



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1755367 B

(45) 授权公告日 2011.07.27

(21) 申请号 200410040814.4

(22) 申请日 2004.10.01

(73) 专利权人 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 深圳鼎合诚知识产权代理有
限公司 44281

代理人 陈俊斌

(56) 对比文件

EP 0348174 A2, 1989.06.21, 说明书第 2 页
第 39-46 行, 第 3 页第 16-65 行, 第 4 页第 1 ~ 第
5 页第 35-58 行、实施例 1、2.

CN 1432811 A, 2003.07.30, 全文.

CN 1755366 A, 2006.04.05, 全文.

MacMillan RA, Baker HW.. Comparison
of latex and polyacrylamide beads for
detecting sperm antibodies.. Clin Reprod
Fertil. 5 4. 1987, 5(4), 203-209.

审查员 李冰

(51) Int. Cl.

A61K 45/08 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

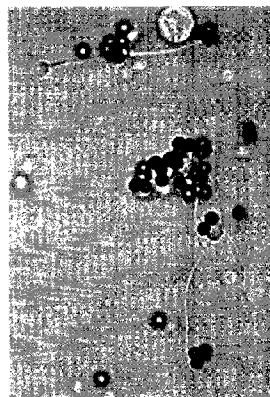
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂及其
制备、检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种精子膜表面抗体免疫珠法
检测试剂及其制备、检测方法。所述精子膜表面
抗体免疫珠法检测试剂包括直径为 1.8 ~ 2.2 μm 的
免疫珠, 即交联有抗人 IgG 或 IgA 或 IgM 抗体的聚
合物胶乳颗粒; 洗涤液, 即含 0.1 ~ 0.5% 牛血清
白蛋白的台氏液; 复悬液, 即含 4 ~ 6% 牛血清白
蛋白的台氏液。上述试剂还可进一步包括高活力
精子提取液。本发明并提供制备上述精子膜表面
抗体免疫珠法检测试剂的方法。所述含高活力精
子提取液的精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂的
检测方法, 除常规步骤外, 在检测样本制备步骤中
对少精子症或弱精子症样本还包括活动精子提取
的步骤。本发明所采用免疫珠相对于精子而言大
小合适, 避免其过小造成的非特异性吸附或过大
影响精子活动力, 检测结果易于判读; 进一步配
备了高活力精子提取液, 可检测弱精子症、少精子
症样本。



