



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110568039 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910844262.9

(22)申请日 2019.09.06

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 王江云 夏霖 韩明杰 杨朝雅

(74)专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 11250

代理人 李红团 李敏

(51)Int.Cl.

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

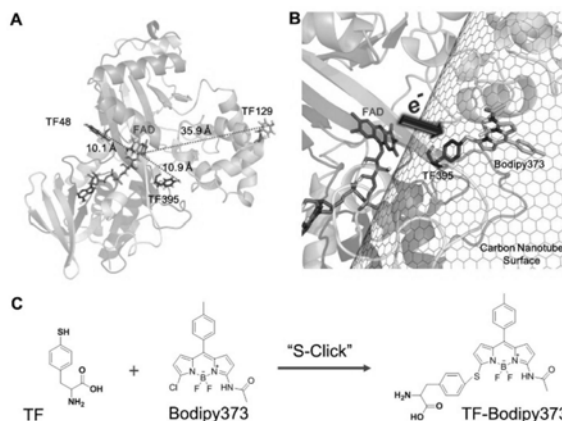
权利要求书1页 说明书11页  
序列表3页 附图12页

(54)发明名称

使用新型电化学传感器的氨基酸特异实时检测方法

(57)摘要

本申请提供了一种使用新型电化学传感器的氨基酸特异实时检测方法,所述的电化学传感器包括掺入了非天然氨基酸的氧化还原酶。



1. 一种电化学传感器,其中包含掺入了非天然氨基酸的氨基酸氧化酶。
2. 根据权利要求1的电化学传感器,其中所述氨基酸氧化酶为甘氨酸氧化酶GlyOx或L-色氨酸氧化酶TrpOx。
3. 根据权利要求2的电化学传感器,其中所述氨基酸氧化酶为PDB编码1NG4的甘氨酸氧化酶GlyOx或PDB编码5G3T的L-色氨酸氧化酶TrpOx。
4. 根据权利要求1-3任一项的电化学传感器,其中所述非天然氨基酸为2-氨基-3-(4-巯基苯基)丙酸(对硫醇-苯丙氨酸,TF)。
5. 根据权利要求4的电化学传感器,其中所述掺入了非天然氨基酸的氨基酸氧化酶为GlyOx-266TF和TrpOx-395TF。
6. 根据权利要求5的电化学传感器,其中所述掺入了非天然氨基酸的氨基酸氧化酶为TrpOx-395TF。
7. 根据权利要求1-6任一项的电化学传感器,其中所述电化学传感器包括作为连接接头的Bodipy373。
8. 根据权利要求1-6任一项的电化学传感器,其中所述电化学传感器中使用的电极为碳基电极。
9. 根据权利要求7的电化学传感器,其中所述电化学传感器中使用的电极可选玻碳电极、HOPG电极、碳纤维电极或石墨烯电极。
10. 根据权利要求6或7的电化学传感器,其中所述电极由碳基纳米复合材料修饰。
11. 根据权利要求1-9任一项的电化学传感器,其中所述电化学传感器的制备过程包括将Nafion-MWNTs复合物浇铸在玻碳电极上,并在室温下干燥以获得Nafion-MWNTs复合膜修饰的GC电极,然后将包括Bodipy373修饰的酶突变体的混合物滴加到Nafion-MWNTs复合膜修饰的GC电极,静置直至干燥。
12. 根据权利要求1-9任一项的电化学传感器,其中所述电化学传感器的制备过程包括将包括Bodipy373修饰的酶突变体的混合物酶混合物浇铸在HOPG电极表面上并在室温下干燥20分钟。
13. 一种氨基酸特异实时检测方法,其中使用了根据权利要求1-11任一项的电化学传感器。
14. 根据权利要求12的方法,其中所述实时检测方法用于检测血液或汗液中的氨基酸。
15. 根据权利要求13的方法,其中所述方法使用包含TrpOx-395TF-Bodipy373的电化学传感器检测血液或汗液中的色氨酸。
16. 根据权利要求1-11任一项的电化学传感器在制备氨基酸特异实时检测仪器中的应用。

## 使用新型电化学传感器的氨基酸特异实时检测方法

### 技术领域

[0001] 本申请属于电化学传感器领域和生理参数检测领域,具体的,本申请提供了一种使用新型电化学传感器的氨基酸特异实时检测方法,所述的电化学传感器包括掺入了非天然氨基酸的氧化还原酶。

### 背景技术

[0002] 氨基酸是必需的代谢中间体和细胞信号分子,异常氨基酸代谢导致许多严重疾病,因此实时氨基酸分析对诊断和医学具有重要意义。用于测量氨基酸浓度的常规分析程序一般基于非便携式光谱或色谱仪器,这些复杂沉重的仪器显然不适用于POCT和医疗保健监测可穿戴生物传感器。

[0003] 电化学传感器对于即时检测(POCT)和可穿戴传感设备至关重要。在氧化还原酶和电极之间建立有效的电子传递途径是将酶催化反应转化为电化学信号,以及构建稳健,灵敏和选择性生物传感器的关键。酶电化学生物传感器(EEB)为测量分析物浓度提供了方便,低成本和实时的方法。有效的EEB有几个关键要求:高活性部位和电极之间的高表面密度,长期酶稳定性以及可能最具挑战性的有效电子传递途径(EET)。尽管为提高酶的稳健性,选择性和活性以满足实际传感应用的主要要求做出了巨大努力,但对于大多数鉴定健康的生物分子而言,高选择性和灵敏的电化学传感器仍然达不到实用的程度。

[0004] 改进酶电化学生物传感器的重点之一是改善酶和电极之间的电子转移。在EEB中使用介质是一种改善电子转移的稳健方法,但使用介质通常会导致相对于酶的原始氧化还原电位增加的过量电位,并且氧化还原介质通常是非选择性的,不仅促进了电极和蛋白质之间的电子转移,以及各种干扰分子的电子转移。此外,对于体内应用,需要介质固定以确保生物相容性。利用纳米材料增强酶电极的电子转移为第3代生物传感器的实现做出了巨大贡献,但酶相对于电极表面的随机取向导致电子转移效率的较大变化。已证明酶辅因子与导电纳米颗粒的连接可用于实现比未修饰系统更高的催化转换率,但这种方法不适用于其辅因子完全埋藏在蛋白质内的酶。因此,非常需要一种完全生物相容且成本有效的方法来制备广泛适用的POCT生物传感器。

### 发明内容

[0005] 为了开发一种有效且广泛适用的连接策略,将氧化还原酶转化为电化学传感器,我们特异性地向两种不同的氨基酸氧化酶,甘氨酸氧化酶(GlyOx,PDB编码1NG4)和L-色氨酸氧化酶(TrpOx,PDB编码5G3T)中掺入了非天然氨基酸,2-氨基-3-(4-巯基苯基)丙酸(或对巯醇-苯丙氨酸,TF)作为酶的独特锚点。重要的是,TF仅与一个原子的酪氨酸不同,这对靶酶引入了最小的活性干扰。然后我们使用Bodipy373作为酶/电极连接接头,其通过巯醇-氯亲核取代反应特异性地与TF反应(S-Click反应)。与其他双正交反应不同,在与TF反应后产生了显著的红移,这有利于Bodipy373标记的氧化还原酶的方便表征。修饰的酶可以附着在碳电极表面上,并在接近酶的原始氧化还原电位的电位下产生朝向其特定底物的EET生

物催化电流,从而提高选择性。据此制作的生物传感器显示血液和汗液样品中色氨酸(Trp)的实时和选择性监测,线性范围为0.02-0.8mM。沿着本发明的思路可以进一步扩展传感器的用途,用于各种生物分子的测量。

[0006] 一方面,本申请提供了一种电化学传感器,其中包含掺入了非天然氨基酸的氨基酸氧化酶。

[0007] 进一步地,所述氨基酸氧化酶为甘氨酸氧化酶GlyOx或L-色氨酸氧化酶TrpOx。

[0008] 进一步地,所述氨基酸氧化酶为PDB编码1NG4的甘氨酸氧化酶GlyOx或PDB编码5G3T的L-色氨酸氧化酶TrpOx。

[0009] 进一步地,所述非天然氨基酸为2-氨基-3-(4-巯基苯基)丙酸(对硫醇-苯丙氨酸,TF)。

[0010] 进一步地,所述掺入了非天然氨基酸的氨基酸氧化酶为GlyOx-266TF和TrpOx-395TF。

[0011] 进一步地,所述掺入了非天然氨基酸的氨基酸氧化酶为TrpOx-395TF。

[0012] 进一步地,所述电化学传感器包括作为连接接头的Bodipy373。

[0013] 进一步地,所述电化学传感器中使用的电极为碳基电极。

[0014] 进一步地,所述电化学传感器中使用的电极可选玻碳电极、HOPG电极或石墨烯电极。

[0015] 进一步地,所述电极由碳基纳米复合材料修饰。

[0016] 进一步地,所述电化学传感器的制备过程包括将Nafion-MWNTs复合物物浇铸在玻碳电极上,并在室温下干燥以获得Nafion-MWNTs复合膜修饰的玻碳电极,然后将包括Bodipy373修饰的酶突变体的混合物滴加到Nafion-MWNTs复合膜修饰的玻碳电极,静置直至干燥。

[0017] 进一步地,所述电化学传感器的制备过程包括将将包括Bodipy373修饰的酶突变体的混合物酶混合物浇铸在HOPG电极表面上并在室温下干燥20分钟。

[0018] 另一方面,本申请提供了一种氨基酸特异实时检测方法,其中使用了上述电化学传感器。

[0019] 进一步地,所述实时检测方法用于检测血液或汗液中的氨基酸。

[0020] 进一步地,所述方法使用包含TrpOx-395TF-Bodipy373的电化学传感器检测血液或汗液中的色氨酸。

[0021] 另一方面,本申请提供了上述电化学传感器在制备氨基酸特异实时检测仪器中的应用。

[0022] 本申请的电化学传感器中可用的酶可以根据检测需要选用各种有氧化还原活性的酶,不局限于本申请实施例中使用的甘氨酸氧化酶或色氨酸氧化酶。

[0023] 本申请的电化学传感器中使用的修饰物/接头不局限于Bodipy373,任何本领域已知/研究出的有类似性质的均可使用,例如基于Bodipy373有不同亲水侧链的修饰物/接头。

