



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117500917 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 02

(21) 申请号 202280043276.0
(22) 申请日 2022.06.23
(30) 优先权数据
2021-104343 2021.06.23 JP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.18
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/025134 2022.06.23
(87) PCT国际申请的公布数据
W02022/270588 JA 2022.12.29
(71) 申请人 松下知识产权经营株式会社
地址 日本大阪府
(72) 发明人 初谷纪幸 和山文哉 奥村泰章
(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
专利代理师 王灵菇
(51) Int.Cl.
C12N 9/02 (2006.01)

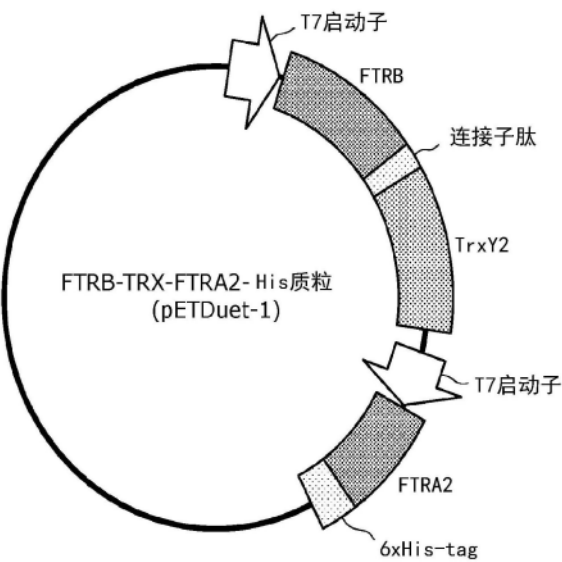
权利要求书1页 说明书12页
序列表3页 附图9页

(54) 发明名称

融合蛋白、融合蛋白的制造方法、电极、氧化还原装置、氧化还原方法、二硫键的切断方法和过敏原的灭活方法

(57) 摘要

一种融合蛋白,其为将铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶与硫氧还蛋白经由连接子肽融合而成的融合蛋白,所述连接子肽包含甘氨酸(G)和丝氨酸(S)。



1. 一种融合蛋白, 其是铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶与硫氧还蛋白经由连接子肽融合而成的融合蛋白, 其中,

所述连接子肽包含甘氨酸(G)和丝氨酸(S)。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白, 其中,

所述连接子肽由比5个残基多且50个残基以下的氨基酸序列构成。

3. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白, 其中,

所述连接子肽包含至少一个甘氨酸和至少一个丝氨酸,

所述融合蛋白还包含(i) $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ 、和(ii) $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ 中的至少任一个, (i)中,R为氢基或碳数为1~4的烷基中的任一个, (ii)中,R的碳数为1或2的烷基中的至少一个氢基被羟基取代。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的融合蛋白, 其中,

所述连接子肽包含 $(\text{GGGS})_n$ 的氨基酸序列, n为2以上的整数。

5. 一种融合蛋白的制造方法, 其中,

制作包含甘氨酸(G)和丝氨酸(S)的连接子肽, 经由制作的所述连接子肽使硫氧还蛋白还原酶与硫氧还蛋白融合。

6. 一种电极, 其固定化有权利要求1~4中任一项所述的融合蛋白。

7. 一种氧化还原装置, 其具备:

权利要求6所述的电极、和

对所述电极施加电压的电源,

其中, 将靶分子氧化或还原。

8. 一种氧化还原方法, 其使用权利要求6所述的电极, 将靶分子氧化或还原。

9. 一种二硫键的切断方法, 其使用权利要求6所述的电极, 将作为靶分子的蛋白的二硫键切断。

10. 一种过敏原的灭活方法, 其使用权利要求6所述的电极, 将作为靶分子的过敏原灭活。

融合蛋白、融合蛋白的制造方法、电极、氧化还原装置、氧化还原方法、二硫键的切断方法和过敏原的灭活方法

技术领域

[0001] 本公开涉及硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白的融合蛋白及其制造方法、固定化有融合蛋白的电极、具备该电极的氧化还原装置、使用了该电极的氧化还原方法、二硫键的切断方法、和过敏原的灭活方法。

背景技术

[0002] 为了利用硫氧还蛋白还原酶的催化作用将硫氧还蛋白还原,硫氧还蛋白与硫氧还蛋白还原酶需要形成异源蛋白复合物。例如,在专利文献1中公开了一种方法,其中,经由油体表面回避性连接子肽,将硫氧还蛋白与硫氧还蛋白还原酶融合而成的蛋白复合物在与植物细胞内的油体缔合的状态下在保持活性的同时进行制备。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:日本特表2004-527227号公报

发明内容

[0006] 发明要解决的课题

[0007] 但是,在专利文献1中记载的方法中,为了在与植物细胞内的油体缔合的状态下保持活性,位于硫氧还蛋白与硫氧还蛋白还原酶之间的油体表面回避性连接子肽长达49个氨基酸残基,并且由带负电的氨基酸序列构成。因此,采用专利文献1中记载的方法制造的硫氧还蛋白与硫氧还蛋白还原酶的蛋白复合物缺乏柔软性,不适于在细胞外的使用。

[0008] 因此,本公开提供经由具有柔软性和适度的亲水性的连接子肽融合而成的硫氧还蛋白和硫氧还蛋白还原酶的融合蛋白及其制造方法。

[0009] 用于解决课题的手段

[0010] 本公开的一个方式的融合蛋白为将铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶与硫氧还蛋白经由连接子肽融合而成的融合蛋白,其中,所述连接子肽包含甘氨酸(G)和丝氨酸(S)。

[0011] 发明效果

[0012] 根据本公开,能够提供经由具有柔软性和适度的亲水性的连接子肽融合而成的硫氧还蛋白和硫氧还蛋白还原酶的融合蛋白。

附图说明

[0013] 图1为用于说明本实施方式的融合蛋白的应用例的图。

[0014] 图2为表示具备本实施方式的电极的氧化还原装置的构成的一个例子的图。

[0015] 图3为图2的II-II线处的剖面图。

[0016] 图4为示意地表示在电极上固定的电子传送体和融合蛋白的图。

[0017] 图5为表示本实施方式的电极的制造方法的一个例子的流程图。

- [0018] 图6为示意地表示图5的各流程的图。
- [0019] 图7为用于说明靶分子的氧化还原方法的图。
- [0020] 图8为融合蛋白制作用的表达载体的概念图。
- [0021] 图9为融合蛋白的概念图。
- [0022] 图10为表示融合蛋白的氨基酸序列的图。
- [0023] 图11为比较例1、比较例2和实施例1的用于还原酶活性评价的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)像。
- [0024] 图12为表示实施例3、实施例4、比较例3和比较例4的SDS-PAGE后的电泳图像的图。
- [0025] 图13为表示过敏原性蛋白的分解率的计算结果的图。

具体实施方式

- [0026] (本公开的一个方式的概要)
- [0027] 本公开的一个方式的概要如下所述。
- [0028] 本公开的一个方式的融合蛋白是将硫氧还蛋白还原酶与硫氧还蛋白经由连接子肽融合而成的融合蛋白,其中,所述连接子肽包含甘氨酸(G)和丝氨酸(S)。
- [0029] 由此,连接子肽由于包含低分子量且具有无极性侧链的甘氨酸、和低分子量且具有亲水性的丝氨酸,因此能够具有柔软性和适度的亲水性。
- [0030] 例如,本公开的一个方式的融合蛋白中,连接子肽由比5个残基多且50个残基以下的氨基酸序列构成。
- [0031] 由此,经由连接子肽融合蛋白之间在相对的运动上能够具有自由度。
- [0032] 例如,在本公开的一个方式的融合蛋白中,连接子肽包含至少一个甘氨酸和至少一个丝氨酸,还包含(i) $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ (其中,R为氢基、或碳数为1~4的烷基中的任一个)、和(ii) $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$ (其中,R的碳数为1或2的烷基中的至少一个氢基被羟基取代)中的至少任一个。
- [0033] 由此,连接子肽即使包含除甘氨酸和丝氨酸以外的相当于上述(i)和(ii)的氨基酸,也能够保持柔软性和适度的亲水性。
- [0034] 例如,在本公开的一个方式的融合蛋白中,连接子肽包含 $(\text{GGGS})_n$ 的氨基酸序列,n为2以上的整数。
- [0035] 由此,融合的蛋白之间在相对的运动上能够具有自由度,连接子肽能够具有柔软性和适度的亲水性。
- [0036] 另外,本公开的一个方式的融合蛋白的制造方法是制作包含甘氨酸(G)和丝氨酸(S)的连接子肽,经由制作的所述连接子肽使硫氧还蛋白还原酶与硫氧还蛋白融合。
- [0037] 由此,融合蛋白的制造方法由于制作包含低分子量且具有无极性侧链的甘氨酸和低分子量且具有亲水性的丝氨酸的连接子肽,因此能够制造经由具有柔软性和适度的亲水性的连接子肽融合而成的融合蛋白。
- [0038] 另外,本公开的一个方式的电极固定化有上述的任一个融合蛋白。
- [0039] 由此,在电极中,由于从电极将电子输送至固定于电极的融合蛋白,因此能够从融合蛋白向靶分子输送电子。
- [0040] 另外,本公开的一个方式的氧化还原装置具备上述的电极、和向所述电极施加电

