

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102586179 A

(43) 申请公布日 2012.07.18

(21) 申请号 201210040778.6

(22) 申请日 2005.03.29

(30) 优先权数据

60/557,407 2004.03.29 US

60/614,178 2004.09.29 US

60/618,440 2004.10.13 US

(62) 分案原申请数据

200580017370.5 2005.03.29

(71) 申请人 英格朗公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 C·L·路德维格 K·S·克劳利

C·N·格拉维斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 史文静 黄革生

(51) Int. Cl.

C12N 5/076 (2010.01)

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 20 页

(54) 发明名称

用于分选带有 X 或 Y 染色体富集群的精子悬浮液

(57) 摘要

本发明公开了包含运动抑制剂的精子细胞悬浮液。此类悬浮液中含有的细胞更能耐受与将精子细胞分选为性别富集群过程一般相关的多个步骤,从而使分选后的组合物中活精子或运动性的精子数目增多。本发明也公开了形成此类细胞悬浮液的方法以及对精子细胞染色的方法。

1. 制备性别富集的精子细胞悬浮液的方法,包括将精子细胞悬浮液与抑制运动性的组合物混合以形成化学不运动的精子细胞悬浮液,用 DNA 选择性染料染色所述化学不运动的精子细胞悬浮液,以及分选染色的化学不运动的精子细胞悬浮液以形成带有 X 染色体或带有 Y 染色体的精子细胞的活的、性别富集的授精群,所述精子细胞具有与其 DNA 相结合的 DNA 选择性染料。

2. 权利要求 1 的方法,其中染料从由 Hoechst 33342、Hoechst 33258、SYBR-14、以及双苯甲亚胺 - **BODIPY**[®] 缀合物 6-[[3-((2Z)-2-[[1-(二氟硼烷基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基]亚甲基]-2H-吡咯-5-基)丙酰基]氨基]-N-[3-(甲基{3-[(4-[6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H,3'H-2,5'-双苯并咪唑-2'-基]苯氧基)乙酰基]氨基]丙基}氨基)丙基]己酰胺组成的组中选择。

3. 权利要求 1 的方法,其中在分选方法中通过抑制运动性的含有碳酸盐源的组合物使得化学不运动的精子细胞悬浮液化学不运动。

4. 权利要求 3 的方法,其中在分选方法中通过抑制运动性的含有 NaHCO₃、KHCO₃ 和 C₆H₈O₇ · H₂O 的组合物使得所述化学不运动的精子细胞悬浮液化学不运动。

5. 权利要求 4 的方法,其中在分选方法中通过抑制运动性的含有水中 0.097mol/L NaHCO₃、0.173mol/L KHCO₃、0.090mol/L C₆H₈O₇ · H₂O 的组合物使得所述化学不运动的精子细胞悬浮液化学不运动。

6. 权利要求 1 的方法,其中在悬浮液中所述带有 X 染色体的精子细胞或带有 Y 染色体的精子细胞的活的、性别富集的授精群的精子浓度为至少 1.25×10^8 精子 /ml。

7. 权利要求 1 的方法,其中在悬浮液中带有 X 染色体的精子细胞或带有 Y 染色体的精子细胞的所述活的、性别富集的授精群的精子浓度为至少 1.5×10^8 精子 /ml。

8. 权利要求 1 的方法,其中在悬浮液中带有 X 染色体的精子细胞或带有 Y 染色体的精子细胞的所述活的、性别富集的授精群的精子浓度为至少 1.75×10^8 精子 /ml。

9. 权利要求 1 的方法,其中在悬浮液中带有 X 染色体的精子细胞或带有 Y 染色体的精子细胞的所述活的、性别富集的授精群的精子浓度为小于约 9.0×10^5 精子 /ml。

10. 权利要求 1 的方法,其中在悬浮液中带有 X 染色体的精子细胞或带有 Y 染色体的精子细胞的所述活的、性别富集的授精群的精子浓度为小于约 7×10^5 精子 /ml。

11. 权利要求 1 的方法,其中在悬浮液中带有 X 染色体的精子细胞或带有 Y 染色体的精子细胞的所述活的、性别富集的授精群的精子浓度为小于约 5×10^5 精子 /ml。

12. 权利要求 1 的方法,所述在悬浮液中带有 X 染色体的精子细胞或带有 Y 染色体的精子细胞的所述活的、性别富集的授精群的精子浓度为小于约 2×10^5 精子 /ml。

13. 权利要求 1 的方法,其中在悬浮液中带有 X 染色体的精子细胞或带有 Y 染色体的精子细胞的所述活的、性别富集的授精群的精子浓度为小于约 1×10^5 精子 /ml。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述活的精子悬浮液包含活的冷冻的精子。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述带有 X 染色体的精子细胞或带有 Y 染色体的精子细胞的活的、性别富集的授精群的浓度是小于约 1×10^6 精子 /ml 或至少为约 1×10^8 精子 /ml 的在悬浮液中的精子。

16. 权利要求 1 的方法,其中在分选方法中在包含钾和钠的悬浮液中使得化学不运动的精子细胞悬浮液化学不运动,其中钾与钠的摩尔比大于各 1 : 1。

17. 权利要求 16 的方法,其中钾与钠的摩尔比大于各 1.25 : 1。
18. 权利要求 16 的方法,其中钾与钠的摩尔比大于各 1.5 : 1。
19. 权利要求 16 的方法,其中钾与钠的摩尔比大于各 1.75 : 1。
20. 权利要求 16 的方法,其中钾与钠的摩尔比大于各 2 : 1。

用于分选带有 X 或 Y 染色体富集群的精子悬浮液

[0001] 本申请为 2005 年 3 月 29 日提交的、发明名称为“用于分选带有 X 或 Y 染色体富集群的精子悬浮液”的 PCT 申请 PCT/US2005/010481 的分案申请,所述 PCT 申请进入中国国家阶段的日期为 2006 年 11 月 28 日,申请号为 200580017370.5。

发明领域

[0002] 本发明主要涉及分选精子细胞的方法。更具体而言,本发明涉及制备精子细胞运动性相对于体内射精精子降低的悬浮液,更具体而言是运动性暂时降低;所述悬浮液可用于如将精子细胞分选为带有 X 或 Y 染色体的富集精子细胞群的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 通过人工授精 (AI) 使动物受精以及体外受精后的胚胎移植已经是一项成熟的技术。在家畜产业中,能够对繁殖结果施加影响而使其后代具有一种或多种所需特征,有明显的优势。例如,乳制品产业中如能预先选择后代有利于雌性而保证奶牛的产量,则会带来经济效益。将精子分离为富集的带有 X 和 Y 染色体的细胞群,即所谓的性别富集精液或性别富集精子,便是达到后代预选目的的方法之一。

[0005] 为得到性别富集精液,必须将精子细胞以染料染色,然后分选为带有 X 和 Y 染色体的细胞。染色和分选过程的每一步对于精子细胞而言都是应激,会导致精子细胞的存活力或运动性,特别是前向性运动性降低。

[0006] Salisbury 等人描述了将公牛射出的精液直接收集至稀释液中的技术,所述稀释液可抑制细胞的运动性并防止其从周围精浆中吸收糖。当收集射出精液至稀释液中,且通过充气 100% 的 CO₂ 替换液体上方的气相时,射出精液内的细胞会丧失运动性。只要将细胞留存于该稀释液中且排除空气,就可以保证其在室温下数小时不运动,而在 5°C 时可维持至少 8 天。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明的多方面之一涉及精子悬浮液,所述精子悬浮液可用于如将精子分选为带 X 或 Y 染色体的富集精子群的方法。

[0009] 因此简言之,本发明涉及含有活精子以及下调精子糖摄取的组合物的精子细胞悬浮液,所述悬浮液中的精子浓度小于约 1×10^6 精子 /ml 或至少为 1×10^8 精子 /ml。

[0010] 本发明还涉及含有不运动活精子的精子细胞悬浮液,所述悬浮液中的精子浓度小于约 1×10^6 精子 /ml 或至少为 1×10^8 精子 /ml。

[0011] 本发明还涉及含有活精子的精子细胞悬浮液,所述精子相对于同一种系体内射出的精子更具附睾中精子的运动性特点,所述悬浮液中的精子浓度小于约 1×10^6 精子 /ml 或至少为 1×10^8 精子 /ml。

[0012] 本发明还涉及含有活精子、钾、并任选地含有钠的精子细胞悬浮液,所述悬浮液中的精子浓度至少为 1×10^8 精子 /ml,而钾与钠的摩尔比大于各 1 : 1。

[0013] 本发明还涉及含有活精子、下调精子糖摄取的组合物、以及 DNA 选择性染料的精子细胞悬浮液。

[0014] 本发明还涉及含有不运动活精子和 DNA 选择性染料的精子细胞悬浮液。

[0015] 本发明还涉及含有活精子和 DNA 选择性染料的精子细胞悬浮液,所述精子相对于同一种系体内射出的精子,其代谢率和运动性更具附睾中精子的特点。

[0016] 本发明还涉及含有不运动活精子的精子细胞悬浮液,所述精子的 DNA 上结合有 DNA 选择性染料。

[0017] 本发明还涉及含有活精子的精子细胞悬浮液,相对于同一种系体内射出的精子而言,所述精子代谢率和运动性更具附睾中精子的特点,且其 DNA 上还结合有 DNA 选择性染料。

[0018] 本发明还涉及对精子细胞染色的方法,所述方法包括形成这样的染色混合物,其含有完整的活精子细胞、运动抑制性量的钾,以及 DNA 选择性染料。

[0019] 本发明还涉及形成用于流式细胞术方法的精子细胞悬浮液的方法,所述方法包括将精子细胞源与抑制精子细胞运动性的组合物混合,以形成精子细胞悬浮液,所述悬浮液中精子细胞浓度小于约 1×10^6 精子细胞 /ml 或至少为 1×10^8 精子细胞 /ml。

[0020] 本发明还涉及形成用于流式细胞术方法的精子细胞悬浮液的方法,所述方法包括将哺乳动物射出精液收集至含有抑制性量的运动抑制剂的缓冲液中以形成精子悬浮液,所述悬浮液中含有精子浓度小于约 1×10^6 精子细胞 /ml 或至少为 1×10^8 精子细胞 /ml。

[0021] 本发明的其它方面和特征是显而易见的,部分将于后文说明。

[0022] 附图简述

[0023] 图 1 以图表显示了实施例 1 中进行研究的结果,其中测量了于 28°C 含 10mM 丙酮酸盐的 TCA 或二氧化碳气层包裹的含 10mM 丙酮酸盐的 TCA 中,用 600 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子细胞的前向性运动百分比。

[0024] 图 2 以图表显示了实施例 1 中进行研究的结果,其中测量了于 28°C 含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 或 pH 7.3 基于碳酸盐的抑制剂中,用 600 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子细胞的前向性运动百分比。

[0025] 图 3 以图表显示了实施例 1 中进行研究的结果,其中测量了于 28°C 含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 或 pH 6.2 基于碳酸盐的抑制剂中,用 600 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子细胞的前向性运动百分比。

[0026] 图 4 以图表显示了实施例 2 中进行研究的结果,其中测量了于 28°C 含 10mM 丙酮酸盐的 TCA 且随后用含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 或 pH 6.2 基于碳酸盐的抑制剂 1 比 3 稀释的情况下,用 1000 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子细胞的前向性运动百分比。

[0027] 图 5 以图表显示了实施例 2 中进行研究的结果,其中测量了于 28°C (1) 含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 且用相同溶液 1 比 3 稀释的情况下或 (2) pH 7.3 基于碳酸盐的缓冲液且用 pH 6.2 基于碳酸盐的抑制剂 1 比 3 稀释的情况下,用 1000 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子细胞的前向性运动百分比。

[0028] 图 6 以图表显示了实施例 2 中进行研究的结果,其中测量了于 28°C 含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 或 pH 6.2 基于碳酸盐的抑制剂中,用 1000 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子细胞的前向性运动百分比。

[0029] 图 7 以图表显示了实施例 3 中进行研究的结果,其中测量了于 41°C 含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 且随后用含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 或 pH 6.2 基于碳酸盐的抑制剂 1 比 3 稀释

的情况下,用 300 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子细胞的前向性运动百分比。

[0030] 图 8 以图表显示了实施例 3 中进行研究的结果,其中测量了于 41 $^{\circ}$ C (1) 含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 且用相同溶液 1 比 3 稀释的情况下或 (2) pH 7.3 基于碳酸盐的缓冲液且用 pH 6.2 基于碳酸盐的抑制剂 1 比 3 稀释的情况下,用 300 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子细胞的前向性运动百分比。

[0031] 图 9 以图表显示了实施例 3 中进行研究的结果,其中测量了于 41 $^{\circ}$ C 含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 或 pH 6.2 基于碳酸盐的抑制剂中,用 300 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子细胞的前向性运动百分比。

[0032] 图 10 以图表显示了实施例 4 中进行研究的结果,其中测量了于 41 $^{\circ}$ C TCA 缓冲液或含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液中,用 400 μ M Hoechst33342 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0033] 图 11 以图表显示了实施例 5 中进行研究的结果,其中测量了于 41 $^{\circ}$ C TCA 缓冲液或含有 10 μ M 维生素 K 的 TCA 缓冲液中,用 400 μ M Hoechst33342 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0034] 图 12 以图表显示了实施例 6 中进行研究的结果,其中测量了于 41 $^{\circ}$ C TCA 缓冲液或含有 100 μ M 维生素 K 的 TCA 缓冲液中,用 400 μ M Hoechst33342 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0035] 图 13 以图表显示了实施例 7 中进行研究的结果,其中测量了于 41 $^{\circ}$ C TCA 缓冲液或含 1mM 硫辛酸的 TCA 缓冲液中,用 400 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0036] 图 14 以图表显示了实施例 8 中进行研究的结果,其中测量了于 28 $^{\circ}$ C TCA 缓冲液或含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液中,用 600 μ M Hoechst33342 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0037] 图 15 以图表显示了实施例 9 中进行研究的结果,其中测量了于 28 $^{\circ}$ C TCA 缓冲液或含有 100 μ M 维生素 K 的 TCA 缓冲液中,用 600 μ M Hoechst33342 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0038] 图 16 以图表显示了实施例 10 中进行研究的结果,其中测量了于 28 $^{\circ}$ C TCA 缓冲液或含 1mM 硫辛酸的 TCA 缓冲液中,用 600 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0039] 图 17 以图表显示了实施例 11 中进行研究的结果,其中测量了于 28 $^{\circ}$ C TCA 缓冲液、含有 2.5mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液、含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液、含有 25mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液以及含有 50mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液中,用 600 μ M Hoechst 33342 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0040] 图 18 以图表显示了实施例 12 中进行研究的结果,其中测量了于 28 $^{\circ}$ C TCA 缓冲液或含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液中,用 20 μ M SYBR-14 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0041] 图 19 以图表显示了实施例 13 中进行研究的结果,其中测量了于 28 $^{\circ}$ C TCA 缓冲液或含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液中,用 100 μ M BBC 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0042] 图 20 以图表显示了实施例 14 中进行研究的结果,其中测量了于 28°C TCA 缓冲液或含有 10mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液中,用 200 μ M BBC 染料染色的精子的前向性运动百分比。

[0043] 发明详述

[0044] 令人惊讶的是,已经确定相对于体内射精精子(相同种系)运动性降低的精子,往往更能耐受多个与分选精子细胞为带有 X 或 Y 染色体的精子富集群通常相关的步骤。因此在优选实施方案中,可制备用于人工授精的性别富集精子群,所述精子群在染色后或分选后的组合物中活细胞数目增多或运动精子(特别是前向运动性精子)数目增多。

[0045] 根据本发明的方法,形成含有精子和一种或多种抑制精子运动性的组合物的悬浮液,有时也称其为分散体系;此种运动性受抑的状态有时被称之为不运动或精子静止。一般而言,悬浮液中含有精子的密度为约 1×10^3 精子/ml 至约 5×10^{10} 精子/ml 悬浮液。例如,在一个实施方案中,悬浮液中可含有“相对低”密度的精子,即精子密度少于约 1×10^7 精子/ml,优选少于约 1×10^6 精子/ml,更优选约 1×10^3 至约 5×10^6 精子/ml,更优选约 1×10^3 至约 1×10^6 精子/ml,甚至更优选 1×10^4 至约 1×10^5 精子/ml,最优选约 1×10^5 精子/ml 悬浮液。在可选的实施方案中,悬浮液中可含有“中间”密度的精子,即密度为约 1×10^7 至约 1×10^8 精子/ml 悬浮液。而在另一个实施方案中,悬浮液中可含有“相对高”密度的精子,即精子密度至少为约 1×10^8 精子/ml,优选约 1×10^8 至约 5×10^{10} 精子/ml,更优选约 1.5×10^8 至约 2×10^{10} 精子/ml,甚至更优选 1.5×10^8 至约 2×10^8 精子/ml,更加优选约 1.5×10^8 精子/ml 悬浮液。因此例如,在一个实施方案中,悬浮液中可含有至少约 1.25×10^8 、至少约 1.5×10^8 、至少约 1.75×10^8 、至少约 2×10^8 、至少约 2.25×10^8 、至少约 2.5×10^8 、至少约 2.75×10^8 ,或甚至至少约 3×10^8 精子/ml 悬浮液。在可选的实施方案中,悬浮液中可含有少于约 9×10^5 、少于约 7×10^5 、少于约 5×10^5 、少于约 2×10^5 、少于约 1×10^5 、少于约 1×10^4 ,或甚至少于约 1×10^3 精子/ml 悬浮液。

