(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118475593 A
(43)申请公布日 2024.08.09

(21)申请号 202280083899.0
(22)申请日 2022.12.22
(30)优先权数据
2118939.4 2021.12.23 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/087410 2022.12.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/118404 EN 2023.06.29
(71)申请人 牛津纳米孔科技公开有限公司
地址 英国牛津
(72)发明人 伊丽莎白·杰恩·华莱士
迈克尔·罗伯特·乔丹
瓦尔德马尔·阿克肖诺夫
(74)专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112
专利代理师 麦善勇 张天舒
(51)Int.Cl.
C07K 14/195(2006.01)
C12Q 1/00(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)

权利要求书5页 说明书56页
序列表（电子公布） 附图112页

(54)发明名称

孔

(57)摘要

本发明涉及新的红球菌孔蛋白单体和包含所述单体的孔,以及使用所述孔表征分析物诸如多肽和多核苷酸的方法。

CN 118475593 A

1.一种突变体红球菌孔,其包含单体,所述单体是SEQ ID NO:2中所示的序列的变体,其中所述变体在以下位置中的一者或多者处包含一个或多个突变:

(a)D11、G12、G13、G14、N15、T52、G53、P54、D55、A56、E57、D58、F59、S60、G61、T62、T64、Y67、Q68、V69、Y71、P119、G120、I121、E122、T123、V124、E125、V126、S128、A130、A131、S132、G133、A134、H135、L143、H144、T146、T148、K149、Y159、Q161、V163、S164、D165、N166、G167、D168、V169和T171;

(b)S74、G76、E78、T80、D82、T84、Q108、G110、G112、T114、E116和P117;

和/或

(c)G87、E89、G91、S93、S94、A95、G96、A97、S99、T101、S103和D104;

其中所述一个或多个突变改变所述单体与靶分析物相互作用的能力。

2.根据权利要求1所述的突变体孔,其中所述变体在(a),(b),(c),(a)和(b),(b)和(c),(a)和(c),或者(a)、(b)和(c)中的位置中的一者或多者处包含一个或多个突变。

3.根据权利要求1或2所述的突变体孔,其中所述变体至少在以下位置处包含一个或多个突变:

E78/D82/E89、

E78/D82/E89/E116/E125/D165、

E57/E78/D82/E89/E116/E125/D165、

D55/E57/D58/E78/D82/E89/E116/E125/D165、

E78/D82/E89/D104/E116/E122/E125/D165、

D55/E57/D58/E78/D82/E89/D104/E116/E122/E125/D165、

E57/E78/D82/E89/D104/E116/E122/E125/D165、

E78/D82/E89/T101/E116/E125/D165、

E78/D82/G87/E89/E116/E125/D165、

E78/D82/E89/G91/I92/E116/E125/D165、

E78/D82/E89/I92/E116/E125/D165、

E78/D82/E89/S99/E116/E125/D165、

E78/D82/E89/S103/E116/E125/D165、

E78/D82/E89/D104/E116/E125/D165、

E78/D82/E89/E116/E122/E125/D165、

E78/D82/E89/G91/I92/E116/E125/D165或

E78/D82/E89/E116/E125/D165。

4.根据前述权利要求中任一项所述的突变体孔,其中所述一个或多个突变各自独立地(a)改变经修饰位置处的氨基酸残基的大小;(b)改变经修饰位置处的氨基酸残基的净电荷;(c)改变经修饰位置处的氨基酸残基的氢键特征;(d)向经修饰位置处的氨基酸残基引入或从其去除通过离域电子pi系统相互作用的一个或多个化学基团,和/或(e)改变经修饰位置处的氨基酸残基的结构。

5.根据前述权利要求中任一项所述的突变体孔,其中所述一个或多个突变是一个或多个取代。

6.根据前述权利要求中任一项所述的突变体孔,其中所述一个或多个突变选自:

D至Q、S或Y,更优选地D至S,

G至S、N、Q、T或A,更优选地G至S或N,

N至S、Q、L、Y、M、I、V或G,

T至V、S、N、Q、R、F或I,更优选地T至V、S、N、Q或R,

P至S,

A至R、V、D、N、S或T,

E至S、N、T、A、R、G、V、L、I、F、Q或K,

F至R、K、S、T、N、Q、G、A、V、L、I、P、C、Y或W,

S至N或C,更优选地S至N,

Y至R、K、S、T、N、Q、G、A、V、L、I、P、C、D、E、F或W,

Q至R,

V至I,

I至G、L、S、F、V、A、P、W、Q、N、C、S、Y、K或T,更优选地I至N,

E至R,

H至F、N、Q或A,

L至N、S、Y、V、Q、T、R、A、G、C、F或D,以及

K至R、S、T、N、Q、G、A、V、L、I、P、C、D、E、F、Y或W。

7.根据前述权利要求中任一项所述的突变体孔,其中所述变体至少包含以下突变:

E78S/D82S/E89N、

E78S/D82S/E89N/E116T/E125A/D165S、

E78S/D82S/E89R、

E78R/D82S/E89R、

E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S、

E57R/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S、

D55S/E57S/D58S/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S、

D55S/E57S/D58S/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S、E57R/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S、E78R/D82S/E89G/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89A/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89V/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89L/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89I/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89F/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89S/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89T/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89Q/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89K/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89R/T101V/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89R/T101S/E116T/E125A/D165S、

E78R/D82S/E89R/T101N/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89R/T101Q/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89R/T101R/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89N/T101V/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89N/T101S/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89N/T101N/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89N/T101Q/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89N/T101R/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/G87S/E89R/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89R/G91S/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89R/G91N/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89R/G91N/I92N/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89R/I92N/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89R/S99N/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89R/S103N/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E125A/D165S、
E78R/D82S/E89R/E116T/E122S/E125A/D165S、
E78G/D82S/E89L/G91N/I92N/E116G/E125A/D165S或
E78G/D82S/E89L/E116G/E125A/D165S。

8.一种突变体红球菌孔,其包含单体,所述单体是SEQ ID NO:6中所示的序列的变体,其中所述变体包含SEQ ID NO:6的位置9与200之间的一个或多个突变,并且其中所述一个或多个突变改变所述孔与靶分析物相互作用的能力。

9.根据前述权利要求中任一项所述的突变体孔,其中所述变体与SEQ ID NO:2中所示的序列具有至少70%同一性。

10.根据前述权利要求中任一项所述的突变体孔,其中所述突变体是经化学修饰的。

11.根据权利要求10所述的突变体孔,其中所述突变体通过以下方式而经化学修饰:将分子附接至一个或多个半胱氨酸、将分子附接至一个或多个赖氨酸、将分子附接至一个或多个非天然氨基酸、对表位进行酶修饰或对末端进行修饰。

12.根据权利要求11所述的突变体孔,其中所述一个或多个半胱氨酸已通过取代引入至所述突变体。

13.根据权利要求11或12所述的突变体孔,其中所述分子是(a)促进所述单体与靶分析物之间的相互作用的分子衔接子或(b)多核苷酸结合蛋白。

14.一种构建体,其包含两个或更多个共价附接的红球菌孔蛋白单体。

15.根据权利要求14所述的构建体,其中所述单体中的至少一者是如权利要求1至13中任一项所定义的变体。

16.根据权利要求14或15所述的构建体,其中所述单体是经由接头基因融合的和/或附接的。

17.一种多核苷酸,其编码根据权利要求1至13中任一项所述的突变体孔或根据权利要求14至16中任一项所述的构建体。

18.一种孔,其包含至少一个根据权利要求14至16中任一项所述的构建体。

19.一种用于表征靶多核苷酸或靶多肽的试剂盒,所述试剂盒包含(a)根据权利要求1至13和18中任一项所述的孔和(b)多核苷酸结合蛋白或多肽处理酶。

20.一种用于表征样品中的靶多核苷酸或靶多肽的装置,所述装置包含(a)多个根据权利要求1至13和18中任一项所述的孔和(b)多个多核苷酸结合蛋白或多个多肽处理酶。

21.一种膜,其包含根据权利要求1至13和18中任一项所述的孔。

22.一种阵列,其包含多个根据权利要求21所述的膜。

23.一种系统,其包括(a)根据权利要求21所述的膜或根据权利要求22所述的阵列,(b)用于跨所述膜施加电势的工具,以及(c)用于检测跨所述膜的电信号或光信号的工具。

24.一种确定靶分析物的存在、不存在或一种或多种特征的方法,所述方法包括(a)使所述靶分析物与根据权利要求1至13和18中任一项所述的孔接触,以及(b)当所述靶分析物相对于所述孔移动时进行一次或多次测量,并且从而确定所述靶分析物的所述存在、不存在或一种或多种特征。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述靶分析物是或包括多肽、多核苷酸或多糖。

26.根据权利要求24或25所述的方法,其中所述靶分析物包括多核苷酸,并且所述方法包括(i)使所述多核苷酸与能够控制所述多核苷酸相对于所述孔的移动的多核苷酸结合蛋白接触;以及(ii)当所述多核苷酸相对于所述孔移动时,进行以所述多核苷酸为特征的一次或多次测量。

27.根据权利要求24或25所述的方法,其中所述靶分析物包括多肽,并且所述方法包括(i)使所述多肽与能够控制所述多肽相对于所述孔的移动的多肽处理酶接触;以及(ii)当所述多肽相对于所述孔移动时,进行以所述多肽为特征的一次或多次测量。

28.根据权利要求24或25所述的方法,其中所述靶分析物包括多核苷酸-多肽缀合物,并且所述方法包括(i)使所述缀合物与能够控制所述缀合物的多核苷酸相对于所述孔的移动的多核苷酸结合蛋白接触;以及(ii)当所述缀合物相对于所述孔移动时,进行以所述多肽为特征的一次或多次测量。

29.一种表征靶多核苷酸的方法,所述方法包括(a)使所述靶多核苷酸与根据权利要求1至13和18中任一项所述的孔接触,以及(b)当所述靶多核苷酸相对于所述孔移动时进行一次或多次测量,并且从而表征所述靶多核苷酸。

30.根据权利要求1至13和18中任一项所述的孔用于确定靶分析物或靶多核苷酸的存在、不存在或一种或多种特征的用途。

31.一种装置,其包含插入至体外膜中的跨膜蛋白孔,其中所述跨膜蛋白孔包含至少一个单体,所述至少一个单体是红球菌孔蛋白单体的变体并且在以下位置中的一者或多者处包含突变:

(a)D11、G12、G13、G14、N15、T52、G53、P54、D55、A56、E57、D58、F59、S60、G61、T62、T64、Y67、Q68、V69、Y71、P119、G120、I121、E122、T123、

V124、E125、V126、S128、A130、A131、S132、G133、A134、H135、L143、H144、T146、T148、K149、Y159、Q161、V163、S164、D165、N166、G167、D168、V169和T171;

(b)S74、G76、E78、T80、D82、T84、Q108、G110、G112、T114、E116和P117;

和/或

(c)G87、E89、G91、S93、S94、A95、G96、A97、S99、T101、S103和D104,其是对应于SEQ ID NO:2中所示的序列。

32.一种通过包括以下方式的方法生产的装置:

(i)获得包含至少一个红球菌孔蛋白单体的跨膜蛋白孔,其中所述单体在以下位置中的一者或多者处包含氨基酸突变

(a)D11、G12、G13、G14、N15、T52、G53、P54、D55、A56、E57、D58、F59、S60、G61、T62、T64、Y67、Q68、V69、Y71、P119、G120、I121、E122、T123、V124、E125、V126、S128、A130、A131、S132、G133、A134、H135、L143、H144、T146、T148、K149、Y159、Q161、V163、S164、D165、N166、G167、D168、V169和T171;

(b)S74、G76、E78、T80、D82、T84、Q108、G110、G112、T114、E116和P117;和/或

(c)G87、E89、G91、S93、S94、A95、G96、A97、S99、T101、S103和D104,其是对应于SEQ ID NO:2中所示的序列;以及

(ii)使所述孔与体外膜接触,使得所述孔插入在所述体外膜中。

孔

技术领域

[0001] 本发明涉及新的红球菌孔蛋白单体、包含该单体的孔以及使用该孔表征分析物诸如多核苷酸和多肽的方法。

[0002] 介绍

[0003] 纳米孔感测是一种分析物检测和表征的方法,它依赖于对分析物分子与离子传导通道之间的个体结合或相互作用事件的观察。纳米孔传感器可以通过将纳米尺寸的单个孔放置在电绝缘膜中并在分析物分子的存在下测量通过孔的电压驱动离子电流来创建。纳米孔内部或附近的分析物的存在将改变通过孔的离子流,从而导致在通道上方测量的离子或电流发生变化。分析物的同一性通过其独特的电流特征(特别是在其与孔的相互作用时间期间电流阻断的持续时间和程度以及电流水平的变化)来揭示。分析物可以是有机和无机小分子以及各种生物或合成大分子和聚合物,包括多核苷酸、多肽和多糖。纳米孔感测可以揭示被感测分析物的同一性并执行单分子计数,但也可以提供有关分析物组合物(诸如核苷酸、氨基酸或聚糖序列)的信息,以及碱基、氨基酸或聚糖修饰(诸如甲基化和酰化、磷酸化、羟基化、氧化、还原、糖基化、脱羧、脱氨基等)的存在。纳米孔感测有潜力实现快速且廉价的多核苷酸测序,提供数十至数万个碱基长度的多核苷酸的单分子序列读段。

[0004] 使用纳米孔感测进行聚合物表征的两个基本组成部分是(1)控制通过孔的聚合物移动,以及(2)当聚合物移动通过孔时辨别组成结构单元(building block)。在纳米孔感测期间,孔的最窄部分形成读取器头,这是纳米孔相对于作为通过的分析物的函数的电流特征的最具辨别力的部分。

[0005] 对于多核苷酸分析物,核苷酸辨别是经由穿过此类突变体孔来实现的,但电流特征已被证明是序列依赖性的,并且多个核苷酸对观察到的电流有贡献,因此通道缩窄的高度以及与分析物相互作用表面的范围影响观察到的电流与多核苷酸序列之间的关系。虽然用于核苷酸辨别的电流范围已通过突变得到改善,但如果可以进一步改善核苷酸之间的电流差异,测序系统将具有更高的性能。因此,需要鉴定出改进纳米孔感测特征的新方法。

[0006] 按照既定程序纯化棒状杆菌红球菌(Rhodococcus corynebacteroides)的细胞壁通道(Riess和Benz,2000,Biochim Biophys Acta,20;1509(1-2):485-495)。然后对蛋白质进行埃德曼降解和测序。然后将获得的部分序列用作BLAST搜索的输入,鉴定出名为PorARc的蛋白质。对棒状杆菌红球菌细胞壁通道PorARc的部分序列的同源物进行BLAST搜索,鉴定出来自赤红球菌(Rhodococcus ruber)的两个主要多肽序列:PorARr和PorBRr。

发明内容

[0007] 本发明涉及经修饰的红球菌孔蛋白单体和包含该单体的孔。孔蛋白单体和包含它们的孔已经过修饰,以促进对靶分析物,尤其是靶多核苷酸和多肽的表征。

[0008] 发明人已令人惊讶地证明PorARr、PorBRr和PorARc的新突变体在估计分析物(诸如多核苷酸或多肽的序列)的特征方面表现出改进的特性。突变体令人惊讶地表现出改进的多核苷酸捕获和核苷酸辨别力。特别地,突变体令人惊讶地表现出增加的电流范围,这使

得更容易辨别不同的核苷酸,以及减少的状态方差(称为“中值sd”),这增加了信噪比(称为“SNR”)。

[0009] 特别地,本发明提供:

[0010] -一种突变体红球菌孔,其包含单体,该单体是SEQ ID NO:2中所示的序列的变体,其中该变体在以下位置中的一者或多者处包含一个或多个突变:

[0011] (a)D11、G12、G13、G14、N15、T52、G53、P54、D55、A56、E57、D58、F59、S60、G61、T62、T64、Y67、Q68、V69、Y71、P119、G120、I121、E122、T123、V124、E125、V126、S128、A130、A131、S132、G133、A134、H135、L143、H144、T146、T148、K149、Y159、Q161、V163、S164、D165、N166、G167、D168、V169和T171;

[0012] (b)S74、G76、E78、T80、D82、T84、Q108、G110、G112、T114、E116和P117;和/或

[0013] (c)G87、E89、G91、S93、S94、A95、G96、A97、S99、T101、S103和D104;

[0014] 其中该一个或多个突变改变单体与靶分析物相互作用的能力;

[0015] -一种突变体红球菌孔,其包含单体,该单体是SEQ ID NO:6中所示的序列的变体,其中该变体包含SEQ ID NO:6的位置9与200之间的一个或多个突变,

[0016] 并且其中该一个或多个突变改变孔与靶分析物相互作用的能力;

[0017] -一种构建体,其包含两个或更多个共价附接的红球菌孔蛋白单体;

[0018] -一种编码本发明的突变体孔或本发明的构建体的多核苷酸;

[0019] -一种包含至少一个本发明的构建体的孔;

[0020] -一种用于表征靶多核苷酸或靶多肽的试剂盒,该试剂盒包含(a)本发明的孔和(b)多核苷酸结合蛋白或多肽处理酶;

[0021] -一种用于表征样品中的靶多核苷酸或靶多肽的装置,所述装置包含(a)多个本发明的孔和(b)多个多核苷酸结合蛋白或多个多肽处理酶;

[0022] -一种包含本发明的孔的膜;

[0023] -一种包含多个本发明的膜的阵列;

[0024] -一种系统,其包括(a)本发明的膜或本发明的阵列,(b)用于跨膜施加电势的工具,以及(c)用于检测跨膜的电信号或光信号的工具;

[0025] -一种确定靶分析物的存在、不存在或一种或多种特征的方法,该方法包括(a)使靶分析物与本发明的孔接触,以及(b)当靶分析物相对于孔移动时进行一次或多次测量,并且从而确定靶分析物的存在、不存在或一种或多种特征;

[0026] -一种表征靶多核苷酸的方法,该方法包括(a)使靶多核苷酸与本发明的孔接触,以及(b)当靶多核苷酸相对于孔移动时进行一次或多次测量,并且从而表征靶多核苷酸;

[0027] -本发明的孔用于确定靶分析物或靶多核苷酸的存在、不存在或一种或多种特征的用途;

[0028] -一种装置,其包含插入至体外膜中的跨膜蛋白孔,其中该跨膜蛋白孔包含至少一个单体,该至少一个单体是红球菌孔蛋白单体的变体并且在以下位置中的一者或多者处包含突变:

[0029] (a)D11、G12、G13、G14、N15、T52、G53、P54、D55、A56、E57、D58、F59、S60、G61、T62、T64、Y67、Q68、V69、Y71、P119、G120、I121、E122、T123、V124、E125、V126、S128、A130、A131、S132、G133、A134、H135、L143、H144、T146、T148、K149、Y159、Q161、V163、S164、D165、N166、

G167、D168、V169和T171;

[0030] (b)S74、G76、E78、T80、D82、T84、Q108、G110、G112、T114、E116和P117;和/或

[0031] (c)G87、E89、G91、S93、S94、A95、G96、A97、S99、T101、S103和D104,其是对应于SEQ ID NO:2中所示的序列;以及

[0032] -一种通过包括以下方式的方法生产的装置:

[0033] (i)获得包含至少一个红球菌孔蛋白单体的跨膜蛋白孔,其中该单体在以下位置中的一者或多者处包含氨基酸突变

[0034] (a)D11、G12、G13、G14、N15、T52、G53、P54、D55、A56、E57、D58、F59、S60、G61、T62、T64、Y67、Q68、V69、Y71、P119、G120、I121、E122、T123、V124、E125、V126、S128、A130、A131、S132、G133、A134、H135、L143、H144、T146、T148、K149、Y159、Q161、V163、S164、D165、N166、G167、D168、V169和T171;

[0035] (b)S74、G76、E78、T80、D82、T84、Q108、G110、G112、T114、E116和P117;和/或

[0036] (c)G87、E89、G91、S93、S94、A95、G96、A97、S99、T101、S103和D104,其是对应于SEQ ID NO:2中所示的序列;以及

[0037] (ii)使孔与体外膜接触,使得孔插入在体外膜中。

附图说明

[0038] 图1示出了PorARc野生型(WT)和PorARc突变体E78S/D82S/E89N和E78S/D82S/E89N/E116T/E125A/D165S的数据。

[0039] 图2示出了PorARc突变体E78S/D82S/E89R、E78R/D82S/E89R和E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S的数据。

[0040] 图3示出了PorARc突变体E57R/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S、D55S/E57S/D58S/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S的数据。

[0041] 图4示出了PorARc突变体D55S/E57S/D58S/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S和E57R/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S的数据。

[0042] 图5示出了PorARc突变体E78R/D82S/E89G/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89A/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89V/E116T/E125A/D165S的数据。

[0043] 图6示出了PorARc突变体E78R/D82S/E89L/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89I/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89F/E116T/E125A/D165S的数据。

[0044] 图7示出了PorARc突变体E78R/D82S/E89S/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89T/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89Q/E116T/E125A/D165S的数据。

[0045] 图8示出了PorARc突变体E78R/D82S/E89K/E116T/E125A/D165S的数据。

[0046] 图9示出了PorARc突变体E78R/D82S/E89R/T101V/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/T101S/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89R/T101N/E116T/E125A/D165S的数据。

[0047] 图10示出了PorARc突变体E78R/D82S/E89R/T101Q/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89R/T101R/E116T/E125A/D165S的数据。

[0048] 图11示出了PorARc突变体E78R/D82S/E89N/T101V/E116T/E125A/D165S、E78R/

D82S/E89N/T101S/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89N/T101N/E116T/E125A/D165S的数据。

[0049] 图12示出了PorARc突变体E78R/D82S/E89N/T101Q/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89N/T101R/E116T/E125A/D165S的数据。

[0050] 图13示出了PorARc突变体E78R/D82S/G87S/E89R/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/G91S/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89R/G91N/E116T/E125A/D165S的数据。

[0051] 图14示出了PorARc突变体E78R/D82S/E89R/G91N/I92N/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/I92N/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89R/S99N/E116T/E125A/D165S的数据。

[0052] 图15示出了PorARc突变体E78R/D82S/E89R/S103N/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E125A/D165S和E78R/D82S/E89R/E116T/E122S/E125A/D165S的数据。

[0053] 图16示出了PorARc突变体E78G/D82S/E89L/G91N/I92N/E116G/E125A/D165S和E78G/D82S/E89L/E116G/E125A/D165S的数据。

[0054] 图17示出了PorARr突变体E182R/E184R、E89N/E91N和E89N/E91N/E168R/E182R/E184R的数据。

[0055] 图18示出了PorARr突变体E89N/E91N/E96R/E99N/E113N/E123N/D130N/E182R/E184R和E89N/E91N/E96R/E99R/E113K/E123K/D130K/E182R/E184R的数据。

