

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/546 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410040793.6

[43] 公开日 2006年4月5日

[11] 公开号 CN 1755366A

[22] 申请日 2004.9.30

[21] 申请号 200410040793.6

[71] 申请人 深圳华康生物医学工程有限公司

地址 518054 广东省深圳市南山区南油粤海  
工业区四栋五楼

[72] 发明人 傅剑华 刘瑜 胡家纯 何林  
何小红

[74] 专利代理机构 深圳创友专利商标代理有限公司  
代理人 彭家恩

权利要求书 2 页 说明书 8 页

### [54] 发明名称

精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测试剂及  
免疫微球的制备方法

### [57] 摘要

本发明公开一种精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测试剂，包括抗血清和免疫微球，所述免疫微球的直径为 1.8um ~ 2.2um。直径为 1.8um ~ 2.2um 的免疫微球，大小一致、易于与精子相互凝集，从而在结合有抗精子抗体的阳性精子表面形成的凝集颗粒大小适中，易于观察结果，且结果的准确性更高；否则会出现假阳性结果。还提出一种免疫微球的制备方法，包括如下步骤：1) 洗去羧化胶乳中为保存而加入的稳定成分，所述羧化胶乳的直径为 1.8um ~ 2.2um；2) 活化步骤 1) 所述的羧化胶乳表面的羧化基团；3) 使人 IgG 包被在步骤 2) 所述羧化胶乳表面的活化基团上面；4) 封闭羧化胶乳表面未结合抗体的羧化基团，得到免疫微球。

1、一种精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测试剂，包括抗血清和免疫微球，其特征在于：所述免疫微球的直径为  $1.8\mu\text{m}\sim 2.2\mu\text{m}$ 。

2、根据权利要求 1 所述的精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测试剂，其特征在于：还包括磷酸盐缓冲液，所述免疫微球在磷酸盐缓冲液中的体积含量为  $1\sim 2\%$ 。

3、根据权利要求 2 所述的精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测试剂，其特征在于：所述免疫微球是结合有反应量的人 IgG 的羧化胶乳。

4、根据权利要求 3 所述的精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测试剂，其特征在于：所述抗血清是含反应量的抗人 IgG 或抗人 IgG-Fab 段的磷酸盐缓冲液。

5、根据权利要求 1-4 其中之一所述的精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测试剂，其特征在于：所述抗血清为冻干粉，还包括抗血清溶解液，用于溶解抗血清冻干粉。

6、如权利要求 5 所述的精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测试剂，其特征在于：所述抗血清溶解液是单糖重量含量为  $0.9\sim 1.0\%$ 、无机盐的物质的量浓度为  $20\sim 40\text{mmol/L}$ 、酪蛋白重量含量为  $0.15\sim 0.25\%$  的水溶液。

7、一种用于精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测的免疫微球的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

1) 洗去羧化胶乳中为保存而加入的稳定成分，所述羧化胶乳的直径为  $1.8\mu\text{m}\sim 2.2\mu\text{m}$ ；

2) 活化步骤 1) 所述的羧化胶乳表面的羧化基团；

3) 使人 IgG 包被在步骤 2) 所述羧化胶乳表面的活化基团上面；

4) 封闭羧化胶乳表面未结合抗体的羧化基团，得到免疫微球。

8、根据权利要求 7 所述的免疫微球的制备方法，其特征在于，

所述步骤 1) 洗去羧化胶乳中的稳定成分的方法为：以 PH 为  $9.4\sim 9.8$ 、浓度为  $0.1\sim 0.2\text{mol/L}$  的第一碳酸盐缓冲液冲洗羧化胶乳，直至洗去羧化胶乳中为保存而加入的稳定成分；

所述步骤 2) 活化羧化胶乳表面基团的方法为：步骤 1) 中的羧化胶乳悬浮于 PH 为  $9.4\sim 9.8$ 、浓度为  $0.1\sim 0.2\text{mol/L}$  的第二碳酸盐缓冲液中，直至羧化胶乳表面基团被活化，该第二碳酸盐缓冲液中含有丙烯酸树脂 S-100，丙烯酸树脂 S-100 的

