



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102575278 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201080033796. 0

C12Q 1/26 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 02

G01N 33/72 (2006. 01)

(30) 优先权数据

09009968. 0 2009. 08. 03 EP

(56) 对比文件

EP 1291416A1 , 2003. 03. 12, 全文 .

CN 1823166A , 2006. 08. 23, 全文 .

EP 2020439A1 , 2009. 02. 04, 全文 .

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 01. 30

审查员 程婷

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/004707 2010. 08. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/015325 EN 2011. 02. 10

(73) 专利权人 霍夫曼—拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

专利权人 究极酵素国际股份有限公司

(72) 发明人 K. 索德 K. 伊克布库罗

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 权陆军 郭文洁

(51) Int. Cl.

C12Q 1/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

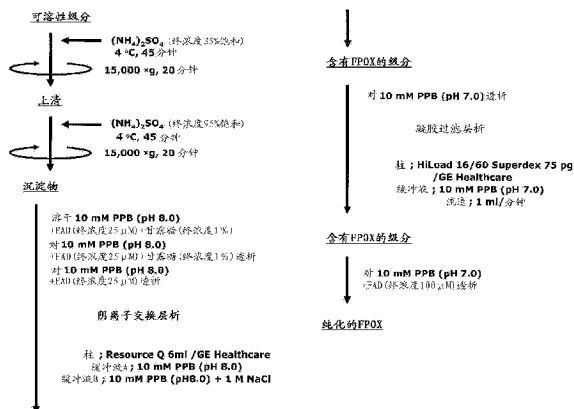
序列表4页 附图8页

(54) 发明名称

果糖基肽基氧化酶和用于测定糖化蛋白质的传感器

(57) 摘要

公开了来源于芽殖酵母小麦颖枯病菌 (*Phaeosphaerianodorum*) 的果糖基肽基氧化酶用于测定样品中的糖化蛋白质的用途。本发明的果糖基肽基氧化酶具有对果糖基缬氨酸以及果糖基缬氨酰组氨酸的较高的活性, 并以较高的灵敏度和特异性用于测定 HbA1c。还公开了包含这种酶的电极传感器。



1. 果糖基肽基氧化酶用于测定样品中的糖化蛋白质的用途,所述果糖基肽基氧化酶由 SEQ ID NO:1 所述的氨基酸序列组成并对果糖基缬氨酰组氨酸具有 1mM 或更低的 K_m 值。

2. 果糖基肽基氧化酶用于测定样品中的糖化蛋白质的用途,所述果糖基肽基氧化酶由 SEQ ID NO:1 中所述的氨基酸序列组成并对果糖基缬氨酰组氨酸具有 10U/mg • mM 或更高的 V_{max}/K_m 值。

3. 果糖基肽基氧化酶用于测定样品中的糖化蛋白质的用途,所述果糖基肽基氧化酶由 SEQ ID NO:1 中所述的氨基酸序列组成并且当在 50°C 热处理 10 分钟时具有 50% 或更高的残留活性。

4. 在权利要求 1-3 的任一项中定义的果糖基肽基氧化酶在制备用于测定样品中的糖化蛋白质的方法的试剂盒中的用途,所述方法包括使所述样品接触如在权利要求 1-3 的任一项中定义的果糖基肽基氧化酶,并测量被所述果糖基肽基氧化酶氧化的糖化蛋白质的量。

5. 在权利要求 1-3 的任一项中定义的果糖基肽基氧化酶在制备用于测定 HbA1c 的方法的试剂盒中的用途,所述方法包括消化样品中的 HbA1c 以产生果糖基缬氨酸或果糖基缬氨酰组氨酸,使所述果糖基缬氨酸或果糖基缬氨酰组氨酸接触如在权利要求 1-3 的任一项中定义的果糖基肽基氧化酶,并测量被氧化的果糖基缬氨酸或果糖基缬氨酰组氨酸的量。

6. 一种用于测定样品中果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸、果糖基六肽或 HbA1c 的装置,所述装置为生物传感器检测条,其具有放置在绝缘基质上的工作电极和参考电极或对电极、试剂端口和样品接收器,所述试剂端口包含如在权利要求 1-3 的任一项中定义的果糖基肽基氧化酶和电子转移介质。

7. 如权利要求 6 中要求保护的装置,其中所述电子转移介质是 N,N-双羟乙基-4-亚硝基苯胺。

8. 如权利要求 6 或 7 中要求保护的装置,其还包含一种或多种选自皂苷、胆红素氧化酶和蛋白酶 N 的试剂。

9. 一种用于测定样品中果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸、果糖基六肽或 HbA1c 的试剂盒,其包含如在权利要求 1-3 的任一项中定义的果糖基肽基氧化酶和电子转移介质。

10. 如权利要求 9 中要求保护的试剂盒,其中所述电子转移介质是 N,N-双羟乙基-4-亚硝基苯胺。

11. 如权利要求 9 或 10 中要求保护的试剂盒,其还包含一种或多种选自皂苷、胆红素氧化酶和蛋白酶 N 的试剂。

12. 一种酶电极,其具有固定在电极上的如在权利要求 1-3 的任一项中定义的果糖基肽基氧化酶。

13. 如权利要求 12 中要求保护的酶电极,其中使用具有叠氮化物单元侧基的水溶性光聚合物(AWP)将果糖基肽基氧化酶固定在电极上。

14. 如权利要求 12 或 13 中要求保护的酶电极,其还包含固定在电极上的 N,N-双羟乙基-4-亚硝基苯胺。

15. 一种用于测定果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸、果糖基六肽或 HbA1c 的酶传感器,其包含权利要求 12-14 中任一项的酶电极作为工作电极。

果糖基肽基氧化酶和用于测定糖化蛋白质的传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及新的果糖基肽基氧化酶 (FPOX)。更具体地,本发明涉及在用于测量糖化蛋白质(glycated proteins),例如糖化白蛋白、果糖胺、HbA1c、果糖基六肽、果糖基缬氨酸和果糖基缬氨酰组氨酸的试剂盒和传感器中使用的果糖基肽基氧化酶。

背景技术

[0002] 糖化的蛋白质通过蛋白质上的氨基和糖的还原端之间的共价键非酶促地产生,并又被称作 Amadori 化合物。在血液中,葡萄糖在血红蛋白 β 链的 N 端结合缬氨酸,从而产生糖化的血红蛋白(糖化血红蛋白(glycohemoglobin);HbA1c)。与正常的健康个体相比,在患有糖尿病的患者中 HbA1c 与血红蛋白(Hb)的丰度比值较高,且已知血液中的 HbA1c 浓度反映了在过去几周内的血糖水平。因此血液中的 HbA1c 浓度在诊断糖尿病的临床检测和患有糖尿病的患者血糖控制中非常重要。可使用对果糖基缬氨酸具有特异性的酶测量血液中的 HbA1c 浓度。

[0003] 果糖基氨基酸氧化酶是 FAD 依赖性酶,其催化下述反应,其中果糖基氨基酸被氧化,从而生成 2-酮基-D-葡萄糖和相应的氨基酸。已经从多种生物中分离出果糖基氨基酸氧化酶,且已表明可使用这样的酶分析糖化蛋白质,例如糖化白蛋白、HbA1c 和果糖胺。

[0004] 为了以高特异性测定 HbA1c,果糖基氨基酸氧化酶优选地具有对果糖基缬氨酸的选择性(相比果糖基赖氨酸)。更优选地,果糖基氨基酸氧化酶可具有对果糖基缬氨酰组氨酸的氧化酶活性,果糖基缬氨酰组氨酸对应于 Hb 的 N 端的 2 个氨基酸。Hirokawa 等人(Biochem Biophys Res Commun, 311(1), 2003, 104-111)公开了来源于 Achaetomiella 和 Chaetomius 属的丝状细菌的果糖基肽基氧化酶。

