(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109180768 A
(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201811036051.4

(22)申请日 2018.09.06

(71)申请人 苏州博源医疗科技有限公司
地址 215163 江苏省苏州市苏州高新区锦峰路8号9号楼北二层

(72)发明人 虞留明 谢江涛 陈学东 郭进京

(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 43/00(2006.01)
C07K 14/765(2006.01)
C07K 14/77(2006.01)
C07K 14/795(2006.01)
C07K 14/435(2006.01)
C07K 16/26(2006.01)
C07K 16/06(2006.01)
G01N 33/535(2006.01)

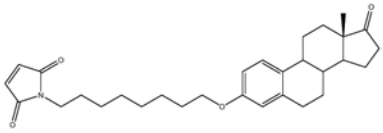
权利要求书3页 说明书19页 附图2页

(54)发明名称

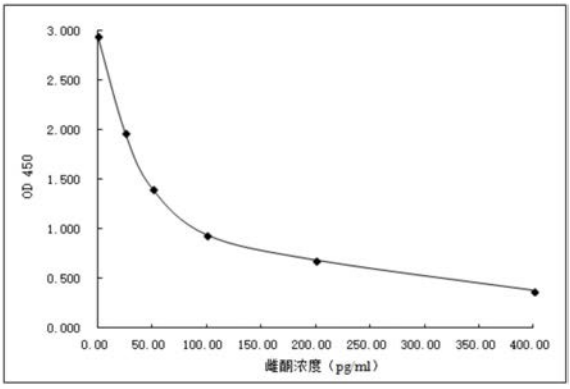
雌酮衍生物、免疫原、抗体、酶标偶联物、检测试剂及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于检测生物样本中雌酮含量的雌酮衍生物及其制备方法，所述雌酮衍生物的结构式如式(I)所示。使用该雌酮衍生物相继制备得到高免疫原性的雌酮免疫原与相应抗体，该雌酮免疫原特异性强、免疫原性高，抗雌酮特异性抗体特异性强、效价高，能很好地识别并结合雌酮，并且与常见的92种干扰物无任何交叉反应。本发明还得到雌酮酶标偶联物，并利用抗雌酮特异性抗体和雌酮酶标偶联物制备得到雌酮均相酶免疫检测试剂，该试剂可以方便、快速、准确地测定生物样品中的雌酮含量，同时在全自动生化分析仪上测定多个样品，实现雌酮的高通量、快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高。

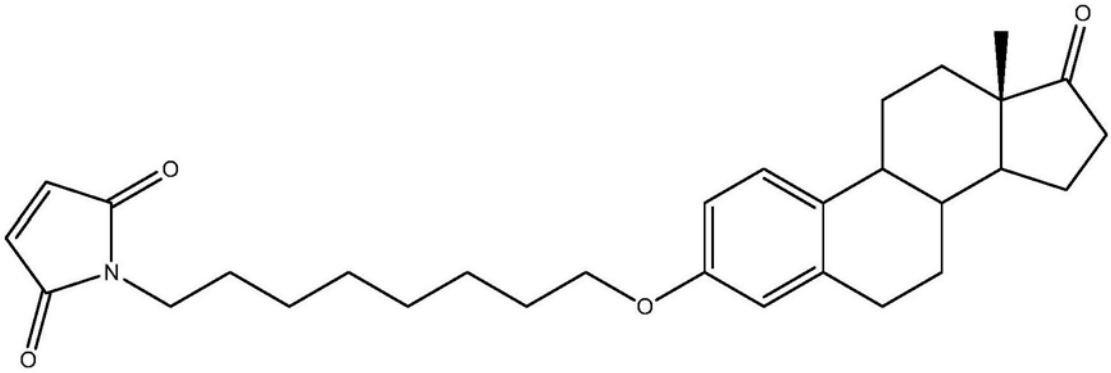


式(I)



CN 109180768 A

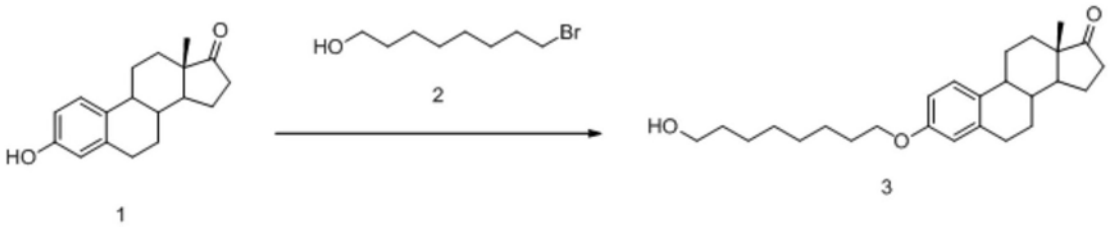
1.一种雌酮衍生物,其结构式如下述式(I)所示:



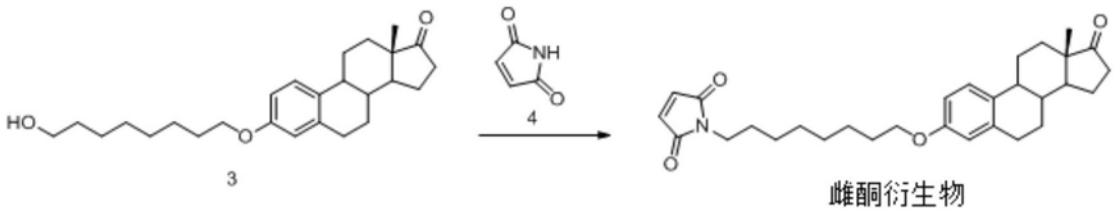
式（I）。

2.一种权利要求1所述的雌酮衍生物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)化合物3的合成



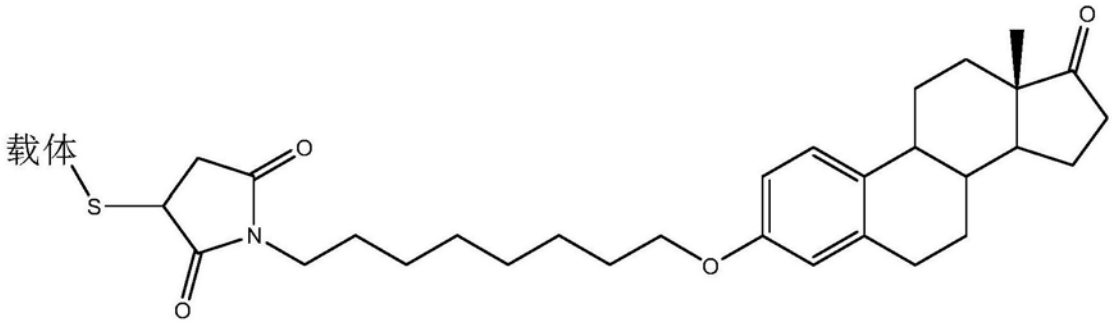
(2)雌酮衍生物的合成



其中,所述步骤(1)的具体方法为:将化合物1与化合物2溶解于丙酮中,然后加入K_2CO_3,制成反应混合溶液,加热回流后过滤,再将去除溶剂后得到的剩余物通过硅胶纯化柱进行纯化,得到化合物3;

所述步骤(2)的具体方法为:将化合物3、化合物4与三苯基膦溶解于四氢呋喃中,然后加入偶氮二甲酸二异丙酯,制成反应混合溶液,搅拌反应,过滤反应结束后的溶液,再将去除溶剂后得到的剩余物通过硅胶纯化柱进行纯化,得到雌酮衍生物。

3.一种雌酮免疫原,其特征在于,由权利要求1所述的雌酮衍生物或权利要求2所述的制备方法制备得到的雌酮衍生物与载体连接而成,其结构式如下述式(Ⅱ)所示:



式（Ⅱ）;

其中，所述载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽，选自血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种，优选为血清蛋白，更优选为牛血清白蛋白。

4.一种权利要求3所述的雌酮免疫原的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1)配制缓冲液A：按照重量份数计，2.3-3.2份磷酸二氢钾、3.8-4.5份磷酸氢二钠、8.0-9.0份氯化钠、0.7-1.3份氯化镁，溶解于900-1100份水中，调节pH至8.0-8.5；

(2)将载体溶解于缓冲溶液A中，制成载体溶液；

(3)将式(I)所示的雌酮衍生物，溶解于缓冲溶液A中，制成雌酮衍生物溶液；

(4)将雌酮衍生物溶液逐滴加入上述载体溶液中，搅拌得到混合溶液A；

(5)将混合溶液A用上述缓冲溶液A进行透析，即得雌酮免疫原溶液。

5.一种抗雌酮特异性抗体，其特征在于，由权利要求3所述的雌酮免疫原或权利要求4所述制备方法制备得到的雌酮免疫原通过免疫实验动物后产生；

所述抗体为完整抗体分子，或者为保留与雌酮特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物；

所述实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种，优选为兔。

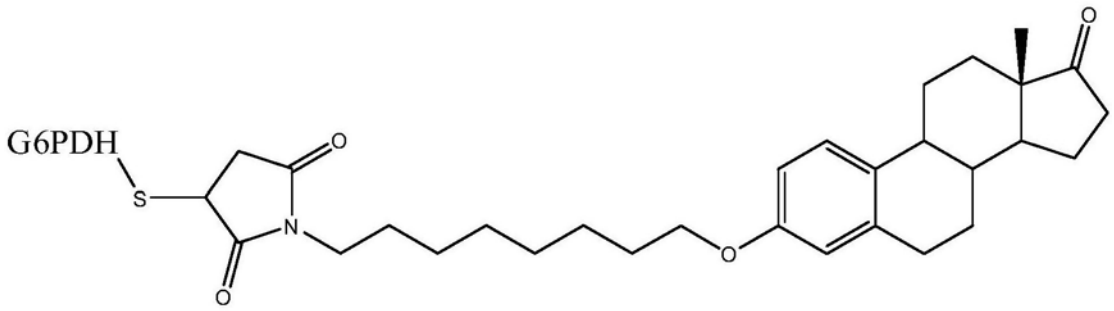
6.一种权利要求5所述的抗雌酮特异性抗体的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1)用PBS缓冲液稀释式(II)所示的雌酮免疫原，得到抗原溶液，将抗原溶液与弗氏完全佐剂等体积混合，对实验动物进行注射；

