



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103197057 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201310102069. 0

(22) 申请日 2013. 03. 28

(71) 申请人 天津市宝坻区人民医院
地址 301800 天津市宝坻区广川路 8 号

(72) 发明人 李立和 王彦平 李铮

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

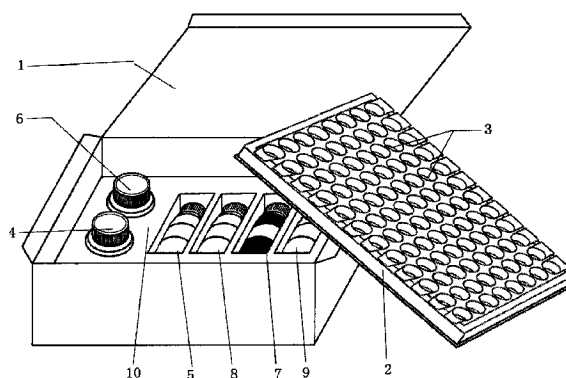
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体检测试剂盒及使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体酶免疫检测试剂盒及其检测方法,属于酶免疫分析技术领域,本发明配制的试剂盒,通过 N-乙酰-L-半胱氨酸使宫颈分泌物中分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体多聚体的双硫键 (-S-S-) 结构断裂转变成可溶性单体,加入到抗子宫内膜抗体检测酶标板上,采用酶免疫吸附 (ELISA) 法检测分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体,经温浴、洗涤、加酶标二抗,使两者进行反应、洗涤、加入酶底物显色。本发明前处理简单,快速、灵敏、准确、廉价的检测方法,适用于宫腔分泌物分泌型抗子宫内膜抗体检测,可以作为不孕不育的重要检查指标。



1. 一种分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体酶免疫检测试剂盒,其特征在于由盒体(1),酶标板(2)中设有反应孔(3)的板条,A试剂瓶(分泌物前处理液)(4),B试剂瓶(酶标记的抗子宫内膜二抗)(5),C试剂瓶(含吐温-20的磷酸盐 PBS 溶液)(6),D试剂瓶(邻苯二胺 OPD 试剂)(7),E试剂瓶(H_2O_2)(8),F试剂瓶(硫酸溶液)(9),塑料托架(10)及酶标板(2)均安放在盒体(1)内。

2. 根据权利要求1所述的分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体酶免疫检测试剂盒,其特征在于所述的塑料托架(10)上制有孔和凹槽。

3. 根据权利要求1所述的分泌型抗子宫内膜抗体酶免疫检测试剂盒,其特征在于所述的酶标板(2)有塑料支架和各自分开的带孔穴的塑料条组成均放在盒体(1)内。

4. 一种分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体检测方法,其特征在于取待检患者宫颈分泌物拭子,加入到2ml含有30g/L N-乙酰-L-半胱氨酸-PBS缓冲液中剧烈震荡,静至60min,分别取100 μ l 经N-乙酰-L-半胱氨酸-PBS缓冲液液处理的分泌物溶液、阴阳性对照加入抗子宫内膜抗体 ELISA 反应孔中,震荡混匀后,至37℃水浴箱水浴20min,应用洗涤液洗涤5次,拍干,每孔加入酶标液50 μ l,至37℃水浴箱水浴20min,应用洗涤液洗涤5次,拍干,加入试剂D、E各50 μ l,至37℃水浴箱水浴10min,加1滴终止液酶标仪测定 A_{490nm} 值。

5. 按照权利要求4所述的分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体检测方法,其特征在于所述的A试剂瓶(分泌物前处理液)为含有30mg/L N-乙酰-L-半胱氨酸、30mg/L 胃蛋白酶的 PBS-Tween 缓冲液。

6. 按照权利要求4所述的分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体检测方法,其特征在于所述的B试剂瓶,为辣根过氧化物酶标记的抗子宫内膜二抗。

7. 按照权利要求4所述的分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体检测方法,其特征在于所述的酶底物液,D试剂瓶为邻苯二胺(OPD)试剂,E试剂瓶为 H_2O_2 。

分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体检测试剂盒及使用方法

技术领域

[0001] 一种分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体酶免检测试剂盒及其检测方法,属于酶免疫分析技术领域。