[0005] 本发明的目的是提供用于测量糖化蛋白质的新的果糖基肽基氧化酶。

发明内容

[0006] 本发明是基于具有图 1 所示的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 的来源于小麦颖枯病菌 (*Phaeosphaeria nodorum*) 的果糖基肽基氧化酶的发现。在一个方面,本发明提供了包含与 SEQ ID NO:1 中所述的氨基酸序列具有至少 70% 同一性的氨基酸序列并对果糖基缬氨酰组氨酸具有 1mM 或更低的 K_m 值的果糖基肽基氧化酶用于测定样品中的糖化蛋白质的用途。本发明还提供了包含与 SEQ ID NO:1 中所述的氨基酸序列具有至少 70% 同一性的氨基酸序列并对果糖基缬氨酰组氨酸具有 10U/mg \cdot mM 或更高的 V_{max}/K_m 值的果糖基肽基氧化酶用于测定样品中的糖化蛋白质的用途。本发明还提供了包含与 SEQ ID NO:1 中所述的氨基酸序列具有至少 70% 同一性的氨基酸序列并且当在 50°C 热处理 10 分钟时具有 50% 或更高的残留活性的果糖基肽基氧化酶用于测定样品中的糖化蛋白质的用途。

[0007] 在另一个方面,本发明提供了测定样品中的糖化蛋白质的方法,其包括使样品接触如上定义的果糖基肽基氧化酶,并测量被果糖基肽基氧化酶氧化的糖化蛋白质的量。

[0008] 在还另一个方面,本发明提供了测定 HbA1c 的方法,其包括消化样品中的 HbA1c 以

产生果糖基缬氨酸或果糖基缬氨酰组氨酸,使果糖基缬氨酸或果糖基缬氨酰组氨酸接触如上定义的果糖基肽基氧化酶,并测量被氧化的果糖基缬氨酸或果糖基缬氨酰组氨酸的量。

[0009] 在还另一个方面,本发明提供了测定样品中果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸、果糖基六肽或 HbA1c 的装置,其包含如上定义的果糖基肽基氧化酶和电子转移介质。优选地,电子转移介质是 N,N-双羟乙基-4-亚硝基苯胺。也优选地,所述装置还包含一种或多种选自皂苷、胆红素氧化酶和蛋白酶 N 的试剂。

[0010] 在另一个方面,本发明提供了测定样品中果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸、果糖基六肽或 HbA1c 的试剂盒,其包含如上定义的果糖基肽基氧化酶和电子转移介质。

[0011] 在还另一个方面,本发明提供了酶电极,其具有固定在电极上的如上定义的果糖基肽基氧化酶。优选地,使用可光交联的聚乙烯醇树脂将果糖基肽基氧化酶固定在电极上。

[0012] 在还另一个方面,本发明提供了测定果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸、果糖基六肽或 HbA1c 的酶传感器,其包含本发明的酶电极作为工作电极。

附图说明

[0013] 图 1 显示了来自小麦颖枯病菌的果糖基肽基氧化酶的氨基酸序列。

[0014] 图 2 显示了果糖基肽基氧化酶的纯化步骤。

[0015] 图 3 显示了纯化的果糖基肽基氧化酶的 SV 曲线。

[0016] 图 4 显示了果糖基肽基氧化酶的热稳定性。

[0017] 图 5 显示了在 m-PMS/DCIP 系统中使用果糖基肽基氧化酶测量果糖基缬氨酸。

[0018] 图 6 显示了使用果糖基肽基氧化酶测量果糖基六肽。

[0019] 图 7 显示了使用果糖基肽基氧化酶测量 HbA1c。

[0020] 图 8 显示了在 H₂O₂ 系统中使用具有果糖基肽基氧化酶的电极测量果糖基缬氨酸。

[0021] 图 9 显示了在普鲁士蓝系统中使用具有果糖基肽基氧化酶的电极测量果糖基缬氨酸。

[0022] 图 10 显示了在亚硝基苯胺(NA)系统中使用具有果糖基肽基氧化酶的电极测量果糖基缬氨酸。

[0023] 图 11 显示了在 m-PMS 系统中使用具有果糖基肽基氧化酶的电极测量果糖基缬氨酸。

具体实施方式

[0024] 本发明的果糖基肽基氧化酶(PnFPOX)来源于小麦颖枯病菌,并具有图 1 中所示的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。在本发明中也可使用具有与 SEQ ID NO:1 中所述的氨基酸序列至少 80% 序列同一性的修饰的氨基酸序列的果糖基肽基氧化酶变体。优选地,序列同一性为至少 85%,更优选地至少 90%,和最优选地至少 95%。小麦颖枯病菌的基因组序列已被公开,但此基因还没有被注释。没有迹象或暗示显示小麦颖枯病菌具有果糖基肽基氧化酶或此基因可能编码任意种类的酶。

[0025] PnFPOX 的氨基酸序列显示了与 FPOX-E(土正青霉(*Eupenicillium terrenum*)ATCC 18547; GenBank: BAD00185.1) 的 71% 的同一性和与 FPOX-C(锥毛壳属物种(*Coniochaeta* sp.)NISL 9330; GenBank: BAD00186.1) 的 74% 的同一性。与其他已知果糖基氨基酸氧化

酶的序列同源性为约 30%。

[0026] 如在下面的实施例中所描述地，PnFPOX 显示了对果糖基缬氨酸的更高的活性（相比对果糖基赖氨酸）。其也显示了对果糖基缬氨酰组氨酸的甚至更高的活性。PnFPOX 对果糖基缬氨酰组氨酸的 K_m 值是 1mM 或更低，优选地 0.5mM 或更低，和更优选地 0.3mM 或更低，这比 FPOX-E 和 FPOX-C 的低约 10 倍。PnFPOX 对果糖基缬氨酰组氨酸的 V_{max}/K_m 值是 10U/mg · mM 或更高。此特征在使用此酶以更高的灵敏度和特异性测定 HbA1c 中特别有利。

[0027] 本发明的果糖基肽基氧化酶的另一个有利特征是其热稳定性。当在 10 mM PPB (pH 7.0) 中在 50°C 热处理 PnFPOX 10 分钟时，观察到约 75% 的残留活性。

[0028] 可使用本领域熟知的技术通过重组表达制备本发明的果糖基肽基氧化酶。PnFPOX 的核酸序列可见 GenBank: XP_001798711.1。可适当地修饰或设计序列，从而在选定的宿主生物中获得更好的表达水平。编码 PnFPOX 的多核苷酸可从小麦颖枯病菌中克隆，或使用一系列化学合成的寡核苷酸通过 PCR 制备，或使用自动化 DNA 合成仪完全合成。

[0029] 将编码 PnFPOX 的基因插入合适的表达载体，并将载体引入合适的宿主细胞，例如大肠杆菌。培养转化体，并从细胞或培养基中收集在转化体中表达的果糖基肽基氧化酶。

[0030] 这样得到的重组果糖基肽基氧化酶可通过本领域已知的任意纯化技术纯化，所述技术包括离子交换柱层析、亲和层析、液体层析、过滤、超滤、盐沉淀、溶剂沉淀、免疫沉淀、凝胶电泳、等电电泳和透析。

