



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110003300 A

(43)申请公布日 2019.07.12

(21)申请号 201910325085.3

(22)申请日 2019.04.22

(71)申请人 苏州博源医疗科技有限公司  
地址 215163 江苏省苏州市高新区锦峰路8号9号楼101、201室

(72)发明人 虞留明 张小可

(74)专利代理机构 北京精金石知识产权代理有限公司 11470

代理人 张黎

(51) Int. Cl.

C07J 7/00(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

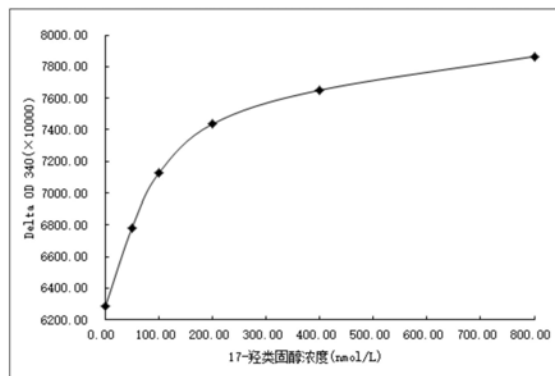
权利要求书3页 说明书15页  
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

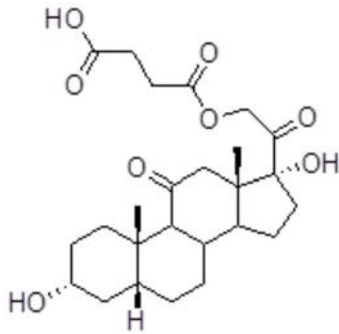
一种17-羟类固醇的衍生物、检测试剂及制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种17-羟类固醇的衍生物、检测试剂及制备方法,涉及生物检测技术领域。利用该17-羟类固醇衍生物制备的17-羟类固醇免疫原,免疫原性高,得到的抗体特异性强、效价高;利用该衍生物制备得到的均相酶免疫检测试剂中17-羟类固醇酶标偶联物连接了经基因工程改造过的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,显著提高了检测灵敏度,可有效检测浓度低至80nmol/L的样品,且特异性强,与常见的92种干扰物无交叉反应;可实现在全自动生化分析仪上对17-羟类固醇含量的高通量、快速化检测,检测结果稳定,准确度高,检测方法简单,易于实现和推广使用。



1. 一种17-羟类固醇衍生物,其特征在于,所述的17-羟类固醇衍生物的结构式如式(I)所示:



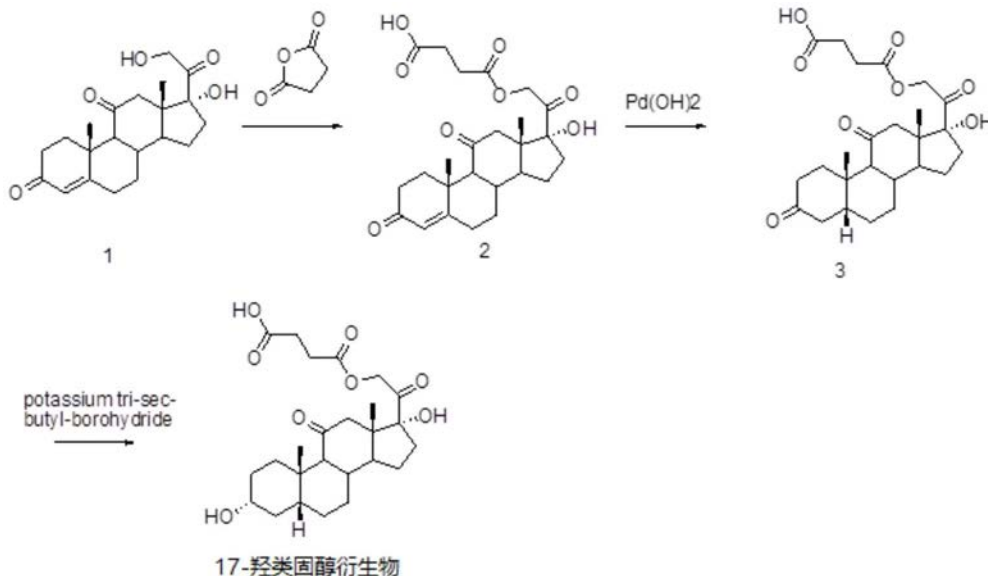
2. 一种权利要求1所述的17-羟类固醇衍生物的制备方法,其特征在于,所述的制备方法包括以下步骤:

(1) 化合物2的合成:将化合物1和三乙胺溶解于二氯甲烷中,加入二氢呋喃-2,5-二酮,搅拌,薄层色谱法显示反应完成后,用纯化水淬灭反应,盐酸调节pH,二氯甲烷萃取3次,合并有机层,用纯化水和卤水洗涤,真空干燥浓缩,得到白色固体,即化合物2;

(2) 化合物3的合成:将步骤(1)得到的化合物2溶解于吡啶中,加入Pd(OH)<sub>2</sub>,在室温和H<sub>2</sub>条件下搅拌过夜,薄层色谱法显示起始反应原料全部消失后,过滤,真空浓缩,纯化得到白色固体,即化合物3;

(3) 17-羟类固醇衍生物的合成:将步骤(2)得到的化合物3溶于无水四氢呋喃中,在-78℃下,加入三异丁基硼氢化钾,搅拌,薄层色谱法显示反应完全结束后,用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液淬灭反应,乙酸乙酯萃取3次,合并有机层,用纯化水和卤水洗涤,真空干燥浓缩,纯化得到白色固体,即17-羟类固醇衍生物;

所述的17-羟类固醇衍生物的合成路径如下:



3. 一种17-羟类固醇检测试剂,其特征在于,所述的17-羟类固醇检测试剂包括试剂A和试剂B;

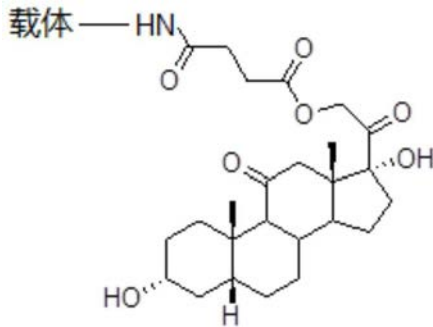
所述的试剂A包括抗17-羟类固醇特异性抗体和均相酶底物;

所述的试剂B包括17-羟类固醇酶标偶联物和Tris缓冲液；

所述的抗17-羟类固醇特异性抗体是由17-羟类固醇免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子,或者为保留与17-羟类固醇特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物；

所述的实验动物是哺乳动物；

所述的17-羟类固醇免疫原是由权利要求1所述的17-羟类固醇衍生物或权利要求2所述的制备方法制备得到的17-羟类固醇衍生物与载体连接得到的化合物,其结构式如式(II)所示：

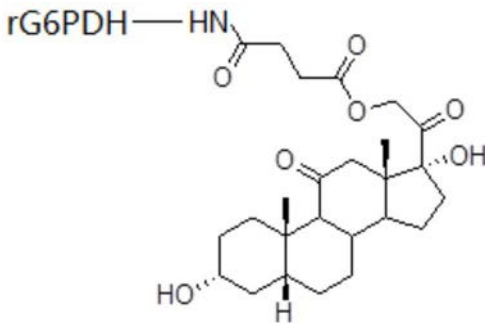


式 (II)；

所述的载体是具有免疫原性的蛋白质或多肽；

所述的均相酶底物是由葡萄糖-6-磷酸、氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和Tris缓冲液配制得到的；

所述的17-羟类固醇酶标偶联物是由权利要求1所述的17-羟类固醇衍生物或权利要求2所述制备方法制备得到的17-羟类固醇衍生物与重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶连接而成,其结构式如式(III)所示：



式 (III)。

4. 根据权利要求3所述的17-羟类固醇检测试剂,其特征在于,所述的载体为甲状腺球蛋白、血清蛋白或血蓝蛋白中的一种；

所述的实验动物是绵羊、山羊、小鼠、豚鼠、兔或马中的一种。

5. 根据权利要求4所述的17-羟类固醇检测试剂,其特征在于,所述载体为甲状腺球蛋白；所述的实验动物是绵羊。

6. 根据权利要求3所述的17-羟类固醇检测试剂,其特征在于,所述的17-羟类固醇免疫原的制备方法包括以下步骤：

(A1) 载体溶液的制备:将载体溶解于磷酸缓冲液中,得到载体溶液；

(A2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备:将权利要求1所述的17-羟类固醇衍生物或权利要求2所述制备方法制备得到的17-羟类固醇衍生物与二甲基甲酰胺、乙醇、磷酸钾缓冲液、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺混合,搅拌溶解,得到17-羟