[0056] 图19示出了PorBRr野生型(WT)和PorBRr突变体E90N和E92N的数据。

[0057] 图20示出了PorBRr突变体E90N/E92N、E90N/E92N/E115R/E131R和E90N/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R的数据。

[0058] 图1至20中的每一者示出:

[0059] a)当DNA易位通过孔时离子电流与时间的关系的快照,其中x轴跨越整个实验运行时间(通常为6小时)。

[0060] b)在添加分析物之前施加-180mV的所施加电势时,来自流动池中每个通道的电流的直方图。

[0061] c)当DNA易位通过孔时离子电流与时间的关系的放大快照。请注意,y轴范围跨越150pA,以便于孔突变体之间的比较,且x轴通常多于2秒。

[0062] d)当DNA易位通过孔时离子电流与时间的关系的放大快照。请注意,y轴范围跨越150pA,以便于孔突变体之间的比较,且x轴通常小过2秒。

[0063] 图21示出了当DNA易位通过孔时来自PorARr、PorBRr和PorARc野生型孔及其突变体的链指标。SNR=当前范围除以当前事件的噪声,范围=当前范围,中值sd=当前事件的噪声,且中值电流=当DNA易位通过孔时的中值电流。

[0064] 图22示出了当DNA易位通过孔时来自PorBRr突变体的链指标。SNR=当前范围除以当前事件的噪声,范围=当前范围,中值sd=当前事件的噪声,且归一化MAD电流=当DNA易位通过孔时信号内电流水平的中值绝对偏差并通过除以当DNA易位通过孔时链的电流范围进行归一化。

[0065] 序列表中的序列

[0066] SEQ ID NO:1显示编码PorARc的多核苷酸序列。

[0067] SEQ ID NO:2显示PorARc的氨基酸序列。

[0068] SEQ ID NO:3显示编码PorARr的多核苷酸序列。

[0069] SEQ ID NO:4显示PorARr的氨基酸序列。

[0070] SEQ ID NO:5显示编码PorBRr的多核苷酸序列。

[0071] SEQ ID NO:6显示PorBRr的氨基酸序列。

具体实施方式

[0072] 将关于特定实施例并参考某些附图来描述本发明,但本发明不限于此而仅受权利要求书的限制。权利要求书中的任何附图标记不应被解释为限制范围。当然,应当理解,不一定可以根据本发明的任何特定实施例来实现所有方面或优点。因此,例如,本领域技术人员将认识到,本发明可以实现或优化本文所教导的一个优点或一组优点而不必实现本文可以教导或建议的其它方面或优点的方式来实施或进行。

[0073] 当结合附图阅读时,参考以下详细描述可以最好地理解本发明的关于组织和操作方法两者及其特征和优点。参考下文描述的实施例,本发明的方面和优点将变得显而易见并得到阐明。在整个说明书中对“一个实施例”或“实施例”的提及意指结合该实施例描述的特定特点、结构或特征被包括在本发明的至少一个实施例中。因此,在整个说明书的各个地方出现的短语“在一个实施例中”或“在实施例中”不一定都指相同的实施例,而是可以指相同的实施例。类似地,应当理解,在本发明的示例性实施例的描述中,出于简化公开内容和帮助理解一个或多个各种发明方面的目的,本发明的各种特征有时被组合在单个实施例、附图或其描述中。然而,本公开方法不应被解释为反映了所要求保护的发明需要比每项权利要求中明确列举的特征更多的特征的意图。相反,如所附权利要求书所反映的,创造性方面在于少于单个前述公开的实施例的所有特征。

[0074] 另外,如在本说明书和所附权利要求书中所使用的,除非内容另外明确指出,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包含复数指代物。因此,例如,提及“多核苷酸”包括两个或更多个多核苷酸,提及“多核苷酸结合蛋白”包括两个或更多个此类蛋白质,提及“解旋酶”包括两个或更多个解旋酶,提及“单体”是指两个或更多个单体,提及“孔”包括两个或更多个孔等。

[0075] 在本文的所有讨论中,使用氨基酸的标准单字母代码。它们如下:丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、半胱氨酸(C)、谷氨酸(E)、谷氨酰胺(Q)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、甲硫氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。还使用标准取代符号,即E78S意指78位的E被S替换。

[0076] 在本文中特定位置处的不同氨基酸由/符号分隔的段落中,/符号意指“或”。例如,E89A/V意指E89A或E89V。

[0077] 在本文中不同位置或取代由/符号分隔的段落中,/符号意指“和”,使得E89A/E116T是E89A和E116T。

[0078] 除非相反说明,否则本文所公开的所有氨基酸取代、缺失和/或添加均涉及包含SEQ ID NO:2、4或6中所示序列的变体的突变体单体。

[0079] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请,无论上文还是下文,均特此通过引用整体并入。本说明书中所提到的所有公开、专利和专利申请均通过相同的程度引用结合在此,如同特定且单独地指示每个单独的公开、专利或专利申请是通过引用并入的。在通过引用并入的出版物和专利或专利申请与说明书中包含的公开内容相矛盾的程度下,说明书旨在取代和/或优先于任何此类矛盾的材料。

[0080] 定义

[0081] 当提及单数名词时使用不定冠词或定冠词时,例如“一(a)”或“一个(an)”、“该(the)”,这包括该名词的复数,除非另有特别说明。当本说明书和权利要求书中使用术语“包含/包括(comprising)”时,其不排除其他元素或步骤。此外,说明书和权利要求书中的术语第一、第二、第三等用于区分相似的元素,而不一定用于描述顺序或时间次序。应当理解,如此使用的术语在适当情况下是可互换的,并且本文所描述的本发明的实施例能够以不同于本文描述或说明的其它顺序操作。提供以下术语或定义仅是为了帮助理解本发明。除非本文具体定义,否则本文使用的所有术语具有与本发明领域技术人员所理解的相同的含义。从业者特别要参考Sambrook等人,Molecular Cloning:ALaboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Press,Plainsview,New York(2012);以及Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(增刊114),John Wiley&Sons,New York(2016),以了解本领域的定义和术语。本文提供的定义不应被解释为具有小于本领域普通技术人员所理解的范围。

[0082] 当涉及可测量值诸如量、持续时间等时,如本文所用的“约”意指涵盖从指定值的±20%或±10%、更优选±5%、甚至更优选±1%,且还更优选±0.1%的变化,因为此类变化适合于执行所公开的方法。

[0083] 如本文所用的“多核苷酸”、“核苷酸序列”、“DNA序列”或“核酸分子”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合形式。该术语仅指分子的一级结构。因此,该术语包括双链和单链DNA以及RNA。如本文所用的术语“核酸”是单链或双链共价连接的核苷酸序列,在该核苷酸序列中每个核苷酸上的3’和5’端通过磷酸二酯键连接。多核苷酸可以由脱氧核糖核苷酸碱基或核糖核苷酸碱基组成。核酸可以在体外合成制造或从天然来源分离。核酸可以进一步包括经修饰的DNA或RNA,例如已甲基化的DNA或RNA,或已进行翻译后修饰的RNA,例如用7-甲基鸟苷进行5’-加帽、3’-加工诸如切割以及聚腺苷酸化和剪接。核酸还可以包括合成核酸(XNA),诸如己糖醇核酸(HNA)、环己烯核酸(CeNA)、苏糖核酸(TNA)、甘油核酸(GNA)、锁核酸(LNA)和肽核酸(PNA)。核酸(本文也称为“多核苷酸”)的大小对于双链多核苷酸通常表示为碱基对(bp)的数目,或者在单链多核苷酸的情况下表示为核苷酸(nt)的数目。一千bp或nt等于千碱基(kb)。长度小于约40个核苷酸的多核苷酸通常被称为“寡核苷酸”并且可以包含用于操作DNA(诸如经由聚合酶链式反应(PCR))的引物。

[0084] 如此处所用的“基因”包括基因的启动子区域以及编码序列两者。它既指基因组序列(包括可能的内含子),也指源自剪接信使的、与启动子序列可操作地连接的cDNA。

[0085] “编码序列”是核苷酸序列,当置于适当的调控序列的控制下时,其转录成mRNA和/或翻译成多肽。编码序列的边界由5’末端处的翻译起始密码子和3’末端处的翻译终止密码子确定。编码序列可以包括但不限于mRNA、cDNA、重组核苷酸序列或基因组DNA,而在某些情况下也可以存在内含子。

[0086] 在本公开的上下文中,术语“氨基酸”以其最广泛的含义使用,并且意指包括含有胺(NH_2)和羧基(COOH)官能团以及特定于每种氨基酸的侧链(例如,R基团)的有机化合物。在一些实施例中,氨基酸是指天然存在的Lα-氨基酸或残基。本文使用天然存在的氨基酸的常用一字母和三字母缩写:A=Ala;C=Cys;D=Asp;E=Glu;F=Phe;G=Gly;H=His;I=Ile;K=Lys;L=Leu;M=Met;N=Asn;P=Pro;Q=Gln;R=Arg;S=Ser;T=Thr;V=Val;W=Trp;以及Y=Tyr(Lehninger,A.L.,(1975)Biochemistry,第2版,第71-92页,Worth Publishers,New York)。通用术语“氨基酸”进一步包括D-氨基酸、逆转录氨基酸以及经化学修饰的氨基酸诸如氨基酸类似物、通常不掺入蛋白质中的天然存在的氨基酸诸如正亮氨酸、以及具有本领域已知的氨基酸特征的特性的化学合成的化合物,诸如β-氨基酸。例如,苯丙氨酸或脯氨酸的类似物或模拟物,其允许与天然Phe或Pro相同的肽化合物的构象限制,包括在氨基酸的定义内。此类类似物和模拟物在本文中被称为相应氨基酸的“功能等同物”。氨基酸的其他实例由以下文献列出:Roberts和Vellaccio,The Peptides:Analysis,Synthesis,Biology,Gross和Meiehofer编辑,第5卷第341页,Academic Press,Inc.,N.Y.1983,其通过引用并入本文。

[0087] 术语“多肽”和“肽”在本文中进一步互换使用,是指氨基酸残基的聚合物以及其变体和合成类似物。因此,这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是合成的非天然存在的氨基酸(诸如对应的天然存在的氨基酸的化学类似物)的氨基酸聚合物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。多肽还可以经历成熟或翻译后修饰过程,其可包括但不限于糖基化、蛋白水解切割、脂化、信号肽切割、前肽切割、磷酸化等。“重组多肽”意指使用重组技术,例如通过重组或合成多核苷酸的表达制备的多肽。当重组产生嵌合多肽或其生物活性部分时,其还优选地基本上不含培养基,例如,培养基代表小于约20%,更优选小于约10%,且最优选小于约5%的蛋白质制剂的体积。“分离的”意指基本上或本质上不含在其天然状态下通常伴随其的组分的材料。例如,如本文所用的“分离的多肽”是指已经从天然存在状态下侧接其的分子中纯化的多肽,例如,已经从与所述多肽相邻的生产宿主中存在的分子中除去的红球菌孔蛋白单体。分离的肽可以通过氨基酸化学合成产生或者可以通过重组生产产生。分离的孔可以在孔的组分纯化后通过体外重建来产生,或者可以通过重组共表达来产生。

[0088] 术语“蛋白质”用于描述具有二级或三级结构的折叠多肽。蛋白质可以由单一多肽组成或可包含组装形成多聚体的多个多肽。多聚体可以是同源寡聚体或异源寡聚体。蛋白质可以是天然存在的或野生型蛋白质,或者经修饰的或非天然存在的蛋白质。例如,蛋白质可以通过添加、取代或缺失一个或多个氨基酸而与野生型蛋白质不同。

[0089] “直系同源物”和“旁系同源物”涵盖用于描述基因的祖先关系的进化概念。旁系同源物是已通过祖先基因的复制而起源的同一物种内的基因;直系同源物是来自已通过物种形成而起源的不同生物体的基因,并且也源自共同的祖先基因。

[0090] 蛋白质的“变体”、“同源物(Homologue和Homologues)”涵盖以下的肽、寡肽、多肽、蛋白质和酶:相对于所讨论的未经修饰或野生型蛋白质具有氨基酸取代、缺失和/或插入并且具有与从其衍生的未经修饰蛋白质相似的生物和功能活性。如本文所用的术语“氨基酸同一性”是指序列在比较窗口内逐个氨基酸基础上相同的程度。因此,“序列同一性百分比”通过以下来计算:在比较窗口内比较两个经过最佳比对的序列,确定相同的氨基酸残基(例

如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)出现在这两个序列中的位置的数量以产生匹配位置的数量,用匹配位置的数量除以比较窗口中的位置的总数(即,窗口大小),以及将结果乘以100以产生序列同一性百分比。

[0091] 术语"跨膜蛋白孔"定义为包含多个孔单体的孔。每个单体可以是野生型单体或其变体。变体单体也可称为经修饰的单体或突变体单体。变体中的修饰或突变包括但不限于本文公开的修饰中的任一者或多者、或者所述修饰的组合。

[0092] 术语"红球菌孔"定义为包含多个PorARr、PorBRr或PorARc单体的孔。每个PorARr、PorBRr或PorARc单体可以是野生型单体(SEQ ID NO:2、4或6)、PorARr、PorBRr或PorARc的野生型同源物、或者其任何变体(例如,SEQ ID NO:2、4或6中的任一者的变体)。变体PorARr、PorBRr或PorARc单体也可称为经修饰的PorARr、PorBRr或PorARc单体或者突变体PorARr、PorBRr或PorARc单体。变体中的修饰或突变包括但不限于本文公开的修饰中的任一者或多者、或者所述修饰的组合。

[0093] 对于本发明的所有方面和实施例,同源物被称为与PorARr、PorBRr或PorARc具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%完整序列同一性的多肽,诸如SEQ ID NO:2、4或6中所示的序列。同样,同源多核苷酸可包含与编码野生型蛋白质的核酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%完整序列同一性的多核苷酸。例如,PorARr、PorBRr或PorARc同源多核苷酸可包含与SEQ ID NO:1、3或5中所示的PorARr、PorBRr或PorARc具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%完整序列同一性的多核苷酸。

[0094] 序列同一性还可以针对全长多核苷酸或多肽的片段或部分。因此,序列可能与全长参考序列具有仅50%的总体序列同一性,但特定区域、结构域或亚基的序列可能与参考序列共有80%、90%或高达99%的序列同一性。分别对于PorARr、PorBRr或PorARc同源物的SEQ ID NO:1、3或5的核酸序列的同源性不仅仅限于序列同一性。许多核酸序列尽管具有明显较低的序列同一性,但可以表现出彼此生物学显著的同源性。同源核酸序列被认为是在低严格条件下将彼此杂交的核酸序列(M.R.Green,J.Sambrook,2012,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第四版,第1-3册,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY)。

[0095] 术语"野生型"是指从天然存在的来源分离的基因或基因产物。野生型基因是在群体中最常观察到的基因,且因此被任意设计为该基因的"正常"或"野生型"形式。相反,术语"经修饰的"、"突变体"或"变体"是指当与野生型基因或基因产物相比时表现出序列中的修饰(例如,取代、截短或插入)、翻译后修饰和/或功能特性(例如,改变的特征)的基因或基因产物。值得注意的是,可以分离天然存在的突变体;通过当与野生型基因或基因产物相比时它们具有改变的特征这一事实来鉴定这些突变体。用于引入或取代天然存在的氨基酸的方法是本领域众所周知的。例如,通过在编码突变体单体的多核苷酸中的相关位置处用精氨酸密码子(CGT)替换甲硫氨酸密码子(ATG),可以用精氨酸(R)取代甲硫氨酸(M)。用于引入或取代非天然存在的氨基酸的方法也是本领域众所周知的。例如,可以通过在用于表达突变体单体的IVTT系统中包括合成的氨酰基-tRNA来引入非天然存在的氨基酸。可替代地,它们可以通过在大肠杆菌(E.coli)中表达突变体单体来引入,该大肠杆菌在特定氨基酸的合成(即非天然存在)类似物的存在下对于那些特定氨基酸是营养缺陷的。如果突变体单体是

使用部分肽合成产生的,则它们也可以通过裸连接产生。保守取代用具有相似化学结构、相似化学特性或相似侧链体积的其他氨基酸替换氨基酸。引入的氨基酸可以具有与它们替换的氨基酸相似的极性、亲水性、疏水性、碱性、酸性、中性或电荷。可替代地,保守取代可引入另一种芳香族或脂肪族氨基酸来代替预先存在的芳香族或脂肪族氨基酸。保守氨基酸改变是本领域众所周知的并且可以根据如下表1中定义的20种主要氨基酸的特性来选择。当氨基酸具有相似的极性时,也可以通过参考表2中氨基酸侧链的亲水等级来确定它。

[0096] 表1-氨基酸的化学特性

[0097]

Ala	脂肪族，疏水性，中性	Met	疏水性，中性
Cys	极性，疏水性，中性	Asn	极性，亲水性，中性
Asp	极性，亲水性，带电荷(-)	Pro	疏水性，中性
Glu	极性，亲水性，带电荷(-)	Gln	极性，亲水性，中性
Phe	芳香族，疏水性，中性	Arg	极性，亲水性，带电荷(+)

[0098]

Gly	脂肪族，中性	Ser	极性，亲水性，中性
His	芳香族，极性，亲水性，带电荷(+)	Thr	极性，亲水性，中性
Ile	脂肪族，疏水性，中性	Val	脂肪族，疏水性，中性
Lys	极性，亲水性，带电荷(+)	Trp	芳香族，疏水性，中性
Leu	脂肪族，疏水性，中性	Tyr	芳香族，极性，疏水性

[0099] 表2-亲水性量表

[0100]

侧链	亲水性
Ile	4.5
Val	4.2
Leu	3.8
Phe	2.8
Cys	2.5
Met	1.9
Ala	1.8
Gly	-0.4
Thr	-0.7
Ser	-0.8
Trp	-0.9
Tyr	-1.3
Pro	-1.6
His	-3.2
Glu	-3.5
Gln	-3.5
Asp	-3.5
Asn	-3.5
Lys	-3.9
Arg	-4.5

[0101] 突变体或经修饰的蛋白质、单体或肽也可以以任何方式并在任何位点进行化学修饰。突变体或经修饰的单体或肽优选通过以下方式而经化学修饰:将分子附接至一个或多个半胱氨酸(半胱氨酸连接)、将分子附接至一个或多个赖氨酸、将分子附接至一个或多个非天然氨基酸、对表位进行酶修饰或对末端进行修饰。用于进行此类修饰的合适方法是本领域众所周知的。经修饰的蛋白质、单体或肽的突变体可以通过附接任何分子进行化学修饰。例如,经修饰的蛋白质、单体或肽的突变体可以通过附接染料或荧光团进行化学修饰。

[0102] 蛋白质还可以是融合蛋白,特别是指例如通过重组DNA技术制造的基因融合。如本文所用,蛋白质也可以被缀合,或“缀合至”,其特别是指产生稳定的共价连接的化学和/或酶促缀合。例如,多聚体辅助蛋白和/或纳米孔的多肽亚基中的两者、更多者或全部可以融合,和/或辅助蛋白的多肽亚基可以与纳米孔的单体融合。

[0103] 当几个多肽或蛋白质单体彼此结合或相互作用时,蛋白质可以形成蛋白质复合物。“结合”意指任何相互作用,无论是直接的还是间接的。直接相互作用意味着结合配偶体

之间的接触,例如通过共价连接或偶联。间接相互作用意指其中相互作用配偶体在多于两种化合物的复合物中相互作用的任何相互作用。该相互作用可以是完全间接的(借助一种或多种桥接分子),也可以是部分间接的(其中配偶体之间仍然存在直接接触,该直接接触通过一种或多种化合物的另外的相互作用而稳定)。本公开中提到的"复合物"被定义为一组两个或更多个相关的蛋白质,它们可能具有不同的功能。蛋白质复合物的不同多肽之间的缔合可以经由非共价相互作用,诸如疏水力或离子力,或者也可以是共价结合或偶联,诸如二硫桥或肽键。共价"结合"或"偶联"在本文中可互换使用,并且还可以涉及"半胱氨酸偶联"或"反应性或光反应性氨基酸偶联",分别指半胱氨酸之间或(光)反应性氨基酸之间的生物缀合,该生物缀合是形成稳定的复合物的化学共价连接。光反应性氨基酸的实例包括叠氮高丙氨酸、高炔丙基甘氨酸、高丙酰甘氨酸、对乙酰基-Phe、对叠氮基-Phe、对炔丙基氧基-Phe和对苯甲酰基-Phe(Wang等人2012,in Protein Engineering,DOI:10.5772/28719;Chin等人2002,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 99(17);11020-24)。

[0104] "跨膜蛋白孔"或"生物孔"是限定允许分子和离子从膜的一侧易位至另一侧的通道或孔的跨膜蛋白结构。离子物质通过孔的易位可以由施加到孔的任一侧的电势差驱动。"纳米孔"是其中分子或离子通过的通道的最小直径为纳米量级(10^{-9}米)的孔。最小直径是缩窄最窄点处的直径。跨膜蛋白孔本质上可以是单体的或寡聚的。通常,孔包含围绕中心轴排列的多个多肽亚基,从而形成基本上垂直于其中纳米孔所在膜延伸的蛋白质衬里通道。多肽亚基的数量不受限制。通常,亚基的数量为5至最多30,适当地,亚基的数量为6至10。可替代地,亚基的数量不像产气荚膜溶血素或相关的大膜孔的情况那样定义。纳米孔内形成蛋白质排列通道的蛋白质亚基的部分通常包含二级结构基序,其可包括一个或多个跨膜β-桶和/或α-螺旋部分。

[0105] 本公开的单体、孔或跨膜蛋白孔适合于分析物表征,尤其是多肽或多核苷酸的表征。在一些实施例中,本文描述的单体、孔或跨膜蛋白孔可以用于对多核苷酸序列进行测序,例如,因为它可以以高灵敏度辨别不同的核苷酸。在一些实施例中,本文描述的单体、孔或跨膜蛋白孔可以用于对多肽序列进行测序,例如,因为它可以以高灵敏度辨别不同的氨基酸。本公开的单体、孔或跨膜蛋白孔可以是分离的、基本上分离的、纯化的或基本上纯化的。如果本公开的单体、孔或跨膜蛋白孔完全不含任何其他组分(诸如脂质和/或其他孔,或在其天然状态下通常与其相关的其他蛋白质),或者如果它是从膜室中充分富集的,则该单体、孔或跨膜蛋白孔是"分离的"或纯化的。如果单体、孔或跨膜蛋白孔与不会干扰其预期用途的载体或稀释剂混合,则该单体、孔或跨膜蛋白孔基本上是分离的。例如,如果单体、孔或跨膜蛋白孔以包含小于10%、小于5%、小于2%或小于1%的其他组分(诸如三嵌段共聚物、脂质或其他孔)的形式存在,则该单体、孔或跨膜蛋白孔是基本上分离的或基本上纯化的。可替代地,当存在于膜中时,本公开的单体、孔或跨膜蛋白孔可以是跨膜孔。

