

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510022324.6

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年4月8日

[11] 授权公告号 CN 100476432C

[22] 申请日 2005.12.19

[21] 申请号 200510022324.6

[73] 专利权人 孟衍建

地址 610041 四川省成都市人民南路四段
17号

[72] 发明人 张国芬 孟衍建 马天根

[56] 参考文献

WO0242498A2 2002.5.30

CN1755366A 2006.4.5

CN1432811A 2003.7.30

US2003199004A1 2003.10.23

精子结合抗体检测药盒的制备及其临床应用. 张国芬, 马天根等. 男性学杂志, 第10卷
第2期. 1996

审查员 吴江明

[74] 专利代理机构 成都中亚专利代理有限公司
代理人 袁英

权利要求书2页 说明书7页

[54] 发明名称

精子结合抗体检测试剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了精子结合抗体检测试剂, 其特征在于: 该试剂是由敏化羧化胶乳液、羊抗人丙种球蛋白血清组成的液体型双试剂, 敏化羧化胶乳液含有标记人丙种球蛋白的羧化胶乳。精子结合抗体检测试剂的制备方法, 制备方法包括反应步骤、纯化步骤和保存步骤。本发明具有以下优点: 可满足国内各医院、计划生育部门研究与临床需要, 为诊断男性免疫性不育, 以及男性在接受输精管复育术后, 能否恢复生育能力提供重要依据, 具较大的经济价值, 它操作简便, 快速、敏感、特异。

1. 精子结合抗体检测试剂，其特征在于：该试剂是由敏化羧化胶乳液、羊抗人丙种球蛋白血清组成的液体型双试剂，敏化羧化胶乳液含有标记人丙种球蛋白的羧化胶乳，所述敏化羧化胶乳液还包括辅料，所述辅料包括磷酸盐缓冲液、碳化二亚胺、甘氨酸、6-氨基己酸；敏化羧化胶乳液包含：按体积计 8~20% 的羧化胶乳；按重量计 0.15 克%~0.25 克%的人丙种球蛋白；磷酸盐缓冲液的含量为 0.05~0.15M、PH 值为 6.7~8.4；碳化二亚胺的含量为 0.38~1.9 毫克%；6-氨基己酸的含量为 0.1~0.66 毫克%；甘氨酸的含量为 22.5~37.5 毫克%；所述磷酸盐缓冲液包括磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）、磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）和水。
2. 如权利要求 1 所述的精子结合抗体检测试剂，其特征在于，所述的敏化羧化胶乳液包含：按体积计 12% 的羧化胶乳；按重量计 0.15 克%的人丙种球蛋白；磷酸盐缓冲液的含量为 0.1M、PH 值为 7.6；碳化二亚胺的含量为 0.96 毫克%；6-氨基己酸的含量为 0.26 毫克%；甘氨酸的含量为 30.0 毫克%。
3. 如权利要求 1 所述精子结合抗体检测试剂，其特征在于，羊抗人丙种球蛋白血清滴定效价为 1：50~1：150。
4. 如权利要求 3 所述精子结合抗体检测试剂，其特征在于，羊抗人丙种球蛋白血清滴定效价为 1:100。
5. 权利要求 1 所述精子结合抗体检测试剂的制备方法，其特征在于，制备方法包括反应步骤、纯化步骤和保存步骤：

反应反应步骤：取羧化胶乳 8~20ml，加入磷酸盐缓冲液 a 88ml 混匀，再加入碳化二亚胺 0.38~1.9 毫克%，6-氨基己酸 0.1~0.66 毫克%，在 4~8℃ 以 500 转/ min 搅拌 60~90min，在 4~8℃，以 8000~10000 转/ min 离心 20~30min，弃上清，沉淀用磷酸盐缓冲液 b 100 ml 混匀；加入人丙种球蛋白 0.15~0.25 克%，加入碳化二亚胺 0.38~1.9 毫克%；在 4~8℃，以 500 转/ min 搅拌 250~300min，加入 22.5~37.5 毫克%甘氨酸终止；