类固醇衍生物溶液；

(A3) 得到17-羟类固醇免疫原：将步骤(A2)得到的17-羟类固醇衍生物溶液加入到步骤(A1)得到的载体溶液中，搅拌过夜，经透析纯化，得到17-羟类固醇免疫原。

7. 根据权利要求3所述的17-羟类固醇检测试剂，其特征在于，所述的抗17-羟类固醇特异性抗体的制备方法包括以下步骤：

(B1) 用PBS将权利要求3中所述的17-羟类固醇免疫原稀释，得到抗原溶液，然后将抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行注射；

(B2) 5-6周后，再用相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物进行注射，之后每隔2周注射一次，共计注射5-8次；

(B3) 对步骤(B2)的实验动物取血，分离纯化，得到抗17-羟类固醇特异性抗体。

8. 根据权利要求3所述的17-羟类固醇检测试剂，其特征在于，所述的17-羟类固醇酶标偶联物的制备方法包括以下步骤：

(C1) 重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备：将重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、Tris缓冲液、MgCl<sub>2</sub>和NaCl混合溶解；再加入还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、葡萄糖-6-磷酸、卡必醇和二甲基亚砷，得到重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液；

(C2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备：将权利要求1所述的17-羟类固醇衍生物或权利要求2所述制备方法制备得到的17-羟类固醇衍生物溶解于二甲基甲酰胺中，降温至-18℃，加入三丁胺和氯甲酸异丁酯，低温搅拌混匀，得到17-羟类固醇衍生物溶液；

(C3) 得到17-羟类固醇酶标偶联物：将步骤(C2)得到的17-羟类固醇衍生物溶液逐滴加入到步骤(C1)得到的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中，搅拌过夜，凝胶层析柱纯化，得到17-羟类固醇酶标偶联物。

9. 一种17-羟类固醇检测试剂的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括以下步骤：

(D1) 均相酶底物的制备：将氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和葡萄糖-6-磷酸按照终浓度比为1:1的比例溶于Tris缓冲液中，制得均相酶底物；

(D2) 试剂A的制备：将步骤(D1)得到的均相酶底物和权利要求3中所述的抗17-羟类固醇特异性抗体混合均匀，得到试剂A，所述的试剂A中抗17-羟类固醇特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:50-5000；

(D3) 试剂B的制备：将权利要求3中所述的17-羟类固醇酶标偶联物溶于Tris缓冲液中，得到试剂B，所述的试剂B中17-羟类固醇酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:50-5000。

10. 根据权利要求9所述的17-羟类固醇检测试剂，其特征在于，所述的试剂A中抗17-羟类固醇特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:500；

所述的试剂B中17-羟类固醇酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:750。

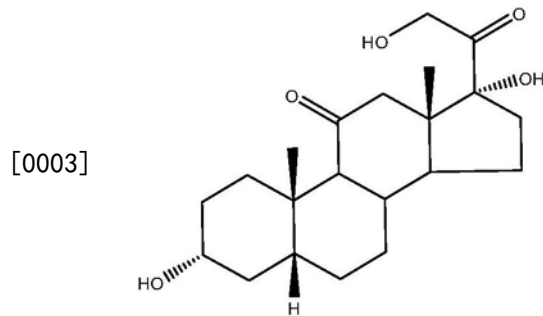
## 一种17-羟类固醇的衍生物、检测试剂及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,具体涉及一种17-羟类固醇的衍生物、检测试剂及制备方法。

### 背景技术

[0002] 17-羟类固醇(17-hydroxycorticosteroids,17-OHCS),其结构式如式(IV)所示:



[0004] 17-羟类固醇属于糖类肾上腺皮质激素,是由肾上腺皮质所分泌的激素及其代谢产物,主要有皮质醇、皮质素、四氢皮质醇和四氢皮质素等,常随尿液排出体外。因此,尿液中17-羟类固醇的含量可以反映肾上腺皮质分泌皮质醇的情况,可辅助诊断相关内分泌疾病。17-羟类固醇含量降低常见于肾上腺皮质功能减退症、腺垂体功能减退症、双侧肾上腺切除术后、营养不良、肝硬化、结核病以及某些慢性消耗性疾病等;17-羟类固醇含量升高则常见于肾上腺皮质功能亢进症(肿瘤或增生引起)、异位ACTH综合征、肥胖症、甲状腺功能亢进症以及胰腺炎等。

[0005] 目前最常用的检测尿液中17-羟类固醇的方法是比色测定法。该方法原理是:在酸性条件下,17-羟类固醇与盐酸苯肼作用,生成黄色苯肼衍生物,此显色结果减去硫酸与其它非17-羟类固醇显色物所产生的本底颜色,与标准液同样处理比色即可求其含量。该方法检测步骤包括:采集受检尿液;抽提17-羟类固醇样品;制备比色测定试样;进行显色反应;比色,读取吸光度,根据吸光度计算17-羟类固醇含量。该方法需用到三氯甲烷-正丁醇混合液进行抽提,该试剂具有麻醉作用及刺激性,在光的作用下能被氧化成氯化氢和有剧毒的光气,给操作人员及环境带来危害;另一方面,利用该方法检测的结果稳定性较差,操作复杂,耗时长,不适合进行大量临床应用。

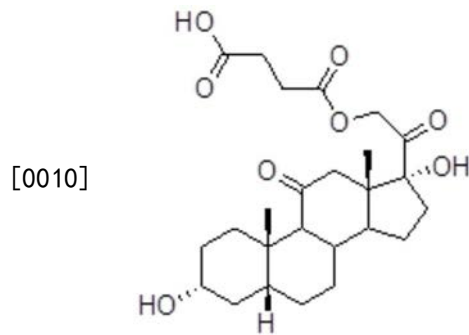
[0006] 随着生物检测技术的不断发展,17-羟类固醇的检测方法逐渐改进。在现有技术中,中国专利CN103335969B公开了一种17-羟皮质类固醇的比色测定方法,该方法不含三氯甲烷、氯仿等有毒试剂,操作过程安全可靠,无需使用无水硫酸铵及无水硫酸钠,节约试剂;通过将传统的抽提备用试液改进成去除色素后直接利用上清液,大大简化了受检尿液制备备用试液的步骤,测定方法简单易操作。中国专利CN105092831A公开了一种17-羟皮质类固醇免疫检测试剂及其制备方法,该试剂包括抗17-羟类固醇特异性抗体和指示试剂,其最低检测浓度为 $1\mu\text{mol/L}$ 。目前,与市场上现有的检测试剂较少,且仍存在一定的缺陷,比如:稳定性较差、灵敏度低,不适于大量样品同时检测等。

[0007] 因此,针对现有技术中存在的缺陷,研发一种质量达到临床要求、灵敏度高,稳定性好、结果准确,可应用于全自动生化分析仪的高通量、快速化检测的试剂已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种17-羟类固醇的衍生物、检测试剂及制备方法。克服了现有技术存在的缺陷,该均相酶免疫检测试剂与,灵敏度高,稳定性好,特异性强,可实现大批量样品全自动快速检测。

[0009] 本发明一方面提供了一种17-羟类固醇衍生物,所述的17-羟类固醇衍生物的结构式如式(I)所示:



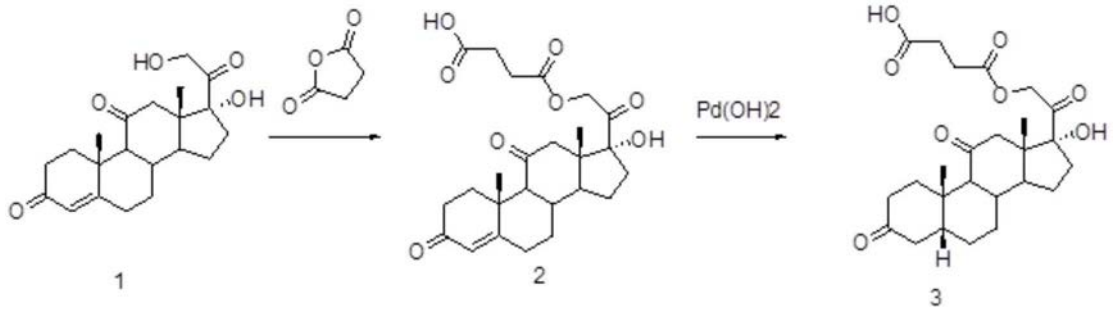
[0011] 本发明还提供了一种上述的17-羟类固醇衍生物的制备方法,所述的制备方法包括以下步骤:

[0012] (1) 化合物2的合成:将化合物1和三乙胺溶解于二氯甲烷中,加入二氢呋喃-2,5-二酮,搅拌,薄层色谱法显示反应完成后,用纯化水淬灭反应,盐酸调节pH,二氯甲烷萃取3次,合并有机层,用纯化水和卤水洗涤,真空干燥浓缩,得到白色固体,即化合物2;

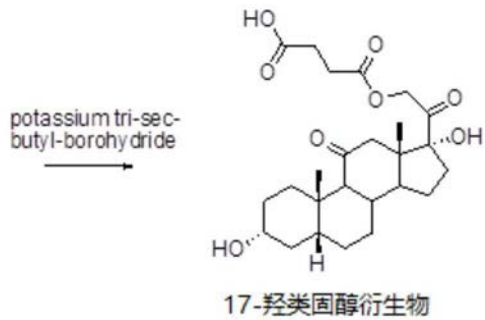
[0013] (2) 化合物3的合成:将步骤(1)得到的化合物2溶解于吡啶中,加入Pd(OH)<sub>2</sub>,在室温和H<sub>2</sub>条件下搅拌过夜,薄层色谱法显示起始反应原料全部消失后,过滤,真空浓缩,纯化得到白色固体,即化合物3;

[0014] (3) 17-羟类固醇衍生物的合成:将步骤(2)得到的化合物3溶于无水四氢呋喃中,在-78℃下,加入三异丁基硼氢化钾,搅拌,薄层色谱法显示反应完全结束后,用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液淬灭反应,乙酸乙酯萃取3次,合并有机层,用纯化水和卤水洗涤,真空干燥浓缩,纯化得到白色固体,即17-羟类固醇衍生物;

[0015] 所述的17-羟类固醇衍生物的合成路径如下:

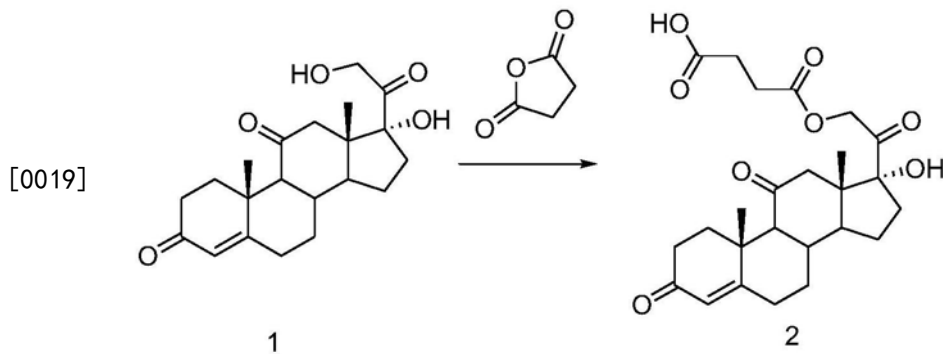


[0016]

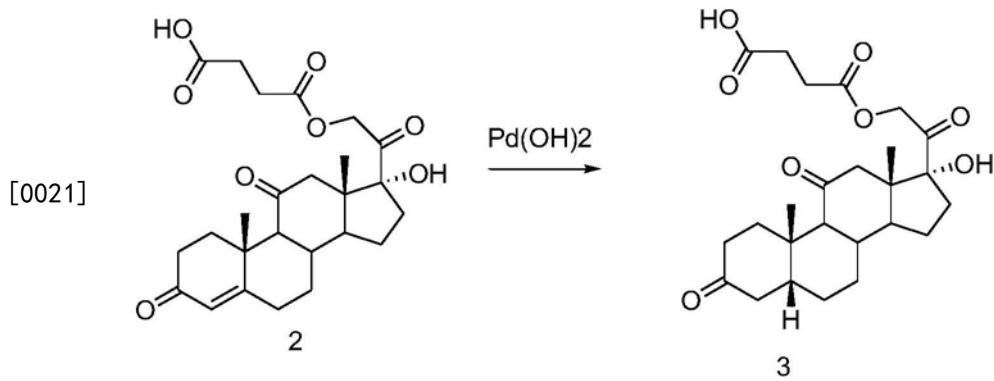


[0017] 具体地,上述17-羟类固醇衍生物的制备方法,包括以下步骤:

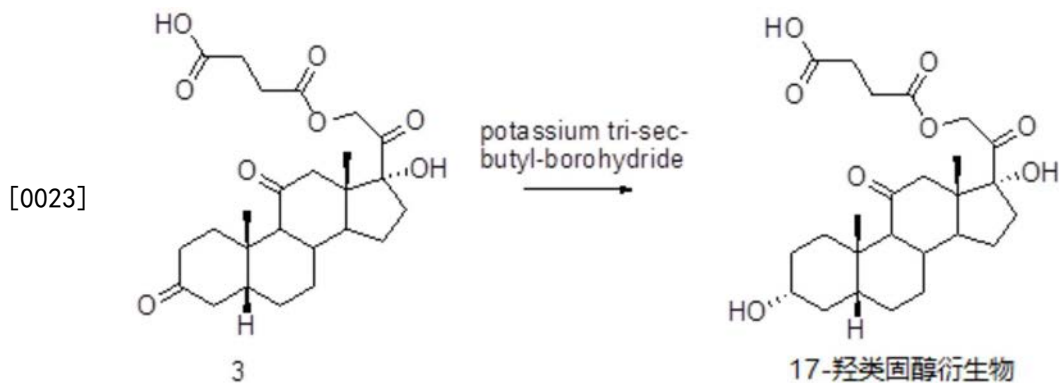
[0018] (1) 化合物2的合成:将5g化合物1和2.1g三乙胺(TEA)一起溶解于二氯甲烷(DCM)(50mL)中,然后在室温下一次性加入1.8g二氢呋喃-2,5-二酮,在室温下搅拌2小时,薄层色谱法(TLC)显示反应完成后,用300mL纯化水淬灭反应,用1N的盐酸调节pH=3,将反应后的混合物用300mL DCM进行萃取,重复3次,合并有机层,用纯化水(200mL)和卤水(200mL)洗涤,在真空中进行干燥和浓缩,得到白色固体,即化合物2;



[0020] (2) 化合物3的合成:将步骤(1)得到的化合物2溶解于吡啶(120mL)中,然后加入4g Pd(OH)<sub>2</sub>,在室温和H<sub>2</sub>条件下搅拌过夜,薄层色谱法显示起始反应原料全部消失后,将得到的溶液进行过滤,再将滤液在真空中进行浓缩,得到的粗产物经硅胶纯化,得到白色固体,即化合物3;



[0022] (3) 17-羟类固醇衍生物的合成:将步骤(2)得到的化合物3溶解于无水四氢呋喃(THF)(50mL)中,在-78℃下,逐滴加入三异丁基硼氢化钾(15mL,1M),在-78℃下搅拌1小时,薄层色谱法显示反应已完全结束后,用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液淬灭反应,然后用乙酸乙酯(EA)(200mL)进行萃取,重复3次,合并有机层,用纯化水(200mL)和卤水(200mL)洗涤,在真空中干燥和浓缩,得到的粗产物通过硅胶进行纯化,得到白色固体,即17-羟类固醇衍生物。



[0024] 本发明还提供了一种17-羟类固醇检测试剂,所述的17-羟类固醇检测试剂包括试剂A和试剂B;

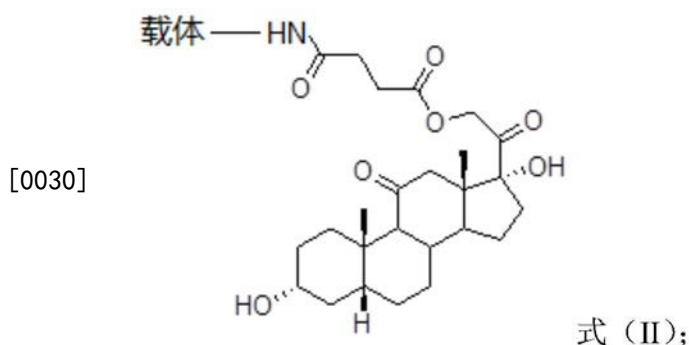
[0025] 所述的试剂A包括抗17-羟类固醇特异性抗体和均相酶底物;

[0026] 所述的试剂B包括17-羟类固醇酶标偶联物和Tris缓冲液;

