

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53
G01N 33/558



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 02113263.1

[45] 授权公告日 2004 年 7 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1156701C

[22] 申请日 2002.1.23 [21] 申请号 02113263.1
[71] 专利权人 郭大智
地址 625014 四川省雅安市雨城区四川农业大学 101 研究室
[72] 发明人 郭大智
审查员 周 航

[74] 专利代理机构 成都立信专利事务所有限公司
代理人 濮家蔚

权利要求书 2 页 说明书 7 页

[54] 发明名称 现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒

[57] 摘要

本发明涉及的是可在现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，包括固相载体和检测用试剂两部分。检测试剂中有以抗孕酮抗体为第一抗体，还包括有抗第一抗体的第二抗体。检测试剂的组成为：使用前以磷酸盐缓冲液溶解的酶标孕酮，以磷酸盐缓冲液配制的孕酮标准品，使用前以磷酸盐缓冲液稀释的抗孕酮抗体，使用前以碳酸盐缓冲液稀释的抗第一抗体的第二抗体，过氧化氢和含有四甲基联苯胺缓冲液的第一和第二显色剂，pH7-7.4 的磷酸盐缓冲液和 pH9-9.8 的碳酸盐缓冲液。用本发明测试盒可以在现场由奶牛的奶样品快速准确地判断奶牛是否已受孕或发情的分析检测结果。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，包括固相载体和检测用试剂两部分，检测用试剂中有酶标孕酮，孕酮标准品，抗孕酮抗体，显色试剂和缓冲试剂，其特征在于检测试剂中以抗孕酮抗体为第一抗体，同时还包括有抗第一抗体的第二抗体，检测用试剂的组成为：

a) 酶标孕酮，并含有重量/体积为 5%-20%的硫柳汞和体积/体积为 1%-3%的福尔马林的防腐剂，使用前以磷酸盐缓冲液溶解，

b) 孕酮标准品，以磷酸盐缓冲液配制，

c) 抗孕酮抗体为第一抗体，为以孕酮-6 β -羟基-半琥珀酸盐与牛血清白蛋白的联结物为抗原免疫家兔所获得的抗体，并含有重量/体积为 5%-20%的硫柳汞和体积/体积为 1%-3%的福尔马林的防腐剂，使用前以磷酸盐缓冲液稀释，

d) 抗第一抗体的第二抗体，为山羊或绵羊的抗兔免疫球蛋白 G，使用前以碳酸盐缓冲液稀释，

e) 显色试剂：

第一显色剂为体积含量为 0.004%的过氧化氢溶液，

第二显色剂为含有重量/体积为 0.01%四甲基联苯胺的 0.05 摩尔磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液，pH 5.0，

f) 磷酸盐缓冲液，含有 0.04 摩尔磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和 0.14 摩尔氯化钠，pH 7-7.4，

g) 由碳酸钠-碳酸氢钠组成的碳酸盐缓冲液，pH 9-9.8

h) 防冻剂，为体积比为 15-30%的甘油。

2. 如权利要求 1 所述的现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，其特征在于所说的防冻剂为 10%-20%的甘油。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，其特征在于所说的抗孕酮抗体为滴度至少为 1: 210,000 的特异抗体。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，其特征在于所说的酶标孕酮为辣根过氧化物酶与孕酮-6 β -羟基-半琥珀酸盐的联结物。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，其特征在于所说的固相载体为可分拆的微滴定板。

6. 一种现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，包括固相载体和检测用

试剂两部分，检测用试剂中有酶标孕酮，孕酮标准品，抗孕酮抗体，显色试剂和缓冲试剂，其特征在于检测试剂中以抗孕酮抗体为第一抗体，在固相载体的板孔内壁先用抗第一抗体的第二抗体包被，继而是用牛血清白蛋白作封闭处理，最后向板孔内加入含有 15—25 毫克/100 毫升硫柳汞的磷酸盐缓冲液 180 微升/孔，封存备用，所说检测用试剂的组成为：

