



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101923094 A

(43) 申请公布日 2010.12.22

(21) 申请号 200910217432.7

(22) 申请日 2009.12.28

(71) 申请人 张洪友

地址 163319 黑龙江省大庆市高新技术开发  
区黑龙江八一农垦大学

(72) 发明人 张洪友 夏成 高维明 曾文渊  
刘骞 黄海波

(51) Int. Cl.

G01N 33/64 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 2 页

### (54) 发明名称

奶牛乳汁孕酮检测试剂盒

### (57) 摘要

本发明公开了一种奶牛乳汁孕酮检测试剂盒,涉及生物技术,尤其是一种可用于酶标记免疫检测技术,建立了直接竞争 ELISA 法的定量酶免疫吸附试验,用于检测奶牛乳汁中孕酮水平。应用 ELISA 方法,通过抗原-抗体的特异性结合,将抗孕酮单克隆抗体、孕酮或酶标孕酮复合物间接地固定于固相酶标板上,建立了直接竞争 ELISA 法定量检测奶牛乳汁中孕酮。用抗孕酮单克隆抗体包被酶标板,辣根过氧化物酶标记孕酮抗原。具有简便、快速、灵敏度高等优点,用于检测奶牛乳汁孕酮有良好的开发使用价值。

1. 奶牛乳汁孕酮检测试剂盒,其特征在于:通过抗原-抗体反应,将抗体、抗原或酶标抗原固定于固相酶标板上,建立板式直接竞争 ELISA 法。

2. 根据权利要求 1 所述的奶牛乳汁孕酮检测试剂盒,其特征在于:所述的板式抗孕酮单克隆抗体包被酶标板,辣根过氧化物酶标记孕酮抗原。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的奶牛乳汁孕酮检测试剂盒,其特征在于:用板式直接竞争 ELISA 法定量检测奶牛乳汁孕酮。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的奶牛乳汁孕酮检测试剂盒,其特征在于:制备方法是板式之竞争 ELISA 法的制备方法,第一,抗孕酮单克隆抗体固相酶标板制备:抗孕酮单克隆抗体腹水采用辛酸-硫酸铵法和 HiTrap Protein G HP 层析柱纯化,用 0.01mmol/LPBS1 : 8000 稀释抗体包被酶标板 4℃ 过夜,并用 1% 酪蛋白封闭,后置于 30℃ 干燥箱处理,处理后置于 4℃ 待用。第二,酶标记孕酮抗原的制备:(1) 称取 11 $\alpha$ -羟孕酮半琥珀酸酯 2.6mg, N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 0.9mg 和二环己基羰二亚胺 (DCC) 1.3mg 置 5mL 三角烧杯中,滴加 0.15mL 二甲基甲酰胺 (DMF),混匀后于 4℃ 过夜;(2) 次日可发现有尿素衍生物结晶析出,说明已有孕酮衍生物的 N-羟基琥珀酰亚胺活化酯形成;(3) 取辣根过氧化物酶 (HRP) 2mg,用 2mL 0.1MNaHCO<sub>3</sub> 液溶解,室温搅拌下加活化酯 2 $\mu$ L,以后每 10 秒 2 $\mu$ L,共加 10 $\mu$ L。室温下继续搅拌 8h,然后应用 0.04M pH 7.2 的 PBS1000mL 搅拌透析 24h,期间换液三次。初步透析的偶联物上 SephadexG-25 柱 (GE),用 PBS 洗脱,流速为 1 滴/6s。加稳定剂在 -20℃ 保存。第三,标准品的制备:以 5.0g 活性炭和 0.5g 葡聚糖 (G25) 溶于 250mL 不含 BSA 的测定缓冲液,磁力搅拌器搅拌 30min,成为用葡聚糖包被的活性炭 (DCC),弃上清取沉淀,加入 50mL 奶牛乳样,磁力搅拌器搅拌 30min,置冰箱中过夜,2000rpm 离心 1h,取上清液同法再离心一次,收集上清即为去激素率 98% 的脱激素乳。