纯化步骤：在4~8℃，以5000~6000转/min离心30min，弃上清，沉淀加蒸馏水100ml混匀，在4~8℃，以5000~6000转/min离心20min，弃上清，沉淀加入生理盐水至100ml；

保存步骤：加入庆大霉素1.0ml混匀，质量检测，分装，4~8℃保存。

6. 如权利要求5所述精子结合抗体检测试剂的制备方法，其特征在于：所用磷酸盐缓冲液a和磷酸盐缓冲液b分别由A液和B液配置而成，

A液的制备方法为：将分子量为178.05的磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)35.61克溶于1000ml蒸馏水中；该A液浓度为0.2M；

B液的制备方法为：将分子量为156.03磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)31.21克溶于1000ml蒸馏水中；该A液浓度为0.2M；

磷酸盐缓冲液a的制备方法为：取A液720ml，B液280ml混合即成；

磷酸盐缓冲液b的制备方法为：取A液435ml，B液65ml，蒸馏水500ml混合即成。

精子结合抗体检测试剂及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种生物体外诊断试剂及其制备方法，特别是精子结合抗体检测试剂的制备方法。

技术背景

免疫性不育是因抗原抗体反应干扰了受孕过程造成的不育，其中较多见的是精子抗体导致的不育。一些研究指出，大约 5%~30% 不明原因的不育夫妇和 50%~70% 的输精管结扎男子血清中可检出直接针对精子的精子抗体。大约 6.8%~13% 以及 50%~75% 的不育男子和输精管吻合男子精液中可检测出直接针对精子的精子结合抗体。血清中精子抗体达到一定水平时可引起精子凝集、制动，干扰精子运行，抑制精卵结合，致使受精障碍而影响生育力。

检测结合于精子表面的精子结合抗体，是诊断男性免疫性不育，以及男性在接受输精管复育术后，能否恢复生育能力的重要依据。而生殖道局部抗体由于可直接作为一种空间屏障直接干扰受精而影响生育力，因此比较筛选一种既可检测血清精子抗体，又可检测男性生殖道结合抗体的方法十分必要。近来有关精子抗体的临床重要性，影响生育的机制，以及检测精子抗体的方法比较，国内外均有较多的报道。目前应用的抗精子抗体检测方法有：精子制动试验(SIT)；精子凝集试验(STAT)；酶联免疫吸附试验(ELISA)；间接免疫荧光试验(IIF)和混合凝集试验(MAR)。唯 MAR 方法可检测精子表面的结合抗体和体液中存在的抗精子抗体，该方法简便、敏感，且由于不必用预洗过的精子，能检测精子活率低、数目少的样品，出结果快，为 WHO 推荐用于男性精子抗体检测的首选方法。

目前国内仅有安徽安科生物工程(集团)股份有限公司生产的抗精子抗体检测试剂盒使用 MAR 法检测抗精子抗体，其产品的专利号为 02112511。该试剂包括 2—3% 的敏化绵羊红细胞悬液，1:28—1:210 兔抗人 IgG，2—3% 的敏化绵羊红细胞悬液的制备包括取绵羊血、洗涤、醛化处理、鞣化处理、敏化处理等；1:28—1:210 的制备包括取家兔血、血清分离等。然而，该制备方法步骤多，并且由于该产品使用动物来源的血细胞，各批次难免有差异，也不能完全排除潜在动物来源病原物质的威胁。而国际生育技术有限公司出售的 Sperm Mar Test

Kit 检测精子结合抗体虽灵敏度高，但价格昂贵，不能满足国内需求。

发明内容

本发明的目的即在于克服现有技术的缺点，提供一种大大节约成本、制备方便、性能优良的精子结合抗体检测试剂及其制备方法。

本发明的目的通过以下技术方案来实现：精子结合抗体检测试剂，该试剂是由敏化羧化胶乳液、羊抗人丙种球蛋白血清组成的液体型双试剂，敏化羧化胶乳液含有标记人丙种球蛋白的羧化胶乳。

