



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102253203 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 201110054994. 1

(22) 申请日 2011. 03. 09

(71) 申请人 塔里木大学

地址 843300 新疆维吾尔自治区阿拉尔市塔里木大学动科学院

(72) 发明人 高庆华 马瑛 韩春梅

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种奶牛宫颈粘液中抗精子抗体的检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种奶牛宫颈粘液中抗精子抗体的检测方法,包括 1) 取奶牛发情盛期的宫颈粘液备用;2) 取公牛细管冻精、离心弃上清液,加入 EBSS 悬浮,将悬浮液铺在预先放有含 10% 胎牛血清的 EBSS 的试管底部,培养箱中孵育 45min,取上层清液;3) 将菠萝蛋白酶液加入室温下化冻宫颈粘液中离心;4) 将步骤 3) 的上清液用 EBSS 液稀释后加入 15 μ L 步骤 2) 制备的上层清液混匀,覆以 20 μ L 石蜡油,孵育 30min,凝集精子数计 N,精子总数计 Nz,以 $N/N_z \geq 10\%$ 判定为抗精子抗体阳性, $< 10\%$ 为抗精子抗体阴性。该检测方法能够简易、快速检出奶牛群抗精子免疫不孕牛的方法。

1. 一种奶牛宫颈粘液中抗精子抗体的检测方法,其特征在于,包括下列步骤:

1) 取奶牛发情盛期的宫颈粘液在 -20°C 进行冷冻备用;

2) 取 0.25ml 活率 ≥ 0.40 、密度 $\geq 10^8$ 精子 /ml 的公牛细管冻精, 38°C 水浴解冻, 700g 离心 8min 后弃上清液, 加入 EBSS 1ml 悬浮, 将悬浮液铺在预先放有 2ml 含 10% 胎牛血清的 EBSS 的试管底部, 倾斜 45° 在 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 45min, 取上层清液;

3) 将 500 μL 浓度为 60 $\mu\text{g/ml}$ ~ 160 $\mu\text{g/ml}$ 的菠萝蛋白酶液加入 500 μL 室温下化冻宫颈粘液中, 37°C 温育 30min, 2600g 离心 15min;

4) 将步骤 3) 的上清液用 EBSS 液作 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256 共 8 个梯度稀释至 15 μL , 再加入 15 μL 步骤 2) 制备的上层清液混匀, 覆以 20 μL 石蜡油, 5% CO_2 、 37°C 孵育 30min, 凝集精子数计 N, 精子总数计 N_z , 以 $N/N_z \geq 10\%$ 判定为抗精子抗体阳性, $< 10\%$ 为抗精子抗体阴性。

一种奶牛宫颈粘液中抗精子抗体的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种奶牛宫颈粘液中抗精子抗体的检测方法。

背景技术

[0002] 抗精子抗体 (antisperm antibody, AsAb) 能与精子结合产生免疫反应而影响生殖能力。精子对雄性具有抗原性,而精子对雌性而言是同种异体免疫抗原,每一次交配都相当于一次免疫接种。生殖道局部和血清抗精子抗体是机体对精子抗原产生自身或同种异体免疫反应的产物,是引起免疫性不孕的主要原因。奶牛生产环节的核心是繁殖,防治不孕是要解决的首要问题。抗精子抗体对不育的影响,在奶牛的群体当中普遍存在,而相当一部分抗精子免疫不孕牛可以通过适当的针对性技术措施加以防治。奶牛免疫不孕可能并没有明显的征兆,周期正常、卵泡发育与排卵均正常,与明显的其他不孕类型相比更加隐蔽,对生产影响更为严重。早发现并采取必要防治措施非常重要。

[0003] 抗精子抗体的检测方法还有间接免疫珠试验、间接混合抗球蛋白反应试验、精子制动试验、酶联免疫吸附试验和免疫胶体金渗滤斑点试验,等。

[0004] 间接免疫珠试验 (I-BT) 和间接混合抗球蛋白反应试验 (I-MAR):试验方法和原理与 IBT 和 MAR 相同。唯一区别在于使用正常供体新鲜精液代替不育症患者精液,以去精浆供体精子与待测体液标本共同培养,使供体精子与标本中可能存在的 AsAb 结合,检测是否通过培养使供体精子获得了结合免疫珠的能力,或与 MAR 标记颗粒发生混合凝集的能力,判断标本中 AsAb 的存在。I-IBT 也是 WHO 推荐用于体液 AsAb 检测的方法。与 I-MAR 相比,其优点是可以检测 IgA 类 AsAb。还可以识别 AsAb 在精子表面的定位。

