



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105940300 B

(45)授权公告日 2019.01.22

(21)申请号 201480057514.9

院为代表的美利坚合众国

(22)申请日 2014.09.02

(72)发明人 O·B·阿雅布 A·M·伯赫恩斯

P·科菲纳斯 M·L·萨默

J·M·卡布里拉-卢克 G·坎宁安

A·萨米欧诺夫 J·马鲁甘

(43)申请公布日 2016.09.14

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(30)优先权数据

代理人 张静 陈文青

61/872,149 2013.08.30 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.04.19

(56)对比文件

US 7150975 B2,2006.12.19,

(86)PCT国际申请的申请数据

徐华华等.加膜流动注射光度法测定水中微量氨.《上海环境科学》.2000,第19卷(第12期),

PCT/US2014/053756 2014.09.02

徐华华等.加膜流动注射光度法测定水中微量氨.《上海环境科学》.2000,第19卷(第12期),

(87)PCT国际申请的公布数据

审查员 谢林

W02015/031911 EN 2015.03.05

权利要求书4页 说明书84页  
序列表40页 附图29页

(73)专利权人 马里兰大学派克分院

地址 美国马里兰州

专利权人 儿童国家医疗中心

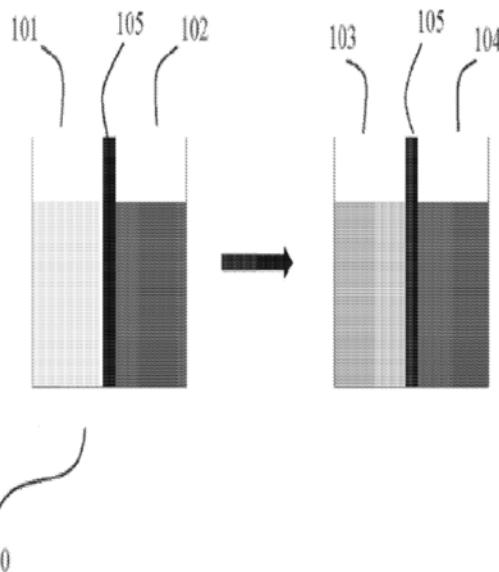
(54)发明名称

检测高氨血症的装置和使用此类装置的方

法

(57)摘要

本公开涉及能够通过在离聚物存在的情况下,使用靛酚试剂测量一种或多种氨或铵离子的总浓度的生物传感器。在一些实施方案中,所述生物传感器包含全氟化膜,所述膜包含与被配置来接收样品诸如全血的容器中的碱缓冲液接触的离聚物。本公开还涉及在即时检测型生物传感器中检测或定量全血中的氨或铵离子浓度而不依赖于气相色谱或花费超过约20分钟的任何测量的方法。



1. 一种生物传感器，所述生物传感器包含：  
至少第一容器和第二容器；  
置于所述第一容器与所述第二容器之间的流体交换开口；  
与所述至少第一容器流体连通的至少一个导管，所述至少一个导管被配置来从所述生物传感器外部的点接收流体；和  
置于所述流体交换开口的膜；  
其中所述膜为Nafion膜，并且  
其中所述第一容器或所述第二容器单独地或组合地包含：次卤酸盐、碱性缓冲剂以及至少一种酚试剂。
2. 根据权利要求1所述的生物传感器，其中所述第一容器或所述第二容器单独地包含次卤酸盐、碱性缓冲剂、催化剂和至少一种酚试剂。
3. 根据权利要求1所述的生物传感器，所述生物传感器还包含至少第一导电载体，所述导电载体与所述至少第二容器流体连通，所述导电载体通过至少一根导线可操作地连接至安培计、电压计、分光光度计或其组合。
4. 根据权利要求3所述的生物传感器，其中所述导电载体还包含水凝胶和至少一种代谢酶或其功能性片段。
5. 根据权利要求3所述的生物传感器，其中所述导电载体包含选自说明书表2的代谢酶或其功能性片段的至少一种或其组合。
6. 根据权利要求3所述的生物传感器，其中所述生物传感器包含至少第一导电载体和第二导电载体，其中将所述第一导电载体附接于水凝胶，所述水凝胶包含至少一种代谢酶或其功能性片段，其中所述第一导电载体和第二导电载体可操作地连接于所述电压计和/或安培计以在其间施加电压。
7. 根据权利要求1所述的生物传感器，其中所述生物传感器不包含以下物质的一种或多种：(i) 尿酸酶或其功能性片段；(ii) 包含葡聚糖或其衍生物的水凝胶；(iii) 细菌细胞；(iv) 被配置来用于电泳的电子偶极；和(v) 3,4-DHB。
8. 根据权利要求1所述的生物传感器，其中所述生物传感器不包含气化室、气相色谱或被配置用于将液氮转换成气体状态的加热组件。
9. 根据权利要求1所述的生物传感器，其中所述至少一个导管被配置来保持约5μl至约100μl的样品体积。
10. 根据权利要求1所述的生物传感器，其中所述生物传感器在功能上不依赖于对所述生物传感器外部的任何刺激的暴露。
11. 根据权利要求3所述的生物传感器，所述生物传感器还包含含有至少一根导线和数字显示器的电路，所述数字显示器可操作地连接于被配置来接收来自所述分光光度计的数字信息并将数字信息发送至所述数字显示器的处理器。
12. 根据权利要求1所述的生物传感器，其中所述生物传感器还包含含有被配置用于接收一定体积的体液的所述至少一个导管的测试条。
13. 根据权利要求1所述的生物传感器，还包含含有约0.1M至约5M醋酸钠或氯化钠的缓冲剂。
14. 根据权利要求4所述的生物传感器，其中所述至少一种酶是来自表2的酶或其功能

性片段,所述功能性片段与说明书表2中公开的序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性;其中所述水凝胶包含海藻酸盐,其中所述水凝胶的海藻酸盐浓度为约1%至约3%的重量对体积的附着于所述至少一种导电载体的总体积;以及其中所述导电载体包含可操作地连接于所述电压计和/或安培计的包含银和氯化银的导线。

15. 根据权利要求1所述的生物传感器,其中所述膜的厚度为约1到约40微米。
16. 根据权利要求3所述的生物传感器,其中所述导电载体未被包含纤维素或其衍生物的膜覆盖。
17. 根据权利要求1所述的生物传感器,其中所述次卤酸盐是次氯酸盐。
18. 根据权利要求1所述的生物传感器,其中所述至少一种酚试剂选自:苯酚、2-苯基苯酚或萘酚。
19. 根据权利要求1所述的生物传感器,还包含含有约1.0M的氯化钠、氯化钙、氯化锌、醋酸钠、醋酸钙或醋酸锌的缓冲剂。
20. 根据权利要求1所述的生物传感器,其中所述膜的厚度为约15到约35微米。
21. 一种用于检测代谢疾病的系统,其包含与至少一个计算机存储器内存可操作地连接的权利要求1-20的任一项的生物传感器。
22. 根据权利要求21所述的系统,所述系统还包含含有全血的样品。
23. 根据权利要求21或22中任一项所述的系统,所述系统还包含通过电路可操作地连接于二极管、分光光度计、电压计和/或安培计的数字显示器,所述电路能够将对应于来自二极管、分光光度计、电压计和/或安培计的波长、电流和/或电压差分的测量的电信号传输至所述数字显示器,其中所述数字显示器被配置来显示当酚试剂与所述样品接触足以形成靛酚反应的反应产物的一段时间时,样品中的氨、铵离子和/或氨基酸的浓度值。
24. 根据权利要求21所述的系统,所述系统还包含与所述至少一个计算机存储器内存可操作地连接的计算机处理器。
25. 一种包含生物传感器或测试条的试剂盒,所述生物传感器或测试条包含:
  - 至少第一容器和第二容器;
  - 置于所述第一容器与所述第二容器之间的流体交换开口;
  - 与所述至少第一容器流体连通的至少一个导管,所述至少一个导管被配置来从所述生物传感器外部的点接收流体;和
  - 置于所述流体交换开口的膜;
  - 其中所述膜为Nafion膜,和
  - 其中所述第一容器或所述第二容器单独地或组合地包含:次卤酸盐、碱性缓冲液以及至少一种酚试剂。
26. 根据权利要求25所述的试剂盒,其中所述碱性缓冲液为约1M氯化钠或醋酸钠。
27. 根据权利要求25所述的试剂盒,所述试剂盒还包含以下的至少一种:
  - (i) 多个包含一个或多个导电载体的测试条,其中所述一个或多个导电载体包含含有海藻酸盐的水凝胶,
  - (ii) 对照或参照体液样品,
  - (iii) 一组包含阈值的数据,以及

(iv) 一套说明书,所述一套说明书或所述数据组任选地可通过电子介质来远程访问。

28. 一种包含固体载体的试剂盒,所述固体载体包含至少第一容器和第二容器;  
置于所述至少第一容器与第二容器之间的流体交换开口;  
与所述至少第一容器体液连通的至少一个导管,所述至少一个导管被配置来从所述固体载体外部的点接收流体;和

置于所述流体交换开口的膜;

其中所述膜为Nafion膜,和

其中所述第一容器或所述第二容器单独地或组合地包含:次卤酸盐、碱性缓冲液以及至少一种酚试剂。

29. 根据权利要求28所述的试剂盒,所述试剂盒还包含第一电极和第二电极,其中所述第一电极包含水凝胶,所述水凝胶包含至少一种电子介体、至少一种还原剂和至少一种代谢酶或其功能性片段;并且其中所述第二电极是对照或参比电极。

30. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中所述固体载体是附接于所述第一电极和第二电极的测试条。

31. 一种测定或鉴定样品中的氨或铵离子的浓度的方法,所述方法包括:将样品与权利要求1-20的任一项所述的生物传感器接触,和测定所述样品中的氨或铵离子的量。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述样品为全血。

33. 一种定量体液样品中的氨或铵离子的浓度的方法,所述方法包括将体液样品与权利要求1-20的任一项所述的生物传感器接触。

34. 根据权利要求31所述的方法,其中所述接触步骤包括将所述样品暴露于权利要求1-20的任一项的生物传感器持续充足的一段时间,以允许所述酚试剂的修饰,以被修饰成靛酚反应的反应产物。

35. 根据权利要求33所述的方法,其中所述方法不包括在将所述样品与所述至少一种导电载体接触之前,将所述体液样品暴露于任何外部刺激物或试剂。

36. 根据权利要求33所述的方法,其中所述体液样品为来自受试者的全血。

37. 根据权利要求33所述的方法,其中所述体液样品不含尿。

38. 如权利要求1-20的任一项的生物传感器在制备用于诊断对象代谢疾病的试剂盒中的应用。

39. 根据权利要求38所述的应用,其中所述代谢疾病为高氨血症。

40. 如权利要求1-20的任一项的生物传感器在制备用于确定对象对疗法的响应的试剂盒中的应用。

41. 一种包含固体载体的测试条,所述固体载体包含:

至少第一容器和第二容器;

置于所述第一容器与第二容器之间的流体交换开口;

与所述至少第一容器流体连通的至少一个导管,所述至少一个导管被配置来从所述固体载体外部的点接收流体;和

置于所述流体交换开口的膜;

其中所述膜为Nafion膜,和

其中所述第一容器或所述第二容器单独地或组合地包含:次卤酸盐、碱性缓冲液以及

至少一种酚试剂。

42. 根据权利要求41所述的测试条,其中所述测试条适合用于包含二极管、分光光度计、电压计和/或安培计和数字显示器的便携式装置,以便当将所述测试条与所述装置接触时,所述第一和第二容器被可操作地连接成包含电压计和/或安培计和数字显示器的闭合电路,并且,在与样品、次卤酸盐、碱性缓冲液和至少一种酚试剂在靛酚反应中反应,从而导致对应于样品中的氨的浓度值的对流,此类浓度值可在所述便携式装置的显示器上读出。

43. 一种制造权利要求1-20的任一项的生物传感器的方法,所述方法包括:用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>洗涤所述膜,和将所述膜固定在所述导管中的所述第一容器和第二容器之间。

44. 一种检测样品中的氨基酸的存在、不存在或量的方法,所述方法包括:

- (a) 将体液样品与权利要求1-20的任一项的生物传感器接触;
- (b) 定量一个或多个氨或铵离子的浓度值;
- (c) 使所述一个或多个氨或铵离子的浓度值与氨基酸的一个或多个量相关联。

## 检测高氨血症的装置和使用此类装置的方法

[0001] 政府资助

[0002] 本公开是由NIH和政府在由NIH授予的HHSN268201200360P下通过政府资助联合进行的。美国政府具有本公开的某些权利。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请是指定美国和根据35U.S.C. §120提交的国际申请,其要求2013年8月30日提交的美国临时专利申请第61/872,149号的优先权,该临时专利申请通过引用整体并入本文。

### 发明领域

[0005] 本公开总体上涉及定量和鉴定氨或铵离子在体液、水的样品或其它环境样品中的存在或不存在的装置。在一些实施方案中,本公开涉及通过检测氨或铵离子在体液样品中的存在、不存在或量诊断具有高氨血症的受试者。在一些实施方案中,所述装置为仅需要完全体液的样品来检测和/或定量氨或铵离子的生物传感器。

[0006] 发明背景

[0007] 升高的氨水平(常常称为高氨血症)是与多种疾病,诸如在新生婴儿中发现的肝硬化和尿素循环障碍相关联的潜在致命症状。如果不进行治疗,高氨血症可导致认知发展、癫痫、其它神经问题和死亡。目前的测试方法包括由中心实验室进行的荧光和串联质谱分析,其可花费数天来产生可靠的诊断。这些方法涉及大量的、繁琐的和昂贵的机器,一旦疾病已被确定,这阻碍了在床边或家中的氨水平的测试。因此,用于即时检测型测试装置的系统可以是想要的,因为这可允许治疗的施用更迅速地进行,反过来促进婴儿的神经发育以及使肝硬化更易于控制。还可廉价地改进能够测试高氨血症的装置来检测氨基酸水平,以用于诊断和治疗氨基酸代谢疾病和其它疾病。

[0008] 发明概述

[0009] 本公开认识到,可通过确定任何样品(包括体液,包括人和非人全血样品)中的氨或铵离子的水平或量来鉴定和/或表征高氨血症。在一些实施方案中,本公开涉及通过将体液与本文中公开的装置接触来鉴定氨或铵离子在体液中的量、存在或不存在。在一些实施方案中,本文中公开的方法不包括在鉴定或定量一种或多种氨或铵离子是否存在于体液中或有多少存在于体液中之前,将体液与任何试剂或外部刺激接触。

[0010] 根据至少一个示范性实施方案,可公开用于即时检测型高氨血症传感器的系统、方法和装置。该系统可利用苯酚、2-苯基苯酚、茚三酮、碘化汞钾(II)、硝普钠、氢氧化钠、类似试剂、催化剂和缓冲剂,或其组合。该系统还可利用次卤酸盐、氯胺T、漂白剂或类似化学物质。通常被称为贝特洛反应或靛酚反应,该反应可通过在检测氨浓度时改变颜色来测定各种介质中的氨水平。这对于医疗系统(诸如在诊断高氨血症和各种氨基酸代谢疾病中);民用工程系统(诸如在测定废水处理厂的氨水平中);或对于基于家庭的系统(诸如水族馆或导管中的氨检测中)是有用的。

[0011] 根据至少一个示范性实施方案,可公开用于即时检测型高氨血症传感器的装置。

使用的装置可具有用于放置待测试的试剂和样品的凹部、窝或根据需要的任何其它类型的孔。分离样品和试剂可以是阳离子交换膜过滤器,诸如,Nafion或类似的全氟化离聚物,以允许氨在孔的两个部分之间通过。也可使用阴离子交换膜,以及各种聚合物水凝胶,诸如丙烯酰胺、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)。另外,其它示例性实施方案可包括用于通过光电二极管和传感器或需要更少量的试剂和样品的微流体装置定量分析颜色变化的机制。

[0012] 本公开涉及能够通过使用包含用于靛酚或贝特洛反应的试剂(诸如次氯酸盐(hypchlorite)、苯基苯酚、碱性水溶液诸如NaOH和碱诸如醋酸钠)的系统测量样品中的氨或铵离子的总浓度的生物传感器。在一些实施方案中,所述传感器或系统包括至少包含含水相或干燥相中的碱性缓冲剂的第一容器。在一些实施方案中,包括至少包含凝胶或水凝胶的第一容器,所述凝胶或水凝胶包含以下物质的至少一种或其组合:干燥相或水相中的靛酚反应物,水相或干燥相中的碱性缓冲液,水相或干燥相中的碱溶液,和或氧化至少一种氨基酸底物的酶。本公开提供了用于测量氨或铵离子的总浓度的氨或铵离子生物传感器。在一些实施方案中,通过比色分析实现氨或铵离子的检测或定量,由此氨或铵离子的反应产物能够发射在光的可见光谱中的波长。在一些实施方案中,所述系统和/或生物传感器包含在至少一个容器中被配置来发射光的二极管,和在含有靛酚或贝特洛反应的反应物的容器中被配置来接收发射的光的分光光度计。

[0013] 在一些实施方案中,所述系统和/或生物传感器还检测氨基酸在溶液中的不存在、存在或量。在一些实施方案中,所述系统和/或生物传感器包含至少第一导电表面(用于测量)和至少第二导电表面(对电极),其中所述第一导电表面具有一种或多种本文中描述的靛酚反应试剂或本文中描述的任一种或多种靛酚反应试剂的组合以及组成因子、介体、一种或多种酶的任一种或组合,其中,如果所述装置包含一种或多种酶,则所述一种或多种酶选择性地将一种或多种氨基酸用作底物。在这些利用至少第一或第二电极的实施方案中,所述一个或多个酶通过与作为底物的指定的氨基酸反应产生反应产物,其中所述介体在反应产物之间传输电子,以及所述电极测量氨基酸浓度,并且其中在所述第一与第二导电表面之间测量时施加的电压包括这样的施加电压,所述施加电压,在工作曲线上代表针对一种或多种指定的氨基酸的每一种的电流值与施加的电压之间的关系、关于个别氨基酸的未改变的施加电压上的电流值的分布。在其中所述装置、系统和/或生物传感器包含至少第一电极和/或第二电极的其它实施方案中,将所述第一电极和/或第二电极置于至少一个其中本文中描述的靛酚试剂可与试剂的一种或多种组分反应的容器中,与其基本相邻或相邻。在一些实施方案中,铵离子的氨可以是其中使用酚或酚相关化合物的靛酚反应可发生的酶促反应之一的反应产物。

[0014] 根据至少一个示范性实施方案,公开了用于即时检测型高氨血症传感器的装置、设备和/或系统。所述装置包括用于放置待测试的试剂和样品的至少第一容器、或一个凹部或根据需要的任何其它类型的孔。所述第一容器可由本文中公开的膜制造或所述第一容器可与第二容器紧密相邻,经由流体交换开口与第二容器流体连通。在一些实施方案中,将膜置于流体交换开口上。在一些实施方案中,所述膜能够从将离子所述第一容器输送至所述第二容器或反之亦然。在一些实施方案中,膜为阳离子交换膜过滤器,例如Nafion®或包含全氟化离聚物的类似膜。所述膜允许氨在两个容器之间或所述至少第一容器的两个分叉

部分之间的通过。还可使用阴离子交换膜,以及各种聚合物水凝胶,诸如丙烯酰胺、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)。

[0015] 其它示例性实施方案可包括用于样品中氨或铵离子浓度的定量分析的方法和机制,通过将样品与包含于固相或液相中的至少一种靛酚试剂和/或碱性缓冲液的容器、暴露于本文中公开的膜的至少部分的容器的部分接触。在一些实施方案中,所述方法包括在将样品添加至所述容器或容器之前和之后检测或定量至少所述第一容器或第二容器内的颜色变化的强度。在一些实施方案中,所述方法包括将样品与至少第一容器、暴露于本文中公开的至少一种膜或被所述膜覆盖的区域或部分接触,此类第一容器还任选地包含于固相或液相中的本文中公开的至少一种靛酚试剂和/或碱性缓冲液。在一些实施方案中,如果所述至少第一容器包含缓冲液,则所述缓冲液可以是碱性溶液诸如醋酸钠或醋酸钙。在一些实施方案中,本公开涉及将样品与本文中公开的包含至少第一容器和第二容器的装置、生物传感器或系统接触,所述方法包括将样品与所述第一容器中的所述碱性缓冲液接触或暴露于其,从而允许来自样品的氨转移至包含本文中公开的靛酚试剂的第二容器。在一些实施方案中,本公开涉及将样品与本文中公开的包含至少第一容器和第二容器的装置、生物传感器或系统接触,所述方法包括将样品与所述至少第一容器中的碱性溶液接触或暴露于其,从而允许来自样品的氨转移至包含本文中公开的靛酚试剂的第二容器,所述第二容器包含一种或多种靛酚反应物,其在与氨接触后产生靛酚或靛酚相关化合物,在一些实施方案中,将所述第二容器的内容物暴露于光,测量靛酚化合物或靛酚相关化合物在特定的可见光波长下对光的吸收,所述吸光度指示样品中的氨或铵离子的量或与所述量成比例,并且其吸光度可通过个人进行测试或通过被并入本文中公开的装置、生物传感器或系统的测量波长的装置来检测。在一些实施方案中,所述方法包括将颜色或波长的吸光度与指示高氨血症的程度或严重度的标准相比较。在一些实施方案中,所述方法包括将样品与公开的包含二极管、光电二极管和/或分光光度计或能够测量靛酚或靛酚相关化合物(作为装置内的靛酚的产物产生的并且暴露于光的)对波长的吸光度的其它装置的装置、生物传感器或系统接触。在一些实施方案中,所述装置、生物传感器和/或系统包含微流体电路,其包含至少一个被配置来从装置、生物传感器和/或系统外部的点接收样品的导管,此类微流体电路包含与至少所述第一和/或第二容器流体连通的导管或系列导管以及分光光度计、二极管或能够测量靛酚或靛酚相关化合物在其暴露于光后对特定波长的吸光度的其它装置之一或其组合。

[0016] 在一些实施方案中,本公开涉及将样品与本文中公开的容器内的碱缓冲液和/或膜接触或暴露于其,所述容器附接于能够测量由靛酚或靛酚相关化合物产生的或被分析的代谢产物的氧化还原转化产生的电子流的电极。血液中的氨和/或铵离子和/或代谢产物的浓度与包含所述至少一个导电表面的电路上的电子流或电流测量相关。本公开涉及该概念的付诸实践,显示如何选择代谢产物,如何选择固定化酶,如何进行固定化(什么聚合物、什么添加剂等),如何将组分附接于电极,如何进行测量和如何开发原型。本公开用于实时测量患者血液中的氨或铵离子和/或代谢产物。除本文中公开的传感器外,不存在能够实时测量提出的代谢产物的已知传感器。

[0017] 本公开还涉及装置或系统,所述装置或系统包含至少一个可操作地连接于二极管、分光光度计、电压计和/或安培计的导电表面(诸如电极),所述电极包含当组合时并且

在氨存在的情况下引起靛酚反应的组分。靛酚反应产物包含在暴露于光后发射可见的或已知的波长的分子。在一些实施方案中，本文中公开的装置和系统包含二极管诸如光电二极管，其发射光至包含靛酚反应产物的容器中，从而激发反应产物并引起反应产物发射可见或已知的波长。在一些实施方案中，本文中公开的装置和系统包含检测和/或定量由靛酚反应产物发射的可见或已知的光波长的强度的分光光度计。

[0018] 本公开还涉及检测和定量氨基酸的装置和/或系统。在一些实施方案中，所述装置和/或系统包含含有本文中公开的代谢酶或其功能性片段的容器或孔。在一些实施方案中，将酶或其片段固定至将样品在其中最初置于装置、生物传感器、系统、测试条或盒中的容器。在与样品接触后，所述酶或其功能性片段释放至少一个或一系列电子和氨，以便氨在溶液中是游离的并且能够通过本文中公开的膜在第一容器与第二容器之间移动。在一些实施方案中，所述装置包含至少第一和第二导电表面，其中所述第一导电表面包含含有本文中公开的酶的水凝胶，并且所述第二导电表面不包含水凝胶或酶；其中电压计和/或安培计被配置在电路中以便电压计可在氨基酸存在的情况下检测所述第一电极与第二电极之间的电压差分和/或其中安培计可在氨基酸存在的情况下检测相较于第二电极的第一电极中的增加的电流。在水凝胶内的一种或多种酶在一种或多种氨基酸存在的情况下催化身体样品中的氨基酸氧化后释放所述至少一个或一系列电子。

[0019] 在一些实施方案中，水凝胶用于将一种或多种酶(利用代谢产物/分析物作为其反应的特异性底物)连同必需辅因子固定，紧靠至少第一电极表面，水凝胶提供干扰离子和大分子(包含在患者的血液样品中的)从电极传感器的同时排除。将经涂覆的电极包含在能够将通过酶反应产生的氧化还原等效物转换成电子流的电化学检测装置中，所述电子流转而被测量为电流或电压差分。使用使安培数或电压差分与体液样品中的氨基酸浓度相关联的校准曲线推导出分析物浓度。在一个实施方案中，将小体积的全血施加至暴露于电极的容器中或来自全血的氨扩散至所述容器中，并且在至电极的施加或与电极接触的数分钟内报告结果。取决于确切的分析物，将特定的酶和辅因子掺入电极以实现分析物-特异性反应和响应。例如，为了检测升高的苯丙氨酸，将酶苯丙氨酸脱氢酶固定在至少一个任选地包含在水凝胶中的导电表面上。

[0020] 本公开提供了分选体液样品的混合物的方法，所述方法包括：将多个体液样品与本文中公开的装置或系统接触。在一些实施方案中，分选或分类体液样品的混合物的方法还包括以下步骤：测定体液样品中的氨、铵离子和/或氨基酸的一个或多个浓度，如果涉及氨或铵离子浓度，则基于一个或多个容器中靛酚反应产物的存在或量或通过装置测量的电流值或电压差分值；和，如果涉及测定溶液中的氨基酸的一个或多个浓度，则基于通过装置测量的电流值或电压差分值。在一些实施方案中，所述方法还包括以下步骤：将样品或体液中的氨、铵离子和/或氨基酸的一个或多个浓度与获自不具有或非疑似具有一种或多种氨基酸代谢疾病或高氨血症的受试者的体液样品中的氨、铵离子和/或氨基酸的一个或多个浓度相比较，和基于它们在浓度值上与来自无氨基酸代谢疾病和/或高氨血症的受试者的体液样品的相似性或差异分类、汇编或鉴定来自受试者的体液样品或鉴定其是否具有氨基酸代谢疾病和/或高氨血症。本公开提供了诊断具有高氨血症的受试者的方法，所述方法包括：将来自受试者的至少一个体液样品与本文中公开的装置或系统接触。在一些实施方案中，所述诊断方法还包括以下步骤：基于电流值、电压差分值或由靛酚反应产物、靛酚或靛

酚相关化合物发射的光的波长的存在或不存在测定氨和/或铵离子在体液样品中的一个或多个浓度。在每一种情况下,本文中公开的装置和/或系统检测和/或测量此类值。在一些实施方案中,所述方法还包括将来自受试者的一个或多个样品中的氨、铵离子和/或氨基酸的一个或多个浓度与从不具有或非疑似具有一种或多种氨基酸代谢疾病和/或高氨血症的受试者获得的体液样品中的氨基酸的一个或多个浓度相比较,基于它们在浓度值上与来自不具有氨基酸代谢疾病和/或高氨血症的受试者的体液样品的相似性或差异鉴定来自受试者的体液样品是否具有氨基酸代谢疾病和/或高氨血症。

[0021] 本公开还提供监测来自被诊断为具有高氨血症或疑似具有高氨血症的受试者的体液样品中随时间推移的受试者的氨或铵离子的浓度的方法,所述方法包括:将来自受试者的一个或多个体液样品与本文中公开的装置或系统接触,和测量来自受试者的体液在一个时间点上的氨或铵离子的浓度,以及在不同时间点上重复所述测量至少一次。在一些实施方案中,监测来自被诊断为具有高氨血症或疑似具有高氨血症的受试者的体液样品中随时间推移受试者的氨或铵离子的浓度的方法还包括汇编随时间推移的氨或铵离子的浓度值的步骤。在一些实施方案中,所述方法还包括以下步骤:比较随时间推移来自受试者的多个体液样品的氨基酸的一个或多个浓度,任选地当一个或多个氨或铵离子的浓度达到或超过或低于需要医学治疗或饮食调整的阈值时通知受试者。

[0022] 在一些实施方案中,从已被诊断为具有高氨血症或疑似具有高氨血症的受试者分离体液样品。例如,在一些实施方案中,从受试者分离体液样品诸如尿样品或血液样品。将体液样品与至少一个包含至少一种本文中公开的酶的电极接触,和基于通过包含所述至少一个电极的装置检测的电压差分或电流的量级测量体液样品中的氨基酸浓度。在其它实施方案中,本公开的方法包括将体液样品与至少一个包含本文中公开的固定化酶的电极接触,测量所述至少一个电极与不包含本文中公开的固定化酶的导电表面之间的电流或电压差,测定体液样品中的一种或多种氨基酸的浓度,和任选地为从其获得所述体液样品的受试者提供一个或多个浓度值的读出。在其它实施方案中,检测氨或铵离子的方法包括将体液样品与至少一个包含次卤酸盐、碱性水溶液和至少一种包含本文中公开的苯基的化合物的容器接触,测量所述至少一个电极与不包含本文中公开的固定化酶的导电表面之间的电流或电压差,测定体液样品中的氨或铵离子的浓度和任选地,为从其获得体液样品的受试者提供一个或多个浓度值的读出。

[0023] 在一些实施方案中,本公开提供了这样的方法,所述方法包括将来自受试者的体液样品与碱性水溶液或干燥相或粉末相中的碱性缓冲剂接触,在包含离聚物的膜存在(或不存在---以确定对照值)的情况下将所述样品暴露于次卤酸盐和至少一种包含苯基的化合物接触,和任选地接触凝胶。在一些实施方案中,所述凝胶是包含海藻酸盐的水凝胶。在一些实施方案中,本公开提供了包括检测样品中的细胞之间的体液样品中的氨或铵离子的存在或水平的方法。一些实施方案中,提供的方法包括确定特定组的检测的相互作用确定阈值(或对照值)(所述阈值是增加的高氨血症的严重度的特征,因为其将它们与来自受试者的另一个体液样品或作为参照或对照样品的体液样品中的升高的或未升高的氨基酸水平区分开来),以便如果达到所述阈值,本文中公开的装置或系统为受试者提供应当寻求治疗或饮食调整的信号或通知。在一些实施方案中,检测的步骤包括检测体液样品中的氨或铵离子浓度的存在或水平,所述氨或铵离子浓度的存在或水平是样品中的疾病的特定严重

度的特征,因为其将它们与作为参照或对照样品的体液样品区分开来。

[0024] 在一些实施方案中,检测的步骤包括检测体液样品中的氨或铵离子浓度的存在或水平,所述存在或水平为样品中的疾病的特定严重度的特征,因为其将它们与作为参照或对照样品的体液样品相区别。

[0025] 在一些实施方案中,本文中公开的任何方法不包括在将样品与测试条、导管、生物传感器和/或至少一个导电表面接触之前预处理体液样品。在一些实施方案中,本文中公开的任何方法不包括在将样品与测试条、导管、生物传感器和/或至少一个导电表面接触之前、与之同时或之后,使用利用液相色谱、气相色谱和电泳处理样品的步骤。在一些实施方案中,本文中公开的任何方法包括将样品与不包含源自除细菌或植物外的生物的酶的至少一个电极接触。

[0026] 本公开涉及通过将全血样品暴露于本文中公开的生物传感器、系统或装置之一来检测全血中的氨或铵离子的水平的方法。本公开还涉及通过在将膜置于流体交换开口或容器之前,通过利用1、2、3或更多次酸性溶液的洗涤处理所述膜来制造本文中公开的生物传感器。本公开涉及通过在将膜置于流体交换开口或容器之前,通过利用1、2、3或更多次酸性溶液(约0.1M至约1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)的洗涤处理所述膜来制造本文中公开的生物传感器。本公开还涉及通过在将膜置于流体交换开口或容器之前,通过利用1、2、3或更多次过氧化氢溶液(约0.1M至约1M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的洗涤处理所述膜来制造本文中公开的生物传感器。本公开涉及通过在将膜置于流体交换开口或容器之前,通过利用1、2、3或更多次酸性溶液和/或过氧化氢溶液的洗涤处理所述膜来制造本文中公开的生物传感器。本公开涉及通过在将膜置于流体交换开口或容器之前,通过利用1、2、3或更多次酸性溶液(约0.1M至约1M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的洗涤处理所述膜来制造本文中公开的生物传感器。本公开还涉及通过在将膜置于流体交换开口或容器之前,通过利用1、2、3或更多次包含约0.1M至约1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的酸性溶液的洗涤以及利用1、2、3或更多次包含约0.1M至约1M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的过氧化氢的洗涤处理所述膜来制造本文中公开的生物传感器。

[0027] 在一些实施方案中,本公开提供了这样的系统,所述系统包含任选地与汇编受试者的氨或铵离子和/或氨基酸浓度值的电子存储介质可操作连接的一个或多个本文中公开的装置。在一些实施方案中,所述电子存储介质包含汇编的随时间推移的受试者的氨基酸浓度值。在一些实施方案中,所述系统包含至少一个导电表面,其包含本文中公开的酶、介体和任选地凝胶或水凝胶。在一些实施方案中,所述系统包含与所述至少一个电极和二极管、分光光度计、电压计和/或安培计可操作连接的电子电路。在二极管和/或分光光度计的情况下,所述二极管或分光光度计检测从至少一个容器发射的光的波长。在电压计和/或安培计的情况下,所述电压计和/或安培计测量当至少一个电极在一个或多个氨基酸和/或氨浓度存在时,穿过所述至少一个电极的电路的各自的电压和/或电流强度。在一些实施方案中,包含任选地与汇编受试者的氨基酸浓度值的电子存储介质可操作连接的一个或多个本文中公开的装置的系统,测定体液样品中的氨和/或氨基酸的一个或多个浓度值,此时所述体液样品与所述至少一个电极接触并且处于足以满足靛酚反应发生或本文中公开的一种或多种酶氧化其氨基酸底物的条件和时间下,在电路中产生电压差分或电流变化,并且所述装置将所述浓度值显示在一个或多个显示器上。在一些实施方案中,所述装置、系统和/或生物传感器不包含一个或多个电极。

[0028] 在一些实施方案中,本公开提供了包括以下步骤的方法:将包含细胞的样品与电极接触。本公开还提供了包括在足以使一组相互作用在样品中的氨与本文中描述的膜之间发生的条件和时间下接触样品的步骤的方法。本公开还提供了包括在足以使一组相互作用在样品中的氨与本文中描述的膜之间发生的条件和时间下接触全血样品的步骤的方法。本公开还提供了包括在足以使一组相互作用在样品中的氨与一种或多种本文中描述的靛酚反应试剂之间发生的条件和时间下接触包含体液的样品的步骤的方法。

[0029] 本公开涉及生物传感器,其包含:至少一种导电载体,所述导电载体附接于水凝胶,所述水凝胶包含至少一种电子介体、至少一种还原剂和至少一种代谢酶或其功能性片段,其中所述水凝胶包含海藻酸盐;和可操作地连接于所述至少一种导电载体或表面的安培计和/或电压计。

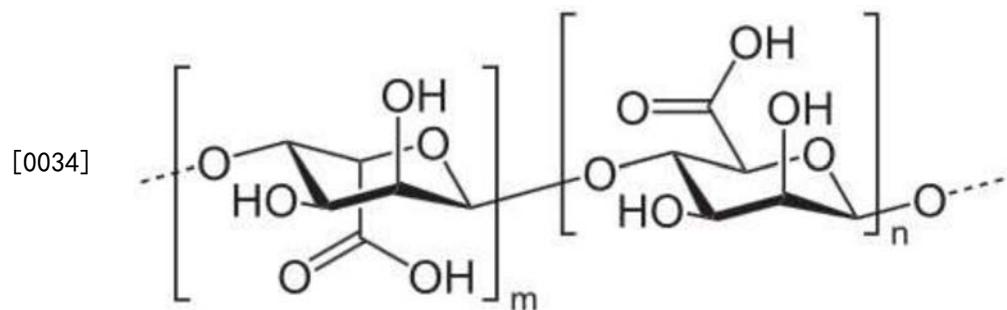
[0030] 在一些实施方案中,所述生物传感器包含至少3种导电载体。在一些实施方案中,所述至少一种导电载体为银和氯化银导线。在一些实施方案中,所述至少一种导电载体包含选自以下的酶的代谢酶的至少一种或其组合:亮氨酸脱氢酶、酪氨酸脱氢酶、苯丙氨酸脱氢酶、亮氨酸氧化还原酶、酪氨酸单加氧酶、丙氨酸脱氢酶或谷氨酸脱氢酶;或它们的功能片段。在一些实施方案中,所述生物传感器包含至少第一导电载体和第二导电载体,其中将所述第一导电载体附接于水凝胶,所述水凝胶包含至少一种电子介体,至少一种还原剂和至少一种代谢酶或其功能性片段,其中所述第一导电载体和第二导电载体可操作地连接于所述电压计和/或安培计以在其间施加电压。

[0031] 在一些实施方案中,所述至少一种导电载体包含负电性或阴离子性化学组分。在一些实施方案中,所述至少一种水凝胶包含海藻糖。在一些实施方案中,所述生物传感器不包含一种或多种以下物质:(i)尿酸酶或其功能性片段;(ii)包含葡聚糖或其衍生物的水凝胶;(iii)细菌细胞;(iv)配置来用于电泳的电子偶极;和(v)3,4-DHB。在一些实施方案中,所述生物传感器在4°C下贮存约16天后具有至少70%的生物活性。在一些实施方案中,所述生物传感器在4°C下贮存约30天后具有至少70%的生物活性。在一些实施方案中,所述生物传感器在4°C下贮存约30天后具有至少80%的生物活性。在一些实施方案中,所述生物传感器在4°C下贮存约30天后具有至少90%的生物活性。在一些实施方案中,所述生物传感器在4°C下贮存约30天后具有至少95%的生物活性。在一些实施方案中,所述生物传感器在功能上不依赖于对UV光的暴露或任何外部刺激物至所述生物传感器的添加。在一些实施方案中,所述至少一种酶或其功能性片段来源于细菌种类并且被固定在水凝胶中。在一些实施方案中,所述至少一种酶或其功能性片段来源于嗜热细菌种类并且被固定在水凝胶中。在一些实施方案中,所述至少一种酶或其功能性片段与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少约70%同一性。

[0032] 在一些实施方案中,本公开涉及本文中公开的生物传感器、装置或系统,所述生物传感器、装置或系统包含含有至少第一电极和第二电极的电路,所述电极与二极管、光电二极管、分光光度计或能够测量由一定量的暴露于光的靛酚或靛酚相关化合物发射的光的存在、不存在或强度的其它装置的至少一种或其组合电通信。在一些实施方案中,所述电路包含导线。在一些实施方案中,所述导线包含与电压计和/或安培计可操作连接的银和氯化银。

[0033] 在一些实施方案中,本文中公开的生物传感器、装置和/或系统包含任选地包含海

藻酸盐的膜,所述膜包含具有下式的嵌段聚合物:



[0035] 其中m和n是任意正整数。

[0036] 在一些实施方案中,所述生物传感器包含至少一种导电载体,所述导电载体未被包含纤维素或其衍生物的膜覆盖。在一些实施方案中,所述至少一种电子介体选自:硫堇、邻-苯二胺、亚甲基蓝和甲苯胺蓝。在一些实施方案中,所述至少一种还原剂选自:NAD<sup>+</sup>或FAD<sup>+</sup>。

[0037] 本公开还涉及生物传感器,其包括:至少一种导电载体,所述导电载体附连于至少一种水凝胶,所述水凝胶包含至少一种电子介体,至少一种还原剂,和至少一种代谢酶或其功能片段;其中所述至少一种酶或其功能性片段与来自热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoglucosidius*)的苯丙氨酸脱氢酶具有至少70%的同源性;和可操作地连接于所述至少一种导电载体的安培计和/或电压计。在一些实施方案中,所述酶或其功能性片段与SEQ ID NO:1具有至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性或与SEQ ID NO:1的功能性片段具有至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性。在一些实施方案中,所述酶或其功能性片段不来源于除细菌细胞外的物种。在一些实施方案中,所述酶或其功能性片段与SEQ ID NO:2具有至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性或与SEQ ID NO:2的功能性片段具有至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性。

[0038] 本公开涉及包含生物传感器的系统,所述生物传感器包含至少第一容器和第二容器;位于所述至少第一容器与第二容器之间的流体交换开口;至少一个与所述至少第一容器流体连通的导管,所述至少一个导管被配置来接收来自所述生物传感器外部的点的流体;和位于流体交换开口的膜;其中所述膜包含离聚物,并且其中所述第一容器或所述第二容器单独地或组合地包含:次卤酸盐、碱性水溶液和至少一种含有苯基的化合物。

[0039] 本公开还涉及包含本文中公开的生物传感器的系统,所述生物传感器任选地包含含有可操作地连接于所述至少一种导电载体或表面的二极管(诸如光电二极管)、分光光度计、安培计和/或电压计的任一种或其组合的电子电路;其中所述生物传感器可操作地连接于至少一个计算机存储器内存。在一些实施方案中,所述系统还包含体液样品,诸如全血。在一些实施方案中,所述系统还包含通过电路(其能够将对应于来自二极管、分光光度计、电压计和/或安培计的电流和/或电压差分的测量的电信号传输至数字显示器)可操作地连接于所述至少一种导电载体(或表面)的数字显示器,其中所述电子显示器被配置来当所述至少一种导电载体(或表面)与样品接触足以使靛酚反应发生的一段时间时显示随时间推移样品中的氨或铵离子和/或氨基酸的一个或多个浓度值。

[0040] 在一些实施方案中,所述系统还包含与至少一个计算机存储器内存可操作连接的

计算机处理器。在一些实施方案中,所述代谢酶为固定在水凝胶内的苯丙氨酸脱氢酶,并且其中水凝胶的海藻酸盐浓度为约1%至约3%的重量对附接于所述至少一种导电载体和/或与其接触的总体积的体积。

[0041] 本公开还涉及包含生物传感器的试剂盒,所述生物传感器包含配置在电路中的二极管、分光光度计、电压计和/或安培计以及显示器,以便在与至少一个可移动的导电载体接触后,所述电路闭合,以使得二极管、分光光度计、电压计和/或安培计与至少一种导电载体可操作地通信。

[0042] 在一些实施方案中,所述试剂盒包含以下的至少一个:多个包含一个或多个被配置来接收样品诸如全血的容器的测试条,其中所述一个或多个测试条还包含与所述至少一个容器流体连通的至少一个导管。在一些实施方案中,所述试剂盒包含以下的至少一个:多个包含一个或多个被配置来接收样品诸如全血的容器的测试条,其中所述一个或多个测试条还包含与至少第一容器流体连通的至少一个导管和单独地或组合地:次卤酸盐、碱性水溶液和至少一种包含苯基的化合物。在一些实施方案中,所述试剂盒包含以下的至少一种:多个包含被配置来接收样品诸如全血的一个或多个容器的测试条,其中所述一个或多个测试条还包含与至少第一容器流体连通的至少一个导管和包含本文中公开的膜的生物传感器。在一些实施方案中,所述试剂盒包含以下的至少一种:多个测试条,所述测试条包含:一个或多个被配置接收样品诸如全血的容器,其中所述一个或多个测试条还包含与所述至少第一容器流体连通的至少一个导管;和包含本文中公开的膜的生物传感器。

[0043] 在一些实施方案中,所述膜包含水凝胶层。在一些实施方案中,所述水凝胶层包含海藻酸盐。在一些实施方案中,对照或参照体液样品;一组包含阈值的数据;和一套说明书,其中所述说明书的组或数据的组任选地可通过电子媒介远程访问。在一些实施方案中,所述试剂盒包含含有至少第一电极和第二电极的固体载体,其中所述第一电极包含水凝胶,所述水凝胶包含至少一个电子介体,至少一种还原剂和至少一种代谢酶或其功能性片段;并且其中所述第二电极是对照或参比电极。在一些实施方案中,所述试剂盒包含含有附接于本文中公开的第一电极和第二电极的固体载体的测试条。

[0044] 本公开还涉及测定或鉴定体液样品中的氨或铵离子的浓度的方法,所述方法包括:(a)将体液样品与以下装置接触:(i)生物传感器,其包含至少一种导电载体,所述导电载体附接于与本文中公开的膜流体连通的容器,和任选地包含可操作地连接于所述至少一种导电载体的安培计和/或电压计;或(ii)包含生物传感器的系统,所述生物传感器包含:附接于与本文中公开的膜流体连通的容器的至少一种导电载体和任选地包含可操作地连接于所述至少一种导电载体的安培计和/或电压计;或(iii)本文中公开的测试条;和/或(b)测定样品中氨或铵离子的量。在一些实施方案中,所述体液样品包含来自受试者的血液或血清。在一些实施方案中,所述样品由全血组成或基本上由全血组成。

[0045] 本公开还涉及定量体液样品中的氨和/或氨基酸的浓度的方法,所述方法包括:(a)将体液样品与以下接触:(i)生物传感器,其包含至少一种导电载体或表面,所述导电载体或表面附接于水凝胶,所述水凝胶包含至少一种电子介体、至少一种还原剂和至少一种代谢酶或其功能片段,其中所述水凝胶包含海藻酸盐;和可操作地连接于所述至少一种导电载体或表面的安培计和/或电压计;或(ii)包含生物传感器的系统,所述生物传感器包含:至少一种导电载体或表面,所述导电载体或表面附接于至少一种水凝胶,所述水凝胶包

含至少一种电子介体、至少一种还原剂,和至少一种代谢酶或其功能性片段;其中所述至少一种酶或其功能性片段与来自热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 (*Geobacillus thermoglucosidius*) 的苯丙氨酸脱氢酶具有至少70%同源性;和可操作地连接于所述至少一种导电载体的安培计和/或电压计;或(iii)本文中公开的测试条;或(b)测定样品中的氨基酸的量。在一些实施方案中,所述方法还包括将通过定量或鉴定步骤获得的浓度值与与一种或多种代谢疾病相关的阈值相比较。

[0046] 本公开还涉及包括接触本文中公开的生物传感器、系统或测试条的步骤的方法,其中将受试者的体液样品与所述公开的生物传感器、系统或测试条的任一种接触的步骤包括接触所述样品,持续充足的一段时间以允许氨转运通过膜和允许将来自样品的氨暴露于与靛酚反应相关的试剂。如果也将通过生物传感器、系统或测试条测试来测试氨基酸,则此类方法包括接触样品,持续充足的一段时间以允许体液样品中的至少一种氨基酸被所述代谢酶或其功能性片段氧化。在一些实施方案中,所述方法不包括将体液样品暴露于所述至少一种导电载体。在一些实施方案中,所述方法不包括在将样品暴露于至少一个包含水凝胶的电极之前、与之同时或之后,将体液样品暴露于铁离子和/或酰肼离子。在一些实施方案中,所述方法不包括将样品暴露于包含在所述装置、测试条或生物传感器内的非多孔载体,诸如玻璃珠。在一些实施方案中,所述体液样品含有来自受试者的全血或血清。在一些实施方案中,所述体液样品不含尿。在一些实施方案中,所述体液样品不含除全血或血清外的体液。

[0047] 本公开还涉及诊断受试者的代谢疾病的方法,所述方法包括: (a) 将体液样品与以下的一种或其组合接触: (i) 生物传感器,其包含至少一种导电载体或表面,所述导电载体或表面附接于包含一定量的靛酚或靛酚相关化合物的容器;和,任选地包含可操作地连接于所述至少一种导电载体或表面的安培计和/或电压计;或(ii)包含生物传感器的系统,所述生物传感器包含:至少一种导电载体或表面,所述导电载体或表面暴露于包含靛酚和/或靛酚相关化合物的所述至少第一容器或第二容器;和可操作地连接于所述至少一种导电载体的安培计和/或电压计;或(iii)本文中公开的测试条; (b) 定量样品中的氨或铵离子的一个或多个浓度值; (c) 将样品中的氨或铵离子的一个或多个浓度值与鉴定为在健康范围中的或不在表示高氨血症的范围或浓度内的氨或铵离子浓度的阈值相比较;和(d)如果样品中的氨基酸的一个或多个浓度值超过或低于所述阈值,则将受试者鉴定为患有高氨血症或与高氨血症相关的代谢疾病。在一些实施方案中,所述代谢疾病为高氨血症相关病症。

[0048] 本公开还涉及测定患者对疗法的反应性的方法,所述方法包括: (a) 将体液的样品与以下的一种或组合接触: (i) 生物传感器,其包含至少一种导电载体或表面,所述导电载体或表面附接于包含一定量的靛酚或靛酚相关化合物的容器;和,任选地包含可操作地连接于所述至少一种导电载体或表面的安培计和/或电压计;或(ii)包含生物传感器的系统,所述生物传感器包含:至少一种导电载体或表面,所述导电载体或表面暴露于包含靛酚和/或靛酚相关化合物的所述至少第一载体或第二载体;和可操作地连接于所述至少一种导电载体的安培计和/或电压计;或(iii)本文中公开的测试条; (b) 定量样品中氨或铵离子的一个或多个浓度值; (c) 将样品中的氨或铵离子的一个或多个浓度值与被鉴定为在健康范围内或不在表示高氨血症的范围或浓度内的氨或铵离子浓度的阈值相比较;和(d)如果样品中的氨基酸的一个或多个浓度值超过或低于所述阈值,则将受试者鉴定为患有高氨血症或

与高氨血症相关的代谢疾病。

[0049] 本公开还涉及包含固体载体和至少附接于固体载体的第一电极和第二电极的测试条,其中所述第一电极包含膜,所述膜包含全氟化的离聚物。在一些实施方案中,所述测试条适合用于包含二极管、分光光度计、电压计和/或安培计和数字显示器的便携式装置,以便当将所述测试条连接于所述装置时,所述第一电极和第二电极被可操作地连接成包含二极管、分光光度计、电压计和/或安培计和数字显示器的闭合电路,并且,在与从靛酚或靛酚相关化合物发射的光接触后,在第一电极上导致对应于体液样品中的氨基酸的浓度值的电流,此浓度值可在该便携式装置的显示器上读出。在一些实施方案中,所述测试条包含任选地与所述至少第一容器分离但与所述容器的导管、体积或空间流体连通的固相或液相中的靛酚试剂的至少一种或其组合。

[0050] 本公开还涉及制造本文中公开的包含至少一个电极的所公开的生物传感器、测试条、系统的方法,所述方法包括:将所述至少一个电极与包含至少一个容器、与所述至少一个容器流体连通的至少一个导管和至少一种靛酚试剂的溶液接触;随后将所述至少一个电极与具有约1M或低于约1M的Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>和/或醋酸盐浓度的碱性缓冲液接触。

[0051] 附图简述

[0052] 根据以下示例性实施方案的详细描述,本发明的实施方案的有利方面将显而易见。应当将以下详细描述与附图结合考虑,其中:

[0053] 图1是具有检测施加至被置于流体交换开口的膜分隔的第一容器和第二容器中的给定的样品中的氨或铵离子水平的能力的系统的示例性视图。

[0054] 图2是包含多个容器的系统的示例性示图,在所述多个容器中并行地进行不止一个靛酚反应。

[0055] 图3显示另外地称为贝特洛反应或靛酚反应的示例性反应。

[0056] 图4显示微流体测试装置的示例性实施方案。

[0057] 图5显示使用本公开的实施方案进行定量即时检测型高氨血症感测的方法的示例性流程图。

[0058] 图6显示用于与电子测试装置一起使用的血液测试条的示例性实施方案。

[0059] 图7显示包含电子电路的装置的示例性实施方案,所述电子电路包含暴露于被配置来进行靛酚反应的容器的电极;模数转换器,与显示器电子通信的微芯片。

[0060] 图8显示Nafion的化学组成。

[0061] 图9显示演示钠盐的浓度如何产生高的氨从样品的回收和转移的实验数据。

[0062] 图10显示演示当使用醋酸钠对比氯化钠作为碱性缓冲剂时装置性能的差异的实验数据。

[0063] 图11描绘围绕Nafion扣合在一起以形成用于感测实验的二分孔的3D打印模块化部件的照片。

[0064] 图12描绘靛酚反应产生线性曲线,氯化铵的浓度在0-750μM的范围内,COD为0.9939。

[0065] 图13描绘将用于靛酚反应的试剂在室温下贮存和用于在规则的间隔内产生持续100天的氨标准曲线。对500μM氨的反应在第75天开始衰减。靛酚反应的试剂在室温下稳定长达50天,随后其对不同浓度的氨的反应开始减弱。

[0066] 图14描绘使用靛酚反应测试1mM浓度的21种氨基酸的每一种。将在靛酚反应后每一种氨基酸在635nm测量的吸光度计算为来自利用1mM氯化铵的靛酚反应的响应的百分比。雷达图显示相较于氯化铵的百分比响应。最高响应为苏氨酸,其产生仅为7%的氨的响应的吸光度值。

[0067] 图15:构建的传感器对一系列1X PBS中的氨浓度的响应。COD为0.9758,n=5个样品。

[0068] 图16:测定血氨浓度的初步实验显示有限的响应。响应受到阻碍并且不超过表明一定程度的干扰的0.35的吸光度。

[0069] 图17:将2-10X次氯酸盐的浓度用于500mM的1X PBS和全绵羊血中的氨的分析。增加用于靛酚反应的次氯酸盐的浓度减少小的血液分子对靛酚反应所具有的负干扰。在高于3X的浓度上,反应本身开始衰减。次氯酸盐浓度的3倍增加是最佳的。

[0070] 图18:将二分孔传感器再次用于提取人全血中的氨。利用3X次氯酸盐-修饰的靛酚反应测试提取的氨溶液,并在635nm测量吸光度。在0-500μM的范围内,COD为0.9573,n=5个样品。