[0031] 本发明的果糖基肽基氧化酶在测定样品中的糖化蛋白质中 useful。测定方法包括使样品接触本发明的果糖基肽基氧化酶，并测量被果糖基肽基氧化酶氧化的糖化蛋白质的量。通过本发明测定的糖化蛋白质包括，例如，果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸、果糖基六肽、HbA1c、糖化白蛋白和果糖胺。在一个方面，本发明提供了测定 HbA1c 的方法，其包括消化样品中的 HbA1c 以产生果糖基缬氨酸，使果糖基缬氨酸接触本发明的果糖基肽基氧化酶，并测量被氧化的果糖基缬氨酸的量。可用蛋白酶 (proteinase) (例如蛋白酶 (protease) 和蛋白酶 N) 消化 HbA1c。在优选的实施方案中，所述方法包括用蛋白酶 N 消化样品中的 HbA1c 以产生果糖基缬氨酰组氨酸，使果糖基缬氨酰组氨酸接触本发明的果糖基肽基氧化酶，并测量被氧化的果糖基缬氨酰组氨酸的量。在另一个方面，本发明提供了通过内切蛋白酶 (endoprotease) Glu-C 消化 HbA1c 以产生果糖基六肽，并通过本发明的果糖基肽基氧化酶测定果糖基六肽来测定 HbA1c 的方法。现在令人惊讶地发现，来自小麦颖枯病菌的果糖基氨基酸氧化酶能够氧化果糖基六肽，而现有技术的 FPOX-C (锥毛壳属物种 NISL 9330; GenBank: BAD00186.1) 不能。

[0032] 可通过本领域已知的任意方法，例如使用 H_2O_2 检测试剂如 4AA/TODB/POD (4-氨基安替比林 /N,N-双(4-磺丁基)-3-甲基苯胺二钠盐 /辣根过氧化物酶) 或通过铂电极测量产生的 H_2O_2 的量来实现被果糖基肽基氧化酶氧化的糖化蛋白质的量的测量。可选地，可在电子介质的存在下进行测定，并使用例如 mPMS/DCIP (1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓甲基硫酸化物 /2,6-二氯靛酚)，cPES (三氟乙酸-1-(3-羧基-丙氧基)-5-乙基-吩嗪鎓，NA BM31_1144 (N,N-双(羟乙基)-3-甲氧基-亚硝基苯胺盐酸化物，NA BM31_1008 (N,N-二羟乙基-4-亚硝基苯胺) 和 N,N-4-二甲基-亚硝基苯胺测量转移至介质的电子的量。其中，特别优选 NA_BM31_1008。

[0033] 在另一个方面，本发明提供了测定样品中果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸、果

糖基六肽或 HbA1c 的装置,其包含本发明的果糖基肽基氧化酶。

[0034] 测定装置可具有与常规的、市售的用于监控血糖水平的测量电流的生物传感器检测条类似的结构。这样的装置的实例具有放置在绝缘基质上的 2 个电极(工作电极和参考电极或对电极)、试剂端口和样品接收器。试剂端口包含本发明的果糖基肽基氧化酶、FAD 和电子转移介质。当向样品接收器中加入例如血样的样品时,样品中包含的果糖胺将与果糖基肽基氧化酶反应从而产生电流,其指示样品中果糖胺的量。当使用全血作为样品时,装置还可包含用于溶血的试剂。特别优选的溶血试剂是皂苷。在另一个优选的实施方案中,装置还可包含胆红素氧化酶(BOD)以减少由全血样品中包含的还原性成分导致的传感器的背景电流。在另一个优选的实施方案中,装置还可包含蛋白酶 N 以实现果糖基缬氨酸或果糖基缬氨酰组氨酸从血液中的糖化白蛋白中的释放。皂苷、BOD 和蛋白酶 N 可被单独地固定在装置上,使得全血样品与皂苷接触以实现溶血,然后与 BOD 和蛋白酶 N 接触。适于测定酶底物的电化学传感器的一般实例是已知的,例如来自 WO 2004/113900 和 US 5,997,817。作为电化学传感器的替代选择,可使用光学检测技术。一般地,这样的光学装置是基于包含酶、电子转移介质和指示剂的试剂系统中发生的颜色变化。可使用荧光、吸收或减轻(emission)的测量定量颜色变化。适于测定酶底物的光学装置的一般实例是已知的,例如来自 US 7,008,799, US 6,036,919, 和 US 5,334,508。

[0035] 在还另一个方面,本发明提供了用于测定样品中果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸、果糖基六肽或 HbA1c 的试剂盒,其包含本发明的果糖基肽基氧化酶。

[0036] 可使用本发明的果糖基肽基氧化酶构建用于测量果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸或果糖基六肽的试剂盒。除了本发明的果糖基肽基氧化酶以外,试剂盒可包含测量所必需的缓冲液,合适的介质,用于制作校准曲线的果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸或果糖基六肽或其衍生物的标准品,和使用说明书。试剂盒也可包含内切蛋白酶 Glu-C,用于消化 HbA1c 以产生果糖基六肽。可以多种形式提供本发明的果糖基肽基氧化酶,例如作为冻干试剂或作为在合适的储存溶液中的溶液。

[0037] 也有可能使用本发明的果糖基肽基氧化酶构建果糖胺、糖化白蛋白或 HbA1c 测定试剂盒。酶促或化学消化果糖胺、糖化白蛋白或 HbA1c,从而产生果糖胺化合物例如糖基缬氨酸或果糖基缬氨酰组氨酸,其然后通过使用本发明的果糖基肽基氧化酶被定量。因此,用于果糖胺、糖化白蛋白或 HbA1c 的本发明的测定试剂盒可还包含用于水解的试剂或蛋白酶。优选的蛋白酶是蛋白酶 N,其将消化 HbA1c 以产生果糖基缬氨酰组氨酸。

[0038] 在另一个方面,本发明提供了具有固定在电极上的本发明的果糖基肽基氧化酶的酶电极。在优选的实施方案中,使用聚合物将本发明的果糖基氨基酸氧化酶固定在电极上,以避免 BOD 和蛋白酶 N 与果糖基氨基酸氧化酶和介质接触。否则,BOD 将干扰介质的氧化还原性能,且蛋白酶 N 将降解果糖基氨基酸氧化酶。优选的聚合物是可光交联的聚乙烯醇树脂,例如由 Toyo Gosei 有限公司(Chiba, Japan)提供的具有叠氮化物单元侧基的(azide-unit pendant)水溶性光聚合物(AWP)。为了构建酶电极,向电极表面应用包含 AWP、果糖基氨基酸氧化酶和介质如 NA_BM31_1008 的缓冲溶液。在干燥溶液后,辐射紫外光以实现聚合物的交联。

[0039] 在另一个方面,本发明提供了用于测定果糖基缬氨酸、果糖基缬氨酰组氨酸、果糖基六肽或 HbA1c 的酶传感器,其包含本发明的酶电极作为工作电极。

[0040] 可通过测量通过酶反应产生的电子的量测定样品中果糖胺的浓度。本发明的果糖基肽基氧化酶被固定在电极,例如碳电极、金属电极和铂电极上。可通过交联、封装进大分子基质、用透析膜覆盖、光交联聚合物、导电聚合物、氧化还原聚合物或本领域技术人员熟知的其它方法和任意其组合固定酶。

[0041] 当在测量电流的系统中进行测量时,使用具有固定的 PnFPOX 的碳电极、金电极或铂电极作为工作电极,同时使用对电极(例如铂电极)和参考电极(例如 Ag/AgCl 电极)。将电极插入包含介质的缓冲液并维持在预定的温度下。对工作电极应用预定的电压,然后加入样品并测量电流的增加值。在测定中使用的介质的实例包括铁氰化钾、二茂铁、钒衍生物、钨衍生物、吩嗪甲基硫酸化物等等。一般也可能使用所谓的双电极系统,其具有一个工作电极和一个对电极或假参考电极。

