(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111315894 B
(45)授权公告日 2024.08.13

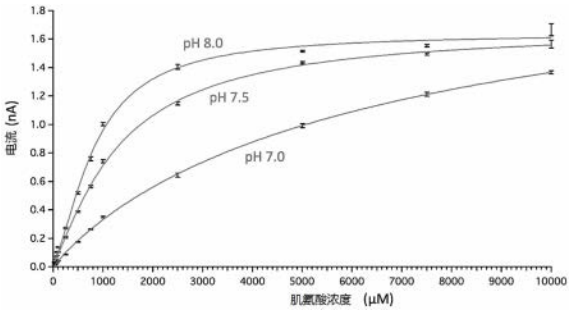
(21)申请号 201880059729.2
(22)申请日 2018.08.03
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111315894 A
(43)申请公布日 2020.06.19
(30)优先权数据
1712592.3 2017.08.04 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.03.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2018/052231 2018.08.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/025815 EN 2019.02.07
(73)专利权人 IP2IPO 创新公司
地址 英国伦敦
(72)发明人 马丁·G·鲍特尔
罗伯特·M·李尔尼
(74)专利代理机构 北京骥驰知识产权代理有限公司 11422
专利代理师 唐晓峰
(51)Int.Cl.
C12Q 1/00(2006.01)
C12Q 1/26(2006.01)
G01N 33/70(2006.01)
C12Q 1/34(2006.01)
(56)对比文件
WO 2016135136 A1,2016.09.01
US 2010112599 A1,2010.05.06
US 2002119507 A1,2002.08.29
JP 2002303631 A,2002.10.18
审查员 王鹏
权利要求书3页 说明书39页 附图15页

(54)发明名称

用酶组合物检测肌酸水平

(57)摘要

本发明提供了允许灵敏测定特定溶液中肌酐水平的组合物和系统。还提供了通过优化检测肌酐的酶催法实时测定肌酐水平和肌酐清除率，从而可以实时监测肾脏功能。认为这在活体受试者的监测以及在用于移植的离体器官例如肾脏的监测中都是有用的。



CN 111315894 B

1.一种监测肌酐清除率的非治疗和非诊断方法,所述方法包括:

a.提供来自受试者的分离样品,并在一个以上的时间点使所述样品与包含肌酐酶,肌酸酶和肌氨酸氧化酶的酶混合物的组合物接触,其中:

i.所述组合物的pH为8.0-8.5;

ii.酶处于溶液中;和

iii.肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶的比例分别在10:5:1和49:8:1U/ml之间;

b.通过用所述酶混合物将肌酐转化为H_2O_2检测肌酐,并用安培传感器检测H_2O_2的水平;和

c.测定肌酐清除率。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述样品是微透析液。

3.根据权利要求1所述的方法,其中肌酐清除率低于参考值表明肾脏功能受损。

4.根据前述权利要求1所述的方法,其中所述酶以包含所有三种酶的组合物的形式提供,或其中所述酶单独提供并分别与灌注液接触。

5.根据前述权利要求1所述的方法,其中所述组合物包含选自EPPS,HEPBS,POPSO,HEPPSO和MOBS的缓冲液。

6.根据前述权利要求1所述的方法,其中所述组合物包含pH 8.0-8.5的EPPS。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述比例是10:5:1。

8.一种用于检测样本中肌酐的传感器系统,所述系统包括:

a.包含肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶的比例分别在10:5:1和49:8:1U/ml之间的酶组合物;

b.和至少第一安培传感器,

c.其中所述酶在缓冲液中,并且所述组合物的pH为8.0-8.5。

9.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述缓冲液不是磷酸盐缓冲液或PBS,和/或不是Tris缓冲液,和/或不是四硼酸盐和/或不是HEPES。

10.根据权利要求8或9中所述的传感器系统,其中所述缓冲液选自EPPS、HEPBS、POPSO、HEPPSO和MOBS。

11.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述组合物或缓冲液的pH为8.5。

12.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述组合物包含pH 8.0-8.5的EPPS。

13.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述组合物还包含脲酶和/或尿酸酶和/或检测胱抑素C的工具和/或检测白蛋白的工具。

14.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述组合物中的肌氨酸氧化酶和/或肌酐酶和/或肌酸酶的浓度使得在最终反应混合物中肌酐酶的浓度为至少300U/m l,和/或肌酸酶的浓度为至少120U/ml,肌氨酸氧化酶的浓度为至少10U/ml。

15.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述比例为10:5:1。

16.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述组合物使得由含有肌酐的样本与所述酶组合物混合而产生的最终混合溶液包含量为600U/m l、300U/m l和60U/m l的肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶。

17.根据权利要求8所述的传感器系统,包括微流控电路、微流控装置和微透析探针中的任一种或多种。

18.根据权利要求8所述的传感器系统,还包括连续流系统。

19.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述系统还包括用于从患者取样本或闭环离体灌注器官取样本的工具。

20.根据权利要求19所述的传感器系统,其中取自患者的样本是微透析液。

21.根据权利要求8所述的传感器系统,其布置为使得在使样本与传感器接触之前,将组合物的肌氨酸氧化酶和/或肌酐酶和/或肌酸酶添加到样本中,其中在与传感器接触之前,添加传感试剂大于1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250秒,5、5.5、6、6.5、7.5、8、8.5、9、9.5或10分钟。

22.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述系统包括在添加所述传感试剂之前或之后增加样本中氧量的装置。

23.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述系统可以检测浓度小于10uM。

24.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述传感器系统可以相对于40uM至120uM的本底肌酐水平检测小于1uM,或小于2uM或小于3uM或小于4uM,或小于5uM或小于7.5uM或小于10uM的肌酐浓度变化。

25.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述系统包括用于从传感器收集数据的装置。

26.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述系统还包括用于数据分析的装置。

27.根据权利要求8所述的传感器系统,还包括至少一个废物收集容器。

28.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述系统是移动的系统。

29.根据权利要求8所述的传感器系统,其中所述系统包括计算肌酐水平/肌酸酐清除率/肾小球滤过率的装置。

30.根据权利要求8所述的传感器系统,进一步包括递送试剂。

31.根据权利要求8-30中任一项所述的传感器系统,其中所述系统还包括第二传感器和任选地第二装置,以获得第二样本,其中在第二传感器处进行检测之前,使第二样本与包含肌酸酶和肌氨酸氧化酶的第二传感试剂接触。

32.根据权利要求31所述的传感器系统,其中所述系统包括从第一传感器获得的数据中减去从第二传感器获得的数据的装置。

33.根据权利要求31所述的传感器系统,其中所述第一传感器连续地捕获数据。

34.根据权利要求31所述的传感器系统,其中所述第一传感器至少每24小时捕获一次数据。

35.一种用于通过将肌酐转化为用安培传感器可检测的H_2O_2检测样品中肌酐的组合物,其包含肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶的比例分别在10:5:1和49:8:1U/ml之间的酶,其中所有的酶都在缓冲液中,并且所述组合物的pH为8.0-8.5,其中所述组合物可在透析液样品中稀释,以提供包含大于100U/ml肌酐酶的最终混合溶液。

36.根据权利要求35所述的组合物,其中所述缓冲液不是磷酸盐缓冲液或PBS,和/或不是Tris缓冲液,和/或不是四硼酸盐和/或不是HEPES。

37.根据权利要求35或36中任一项所述的组合物,其中所述缓冲液选自EPPS、HEPBS、POPSO、HEPPSO和MOBS。

38.根据权利要求35所述的组合物,其中所述缓冲液的pKa在7.0-9.0之间。

39.根据权利要求35所述的组合物,其中所述组合物的pH为8.5。

40.根据权利要求35所述的组合物,其中所述组合物包含pH 8.0-8.5的EPPS。

41.根据权利要求35所述的组合物,其进一步包含脲酶和/或尿酸酶和/或检测胱抑素C的工具和/或检测白蛋白的工具。

42.根据权利要求35所述的组合物,其中所述酶的浓度使得在最终反应混合物中肌酐酶的浓度为至少300U/ml,和/或肌酸酶的浓度为至少120U/ml,肌氨酸氧化酶的浓度为至少10U/ml。

43.根据权利要求35所述的组合物,其中所述组合物使得由含有肌酐的样本与所述组合物混合而产生的最终混合溶液包含比率为10:5:1至49:8:1U/ml的肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶。

44.根据权利要求43所述的组合物,其中所述比率是10:5:1。

45.根据权利要求35所述的组合物,其中所述组合物使得由含有肌酐的样本与所述组合物混合而产生的最终混合溶液包含量为600U/ml、300U/ml和60U/ml的肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶。

46.一种测定来自离体灌注肾脏的离体样本中肌酐水平的非治疗和非诊断的体外方法,其中所述方法包括使用根据权利要求8-45中任一项的组合物或传感器系统。

47.根据权利要求46所述的方法,其中,所述方法用于测定肌酐水平和/或肌酐清除率和/或肾小球滤过率。

48.根据权利要求47所述的方法,其中,所述方法用于实时测定肌酐水平和/或肌酐清除率和/或肾小球滤过率的水平。

49.根据权利要求46-48中任一项所述的方法,其中所述离体样本为透析液或微透析液。

50.一种用于监测用于移植的离体肾脏的试剂盒,包含:

根据权利要求35-45中任一项的组合物;

肌酐;

pH为8.0-8.5的缓冲剂,选自EPPS,HEPBS,POPSO,HEPPSO和MOBS;

微透析探针;

至少一个废物容器;和

至少一台精密泵。

51.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述受试者是先前施用肌酐加标样的受试者。

52.根据权利要求6所述的方法,其中所述组合物包含pH 8.0-8.5的50mM EPPS。

用酶组合物检测肌酸水平

发明领域

[0001] 本发明提供了允许灵敏测定特定溶液中肌酐水平的组合物和系统。还提供了在实时测定肌酐水平和肌酐清除率中使用该组合物和系统的方法,从而可以实时监测肾脏功能。

发明背景

[0002] 尽管肾脏具有许多不同的组成部分,例如肾单位和肾小球,其功能可能会个别受损,但是目前测定受试者肾脏功能的方法评估肾脏的总体功能,目前尚无法测定肾脏的哪个精确部分受到影响。这种肾脏功能的总体测量称为肾小球滤过率(GFR),并评估肾脏从血液中清除物质(特别是肌酐)的能力。这是临床环境中常规使用的方法。

[0003] GFR通常报告为标准化为1.73m^2体表面积的以ml/min为单位的值。正常的成人GFR在90ml/min/1.73m^2和130ml/min/1.73m^2之间。GFR恶化是评估患者慢性肾脏疾病分期的临床手段,其中GFR为15ml/min或以下时被称为晚期肾衰竭。

[0004] 基于肌酐清除率的GFR计算公式为GFR(ml/min)=尿流率•([尿]/[血浆])

[0005] 尽管即使在肾功能下降的情况下,分泌的肌酐量仍保持恒定,但远端肾小管也会分泌少量肌酐。

[0006] 由于肾脏不断滤过,肌酐以微摩尔浓度存在于人血中。在稳定状态的系统中,人体的骨骼肌将向血流中释放恒定量的肌酐,肾脏将通过滤过和肾小管主动分泌的组合将其从循环系统中清除。这种肾小管主动分泌在较低的功能极限处包含较大比例的肌酐清除率,并导致高估肾小球滤过率(GFR)。

[0007] 在临床实践中测量肌酐

[0008] 目前使用三种主要技术来测量临床样本中的肌酐浓度:(i)Jaffe反应,(ii)酶法和(iii)同位素稀释质谱法(IDMS),后者是目前所有其他方法与之所比较的方法。

[0009] IDMS

[0010] IDMS被认为是量化现代临床生物化学中目标分析物的最准确方法。原理很简单,类似于通过标签和释放方法估算动物的野生种群。从未知数量但已知同位素组成的样本开始,然后用已知数量和同位素组成的标准液稀释样本,就可以通过测量相关同位素的最终稀释率来测定原始样本中的浓度。该方法将内部比例归一化与现代质谱的高精度和低检测限结合在一起,从而可在低偏差的情况下获得高度准确且可重现的结果。

[0011] 不幸的是,进行该测定所需的方法、GC-MS设备的尺寸和成本并未使其小型化,从而无法纳入连续的在线肌酐测定中。

[0012] Jaffe反应

[0013] 该检测肌酐的方法早于将其作为肾功能重要指标的认识。Max Jaffe(1841-1911)于1886年发表了苦味酸和尿肌酐的反应产物碱化后有色化合物生产的第一个正式描述,并为此命名了该检测方法。可以使用比色法或分光光度法以520nm的最大吸光度快速评估颜色变化的强度,从而快速评估样本中的肌酐含量。

[0014] 不幸的是,该方法并非没有缺点,尤其是实验室之间缺乏标准化的历史,这一点已由导致开发IDMS标准的工作证明[35]。Jaffe反应也是高度非特异性的,会与人体样本中经常发现的大量内源性和外源性化合物产生假阳性或阴性,包括微量的蛋白质、葡萄糖、酮体、胆红素和某些氨基糖苷和头孢菌素抗生素。

[0015] 试图针对这些进行校正实际上会给正常功能和异常功能之间的边界值带来更大的不确定性,并且自相矛盾地低估没有发现内源性干扰物的尿中肌酐浓度[37]。为了说明即使是很小的误差的影响,血清肌酐浓度绝对值仅增加20μmol也可能意味着正常功能和早期肾衰竭之间的差异。

[0016] 由于这些原因,在发达国家,Jaffe方法正逐渐被酶检测所取代。

[0017] 三酶系统

[0018] 该方法依赖于更复杂的三步法,即以肌酸和肌氨酸为中间物,以脲为中间副产物,将肌酐消化成1:1:1摩尔比的过氧化氢、甲醛和甘氨酸。

[0019] 该系统可导致两个潜在的非光学检测目标:脲和过氧化氢。

[0020] 检测脲

[0021] 脲的检测需要进一步与脲酶的偶联反应,以催化NH_3和CO_2的产生。尽管NH_3的检测因困难而复杂,但可以使用常见的Severinghaus电极或更稀有掺杂的纳米材料来量化CO_2的产生[51]。

[0022] Severinghaus电极需要玻璃pH电极的特殊内部配置,该电极被封装在已知pH的$NaHCO_3$溶液中,并通过透气膜与样本溶液隔开。当CO_2穿过膜时,它溶解在$NaHCO_3$溶液中以释放H+离子。然后在内部pH电极上用电位计传感这些。

[0023] 虽然原理很容易理解,并且传感器在正常人血pCO_2范围内呈线性行为,但是这种三壁、含液体的传感器却很难小型化,并且在微加工的Severinghaus型电极的文献中只有少量报道,响应时间非常慢[52]。

[0024] 此外,从肌酐的完全消化释放出的二氧化碳量最多将在亚毫摩尔范围内。这意味着,无论是从血液还是从尿液中提取样本,任何二氧化碳传感器系统都将暴露于正常代谢过程中溶解于样本中的二氧化碳本底水平的预期信号强度的数十倍偏移(4.5-6kPa,1.75≡2.33mmol)。

[0025] 最后,任何生物样本中的脲水平也将远高于肌酐水平。

[0026] 检测H_2O_2

[0027] H_2O_2是氧化代谢过程的结果,会在血液和尿液中产生,但在低微摩尔水平下,在血浆中内源性抗氧化剂(包括过氧化氢酶、血红素和抗坏血酸)的作用下迅速降低[53]。因此,在三重酶方案中,H_2O_2唯一可识别的来源是通过肌氨酸氧化酶的肌酐本身。H_2O_2也可以通过安培法轻松检测到。

[0028] 最后,与通过谷氨酸脱氢酶和谷氨酸氧化酶检测肌酐脱亚氨酶的情况不同,三重酶系统的总体平衡与产物的产生和底物的消耗非常接近。这表明较高的产品电位水平,以及因此而产生的信号,是由较少量的底物引起的,从而改善了该系统的信噪比和检测极限。

[0029] 微透析

[0030] 微透析是一种从目标组织或溶液中获取连续的小分子样本,同时将干扰物减至最少的方法,最初是在1970年代率先从大鼠大脑中提取神经递质[55]。它的工作原理是用一

种缺乏目标分子的流体连续灌注半透膜的一侧,使目标分子沿膜的浓度梯度向下扩散到灌注液中。同时,高于膜截留重量的分子或已经与灌注液平衡的分子的浓度不会改变。然后,膜后透析液将目标分子带到检测系统。

[0031] 微流控

[0032] 术语"微流控"描述了使用纳升级或以下的液体体积进行处理的实践,其流动通道的直径仅为数十至数百微米。与传统的实验室分析不同,在此类级上进行操作可带来强大的优势,可减少所需的样本量和潜在的昂贵试剂,同时提高灵敏度、可重复性和分析速度[56]。这对于基于酶的反应特别有用,在这种情况下,酶本身的成本可能特别高,而在微量透析的情况下,只有少量底物可用。

[0033] Labsmith平台

[0034] LabSmith微流控平台系统与内径为150μm的惰性PEEK(聚醚醚酮)管材(外径为360μm)兼容,具有定制的毫升级底物和反应物储存器,能够处理微升体积的精密微泵,可产生低至≈每秒8纳升(500nl/min)的流速,以及带有内部PEEK表面的三通或四通切换阀。所有这些组件都是完全模块化的,并且可以与用于形成防水微流控连接的通用锁紧卡套配件和用于将其他各个组件固定在适当位置的螺丝固定式线路板系统互换。

[0035] 安培传感器

[0036] 安培法是一种在一定电势下测量氧化还原反应消耗或产生的电子数的技术,例如Leyland Clark(1918-2005)在1950年代发明的用于在-0.6V至-0.7V(相对于AgIAgCl)的电势下测量溶液中氧分压的技术。

[0037] 安培传感器包括三个元件-(i)用于与目标基质进行氧化还原反应的工作电极;(ii)平衡氧化还原反应另一面的辅助电极或反电极;以及(iii)将电路固定在电气空间的稳定点上的参比电极。

[0038] 恒电位仪电路使用伺服放大器自动调节来自反电极的电流,以将工作电极的电位保持在参比的固定点上,以控制氧化还原反应,并与跨阻放大器结合,以测量通过工作电极的电流作为电压信号进行记录和分析。

[0039] 跨阻放大器必须具有大约10^12Ω的适当高输入阻抗,以防止对工作电极上的氧化还原反应产生任何干扰,并具有频率响应,以使系统的氧化还原速率的预期变化与新底物的出现相匹配。类似地,伺服放大器必须具有足够低的输出阻抗和响应速率,以能够保持工作电极上电位的稳定性。

[0040] 在现有技术中已经使用三酶系统来测定肌酐的水平。

[0041] Tsuchida和Yoda[40]使用三酶系统。该作者测定,游离溶液中肌氨酸氧化酶的最佳pH值为7.5,但是一旦被固定化,其pH值就会增加到10。因此,人们希望游离溶液三酶体系的最佳pH值为约7.5。

[0042] Khue等人[72]使用包含固定化酶的电极。发现该系统的最佳pH超出pH 6.5-8.5的测试范围,为pH 8.0。随后的实验在生理pH下在PBS缓冲液中进行。

[0043] Sakslund等人[74]发现,固定在电极上的三酶系统的最佳pH值为7.7。

[0044] Madaras[77]讨论了一种将三酶系统的酶固定在一层上的电极。该系统的检出限为30uM肌酐,在PBS中于pH 7.3-7.4下进行。

[0045] 需要一种便携、低成本的系统,用于连续采样和测定离体灌注肾脏的血液或尿液

中的正常肌酐浓度。

[0046] 只有通过本发明的工作,才能测定利用三酶系统(酶在游离溶液中)的传感器系统的最佳pH。

发明概述

[0047] 如上所述,测定肾脏功能的现有技术方法不适当且过时。本发明人令人惊讶地发现,使用游离溶液中的三酶系统而不是在电极上嵌入至少一种酶的现有技术方法来测定肌酐水平,可以产生令人惊讶的准确和灵敏的读数,从而足以实现实时测定肾脏功能。不希望受到任何理论的束缚,发明人认为,酶溶液使反应接近完成,因此产生的信号高于其中酶仅在短时间内暴露于底物的现有技术生物传感器所获得的信号的事实至少部分归因于这种改进。

[0048] 另外,与现有技术,例如Tsuchida和Yoda[40]的教导不同,发明人发现游离溶液中的三酶体系的最佳pH实际上是在较高pH下,即pH8.0-8.6。该优化被认为是进一步提高了测定的灵敏度。

[0049] 三酶游离溶液方法与通过安培传感器检测生成的H_2O_2相结合,被认为具有特别出乎意料的灵敏度,并首次实现了在医学上相关水平的肌酐的实时检测。

发明详述

[0050] 本发明的第一方面提供了一种组合物,其包含肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶中的任何两种或全部。

[0051] 在一个实施方案中,组合物是液体。在另一个实施方案中,组合物是固体。所谓固体,是指例如组合物的组分以干粉形式提供,而不是将组分包埋在电极内或电极上。在另一个实施方案中,所述组合物为凝胶形式。

[0052] 在一实施方案中,组合物包含肌酐酶和肌酸酶。在另一个实施方案中,组合物包含肌酐酶和肌氨酸氧化酶。在另一个实施方案中,组合物包含肌氨酸氧化酶和肌酸酶。在另一个实施方案中,组合物包含肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶。

[0053] 本文所指的三酶系统利用了肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶的全部三种。然而,本领域技术人员将理解,对于要采用的三酶系统,不是所有三种酶必须在同一组合物中。例如,可以允许包含肌酐酶和肌酸酶的本发明组合物与底物反应,随后加入肌氨酸氧化酶以产生可以被传感器检测到的过氧化氢。因此,本文提及的三酶系统可以指同时使用三种酶,即在同一组合物中,或依次添加酶。

[0054] 尽管在一些实施方案中,组合物的两种或更多种酶例如通过戊二醛彼此交联或与另一种试剂例如BSA交联,但在优选的实施方案中,酶不经交联。

[0055] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了本发明的组合物,其中酶不经交联,任选地还没有与戊二醛交联。

[0056] 在一个实施方案中,本发明提供了一种组合物,其中至少一种,任选地两种,任选地所有的酶均未固定化,任选地,其中所有的酶都在溶液中。

[0057] 应该理解的是,该组合物的一种预期用途是测定肌酐水平,或稳态实时监测肌酸酐水平。因此,在一个实施方案中,该组合物由实际反应混合物的要求限定,即,当本发明的

组合物与包含底物例如肌酐的样本混合并且在其中产生过氧化氢时。例如,组合物可包含特定浓度的酶,或特定浓度或pH的特定缓冲液中的酶,使得在由样本混合产生的最终混合溶液,例如含有肌酐和本发明酶组合物的透析液中,满足各种参数。

[0058] 例如,众所周知,提供包含浓缩量的各种组分的组合物,使得在稀释时达到所需的浓度。这是本领域技术人员众所周知的。因此,可以制备本发明的组合物以允许满足本文定义的任何优选的最终反应浓度或参数。例如,在一些实施方案中,本发明的组合物与微透析一起使用,并且酶混合物以特定的流速与微透析液混合。本领域技术人员将能够基于流速和所涉及的参数测定本发明的合适起始组合物,其在使用时提供所需的参数。

[0059] 在一个实施方案中,当本发明的组合物是液体时,该液体包含缓冲液。因此,本发明的一个实施方案提供了在缓冲液中的本发明组合物的酶。

[0060] 在另一个实施方案中,当本发明的组合物是凝胶时,该凝胶也可以包含缓冲液。优选缓冲液如本文所述。

[0061] 所选择的缓冲液被认为对酶的活性和肌酐检测的所得敏感性具有显著影响。现有技术中使用三酶系统的尝试集中于通常在生理pH和磷酸盐缓冲盐水(PBS)中使用酶。在图19中给出了这些尝试的例子。大多数这项工作还使用了生物传感器,其中三酶系统中的至少一种酶被掺入到一个电极中。PBS被认为是适用于电化学传感器的缓冲液,因为磷酸盐和电极之间发生了良好的相互作用。

[0062] 然而,尽管在现有技术中大量使用了PBS,但是发明人惊奇地发现PBS不是用于本发明的最合适缓冲液。这可能是因为PBS具有螯合二价阳离子(例如$Zn^{2}+$、$Mn^{2}+$和$Mg^{2}+$)的能力,所有这些都是从各种物种中分离出来的肌酐酶的重要辅助因子。认为PBS与诸如此类的阳离子形成不溶性盐。图18列出了各种缓冲盐的溶解度,本领域技术人员可以从中容易地确定哪些是和哪些不是适合用于本发明的缓冲液。图18举例说明了例如二价阳离子的磷酸盐的不溶性水平。

[0063] 在优选的实施方案中,缓冲液不与肌酐酶竞争肌酐酶的辅助因子,例如二价阳离子辅助因子,例如$Zn^{2}+$、$Mn^{2}+$或$Mg^{2}+$。在另一个实施方案中,缓冲液不螯合阳离子,例如二价阳离子,例如$Zn^{2}+$、$Mn^{2}+$和$Mg^{2}+$。

[0064] 因此,在一个实施方案中,缓冲液不是磷酸盐缓冲液或PBS。

[0065] 在一个实施方案中,基于Tris的缓冲液也被认为不适合与本发明的组合物一起使用。因此,在一个实施方案中,缓冲液不是PBS和/或不是基于Tris的缓冲液。

