“Factors influencing the fertility of stallion spermatozoa in an A. I. program”), Proc. 8th Internat. Congr. Anim. Reprod. A. I. Krakow, Poland. 4: 1049-1052. (1976)
Pickett, B. W., 和 Shiner, K. A.,“马人工授精的最新进展”(“Recent developments in artificial insemination in horses”), Livestock Production Science, 40,1994, pp 31-36.
Pickett, B. W. 和 Back, D. G.,“种马精子的制备, 收集, 评估以及授精方法”(“Procedures for preparation, collection, evaluation and insemination of stallion semen”). C. S. U. Exp. Sta. Artira. Reprod. Lab. Gen. Series Bull. 935. (1973)
Pickett, B. W., 等,“精子膨胀剂对马授精的影响”(“Effect of seminal extenders on equine fertility”), J. Anim. Sci. 40: 1136-1143. (1975)
Pickett, B. W., 等,“精子添加剂和包装系统对牛精子授精的影响”(“Influence of seminal additives and packaging systems on fertility of bovine spermatozoa”), J. Anim. Sci. Suppl. II. 47: 12. (1978)
Pickett, G. W., 等,“对最大生殖率的母马的经营”(“Management of the mare for maximum reproductive efficiency”)Bulletin No. 6 Colorado State University, Ft. Collins CO. (1989)
Pinkel, D., 等,“哺乳动物精子高分辨率 DNA 的测定”(“High resolution DNA measurements of mammalian spermatozoa”). Cytometry. 3: 1-9. (1982)
Pinkel, D., 等,“流式细胞技术鉴定分离的牛精子样品中带 X 染色体和带 Y 染色体精子的比例”(“Flow Cytometric Determination of the Proportions of X-and Y-Chromosome-Bearing Sperm in Samples of Purportedly Separated Bull Sperm”), Journal of Animal Science, Vol. 60, No. 5,1985, pp 1303-1307.
Polge, E. J.,“AI 的历史透视: 生产特定性别精子的商业方法, IVF 步骤”(“Historical Perspective of AI : Commercial Methods of Producing Sex Specific Semen, IVF Procedures”), Proceedings of the 16 th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction, Cambridge, England, 1996, pp. 7-11.

[0149]

Preza, C. 等,“用多向旋转发光差分干涉比较(DIC)图像测定细胞的不依赖于方向的光学路径长度分布”(“Determination of Direction-Independant Optical Path-Length Distribution of Cells Using Rotational-Diversity Transmitted-Light Differential Interference Contrast (DIC) Images”), Presented at the Multidimensional Microscopy: Image Aquisition and Processing V, p. 1-11 (1998)
Rath, D., 等,“在用流式细胞技术筛选的带 X 和带 Y 染色体的精子进行体外授精后进行性别预选以生产小猪”(“Production of Piglets Preselected for Sex Following in Vitro Fertilization with X and Y Chromosome-Bearing Spermatozoa Sorted by Flow Cytometry”), Theriogenology, 47,1997, pp 795-800.
Rath, D., 等,“猪的低剂量授精技术”(“Low Dose Insemination Technique in the Pig”), Boar Semen Preservation IV, 2000, pp. 115-118.
Reiling, B. A., 等,“产前雄性化对行为, 位置, 以及屠体的影响和感觉特征对单一牛母牛的小母牛的影响”(“Effect of Prenatal Androgenization on Preformance, Location, and Carcass and Sensory Traits on Heifers in Single Calf Heifer System”), J. Anim. Sci., 1995,73: pp 986-992.
Rens, W., 等,“改进的流式细胞仪筛选带 X 和带 Y 染色体精子: 大大提高了有性精子的回收率”(“Improved Flow Cytometric Sorting of X-and Y-Chromosome Bearing Sperm: Substantial Increase in Yield of Sexed Semen”), Molecular Reproduction and Development, 1999, pp 50-56.
Rens, W., 等,“用于更高效精子定向以提高带 X 和带 Y 染色体精子的筛选效率的新式喷嘴”(“A Novel Nozzle for More Efficient Sperm Orientation to Improve Sorting Efficiency of X and Y Chromosome-Bearing Sperm”), Technical Notes, Cytometry 33,1998, pp 476-481.
Rieger, D., 等,“授精家畜卵母细胞的第一次分裂和它们发育到胚泡阶段之间的关系”(“The Relationship Between the Time of First Cleavage of Fertilized Cattle Oocytes and Their Development to the Blastocyst Stage”), Theriogenology, 1999, pp. 190.
Ritar, A. 和 Ball, A. “腹腔镜授精后的山羊绒用幼山羊的生殖力”(“Fertility of young cashmere goats after laparoscopic insemination”). J. Agr. Sci. 117: 271-273.(1991)
Roberts, J. R. 兽医产科和生殖疾病(In: Veterinary Obstetrics and Genital Diseases). Ithaca, New York. pp. 740-749. (1971)
Roser, JF., 等,“用抗 hCG 抗体对母马生殖率影响”(“Reproductive efficiency in mares with anti-hCG antibodies”), Proc 9th Int. Congr. Artira. Repro. and A. I. 4: 627. abstr. (1980)
Roth, T. L., 等,“马绒膜促性腺素, 人类绒膜促性腺素, 以及腹腔镜人工授精胚胎, 内分泌物, 以及卵黄特征对家猫的影响”(“Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat”), Bio Reprod. 57: 165171. (1997)
Rowley, H-S., 等,“母马授精量对胚胎回收的影响”(“Effect of insemination volume on embryo recover; in mares”, J. Equine Vet. Sci. 10: 298-300.(1990)
Salamon, S. “绵羊的人工授精”(“Artificial Insemination of Sheep”). Chippendale, New South Whales. Publicity Press. p. 83-84. (1976)
Salisbury, G. W. 和 VanDemark, N. L. “家畜人工授精和生殖的生理学”(“Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle”), San Francisco: Freeman and Company. (1961)
SAS, SAS/STAT 0 User's Guide (Release 6.03), SAS Inst. Inc., Cary, NC., 1988.3 pages
Schenk, J. L. 和 Seidel, Jr., G. E., “有牛性别选择的商业化的来临”(“Imminent Commercialization of Sexed Bovine”), Proceedings, The Range Beef Cow Symposium XVI, 1999, pp 89-96.
Schenk, J. L., 等,“流式筛选的牛细胞精子的冷藏”(“Cryopreservation of Flow-Sorted Bovine Spermatozoa”), Theriogenology 52,1999, pp. 13751391.
Schmid R. L., 等,“以胞质内精子注射和输卵管授精用有性马精子进行妊娠”(“Fertilization with Sexed Equine Spermatozoa Using Intracytoplasmic Sperm Injection and Oviductal Insemination”), 7th International Symposium On Equine Reproduction, pp. 139 (Abstract) (1998)
Seidel, G. Jr., “利用有性牛精子进行体外受孕和超量排卵”(“Use of Sexed Bovine Sperm for In Vitro Fertilization and Superovulation”), Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Proceedings of the 2000 CETA/ACTE Convention, Charlottetown, Prince Edward Island, August 2000, pp. 22-24.
Seidel, G. E. 和 Johnson, L. A., “有性的哺乳动物精子—回顾”(“Sexing Mammalian

[0150]

Sperm-Overview"), <i>Theriogenology</i> 52: 1267-1272, (1999)
Seidel, G. E. Jr, 等,“用有性精子对小母牛授精”(“Insemination of Heifers with Sexed Sperm”), <i>Theriogenology</i> , Vol. 52, pp. 1407-1421 (1999)
Seidel, G. E. Jr, 等,“用冷却的, 未冷冻的有性精子给小母牛人工授精”(“Artificial Insemination of Heifers with Cooled, Unfrozen Sexed Semen”), <i>Theriogenology</i> , Vol. 49 pp. 365 (Abstract) (1998)
Seidel, G. E. Jr, 等,“用有性冷冻或者液体精子给小母牛授精”(“Insemination of heifers with sexed frozen or sexed liquid semen”), <i>Theriogenology</i> : 51. (in press). abstr. (1999)
Seidel, G. E., Jr, 等,“用很低剂量的未冷冻有性精子给小母牛进行子宫角授精”(“Uterine Horn Insemination of Heifers With Very Low Numbers of Nonfrozen and Sexed Spermatozoa.”), <i>Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Colorado State University, Atlantic Breeders Cooperative, Theriogenology</i> (1997), pp. 1255-1264
Seidel, G. E., “用于肉用家畜的有性精子的情况”(“Status of Sexing Semen for Beef Cattle”), <i>Texas A & M University 45th Annual Beef Cattle Short Course and Trade Show Proceedings, August 9-11, 1999; pp. III 24-III 27</i>
Seidel, Jr., G. E., “用带 X 和 Y 的牛精子进行人工授精”(“Artificial Insemination With X-and Y-Bearing Bovine Sperm”), <i>Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, (1996)</i>
Seidel, Jr., G. E., 等,“用很低剂量的未冷冻精子给 Holstein Heifers 授精”(“Insemination of Holstein Heifers With Very Low Numbers Of Unfrozen Spermatozoa”), <i>Colorado State University, Atlantic Breeders Cooperative, (1995)</i>
Senger, P.L., 等, “子宫角授精对奶牛妊娠率的影响”(“Influence of cornual insemination on conception rates in dairy cattle”). <i>J Anim. Sci.</i> 66:30103016. (1988)
Shelton, J. N. 和 Moore, N. W. 1967. 母羊对妊娠母马的促性腺素以及马前垂体提取物的反应(The response of the ewe tot pregnant mare gonadotropin and to horse anterior pituitary extract.) <i>J. Reprod. Fert.</i> 14: 175-177.
Shilova, A. V., Platov, E. M. 和 Lebedev, S. G. 1976. 利用人绒毛膜促性腺素对母马的排卵期进行调节(The use of human chorionic gonadotrophin for ovulation date regulation in mares). <i>VIIIth Int. Congr. On Anim. Repro. and A. I.</i> 204-208.
Squires, E.,“用流式细胞仪对多种精子的同时分析”(“Simultaneous Analysis of Multiple Sperm Attributes by Flow Cytometry”), <i>Diagnostic Techniques and Assisted Reproductive Technology, The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice, Vol. 12, No. 1, April 1996, ppl27-130.</i>
Squires, E. L., 等,“GnRH 类似物对母马排卵的有效剂量”(“Effect of dose of GnRH analogue on ovulation in mares”), <i>Theriogenology</i> . 41: 757-769. (1994)
Squires, E. L.,“早期胚胎死亡”(“Early Embryonic Loss”)in <i>Equine Diagnostic Ultrasonography, 1 st Ed. pp 157-163 Eds Rantanen & McKinnon. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland (1998)</i>
Squires, E. L., 等,“种马精子的冷却和冷冻”(“Cooled and frozen stallion semen”), <i>Bulletin No. 9, Colorado State University, Ft. Collins, CO. (1999)</i>
Sullivan, J. J., Parker, W. G. 和 Larson, LL. 1973. 在三个连续发情期施用人类绒毛膜促性腺素后不分泌乳汁的母马的发情期和排卵期的持续时间(Duration of estrus and ovulation time in nonlactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous periods.) <i>J. A. V. M. A.</i> 162: 895-898.
Sumner, A. T. 和 Robinson, J. A.,“带 X 和带 Y 的人精子头部干物质之间的差异”(“A Difference in Dry mass between the heads of X and Y-bearing human Spermatozoa”), <i>J Reprod Fert</i> 48, p. 9-15 (1976)
Taljaard, T. L., Terblanche, S. J., Bertschinger, H. J. 和 Van Vuuren, L. J. 1991. 发情期母羊腹腔镜授精技术的效果(The effect of the laparoscopic insemination technique on the oestrus cycle of the ewe.) <i>J. S Afr. Vet. Assoc.</i> 62 (2) : 60-61.
Taylor, C. S., “用传统和性别控制系统的肉牛业的食物利用率”(“Efficiency of Food Utilization in Traditional and Sex-Controlled Systems of Beef Production”), <i>AFRC Animal Breeding Research Organization, West Mains Road, Edinburg EH9 3JQ, pp 401-440.</i>
Tervit, H. R., 等,“绵羊和家畜卵细胞的成功体外培养”(“Successful Culture In Vitro of Sheep and Cattle Ova”), <i>Agricultural Research Council, Unit of Reproduction Physiology and Biochemistry, University of Cambridge, 1972, p. 493-497.</i>

[0151]