[0042] 为了制造用于测量果糖胺、糖化白蛋白或 HbA1c 的传感器,将上述用于测量果糖基缬氨酸或果糖基缬氨酰组氨酸的传感器进一步与包含固定的蛋白酶(如蛋白酶 N 或蛋白酶,优选蛋白酶 N)的膜组合,以构建复合传感器。这样的通过组合多种酶基于连续反应的复合传感器的结构是本领域熟知的。见,例如 Anthony P. F. Tuner, Isao Karube 和 George S. Wilson 的“Biosensor - Fundamental 和 Applications”, Oxford University Press, 1987。

[0043] 在本说明书中引用的所有专利和参考文件内容以其整体引入本文作为参考。

实施例

[0044] 通过下面的实施例将详细说明本发明,尽管本发明不应受限于这些实施例。

[0045] 实施例 1

[0046] 小麦颖枯病菌果糖基肽基氧化酶的制备

[0047] 在公开数据库中的小麦颖枯病菌的基因组信息中发现 PnFPOX 的核苷酸序列(GenBank: XP_001798711.1)。由于推定的 ORF 包含大肠杆菌中的一些稀有密码子,因此优化了基因的密码子使用以在大肠杆菌中表达基因。在此优化后,在序列中不存在显著的稀有密码子。将合成的基因亚克隆进表达载体 pET28a 以构建 pEPN (pET28a-PnFPOX)。

[0048] 在 50 ml 补充 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基中在 37°C 培养用 PnFA0D 表达载体 (pEPN) 转化的大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞,并在 OD_{660nm} = 0.8 时加入 IPTG (终浓度 0.4 mM)。在 25°C 继续培养,直到 OD_{660nm} 达到约 3。通过离心 (5,000xg, 4°C, 10 分钟) 收集细胞,洗涤 (0.85% NaCl 溶液, 6,000xg, 4°C, 5 分钟),在 3ml 10 mM PPB (pH 7.0) 中悬浮,并通过超声波均质器均质。将得到的悬浮液离心 (10,000xg, 4°C, 20 分钟),并进一步离心上清 (60,000 rpm, 4°C, 60 分钟)。将上清针对添加 25 μ M FAD 的 10mM PPB (pH7.0) 透析以得到水溶性级分。在 SDS-PAGE 分析中,水溶性级分显示了约 48-50kDa 的条带,这与 PnFPOX 的预测分子量一致。

[0049] 使用 POD/TODB/4A. A. 法用 3 种底物:果糖基缬氨酸(FV)、果糖基赖氨酸(FK)和果糖基缬氨酰组氨酸(FVH)检查水溶性级分的氧化酶活性。果糖基肽基氧化酶不仅显示了对果糖基氨基酸(FV、FK)的氧化活性,而且显示了对果糖基二肽(FVH)的氧化活性。

[0050] 实施例 2

[0051] 小麦颖枯病菌果糖基肽基氧化酶的纯化和表征

[0052] 在图 2 中总结了纯化步骤。在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的 LB 培养基(7L)中在 37 $^{\circ}\text{C}$ 有氧培养用 pEPN (pET28a-PnFPOX) 转化的大肠杆菌 BL21 (DE3)。在达到 1.4 的 A660nm 值后,用 0.3 mM IPTG 诱导细胞,并在 25 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养,直到达到 3.0 的 A660nm 值。通过离心收获细胞,并将 1/4 的收获细胞(约 10.5g)在 10 mM PPB, pH 7.0 中重悬,并通过 2 个通道穿过弗氏压碎器 ($1,000 \text{ kg cm}^{-2}$) 裂解。以 10,000g 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心裂解液 20 分钟,并以 40,000 rpm 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心上清 90 分钟。然后将上清对含有 25 μM FAD 的 10 mM PPB, pH 8.0 透析。

[0053] 向透析的上清中加入硫酸铵至 35% 饱和,然后通过以 15,000g 离心 20 分钟沉淀形成的沉淀物。向上清中加入硫酸铵至 95% 饱和,以 15,000g 离心 20 分钟。在含有 25 μM FAD 和 1% 甘露糖的 10mM PPB, pH 8.0 中溶解得到的沉淀物,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 对相同的缓冲液透析,并且之后对含有 25 μM FAD 的 10 mM PPB, pH 8.0 透析。对用 10 mM PPB, pH 8.0 平衡的 RESOURCE Q 柱 (GE Healthcare) 应用透析的酶溶液。收集活性流通(flow-through)级分,并用 1 M NaCl 洗脱显示无 FAOD 活性的吸附的蛋白质。收集活性流通级分,并对 10 mM PPB, pH 7.0 透析。

[0054] 对用 10 mM PPB, pH 7.0 平衡的 HiLoad 16/60 Superdex 75 μg 柱 (GE Healthcare) 应用透析的酶溶液。用相同的缓冲液进行凝胶过滤层析。收集活性级分,并将纯化的酶溶液对含有 100 μM FAD 的 10 mM PPB, pH 7.0 透析,并储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。通过 SDS-PAGE 验证纯化的酶的纯度,并使用 DC 蛋白质测定试剂盒 (Bio-Rad, CA, USA) 测量蛋白质浓度。

[0055] 如在表 1 中总结的,通过硫酸铵沉淀、阴离子交换层析和凝胶过滤层析,从大肠杆菌 BL21 (DE3)/pEPN(pET28a-PnFPOX) 的细胞提取物中纯化了 35 倍的 PnFPOX。纯化的制品在 SDS-PAGE 上显示了接近单个条带。

[0056] 表 1 重组 PnFPOX 的纯化

[0057]

阶段	总活性(U)	总蛋白质(mg)	比活(U/mg)	纯化(倍)	产量(%)
可溶级分	298	526	0.57	1	100
硫酸铵	243	415	0.59	1.03	82
ResourceQ	189	23.9	7.9	13.9	63
HiLoad1	52.9	2.69	20	34.8	18

[0058] 使用 4A.A/TODB/POD 和不同浓度的底物(FV, FK 和 FVH)测定氧化酶活性。监控在 546nm 处的吸光度。结果显示在图 3 中。使用 FV 和 FVH 得到典型的 Michaelis-Menten 曲线,但用 FK 不行。对 Fv 的表观 K_m 值是 0.64 mM,对 FVH 是 0.20 mM (表 2)。对 FV 的高 $V_{\text{max}}K_m^{-1}$ 值 ($42.8 \text{ U mg}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) 表明,此酶对 FV 的高特异性。应当注意到,对 FVH 的 $V_{\text{max}}K_m^{-1}$ 值也是相当高的 ($14.7 \text{ U mg}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, 是 FV 的 $V_{\text{max}}K_m^{-1}$ 的 34%)。PnFPOX 对 FVH 的此活性在基于酶的 HbA1c 测量中将是有利的。为了比较,在表中也包括了已知的果糖基肽基氧化酶 (FPOX-C 和 FPOX-E) 的氧化酶活性 (Hirokawa 等人同上)。

[0059] 表 2 果糖基肽基氧化酶的动力学参数

[0060]

	FV			FK			FVH		
	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	V_{max}/K_m m	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	V_{max}/K_m	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	V_{max}/K_m
PnFPOX	0.64	27.6	42.8	16	3.23	0.206	0.20	2.97	14.7
FPOX-C	0.824	66.0	80.1	10.6	23.4	2.17	2.81	23.8	8.47
FPOX-E	0.318	20.6	64.8	ND	0.42	---	2.76	5.43	1.97

[0061] 通过在不同温度下在 10 mM PPB (pH 7.0) 中孵育纯化的酶溶液 10 分钟和然后测量残留活性评估 PnFPOX 的热稳定性。结果显示在图 4 中。PnFPOX 的活性在高达 50 °C 时保留约 75%。这与已知的果糖基肽基氧化酶(FPOX-C 和 FPOX-E)是相反地, 已知的果糖基肽基氧化酶在 50 °C 时丧失几乎所有的活性 (Hirokawa 等人同上)。

