



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108152483 A

(43)申请公布日 2018.06.12

(21)申请号 201711240404.8

(22)申请日 2017.11.30

(71)申请人 苏州峰通光电有限公司

地址 215600 江苏省苏州市张家港市凤凰  
科技创业园D栋

(72)发明人 高任峰 陈晓乐

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

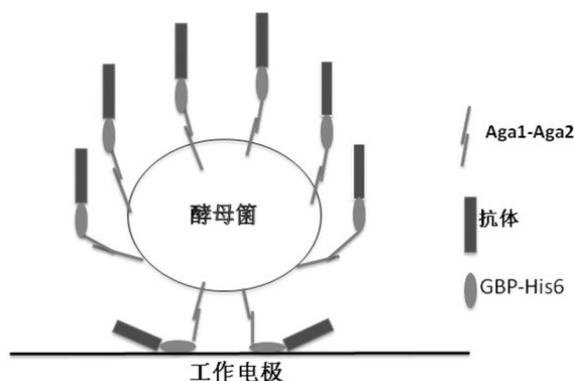
权利要求书1页 说明书3页  
序列表5页 附图2页

## (54)发明名称

一种免疫电化学分析仪

## (57)摘要

本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种免疫电化学分析仪,其制备方法及其用途。所述电化学分析仪的工作电极上连接有具有抗原结合活性的酵母菌,所述电化学分析仪能够快速、准确、高效检测血液,尿液或者循环肿瘤细胞表面的HER2蛋白,该方法特异性强、准确度高,检测浓度范围可达 $10^{-9}$  mol/L。本发明还提供一种检测肿瘤标记物HER2的方法,其具有精密度高、重复性高、低成本、易操作等优点,适用于各类肿瘤相关检测。



1. 一种免疫电化学分析仪,其特征在于,所述电化学分析仪的工作电极上连接有酵母菌。

2. 根据权利要求1所述的电化学分析仪,其特征在于,所述酵母菌为基因工程改造的酿酒酵母菌。

3. 根据权利要求2所述的电化学分析仪,其特征在于,所述酵母菌包含表面展示系统。

4. 根据权利要求3所述的电化学分析仪,其特征在于,所述表面展示系统包括表面多肽序列,所述表面多肽序列为具有抗原结合活性的氨基酸序列,所述表面多肽序列具有电极结合活性,优选地,所述表面多肽序列具有金属电极结合活性。

5. 根据权利要求4所述的电化学分析仪,其特征在于,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO. 6或SEQ ID NO. 7,所述氨基酸可包含一个或多个多肽,所述多肽包括抗原识别多肽和/或抗体,所述抗原识别多肽和/或抗体位于所述多肽的N端、C段或者中间。

6. 根据权利要求3-5任一所述的电化学分析仪,其特征在于,所述酵母表面展示系统的制备方法包括:

将编码相应于权利要求4所述表面多肽序列的多核苷酸序列或编码相应于SEQ ID NO. 6或SEQ ID NO. 7的多核苷酸序列连接入克隆载体中,获得重组克隆载体pHE1;

pHE1质粒直接用LiCl法或电转法转化酿酒酵母,在MD平板上挑取His<sup>+</sup>转化子,提取基因组DNA作为模板,设计引物进行PCR扩增,得到的重组菌E3,阳性克隆菌株E3保存于-80℃冰箱;

所述阳性克隆菌株E3表达时经菌株复苏后在SD-His液体培养基中生长到特定密度后换到含Galatose的诱导培养基中24小时诱导蛋白表达并展现在细胞表面。

7. 根据权利要求6所述的电化学分析仪,其特征在于,所述工作电极的制备方法包括:将表达后的酵母置于含PBS和BSA的溶液中,将工作电极浸泡在上述溶液中30分钟至24小时,优选地为18小时,酵母菌表面的抗体通过GBP和His-Tag吸附在工作电极表面,制成酵母菌免疫电极在1% BSA溶液中浸泡1小时以封闭非特异性抗原结合位点。