a) 酶标孕酮，并含有重量/体积为 5%-20%的硫柳汞和体积/体积为 1%-3%的福尔马林的防腐剂，以磷酸盐缓冲液溶解，

b) 孕酮标准品，以磷酸盐缓冲液配制，

c) 抗孕酮抗体为第一抗体，为以孕酮-6 β -羟基-半琥珀酸盐与牛血清白蛋白的联结物为抗原免疫家兔所获得的抗体，并含有重量/体积为 5%-20%的硫柳汞和体积/体积为 1%-3%的福尔马林的防腐剂，

d) 抗第一抗体的第二抗体，为山羊或绵羊的抗兔免疫球蛋白 G，使用前以碳酸盐缓冲液稀释，

e) 显色试剂：

第一显色剂为体积含量为 0.004%的过氧化氢溶液，

第二显色剂为含有重量/体积为 0.01%四甲基联苯胺的 0.05 摩尔磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液，pH 5.0，

f) 磷酸盐缓冲液，含有 0.04 摩尔磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和 0.14 摩尔氯化钠，pH 7-7.4，

g) 由碳酸钠-碳酸氢钠组成的碳酸盐缓冲液，pH 9-9.8

h) 防冻剂，为体积比为 15-30%的甘油。

7. 如权利要求 6 所述的现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，其特征在于所说的防冻剂为 10%-20%的甘油。

现场快速诊断奶牛早孕与发情用的 酶免疫分析测试盒

技术领域

本发明涉及的是一种用于检测和判断奶牛是否处于早孕或发情期的酶免疫分析测试盒，具体讲是一种可供在现场应用，以奶牛的乳汁为样品快速检测判断奶牛的早孕与发情状况的酶免疫分析测试盒。

背景技术

奶牛的产奶量与其所处的不同生殖周期关系密切。奶牛配种后的不孕是导致产犊间隔延长、繁殖率降低，并使产奶量减少，饲养成本增高的重要原因。现已发现，奶牛乳汁中的孕酮浓度在奶牛的发情周期中可呈现出有规律的消长变化，能准确反映其所处生殖周期的状况。因而通过测定奶牛乳汁中孕酮的含量，可以了解和判断奶牛是否受孕、是否发情，以及是否患有某些卵巢等生殖系统的疾病。

目前检测奶牛乳汁中孕酮含量的测定方法，一般可有放射免疫分析法和酶免疫分析法两类。放射免疫分析法由于只能在实验室中进行，不能在现场使用，检测周期时间长，养牛者得到检测结果一般需要 2-7 天，且易造成放射性污染。酶免疫分析法是一种无伤害的测试方法，不存在放射性污染的问题，其灵敏度不仅与放射免疫分析法的相当，甚至可以更高，且所需设备和试剂、材料都相对更为简单方便和价廉。但目前医学及动物科学中所用的一般酶免疫分析法所需要的检测时间周期仍较长，完成一批试样的测定一般需 3-16 小时，同样也难于在现场应用。另一方面，目前检测奶牛乳汁孕酮含量的酶免疫分析法，所采用的都是单一抗体检测的原理和方法。如，在 *Can.J.Anim.Sci.*,70:997-1003,1990 中所报导的 Target 测试盒，是先将抗孕酮抗体包被在一种多孔的小盘表面，分别加入标准液和奶样品，反应后再加入酶标孕酮液及显色液，进行比色观察评定。*J.Dairy Sci.*,69,Suppl.1,1986 中报导的方法，是将单克隆抗体包被在塑料小棒上，测定时将小棒置于小管中，使其与其它试液进行免疫反应。在 *J.Dairy Sci.*,69: 1115-1121,1986 中报导的是将抗孕酮抗体包被于纸条上，测定时将其置于塑料管中，