(2)2-5周后，再用上述抗原溶液与弗氏不完全佐剂等体积混合，对上述实验动物进行注射，之后每隔2-5周注射一次，共计注射3-8次；

(3)对免疫后的实验动物取血，分离纯化得到抗雌酮特异性抗体。

7.一种雌酮酶标偶联物，其特征在于，由权利要求1所述的雌酮衍生物或权利要求2所述制备方法制备得到的雌酮衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶连接而成，其结构式如下述式(Ⅲ)所示：



式（Ⅲ）。

8.一种权利要求7所述的雌酮酶标偶联物的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1)制备缓冲溶液B：按照重量份数计，0.85-1.30份磷酸二氢钾、1.2-2.0份磷酸氢二钠、8.0-9.0份氯化钠、0.7-1.3份氯化镁，溶解于900-1100份水中，调节pH至8.0-8.5；

(2)将葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶解于缓冲溶液B中，制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液；

(3)将式(I)所示的雌酮衍生物溶解于缓冲溶液B中，制成雌酮衍生物溶液；

(4)将雌酮衍生物溶液逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中，搅拌得到混合溶液B；

(5)将混合溶液B用上述缓冲溶液B进行透析，透析后所得溶液即为雌酮酶标偶联物溶

液。

9.一种雌酮检测试剂,其特征在于,包括试剂A和试剂B,所述试剂A中包含权利要求5所述的抗雌酮特异性抗体或权利要求6所述的制备方法制备得到的抗雌酮特异性抗体和均相酶底物,所述均相酶底物由葡萄糖-6-磷酸、氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和Tris缓冲液配制而成;所述试剂B包含权利要求7所述的雌酮酶标偶联物或权利要求8所述的制备方法制备得到的雌酮酶标偶联物和Tris缓冲液。

10.一种权利要求9所述的雌酮检测试剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)试剂A的制备:将氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸与葡萄糖-6-磷酸溶解于Tris缓冲液中,制成均相酶底物;再将权利要求5所述的抗雌酮特异性抗体或权利要求6所述的制备方法制备得到的抗雌酮特异性抗体加入上述均相酶底物中,得到试剂A,

优选地,所述试剂A中抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100-1:10000,

更优选地,所述试剂A中抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:300-1:700,

更优选地,所述试剂A中抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:625;

(2)试剂B的制备:将权利要求7所述的雌酮酶标偶联物或权利要求8所述的制备方法制备得到的雌酮酶标偶联物溶解于Tris缓冲液中,得到试剂B,

优选地,所述试剂B中雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100-1:10000,

更优选地,所述试剂B中雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:1000-1:3500,

更优选地,所述试剂B中雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:1250。

雌酮衍生物、免疫原、抗体、酶标偶联物、检测试剂及其制备方法

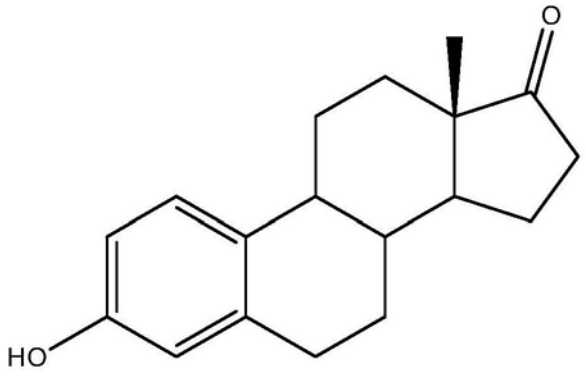
技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域，具体涉及一种雌酮衍生物、免疫原、抗体、酶标偶联物、检测试剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 雌酮(Estrone，E1)的化学结构式如下述式(Ⅳ)所示：

[0003]



式（Ⅳ）

[0004] 雌酮是一种甾体类激素化合物，为天然内源性雌激素，可以从孕妇或孕马的妊娠尿中提取。目前，雌酮检测常用仪器分析的方法，如：气相色谱法、气质联用法、液相色谱法、高效液相色谱法等，这些方法虽然灵敏度较高，检测结果精密度高、准确性好，但是存在样品的前处理较繁琐、测定时间较长、需要配备专门的仪器设备，操作流程复杂，单个样品的检测时间较长，不能快速提供检测结果等缺陷，不适用于临床上大批量样品的检验。如专利申请CN105929014A公开了一种通过质谱法检测雌酮的方法，其对样品经过分离纯化、电离后进行质谱检测，操作方法繁琐，定量分析复杂，单个样品分析时间长，不适合大量样本的批量分析。因此，寻找一种灵敏度高、结果精确，且高通量、快速化，操作简便、成本低廉的雌酮检测方法对临床诊断、食品卫生、环境激素检测等方面都具有重要意义。

[0005] 利用免疫学方法进行雌酮含量测定是一种极具应用前景的新技术，目前利用免疫方法检测雌酮的原理是：由于雌酮上没有可以直接连接上标记分子的官能团，需要经过化学合成的方法引入可以直接连接上标记分子的结构(称为连接臂，末端官能团可以为羧基、氨基等)，得到雌酮衍生物。接着，通过化学方法将雌酮衍生物的连接臂连接到标记分子上，制备成雌酮标记分子。在检测过程中，雌酮标记分子与待测样本中的雌酮竞争结合雌酮抗体，利用标记分子直接或者间接产生的光信号，通过赋值校准，获得待测雌酮衍生物的浓度值，从而完成对待测样本中雌酮含量的测定。由此可见制备灵敏度高、特异性强的雌酮特异性抗体和雌酮酶标偶联物是实现该技术的关键所在。均相酶免疫检测技术可以方便、快速、准确地确定生物样品中的雌酮含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现雌酮的高通量、快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高。专利申请CN107652343A公开了雌醇衍生物及其衍生物与试剂盒在检测雌醇含

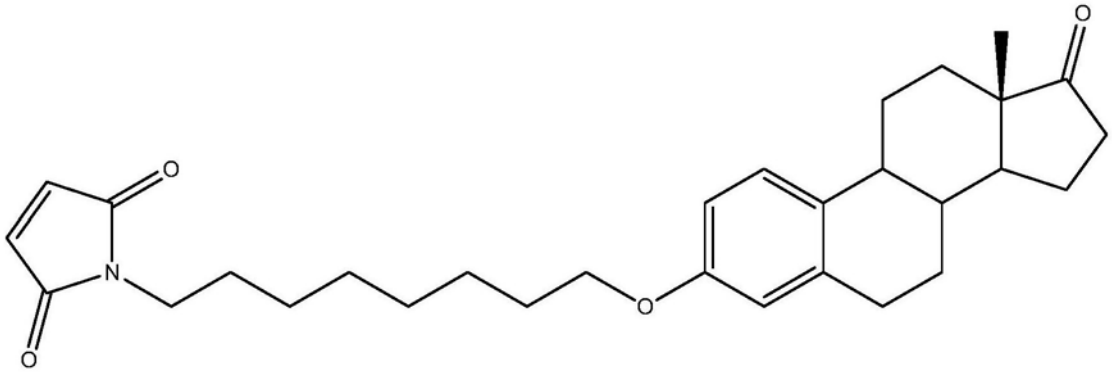
量中的应用，但是该雌醇衍生物制备成的试剂检测雌醇含量时与市售已知试剂盒相比相关性仅为0.983，存在一定的误差。

发明内容

[0006] 基于上述现有技术的缺陷，本发明提供一种全新的雌酮衍生物，通过该衍生物制备得到的抗体效价较高、特异性强；另一方面该雌酮衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶偶联得到雌酮酶标偶联物，上述雌酮特异性抗体与雌酮酶标偶联物共同制备为均相酶免疫检测试剂，能够很好的识别并检测雌酮，并且与常见的92种干扰物无任何交叉反应，检测方法简单、迅速、特异性强、实现大批量样品全自动检测。

[0007] 本发明提供一种雌酮衍生物，其结构式如下述式(I)所示：

[0008]

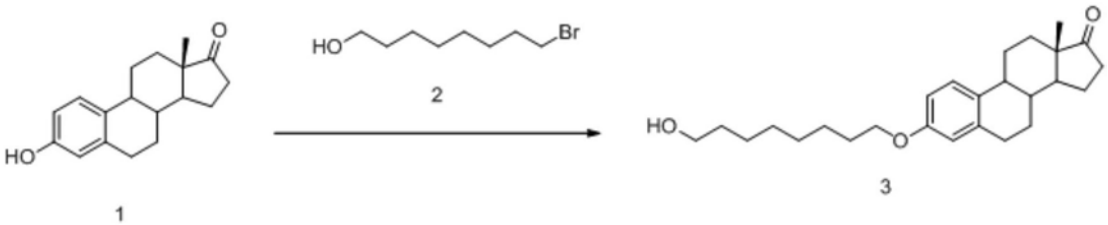


式（I）。

[0009] 进一步地，所述雌酮衍生物的制备方法包括以下步骤：

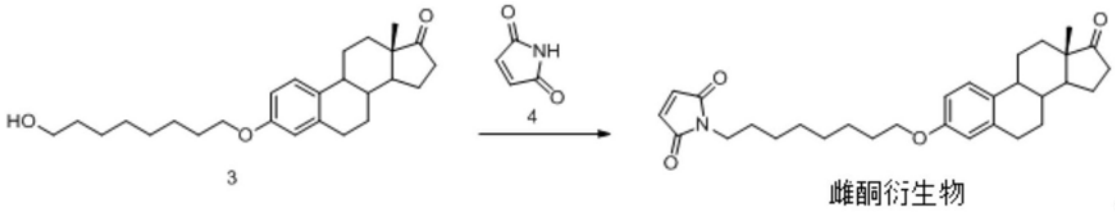
[0010] (1)化合物3的合成

[0011]



[0012] (2)雌酮衍生物的合成

[0013]