重量含量为 0.2~0.4%;

所述步骤 3) 中人 IgG 包被的方法为: 步骤 2) 中的第二碳酸盐缓冲液离心, 弃上清, 再将羧化胶乳悬浮于 PH 为 4.3~4.7、浓度为 0.15~0.25mol/L 的第一磷酸盐缓冲液中, 加入人 IgG, 轻轻混匀使人 IgG 结合在羧化胶乳表面的活化基团上面;

所述步骤 4) 羧化胶乳表面的活化基团封闭的方法为: 在步骤 3) 中的第一磷酸盐缓冲液中加入浓度为 0.8~1.2mol/L 的氯化氨, 封闭羧化胶乳表面未与人 IgG 结合的羧基位点, 最后得到的即为免疫微球。

9、根据权利要求 7 或 8 所述的免疫微球的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 1) 之前还包括如下步骤: 在 PH 为 7.2~7.6、浓度为 0.01~0.02mol/L 的第二磷酸盐缓冲液中加入摩尔浓度为 100~150mmol/L 的无机盐、质量浓度为 1.5~2.5g/L 的牛血清蛋白制得免疫微球稀释液。

10、根据权利要求 9 所述的免疫微球的制备方法, 其特征在于,

还包括如下步骤 5): 步骤 4) 所述的第一磷酸盐缓冲液再次离心, 免疫微球重悬于免疫微球稀释液中;

所述步骤 5) 之后还包括如下步骤: 免疫微球与抗血清作交叉试验, 得到免疫微球的合适稀释度, 并用免疫微球稀释液稀释步骤 5) 所述的免疫微球至所述合适稀释度。

## 精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测试剂及免疫微球的制备方法

### 技术领域

本发明属于体外诊断试剂类，具体适用于活动精子膜表面的抗精子抗体的检测。

### 背景技术

免疫因素为男性不育的病因之一。射精前精子抗体与精子表面的结合，是精子抗体干扰男性生殖的唯一途径。其干扰机制为：①干扰精子的代谢活化；②降低进入受精部位的精子数；③干扰受精；④抑制合子细胞分裂。男性免疫性不育诊断的主要依据是证实射精精子表面抗体的附着，因此活体精子膜表面抗体检测是免疫性不育最具诊断价值的指标。

目前国内主要是采用酶联免疫实验（ELISA）测血清或精浆内抗精子抗体，其原理是利用纯化的精子抗原包被，用酶标抗人抗体与相应底物显色。

虽然测女性血清内抗精子抗体有一定的临床意义，检测男性血清抗精子抗体却意义不大，其主要原因在于男性特有的血睾屏障对精子施行封闭式保护，即使血清内有抗精子抗体也不一定会影响生育；再者精子抗原的复杂性给诊断试剂的制备带来困难，正常人血清、精浆中存在许多与精子抗原交叉成分，造成很高的假阳性率。

混合凝集反应(MAR)是 WHO 推荐的免疫性不育诊断方法。但是 WHO 推荐的诊断方法试剂价格昂贵且难以购买，而且其中 MAR 检测方法中由于 IgG 大小不一，难以观察检测结果，试验中还有假阳性精子出现，使得检测的准确度和可靠性不高。