[0005] 精子制动试验 (SIT):设计原理为抗体依赖的补体介导的细胞毒反应,主要用于体液标本中精子制动抗体的检测。将补体加热灭活后的患者血清和供者健康精子混合后,加入外源补体,若患者体液中含精子制动抗体,则出现精子运动力降低或死亡。由于只有 IgG 类型的 AsAb 才能被补体固定,而对于体液中占多数的 IgA 类 AsAb 则不能被检测;另外,有些结合于精子头部、而不引起精子制动作用的 IgG 类 AsAb,也不能被检测;同时,本试验检测主观性较强,检测程序的数字化有助于避免主观判断的误差。

[0006] 酶联免疫吸附试验 (ELISA):常用的方法为使用全精子或精子提取物包被多孔塑料板,由于全精子包被过程所导致的一些精子特异性抗原的变性和精子非特异性内部抗原的暴露,以及精子膜提取物包被可能缺失一些生育相关的关键抗原,其检测特异性不高。同时,由于这类方法几乎一概存在高背景噪音,实际灵敏度也不高。使用纯化精子特异性抗原作为 ELISA 的包被抗原,有望克服以上的缺点,从而使 ELISA 法最终成为一种真正实用的特异性 AsAb 检测方法。

[0007] 免疫胶体金渗滤斑点试验 (DIGFA):以红色胶体金代替酶作为标记物进行斑点免疫结合试验 (DIBA)。其测定原理是利用微孔膜的可滤性,在其反应膜上固定有精子抗原提取物,膜下装有吸水垫料,依次加入待测血清和胶体金标记的葡萄球菌 A 蛋白 (SPA),若

血清中含有 AsAb,即可在膜上显色。该法敏感、快速、简便,是目前国内临床上较为常用的 AsAb 检测方法,并有成品试剂盒出售。但同样不能定量,也不能排除生育无关 AsAb 引起的假阳性结果。

发明内容

[0008] 针对上述现有技术中存在的问题与不足,本发明的目的在于提供一种检测奶牛抗精子抗体的方法,该检测方法能够简易、快速检出奶牛群抗精子免疫不孕牛的方法。

[0009] 实现上述发明目的技术方案是:一种奶牛宫颈粘液中抗精子抗体的检测方法,包括下列步骤:

[0010] 1) 取奶牛发情盛期的宫颈粘液在 -20°C 进行冷冻备用;

[0011] 2) 取 0.25ml 活率 ≥ 0.40 、密度 $\geq 10^8$ 精子 / ml 的公牛细管冻精, 38°C 水浴解冻, 700g 离心 8min 后弃上清液,加入 EBSS 1ml 悬浮,将悬浮液铺在预先放有 2ml 含 10% 胎牛血清的 EBSS 的试管底部,倾斜 45° 在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中孵育 45min ,取上层清液;

[0012] 3) 将 $500\mu\text{L}$ 浓度为 $60\mu\text{g}/\text{ml} \sim 160\mu\text{g}/\text{ml}$ 的菠萝蛋白酶液加入 $500\mu\text{L}$ 室温下化冻宫颈粘液中, 37°C 温育 30min , 2600g 离心 15min ;

[0013] 4) 将步骤 3) 的上清液用 EBSS 液作 $1/2$ 、 $1/4$ 、 $1/8$ 、 $1/16$ 、 $1/32$ 、 $1/64$ 、 $1/128$ 、 $1/256$ 共 8 个梯度稀释至 $15\mu\text{L}$,再加入 $15\mu\text{L}$ 步骤 2) 制备的上层清液混匀,覆以 $20\mu\text{L}$ 石蜡油, $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 孵育 30min ,凝集精子数计 N ,精子总数计 N_z ,以 $N/N_z \geq 10\%$ 判定为抗精子抗体阳性, $< 10\%$ 为抗精子抗体阴性。

[0014] 本发明检测奶牛抗精子抗体的方法与现有技术相比,具有以下优点:

[0015] 1) 本发明的检测方法能够简易、快速检出奶牛群体中抗精子抗体免疫不孕牛的方法,不需要许多价值昂贵的实验室仪器,在普通光学显微镜下即能观察到精子凝集现象,能够广泛应用于实际生产当中。

[0016] 2) 本发明的检测材料是奶牛发情盛期时的宫颈粘液,而宫颈粘液中的抗精子抗体检测阳性率明显高于血清中的抗精子抗体,因而具有更高的应用价值。

具体实施方式

[0017] 以下通过发明人给出的试验例和具体实施方式来进一步说明本发明的有益效果。

[0018] 试验例 1

[0019] 材料和方法

[0020] 材料

[0021] 正常生殖能力 3 头公牛的细管冻精(活率 ≥ 0.40 ,密度 $\geq 10^8$ 精子 / ml)。根据配种记录和直肠检查结果确定 23 头屡配不孕奶牛作实验牛和 20 头正常牛用作对照进行检测,在直检后刺激其宫颈待其流出发情盛期宫颈粘液后,用注射器吸取注入事先高压处理过的青霉素小瓶中,进行密封, -20°C 进行冷冻备用。