1. 一种精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂盒,包括
 - 1) 免疫珠:交联有抗人 IgG 或 IgA 或 IgM 抗体的聚合物胶乳颗粒,所述免疫珠的直径为 $1.8 \sim 2.2 \mu\text{m}$;
 - 2) 洗涤液:含 $0.1 \sim 0.5\%$ 牛血清白蛋白的台氏液;
 - 3) 复悬液:含 $4 \sim 6\%$ 牛血清白蛋白的台氏液;
 - 4) 高活力精子提取液:按重量百分比计,所述高活力精子提取液为含氯化钠 $0.6 \sim 0.8\%$ 、氯化钾 $0.04 \sim 0.05\%$ 、二水氯化钙 $0.02 \sim 0.03\%$ 、七水硫酸镁 $0.01 \sim 0.02\%$ 、碳酸氢钠 $0.2 \sim 0.3\%$ 、二水磷酸二氢钠 $0.01 \sim 0.02\%$ 、丙酮酸钠 $0.002 \sim 0.003\%$ 、 60% 为糖浆的乳酸钠 $0.3 \sim 0.4\%$ 、叠氮钠 $0.01 \sim 0.02\%$ 、葡萄糖 $0.1 \sim 0.15\%$ 、一水枸橼酸 $0.03 \sim 0.04\%$ 、小牛血清 $0.8 \sim 1.2\%$ 的水溶液。
2. 根据权利要求 1 所述的精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂盒,其特征在于:还包括稀释液,所述免疫珠悬于稀释液中,该稀释液的主要成分是含 Na^+ 的磷酸盐缓冲液。
3. 根据权利要求 2 所述的精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂盒,其特征在于:所述稀释液还含有 $1 \sim 2\text{g/L}$ 的牛血清白蛋白。
4. 根据权利要求 2 所述的精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂盒,其特征在于:所述聚合物胶乳是羧化聚苯乙烯胶乳。
5. 根据权利要求 2 所述的精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂盒,其特征在于:所述台氏液是含 CaCl_2 $0.1 \sim 0.2\text{g/L}$, KCl $0.1 \sim 0.2\text{g/L}$, NaH_2PO_4 $0.04 \sim 0.06\text{g/L}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0.1 \sim 0.2\text{g/L}$, NaCl $6 \sim 8\text{g/L}$, NaHCO_3 $1 \sim 1.5\text{g/L}$, 葡萄糖 $1 \sim 1.5\text{g/L}$ 的去离子水溶液。
6. 一种精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂的制备方法,包括以下步骤,
 - 1) 免疫珠的制备和稀释:
 - a) 制备免疫珠稀释液:在浓度为 $0.01 \sim 0.02\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液中,按 Na^+ 浓度为 $100 \sim 150\text{mmol/L}$ 的比例加入 Na 盐,滤过后保存;
 - b) 制备免疫珠:在浓度为 $0.1 \sim 0.2\text{mol/L}$ 的碳酸盐缓冲液中,加入 $0.2 \sim 0.4\%$ 的丙烯酸树脂 S-100,与直径为 $1.8 \sim 2.2 \mu\text{m}$ 聚合物胶乳混合,放置至充分反应;
将所得混合液离心,弃上清,加入 $0.2 \sim 0.3\text{mol/L}$ 磷酸盐缓冲液,再加入反应量的抗人 IgG 或抗人 IgA 或抗人 IgM 的抗体,混匀后放置至充分反应;
按 $1 : 100$ 的体积比加入 $1 \sim 1.5\text{mol/L}$ 氯化氨,充分反应后再次离心,弃上清,加入 $0.02 \sim 0.03\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液;
 - c) 稀释免疫珠乳液:用 a) 制得的免疫珠稀释液稀释 b) 制得的免疫珠,将稀释后的免疫珠与阳性精子反应,观察结果,取阳性精子表面粘附免疫珠个数为 $5 \sim 15$ 个时的稀释浓度为最适浓度,将免疫珠乳液用免疫珠稀释液稀释至最适浓度;
 - 2) 制备洗涤液:在台氏液中,按 $1 \sim 5\text{g/L}$ 的比例加入牛血清白蛋白,滤过除菌后保存;
 - 3) 制备复悬液:在台氏液中,按 $40 \sim 60\text{g/L}$ 的比例加入牛血清白蛋白,滤过除菌后保存。
7. 根据权利要求 6 所述的制备精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂的方法,其特征在于:步骤 1) 的 a) 过程中在过滤前还加入 $1 \sim 2\text{g/L}$ 的牛血清白蛋白。
8. 一种精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂的检测方法,包括检测样本制备步骤、对检测样本进行免疫珠实验步骤和结果判读步骤,所述检测样本制备步骤包括对精液样本的洗

涤步骤,其特征在于:在检测样本制备步骤中,对少精子症或弱精子症样本的制备还包括如下步骤

1) 在洗涤后的精液样本上层加入高活力精子提取液,适温静置,使活力较高的精子从底层游动到上层;

2) 取上层含活动精子的溶液作为后续步骤的检测样本。

一种精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂及其制备、检测方法

【技术领域】

【0001】 本发明涉及一种体外诊断用试剂及其制备、检测方法,具体涉及一种精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂及其制备、检测方法。

【背景技术】

【0002】 免疫因素为男性不育的病因之一,因此其临床检测是一个十分重要的课题。2000年世界卫生组织(WHO)规定混合凝集反应(MAR)和免疫珠试验(IBT)为诊断免疫性不育的标准试验。

【0003】 目前由于免疫珠法检测试剂较难获得,国内主要是采用酶联免疫实验(ELISA)来检测血清或精浆内的抗精子抗体,此检测对男性而言意义不大,并且假阳性率很高。而在免疫珠试验的实际操作中,也存在着免疫珠大小不一,检测结果难于判读,如图1所示。同时,存在对于弱精子症、少精子症的样本无法直接进行检测等缺点。

【发明内容】

【0004】 本发明要解决的技术问题是提供一种便于制备、检测结果容易判读,以及进一步可以直接检测弱精子症、少精子症样本的精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂及其制备、检测方法。

【0005】 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是一种精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂,包括

