



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103592432 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201310481186. 2

(22) 申请日 2013. 10. 15

(71) 申请人 重庆市公安局

地址 401147 重庆市渝北区黄泥磅黄龙路  
555 号

(72) 发明人 李红卫 王清山 李学博 封宇  
宁淑华 王业全

(74) 专利代理机构 重庆市前沿专利事务所(普  
通合伙) 50211

代理人 谭春艳

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

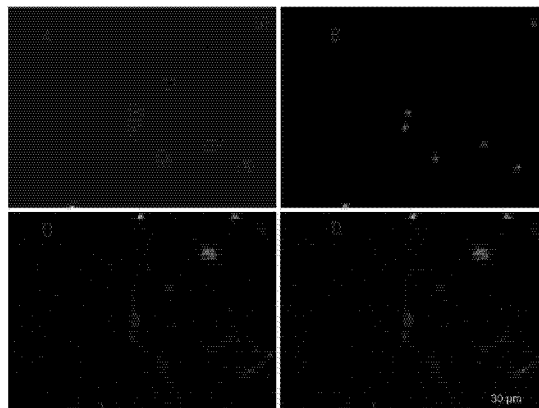
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中  
精子的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,所述的分离方法步骤为:1)生物素标记抗精子膜蛋白抗体;2)精子与抗体的结合;3)磁珠与抗体-精子复合体的结合;4)精子与上皮细胞的分离;5)精子与磁珠的分离。本方法利用生物素标记抗精子膜蛋白抗体,通过亲和素(包被在磁珠上)偶联生物素,成功构建了磁珠-亲和素-生物素-抗体-膜抗原(精子)复合物,并优化相关试剂体系及建立相应操作流程,提高混合斑检验的能效;具有流程少、操作简单、便于普及等优点,可为自动化检验提供理论及实践基础。



1. 一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,包括以下步骤:

1) 生物素标记抗精子膜蛋白抗体:

向浓度为 5mg/mL 的 MOSPD3 抗体或浓度为 5mg/mL 的 Anti-SPAG8 抗体中加入浓度为 1mg/mL 的 Sulfo-NHS-LC-Biotin, 抗体与 Sulfo-NHS-LC-Biotin 的体积比为 10:3 ~ 5, 在离心管中混匀后 3 ~ 5°C 反应 48 ~ 72 小时;将离心管中的液体加入透析袋,加 1L 0.01mol/L, pH7.2 的 PBS 3 ~ 5°C 透析 12 ~ 24 小时;得到 MOSPD3-生物素偶联物或 Anti-SPAG8 生物素偶联物;

2) 精子与抗体的结合:

向精子与上皮细胞混合悬液中加入上述生物素标记的 MOSPD3 抗体或 Anti-SPAG8 抗体,置于 Thermomixer comfort 上孵育;离心,弃去上清液后加入预冷的洗涤液,震荡后离心,弃去上清,得到抗体-精子复合体;

3) 磁珠与抗体-精子复合体的结合:

向步骤 2) 得到的抗体-精子复合体中加入吸附液,震荡混匀后加入过量磁珠,室温孵育 30 ~ 45 分钟;

4) 精子与上皮细胞的分离:

将步骤 3) 中的离心管置于磁分离架上吸附 5 ~ 10 分钟,吸弃液体;加入洗涤液洗涤、磁分离架吸附、吸弃液体,重复两次;

5) 精子与磁珠的分离:

向步骤 4) 中的离心管内加入 300 ~ 500  $\mu$ L 洗脱液,震荡,56 ~ 65°C 放置 5 ~ 10 分钟后再次置于磁分离架上吸附 3 ~ 5 分钟,回收洗脱液于另一离心管,洗脱液内得到分离的精子。

2. 根据权利要求 1 所述的一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,其特征在于:步骤 2 中所述向精子与上皮细胞混合悬液中加入生物素标记的抗体,按照  $10^3 \sim 10^5$  个精子加 0.1 ~ 0.5  $\mu$ g 抗体的比例加入抗体;所述孵育的条件为 37°C 800 ~ 1200rpm 孵育 1 ~ 2 小时或 4°C 孵育 12 ~ 24 小时。