压的电源,将靶分子氧化或还原。

[0041] 由此,氧化还原装置由于从电极将电子输送至靶分子,因此能够高效率地将靶分子氧化或还原。

[0042] 另外,本公开的一个方式的氧化还原方法使用上述的电极,将靶分子氧化或还原。

[0043] 由此,氧化还原方法由于从电极将电子输送至靶分子,因此能够高效率地将靶分子氧化或还原。

[0044] 另外,本公开的一个方式的二硫键的切断方法使用上述的电极,将作为靶分子的蛋白的二硫键切断。

[0045] 由此,二硫键的切断方法由于从电极将电子输送至靶分子,因此能够将靶分子的二硫键高效率地还原。

[0046] 另外,本公开的一个方式的过敏原的灭活方法使用上述的电极,将作为靶分子的过敏原灭活。

[0047] 由此,过敏原的灭活方法由于从电极将电子输送至作为靶分子的过敏原,将过敏原还原,因此能够高效率地将过敏原灭活。

[0048] 以下对于实施方式,参照附图进行说明。

[0049] 需要说明的是,以下说明的实施方式均是表示概括性的或具体的例子。以下的实施方式中所示的数值、形状、材料、构成要素、构成要素的配置位置和连接形态、工序、工序的顺序等为一个例子,并不意在限定权利要求。另外,以下的实施方式中的构成要素中,对于表示最上位概念的独立权利要求中没有记载的构成要素,作为任选的构成要素进行说明。另外,各图未必严格地图示。在各图中,对于实质上相同的构成,标注同一附图标记,有时将重复的说明省略或简化。

[0050] 另外,在各图中,酌情使用彼此相互正交的X轴方向、Y轴方向和Z轴方向进行说明。特别地,有时将Z轴方向的+侧作为上侧、将-侧作为下侧进行说明。

[0051] 另外,在本公开中,表示平行和垂直等要素间的关系性的用语和表示矩形等要素的形状的用语以及数值并非只表示严格的含义,意味着也包含实质上同等的范围例如数%左右的差异。

[0052] (实施方式)

[0053] 以下对于实施方式,参照附图进行说明。

[0054] [1.融合蛋白]

[0055] 首先,对本实施方式的融合蛋白进行说明。本实施方式的融合蛋白是将硫氧还蛋白还原酶与硫氧还蛋白经由连接子肽融合而成的融合蛋白。更具体地,融合蛋白是将NADPH-硫氧还蛋白还原酶或铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶(FTR)与硫氧还蛋白(Trx)经由连接子肽融合而成的融合蛋白,换言之,是杂交型的酶。融合蛋白如图1所示,当接受从电极向电子介体供给的电子时,会向靶分子(在此为过敏原)供给电子。图1为用于说明本实施方式的融合蛋白的应用例的图。

[0056] 图1中示出了将融合蛋白应用于过敏原的灭活的例子。例如,过敏原为具有二硫键的蛋白,也称为所谓的过敏原性蛋白。二硫键是非常牢固的键,不易因热、酸和酶(例如胃的消化酶)而被切断。因此,具有二硫键的蛋白引起过敏症的可能性高。在将融合蛋白应用于过敏原的灭活的情况下,当融合蛋白接受从电极向电子介体供给的电子时,会向过敏原供

给电子。然后,过敏原的二硫键(例如图1的(a))通过从活性型的融合蛋白(图1中的活性型FTR-Trx)供给电子,从而被还原为硫醇基(例如图1的(b))。由此,将过敏原性蛋白中的二硫键切断,过敏原被灭活。

[0057] [2.连接子肽]

[0058] 实施方式中的连接子肽为用于使硫氧还蛋白还原酶与硫氧还蛋白融合以制作融合蛋白的连接子肽。连接子肽以硫氧还蛋白的氧化还原活性的二硫化物(redox-active disulfide)能够与硫氧还蛋白还原酶的氧化还原活性的二硫化物相互作用的方式,使硫氧还蛋白与硫氧还蛋白还原酶融合。

[0059] 连接子肽包含甘氨酸(G)和丝氨酸(S)。连接子肽由比5个残基多且50个残基以下的氨基酸序列构成。例如,连接子肽包含至少一个甘氨酸和至少一个丝氨酸,还包含(i) $H_2N-CHR-COOH$ (其中,R为氢基、或、碳数为1~4的烷基中的任一个)、和(ii) $H_2N-CHR-COOH$ (其中,R的碳数为1或2的烷基中的至少一个氢基被羟基取代)中的至少任一个。例如,连接子肽包含 $(GGGGS)_n$ 的氨基酸序列,n为2以上的整数。换言之,连接子肽以由甘氨酸(G)-甘氨酸(G)-甘氨酸(G)-甘氨酸(G)-丝氨酸(S)这5个残基组成的氨基酸序列为一个单元时,可包含1个以上且3个以下、优选2个以上且3个以下、或其以上的该一个单元的氨基酸序列(以下有时也简称为“GGGGS”)。甘氨酸为不具有侧链的疏水性的氨基酸,与其他氨基酸相比,柔软性高。丝氨酸为水溶性的氨基酸。为了制作具有柔软性和适度的亲水性的连接子肽而进行了研究,结果确认了:将GGGGS作为一个单元的氨基酸序列是有效的。

[0060] 另一方面,在专利文献1中,为了使硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白融合,公开了带负电的由49个氨基酸残基构成的连接子肽。本公开的连接子肽由包含侧链小且不带电的、与其他氨基酸相比柔软性高的甘氨酸、和作为水溶性的氨基酸的丝氨酸在内的5个残基至15个残基的氨基酸序列构成。因此,本发明申请的连接子肽与专利文献1中记载的连接子肽的氨基酸序列的构成和长度都不同,效果也不同。

[0061] [3.融合蛋白的制作方法]

[0062] 经由上述的连接子肽融合的硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白的融合蛋白可以采用使各个蛋白融合的惯用的技术制作。

[0063] 例如,编码硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白的DNA可以从植物、动物或微生物中采用聚合酶链反应(PCR)法分离。例如,在拟南芥的硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白的情况下,可以由使用了从拟南芥提取的总RNA的反转录反应后的cDNA中采用PCR法进行分离。分离所需的引物可以使用各生物的基因的序列信息进行设计。拟南芥的DNA和氨基酸序列信息例如可以充分利用TAIR(The Arabidopsis Information Resource,拟南芥信息资源中心)、或、NCBI(National Center for Biotechnology Information,美国国家生物技术信息中心)的基因组数据库中注册的信息。

[0064] 在制作硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白的融合蛋白的情况下,能够将编码该蛋白的基因按照公知的方法组装到表达载体中。表达载体的种类可以根据组装该载体的预定的宿主的种类适当地选择。

[0065] 而且,可以使制作的表达载体转化到大肠杆菌等微生物、植物体、植物细胞、动物细胞、或昆虫细胞等宿主中,使它们表达蛋白。另外,也可不使用宿主而使用无细胞蛋白表达系进行制作。

[0066] [4.氧化还原装置]

[0067] 接着,作为本实施方式的融合蛋白的应用例,对于具备固定化有融合蛋白的电极的氧化还原装置进行说明。图2为表示具备实施方式的电极的氧化还原装置的构成的一个例子的图。

[0068] 氧化还原装置100具备固定化有融合蛋白的电极(例如图2中的阴极电极1)和对电极施加电压的电源20,将靶分子氧化或还原。氧化还原装置100通过向电极施加电压,从而进行电极与融合蛋白之间的电子输送。由此,在固定化有融合蛋白的电极与试样9中的靶分子之间发生电子传递,因此靶分子被氧化或还原。例如,氧化还原装置100通过对包含靶分子的试样9(例如样品溶液)在非流动状态下对电极施加电压,从而在固定于电极的融合蛋白与试样9中的靶分子之间进行电子传递,靶分子被氧化或还原。在图2的例子中,氧化还原装置100包含搅拌子8和使搅拌子8旋转的搅拌部40,也可不具备搅拌子8和搅拌部40。在图2的例子中,氧化还原装置100通过搅拌部40使搅拌子8旋转,将样品溶液从非流动状态切换为流动状态,从而使氧化或还原后的靶分子在样品溶液中扩散。这样,氧化还原装置100通过反复进行试样9(样品溶液)的流动状态的切换,从而能够在溶液整体中将靶分子高效率地氧化或还原。

[0069] 需要说明的是,所谓溶液为非流动状态是指,例如溶液没有被搅拌或振荡(即,没有受到剪切力或振动等外力)、在液面没有发现摇动等运动的状态。

[0070] 接着,对实施方式的氧化还原装置100的构成参照图2至图4进行说明。

[0071] 如图2所示,氧化还原装置100具备:例如搅拌包含靶分子的试样9使其成为流动状态的搅拌部40;通过与靶分子之间进行电子传递从而将靶分子氧化或还原的固定有融合蛋白的电极(阴极电极1);对电极施加电压的电源20;和控制电源20和搅拌部40的控制部30。其中,在电极固定有电子传送体和融合蛋白酶。