所述敏化羧化胶乳液还包括辅料，辅料包括磷酸盐缓冲液 a、磷酸盐缓冲液 b、碳化二亚胺、甘氨酸、6-氨基己酸。

敏化羧化胶乳液包含：

按体积计 8~20%的羧化胶乳，优选 8~15%的羧化胶乳，更优选 12%的羧化胶乳；

按重量计 0.15~0.25 克%的人丙种球蛋白，优选 0.20 克%的人丙种球蛋白，更优选 0.15 克%的人丙种球蛋白；

磷酸盐缓冲液 a 的含量为 0.1~0.2M、PH 值为 6.5~8.0；优选为 0.2M、PH 值为 7.2；

磷酸盐缓冲液 b 的含量为 0.05~0.15M、PH 值为 6.7~8.4；优选为 0.1M、PH 值为 7.6；

碳化二亚胺的含量为 0.38~1.9 毫克%；优选为 0.96 毫克%；

6-氨基己酸的含量为 0.1~0.66 毫克%；优选为 0.26 毫克%；

甘氨酸的含量为 22.5~37.5 毫克%；优选为 30.0 毫克%。

羊抗人丙种球蛋白血清滴定效价为 1:50~1:150，优选 1:100。

精子结合抗体检测试剂的制备方法，制备方法包括反应步骤、纯化步骤和保存步骤：

反应步骤：取 8~20ml 的羧化胶乳，加入 88ml 的蒸馏水混匀，再加入 0.15~0.25 克的人丙种球蛋白；在 20℃，以 500 转/ min 搅拌 10 小时终止反应；

纯化步骤：在 4~8℃，以 5000~6000 转/ min 离心 30min，弃上清，沉淀加蒸馏水 100ml 混匀，在 4~8℃，以 5000~6000 转/min 离心 20min，弃上清，沉淀加入生理盐水至 100ml；

保存步骤：加入庆大霉素 1.0ml 混匀，质量检测，分装，4~8℃ 保存。

精子结合抗体检测试剂的制备方法，反应步骤还可以为：取羧化胶乳 8~20ml，加入磷酸盐缓冲液 a 88ml 混匀，再加入碳化二亚胺 0.38~1.9 毫克%，

6-氨基己酸 0.1~0.66 毫克%，在 4~8℃以 500 转/ min 搅拌 60~90min，在 4~8℃，以 8000~10000 转/ min 离心 20~30min，弃上清，沉淀用磷酸盐缓冲液 b 100 ml 混匀；加入人丙种球蛋白 0.15~0.25 克%，加入碳化二亚胺 0.38~1.9 毫克%；在 4~8℃，以 500 转/ min 搅拌 250~300min，加入 22.5~37.5 毫克%甘氨酸终止反应；所用磷酸盐缓冲液 a 和磷酸盐缓冲液 b 分别由 A 液和 B 液配置而成，

A 液的制备方法为：将分子量为 178.05 的磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)35.61 克溶于 1000ml

蒸馏水中；该 A 液浓度为 0.2M；

B 液的制备方法为：将分子量为 156.03 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 31.21 克溶于 1000ml 蒸馏水中；该 A 液浓度为 0.2M；

磷酸盐缓冲液 a 的制备方法为：取 A 液 720 ml，B 液 280 ml 混合即成；

磷酸盐缓冲液 b 的制备方法为：取 A 液 435 ml，B 液 65 ml，蒸馏水 500 ml 混合即成。

通过上面的叙述可以看出，本发明具有以下优点：可满足国内各医院、计划生育部门研究与临床需要，为诊断男性免疫性不育，以及男性在接受输精管复育术后，能否恢复生育能力提供重要依据，具较大的经济价值，它操作简便，快速、敏感、特异。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明做进一步的描述：