US application 09/015, 454 filed January 29,1998, entitled“用于提高哺乳动物有性胚胎收率的系统”(“System for Improving Yield of Sexed Embryos in Mammals”).
US application 09/001, 394, filed December 31,1997, entitled“用于筛选特定性别精子的鞘液和收集系统”(“Sheath Fluids and Collection Systems for Sex Specific Cytometer Sorting of Sperm”).
US Application, 09/454,488, entitled“改进的流式细胞仪喷嘴和流式细胞仪样品的处理方法”(“Improved Flow Cytometer Nozzle and Flow Cytometer Sample Handling Methods”), filed December 3,1999.
US Application, 09/448, 643, entitled“哺乳动物的多性别胚胎生产系统”(“Multiple Sexed Embryo Production System for Mammals”), filed November
US Application, 09/511,959 entitled“用于改进细胞仪筛选的特定性别精子的鞘液和收集系统的方法”(“Methods For Improving Sheath Fluids and Collection Systems For Sex Specific Cytometer Sorting of Sperm”), filed February 23,2001.
US Application, 60/094, 720, entitled“马的低剂量授精系统”(“System for Low Dose Insemination of Equines”), filed July 30,1998.
US Application, 60/224, 050., entitled“使用有性精子的带有终端交互程序的用于兽群管理的集成系统”(“Integrated System for Herd Management With Terminal-Cross Program Using Sexed Semen”), filed August 9,2000.
US Application, 60/113,143, entitled“马的授精系统”(“Equine Insemination System”), filed December 18,1998.
US Application, 60/203,089, entitled“用于分辨图像生产信号中微小差异的检测系统”(“Detector System for Resolving Small Differences in Photo-generated Signal”), filed May 9,2000.
US Application, 60/238,294, entitled“母马的子宫镜授精”(“Hysteroscopic Insemination of Mares”)filed October 5,2000.
US Application, entitled“将冻融精子细胞分离成带 X 染色体和带 Y 染色体群体的系统”(“System For Separating Frozen-Thawed Sperm Cells Into X-Chromosome And Y Chromosome Bearing Populations”), filed November 28,2000.
US Application, entitled“用分成带 X-染色体和带 Y-染色体群体的精子进行体外授精的系统”(“A System for In-vitro Fertilization with Spermatozoa Separated into X-chromosome and Y-chromosome Bearing Populations”), filed November 28,2000.
Van Munster E. B., 等,“由模拟差分干涉对比图像对基于测量评价的光学路径分布进行重建”(“Measurement-based evaluation of optical pathlength distributions reconstructed from simulated differential interference contrast images”), Journal of Microscopy 192, Pt. 2, p. 170-176 (1998)
Van Munster, E. B., 等,“以精子头部体积差异作为理论基础筛选带 X 和带 Y 的精子”(“Difference in Sperm Head Volume as a Theoretical Basis for Sorting X & Y-Bearing Spermatozoa : Potentials and Limitations”), Theriogenology 52, pp. 1281-1293, (1999)
Van Munster, E. B., 等,“由宽视野差分干涉对比显微镜获得的光学路径分部形成图像的改建”(“Reconstruction of optical pathlength distributions form images obtained by a wide field differential interference contrast microscope”), Journal of Microscopy 188, Pt. 2, p. 149-157 (1997)
Van Munster, E. B.,“Geslachtsbepaling met interferometrie”, Derde prijs NtvN-prijsvraag voor pas-gcpromoveerden 65/4, p. 95-98 (1999)
Van Munster E. B., 等,“带 X 染色体和带 Y 染色体的牛精子头部的体积差异于 DNA 含量差异相符合”(“Difference in Volume of X-and Y-chromosome Bearing Bovine Sperm Heads Matches Difference in DNA Content”)Cytometry 35 p. 125-128 (1999)
Vazquez, J., 等,“猪 A.I.; 以少量的精子用非外科手术方法进行深入授精的的新策略”(“A. I. in Swine; New Strategy for Deep Insemination with Low Number of Spermatozoa Using a Non-surgical Methodology”), 14 th International Congress on Animal Reproduction, Vol. 2, Stockhlom, July, 2000, p. 289.
Vazquez, J., 等,“非外科手术深入子宫内部授精技术的发展”(“Development of a Non-surgical Deep Intra Uterine Insemination Technique”), IV International Conference on Boar Semen Preservation, Maryland, August, 1999, p 35 and photo of display board.
Vazquez, J., 等,“纤维内窥镜技术成功对母猪低剂量授精”(“Successful Low-Dose Insemination by a Fiberoptic Endoscope Technique in the Sow”), Proceedings Annual Conference of the International

[0152]

Embryo Transfer Society, Netherlands, Theriogenology, Vol. 53, January, 2000, pp. 201.
Vazquez, J., 等,“Hyposematic Swelling 试验预测猪精子完整性”(“Hyposematic Swelling Test as Predictor of the Membrane Integrity in Boar Spermatozoa”), Boar Semen Preservation IV, IVth International Conference on Boar Semen Preservation, Maryland, pp. 263.
Vazquez, J. 等,“母马的非外科子宫输卵管授精”(“Nonsurgical Uterotubal Insemination in the Mare”), Proceedings of the 44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Baltimore, Maryland, December 6-9, 1998, Vol. 44, pp 68-69
Vidament, M., Dupere, A. M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P. and Palmer, E. 1997. 马冷冻精子的耐冻力和生育田间试验结果 (Equine frozen semen freezeability and fertility field results.) Theriogenology. 48: 907.
Voss, J. L. 等,“母马的生育管理”(“Reproductive management of the broodmare”). C. S. U. Exp. Sta. Anim. Reprod. Lab. Gen. Series.Bull. 961. (1976)
Voss, J. L., 等,“授精量和授精频率对母马生育力的影响”(“Effect of number and frequency of inseminations on fertility in mares”, J. Reprod. Fert. Suppl. 32: 53-57. (1982)
Voss, J. L.,“人绒毛膜促性腺激素对母马发情周期和正常周期非分泌期的影响”(“Effect of human chorionic gonadotropin on duration oestrous cycle and fertility of normally cycling, non-lactating mares”). J. A. V. M. A. 165: 704-706. (1974)
Welch, G., 等,“带 X 和带 Y 染色体的牛精子的流式细胞技术筛选以及 PCR 鉴定”(“Flow Cytometric Sperm Sorting and PCR to Confirm Separation of X-and Y-Chromosome Bearing Bovine Sperm”), Animal Biotechnology, 6 (2), 131-139, 1995, pp 131-139.
Welch G. R., 等,“用 FACS IV 流式筛选基于 DNA 的带 X 和带 Y 染色体的精子进行流体和光学改进”(“Fluidic and optical modifications to a FACS IV for flow sorting of X-and Y-chromosome bearing sperm based on DNA”), Cytometry 17 (suppl. 7): 74. (1994)
Wilson, C. G., 等,“重复注射 hCG 对母马生殖效率的影响”(“Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares”), Eq. Vet. Sci. 4: 301308. (1990)
Wilson, M.S., “用冷冻精子对母狗进行非外科子宫内人工授精”(“Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen”), J.Reprod. Fert Suppl. 47:307-311. (1993)
Windsor, D.P., 等, “通过分离带 X 染色体和带 Y 染色体精子进行性别预选: 回顾”(“Sex Predetermination by Separation of X and Y Chromosome-bearing Sperm: A Review”), Reproduction of Fertilization and Development 5, pp. 155-171, (1993)
Woods, J. 和 Ginther, O. J.,“收集母马多数胚胎的最新相关研究”(“Recent studies related to the collection of multiple embryos in mares”). Theriogenology. 19: 101-108. (1983)
Woods, J., 等,“排卵的授精时间对母马妊娠率和胚胎死亡率的影响”(“Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares”). Eq. Vet. J. 22 (6): 410-415. (1990)
XP-002103478, File Biosis, (1988), 一页

[0153] 另外,应当理解所用的每个术语除非同本申请中的应用具有不一样的解释,应当理解为在此引入的通常字典中对每个术语及所有定义,可替代术语,以及同义词,例如在此引入作为参考的蓝登书屋韦氏字典的第二版中所编入的。但是,就以上的每一项而言,在此引入作为参考的这样的信息或者声明所能够延伸的程度应当被认为同这一/这些发明的授权是不一致的,这些声明显然不能被认为是申请人所做出的。

[0154] 另外,除非上下文中有其它需要,应当理解术语“含有”或者其它动词形式的目的是为了说明包括阐明的元件或者步骤或者一组元件或一组步骤而不排除任何其它元件或者步骤或者一组元件或者一组步骤。这样的术语应当被解释为其最广泛的形式以赋予申请人在澳大利亚等国最大范围的法律许可。

[0155] 因此,应当清楚申请人的权利要求至少已经支持了i) 这里描述的每种液气转换设备, ii) 公开和描述的相关方法, iii) 类似的,相当的,以及实际上隐含有改变的这些设备和方法, iv) 公开和描述的能够完成所示的每种功能的可供替换的设计, v) 那些可以完成或者

意味着能够完成上面描述和公开的所示每种功能的可替换的设计和方法,vi)所示的分离和独立发明的特征,组件和步骤,vii)用公开的不同系统或者组件改进的申请,viii)由这样的系统或者组件获得的产品,ix)本质上如本文上面以及同任何有关附加的实施例所描述的一样的方法和装置,以及x)每种公开的元件的各种组合和置换。

[0156] 另外,除非上下文有其它需要,应当理解术语“包含”或者动词的其它形式的目的是为了说明包括阐明的元件或者步骤或者一组元件或一组步骤而不排除任何其它元件或者步骤或者一组元件或者一组步骤。这样的术语应当被解释为其最广泛的形式以赋予申请人在澳大利亚等国最大范围的法律许可。

[0157] 说明书中所阐明的权利要求在此引入作为本发明说明书的一部分作为参考,并且申请人明确地保留权利以用引入所有这些权利要求的部分或全部内容作为支持全部或部分权利要求或者其任何部分或组成的附加说明,并且申请人进一步明确地保留了将引入的这些权利要求的部分或全部或其任何部分或组成从说明书中移动到权利要求中的权利或者相反作为本申请或者任何后继申请,分案申请,或者其部分继续申请要求的需要而定义要求保护的物质,或者根据任何国家的专利法,细则,或者条约的规定获得任何减少费用的利益,这些在此引入作为参考的内容在本申请包括任何后继申请,分案申请,或者部分后继申请或者在其上进行修改或者扩充的整个期间应当是有效的。