[0072] 电压施加部10例如为具备阴极电极1(也称为作用电极)、参比电极2、对电极3、电池4、盖部5、端子6a、6b、6c和引线7a、7b、7c的三电极式电池。其中,电压施加部10例如也可具备作用电极(阴极电极1)和对电极3的二电极式电池。

[0073] 阴极电极1和对电极3由导电性物质构成。作为导电性物质,例如可为碳材料、导电性聚合物材料、半导体或金属等。

[0074] 首先,对于阴极电极1参照图3和图4进行说明。图3为图2的II-II线处的剖面图。图4为示意地表示在电极上固定的电子传送体和融合蛋白的图。

[0075] 阴极电极1为固定有融合蛋白的电极。阴极电极1例如具有:玻璃基板11、在玻璃基板11上蒸镀的钛蒸镀层12、在钛蒸镀层12形成的阴极基板13、和固定于阴极基板13的包含电子传送体和融合蛋白的反应层14。

[0076] 作为阴极基板13,例如可使用金、玻璃碳、或ITO(氧化铟锡(Indium Tin Oxide))等导电性基板。对阴极基板13的厚度并无特别限定。

[0077] 固定化于阴极基板13的电子传送体只要是能够进行电极与电极上固定的融合蛋白之间的电子传递的物质,则并无特别限定。例如可列举出紫精、醌或吡啶酚等。电子传送体例如用链状的第一连接子固定化在阴极基板13上。第一连接子例如包含碳数为2以上且5以下的烷基链。第一连接子在末端具有硫醇基。通过第一连接子与电极(具体地,阴极基板13)化学键合,从而将电子传送体固定化在电极的表面。

[0078] 对于固定化于电极的电子传送体和融合蛋白,可具有以下的(1)~(4)的特征。(1)将电子传送体与电极连接的第一连接子具有导电性,并且(2)将融合蛋白与电极连接的第二连接子为与第一连接子类似的结构,但不具有导电性。另外,(3)与电子传送体和电极之间的距离相比,融合蛋白与电极之间的距离大。(4)电子传送体与融合蛋白的距离为电子可移动的距离(例如数 μm 以内)。由此,从电极向电子传送体移动的电子容易向融合蛋白移动。另外,将融合蛋白配置在电极的最表面,用链状的第二连接子固定于电极,因此融合蛋白的自由度提高,容易作用于靶分子。

[0079] 需要说明的是,通过电子传送体与融合蛋白的组合,在上述的优选的范围内,可改变第一连接子和第二连接子的碳数。

[0080] 其中,所谓第二连接子不具有导电性包括虽然稍微导电但与第一连接子相比导电性足够低、基本上能够视为非导电性的程度的情形。

[0081] 另外,固定化于电极的表面(所谓的阴极基板13)的融合蛋白与氧化还原蛋白(例如硫氧还蛋白)和氧化还原酶(例如铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶)经由连接子肽融合,将靶分子氧化或还原。融合蛋白通过比第一连接子长的链状的第二连接子固定化在阴极基板13上。第二连接子例如包含碳数为3以上且20以下的烷基链,其中,可包含碳数为6以上且14以下的烷基链。

[0082] 参比电极2是不与试样9中的成分反应、维持恒定的电位的电极,用于利用电源20将阴极电极1与参比电极2之间的电位差控制为恒定。参比电极2例如为银/氯化银电极。对电极3例如为铂电极。

[0083] 电源20按照从控制部30输出的控制信号,在电压施加部10的阴极电极1与对电极3之间施加电压,将阴极电极1与参比电极2之间的电位控制为规定的值。

[0084] 控制部30进行用于控制电源20的电压施加和搅拌部40的马达(未图示)的运动的信息处理。控制部30例如采用处理器、微型计算机或专用电路来实现。

[0085] 搅拌部40通过按照从控制部30输出的控制信号,控制马达的动作,从而控制在电压施加部10中设置的搅拌子8的旋转速度和旋转时间。

[0086] [5.电极的制造方法]

[0087] 接着,对于本实施方式的电极的制造方法参照图5和图6进行说明。图5为表示本实施方式的电极的制造方法的一个例子的流程图。图6为示意地表示图5的各流程的图。图6的(a)表示第一固定化工序,图6的(b)表示第二固定化工序。其中,本实施方式的电极为阴极电极1。

[0088] 电极的制造方法包含:第一固定化工序(S1)、和将融合蛋白经由第二连接子固定化在电极上的第二固定化工序(S2)。

[0089] 在第一固定化工序(S1)中,将电子传送体经由链状的第一连接子固定化在电极上。首先,准备包含与第一连接子键合的电子传送体(例如电子介体)和第二连接子的溶液,与自组织化单分子膜(SAM)的形成同样地,将与电子传送体键合的第一连接子和第二连接子固定化在电极上。例如,将与电子传送体键合的第一连接子、和第二连接子分别在乙醇:乙腈=1:1的溶液中混合,在该混合溶液中将电极浸渍1小时以上,静置。其中,如图6的(a)所示,电子传送体具有第一连接子。第一连接子在末端具有硫醇基。通过第一连接子与电极化学键合,从而将电子传送体经由第一连接子固定化在电极上。其中,第一连接子为电子能

够从电极移动到电子传送体的长度的烷基链。第一连接子例如为碳数为2以上且5以下的烷基链。

[0090] 另外,用于将融合蛋白固定化在电极上的第二连接子为碳数为3以上的烷基链,为了使电子不能从电极直接移动至融合蛋白,可为碳数为6以上的烷基链。另外,第二连接子为碳数为20以下的烷基链,为了使从与第一连接子键合的电子传送体向融合蛋白的电子的移动变得容易,可为碳数为14以下的烷基链。即,第二连接子为碳数为3以上且20以下,更优选地,例如第二连接子可为碳数为6以上且14以下的烷基链。另外,第二连接子在一个末端具有羧基或氨基,在另一末端具有硫醇基。其中,在将分子量为500以下的化合物用作电子传送体的情况下,第二连接子可为碳数不到15的烷基链。例如,第二连接子的烷基链的长度可根据第一连接子的烷基链的长度、和与第一连接子键合的电子传送体的尺寸(分子量)来适当地确定。

[0091] 接着,在第二固定化工序(S2)中,将融合蛋白经由第二连接子固定化在电极上。更具体地,如图6的(b)所示,使固定化在电极上的第二连接子与融合蛋白键合。此时,例如将融合蛋白中的硫氧还蛋白还原酶的氨基与第二连接子的羧基通过氨基偶联反应结合。由此,将融合蛋白经由第二连接子固定化在电极上。

[0092] [6. 靶分子的氧化还原方法]

[0093] 接着,对靶分子的氧化还原方法参照图3和图7进行说明。图7为用于说明靶分子的氧化还原方法的图。靶分子例如为蛋白或过敏原,具有二硫键。

[0094] 靶分子的氧化还原方法例如使用具备作为阴极电极1的固定化有融合蛋白的电极、作为对电极3的阳极电极、和参比电极2的三电极方式的电压施加部10,将试样9中所含的靶分子氧化或还原。阳极电极的表面积例如比阴极电极1足够大。

[0095] 试样9为包含靶分子的水溶液。可控制对试样9施加的电压,以使相对于参比电极2的阴极电极1的电位成为电子传送体(电子介体)的氧化电位。

[0096] 实施例

[0097] 以下通过实施例对本公开具体地说明,本公开并不只限定于以下的实施例。

[0098] [硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白的融合蛋白的制作]

[0099] [实施例1]

[0100] 在实施例1中,使融合蛋白的构成如下。实施例1中的连接子肽将由甘氨酸(G)-甘氨酸(G)-甘氨酸(G)-甘氨酸(G)-丝氨酸(S)这5个残基构成的氨基酸序列(GGGGS)作为一个单元。

[0101] 就硫氧还蛋白还原酶而言,使用了铁氧还蛋白:硫氧还蛋白还原酶(以下记为FTR),另外就硫氧还蛋白而言,使用了硫氧还蛋白Y2(以下记为TrxY2)。FTR由催化子单元(catalytic Subunit)(以下记为FTRB)和可变子单元(variable Subunit)(以下记为FTRA2)构成,两者形成异源二聚体。

[0102] 图8为融合蛋白制作用的表达载体的概念图。如图8所示,在酶表达载体(pETDuet-1:Novagen公司制)的多克隆位点1的5'侧导入编码FTRB的第32位-第146位的氨基酸的基因(序列号1),在3'侧导入编码TrxY2的第59位-第167位的氨基酸的基因(序列号2)。按照以所需的单元和适当的顺序表达的方式在这2个基因之间导入编码连接子肽的基因(序列号3~5)导入。在多克隆位点2导入编码FTRA2的第73位-第184位的氨基酸的基因(序列号6)和编