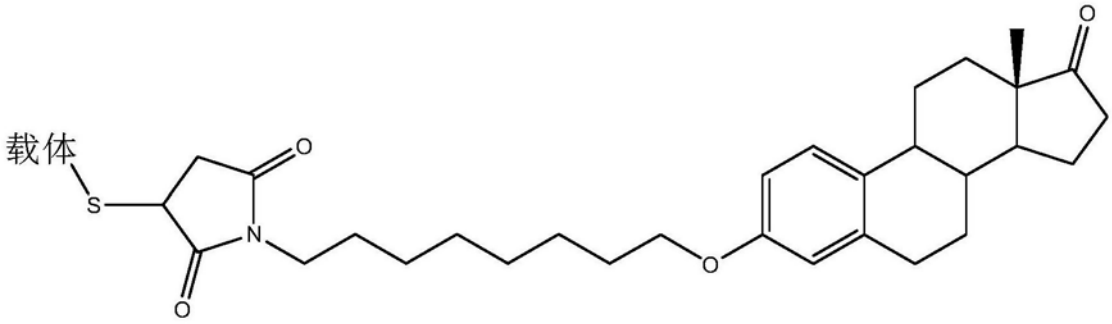
。

[0014] 进一步地，所述步骤(1)的具体方法为：化合物1与化合物2溶解于丙酮中，然后加入K_2CO_3，制成反应混合溶液，加热回流后过滤，再将去除溶剂后得到的剩余物通过硅胶纯化柱进行纯化，得化合物3。

[0015] 进一步地，所述步骤(2)的具体方法为：化合物3、化合物4、三苯基膦(PPh3)溶解于四氢呋喃(THF)中，然后加入偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD)，制成反应混合溶液，搅拌反应，过滤反应液，再将去除溶剂后得到的剩余物通过硅胶纯化柱进行纯化，得本发明的雌酮衍生

物。

[0016] 本发明还提供一种雌酮免疫原，由上述雌酮衍生物与载体连接而成，其结构式如下述式(Ⅱ)所示：

[0017] 

式（Ⅱ）；

[0018] 其中，所述载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽，选自血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种。

[0019] 其中载体优选为血清蛋白。

[0020] 其中载体更优选为牛血清白蛋白。

[0021] 进一步地，所述雌酮免疫原的制备方法包括以下步骤：

[0022] (1)配制缓冲液A：按照重量份数计，2.3-3.2份磷酸二氢钾、3.8-4.5份磷酸氢二钠、8.0-9.0份氯化钠、0.7-1.3份氯化镁，溶解于900-1100份水中，调节pH至8.0-8.5；

[0023] (2)将载体溶解于缓冲溶液A中，制成载体溶液；

[0024] (3)将式(I)所示的雌酮衍生物，溶解于缓冲溶液A中，制成雌酮衍生物溶液；

[0025] (4)将雌酮衍生物溶液逐滴加入上述载体溶液中，搅拌得到混合溶液A；

[0026] (5)将混合溶液A用上述缓冲溶液A进行透析，即得雌酮免疫原溶液。

[0027] 更进一步地，所述雌酮免疫原的制备方法包括以下步骤：

[0028] (1)配制缓冲液A：称取2.72g磷酸二氢钾、4.26g磷酸氢二钠、8.5g氯化钠、0.95g氯化镁，共同溶解于1L去离子水中，调节pH至8.0-8.5；

[0029] (2)将蛋白质载体在-2～-8℃下溶解于缓冲溶液A中，制成0.5-2mg/ml的载体溶液；

[0030] (3)将式(I)所示的雌酮衍生物在-2～-8℃下溶解于缓冲溶液A中，制成8-12mg/ml雌酮衍生物溶液；

[0031] (4)将雌酮衍生物溶液逐滴加入上述载体溶液中，然后将此混合溶液在-2～-8℃下搅拌2-5小时，得到混合溶液A；

[0032] (5)将混合溶液A用上述缓冲溶液A进行透析，透析后所得溶液即为雌酮免疫原溶液，加入质量分数0.05-0.15％的NaN_3，于-18～-22℃下储存。

[0033] 本发明进一步提供一种抗雌酮特异性抗体，由上述雌酮免疫原通过免疫实验动物后产生，所述抗体为完整抗体分子，或者为保留与雌酮特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

[0034] 进一步地，所述实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种。

[0035] 更进一步地，所述实验动物为兔。

[0036] 进一步地，所述抗雌酮特异性抗体的制备方法包括以下步骤：

[0037] (1)用PBS缓冲液稀释式(II)所示的雌酮免疫原，得到抗原溶液，将抗原溶液与弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行注射；

[0038] (2)2-5周后，将抗原溶液与弗氏不完全佐剂混合，对实验动物再次进行注射；

[0039] (3)对免疫后的实验动物取血，分离纯化得到抗雌酮特异性抗体。

[0040] 更进一步地，所述抗雌酮特异性抗体的制备方法包括以下步骤：

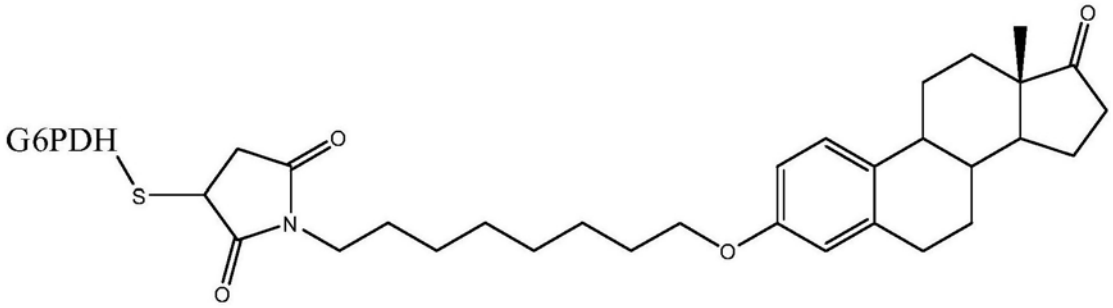
[0041] (1)用PBS缓冲液(pH7.2-7.6)将上述式(Ⅱ)所示的雌酮免疫原稀释至1.0-3.0mg/ml，得到抗原溶液，然后用1-3ml抗原溶液与弗氏完全佐剂等体积混合，对实验动物进行注射；

[0042] (2)2-5周后，再用1-3ml上述抗原溶液与弗氏不完全佐剂等体积混合，对上述实验动物进行注射，之后每隔2-5周注射一次，共计注射3-8次；

[0043] (3)对免疫后的实验动物取血，分离纯化得到效价为1:50000-1:80000的抗雌酮特异性抗体。

[0044] 本发明还提供一种雌酮酶标偶联物，由式(I)所示的雌酮衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶连接而成，其结构式如下述式(Ⅲ)所示：

[0045]



式（Ⅲ）。

[0046] 进一步地，所述雌酮酶标偶联物的制备方法包括以下步骤：

[0047] (1)制备缓冲溶液B：按照重量份数计，0.85-1.30份磷酸二氢钾、1.2-2.0份磷酸氢二钠、8.0-9.0份氯化钠、0.7-1.3份氯化镁，溶解于900-1100份水中，调节pH8.0-8.5；

[0048] (2)将葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶解于缓冲溶液B，制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液；

[0049] (3)将式(I)所示的雌酮衍生物溶解于缓冲溶液B中，制成雌酮衍生物溶液；

[0050] (4)将雌酮衍生物溶液逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中，搅拌得到混合溶液B；

[0051] (5)将混合溶液B用上述缓冲溶液B进行透析，透析后所得溶液即为雌酮酶标偶联物溶液。

[0052] 更进一步地，所述雌酮酶标偶联物的制备方法包括以下步骤：

[0053] (1)缓冲溶液B的制备：称取1.09g磷酸二氢钾、1.70g磷酸氢二钠、8.5g氯化钠、0.95g氯化镁，共同溶解于1L去离子水中，调节pH至8.0-8.5；

[0054] (2)将葡萄糖-6-磷酸脱氢酶于-2～-8℃溶解于缓冲溶液B中，制成0.5-2mg/ml的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液；

[0055] (3)将式(I)所示的雌酮衍生物于-2～-8℃溶解于缓冲溶液B中，制成8-12mg/ml的雌酮衍生物溶液；

[0056] (4)将雌酮衍生物溶液逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中，然后将此混合

溶液在-2～-8℃下搅拌2-5小时，得到混合溶液B；

[0057] (5)将混合溶液B用上述缓冲溶液B进行透析，透析后所得溶液即为雌酮酶标偶联物溶液，加入质量分数0.3-1.0％的BSA和质量分数0.05-0.15％的NaN_3，于2～8℃下储存。

[0058] 本发明进一步提供一种雌酮检测试剂，该试剂包括试剂A和试剂B，所述试剂A中包含上述抗雌酮特异性抗体和均相酶底物；所述试剂B包含式(III)所示的雌酮酶标偶联物和Tris缓冲液。

[0059] 进一步地，所述均相酶底物由葡萄糖-6-磷酸、氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和Tris缓冲液组成；

[0060] 进一步地，所述雌酮检测试剂使用时将试剂A与试剂B按1:1-4:1的体积比混合。

[0061] 更进一步地，所述雌酮检测试剂使用时将试剂A与试剂B按4:1的体积比使用。

[0062] 进一步地，所述雌酮检测试剂的制备方法包括以下步骤：

[0063] (1)试剂A的制备：将氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、葡萄糖-6-磷酸溶解于Tris缓冲液中，制成均相酶底物；再将上述抗雌酮特异性抗体加入上述均相酶底物中，得到试剂A。

[0064] 进一步地，所述试剂A中抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100-1:10000。

[0065] 更进一步地，所述试剂A中抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:300-1:700。

[0066] 更进一步地，所述试剂A中抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:625。

[0067] (2)试剂B的制备：将上述雌酮酶标偶联物溶解于Tris缓冲液中，得到试剂B。

[0068] 进一步地，所述试剂B中雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100-1:10000。