【0006】 1) 免疫珠:直径为 $1.8 \sim 2.2 \mu\text{m}$ 的交联有抗人IgG或IgA或IgM抗体的聚合物胶乳颗粒;

【0007】 2) 洗涤液:含 $0.1 \sim 0.5\%$ 牛血清白蛋白的台氏液;

【0008】 3) 复悬液:含 $4 \sim 6\%$ 牛血清白蛋白的台氏液;

【0009】 上述检测试剂还可进一步包括

【0010】 4) 高活力精子提取液:改良Earl's培养液。

【0011】 所述高活力精子提取液的具体成分可以是:氯化钠(NaCl) $0.6 \sim 0.8\%$ 、氯化钾(KCl) $0.04 \sim 0.05\%$ 、二水氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) $0.02 \sim 0.03\%$ 、七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) $0.01 \sim 0.02\%$ 、碳酸氢钠(NaHCO_3) $0.2 \sim 0.3\%$ 、二水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) $0.01 \sim 0.02\%$ 、丙酮酸钠 $0.002 \sim 0.003\%$ 、60%为糖浆的乳酸钠 $0.3 \sim 0.4\%$ 、叠氮钠(NaN_3) $0.01 \sim 0.02\%$ 、葡萄糖 $0.1 \sim 0.15\%$ 、一水枸橼酸 $0.03 \sim 0.04\%$ 、小牛血清 $0.8 \sim 1.2\%$ 的水溶液。

【0012】 所述免疫珠可保存于稀释液中,该稀释液的主要成分是含 Na^+ 的磷酸盐缓冲液。

【0013】 所述稀释液还可含有 $1 \sim 2\text{g/L}$ 的牛血清白蛋白。

【0014】 所述聚合物胶乳可优选羧化聚苯乙烯胶乳。

【0015】 所述台氏液是含 CaCl_2 $0.1 \sim 0.2\text{g/L}$,KCl $0.1 \sim 0.2\text{g/L}$, NaH_2PO_4 $0.04 \sim 0.06\text{g/L}$,

MgCl₂·6H₂O 0.1 ~ 0.2g/L, NaCl 6 ~ 8g/L, NaHCO₃ 1 ~ 1.5g/L, 葡萄糖 1 ~ 1.5g/L 的去离子水溶液。

[0016] 本发明并提供一种制备精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂的方法, 包括以下步骤,

[0017] 1) 免疫珠的制备和稀释

[0018] a) 制备免疫珠稀释液: 在浓度为 0.01 ~ 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液中, 按 Na⁺ 浓度为 100 ~ 150mmol/L 的比例加入 Na 盐, 滤过后保存;

[0019] b) 制备免疫珠: 在浓度为 0.1 ~ 0.2mol/L 的碳酸盐缓冲液中, 加入 0.2 ~ 0.4% 的丙烯酸树脂 S-100, 与直径为 1.8 ~ 2.2 μm 聚合物胶乳混合, 放置至充分反应;

[0020] 将所得混合液离心, 弃上清, 加入 0.2 ~ 0.3mol/L 磷酸盐缓冲液, 再加入反应量的抗人 IgG 或抗人 IgA 或抗人 IgM 的抗体, 混匀后放置至充分反应;

[0021] 按 1:100 的体积比加入 1 ~ 1.5mol/L 氯化氨, 充分反应后再次离心, 弃上清, 加入 0.02 ~ 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液;

[0022] c) 稀释免疫珠乳液: 用 a) 制得的免疫珠稀释液稀释 b) 制得的免疫珠, 将稀释后的免疫珠与阳性精子反应, 观察结果, 取阳性精子表面粘附免疫珠个数为 5 ~ 15 个时的稀释浓度为最适浓度, 将免疫珠乳液用免疫珠稀释液稀释至最适浓度;

[0023] 2) 制备洗涤液: 在台氏液中, 按 1 ~ 5g/L 的比例加入牛血清白蛋白, 滤过除菌后保存;

[0024] 3) 制备复悬液: 在台氏液中, 按 40 ~ 60g/L 的比例加入牛血清白蛋白, 滤过除菌后保存。

[0025] 本发明制备方法步骤 1) 的 a) 过程中在过滤前还可加入 1 ~ 2g/L 的牛血清白蛋白。

[0026] 本发明制备方法中使用的聚合物胶乳可优选羧化聚苯乙烯胶乳。

[0027] 本发明还提供一种使用前述含高活力精子提取液的精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂的检测方法, 包括检测样本制备步骤、对检测样本进行免疫珠实验步骤和结果判读步骤, 所述检测样本制备步骤包括对精液样本的洗涤步骤, 其特征在于: 在检测样本制备步骤中, 对少精子症或弱精子症样本的制备还包括如下步骤