[0071] 图19:传感器对在0-150μM的范围内的血液氨浓度的响应。相对标准偏差为~10%,COD为0.9777,n=5个样品。

[0072] 图20:描绘实施方案的孔板的前面的CAD草图。

[0073] 图21:描绘演示实施方案的孔板的区域的CAD草图,应当在完成装置的制造之前将粘合剂硅酮粘附至(黑色区域)。

[0074] 图22描绘围绕Nafion®扣合在一起以将孔分成两个部分的3D打印模块化左侧和右侧部件的照片。

[0075] 图23描绘3D打印孔的工程图。

[0076] 图24描绘一次性盒的顶部部件的CAD草图,尺度以mm表示。标记通道1至5。

[0077] 图25:具有标记的通道6的芯片的底部部件的CAD草图。

[0078] 图26:描绘在将40微升中的全血样品加载至孔编号6后i) t=0秒(s); ii) t=13秒和iii) t=24秒时的浓度曲线的图示。

[0079] 图27描绘包含用于定量全血中的氨水平的微流体装置的实施方案的上半部。

[0080] 图28描绘包含用于定量全血中的氨水平的微流体装置的实施方案的下半部。

[0081] 图29:为具有检测施加于通过置于流体交换开口的膜分隔的第一容器和第二容器的给定的样品中的氨或铵离子水平和氨基酸的能力的系统的示例性图示,其中所述反应由酶催化。

[0082] 发明详述

[0083] 在整个说明书和权利要求中使用与本公开的方法和其它方面相关的各种术语。除非另有所指,否则将以它们在本领域中的普通含义赋予此类术语。将以与本文中提供的定义一致的方式解释其它明确定义的术语。

[0084] 如本说明书和所述权利要求中所使用的,除非内容另外明确地指出,否则单数形式“一个/种(a)”,“一个/种(an)”和“该(the)”包括复数指示物。

[0085] 如本文中所用,术语“约”当指可测量的值诸如量、时距等时,意指包括与所指定的值相差±20%、±10%、±5%、±1%或±0.1%的变化,这样变化适合于进行公开的方法。

[0086] 如本文中所用,术语“粘附(attach)”、“附接(attachment)”、“粘着(adhere)”、“附接的(adhered)”、“粘连的(adherent)”等类似术语通常指将例如基团、化合物或酶固定或固着于表面,诸如通过物理吸附、化学键合等类似过程或其组合。

[0087] 如本文中所用,术语“活检”意指从受试者或患者取出的用于分析的细胞样品、细胞的集合或体液。在一些实施方案中,所述活检是骨髓活检、打孔活检、内窥镜活检、针吸活检、刮取活检、切开活检、切除活检或手术切除。

[0088] 如本文中所用,术语“体液”意指从受试者分离的任何液体,包括,但不一定限于,血液样品、血清样品、全血样品、尿样品、粘液样品、唾液样品和汗液样品。所述样品可通过任何方式诸如静脉穿刺、活检、拭子、毛细管抽吸、刺血针、针吸、通过排泄液的简单捕获进行的收集从受试者获得。

[0089] 如本文中所用,术语“电子介质”意指采用电子技术进行访问的任何物理存储,包括硬盘、ROM、EEPROM、RAM、闪存、非易失性存储器,或任何实质上和功能上等同的介质。在一些实施方案中,可将软件存储器与执行本公开的实施方案的处理器共处一地,或可将软件存储器的至少部分远程放置,但当需要时可访问。

[0090] 如本文中所用,单词“示例性”意指“用作示例、实例或例证”。本文所述的实施方案不是限制性的,而仅仅是示例性的。应当理解的是,所描述的实施例不一定被理解为相对于其它实施方案是优选的或有利的。此外,术语“本发明的实施方案”、“实施方案”或“发明”不要求本发明的所有实施方案包括所论述的特征、有利方面或操作模式。此外,本领域技术人员可理解比所公开的那些大小尺度大或小许多数量级的可被并入用于样品的所公开的或相关的设计的大小尺度的广泛变化。

[0091] 如本文中所用,术语“氨基酸代谢疾病”意欲指特征在于导致受试者体内氨基酸的过量产生或产生不足的氨基酸的代谢催化的功能障碍的那些疾病和病症。氨基酸代谢疾病的实例列于代谢疾病(即在本申请中可互换使用的术语)的定义中。

[0092] 如本文中所用,“序列同一性”通过使用可单独执行的用于blasting两个序列(b12seq)的BLAST引擎程序(其可从国家生物技术信息中心(NCBI) ftp网站获取),使用默认参数(Tatusova和Madden, FEMS Microbiol Lett., 1999, 174, 247-250; 其通过引用整体并入本文)来测定。使用术语“与……同源”与测量的“序列同一性”同源。在一些实施方案中,如果实施方案包含具有百分比序列同一性的核酸序列或氨基酸序列,则所述术语指在其整个长度上具有与公开的序列的同源性的所公开的核酸序列或氨基酸序列。

[0093] 术语“受试者”在整个说明书中用于描述从其获取体液样品的动物。在一些实施方案中,所述动物为人。为了诊断对于特定受试者诸如人类是特异的那些病况,术语“患者”可被互换使用。在本公开的描述中的一些情况下,术语“患者”将指患有特定疾病或病症的人患者。在一些实施方案中,所述受试者可以是疑似具有氨基酸代谢疾病或被鉴定为处于发生所述疾病的风险中的人。在一些实施方案中,所述受试者可被诊断为具有至少一种氨基酸代谢疾病。在一些实施方案中,所述受试者疑似具有或已被诊断为具有高氨血症。在一些实施方案中,所述受试者可以是疑似具有高氨血症或被鉴定为处于发生所述疾病的风险中的人。在一些实施方案中,所述受试者可以是充当分离的体液样品的来源的哺乳动物。在一些实施方案中,所述受试者可以是从其分离或提供体液样品的非人动物。术语“哺乳动物”包括人和非人,包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、鼠科动物、牛科动

物、马科动物和猪科动物。

[0094] 如本文中所用,“保守”氨基酸取代可被定义为下面表A、B或C中显示的。代谢酶包括其中已通过编码本文中公开的多肽的多核苷酸的修饰引入保守取代的那些氨基酸序列。可根据物理性质以及对二级和三级蛋白质结构的贡献来分类氨基酸。保守取代在本领域中被认为是一个氨基酸对具有类似性质的另一个氨基酸的取代。示例性保守取代示于表A中。

[0095] 表A-保守取代I

	侧链特征	氨基酸
	脂肪族	
	非极性	G A P I L V F
[0096]	极性 - 不带电荷的	C S T M N Q
	极性 - 带电荷的	D E K R
	芳香族	H F W Y
	其它	N Q D E

[0097] 或者,可如Lehninger, (Biochemistry, 第二版;Worth Publishers, Inc.NY, N.Y. (1975), 第71-77页) 中所述,如表B中所示将保守氨基酸分类。

[0098] 表B-保守取代II

	侧链特征	氨基酸
	非极性(疏水)	
	脂肪族:	A L I V P
[0099]	芳香族:	F W Y
	含硫:	M
	边界线:	G Y
	不带电荷的-极性	
	羟基:	S T Y
	酰胺:	N Q
	巯基:	C
[0100]	边界线:	G Y
	带正电荷的(碱性):	K R H
	带负电荷的(酸性):	D E

[0101] 或者,示例性保守取代示于表C中。

[0102] 表C-保守取代III

原始残基	示例性取代
Ala (A)	Val Leu Ile Met
Arg (R)	Lys His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser Thr
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala Val Leu Pro
His (H)	Lys Arg
Ile (I)	Leu Val Met Ala Phe
Leu (L)	Ile Val Met Ala Phe
Lys (K)	Arg His
Met (M)	Leu Ile Val Ala
Phe (F)	Trp Tyr Ile
Pro (P)	Gly Ala Val Leu Ile
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr Phe Ile
Tyr (Y)	Trp Phe Thr Ser
Val (V)	Ile Leu Met Ala

[0103] 应当理解,包含与本文中描述的细胞外基质结合的多肽序列的多肽旨在包括具有一个或多个氨基酸残基的插入、缺失或取代或其任意组合以及除氨基酸残基的插入、缺失或取代外的修饰的多肽。

[0104] 如本文中所用,术语“预后”意指确定疾病的可能过程和/或结果。

[0105] 如本文中所用,术语靛酚相关化合物-为靛酚反应的反应产物的小的化合物。在一些实施方案中,其在4,5,6-元环中包含至少一个碳原子并且在利用从光源发射的光激发所述小的化合物后发射可见的光波长。在一些实施方案中,所述小的化合物是靛酚反应的产物并且在利用从光源发射的光激发化合物后发射对于人眼是可见的光的波长。在一些实施方案中,所述小的化合物,当其被来自光源的光激发时,发射约400nm至约600nm的波长。在一些实施方案中,所述生物传感器、装置和/或系统包含光源和至少一个二极管和/或分光光度计,或能够测量由靛酚或靛酚相关化合物发射的光的其它装置。

[0106] 如本文中所用,术语“容器”是任何腔室、凹陷、容纳器、贮器或空间。在一些实施方案中,容器可以是能够容纳超过约1,000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、40、30、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1 $\mu$ L的体液样品。

[0107] 术语“膜”意指固相中的任何单体或聚合物。在一些实施方案中,所述膜包含离聚物。在一些实施方案中,所述膜不能进行气相色谱。

[0108] 本文中公开的术语“即时检测”是指单独地或被配置来与一个或多个另外的组件一起发挥作用的,能够在不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30分钟的时间段内分析反应产物诸如氨和/或样品组分诸如氨基酸的存在、不存在或量的装置、生物传感器、系统、测试条或盒。在一些实施方案中,术语是指单独地或被配置来与一个或多个另外的组

件一起发挥作用的,能够在不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30分钟的一段时间内分析氨和/或氨基酸的存在、不存在或量,或能够分析从其获取样品的点上或充分靠近所述点的氨和/或氨基酸的存在、不存在或量的装置、生物传感器、系统、测试条或盒。例如,在一些实施方案中,所述样品可采自疑似具有或先前经诊断具有高氨血症或高氨血症相关病症的受试者。无需从样品来源发送至不同的地方和分析样品的氨含量,在一些实施方案中,所述即时检测型装置或生物传感器或系统是能够检测氨或铵离子在样品中的存在、不存在或量的即时检测型装置。

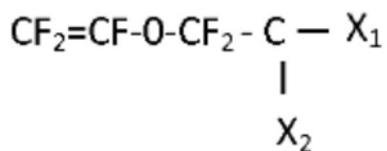
[0110] 术语“流体交换开口”意指流体可通过其从一个容器流经相邻容器或与所述一个容器流体连通的另一个容器的任何空间或空隙。

[0111] 术语“单独地包含”就所述元件或多个元件而言意指只有一个所述元件包括所列元件的每一个元件并且不与任何其它命名的元件组合。

[0112] 术语“包含酚取代基的化合物”意指包含附接于包含至少一个碳原子的4、5、6或更多-元原子环的苯基的任何分子。

[0113] 如本文中所用,术语“离聚物”是包含离子的任何聚合物。在一些实施方案中,所述离聚物是全氟化离聚物。在一些实施方案中,所述离聚物包含式I或其盐。

[0114] 式I:



[0115]

[0116] 其中 $\text{X}_1=\text{F}-\text{O}-\text{CF}_2-\text{Y}$ , $\text{F}_2-\text{SO}_2$ 或 $\text{F}_2-\text{CF}_2-\text{CO}_2\text{CH}_3$

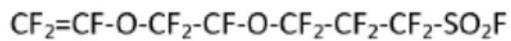
[0117]  $\text{X}_2=\text{CF}_3$ ,或,如果 $\text{X}_1$ 为 $\text{F}_2$ ,则 $\text{X}_2$ 为空

[0118] 其中 $\text{Y}=\text{CF}_2-\text{SO}_2\text{F}$ 、 $\text{CF}_2-\text{CF}-\text{SO}_2\text{F}$ 或 $\text{CF}_3-\text{CO}_2\text{CH}_3$

[0119] 在一些实施方案中,所述离聚物包含以下物质之一或其组合或其盐:



|

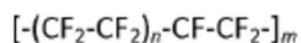
 $\text{CF}_3,$ 

|

 $\text{CF}_3,$ 

[0120]

|

 $\text{CF}_3,$ 

|



|

 $\text{CF}_3,$ 

[0121] 其中n和m是任何正整数。在一些实施方案中,n和/或m为1、2、3、4、5、6、7、8、9,或10或更多。在一些实施方案中,n和/或m是独立地可变的并且为约1至约1000的任何正整数。在一些实施方案中,n和/或m是独立地可变的并且为约1至约500的任何正整数。

[0122] 术语“体液”意指从动物包括人或非人动物获取的任何样品。

[0123] 如本文中所用,术语“功能性片段”意指所公开的多肽的任何部分,所述部分具有足够长度以保留与所述片段所基于的野生型多肽的功能类似或大体类似的至少部分生物学功能。在一些实施方案中,与代谢酶的功能相关的多肽的功能性片段为这样的多肽,所述多肽与本文中公开的任何多肽具有至少70%、75%、80、85、90、95、96、97、98或99%序列同一性,并且具有足够的长度来保留至少部分对一种或多种结合所述多肽的底物的结合亲和力。在一些实施方案中,所述片段是本文中公开的任何多肽的片段并且具有至少约10、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90或约100个连续氨基酸的长度。在一些实施方案中,所述片段为本文中公开的任何多肽的片段并且具有至少约50个氨基酸的长度。在一些实施方案中,所述片段为本文中公开的任何多肽的片段并且具有至少约100个氨基酸的长度。在一些实施方案中,所述片段为本文中公开的任何多肽的片段并且具有至少约150个氨基酸的长度。在一些实施方案中,所述片段为本文中公开的任何多肽的片段并且具有至少约200个氨基酸的长度。在一些实施方案中,所述片段为本文中公开的任何多肽的片段并且具有至少约250个氨基酸的长度。

[0124] 如本文中所用,术语“与代谢酶相关的多肽序列”意指被或未被任何大分子(诸如糖类分子或大分子)修饰的任何多肽或其片段,其为如本文中公开的代谢酶或其功能性片段。在一些实施方案中,所述多肽序列在任何多细胞或单细胞生物体中被合成或重组地产生。在一些实施方案中,与细胞外基质结合的多肽序列是其序列包含表2中公开的任何多肽的任何多肽。在一些实施方案中,与代谢酶结合的多肽序列是包含表2中公开的任何多肽的任何多肽序列或与表2中公开的多肽共有85、90、95、96、97、98或99%序列同一性的序列或其功能性片段。在一些实施方案中,与代谢酶结合的多肽序列由表2中公开的任何多肽或与表2中公开的多肽共有85、90、95、96、97、98或99%序列同一性的序列组成。

[0125] 术语“盐”是指利用无机和/或有机酸形成的酸性盐以及利用无机或有机碱形成的碱性盐。这些酸和碱的实例对于本领域普通技术人员来说是公知的。此类酸加成盐通常是药学上可接受的,虽然非药学上可接受的酸的盐在所述化合物的制备和纯化中可具有效用。盐包括从盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、甲烷磺酸形成那些盐。

[0126] 在一些实施方案中,所述装置、系统、膜或容器可包含本文中公开的任何所公开的试剂或配方或任何盐。盐可通过将游离碱或其盐、对映异构体或外消旋物与一个或多个当量的适当的酸反应来形成。在一些实施方案中,本发明的盐是指本文公开的具有至少一个碱性基团或至少一个碱基的所公开的试剂或配方的盐。在一些实施方案中,本发明的盐是指本文中公开的具有游离氨基、游离胍基、吡嗪基或吡啶基的形成酸加成盐的所公开的试剂或配方的盐。在一些实施方案中,本发明的盐是指本文中公开的所公开的试剂或配方的盐,其为主题化合物与(例如)无机酸(诸如盐酸,硫酸或磷酸)或与合适的羧酸或磺酸(例如脂肪族单羧酸或二羧酸,诸如三氟乙酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、羟基乙酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸或草酸酸、或氨基酸如精氨酸或赖氨酸,芳香族羧酸,诸如苯甲酸、2-苯氧基苯甲酸、2-乙酰氧基苯甲酸、水杨酸、4-氨基水杨酸,芳族-脂肪族羧酸,诸如扁桃酸或肉桂酸,杂芳族羧酸,诸如烟酸或异烟酸,脂族磺酸,诸如甲磺酸、乙磺酸或2-羟乙基磺酸,或芳族磺酸,例如苯磺酸、对-甲苯磺酸或萘-2-磺酸)的酸加成盐。当几个碱性基团存在时,可形成单-或聚-酸加成盐。可在所述盐可溶于其中的溶剂或介质中或在所述盐可

溶于其中的溶剂例如水、二噁烷、乙醇、四氢呋喃或二乙醚或其混合物中进行所述反应,可在真空中或通过冷冻干燥来除去所述溶剂或介质。所述反应也可以是复分解过程或其可在离子交换树脂上进行。可发现根据本发明的盐以它们的无水形式或以水合结晶形式(即,与一个或多个水分子复合或结晶的形式)存在。

[0127] 如本文中所用,术语“抗体”是指任何免疫球蛋白,无论是天然的还是全部或部分地合成产生的。在一些实施方案中,抗体是由4条全长多肽链组成的复合物,所述多肽链的每一条包括例如大体上具有由B细胞天然产生的抗体的结构的可变区和恒定区。在一些实施方案中,抗体是单链。在一些实施方案中,抗体是骆驼类(cameloid)。在一些实施方案中,抗体是抗体片段。在一些实施方案中,抗体是嵌合的。在一些实施方案中,抗体是双特异性的。在一些实施方案中,抗体是多特异性的。在一些实施方案中,抗体是单克隆的。在一些实施方案中,抗体是多克隆的。在一些实施方案中,抗体被缀合(即,缀合于或融合于其它蛋白质、放射性标记、细胞毒素的抗体)。在一些实施方案中,抗体是人抗体。在一些实施方案中,抗体是小鼠抗体。在一些实施方案中,抗体是兔抗体。在一些实施方案中,抗体是大鼠抗体。在一些实施方案中,抗体是驴抗体。在一些实施方案中,本文中描述的生物传感器或系统包含抗体或多种抗体。

[0128] 特征:如本文中所用,术语“特征”是指体液样品的任何可检测的特性,所述特性允许其与可比较的体液样品相区别。在一些实施方案中,特征是体液、环境样品或水样品中的氨或铵离子的量或身份。在一些实施方案中,特征是氨基酸的量、序列或修饰。在一些实施方案中,特征是碳水化合物的量。在一些实施方案中,特征是小分子的量。

[0129] 可比较的:如本文所用,术语“可比较的”用于指充分相似以允许比较但在至少一个特性上相异的两个实体。

[0130] 代谢酶:如本文中所用,术语“代谢酶”意指负责一种或多种氨基酸的代谢途径中的至少一个步骤的催化的酶。在一些实施方案中,代谢酶是苯丙氨酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、其各自的功能性片段或组合或其融合蛋白。

[0131] 如本文中所用,术语“代谢疾病”是因一种或多种氨基酸的代谢途径中的酶促步骤中的或将某些氨基酸转运进或转运出细胞所必需的蛋白质介体中的缺陷引发的一组病症的任一种。在一些实施方案中,所述代谢疾病选自:精氨酸血症(ARG,精氨酸酶缺乏症)、精氨基琥珀酸血症(ASA,精氨基琥珀酸酶)、瓜氨酸血症I型(CIT-I,精氨酸琥珀酸合成酶)、瓜氨酸血症II型(CIT-II,citrin缺乏症)、生物喋呤辅因子生物合成的缺陷(BIOPT-BS)、生物喋呤辅因子再生的缺陷(BIOPT-RG)、高胱氨酸尿症(HCY,胱硫醚 $\beta$ 合酶)、高苯丙氨酸血症(H-PHE)、高甲硫氨酸血症(MET)、Maple糖尿病(MSUD,支链酮酸脱氢酶)、苯丙酮尿症(PKU,苯丙氨酸羟化酶)、酪氨酸血症I型(TYR-1,延胡索酰乙酰乙酸水解酶)、酪氨酸血症II型(TYR-II,酪氨酸转氨酶)和酪氨酸血症III型(TYR-III,羟苯丙酮酸二加氧酶),其中每一种疾病状态后的括号内的短语表示伴随通常在遭受该疾病状态的受试者中具有缺陷的酶的疾病的缩写。

[0132] 多肽:如本文中所用,术语“多肽”通常具有至少3个氨基酸的聚合物的其本领域公认的含义。本领域普通技术人员将理解,术语“多肽”意在足够通用,以不仅包括具有本文中引用的完整序列的多肽,而且还包括代表此类完整多肽的功能性片段(即,保持至少一个活性的片段)的多肽。此外,本领域普通技术人员理解,蛋白质序列通常耐受一些替代而无破

坏或显著还原活性。因此,保持活性并且与相同种类的另一个多肽共有至少约30-40% (通常大于约50%、60%、70%、75%、80%或85%) 的总体序列同一性,并且通常还包括至少一个具有高得多(在一个或多个更加高度保守的区域中通常大于90%或甚至95%、96%、97%、98%或99%) 的同一性的区域,通常包含至少3-4个,通常高达20个或更多个氨基酸的任何多肽,涵盖于如本文中使用的相关术语“多肽”内。

[0133] 如本文中所用,术语“阈值”是这样的体液样品中的氨或铵离子或氨基酸的浓度,其指示所述样品中的氨或铵离子或氨基酸的量是否被认为异常高或异常低,从而导致特定病症诸如代谢疾病的诊断或疑似诊断。例如,在血液样品的情况下,针对某些氨基酸代谢疾病的已知的阈值示于下面的表1中:

[0134] 表1:氨基酸代谢疾病及它们在样品中的可检测的相关氨基酸标志物

病症	标志物 Marker	异常范围
ARG	精氨酸	>100umol/L
	精氨酸琥珀酸	>4.0umol/L
ASA	ASA/Arg	>0.75
	瓜氨酸	>60umol/L
CIT-I 和 CIT-II	Cit/Tyr	>1.0
	Cit/Arg	>6.0
HCY 和 MET	甲硫氨酸	>70umol/L
	Met/Phe	>1.2
MSUD	亮氨酸	>250umol/L
	缬氨酸	>250umol/L
PKU,H-PHE	Leu/Phe	>4.0
	Val/Phe	>3.5
BIOPT-BS 和 BIOPT-RG	苯丙氨酸	>130umol/L
	Phe/Tyr	>2.0
TYR-I, TYR-II 和 TYR-III	酪氨酸	>250umol/L

[0135]

[0136] 在一些实施方案中,先于关于实验性体液样品的信息或与之同时获得关于阈值或参照体液样品的信息。在一些实施方案中,关于参照细胞或细胞类型的信息是历史的。在一些实施方案中,关于阈值或参照体液样品的信息存储在例如计算机可读存储介质中。在一些实施方案中,特定浓度值与阈值或参照体液样品的比较区分实验性体液样品中的氨的浓度值与阈值,从而允许导致将受试者诊断为具有一种或多种代谢疾病或一种或多种代谢疾病的严重度的变化的比较。

[0137] 参比电极:正如从上下文中所理解的,参比电极或控制电极是与至少一个包含本文中公开的水凝胶和/或固定化酶的导电载体一起置于电路中(以允许参照或控制电极与所述至少一个包含本文中公开的水凝胶和/或固定化酶的导电载体之间的电压差的相关比较)的导电载体诸如电极。

[0138] 样品:如本文中所用,术语“样品”是指获自或来源于目标来源的生物样品,如本文中所述的。在一些实施方案中,目标来源包含生物体,诸如动物或人。在一些实施方案中,生物样品包含生物组织或流体。在一些实施方案中,生物样品可以是或者包含骨髓、血液、血

细胞、腹水、组织或细针活检样品、含细胞体液、自由浮动核酸、痰、唾液、尿、脑脊髓液、腹膜液、胸腔积液、粪便、淋巴、妇科液、皮肤拭子、阴道拭子、口腔拭子、鼻拭子、洗液或灌洗液诸如导管灌洗或支气管肺泡灌洗液、抽吸物、刮削物、骨髓标本、组织活检标本、手术标本、粪便、其它体液、分泌物和/或排泄物；和/或来自其的细胞等。在一些实施方案中，生物样品是体液或包含体液。在一些实施方案中，样品是通过任何适当的手段，直接从目标来源获得的“原始样品”。例如，在一些实施方案中，原始生物样品通过选自由以下组成的组的方法获得：活检（例如，细针抽吸或组织活检）、手术、体液（例如，血液、淋巴液、粪便等）的收集等。在一些实施方案中，如从上下文中所明确的，术语“样品”是指通过处理原始样品（例如，通过除去原始样品的一个或多个组分和/或通过向原始样品添加一种或多种试剂）获得的制剂。例如，使用半透膜的过滤。此类“处理的样品”可包含，例如，从样品提取的或通过将原始样品经历技术诸如mRNA的扩增或反转录、某些组分的分离和/或纯化等获得的核酸或蛋白质。在一些实施方案中，本文公开的方法不包括处理的样品。

[0139] 在一些实施方案中，所述系统、测试条、设备、生物传感器和/或滤筒包括在本公开的第78-84页中公开的试剂的任何一种或其组合的浓度。

[0140] 表2

[0141]	酶	基因序列	登录号
	苯丙氨酸脱氢酶	ATGGAAATCTTCGAGGAAATCAAAC	AEW06037.1

[0142]	GGCGGGGACACGAGCAAATTCTGT TCAATTATGATCGGGCTTCCG GTTTGAAGCAATTATGCCATTCA CAACTACGTTGGGCCGGCGTTG GGCGGGTGCCGAATGTTACC GTATCAAACGGAAGAGGGCGGCCCT CGAGGATGCGCTCGGGTTGCGGA AGGGATGACCTATAAAGCGGCC GCCGCCGGCGTCGATTCGGCGGG GGCAAAACGGTGATTATCGGGGATC CGATGAAAGACAAGTCCGAGG CCCTGTTCGTGCCTCGGGCGTT TATCGAGACCTTGAAGGCCGTTAC CTTACGGGAGAAAGACGTAGG AACCAACGAAGAAGATTGTCTG GGCTCGTCGGAAACCCGTTATGTT GTCGGATTGCCGCCGGCTTAT GGCGGGTCCGGCGATACGGGTGAC AATACCGCGCGCGTCATTCAAG CGATGCGCGCCCGCGTTGATGC ACCGGTACGGTTCGCCGGATCTCCA GGGCCGGCGGATTGCCGTCCAAGG GCTGGGCAAAGTAGGCTATCA TGTGGCGCGACGGGCCATCGAGGC CGCGCTCGAGTGATTGCCGCCGAT ATCAATCCGCATGTAGTCGGC CGAGTGGCGTCCGCTTGGGGATTG AAGCCACCGATCCGTGGCTGTGGT GGAAACCCCGATCTGCGATATT TCGCCCCCTGTGCGTTGGGTAACGT CATTACGGAACGGACCGTGTCCGCC CTCCAATGTCAGGTGGTGGC CGGTCGGCCAACAATCAGCTGGC GGATGATCGACTGGCCGATGATT GCTGCCCGCGGCATTCTCTAT GCGCCGGATTTATTGCGAATGCCG GCGGATTGATTCAAGTGGCGGATGA AATTGGGGATATCATGAAG AACGGGTCCGTCAAAATAGACGG GATTATGACGTCCTGCTCGAGATT TTCGGAAGGCAGCGCCTC CGGCCGATCAACCGTGGCGGTTGC GGTAGACGAGGCCGTCGCCGTT GGACACCATTCAAGGCCATCCAC CGCCTGTACGGATCATAG	YP_005257709.1 AEH47572.1 YP_004587653.1 YP_004581770.1 AEH07849.1 ACF96938.1 YP_007466124.1 EZP75760.1AGT 95551.1 EWG09095.1 YP_008456272.1 EME23486.1 EJS99791.1 EIT85807.1 AAA22646.1 EDL64419.1 EAR66050.1 BAA08816.1
[0143]	苯丙氨酸解氨	CTGCAGGTCAACGGATCATATTCTAC AAA34179.2

酶	ACATATATAATGCACTCCAATTGACA TAATACATAACGTGACAT ATGATACATTTATAATATTAAATTGTC ACATTTACACTTCACATATTAAAATA CTCTCGTATGAAATGCAA TTGAAACATATTTAAATTAATTGAT TGATATATATTGAACAAAACCTAACAA AAAATGCACCCCTTGG TTCACAAAGAAACTTCTTCTATTCT CACTTATTCTGCTAGTGTCTTCCTA TTCAAAGCCATCATTT CCATCAACCTTCACAATACCATGTTT AAAAAGTCATTAAAAATCAATTTC AAATAGAAAAAAACAAGA AGATGGAAATCACTGGTTGGTACTA TATATTAGTTGTTAAGTTGACTCAT ACCGTGTATTGACCAAT ATAAATAAAATCTTATTCAAATAAA TTCAAAAGTTCAATAAATATATATT GTTCATAACTTATAATAA AATTGATTATACATAGTCCTCCCCA TTCACTTTACTGATCAATTATTCTA AAATATATTATTACTTT TACTTGTATTAAATAAAATTAAGAA AATATAAACTCCCTCGTTTAAAA AAATACCTAGTTGAC TTGAAACGGAGTTAATAAAAGAAA GAAGACTTGTAAATCTTGTGATTCTA AATTAAAGTTATGTCAAAT GTACCAAAATGTCCTTAATCTTGTG GTCTTAAACATGTCACATGAAAAATT AAAGTGTTCACAAAAAAA GAAAGGGGTCAATGTCATTCTTTT AAACAGACTAAAAAGAAATAAAACT CATTCTTTGAAACGGAG AGAGTAATTTCACGTTTACTCA TTAATATTAATATTCTCTAGATC ATCCTATAAGATCTAA TAGTGGACATCAATTAAACCTATGT CACTTATTATTATTAAATAATTGTAT CAAGTCACATAATAACA AGTAAAATGGAGTACCTACTATTAA TCTTCAACAACCACAATTACTAGTT TTCCCTAGCAACCCCTCTCACATATT TTGTTACCAACCATC ATTGTTCTCTATATATACTCACAC ATGATAGATACATATATACCAACAA CCAAAACAAAAGGTTT	ADR78835.1 AAA99500.1 AAC18871.1 AAC18870.1 AAA33805.1 AIC66437.1 AGY49231.1 AEW43005.1 AFP24940.1 AER58180.1 ADD12041.1 AEE81750.1 AAP59440.1 AAP59439.1 AAP59438.1 ACG80829.1 ACG80828.1 ACG56648.1 ACG56647.1
[0144]		

[0145]

	ATAAGTTCACAACATTTTATATAC ATACAAATAAAGCTAACCATTTCT CTTCACTAAAATTCTTC ATTACAAATCTAACAAATTACTTGAT CCAATGGCACCATCAATTGCACAAAA TGGACATATTAATGGAGA AGTAGCTATGGATTGTGCAAGAAAT CAATCAATGATCCATTGAATTGGGAA ATGGCTGCTGATTCTTA AGAGGCAGCCATTGGATGAAGTGA AAAAGATGGTGGATGAATTAGAAA GCCAATTGTGAAACTTGGGG GTGAAACTTGTCAAGTGCACAAGTT GCATCCATTGCAAATGTTGATGACAA AAGTAATGGGGTAAAGT GGAACCTTCTGAAAGTGCAGGGCTG GTGTGAAAGCTAGTAGTGATTGGGTT ATGGATAGTATGAGTAAA GGTACAGATAGTATGGTGTACTGC TGGATTGGAGCAACATCTCATAGAA GAACAAAAAAATGGTGGTG CTCTTCAAAAAGAACTTATTAGGTA ACAAACTATTTTTTCGTTATATATA CTAACAAATGTAAAGAAT TTAATATTTTTGTTATATATACTAA CAATGTAAAAAAATTAATATTTTTG TTATATATACTAACAA TGTAAAGAATTAAATATTTTTGTTA TACATAGCTTATCGACTACTTAAGTG CTCCATTGATAAAGATT TTTTTTGTTTACCGAAGGGGATT CGGATGAATTCAAGTAAATGTGATC TTAATGAATTATGATAT TTTTTGTTAGGTTCTGAATGCTGGAG TTTTGGTAATGGAATAGAATCATT CACACATTGCCACATT AGCAACAAAGGGCAGCTATGCTGTTA GGATCAACACTCTGCTTCAAGGCTAC TCTGGCATTAGATTGAG ATCTTGGAAAGCAATCACTAAGTTGAT CAATAGCAACATCACCCCGTGTG CTCTCCGTGGCACGATCA CTGCCTCGGGTGAATCGTCCCTTGT CCTATATTGCTGGTTGCTCACTGGCA GACCTAATTCCAAGGC TGTTGGACCCAATGGTGAGAAACTTA ATGCTGAGGAAGCTTCTGCGTG GGTATTAGTGGTGGATT TTCGAGTTGCAGCCTAACAGGAAGGACT TGCACATTGTGAATGGCACAGCAGTTG	
--	---	--

[0146]

	GTTCTGCTATGGCATCAA TAGCCTGTTGAGTCCAATATCTTG CTGTTATGTCTGAAGTTTATCAGCG ATTTTACTGAAGTGAT GAACGGAAAGCCGAATTCACTGACT ATTTGACACACAAGTTGAAGCATCAC CCTGGTCAGATTGAGGCT GCTGCTATTATGGAACACATTTGGA TGGAAAGCTCTATGTGAAGGTAGCTC AGAAGCTCCATGAAATGG ATCCTCTCAAAAACCAAGCAAGAT CGTTATGCTCTCCGAACATCTCCACA ATGGCTTGGACCTCAGAT TGAAGTCATTGCTGCAACTAAGA TGATCGAGAGGGAGATTAACTCAGT AACGACAATCCATTGATC GATGTTCAAGAAACAAGGCCTTACA TGGTGGCAACTTCCAAGGAACCCCTA TTGGTGTCTCCATGGATA ATACAAGATTGCCCTGCATCAATT GGTAAATTGATGTTGCCAATTCTC AGAGCTTGTCAACGACTA TTACAACAACGGGTTGCCATCTAATC TGACAGCAGGAAGGAATCCAAGCTT GGACTATGGTTCAAGGGC GCTGAAATCGCGATGGCTTACTG CTCGGAACTTCAATTCTGGCAAATC CAGTGACTAACCATGTCT AAAGTGCTGAGCAACACAAACCAAGA TGTGAATTCTTGGCTTAATTTCAGC CAGGAAAACAGCTAACGGC TGTGATATCTTGAAGATAATGTCAT CAACCTATCTCGTGGCTTTGCCAA GCTATTGACTTACGACAT TTGGAGGAAAACCTGAAGAGTGTG CAAGAACACAGTTAGCCAAGTAGCTA AGAGAACTTGACAATGG GTGCTAATGGTGAACCTCATCCAGCA AGATTCAAGCGAAAAAGAATTGCTTCG AGTCGTGGATAGAGAATA CTTGTGCTTGCCTATGCTGATGATCCCTG CAGCTCCAACCTACCCCTTGATGCAGA AGCTGAGACAAGTCCTT GTTGATCAAGCAATGAAGAATGGTGA AAGTGAGAAGAATGTCAACAGCTCA ATCTTCCAAAAGATTGGAG CTTTCGAGGACGAATTAAATCGCTGTG TTGCCTAAAGAAGTTGAGAGTGTAAAG AGCTGTTTGAAAGTGG CAACCCTTAATTGTAACAGGATCA	
--	---	--

[0147]

	CAGAATGCAGATCATATCCATTGTAC AGGTTGGTGAGAGAAGAA CTTGGAACAGAATTGTTGACGGGTGA AAAAGTCGATCACCTGGTGAGGAGA TTGATAAAAGTGTACAG CAATATGTAATGGACAGATTATTGAT CCATTGTTGGAGTGTCTGAAGAGCTG GAATGGTGCTCCTCTTCC AATCTGCTAAATGTGTTATTCTTCAA GTTCTTTTTGTACCTTTAGTGAAT TACTAGAATTATAATG ATGTTATGAACCTATATTAAAAAAA ATATTTTGACTATAAAATTAGTTT GTTATTGAAATTAAAGG CTCAATCTGTGTTCTTCCTCTGTTA TCTGAATATTATAAGAATTCAAGTAA TCTTTAGCTTGTGAA CATGATGACATGCTTCTT	
组氨酸解氨酶	ATGATCACGCTTACCCCCGGCACCT GACCCTCCCGCAACTGCGCCAGATCG CGCGCGAGCCCGTGCAGC TGACGCTGGATCCGGCCAGCTCGCG AAGATCGACGCAGGCGCGAAGGCCG TGTCCGACATCGCCGCGAA GGGCGAGCCGGCGTACGGCATCAAC ACGGGCTTCGGTCGTCTGGCCAGCAC GCATATCCCGCACGATCAG CTCGAATTGCTGCAGAAGAACCTCGT GCTGTCGCATGCAGTCGGTGTGGCG AGCCGATGGCGCGTTCGT CGGTGCGTCTGCTGATCGCGCTGAAG CTGTCGAGCCTCGGCCGCGGCCATT GGGCATTGCGCCGCGAAGT GATGGACGCGCTGATCAAGCTGTTCA ACGCCGACGTGCTGCCGCTGATTCCG GTGAAGGGCTCGGTGCG GCATCGGGCGACCTCGCGCCGCTCGC GCACATGTCGGCCGTGCTGCTCGCG TCGGCGAAGTGTTCATT GCGGCGAGCGCGCGAGCGCGGTGGA CGGGTTGCGCGTGCAGGGCCTCGCG CGCTGACGCTGCAGGCAGA GGAAGGCGCTCGCGCTGCTGAACGGTA CGCAGGGCGTGCAGGGCGCTCGCGCTC GACAACCTGTTCGCGATC GAAGACCTGTACCGCACGGCGCTCGT CGCCGGCGCGCTGTCGGTCATGCGG CGGCCGGCTCGGTGAAGC CGTTGACGCGCGCATCCACGAACGT	BAG44062.1 YP_00522592 3.1 CDF52938.1 ABR76232.1 AAL19728.1 AEW60321.1 AEW51583.1 ABQ54772.1 AAX64695.1 AAU27462.1 WP_02100008 7.1 YP_00518568 2.1 YP_00125011 8.1 EFC47317.1 AAH89809.1 BAH62483.1 XP_00268006 1.1 AAO73411.1 CAI79696.1 CAI79696.1

[0148]	CGCGGCCATCGCGGCCAGATCGATGC GGCGGCCCGTATCGCGA GCTGCTCGAAGGCTCGCGATCAACC TCTCGCATCGCAGTCGGCAAGGTG CAGGATCCGTACAGCCTG CGCTGCCAGCCGCAGGTGATGGGCGC GTGCCTGGACCAGATGCGTCATGCGG CCGACGTGCTGCTCGTCG AGGCGAACCGCGGTATCGGACAACCC GCTGATCTTCCCGGATACCGCGAAG TGCTGTCGGCGGCAATT CCATCGGAGGCCGTCGCGTTCGCG CCGACAAACCTCGCGCTCGCGCTGCG GAAATCGGCGCGCTGGCC GAGCGCCGCATCGCGCTGCTGATCGA CGCGACGCTGTCGGGCCTGCCGCCGT TCCTCGTGAAGGATGGCG GCGTGAACCTGGGCTTCATGATTGCG CACGTGACGGCAGCTGCGCTCGCATC GGAGAACAAAGACGCTCGC GCATCCGGCGTCGGTCGATTGCTGC CGACCTCGCGAACCGAGGAAGACCA CGTTCGATGGCGACGTT GCGGCACGCAAGCTGGCCGACATCG CCGACAAACACGAAGCACATCCTCGCG ATCGAACTGCTCGCGGCCG CGCAGGGCGTCGATCTGCGCGAGAA CGAGACGAGCCCCGAAGCTCGCGGAA GTGATGAAGACGATTGCGAG CAAGGTCGCGCATTACGAGCTCGACC ACTACTTGCGCCGGACATCGCCGTG ATCGCGAACGCTCGTCGTC GAGCGCGCGTCGCGAACGACTGCC GTTCGCCTTCGCATCGGAGCAGTAA	
酪氨酸解氨酶	GTGACGCAGGTGCGTGGAACGTCAGGC TGATCGGCTCAGCAGCAGGGAGTACC TGGCCCGGGTCGTCGCGA GCGCCGGGTGGGACGCCGGTCTCACCC TCGTGCACCGACGAGGAGATCGTCCG GATGGGCGCGAGCGCG CACCATCGAGGAGTACCTGAAGTCCG ACAAGCCCACATCTACGGCCTGACGCAG GGCTTCGGTCCGCTGGT CTGTTCGACGCCGACTCGGAGCTGGA GCAGGGCGGCTCGCTGATCTCGCACC TGGGCACCGGCCAGGGCG CGCCACTGGCCCCGGAGGGTGTGCGGG CTGATCCTCTGGCTGCGCATCCAGAA CATCGCGAACGGGGTACTC	YP_00703999 9.1 Q8GMG0.1 WP_01510323 7.1 CCH33126.1 AGZ04575.1 GAK34477.1 AIG26365.1 WP_03081426 3.1 WP_03059262 2.1 WP_03058380 2.1

[0149]	GGCGGTCTCGCCGGTGTCTGGCAGA AGCTCGCCGACCTGTGGAACAAAGGG GTTCACCCCCGGCGATCCCC CGGCACGGCACGGTCAGCGCGAGCG GCGACCTGCAACCGCTGGCGCACGCC GCGCTCGCCTTACCGGTG TCGGCGAGGCAGTGGACCCGGGACGC CGACGGCCGGTGGTCCACCGTGCCGG CCGTGGACGCGCTCGCCGC GCTGGGGCGGAGCCGTTGACTGGC CGGTGCGCGAGGCAGTGGCGTTGTC AACGGGACCGGGCGCAG CTCGCGGTGGCTGTGCTAACCAACCG GTCCGCCCTGCGGCTGGTCCCGCGCCT GCGCGTGCTCTCCCGCG GGCTGGCGACCCCTGCTGGGGGCAAT CCCGAGCACTACGACGTGGGGCACG GTGTCGCGCGCAGGT CGGTCAAGCTGACCGCGGGAGTGG ATCCGGCAGGGCTGCCCGGGCAT GGTGCAGCGACGGCAGCCGC CCGCTCCAGGAGGCCGTACAGCCTGCG GTGCGCGCCGCAGGTGCTGGCGCG TGCTCGACCAGCTCGACCG GCGCGGGCGACGTGCTGGCGCGGA GGTCGACGGCTGCCAGGACAACCCG ATCACCTACGAGGGCGAGCT GCTGCACGGCGGCAACTTCCACGCCA TGCCGGTGGGTTTCGCCTCCGACCA ATCGGGTTGGCCATGCAC ATGGCCGCCTACCTGGCCGAGCGCCA GCTGGGTCTGCTGGTCAGCCGGTGA CCAACGGCGACCTGCCGC CCATGCTCACCCCGCGGCCGGCGC GGTGCAGGGCTGGCCGGGTGCAGAT CAGCGCGACCTCGTCGT CTCGCGGATCCGGCAGCTGGTGTCC CCGCCTCGCTGACCACCGTGGCGACC AACGGCTGGAACCAGGAC CACGTGCCGATGGCGCTAACGGGGC GAACTCGGTGTTCGAGGGCGTTGGAGC TCGGCTGGCTGACGGTCG GGTCGCTGGCGGTGGCGTCGCGCAG CTCGCGGCCATGACCGGCCACGCCGC GGAGGGCGTCTGGCGGA GCTGGCCGGGATCTGCCCGCCGCTGG ACGCCGACCGCCGCTGGCGCCGA GGTGCAGCGCCGCGCAG CTGCTGTCCCGCGCACGCGGACCAACT GCTCGTCGACGAGGCAGACGGGAAG	WP_03022588 5.1 WP_03010705 6.1 WP_01026161 5.1 WP_00906581 1.1 WP_02904390 4.1 WP_02902760 7.1 WP_02902567 0.1 WP_02902398 8.1 WP_02902028 0.1 WP_02867358 1.1

	GATTCGGATGA	
谷氨酸脱氢酶	ATGTCAGCAAAGCAAGTCTCGAAAG ATGAAGAAAAAGAAGCTCTTAACCTA TTCTGTCTACCCAAACAA TCATTAAGGAAGCCCTCGGAAGCTG GGTTATCCGGGAGATATGTATGAACT CATGAAAGAGCCGCAGAG AATGCTCACTGTCCGCATTCCGGTCA AAATGGACAATGGGAGCGTCAAAGT GTTCACAGGCTACCGGTCA CAGCACAATGATGCTGTCGGTCCGAC AAAGGGGGCGTTCGCTCCATCCAG AAGTTAATGAAGAGGAAG TAAAGGCATTATCCATTGGATGACG CTCAAATGCGGGATTGCCAATCTCC TTACGGCGGCCGGAAAGGG CGGTATTATTGTGATCCCGGGACAA TGTCAATTGGAGAACTGGAAAGGCTG AGCAGGGGGTATGTCCGT GCCATCAGCCAGATCGTCGGTCCGAC AAAGGATATTCCAGCTCCGATGTGT ACACCAATTGCGCAGATTA TGGCGTGGATGATGGATGAGTACAGC CGGCTGCGGGATTGATTCTCCGGG CTTATTACAGGTAAACC GCTTGTGAGGGAGGATCGCAAGGAC GGGAAACAGCGACGGCACAGGGCGT CACGATTGTATTGAAGAG GCGGTGAAGAAAAAGGGATCAAGC TGCAAAACGCGCGCATCATACAG GGCTTGGAAACCGCGGGTA GCTTCCTGGCAAATTGACAGGAT GCGGGCGCGAAGGTGATCGGGATTTC TGATGCCAATGGCGGGCT CTACAACCCAGACGGCCTGATATCC CTTATTGCTCGATAAACCGGGACAGC TTTGGTATGGTCACCAAT TTATTTACTGACGTCATCACAAATGA GGAGCTGCTTGAAAAGGATTGCGATA TTTAGTGCCTGCCGCGA TCTCCAATCAAATCACAGCCAAAAC GCACATAAACATTCAAGCGTCAATCGT CGTTGAAGCGCGAACGG CCCGACAACCATTGATGCCACTAAGA TCCTGAATGAAAGAGGCGTGCTGCTT GTGCCGGATATCCTAGCG AGTGCCGGCGCGTCACGGTTCTA TTTGAATGGGTGCAAAACAACCAAG	P39633.3 KEG08275.1 NP_00123385 0.1 NP_00126803 9.1 AEW04907.1 YP_00716125 5.1 YP_00525657 9.1 YP_00493265 2.1 YP_00444244 4.1 YP_00441234 8.1 YP_00441098 6.1 YP_00437273 1.1 YP_00436766 7.1 YP_00436636 6.1 YP_00434396 8.1 YP_00434335 6.1 YP_00426176 6.1 YP_00427038 2.1 YP_00409996 1.1 YP_00396781 1.1

[0150]



	CTCCTACAAACGCCCTGT GCCGCACTTGAAGCGCCGACCAAAC TGGCATATTCCGCCAAAAACCGTTCC GCTTCCATCCGTATTCCG TCTGTGAACAGCAGCAAGGCGGCC GCATCGAAGCGCGTTCGGACCCG ACCGCCAACCCGTACTTGG CGTCGCTGCCCTGCTGATGGCGGGT TTGGACGGCATTCAAAACAAAATCCA TCCGGCGATCCTGCCGA AAAAATCTCTACGACCTGCCGCCG AAGAAGACGCGCTCGTCCCACCCTT TGCCTCTTTAGAAGAA GCCCTCGCCGCGCTCAAAGCCGACCA CGAATTCCCTTACGCGGGCGTGT TCAGCAAAGACTGGATCG ACAGCTACATCGCCTTAAAGAGGAA GATGTCCGCCGATCCGTATGGGCC GCATCCGCTGGAATTGAA AATGTATTACAGCCTGTAA	
[0152]	苏氨酸脱氢酶 AGGAGGTGTTTAATAATGAAAGGTT TTGCAATGCTCAGTATCGGTAAAGTC GGTTGGATTGAAAAAGAA AAGCCTACTCCCGGCCCTTGACGC TATTGTAAGACCTCTAGCTGTGGCCC CTTGCACCTCGGACGTTC ATACCGTTTGAGGTGCTATTGGC GAAAGACATAACATGATACTCGGTCA CGAAGCTGTAGGTGAAGT AGTTGAAGTAGGTAGTGAGGTAAAA GATTAAACCTGGTATCGCGTTGT GGTACCAAGCTATTACCCCT GATTGGCGAACCTCTGAAGTGAAAG AGGATATCACCAACACTCTGGTGGAA TGCTGGCAGGCTGGAAAT TTTCGAATATAAAAGATGGTTTTT GGTGAATTTCATGTGAACGATGC TGATATGAATTAGCACA TCTGCCTAAGGAAATTCCATTGGAAG CTGCAGTTATGATTCCGATATGATG ACTACTGGCTTCACGGA GCCGAACTGGCAGATATAGAATTAGG TGCACGGTAGCGGTTGGGTATTG GCCCAGTAGGTCTTATGG CAGTCGCTGGTGCCAAATTGCGGGGT GCTGGAAGGATTATCGCAGTAGGCAG TAGACCAAGTTGTGAGA TGCTGCAAAACTATGGAGCTACTG ATATTGTAAACTATAAAGATGGCCT	NP_622353.1 EPX86072.1 AFT82159.1 YP_00679615 8.1 EJZ15419.1 YP_00172763 0.1 ACA82186.1 AGZ44086.1 AEB44998.1 YP_00873713 9.1 EPX87740.1 YP_00440559 8.1 BAN60779.1 EPE39095.1 EPC57128.1 EME23086.1 ACI75705.1 ACI75704.1 ACI75703.1 ACI75702.1

[0153]

	ATCGACAGTCAGATTATG GATTAAACGGAAGGCAAAGGTGTTGA TGCTGCCATCATCGCTGGAGGAAATG TTGACATCATGGCTACAG CAGTTAAGATTGTTAACCTGGTGGC ACCATCGCTAATGTAATTACTTGG CGAAGGAGATGTTTGCC TGTTCCCTCGTCTTGAATGGGGTTGCG GCATGGCTCATAAAACTATAAAAGGC GGGCTATGCCCGGTGGA CGTCTAAGAATGAAAGACTGATTGA CCTTGTGTTATAAGCGTGTGATCC TTCTAAGCTCGTCACTC ACGTTTCCGGGGATTGACAATATT GAAAAAAGCCTTATGTTGATGAAAGA CAAACCAAAAGACCTAAT CAAACCTGTTGTAATATTAGCATAA	
苏氨酸解氨酶	ATGGCTGACTCGCAACCCCTGTCCGG TACCCCGGAAGGTGCCGAATATTAA GAGCGGTGCTGCGCGCG CGGTCTACGAAGCGGCGCAGGTAC GCCGCTACAGAAAATGAAAAACTG TCGTCGCGTCTCGATAACGT GATTCTGGTGAAGCGCGAAGATGCC AGCCAGTTCATAGCTTAAGTTGCGC GGCGCATACGCCATGATG GCGGGCCTGACGGAAGAACAAAAAG CACACGGCGTATTACCGCTTCTGCA GGTAACCACGCGCAGGGCG TCGCGTTTCTTCCGCACGGTTAGGC GTGAAGGCGCTGATCGTCATGCCAAC CGCCACCGCCGATATCAA AGTTGATGCGGTGCGCGGCTTGGCG GCGAAGTGCTGCTCACGGCGAAAT TTCGATGAAGCGAAAGCG AAAGCGATCGAACTGTCACAGCAGC AGGGTTCACCTGGTACCGCCGTT GATCATCCGATGGTGATCG CCGGCAAGGCACGCTGGCGCTGGA ACTGCTCCAGCAGGACGCCATCTCG ACCGCGTATTGTACCGGT CGGCGGGCGGCGGTCTGGCAGCGGGT GTGGCGGGTGTGATCAAACAACTGAT GCCGCAAATCAAAGTAATC GCCGTGGAAGCGGAAGATTCCGCCTG CCTGAAAGCGGCGCTGGATGCGGGTC ATCCCGTTGATCTGCCCC GCGTGGGGCTGTTGCTGAAGGCGTC GCGGTAAAACGCATGGCGATGAAA	EGP22802.1 AIL15845.1 KFJ14411.1 B22317 ESE06785.1 ESD87895.1 ESD77040.1 ESD56952.1 ESD26867.1 ESD18649.1 ESC98561.1 ESA95751.1 ESA86931.1 ESA78951.1 ESA72735.1 ESA67809.1 ERL21545.1 ERK40933.1 ERJ97484.1 ERH28800.1

[0154]	CCTTCCGTTGTGCCAGGA GTATCTGACGACATCATCACCGTCG ATAGCGATGCCATCTGTGCGGCGATG AAAGATCTGTCGAAGAT GTGCGCGCGGTGGCGAACCTCCGG CGCGCTGGCGTGGCGGGGATGAAA AAATACATCGCCCAGCACA ACATTGCGGTGAACGGCTGGCGCAT ATTCTTCCGGTGCTAACGTGAACCTT CACGGTCTGCGCTACGT CTCGGAACGCTGCGAACCTGGCGAA CAGCGTGAAGCGTTGGCGGTGAC CATTCCGGAAGAAAAAGGC AGCTTCCTCAAATTCTGCCAACTGCTT GGCGGGCGTTCGGTACCGAGTTCAA CTACCGTTTGCCGATG CCAAAAAACGCTGCATCTTGTGGC GTGCGCTTAAGCCGTGGCCTCGAAGA GCGCAAAGAAATTTGCA GATGCTCAACGACGGTGGCTACAGCG TGGTTGATCTCTCCGACGACGAAATG GCGAAGCTGCATGTGCGC TATATGGTTGGCGGGCGTCCATCGCA TCCTGTCAGGAACGCCTATACAGCT TCGAATTCCCGGAATCAC CGGGCGCGCTGCTGCGCTCCTCAAC ACGCTGGGTACGCCACTGGAACATCTC GCTGTTCCATTATCGCAG CCACGGTACCGACTACGGGCGCGTAC TGGCGCGTTCGAGCTTGGCGATCAT GAACCGGATTTGAAACC CGGTTGAATGAACTGGGCTACGATTG CCACGACGAAACCAATAACCCGGCG TTCAGGTTCTTTGGCGG GTTAG	
丝氨酸脱氢酶	ATGAGCGGTACCATCCTCATCACCGG CGCCACGTCCGGCTTCGGACAGGCCA CGGCGCGCGTTCGTCA AGGAAGGCTGGAAGGTATCGGCAC AGGTCGGCGGGCGGAACGGCTGGAG GCGCTGGCGCAAGAACTCGG CTCCGCCTTCACGGCGCTGCCTCG ATGTTACCGACGAAGATGCCACTAGA AAGGCACCTGCGGCTTG CCGGAAGGTTCCGGACATCGATAT TCTCGTCAACAATGCGGGGCTTGCAC TCGGCACCGCACCTGCAC CGCAGGTGCCGCTGAAAGACTGGCA GACCATGGTGAACACCAACATCACCG	ADY67207.1 YP_00444429 8.1 EAZ63492.1 XP_00138751 5.1 BAB07807.1 EMS96834.1 EKJ96295.1 EHJ96027.1 EHH03760.1 WP_02870702 5.1 NP_356536.1