实施例 1：精子结合抗体检测试剂，该试剂是由敏化羧化胶乳液、羊抗人丙种球蛋白血清组成的液体型双试剂，敏化羧化胶乳液含有标记人丙种球蛋白的羧化胶乳。敏化羧化胶乳液包含：按体积计 8%的羧化胶乳，按重量计 0.25 克%的人丙种球蛋白，

羊抗人丙种球蛋白血清滴定效价为 1:50。

精子结合抗体检测试剂的制备方法，制备方法包括反应步骤、纯化步骤和保存步骤：

反应步骤：取 8ml 的羧化胶乳，加入 88ml 的蒸馏水混匀，再加入 0.25 克的人丙种球蛋白；在 20℃，以 500 转/ min 搅拌 10 小时终止反应；

纯化步骤：在 4℃，以 5000 转/ min 离心 30min，弃上清，沉淀加蒸馏水 100ml 混匀，在 4℃，以 5000 转/min 离心 20min，弃上清，沉淀加入生理盐水至 100ml；

保存步骤：加入庆大霉素 1.0ml 混匀，质量检测，分装，4℃保存。

实施例 2: 精子结合抗体检测试剂, 该试剂是由敏化羧化胶乳液、羊抗人丙种球蛋白血清组成的液体型双试剂, 敏化羧化胶乳液含有标记人丙种球蛋白的羧化胶乳。

所述敏化羧化胶乳液还包括辅料, 辅料包括磷酸盐缓冲液 a、磷酸盐缓冲液 b、碳化二亚胺、甘氨酸、6-氨基己酸。

敏化羧化胶乳液包含: 按体积计 20% 的羧化胶乳, 0.20 克% 的人丙种球蛋白, 磷酸盐缓冲液 a 的含量为 0.1M、PH 值为 6.5; 磷酸盐缓冲液 b 的含量为 0.05M、PH 值为 6.7; 碳化二亚胺的含量为 0.38 毫克%; 6-氨基己酸的含量为 0.1; 甘氨酸的含量为 22.5 毫克%; 羊抗人丙种球蛋白血清滴定效价为 1: 150。

精子结合抗体检测试剂的制备方法, 制备方法包括反应步骤、纯化步骤和保存步骤:

反应步骤: 取羧化胶乳 20ml, 加入磷酸盐缓冲液 a 88ml 混匀, 再加入碳化二亚胺 1.9 毫克%, 6-氨基己酸 0.66 毫克%, 在 8°C 以 500 转/ min 搅拌 90min, 在 8°C, 以 10000 转/ min 离心 30min, 弃上清, 沉淀用磷酸盐缓冲液 b 100 ml 混匀; 加入人丙种球蛋白 0.25 克%, 加入碳化二亚胺 1.9 毫克%; 在 8°C, 以 500 转/ min 搅拌 300min, 加入 37.5 毫克% 甘氨酸终止反应;

纯化步骤: 在 8°C, 以 5000 转/ min 离心 30min, 弃上清, 沉淀加蒸馏水 100ml 混匀, 在 8°C, 以 6000 转/ min 离心 20min, 弃上清, 沉淀加入生理盐水至 100ml;

保存步骤: 加入庆大霉素 1.0ml 混匀, 质量检测, 分装, 8°C 保存。

所用磷酸盐缓冲液 a 和磷酸盐缓冲液 b 分别由 A 液和 B 液配置而成,

A 液的制备方法为: 将分子量为 178.05 的磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 35.61 克溶于 1000ml 蒸馏水中;

该 A 液浓度为 0.2M;

B 液的制备方法为: 将分子量为 156.03 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 31.21 克溶于 1000ml 蒸馏水中; 该 A 液浓度为 0.2M;

磷酸盐缓冲液 a 的制备方法为: 取 A 液 720 ml, B 液 280 ml 混合即成;