3. 根据权利要求 1 所述的一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,其特征在于:步骤 3 中所述加入的磁珠量按照抗体-精子复合体与磁珠的个数比为 1:8 ~ 20 加入。

4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,其特征在于:所述洗涤液为 0.01mol/L PBS, 0.5%BSA, 2mM EDTA, pH7.2。

5. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,其特征在于:所述吸附液为 0.01mol/L PBS, 0.5%BSA, pH7.2。

6. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,其特征在于:所述的磁珠直径为 2.8  $\mu$ m。

## 一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫磁珠分离细胞的方法,具体涉及一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法。

### 背景技术

[0002] 含有精液的混合斑是强奸案件中最常见的生物物证,其成分包括男性细胞(如精子、阴茎脱落细胞、精浆中的白细胞等)和女性细胞(如阴道上皮细胞、血液中的各种细胞等);如何分离并获得混合斑中男性成分即嫌疑人的精子并进行DNA分型是案件侦破和诉讼的关键;目前,解决混合斑DNA分型有三种途径:一是分离混合斑中来自不同个体的细胞;二是设计Y染色体特异的DNA基因座引物,用PCR特异扩增男性成分片段;三是将混合斑痕中所有的遗传标记都检测出来,然后与案件相关的所有个体进行比对分析;以上方法中第一种途径可以获得高识别率的嫌疑人DNA,其余方法获得的结果常难以认定嫌疑人,多为检验的补救措施;

[0003] 第一种途径中,国内外学者建立了以下方法:一是(Gill等)利用精子外包膜和核膜富含鱼精蛋白及硫醇蛋白交联网状结构,较体细胞具有更强的耐受力的结构特点,对混合斑中的细胞进行二步消化,即第一步消化体细胞,第二步消化精子;实践证明,二步消化法存在第一步体细胞消化不完全或精子被过度消化的问题,进而导致DNA检验后仍出现混合分型、女性分型或无结果;同时,二步消化法需要两次消化,耗时长,需反复离心,自动化程度低;尽管很多学者对二步消化法进行了改良,但仍无法解决上述难题;二是(Chen等)利用精子与体细胞大小不同的特点,可利用带微小网孔的尼龙滤膜,把体积较小而呈卵圆形的精子与大而扁平的上皮细胞分离,但该方法也需要经较强烈的第一步消化,常造成精子被过度消化得不到男性分型的结局;三是(Elliot等)根据精子与体细胞形态结构差异,将光学显微技术与激光细胞切割技术相结合,利用激光捕获显微切割技术在显微镜下选取并切割精子细胞,得到单一男性DNA分型,但该方法需联合应用激光捕获显微切割仪器及低体系扩增仪器,实验条件要求苛刻,难于对批量检材检验,且不利于基层实验室的普及。

### 发明内容

[0004] 针对以上问题,本发明所要解决的技术问题在于提供一种流程少、操作简单、便于普及、分离效果好的免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,包括以下步骤:

[0006] 1) 生物素标记抗精子膜蛋白抗体:

[0007] 向浓度为5mg/mL的MOSPD3抗体或浓度为5mg/mL的Anti-SPAG8抗体中加入浓度为1mg/mL的Sulfo-NHS-LC-Biotin,抗体与Sulfo-NHS-LC-Biotin的体积比为10:3~5,在离心管中混匀后3~5℃反应48~72小时;将离心管中的液体加入透析袋,加1L0.01mol/L,pH7.2的PBS3~5℃透析12~24小时;得到MOSPD3-生物素偶联物或Anti-SPAG8生物

素偶联物；

[0008] 2) 精子与抗体的结合：

[0009] 向精子与上皮细胞混合悬液中加入上述生物素标记的 MOSPD3 抗体或 Anti-SPAG8 抗体，置于 Thermomixer comfort 上孵育；离心，弃去上清液后加入预冷的洗涤液，震荡后离心，弃去上清，得到抗体-精子复合体；