5. 根据权利要求 3 所述的奶牛乳汁孕酮检测试剂盒,其特征在于:试剂盒的使用方法:(1) 将试剂盒取出,将各种试剂恢复到室温;(2) 洗涤:用洗涤液洗涤酶标板,3min/次,洗 2 次;(3) 标准品配制:用标准品稀释液稀释标准品成 8 个浓度 (40ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL、0ng/mL);(4) 加样:将稀释后的标准品和待测乳样各 100 $\mu$ L,分别加入 100 $\mu$ L 酶标孕酮工作液混匀后加入各孔,100 $\mu$ L/孔,并做重复孔。置于 37℃ 反应 50min;(5) 洗涤:同 2,洗 3 次;(6) 显色:加入显色剂(由显色 B 液对显色 A 液 100 倍稀释)100,室温避光 15min;(7) 终止:加入终止液 50 $\mu$ L/孔;(8) 酶标仪测定 OD<sub>450nm</sub> 值。其中 B<sub>0</sub> 是无孕酮抑制时 0ng/mL 的 OD 值,B 为各个孕酮浓度抑制时的 40ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL OD 值,代入公式  $\text{Logit}(B/B_0) = \text{Ln}[(B/B_0)/(1-B/B_0)]$ ,以  $\text{Lg}[P]$  为横坐标,  $\text{Logit}(B/B_0)$  为纵坐标绘制标准曲线,利用 Microsoft Excel 拟合曲线方程。将所得 B/B<sub>0</sub> 值代入曲线方程求出乳汁样品中的孕酮含量。试剂盒的最低检测限为 0.14ng/mL。

## 奶牛乳汁孕酮检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种奶牛乳汁孕酮检测试剂盒,用于检测奶牛乳汁孕酮水平。

### 技术背景

[0002] 目前我国奶牛的饲养规模不断的扩大,现在已经成为畜牧业的支柱产业,为了缩短奶牛的产犊间隔提高奶牛的利用率,能使奶牛多产奶和多繁殖犊牛,要经常对产犊后空怀泌乳母牛进行卵巢孕酮检查,目前在养殖现场进行卵巢孕酮检查常用的有直肠检查与采血检查这两种方法,直肠检查法对牛的直肠粘膜卵巢等易造成机械性刺激易引起粘膜损伤和造成出血对奶牛卵巢造成损伤,需要检查人员直检水平较高,但检查结果也不很准确;采血检查法须将奶牛保定易造成应激有碍奶牛健康,奶牛乳汁孕酮的变化与血浆孕酮的含量同步。所以,根据乳汁中孕酮含量可以描述出母牛生殖过程所发生的生理变化,包括黄体的形成及其分泌活动的连续或结束等生理状态。因此,根据乳汁中孕酮含量的变化可检查母牛的发情、妊娠诊断、产后卵巢机能活动、以及一些繁殖疾病的诊断及其治疗效果的监测等。乳汁中孕酮含量的测定,取样方便,不损害家畜健康,不影响生产,比血浆孕酮的测定更具有实用性。因此,采取奶牛乳汁孕酮检查法是奶牛机体孕酮含量测定的有效途径,寻求一种奶牛乳汁孕酮试剂盒成为广大奶牛养殖场、户和兽医的祈盼。

### 发明内容

[0003] (一) 要解决的技术问题

[0004] 本发明的目的是针对上述现有的技术不足,提供一种取样方便,不损害家畜健康,不影响生产,比血浆孕酮的测定更具有实用性的乳汁孕酮检测试剂盒。

[0005] (二) 技术方案

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明在于:提供一种试剂盒,系板式直接竞争 ELISA 法。

