

流式细胞仪精子分离技术 在工作犬繁育中的应用展望

韦云芳 唐树生 万九生* 黎立光 陈方良 杜晓鹏

公安部昆明警犬基地,昆明 650204

动物的性别控制是指通过人为作用使雌性动物按照人们的意愿繁殖出所需性别后代的一门生物技术,该技术具有巨大的利用价值。在人类领域,性别控制最重要的意义在于帮助具有性连锁遗传病的患者选择后代性别,避免遗传病的发生^[1];在畜牧生产中,动物的许多重要经济性状都与性别密切相关,通过控制后代的性别,可充分发挥受性别限制的生产性状(如泌乳)和受性别影响的生产性状(如生长速度、肉质等)的优势,使肉用家畜多产公畜、乳用家畜多产母畜,满足畜牧生产需要,获得最大的经济效益^[2]。同时,优质种公畜精子的分离,不但能够提高家畜繁殖效率,也能够减少家畜性连锁遗传病的传播。另外,在品种繁育方面,精子分离技术可为育种工作者节省育种时间、精力和费用,从而加大选择强度、加快遗传进展、提高育种效率;在生态保护方面,还可挽救濒临灭绝的珍稀物种,对珍稀动物的繁殖、保种及遗传科学的发展有促进作用^[3]。

近年来,全国各级公安机关认真贯彻警犬作为技术装备配发的工作思路,随着工作犬在公安事业中的普及和各地公安部门用犬意识的提高,其作用日趋突出。在自然繁殖过程中,公犬与母犬的性别比例大约为 1:1,而在警犬实际使用过程中,由于性别差异,公、母犬在警用性能方面却各有特点^[4]。事实证明,公犬凶猛性普遍高于母犬,精力较母犬充沛,体格也大于母犬;而母犬在气味作业过程中嗅认仔细程度好于公犬,但性成熟后,母犬平均每年发情 2 次,在发情期间其警用性能普遍下降;此外,公犬比母犬更受带犬民警的欢迎。因此,根据工作犬的专业方向和公安部门对工作犬性别的要求,将性别控制技术用于警犬繁育工作中,可使工作犬繁育工

作者根据实际需要(如训练、保种等)选择工作犬的性别,以提高工作犬繁育的工作效率和工作犬的实战作用,同时加快工作犬品种改良的步伐。

自 1925 年 Lush^[5]首次尝试分离兔子精子以来,许多科学工作者对分离精子的研究作了不懈努力,依据精子的大小、形态、密度、活力、表面电荷、免疫原性等特性研究出了各种分离精子的方法。在实现性别控制的众多途径中,含 X 染色体的精子(以下简称“X 精子”)和含 Y 染色体的精子(以下简称“Y 精子”)的分离是性别控制最根本的技术手段,也是目前国际上最先进、最经济的性别控制繁育技术。为实现高水平性别控制,高效、快速的 X 精子与 Y 精子分离成为研究的焦点,以 X 精子和 Y 精子的 DNA 含量差别为基础的流式细胞仪精子分离技术是目前最科学、最可靠、最有效的哺乳动物性别控制方法。

1 流式细胞仪分离精子的原理

流式细胞仪分离哺乳动物 X 精子和 Y 精子的性别控制技术,是根据哺乳动物 X 精子的 DNA 含量比 Y 精子多的原理,利用特异性荧光染料 Hoechst33342 将精子的 DNA 染色,然后通过流式细胞仪识别并将 X 精子和 Y 精子分离开,并通过人工授精、体外受精等技术,按人们的意愿使雌性动物繁殖出所需性别后代的一种繁殖新技术。

1.1 X 精子和 Y 精子的 DNA 含量差异

在哺乳动物中,决定动物性别的关键是其所携带的性染色体,雄性动物生殖细胞经过减数分裂形成单倍体的配子后,X 精子携带 X 染色体,与卵子受精后产生雌性后代;Y 精子携带 Y 染色体,与卵

收稿日期:2013-04-24

基金项目:公安部应用创新计划项目“工作犬性别控制技术研究与应”(2011YYCXKMQ167)。

* 通讯作者

韦云芳,女,1986 年生,硕士。

子受精后产生雄性后代。通常 X 染色体较 Y 染色体大, X 精子的 DNA 含量也比 Y 精子多。目前,许多动物的 X 精子和 Y 精子 DNA 含量的差别已经通过流式细胞仪得到精确测定^[6-8]。

一般情况下,动物的 X 精子和 Y 精子 DNA 含量差异大于 3.5% 时,通过流式细胞仪就能较好地分辨和分离^[3]。犬的 X 精子和 Y 精子 DNA 含量的差异为 3.9%^[8],这就为通过分离精子进行性别控制在犬上的研究和应用奠定了理论基础。