[0028] 1) 在洗涤后的精液样本上层加入高活力精子提取液, 适温静置, 使活力较高的精子从底层游动到上层;

[0029] 2) 取上层含活动精子的溶液作为后续步骤的检测样本。

[0030] 采用本发明提供的技术方案, 有如下优点: 1) 采用直径为 1.8 ~ 2.2 μm 的聚合物胶乳颗粒作为抗体载体, 使得免疫珠相对于精子而言大小较合适, 避免免疫珠过小造成的非特异性吸附或过大造成的影响精子活动力, 令检测结果易于判读; 2) 进一步配备了高活力精子提取液, 可检测弱精子症、少精子症的样本, 克服了此类样本因洗力或浓度等原因不能直接检测的缺点; 3) 试剂制备材料均易于获取, 方法简单易行。

【附图说明】

[0031] 图 1 是使用现有试剂在显微镜下的检测结果。

[0032] 图 2 是使用本发明试剂在显微镜下的检测结果。

【具体实施方式】

[0033] 下面对本发明作进一步的详细说明。

[0034] 实施例一、一种精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂,包括

[0035] 1) 储存于稀释液中的免疫珠:所述稀释液的主要成分是 pH 为 7.4, 含 NaCl125mmol/L、牛血清白蛋白 1.5g/L、NaN₃0.15%, 磷酸盐溶质 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述免疫珠是直径约为 2.0 μm, 交联有抗人 IgG 或 IgA 或 IgM 抗体的羧化聚苯乙烯胶乳颗粒;

[0036] 2) 洗涤液:含 0.3%牛血清白蛋白的台氏液;

[0037] 3) 复悬液:含 5%牛血清白蛋白的台氏液;

[0038] 4) 高活力精子提取液:含 NaCl0.7%、KCl0.045%、CaCl₂·2H₂O0.025%、MgSO₄·7H₂O0.015%、NaHCO₃0.25%、NaH₂PO₄·2H₂O0.015%、丙酮酸钠 0.0025%、60%为糖浆的乳酸钠 0.35%、NaN₃0.015%、葡萄糖 0.13%、一水枸橼酸 0.035%、小牛血清 0.09%的水溶液;

[0039] 其中,台氏液是 pH 为 7.3, 含 CaCl₂0.15g/L、KCl0.15g/L、NaH₂PO₄0.05g/L、MgCl₂·6H₂O0.15g/L、NaCl7g/L、NaHCO₃1.25g/L、葡萄糖 1.25g/L 的去离子水溶液。

[0040] 在本发明试剂中,

[0041] (1) 稀释液中的必要成分为磷酸盐缓冲液和一定浓度的 (100 ~ 150mmol/L)Na⁺ 离子,它们分别起到保持免疫珠储存的适宜 pH(7.3 ~ 7.5) 和维持抗体活性的作用,各值过高或过低都会导致附着抗体的活性降低。其余成分中,牛血清白蛋白用作蛋白稳定剂,起到更好的保护作用,其含量可取 1 ~ 2g/L,可用卵白蛋白,聚乙二醇或白明胶等代替;NaN₃ 用作防腐剂,起到延长试剂储存时间的作用,其含量可取 0.1 ~ 0.2%,可用柳硫汞、溶菌酶或抗菌素等代替。在加入防腐剂的状态下本发明试剂可保存一年以上,不加也可保存一个月左右。

[0042] (2) 羧化聚苯乙烯胶乳的作用是提供羧基与抗体交联,其颗粒大小在 1.8 ~ 2.2 μm 之间都是比较适宜的。也可以用其他颗粒大小符合要求的聚合物胶乳来代替,例如,聚丙烯酰胺。