[0062] 实施例 3

[0063] 使用果糖基肽基氧化酶测量果糖胺

[0064] (1) FV - m-PMS/DCIP 系统

[0065] 在 0.6mM PMS 和 0.06mM DCIP 存在下在 m-PMS/DCIP 系统中使用 PnFPOX 测定果糖基缬氨酸(FV)。监控在 600nm 处的吸光度。结果显示在图 5 中。可在 0.05mM 和 1mM 之间的范围内测量 FV 的浓度。

[0066] (2) F6P - 4AA/TODB/POD

[0067] 使用 PnFPOX 测定具有 HbA1c β 链的 N 端氨基酸残基的果糖基六肽 (F6P: Fru-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu)。向在 PBS 缓冲液 (pH7.4) 中的终浓度 300 μ M 的果糖基六肽溶液中, 加入终浓度 20mg/ml 的来源于枯草芽孢杆菌 (Sigma) 的蛋白酶 N, 并在 37 °C 孵育 10 分钟。用 10kDa 截止的离心柱去除蛋白质 N, 并在 4AA/TODB/POD 系统中用 PnFPOX 测定切割产物。使用用 FVH 作为底物制作的校准曲线计算样品中果糖基六肽的量。结果显示, 检测到 300 μ M FVH (图 6)。

[0068] (3) HbA1c - 4AA/TODB/POD

[0069] 从外周血中分离红细胞并通过硼酸柱纯化。将吸附的和未吸附的部分分别指定为 HbA1c 样品和 Hb 样品。在含有 0.2% HCl 的丙酮中对这些样品进行去血红素 (de-heme) 处理, 以制备去血红素 HbA1c 和去血红素 Hb 样品。向在 PBS 缓冲液 (pH7.4) 中的终浓度 300 μ M 的去血红素 HbA1c 样品和去血红素 Hb 样品溶液中, 加入终浓度 20mg/ml 的蛋白酶 N, 并在 37 °C 孵育 10 分钟。用 10kDa 截止的离心柱去除蛋白质 N, 并在 4AA/TODB/POD 系统中用 PnFPOX 测定切割产物。使用在蛋白质 N 处理的 Hb 的存在下用 FTV 作为底物制作的校准曲线计算样品中 HbA1c 的量。结果显示, 检测到 350 μ M FVH (图 7)。在 Hb 中未检测到 FVH, 表明可特异性检测 HbA1c。

[0070] (4) FV - 电极 - H₂O₂ 系统

[0071] 混合 3.3 μ l (0.04U) PnFPOX 酶溶液 (12u/ml) 和 1.7 μ l 6% 的光交联树脂 AWP (Toyo Gosei Kogyo) (2% 的终浓度), 并将 5 μ l 混合物应用于具有 7mm² 的表面积铂电极。在 30 °C 风干电极 30 分钟, 并用紫外光辐射 1 分钟以制备工作电极。将电极和对电极 (铂线) 和参考电极 (Ag/AgCl) 浸入 2 ml 50 mM PPB (pH 7.0), 并应用相对 Ag/AgCl 的 +600mV。当观察到稳定态电流时, 向反应混合物中加入含有指示量 FV 的样品溶液, 并监控电流的增加。结果显示在图 8 中。可在 0.05mM 和 1.5mM 之间的范围内测量 FV 的浓度。

[0072] (5) FV - 电极 - 普鲁士蓝系统

[0073] 将玻璃碳电极(BAS, 7mm² 的面积)浸入 1mM FeCl₃, 1mM 铁氰化钾和 2M KCl 的溶液中, 并应用相对 Ag/AgCl 的 +0.4V 电压 1 分钟以制备普鲁士蓝膜。然后用相对 Ag/AgCl 的 -50mV 至 +350mV 以 5mV/ 秒的清扫率(sweeping rate)对电极进行 10 次 CV 处理, 以稳定普鲁士蓝膜。用水洗涤电极并干燥。混合 3.3u1 (0.04U) PnFPOX 酶溶液(12u/ml)和 1.7u1 6% 的光交联树脂 AWP(Toyo Gosei Kogyo) (2% 的终浓度), 并应用于电极; 在 30 °C 风干电极 30 分钟, 然后用紫外光辐射 1 分钟以制备普鲁士蓝 - 酶固定化的电极作为工作电极。将电极和对电极(铂线)和参考电极(Ag/AgCl) 浸入 2 ml 50 mM PPB (pH 7.0), 并应用相对 Ag/AgCl 的 -150mV。向反应混合物中加入 FV, 并监控电流的增加。结果显示在图 9 中。可在 0.05mM 和 1mM 之间的范围内测量 FV 的浓度。

[0074] (4) FV- 电极 -NA 系统

[0075] 混合 3.3u1 (0.04U) PnFPOX 酶溶液(12u/ml)和 1.7u1 6% 的光交联树脂 AWP(Toyo Gosei Kogyo) (2% 的终浓度), 并将 5 μ 1 混合物应用于具有 7mm² 的面积的金电极。在 30°C 风干电极 30 分钟, 并用紫外光辐射 1 分钟以制备工作电极。将电极和对电极(铂线)和参考电极(Ag/AgCl) 浸入 2 ml 含有 5mM N, N- 双(羟乙基)-3- 甲氧基 - 亚硝基苯胺(NA) 的 50 mM PPB (pH 7.0), 并应用相对 Ag/AgCl 的 +200mV。向反应混合物中加入 FV, 并监控电流的增加。为了避免氧气的影响, 在反应室中连续通入氩气。结果显示在图 10 中。可在 0.05mM 和 1.5mM 之间的范围内测量 FV 的浓度。

[0076] (5) FV- 电极 -m-PMS 系统

[0077] 如上(4) 中描述的制备 PnFPOX 固定化的金电极。将电极和对电极(铂线)和参考电极(Ag/AgCl) 浸入 2 ml 含有 2mM m-PMS 的 50 mM PPB (pH 7.0), 并应用相对 Ag/AgCl 的 +100mV。向反应混合物中加入 FV, 并监控电流的增加。结果显示在图 11 中。可在 0.05mM 和 1.5mM 之间的范围内测量 FV 的浓度。

[0078] 实施例 4

[0079] 果糖基肽基氧化酶对果糖基六肽的氧化酶活性

[0080] 在没有加入蛋白酶 N 的情况下测定了果糖基肽基氧化酶 PnFPOX 和 FPOX-C 对果糖基六肽 (F6P: Fru-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu) 的氧化酶活性。如实施例 2 中描述地, 在 4AA/TODB/POD 系统中测量酶活性, 对 FV 和 FVH 应用 1mM 的底物浓度, 和对 F6P 应用 5mM 的底物浓度。结果显示在表 3 中。

[0081] 表 3

[0082]

	FV (U/mg)	FVH (U/mg)	F6P (U/mg)
PnFPOX	1.3	0.11	1.3x10 ⁻³
FPOX-C	2.3	0.60	未测定

[0083] 果糖基肽基氧化酶 PnFPOX 能够氧化果糖基六肽。

[0084] 工业适用性

[0085] 本发明的果糖基肽基氧化酶可用于测量糖化蛋白质, 例如血红蛋白 (HbA1c), 其在临床上用于糖尿病状况的诊断和控制。

序列表

- <110> Roche Diagnostics GmbH
 Ultizyme International Ltd.
 F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> 新的果糖基肽基氧化酶
- <130> 26173 W0
- <160> 1
- <170> PatentIn 版本 3.5
- <210> 1
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> 小麦颖枯病菌(Phaeosphaeria nodorum)
- <400> 1

Met Ala Pro Ser Arg Ala Asn Thr Ser Val Ile Val Val Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Ile Gly Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Val Arg Ser Gly Tyr
 20 25 30