码组氨酸标签 (His-Tag) 的基因 (序列号7)。

[0103] 表达载体作用插入基因的各碱基序列

[0104] (1) 编码FTRB的第32位-第146位的氨基酸的基因 (序列号1) ATGGCGAAAACGGAACCG
TCGGAGAAATCAGTAGAGATTATGAGGAAATCTCCGAGCAATATGCTCGTCGCTCTGGGACTTACTTCTGTGTTGA
TAAAGGAGTTACTTCAGTCGTTATTAAGGGTTTGGCTGAGCATAAAGATTCATATGGTGCACCGCTTTGCCCTTGCA
GACACTATGATGATAAAGCTGCTGAGGTTGGACAAGGCTTTTGAATTGTCCGTGTGTTCCAATGAGAGAGAGGAAG
GAGTGCCATTGTATGCTTTTCTTAACCTCTGATAATGATTTGCTGGAAAAGATCAGACGATTACATCGGATGAAAT
AAAAGAACTACAGCTAACATG

[0105] (2) 编码TrxY2的第59位-第167位的氨基酸的基因 (终止密码子:TAG) (序列号2)

[0106] ATGGCAGCAAAGAAGCAAACCTTCAACTCTTTTGATGATTTGTTGCAG

[0107] AACTCTGATAAACCTGTACTTGTAGACTTCTATGCTACTTGGTGTGGTC

[0108] CATGTCAGCTTATGGTACCTATACTCAATGAAGTGAGTGAAACACTGA

[0109] AAGATATAATTGCAGTTGTGAAAATTGATACTGAGAAGTACCCAAGTC

[0110] TTGCTAACAAATACCAGATTGAGGCTTTGCCACATTCATCTTATTCAA

[0111] AGACGGCAAACCTCTGGGACCGTTTCGAGGGTGCCTTGCCAGCGAACCA

[0112] ACTCGTTGAGCGTATTGAGAATTCTTTGCAAGTGAAACAGTAG

[0113] (3) 编码连接子肽的基因 (序列号3~5)

[0114] (GGGS)₁:ggcggcggcggcagc (序列号3)

[0115] (GGGS)₂:ggcggcggcggcagcggcggcggcggcagc (序列号4)

[0116] (GGGS)₃:ggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagc (序列号5)

[0117] (4) 编码FTRA2的第73位-第184位的氨基酸的基因 (序列号6) ATGGATATTGCTGTGAA
ATCGGCGGCTTCTGTAGACGCGGACGCTGATCTATCGTCATCTACGTCGTTGGAGACGGAGGAAGACGAGAAAGCGA
AGGAGAAGATTGGAGCTAGGGTTAGGGTTACGGTTCCGTTGAAAGTTTACCATGTGGTTTCGTGTACCGGAGGTTGAA
TTGATGGGAATGGAAGGTTTTATCAAAGATTACGTCGTTCTTTGAAAGGAAAGAAAATCTCAGCTAATCTGCCGTT
TAAGGTACAGTTCGTGAAAGAGATCGAAGGTCGTGGTCCTGTCAAATTCCTCACGCATCTTAAGGAAGACGAGTTTCG
AGTTAATTGATCCG

[0118] (5) 编码组氨酸标签 (His-Tag) 的基因 (终止密码子:TGA) (序列号7)

[0119] CACCACCACCACCACCTGA

[0120] 接着,将制作的表达载体组装于大肠杆菌BL21 (DE3) (NIPPON GENE株式会社制),将该大肠杆菌在LB培养基中37℃下预培养一晚。将预培养的大肠杆菌适量接种到MagicMedia E.coli Expression Medium(Invitrogen公司)中,在16℃下培养一晚。通过离心操作集菌,在菌体内使融合蛋白表达。图9为融合蛋白的概念图,图10为表示氨基酸序列的图。

[0121] 图9的(a)为表示FTRB和TrxY2的融合蛋白的概念图,图9的(b)为表示FTRA2和组氨酸标签的融合蛋白的概念图。另外,图10的(a)表示FTRB和TrxY2的融合蛋白的氨基酸序列,下划线部表示连接子肽的序列。另外,图10的(b)为表示FTRA2和组氨酸标签的融合蛋白的氨基酸序列的图,下划线部表示组氨酸标签的序列。

[0122] 使大肠杆菌悬浮在xTractor Buffer(Clontech)中,在10分钟、4℃下,使用旋转器孵育。在12000×g、4℃下进行20分钟离心操作,将细胞片除去。表达的融合蛋白使用Ni²⁺亲

和色谱法从离心操作后的上清液中精制。

[0123] [还原酶活性评价]

[0124] [实施例2]

[0125] 对于实施例1中精制得到的融合蛋白的酶活性,按照以下的公知方法考察。还原酶活性评价法如下所述。

[0126] 在包含氧化型的过敏原性蛋白的试样中混合1.0mM还原型烟酰胺二核苷酸磷酸(NADPH)、0.2 μ M铁氧还蛋白:NADPH还原酶、1 μ M铁氧还蛋白、1 μ M的本公开的融合蛋白,制备酶反应液,在37℃下孵育1小时。然后,加入10mM 4-乙酰氨基-4'-马来酰亚胺基-二苯乙烯-2,2'-二磺酸盐(AMS),在37℃下孵育1小时后,供于SDS-PAGE。AMS为与硫醇基特异地结合的低分子化合物,就接受了氧化性修饰的蛋白和未接受修饰的蛋白而言,所结合的AMS的数不同,能够将该数的差异作为SDS-PAGE的迁移率的差异进行检测。

[0127] 图11为用于比较例1、比较例2和实施例1的还原酶活性评价的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)像。过敏原性蛋白使用了 β 乳球蛋白。

[0128] 图11的(b)为用经由实施例1的序列号5所示的氨基酸残基为15个的连接子肽(GGGGS)₃融合而成的融合蛋白将 β 乳球蛋白还原时的电泳图像。图11的(c)为用经由实施例1的序列号4所示的氨基酸残基为10个的连接子肽(GGGGS)₂融合而成的融合蛋白将 β 乳球蛋白还原时的电泳图像。图11的(d)为用经由实施例1的序列号3所示的氨基酸残基为5个的连接子肽(GGGGS)₁融合而成的融合蛋白将 β 乳球蛋白还原时的电泳图像。图11的(b)~(d)均检测出过敏原性蛋白的还原型,确认了还原酶活性。其中,启示将氨基酸残基为10个(图11的(c))或15个(图11的(b))的连接子肽用于融合蛋白的制作时,过敏原性蛋白的还原酶活性优异。

[0129] [比较例1]

[0130] 在比较例1中,除了使用了从上述的酶反应液中将融合蛋白除去而得到的溶液这点以外,与实施例2同样地进行。这种情况下,如图11的(a)所示,没有检测出过敏原性蛋白的还原型,没有确认到还原酶活性。

[0131] [比较例2]

[0132] 在比较例2中,除了代替融合蛋白而将FTRB和TrxY2单独地添加到酶反应液中这点以外,与实施例2同样地进行。这种情况下,如图11的(e)所示,检测出过敏原性蛋白的还原型,确认了还原酶活性。

[0133] [使用了固定化有融合蛋白的电极的过敏原性蛋白的分解能力评价]

[0134] 在上述的还原酶活性中,将实施例1中制作的融合蛋白添加到酶反应溶液中。以下,使用固定化有实施例1中制作的融合蛋白的电极,评价了氧化型的过敏原性蛋白的分解能力。

[0135] (1) 包含靶分子的试样的制备

[0136] 过敏原性蛋白使用了 β -乳球蛋白。包含过敏原性蛋白的试样(以下称为样品溶液)通过将 β -乳球蛋白溶解于pH7.4的磷酸缓冲生理食盐水(PBS)中而制备成3.3mg/mL。

[0137] (2) 使用了电极的靶分子的还原

[0138] 使用三电极方式的电压施加电池(例如图2的电压施加部10)和恒电位仪(例如图2的电源20),对试样在低温下施加了规定的电压8小时。三电极中,阴极电极1使用了固定化

有实施例1中制作的融合蛋白的电极,参比电极2使用了Ag/AgCl电极,对电极3使用了铂(Pt)电极。对包含过敏原性蛋白的试样施加的规定的电压以相对于参比电极2的阴极电极1的电位成为电子介体的还原电位的方式采用恒电位仪进行控制。对于电极,使用碳数为4的烷基链作为第一连接子,将电子传送体(例如甲基紫精)固定化在电极上,使用碳数为10的烷基链作为第二连接子,将融合蛋白(更具体地,将铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白通过连接子肽键合而成的融合蛋白)固定化在电极上。

[0139] (3) 靶分子的还原状态的确认

[0140] 为了确认过敏原性蛋白(在此为 β -乳球蛋白)已被还原,使电压施加后的试样与消化酶在37℃下反应1小时后,进行了SDS-PAGE。其次,将电泳后的凝胶染色,通过图像解析,将过敏原性蛋白的条带的深浅度数值化。将电泳图像示于图12。其中,作为对照样品,使用未固定化有融合蛋白的普通的电极(阴极电极),对试样在低温下施加了8小时规定的电压后,将用消化酶处理试样得到的产物供于SDS-PAGE,将该数值设为过敏原性蛋白的残留率100%。