[0043] (3) 高活力精子提取液的作用是将精液中具有较高活动力的精子通过其上游将其提取出来,可以采用现有的改良 Ear1¹s 培养液,其中的必要成分为一定浓度的 Na⁺(0.23 ~ 0.32%), K⁺(0.02 ~ 0.026%), Ca²⁺(0.005 ~ 0.008%), MgSO₄(0.005 ~ 0.01%), HCO₃⁻(0.14 ~ 0.22%), 丙酮酸根阴离子(0.0016 ~ 0.0024%), 乳酸根阴离子(0.095 ~ 0.127%) 和葡萄糖(0.1 ~ 0.15%), 它们提供精子在活动过程中需要的离子、酸碱度和能量等。其他成分,如适量的 NaH₂PO₄·2H₂O(0.01 ~ 0.02%)、NaN₃(0.01 ~ 0.02%)、一水枸橼酸(0.03 ~ 0.04%)、小牛血清(0.08 ~ 0.1%) 等,可使溶液起到更好的提取活力精子的效果以及延长溶液的保存时间等。

[0044] (4) 台氏液作为一种常用的生理溶液(pH可取7.2 ~ 7.4),也可以采用公知技术中其它那些组分配合方式,例如,用 MgSO₄·7H₂O 来取代 MgCl₂·6H₂O 等。

[0045] (5) 本发明试剂的最佳保存温度为 2 ~ 8°C, 低于 0°C 会使试剂失效,在室温下则试剂有效期缩短。

[0046] (6) 基于应用需要,本发明试剂可制作成试剂盒的形式,试剂盒中各部分的具体备量是:可储存免疫珠 4 ~ 6 μ l,洗涤液 8 ~ 10ml,复悬液 0.15 ~ 0.25ml,高活力精子提取液 1 ~ 3ml。

[0047] 实施例二、一种制备实施例一中精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂的方法,包括以下步骤,

[0048] 1) 免疫珠的制备和稀释:

[0049] a) 制备免疫珠稀释液:在浓度为 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液中,加入 125mmol/L 的 NaCl,1.5g/L 的牛血清白蛋白和 0.15% 的 NaN_3 ,调 pH 为 7.4,用 0.22 μ m 过滤器滤过后保存。

[0050] b) 制备免疫珠:在 2.5ml 浓度为 0.5mol/L 的碳酸盐缓冲液中,加入 0.3% 的丙烯酸树脂 S-100,调 pH 为 9.5,与颗粒直径为 2.0 μ m 左右的羧化聚苯乙烯胶乳混合,置 5 $^{\circ}$ C 1 小时使得反应充分。

[0051] 所述颗粒直径为 2.0 μ m 左右的羧化聚苯乙烯胶乳取自美国 Sigma 公司生产的浓度为 2.5% 的羧化聚苯乙烯胶乳。取该产品 500 μ l,以 pH 为 9.5,浓度为 0.15mol/L 的碳酸盐缓冲液洗两次,去除其在储存过程中的保护成分即可使用。

[0052] 将所得混合液离心,弃上清,加入 2.5ml 0.25mol/L 的磷酸盐缓冲液,该磷酸盐缓冲液中含有 0.15ml 抗人 IgG 或抗人 IgA 或抗人 IgM 的抗体,调 pH 为 4.4,混匀后置 5 $^{\circ}$ C 3 小时使得反应充分;

[0053] 加入 1.25mol/L 氯化氨 55 μ l,5 $^{\circ}$ C 反应 10min,封闭胶乳上未结合抗体的羧基。再次离心,弃上清,加入 0.025mol/L 的磷酸盐缓冲液,调 pH 为 7.3;

[0054] c) 稀释免疫珠乳液:用 a) 制得的免疫珠稀释液将 b) 制得的免疫珠乳液稀释为一系列的浓度,用稀释后的免疫珠与阳性精子反应,观察结果,取阳性精子表面粘附免疫珠个数为 10 个时的稀释浓度为最适浓度,将免疫珠乳液用免疫珠稀释液稀释至最适浓度。

[0055] 2) 制备洗涤液:称取 0.35g 牛血清白蛋白溶于 100ml pH 为 7.3 的台氏液中,用 0.22 μ m 微孔膜滤过除菌后保存;

[0056] 3) 制备复悬液:称取 5g 牛血清白蛋白溶于 100ml pH 为 7.3 的台氏液中,用 0.22 μ m 微孔膜滤过除菌后保存;