Thr Pro Ser Asn Val Thr Val Leu Asp Ala Tyr Pro Ile Pro Ser Ser
 35 40 45

Gln Ser Ala Gly Asn Asp Leu Asn Lys Ile Met Gly Val Ser Leu Arg
 50 55 60

Asn Pro Val Asp Leu Gln Leu Ala Leu Glu Ala Arg Gln Met Trp Asn

65	70	75	80
Glu Asp Glu Leu Phe Lys Lys Phe Phe His Asn Thr Gly Arg Leu Asp	85	90	95
Cys Ala His Gly Glu Lys Asp Ile Ala Asp Leu Lys Ser Gly Tyr Gln	100	105	110
Ala Leu Val Asp Ala Gly Leu Asp Ala Thr Asn Glu Trp Leu Asp Ser	115	120	125
Glu Asp Glu Ile Leu Lys Arg Met Pro Leu Leu Ser Arg Asp Gln Ile	130	135	140
Lys Gly Trp Lys Ala Ile Phe Ser Lys Asp Gly Gly Trp Leu Ala Ala	145	150	155
Ala Lys Ala Ile Asn Ala Val Gly Glu Tyr Leu Arg Asp Gln Gly Val	165	170	175
Arg Phe Gly Phe Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Lys Ala Pro Leu Leu Ala	180	185	190
Glu Gly Val Cys Ile Gly Val Glu Thr Val Asp Gly Thr Arg Tyr Tyr	195	200	205
Ala Asp Lys Val Val Leu Ala Ala Gly Ala Trp Ser Pro Thr Leu Val	210	215	220

Val Val Glu Leu Leu Glu Gly Thr Leu Ala Asp Asp Leu Ala His Ala
385 390 395 400

Trp Arg Trp Arg Pro Gly Ser Gly Asp Ala Leu Lys Ser Arg Arg Ser
405 410 415

Ala Pro Ala Lys Asp Leu Ala Asp Met Pro Gly Trp Asn His Asp Lys
420 425 430

Pro Arg Ala Asn Leu
435

小麦颖枯病菌果糖基肽氧化酶

MAPSRANTSVIIVGGGTIGSSTALHLVRSGYTPSNVTVLDAYPI PSSQSAGNDLNKIMG
 VSLRNPVDLQLALEARQMWNEDELFKKFFHNTGRLLDCAHGEKDIADLKSGYQALVDAGLD
 ATNEWLDSEDEILKRMPLLSRDQIKGWKAIFSKDGGWLAAKAINAVGEYLRDQGVRFQF
 YGAGSFKAPLLAEGVCIGVETVDGTRYADKVVLAAGAWSPTLVELHEQCVCVKAWVYGHI
 QLTPEEAARYKNSPVVYNGDVGFPEPNEHGVIKVCDEFPGFTRFKMHQFFGAKAPKRIS
 VPRSHAKHPTDTIPDASDVSIRRAIATFMPQFKNKKMFENQAMCWCCTDTADAALLICEHPE
 WKNFVLATGDSGHSFKLLLPNIGKHVVELLEGTLADDLAHAWRWRPQSGDALKSRRSAPAK
 DLADMPGWNHDKPRANL

(SEQ ID NO:1)