[0027] 所述的抗17-羟类固醇特异性抗体是由17-羟类固醇免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子,或者为保留与17-羟类固醇特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物;

[0028] 所述的实验动物是哺乳动物;优选地,所述的实验动物是绵羊、山羊、小鼠、豚鼠、兔或马中的一种;更优选地,所述的实验动物是绵羊。

[0029] 所述的17-羟类固醇免疫原是由上述的17-羟类固醇衍生物或上述的制备方法制备得到的17-羟类固醇衍生物与载体连接得到的化合物,其结构式如式(II)所示:

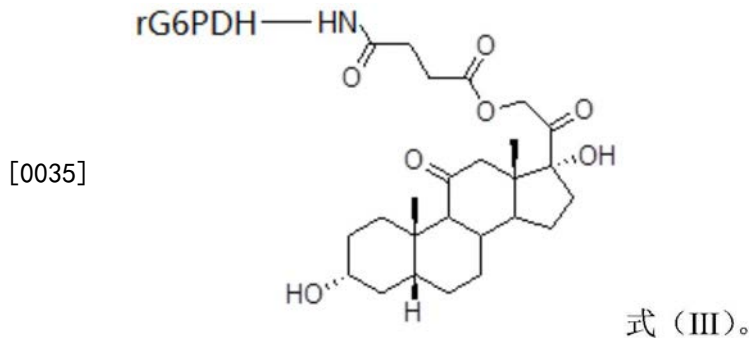


[0031] 所述的载体是具有免疫原性的蛋白质或多肽；

[0032] 优选地，所述的载体为甲状腺球蛋白、血清蛋白或血蓝蛋白中的一种；更优选地，所述的载体为甲状腺球蛋白；

[0033] 所述的均相酶底物是由葡萄糖-6-磷酸、氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和Tris缓冲液配制得到的；

[0034] 所述的17-羟类固醇酶标偶联物是由上述的17-羟类固醇衍生物或上述制备方法制备得到的17-羟类固醇衍生物与重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (rG6PDH) 连接而成，其结构式如式 (III) 所示：



[0036] 具体地，重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (rG6PDH) 的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0037] 优选地，所述的17-羟类固醇免疫原的制备方法包括以下步骤：

[0038] (A1) 载体溶液的制备：将载体溶解于磷酸缓冲液中，得到载体溶液；

[0039] (A2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备：将上述的17-羟类固醇衍生物、二甲基甲酰胺、乙醇、磷酸钾缓冲液、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺混合，搅拌溶解反应90min，得到17-羟类固醇衍生物溶液；

[0040] (A3) 得到17-羟类固醇免疫原：将步骤 (A2) 得到的17-羟类固醇衍生物溶液加入到步骤 (A1) 得到的载体溶液中，并在4℃下搅拌过夜，经透析纯化，得到17-羟类固醇免疫原。

[0041] 具体地，所述的17-羟类固醇免疫原的制备方法包括以下步骤：

[0042] (A1) 载体溶液的制备：将载体蛋白溶解于0.2M, pH=8.5的磷酸缓冲液中，载体蛋白的终浓度为4mg/mL，得到载体溶液；

[0043] (A2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备：将100-300mg上述的17-羟类固醇衍生物、1.75-5.25mL二甲基甲酰胺、1.75-5.25mL乙醇、3.5-10.5mL, 10mM, pH=5.0的磷酸钾缓冲液、100-300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺、25-75mg N-羟基琥珀酰亚胺混合，搅拌溶解反应30-60min，得到17-羟类固醇衍生物溶液；

[0044] (A3) 得到17-羟类固醇免疫原：将步骤 (A2) 得到的17-羟类固醇衍生物溶液加入到步骤 (A1) 得到的载体溶液中，并在4℃下搅拌过夜，经透析纯化，得到17-羟类固醇免疫原。

[0045] 优选地，所述的抗17-羟类固醇特异性抗体的制备方法包括以下步骤：

[0046] (B1) 用PBS将上述的17-羟类固醇免疫原进行稀释，得到抗原溶液，然后将抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行注射；

[0047] (B2) 5-6周后，再用相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物进行注射，之后每隔2周注射一次，共计注射5-8次；

[0048] (B3) 对步骤 (B2) 的实验动物取血，分离纯化，得到抗17-羟类固醇特异性抗体。

[0049] 具体地，所述的抗17-羟类固醇特异性抗体的制备方法包括以下步骤：

[0050] (B1) 用PBS将上述的17-羟类固醇免疫原稀释至0.1-3.0mg/mL,得到抗原溶液,然后将抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

[0051] (B2) 5-6周后,再用相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物进行注射,之后每隔2周注射一次,共计注射5-8次;

[0052] (B3) 对步骤(B2)的实验动物取血,分离纯化,得到抗17-羟类固醇特异性抗体。

[0053] 优选地,所述的17-羟类固醇酶标偶联物的制备方法包括以下步骤:

[0054] (C1) 重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:将重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、Tris缓冲液、MgCl<sub>2</sub>和NaCl混合溶解;再加入还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、葡萄糖-6-磷酸、卡必醇和二甲基亚砷,得到重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0055] (C2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备:将上述的17-羟类固醇衍生物溶解于二甲基甲酰胺中,降温至-18℃,加入三丁胺和氯甲酸异丁酯,低温搅拌混匀,得到17-羟类固醇衍生物溶液;

[0056] (C3) 得到17-羟类固醇酶标偶联物:将步骤(C2)得到的17-羟类固醇衍生物溶液逐滴加入到步骤(C1)得到的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,2-8℃搅拌过夜,凝胶层析柱纯化,得到17-羟类固醇酶标偶联物。

[0057] 具体地,所述的17-羟类固醇酶标偶联物的制备方法包括以下步骤:

[0058] (C1) 重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:将7.5-22.5mg的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-18mL Tris缓冲液、8mg MgCl<sub>2</sub>和100mg NaCl混合溶解;再加入112.5-337.5mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、67.5-202.5mg葡萄糖-6-磷酸、0.375-1.125mL卡必醇和1-3mL二甲基亚砷,得到重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0059] (C2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备:将5-15mg上述的17-羟类固醇衍生物溶解于300-900μl二甲基甲酰胺中,降温至-18℃,加入1.5-4.5μl三丁胺和0.75-2.25μl氯甲酸异丁酯,低温搅拌混匀,得到17-羟类固醇衍生物溶液;

[0060] (C3) 得到17-羟类固醇酶标偶联物:将步骤(C2)得到的17-羟类固醇衍生物溶液逐滴加入到步骤(C1)得到的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,2-8℃搅拌过夜,凝胶层析柱纯化,得到17-羟类固醇酶标偶联物。

[0061] 本发明另一方面提供了一种上述的17-羟类固醇检测试剂的制备方法,包括以下步骤:

[0062] (D1) 均相酶底物的制备:将氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和葡萄糖-6-磷酸按照终浓度比为1:1的比例溶于Tris缓冲液中,制得均相酶底物;

[0063] (D2) 试剂A的制备:将上述步骤(D1)得到的均相酶底物和上述的抗17-羟类固醇特异性抗体混合均匀,得到试剂A,所述的试剂A中抗17-羟类固醇特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:50-5000;

[0064] (D3) 试剂B的制备:将上述的17-羟类固醇酶标偶联物溶于Tris缓冲液中,得到试剂B,所述的试剂B中17-羟类固醇酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:50-5000。

[0065] 优选地,所述的试剂A中抗17-羟类固醇特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:500;所述的试剂B中17-羟类固醇酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:750。

[0066] 本发明的有益效果为:

[0067] 本发明提供了一种17-羟类固醇的衍生物、检测试剂及制备方法。由该衍生物制备

得到的抗体特异性强、效价高,利用该衍生物制备得到的均相酶免疫检测试剂中17-羟类固醇酶标偶联物连接了经基因工程改造过的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(rG6PDH),显著提高了检测灵敏度,可有效检测浓度低至80nmol/L的样品;可实现在全自动生化分析仪上对17-羟类固醇含量的高通量、快速化检测,检测的稳定性和准确度高,特异性强,与常见的92种干扰物无交叉反应,检测效率显著提高,检测方法简单,易于实现和推广使用。

### 附图说明

[0068] 图1是本发明实施例5中17-羟类固醇的ELISA检测标准曲线;