[0046] 精子悬浮液中的精子密度取决于若干考虑,包括随后将用于富集或分选精子细胞的方法。例如,可以利用如下文详述的流式细胞术分选精子细胞。在这样的情况下,缓冲精子悬浮液一般含“中间”或“相对高”密度的精子。其它分选或富集技术可能在精子密度较低时更利于使用,例如标有标记(如此处所述的染料和标记)的“相对低”密度的精子。

[0047] 在优选实施方案中,本发明悬浮液中的精子在某些方面表现出附睾中精子的特征性行为;例如,精子的不运动性,和/或相对于洗涤或刚射出的精子而言,其内呼吸速率更低而有氧糖酵解的速率更高。最好受抑精子在与抑制剂分离后,其运动性能够表现出射出精子的特征性行为(而不具有附睾精子的特点);而在一个实施方案中,其运动性和呼吸都可具有如射出精子的特征性表现。

[0048] 例如在一个实施方案中,通过 HTM-IVOS 精子分析(Hamilton-Thorne HTM-IVOS 计算机辅助精子分析系统,Hamilton-Thorne Research, Beverly MA)测量,运动抑制剂可使分散体系中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时相对于相同种系刚射出精液中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时,降低至少约 50%。优选通过 HTM-IVOS 精子分析测量,运动抑制剂可使分散体系中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时相对于相同种系刚射出精液中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时,降低至少约 60%。更优选通过 HTM-IVOS 精子分析测量,运动抑制剂可使分散体系中精子细胞的路径速度、前向

性速度或两者同时相对于相同种系刚射出精液中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时,降低至少约 70%。还更优选通过 HTM-IVOS 精子分析测量,运动抑制剂可使分散体系中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时相对于相同种系刚射出精液中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时,降低至少约 80%。甚至更优选通过 HTM-IVOS 精子分析测量,运动抑制剂可使分散体系中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时相对于相同种系刚射出精液中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时,降低至少约 90%。甚至更优选通过 HTM-IVOS 精子分析测量,运动抑制剂可使分散体系中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时相对于相同种系刚射出精液中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时,降低至少约 95%。最优选通过 HTM-IVOS 精子分析测量,运动抑制剂可使分散体系中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时相对于相同种系刚射出精液中精子细胞的路径速度、前向性速度或两者同时,降低至少约 99%。

[0049] 除抑制性缓冲液外或可替代之的是,也可单独降低精子细胞的温度或紧邻精子细胞的环境温度(即精子分散体系)以影响细胞的运动性。此种降温一般会增加不运动性。此外,例如,精子细胞或精子分散体系温度的降低会导致用于诱导不运动性的抑制剂的浓度降低。因此,精子分散体系可处于不超过 5°C 的温度;优选在约 0°C 至约 5°C 之间;更优选为约 3°C 至约 5°C 之间;而最优选为约 5°C。或者精子分散体系的温度可介于约 4°C 至约 50°C 范围内;优选为约 7°C 至约 43°C;更优选为约 10°C 至约 39°C;还更优选为约 15°C 至约 30°C;甚至更优选为约 17°C 至约 25°C;而最优选为约 18°C。然而,优选不将精子细胞暴露于会对细胞存活力造成实质不良影响的温度下。

[0050] 抑制剂可以为一系列对精子运动性具有抑制作用的组合物中的任意一种。此类组合物包括如钠/钾 ATP 酶抑制剂,如乌本苷;含有钾离子的组合物;以及含有钾离子和钠离子的组合物。例如,悬浮液中相对高浓度的钾离子会抑制精子运动性。因此一般而言,优选悬浮液中含有钾离子源且悬浮液中的钾浓度至少为约 0.05mol/L。更优选钾浓度为至少约 0.05mol/L 至约 0.5mol/L。还更优选钾浓度为至少约 0.1mol/L 至约 0.3mol/L。最优选钾浓度为约 0.173 摩尔/升。此类悬浮液一般(但非必须)也含有钠离子源。当含有钠离子时,钾和钠的摩尔比一般等于或大于各 1:1。优选钾和钠的摩尔比为至少约 1.25:1。更优选钾和钠的摩尔比为至少约 1.5:1。还更优选钾和钠的摩尔比为至少约 1.75:1。还更优选钾和钠的摩尔比为至少约 1.78:1。在一个具体的实施方案中,钾和钠的摩尔比为至少约 2:1。而在另一个实施方案中,钾和钠的摩尔比为至少约 3:1。又在另一个实施方案中,钾和钠的摩尔比为至少约 4:1。又在另一个实施方案中,钾和钠的摩尔比为至少约 5:1。又在另一个实施方案中,钾和钠的摩尔比为至少约 6:1。又在另一个实施方案中,钾和钠的摩尔比为至少约 7:1。又在另一个实施方案中,钾和钠的摩尔比为至少约 8:1。

[0051] 精子悬浮液中还可额外含有能够下调糖摄取的离子或二氧化碳源。在该实施方案中,二氧化碳的来源可以为如一种或多种碳酸盐。在目前优选的一个实施方案中,精子悬浮液含有 NaHCO_3 和 KHCO_3 , 由此提供钾和钠离子源以及二氧化碳分压。例如,在目前优选的一个实施方案中,精子悬浮液含有 NaHCO_3 和 KHCO_3 的水性溶液,优选 NaHCO_3 、 KHCO_3 和 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的水溶液;一般而言,分散体系中 KHCO_3 的浓度可为至少约 0.05mol/L。更优选 KHCO_3 的浓度为至少约 0.05mol/L 至约 0.5mol/L。还更优选 KHCO_3 的浓度为至少约 0.1mol/L

至约 0.3mol/L。在特别优选的实施方案中,如 Salisbury & Graves, J. Reprod. Fertil., 6 : 351-359 (1963) 中公开的那样,利用含 0.097mol/L NaHCO_3 、0.173mol/L KHCO_3 、0.090mol/L $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 水溶液的抑制性缓冲液形成悬浮液。只要精子细胞暴露于运动抑制剂,它们一般都会保持静止。

[0052] 当分散体系中含有 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 时, KHCO_3 与 NaHCO_3 间的摩尔比可如上所述。 KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比一般等于或大于各 1 : 1,但一般不会超过摩尔比 8 : 1。优选 KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 1.25 : 1。还更优选 KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 1.5 : 1。还更优选 KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 1.75 : 1。在一个具体实施方案中, KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 1.78 : 1。在另一具体实施方案中, KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 2 : 1。而在另一实施方案中, KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 3 : 1。又在另一实施方案中, KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 4 : 1。又在另一实施方案中, KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 5 : 1。又在另一实施方案中, KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 6 : 1。又在另一实施方案中, KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 7 : 1。又在另一实施方案中, KHCO_3 与 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 间的摩尔比为至少约 8 : 1。在特别优选的实施方案中,如 Salisbury & Graves, J. Reprod. Fertil., 6 : 351-359 (1963) 中所公开的那样,利用含 0.097mol/L NaHCO_3 、0.173mol/L KHCO_3 、0.090mol/L $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的水溶液的抑制性缓冲液形成悬浮液。只要精子细胞暴露于运动抑制剂,它们一般都会保持静止。

[0053] 迄今为止的实验证据还提示,如果将精子细胞悬浮液保存在相对于空气二氧化碳分压增高的大气下,可以改善精子细胞的整体健康和其生命特征。在优选实施方案中,悬浮液上方的大气中二氧化碳分压值为至少 0.9 ;更优选为至少约 0.95。

[0054] 可以将细胞与运动性抑制剂分离并将其暴露于空气中,使静止细胞还原为活性状态。此外,还可以通过在生理盐水中 (salisbury 等人, 1963) 或诸如 TCA 缓冲液或 PBS 的缓冲液中稀释细胞来起始活性状态。一般而言,根据 HTM-IVOS 精子分析测量,至少约 20%、优选至少约 50%、更优选至少约 60%、还更优选至少约 70%、甚至更优选至少约 80%、甚至更优选至少约 90%、还更优选至少约 95%、而最优选至少约 99% 回复活性状态的细胞 (即再活化细胞) 具有这样的路径速度、前向性速度或两者兼具 ;即分别为与运动性抑制剂混合前的精子细胞 (即刚射出的精子细胞) 的路径速度、前向性速度或两者的至少约 50%, 优选至少约 60%, 更优选至少约 70%, 还更优选至少约 80%, 甚至更优选至少约 90%, 甚至更优选至少约 95%, 而最优选至少约 99%。

[0055] 一般而言,细胞分选方法包括一系列分离步骤,即细胞样本的收集、细胞染色、细胞分选、分选细胞的收集,并任选地包括分选细胞的冷冻伸展 (cryoextension)。形成的精子悬浮液中最好包含运动性抑制剂,或在一个或多个这些步骤中采用之。

[0056] 细胞样品的收集

[0057] 可以收集牛、猪、马或其它哺乳动物完整的活精子细胞并将之与运动性抑制剂接触。已知众多收集活精子的方法,例如,包括手握法、使用人工阴道以及电刺激射精。例如,可以将一般每毫升含有 5 亿至 10^8 细胞的牛精液样品,直接由来源哺乳动物收集于含有运动性抑制剂的容器中,以形成精子悬浮液。可选地,也可以将精子样品收集于空容

器中,随后在收集的数分钟至数小时内将之与运动性抑制剂接触以形成精子悬浮液。

[0058] 除缓冲物外,精子悬浮液中也可含有一系列添加剂以增强精子存活力。例示性的添加剂包括蛋白质源、抗生素以及调节细胞内和 / 或细胞外氧化 / 还原反应的组合物。

[0059] 例示性的蛋白质源包括卵黄、卵黄提取物、乳 (包括热匀浆和脱脂乳)、乳提取物、大豆蛋白、大豆蛋白提取物、血清白蛋白、牛血清白蛋白、人血清替代物增补剂以及它们的组合。白蛋白特别是牛血清白蛋白 (BSA),是优选的蛋白质源。例如,若含有 BSA,则精子悬浮液中的 BSA 含量可少于约 5.0% (w/v),优选少于约 2% (w/v),更优选少于约 1% (w/v),而最优选其量为约 0.1% (w/v)。

[0060] 单独使用蛋白质源 (如 BSA),可能会起始悬浮液中百分之一精子细胞的获能过程。该过程优选发生于雌性生殖道内。因此,为了抑制稀释过程以及随后的染色和分选期间获能的起始,精子悬浮液中可含有备选的蛋白质源或蛋白质替代物。所述备选蛋白质源或蛋白质替代物除了能够抑制精子悬浮液中更大百分比的细胞起始获能,还具有典型蛋白质源 (如 BSA) 的优点。备选蛋白质源的实例包括人血清替代物增补剂 (SSS) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) 以及胆固醇强化的 BSA,而蛋白质替代物的实例包括聚乙烯醇,例如一般分子量为约 30,000 至约 60,000 的低至中粘度聚乙烯醇。一般而言,若含有这些组合物,其含量与上述 BSA 的量相同;缓冲物或缓冲溶液中总白蛋白含量一般不超过约 5.0% (w/v)。

[0061] 例如,调节细胞内和 / 或细胞外氧化 / 还原反应的例示性组合物包括丙酮酸盐、维生素 K、硫辛酸、谷胱甘肽、黄素、醌类、超氧化物歧化酶 (SOD) 以及 SOD 模拟物。若精子悬浮液中含有此类组合物,则其浓度足以产生保护性作用而不会对精子健康产生不良影响。例示性的浓度范围包括从约 10 μ M 至约 20mM,取决于诸如所用的具体组合物或悬浮液中的精子浓度等因素。例如,精子悬浮液中丙酮酸盐的浓度可为约 1mM 至约 20mM,优选为约 5mM 至约 15mM,更优选为约 10mM。精子悬浮液中维生素 K 的浓度可为约 1 μ M 至约 100 μ M,优选为约 10 μ M 至约 100 μ M,更优选为约 100 μ M。精子悬浮液中硫辛酸的浓度可为约 0.1mM 至约 1mM,优选为约 0.5mM 至约 1mM,而更优选为约 1mM。

[0062] 精子悬浮液中可含有抗生素以抑制细菌的生长。例示性的抗生素包括例如泰乐菌素、庆大霉素、林可霉素、壮观霉素、利高霉素 Linco-**Spectin**[®] (林可霉素羟氯化物 - 壮观霉素)、青霉素、链霉素、替卡西林 (ticarcillin) 或其任意组合。若含有抗生素,则其浓度可为每 ml 精液中约 50 μ g 至约 800 μ g (不论精液是纯净的、缓冲性的或含有其它物质,例如此处提及的任一种添加剂)。Certified Semen Services (CSS) 和美国国家动物育种协会 (NAAB) 已经颁布了有关抗生素在精子收集和使用中应用的纲要。

[0063] 可以向精子分散体系中加入生长因子,以协助维持精子细胞的存活力。例示性的生长因子包括如转化生长因子 (“TGF”) (例如 TGF β -1 和 TGF β -2),以及胰岛素样生长因子 (“IGF”) (例如 IGF-1)。一般而言,精子分散体系中的 TGF 可以 TGF β -1 的形式出现,其浓度为约 0.1ng/L 至约 10 μ g/L,或为 TGF β -2 的形式,其浓度为约 0.1ng/L 至约 200ng/L;而 IGF 在精子分散体系中可以为 IGF-1 形式,其浓度为约 0.1ng/L 至约 50 μ g/L。此类生长因子的用途为本领域所公知,并公开于如美国专利申请公开号 2003/0157473 中,其内容在此处引用作为参考。

[0064] 一旦收集到细胞,可将其于室温下静止状态保存数小时、低温下 (如 5 $^{\circ}$ C) 保存数

周,或在下文所讨论的冰冻伸展剂中保存数月。优选细胞上方的大气如上所述含有较高的二氧化碳分压。或者,收集的细胞还可在数小时内用于如育种方法、染色方法或分选方法。

[0065] 细胞染色

[0066] 运动性抑制剂可用于使细胞在细胞染色期间不运动。一般而言,精子细胞染色方法中可包括形成染色混合物(有时称之为标记混合物),其中含有完整的活精子细胞、运动性抑制剂和染料(有时称之为标记)。在本发明的这一方面,可以将运动性抑制剂与精子细胞接触以形成精子悬浮液,然后将精子悬浮液与DNA选择性染料相接触。在该实施方案中,精子来源可为纯精子,或者为通过离心或使用其它手段分离精子级分而得到的含精子的精液衍生物。

[0067] 在可选的实施方案中,染料可与运动性抑制剂相混合,从而形成染料溶液。因此,例如,纯固体(包括可自由流动的粉末)或液体组合物形式的染料可与抑制剂组合形成染料溶液,所述溶液可随后与纯精子、精子悬浮液或含精子的精液衍生物混合。

[0068] 任何情况下,只要精子细胞保存在抑制剂中,一般都会保持静止(Salisbury 等人,1963)。然而,优选将染色混合物保存在二氧化碳分压相对于空气而言增高的大气中;例如,一般优选染色混合物上方的大气中含99%+的CO₂。

[0069] 可将染色混合物的pH保持在一定pH值范围内的任意一点;一般而言,该范围为约5.0至约9.0。例如,可使染色混合物保持在“微酸性”pH下,即约5.0至约7.0。在该实施方案中,优选pH为约6.0至约7.0,更优选为约6.0至约6.5,而最优选为约6.2。或者,还可使染色混合物保持在“微碱性”pH下,即约7.0至约9.0。在该实施方案中,优选pH为约7.0至约8.0,更优选为约7.0至约7.5,而最优选为约7.3。

[0070] 如以前在美国专利号5,135,759和WO 02/41906中所述,可使用一种或多种可经UV或可见光激发的DNA选择性染料形成染色混合物。经紫外光(UV)激发的选择性染料的实例包括Hoechst 33342和Hoechst 33258,二者均可由Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)购得。经可见光激发的例示性选择性染料包括可购于Molecular Probe, Inc. (Eugene, OR)的SYBR-14,以及WO2/41906中所描述的双苯甲亚胺-BODIPY[®]缀合物6-{{3-((2Z)-2-{{1-(二氟硼烷基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基}亚甲基}-2H-吡咯-5-基)丙酰基}氨基}-N-[3-(甲基{3-[(4-[6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H,3'-H-2,5'-双苯并咪唑-2'-基]苯氧基}乙酰基)氨基]丙基}氨基)丙基]己酰胺(“BBC”)。这些染料中的每一种都可以单独使用或者联合使用;或者,也可以将其它具有细胞渗透性的UV和可见光激发的染料单独或与前述染料联合使用,只要所述染料在可进行别处所述分选的浓度下不会对精子细胞的存活力产生不可接受的不良影响。

[0071] 或者,还可利用荧光聚酰胺形成染色混合物,更具体而言是利用缀合有荧光标记或报告子的聚酰胺。此类标记在结合于核酸时会发出荧光。连接有荧光标记或报告子的聚酰胺实例包括,如Best等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(21):12063-12068(2003); Gygi等人, Nucleic Acids Res., 30(13):2790-2799(2002);美国专利号5,998,140;美国专利号6,143,901以及美国专利号6,090,947中所公开的那些,其中每一篇内容均在此处引用作为参考。