图 1

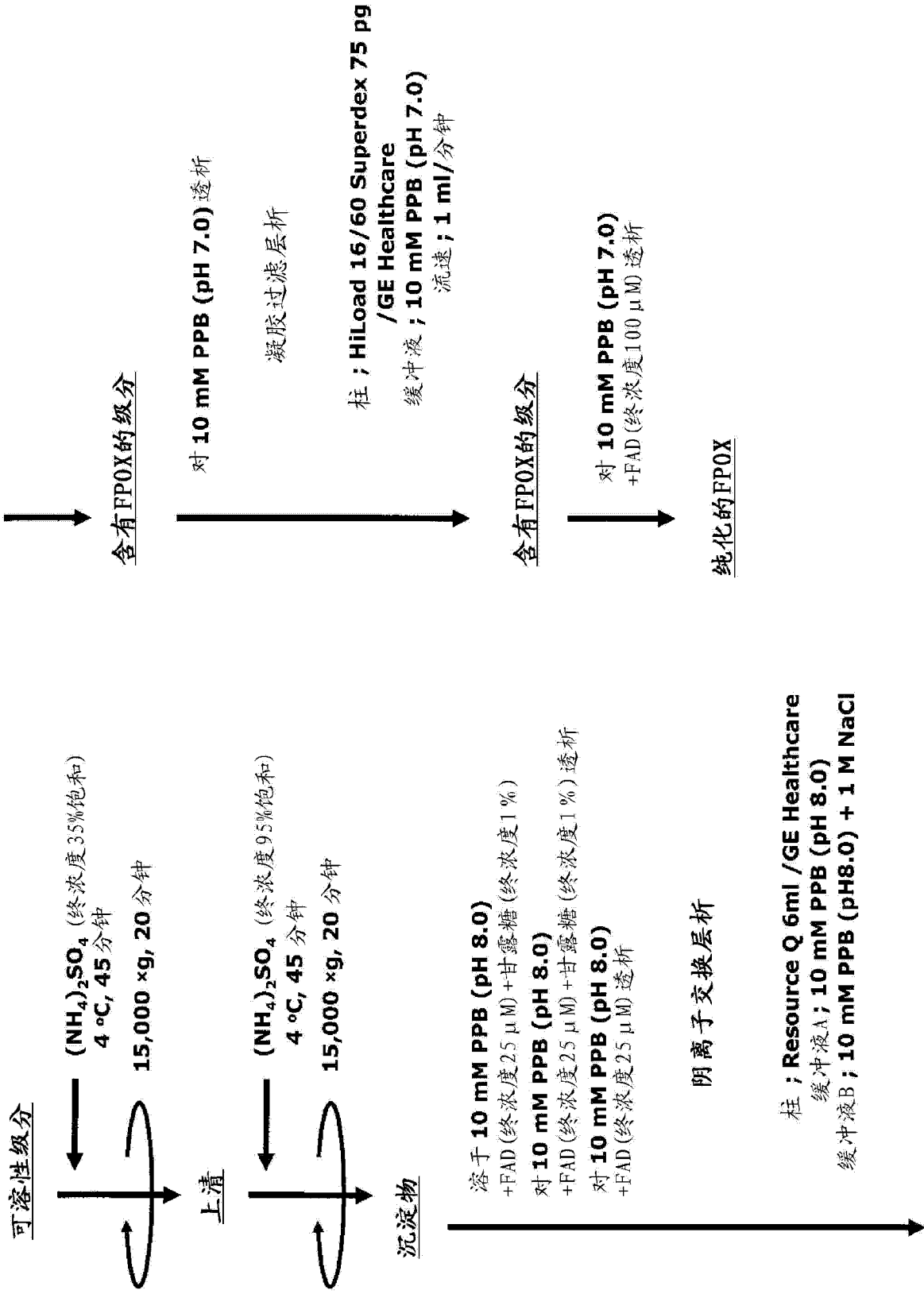


图 2

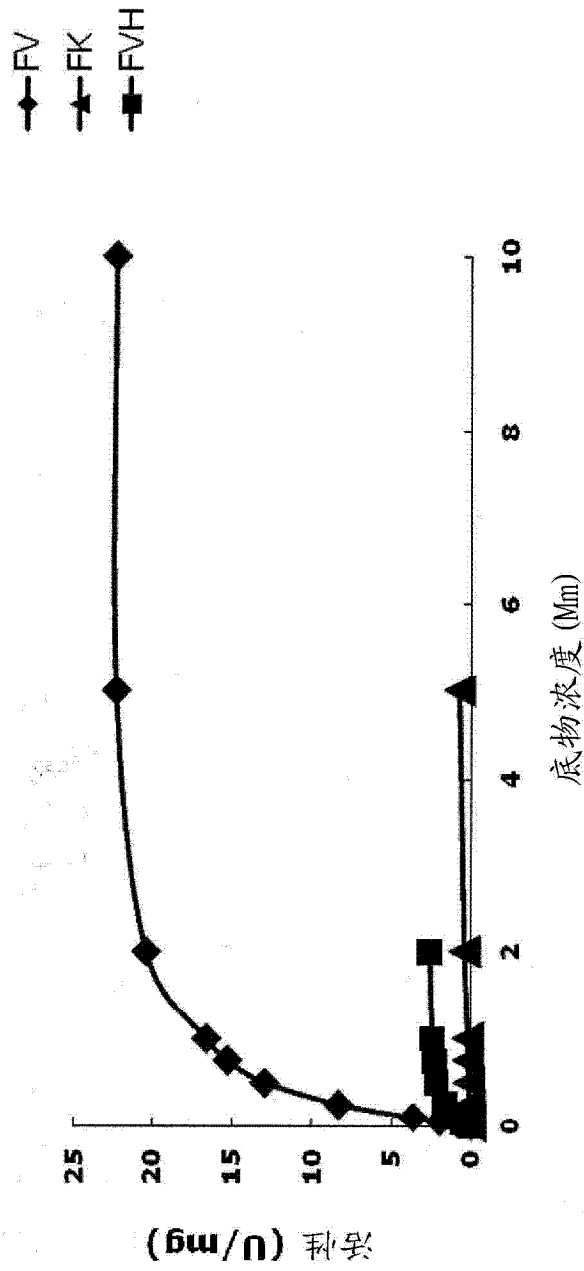


图 3

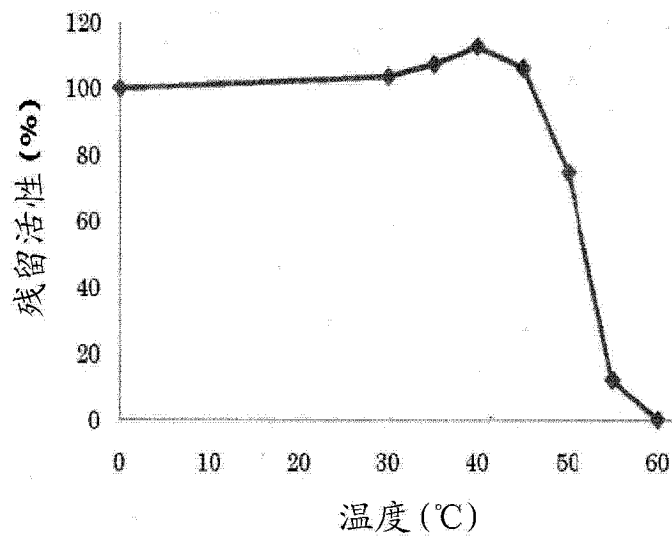


图 4

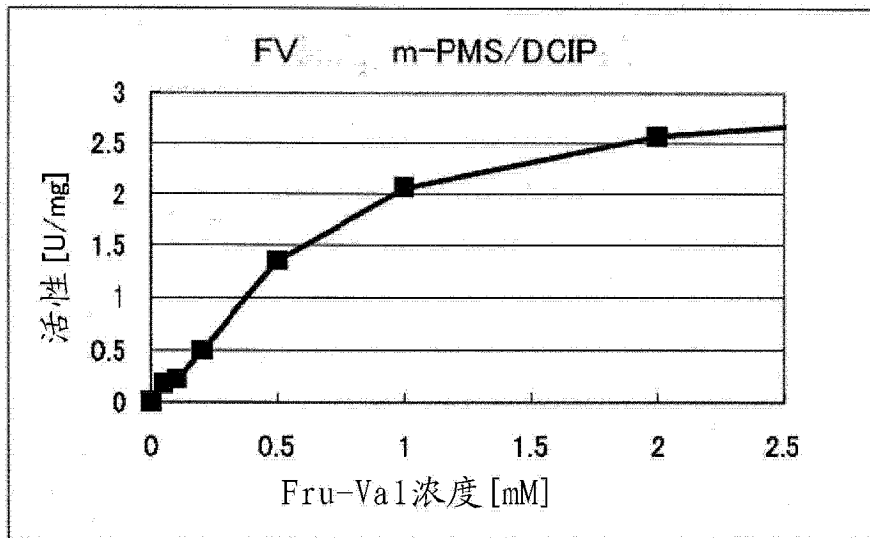


图 5

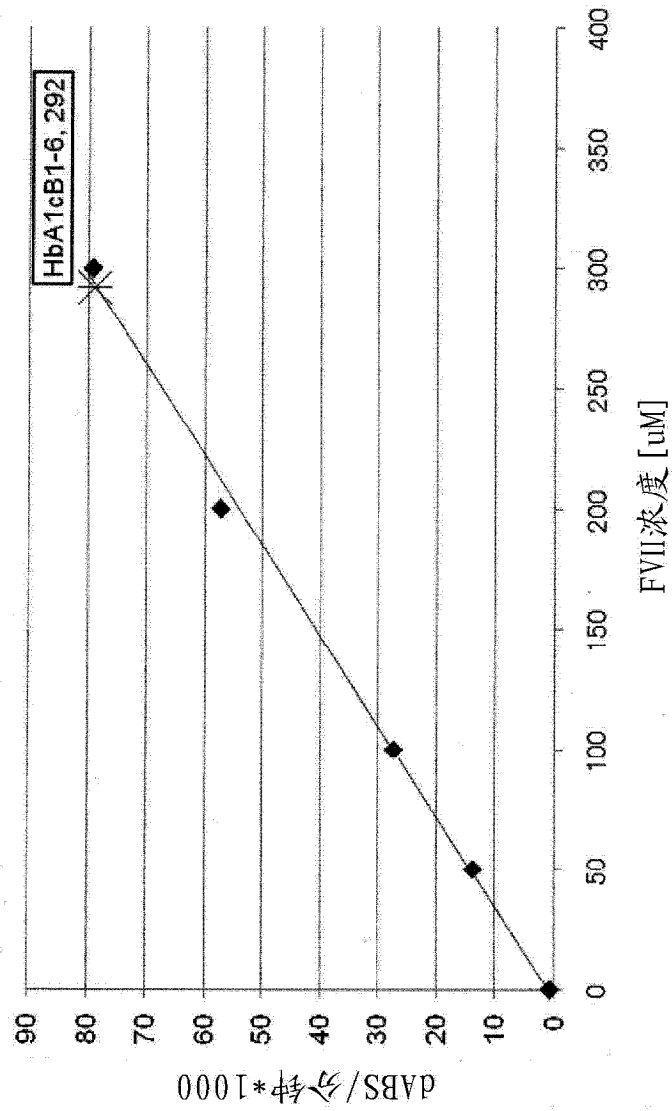