[0010] 3) 磁珠与抗体-精子复合体的结合：

[0011] 向步骤 2) 得到的抗体-精子复合体中加入吸附液，震荡混匀后加入磁珠，室温孵育 30 ~ 45 分钟；

[0012] 4) 精子与上皮细胞的分离：

[0013] 将步骤 3) 中的离心管置于磁分离架上吸附 5 ~ 10 分钟，吸弃液体；加入洗涤液洗涤、磁分离架吸附、吸弃液体，重复两次；

[0014] 5) 精子与磁珠的分离：

[0015] 向步骤 4) 中的离心管内加入 300 ~ 500  $\mu$ L 洗脱液，震荡，56 ~ 65 $^{\circ}$ C 放置 5 ~ 10 分钟后再次置于磁分离架上吸附 3 ~ 5 分钟，回收洗脱液于另一离心管，洗脱液内得到分离的精子。

[0016] 本发明应用免疫荧光技术检测筛选精子表面特异膜抗体，利用生物素标记上述抗体，通过亲和素(包被在磁珠上)偶联生物素，成功构建了磁珠-亲和素-生物素-抗体-膜抗原(精子)复合体，并优化相关试剂体系及建立相应操作流程，提高混合斑检验的能效；针对免疫分选技术应用于法医物证学领域存在的技术难点与关键点，简化了反复洗涤离心的繁琐过程，节省了二步消化的时间，特异抗体的应用，可特异性选择靶细胞，避免了差异裂解法混合分型问题。

[0017] 步骤 2 中所述向精子与上皮细胞混合悬液中加入生物素标记的抗体，按照  $10^3 \sim 10^5$  个精子加 0.1 ~ 0.5  $\mu$ g 抗体的比例加入抗体；所述孵育的条件为 37 $^{\circ}$ C 800 ~ 1200rpm 孵育 1 ~ 2 小时或 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 ~ 24 小时。

[0018] 步骤 3 中所述加入的磁珠量按照抗体-精子复合体与磁珠的个数比为 1:8 ~ 20 加入。

[0019] 所述洗涤液为 0.01mol/L PBS, 0.5%BSA, 2mM EDTA, pH7.2。

[0020] 所述吸附液为 0.01mol/L PBS, 0.5%BSA, pH7.2。

[0021] 所述的磁珠直径为 2.8  $\mu$ m。选择的磁珠大小与精子头部大小相当，捕获能力强。

[0022] 有益效果：本发明应用免疫荧光技术检测筛选精子表面特异膜抗体，利用生物素标记上述抗体，通过亲和素(包被在磁珠上)偶联生物素，成功构建了磁珠-亲和素-生物素-抗体-膜抗原(精子)复合体，并优化相关试剂体系及建立相应操作流程，提高混合斑检验的能效；针对免疫分选技术应用于法医物证学领域存在的技术难点与关键点，简化了反复洗涤离心的繁琐过程，节省了二步消化的时间，特异抗体的应用，可特异性选择靶细胞，避免了差异裂解法混合分型问题；本方法利用磁珠与抗体间磁珠-亲和素-生物素-抗体偶联的方式，选择磁珠(包被亲和素)大小为 2.8  $\mu$ m，与精子头部大小相当，捕获能力强；同时，抗体经生物素标记，利用了亲和素、生物素的级联放大偶联效应，与二抗修饰的磁珠相比，可以保证精子细胞-抗体-生物素与亲和素-磁珠最大量的结合，可达到最大化捕获分离精子细胞的能力；本方法具有流程少、操作简单、便于普及等优点，可为自动化检验提供

理论及实践基础；

[0023] 说明书附图；

[0024] 图 1 为本发明的免疫磁珠分选原理模式示意图；

[0025] 图 2 为本发明的精子膜蛋白抗体与精子免疫荧光检测结果图；

[0026] 图 2-A 为透射光下的精子；

[0027] 图 2-B 为 DAPI 对精子细胞核染色效果图；

[0028] 图 2-C 为 MOSPD3 与精子结合效果图；

[0029] 图 2-D 为图 2-B 和图 2-C 的复合效果图；

[0030] 图 3 为本发明的精子 - 磁珠复合体图。

### 具体实施方式

[0031] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明：

[0032] 本发明中的 MOSPD3 为 Motile Sperm Domain-containing Protein3 的缩写,中文名称为:精子运动结构域 3 抗体(Abnova 公司,台湾)