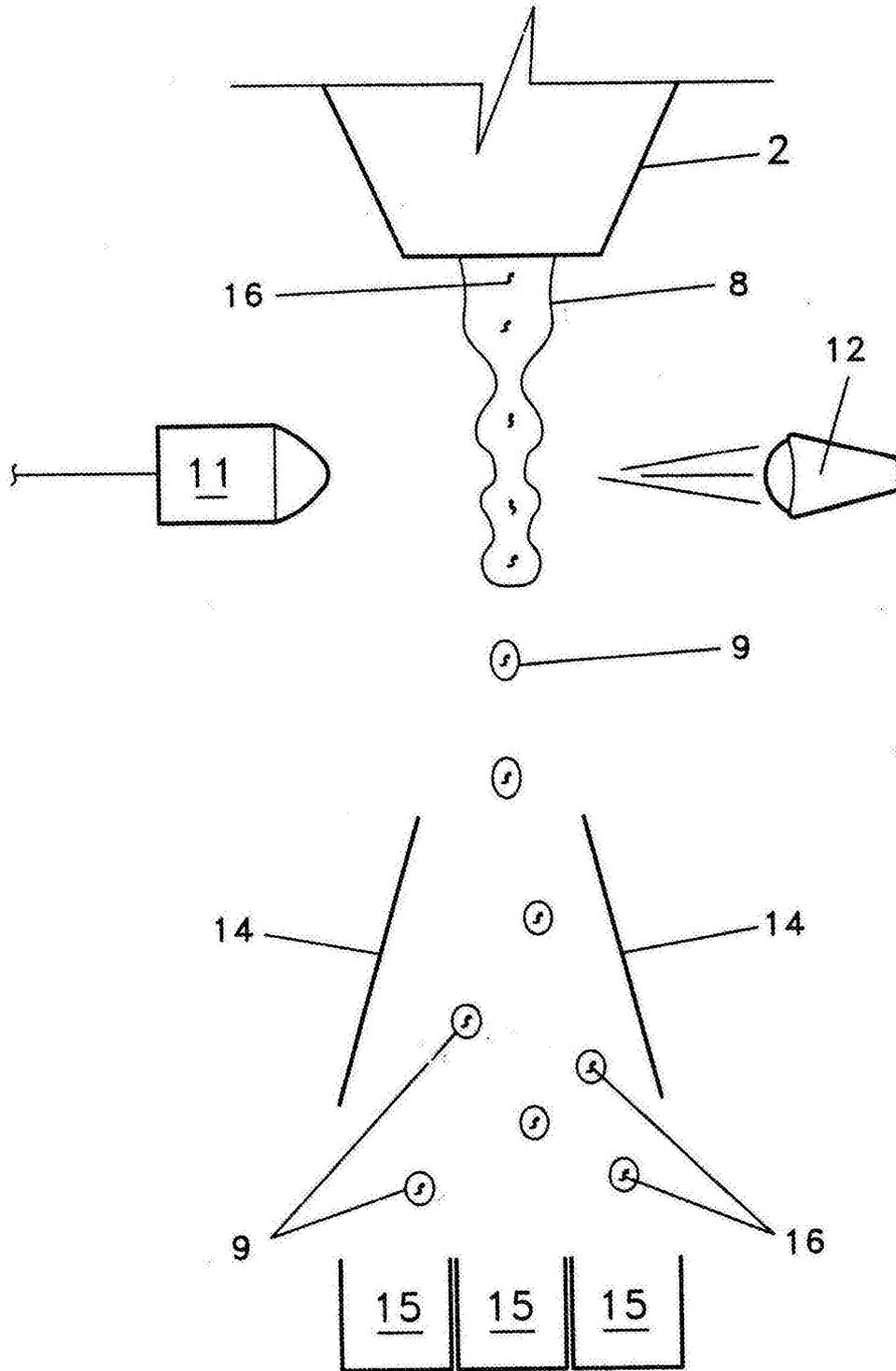


图2

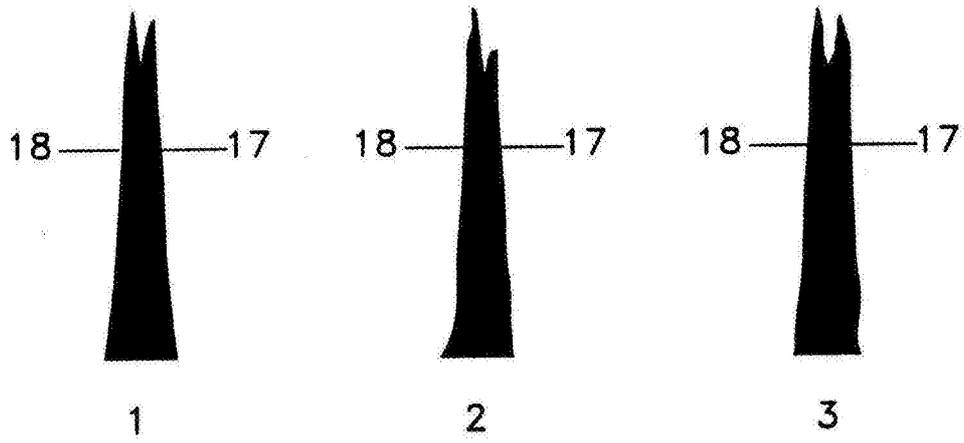


图3a

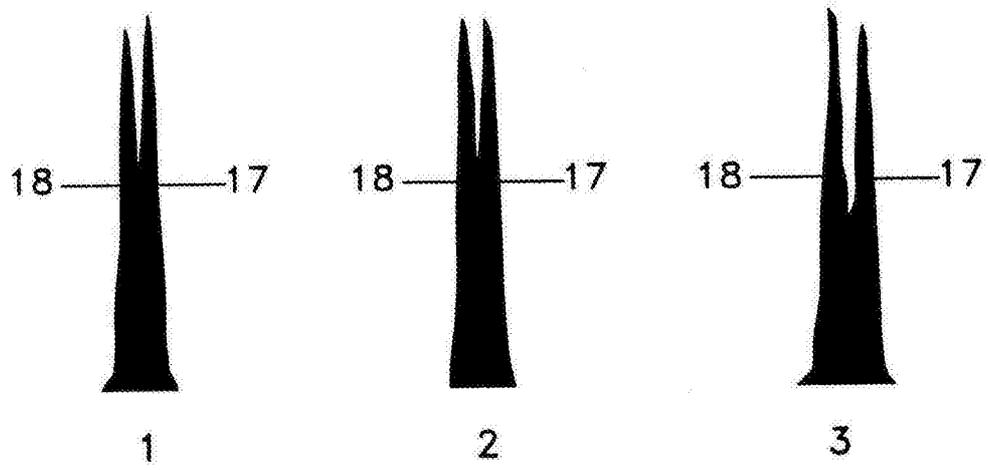


图3b

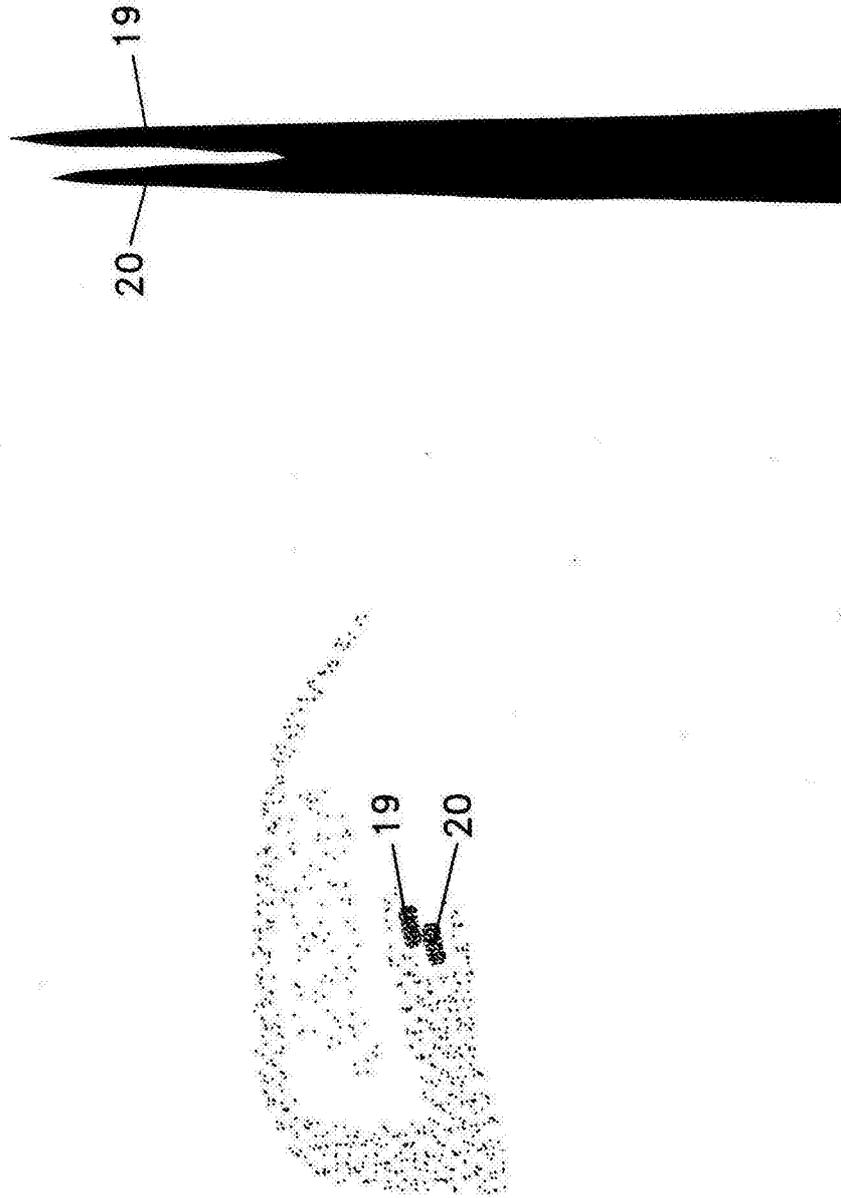


图4

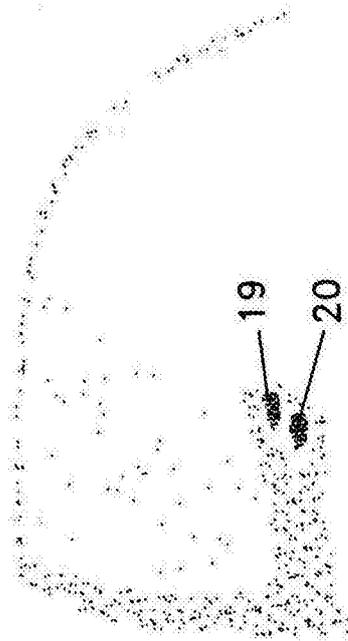


图5

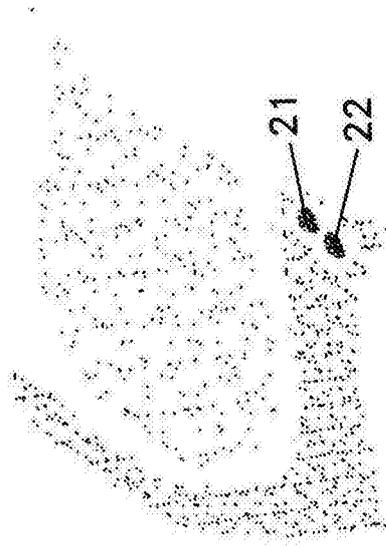


图6

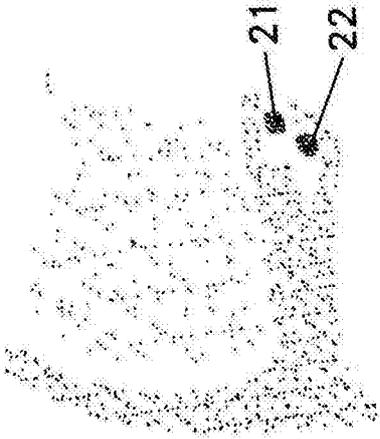
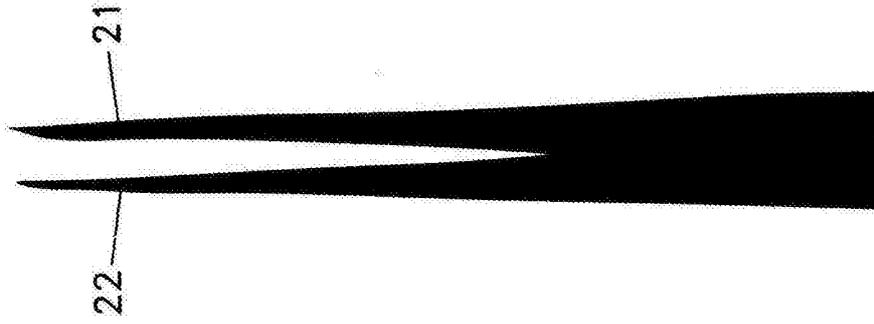


图7

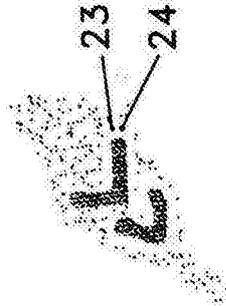
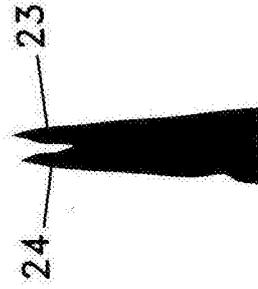


图8

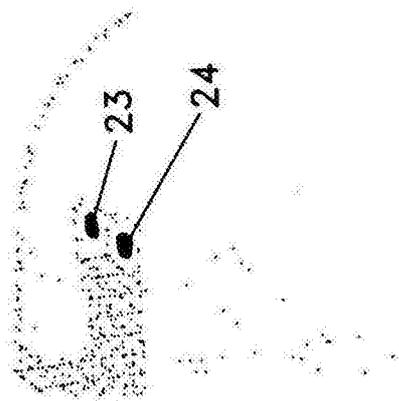
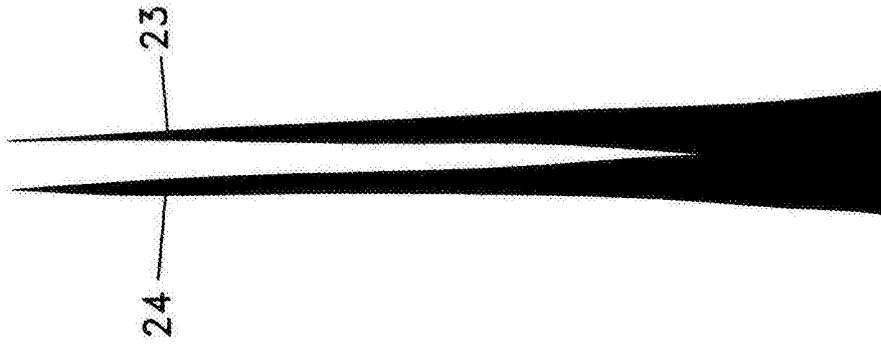


