



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106544411 A

(43)申请公布日 2017.03.29

(21)申请号 201610750135.9

(22)申请日 2016.08.27

(71)申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72)发明人 张淑君 刘方 周浩 上官爱哨  
杨利国 南良康 梁秋曼

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001  
代理人 张红兵

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页  
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法

(57)摘要

本发明属于免疫分析技术领域,具体涉及一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法。利用免疫荧光、免疫印迹和流式细胞仪分析,确定了在Y精子中表达和定位于Y精子顶体部分的基因蛋白TSPY。本发明的蛋白TSPY可在哺乳动物X和Y精子的分离中作为Y精子标识抗原蛋白应用。该Y精子标识蛋白TSPY可在哺乳动物精液中X和Y精子分离中作为Y精子标识抗原蛋白,所述的哺乳动物包括牛、羊、猪、兔、马等,但不包括人类。本发明的Y精子标识蛋白用于分离X和Y精子具有准确、快速、简便、成本低、设备简单、对精子伤害小等优势,适于动物生产中应用。

1. 一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法,其特征在于,包括下述步骤:

(1) 利用免疫荧光方法检测TSPY蛋白在牛精子顶体部分中表达

取适量荷斯坦奶牛精液加入磷酸盐缓冲液(PBS),使精子浓度达到 $10^5$ 个/ml,再取100ul荷斯坦奶牛精液涂于经多聚赖氨酸处理过的载玻片上,通风晾置数分钟;用浓度为0.5% TritonX100/PBS缓冲液通透5min;再用浓度为5%的牛血清白蛋白(BSA)/PBS缓冲液封闭30min;在样品表面均匀涂抹上浓度为1%的体积比为1:100稀释的BSA/PBS稀释的TSPY蛋白抗体,4℃孵育过夜,用浓度为1%的BSA/PBS洗5min/3次;用体积比为1:200的1%BSA/PBS稀释液的荧光二抗羊抗兔Cy3稀释液,37℃孵育1小时,用PBS洗5min/3次;加入DAPI染核10min;加抗荧光淬灭剂封片,置于荧光显微镜下观察;检测TSPY蛋白在荷斯坦奶牛精子中的表达和定位;

(2) 利用Western Blotting检测TSPY蛋白在牛Y精子中的表达

1) 分别提取荷斯坦奶牛商业性控X精液和Y精液的蛋白,进行Western Blot分析,实验验证TSPY蛋白在奶牛X和Y精子中的差异化表达,并利用Image J软件进行相关的统计学分析;

2) 提取商业化的荷斯坦奶牛X精液和Y精液中的总蛋白,利用Western Blotting检测TSPY蛋白抗体与TSPY蛋白结合情况,用Image J扫描Western Blot结果灰度值,检测X精子中存在少量的TSPY蛋白表达,得到包含TSPY蛋白的Y精子的标识蛋白;

3) 以TSPY蛋白为Y精子标识蛋白,利用TSPY蛋白抗体分离X精子和Y精子,用流式细胞仪分析分离出的X精子和Y精子的纯度;

4) 将荷斯坦奶牛精子与TSPY抗体以体积比为1:100混合,在37℃孵育40min,再与体积比为1:200的FITC羊抗兔荧光二抗在37℃孵育40min,洗涤后利用流式细胞仪分选出TSPY阳性精子,该精子即为Y精子,和TSPY阴性精子,该精子即为X精子;

5) 利用流式细胞仪分别检测分离出的X精子和Y精子的纯度,将分离出的X精子和Y精子分别再放入流式细胞仪中,分析它们与TSPY蛋白抗体结合的阳性比率;

其中

上述步骤中所述的TSPY蛋白的Y精子的标识蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

(3) 利用基因SRY-PCR检测分离出的X精子和Y精子的纯度

1) 分别提取分离Y精子和分离X精子以及来自商业化的同一头荷斯坦奶牛的X精液、Y精液和普通精液基因组DNA,用半定量SRY-PCR检测Y精子比例,检测分离出的X精子和Y精子的纯度,分别扩增各样本的SRY基因序列,所述的SRY基因的登陆号为ID:280931,用Image J软件统计分析扩增结果的琼脂糖凝胶电泳图的灰度值;

2) 合成所述的SRY基因的扩增引物对,该引物对的序列如下所示:

上游引物:CATTCATCGTGTGGTCTCGCGA,

下游引物:GCCTCCGACGAGGTCGATACT-3;

3) 提取5个样本DNA进行PCR扩增,利用琼脂糖凝胶电泳分析所有样品,以登陆号为ID:281181的GAPDH基因作为内参基因,合成如下所述的引物对,其引物对的序列如下所示:

上游引物:CTCACATTCCTAAGTCCGCTTT,

下游引物:GTCCCTGAGCTTTGTCCTGTC 3.