## 附图说明

[0024] 图1为TF的合成途径图;

[0025] 图2为TrpOx-395TF-Bodipy373形成过程示意图:其中A)显示TrpOx的结构和TF掺

入的位置,并显示了TF和FAD之间的距离;B)为TrpOx从TF395位点通过Bodipy373接头到碳纳米管表面的连接示意图;C)为S-Click反应的示意图(S代表TF中的硫原子,C1代表Bodipy373中的氯原子)。

[0026] 图3为使用S-Click反应将TF遗传掺入蛋白质和位点特异性修饰截过图。A)为在不存在或存在1mM TF时表达的考马斯蓝染色的GlyOx和TrpOx突变体的SDS-PAGE凝胶图;B)为存在或不存在Bodipy373的情况下孵育的TrpOx-395TF和GlyOx-266TF突变体的SDS-PAGE凝胶的考马斯蓝染色(上)和荧光图像(下);C)为TrpOx-395TF和GlyOx-266TF的MS谱。

[0027] 图4为野生型和突变TrpOX活性实验结果。

[0028] 图5为Bodipy373与TF和N-乙酰半胱氨酸反应的动力学分析。A)为加入10mM TF后,27 $\mu$ M Bodipy373的吸收光谱作为时间的函数测量结果;B)为Bodipy373与TF反应的动力学曲线,吸收波长:570nm、Bodipy373:27 $\mu$ M、TF:10mM、缓冲液:HEPES (pH 7.4,200mM)/5%CH<sub>3</sub>CN。二阶速率常数为5.6M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>。C)为加入100mM N-乙酰半胱氨酸(NAcCys)后,作为时间的函数测量的27 $\mu$ M Bodipy373的吸收光谱;D)为Bodipy373的动力学曲线与NACys反应。吸收波长:570nm,Bodipy373:27 $\mu$ M,TF:10mM、缓冲液:HEPES (pH 7.4,200mM)/5%CH<sub>3</sub>CN。二阶速率常数为0.0057M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>。在pH 7.4中,TF与Bodipy373染料反应速度比NACys快1000倍。在Agilent 8453紫外-可见光谱系统上进行动力学测量。

[0029] 图6为Bodipy373在不存在CNT(灰色)或存在CNT(绿色)时;TrpOx-395TF-Bodipy373在不存在CNT(黑色)或存在CNT(红色)的情况下的荧光光谱。

[0030] 图7为原子力显微镜图像和循环伏安图(CV)。A)为TrpOx-395TF吸附在HOPG表面上的AFM图像。B)为TrpOx-395TF-Bodipy373吸附在HOPG表面上的AFM图像。C)为吸附在CNT/GCE上的TrpOx-395TF的循环伏安图(CV);D)为加入2mM Trp之前(红色)和之后(黑色)吸附在CNT/GCE上的TrpOx-395TF-Bodipy373的循环伏安图(CV)。CV在PBS缓冲液(pH 7.4)中进行,扫描速率:5mV/s

[0031] 图8为bodipy373/CNT交互分子模拟和表征图。(A,B) 苳和Bodipy373的化学结构。(C,D) 苳/Bodipy373与CNT表面相互作用的顶视图;通过PM6-DH+半经验QM方法优化苳-CNT表面和Bodipy373-CNT表面相互作用图;(E,F) 苳/Bodipy373与CNT表面相互作用的侧视图。原子颜色如下:CNT的碳原子:绿色、苳和Bodipy373的碳原子:蓝色、氧气:红色、氮:紫色、硼:粉红色、氟:浅绿色、氯:绿色;氢:白色(灰度图中未能完整显示)。

[0032] 图9为苳/Bodipy和CNT复合体系MD模拟图。在100ps MD模拟期间,苳/Bodipy373和CNT复合物的RMSD(A)和计算的相互作用能(B)。

[0033] 图10为一次分别添加Trp(30 $\mu$ M),抗坏血酸(AA,50和100 $\mu$ M),尿酸(UA,100 $\mu$ M)和多巴胺(DA,100 $\mu$ M)后,pH 7.4的PBS中,在-0.05V的电位下,nafion涂层TrpOx-395TF-Bodipy373 CNT/GCE的电流响应。

[0034] 图11为实时检测色氨酸的浓度的结果,其中A)为TrpOx-395TF-Bodipy373/CNT/GCE在添加Trp时的电流响应,施加电位-0.05V,在pH7.4 PBS缓冲液中;B)为稳态电流与Trp浓度的关系;C)为在注射Trp、Tyr和IDO后体外测量Trp浓度;D)为HeLa细胞生长期间的实时和在线Trp浓度测量,从48小时到54小时。;蓝点:空白培养、黑点:HeLa细胞在没有IFN- $\gamma$ 刺激的情况下、红点:50ng/ml IFN- $\gamma$ 刺激24小时后的HeLa细胞。

[0035] 图12为TrpOx-395TF-Bodipy373 CNT/GCE在操作条件下的稳定性结果图,A)10天

内的长期稳定性;B) 13小时内的短期稳定性。从图表中记录从计时电流图到50 $\mu$ MTrp的稳态电流,在长期稳定性测试中,用0.01M PBS (pH 7.4) 洗涤电极并在每次测试后在4 $^{\circ}$ C下储存;在短期测试中,电极用0.01M PBS, pH 7.4缓冲液洗涤,并在每次测试后在室温下安装在PBS溶液上方。

[0036] 图13-图20TF合成中各步骤产物的具体NMR图。

[0037] 图21为在CNT/GCE上具有Bodipy373连接的各种TrpOx突变体的CV, A) TrpOx-48TF-Bodipy373/CNT/GCE, B) TrpOx-129TF-Bodipy373/CNT/GCE C) TrpOx-343TF-Bodipy373/CNT/GCE, 黑色曲线:在没有Trp的情况下,红色曲线:在2mM Trp存在下, CV在0.1M PBS缓冲液 (pH 7.4) 中进行,扫描速率:5mV/s

[0038] 图22为加入100 $\mu$ MTrp基质之前 (红色曲线) 和之后 (绿色曲线) 的TrpOx-395TF的稳态吸收光谱。100 $\mu$ MTrp溶液作为对照 (蓝色曲线)。酶浓度为10 $\mu$ M, 反应在pH 7.4 0.02M PBS缓冲液中进行,每孔的总体积为100 $\mu$ L。B) 在与其底物反应期间获得的TrpOx-395TF半醌基团 (红色迹线) 的EPR光谱。信号以g=2.0046为中心,线宽 (峰-峰值) 为11.2高斯。

[0039] 图23为A) 在CNT/GCE上修饰的Bodipy373的CV, B) 在CNT/GCE上制造的wt TrpOx/Bodipy373混合物的CV, 黑色曲线:在不存在Trp的情况下,红色曲线:在2mM Trp存在下。C) 在不存在 (黑色曲线) 或存在 (红色曲线) 5mM甘氨酸的情况下,在没有Bodipy373连接的CNT/GCE上修饰的GlyOx-266TF的CV。D) 在不存在 (黑色曲线) 或存在 (红色曲线) 5mM甘氨酸的情况下GlyOx-266TF-Bodipy373/CNT/GCE的CV。CV在0.1M PBS缓冲液 (pH 7.4) 中进行,扫描速率:5mV/s。

## 实施例

[0040] 主要试剂、菌株和质粒:

[0041] 所有化学药品均购自Innochem, 无需进一步纯化;

[0042] 玻碳电极购自天津Aida;

[0043] 导向基板的HOPG电极购自南京XFNano;

[0044] 在Bruker AMX-500仪器上记录 $^1$ H和 $^{13}$ C NMR光谱;

[0045] 相对于 $\text{CDCl}_3$ 在7.26ppm (s) 以及 $\text{D}_2\text{O}$ 在4.79ppm处的残留信号,报告 $^1$ H NMR的化学位移;相对于 $\text{CDCl}_3$ 在77.0ppm处的信号报告 $^{13}$ C NMR的化学位移。

[0046] 实施例1 TF和Bodipy373的合成

[0047] TF的合成途径如图1所示:

[0048] 2-乙酰氨基-2-(4-硝基苄基) 丙二酸二乙酯 (3):

[0049] 向2-乙酰氨基丙二酸二乙酯 (7.815g, 36mmol) 的EtOH溶液 (60mL) 中加入叔丁醇钾 (4.399g, 36mmol), 1-(溴甲基)-4-硝基苯 (6.448g, 30mmol)。将反应混合物回流12小时,随后冷却至室温。过滤黄色悬浮液,用EtOH洗涤。获得化合物 (3), 为黄色固体 (8.451g, 24mmol, Y=80%)。 $^1$ H NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ 8.14 (d, J=9.0Hz, 2H), 7.19 (d, J=9.0Hz, 2H), 6.55 (s, 1H), 4.36-4.23 (m, 4H), 3.79 (s, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.31 (t, J=7.0Hz, 6H)。 $^{13}$ C NMR (126MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ 169.74, 167.43, 147.66, 143.50, 131.07, 123.85, 67.23, 63.40, 37.97, 23.41, 14.38。LCMS (ESI) 计算值 $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7$  [M] $^+$ : 353.1, 实测值: 353.2。

[0050] 2-乙酰氨基-2-(4-氨基苄基) 丙二酸二乙酯 (4):