[0141] 图12为表示实施例3、实施例4、比较例3和比较例4的SDS-PAGE后的电泳图像的图。在图12中,表示通过相对于对照样品中的过敏原性蛋白的残留率的比例计算算出的过敏原性蛋白的残留率。图12的(a)为分子量标记物的电泳图像,图12的(b)为对照样品的电泳图像。另外,图13为表示过敏原性蛋白的分解率的计算结果的图。图13的(b)为表示对照样品中的过敏原性蛋白的分解率的柱状图。对照样品中的过敏原性蛋白的分解率为0%。

[0142] [实施例3]

[0143] 在实施例3中,采用上述的[3.电极的制造方法]中记载的方法制作在电极(图2的阴极电极1)表面固定化有经由实施例1的序列号5所示的氨基酸残基为15个的连接子肽(GGGGS)₃融合而成的融合蛋白的电极,并使用该电极。将结果示于图12的(c)。图12的(c)为实施例3的电泳图像。另外,图13的(c)为表示实施例3的过敏原性蛋白的分解率的柱状图。在实施例3中,确认了过敏原性蛋白的残留率为44%,分解率为56%。

[0144] [实施例4]

[0145] 除了使用了经由实施例1的序列号4所示的氨基酸残基为10个的连接子肽(GGGGS)₂融合而成的融合蛋白这点以外,与实施例3同样地进行。将结果示于图12的(d)。图12的(d)为实施例4的电泳图像。另外,图13的(d)为表示实施例4的过敏原性蛋白的分解率的柱状图。实施例4中,确认了过敏原性蛋白的残留率为42%,分解率为58%。

[0146] [比较例3]

[0147] 在比较例3中,除了使用了经由实施例1的序列号3所示的氨基酸残基为5个的连接子肽(GGGGS)₁融合而成的融合蛋白这点以外,与实施例3同样地进行。将结果示于图12的(e)。图12的(e)为比较例3的电泳图像。另外,图13的(e)为表示比较例3的过敏原性蛋白的分解率的柱状图。比较例3中,确认了过敏原性蛋白的残留率为71%,分解率为29%。

[0148] [比较例4]

[0149] 在比较例4中,除了使用了普通的电极这点和在试样中单独添加铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白这点以外,与实施例3同样地进行。将结果示于图12的(f)。图12的(f)为比较例4的电泳图像。另外,图13的(f)为表示比较例4的过敏原性蛋白的分解率的柱状图。在比较例4中,确认了过敏原性蛋白的残留率为58%,分解率为42%。

[0150] (结果)

[0151] 由实施例2、实施例3、实施例4和比较例3的结果(参照图11、图12)确认了:融合蛋白中的连接子肽的氨基酸残基比5个多时,过敏原性蛋白的分解率提高。认为这是因为,通过该连接子肽键合的铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白的自由度提高。

[0152] 另外,由实施例3、实施例4、比较例3和比较例4的结果(参照图12、图13)确认了:将包含氨基酸残基比5个多的连接子肽的融合蛋白固定化在电极上时,与在试样中单独添加铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白相比,过敏原性蛋白的分解率提高。因此确认了,通过使用本公开的电极,能够将作为靶分子的过敏原性蛋白的二硫键高效率地还原,因此能够将过敏原性蛋白高效率地分解。

[0153] (其他实施方式)

[0154] 以上对于本公开的酶固定电极、酶固定电极的制造方法和靶分子的氧化还原方法基于实施方式进行了说明,但本公开并不限于这些实施方式。只要不脱离本公开的主旨,将本领域技术人员能想到的各种变形施用于实施方式而得到的实施方式、将实施方式中的一部分构成要素组合而构建的其他实施方式也包含在本公开的范围。

[0155] 产业上的可利用性

[0156] 本公开例如能够用作可连续地将过敏原性蛋白还原使其灭活的融合蛋白、融合蛋白的制造方法、电极、氧化还原装置、氧化还原方法、二硫键的切断方法和过敏原的灭活方法。

[0157] 附图标记的说明

[0158] 1阴极电极

[0159] 2参比电极

[0160] 3对电极

[0161] 4电池

[0162] 5盖部

[0163] 6a 端子

[0164] 6b 端子

[0165] 6c 端子

[0166] 7a 引线

[0167] 7b 引线

[0168] 7c 引线

[0169] 8搅拌子

[0170] 9试样

[0171] 10 电压施加部

[0172] 11 玻璃基板

[0173] 12 钛蒸镀层

[0174] 13 阴极基板

[0175] 14 反应层

[0176] 20 电源

[0177] 30 控制部

[0178] 40 搅拌部

[0179] 100 氧化还原装置

序 列 表

<110> 松下知识产权经营株式会社

<120> 融合蛋白、融合蛋白的制造方法、电极、氧化还原装置、氧化还原方法、二硫键的切断方法和过敏原的灭活方法

<130> P1039383WO01

<150> JP 2021-104343

<151> 2021-06-23

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> 编码FTRB的第32位-第146位的氨基酸的基因

<400> 1

atggcgaaaa cggaaccgtc ggagaaatca gtagagatta tgaggaaatt ctccgagcaa 60

tatgctcgtc gctctgggac ttacttctgt gttgataaag gagttacttc agtcgttatt 120

aagggtttgg ctgagcataa agattcatat ggtgcaccgc ttggcccttg cagacactat 180

gatgataaag ctgctgaggt tggacaaggc ttttgaatt gtccgtgtgt tccaatgaga 240

gagaggaagg agtgccattg tatgcttttc ttaactctg ataatgattt cgctggaaaa 300

gatcagacga ttacatcgga tgaaataaaa gaaactacag ctaacatg 348

<210> 2

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

	<223> 编码TrxY2的第59位-第167位的氨基酸的基因	
	<400> 2	
	atggcagcaa agaagcaaac ttcaactct ttgatgatt tgttcagaa ctctgataaa	60
	cctgtacttg tagacttcta tgctacttg tgtggtccat gtcagcttat ggtacctata	120
	ctcaatgaag tgagtgaaac actgaaagat ataattgcag ttgtgaaaat tgatactgag	180
	aagtacccaa gtcttgctaa caaataccag attgaggctt tgccacatt catcttattc	240
	aaagacggca aactctggga ccgttcgag ggtgccttgc cagcgaacca actcgttgag	300
	cgtattgaga attctttgca agtgaaacag tag	333
	<210> 3	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0002]	<220>	
	<223> 编码连接子肽(GGGGS)1的基因	
	<400> 3	
	ggcggcggcg gcagc	15
	<210> 4	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码连接子肽(GGGGS)2的基因	
	<400> 4	
	ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc	30
	<210> 5	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 编码连接子肽(GGGGS)3的基因		
	<400> 5		
	ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagc	45	
	<210> 6		
	<211> 339		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 编码FTRA2的第73位-第184位的氨基酸的基因		
	<400> 6		
	atggatattg ctgtgaaatc ggcggttct gtagacgcgg acgtgatct atcgtcatct	60	
	acgtcgttgg agacggagga agacgagaaa gcgaaggaga agattggagc tagggtagg	120	
[0003]	gttacggttc cgttgaaagt ttacatgtg gttcgtgtac cggaggttga attgatggga	180	
	atggaagggt ttatcaaaga ttacgtcgtt ctttgaaag gaaagaaaat ctacgcta	240	
	ctgccgttta aggtacagtt cgtgaaagag atcgaaggtc gtggtcctgt caaattcttc	300	
	acgcatctta aggaagacga gttcgagtta attgatccg	339	
	<210> 7		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 编码组氨酸标签 (His-Tag) 的基因		
	<400> 7		
	caccaccacc accaccactg a	21	

