

# 精子性别化对乳牛性别控制的试验

罗承浩 丘陵 高萍 李安

(畜牧系遗传繁育教研室)

蔡耀恒

(农业生物系)

**摘要** 试验于1991年在华南农业大学实验乳牛场进行,初步成功地获得乳牛雌性控制率达到81.8%的国内外先进水平,计有十头乳牛产犊:二雄、九雌,其中一头产异性双犊,研究试验结果包括三个方面:一是研制成具有一定的纯度和工作效价的H-Y抗血清;二是这种H-Y抗血清IgG确实存在有抑制牛Y染色体精子的基因抗体;三是掌握H-Y抗血清IgG与牛精液发生“感作”和导致正常受孕的技术方法。试验应用免疫遗传学原理,进一步证明H-Y抗血清IgG有抑制牛Y染色体精子的受精能力而获得较高的雌性控制率,具有很大的生物科学与经济价值

**关键词** 性别控制; H-Y抗血清; 特异性荧光反应; 密度梯度离心法

乳牛性别控制是当前生物技术,遗传工程和家畜繁殖在组织开发生物技术应用研究中的一项重大攻关课题,是生物发育科学的高技术研究。试验采用H-Y抗血清感作牛精液,实现精子性别化,结合蔗糖溶液密度梯度离心法和荧光素染色标记法,目的就是在两性配子结合受精前,将x与y染色体精子加以分离和选择而达到性别控制,确是具有很大的研究价值和生产实践意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料:

- 1.公牛精液
- 2.荧光素 (Fluorescein  $C_{20}H_{12}O_5$ ), 广州化学试剂厂生产,批号881101
- 3.H-Y抗血清 IgG
- 4.不同密度梯度的蔗糖溶液: 1.12, 1.11, 1.10, 1.09, 1.08, 1.07, 1.06,
- 5.新西兰纯系小鼠、大白鼠(中山医科大学实验动物饲养场)

### 1.2 试验方法:

#### 1.2.1 H-Y抗血清的制备:

- (1)用新西兰CAD纯系小鼠提取H-Y抗原和大白鼠进行体液免疫
- (2)分离血清采用透析与滤过洗脱盐质,并用离子交换层析法进行IgG的纯化
- (3)采用环状沉淀反应与双向琼脂扩散试验测定血清效价
- (4)粗制抗血清用Sephadex G 25进一步纯化和收集活性最高组分进行理化性质鉴定

1992-04-09收稿

(5) 酶联免疫吸附双抗体夹心法进行 H—Y 抗血清 IgG 的检测

1.2.2 荧光素染色标记和 x 与 y 染色体精子的鉴别：

(1) 用蔗糖溶液密度梯度离心法分离牛 x 与 y 染色体精子

(2) 用国产荧光素染色标记 x 与 y 染色体精子，分别观察有否 F 小体的特异性荧光反应

(3) 用 H—Y 抗血清 IgG 结合定量的补体感作牛精液，然后再用荧光素染色标记和观察 F 小体的特异性荧光反应。

1.2.3 乳牛输精试验：

(1) 选择发情母牛用 H—Y 抗血清 IgG 感作过的牛精液进行输精，作为试验组。

(2) 用正常牛精液对发情母牛进行输精，作为对照组。

## 2 结果

### 2.1 乳牛输精试验 结果列于表1。

表1 H—Y 抗血清 IgG—牛精液输精的作用效果

组别	试验头数	精液种类	妊娠		产犊			备注	
			数	%	♂	%	♀		%
试验	24	H—Y 抗血清—牛精液	10	41.3	2	18.2	9	81.8	其中：一胎产异性双犊
对照	4	正常精液	20	48.7	11	52.3	10	47.7	其中：一胎产同性双犊

由表1来看，H—Y 抗血清—牛精液进行输精，其受胎率虽较对照组下降约7.5%，但对提高雌性出生率有一定效果，可达81.8%

### 2.2 荧光素对精子的染色标记 结果列于表2。

表2 荧光素对精子染色标记的效果

组别	荧光素浓度 (%)	染色的时间 (分钟)	染色程度
1	0.1	30	明显的荧光亮点
2	0.2	30	微弱的荧光点
3	0.5	30	荧光模糊不清

由表2. 可见，0.1%浓度的荧光素对精子染色标记的效果良好，可看到部分精子的头部有明显特异性荧光亮点，其它的则模糊不精。

### 2.3 H—Y 抗血清感作牛精液的荧光反应 结果见表3。

表3 H—Y 抗血清感作后精子对荧光素染色标记的效果

组别	精子量 (10 <sup>6</sup> /ml)	H—Y 抗血清量 (ml)	作用时间 min	荧光反应
1	1ml	0.3ml	10	++
2	1ml	0.3ml	20	—
3	1ml	0.3ml	30	—

由表3. 可见, H—Y 抗血清依时间的长短可作用于牛精子, 并抑制其特异性荧光反应, 经过10分钟后仍见头部有明显的荧光亮点, 20分钟后则荧光亮点全部消失。

#### 2.4 蔗糖溶液密度梯度分离牛精子试验 结果列于表4。

表4 蔗糖溶液密度梯度对精子分布及对荧光素反应的影响

序 别	蔗糖溶液密度	精子分布状况	荧光反应
1	1.06	无	—
2	1.07	无	—
3	1.08	悬浮混浊	+
4	1.09	悬浮混浊	+
5	1.10	悬浮混浊	+
6	1.11	块状沉淀	—
7	1.12	块状沉淀	—