2. 如权利要求1所述的一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法,其特征在于,所述的方法还包括在检测试剂盒、抗体-流式细胞仪、抗体-磁珠或抗体直接作用于精子的应用。

3. 如权利要求1所述的一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法,其特征在于,所述的哺乳动物,包括牛、猪、羊、马、兔,但不包括人类。

## 一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析技术领域,具体涉及一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法。所述的哺乳动物包括牛、羊、猪、兔、马等,但不包括人。

### 背景技术

[0002] 在畜牧业生产中,新生仔畜的性别比例已经成为影响畜牧业经济效益的重要因素。例如,在奶牛养殖中,人们更希望母畜在新生仔畜中占更高的比例。此外,性别选择可以避免伴性疾病在畜群中传播。所以在不影响母畜受胎率的情况下,实现对怀孕母畜后代性别的控制对于畜牧业至关重要。然而,目前得到广泛应用的高效而便利的性别控制方法还不断研究和完善中,其中利用免疫学原理和抗原抗体特异免疫反应技术进行X和Y精子的分离的策略之一。

[0003] 目前,应用于X/Y精子分离的方法包括:电泳法、白蛋白柱分离法、Percoll密度梯度离心法、免疫法和流式细胞仪分离法。其中分离效果最稳定、纯度最高的是流式细胞分离技术,流式细胞仪可识别因X和Y精子DNA含量差异而携带不同的荧光染色信号,从而分离X和Y精子,其分离纯度可达90%,在奶牛业中得到一定的应用。虽然流式细胞法在分选速度和纯度上都有所提高,但该方法因设备高昂、成本高、分离对精子造成伤害、购买知识产权等缺点或不足限制了其在生产中的应用。所以,根据抗原和抗体特异结合的原理的免疫法分离X和Y精子,具有高特异性、高效率、低成本的优势,应用前景广阔。

[0004] 如果能够找到X和Y精子中特异表达或显著表达差异的精子膜蛋白,即X精子或Y精子标识蛋白,则可根据抗原抗体特异性结合建立免疫分离X和Y精液技术,有望以较低的成本、快速地实现对X和Y精子的分离,有可能满足生产中对性控精液的需要。

[0005] X精子或Y精子标识蛋白用于分离性别控制X和Y精子的原理:将X精子或Y精子标识蛋白作为抗原,利用其相应的抗体,进行抗原与抗体特异性结合的免疫反应,这种抗原抗体结合的特异性是指抗原表位与抗体超变区结合的特异性,是由两者在化学结构和空间构型上呈互补关系所决定的,故而两者结合高效且特异。

### 发明内容

[0006] 本发明目的在于克服现有技术的缺陷,建立一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法,本发明利用免疫荧光、免疫印记和流式细胞仪等技术分析和鉴定出了在动物Y精子中表达和定位于Y精子顶体部分的基因蛋白TSPY(testis-specific protein Y encoded,睾丸特异性蛋白),提供了一种可用于哺乳动物(包括牛、羊、猪、兔、马等,但不包括人类)性控X和Y精子分离的Y精子标识抗原蛋白TSPY,该蛋白可用于Y精子的生物标识物,用于哺乳动物性别控制X和Y精子的分离,为哺乳动物性别控制、改变哺乳动物性别比例和提高生产效率提供技术支持。

[0007] 本发明的技术方案如下所述:

[0008] 申请人提供了一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法。

[0009] 所述的动物Y精子分型方法包括检测试剂盒、抗体-流式细胞仪、抗体-磁珠或抗体直接作用精子等的应用。

[0010] 所述应用的哺乳动物,包括牛、猪、马、兔,但不包括人类。

[0011] 本发明的Y精子的标识蛋白TSPY(testis-specific protein Y encoded,睾丸特异性蛋白)位于Y精子顶体部分,TSPY标识蛋白的抗体能特异性识别和结合含标识蛋白TSPY的Y精子,而不能与不含标识蛋白TSPY的X精子结合,根据抗体是否与精子结合而达到分离X和Y精子的目的。