### 发明内容

本发明的主要目的在于提供一种易于观察、结果准确的精子膜表面抗体（MAR）IgG 检测试剂及免疫微球的制备方法。

本发明的再次一目的在于提供一种稳定性更好、保存期更长的精子膜表面抗体（MAR）IgG 检测试剂及免疫微球的制备方法。

为实现上述目的，本发明提出一种精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测试

剂，包括抗血清和免疫微球，所述免疫微球的直径为  $1.8\mu\text{m}\sim 2.2\mu\text{m}$ 。

还包括磷酸盐缓冲液，所述免疫微球在磷酸盐缓冲液中的体积含量为  $1\sim 2\%$ 。

所述免疫微球是结合有反应量的人 IgG 的羧化胶乳。

所述抗血清是含反应量的抗人 IgG 或抗人 IgG-Fab 段的磷酸盐缓冲液。

所述抗血清为冻干粉，还包括抗血清溶解液，用于溶解抗血清冻干粉。

所述抗血清溶解液是单糖重量含量为  $0.9\sim 1.0\%$ 、无机盐的物质的量浓度为  $20\sim 40\text{mmol/L}$ 、酪蛋白重量含量为  $0.15\sim 0.25\%$  的水溶液。

进一步的，提出一种用于精子膜表面抗体混合凝集反应 IgG 检测的免疫微球的制备方法，包括如下步骤：1) 洗去羧化胶乳中为保存而加入的稳定成分，所述羧化胶乳的直径为  $1.8\mu\text{m}\sim 2.2\mu\text{m}$ ；2) 活化步骤 1) 所述的羧化胶乳表面的羧化基团；3) 使人 IgG 包被在步骤 2) 所述羧化胶乳表面的活化基团上面；4) 封闭羧化胶乳表面未结合抗体的羧化基团，得到免疫微球。

所述步骤 1) 洗去羧化胶乳中的稳定成分的方法为：以 PH 为  $9.4\sim 9.8$ 、浓度为  $0.1\sim 0.2\text{mol/L}$  的第一碳酸盐缓冲液冲洗羧化胶乳，直至洗去羧化胶乳中为保存而加入的稳定成分；

所述步骤 2) 活化羧化胶乳表面基团的方法为：步骤 1) 中的羧化胶乳悬浮于 PH 为  $9.4\sim 9.8$ 、浓度为  $0.1\sim 0.2\text{mol/L}$  的第二碳酸盐缓冲液中，直至羧化胶乳表面基团被活化，该第二碳酸盐缓冲液中含有丙烯酸树脂 S-100，丙烯酸树脂 S-100 的重量含量为  $0.2\sim 0.4\%$ ；

所述步骤 3) 中人 IgG 包被的方法为：步骤 2) 中的第二碳酸盐缓冲液离心，弃上清，再将羧化胶乳悬浮于 PH 为  $4.3\sim 4.7$ 、浓度为  $0.15\sim 0.25\text{mol/L}$  的第一磷酸盐缓冲液中，加入人 IgG，轻轻混匀使人 IgG 结合在羧化胶乳表面的活化基团上面；

所述步骤 4) 羧化胶乳表面的活化基团封闭的方法为：在步骤 3) 中的第一磷酸盐缓冲液中加入浓度为  $0.8\sim 1.2\text{mol/L}$  的氯化氨，封闭羧化胶乳表面未与人 IgG 结合的羧基位点，最后得到的即为免疫微球。

所述步骤 1) 之前还包括如下步骤：在 PH 为  $7.2\sim 7.6$ 、浓度为  $0.01\sim 0.02\text{mol/L}$  的第二磷酸盐缓冲液中加入摩尔浓度为  $100\sim 150\text{mmol/L}$  的无机盐、质量浓度为  $1.5\sim 2.5\text{g/L}$  的牛血清蛋白制得免疫微球稀释液。

还包括如下步骤 5)：步骤 4) 所述的第一磷酸盐缓冲液再次离心，免疫微球重

悬于免疫微球稀释液中；

所述步骤 5) 之后还包括如下步骤：免疫微球与抗血清作交叉试验，得到免疫微球的合适稀释度，并用免疫微球稀释液稀释步骤 5) 所述的免疫微球至上述合适稀释度。

本发明的检测原理为：人的活动精子与致敏有人 IgG 的免疫微球混合，再与抗血清反应，如果精子结合有抗精子抗体 (anti-sperm antibody, AsAb)，则可以形成活动精子与免疫微球的混合凝集物；反之，免疫微球互相粘着成团。由于上述技术方案，结合下面将要详述的实施例，本发明突出的技术效果在于：