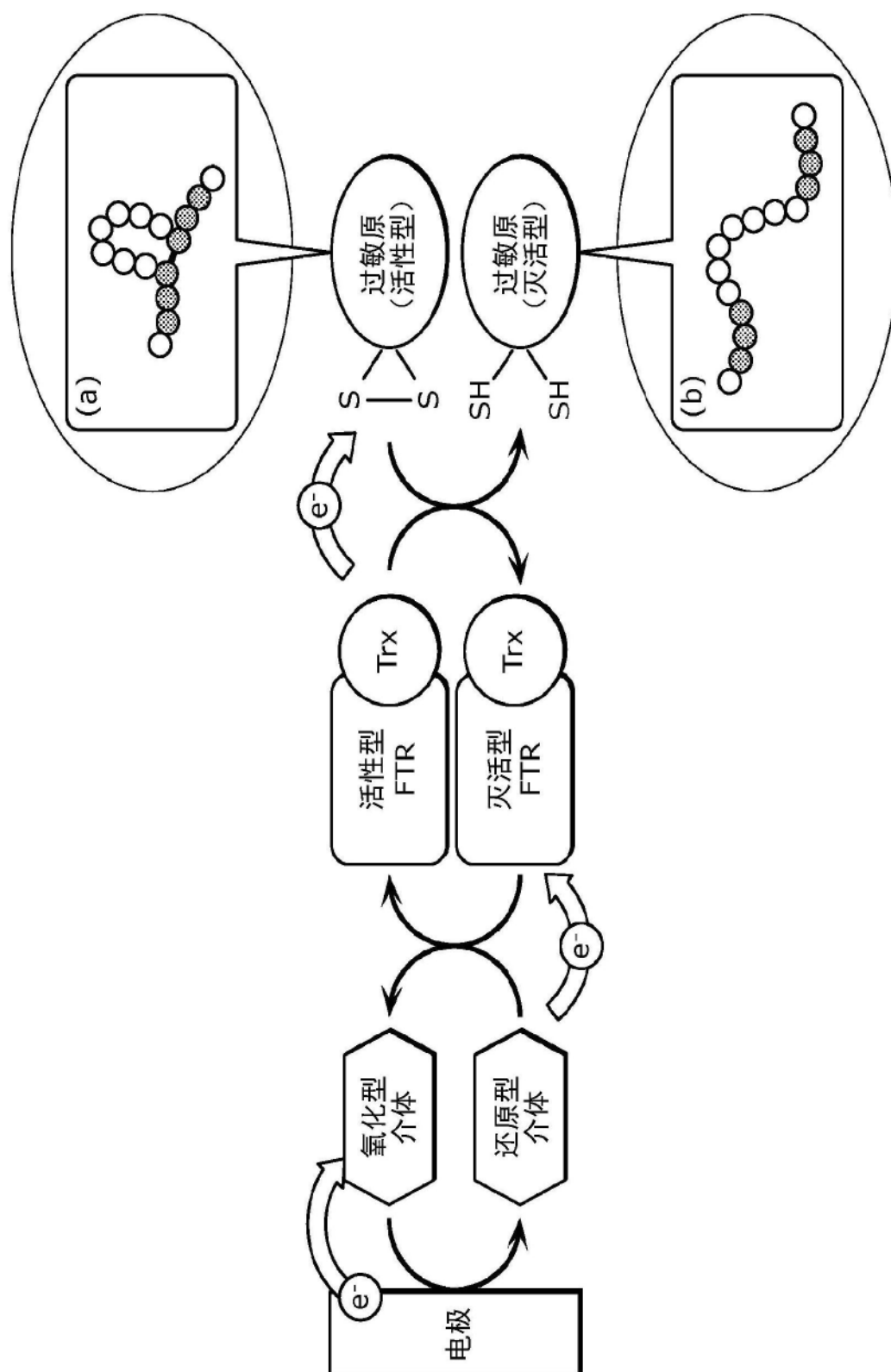


图1

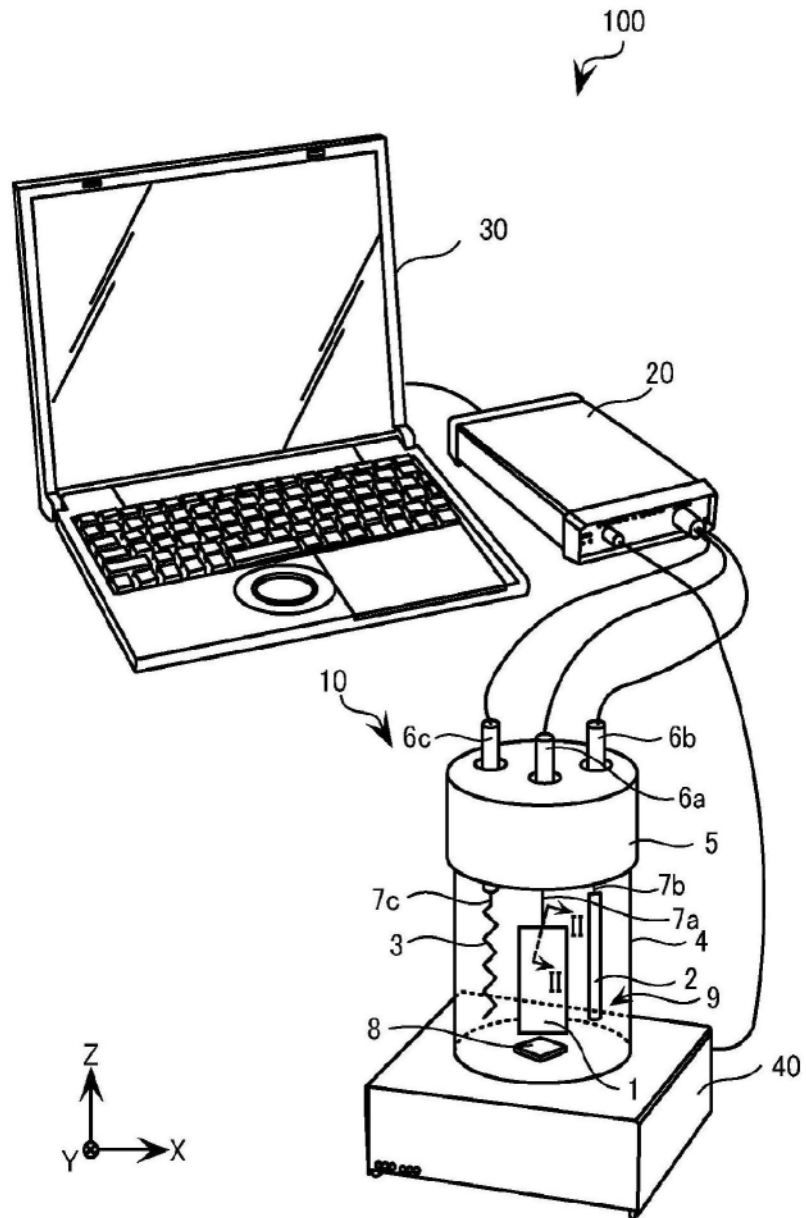


图2

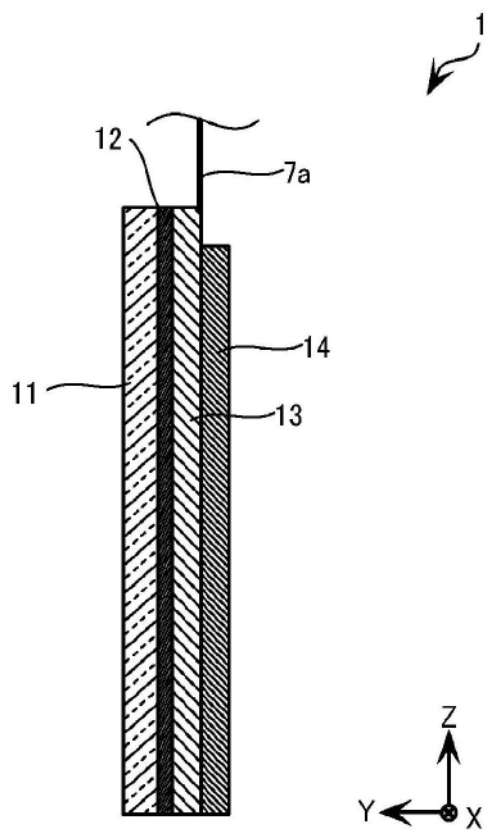


图3

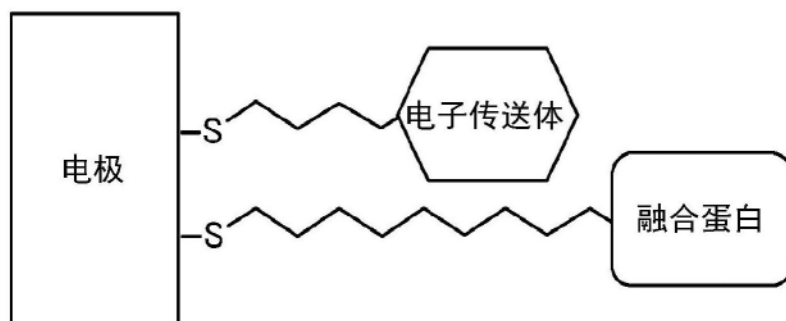


图4