先后加入标准、样品和酶标孕酮，反应后再加显色液进行观察评定的方法。与此相同测试原理的检测方法的报导还有一些。此检测原理方法的基本过程为：检测前先将一定量的激素抗体包被在塑料管、塑料棒、塑料珠、微滴定板或纸条等固相载体的表面，再用牛血清白蛋白进行封闭。测定时对已作包被和封闭处理过的固相载体用水清洗后，加入待测样品和酶标激素进行竞争性免疫反应，再经洗涤和加入含有显色剂的底物并放置，用仪器或肉眼观察颜色的变化结果。这些测试盒虽然可以在现场使用，并有快速、简便等优点，对孕牛的诊断准确率可以达到70%-85%，对未孕牛的可为80%-95%，但除所需费用较高外，由于采用的都是单一抗体形式的酶免疫分析，实践结果已表明，固相载体以该激素抗体包被后，易因保存时间的延长，测定中的清洗等处理和操作而使原已包被附着于固相载体上的该激素抗体有所损失，导致了参与免疫反应的抗体的量在孔与孔之间产生一定的差异，是影响免疫反应结果的准确性、灵敏性及重现性的一个重要原因。

发明内容

根据上述情况，本发明将提供一种可在现场使用，并能简单方便地对奶牛的早孕与发情状况进行快速检测判断的酶免疫分析测试盒。

本发明的现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，包括固相载体和检测用试剂两部分，检测用试剂中有酶标孕酮，孕酮标准品，抗孕酮抗体，显色试剂和缓冲试剂。检测试剂中以抗孕酮抗体为第一抗体，还包括有抗第一抗体的第二抗体，检测用试剂的组成为：

- a) 酶标孕酮，使用前以磷酸盐缓冲液溶解，
- b) 孕酮标准品，以磷酸盐缓冲液配制，
- c) 抗孕酮抗体为第一抗体，使用前以磷酸盐缓冲液稀释，
- d) 抗第一抗体的第二抗体，使用前以碳酸盐缓冲液稀释，
- e) 显色试剂：

第一显色剂为体积含量为0.004%的过氧化氢溶液，

第二显色剂为含有重量/体积为0.01%四甲基联苯胺的0.05摩尔磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液，pH 5.0，

- f) 磷酸盐缓冲液，含有0.04摩尔磷酸氢二钠、磷酸二氢钠及0.14摩尔氯化钠，pH 7-7.4，

g) 由碳酸钠-碳酸氢钠组成的碳酸盐缓冲液, pH 9-9.8。

很明显, 本发明上述酶免疫分析试剂盒的一个显著特点是采用的是双抗体酶免疫分析的原理, 即, 在检测用试剂的组成中, 除含有以通常所用的抗孕酮激素的抗体作为第一抗体成分外, 同时还有抗第一抗体的第二抗体。

一般而言, 所说的各种抗体通常都是一种免疫球蛋白 G (IgG)。本发明上述所说的该抗孕酮激素的第一抗体, 也是一种可以按常规的操作方法制备得到的免疫球蛋白 G。例如: 以含有所说的孕酮激素为免疫原免疫家兔, 然后由其血清分离制得作为第一抗体的该免疫球蛋白 G。从结构上讲, 作为一种实施例, 所说的该第一抗体的抗孕酮抗体可以是以孕酮-6 β -羟基-半琥珀酸盐与牛血清白蛋白的联结物作为抗原, 对家兔进行免疫所制得的特异抗体血清, 并使其滴度保持为至少 1: 210,000 为佳。

上述所说的抗第一抗体的第二抗体, 一般是采用以第一抗体为免疫原免疫另一种动物后, 再从其血清分离制得的另一种免疫球蛋白 G。例如, 作为一种实例, 可以用上述家兔的免疫球蛋白 G 等第一抗体为免疫原免疫山羊或绵羊, 并由此得到山羊或绵羊的抗兔免疫球蛋白 G 作为抗第一抗体的第二抗体。

上述所说的酶标孕酮通常可以采用与辣根过氧化物酶联结的孕酮-6 β -羟基-半琥珀酸盐的形式, 可以采用常规的缩合胺方法, 例如参照 S.Liebermann 所报告的方法制备得到。

为便于保存, 在上述检测试剂中所说的抗孕酮抗体与酶标孕酮中分别还可以按常规方式再含有少量适当形式的防腐剂。作为一种实施例, 所说的防腐剂可以采用为重量/体积为 5%-20%的硫柳汞和体积/体积为 1%-3%的福尔马林。