[0072] 荧光核苷酸序列也可用于标记精子细胞。此类核苷酸序列在与含有靶序列或互补序列的核酸杂交时会发出荧光,但在非杂交状态时则不会发出荧光。此类核苷酸公开见于

如美国专利申请公开号 2003/0113765(此处引用作为参考)。

[0073] 性别特异性抗体也可用于标记染色混合物中的精子细胞。例如,在该实施方案中,性别特异性抗体可缀合于荧光部分(或等价报告分子)。由于抗体结合的抗原只存在于带有 X 染色体或 Y 染色体的细胞上,根据其荧光(相对于无荧光的未标记细胞)能够选择性地鉴定此类细胞。此外,可以同时使用分别与不同荧光部分相连的一种以上的性别特异性抗体。从而能根据带有 X 染色体或 Y 染色体的细胞间的不同荧光,对之进行区分。

[0074] 也可使用发光的色彩选择性纳米晶体标记染色混合物中的精子细胞。这些颗粒也称为量子点,正如美国专利号 6,322,901 和美国专利号 6,576,291 所述为本领域所公知(均在此处引用作为参考)。这些纳米晶体已被缀合于多种生物学材料,包括如肽、抗体、核酸、链霉亲和素及多糖(见如美国专利号 6,207,392、6,423,551、5,990,479 和 6,326,144,均在此处引用作为参考),且已用于检测生物学靶标(见如美国专利号 6,207,392 和 6,247,323,两者均在此处引用作为参考)。

[0075] 染色混合物中 DNA 选择性染料或任何其它类型染料的浓度优选为一系列变量的函数,所述变量包括细胞对于所选染料的渗透性、染色混合物的温度、完成染色所需要的时间量、以及在随后的分选步骤中所期望的富集程度。一般而言,优选的染料浓度足以在适度短的时间内达到所期望的染色程度,而不会对精子存活力产生实质的不良影响。例如,Hoechst33342、Hoechst 33258、SYBR-14 或 BBC 在染色混合物中的浓度一般在约 0.1 μ M 至约 1.0M 之间,优选为约 0.1 μ M 至约 700 μ M,更优选为约 100 μ M 至约 200 μ M。在特别优选的实施方案中,Hoechst 33342、Hoechst33258、SYBR-14 或 BBC 在染色混合物中的浓度一般在约 400 μ M 至约 500 μ M,最优选为约 450 μ M。因此,在一种染色条件设置下,Hoechst 33342 的浓度优选为约 100 μ M。在另一种染色条件设置下 Hoechst 33342 的浓度为约 150 μ M。又在另一种染色条件设置下,浓度优选为约 200 μ M。而在另一种染色条件设置下,Hoechst 33342 的浓度最优选为约 450 μ M。

[0076] 又例如,荧光聚酰胺的浓度(例如美国申请公开号 2001/0002314 中所述的那些),一般为约 0.1 μ M 至约 1mM,优选约 1 μ M 至约 1mM,更优选约 5 μ M 至约 100 μ M,甚至更优选约 10 μ M。

[0077] 染色混合物中也可任选地包含可增强精子存活力的添加剂。例示性的添加剂包括如上文“细胞样品的收集”中已经讨论过的抗生素、生长因子或调节细胞内和/或细胞外氧化/还原反应的组合物。可据此向收集液中添加此类添加剂。

[0078] 染色混合物一旦形成,可以在一系列温度范围中的任意温度下保存;一般而言,温度范围为约 4°C 至约 50°C。例如,可以将染色混合物保存于“相对低”的温度下,即温度为约 4°C 至约 30°C;在该实施方案中,温度优选为约 20°C 至约 30°C,更优选为约 25°C 至约 30°C,最优选为约 28°C。或者也可将染色混合物保存于“中间”温度范围内,即温度为约 30°C 至约 39°C;在该实施方案中,温度优选为约 34°C 至约 39°C,更优选为约 37°C。此外,还可将染色混合物保存于“相对高”的温度范围内,即温度为约 40°C 至约 50°C;在该实施方案中,温度优选为约 40°C 至约 45°C,更优选为约 40°C 至约 43°C,最优选为约 41°C。对于优选温度的选择一般取决于一系列变量,包括如细胞对所用染料的渗透性、染色混合物中染料的浓度、细胞在染色混合物中留存的时间、以及在分选步骤中所期望的富集程度。

[0079] 精子细胞摄取染色混合物中的染料可以持续足够长的一段时间,以达到所期望程

度的 DNA 染色。所述时间一般足以使染料结合于精子细胞的 DNA,从而能根据带有 X 和 Y 染色体的精子细胞间不同的且可测量的荧光强度,将两者分选开来。一般而言,这一时间不会超过约 160 分钟,优选不超过约 90 分钟,还更优选不超过约 60 分钟,而最优选为约 5 分钟至约 40 分钟。

[0080] 因此,在一个实施方案中,形成含有精子细胞、运动性抑制剂和浓度为约 100 μ M 至约 200 μ M 的染料的染色混合物,且将该染色混合物于约 41 $^{\circ}$ C 的温度保持一段时间。在另一个实施方案中,运动性抑制剂于每 25ml 纯水中含有 0.204g NaHCO_3 、0.433g KHCO_3 和 0.473g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (NaHCO_3 0.097mol/L、 KHCO_3 0.173mol/L、 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.090mol/L 的水溶液)。

[0081] 在另一个实施方案中,形成含有精子细胞、运动性抑制剂和浓度为约 400 μ M 至约 500 μ M 的染料的染色混合物,且将该染色混合物于约 41 $^{\circ}$ C 的温度保持一段时间。在另一个实施方案中,染料浓度为 450 μ M。在另一个实施方案中,运动性抑制剂于每 25ml 纯水中含有 0.204g NaHCO_3 、0.433g KHCO_3 和 0.473g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (NaHCO_3 0.097mol/L、 KHCO_3 0.173mol/L、 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.090mol/L 的水溶液)。

[0082] 又在另一个实施方案中,形成含有精子细胞、运动性抑制剂和浓度为约 100 μ M 至约 200 μ M 的染料的染色混合物,且将该染色混合物于约 28 $^{\circ}$ C 的温度保持一段时间。在另一个实施方案中,运动性抑制剂于每 25ml 纯水中含有 0.204g NaHCO_3 、0.433g KHCO_3 和 0.473g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (NaHCO_3 0.097mol/L、 KHCO_3 0.173mol/L、 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.090mol/L 的水溶液)。

[0083] 而在另一个实施方案中,形成含有精子细胞、运动性抑制剂和浓度为约 400 μ M 至约 500 μ M 的染料的染色混合物,且将该染色混合物于约 28 $^{\circ}$ C 的温度下保持一段时间。在另一个实施方案中,染料浓度为 450 μ M。在另一个实施方案中,运动性抑制剂于每 25ml 纯水中含有 0.204g NaHCO_3 、0.433g KHCO_3 和 0.473g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (NaHCO_3 0.097mol/L、 KHCO_3 0.173mol/L、 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.090mol/L 的水溶液)。

[0084] 分选

[0085] 运动性抑制剂也可用于在分选精子细胞期间使细胞不运动。一般而言,一旦根据本发明将精子染色,可以根据任何已知的可依据荧光分离的方法分选之。常用且公知的方法包括流式细胞术体系,如美国专利号 5,135,759、5,985,216、6,071,689、6,149,867 及 6,263,745;国际专利公开号 W099/33956 和 W001/37655;美国专利申请系列号 10/812,351 及其相应的国际专利公开号 WO 2004/088283 中所例示和描述的那些,此处引用其内容作为参考)。当根据这些方法分选时,将精子作为样品液引入流式细胞仪的管口中。因此在一个实施方案中,样品液可包含有染色精子细胞和运动性抑制剂。

[0086] 与之类似,用于在穿行细胞仪时包裹样品液流的鞘液中也含有运动性抑制剂。一般而言,利用加压空气或注射泵将鞘液引入流式细胞仪的管口。优选的加压空气为二氧化碳或氮气,更优选氮气。或者,加压空气也可为二氧化碳,但在这种情况下,必须注意尽量减少气泡。

[0087] 样品液或鞘液中也任选地含有添加剂,如上文“细胞样品的收集”中讨论过的抗生素、调节细胞内和 / 或细胞外氧化 / 还原反应的组合物或生长因子。可据此将这些添加剂中的每一种加入任一种液体中。

[0088] 分选细胞的收集

[0089] 一旦完成分选,将分选细胞收集于含有收集液的容器内。一般而言,(采用)收集液的目的包括缓冲收集容器对精子细胞的影响,或为细胞提供液体支持。

[0090] 在一个实施方案中,收集液中可含有运动性抑制剂和蛋白质源。若含有蛋白质源,则其可为任何不会干扰精子细胞存活力并与所用的运动性抑制剂相容的蛋白质源。常用蛋白质源的实例包括乳(包括热匀浆和脱脂乳)、乳提取物、卵黄、卵黄提取物、大豆蛋白和大豆蛋白提取物。此类蛋白质的使用浓度可为约 1% (v/v) 至约 30% (v/v),优选约 10% (v/v) 至约 20% (v/v),更优选约 10% (v/v)。

[0091] 收集液中也任选地含有添加剂,如上文“细胞样品的收集”中讨论过的抗生素、生长因子或调节细胞内和/或细胞外氧化/还原反应的组合物。可据此将这些添加剂中的每一种加入收集液中。

[0092] 因此,在某一实施方案中,收集液为含有 0.097mol/L NaHCO_3 、0.173mol/L KHCO_3 、0.090mol/L $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 以及 10% (v/v) 卵黄的水溶液, pH 为约 6.2,更优选 pH 为约 7.0,甚至更优选为约 6.5。优选将收集液保存在二氧化碳分压高于空气的大气中;例如,大气中二氧化碳分压可大于 0.9,更优选 0.95,还更优选 0.99。

[0093] 可将分选细胞收集至含有或包被有冰冻伸展剂的容器中,以代替常规收集液的使用。因此,在具体的实施方案中,分选细胞收集于含有运动性抑制剂的冰冻伸展剂中。在另一个实施方案中,分选细胞收集于这样的冰冻伸展剂中,其含有运动性抑制剂、水、**Triladyl**[®] (Minitube, Verona, WI, 含有甘油、tris、柠檬酸、果糖、泰乐菌素 5mg/100ml、庆大霉素 25mg/100ml、壮观霉素 30mg/100ml 及林可霉素 15mg/100ml)、卵黄以及丙酮酸盐。而在另一个实施方案中,收集液为这样的冰冻伸展剂,其含有 0.097mol/L NaHCO_3 、0.173mol/L KHCO_3 、0.090mol/L $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的水溶液,且每 75ml 水中含 25g **Triladyl**[®]、25g 卵黄和 10mM 丙酮酸盐。

[0094] 分选细胞的冰冻伸展

[0095] 一旦完成精子的分选并收集其至收集容器内,这些精子即可用于对雌性哺乳动物授精。这几乎不需要对精子进行其它处理就可以立即进行。同样,也可以将精子冷却或冰冻以备后用。在这种情况下,加入冰冻伸展剂以最大程度地降低冷却或冰冻对存活力或解冻后运动性的影响,对精子大有益处。

[0096] 运动性抑制剂可用于使冰冻伸展剂中的细胞不运动。一般而言,冰冻伸展剂含有运动性抑制剂、蛋白质源和冰冻保护剂。若含有,也可加入例如蛋白质源以提供细胞支持、缓冲细胞与收集容器的接触。蛋白质源可为任何不会干扰精子细胞存活力并与具体所用运动性抑制剂相容的蛋白质源。常用蛋白质源的实例包括乳(包括热匀浆和脱脂乳)、乳提取物、卵黄、卵黄提取物、大豆蛋白和大豆蛋白提取物。此类蛋白质的使用浓度可为约 10% (v/v) 至约 30% (v/v),优选约 10% (v/v) 至约 20% (v/v),更优选约 20% (v/v)。

[0097] 冰冻伸展剂中优选含有冰冻保护剂,以减轻或避免冷冻休克或以保持精子的生育力。本领域已知众多冰冻保护剂。适于与给定伸展剂共同使用的冰冻保护剂可有多种选择,取决于待冰冻的精子来源于哪一种系。适宜的冰冻保护剂的实例包括如,甘油、二甲基亚砷、乙二醇、丙二醇、海藻糖、**Triladyl**[®] 以及它们的组合。若含有冰冻保护剂,则其在冰冻伸展剂中的量一般为约 1% (v/v) 至约 15% (v/v),优选其量为约 5% (v/v) 至约 10%

(v/v),更优选其量为约 7% (v/v),最优选量为约 6% (v/v)。

[0098] 在具体实施方案中,冰冻伸展剂包含运动性抑制剂、水、**Triladyl**[®]、卵黄和丙酮酸盐。而在另一个实施方案中,冰冻伸展剂为含 0.097mol/L NaHCO₃、0.173mol/L KHCO₃、0.090mol/L C₆H₈O₇·H₂O 的水溶液,且每 75ml 水中含 25g **Triladyl**[®]、25g 卵黄和 10mM 丙酮酸盐。

[0099] 在另一个具体实施方案中,冰冻伸展剂包含运动性抑制剂、水、**Triladyl**[®]和卵黄。而在另一个实施方案中,冰冻伸展剂为含 0.097mol/L NaHCO₃、0.173mol/L KHCO₃、0.090mol/L C₆H₈O₇·H₂O 的水溶液,且每 75ml 水中含 25g **Triladyl**[®]、25g 卵黄。

[0100] 冰冻伸展剂中也可任选地含有如上文“细胞样品的收集”中讨论过的抗生素、生长因子或调节细胞内和 / 或细胞外氧化 / 还原反应的组合物。可据此将这些添加剂中的每一种加入收集液中。

[0101] 上文已经详细描述了本发明,显而易见的是,在不脱离所附权利要求定义的本发明范围时可以对之进行修饰和改变。

实施例

[0102] 提供以下非限制性实施例以进一步举例说明本发明。

[0103] 实施例 1

[0104] 利用人工阴道从性成熟公牛中收集公牛精液,并将样品在 25°C 温控容器内转运至染色设施。精液一经接收,便根据标准和公知的方法 (Farrell 等人 *Theriogenology*, 49(4):871-9(1998 年 3 月)),利用 Hamilton-Thorn 运动性分析仪 (IVOS) 分析其浓度、运动性和前向运动性。根据精液浓度,将精液悬浮于 TCA 缓冲物或基于碳酸盐的抑制剂中,制备数管含 150×10⁶ 精子 /ml 的悬浮液。下表 I 显示了所用的组合物和染色条件。

[0105] 表 I

[0106]

样品名	组成成分	pH	浓度 (μM) Hoechst	温度 (°C)
10 mM pyr TCA	含 10mM 丙酮酸盐的 TCA	7.3	600 μM	28°C
10 mM pyr CO ₂	CO ₂ 气球包裹的含 10 mM 丙酮酸盐的 TCA	7.3	600 μM	28°C
碳酸盐 6.2	基于碳酸盐的抑制剂, pH 6.2	6.2	600 μM	28°C
碳酸盐 7.3	基于碳酸盐的抑制剂, pH 7.3	7.3	600 μM	28°C

[0107] 向精子悬浮液中加入等份 10mM Hoechst 水溶液以使浓度为 600 μ MHoechst。染色期间将精子悬浮液留置于 28°C 水浴中（约 1 小时）。从染色分精子悬浮液中移取 50 μ l 小份，加入 200 μ l 25°C 含 10mM 丙酮酸盐的 TCA (pH7.3) 以起始静止逆转，至少 5 分钟的平衡时间后，通过 IVOS 分析测量前向性运动百分比（前向性运动%）进行分析。IVOS 前向性运动百分比的比较结果见图 1-3。

[0108] 实施例 2

[0109] 利用人工阴道从性成熟公牛中收集公牛精液，并将样品在 25°C 温控容器内转运至染色设施。精液一经接收，便根据标准和公知的方法 (Farrell 等人 Theriogenology, 49(4) :871-9(1998 年 3 月))，利用 Hamilton-Thorn 运动性分析仪 (IVOS) 分析其浓度、运动性和前向运动性。根据精液浓度，将精液悬浮于 TCA 缓冲物或基于碳酸盐的抑制剂中，制备数管含 450×10^6 精子 /ml 的悬浮液。下表 II 显示了所用的组合物和染色条件。

[0110] 表 II

[0111]

样品名	组成成分	pH	浓度 (μ M) Hoechst	温度(°C)
10mM pyr TCA	含 10mM 丙酮酸盐的 TCA	7.3	1000 μ M	28°C
碳酸盐 6.2	基于碳酸盐的抑制剂， pH 6.2	6.2	1000 μ M	28°C
碳酸盐 7.3	基于碳酸盐的抑制剂， pH 7.3	7.3	1000 μ M	28°C

