

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/531 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03110098.8

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100360938C

[22] 申请日 2003.4.23 [21] 申请号 03110098.8

[73] 专利权人 北京科美东雅生物技术有限公司  
地址 100094 北京市海淀区永丰产业基地  
丰贤中路 7 号北科技园

[72] 发明人 李振甲

[56] 参考文献

EP0114615A2 1984.8.1

US5939272A 1999.8.17

US5028535A 1991.7.2

EP0114614A2 1984.8.1

审查员 牛艳玲

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 陶贻丰 郑霞

权利要求书 2 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

甾体类激素 - 碱性磷酸酶结合物制备方法

[57] 摘要

化学发光免疫分析技术是当代最流行的一类超灵敏度检测手段, 广泛应用于生物医学基础研究和临床疾病的诊疗。对于甾体类激素的检测其标记物是碱性磷酸酶和甾体类激素的结合物。甾体类激素是一类脂溶性较强的物质, 而碱性磷酸酶在一些低浓度的有机溶剂中即可变性失活, 故制备这种标记物均为国外某些高科技生物制剂机构所垄断。本工艺简便易行、成本低廉, 为开发此类试剂盒替代国外商品创造了条件。

1、一种甾体类激素 - 碱性磷酸酶结合物的制备方法，其特征在于脂溶性的甾体类激素经过聚赖氨酸联接降低其脂溶性，在微量的有机溶剂中完全溶解，形成甾体类激素 - 聚赖氨酸，当甾体类激素 - 聚赖氨酸和碱性磷酸酶联结时不降低其活性，采用戊二醛法联接，形成甾体类激素 - 碱性磷酸酶结合物。

2、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于所述的甾体类激素经过聚赖氨酸联接形成甾体类激素 - 聚赖氨酸是采用如下方法：

(1) 取甾体类激素羧甲基脲 300ug 溶于 100  $\mu$ l 50% 吡啶中，另取 EDC 2mg 溶于 100  $\mu$ l 双蒸水中，两液混合，室温反应 1.5 小时，为 A 液，取聚赖氨酸 600ug 溶于 100  $\mu$ l 双蒸水中，为 B 液，其中所述甾体类激素羧甲基脲选自睾酮羧甲基脲、雌二醇羧甲基脲、雌三醇羧甲基脲、孕酮羧甲基脲；(2) A 液置磁力搅拌器上，将 B 液滴加至 A 液中，反应 4 - 6h，4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜；

(3) 将反应液冷冻干燥，加 40% 的乙醇 100  $\mu$ l 溶解，充分振荡后离心去沉淀，上清液用划线法点在硅胶板 GF254 10  $\times$  20cm 板上，展开液为氯仿 - 甲醇 - 水系统，在 254nm 反射紫外光检测仪显示两条区带，样品参照位经茛三酮呈色显出两条斑点，将相应的经鉴定为具有茛三酮显色又在 254nm 紫外光下显出区带处刮下，洗脱并干燥后即产物。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的制备方法，其特征在于所述的甾体类激素 - 聚赖氨酸和碱性磷酸酶联接是采用如下方法：

(1) 取甾体类激素 - 聚赖氨酸 150ug 溶于 40% 乙醇 100  $\mu$ l 中，为 A 液，另取经透析的 SIGMA 公司生产，活性为 3870U/mg 的碱性磷酸酶 1mg，补加生理盐水至 400  $\mu$ l，为 B 液；

(2) 将 A 液置于磁力搅拌器上，取 B 液缓缓滴加至 A 液中，此时应完全透明，即刻加入 1% 戊二醛 30  $\mu$ l，放室温暗处反应 3h；

(3) 将反应液装入 8mm 直径透析袋，4 $^{\circ}$ C 搅拌对 PBS 透析 48h，

再移至 50mmol/l pH7.6 Tris-HCl 缓冲液透析 24h, 离心 10000r / min 20 分钟, 上清液加等量 AR 级丙三醇及适量优级 BSA, 分装 50  $\mu$ l/支, 4  $^{\circ}$ C 保存。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的制备方法, 其特征在于所述的聚赖氨酸由如下方法制备:

(1)取赖氨酸 3mg 溶于 500  $\mu$ l 生理盐水 pH6.5 中, 另取 EDC 5mg 滴加至赖氨酸溶液中, 磁力搅拌下室温反应 5-6h, 移至 4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜;

(2)将反应液冷冻干燥, 加 150  $\mu$ l 双蒸水溶解, 离心 5000r / min 20 分钟, 取上清液在 10  $\times$  20 cm 微晶纤维素薄板上, 自制厚度 1~1.2mm, 在板的左 1/4 处点 10  $\mu$ l 反应液, 采用上行层析在层析筒中展开, 展开剂为正丁醇-冰乙酸-水系统, 待展层液展至上端 2cm 处, 取出放室温下干燥;