[0066] 由于认为包含所有三种酶(肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶)的反应的最佳pH在约pH 8.0至pH 8.95之间,因此在本发明的一个实施方案中,缓冲液是pKa在7.0至9.0之间的缓冲液。在一个实施方案中,缓冲液的pKa为7.0至9.0,但不是PBS或四硼酸盐或Tris。在另一个实施方案中,缓冲液的pKa在7.05至pH 8.95之间,任选地在7.1至8.9之间,任选地在7.15至8.85之间,任选地在7.2至8.80之间,任选地在7.20至8.75之间,任选地在7.25至8.70之间,任选地在7.30至8.65之间,任选地在7.35和8.60之间,任选地在7.40和8.55之间,任选地在7.45和8.50之间,任选地在7.40和8.45之间,任选地在7.45和8.40之间,任选地在7.50和8.35之间,任选地在7.55和8.30之间,任选地在7.60和8.25之间,任选地在7.65和8.20之间,任选地在7.70和8.15之间,任选地在7.75和8.10之间,任选地在7.80和8.05之间,任选地在7.85和8.00之间,任选地在7.90和7.95之间,或者pKa至少是上述pKa值中的任

何一个,或者小于上述任何一个pKa值。

[0067] 在一个实施方案中,缓冲液的pKa在7.3和8.95之间。

[0068] 在一个实施方案中,缓冲液的pKa为8.5或约8.5。

[0069] 对于任何上述pKa范围,在一个实施方案中,缓冲液不是PBS和/或不是四硼酸盐和/或不是Tris和/或不是HEPES。

[0070] 本领域技术人员将清楚地知道各种缓冲液的pKa,并可以获得各种缓冲液的pKa列表。

[0071] 在一个实施方案中,EPPS 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸被认为是对本发明有用的缓冲液的特定实例。在另一个实施方案中,HEPBS(N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(4-丁磺酸))也被认为是有用的。在另一个实施方案中,POPSO(哌嗪-1,4-双(2-羟基丙磺酸))、HEPPSO(N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-羟基丙烷-3-磺酸))和MOBS(4-(N-吗啉代)丁磺酸)也被认为是有用的。

[0072] 认为在一个实施方案中,应在其pKa的1个pH单位内使用缓冲液。

[0073] 也可以使用pKa大于9的缓冲液。但是,在测定例如血液或尿液中的肌酐水平的情况下,pKa大于9.5不太可能有用。然而,此缓冲液,即pKa大于9或大于9.5的缓冲液在其他情况下可能是有用的,并且也被包括在本发明中。

[0074] 可以轻松找到有关不同缓冲液(包括pKa)各种特性的详细信息,例如Sigma网站上有许多缓冲液的详细信息(http://www.sigmaaldrich.com/life-science/c或e-bi或eagents/biologic-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html)。

[0075] 在一个实施方案中,本发明的缓冲液在室温下使用,例如在18℃至25℃之间,例如在18℃,19℃,20℃,21℃,22℃,23℃,24℃或25℃下使用。缓冲液通常可在20℃下使用。在另一个实施方案中,本发明的缓冲液在高于室温的温度下使用,例如26℃,27℃,28℃,29℃,30℃,31℃,32℃,33℃,34℃,35℃或更高。在另一个实施方案中,缓冲液在55℃或更低,例如50℃,45℃,40℃或更低的温度下使用。在另一个实施方案中,在低于室温的温度下不使用缓冲液。

[0076] 除了所用缓冲液的pKa之外,酶在其中进行反应的混合物的pH值也非常重要。在一个实施方案中,组合物或缓冲液的pH在约pH 8.0至pH 8.95之间。在本发明的一个实施方案中,组合物或缓冲液是pH在7.0至9.0之间的组合物或缓冲液。在一个实施方案中,组合物或缓冲液的pH为7.0至9.0,但不是PBS或四硼酸盐或Tris。在另一个实施方案中,组合物或缓冲液的pH在7.05至pH 8.95之间,任选地在7.1至8.9之间,任选地在7.15至8.85之间,任选地在7.2至8.80之间,任选地在7.20至8.75之间,任选地在7.25至8.70之间,任选地在7.30和8.65之间,任选地在7.35和8.60之间,任选地在7.40和8.55之间,任选地在7.45和8.50之间,任选地在7.40和8.45之间,任选地在7.45和8.40之间,任选地在7.50和8.35之间,任选地在7.55和8.30之间,任选地在7.60之间8.25,任选地在7.65和8.20之间,任选地在7.70和8.15之间,任选地在7.75和8.10之间,任选地在7.80和8.05之间,任选地在7.85和8.00之间,任选地在7.90和7.95之间,或者pH值至少是上述pKa中的任何一个,或小于上述任何pH值。

[0077] 在一个实施方案中,组合物或缓冲液的pH在7.3至8.95之间。

[0078] 在一个实施方案中,组合物或缓冲液的pH为8.5或约8.5。

[0079] 对于任何上述pH范围,在一个实施方案中,缓冲液不是PBS和/或不是四硼酸盐和/或不是Tris和/或不是HEPES。

[0080] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含以下浓度的缓冲液:5mM至100mM,任选地10mM至90mM,任选地15mM至85mM,任选地20mM至80mM,任选地25mM至75mM,任选地30mM至70mM,任选地35mM至65mM,任选地40mM至60mM,任选地45mM至55mM之间,任选地50mM。本领域技术人员将能够容易地测定所需缓冲液的适当浓度。例如,本领域技术人员可以(i)使用Henderson-hasselbalch公式来计算例如pH值为7.35的正常人血清,以得到适当范围的最低限度,将范围保持在例如pH 8.5的0.1之内,然后(ii)使碱性pKa在例如8.5的0.1pH之内缓冲。

[0081] 应当理解,尽管本发明的组合物的pH可以在一定的pH值下,但是在添加生物样本例如血液、during或组织流体样本后,所得混合物的pH值可以变化。优选地,将pH的变化保持在最小,因为在一个实施方案中,组合物的缓冲液的pH被认为对于三酶系统是最佳的,并且如果不保持最佳条件,则到达T_{90}的时间可能会延长。在一个实施方案中,所得混合物的pH在0-0.1个pH单位之间,不同于本发明的组合物的pH。在另一个实施方案中,所得混合物的pH在0.1-0.2个pH单位之间,不同于本发明的组合物的pH。在另一个实施方案中,所得混合物的pH在0.2-0.3个pH单位之间,不同于本发明的组合物的pH。在另一个实施方案中,所得混合物的pH在0.3-0.4个pH单位之间,不同于本发明的组合物的pH。在另一个实施方案中,所得混合物的pH在0.5-0.6个pH单位之间,不同于本发明的组合物的pH。在另一个实施方案中,所得混合物的pH在0.6-0.7个pH单位之间,不同于本发明的组合物的pH。在另一个实施方案中,所得混合物的pH在0.7-0.8个pH单位之间,不同于本发明的组合物的pH。在另一个实施方案中,所得混合物的pH在0.8-0.9个pH单位之间,不同于本发明的组合物的pH。在另一个实施方案中,所得混合物的pH在0.9-1.0个pH单位之间,不同于本发明的组合物的pH。

[0082] 在另一个实施方案中,组合物的缓冲液的pH不被认为对于三酶系统而言是最佳的,而是被设计为使得一旦本发明的组合物已经与生物样本例如血液、during或组织流体样本混合,可获得最佳pH。

[0083] 在一个实施方案中,组合物包含pH 8.0-8.5的EPPS,任选地pH 8.0-8.5的50mM EPPS,任选地pH 8.0的50mM EPPS或pH 8.5的50mM EPPS。

[0084] 在一个优选的实施方案中,组合物包含pH 8.0或pH 8.5的50mM EPPS。

[0085] 如上所述,不同缓冲液的各种性质,包括pH值,是本领域技术人员已知的,并且基于本发明给出的详细信息并结合公知常识,本领域技术人员可以容易地确定哪些缓冲液适用于本发明。

[0086] 此类缓冲液性质与肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶溶液的组合在现有技术中是先前未曾考虑的。只有本发明人的工作才确定了三酶反应的最佳pH,以及PBS不适合用作缓冲液。

[0087] 由于重要的是反应混合物的pH,因此应当理解,尽管包含酶的组合物也可以包含本文所述的缓冲液,但是缓冲液可以替代地单独提供,例如作为部件试剂盒的一部分与肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶中的一种或多种或全部一起提供。在这种情况下,将一种或多种酶分别添加到反应混合物中的缓冲液中,以保持适当的pH。

[0088] 在一个实施方案中,组合物中仅有的独立存在物是肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化

酶,以及缓冲液(如果存在缓冲液)。在这种情况下,本发明的组合物由或基本上由肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶中的任意两种或全部以及如上所述的缓冲液(如果存在的话)组成。应当理解,如果组合物是固体,则该组合物可能仅由肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶中的任意两种或全部组成。然而,当组合物是凝胶液体时,该组合物还必须包含液体或凝胶组分,在一个实施方案中,其不被认为对本发明的工作有任何实质性影响,因此在这种情况下组合物由或基本上由肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶中的任意两种或全部组成。

[0089] 然而,将意识到,在诸如监测肾功能的情况下,例如监测受试者的其他代谢物或参数也可能是有用的。因此,在一些实施方案中,组合物除了可能还包含其他有用的试剂之外,还包含上述试剂。例如,如果组合物还包含脲酶,则检测脲被认为是有用的,尽管本领域技术人员将理解该反应不会产生电化学物质,并且必须采用检测氨和二氧化碳产生所引起的pH值变化的工具。组合物还可包含尿酸酶,其可消化尿酸并产生电化学物质。在另一个实施方案中,组合物还可包含检测胱抑素C和白蛋白的工具。

[0090] 组合物的酶可以来自任何来源,只要其具有肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶活性。酶可以是野生型酶,即具有在特定生物中天然存在的多肽序列的酶。在其他实施方案中,一种或多种酶可以具有非天然序列,例如与天然存在的序列相比,其可以具有突变。例如,这些酶可以具有故意突变以增加其活性或特异性。

[0091] 在一个实施方案中,肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶与天然存在的肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶具有至少20%的同一性或同源性,例如与天然存在的肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶具有至少25%,或至少30%,或至少35%,或至少40%,或至少45%,或至少50%,或至少55%,或至少60%,或至少65%,或至少70%,或至少75%,或至少80%,或至少85%,或至少90%,或至少92%,或至少94%,或至少96%,或至少98%,或至少99%,或100%的同一性或同源性。

[0092] 组合物的酶可以具有任何序列,条件是其能够催化所需的反应,即肌酐酶将肌酐转化为肌酸;肌酸酶将肌酸转化为肌氨酸和脲;肌氨酸氧化酶将肌氨酸转化为甘氨酸、甲醛和过氧化氢。

[0093] 组合物的酶可以是重组蛋白或可以是合成蛋白。

[0094] 在一个实施方案中,肌酐酶得自Sorachim目录号CNH-311;和/或肌酸酶得自Sorachim目录号CRH-211;和/或肌氨酸氧化酶来自Sorachim目录号SAO-351。

[0095] 在一个实施方案中,认为三酶体系中酶的相对比例对于产生优化的反应混合物很重要。本领域技术人员将理解,在任何反应中,都存在限速步骤。不希望受到任何理论的束缚,发明人认为在本文所述的三酶系统中,肌氨酸氧化酶是限速步骤。因此,本领域技术人员将理解,无论向反应中加入多少肌酐酶和肌酸酶,在一个实施方案中,过氧化氢的产生速率将受到肌氨酸氧化酶的量的限制。

[0096] 在另一个实施方案中,将意识到酶的实际物理量是重要的。例如,太少的酶,即使当酶以最合适的比例使用时,也不会产生足够量的过氧化氢,无法例如在电极上进行检测。尽管本领域技术人员将理解过量的酶是浪费并且招致不必要的花费,但是认为可以添加的酶量的上限没有限制。

[0097] 因此,在一个实施方案中,认为在由含有肌酐的透析液和本发明的酶组合物混合而得到的最终混合溶液中,肌酐酶的浓度应大于约50U/ml,例如大于约75U/ml,例如大于约

100U/ml,例如大于约125U/ml,例如大于约150U/ml,例如大于约175U/ml,例如大于约200U/ml,例如大于约250U/ml,例如大于约300U/ml,例如大于约325U/ml,例如大于约350U/ml,例如大于约375U/ml,例如大于约400U/ml,例如大于约425U/ml,例如大于约450U/ml,例如大于约475U/ml,例如大于约500U/ml,例如大于约525U/ml,例如大于约550U/ml,例如大于约575U/ml,例如大于约600U/ml,例如大于约625U/ml,例如大于约650U/ml,例如大于约675U/ml,例如大于约800U/ml,例如大于约825U/ml,例如大于约850U/ml,例如大于约875U/ml,例如大于约900U/ml,例如大于约925U/ml,例如大于约950U/ml,例如大于约975U/ml,例如大于约1000U/ml。本领域技术人员将能够确定本发明的组合物中肌酐酶的合适起始浓度,以允许反应混合物中所需的最终浓度。

[0098] 在相同或替代的实施方案中,认为在由包含肌酐的透析液和本发明的酶组合物混合产生的最终混合溶液中,肌酸酶的浓度应大于约50U/ml,例如大于约75U/ml,例如大于约100U/ml,例如大于约125U/ml,例如大于约150U/ml,例如大于约175U/ml,例如大于约200U/ml,例如大于约250U/ml,例如大于约300U/ml,例如大于约325U/ml,例如大于约350U/ml,例如大于约375U/ml,例如大于约400U/ml,例如大于约425U/ml,例如大于约450U/ml,例如大于约475U/ml,例如大于约500U/ml,例如大于约525U/ml,例如大于约550U/ml,例如大于约575U/ml,例如大于约600U/ml,例如大于约625U/ml,例如大于约650U/ml,例如大于约675U/ml,例如大于约800U/ml,例如大于约825U/ml,例如大于约850U/ml,例如大于约875U/ml,例如大于约900U/ml,例如大于约925U/ml,例如大于约950U/ml,例如大于约975U/ml,例如大于约1000U/ml。本领域技术人员将能够确定本发明的组合物中肌酸酶的合适起始浓度,以允许反应混合物中所需的最终浓度。

[0099] 在相同或替代的实施方案中,认为在由包含肌酐的透析液和本发明的酶组合物混合产生的最终混合溶液中,肌氨酸氧化酶的浓度应大于约10U/ml,例如大于约15U/ml,例如大于约20U/ml,例如大于约25U/ml,例如大于约30U/ml,例如大于约35U/ml,例如大于约40U/ml,例如大于约45U/ml,例如大于约50U/ml,例如大于约55U/ml,例如大于约60U/ml,例如大于约65U/ml,例如大于约70U/ml。优选地,最终混合溶液中由含有肌酐的透析液和本发明的酶组合物混合产生的肌氨酸氧化酶的量为至少30U/ml。本领域技术人员将能够确定本发明的组合物中肌氨酸氧化酶的合适起始浓度,以允许反应混合物中所需的最终浓度。

[0100] 本领域技术人员将理解,所需的每种酶的量,特别是被认为是限速的肌氨酸氧化酶的量,将取决于多种因素。例如,预期待检测的肌酐量将影响所需酶的量。因此,在一个实施方案中,根据样本中肌酐的量来调节反应中用于测定肌酐的量的每种酶的量。

[0101] 优选地,由含有肌酐的透析液和本发明的酶组合物混合产生的最终混合溶液包含至少300U/ml的肌酐酶。

[0102] 优选地,由含有肌酐的透析液和本发明的酶组合物混合产生的最终混合溶液包含至少120U/ml的肌酸酶。

[0103] 优选地,由含有肌酐的透析液和本发明的酶组合物混合产生的最终混合溶液包含至少15U/ml的肌氨酸氧化酶。

[0104] 在一个实施方案中,由含有肌酐的透析液和本发明的酶组合物混合产生的最终混合溶液包含至少300U/ml的肌酐酶、120U/ml的肌酸酶和至少15U/ml的肌氨酸氧化酶。

[0105] 尽管包含小于300U/ml的肌酐酶和/或小于120U/ml的肌酸酶和/或小于15U/ml的

肌氨酸氧化酶,由含有肌酐的透析液和本发明的酶组合物混合产生的最终混合溶液仍被认为会产生有用的反应,但高于这些值的酶的浓度被认为在肌酐与最终可检测的过氧化氢的反应中提供了甚至更大的改善。

[0106] 本领域技术人员将理解,所需的每种酶的量还将取决于在检测所得的过氧化氢之前允许反应进行的时间长度。例如,在不需要读数频率很高的情况下,例如一个小时或以上读数一次,例如每两小时或以上读数一次,则可以使反应进行更长的时间,相比例如每0.5秒或每1秒都需要读数一次。在后一种情况下,需要更高量的酶,以便进行反应,例如,以便90%的肌酐与生成的过氧化氢反应(T_{90}),而在前一种情况下,则需要少量酶,因为在检测过氧化氢之前可以让反应进行更长的时间。

[0107] 本发明人已经优化了反应条件,以考虑到健康个体中血浆肌酐的低生理水平和肾功能降低的个体中血浆肌酐的水平增加。

[0108] 在一个优选的实施方案中,由含有肌酐的透析液与本发明的酶组合物混合产生的最终混合溶液中肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶的比例分别为10:5:1至49:8:1U/ml肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶。例如,由含有肌酐的透析液和本发明的酶组合物混合产生的最终混合溶液中的肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶的比例分别可以是任意合适的比例,例如可以为10:5:1,或15:5:1,或20:5:1,或25:5:1,或30:5:1,或35:5:1,或40:5:1,或45:5:1,或10:10:1,或15:10:1,或20:10:1,或25:10:1,或30:10:1,或35:10:1,或40:10:1,或45:10:1,或50:10:1,或10:15:1,或15:15:1,或20:10:1,或25:15:1,或30:15:1,或35:15:1,或40:15:1,或45:15:1,或50:15:1,或10:20:1,或15:20:1,或20:20:1,或25:20:1,或30:20:1,或35:20:1,或40:20:1,或45:20:1,或50:20:1,或10:25:1,或15:25:1,或20:25:1,或25:25:1,或30:25:1,或35:25:1,或40:25:1,或45:25:1,或50:25:1,或10:30:1,或15:30:1,或20:30:1,或25:30:1,或30:30:1,或35:30:1,或40:30:1,或45:30:1,或50:30:1,或10:35:1,或15:35:1,或20:35:1,或25:35:1,或30:35:1,或35:35:1,或40:35:1,或45:35:1,或50:35:1,或10:40:1,或15:40:1,或20:40:1,或25:40:1,或30:40:1,或35:40:1,或40:40:1,或45:40:1,或50:40:1,或10:45:1,或15:45:1,或20:45:1,或25:45:1,或30:45:1,或35:45:1,或40:45:1,或45:45:1,或50:45:1;或10:50:1,或15:50:1,或20:50:1,或25:50:1,或30:50:1,或35:50:1,或40:50:1,或45:50:1,或50:50:1。

[0109] 如上所述,如果由含有肌酐的透析液与本发明的酶组合物混合产生的最终混合溶液中肌氨酸氧化酶的量大于约10U/ml,优选为至少30U/ml,则认为是优选的。这被认为可以使足够量的这种酶为健康受试者中发现的肌酐水平低提供可靠的信号,并能够检测低至4.3uM的肌酐水平,提高了样本中肌酐的回收率,从而有望将灵敏度提高到低至2uM。健康个体的血清肌酐浓度在60uM至120uM之间,因此很明显,要求保护的发明的敏感性适当高,以允许准确测定血清肌酐水平。

[0110] 在一个特定的实施方案中,缓冲液的特定pH值和/或组合物的缓冲液类型和/或酶的比例和/或每种酶的实际量的组合被认为提供了一组特别有效的反应条件。例如,在一个实施方案中,组合物包含酶和缓冲液,使得在由含有肌酐的透析液和酶组合物混合产生的最终混合溶液中,存在600U/ml的肌酐酶、300U/ml的肌酸酶和60U/ml的肌氨酸氧化酶。在另一个实施方案中,组合物包含酶和缓冲液,使得在由含有肌酐的透析液和酶组合物混合产生的最终混合溶液中,在pH值为8.5时,存在600U/ml的肌酐酶、300U/ml的肌酸酶和60U/ml

的肌氨酸氧化酶。

[0111] 在一个实施方案中,组合物包含肌酐酶、肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶中的任何两种或更多种,以及其他组分,例如本文所述的缓冲液,使得包含100uM肌酐的反应的T_{90}小于10分钟,例如小于9.5分钟,例如小于9分钟,例如小于8.5分钟,例如小于8分钟,例如小于7.5分钟,例如小于7分钟,例如小于6.5分钟,例如小于6分钟,例如小于5.5分钟,例如小于5分钟,例如小于250秒,例如小于225秒,例如小于200秒,例如小于190秒,例如小于180秒,例如小于170秒,例如小于160秒,例如小于150秒,例如小于140秒,例如小于大于130秒,例如小于120秒,例如小于110秒,例如小于100秒,例如小于90秒,例如小于80秒,例如小于70秒,例如小于60秒,例如小于50秒,例如小于40秒,例如小于30秒,例如小于20秒,例如小于10秒。在一实施例方案中,T_{90}为195秒或更短。在另一个实施例中,T_{90}为154秒或更短。在又一个实施例中,T_{90}为135秒或更短。本领域技术人员将能够确定合适的参数,并且在实施例中给出了实例。

[0112] 对于本领域技术人员将显而易见的是,本发明的组合物可以包含其他组分或试剂,例如可用于确定受试者健康的其他试剂。例如,组合物可以包含检测脲(例如脲酶和/或尿酸酶)水平的工具。组合物还可包含检测胱抑素C和白蛋白的工具。

[0113] 显然,本文详述的灵敏、优化的组合物可以以多种方式用于检测肌酐的水平。

[0114] 因此,另一方面提供了包含肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶和至少第一传感器的传感器系统。

[0115] 在一个实施方案中,肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶作为根据本文所述的本发明的组合物提供。在另一个实施方案中,将三种酶分开提供,并依次加入反应混合物中。应当理解,尽管以上优选方案涉及包含肌酐酶、肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶中的两种或更多种的组合物,但是最佳反应条件适用于三种酶参与的任何反应。例如,包含肌酐酶和肌酸酶的本发明组合物可以与肌氨酸氧化酶的单独组合物或试样一起使用。优选的条件,例如非PBS的缓冲液和/或pH为8.5的缓冲液仍然适用。因此,关于本发明组合物描述的上述条件和优选方案也适用于所有三种酶分别提供并且例如依次引入反应容器中的情况。

[0116] 因此,传感器系统可以至少包括以下各种情况:

[0117] 包含肌酐酶和肌酸酶且不包含肌氨酸氧化酶的组合物;

[0118] 包含肌酐酶和肌氨酸氧化酶但不包含肌酸酶的组合物;

[0119] 包含肌酸酶和肌氨酸氧化酶但不包含肌酐酶的组合物;

[0120] 包含肌酐酶和肌酸酶的组合物,其中肌氨酸氧化酶单独提供;

[0121] 包含肌酐酶和肌氨酸氧化酶的组合物,其中肌酸酶单独提供;

[0122] 包含肌酸酶和肌氨酸氧化酶的组合物,其中肌酐酶单独提供;和

[0123] 单独提供肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶-不作为任何同一组合物的一部分。

[0124] 如上所述,在一个实施方案中,传感器系统还可包括一种或多种本文所述的缓冲液,以允许反应在最佳条件下进行。

[0125] 三酶系统同时产生脲和过氧化氢,两者均可检测。

[0126] 检测由肌氨酸氧化酶产生的过氧化氢被认为是有利的。这允许通过例如安培传感器进行灵敏的电化学检测。过氧化氢也可以使用专用膜电位滴定法检测。或者,可通过使用酶例如辣根过氧化物酶和染料分子光学检测过氧化氢。因此,该系统可以包括安培传感器

和/或用于电位传感的专用膜和/或其他酶,例如辣根过氧化物酶和染料分子。

[0127] 优选地,该系统至少包括安培传感器。安培传感器在本领域中是众所周知的。

[0128] 如果检测电极被多种试剂之一保护,则认为是有用的。此类试剂是本领域技术人员已知的,并且包括mPD、多酚和nafion以及对苯二胺(pPD)。此类试剂被认为可以防止有害分子进入电极,同时允许过氧化氢通过。在一个实施方案中,检测电极由铂制成,铂被认为是用于过氧化氢电化学的最合适材料。在另一个实施方案中,检测电极可以是例如溅射有铂的硅酮针或碳纳米管。

[0129] 传感器系统可用于检测任何样本中的肌酐,例如从受试者获得的样本,例如从血液、血浆、尿液、组织液或脑脊液中采集的样本;或取自例如灌注肾脏的样本,例如取自准备用于器官移植的灌注肾脏的灌注液样本。

[0130] 传感器系统还可用于任何体积的样本。有利地,本发明的组合物和系统适用于微流控芯片技术,例如微流控电路和/或微流控装置和/或微流控探针。因此,在一个实施方案中,系统包括微流控电路和/或微流控装置和/或微流控探针。微流控电路、微流控装置和微流控探针在本领域中是众所周知的,并且在实施例中详述了具体的实例。

[0131] 在一个实施方案中,系统包括采样探针,例如微流控探针。合适的微流控探针是本领域已知的,并且包括Brain CMA-70(得自MDialysis);Freeflap CMA-70(得自MDialysis);MAB9.14.2(Microbiotech SE);MAB6.14.2(Microbiotech SE);MAB11.35.4(Microbiotech SE)或得自MDialysis的67号静脉内微透析导管。