[0112] 向精子悬浮液中加入等份 10mM Hoechst 水溶液以使浓度为 1000 μ MHoechst。将精子悬浮液留置于 28°C 水浴中 1 小时，然后按照各图中具体的说明，用含 10mM 丙酮酸盐的 TCA 或 pH 6.2 基于碳酸盐的抑制剂将之稀释为 150×10^6 精子 /ml 的典型分选浓度。在各图指定的时间内从染色并稀释的精子悬浮液中移取 50 μ l 小份，并加入 200 μ l 25°C 含 10mM 丙酮酸盐的 TCA (pH7.3) 以起始静止逆转，至少 5 分钟的平衡时间后，通过 IVOS 分析测量前向性运动百分比（前向性运动%）进行分析。IVOS 前向性运动百分比的比较结果见图 4-6。

[0113] 实施例 3

[0114] 利用人工阴道从性成熟公牛中收集公牛精液，并将样品在 25°C 温控容器内转运至染色设施。精液一经接收，便根据标准和公知的方法 (Farrell 等人 Theriogenology, 49(4) :871-9(1998 年 3 月))，利用 Hamilton-Thorn 运动性分析仪 (IVOS) 分析其浓度、运动性和前向运动性。根据精液浓度，将精液悬浮于 TCA 缓冲物或基于碳酸盐的抑制剂中，制备数管含 450×10^6 精子 /ml 的悬浮液。下表 III 显示了所用的组合物和染色条件。

[0115] 表 III

[0116]

样品名	组成成分	pH	浓度 (μM) Hoechst	温度 ($^{\circ}\text{C}$)
10mM pyr TCA	含 10mM 丙酮酸盐的 TCA	7.3	300 μM	41 $^{\circ}\text{C}$
碳酸盐 6.2	基于碳酸盐的抑制剂, pH 6.2	6.2	300 μM	41 $^{\circ}\text{C}$
碳酸盐 7.3	基于碳酸盐的抑制剂, pH 7.3	7.3	300 μM	41 $^{\circ}\text{C}$

[0117] 向精子悬浮液中加入等份 10mM Hoechst 水溶液以使浓度为 3001 μM Hoechst。将精子悬浮液留置于 41 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 30 分钟,然后按照各图中具体的说明,用含 10mM 丙酮酸盐的 TCA 或 pH 6.2 基于碳酸盐的抑制剂将之稀释为 150×10^6 精子 /ml 的典型分选浓度。在各图指定的时间内从染色并稀释的精子悬浮液中移取 50 μl 小份,并加入 200 μl 25 $^{\circ}\text{C}$ 含 10mM 丙酮酸盐的 TCA (pH 7.3) 以起始静止逆转,至少 5 分钟的平衡时间后,通过 IVOS 分析测量前向性运动百分比 (前向性运动%) 进行分析。IVOS 前向性运动百分比的比较结果见图 7-9。

[0118] 实施例 4

[0119] 利用人工阴道从性成熟公牛中收集公牛精液,并将样品以 2 份的碳酸盐缓冲液稀释、于 25 $^{\circ}\text{C}$ 温控容器内转运至染色设施。精液一经接收,便根据标准和公知的方法 (Farrell 等人 *Theriogenology*, 49(4):871-9 (1998 年 3 月)), 利用 Hamilton-Thorn 运动性分析仪 (IVOS) 分析其浓度、运动性和前向运动性。根据精液浓度,移取小份碳酸盐精子悬浮液、将其在 500Xg 离心 5 分钟、除去上清液并将沉淀重悬于 41 $^{\circ}\text{C}$ pH 7.3 的 TCA 缓冲液中,制备 1mL 150×10^6 精子 /ml 的悬浮液。再通过将小份精液悬浮于 41 $^{\circ}\text{C}$ 含 10mM 丙酮酸盐、pH 7.3 的 TCA 缓冲液内,制备另外 1mL 150×10^6 精子 /ml 悬浮液。向精子悬浮液中加入等份 10mM Hoechst 水溶液以使染料浓度为 400 μM Hoechst。染色期间将精子悬浮液留置于 41 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中。从染色的精子悬浮液中移取 50 μl 小份,加入 200 μl 相同温度的相同缓冲物,通过 IVOS 分析测量前向性运动百分比 (前向性运动%) 进行分析。IVOS 分析的结果总结于图 10。

[0120] 实施例 5

[0121] 除以下不同外,按照实施例 4 的相同方法获取和制备精子样品:用于悬浮精子以进行染色和 IVOS 分析的缓冲物为 TCA 和含 10 μM 维生素 K 的 TCA。IVOS 分析的结果总结于图 11。

[0122] 实施例 6

[0123] 除以下不同外,按照实施例 4 的相同方法获取和制备精子样品:用于悬浮精子以进行染色和 IVOS 分析的缓冲物为 TCA 和含 100 μM 维生素 K 的 TCA。IVOS 分析的结果总结于图 12。

[0124] 实施例 7

[0125] 除以下不同外,按照实施例 4 的相同方法获取和制备精子样品:用于悬浮精子以进行染色和 IVOS 分析的缓冲物为 TCA 和含 1mM 硫辛酸的 TCA。IVOS 分析的结果总结于图 13。

[0126] 实施例 8

[0127] 利用人工阴道从性成熟公牛中收集公牛精液,并将样品以 2 份的碳酸盐缓冲液稀释、于 25℃ 温控容器内转运至染色设施。精液一经接收,便根据标准和公知的方法 (Farrell 等人 *Theriogenology*, 49(4):871-9(1998 年 3 月)),利用 Hamilton-Thorn 运动性分析仪 (IVOS) 分析其浓度、运动性和前向运动性。根据精液浓度,将精子悬浮液在 500Xg 离心 5 分钟、除去上清液并将沉淀重悬于 28℃ pH 7.3 的 TCA 缓冲液中,制备 1mL 含 150×10^6 精子 /ml 的悬浮液。再通过将小份精液悬浮于 28℃ 含 10mM 丙酮酸盐、pH 7.3 的 TCA 缓冲液内,制备另外 1mL 150×10^6 精子 /ml 悬浮液。向精子悬浮液中加入等份 10mM Hoechst 水溶液以使染料浓度为 600 μ M Hoechst。染色期间将精子悬浮液留置于 28℃ 水浴中。从染色精子悬浮液中移取 50 μ l 小份,加入 200 μ l 相同温度的相同缓冲物,通过 IVOS 分析测量前向性运动百分比 (前向性运动%) 进行分析。IVOS 分析的结果总结于图 14。

[0128] 实施例 9

[0129] 除以下不同外,按照实施例 8 的相同方法获取和制备精子样品:用于悬浮精子以进行染色和 IVOS 分析的缓冲物为 TCA 和含 100 μ M 维生素 K 的 TCA。IVOS 分析的结果总结于图 15。

[0130] 实施例 10

[0131] 除以下不同外,按照实施例 8 的相同方法获取和制备精子样品:用于悬浮精子以进行染色和 IVOS 分析的缓冲物为 TCA 和含 1mM 硫辛酸的 TCA。IVOS 分析的结果总结于图 16。

[0132] 实施例 11

[0133] 利用人工阴道从性成熟公牛中收集公牛精液,并将样品以 2 份的碳酸盐缓冲液稀释、于 25℃ 温控容器内转运至染色设施。精液一经接收,便根据标准和公知的方法 (Farrell 等人 *Theriogenology*, 49(4):871-9(1998 年 3 月)),利用 Hamilton-Thorn 运动性分析仪 (IVOS) 分析其浓度、运动性和前向运动性。根据精液浓度,移取小份碳酸盐精子悬浮液、将其在 500Xg 离心 5 分钟、除去上清液并将沉淀重悬于 1ml TCA 缓冲液或 1ml 含 2.5mM、10mM、25mM 或 50mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液中,制备 1mL 含 150×10^6 精子 /ml 的悬浮液。向样品中加入 MON33342 溶液以使染料终浓度为 600 μ M。于 28℃ 水浴中孵育悬浮液。从染色精子悬浮液中移取 50 μ l 小份,加入 200 μ l 相同温度的相同缓冲物,通过 IVOS 分析测量前向性运动百分比 (前向性运动%) 进行分析。IVOS 分析前向性运动%的结果如图 17 所示。

[0134] 实施例 12

[0135] 利用人工阴道从性成熟公牛中收集公牛精液,并将样品以 2 份的碳酸盐缓冲液稀释、于 25℃ 温控容器内转运至染色设施。精液一经接收,便根据标准和公知的方法 (Farrell 等人 *Theriogenology*, 49(4):871-9(1998 年 3 月)),利用 Hamilton-Thorn 运动性分析仪 (IVOS) 分析其浓度、运动性和前向运动性。根据精液浓度,移取小份碳酸盐精子

悬浮液、将其在 500Xg 离心 5 分钟、除去上清液并将沉淀重悬于 1ml TCA 缓冲液中,制备 1mL 含 150×10^6 精子 /ml 的 TCA 缓冲液。移取一份碳酸盐精子悬浮液、将其在 500Xg 中离心 5 分钟、除去上清液并将沉淀重悬于 1ml 含 10mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液中,制备 1mL 含 150×10^6 精子 /ml 的 10mM 丙酮酸盐 TCA 缓冲液。向样品中加入 SYBR14 染料溶液以使染料终浓度为 20 μ M。于 28°C 水浴中孵育悬浮液。从染色精子悬浮液中移取 50 μ l 小份,加入 200 μ l 相同温度的相同缓冲物,通过 IVOS 分析测量前向性运动百分比(前向性运动%)进行分析。IVOS 分析前向性运动%的结果如图 18 所示。

[0136] 实施例 13

[0137] 利用人工阴道从性成熟公牛中收集公牛精液,并将样品以 2 份的碳酸盐缓冲液稀释、以于 25°C 温控容器内转运至染色设施。精液一经接收,便根据标准和公知的方法(Farrell 等人 Theriogenology, 49(4):871-9(1998 年 3 月)),利用 Hamilton-Thorn 运动性分析仪(IVOS)分析其浓度、运动性和前向运动性。根据精液浓度,移取小份碳酸盐精子悬浮液、将其在 500Xg 离心 5 分钟、除去上清液并将沉淀重悬于 1ml TCA 缓冲液中,制备 1mL 含 150×10^6 精子 /ml 的 TCA 缓冲液。移取一份碳酸盐精子悬浮液、将其在 500Xg 中离心 5 分钟、除去上清液并重悬浮沉淀于 1ml 含 10mM 丙酮酸盐的 TCA 缓冲液中,制备 1mL 含 150×10^6 精子 /ml 的 10mM 丙酮酸盐 TCA 缓冲液。向样品中加入 BBC 溶液以使染料终浓度为 100 μ M。于 28°C 水浴中孵育悬浮液。从染色精子悬浮液中移取 50 μ l 小份,加入 200 μ l 相同温度的相同缓冲物,通过 IVOS 分析测量前向性运动百分比(前向性运动%)进行分析。IVOS 分析前向性运动%的结果如图 19 所示。