[0106] 本文可互换使用的"缩窄"、"孔口"、"缩窄区域"、"通道缩窄"、"缩窄位点"或"读取器头"是指由孔的内腔表面限定的孔径,该孔径作用是允许离子和靶分子(例如,但不限于氨基酸、多肽、多核苷酸或单个核苷酸)通过,但不允许其他非靶分子通过孔通道或由孔和辅助蛋白或肽形成的连续通道。在一些实施例中,缩窄是孔内最窄的孔径。在该实施例中,缩窄可用于限制分子通过孔。缩窄的尺寸通常是确定纳米孔适合于核酸测序应用的关键因素。如果缩窄太小,待测序的分子将无法通过。然而,为了实现对通过通道的离子流的最大

效果,缩窄不应该太大。例如,缩窄应优选不宽于靶分析物的溶剂可及的横向直径。理想地,任何缩窄的直径应尽可能接近通过的分析物的横向直径。对于核酸和核酸碱基的测序,合适的缩窄直径在纳米范围(10^{-9}米范围)内。适当地,直径应当在0.5至2.0nm、或0.5至4.0nm的范围内,通常,直径在0.7至1.2nm的范围内,诸如0.9nm(9 Å)。此类直径可能特别适合于单链核酸的测序。较大直径,诸如约1.2nm至约4nm,诸如约2nm至约4nm或约3nm至约4nm可能特别适合于双链核酸的测序。

[0107] 当两个或更多个缩窄存在并且间隔开时,每个缩窄可以同时与核酸链内的单独的核苷酸,或者同时与多肽内的单独的氨基酸相互作用或"读取"。在这种情况下,通过通道的离子流的减少将是所有含有核苷酸或氨基酸的缩窄物的流的组合限制的结果。因此,在一些情况下,双重缩窄可能导致复合电流信号。在某些情况下,当存在两个此类读取头时,可能无法单独确定一个缩窄或"读取头"的当前读数。下面讨论缩窄区域之间的合适距离。本发明的孔或跨膜孔包括具有两个或更多个读取器头的孔或跨膜孔,这意指,两个或更多个通道缩窄以此类方式定位以提供合适的单独读取器头而不干扰其他缩窄通道读取器头的准确性。

[0108] 缩窄区或缩窄位点可以由跨膜蛋白纳米孔和/或辅助蛋白或肽的蛋白序列内的一个或多个特定氨基酸残基形成。

[0109] 在野生型PorARr、PorBRr和PorARc中,缩窄位于孔的底部。这被描述为下面的(c)部分。

[0110] 本发明的PorARc孔和单体

[0111] 本发明提供了一种突变体红球菌孔,其包含单体,该单体是SEQ ID NO:2中所示的序列的变体,其中该变体包含SEQ ID NO:2的位置9与200之间的一个或多个突变,并且其中该一个或多个突变改变孔与靶分析物相互作用的能力。下面讨论的任何具体实施例均适用于本发明的该实施例。该变体优选地包含SEQ ID NO:2的位置10与190或11与180之间的一个或多个突变。该变体优选地包含位置87与104之间的一个或多个突变。

[0112] 本发明还提供了一种突变体红球菌孔,其包含单体,该单体是SEQ ID NO:2中所示的序列的变体,其中该变体在下文的(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含一个或多个突变,并且其中该一个或多个突变改变孔与靶分析物相互作用的能力。

[0113] 靶分析物可以是下面讨论的那些中的任一者。靶分析物优选是氨基酸、多肽、核苷酸或多核苷酸。孔与靶分析物相互作用的能力可以使用已知的方法来测量,包括实例中描述的那些方法。孔可包含任何数量的单体,诸如2、3、4、5、6、7、8、9或10个单体。孔中任意数量的单体可以是如上所定义的变体。孔可以是如上所定义的同源寡聚体或异源寡聚体。

[0114] 本发明还提供了一种突变体红球菌孔蛋白单体,其包含SEQ ID NO:2中所示序列的变体,其中该变体包含SEQ ID NO:2的位置9与200之间的一个或多个突变,其中该一个或多个突变改变单体与靶分析物相互作用的能力,并且其中单体可以形成孔。下面讨论的任何具体实施例均适用于本发明的该实施例。该变体优选地包含SEQ ID NO:2的位置10与190或11与180之间的一个或多个突变。该变体优选地包含位置87与104之间的一个或多个突变。

[0115] 本发明还提供了包含SEQ ID NO:2中所示序列的变体的突变体红球菌孔蛋白单体。该变体在下文(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含一个或多个突变,该一个或

多个突变改变单体与靶分析物相互作用的能力,并且该单体可以形成孔。

[0116] 靶分析物优选是氨基酸、多肽、核苷酸或多核苷酸。单体与靶分析物相互作用的能力可以使用已知的方法来测量,包括实例中描述的那些方法。单体形成孔的能力可以使用已知方法来确定,包括实例中的那些方法。

[0117] 突变体单体具有改进的靶分析物读取特性,即表现出改进的分析物捕获和辨别力。特别地,由突变体单体构建的孔比野生型更容易捕获氨基酸、多肽、核苷酸和多核苷酸。此外,由突变体单体构建的孔显示出增加的电流范围,这使得更容易辨别不同的氨基酸或核苷酸以及减少的状态方差,这增加了信噪比。此外,当核酸移动通过由突变体构建的孔时,对电流有贡献的氨基酸或核苷酸的数量减少。这使得更容易鉴定当多肽或多核苷酸移动通过孔时观察到的电流与多肽或多核苷酸序列之间的直接关系。突变体的氨基酸或核苷酸读取特性的改善是经由五种主要机制实现的,即通过以下的变化:空间位阻(增加或减少氨基酸残基的大小);电荷(例如,引入+ve电荷以与核酸序列相互作用);氢键(例如,引入可以与碱基对形成氢键的氨基酸);pi堆积(例如,引入通过离域电子pi系统相互作用的氨基酸);和/或孔结构的改变(例如,引入增加前庭和/或缩窄的尺寸的氨基酸)。

[0118] 这五种机制中的任一者或多者可能是本发明的孔的特性改善的原因。例如,由于改变的空间位阻、改变的氢键和改变的结构,本发明的孔可以表现出改善的氨基酸或核苷酸读取特性。

[0119] 大残基(诸如苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)或组氨酸(H))的引入增加了孔的空间位阻。芳香族残基(诸如苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)或组氨酸(H))的引入也增加了孔中的pi堆积。大残基或芳香族残基的引入也改变了孔的结构,例如通过打开孔并增加前庭和/或缩窄的尺寸。这在下面更详细地描述。

[0120] 一个或多个位置出现在单体的三个区域:顶部、中间或底部。

[0121] 在顶部(a)中,位置为D11、G12、G13、G14、N15、T52、G53、P54、D55、A56、E57、D58、F59、S60、G61、T62、T64、Y67、Q68、V69、Y71、P119、G120、I121、E122、T123、V124、E125、V126、S128、A130、A131、S132、G133、A134、H135、L143、H144、T146、T148、K149、Y159、Q161、V163、S164、D165、N166、G167、D168、V169和T171。

[0122] 在中间(b)中,位置为S74、G76、E78、T80、D82、T84、Q108、G110、G112、T114、E116和P117。

[0123] 在底部(c)中,位置为G87、E89、G91、S93、S94、A95、G96、A97、S99、T101、S103和D104。

[0124] 该变体在顶部、中间和底部的任意组合(即(a),(b),(c),(a)和(b),(b)和(c),(a)和(c),或者(a)、(b)和(c))中的位置的一者或多者处可以包含一个或多个突变。

[0125] 该变体可包含任意数量的一个或多个突变,诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个突变。

[0126] 该变体优选地至少在SEQ ID NO:2的以下位置处包含一个或多个突变:

[0127] E78/D82/E89、

[0128] E78/D82/E89/E116/E125/D165、

[0129] E57/E78/D82/E89/E116/E125/D165、

[0130] D55/E57/D58/E78/D82/E89/E116/E125/D165、

[0131] E78/D82/E89/D104/E116/E122/E125/D165、

[0132] D55/E57/D58/E78/D82/E89/D104/E116/E122/E125/D165、

[0133] E57/E78/D82/E89/D104/E116/E122/E125/D165、

[0134] E78/D82/E89/T101/E116/E125/D165、

[0135] E78/D82/G87/E89/E116/E125/D165、

[0136] E78/D82/E89/G91/I92/E116/E125/D165、

[0137] E78/D82/E89/I92/E116/E125/D165、

[0138] E78/D82/E89/S99/E116/E125/D165、

[0139] E78/D82/E89/S103/E116/E125/D165、

[0140] E78/D82/E89/D104/E116/E125/D165、

[0141] E78/D82/E89/E116/E122/E125/D165、

[0142] E78/D82/E89/G91/I92/E116/E125/D165或

[0143] E78/D82/E89/E116/E125/D165。

[0144] 该变体优选地包含在SEQ ID NO:2的紧接上文位置处的突变或由其组成。

[0145] 一个或多个突变各自独立地(a)改变经修饰位置处的氨基酸残基的大小;(b)改变经修饰位置处的氨基酸残基的净电荷;(c)改变经修饰位置处的氨基酸残基的氢键特征;(d)向经修饰位置处的氨基酸残基引入或从其去除通过离域电子pi系统相互作用的一个或多个化学基团,和/或(e)改变经修饰位置处的氨基酸残基的结构。一个或多个突变是一个或多个取代。技术人员能够基于上表1和2进行合适的取代。

[0146] 在顶部(a)中,优选进行突变以包括带正电、极性或疏水性的氨基酸,以便减少负电性(使得促进带负电荷的分析物的捕获)或改善/稳定与酶的相互作用。(a)中的位置处的氨基酸可以被R、K、S、T、N、Q、G、A、V、L、I、P、C、F、Y或W取代。

[0147] 在中间(b)中,优选进行突变以包括带正电、极性或疏水性的氨基酸,以便减少负电性(使得促进带负电荷的分析物的捕获)。(b)中的位置处的氨基酸可以被R、K、S、T、N、Q、G、A、V、L、I、P、C、F、Y或W取代。

[0148] 在底部(c)中,优选地进行突变以包括极性、疏水性、正性或负性,以便改变辨别力(中间/顶部的残基也可能影响辨别力,但可能程度较小)。(c)中的位置处的氨基酸可以被S、T、N、Q、G、A、V、L、I、P、C、R、K、D、E、F、Y或W取代。

[0149] 突变为极性、疏水性、正性或负性以便改变辨别力(中间/顶部的残基也可能影响辨别力,但可能程度较小)。

[0150] 一个或多个突变优选地选自以下特定取代:

[0151] D至Q、S或Y,更优选地D至S,

[0152] G至S、N、Q、T或A,更优选地G至S或N,

[0153] N至S、Q、L、Y、M、I、V或G,

[0154] T至V、S、N、Q、R、F或I,更优选地T至V、S、N、Q或R,

[0155] P至S,

[0156] A至R、V、D、N、S或T,

[0157] E至S、N、T、A、R、G、V、L、I、F、Q或K,

[0158] F至R、K、S、T、N、Q、G、A、V、L、I、P、C、Y或W,

[0159] S至N或C,更优选地S至N,

[0160] Y至R、K、S、T、N、Q、G、A、V、L、I、P、C、D、E、F或W,

[0161] Q至R,

[0162] V至I,

[0163] I至G、L、S、F、V、A、P、W、Q、N、C、S、Y、K或T,更优选地I至N,

[0164] E至R,

[0165] H至F、N、Q或A,

[0166] L至N、S、Y、V、Q、T、R、A、G、C、F或D,以及

[0167] K至R、S、T、N、Q、G、A、V、L、I、P、C、D、E、F、Y或W。

[0168] 该变体优选地包含SEQ ID NO:2中的至少以下突变:

[0169] E78S/D82S/E89N、

[0170] E78S/D82S/E89N/E116T/E125A/D165S、

[0171] E78S/D82S/E89R、

[0172] E78R/D82S/E89R、

[0173] E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S、

[0174] E57R/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S、D55S/E57S/D58S/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S、D55S/E57S/D58S/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S、E57R/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S、E78R/D82S/E89G/E116T/E125A/D165S、

[0175] E78R/D82S/E89A/E116T/E125A/D165S、

[0176] E78R/D82S/E89V/E116T/E125A/D165S、

[0177] E78R/D82S/E89L/E116T/E125A/D165S、

[0178] E78R/D82S/E89I/E116T/E125A/D165S、

[0179] E78R/D82S/E89F/E116T/E125A/D165S、

[0180] E78R/D82S/E89S/E116T/E125A/D165S、

[0181] E78R/D82S/E89T/E116T/E125A/D165S、

[0182] E78R/D82S/E89Q/E116T/E125A/D165S、

[0183] E78R/D82S/E89K/E116T/E125A/D165S、

[0184] E78R/D82S/E89R/T101V/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/T101 S/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/T101N/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/T101Q/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/T101R/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89N/T101V/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89N/T101 S/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89N/T101N/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89N/T101Q/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89N/T101R/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/G87S/E89R/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/G91 S/E116T/E125A/D165S、E78R/D82S/E89R/G91N/E116T/E125A/D165S、

[0185] E78R/D82S/E89R/G91N/I92N/E116T/E125A/D165S、

[0186] E78R/D82S/E89R/I92N/E116T/E125A/D165S、

[0187] E78R/D82S/E89R/S99N/E116T/E125A/D165S、

[0188] E78R/D82S/E89R/S103N/E116T/E125A/D165S、

[0189] E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E125A/D165S、

[0190] E78R/D82S/E89R/E116T/E122S/E125A/D165S、

[0191] E78G/D82S/E89L/G91N/I92N/E116G/E125A/D165S或

[0192] E78G/D82S/E89L/E116G/E125A/D165S。

[0193] 该变体优选地包含紧接上文所示的针对SEQ ID NO:2的突变或由其组成。该变体可以是表3中所示的任何突变体。

[0194] SEQ ID NO:2的变体优选与SEQ ID NO:4或6不相同(即,不与SEQ ID NO:4或6共有100%氨基酸同一性)。

[0195] 本发明的PorARr孔和单体

[0196] 本发明还提供了一种突变体红球菌孔,其包含单体,该单体是SEQ ID NO:4中所示的序列的变体,其中该变体包含SEQ ID NO:4的位置9与250之间的一个或多个突变,并且其中该一个或多个突变改变孔与靶分析物相互作用的能力。下面讨论的任何具体实施例均适用于本发明的该实施例。该变体优选地包含SEQ ID NO:4的位置10与200或11与180之间的一个或多个突变。该变体优选地包含位置87与158之间的一个或多个突变。

[0197] 本发明还提供了一种突变体红球菌孔,其包含单体,该单体是SEQ ID NO:4中所示的序列的变体,其中该变体在下文的(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含一个或多个突变,并且其中该一个或多个突变改变孔与靶分析物相互作用的能力。

[0198] 靶分析物可以是下面讨论的那些中的任一者。靶分析物优选是氨基酸、多肽、核苷酸或多核苷酸。孔与靶分析物相互作用的能力可以使用已知的方法来测量,包括实例中描述的那些方法。孔可包含任何数量的单体,诸如2、3、4、5、6、7、8、9或10个单体。孔中任意数量的单体可以是如上所定义的变体。孔可以是如上所定义的同源寡聚体或异源寡聚体。

[0199] 本发明提供了一种突变体红球菌孔蛋白单体,其包含SEQ ID NO:4中所示序列的变体,其中该变体包含SEQ ID NO:4的位置9与250之间的一个或多个突变,其中该一个或多个突变改变单体与靶分析物相互作用的能力,并且其中单体可以形成孔。下面讨论的任何具体实施例均适用于本发明的该实施例。该变体优选地包含SEQ ID NO:4的位置10与200或11与180之间的一个或多个突变。该变体优选地包含位置87与158之间的一个或多个突变。

[0200] 本发明还提供了包含SEQ ID NO:4中所示序列的变体的突变体红球菌孔蛋白单体。该变体在下文(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含一个或多个突变,该一个或多个突变改变单体与核苷酸相互作用的能力,并且该单体可以形成孔。

[0201] 靶分析物优选是氨基酸、多肽、核苷酸或多核苷酸。单体与靶分析物相互作用的能力可以使用已知的方法来测量,包括实例中描述的那些方法。单体形成孔的能力可以使用已知方法来确定,包括实例中的那些方法。

[0202] 基于SEQ ID NO:4的突变体单体具有改善的靶分析物读取特性,其原因与上文针对SEQ ID NO:2所讨论的相同。

[0203] 一个或多个位置出现在单体的三个区域:顶部、中间或底部。

[0204] 在顶部(a)中,位置为S11、D12、G13、H14、V51、G52、P53、D54、A55、A56、D57、F58、E59、G60、S61、Q64、Y67、Q68、F69、W71、P173、G174、I175、E176、E177、L178、V179、V180、E182、G183、E184、F185、D186、G187、D188、F189、V197、H198、A200、T202、G203、F213、R215、I217、T218、A219、N220、G221、D222、N223和T225。

[0205] 在中间(b)中,位置为S74、D76、S78、G80、A82、S84、Q162、T164、G166、E168、T170和P171。

[0206] 在底部(c)中,位置为Q87、E89、E91、V92、A93、P94、G95、E96、V97、Y98、E99、P100、A101、T102、E103、T104、K105、T106、V107、D108、G109、K110、E111、T112、E113、V114、P115、V116、T117、A118、P119、V120、L121、N122、E123、D124、G125、S126、P127、I128、L129、D130、A131、D132、G133、K134、P135、V136、T137、E138、Q139、L140、Y141、R142、I143、K144、P145、D146、A147、T148、A149、T150、E151、N152、T153、T155、V156、G157和G158。

[0207] 该变体在顶部、中间和底部的任意组合(即(a),(b),(c),(a)和(b),(b)和(c),(a)和(c),或者(a)、(b)和(c))中的位置的一者或多者处可以包含一个或多个突变。

[0208] 该变体可包含任意数量的一个或多个突变,诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个突变。

[0209] 该变体优选地至少在SEQ ID NO:4的以下位置处包含一个或多个突变:

[0210] E182/E184、

[0211] E89/E91、

[0212] E89/E91/E168/E182/E184、或

[0213] E89/E91/E96/E99/E113/E123/D130/E182/E184。

[0214] 该变体优选地包含在紧接上文所示的针对SEQ ID NO:4的位置处的突变或由其组成。

[0215] 一个或多个突变各自独立地(a)改变经修饰位置处的氨基酸残基的大小;(b)改变经修饰位置处的氨基酸残基的净电荷;(c)改变经修饰位置处的氨基酸残基的氢键特征;(d)向经修饰位置处的氨基酸残基引入或从其去除通过离域电子pi系统相互作用的一个或多个化学基团,和/或(e)改变经修饰位置处的氨基酸残基的结构。一个或多个突变是一个或多个取代。技术人员能够基于上表1和2进行合适的取代。

[0216] 一个或多个突变优选地选自上文针对SEQ ID NO:2列出的优选或特定取代。

[0217] 该变体优选地包含SEQ ID NO:4中的至少以下突变:

[0218] E182R/E184R、

[0219] E89N/E91N、

[0220] E89N/E91N/E168R/E182R/E184R、

[0221] E89N/E91N/E96R/E99N/E113N/E123N/D130N/E182R/E184R或

[0222] E89N/E91N/E96R/E99R/E113K/E123K/D130K/E182R/E184R。

[0223] 该变体优选地包含紧接上文所示的针对SEQ ID NO:4的突变或由其组成。该变体可以是表3中所示的任何突变体。

[0224] SEQ ID NO:4的变体优选与SEQ ID NO:2或6不相同(即,不与SEQ ID NO:2或6共有100%氨基酸同一性)。

[0225] 本发明的PorBRr孔和单体

[0226] 本发明还提供了一种突变体红球菌孔,其包含单体,该单体是SEQ ID NO:6中所示的序列的变体,其中该变体包含SEQ ID NO:6的位置9与200之间的一个或多个突变,并且其中该一个或多个突变改变孔与靶分析物相互作用的能力。下面讨论的任何具体实施例均适用于本发明的该实施例。该变体优选地包含SEQ ID NO:6的位置10与190或11与180之间的

一个或多个突变。该变体优选地包含位置88与105之间的一个或多个突变。

[0227] 本发明还提供了一种突变体红球菌孔,其包含单体,该单体是SEQ ID NO:6中所示的序列的变体,其中该变体在下文的(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含一个或多个突变,并且其中该一个或多个突变改变孔与靶分析物相互作用的能力。

[0228] 靶分析物可以是下面讨论的那些中的任一者。靶分析物优选是氨基酸、多肽、核苷酸或多核苷酸。孔与靶分析物相互作用的能力可以使用已知的方法来测量,包括实例中描述的那些方法。孔可包含任何数量的单体,诸如2、3、4、5、6、7、8、9或10个单体。孔中任意数量的单体可以是如上所定义的变体。孔可以是如上所定义的同源寡聚体或异源寡聚体。

[0229] 本发明提供了一种突变体红球菌孔蛋白单体,其包含SEQ ID NO:6中所示序列的变体,其中该变体包含SEQ ID NO:6的位置9与200之间的一个或多个突变,其中该一个或多个突变改变单体与核苷酸相互作用的能力,并且其中单体可以形成孔。下面讨论的任何具体实施例均适用于本发明的该实施例。该变体优选地包含SEQ ID NO:6的位置10与190或11与180之间的一个或多个突变。该变体优选地包含位置88与105之间的一个或多个突变。

[0230] 本发明还提供了包含SEQ ID NO:6中所示序列的变体的突变体红球菌孔蛋白单体。该变体在下文(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含一个或多个突变,该一个或多个突变改变单体与核苷酸相互作用的能力,并且该单体可以形成孔。

[0231] 靶分析物优选是氨基酸、多肽、核苷酸或多核苷酸。单体与靶分析物相互作用的能力可以使用已知的方法来测量,包括实例中描述的那些方法。单体形成孔的能力可以使用已知方法来确定,包括实例中的那些方法。

[0232] 基于SEQ ID NO:6的突变体单体具有改善的靶分析物读取特性,其原因与上文针对SEQ ID NO:2所讨论的相同。

[0233] 一个或多个位置出现在单体的三个区域:顶部、中间或底部。

[0234] 在顶部(a)中,位置为S11、T12、D13、G14、Y15、V52、G53、A54、D55、A56、A57、D58、A59、E60、G61、T62、Q65、Y68、Q69、F70、W72、P120、G121、I122、E123、E124、L125、V126、V127、E129、G130、E131、F132、D133、G134、D135、F136、V144、H145、T147、S149、G150、F160、R162、I164、T165、A166、N167、G168、D169、N170和T172。