[0033] Anti-SPAG8 为 Sperm Associated Antigen8 的缩写,中文名称为:精子相关抗原 8 抗体(Abcam 公司,美国)

[0034] Thermomixer comfort:恒温混匀仪(Eppendorf 公司,德国)

[0035] Sulfo-NHS-LC-Biotin:6-[生物素酰氨基]己酸磺基琥珀酰亚胺酯(Pierce Corporation 公司,美国)

[0036] 实施例一、精子表面稳定特异的膜蛋白抗体的筛选

[0037] 取精子细胞及口腔上皮细胞悬液各 0.2mL(约  $10^4$  个)涂于粘附载玻片上,置于 37°C 电热恒温箱烤干或 20 ~ 25°C 晾干,固定液(4% ~ 6% 多聚甲醛,0.01 ~ 0.02mM EDTA)固定 10 ~ 15 分钟,0.5% ~ 1% Triton-100 透明 15 ~ 20 分钟,放入修复液(0.01 ~ 0.02mol/L 柠檬酸盐, pH6.0, 0.01 ~ 0.02mol/L EDTA)中置于微波炉中煮沸 10 ~ 15 分钟,山羊血清(Santa Cruz Biotechnology 公司,美国)封闭 15 分钟后加入抗精子膜蛋白抗体(MOSPD3 或 Anti-SPAG8)4°C 孵育 12 小时,加入 Alexa Fluor488 标记抗小鼠 IgG(荧光显微镜下呈绿色荧光),37°C 电热恒温箱孵育 1 小时,DAPI 染色 15 分钟,荧光显微镜下观察。如图 2,经免疫荧光检测,精子膜表面可见绿色荧光,精子细胞核呈蓝色荧光。上皮细胞未见绿色荧光。因此,MOSPD3 或 Anti-SPAG8 抗体抗原位于精子膜表面,在上皮细胞无表达。

[0038] 实施例二、一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,按照以下步骤完成：

[0039] 1) 生物素标记抗精子膜蛋白抗体：

[0040] 向 1mL 浓度为 5mg/mL 的 MOSPD3 抗体或 1mL 浓度为 5mg/mL 的 Anti-SPAG8 抗体中加入 300  $\mu$ L 浓度为 1mg/mL 的 Sulfo-NHS-LC-Biotin,离心管中混匀后 4°C 反应 72 小时;将离心管中的液体加入透析袋,加 1L 0.01mol/L, pH7.2 的 PBS4°C 透析 16 小时;得到 MOSPD3-生物素偶联物或 Anti-SPAG8 生物素偶联物;紫外/分光光度计检测 280nm 的吸光度,测得抗体浓度分别为 0.75mg/mL、0.59mg/mL,摩尔浓度为  $5.01 \times 10^{-6}$ mol/L、 $3.921 \times 10^{-6}$ mol/L,用生物素定量试剂盒(Pierce Corporation, USA)检测生物素摩尔浓度为  $1.02 \times 10^{-5}$ mol/L,生物素/抗体偶联比为 2.04、2.76。

[0041] 2) 精子与抗体的结合：

[0042] 向混合斑(含有  $10^3$  个精子与  $10^5$  个上皮细胞)中加入  $0.1 \mu\text{L}$  上述生物素标记的 MOSPD3 抗体或 Anti-SPAG8 抗体,置于 Thermomixer comfort (Eppendorf 公司,德国)上  $37^\circ\text{C}$  800rpm 孵育 1 小时;离心,弃去上清液后加入  $300 \mu\text{L}$   $4^\circ\text{C}$  预冷的洗涤液,震荡后 5000rpm 离心 3 分钟,弃去上清,得到抗体-精子复合体;

[0043] 3) 磁珠与抗体-精子复合体的结合：

[0044] 向步骤 2)得到的抗体-精子复合体中加入  $300 \mu\text{L}$   $0.01\text{mol/L}$  PBS,  $0.5\%$ BSA,  $\text{pH}7.2$  的吸附液,震荡混匀后加入  $8 \times 10^3$  个磁珠,室温孵育 30 分钟;