	GTCTTTGAACATCACCCA CCATCTTGCACGGTGTGATCGACC GCAAGGGCATTGTCATCAACCTTCC TCGGTAGCTGCGCACTGG CCCTATGCGGGGCAATGTCTATGC CGGAACGAAAGCCTCCTGCGGCAAT TCTCGCTCGGTCTGCGCT CCGACCTGCATGGCAAGGGCGTGC GTCACCTCGATCGAACCGGGCATGTG CGAAACGGAATTACGCT TGTCGCACCAGGGCAATCAGGATG CCTCGGACAATCTTACAAGGGCGTC AATCCGATCACGGCCGAG GATATGCCAATACGATCCATTGGGT CGCCTCGCAGCCAAACATATCAACA TCAACAGCCTCGAACTCA TGCCGGTCAACCAGTCCTTGCCGGT TTCCAAGTGCATCGGGAAAGTTGA	AEQ50417.1 AAK89321.1 YP_00489816 7.1 YP_064393.1 WP_00352248 0.1 EGP55658.1 EGL63994.1 KFC62486.1 WP_03135434 8.1
[0155]	丝氨酸解氨酶 ATGATGACCAAAACGAAATCCAAA AGTGGGTAAAGGAATTCCCGCTGCTT GAAACGATCATGGCGGCCG AAGAGGTATTTGGCGCAATCCAAA TATCACCGCGTTGCGCAAGCTATTG AACGATTCCCTTACCGA ACCGCGATGTCAAGGAGGCCGAAGAG CGATTGCGCCGCTTGCCCCCTACAT CGCGAAAGTGTTCAGGAGGCCGAAGAG ACCGAACGGCCCACGGTATCATCGA ATCCCCCTTAGTGCAGGATTCCGAACA TGAAACAGCGTTGGAAA AGATGTTCAAGACCAACATCGAGGGG GATCTGTTGCTAAATGCGACAGCCA TCTTCCCCTCTCCGGATC GATCAAGGCAGAGAGGGGAATCTAC GAGGTTCTGAAACATGCGGAAGAACT CGCTCTGGCAAACCATATG ATCACCATGGGGATGACTATGCGGT CATGGCCAGCGAAGAAATTCCGGCAGT TCTTTCCCGCTATTG TTGTCGTTGGTTGACGGGAAATTG GGCTTGAGTATCGGCATCATCGGGC GCAGCTGGTTCCCGCGT TACCGTTCATATGTCAGCCGATGCGA AACAAATGGAAAAAAAGACTTGTGCG AAGCAAAGGGTTGCGGTC ATCGAACATCTCACCGACTACAACAA GGTGGTGGAAAGAGGCCGAAGACAG TCCGCCGAGGATCCAACGT CGTATTTCATCGATGATGAGAACTCG	KFL14920.1 AIF56070.1 KFI03369.1 KFH36969.1 KFH35774.1 KFF56112.1 WP_03140914 1.1 KFC30598.1 KEZ84476.1 KEY95863.1 KER46054.1 WP_03002494 9.1 KEK24273.1 KEK22892.1 KEK18491.1 KEK12402.1 WP_02976121 2.1 WP_02975817 4.1 WP_02971407 8.1 WP_02959831 6.1

[0156]

	ATCCATCTGTTTTAGGCTATGCGGTG GCGGCCTTCGGCTGAA AAAGCAATTAGAGGACATGAACATC ACGGTTGATGAAAACCACCCGCTCTT TGTATATCTTCCTTGCAGGC GTCGGCGGCGGTCCGGGGGGTGA CGTTTGGGCTGAAGCTCGTGTACGGC GATCATGTCCATTGCTTT TCGCTGAGCCGACGCATTGCCTTGC ATGTTGCTCGGCCTGATGACGGGACA GCACGACCGCGTGTGGT GCAAGAGTTGGCCTCGACAATAAGA CCGAAGCGGACGGGCTAGCGGTGGG GCGGCCGTCAAGGTTGGT GGGAACATGCTTGAGAACGTCATCAG CGGCGTCTATACGGTGGACGATGCGA CGCTTACCGCTTGCCTG CGGCGATGGTGAAACGGAGGAAAT CTATTAGAGCCGTCGGCCTTGGCGG GGGTGGCGGGGCCTGTTCG GCTGTTCTGTGATTGGCGGGGAAA CGTACGTAGAGGCAAACGGTTGAAA GAAAAGATGAAAAACGCC GTCCATATTGGCTGGCGACAGGCGG AAGCATGGTGTAAAGGATGTGATGG AGGCCTATTATCGGGAAG GCGTGCATCGAAACGATGACAGG GAACGGTTTCTGAAGGACGATAA	
亮氨酸脱氢酶	ATGCTGATGTTCGAAGAAATCCAGGC GCGCGGCCACGAGAGCGTCACGCTG CTGCACCAACGCCCGAGCG GCCTGCGGCCGTGCTCGCCGTGCAC TCCACCGTGTGCTGGCCCTGCCATTGC CGGCTGCCGCTGATGCC CTGCACCGAGGAACGCCGTGCGC GACGCCCTGCCCTCAGCGAGTCCGT CACGCTCAAGGCCGCCCC GCGGGCCTGAACTACGGCGGGGGCG CGTGCCTCATGCTCCCCCGGAAGGC GGCGACATCGACGGGCACG CCCGCGAGGCCTGTTCCCGCGCCTC GGCCGGCAGATCCGTTACCGCGGTGG CCCGCTCATCCTCACCGA GGACGTCGGCGTGACCGGCCGCGAC ATCGCCTCGCCCGCAGGAAACCGA CAGCACCATGGGCATGCAC ACCGACACGCCACCGTCACCGCGTA CGGCGTGTACCGCGGCATCAAGGCCG CCGCGCGCCTACCTCG	YP_00416978 5.1 ADV66120.1 ADY26991.1 AEW05136.1 YP_00525680 8.1 YP_00425660 8.1 YP_00434624 5.1 AEA45407.1 YP_00410199 2.1 YP_00410199 1.1 YP_00382593 2.1 ADU51265.1 ADU51264.1 ADL08309.1

[0157]

	GC GGCGAGAGCATGCGCGCGTGC CGTCGCGCTGCTCGGCGGGCGCAG TCGGGCGCACCCCTCGCGA GCACCTGCACC CGAGGGCGCGC CTCACCGTCG CAGACCTGATGTCTGA GCGCGCGCAGGCCCTCGCG GACGACCTCGGCGAGCGCGTCACCGT CGTGAGCGCCGCTGACATCTTCGACG TGCCGTGCGACGTATTG CGCCGTGCGCGT CCGGACAGCATC AAAAGCGCCGACGTGCCCGCTTGCA GTGCCGGGTGATCGCCGG CAGCGAACACCACCCGCTAGCCACA ACGGCGAGACGCTCGTGC CGAAGC GGGCATCACATACATCCCG GACTTCGCCATCAACAGCGCCGGCCT GATGAGCGCCGCGCAGAACCTCAGC ATCGAAACGGCGGCGGAAC GCGTGTACGAGAGCGTGCAGATC TGC CGACCGCGCAGAAGTACGAGA AGCCGCCGCACGT CGC CCG TAAACTCGCGCTGCCGCATCG AACTGATCGGCTCCATCAGCGGCCAG TACGCCGGCCAGTAA	AFY88585.1 YP_00405400 7.1 YP_00709245 4.1 YP_00382521 6.1 ADR21899.1 ADL07593.1
天冬氨酸脱氨 酶	TCATGTGCCAACACGTATGTTATCAC TTAAAATTTTAGTAAAGTGAUTGCT GAATATGCTGCCAAAACA CTTGTGTTGGATTTAATTACACACACA GTGTTTTGTTAGATTTAAACTCT CCAAAATCTCCTTTAA CATGGACTTCATGGATATTGTGTTCA ACTTCAGGATCTGCAATTATCTTAC ATCCGCATCTATTCCAGA GGCTAGACTTAATGCCGCAGCACGT TAATATTCACTGGAAATT TTAACA GCTTCTGAGGATTCCCT TTAACACAGACCTCCTTTGGTC TTAACACCTAACGAAGTAGGTGATT TCTCGTTATAAGTTTA TTTCTTTATCTTACCTAACGGATGCGG CTTTACACCATCTAAACCAATTATTG CACCGGAAGGTATGTA TATATTAGCTCCTGATTCTCTAGATT CTTTATCAATCTTCTTAACCTTCTC ATCTAACATAGTGCACCC ACACTCATAATAAAACATCTATAACC TCTACTAATTATATTGGGCACAATT TTTACTGCCTCTTGAG AAGCAGATTCAATTATCAAATCAACT	ADP76847.1 YP_00400360 9.1 ADE37476.1 AEH60264.1 AEH50568.1 YP_00461548 3.1 YP_00465966 4.1 YP_00354312 1.1 YP_00389589 1.1 ADN37453.1 ADV47603.1 YP_00416310 1.1 ADY50896.1 ABX33598.1 YP_00427271 8.1 ADN60949.1 ACL18032.1 ACL16745.1

[0158]

	CCATTGAACATTCTTCTACCTTTTT ACGGCAGTGCCATTGT TAAATTGCTAGCTTCTAGCTTTCT AAAATTCTGTCAAAAAATATTTA ATTTTATTTTTGATA TCTTGTAAAGACAAGGTTAACTATT GTATTGCAATTGCACCATCCTAT AATCCCACATCTCAT	ABX00971.1 ADD08173.1
天冬氨酸解氨 酶	ATGTCCCTGCCTGCATCATCGCGAT CGAAAAAGACCTGCTTGGTGTCTCG AAGTACCTGCCAACCGCGT ATTACGGCATCCAGACCCCTGCGAGCG GTGAACAACTTCACCTCTCCGGCGT GCCGCTTCGCACTACCC GAAACTGGTAGTCGCGCTGGCCATGG TCAAGCAGCGGCAGCGGATGCAA CCATCAGCTGGACACCTC AATGACGCCAACGATGCCGATCA GCGAGGCCTGTGCCCGCCTGATCCGC GGCGACTTCCACGGATCAGT TCGTGGTCGACATGATCCAGGGCGGC GCTGGCACGTCGACCAACATGAATGC CAACGAAGTCATGCCAA CATCGCTCTGGAAACCATGGGTTCG AGAAAGCGCATACAAACACCTGCA CCCCAACAACGATGTCAAC ATGGCGCAGTCGACCAACGACGCC CCCCACGGCGATCCGCTTGGGTCTGC TGCTGGGTCACGACGCTC TGCTCGCCAGCCTTCCAGCCTGATT CAGGCCTTCGCCGCCAACGGCGAAG AATTCAACCATGTGCTGAA GATGGGCCGCACCCAGTTGCAGGAC GCCGTTCCAATGACCCCTGGGTAGGA ATTCCGCGCCTTCGCCACC ACCCTGACAGAACGACCTGAACCGC GCGCAGCCTGGGCCAGAGCTGTTGA CCGAAGTGAACCTCGGCG GAACCGCCATCGGCACCGGCATCAAC GCCGACCCCTGGCTATCAGAAGCTGGC AGTCGATCGTCTGGCACT CATCAGCGGCCAGCCTCTGGTGCAG CAGCCGACCTGATCGAACGACCTCC GACATGGCGCCTTCGTG TTGTTCTCGGGCATGCTCAAGCGTAC TGCAGTCAGCTGTCGAAAATCTGCA ACGACCTGCGCCTGCTGT CCAGCGGCCACGCACCGGCATCAAC GAAATCAACCTGCCGGCACGTCAGCC	ELS44542.1 EXL32019.1 EPF69098.1 EDZ32290.1 ACC77466.1 ETO09916.1 ETN58394.1 AGZ94384.1 EGU12843.1 AGQ54567.1 BAN21048.1 ELU36465.1 ELU36464.1 EDS31003.1 BAM20634.1 ACO48312.1 XP_00182883 3.2 EAU92840.2 XP_00184988 0.1 XP_00165898 8.1

[0159]

	AGGCAGCTCGATCATGCC CGGCAAGGTCAACCCGGTGATCCCGG AAGCGGTCAATCAGGTTGCCTTCGAA ATCATCGGCAACGACCTG TCGCTGACCATGGCAGCCGAAGGAG GACAATTGCAGCTAACGTGATGGAG CCGCTGATCGCCTACAAGA TCTTCGACTCGATCCGCCTGCTGCAG CGCGCCATGGACATGCTGCGCGAGCA CTGCATCGTCGGCATCAC AGCCAACGAACAGCGCTGCCCGAG CTGGTCGAGCATTGATCGGTCTGGT CACCGCCCTGAACCCCTTAC ATCGGTTACGAGAACTCCACCCGTAT CGCCCGCATCGCGCTGGAAACCGGCC GCGGCGTGCTGGAACCTGG TGCCTGAGGAAGGTCTGCTCGACGAC GCCATGCTCGACGACATCCTGCGCCC GAAAAACATGATCGCTCC GCGTCTGGCCCCCTGAAGGCCTGA	
缬氨酸脱氢酶	TCAGCGACCGCGGGCCTCGGCCATCC GCTGCTCGCGATCCGGTCGGCCGCC GCGGCGGGCGGAATGCCG TCCGCCTTCGCACGTGCGAATATTTC CAGCGTGGTGTGCGAAGATCTTCGTCG CCTTCGCTTGACCGCGT CGAAGTCGAACCCGTGCAGCTCGTCG GCGACCTGGATCACGCCGCCGGCGTT GACCACATAGTCGGGTGC GTAGAGGACCGACCGGTCGGCCAGG TCCTTCTCGACACCCGGGTGGGCCAG CTGGTTGTTGGCCCGCCG CACACCACCTTCGCCGTGAGCACC AACGGTCGCGTCGTTGAGCGCGCCGC CGAGCGCGCAGGGCGCGT AGATGTGAGACCCCTCGGTGCGGATC AGCGTCTCGGTGTCGCCACCGGT GACCTCGGGGTGCAGATC GGTATCCGGCGCACCGACTCCTCGC GTACGTGGTGATCACGACCTCGGCC CCGTCGGAGAGCAGGTGC TCGACGAGGTGGTGGCCCACCTGCC GACCCCGCGACGCCGACCTTGC CGCGCAGCGTCGGGTGC CCCACAGGTGCTGGGCCGAGGCC ATGCCCTGGAAGACACCGAACCG TGAGGACGGAGGAGTGC GGCGCCGCCGTTCTCGGGGGAGCGGC CGGTGGTCCAGCGGCAC TCCCTGGCG	YP_00793265 2.1 AGK78767.1 NP_628270.1 YP_00197323 4.1 AIJ14557.1 YP_00752320 9.1 WP_01565942 6.1 CCK29082.1 CAR62534.1 AGT93561.1 AEK45617.1 ADI08852.1 YP_00845428 2.1 ESQ05180.1 ESP98677.1 YP_00553507 4.1 YP_00496398 3.1 EOD63988.1 EME98953.1 EME52779.1

[0160]

	ACGACGTCCATGTCGGCG ACGTAGGTGCCGACATCGCAGGGCGT GACGTACCGGCCGAGCGAGGCG ACGAACCGGCCGTAGGCCA GGAGGAGTTCCTCCGTCTGATCTTCT CCGGGTGCCGATGATGACGGCCTG CCGCCACCCTGGTCGAG TCCGGCCAGGGCGTTCTTGTACGACA TCCCAGCGACAGGTTCAGCGCGTCG GCGACGGCCTCGGCCTCG GTCGCGTACGGGTAGAACGGGTGCC GCCGAGGCCGGGCCCAGGGCGGTG GAGTGGAGGGCGATGACGG CCTTGAGGCCGGTGGCACGGTCCTGG CAGATCACGACTTGCTCGTACCCCC CTGATCCGAGTGGAACAG GGTGTGCAGGACGCCGTTAGTCACAT CGGTACAC	
甘氨酸脱氢酶	CTAGTTGTAAAAGTCGAGGGAGGCGC AACTGCACATGAGGTGACGATCTCCG TAAACCCCGTCAATGCGA CCCACAGTCGGCCAGTACTTTCAAC GTACGAGTAAGGATAAGGGAATGCC GCCAAACGCCGATCATATG GTTTGTCCCATTATCATCGGTGACAC ATCTTGCCGTGTGGTGACATTCTCA AAACATTGTTATCCAC TGGTTGTTCACCTTTCAATGGCGGC AATCTCACCTCGAACGGAAATTAGTG CATCTGCCAACGCCGATCC AACTCCCGCTTGGTTCTGATTGGT GGGTTCAATCATAAAGTCCCAGGT CAGGAAACGCCAGTGTG GCGAGTGAATTCCGTAGTCCATCAAC CGTTGGCCACGTCCTCCGCCCTCAAT ATGAGCTGTCTTCTTGAA CCGTCGAAGATCAACGATAAACTCAT GAGCGCAGTAGTTCTCCACCCAGG AAAAGAATCGTATAATGG TTCTCTAGGCGCTTCTTCAAGTAGTT GCATTCAAAACGGCGTACTCTGTACA AGTTTGAGGCCGTGTG ATCCAAGCATTAAACATCAACATGTAC GATATCGGAAGAATTGATGCTGATCC GTACGCTGATTGTGAGAC TTGGCCGAATGGCTGTGAACCGCCAA CTTTTGTTGAAAACAGAACATTGGC AAAAAGGGGGCCAGATGT TGACGGACAGCTATAGGGCCCATTCC	KEG12217.1 ADH66904.1 YP_00367941 0.1 YP_00350749 1.1 ADN74845.1 ADD28471.1 YP_00444520 3.1 YP_00391191 9.1 ADQ81869.1 AEH88507.1 YP_00713821 9.1 YP_00461260 1.1 YP_00417031 8.1 YP_00416355 9.1 YP_00404537 5.1 YP_00478719 0.1 YP_00714236 1.1 YP_00706789 6.1 YP_00710078

[0161]	GGGGCCGCCACCACCATGGGAATT GAAAACGTCTTGTGGAGAT TAATGTGGCACACGTCGCCACCGATA TATCCAGGGCCTGTATAGCCAACCAT GGCGTTAAGATTGCC ATCAATGTAGCATTGTCCACCGTAGT AGTGCGCCATTGATGTAATGGATAAA ATATCCTGTCAAACAAG CCATACGTACTGGATATGTTATCAT GATACACGACAACCTCCTTGCCTGTT TTGGCAAGATTCTCCA GGTCATTGATATCAACCCTGCCGTTA GACAAGCATTCAACCAAGACAATATT CATTCTGCCAATGTTGC CGAAGCTGGATTGTAACCATGCCAC TCTCTGGAATCAAACAGACGTTGCC TGTCTTCCTTCATTGAT AGATGGTACGCACGAATAACACGAA GCCAGCGTATTCACCTGGGCC CTATTAGGCTGAAGCGATA CCGCATCCAGACCGTAATTCC AACTTTGCTCAAGATCTAGACACAA CGCACTGTACCCCTCGCAC TTGGTCCACTGGGCAAGGGGATGCA CATTGGTGAATTCTGGCCAAGAGAGT GGTAACATAGCAGCGGCA GGGTTAAGCTCATGGTGCAAGATCC CAACGGGACGCAACCATGCGTAAGG CCGTAATCCTTCGTTGTA GACGATGAATATAGCGCATCAGTTCA CTTCACTCTGTACTTTGAAACGTT GAGTGTTCAGGAAATC AGACTTCCGCACCAAGATCCAACGGTA GTACCGATTCTGATCGGCTATTTGG AAAGGGCTGCGACGACG GGAAGCTCAACCTGCAGCCTCAA AAGTGACACAATGTGTCCATCCGTTG TTGCCTCATCCACAGAAA TGGAGACAGTCCCATTACTGTAATCA ACAAAAAACATTAATACCCCTCTAAC ACATCGTGTCTGTAATC CTCCGCTGTAATGCCTTTAGGTTCAC AGTAACAGTGTGAAAAATGCACGT TTACCACAGAGTGT ACTGATTCCATACCAACAGCGAGCAC TTTCGCCTGCCGTGTATCTCATTGGC AATCTCATTAGACCAT CTGGACCATGGTAGGCGGCATAAAAC CCACTCACGTTGCCAATAACGCTTG TGCAGTACAGATATTGA	8.1 YP_00477304 3.1
--------	--	---------------------------

[0162]	TGTGGCGCGCTCACGCTTAATATGTT GTTCACCGTGTCTGCAGCGCCATGCGT ATGGATGGCTCTCCGGCA GAATCCTTACTGACGCCGATCACACG TCCCAGGATCAACCTCTTAAACTGCT CCTTGACAGCAAAGAACG CGGCGTGAGGACCTCCATATCCTAGT GGAACACCAAAACGCTGGGAGGATC CCACAACCACATCTGCATT CATTTCACCAGGTGGCTTGACAAGAA ACAAGCCATCAAGTCGGTCCCACAG CAACTAATGACACCGTGC TTCTTGCAATTCTCGAACAGTGGTGA GAAGTCATGAAGCATGCCATCGCAT CTGGTGTGTACAAGGA TACCAAACAAGGAACTGTCAGTCCAG TCAATCAGATTGTCGCCCCACGAC GACGTTTATCTTGAGCGG TTCGGCTCTGTCTAACCATCTCAAT GCAGGATGGAAAAACAGTTTGATA CGAAGAACGTATTCCGC TTTCGTTGACCATGCTGAAAAGCAAG ATGCATCGCCTCGGATGATGCTGTCG CTTGGTCAAGAAGAGATG CATTGCCCACATCCATCTTGCAAAT CCATAACCATGGTTGGAAATTCAA AGGGACTCCAGACGTCC TTGTGCAATCTCAGCTTGGTATGGT TGTAGGGTGTGTACCATCCAGGATT TCAATGACGTTGCGAAGT ATGACAGGAGGAGTAATGGACTCGT AGTACCCCTGACCAATCATGCTTTT AGTACCTTGGTGCAC CAAGAGAGCGCACGAGTGCAGAG ATCCATCTCACTCATAGCCGCCACCT CCGTCAAGGGTGGCGTAC AATATCCCCTGGAATAGCAGCCGTCA TCAAATCAGAGAGACTCTTTCCA ACCGTTCGAAGCATCGAC ATTGTCTCAGCCGTTGGACCAAT ATGGCGGTTAATATAGCTGTCCGTGG CAGTCCATCGAACAAATG TCACGCATGGCAAAGAGGCCACGAAA CAAACGACGGTACAT	
丙氨酸脱氢酶	ATGATCATTGGCCTGCCGAAAGAGAT CAAAGTTAAGGAAAACCGCGTGGCA CTCACGCCGGGGCGTGC CCAGCCTCGTGCGCCGCGGCCACACC GTCATCGTGGAACCGCAGCGCCGGCGT	YP_00417139 5.1 ADV67730.1 ADY25885.1 ADV48359.1

[0163]	GGGCAGCGGCATCCAGGA CACCGAGTACGAGCAGGCCGGCG CAGCTCGGCAGCGCCGCCAGGGCGT GGGCCGCGCAGATGGTCGTG AAGGTCAAGGAGCCCATCAAGAGCG AATACGGGTACCTCCGCCGGACCTG CTGCTGTTCACGTACCTGC ACCTCGCTGCGGACCAGCCCCCTACG GACGCCCTGCTGAGCGCCGGCACGAC CGCCGTTGCGTACGAGAC GGTGCAGCTCGACGACCGCAGCCTGC CGCTGCTCACGCCATGAGTGAGGTC GCGGGCCGCCTGAGCGTG CAGGCCGGCGCGTACCAACCTGCAAA AGCCCATCGGCGGGCGCGCGTGTGCTG CTCGCGCGCGTGCCGGCG TGCAGGGGGCACGTGCGTGTGATT GGCGGCGGCGTGTGCGCACGAACG CCCGAACGGGACCTCGTGA TCGGCGCGTGTGATCCCCGGGGCG AAGGCGCCGCACCTGTACGCGCGA CATGCTGGCGACCATGCA GGAAGGCAGCGTCATCGTCACGTGG CGGTGGACCAGGGCGGATGCGTGG GACCATTCACGCGACGACG CACGACGATCCCACGTACATCGTGG CGGCGTGTGATCCACTACGGCGTGGCGA ACATGCCGGCGCGGTGC CGCGCACCAAGCACGTTCGCGCTACG AACCAAGACCATTGGGTACGTGCTGCA GCTCGCGAACAGGGCGT GGAGGCACTCAGGCCAGCAAGCCG CTGCTGCGTGGCCTGAACACCATCGG CGGGAAAGCTGACGTACGCG GGCGTCGCGGAAGCGTTCGGCCTGAC GTACACC CGCGCCTGAAGTGGCGCTGG CGTAA	AFZ35471.1 AFZ05172.1 AEW05285.1 AEW04533.1 AEM70054.1 YP_00525695 7.1 YP_00525620 5.1 YP_00445049 2.1 YP_00436810 3.1 YP_00434043 2.1 YP_00426160 9.1 YP_00425550 2.1 YP_00416385 7.1 YP_00478747 6.1 YP_00713243 7.1 YP_00711358 8.1
脯氨酸脱氢酶	ATGGAGCCCACATATGAGCCAATTGCA ACAGCTGTACCGCCAGGTGGCCCTCA GTGTCGCCGGCAACCCGG TCGTGGAAAAAGTCTTGAGCAAGCAG GGCTGGCGCTGGCGAGCGTTTGT ATCGGGCGAGACGGCGCA	ADY26965.1 ADI14996.1 YP_00443747 0.1 YP_00436897 4.1

[0164]	GGACGCCATCAAGGCCATCAAGCGG CTGGAAGCCCAGGGCATCTCCGGCAA CCTCGACCTGCTGGCGAG TTCGTGAACACCCCGGAACCCGCAA TGCCAACACCGAGATGATTCTGGCGA CCATTGACCAGGTGCACG CGGCAGGGCCTCACGCCCTACAACAGC GTGAAAATGTCGGCGCTGGGCCAAG GGCAGACCGCGCCGGACGG CCAGGACCTCGGCTACGTCAACACCC GCCGCGTCGTGGAGCGGGCCAAGCG CTACGGCGGCTCGTCAAT CTGGACATGGAAGACCACACCCCGT GGACTCGACTCTGCAGATTTCGCC GCCTGGTCAAGGAGTCG GCCACCAGCATGTGGAACGGTGTG CAGGCCTACCTGCACCGCTCGGAAGA CGACCGCCGCAGCCTGGA CGACCTGCGCCCCAACCTCCGCATGG TGAAGGGCGCCTACCTGGAGGCCGCC TCCGTCGCCCTGCAGAGC AAAACCGACATTGACGCCCTACCG CCGCCTGGTCTACGAGCACCTCAAGG CCGGCAACTACTGCAACG TGGCCACCCACGACCACCATCATC TACGACGTGATGCACTTGCGCTGGC CCACGGCATCCCTAAGGA CCAGTTGAATTCCAGCTGCTGTACG GCATCCCGAGGACCTGCAGCGCGA ATTGGCCGAGGCCGGCTAC ACGGTGCCTCGTACATTCCCTTCGG CAAGGACTGGTACGGCTACTACTCGC GCCGCATGCCGAGCGCC CGCAGAACGTGATGTTCGTGC GGCCTGCTGTAA	YP_00434574 4.1 YP_00434068 4.1 YP_00425658 2.1 YP_00417068 0.1 YP_00370553 9.1 AEA44906.1 AEB12864.1 ADV67015.1 AEE14339.1 AEA34625.1 EFH87253.1 NP_868270.1 ADQ16526.1 AEL26370.1 AFK04422.1 AEM71761.1
	赖氨酸脱氢酶	ATGAAAAACATTGTGGTTATCGGCC GGCAATATCGGTTCGGCAATCGCCT GGATGCTGGCCGCATCAG GCGATTATCGCATCACGGTTGCCGAT CGTTCAGCCGATCAGCTGGCCAATGT GCCGGCGCATGAACGGGT CGACATCGTCGACATTACCGACCGTC CCGCTCTGGAAGCACTGCTAAAAGGC AAATTGCCGTGCTCTCC GCCGCCCTACCGAATTCCACCTGAC GGCGGGTATTGCCGAAGCGGCCGTTG CCGTCGGCACGCATTATC TCGATCTCACCGAAGACGTGGAATCC ACCCGCAAGGTCAAGGCCGCTGGCGG

[0165]	AAACGGCCGAAACCGCGCT CATTCCCGCAATGCGGCCTCGCCCCCG GCTTCATCTCCATCGTCGCTGCCGAT CTCGCCGTCAAGTCGAC AAGCTGGACAGCGTGCGCATGCGGT CGGCGCTCTGCCGAATATCCGTCCA ATGCGCTCAACTACAACC TCACCTGGAGTACCGACGGGCTGATC AACGAATATATCGAGGCCCTGCGAAGG ATTCGTCAAGGCCGCCT CACCGCCGTTCCGGCCCTGAGGAGC GCGAGGAGTTCTCGCTCGATGGCATC ACCTACGAGGCAGTCAAC ACCTCGGGCGGTCTCGGTACGCTTG CGCGACGCTGGAAGGCAAGGTGCGG ACCATGAACTACCGCACTA TCCGTTATCCCGGCCATGTGGCGATC ATGAAGGCGTTTGAAACGACCTCAA CCTGCGCAACCGCCCGA TGTGCTGAAGGACCTGTTGAAACGAAACG CCCTGCCCGGACCATGCAGGATGTG GTCATCGTCTCGTCACC GTCTGCGGCACCCGCAACGGCCGCTT CCTGCAGGAAACCTATGCCAACAAAG GTCTATGCCGGCCCGGTTT CCGGCCGGATGATGAGCGCCATCCAG ATCACTACCGCCGCCGGCATCTGCAC GGTTCTGACCTGCTCGC GGAAGGCGCCCTGCCGCAGAAGGGC TTCGTTCGACAGGAGGAAGTGGCGCT GCCGAAGTTCCTCGAAAC CGGTTGGCCGGTATTATGGCTCGCA TGAGCCGCTGGCGCGGGTTGGGTGA	EOT04629.1 AIA07859.1 AIA04644.1 AIA04440.1 AIA03522.1 AIA02686.1

[0166] 本公开涉及用于测量血液中的氨的总浓度的氨或铵离子生物传感器。氨生物传感器包含测量电极,所述电极包含选择性作用于多种特定的氨基酸(每一种用作底物)的介体和酶作为组分,和对电极。在氨基酸生物传感器中,所述酶具有针对所述多种特定的氨基酸的每一种的底物亲和力。所述酶可操作地催化所述多种特定的氨基酸(作为底物)的每一种中的反应,以形成反应产物。所述介体在氨基酸浓度测量中可操作地在反应产物与测量电极之间传送电子。此外,所述氨基酸生物传感器被设计来以这样的方式在测量点于测量电极与对电极之间施加电压,以便在代表在多种特定的氨基酸的每一种的特定浓度中施加的电压与电流值之间的关系的分析曲线中,所施加的电压是允许在相同浓度中和在相同的施加的电压下对于氨基酸存在电流值的多样性的电压。

[0167] 在一些实施方案中,所述测量电极(至少第一电极)还包含含有辅酶或还原剂作为组分的水凝胶。在一些实施方案中,所述酶由脱氢酶组成。此外,所述反应产物由通过辅酶的还原衍生的还原的辅酶组成,并且所述介体在氨基酸浓度测量过程中可操作地将电子从还原的辅酶传送至测量电极。

[0168] 在一些实施方案中,将本文中公开的生物传感器或系统与以下组件之一或其组合

结合使用：

[0169] 1. 电源,与电极电连接的并且能够供应足以在工作电极的表面上引起所述介体的还原形式的扩散受限电氧化的电极之间的电势差;和

[0170] 2. 至少一个计量器(诸如分光光度计、电压计和/或安培计),其与电极电连接并且能够测量由所述介质的还原形式产生(通过施加上述电势差)的扩散受限电流。

[0171] 所述计量器通常适合用于将算法用于电流测量,由此提供和可视地显示氨或铵离子浓度。此类电源、计量器和生物传感器系统的改进是通常指定的1990年10月16日发布的美国专利第4,963,814号、1991年3月12日发布的美国专利第4,999,632号、1991年3月12日发布的日发布的美国专利第4,999,582号、1993年9月7日发布的美国专利第5,243,516号、1994年10月4日日发布的美国专利第5,352,351号、1994年11月22日日发布的美国专利第5,366,609号、White等人,1995年4月11日发布的美国专利第5,405,511号和White等人,1995年8月1日发布的美国专利第5,438,271号(所述美国专利的公开内容通过引用由此明确地并入)的主题。

[0172] 可并行分析来自多个样品的氨或铵离子浓度。例如,可测量人和非人类体液诸如全血、血浆、血清、淋巴、胆汁、尿、精液、脑脊髓液、脊髓液、泪液和粪便标本,以及对于本领域技术人员来说是显而易见的其它生物流体。还可连同食物、水样品、发酵产品和环境物质(其潜在地含有环境污染物)一起来测定来自人和非人类动物的组织的流体制剂。在一些实施方案中,利用所公开的生物传感器测定人血清。在一些实施方案中,所述生物传感器包括测定全血或被配置来测定全血。

[0173] 在反应完成后,电源(例如,电池)施加电极之间的电势差。当施加电势差时,辅助电极上介体的氧化形式的量和所述电势差必须足以引起工作电极表面上的所述至少一种介体的还原形式的扩散受限电氧化。在一些实施方案中,所述工作电极包含本文中公开的水凝胶。电流测量计(未显示)测量由工作电极表面上的介体的还原形式的氧化产生的扩散受限电流。当满足以下要求时,可将测得的电流与样品中的氨或铵离子和/或一种或多种氨基酸的浓度精确地相关联:

[0174] 1. 基于靛酚试剂的浓度的靛酚反应的速率受氨从第一容器中的样品至包含工作电极表面的第二容器的扩散速率控制。

[0175] 为了制造生物传感器,通过导向辊将一卷金属化膜送入消融/洗涤和干燥站。能够烧蚀底板元件14的激光系统对于本领域普通技术人员是公知的。其非限定性实例包括准分子激光器,其具有由反射镜、透镜和掩模控制的消融图案。此类系统的非限定性实例是LPX-300或LPX-200,两者皆可从LPKF Laser Electronic GmbH, of Garbsen, Germany商购获得。

[0176] 在激光烧蚀体中,以预定的图案烧蚀金属化膜的金属层,以形成一条分离的电极组。在形成所述分离的电极组后,进一步烧蚀金属化膜,以产生位于电化学区域邻近的凹部。随后利用张力环将所述电极组带传送通过更多导向辊,并通过任选的检查照相机。所述照相机用于质量控制以检查缺陷。

[0177] 将试剂混合并以液体形式施加至分配和干燥站上的电化学区域的中央。试剂施加技术对于本领域普通技术人员来说是公知的,如美国专利第5,762,770号(其公开内容明确地通过引用并入本文)中所描述的。应理解,可将试剂以液态或其它形式施加至阵列,并按照本公开,干燥或半干燥至电化学区域的中央上。

[0178] 另外,将辊板或顶板元件材料连同一卷间隔件材料送入组装站。在该站中除去间隔件材料的任一侧上的衬里,并将顶板元件或表面支架施加至间隔件材料的一侧,以形成顶板元件/间隔件子组件。将顶板元件/间隔件子组件分成合适的宽度以用于一排生物传感器。随后,将新的释放衬里添加至与盖相对的间隔件材料的侧面,并将子组件卷绕成卷。

[0179] 展开涂覆试剂的底板元件的带,将其连同顶板元件/间隔件子组件传入传感器组装站。从所述间隔件除去衬里,并将子组件置于在底板元件以覆盖试剂。随后,将组装的材料切割以形成单独的生物传感器,分选所述生物传感器并包装入小瓶,用塞子封闭每一个小瓶,以产生包装的传感器测试条。

[0180] 虽然本文中描述了消融凹部,但应理解,在底板元件中形成凹部的方法也不受限制。例如,凹部可通过蚀刻(例如,使用光刻法)或以其它方式除去顶板元件表面的一部分来形成。最近的电极边缘离凹部约10 $\mu\text{m}$ 至约500 $\mu\text{m}$ ,离凹部约100 $\mu\text{m}$ 至约400 $\mu\text{m}$ ,或离凹部约200 $\mu\text{m}$ 至约300 $\mu\text{m}$ 。按照本公开利用凹部形成的生物传感器产生具有大致均匀的化学厚度的试剂轮廓。大致均交的化学厚度可允许更准确的样品分析。

[0181] 上述方法和产品包括一次性生物传感器,尤其是单独地或与被配置来诊断样品中的高氨血症、异常功能或异常高的或低的量的氨的其它组件(诸如泵系统或分光光度计)组合地用作诊断装置的生物传感器。

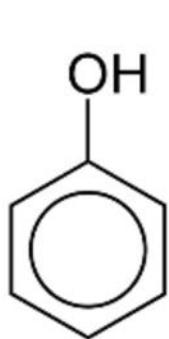
[0182] 关于靛酚反应的变型

[0183] 本公开涉及将样品与干燥相、粉末相或水相的独立可变相中的一种或多种试剂接触。所述反应具有4个主要组分:包括苯基的化合物、次卤酸盐、催化剂和碱缓冲液。当这些试剂暴露于氨时,产生靛酚化合物,所述化合物,当在特定波长暴露于光源时,吸收和/或发射特定波长的光。在一些实施方案中,本文中公开的任何方法包括通过测量至少所述第一容器或所述第二容器的内容物的吸光度来检测氨或铵离子的存在、不存在或量的步骤。

[0184] 苯酚家族

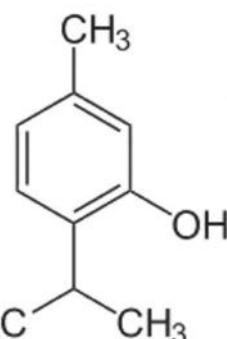
[0185] 可使用包含苯基的不同化合物,只要所述化合物包含具有至少1个碳原子和未取代的‘对位’的4、5或6元环。

苯酚



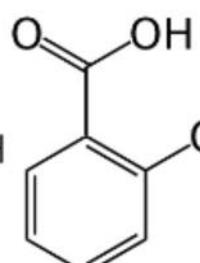
[0186]

百里香酚

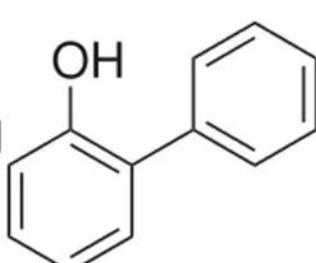


愈创木酚

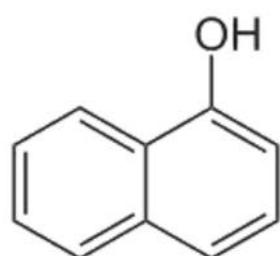
水杨酸酯



2-苯基苯酚



萘酚



[0187]

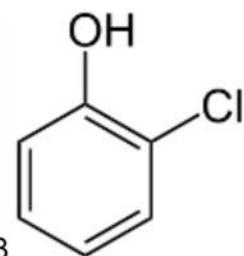
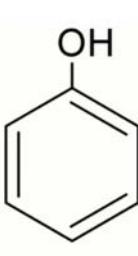
次卤酸盐家族

[0188]

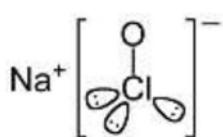
次氯酸盐

间甲酚

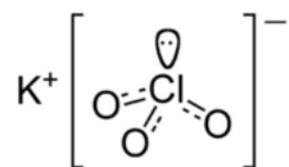
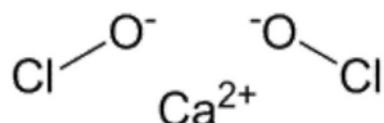
氯酚



次溴酸盐



[0189]

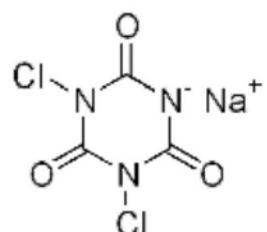
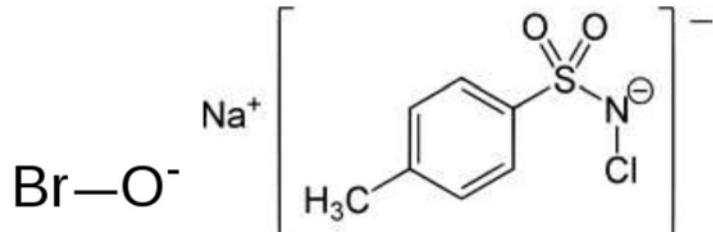


次溴酸盐

氯胺 T

二氯异氰尿酸钠

[0190]

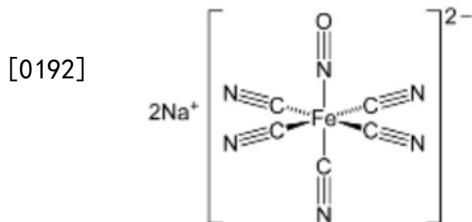


[0191]

催化剂/偶联剂家族

## 硝普钠

## 铬 铁 锰



[0193] 碱性条件

[0194] 可使用能够建立用于与来自样品的氨的反应发生的碱性微环境的任何缓冲液。在一些实施方案中,可将包含具有pH约8.5至约13的碱缓冲液的容器用于本文中公开的生物传感器、测试条或系统。可使用可建立这些碱性条件的任何化合物,包括氢氧化钠和氢氧化钾,或醋酸钠或醋酸钾。在一些实施方案中,碱缓冲液以粉末形式、冻干形式或水溶液存在于位于本文中公开的生物传感器或试剂盒内的容器中。

[0195] 电极

[0196] 在一些实施方案中,本文中公开的生物传感器、系统或测试条包含一个或多个电极。在一些实施方案中,所述一个或多个电极传输由靛酚试剂与来自样品的氨或铵离子之间的反应产生的电流变化和/或将由电池源产生的电流变化传输至光源或提供样品中的氨的水平的读出所必需的其它设备,例如,在分光光度计的情况下,以测量所述生物传感器中的反应物容器的吸光度。在一些实施方案中,所述电极包含金属。在一些实施方案中,所述电极包含其上沉积金属的碳支架。在一些实施方案中,所述电极包含碳纳米管的碳支架。

[0197] 适合于本公开的电极结构以及用于产生此类结构的方法已在为了其它目的生物传感器技术中提出。在这方面,参考美国专利第6,645,359号,并且其内容通过引用整体并入本文。在第一表面上产生或分离电极或导电轨道。轨道代表生物传感器的电极。如本文中所用,短语“电极组”是一组至少两个电极,例如2至200个,或3至20个电极。这些电极可以例如是工作(或测量)电极和辅助电极。在一些实施方案中,轨道协作以形成位于阵列的边缘内的叉指形电极阵列和从阵列延伸并且在朝向端部的凹部之间的引线。

[0198] 轨道由导电材料构建。导电材料的非限制性实例包括铝、碳(诸如石墨)、钴、铜、镓、金、铟、铱、铁、铅、镁、汞(作为汞齐)、镍、铌、锇、钯、铂、铼、铑、硒、硅(例如高度掺杂的多晶硅)、银、钽、锡、钛、钨、铀、钒、锌、锆、其混合物以及这些元素的合金、氧化物或金属化合物。优选地,所述轨道包括金、铂、钯、铱或这些金属的合金,因为此类贵金属及其合金在生物系统中是惰性的。在一些实施方案中,所述轨道是由银和/或氯化银制造的工作电极,以及所述轨道是也由银和/或氯化银制造的并且与所述工作电极具有大体上相同的尺寸的辅助电极。

[0199] 轨道通过激光烧蚀与导电表面的其余部分隔离。用于使用激光烧蚀在表面上形成电极的技术是公知的。用于使用激光烧蚀在表面上形成电极的技术是公知的。参见,例如,1999年10月4日提交的并且标题“LASER DEFINED FEATURES FOR PATTERNED LAMINATES AND ELECTRODE”的第09/411,940号美国专利申请,其公开内容通过引用明确地并入本文。优选地通过从围绕电极延伸的区域除去导电材料来产生轨道。因此,轨道通过具有约5μm至约500μm的宽度的间隙与表面上的导电材料的其余部分隔离,优选地所述间隙具有100μm至

约200μm的宽度。或者，应理解，可通过单独的激光烧蚀在底部基板上产生轨道。此外，轨道可被层压，丝网印刷，或通过光刻法形成。

[0200] 根据本公开内容多电极设置也是可能的。例如，预期可形成包括附加导电轨道的生物传感器。在三电极设置诸如图4中描绘的设置中，所述第一轨道是工作电极，所述第二个是电极，以及所述第三电极是参比电极。还应理解，其中轨道是工作电极并且将第三电极提供为辅助或参比电极的替代电极是可能的。应当理解，根据本公开内容，轨道的数目以及阵列中的轨道之间的间隔可变化，以及正如将被本领域技术人员所理解的，可形成许多阵列。在一些实施方案中，电极被嵌入或附连至固体载体，诸如包括塑料和/或纸材料的测试条。

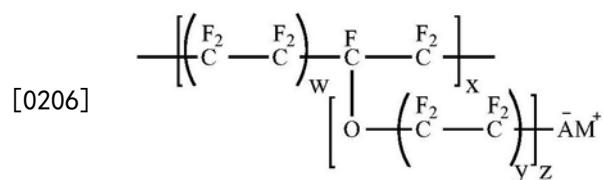
[0201] 微电极阵列通常具有非常小的尺寸的两个电极结构,通常每一个电极具有共同的组件和电极组件或微电极。如果是“叉指形的”,则阵列被以交替的指样形式排列(参见,例如,美国专利第5,670,031号)。这些通常是一个子类的微电极。微电极的叉指形阵列或IDA可表现出期望的性能特性;例如,由于它们的尺寸小,因此IDA可以表现出优异的信噪比。

[0202] 已使用集成电路光刻法将叉指形阵列设置在非柔性基板诸如硅或玻璃基板上。IDA已被用在非柔性基板上,因为IDA被认为当以非常小的尺度(例如,在1-3微米范围内的特征尺度)使用时,提供优异的工作性能。在这样小的尺度上,基板的表面结构(例如,平整度或粗糙度)在IDA的性能中变得非常重要。因为非柔性基板,尤其是硅,可被加工成非常光滑平整的表面,因此这些基板已被用于IDA。在一些实施方案中,所述至少一个电极是本文中公开的任何IDA的组件。

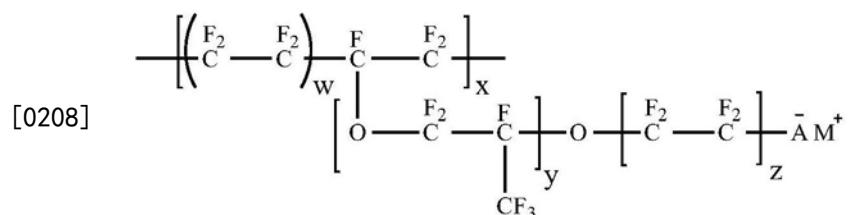
[0203] 膜

[0204] 在一些实施方案中，位于流体交换开口的膜包含离聚物。在一些实施方案中，所述膜包含以下聚合物之一或其组合：

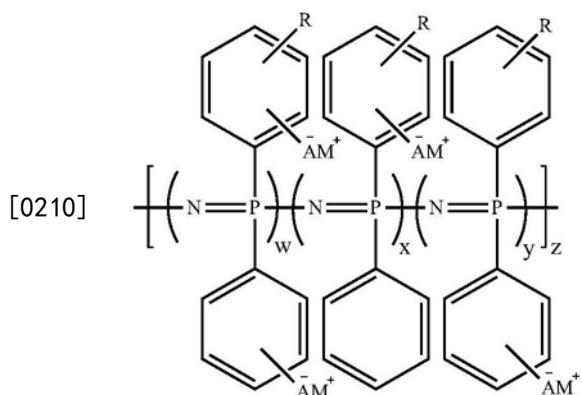
[0205] 1.



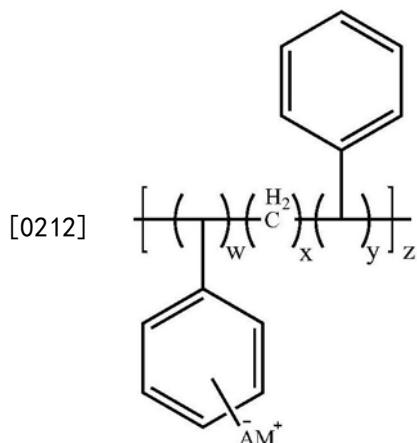
[0207] 2.



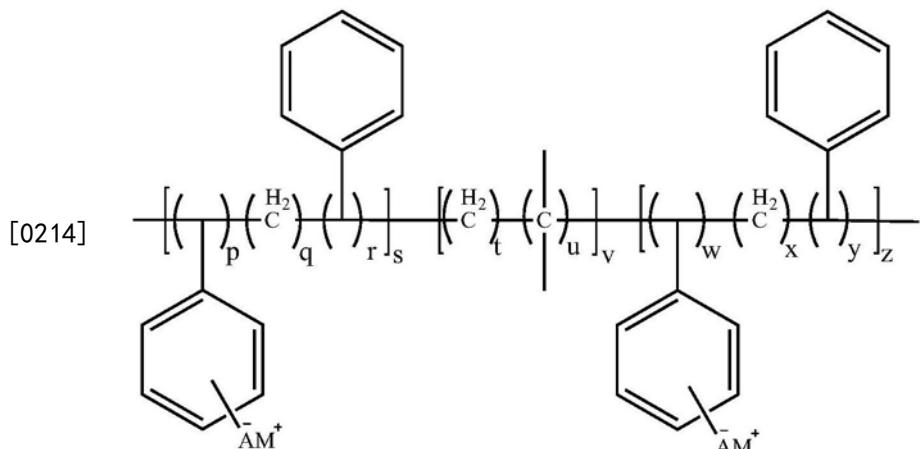
[0209] 3.



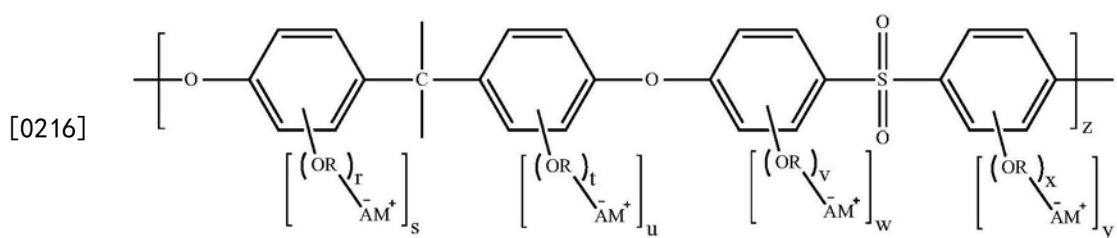
[0211] 4.



[0213] 5.



[0215] 6.