[0132] 在另一个实施方案中,系统还包括一个区域,在该区域中可以将样本例如微透析液与本发明的组合物或肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶混合以产生过氧化氢。在另一个实施方案中,系统还包括例如通过安培传感器在其中检测过氧化氢的部分。

[0133] 在一个实施方案中,系统还包括连续流系统。

[0134] 在另一个实施方案中,该系统不包括连续流系统。

[0135] 在另一个实施方案中,系统包括用于维持稳定流的装置。当需要实时或连续监测肾功能时,这被认为是有利的。

[0136] 在另一个实施方案中,系统不包括用于维持稳定流的装置。例如,系统可以用于线性流测定系统中。可以认为此系统适合在家庭中使用。例如,在一个实施方案中,系统包括本文所述的传感试剂,例如具有在合适pH下的合适缓冲液,以及传感器,例如电化学传感器,其中该系统用于单次护理点情况或家庭测试试剂盒或装置,其中将样本(例如血液)与传感试剂和缓冲液(如果存在)混合,混合并反应,然后用传感器,例如安培传感器或电位传感器和/或酶传感器,例如辣根过氧化物酶和染料分子(其可以可视地读出肾功能的程度)传感生成的过氧化氢。

[0137] 应当理解,系统还可以包括校准标准液。因此,在一个实施方案中,系统可以包括在校准流和样本流之间切换的工具。在另一个实施方案中,系统可以包括并行流形式的校准标准液。该后一个实施方法被认为在家庭系统或即时护理系统的情况下特别有用。

[0138] 系统还可以包括从患者,例如从血液、尿液、血浆、组织液或脑脊髓液中采集样本的工具,尽管任何合适的样本都适用于本发明。系统还可以包括从闭环离体灌注器官(例如肾脏)中采集样本的工具。

[0139] 在一个实施方案中,样本是透析液,例如微透析液。

[0140] 如上所述,本领域技术人员将理解,反应越接近完成,灵敏度越高。本领域技术人员还将理解,在期望的灵敏度和反应时间之间可能达到折衷点。为了减少完成或接近完成所花费的时间,可以增加酶的量。

[0141] 在一个实施方案中,布置传感器系统,使得在将样本与传感器接触之前将传感试剂添加到样本中。以此方式,酶在传感之前可以产生一定水平的过氧化氢。在一个优选的实施方案中,反应在传感之前已经完成,或者在传感之前已经完成至少95%,或者在传感之前已经完成至少90%,或者在传感之前已经完成至少85%,或者在感应之前已经完成至少80%,或者在传感之前已经完成至少75%,或者在传感之前已经完成至少70%,或者在传感之前已经完成至少65%,或者在传感之前已经完成至少60%,或者在传感之前已经完成至少55%,或者在传感之前已经完成至少50%,或者在传感之前已经完成至少45%,或者在传感之前已经完成40%。

[0142] 在一个实施方案中,布置传感器系统,使得在与传感器接触之前,将传感试剂(如上所述,其可以是包含肌酐酶、肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶中的两种或更多种的组合物,或者可以是单独试样中的全部三种酶)添加到样本中,例如,将传感器系统布置为在将传感试剂添加到样本和与传感器接触之间有大于10分钟。在一个实施方案中,布置传感器系统,使得在将本发明的酶或组合物添加到样本和与传感器接触之间有大于10分钟,例如大于9.5分钟,例如大于9分钟,例如大于8.5分钟,例如大于8分钟,例如大于7.5分钟,例如大于7分钟,例如大于6.5分钟,例如大于6分钟,例如大于5.5分钟,例如大于5分钟,例如大于250秒,例如大于225秒,例如大于200秒,例如大于190秒,例如大于180秒,例如大于170秒,例如大于160秒,例如大于150秒,例如大于140秒,例如大于130秒,例如大于120秒秒,例如大于110秒,例如大于100秒,例如大于90秒,例如大于80秒,例如大于70秒,例如大于60秒,例如大于50秒,例如大于40秒,例如大于30秒,例如大于20秒,例如大于10秒,例如大于5秒,例如大于2秒,例如大于1秒。

[0143] 在一个实施方案中,布置传感器系统,使得在将本发明的酶或组合物添加到样本和与传感器接触之间有小于10分钟,例如小于9.5分钟,例如小于9分钟,例如小于8.5分钟,例如小于8分钟,例如小于7.5分钟,例如小于7分钟,例如小于6.5分钟,例如小于6分钟,例如小于5.5分钟,例如小于5分钟,例如小于250秒,例如小于225秒,例如小于200秒,例如小于190秒,例如小于180秒,例如小于170秒,例如小于160秒,例如小于150秒,例如小于140秒,例如小于130秒,例如小于120秒,例如小于110秒,例如小于100秒,例如小于90秒,例如小于80秒,例如小于70秒,例如小于60秒,例如小于50秒,例如小于40秒,例如小于30秒,例如小于20秒,例如小于10秒,例如小于5秒,例如小于2秒,例如小于1秒。

[0144] 灌注液和本发明的组合物或传感试剂(其中三种酶依次而不是同时递送)的流速影响所得反应混合物的组成。如本文所述,本领域技术人员将能够确定合适的流速以获得最佳的反应混合物。在一个实施方案中,布置传感器系统,使得灌注液流速在0.1-10ul/min之间,例如至少0.1ul/min,例如至少0.25ul/min,例如至少0.5ul/min,例如至少0.75ul/min,例如至少1.0ul/min,例如至少1.25ul/min,例如至少1.5ul/min,例如至少1.75ul/min,例如至少2.0ul/min,例如至少2.25ul/min,例如至少2.5ul/min,例如至少2.75ul/min,例如至少3.0ul/min,例如至少3.25ul/min,例如至少3.5ul/min,例如至少3.75ul/min,例如至少4.0ul/min,例如至少4.25ul/min,例如至少4.5ul/min,例如至少4.75ul/

min,例如至少5.0ul/min,例如至少5.25ul/min,例如至少5.5ul/min,例如至少5.75ul/min,,例如至少6.0ul/min,至少6.25ul/min,例如至少6.5ul/min,例如至少6.75ul/min,例如至少7.0ul/min,例如至少7.25ul/min,例如至少7.75ul/min,例如至少8.0ul/min,例如至少8.25ul/min,例如至少8.5ul/min,例如至少8.75ul/min,例如至少9.0ul/min,例如至少9.25ul/min,例如至少9.5ul/min,例如至少9.75ul/min,例如至少10.0ul/min。

[0145] 在一个优选的实施方案中,灌注液的流速在1ul/min至2ul/min之间。在一个实施方案中,灌注液的流速为1ul/min。在另一个实施方案中,流速为2ul/min。

[0146] 应当理解,酶的流速取决于酶的浓度和反应混合物中的最终所需浓度。

[0147] 例如,当组合物在pH 8.5的缓冲液中包含分别为600U/ml,200U/ml和60U/ml的肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶时,将添加酶混合物使得本发明的酶混合物/组合物:透析液的最终体积比为1:1至1:10。在一个实施方案中,添加本发明的酶混合物/组合物使得本发明的酶混合物/组合物:透析液的最终体积比为1:4。在此实施方案中,灌注液的流速可以是2ul/min,本发明的酶/组合物的流速可以是0.5ul/min。

[0148] 本领域技术人员将理解,如果酶的浓度增加或减少,则酶溶液与灌注液的比例将改变。

[0149] 应当理解,肌氨酸氧化酶与肌氨酸之间的反应需要氧气。因此,在一个实施方案中,系统包括增加反应混合物中氧气量的工具。在一个实施方案中,该装置将反应溶液中氧气量增加至大于10uM或以上。例如,增加反应溶液中氧气量的工具导致氧气浓度大于25uM,例如大于50uM,例如大于75uM或大于100uM,例如大于125uM,例如大于150uM,例如大于175uM,例如大于200uM,例如大于225uM,例如大于250uM,例如大于275uM,例如大于300uM,例如大于325uM,例如大于350uM,例如大于375uM,例如大于400uM,例如大于425uM,例如大于450uM,例如大于475uM,例如大于500uM。在一个实施方案中,氧的浓度为约200uM至250uM。http://www.engineeringtoolbox.com/oxygen-solubility-water-d_841.html上的工程工具箱提供了常压盐溶液中氧气浓度的范围-在1个大气压下,在35%的盐水中为225umol的O_2。

[0150] 反应混合物中的氧气量可以通过多种方式增加,所有方式都可以包括在本发明的系统中。例如,该系统可以包括混合器,该混合器又包括导流板或蛇形区域,或例如增加溶液混合的任何东西。混合器可以用高渗透性材料(例如PDMS)制成,或具有通过聚四氟乙烯管连接的多个混合段,以使耗尽的氧水平“重新充满”。本领域技术人员将理解,可以通过材料的固有渗透性或通过薄壁,或大表面积,或所有这些的组合来实现渗透性。在一个实施方案中,使用多种增加反应混合物中氧含量的装置,例如由聚四氟乙烯制成的多个混合器和多个连接件。在另一个实施方案中,增加氧气含量的装置或多个装置位于加压容器中。

[0151] 如上所述,反应条件的优化允许肌酐水平的非常灵敏和准确的测定。因此,在一个实施方案中,系统能够检测溶液中4uM或以下的肌酐,例如可以检测2uM或以下或1uM或以下的肌酐。在另一个实施方案中,传感器系统可以例如相对于40uM至120uM之间的本底肌酐水平检测小于1uM,或小于2uM或小于3uM或小于4uM,或小于5uM或小于7.5uM或小于10uM的肌酐变化。

[0152] 在优选的实施方案中,传感器系统包括用于从传感器收集数据的装置。此类装置在本领域中是众所周知的,PowerLab/4SP就是其一个例子。

[0153] 在一些实施方案中,传感器系统还可包括用于发送数据的无线发送装置,例如蓝牙发送器或其他无线发送器。

[0154] 在一些实施方案中,传感器系统还可以包括用于数据分析的装置,例如计算机或可穿戴设备。在一实施方案中,用于数据分析的装置计算估计的肾小球滤过率(eGFR)。在优选的实施方案中,传感器系统包括无线发送装置、用于数据分析的装置、和用于接收无线发送的数据的装置。

[0155] 在一个实施方案中,系统还包括至少一个废物收集容器。例如,本发明的一个实施方案是一种实时监控器,其可以是移动的也可以不是移动的。为了易于使用,特别是在长期环境和/或家居环境中,在反应并传感到过氧化氢之后,微透析液被认为是废物。在一个优选的实施方案中,该废物被处置在废物容器中。该容器优选非常小,例如样本/传感试剂的总流速为3ul/min,24小时内将产生4.3毫升的废物。因此,在一个实施方案中,废物容器的体积小于10ml,例如小于9.5ml,例如小于9ml,例如小于8.5ml,例如小于8ml,例如小于7.5ml,例如小于7ml,例如小于6.5ml,例如小于6ml,例如小于5.5ml,例如小于5ml,例如小于4.5ml,例如小于4ml,例如小于3.5ml,例如小于3ml,例如小于2.5ml,例如小于2ml,例如小于1.5ml,例如小于1ml,例如小于0.5ml,例如小于0.25ml。

[0156] 应当理解,此废物容器具有超出本发明范围的用途,并且可以在任何微透析治疗或分析的情况下使用,或与其他移动装置一起使用。

[0157] 在一个实施方案中,传感器系统是移动的。例如,传感器系统可以完全独立于必须与受试者连接的大型机械,或者可以仅需要在短时间内与此机械连接。

[0158] 本文所述的传感器系统允许准确测定实时肾功能。如所讨论的,该信息可用于通知临床医生是要用特定药剂(例如药物)进行治疗还是中止治疗,或者调整药物剂量。在一个实施方案中,传感器系统包括用于递送药物的装置,例如药物泵。在一个优选的实施方案中,传感器系统包括基于所计算的肌酐水平/肌酐清除率/肾小球滤过率自动调节药物泵的工作,即递送的药物量,的装置。在优选的实施方案中,所需药物量的测定是自动进行的,而无需临床医生的干预。此实施方式被认为在其中肾功能降低或有肾功能受损风险的受试者在家中使用传感器系统来监测肾功能并给与适当量的相关药物的情况下特别有用。

[0159] 通过使用本发明的系统调节其给药而受益的药物或试剂的例子包括所有肾清除的药物,特别是那些可能促进或损害肾清除率或其生物活性取决于清除率的药物。此类药物包括用于影像学研究的造影剂,而相关药物的例子包括免疫抑制剂;化学治疗剂,例如铂剂;抗菌素,例如糖肽万古霉素和替考拉宁,以及青霉素;和阿片类镇痛药,例如吗啡、海洛因和可待因。

[0160] 此方法允许基于实时的实际肾脏清除率测量而不是基于估计的清除率测量来个性化药物剂量,所述估计的清除率测量基于在结果变得已知之前的一段时间,例如几个小时所获取的样本。

[0161] 本发明的组合物或传感器系统可用于监测受试者中肌酐的稳态水平。该水平的任何升高都可能表明肾功能受损。该水平的降低也可能表明需要其他临床干预。因此,肌酐的稳态水平的读出被认为是有用的。

[0162] 然而,为了获得GFR的“实时”读数,在一个实施方案中,向受试者给与肌酐和/或肌酸和/或肌氨酸,以测定该人工诱导的肌酐峰的清除率,并测试肾脏将其从血液中清除的能

力。此方法被认为是有利的,因为它不受可能影响稳态肌酐水平的因素的影响。例如,较高的肌酐读数可能是由于肌酐的产生增加引起,而不是由于肾功能下降引起。样本中的试剂可能会干扰测定,或者读数可能会受到肌酐肾小管分泌减少的影响。血清肌酐的增加还可以归因于熟食(其含有通过烹饪产生的热量由肌酸转化的肌酐)的摄入量增加或为增强运动表现而摄入过量的蛋白质和肌酸补充剂。剧烈运动可通过增加肌肉分解而增加肌酐。几种药物和色原可能会干扰测定。某些药物可以阻止肾小管分泌肌酐,从而再次增加所测到的肌酐。

[0163] 因此,本发明的传感器系统还可包括例如定期向受试者给与肌酐和/或肌酸和/或肌氨酸的工具。可以给与任何量的肌酐。在一个实施方案中,给与肌酐的量足以使基线水平增加10%至250%,例如20%至230%,例如30%至210%,例如40%至200%,例如50%至190%,例如60%至180%,例如70%至170%,例如80%至160%,例如90%至150%,例如100%至140%,例如110%至130%,例如120%。

[0164] 如果给与肌酐的量足以将其水平增加两倍于其基线肌酐水平,则认为是特别有用的。

[0165] 本领域技术人员将理解,肾功能严重受损的受试者将难以清除甚至少量的外来给与肌酐,而肾脏健康的受试者将能够相对较快地清除大量的外来给与肌酐。本领域技术人员将能够确定给予受试者适当量的肌酐以允许进行所需的分析。

[0166] 如上所述,在优选的实施方案中,肌酐、肌酸和/或肌氨酸是自动给药的,而无需临床医生的干预。此实施方案被认为在其中肾功能降低或有肾功能受损风险的受试者在家中使用传感器系统来监测肾功能并给与适当量的相关药物的情况下特别有用。

[0167] 应当理解,可能存在一些由内源性肌酸和肌氨酸产生的过氧化氢的本底水平,即不是直接源自肌酐。为了提高肌酐水平测定的准确性,本领域技术人员可以考虑此类本底水平。在一个实施方案中,布置传感器系统,使得其包括第二传感器和用于获得第二样本的第二工具。在该实施方案中,在第二传感器处进行检测之前,使第二样本与包含肌酸酶和肌氨酸氧化酶(即无肌酐酶)的第二传感试剂接触。如上所述,可以将反应进行的酶浓度、比例和时间都最优化以提供最高的灵敏度。在一个实施方案中,布置传感器系统,使得在将传感试剂添加到第二样本和与第二传感器接触之间有大于10分钟。在一个实施例中,布置传感器系统,使得在将本发明的酶或组合物添加到样本和与传感器接触之间有大于10分钟,例如大于9.5分钟,例如大于9分钟,例如大于8.5分钟,例如大于8分钟,例如大于7.5分钟,例如大于7分钟,例如大于6.5分钟,例如大于6分钟,例如大于5.5分钟,例如大于5分钟,例如大于250秒,例如大于225秒,例如大于200秒,例如大于190秒,例如大于180秒,例如大于170秒,例如大于160秒,例如大于150秒,例如大于140秒,例如大于130秒,例如大于120秒,例如大于110秒,例如大于100秒,例如大于90秒,例如大于80秒,例如大于70秒,例如大于60秒,例如大于50秒,例如大于40秒,例如大于30秒,例如大于20秒,例如大于10秒,例如大于5秒,例如大于2秒,例如大于1秒。

[0168] 在一个实施方案中,布置传感器系统,使得在将肌酸酶和肌氨酸氧化酶添加到第二样本和与第二传感器接触之间有少于10分钟,例如少于9.5分钟,例如少于9分钟,例如小于8.5分钟,例如小于8分钟,例如小于7.5分钟,例如小于7分钟,例如小于6.5分钟,例如小于6分钟,例如小于5.5分钟,例如小于5分钟,例如小于250秒,例如小于225秒,例如小于200

秒,例如小于190秒,例如小于180秒,例如小于170秒,例如小于160秒,例如小于150秒,例如小于140秒,例如小于130秒,例如小于120秒,例如小于110秒,例如小于100秒,例如小于90秒,例如小于80秒,例如小于70秒,例如小于60秒,例如小于50秒,例如小于40秒,例如小于30秒,例如小于20秒,例如小于10秒。

[0169] 在优选的实施方案中,传感器系统还包括从从第一传感器获得的数据中减去从第二传感器获得的数据的工具。这样,就可以真正测定肌酐的水平。但是,测定由内源性肌酸和肌氨酸产生的过氧化氢的本底水平并不是必需的。此类水平被认为是低的并且通常是微不足道的。另外,本发明允许测定肌酐的相对量及其变化,即在特定受试者内。肌酐的实际物理量不像在例如给药后所感知的肌酐量的任何相对变化一样重要。

[0170] 还已知肾小管肌酐分泌占肌酐总量的总和。为了对此进行进一步校正,可以布置系统,使得在反应之前还可以将西咪替丁药物给予受试者以确定肌酐水平。西咪替丁被认为抑制肌酐的肾小管分泌。在这种情况下,动力学完全是一级的,并且血液中肌酐的量仅取决于功能正常的肾单位。

[0171] 应当理解,本发明的真正优点之一是实现了实时监测肾功能的能力。因此,在一个实施方案中,传感器系统连续地捕获数据。例如,在传感器系统包括微流控的情况下,在一个实施方案中,本发明的传感器试剂连续地流入来自受试者的微透析液流中。在适当的反应时间之后,其可以简单地通过改变所述反应混合物必须经过直至到达传感器的路径长度来设置(如上所述,优选通过一个或多个混合器和/或一个或多个增加反应混合物中氧浓度的组件),测定过氧化氢的量,然后测定样本中肌酐的量,如果需要,可将其用于计算GFR。这可以是连续的,并且可以实时、连续地读取受试者的肌酐水平。

[0172] 或者,可以认为连续地读取肌酐水平是不必要的,并且可以认为来自不同离散时间点的数据就足够了。尽管分析物的流动可以是连续的,但数据采样可以是连续的,也可以不是连续的。如果数据采样不是连续的,它仍然可能发生得足够快,足以获得有效的连续数据流。例如,来自传感器的读数可以以大约200Hz进行数字化。可以以低至10Hz的频率对样本进行数字化,并且仍然可以提供有效的连续数据流。来自传感器的读数可以以比200Hz更快的速率数字化。但是,认为以特定速率获得的数据的有用性受到限制。例如,应该以足够高的速率获得数据,以足以快速检测代谢物或分子水平的变化,但速率可能没有那么快,因为它会生成过多的无用数据,其可能使数据分析系统不堪重负。例如,每10秒的读数可以被认为是可以接受的,或者每10秒的平均读数,以提供连续获取数据的平均值。

[0173] 因此,在一个实施方案中,传感器系统至少每24小时或至少每22小时,例如至少每20小时,例如至少每18小时,例如至少每16小时,例如至少每14小时,例如至少每12小时,例如至少每10小时,例如至少每8小时,例如至少每6小时,例如至少每5小时,例如至少每4小时,例如至少每3小时,例如至少每2小时,例如至少每1.5小时,例如至少每1小时,例如至少每50分钟,例如至少每45分钟,例如至少每40分钟,例如至少每35分钟,例如至少每30分钟,例如至少每25分钟,例如至少每20分钟,例如至少每15分钟,例如至少每10分钟,例如至少每5分钟,例如至少每2分钟,例如至少每1.5分钟,例如至少每60秒,例如至少每45秒,例如至少每30秒,例如至少每15秒,例如至少每10秒,例如至少每5秒,例如至少每2秒,例如至少每1秒,例如至少每0.5秒捕获一次数据。

[0174] 在一个实施方案中,获得的数据是特定间隔的平均读数,例如是至少每24小时,例

如至少每22小时,例如至少每20小时,例如至少每18小时,例如至少每16小时,例如至少每14小时,例如至少每12小时,例如至少每10小时,例如至少每8小时,例如至少每6小时,例如至少每5小时,例如至少每4小时,例如至少每3小时,例如至少每2小时,例如至少每1.5小时,例如至少每1小时,例如至少每50分钟,例如至少每45分钟,例如至少每40分钟,例如至少每35分钟,例如至少每30分钟,例如至少每25分钟,例如至少每分钟20分钟,例如至少每15分钟,例如至少每10分钟,例如至少每5分钟,例如至少每2分钟,例如至少每1.5分钟,例如至少每60秒,例如至少每45秒,例如至少每30秒,例如至少每15秒,例如至少每10秒,例如至少每5秒,例如至少每2秒,例如至少每1秒,例如至少每0.5秒的平均读数。

[0175] 当前的临床实践是每天三次分析肾功能。相应地,在一个实施方案中,传感器系统每天三次,例如每八小时捕获一次数据。

[0176] 数据捕获可能定期发生,也可能不定期发生。例如,在风险增加时,例如在给药后,数据捕获可能会更频繁地发生,而在风险较小时,数据捕获可能会不那么频繁。

[0177] 如上所述,传感器系统可以包括无线发射机,该无线发射机将数据发送到用于数据分析的工具。与数据捕获一样,数据的传输可以是连续的,也可以是定期的或不定期的。例如,可以至少每24小时,例如至少每22小时,例如至少每20小时,例如至少每18小时,例如至少每16小时,例如至少每14小时,例如至少每12小时,例如至少每10小时,例如至少每8小时,例如至少每6小时,例如至少每5小时,例如至少每4小时,例如至少每3小时,例如至少每2小时,例如至少每1.5小时,例如至少每1小时,例如至少每50分钟,例如至少每45分钟,例如至少每40分钟,例如至少每35分钟,例如至少每30分钟,例如至少每25分钟,例如至少每20分钟,例如至少每15分钟,例如至少每10分钟,例如至少每5分钟,例如至少每2分钟,例如至少每1.5分钟,例如至少每60秒,例如至少每45秒,例如至少每30秒,例如至少每15秒,例如至少每10秒,例如至少每5秒,例如至少每2秒,例如至少每1秒,例如至少每0.5秒发送一次数据。

[0178] 如上所述,当前的临床实践是每天三次分析肾功能。相应地,在一个实施方案中,传感器系统每天三次,例如每8小时发送一次数据。

[0179] 在一个实施方案中,监测脲水平被认为是有用的。因此,在一个实施方案中,系统包括测定脲水平的工具。例如,如果本发明的组合物还包含脲酶以允许检测脲,则被认为是有用的,尽管本领域技术人员将意识到该反应不会产生电化学物质,因此该系统还可包括检测由氨和二氧化碳的产生所引起的pH值变化的工具。本发明的组合物还可包含尿酸酶,其消化尿酸并确实产生电化学物质,该电化学物质可使用系统中的一个或多个传感器来检测。在另一个实施方案中,系统还包括检测胱抑素C和白蛋白的工具。

[0180] 如上所述,本发明提供了各种组合物,其包含肌酐酶、肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶中的任何两种或更多种,以及各种其他组件和最佳酶活性的参数。本发明还提供了一种传感器系统,其除了可以与组合物相同的传感试剂之外,还包括被认为在实际确定受试者的肌酐水平方面有利的组件,或可以替代地在供依次使用的单独容器中包含肌酐酶、肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶。

[0181] 本发明还提供了使用本发明的组合物和传感器系统的各种方法。上文所讨论的本发明组合物、传感试剂和传感器系统的各种特征的优选方案也适用于下文。

[0182] 在一个实施方案中,本发明提供了一种测定来自人或动物受试者的样本中肌酐水

平的方法,其中该方法包括使用本发明的组合物或传感器系统。在一个优选的实施方案中,样本是透析液或微透析液。

[0183] 肌酐水平可用于测定肾小球滤过率(GFR),因此,本发明还提供了用于测定人或动物受试者中GFR的方法,其中该方法包括使用本发明的组合物或传感器系统。在一个优选的实施方案中,样本是透析液或微透析液。

[0184] 由于本发明独特地允许实时测定肌酐水平,因此本发明还提供了一种实时测定人或动物受试者样本中肌酐水平或肌酐清除率或GFR的方法。其中该方法包括使用本发明的组合物或传感器系统,任选地,其中样本是透析液或微透析液。