[0235] 在中间(b)中,位置为S75、D77、A79、G81、T83、D85、Q109、Y111、E113、E115、T117和P118。

[0236] 在底部(c)中,位置为G88、E90、E92、L93、S94、A95、K96、D97、G98、P99、T100、T102、V103、T104和D105。

[0237] 该变体在顶部、中间和底部的任意组合(即(a),(b),(c),(a)和(b),(b)和(c),(a)和(c),或者(a)、(b)和(c))中的位置的一者或多者处可以包含一个或多个突变。

[0238] 该变体可包含任意数量的一个或多个突变,诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个突变。

[0239] 该变体优选地至少在SEQ ID NO:6的以下位置处包含一个或多个突变:

[0240] E90、

[0241] E92、

[0242] E90/E92、

[0243] E90/E92/E115/E131、或

[0244] E90/E92/E113/E115/E129/E131。

[0245] 该变体优选地至少在SEQ ID NO:6的以下位置处包含一个或多个突变：

[0246] E90/E92/E115/E131、

[0247] E90/E92/T100/E115/E131、

[0248] E90/E92/T102/E115/E131、

[0249] E90/E92/T104/E115/E131、

[0250] E90/E92/D105/E115/E131、

[0251] E90/E92/T102/T104/E115/E131、或

[0252] E90/E92/E113/E115/E129/E131。

[0253] 该变体优选地至少在SEQ ID NO:6的以下位置处包含一个或多个突变：

[0254] E90、

[0255] E92、

[0256] E90/E92、

[0257] E90/E92/E115/E131、

[0258] E90/E92/T100/E115/E131、

[0259] E90/E92/T102/E115/E131、

[0260] E90/E92/T104/E115/E131、

[0261] E90/E92/D105/E115/E131、

[0262] E90/E92/T102/T104/E115/E131、或

[0263] E90/E92/E113/E115/E129/E131。

[0264] 该变体优选地包含在紧接上文所示的针对SEQ ID NO:6的位置处的突变或由其组成。

[0265] 一个或多个突变各自独立地(a)改变经修饰位置处的氨基酸残基的大小;(b)改变经修饰位置处的氨基酸残基的净电荷;(c)改变经修饰位置处的氨基酸残基的氢键特征;(d)向经修饰位置处的氨基酸残基引入或从其去除通过离域电子pi系统相互作用的一个或多个化学基团,和/或(e)改变经修饰位置处的氨基酸残基的结构。一个或多个突变是一个或多个取代。技术人员能够基于上表1和2进行合适的取代。

[0266] 一个或多个突变优选地选自上文针对SEQ ID NO:2列出的优选或特定取代。90位的E优选被G、A、V、L、I、F、Y、S、T、Q、N、C或P取代。90位的E优选被N、G、V、L或I取代。90位的E优选被N取代(E90N)。92位的E优选被N、G、A、V、L、I、F、Y、S、T、Q、C或P取代。92位的E优选被N、A、V、L或I取代。92位的E优选被N取代(E92N)。100位的T优选被A、V、N或Q取代。100位的T优选被N取代(T100N)。102位的T优选被A、V、N或Q取代。102位的T优选被V或N取代。104位的T优选被A、V、N或Q取代。104位的T被A或N取代。105位的D优选被A取代。113位的E优选被R取代(E113R)或被K取代(E113K)。113位的E优选被R取代(E113R)。115位的E优选被R取代(E115R)或被K取代(E115K)。115位的E优选被R取代(E115R)。131位的E优选被R取代(E131R)或被K取代(E131K)。131位的E优选被R取代(E131R)。

[0267] 该变体优选地包含SEQ ID NO:6中的至少以下突变：

[0268] E90N、

[0269] E92N、

[0270] E90N/E92N、

[0271] E90N/E92N/E115R/E131R、或

[0272] E90N/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R。

[0273] 该变体优选地包含SEQ ID NO:6中的至少以下突变：

[0274] E90C、

[0275] E90P、

[0276] E92C、

[0277] E92P、

[0278] E90C/E92C、

[0279] E90P/E92P、

[0280] E90C/E92P、

[0281] E90P/E92C、

[0282] E90N/E92C、

[0283] E90N/E92P、

[0284] E90C/E92N、

[0285] E90P/E92N、

[0286] E90C/E92C/E115R/E131R、

[0287] E90C/E92P/E115R/E131R、

[0288] E90P/E92C/E115R/E131R、

[0289] E90C/E92C/E115R/E131R、

[0290] E90N/E92C/E115R/E131R、

[0291] E90N/E92P/E115R/E131R、

[0292] E90P/E92N/E115R/E131R、

[0293] E90C/E92N/E115R/E131R、

[0294] E90C/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、

[0295] E90C/E92P/E113R/E115R/E129R/E131R、

[0296] E90P/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、

[0297] E90P/E92P/E113R/E115R/E129R/E131R、

[0298] E90C/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R、

[0299] E90P/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R、

[0300] E90N/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、

[0301] E90N/E92P/E113R/E115R/E129R/E131R、

[0302] E90C、

[0303] E90P、

[0304] E92C、

[0305] E92P、

[0306] E90C/E92C、

[0307] E90P/E92P、

[0308] E90C/E92P、

[0309] E90P/E92C、

[0310] E90N/E92C、

[0311] E90N/E92P、

[0312] E90C/E92N、

[0313] E90P/E92N、

[0314] E90C/E92C/E115K/E131K、

[0315] E90C/E92P/E115K/E131K、E90P/E92C/E115K/E131K、E90C/E92C/E115K/E131K、E90N/E92C/E115K/E131K、E90N/E92P/E115K/E131K、E90P/E92N/E115K/E131K、E90C/E92N/E115K/E131K、E90C/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K、E90C/E92P/E113K/E115K/E129K/E131K、E90P/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K、E90P/E92P/E113K/E115K/E129K/E131K、E90C/E92N/E113K/E115K/E129K/E131K、E90P/E92N/E113K/E115K/E129K/E131K、E90N/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K、E90N/E92P/E113K/E115K/E129K/E131K、E90G/E92N/E115R/E131R、E90A/E92N/E115R/E131R、E90V/E92N/E115R/E131R、E90L/E92N/E115R/E131R、E90I/E92N/E115R/E131R、E90F/E92N/E115R/E131R、E90Y/E92N/E115R/E131R、E90S/E92N/E115R/E131R、E90T/E92N/E115R/E131R、E90Q/E92N/E115R/E131R、E90C/E92N/E115R/E131R、E90P/E92N/E115R/E131R、E90N/E92G/E115R/E131R、E90N/E92A/E115R/E131R、E90N/E92V/E115R/E131R、E90N/E92L/E115R/E131R、E90N/E92I/E115R/E131R、E90N/E92F/E115R/E131R、E90N/E92Y/E115R/E131R、E90N/E92S/E115R/E131R、E90N/E92T/E115R/E131R、E90N/E92Q/E115R/E131R、E90N/E92N/E115R/E131R、E90N/E92C/E115R/E131R、E90N/E92P/E115R/E131R、E90C/E92C/E115R/E131R、E90P/E92P/E115R/E131R、E90C/E92P/E115R/E131R、E90P/E92C/E115R/E131R、E90N/E92N/T100N/E115R/E131R、E90N/E92N/T102A/E115R/E131R、E90N/E92N/T102V/E115R/E131R、E90N/E92N/T102N/E115R/E131R、E90N/E92N/T102Q/E115R/E131R、E90N/E92N/T104A/E115R/E131R、E90N/E92N/T104N/E115R/E131R、E90N/E92N/D105A/E115R/E131R、E90N/E92N/T102V/T104N/E115R/E131R、E90N/E92N/T102N/T104N/E115R/E131R、E90N/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R、E90C/E92N/T100N/E115R/E131R、E90C/E92N/T102A/E115R/E131R、E90C/E92N/T102V/E115R/E131R、E90C/E92N/T102N/E115R/E131R、E90C/E92N/T102Q/E115R/E131R、E90C/E92N/T104A/E115R/E131R、E90C/E92N/T104N/E115R/E131R、E90C/E92N/D105A/E115R/E131R、E90C/E92N/T102V/T104N/E115R/E131R、E90C/E92N/T102N/T104N/E115R/E131R、E90C/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R、E90N/E92C/T100N/E115R/E131R、E90N/E92C/T102A/E115R/E131R、E90N/E92C/T102V/E115R/E131R、E90N/E92C/T102N/E115R/E131R、E90N/E92C/T102Q/E115R/E131R、E90N/E92C/T104A/E115R/E131R、E90N/E92C/T104N/E115R/E131R、E90N/E92C/D105A/E115R/E131R、E90N/E92C/T102V/T104N/E115R/E131R、E90N/E92C/T102N/T104N/E115R/E131R、E90N/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、E90C/E92C/T100N/E115R/E131R、E90C/E92C/T102A/E115R/E131R、E90C/E92C/T102V/E115R/E131R、E90C/E92C/T102N/E115R/E131R、E90C/E92C/T102Q/E115R/E131R、E90C/E92C/T104A/E115R/E131R、E90C/E92C/T104N/E115R/E131R、E90C/E92C/D105A/E115R/E131R、E90C/E92C/T102V/T104N/E115R/E131R、E90C/E92C/T102N/T104N/E115R/E131R、E90C/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、E90C/E92P/T100N/E115R/E131R、E90C/E92P/T102A/E115R/E131R、E90C/E92P/

T102V/E115R/E131R、E90C/E92P/T102N/E115R/E131R、E90C/E92P/T102Q/E115R/E131R、E90C/E92P/T104A/E115R/E131R、E90C/E92P/T104N/E115R/E131R、E90C/E92P/D105A/E115R/E131R、E90C/E92P/T102V/T104N/E115R/E131R、E90C/E92P/T102N/T104N/E115R/E131R、E90C/E92P/E113R/E115R/E129R/E131R、E90P/E92C/T100N/E115R/E131R、E90P/E92C/T102A/E115R/E131R、E90P/E92C/T102V/E115R/E131R、E90P/E92C/T102N/E115R/E131R、E90P/E92C/T102Q/E115R/E131R、E90P/E92C/T104A/E115R/E131R、E90P/E92C/T104N/E115R/E131R、E90P/E92C/D105A/E115R/E131R、E90P/E92C/T102V/T104N/E115R/E131R、E90P/E92C/T102N/T104N/E115R/E131R、E90P/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、E90G/E92N/E115K/E131K、E90A/E92N/E115K/E131K、E90V/E92N/E115K/E131K、E90L/E92N/E115K/E131K、E90I/E92N/E115K/E131K、E90F/E92N/E115K/E131K、E90Y/E92N/E115K/E131K、E90S/E92N/E115K/E131K、E90T/E92N/E115K/E131K、E90Q/E92N/E115K/E131K、E90C/E92N/E115K/E131K、E90P/E92N/E115K/E131K、E90N/E92G/E115K/E131K、E90N/E92A/E115K/E131K、E90N/E92V/E115K/E131K、E90N/E92L/E115K/E131K、E90N/E92I/E115K/E131K、E90N/E92F/E115K/E131K、E90N/E92Y/E115K/E131K、E90N/E92S/E115K/E131K、E90N/E92T/E115K/E131K、E90N/E92Q/E115K/E131K、E90N/E92N/E115K/E131K、E90N/E92C/E115K/E131K、E90N/E92P/E115K/E131K、E90C/E92C/E115K/E131K、E90P/E92P/E115K/E131K、E90C/E92P/E115K/E131K、E90P/E92C/E115K/E131K、E90N/E92N/T100N/E115K/E131K、E90N/E92N/T102A/E115K/E131K、E90N/E92N/T102V/E115K/E131K、E90N/E92N/T102N/E115K/E131K、E90N/E92N/T102Q/E115K/E131K、E90N/E92N/T104A/E115K/E131K、E90N/E92N/T104N/E115K/E131K、E90N/E92N/D105A/E115K/E131K、E90N/E92N/T102V/T104N/E115K/E131K、E90N/E92N/T102N/T104N/E115K/E131K、E90N/E92N/E113K/E115K/E129K/E131K、E90C/E92N/T100N/E115K/E131K、E90C/E92N/T102A/E115K/E131K、E90C/E92N/T102V/E115K/E131K、E90C/E92N/T102N/E115K/E131K、E90C/E92N/T102Q/E115K/E131K、E90C/E92N/T104A/E115K/E131K、E90C/E92N/T104N/E115K/E131K、E90C/E92N/D105A/E115K/E131K、E90C/E92N/T102V/T104N/E115K/E131K、E90C/E92N/T102N/T104N/E115K/E131K、E90C/E92N/E113K/E115K/E129K/E131K、E90N/E92C/T100N/E115K/E131K、E90N/E92C/T102A/E115K/E131K、E90N/E92C/T102V/E115K/E131K、E90N/E92C/T102N/E115K/E131K、E90N/E92C/T102Q/E115K/E131K、E90N/E92C/T104A/E115K/E131K、E90N/E92C/T104N/E115K/E131K、E90N/E92C/D105A/E115K/E131K、E90N/E92C/T102V/T104N/E115K/E131K、E90N/E92C/T102N/T104N/E115K/E131K、E90N/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K、E90C/E92C/T100N/E115K/E131K、E90C/E92C/T102A/E115K/E131K、E90C/E92C/T102V/E115K/E131K、E90C/E92C/T102N/E115K/E131K、E90C/E92C/T102Q/E115K/E131K、E90C/E92C/T104A/E115K/E131K、E90C/E92C/T104N/E115K/E131K、E90C/E92C/D105A/E115K/E131K、E90C/E92C/T102V/T104N/E115K/E131K、E90C/E92C/T102N/T104N/E115K/E131K、E90C/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K、E90C/E92P/T100N/E115K/E131K、E90C/E92P/T102A/E115K/E131K、E90C/E92P/T102V/E115K/E131K、E90C/E92P/T102N/E115K/E131K、

[0316] E90C/E92P/T102Q/E115K/E131K、

[0317] E90C/E92P/T104A/E115K/E131K、

[0318] E90C/E92P/T104N/E115K/E131K、

[0319] E90C/E92P/D105A/E115K/E131K、

[0320] E90C/E92P/T102V/T104N/E115K/E131K、

[0321] E90C/E92P/T102N/T104N/E115K/E131K、

[0322] E90C/E92P/E113K/E115K/E129K/E131K、

[0323] E90P/E92C/T100N/E115K/E131K、

[0324] E90P/E92C/T102A/E115K/E131K、

[0325] E90P/E92C/T102V/E115K/E131K、

[0326] E90P/E92C/T102N/E115K/E131K、

[0327] E90P/E92C/T102Q/E115K/E131K、

[0328] E90P/E92C/T104A/E115K/E131K、

[0329] E90P/E92C/T104N/E115K/E131K、

[0330] E90P/E92C/D105A/E115K/E131K、

[0331] E90P/E92C/T102V/T104N/E115K/E131K、

[0332] E90P/E92C/T102N/T104N/E115K/E131K、或

[0333] E90P/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K。

[0334] 该变体优选地包含SEQ ID NO:6中的至少以下突变：

[0335] E90N、

[0336] E92N、

[0337] E90N/E92N、

[0338] E90N/E92N/E115R/E131R、

[0339] E90N/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R、

[0340] E90C、

[0341] E90P、

[0342] E92C、

[0343] E92P、

[0344] E90C/E92C、

[0345] E90P/E92P、

[0346] E90C/E92P、

[0347] E90P/E92C、

[0348] E90N/E92C、

[0349] E90N/E92P、

[0350] E90C/E92N、

[0351] E90P/E92N、

[0352] E90C/E92C/E115R/E131R、E90C/E92P/E115R/E131R、E90P/E92C/E115R/E131R、E90C/E92C/E115R/E131R、E90N/E92C/E115R/E131R、E90N/E92P/E115R/E131R、E90P/E92N/E115R/E131R、E90C/E92N/E115R/E131R、E90C/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、E90C/E92P/E113R/E115R/E129R/E131R、E90P/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、E90P/E92P/E113R/E115R/E129R/E131R、E90C/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R、E90P/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R、E90N/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、E90N/E92P/E113R/E115R/

E129R/E131R、E90C、

[0353] E90P、

[0354] E92C、

[0355] E92P、

[0356] E90C/E92C、

[0357] E90P/E92P、

[0358] E90C/E92P、

[0359] E90P/E92C、

[0360] E90N/E92C、

[0361] E90N/E92P、

[0362] E90C/E92N、

[0363] E90P/E92N、

[0364] E90C/E92C/E115K/E131K、

[0365] E90C/E92P/E115K/E131K、

[0366] E90P/E92C/E115K/E131K、

[0367] E90C/E92C/E115K/E131K、

[0368] E90N/E92C/E115K/E131K、

[0369] E90N/E92P/E115K/E131K、

[0370] E90P/E92N/E115K/E131K、

[0371] E90C/E92N/E115K/E131K、

[0372] E90C/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K、

[0373] E90C/E92P/E113K/E115K/E129K/E131K、

[0374] E90P/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K、

[0375] E90P/E92P/E113K/E115K/E129K/E131K、

[0376] E90C/E92N/E113K/E115K/E129K/E131K、

[0377] E90P/E92N/E113K/E115K/E129K/E131K、

[0378] E90N/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K、

[0379] E90N/E92P/E113K/E115K/E129K/E131K、

[0380] E90G/E92N/E115R/E131R、

[0381] E90A/E92N/E115R/E131R、

[0382] E90V/E92N/E115R/E131R、

[0383] E90L/E92N/E115R/E131R、

[0384] E90I/E92N/E115R/E131R、

[0385] E90F/E92N/E115R/E131R、

[0386] E90Y/E92N/E115R/E131R、

[0387] E90S/E92N/E115R/E131R、

[0388] E90T/E92N/E115R/E131R、

[0389] E90Q/E92N/E115R/E131R、

[0390] E90C/E92N/E115R/E131R、

[0391] E90P/E92N/E115R/E131R、

[0392] E90N/E92G/E115R/E131R、E90N/E92A/E115R/E131R、E90N/E92V/E115R/E131R、E90N/E92L/E115R/E131R、E90N/E92I/E115R/E131R、E90N/E92F/E115R/E131R、E90N/E92Y/E115R/E131R、E90N/E92S/E115R/E131R、E90N/E92T/E115R/E131R、E90N/E92Q/E115R/E131R、E90N/E92C/E115R/E131R、E90N/E92P/E115R/E131R、E90C/E92C/E115R/E131R、E90P/E92P/E115R/E131R、E90C/E92P/E115R/E131R、E90P/E92C/E115R/E131R、E90N/E92N/T100N/E115R/E131R、E90N/E92N/T102A/E115R/E131R、E90N/E92N/T102V/E115R/E131R、E90N/E92N/T102N/E115R/E131R、E90N/E92N/T102Q/E115R/E131R、E90N/E92N/T104A/E115R/E131R、E90N/E92N/T104N/E115R/E131R、E90N/E92N/D105A/E115R/E131R、E90N/E92N/T102V/T104N/E115R/E131R、E90N/E92N/T102N/T104N/E115R/E131R、E90C/E92N/T100N/E115R/E131R、E90C/E92N/T102A/E115R/E131R、E90C/E92N/T102V/E115R/E131R、E90C/E92N/T102N/E115R/E131R、E90C/E92N/T102Q/E115R/E131R、E90C/E92N/T104A/E115R/E131R、E90C/E92N/T104N/E115R/E131R、E90C/E92N/D105A/E115R/E131R、E90C/E92N/T102V/T104N/E115R/E131R、E90C/E92N/T102N/T104N/E115R/E131R、E90C/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R、E90N/E92C/T100N/E115R/E131R、E90N/E92C/T102A/E115R/E131R、E90N/E92C/T102V/E115R/E131R、E90N/E92C/T102N/E115R/E131R、E90N/E92C/T102Q/E115R/E131R、E90N/E92C/T104A/E115R/E131R、E90N/E92C/T104N/E115R/E131R、E90N/E92C/D105A/E115R/E131R、E90N/E92C/T102V/T104N/E115R/E131R、E90N/E92C/T102N/T104N/E115R/E131R、E90N/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、E90C/E92C/T100N/E115R/E131R、E90C/E92C/T102A/E115R/E131R、E90C/E92C/T102V/E115R/E131R、E90C/E92C/T102N/E115R/E131R、E90C/E92C/T102Q/E115R/E131R、E90C/E92C/T104A/E115R/E131R、E90C/E92C/T104N/E115R/E131R、E90C/E92C/D105A/E115R/E131R、E90C/E92C/T102V/T104N/E115R/E131R、E90C/E92C/T102N/T104N/E115R/E131R、E90C/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、E90C/E92P/T100N/E115R/E131R、E90C/E92P/T102A/E115R/E131R、E90C/E92P/T102V/E115R/E131R、E90C/E92P/T102N/E115R/E131R、E90C/E92P/T102Q/E115R/E131R、E90C/E92P/T104A/E115R/E131R、E90C/E92P/T104N/E115R/E131R、E90C/E92P/D105A/E115R/E131R、E90C/E92P/T102V/T104N/E115R/E131R、E90C/E92P/T102N/T104N/E115R/E131R、E90C/E92P/E113R/E115R/E129R/E131R、E90P/E92C/T100N/E115R/E131R、E90P/E92C/T102A/E115R/E131R、E90P/E92C/T102V/E115R/E131R、E90P/E92C/T102N/E115R/E131R、E90P/E92C/T102Q/E115R/E131R、E90P/E92C/T104A/E115R/E131R、E90P/E92C/T104N/E115R/E131R、E90P/E92C/D105A/E115R/E131R、E90P/E92C/T102V/T104N/E115R/E131R、E90P/E92C/T102N/T104N/E115R/E131R、E90P/E92C/E113R/E115R/E129R/E131R、E90G/E92N/E115K/E131K、E90A/E92N/E115K/E131K、E90V/E92N/E115K/E131K、E90L/E92N/E115K/E131K、E90I/E92N/E115K/E131K、E90F/E92N/E115K/E131K、E90Y/E92N/E115K/E131K、E90S/E92N/E115K/E131K、E90T/E92N/E115K/E131K、E90Q/E92N/E115K/E131K、E90C/E92N/E115K/E131K、E90P/E92N/E115K/E131K、E90N/E92G/E115K/E131K、E90N/E92A/E115K/E131K、E90N/E92V/E115K/E131K、E90N/E92L/E115K/E131K、E90N/E92I/E115K/E131K、E90N/E92F/E115K/E131K、E90N/E92Y/E115K/E131K、E90N/E92S/E115K/E131K、E90N/E92T/E115K/E131K、E90N/E92Q/E115K/E131K、E90N/E92N/E115K/E131K、E90N/E92C/E115K/E131K、E90N/