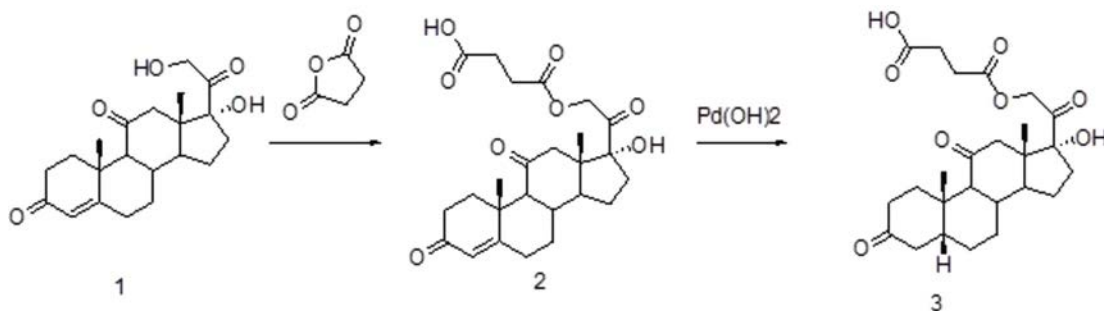
[0069] 图2是本发明的实施例12中17-羟类固醇的均相酶免疫标准曲线。

### 具体实施方式

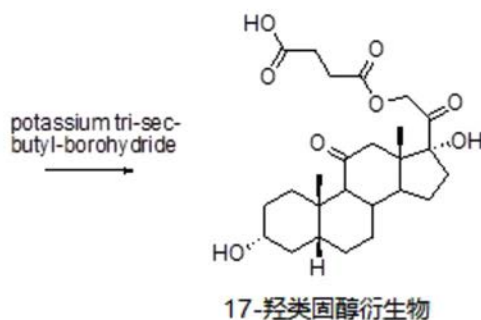
[0070] 下面,结合附图以及具体实施方式,对本发明做进一步描述,需要说明的是,在不冲突的前提下,以下描述的各实施例之间或各技术特征之间可以任意组合形成新的实施例。

[0071] 实施例1:17-羟类固醇衍生物的合成

[0072] 17-羟类固醇衍生物的合成路径如下:



[0073]



[0074] 17-羟类固醇衍生物的制备方法,具体步骤如下:

[0075] (1) 化合物2的合成:将5g化合物1和2.1g三乙胺(TEA)一起溶解于二氯甲烷(DCM)(50mL)中,然后在室温下一次性加入二氢呋喃-2,5-二酮1.8g,在室温下搅拌2小时,薄层色谱法(TLC)显示反应完成后,用300mL纯化水淬灭反应,用1N的盐酸调节pH=3,将反应后的混合物用300mL DCM进行萃取,重复3次,合并有机层,用纯化水(200mL)和卤水(200mL)洗涤,在真空中进行干燥和浓缩,得到白色固体6g,即化合物2,产率:94%;

[0076] (2) 化合物3的合成:将步骤(1)得到的化合物2(6g)溶解于吡啶(120mL)中,然后加入Pd(OH)<sub>2</sub>(4g),在室温和H<sub>2</sub>条件下搅拌过夜,薄层色谱法显示起始反应原料全部消失后,将得到的溶液进行过滤,再将滤液在真空中进行浓缩,得到的粗产物经硅胶纯化,得到白色固

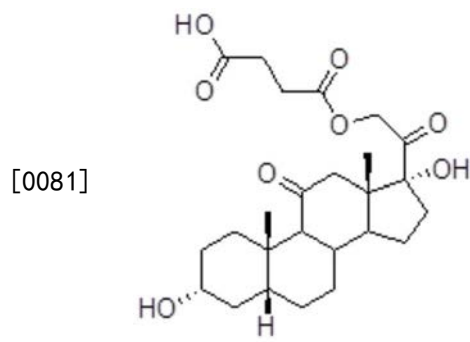
体3.5g,即化合物3,产率:58.3%;

[0077] (3) 17-羟类固醇衍生物的合成:将步骤(2)得到的化合物3(3.5g)溶解于无水四氢呋喃(THF)(50mL)中,在-78℃下逐滴加入三异丁基硼氢化钾(15mL,1M),在-78℃下搅拌1小时,薄层色谱法显示反应已完全结束后,用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液淬灭反应,然后用乙酸乙酯(EA)(200mL)进行萃取,重复3次,合并有机层,用纯化水(200mL)和卤水(200mL)洗涤,在真空中干燥和浓缩,得到的粗产物通过硅胶进行纯化,得到白色固体1.1g,产率:31.4%。

[0078] 利用Bruker Avance III plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对步骤(3)得到的白色固体化合物进行核磁共振光谱扫描,采用TMS作为内标,鉴定其化学结构。结果如下:

[0079] <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz): δ 0.54-0.55 (s, 3H), 1.54 (s, 1H), 1.58-1.60 (s, 3H), 1.64-1.68 (m, 4H), 1.74-1.75 (m, 2H), 1.80-1.81 (m, 2H), 1.82-1.83 (m, 2H), 1.9-2.1 (m, 5H), 2.26-2.27 (m, 1H), 2.50-2.75 (m, 6H), 2.90-3.10 (m, 1H), 3.90-4.10 (d, 1H), 4.85-4.90 (d, 1H), 4.95-5.10 (d, 1H).

[0080] 其结构式如式(I)所示:



[0082] 结果表明,该白色固体为17-羟类固醇衍生物。

[0083] 实施例2:17-羟类固醇免疫原和抗17-羟类固醇特异性抗体的制备

[0084] 17-羟类固醇免疫原的制备步骤如下:

[0085] (A1) 血蓝蛋白溶液的制备:将血蓝蛋白100mg溶解于25mL,0.2M,pH=8.5的磷酸缓冲液中,得到血蓝蛋白溶液;

[0086] (A2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备:将100mg实施例1得到的17-羟类固醇衍生物、1.75mL二甲基甲酰胺、1.75mL乙醇、3.5mL,10mM,pH=5.0的磷酸钾缓冲液、100mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、25mg N-羟基琥珀酰亚胺混合,搅拌溶解反应90min,得到17-羟类固醇衍生物溶液;

[0087] (A3) 得到17-羟类固醇免疫原:将步骤(A2)得到的17-羟类固醇衍生物溶液加入到步骤(A1)得到的血蓝蛋白溶液中,并在4℃下搅拌过夜,经透析纯化,得到17-羟类固醇免疫原。

[0088] 抗17-羟类固醇特异性抗体的制备步骤如下:

[0089] (B1) 用PBS将上述的17-羟类固醇免疫原稀释至0.1mg/mL,得到抗原溶液,然后将抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物山羊进行注射;

[0090] (B2) 5周后,再用相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物山羊进行注射,之后每隔2周注射一次,共计注射5次;

[0091] (B3) 对步骤(B2)的实验动物山羊取血,分离纯化得到效价为1:30000的抗17-羟类固醇特异性抗体。

[0092] 实施例3:17-羟类固醇免疫原和抗17-羟类固醇特异性抗体的制备

[0093] 17-羟类固醇免疫原的制备步骤如下:

[0094] (A1) 甲状腺球蛋白溶液的制备:将甲状腺球蛋白200mg溶解于50mL,0.2M,pH=8.5的磷酸缓冲液中,得到甲状腺球蛋白溶液;

[0095] (A2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备:将200mg实施例1得到的17-羟类固醇衍生物、3.5mL二甲基甲酰胺、3.5mL乙醇、7.0mL,10mM,pH=5.0的磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、50mg N-羟基琥珀酰亚胺混合,搅拌溶解反应90min,得到17-羟类固醇衍生物溶液;

[0096] (A3) 得到17-羟类固醇免疫原:将步骤(A2)得到的17-羟类固醇衍生物溶液加入到步骤(A1)得到的甲状腺球蛋白溶液中,并在4℃下搅拌过夜,经透析纯化,得到17-羟类固醇免疫原。

[0097] 抗17-羟类固醇特异性抗体的制备步骤如下:

[0098] (B1) 用PBS将上述的17-羟类固醇免疫原稀释至1.0mg/mL,得到抗原溶液,然后将抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物绵羊进行注射;

[0099] (B2) 5周后,再用相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物绵羊进行注射,之后每隔2周注射一次,共计注射6次;

[0100] (B3) 对步骤(B2)的实验动物绵羊取血,分离纯化得到效价为1:50000的抗17-羟类固醇特异性抗体。

[0101] 实施例4:17-羟类固醇免疫原和抗17-羟类固醇特异性抗体的制备

[0102] 17-羟类固醇免疫原的制备步骤如下:

[0103] (A1) 血清蛋白溶液的制备:将血清蛋白300mg溶解于75mL,0.2M,pH=8.5的磷酸缓冲液中,得到血清蛋白溶液;