[0185] 该方法的优选方案包括以上关于本发明的组合物或本发明的传感器系统所讨论的那些优选方案。例如,在本发明的任何方法中,在一个实施方案中,在使样本与传感器接触之前,添加本发明的组合物或三种单独的酶。在另一个实施方案中,给与受试者一定量的肌酐并测定清除率。同样如上所述,也可以在测定肌酐水平之前给与药物西咪替丁。

[0186] 对于本领域技术人员将显而易见的是,本文所述的方法、组合物和传感器系统可用于诊断方法。例如,在一个实施方案中,本发明提供了一种用于诊断受试者患有急性或慢性肾脏疾病的方法,该方法包括根据本文所述的任何一种方法测定肌酐水平和/或肌酐清除率和/或肾小球滤过率。

[0187] 例如,如果肌酐的稳态水平开始上升,则受试者可能开始患有肾脏损害和肾功能受损。另外或或者,如果在给与一定量的肌酐之后,清除率不如先前给与肌酐的清除率那么快,则受试者可能再次开始患有肾脏损害。

[0188] 在此诊断之后,该方法还可以包括治疗受试者的急性或慢性肾脏疾病。这可能涉及停止用在急性或慢性肾脏疾病中禁忌或危险的药物的治疗或减少急性或慢性肾脏疾病中禁忌或危险的药物的剂量,或者可能涉及停止用最近服用并且可能被认为是造成肾功能受损的原因的药物的治疗或减少最近服用并且可能被认为是造成肾功能受损的原因的药物的剂量。

[0189] 例如,阿片类镇痛药,特别是吗啡、海洛因、可待因和化学治疗剂,例如铂类药物,被认为是在使用本发明的方法测定肾功能后可以调节给药的药物。其他药物是本领域已知的,例如http://www.eastmidlandscancernetwork.nhs.uk/Library/RenalDosageAdjustments.pdf详细介绍了根据多种药物的GFR推荐的剂量调整。

[0190] 例如,完全禁止(CI)使用阿糖胞苷,其GFR低于30ml/min。用本发明检测肌酐水平的准确性和灵敏度可以使这些患者仅接受个性化剂量的这种有用药物,而不是完全停止治疗。

[0191] 其他此类药物包括抗生素,例如糖肽万古霉素和替考拉宁,或增加青霉素的剂量。有关更多信息,请访问:https://www.google.co.uk/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0ahUKEwjQh5v63JDVAhVgOMAKHSnrByUQFggtMAE&url=https%3A%2F%2Fwww.nuh.nhs%2Fhandlers%2Fdownloads.ashx%3Fid%3D60983&usg=AFQjCNFrkdOqgEItYOE8rSWu4GJmTbRgOQ

[0192] 因此,本发明还提供了一种测定待给与受试者的药物剂量的方法,该方法包括至少在给药前和至少在给药后测定肌酐水平/肌酐清除率/肾小球滤过率,任选地进一步包括比较给药前和给药后肌酐水平/清除率/肾小球滤过率。

[0193] 诸如本文所述的调整药物剂量的方法也被认为可用于药物试验。

[0194] 本发明还提供了一种仅基于受试者的基线肌酐水平测定待给予受试者的药物剂量的方法。例如,如果认为受试者的血肌酐水平较高,则可以减少药物剂量,或者根本不给药。

[0195] 或者,如果在给药后肌酸酐水平维持稳定状态,则该方法还可包括维持或增加药物剂量。

[0196] 以上方法可以用于诊断患有慢性肾脏疾病的受试者的方法。例如,通常基于长期较高的肌酐水平来诊断慢性肾脏疾病。

[0197]

期	GFR*	说明	治疗期
1	90+	肾功能正常,但尿液表现或结构异常或遗传特征指向肾脏疾病	观察,控制血压。
2	60-89	肾功能轻度减退,其他发现(如1期)指向肾脏疾病	观察、控制血压及危险因素。
3A 3B	45-59 30-44	肾功能中度减退	观察、控制血压及危险因素。
4	15-29	肾功能重度减退	规划终末期肾衰竭。
5	<15或透析	非常严重,或终末期肾衰竭(有时称为确认肾衰竭)	治疗选择。

[0198] 在优选的实施方案中,重复本发明的方法,例如,肌酐水平和GFR的测定可以连续地定期或不定期进行,如以上关于传感器系统所讨论的。该方法应该执行的频率将取决于目的,且可以被本领域技术人员容易地测定。例如,如果认为受试者有肾衰竭的风险,则可以非常频繁地进行该方法,或者在认为受试者肾衰竭的风险没有增加的情况下可以不那么频繁地进行。药物的剂量可以定期调整,也可以实时调整。

[0199] 如上所述,在某些情况下给与受试者肌酐和/或肌酸和/或肌氨酸的“加标样(spike)”是有利的,以允许观察肌酐清除的动力学。例如,肌酐水平(例如)恢复到基线水平所花费的时间表示肾脏的功能。在这种情况下,在给与肌酐后立即监测肌酐水平(或可能是肌酸或肌氨酸,视情况而定)是有利的。

[0200] 如上所述,本发明的任何方法可以对来自受试者的任何类型的样本,例如血液样本或血浆或尿液样本,或脑脊髓液的组织液进行。在一个实施方案中,样本是透析液或微透析液,例如来自血液、尿液、组织液或脑脊髓液中的任何一种。

[0201] 应当理解,本发明的方法可用于离开基准样本(例如已知肌酐浓度的基准样本)测定肾功能,即基于本发明测定的肌酐水平的GFR。在一个实施方案中,认为肌酐水平或用于确定是否应给予药物或要给予多少药物的计算的GFR的相对变化仅基于受试者肾脏功能的相对变化。例如,如果基线肌酐水平开始增加,则认为受试者开始显示肾功能受损的迹象。或者,如果在添加肌酐、肌酸或肌氨酸后,清除肌酐、肌酸或肌氨酸的速度低于先前测试中清除肌酐、肌酸或肌氨酸的速度。

[0202] 然而,在一些实施方案中,将测定的肌酐水平或计算的GFR与已知肌酐浓度的基准样本进行比较,因此在另一个实施方案中,本发明提供了一种监测肾功能的方法,其中该方法包括使样本与前述权利要求中任一项所定义的组合物或传感试剂接触,任选地,其中该方法包括测定样本中肌酐的浓度,并且任选地还包括与基准样本或已知基准浓度进行比较,任选地,其中该方法包括任选地通过使用电化学传感器,任选地通过安培法检测H_2O_2的水平。

[0203] 认为即使在没有实时监测的情况下(由于本发明,这现在是可能的),本发明也被认为在例如肌酐水平的单次测量中是有用的,如当前实际使用的那样。在这种情况下,将受试者样本与基准样本或可以与受试者样本进行比较以提供有用信息的其他已知样本集进行比较被认为是适当的。因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种测定样本中肌酐浓度的方法,其中该方法包括使样本与前述权利要求中任一项所定义的组合物或传感试剂接触。在一个优选的实施方案中,该方法包括例如通过使用电化学传感器,例如通过安培法检测H_2O_2的水平。该方法还可包括与基准样本或已知基准浓度进行比较。在一个优选的实施方案中,肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶全部处于游离溶液中。如上所述,可以将酶分别添加到受试者样本中,即,如以上关于传感试剂所讨论的,或者可以例如通过使用本发明的组合物同时添加至少两种酶。在另一个实施方案中,所有三种酶都是同一组合物的一部分,因此所有三种酶都同时添加到受试者样本中。上文讨论的组合物的优选方案,其也适用于传感试剂,例如缓冲液的选择,缓冲液不是PBS,pH和/或pKa的选择均适用于该(以及所有其他)实施方案。

[0204] 如上所述,本发明提供了一种测定肌酐浓度相对变化的方法,其中该方法包括在一个以上的时间点使样本与前述权利要求中任一项所定义的组合物接触,任选地,其中该方法包括与基准样本或已知基准浓度进行比较。

[0205] 本领域技术人员将理解,本文所述的组合物、传感系统和方法也在器官移植领域中也具有效用。如果可以监测在移植前已经离体的肾脏功能,以至于如果肾脏功能开始下降,可以采取各种干预措施,那将是有益的。

[0206] 在此,本发明提供了基于移植肾脏支持概念证明的数据。然而,认为将特定试剂添加到闭环灌注系统中并监测代谢物的清除或转化作为器官功能指标的方法是广泛适用的,并且可应用于有代谢物的任何器官,可以监测其产生或减少。

[0207] 例如,可以通过测量二氧化碳清除率来监测用于移植的肺的功能(即从受试者身上获取的肺)。在这种情况下,可以将二氧化碳的试样添加到灌注系统中,并监测二氧化碳的清除率。本领域技术人员将理解,本发明的组合物不被认为可用于测定二氧化碳的水平,但是本领域技术人员将充分了解用于测定例如血液中二氧化碳水平的方法,其可以直接用于检测灌注液中的二氧化碳。基于本文的工作,这种方法被认为将是可行的。

[0208] 类似地,可以通过将血红素添加到闭环系统中来测定肝脏功能的水平,并可以监测胆红素的产生,这可以直接指示该特定时间的肝脏功能。

[0209] 例如,在一个实施方案中,本发明提供了一种用于监测移植器官的方法,所述移植器官例如是先前已从受试者体内获取的移植器官,所述方法包括向离体移植器官给与通常由健康器官代谢的试剂,并且随后测定所述试剂或所述试剂的代谢产物的水平,任选地,其中所述测定进一步包括使用本发明的组合物、传感器系统或方法。优选地,器官处于闭环系

统中。

[0210] 在一个实施方案中,器官是肾脏,因此本发明提供了一种用于监测先前已从受试者体内获取的移植肾脏的方法,所述方法包括对离体移植肾脏给与肌酐、肌酸或肌氨酸,然后测定肌酐、肌酸或肌氨酸的水平,任选地,其中所述测定进一步包括使用本发明的组合物、传感器系统或方法。优选地,肾脏处于闭环系统中。

[0211] 在此系统中,上文讨论的给与肌酐、肌酸或肌氨酸,然后测定清除率的"加标"方法被认为是合适的。

[0212] 本发明的组合物、系统和方法也被认为可用于监测游离皮瓣手术的移植物。受损的肌肉组织会泄漏肌酐和钾,因此本发明可用于监测肌酐的任何潜在增加,其表示移植物正在恶化。

[0213] 对于涉及移植器官的所有方法,优选地,重复测定器官(例如肾脏)功能所涉及的方法,并且可以定期重复,例如至少每24小时,例如至少每22小时,例如至少每20小时,例如至少每18小时,例如至少每16小时,例如至少每14小时,例如至少每12小时,例如至少每10小时,例如至少每8小时,例如至少每6小时,例如至少每5小时,例如至少每4小时,例如至少每3小时,例如至少每2小时,例如至少每1.5小时,例如至少每1小时,例如至少每50分钟,例如至少每45分钟,例如至少每40分钟,例如至少每35分钟,例如至少每30分钟分钟,例如至少每25分钟,例如至少每20分钟,例如至少每15分钟,例如至少每10分钟,例如至少每5分钟,例如至少每2分钟,例如至少每1.5分钟,例如至少每60秒,例如至少每45秒,例如至少每30秒,例如至少每15秒,例如至少每10秒,例如至少每5秒,例如至少每2秒,例如至少每1秒,例如至少每0.5秒。

[0214] 在一个实施方案中,本发明提供了一种监测移植肾脏的方法,所述方法包括灌注肾脏并将一定量的肌酐给与到系统中,并使用本发明的组合物和/或系统测定肌酐清除率。

[0215] 本领域技术人员将清楚地意识到本发明在移植器官后检测受试者器官功能的效用。因此,本发明还提供了一种用于监测移植接受者的肾功能的方法,其中肌酐水平和/或肌酐清除率和/或GFR和/或肾功能通过使用一种或多本文所述的组合物、传感器系统和/或方法测定。

[0216] 本发明还提供了延长离体肾脏寿命的方法,其中所述方法包括通过使用前述权利要求中任一项的组合物、传感器系统和/或方法监测肾脏功能,任选地,其中如果肾脏功能开始下降,则修改诸如氧递送、温度、压力和流速等参数,以尝试增加离体肾脏的寿命。延长移植器官寿命的方法的研究正在进行中,并且本发明的组合物、系统和方法被认为可用于检查该研究的终点,并可用于开发药物以改善寿命。

[0217] 本发明的组合物、传感器系统和方法可以作为各种部件的试剂盒提供。例如,在一个实施方案中,本发明提供了一种试剂盒,其包含:

[0218] 肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶中的任何两种或全部;和/或

[0219] 如本文所述的本发明的组合物;和/或

[0220] 肌酐和/或肌酸和/或肌氨酸;和/或

[0221] 至少一个废物容器;

[0222] 缓冲液,例如本文所述的缓冲液,例如非PBS的缓冲液,和/或微透析探针;和/或

[0223] 至少一个,优选至少两个精密泵。

[0224] 在本说明书中列出或讨论显然是先前出版的文件不应视为承认该文件是现有技术的一部分或是公知常识。

[0225] 除非上下文另有说明,否则应将本发明的给出特征、性能或参数的优选方案和选项视为已与本发明的所有其他特征、性能或参数的所有优选方案和选项组合公开。例如,本发明的方法可以包括pH为8.5的缓冲液,灌注液流速为4ul/min,酶/组合物流速为0.5ul/min。

[0226] 现在将通过以下非限制性实施例举例说明本发明。

附图说明

[0227] 图1.使用50μm电极比较pH 7.0-8.0的10mM PBS中的30U/ml SAO。

[0228] 图2.用8x25μm电极阵列比较pH 7.5的100mM PBS中,pH 8.0的50mM EPPS中和pH 9.0的50mM硼酸盐中的30U/ml SAO,表明在EPPS中1mM肌氨酸的电流几乎增加了三倍。

[0229] 图3.在各种缓冲液中通过30U/ml SAO与100uM肌氨酸的系列稀释实验获得的标准化电流响应曲线,证实了Tris和硼酸盐缓冲液不适用于该系统。时间以分钟为单位。

[0230] 图4.一项最终的酶优化实验,表明了从100μM肌酐的酶消化得到的信号的标准化时间演变。所有酶量均以单位/毫升为单位。注意由pH 3.0的无缓冲NaCl前沿引起的小扰动(*)。

[0231] 图5.以2μl/min进行微透析的肌酐校准曲线,通过在充分搅拌的T1中添加标准液获得,并具有从充分搅拌的去纤维蛋白的马血中得到的平行采样曲线。通过对希尔方程自动拟合获得两个曲线。

[0232] 图6.微透析取样系统在12小时内的稳定性测试。注意,酶泵的加标样每40分钟加注一次(20μl,0.5μl/min)。实验在酶库耗尽12小时后结束。

[0233] 图7.测试抗坏血酸(Asc)、尿酸(Uric)和扑热息痛(Para)的干扰。标签下方的值是运行总浓度。根据尿酸在20℃下在水中的最大溶解度来估算其浓度。

[0234] 图8.用溶液中不同水平的肌酐模拟100ml/min的肌酐清除率。虚线表示从中得出速率常数和半衰期的指数曲线。

[0235] 图9.稀释实验结果,从CKD1-CKD4模拟不同程度的肾功能不全,相当于肌酐清除率在100ml/min-25ml/min。

[0236] 图10.Waters RM3冷灌注系统配置为使用外膜氧合器和热交换器(框架外)进行温热血灌注。微透析系统已完成初始校准,正在等待肾脏到达。

[0237] 图11.灰色:来自微透析系统的原始信号,显示来自RM3泵的常规电脉冲。黑色:对数据应用Savitsky-Golay平滑滤波器的结果。

[0238] 图12.在真实的血液灌注猪肾脏中测试的系统的时序图像。温热灌注实验的结果显示出初始的平稳期,随后在充氧后信号强度稳定下降,随后进行了两次肌酐测试。

[0239] 图13.在pH 3.0的NaCl中消化100uM肌酐,a)pH 7.5,b)pH 8.0和c)pH 8.5的50mM EPPS作为运行缓冲液。

[0240] 图14.在pH 3.0的NaCl中消化100uM肌酐。a)肌酐酶:肌酸酶:肌氨酸氧化酶-150:300:60,b)肌酐酶:肌酸酶:肌氨酸氧化酶-300:300:60和c)肌酐酶:肌酸酶:肌氨酸氧化酶-600:300:60。

[0241] 图15.在pH 3.0的NaCl中消化肌酸,a)pH 7.5,b)pH 8.0和c)pH 8.5的50mM EPPS作为运行缓冲液。

[0242] 图16.在pH 3.0的NaCl中消化肌酸。a)肌酸酶与SOA的比例=150:60,b)肌酸酶与SOA的比例=180:60,以及c)肌酸酶与SOA的比例=300:60。

[0243] 图17.a)在50mM EPPS中消化100uM肌氨酸,b)消化100uM肌酸酶时,不同浓度的肌酸酶与肌氨酸氧化酶的信号响应随时间的变化。

[0244] 图18.溶解度表。

[0245] 图19.文献中描述的用于肌酐的三酶安培检测的实验条件的概述。CA=肌酐酶,CI=肌酸酶,SO=肌氨酸氧化酶,在制备溶液中标准化为U/ml,其中1单位催化每分钟1μmol底物的转化。*U/cm^2的电极。**U/电极。***毫克的酶,无法进行转化。

实施例

[0246] 实施例1-设计要求

[0247] 总体设计概念是创建一种便携式、低成本、总体上交钥匙的微型系统,用于连续采样和分析受试者(例如患者)的离体灌注肾脏的血液或尿液中的正常肌酐浓度。这需要一种能够检测血液中60μm至120μm和尿液中7至16mM浓度的系统(下表1.1)。请注意,这些血肌酐浓度仅为血糖浓度的1/25至1/150,而且目前尚无在临床环境中能够连续实时进行肌酐监测的系统[33]。

[0248]

血液和尿液的正常范围[1,4-6]			
	组分	血清	尿
一般特性	体积	~80ml/Kg体重	~1.5L/24hrs

[0249]

	重量克分子渗透压浓度	280-295mOsm/Kg	450-900mOsm/Kg
	pH值	7.35-7.45	4.5-8.0
	$[H^+]$	35-45nmol/L	1-32，000nmol/L
	蛋白质	60-80g/L	≤150mg/24hrs
离子	Na^+	135-145mmol/L	40-220mmol/24hrs
	K^+	3.5-5.0mmol/L	25-120mmol/24hrs
	Ca^{2+}	2.0-2.5mmol/L	2.5-7.5mmol/24hrs
	Mg^{2+}	0.6-0.8mmol/L	3-4.5mmol/24hrs
	Cl^-	95-105mmol/L	100-250mmol/24hrs
含氮废物	脲	1.5-5mmol/L	420-720mmol/24hrs
	肌酐	60-120μmol/L	7-16mmol/24hrs
	氨/NH_4^+	10-35μmol/L	20-70mmol/24hrs
	尿酸	180-480μmol/L	1.4-4.4mmol/24hrs
细胞	红细胞	$4-5x10^{12}$/L	0-3/HPF+
	白细胞	$4-9x10^{9}$/L	0-2/HPF+
其他	葡萄糖	4-6mmol/L	无
	胆红素	2-25μmol/L	无
	酮类	无	无
	亚硝酸盐	无	无

[0250] +/HPF＝每高倍显微镜视野

[0251] 表1.1

[0252] 我们从经验中知道,在设计过程的早期阶段考虑反应产物的检测方法很重要。肌酐脱亚氨酶的反应方案和Tsuchida和Yoda的更复杂三步法均产生适合电化学或分光光度定量的物质。在这两种方法中,由于小规模的光程长度以及比色或基于吸收的检测所需的单色光源的产生和稳定性问题,电化学方法更适合于小型化。

[0253] 实施例2-开发实时测定系统

[0254] 我们实验室中开发的葡萄糖和乳酸采样系统利用微透析、微流控和安培传感的组合来创建强大的连续流实时测定系统(例如,参见WO 2016189301)。

[0255] 安培传感器

[0256] 我们实验室使用由以前的博士研究员Chu Wang博士设计的恒电位仪[58]。该器件使用OPA129(Texas Instruments Inc.,Dallas,Texas,USA)作为跨阻放大器,其最大输入偏置电流为100fA,电流噪声系数为$0.1fA/\sqrt{Hz}$,差分输入阻抗为1013Ω。在该设计中,电压设定点是作为反向电压从PowerLab数据采集系统施加到对电极,而不是在工作电极上的直接偏置,从而将跨阻放大器输入端的任何可能的噪声降至最低。电路的伺服部分使用OPA140(Texas Instruments Inc.,Dallas,Texas,USA),其低失调电压为120μN,失调电压

漂移为1μV/℃,差分输入阻抗为1013Ω,输出阻抗为16Ω和增益带宽积为11MHz。

[0257] 电聚合间苯二胺(mPD)的表面保护

[0258] 准备针状微电极的最后一步是保护工作电极免受污染,并仅允许H_2O_2规模的分子到达表面。这项技术是从许多报道的聚合物薄膜演变而来的,该薄膜用于通过电极表面截留酶以形成生物传感器,其已存在于文献中,包括nafion[64]、聚吡咯[65]和多酚[66]的薄膜。

[0259] 这些中最稳定和均匀的是通过原位电聚合形成的。这样,可以控制最终膜的精确位置、速率和厚度。我们发现聚合间苯二胺(mPD)[67]产生可再生的薄膜,该薄膜紧密粘附在工作电极的表面,并且足够致密,以防止较大的干扰氧化还原物质到达电极表面,例如二茂铁或通常在生物系统中发现的那些(抗坏血酸、尿酸或扑热息痛(N-(4-羟基苯乙酰胺)),同时仍允许H_2O_2以足以产生良好响应时间(<1秒)的速率。

[0260] 该方法很简单。将针状微电极悬浮在pH 7.4的10mM磷酸盐缓冲盐水中的100mM mPD溶液中,并向工作电极施加+0.7V电压(vs.AgIAgC1),持续20分钟,直到电流减小到渐近低水平。然后将电极在0V下再保持2-5分钟,风干,然后在dH_2O中冲洗。然后用循环伏安法检查mPD层的质量,其中良好的结果被认为可以将信号峰的强度降低95%,同时具有相同的氧化和还原曲线,并且没有银污染的迹象。

[0261] 实施例3-优化3酶系统

[0262] 所有实验都使用了肌酐酶(CNH-311;EC 3.5.2.10;259U/mg),肌酸酶(CRH-221;EC 3.5.3.3;9.18U/mg)和肌氨酸氧化酶(SAO-351;EC 1.5.3.1;13.3U/mg),购自Sorachim(Sorachim SA.,Lausanne,Switzerland),其从Toyobo(Toyobo Co.,Ltd.,Osaka,Japan)提供酶。

[0263] 完善过程花了几个月的时间才完成,探索LabSmith微流控系统的酶混合物、缓冲液和布局的最佳范围,以实现低浓度肌酐的可靠检测。

[0264] 在综述有关酶反应的选择和优化的文献后,有三个明显的趋势。首先,大多数研究人员正在使用生物传感器,将酶嵌入基质中直接应用于各种形式的电极。其次,用于产生传感器的酶的特定量或由此得出的检测限几乎没有一致性。第三,过去33年中对该系统的所有研究都使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)作为运行缓冲液,见图19。

[0265] 在图19所示的论文中,只有[73]和[74]没有使用生物传感器,而是分别使用了分光光度法和流动注射分析以及一系列酶反应床。

[0266] 实施例4-缓冲液选择

[0267] 希望选择除PBS以外的其他缓冲液的一个原因是系统打算从尿液或血液中取样。表1.1显示,正常成年人的尿液pH值可低至4.5(32mol H^+)。我选择对pH值为3的系统进行过度设计,以在面对重度缺血时保持灵敏性。PBS的pKa仅为7.2,这意味着需要高浓度的缓冲液才能提供足够的能力来中和1mmol H^+,并使透析液的pH值保持在pH 8.0的0.1个单位内。这将需要PBS浓度为100mM,如通过以下3.1所述的Henderson-Hasselbalch方程所证明的,而pKa为8.0的缓冲液仅需要20mM的浓度即可抵抗±0.1个单位的pH值变化。

[0268] $8.0=7.2+\log_{10}$(酸/碱)

[0269] $10^{0.8}=$(酸/碱)

[0270] 碱(1+6.3095)=100mM

[0271] 碱＝13.68mM

[0272] 酸＝86.32mM

[0273] 缓冲1mmol的H^+将改变比例如下:

[0274] (86.32/13.68)→(85.32/14.68)

[0275] 使用Henderson-Hasselbalch方程进行反向计算:

[0276] $$\mathbf{pH} = 7.2 + \log_{10}\left(\frac{85.32}{14.68}\right)$$
$$= 7.964$$

[0277] 我检查了一系列备用缓冲液,寻找合适的缓冲液,其pKa为8.0,具有低温敏感性,且缺乏阳离子络合,并鉴定出4-(2-羟乙基)哌嗪-1-丙磺酸(EPPS),一种符合所有这些条件的不常见的哌嗪类药物。

[0278] 台式测试表明,当与缓冲的酶溶液以1:4的体积比混合时,50mM的EPPS能够将pH 3.0的盐溶液中和至最终pH 7.7,而100mM PBS中的酶的pH值仅为7.5。