图 6

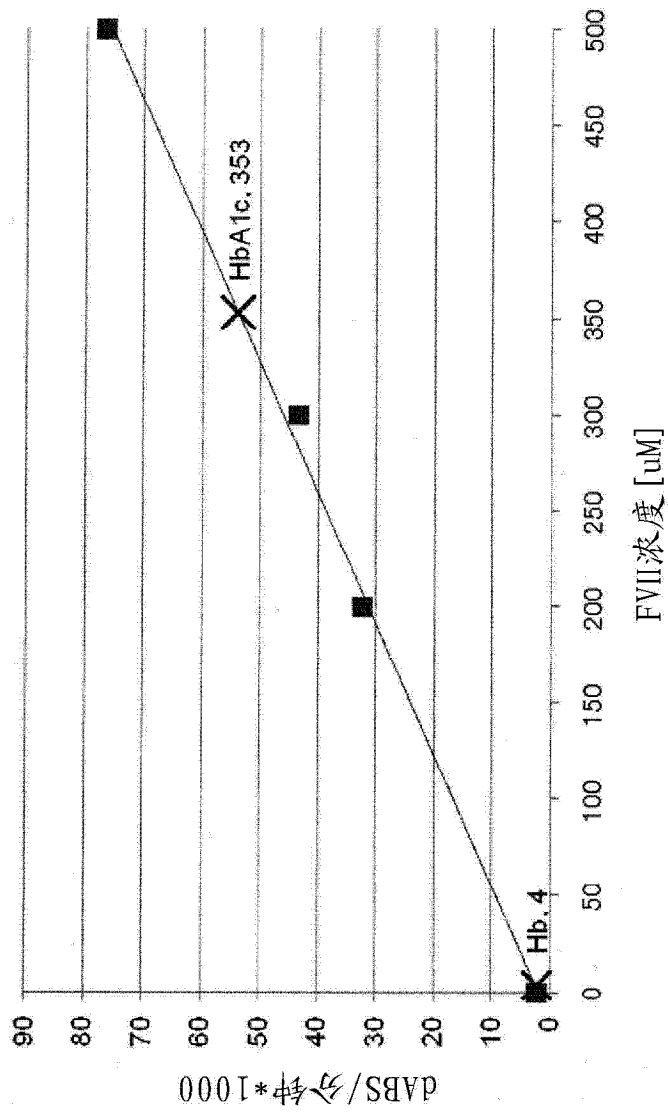


图 7

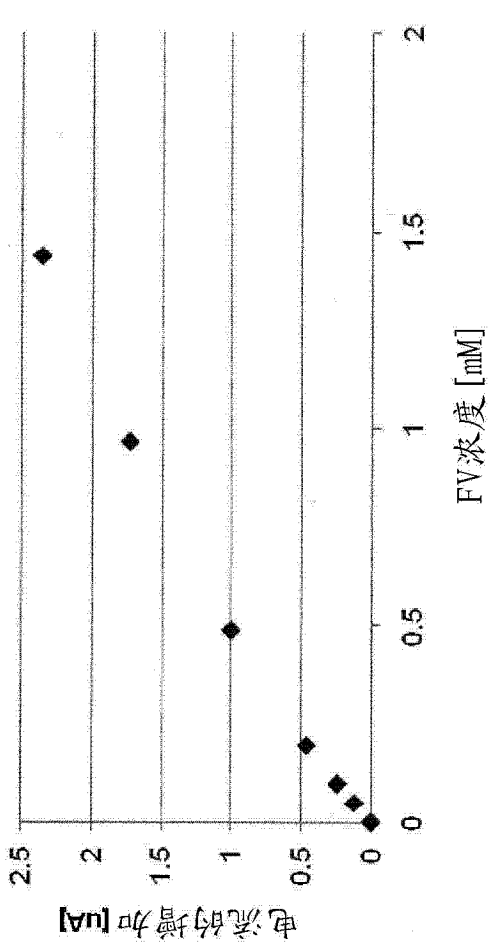


图 8

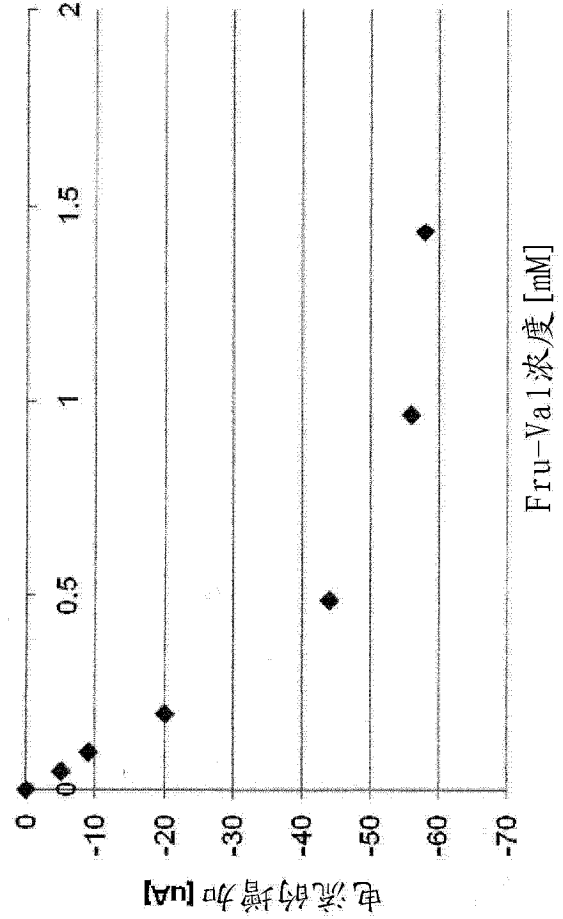


图 9

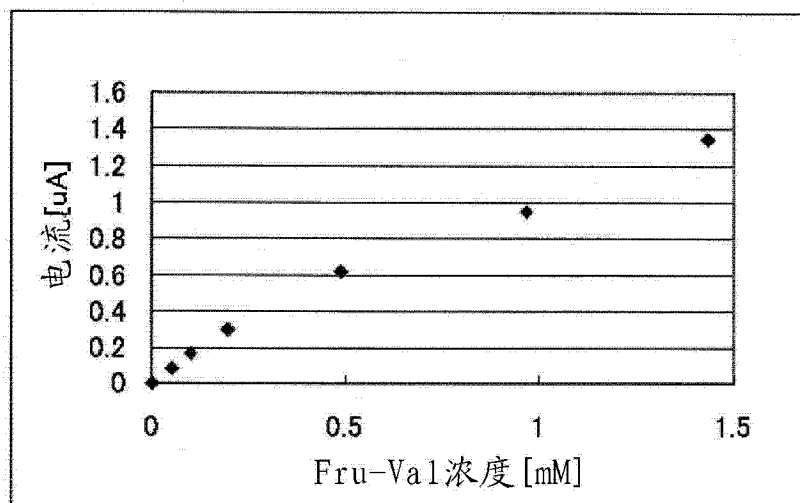


图 10

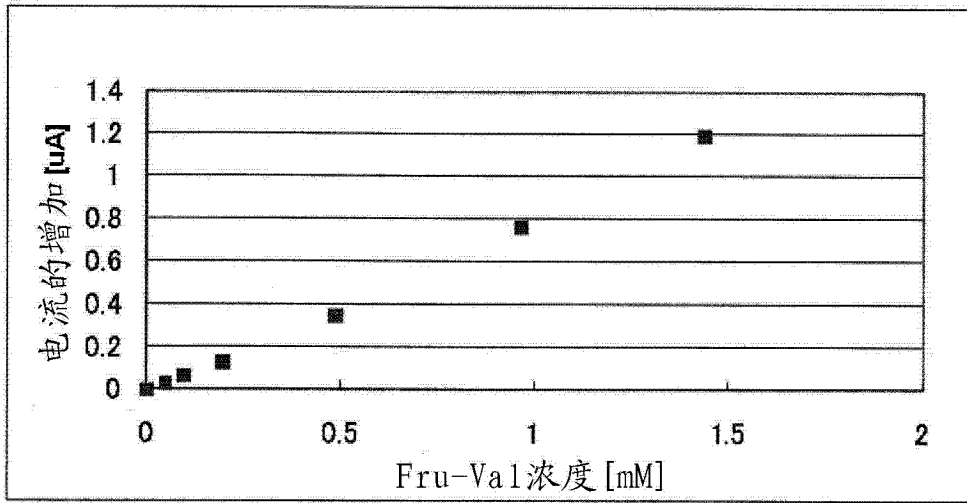


图 11