[0057] (步骤 2)、3) 中的台氏液作为一种常用的生理溶液,可以采用公知技术中常见的那些配制方式,例如:按 CaCl_2 0.15g/L, KCl 0.15g/L, NaH_2PO_4 0.05g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.15g/L, NaCl 7g/L, NaHCO_3 1.25g/L, 葡萄糖 1.25g/L 的比例将各溶质溶于去离子水中,调 pH 为 7.3。)

[0058] 4) 制备高活力精子提取液:按 NaCl 7g/L, KCl 0.45g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15g/L, NaHCO_3 2.5g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15g/L, 丙酮酸钠 0.025g/L, 含 60% 糖浆的乳酸钠 3.5ml/L, NaN_3 0.15g/L, 葡萄糖 1.25g/L, 一水枸橼酸 0.35g/L 的比例依次将各溶质溶解在蒸馏水中;

[0059] 再加入 56 $^{\circ}$ C 30min 灭活后的小牛血清 9ml/L,混匀,调 pH 为 7.4,用 0.22 μ m 微孔膜滤过除菌后保存。

[0060] 在本发明制备方法中,

[0061] (1) 采用微孔膜滤过是为了滤过除菌并保证溶液中不含与免疫珠形状大小相似的杂质,以免结果观察时将杂质颗粒误认成免疫珠),微孔膜规格在 0.2 ~ 0.36 μ m 之间都是

适宜的；

[0062] (2) 述及“调 pH 为”可采用公知技术中常见的那些调整溶液 pH 的方法，例如，对磷酸盐缓冲液一般是用 KH_2PO_4 、 NaH_2PO_4 等，对碳酸盐缓冲液一般是用 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 等。

[0063] 实施例三、一种使用实施例二中制得的精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂进行精子膜表面抗体检测的方法，包括以下步骤，

[0064] 1) 试剂准备

[0065] 洗涤免疫珠：临用前可对免疫珠进行洗涤，避免免疫珠非特异性粘附在精子表面，具体方法为

[0066] a) 向 Eppendorf 管中加 $50 \mu\text{l}$ 稀释至最适浓度的免疫珠和 1.5ml 洗涤液，2000g 离心 10min；

[0067] b) 弃上清，加复悬液至 $50 \mu\text{l}$ 。

[0068] 洗涤后的免疫珠置 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 保存，可用 1 个月。

[0069] 2) 样本制备

[0070] a) 普通精液样本制备

[0071] ①将一定体积的鲜精液转移至圆锥底离心管，加洗涤液至 4ml。精液加样量可根据精子密度及活动率参考下表

[0072]

密度($10^6/\text{ml}$)	活动率(a 级+b 级,%)	所需精液(ml)
>50		0.2
20~50	>40	0.4
20~50	<40	0.8
<20	>40	1.0
<20	<40	2.0

[0073] ②将所得混合液 500g 离心 8 分钟。

[0074] ③小心弃去上清液，加洗涤液 4ml，将精子沉淀团轻轻混匀，500g 再次离心 8 分钟。

[0075] ④小心倾弃上清液，加复悬液 0.2ml，将精子沉淀团轻轻混匀。

[0076] b) 少精子及弱精子样本制备

[0077] ①将一定体积的精液转移至圆锥底离心管，加洗涤液至 4ml。精液加样量可根据精子密度及活动率参考下表：

[0078]

密度($10^6/ml$)	活动率(a级+b级,%)	所需精液(ml)
>50		0.2
20~50	>40	0.4
20~50	<40	0.8
<20	>40	1.0
<20	<40	2.0
<10		>2.0

[0079] ②将所得混合液 500g 离心 8 分钟。

[0080] ③小心弃去上清液,加洗涤液 4ml,将精子沉淀团轻轻混匀,500g 再次离心 8 分钟。

[0081] ④小心倾弃部分上清液,管底留液体约 0.5ml,轻轻混匀,转移至活力精子提取管内。

[0082] ⑤小心在上层加入高活力精子提取液 2ml,将试管倾斜 45° 以加大精液与提取液的接触面积,37℃静置 50min 使活力较高的精子从底层游动到上层。

[0083] ⑥轻轻将试管竖直,小心吸取上层含活动精子的溶液 1ml 至另一试管,然后加 2ml 高活力精子提取液,500g 离心 5 分钟。

[0084] ④小心倾弃上清液,加复悬液 0.2ml,轻轻混匀,以复悬液调整精子浓度至 $50 \times 10^6/ml$ 左右。

[0085] c) 血清 / 精浆 / 宫颈粘液标本制备:

[0086] ①宫颈粘液先以液化剂溶解(液化剂可另购),新鲜血清、精浆 56℃ 30 分钟灭活。

[0087] ②以复悬液将血清或精浆或宫颈粘液按 1:5 的比例稀释,如 10ul 标本如 40 μ l 重悬液。

[0088] 3) 直接免疫珠试验

[0089] a) 在洁净载玻片上加 :5ul 步骤 2) 的过程 a) 或 b) 制备的精子悬液和 5ul 洗涤后的免疫珠(用前充分混匀)。

[0090] b) 以加样器头或盖片边缘混合样本和洗涤后的免疫珠 5 次,盖上盖玻片。

[0091] c) 室温 (25 ~ 35℃) 孵育 10 分钟令抗原抗体充分反应。

[0092] 4) 间接免疫珠试验

[0093] a) 可选用下列任一标本组合方式进行抗精子抗体检测:

[0094] ①男配偶活动精子 + 女配偶血清或宫颈粘液

[0095] ②供体活动精子(抗精子抗体阴性)+待检精浆

[0096] ③供体活动精子(抗精子抗体阴性)+待检宫颈粘液

[0097] ④供体活动精子(抗精子抗体阴性)+待检血清

[0098] b) 操作方法

[0099] ①取洗涤后精子悬液 50ul 于 Eppendorf 管中,另加血清或精浆或宫颈粘液稀释液 50ul,试管加盖,混匀。37℃孵育 1 小时。

- [0100] ②加洗涤液至 1ml, 500g 离心 8 分钟。
- [0101] ③小心弃去上清液, 加洗涤液 1ml, 将精子沉淀团轻轻混匀, 500g 再次离心 8 分钟。
- [0102] ④小心倾弃上清液, 用复悬液将精子团粒重新悬浮至原来体积 (100u1), 轻轻混匀。
- [0103] ⑤在洁净载玻片上加 :5u1 上述洗涤后的精子悬液和 5u1 洗涤后的免疫珠 (用前充分混匀)。
- [0104] ⑥以加样器头或盖片边缘混合样本和洗涤免疫珠 5 次, 盖上盖玻片。
- [0105] ⑦室温 (25 ~ 35°C) 孵育 10 分钟。
- [0106] 5) 结果判读
- [0107] 在 400× 至 600× 高倍显微镜或相差显微镜下判读结果。分别记录片中附着在免疫珠上的活动精子百分率 (忽略尾尖结合)。记录抗体种类 (IgG、IgA 或 IgM) 以及免疫珠同精子结合的部位 (头、中段、尾)。
- [0108] 图 2 和图 1 分别给出了采用本发明试剂和现有试剂 (IMMUNBEADREAGENT RABBIT AND ANTI-HUMAN IMMUNOGLOBULIN, 生产厂家 IRVINE SCIENTIFIC (欧文公司)) 在 DMLS2 (生产厂家 Leica) 显微镜下观察到的结果图 (Leica DFC480 专业数码相机拍摄)。比较图 2 (本发明试剂) 和图 1 (现有试剂) 可以很明显的看出, 由于本发明试剂中免疫珠大小适中、一致, 因而其与精子的结合无论是结合位置的判断还是结合数目的分辨都是十分清晰和容易的, 并且避免了其他形状和大小的杂质对观察造成的干扰和影响, 使得结果易于判读; 而现有试剂的检测结果图中, 大小不一的免疫珠堆积在精子周围, 几乎无法明显地分辨出精子上具体结合的免疫珠数目, 并且很难从背景中分辨出杂质与微球, 容易造成误判。
- [0109] 6) 正常参考值
- [0110] 如果 50% 活动精子表面粘附有免疫珠, 则有临床意义。
- [0111] 如果结合仅限于尾尖, 则无临床意义。
- [0112] 7) 临床适用性
- [0113] 此方法是 WHO 推荐的免疫性不育诊断方法。