[0279] 实施例5-优化实验

[0280] 实验室中的先前工作发现,灌注液流速为2μl/min和酶流速为0.5μl/min的组合,效果很好。我决定倒着工作,从肌氨酸氧化酶到肌酐酶,直接依次测试并优化每个步骤的酶混合物和pH值,然后进行微透析实验。

[0281] 图1示出了我在创建8x25μm电极之前运行的单个50μm电极的初始实验结果,比较了10mM PBS中30U/ml肌氨酸氧化酶与25μM至10mM肌氨酸的信号强度,证实了将pH值调到8.0会改善信号的怀疑。对于两步和三步混合物,在pH 8.0时灵敏度高于7.5时,结果相似。

[0282] 使用更新的8x 25μm电极阵列,在pH 7.5的100mM PBS,pH 8.0的50mM EPPS和pH 9.0的50mM硼酸盐缓冲液中的30U/ml SAO进行了头对头比较。结果如图2所示。随着浓度的提高,EPPS信号标准偏差的扩大很可能是由于底物泵的故障所致,该故障也出现在以后的实验中,导致其被替换。

[0283] 图3示出了这些系列稀释实验的阶梯图,表明与Tris和硼酸盐缓冲液相比,在PBS和EPPS中获得的清晰结果,进一步证实了它们不适用于该系统。

[0284] 此后,进行了一系列实验,以检查对各种酶混合物的响应曲线的时间分布,以在最短的时间内获得最大的响应,在此之后可以看到最小的改进。这表明酶的比例不再是限制性的,而只是酶的量。我决定将系统的总酶含量(重量/体积)限制为血清白蛋白的(400mg/ml),但是可以在以后的开发中进一步推广。我意识到微流控系统中沉积物的可能性,以及在这些规模的较高蛋白质浓度下粘度增加以及对混合和底物扩散的干扰。

[0285] 所有实验均在pH值为3.0的生理盐水中的100μM底物储液器进行,按预期的1:4体积比向其中加入酶混合物,然后以2.5μl/min的速度泵入传感器以再现最终系统的总流量。将酶混合物在pH 7.5、8.0和8.5的50mM EPPS中缓冲。除了图4是最终实验之一之外,这里没有再现广泛的系列结果,在该实验中,SAO和肌酸酶的含量已针对100μm肌酸进行了优化,现在该实验试图确定在pH 3.0的生理盐水中100μm肌酐的最佳肌酐酶量。

[0286] 请注意,如何将pH从8.0增加到8.5相当于将肌酐酶含量加倍从300U/ml增加到600U/ml(蓝线与红线),以及在pH 8.5下使用600:300:60的混合物增加响应。选择用于微透

析实验的最终混合物是在pH 8.0的50mM EPPS中的600:300:60,但是该实验提出了将来使用pKa值约为8.5的替代缓冲剂,例如HEPBS(pKa值为8.3)[94]的可能性。

[0287] 下表3.4列出了通过该实验方法在pH 8.0下获得的T_{90}水平(达到最高峰的90%的时间,从上行程开始测量)的集合,证明了混合物的演变。

[0288]

SAO (U)	T_{90} (sec)	CRH : SAO (U)	T_{90} (sec)	CNH : CRH : SAO (U)	T_{90} (sec)
15	138	150: 60	145	150: 300: 60	195
30	73	180: 60	104	300: 300: 60	154
60	28	300 : 60	77	600 : 300 : 60	**135**

[0289] 表3.4:在pH 8.0下进行酶优化实验的结果,以达到最低T_{90}水平。最终混合物的反应时间以粗体突出显示。

[0290] 从这些结果中,我决定在将酶送入透析液的Y形接头和传感器之间实现3分钟的延迟,以通过提供足够的混合和反应时间来确保最大的灵敏度。

[0291] 实施例6-微透析实验

[0292] 通过优化酶量和缓冲液以检测100μM的肌酐水平,我开始用微透析测试模拟的最终环境中的系统。在此,将用于深层组织取样的临床级CMA 70微透析探针(M Dialysis AB,Stockholm,Sweden,其膜表面积为18.8mm^2,截留值为20kDa)悬浮在充分搅拌的T1溶液(细胞外液类似物)(我们的原液含有2.3mM氯化钙、147mM氯化钠和4mM氯化钾于dH_2O中)中,并以标准添加方法向其中添加了肌酐试样。T1也用作灌注液,由哈佛仪器PHD 2000可编程输液泵(Harvard Bioscience Inc.,Holliston,Massachusetts,USA)以2μl/min的速度递送,透析液返回我LabSmith板的Y形接头与经缓冲的酶混合物混合,流速为0.5μl/min,然后到延迟回路和传感器。根据这些结果,可以为系统建立校准曲线,该曲线符合酶动力学Hill方程,其中Km为2.3mM(±1.3mM),V_{max}为2.9mM(±1.0mM),速率常数为0.96μM/秒(+0.05μM/秒)。有趣的是,系统的Km值包括肌氨酸氧化酶的Km值(Km为2.8mM),而不是肌酐(4.5mM)或肌酐酶(32mM)的Km,这可能表明这是限速步骤,甚至可能是由于溶液中存在氧(≈250μm)。

[0293] 然后将相同的装置用于经过充分搅拌的去纤维蛋白马血(TCS Biosciences Ltd.,Botolph Claydon,Buckingham,UK)中的标准添加实验以证明可以检测出生物液中的微摩尔量的肌酐。结果如图5所示。

[0294] 在T1中获得的结果表明,这种微透析装置(其是第一个此类装置)是一种灵敏且低噪声的肌酐测量方法,检出限为4.3μM,测试上限为500μM。曲线的Km表示,该方法在进一步测试后可达到约2mM的水平,提供了广泛的可用工作范围。此外,微透析采样方法的估计回收率仅为40%,这意味着提高回收率可以将检出限降低到≈2μM。

[0295] 在充分搅拌的马血中的结果表明,马的基础肌酐水平为180μM-186μM。这刚好超出马的正常上限(100μM-160μM),但我们不知道从中获得该结果的马匹的肌肉质量或性别,也不知道其运动状态,从而水平可以上升到≥200μM[95]。也可能是样本被轻微溶血,其红细胞肌酸进入了酶级联反应(参见下表3.5)。这些结果的更宽标准偏差无疑来自对流效应和由于红细胞团块导致的排除扩散路径的组合,从而以一种混乱的方式改变了透析膜的通

量。

[0296] 实施例7-稳定性测试

[0297] 为了测试该微透析系统的长期稳定性,我将探针悬浮在一个充分搅拌的T1罐中,向其中加入了一定量的肌酐以使总浓度达到100μM。图6中的归一化结果表明,系统在12小时内保持响应,在9小时后灵敏度下降到原始信号的50-60%(相当于250pA),但从那时起保持恒定。从11.5个小时开始的噪音增加是同事早上上班的结果。频谱分析显示了三个主要的噪声峰-一个来自电源的50赫兹,另一个可能来自磁力搅拌器的13赫兹,以及一个速度慢得多的0.2赫兹正弦叠加在整个数据集上,可以反映搅拌液体或哈佛仪器PHD 2000泵的螺杆驱动内的对流。

[0298] 实施例8:干扰测试

[0299] 在700mV偏压(相对于AglAgCl)下,工作电极能够氧化血液中常见的其他化学物质,例如扑热息痛、尿酸和抗坏血酸,但应通过聚合的mPD层防止这些化学物质到达电极表面。该三酶系统还将能够从肌氨酸和肌酸生成过氧化氢。

[0300] 这些常见干扰物的水平在下表3.5中列出。

[0301]

干扰物	浓度	引文
抗坏血酸	164 μm + 228 μM +	[77] [81]
尿酸	916 μM + 42 — 744 μM *	[81] [96]
扑热息痛	164 μM + 264 μM +	[77] [81]
肌氨酸	0.6 — 2.76 μM *	[97]
肌酸	25 μM * 38.2 — 68.7 μM *	[98] [99]

[0302] 表3.5:+传感器测试中使用的水平。*记录的血清正常范围

[0303] 我没有测试最终系统中的肌酸和肌氨酸干扰,因为肌氨酸的内源性水平处于低微摩尔范围,肌酸的内源性水平仅在广泛溶血的情况下才引起问题,因为大多数是在细胞内。这两种物质也可以通过预处理,本底扣除或使用不同酶混合物的平行采样途径来消除。

[0304] 图7示出了干扰测试的结果,其中将目标物质添加到充分搅拌的T1容器中。抗坏血酸和扑热息痛的添加量超过文献中的量。

[0305] 请注意,在泵加注之前,对第一次添加抗坏血酸的反应但对第二次添加没有反应,以及对添加尿酸的类似反应。这些可能是由于探针尖端与用于实验的小型玻璃样本罐内部接触而导致的回收率暂时降低。第二次添加抗坏血酸没有明显的干扰,扑热息痛也没有,对

第二个肌酐试样的反应也没有任何干扰,使总浓度达到200μM。

[0306] 尽管取得了这些良好的结果,但我也意识到,可以采用另一种方法来抵消系统中任何潜在干扰物的影响。

[0307] 实施例9-测量肌酐清除率

[0308] 测量响应的绝对强度时遇到的问题包括,当工作电极被H_2O_2毒害,涂有蛋白质或参比物质降解时,需要持续考虑传感器的灵敏度和偏移的漂移。如上一节所述,还需要考虑系统中可能产生人为结果的任何潜在干扰物。

[0309] 我意识到,应该有可能对肌酐清除率本身进行测试,将肾功能作为速率常数而不是测量绝对浓度,从而避免对干扰物和传感器漂移的所有潜在担忧,只要肌酐能在本底上检测到。如果我们认为闭环灌注系统不应含有内源性肌酐,那么应该可以定期将已知量的肌酐添加到循环容量中,并监测衰减率,因为工作肾以一级动力学将其滤过到尿液中。在高于衰竭水平时,清除率应反映GFR,因为主动肾小管分泌的贡献最小。

[0310] 因此,我构建了一系列实验,以模拟连续微透析采样期间T1中已知量的肌酐的不同肌酐清除率。例如,清除率为100ml/min,将在5分钟内使1升样本以1/分钟的速度循环(相当于正常成年人的血液循环速度(5升血液,以5l/min的速度))至其原始浓度的一半。此清除率可以通过在5分钟内或以400μl/min的速度将包含已知量肌酐的2ml样本的体积稳定加倍来模拟。

[0311] 我选择重新创建各种功能障碍状态的肾脏清除率,从CKD1(1期慢性肾脏病)到CKD4,其清除率分别为100ml/min、75ml/min、50ml/min和25ml/min。下面的表1.2首先介绍了GFR和CKD期之间的对应关系。请注意,如图6所示,在稳定性测试期间的信号衰减率将等于2ml/min的清除率。

[0312]

期	1	2	3	4	5
GFR ($ml/min/1.73m^2$)	>90	60-89	30-59	15-29	<15

[0313] 表1.2:CKD的5期。第1期和第2期功能保持,但有肾脏疾病的迹象,例如瘢痕化或尿中有蛋白或血。第5期也称为终末期肾病(ESRD),需要透析或移植。

[0314] 图8示出了三种不同浓度的肌酐(100μM、200μM和300μM)在100ml/min的模拟清除率下的该稀释测试结果。

[0315] 200μM和300μM实验的结果非常相似,其时间常数的半衰期分别为476±0.86秒和471±1.0秒。100μM样本的半衰期更高,为620±2.8秒。值得注意的是,衰减曲线让人联想到Albery方程[100]所描述的曲线,表明透析液中向电极提供底物的可变性可能是这些实验错误的根本原因,因为我没有控制探针的放置、搅拌速度和温度。

[0316] 图9示出了模拟不同水平CKD的后续实验。每个信号均已标准化为从100%开始,以强调观察到的不同衰减率。

[0317] 这些曲线的半衰期是从原始数据的指数拟合得出的,分别为75ml/min、50ml/min和25ml/min清除率提供约13分钟40秒、16分钟30秒和27分钟的值。尽管这些并不直接对应于实验设计,但它们确实遵循有序的顺序,其得到的值之间有一定的比例关系。结果在较低的稀释率下明显更稳定,这进一步暗示了透析恢复和混合是错误的来源。

[0318] 实施例10-用血液灌注的猪肾测试系统

[0319] 最终实验探索了该系统在离体灌注肾脏设置中的功能。为此,我与在英国主要肾移植中心之一Hammersmith医院工作的临床研究人员Bynvant Sandhu博士合作。她的工作涉及使用RM3灌注装置(Waters Medical Systems LLC,Rochester,Minnesota,USA)对猪肾脏进行温热血灌注。从附近的有执照的屠宰场收集成年猪肾脏,并在静态冷库中保存4小时。此后,将其连接到RM3灌注装置中,该装置已重新配置了热交换器和氧合器以进行温热灌注。明显地,为再灌注实验收集的自体血被溶血并且含有大量血栓,使用前必须将其过滤掉。

[0320] 针对直接注入Y形接头的100μM肌酐校准传感器系统,然后通过在未搅拌的100μM肌酐T1溶液中的微透析探针,我将探针尖端深入肾静脉残端,以确保良好的血流。图10更详细地示出了实验设置。然后在再灌注的下一小时收集数据,直到在重新定位过程中探针膜受损为止,并且必须放弃实验。

[0321] 数据分析首先需要使用Savitsky-Golay平滑滤波器(具有513个样本窗口的二阶多项式)来消除由RM3的灌注泵引起的可见电尖峰,如图11所示。

[0322] 这些结果表明在系统设置和初始灌注过程中出现了一个初始平台,相当于≈300μM肌酐。较高的系统偏移量可能是由于屠宰过程中的肌肉损伤和自体血液的广泛溶血,从而将肌酸释放到灌注液中导致的。刚开始灌注时,随着肾脏开始消耗氧,血液会明显变黑。打开向膜式氧合器供氧后,血液迅速恢复为宝石红色,并导致信号强度突然下降,并很快恢复到较高的基线。实际上,这可能反映了由缺血性肾脏消耗了肌氨酸氧化酶正常作用所需的氧的突发性活性氧迸发,或由传感器检测到的pH的快速变化。

[0323] 然后,肾脏似乎正在以与以前的100ml/min肌酐清除率实验相同的速率排泄可检测到的代谢物,半衰期为652±3.5秒,但要注意的是,结果可能并不完全相同。然后,我用100微摩尔肌酐(10mls x 10mM)的两个单独试样加标了RM3系统的动脉贮血室,得到的结果如图12所示。这些曲线的半衰期分别为27秒和18秒,表明这些结果更可能是由于稀释而不是清除导致的。

[0324] 不幸的是,实验必须在系统中的可检测代谢物降低到低稳态之前结束。在最终的再灌注系统中,灌流液将包含在等张晶体溶液中洗涤的红细胞,而不含任何内源性肌酐,从而允许进行纯清除试验。

[0325] 结论

[0326] 该项目的这一部分表明,基于微透析采样和肌酐安培测试的独立系统能够实现4.3μM的检出限和500μM的测试上限,达到或超过文献报道的水平(表3.3)。这种性能是由于我对恒电位仪、微电极传感器阵列以及Tsuchida和Yoda的三重酶系统[40]进行了一系列改进和优化所导致的。将mPD电聚合到工作电极上的工艺还提供了良好的保护,防止了干扰物的水平远远超过进行此类测试的其他小组所报告的水平。

[0327] 除了开发实时肌酐监测系统(反应时间延迟3分钟)外,我还提出并探索了一种无需传感器校准即可监测肾功能的新方法,从而避免了需要补偿任何本底噪声或传感器偏移、漂移或灵敏度损失随时间变化。我相信这可以通过测量肌酐排泄衰减曲线的时间常数(或半衰期)来实现,并且这已经在包含猪肾脏的闭环灌注系统中通过实验得到证明。

[0328] 使用这种微流控系统进行实时监测的经济性也是有利的。尽管分析中使用的酶不

断浪费,但是连续监测一周仅需消耗5ml 600:300:60的混合物。按照截至2016年9月的三种酶的当前市场价格,这相当于不到每周50英镑。

[0329] 未来的工作将看到酶在具有更高pKa的缓冲液(例如HEPBS)中进行再优化,创建模块化微透析采样探针以将其在线包含在灌注回路中,并尝试标准化微通道内微电极阵列的形成,以提供用于实时监测肌酐的“热插拔”系统。该系统还可以受益于使用液滴微流控技术,以允许与普通传感器并行进行多种酶反应的多路复用,同时产生更好的混合效果,并产生更少的泰勒分散以降低信号强度,这很可能发生在3分钟的延迟环路中。随着进一步的开展,该系统也可以在重症监护室试用以监测活体肾功能。

[0330] 总的来说,本发明使我们更接近在移植前将器官保持在最佳状态的目标,在每秒钟都很重要的情况下争取时间。

[0331] 基准文献

[0332] 33.Randviir EP,Banks CE.Analytical methods for quantifying creatinine within biological media.Sensors and Actuators B:Chemical.2013;183:239-252.

[0333] 35.Myers GL,Miller WG,Coresh J,Fleming J,Greenberg N,Greene T,et al.Recommendations for improving serum creatinine measurement:a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program.Clinical Chemistry.2006;52(1):5-18.

[0334] 37.Panteghini M.Enzymatic assays for creatinine:time for action.Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.2008;68(sup241):84-88.

[0335] 40.Tsuchida T,Yoda K.Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum.Clinical Chemistry.1983;29(1):51-55.

[0336] 51.Xu JC,Hunter GW,Lukco D,Liu CC,Ward BJ.Novel carbon dioxide microsensor based on tin oxide nanomaterial doped with copper oxide.IEEE Sensors Journal.2009;9(3):235-236.

[0337] 52.Suzuki H,Arakawa H,Karube I.Performance characteristics of a urea microsensor employing a micromachined carbon dioxide electrode.Electroanalysis.2000;12(16):1327-1333.

[0338] 53.Halliwell B,Clement MV,Long LH.Hydrogen peroxide in the human body.FEBS letters.2000;486(1):10-13.

[0339] 55.Ungerstedt U,Pycock C.Functional correlates of dopamine neurotransmission.Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften.1974;30(1-3):44-55.

[0340] 56.Whitesides GM.The origins and the future of microfluidics.Nature.2006;442(7101):368-373.

[0341] 58.Wang C.Development of clinical instruments for traumatic brain injury patients:design,realisation,and performance.Imperial College London;2015.

[0342] 64.Liu H,Ying T,Sun K,Li H,Qi D.Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide,glucose and lactose based on N-methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode.Analytica Chimica Acta.1997;344(3):187-199.

[0343] 65.Guerrieri A,De Benedetto G,Palmisano F,Zambonin P.Electrosynthesized non-conducting polymers as permselective membranes in amperometric enzyme electrodes:a glucose biosensor based on a co-crosslinked glucose oxidase/overoxidized polypyrrole bilayer.Biosensors and Bioelectronics.1998;13(1):103-112.

[0344] 66.Nakabayashi Y,Wakuda M,Imai H.Amperometric Glucose Sensors Fabricated by Electrochemical Polymerization of Phenols on Carbon Paste Electrodes Containing Ferrocene as an Electron Transfer Mediator.Analytical Sciences.1998;14(6):1069-1076.

[0345] 67.Mitchell KM.Acetylcholine and Choline Amperometric Enzyme Sensors Characterized in Vitro and in Vivo.Analytical Chemistry.2004Feb;76(4):1098-1106.Available from:http://dx.doi.org/10.1021/ac034757v.

[0346] 72.Khue NV,Wolff CM,Seris JL,Schwing JP.Immobilized enzyme electrode for creatinine determination in serum.Analytical Chemistry.1991;63(6):611-614.

[0347] 73.Weber J,Van Zanten A.Interferences in current methods for measurements of creatinine.Clinical Chemistry.1991;37(5):695-700.

[0348] 74.Sakslund H,Hammerich O.Effects of pH,temperature and reaction products on the performance of an immobilized creatininase-creatinase-sarcosine oxidase enzyme system for creatinine determination.Analytica Chimica Acta.1992;268(2):331-345.

[0349] 75.Yamato H,Ohwa M,Wernet W.A polypyrrole/three-enzyme electrode for creatinine detection.Analytical Chemistry.1995;67(17):2776-2780.

[0350] 76.Schneider J,Gründig B,Renneberg R,Cammann K,Madaras M,Buck R,et al.Hydrogel matrix for three enzyme entrapment in creatine/creatinine amperometric biosensing.Analytica Chimica Acta.1996;325(3):161-167.

[0351] 77.Mădăraş MB,Popescu IC,Ufer S,Buck RP.Microfabricated amperometric creatine and creatinine biosensors.Analytica Chimica Acta.1996;319(3):335-345.

[0352] 78.Mădăraş MB,Buck RP.Miniaturized biosensors employing electropolymerized permselective films and their use for creatinine assays in human serum.Analytical Chemistry.1996;68(21):3832-3839.

[0353] 79.Khan G,Wernet W.A highly sensitive amperometric creatinine sensor.Analytica Chimica Acta.1997;351(1):151-158.

[0354] 80.Kim EJ,Haruyama T,Yanagida Y,Kobatake E,Aizawa M.Disposable creatinine sensor based on thick-film hydrogen peroxide electrode system.Analytica Chimica Acta.1999;394(2):225-231.

[0355] 81.Shin JH,Choi YS,Lee HJ,Choi SH,Ha J,Yoon IJ,et al.A planar amperometric creatinine biosensor employing an insoluble oxidizing agent for removing redox-active interferences.Analytical Chemistry.2001;73(24):5965-5971.

[0356] 82.Tombach B,Schneider J,Matzkies F,Schaefer RM,Chemnitius GC.Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients.Clinica Chimica Acta.2001;312(1):129-134.

[0357] 83.Erlenkötter A,Fobker M,Chemnitius GC.Biosensors and flow-through system for the determination of creatinine in hemodialysate.Analytical and Bioanalytical Chemistry.2002;372(2):284-292.

[0358] 84.Stefan RI,Bokretsion RG,van Staden JF,Aboul-Enein HY.Simultaneous determination of creatine and creatinine using amperometric biosensors.Talanta.2003;60(6):1223-1228.

[0359] 85.Hsiue GH,Lu PL,Chen JC.Multienzyme-immobilized modified polypropylene membrane for an amperometric creatinine biosensor.Journal of Applied Polymer Science.2004;92(5):3126-3134.

[0360] 86.Berberich JA,Yang LW,Madura J,Bahar I,Russell AJ.A stable three-enzyme creatinine biosensor.1.Impact of structure,function and environment on PEGylated and immobilized sarcosine oxidase.Acta Biomaterialia.2005;1(2):173-181.

[0361] 87.Berberich JA,Yang LW,Bahar I,Russell AJ.A stable three enzyme creatinine biosensor.2.Analysis of the impact of silver ions on creatine amidinohydrolase.Acta Biomaterialia.2005;1(2):183-191.

[0362] 88.Berberich JA,Chan A,Boden M,Russell AJ.A stable three-enzyme creatinine biosensor.3.Immobilization of creatinine amidohydrolase and sensor development.Acta Biomaterialia.2005;1(2):193-199.

[0363] 89.Staden RISv,Bokretsion RG.Simultaneous Determination of Creatine and Creatinine using Monocrystalline Diamond Paste—Based Amperometric Biosensors.Analytical Letters.2006;39(11):2227-2233.

[0364] 90.Nieh CH,Tsujimura S,Shirai O,Kano K.Amperometric biosensor based on reductive H2O,detection using pentacyanoferrate-bound polymer for creatinine determination.Analytica Chimica Acta.2013;767:128-133.

[0365] 91.Serafín V,Hernández P,AgüíL,Yáñez-Sedeño P,Pingarrón J.Electrochemical biosensor for creatinine based on the immobilization of creatininase,creatinase and sarcosine oxidase onto a ferrocene/horseradish peroxidase/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/Teflon composite electrode.Electrochimica

Acta.2013;97:175-183.

[0366] 92.Yoshimoto T,Tanaka N,Kanada N,Inoue T,Nakajima Y,Haratake M,et al.Crystal structures of creatininase reveal the substrate binding site and provide an insight into the catalytic mechanism.Journal of Molecular Biology.2004;337(2):399-416.

[0367] 93.Hall SB,Khudaish EA,Hart AL.Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes.Part IV:phosphate buffer dependence.Electrochimica Acta.1999;44(25):4573-4582.

[0368] 94.Ferreira CM,Pinto IS,Soares EV,Soares HM.(Un)suitability of the use of pH buffers in biological,biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions—a review.RSC Advances.2015;5(39):30989-31003.

[0369] 95.Judson G,Frauenfelder H,Mooney G.Biochemical Changes in Thoroughbred Racehorses Following Submaximal and Maximal Exercise.In:Equine Exercise Physiology.Granta Editions Cambridge;1983.p.408-415.

[0370] 96.Fang J,Alderman MH.Serum uric acid and cardiovascular mortality:the NHANES I epidemiologic follow-up study,1971-1992.JAMA.2000;283(18):2404-2410.

[0371] 97.Allen RH,Stabler SP,Lindenbaum J.Serum betaine,N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism.Metabolism.1993Nov;42(11):1448-1460.Available from:http://dx.doi.org/10.1016/0026-0495(93)90198-W.

[0372] 98.Schedel JM,Tanaka H,Kiyonaga A,Shindo M,Schutz Y.Acute creatine ingestion in human:consequences on serum creatine and creatinine concentrations.Life Sciences.1999;65(23):2463-2470.

[0373] 99.Verhelst J,Berwaerts J,Marescau B,Abs R,Neels H,Mahler C,et al.Serum creatine,creatinine,and other guanidino compounds in patients with thyroid dysfunction.Metabolism.1997;46(9):1063-1067.