背景技术

[0002] 不孕不育,分为不孕症和不育症,根据发生的原因可分为器质性、免疫性、医源性、感染性、生理性不孕,根据是否有过妊娠史可分为原发性不孕和继发性不孕。还有 10%~20% 的患者原因不明,在此类患者中,免疫因素占据 30~40% 起着不可忽视的作用。因此免疫性不孕的临床诊治越来越被人们重视,它将有助于临床的诊断与治疗,为患者带来福音。抗子宫内膜抗体(AEAb)主要有 IgG、IgM、IgA3 种类型,受孕是一个很复杂的生理生殖过程,需要机体生殖器官、内分泌、免疫系统功能正常,协调一致才能完成。正常位置的子宫内膜对机体无抗原性,但女性生殖道感染使其内部环境发生改变、生理屏障受到破坏、女性体内独特型抗体和抗独特型抗体的网络功能紊乱,同时也可使免疫系统受损及损伤子宫内膜,导致机体将自身内膜组织作为抗原刺激机体产生抗子宫内膜抗体,以及异位的子宫内膜也可作为抗原刺激机体免疫系统,产生特异性的抗子宫内膜抗体,可以和子宫内膜中的抗原结合,发生抗原抗体反应,激活补体系统,发生一系列免疫反应,导致营养胚胎的糖原分泌不足,同时,抗子宫内膜抗体往往与子宫内膜异位症并存,可通过抑制排卵、干扰精子和卵子的运送、阻碍精卵结合、影响早期胚胎的发育、干扰胚胎着床等环节,最终导致孕卵着床失败而致患者不孕不育。由于反复刺激而大量产生达到一定含量时,可与自身靶细胞一子宫内膜组织发生抗原抗体结合反应,并激活补体引起损伤性效应,造成子宫内膜组织细胞生化代谢及生理功能损害,从而引起不孕。抗子宫内膜抗体是一种自身抗体,所针对的抗原为子宫内膜腺上皮细胞中的一种孕激素依赖蛋白,正常位置的子宫内膜对机体无抗原性,但异位的子宫内膜可作为抗原刺激机体免疫系统,产生特异抗子宫内膜抗体不仅和异位子宫内膜发生抗原抗体反应,同时也可与正常位置的子宫膜细胞中的抗原位点相结合,激活补体系统,局部产生免疫病理变化,直接影响子宫内膜腺体的功能,从而导致孕卵着床失败或(和)不育,最终以不显性的早期流产而告终。因此抗子宫内膜抗体检测对临床诊断与治疗不孕不育患者也有重要意义。

[0003] 分泌型 IgA 抗体(SIgA 抗体)可分为血清型和分泌型,血清型多为 IgA 单体,分泌型多为 IgA 二聚体和多聚体, IgA 可以单体、二聚体甚至多聚体的形式存在,聚合体不仅结合抗原的能力增强,还可使 IgA 能结合分泌片,赋予 IgA 以特殊的活性。

[0004] 局部免疫 SIgA 是由 J 链连接成的双聚 IgA 与 SC(分泌片段)结合后形成的复合物,多为二聚体或多聚体而不易检测。SIgA 与 IgA 在免疫功能上具有不同之处,作用的最大特点是将抗原抗体的反应控制在膜免疫系统的局部,而且是以非炎症的方式限制抗原物质对粘膜表面的侵入。SIgA 的重链有一个含额外半胱氨酸的 C 端结构,可与 B 细胞产生的 J 链相结合,使 IgA 形成二聚体或多聚体。聚合体不仅结合抗原的能力增强, J 链对于 SIgA 的形成有两个重要的功能,除了使 IgA 形成双聚体,在多聚 IgA(多聚免疫球蛋白)与

SC/pIgR(多聚免疫球蛋白受体)结合的亲和性方面也起了重要作用,在排除抗原方面发挥了重要的作用,不仅可以通过聚集潜在入侵的病原体使之易于蠕动和粘液纤毛运动将其清除,而且SC能通过其糖类残基使SIgA能与沿着表皮表面的粘膜抗体锚着于适当的组织处,破坏抗原的定位,进而清除抗原,SC上的N-糖基为抗原粘附和凝集素的结合提供了很多表位,因此,SIgA抗体在生殖免疫中起到重要作用。