图9

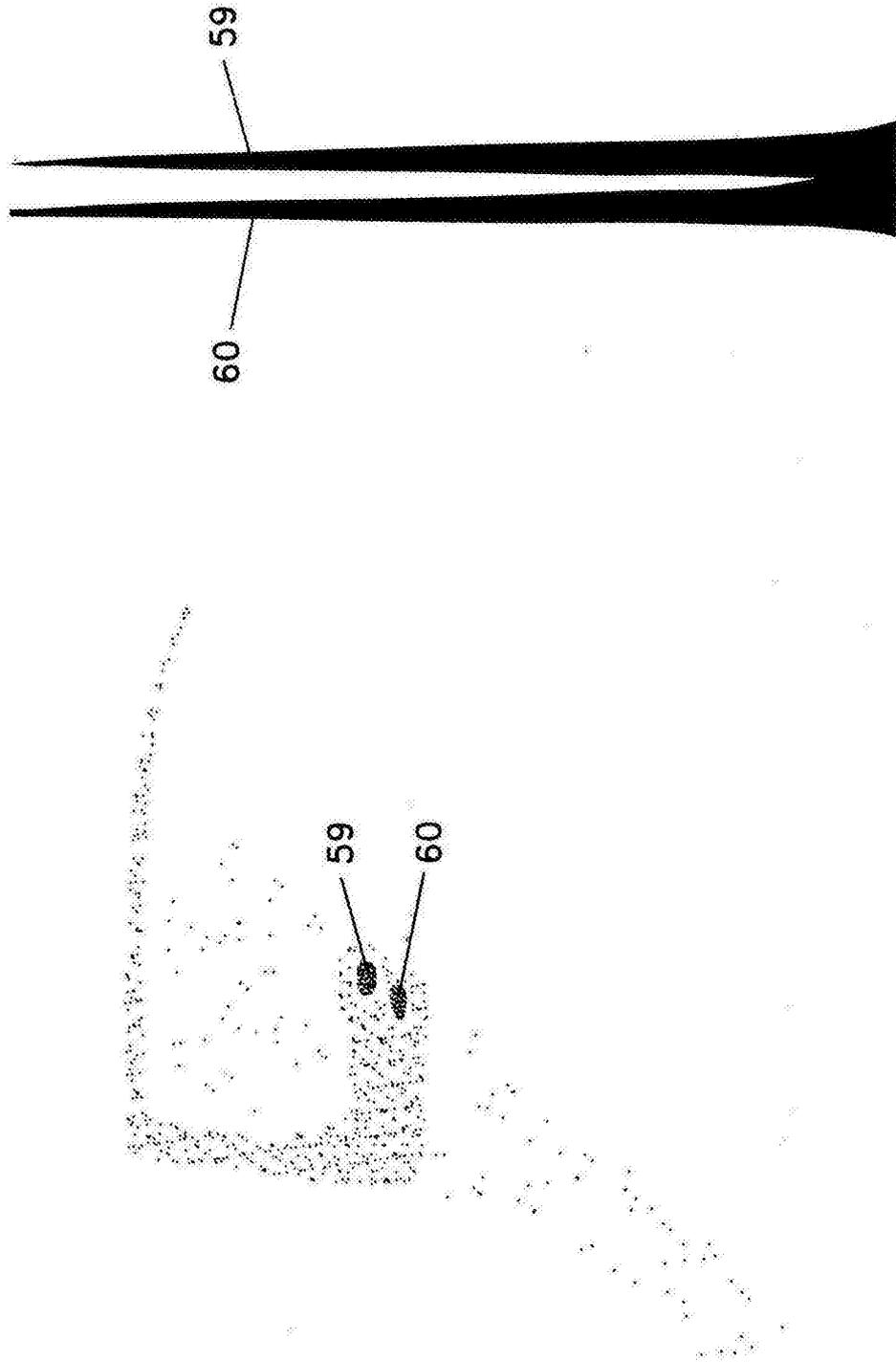


图10

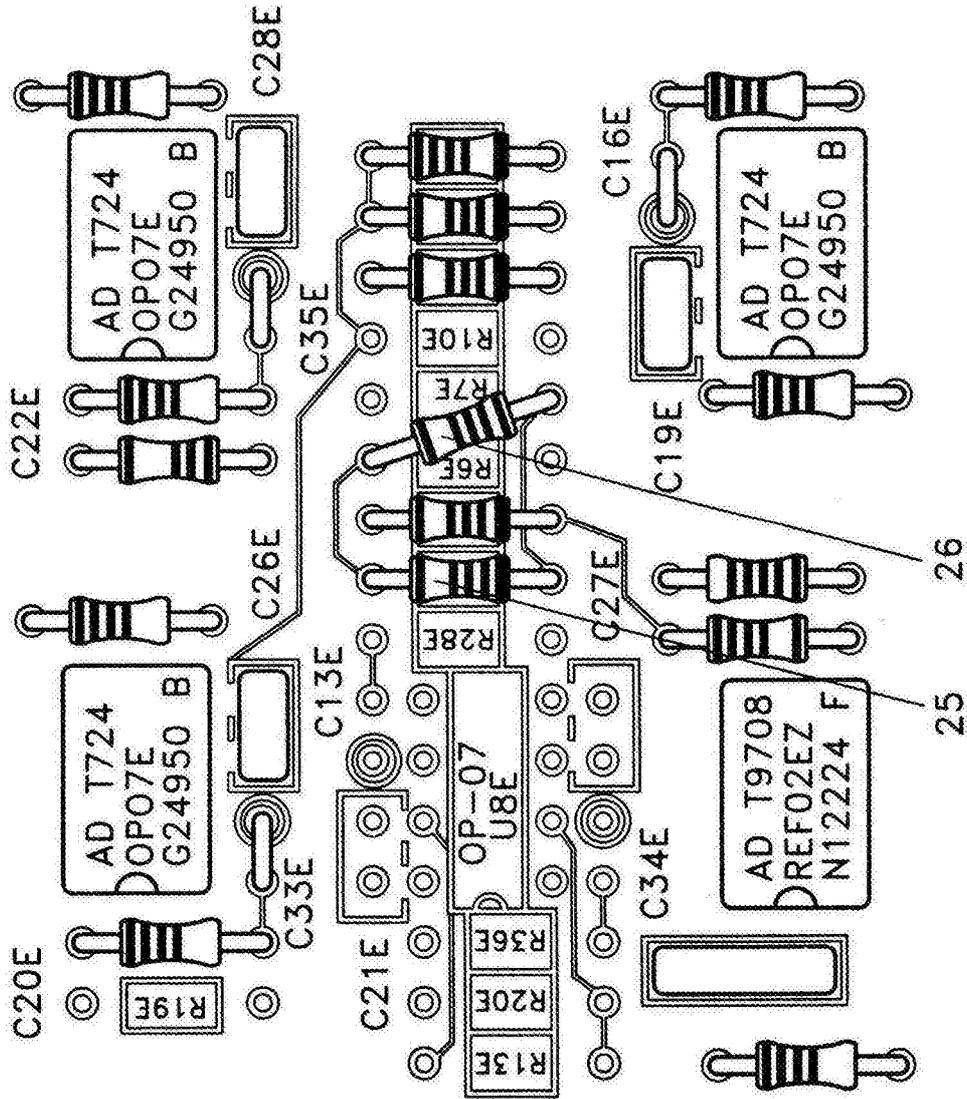


图11

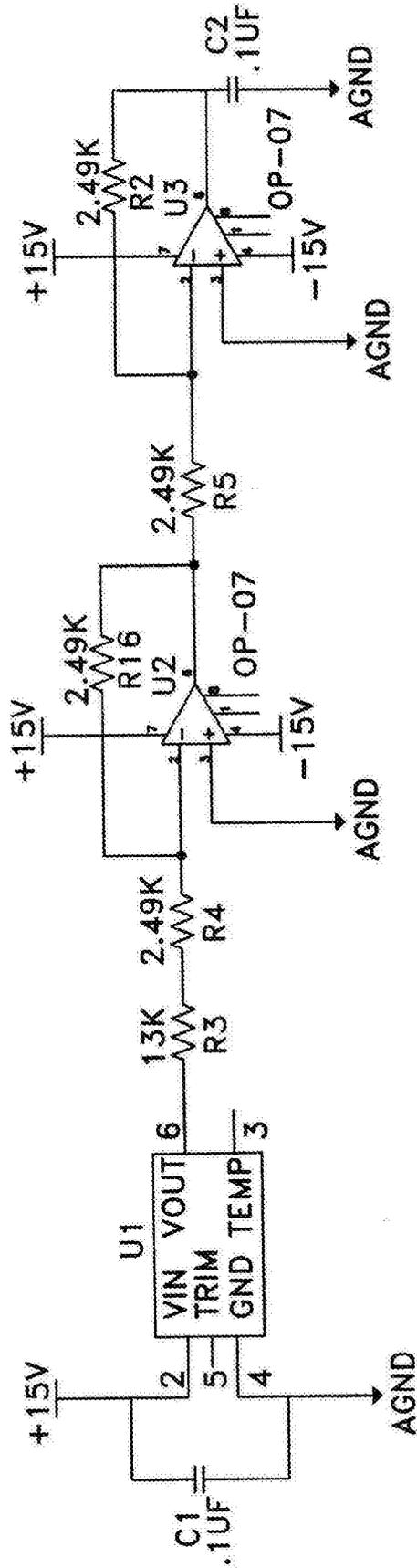


图12

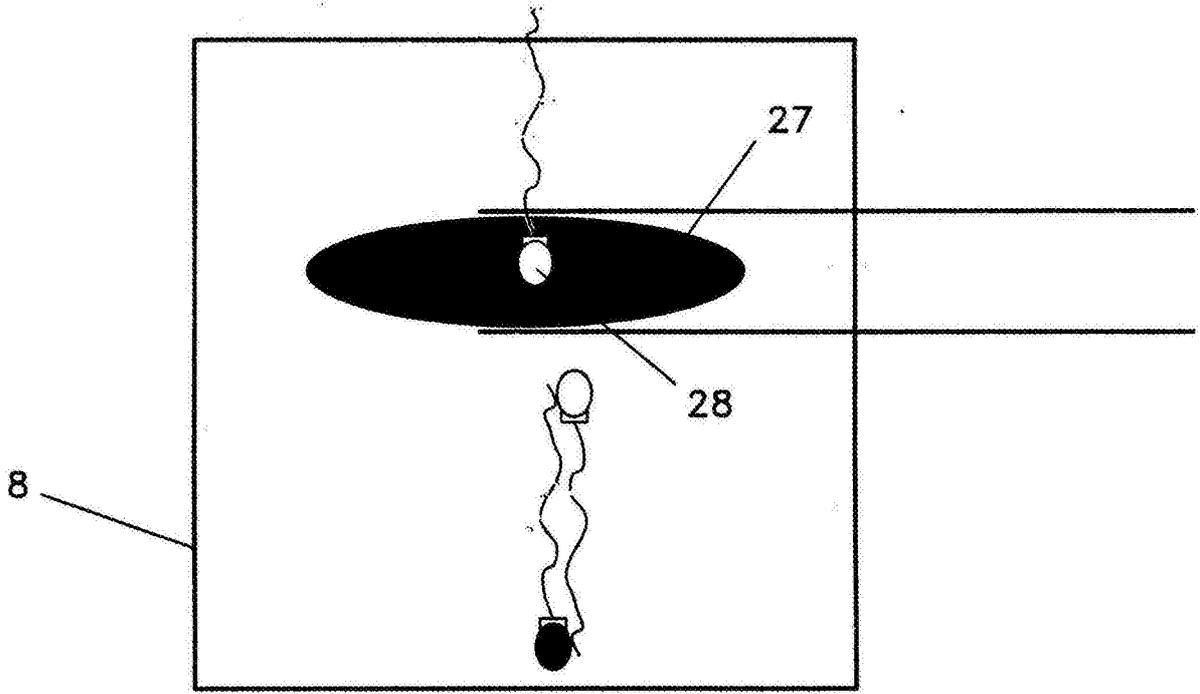


图13a

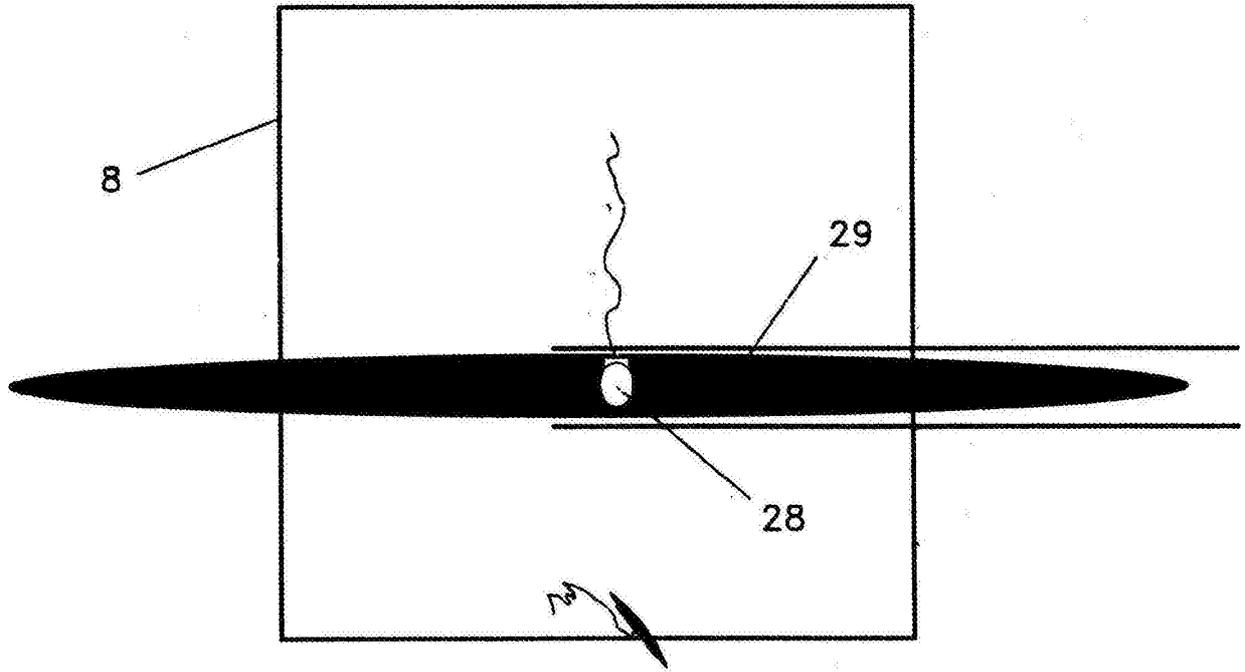


图13b

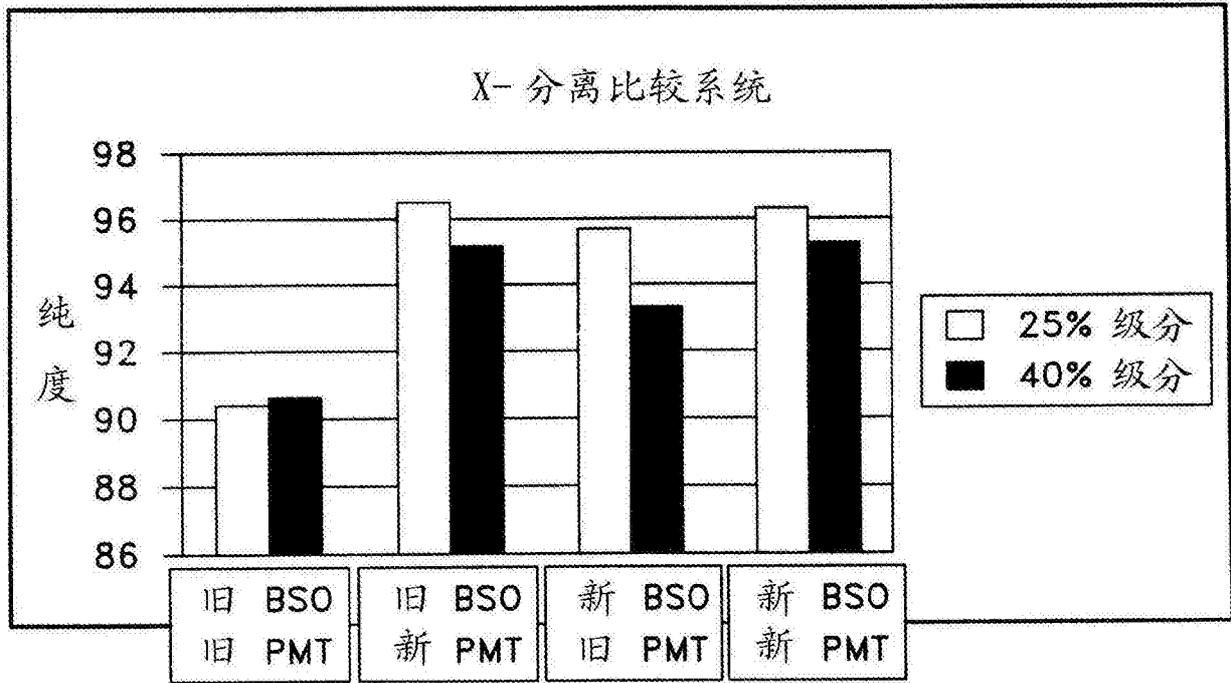