[0051] 将化合物(3) (7.042g, 20mmol), 10% 钨碳(0.700g), MeOH(100mL) 加入到在高压釜中加盖的反应管内。随后吹扫高压釜并在4atm下加入H<sub>2</sub>。将反应混合物在室温下搅拌16小时。然后小心地释放H<sub>2</sub>并将反应混合物通过硅藻土过滤。减压蒸发溶剂后, 残余物用硅胶柱色谱(己烷/乙酸乙酯=1:1) 纯化, 得到所需产物46.247g (Y=97%)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ6.79 (d, J=8.5Hz, 2H), 6.57 (d, J=8.5Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 4.31-4.20 (m, 4H), 3.62 (s, 2H), 3.53 (s, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.29 (dd, J=7.5, 7.0Hz, 6H)。<sup>13</sup>C NMR (126MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ169.29, 168.00, 145.80, 131.01, 125.14, 115.36, 67.72, 62.84, 37.41, 23.37, 14.35。LCMS (ESI) C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>的计算值: 345.1, 实测值: 345.1。

[0052] 2-乙酰氨基-2-(4-((乙氧基硫代硫代)硫代)苄基)丙二酸二乙酯(6):

[0053] 将化合物(4) (1g, 3.1mmol) 在6N HCl (5mL) 中搅拌。将反应混合物冷却至0°C, 并在10分钟内逐渐加入0.5M NaNO<sub>2</sub>水溶液(256.7mg, 3.72mmol)。再搅拌10分钟后, 通过加入Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>将溶液的pH调节至7.0。然后将反应混合物冷却至0°C, 并逐滴加入0-乙基二硫代碳酸钾水溶液(545.0mg, 3.41mmol)。在60°C下搅拌1小时后, 将所得混合物用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150mL) 萃取。将合并的有机相用H<sub>2</sub>O和盐水洗涤, 用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥。将溶液蒸发并通过硅胶色谱法(己烷/乙酸乙酯=2:1) 纯化, 得到产物6 860mg (Y=65%)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ7.41-7.37 (m, 2H), 7.07 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.56 (s, 1H), 4.62-4.56 (m, 2H), 4.33-4.21 (m, 4H), 3.70 (s, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.31 (m, 9H)。<sup>13</sup>C NMR (126MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ213.22, 169.46, 167.62, 137.90, 135.27, 131.00, 129.36, 77.61, 77.36, 77.11, 70.62, 67.34, 63.12, 37.94, 23.36, 14.34, 13.86。LC-MS (ESI) C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup>的计算值: 428.1, 实测值: 428.0。

[0054] 2-氨基-3-(4-巯基苄基)丙酸(7):

[0055] 将化合物(6) (860mg, 2.015mmol) 和浓HCl (15mL) 的混合物加热回流16小时。用NaOH中和所得混合物后, 形成沉淀物并过滤, 得到最终产物(7) 320mg (Y=80%)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) δ7.29 (d, J=8.0Hz, 4H), 6.94 (d, J=8.0Hz, 4H), 3.43 (dd, J=7.0, 5.5Hz, 2H), 2.88 (dd, J=13.5, 5.5Hz, 2H), 2.71 (dd, J=13.5, 7.4Hz, 2H)。<sup>13</sup>C NMR (126MHz, D<sub>2</sub>O) δ182.59, 143.06, 132.86, 131.28, 129.21, 57.34, 40.07。LCMS (ESI) C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup>的计算值: 393.1, 实测值: 393.2。

[0056] 各步骤的NMR图详见图13-图20。

[0057] 按照X.L.Liu, L.Y.Niu, Y.Z.Chen, Y.Yang, Q.Z.Yang, Sens. Actuators. B2017, 252, 470-476报导的方法合成Bodipy373。

[0058] 实施例2 pET22b-GlyOx和pET22b-TrpOx质粒的构建以及GlyOx and TrpOx基因定点突变

[0059] 使用下列引物以纯化的基因组DNA为模板从枯草芽孢杆菌基因组PCR扩增GlyOX基因(1116bp):

[0060] 正向(pET22b-GlyOx-F, 包括NdeI限制性位点):

[0061] AGAAGGAGATATACATATGAAAAGGCATTATGAAGCAGTGGTG (SEQ ID NO.1)

[0062] 反向(pET22b-GlyOx-R, 包括NotI限制性位点):

[0063] TGCTCGAGTGCGGCCGCTATCTGAACCGCCTCCTTGC (SEQ ID NO.2)。

[0064] 以NdeI和NotI消化GlyOX基因并连接入载体pET22b形成质粒pET22b-GlyOx。

[0065] TrpOx质粒以类似的方式构建pET22b-TrpOx。

[0066] 用于产生3种不同的Gly0x突变体 (A47TAG、D135TAG和W266TAG) 的引物如表1所示；用于产生3种不同Trp0x突变体 (Q129TAG、R48TAG和C395TAG) 的引物如表2所示。

[0067] 表1 Gly0x突变引物

突变	方向	引物	序列
A47TAG	正向	Gly0x A47F	TGCCGCTTAGGGAATGCTGGGC (SEQ ID NO. 3)
A47TAG	反向	Gly0x A47R	AGCATTCCCTAAGCGGCACTTGTCGT (SEQ ID NO. 4)
D135TAG	正向	Gly0x D135F	GCGTCTGGTTAGATCTTTGGTGCATCT (SEQ ID NO. 5)
D135TAG	反向	Gly0x D135R	CCAAAGATCTAACCAGACGCATACGGC (SEQ ID NO. 6)
W266TAG	正向	Gly0x W266F	CGGGGGACTAGAGTGAAACACCGGATCTT (SEQ ID NO. 7)
W266TAG	反向	Gly0x W266R	GTTTCACTCTAGTCCCCGGCTTCATTGTC (SEQ ID NO. 8)

[0069] 表2 Trp0x突变引物

突变	方向	引物	序列
Q129TAG	正向	Trp0x Q129F	CCCGTTACTAGGGTCACGACTCTGCAG (SEQ ID NO. 9)
Q129TAG	反向	Trp0x Q129R	GTCGTGACCCTAGTAACGGGAAACGAAC (SEQ ID NO. 10)
R48TAG	正向	Trp0x R48F	GCCGTATTTAGAGCAAAATGCTGGACG (SEQ ID NO. 11)
R48TAG	反向	Trp0x R48R	ATTTTGCTCTAAATACGGCCACCAGCTTC (SEQ ID NO. 12)
C395TAG	正向	Trp0x C395F	CTGAACATTAGGGCTGGATGGAAGGTG (SEQ ID NO. 13)
C395TAG	反向	Trp0x C395R	CCATCCAGCCCTAATGTTTCAGTATAAGCG (SEQ ID NO. 14)

[0072] 实施例3 Gly0x and Trp0x的表达、纯化以及活性测定

[0073] 对于野生型Gly0x和Trp0x蛋白的表达,将pET22b-Gly0x或pET22b-Trp0x质粒分别转化入大肠杆菌菌株BL21 (DE3) 中,并于37℃下在补充有氨苄青霉素100μg/mL的Luria Bertani (LB) 培养基中生长。在0.8的OD600下用1mM IPTG诱导转化的BL21 (DE3) 细胞。在30℃生长16小时后,收获细胞,重悬于裂解缓冲液 (50mM Tris、pH 8.0、300mM NaCl、10mM咪唑) 中并通过超声处理裂解。将超声处理后的裂解物上样到Ni-NTA柱 (HisTrap 1mL, GE healthcare) 上。将柱用5mL洗涤缓冲液 (50mM Tris、pH 8.0、300mM NaCl、50mM咪唑) 洗涤三次,然后用洗脱缓冲液 (50mM Tris、pH 8.0、300mM NaCl、250mM咪唑) 洗脱。通过装有G75柱的AKTA纯化器纯化Gly0x和Trp0x蛋白,并储存在含有10%甘油的缓冲液 (20mM Tris、pH8.0、150mM NaCl) 中并保存在-80℃。

[0074] 对于掺入TF的Gly0x或Trp0x突变体表达,将定点突变的pET22b-Gly0x或pET22b-Trp0x质粒分别与pEVOL-TFRS (RS代表氨酰基tRNA合成酶) 共转化入BL21 (DE3)。将单菌落于37℃下在4mL补充有氨苄青霉素100μg/mL和氯霉素25μg/mL的LB培养基中培养过夜,随后在100mL LB培养基中稀释。在1mM TF的存在下,在1.0的OD 600nm下以1mM IPTG,1mM DTT和0.2%L-阿拉伯糖诱导转化的细胞。在30℃生长16小时后,收获细胞,重悬于裂解缓冲液 (50mM Tris、pH 8.0、300mM NaCl、10mM咪唑) 中并通过超声处理裂解。根据wt Gly0x和Trp0x蛋白的纯化方法,通过Ni-NTA亲和层析纯化Gly0x和Trp0x突变体。

[0075] 相关实验结果见图3C,显示TF位点特异性地掺入了蛋白之中。



[0076] 氧化酶活性测定:使用辣根过氧化物酶(购自北京Lablead)(10 $\mu$ g/mL)和邻联茴香胺(0.32mg/mL),使用 $\Delta\epsilon_{440}=13000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 氧化产物,通过分光光度法以酶偶联分析测定 $\text{H}_2\text{O}_2$ 来检测GlyOx和TrpOx活性。所有测定均在100mM焦磷酸钾缓冲液pH7.4中100 $\mu$ L的终体积进行。

[0077] 野生型和突变TrpOX活性实验结果见图4,结果显示TF的位点特异性掺入对酶功能的影响很小。

[0078] 实施例4 偶联蛋白质与Bodipy373以及酶电极的制备和表征

[0079] 在1mM DTT和25%乙腈存在下,将TrpOx或GlyOx突变蛋白(50 $\mu$ M)与Bodipy373(50 $\mu$ M)在20mM Tris缓冲液(pH8.0)中反应。将上述混合物在4 $^{\circ}$ C温育20分钟至1小时。