[0012] TSPY可以作为一个重要的Y精子的标识蛋白,可将Y精子从哺乳动物精液中分离出来,分别获得X精子和Y精子的性别控制精液。为以后免疫法分离X和Y精子的研究提供了新的思路,具有重大的理论意义和潜在的使用价值。

[0013] 具体地,本发明的应用步骤如下所述:

[0014] 申请人提供了一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法,包括下述步骤

[0015] 利用免疫荧光技术首次证实了TSPY基因蛋白在精子顶体部分表达且在Y精子中表达,是Y精子标识基因蛋白。

[0016] 为了进一步分析TSPY蛋白在精子中表达和定位,利用免疫印记技术分析和确定了TSPY基因蛋白在动物Y精子中表达和定位于Y精子顶体部分,利用TSPY抗体采用流式细胞仪技术分离出了Y精子和X精子,Y精子纯度至少可达82.20%。并用建立的基因SRY-PCR技术验证了分离出的X精子和Y精子的纯度,得到结果稳定可靠。

[0017] 本发明分离精子具有快速、准确、简便、成本低、设备简单等优势,适于在性控动物大规模生产中应用。本发明为哺乳动物性别控制技术的研发和性别分化机理的研究提供了基础,具有重要的理论意义和潜在的应用价值。

[0018] 1、利用免疫荧光方法检测TSPY蛋白在牛精子顶体部分中表达

[0019] 取适量优化荷斯坦奶牛精液加入磷酸盐缓冲液(PBS),使精子浓度达到 $10^5$ 个/ml,再取100ul处理过的精液涂于经多聚赖氨酸处理在过的载玻片上,通风晾置数分钟;用浓度为0.5% TritonX100/PBS通透5min;再用浓度为5%的牛血清白蛋白(BSA)/PBS封闭30min;在样品表面均匀涂抹上用浓度为1%的体积比为1:100稀释的BSA/PBS稀释TSPY蛋白抗体,4℃孵育过夜,用浓度为1%的BSA/PBS洗5min/3次;用体积比为1:200的1%BSA/PBS稀释液的荧光二抗羊抗兔Cy3)稀释液,37℃孵育1小时,用PBS洗5min/3次;加入DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)染核10min;加抗荧光淬灭剂封片,置于荧光显微镜下观察;检测TSPY蛋白在荷斯坦奶牛精子中的表达和定位;

[0020] 2、利用Western Blotting检测TSPY蛋白在牛Y精子中的表达

[0021] (1) 分别提取荷斯坦奶牛商业性控X精液和Y精液的蛋白,进行Western Blot分析,实验验证TSPY蛋白在牛X和Y精子中的差异化表达,并利用Image J软件进行相关的统计学分析;

[0022] (2) 提取商业化的荷斯坦奶牛X精液、Y精液中总蛋白,利用Western Blotting检测TSPY蛋白抗体与TSPY蛋白结合情况,用Image J扫描Western Blot结果灰度值,检测X精子中存在少量的TSPY蛋白表达,得到包含TSPY蛋白的Y精子的标识蛋白;

[0023] (3) 以TSPY蛋白为Y精子标识蛋白,利用TSPY蛋白抗体分离X精子和Y精子,用流式

细胞仪分析分离出的X精子和Y精子的纯度

[0024] (4) 将荷斯坦奶牛精子与TSPY抗体以体积比为1:100混合,在37℃孵育40min,再与体积比为1:200的FITC羊抗兔荧光二抗在37℃孵育40min,洗涤后利用流式细胞仪分选出TSPY阳性精子,该精子即为Y精子,和TSPY阴性精子,该精子即为X精子;

[0025] (5) 利用流式细胞仪分别检测分离出的X精子和Y精子的纯度,将分离出的X精子和Y精子分别再放入流式细胞仪中,分析它们与TSPY蛋白抗体结合的阳性比率;