[0104] (A2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备:将300mg实施例1得到的17-羟类固醇衍生物、5.25mL二甲基甲酰胺、5.25mL乙醇、10.5mL,10mM,pH=5.0的磷酸钾缓冲液、300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、75mg N-羟基琥珀酰亚胺混合,搅拌溶解反应90min,得到17-羟类固醇衍生物溶液;

[0105] (A3) 得到17-羟类固醇免疫原:将步骤(A2)得到的17-羟类固醇衍生物溶液加入到步骤(A1)得到的血清蛋白溶液中,并在4℃下搅拌过夜,经透析纯化,得到17-羟类固醇免疫原。

[0106] 抗17-羟类固醇特异性抗体的制备步骤如下:

[0107] (B1) 用PBS将上述的17-羟类固醇免疫原稀释至3.0mg/mL,得到抗原溶液,然后将抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物小鼠进行注射;

[0108] (B2) 6周后,再用相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物小鼠进行注射,之后每隔2周注射一次,共计注射8次;

[0109] (B3) 对步骤(B2)的实验动物小鼠取血,分离纯化得到效价为1:40000的抗17-羟类固醇特异性抗体。

[0110] 实施例5:17-羟类固醇的ELISA检验

[0111] (1) 建立17-羟类固醇的ELISA检测标准曲线

[0112] 标准品的制备:将17-羟类固醇粉末(购自Sigma公司)溶解于甲醇溶液,制备成1000 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液。用ELISA缓冲液将储存液依次稀释为800.0、400.0、200.0、100.0、50.0、0.0nmol/L的标准溶液。其中,ELISA缓冲液含有50.0mM Tris,145mM NaCl和质量分数为0.25%牛血清白蛋白(BSA)。

[0113] 绘制标准曲线:用PBS将实施例3所制备的抗17-羟类固醇特异性抗体稀释成1:8000的终浓度溶液,100 $\mu\text{l}$ /孔包被在96孔酶联板上,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置12-24h,用PBS将包被有上述抗体的96孔酶联板洗涤3次,加入200 $\mu\text{l}$ /孔的质量分数为0.5%的BSA溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭放置8-16h,用PBS洗涤3次,加入20 $\mu\text{l}$ /孔的标准品,再加入100 $\mu\text{l}$ /孔工作浓度的辣根过氧化物酶(HRP)-17-羟类固醇偶联物,室温下孵育30min,PBS洗板5次,然后每孔加入100 $\mu\text{l}$ 四甲基联苯胺(TMB)底物,室温孵育30min,再每孔加入100 $\mu\text{l}$ 终止液(即2M硫酸)。在波长为450nm下测定吸光值,制作标准曲线,结果如图1所示。

[0114] (2) 待测样品中17-羟类固醇含量的检测

[0115] 待测样品的制备:将17-羟类固醇粉末(购自Sigma公司)溶解于甲醇溶液制成1000 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液,并将此储存液稀释于空白尿液中,至终浓度分别为0.00,80.00,320.00,800.00nmol/L,形成空白、低、中、高浓度的尿液样本,该空白尿液为不含17-羟类固醇的健康人尿液。

[0116] 检测待测样品:利用上述步骤(1)中的检验方法,将空白、低、中、高浓度的尿液样本代替标准品,每个样本进行3个复孔测定,检测空白、低、中、高浓度的尿液样本在450nm处的吸光值。根据图1所示的标准曲线,计算每个样本中17-羟类固醇的含量,根据样本中17-羟类固醇的实际含量计算回收率,回收率=检测浓度/样品浓度 $\times 100\%$ ,结果如表1所示。

[0117] 表1:17-羟类固醇的ELISA检测结果

[0118]

尿液样品	空白	低	中	高
样品浓度(nmol/L)	0.00	80.00	320.00	800.00
测试1	0.01	81.25	319.66	811.35
测试2	0.03	80.41	315.58	808.20
测试3	0.02	80.56	317.73	805.44
平均值(nmol/L)	0.02	80.74	317.66	808.60
回收率(%)	-	100.9	99.3	101.0

[0119] 由表1结果可知:采用本发明17-羟类固醇ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的17-羟类固醇回收率都较高,达到99% $<$ 回收率 $\leq 101\%$ ,说明本发明提供的抗17-羟类固醇特异性抗体可以用于样本中17-羟类固醇的检测,并且结果准确度高,稳定性好。

[0120] 另外,本发明还对其他实施例制备的抗17-羟类固醇特异性抗体进行了17-羟类固醇的ELISA检测,17-羟类固醇回收率较高,均能达到95% $<$ 回收率 $< 105\%$ 。

[0121] 实施例6:17-羟类固醇酶标偶联物的制备

[0122] (C1) 重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:将7.5mg的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)、6mL Tris缓冲液、8mg  $\text{MgCl}_2$ 和100mg NaCl混合溶解;再加入112.5mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、67.5mg葡萄糖-6-磷酸、0.375mL卡必醇和

1mL二甲基亚砷,得到重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0123] (C2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备:将5mg实施例1得到的17-羟类固醇衍生物溶解于300 $\mu$ l二甲基甲酰胺中,降温到-18 $^{\circ}$ C,加入1.5 $\mu$ l三丁胺和0.75 $\mu$ l氯甲酸异丁酯,-2~-8 $^{\circ}$ C搅拌30min,混匀,得到17-羟类固醇衍生物溶液;

[0124] (C3) 得到17-羟类固醇酶标偶联物:将步骤(C2)得到的17-羟类固醇衍生物溶液逐滴加入到步骤(C1)得到的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,2-8 $^{\circ}$ C搅拌过夜,凝胶层析柱纯化,得到17-羟类固醇酶标偶联物。

[0125] 实施例7:17-羟类固醇酶标偶联物的制备

[0126] (C1) 重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:将15mg的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)、12mL Tris缓冲液、8mg MgCl<sub>2</sub>和100mg NaCl混合溶解;再加入225mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、135mg葡萄糖-6-磷酸、0.75mL卡必醇和2mL二甲基亚砷,得到重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0127] (C2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备:将10mg实施例1得到的17-羟类固醇衍生物溶解于600 $\mu$ l二甲基甲酰胺中,降温到-18 $^{\circ}$ C,加入3 $\mu$ l三丁胺和1.5 $\mu$ l氯甲酸异丁酯,-2~-8 $^{\circ}$ C搅拌30min,混匀,得到17-羟类固醇衍生物溶液。

[0128] (C3) 得到17-羟类固醇酶标偶联物:将步骤(C2)得到的17-羟类固醇衍生物溶液逐滴加入到步骤(C1)得到的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,2-8 $^{\circ}$ C搅拌过夜,凝胶层析柱纯化,得到17-羟类固醇酶标偶联物。

[0129] 实施例8:17-羟类固醇酶标偶联物的制备

[0130] (C1) 重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:将22.5mg的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)、18mL Tris缓冲液、8mg MgCl<sub>2</sub>和100mg NaCl混合溶解;再加入337.5mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、202.5mg葡萄糖-6-磷酸、1.125mL卡必醇和3mL二甲基亚砷,得到重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0131] (C2) 17-羟类固醇衍生物溶液的制备:将15mg实施例1得到的17-羟类固醇衍生物溶解于900 $\mu$ l二甲基甲酰胺中,降温到-18 $^{\circ}$ C,加入4.5 $\mu$ l三丁胺和2.25 $\mu$ l氯甲酸异丁酯,-2~-8 $^{\circ}$ C搅拌30min,混匀,得到17-羟类固醇衍生物溶液。

[0132] (C3) 得到17-羟类固醇酶标偶联物:将步骤(C2)得到的17-羟类固醇衍生物溶液逐滴加入到步骤(C1)得到的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,2-8 $^{\circ}$ C搅拌过夜,凝胶层析柱纯化,得到17-羟类固醇酶标偶联物。

[0133] 实施例9:17-羟类固醇检测试剂的制备

[0134] 具体包括以下步骤:

[0135] (D1) 均相酶底物的制备:将12.5g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)和5.2g葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)用3L80mM、pH=8.5的Tris缓冲液溶解,制得均相酶底物,其中氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和葡萄糖-6-磷酸的终浓度比为1:1;

[0136] (D2) 试剂A的制备:将上述步骤(D1)得到的均相酶底物和实施例3制得的抗17-羟类固醇特异性抗体混合均匀,得到试剂A,试剂A中抗17-羟类固醇特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:50;

[0137] (D3) 试剂B的制备:将实施例7得到的17-羟类固醇酶标偶联物溶于100mM、pH=7.8的Tris缓冲液中,得到试剂B,试剂B中17-羟类固醇酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:

50。

[0138] 实施例10:17-羟类固醇检测试剂的制备

[0139] 本实施例与实施例9的区别在于,试剂A中抗17-羟类固醇特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:500;试剂B中17-羟类固醇酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:750。

[0140] 实施例11:17-羟类固醇检测试剂的制备

[0141] 本实施例与实施例9的区别在于,试剂A中抗17-羟类固醇特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:5000;试剂B中17-羟类固醇酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:5000。

[0142] 实施例12:17-羟类固醇均相酶免疫检验

[0143] (1) 建立17-羟类固醇均相酶免疫检验标准曲线

[0144] 标准品的制备:制备方法与实施例5中的ELISA检测标准品制备方法相同。

[0145] 绘制标准曲线:按照表2设置迈瑞BS-480全自动生化分析仪反应参数。所用17-羟类固醇均相酶免疫检验试剂为实施例10制备得到的检测试剂。先加试剂A,再加入标准品,最后加入试剂B。加入试剂B后,测定不同时间点的OD<sub>340</sub>吸光值,计算出不同标准品浓度时的反应速率,绘制反应标准曲线,如图2所示。

[0146] 表2:迈瑞BS-480全自动生化分析仪反应参数

[0147]

项目名称	17-羟类固醇
试剂A	200μl
试剂B	50μl
样本量	12μl
分析方法	终点法
主波长	340nm
次波长	412nm
反应时间	10分钟
孵育时间	5分钟
反应方向	上升
结果	nmol/L
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00,50.00,100.00,200.00,400.00,800.00nmol/L

[0148] (2) 待测样本检测:

[0149] 待测样本是将17-羟类固醇标准品溶解于人尿液中,至浓度分别为80.00,320.00,800.00nmol/L。重复测定低、中、高浓度质控样本10次,根据图2所示的标准曲线,计算每个样本中17-羟类固醇的含量和回收率,回收率=检测浓度/样品浓度×100%,结果如表3所示。

[0150] 表3:样品测定及精密度和回收率评估

[0151]

尿液样品	低	中	高
样品浓度 (nmol/L)	80.00	320.00	800.00

1	82.13	321.36	815.95
2	82.25	325.47	804.60
3	81.50	316.82	786.59
4	80.73	324.53	809.94
5	79.64	326.99	831.36
6	80.91	330.25	804.25
7	80.45	315.85	796.89
8	81.18	319.83	801.62
9	79.46	328.20	812.74
10	80.40	321.76	792.51
平均值 (nmol/L)	80.84	323.16	805.65
标准差 (SD)	0.095	0.485	1.281
精密度 (CV%)	1.17	1.51	1.60
回收率%	101.1	100.9	100.7

[0152] 检测结果：本发明的均相酶免疫检测试剂测定的准确度高，回收率达到95%–105%，精密度高，CV均低于3%。

[0153] 实施例13. 药物与激素干扰试验

[0154] 选取62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物进行干扰检测，调整待测干扰物浓度至0.10 $\mu$ mol/L，采用实施例12的17- $\alpha$ -羟类固醇均相酶免疫检测方法进行检测。

[0155] 将待测干扰物与实施例10制备的试剂A接触反应，再加入试剂B；检测340nm处的吸光值，根据如图2所示的标准曲线得到相应物质的浓度。62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物名称以及测定结果具体参见表4。

[0156] 表4：常见干扰物均相酶免疫检验结果

[0157]

ID#	化合物名称	等价于 17-羟类固醇的浓度 (μmol/L)	ID#	化合物名称	等价于 17-羟类固醇的浓度 (μmol/L)
1	阿司匹林	0.00	2	苯丙醇胺	0.00
3	β-苯基乙胺	0.00	4	普鲁卡因酰胺	0.00
5	安非他命	0.00	6	普鲁卡因	0.00
7	氨苄青霉素	0.00	8	奎尼丁	0.00
9	甲氨二氮卓	0.00	10	佐美酸	0.00
11	氯丙嗪	0.00	12	苯肾上腺素	0.00
13	氯拉卓酸	0.00	14	桂皮酰艾克宁	0.00
15	二甲苯氧庚酸	0.00	16	芽子碱	0.00
17	非诺洛芬	0.00	18	地西洋	0.00
19	甲基苯丙胺	0.00	20	可替宁	0.00
21	龙胆酸	0.00	22	阿替洛尔	0.00
22	吉非贝齐	0.00	24	心得安	0.00
25	氢可酮	0.00	26	苯乙哌啶酮	0.00
27	布洛芬	0.00	28	苯基丁氮酮	0.00
29	丙咪嗪	0.00	30	麦角酸二乙基酰胺	0.00
31	二氨基二苯砜	0.00	32	大麻酚	0.00
33	萘普生	0.00	34	洛哌丁胺	0.00
35	氢氯噻嗪	0.00	36	异克舒令	0.00
37	哌替啶	0.00	38	苯基丙氨酸	0.00
39	烯丙羟吗啡酮	0.00	40	盐酸氟西汀	0.00
41	麻黄素	0.00	42	柳丁氨醇	0.00
43	烟酰胺	0.00	44	青霉素	0.00
45	甲胺苄硫	0.00	46	甲基乙二醇胺	0.00
47	异戊巴比妥	0.00	48	二亚甲基双氧苯丙胺	0.00
49	甲撑二氧苯丙胺	0.00	50	琥珀酸多西拉敏	0.00
51	四氢大麻酚	0.00	52	纳布啡	0.00
53	制霉菌素	0.00	54	去甲吗啡	0.00
55	乙酰吗啡	0.00	56	羟考酮	0.00
57	苯非他明	0.00	58	克他命	0.00
59	异丙嗪	0.00	60	苯海拉明	0.00
61	阿司帕坦	0.00	62	苯丁胺	0.00

[0158]

ID#	化合物名称	等价于 17-羟类固醇的浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	ID#	化合物名称	等价于 17-羟类固醇的浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )
63	皮质醇(氢化可的松)	0.00	64	香草扁桃酸	0.00
65	雄烯二酮	0.00	66	雄甾酮	0.00
67	皮质脂酮	0.00	68	皮质酮(可的松)	0.00
69	去氧皮质酮	0.00	70	脱氢表雄酮	0.00
71	硫酸脱氢表雄酮	0.00	72	二氢睾酮	0.00
73	醛固酮	0.00	74	雌三醇	0.00
75	雌二醇	0.00	76	本胆烷醇酮	0.00
77	17-羟孕烯醇酮	0.00	78	17-羟孕酮	0.00
79	孕烯醇酮	0.00	80	孕酮	0.00
81	睾酮	0.00	82	孕三醇	0.00
83	孕二醇	0.00	84	17 $\alpha$ -羟基黄体酮	0.00
85	雄烯二酮	0.00	86	17-酮类固醇	0.00
87	雌酮	0.00	88	肾上腺素	0.00
89	去甲肾上腺素	0.00	90	多巴胺	0.00
91	高香草酸	0.00	92	二羟基杏仁酸	0.00

[0159] 测定结果显示:上述62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物等价于17-羟类固醇的浓度均小于 $0.10\mu\text{mol/L}$ 。由此可见,本发明提供的17-羟类固醇均相酶免疫检验试剂,特异性强,与常见的92种干扰物无交叉反应。

[0160] 以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例,本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换,均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

## 序列表

&lt;110&gt; 苏州博源医疗科技有限公司

&lt;120&gt; 一种17-羟类固醇的衍生物、检测试剂及制备方法

&lt;130&gt; 2019

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; SIPOSequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 455

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成(Artificial)