E92P/E115K/E131K、E90C/E92C/E115K/E131K、E90P/E92P/E115K/E131K、E90C/E92P/E115K/E131K、E90P/E92C/E115K/E131K、E90N/E92N/T100N/E115K/E131K、E90N/E92N/T102A/E115K/E131K、E90N/E92N/T102V/E115K/E131K、E90N/E92N/T102N/E115K/E131K、E90N/E92N/T102Q/E115K/E131K、E90N/E92N/T104A/E115K/E131K、E90N/E92N/T104N/E115K/E131K、E90N/E92N/D105A/E115K/E131K、E90N/E92N/T102V/T104N/E115K/E131K、E90N/E92N/T102N/T104N/E115K/E131K、E90N/E92N/E113K/E115K/E129K/E131K、E90C/E92N/T100N/E115K/E131K、E90C/E92N/T102A/E115K/E131K、E90C/E92N/T102V/E115K/E131K、E90C/E92N/T102N/E115K/E131K、E90C/E92N/T102Q/E115K/E131K、E90C/E92N/T104A/E115K/E131K、E90C/E92N/T104N/E115K/E131K、E90C/E92N/D105A/E115K/E131K、E90C/E92N/T102V/T104N/E115K/E131K、E90C/E92N/T102N/T104N/E115K/E131K、E90C/E92N/E113K/E115K/E129K/E131K、E90N/E92C/T100N/E115K/E131K、E90N/E92C/T102A/E115K/E131K、E90N/E92C/T102V/E115K/E131K、E90N/E92C/T102N/E115K/E131K、E90N/E92C/T102Q/E115K/E131K、E90N/E92C/T104A/E115K/E131K、E90N/E92C/T104N/E115K/E131K、E90N/E92C/D105A/E115K/E131K、E90N/E92C/T102V/T104N/E115K/E131K、E90N/E92C/T102N/T104N/E115K/E131K、E90N/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K、E90C/E92C/T100N/E115K/E131K、E90C/E92C/T102A/E115K/E131K、E90C/E92C/T102V/E115K/E131K、E90C/E92C/T102N/E115K/E131K、E90C/E92C/T102Q/E115K/E131K、E90C/E92C/T104A/E115K/E131K、E90C/E92C/T104N/E115K/E131K、E90C/E92C/D105A/E115K/E131K、E90C/E92C/T102V/T104N/E115K/E131K、E90C/E92C/T102N/T104N/E115K/E131K、E90C/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K、E90C/E92P/T100N/E115K/E131K、E90C/E92P/T102A/E115K/E131K、

[0393] E90C/E92P/T102V/E115K/E131K、

[0394] E90C/E92P/T102N/E115K/E131K、

[0395] E90C/E92P/T102Q/E115K/E131K、

[0396] E90C/E92P/T104A/E115K/E131K、

[0397] E90C/E92P/T104N/E115K/E131K、

[0398] E90C/E92P/D105A/E115K/E131K、

[0399] E90C/E92P/T102V/T104N/E115K/E131K、

[0400] E90C/E92P/T102N/T104N/E115K/E131K、

[0401] E90C/E92P/E113K/E115K/E129K/E131K、

[0402] E90P/E92C/T100N/E115K/E131K、

[0403] E90P/E92C/T102A/E115K/E131K、

[0404] E90P/E92C/T102V/E115K/E131K、

[0405] E90P/E92C/T102N/E115K/E131K、

[0406] E90P/E92C/T102Q/E115K/E131K、

[0407] E90P/E92C/T104A/E115K/E131K、

[0408] E90P/E92C/T104N/E115K/E131K、

[0409] E90P/E92C/D105A/E115K/E131K、

[0410] E90P/E92C/T102V/T104N/E115K/E131K、

[0411] E90P/E92C/T102N/T104N/E115K/E131K、或

[0412] E90P/E92C/E113K/E115K/E129K/E131K。

[0413] 该变体优选地包含紧接上文所示的针对SEQ ID NO:6的突变或由其组成。该变体可以是表3或表4中所示的任何突变体。

[0414] SEQ ID NO:6的变体优选与SEQ ID NO:2或4不相同(即,不与SEQ ID NO:2或4共有100%氨基酸同一性)。

[0415] 变体

[0416] 除了上面讨论的特定突变之外,变体还可以包括其他突变。在SEQ ID NO:2、4或6的氨基酸序列的整个长度上,基于氨基酸同一性,变体将优选与该序列至少70%同源。更优选地,基于氨基酸同一性,变体可以与SEQ ID NO:2、4或6的氨基酸序列在整个序列上至少75%、至少80%、至少85%、至少90%且更优选至少95%、97%、98%或99%同源。在SEQ ID NO:2、4或6的氨基酸序列的整个长度上,变体将优选与SEQ ID NO:2、4或6的氨基酸序列在整个序列上至少75%、至少80%、至少85%、至少90%且更优选至少95%、97%、98%或99%相同。提及在整个序列上的同源性或同一性可称为“全局”同源性或同一性。

[0417] 在一段100个或更多个,例如125个、150个、175个或200个或更多个连续氨基酸上可以存在至少80%,例如至少85%、90%或95%的氨基酸同一性(“硬同源性”)。

[0418] 软件包提供了可用于计算同源性的BESTFIT程序,例如在其默认设置上使用(Devereux等人(1984)Nucleic Acids Research 12,第387-395页)。PILEUP和BLAST算法可用于计算同源性或排列序列(诸如鉴定等效残基或对应序列(通常在其默认设置下)),例如如以下文献中所述:Altschul S.F.(1993)J Mol Evol 36:290-300;Altschul,S.F等人(1990)J Mol Biol 215:403-10。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)公开获得。

[0419] 除了上面讨论的那些之外,还可以对SEQ ID NO:2、4或6的氨基酸序列进行氨基酸取代,例如最多1、2、3、4、5、10、20或30个取代。保守取代用具有相似化学结构、相似化学特性或相似侧链体积的其他氨基酸替换氨基酸。引入的氨基酸可以具有与它们替换的氨基酸相似的极性、亲水性、疏水性、碱性、酸性、中性或电荷。可替代地,保守取代可引入另一种芳香族或脂肪族氨基酸来代替预先存在的芳香族或脂肪族氨基酸。保守氨基酸改变是本领域众所周知的并且可以根据如上表1中定义的20种主要氨基酸的特性来选择。当氨基酸具有相似的极性时,也可以通过参考表2中氨基酸侧链的亲水等级来确定它。

[0420] SEQ ID NO:2、4或6的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基可以另外从上述多肽中缺失。最多可缺失1、2、3、4、5、10、20或30个残基或更多个。

[0421] 变体可以包括SEQ ID NO:2、4或6的片段。此类片段保留了成孔活性。片段的长度可以是至少50、至少100、至少150、至少200或至少250个氨基酸。此类片段可用于产生本发明的孔。片段优选包含SEQ ID NO:2、4或6的成孔结构域。片段优选包括SEQ ID NO:2、4或6的氨基酸9至200。

[0422] 可以可替代地或另外地将一种或多种氨基酸添加至上述多肽中。可以在SEQ ID NO:2或其多肽变体或片段的氨基酸序列的氨基末端或羧基末端处提供延伸。延伸可以非常短,例如长度为1至10个氨基酸。可替代地,延伸可以更长,例如最多50或100个氨基酸。载体蛋白可以与根据本发明的氨基酸序列融合。其他融合蛋白将在下面更详细地讨论。

[0423] 如上所讨论的,变体是具有与SEQ ID NO:2、4或6不同的氨基酸序列并且保留其形成孔的能力的多肽。变体通常含有负责孔形成的SEQ ID NO:2、4或6的区域。SEQ ID NO:2、4或6的变体通常包含SEQ ID NO:2、4或6中形成β-链的区域。可以对形成β-链的SEQ ID NO:2、4或6的区域进行一个或多个修饰,只要所得变体保留其形成孔的能力。SEQ ID NO:2、4或6的变体优选包括其a-螺旋和/或环区域内的一个或多个修饰,诸如取代、添加或缺失。

[0424] 构建体

[0425] 本发明还提供了包含两个或更多个源自红球菌的共价附接的单体的构建体。本发明的构建体保留其形成孔的能力。本发明的一个或多个构建体可用于形成用于表征靶分析物,诸如对多肽或多核苷酸进行测序的孔。该构建体可以包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个单体。两个或更多个单体可以相同或不同。

[0426] 单体不必是本发明的突变体单体。例如,所有单体可包含SEQ ID NO:2、4或6中所示的序列。例如,至少一个单体可以包含SEQ ID NO:2、4或6中所示的序列。可替代地,至少一个单体可包含SEQ ID NO:2、4或6的变体,该变体基于氨基酸同一性在其整个序列上与SEQ ID NO:2、4或6至少50%同源,但不包括本发明的突变体单体所需的任何特定突变。更优选地,基于氨基酸同一性,变体可以与SEQ ID NO:2、4或6的氨基酸序列在整个序列上至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%,且更优选至少95%、97%或99%同源。在优选的实施例中,构建体中的至少一个单体是本发明的突变体单体。构建体中的所有单体可以是本发明的突变体单体。突变体单体可以相同或不同。在更优选的实施例中,构建体包含两个单体并且单体中的至少一者是本发明的突变体单体。

[0427] 单体优选是基因融合的。如果整个构建体由单个多核苷酸序列表达,则单体是基因融合的。单体的编码序列可以以任何方式组合以形成编码构建体的单个多核苷酸序列。

[0428] 单体可以以任何构型进行基因融合。单体可以经由它们的末端氨基酸进行融合。例如,一个单体的氨基末端可以与另一个单体的羧基末端融合。如果构建体由两个或更多个单体的基因融合形成,每个单体包含SEQ ID NO:2、4或6中所示的序列或其变体,则构建体中的第二个和后续单体(在氨基到羧基方向)可以在其氨基末端包含甲硫氨酸(每个氨基末端与前一个单体的羧基末端融合)。例如,如果M是包含SEQ ID NO:2、4或6中所示的序列或变体(不具有氨基末端甲硫氨酸)的单体并且mM是包含SEQ ID NO:2、4或6中所示的序列或变体(具有氨基末端甲硫氨酸)的单体,则构建体可以包含序列M-mM、M-mM-mM或M-mM-mM-mM。这些甲硫氨酸的存在通常是由起始密码子(即ATG)在编码整个构建体的多核苷酸内编码第二个或后续单体的多核苷酸的5'端的表达引起的。构建体中的第一单体(沿氨基至羧基方向)还可包含甲硫氨酸(例如,mM-mM、mM-mM-mM或mM-mM-mM-mM)。

[0429] 两个或更多个单体可以直接地基因融合在一起。单体优选地使用接头进行基因融合。接头可被设计为限制单体的移动性。优选的接头是氨基酸序列(即,肽接头)。可以使用上面讨论的任何肽接头。

[0430] 在另一个优选的实施例中,单体是化学融合的。如果两个部分是化学方式附接的,例如经由化学交联剂,则亚基与酶化学融合。可以使用上面讨论的任何化学交联剂。接头可附接至引入至本发明的突变体单体中的一个或多个半胱氨酸残基。可替代地,接头可附接至构建体中单体中的一者的末端。

[0431] 如果构建体含有不同的单体,则可以通过将接头的浓度保持在远远过量的单体中来防止单体对自身的交联。可替代地,可以使用其中使用两个接头的“锁和钥匙”排列。每个接头的仅一端可以反应在一起以形成更长的接头,并且接头的另一端各自与不同的单体反应。此类接头描述于国际申请号PCT/GB10/000132(公开为WO 2010/086602)中。

[0432] 多核苷酸

[0433] 本发明还提供了编码本发明的突变体孔或本发明的突变体单体的多核苷酸序列。突变体孔或突变体单体可以是上面讨论的那些中的任一者。多核苷酸序列优选包含基于核苷酸同一性与SEQ ID NO:1、3或5的序列在整个序列上至少50%、60%、70%、80%、90%或95%同源的序列。多核苷酸序列优选包含与SEQ ID NO:1、3或5的序列在整个序列上至少50%、60%、70%、80%、90%或95%相同的序列。提及在整个序列上的同源性或同一性可称为“全局”同源性或同一性。

[0434] 在一段300个或更多个,例如375个、450个、525个或600个或更多个连续核苷酸上可以存在至少80%,例如至少85%、90%或95%核苷酸同一性(“硬同源性”)。同源性可以如上所述进行计算。多核苷酸序列可以包含基于遗传密码的简并性而不同于SEQ ID NO:1、3或5的序列。

[0435] 本发明还提供了编码本发明的任何基因融合构建体的多核苷酸序列。多核苷酸优选地包含两个或更多个如SEQ ID NO:1、3或5中所示的序列或其如上所述的变体。

[0436] 多核苷酸序列可以使用本领域的标准方法衍生和复制。编码野生型Msp的染色体DNA可以从产生孔的生物体,诸如棒状杆菌红球菌中提取。编码孔亚基的基因可以使用涉及特异性引物的PCR来扩增。然后可以对扩增的序列进行定点诱变。合适的定点诱变方法是本领域已知的并且包括例如联合链式反应。编码本发明构建体的多核苷酸可以使用众所周知的技术来制备,诸如Sambrook,J.和Russell,D.(2001).Molecular Cloning:ALaboratory Manual,第3版.Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.中描述的那些。

[0437] 然后可以将所得多核苷酸序列掺入至重组可复制载体诸如克隆载体中。载体可用于在相容的宿主细胞中复制多核苷酸。因此,多核苷酸序列可以通过将多核苷酸引入至可复制的载体、将载体引入至相容的宿主细胞、以及在引起载体复制的条件下培养宿主细胞来制备。载体可以从宿主细胞中回收。用于克隆多核苷酸的合适宿主细胞是本领域已知的并且在下面更详细地描述。

[0438] 可以将多核苷酸序列克隆到合适的表达载体中。在表达载体中,多核苷酸序列通常可操作地连接至能够通过宿主细胞提供表达编码序列的控制序列。此类表达载体可用于表达孔亚基。

[0439] 术语“可操作地连接”是指并置,其中所描述的组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系。“可操作地连接”至编码序列的控制序列以此类方式连接,使得在与控制序列相容的条件下实现编码序列的表达。可以将相同或不同的多核苷酸序列的多个拷贝引入至载体中。

[0440] 然后可以将表达载体引入至合适的宿主细胞中。因此,本发明的突变体单体或构建体可以通过将多核苷酸序列插入至表达载体、将载体引入至相容的细菌宿主细胞、以及在引起多核苷酸序列表达的条件下培养宿主细胞来产生。重组表达的单体或构建体可以自

组装到宿主细胞膜中的孔中。可替代地,可以将以此方式产生的重组孔从宿主细胞中取出并插入至另一膜中。当产生包含至少两个不同亚基的孔时,不同的亚基可以如上所述在不同的宿主细胞中分别表达,从宿主细胞中取出,并组装到单独的膜(诸如兔细胞膜)中的孔中。

[0441] 载体可以是例如提供有复制起点、任选地用于表达所述多核苷酸序列的启动子和任选地启动子的调控子的质粒、病毒或噬菌体载体。载体可以含有一种或多种选择标记基因,例如四环素抗性基因。可以选择启动子和其他表达调控信号,以与设计的表达载体的宿主细胞相容。通常使用T7、trc、lac、ara或λ_L启动子。

[0442] 宿主细胞通常以高水平表达孔亚基。将选择用多核苷酸序列转化的宿主细胞,以与用于转化细胞的表达载体相容。宿主细胞通常是细菌,且优选大肠杆菌。具有λDE3溶原,例如C41(DE3)、BL21(DE3)、JM109(DE3)、B834(DE3)、TUNER、Origami和Origami B的任何细胞,可以表达包含T7启动子的载体。除了上面列出的条件之外,Proc Natl Acad Sci USA.2008年12月30日;105(52):20647-52中引用的任何方法可用于表达蛋白质。

[0443] 孔

[0444] 本发明还提供了各种孔,包括上述那些。本发明的孔非常适合表征分析物,诸如对多肽或多核苷酸进行测序,因为它们可以以高灵敏度辨别不同的氨基酸或核苷酸。这些孔可以令人惊讶地区分DNA和RNA中的四种核苷酸。本发明的孔甚至可以区分甲基化与未甲基化的核苷酸。本发明的孔的基础分辨率令人惊讶地高。该孔显示所有四种DNA核苷酸几乎完全分离。该孔基于在孔中的停留时间和流过孔的电流进一步辨别脱氧胞苷单磷酸(dCMP)与甲基-dCMP。

[0445] 本发明的孔还可以在一系列条件下辨别不同的氨基酸或核苷酸。特别地,该孔将在有利于表征分析物(诸如对多肽或多核苷酸进行测序)的条件下辨别氨基酸或核苷酸。本发明的孔可辨别不同氨基酸或核苷酸的程度可通过改变施加的电势、盐浓度、缓冲液、温度和添加剂(诸如尿素、甜菜碱和DTT)的存在来控制。这使得孔的功能能够得到微调,特别是在测序时。这将在下面更详细地讨论。本发明的孔还可用于从与一个或多个单体的相互作用而不是在逐个氨基酸或逐个核苷酸的基础上鉴定多肽或多核苷酸。

[0446] 本发明的孔可以是分离的、基本上分离的、纯化的或基本上纯化的。如果本发明的孔完全不含任何其他组分,诸如脂质或其他孔,则本发明的孔是分离的或纯化的。如果孔与不会干扰其预期用途的载体或稀释剂混合,则孔基本上是分离的。例如,如果孔以包含小于10%、小于5%、小于2%或小于1%的其他组分(诸如脂质或其他孔)的形式存在,则该孔是基本上分离的或基本上纯化的。可替代地,本发明的孔可以存在于脂质双层中。

[0447] 本发明的孔可以作为单独的或单一的孔存在。可替代地,本发明的孔可以存在于两个或更多个孔的同源或异源群体中。

[0448] 同源寡聚孔

[0449] 本发明还提供了包含本发明的相同突变体单体的同源寡聚孔。本发明的同源寡聚孔非常适合表征分析物,诸如对多肽或多核苷酸进行测序。本发明的同源寡聚孔可具有任何上面讨论的优点。

[0450] 同源寡聚孔可含有任意数量的突变体单体。孔通常包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个相同的突变体单体。孔优选包含7或8个相同的突变体单体。一个或多个,诸如2、3、4、5、6、7、

8、9或10个突变体单体优选如上所讨论进行化学修饰。

[0451] 下面更详细地讨论用于制造孔的方法。

[0452] 异源寡聚孔

[0453] 本发明还提供了包含至少一个本发明的突变体单体的异源寡聚孔,其中单体中的至少一者与其他单体不同。本发明的异源寡聚孔非常适合表征分析物,诸如对多肽或多核苷酸进行测序。异源寡聚孔可以使用本领域已知的方法进行制备(例如,Protein Sci.2002年7月;11(7):1813-24)。

[0454] 异源寡聚物孔含有足够的单体以形成孔。单体可以是任何类型的。孔通常包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个单体。孔优选包含7或8个单体。

[0455] 孔可包含至少一个单体,该单体包含(a)SEQ ID NO:2、4或6中所示的序列或(b)不具有本发明的突变体单体所需的突变的其变体。上面讨论了合适的变体。在该实施例中,剩余的单体优选为本发明的突变体单体。因此,孔可以包含9、8、7、6、5、4、3、2或1个本发明的突变体单体。

[0456] 在优选的实施例中,该孔包含(a)一个本发明的突变体单体和(b)七个相同的单体,其中(a)中的突变体单体不同于(b)中的相同单体。(b)中的相同单体优选包含(i)SEQ ID NO:2、4或6中所示的序列或(ii)其不具有本发明的突变体单体中存在的突变的变体。

[0457] 在另一个优选的实施例中,所有单体(即10、9、8、7、6、5、4、3或2个单体)都是本发明的突变体单体,并且它们中的至少一者与其他单体不同。在更优选的实施例中,孔包含八个本发明的突变体单体并且它们中的至少一者与其他单体不同。

[0458] 在上面讨论的所有实施例中,一个或多个,诸如2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变体单体优选如上所述进行化学修饰。上述优选的孔(a)至(c)优选通过将分子附接至引入的半胱氨酸中的一者或多者而进行化学修饰。

[0459] 下面更详细地讨论用于制造孔的方法。

[0460] 含有构建体的孔

[0461] 本发明还提供了包含至少一个本发明的构建体的孔。本发明的构建体包含两个或更多个共价附接的红球菌孔蛋白单体。换言之,构建体必须含有多于一个单体。孔含有足够的构建体,并且如果需要,还含有形成孔的单体。例如,八聚孔可包含(a)两个构建体,每个构建体包含四个单体,或(b)一个构建体,其包含两个单体和六个不形成构建体的一部分的单体。孔中的单体中的至少两者呈本发明的构建体的形式。单体可以是任何类型的。孔通常总共包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个单体(该单体中的至少两者必须在构建体中)。孔优选地包含7或8个单体(该单体中的至少两者必须在构建体中)。

[0462] 孔通常含有(a)一种包含两个单体的构建体和(b)1、2、3、4、5、6、7或8个单体。该构建体可以是上面讨论的那些中的任一者。单体可以是上面讨论的那些中的任一者,包括本发明的突变体单体。

[0463] 另一种典型的孔包含多于一个的本发明的构建体,诸如两个、三个或四个本发明的构建体。此类孔进一步包含足够的单体以形成孔。单体可以是上面讨论的那些中的任一者。本发明的另一孔仅包含含有2个单体的构建体,例如孔可包含1、2、3、4、5、6、7或8个含有2个单体的构建体。根据本发明的特定孔包含四个构建体,每个构建体包含两个单体。构建体可以寡聚成具有这样的结构的孔,使得只有一个构建体的单体对孔的桶或前庭有贡献。

通常,构建体的其他单体将位于孔的桶或前庭的外侧。例如,本发明的孔可包含1、2、3、4、5、6、7或8个含有2个单体的构建体,其中桶或前庭包含8个单体。

[0464] 可以如上所述将突变引入至构建体中。突变可以是交替的,即,对于两个单体构建体内的每个单体来说,突变是不同的,并且构建体被组装为同源寡聚物,导致交替修饰。换言之,包含MutA和MutB的单体融合并组装以形成A-B:A-B:A-B:A-B孔。可替代地,突变可以是相邻的,即,将相同的突变引入至构建体中的两个单体中,且然后将其与不同的突变体单体寡聚化。换言之,包含MutA的单体融合,随后与含有MutB的单体寡聚化以形成A-A:B:B:B:B:B。