[0026] 其中

[0027] 上述TSPY蛋白的Y精子的标识蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

[0028] 3、利用基因SRY-PCR检测分离出的X精子和Y精子的纯度

[0029] (1) 分别提取分离Y精子和分离X精子以及来自商业化的同一头荷斯坦奶牛X精液、Y精液和普通精液基因组DNA,用半定量SRY-PCR检测Y精子比例,检测分离出的X精子和Y精子的纯度,分别扩增各样本的SRY基因序列(登陆号为ID:280931),用Image J软件统计分析扩增结果的琼脂糖凝胶电泳图的灰度值;

[0030] (2) 合成登陆号为ID:280931的SRY基因的扩增引物对,该引物对的序列如下所示:

[0031] 上游引物CATTTCATCGTGTGGTCTCGGA,

[0032] 下游引物GCCTTCCGACGAGGTCGATACT-3;

[0033] (3) 提取5个样本DNA进行PCR扩增,利用琼脂糖凝胶电泳分析所有样品,以登陆号为ID:281181的GAPDH基因作为内参基因,合成如下所述的引物对,该引物对的序列如下所示:

[0034] 上游引物:CTCACATTCTAAGTCCGCTTT,

[0035] 下游引物GTCCCTGAGCTTTGTCCTGTC 3。

[0036] 本发明的有益效果如下:

[0037] (1) 本发明首次发现TSPY基因蛋白可以作为奶牛Y精子的重要标识蛋白,并可用于X和Y精子的分离,为奶牛性控精子筛选提供了重要的资源。

[0038] (2) 本发明利用免疫荧光、免疫印记和流式细胞仪等技术分析和确定了TSPY基因蛋白在动物Y精子中表达和定位于Y精子顶体部分,为精准筛选X和Y精子和定性筛选奶牛提供了简便、快捷的方法。

[0039] (3) 本发明定性分离Y精子的纯度达到82.20%。

[0040] 更详细的技术方案及其效果《参见具体实施方式》。

## 附图说明

[0041] 图1:是本发明的Y精子标识TSPY蛋白在奶牛精子顶体部分上的表达定位图(放大200倍)附图标记说明:A.D.G代表只用DAPI染细胞核呈现的蓝色荧光;B.E.H代表ZFY抗体与相应的蛋白结合呈现的红色荧光;C.F.I代表同一个视野中细胞核和ZFY蛋白荧光的合成。

[0042] 图2:利用免疫印记(Western Blotting)方法检测Y精子标识TSPY蛋白在性控X精子和性控Y精子中的表达差异和灰度值比较。附图标记说明:图2中的A图是用Western Blotting检测TSPY蛋白在性控X精子和性控Y精子中的表达差异。图2中的B图是用ImageJ软件统计灰度值比较;\*\*\*P<0.0001;数据以Mean±SD表示,n=3。

[0043] 图3:检测基于Y精子标识TSPY蛋白抗体分离精子的纯度。附图标记说明:图3中的A

图是阴性对照;图3中的B图为普通精子;图3中的C图为分离X精子;图3中的D图为分离Y精子。

[0044] 图4:分离精子DNA中基因SRY-PCR的扩增产物量比较的电泳图。

### 具体实施方式

[0045] 实施例1:

[0046] 1、利用免疫荧光技术证实TSPY蛋白在牛精子顶体部分中表达

[0047] 取适量优化荷斯坦奶牛精液加入PBS(磷酸盐缓冲液,购于Hyclone公司),使精子浓度达到 $10^5$ 个/ml,取100ul精液涂于经多聚赖氨酸处理过的载玻片(购于武汉博士德生物工程有限公司)上,通风晾置数分钟(不能干透);用浓度为0.5%TritonX100/PBS(购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)通透5min;再用浓度为5%的牛血清白蛋白BSA/PBS封闭30min;在样品表面均匀涂抹上浓度为1%的BSA/PBS稀释的(按体积比为1:100稀释)TSPY蛋白抗体(购自Abclonal公司,货号A6270),4℃孵育过夜,浓度为1%的BSA/PBS洗5min/3次;荧光二抗羊抗兔Cy3稀释液((购于武汉博士德生物工程有限公司),货号ba1032,按体积比为1:200的1%BSA/PBS稀释液稀释)37℃孵育1小时,PBS洗5min/3次;加入(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)DAPI染核10min;加抗荧光淬灭剂(购自ThermoFisher公司)封片,置于荧光显微镜下观察。