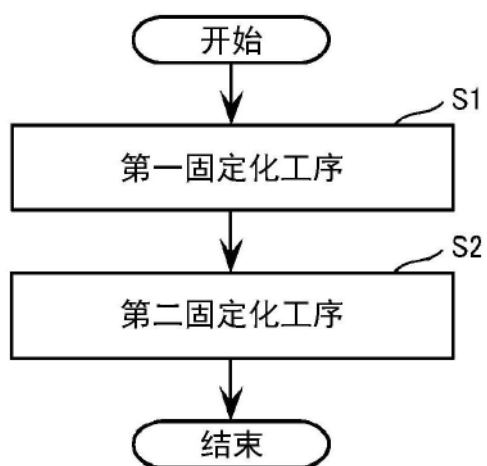


图5

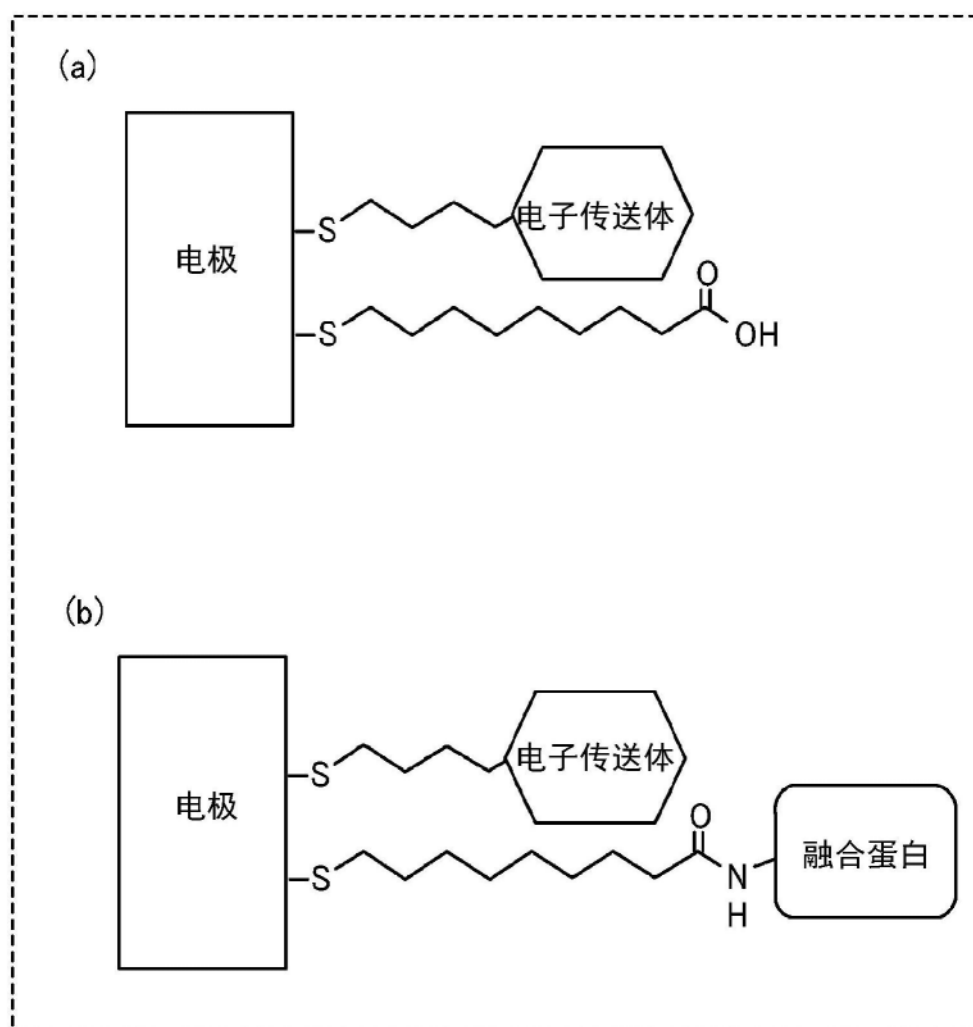


图6

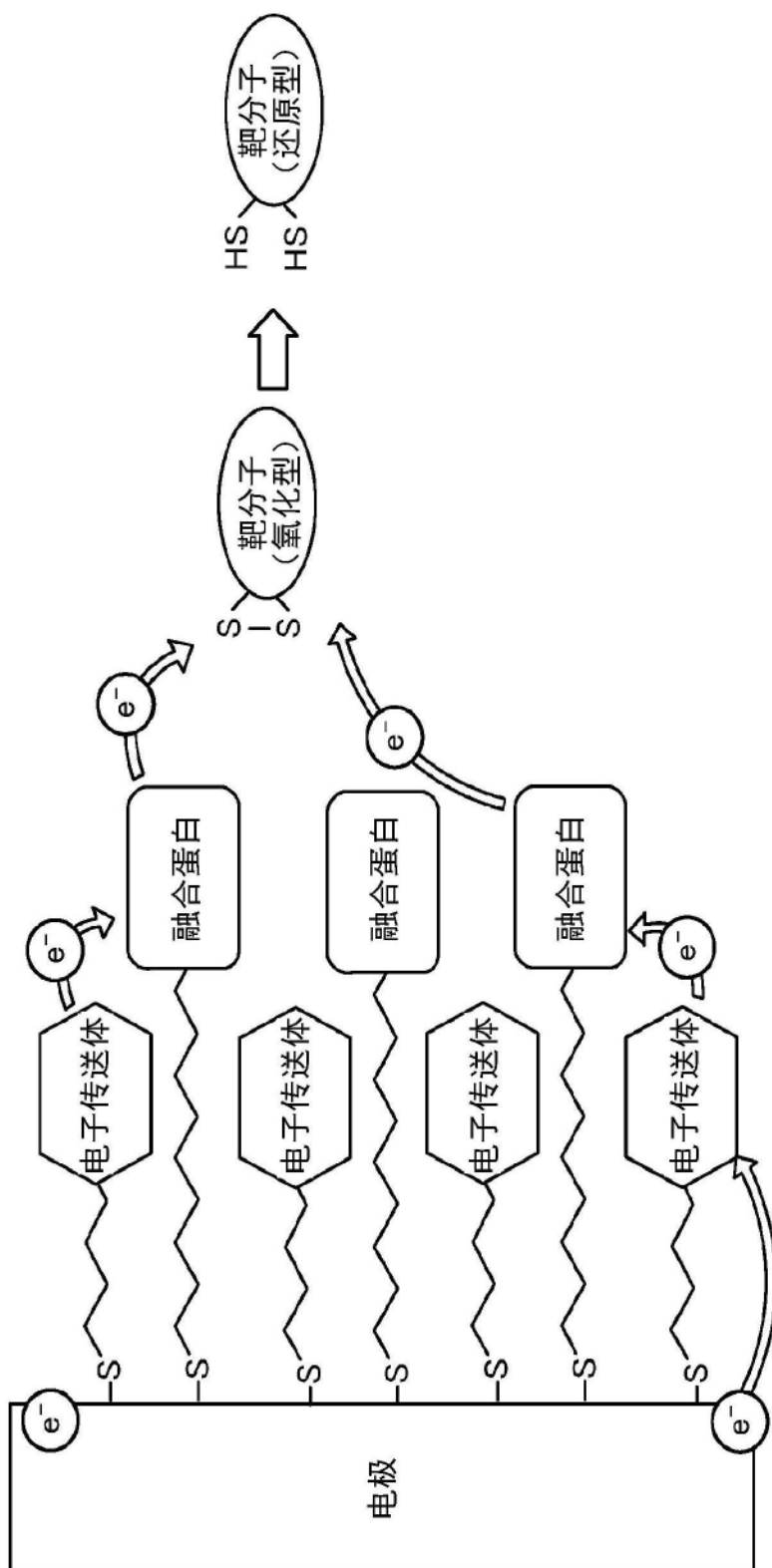


图7

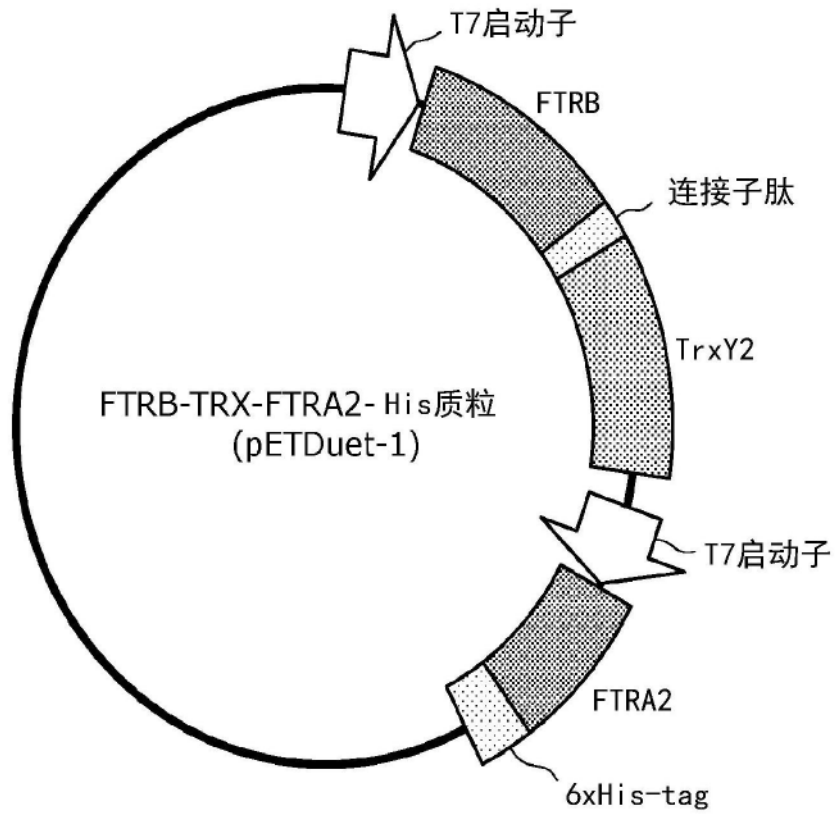


图8

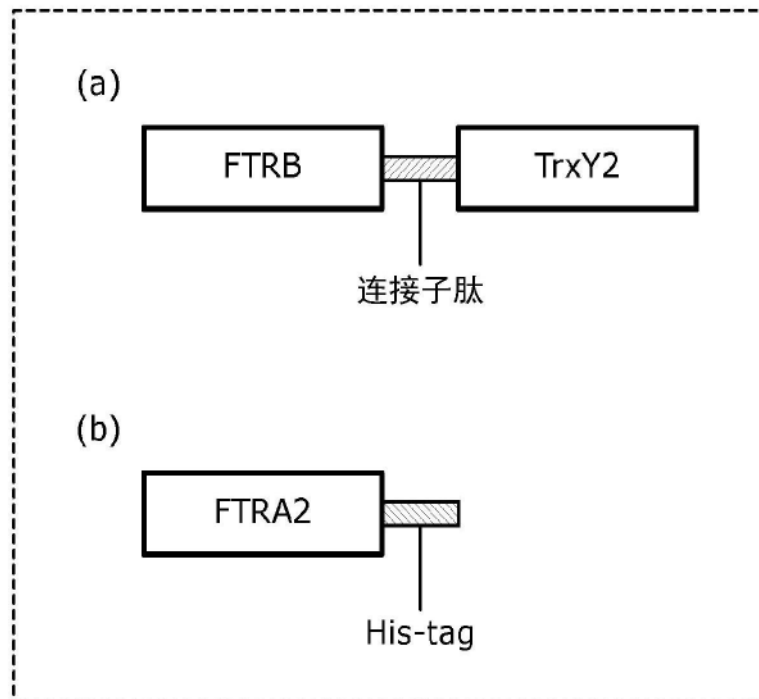