(3)用相同大小的玻板将点样处覆盖, 向左 1/4 处喷 1mg/ml 茚三酮液, 放 50 $^{\circ}$ C 干燥箱 30 分钟, 可见 3-4 个相同色的斑点, 根据预先测得赖氨酸的  $R_f$  值, 刮去赖氨酸单体, 将其余斑点刮下至离心管中, 用适量双蒸水洗 3 次, 洗脱液合并, 冷冻干燥, 产物为二聚体和三聚体, 产率 40%。

## 甾体类激素 - 碱性磷酸酶结合物制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种甾体类激素 - 碱性磷酸酶结合物的制备方法，适合于以碱性磷酸酶标记的甾体类激素小分子物质在化学发光免疫分析技术中的应用。

### 背景技术

甾体类激素是一组具有环戊烷多氢菲基本结构的化合物，脂溶性很强，在水中溶解性极微，而碱性磷酸酶是一种分子量 100kDa 的蛋白质，在有机溶剂中易失活。甾体类激素 - 碱性磷酸酶结合物是研发化学发光免疫分析试剂盒中的重要组分。目前制备这种标记物均为国外某些高科技生物制剂机构所垄断，关于其制造工艺国内外尚未有报道。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种甾体类激素 - 碱性磷酸酶结合物制备方法，该方法简便易行。

本发明提供的甾体类激素 - 碱性磷酸酶结合物的制备方法，是将脂溶性的甾体类激素经过聚赖氨酸联接降低其脂溶性，在微量的有机溶剂中完全溶解，形成甾体类激素 - 聚赖氨酸，当甾体类激素 - 聚赖氨酸和碱性磷酸酶联结时不降低其活性，采用戊二醛法联结，形成甾体类激素 - 碱性磷酸酶结合物。

所述的甾体类激素经过与聚赖氨酸联接形成甾体类激素 - 聚赖氨酸

是采用如下方法:

(1) 取甾体类激素羧甲基肟(睾酮、雌二醇、雌三醇或孕酮) 300ug 溶于 100  $\mu$ l 50%吡啶中,另取 EDC 2mg 溶于 100  $\mu$ l 双蒸水中,两液混合,室温反应 1.5 小时,为 A 液,取聚赖氨酸 600ug 溶于 100  $\mu$ l 双蒸水中,为 B 液。

(2) A 液置磁力搅拌器上,将 B 液滴加至 A 液中,反应 4-6h, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。

(3) 将反应液冷冻干燥,加 40%的乙醇 100  $\mu$ l 溶解,充分振荡后离心去沉淀,上清液用划线法点在硅胶板 GF254 10 $\times$ 20cm 上,展开液为氯仿-甲醇-水系统,在 254nm 反射紫外光检测仪显示两条区带,样品参照位经甾三酮呈色显出两条斑点,将相应的经鉴定为具有甾三酮显色又在 254nm 紫外光下显出区带处刮下,洗脱并干燥后即产物。

所述的甾体类激素-聚赖氨酸和碱性磷酸酶联结是采用如下方法:

(1) 取甾体类激素-聚赖氨酸 150ug 溶于 40%乙醇 100  $\mu$ l 中,为 A 液,另取经透析的碱性磷酸酶 1mg (SIGMA 产品,活性 3870U/mg),补加生理盐水至 400  $\mu$ l,为 B 液。

(2) 将 A 液置于磁力搅拌器上,取 B 液缓缓滴加至 A 液中,此时应完全透明,即刻加入 1%戊二醛 30  $\mu$ l,放室温暗处反应 3h。

(3) 将反应液装入 8mm 直径透析袋,4 $^{\circ}$ C 搅拌对 PBS 透析 48h,再移至 50mmol/l pH7.6 Tris-HCL 缓冲液透析 24h。离心 10000r/min 20 分钟,上清液加等量 AR 级丙三醇及适量优级 BSA,分装 50  $\mu$ l/支,4 $^{\circ}$ C 保存。

前面所述的聚赖氨酸采用如下方法制备:

(1) 取赖氨酸 3mg 溶于 500  $\mu$ l 生理盐水(pH6.5)中,另取 EDC 5mg (300  $\mu$ l)滴加至赖氨酸溶液中,磁力搅拌下室温反应 5-6h,移至 4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜。

(2) 将反应液冷冻干燥,加 150  $\mu$ l 双蒸水溶解,离心 5000r/min 20 分钟。取上清液在 10 $\times$ 20 cm 微晶纤维素薄板上(自制厚度 1~1.2mm),在板的左 1/4 处点 10  $\mu$ l 反应液,采用上行层析在层析筒中展开,展开剂