[0069] 更进一步地，所述试剂B中雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:1000-1:3500。

[0070] 更进一步地，所述试剂B中雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:1250。

[0071] 本发明的有益效果为：

[0072] (1)通过反复的试验获得了一种全新的雌酮衍生物，该雌酮衍生物与载体蛋白结合，获得了高免疫原性的雌酮免疫原；该免疫原免疫实验动物，获得效价较高的特异性抗体。

[0073] (2)利用本发明的雌酮衍生物还获得了相应的雌酮酶标偶联物，用于制备雌酮均相酶免疫检测试剂。

[0074] (3)本发明得到的雌酮免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗雌酮特异性抗体特异性强、效价高，能很好地识别并结合雌酮，并且与常见的92种干扰物无任何交叉反应；含有上述抗雌酮特异性抗体与雌酮酶标偶联物的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定生物样品中的雌酮含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现雌酮的高通量、快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高，同时实现了检测过程的全自动化，对检测人员的要求不高，易于实现和推广使用。

附图说明

[0075] 图1是本发明的雌酮ELISA检测反应曲线；

[0076] 图2是本发明的雌酮均相酶免疫检测反应曲线；

[0077] 图3是本发明的雌酮均相酶免疫法与高效液相色谱法相关性分析图。

[0078] 图4是本发明的雌酮衍生物的核磁共振光谱扫描的图谱。

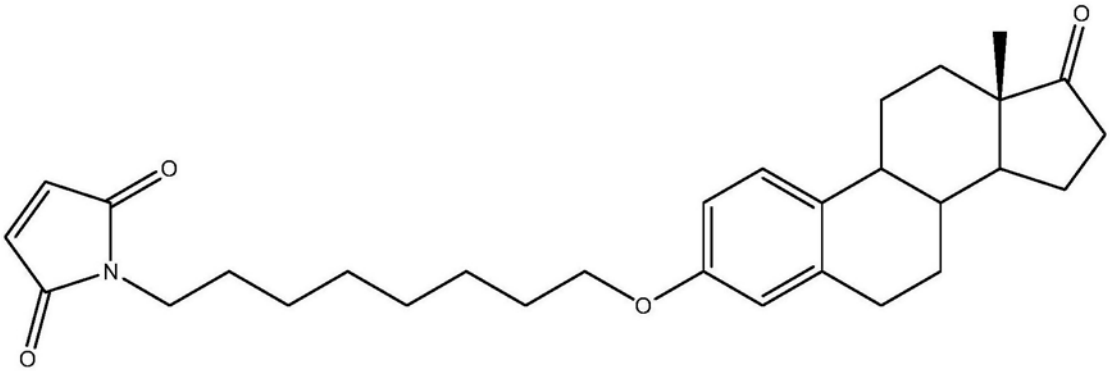
具体实施方式

[0079] 下面结合附图以及具体实施方式，对本发明做进一步描述，这些附图均为简化的示意图，仅以示意方式说明本发明的基本结构，因此其仅显示与本发明有关的构成。除非特别指明，以下实施例中所用的试剂、仪器、设备、耗材均可从正规渠道商购买获得。

[0080] 实施例1.雌酮衍生物的合成

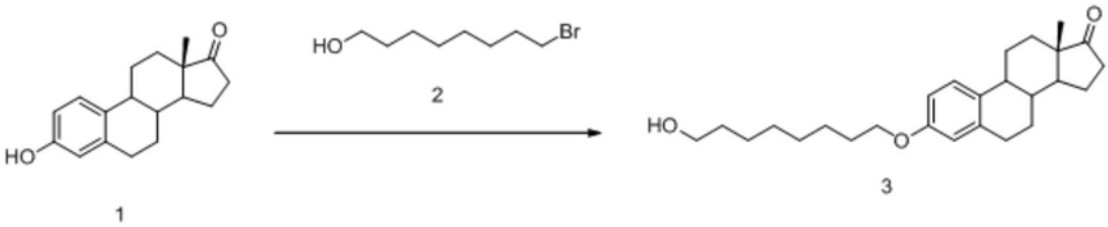
[0081] 雌酮衍生物的化学结构如式(I)所示：

[0082]

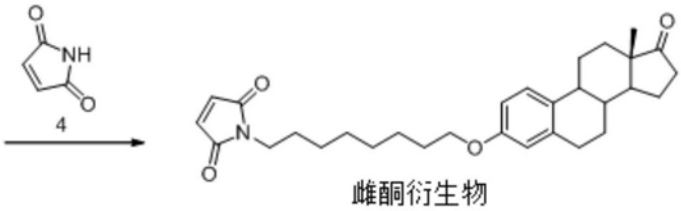


式（I）。

[0083] 上述雌酮衍生物的合成路线及制备步骤如下：



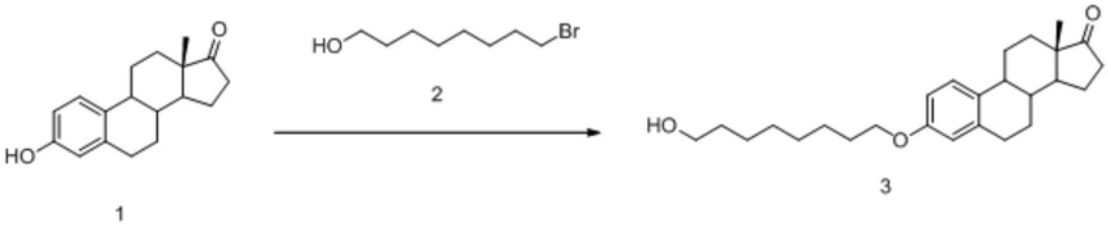
[0084]



[0085] 具体的合成步骤如下：

[0086] (1)化合物3的合成

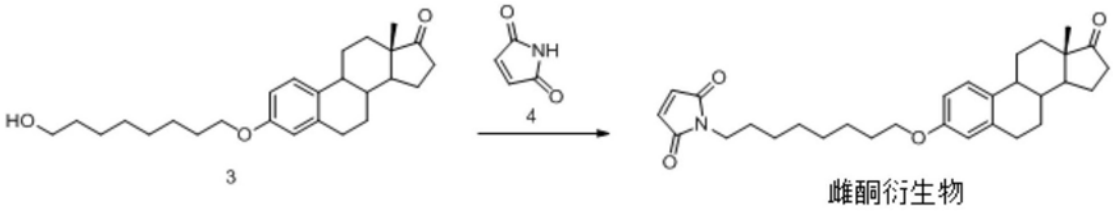
[0087]



[0088] 称取5.0g(0.018mol)的化合物1与10g(0.048mol)的化合物2共同溶解于100mL的丙酮中，然后加入7.9g(0.057mol)的K_2CO_3，制成反应混合溶液，然后将此反应混合溶液加热回流12小时。将反应结束后的溶液进行过滤，再将去除溶剂后得到的剩余物通过硅胶纯化柱进行纯化，得到3.0g白色固体状的化合物3。

[0089] (2)雌酮衍生物的合成

[0090]



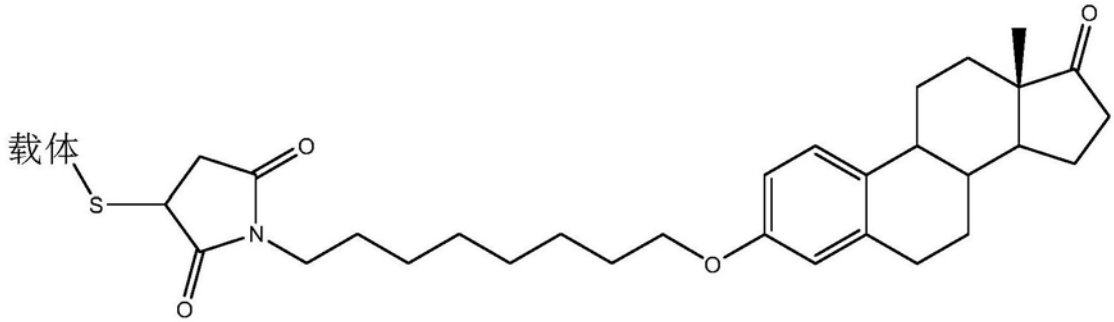
[0091] 称取3.0g(7.54mmol)的化合物3，1.1g(11.3mmol)的化合物4，2.96g(11.3mmol)的三苯基膦(PPh_3)，共同溶解于50mL的四氢呋喃(THF)中，然后在0℃下加入2.28g(11.3mmol)的偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD)，制成反应混合溶液，然后将此反应混合溶液在室温下搅拌12小时。将反应结束后的溶液进行过滤，再将去除溶剂后得到的剩余物通过硅胶纯化柱进行纯化，得到1.0g白色固体状的雌酮衍生物。

[0092] 式(I)所示雌酮衍生物的结构鉴定：利用Bruker Avance III plus 400MHz和VARIANMERCURY plus 300M对上述白色固体化合物进行核磁共振光谱扫描，采用TMS作为内标。如附图4所示，具体结果如下：1H-NMR(400MHz,CDCl3)：δ0.82(s,3H)，1.19-1.38(m,11H)，1.44-1.53(m,8H)，1.63-2.17(m,4H)，2.32-2.46(m,2H)，2.78-2.81(m,2H)，3.38-3.40(m,2H)，3.86-3.89(m,2H)，6.60-6.67(m,2H)，7.00(s,2H)，7.13-7.16(d,1H)；表征为结构式(I)所示的雌酮衍生物。

[0093] 实施例2.雌酮免疫原的合成

[0094] 本实施例中的雌酮免疫原由实施例1式(I)所示的雌酮衍生物与牛血清白蛋白(BSA)连接而成，其结构式如下述式(Ⅱ)所示：

[0095]



式（Ⅱ）。

[0096] 其中载体为牛血清白蛋白。

[0097] 该雌酮免疫原的合成方法具体步骤如下：

[0098] (1)称取2.72g磷酸二氢钾、4.26g磷酸氢二钠、8.5g氯化钠、0.95g氯化镁，共同溶解于1L去离子水中，调节pH至8.2，制成缓冲溶液A；

