(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117529656 A
(43)申请公布日 2024.02.06

(21)申请号 202280041881.4
(22)申请日 2022.06.23
(30)优先权数据
2021-103850 2021.06.23 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/025122 2022.06.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/270586 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 和山文哉 初谷纪幸 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 张楠
(51)Int.Cl.
G01N 27/327(2006.01)

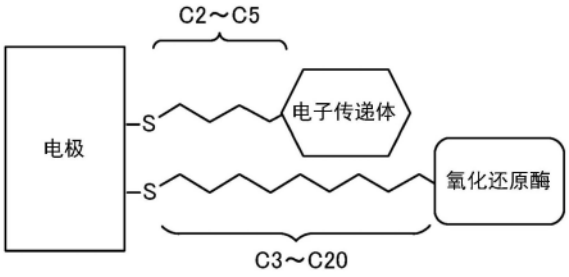
权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54)发明名称

酶固定电极、酶固定电极的制造方法、目标分子的氧化还原方法和目标分子的氧化还原装置

(57)摘要

一种酶固定电极，其具备：电极、将目标分子氧化或还原的氧化还原酶、和进行电极与氧化还原酶之间的电子传输的电子传递体，电子传递体经由链状的第一接头被固定在电极上，氧化还原酶经由比第一接头长的链状的第二接头被固定在电极上。



CN 117529656 A

1.一种酶固定电极,其具备:

电极、

将目标分子氧化或还原的氧化还原酶、和

进行所述电极与所述氧化还原酶之间的电子传输的电子传递体,

所述电子传递体经由链状的第一接头被固定在所述电极上,所述氧化还原酶经由比所述第一接头长的链状的第二接头被固定在所述电极上。

2.根据权利要求1所述的酶固定电极,其中,所述第一接头包含碳数为2以上且5以下的烷基链。

3.根据权利要求1或2所述的酶固定电极,其中,所述第二接头包含碳数为3以上且20以下的烷基链。

4.根据权利要求1~3中任一项所述的酶固定电极,其中,所述电子传递体的分子量为500以下。

5.一种酶固定电极的制造方法,其是制造权利要求1~4中任一项所述的酶固定电极的酶固定电极的制造方法,所述制造方法包括:

将所述电子传递体经由链状的所述第一接头固定在所述电极上的第一固定化步骤;和

将所述氧化还原酶经由所述第二接头固定在所述电极上的第二固定化步骤。

6.一种目标分子的氧化还原方法,其使用通过权利要求5所述的酶固定电极的制造方法制造而成的酶固定电极,将目标分子氧化或还原。

7.根据权利要求6所述的目标分子的氧化还原方法,其中,所述目标分子为具有二硫键的蛋白质。

8.一种目标分子的氧化还原装置,其具备:

权利要求1~4中任一项所述的酶固定电极、和对所述酶固定电极施加电压的电源,

所述目标分子的氧化还原装置将目标分子氧化或还原。

酶固定电极、酶固定电极的制造方法、目标分子的氧化还原方法和目标分子的氧化还原装置

技术领域

[0001] 本公开涉及酶固定电极、酶固定电极的制造方法、目标分子的氧化还原方法和目标分子的氧化还原装置。

背景技术

[0002] 作为将酶固定于电极的方法,有通过化学键合将酶固定于电极表面的方法;用聚合物将酶包埋地固定的方法。例如,在专利文献1中公开了将载体、酶、介体(mediator,也可称为媒介体)固定于导电性构件的酶电极。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:日本特开2006-058289号公报

发明内容

[0006] 发明所要解决的课题

[0007] 但是,专利文献1中记载的酶电极虽然能够作为观测从酶到电极的电子移动并测量电流值的传感器使用,但不能从电极向酶、进而从酶向试样中的基质(以下也称为目标分子)供给电子。

[0008] 因此,本公开提供能够从电极将电子输送至氧化还原酶、进而从氧化还原酶将电子输送至试样中的目标分子的酶固定电极、酶固定电极的制造方法、目标分子的氧化还原方法和目标分子的氧化还原装置。

[0009] 用于解决课题的手段

[0010] 本公开的一方案涉及的酶固定电极具备:电极、将目标分子氧化或还原的氧化还原酶、和将从所述电极接受的电子向所述氧化还原酶供给的电子传递体,所述电子传递体经由链状的第一接头(linker)被固定在所述电极上,所述氧化还原酶经由比所述第一接头长的链状的第二接头被固定在所述电极上。

[0011] 另外,本公开的一方案涉及的酶固定电极的制造方法是制造上述的酶固定电极的酶固定电极的制造方法,其包括:将所述电子传递体经由链状的所述第一接头固定在所述电极上的第一固定化步骤;和将所述氧化还原酶经由所述第二接头固定在所述电极上的第二固定化步骤。

[0012] 另外,本公开的一方案涉及的目标分子的氧化还原方法使用通过上述的酶固定电极的制造方法制造而成的酶固定电极,将目标分子氧化或还原。

[0013] 另外,本公开的一方案涉及的目标分子的氧化还原装置具备所述的酶固定电极和向所述酶固定电极施加电压的电源,所述目标分子的氧化还原装置氧化还原装置将目标分子氧化或还原。

[0014] 发明效果

[0015] 根据本公开,能够提供可从电极将电子输送至试样中的目标分子的酶固定电极、酶固定电极的制造方法、目标分子的氧化还原方法和目标分子的氧化还原装置。

附图说明

[0016] 图1为表示具备本实施方式涉及的酶固定电极的目标分子氧化还原装置的构成的一例的图。

[0017] 图2为图1的II-II线处的剖面图。

[0018] 图3为示意地表示固定在电极上的电子传递体和氧化还原酶的图。

[0019] 图4为表示酶固定电极的制造方法的一例的流程图。

[0020] 图5为示意地表示图4的各流程的图。

[0021] 图6为用于说明目标分子的氧化还原方法的图。

[0022] 图7是表示实施例1、比较例1、比较例2和比较例3的SDS-PAGE后的电泳图像的图。

[0023] 图8是表示实施例1、比较例1、比较例2和比较例3的目标分子的分解率的图表。

[0024] 图9是表示实施例1、比较例4和比较例5的SDS-PAGE后的电泳图像的图。

[0025] 图10是表示实施例1、比较例4和比较例5的目标分子的分解率的图表。

具体实施方式

[0026] (直至本公开的见解)

[0027] 将酶固定于电极的酶固定电极以往一直被用于生物传感器等中。但是,酶固定电极用于测量从酶向电极的电子移动,但不能实现从电极向酶的电子传输、进而从酶向目标分子的电子传输。就从电极向酶的电子传输而言,由于酶形成了复杂的立体结构,因此难以接受电子,或者,如果酶过度靠近电极,则容易破坏结构,因此从电极向酶的电子传输困难。