[0080] 用0.3和0.05 $\mu$ m氧化铝浆料仔细抛光玻碳电极(GCE,直径3mm)和HOPG电极,分别在去离子水和乙醇中超声处理,然后在进一步改性之前用氮气吹干。通过将1mL乙醇中的Nafion(0.05wt%)和2.5mg MWNT混合,随后超声处理10分钟直至形成均匀的水性分散体来制备Nafion-MWNTs复合物。将7 $\mu$ L匀质混合物浇铸在电极上,并在室温下干燥以获得Nafion-MWNTs复合膜修饰的GC电极。然后将4 $\mu$ L Bodipy373修饰的酶突变体混合物滴加到MWNT/GCE上,静置直至干燥以使水收缩促进Bodipy373和MWNTs表面之间的 $\pi$ - $\pi$ 堆积。对于平面HOPG电极的修饰,将2 $\mu$ L酶混合物浇铸在电极表面上并在室温下干燥20分钟。随后,在洗涤步骤之后,将制备的电极浸入PBS缓冲液中5分钟以除去松散结合的复合物。

[0081] 为了证明Bodipy373选择性地与TF的苯硫酚基团反应,将wt GlyOx,GlyOx-266TF, wt TrpOx和TrpOx-395TF与50 $\mu$ M Bodipy373在pH 8.0Tris缓冲液中在4 $^{\circ}$ C下孵育60分钟。SDS-PAGE分析显示,对于GlyOx-266TF和TrpOx-395TF观察到荧光带,但对于wt GlyOx和wt TrpOx没有观察到荧光带(图3B,wt GlyOx和wt TrpOx都含有四个表面半胱氨酸残基,其在测试条件下不与Bodipy373反应)。图5的Bodipy373与TF和N-乙酰半胱氨酸反应的动力学分析表明:TF与Bodipy373的反应速率为 $5.6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;相比之下,Bodipy373与N-乙酰半胱氨酸反应约1000倍,速度为 $0.0057\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;TF(6.4)相对于半胱氨酸(8.4)的pKa低得多,部分原因在于这种显着的反应性,允许在表面暴露的半胱氨酸存在下选择性修饰TF。

[0082] 在电极上定量固定的TrpOx-395TF-Bodipy373复合物

[0083] 使用纯化的TrpOx-395TF-Bodipy373复合物在570nm处的吸收峰来定量固定化之前和之后的蛋白质。固定在电极上后,用PBS缓冲液(pH7.4)洗涤修饰电极三次以除去非特异性结合蛋白复合物。然后收集洗去的溶液并冷冻干燥。将收集的蛋白质复合物重悬于100 $\mu$ LPBS缓冲液中用于吸收光谱测量。校准曲线由几批平行批次的TrpOx-395TF-Bodipy373溶液连续稀释液制成。通过使用280nm吸收的纳米滴测定初始蛋白质浓度。对于物理吸附的TrpOx-395TF,通过BCA测定法测量蛋白质浓度。

[0084] 图6的荧光光谱测量表明,当与碳纳米管(CNT)孵育时,Bodipy373荧光淬灭60倍,这可能是由于Bodipy373和CNT的强 $\pi$ - $\pi$ 相互作用,以及光诱导电子转移(PET)淬灭。

[0085] 原子力显微镜分析

[0086] 使用Bruker原子力显微镜(FastscanBio)表征。在轻叩模式和接触模式下收集图像。将20 $\mu$ L蛋白质或蛋白质-Bodiy373复合物(蛋白质浓度1 $\mu$ M)浇铸在HOPG基底(10 $\times$ 10mm)上,并在室温下干燥15分钟,然后用双蒸水洗涤并用氮气干燥。AFM结果的定量分析遵循先前报导的程序(R.Gettens,Z.Bai,J.Gilbert,J.Biomed.Mater.Res.Part A.2005,72,

246)。原子力显微镜图像及分析见图7:其进一步表征TrpOx与碳电极的位点特异性附着。在没有Bodipy373修饰的情况下,物理吸附的TrpOx-395TF酶在高度取向的热解石墨(HOPG)表面上的覆盖率远低于TrpOx-395TF-Bodipy373。通过使用Nanoscope IIIa软件承载功能进一步进行蛋白质覆盖的定量分析,物理吸附的TrpOx-395TF的计算结果为12.3%,这远低于TrpOx-395TF-Bodipy373的计算值51.5%。该结果表明,借助Bodipy373接头作为碳表面的“贴”,修饰的酶在HOPG表面上具有显著增加的表面覆盖度。

[0087] 使用Gaussian 09软件进行量子力学(QM)计算,使用MOPAC 2016软件进行半经验QM计算,计算在中国科学院超级计算中心的“Era”超级计算机上进行。使用Gromacs 5.1.4软件的MD模拟(M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, SoftwareX 2015, 1-2 (Supplement C), 19-25)在中国科学院生物物理研究所生物成像中心的HPC服务站进行。

[0088] 使用Gromacs 5.1.4进行苾/Bodipy373和CNT复合物的分子动力学模拟。单壁碳纳米管模型由VMD4中的Nanotube Builder插件构建,具有以下参数:手性指数 $n=55, m=55$ 和长度=5nm。完整模型中有4620个碳原子,直径约为7.5nm。将一般Amber力场(GAFF)应用于CNT(J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, D. A. Case, J. Mol. Graphics Modell. 2006, 25 (2), 247-260; J. Wang, R. Wolf, J. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, J. Comput. Chem. 2004, 25 (9), 1157-1174),其中碳原子用原子类型CA(sp<sup>2</sup>芳族碳)参数化,并且在gromacs中生成拓扑文件。如先前报导的,通过RESP方法计算苾和Bodipy的原子电荷(C. I. Bayly, P. Cieplak, W. Cornell, P. A. Kollman, J. Phys. Chem. 1993, 97 (40), 10269-10280),并且力场参数来自GAFF力场。硼原子的力场参数取自Universal Force Field(G. Garberoglio, J. Comput. Chem. 2012, 33 (27), 2204-2208)。

[0089] 将苾/Bodipy和CNT复合体系置于立方体盒中。盒子表面距离CNT 4nm,作为盒子中心。通过10000个最陡下降最小化循环进行能量最小化。对于每100个循环间隔,使用共轭梯度最小化。在MD模拟过程中,所有氢连接键都使用LINCS算法进行约束,时间步长设置为2fs。使用V-rescale温度耦合方法维持温度。温度耦合的时间常数设定为0.2ps,温度设定为298.15K。对于两个系统进行100ps的生产运行,收集间隔为1ps。在gromacs中分析相互作用能和RMSD(均方根偏差)。

[0090] 为了更精确地计算苾/Bodipy373和纳米管之间的相互作用能,在MOPAC 2016中使用了半经验QM PM6-DH+方法,据报道该方法能给出合理的结果(J. J. P. Stewart, J. Mol. Model. 2007, 13 (12), 1173-1213; M. Korth, J. Chem. Theory Comput. 2010, 6 (12), 3808-3816; S. Conti, M. Cecchini, J. Phys. Chem. C. 2015, 119 (4), 1867-1879)。分别提取苾/Bodipy373和纳米管复合体系的MD轨迹87ps和68ps的数据用于QM计算。为了将计算时间减少到可接受的水平,手动生成来自系统接口的截断的绑定复合体。对于CNT部分,在CNT表面上分离出长度约为40埃且宽度约为25埃的矩形区域与CNT的其余部分分离。对于小分子部分,包括苾/Bodipy373的所有原子。来自配合物的CNT部分的碳原子数分别为227和266。然后通过PM6-DH+方法在MOPAC 2016中使用默认参数优化复合物的几何形状。计算单体A(苾/Bodipy), B(CNT部分)和络合物A-B的形成焓(E)。结合能 $\Delta E$ 计算为: $\Delta E = E_{A-B} - (E_A + E_B)$

[0091] 图8-9表明了Bodipy373和CNT表面之间的结合能计算为-152kJ/mol,强于苾(-110kJ/mol)。更精确的PM6-DH+半经验量子力学(QM)方法给出了类似的结果。

[0092] 电化学表征

[0093] 使用Autolab Potentiostat (M204, Metrohm, Switzerland) 进行电化学测量。电化学表征在常规的三电极基电化学电池中进行, 制备的酶电极用作工作电极, Pt线圈用作辅助电极, SCE电极用作参比电极。在本文中相对该参照报导所有点位。所有测量均在室温 (23 °C) 下在空气环境中进行。使用0.1M磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 作为支持电解质。

[0094] 建立了TrpOx到电极的特定连接后, 我们进行了实时色氨酸 (Trp) 电化学测量。虽然Trp是一种电化学活性氨基酸, 其可以在300mV的起始电位下被氧化, 但由于强干扰而在生物系统中以这种电位进行选择性的Trp测量是不实际的。我们通过TrpOx-395TF-Bodipy373连接的CNT修饰的玻碳电极 (TrpOx-395TF-Bodipy373/CNT/GCE) 证明了检测Trp的电位低得多。如图7D所示, 观察到氧化电流显著增加, 加入2mM Trp后起始电位为-180mV。为了排除Bodipy373作为氧化还原介体的可能性, 测量了在没有酶修饰的Bodipy373或Bodipy373修饰电极存在下wt TrpOx的电化学信号, 没有观察到催化电流 (图21)。此外, 没有Bodipy373连接到电极的相同TrpOx-395TF突变体 (图7C) 在添加Trp时显示可忽略的氧化电流, 表明EET需要Bodipy373连接。