[0138] 实施例 14

[0139] 除以下不同外,按照实施例 4 的相同方法获取和制备精子样品:染色浓度为 200 μ M BBC。IVOS 分析的结果总结于图 20。

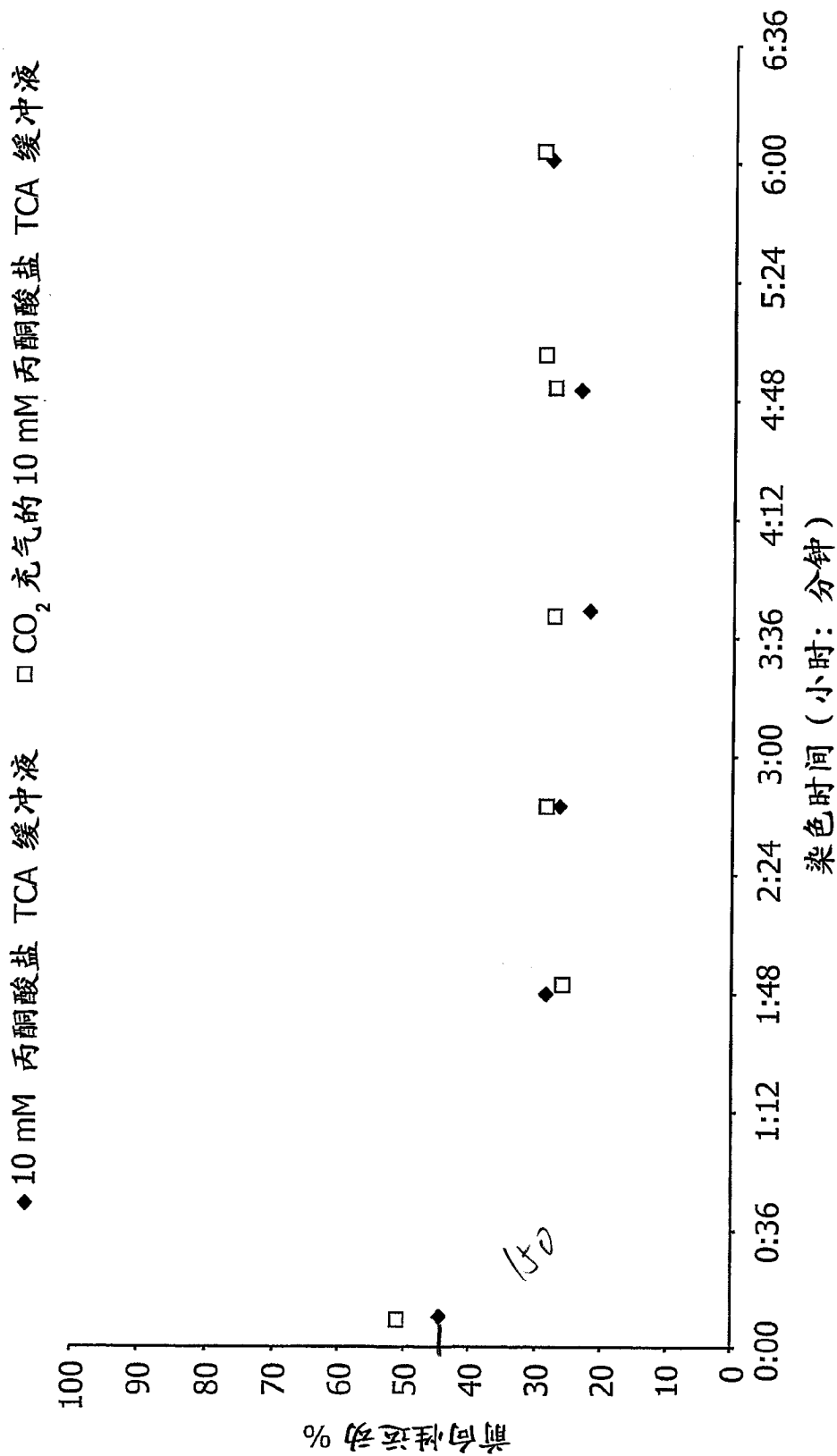


图 1

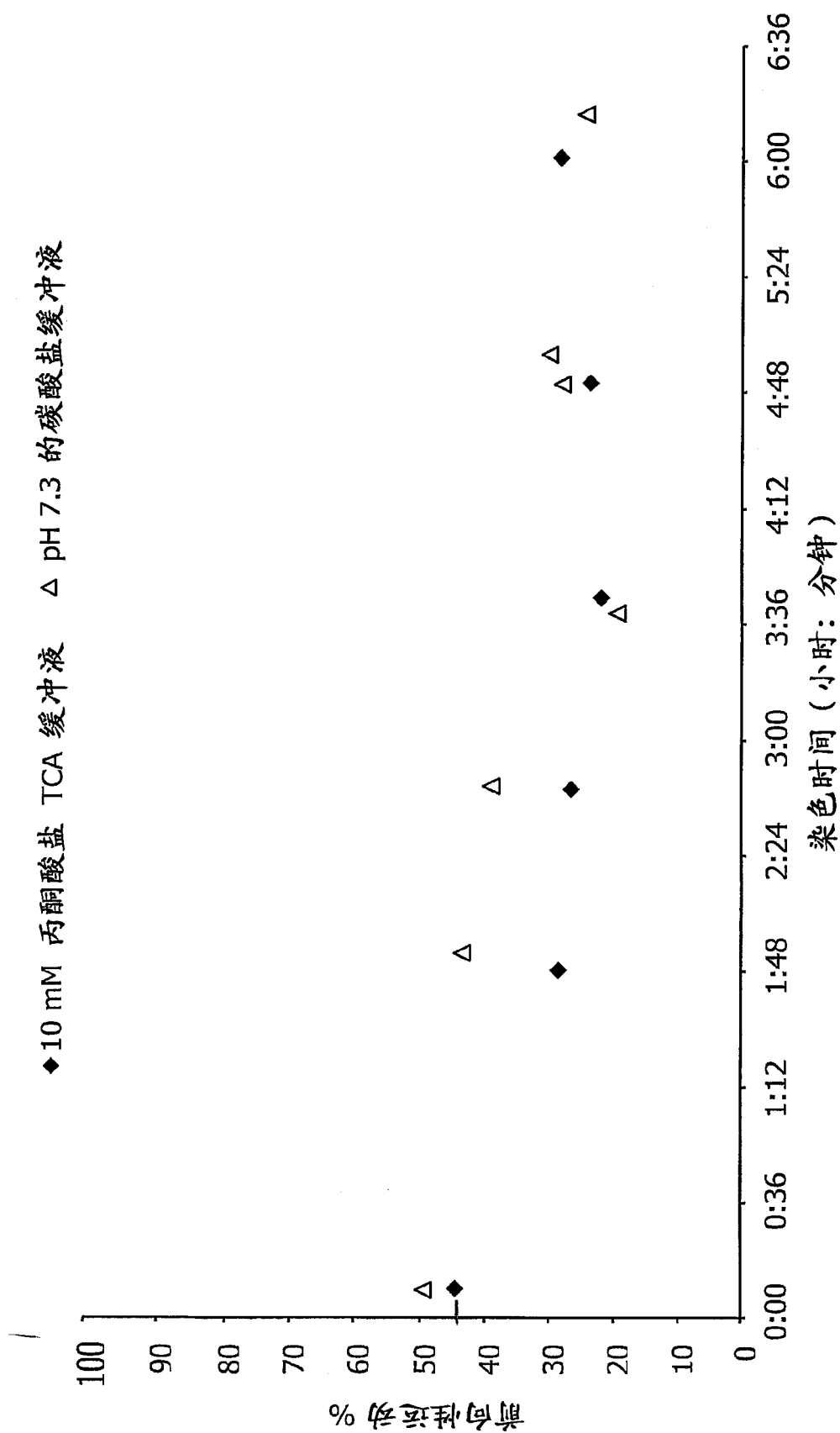


图 2

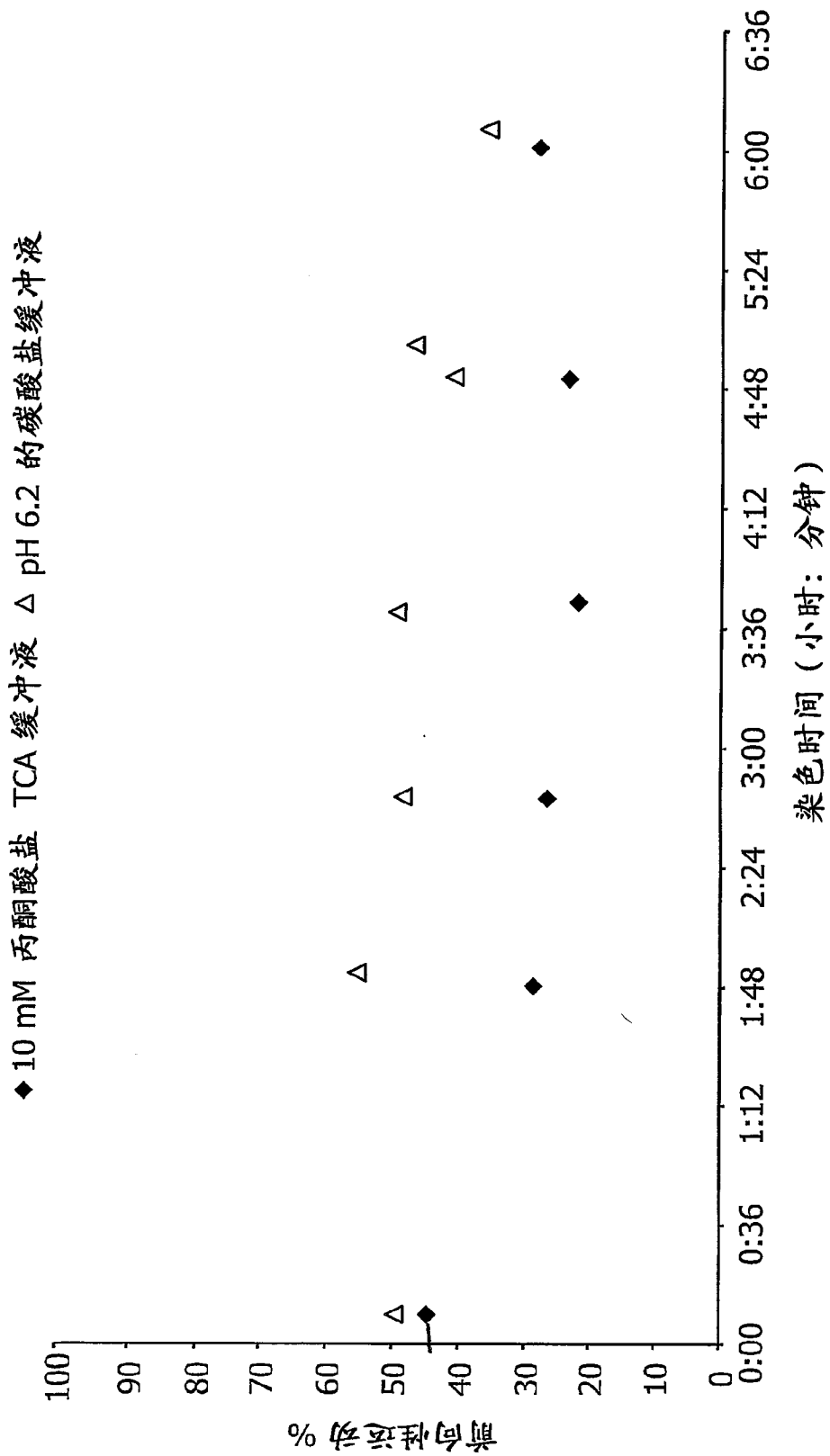


图 3

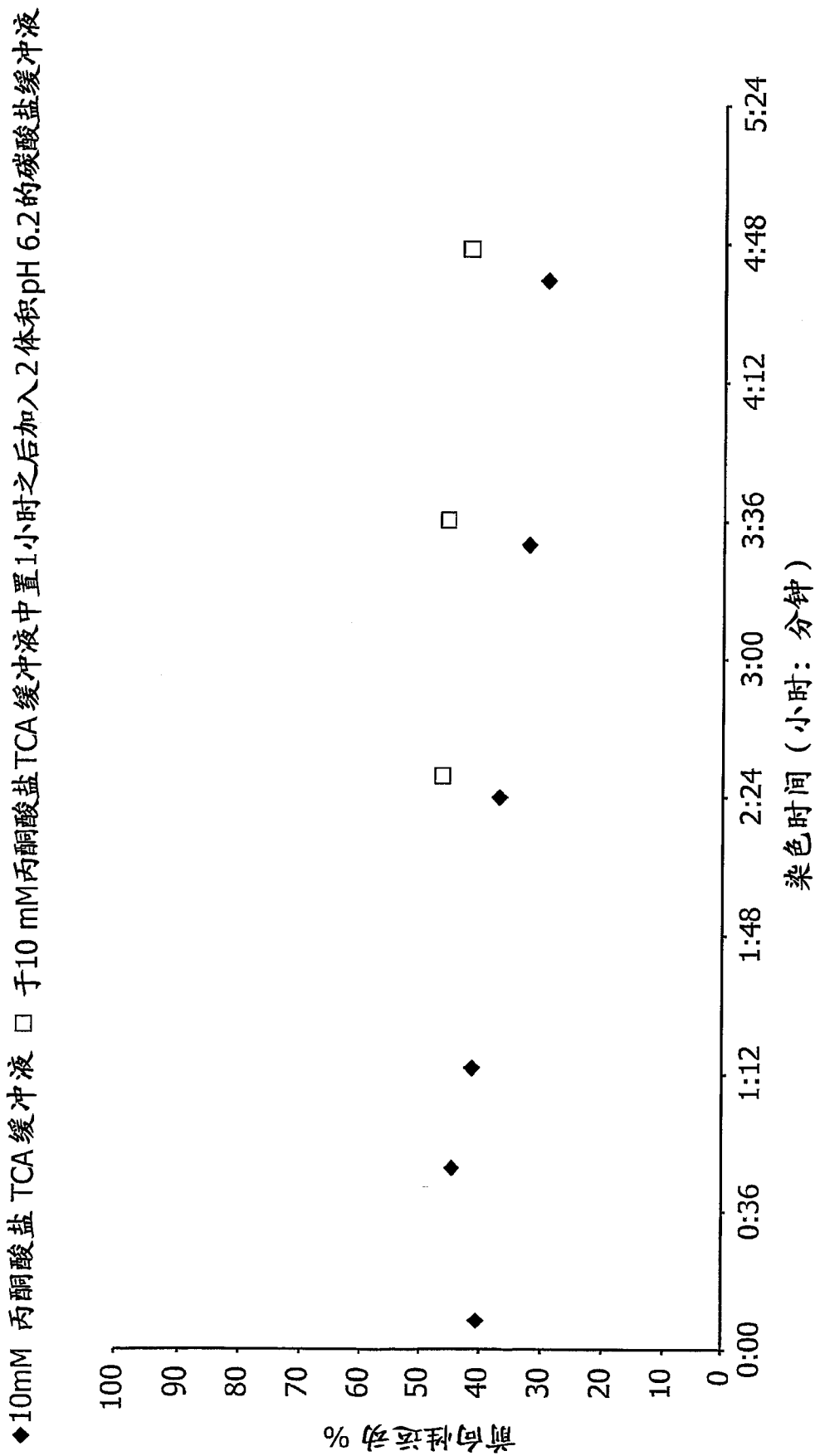


图 4