[0217] 其中,变量p、q、r、s、t、u、v、w、x、y和z的每一个是独立可变的,并且为0或任意正整数;并且其中R独立地选自胺、羟基、羟基、羰基、H、=O、-OH、-COOH、-N、-CH3、-CH2-X、卤素、芳基、芳基烷氧基、芳烷基、炔基、烯基、亚烷基、烷基、烷基-卤代、芳基酰氨基、烷基杂环、烷基

氨基、烷基胍基、烷醇、烷基羧基、环烷基、杂芳基、杂芳基烷基、杂芳烷氧基或杂环基或其任何盐。

[0218] 在一些实施方案中, R基团是酸性的或负电性的取代基。在一些实施方案中, 变量p、q、r、s、t、u、v、w、x、y、z是独立可变的, 并且为0或约1至约200的正整数。在一些实施方案中, 变量p、q、r、s、t、u、v、w、x、y、z是独立可变的, 并且为0或约10至约100的正整数。在一些实施方案中, 在包含许多种类的聚合物的材料的基质内的许多种类之间, 变量p、q、r、s、t、u、v、w、x、y、z是独立可变的, 并且为0或约10至约100的正整数。A-表示阴离子或酸性基团, 其可包括磺酸根、羧酸根或其它类似的官能团。M+代表抗衡离子, 并且可包括H+、Li+、Na+或类似的阳离子。伴有括弧或括号的字母(p-z)代表可在0至任意正整数值的范围内的重复单元。还可使用含有碳(C)、氟(F)、硫(S)、氧(O)、氢(H)、氮(N)、磷(P)或任何类似的元素的组合的任何聚合物, 其可用于产生离子交换膜。

[0219] 可从聚合物构建离子交换膜, 所述聚合物包括全氟化离聚物(1和2)、基于聚磷腈的离聚物(3)、基于聚苯乙烯的离聚物(4), 基于聚苯乙烯的嵌段-共聚物离聚物(5), 和基于聚(亚芳基醚砜)的离聚物(6)。

[0220] 用于离子交换膜的总酸含量可在约0.57至约3.5meq/g的范围内。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约4.0meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约3.0meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约2.9meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约2.8meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约2.7meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约2.6meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约2.5meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约2.4meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约2.3meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约2.2meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约2.1meq/g。在一些实施方案中, 用于离子交换的总酸含量为约0.57至约2.0meq/g。

[0221] 从这些离聚物构建的膜的厚度可在约.025至约.69mm的范围内。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约069mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约068mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约067mm。

[0222] 在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约066mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约065mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约064mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约063mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约062mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约061mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约060mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约059mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约058mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约050mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约040mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约030mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约020mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.001至约010mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.025至约065mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.025至约064mm。在一些实施方案中, 所述膜的厚度为约.025至约063mm。在一些实施方案中, 所述膜

的厚度为约.025至约062mm。在一些实施方案中,所述膜的厚度为约.025至约061mm。在一些实施方案中,所述膜的厚度为约.025至约060mm。在一些实施方案中,所述膜的厚度为约.025至约059mm。在一些实施方案中,所述膜的厚度为约.025至约058mm。在一些实施方案中,所述膜的厚度为约.025至约050mm。在一些实施方案中,所述膜的厚度为约.025至约040mm。在一些实施方案中,所述膜的厚度为约.025至约030mm。在一些实施方案中,所述膜的厚度为约.025至约020mm。在一些实施方案中,所述膜的厚度为约.025至约010mm。

[0223] 较高的总酸含量和较小的膜厚度导致较快的扩散时间。可通过挤压铸造、滴落浇铸、热压或类似方法形成膜。

[0224] 盒和一次性装置

[0225] 所述生物传感器、装置系统和/或测试条可以是盒或包含盒。在一些实施方案中,所述盒在一次使用后是可弃置的或可以每氨或铵离子检测事件使用超过一次。在一些实施方案中,所述盒包含多个与盒的储存部分、混合部分和读出部分流体连通的微流体导管。所述储存部分包含储存结晶的、干燥的、冻干的或溶液中的靛酚试剂之一或其组合的多个隔室。在一些实施方案中,可将通过塑料壁或其它惰性材料将所述隔室与相邻的导管分开。所述盒的混合部分包含树干形导管,其中一种或多种被储存的试剂在它们从装置的储存部分释放后混合。所述试剂可与样品混合和/或彼此在与装置的储存部分相邻的微流体通道中的不同点混合。在所述装置的一些实施方案中,微流体导管的读出部分与装置的混合部分相邻。在装置的一些实施方案中,盒只包含储存部分和读出部分,其中所述读出部分包含被配置来对准仪器的微流体导管,所述仪器测量样品中的氨或铵的量而且还允许在任何检测或定量步骤发生之前通过仪器混合样品。在一些实施方案中,所述盒不包含用于检测样品中的氨或铵离子的量(分光光度计),但被配置来将盒的读出部分对准能够测定样品中的氨或铵离子的量的仪器。在一些实施方案中,所述盒包含用于检测样品中的氨或铵离子的量的仪器,诸如光电二极管。在一些实施方案中,所述盒包含与装置的混合部分相邻的含有用于检测或定量的微流体导管的读出部分。在一些实施方案中,所述盒包含用于检测样品中的氨或铵离子的量的仪器诸如光电二极管,此类仪器包含对准装置的读出部分或与所述读出部分对准的光源,以使得来自光源的光可以穿透读出部分,并且此类仪器可检测光的波长在读出部分中的存在、不存在或吸收。

[0226] 在一些实施方案中,所述盒包含微流体电路,其包含与混合部分流体连通的储存部分,所述混合部分也与读出部分流体连通。此类实施方案中的流体被设计来从储存部分流至混合部分,并从混合部分流至所述盒的读出部分。在一些实施方案中,所述储存部分对于每一种靛酚试剂包含一个隔室。在一些实施方案中,所述储存部分包含:第一隔室,其包含次卤酸盐(诸如次氯酸盐);第二隔室,其包含碱性缓冲液(诸如NaOH);和第三隔室,其包含至少一种靛酚试剂或靛酚相关化合物(诸如2-苯基苯酚)。在一些实施方案中,所述储存部分包含第四隔室,其包含催化剂或偶联试剂(诸如硝普钠)。在一些实施方案中,所述储存部分包含第五隔室,其包含碱缓冲液(诸如醋酸钠或醋酸钙或醋酸锌)。在一些实施方案中,所述盒在微流体导管与包含碱缓冲液(诸如醋酸钠或醋酸钙或醋酸锌)的隔室之间包含流体交换开口。在一些实施方案中,本文中公开的膜被置于流体交换开口的至少一部分的上方,以使得当样品与碱缓冲液接触时,氨可穿过膜进入相邻的微流体导管。

[0227] 在一些实施方案中,所述储存部分包含任选地包含电极的隔室。在一些实施方案

中,所述任选地包含电极的隔室与包含固相或液相中的碱性缓冲液的隔室相邻,此类隔室具有通过其可将样品从盒外部的点置于盒内的开口。在一些实施方案中,所述盒包含含有开口和任选地包含电极的第六隔间,此类隔室具有通过其可将样品从盒外部的点置于盒内的开口;其中所述盒还包含位于包含开口的隔室上或大致其附近的包含碱性缓冲液的隔室,以使得在将样品插入具有开口的隔室后,所述碱缓冲液被输送至包含所述开口的隔室并与样品混合。

[0228] 在一些实施方案中,隔室具有不大于约100微升流体的体积。在一些实施方案中,盒中的一个或多个隔室具有不超过约100微升流体的体积。在一些实施方案中,盒中的一个或多个隔室具有不超过约90微升流体的体积。在一些实施方案中,盒中的一个或多个隔室具有不超过约80微升流体的体积。在一些实施方案中,盒中的一个或多个隔室具有不超过约70微升体积的流体。在一些实施方案中,盒中的一个或多个隔室具有不超过约60微升流体的体积。在一些实施方案中,盒中的一个或多个隔室具有不超过约50微升流体的流体。在一些实施方案中,盒中的一个或多个隔室具有不超过约40微升流体的体积。在一些实施方案中,盒中的一个或多个隔室具有不超过约30微升流体的体积。在一些实施方案中,盒中的一个或多个隔室具有不超过约20微升流体的体积。在一些实施方案中,盒中的一个或多个隔室具有不超过约10微升流体微升的体积。

[0229] 图24至28描绘了为盒的本发明的实施方案。所述盒的一半描绘于图24中,而所述盒的相对面的一半描绘于图25中。所述盒的两个半部分可通过一个或多个微螺钉、销钉或扣件固定在一起。盒的两个半部分可由一种或多种惰性材料诸如塑料和/或玻璃制成。

[0230] 在图24中公开的盒的一半包括第一、第二、第三、第四和第五储存隔室。图24描绘了第一、第二、第三、第四和第五隔室(分别标记为1、2、3、4和5),所述隔室界定了与盒的下半部分上的微流体导管紧邻,但与其分开的体积。所述分区通过平分隔室和微流体导管(对于隔室1、2、3、4和5的每一个分别标记为10、11、12、13和14)之间的空间的小的实虚线描绘。在该实施方案中,所述第一隔室包含次卤酸盐,所述第二隔室包含碱性缓冲液,所述第三室包含催化剂,所述第四隔室包含靛酚试剂(诸如酚化合物),以及所述第五隔室包含碱缓冲液,所述试剂,如果存在于水溶液中,则可以是浓度为约500mM至约1M的醋酸钠。所述微流体电路的储存部分包含储存点1、2、3、4、5和6。可将本文中公开的任何膜置于位置14或其接近,以使得在将样品诸如全血引入图25的隔室6后,可进行试剂的混合。将来自隔室5的流体与样品混合,并且可将溶液中的氨离子从5和6跨膜转移至装置20的混合部分。也释放隔室1至4中的试剂,以使得在约4-5秒的一段时间后,所有试剂已进入装置20的混合部分。混合部分20的上部分支部分将隔室1、2、3和4中含有的靛酚试剂混合,而来自样品的氨与5和6中的缓冲液在盒的下部主干中混合。一旦使用,图26描绘了流体从每一个隔室至盒的混合部分的预期流动。较浅的灰度显示当来自每一个隔室的试剂在第0秒(i)、第13秒(ii)和第24秒(iii)通过微流体导管时它们的团块。在于所述装置的混合部分完成混合后,所有试剂在最接近所述电路的读出部分25的混合部分的一部分中混合。在所述装置的读出部分,所述盒可具有通过其光可通过并将流体暴露于某一可测量的光波长的开口。仪器诸如光电二极管可存在于装置的读出部分的附近或与之相邻,以便可进行吸光度的测量。

[0231] 在一些实施方案中,所述盒包含至少一个电极,其检测容器(其被配置来从盒外部的点接收样品)中的样品中的氨或铵离子的存在或不存在。一旦电极因样品的存在而被激

活,盒的储存部分就打开并释放其内容物,以使得来自每一个隔室的溶液被释放至微流体导管的混合部分中。所述微流体导管具有足以混合所有来自每一个隔室的试剂的长度,以使得当总的流体体积的反应物到达盒的读出部分时,靛酚反应已发生并且靛酚反应产物(诸如靛酚或靛酚相关化合物)已在微流体导管中形成。

[0232] 表3

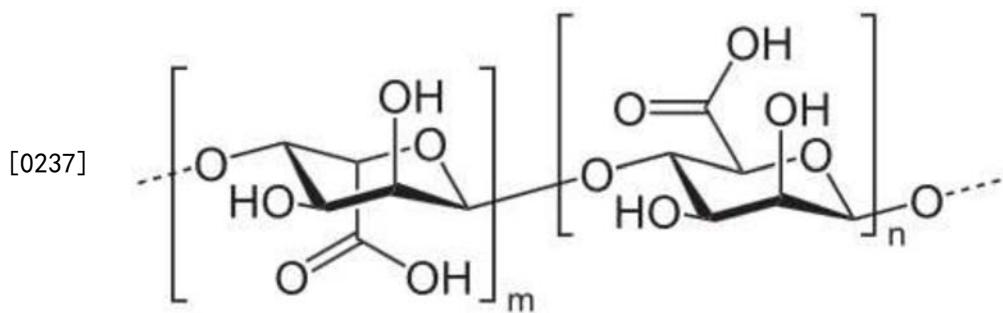
[0233] 靛酚试剂浓度范围的实例

[0234]

试剂	范围
2-苯基苯酚	从约50至约70mmol/升
硝普钠	约7微摩尔/升
氢氧化钠	从约50至约500mmol/升
次氯酸钠	从约50至约120mmol/升
醋酸钠/醋酸钙	从约0.5至约1mmol/升

[0235] 水凝胶

[0236] 所述生物传感器在一些实施方案中包含水凝胶。所述水凝胶可以是在水中膨胀但不溶解的交联的聚合物材料。可预期,所述水凝胶可以能够吸收至少约1至约10倍,在一个实施方案中至少约100倍的其自身重量的液体。被选择用于所述生物传感器的水凝胶应当直接取决于功能化方法。可预期所述水凝胶可以是生物相容性的。在一些实施方案中,所述水凝胶包含海藻酸钠。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.1%至约5%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.1%至约4%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.1%至约3%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.1%至约2%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.1%至约1%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.1%至约1%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.2%至约1%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含海藻酸钠。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.3%至约1%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.4%至约1%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.5%至约1%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.6%至约1%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.7%至约1%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.8%至约1%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约0.9%至约1%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约1.0%至约3.0%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约1.0%至约2.0%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约1.0%至约1.5%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含约1%、约2%或约3%的海藻酸盐重量/体积。在一些实施方案中,所述水凝胶包含海藻酸盐。所述海藻酸盐可以是以单体、G嵌段、M嵌段和/或GM嵌段的松散形式或重复模式使用的海藻酸盐的任何单个聚合物。在一些实施方案,所述海藻酸盐包含下式:



[0238] 其中m和n是任意正整数。在一些实施方案, m和n是独立可变的并且是约1至约1000的任何正整数。在一些实施方案中, 所述水凝胶可从丙烯酸类单体聚合而来。所述丙烯酸类单体可以是以下物质之一或其组合: 丙烯酰胺-乙醇酸、丙烯酰氨基-甲基-丙磺酸、丙烯酰胺基-乙基磷酸酯、二乙基-氨基乙基-丙烯酰胺-、三甲基-氨基-丙基-甲基丙烯酰胺、N-辛基丙烯酰胺、N-苯基-丙烯酰胺和叔丁基-丙烯酰胺。在其中所述装置包含交联剂的实施方案中, 示例性交联剂可以是N,N'-亚甲基-双丙烯酰胺、N,N'-亚甲基-双甲基丙烯酰胺、二烯丙基酒石二酰胺和聚(乙二醇)二甲基丙烯酸酯。合适的水凝胶的实例还可包括硅晶片、硼硅玻璃基板、2-羟乙基甲基丙烯酸酯(HEMA)、N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)和聚乙二醇(PEG)。

[0239] 水凝胶可包括任何数目的分子。例如, 水凝胶可以包括聚合的单体或水凝胶交联剂和任选的化学或紫外线光活化诱导剂。此类单体或二聚体的实例包括乙酸乙烯酯、乙烯吡咯烷酮、乙烯醚、烯烃、苯乙烯、氯乙烯、乙烯类、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、腈、丙烯酰胺、马来酸酯、环氧树脂、环氧化物、内酯、环氧乙烷、乙二醇、乙基噁唑啉、氨基酸、糖类、蛋白质、酸酐、酰胺、碳酸酯、亚苯基氧化物、缩醛、砜、亚苯基硫醚、酯、氟聚合物、酰亚胺、酰胺-酰亚胺、酰酰亚胺、离聚物、芳基醚酮、胺、酚、酸、苯、肉桂酸酯、唑类、硅烷类、氯化物和环氧化物、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、亚甲基双甲基丙烯酰胺乙二醇二甲基丙烯酸酯、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、聚乙烯二丙烯酸酯(PEGDA)、聚乙二醇二甲基丙烯酸酯(PEGDMA)、聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、聚乙二醇二甲基丙烯酸酯(PEGDMA)、基于聚(偏二氟乙烯)(PVdF)的聚合物、基于聚丙烯腈(PAN)的聚合物、基于聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)的聚合物、基于聚氯乙烯(PVC)的聚合物, 以及基于聚(偏二氟乙烯)(PVdF)的聚合物、基于聚丙烯腈(PAN)的聚合物、基于聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)的聚合物和基于聚氯乙烯(PVC)的聚合物的混合物, 以及其任意两种或更多种的混合物。在一些实施方案中, 所述水凝胶不包含3,4-二羟基苯甲酸(3,4-DHB)或其类似物。

[0240] 交联剂和任选地化学或紫外线光活化诱导剂可包括N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、亚甲基双甲基丙烯酰胺乙二醇-二甲基丙烯酸酯和试剂N,N'-亚甲基双丙烯酰胺。Irgacure 2959(Ciba)、2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮、2-甲氧基-2-苯基丙酮、苄基-二甲基-缩酮、硫酸铵、二苯甲酮、乙基安息香乙醚、异丙苯偶姻醚、 $\alpha$ -甲基苯偶姻醚、苯偶姻苯基醚、2,2-二乙氧基苯乙酮、1,1-二氯苯乙酮、2-羟基-2-甲基-1-苯基丙烷-1-酮、1-羟基环己基苯基酮、蒽醌、2-乙基蒽醌、2-氯蒽醌、噻吨酮(tioxantone)、异丙基噻吨酮(tioxantone)、氯噻吨酮(chloro tioxantone)、2,2-氯二苯甲酮、苯甲酸苄酯和苯甲酰基苯甲酸酯、TEMED和过硫酸铵(APS)。在一些实施方案中, 水凝胶包含蛋白质、肽、糖蛋白、蛋白聚糖、葡糖氨基聚糖和/或由细胞分泌至细胞外环境中的糖类。在一些实施方案中, 所述分泌的蛋白质、肽、糖蛋白、蛋白聚糖、葡糖氨基聚糖和/或糖类或由其组成的结构。

[0241] 在一些实施方案中,本公开涉及包含至少一个涂层的涂覆的生物传感器设备,其中所述生物传感器包含共价结合于或固定于该涂层的代谢酶,其中所述代谢酶与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2共有至少70%序列同一性或与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的功能性片段共有至少70%序列同一性。在一些实施方案中,本公开涉及包含至少一个涂层的涂覆的生物传感器设备,其中所述生物传感器包含共价结合于或固定于所述涂层内的代谢酶,其中所述涂层包含含有水凝胶基质的组合物,所述基质包含以下物质的任一种或其组合:海藻酸盐、海藻糖、至少一种电子介体和至少一种还原剂。在一些实施方案中,本公开涉及包含至少一个涂层的涂覆的生物传感器设备,其中所述生物传感器包含共价结合于或固定于所述涂层的代谢酶,其中所述涂层包含含有水凝胶基质的组合物,所述基质包含以下物质的任一种或其组合:具有约1000 (PEGDMA-1000) 的分子量的聚(乙二醇)二甲基丙烯酸酯、2-羟基-2-甲基苯丙酮 (HMPP) 和至少一种丙烯酸酯,其中丙烯酸酯选自由以下组成的组:甲基丙烯酸 (MAA) 和甲基丙烯酸甲酯 (MMA),其中 PEGDMA:丙烯酸酯的比率为约10:90mol%至约70:30mol%,并且所述HMPP的浓度为约0.2%至约0.6的浓度%的总重量。

[0242] 在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1nM至约999mM的浓度的海藻糖或类似物。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1μM至约10mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1μM至约9mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1μM至约8mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1μM至约7mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1μM至约6mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1μM至约5mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1μM至约4mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1μM至约3mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1μM至约2mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约1μM至约1mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约10μM至约1mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约100μM至约1mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约200μM至约1mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约300μM至约1mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约400μM至约1mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约500μM至约1mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约600μM至约1mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约700μM至约1mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,固化前的水凝胶溶液包含约800μM至约1mM的浓度的海藻糖。在一些实施方案中,水凝胶溶液(与电极接触之前)包含约900μM至约1mM的浓度的海藻糖。

#### [0243] 酶

[0244] 任何一种或多种代谢酶可被选择用于本公开。可单独使用或可与本文中公开的生物传感器、系统或测试条组合使用的代谢酶包括:苯丙氨酸脱氢酶、组氨酸解氨酶、组氨酸氧化酶、苯丙氨酸裂解酶、谷氨酸脱氢酶的任何细菌克隆。在一些实施方案中,所述酶选自下文中公开的酶或它们的功能性片段的任一种或其组合,所述功能性片段与所述全长酶或编码此类酶的核酸具有至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同源性。

生物体	酶	基因库登录号	SEQ ID NO
[0245]	中间型嗜热放线菌 (Thermoactinomyces intermedius)	苯丙氨酸脱氢酶	D00631.1 2
	蕃茄(Solanum lycopersicum)	苯丙氨酸羧解氨	XM_004246602 7
[0246]	中间型嗜热放线菌	苯丙氨酸脱氢酶	DD421709.1 8
	腐生水果线虫(Caenorhabditis remanei)	苯丙氨酸脱氢酶	XM_003102740 9
	拟南芥	谷氨酸脱氢酶	NM_121822.3 10
	非洲螺旋体(Spirochaeta africana)	组氨酸解氨酶	NC_017098.1

[0247] SEQ ID NO:2

[0248] MRDVFEMMDRYGHEQVIFCRHPQTGLKAIIALHNTTAGPALGGC

[0249] RMIPYASTDEALEDVRLSKGMYKCSLADVDFGGGKVIIGDPKKDKSPELFRVIGR

[0250] FVGGLNGRFYTGTDGTPEDFVHAARESKSFAGLPKSYGGKGDTSIPTALGVFHGM RAT

[0251] ARFLWGTDLQKGRVVAIQGVGVGERLLQLLVEVGAYCKIADIDSVRCEQLKEKYG

[0252] DKVQLVDVNRRIHKESCDIFSPCAKGVVNDTIDEFRCLAIVG SANNQLVEDRHGALL

[0253] QKRSICYAPDYLVNAGGLIQVADELEGFHEERVLAKTEAIYDMVLDIFHRAKNENITT

[0254] CEAADRIVMERLKKLTDIRRILEDPRNSARR

[0255] SEQ ID NO:7

[0256] MASSIVQNGHVNGEAMDLCKKSINVNDPLNWEMAAESLRGSHLD

[0257] EVKKMVDEFRKPIVKLGGETLTVAQVASIANVDNKSNGVKVELSESARAGVKASSDWV

[0258] MDSMGKGTDSYGVTTGFGATSHRRKTNGGALQKELIRFLNAGVFGNGTESSHTLPHSA

[0259] TRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAITKLINSNITPCPLPLRGTTASGDLVPLSYIA

[0260] GLLTGRPNSKAVGPNGEKLNAEEAFRVAGVTSGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGMASM

[0261] VLFESNILAVMSEVLSAIFAEVMNGKPEFTDYLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSS

[0262] YVKAAQKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRAATKMIEREINSVNDNPLI

[0263] DVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMDNTRLALASIGKLMFAQFSELVNDYYNGLPSNLTA

[0264] GRNPSLDYGLKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISARKTAE

[0265] AVDILKLMSSTYLVALCQAIIDLHLEENLRSAVKNTVSQVAKRTLTMGANGELHPARF

[0266] CEKELLVVVDREYVFAYADDPCSSTYPLMQKLRQVLVDHAMNGESEKNVNSSIFQKI

[0267] VAFEDELKAVLPKEVESARAVVESGNPAIPNRITECRSYPLYRLVRQELGSELLTGEK

[0268] VRSPGEEIDKVFTAMCNGQIIDPLLECLKSWNGAPLPIC

[0269] SEQ ID NO:8

atgcgcgacg tgttgaaat gatggaccgc tatggccacg agcaggcat ttttgcgt  
 61 catccgcaaa cgggtctcaa agcgatcatc gcctgcata atacaaccgc gggccggct  
 121 tgggtggat gcccgtatgc cccgtatgc tcgacggacg aagecttggaa ggatgtttg  
 181 cgggtgtcca aaggcatgac ctataatgc agtctggcg agtggactt tggcggggaa  
 241 aaaatggta tcatcgccg tccgaaaaaa gataaatgc cggagttgtt tcgcgtgatc  
 301 ggccgtttt tggcggtt aaacggccgt ttctataccg gaaccgacat gggaaaccaat  
 361 cccgaagatt ttgcctatgc cggcaggaa tcgaaatctt ttgcggatt gcccgaatcg  
 421 tacggcgaa agggggacac atccatccc accgcgtcg ggggttca cggaaatcg  
 481 gccaccggcc ggttttatg ggggacggat cagctgaaag ggcgtgtgt tgccatccaa  
 541 ggagtcggca aggtgggaga ggcgtgttgc cagctttgg tcgaagtggg ggcttactgc  
 601 aaaattgccc acatcgattc ggtgcgtgc gaacagctga aagaaaagta tggcacaag  
 661 gtccaaatgg tggatgtgaa cgggattcac aaggagagtt gcgatattt ctgccttgc  
 721 gccaaaggcg gctgtgtcaa tgatgacacc attgacgagt tccgtgcct ggcattgtc  
 781 ggatccgcca acaaccaact ggtggaaagac cggcatgggg cactgcgtca aaaacggagc  
 841 atttggatg cacccgattt tctggtaat gcccggggc tgattcaagt ggctgtgaa  
 901 ctggaggct tccatgaaga gagagtgtc gccaaaaccc aagcgattt tgacatggc  
 961 ctggatattt ttccggggc gaaaaatgg aatattacca ttgtggagc agcggaccgg  
 1021 atcgtatgg agcgtttgaa aaagttaacc gatattcgcc ggttgcgtt ggaggatccc  
 1081 cggcaacacgca caaggaggtta a

[0271] SEQ ID NO:9

[0272] MDFKAKLLAEMAKKRKAVSGLEVKEGGAKFVRGADLESKRTQEY

[0273] EAKQEELAIKKRADDEILQUESTRAKIVPEVPEAEFDEKTPMPEIHARLRQRGPIL

[0274] LFGESLSVRKRLHQLEIEQPELNEGWEQMKTAMKFIGKEMDKAVVEGTADSATRHD

[0275] IALPQGYEEDNWKSIEHASTLLGVGDEMKRDCDIILSICRYILARWARDLNDRPLDVK

[0276] KTAQGMHEAAHKQTTMHLKSLMTSMEKYNVNNDIRHHLAKICRLLVIERNYLEANNA

[0277] YMEMAIIGNAPWPVGVTRSIGHQRPGSAKAYVSNIAHVLNDTQRKYIQAFKRLMTKLQ

[0278] EYFPTDPSKSVEFVKKSV

[0279] SEQ ID NO:10

[0280] MNALAATNRNFKLAARLLGLDSKLEKSLLIPFREIKVECTIPKD

[0281] DGTLASFVGFRVQHDNARGPMKGGIRYHPEVDPDEVNALAQLMTWKTAVAKIPYGGAK

[0282] GIGCDPSKLSISELERLTRVFTQKIHDLIGIHTDVPAPDMGTGPQTMWILDEYSKF

[0283] HGYSPAVVTGKPIDLGSSLGRDAATGRGVMFGTEALLNEHGKTISGQRFVIQGFGNVG

[0284] SWAAKLISEKGGKIVAVSDITGAINKNDGIDIPALLKHTKEHRGVKGFDGADPIDPNS

[0285] ILVEDCDILVPAALGGVINRENANEIKAKFIIEAANHPTDPADEILSKKGVVILPDI

[0286] YANSGGTVTSYFEWVQNIQGFMWEEEVNDELKTYMTRSFKDLKEMCKTHSCDLRMGA

[0287] FTLGVNRVAQATILRGWGA

[0288] MNTVTNQWKAVDIFTQIRDHEQVVFCDKNTGLKAIIAIHDTTL

[0289] GPALGGCRMYPYATVEDALFDVRLSLKGMTYKCLAADVDFGGGKAVIIGDPHKDKTPE

[0290] LFRAGFQFVESLNGRFYTGTDMGTPDDFVHAMKETNCIVGVPEYGGSGDSSVPTAL

[0291] GVIYGIQATNKVIWGSDELHGKTYAIQGLGKVGRKVAERLLKEGADLYVCDIHPTAIE

[0292] AIVSYAKKLGANVKVVQGTEIYRTDADIFVPCAFGNVNDNTIHVLKVKAIVGSANNQ

[0293] LLDVRHGQLLKEKGILYAPDYIVNAGGLIQVADELYGLNKERVLQTKAIYSTLLHIY

[0294] SRAEADHITTIEAANRFCEERLQQRSRRNDFTHRQPKWDIRR

[0295] (SEQ ID NO:1)。

[0296] 固体载体

[0297] 存在多种形式的氨或铵离子测量装置;一个常见类型以通过基于酶的测试条接收血液样品的手持式电子测量仪为代表。在使用这些系统中,患者可以例如切开手指或其它身体部位,以获得血液样品,将测试条插入仪表外壳上中的测试条开口,将样品施加至测试条,并且仪表中的电子计将由测试条中的酶促反应产生的电流转化成氨基酸浓度值。

[0298] 本公开的固体载体可以是固体状态,但为柔性基片。根据本公开,所述叉指式阵列或至少一个电极被设置靠近柔性基片,例如在柔性基片上。为了用作柔性基片,材料必须是柔性的,并且也是绝缘的,并且通常是相对薄的。所述基片应该能够将IDA的组件或传感器的另外的组件粘附于其表面。此类薄的、绝缘的柔性基片在柔性电路和柔性电路光刻的领域中是已知的。根据本公开的“柔性基板”可与集成电路(IC)光刻但非柔性电路光刻中使用的非柔性基片形成对比。IC光刻中使用的非柔性基片的实例包括硅、氧化铝和其它陶瓷。这些非柔性基片被选择来可加工成非常平的表面。用于本公开的典型柔性基片由薄塑料材料(例如,聚酯,尤其是高温聚酯材料、聚萘二甲酸乙二醇酯(PEN)和聚酰亚胺,或这些的两种或更多种的混合物)构成。聚酰亚胺是例如以商品名Kapton®从I.E.duPont de Nemours and Company of Wilmington, Del. (duPont)商购获得的。聚萘二甲酸乙二醇酯可作为Kaladex®也从duPont商购获得。特别优选的柔性基片是7密耳厚的Kaladex®薄膜。

[0299] 本公开的叉指形阵列可用于通常已知包括电极的应用,特别是已知牵涉电极的叉指形阵列的应用。各种应用在电子学和电化学领域中是已知的,包括与过程和流量监测或控制以及化学分析方法相关的应用。所述阵列作为电化学传感器的组件是特别有用的,其中使用柔性基片具有附加值、效益或成本效率,或其中在具有拥有比常规地设置在非柔性基片上的叉指形阵列的尺度相对更大的尺度的叉指形阵列中存在价值、效益或成本效率。

[0300] 本公开的叉指形阵列可以例如被包含在电化学检测法中使用的电化学传感器(有时称为“生物传感器”或简称“传感器”)中。电化学检测法依照电学和化学或电化学的原理,例如,依照使流过物质的电流、物质的电阻或横跨被给予已知电流的物质的电压的量级与化学物质种类在所述物质中的存在发生关联的原理运行。这些方法的一些可被称为电位、计时或阻抗,这取决于它们是如何被实施的,例如,是电位差还是电流被控制或测量。所述方法和传感器(包括本公开的传感器)可测量直接或间接因特定化合物(例如,分析物或电活性化合物)诸如血液、血清、间质液或另一种体液内的化合物的存在而引起的流经物质的电流,例如以确定氨基酸、尿素、氮、胆固醇、乳酸等的水平。一些电化学方法和电化学传感器的改造,以及它们的结构、电子学和电化学运行的特征描述于例如美国专利第5,698,083、5,670,031、5,128,015和4,999,582(所述专利的每一篇通过引用并入本文)中。

[0301] 在一些实施方案中,上述生物传感器盒、装置或方法中的任一种包含一定体积的抗凝剂。在一些实施方案中,本文中公开的抗凝剂的体积为约10微升的体积。在一些实施方案中,本文中公开的抗凝剂的体积为约20微升的体积。在一些实施方案中,本文中公开的抗凝剂的体积为约30微升的体积。在一些实施方案中,本文中公开的抗凝剂的体积为约40微升的体积。在一些实施方案中,本文中公开的抗凝剂的体积为约50微升的体积。在一些实施

方案中,本文中公开的抗凝剂的体积为约100微升的体积。

[0302] 在一些实施方案中,本文中公开的方法包括将包含血液的样品与抗凝剂诸如肝素、醋硝香豆素、苯丙香豆素、黑毛椿菇素、溴鼠灵、苯茚二酮、香豆素等混合的步骤。在一些实施方案中,所述生物传感器、盒、装置或测试条包含被配置来在所述生物传感器、盒、装置或测试条中的至少一个容器、微流体导管或混合部分中振荡一个或多个体积的机械振荡器。

[0303] 方法

[0304] 本公开涉及诊断或预后具有高氨血症或高氨血症相关病症的受试者的临床结果的方法,所述方法包括将本文中公开的传感器、系统或测试条与体液样品接触,和定量样品中的氨或铵离子的水平;以及将样品中的氨基酸的水平与被认为是体液中的氨基酸水平的正常水平的阈值相比较。在一些实施方案中,所述方法涉及诊断或预后疑似患有或先前已被诊断患有高氨血症或高氨血症相关病症和/或至少一种氨基酸代谢疾病的受试者的临床结果的方法。

[0305] 在一些实施方案中,所述方法涉及诊断或预后疑似患有或先前已被诊断患有高氨血症或高氨血症相关病症的受试者的临床结果的方法。针对每一个年龄类型被认为是正常的氨或铵离子水平的范围示于下面的表4中。如果在执行本文所提供的定量步骤后,样品溶液中的氨或铵离子的量超过或低于提供的范围,则可启动或改变饮食养生、运动养生和/或药物治疗,以使得氨或铵离子水平被监测,直至受试者的水平已经稳定在或落在被认为是健康范围的范围内。

[0306] 表4

[0307] 氨的范围

[0308]

病例	范围
新生儿-健康	少于110微摩尔/升
新生儿-疑似代谢疾病症	大于200微摩尔/升
比新生儿大-健康	50-80微摩尔/升
比新生儿大-疑似代谢疾病症	大于100微摩尔/升
肝性脑病	大于70微摩尔/升

[0309] 本公开涉及检测氨或铵相关病症在体液中的存在或不存在或量的方法。本公开还涉及定量受试者的体液中的氨或铵离子的浓度的方法。由于快速酶促反应读出(由在受试者的样品暴露于一个或多个包含本文中公开的靛酚试剂的任一种或其组合的容器后,电路中的可检测电流的产生引起的),因此可即时检测地进行定量。在一些实施方案中,本文中公开的装置或系统可用于检测人是否具有异常高或低的血氨水平,随后可将电子信息或显示提供给所述装置或系统的用户,或通过一个或多个处理器或微芯片(其远程或直接访问包含受试样品中的氨或铵离子的一个或多个浓度值的一个或多个存储器)激活在显示器上。在一些实施方案中,可同时或相继地获得多个浓度值,利用可操作地连接于本文中公开的装置或系统的一个或多个处理器比较或分析所述浓度值。在一些实施方案中,可利用可操作地连接于本文中公开的装置或系统的一个或多个处理器比较或分析受试者在一段时间内的多个浓度值,随后显示包含浓度值和/或阈值的信息。在一些实施方案中,所述信息

任选地包括表明所述受试者应当寻求药物治疗或改变饮食以控制受试者中的氨或铵离子水平的信号。

[0310] 本公开还涉及诊断具有肝功能障碍的受试者的方法,所述方法包括: (a) 将来自受试者的体液样品与本文中公开的生物传感器、系统或测试条接触;

[0311] (b) 定量所述样品中的氨的一个或多个浓度值;

[0312] (c) 将所述样品中的氨的一个或多个浓度值与被鉴定为在健康范围内的氨浓度的阈值相比较; 和

[0313] (d) 如果所述样品中的氨的一个或多个浓度值超过或低于所述阈值,则将所述受试者鉴定为具有代谢疾病。在一些实施方案中,如果所述样品是血液或全血,则所述方法包括在步骤(a)之前或与之同时将所述样品与抗凝剂接触。

[0314] 本公开还涉及诊断具有高氨血症的受试者的方法,所述方法包括: (a) 将来自受试者的体液样品与本文中公开的生物传感器、系统或测试条接触;

[0315] (b) 定量所述样品中的氨的一个或多个浓度值;

[0316] (c) 将所述样品中的氨的一个或多个浓度值与被鉴定为在健康范围内的氨浓度的阈值相比较; 和

[0317] (d) 如果所述样品中的氨的一个或多个浓度值超过或低于所述阈值,则将所述受试者鉴定为具有代谢疾病。在一些实施方案中,如果所述样品是血液或全血,则所述方法包括在步骤(a)之前或与之同时将所述样品与抗凝剂接触。

[0318] 本公开还涉及定量样品中的氨基酸的量的方法,所述方法包括: (a) 将来自受试者的体液样品与本文中公开的生物传感器、系统或测试条接触;

[0319] (b) 定量所述样品中的氨的一个或多个浓度值;

[0320] (c) 将所述样品中的氨的一个或多个浓度值与经鉴定与氨基酸的量相关的氨浓度的阈值相比较; 和

[0321] (d) 如果所述样品中的氨的一个或多个浓度值超过或低于所述阈值,则鉴定所述氨基酸水平。可使用来自图14的参照信息检测任意氨基酸,其中本文中公开的生物传感器、系统或测试条包含本文中公开的酶或功能性片段,所述功能性片段与本文中公开的任何酶具有70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性。本领域普通技术人员例如已知,为了检测表5中所列的氨基酸的存在、不存在或量,可使用本文中公开的一种或多种重组或合成的酶或其功能性片段,所述酶或其功能性片段与本文中公开的任何序列(核酸或编码的氨基酸)具有70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性。

[0322] 在一些实施方案中,使用在约50至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约52至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约54至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约56至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约58至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约60至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约62至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约64至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约66至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约66至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。

70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约68至约70mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约50至约68mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约50至约66mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约50至约64mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约50至约62mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约50至约60mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约50至约58mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约50至约56mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约50至约54mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用在约50至约52mmol/升的范围内的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,使用约59mmol/升的浓度的所述酚试剂或靛酚试剂。在一些实施方案中,所述酚试剂或靛酚试剂为2-苯基苯酚。

[0323] 在一些实施方案中,使用约7微摩尔/升的浓度的催化剂。在一些实施方案中,所述催化剂为硝普钠。

[0324] 在一些实施方案中,使用在约50至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约120至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约140至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约160至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约180至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约200至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约220至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约240至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约260至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约280至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约300至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约320至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约340至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约360至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约380至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约400至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约420至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约440至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约460至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约480至约500mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约100至约480mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约100至约460mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约100至约420mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约100至约400mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约100至约380mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约100至约360mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约100至约340mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约100至约320mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中,使用在约100至约300mmol/升的范围内的碱性缓冲

液。在一些实施方案中，使用在约100至约280mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中，使用在约100至约260mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中，使用在约100至约240mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中，使用在约100至约220mmol/升的范围内使用碱性缓冲液。在一些实施方案中，使用在约100至约200mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中，使用在约100至约180mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中，使用在约100至约160mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中，使用在约100至约140mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中，使用在约100至约120mmol/升的范围内的碱性缓冲液。在一些实施方案中，使用约50mmol/升的浓度的碱性缓冲液。在一些实施方案中，所述碱性缓冲液是氢氧化钠。在一些实施方案中，使用约100mmol/升的浓度的所述碱性缓冲液。在一些实施方案中，所述碱性缓冲液是氢氧化钠。在一些实施方案中，使用约200mmol/升的浓度的所述碱性缓冲液。在一些实施方案中，所述碱性缓冲液是氢氧化钠。在一些实施方案中，使用约300mmol/升的浓度的所述碱性缓冲液。在一些实施方案中，所述碱性缓冲液是氢氧化钠。在一些实施方案中，使用约400mmol/升的浓度的所述碱性缓冲液。在一些实施方案中，所述碱性缓冲液是氢氧化钠。在一些实施方案中，使用约500mmol/升的浓度的所述碱性缓冲液。在一些实施方案中，所述碱性缓冲液是氢氧化钠。

[0326] 在一些实施方案中,使用在约0.5至约1.0mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一

些实施方案中,使用在约0.6至约1.0mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用在约0.7至约1.0mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用在约0.8至约1.0mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用在约0.9至约1.0mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用在约0.5至约0.9mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用在约0.5至约0.8mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用在约0.5至约0.7mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用在约0.5至约0.6mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用以约1.0mol/升的浓度的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,所述碱缓冲液是以下物质的一种或其组合:醋酸钙、氯化钙、醋酸锌、氯化锌或其任何等同的单价、二价或三价盐。在一些实施方案中,所述碱缓冲液是醋酸钠/醋酸钙。在一些实施方案中,使用在约0.5至约0.6mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用约1.0mol/升的浓度的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,所述碱缓冲液是以下物质之一或其组合:醋酸钙、氯化钙、醋酸锌、氯化锌或其任何等同的单价、二价或三价盐。在一些实施方案中,所述碱缓冲液是醋酸钠/醋酸钙。在一些实施方案中,使用在约0.5至约0.6mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用约1.0mol/升的浓度的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,所述碱缓冲液是以下物质之一或其组合:醋酸钙、氯化钙、醋酸锌、氯化锌或其任何等同的单价、二价或三价盐。在一些实施方案中,所述碱缓冲液是醋酸钠/醋酸钙。在一些实施方案中,使用在约0.5至约0.6mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用约1.0mol/升的浓度的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,所述碱缓冲液是以下物质之一或其组合:醋酸钙、氯化钙、醋酸锌、氯化锌或其任何等同的单价、二价或三价盐。在一些实施方案中,所述碱缓冲液是醋酸钠/醋酸钙。在一些实施方案中,使用在约0.5至约0.6mol/升的范围内的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用约0.5mol/升的浓度的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,所述碱缓冲液是以下物质之一或其组合:醋酸钙、氯化钙、醋酸锌、氯化锌或其任何等同的单价、二价或三价盐。在一些实施方案中,所述碱缓冲液是醋酸钠/醋酸钙。在一些实施方案中,使用约0.6mol/升的浓度的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用约0.7mol/升的浓度的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用约0.8mol/升的浓度的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用约0.9mol/升的浓度的所述碱缓冲液。在一些实施方案中,使用约0.75mol/升的浓度的所述碱缓冲液。

[0327] 本公开涉及诊断受试者中的肝功能障碍或高氨血症的方法,所述方法包括:

[0328] (a) 将受试者的样品与本文中公开的系统、盒、测试条、生物传感器或装置接触;

[0329] (b) 检测氨的存在、不存在或量;

[0330] (c) 使氨的量与样品中的氨基酸的水平相关联;

[0331] (d) 如果所述氨的水平被定量为高于约100微摩尔/升的样品,则将所述受试者诊断为具有肝功能障碍或高氨血症。

[0332] 本公开涉及诊断受试者中的肝功能障碍或高氨血症的方法,所述方法包括;

[0333] (a) 将所述受试者的样品与本文中公开的系统、盒、测试条、生物传感器或装置接

触；

- [0334] (b) 检测氨的存在、不存在或量；
- [0335] (c) 使氨的量与所述样品中的氨基酸的水平相关联；
- [0336] (d) 如果所述氨的水平被定量为高于约90微摩尔/升的样品，则将所述受试者诊断为具有肝功能障碍或高氨血症。
- [0337] 本公开涉及诊断受试者中的肝功能障碍或高氨血症的方法，所述方法包括：
  - [0338] (a) 将所述受试者的样品与本文中公开的系统、盒、测试条、生物传感器或装置接触；
  - [0339] (b) 检测氨的存在、不存在或量；
  - [0340] (c) 使氨的量与所述样品中的氨基酸的水平相关联；
  - [0341] (d) 如果所述氨的水平被定量为高于约80微摩尔/升的样品，则将所述受试者诊断为具有肝功能障碍或高氨血症。
- [0342] 本公开涉及诊断受试者中的肝功能障碍或高氨血症的方法，所述方法包括：
  - [0343] (a) 将所述受试者的样品与本文中公开的系统、盒、测试条、生物传感器或装置接触；
  - [0344] (b) 检测氨的存在、不存在或量；
  - [0345] (c) 使氨的量与所述样品中的氨基酸的水平相关联；
  - [0346] (d) 如果所述氨的水平被定量为高于约70微摩尔/升的样品，则将所述受试者诊断为具有肝功能障碍或高氨血症。
- [0347] 治疗具有肝功能障碍或高氨血症的受试者的方法，所述方法包括：
  - [0348] (a) 将所述受试者的样品与本文中公开的系统、盒、测试条、生物传感器或装置接触；
  - [0349] (b) 如果所述氨的水平被定量为高于约70微摩尔/升的样品，则将所述受试者诊断为具有肝功能障碍或高氨血症；和
  - [0350] (c) 通过施用类固醇、精氨酸补充剂、苯甲酸钠、苯乙酸盐和/或葡萄糖溶液来治疗所述受试者。
- [0351] 治疗具有肝功能障碍或高氨血症的受试者的方法，所述方法包括：
  - [0352] (a) 将所述受试者的样品与本文中公开的系统、盒、测试条、生物传感器或装置接触；
  - [0353] (b) 如果所述氨的水平被定量为高于约80微摩尔/升的样品，则将所述受试者诊断为具有肝功能障碍或高氨血症；和
  - [0354] (c) 通过施用类固醇、精氨酸补充剂、苯甲酸钠、苯乙酸盐和/或葡萄糖溶液来治疗所述受试者。
- [0355] 治疗具有肝功能障碍或高氨血症的受试者的方法，所述方法包括：
  - [0356] (a) 将所述受试者的样品与本文中公开的系统、盒、测试条、生物传感器或装置接触；
  - [0357] (b) 如果所述氨的水平被定量为高于约90微摩尔/升的样品，则将所述受试者诊断为具有肝功能障碍或高氨血症；和
  - [0358] (c) 通过施用类固醇、精氨酸补充剂、苯甲酸钠、苯乙酸盐和/或葡萄糖溶液来治疗

所述受试者。

[0359] 治疗具有肝功能障碍或高氨血症的受试者的方法,所述方法包括:

[0360] (a) 将所述受试者的样品与本文中公开的系统、盒、测试条、生物传感器或装置接触;

[0361] (b) 如果所述氨的水平被定量为高于约100微摩尔/升的样品,则将所述受试者诊断为具有肝功能障碍或高氨血症;和

[0362] (c) 通过施用类固醇、精氨酸补充剂、苯甲酸钠、苯乙酸盐和/或葡萄糖溶液来治疗所述受试者。

[0363] 在任何上述方法中,所述方法包括检测全血、水或获自微环境的样品诸如从采自微环境的拭子重建的测试溶液中的氨或铵离子水平。

[0364] 本公开涉及诊断受试者中的代谢疾病症的方法,所述方法包括:

[0365] (a) 将所述受试者的样品与本文中公开的系统、盒、测试条、生物传感器或装置接触;

[0366] (b) 检测氨的存在、不存在或量;

[0367] (c) 使氨的量与所述样品中的氨基酸的水平相关联;

[0368] (d) 如果所述氨基酸的水平被定量为高于表1中所示的那些水平,则将所述受试者诊断为具有代谢疾病症。

[0369] 在一些实施方案中,本文所公开的任何方法包括采用通过同时或相继进行1、2、3或更多个测试来检测样品中的氨的存在、不存在或量的多个步骤。

[0370] 在一些实施方案中,检测氨的存在、不存在或氨的量的步骤包括检测由靛酚反应产物发射或吸收的波长。在任何上述方法中,检测氨的存在、不存在或量的步骤包括通过观看一个或多个容器中的可见光来检测由靛酚反应产物发射或吸收的波长。在一些实施方案中,检测氨的存在、不存在或量的步骤包括检测由靛酚反应产物吸收的波长,其中所述波长约500nm至约700nm。

[0371] 在一些实施方案中,任何的上述方法、检测氨的存在、不存在或量的步骤包括检测由靛酚反应产物发射或吸收的波长。

[0372] 在一些实施方案中,任何上述方法不包括将液体转化成气体的步骤或涉及气相色谱的任何步骤。

[0373] 在一些实施方案中,任何上述生物传感器、盒、装置或方法包括在约10微升至约150微升的体积中混合一定体积的任何本文中公开的试剂。在一些实施方案中,任何上述生物传感器、盒、装置或方法包括在约10微升至约100微升的体积中混合一定体积的任何本文中公开的试剂。在一些实施方案中,任何上述生物传感器、盒、装置或方法在约10微升至约150微升的体积中包含一定体积的任何本文中公开的试剂。在一些实施方案中,任何上述生物传感器、盒、装置或方法在约20微升的体积中包含一定体积的任何本文中公开的试剂。在一些实施方案中,任何上述生物传感器、盒、装置或方法在约30微升的体积中包含一定体积的任何本文中公开的试剂。在一些实施方案中,任何上述生物传感器、盒、装置或方法在约40微升的体积中包含一定体积的任何本文中公开的试剂。在一些实施方案中,任何上述生物传感器、盒、装置或方法在约50微升的体积中包含一定体积

的任何本文中公开的试剂。

[0374] 在一些实施方案中,本公开涉及定量样品中的氨或铵离子和/或氨基酸浓度的计算机实现的方法。

[0375] 在一些实施方案中,本公开涉及包含执行定量受试者样品中的氨基酸浓度的计算机实现的方法的处理器的系统。在一些实施方案中,该系统包含任选地位于远程位置并且可通过互联网连接访问的处理器,其可操作地连接至存储受试者的随着时间推移的浓度的计算机存储器内存。在一些实施方案中,所述受试者或受试者的医疗服务提供者可访问互联网以与连接至计算机存储器内存的服务器进行通信。可在产生受试者数据报告,并且可在通过处理器发起检索命令后由受试者获得该报告。在一些实施方案中,所述系统包括计算机程序产品,其执行由本文中公开的生物传感器产生的电流信号至样品中特定氨基酸和/或氨的浓度的功能转换。在一些实施方案中,本公开涉及包含至少一个处理器和计算机可读存储器的系统,所述计算机可读存储器具有存储在其上的用于定量体液样品中的氨基酸浓度的程序代码,计算机可读存储器包含:用于存储与受试者相关联的数据的装置;用于响应于接收来自生物传感器或其计算机存储器内存的电流响应的水平,将浓度值作为用户界面的一部分呈现给用户的装置。在一些实施方案中,所述用户是受试者或受试者的医疗保健提供者。在一些实施方案中,本公开涉及包含至少一个处理器、程序存储器(诸如内存,用于存储可在处理器上执行的程序代码)和一个或多个输入/输出装置和/或接口(诸如数据通信和/或外围设备和/或接口)的系统。在一些实施方案中,所述用户设备和计算机系统或多个系统通过数据通信网络诸如局域网(LAN)、因特网等通信连接,其也可被连接至许多其它客户端和/或服务器计算机系统。所述用户设备和客户端和/或服务器计算机系统还可包括适当的操作系统软件。

[0376] 本公开总体上涉及表征受试者的行为修正的浓度值的定义和/或用途。在一些实施方案中,对应于体液样品中的氨基酸浓度的浓度值可表征受试者被建议修改饮食或就医的程度。

[0377] 在一些实施方案中,本公开提供了用于诊断测定的生物传感器或测试条。在一些实施方案中,所述生物传感器和/或测试条被作为诊断或检测试剂盒的部分来提供。在某些实施方案中,用于根据本公开使用的试剂盒可包括一个或多个参照样品;指令(例如,用于处理样品,用于进行测试,用于解释结果等);媒介;和/或进行测试所必需的其它试剂。

[0378] 本公开提供了测试条,其包含:固体载体,与至少一个导管流体连通的至少第一容器,其中所述测试条包含本文中公开的水凝胶。在一些实施方案中,所述固体载体是任选地用聚合物涂覆的载玻片。在一些实施方案中,固体载体涂覆有聚合物。在一些实施方案中,所述聚合物是聚丙烯酰胺。在一些实施方案中,所述固体载体是选自以下物质的材料:聚苯乙烯(TCPS)、玻璃、石英、石英玻璃、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)(PET)、聚乙烯、聚二氟乙烯(PVDF)、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚四氟乙烯(PTFE)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚碳酸酯、聚烯烃、乙烯醋酸乙烯酯、聚丙烯、聚砜、聚四氟乙烯、硅酮、聚(甲基)丙烯酸、聚酰胺、聚氯乙烯、聚乙烯基苯酚及其共聚物和混合物。在一些实施方案中,所述测试条是纸制品。在一些实施方案中,将所述至少一个电极附接于所述固体载体。

[0379] 根据一些实施方案,本公开提供了一个软件组件或被编码在计算机可读存储介质上并且任选地包括指令(诸如编程脚本等)的其它非临时性计算机程序产品,所述指令,当

被执行时,引起与氨基酸浓度值的计算相关的操作。在一些实施方案中,所述计算机程序产品被编码在计算机可读存储介质上,所述计算机可读存储介质,当被执行时:定量一个或多个氨或铵离子浓度值;针对对照组的数据标准化所述一个或多个氨或铵离子浓度值;生成受试者的氨基酸特征谱和特征;和向计算机程序产品的用户显示所述特征谱或特征。在一些实施方案中,所述计算机程序产品被编码在计算机可读存储介质上,所述程序产品,当被执行时:计算一个或多个氨或铵离子浓度值,标准化一个或多个氨或铵离子浓度值,和生成氨基酸特征,其中所述计算机程序产品任选地在由用户操作的显示器上显示氨基酸特征和/或一个或多个氨或铵离子的浓度值。在一些实施方案中,本公开涉及被编码在包含指令的计算机可读存储介质上的非临时性计算机程序产品,所述指令用于:定量一个或多个氨或铵离子的浓度值;和向所述计算机程序产品的用户显示所述一个或更多氨或铵离子的浓度值。

[0380] 在一些实施方案中,计算一个或更多氨或铵离子的浓度值的步骤包括:针对将所述装置或测试条与一个或多个体液样品接触的重复试验定量计数的平均值和标准偏差。

[0381] 在一些实施方案中,将所述一个或多个水凝胶涂覆的电极附接于固相载体。在一些实施方案中,固相载体包含任何固体或半固体表面。在一些实施方案中,固相包含用于在培养中生长或维持细胞的任何常规实验室材料,包括培养皿、烧杯、烧瓶、试管、微量滴定板和/或培养载玻片。在一些实施方案中,固相包括玻片、塑料载片、纸质测试条或其组合。

[0382] 在一些实施方案中,将一个或多个水凝胶涂覆的电极附接于固相载体。在一些实施方案中,固相包括聚酰胺、聚酯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚丙烯酸酯、聚乙烯基化合物(例如聚氯乙烯)、聚碳酸酯、聚四氟乙烯(PTFE)、硝化纤维素、棉花、聚乙醇酸(PGA)、纤维素、葡聚糖、明胶、玻璃、氟聚合物、氟化乙烯丙烯、聚偏乙烯、聚二甲基硅氧烷、聚苯乙烯,硅基板(诸如熔融石英、多晶硅或单晶硅)或其组合。

[0383] 在一些实施方案中,本公开涉及与受试者相关的医疗记录的目录,其包含来自一个或多个本文中公开的方法的测试结果。在一些实施方案中,这样的目录被存储在可通过无线网络连接远程访问的计算机可读介质上。

[0384] 如上所述,本公开的某些实施方案可用于区分获自具有或疑似具有高氨血症的受试者与不具有代谢疾病的受试者的体液样品。当例如测试受试者的全血样品以确定疾病是否存在时,该系统可能是有用的。使用一个或多个氨或铵离子诊断患者可包括,例如,将来自受试者的样品的一个或多个氨或铵离子的浓度值与所测量的受试者的参照值或阈值相比较。

[0385] 试剂盒

[0386] 在一些实施方案中,根据本公开的试剂盒可用于定量体液样品中的氨基酸浓度。

[0387] 本公开还提供了包含含有一种或多种本文中公开的多肽或片段的一个或多个容器的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒包含测试条和/或包含测试条的生物传感器,或增强细胞的培养或增殖的任何基于动物的血清衍生物。在一些实施方案中,所述试剂盒包含:本文公开的生物传感器、本文公开的任何测试条,以及本文中公开的任选地包含执行本文中公开的任何方法的任一个或多个步骤的指令的计算机程序产品。在一些实施方案中,所述试剂盒不包含细胞培养基。在一些实施方案中,所述试剂盒包含含有本文中公开的膜和/或嵌入有至少一个本文中公开的电极的固体载体,所述固体载体任选地在一个或多