[0028] 在将酶固定于电极的方法中,有用聚合物将电子传递物质和酶包埋而固定于电极的方法,由该方法制造的酶固定电极与基质(目标分子)的反应性低。这是因为,经由电子传递向酶输送电子时,在酶固定电极的最表面不存在酶,或者,由于被包埋在聚合物中,因此不具有酶的自由度。

[0029] 因此,需要酶能够从电极接受电子、进而能够向试样中的基质供给电子(换言之,基质的反应性良好)的酶固定电极。在酶固定电极中所使用的酶例如为氧化还原酶。为了将作为试样中的目标分子(所谓的目标分子)的基质氧化或还原,需要氧化还原酶。为了使固定于电极的氧化还原酶作用于基质,需要从电极向氧化还原酶输送电子。通常,使用电化学测定装置等从电极向酶输送电子。此时,为了更高效率地输送电子,使用介体等电子传递物质等。由于不优选使试样中混入酶和电子传递物质,因此需要使用将这些物质固定于电极的酶固定电极。

[0030] 因此,本申请发明人鉴于上述课题进行了深入研究,结果发现了下述酶固定电极,其为在电极上将电子传递体和酶分别通过化学键合固定的酶固定电极,用具有导电性的第一接头将电子传递体固定在电极上,用不具有导电性的第二接头将酶固定在电极上。该酶固定电极的特征在于,第一接头和第二接头为链状,第二接头比第一接头长,通过这些接头被固定在电极上的电子传递体与酶之间的距离小到电子能够移动的程度(例如数μm以内)。本公开涉及的酶固定电极由于将电子传递体(例如介体)和酶这两者固定在电极上,电子传

递体与酶之间的距离小到电子能够移动的程度,因此将电子从电极输送至氧化还原酶,进而,能够实现从氧化还原酶向试样中的基质(所谓的目标分子)的电子传输。

[0031] (本公开的一方案)

[0032] 本公开的一方案的概要如下所述。

[0033] 本公开的一方案涉及的酶固定电极具备:电极、将目标分子氧化或还原的氧化还原酶、和进行所述电极与所述氧化还原酶之间的电子传输的电子传递体,所述电子传递体经由链状的第一接头被固定在所述电极上,所述氧化还原酶经由比所述第一接头长的链状的第二接头被固定在所述电极上。

[0034] 由此,在酶固定电极中,从电极向电子传递体供给的电子容易被输送至氧化还原酶。另外,在酶固定电极中,由于将氧化还原酶用链状的第二接头固定在电极上,因此氧化还原酶的自由度提高。进而,在酶固定电极中,由于氧化还原酶位于酶固定电极的最表面,因此被氧化还原酶接受的电子容易从氧化还原酶向试样中所含的目标分子输送。因此,酶固定电极能够从电极将电子输送至氧化还原酶,进而从氧化还原酶将电子输送至试样中的目标分子。

[0035] 例如,在本公开的一方案涉及的酶固定电极中,第一接头包含碳数为2以上且5以下的烷基链。

[0036] 由此,第一接头能够具有导电性,因此容易将从电极供给的电子输送至电子传递体。

[0037] 例如,在本公开的一方案涉及的酶固定电极中,第二接头包含碳数为3以上且20以下的烷基链。

[0038] 由此,第二接头难以具有导电性,因此容易从电子传递体将电子输送至氧化还原酶。

[0039] 例如,在本公开的一方案涉及的酶固定电极中,电子传递体的分子量为500以下。

[0040] 电子传递体如果分子量超过500,则不再靠近氧化还原酶的活性部位,不再能够给予电子。因此,如果电子传递体的分子量为500以下,则电子传递体能够将电子给予氧化还原酶。

[0041] 另外,本公开的一方案涉及的酶固定电极的制造方法是制造上述的任一个酶固定电极的酶固定电极的制造方法,其包括:将所述电子传递体经由链状的所述第一接头固定在所述电极上的第一固定化步骤;和将所述氧化还原酶经由所述第二接头固定在所述电极上的第二固定化步骤。

[0042] 由此,酶固定电极的制造方法能够制造能够将电子从电极输送至氧化还原酶、进而能够将电子从氧化还原酶输送至试样中的目标分子的酶固定电极。

[0043] 另外,本公开的一方案涉及的目标分子的氧化还原方法使用通过上述的酶固定电极的制造方法制造而成的酶固定电极,将所述目标分子氧化或还原。

[0044] 由此,目标分子的氧化还原方法由于将电子从酶固定电极输送至目标分子,因此能够高效率地将目标分子氧化或还原。

[0045] 另外,在本公开的一方案涉及的目标分子的氧化还原方法中,所述目标分子为具有二硫键的蛋白质。

[0046] 由此,目标分子的氧化还原方法通过将目标分子中的二硫键还原,从而能够将目

标分子还原。

[0047] 另外,本公开的一方案涉及的目标分子的氧化还原装置具备上述的任一个酶固定电极和向所述酶固定电极施加电压的电源,所述目标分子的氧化还原装置将目标分子氧化或还原。

[0048] 由此,目标分子的氧化还原装置由于将电子从酶固定电极输送至目标分子,因此能够高效率地将目标分子氧化或还原。

[0049] 再有,这些总括的或具体的方案可采用系统、方法、装置、集成电路、计算机程序或计算机可读取的CD-ROM等记录介质实现,也可采用系统、方法、装置、集成电路、计算机程序和记录介质的任意的组合实现。

[0050] 以下对于实施方式,参照附图具体地说明。

[0051] 再有,以下说明的实施方式均是示出总括的或具体的例子。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、步骤、步骤的顺序等为一例,其主旨并非限定权利要求。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来说明。另外,各图未必进行了严格地图示。在各图中,对于实质上相同的构成,标注同一符号,有时将重复的说明省略或简化。

[0052] 另外,在各图中,适当使用彼此相互正交的X轴方向、Y轴方向和Z轴方向来说明。特别地,有时将Z轴方向的正侧作为上侧、将负侧作为下侧进行说明。

[0053] 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。

[0054] 另外,在本公开的附图中,虚线表示从表面看不到的部位和区域的边界。

[0055] (实施方式)

[0056] 以下参照图1至图6对实施方式具体地说明。

[0057] [目标分子氧化还原装置]

[0058] [1.概要]