1、采用直径在  $1.8\mu\text{m} \sim 2.2\mu\text{m}$  的免疫微球，可以保证免疫微球的大小一致，大小一致的免疫微球与传统方法相比，结合抗体的活性基团的数目多，交联率高。

直径在上述范围内的免疫微球易于与精子相互凝集，大小一致的免疫微球在结合有抗精子抗体的阳性精子表面形成的凝集颗粒大小适中，易于观察结果，并且读取的结果准确性更高；否则，免疫微球大小不一，则易非特异性粘附在精子上，以致出现假阳性结果。

2、免疫微球在磷酸盐缓冲液中的体积含量为  $1 \sim 2\%$ ，该含量是免疫微球在显微镜下观察以及免疫微球与精子、抗血清反应的合适浓度范围。免疫微球的含量低于上述浓度范围时，免疫微球与精子的碰撞少，易出现假阴性结果；免疫微球的含量高于上述浓度范围时，显微镜下视野内的珠数量过多影响结果观察，而且凝集的免疫微球易堆积在精子周围，出现假阳性结果。

3、抗人 IgG-Fc 段会在反应中有非特异性的反应，因此将抗人 IgG 整链经胃蛋白酶消化除去 Fc 段，仅含有抗人 IgG-Fab 段的抗血清使反应更特异。

4、采用含单糖、无机盐、酪蛋白的水溶液作为抗血清溶解液，其中单糖重量含量为  $0.9 \sim 1\%$ 、无机盐物质的量浓度为  $20 \sim 40\text{mM}$ ，酪蛋白重量含量有利于抗原抗体结合的亲和力及抗血清冻干粉复溶后的稳定性。

5、制备方法中用 pH 值在  $9.4 \sim 9.8$  之间，浓度在  $0.1 \sim 0.2\text{mol/L}$  之间的碳酸盐缓冲液冲洗羧化胶乳中的稳定成分，可以所述 PH 值范围可以充分开放羧化胶乳的酸性基团，且此浓度有利于维持反应体系的离子强度。

6、采用 Eudragit S-100 的含量在  $0.2 \sim 0.4\%$  的碳酸盐缓冲液活化羧化胶乳，Eudragit S-100 的浓度与免疫微球在磷酸盐缓冲液中的体积含量间的配比关系，决定了免疫微球制备的交联率高低， $0.2 \sim 0.4\%$  是达到最佳交联率时的浓度，过高或过

低会使交联到羧化胶乳上的人 IgG 减少。

#### 具体实施方式

下面通过具体的实施例对本发明作进一步详细的描述。

一种精子膜表面抗体 (MAR) IgG 检测试剂, 包括含有免疫微球的磷酸盐缓冲液、抗血清冻干粉和抗血清溶解液。

其中免疫微球起抗体载体的作用, 所述免疫微球在本发明中采用的是结合有人 IgG 的羧化聚苯乙烯胶乳, 该免疫微球的直径为  $1.8\mu\text{m}\sim 2.2\mu\text{m}$ , 其在磷酸盐缓冲液中的体积含量为  $1\sim 2\%$ 。磷酸盐缓冲液还可以用 PH 在 7.4 左右 (PH 为 7.2-7.6) 的其它常见缓冲液替换, 用于维持免疫微球上结合的人 IgG 所处环境的 PH 值、离子强度。

直径在  $1.8\mu\text{m}\sim 2.2\mu\text{m}$  是为了保证免疫微球的大小一致, 同时在上述直径范围内的免疫微球适合与精子相互凝集, 还可以采用其他常用的羧化微粒替换本发明中的羧化聚苯乙烯胶乳, 或者采用其他表面具有羧基、氨基的化学胶乳替换本发明中的羧化聚苯乙烯胶乳, 当不采用羧化胶乳时, 交联人 IgG 与胶乳的方法需要相应改变。