&lt;400&gt; 1

```

Met Val Ser Glu Ile Lys Thr Leu Val Thr Phe Phe Gly Gly Thr Gly
1           5           10           15
Asp Leu Ala Lys Arg Lys Tyr Pro Ser Val Phe Asn Tyr Lys Lys Gly
           20           25           30
Tyr Gln Lys His Phe Ala Ile Val Gly Thr Ala Arg Gln Ala Asn Asp
           35           40           45
Asp Glu Phe Lys Gln Val Arg Asp Ser Ile Lys Asp Phe Thr Asp Asp
           50           55           60
Gln Ala Gln Ala Glu Ala Phe Ile Glu His Phe Ser Tyr Arg Ala His
65           70           75           80
Asp Val Thr Asp Ala Ala Ser Tyr Ala Val Lys Glu Ala Ile Glu Glu
           85           90           95
Ala Ala Asp Lys Phe Asp Ile Asp Gly Asn Arg Ile Phe Tyr Met Ser
           100          105          110
Val Ala Pro Arg Phe Phe Gly Thr Ile Ala Lys Tyr Lys Ser Glu Gly
           115          120          125
Ala Asp Thr Gly Tyr Asn Arg Met Ile Glu Lys Pro Phe Gly Thr Ser
           130          135          140
Tyr Asp Thr Ala Ala Glu Gln Asn Asp Glu Asn Ala Phe Asp Asp Asn
145          150          155          160
Gln Phe Arg Ile Asp His Tyr Gly Lys Glu Met Val Gln Asn Ile Ala
           165          170          175
Ala Arg Phe Gly Asn Pro Ile Phe Asp Ala Ala Trp Asn Lys Asp Tyr
           180          185          190
Ile Lys Asn Val Gln Val Thr Ser Glu Val Gly Val Glu Glu Arg Ala
           195          200          205
Gly Tyr Tyr Asp Thr Ala Gly Ala Asp Met Ile Gln Asn His Thr Met

```

210	215	220
Gln Ile Val Gly Trp Ala Met Glu Lys Pro Glu Ser Phe Thr Asp Lys		
225	230	235
Asp Ile Arg Ala Ala Lys Asn Ala Ala Phe Asn Ala Lys Ile Tyr Asp		
	245	250
Glu Ala Glu Val Asn Lys Tyr Phe Val Arg Ala Gln Tyr Gly Ala Gly		
	260	265
Asp Ser Ala Asp Phe Lys Pro Tyr Glu Glu Asp Val Pro Ala Asp Ser		
	275	280
Lys Asn Asn Thr Phe Ile Ala Gly Glu Gln Phe Asp Pro Arg Trp Glu		
290	295	300
Gly Val Pro Phe Tyr Val Arg Ser Gly Lys Arg Ala Ala Lys Gln Thr		
305	310	315
Arg Val Asp Ile Val Phe Lys Ala Gly Thr Phe Asn Phe Gly Ser Glu		
	325	330
Gln Glu Ala Gln Glu Ala Val Ser Ile Ile Ile Asp Pro Lys Gly Ala		
	340	345
Ile Glu Lys Asn Ala Lys Ser Val Glu Asp Ala Phe Asn Thr Arg Thr		
	355	360
Ile Asp Gly Trp Thr Val Ser Asp Glu Asp Lys Lys Asn Thr Pro Glu		
370	375	380
Pro Tyr Glu Arg Met Ile His Asp Thr Met Asn Gly Asp Gly Ser Asn		
385	390	395
Phe Ala Asp Trp Asn Gly Val Ser Ile Ala Trp Lys Phe Val Asp Ala		
	405	410
Ile Ser Ala Val Tyr Thr Ala Asp Lys Ala Pro Glu Thr Tyr Lys Ser		
	420	425
Gly Ser Met Gly Pro Glu Ala Ser Asp Lys Leu Leu Ala Ala Asn Gly		
	435	440
Asp Ala Trp Val Phe Lys Gly		
450	455	

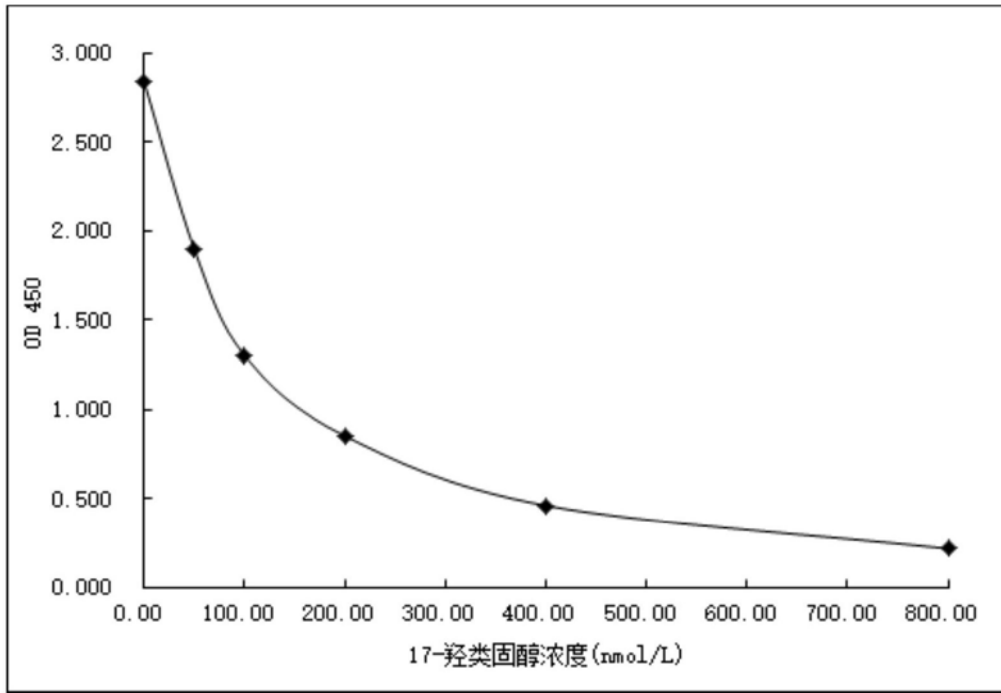


图1

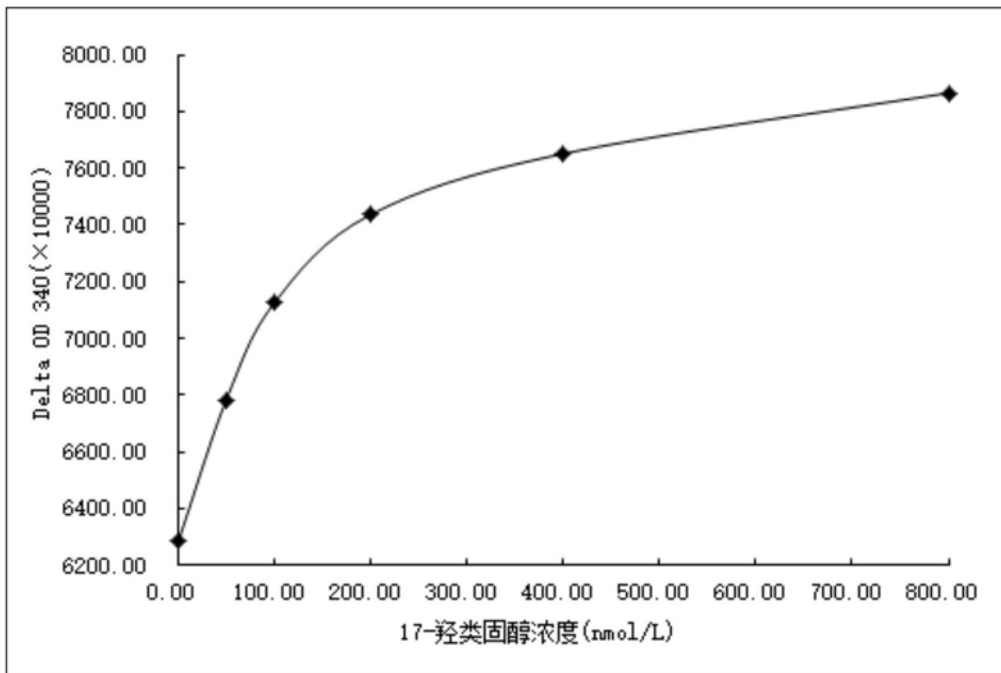


图2

专利名称(译)	一种17-羟类固醇的衍生物、检测试剂及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110003300A</a>	公开(公告)日	2019-07-12
申请号	CN201910325085.3	申请日	2019-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
[标]发明人	虞留明 张小可		
发明人	虞留明 张小可		
IPC分类号	C07J7/00 G01N33/531 G01N33/74		
CPC分类号	C07J7/008 G01N33/531 G01N33/74		
代理人(译)	张黎		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种17-羟类固醇的衍生物、检测试剂及制备方法，涉及生物检测技术领域。利用该17-羟类固醇衍生物制备的17-羟类固醇免疫原，免疫原性高，得到的抗体特异性强、效价高；利用该衍生物制备得到的均相酶免疫检测试剂中17-羟类固醇酶标偶联物连接了经基因工程改造过的重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，显著提高了检测灵敏度，可有效检测浓度低至80nmol/L的样品，且特异性强，与常见的92种干扰物无交叉反应；可实现在全自动生化分析仪上对17-羟类固醇含量的高通量、快速化检测，检测结果稳定，准确度高，检测方法简单，易于实现和推广使用。