[0095] 为了研究氧化电流的来源, 测量TrpOx-395TF在添加Trp底物之前和之后的吸收光谱。在Trp氧化过程中观察到~320nm处的新吸收峰 (图22), 这对应于先前报道的黄素蛋白中单电子还原自由基半醌 (FAD•) 的形成 (M. Pedotti, S. Ghisla, L. Motteran, G. Molla, L. Pollegioni, Biochimie 2009, 91, 604-612; C. J. Balibar, C. T. Walsh, Biochemistry 2006, 45, 15444-15457)。还进行了低温电子顺磁共振 (EPR) 测量以验证FAD的存在。显示TrpOx在与其底物反应期间的EPR光谱。信号以 $g = 2.0046$ 为中心, 线宽 (峰-峰值) 为11.2高斯, 与FAD报道的信号一致。报导的 (M. Medina, A. Vrielink, R. Cammack, Eur. J. Biochem 1994, 222, 941-947) FAD的氧化电位约为-200mv (相对于SCE), 这与本研究中观察到的氧化电位接近。因此, -188mV的起始电位表明电极和FAD中心之间的直接连通, 这是由FAD的再氧化引起的。有线TrpOx突变体的进一步电子转移速率分析和动力学研究表明适当的酶对齐对电极有利于电子转移的重要性 (进一步的结果显示在表S3中)。表明GlyOx-266TF-Bodipy373与电极之间的EET需要Bodipy373连接 (图23)。

[0096] 表3在连接到HOPG电极后各种氨基酸氧化酶突变体的稳态动力学参数

突变体	$K_m^{app}$ (mM)	$I_{max}$ ( $\mu A \cdot cm^{-2}$ )	$k_{ET}$ ( $s^{-1}$ )	从 TF 到 FAD 距离 (Å)
TrpOx 48TF	2.13 ± 0.33	30.2 ± 5.3	3.55 ± 0.25	10.1
[0097] TrpOx 395TF	1.85 ± 0.35	93.3 ± 16.2	11.55 ± 0.31	10.9
TrpOx 129TF	2.33 ± 0.41	72.5 ± 11.1	7.15 ± 0.27	35.9

[0098] 动力学研究和ET率计算。

[0099] 使用Laviron的理论 (E. Laviron, J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. 1979, 101, 19-28) 计算了各种TrpOx突变体的ET率。使用对照裸电极测量由HOPG电极的电容产生的非法拉第电流, 其在分析之前从所有测量值中减去。如表3所示, TrpOx-395TF突变体表现出最高的灵敏度 (最低 $K_m$ ) 和最高的 $I_{max}$  (酶活性测定中 $V_{max}$ 的对

应物)。对于TrpOx-395TF突变体,我们观察到最高的ET速率常数( $11.55\text{s}^{-1}$ )。129TF-Bodipy373突变体的ET率为 $7.15\text{s}^{-1}$ ,48TF-Bodipy373突变体的ET率为 $3.55\text{s}^{-1}$ 。表观ET速率差异表明电极表面上的蛋白质取向可显著影响电子隧穿速率。一旦Bodipy373与CNT电极表面形成初始接触,TrpOx可形成额外的接触点和DET与电极的路径,因此TF与黄素之间的距离可能不代表黄素氧化还原中心与CNT电极表面之间的最近距离。

[0100] 实施例5 实时监测色氨酸的浓度

[0101] 我们测量TrpOx-395TF-Bodipy373/CNT/GCE对Trp的电流响应,施加电位为 $-0.1\text{V}$ 。动态范围为 $0.02\text{--}2.5\text{mM}$ ,线性范围为 $0.02\text{--}0.8\text{mM}$ 。与目前对 $30\mu\text{M}$ Trp的反应相比,多巴胺,抗坏血酸和尿酸(分别为 $0.1\text{mM}$ )的生理水平信号可忽略不计(图10)。这种抗干扰能力归因于用于选择性检测Trp的低操作电位。然后我们测试了TrpOx-395TF-Bodipy373/CNT/GCE是否能够选择性地实时监测血液中的Trp浓度。如图11C所示,在向小鼠血液中加入 $0.03\text{mM}$  Trp后,在5秒内观察到快速电流增加。然而,在注射 $0.1\text{mM}$  Trp降解酶IDO后,观察到稳态电流的快速下降,表明Trp浓度已降低。随后我们使用TrpOx-395TF-Bodipy373/CNT/GCE电极监测HeLa细胞培养物中的Trp浓度(将HeLa细胞培养于补充有10%热灭活的胎牛血清,1%链霉素和1%青霉素的RPMI 1640培养基中。将细胞在 $37^\circ\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ 的湿润气氛中培养。当细胞达到60-70%汇合时,将人IFN- $\gamma$ 溶液加入培养基中至终浓度为 $50\text{ng/ml}$ 。在对照组中未添加IFN- $\gamma$ 。孵育24小时后,用Trp浓度调节至 $60\mu\text{M}$ 的RPMI 1640培养基更新培养基,随后恢复1小时。随后每15分钟通过电流分析法测量培养物中的色氨酸浓度,持续6小时。为了避免电极稳定性对传感精度的影响,将三个平行电极用作一组,并且每小时更新整个组)。如图11D所示,在不存在IFN- $\gamma$ 的情况下,Trp浓度在生长阶段期间从48小时缓慢下降至54小时。然而,在 $50\text{ng/ml}$  IFN- $\gamma$ 存在下,在HeLa细胞中表达更多的IDO,并且观察到Trp浓度显著降低。

[0102] 汗液和血浆采样,LC-MS分析,电流分析。

[0103] 在跑步机(7MPH)上跑步期间从志愿者的前额收集人体汗液,样品采集时间窗口为跑步20至25分钟期间。在取样之前用酒精棉签清洁前额,并将总计约 $200\mu\text{L}$ 的汗液收集到 $1.5\text{mL}$ 的enphendoff管中。使用Waters 2998仪器进行LC-MS,将汗液样品与相同体积的甲醇溶液(水/甲醇1:1)混合,然后在取样或进一步的丹磺酰化程序之前离心。甘氨酸的LC-MS分析从先前报道的用于LC-MS程序的氨基酸丹磺酰化修改(Y. Tapuhi, D.E. Schmidt, W. Lindner, B.L. Karger, Anal. Biochem. 1981, 115, 123-129)。直接进行色氨酸的LC-MS分析。

[0104] 使用定制的微室电化学电池( $0.4$ 至 $1\text{mL}$ 工作体积)进行甘氨酸和色氨酸的安培检测。施加的点位为 $-0.05\text{V}$ 。记录每个汗液样品,血浆样品或标准氨基酸样品的稳态电流用于计算和校准。

[0105] 结果见下面的表4和5:

[0106] 表4三个个体的汗液样本分析

甘氨酸分析	LC-MS参考值 (mM)	电流分析测量值 (mM)
1 mM甘氨酸溶液	1	$1.06 \pm 0.08$

[0107]

汗液样本1	1.22 ±0.05	1.34 ±0.10
汗液样本2	1.06 ±0.03	1.14 ±0.05
汗液样本3	0.37 ±0.02	0.41 ±0.09

[0108]

色氨酸分析	LC-MS参考值 (μM)	电流分析测量值(μM)
100 μM色氨酸溶液	100	104 ±10
汗液样本1	39 ±5	42 ±5
汗液样本2	37 ±4	42 ±8
汗液样本3	33 ±6	34 ±5

[0109] 表5五个个体的血液样本色氨酸分析

色氨酸分析	LC-MS参考值 (μM)	电流分析测量值(μM)
血液样本 1	53 ±5	59 ±3
血液样本 2	47 ±3	49 ±6
[0110] 血液样本 3	46 ±3	50 ±5
血液样本 4	55 ±4	62 ±6
血液样本 5	51 ±3	57 ±5

[0111] 数据显示来自电流分析法的所有测量值与通过LC-MS获得的参考值具有良好的线性相关性。考虑到电流分析测量的简单性和快速性,我们的方法在人体汗液和血液样本分析以及实时健康状态监测方面表现出巨大潜力。

[0112] 图11的稳定性测试表明,进行适当的处理后,TrpOx-395TF-Bodipy373 CNT/GCE可以在一定时期内保持性能稳定。

## SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 使用新型电化学传感器的氨基酸特异实时检测方法

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

agaaggagat atacatatga aaaggcatta tgaagcagtg gtg 43

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

tgctcgagtg cggccgctat ctgaaccgcc tccttgc 37

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

tgccgcttag ggaatgctgg gc 22

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

agcattccct aagcggcact tgcgt 26

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

gcgtctggtt agatctttgg tgcatt 27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列  
<400> 6  
ccaaagatct aaccagacgc atacggc 27  
<210> 7  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 7  
cgggggacta gagtgaaaca ccgatctt 29  
<210> 8  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 8  
gtttcactct agtcccccg cttcattgtc 30  
<210> 9  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 9  
cccgttacta gggtcacgac tctgcag 27  
<210> 10  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 10  
gtcgtgacct tagtaacggg aaacgaac 28  
<210> 11  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 11  
gccgtattta gagcaaaatg ctggacg 27  
<210> 12  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 12  
attttgcctc aaatacggcc accagcttc 29