磷酸盐缓冲液 b 的制备方法为: 取 A 液 435 ml, B 液 65 ml, 蒸馏水 500 ml 混合即成。

实施例 3: 精子结合抗体检测试剂, 该试剂是由敏化羧化胶乳液、羊抗人丙种球蛋白血清组成的液体型双试剂, 敏化羧化胶乳液含有标记人丙种球蛋白的羧化胶乳。

敏化羧化胶乳液还包括辅料, 辅料包括磷酸盐缓冲液 a、磷酸盐缓冲液 b、

碳化二亚胺、甘氨酸、6-氨基己酸。

敏化羧化胶乳液包含：按体积计 12%的羧化胶乳，按重量计 0.15 克%的人丙种球蛋白；磷酸盐缓冲液 a 的含量为 0.2M、PH 值为 7.2；磷酸盐缓冲液 b 的含量为 0.1M、PH 值为 7.6；碳化二亚胺含量为 0.96 毫克%；6-氨基己酸的含量为 0.26 毫克%，甘氨酸的含量为 30.0 毫克%。

羊抗人丙种球蛋白血清滴定效价为 1：100。

精子结合抗体检测试剂的制备方法，制备方法包括反应步骤、纯化步骤和保存步骤：

反应步骤为：取羧化胶乳 12ml，加入磷酸盐缓冲液 a 88ml 混匀，再加入碳化二亚胺 0.96 毫克%，6-氨基己酸 0.26 毫克%，在 4℃ 以 500 转/ min 搅拌 60min，在 4℃，以 8000 转/ min 离心 30min，弃上清，沉淀用磷酸盐缓冲液 b 100 ml 混匀；加入人丙种球蛋白 0.15 克%，加入碳化二亚胺 0.96 毫克%；在 4℃，以 500 转/ min 搅拌 250min，加入 30.0 毫克%甘氨酸终止反应；

纯化步骤：在 4℃，以 5000 转/ min 离心 30min，弃上清，沉淀加蒸馏水 100ml 混匀，在 4℃，以 5000 转/min 离心 20min，弃上清，沉淀加入生理盐水至 100ml；

保存步骤：加入庆大霉素 1.0ml 混匀，质量检测，分装，4℃ 保存。

所用磷酸盐缓冲液 a 和磷酸盐缓冲液 b 分别由 A 液和 B 液配置而成，

A 液的制备方法为：将分子量为 178.05 的磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)35.61 克溶于 1000ml 蒸馏水中；

该 A 液浓度为 0.2M；

B 液的制备方法为：将分子量为 156.03 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 31.21 克溶于 1000ml 蒸馏水中；该 A 液浓度为 0.2M；

磷酸盐缓冲液 a 的制备方法为：取 A 液 720 ml，B 液 280 ml 混合即成；

磷酸盐缓冲液 b 的制备方法为：取 A 液 435 ml，B 液 65 ml，蒸馏水 500 ml 混合即成。

实施例 3 为本发明的最佳实施例，按实施例 3 配制的试剂，用于检测。

检测方法如下：

一、直接法：适用于检测精液中精子结合抗体。取 10 μ l 待检人新鲜精液和 10 μ l 敏化羧化胶乳液于载玻片上混合，再取 10 μ l 羊抗人 IgG 血清充分混匀后盖上盖玻片，置 37℃ 孵育 3~5 分钟，在 200X 显微镜下观察结果，一般观察 5 个视野，计算活动精子结合胶乳颗粒的百分率。

10%~25%的活动精子粘附了胶乳颗粒判为 (+)；

25%~50%的活动精子粘附了胶乳颗粒判为(++)；
 50%~75%的活动精子粘附了胶乳颗粒判为(+++)；
 >75%的活动精子粘附了胶乳颗粒判为(++++)；
 粘附胶乳颗粒的活动精子<10%判为阴性。