[0048] 本发明利用TSPY蛋白抗体和免疫荧光技术,检测TSPY蛋白在荷斯坦奶牛精子中的表达和定位,图1表明TSPY基因蛋白在精子的顶体部分中表达。检测效果见表1。

[0049] 2、利用免疫印记(Western Blotting)技术证实TSPY蛋白在牛Y精子中的表达

[0050] 试验分别提取荷斯坦奶牛商业性控X精液和Y精液的蛋白,进行Western Blot分析,实验验证TSPY蛋白在牛X和Y精子中差异化表达,并利用Image J软件进行相关的统计学分析。

[0051] 为证实TSPY蛋白在奶牛Y精子上中表达,本发明分别从商业化的荷斯坦奶牛X精液、Y精液(购自内蒙古赛科星繁育生物技术(集团)股份有限公司)中提取总蛋白,利用Western Blotting技术进行检测TSPY蛋白抗体与TSPY蛋白结合情况,如图2中的A图。用Image J扫描Western Blot结果灰度值,结果如图2中的B图所示。发现TSPY蛋白在Y精子中表达量极显著地高于X精子( $P < 0.01$ )。同时也发现在X精子中存在少量的TSPY蛋白表达,其原因是目前商业化的性控精液中X精子纯度只有90%左右,还存在约10%的Y精子。

[0052] 由图2的结果证实:TSPY蛋白在Y精子中的表达,因此TSPY蛋白可望作为Y精子的标识蛋白。

[0053] 实施例2:

[0054] 1、TSPY蛋白作为Y精子标识蛋白,利用TSPY蛋白抗体分离X精子和Y精子,并用流式细胞仪分析分离出的X精子和Y精子的纯度

[0055] 将优化的荷斯坦奶牛精子与实施例1中TSPY抗体(奶牛精子与TSPY抗体的体积比为1:100)37℃孵育40min,再与FITC羊抗兔荧光二抗(购于武汉谷歌生物科技有限公司,货号GB22303,体积比为1:200)37℃孵育40min,洗涤后利用流式细胞仪(美国BD公司,FACSAria 111)分选出TSPY阳性精子(即为Y精子)和TSPY阴性精子(即为X精子)。

[0056] 利用流式细胞仪分别对以上分离出的X精子和Y精子进一步检测其纯度,将分离出

的X精子和Y精子分别再放入流式细胞仪(美国BD公司,FACSAria 111)中,分别分析与TSPY蛋白抗体结合的阳性比率,用于分析分离精子的纯度。

[0057] 试验结果见图3。我们将图3的结果统计显示在表1中:

[0058] 表1利用流式细胞仪分析技术分析基于TSPY蛋白抗体分离精子的纯度

分离精子	TSPY 蛋白抗体结合阳性率 (%)	TSPY 蛋白抗体结合阴性率 (%)
分离 Y 精子	82.20	18.80
分离 X 精子	1.30	98.70

[0060] 试验表明,本发明分离出的Y精子能与TSPY蛋白抗体结合的阳性率为82.20%,即分离Y精子中含Y精子比例为82.20%,含X精子比例18.80%。分离出的X精子与TSPY蛋白抗体结合的阳性率为1.30%,表明分离X精子中含Y精子比例为1.30%,含X精子比例98.70%。。

[0061] 因此,本发明利用TSPY蛋白抗体分离X精子和Y精子的纯度较高,适合特定性控经济动物的生产。

[0062] 3、利用基因SRY-PCR技术分析分离出X精子和Y精子的纯度

[0063] 分别提取分离Y精子和分离X精子以及商业化同一头荷斯坦奶牛X精液、Y精液和普通精液(购于内蒙古赛科星公司)的基因组DNA(常规方法),用半定量SRY-PCR技术检测Y精子比例的方法分析分离出X精子和Y精子的纯度,分别扩增各样本的SRY序列,用Image J软件统计分析扩增结果的琼脂糖凝胶电泳图的灰度值。

[0064] 合成SRY基因(基因ID:280931)的引物对,其序列如下:

[0065] 上游引物5'-CATTCATCGTGTGGTCTCGCGA-3',

[0066] 下游引物5'-GCCTTCCGACGAGGTCGATACT-3';