1.2 分离原理

该技术是以生物化学、光电学、流体力学为理论依据,应用电子计算机根据 X 精子和 Y 精子性染色体 DNA 含量的微小差异,通过 X 精子和 Y 精子分离仪光电信号的互相转变,使所有活力正常的 X 精子和 Y 精子得到有效分离,而活力差、畸形、死亡的精子在分离过程中都被剔除。

精子经 Hoechst33342 染色后,通过流式细胞仪时在细微进样管液流中排成单列,高速射出喷嘴后逐个与激光交截。精子上的荧光染料 Hoechst33342 被氩离子紫外激光(约 350 nm)激发,产生蓝色激发光(约 460 nm)。由于 X 精子所含 DNA 比 Y 精子多,其结合上的荧光染料 Hoechst33342 就相对较多,所激发出的荧光就比 Y 精子更强。荧光信号通过光电倍增管探测并转变成电信号,传递给流式细胞仪的信息处理芯片,信息处理芯片迅速根据荧光强度的差别分辨出哪个是 X 精子、哪个是 Y 精子。同时,由于喷嘴产生高频率震动,高速喷射出的液流也就形成了一滴滴包含有单个 X 精子或 Y 精子的微小液滴,被分辨出的 X 精子或 Y 精子分别充上正电荷或负电荷后,在高压电场的作用下,分别落入不同的收集容器中, X 精子和 Y 精子得以分离^[9-10],如图 1 所示。

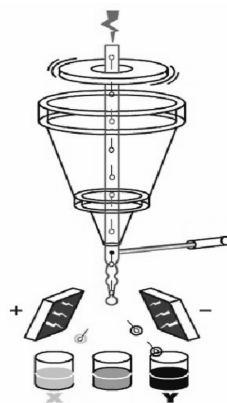


图 1 流式细胞仪分离精子过程示意图
(Cytomation 公司 SX MoFlo[®] 流式细胞仪)

小沟的腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)密集区域,即主要通过氢键、范德华力和电场相互作用力与 DNA 结合。精子上的 Hoechst33342 在激光的照射下,能定量地激发出荧光。该染料的特殊性在于不仅能渗透进入活精子,而且在适当浓度时对精子活力、受精后的胚胎和动物后代的发育都不会造成显著影响^[13-15]。Hoechst33342 的应用大大促进了哺乳动物活精子的分离研究。1989 年 Johnson 等^[16]成功进行了兔子活精子的分离实验,并通过手术法人工授精,首次得到了通过流式细胞仪分离精子的兔子后代,雄性准确率为 81%,雌性准确率为 94%,所有兔子在形态以及生育能力方面都没有因为精子分离过程而受到显著影响。这一研究成果在性别控制研究历史上具有里程碑的意义,第一次系统地向人们展示了一种科学、准确、高效的精子分离技术。

之后,活精子分离技术在其它哺乳动物中全面展开。Seidl 等^[17]用流式细胞分离法分离奶牛精子,用分离到的 X 精子输精后所产犊牛的性别准确率为 83%,而 Y 精子为 90%。Liu 等^[18]利用流式细胞分离法获得国内首批性别控制的仔猪,仔猪性别与预测的准确率达 100%。

近年来,在流式细胞仪设备本身和其分离技术的改进优化方面都取得了很大进展,尤其是在精子定向技术的改进和分离速度的提高方面。除此之外,分离后精液的保存以及冷冻技术在不断进步,而且与之相关的人工授精技术、体外受精技术也在不断完善。自 2000 年英国 Cogent 公司首先利用流式细胞仪进行牛精子分离产业化应用以来,目前已有包括美国、中国、加拿大、墨西哥、阿根廷等国家相继

2 流式细胞仪精子分离技术的研究进展

Johnson 等^[11]于 1987 年首次将荧光染料 Hoechst33342 应用于精子染色和分离。随后 Johnson 等^[12]将分离之后的精子显微注射到仓鼠卵母细胞后,发现该受精卵可发育成雄原核,证明了分离之后的精子仍然具有受精能力。Hoechst33342 是一种相对安全的活细胞荧光染料,该染料能穿透活细胞的脂质膜,以非嵌入方式特异地结合到 DNA 双链