应用直接法检测不育男子（妻子经妇科双合诊，输卵管碘油造影，基础体温测定未发现不育原因），接受输精管吻合术后1~12月随访到的男子，输精管栓堵不完全和堵后再通男子，禁欲3~7天，取精液作精子结合抗体测定，并与进口 Sperm Mar Test 试剂作了比较，获得满意结果（见表1）。

表1 两种胶乳试剂对不育及输精管吻合后男子
 精液中结合抗体的检测结果比较（%）

分组	本所试剂		进口试剂		两种试剂结果符合率（%）	使用单位
	阳性（%）	阴性（%）	阳性（%）	阴性（%）		
不育男子 (n=115)	17.39	82.61	16.52	83.48	98.81	计生所1
(n=84)	15.48	84.52	16.67	83.33		
输精管吻合男 (n=20)	65.00	35.00	65.00	35.00	100.00	计生所2
输精管栓堵塞不全和堵后再通男子 (n=40)	85.00	15.00				计生所3
正常对照男子 (n=18)	0.00	100.0	0.00	100.0	100.00	计生所4

二、间接法：适用检测男、女血清和女性生殖道分泌物中的精子抗体。

- 待检血清或生殖道分泌液 56℃，30分钟灭活；
- 已灭活待检血清或生殖道分泌液用培养液4倍稀释（10 uL: 30uL）于小试管中；
- 加新鲜液化正常人精液 40uL 于（B）小试管中，（37℃）保温1小时，以下按直接法进行：
 - 取上述保温后混合物 10 μl 于载玻片上；
 - 加 10 μl 敏化羧化胶乳液（Latex Ag），并用盖玻片充分混匀；
 - 加 10 μl 羊抗人 IgG 抗血清（Latex Ab）亦用盖玻片充分混匀，盖上盖玻片，置（37℃）3~5分钟，在 200X 显微镜下观察结果。

我们用精子结合抗体检测药盒使用间接法对经精子微量凝集试验（MTAT）和精子制动试验（SIT）检测定为阳性和阴性的部份血清（接受输精管吻合术后患者和不育患者血清）作测定，其比较结果列于表2：

表 2 间接法检测血清与 MTAT,SIT 的结果比较

血清检测结果 分 组	例数	间接法		结果符合(%)
		阳性	阴性	
MTAT (+)	9	1	8	11.11
MTAT(++~++++) 滴度>1:32	40	39	1	97.50
SIT(25%~100%)	26	26	0	100.00
MTAT (-)	11	1	10	90.91

专利名称(译)	精子结合抗体检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN100476432C	公开(公告)日	2009-04-08
申请号	CN200510022324.6	申请日	2005-12-19
[标]发明人	张国芬 孟衍建 马天根		
发明人	张国芬 孟衍建 马天根		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	袁英		
审查员(译)	吴江明		
其他公开文献	CN1790022A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了精子结合抗体检测试剂，其特征在于：该试剂是由敏化羧化胶乳液、羊抗人丙种球蛋白血清组成的液体型双试剂，敏化羧化胶乳液含有标记人丙种球蛋白的羧化胶乳。精子结合抗体检测试剂的制备方法，制备方法包括反应步骤、纯化步骤和保存步骤。本发明具有以下优点：可满足国内各医院、计划生育部门研究与临床需要，为诊断男性免疫性不育，以及男性在接受输精管复育术后，能否恢复生育能力提供重要依据，具较大的经济价值，它操作简便，快速、敏感、特异。

分组	本所试剂		进口试剂		两种试剂结果符合率(%)	使用单位
	阳性(%)	阴性(%)	阳性(%)	阴性(%)		
不育男子 (n=115)	17.39	82.61	16.52	83.48	98.81	计生所1
(n=84)	15.48	84.52	16.67	83.33		
输精管吻合男 (n=20)	65.00	35.00	65.00	35.00	100.00	计生所2
输精管堵塞不全和堵后 再通男子 (n=40)	85.00	15.00				计生所3
正常对照男子 (n=18)	0.00	100.0	0.00	100.0	100.00	计生所4