免疫微球在磷酸盐缓冲液中的体积含量, 是免疫微球在显微镜下观察及免疫微球与精子、抗血清反应的合适浓度范围。免疫微球的含量过低时, 免疫微球与精子的碰撞少, 易出来假阴性结果; 免疫微球的含量过高时, 显微镜下视野内的微球数量过多影响结果观察, 而且凝集的免疫微球易堆积在精子周围, 易出现假阳性结果。

抗血清冻干粉被复溶后起连接免疫微球与结合有抗精子抗体阳性精子的作用, 也可以直接使用抗血清溶液, 这样就无需使用抗血清溶解液了, 所述抗血清冻干粉在本发明中采用的是含抗人 IgG-Fab 段的磷酸盐冻干粉, 这是由于抗人 IgG-Fc 段具有非特异性, 会在检测中发生非特异性的反应, 因此将抗人 IgG 整链经胃蛋白酶消化除去 Fc 段, 使用纯化的抗人 IgG-Fab 段作抗血清, 使检测结果更特异, 还可以采用其他常用的抗人 IgG 的抗血清替换本发明中的抗血清。

羧化聚苯乙烯胶乳上人 IgG 的含量为需与抗血清溶液内的抗人 IgG 或抗人 IgG-Fab 段效价相适应, 当它们含量配比过低时, 免疫微球难以结合在阳性精子表面导致出现假阴性结果; 当它们含量配比过高时, 免疫微球凝集速度过快, 难以与阳性精子凝集或堆积在阴性精子表面, 影响检测。此含量配比可作交叉实验得出。

抗血清溶解液起复溶抗血清冻干粉及稳定复溶后抗血清的作用, 所述抗血清溶

解液在本发明中采用含葡萄糖含量为0.9~1.0%、氯化钠20~40mM,酪蛋白0.15~0.25%的水溶液,其中葡萄糖还可以用其他的单糖替换,氯化钠还可以用其他的无机盐替换,葡萄糖、氯化钠、酪蛋白的含量过高或过低都会影响抗原抗体结合的亲和力及抗血清冻干粉复溶后的稳定性。

上述检测试剂的各成分采用如下工艺方法制得:

A、免疫微球稀释液的制作工艺方法:

1) 含氯化钠(NaCl) 125mmol/L、牛血清蛋白(BSA) 2mg/ml、叠氮钠( $\text{NaN}_3$ ) 0.15%的pH7.3, 0.015mol/L的第二磷酸盐缓冲液,以孔径0.22 $\mu\text{m}$ 过滤器滤过后2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

其中NaCl是为了保持溶液的渗透压和离子强度,BSA是为了稳定抗人IgG-Fab段, $\text{NaN}_3$ 是为了防腐;NaCl的含量为100~150mmol/L、BSA的含量为1.5~2.5mg/ml、 $\text{NaN}_3$ 的含量为0.1~0.2%,NaCl、BSA、 $\text{NaN}_3$ 的含量不在所给范围之内会使效果不明显;孔径0.22 $\mu\text{m}$ 过滤器过滤是为了除过溶液内的细菌和沉淀,能保证产品的稳定性,还可以采用其他过滤器过滤,只要过滤器的孔径小于细菌的直径即可。

第二磷酸盐缓冲液的PH值在7.2~7.6之间,浓度在0.01~0.02mol/L之间,指定PH值在7.2~7.6之间是因为在此pH值范围内的第二磷酸盐缓冲液可以稳定连接到免疫微球上的抗体的空间构型,维持抗体活性;其浓度范围在0.01~0.02mol/L之间有利于维持溶液的离子强度和渗透压,不在或超出该范围:交联抗体易脱落或空间构型发生变化导致失活。

B、免疫微球的制作工艺方法:

2) 羧化胶乳15 $\mu\text{l}$ ,以pH9.6、浓度为0.15mol/L的第一碳酸盐缓冲液洗两次或洗净至洗去为保存羧化胶乳而加入的稳定成分,小珠悬浮于2.5ml pH9.4 0.15mol/L含0.3% Eudragit S-100的第二碳酸盐缓冲液,轻轻混合置2~8 $^{\circ}\text{C}$ 下1小时或直到活化羧化胶乳表面的基因。

其中,羧化胶乳用于提供致敏所需的载体,在本制备方法中采用的羧化聚苯乙烯胶乳微粒,还可以用其他的羧化微粒替换,或者用其他表面具有羧基的化学胶乳替换本制备方法中的羧化聚苯乙烯胶乳。

在本实施例中该第二碳酸盐缓冲液的pH值在9.4~9.8之间,浓度在0.1~0.2mol/L之间

第一碳酸盐缓冲液用于冲洗羧化胶乳中的稳定成分，该第一碳酸盐缓冲液的pH值在9.4~9.8之间，浓度在0.1~0.2mol/L之间，指定第一碳酸盐缓冲液的PH值在9.4~9.8之间是因为pH值范围在开放胶乳酸性基团时起到决定性的作用，其浓度范围在0.1~0.2mol/L之间有利于维持反应体系的离子强度。

第二碳酸盐缓冲液的pH值在9.4~9.8之间，浓度在0.1~0.2mol/L之间，其中Eudragit S-100的含量在0.2~0.4%之间，Eudragit S-100的浓度与免疫微球在磷酸盐缓冲液中的体积含量间的配比关系，决定了免疫微球制备的交联率高低，本制备方法中指定Eudragit S-100的含量为0.2~0.4%是达到最佳交联率时的浓度，过高或过低会使交联到羧化胶乳上的人IgG减少。

3) 将上述第二碳酸盐缓冲液离心，弃上清，羧化胶乳悬浮于2.5ml含0.1ml抗体pH4.5、浓度为0.2mol/L第一磷酸盐缓冲液中，轻轻混匀后置2~8℃3小时或直至抗体结合在羧化胶乳的活化基团上面。

上述第一碳酸盐缓冲液的pH值为4.3~4.7，为0.15~0.25mol/L，指定PH值为4.3~4.7是因为pH值范围在开放抗体氨基基团时起到决定性的作用，其浓度在0.15~0.25mol/L之间有利于维持反应体系的离子强度。

4) 在上述的第一磷酸盐缓冲液中加入1mol/L氯化氨50ul 2~8℃下反应10min，再次离心，羧化胶乳重悬于0.015M pH7.24的第二磷酸盐缓冲液中。

氯化氨的浓度为0.8~1.2mol/L，此浓度为实现氯化氨封闭羧化胶乳表面化学基团的最适反应配比，低于此浓度会导致封闭不完全，高于此浓度会破坏交联在羧化胶乳上的抗体。

5) 与抗血清作交叉试验，根据不同稀释度的抗血清与羧化胶乳反应形成凝集颗粒所用的时间及形成凝集颗粒大小，得免疫微球合适稀释度和抗人IgG-Fab段的合适稀释度，根据免疫微球合适稀释度，用步骤1)得到的免疫微球稀释液稀释，2~8℃保存。