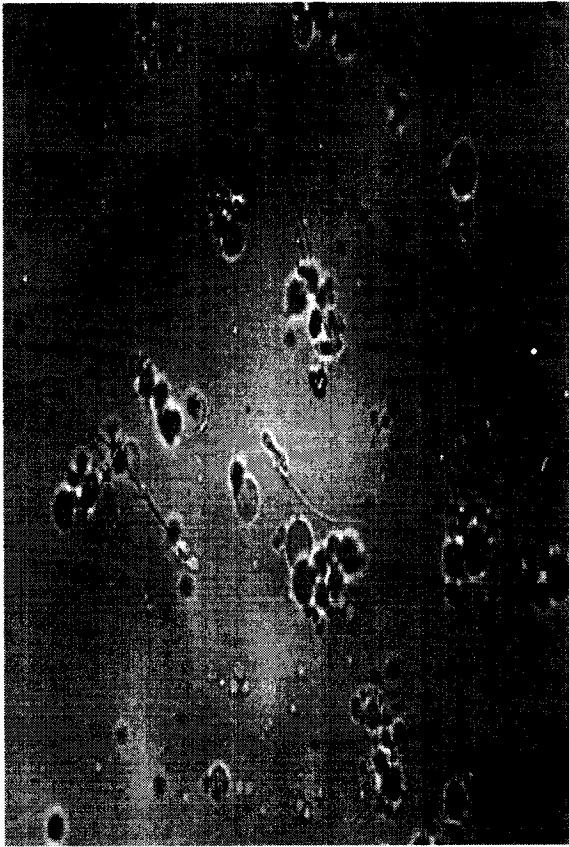


图 1

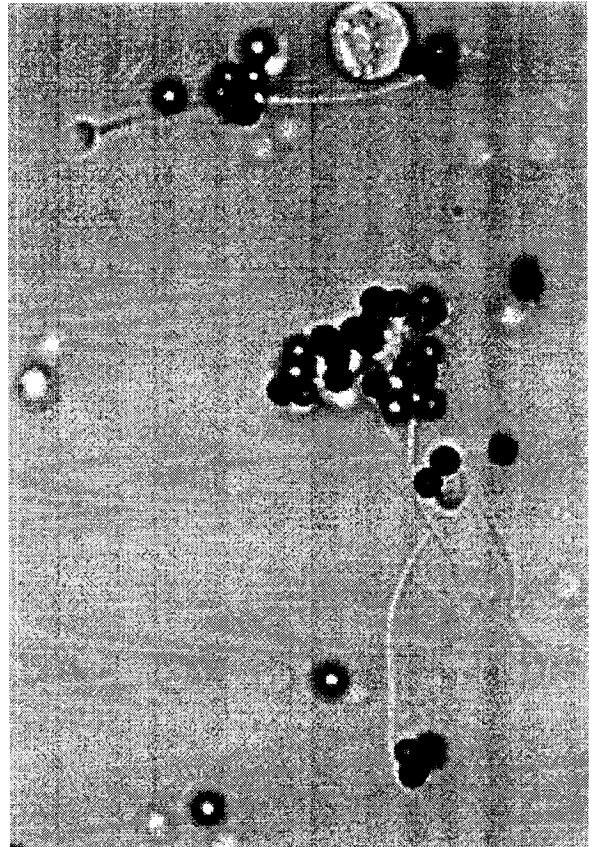


图 2

专利名称(译)	一种精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂及其制备、检测方法		
公开(公告)号	CN1755367B	公开(公告)日	2011-07-27
申请号	CN200410040814.4	申请日	2004-10-01
[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	A61K45/08 G01N33/531		
代理人(译)	陈俊斌		
审查员(译)	李冰		
其他公开文献	CN1755367A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂及其制备、检测方法。所述精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂包括直径为1.8~2.2 μ m的免疫珠，即交联有抗人IgG或IgA或IgM抗体的聚合物胶乳颗粒；洗涤液，即含0.1~0.5%牛血清白蛋白的台氏液；复悬液，即含4~6%牛血清白蛋白的台氏液。上述试剂还可进一步包括高活力精子提取液。本发明并提供制备上述精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂的方法。所述含高活力精子提取液的精子膜表面抗体免疫珠法检测试剂的检测方法，除常规步骤外，在检测样本制备步骤中对少精子症或弱精子症样本还包括活动精子提取的步骤。本发明所采用免疫珠相对于精子而言大小合适，避免其过小造成的非特异性吸附或过大影响精子活动力，检测结果易于判读；进一步配备了高活力精子提取液，可检测弱精子症、少精子症样本。