说明: 离心速度均为3000转/分, 离心时间为30分钟

由表4. 说明, 精子分布依比重不同而有很大的差异, 悬浮混浊液内是游离分散的精子, 呈现弱荧光亮点; 块状沉淀液内是浓缩聚集的精子, 无特异性荧光亮点。前者被认为是 y 染色体精子, 后者是 x 染色体精子。

### 3 讨论

乳牛性别控制当今仍然是一个重要的研究课题, 许多专家的研究方法不尽相同, 所获得的结果亦不全一致。本试验采用 H—Y 抗血清感作牛精液, 实现精子性别化而获得雌性控制率达81.8%的国内外先进水平。哺乳动物胚胎时期的性腺具有既向雄性分化亦可向雌性分化的双向性潜能。H—Y 抗原正是这种具有可诱发原始性腺分化为睾丸的潜能, 它是由位于 y 染色体上的基因位点所编码的。H—Y 抗原的结构基因与睾丸分化的启动密切相关, 一旦睾丸细胞形成, 便可分泌睾丸激素阻止性腺发展为雌性表现型的趋势。但是, 雄性动物的 H—Y 抗原对雌性动物发生免疫作用后, 在雌性动物的血清中即存在有排斥 y 染色体精子的基因抗体, 简称为 H—Y 抗血清 IgG, 它可封闭 Y 染色体精子细胞膜上的 H—Y 抗原。所以试验采用 H—Y 抗血清与牛精液发生感作, 目的就是使 Y 精子失去 H—Y 基因产物, 失去 Y 精子 F 小体的活性。此外, 哺乳动物的 H—Y 抗原均具有血清凝集交叉反应的特性, 无论小白鼠, 大白鼠与牛的 H—Y 抗原均极相似, 因而试验采用大白鼠的 H—Y 抗血清 IgG 就具有抑制牛 Y 染色体精子的作用。

试验结果表明, 国产荧光素以0.1%浓度直接染色标记牛 Y 染色体精子效果较明显, F 小体可呈现特异性荧光反应, 可见其头部出现有区别于 X 染色体精子的特异性荧光亮点。Asperson 的奎纳克林—马斯塔氏法对男性染色体, 发现 Y 染色体长臂发出的荧光较强些, 并且在细胞分裂期间可出现更强的斑点, 这称为 F 小体, 凡呈现 F 小体的一定是 Y 精子, 否则便是 X 精子。本试验所观察到牛 Y 染色体精子 F 小体与其研究结果相一致, 均呈现特异性荧光反应。

试验结果亦表明, 蔗糖溶液密度梯度离心法分离牛 X 与 Y 精子是成功的。Rohde (1975) 曾用密度梯度离心法对人的精子进行分离, 获得上层的精液多是 Y 精子, 下层则是 X 精子。Shastry (1977) 亦曾用聚蔗糖胶体密度梯度离心法分离出73%以上的 Y 精子。Percoll

密度梯度离心法(1988)用改进的胶质状硅胶亦分离出人的 X 与 Y 精子.本试验采用的蔗糖溶液密度梯度离心法分离牛 X 和 Y 精子与彼等的研究结果亦相一致,精子依其物理特性的不同而分布亦殊异,可见蔗糖溶液密度梯度离心法是分离牛 X 与 Y 精子的一种最简易而最有效的技术方法。

### 参 考 文 献

1. 王梦玖, 腾春英. 产科免疫学. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1985, 408~414
2. 林剑. 免疫遗传学基础. 北京: 北京大学出版社, 1982. 383~396
3. 柳田情司. X 与 Y 精子分离实验动态. 国外畜牧科技, 1989, (2): 216~1
4. Mohri H. 哺乳动物 X 精子和 Y 精子的分离及特点. 国外畜牧科技, 1988, (3): 15~4
5. Palmer M S. 性别决定基因. 国外畜牧科技, 1989, (3): 18~1
6. Ogawa H, Yamakawa J D. Are Fluorescent bodies of Y-spermatozoa detectable in common with Mammalian species. Theriogenology May 1988, 29, (5): 1083~1089
7. Pearson P L, Bobrow M. el. Fluorescent Staining of the Y chromosome in meiotic stage of the human male. J Reprod Fertil, 1970, 22, (1): 177~179
8. Satoru Kaneko, Jun Yamaguchi. el. Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll Density Gradient Centrifugation. Fertility and Sterility, 1983, 40, (3): 661~665

## A TRIAL OF SEXING SPERM FOR SEXING CONTROL IN DAIRY CATTLE

Luo Cheng Hao\*      Cai Yao Huan\*\*      Qiong Ling\* et.

(\*Dept. of Animal Husbandry, \*\*Dept. of Agricultural Biology)

**Abstract** This trial was proceeded in the experimental dairy farm at South China Agricultural University in 1991 and the primary coefficient of female control was successfully reached to 81.8% at an advanced level between the internal and outside the country. As a result of the trial, 11 calves were born by 10 cows, including a twin of sexuality at birth. It is of immense values to biological science and economy for this trial. It was found that it is possible for realizing of sexing sperm by treating of bovine semen with H-y antiserum IgG. It was also an evidence of using Density Gradient Centrifugation of Sucrose solution and Fluorescent Staining for inspection of the effectiveness of H-Y antiserum IgG. We observed that the H-Y antiserum IgG showed marked effect of inhibition on Y-bearing sperm, so that we can achieve a good result of sexing control in dairy cattle.

**Key words** Sexing Control; H-Y antiserum IgG; Fluorescent staining for inspection; Density Gradient Centrifugation