[0008] 本发明的目的可通过下述技术方案实现的:本发明是通过抗原-抗体特异性反应,将抗体、抗原或酶标抗原固定于固相酶标板上。以酶免疫技术为基础,建立直接竞争 ELISA 法定量检测奶牛乳汁孕酮,可供奶牛早期妊娠诊断、发情鉴定以及相关疾病的诊断的确诊使用,可以通过连续动态监测孕酮判断奶牛机体的生殖状态。

[0009] 在上述技术方案基础上,采用抗孕酮单克隆抗体固相于酶标板,辣根过氧化物酶标记孕酮抗原,建立直接竞争 ELISA 法。

[0010] 本发明中,抗孕酮单克隆抗体直接固相于酶标板,单克隆抗体经 0.01mmol/LPBS 稀释后,置于 4℃ 过夜包被酶标板,后用 1% 酪蛋白封闭,再经过 30℃ 干燥箱处理 2h,置于 4℃ 保存。应用该方法制备的酶标板具有稳定性好、操作及处理简便等优点。同时抗孕酮单克隆抗体的特异性强,降低阴性成本底,提高了试剂盒的灵敏度,应用于孕酮的检测,能够达到检测乳汁中孕酮含量的要求。

[0011] 辣根过氧化物酶标记孕酮抗原的制备,采用常用的碳化二亚胺法。标记结合物分

别加 30-40% 的甘油, -20℃ 可保存数年。

### [0012] (三) 有益效果

[0013] 本发明优越性在于: 板式直接竞争 ELISA 定量检测奶牛乳汁孕酮的方法具有简便、快速、低阴性本底和低成本。方法学考核表明本发明方法的最低检测限可达 0.14ng/mL, 批内平均差异 4.11%, 批间平均差异 6.26%。用本发明方法对配种奶牛 19-23 天乳汁孕酮检测, 确定妊娠与未妊娠的诊断准确率为 93.3% 和 95.8%。说明本方法对检测奶牛乳汁孕酮来改善奶牛繁殖具有重要的商业开发价值。

### 附图说明

[0014] 图 1 是发明创建的板式直接竞争 ELISA 法定量检测奶牛乳汁孕酮的操作流程图。

[0015] 图 2 是本发明板式直接竞争 ELISA 法定量检测奶牛乳汁孕酮的定量标准曲线。

### 具体实施方式

[0016] 下面结合附图, 进一步详细说明本发明所述奶牛乳汁孕酮检测试剂盒的具体实施方式, 但不用来限制本发明的保护范围。

#### [0017] 实施例一

[0018] 通过抗原-抗体反应, 将抗体、抗原或酶标抗原固定于固相酶标板上, 建立板式直接竞争 ELISA 法。其中所述的固相直接竞争 ELISA 法是用抗孕酮单克隆抗体包被酶标板, 辣根过氧化物酶标记孕酮抗原。

[0019] 抗孕酮单克隆抗体固相酶标板的制备: 抗孕酮单克隆抗体经 0.01mmol/L PBS pH7.2 稀释后, 100uL/孔加入酶标板, 置于 4℃ 过夜, 后用 1% 酪蛋白 (用 0.01mmol/L PBS pH7.2 稀释) 封闭, 再经过 30℃ 干燥箱处理 2h, 避光、真空包装置于 4℃ 保存, 备用。

[0020] 酶标记孕酮抗原的制备: 采用碳化二亚胺法, 具体步骤如下: (1) 称取 11 $\alpha$ -羟孕酮半琥珀酸酯 (11 $\alpha$ -OH-P<sub>4</sub>-HS) 2.6mg, N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 0.9mg 和二环己基羰二亚胺 (DCC) 1.3mg 置 5mL 三角烧杯中, 滴加 0.15mL 二甲基甲酰胺 (DMF), 混匀后于 4℃ 过夜; (2) 次日可发现有尿素衍生物结晶析出, 说明已有孕酮衍生物的 N-羟基琥珀酰亚胺活化酯形成; (3) 取辣根过氧化物酶 (HRP) 2mg, 用 2mL 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 液溶解, 室温搅拌下加活化酯 2uL, 以后每 10 秒 2uL, 共加 10uL。室温下继续搅拌 8h, 然后应用 0.04M pH7.2 的 PBS 1000mL 搅拌透析 24h, 期间换液三次。初步透析的偶联物上 Sephadex G-25 柱 (GE), 用 PBS 洗脱, 流速为 1 滴/6s。加入 30-40% 甘油 -20℃ 保存。