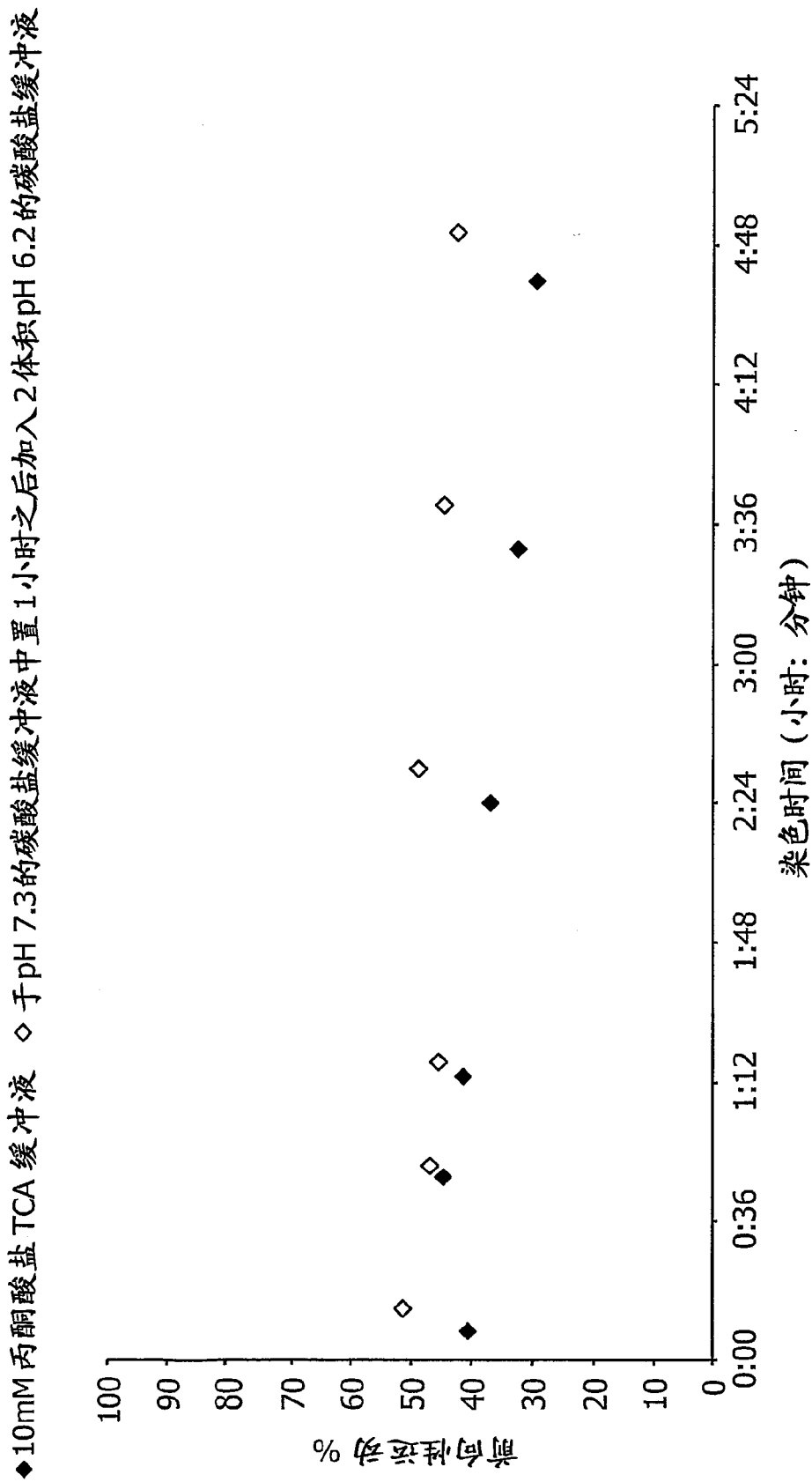


图 5

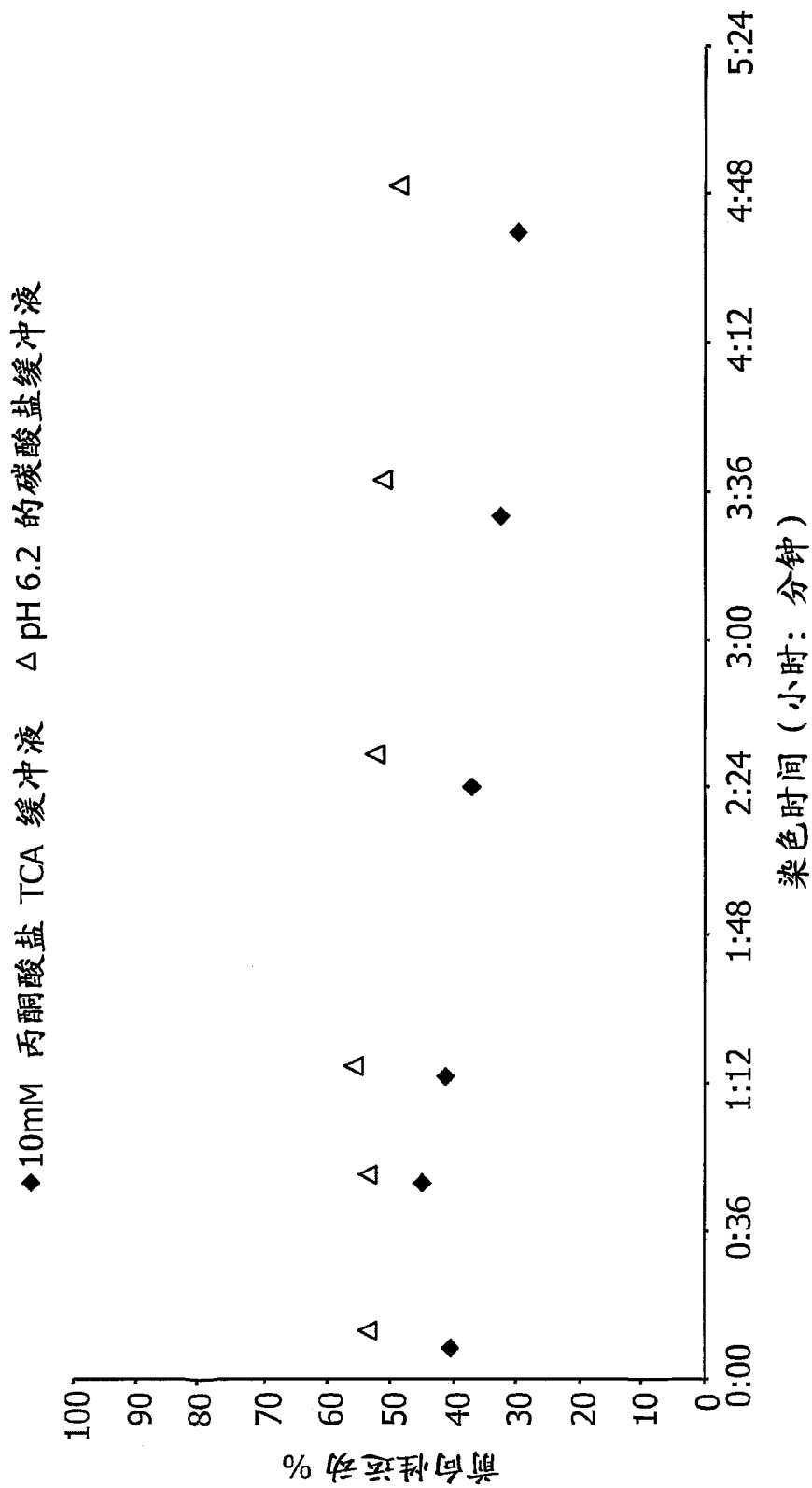


图 6

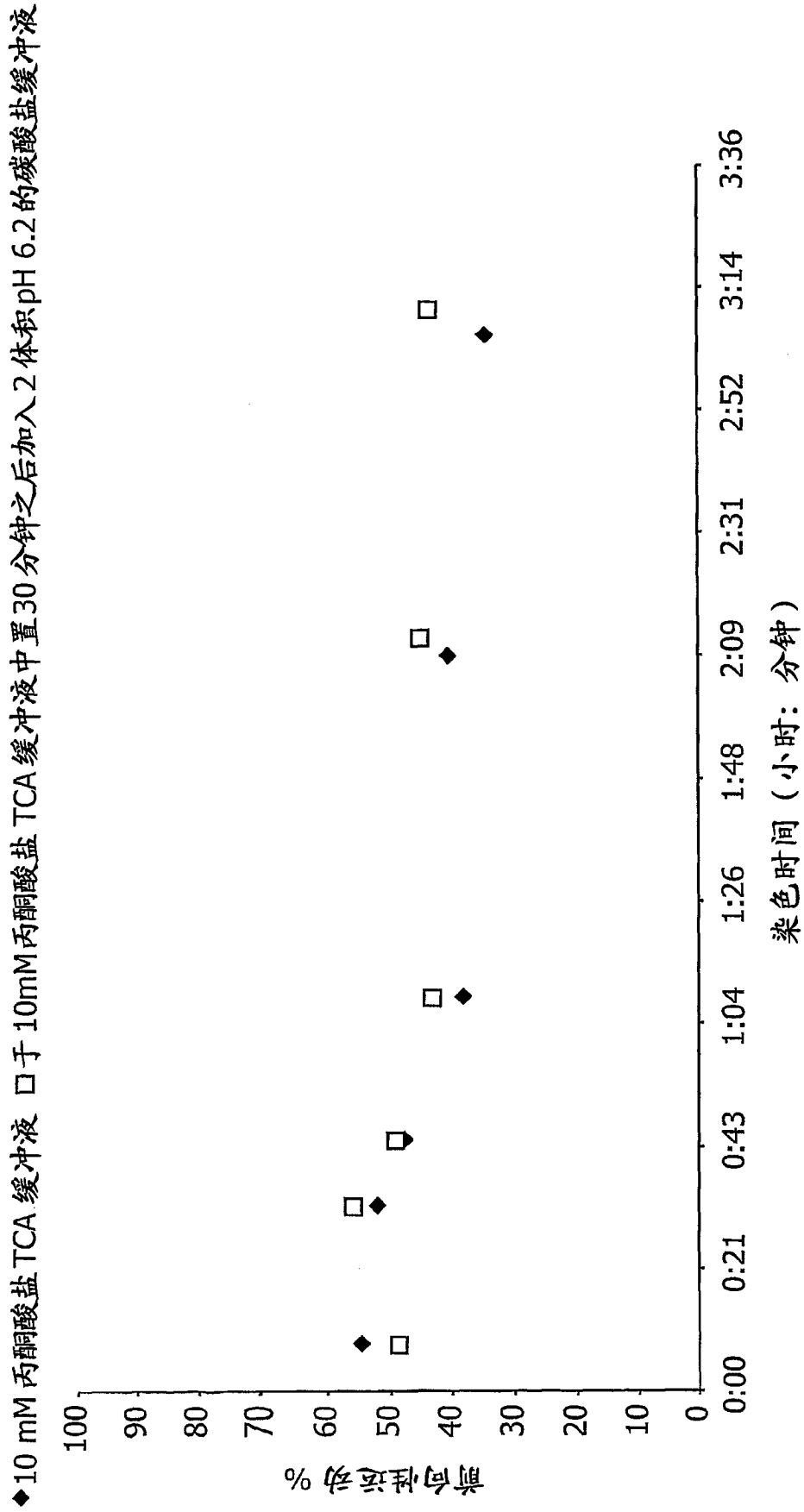


图 7

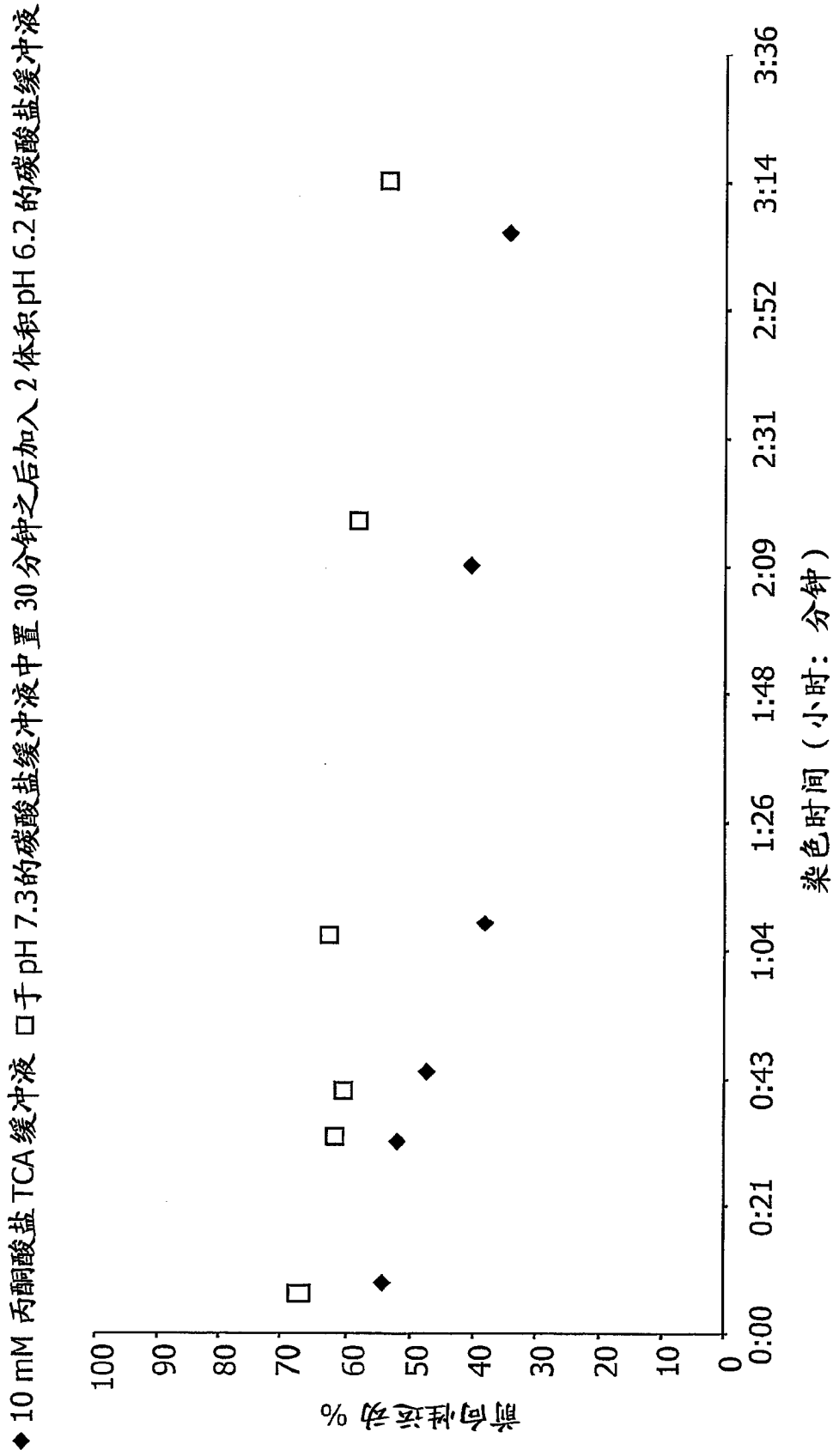


图 8

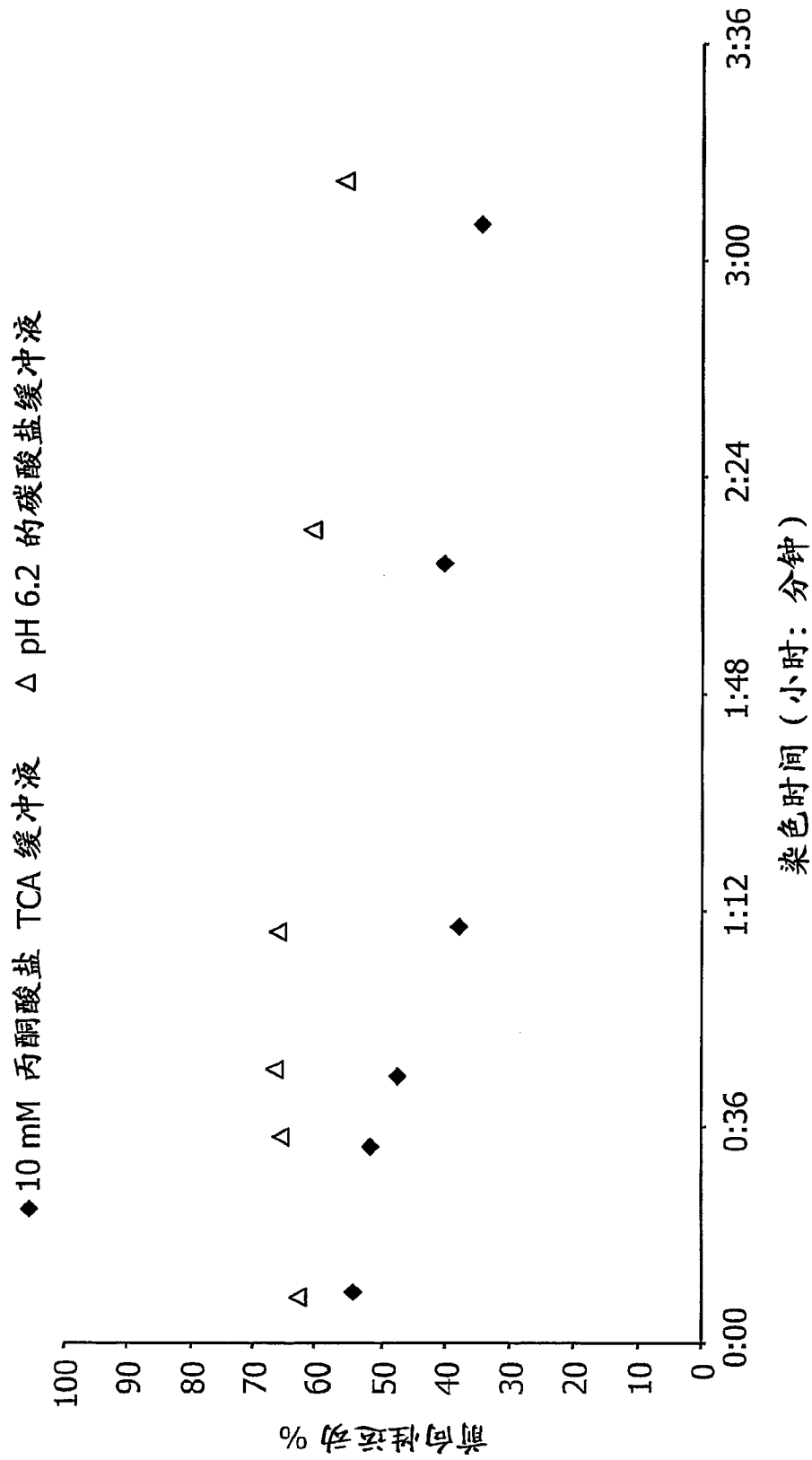


图 9

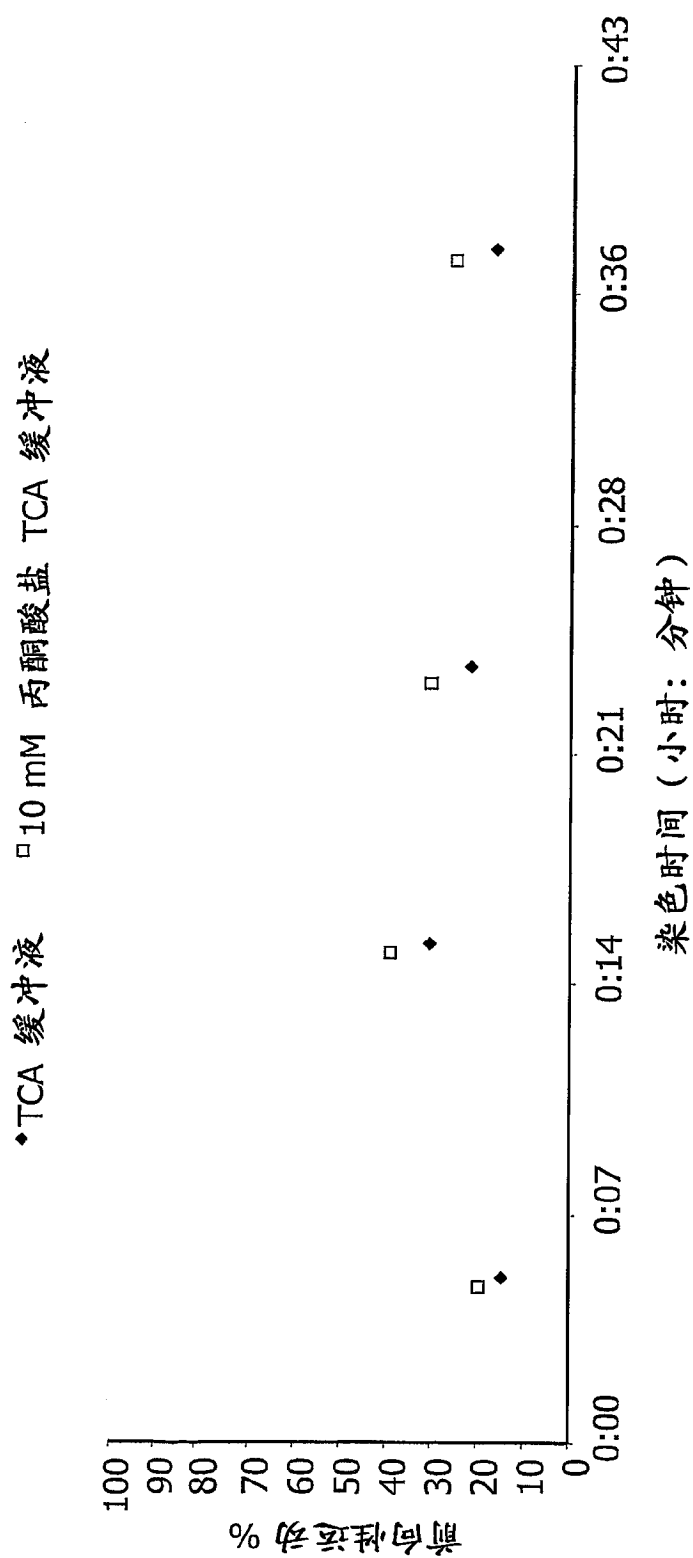