个容器中包含次卤酸盐、碱性水溶液和至少一种包含苯基的化合物的任一种或其组合。在一些实施方案中,所述试剂盒包含将水凝胶固定于固体载体的装置。

[0388] 所述试剂盒可包含两个或更多个容器、包装或分配器以及用于制备阵列的说明书。在一些实施方案中,所述试剂盒包含至少一个包含本文所述的生物传感器或系统的容器和包含用于维持、使用和/或储存所述生物传感器的溶液诸如储存缓冲液的第二容器。在一些实施方案中,所述试剂盒包含组合物,所述组合物包含溶液中的或冻干的或干燥的或伴有再水化混合物的本文中公开的任何分子。在一些实施方案中,所述分子和再水化混合物可存在于一个或多个另外的容器中。在一些实施方案中,所述试剂盒包含含有的任一种或其组合的组合物。

[0389] 可在任何种类的容器中提供试剂盒中包含的组合物,以使得不同组分的保存期限得以保持,并且不被容器的材料吸附或改变。例如,合适的容器包括可从玻璃、有机聚合物诸如聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯、陶瓷、金属或通常用于保持试剂或食品的任何其它材料制造的简单瓶子;封套,其可由衬箔内饰,诸如铝或合金组成。其它容器包括试管、小瓶、烧瓶和注射器。容器可具有由可被容易除去的膜分隔的两个隔室,所述膜在除去后,允许组合物的组分混合。可除去的膜可以是玻璃、塑料、橡胶或其它惰性材料。

[0390] 所述试剂盒可含有本文中描述的生物传感器和/或测试条,其包含次卤酸盐、碱性水溶液和至少一种包含苯基的化合物。所述试剂盒还可含有包含本文中公开的任何膜的固体载体诸如测试条。

[0391] 还为试剂盒提供了说明书材料。说明书可被打印在纸上或其它基质上,和/或可作为电子可读介质诸如软盘、CD-ROM、DVD-ROM、zip盘、录像带、录音带或其它可读存储器设备提供。详细说明可以在物理上不与试剂盒相随;相反地,用户可被导向由试剂盒的制造商或分销商指定的互联网网站或以电子邮件形式提供。

[0392] 本公开还提供了试剂盒,其包含:包含固体载体和多个电极的生物传感器,其中至少一个电极包括本文中公开的水凝胶。在一些实施方案中,所述水凝胶包含固定化代谢酶或其功能性片段;和任选地包含至少一个容器,其包含液相或固相中的次卤酸盐、碱性缓冲水溶液,和至少一种包含苯基的化合物。在一些实施方案中,所述试剂盒还包含以下的至少一种:样品,和一组指令,任选地可通过电子介质远程访问。

[0393] 通常参照图1-7,可描述用于即时检测型高氨血症传感器的系统、方法和装置。在由所述附图描述的示例性实施方案中,可通过与某些试剂协作以利用靛酚反应测试样品的氨水平、氨基酸水平或其它化合物水平。可通过与泛颜色匹配片的手工比较或通过使用校准曲线的自动电子分析来测量反应中的颜色变化,并且所述颜色变化对应于特定化合物和分子的某些浓度。

[0394] 图1显示演示检测各自样品中的氨水平的能力的系统的一个示例性实施方案。孔100可由塑料、木材、金属、复合材料或其组合制成。另外,孔100可由合成化合物或聚合物诸如聚硅氧烷组成。孔100还可被分成两个或更多个部分,并且可被间插在孔100的中心或中心附近的膜过滤器105分隔。以通过插在或靠近井标志的中心的膜过滤器105分开。膜过滤器105可由阳离子交换过滤器,诸如Nafion(补充图A中显示的),或只允许小的带电荷的和中性的分子在部分之间通过的类似的全氟化离聚物制造。因此,膜过滤器105可被选择来允许各种分子或生物组分基于电荷、尺寸或类似特征的通过。其它膜过滤器从而可用于所需

的功能性,诸如丙烯酰胺、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)、聚(乙烯醇)或其它类似聚合物水凝胶。用于高氨血症传感器的膜过滤器105的选择可取决于膜允许分子诸如氨的通过的能力以及限制蛋白质、氨基酸和其它分子或化合物的通道的能力。

[0395] 仍然参照图1,试剂部分101可含有试剂例如苯酚、2-苯基苯酚、水杨酸钠、其它酚试剂或聚合物,或其组合。此外,试剂部分101还可含有漂白剂、次氯酸盐、氯胺T、类似的阴离子或其组合、催化剂诸如硝普钠和碱性缓冲液诸如氢氧化钠或氢氧化钾,以维持碱性条件。样品部分102可含有血清、血液、血浆或期望被测试的其它液体。膜过滤器105可以只允许氨从部分102向部分101通过。图3中描述的化学反应可在氨或类似分子至部分101中的接收后发生,从而将试剂转变成蓝色,如部分103中显示的。部分104可描述反应发生后的测试的样品。颜色表可能为代表特定浓度铵颜色之间的定性比较可用。颜色片可用于代表特定铵浓度的颜色之间的定性比较。

[0396] 为了使阳离子交换膜诸如Nafion可用于该应用,可以公开某一洗涤步骤和方法。可在过氧化氢水溶液中洗涤所述膜,所述溶液可处于沸腾温度。另外,可在去离子水、乙二胺四乙酸或其它螯合剂、硫酸以及其它类似的含水材料中洗涤所述膜。可将所述膜暴露于极端的温度和压力,以进一步确保洗涤。

[0397] 图2示出了装配有多个孔的装置的示例性实施例。孔200可以是安装板203中的凹部或窝。安装板203可由塑料、木材、金属、复合材料或其组合组成。另外,安装板203可由合成化合物或聚合物诸如聚硅氧烷组成。如所显示的,安装板203携带三个孔200,但本领域技术人员可以理解安装板203根据需要携带显著更多或更少的孔的能力。膜过滤器205可由Nafion膜或类似的膜制成,并且可以以任何角度设置,诸如如图2中显示的垂直放置,水平放置,根据需要以不同的角度放置。试剂部分201可填充有苯酚、2-苯基苯酚、其它酚试剂或其组合;漂白剂、次氯酸盐、氯胺T、类似的阴离子或其组合;氢氧化钠、氢氧化钾,或类似的碱性缓冲液,以维持碱性条件;和一种或多种催化剂,诸如硝普钠。样品部分202可填充有血清、血液、血浆或期望测试的类似材料。各个孔200可以相互连接以促进各部分之间的流体流动,以测试样品多次以进一步提高准确性,或利用多个不同的膜过滤器或试剂来测试样品。通常地,如果样品部分202含有足够的氨水平,则所述氨可扩散通过膜过滤器205并进入试剂部分202,这可使图3中描述的反应发生。

[0398] 图3显示了可在即时检测型高氨血症传感器(有时称为靛酚反应或贝特洛反应)中发生的示例性反应。反应300、330和360可在氨从孔的一个部分通过膜过滤器扩散至另一个部分后发生,如图1-2中描述的。阴离子302可以是次氯酸盐(如所显示的)、漂白剂、次氯酸钙、次氯酸钠或其它类似的阴离子。随后阴离子302可与氨301反应,产生氯胺303,或类似的氨衍生物。随后氯胺303可与另外的试剂,例如苯酚331反应。苯酚-氯胺中间体333可进一步与另外的苯酚331分子反应,产生可呈现明显蓝色的靛酚363。还可用2-苯基苯酚(以提高效率)、用其它酚试剂诸如水杨酸钠、用酚聚合物或用其组合替换苯酚331。孔或凹部的试剂部分中的颜色变化可证明氨在样品部分中的存在。

[0399] 图4显示了由微流体组成的测试装置的另外的示例性实施方案。微流体400可适合于以类似于血糖仪的方式用于家庭使用,以为氨血症、各种氨基酸代谢疾病提供持续的、快速的,可靠的测试,和其它类似的应用。装置401可由塑料、木材、金属、复合材料或其组合,或合成聚合物或化合物诸如硅氧烷制造。用户可使用刺血针从手指尖端或身体上其它位置

的排出少量血液，并在导管通道402的开口施用少量血液、血清、血浆或类似组分。样品可通过毛细管作用被运输通过导管通道402并到达样品部分403。可利用阳离子交换膜405诸如Nafion将样品部分403与试剂部分404分隔，由此允许氨扩散通过膜405，进入试剂部分404。在施用血液样品之前，可手动刺激或电刺激含有干燥或液体漂白剂、次氯酸盐、氯胺T或类似的阴离子的可挤压的贮存器406，从而允许漂白剂流入间插试剂部分404。可将所述漂白剂与试剂部分404中的试剂分开以确保准确和及时的化学反应。试剂部分404可含有图1-3中公开的试剂的液体或干燥成分，诸如苯酚、2-苯基苯酚、其它酚试剂或其组合；氢氧化钠、氢氧化钾或类似的碱性缓冲液，以保持碱性条件；并且还可含有一种或多种催化剂，诸如硝普钠。当样品中存在某一水平的铵时，所述试剂部分404可变成蓝色，可将所述蓝色与单独的或包含的颜色原理图相比较以待用户鉴定。

[0400] 仍然参照图4，可多次使用微流体400或可将其制造成单次使用的装置。此外，可用于测定样品中的氨基酸水平的设计和化学物质的范围进行改变。本领域技术人员也可理解装置或类似装置适应各种生物或非生物样品，诸如唾液、尿液、废水或待在实验室或医疗环境中使用的可能的各种化学物质的能力。

[0401] 除了确定适用样品中的氨的存在或水平的定性方法以外，还可公开定量装置、系统和方法。

[0402] 图5显示了可发生以准确而定量地确定样品中的氨的量并且与图6-7中公开的示例性装置和系统密切相关的事件的顺序的示例性流程图。此外，本领域技术人员还可理解，可将该方式或类似方式进行的定量分析添加至图1-4中公开的任何装置或系统中。

[0403] 因此，图5显示了用于定量即时检测型高氨血症传感器的步骤的示例性流程图。可以理解，这些步骤在时间顺序上是可互换的，可被显著改变，或消除，然而接受相似的结果。框501可以指任何尺寸的测试条，与血糖仪的测试条的尺寸相似。插入机理框501测试条可以是手动的或自动的。在插入装置后，框502可进一步揭示一系列可在程序控制下发生事件的起始。可手动或自动地打开漂白贮存器至装置内的试剂部分。试剂部分、样品部分或两者可含有靛酚反应所必需的试剂或用于诊断氨基酸代谢疾病或类似疾病和病况的试剂。框503可通过刺血针排出的方式进一步揭示血液样品的应用。血液样品可取代其它生物样品，随后可通过导管通道将其输送至通过阳离子交换膜诸如Nafion与试剂部分分隔的样品部分。框503还可起始程序控制下的微芯片，其可用作定时装置，从而允许各种步骤之间是连贯时序。该微芯片可指导光电二极管或光敏电阻以保持非活动状态持续所需的持续时间，以允许某些反应进行足够的一段时间。

[0404] 仍参照图5，框504可以进一步揭示氨或类似的化合物从样品部分至试剂部分以启动任何反应的扩散。在确定的一段时间后，所述试剂部分可在氨存在的情况下变蓝。着色的程度可取决于样品部分中的氨的量，这将允许进行精确的定量分析。框505可进一步揭示启动试剂部分附近的光电二极管或光敏电阻来测量着色程度。所述光电二极管或光敏电阻可基于着色改变系统的电流，从而框506可揭示将光电二极管或光敏电阻信号从模拟信号转换成数字信号的步骤。框507可以进一步揭示在程序控制下的数字信号至微芯片的接收。接收时，框507的微芯片可利用预定校准曲线，以使信号与准确的氨浓度值相关联，如进一步在框508中揭示的。框509可进一步揭示数据从微芯片至显示装置的传输，就用户的访问性而言所述显示装置可以物理地或无线地连接至微芯片。该方法可包括在额外的程序控制

下的较少或显著更多的微芯片和控制器的使用。其它微芯片可用于各种测试、显示机制、数据分析以及视觉和听觉美学。微芯片还可帮助示例性装置与家用计算机、蜂窝电话、电视或其它常用显示器和通信设备之间的通信。

[0405] 图6显示了用于进一步在图7中公开的电子装置的血液测试条的示例性实施方案。所述测试条在性质上可以是大的或小的,以用于实验室设置或个人家庭使用。导管通道601可以是待测试的样品的接收点。可将通过刺血针排出的血滴置于导管通道601的远端边缘,其中毛细作用可将样品输送至样品部分602中。样本部分602可被塑造成U形,以增加与阳离子交换膜604诸如N afion接触的表面积。在膜604的相对侧上,试剂部603可填充有通常用于靛酚或贝特洛反应的试剂。漂白剂或类似的阴离子,可以位于测试条上或电子设备内的分离的贮存器中以便确保某些试剂的反应性。

[0406] 图7显示了在程序控制下的测试装置和用于呈现定量分析的显示装置的示例性实施方案。可将血液测试条701,诸如在图6中公开的测试条插入位于测试装置700上的端口或孔,并且可将血滴702分配至位于血液测试条701远端上的导管中。在插入后,注射机械装置770可自动地或手动地将漂白剂或类似的阴离子添加至反应部分703。可将漂白剂、氯胺T或类似的干的或液体的阴离子存储在贮存器775中,并且可根据需要再填充。光电二极管或光敏电阻771可保持非活动状态持续预定的一段时间,直至微芯片773内的填充传感器指导光电二极管或光敏电阻产生对应于试剂部分703的着色的信号。光电二极管或光敏电阻771随后可改变系统(具有或不具有仪器放大器的装置)的电流或电压并且发射被发送至模数转换器772的信号。在转换为数字信号后,该信号可被发送至微芯片773以用于分析和进一步的程序控制。微芯片773可计算信号和通过预编程的校准曲线等同于样品部分702内的铵或特定氨基酸的浓度。微芯片773随后可将数据和信息发送至显示装置774以方便用户的可读性。可将显示装置774全部集成至测试装置700中,或可将其物理地或无线地连接至测试装置700。另外,测试装置700的替代实施方案可整合多个微芯片以用于进一步程序控制,并且可无线地或物理地连接至外部显示装置,诸如计算机、蜂窝电话、TV、LCD屏、打印机,或类似的显示和通信设备。测试装置700也可与医院或实验室的设备通信以便信息传送至用户的医生或医疗设施。

[0407] 图8显示Nafion的化学组成。其它类似的阳离子交换膜或全氟化离聚物膜也可互换使用。

[0408] 前述描述和附图举例说明本发明的原理、优选实施方案和操作模式。然而,本发明不应该被解释为局限于上述特定的实施方案或应用。本领域技术人员将理解上述实施方案的另外的变型、修改和应用。另外的变型和修改可包括,但不限于,各种不同的氨基酸,诸如苯丙氨酸、组氨酸、酪氨酸、谷氨酸、苏氨酸、丝氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、赖氨酸、精氨酸或其它氨基酸的检测。这些氨基酸的检测可包括将脱氢酶或其它解氨酶与血液、血清或血浆一起置于孔的样品部分中。用于检测氨基酸的存在的可能应用是诊断苯丙酮尿症或其它氨基酸代谢疾病或氨基酸血症。

[0409] 本文中公开的任何和所有的期刊论文、专利申请、公布的专利或其它引用的参考文献通过引用整体并入。

[0410] PCT申请第PCT/US2013/065548号。

[0411] 1.J.Zschocke, G.F.Hoffmann, *Vademecum Metabolicum* (Milupa Metabolics,

Friedrichsdorf,Germany,ed.3rd,2011) .

[0412] 2.B.C.Lanpher,A.L.Gropman,K.A.Chapman,U.Lichter-Konecki,M.L.Summar, Urea Cycle Disorders Overview (NCBI Bookshelf,2003) .

[0413] 3.M.L.Summar,S.Koelker,D.Freedenberg,C.Le Mons,J.Haberle,H.-S.Lee, B.Kirmse,The incidence of urea cycle disorders.,Mol.Genet.Metab.110,179-80 (2013) .

[0414] 4.R.H.Singh,Nutritional management of patients with urea cycle disorders.,J.Inherit.Metab.Dis.30,880-7 (2007) .

[0415] 5.M.Msall,Neurological Outcome in Children with Inborn Errors of Urea Synthesis.pdf,N Engl.J.Med.310,1500-1505 (1984) .

[0416] 6.A.L.Gropman,M.L.Batshaw,Cognitive outcome in urea cycle disorders., Mol.Genet.Metab.81 Suppl 1,S58-62 (2004) .

[0417] 7.M.L.Batshaw,S.Brusilow,L.Waber,W.Bлом,A.M.Brubakk,B.K.Burton, H.M.Cann,D.Kerr,P.Mamunes,R.Matalon,D.Myerberg,I.A.Schafer,Treatment of Inborn Errors of Urea Synthesis,N Engl.J.Med.306,1387-1392 (1982) .

[0418] 8.F.F.Poordad,Review article:the burden of hepatic encephalopathy., Aliment.Pharmacol.Ther.25 Suppl 1,3-9 (2007) .

[0419] 9.R.F.Butterworth,J.F.Giguere,J.Michaud,J.Lavoie,G.P.Layrargues, Ammonia:key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy,Neurochem Pathol 6,1-12 (1987) .

[0420] 10.R.F.Butterworth,Pathophysiology of hepatic encephalopathy:a new look at ammonia.,Metab.Brain Dis.17,221-7 (2002) .

[0421] 11.J.Stahl,Studies of the Blood Ammonia in Liver Disease, Ann.Intern.Med.58 (1963) .

[0422] 12.I.Eijgelshoven,S.Demirdas,T.A.Smith,J.M.T.van Loon,S.Latour, A.M.Bosch,The time consuming nature of phenylketonuria:A cross-sectional study investigating time burden and costs of phenylketonuria in the Netherlands,Mol.Genet.Metab.109,237-242 (2013) .

[0423] 13.P.V.D.Burg,H.W.Mook,A simple and rapid method for the determination of ammonia in blood,Clin.Chim.Acta 8,162-164 (1962) .

[0424] 14.Y.Murawaki,K.Tanimoto,C.Hirayama,Y.Ikuta,N.Watabe,A simple and rapid microdiffusion method for blood ammonia using a reflectance meter and a reagent plate, and its clinical evaluation for liver diseases.,Clin.Chim.Acta 144 (1984) .

[0425] 15.R.J.Barsotti,Measurement of ammonia in blood,J.Pediatr.138,S11-S20 (2001) .

[0426] 16.J.Buttery,R.Ratnaike,B.Chamberlain,The measurement of erythro-cyte ammonia using the Hyland ammonia kit,J Clin Chem Clin Biochem 20 (1982) .

[0427] 17.S.Dienst,An ion exchange method for plasma ammonia concentration,

J.Lab.Clin.Med.58 (1961) .

[0428] 18.J.Huizenga,C.Gips,Determination of blood ammonia using the Ammonia Checker,Ann Clin Biochem 20 (1983) .

[0429] 19.H.van Anken,M.Schiphorst,A kinetic determination of ammonia in plasma,Clin Chim Acta 56 (1974) .

[0430] 20.L.Rover Júnior,J.C.Fernandes,G.de Oliveira Neto,L.T.Kubota,E.Katekawa,S.H.Serrano,Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design.,Anal.Biochem.260,50-5 (1998) .

[0431] 21.M.Berthelot,B,Repert.Chim.Appl.,254 (1859) .

[0432] 22.E.D.Rhine,G.K.Sims,R.L.Mulvaney,E.J.Pratt,Improving the Berthelot Reaction for Determining Ammonium in Soil Extracts and Water,Soil Sci.Soc.Am.J.62 (1998) .

[0433] 23.T.T.Ngo,A.P.H.Phan,C.F.Yam,H.M.Lenhoff,Interference in Determination of Ammonia with the Hypoehlorite-Alkali Phenol Method of Berthelot,,46-49 (1981) .

[0434] 前述描述和附图举例说明本公开的原理、优选实施方案和操作模式。然而,本公开不应该被解释为局限于上述特定的实施方案或应用程序。本领域技术人员将理解上述实施方案的另外的变型、修改和应用。另外的变型和修改可包括,但不限于,各种不同的氨基酸,诸如苯丙氨酸、组氨酸、酪氨酸、谷氨酸、苏氨酸、丝氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、赖氨酸、精氨酸或其它氨基酸的检测。这些氨基酸的检测可包括将脱氢酶或其它解氨酶与血液、血清或血浆一起置于孔的样品部分中。用于检测氨或铵离子的存在的可能应用是诊断苯丙酮尿症或其它氨基酸代谢疾病。

[0435] 因此,上述实施方案应当被视为说明性的而不是限制性的。因此,应理解的是那些实施方案的变型可由本领域技术人员在不背离由以下权利要求定义的本公开的范围的情况下产生。

## 实施例

[0436] 实施例1

[0437] 所提出的工作表明先前已知的技术的系统调查如何产生有效的血氨传感器的制造。与多电解质膜串联的靛酚反应被探究为定量全血中的氨的浓度的装置。

[0438] 使用一系列0至750 $\mu$ M的1X磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的氯化铵产生氨-靛酚标准曲线。将以下浓度用于靛酚反应:59mM于乙醇中的2-苯基苯酚、7 $\mu$ M于水中的硝普钠、500mM于水中的氢氧化钠、0.2-0.25%的含次氯酸盐。将这些浓度以1:1:1:0.5的比率与等体积的目标铵溶液混合,并使其在室温下反应10分钟。在635nm的波长下测量所得溶液的吸光度。

[0439] 实施例2

[0440] 稳定性研究

[0441] 调查靛酚反应中使用的试剂的长期稳定性。将次氯酸盐、硝普钠、氢氧化钠的水溶液和2-苯基苯酚的乙醇溶液储存在单独的50mL falcon管中,有限地暴露于光。以3、5、7、

15、21、28、35、50、75和100天的间隔,使用0-750 $\mu$ M范围内的氨浓度,将次氯酸盐、硝普钠、氢氧化钠和2-苯基苯酚用于产生标准曲线。与原始标准曲线的显著偏差指示所储存的试剂的降解。应当注意的是,在每一个测试间隔使用新鲜氨样品。

[0442] 对氨基酸的响应

[0443] 伯胺还可经历靛酚反应。血液中的总氨基酸浓度可高达2.5mM,因此在靛酚反应中测定2-苯基苯酚的选择性。在1X PBS中制备21种氨基酸的每一种的1mM的溶液。将与用于氨标准曲线的靛酚试剂一起使用的相同方案用于每一种氨基酸溶液。在将靛酚试剂和氨基酸溶液混合后10分钟,使用板读数器测量其在635nm的吸光度。直接将响应与从1mM氯化铵溶液看到的反应相比较,并将其表示为铵响应的百分比。

[0444] 传感器的设计

[0445] 在一部分中含有血液并且在另一部分中含有浓缩的碱溶液的二分孔可提供用于全血的阳离子交换发生的装置,从而产生铵的高回收。作为可重复使用的和模块化的孔的计算机辅助设计是3D打印。如在图11看到的,从丙烯腈-丁二烯-苯乙烯热塑性塑料3D打印两个模块化片。用膜在中间将所述片扣合在一起,形成Nafion二分的孔。该设计被选择用来为牵涉该传感机械装置的所有将来的实验提供了统一平台。将1/64"厚度的硅酮密封材料胶粘至每一个半孔中的内表面,以确保水密封。随后向孔中回充聚二甲基硅氧烷,以改善其机械性能。

[0446] 图11显示围绕Nafion扣合在一起以形成用于传感实验的二分孔的3D打印模块件的照片。

[0447] 对磷酸缓冲盐和全血中的氨的传感器响应

[0448] 3D打印孔用1cm<sup>2</sup>的Nafion膜片构建。在孔的一个二分部分中,添加一系列0-500 $\mu$ M浓度的1X PBS中的氯化铵。在相对的二分部分中,添加1M的碱溶液。使铵的离子交换发生20分钟。随后萃取现含有氨的碱溶液,并将其用于靛酚反应。10分钟后,使用微量板读数器在635nm测量所得的靛酚反应的吸光度。

[0449] 使用氯化铵掺入人全血以产生25、50、75、100、150、200、250、300、400和500 $\mu$ M氨浓度。利用Siemens RXL测定所得的全血的真实氨浓度来验证产生掺有氨的血液的这种方法。将掺有氨的全血吸移至与在1X PBS中的氨的情况下使用的方案相同的方案中的传感器中。在孔的一个部分中,添加掺有氨的血液。在其它部分中是浓的碱溶液。20分钟后,离子交换已发生并氨被萃取至碱溶液中。随后将所述含氨碱溶液与次氯酸盐、氢氧化钠、硝普钠和2-苯基苯酚混合。10分钟后在635nm处测量所得的靛酚反应的吸光度。

[0450] 次卤酸盐浓度对针对血氨的靛酚响应的作用

[0451] 为了减少来自血液的中的还原种类的干扰,在利用从绵羊全血萃取的氨的靛酚反应中使用比常规使用的浓度更高的次氯酸盐浓度。使用1、2、3、5和10X的浓度的次氯酸盐,并且记录635nm处的所得吸光度。

[0452] 氨-靛酚标准曲线

[0453] 图12. 靛酚反应产生线性曲线,氯化铵的浓度在0-750 $\mu$ M范围内,COD为0.9939。

[0454] 针对其定量的下限 (LLoQ)、分辨率、范围和响应时间初步评估靛酚反应的效率。对所利用的试剂进行优化,以产生图12中显示的来自25-1000 $\mu$ M氯化铵的响应。记录25 $\mu$ M的LLoQ,平均误差为~15%,因此传感器在浓度方面的分辨率在较低的铵浓度上较高。

[0455] 稳定性研究

[0456] 使用靛酚反应测定氨浓度的一个主要有利方面是,其不需要容易发生稳定性问题的任何生物组分,诸如酶。在100天的过程中检查用于靛酚反应的溶液的保存期限。当混合在一起时,靛酚反应的组分不稳定,有可能归因于次氯酸盐和偶联剂硝普钠的反应性。对氯化铵的浓度范围的响应稳定长达50天。如在图13中看到的,直至第75天,25、150和500 $\mu$ M氯化铵的响应才显著改变。

[0457] 图13将用于靛酚反应的试剂在室温下储存,并将其用于以规则的时间间隔,持续100天来产生氨标准曲线。对500 $\mu$ M氨的响应在第75天开始下降。靛酚反应的试剂在室温下稳定长达50天,随后其对不同氨浓度的响应开始下降。

[0458] 对氨基酸的响应

[0459] 靛酚反应的机制也适用于其它含伯胺的化合物。对于全血应用,由于小的含胺分子诸如氨基酸(当测量血氨时其可引起干扰)的存在,这是有问题的。用于靛酚反应的酚类化合物2-苯基苯酚,被认为因大的苯基对反应增加了一定程度的空间位阻而引入某种形式的选择性。利用大阵列的不同氨基酸测试所述反应的选择性。由于对氨基酸的响应是如此之低,以至于将500 $\mu$ M的浓度用于氨和1mM的浓度用于氨基酸。将氨用作100%来标准化针对氨基酸记录的吸光度值。图14中的雷达图显示了每一种氨基酸的响应,其中最高的是苏氨酸,其仅为氨响应的7%。

[0460] 图14使用靛酚反应测试1mM浓度的21种氨基酸中的每一种。将靛酚反应后每一种氨基酸的635nm处测量的吸光度计算为来自利用1mM氯化铵的靛酚反应的响应的百分比。雷达图显示与氯化铵相比较的百分比响应。最高的响应为苏氨酸,其产生仅为7%的氨的响应的吸光度值。

[0461] 全血的阳离子交换

[0462] 靛酚反应的另一个主要干扰源是蛋白质。少量蛋白质可完全阻止反应进行。为了将铵与全血快速分离同时排除任何蛋白质,使用Nafion(一种阳离子交换膜)。Nafion先前已应用于生物传感器,但几乎完全用于保护电化学传感器中的电极。在该情况下,将Nafion作为阳离子交换膜而非Teflon的纳米孔形式来操作,如在电化学传感器中使用的。Nafion是氟化离聚物的嵌段共聚物。当通常在热压下从溶液铸成薄膜时,离聚物区块聚集成被氟聚合物的基质包围的砜的长距离孔。所述孔因磺酸基团而带有高度的负电荷,并且尺寸通常为1-4nm。这些孔允许含羟基分子和阳离子通过Nafion的迅速扩散,同时抑制阴离子和完全阻止大分子。这将允许氨的迅速扩散,同时减少氨基酸的扩散和完全消除蛋白质通过并阻止靛酚反应。

[0463] 通过使用Nafion进行的铵的离子交换是回收分析物的主要机制。铵也将被动地穿膜扩散,但以对于有益的即时检测型传感器是不充足的速率进行。测试具有不同离子强度的碱溶液在与来自PBS溶液的铵的交换中的效率。预期,较高浓度的盐将产生较大的氨回收率。利用Nafion膜制备二分孔。将500mM的PBS中的氯化铵溶液置于二分孔的‘分析物’侧上,并将浓缩的含碱性水溶液置于相对的二分部分中。蒸馏水导致10%的回收率,在对照情况下,而浓缩的含水碱导致75%的铵的回收率。碱溶液中的铵的较大浓度表示离子交换机制发生,因为如果机制仅仅是被动扩散,浓度将相等。

[0464] 传感器对PBS中的氨的响应

[0465] 在引入如全血一样复杂的环境中之前,最初用PBS中的氯化铵溶液挑战传感器。分析在0-500 $\mu$ M的范围内的浓度。在健康成人中,氨的水平通常为50-80 $\mu$ M,然而大于100 $\mu$ M的浓度值得怀疑。这些数字是新生儿中较高,在该情况下低于110 $\mu$ M是正常的,高达180 $\mu$ M可归因于其它疾病,高于200 $\mu$ M令人担忧。在严重的情况下,氨水平可以高达500 $\mu$ M(1)。

[0466] 图15构成的传感器对一系列1X PBS中的氨浓度的响应。COD为0.9758,其中n=5个样品。

[0467] 所述传感器可靠地在20分钟内萃取氨。随后使用靛酚反应测试所述萃取液,并使用板读数器在635nm处测量吸光度来分析显色。所述方法生产图15中看到的标准曲线。用于在PBS中检测的COD为0.97,误差为5-15%。在0-100mM的范围内,存在~30 $\mu$ M的铵的分辨率。所述传感器在PBS中的氨水平的整个临床相关范围内是有效的。

[0468] 初始传感器对全血中的氨的响应

[0469] 血液的初步研究在氨浓度与吸光度之间产生非线性关系。响应在500mM的血氨浓度上是有限的,吸光度为0.35。这些响应相较于PBS中的氨的相同浓度显著减少。这表明,氨是穿过Nafion膜的扩散被抑制或来自血液的小分子干扰靛酚反应。靛酚反应的负干扰还可因某些小分子的存在而发生。先前已报导,高浓度的胺、硫醇和还原剂将中断靛酚反应,其全都存在于血液(23)。还原剂将容易地与次氯酸盐、氧化剂发生反应,有效地中止靛酚反应。为了确定是否是这种情况,将来自羊全血的氨萃取物暴露于改进的靛酚反应(使用比常规使用的更浓的2、3、5和10X的次氯酸盐)。如在图17中所看到的,将次氯酸盐的浓度升高至高达3X提高了反应对从全血萃取的氨的响应。在5和10X浓次氯酸盐上,对氨的反应响应开始下降,这表明3X次氯酸盐最适合于用于减少通过血液中发现的还原剂引入的干扰。

[0470] 改进的传感器对全血中的氨的响应

[0471] 结合基于Nafion的分离技术检测3X次氯酸盐-改进的靛酚反应的在区分在25至500 $\mu$ M(代表健康至患病水平)范围内的血氨浓度中的效率。所得的标准曲线(于图18中)展示了在此范围内的响应。靛酚反应后血氨浓度与于635nm处的所得的吸光度之间存在显著相关性,COD为0.9573。

[0472] 图18.再次使用二分孔传感器来萃取人全血中的氨。利用3X次氯酸盐-改进的靛酚反应测试所萃取的氨溶液,并在635nm处测量吸光度。在0-500 $\mu$ M的范围内,COD为0.9573,其中n=5个样品。

[0473] 在其中高分辨率测量对于检查治疗效果是至关重要的25-150 $\mu$ M的范围内,COD为0.9777,如图19中看到的。该范围内的误差为~10%,给出15 $\mu$ M的初步分辨率。10%的百分比的相对标准偏差落在用于验证生物分析法的FDA指导下,所述生物分析法要求在n=5个样品时,15%的相对标准偏差。LLoQ,25 $\mu$ M高于0.04483+/-0.00117的吸光度的平均本底读数至少3 $\sigma$ 。另外,所述传感器可以可靠地区分50 $\mu$ M与100 $\mu$ M血氨,p=0.0001。

[0474] 图19描绘传感器对范围在0-150 $\mu$ M内的血氨浓度的响应。相对标准偏差为~10%,COD为0.9777,n=5个样本。

[0475] 用于评估血氨水平的调查生物分析法显示血氨与传感器应答之间的高度相关性。在约25至约150mM的范围内时,所述相对标准偏差为约10%。所述传感器具有约20分钟的响应时间,并且来自其它小分子的干扰大大降低。所使用的组分在室温下稳定达到50天,并很廉价。

[0476] 还将使用以下实验设计进行所述生物传感器的功能验证。苯丙氨酸传感器的效率评估需要构建3个利用由海藻酸盐、CaCl<sub>2</sub>、甲苯胺蓝、苯丙氨酸脱氢酶和NAD(P)<sup>+</sup>组成的海藻酸盐水凝胶改进的碳电极。所述水凝胶将用作过滤器,以防止来自全血中的小分子和蛋白质的干扰。最初,利用范围在约35μM至约2000μM内的苯丙氨酸浓度测试32个全血样品。具体地,在酶电极上测试以下Phe浓度:35μM、100μM、250μM、500μM、1000μM、1250μM、1500μM、2000μM。在本实验中,35μM将代表生理上正常的浓度,并且每一个高于100μM的其它浓度将代表各种不同的患病浓度。这些浓度将通过掺杂低于35μM的浓度的全血中来产生。另外,测试受试者样品以确保传感器运行而无针对患者全血形成未预料到的异常的问题。通过使用高效液相色谱(HPLC)验证所有苯丙氨酸浓度,所述液相色谱是测定血液中的丙氨酸水平的金标准。样品将不需要预处理。使用肝素钠真空管采集血液,随后用在未改性的外侧用较高的苯丙氨酸浓度掺杂血液。预期的检测限为35μM(对于35–2000μM的范围),分辨率为20μM。将进行统计评价来评估浓度测量的可靠性。将使用ANOVA单因素分析来分析浓度测量,以显示组之间的差异(假定数据正态分布)。对置信区间进行评估,并显示方法的灵敏度和再现性。具有95%( $p<0.05$ )或更高的置信度的范围在正常生理状况至患病状况内的浓度测量将被视为统计学显著的。患病浓度水平和健康的生理浓度水平之间的统计学差异将首先被证实。随后的实验将用于在整个范围内验证离散浓度值的定量。

[0477] 实施例3

[0478] 利用模块孔板测量全血中的氨

[0479] 材料

[0480] 2-苯基苯酚、硝普钠、氢氧化钠、次氯酸钠、醋酸钠和氯化铵均购自Sigma-Aldrich。Nafion 111购自Ion-Power。1/64"的具有粘连衬背的硅酮密封垫购自McMaster-Carr,丙烯腈丁二烯苯乙烯树脂。

[0481] 方法

[0482] 样品的制备

[0483] • 制备59mM于乙醇中的2-苯基苯酚、7μM于水中的硝普钠、500mM于水中的氢氧化钠和0.6–0.75%于水中的次氯酸钠的储备液。

[0484] • 制备1M于水中的醋酸钠的储备液。

[0485] • 基于图210中看到的模型使用丙烯腈丁二烯苯乙烯从熔化沉积成型产生3D打印孔。

[0486] • 将一层1/64"硅酮贴附于图21中的阴影显示的孔的区域。

[0487] • 从塑料衬背取出25μm厚的Nafion 111并切成1.5X1.5cm的方块。

[0488] 氨的交换

[0489] • 将两个模块化3D打印部件围绕Nafion方块之一扣合在一起,产生二分孔。最终的构型示于图22中。

[0490] • 将45μl的醋酸钠溶液吸移至孔的部分B中。

[0491] • 将100μM的含氨样品(全血)吸移至所述孔的部分A中。

[0492] • 等待20分钟以使离子交换发生。

[0493] 数据的收集

[0494] • 将35μl的醋酸钠/氨溶液从部分B吸移至384孔板中。

- [0495] • 将各自10 $\mu$ l的2-苯基苯酚、硝普钠和氢氧化钠储备液吸移至与醋酸钠相同的孔中。
- [0496] • 将5微升的次氯酸钠溶液添加至孔中并通过移液器充分混合。
- [0497] • 等待10分钟中以使靛酚反应进行。
- [0498] • 使用384板读数器在635nm测量孔的吸光度。
- [0499] • 将所测量的吸光度与标准曲线相比较以测定未知的氨浓度。
- [0500] 图20孔板的前面的CAD草图。
- [0501] 图21显示应当将粘性硅酮附接于其的孔板的区域(黑色区域)的CAD草图。
- [0502] 图22围绕Nafion扣合在一起以将孔分成两个部分的3D打印模块片的照片。
- [0503] 图23 3D打印孔的工程草图。
- [0504] 实施例4
- [0505] 利用射流装置测量全血中的氨
- [0506] 材料
- [0507] 2-苯基苯酚、硝普钠、氢氧化钠、次氯酸钠、醋酸钠和氯化铵购自Sigma-Aldrich。Nafion 111购自Ion-Power。
- [0508] 方法
- [0509] 样品的制备
- [0510] • 制备59mM于乙醇中的2-苯基苯酚、7 $\mu$ M于水中的硝普钠、500mM于水中的氢氧化钠和0.75%的水中的次氯酸钠的储备液。
- [0511] • 制备1M于水中的醋酸钠的储备液。
- [0512] • 从3D打印机产生用于装置的2个单独的部件的模具。
- [0513] • 用PDMS合成橡胶充填每一个模具,将其在60°C加热1小时。
- [0514] • 利用刮刀从模具取出装置的每一侧。
- [0515] • 从塑料衬背取出25 $\mu$ m厚的Nafion 111,将其切成1.5X1.5cm的方块。
- [0516] • 使用PDMS将Nafion方块粘附在通道6中的孔的上方。
- [0517] • 使用PDMS将装置的顶部部件粘附于底部部件,确保通道6与通道5成一直线。
- [0518] • 将装置加热至60°C,持续1小时。
- [0519] 氨的交换
- [0520] • 将针插入至装置的底部进入孔6,并填充40 $\mu$ l的血液。
- [0521] • 分别用5 $\mu$ l 2-苯基苯酚、硝普钠、氢氧化钠和次氯酸钠填充通道1-4。
- [0522] • 用20 $\mu$ l的醋酸钠溶液充填通道5。
- [0523] • 等待20分钟,以使离子交换发生。
- [0524] 数据的收集
- [0525] • 将1mm/秒的流速用于通道1至5,持续24秒。
- [0526] • 等待10分钟中,以便靛酚反应进行。
- [0527] • 将装置插入至定制的光电-分光计以获得吸光度数据。
- [0528] • 将所测量的吸光度与标准曲线相比较以测定未知的氨浓度。
- [0529] 描绘基于氨水平检测氨基酸的方法的实施方案描绘于图29中。在如图29的左手侧上所描述的添加血液后,通过在右手侧上描绘的装置的左孔中与氨与靛酚试剂的反应的颜

色变化来可视化氨水平。左孔比在左手侧上描绘的装置中(在靛酚反应发生之前)的左孔灰度更深(蓝色的指示)。

[0530] 实施例5

[0531] 利用模块化孔板通过使用产氨酶检测全血中的氨基酸

[0532] 脱氢酶和解氨酶通常通过切除伯胺从而产生氨来影响氨基酸。通过使用本文中描述的氨检测模块化孔板系统,随后可将通过产生的颜色变化测量的产生的氨与给定的氨基酸的浓度相关联。该实施例使用苯丙氨酸解氨酶测试苯丙氨酸的存在,尽管可通过使用表5中所列的合适的酶测试其它氨基酸。

[0533] 表5

苯丙氨酸	组氨酸	酪氨酸	谷氨酸	苏氨酸	丝氨酸
苯丙氨酸 解氨酶、 苯丙氨酸 脱氢酶	组氨酸 解氨酶	酪氨酸 解氨酶	谷氨酸 脱氢酶	苏氨酸解 氨酶、苏氨 酸脱氢酶	丝氨酸 解氨酶、 丝氨酸 脱氢酶
亮氨酸	异亮氨酸	天冬氨酸	缬氨酸	甘氨酸	丙氨酸
亮氨酸脱 氢酶	异亮氨酸 脱氢酶	天冬氨酸 解氨	缬氨酸 脱氢酶	甘氨酸脱 氢酶	丙氨酸 脱氢酶

	酶	酶、 天冬氨酸 脱氢酶			
色氨酸	脯氨酸	赖氨酸	精氨酸		
色氨酸脱 氢酶	脯氨酸 脱氢酶	赖氨酸 脱氢酶	精氨酸 脱氢酶		

[0536] 材料

[0537] 2-苯基苯酚、硝普钠、氢氧化钠、次氯酸钠、醋酸钠和氯化铵购自Sigma-Aldrich。Nafion 111购自Ion-Power。1/64”的具有粘连衬背的硅酮密封垫购自McMaster-Carr,丙烯腈苯乙烯树脂、苯丙氨酸解氨酶、来自褐藻(任选的)的海藻酸钠、磷酸缓冲盐溶液(任选的)、0.1M CaCl<sub>2</sub>溶液(任选的)。

[0538] 方法

[0539] 样品的制备

[0540] • 制备59mM于乙醇中的2-苯基苯酚、7μM于水中的硝普钠、500mM于水中的氢氧化钠和0.6-0.75%的水中的次氯酸钠的储备液。

[0541] • 在水中制备1M醋酸钠的储备液。

[0542] • 基于图210中看到的模型使用丙烯腈丁二烯苯乙烯,从熔化沉积成型产生3D打印孔。

[0543] • 将一层1/64"硅酮粘附于图21中阴影显示的孔的区域。

[0544] • 从塑料衬背取出25 $\mu$ m厚的Nafion 111，并将其切成1.5X1.5cm的方块。

[0545] 可以以两种方式将酶添加至含氨基酸样品(全血)中。通过将酶直接添加至样品，通过将酶固定在置于样品孔内的凝胶中，引入更大的酶稳定性。

[0546] 利用游离酶的氨交换(选择1)

[0547] • 将两个模块化3D打印部件围绕Nafion方块之一扣合在一起，产生二分孔。最终的构型示于图22中。

[0548] • 将45 $\mu$ l的醋酸钠溶液吸移至孔的部分B中。

[0549] • 将100 $\mu$ M的含氨基酸样品(全血)吸移至所述孔的部分A中。

[0550] • 将40个单位的苯丙氨酸解氨酶添加至样品中。

[0551] • 等待20分钟以使离子交换发生。

[0552] 利用凝胶固定化酶的氨交换(选择2)

[0553] • 将两个模块化3D打印部件围绕Nafion方块之一扣合在一起，产生二分孔。最终的构型示于图22中。

[0554] • 在1mL 1x磷酸缓冲盐溶液中制备具有40个单位的苯丙氨酸解氨酶和1%重量/体积的来自褐藻的海藻酸钠的预凝胶溶液

[0555] • 将10 $\mu$ L的预凝胶溶液置于孔的部分A(其中将通过全血)中。

[0556] • 使用Badger 200N喷枪以7.5psi将孔中的预凝胶溶液和0.1M CaCl<sub>2</sub>溶液进行喷雾，持续1秒，沉积~5 $\mu$ L的CaCl<sub>2</sub>溶液。在潮湿环境中使凝胶固化30分钟。

[0557] • 将45 $\mu$ l的醋酸钠溶液吸移至孔的B部分。

[0558] • 将100 $\mu$ M的含氨基酸样品(全血)吸移至所述孔的部分A中。

[0559] • 等待20分钟以使离子交换发生。

[0560] 数据的收集

[0561] • 将35 $\mu$ l的醋酸钠/氨溶液从部分B吸移至384孔板中。

[0562] • 将各自10 $\mu$ l的2-苯基苯酚、硝普钠和氢氧化钠储备液吸移至与醋酸钠相同的孔中。

[0563] • 将5微升的次氯酸钠溶液添加至孔中并通过移液器充分混合。

[0564] • 等待10分钟中以使靛酚反应进行。

[0565] • 使用384板读数器在635nm处测量孔的吸光度。

[0566] • 将所测量的吸光度与标准曲线相比较以测定未知的氨浓度。

[0567] 实施例6

[0568] 利用射流装置通过使用产氨酶检测全血中的氨基酸

[0569] 脱氢酶和解氨酶通常通过切除伯胺从而产生氨来影响氨基酸。通过使用本文中描述的氨检测模块化孔板系统，随后可将通过产生的颜色变化测量的产生的氨与给定的氨基酸的浓度相关联。该实施例使用苯丙氨酸解氨酶测试苯丙氨酸的存在，尽管可通过使用表5中所列的合适的酶测试其它氨基酸。

[0570] 材料

[0571] 2-苯基苯酚、硝普钠、氢氧化钠、次氯酸钠、醋酸钠和氯化铵购自Sigma-Aldrich。Nafion 111购自Ion-Power，苯丙氨酸解氨酶、来自褐藻(任选的)的海藻酸钠、磷酸缓冲盐

溶液(任选的)、0.1M CaCl<sub>2</sub>溶液(任选的)。

[0572] 方法

[0573] 样品的制备

[0574] • 制备59mM于乙醇中的2-苯基苯酚、7μM于水中的硝普钠、500mM于水中的氢氧化钠和0.75%于水中的次氯酸钠的储备液。

[0575] • 制备1M于水中的醋酸钠的储备液。

[0576] • 从3D打印机产生用于装置的2个单独的部件的模具。

[0577] • 用PDMS合成橡胶充填每一个模具,将其在60°C加热1小时。

[0578] • 利用刮刀从模具取出装置的每一侧。

[0579] • 从塑料衬背取出25μm厚的Nafion 111,将其切成1.5X1.5cm的方块。

[0580] • 使用PDMS将Nafion方块粘附在通道6中的孔的上方。

[0581] • 使用PDMS将装置的顶部部件粘着至底部部件,确保通道6与通道5成一直线。

[0582] • 将装置加热到60°C持续1小时。

[0583] 可以以两种方式将酶添加至含氨基酸的样品(全血)中。通过将酶直接添加至样品,通过将酶固定在置于样品孔内的凝胶中,引入较大的酶稳定性。

[0584] 利用游离酶的氨交换(选择1)

[0585] • 将针插入至装置的底部进入孔6,并充入40μl的血液。

[0586] • 将40个单位的苯丙氨酸解氨酶添加至血液样品中。

[0587] • 分别用5μl的2-苯基苯酚、硝普钠、氢氧化钠和次氯酸钠填充通道1-4。

[0588] • 用20μl的醋酸钠溶液充填通道5

[0589] • 等待20分钟,以让离子交换发生。

[0590] 利用凝胶-固定化酶的氨的交换(选项2)

[0591] • 制备具有40个单位的苯丙氨酸解氨酶和1%重量/体积的来自褐藻的海藻酸钠(于1mL 1x磷酸盐缓冲盐中)的预凝胶溶液。

[0592] • 将10μL的预凝胶溶液置于孔的部分A中(其中将通过全血)。

[0593] • 使用Badger 200N喷枪以7.5psi将孔中的预凝胶溶液和0.1M CaCl<sub>2</sub>溶液喷雾,持续1秒,沉积~5μL的CaCl<sub>2</sub>溶液。在潮湿环境中使凝胶固化30分钟。

[0594] • 将针插入通过装置的底部直至孔6中,并填充40μl的血液。

[0595] • 向血液样品添加40个单位的苯丙氨酸解氨酶。

[0596] • 分别用5μl的2-苯基苯酚、硝普钠、氢氧化钠和次氯酸钠填充通道1-4。

[0597] • 用20μl的醋酸钠溶液充填通道5。

[0598] • 等待20分钟以使离子交换发生。

[0599] 数据的收集

[0600] • 将1mm/秒的流速用于通道1至5,持续24秒。

[0601] • 等待10分钟以使靛酚反应进行。

[0602] • 将装置插入定制的光电-分光计以获得吸光度数据。

[0603] • 将所测量的吸光度与标准曲线相比较以测定未知的氨浓度。

[0604] 等同物

[0605] 本领域技术人员将承认,或能够只使用常规实验确定本文中描述的本公开的特定

实施方案的等同物。本公开的范围不旨在限制于上述说明,而是如以下权利要求所示的:

## 序列表

<110> 马里兰大学派克分院(The University of Maryland, College Park)

儿童国家医疗中心(Children's National Medical Center)

O · B · 阿雅布(yyub, Omar Bilal)

A · M · 伯赫恩斯(Behrens, Adam Michael)

P · 科菲纳斯(Kofinas, Peter)

M · L · 萨默(Summar, Marshall Lynn)

J · M · 卡布里拉-卢克(Cabrera-Luque, Juan Manuel)

G · 坎宁安(Cunningham, Gary)

<120> 检测高氨血症的装置和使用此类装置的方法

<130> 140695.00702

<140> PCT/US14/53756

<141> 2014-09-02

<150> US 61/872,149

[0001] <151> 2013-08-30

<160> 24

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 378

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脱氢酶突变体 1

<400> 1

Met Asn Thr Val Thr Asn Gln Trp Lys Ala Val Asp Ile Phe Thr Gln

1

5

10

15

Ile Arg Asp His Glu Gln Val Val Phe Cys Asn Asp Lys Asn Thr Gly

20

25

30

Leu Lys Ala Ile Ile Ala Ile His Asp Thr Thr Leu Gly Pro Ala Leu

35 40 45

Gly Gly Cys Arg Met Tyr Pro Tyr Ala Thr Val Glu Asp Ala Leu Phe

50 55 60

Asp Val Leu Arg Leu Ser Lys Gly Met Thr Tyr Lys Cys Leu Ala Ala

65 70 75 80

Asp Val Asp Phe Gly Gly Lys Ala Val Ile Ile Gly Asp Pro His

85 90 95

Lys Asp Lys Thr Pro Glu Leu Phe Arg Ala Phe Gly Gln Phe Val Glu

100 105 110

Ser Leu Asn Gly Arg Phe Tyr Thr Gly Thr Asp Met Gly Thr Thr Pro

[0002] 115 120 125

Asp Asp Phe Val His Ala Met Lys Glu Thr Asn Cys Ile Val Gly Val

130 135 140

Pro Glu Glu Tyr Gly Gly Ser Gly Asp Ser Ser Val Pro Thr Ala Leu

145 150 155 160

Gly Val Ile Tyr Gly Ile Gln Ala Thr Asn Lys Val Ile Trp Gly Ser

165 170 175

Asp Glu Leu His Gly Lys Thr Tyr Ala Ile Gln Gly Leu Gly Lys Val

180 185 190

Gly Arg Lys Val Ala Glu Arg Leu Leu Lys Glu Gly Ala Asp Leu Tyr

195 200 205

Val Cys Asp Ile His Pro Thr Ala Ile Glu Ala Ile Val Ser Tyr Ala  
 210 215 220

Lys Lys Leu Gly Ala Asn Val Lys Val Val Gln Gly Thr Glu Ile Tyr  
 225 230 235 240

Arg Thr Asp Ala Asp Ile Phe Val Pro Cys Ala Phe Gly Asn Val Val  
 245 250 255

Asn Asp Asn Thr Ile His Val Leu Lys Val Lys Ala Ile Val Gly Ser  
 260 265 270

Ala Asn Asn Gln Leu Leu Asp Val Arg His Gly Gln Leu Leu Lys Glu  
 275 280 285

[0003] Lys Gly Ile Leu Tyr Ala Pro Asp Tyr Ile Val Asn Ala Gly Gly Leu  
 290 295 300

Ile Gln Val Ala Asp Glu Leu Tyr Gly Leu Asn Lys Glu Arg Val Leu  
 305 310 315 320

Gln Lys Thr Lys Ala Ile Tyr Ser Thr Leu Leu His Ile Tyr Ser Arg  
 325 330 335

Ala Glu Ala Asp His Ile Thr Thr Ile Glu Ala Ala Asn Arg Phe Cys  
 340 345 350

Glu Glu Arg Leu Gln Gln Arg Ser Arg Arg Asn Asp Phe Phe Thr His  
 355 360 365

Arg Lys Gln Pro Lys Trp Asp Ile Arg Arg  
 370 375

<210> 2  
<211> 366  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 突变酶 2  
<400> 2

Met Arg Asp Val Phe Glu Met Met Asp Arg Tyr Gly His Glu Gln Val  
1 5 10 15

Ile Phe Cys Arg His Pro Gln Thr Gly Leu Lys Ala Ile Ile Ala Leu  
20 25 30

His Asn Thr Thr Ala Gly Pro Ala Leu Gly Gly Cys Arg Met Ile Pro  
35 40 45

[0004]  
Tyr Ala Ser Thr Asp Glu Ala Leu Glu Asp Val Leu Arg Leu Ser Lys  
50 55 60

Gly Met Thr Tyr Lys Cys Ser Leu Ala Asp Val Asp Phe Gly Gly  
65 70 75 80

Lys Met Val Ile Ile Gly Asp Pro Lys Lys Asp Lys Ser Pro Glu Leu  
85 90 95

Phe Arg Val Ile Gly Arg Phe Val Gly Gly Leu Asn Gly Arg Phe Tyr  
100 105 110

Thr Gly Thr Asp Met Gly Thr Asn Pro Glu Asp Phe Val His Ala Ala  
115 120 125

Arg Glu Ser Lys Ser Phe Ala Gly Leu Pro Lys Ser Tyr Gly Gly Lys  
130 135 140

Gly Asp Thr Ser Ile Pro Thr Ala Leu Gly Val Phe His Gly Met Arg  
 145 150 155 160

Ala Thr Ala Arg Phe Leu Trp Gly Thr Asp Gln Leu Lys Gly Arg Val  
 165 170 175

Val Ala Ile Gln Gly Val Gly Lys Val Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu  
 180 185 190

Leu Val Glu Val Gly Ala Tyr Cys Lys Ile Ala Asp Ile Asp Ser Val  
 195 200 205

Arg Cys Glu Gln Leu Lys Glu Lys Tyr Gly Asp Lys Val Gln Leu Val  
 210 215 220

[0005] Asp Val Asn Arg Ile His Lys Glu Ser Cys Asp Ile Phe Ser Pro Cys  
 225 230 235 240