[0099] (2)称取3mg BSA，-4℃下溶解于3mL上述缓冲溶液A中，制成1mg/ml载体溶液；

[0100] (3)称取3mg上述式(I)所示的雌酮衍生物，-4℃下溶解于300μl上述缓冲溶液A中，制成10mg/ml雌酮衍生物溶液；

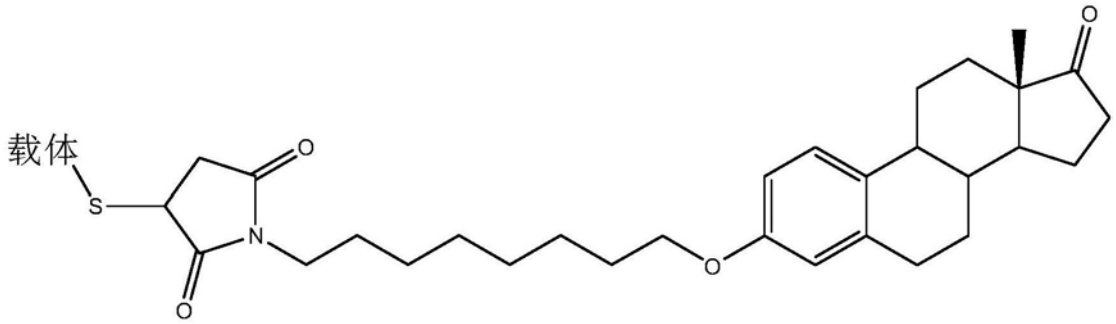
[0101] (4)当上述雌酮衍生物溶液刚变澄清时，将其逐滴加入上述载体溶液中，然后将此混合溶液在-4℃下搅拌3小时；

[0102] (5)将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液A进行透析，透析后所得溶液即为雌酮免疫原溶液，在雌酮免疫原溶液中加入质量分数0.1％的NaN_3，于-20℃下储存。

[0103] 实施例3雌酮免疫原的合成

[0104] 本实施例中的雌酮免疫原由实施例1式(I)所示的雌酮衍生物与牛血清白蛋白(BSA)连接而成，其结构式如下述式(Ⅱ)所示：

[0105]



式（Ⅱ）。

[0106] 其中载体为牛血清白蛋白。

[0107] 该雌酮免疫原的合成方法具体步骤如下：

[0108] (1)称取2.3g磷酸二氢钾、3.8g磷酸氢二钠、8.0g氯化钠、0.7g氯化镁，共同溶解于0.9L去离子水中，调节pH至8.0，制成缓冲溶液A；

[0109] (2)称取6mg BSA，-4℃下溶解于3mL上述缓冲溶液A中，制成2mg/ml载体溶液；

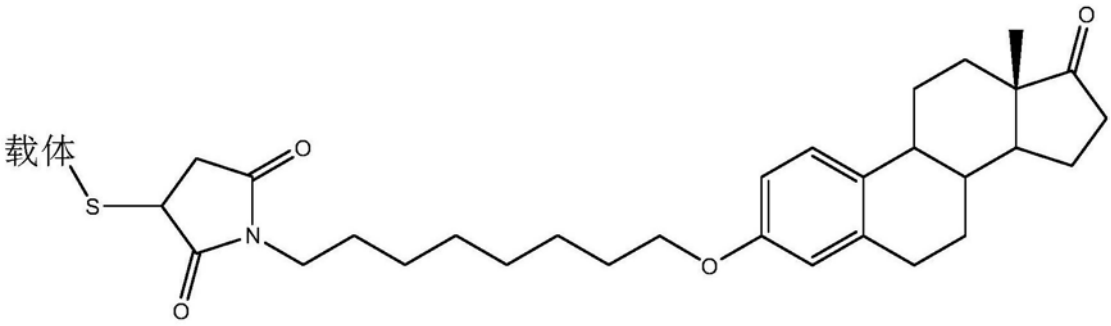
[0110] (3)称取2.4mg上述式(I)所示的雌酮衍生物，-4℃下溶解于300μl上述缓冲溶液A中，制成8mg/ml雌酮衍生物溶液；

[0111] (4)当上述雌酮衍生物溶液刚变澄清时，将其逐滴加入上述载体溶液中，然后将此混合溶液在-5℃下搅拌5小时；

[0112] (5)将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液A进行透析，透析后所得溶液即为雌酮免疫原溶液，在雌酮免疫原溶液中加入质量分数0.05％的NaN_3，于-22℃下储存。

[0113] 实施例4雌酮免疫原的合成

[0114] 本实施例中的雌酮免疫原由实施例1式(I)所示的雌酮衍生物与牛血清白蛋白(BSA)连接而成，其结构式如下述式(Ⅱ)所示：

[0115] 

式（II）。

[0116] 其中载体为牛血清白蛋白。

[0117] 该雌酮免疫原的合成方法具体步骤如下：

[0118] (1)称取3.2g磷酸二氢钾、4.5g磷酸氢二钠、9.0g氯化钠、1.3g氯化镁，共同溶解于1.1L去离子水中，调节pH至8.5，制成缓冲溶液A；

[0119] (2)称取1.5mg BSA，-4℃下溶解于3mL上述缓冲溶液A中，制成0.5mg/ml载体溶液；

[0120] (3)称取3.6mg上述式(I)所示的雌酮衍生物，-4℃下溶解于300μl上述缓冲溶液A中，制成12mg/ml雌酮衍生物溶液；

[0121] (4)当上述雌酮衍生物溶液刚变澄清时，将其逐滴加入上述载体溶液中，然后将此混合溶液在-8℃下搅拌2小时；

[0122] (5)将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液A进行透析，透析后所得溶液即为雌酮免疫原溶液，在雌酮免疫原溶液中加入质量分数0.15％的NaN_3，于-18℃下储存。

[0123] 实施例5抗雌酮特异性抗体的制备

[0124] 将实施例2制备得到的雌酮免疫原采用常规方法接种实验动物兔，加强免疫后取抗血清，具体步骤如下：

[0125] a.用PBS缓冲液将上述式(II)所示的雌酮免疫原稀释至2.0mg/ml，得到抗原溶液，然后用2.0ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物兔进行注射；

[0126] b.3周后，再用2.0ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合，对上述实验动物兔注射一次，之后每隔3周注射一次，共计注射5次；

[0127] c.对免疫后的实验动物兔取血，分离纯化得到效价为1:80000的抗雌酮特异性抗体。

[0128] 实施例6抗雌酮特异性抗体的制备

[0129] 将实施例3制备得到的雌酮免疫原采用常规方法接种实验动物兔，加强免疫后取抗血清，具体步骤如下：

[0130] a.用PBS缓冲液将上述式(II)所示的雌酮免疫原稀释至1.0mg/ml，得到抗原溶液，然后用1.0ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物兔进行注射；

[0131] b.2周后，再用1.0ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合，对上述实验动物兔注射一次，之后每2周注射一次，共计注射3次；

[0132] c.对免疫后的实验动物兔取血，分离纯化得到效价为1:50000的抗雌酮特异性抗体。

[0133] 实施例7抗雌酮特异性抗体的制备

[0134] 将实施例2制备得到的雌酮免疫原采用常规方法接种实验动物兔，加强免疫后取

抗血清，具体步骤如下：

[0135] a.用PBS缓冲液将上述式(Ⅱ)所示的雌酮免疫原稀释至3.0mg/ml，得到抗原溶液，然后用3.0ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物兔进行注射；

[0136] b.5周后，再用3.0ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合，对上述实验动物兔注射一次，之后每5周注射一次，共计注射8次；

[0137] c.对免疫后的实验动物兔取血，分离纯化得到效价为1:60000的抗雌酮特异性抗体。

[0138] 实施例8雌酮ELISA检验

[0139] 1.雌酮ELISA检测标准曲线的建立

[0140] (1)标准品的制备

[0141] 将雌酮粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液，制备成1mg/ml的储存液。用ELISA缓冲液将储存液依次稀释为400.00pg/mL、200.00pg/mL、100.00pg/mL、50.00pg/mL、25.00pg/mL和0.00pg/mL的标准溶液。其中，ELISA缓冲液含有50.0mM Tris，145mM NaCl和0.25％的BSA。

[0142] (2)利用雌酮的ELISA检验方法制备标准曲线

[0143] 用PBS将实施例5中所制备的抗雌酮抗体稀释成1:7500的终浓度溶液，100μL/孔包被在96孔酶联板上，4℃放置12-24h；用PBS将上述包被有抗雌酮抗体的96孔酶联板洗涤3次后，加入200μL/孔的0.5％的BSA溶液，4℃封闭放置8-16h。然后用PBS洗涤3次，加入20μL/孔的标准品。再加入100μL/孔工作浓度的辣根过氧化物酶(HRP)-雌酮偶联物；室温下孵育30min后PBS洗板5次；然后每孔加入100μL TMB底物，室温孵育30min。再每孔加入100μL终止液(2M硫酸)。测定450nm的吸光值。根据各标准品所对应的450nm的吸光值定标，制作标准曲线，结果如附图1所示。

[0144] 2.待测样品中雌酮含量的检测

[0145] (1)制作待测样品

[0146] 制备方法：将雌酮粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液制成1μg/mL的储存液，并将此储存液稀释于空白血浆中，至终浓度分别为0.00，20.00，120.00，360.00pg/mL，形成空白、低、中、高浓度的血浆样本。该空白血浆为不含雌酮的健康人血浆。

[0147] (2)测试方法

[0148] 利用上述雌酮的ELISA检验方法，将上述空白、低、中、高浓度的血浆样本代替标准品，测试上述空白、低、中、高浓度的血浆样本在450nm的吸光值。

[0149] (3)测试结果

[0150] 对照附图2中所示的雌酮ELISA检验的标准曲线，计算每个样本中雌酮含量，并对每个样本进行3个复孔测定，根据上述样本中雌酮的实际含量计算回收率，结果如表1所示。

[0151] 表1雌酮的ELISA检测回收实验

[0152]