图14a

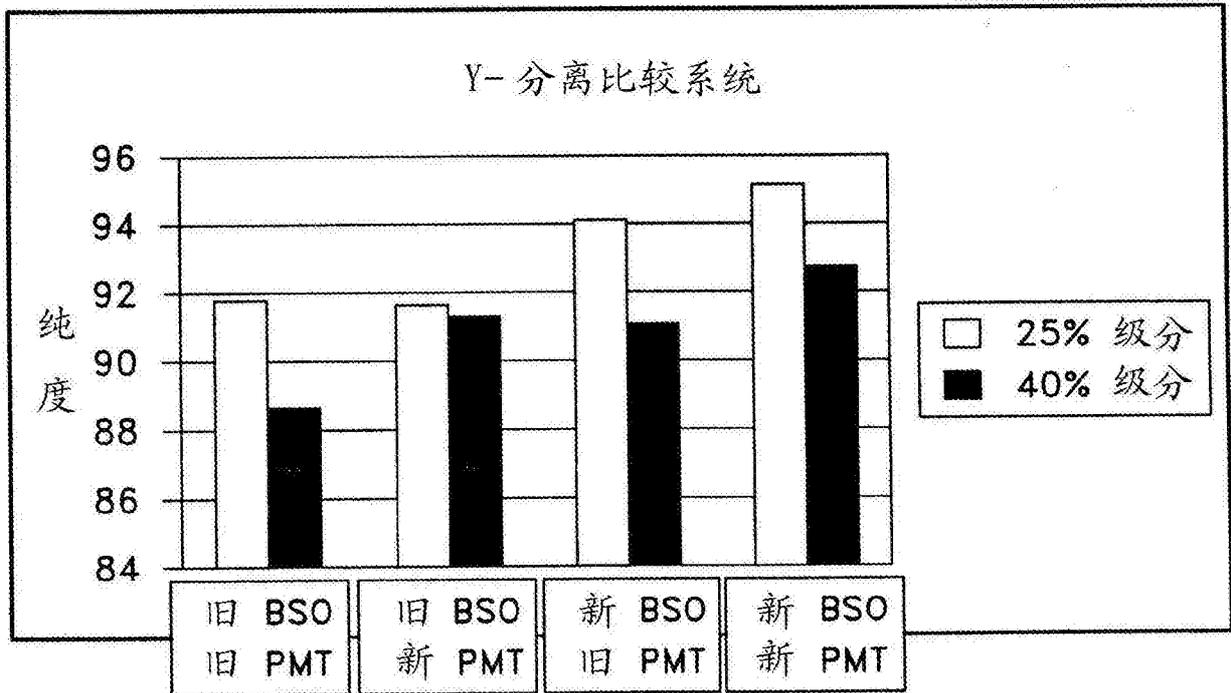


图14b

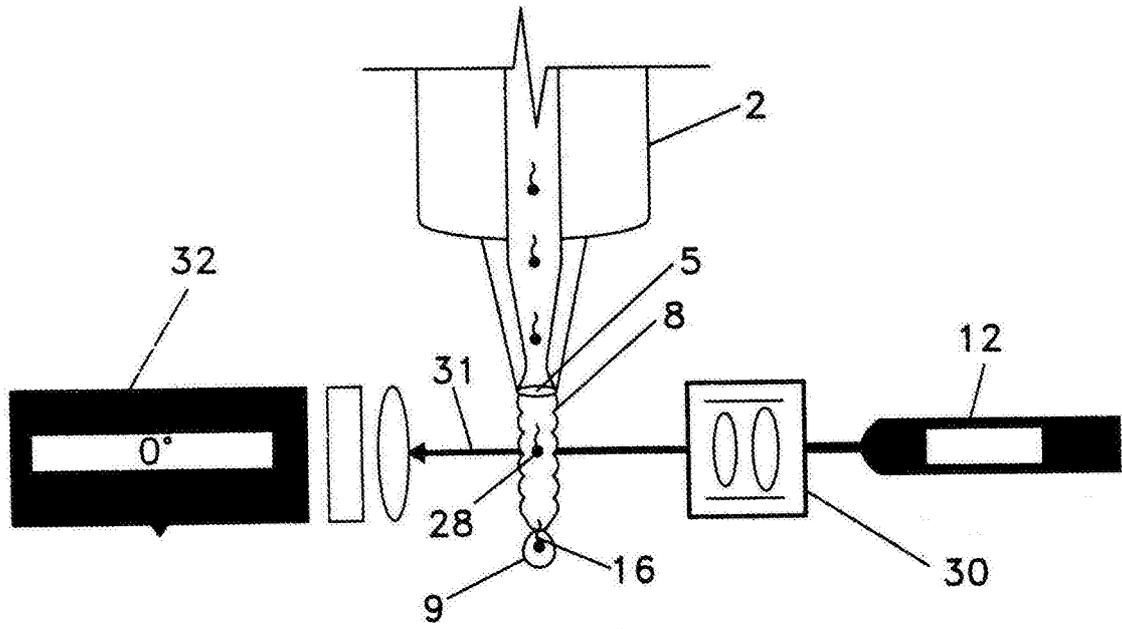


图15

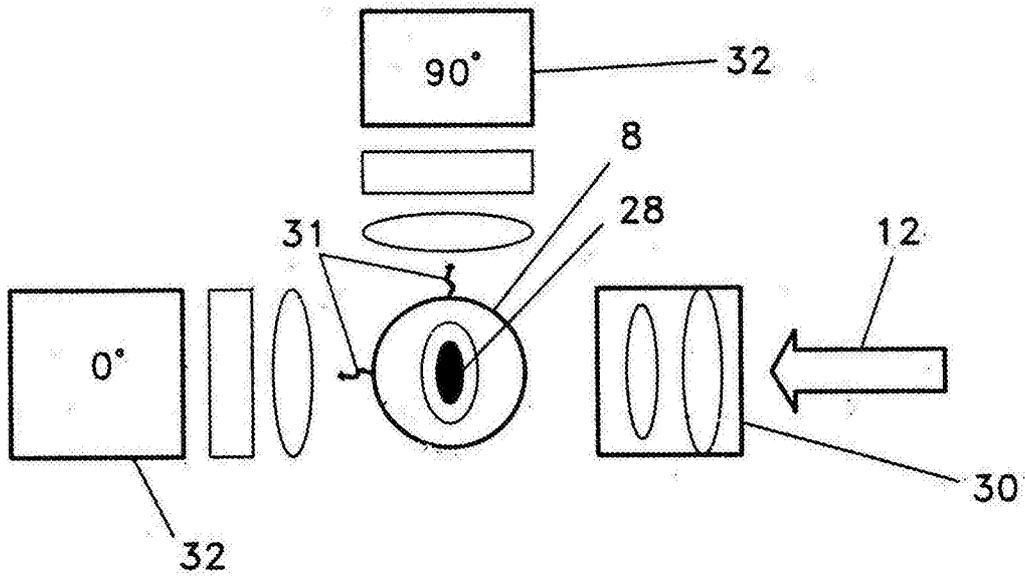


图16

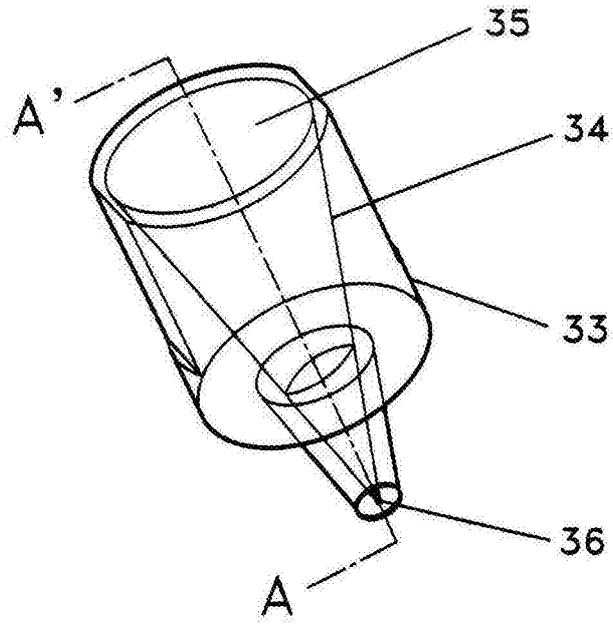
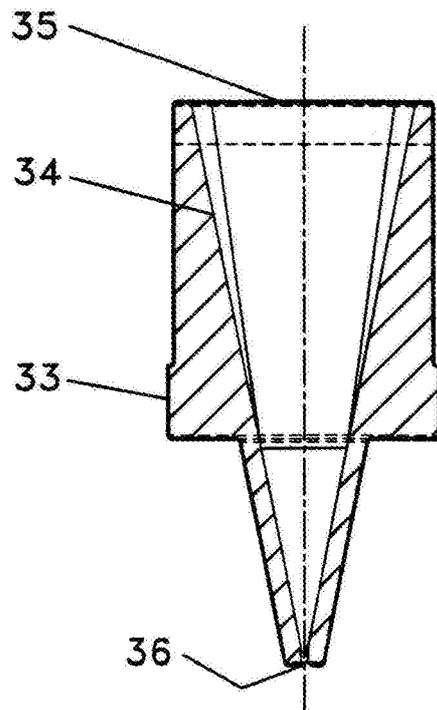


图17a



剖面 A-A'