Ala Lys Gly Gly Val Val Asn Asp Asp Thr Ile Asp Glu Phe Arg Cys  
 245 250 255

Leu Ala Ile Val Gly Ser Ala Asn Asn Gln Leu Val Glu Asp Arg His  
 260 265 270

Gly Ala Leu Leu Gln Lys Arg Ser Ile Cys Tyr Ala Pro Asp Tyr Leu  
 275 280 285

Val Asn Ala Gly Gly Leu Ile Gln Val Ala Asp Glu Leu Glu Gly Phe  
 290 295 300

His Glu Glu Arg Val Leu Ala Lys Thr Glu Ala Ile Tyr Asp Met Val  
 305 310 315 320

Leu Asp Ile Phe His Arg Ala Lys Asn Glu Asn Ile Thr Thr Cys Glu  
 325 330 335

Ala Ala Asp Arg Ile Val Met Glu Arg Leu Lys Lys Leu Thr Asp Ile  
 340 345 350

Arg Arg Ile Leu Leu Glu Asp Pro Arg Asn Ser Ala Arg Arg  
 355 360 365

<210> 3

<211> 1068

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 核酸编码酶 3

[0006] <400> 3  
 atgaaatct tcgaggaaat caaacggcgg ggacacgagc aaattctgtt caattatgat 60  
 cgggcttccg gtttcaaagc aattatcgcc attcacaata ctacgttggg gcccggcttg 120  
 ggcgggtgcc gaatgttacc gtatcaaacg gaagaggcgg ccctcgagga tgcgctgcgg 180  
 ttgcggaaag ggtgaccta taaagcggcc gccgcccggc tcgatttcgg cggggcaaa 240  
 acggtgatta tcgggatcc gatgaaagac aagtccgagg ccctgttgc tgcgctcggg 300  
 cgtttatcg agaccttgaa aggccgttac ctacggag aagacgtagg aaccaacgaa 360  
 gaagattttg tctgggctcg tcggaaacc cgttatgttgc tcggattgcc gcccgttat 420  
 ggcgggtccg gcgatacgg tgacaatacc gcgccggcgc tcattcaagc gatgcgcgc 480  
 gcgttgatgc accggtacgg ttgcggat ctccaggcc ggcggattgc cgtccaagg 540  
 ctgggcaaa taggctatca tggccgcga cggccatcg aggccggcgc tcgactgtt 600  
 gccggccata tcaatccgca tggatcggc cgagtggcgt ccgcttgggg gattgaagcc 660

accgatccgt gggctgtggt gaaaccccc tcgcataattt tcgccccctg tgcgttgggt	720
aacgtcatta cggaacggac cgttccggcc ctccaaatgtc aggtggtggc cggttggcc	780
aacaatcagc tggcggatga tcgactggcc gatgatttag ctgcccggg cattcttat	840
gcgcggatt ttatgcgaa tgccggcggg ttgattcagg tggcggatga aattcgggga	900
tatcatgaag aacgggtccg tcatcaaata gacgggattt atgacgtcct gctcgagatt	960
ttcggagg cggacgcctc cggccgatca accgtggcgg ttgcggtaga cgaggcgcgt	1020
cgcgttgg acaccattca ggccatccac cgccgtacg gatcatag	1068
<210> 4	
<211> 3939	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
[0007] <223> 核酸编码酶 4	
<400> 4	
ctgcaggtca acggatcata ttctacacat atataatgca ctccaattga cataatacat	60
aacgtgacat atgatacatt tattaatatt aattgtcaca ttacacttc acatattaaa	120
atactctcgat atgaatgcaa ttgaaacat attttaaatt aattgattga tatatattga	180
acaaaaccta acaaaaatgc acccttgg ttcacaaaga aacttcttc tatttctcac	240
ttatttctgc tagtgtctt cctattcaaa gccatcattt ccatcaacct tcacaatacc	300
atgtttaaaa agtcattaaa aatcaatttt ttaaatagaa aaaaacaaga agatggaaat	360
cacttggttg gtactatata tttagtttt aagtttgact cataccgtt attgaccat	420
ataaataaaa tcttattca aataaattca aaagtcaat aaatataat tcgttcataa	480
cttataataa aattgattat acatagtcc ccccaattca ctttactga tcaattttt	540
ctaaaatata ttattactt tacttggat ttttaataaa ttaagaaaat ataatactcc	600

cttcgtttt aaaaaaatac ctagttgac ttgaaacgga gttataaaa agaaagaaga	660	
cttgttaatc ttgtgattct aaattaaagt tatgtcaaat gtacccaaat gtccttaat	720	
cttgtggct taaacatgtc acatgaaaaa ttaaagtgtt tccaaaaaaa gaaaggggtc	780	
aatgtcattc tttttaaac agactaaaaa agaaataaac tcattttt tgaaacggag	840	
agagtaattt ttccacgtt ttactcatta atattaaata ttattctcta gatcatccta	900	
taagatctaa tagggacat caattaatac ctatgtcaact tattatttt ttaataattg	960	
tatcaagtca aataataaca agtaaaaatg gagtacctac tattaatctt caacaaccac	1020	
aatttactag tttttccta gcaacccct ctcacatatt tcaccattt ctgggtttt	1080	
cctagcaacc ccctctcaca tattttgtt accaaccatc atttgcctt ctatataac	1140	
tcaccacatg atagatacat atatatacca caaccaaaaac aaaagggttt ataagttcac	1200	
aacattttt atatacatac aaataaaactc taaccattt ctcttcacta aaatttctt	1260	
[0008]	attacaatc taacaattt ctgtatccaa tggcaccatc aattgcacaa aatggacata	1320
	ttaatggaga agtagctatg gatttgca agaaatcaat caatgtcca ttgaattggg	1380
	aaatggctgc tgatttttta agaggcagcc atttggatga agtggaaaag atgggtggatg	1440
	aatttagaaa gccaatttgaaacttggg gtgaaacttt gtcagttca caagttgcat	1500
	ccattgcaaa tggatgtac aaaagtaatg gggtaaagt ggaactttct gaaagtgcaa	1560
	gggctgggtgt gaaagctagt agtgattggg ttatggatag tatgagtaaa ggtacagata	1620
	gttatgggtgt tactgttggaa ttggagcaa catctcatag aagaacaaaa aatgggtgg	1680
	ctctcaaaa agaacttatt agttaaacaactatttttt ttcgttatatactacaacaa	1740
	tgttaaagaat ttaatattttttt ttcgttatatactacaacaa tggtaaaaaat ttaatattttt	1800
	tttgttatatactacaacaa tggtaaagaat ttaatattttttt ttcgttatatactacaacaa	1860
gactacttaa gtgctccatt gataaagatt tttttttttt tttacgcgaa ggggattcgg	1920	

atgaattcag taaaatgtg atcttaatga attatgatat tttttgtag gttcttgaat	1980	
gctggagttt ttggtaatgg aatagaatca tttcacacat tgccacattc agcaacaagg	2040	
gcagctatgc ttgttaggat caacactctg ctcaaggct actctggcat tagatttgag	2100	
atcttggaaag caatcactaa gttgatcaat agcaacatca ccccggttt gcctctccgt	2160	
ggcacgatca ctgectcggg tcatctcgcc cctttgtctt atattgtggg ttgtctact	2220	
ggcagaccta attccaaggc tggtggaccc aatggtgaga aacttaatgc tgaggaagct	2280	
ttctgcgtgg ctggatttag tggtgattt ttcgagttgc agcctaagga aggacttgc	2340	
cttgtgaatg gcacagcgt tggttctgtc atggcatcaa tagtctgtt tgagtccaaat	2400	
atcttgctg ttatgtctga agtttatca gcgatttttta ctgaagtgtat gaacggaaag	2460	
cccgaaattca ctgactattt gacacacaag ttgaagcatc accctggca gattgaggt	2520	
gctgcttta tggAACACAT ttggatgga agctctttagt tgaaggtagc tcagaagctc	2580	
[0009]	catgaaatgg atccctttca aaaaccaaag caagatcgat atgctctccg aacatctcca	2640
	caatggcttg gacctcagat tgaagtcatt cgtgctgcaa ctaagatgtat cgagagggag	2700
	attaactcag tgaacgacaa tccattgatc gatgttcaa gaaacaaggc cttacatgtt	2760
	ggcaacttcc aaggaacccc tattgggttc tccatggata atacaagatt ggcccttgc	2820
	tcaattggta aattgtatgtt tgcccaattc tcagagcttg tcaacgacta ttacaacaac	2880
	gggttgcatt ctaatctgac agcaggaagg aatccaagct tggactatgg tttcaagggc	2940
	gtgaaatcg cgatggcttc ttactgtctg gaacttcaat tcttggcaaa tccagtgact	3000
	aaccatgtct aaagtgtca gcaacacaac caagatgtatc attccttggg cttaaattca	3060
	gccagggaaa cagctaaggc tggatgatc ttgaagataa tgcataac ctatctgt	3120
	gcttttgc aagctattgtt ctacgacat ttggaggaaa acttgaagag tggtaag	3180
	aacacagttt gccaagttagc taagagaact ttgacaatgg gtgctaatgg tgaacttcat	3240

ccagcaagat tcagcgaaaa agaattgcct cgagtcgtgg atagagaata cttgtttgcc	3300
tatgctgatg atccctgcag ctccaactac cctttgatgc agaagctgag acaagtcctt	3360
gttgatcaag caatgaagaa tggtaaagt gagaagaatg tcaacagtc aatctccaa	3420
aagattggag ctttcgagga cgaattaatc gctgtgtgc ctaaagaagt tgagagtgt	3480
agagctgttt ttgaaagtgg caaccctta attcgtaca ggatcacaga atgcagatca	3540
tatccattgt acaggttggt gagagaagaa ctggAACAG aattgttgac gggtgaaaaa	3600
gttcgatcac ctggtgagga gattgataaa gtgttacag caaatgtaa tggacagatt	3660
attgatccat tggatggatgt tctgaagagc tggaatggtg ctcccttcc aatctgctaa	3720
atgtgttatt ctttcaagtt cttttttgtt accttttagt gaattactag aattataatg	3780
atgttatgaa cttatattaa aaaaaaatat ttttgactat aaaatttagt tttgttattg	3840
aaattaaagg ctcaatctgt gtttttcct tctgttatct gaatattata agaattcaag	3900
[0010]	
taatcttta gctttgtgaa catgtgaca tgctttctt	3939
<210> 5	
<211> 1521	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸序列编码酶 5	
<400> 5	
atgateacgc ttaccccccgg ccacctgacc ctcccgeaac tgcggccagat cgcgccgag	60
cccggtcagc tgacgtgga tccggccagc ttgcgcaaga tcgacgcccc cgccaaaggcc	120
gtgtccgaca tcgccccgaa gggcgagccg gcgtacggca tcaacacggg ctccgtcg	180
ctggccagca cgcatatccc gcacgatcag ctcgaattgc tgcagaagaa cctcgtcg	240
tcgcgtcgatc cggtgtcgatc ggcgttcgt cggtgcgtct gctgtcgatc	300

ctgaagctgt cgagcctcg cgccggccat tcggcattc gcccgaagt gatggacg	360
ctgatcaagc tttcaacgc cgacgtgctg ccgtgattc cggtgaaggg ctggcg	420
gcatcgccg acctcgccg gctcgccac atgtcgccg tgctgctcg cgtcgcc	480
gtttcattc gcccggcgc cgccggcgcg gtggacgggt tgccgtcgc gggctcg	540
ccgtgacgc tgcaggcgaa ggaaggcgc gcgctgctga acggtacgca ggcgtcg	600
gcgcgcgc tcgacaacct gttcgatgc gaagacctgt accgcacggc gtcgtcg	660
ggcgcgctgt cggcgatgc ggcggccgc tcggtaagc cggtcgacgc ggcac	720
gaactgcgcg gccatcgccg ccagatcgat gcccggccg cgtatcgca gctgtcg	780
ggctggcga tcaacctctc gcatcgac tgcggcaagg tgcaggatcc gtacagc	840
cgctgccagc cgcagggtat gggcgctgc ctggaccaga tgcgtcatgc ggccgac	900
[0011] ctgctcg aggcaacgc ggtatcgac aacccgtga tttccggaa taccggc	960
gtgtgtcg ggccaattt ccatcgccg cccgtcgat tcggccgc caacctcg	1020
ctcgccgtc cgaaatcg cgctggcc gaggatggcg gctgtactc gggcttc	1080
acgtgtcg gcctggcc gttctcgta aaggatggcg gctgtactc gggcttc	1140
attgcgcac tgacggcagc tgcgtcgca tcggagaaca agacgtcgc gcatccgg	1200
tcggtcatt cgctggcgc ctggcgaa caggaagacc acgtgtcgat ggcaacgt	1260
gccccacgca agctggccga catcgccac aacacgaac acatctcg gatcaact	1320
ctcgccggccg cgcaaggcgat cgtatcgat gagaacgaga cgagccgaa gtc	1380
gtgatgaaga cgatcgac caaggatcgat cattacgacg tcgaccacta ttgc	1440
gacatcgccg tgatcgaa gtcgtcgat gagcgccgt tcggaaagca ctggccgt	1500
gccttcgtat cggaggcgtat a	1521

<210> 6	
<211> 1533	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸序列编码酶 6	
<400> 6	
gtgacgcagg tcgtggaacg tcaggctgat cggctcagca gcagggagta cctggccgg	60
gtcgtgcgca gcgcgggtg ggacgcgggt ctcacctcg gcaccgacga ggagatcg	120
cggatggcgc cgagcgcgcg caccatcgag gagtacctga agtccgacaa gcccatctac	180
ggcctgacgc agggcttcgg tccgctgggt ctgttcgacgc ccgactcgga gctggagcag	240
ggcggctcgc tgcgtcgca cctggcacc ggccaggcgc cgccactggc cccggagg	300
tcgcggctga tcctctggct ggcgcattcag aacatgcgca aggggtactc ggccgtctcg	360
ccgggttct ggcagaagct cgccgacctg tggaacaagg ggttacccccc ggcgttccc	420
cgccacggca cggcagcgcg gagcggcgc ac tgcacccgc tggegcacgc cgccgtcg	480
ttcacccgtg tcggcgaggc gtggacccgg gacgcgcacgc gcccgtggc caccgtgc	540
gccgtggacgc cgctgcgcgc gctggggcg gagccgtcg actggccggt ggcgcaggc	600
ctggcggtcg tcaacgggac cggcgcgagc ctgcgggtgg ctgtgtcaa ccaccgg	660
gccctgcggc tggccgcgc ctgcggcgtg ctctccgcgc ggctggcgc ac cttgtgg	720
gccaatcccg agcactacga cgtggggcac ggtgcgcgc gcccgcagg cggcagctg	780
accgcggcgg agtggatccg gcaggggtcg ccccgccgca tggcgcgcga cggcagccgc	840
ccgctccagg agccgtacag cctgcgggtgc ggcgcgcagg tgctggcgc ggtgcgcac	900
cagctcgacgc ggcgggcga cgtgcggcg cgggaggctg acggctgcac ggacaacccg	960
atcacctacg agggcgagct gtcgcacggc ggcaacttcc acgcacatgc ggtgggttc	1020
gcctccgacc agatcggtt ggccatgcac atggccgcct acctggccga ggcgcagctg	1080

ggctcgctgg tcagcccggt gaccaacggc gacctgccgc ccatgctac cccgcgcgc	1140
ggcgcgggtg cgggctggc cgggtgcag atcagcgcga cctcggtcg ctgcggatc	1200
cggcagctgg tggtccccgc ctgcgtgacc accctgccga ccaacggctg gaaccaggac	1260
cacgtgccga tggcgtcaa cggggcgaac tcgggttgc aggcgttgg a gtcggctgg	1320
ctgacggctcg ggtcgctggc ggtggcgctc gcgcagctcg cggccatgac cggccacgcc	1380
gcggagggcg tctggccgga gctggccggg atctgcccgc cgctggacgc cgaccggcc	1440
ctggcgcccg aggtgcgcgc cgcgcgcgac ctgctgtccg cgcacgcgga ccaactgctc	1500
gtcgacgagg cagacggaa ggattcggta tga	1533

<210> 7

<211> 721

<212> PRT

[0013] <213> 番茄

<400> 7

Met Ala Ser Ser Ile Val Gln Asn Gly His Val Asn Gly Glu Ala Met

1 5 10 15

Asp Leu Cys Lys Lys Ser Ile Asn Val Asn Asp Pro Leu Asn Trp Glu

20 25 30

Met Ala Ala Glu Ser Leu Arg Gly Ser His Leu Asp Glu Val Lys Lys

35 40 45

Met Val Asp Glu Phe Arg Lys Pro Ile Val Lys Leu Gly Gly Glu Thr

50 55 60

Leu Thr Val Ala Gln Val Ala Ser Ile Ala Asn Val Asp Asn Lys Ser

65 70 75 80

Asn Gly Val Lys Val Glu Leu Ser Glu Ser Ala Arg Ala Gly Val Lys

85

90

95

Ala Ser Ser Asp Trp Val Met Asp Ser Met Gly Lys Gly Thr Asp Ser

100

105

110

Tyr Gly Val Thr Thr Gly Phe Gly Ala Thr Ser His Arg Arg Thr Lys

115

120

125

Asn Gly Gly Ala Leu Gln Lys Glu Leu Ile Arg Phe Leu Asn Ala Gly

130

135

140

Val Phe Gly Asn Gly Thr Glu Ser Ser His Thr Leu Pro His Ser Ala

145

150

155

160

[0014] Thr Arg Ala Ala Met Leu Val Arg Ile Asn Thr Leu Leu Gln Gly Tyr

165

170

175

Ser Gly Ile Arg Phe Glu Ile Leu Glu Ala Ile Thr Lys Leu Ile Asn

180

185

190

Ser Asn Ile Thr Pro Cys Leu Pro Leu Arg Gly Thr Ile Thr Ala Ser

195

200

205

Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr Ile Ala Gly Leu Leu Thr Gly Arg

210

215

220

Pro Asn Ser Lys Ala Val Gly Pro Asn Gly Glu Lys Leu Asn Ala Glu

225

230

235

240

Glu Ala Phe Arg Val Ala Gly Val Thr Ser Gly Phe Phe Glu Leu Gln

245

250

255

Pro Lys Glu Gly Leu Ala Leu Val Asn Gly Thr Ala Val Gly Ser Gly  
 260 265 270

Met Ala Ser Met Val Leu Phe Glu Ser Asn Ile Leu Ala Val Met Ser  
 275 280 285

Glu Val Leu Ser Ala Ile Phe Ala Glu Val Met Asn Gly Lys Pro Glu  
 290 295 300

Phe Thr Asp Tyr Leu Thr His Lys Leu Lys His His Pro Gly Gln Ile  
 305 310 315 320

Glu Ala Ala Ala Ile Met Glu His Ile Leu Asp Gly Ser Ser Tyr Val  
 325 330 335

[0015] Lys Ala Ala Gln Lys Leu His Glu Met Asp Pro Leu Gln Lys Pro Lys  
 340 345 350

Gln Asp Arg Tyr Ala Leu Arg Thr Ser Pro Gln Trp Leu Gly Pro Gln  
 355 360 365

Ile Glu Val Ile Arg Ala Ala Thr Lys Met Ile Glu Arg Glu Ile Asn  
 370 375 380

Ser Val Asn Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val Ser Arg Asn Lys Ala Leu  
 385 390 395 400

His Gly Gly Asn Phe Gln Gly Thr Pro Ile Gly Val Ser Met Asp Asn  
 405 410 415

Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Ile Gly Lys Leu Met Phe Ala Gln Phe  
 420 425 430

Ser Glu Leu Val Asn Asp Tyr Tyr Asn Asn Gly Leu Pro Ser Asn Leu  
 435 440 445

Thr Ala Gly Arg Asn Pro Ser Leu Asp Tyr Gly Leu Lys Gly Ala Glu  
 450 455 460

Ile Ala Met Ala Ser Tyr Cys Ser Glu Leu Gln Phe Leu Ala Asn Pro  
 465 470 475 480

Val Thr Asn His Val Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Gln Asp Val Asn  
 485 490 495

Ser Leu Gly Leu Ile Ser Ala Arg Lys Thr Ala Glu Ala Val Asp Ile  
 500 505 510

[0016] Leu Lys Leu Met Ser Ser Thr Tyr Leu Val Ala Leu Cys Gln Ala Ile  
 515 520 525

Asp Leu Arg His Leu Glu Glu Asn Leu Arg Ser Ala Val Lys Asn Thr  
 530 535 540

Val Ser Gln Val Ala Lys Arg Thr Leu Thr Met Gly Ala Asn Gly Glu  
 545 550 555 560

Leu His Pro Ala Arg Phe Cys Glu Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Asp  
 565 570 575

Arg Glu Tyr Val Phe Ala Tyr Ala Asp Asp Pro Cys Ser Ser Thr Tyr  
 580 585 590

Pro Leu Met Gln Lys Leu Arg Gln Val Leu Val Asp His Ala Met Lys  
 595 600 605

Asn Gly Glu Ser Glu Lys Asn Val Asn Ser Ser Ile Phe Gln Lys Ile

610 615 620

Val Ala Phe Glu Asp Glu Leu Lys Ala Val Leu Pro Lys Glu Val Glu

625 630 635 640

Ser Ala Arg Ala Val Val Glu Ser Gly Asn Pro Ala Ile Pro Asn Arg

645 650 655

Ile Thr Glu Cys Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Arg Leu Val Arg Gln Glu

660 665 670

Leu Gly Ser Glu Leu Leu Thr Gly Glu Lys Val Arg Ser Pro Gly Glu

675 680 685

Glu Ile Asp Lys Val Phe Thr Ala Met Cys Asn Gly Gln Ile Ile Asp

[0017] 690 695 700

Pro Leu Leu Glu Cys Leu Lys Ser Trp Asn Gly Ala Pro Leu Pro Ile

705 710 715 720

Cys

<210> 8

<211> 1101

<212> DNA

<213> 中间型嗜热放线菌

<400> 8

atgcgcgacg tgttgaaat gatggaccgc tatggccacg agcaggtcat ttttgccgt 60

catccgcaaa ccggctctcaa agcgatcatc gcctgcata atacaaccgc gggccggct 120

ttgggtggat gccgcatgat cccgtatgct tcgacggacg aagccttggaa ggtatgtttg 180

cggttgtcca aaggcatgac ctataaatgc agtctggcgg atgtggactt tggcggggga	240
aaaatggta tcatcgccga tccgaaaaaaaa gataaatgcg cggagttgt tcgcgtgatc	300
ggccgttttgcggccgtt aaacggccgtt ttctataccg gaaccgacat gggaaaccaat	360
ccggaagatt ttgtccatgc cgccagggaa tcgaaatctt ttgcggatt gccgaaatcg	420
tacggcggaa agggggacac atccattccc accgegctcg ggggtttca cggaatgcgg	480
gccaccgccc ggtttttatg ggggacggat cagctgaaag ggcgtgtgg tgccatccaa	540
ggagtccgca aggtgggaga ggcgtgttg cagctttgg tcgaagtggg ggcttactgc	600
aaaattgccg acatcgattc ggtgcgatgc gaacagctga aagaaaagta tggcgacaag	660
gtccaatttgg tggatgtgaa ccggattcac aaggagagtt gcgatattt ctgccttgc	720
cccaaaggcg gcgtggtcaa tcatgcacacc attgacgagt tccgtgcct ggccattgtc	780
ggatccgcca acaaccaact ggtggaaagac cggcatgggg cactgctca aaaacggagc	840
[0018] atttgttagt caccggattt tctggtaat gcccggggc tgattcaagt ggctgatgaa	900
ctggaaggct tccatgaaga gagagtgcgc gccaaaaccg aagcgatttgc tgacatggc	960
ctggatattt ttcaccgggc gaaaaatgag aatattacca cttgtgaggc agcggaccgg	1020
atcgtgatgg agcgttgaa aaagttacc gatattcgcc ggtatctttt ggaggatccc	1080
cgcaacagcg caaggaggta a	1101

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 352

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 腐生水果线虫

&lt;400&gt; 9

Met Asp Phe Lys Ala Lys Leu Leu Ala Glu Met Ala Lys Lys Arg Lys

1

5

10

15

Ala Val Ser Gly Leu Glu Val Lys Glu Gly Gly Ala Lys Phe Val Arg

20 25 30

Gly Ala Asp Leu Glu Ser Lys Arg Thr Gln Glu Tyr Glu Ala Lys Gln

35 40 45

Glu Glu Leu Ala Ile Lys Lys Arg Lys Ala Asp Asp Glu Ile Leu Gln

50 55 60

Glu Ser Thr Ser Arg Ala Lys Ile Val Pro Glu Val Pro Glu Ala Glu

65 70 75 80

Phe Asp Glu Lys Thr Pro Met Pro Glu Ile His Ala Arg Leu Arg Gln

85 90 95

[0019] Arg Gly Gln Pro Ile Leu Leu Phe Gly Glu Ser Glu Leu Ser Val Arg

100 105 110

Lys Arg Leu His Gln Leu Glu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Asn Glu Gly

115 120 125

Trp Glu Asn Glu Met Gln Thr Ala Met Lys Phe Ile Gly Lys Glu Met

130 135 140

Asp Lys Ala Val Val Glu Gly Thr Ala Asp Ser Ala Thr Arg His Asp

145 150 155 160

Ile Ala Leu Pro Gln Gly Tyr Glu Glu Asp Asn Trp Lys Ser Ile Glu

165 170 175

His Ala Ser Thr Leu Leu Gly Val Gly Asp Glu Met Lys Arg Asp Cys

180 185 190

Asp Ile Ile Leu Ser Ile Cys Arg Tyr Ile Leu Ala Arg Trp Ala Arg  
195 200 205

Asp Leu Asn Asp Arg Pro Leu Asp Val Lys Lys Thr Ala Gln Gly Met  
210 215 220

His Glu Ala Ala His His Lys Gln Thr Thr Met His Leu Lys Ser Leu  
225 230 235 240

Met Thr Ser Met Glu Lys Tyr Asn Val Asn Asn Asp Ile Arg His His  
245 250 255

Leu Ala Lys Ile Cys Arg Leu Leu Val Ile Glu Arg Asn Tyr Leu Glu  
260 265 270

Ala Asn Asn Ala Tyr Met Glu Met Ala Ile Gly Asn Ala Pro Trp Pro  
[0020] 275 280 285

Val Gly Val Thr Arg Ser Gly Ile His Gln Arg Pro Gly Ser Ala Lys  
290 295 300

Ala Tyr Val Ser Asn Ile Ala His Val Leu Asn Asp Glu Thr Gln Arg  
305 310 315 320

Lys Tyr Ile Gln Ala Phe Lys Arg Leu Met Thr Lys Leu Gln Glu Tyr  
325 330 335

Phe Pro Thr Asp Pro Ser Lys Ser Val Glu Phe Val Lys Lys Ser Val  
340 345 350

<210> 10  
<211> 411  
<212> PRT

<213> 拟南芥

<400> 10

Met Asn Ala Leu Ala Ala Thr Asn Arg Asn Phe Lys Leu Ala Ala Arg  
1 5 10 15

Leu Leu Gly Leu Asp Ser Lys Leu Glu Lys Ser Leu Leu Ile Pro Phe  
20 25 30

Arg Glu Ile Lys Val Glu Cys Thr Ile Pro Lys Asp Asp Gly Thr Leu  
35 40 45

Ala Ser Phe Val Gly Phe Arg Val Gln His Asp Asn Ala Arg Gly Pro  
50 55 60

[0021] Met Lys Gly Gly Ile Arg Tyr His Pro Glu Val Asp Pro Asp Glu Val  
65 70 75 80

Asn Ala Leu Ala Gln Leu Met Thr Trp Lys Thr Ala Val Ala Lys Ile  
85 90 95

Pro Tyr Gly Gly Ala Lys Gly Gly Ile Gly Cys Asp Pro Ser Lys Leu  
100 105 110

Ser Ile Ser Glu Leu Glu Arg Leu Thr Arg Val Phe Thr Gln Lys Ile  
115 120 125

His Asp Leu Ile Gly Ile His Thr Asp Val Pro Ala Pro Asp Met Gly  
130 135 140

Thr Gly Pro Gln Thr Met Ala Trp Ile Leu Asp Glu Tyr Ser Lys Phe  
145 150 155 160

His Gly Tyr Ser Pro Ala Val Val Thr Gly Lys Pro Ile Asp Leu Gly

165

170

175

Gly Ser Leu Gly Arg Asp Ala Ala Thr Gly Arg Gly Val Met Phe Gly

180

185

190

Thr Glu Ala Leu Leu Asn His Gly Lys Thr Ile Ser Gly Gln Arg

195

200

205

Phe Val Ile Gln Gly Phe Gly Asn Val Gly Ser Trp Ala Ala Lys Leu

210

215

220

Ile Ser Glu Lys Gly Gly Lys Ile Val Ala Val Ser Asp Ile Thr Gly

225

230

235

240

[0022] Ala Ile Lys Asn Lys Asp Gly Ile Asp Ile Pro Ala Leu Leu Lys His

245

250

255

Thr Lys Glu His Arg Gly Val Lys Gly Phe Asp Gly Ala Asp Pro Ile

260

265

270

Asp Pro Asn Ser Ile Leu Val Glu Asp Cys Asp Ile Leu Val Pro Ala

275

280

285

Ala Leu Gly Gly Val Ile Asn Arg Glu Asn Ala Asn Glu Ile Lys Ala

290

295

300

Lys Phe Ile Ile Glu Ala Ala Asn His Pro Thr Asp Pro Asp Ala Asp

305

310

315

320

Glu Ile Leu Ser Lys Lys Gly Val Val Ile Leu Pro Asp Ile Tyr Ala

325

330

335

Asn Ser Gly Gly Val Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Val Gln Asn Ile  
 340 345 350

Gln Gly Phe Met Trp Glu Glu Glu Lys Val Asn Asp Glu Leu Lys Thr  
 355 360 365

Tyr Met Thr Arg Ser Phe Lys Asp Leu Lys Glu Met Cys Lys Thr His  
 370 375 380

Ser Cys Asp Leu Arg Met Gly Ala Phe Thr Leu Gly Val Asn Arg Val  
 385 390 395 400

Ala Gln Ala Thr Ile Leu Arg Gly Trp Gly Ala  
 405 410

<210> 11

[0023] <211> 1275  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 核酸序列编码酶 11

<400> 11

atgtcagcaa agcaagtctc gaaagatgaa gaaaaagaag ctcttaactt atttctgtct 60

acccaaacaa tcattaagga agcccttcgg aagctgggtt atccgggaga tatgtatgaa 120

ctcatgaaag agccgcagag aatgctcaact gtccgcattc cggtaaaat ggacaatgg 180

agcgtcaaag tggcacagg ctaccgtca cagcacaatg atgctgtcg tccgacaaag 240

ggggcggtc gttccatcc agaagttat gaagaggaag taaaggcatt atccatttgg 300

atgacgctca aatgcgggat tgccaatctt cttacggcg gcgggaaggg cggattatt 360

tgtgatccgc ggacaatgtc atttggagaa ctggaaaggc tgagcagggg gtatgtccgt 420

gccatcagcc agatcgtcgg tccgacaaag gatattccag ctcccgatgt gtacaccaat 480

tcgcagatta tggcgtggat gatggatgag tacagccggc tgccggaaatt cgattctcg	540
ggcttattt caggtaaacc gcttgggtt ggaggatcgc aaggacggga aacagcgacg	600
gcacagggcg tcacgattt tattgaagag gccgtgaaga aaaaaggat caagctcaa	660
aacgcgcgca tcatacataca gggcttggta aacgcgggtc gcttcctggc caaattcatg	720
cacgatgcgg gcgcgaaggat gatcgggatt tctgatgcca atggcgggct ctacaaccca	780
gacggcctt atatcccta ttgctcgat aaacgggaca gctttggat ggtcaccaat	840
tttttactg acgtcatcac aaatgaggag ctgcttgaaa aggattgega tattttatgt	900
cctgccgcga tctccatca aatcacagcc aaaaacgcac ataacattca ggcgtcaatc	960
gtcggtgaag cggcgaacgg cccgacaacc attgatgcca ctaagatcct gaatgaaaga	1020
ggcgtgctgc ttgtccggta tattctcgat agtgcggcg ggcgtcacgg ttctttttt	1080
gaatgggtgc aaaacaacca aggtatattt tggtcggaaag aagagggtgc agaaaaactg	1140
[0024] agaagcgtca tggcagctc gttcgaaaca atttatcaaa cagcggcaac acataaagt	1200
gatatgcgtt tggcggctta catgacgggc atcagaaaat cggcagaagc atcgcgttc	1260
cgcggatggg tctaa	1275
<210> 12	
<211> 1419	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸序列编码酶 12	
<400> 12	
atgtccatca aagacgtgt aaaactgatt gaagaaagcg aagcccgctt tgtcgattt	60
cgcgttaccg ataccaaagg caagcagcac cactttaccg tgcctgcgcg catcggttg	120
gaagaccccg aagagtggtt cgaaaacggta caggcggtt acgggtcgctc catcgccggc	180

tgaaaaggca ttcaggcttc ccatatgcag ctgcggccg atccggccac ggcgtttac	240
gatcctttt atgatgatgt taccgtcg tcattacctgcg acgttatcga tcccgccgac	300
ggcagggtt acgaccgcga cccgcgtcc atcgcacgccc gcggccaaac ctattgaaa	360
tctccggta tcggcgacac ggcatacttc ggtccgaaac ccgagtttt cgtttcgac	420
ggcgtagaat ttgaaaccga tatgcacaaa acccggtacg aaatcacgtc cgaaagcggc	480
gcatggcca gggcctgca tatggacggt caaaacacccg gccaccgccc tgccgtaaa	540
ggcggttacg cgcccggtgcg gccgattgac tgccgtcagg atttgcgttc cgcgatggta	600
aacatttgg aaggactcgg catcgaagtc gaagtgcacc acagcgaagt cggtaccggc	660
agccaaatgg aaatcggcac ggcgttcgc acctggta aacgcggcga ccaaacccaa	720
gacatgaaat atgtgattca aaatgtcgcc cacaacttcg gcaaaaccgc cacttcatg	780
[0025] cccaaaccctt atggcgca caacggcagc ggtatgcacg ttccaccaatc catctggaaa	840
gacggtaaa acctgttcgc aggcgacggc tatggcgct tgagcgacac cgccgtctac	900
tacatcgccg gcatcatcaa acacgcacaa gccctgaacg cgattaccaa tccgtccacc	960
aactcctaca aacgccttgt gccgcacttt gaagcgccga ccaaactggc atattccgccc	1020
aaaaaccgtt ccgttccat ccgtattccg tctgtgaaca gcagcaaggc gcgcgcac	1080
gaagcgccgtt tccccgaccc gaccgcaccc ccgtacttgg cgttcgctgc cctgctgtat	1140
gcgggttgg acggcattca aaacaaaatc catcggggcg atcctggccga taaaatctc	1200
taacgacactgc cgccggaaaga agacgcgctc gtcccgaccc ttgcgttcc tttagaagaa	1260
gcctcgccg cgctaaagc cgaccacgaa ttccctttac gcggcgccgt gttcagcaaa	1320
gactggatcg acagctacat cgccttaaa gaggaagatg tccgcgcac ccgtatggcg	1380
ccgcattccgc tgaaatttga aatgtattac agcctgtaa	1419

<210> 13  
 <211> 1075  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 核酸序列编码酶 13

<400> 13

aggaggtgtt ttaataatga aagggtttgc aatgctcagt atcggtaaag tcggttggat 60

tgaaaaagaa aagectactc ccggcccttt tgacgctatt gtaagacctc tagctgtggc 120

cccttgcaact tcggacgttc ataccgtttt tgaagggtctt attggcgaaa gacataacat 180

gatactcggt cacgaagctg taggtgaagt agttgaagta ggttagtgagg taaaagattt 240

taaacctggat gatcgcttg tggtaccagc tattaccctt gattggcgaa cctctgaagt 300

gcaaagagga tatcaccaac actctgggtt aatgctggca ggctggaaat ttgcataat 360

aaaagatggt gttttgggtt aatttttca tggtaacgtt gctgatatga atttagcaca 420

[0026] tctgcctaag gaaattccat tggaagctgc agttatgattt cccgatatga tgactactgg 480

ctttcacggc gccgaactgg cagatatacg attaggtgcg acggtagcgg tttgggtat 540

tggcccgatgtt ggtttatgg cagtcgctgg tgccaaattt cgggggtgtt gaaggattat 600

cgcagtaggc agtagaccag ttgtgttaga tgctgcggaaa tactatggag ctactgat 660

tgtaaactat aaagatggc ctatcgacag tcaattatg gatttaacgg aaggcaaaagg 720

tggatgtt gccatcatcg ctggaggaaa tggatgtt acgttacatc atggctacatc cagttaatgt 780

tgtaaacctt ggtggcacca tcgctaatgtt aaattactttt ggcgaaggag atgttttgc 840

tggatgtt ggtggcacca tcgctaatgtt aaattactttt ggcgaaggag atgttttgc 840

tggatgtt ggtggcacca tcgctaatgtt aaattactttt ggcgaaggag atgttttgc 840

tggatgtt ggtggcacca tcgctaatgtt aaattactttt ggcgaaggag atgttttgc 840

ccccggttggaa cgtctaagaa tggaaagact gattgacattt gttgtttata agcgtgtcga 960

tccttctaag ctcgtcactc acgtttccg gggatttgac aatattgaaa aagcctttat 1020

gttgtatgtt gacaaaccaa aagacctaattt caaacctgtt gtaatatttag cataaa 1075

<210> 14  
 <211> 1545  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 核酸序列编码酶 14

<400> 14

atggctgact cgcaaccct gtccggtacc ccggaaagggtg ccgaatattt aagaggggtg 60

ctgcgcgcgc cggctacga agcggcgcag gtcacgccgc tacagaaaat ggaaaaactg 120

tcgtcgctc tcgataacgt gattctggtg aagcgcaag atcgccagcc agttcatagc 180

tttaagttgc gccgcgcata cggcatgatg gccccctga cggaagaaca aaaagcacac 240

ggcgtgatta cgcgttgc aggttaaccac ggcgcaggcg tcgcgtttc ttccgcacgg 300

ttaggcgtga aggcgctgat cgtcatgccca accgccaccg ccgatataa agttgatgct 360

[0027] gtgcgcggct ttggcggcga agtgcgtctt cacggcgc当地 atttcgatga agcgaaagcg 420

aaagcgatcg aactgtcaca gcagcagggt ttcacctggg taccgcgtt cgatcatccg 480

atggatcg cccggcaagg cacgctggcg ctggactgc tccagcagga cgc当地 540

gaccgcgtat ttgtaccggc cggcggcggc ggtctggcag cgggtgtggc ggtgcgtatc 600

aaacaactga tgccgcaat caaagtaatc ggcgttggaa cggaagattc cgcctgc当地 660

aaagcggcgc tggatgcggg tcatccgtt gatctgcccc gcgtgggct gttgc当地 720

ggcgtcgccgg taaaacgc当地 cggcgatgaa accttccgtt tgtccagga gatcttgc当地 780

gacatcatca ccgtcgatag cgatgccatc tgtgcggcga taaaagatct gttc当地 840

gtgcgcggcgg tggcggaaacc ttccggcgcg ctggcgctgg cggggatgaa aaaatacatc 900

gcccagcaca acattcgc当地 tgaacggctg ggc当地 atttccggc当地 taacgtgaaac 960

ttacacggc当地 tgcgtacgt ctggaaacgc tgc当地 aactgg gcaacagcg tgaaggc当地 1020

ttggcggta ccattccgga agaaaaaggc agcttctca aattctgcca actgcttgc	1080
ggcggttcgg tcaccgagtt caactaccgt tttgccatg ccaaaaacgc ctgcacattt	1140
gtcgccgtgc gcttaagccg tggcctcgaa gagcgcaaaag aaatttgcgat gatgctcaac	1200
gacgggtggct acagcgtggt tgatctctcc gacgacgaaa tggcgaagct gcatgtgcgc	1260
tatatggttg gcgggcgtcc atcgcacatcc ttgcaggaac gcctatacag ctgcgaattc	1320
ccggaatcac cgggccccgt gctgcgttc ctcaacacgc tgggtacgca ctggAACATC	1380
tcgcgttcc attatcgac ccacgggtacc gactacgggc gcgtactggc ggcgttcgag	1440
cttggcgatc atgaaccgga ttttggaaacc cgggtgaatg aactgggcta cgattgccac	1500
gacgaaaccca ataaccggc gttcagggttc ttttggcggtt gtttag	1545
<210> 15	
<211> 750	
[0028] <212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸序列编码酶 15	
<400> 15	
atagacggta ccattccat caccggcgcc acgtccggct tcggacagggc cacggcgccgg	60
cggttcgtca aggaaggctg gaaggtcatc ggcacaggc ggcggggggc acggctggag	120
gcgcgtggcgc aagaactcgg ctccgcctt cacggcgctg ccttcgtatgt taccgacgaa	180
gatgccacta gaaaggcact tgcggcttg cggaaagggtt tccggggacat cgatatttc	240
gtcaacaatg cggggcgttc gcttcggcacc gcacactgcac cgcagggtgc gctgaaagac	300
tggcagacca tggtaaacac caacatcacc ggttttgc acatcacccca ccatcttttgc	360
cccacgttga tcgaccgcaa gggcattgtc atcaaccttt cctcggttagc tgcgcactgg	420
ccctatgcgg gggcaatgt ctatgcggaa acgaaaggctt tccgtggca atttcgttc	480

ggctgcgct ccgacctgca tggcaaggcgtgc cctcgatcga accgggcatg	540
tgcgaaacgg aattcacgt tggcgacc ggcggcaatc aggtgcctc ggacaatctt	600
tacaaggcg tcaatccgat cacggccgag gatatgcgcatacgatcca ttgggtcgcc	660
tcgcagccca aacatatcaa catcaacagc ctcgaactca tgccggcaa ccagtcctt	720
gccggttcc aagtgcatcg ggaaagttga	750

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 1380

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 核酸序列编码酶 16

&lt;400&gt; 16

atgatgatcca aaaacgaaat cccaaagtgg gtaaaggaat tcccgctgtc tgaaacgatc

60

[0029]

atggcgccg aagaggtatt ttggcgcaat cccaaatatc acgcgttgc gcaagctatt

120

cgaacgattc ctttacgcga acgcgtatc aaggaggccg aagagcgatt gcgcgcctt

180

gccccctaca tcgcgaaagt gttcccgag acgcgaacgg cccacggat catgaatcc

240

cctttagtgc ggattccgaa catgaaacag cggttggaaa agatgttca gaccaacatc

300

gagggggatc tggtgctaaa atgcgacagc catcttcca tctccggatc gatcaaggcg

360

agagggggaa tctacgaggt tctgaaacat gcggaaagaac tcgctctggc aaaccatatg

420

atcacatgg gggatgacta tgccgtcatg gccagcgaag aattccggca gttctttcc

480

cgctattcgc ttgcgttgg ttgcacggga aatttaggct tgagtatcgg catcatcggt

540

gcgcagcttgc gttccgcgt taccgtcat atgtcagccg atgcgaaaca atggaaaaaa

600

gacttgcgtc gaagcaaagg gttgcggtc atcgaacatc tcaccgacta caacaaggtg

660

gtgaaagagg cgcaagaca gtccggcag gatccaaacgt cgtatttat cgatgtgag

720

aactcgatcc atctgtttt aggctatgcg gtggccgcgt tcggctgaa aaagcaatta	780
gaggacatga acatcacggt tcatgaaaac caccgcctt ttgtatatct tcctgcggc	840
gtccggccgcgtc tcggccgggg ggtgacgtt gggctgaagc tcgtgtacgg cgatcatgtc	900
cattgtttt tcgtcgagcc gacgcattcg cttgcattgt tgctcgccct gatgacggga	960
cagcacgacc gcgtgtcggt gcaagattt ggcctcgaca ataagaccga agcggacggg	1020
ctagcggtgg ggcggccgtc aagggtggtg gggaaacatgc ttgagaacgt catcagcgcc	1080
gtctatacgg tggacgatgc gacgcattac cgcttgcgtc cggcgatggt ggaaacggag	1140
gaaatctatt tagagccgtc cgcctggcg ggggtggcg ggcctgttcg gctgttctgt	1200
gattggccgg ggcaaacgta cgttagaggca aacggttga aagaaaaagat gaaaaacgcc	1260
gtccatattt gctggcgac aggcggaaagc atgggtctaa aggatgtgtat ggaggcctat	1320
tatcgggaag gcgtgcgtat cggaaacgatg acaggaaacg gttttctga aggacgataa	1380
[0030]	
<210> 17	
<211> 1047	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸序列编码酶 17	
<400> 17	
atgctgatgt tcgaagaaat ccaggcgccg ggcacgaga gcgtcacgct gctgcaccac	60
gcggcccgccg gcctgcgcgc cgtgcgtccg gtgcacttca ccgtgcgtccg ccctgcatt	120
gcggcgccgc gcctgatgcc ctgcaccgag gaacgcgcgc tgcgacgc cctgcgcctc	180
agcgagtccg tcacgctcaa ggcgcgcctc gcgggcctga actacggcgg gggcgccgtgc	240
gtcatgtcc ccccgaaagg cggcgacatc gacgggcacg cccgcgaggc gctgtccgc	300
gcgcgtccgc ggcagatccg ttaccgcggt ggccgcgtca tcctcaccga ggacgtccgc	360

gtgaccggcc ggcacatcgc ctgcgcgcg cagaaaccg acagcaccat gggcatgcac	420
accgacacgc ccacccgtac cgccgtacggc gtgtaccgcg gcatcaaggc cgccgcgcgc	480
gcctaccccg gcggcgagag catgcgcggc gtgcgcgtcg cgctgcgtgg cgccggcgca	540
gtcgccgcga ccctcgccca gcacccgtac cgccggggcg cgccgcgtac cgtcgccagac	600
ctgatgtctg agcgccgcga gcccctcgac gacgacccgtcg gcgagcgcgt caccgtcg	660
agcgccgcgt acatctcgac cgtgcgtgc gacgtattcg cgccgtgcgc gttcgccac	720
agcatcaaaa gcgcgcacgt gccccgttg cagtgcggg tgategcggg cagcgaacac	780
cacccgcgtca gccacaacgg cgagacgcgc gtgcgcgaag cgggcatcac atacatcccg	840
gacttcgcac tcaacacgcgc cggcctgtatc agcgccgcgc agaacccatc catcgaaacg	900
gcggcgaaac gcgtgtacga gagcgtcgac cagatctcgac cgaccgcga gaagtacgag	960
aagccgcgc acgtcgacgc cgtaaactc gcgctgcgc gcatcgaact gatcggtcc	1020
<b>[0031]</b>	
atcagcggcc agtacgcggc ccagtaa	1047

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 768

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 核酸序列编码酶 18

&lt;400&gt; 18

tcatgtgcac acacgtatgt tatcacttaa aatttttagt aaagtgtactg ctgaatatgc 60

tgccaaaaca ctgtttttt gatttaattc acacacagtgttttttta tagatttaaa 120

ctctccaaaaa tctcccttaa catggacttc atggatattgttcaactt caggatctgc 180

aattatctttt acatccgcat ctattccaga ggcttagactt aatgccgcag caacgttaat 240

attcactggaa aatttttaa cagcttctga ggattccct ttaaacacga cctcctttt 300

tttgttctta acacctaacg aagtaggtga ttttctcggtt ataagttta tttttttat 360

cttacctaag gatgcggctt ttacaccatc taaaccaatt attgcaccgg aaggtatgtt 420

tatattagct cctgattctc tagattcctt tatcaatctt cttctaactt tctcatctaa 480

tagtgcaccc acactcataa tcaaaacatc tataccctta ctaattatat tggcacaat 540

ttctttact gcctttgag aagcagattc aattatcaaa tcaactccat tgaacattc 600

ttctaccttt ttacggcag tgccatttgt taaattgct agcttcttag ctttctaaa 660

atttctgtca taaaaatatt ttaattttat tttttgata tcttgttta agacaagg 720

aactattgtatttgcaattgcaccacatccatataatccccatctcat 768

<210> 19

<211> 1425

<212> DNA

<213> 人工序列

[0032]

<220>

<223> 核酸序列编码酶 19

<400> 19

gccaacgcgt attacggcat ccagaccctg cgagccgtga acaactttca cctctccggc 120

gtgcccgtt cgcaactaccc gaaactggta gtcgcgtgg ccatggtcaa gcaggcggca 180

gcggatcaa accatagct cggacacctc aatgacgcca agcatgcggc gatcagcgag 240

gcctgtgcc gcctgatccg cggcgacttc cacgatcagt tcgtggtcga catgatccag 300

ggcggcgctg gcacgtcgac caacatgaat gccaacgaag tcatcgccaa catcgcttg 366

gaaaccatgg gtttcgagaa aggcgcatac aaacacacctgc acccccaacaa cgatgtcaac 420

atggcgcagt cgacccaacga cgccctaccccg acggcgatcc gcttgggtct gctgtgggt 480

cacggacgctc tgctcgccag ccfttccagg ctgattcagg ccftcgccgc caagggcgaa 540

gaattcaacc atgtgctgaa gatggccgc acccagtgc aggacgccgt tccaatgacc	600
ctgggtcagg aattccgcgc ctccgcacc accctgacag aagacctgaa ccgcctgcgc	660
agcctggcgc cagagctgtt gaccgaagtg aacctggcg gaaccgccat cggcaccggc	720
atcaacgccc accctggcta tcagaagctg gcagtcgatc gtctggcact catcagcggc	780
cagcctctgg tgccagcgcg cgacctgatc gaagcgacct ccgacatggg cgcctcgtg	840
ttgttctcg gcatgctaa gcgtactgctg gtcaagctgt cgaaaatctg caacgacactg	900
cgcctgctgt ccagcggccc acgcacccgc atcaacgaaa tcaacctgcc ggcacgtcag	960
ccaggcagct cgatcatgcc cggcaaggta aacccggta tcccgaaagc ggtcaatcag	1020
ttgccttcg aaatcatcg caacgacactg tcgctgacca tggcagccga aggaggacaa	1080
ttgcagctca acgtgatgga gccgctgatc gcctacaaga tcttcgactc gatccgcctg	1140
ctgcagcgcg ccatggacat gctgcgcgag cactgcacatc tcggcatcac agccaaacgaa	1200
[0033] cagegctgcc gcgagctggt cgagcattcg atcggcttgg tcaccgcctt gaacccttac	1260
atcggttacg agaactccac ccgtatcgcc cgcacgcgc tgaaaccgg ccgcggcgtg	1320
ctgaaactgg tgcgtgagga aggtctgctc gacgacgcga tgctcgacga catcctgcgc	1380
ccggaaaaca tgatcgctcc gcgtctggcc cccttgaagg cctga	1425
<210> 20	
<211> 1083	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸序列编码酶 20	
<400> 20	
tcagcgaccc cgggcctcg ccattccgtc ctccgcgtc cggtcggccg ccgcggcgaa	60
cggaatgcgg tccgccttcg cacgtgcgaa tattccagc gtgggtcga agatcttcgt	120

cgccctcgcc ttgcacccgt cgaagtcgaa cccgtgcagc tcgtcgccga cctggatcac	180
gccgcggcg ttgaccacat agtcgggtgc gtagaggacc gaccggtcgg ccaggtcctt	240
ctcgacaccc ggggtggcca gctgggttt ggccgcggc cacaccacct tcgccgtgag	300
cacccgaacg gtgcgttgt tgagcgcgcc gccgagcgcg cagggcgcgt agatgtcgag	360
accctcggtg cggatcagcg tctcggtgtc cgccaccacg gtgacctcg ggtgcagatc	420
ggtgatccgg cgcaccgact cctcgctac gtccgtgatc acgacccctcg ccccgctgga	480
gagcagggtc tcgacgaggt ggtggccac ctggccgacc ccggcgacgc cgaccctgct	540
gccgcgcgcg gtccgggtcgc cccacagggt ctggccgag gcccgcatgc cctggaagac	600
accgaacgcg gtgaggacgg aggagtcgcc ggcgcgcgcg ttctcgaaaa agcggccgggt	660
ggccagcgg cactccctgg cgacgacgtc catgtcgccg acgttaggtc cgacatcgca	720
ggccgtgacg taccggccgc cgagcgaggc gacgaaccgg ccgtaggcca ggaggagttc	780
ctccgtcttg atttctccg ggtcgccgtat gatgacggcc ttggccgcac cgtgggtcag	840
tccggccagg gcggtcttgt acgacatccc gcgacagg ttcagcgcgt cggcgacggc	900
ctcggccctcg gtcgcgtacg ggtagaagcg ggtggccgcg aggccggggc ccagggcggt	960
ggagtggagg gcgatgacgg ctttggaggcc ggtggcacgg tcctggcaga tcacgacttg	1020
ctcgtgaccc ccctgtatccg agtggaaacag ggtgtgcagg acgcccgttag tcacatcggt	1080
cac	1083