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

ctgaacatta gggctggatg gaaggtg 27

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

ccatccagcc ctaatgttca gtataagcg 29



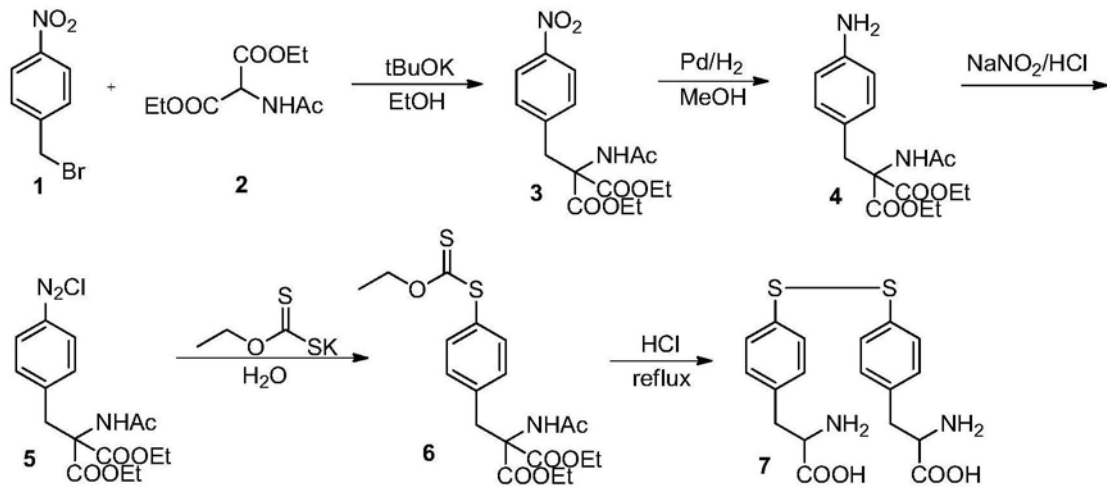


图1

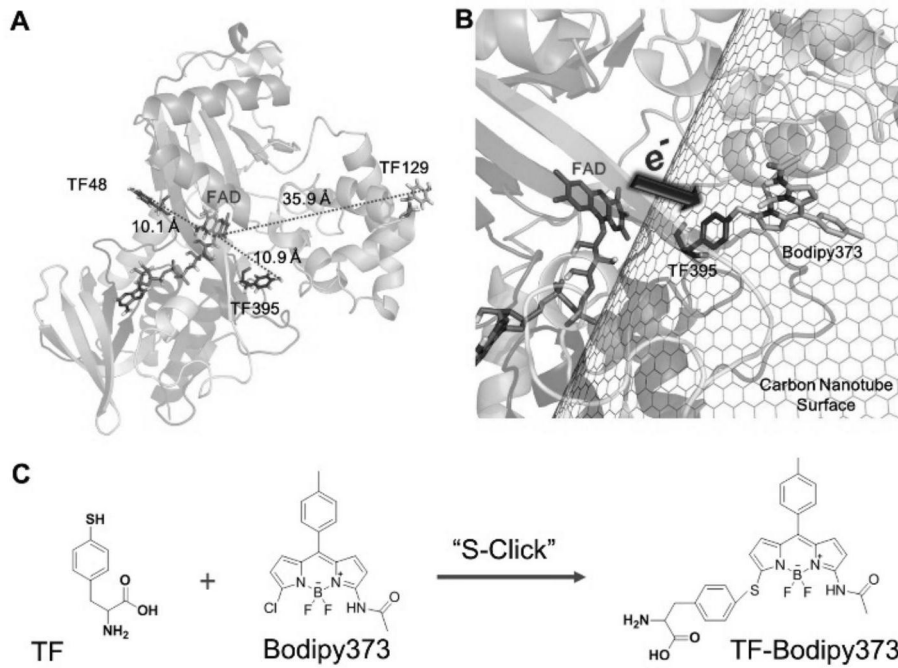


图2



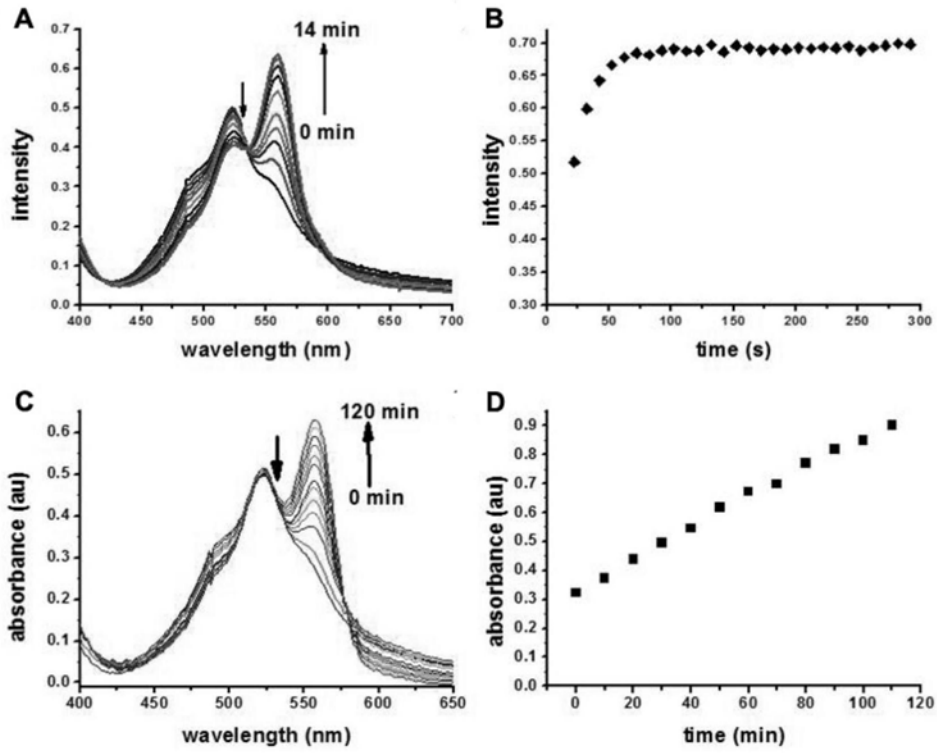


图5

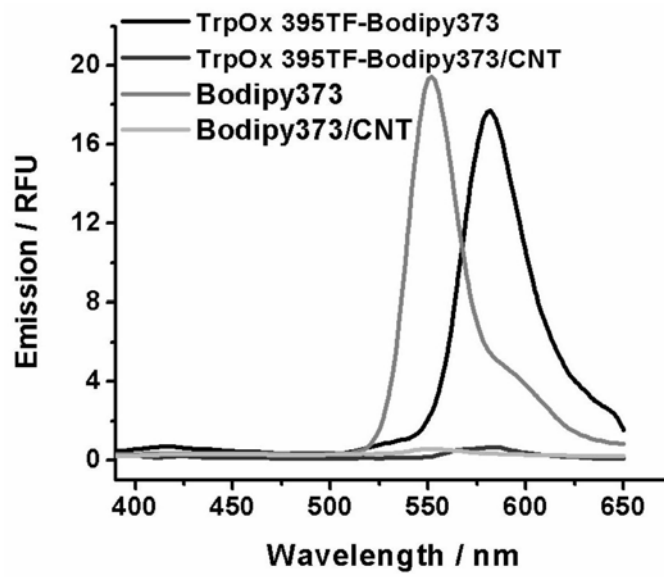