图17b

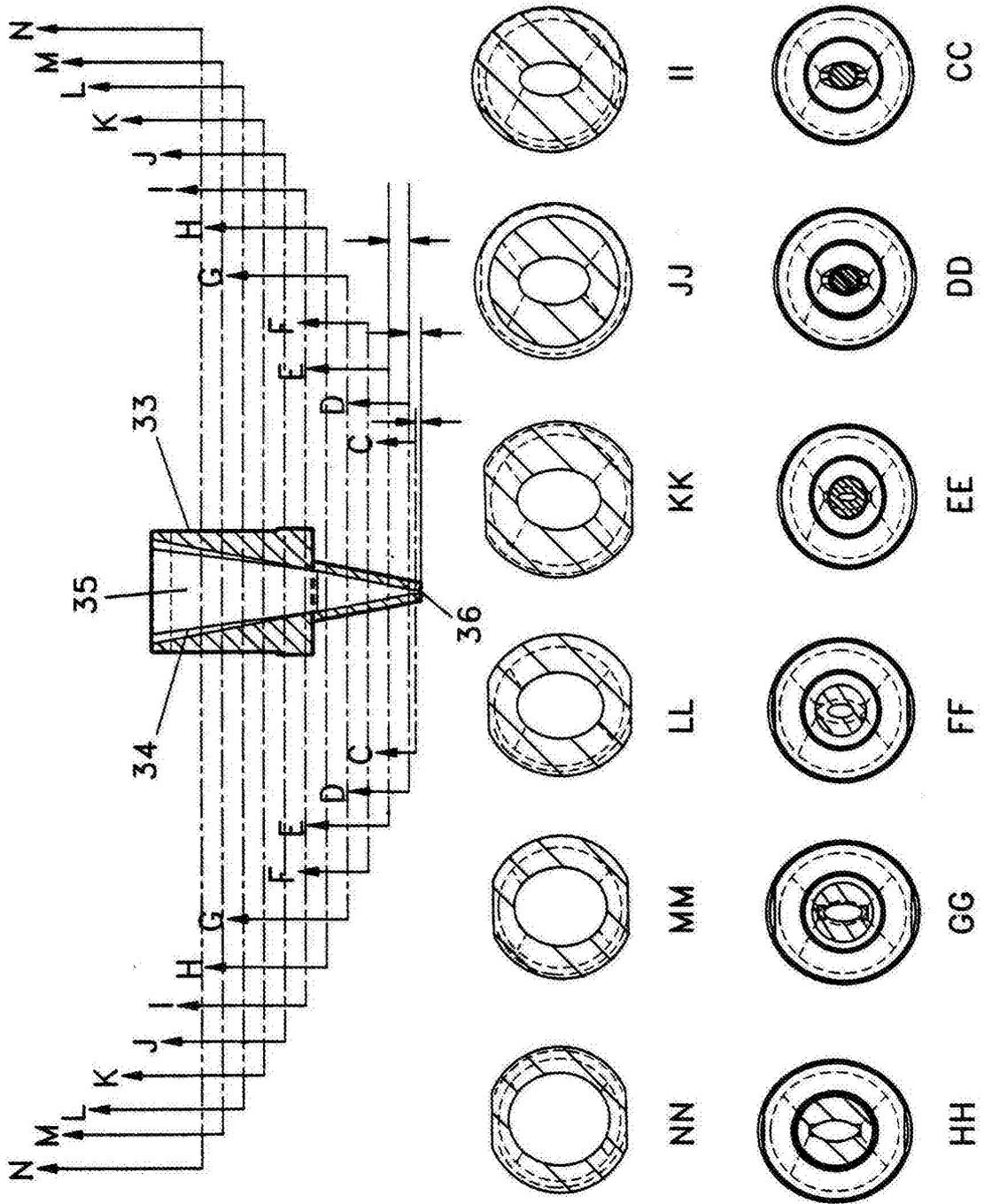


图18

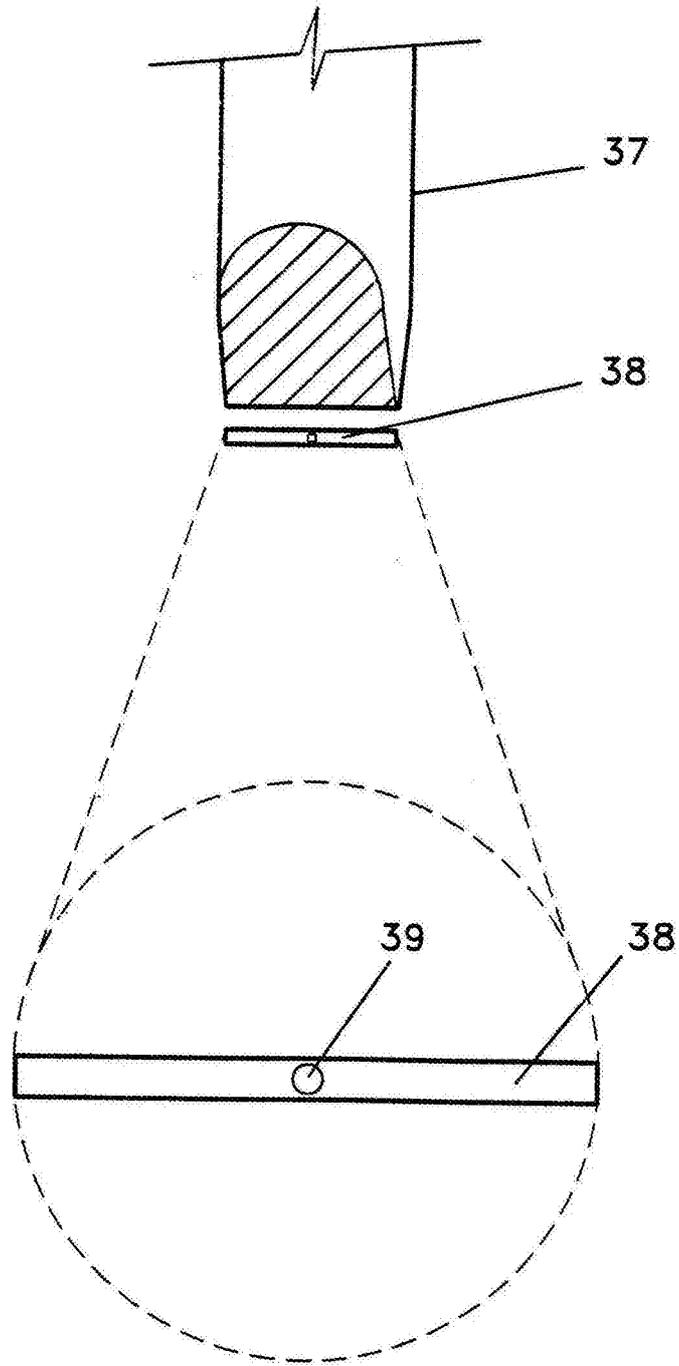


图19

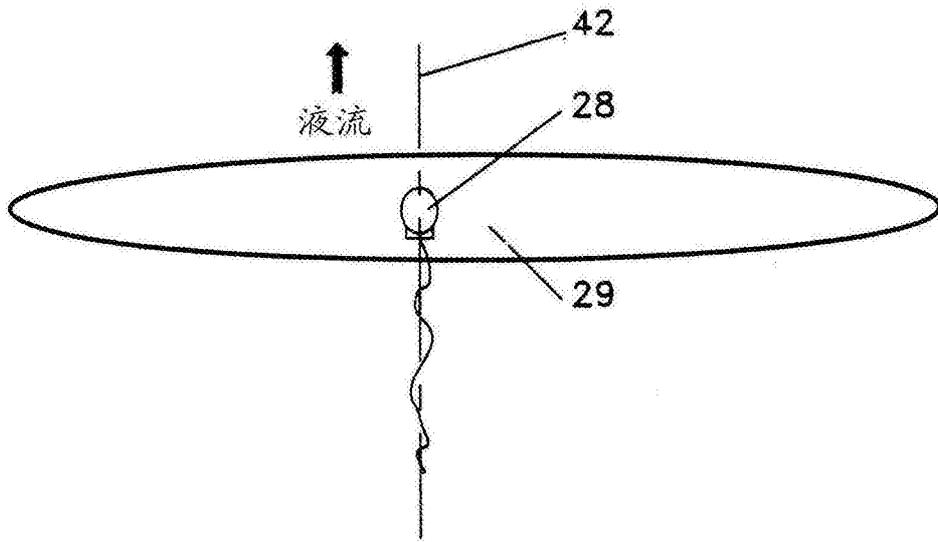


图20a



图20b

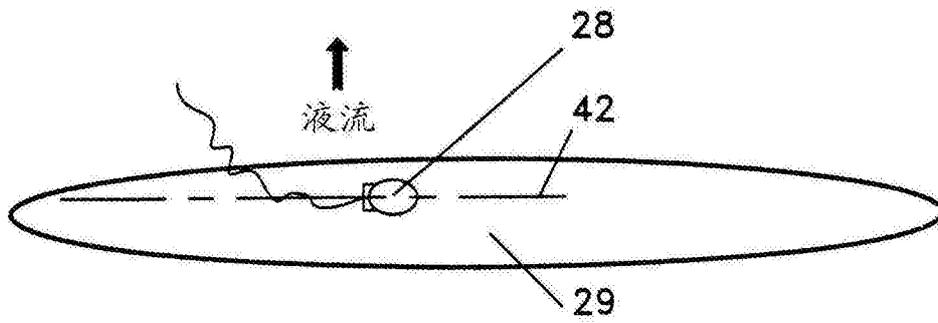


图20c

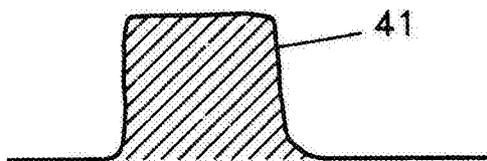


图20d

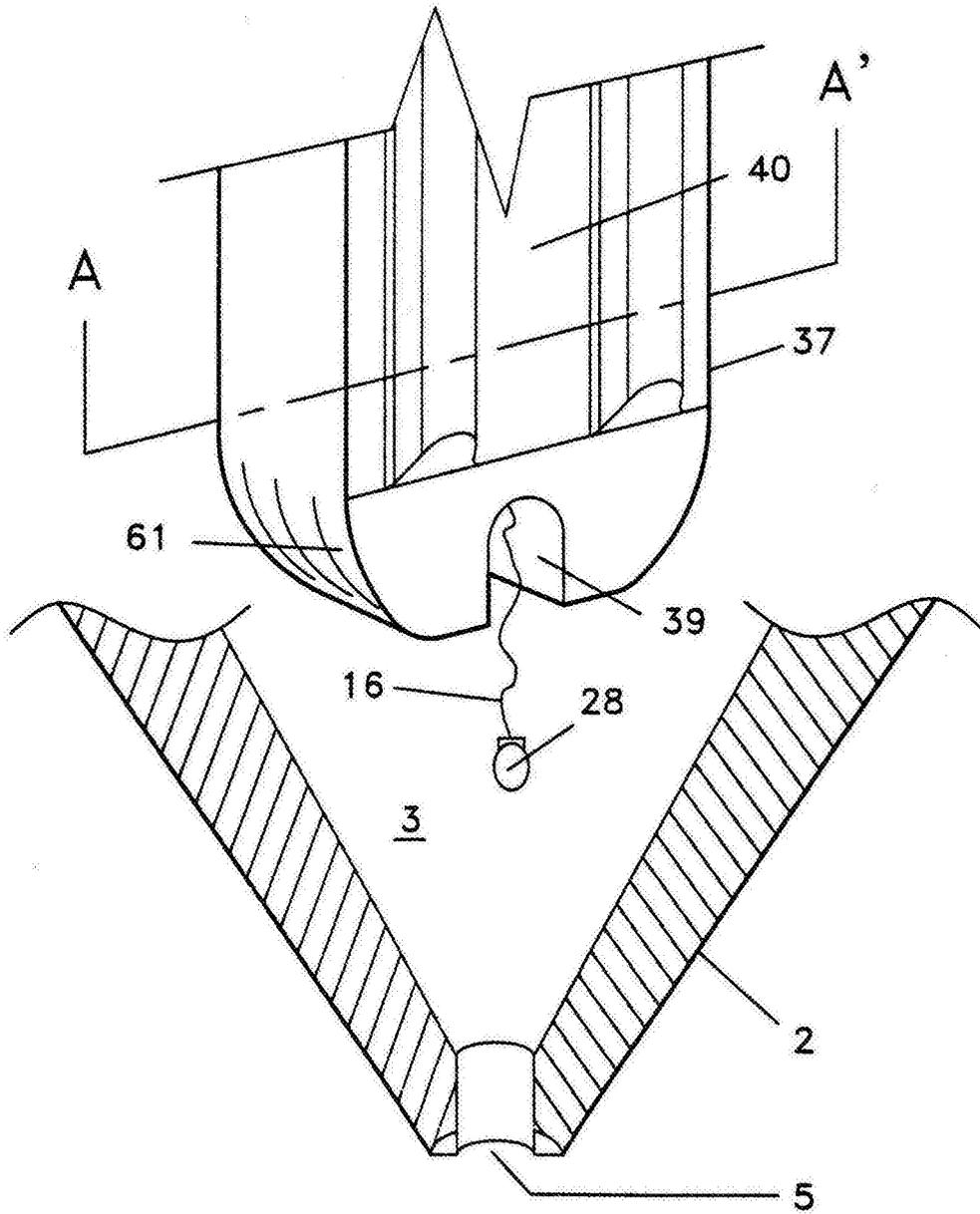
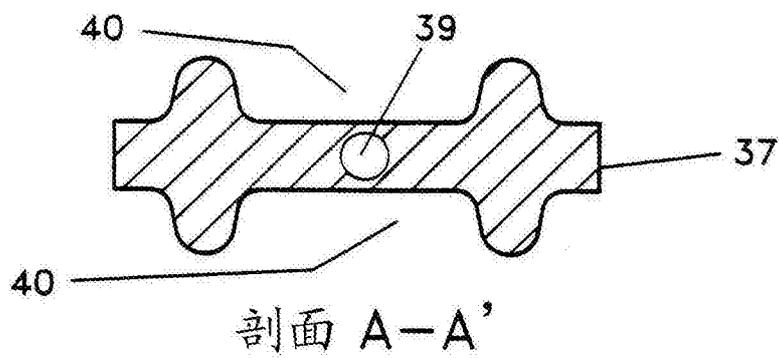


图21a



剖面 A-A'