[0465] 含有构建体的孔中的本发明的一个或多个单体可以如下文所讨论地进行化学修饰。

[0466] 用于制备经修饰的蛋白质的方法

[0467] 用于引入或取代非天然存在的氨基酸的方法也是本领域众所周知的。例如,可以通过在用于表达突变体单体的IVTT系统中包括合成的氨酰基-tRNA来引入非天然存在的氨基酸。可替代地,它们可以通过在大肠杆菌(E.coli)中表达突变体单体来引入,该大肠杆菌在特定氨基酸的合成(即非天然存在)类似物的存在下对于那些特定氨基酸是营养缺陷的。如果突变体单体是使用部分肽合成产生的,则它们也可以通过裸连接产生。

[0468] 本文描述的任何蛋白质,尤其是本发明的突变体单体,可以被修饰以帮助其鉴定或纯化,例如通过添加组氨酸残基(his标签)、天冬氨酸残基(asp标签)、链霉亲和素标签、flag标签、SUMO标签、GST标签或MBP标签,或通过添加信号序列以促进它们从细胞中分泌,其中单体或亚基天然地不含有此类序列。引入遗传标签的可替代方案是将标签化学反应到蛋白质上的天然或工程化位置上。该方案的实例是使凝胶转移试剂与蛋白质外部上的所工程化的半胱氨酸发生反应。

[0469] 蛋白质或单体可以用揭示标记来标记。揭示标记可以是允许检测单体或亚基的任何合适的标记。合适的标记包括但不限于荧光分子、放射性同位素(例如^{125}I、^{35}S)、酶、抗体、抗原、多核苷酸和配体(诸如生物素)。

[0470] 在一个实施例中,蛋白质或单体可以使用D-氨基酸来产生。例如,蛋白质或单体可以包含L-氨基酸和D-氨基酸的混合物。这是本领域用于生产此类蛋白质或肽的常规方法。

[0471] 蛋白质或单体可包含一种或多种特定修饰以促进氨基酸或核苷酸辨别。蛋白质或单体还可以含有其他非特异性修饰,只要它们不干扰孔形成即可。许多非特异性侧链修饰是本领域已知的,并且可以对跨膜蛋白纳米孔和/或辅助蛋白中的氨基酸侧链进行。此类修饰包括例如通过与醛反应然后用$NaBH_4$还原而进行的氨基酸还原烷基化、用乙酰亚氨酸甲酯进行的酰胺化或用乙酸酐进行的酰化。

[0472] 蛋白质或单体可以使用本领域已知的标准方法产生。蛋白质或单体可以合成方式或通过重组方式制备。例如,蛋白质可以通过体外翻译和转录(IVTT)来合成。可以修饰蛋白质的氨基酸序列以包括非天然存在的氨基酸或增加蛋白质的稳定性。当通过合成方式产生蛋白质时,可以在生产期间引入此类氨基酸。蛋白质也可以在合成或重组生产后被改变。用于产生跨膜蛋白纳米孔的合适方法在国际申请WO 2010/004273、WO 2010/004265或WO 2010/086603中讨论。用于将孔插入至膜中的方法是已知的。

[0473] 编码蛋白质的多核苷酸序列可以使用本领域的标准方法衍生和复制。编码蛋白质

的多核苷酸序列可以使用本领域的标准技术在细菌宿主细胞中表达。可以通过来自重组表达载体的多肽的原位表达在细胞中产生蛋白质。表达载体任选地携带诱导型启动子以控制多肽的表达。这些方法描述于Sambrook,J.和Russell,D.(2001).Molecular Cloning:ALaboratory Manual,第3版.Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY中。

[0474] 可以在通过任何蛋白质液相色谱系统从蛋白质生产生物体纯化后或在重组表达后大规模生产蛋白质。典型的蛋白质液相色谱系统包括FPLC、AKTA系统、Bio-Cad系统、Bio-Rad BioLogic系统和Gilson HPLC系统。

[0475] 两个或更多个单体可以彼此共价附接。例如,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个单体或亚基可以共价附接。共价附接的单体或亚基可以相同或不同。

[0476] 单体或亚基可以任选地经由接头进行基因融合,或者例如经由化学交联剂进行化学融合。用于共价附接单体或亚基的方法公开于WO2017/149316、WO2017/149317和WO2017/149318中。

[0477] 化学修饰

[0478] 在一些实施例中,突变体单体经过化学修饰。突变体单体可以以任何方式并且在任何位点进行化学修饰。例如,突变体单体可以通过以下方式而经化学修饰:将分子附接至一个或多个半胱氨酸(半胱氨酸连接)、将分子附接至一个或多个赖氨酸、将分子附接至一个或多个非天然氨基酸、对表位进行酶修饰或对末端进行修饰。用于进行此类修饰的合适方法是本领域众所周知的。突变体单体可以通过附接任何分子进行化学修饰。例如,突变体单体可以通过附接染料或荧光团进行化学修饰。

[0479] 在一些实施例中,用分子衔接子对突变体单体进行化学修饰,该分子衔接子促进包含单体的孔与靶分析物(诸如靶氨基酸、靶多肽、靶核苷酸或靶多核苷酸序列)之间的相互作用。衔接子的存在改善了孔和靶分析物的主客体化学,且从而改善了由突变体单体形成的孔的测序能力。主客体化学的原理是本领域众所周知的。衔接子对孔的物理或化学特性具有效果,该衔接子改善孔与靶分析物(诸如靶氨基酸、多肽、核苷酸或多核苷酸)的相互作用。衔接子可以改变孔的桶或通道的电荷或者与靶分析物特异性相互作用或结合,从而促进其与孔的相互作用。

[0480] 分子衔接子优选是环状分子、环糊精、能够杂交的物质、DNA结合剂或相互螯合剂、肽或肽类似物、合成聚合物、芳香族平面分子、带正电荷的小分子或能够形成氢键的小分子。

[0481] 衔接子可以是环状的。环状衔接子优选具有与孔相同的对称性。衔接子优选具有二重、三重、四重、五重、六重、七重、八重、九重或十重对称性,因为孔通常具有2至10个亚基围绕中心轴。这在上面更详细地讨论。

[0482] 衔接子通常经由主客体化学与靶分析物,诸如氨基酸、多肽、核苷酸或多核苷酸相互作用。衔接子通常能够与靶分析物相互作用。衔接子包含一种或多种能够与靶分析物相互作用的化学基团。一种或多种化学基团优选通过非共价相互作用,诸如疏水相互作用、氢键、范德华力、π阳离子相互作用和/或静电力与靶分析物相互作用。一种或多种能够与靶分析物相互作用的化学基团优选带正电荷。一种或多种能够与靶分析物相互作用的化学基团

更优选包括氨基。氨基可以附接至伯、仲或叔碳原子。衔接子甚至更优选包含氨基环,诸如6、7或8个氨基的环。衔接子最优选包含八个氨基的环。质子化氨基环可以与靶分析物中带负电荷的磷酸基团相互作用。

[0483] 衔接子在孔内的正确定位可以通过衔接子与包含突变体单体的孔之间的主客体化学来促进。衔接子优选包含一种或多种能够与孔中的一种或多种氨基酸相互作用的化学基团。衔接子更优选包含一种或多种能够经由非共价相互作用(诸如疏水相互作用、氢键、范德华力、π阳离子相互作用和/或静电力)与孔中的一种或多种氨基酸相互作用的化学基团。能够与孔中的一种或多种氨基酸相互作用的化学基团通常是羟基或胺。羟基可附接至伯、仲或叔碳原子。羟基可以与孔中不带电荷的氨基酸形成氢键。可以使用促进孔与靶分析物(诸如氨基酸、多肽、核苷酸或多核苷酸)之间的相互作用的任何衔接子。

[0484] 合适的衔接子包括但不限于环糊精、环肽和葫芦脲。衔接子优选是环糊精或其衍生物。环糊精或其衍生物可以是Eliseev,A.V.,和Schneider,H-J.(1994)J.Am.Chem.Soc.116,6081-6088中公开的那些中的任一者。衔接子更优选为七-6-氨基-β-环糊精(am7-βCD)、6-单脱氧-6-单氨基-β-环糊精(am1-βCD)或七-(6-脱氧-6-胍基)-环糊精(gu7-βCD)。gu7-βCD中的胍基具有比am7-βCD中的伯胺高得多的pKa,且因此带更多正电荷。该gu7-βCD衔接子可用于增加氨基酸或核苷酸在孔中的停留时间,以提高所测量的剩余电流的准确性,以及提高高温或低数据采集率下的碱基检测率。

[0485] 如果如下文更详细讨论的那样使用琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)交联剂,则衔接子优选是七(6-脱氧-6-氨基)-6-N-单(2-吡啶基)二硫代丙酰基-β-环糊精(am6amPDP1-βCD)。

[0486] 更合适的衔接子包括γ-环糊精,其包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个糖单元。γ-环糊精可含有接头分子或可以经修饰以包含在上面讨论的β-环糊精实例中使用的全部或多个经修饰的糖单元。

[0487] 分子衔接子可以共价附接至突变体单体。可使用本领域已知的任何方法将衔接子共价附接至孔。衔接子通常经由化学连接附接。如果分子衔接子经由半胱氨酸连接附接,则优选已经通过取代将一个或多个半胱氨酸引入至突变体,例如在桶中。突变体单体可以通过将分子衔接子附接至一个或多个引入至突变体单体中的半胱氨酸,例如通过取代来进行化学修饰。

[0488] 半胱氨酸残基的反应性可以通过相邻残基的修饰来增强。例如,侧接的精氨酸、组氨酸或赖氨酸残基的碱性基团会将半胱氨酸硫醇基团的pKa改变为更具反应性的S-基团的pKa。半胱氨酸残基的反应性可以通过硫醇保护基团诸如dTNB来保护。这些可以在接头附接之前与突变体单体的一个或多个半胱氨酸残基反应。

[0489] 该分子可以直接附接至突变体单体。优选使用接头,诸如化学交联剂或肽接头将分子附接至突变体单体。

[0490] 合适的化学交联剂是本领域众所周知的。优选的交联剂包括2,5-二氧代吡咯烷-1-基3-(吡啶-2-基二硫烷基)丙酸酯、2,5-二氧代吡咯烷-1-基4-(吡啶-2-基二硫烷基)丁酸酯和2,5-二氧代吡咯烷-1-基8-(吡啶-2-基二硫烷基)辛酸酯。最优选的交联剂是3-(2-吡啶基二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯(SPDP)。通常,在分子/交联剂复合物共价附接至突变体单体之前,分子共价附接至双功能交联剂,但也可以在双功能交联剂/单体复合物附接至分

子之前,将双功能交联剂共价附接至单体。肽接头的合适实例如上文所定义。

[0491] 接头优选对二硫苏糖醇(DTT)具有抗性。合适的接头包括但不限于基于碘乙酰胺和基于马来酰亚胺的接头。

[0492] 在其他实施例中,突变体单体可以附接至多核苷酸结合蛋白。这形成了可用于本发明的测序的方法中的模块化测序系统。多核苷酸结合蛋白可以是核酸处理酶,例如转位酶、聚合酶或解旋酶。

[0493] 多核苷酸结合蛋白优选共价附接至突变体单体。可以使用本领域已知的任何方法将蛋白质共价附接至单体。单体和蛋白质可以化学融合或基因融合。如果整个构建体由单个多核苷酸序列表达,则单体和蛋白质是基因融合的。单体与多核苷酸结合蛋白的基因融合在WO 2010/004265中讨论。

[0494] 如果多核苷酸结合蛋白经由半胱氨酸连接附接,则优选已经通过取代将一个或多个半胱氨酸引入至突变体。优选将一个或多个半胱氨酸引入至同源物当中具有低保守性的环区,这表明可以耐受突变或插入。因此它们适合于附接多核苷酸结合蛋白。半胱氨酸残基的反应性可以通过如上所述的修饰来增强。

[0495] 多核苷酸结合蛋白可直接附接至突变体单体或经由一个或多个接头附接。可以使用WO 2010/086602中描述的杂交接头将分子附接至突变体单体。可替代地,可以使用肽接头。肽接头是氨基酸序列。肽接头的长度、柔性和亲水性通常被设计成不会干扰单体和分子的功能。优选的柔性肽接头是2至20个,诸如4、6、8、10或16个丝氨酸和/或甘氨酸氨基酸的片段。更优选的柔性接头包括$(SG)_1$、$(SG)_2$、$(SG)_3$、$(SG)_4$、$(SG)_5$和$(SG)_8$,其中S是丝氨酸并且G是甘氨酸。优选的刚性接头是2至30个,诸如4、6、8、16或24个脯氨酸氨基酸的片段。更优选的刚性接头包括$(P)_{12}$,其中P是脯氨酸。

[0496] 突变体单体可以用分子衔接子和多核苷酸结合蛋白进行化学修饰。

[0497] 产生孔的方法

[0498] 本发明还提供了在体内和体外产生本发明的孔的方法。一个实施例提供了一种用于经由共表达产生本发明的孔的方法。该方法包括在合适的宿主细胞中表达必要的单体并允许体内孔形成。

[0499] 用于产生本发明的孔的另一种方法涉及所述单体的体外重构以获得功能性孔。所述方法包括使必要的单体在合适的系统中接触以允许复合物形成的步骤。所述系统可以是“体外系统”,其是指至少包括执行所述方法所必需的组分和环境的系统,并且利用其正常天然存在的环境外部的生物分子、生物体、细胞(或细胞的一部分),允许比对整个生物体进行更详细、更方便或更有效的分析。体外系统还可以包含在试管中提供的合适的缓冲液组合物,其中已经添加了形成复合物的所述蛋白质组分。本领域技术人员意识到提供所述系统的选项。

[0500] 可以对一些或全部单体进行加标签以促进纯化。当单体未加标签时也可以执行纯化。本领域已知的方法(例如离子交换、凝胶过滤、疏水相互作用柱色谱等)可以单独使用或以不同的组合使用以纯化孔的组分。

[0501] 试剂盒

[0502] 本发明还提供了一种用于表征靶多核苷酸或靶多肽的试剂盒。该试剂盒包含红球菌孔,优选分离的红球菌孔,以及多核苷酸结合蛋白或多肽处理酶。

[0503] 红球菌孔可以是野生型孔。孔可由包含SEQ ID NO:2、4或6中所示序列的单体形成。孔可包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个含有SEQ ID NO:2、4或6中所示序列的单体，优选2、3、4、5、6、7、8、9或10个相同的单体。孔优选为本发明的孔并且可以是上述孔中的任一者，包括突变体孔、异源寡聚孔、同源寡聚孔和含有构建体的孔。

[0504] 多核苷酸结合蛋白可以是上面讨论的那些中的任一者。如上所讨论，多核苷酸结合蛋白或多肽处理酶可以附着至孔。

[0505] 试剂盒优选进一步包含膜的组分。试剂盒可包含任何类型的膜，诸如两亲层或三嵌段共聚物膜的组分。试剂盒可以进一步包含一种或多种锚定物，诸如胆固醇，用于将靶多核苷酸偶联至膜。试剂盒可以进一步包含一种或多种多核苷酸衔接子，该多核苷酸衔接子可附接至靶多核苷酸以促进多核苷酸的表征。在一个实施例中，锚定物，诸如胆固醇，附接至多核苷酸衔接子。

[0506] 试剂盒可以另外地包含一种或多种能够实现上述待进行的任何实施例的其他试剂或仪器。此类试剂或仪器包括以下项中的一者或多者：合适的缓冲液(水溶液)、从受试者获得样品的工具(诸如包含针的容器或仪器)、扩增和/或表达多核苷酸的工具、或者电压或膜片钳装置。试剂盒中的试剂可以以干燥状态存在，使得流体样品重新悬浮试剂。试剂盒还可以任选地包含使得试剂盒能够用于本发明的方法中的说明书或关于该方法可以用于哪种生物体的细节。最后，试剂盒还可以包含可用于分析物表征的另外组分。

[0507] 装置

[0508] 本发明还提供了用于表征样品中的靶多核苷酸或靶多肽的装置。该装置包含多个红球菌孔，优选多个分离的红球菌孔，以及多个多核苷酸结合蛋白或多个多肽处理酶。红球菌孔可以是上面参考本发明的试剂盒讨论的那些中的任一者，包括野生型孔。红球菌孔优选为本发明的孔并且可以是上述孔中的任一者，包括突变体孔、异源寡聚孔、同源寡聚孔和含有构建体的孔。多核苷酸结合蛋白可以是上面讨论的那些中的任一者。如上所讨论，多核苷酸结合蛋白或多肽处理酶可以附着至孔。

[0509] 本发明还提供了一种装置，其包含插入至体外膜中的跨膜蛋白孔，其中该跨膜蛋白孔包含至少一个单体，该至少一个单体是红球菌孔蛋白单体的变体并且在(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含突变，其是对应于SEQ ID NO:2中所示的序列。上文参考本发明的孔和单体讨论了关于SEQ ID NO:2的(a)、(b)和/或(c)中的位置。

[0510] 本发明还提供了一种通过包括以下方式的方法生产的装置：(i)获得包含至少一个红球菌孔蛋白单体的跨膜蛋白孔，其中该单体在(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含氨基酸突变，其是对应于SEQ ID NO:2中所示的序列；以及(ii)使孔与体外膜接触，使得孔插入在体外膜中。上文参考本发明的孔和单体讨论了关于SEQ ID NO:2的(a)、(b)和/或(c)中的位置。

[0511] 本发明还提供了一种装置，其包含插入至体外膜中的跨膜蛋白孔，其中该跨膜蛋白孔包含至少一个单体，该至少一个单体是红球菌孔蛋白单体的变体并且在(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含突变，其是对应于SEQ ID NO:4中所示的序列。上文参考本发明的孔和单体讨论了关于SEQ ID NO:4的(a)、(b)和/或(c)中的位置。

[0512] 本发明还提供了一种通过包括以下方式的方法生产的装置：(i)获得包含至少一个红球菌孔蛋白单体的跨膜蛋白孔，其中该单体在(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置

处包含氨基酸突变,其是对应于SEQ ID NO:4中所示的序列;以及(ii)使孔与体外膜接触,使得孔插入在体外膜中。上文参考本发明的孔和单体讨论了关于SEQ ID NO:4的(a)、(b)和/或(c)中的位置。

[0513] 本发明还提供了一种装置,其包含插入至体外膜中的跨膜蛋白孔,其中该跨膜蛋白孔包含至少一个单体,该至少一个单体是红球菌孔蛋白单体的变体并且在(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含突变,其是对应于SEQ ID NO:6中所示的序列。上文参考本发明的孔和单体讨论了关于SEQ ID NO:6的(a)、(b)和/或(c)中的位置。

[0514] 本发明还提供了一种通过包括以下方式的方法生产的装置:(i)获得包含至少一个红球菌孔蛋白单体的跨膜蛋白孔,其中该单体在(a)、(b)和/或(c)中的一个或多个位置处包含氨基酸突变,其是对应于SEQ ID NO:6中所示的序列;以及(ii)使孔与体外膜接触,使得孔插入在体外膜中。上文参考本发明的孔和单体讨论了关于SEQ ID NO:6的(a)、(b)和/或(c)中的位置。

[0515] 上面讨论的任何具体实施例,尤其是与本发明的孔和单体有关的具体实施例,同样适用于本发明的装置。

[0516] 包含孔的膜

[0517] 本发明还提供了包含红球菌孔、优选分离的红球菌孔的膜。孔优选存在于膜中,一起形成跨膜孔。膜可包含任何类型的膜,诸如两亲层或三嵌段共聚物膜的组分。膜可以进一步包含附着至孔的多核苷酸结合蛋白或多肽处理酶。膜可以进一步包含一个或多个用于将多核苷酸或多肽偶联至膜的锚定物。红球菌孔可以是上面参考本发明的试剂盒讨论的那些中的任一者,包括野生型孔。红球菌孔优选为本发明的孔并且可以是上述孔中的任一者,包括突变体孔、异源寡聚孔、同源寡聚孔和含有构建体的孔。

[0518] 阵列

[0519] 本发明还提供了包含多个本发明的膜的阵列。上文关于本发明的膜讨论的任何实施例同样适用于本发明的阵列。该阵列可以被设置为执行下述方法中的任一者。

[0520] 在优选实施例中,阵列中的每个膜包含一个孔。由于阵列形成的方式,例如,阵列可包含一个或多个不包含孔的膜,和/或一个或多个包含两个或更多个孔的膜。该阵列可包含约2至约1000个、诸如约10至约800、约20至约600或约30至约500个膜。

[0521] 系统

[0522] 本发明提供了一种系统,其包括(a)本发明的膜或本发明的阵列,(b)用于跨膜施加电势的工具,以及(c)用于检测跨膜的电信号或光信号的工具。

[0523] 本发明还提供了一种系统,其包括(a)包含红球菌孔的膜或多个膜,(b)用于跨过膜施加电势的工具,以及(c)用于检测跨膜的电信号或光信号的工具。红球菌孔可以是上面参考本发明的试剂盒讨论的那些中的任一者,包括野生型孔。红球菌孔优选为本发明的孔并且可以是上述孔中的任一者,包括突变体孔、异源寡聚孔、同源寡聚孔和含有构建体的孔。

[0524] 孔和膜可以是如本文上面所述的任何孔和膜。

[0525] 在一个实施例中,该系统进一步包括第一室和第二室,其中第一室和第二室由膜分开。当用于表征靶分析物时,该系统可以进一步包括靶分析物,其中靶分析物瞬时位于连续通道内,并且其中靶分析物的一端位于第一室中,并且靶分析物的一端位于第二室中。靶

分析物优选是靶多肽或靶多核苷酸。

[0526] 在一个实施例中,该系统进一步包括与孔接触的导电溶液、提供跨膜的电压电势的电极、以及用于测量通过孔的电流的测量系统。在一个实施例中,跨膜和孔施加的电压为+5V至-5V,诸如-600mV至+600mV或-400mV至+400mV。所使用的电压优选在100mV至240mV的范围内,且更优选在120mV至220mV的范围内。通过使用增加的所施加的电势,可以通过孔来增加不同氨基酸或核苷酸之间的辨别。可以使用任何合适的导电溶液。例如,溶液可以包含电荷载体,诸如金属盐、例如碱金属盐,卤化物盐、例如氯化物盐、诸如碱金属氯化物盐。电荷载体可以包括离子液体或有机盐,例如四甲基氯化铵、三甲基苯基氯化铵、苯基三甲基氯化铵或1-乙基-3-甲基氯化咪唑鎓。在示例性系统中,盐存在于室中的水溶液中。通常使用氯化钾(KCl)、氯化钠(NaCl)、氯化铯(CsCl)或亚铁氰化钾和铁氰化钾的混合物。优选KCl、NaCl以及亚铁氰化钾和铁氰化钾的混合物。电荷载体可以是跨膜不对称的。例如,在膜的每一侧(例如在每个室)上的电荷载体的类型和/或浓度可以不同。