[0059] 首先,参照图1对实施方式中的目标分子氧化还原装置的概要进行说明。图1为表示具备本实施方式涉及的酶固定电极的目标分子氧化还原装置的构成的一例的图。

[0060] 目标分子氧化还原装置100通过对电极(所谓的酶固定电极)施加电压,从而进行电极与氧化还原酶之间的电子传输。例如,目标分子氧化还原装置100将电子从电极输送至固定在电极的表面的电子传递体,进而将电子从电子传递体输送至位于电极的最表面的氧化还原酶。由此,在酶固定电极与试样中的目标分子之间发生电子授受,因此将目标分子氧化或还原。例如,目标分子氧化还原装置100通过在包含目标分子的试样(例如样品溶液)为非流动状态下对电极施加电压,从而在固定于电极的氧化还原酶与试样中的目标分子之间进行电子授受,将目标分子氧化或还原。而且,通过将液体从非流动状态切换为流动状态,从而使被氧化或还原的目标分子在液体中扩散。通过这样反复液体的流动状态的切换,从而能够以液体整体将目标分子高效率地氧化或还原。

[0061] 应予说明,所谓液体为非流动状态,例如,是指液体没有被搅拌或振荡(即,没有受到剪切力或振动等外力)、在液面看不到波动等运动的状态。

[0062] [2.构成]

[0063] 接着,对于实施方式中的目标分子氧化还原装置100的构成,参照图1至图3进行说明。

[0064] 如图1所示,目标分子氧化还原装置100具备:将包含目标分子的试样9搅拌使其成为流动状态的搅拌部40;将通过在与目标分子之间进行电子授受从而将目标分子氧化或还原的氧化还原酶固定的酶固定电极(阴极电极1);对酶固定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。再有,在酶固定电极上固定有电子传递体和氧化还原酶。

[0065] 电压施加部10例如为具备阴极电极1(也称为工作电极)、参比电极2、对电极3、单元4、盖部5、端子6a、6b、6c、和引线7a、7b、7c的三电极式单元。再有,电压施加部10例如可为包括工作电极(阴极电极1)和对电极3的二电极式单元。

[0066] 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。

[0067] 首先,对于阴极电极1,参照图2和图3进行说明。图2为图1的II-II线处的剖面图。图3为示意地表示固定在电极上的电子传递体和氧化还原酶的图。

[0068] 阴极电极1为酶固定电极。阴极电极1具有例如玻璃基板11、蒸镀在玻璃基板11上的钛蒸镀层12、形成在钛蒸镀层12的阴极基板13、和固定在阴极基板13的包含电子传递体和氧化还原酶的反应层14。

[0069] 作为阴极基板13,可使用例如金、玻璃碳、或ITO(氧化铟锡)等导电性基板。对阴极基板13的厚度并无特别限定。

[0070] 固定于阴极基板13的电子传递体只要是能够进行电极与固定在电极上的氧化还原酶之间的电子授受的物质,则并无特别限定。例如可列举出紫精、醌或靛酚等。将电子传递体用链状的第一接头固定在阴极基板13上。第一接头例如包含碳数为2以上且5以下的烷基链。第一接头在末端具有硫醇基。通过第一接头与电极(具体地为阴极基板13)进行化学键合,从而将电子传递体固定在电极的表面。

[0071] 对于固定于电极的电子传递体和氧化还原酶,可具有以下的(1)~(4)的特征。(1)将电子传递体与电极连接的第一接头具有导电性,并且(2)将氧化还原酶与电极连接的第二接头为与第一接头类似的结构,但不具有导电性。另外,(3)与电子传递体和电极之间的距离相比,氧化还原酶与电极之间的距离大。(4)电子传递体与氧化还原酶的距离为电子可移动的距离(例如数μm以内)。由此,从电极向电子传递体移动的电子容易向氧化还原酶移动。另外,将氧化还原酶配置在电极的最表面,用链状的第二接头固定于电极上,因此氧化还原酶的自由度提高,容易作用于目标分子。

[0072] 再有,通过电子传递体与氧化还原酶的组合,在上述的优选的范围内,可改变第一接头和第二接头的碳数。

[0073] 再有,所谓第二接头不具有导电性,包括虽然很小地导电但与第一接头相比导电性足够低、实质上能够视为非导电性的程度的情形。

[0074] 另外,固定于电极的表面(所谓的阴极基板13)的氧化还原酶是将目标分子氧化或还原的酶。氧化还原酶用比第一接头长的链状的第二接头被固定在阴极基板13上。第二接头例如包含碳数为3以上且20以下的烷基链。其中,第二接头可包含碳数为6以上且14以下的烷基链。

[0075] 参比电极2是不与试样9中的成分反应、维持一定的电位的电极，用于通过电源20将阴极电极1与参比电极2之间的电位差控制为一定。参比电极2例如为银/氯化银电极。对电极3例如为铂电极。

[0076] 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。

[0077] 控制部30进行用于电源20的电压施加和控制搅拌部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得以实现。

[0078] 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中设置的搅拌棒8的旋转速度和旋转时间。

[0079] [3.酶固定电极的制造方法]

[0080] 接着，参照图4和图5于酶固定电极的制造方法进行说明。图4为表示酶固定电极的制造方法的一例的流程图。图5为示意地表示图4的各流程的图。图5的(a)表示第一固定化工序，图5的(b)表示第二固定化工序。再有，酶固定电极为阴极电极1。

[0081] 酶固定电极的制造方法包括：第一固定化步骤(S1)、和将氧化还原酶经由第二接头固定在电极上的第二固定化工序(S2)。

[0082] 在第一固定化步骤(S1)中，将电子传递体经由链状的第一接头固定在电极上。首先，准备包含与第一接头结合的电子传递体(例如电子介体)和第二接头的溶液，与自组织化单分子膜(SAM)的形成同样地，将与电子传递体结合的第一接头和第二接头固定在电极上。例如，将与电子传递体结合的第一接头和第二接头分别在乙醇：乙腈＝1：1的溶液中混合，在该混合溶液中将电极浸渍1小时以上而静置。再有，如图5的(a)所示，电子传递体具有第一接头。第一接头在末端具有硫醇基。通过第一接头与电极化学键合，从而将电子传递体经由第一接头固定于电极上。再有，第一接头为电子能够从电极移动到电子传递体的长度的烷基链。第一接头例如为碳数为2以上且5以下的烷基链。

[0083] 另外，用于将氧化还原酶固定于电极的第二接头为碳数是3以上的烷基链，为了使电子不能从电极直接移动至氧化还原酶，可为碳数为6以上的烷基链。另外，第二接头为碳数是20以下的烷基链，为了使得容易进行从与第一接头结合的电子传递体向氧化还原酶的电子的移动，可为碳数为14以下的烷基链。即，第二接头为碳数是3以上且20以下，更优选地，例如第二接头可为碳数是6以上且14以下的烷基链。另外，第二接头在一个末端具有羧基或氨基，在另一末端具有硫醇基。再有，在将分子量为500以下的化合物用作电子传递体的情况下，第二接头可为碳数低于15的烷基链。例如，第二接头的烷基链的长度可根据第一接头的烷基链的长度、和与第一接头结合的电子传递体的尺寸(分子量)适当地确定。