[0045] 4) 精子与上皮细胞的分离：

[0046] 将步骤 3)中的离心管置于磁分离架上吸附 5 分钟,吸弃液体;加入  $300 \mu\text{L}$   $0.01\text{mol/L}$  PBS,  $0.5\%$ BSA,  $2\text{mM}$  EDTA,  $\text{pH}7.2$  的洗涤液洗涤、磁分离架吸附、吸弃液体,重复两次;

[0047] 5) 精子与磁珠的分离

[0048] 向步骤 4)中的离心管内加入  $300 \mu\text{L}$  洗脱液,震荡,  $65^\circ\text{C}$  放置 5 分钟后再次置于磁分离架上吸附 5 分钟,回收洗脱液于另一离心管,洗脱液内得到分离的精子。

[0049] 实施例三、一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,按照以下步骤完成：

[0050] 1) 生物素标记抗精子膜蛋白抗体：

[0051] 向  $1\text{mL}$  浓度为  $5\text{mg/mL}$  的 MOSPD3 抗体中加入  $400 \mu\text{L}$  浓度为  $1\text{mg/mL}$  的 Sulfo-NHS-LC-Biotin,离心管中混匀后  $4^\circ\text{C}$  反应 48 小时;将离心管中的液体加入透析袋,加  $1\text{L}$   $0.01\text{mol/L}$ ,  $\text{pH}7.2$  的 PBS  $4^\circ\text{C}$  透析 12 小时;得到 MOSPD3-生物素偶联物;

[0052] 2) 精子与抗体的结合：

[0053] 向混合斑(含有  $10^4$  个精子与  $10^5$  个上皮细胞)中加入  $0.2 \mu\text{L}$  生物素标记的 MOSPD3 抗体,置于 Thermomixer comfort 上  $4^\circ\text{C}$  800rpm 孵育 18 小时;5000rpm 离心 3 分钟,弃去上清后加入  $400 \mu\text{L}$   $4^\circ\text{C}$  预冷的  $0.01\text{mol/L}$  PBS,  $0.5\%$ BSA,  $2\text{mM}$  EDTA,  $\text{pH}7.2$  的洗涤液,震荡后 5000rpm 离心 3 分钟,弃去上清,得到抗体-精子复合体;

[0054] 3) 磁珠与抗体-精子复合体的结合：

[0055] 向步骤 2)得到的抗体-精子复合体中加入  $400 \mu\text{L}$   $0.01\text{mol/L}$  PBS,  $0.5\%$ BSA,  $\text{pH}7.2$  的吸附液,震荡混匀后加入  $15 \times 10^4$  个磁珠,室温孵育 30 分钟;

[0056] 4) 精子与上皮细胞的分离：

[0057] 将步骤 3)中的离心管置于磁分离架上吸附 5 分钟,吸弃液体;加入  $400 \mu\text{L}$   $0.01\text{mol/L}$  PBS,  $0.5\%$ BSA,  $2\text{mM}$  EDTA,  $\text{pH}7.2$  的洗涤液洗涤、磁分离架吸附、吸弃液体,重复两次;

[0058] 5) 精子与磁珠的分离：

[0059] 向步骤 4)中的离心管内加入  $400 \mu\text{L}$  洗脱液,震荡,  $56^\circ\text{C}$  放置 10 分钟后再次置于磁分离架上吸附 3 分钟,回收洗脱液于另一离心管,洗脱液内得到分离的精子。

[0060] 实施例四、一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法,包括以下步骤：

[0061] 1) 生物素标记抗精子膜蛋白抗体：

[0062] 向  $1\text{mL}$  浓度为  $5\text{mg/mL}$  的 Anti-SPAG8 抗体中加入  $500 \mu\text{L}$  浓度为  $1\text{mg/mL}$  的

Sulfo-NHS-LC-Biotin,离心管中混匀后 4℃反应 60 小时;将离心管中的液体加入透析袋,加 1L 0.01mol/L, pH7.2 的 PBS 4℃透析 24 小时;得到 Anti-SPAG8 生物素偶联物;

[0063] 2) 精子与抗体的结合:

[0064] 向混合斑(含有  $10^5$  个精子与  $10^5$  个上皮细胞)中加入 0.3  $\mu$ L 生物素标记的 Anti-SPAG8 抗体,置于 Thermomixer comfort 上 37℃ 1200rpm 孵育 2h 或 4℃ 孵育 24h;8000rpm 离心 5min,弃去上清后加入 500  $\mu$ L 预冷的 0.01mol/L PBS, 0.5%BSA, 2mM EDTA, pH7.2 的洗涤液,震荡后 8000rpm 离心 5 分钟,弃去上清,得到抗体-精子复合体;

[0065] 3) 磁珠与抗体-精子复合体的结合:

[0066] 向步骤 2)得到的抗体-精子复合体中加入 500  $\mu$ L 0.01mol/L PBS, 0.5%BSA, pH7.2 的吸附液,震荡混匀后加入  $20 \times 10^6$  个磁珠,室温孵育 45 分钟;

[0067] 4) 精子与上皮细胞的分离:

[0068] 将步骤 3)中的离心管置于磁分离架上吸附 10min,吸弃液体;加入 500  $\mu$ L 0.01mol/L PBS, 0.5%BSA, 2mM EDTA, pH7.2 的洗涤液洗涤、磁分离架吸附、吸弃液体,重复两次;

[0069] 5) 精子与磁珠的分离:

[0070] 向步骤 4)中的离心管内加入 500  $\mu$ L 洗脱液,震荡,65℃放置 5 分钟后再置于磁分离架上吸附 5 分钟,回收洗脱液于另一离心管,洗脱液内得到分离的精子。

[0071] 实施例五、分离效果的评价

[0072] 1)将磁珠-抗体-精子结合后洗涤三次的悬液涂片,经伊红-苏木素染色,显微镜下观察,如图 3 所示,可见精子细胞结构完整,磁珠大小与精子头部体积相当,每个精子细胞结合两个以上的磁珠,磁珠与精子细胞结合位置以精子细胞头部、尾部为主,未见上皮细胞混入;

[0073] 2)取 10  $\mu$ L 回收的洗脱液涂片后,经伊红-苏木素染色,显微镜下观察,可见精子细胞,未见上皮细胞;

[0074] 3)提取回收液中的细胞 DNA,应用 Identifiler-Plus 复合扩增体系扩增,扩增产物经 ABI-3130XL 型遗传分析仪电泳及激光扫描分析,应用 GeneMapperV3.2 软件分析;经检验,当每毫升内含  $10^3$  个精子细胞和  $10^5$  上皮细胞时,80%得到单一男性分型(正确分型 13 个以上位点,RFU > 200);当每毫升内含  $10^4$  个精子细胞和  $10^4$  上皮细胞时均得到单一男性分型(正确分型 13 个以上位点,RFU > 200)。