[0527] 盐浓度可以处于饱和状态。盐浓度可以为3M或更低,且通常为0.1至2.5M、0.3至1.9M、0.5至1.8M、0.7至1.7M、0.9至1.6M、或1M至1.4M。盐浓度优选为150mM至1M。该方法优选使用至少0.3M,诸如至少0.4M、至少0.5M、至少0.6M、至少0.8M、至少1.0M、至少1.5M、至少2.0M、至少2.5M或至少3.0M的盐浓度进行。高盐浓度提供高信噪比并且允许电流指示针对正常电流波动背景待鉴定的氨基酸或核苷酸的存在。

[0528] 导电溶液中可以存在缓冲液。通常,缓冲液是磷酸盐缓冲液。其他合适的缓冲液是HEPES和Tris-HCl缓冲液。导电溶液的pH可以为4.0至12.0、4.5至10.0、5.0至9.0、5.5至8.8、6.0至8.7、或7.0至8.8、或7.5至8.5。所使用的pH优选为约7.5。

[0529] 该系统可以被包括在装置中。该装置可以是用于分析物分析的任何常规装置,诸如阵列或芯片。该装置优选地被设置为进行所公开的方法。例如,该装置可以包括包含水溶液的室以及将该室分成两个部分的屏障。屏障通常具有孔径,在该孔径中形成含有孔的膜。可替代地,屏障形成其中存在孔的膜。

[0530] 装置还可以包括能够跨越膜和孔施加电势并测量电信号的电路。

[0531] 该装置可以是WO 2008/102120、WO 2009/077734、WO 2010/122293、WO 2011/067559或WO 00/28312中描述的那些中的任一者。

[0532] 膜

[0533] 系统中可以使用任何合适的膜。该膜优选是两亲层。两亲层是由两亲分子诸如磷脂形成的层,它具有亲水性和亲脂性两者。两亲分子可以是合成的或天然存在的。非天然存在的两亲物和形成单层的两亲物是本领域已知的并且包括例如嵌段共聚物(Gonzalez-Perez等人,Langmuir,2009,25,10447-10450)。嵌段共聚物是其中两个或更多个单体亚基聚合在一起形成单个聚合物链的聚合物材料。嵌段共聚物通常具有由每个单体亚基贡献的特性。然而,嵌段共聚物可能具有由各个亚基形成的聚合物所不具备的独特特性。嵌段共聚物可经工程化使得单体亚基中的一者是疏水性的(即亲脂性的),而其他亚基当在水性介质中时是亲水性的。在这种情况下,嵌段共聚物可以具有两亲特性并且可以形成模拟生物膜的结构。嵌段共聚物可以是二嵌段(由两个单体亚基组成),但也可以由多于两个单体亚基构建以形成表现为两亲物的更复杂的排列。该共聚物可以是三嵌段、四嵌段或五嵌段共聚物。该膜优选是三嵌段共聚物膜。

[0534] 古细菌双极性四醚脂质是天然存在的脂质,其构造成使得脂质形成单层膜。这些脂质通常存在于在恶劣的生物环境中生存的极端微生物、嗜热微生物、嗜盐微生物和嗜酸微生物中。据信它们的稳定性源自最终双层的融合性质。通过创建具有一般基序亲水-疏水-亲水的三嵌段聚合物,可以直接构建模拟这些生物实体的嵌段共聚物材料。这种材料可以形成单体膜,该单体膜行为类似于脂质双层,并涵盖从囊泡到层状膜的一系列相行为。由这些三嵌段共聚物形成的膜与生物脂质膜相比具有几种优点。因为三嵌段共聚物是合成的,因此可以仔细控制精确的结构,以提供形成膜以及与孔和其他蛋白质相互作用所需的正确链长和特性。

[0535] 嵌段共聚物也可以由不归类为脂质子材料的亚基构建;例如,疏水性聚合物可以由硅氧烷或其他非烃基单体制成。嵌段共聚物的亲水子部分还可以具有低蛋白质结合特性,这使得可以形成在暴露于原始生物样品时具有高度耐受性的膜。该头基单元也可以源自非经典脂质头基。

[0536] 与生物脂质膜相比,三嵌段共聚物膜还具有增加的机械和环境稳定性,例如更高的操作温度或pH范围。嵌段共聚物的合成性质提供了平台来为各种应用定制聚合物基膜。

[0537] 该膜最优选是国际申请号WO2014/064443或WO2014/064444中公开的膜中的一者。

[0538] 两亲分子可以经化学修饰或功能化以促进多核苷酸的偶联。两亲层可以是单层或双层。两亲层通常是平面的。两亲层可以是弯曲的。两亲层可以被支撑。

[0539] 两亲膜通常是天然可移动的,本质上充当具有脂质扩散速率大约为10^{-8}cm s^{-1}的二维流体。这意指孔和偶联的多核苷酸通常可以在两亲膜内移动。

[0540] 该膜可以是脂质双层。脂质双层是细胞膜的模型,并且充当一系列实验研究的优秀平台。例如,脂质双层可用于通过单通道记录进行膜蛋白的体外研究。可替代地,脂质双层可用作生物传感器来检测一系列物质的存在。脂质双层可以是任何脂质双层。合适的脂质双层包括但不限于平面脂质双层、支撑双层或脂质体。脂质双层优选是平面脂质双层。合适的脂质双层公开于WO 2008/102121、WO 2009/077734和WO 2006/100484中。

[0541] 用于形成脂质双层的方法是本领域已知的。脂质双层通常通过Montal和Mueller的方法形成(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,1972;69:3561-3566),在该脂质双层中,脂质单层通过垂直于该界面的孔径的任一侧而承载在水溶液/空气界面上。通过首先将脂质溶解在有机溶剂中,且然后让一滴溶剂在孔径的任一侧上的水溶液表面上蒸发,而将脂质通常添加至电解质水溶液的表面。一旦有机溶剂蒸发,孔径的任一侧上的溶液/空气界面就会物理地上下移动经过孔径,直到形成双层。平面脂质双层可以跨过膜中的孔径或跨过进入凹部的开口而形成。

[0542] Montal&Mueller的方法很受欢迎,因为它是一种具有成本效益且相对直接的形成适合于蛋白质孔插入的优质脂质双层的方法。双层形成的其他常见方法包括尖端浸渍、涂抹双层和脂质体双层的膜片钳。

[0543] 尖端浸渍双层形成需要将孔径表面(例如移液管吸头)接触到携带脂质单层的测试溶液的表面上。同样,通过让溶解在有机溶剂中的一滴脂质在溶液表面蒸发,首先在溶液/空气界面处生成脂质单层。然后通过Langmuir-Schaefer工艺形成双层,并需要机械自动化来相对于溶液表面移动孔径。

[0544] 对于涂抹的双层,将一滴溶解在有机溶剂中的脂质直接施加至孔径上,将其浸入

测试水溶液中。使用漆刷或类似物将脂质溶液薄薄地涂在孔径上。溶剂的稀释导致脂质双层的形成。然而,从双层中完全去除溶剂是困难的,且因此通过该方法形成的双层不太稳定并且在电化学测量期间更容易产生噪声。

[0545] 膜片钳通常用于生物细胞膜的研究。通过吸力将细胞膜夹在移液管末端,并将一小块膜附着在孔径上方。该方法适用于通过夹紧脂质体来产生脂质双层,然后脂质体破裂以留下密封在移液管的孔径上的脂质双层。该方法需要稳定、巨大且单层的脂质体,并在具有玻璃表面的材料中制造小孔径。

[0546] 脂质体可以通过超声处理、挤出或Mozafari方法形成(Colas等人(2007)Micron38:841-847)。

[0547] 在优选的实施例中,脂质双层如国际申请号WO 2009/077734中所述形成。有利地,在该方法中,脂质双层由干燥的脂质形成。在最优选的实施例中,脂质双层跨开口形成,如WO2009/077734中所述。

[0548] 脂质双层由两个相对的脂质层形成。两层脂质排列成使得它们的疏水尾基彼此面对以形成疏水内部。脂质的亲水头基向外面向双层的每一侧上的水性环境。双层可以存在于许多脂质相中,包括但不限于液体无序相(流体层状)、液体有序相、固体有序相(层状凝胶相、叉指状凝胶相)和平面双层晶体(层状亚凝胶相、层状结晶相)。

[0549] 可以使用形成脂质双层的任何脂质组合物。选择脂质组合物,使得形成具有所需特性的脂质双层,该特性诸如表面电荷、支持膜蛋白的能力、堆积密度或机械特性。脂质组合物可包含一种或多种不同的脂质。例如,脂质组合物可含有最多100种脂质。脂质组合物优选含有1至10种脂质。脂质组合物可包含天然存在的脂质和/或人工脂质。

[0550] 脂质通常包含头基、界面部分和两个可以相同或不同的疏水尾基。合适的头基包括但不限于中性头基,诸如二酰基甘油酯(DG)和神经酰胺(CM);两性离子头基,诸如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)和鞘磷脂(SM);带负电荷的头基,诸如磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)、磷酸(PA)和心磷脂(CA);以及带正电荷的头基,诸如三甲基丙烷铵(TAP)。合适的界面部分包括但不限于天然存在的界面部分,诸如甘油基或神经酰胺基部分。合适的疏水尾基包括但不限于饱和烃链,诸如月桂酸(正十二烷酸)、肉豆蔻酸(正十四烷酸)、棕榈酸(正十六烷酸)、硬脂酸(正十八烷酸)和花生酸(正二十烷酸);不饱和烃链,诸如油酸(顺-9-十八烷酸);以及支化烃链,诸如植酰基。不饱和烃链中的链的长度以及双键的位置和数量可以变化。支化烃链中的链的长度以及支链诸如甲基的位置和数量可以变化。疏水尾基可以作为醚或酯连接至界面部分。脂质可以是霉菌酸。

[0551] 脂质也可以经化学修饰。脂质的头基或尾基可以经化学修饰。其头基已经化学修饰的合适的脂质包括但不限于经PEG修饰的脂质,诸如1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000];功能化的PEG脂质,诸如1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3磷酸乙醇胺-N-[生物素基(聚乙二醇)2000];以及用于缀合的经修饰的脂质,诸如1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰基)和1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-(生物素基)。其尾基已经化学修饰的合适的脂质包括但不限于可聚合脂质,诸如1,2-双(10,12-二十二炔酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱;氟化脂质,诸如1-棕榈酰基-2-(16-氟棕榈酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱;氘化脂质,诸如1,2-二棕榈酰基-D62-sn-甘油-3-磷酸胆碱;以及醚连接的脂质,诸如1,2-二-O-植烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。脂质可以经化学修饰或

功能化以促进多核苷酸的偶联。

[0552] 两亲层,例如脂质组合物,通常包含一种或多种将影响该层的特性的添加剂。合适的添加剂包括但不限于脂肪酸,诸如棕榈酸、肉豆蔻酸和油酸;脂肪醇,诸如棕榈醇、肉豆蔻醇和油醇;甾醇,诸如胆固醇、麦角甾醇、羊毛甾醇、谷甾醇和豆甾醇;溶血磷脂,诸如1-酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸胆碱;以及神经酰胺。

[0553] 在另一个优选的实施例中,膜包含固态层。固态层可以由有机材料和无机材料两者形成,该材料包括但不限于微电子材料、绝缘材料(诸如Si_3N_4、$A1_2O_3$和SiO)、有机和无机聚合物(诸如聚酰胺)、塑料(诸如Teflon®)或弹性体(诸如双组分加成固化硅橡胶)和玻璃。固态层可以由石墨烯形成。合适的石墨烯层公开于WO 2009/035647中。如果膜包含固态层,则孔通常存在于固态层内包含的两亲膜或层中,例如存在于固态层内的孔、井、间隙、通道、沟槽或狭缝内。技术人员可以制备合适的固态/两亲混合系统。合适的系统公开于WO 2009/020682和WO 2012/005857中。可以使用上面讨论的两亲膜或层中的任一者。

[0554] 该方法通常使用以下项来进行:(i)包含孔的人工两亲层,(ii)包含孔的分离的天然存在的脂质双层,或(iii)其中插入的有孔的细胞。该方法通常使用人工两亲层诸如人工三嵌段共聚物层来进行。除了孔之外,该层还可以包含其他跨膜和/或膜内蛋白质以及其他分子。下面讨论合适的装置和条件。本发明的方法通常在体外进行。

[0555] 表征分析物的方法

[0556] 本发明还提供了一种确定靶分析物的存在、不存在或一种或多种特征的方法。该方法包括使靶分析物与红球菌孔接触,使得靶分析物分别相对于孔移动,诸如进入或穿过孔,并且当分析物相对于孔移动时进行一次或多次测量,且从而确定分析物的存在、不存在或一种或多种特征。红球菌孔可以是上面参考本发明的试剂盒讨论的那些中的任一者,包括野生型孔。红球菌孔优选为本发明的孔并且可以是上述孔中的任一者,包括突变体孔、异源寡聚孔、同源寡聚孔和含有构建体的孔。分析物可以穿过孔缩窄。孔可以存在于膜中。

[0557] 在一个实施例中,该方法用于确定靶分析物的存在、不存在或一种或多种特征。该方法可以用于确定至少一种分析物的存在、不存在或一种或多种特征。该方法可以涉及确定两种或更多种分析物的存在、不存在或一种或多种特征。该方法可包括确定任何数量的分析物(诸如2、5、10、15、20、30、40、50、100或更多种分析物)的存在、不存在或一种或多种特征。可以确定一种或多种分析物的任何数量的特征,诸如1、2、3、4、5、10或更多种特征。

[0558] 孔的通道中或通道的任一开口附近的分子的结合都将对通过孔的开放通道离子流产生效果,这就是孔通道的“分子感测”的本质。以与核酸测序应用类似的方式,可以使用合适的测量技术通过电流的变化来测量开放通道离子流的变化(例如,WO 2000/28312和D.Stoddart等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,2010,106,7702-7或WO 2009/077734)。通过电流的减少来测量的离子流减少的程度,与孔内或孔附近的障碍物的尺寸有关。因此,目标分子(也称为“分析物”)在孔中或孔附近的结合提供了可检测和可测量的事件,从而形成“生物传感器”的基础。用于纳米孔感测的合适分子包括核酸;蛋白质;肽;多糖和小分子(此处指低分子量(例如,<900Da或<500Da)有机或无机化合物),诸如药物、毒素、细胞因子和污染物。检测生物分子的存在可应用于个性化药物开发、医学、诊断、生命科学研究、环境监测以及应用于安全和/或国防工业。

[0559] 靶分析物可以是金属离子、无机盐、聚合物、氨基酸、肽、多肽、蛋白质、核苷酸、寡

核苷酸、多核苷酸、多糖、染料、漂白剂、药物、诊断剂、消遣性药物、爆炸物、有毒化合物或环境污染物。靶分析物优选是或包括多肽、多核苷酸或多糖。靶分析物可以是代谢物。

[0560] 该方法可以涉及确定相同类型的两种或更多种分析物(诸如两种或更多种蛋白质、两种或更多种核苷酸或者两种或更多种药物)的存在、不存在或一种或多种特征。可替代地,该方法可以涉及确定不同类型的两种或更多种分析物(诸如一种或多种蛋白质、一种或多种核苷酸以及一种或多种药物)的存在、不存在或一种或多种特征。

[0561] 靶分析物可以从细胞中分泌。可替代地,靶分析物可以是存在于细胞内部的分析物,使得在可以进行该方法之前必须从细胞中提取分析物。

[0562] 在一个实施例中,分析物是氨基酸、肽、多肽或蛋白质。氨基酸、肽、多肽或蛋白质可以是天然存在的或非天然存在的。多肽或蛋白质可以在其内包括合成的或经修饰的氨基酸。对氨基酸的几种不同类型的修饰是本领域已知的。合适的氨基酸及其修饰如上所述。应当理解,靶分析物可以通过本领域可用的任何方法进行修饰。该方法优选包括(i)使多肽与能够控制多肽相对于孔的移动的多肽处理酶接触;以及(ii)当多肽相对于孔移动时,进行以多肽为特征的一次或多次测量。

[0563] 在优选的实施例中,分析物是多核苷酸,诸如核酸。该方法优选地包括(i)使多核苷酸与能够控制多核苷酸相对于孔的移动的多核苷酸结合蛋白接触;以及(ii)当多核苷酸相对于孔移动时,进行以多核苷酸为特征的一次或多次测量。多核苷酸定义为包含两个或更多个核苷酸的大分子。DNA和RNA中天然存在的核酸碱基可通过其物理大小来区分。当核酸分子或单个碱基穿过纳米孔的通道时,碱基之间的尺寸差异引起通过通道的离子流中的直接相关的减少。可以记录离子流的变化。用于记录离子流变化的合适的电测量技术描述于例如WO 2000/28312和D.Stoddart等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,2010,106,第7702-7页(单通道记录设备);以及例如描述于WO 2009/077734(多通道记录技术)中。通过适当的校准,离子流的特征减少可用于实时鉴定穿过通道的特定核苷酸和相关碱基。在典型的纳米孔核酸测序中,当目标核酸序列的各个核苷酸依序通过纳米孔的通道时,由于通道被核苷酸部分堵塞,开放通道离子流减少。使用上述合适的记录技术来测量离子流的这种减少。离子流的减少可被校准为通过通道的已知核苷酸的测量离子流的减少,从而产生一种用于确定哪个核苷酸正在通过通道的方式,并且因此,当依序进行时,产生一种确定核酸的核苷酸序列通过纳米孔的方法。为了准确确定单个核苷酸,通常需要通过通道的离子流的减少以与通过缩窄(或“读数头”)的单个核苷酸的大小直接相关。应当理解,可以对经由例如相关聚合酶或解旋酶的作用而“线”穿过孔的完整核酸聚合物执行测序。可替代地,可以通过已经从孔附近的靶核酸依序去除的三磷酸核苷酸碱基的通过来确定序列(参见例如WO 2014/187924)。

[0564] 多核苷酸或核酸可以包含任何核苷酸的任何组合。核苷酸可以是天然存在的或人工的。多核苷酸中的一种或多种核苷酸可以被氧化或甲基化。多核苷酸中的一种或多种核苷酸可能被损坏。例如,多核苷酸可包含嘧啶二聚体。此类二聚体通常与紫外线损伤有关,并且是皮肤黑色素瘤的主要原因。多核苷酸中的一种或多种核苷酸可以被修饰,例如用标记或标签进行修饰,其合适的实例是技术人员已知的。多核苷酸可包含一个或多个间隔区。核苷酸通常含有核碱基、糖和至少一个磷酸基团。核碱基和糖形成核苷。核碱基通常是杂环的。核碱基包括但不限于嘌呤和嘧啶,且更具体地为腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、

尿嘧啶(U)和胞嘧啶(C)。糖通常是戊糖。核苷酸糖包括但不限于核糖和脱氧核糖。糖优选是脱氧核糖。多核苷酸优选包含以下核苷:脱氧腺苷(dA)、脱氧尿苷(dU)和/或胸苷(dT)、脱氧鸟苷(dG)和脱氧胞苷(dC)。核苷酸通常是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。核苷酸通常含有单磷酸盐、二磷酸盐或三磷酸盐。核苷酸可以包含多于三个磷酸根,诸如4个或5个磷酸根。磷酸盐可以附接在核苷酸的5'或3'侧。多核苷酸中的核苷酸可以以任何方式彼此附接。核苷酸通常通过其糖基和磷酸基团附接,如在核酸中一样。核苷酸可以经由其核碱基连接,如在嘧啶二聚体中一样。多核苷酸可以是单链的或双链的。多核苷酸的至少一部分优选是双链的。多核苷酸最优选是核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)。特别地,所述使用多核苷酸作为分析物的方法可替代地包括确定选自以下项的一种或多种特征:(i)多核苷酸的长度,(ii)多核苷酸的同一性,(iii)多核苷酸的序列,(iv)多核苷酸的二级结构以及(v)多核苷酸是否被修饰。

[0565] 多核苷酸可以是任何长度(i)。例如,多核苷酸的长度可以是至少10、至少50、至少100、至少150、至少200、至少250、至少300、至少400或至少500个核苷酸或核苷酸对。多核苷酸的长度可以是1000个或更多个核苷酸或核苷酸对、长度是5000个或更多个核苷酸或核苷酸对或者长度是100000个或更多个核苷酸或核苷酸对。可以研究任意数量的多核苷酸。例如,该方法可以涉及表征2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50、100或更多个多核苷酸。如果表征两个或更多个多核苷酸,则它们可以是不同的多核苷酸或相同多核苷酸的两个实例。多核苷酸可以是天然存在的或人工的。例如,该方法可用于验证制造的寡核苷酸的序列。该方法通常在体外进行。

[0566] 核苷酸可以具有任何同一性(ii),并且包括但不限于单磷酸腺苷(AMP)、单磷酸鸟苷(GMP)、单磷酸胸苷(TMP)、单磷酸尿苷(UMP)、单磷酸5-甲基胞苷、单磷酸5-羟甲基胞苷、单磷酸胞苷(CMP)、环单磷酸腺苷(cAMP)、环单磷酸鸟苷(cGMP)、单磷酸脱氧腺苷(dAMP)、单磷酸脱氧鸟苷(dGMP)、单磷酸脱氧胸苷(dTMP)、单磷酸脱氧尿苷(dUMP)、单磷酸脱氧胞苷(dCMP)和单磷酸脱氧甲基胞苷。核苷酸优选地选自AMP、TMP、GMP、CMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMP、dCMP和dUMP。核苷酸可以是无碱基的(即缺乏核碱基)。核苷酸也可能缺少核碱基和糖(即,是C3间隔区)。核苷酸的序列(iii)由在整个多核苷酸株中在链的5'至3'方向上彼此附接的后续核苷酸的连续同一性所确定。

[0567] 本文描述的孔在分析均聚物时特别有用。例如,孔可用于确定包含两个或更多个(诸如至少3、4、5、6、7、8、9或10个)相同的连续核苷酸的多核苷酸的序列。例如,孔可用于对包含polyA、polyT、polyG和/或polyC区域的多核苷酸进行测序。

[0568] 在优选的实施例中,靶分析物包括多核苷酸-多肽缀合物,并且所述方法包括(i)使缀合物与能够控制缀合物的多核苷酸相对于孔的移动的多核苷酸结合蛋白接触;以及(ii)当缀合物相对于孔移动时,进行以多肽为特征的一次或多次测量。

[0569] 应当理解,虽然本文已经讨论了根据本发明的工程化细胞和方法的特定实施例、具体构造以及材料和/或分子,但是可以在不背离本发明的范围和精神的情况下在形式和细节上进行各种改变或修改。提供以下实例以更好地阐明特定实施例,并且它们不应被视为限制本申请。本申请仅受权利要求书的限制。