[0084] 接着，在第二固定化步骤(S2)中，将氧化还原酶经由第二接头固定在电极上。更具体地，如图5的(b)所示，使固定在电极上的第二接头与氧化还原酶结合。此时，例如，将氧化还原酶的氨基与第二接头的羧基通过胺偶合反应结合。由此，将氧化还原酶经由第二接头固定在电极上。

[0085] [4.目标分子的氧化还原方法]

[0086] 接着，对于目标分子的氧化还原方法，参照图2和图6进行说明。图6为用于说明目标分子的氧化还原方法的图。

[0087] 目标分子的氧化还原方法使用具备作为阴极电极1的酶固定电极、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中所含的目标分子氧化或还原。阳极电极的表面积例如比阴极电极1足够大。

[0088] 试样9为包含目标分子的水溶液。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的电位成为电子传递体(电子介体)的氧化电位。

[0089] 实施例

[0090] 以下通过实施例对使用了本公开的酶固定电极的目标分子的氧化还原方法具体地说明,本公开并不只限定于以下的实施例。

[0091] 在实施例1和比较例1～3中,对于使用了什么都没有固定的电极的情形和使用了将电子传递体和氧化还原酶中的至少任一者固定于电极上的酶固定电极的情形的目标分子的还原率(例如残存率和分解率)进行了验证。

[0092] 在实施例1、比较例4和5中,对于第一接头和第二接头的碳数为优选的范围内的情形和第一接头或第二接头的碳数为优选的范围外的情形的目标分子的还原率进行了验证。

[0093] [实施例1]

[0094] (包含目标分子的试样的制备)

[0095] 目标分子使用了β-乳球蛋白。包含目标分子的试样(以下称为试样)通过将β-乳球蛋白溶解于pH7.4的磷酸缓冲生理食盐水(PBS)中制备成3.3毫克/毫升。

[0096] (使用了酶固定电极的目标分子的还原)

[0097] 使用三电极方式的电压施加单元(例如图1的电压施加部10)和电位计(例如图1的电源20),对试样在低温下施加了8小时规定的电压。对于三极中的阴极电极1,使用酶固定电极,对于参比电极2,使用Ag/AgCl电极,对于对电极3,使用了铂(Pt)电极。对包含目标分子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用电位计来控制。酶固定电极使用碳数4的烷基链作为第一接头而将电子传递体(例如甲基紫精)固定于电极,使用碳数10的烷基链作为第二接头而将氧化还原酶(例如硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白的复合体)固定于电极。

[0098] (目标分子的还原状态的确认)

[0099] 为了确认已将作为目标分子的β-乳球蛋白还原,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质的条带的浓度数值化。再有,作为对照样品,将施加电压前的β-乳球蛋白也供于SDS-PAGE,将其数值作为目标分子的残存率100%,通过比例计算,算出实施例1的目标分子的残存率。将电泳图像示于图7。图7为表示实施例1、比较例1、比较例2和比较例3的SDS-PAGE后的电泳图像的图。图7的(a)为对照样品的电泳图像。图7的(f)为分子量标记的电泳图像。图7的(e)为实施例1的电泳图像,在用虚线围成的位置出现了目标分子的条带。在实施例1中,确认了残存率为70%。

[0100] 将分解率的计算结果示于图8。图8为表示实施例1、比较例1、比较例2和比较例3的目标分子的分解率的图表。在实施例1中,确认了目标分子的分解率为30%。

[0101] [比较例1]

[0102] 除了作为阴极电极1而使用了金电极(在电极上什么也没有固定的金电极)这点以外,与实施例1同样地进行。将电泳图像示于图7。图7的(b)为比较例1的电泳图像,在用虚线围成的区域发现了目标分子的条带。在比较例1中,确认了残存率为99%。

[0103] 另外,将分解率的计算结果示于图8。在比较例1中,确认了目标分子的分解率为1%。

[0104] [比较例2]

[0105] 除了作为阴极电极1而使用了只将电子传递体固定于电极的金电极以外,与实施例1同样地进行。将电泳图像示于图7。图7的(c)为比较例2的电泳图像,在用虚线围成的区域中发现了目标分子的条带。在比较例2中,确认了残存率为99%。

[0106] 另外,将分解率的计算结果示于图8。在比较例2中,确认了目标分子的分解率为1%。

[0107] [比较例3]

[0108] 除了作为阴极电极1而使用了只将氧化还原酶固定于电极的金电极以外,与实施例1同样地进行。将电泳图像示于图7。图7的(d)为比较例3的电泳图像,在用虚线围成的区域中发现了目标分子的条带。在比较例3中,确认了残存率为96%。

[0109] 另外,将分解率的计算结果示于图8。在比较例3中,确认了目标分子的分解率为4%。

[0110] (结果)

[0111] 由实施例1、比较例1~3的结果可知,金电极(比较例1)和只将电子传递体固定于金电极的电极(比较例2)的分解率为1%,只将氧化还原酶固定于金电极的电极(比较例3)的分解率为4%。认为这些结果为误差的范围,因此确认了即使只将电子传递体和氧化还原酶中的一者固定于电极,也没有提高目标分子的还原率。另一方面,如果使用将电子传递体和氧化还原酶固定于电极的酶固定电极(实施例1),获得了目标分子的分解率为30%的明显的结果。因此,确认了如果使用本公开涉及的酶固定电极,能够将试样中的目标分子还原。

[0112] [比较例4]

[0113] 除了作为阴极电极1而使用了将碳数15的烷基链用于第二接头的酶固定电极这点以外,与实施例1同样地进行。与实施例1同样地,作为对照样品,将施加电压前的β-乳球蛋白也供于SDS-PAGE,将该数值作为目标分子的残存率100%,通过比例计算,算出了比较例4的目标分子的残存率。将电泳图像示于图9。图9为表示实施例1、比较例4和比较例5的SDS-PAGE后的电泳图像的图。图9的(a)为对照样品的电泳图像。图9的(e)为分子量标记的电泳图像。图9的(b)为比较例4的电泳图像,在用虚线围成的位置发现了目标分子的条带。在实施例4中,确认了残存率为99%。

[0114] 将分解率的计算结果示于图10。图10为表示实施例1、比较例4和比较例5的目标分子的分解率的图表。在比较例4中,确认了目标分子的分解率为1%。

[0115] 再有,图9的(c)为实施例1的电泳图像,残存率为72%,分解率为28%。

[0116] [比较例5]