此外, 为更有利于低温保存, 在上述检测试剂中的抗孕酮抗体和酶标孕酮中还可以加入体积比为 15-30%的常用防冻剂。作为一种实施例, 所说的防冻剂可以采用 10%-20%的甘油。

对上述分析试剂盒中所说的固相载体一般并无特别要求。例如, 除可以使用进行免疫反应时最常用的不可分拆形式的微滴定板外, 特别推荐使用的固相载体, 是可以根据待测样品所需的板孔数量能够方便地进行选择分拆使用的可分拆式微滴定板为佳。

本发明上述的分析试剂盒在使用时, 先以第二抗体包被固相载体中的检测免

疫反应区域，例如上述所说可分拆或不可分拆形式微滴定板中所需使用的板孔内壁，使第二抗体附着于进行免疫反应的区域部位，然后再用牛血清白蛋白作封闭处理。检测时，分别在已加入了待测奶样品或孕酮标准品的板孔中加入酶标孕酮和第一抗体，使其分别进行竞争性反应。其间第一抗体会与固相载体上的第二抗体结合，而奶样品中的孕酮与酶标孕酮则会同时竞争第一抗体上的结合位点并与之结合。竞争的结果，固相载体上与第一抗体结合的酶标孕酮的量将随奶中孕酮的含量不同而异。奶中的孕酮含量多，则结合在固相载体上的酶标孕酮的量相对较少，酶的量少则相应被显色剂所显示的颜色也较浅；反之，若奶样品中的孕酮含量少，则结合在固相载体上的酶标孕酮就会较多，由显色剂显示出的颜色就相应较深。由于奶牛乳汁中的孕酮含量在其发情周期中呈有规律的消长变化，受孕后奶牛乳汁中的孕酮含量会明显升高，而未受孕或处于发情期时的奶牛乳汁中的孕酮含量则明显较低。因此由显色剂对上述检测过程中的奶样品与孕酮标准品所显示的颜色深浅即可反映出奶样中的孕酮含量高低，从而能准确地判断奶牛是处于受孕期还是发情期，以便采取相应的处理措施。

由上述的使用方法及检测的过程原理可以看出，使用本发明上述形式的酶免疫分析测试盒时，进行检测前必需先用第二抗体包被所用固相载体的检测免疫反应区域——如微滴定板中的板孔内壁，使第二抗体附着于该区域部位，然后再用牛血清白蛋白进行封闭处理。因此，本发明的酶免疫分析测试盒除上述的形式外，还可以进一步采用的形式是：使为使用上述检测方法所提供并储置于测试盒中的滴定孔板等检测用固相载体，在生产出厂时即已成为在其检测免疫的反应区域中已预先用上述所说的第二抗体进行包被、并已用牛血清白蛋白封闭处理好的备用形式。此种形式的固相载体在检测使用时即无需再临时进行包被和封闭的处理操作，对于使现场检测使用操作的更加方便和提高检测效率，显然是十分有利的。采用此种形式的测试盒时，为检测需要而提供和配备的检测试剂中一般也即可省去该第二抗体试剂，从而使测试盒的组成也进一步得以相应简化。

如上述，目前采用单一抗体酶免疫原理分析检测时，由于固相载体以该单一抗体包被后会因保存时间的延长，测定中的清洗处理等因素而使该抗体有所损失，从而导致参与免疫反应的抗体的量在孔与孔间存在一定的差异，影响了免疫反应结果的准确性、灵敏性和重现性。而采用本发明的双抗体法进行检测分析，