#### [0021] 实施例二

[0022] 直接竞争 ELISA 法定量检测奶牛乳汁孕酮方法。

[0023] 如图 1 是本发明创建的板式直接竞争 ELISA 法定量检测奶牛乳汁孕酮的操作流程图所示, 抗孕酮单克隆抗体预包被酶标板的每孔加入 100uL 样本、标准品与酶标抗原工作液等比例混合的试剂, 37℃ 反应 50min, 洗涤。加四甲基联苯胺 (TMB) 底物液, 室温避光 15min, 加 2mol/L 硫酸终止反应。酶标仪上测 450nm 处的吸光值 (OD 值)。B<sub>0</sub> 为零孕酮浓度 (0ng/mL) 抑制时的 OD 值, B 为不同孕酮浓度 (40ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL、0.625ng/mL) 抑制时的 OD 值, 代入公式  $\text{Logit}(B/B_0) = \ln[(B/B_0)/(1-B/B_0)]$ , 以  $\text{Lg}[P]$  为横坐标,  $\text{Logit}(B/B_0)$  为纵坐标绘制标准曲线, 利用 Microsoft Excel 拟合

曲线方程。将所得 B/B<sub>0</sub> 值代入曲线方程求出乳汁样品中的孕酮含量。

[0024] 最低检测量 : 选用 8 个不同浓度的孕酮乳样标准品, 且每个做 4 个水平重复, 以孕酮浓度的对数为横坐标, 以各个浓度的 B/B<sub>0</sub> 值为纵坐标绘制标准曲线, 建立曲线方程的同时, 计算无孕酮抑制的 B<sub>0</sub> 值均数和标准差 (SD)。以 B<sub>0</sub>-3SD 的值再回归曲线上所对应的孕酮浓度为试剂盒的最小检出量。计算平均吸光值为 1.241, 标准差为 0.0212。所以最低检测限是 0.14ng/mL。

[0025] 精密度 : 应用同一批次组装的孕酮乳汁检测试剂盒, 连续 8 天, 每天检测一个标准品, 并做三个水平重复, 测出 OD<sub>450nm</sub> 值, 计算批内变异系数 ; 8 个批次的孕酮乳汁试剂盒, 在同一时间检测三个水平的孕酮标准品, 并做三个水平重复, 测定 OD<sub>450nm</sub> 值, 计算批间变异系数。结果平均批内变异系数为 4.11%, 平均批间变异系数为 6.26%。

[0026] 初步临床应用试验 : 通过对发情和妊娠奶牛乳样各 5 份的测定 : 发情奶牛乳汁的孕酮浓度均小于 0.5ng/mL ; 妊娠母牛平均为 4.48ng/mL。

[0027] 奶牛妊娠乳汁孕酮临界值的确定

[0028]

| 孕酮        | 发情期                          | 妊娠期                          |
|-----------|------------------------------|------------------------------|
| 含量(ng/mL) | 0.42, 0.38, 0.15, 0.27, 0.34 | 2.81, 3.86, 4.75, 4.62, 6.38 |
| 平均值       | 0.31                         | 4.48                         |

[0029] 牛场采取奶牛配种后 19 ~ 23 天奶牛乳样 54 份, 按试剂盒操作检测待测样本, 并以 2.5ng/mL 和 0.625ng/mL 做为半定量区分妊娠与否。