为正丁醇-冰乙酸-水系统。待展层液展至上端 2cm 处，取出放室温下干燥。

(3) 用相同大小的玻板将点样处覆盖，向左 1/4 处喷 1mg/ml 茚三酮液，放 50℃ 干燥箱 30 分钟，可见 3-4 个相同色的斑点，根据预先测得赖氨酸的  $R_f$  值，刮去赖氨酸单体，将其余斑点刮下至离心管中，用适量双蒸水洗 3 次，洗脱液合并，冷冻干燥，产物为二聚体和三聚体，产率 40%。

采用上述本发明方法制备的甾体类激素-碱性磷酸酶结合物简便易行。

## 具体实施方式

### 实施例 1 聚赖氨酸的制备

(1) 取赖氨酸 3mg 溶于 500  $\mu$ l 生理盐水(pH6.5)中，另取 EDC 5mg (300  $\mu$ l) 滴加至赖氨酸溶液中，磁力搅拌下室温反应 5-6h，移至 4℃ 冰箱内过夜。

(2) 将反应液冷冻干燥，加 150  $\mu$ l 双蒸水溶解，离心 5000r/min 20 分钟。取上清液在 10×20 cm 微晶纤维素薄板上(自制厚度 1~1.2mm)，在板的左 1/4 处点 10  $\mu$ l 反应液，采用上行层析在层析筒中展开，展开剂为正丁醇-冰乙酸-水系统。待展层液展至上端 2cm 处，取出放室温下干燥。

(3) 用相同大小的玻板将点样处覆盖，向左 1/4 处喷 1mg/ml 茚三酮液，放 50℃ 干燥箱 30 分钟，可见 3-4 个相同色的斑点，根据预先测得赖氨酸的  $R_f$  值，刮去赖氨酸单体，将其余斑点刮下至离心管中，用适量双蒸水洗 3 次，洗脱液合并，冷冻干燥，产物为二聚体和三聚体，产率 40%。

### 实施例 2-5 甾体类激素-碱性磷酸酶结合物制备

(1) 分别取不同的甾体类激素羧甲基肼(睾酮羧甲基肼、雌二醇羧甲基肼、雌三醇羧甲基肼、孕酮羧甲基肼) 300 $\mu$ g 溶于 100  $\mu$ l 50% 吡啶中，

另取 EDC 2mg 溶于 100  $\mu$ l 双蒸水中，两液混合，室温反应 1.5 小时，为 A 液，取聚赖氨酸 600ug 溶于 100  $\mu$ l 双蒸水中，为 B 液。

(2) A 液置磁力搅拌器上，将 B 液滴加至 A 液中，反应 4-6h，4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。

(3) 将反应液冷冻干燥，加 40% 的乙醇 100  $\mu$ l 溶解，充分振荡后离心去沉淀，上清液用划线法点在硅胶板 GF254 10 $\times$ 20cm 上，展开液为氯仿-甲醇-水系统，在 254nm 反射紫外光检测仪显示两条区带，样品参照位经茛三酮呈色显出两条斑点，将相应的经鉴定为具有茛三酮显色又在 254nm 紫外光下显出区带处刮下，洗脱并干燥后即为甾体类激素-聚赖氨酸。

(4) 取制备的甾体类激素-聚赖氨酸约 150ug 溶于 40% 乙醇 100  $\mu$ l 中，为 A 液，另取经透析的碱性磷酸酶 1mg (SIGMA 产品，活性 3870U/mg)，补加生理盐水至 400  $\mu$ l，为 B 液。

(5) 将 A 液置于磁力搅拌器上，取 B 液缓缓滴加至 A 液中，此时应完全透明，即刻加入 1% 戊二醛 30  $\mu$ l，放室温暗处反应 3h。

(6) 将反应液装入 8mm 直径透析袋，4 $^{\circ}$ C 搅拌对 PBS 透析 48h，再移至 50mmol/l pH7.6 Tris-HCL 缓冲液透析 24h。离心 10000r/min 20 分钟，取上清液加等量 AR 级丙三醇及适量优级 BSA，分装 50  $\mu$ l/支，4 $^{\circ}$ C 保存。

专利名称(译)	甾体类激素-碱性磷酸酶结合物制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN100360938C</a>	公开(公告)日	2008-01-09
申请号	CN03110098.8	申请日	2003-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	北京北免东雅生物技术研究所		
申请(专利权)人(译)	北京北免东雅生物技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
[标]发明人	李振甲		
发明人	李振甲		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	郑霞		
审查员(译)	牛艳玲		
其他公开文献	CN1540347A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

化学发光免疫分析技术是当代最流行的一类超灵敏度检测手段，广泛应用于生物医学基础研究和临床疾病的诊疗。对于甾体类激素的检测其标记物是碱性磷酸酶和甾体类激素的结合物。甾体类激素是一类脂溶性较强的物质，而碱性磷酸酶在一些低浓度的有机溶剂中即可变性失活，故制备这种标记物均为国外某些高科技生物制剂机构所垄断。本研究工艺简便易行、成本低廉，为开发此类试剂盒替代国外商品创造了条件。