[0117] 除了作为阴极电极1而使用了将碳数8的烷基链用于第二接头的酶固定电极这点以外,与实施例1同样地进行。将电泳图像示于图9。图9的(d)为比较例5的电泳图像,在用虚线围成的区域中发现了目标分子的条带。在比较例5中,确认了残存率为81%。

[0118] 另外,将分解率的计算结果示于图10。在比较例5中,确认了目标分子的分解率为19%。

[0119] (结果)

[0120] 由实施例1、比较例4和比较例5的结果确认:在用于将电子传递体和氧化还原酶固定的接头的碳数为优选的范围外的情况下(比较例4和比较例5),没有使目标分子的还原率提高。认为由于电子传递体与氧化还原酶的距离超过了电子可移动的范围,因此没有进行从电极向氧化还原酶的电子传输。

[0121] 另一方面,在用于固定电子传递体和氧化还原酶的接头的碳数为优选的范围内的情况下(实施例1),确认了就目标分子的还原率而言,高效率地将其分解。认为由于电子传递体与氧化还原酶的距离在电子可移动的范围,因此进行了从电极向氧化还原酶的电子传输。因此,获得了目标分子的分解率为28%的明显的结果。因此,确认了如果使用本公开涉及的酶固定电极,则能够将试样中的目标分子还原。

[0122] 以上基于实施方式对本公开涉及的酶固定电极、酶固定电极的制造方法以及目标分子的氧化还原方法进行了说明,但本公开并不限定于这些实施方式。只要不脱离本公开的主旨,将本领域技术人员想到的各种变形施用于实施方式的技术方案、将实施方式中的一部分的构成要素组合而构筑的另外的实施方案也包含在本公开的范围内。

[0123] 产业上的可利用性

[0124] 根据本公开,能够提供能够从电极向固定于电极的氧化还原酶、进而从氧化还原酶向试样中的目标部分输送电子、将目标分子高效率地氧化还原的酶固定电极和实施使用了该电极的目标分子的氧化还原方法的装置。