8. 根据权利要求6所述的电化学分析仪,其特征在于,所述工作电极为金属电极。

9. 根据权利要求1-8任一所述的电化学分析仪,其特征在于,所述电化学分析仪用于检测蛋白。

10. 根据权利要求9所述的电化学分析仪,其特征在于,所述蛋白包括肿瘤标记物。

## 一种免疫电化学分析仪

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测领域,尤其是涉及一种免疫电化学分析仪及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 人类表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor-2,HER2, 又称ErbB2) 基因,位于染色体17q12-21.32上,编码相对分子质量为185000的跨膜受体样蛋白,具有酪氨酸激酶活性,是人类表皮生长因子受体家族的成员之一。其具有重要的信号转导作用,是重要的乳腺癌预后判断因子,HER2阳性(过表达或扩增)的乳腺癌,其临床特点和生物学特性有特殊表现,治疗模式也与其他类型的乳腺癌有很大的区别,据此,HER2的有效检测对有效诊断和治疗乳腺癌具有极其重要的意义。

[0003] 目前HER2的检测主要检测方法包括组织HER2检测及血清HER2检测,其中,组织HER2检测主要应用荧光原位杂交技术、显色原位杂交技术及免疫组织化学染色法,而血清HER2检测主要应用化学发光法检测蛋白胞外段。

[0004] 免疫组织化学染色法(immunohistochemistry, IHC)是利用抗原抗体的特异性结合反应来检测和定位组织和细胞中的某些化学物质的一门技术,大多数病理实验室均采用此方法对HER2进行检测,IHC方法具有较快、较简便的优势,可以实现自动化操作,免疫组化切片保存较久,但其检测结果易受监步骤的影响而产生偏倚,属于半定量检测方法,检测结果的读取较为主观。

[0005] 荧光原位杂交技术(Fluorescence in situ hybridization, FISH)是根据已知微生物不同分类级别上种群特异的DNA序列,以利用荧光标记的特异寡聚核苷酸片段作为探针,检测HER2基因的扩增。此方法相对于IHC法具有更高精度,可自动化操作并且稳定性较高,但其价格昂贵,并且信号强度随时间衰弱。

[0006] 色素原位杂交(Chromogenicin Situ Hybridization,CISH)是指将HER2基因探针用地高辛或生物素标记,利用过氧化物酶或碱性磷酸酶的反应,在光学显微镜下检测组织mRNA的表达水平,其具有染色稳定的优点,但其属于较为新颖的技术,对实验人员操作水平要求较高,普及度较差。

[0007] HER2是重要的肿瘤生物标记物。血液中的HER2片段检测可以作为乳腺癌的检测及预后的重要指标。尿样中HER2也可以作为膀胱癌的肿瘤生物标记物。现有的检测手段一般是取肿瘤组织进行免疫染色或取血液进行ELISA检查。前一方法技术要求高,取样误诊率高,并且对病人有一定的创伤。后一方法有耗时长并且无法实时监测。针对现有技术的缺陷,本发明提供一种快速、准确检测HER2的方法,对病人无创伤、对实验操作人员要求低、准确度高、误诊率低,适用于快速检测需求。

### 发明内容

[0008] 为了解决上述技术问题,实现HER2快速、准确检测,本发明提供一种免疫电化分

析仪,所述电化学分析仪的工作电极上连接有酵母菌。

[0009] 进一步地,所述酵母菌为基因工程改造的酿酒酵母菌。

[0010] 进一步地,所述酵母菌包含表面展示系统。

[0011] 进一步地,所述表面展示系统包括表面多肽序列,所述表面多肽序列为具有抗原结合活性的氨基酸序列,所述表面多肽序列具有电极结合活性,优选地,所述表面多肽序列具有金属电极结合活性。