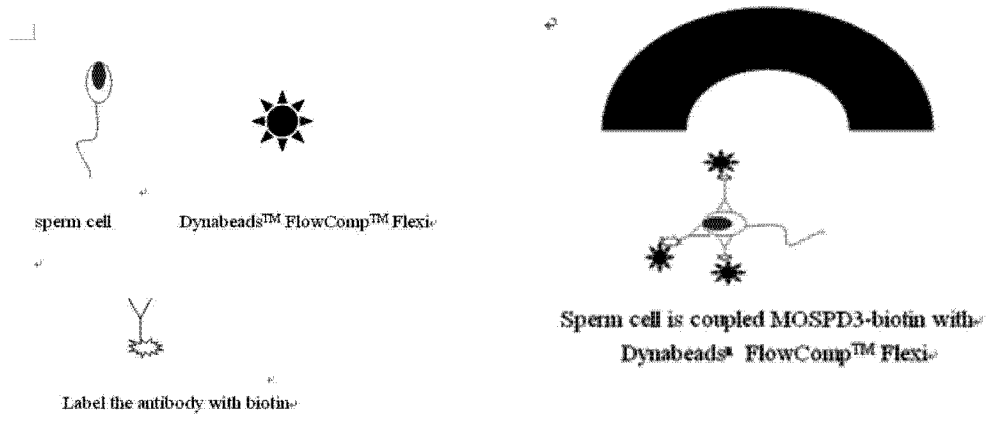


图 1

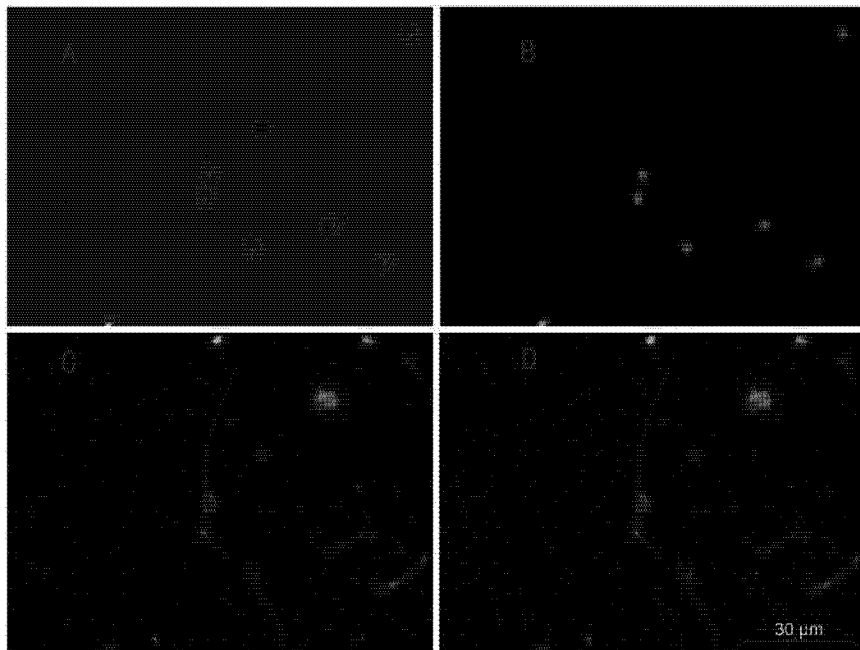


图 2

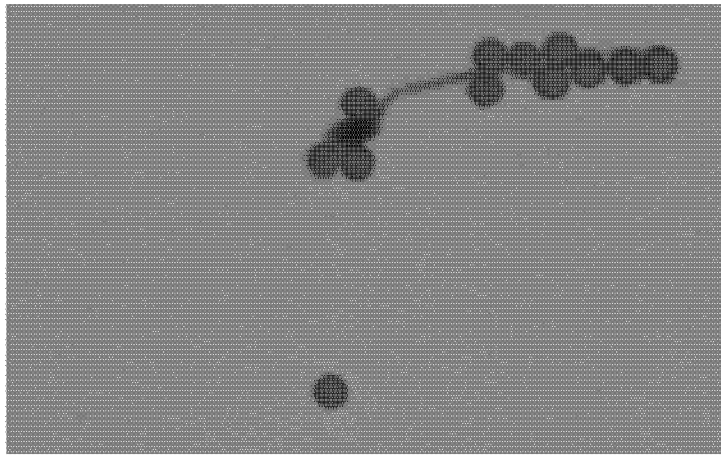


图 3

专利名称(译)	一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103592432A</a>	公开(公告)日	2014-02-19
申请号	CN201310481186.2	申请日	2013-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	重庆市公安局		
申请(专利权)人(译)	重庆市公安局		
当前申请(专利权)人(译)	重庆市公安局		
[标]发明人	李红卫 王清山 李学博 封宇 宁淑华 王业全		
发明人	李红卫 王清山 李学博 封宇 宁淑华 王业全		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	C12N5/061		
代理人(译)	谭春艳		
其他公开文献	CN103592432B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫磁珠分离精子与上皮细胞混合斑中精子的方法，所述的分离方法步骤为：1) 生物素标记抗精子膜蛋白抗体；2) 精子与抗体的结合；3) 磁珠与抗体-精子复合体的结合；4) 精子与上皮细胞的分离；5) 精子与磁珠的分离。本方法利用生物素标记抗精子膜蛋白抗体，通过亲和素(包被在磁珠上)偶联生物素，成功构建了磁珠-亲和素-生物素-抗体-膜抗原(精子)复合体，并优化相关试剂体系及建立相应操作流程，提高混合斑检验的能效；具有流程少、操作简单、便于普及等优点，可为自动化检验提供理论及实践基础。