[0005] N-乙酰-L-半胱氨酸为粘液溶解剂,临床上用于呼吸病人能增加呼吸道粘膜浆液腺的分泌,从而降低痰液粘度,促进肺表面活性物质的分泌,增加支气管纤毛运动,使痰液易于咳出。本品的巯基(-SH)结构可使粘蛋白的双硫(-S-S-)结构断裂,降低宫腔分泌物粘度,胃蛋白酶具有分解蛋白质的作用,使分泌型抗子宫内膜抗体的多聚体转变为单体而易于ELISA法检测。采用聚苯乙烯反应板条固相吸附子宫内膜抗原,在反应过程中若被检样本存在抗子宫内膜抗体,则与板条中包被的精子抗原结合,形成抗原-抗体复合物,再与酶标记的二抗形成抗原-抗体-抗抗体复合物,并结合在微孔壁表面,通过底物作用在相应检测孔中出现蓝色,用以特异性的检测分泌物中的抗子宫内膜抗体。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种样品前处理简单,提取后可直接测定,简便、快速、灵敏、准确的检测分泌型IgA抗子宫内膜抗体的方法。

[0007] 本发明试剂盒主要由盒体(1),酶标板(2)中设有反应孔(3)的板条,A试剂瓶(分泌物前处理液)(4),B试剂瓶(酶标记的抗子宫内膜二抗)(5),C试剂瓶(含吐温-20的磷酸盐PBS溶液)(6),D试剂瓶(邻苯二胺OPD试剂)(7),E试剂瓶(H_2O_2)(8),F试剂瓶(硫酸溶液)(9),塑料托架(10)及酶标板(2)均放在盒体(1)内。

[0008] 本发明的原理是采用N-乙酰-L-半胱氨酸分解宫腔分泌物分泌型IgA抗体,然后采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测分泌型IgA抗子宫内膜抗体。

具体实施方式

[0009] 一、抗子宫内膜抗体酶标板的制备

[0010] 将子宫内膜抗原用包被液稀释成1:200倍,加入100 μ l包被微孔反应板的微孔,加入含1%小牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液350 μ l/每孔,室温封闭2小时,4 $^{\circ}$ C过夜。甩尽孔内液体后,用洗涤液洗3次,每次3分钟。

[0011] 二、酶标记抗体的制备

[0012] (1) 将辣根过氧化物酶5mg溶于0.5ml0.2mol/L pH5.6HAC-NaAc缓冲液中,滴入0.1mol/L NaIO₄0.25ml,4 $^{\circ}$ C 30分钟。

[0013] (2) 加入2.5%乙二醇0.5ml,室温下30min。

[0014] (3) 加入抗子宫内膜抗体二抗5~10mg,用1.0mmol/L pH9.5碳酸盐缓冲液调整反应液的pH至9.0左右,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0015] (4) 加入NaHB₄0.1ml混匀,4 $^{\circ}$ C 2小时后对0.01mol/L pH7.4PBS透析,4 $^{\circ}$ C过夜。加入适量中性甘油后小量分装。

[0016] 三、洗涤缓冲液(PH7.4PBS)配置:0.15M KH₂PO₄0.2克,Na₂HPO₄•12H₂O2.9克,NaCl18.0克,KCl0.2克,Tween-200.05% 0.5ml加蒸馏水至1000ml。

[0017] 四、前处理液的配置：在 1L 洗涤液中加入 N-乙酰-L-半胱氨酸 30mg, 30mg 胃蛋白酶即为前处理液。

附图说明

[0018] 图 1 分泌型 IgA 抗子宫内膜抗体试剂盒示意图。

[0019] 图 2 酶标板示意图。

[0020] 图 3 酶标板条与反应孔示意图。

具体实施方式

[0021] 实施例 1

[0022] 1. 样品处理取待检患者宫颈分泌物拭子, 加入到 2ml 前处理液中剧烈震荡, 静至 60min, 待用。

[0023] 2. 检测方法使用前, 将分泌型抗子宫内膜抗体试剂盒平衡至室温, 取 100 μ l 经 N-乙酰-L-半胱氨酸溶解剂处理的分泌物溶液、阴阳性对照加入到酶标板孔中, 震荡混匀后, 至 37℃ 水浴箱水浴 20min, 应用洗涤液洗涤 5 次, 拍干, 每孔加入酶标液 50 μ l, 至 37℃ 水浴箱水浴 20min, 应用洗涤液洗涤 5 次, 拍干, 加入试剂 D、试剂 E 各 50 μ l, 至 37℃ 水浴箱水浴 10min, 加 1 滴终止液, 酶标仪读取结果。