[0067] 对以上提取5个样本DNA进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳分析所有样品,以GAPDH(基因ID:281181)作为内参基因,合成引物对(上游引物5'CTCACATTCCTAAGTCCGCTTT 3';下游引物5'GTCCCTGAGCTTTGTCCTGTC 3')。

[0068] 表2 PCR反应条件

反应体系	体积 (μl)
MIX	5
模板 DNA	1
引物	0.2
ddH <sub>2</sub> O	3.6
总体积 (μl)	10

[0070] 表3 PCR反应程序

反应程序	温度	时 间	循环数
预变性	94℃	5min	1
变性	94℃	30sec	35
退火	T	30sec	
延伸	72℃	30sec	
延伸	72℃	10min	1
降温	16	10min	

[0071] 图4中的A图表明：在分离Y精子、普通精子、性控Y精子的DNA样本中，能得到较高的基因SRY-PCR扩增产物；而在分离X精子、性控X精子的DNA样本中，存在少量的PCR产物。通过对SRY/GAPDH的灰度比值比较分析（如图4中的B图显示），分选出的TSPY阳性结合精子中Y精子的含量与商业流式细胞仪分离出的Y精子含量差异不显著。TSPY阴性结合精子中Y精子含量极显著（ $P < 0.01$ ）高于商业X精子，但极显著（ $P < 0.01$ ）低于未分选精子。

[0072] 上述结果表明：本发明利用TSPY蛋白抗体分离阳性精子中Y精子纯度与商业性控Y精子的纯度相当，分选出的TSPY阴性精子中X精子的含量显著提高，但是本发明的分离成本明显低于流式细胞仪的方法，可以大大节约分离特定性控精子的成本和效率。

[0073] 主要参考文献：

[0074] 1. 张淑君等. 牛早期胚胎性别鉴定的分子生物学方法. 中国发明专利公开说明书, 公开号: CN101475989A. 2009-07-08, 中华人民共和国国家知识产权局.

[0075] 2. 王栋等, 一种检测牛X、Y精子分离纯度的方法. 中国发明专利公开说明书, 公开号: CN101935698A. 2011-01-05; 中华人民共和国国家知识产权局.

[0076] 3. Adham Fani Maleki等, Introducing and validation of SYBR Green Real-Time PCR method to determinate sex ratio in bovine semen. Animal Reproduction Science, 2013, 140:1-6.

[0077] 4. Garner DL, 等, .History of commercializing sexed semen for cattle. Theriogenology, 2008, 69 (7) :886-895.

[0078] 5. Bermejo-Alvarez P等, Can bovine in vitro-matured oocytes selectively process X-or Y-sorted sperm differentially. Biol Reprod, 2008, 79 (4) :594-597.

<110> 华中农业大学

<120> 一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物 Y 精子分型的方法

<130>

<141> 2016-08-19

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 281

<212> PRT

<213> 睾丸特异性蛋白

<220>

<221> BIND\_DNA

<222> (1)..(281)

[0001]

<223>

<400> 1

Gln Val Val Ser Pro Val Val Thr Pro Gly Gln Glu Ala Thr Leu Phe  
1                    5                    10                    15

Arg Val Glu Ala Val Glu Glu Gly Glu Ala Leu Val Asp Gly Asp Val  
                  20                    25                    30

Ala Gly Ile Gly Arg Glu Phe Gln Leu Leu Ala Glu Asp Ile Val Glu  
                  35                    40                    45

Glu Val Glu Val Val Ala Asp Glu Glu Gln Glu Gln Arg Pro Ser Gln  
                  50                    55                    60

Glu Leu Glu Glu Lys Thr Val Glu Glu Gln Gly Gln Glu Arg Pro Gly  
65                    70                    75                    80

Gly Pro Cys Glu Arg Gln Glu Leu Asp Ala Leu Gln Ala Leu Ala Ala  
 85 90 95

Leu Gln Val Glu Leu Ser Ser Glu Arg Glu Gln Asn Arg Arg Ala Tyr  
 100 105 110

Val Gln Phe Met Arg Lys Asn His Gln Arg Arg Lys Arg His Leu Ala  
 115 120 125

Arg Arg Ser Ala Ile Ile Gln Gly Ile Pro Gly Phe Trp Ala Lys Ala  
 130 135 140

Ile Met Ser His Pro Gln Val Ser Val Leu Ile Ser Asp Gln Asp Gln  
 145 150 155 160