[0125] 符号说明

[0126] 1 阴极电极

[0127] 2 参比电极

[0128] 3 对电极

[0129] 4 单元

[0130] 5 盖部

[0131] 6a 端子

[0132] 6b 端子

[0133] 6c 端子

[0134] 7a 引线

[0135] 7b 引线

[0136] 7c 引线

[0137] 8 搅拌棒

[0138] 9 试样

[0139] 10 电压施加部

[0140] 11 玻璃基板

[0141] 12 钛蒸镀层

[0142] 13 阴极基板

[0143] 14 反应层

[0144] 20 电源

[0145] 30 控制部

[0146] 40 搅拌部

[0147] 100 目标分子氧化还原装置

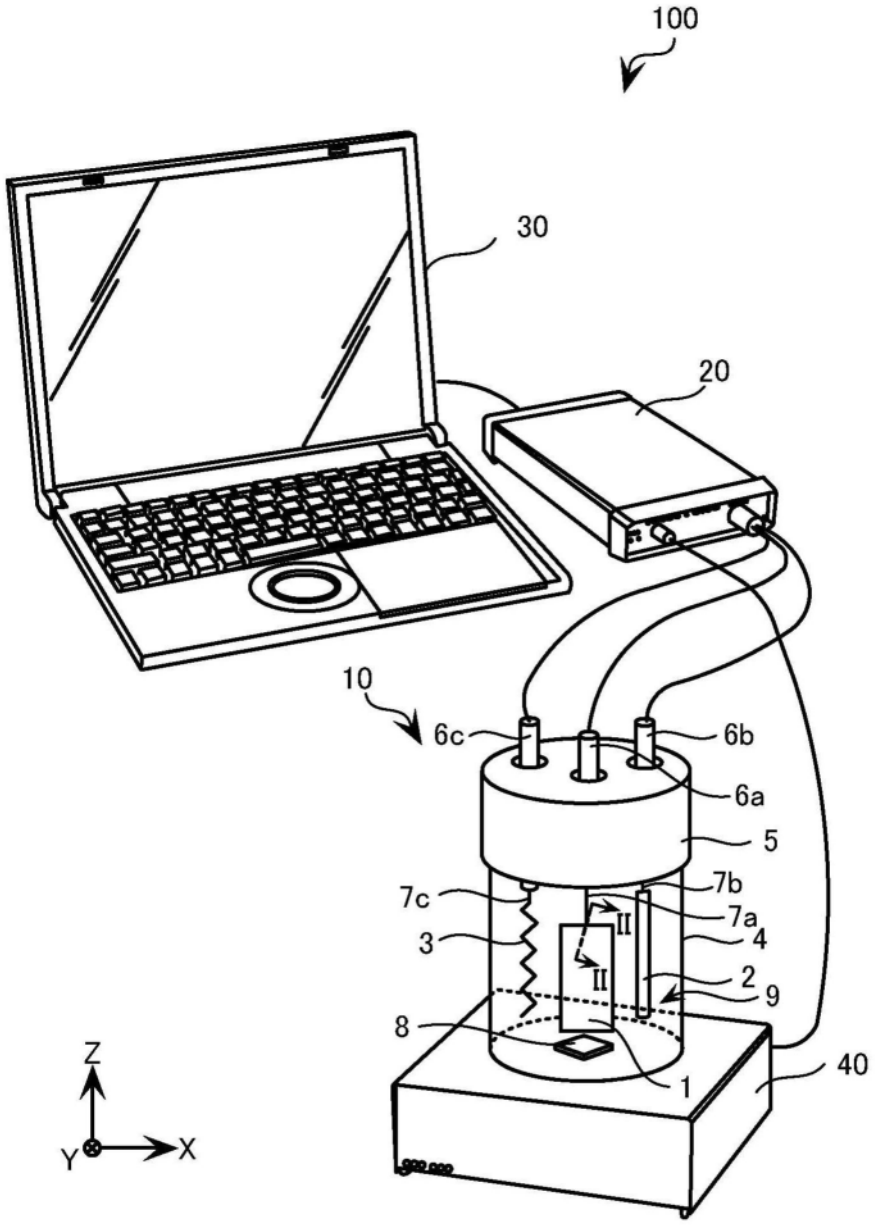


图1

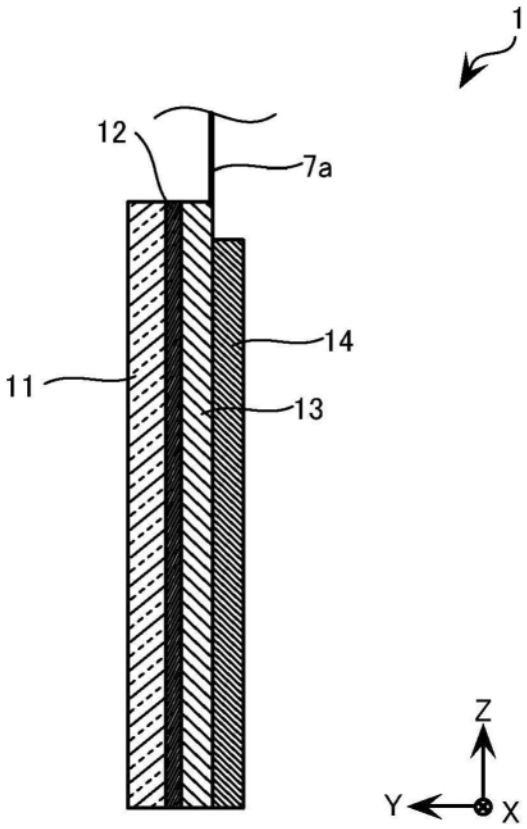


图2

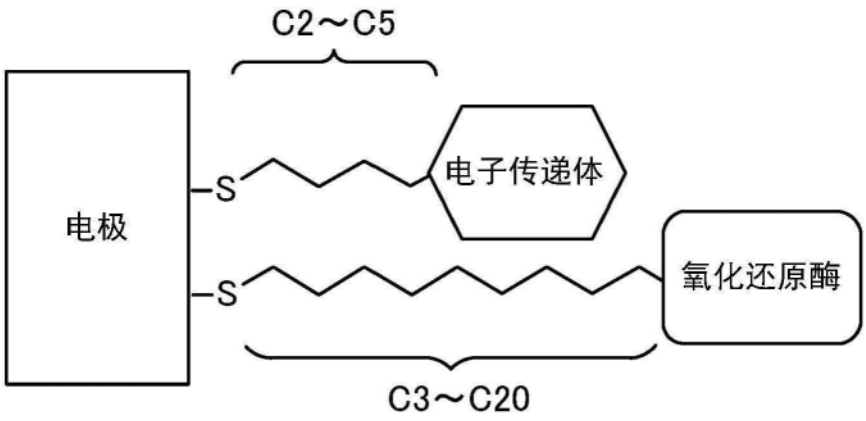


图3

