



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03110098.8

[43] 公开日 2004 年 10 月 27 日

[11] 公开号 CN 1540347A

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

[71] 申请人 北京北免东雅生物技术研究所

地址 100012 北京市朝阳区安定门外大羊坊 6
号

[72] 发明人 李振甲

权利要求书 1 页 说明书 2 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。

-
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衍生物联接降低其脂溶性，在微量的有机溶剂中完全溶解，当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。
 2. 按权利要求 1 所述的结合物的制备方法，其特征在于甾体类激素-赖氨酸合成工艺。
 3. 按权利要求 1 所述的结合物的制备方法，其特征在于甾体类激素-碱性磷酸酶结合物合成材料分子比。

甾体类激素-碱性磷酸酶结合物制备方法

技术领域

本发明是一种针对甾体类激素-碱性磷酸酶结合物制备方法，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。碱性磷酸酶是一种 MW100 Ka 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。关于其制造工艺国内外尚未有报道。

发明内容

作者依照甾体类激素及碱性磷酸酶两种结合物的理化特性，研发出一种简便易行的合成工艺。

实施实例

一、聚赖氨酸的有机合成和分离

- 1、取聚赖氨酸 3mg 溶于 500 μ l 生理盐水 (pH6.5) 中，另取 EDC 5mg (300 μ 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 冰箱过夜。
- 2、将反应液冷冻干燥，加 150 μ l 双蒸水溶解。离心 5000r/min 20 分钟。取上清液在 10 \times 20cm 微晶纤维素薄板上 (自制厚度 1~1.2mm)，在板的左 1/4 处点 10 μ 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，产率为 40%。

二、甾体类激素-聚赖氨酸衍生物制备

- 1、取甾体类激素羧甲基肟（睾酮、雌二醇、雌三醇、孕酮）300 μg 溶于 100 μl 50%吡啶中，另取 EDC 2 mg 溶于 100 μl 双蒸水中，两液混合室温反应 1.5h，为“A”液。取聚赖氨酸 600 μg 溶于 100 μl 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℃冰箱过夜。
- 3、将反应液冷冻干燥，加 40%的乙醇 100 μl 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 10×20cm 板上，展开液为氯仿-甲醇-水系统。在 254nm 反射光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。将相对应经鉴定具有茛三酮显色又在 254nm 紫外光下显出区带刮下，洗脱并干燥后即产物。

三、甾体类激素-碱性磷酸酶结合物制备

- 1、取甾体激素-聚赖氨酸衍生物约 150 μg 溶于 40%乙醇 100 μl 中，为“A”液。另取经透析的碱性磷酸酶 1mg（SIGMA 公司产品，活性 3870u/mg），补加生理盐水至 400 μl 为 B 液。
- 2、将 A 液置磁力搅拌器上，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 μl ，放室温暗处反应 3h。反应液装入 8mm 直径透析袋，4℃搅拌对 PBS48h，再移至 50mmol/L pH7.6 Tris-HCl 缓冲液 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 μl /支，4℃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	CN1540347A	公开(公告)日	2004-10-27
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)	北京北免东雅生物技术研究所		
[标]发明人	李振甲		
发明人	李振甲		
IPC分类号	G01N33/531		
其他公开文献	CN100360938C		
外部链接	Espacenet SIPO		

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。