[0002] Asp Phe Leu Gly Tyr Met Met Asp Leu Lys Val Gln Val Arg Ser His  
 165 170 175

Pro Pro Ser Arg Cys Lys Leu Ile Phe Ser Phe Arg Asp Asn Pro Tyr  
 180 185 190

Phe Leu Asn Ser Val Ile Ile Lys Glu Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Gly  
 195 200 205

Tyr Arg Ala Arg Arg Ser Thr Pro Val His Trp Phe Trp Asp Phe Glu  
 210 215 220

Arg Gly Ala Pro Ser Arg Arg Leu Asp Thr Arg Ser Leu Asn Phe Leu  
 225 230 235 240

Asn Trp Leu Ser Gly His Asn Gly Pro Glu Ser Asn Arg Ile Ala Glu  
 245 250 255

---

Ile Ile Ser Glu Asp Val Trp Asp Asp Pro Leu Lys Tyr Tyr Leu Arg  
260 265 270

[0003]

Glu Glu Gly Ser Ser Met Arg Asp Asn  
275 280

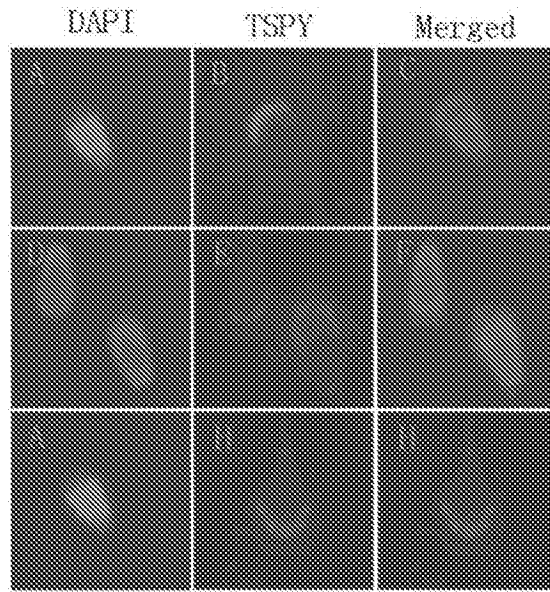


图1

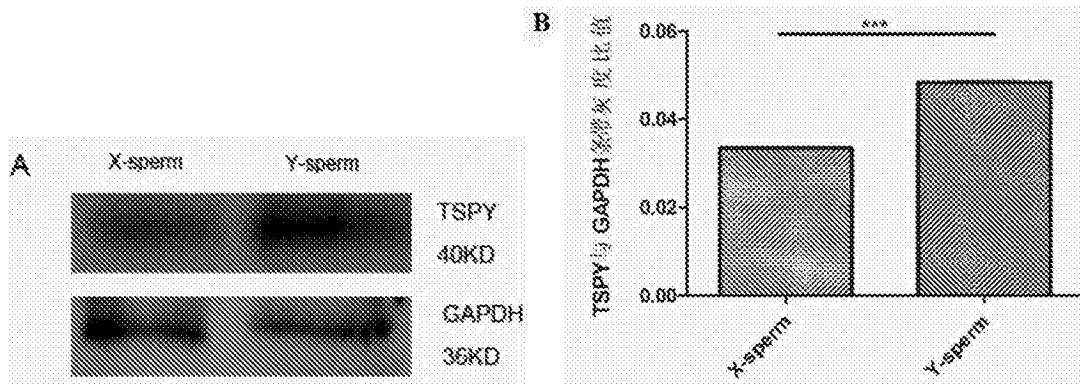


图2

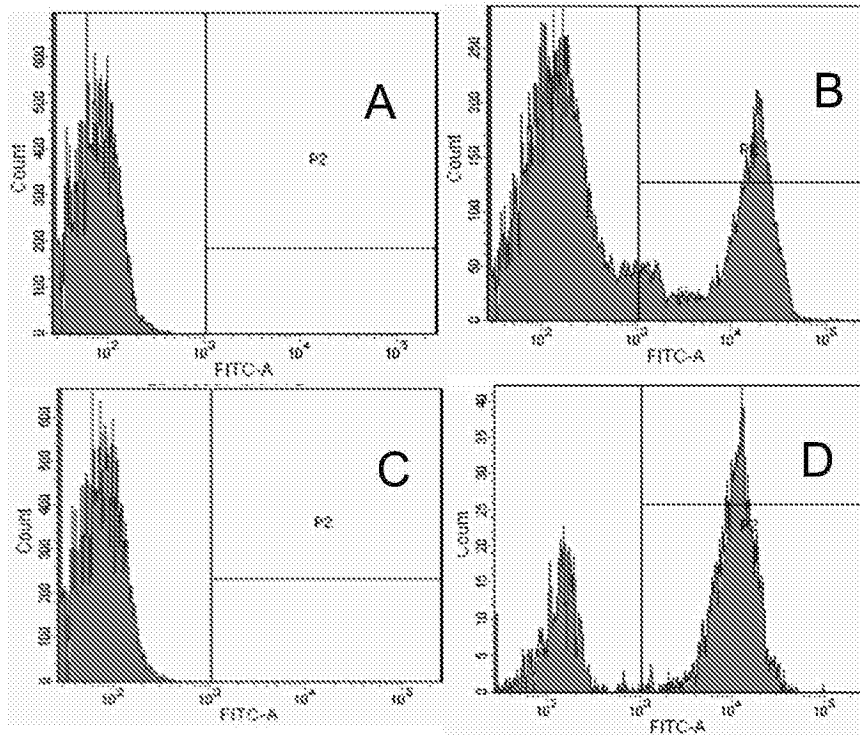


图3

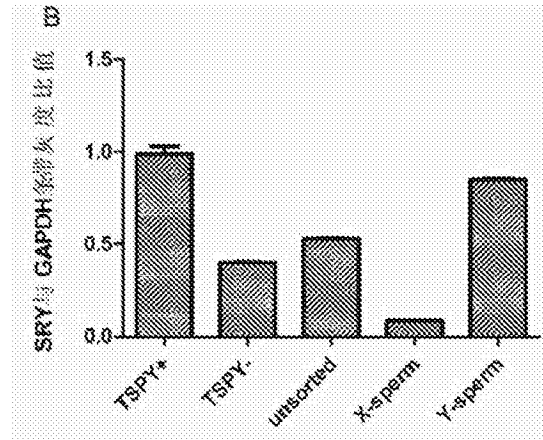