图9

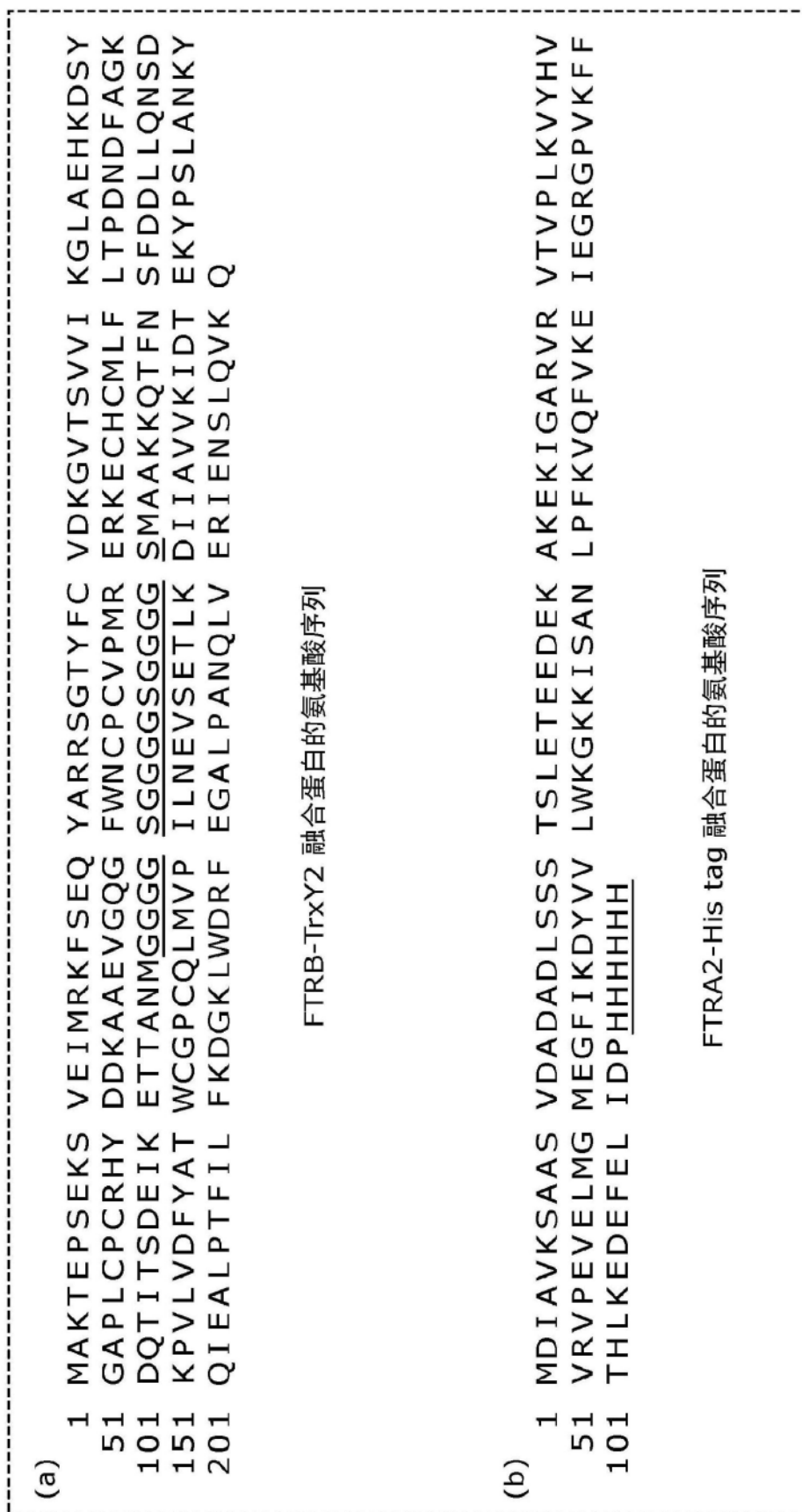


图10

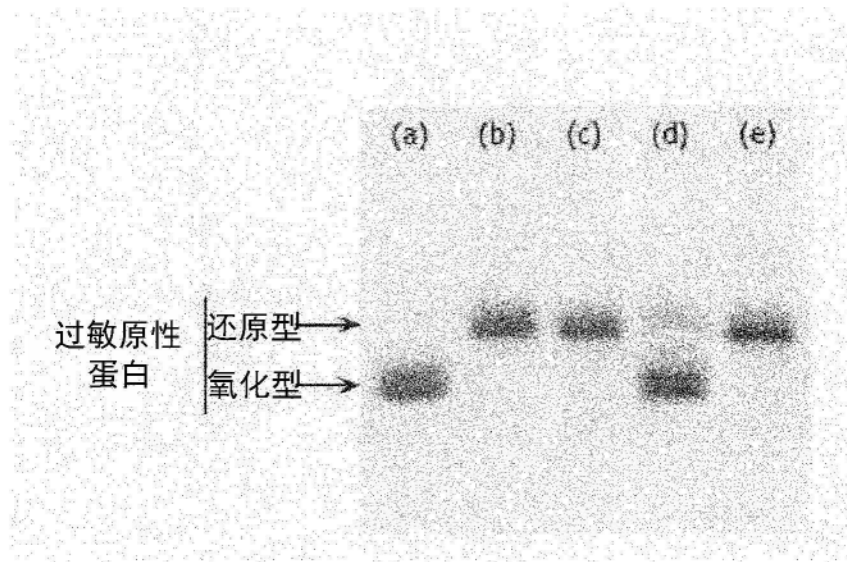


图11

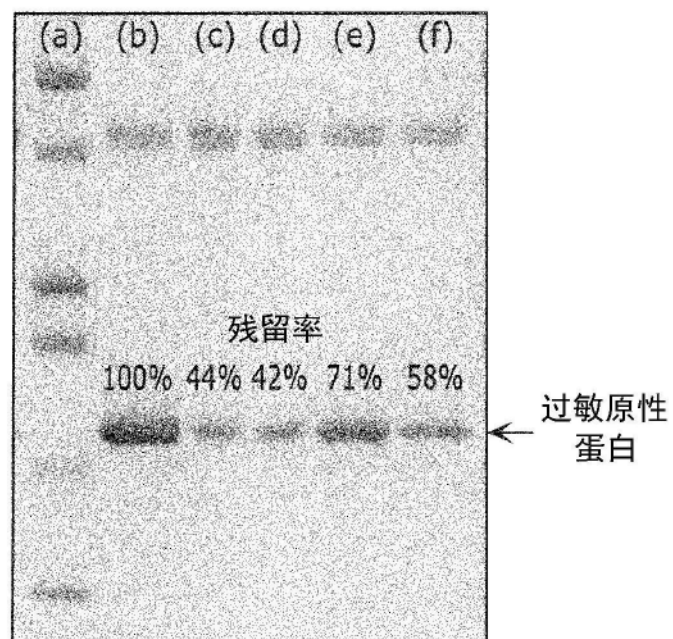


图12

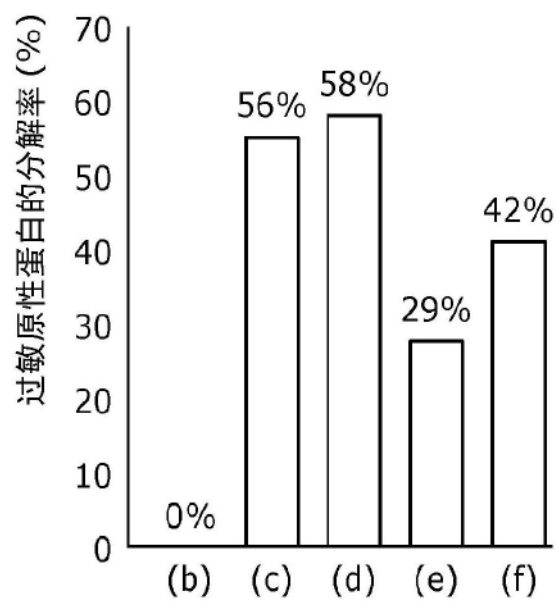


图13