图21b

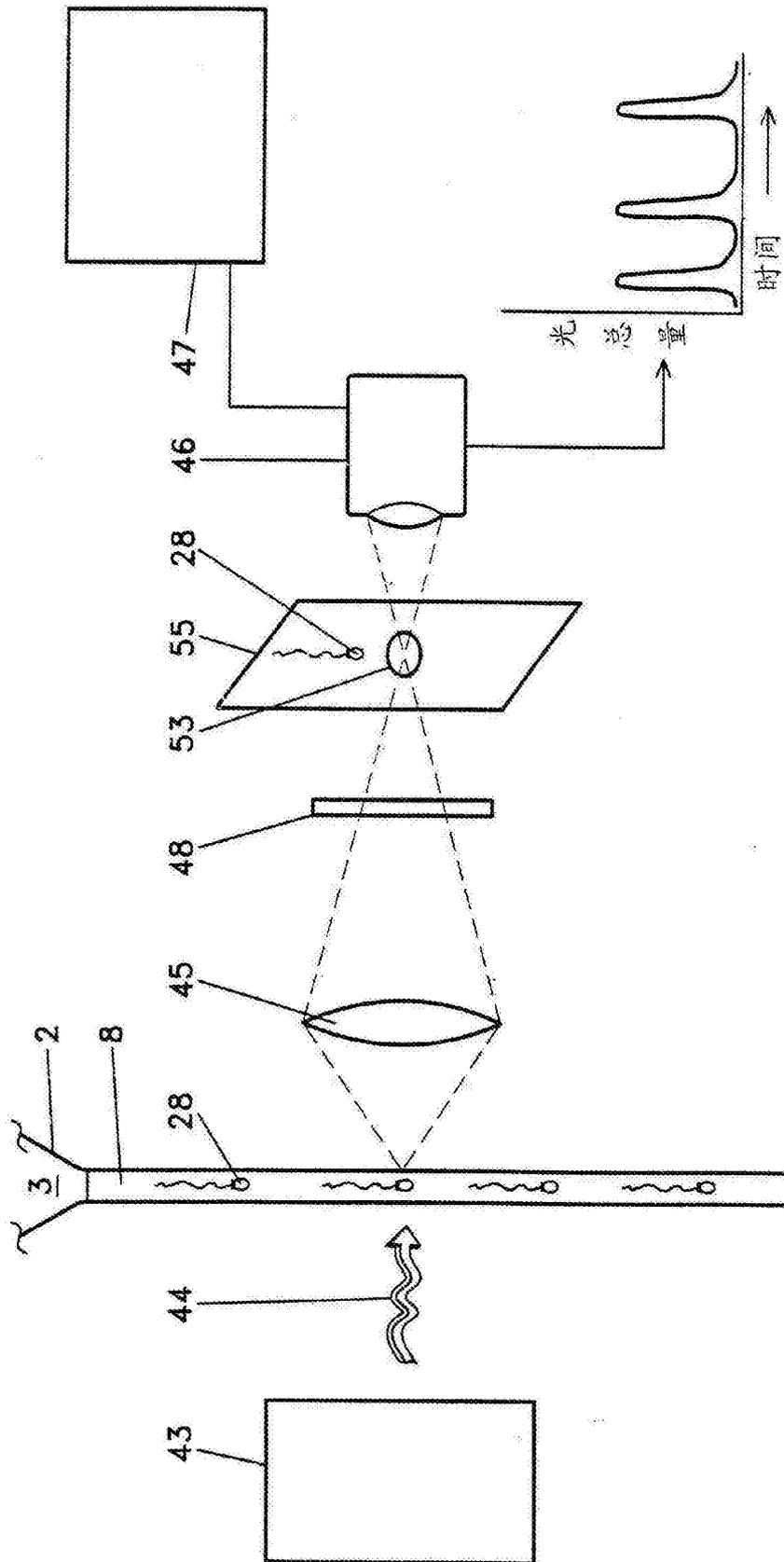


图22

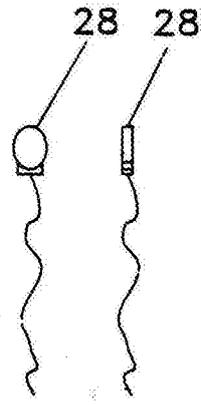
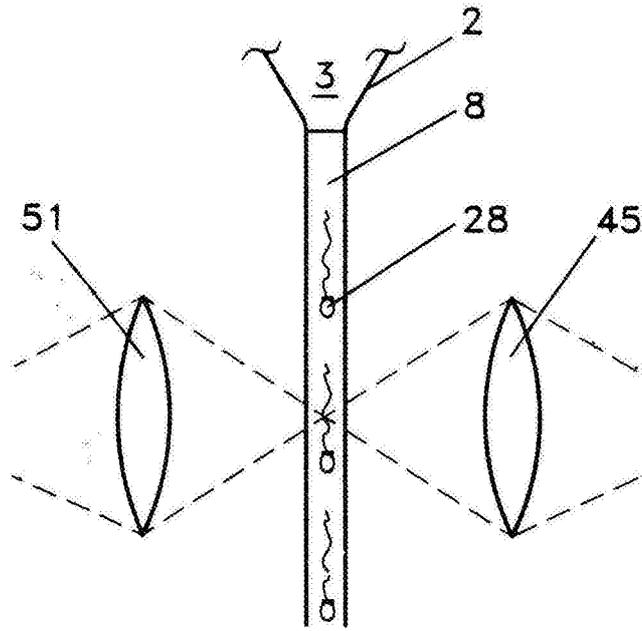
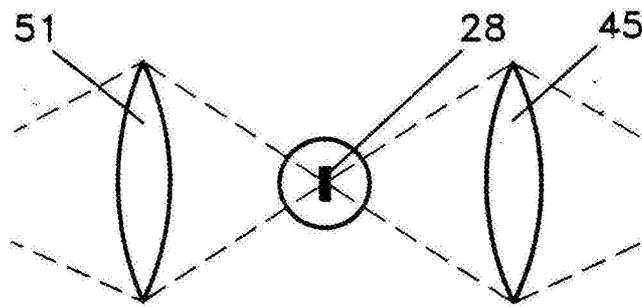