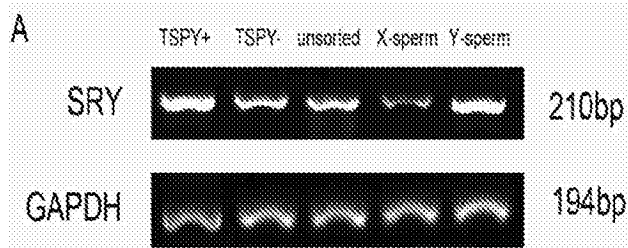


图4

专利名称(译)	一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106544411A</a>	公开(公告)日	2017-03-29
申请号	CN201610750135.9	申请日	2016-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	张淑君 刘方 周浩 上官爱哨 杨利国 南良康 梁秋曼		
发明人	张淑君 刘方 周浩 上官爱哨 杨利国 南良康 梁秋曼		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/533 G01N33/68 G01N15/14		
CPC分类号	G01N33/68 C12Q1/686 G01N15/14 G01N33/533		
代理人(译)	张红兵		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于免疫分析技术领域，具体涉及一种利用标识蛋白分析鉴定哺乳动物Y精子分型的方法。利用免疫荧光、免疫印迹和流式细胞仪分析，确定了在Y精子中表达和定位于Y精子顶体部分的基因蛋白TSPY。本发明的蛋白TSPY可在哺乳动物X和Y精子的分离中作为Y精子标识抗原蛋白应用。该Y精子标识蛋白TSPY可在哺乳动物精液中X和Y精子分离中作为Y精子标识抗原蛋白，所述的哺乳动物包括牛、羊、猪、兔、马等，但不包括人类。本发明的Y精子标识蛋白用于分离X和Y精子具有准确、快速、简便、成本低、设备简单、对精子伤害小等优势，适于动物生产中应用。

分离精子	TSPY 蛋白抗体结合阳性率 (%)	TSPY 蛋白抗体结合阴性率 (%)
分离Y精子	82.20	18.80
分离X精子	1.30	98.70