[0012] 进一步地,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO. 6或SEQ ID NO. 7,所述氨基酸可包含一个或多个多肽,所述多肽包括抗原识别多肽和/或抗体,所述抗原识别多肽和/或抗体位于所述多肽的N端、C段或者中间。

[0013] 进一步地,所述酵母表面展示系统的制备方法包括:

将编码相应于上述表面多肽序列的多核苷酸序列或编码相应于SEQ ID NO. 6或SEQ ID NO. 7的多核苷酸序列连接入克隆载体中,获得重组克隆载体pHE1;

pHE1质粒直接用LiCl法或电转法转化酿酒酵母,在MD平板上挑取His<sup>+</sup>转化子,提取基因组DNA作为模板,设计引物进行PCR扩增,得到的重组菌E3,阳性克隆菌株E3保存于-80℃冰箱;

所述阳性克隆菌株E3表达时经菌株复苏后在SD-His液体培养基中生长到特定密度后换到含Galatose的诱导培养基中24小时诱导蛋白表达并展现在细胞表面。

[0014] 进一步地,所述工作电极的制备方法包括:将表达后的酵母置于含PBS和BSA的溶液中,将工作电极浸泡在上述溶液中30分钟至24小时,优选地为18小时,酵母菌表面的抗体通过GBP和His-Tag吸附在工作电极表面,制成酵母菌免疫电极在1% BSA溶液中浸泡1小时以封闭非特异性抗原结合位点。

[0015] 优选地,所述工作电极为金属电极。

[0016] 进一步地,所述电化学分析仪用于检测蛋白。

[0017] 更进一步地,所述蛋白包括但不限于肿瘤标记物。

[0018] 本发明提供一种快速、准确检测HER2的方法,对病人无创伤、对实验操作人员要求低、准确度高、误诊率低,适用于快速检测需求。

## 附图说明

[0019] 图1为本发明提供的电化学分析仪的表面多肽序列结构示意图;

图2为本发明提供的电化学分析仪的表达载体pHE1结构示意图;

图3为本发明提供的电化学分析仪的酵母表面展示系统结构示意图;

图4为本发明提供的电化学分析仪的结构示意图。

## 具体实施方式

[0020] 实施例1、获得核苷酸序列

酵母表面展示系统的表面多肽序列包含顺序链接的Aga2,HER2,GBP,His-Tag 序列,所述编码Aga2,HER2,GBP,His-Tag 的蛋白质的氨基酸序列通过GS氨基酸序列(如SEQ ID NO. 5所示)连接,Aga2 位于表面多肽序列的5'端(如图1a所示,表面多肽序列1,序列如SEQ ID NO. 6所示)或者位于3'端(图1b所示,表面多肽序列2,序列如SEQ ID NO. 7所示),Aga2

(97个氨基酸)蛋白质的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO.1所示;HER2段的氨基酸序列选自可与HER2抗原结合的任一抗体或抗体片段(128个氨基酸),序列如SEQ ID NO. 2所示;GBP蛋白质的氨基酸序列(12个氨基酸),如序列表中SEQ ID NO. 3所示;His-Tag蛋白质的氨基酸序列(6-10个氨基酸),如序列表中SEQ ID NO. 4所示,上述氨基酸序列相应的核苷酸序列由ThermoFisher公司合成。

#### [0021] 实施例2、酵母表面展示系统的构建

将合成的 表面多肽序列的核苷酸序列连接入克隆载体pRS313(ATCC购买) 的酶切位点HindIII和BamHI之间,得到重组克隆载体pRS313,其载体结构示意图如图2所示。酶切和测序验证重组克隆载体pRS313中所述核苷酸序列正确插入。

[0022] 本实施例所用酵母菌株为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) (MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL) (原菌株购自ATCC公司),采用限制性内切酶HindIII和BamHI对pRS313质粒进行线性化后,用LiCl法转化酿酒酵母INVSc1,在MD平板上挑取His<sup>+</sup>转化子,提取基因组DNA作为模板,设计引物进行PCR扩增,结果证明表面多肽序列的核苷酸序列整合到了酿酒酵母的基因组中,得到的重组菌命名为E3。