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度(pg/mL)	0.00	20.00	120.00	360.00
测试1	0.00	21.76	125.51	356.42
测试2	0.00	20.50	118.39	353.73

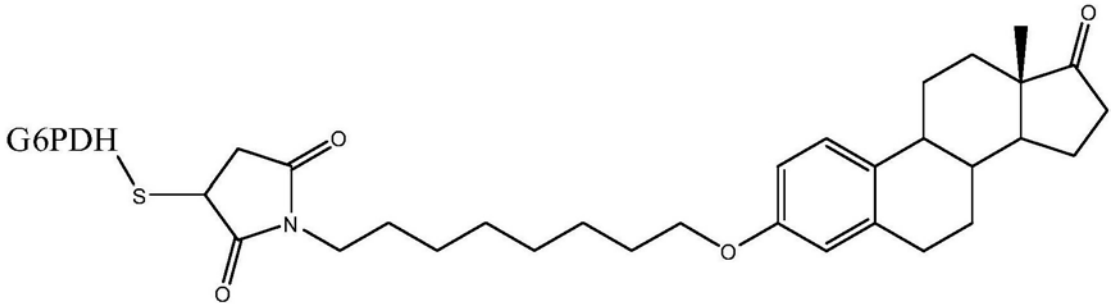
测试3	0.00	21.03	120.66	363.05
平均值(pg/mL)	0.00	21.09	121.52	357.73
回收率(%)	-	105.48	101.27	99.37

[0153] 由表1中结果可知:采用本发明雌酮ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的雌酮回收率都较高,均>95%,说明本发明所述的抗雌酮特异性抗体可以用于样本中雌酮的检测,并且结果准确度高。

[0154] 实施例9雌酮酶标偶联物的制备

[0155] 本实施例中的雌酮酶标偶联物由式(I)所示的雌酮衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)连接而成,其结构式如下述式(Ⅲ)所示:

[0156]



式(Ⅲ);

[0157] 该雌酮酶标偶联物的合成方法具体步骤如下:

[0158] (1)称取1.09g磷酸二氢钾、1.70g磷酸氢二钠、8.5g氯化钠、0.95g氯化镁,共同溶解于1L去离子水中,调节pH至8.2,制成缓冲溶液B;

[0159] (2)称取3mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,-4℃下溶解于3mL上述缓冲溶液B中,制成1mg/ml葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

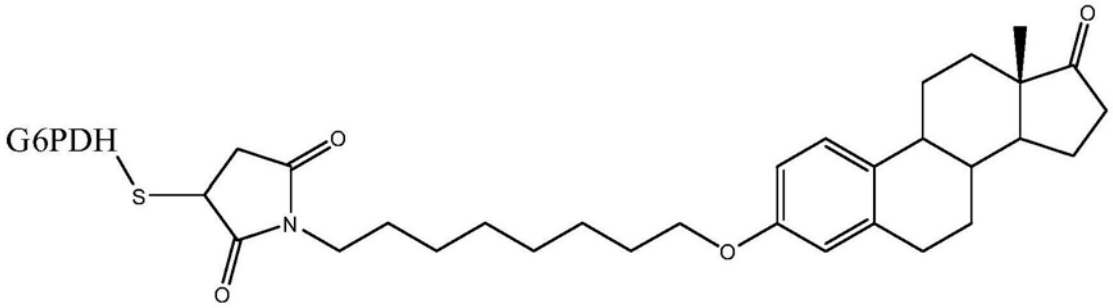
[0160] (3)称取3mg上述式(I)所示的雌酮衍生物,-4℃下溶解于300μl上述缓冲溶液B中,制成10mg/ml雌酮衍生物溶液;

[0161] (4)当上述雌酮衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,然后将此混合溶液在-4℃下搅拌5小时;

[0162] (5)将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液B进行透析,透析后所得溶液即为雌酮酶标偶联物溶液,在雌酮酶标偶联物溶液中加入质量分数0.5%的BSA和质量分数0.1%的NaN_3,于2-8℃下储存。

[0163] 实施例10雌酮酶标偶联物的制备

[0164] 本实施例中的雌酮酶标偶联物由式(I)所示的雌酮衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)连接而成,其结构式如下述式(Ⅲ)所示:

[0165] 

式（III）；

[0166] 该雌酮酶标偶联物的合成方法具体步骤如下：

[0167] (1)称取0.85g磷酸二氢钾、1.21g磷酸氢二钠、8.0g氯化钠、0.7g氯化镁，共同溶解于0.9L去离子水中，调节pH至8.0，制成缓冲溶液B；

[0168] (2)称取1.5mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，-4℃下溶解于3mL上述缓冲溶液B中，制成0.5mg/ml葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液；

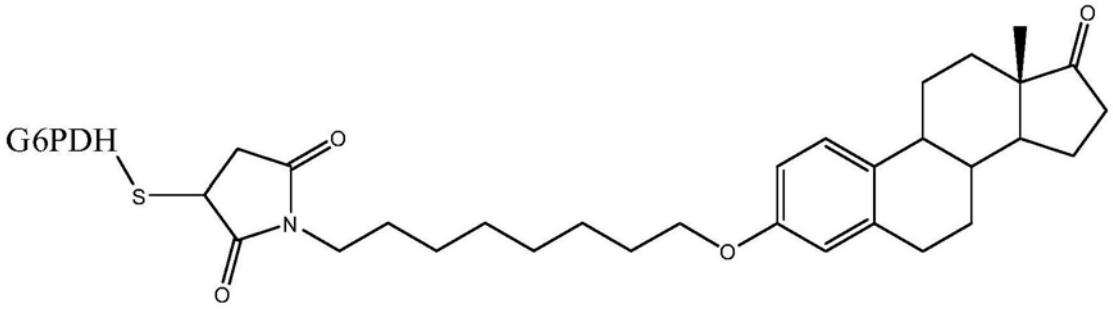
[0169] (3)称取2.4mg上述式(I)所示的雌酮衍生物，-4℃下溶解于300μl上述缓冲溶液B中，制成8mg/ml雌酮衍生物溶液；

[0170] (4)当上述雌酮衍生物溶液刚变澄清时，将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中，然后将此混合溶液在-2℃下搅拌2小时；

[0171] (5)将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液B进行透析，透析后所得溶液即为雌酮酶标偶联物溶液，在雌酮酶标偶联物溶液中加入质量分数0.3％的BSA和质量分数0.05％的NaN_3，于2-8℃下储存。

[0172] 实施例11雌酮酶标偶联物的制备

[0173] 本实施例中的雌酮酶标偶联物由式(I)所示的雌酮衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)连接而成，其结构式如下述式(Ⅲ)所示：

[0174] 

式（III）；

[0175] 该雌酮酶标偶联物的合成方法具体步骤如下：

[0176] (1)称取1.30g磷酸二氢钾、2.0g磷酸氢二钠、9.0g氯化钠、1.3g氯化镁，共同溶解于1.1L去离子水中，调节pH至8.5，制成缓冲溶液B；

[0177] (2)称取6mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，-4℃下溶解于3mL上述缓冲溶液B中，制成2mg/ml葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液；

[0178] (3)称取3.6mg上述式(I)所示的雌酮衍生物，-4℃下溶解于300μl上述缓冲溶液B中，制成12mg/ml雌酮衍生物溶液；

[0179] (4)当上述雌酮衍生物溶液刚变澄清时，将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

溶液中，然后将此混合溶液在-8℃下搅拌3小时；

[0180] (5)将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液B进行透析，透析后所得溶液即为雌酮酶标偶联物溶液，在雌酮酶标偶联物溶液中加入质量分数1.0％的BSA和质量分数0.15％的NaN_3，于2-8℃下储存。

[0181] 实施例12雌酮均相酶免疫检测试剂的制备

[0182] (1)试剂A的制备：将5.0g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、2.5g的葡萄糖-6-磷酸用1L、55mM、pH＝8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物；再将实施例5抗雌酮特异性抗体加入上述均相酶底物中，得到试剂A，所述抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:625；

[0183] (2)试剂B的制备：将上述的实施例9雌酮酶标偶联物用120mM、pH＝8.2的Tris缓冲液溶解，得到试剂B，所述雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:1250。

[0184] 实施例13雌酮均相酶免疫检测试剂的制备

[0185] (1)试剂A的制备：将5.0g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、2.5g的葡萄糖-6-磷酸用1L、55mM、pH＝8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物；再将实施例5抗雌酮特异性抗体加入上述均相酶底物中，得到试剂A，所述抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100；

[0186] (2)试剂B的制备：将实施例9的雌酮酶标偶联物用120mM、pH＝8.2的Tris缓冲液溶解，得到试剂B，所述雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100。

[0187] 实施例14雌酮均相酶免疫检测试剂的制备

[0188] (1)试剂A的制备：将5.0g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、2.5g的葡萄糖-6-磷酸用1L、55mM、pH＝8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物；再将实施例6抗雌酮特异性抗体加入上述均相酶底物中，得到试剂A，所述抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:10000；

[0189] (2)试剂B的制备：将实施例10雌酮酶标偶联物用120mM、pH＝8.2的Tris缓冲液溶解，得到试剂B，所述雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:10000。

[0190] 实施例15雌酮均相酶免疫检测试剂的制备

[0191] (1)试剂A的制备：将5.0g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、2.5g的葡萄糖-6-磷酸用1L、55mM、pH＝8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物；再将实施例7抗雌酮特异性抗体加入上述均相酶底物中，得到试剂A，所述抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:300；

[0192] (2)试剂B的制备：将实施例11雌酮酶标偶联物用120mM、pH＝8.2的Tris缓冲液溶解，得到试剂B，所述雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:1000。

[0193] 实施例16雌酮均相酶免疫检测试剂的制备

[0194] (1)试剂A的制备：将5.0g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、2.5g的葡萄糖-6-磷酸用1L、55mM、pH＝8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物；再将实施例5抗雌酮特异性抗体加入上述均相酶底物中，得到试剂A，所述抗雌酮特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:700；

[0195] (2)试剂B的制备：将实施例9雌酮酶标偶联物用120mM、pH＝8.2的Tris缓冲液溶解，得到试剂B，所述雌酮酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:3500。