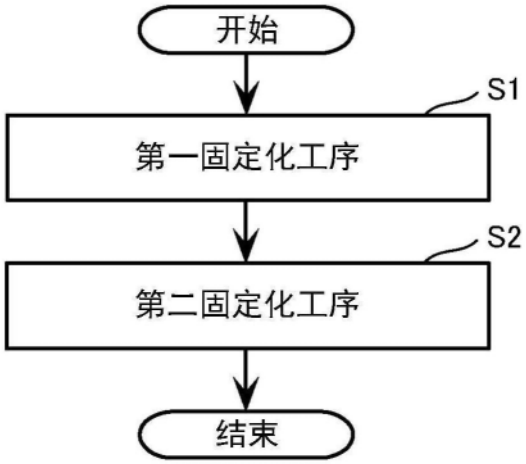

开始
S1
第一固定化工序
S2
第二固定化工序
结束

图4

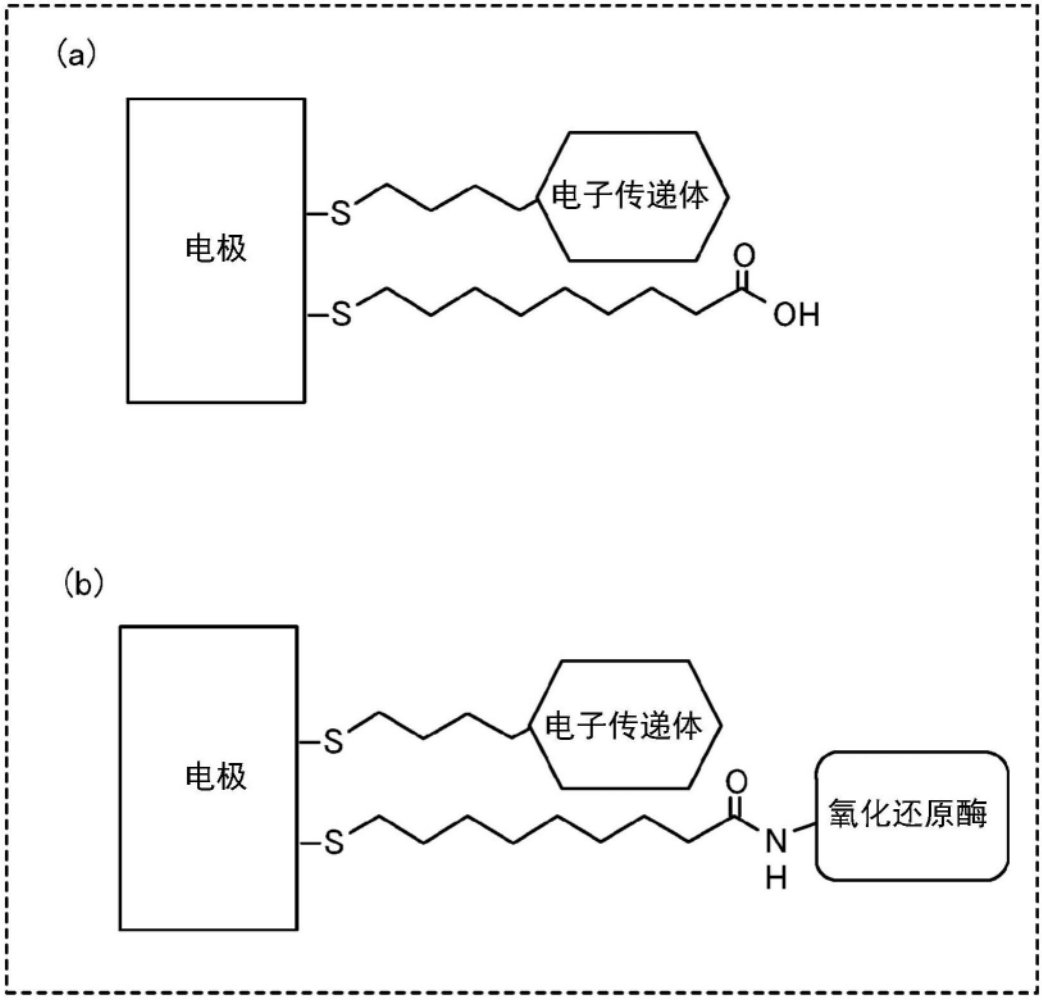

(a)
电极
S
电子传递体
S
O
OH
(b)
电极
S
电子传递体
S
O
N
H
氧化还原酶

图5

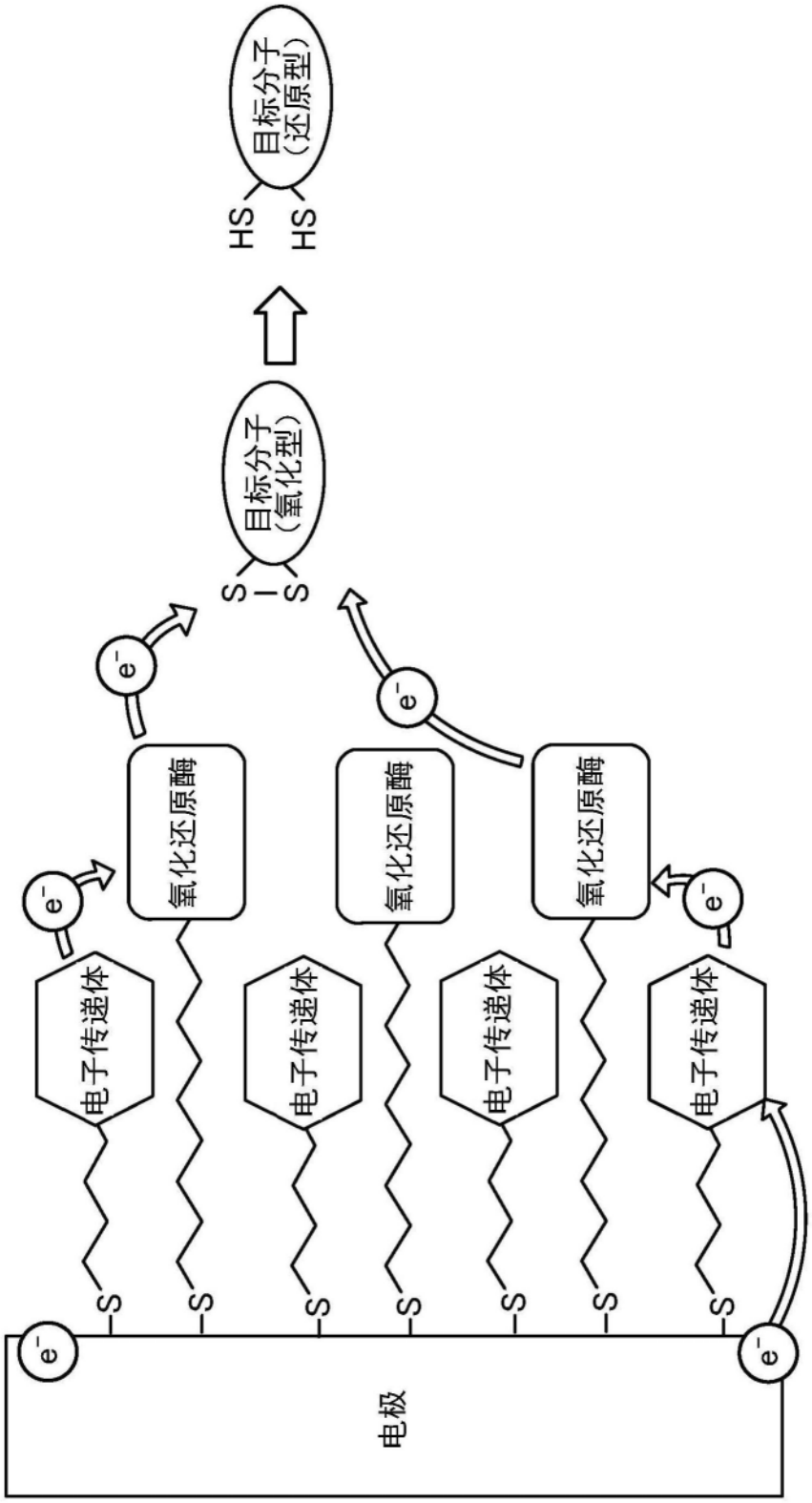

目标分子
(还原型)
HS
HS
目标分子
(氧化型)
S
S
e⁻
氧化还原酶
氧化还原酶
氧化还原酶
电子传递体
电子传递体
电子传递体
电子传递体
S
S
S
S
S
S
S
e⁻
e⁻
e⁻
e⁻
电极

图6

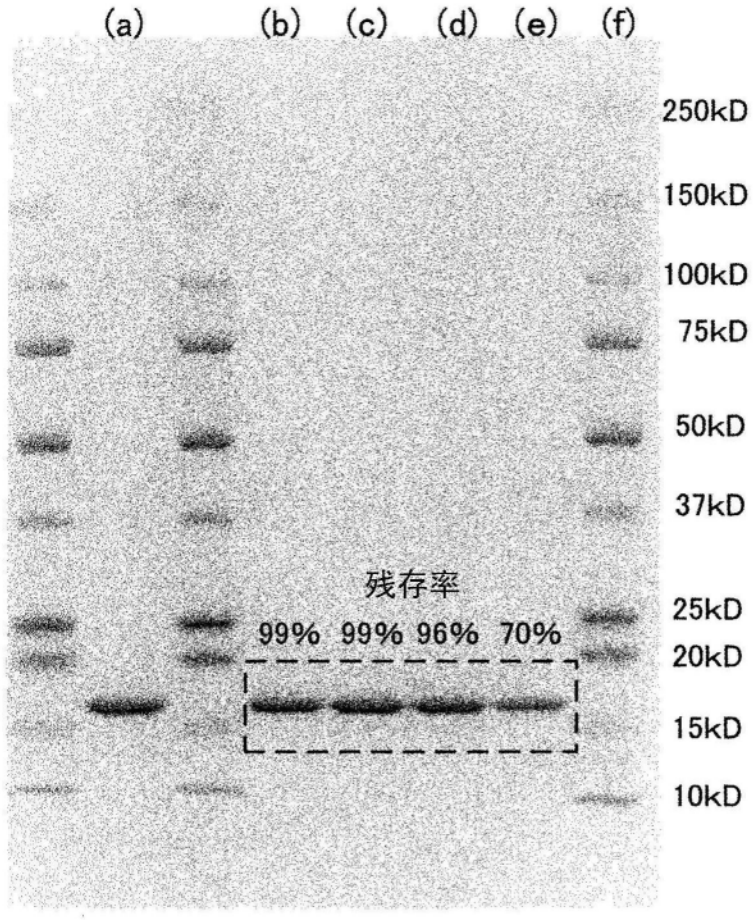

(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
250kD
150kD
100kD
75kD
50kD
37kD
25kD
20kD
15kD
10kD
残存率
99%
99%
96%
70%