[0023] 上述载体转入酵母菌后,阳性克隆菌株E3保存于-80C冰箱。表达时菌株复苏后在SD-His 液体培养基中生长到一定的密度后(OD600=1)换到含Galatose的诱导培养基中24小时诱导蛋白表达并展现在细胞表面。

#### [0024] 实施例3、用于检测HER2蛋白的传感器电极的制备

表达后的酵母置于含PBS和BSA的溶液中,工作电极即金电极浸泡在上述溶液中30分钟至24小时,优选地为18小时,酵母菌表面的抗体通过GBP和His-Tag吸附在工作电极表面(如图3所示),制成酵母菌免疫电极在1% BSA溶液中浸泡1小时以封闭非特异性抗原结合位点。

[0025] 该免疫电极制作方法无需提纯抗体,简便易行。展示在活体酵母菌表面的抗体稳定度好,不易降解,并能有效展示抗原抗体结合位点。酵母菌或者表达的抗体也可以通过其它蛋白或微生物固定法固定于电极上,电极选自金电极或玻碳电极等各种形式的工作电极。

#### [0026] 实施例4、生物样品中HER2蛋白的检测

电化学传感器系统所用电化学分析仪型号为CHI760E(购自上海辰华公司)。以上述免疫电极为主形成的电化学传感器可以用循环伏安法,电流法,阻抗法,电容法对样品中的抗原进行定量测定。该免疫传感器结合抗原抗体的高度亲和力,以及电化学分析法的高灵敏度,相应时间快,不受样品浊度,颜色影响等优点,可以特异性的检测样品中的Her2,电流法检测下限可达 $10^{-9}$  mol/L。所述电化学分析仪如图4所示。

#### [0027] 实施例5、生物分析仪的使用及复位

结合Her2抗原的酵母菌免疫电极可通过10mM pH2.0 Glycine溶液再生,4℃保存在含5-10%甘油的PBS溶液中。修饰好的酵母菌免疫电极可保存两周以上且没有明显的活性变化。应该知悉的是,本发明涵盖所有序列已知的抗体的酵母菌免疫电极,涉及酵母菌表面展示抗体的免疫电极均在本发明的保护范围内。

[0028] 以上仅是本发明的优选实施方式,本发明的保护范围并不局限于上述实施例,与本发明构思无实质性差异的各种工艺方案均在本发明的保护范围内。

## 序列表

<110> 苏州峰通光电有限公司  
 <120> 一种免疫电化学分析仪  
 <160> 7  
 <170> SIPOSequenceListing 1.0  
 <210> 1  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <223> Aga2蛋白质的氨基酸序列  
 <400> 1  
 Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr  
                   20                   25                   30  
 Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Ser Thr Thr Thr Ile Leu Ala Asn  
                   35                   40                   45  
 Gly Lys Ala Met Gln Gly Val Phe Glu Tyr Tyr Lys Ser Val Thr Phe  
                   50                   55                   60  
 Val Ser Asn Cys Gly Ser His Pro Ser Thr Thr Ser Lys Gly Ser Pro  
 65                   70                   75                   80  
 Ile Asn Thr Gln Tyr Val Phe  
                                   85  
 <210> 2  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <223> HER2抗体的氨基酸序列  
 <400> 2  
 Ala Ser Pro Val Thr Ser Ile Ile Ala Ala Val Val Gly Ile Leu Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Val Val Val Val Gly Leu Val Leu Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Arg  
                   20                   25                   30  
 Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu





225		230		235		240
Gly Gly Gly Gly	Ser His His His His His	Leu Lys Ala His Leu				
	245	250	255			
Pro Pro Ser Ser	Arg Leu Pro Ser His His His His His His					
	260	265	270			
<210>	7					
<211>	255					
<212>	PRT					
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)					
<220>						
<221>	PEPTIDE					
<223>	表面多肽序列2					
<400>	7					
Ala Ser Pro Val Thr Ser Ile Ile Ala Ala Val Val Gly Ile Leu Leu						
1	5	10	15			
Val Val Val Val Gly Leu Val Leu Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Arg						
	20	25	30			
Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu						
	35	40	45			
Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln						
	50	55	60			
Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Val Lys Val Leu Gly						
65	70	75	80			
Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly						
	85	90	95			
Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr						
	100	105	110			
Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala						
	115	120	125			
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His						
	130	135	140			
His His His His His Leu Lys Ala His Leu Pro Pro Ser Ser Arg Leu						
145	150	155	160			
Pro Ser His His His His His His Met Gln Leu Leu Arg Cys Phe Ser						
	165	170	175			
Ile Phe Ser Val Ile Ala Ser Val Leu Ala Gln Glu Leu Thr Thr Ile						
	180	185	190			
Cys Glu Gln Ile Pro Ser Pro Thr Leu Glu Ser Thr Pro Tyr Ser Leu						
	195	200	205			

---

Ser	Thr	Thr	Thr	Ile	Leu	Ala	Asn	Gly	Lys	Ala	Met	Gln	Gly	Val	Phe
	210					215					220				
Glu	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Val	Thr	Phe	Val	Ser	Asn	Cys	Gly	Ser	His	Pro
225					230					235					240
Ser	Thr	Thr	Ser	Lys	Gly	Ser	Pro	Ile	Asn	Thr	Gln	Tyr	Val	Phe	
				245					250					255	