由于固相载体已预先用过量的第二抗体进行了包被和封闭，测定时是同时以同量的第一抗体分别与待测奶样中所含的孕酮、孕酮标准品以及酶标孕酮进行反应，避免了免疫反应前不同板孔间的第一抗体的数量上的差异；同时，过量的第二抗体即使在保存、洗涤过程中有所损失，也仍还能有足够的位点与所加入的第一抗体结合，而且它也不会干扰其它试剂的免疫反应。这正是本发明上述的测试盒能显著提高和保证检测结果的准确性、稳定性和重现性的根本原因所在。试验结果显示，采用本发明上述分析测试盒对奶牛的奶样进行分析检测时，对已孕和未孕奶牛的判断准确率一般可分别达到 85%-90%和 95%-100%，并且在奶牛配种后的 21-24 天即可作出判断，比传统的直肠触诊法可提早 21-68 天。同时，在对发情期检查时，即使有的奶牛有隐性发情现象，或有一些发情征兆但尚难以确定时，使用本发明上述的测试盒也能方便准确地加以鉴别，有助于查出隐性发情和假发情牛；在奶牛产犊后，还可以及时准确判断出何时恢复发情期，便于及早配种，防止空怀期延长。试验结果显示，采用本发明上述的分析测试盒，完成一次检测的时间一般仅需 16-20 分钟，其中关键的免疫反应时间一般仅需 5-7 分钟。此外，由于检测时只需取 1 滴奶样即可进行检查，对奶牛完全无任何伤害，又无需使用特别的工具和复杂仪器，测试结果可由肉眼比色即可作出判断，故操作简单方便，并可将原本复杂和技术性很强的工作简化为普通的熟练性操作，充分具备了在奶牛场或农户家的现场推广使用的条件和可行性。试验结果还显示，本发明上述分析测试盒中的测试材料和检测用试剂还具有较长的有效保存时间，在 4℃和 -20℃的条件下的有效保存期可分别达到 5 个月和 6 个月以上，对适用于在各种条件和场合下的推广使用更加有利。

除可用于快速检测奶牛的早孕和发情外，本发明的上述测试盒还可以有助于对某些卵巢疾病，如卵巢静止、卵巢囊肿、持久黄体等疾病的检查和诊断。这些对于实际奶牛生产中也都是具有重要的意义和实用价值的。

以下将通过具体实施方式的形式再对本发明的上述内容作进一步的详细说明，但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅局限于以下的具体实施方式。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

具体实施方式

本例现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，包括固相载体和

检测用试剂两部分。固相载体可以为免疫反应试验中常规使用的可分拆形式 48 孔或 96 孔的微滴定板。检测用试剂中有酶标孕酮，孕酮标准品，作为第一抗体的抗孕酮抗体，抗第一抗体的第二抗体，以及显色剂和缓冲剂等。其具体组成及可供参考的相应制备方式如下：

a) 酶标孕酮：制备时可以采用将 20 毫克辣根过氧化物酶 ($RZ > 3.0$) 溶于 500 微升蒸馏水，加入 300 微升二甲替甲酰胺；另将 5 毫克孕酮-6 β -羟基-半琥珀酸盐溶于 300 微升二甲替甲酰胺中，加入 6 微升甲基吗啉及 3 微升氯甲酸异丁酯，然后与上述的酶液混合，在 -15°C 条件搅拌 1 小时，再在 4°C 条件下搅拌 2 小时，然后在蒸馏水中透析至少 15 小时。用葡聚糖凝胶 G-25 作层析纯化处理后，冻干低温保存于 -20°C 。使用前溶于磷酸盐缓冲液中。

b) 孕酮标准品：将分析纯的孕酮配制于下述的磷酸盐缓冲液中，在 -20°C 条件下保存。

c) 抗孕酮抗体：制备时可以用碳化二亚胺将牛血清白蛋白与孕酮-6 β -羟基-半琥珀酸盐联结制成抗原，将其注射入家兔体内，在 5-7 个月内可先后注射 7-10 次，获得滴度为 1: 210,000 或更高的特异抗血清，冻干低温保存。使用前溶解于下述的磷酸盐缓冲液中，并加入重量/体积为 5%-20% 的硫柳汞和体积/体积为 1%-3% 的福尔马林作为防腐剂，以及体积/体积为 10-20% 的甘油作为防冻剂，于 4°C 或 -20°C 的条件下保存。

d) 羊抗兔 IgG (第二抗体)：可以采用离心沉淀法从兔血清中分离出免疫球蛋白 G (IgG)，以此作为免疫原注射入山羊或绵羊体内，在 4-5 个月内先后注射 4-6 次，常规方法检验滴度后收集血清，以常规的免疫吸附剂，例如兔 IgG-琼脂糖凝胶-CL-6B 等，进行常规的纯化处理制得，于 $-20^{\circ}\text{C} \sim -70^{\circ}\text{C}$ 条件下冻干保存备用。使用前用碳酸盐缓冲液溶解。