[0196] 实施例17雌酮均相酶免疫检验及结果

[0197] 1.获得标准曲线：

[0198] (1)设置迈瑞BS480全自动生化分析仪反应参数(见表2)。

[0199] (2)操作步骤为: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OD340吸光值,算出不同标准品浓度时的反应速率,实际操作过程中需不断调整试剂A和试剂B的体积比例,同时调整测光点,最后得出较理想的反应标准曲线图,如图3所示。

[0200] 表2迈瑞BS480全自动生化分析仪反应参数

[0201]

迈瑞 BS480 参数	
项目名称	雌酮
试剂 1	200 μl
试剂 2	50 μl
样本量	12 μl
分析方法	终点法
主波长	340 nm
次波长	412 nm
反应时间	10 分钟
孵育时间	5 分钟
反应方向	上升
结果	pg/ml
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00，75.00，150.00，300.00，600.00，1200.00 pg/ml

[0202] 2.样本检测:通过本发明的均相酶免疫检测试剂得到的标准曲线,重复测定低、中、高浓度质控样本10次,上述质控样本为:将雌酮标准品溶解于人血浆中,稀释至浓度分别为15.00,250.00,1000.00pg/ml。检测数据及数据分析见表3。

[0203] 表3样品测定及精密度和回收率评估

[0204]

血液样品	低	中	高
样品浓度(pg/ml)	15.00	250.00	1000.00
1	15.45	253.70	1006.07
2	15.71	250.97	1009.25
3	14.32	255.03	1007.61

4	15.90	247.65	995.49
5	14.68	249.93	1005.80
6	14.53	252.14	1010.97
7	14.64	247.82	996.26
8	15.29	253.90	999.00
9	15.77	251.06	1008.01
10	14.80	254.11	1001.52
平均值(pg/ml)	15.11	251.63	1004.00
标准差(SD)	0.580	2.612	5.540
精密度(CV%)	3.84	1.04	0.55
回收率(%)	100.73	100.65	100.40

[0205] 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5%。

[0206] 实施例18药物与激素干扰试验

[0207] 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，调整浓度至1.00ng/ml，采用实施例7的均相酶免疫方法进行测定：

[0208] 1.将待测干扰物与实施例6制备的试剂A接触反应，再加入试剂B；

[0209] 2.检测上述混合溶液的OD340吸光值，根据实施例7的标准曲线得到相应物质的浓度。

[0210] 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。

[0211] 表4常见干扰物测定结果

[0212]

ID#	化合物名称	等价于雌酮的浓度 (pg/ml)	ID#	化合物名称	等价于雌酮的浓度 (pg/ml)
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	甲胺呋硫	0.00	46	甲基二乙醇胺	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

[0213]

ID#	化合物名称	等价于雌酮的浓度 (pg/ml)	ID#	化合物名称	等价于雌酮的浓度 (pg/ml)
55	乙酰吗啡	0.00	56	羟考酮	0.00
57	苄非他明	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
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	17α-羟基黄体酮	0.00
85	雄烯二酮	0.00	86	17-酮类固醇	0.00
87	17-羟皮质类固醇	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

[0214] 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雌酮的浓度均小于1.00pg/ml。由此可见,本发明的抗体是抗雌酮的特异性抗体,与常见干扰物无交叉反应。

[0215] 实施例19相关性分析

[0216] 对100例临床标本分别使用高效液相色谱法和本发明的均相酶免疫试剂进行相关性分析,测定的数据参见表5。

[0217] 表5临床样本测定值

[0218]

样本号	均相酶免疫法测定值（pg/ml）	高效液相色谱法测定值（pg/ml）	样本号	均相酶免疫法测定值（pg/ml）	高效液相色谱法测定值（pg/ml）
1	31.22	31.09	51	97.93	97.14
2	113.78	113.35	52	71.39	71.87
3	53.15	53.59	53	82.24	83.39
4	73.97	74.17	54	29.95	30.10
5	68.08	67.91	55	52.18	51.97
6	83.12	83.15	56	194.21	196.32
7	63.57	63.09	57	82.63	82.91
8	28.51	28.68	58	25.38	25.09
9	166.09	167.00	59	92.70	94.64
10	43.41	43.06	60	58.37	58.03
11	201.00	203.89	61	49.28	49.31
12	31.44	31.60	62	95.19	96.68
13	99.10	100.02	63	38.00	38.39
14	672.53	668.95	64	153.51	155.17
15	33.32	33.58	65	32.38	32.76
16	220.69	221.73	66	82.22	82.59
17	54.14	54.59	67	222.97	225.01
18	77.90	78.00	68	573.80	579.66
19	36.07	36.25	69	89.43	90.13
20	27.29	27.50	70	30.18	31.63
21	100.51	103.92	71	93.22	93.41
22	36.63	36.58	72	58.26	57.36
23	78.13	79.63	73	60.19	60.08
24	60.50	60.13	74	84.53	85.60
25	45.06	45.30	75	61.30	61.66
26	86.64	85.18	76	902.56	908.36
27	44.26	44.69	77	81.28	83.37
28	108.55	109.00	78	56.40	55.97

[0219]

29	460.34	463.07	79	72.18	72.89
30	66.29	66.21	80	29.99	30.58
31	85.18	85.73	81	33.26	32.99
32	92.56	91.50	82	100.30	99.75
33	422.93	420.99	83	65.10	65.06
34	28.72	28.51	84	99.03	99.81
35	621.01	625.49	85	55.24	55.00
36	56.30	56.11	86	72.49	72.28
37	31.77	31.90	87	134.55	135.00
38	40.12	40.21	88	330.31	331.31
39	266.85	268.60	89	155.08	155.63
40	500.84	497.75	90	35.73	35.74
41	79.49	80.48	91	24.54	24.90
42	99.99	100.17	92	166.62	166.41
43	38.02	37.85	93	58.30	58.50
44	41.35	41.60	94	71.50	71.53
45	88.94	87.09	95	732.75	737.66
46	14.76	14.98	96	68.72	68.14
47	36.60	36.25	97	30.00	30.01
48	320.91	323.06	98	48.56	48.67
49	624.57	625.58	99	72.25	73.95
50	50.31	50.54	100	66.22	66.04

[0220] 对上述数据作图，参见附图3，得到的线性方程为：$y=1.0038x-0.0017$，相关系数 $R^2=0.9999$，表明本发明的检测试剂测定雌酮临床标本的准确度高。

[0221] 上述详细说明是针对本发明其中之一可行实施例的具体说明，该实施例并非用以限制本发明的专利范围，凡未脱离本发明所为的等效实施或变更，均应包含于本发明技术方案的范围内。

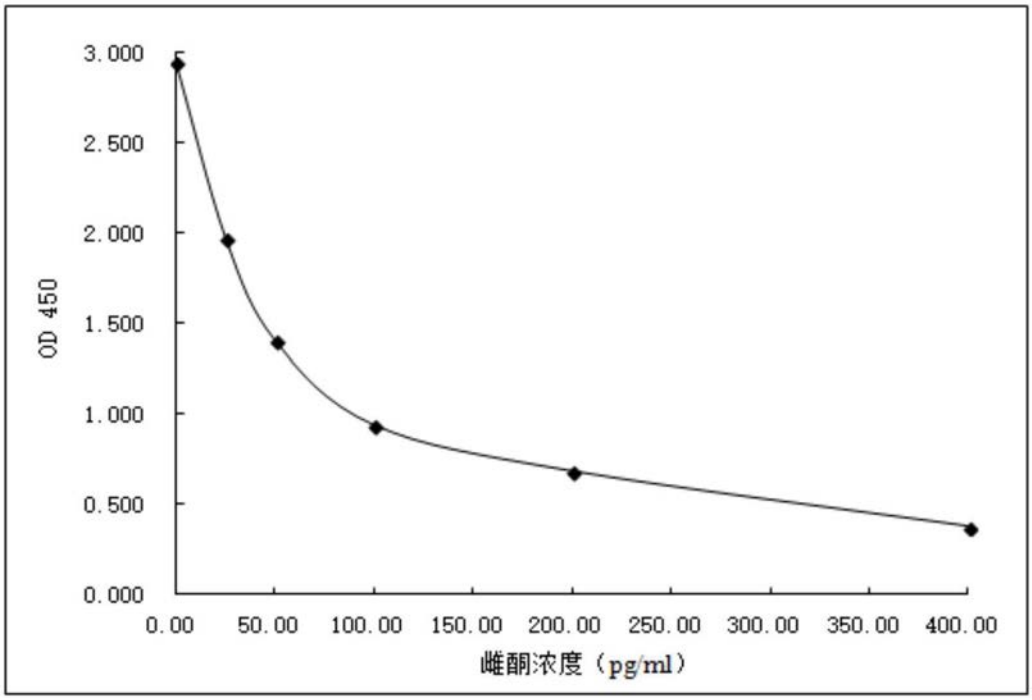

3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
OD 450
0.00
50.00
100.00
150.00
200.00
250.00
300.00
350.00
400.00
雌酮浓度（pg/ml）