[0024] 3. 结果判定：可于白色背景上, 直接用肉眼观察结果：反应孔内颜色越深, 阳性程度越强, 阴性反应为无色或极浅。也可测 OD 值：在 ELISA 检测仪上, 于 490nm 处, 以空白对照孔调零后测各孔 OD 值, 若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍, 即为阳性。

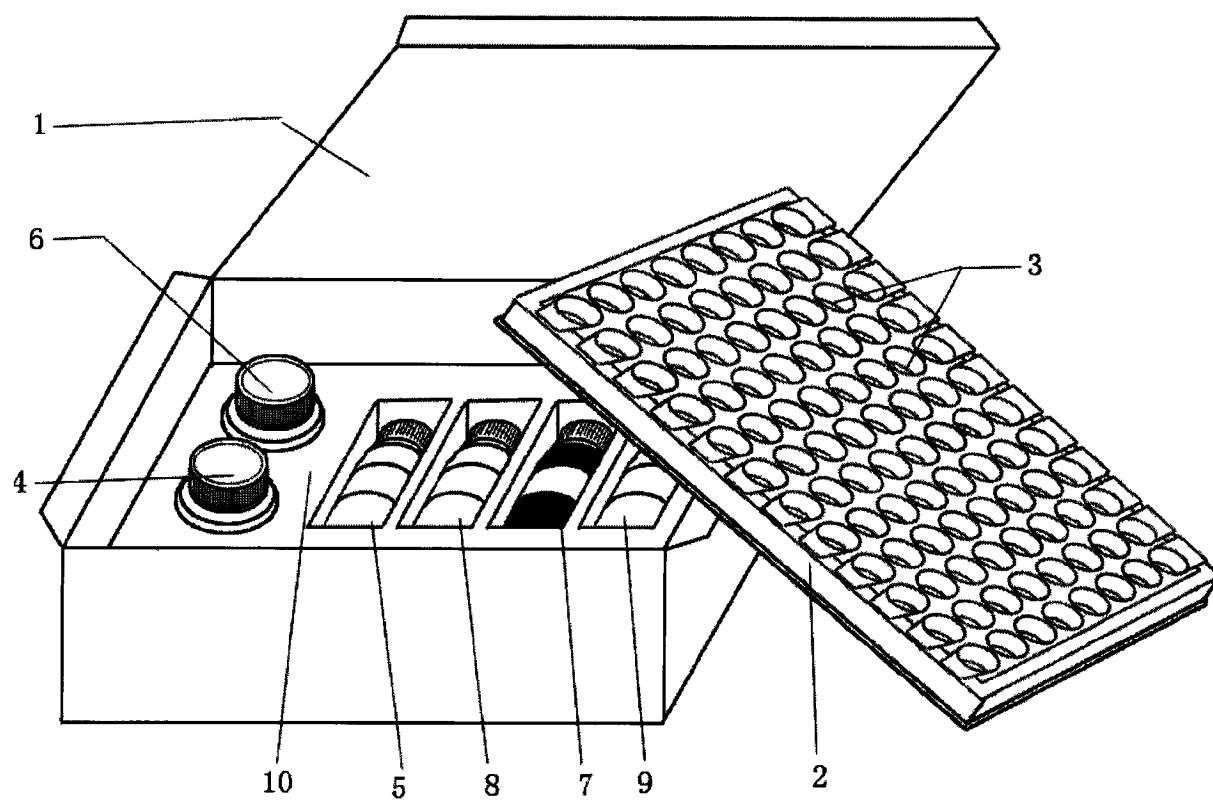


图 1

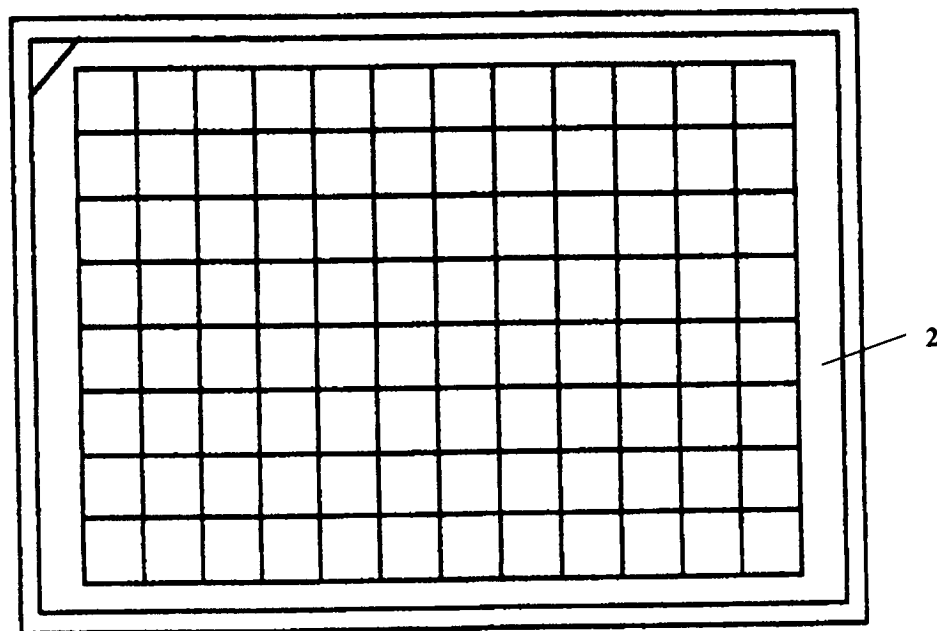


图 2

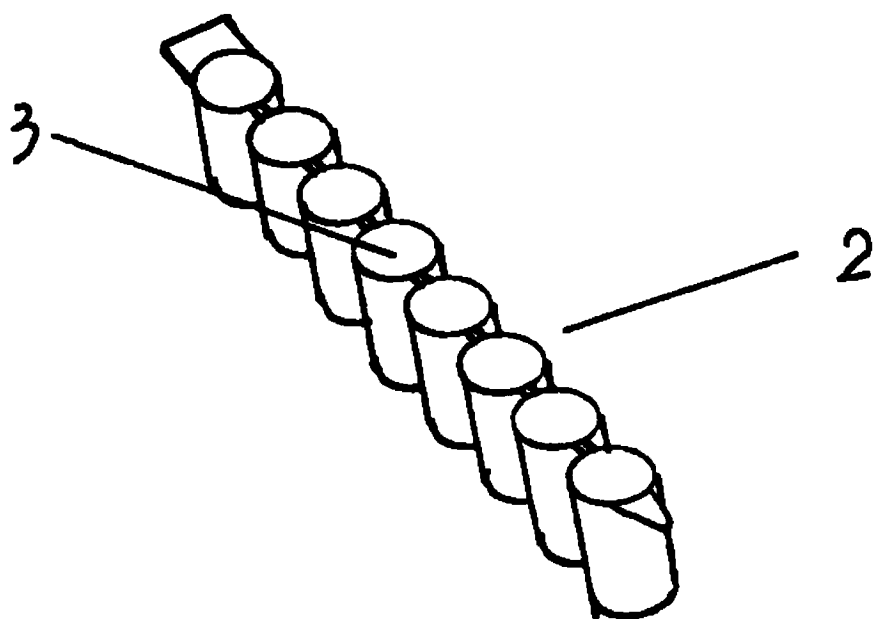


图 3

专利名称(译)	分泌型IgA抗子宫内膜抗体检测试剂盒及使用方法		
公开(公告)号	CN103197057A	公开(公告)日	2013-07-10
申请号	CN201310102069.0	申请日	2013-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	天津市宝坻区人民医院		
申请(专利权)人(译)	天津市宝坻区人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	天津市宝坻区人民医院		
[标]发明人	李立和 王彦平 李铮		
发明人	李立和 王彦平 李铮		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种分泌型IgA抗子宫内膜抗体酶免疫检测试剂盒及其检测方法，属于酶免疫分析技术领域，本发明配制的试剂盒，通过N-乙酰-L-半胱氨酸使宫颈分泌物中分泌型IgA抗子宫内膜抗体多聚体的双硫键(-S-S-)结构断裂转变成可溶性单体，加入到抗子宫内膜抗体检测酶标板上，采用酶免疫吸附(ELISA)法检测分泌型IgA抗子宫内膜抗体，经温浴、洗涤、加酶标二抗，使两者进行反应、洗涤、加入酶底物显色。本发明前处理简单，快速、灵敏、准确、廉价的检测方法，适用于宫腔分泌物分泌型抗子宫内膜抗体检测，可以作为不孕不育的重要检查指标。