图 10

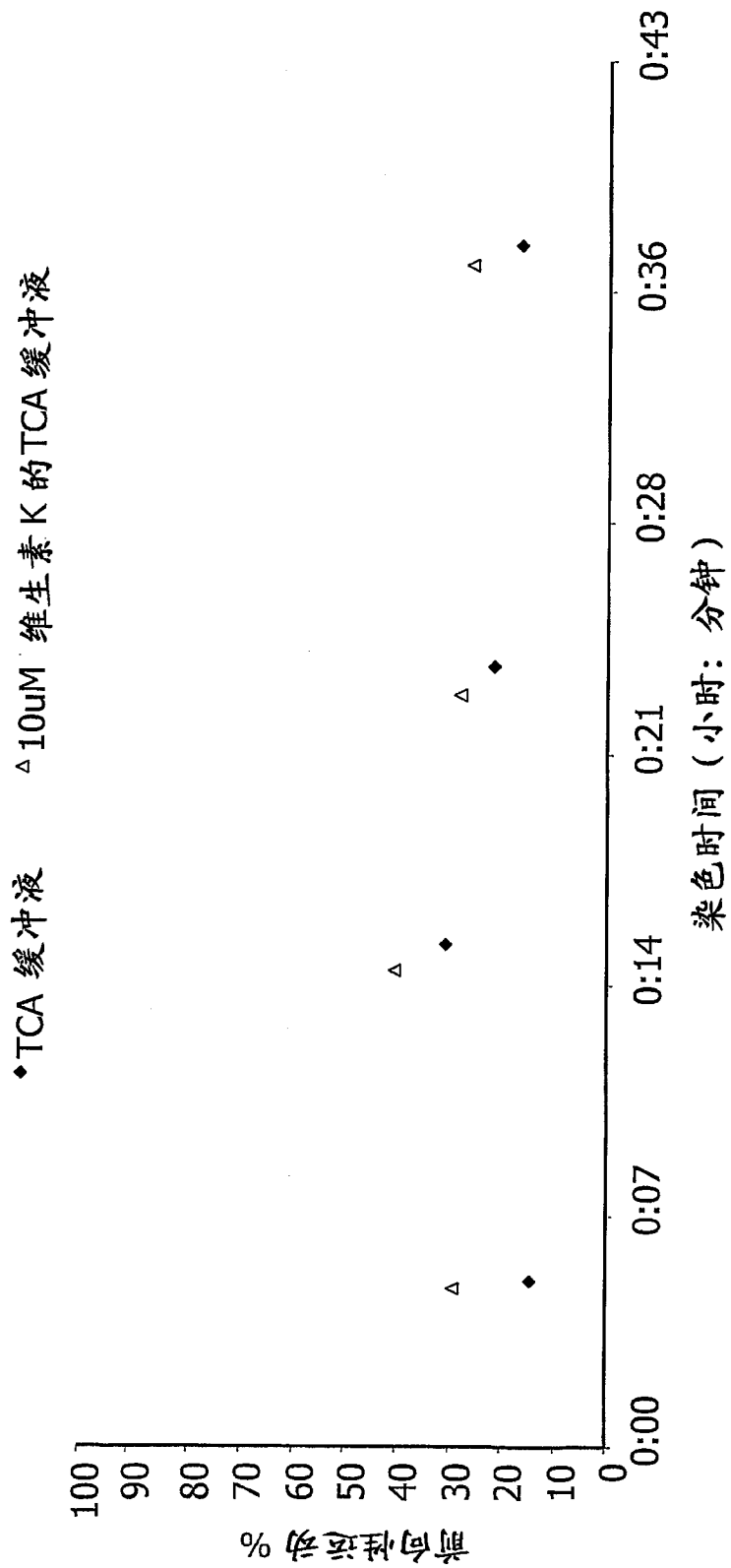


图 11

◆ TCA 缓冲液 ▲ 100 μ M 维生素 K 的 TCA 缓冲液

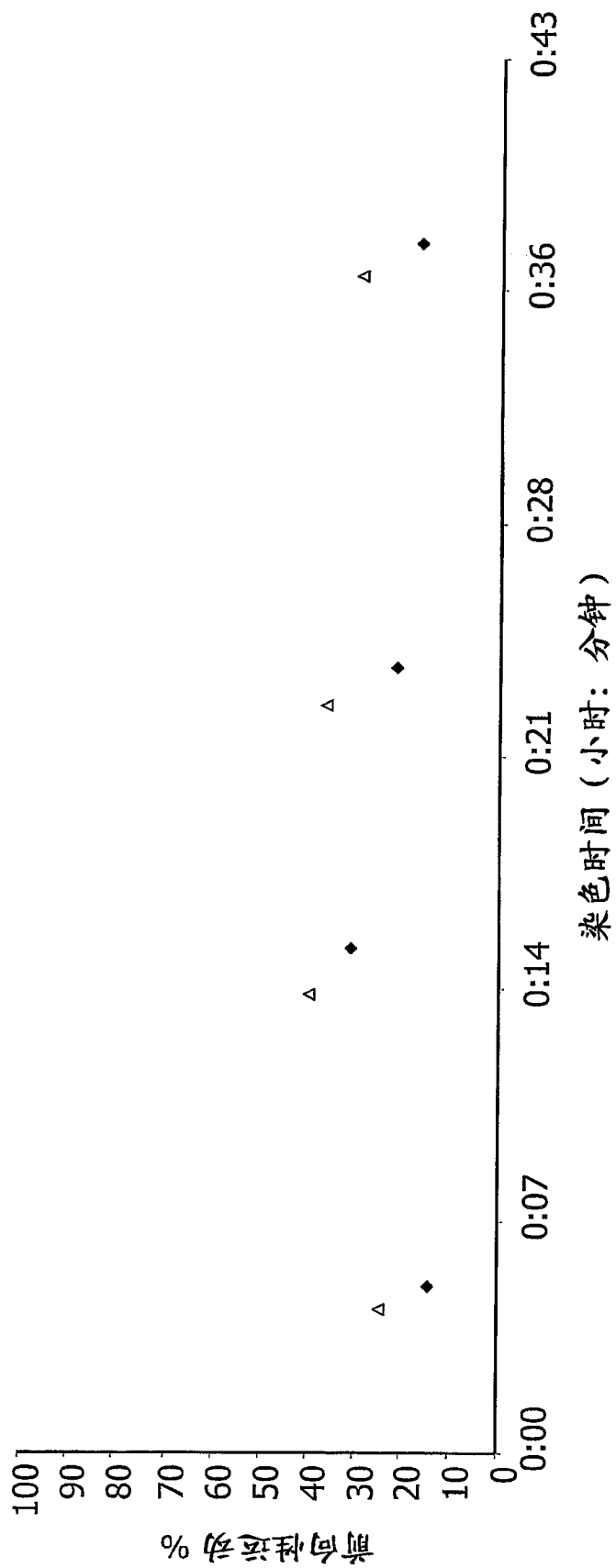


图 12

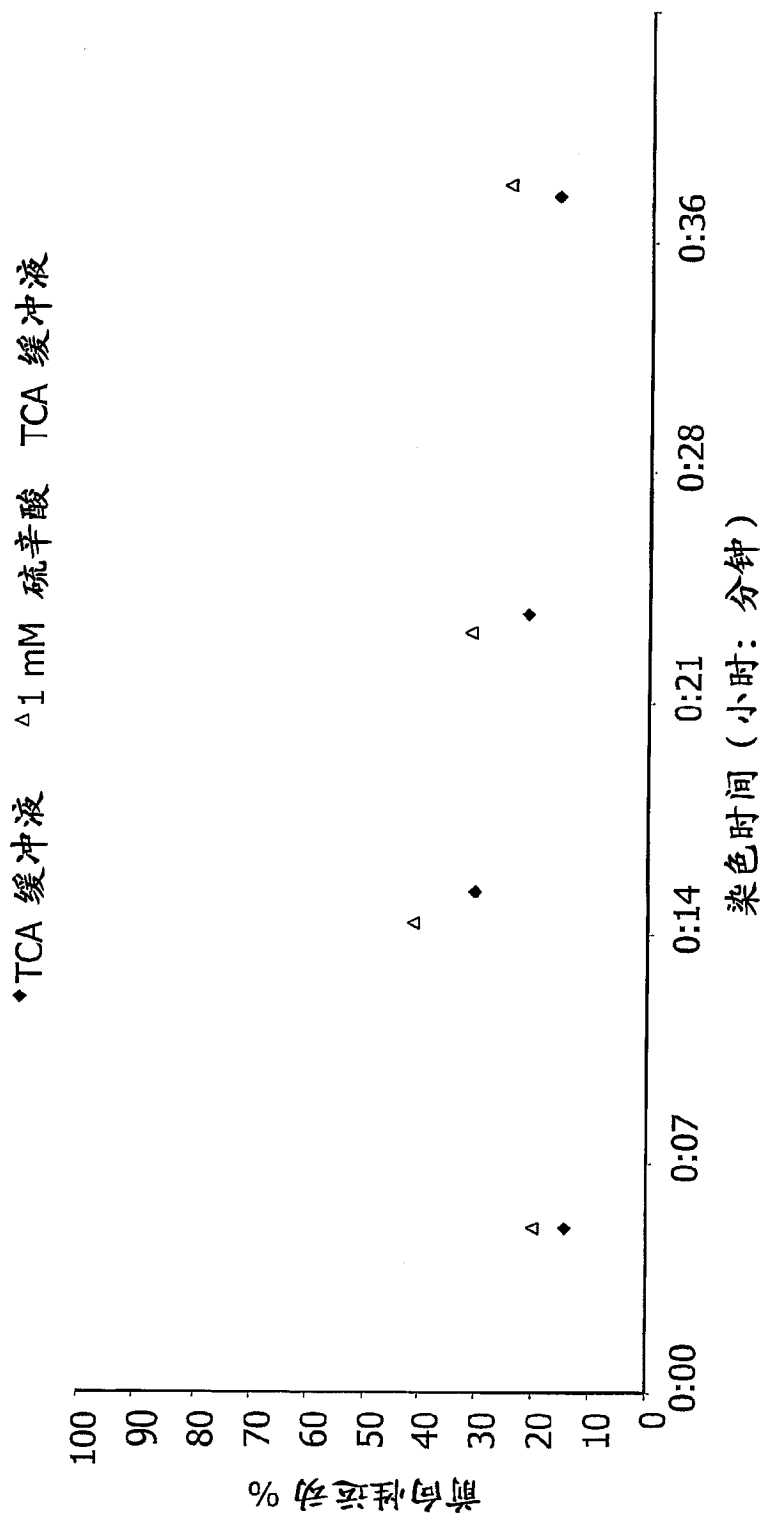


图 13

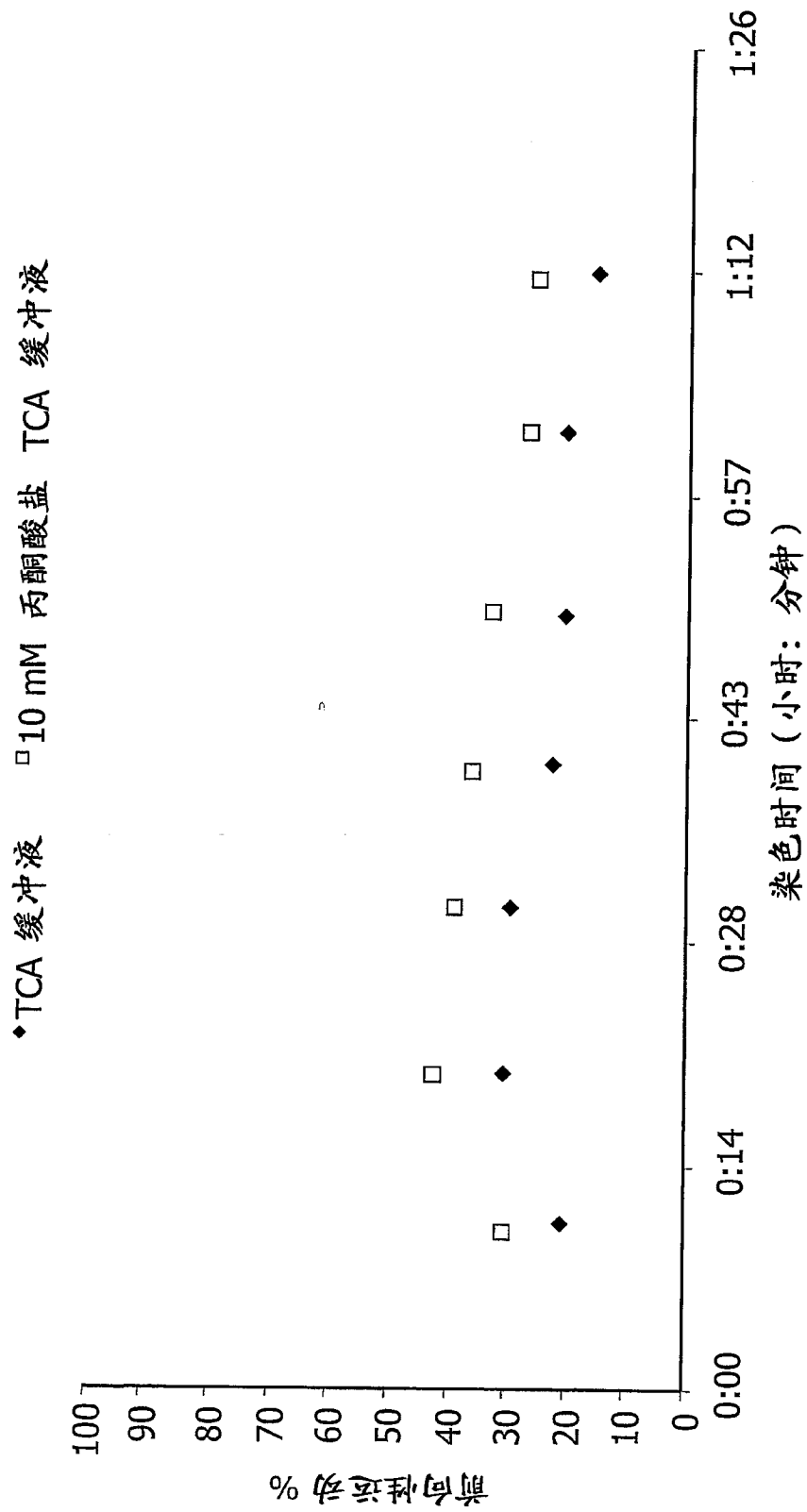


图 14

◆ TCA 缓冲液 △ 100 uM 维生素 K 的 TCA 缓冲液