[0374] 100.Albery WJ,Haggett BG,Svanberg LR.The development of electrochemical sensors.In:Advanced Agricultural Instrumentation.Springer;1986.p.349-392.本发明还提供了以下编号的实施方案:

[0375] 1.一种组合物,其包含肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶中的任何两种或全部。

[0376] 2.根据实施方案1所述的组合物,其中至少一种,任选地两种,任选地所有的酶均未固定化,任选地,其中所有的酶都在溶液中。

[0377] 3.根据实施方案1所述的组合物,其中所述组合物包含缓冲液。

[0378] 4.根据实施方案3所述的组合物,其中所述缓冲液不是磷酸盐缓冲液或PBS,和/或不是Tris缓冲液,和/或不是四硼酸盐和/或不是HEPES。

[0379] 5.根据实施方案3或4中任一项所述的组合物,其中所述缓冲液选自EPPS、HEPBS、POPSO、HEPPSO和MOBS。

[0380] 6.根据实施方案3-5中任一项所述的组合物,其中所述缓冲液的pKa在7.0-9.0之间,任选地在7.3-8.95之间,任选地为8.5。

[0381] 7.根据实施方案1-6中任一项所述的组合物,其中所述组合物或缓冲液的pH在7.0-9.0之间,任选地在7.3-8.95之间,任选地为8.5。

[0382] 8.根据实施方案1-7中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含pH 8.0-8.5的EPPS,任选地pH 8.0-8.5的50mM EPPS,任选地pH 8.0的50mM EPPS或pH 8.5的50mM EPPS。

[0383] 9.根据实施方案1-8中任一项所述的组合物,其进一步包含脲酶和/或尿酸酶和/或检测胱抑素C的工具和/或检测白蛋白的工具。

[0384] 10.根据前述实施方案中任一项所述的组合物,其中所述肌酐酶得自Sorachim目录号CNH-311;和/或所述肌酸酶得自Sorachim目录号CRH-211;和/或所述肌氨酸氧化酶得自Sorachim目录号SAO-351。

[0385] 11.根据前述实施方案中任一项的组合物,其中肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶的浓度使得在最终反应混合物中肌酐酶的浓度为至少300U/ml,和/或肌酸酶的浓度为至少120U/ml,肌氨酸氧化酶的浓度为至少10U/ml。

[0386] 12.根据前述实施方案中任一项所述的组合物,其中所述组合物使得由含有肌酐的样本与前述实施方案中任一项的组合物混合而产生的最终混合溶液包含比率为10:5:1至49:8:1U/ml的肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶。

[0387] 13.根据前述实施方案中任一项所述的组合物,其中所述组合物使得由含有肌酐的样本与前述实施方案中任一项的组合物混合而产生的最终混合溶液包含量为600U/ml、300U/ml和60U/ml的肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶,任选地,其中组合物的pH为8.5。

[0388] 14.一种传感器系统,其包含肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶和至少第一传感器,任选地安培传感器,任选地,其中肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶是根据前述实施方案中任一项的组合物的一部分。

[0389] 15.根据实施方案14所述的传感器系统,包括微流控电路、微流控装置和微透析探针中的任一种。

[0390] 16.根据实施方案14和15中任一项所述的传感器系统,还包括连续流系统。

[0391] 17.根据实施方案14-16中任一项所述的传感器系统,其中所述系统还包括:采集样本装置、任选地取自患者的样本,或者取自闭环离体灌注器官,任选地肾脏的样本。

[0392] 任选地,其中取自患者的样本是微透析液,任选地取自血液、尿液、血浆、组织液、脑脊髓液。

[0393] 18.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其布置为使得在使样本与传感器接触之前,将肌酐酶和/或肌酸酶和/或肌氨酸氧化酶或根据前述实施方案中任一项的组合物添加到样本中,任选地,其中在与传感器接触之前,添加传感试剂大于1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250秒,5、5.5、6、6.5、7.5、8、8.5、9、9.5或10分钟。

[0394] 19.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其中所述系统包括在添加所述传感试剂之前或之后增加样本中氧量的装置,任选地,其中所述增加氧量的装置选自以下的一个或多个:混合器,其任选地包括导流板或蛇形区域,任选地,其中所述混合器由高渗透性材料(例如PDMS)制成;

[0395] 通过聚四氟乙烯管连接的多个混合段;

[0396] 加压容器。

[0397] 20.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其中所述系统可以检测浓度小于10uM,任选地小于7.5uM,任选地小于5uM,任选地小于4uM,任选地小于3uM,任选地小于2uM,任选地小于1uM的肌酐。

[0398] 21.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其中所述传感器系统可以相对于40uM至120uM的本底肌酐水平检测小于1uM,或小于2uM或小于3uM或小于4uM,或小于5uM或小于7.5uM或小于10uM的肌酐浓度变化。

[0399] 22.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其中所述系统包括用于从传感器收集数据的装置,任选地为PowerLab/4SP,任选地,其中所述系统还包括用于发送所述数据的无线发送装置。

[0400] 23.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其中所述系统还包括用于数据分析的装置,任选地为计算机或可穿戴设备,任选地,其中所述用于数据分析的装置包括用于接收无线发送的数据的装置。

[0401] 24.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,还包括至少一个废物收集容器,可选地,其中废物收集容器的体积小于10ml,例如小于9.5ml,例如小于9ml,例如小于8.5ml,例如小于8ml,例如小于7.5ml,例如小于7ml,例如小于6.5ml,例如小于6ml,例如小于5.5ml,例如小于5ml,例如小于4.5ml,例如小于4ml,例如小于3.5ml,例如小于3ml,例如小于2.5ml,例如小于2ml,例如小于1.5ml,例如小于1ml,例如小于0.5ml,例如小于0.25ml。

[0402] 25.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其中所述系统是移动的系统。

[0403] 26.前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其中该系统包括计算肌酐水平/肌酸酐清除率/肾小球滤过率的装置。

[0404] 27.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,进一步包括递送试剂,任选地造影剂或药物或肌酐,或肌酸或肌氨酸的装置,任选地,其中所述装置是药物泵,

[0405] 任选地,其中所述药物选自免疫抑制剂;化学治疗剂,例如铂剂;抗菌素,例如糖肽万古霉素和替考拉宁,以及青霉素;阿片类镇痛药,例如吗啡、海洛因和可待因;

[0406] 任选地,其中基于所计算的肌酐水平/肌酐清除率/肾小球滤过率来调节所递送的试剂的量。

[0407] 28.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其中所述系统还包括第二传感器和任选地第二装置,以获得第二样本,其中在第二传感器处进行检测之前,使第二样本与包含肌酸酶和肌氨酸氧化酶的第二传感试剂接触,任选地,其中布置系统,使得在与传感器接触之前,将第二传感试剂添加到第二样本中大于1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250秒,5、5.5、6、6.5、7.5、8、8.5、9、9.5或10分钟。

[0408] 29.根据实施方案28所述的传感器系统,其中所述系统包括从从第一传感器获得的数据中减去从第二传感器获得的数据的装置。

[0409] 30.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其中所述第一传感器连续地捕获数据。

[0410] 31.根据前述实施方案中任一项所述的传感器系统,其中所述第一传感器至少每

24小时,或至少每22小时,例如至少每20小时,例如至少每18小时,例如至少每16小时,例如至少每14小时,例如至少每12小时,例如至少每10小时,例如至少每8小时,例如至少每6小时,例如至少每5小时,例如至少每4小时,例如至少每3小时,例如至少每2小时,例如至少每1.5小时,例如至少每1小时,例如至少每50分钟,例如至少每45分钟,例如至少每40分钟,例如至少每35分钟,例如至少每30分钟,例如至少每25分钟,例如至少每20分钟,例如至少每15分钟,例如至少每10分钟,例如至少每5分钟,例如至少每2分钟,例如至少每1.5分钟,例如至少每60秒,例如至少每45秒,例如至少每30秒,例如至少每15秒,例如至少每10秒,例如至少每5秒,例如至少每2秒,例如至少每1秒,例如至少每0.5秒捕获一次数据。

[0411] 32.一种测定人或动物受试者的样本中肌酐水平的方法,其中所述方法包括使用根据前述实施方案中任一项的组合物或传感器系统,任选地,其中所述样本是透析液或微透析液。

[0412] 33.一种测定肌酐水平和/或肌酐清除率和/或肾小球滤过率的方法,其中所述方法包括使用根据前述实施方案中任一项的组合物或传感器系统,任选地,其中所述样本为透析液或微透析液。

[0413] 34.一种实时测定人或动物受试者样本中肌酐水平和/或肌酐清除率和/或肾小球滤过率的方法,其中所述方法包括使用根据前述实施方案中任一项的组合物或传感器系统,任选地,其中所述样本为透析液或微透析液。

[0414] 35.一种用于诊断受试者患有急性或慢性肾脏疾病的方法,所述方法包括根据前述方法中的任一种测定肌酐水平和/或肌酐清除率和/或肾小球滤过率,任选地进一步包括治疗受试者的急性或慢性肾脏疾病,或停止用急性或慢性肾脏疾病中禁忌或危险的药物的治疗,可选地,所述药物选自:

[0415] 免疫抑制剂;化学治疗剂,例如铂剂;抗菌素,例如糖肽万古霉素和替考拉宁,以及青霉素;和阿片类镇痛药,例如吗啡、海洛因和可待因。

[0416] 36.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中测定肌酐水平和/或肌酐清除率和/或肾小球滤过率的水平在给与一定量的肌酐和/或肌酸和/或肌氨酸之后进行测定,任选地在给予药物之前和之后。

[0417] 37.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括给予药物剂量,其中所述剂量已经基于传感器系统测定的肌酐水平和/或肌酐清除率和/或肾小球滤过率进行测定。

[0418] 38.一种监测肾脏移植的方法,所述方法包括灌注肾脏并将一定量的肌酐和/或肌酸和/或肌氨酸注入系统,并使用前述实施方案任一项的组合物和/或系统和/或方法测定肌酐清除率。

[0419] 39.一种监测移植接受者肾功能的方法,其中肌酐水平和/或肌酐清除率和/或肾小球滤过率通过使用前述实施方案任一项的组合物、传感器系统和/或方法测定。

[0420] 40.一种试剂盒,包含:

[0421] 肌酐酶、肌酸酶和肌氨酸氧化酶中的任何两种或全部;和/或

[0422] 根据前述实施方案中任一项的组合物;

[0423] 肌酐和/或肌酸和/或肌氨酸;和/或

[0424] 至少一个废物容器;

[0425] 缓冲液,可选地根据前述实施方案中任一项的缓冲液;

[0426] 微透析探针;和/或

[0427] 至少一个,可选地至少两个精密泵。

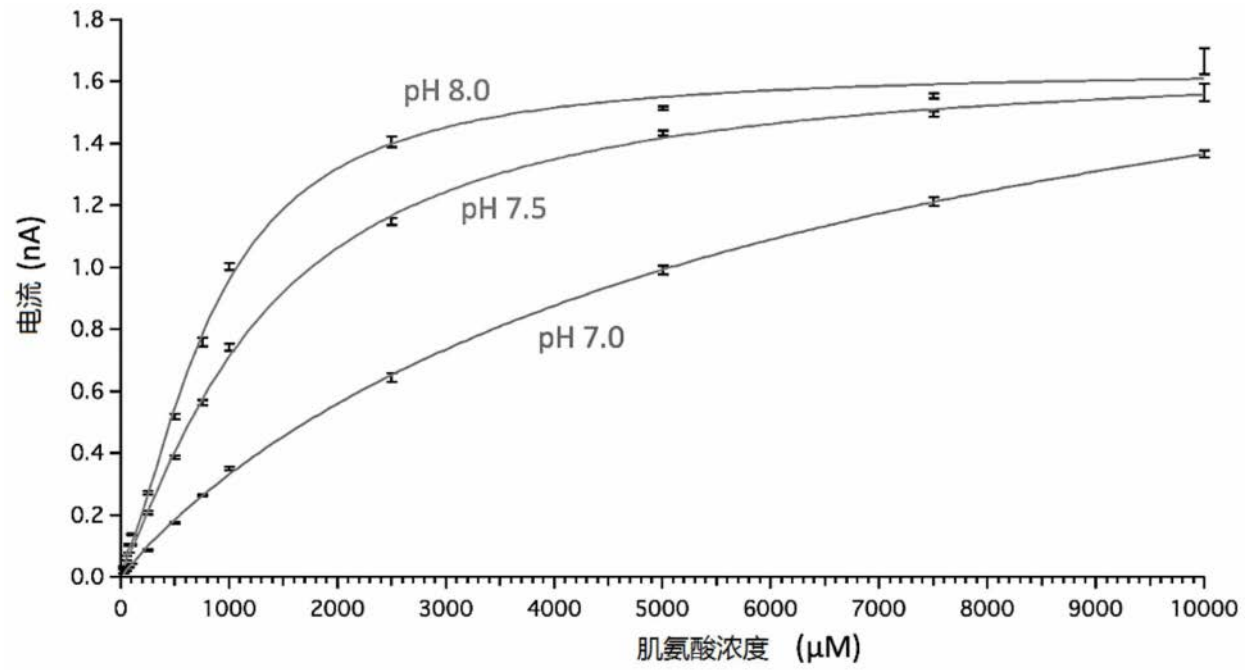

1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
电流 (nA)
pH 8.0
pH 7.5
pH 7.0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000
10000
肌氨酸浓度 (μM)

图1

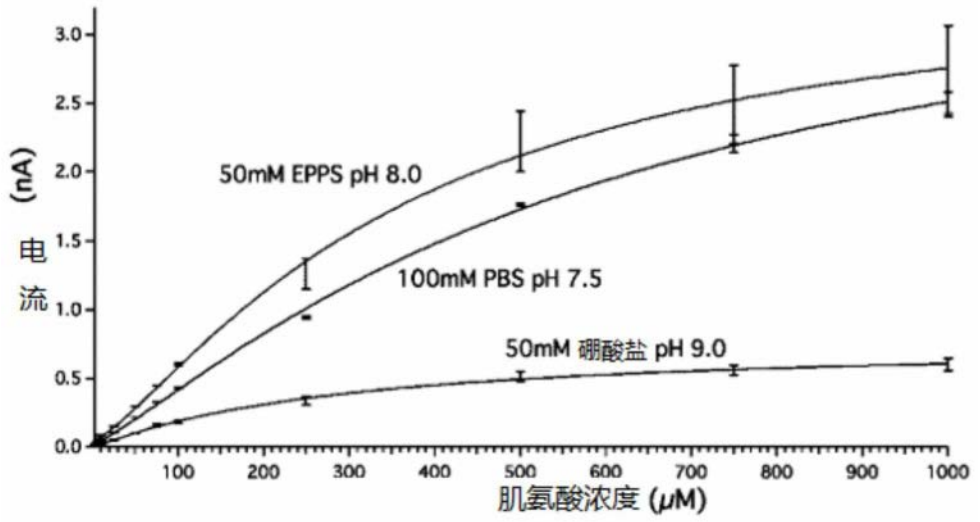

3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
电流 (nA)
50mM EPPS pH 8.0
100mM PBS pH 7.5
50mM 硼酸盐 pH 9.0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
肌氨酸浓度 (μM)

图2

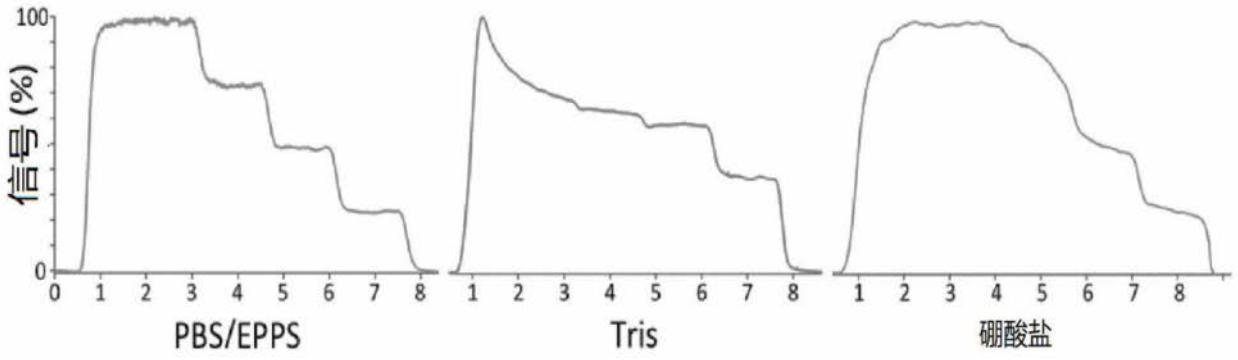

100
信号 (%)
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8
PBS/EPPS
1 2 3 4 5 6 7 8
Tris
1 2 3 4 5 6 7 8
硼酸盐

图3

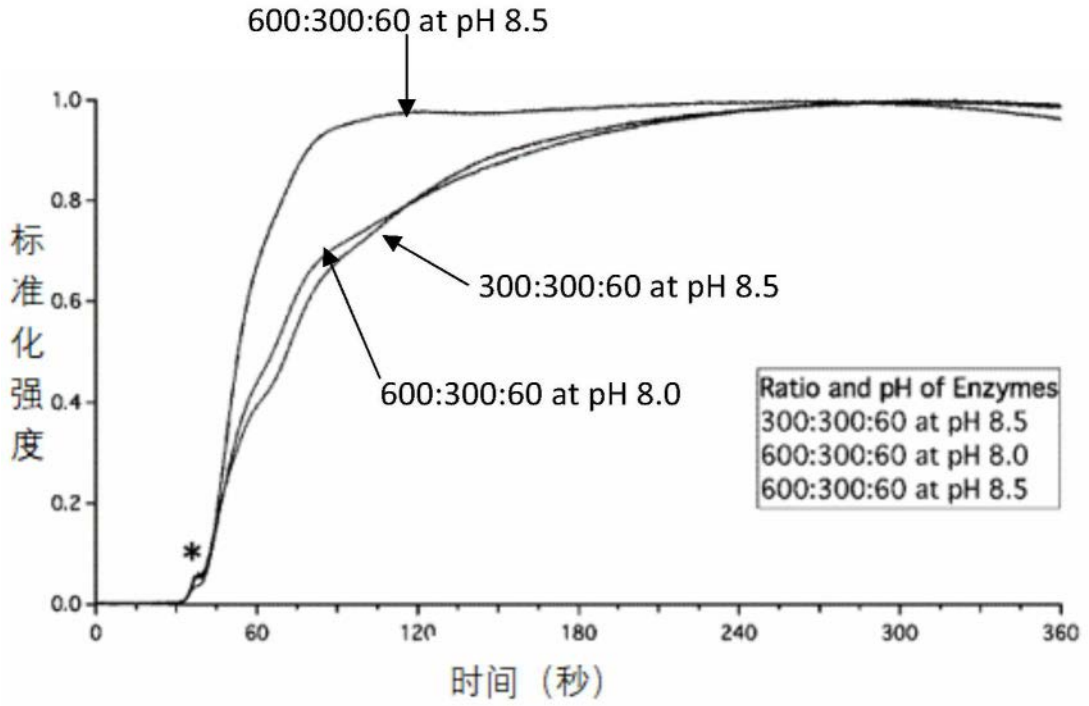

600:300:60 at pH 8.5
300:300:60 at pH 8.5
600:300:60 at pH 8.0
Ratio and pH of Enzymes
300:300:60 at pH 8.5
600:300:60 at pH 8.0
600:300:60 at pH 8.5
标准化强度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
0 60 120 180 240 300 360
时间（秒）

图4

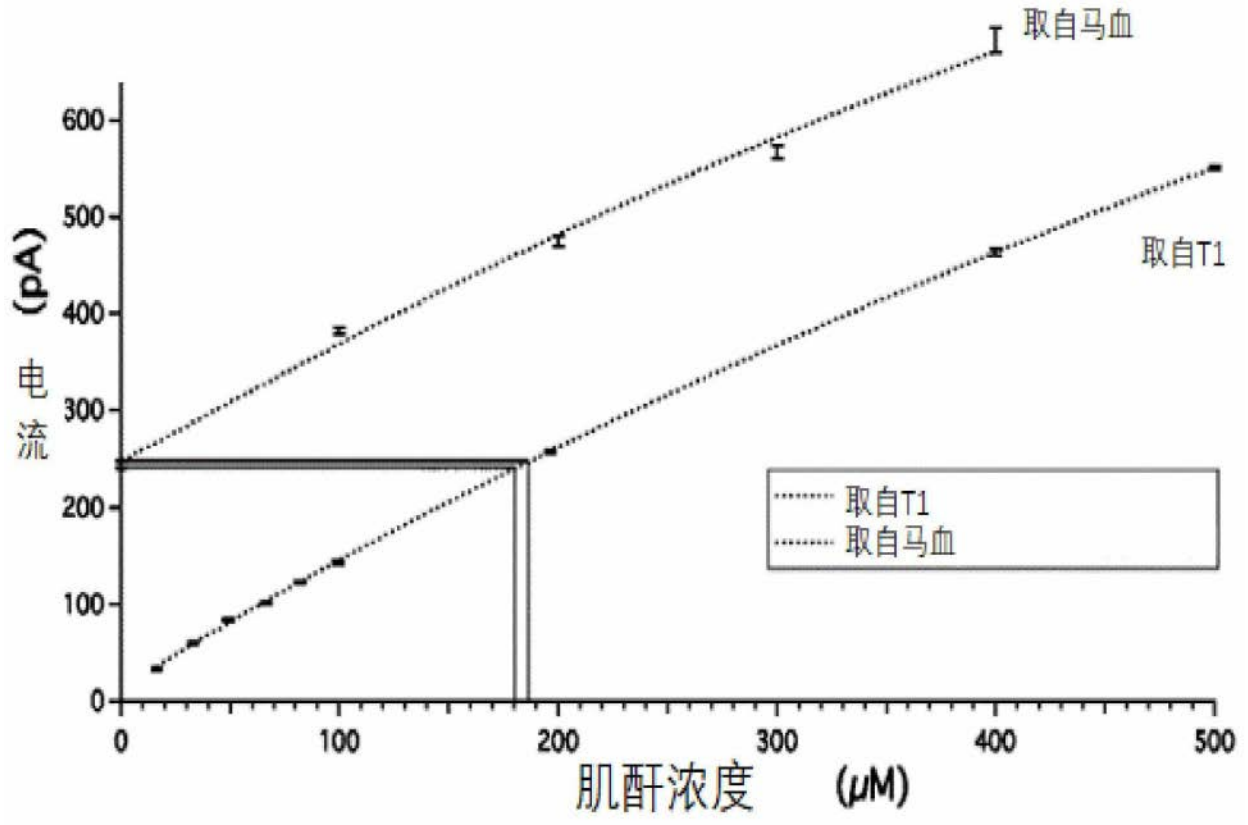

取自马血
取自T1
电流 (pA)
600
500
400
300
200
100
0
取自T1
取自马血
0
100
200
300
400
500
肌酐浓度 (μM)