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 2910

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 核酸序列编码酶 21

<400> 21

ctagttgtaa aagtcgaggg aggcgeact gcacatgagg tgaacatctc cgtaaacc 60

gtcaatgcga cccacagtcg gccagtaactt ttcaacgtac gagtaaggat aaggaaatgc 120

cgccaaacgc cgatcatatg gttgtccca ttatcatcg gtgacacatc ttgcgtgt 180

tggtcattc ttcaaaacat tggatccac tgggtttca ccttttcaa tggcggcaat 240

ctcacctcga atggaaatta gtgcacatgc caagegatcc aactcccgt tgggttctga 300

tccgggttcaatcatta aagtccggg tacaggaac gccagtgtt gcgagtgaat 360

tccgtatc atcaaccgtt tggccacgtc ctccgcctca atatgagctg tcttctgaa 420

ccgtcgaaga tcaacgataa actcatgagc gcagtagttt tctccaccca ggaaaagaat 480

cgtataatgg ttctctaggc gcttctcaa gtagtttgc ttcaaaacgg cgtactctgt 540

acaagtttg agccgtgtg atccaagcat taacatcaac atgtacgata tcggaagaat 600

[0035] tgatgctgat ccgtacgctg attgtgagac ttggccgaat ggctgtgaac cgccaaactt 660

ttggttgaaa acagaatttg gcaaaaaggg ggccagatgt tgacggacag ctatggcc 720

catccgggg ccgccaccac catgggaat tggaaacgtc ttgtggagat taatgtggca 780

cacgtcgcca ccgatatac cagggcctgt atagccaacc atggcgtaa gattgcccc 840

atcaatgttag cattgtccac cgtagtagtg cggcattgtat gtaatggata aaatatcctt 900

gtcaaacaag ccatacgtac ttggatgtat tatcatgata cacgacaact ctttgcgtg 960

ttttggcaa gatttctca ggtcattgtat atcaaccctg ccgttagaca agcatttcac 1020

caagacaata ttcatcctg ccaatgtgc cgaagctgaa ttgcattcat ggcactctc 1080

tggaaatcaa cagacgttgc ggtgccttc cttcattgtat agatggtagc cacgataaac 1140

acgaagccca gcgtattcac ctggcgcc actattaggc tgaagcgata ccgcattccag 1200

accggtaatt tcccttaact ttgtcaag atcttagacac aacgcactgt accctcgac 1260

ttggtccact gggcaaggg gatgcacatt ggtgaattct ggcacagaga gtggtaacat 1320

1380	agcagcggca gggtaagct tcatggcga agatccaaac gggacgcaac catcgtaag
1440	gccgtaatcc ttccgttgc gacgatgaat atagcgcata agttcactt cactcttgc
1500	ctttggaaac gttgagtgtt tcaggaaatc agacttccgc accagatcca acggtagtac
1560	cgatttctga tcggcttattt tggaaaggc tgccgacgacg ggaagttca accctgcagg
1620	ctccaaaagt gacacaatgt gtccatccgt tggccctca tccacagaaa tggagacagt
1680	cccatactg taatcaacaa aaacattaat acccttctca acacatcgta tcttgcata
1740	ctccgctgta atgccttta ggttcacagt aacagtgtcg aaaaatgcac tggttaccac
1800	agagtgctt actgattcca taccacacgc gagcacttc gccttgcgt gtatcttatt
1860	ggcaatctca ttttagaccat ctggaccatg gtagggggca taaaacccac tcacgttgc
1920	caataacgct tggcagttac agatatttga tggccgcgc tcacgcttaa tatgttgttgc
1980	acgtgtctgc agcgccatgc gtagggatgg ctctccggca gaatccttac tgacgcccgt
[0036]	cacacgtccc ggcataacc tcttaactg ctccttgaca gcaagaacgc cggcgtgagg
	acctccatat cctagtggaa cacaaaacg ctgggaggat cccacaacca catctgcatt
2040	catttcacca ggtggcttga caagaacaca agccatcaag tggcccac agcaactaat
2100	gacaccgtgc ttctttgcat tctcgaacag tggtgagaag tcatgaagca tgcccatcg
2160	atctgggtt tggcataagga taccaaacaa ggaacgtca gtcaggtaa tcagattcg
2220	gtcgcccacg acgacgttta tcttgagcgg ttccggcttt gtcttaacca tctcaatgc
2280	ggatggaaaa acagttttg atacgaagaa cgtattccgc ttccgttgc catgctgaaa
2340	agcaagatgc atcgccctcg atgatgtgt cgcttggta agaagagatg catttgcac
2400	atccatcttt gtcaaatcca taaccatggt ttggaaattc aaaaggact ccagacgtcc
2460	ttgtcaatc tcaatgttgc atgggtgttgc ggggtgttgc catccaggat ttcaatgc
2520	ttgtcaatc tcaatgttgc atgggtgttgc ggggtgttgc catccaggat ttcaatgc
2580	ttgtcaatc tcaatgttgc atgggtgttgc ggggtgttgc catccaggat ttcaatgc
2640	ttgtcaatc tcaatgttgc atgggtgttgc ggggtgttgc catccaggat ttcaatgc

tagtacctg ttgcgcac caagagagcg cacgagtgcg agagcatcca ttcactcat	2700
agccgccacc tccgtcaagg gtggcgta aatatccc ggaatagcag ccgtcatcaa	2760
atcagagaga ctctctttc caaccgtcg aagcatcgac attgtctcg ccgtgttgg	2820
accaatatgg cggtaatat agctgtccgt ggcagtccat cgaacaaatg tcacgcattgg	2880
caaagagcca cgaaacaaac gacggatcat	2910
<210> 22	
<211> 1107	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸序列编码酶 22	
<400> 22	
atgatcattg gcctgcccga agagatcaaa gtttaaggaaa accgcgtggc actcacgccc	60
[0037] gggggcgtcg ccagcctcggt ggcgcgcggc cacaccgtca tcgtggaaacg cagcgccggc	120
gtgggcagcg gcatccagga caccgagtac gagcaggccg gcgcgcagct cggcagcgcc	180
gccgaggcgt gggccgcga gatggcgtg aaggtaagg agcccatcaa gagcgaatac	240
gggtacacctcc gcccggacct gctgctgttc acgtacacctc acctcgctgc ggaccagccc	300
ctcacggacg ccctgctgag cggccgcacg accgcgcgtt cgtacgagac ggtgcagctc	360
gacgaccgca gcctgcccgt gctcacgccc atgagtgagg tcgcggccgc cctgagcgtg	420
cagggccggcg cgtaccacct gcaaaagccc atcggccggc gcggcgtgtcgtcgtcgt	480
gtgccggccgt tgcaaggccgg ccacgtcgac gtgattggcg gcggcgtgtcgt cggcacgaac	540
gccgcgaaaa tggccatggg cctcggccgcg aaggtcacgg tgctggacgt gaaccacggg	600
cgccctcgat acctcgacga cgtgttcttc gggaaagctca ccaccatgt gagcaacgag	660
gcgaacatcc gctccatctt gcccgaagcg gacctcgta tcggccggcgt gctgatcccc	720

ggggcgaagg cgccgcacct tgcacgcgc gacatgctgg cgaccatgca ggaaggcagc	780
gtcatcgctg acgtggcggt ggaccaggc ggatgcgtgg agaccattca cgcgacgacg	840
cacgacgatc ccacgtacat cgtggacggc gtgatccact acggcggtgc gaacatgccc	900
ggcgccggc cgcgcaccag cacgttcgcg ctcacgaacc agaccattgg gtacgtgctg	960
cagctcgccg acaagggcgt ggaggcactc agcgccagca agccgctgct gctggcctg	1020
aacaccatcg gcgggaagct gacgtacgcg ggcgtcgcc aagcgttcgg cctgacgtac	1080
accgcgcctg aagtggcgct ggctaa	1107

<210> 23

<211> 948

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0038] <223> 核酸序列编码酶 23

<400> 23

atggagccca ctatgagcca attcgaacag ctgtaccgcc aggtggccct cagtgtcgcc	60
---	----

ggcaaccggc tcgtggaaaa agtcttgagc aagcaggcgt gggcgctggc gcagcgttt	120
--	-----

gtatcggcgc agacggcgcgaa ggacgcccattc aaggccatca agcggctggaa agcccaggcgc	180
---	-----

atctccggca acctcgacct gctggcgcag ttctgtaca ccccggaacc cgccaatgcc	240
--	-----

aacaccgaga tgattctggc gaccattgac caggtgcacg cggcgggcctt caccctac	300
--	-----

aacagcgtga aaatgtcgcc gctggggccaa gggcagaccc cgccggacgg ccaggaccc	360
---	-----

ggctacgtca acacccggcccg cgtcggtggag cggggccaaagc gctacggcgg ctctgtcaat	420
--	-----

ctggacatgg aagaccacac ccgcgtggac tcgactctgc agattttccg ccgcctggc	480
--	-----

aaggagttcg gccaccagca tgtggaaacg gtgttgcagg cctacctgca ccgctcgaa	540
--	-----

gacgaccggcc gcagcctgga cgacctgcgc cccaaacctcc gcatggtgaa gggccctac	600
--	-----

ctggagcccg cctccgtcgc cctgcagacg aaaaccgaca ttgacgcccgc ctaccgcccgc	660
ctggctacg agcacctaa ggcggcaac tactgcaacg tggccaccca cgaccaccac	720
atcatctacg acgtgatgca cttgcgtg gccacggca tccctaaggaa ccagttcgaa	780
ttccagctgc tgtacggcat ccgcgaggac ctgcagcgcg aattggccga ggcggctac	840
acggtgcgt cgtacattcc ttcggcaag gactggtagc gctactactc ggcgcgtac	900
gccgagcgcc cgcagaacgt gatgtcgtg ctgcgcggcc tgctgtaa	948

<210> 24  
 <211> 1101  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 核酸序列编码酶 24

[0039]	<400> 24	
	atgaaaaaca ttgtggttat cggcgccggc aatatcggtt cggcaatcgc ctggatgtg	60
	gccgcatcag gcgattatcg catcacgggtt gccgatcggtt cagccgatca gctggccaat	120
	gtgcggcgc atgaacgggtt cgacatcgtc gacattaccg accgtccgc tctggaagca	180
	ctgctaaaag gcaaattcgc cgtgctctcc gccgcggccca ccgaattcca cctgacggcg	240
	ggtattgccc aagcggccgt tgccgtcggc acgcattatc tcgatctcac cgaagacgtg	300
	gaatccaccc gcaaggtaa ggctggcg gaaacggccg aaaccgcgt cattccgcaa	360
	tgcggcctcg ccccccgggtt catctccatc gtcgtcgcc atctcgccgt caagttcgac	420
	aagctggaca gcgtgcgtat ggcgtcggtt gctctgcgcg aatatccgtc caatgcgtc	480
	aactacaacc tcacctggag taccgacggg ctgatcaacg aatatatcga gcccgtcgaa	540
	ggattcgtcg aaggccgcctt caccggcggtt ccggcccttg aggagcgcga ggagttctcg	600
	ctcgatggca tcacctacga ggctgtcaac acctcggttggc gtctcggtac gctttgcgcg	660

---

acgctggaag gcaagggtcg gaccatgaac taccgcacta tccgttatcc cggccatgtg	720
gcgatcatga aggcgctttt gaacgacctc aacctgcgca accgcccga tgtgctgaag	780
gacctgttcg aaaacgcctt gccccggcacc atgcaggatg tggcatacg tttcgacc	840
gtctgcggca cccgcaacgg ccgttcctg cagaaacct atgccaacaa ggtctatgcc	900
[0040] ggcccggtt ccggccggat gatgagcggc atccagatca ctaccggcgc cggcatctgc	960
acggttctcg acctgctcgc ggaaggcgcc ctgcccaga agggcttcgt tcgacaggag	1020
gaagtggcgc tgccgaagtt cctcgaaaac cggttggcc ggtattatgg ctgcgttag	1080
ccgctggcgc ggggtgggtg a	1101