图7

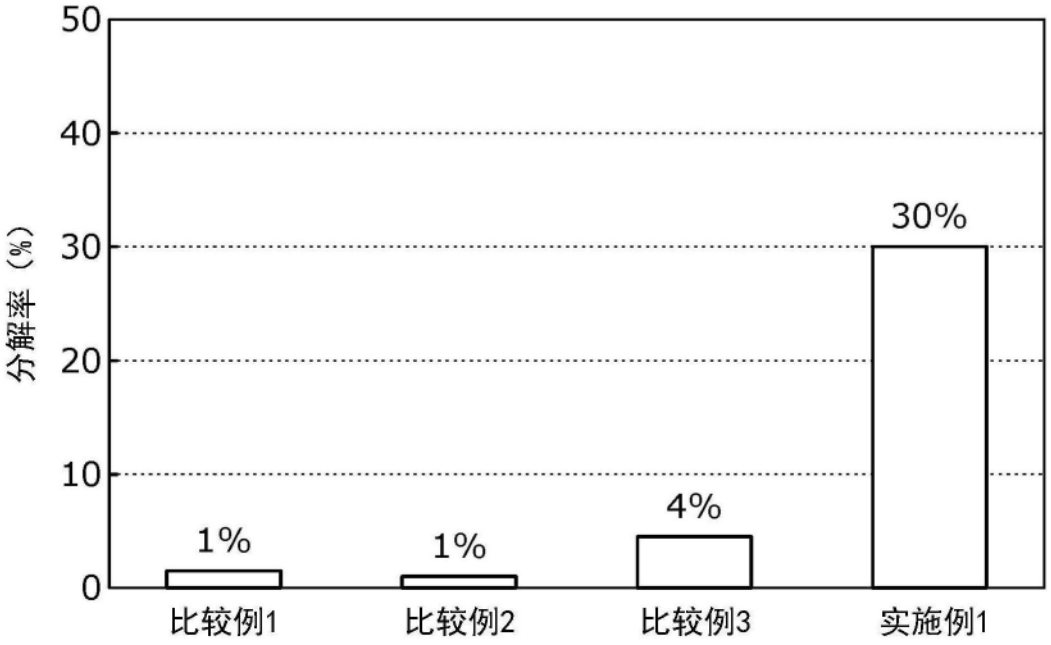

50
40
30
20
10
0
分解率（%）
1%
1%
4%
30%
比较例1
比较例2
比较例3
实施例1

图8

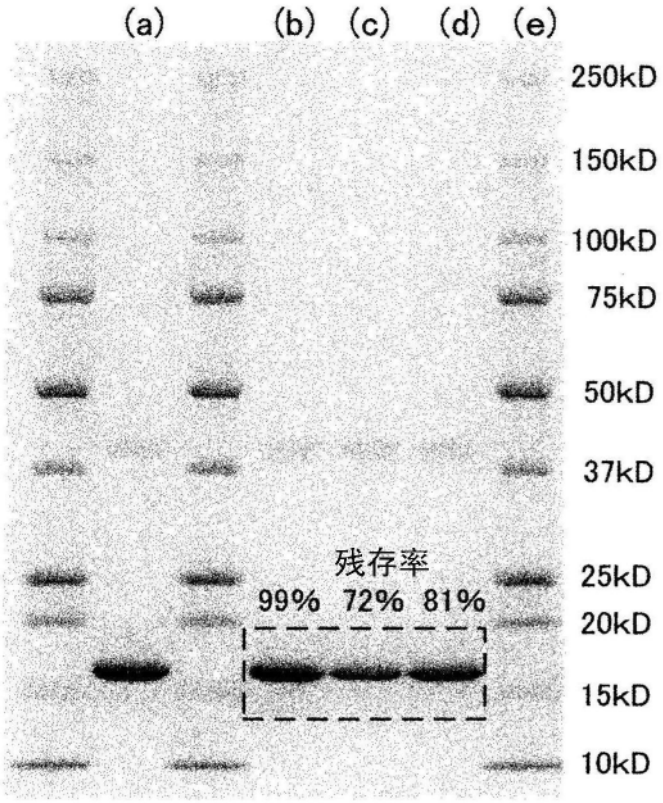

(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
250kD
150kD
100kD
75kD
50kD
37kD
25kD
20kD
15kD
10kD
残存率
99% 72% 81%

图9

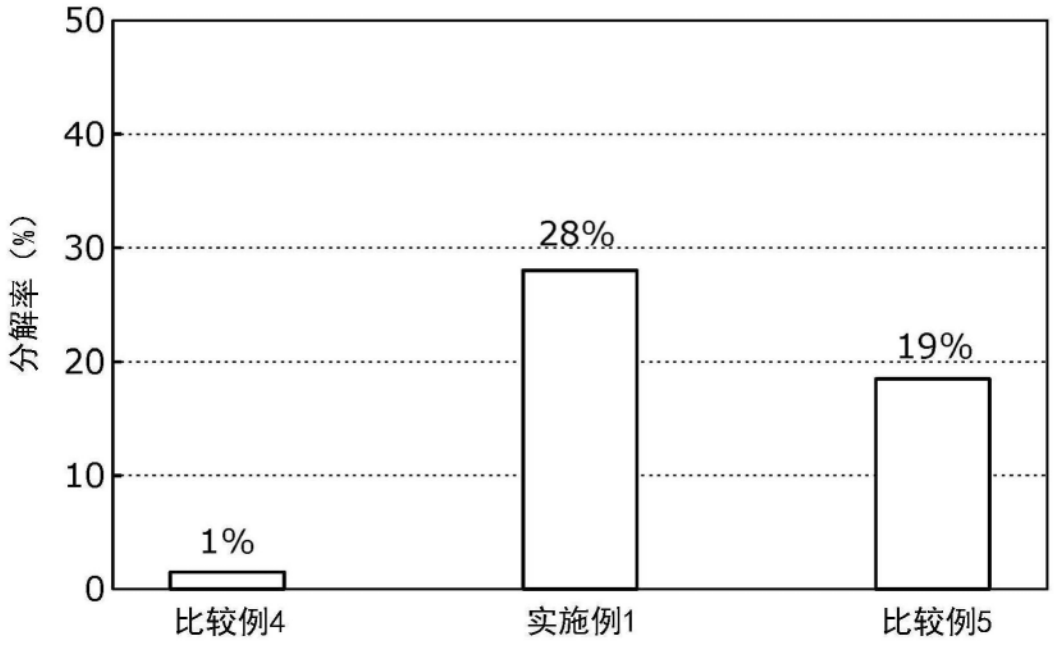

50
40
30
20
10
0
分解率（%）
28%
19%
1%
比较例4
实施例1
比较例5

图10