图1

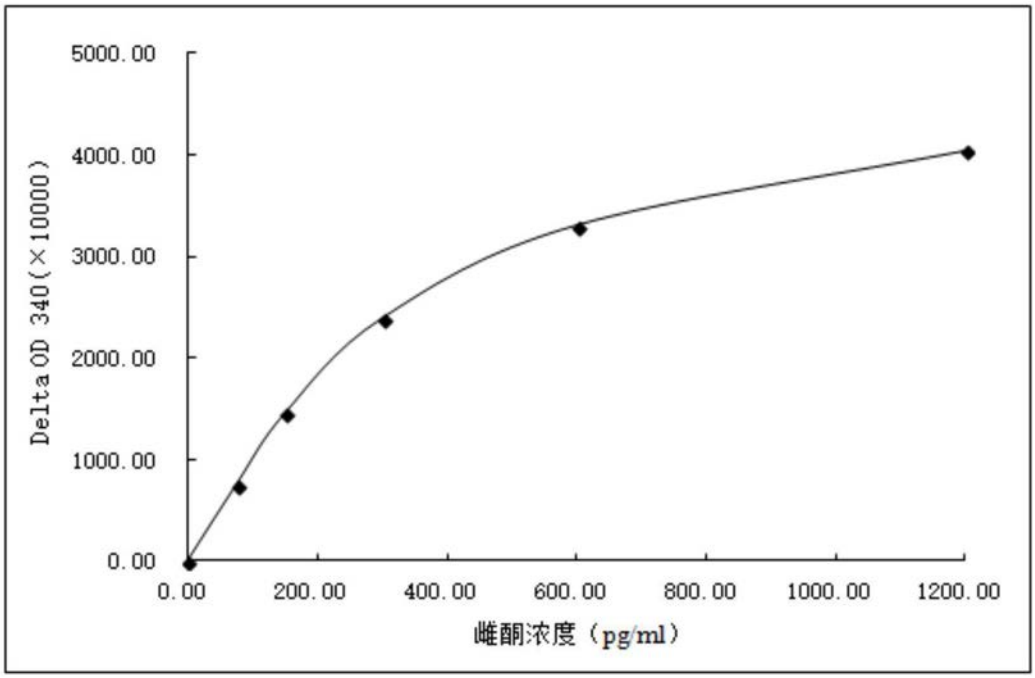

5000.00
4000.00
3000.00
2000.00
1000.00
0.00
Delta OD 340(×10000)
0.00
200.00
400.00
600.00
800.00
1000.00
1200.00
雌酮浓度（pg/ml）

图2

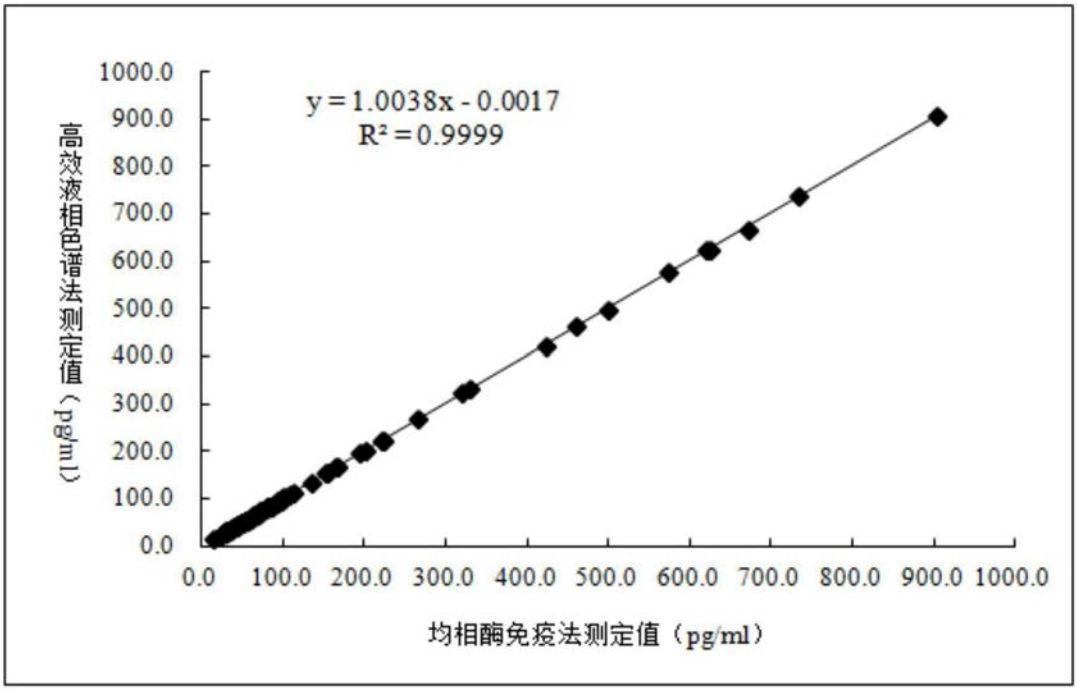

y = 1.0038x - 0.0017
R² = 0.9999
高效液相色谱法测定值（pg/ml）
均相酶免疫法测定值（pg/ml）
0.0
100.0
200.0
300.0
400.0
500.0
600.0
700.0
800.0
900.0
1000.0

图3

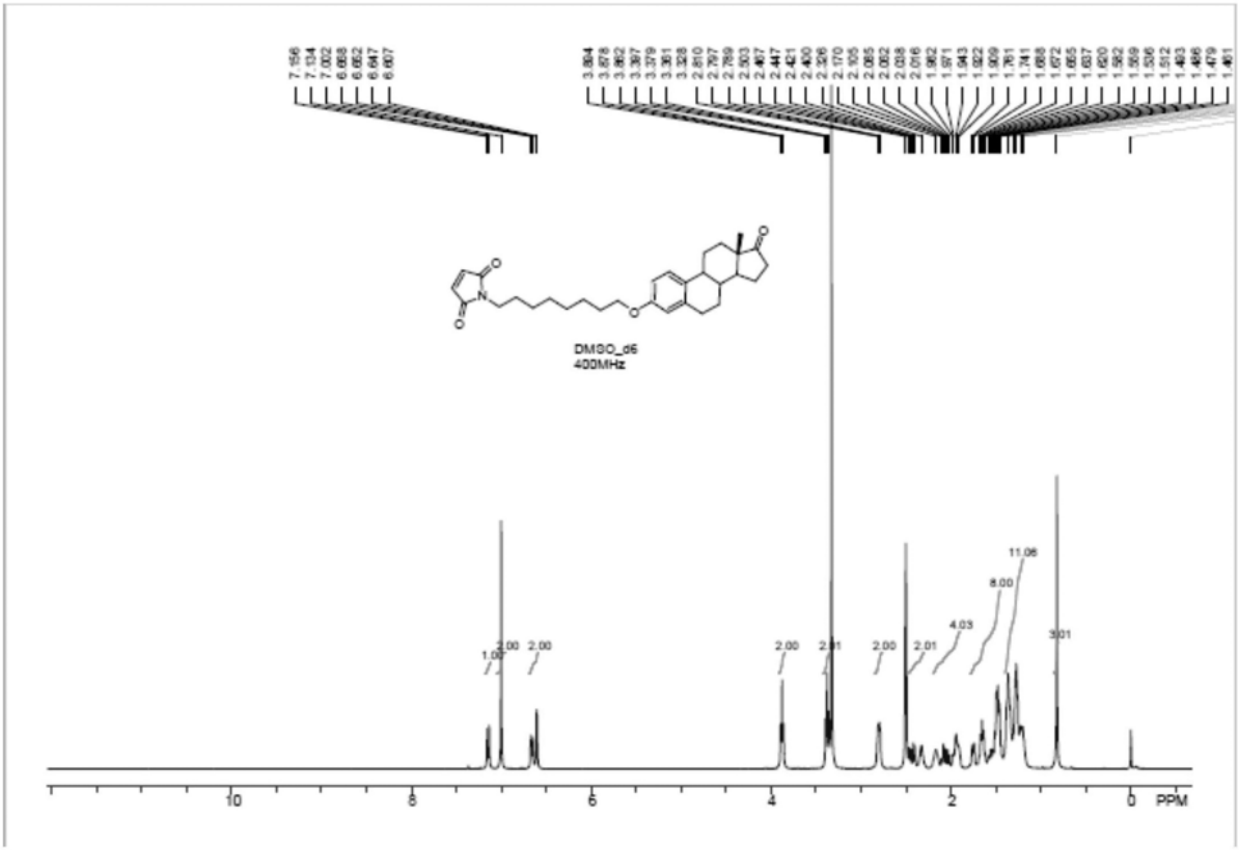
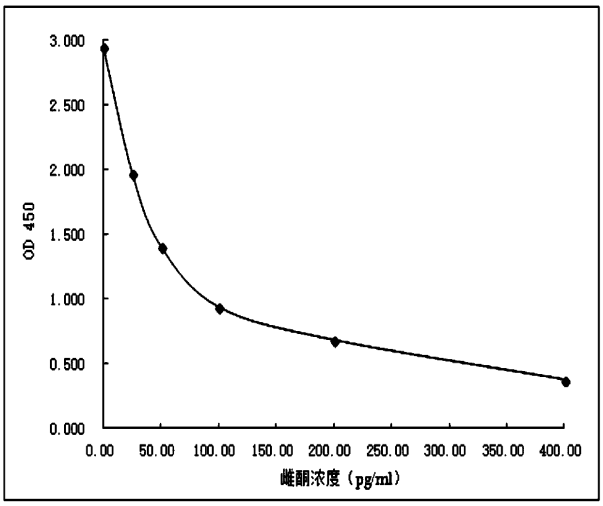

DMSO_d6
400MHz
PPM

图4

专利名称(译)	雌酮衍生物、免疫原、抗体、酶标偶联物、检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN109180768A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201811036051.4	申请日	2018-09-06
[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 谢江涛 陈学东 郭进京		
发明人	虞留明 谢江涛 陈学东 郭进京		
IPC分类号	C07J43/00 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/435 C07K16/26 C07K16/06 G01N33/535		
CPC分类号	C07J43/003 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/065 C07K16/26 C07K19/00 G01N33/535		
代理人(译)	张黎		
其他公开文献	CN109180768B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测生物样本中雌酮含量的雌酮衍生物及其制备方法，所述雌酮衍生物的结构式如式(I)所示。使用该雌酮衍生物相继制备得到高免疫原性的雌酮免疫原与相应抗体，该雌酮免疫原特异性强、免疫原性高，抗雌酮特异性抗体特异性强、效价高，能很好地识别并结合雌酮，并且与常见的92种干扰物无任何交叉反应。本发明还得到雌酮酶标偶联物，并利用抗雌酮特异性抗体和雌酮酶标偶联物制备得到雌酮均相酶免疫检测试剂，该试剂可以方便、快速、准确地测定生物样品中的雌酮含量，同时在全自动生化分析仪上测定多个样品，实现雌酮的高通量、快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高。