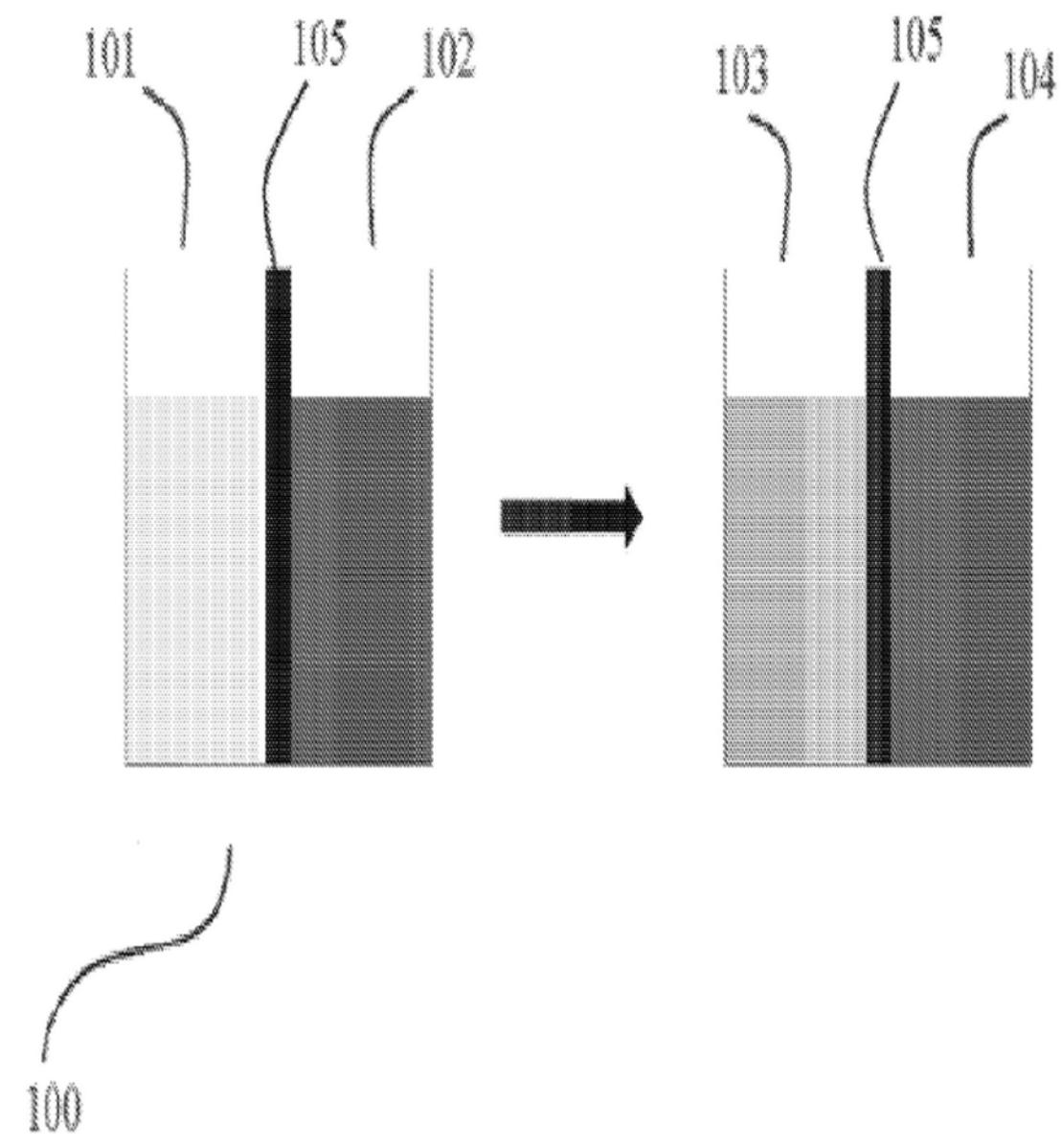


图1

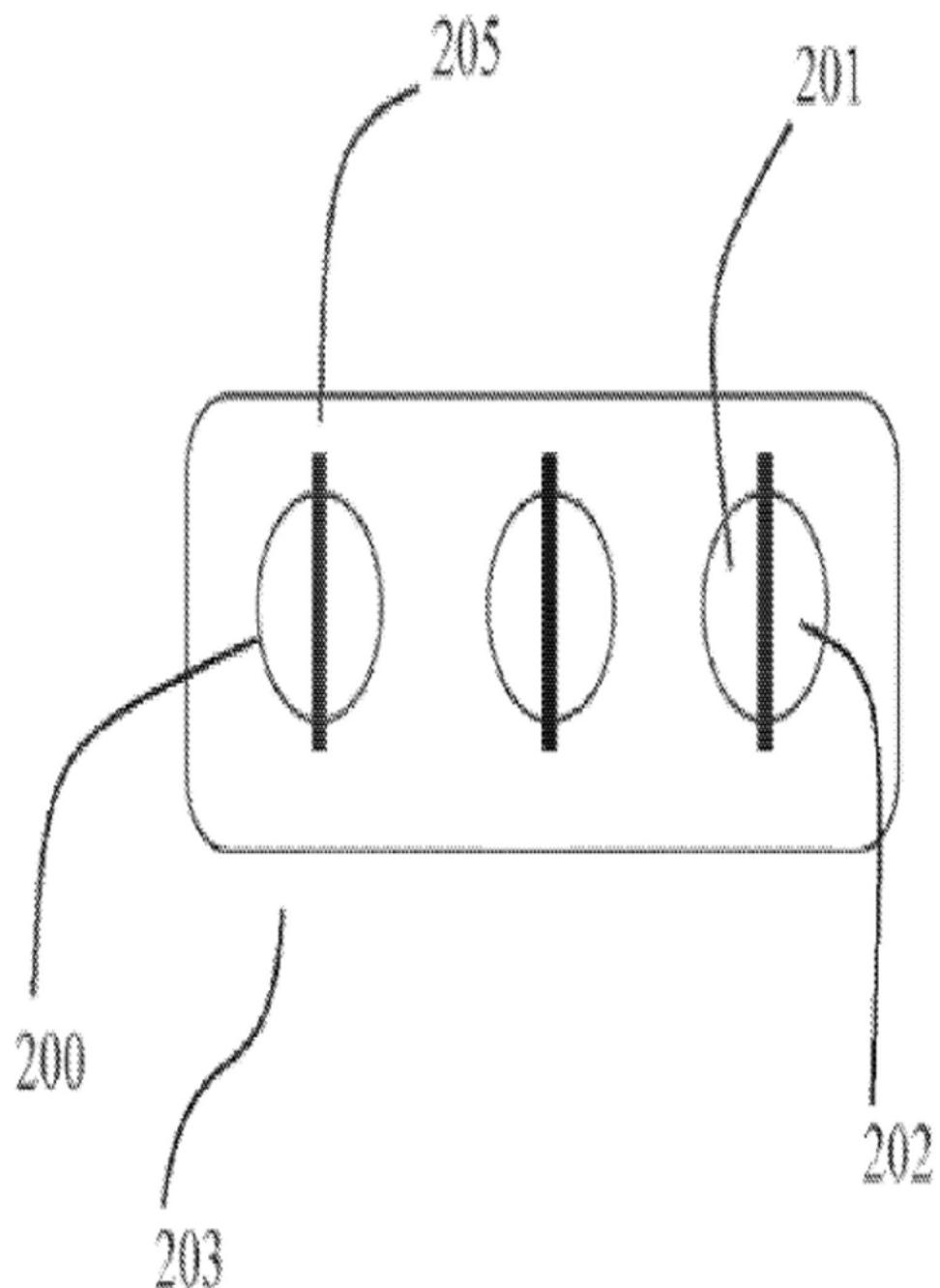


图2

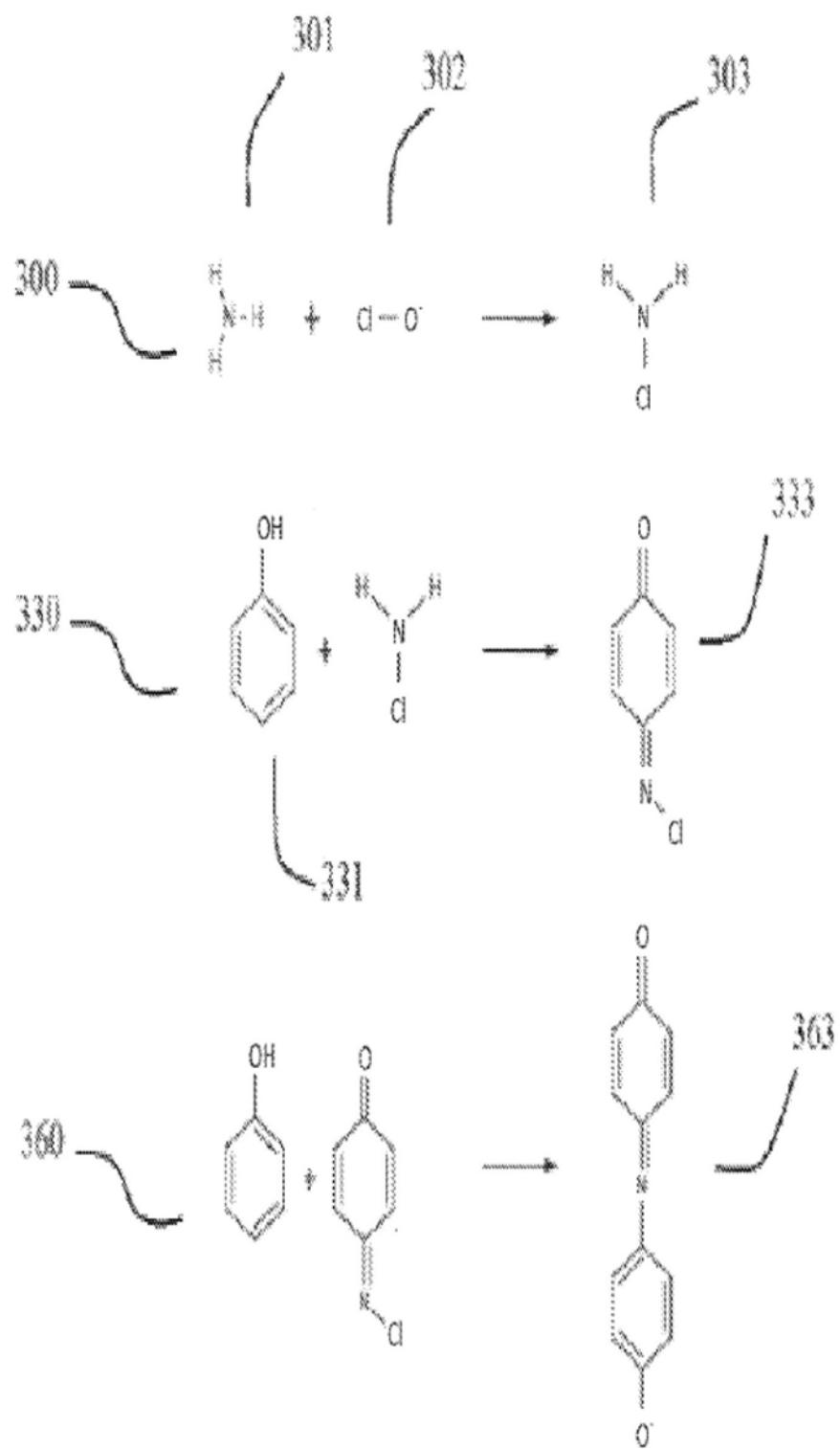


图3

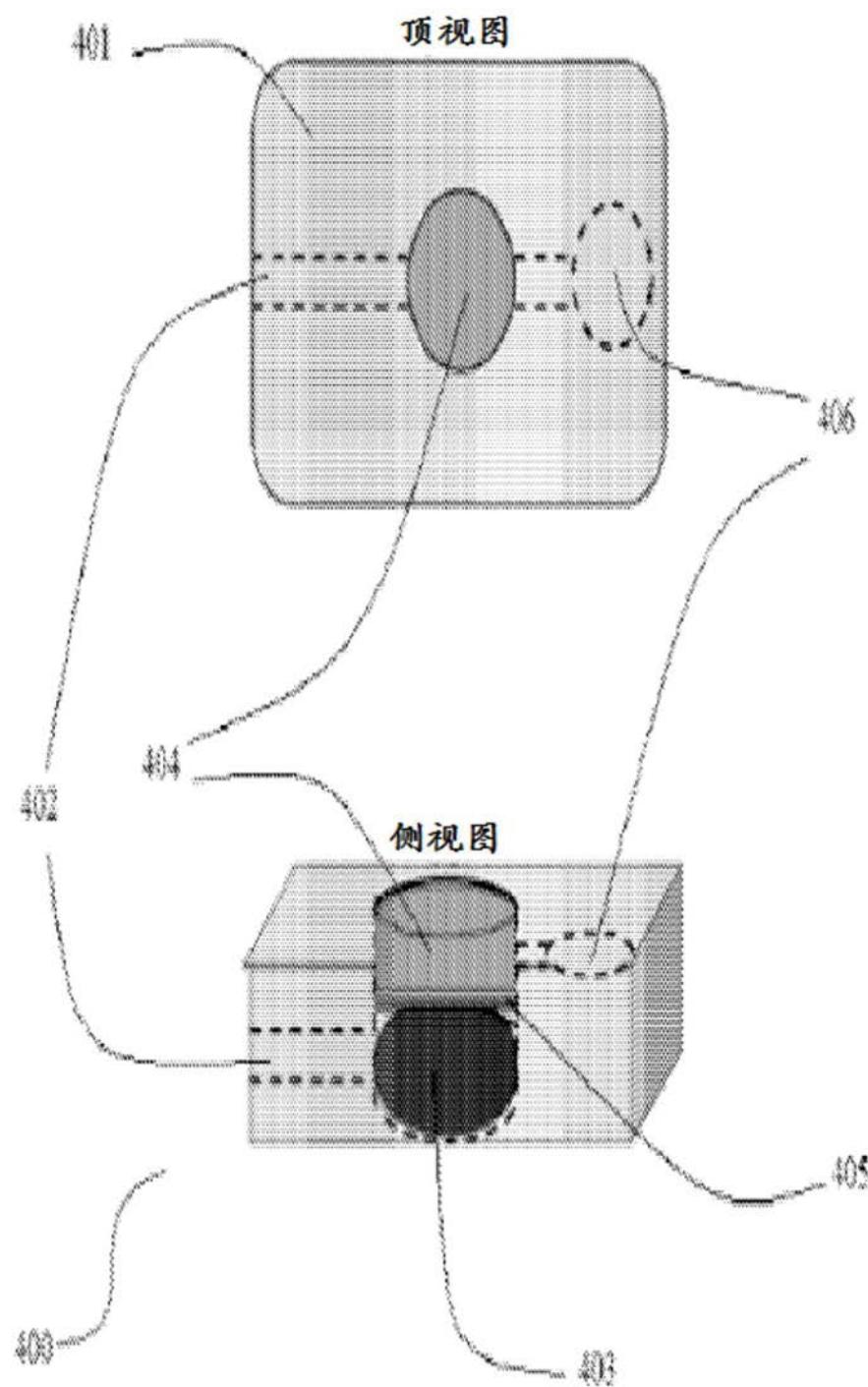


图4

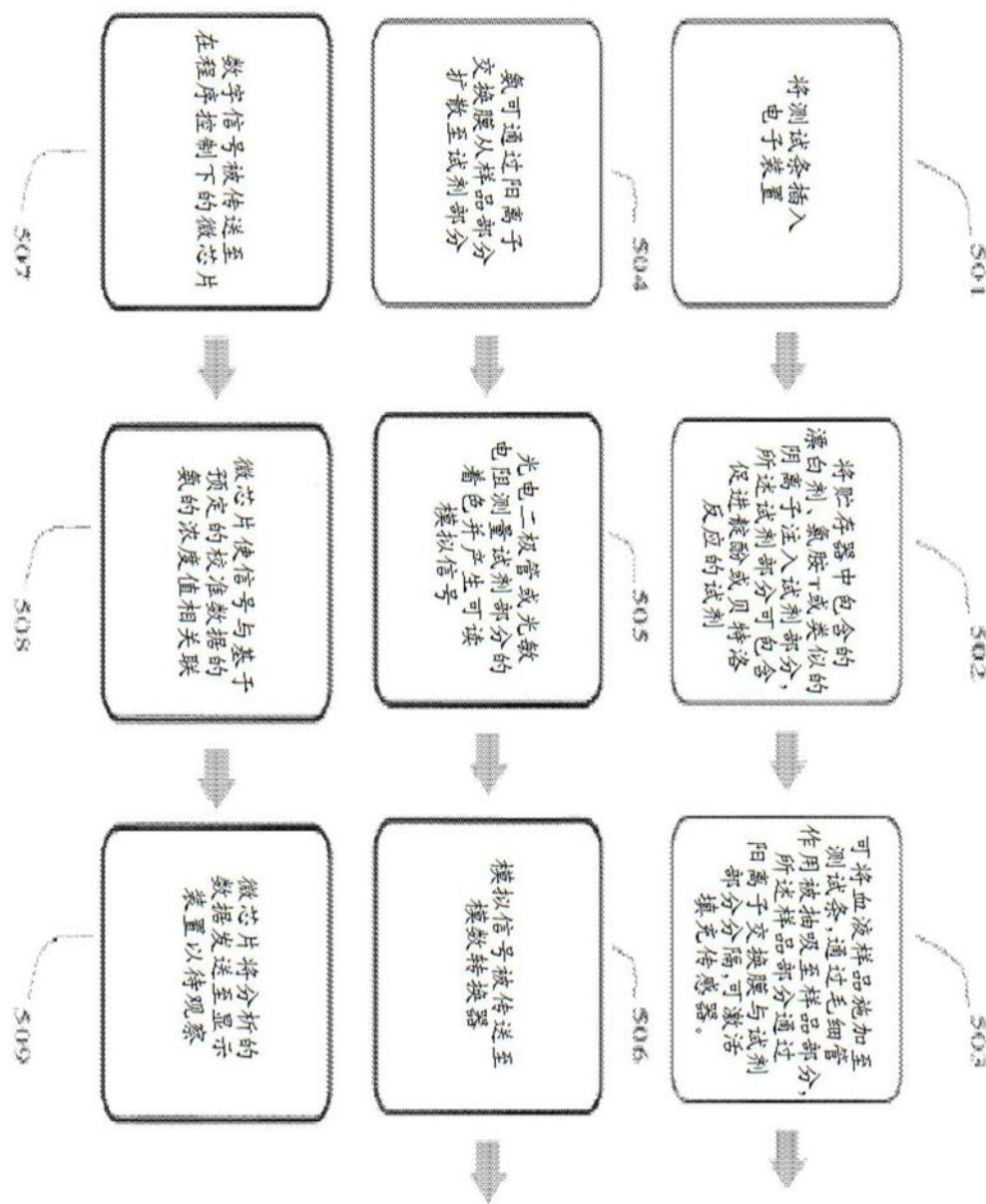


图5

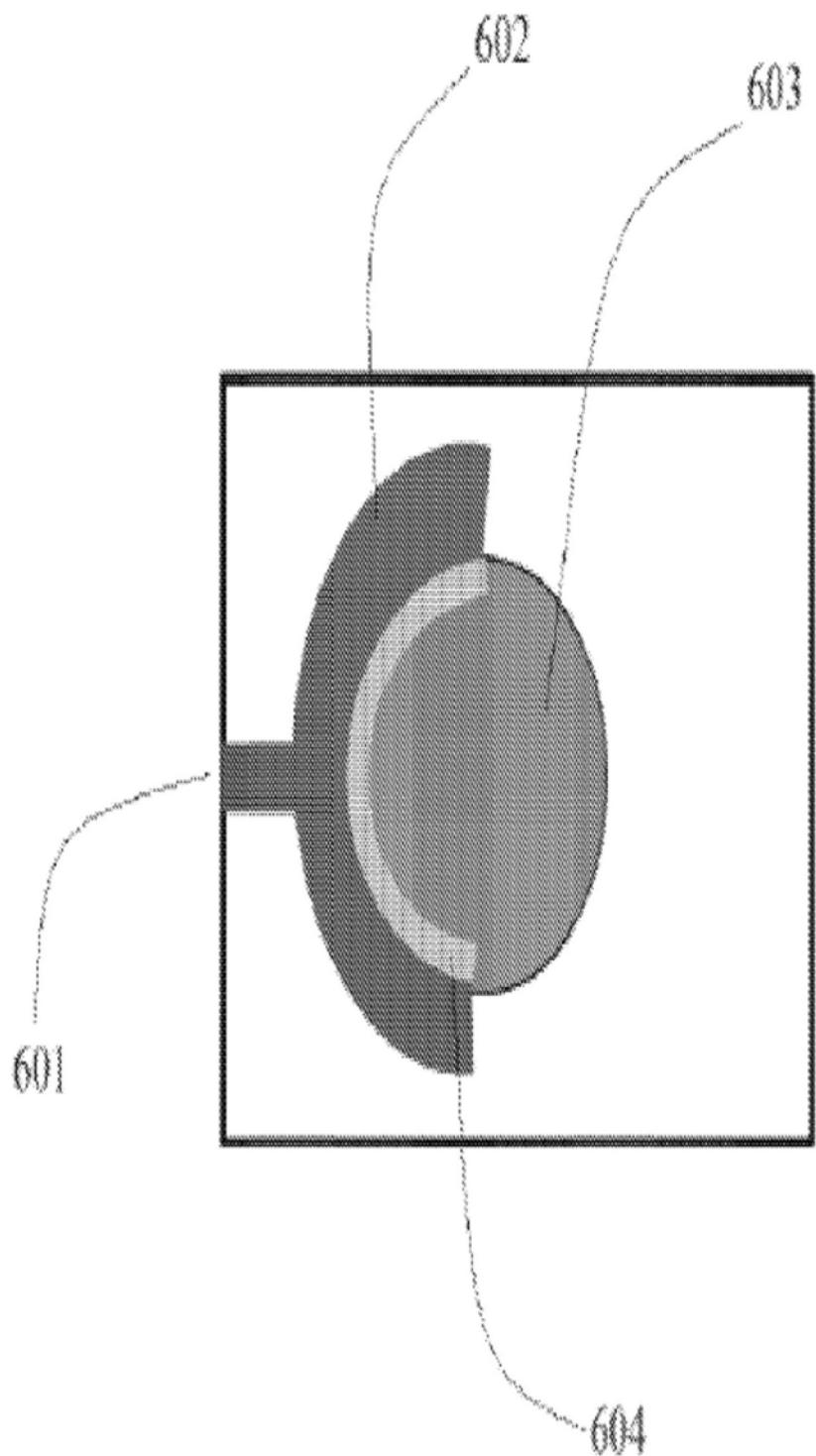


图6

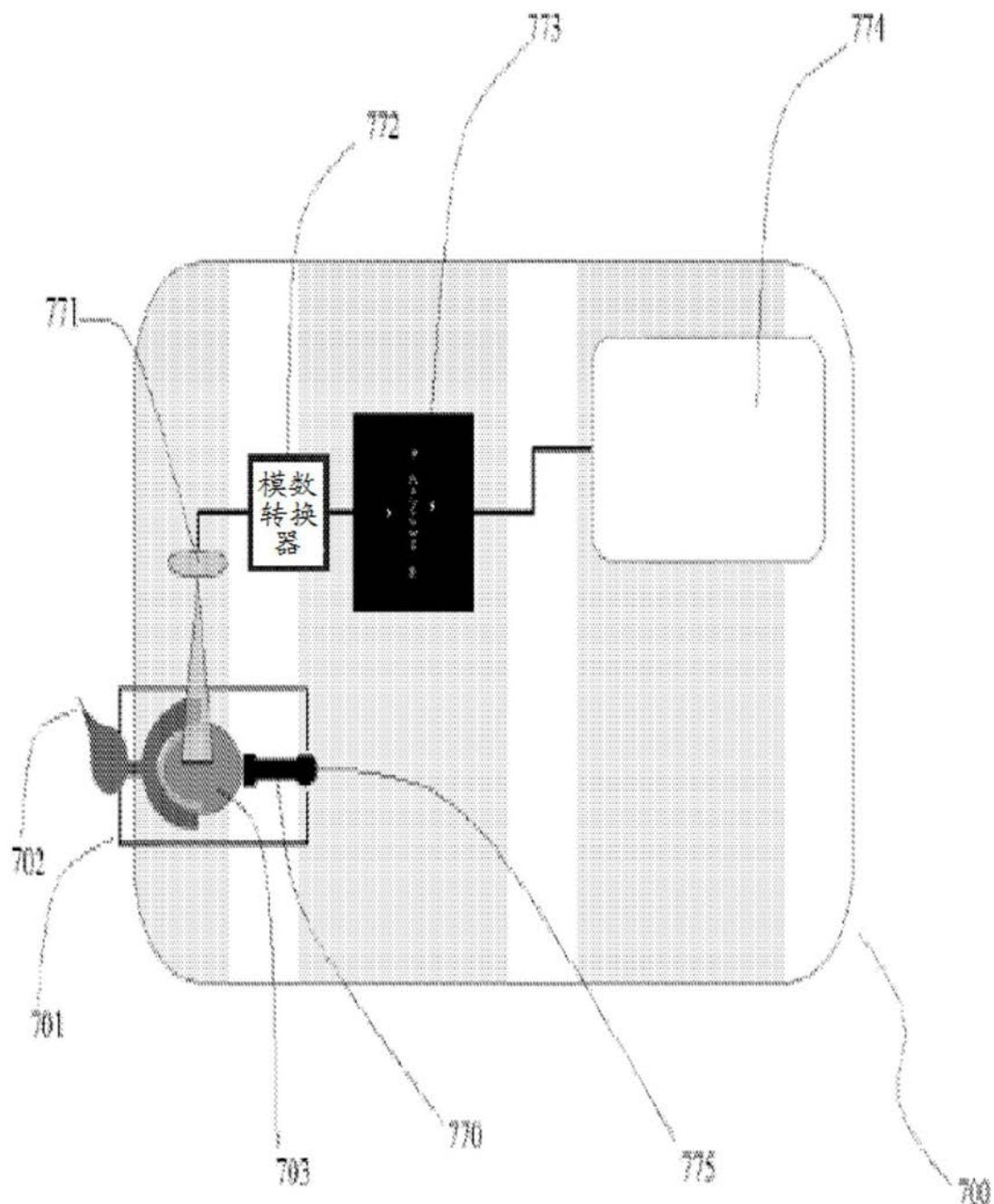


图7

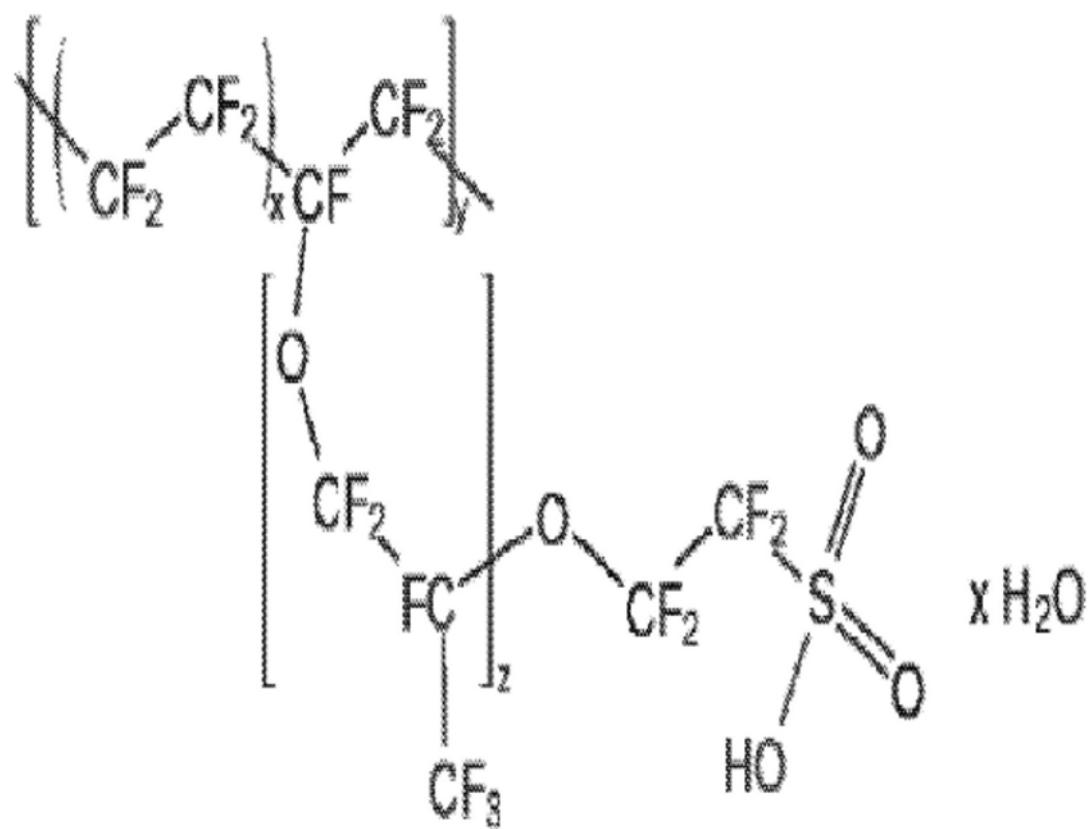


图8

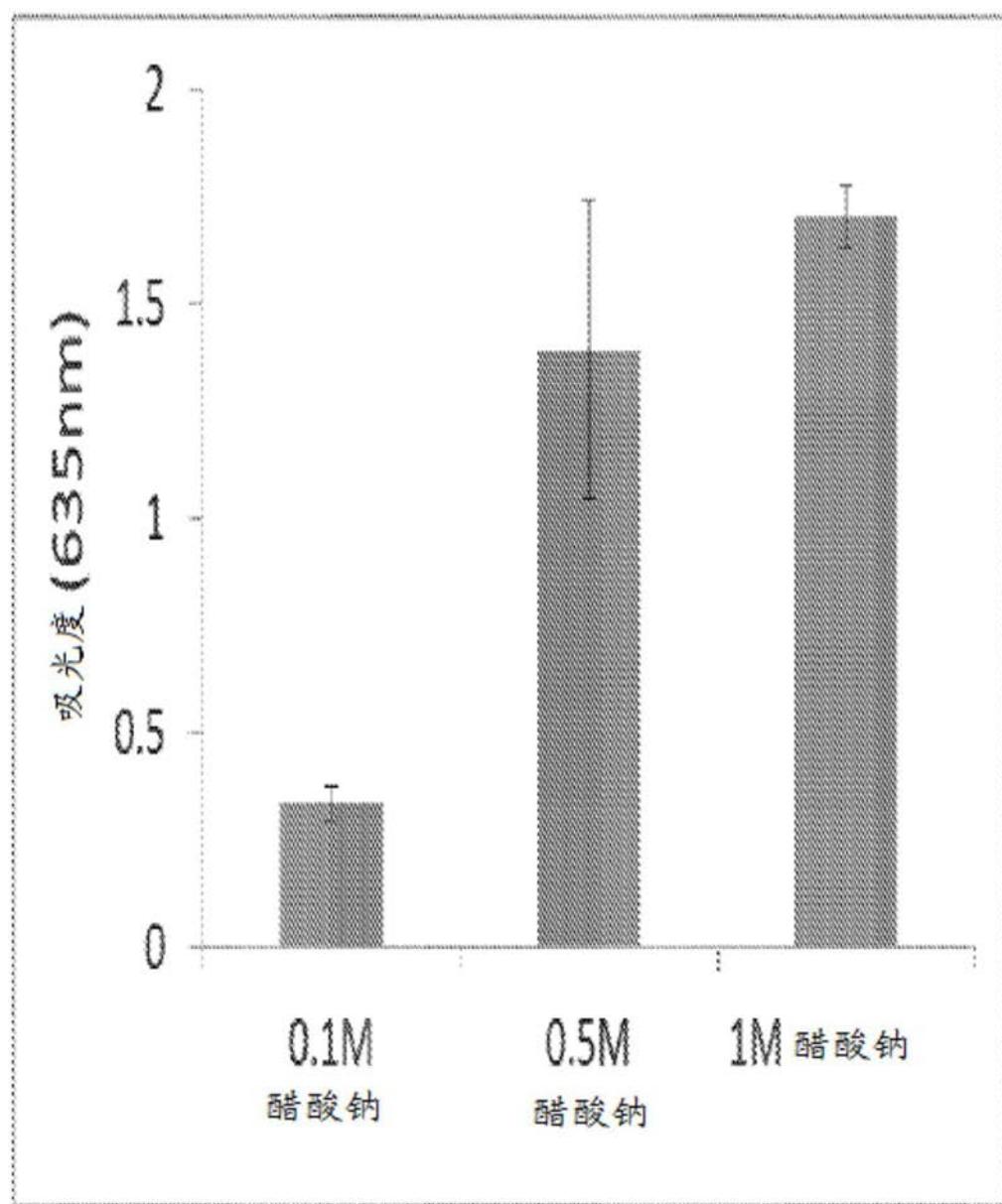


图9

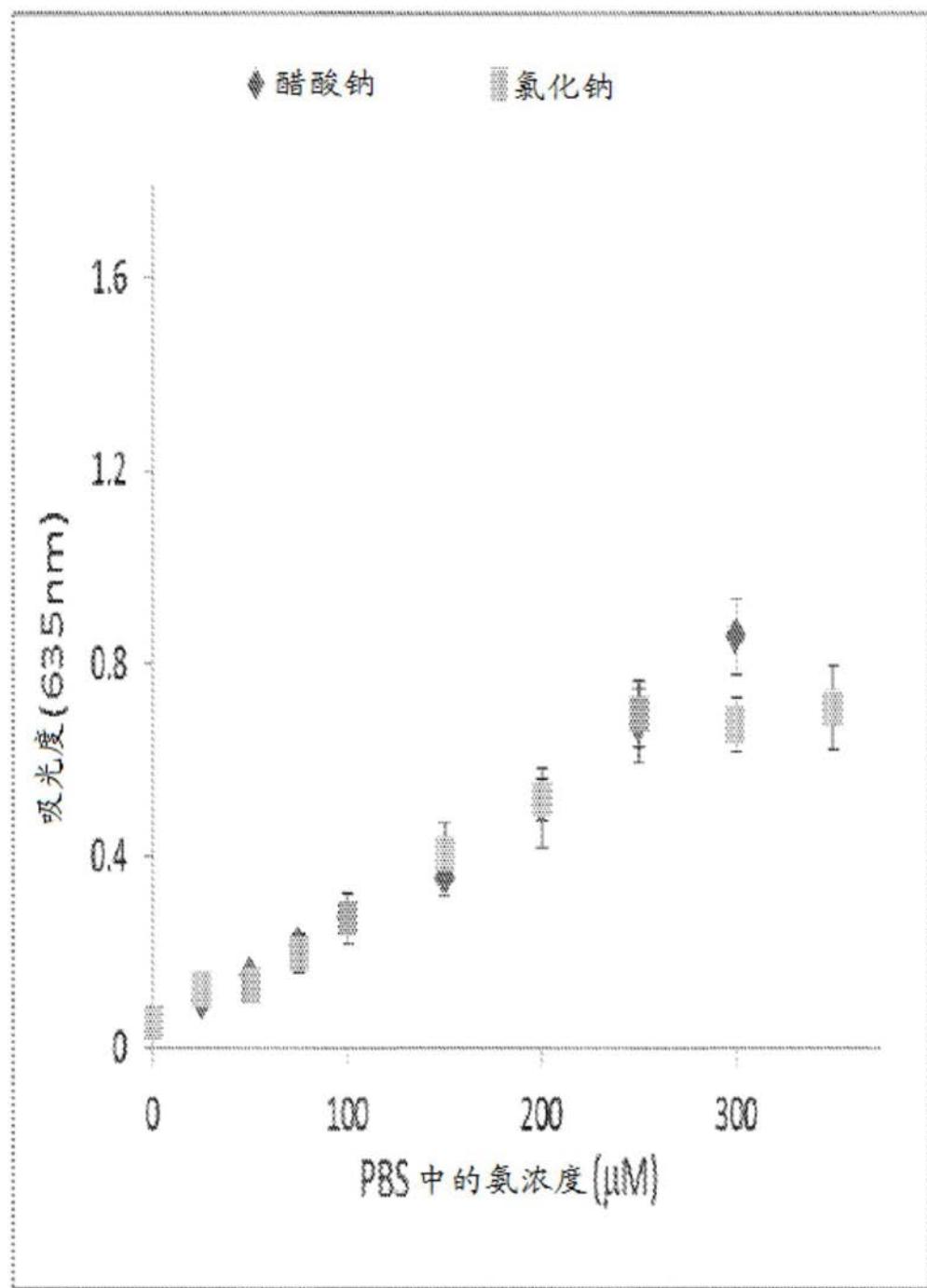


图10

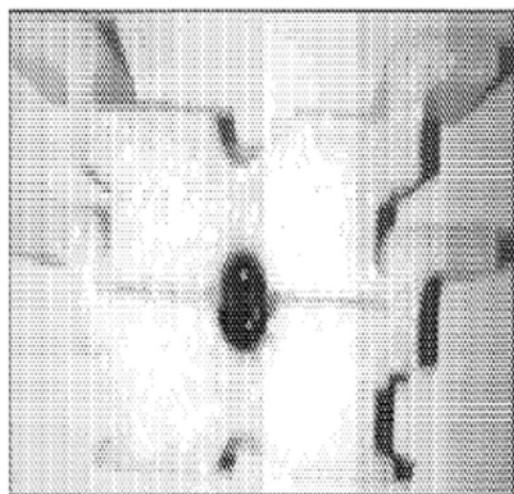


图11

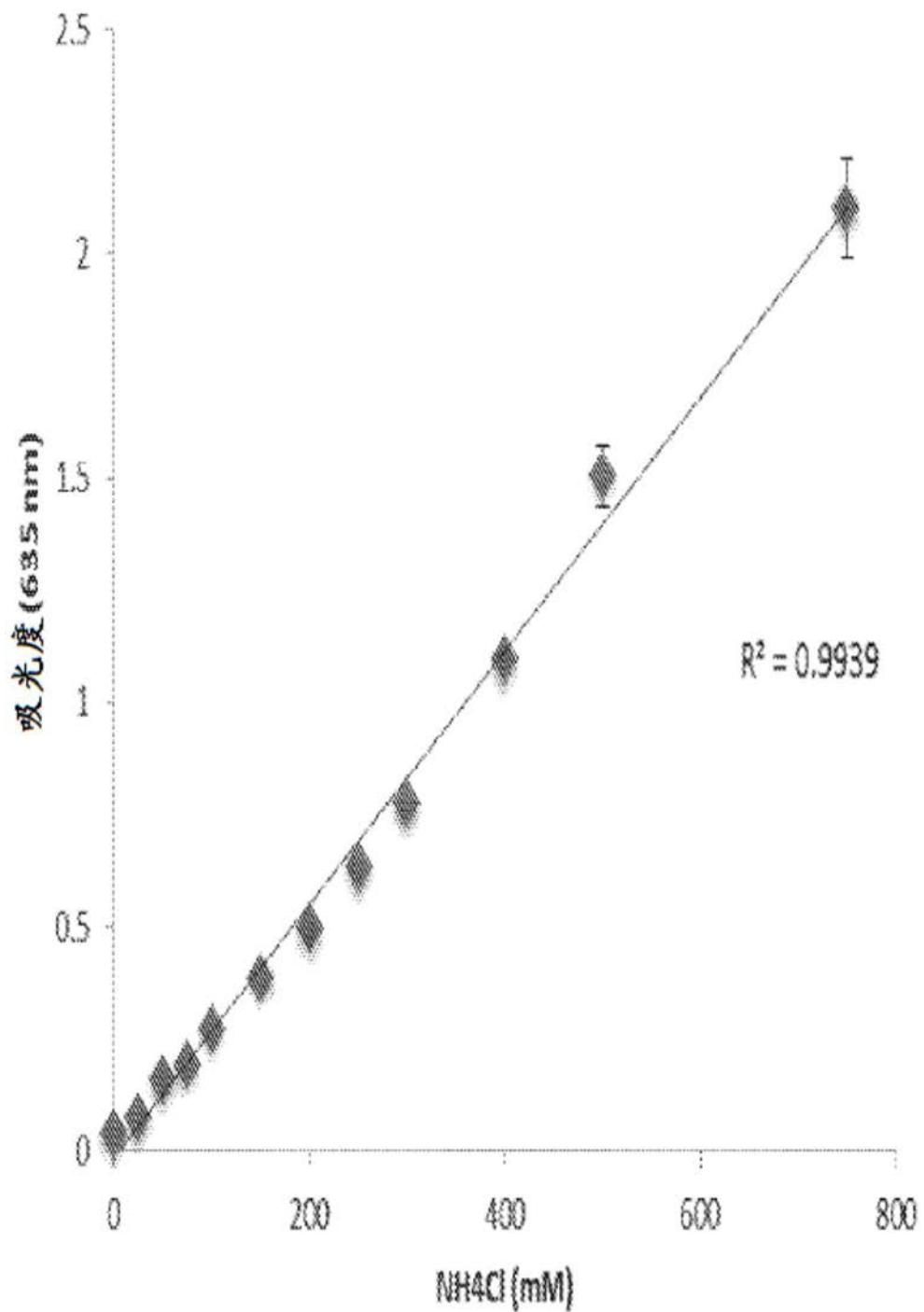


图12

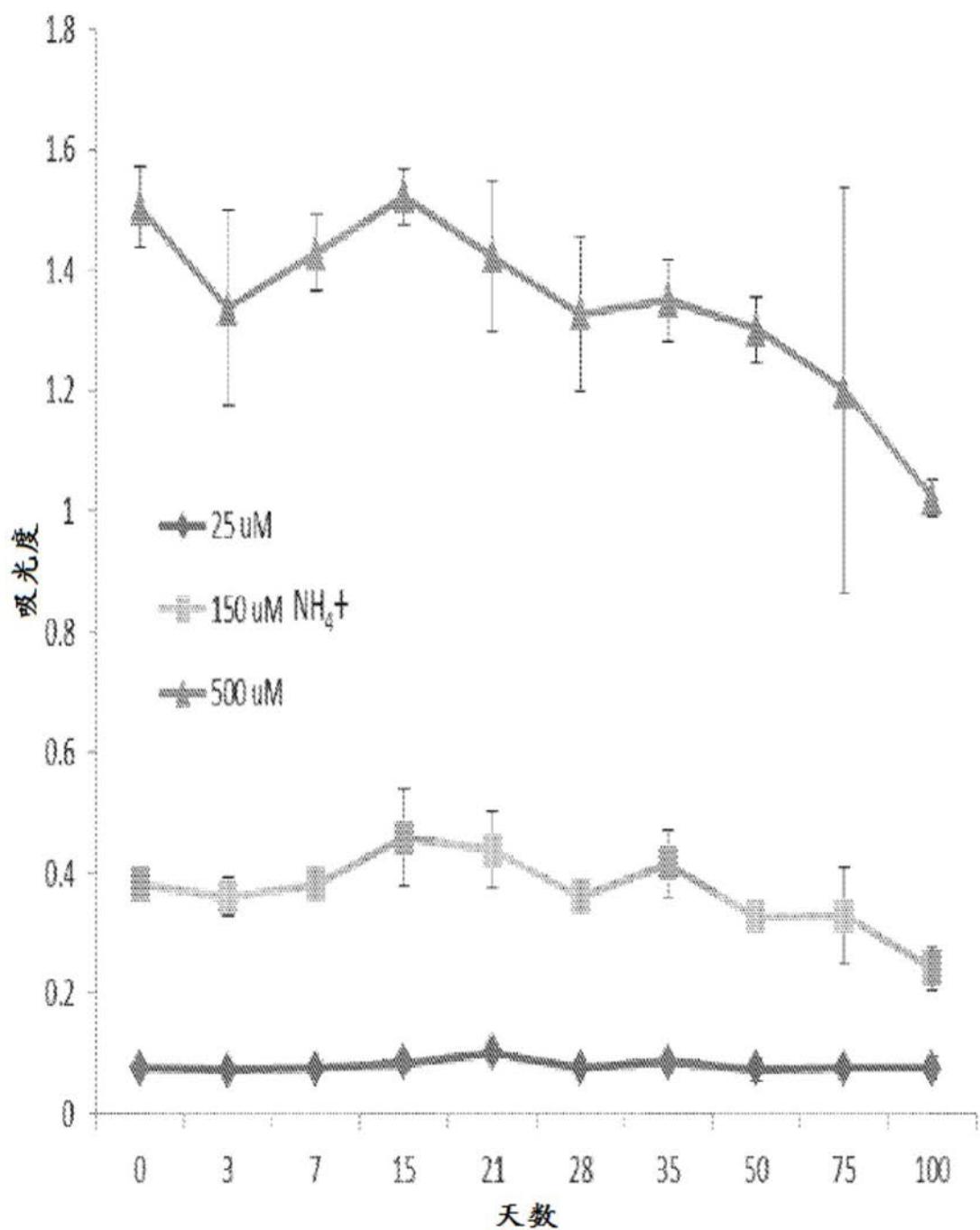


图13

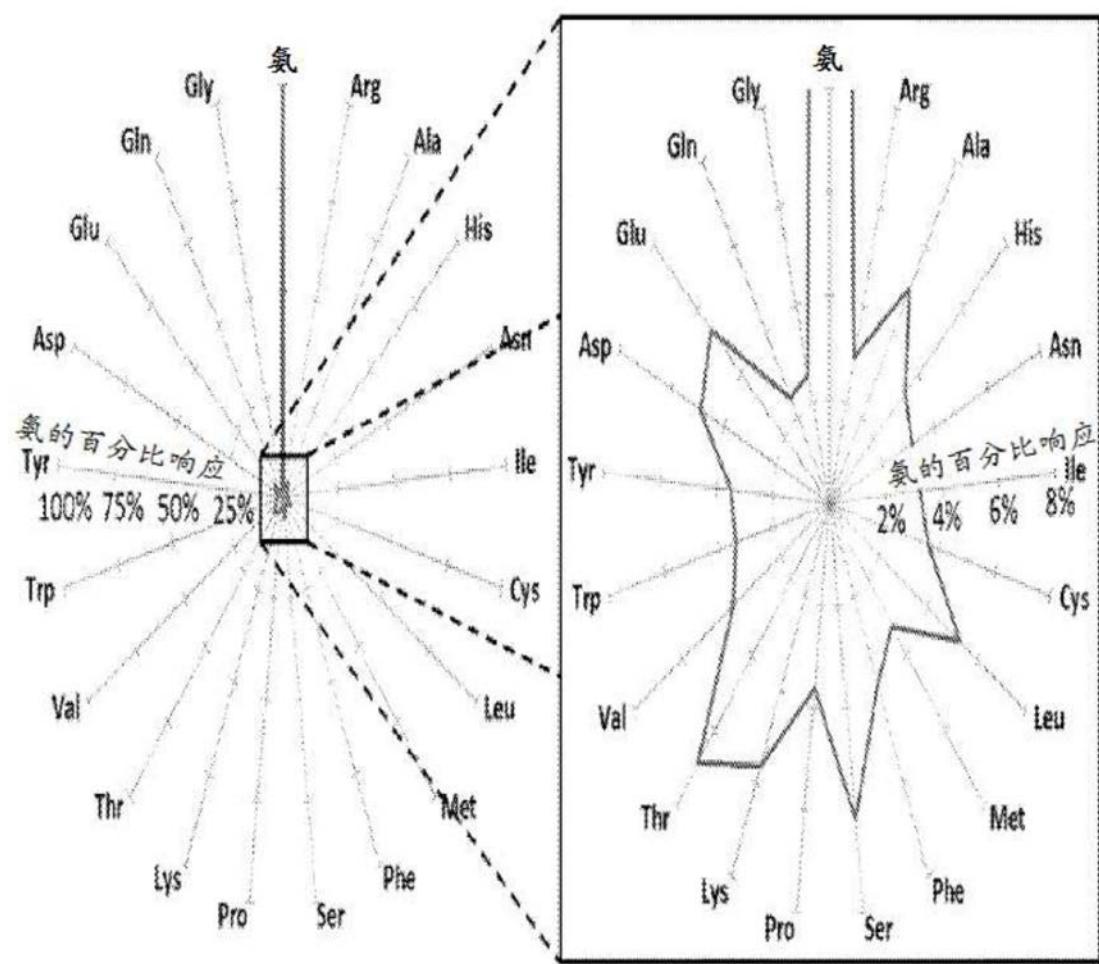


图14

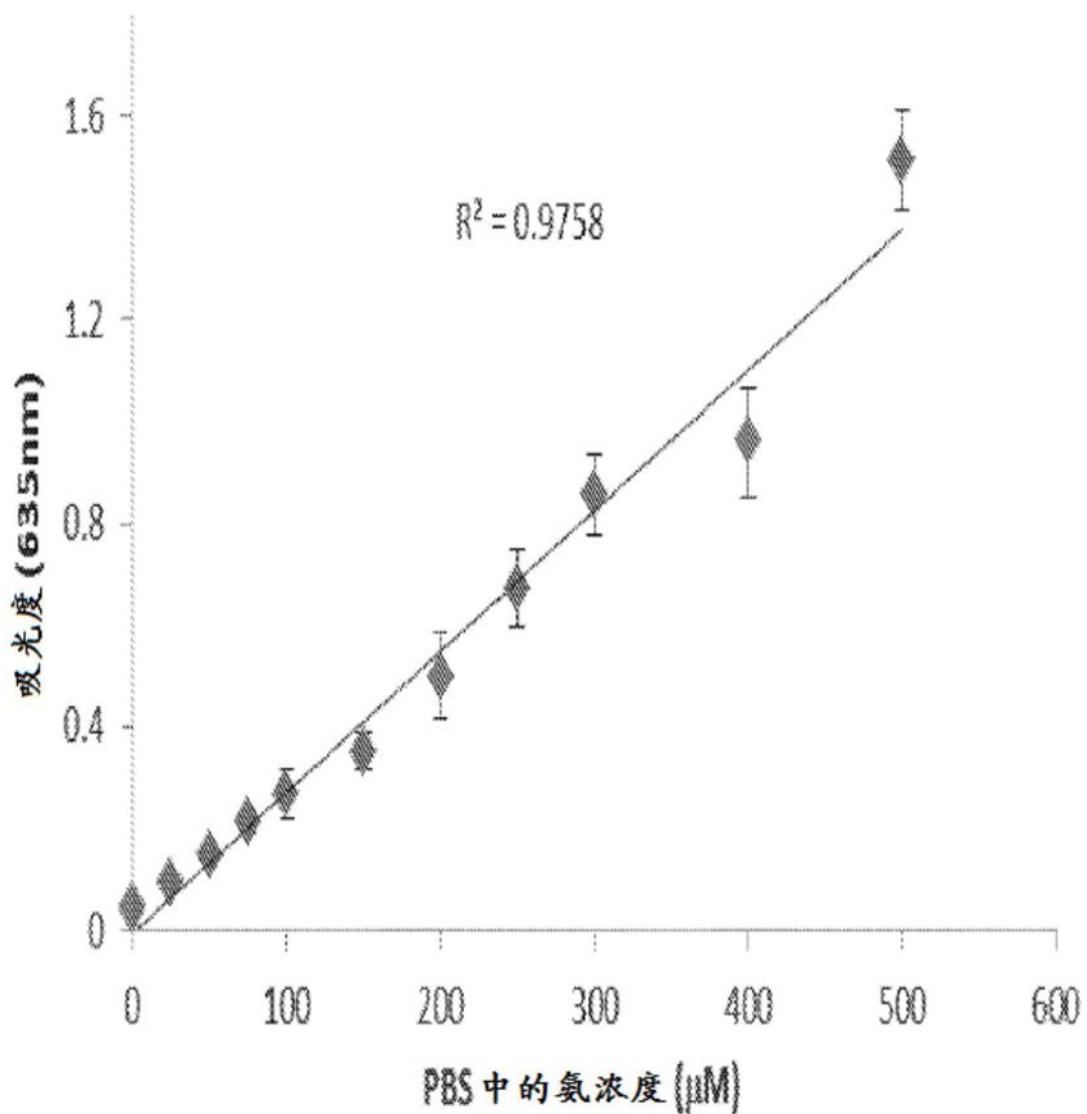


图15

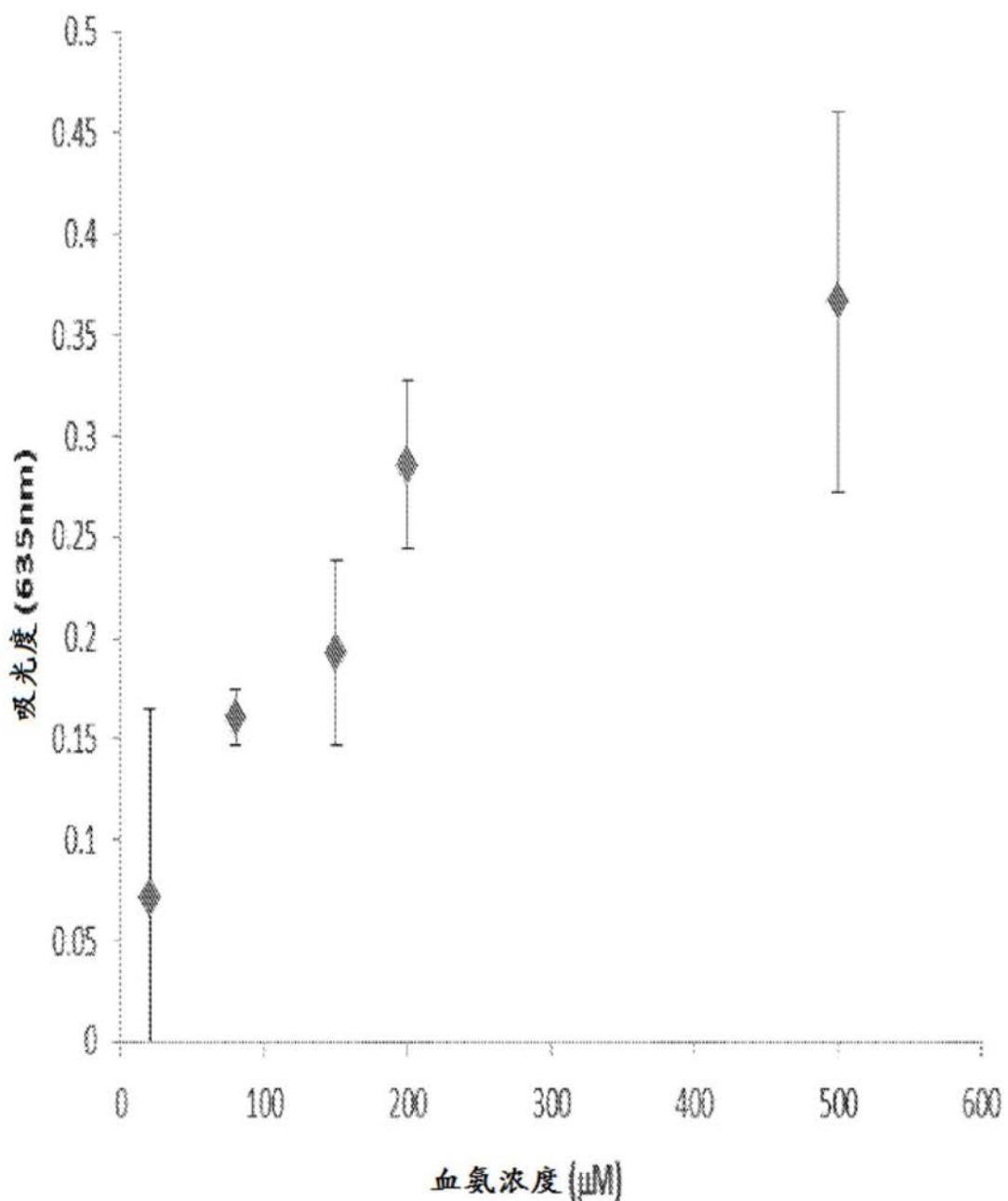


图16

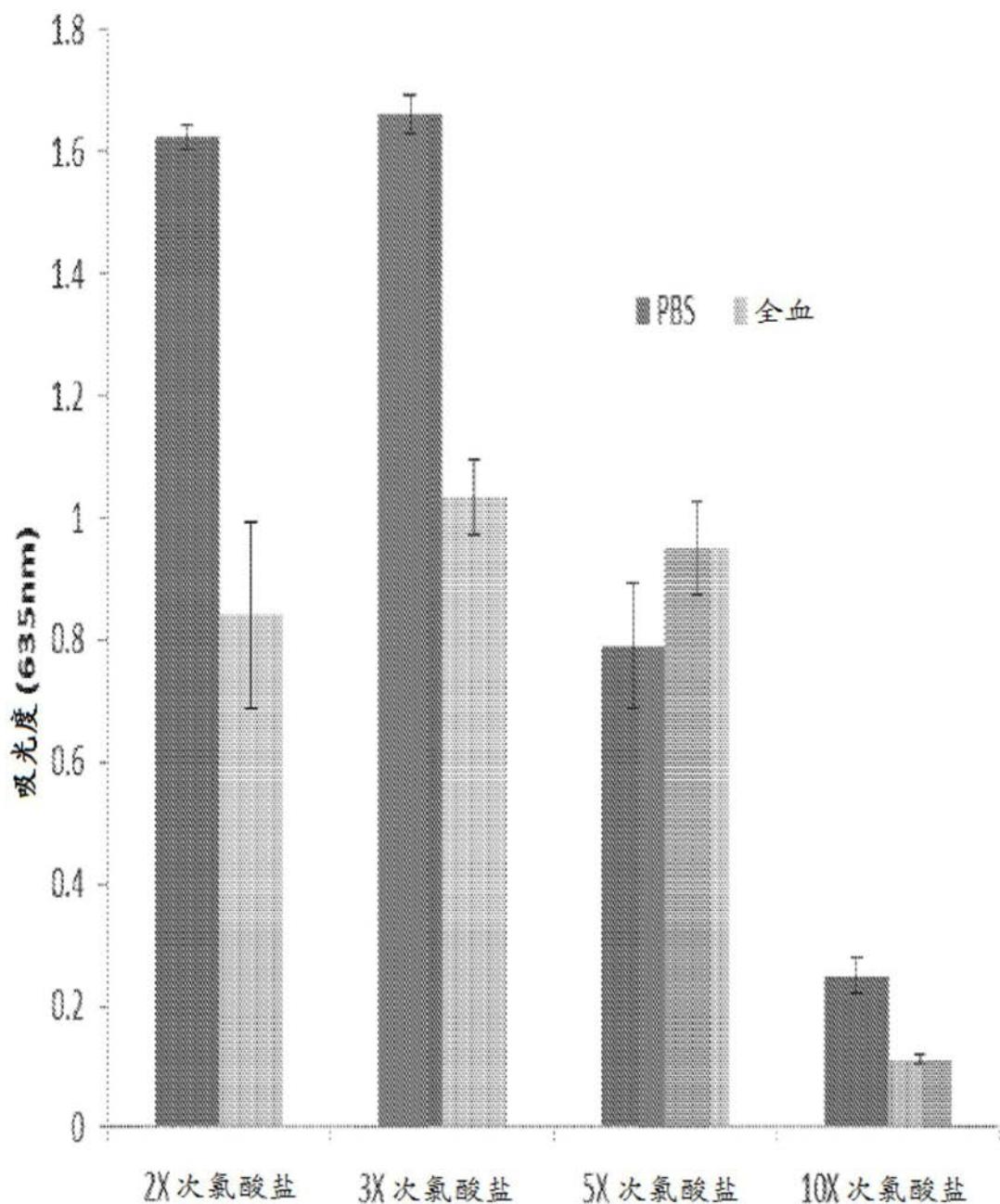


图17

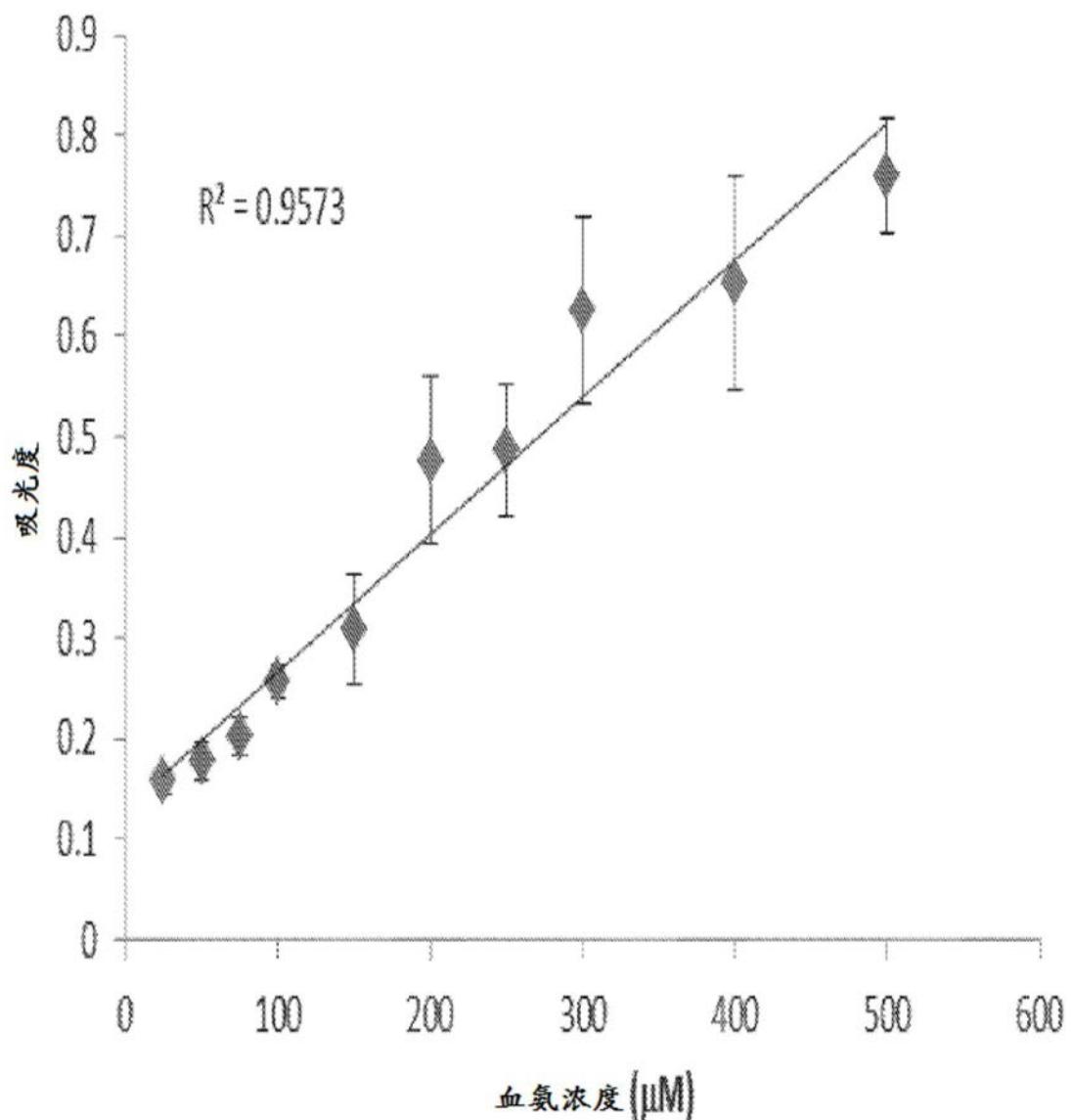


图18

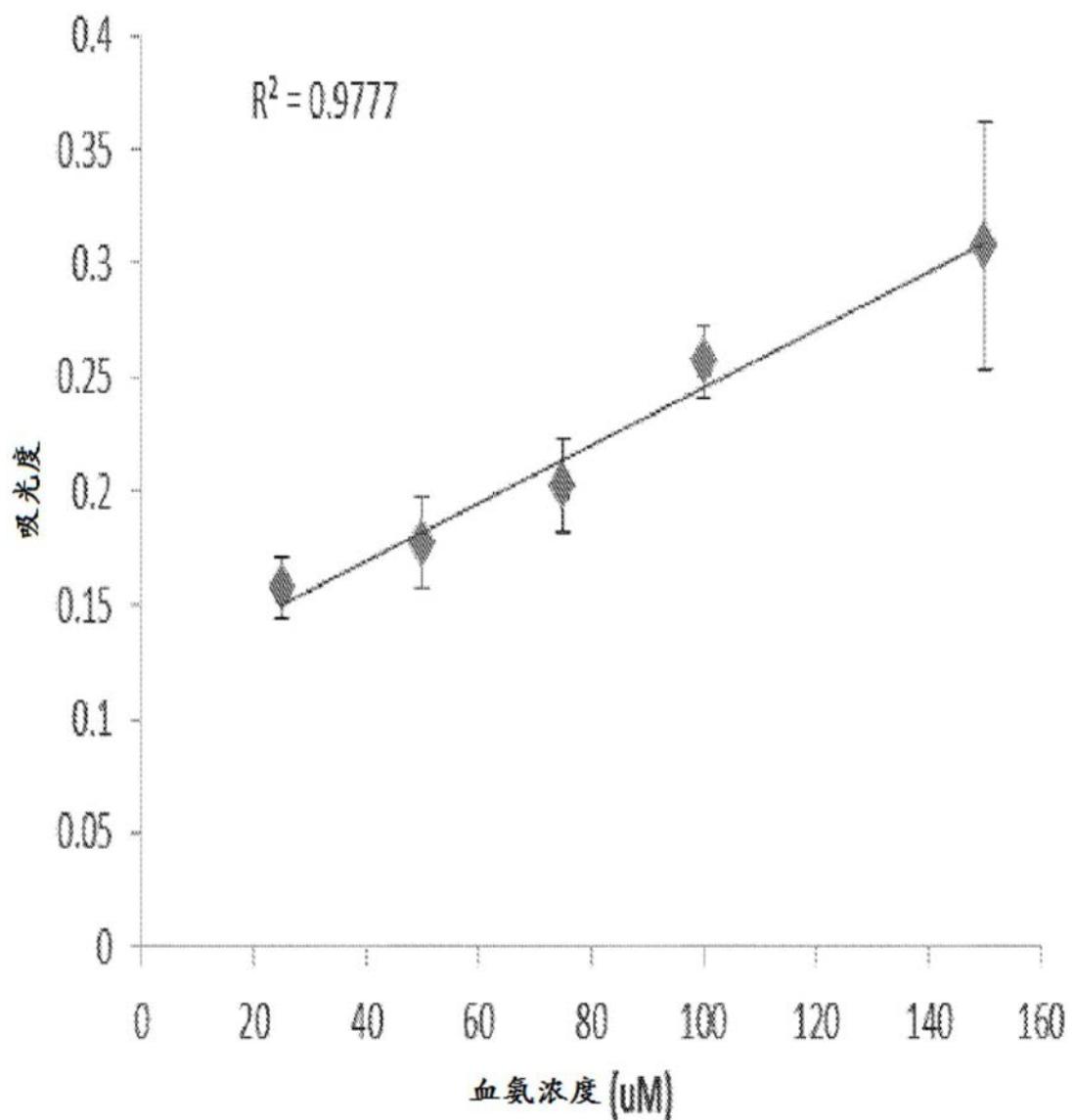


图19

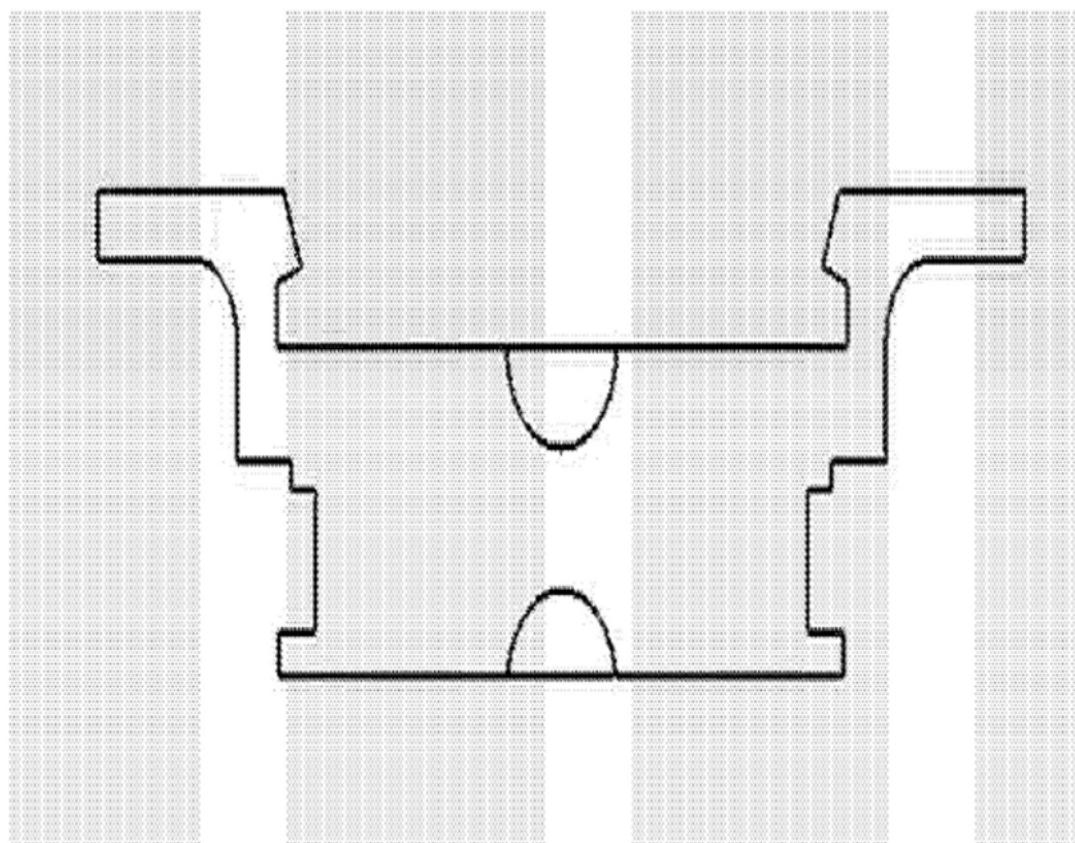


图20

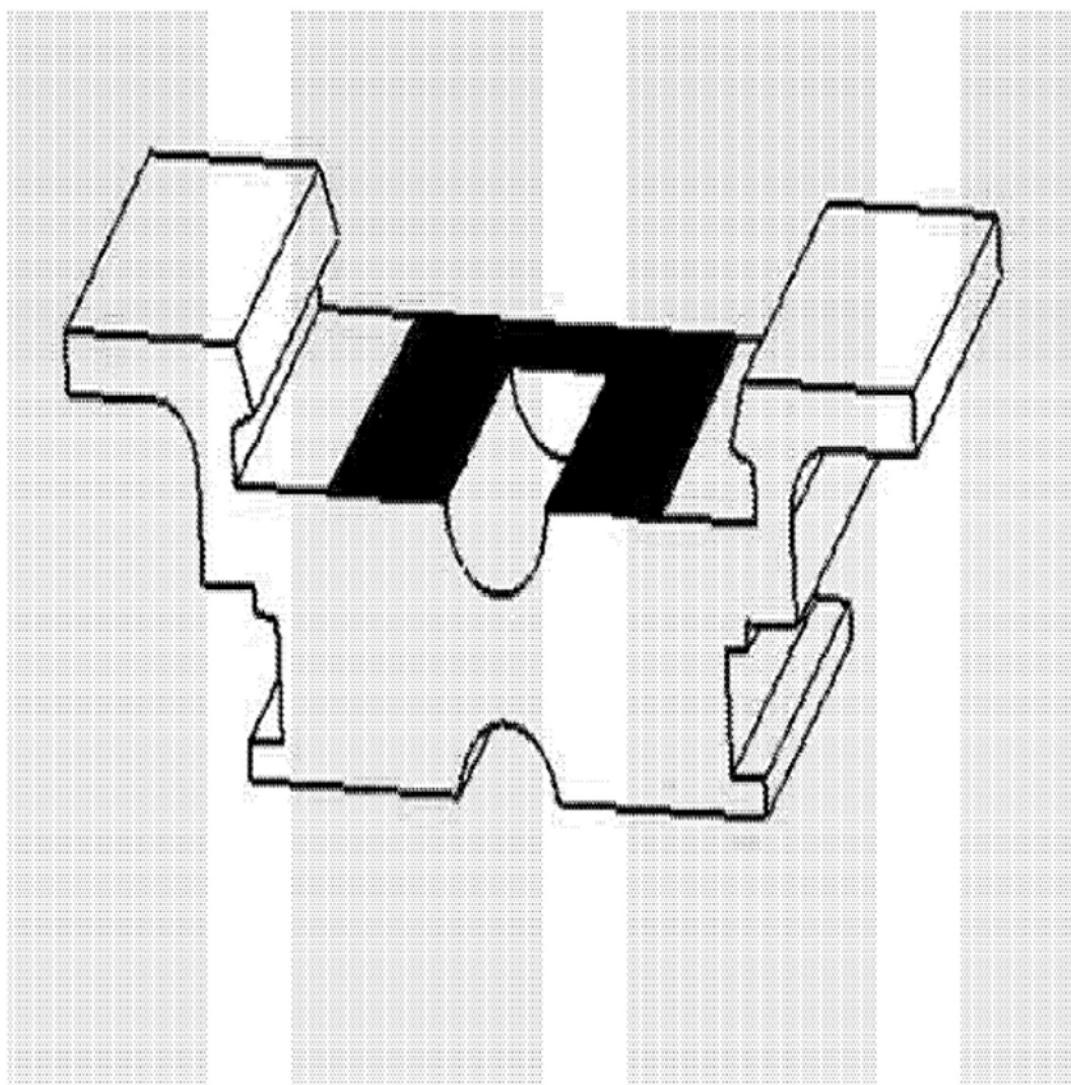


图21

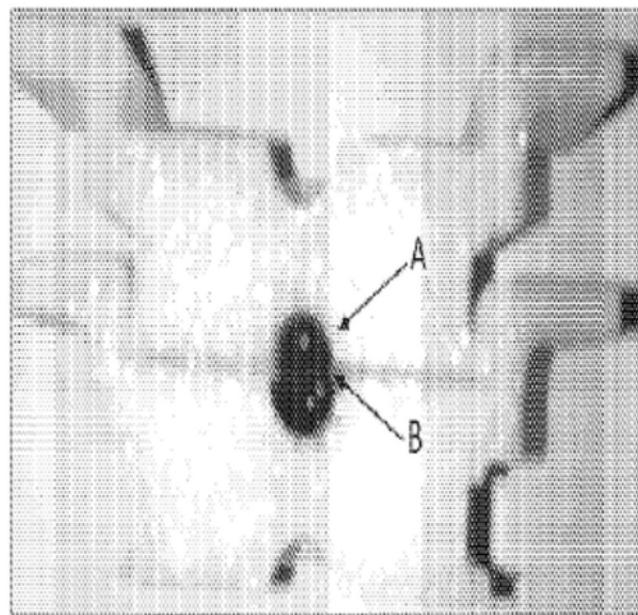


图22

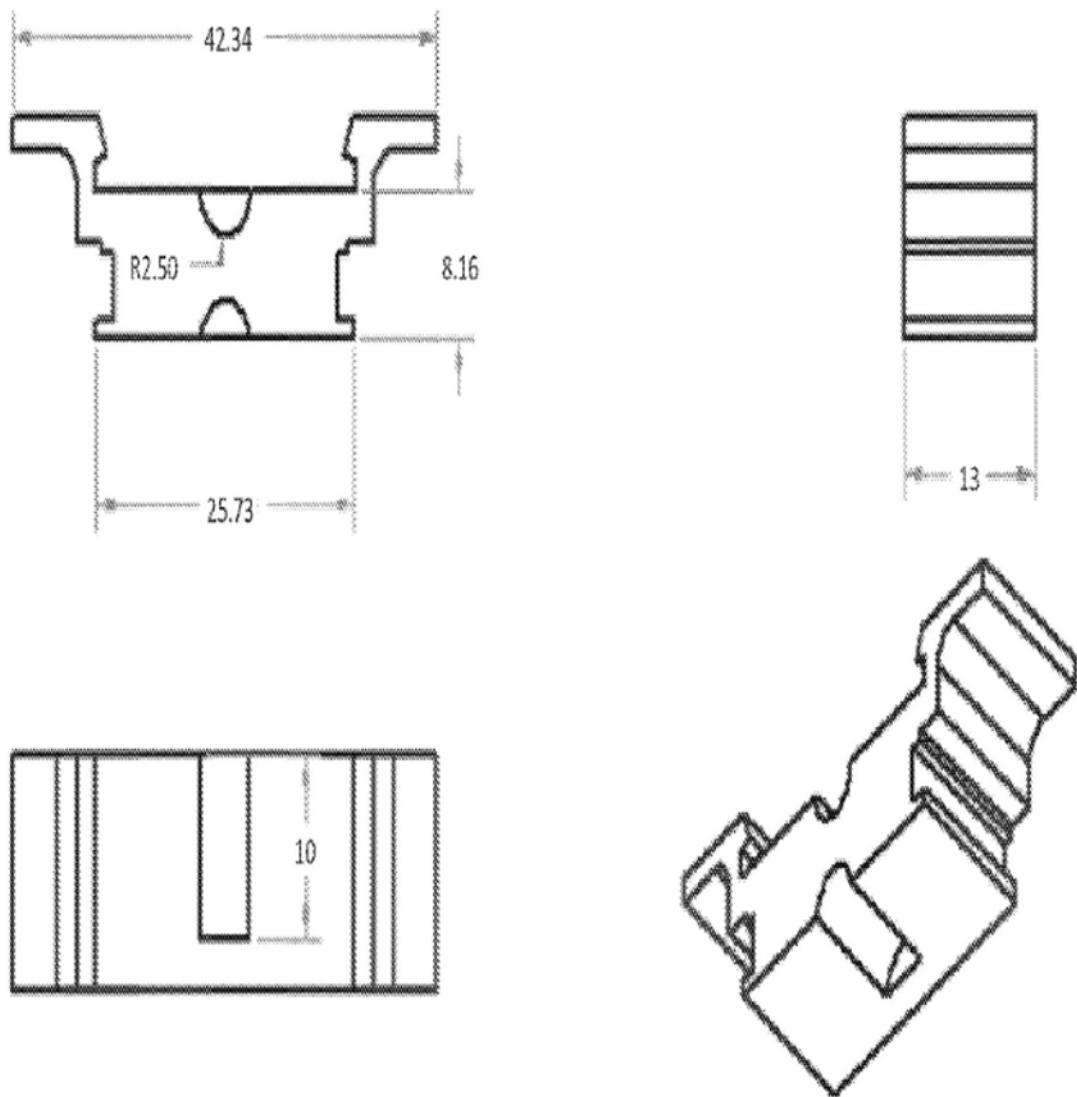


图23

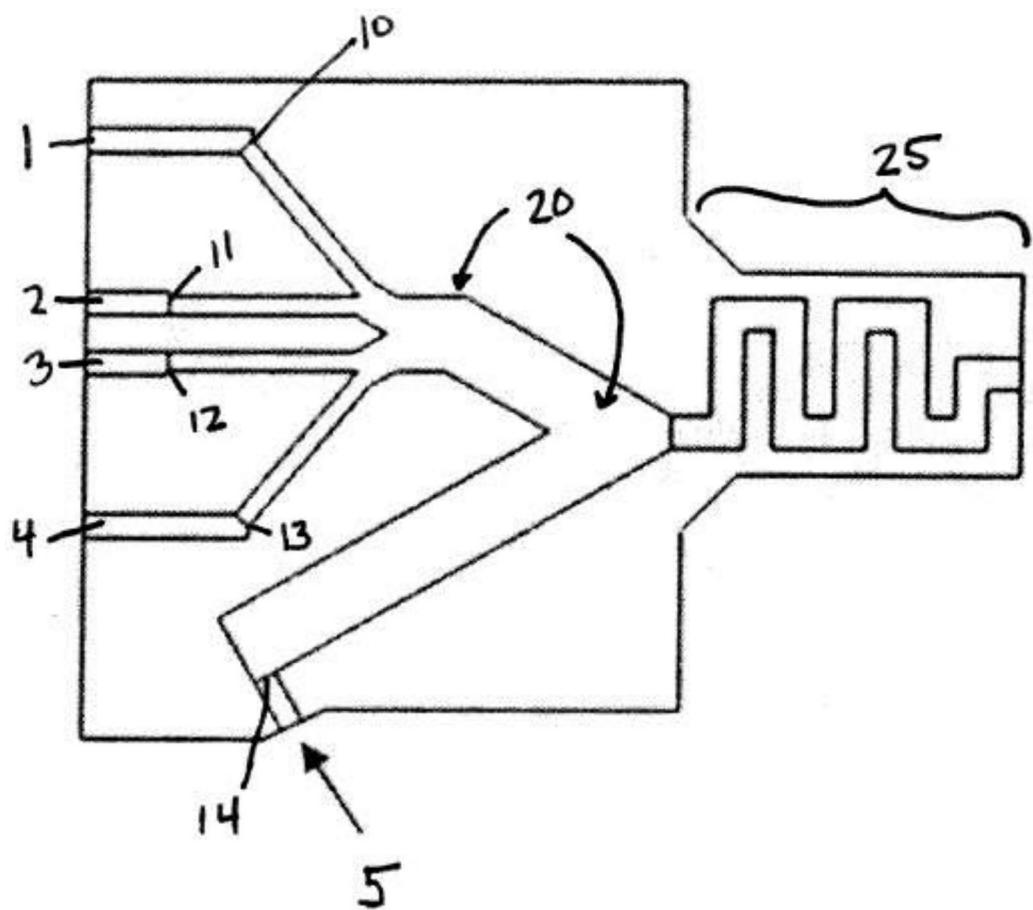


图24

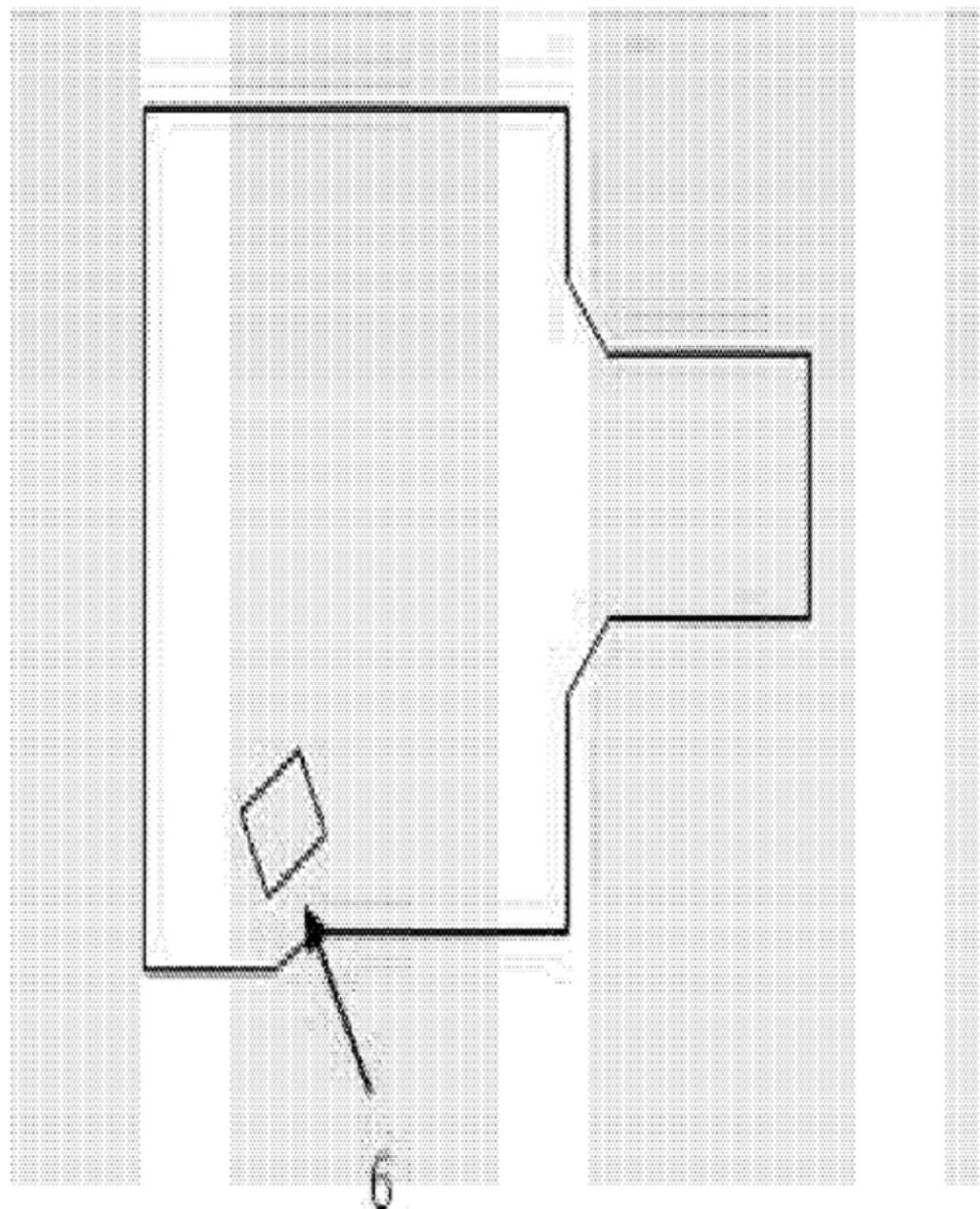


图25

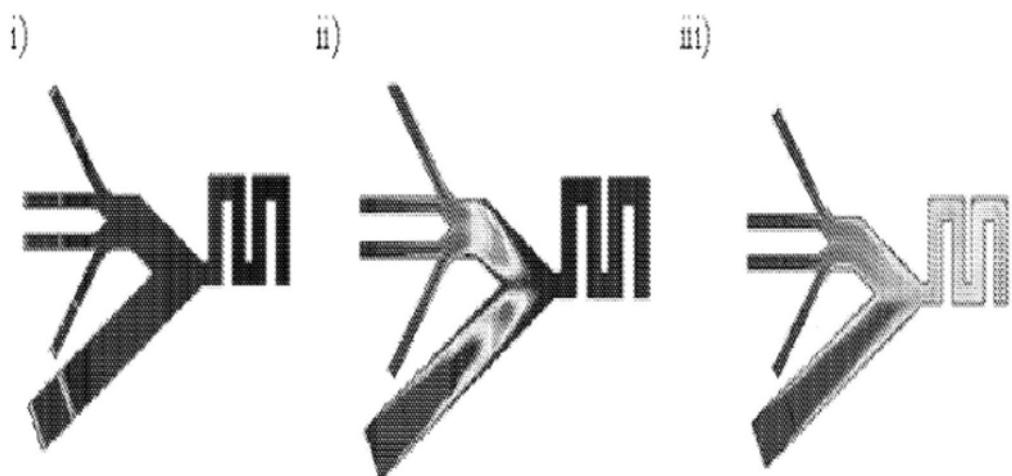


图26

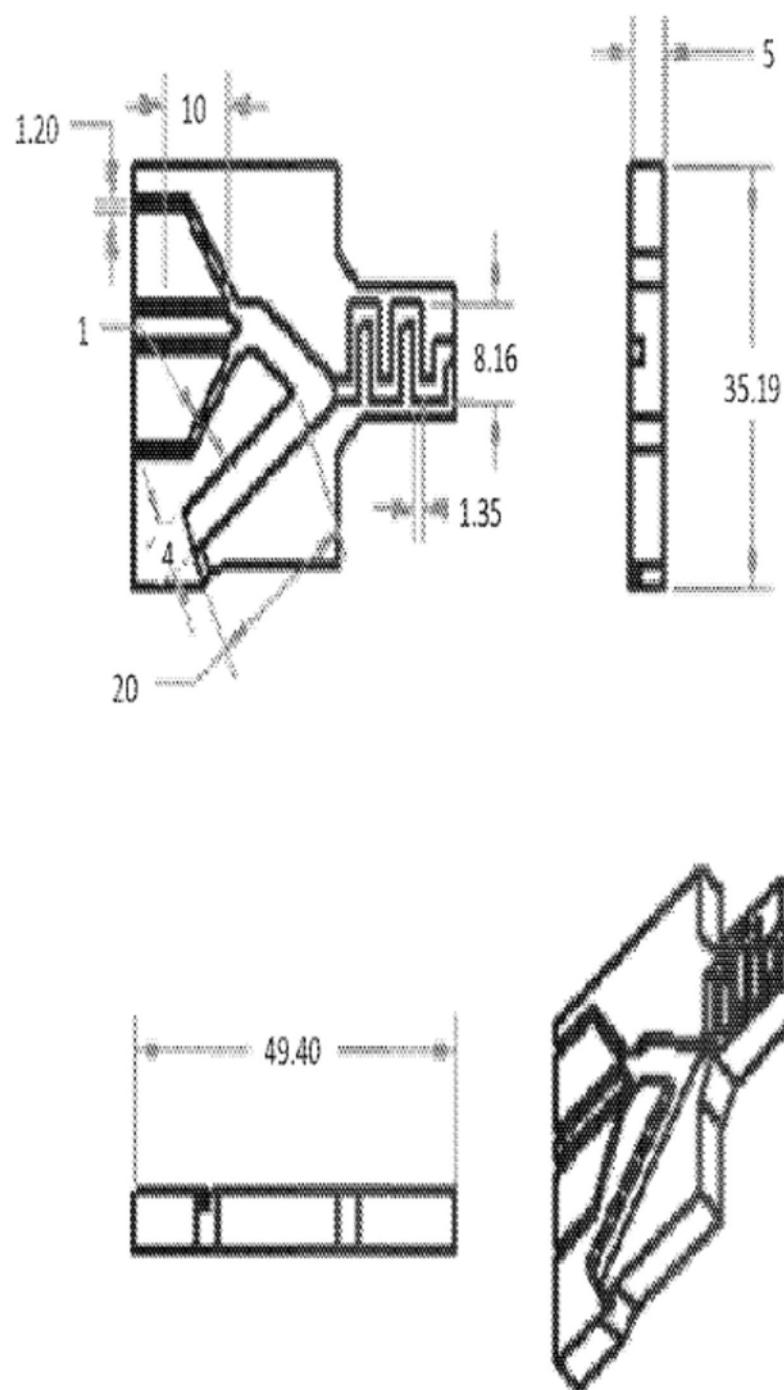


图27

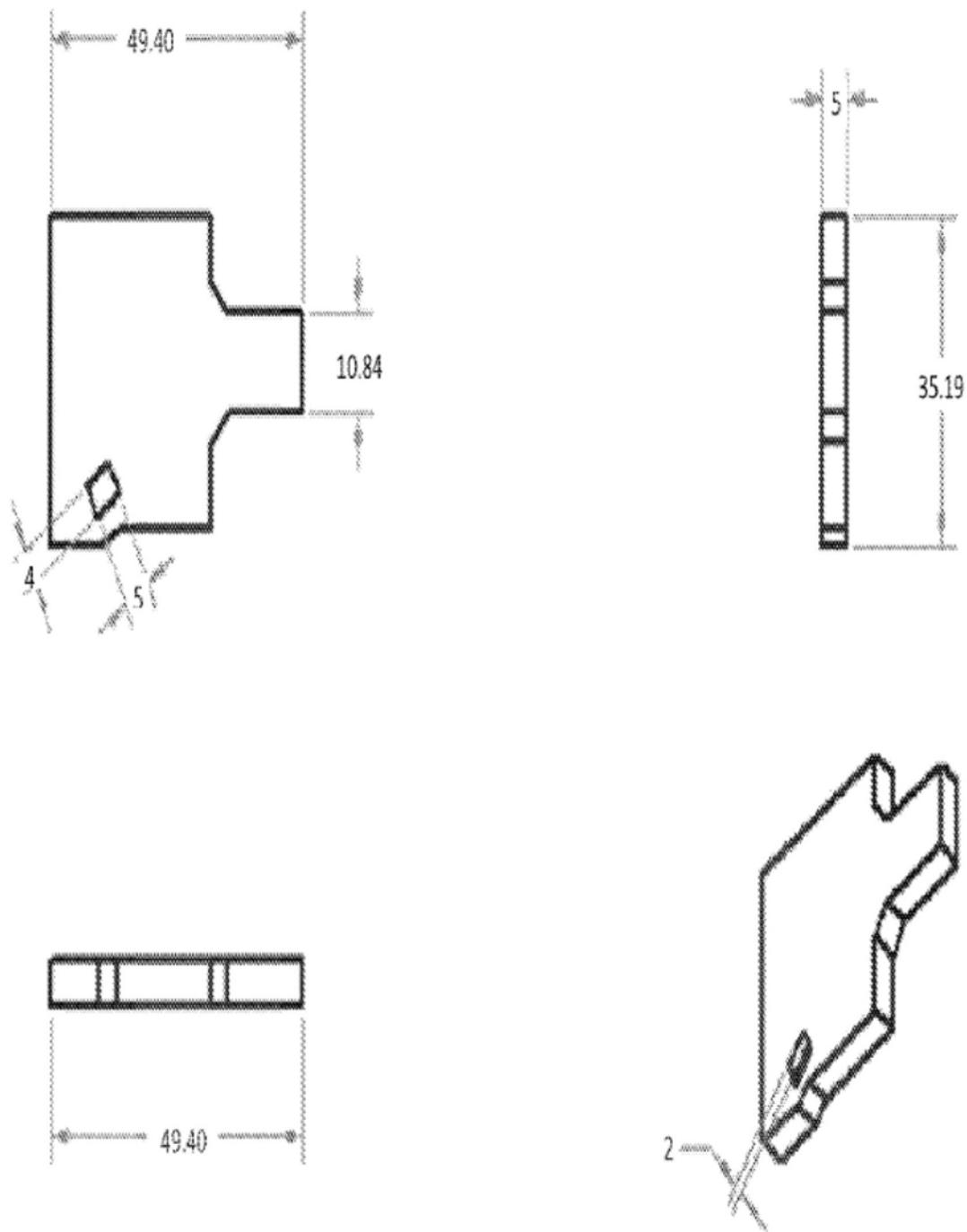


图28

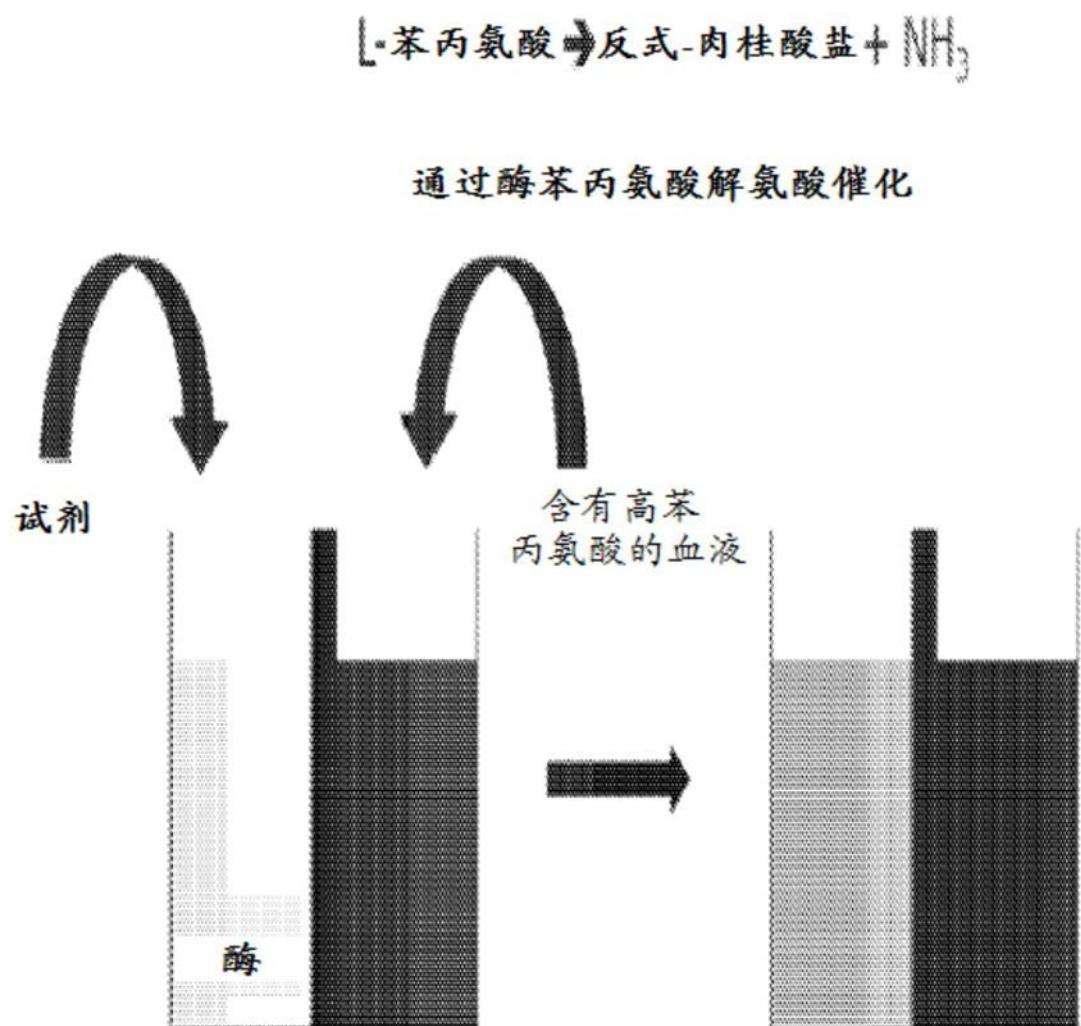


图29