[0022] 主要试剂和仪器

[0023] 主要试剂:PBS 磷酸缓冲液, 1% 胎牛血清的 Earle's 平衡盐液 (EBSS),液氮罐,水浴锅,超净工作台,生物显微镜,血球计数板,微量加样器,高速冷冻离心机 (Sigma3K30 型,德国),菠萝蛋白酶 (BIO BASIC),液体石蜡。

[0024] 主要仪器:96孔聚苯乙烯微量测定板(Biochemical,加拿大),荧光高级研究倒置显微镜(TE2000E,日本),CO₂培养箱(MCO-15A,日本)。

[0025] 方法

[0026] 精子悬液优化

[0027] 两组各分别取三头公牛6管0.25ml冻精(2管/头),38℃水浴解冻,装入两个2ml离心管中,700×g离心8min后弃上清液,分别加入EBSS(处理组)和PBS(对照组)1ml悬浮,将悬浮液分别小心地用注射器铺在另两个预先放有2ml含10%胎牛血清的EBSS和PBS的试管底部,倾斜45°在37℃、5%CO₂培养箱中孵育45min,分别取上层清液2ml,血球计数板检测密度与活力,对活率≥0.6、密度≥3×10⁷精子/ml的优化精子悬液调密度至3×10⁷精子/ml备用。

[0028] 菠萝蛋白酶液的浓度优化

[0029] 三蒸水配制浓度分别为10μg/ml、20μg/ml、40μg/ml、80μg/ml、160μg/ml菠萝蛋白酶液,分别以不同浓度500μl菠萝蛋白酶液加入500μl化冻宫颈粘液中,37℃温育30min,解粘液有拉丝现象标记为“+”,无拉丝现象为“-”。解粘液2600×g离心15min取15μl加入96孔培养板并在各孔再加入15μl精子悬液混匀,倒置镜下观察判断,精子不能游动标为“—a”,可作转圈运动等小幅度运动标为“--a”,速度明显较慢标为“-a”,速度正常,与在精子稀释液中运动状态一样时标为“a”。筛选“a”结果的菠萝蛋白酶液的优化浓度。

[0030] 浅盘凝集法检测宫颈粘液AsAb

[0031] 将宫颈粘液放入平皿自然摊薄,盖盖后水平放入-20℃冰箱冻结,手术刀片划取约500μl放入1.5ml离心管中,融化后每管中分别加等量的新鲜配制的优化浓度菠萝蛋白酶液,37℃温育30min,2600×g离心15min,在96孔板中,上清液用EBSS液作1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256共8个梯度稀释至15μl,分别加入15μl精子悬液混匀,覆以20μl石蜡油,同时设精子悬液作对照,5%CO₂、37℃孵育30min,倒置显微镜下计算凝集精子比例(观察不重复视野的精子总数大于200个,取两人重复计算均值),凝集精子数计N,精子总数计Nz,以N/Nz≥10%判定为阳性,标为“+”,<10%为阴性,标为“-”。

[0032] 正常牛宫颈粘液,1/2稀释倍数时AsAb阳性率为80%,但平均精子凝集率为10.8%,1/4稀释倍数时均不能达到10%的凝集率,全部呈阴性,1/4稀释比可作为正常牛判断界限;全部不孕牛到1/64稀释倍数的凝集率均>10%,全为阳性,在1/128时AsAb阳性率为20%,精子凝集率为7.5%,不孕牛可用1/64稀释比作为判定标准。

[0033] 实施例1

[0034] 1) 根据配种记录和直肠检查结果确定屡配不孕奶牛,在直检后刺激其宫颈待奶牛发情盛期的宫颈粘液在-20℃进行冷冻备用;

[0035] 2) 取0.25ml活率≥0.40、密度≥10⁸精子/ml的公牛细管冻精,38℃水浴解冻,700g离心8min后弃上清液,加入EBSS 1ml悬浮,将悬浮液铺在预先放有2ml含10%胎牛血清的EBSS的试管底部,倾斜45°在37℃、5%CO₂培养箱中孵育45min,取上层清液;

[0036] 3) 将500μl浓度为80μg/ml的菠萝蛋白酶液加入500μl室温下化冻宫颈粘液中,37℃温育30min,2600g离心15min;

[0037] 4) 将步骤3)的上清液用EBSS液作1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256