[0030] 经测定乳汁中孕酮含量判定 30 头妊娠, 24 头为未孕。经配种后为期 60 天观察, 并经直肠检查核对, 未孕的诊断准确率为 95.8% (23/24), 妊娠准确率为 93.3% (28/30)。

[0031] 以上为本发明的最佳实施方式, 依据本发明公开的内容, 本领域的普通技术人员能够显而易见地想到的一些雷同、代替方案, 均应落入本发明保护的范围内。

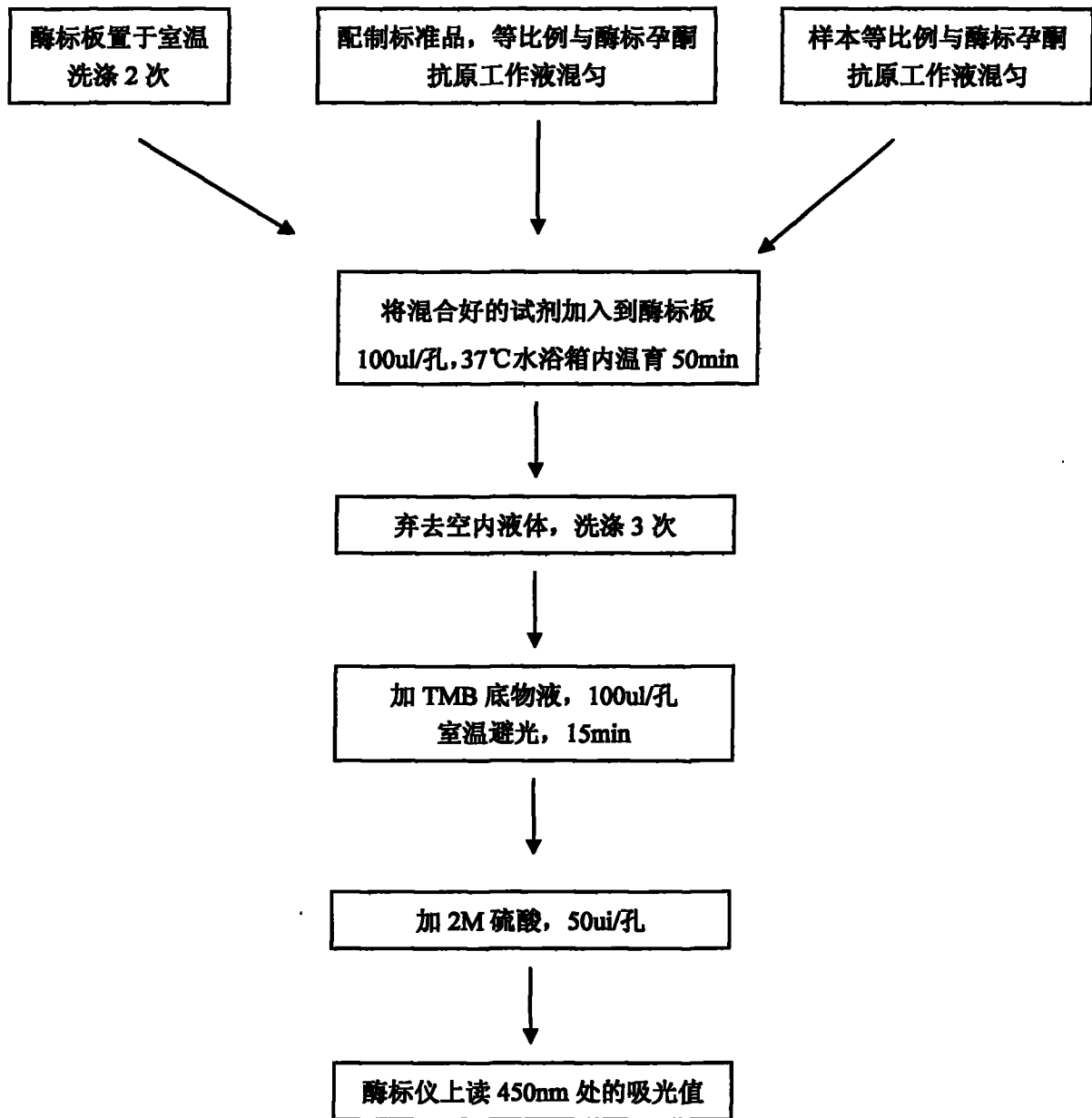


图 1

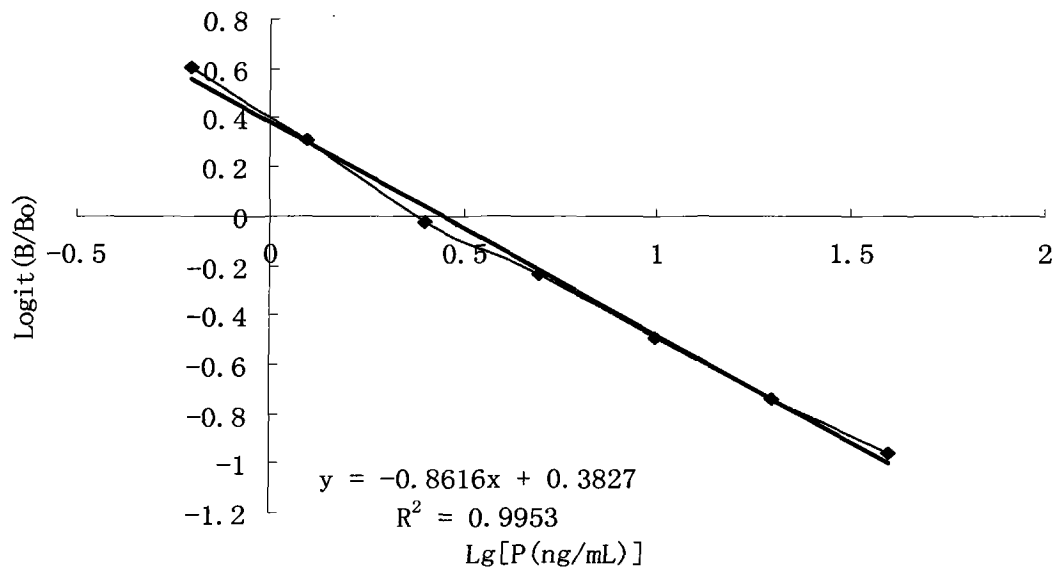


图 2

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 奶牛乳汁孕酮检测试剂盒                                    |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101923094A</a>                   | 公开(公告)日 | 2010-12-22 |
| 申请号            | CN200910217432.7                               | 申请日     | 2009-12-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 张洪友  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 张洪友  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 张洪友  |         |            |
| [标]发明人         | 张洪友<br>夏成<br>高维明<br>曾文渊<br>刘赛<br>黄海波           |         |            |
| 发明人            | 张洪友<br>夏成<br>高维明<br>曾文渊<br>刘赛<br>黄海波           |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/64 G01N33/543 G01N33/535                |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明公开了一种奶牛乳汁孕酮检测试剂盒，涉及生物技术，尤其是一种可用于酶标记免疫检测技术，建立了直接竞争ELISA法的定量酶免疫吸附试验，用于检测奶牛乳汁中孕酮水平。应用ELISA方法，通过抗原-抗体的特异性结合，将抗孕酮单克隆抗体、孕酮或酶标孕酮复合物间接地固定于固相酶标板上，建立了直接竞争ELISA法定量检测奶牛乳汁中孕酮。用抗孕酮单克隆抗体包被酶标板，辣根过氧化物酶标记孕酮抗原。具有简便、快速、灵敏度高等优点，用于检测奶牛乳汁孕酮有良好的开发使用价值。