图5

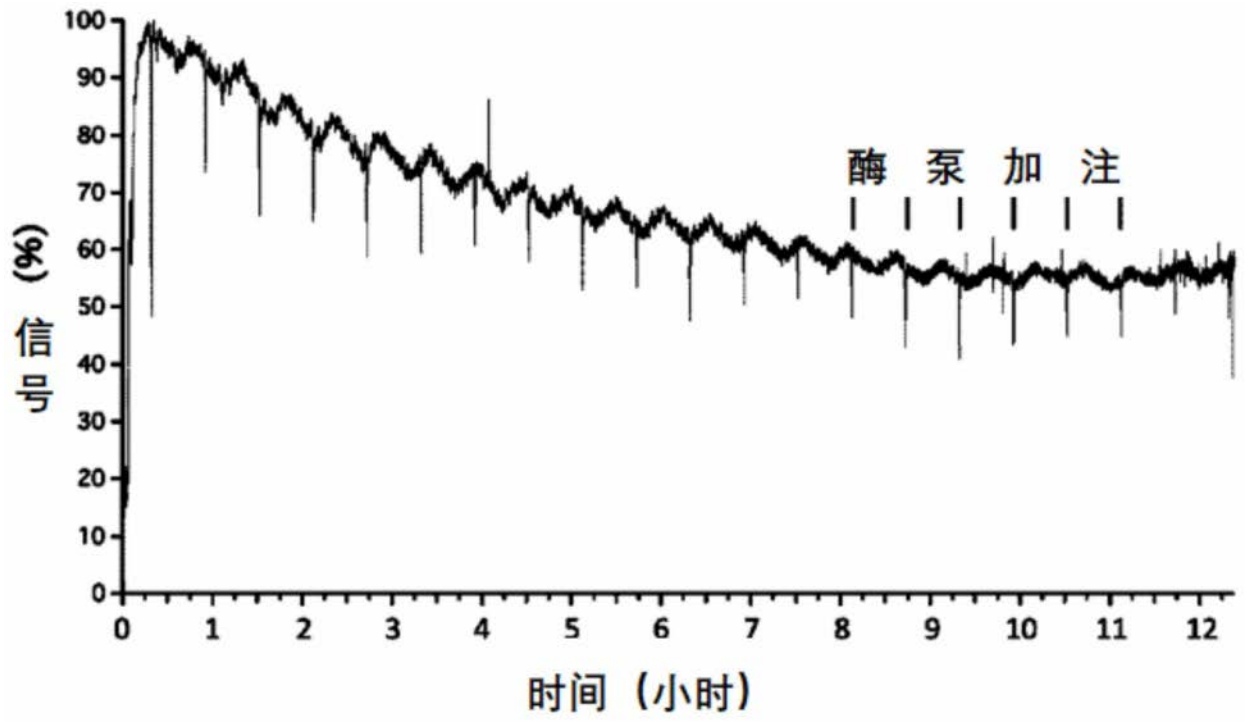

酶 泵 加 注
信号 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
时间（小时）

图6

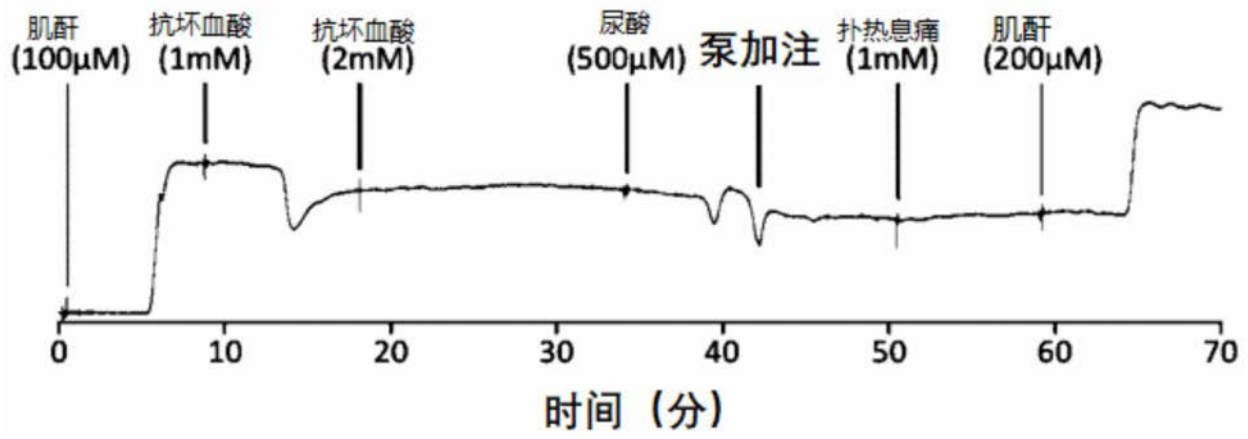

肌酐
(100μM)
抗坏血酸
(1mM)
抗坏血酸
(2mM)
尿酸
(500μM)
泵加注
扑热息痛
(1mM)
肌酐
(200μM)
0
10
20
30
40
50
60
70
时间（分）

图7

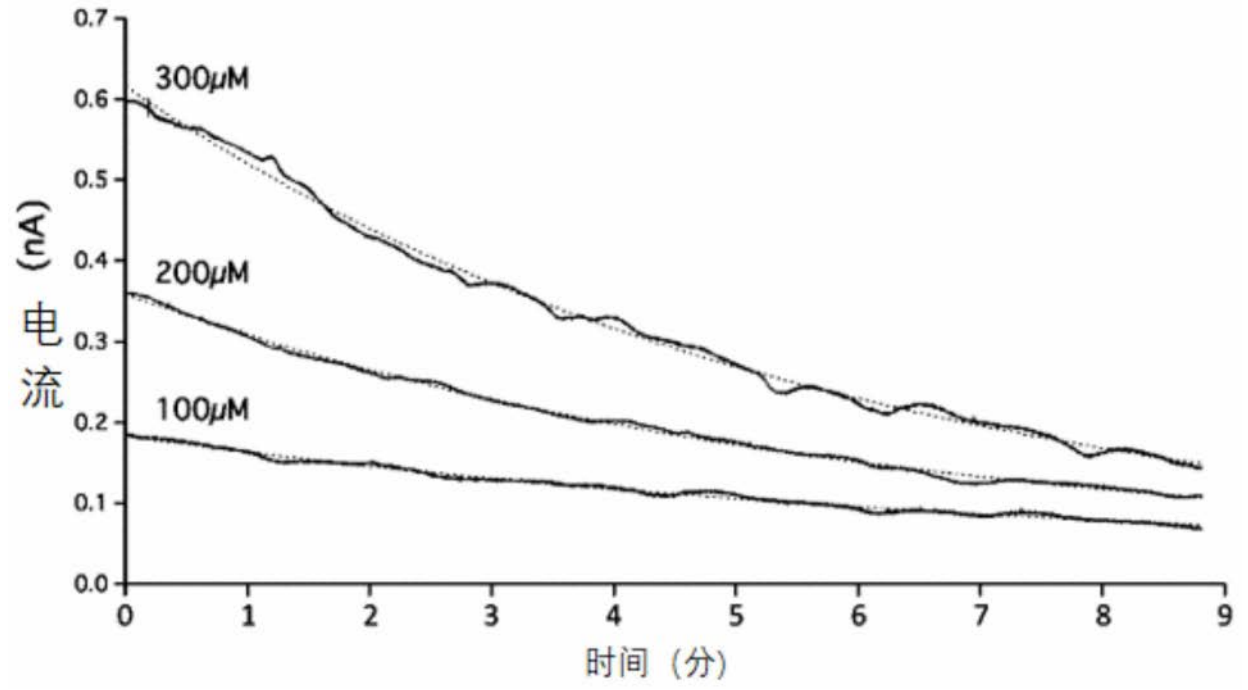

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
(nA)
电流
300μM
200μM
100μM
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
时间（分）

图8

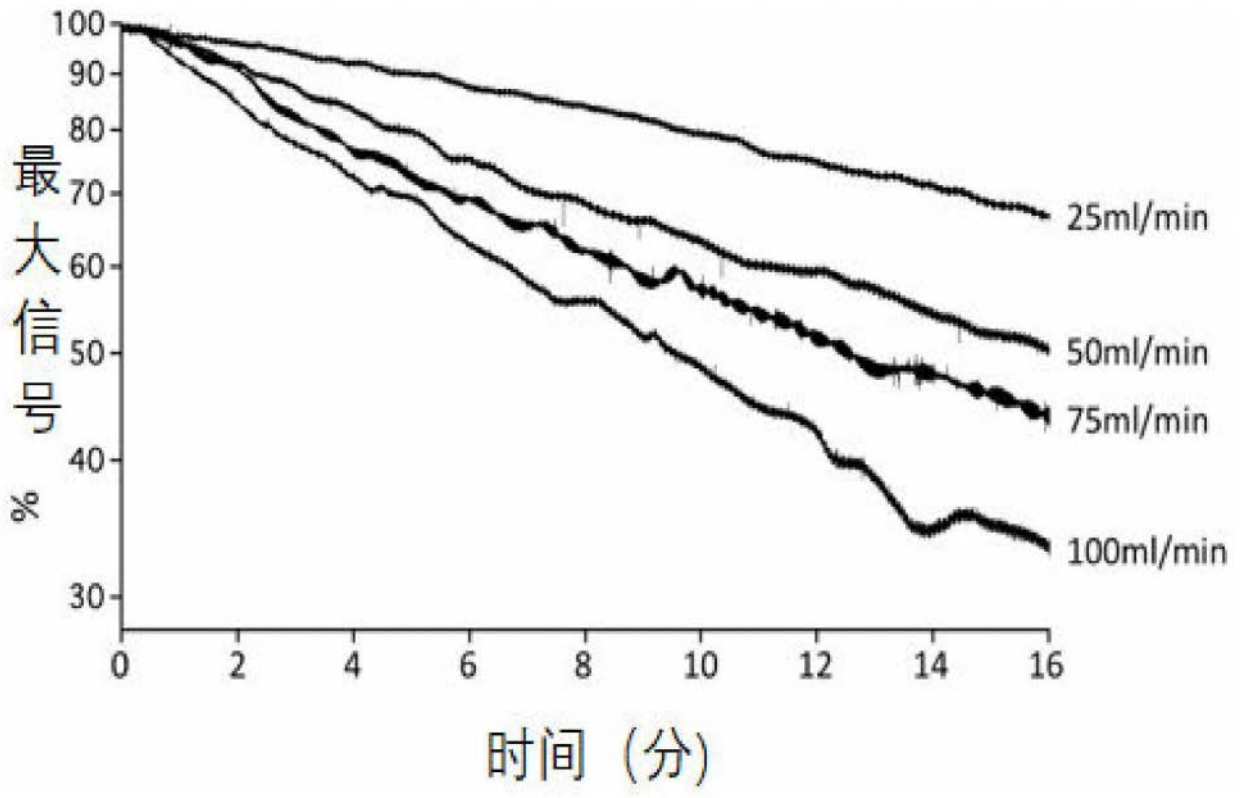

100
90
80
70
60
50
40
30
%
最大信号
0
2
4
6
8
10
12
14
16
时间（分）
25ml/min
50ml/min
75ml/min
100ml/min

图9

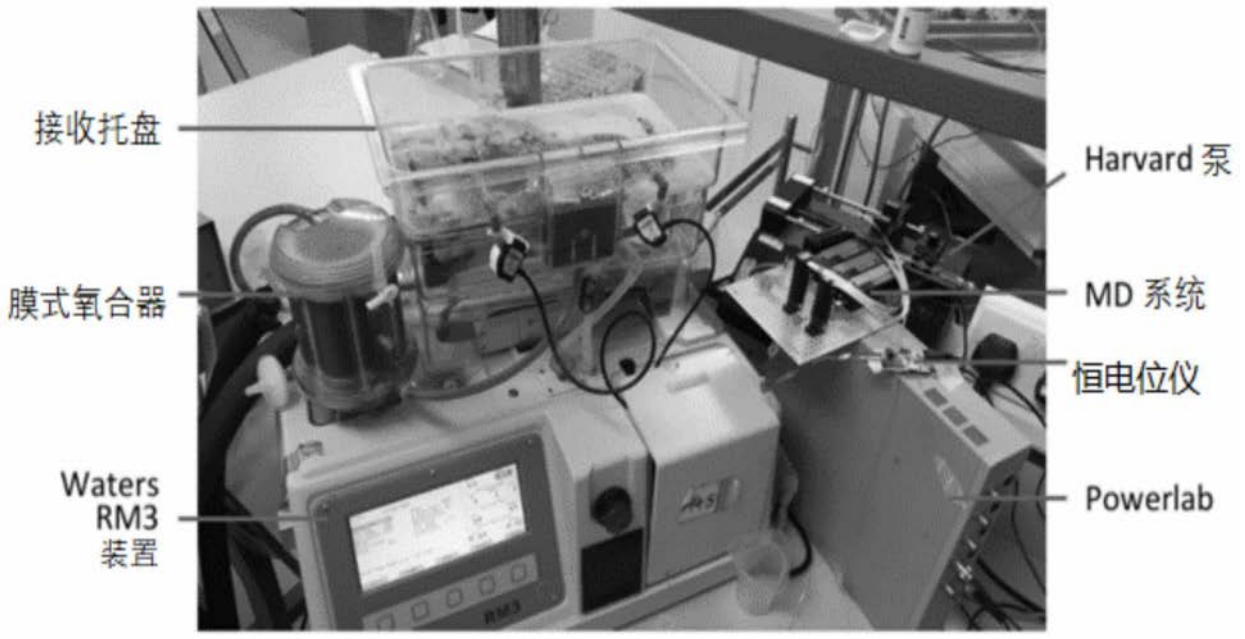

接收托盘
膜式氧合器
Waters
RM3
装置
Harvard 泵
MD 系统
恒电位仪
Powerlab

图10

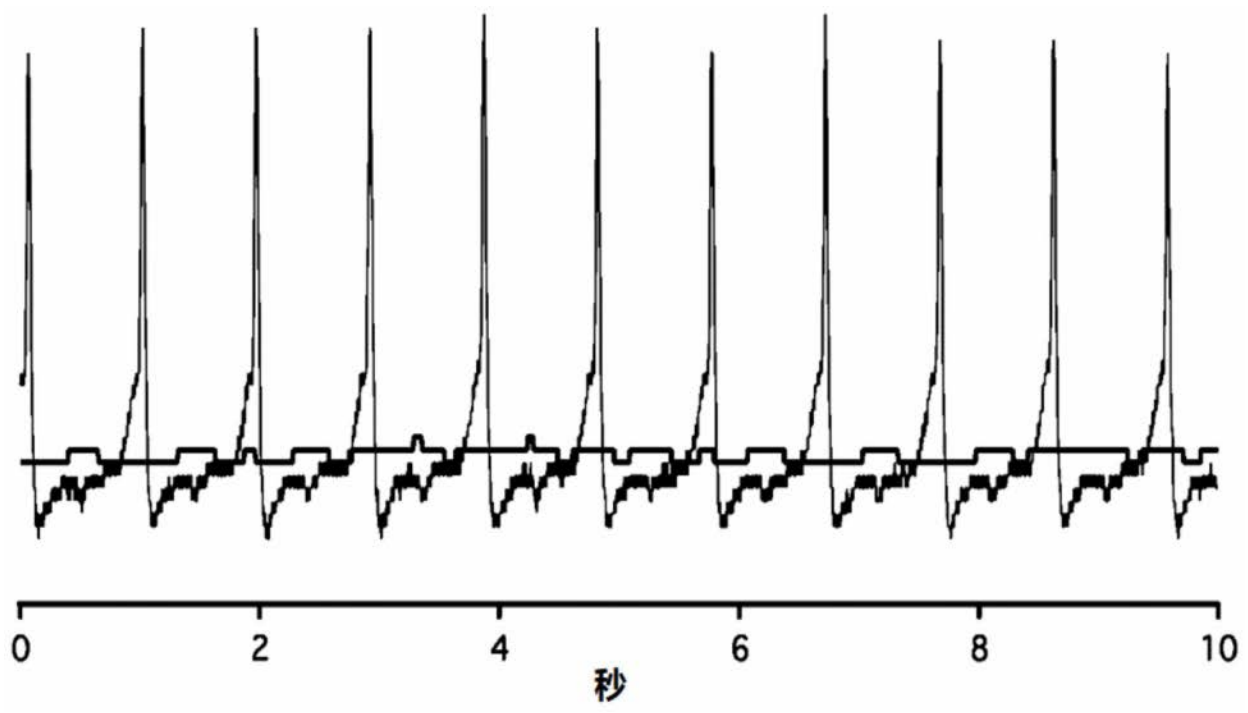


图11

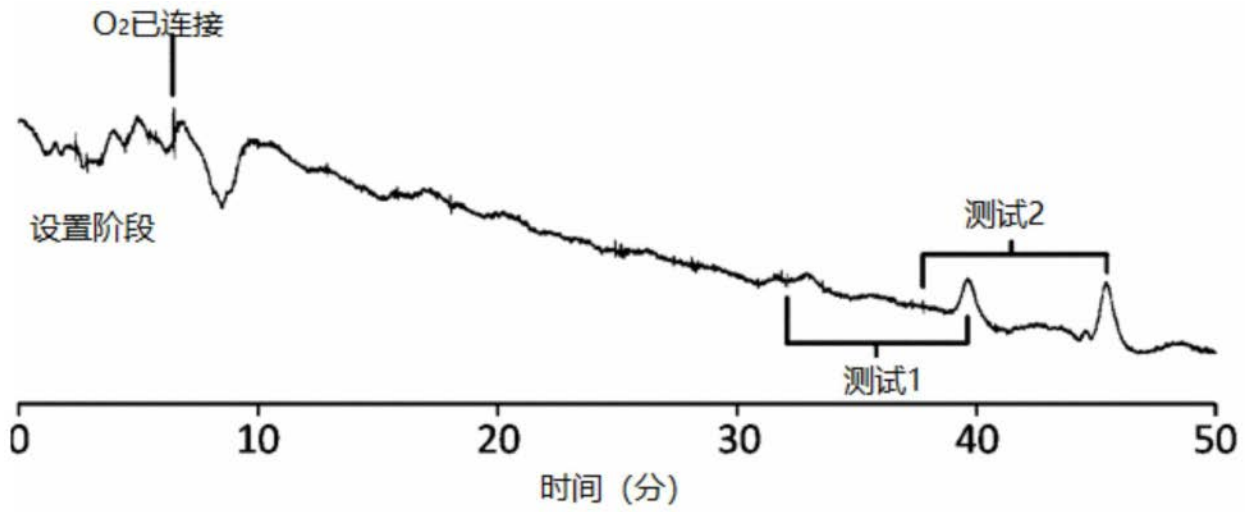


图12

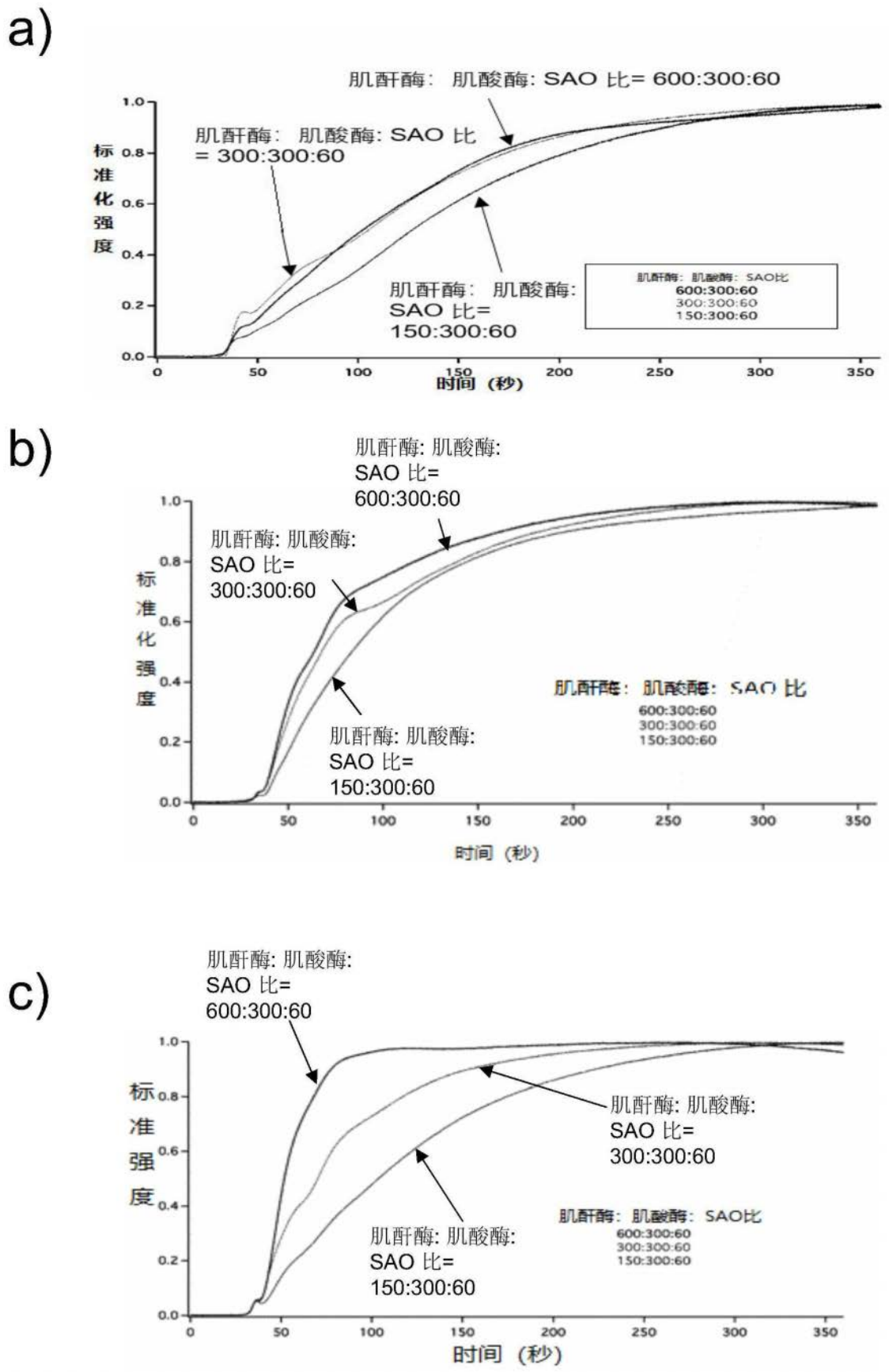
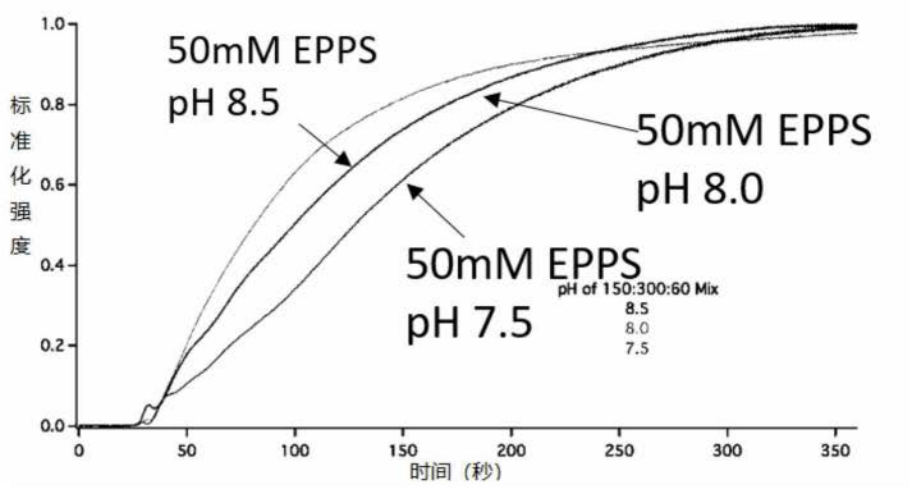
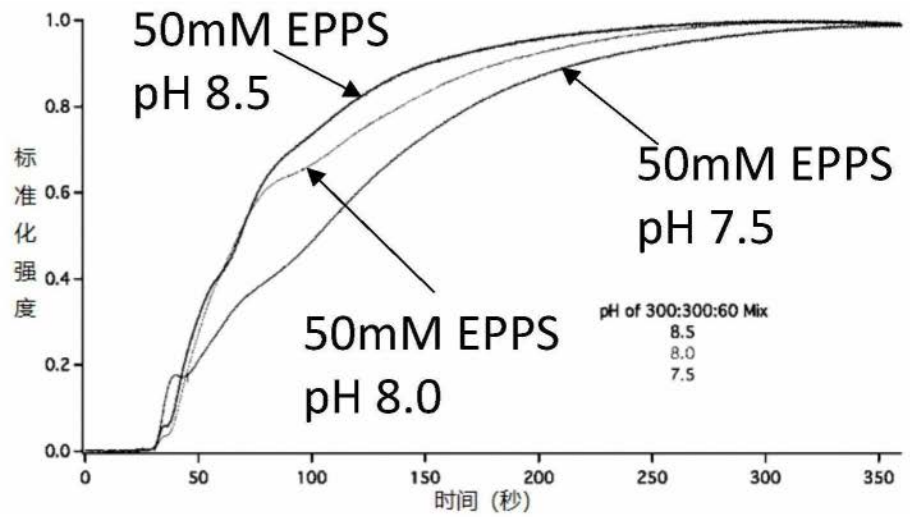

a)
肌酐酶： 肌酸酶: SAO 比= 600:300:60
肌酐酶： 肌酸酶: SAO 比 = 300:300:60
肌酐酶： 肌酸酶: SAO 比= 150:300:60
肌酐酶: 肌酸酶: SAO比
600:300:60
300:300:60
150:300:60
标准化强度
时间（秒）
b)
肌酐酶: 肌酸酶: SAO 比= 600:300:60
肌酐酶: 肌酸酶: SAO 比= 300:300:60
肌酐酶: 肌酸酶: SAO 比= 150:300:60
肌酐酶: 肌酸酶: SAO 比
600:300:60
300:300:60
150:300:60
标准化强度
时间（秒）
c)
肌酐酶: 肌酸酶: SAO 比= 600:300:60
肌酐酶: 肌酸酶: SAO 比= 300:300:60
肌酐酶: 肌酸酶: SAO 比= 150:300:60
肌酐酶: 肌酸酶: SAO比
600:300:60
300:300:60
150:300:60
标准强度
时间（秒）

图13

a)


50mM EPPS
pH 8.5
50mM EPPS
pH 8.0
50mM EPPS
pH 7.5
pH of 150:300:60 Mix
8.5
8.0
7.5
标准化强度
时间（秒）

b)


50mM EPPS
pH 8.5
50mM EPPS
pH 7.5
50mM EPPS
pH 8.0
pH of 300:300:60 Mix
8.5
8.0
7.5
标准化强度
时间（秒）

c)