#### C、抗血清冻干粉的制作工艺方法

6) 根据步骤5)所得到的抗人IgG-Fab段的合适稀释度，用0.015M pH7.4的磷酸盐缓冲液稀释抗体液后，分装稀释后的抗体液，加盖后置-80℃冷冻过夜。

7) 待冷冻干燥机预冷后，迅速将步骤6)所述稀释后的抗体液置于冻干机样品室，开启冻干程序，冷冻6~8小时或直到抗体液完全冻干，放气后，加盖，得到抗

血清冻干粉。

#### D、抗血清溶解液的制作工艺方法

8) 称取葡萄糖 10 克, 氯化钠 30mM, 酪蛋白 2 克, 溶于 800 毫升蒸馏水。所述抗血清溶解液中含葡萄糖的含量为 0.9~1.0%、氯化钠的含量为 20~40mM、酪蛋白的含量为 0.15~0.25%, 其中葡萄糖还可以为单糖替换, 氯化钠还可以用其余可溶性含钠的无机盐替换, 葡萄糖、氯化钠、酪蛋白基本上都是起稳定复溶后抗体的作用, 如果各组分的含量低于所给出的下限或高于所给出的上限都会影响抗原抗体结合的亲和力及抗血清冻干粉复溶后的稳定性。

9) 将步骤 8) 得到的溶液移入 1000 毫升装容量瓶内, 用蒸馏水定容至 1000 毫升。置 2~8℃ 保存。

MAR IgG 检测试剂检测精子膜表面抗体, 具体步骤为:

#### 一、试剂准备

每瓶抗血清冻干粉加 130ul 抗血清溶解液, 溶解 30min 或直至溶液稳定, 待用, 抗血清冻干粉与抗血清溶解液的最佳配比是冻干前的抗血清量与抗血清溶解液的体积比是 1: 1 的关系。

#### 二、样本

##### 新鲜精液

#### 三、操作方法

1、在洁净载玻片上加: 5ul 液化的新鲜精液和 5ul 免疫微球, 以加样器头或盖玻片边缘混合 5 次或充分混合。

2、加 5ul 抗血清, 以加样器头或盖玻片边缘混合 5 次或充分混合, 盖上盖玻片。

3、室温 (25~35℃) 孵育 10 分钟后 (提供抗体反应所需要的时间与温度), 在 400X 至 600X 高倍显微镜或相差显微镜下判读结果, 10 分钟后 (或反应结束) 再观察一次。记录片中两次记录的差值, 计算附着在免疫微球上的活动精子百分率 (忽略尾尖结合)。每片至少计数 200 个活动的精子, 记录免疫微球同精子结合的部位 (头、中段、尾)。

#### 四、参考值

如果 10% 或更多活动阳性精子包裹在免疫微球上, 则有临床意义, 即表示这次

实验的受试者可能是免疫性不育，WHO 规定还需要做重复试验或其实抗精子抗体的检测方法来确定；如果低于 10%的阳性活动精子包裹在免疫微球上，则说明受试者不是免疫性不育。

#### 五、临床适用性

是 WHO 推荐的男性免疫性不育诊断的标准方法。

专利名称(译)	精子膜表面抗体混合凝集反应IgG检测试剂及免疫微球的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1755366A</a>	公开(公告)日	2006-04-05
申请号	CN200410040793.6	申请日	2004-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	深圳华康生物医学工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳华康生物医学工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳华康生物医学工程有限公司		
[标]发明人	傅剑华 刘瑜 胡家纯 何林 何小红		
发明人	傅剑华 刘瑜 胡家纯 何林 何小红		
IPC分类号	G01N33/546 G01N33/531		
其他公开文献	CN1755366B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开一种精子膜表面抗体混合凝集反应IgG检测试剂，包括抗血清和免疫微球，所述免疫微球的直径为1.8um~2.2um。直径为1.8um~2.2um的免疫微球，大小一致、易于与精子相互凝集，从而在结合有抗精子抗体的阳性精子表面形成的凝集颗粒大小适中，易于观察结果，且结果的准确性更高；否则会出现假阳性结果。还提出一种免疫微球的制备方法，包括如下步骤：1)洗去羧化胶乳中为保存而加入的稳定成分，所述羧化胶乳的直径为1.8um~2.2um；2)活化步骤1)所述的羧化胶乳表面的羧化基团；3)使人IgG包被在步骤2)所述羧化胶乳表面的活化基团上面；4)封闭羧化胶乳表面未结合抗体的羧化基团，得到免疫微球。