a. Aga2-GS-Her2-GS-His6-GBP-His6

b. Her2-GS-His6-GBP-His6-Aga2

图1

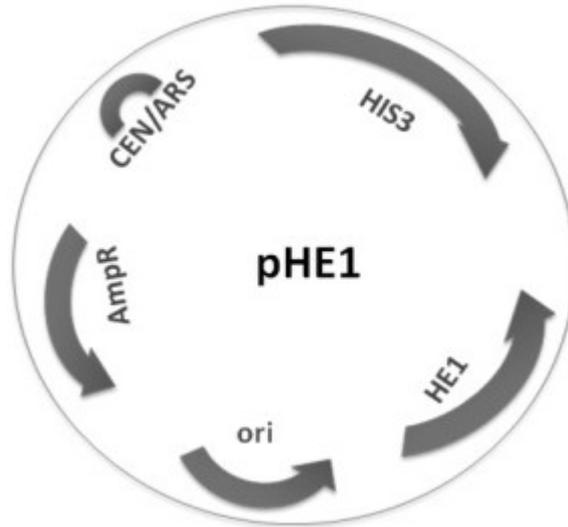


图2

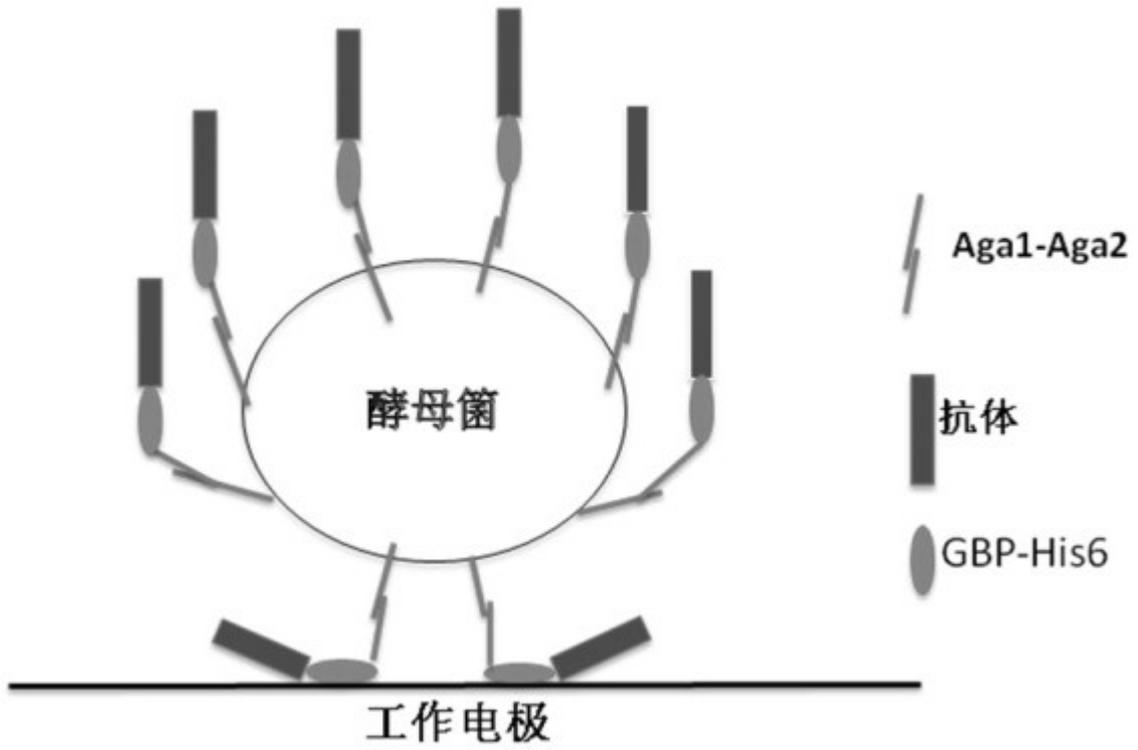


图3

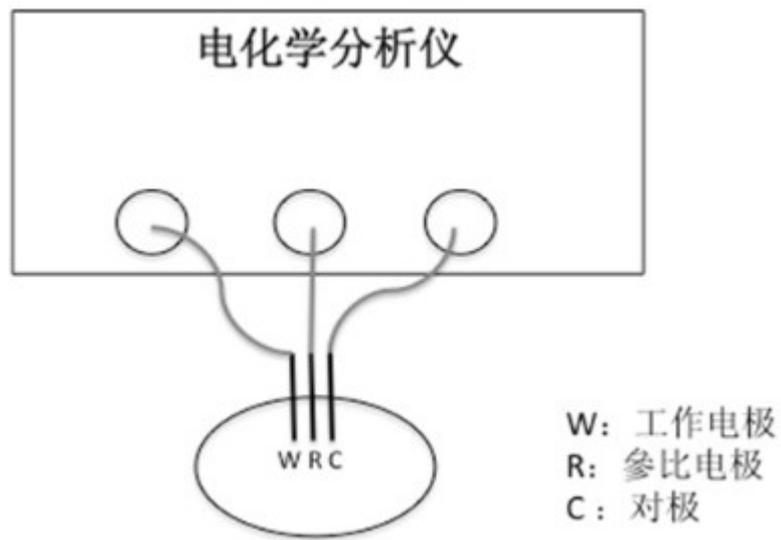


图4

专利名称(译)	一种免疫电化学分析仪		
公开(公告)号	<a href="#">CN108152483A</a>	公开(公告)日	2018-06-12
申请号	CN201711240404.8	申请日	2017-11-30
[标]发明人	高任峰 陈晓乐		
发明人	高任峰 陈晓乐		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/327		
CPC分类号	G01N33/53 G01N27/3275		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物医药技术领域，具体涉及一种免疫电化学分析仪，其制备方法及用途。所述电化学分析仪的工作电极上连接有具有抗原结合活性的酵母菌，所述电化学分析仪能够快速、准确、高效检测血液，尿液或者循环肿瘤细胞表面的HER2蛋白，该方法特异性强、准确度高，检测浓度范围可达 $10^{-9}$  mol/L。本发明还提供一种检测肿瘤标记物HER2的方法，其具有精密度高、重复性高、低成本、易操作等优点，适用于各类肿瘤相关检测。