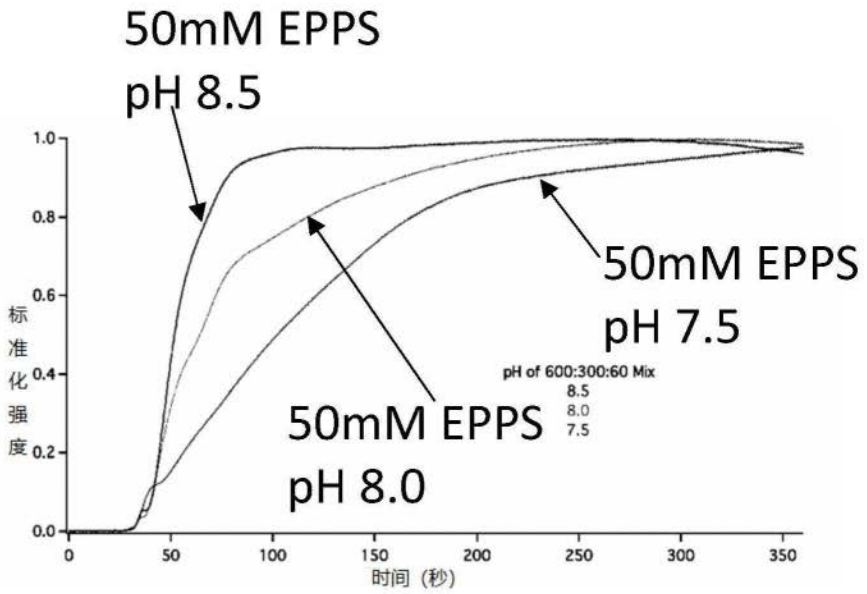

50mM EPPS
pH 8.5
50mM EPPS
pH 7.5
50mM EPPS
pH 8.0
pH of 600:300:60 Mix
8.5
8.0
7.5
标准化强度
时间（秒）

图14

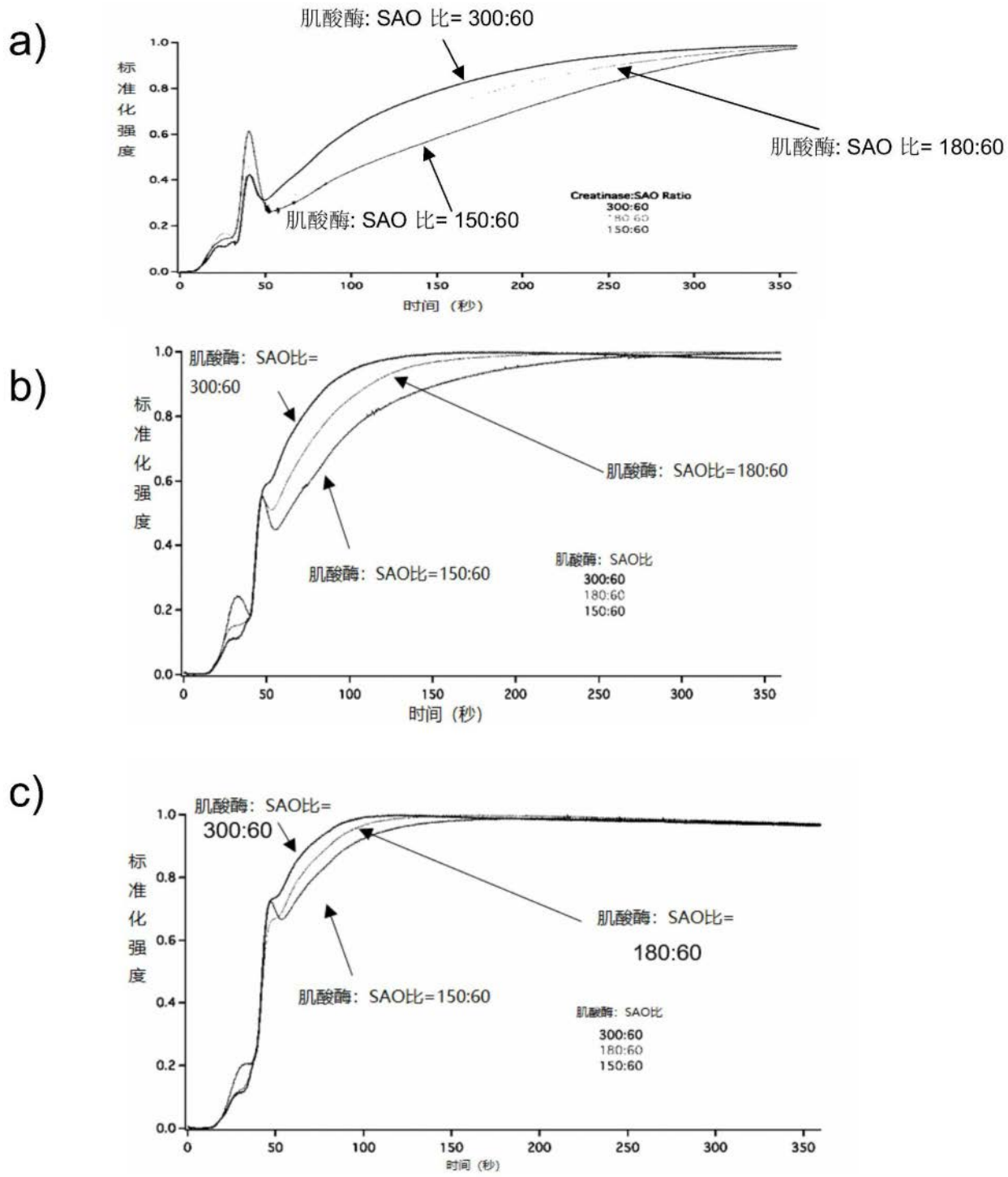

a)
肌酸酶: SAO 比= 300:60
肌酸酶: SAO 比= 180:60
肌酸酶: SAO 比= 150:60
Creatinase:SAO Ratio
300:60
150:60
标准化强度
时间（秒）
b)
肌酸酶：SAO比=
300:60
肌酸酶：SAO比=180:60
肌酸酶：SAO比=150:60
肌酸酶：SAO比
300:60
180:60
150:60
标准化强度
时间（秒）
c)
肌酸酶：SAO比=
300:60
肌酸酶：SAO比=
180:60
肌酸酶：SAO比=150:60
肌酸酶：SAO比
300:60
180:60
150:60
标准化强度
时间（秒）

图15

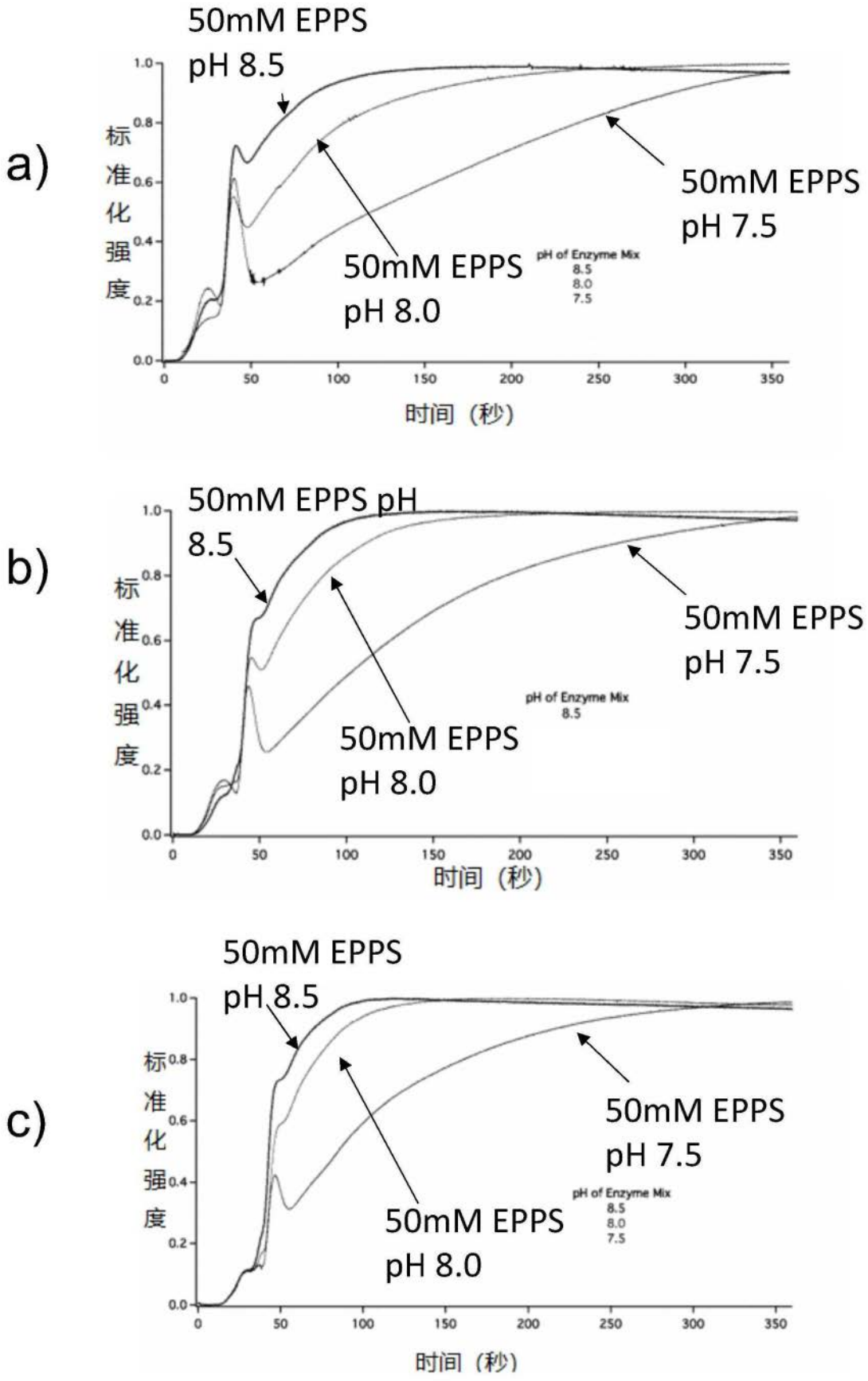
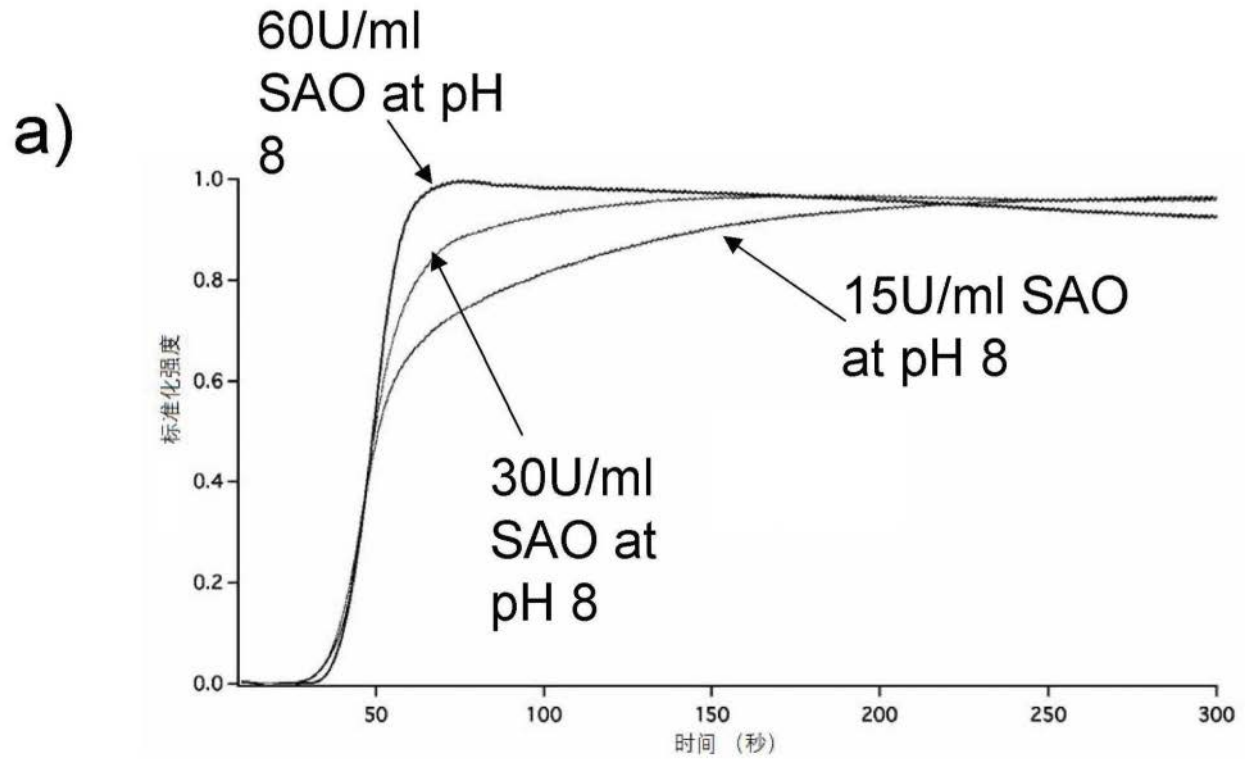

a)
50mM EPPS
pH 8.5
50mM EPPS
pH 7.5
50mM EPPS
pH 8.0
pH of Enzyme Mix
8.5
8.0
7.5
标准化强度
时间（秒）
b)
50mM EPPS pH
8.5
50mM EPPS
pH 7.5
50mM EPPS
pH 8.0
pH of Enzyme Mix
8.5
标准化强度
时间（秒）
c)
50mM EPPS
pH 8.5
50mM EPPS
pH 7.5
50mM EPPS
pH 8.0
pH of Enzyme Mix
8.5
8.0
7.5
标准化强度
时间（秒）

图16


a)
60U/ml SAO at pH 8
15U/ml SAO at pH 8
30U/ml SAO at pH 8
标准化强度
时间 (秒)

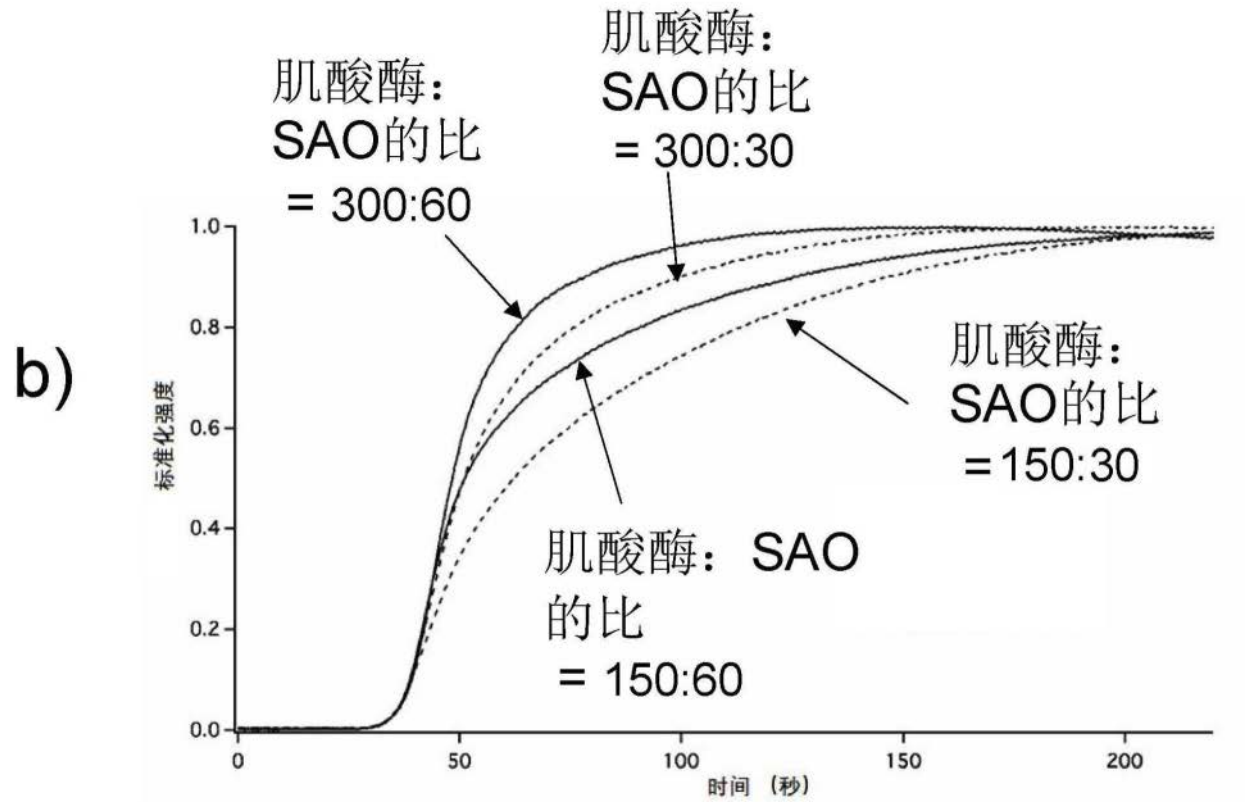

b)
肌酸酶：SAO的比 = 300:60
肌酸酶：SAO的比 = 300:30
肌酸酶：SAO的比 =150:30
肌酸酶：SAO的比 = 150:60
标准化强度
时间 (秒)

图17

物质	化学式	Ksp
氢氧化铝	$Al(OH)_3$	1.3×10^{-33}
磷酸铝	$AlPO_4$	6.3×10^{-19}
碳酸钡	$BaCO_3$	5.1×10^{-9}
铬酸钡	$BaCrO_4$	1.2×10^{-10}
氟化钡	BaF_2	1.0×10^{-6}
氢氧化钡	$Ba(OH)_2$	5×10^{-3}
硫酸钡	$BaSO_4$	1.1×10^{-10}
亚硫酸钡	$BaSO_3$	8×10^{-7}
硫代硫酸钡	BaS_2O_3	1.6×10^{-6}
氯氧化铋	$BiOCl$	1.8×10^{-31}
氢氧化氧铋	$BiOOH$	4×10^{-10}
碳酸镉	$CdCO_3$	5.2×10^{-12}
氢氧化镉	$Cd(OH)_3$	2.5×10^{-14}
草酸镉	CdC_2O_4	1.5×10^{-8}
硫化镉	CdS	8×10^{-28}
碳酸钙	$CaCO_3$	2.8×10^{-9}
铬酸钙	$CaCrO_4$	7.1×10^{-4}
氟化钙	$CaF2$	5.3×10^{-9}
磷酸一氢钙	$CaHPO_4$	1×10^{-7}
氢氧化钙	$Ca(OH)_2$	5.5×10^{-6}
草酸钙	CaC_2O_4	2.7×10^{-9}
磷酸钙	$Ca_3(PO_4)_2$	2.0×10^{-29}
硫酸钙	$CaSO_4$	9.1×10^{-6}
亚硫酸钙	$CaSO_3$	6.8×10^{-8}
氢氧化亚铬	$Cr(OH)_2$	2×10^{-16}
氢氧化铬	$Cr(OH)_3$	6.3×10^{-31}
碳酸亚钴	$CoCO_3$	1.4×10^{-13}
氢氧化亚钴	$Co(OH)_2$	1.6×10^{-15}
氢氧化钴	$Co(OH)_3$	1.6×10^{-44}
硫化亚钴	CoS	4×10^{-21}
氯化亚铜	$CuCl$	1.2×10^{-6}
氰化亚铜	$CuCN$	3.2×10^{-20}
碘化亚铜	CuI	1.1×10^{-12}
砷酸铜	$Cu_3(AsO_4)_2$	7.6×10^{-36}
碳酸铜	$CuCO_3$	1.4×10^{-10}
铬酸铜	$CuCrO_4$	3.6×10^{-6}
亚铁氰化铜	$Cu_2[Fe(CN)_6]$	1.3×10^{-16}
氢氧化铜	$Cu(OH)_2$	2.2×10^{-20}
硫化铜	CuS	6×10^{-37}

图18(第1部分,共3部分)

碳酸亚铁	$FeCO_3$	3.2×10^{-11}
氢氧化亚铁	$Fe(OH)_2$	8.0×10^{-16}
硫化亚铁	FeS	6×10^{-19}
砷酸铁	$FeAsO_4$	5.7×10^{-21}
亚铁氰化铁	$Fe_4[Fe(CN)_6]_3$	3.3×10^{-41}
氢氧化铁	$Fe(OH)_3$	4×10^{-38}
磷酸铁	$FePO_4$	1.3×10^{-22}
砷酸铅	$Pb_3(AsO_4)_2$	4×10^{-36}
叠氮化铅	$Pb(N_3)_2$	2.5×10^{-9}
溴化铅	$PbBr_2$	4.0×10^{-5}
碳酸铅	$PbCO_3$	7.4×10^{-14}
氯化铅	$PbCl_2$	1.6×10^{-5}
铬酸铅	$PbCrO_4$	2.8×10^{-13}
氟化铅	PbF_2	2.7×10^{-8}
氢氧化铅	$Pb(OH)_2$	1.2×10^{-15}
碘化铅	PbI_2	7.1×10^{-9}
硫酸铅	$PbSO_4$	1.6×10^{-8}
硫化铅	PbS	3×10^{-28}
碳酸锂	Li_2CO_3	2.5×10^{-2}
氟化锂	LiF	3.8×10^{-3}
磷酸锂	Li_3PO_4	3.2×10^{-9}
磷酸铵镁	$MgNH_4PO_4$	2.5×10^{-13}
砷酸镁	$Mg_3(AsO_4)_2$	2×10^{-20}
碳酸镁	$MgCO_3$	3.5×10^{-8}
氟化镁	MgF_2	3.7×10^{-8}
氢氧化镁	$Mg(OH)_2$	1.8×10^{-11}
草酸镁	MgC_2O_4	8.5×10^{-5}
磷酸镁	$Mg_3(PO_4)_2$	1×10^{-25}
碳酸锰	$MnCO_3$	1.8×10^{-11}
氢氧化锰	$Mn(OH)_2$	1.9×10^{-13}
硫化锰	MnS	3×10^{-14}
溴化亚汞	Hg_2Br_2	5.6×10^{-23}
氯化亚汞	Hg_2Cl_2	1.3×10^{-18}
碘化亚汞	Hg_2I_2	4.5×10^{-29}
硫化汞	HgS	2×10^{-53}
碳酸镍	$NiCO_3$	6.6×10^{-9}
氢氧化镍	$Ni(OH)_2$	2.0×10^{-15}
硫化镍	NiS	3×10^{-19}
氟化钪	ScF_3	4.2×10^{-18}
氢氧化钪	$Sc(OH)_3$	8.0×10^{-31}

图18(第2部分,共3部分)

乙酸银	$AgC_2H_3O_2$	2.0×10^{-3}
砷酸银	Ag_3AsO_4	1.0×10^{-22}
叠氮化银	AgN_3	2.8×10^{-9}
溴化银	$AgBr$	5.0×10^{-13}
氯化银	$AgCl$	1.8×10^{-10}
铬酸银	Ag_2CrO_4	1.1×10^{-12}
氰化银	$AgCN$	1.2×10^{-16}
碘酸银	$AgIO_3$	3.0×10^{-8}
碘化银	AgI	8.5×10^{-17}
亚硝酸银	ANO_2	6.0×10^{-4}
硫酸银	Ag_2SO_4	1.4×10^{-5}
硫化银	Ag_2S	6×10^{-51}
亚硫酸银	$AgSO_3$	1.5×10^{-14}
硫氰酸银	$AgSCN$	1.0×10^{-12}
碳酸锶	$SrCO_3$	1.1×10^{-10}
铬酸锶	$SrCrO_4$	2.2×10^{-5}
氟化锶	SrF_2	2.5×10^{-9}
硫酸锶	$SrSO_4$	3.2×10^{-7}
溴化铊	$TlBr$	3.4×10^{-6}
氯化铊	$TlCl$	1.7×10^{-4}
碘化铊	TlI	6.5×10^{-6}
氢氧化铊	$Tl(OH)_3$	6.3×10^{-46}
氢氧化锡	$Sn(OH)_2$	1.4×10^{-28}
硫化锡	SnS	1×10^{-26}
碳酸锌	$ZnCO_3$	1.4×10^{-11}
氢氧化锌	$Zn(OH)_2$	1.2×10^{-17}
草酸锌	ZnC_2O_4	2.7×10^{-8}
磷酸锌	$Zn_3(PO_4)_2$	9.0×10^{-33}
硫化锌	ZnS	2×10^{-25}

类型硫化物平衡

$MS(s)+H_2O(l) = M^{2+}(aq)+HS^-(aq)+OH^-(aq)$

图18(第3部分,共3部分)

年	缓冲液	Conc^{n} (mM)	pH	酶 CA : CI : SO (U/ML)	LOD(μM)	引用
1983	PBS	50	7.5	6666 : 700 : 253	8.8	[40]
1991	PBS	50	7.5	1.3 : 0.63: 6.3*	3	72.
1991	PBS	50 - 85	7.9 - 8.1	26 : 16 : 9.8		72.
1992	PBS	100	7.7	300 : 300 : 100	25	72.
1995	PBS	20	7.5	44 : 35 : 28		72.
1996	PBS	50	7.5	2200 : 1800 : 1200	0.3	72.
1996	PBS	50	7.4	2.6 : 3.3 : 3.2*	30	72.
1996	PBS	50	7.4	1316 : 200 : 750	10 - 20	72.
1997	PBS	100	7.0	88 : 70 : 40	1- 2	72.
1999	PBS	100	7.5	446 : 656 : 665	200	72.
2001	PBS	50	7.6	0.3 : 0.3 : 0.3*	0.8	72.
2001	PBS	50	7.5	2200 : 1800 : 1200	5.3	72.
2002	PBS	67 - 335	7.4	4.4 : 0.28: 0.2**	8	72.
2003	PBS	100	7.6	***	13.9	72.
2004	PBS	100	7.0	1185 : 315 : 375	3.2	72.
2005	PBS	50	7.5	150 : 10 : 18		[86-88]
2006	PBS	100	7.6	***		89.
2013	PBS	100	7.0	1.29 : 0.26 : 0.42 **	12	89.
2013	PBS	100	7.4	2340 : 1200 : 1600	3	89.

图19