图6

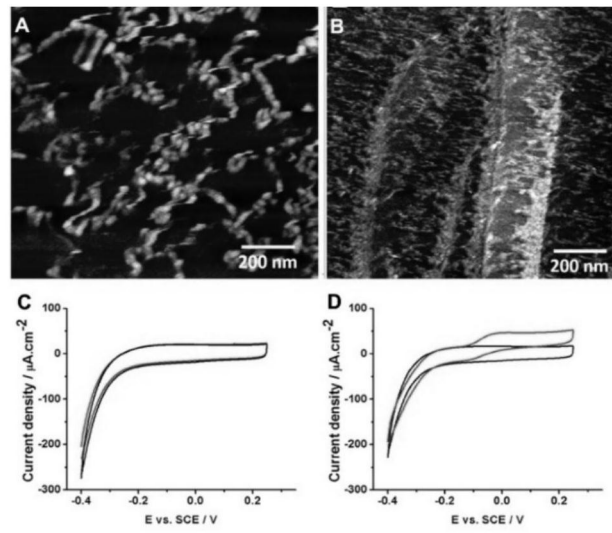


图7

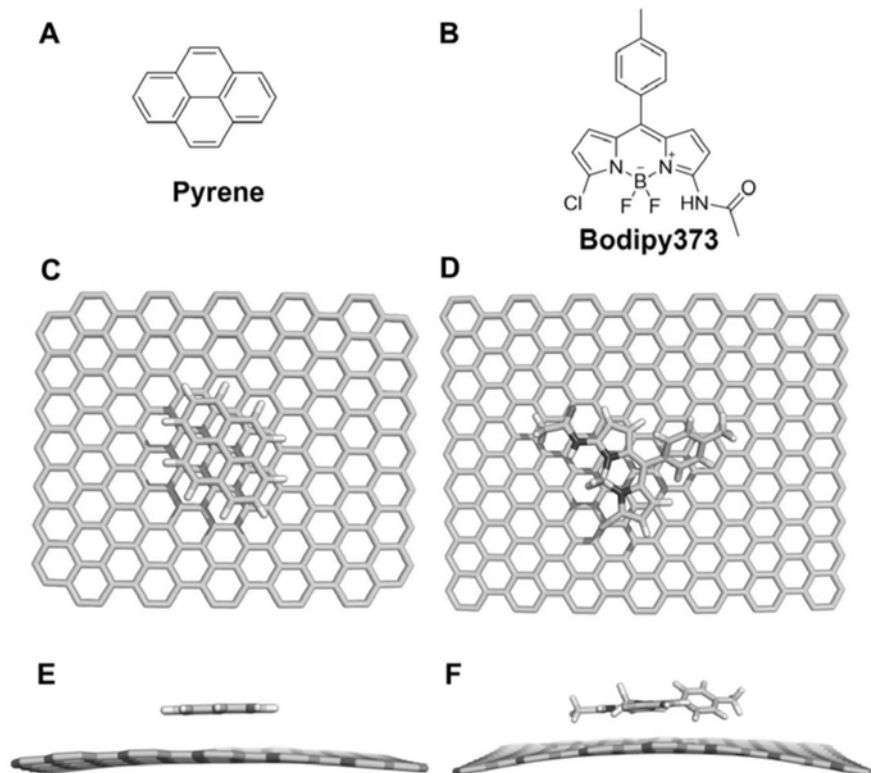


图8

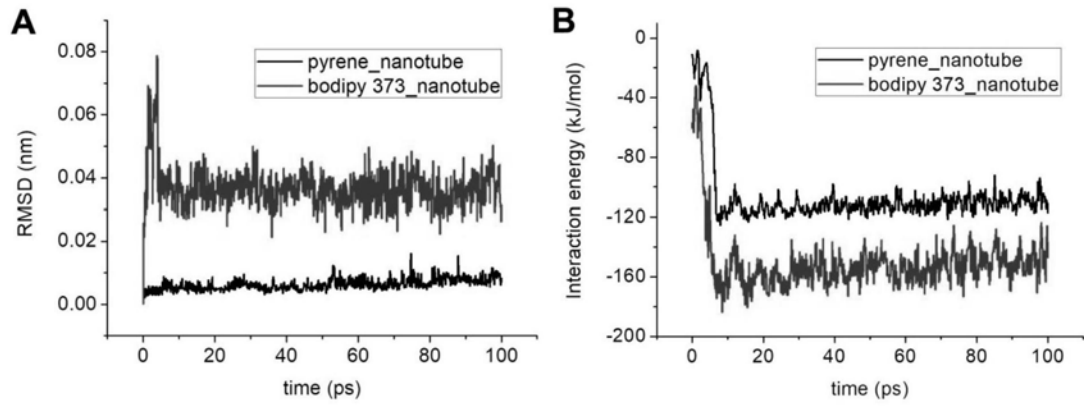


图9

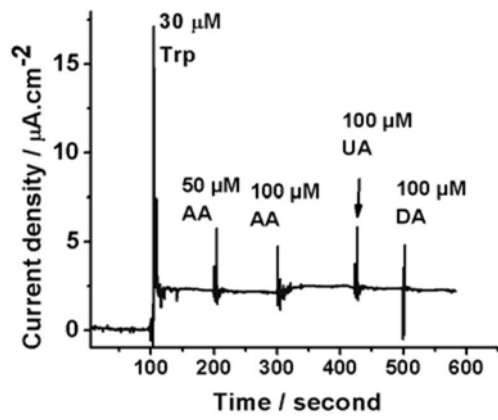


图10

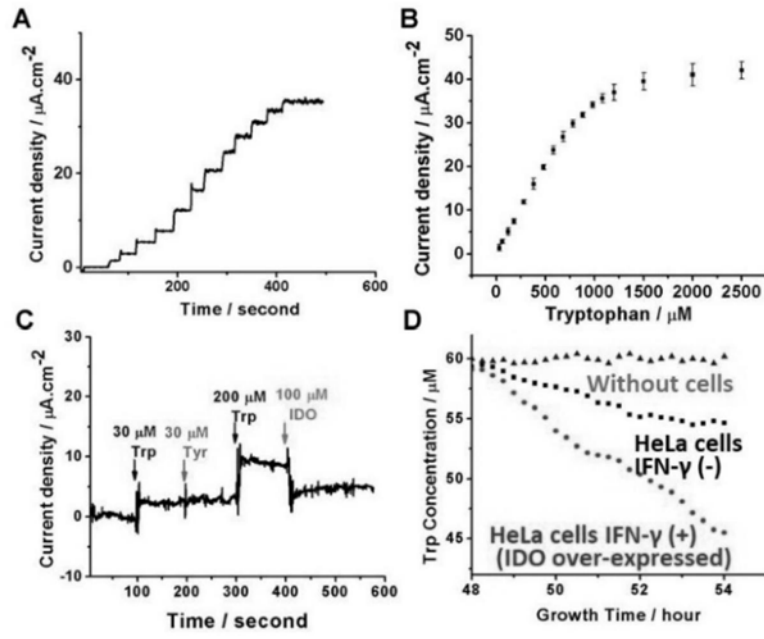


图11

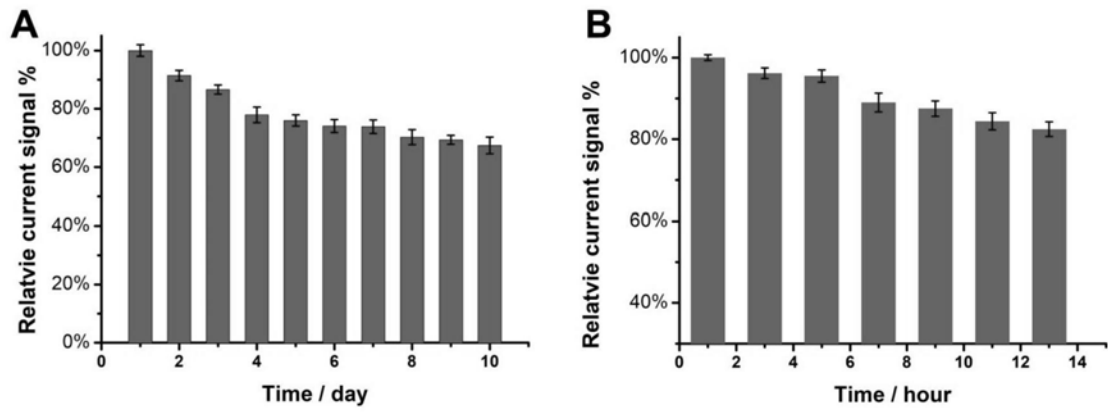


图12

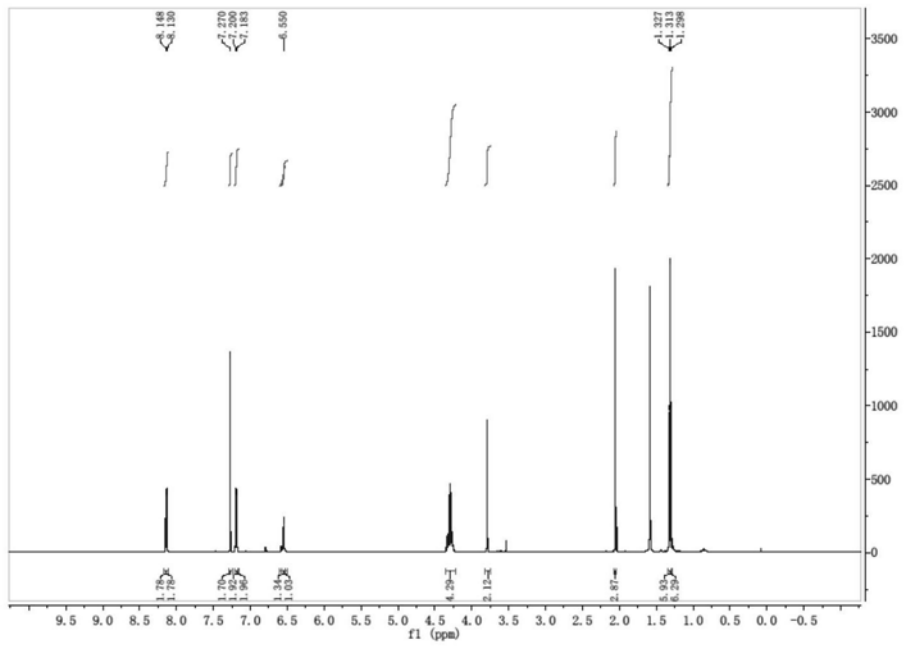


图13

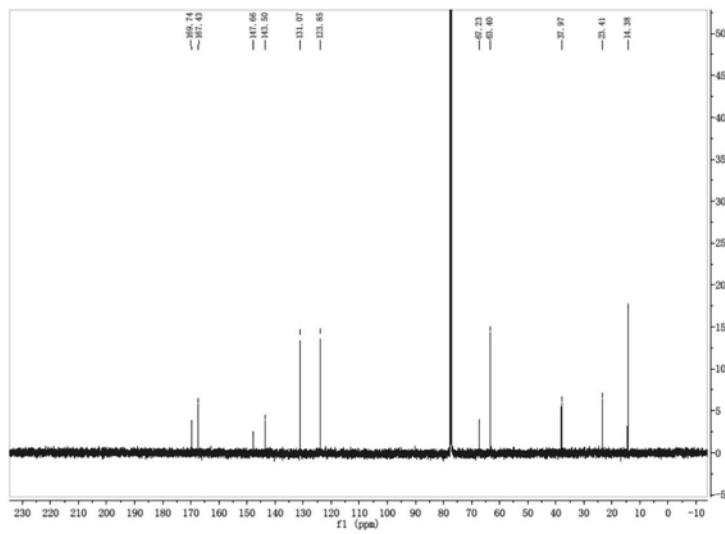