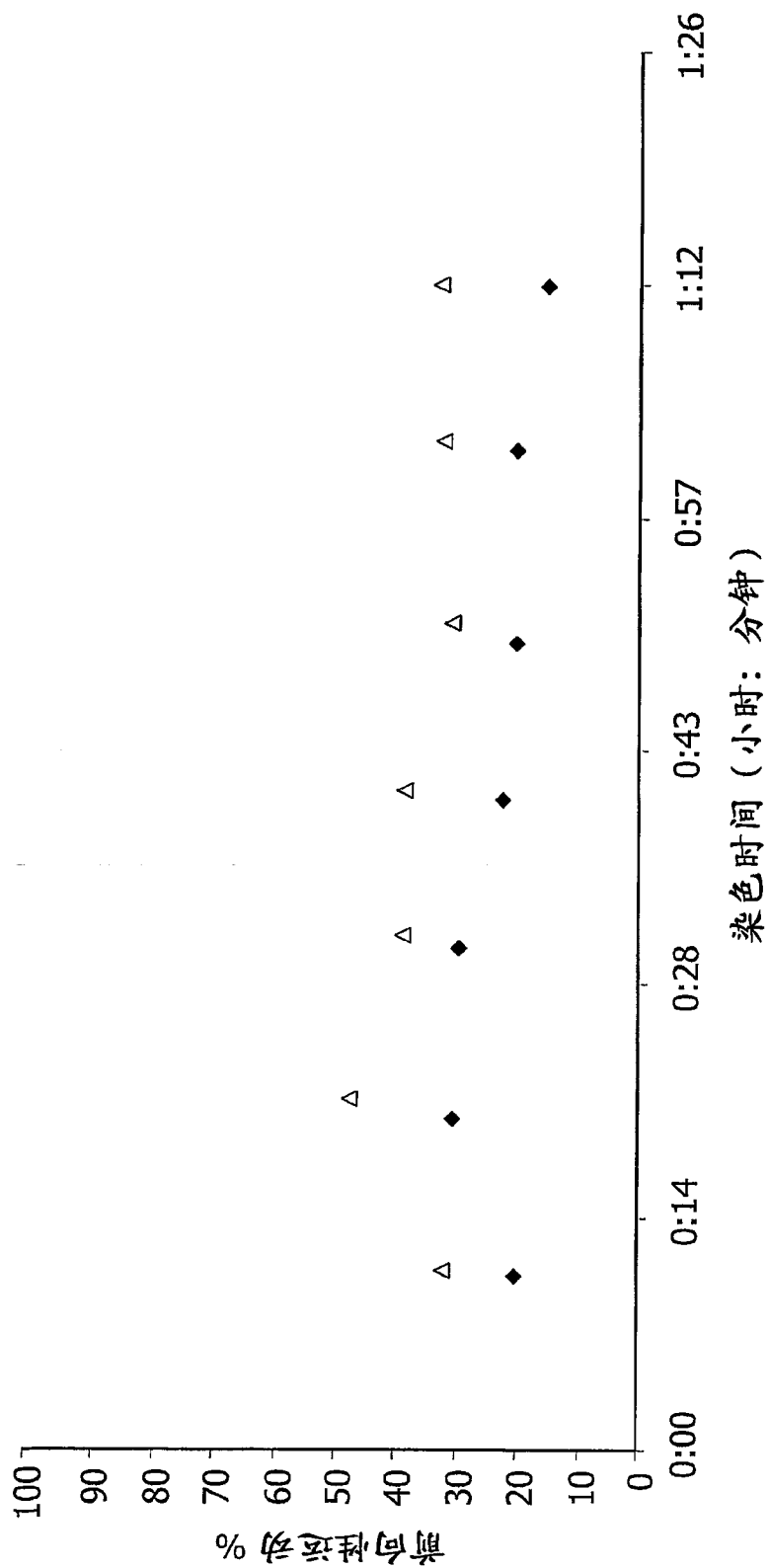


图 15

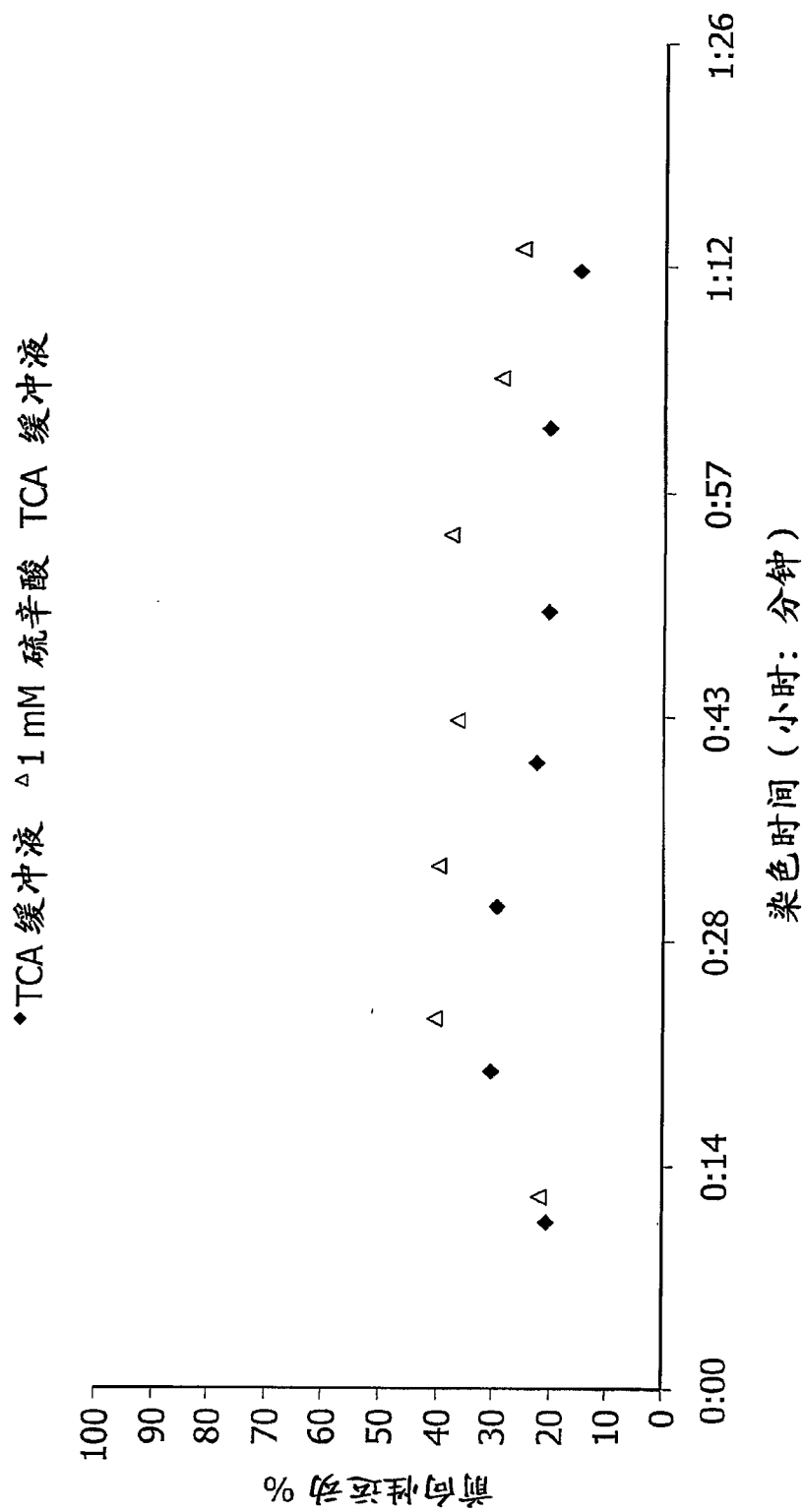


图 16

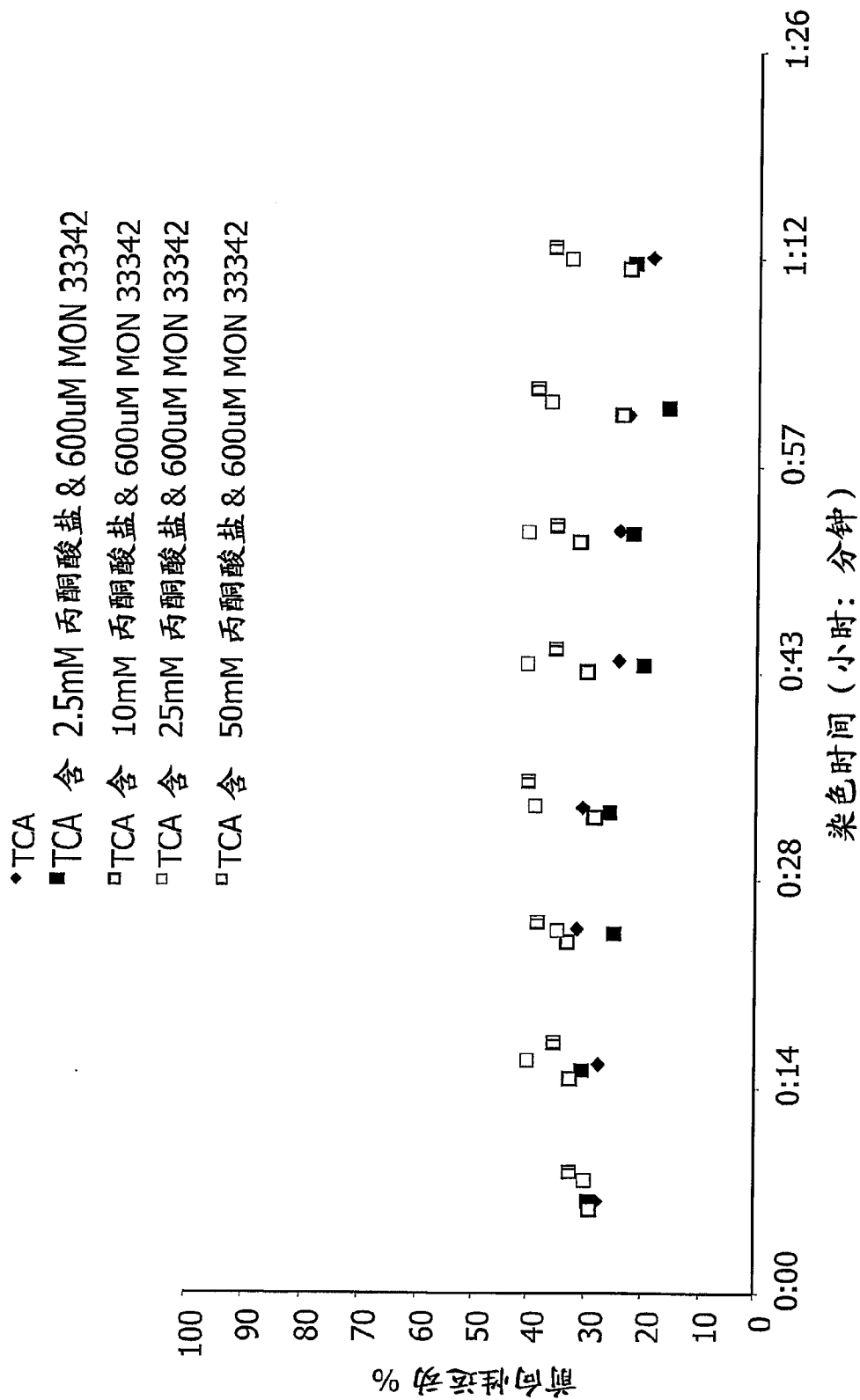


图 17

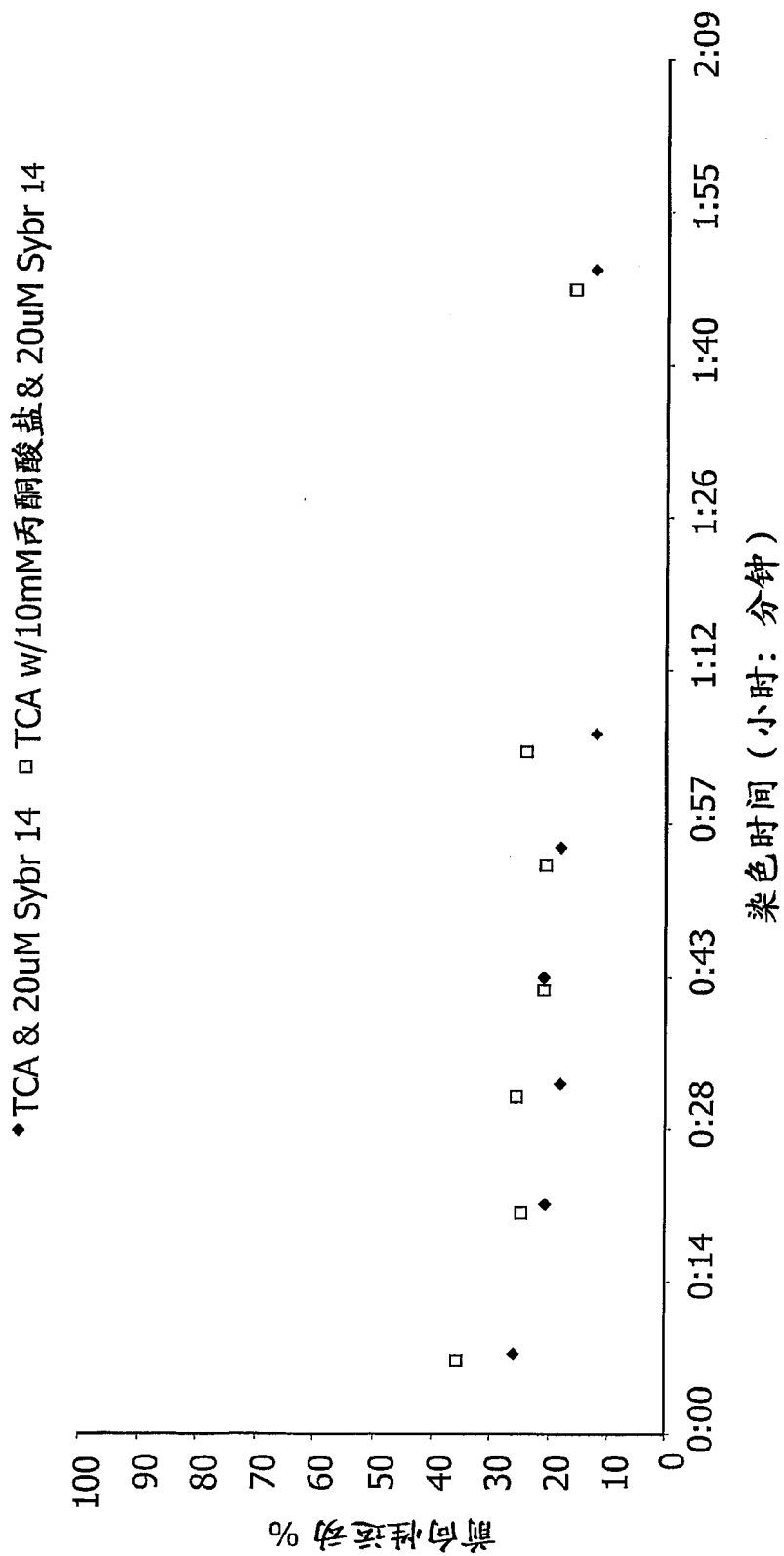


图 18

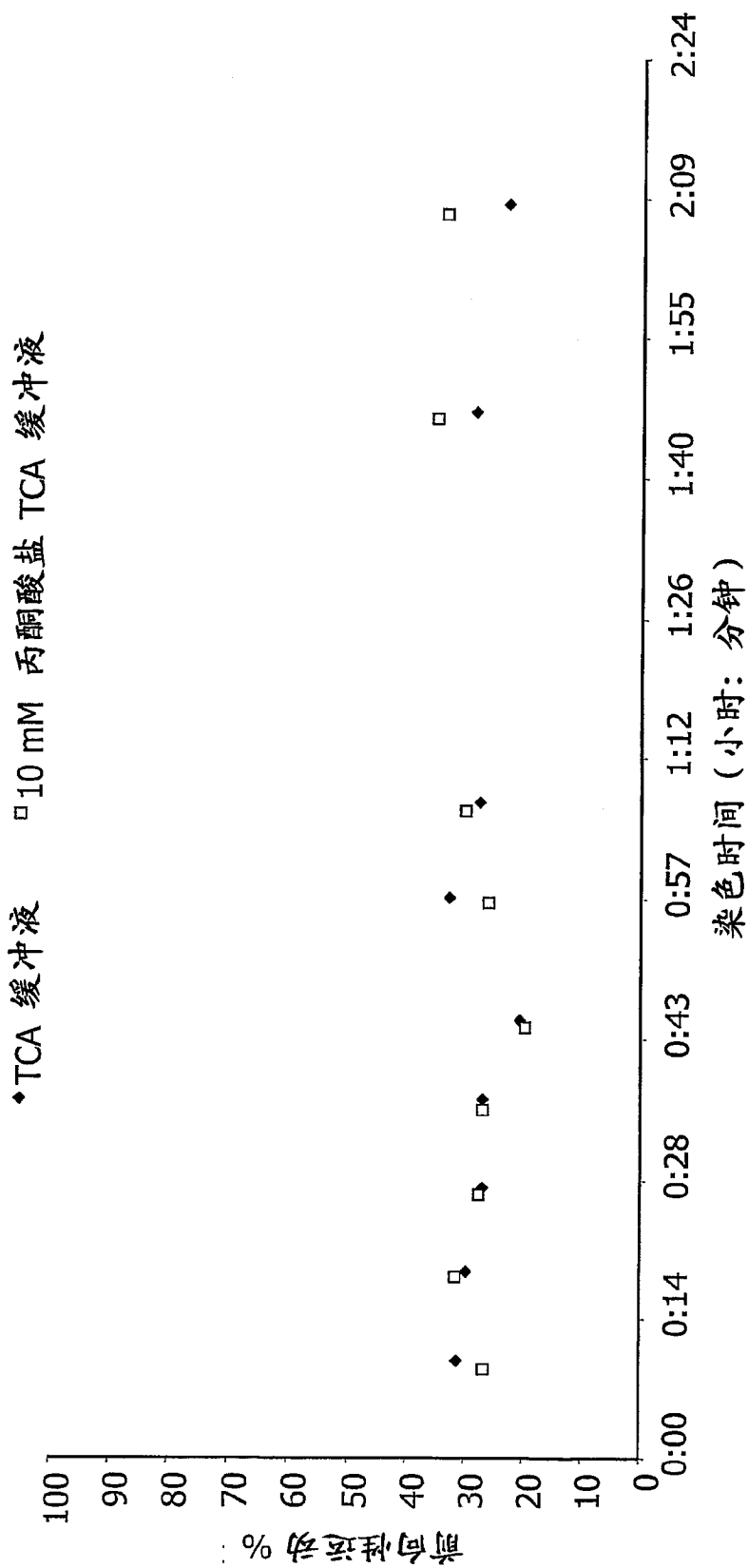


图 19

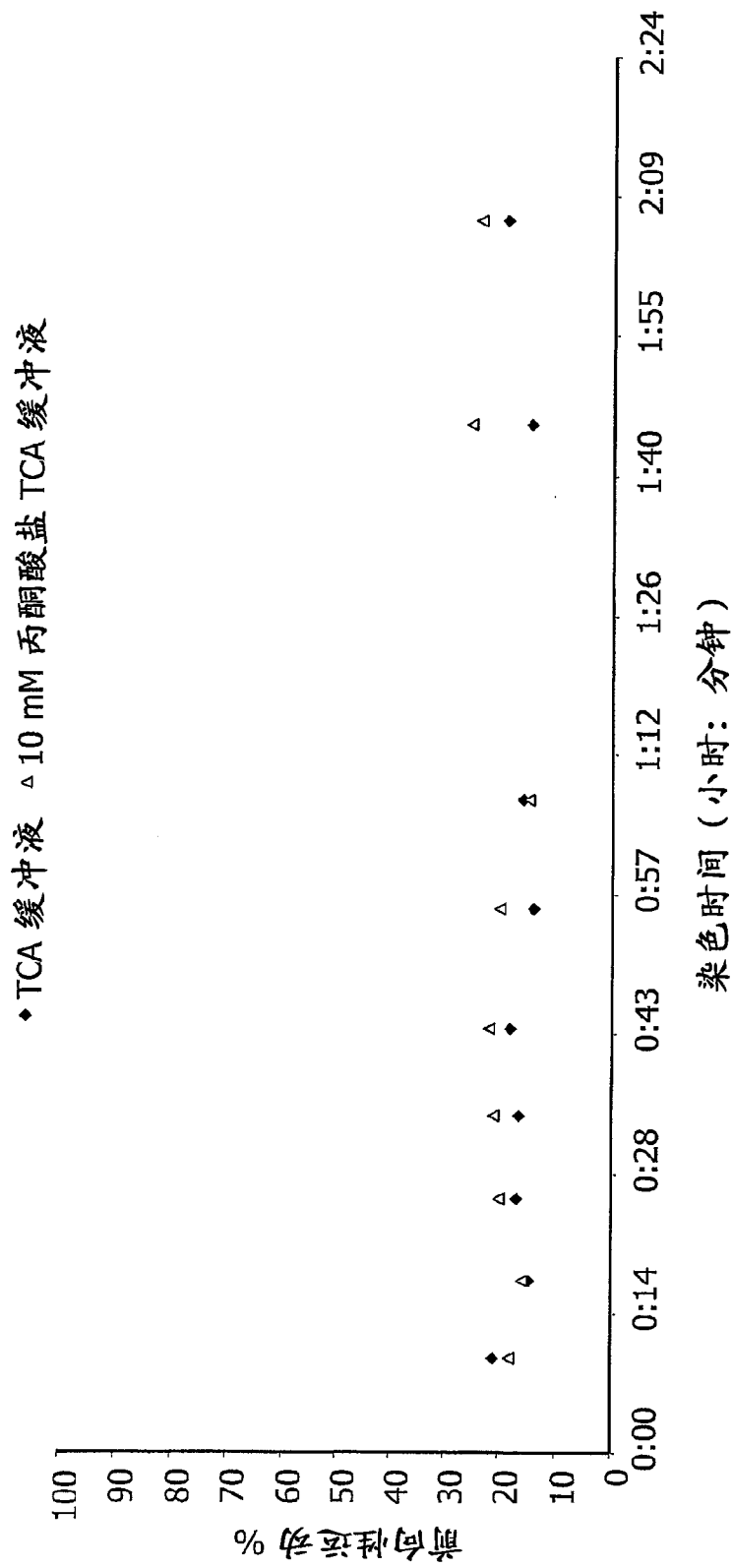


图 20