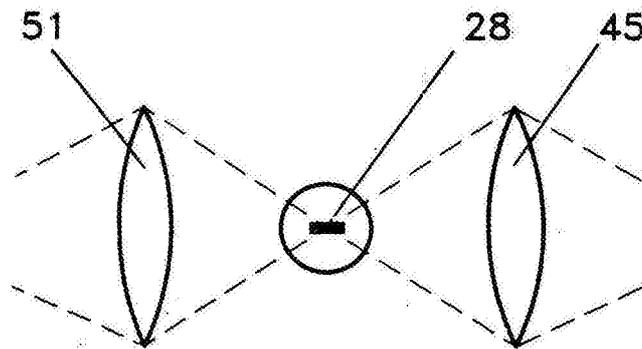
图23a



侧视图



正确取向



不正确取向

俯视图

图23b

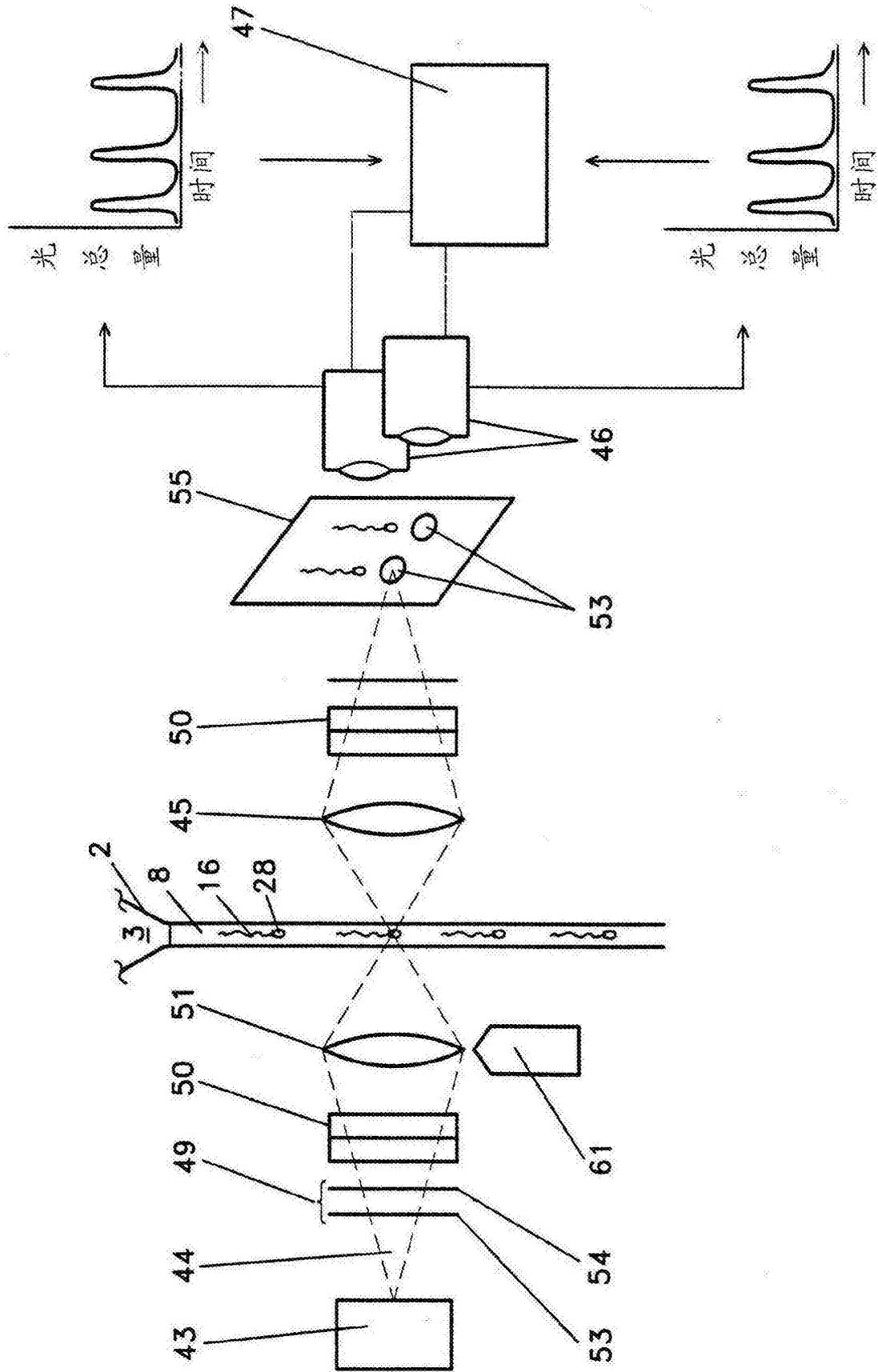


图24

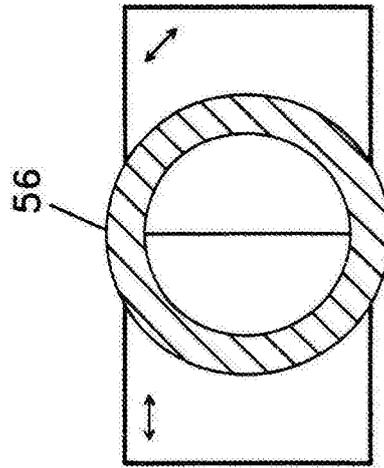


图25a

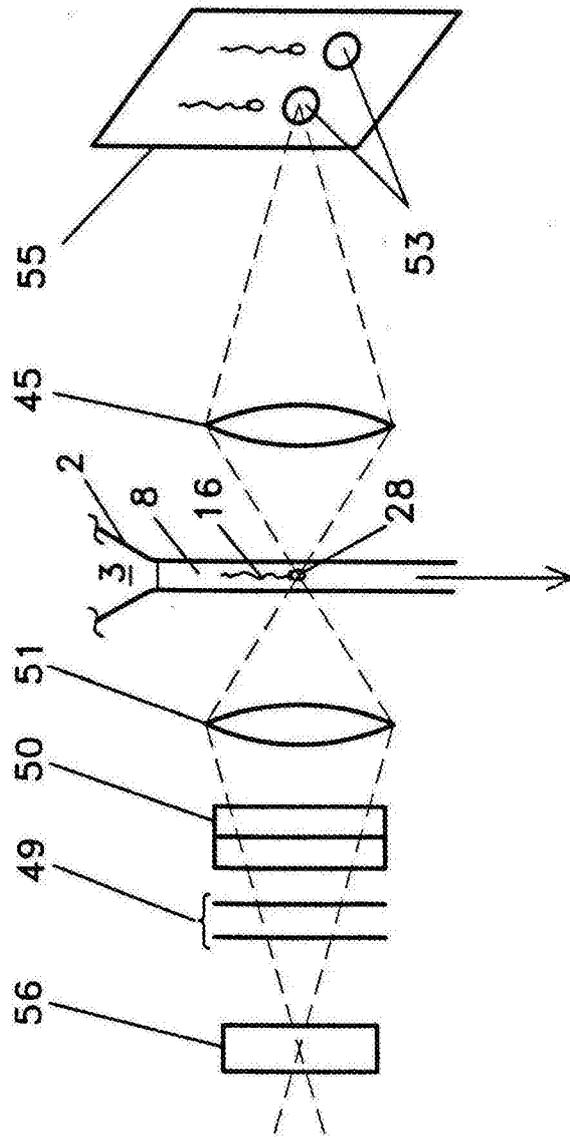


图25b

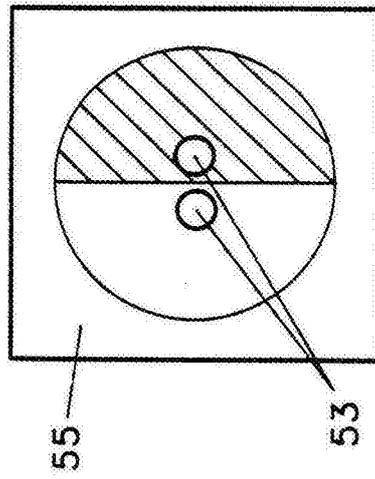


图25c

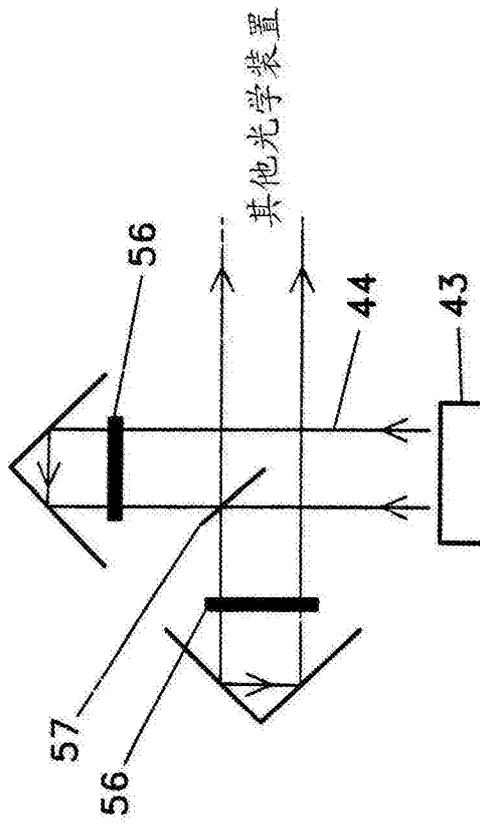


图25d

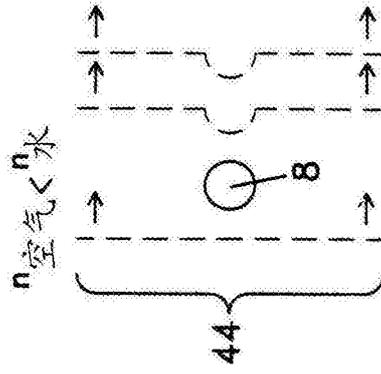


图26a

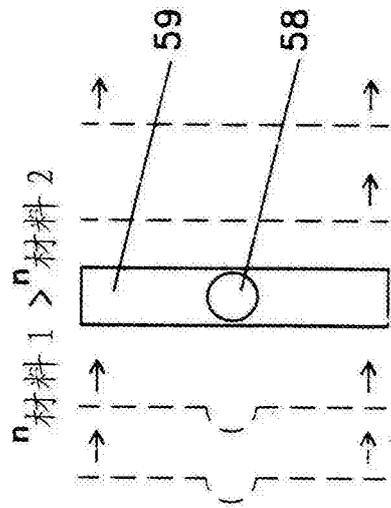


图26b

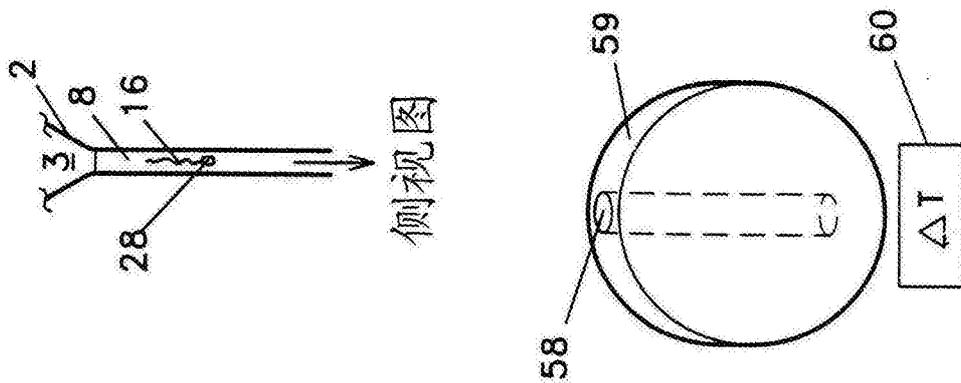


图26c

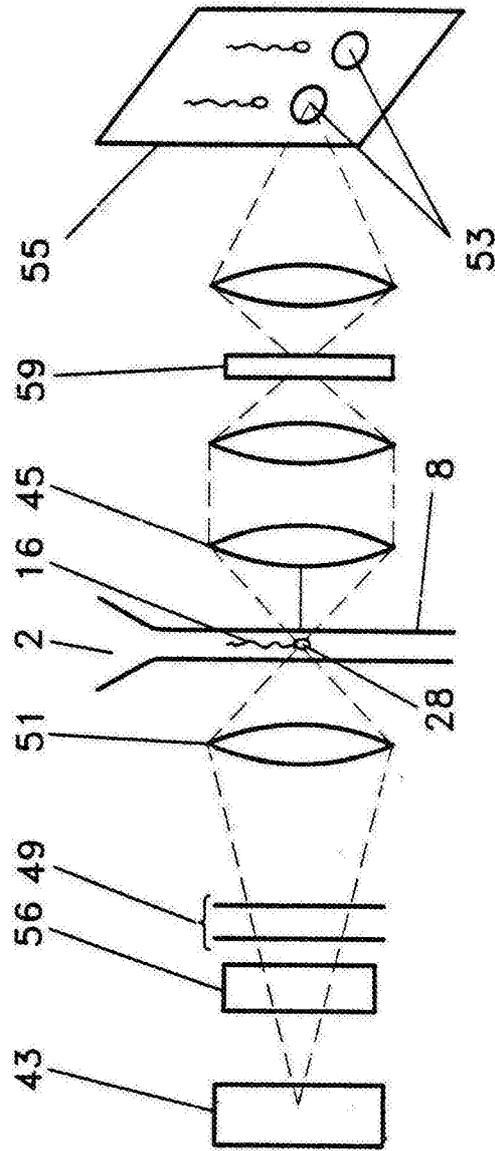


图26d

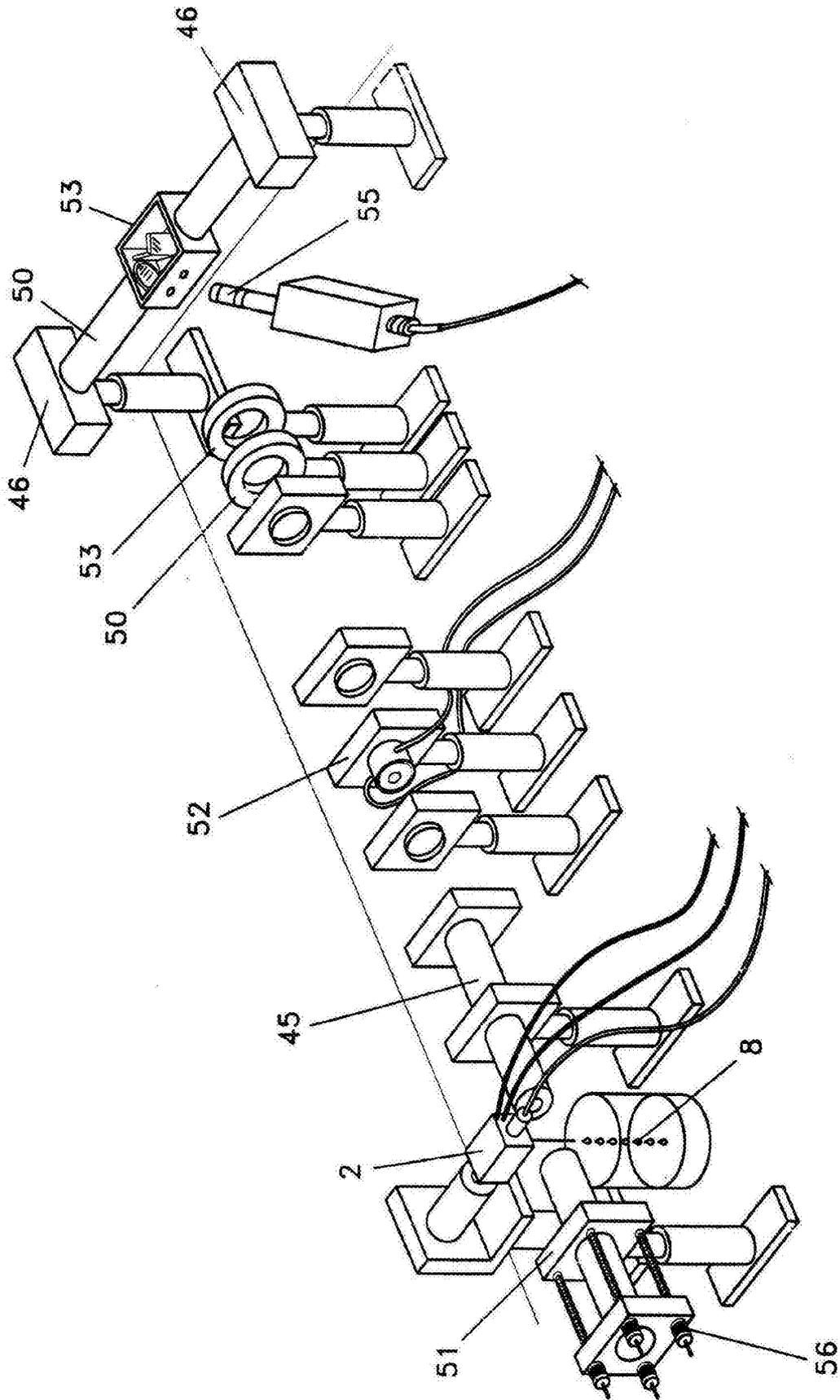


图27

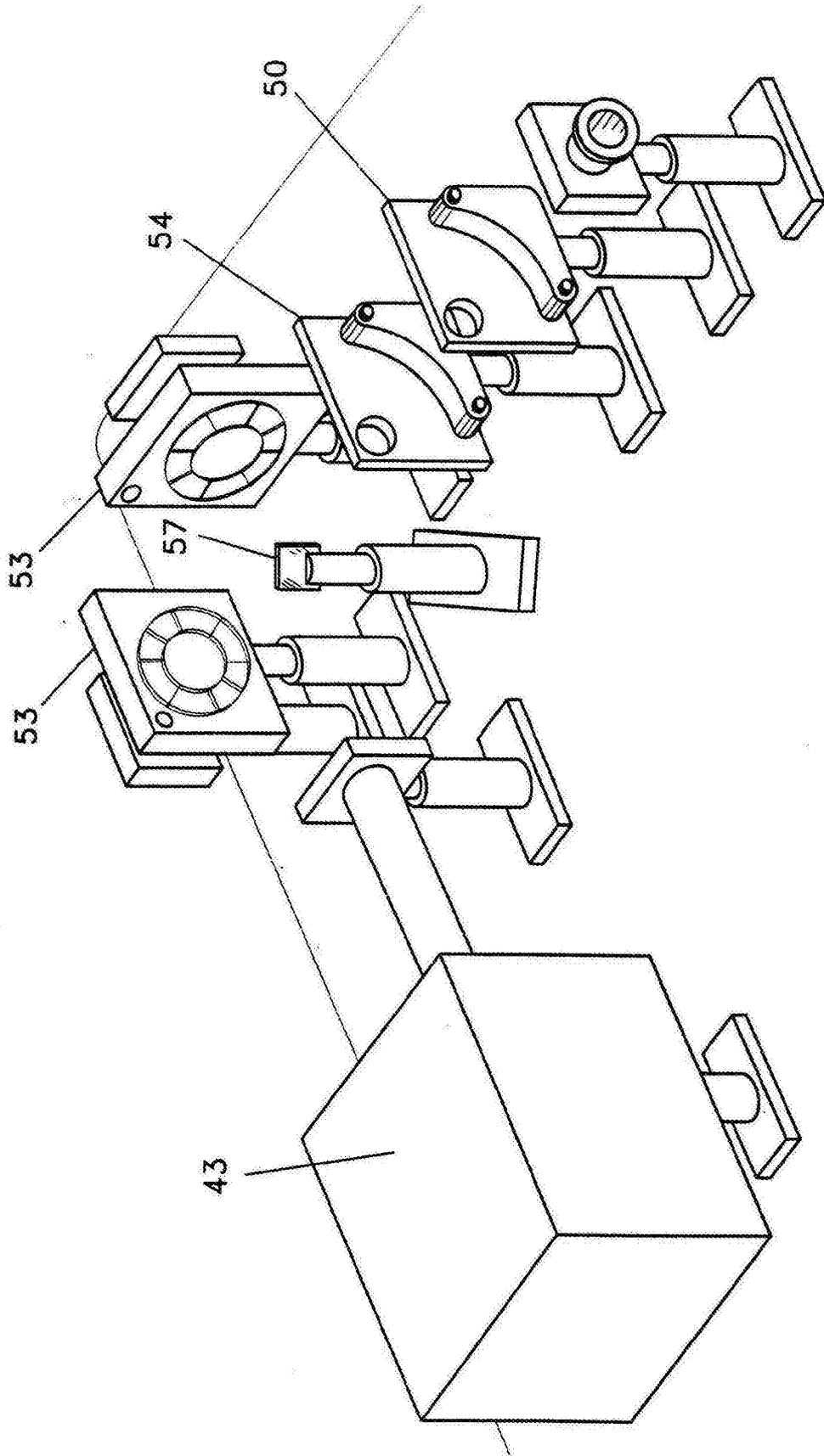


图28