e) 显色试剂：由两种试液组成。其一为含有 0.004% 的过氧化氢溶液；其二为在 0.05 摩尔的磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液溶 ($\text{pH } 5.0$) 中溶有 0.01% (w/v) 的四甲基联苯胺。

f) 磷酸盐缓冲液：含有 0.04 摩尔磷酸氢二钠、磷酸二氢钠及 0.14 摩尔氯化钠， $\text{pH } 7-7.4$ 。

g) 碳酸盐缓冲液：由碳酸钠-碳酸氢钠组成， $\text{pH } 9-9.8$ 。

采用本发明上述的测试盒，对取自奶牛的待测奶样可以按下述的操作方式进行检测：

1) 板孔准备，即以上述的第二抗体包被微滴定板孔：将该第二抗体以所说的碳酸盐缓冲液稀释成 10-20 微克/毫升的浓度后，向每孔加入 100 微升，在 0℃ ~ 4℃ 放置至少 15 小时后弃去。加入 0.1% 牛血清白蛋白液，室温放置 1 小时后弃去；加入含有 15-25 毫克/100 毫升硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液 180 微升/孔，封存于 -20℃ 备用。

检测时按需测的奶样品数量拆取相应数量的板孔。例如：只检测一个奶样品时一般需用两孔，其中一孔用作样品孔，另一个用作标准孔；若同时检测多个奶样品，例如 2-5 个样品时，除各个奶样品需各用一孔外，供孕酮标准品使用的标准孔则可以为共用的一个；若同时检测的奶样品数量更多，如 6 个以上时，可酌情设置 2 个以上的标准孔。检测前按常规方法用清水洗孔三次。

2) 加磷酸盐缓冲液：向各使用的板孔内加磷酸盐缓冲液 3-4 滴。

3) 滴加样品：分别用移液管向样品孔中滴加检测当日的新鲜奶样 1 滴，在标准孔中滴加孕酮标准品 1 滴。

4) 在样品孔和标准孔中分别同时加入 10-20 微升的等量的第一抗体和酶标孕酮试剂，使孔内液体充分混合均匀，避光放置 5-7 分钟。

5) 加显色剂：甩弃板孔内的液体，用清洁水洗孔 5 次，向各板孔内分别加入两种显色剂各两滴，并使其混合均匀，避光放置。

6) 观察判断：~5 分钟后，用肉眼观察比较各孔中液体所显现出的蓝颜色深浅——样品孔内液体颜色深于或同于标准孔，则可判断为属于未孕；反之若样品孔的颜色浅于标准孔则可判断为奶牛已受孕。

为方便实际操作，根据对每批检测用试剂的活性指标实验结果，可以将每次检测中各孔所需的各种试剂预先定量封装于同一小管或其它适当的包装物中，使用时只需按上述方式将其一次性加入板孔即可。

专利名称(译)	现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒		
公开(公告)号	CN1156701C	公开(公告)日	2004-07-07
申请号	CN02113263.1	申请日	2002-01-23
[标]发明人	郭大智		
发明人	郭大智		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558		
其他公开文献	CN1361424A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及的是可在现场快速诊断奶牛早孕与发情用的酶免疫分析测试盒，包括固相载体和检测用试剂两部分。检测试剂中有以抗孕酮抗体为第一抗体，还包括有抗第一抗体的第二抗体。检测试剂的组成为：使用前以磷酸盐缓冲液溶解的酶标孕酮，以磷酸盐缓冲液配制的孕酮标准品，使用前以磷酸盐缓冲液稀释的抗孕酮抗体，使用前以碳酸盐缓冲液稀释的抗第一抗体的第二抗体，过氧化氢和含有四甲基联苯胺缓冲液的第一和第二显色剂，pH7-7.4的磷酸盐缓冲液和pH9-9.8的碳酸盐缓冲液。用本发明测试盒可以在现场由奶牛的奶样品快速准确地判断奶牛是否已受孕或发情的分析检测结果。