共 8 个梯度稀释至 15 μ L, 再加入 15 μ L 步骤 2) 制备的上层清液混匀, 覆以 20 μ L 石蜡油, 5% CO₂、37℃ 孵育 30min, 倒置显微镜下计算凝集精子比例。在 1/64 稀释倍数时, 凝集精子数 N 为 37 个, 精子总数 Nz 为 223 个, 精子凝集率 N/Nz 16.6%, N/Nz $\geq$ 10% 判定结果为抗精子抗体阳性, 与实际生产结果一致。

[0038] 实施例 2

[0039] 1) 根据配种记录和直肠检查结果确定屡配不孕奶牛, 在直检后刺激其宫颈待奶牛发情盛期的宫颈粘液在 -20℃ 进行冷冻备用;

[0040] 2) 取 0.25ml 活率 $\geq$ 0.40、密度 $\geq 10^8$ 精子 /ml 的公牛细管冻精, 38℃ 水浴解冻, 700g 离心 8min 后弃上清液, 加入 EBSS 1ml 悬浮, 将悬浮液铺在预先放有 2ml 含 10% 胎牛血清的 EBSS 的试管底部, 倾斜 45° 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 45min, 取上层清液;

[0041] 3) 将 500 μ l 浓度为 120 μ g/ml 的菠萝蛋白酶液加入 500 μ l 室温下化冻宫颈粘液中, 37℃ 温育 30min, 2600g 离心 15min;

[0042] 4) 将步骤 3) 的上清液用 EBSS 液作 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256 共 8 个梯度稀释至 15 μ L, 再加入 15 μ L 步骤 2) 制备的上层清液混匀, 覆以 20 μ L 石蜡油, 5% CO₂、37℃ 孵育 30min, 倒置显微镜下计算凝集精子比例, 在 1/64 稀释倍数时, 凝集精子数 N 为 29, 精子总数 Nz 为 240, 精子凝集率 N/Nz 为 12.1%, N/Nz $\geq$ 10% 判定结果为抗精子抗体阳性, 与实际生产结果一致。

[0043] 实施例 3

[0044] 1) 取奶牛发情盛期的宫颈粘液在 -20℃ 进行冷冻备用;

[0045] 2) 取 0.25ml 活率 $\geq$ 0.40、密度 $\geq 10^8$ 精子 /ml 的公牛细管冻精, 38℃ 水浴解冻, 700g 离心 8min 后弃上清液, 加入 EBSS 1ml 悬浮, 将悬浮液铺在预先放有 2ml 含 10% 胎牛血清的 EBSS 的试管底部, 倾斜 45° 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 45min, 取上层清液;

[0046] 3) 将 500 μ l 浓度为 160 μ g/ml 的菠萝蛋白酶液加入 500 μ l 室温下化冻宫颈粘液中, 37℃ 温育 30min, 2600g 离心 15min;

[0047] 4) 将步骤 3) 的上清液用 EBSS 液作 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256 共 8 个梯度稀释至 15 μ L, 再加入 15 μ L 步骤 2) 制备的上层清液混匀, 覆以 20 μ L 石蜡油, 5% CO₂、37℃ 孵育 30min, 倒置显微镜下计算凝集精子比例, 在 1/4 稀释倍数时, 凝集精子数 N 为 7, 精子总数 Nz 为 203, 精子凝集率 N/Nz 为 3.4%, N/Nz < 10% 为抗精子抗体阴性, 可以判定该牛为可孕牛。

专利名称(译)	一种奶牛宫颈粘液中抗精子抗体的检测方法		
公开(公告)号	CN102253203A	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN201110054994.1	申请日	2011-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	塔里木大学		
申请(专利权)人(译)	塔里木大学		
当前申请(专利权)人(译)	塔里木大学		
[标]发明人	高庆华 马瑛 韩春梅		
发明人	高庆华 马瑛 韩春梅		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种奶牛宫颈粘液中抗精子抗体的检测方法，包括1)取奶牛发情盛期的宫颈粘液备用；2)取公牛细管冻精、离心弃上清液，加入EBSS悬浮，将悬浮液铺在预先放有含10%胎牛血清的EBSS的试管底部，培养箱中孵育45min，取上层清液；3)将菠萝蛋白酶液加入室温下化冻宫颈粘液中离心；4)将步骤3)的上清液用EBSS液稀释后加入15μL步骤2)制备的上层清液混匀，覆以20μL石蜡油，孵育30min，凝集精子数计N，精子总数计Nz，以N/Nz≥10%判定为抗精子抗体阳性，<10%为抗精子抗体阴性。该检测方法能够简易、快速检出奶牛群抗精子免疫不孕牛的方法。