进入精子分离产业化应用行列^[19-20],采用流式细胞仪分离猪、牛等动物的精子在国内外基本上都进入了商品化生产阶段。

3 流式细胞仪精子分离技术在工作犬繁育中的应用展望

目前,虽然在国内外诸如猪、牛等动物的性别控制精液都已进入商业化应用,但在犬性别控制的研究领域,至今尚未见到关于利用流式细胞仪分离精子生产培育犬的文献资料报道。究其原因,主要可能有:一是在实际生活和畜牧生产中,对犬实行性别控制的意义不大,只有在警犬的繁育中才显得重要;二是性别控制技术一直与其他辅助生殖技术一起被联合使用,而由于犬特殊的生理生殖特性,关于犬精子分离后的应用研究(如人工授精实验、体外受精和胚胎移植研究、单精子胞质内注射等动物繁殖新技术的研究)还不够完善,许多关键的技术性难题亟待解决。

犬的 X 精子和 Y 精子 DNA 含量差异为 3.9%,这是利用流式细胞仪分离精子实现性别控制最重要的理论基础。在此基础之上,本研究组已开展许多相关的前期工作,证实了利用流式细胞仪分离犬 X 精子和 Y 精子的可行性。除此之外,本研究组已在犬人工授精技术上取得突破性进展,并自行研发设计组装了“犬用内窥镜输精枪人工授精系统”,该系统的最大优势在于其不用通过外科手术就能将精液直接准确地输入到母犬子宫内,大大提高了精液的利用率和母犬的受孕率^[21]。因此,利用流式细胞仪精子分离技术来实现工作犬繁育中的性别控制的前景十分乐观,可更好地为公安工作服务。

参 考 文 献

- [1] LEVINSON G,KEYVANFAR K,WU J C,et al. DNA-based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the prevention of X-linked disease[J]. Human Reproduction,1995,10(4):979-982.
- [2] 张丽,杜卫华,张爱玲,等.受精环境对哺乳动物性别形成的影响[J].遗传,2007,29(1):17-21.
- [3] MAXWELL W M C,EVANS G,HOLLINSHEAD F K,et al. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox [J]. Animal Reproduction Science,2004,82/83:79-95.
- [4] 王博.性别控制技术研究现状及在警犬繁育中的应用展望[J].养犬,2009,74(2):23-24.
- [5] LUSH J L. The possibility of sex control by artificial insemination with centrifuged spermatozoa[J]. Journal of Agricultural Research,1925,30(10):893-913.
- [6] GARNER D L,GLEDHILL B L,PINKEL D,et al. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry[J]. Biology of Reproduction,1983,28(2):312-321.
- [7] LU Y Q,ZHANG M,MENG B,et al. Identification of X- and Y-chromosome bearing buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm [J]. Animal Reproduction Science,2006,95(1-2):158-164.
- [8] GARNER D L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm [J]. Theriogenology,2006,65(5):943-957.
- [9] RENS W,WELCH G R,JOHNSON L A. A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y chromosome-bearing sperm[J]. Cytometry,1998,33(4):476-481.
- [10] JOHNSON L A,FLOOK J P,HAWK H W. Sex preselection in rabbits:live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting[J]. Biology of Reproduction,1989,41:199-203.
- [11] JOHNSON L A,FLOOK J P,LOOK M V. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst33342 [J]. Gamete Research,1987,17(3):203-212.
- [12] JOHNSON L A,CLARKE R N. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm:activation and pronuclear development of sorted bull,boar,and ram sperm microinjected into hamster oocytes[J]. Gamete Research,1988,21(4):335-343.
- [13] SEIDEL G E. Economics of selecting for sex;the most important genetic trait[J]. Theriogenology,2003,59(2):585-598.
- [14] WATKINS A,CHAN P J,KALUGDAN T H,et al. Analysis of the flow cytometer stain Hoechst33342 on human spermatozoa[J]. Molecular Human Reproduction,1996,2(9):709-712.
- [15] SEIDEL G E,GARNER D L. Current status of sexing mammalian spermatozoa[J]. Reproduction,2002,124:733-743.
- [16] JOHNSON L A,FLOOK J P,HAWK H W. Sex preselection in rabbits:live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting[J]. Biol Reprod,1989,41(2):199-203.
- [17] SEIDL G E,ALLEN C H,JOHNSON L A,et al. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa[J]. Theriogenology,1997,48(8):1255-1264.
- [18] LIU H B,LV P R,YANG X G,et al. Fibroblasts from the new-born male testicle of Guangxi Bama mini-pig (*Sus scrofa*) can support nuclear transferred embryo development *in vitro* [J]. Zygote,2009,17(2):147-156.
- [19] 陆阳清,张明,卢克焕.流式细胞仪分离精子法的研究进展[J].生物技术通报,2005(3):26-30.
- [20] 徐飞良,肖兵南,李剑波.动物性别控制的研究进展[J].江西畜牧兽医杂志,2005(5):4-5.
- [21] 黎立光,陈方良,韦云芳,等.犬人工授精不同输精部位对母犬繁殖性能的影响[J].养殖与饲料,2013(3):18-20.