图14

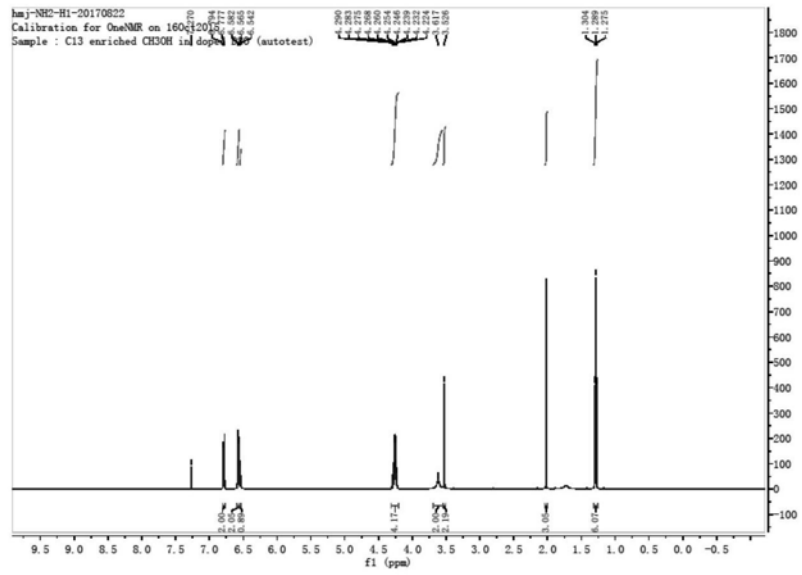


图15

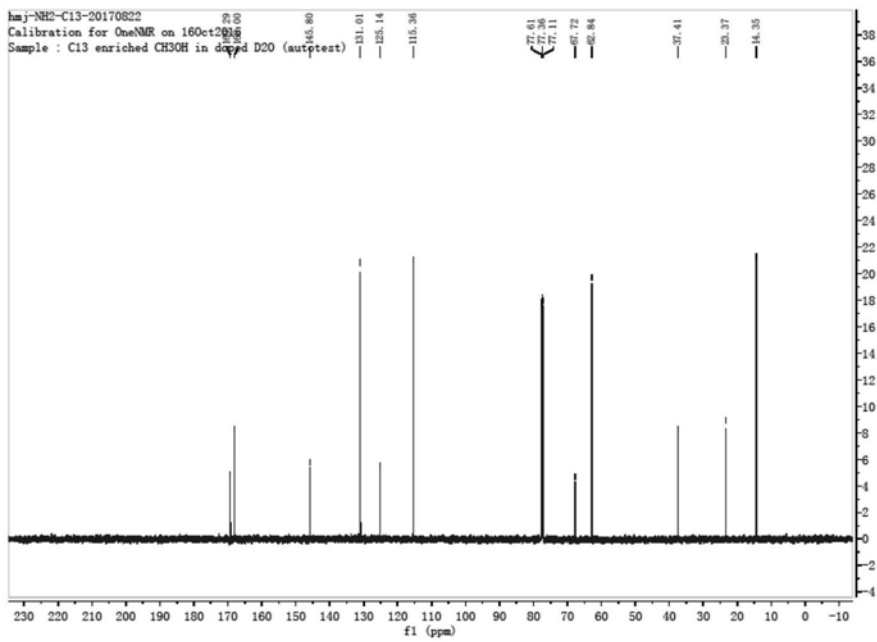


图16





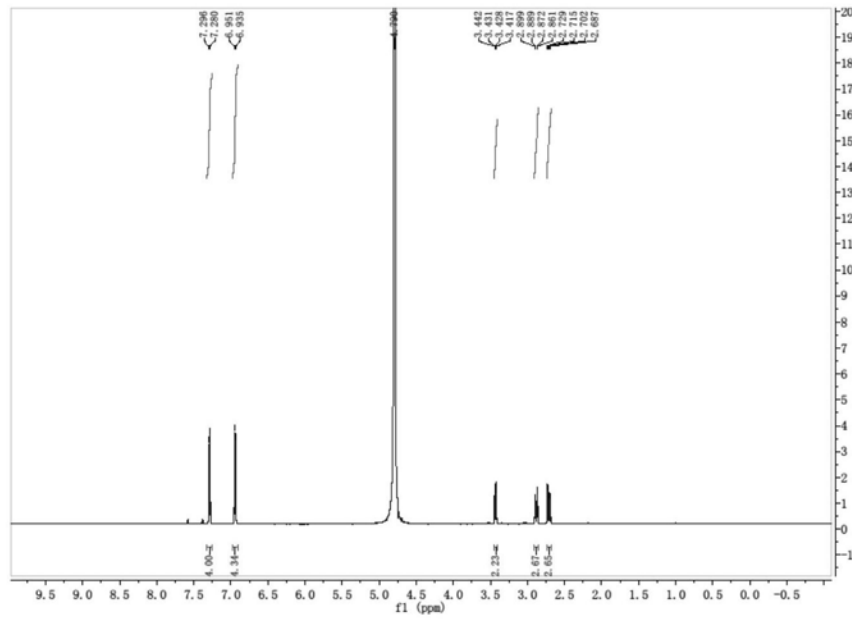


图19

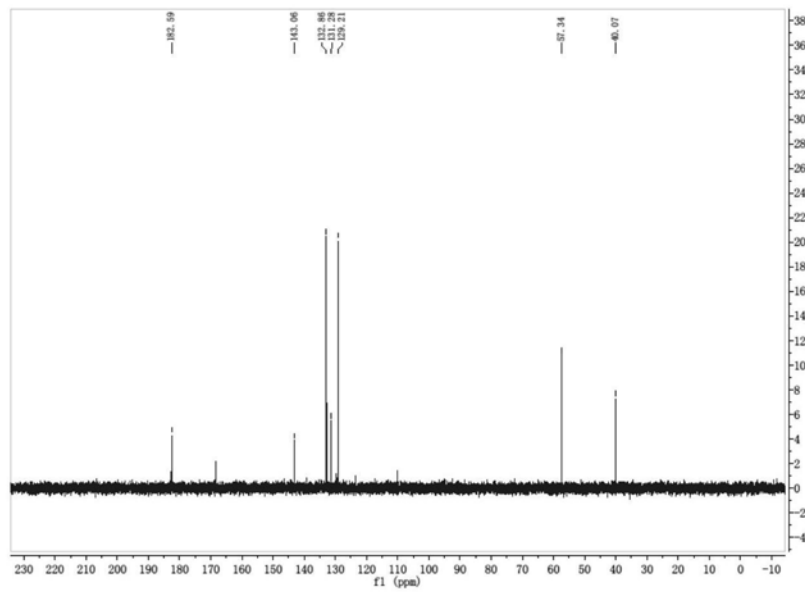


图20

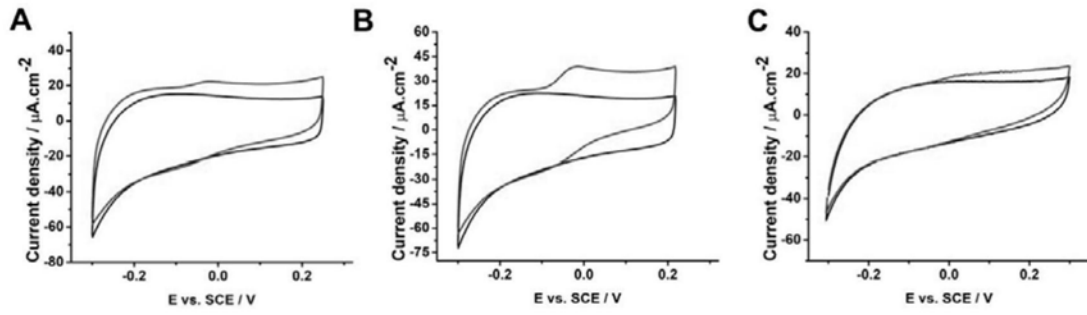


图21

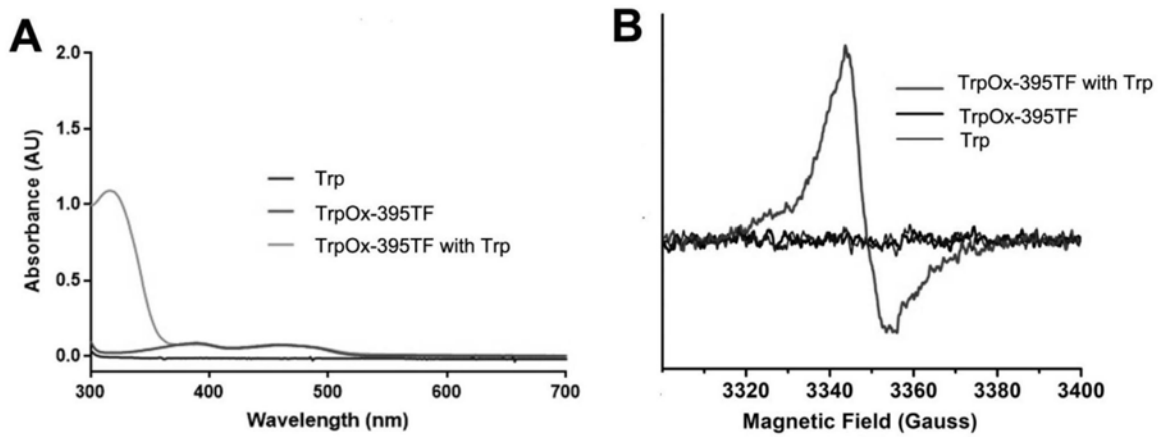


图22

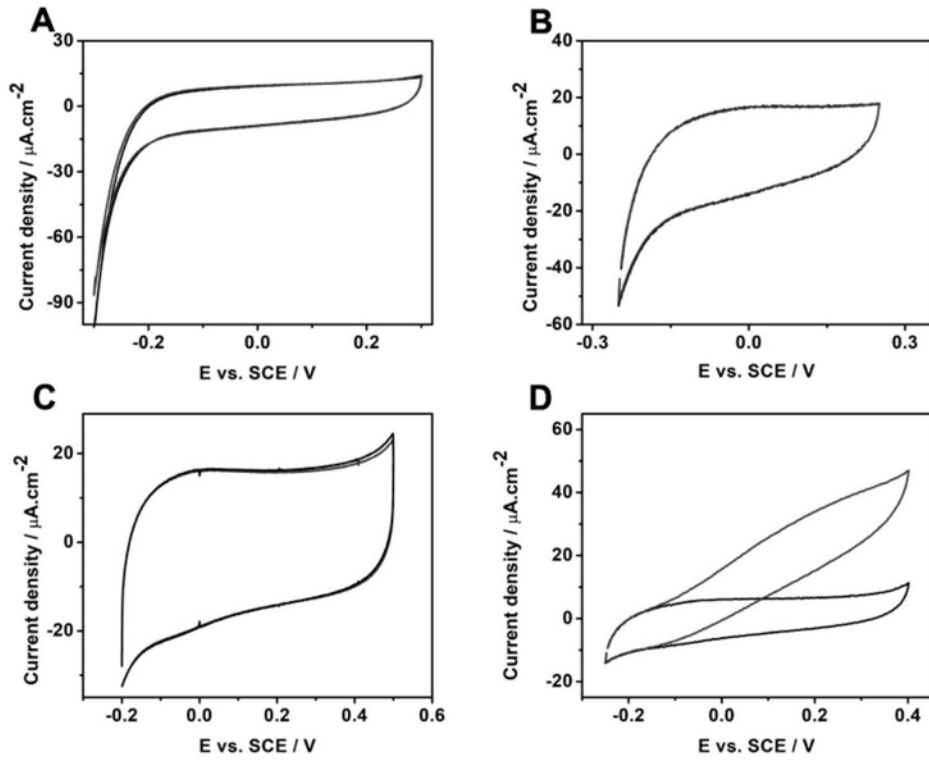


图23