[0570] 以下实例阐明本发明。

[0571] 实例

[0572] 实例1

[0573] 方法

[0574] 大肠杆菌孔的产生

[0575] 编码成熟形式的PorARr、PorBRr和PorARc蛋白的DNA由GENEWIZ Germany GmbH和Twist Bioscience plc.USA合成并克隆到含有氨苄青霉素抗性基因的pT7载体中。DNA浓度调整至400ng/μL。

[0576] 将质粒DNA在室温下解冻并通过缓慢地上下吸移来混合。将化学感受态Lemo21(DE3)大肠杆菌细胞在冰上解冻。将1μl的400ng/μl DNA添加至细胞中,并通过轻弹和搅动管进行混合。然后将其置于冰上30分钟,然后在42℃下对细胞进行热激10秒。然后将细胞置于冰上5分钟。将预热至37℃的250μl的SOC(Sigma,S1797)培养基添加至细胞中,并在37℃下以250rpm摇动放置一小时。然后将75ul的长出的细胞培养物铺在含有100μg/ml氨苄青霉素和41μg/ml氯霉素的大LB琼脂平板上,且然后在37℃下孵育过夜。

[0577] 挑取转化的Lemo21(DE3)细胞的单菌落并接种到含有100μg/ml氨苄青霉素和41μg/ml氯霉素的100ml LB培养基中。该起始培养物在500ml烧瓶中于37℃和250rpm下孵育过夜。将含有100μg/ml氨苄青霉素和41μg/ml氯霉素的500ml LB培养基的主培养物置于2.5l烧瓶中。然后添加4ml的起始培养物(稀释度1:125),并且让细胞在37℃和250rpm下分裂,直至达到0.D 0.6。达到0.D.0.6后,培养箱的温度降至18℃,并且用0.2mM IPTG(培养基中的终浓度)诱导细胞。将细胞在18℃和250rpm下孵育过夜,以允许过度表达目标蛋白。最后,通过在4℃下以6000g旋转20min来收获细胞。

[0578] 称重细胞糊,以计算要制备的功能性裂解缓冲液的正确体积(每10g糊用100ml裂解缓冲液重悬细胞)。通过向含有50mM Tris/HCl、150mM NaCl、2mM EDTA、0.1%DDM的缓冲液中添加Benzonase(10μl/100ml,Sigma)、不含EDTA的蛋白酶抑制剂混合物片剂(1片/100ml,Sigma)和10X BugBuster蛋白提取试剂(10ml/100ml,Sigma)来制备所需量的功能性裂解缓冲液。然后在室温下将所得功能性裂解缓冲液的pH调节至pH 8。将细胞重悬于功能性裂解缓冲液中并在室温下用磁力搅拌器混合1小时以产生均质混合物。然后通过冰上超声处理(Soniprep150,10个循环10s开/20s关,10μm振幅)裂解细胞,并在RT下搅拌3.5h以溶解。然后将细胞提取物转移至100ml Beckman管中并在室温下以40,000g离心35分钟。然后使用无菌0.2μm真空过滤器(Nalgene Rapid-Flow,Sigma)过滤所得上清液

[0579] 亲和色谱

[0580] 将过滤的上清液加载到5mL StrepTrap HP柱(Fisher,10571680)上。用20倍柱体积(CV)的流动相A(25mM Tris、150mM NaCl、2mM EDTA 0.1% DDM,pH 8.0)洗涤该柱。然后用7CV的25mM Tris、2M NaCl、2mM EDTA、0.1% DDM、pH 8.0缓冲液洗涤柱,然后返回至流动相A。通过流动7CV的流动相B缓冲液(25mM Tris、150mM NaCl、2mM EDTA 0.1% DDM、10mM脱硫生物素,pH 8.0)通过柱而进行洗脱。

[0581] 阴离子交换色谱

[0582] 将含有亲和色谱洗脱液的所得级分合并在一起,并用AEX流动相A(25mM Tris、0.1% DDM,pH 9.0)稀释5倍,以降低样品中的盐浓度。然后随后将所得链球菌纯化的样品加载到POROS HQ10 2ml柱(ThermoFisher)上。然后用20CV的AEX流动相A洗涤柱,然后用2M NaCl在35CV上以0-50%的梯度洗脱,其中AEX流动相B由25mM Tris、2M NaCl、0.1% DDM、pH

9.0组成。

[0583] 使用非变性Native-PAGE筛选目标级分。将含有正确寡聚状态的目标蛋白质的级分合并在一起,并加热至90℃持续15min,以使错误折叠的蛋白质变性。然后将加热的样品在RT下以21,130g离心10分钟,以沉淀变性的蛋白质。保留上清液并用于电生理学记录。

[0584] 电生理学数据

[0585] 从插入至MinION流动池的PorARr、PorBRr和PorARc野生型和突变体纳米孔中获取电测量值。将单孔插入至嵌段共聚物膜后,将1mL的包含25mM磷酸钾、150mM铁氰化钾(II)、150mM铁氰化钾(III)、pH 8.0的缓冲液流过系统以去除任何多余的蛋白质纳米孔。

[0586] 正用于评估DNA波形曲线的分析物是来自λ基因组的3'端的3.6千碱基ssDNA片段。使用Oxford Nanopore Technologies Q-SQK-LSK109方案进行分析物的制备、将分析物连接到Y衔接子、连接的分析物的SPRI珠净化以及添加至MinION流动池中。

[0587] 使用来自Oxford Nanopore Technologies的MinION Mk1b获得电测量值。标准测序脚本在-180mV下运行1-6小时,每5分钟进行一次静态轻弹(电压反转至+100mV)以去除延伸的纳米孔块。使用MinKNOW软件(Oxford Nanopore Technologies)将原始数据收集在批量FAST5文件中。

[0588] 结果

[0589] 测试了野生型PorARr、PorBRr和PorARc孔。结果如下。

[0590] PorARr

[0591] • 观察到很少的孔

[0592] • 观察到的少数孔确实看起来很稳定

[0593] • 无DNA捕获

[0594] PorBRr

[0595] • 观察到的孔比PorARr多一些,但仍然不多

[0596] • 孔门很多

[0597] • 无DNA捕获

[0598] PorARc

[0599] • 观察到很多的孔

[0600] • 孔有一定的门控

[0601] • 观察到两个孔群

[0602] • 无DNA捕获

[0603] 从含有突变的PorARr、PorBRr和PorARc单体的孔中获得的结果如表3所示。

[0604]

名称	来源	WT SEQ ID NO#	突变	效果	图
ONLP18153	PorARc	2	- (WT)		1
ONLP18300	PorARc	2	E78S/D82S/E89N	开孔电流增加(与 ONLP18153 相比）。DNA 波形曲线在开孔水平周围。高噪声。	1
ONLP18342	PorARc	2	E78S/D82S/E89N/**E116T/E125A/D165S**	开孔电流增加。DNA 波形曲线在开孔水平周围。DNA 捕获率增加。 与 ONLP18300 相比。	1
ONLP19696	PorARc	2	E78S/D82S/**E89R**	开孔电流增加。开孔噪声减少。DNA 波形曲线远低于开孔水平，有助于将信号分成单独的波形曲线。DNA 易位速度增加。 与 ONLP18300 相比。	2
ONLP19697	PorARc	2	**E78R**/D82S/E89R	开孔电流增加。DNA 波形曲线远低于开孔水平。随着范围和中值 sd 减小，SNR 增加。DNA 易位速度降低。 与 ONLP19696 相比。	2
ONLP18393	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/E116T/**E125A/D165S**	开孔电流增加。DNA 波形曲线远低于开孔水平。随着范围和中值 sd 减小，SNR 增加。 与 ONLP19697 相比。	2
ONLP19077	PorARc	2	**E57R**/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线远低于开孔水平。波形曲线和开孔水平的中值电流减少。 与 ONLP18393 相比。	3
ONLP19076	PorARc	2	**D55S/E57S/D58S**/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线的开孔水平和中值电流略有增加。由于范围略有增加和中值 sd 减少，SNR 增加。	3

[0605]

				与 ONLP18393 相比。	
ONLP19078	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**D104S**/E116T/**E122S**/E125A/D165S	开孔水平略高。随着范围和中值 sd 大幅增加，SNR 降低。 与 ONLP18393 相比。	3
ONLP19079	PorARc	2	**D55S**/**E57S**/**D58S**/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S	DNA 波形曲线的开孔水平和中值电流增加。随着范围和中值 sd 增加，SNR 降低。 与 ONLP19078 相比。	4
9ONLP19080	PorARc	2	**E57R**/E78R/D82S/E89R/**D104S**/E116T/**E122S**/E125A/D165S	开孔水平减少。中值电流增加。由于中值 sd 减少，SNR 增加。 与 ONLP19078 相比。	4
ONLP19320	PorARc	2	E78R/D82S/**E89G**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。中值电流增加。由于范围增加，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	5
ONLP19322	PorARc	2	E78R/D82S/**E89A**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。中值电流增加。由于范围增加，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	5
ONLP19325	PorARc	2	E78R/D82S/**E89V**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。中值电流增加。由于范围增加，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	5
ONLP19323	PorARc	2	E78R/D82S/**E89L**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。中值电流增加。由于范围增加，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	6
ONLP19321	PorARc	2	E78R/D82S/**E89I**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。中值电流增加。由于范围增加，SNR 略有增加。 与 ONLP18393 相比。	6

[0606]

ONLP19324	PorARc	2	E78R/D82S/**E89F**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。中值电流增加。由于范围增加，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	6
ONLP19328	PorARc	2	E78R/D82S/**E89S**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。中值电流增加。由于范围增加，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	7
ONLP19327	PorARc	2	E78R/D82S/**E89T**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。中值电流增加。由于范围增加，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	7
ONLP19326	PorARc	2	E78R/D82S/**E89Q**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。中值电流增加。由于范围增加，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	7
ONLP19537	PorARc	2	E78R/D82S/**E89K**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线远低于开孔水平。随着范围和中值 sd 增加，SNR 相似。 与 ONLP18393 相比。	8
ONLP19405	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**T101V**/E116T/E125A/D165S	开孔水平减少。由于范围增加，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	9
ONLP19404	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**T101S**/E116T/E125A/D165S	由于范围增加，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	9
ONLP19482	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**T101N**/E116T/E125A/D165S	开孔水平和中值电流增加。随着范围和中值 sd 增加，SNR 降低。 与 ONLP18393 相比。	9
ONLP19483	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**T101Q**/E116T/E125A/D165S	中值电流增加。由于噪声降低，SNR 增加。 与 ONLP18393 相比。	10

[0607]

ONLP19481	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**T101R**/E116T/E125A/D165S	中值电流减少。由于范围大幅增加，SNR 大幅增加。 与 ONLP18393 相比。	10
ONLP19536	PorARc	2	**E78R**/D82S/E89N/**T101V**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。由于范围减小和中值 sd 增加，SNR 降低。 与 ONLP18342 相比	11
ONLP19535	PorARc	2	E78R/D82S/E89N/**T101S**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。由于范围增加和中值 sd 减少，SNR 增加。 与 ONLP19536 相比。	11
ONLP19533	PorARc	2	E78R/D82S/E89N/**T101N**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。随着范围和中值 sd 减少，SNR 略有降低。 与 ONLP19536 相比。	11
ONLP19534	PorARc	2	E78R/D82S/E89N/**T101Q**/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线在开孔水平周围。随着范围和中值 sd 增加，SNR 略有降低。 与 ONLP19536 相比。	12
ONLP19539	PorARc	2	E78R/D82S/E89N/**T101R**/E116T/E125A/D165S	随着中值电流降低，DNA 波形曲线远低于开孔水平。效果类似于在 E89 位置处引入正电荷。随着范围和中值 sd 减小，SNR 增加。 与 ONLP19536 相比。	12
ONLP19283	PorARc	2	E78R/D82S/**G87S**/E89R/E116T/E125A/D165S	DNA 波形曲线远低于开孔水平。随着范围和中值 sd 增加，SNR 相似。 与 ONLP18393 相比。	13
ONLP19282	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**G91S**/E116T/E125A/D165S	与 ONLP18393 相当。	13
ONLP19019	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**G91N**/E116T/E125A/D165S	随着范围和中值 sd 增加，SNR 增加。	13

[0608]

				与 ONLP18393 相比。	
ONLP19018	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/G91N/**I92N**/E116T/E125A/D165S	由于中值 sd 增加，SNR 降低。 与 ONLP18393 相比。	14
ONLP19020	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**I92N**/E116T/E125A/D165S	随着范围和中值 sd 减小，SNR 相似。 与 ONLP18393 相比。	14
ONLP19281	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**S99N**/E116T/E125A/D165S	随着范围和中值 sd 减小，SNR 相似。 与 ONLP18393 相比。	14
ONLP19280	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**S103N**/E116T/E125A/D165S	随着范围和中值 sd 相似，SNR 相似。 与 ONLP18393 相比。	15
ONLP19538	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/**D104S**/E116T/E125A/D165S	波形曲线中的下降尖峰。随着范围和中值 sd 大幅增加，SNR 降低。 与 ONLP18393 相比。	15
ONLP19279	PorARc	2	E78R/D82S/E89R/E116T/**E122S**/E125A/D165S	随着范围和中值 sd 增加，SNR 相似。 与 ONLP18393 相比。	15
ONLP19074	PorARc	2	**E78G**/D82S/E89L/**G91N/I92N/E116G**/E125A/D165S	中值电流减少。DNA 波形曲线在开孔水平周围。随着范围和中值 sd 增加，SNR 相似。 与 ONLP19323 相比。	16
ONLP19075	PorARc	2	**E78G**/D82S/E89L/**E116G**/E125A/D165S	中值电流减少。DNA 波形曲线在开孔水平周围。随着范围和中值 sd 增加，SNR 相似。 与 ONLP19323 相比。	16
ONLP19675	PorARr	4	E182R/E184R	观察到清晰的波形曲线。随着范围和中值 sd 减小，SNR 增加。 与大多数 PorARc 突变体相比。	17

[0609]

ONLP19676	PorARr	4	E89N/E91N	观察到清晰的波形曲线。波形曲线的中值电流高于ONLP19675。	17
ONLP19677	PorARr	4	E89N/E91N/**E168R/E182R/E184R**	观察到清晰的波形曲线。波形曲线的中值电流远低于开孔水平。	17
ONLP19678	PorARr	4	E89N/E91N/**E96R/E99N/E113N/E123N/D130N**/E182R/E184R	观察到清晰的波形曲线。	18
ONLP19679	PorARr	4	E89N/E91N/**E96R/E99R/E113K/E123K/D130K**/E182R/E184R	DNA 波形曲线的中值电流较高。由于范围减小，SNR 降低。 与 ONLP19675 相比。	18
ONLP19635	PorBRr	6	-	尚不清楚孔是否可以捕获 DNA。	19
ONLP19636	PorBRr	6	E90N	观察到可能的 DNA 波形曲线。	19
ONLP19637	PorBRr	6	E92N	观察到可能的 DNA 波形曲线。	19
ONLP19638	PorBRr	6	E90N/E92N	观察到清晰的 DNA 波形曲线。视觉上漂亮的波形曲线。由于中值 sd 减少，SNR 增加。 与所有 PorARc 突变体相比。	20
ONLP19639	PorBRr	6	E90N/E92N/**E115R/E131R**	观察到清晰的 DNA 波形曲线。视觉上漂亮的波形曲线。DNA 捕获增加。DNA 波形曲线的开孔电流和中值电流增加。随着范围和中值 sd 增加，SNR 降低。 与 ONLP19638 相比。	20
ONLP19640	PorBRr	6	E90N/E92N/**E113R**/E115R/**E129R**/E131R	观察到清晰的 DNA 波形曲线。视觉上漂亮的波形曲线。随着范围和中值 sd 减少，SNR 增加。 与 ONLP19639 相比。	20

[0610] 实例2-另外的PorBr数据

[0611] 方法

[0612] 大肠杆菌孔的产生

[0613] 编码成熟形式的PorBRr蛋白(SEQ ID NO:6,具有下表4中所示的取代)的DNA由GENEWIZ Germany GmbH和Twist Bioscience plc.USA合成并克隆到含有氨苄青霉素抗性基因的pT7载体中。DNA浓度调整至400ng/μL。

[0614] 将质粒DNA在室温下解冻并通过缓慢地上下吸移来混合。将化学感受态Lemo21(DE3)大肠杆菌细胞在冰上解冻。将1μl的400ng/μl DNA添加至细胞中,并通过轻弹和搅动管进行混合。然后将其置于冰上30分钟,然后在42℃下对细胞进行热激10秒。然后将细胞置于冰上5分钟。将预热至37℃的150μl的SOC(Sigma,S1797)培养基添加至细胞中,并在37℃下以250rpm摇动放置一小时。然后将75ul的长出的细胞培养物铺在含有100μg/ml氨苄青霉素、41μg/ml氯霉素和0.2%葡萄糖的大LB琼脂平板上,且然后在37℃下孵育过夜。

[0615] 挑取转化的Lemo21(DE3)细胞的单菌落并接种到含有100μg/ml氨苄青霉素、41μg/ml氯霉素和0.2%葡萄糖的100ml LB培养基中。该起始培养物在500ml烧瓶中于37℃和250rpm下孵育过夜。将含有100μg/ml氨苄青霉素、41μg/ml氯霉素和0.2%葡萄糖的500ml LB培养基的主培养物置于2.5l烧瓶中。然后添加4ml的起始培养物(稀释度1:125),并且让细胞在37℃和250rpm下分裂,直至达到O.D 0.6。达到O.D.0.6后,培养箱的温度降至18℃,并且用0.2mM IPTG(培养基中的终浓度)诱导细胞。将细胞在18℃和250rpm下孵育过夜,以允许过度表达目标蛋白。最后,通过在4℃下以6000g旋转20min来收获细胞。

[0616] 称重细胞糊,以计算要制备的功能性裂解缓冲液的正确体积(每10g糊用100ml裂解缓冲液重悬细胞)。通过向含有50mM Tris/HCl、150mM NaCl、2mM EDTA、0.1%DDM的缓冲液中添加Benzonase(10μl/100ml,Sigma)、不含EDTA的蛋白酶抑制剂混合物片剂(1片/100ml,Sigma)和10X BugBuster蛋白提取试剂(10ml/100ml,Sigma)来制备所需量的功能性裂解缓冲液。然后在室温下将所得功能性裂解缓冲液的pH调节至pH 8。将细胞重悬于功能性裂解缓冲液中并在室温下用磁力搅拌器混合1小时以产生均质混合物。然后通过冰上超声处理(Soniprep150,10个循环10s开/20s关,10μm振幅)裂解细胞,并在RT下搅拌3.5h以溶解。然后将细胞提取物转移至100ml Beckman管中并在室温下以40,000g离心35分钟。然后使用无菌0.2μm真空过滤器(Nalgene Rapid-Flow,Sigma)过滤所得上清液

[0617] 亲和色谱

[0618] 将过滤的上清液加载到5mL StrepTrap HP柱(Fisher,10571680)上。用20倍柱体积(CV)的流动相A(25mM Tris、150mM NaCl、2mM EDTA 0.1% DDM,pH 8.0)洗涤该柱。然后用7CV的25mM Tris、2M NaCl、2mM EDTA、0.1% DDM、pH 8.0缓冲液洗涤柱,然后返回至流动相A。通过流动7CV的流动相B缓冲液(25mM Tris、150mM NaCl、2mM EDTA 0.1% DDM、10mM脱硫生物素,pH 8.0)通过柱而进行洗脱。

[0619] 阴离子交换色谱

[0620] 将含有亲和色谱洗脱液的所得级分合并在一起,并用AEX流动相A(25mM Tris、0.1% DDM,pH 9.0)稀释5倍,以降低样品中的盐浓度。然后随后将所得链球菌纯化的样品加载到POROS HQ10 2ml柱(ThermoFisher)上。然后用20CV的AEX流动相A洗涤柱,然后用2M NaCl在35CV上以0-50%的梯度洗脱,其中AEX流动相B由25mM Tris、2M NaCl、0.1% DDM、pH 9.0组成。

[0621] 使用非变性Native-PAGE筛选目标级分。将含有正确寡聚状态的目标蛋白质的级分合并在一起并用于电生理学记录。

[0622] 电生理学数据

[0623] 从插入至MinION流动池的PorBRr突变体纳米孔中获取电测量值。将单孔插入至嵌段共聚物膜后,将1mL的包含25mM磷酸钾、150mM铁氰化钾(II)、150mM铁氰化钾(III)、pH 8.0的缓冲液流过系统以去除任何多余的蛋白质纳米孔。

[0624] 正用于评估DNA波形曲线的分析物是来自λ基因组的3'端的3.6千碱基ssDNA片段。使用Oxford Nanopore Technologies Q-SQK-LSK109方案进行分析物的制备、将分析物连接到Y衔接子、连接的分析物的SPRI珠净化以及添加至MinION流动池中。

[0625] 使用来自Oxford Nanopore Technologies的MinION Mk1b获得电测量值。标准测序脚本在-180mV下运行1-6小时,每5分钟进行一次静态轻弹(电压反转至+100mV)以去除延伸的纳米孔块。使用MinKNOW软件(Oxford Nanopore Technologies)将原始数据收集在批量FAST5文件中。鉴于信号指标优于现有的其他孔群,收集到的数据被过滤到蛋白质通道的小群体中。跨所有孔突变体的链的中位数为6000。结果如下图22和表4中所示。在图22和表4两者中,PorBRr-WT-E90N-E92N-E115R-E131R_ONLZ16955(表4中的粗体)可被视为基线。与PorBRr-WT-E90N-E92N-E115R-E131R_ONLZ16955相比,表4中的所有突变体在涉及SNR、范围、中值SD和归一化MAD电流中的一者或多者方面得到改善。

[0626] 表4-图22中的数据摘要

[0627]

突变体	SNR	范围/pA	中值SD/pA	归一化的MAD电流
PorBRr-WT-E90G-E92N-E115R-E131R_ONLZ18535	17.589	17.807	1.012	0.402
PorBRr-WT-E90A-E92N-E115R-E131R_ONLZ18536	16.711	17.340	1.038	0.400
PorBRr-WT-E90V-E92N-E115R-E131R_ONLZ18537	16.837	17.909	1.064	0.401
PorBRr-WT-E90L-E92N-E115R-E131R_ONLZ18538	17.311	18.131	1.047	0.399
PorBRr-WT-E90I-E92N-E115R-E131R_ONLZ18539	16.520	18.559	1.123	0.401
PorBRr-WT-E90F-E92N-E115R-E131R_ONLZ18540	15.808	17.902	1.132	0.399
PorBRr-WT-E90Y-E92N-E115R-E131R_ONLZ18541	16.946	17.122	1.010	0.400
PorBRr-WT-E90S-E92N-E115R-E131R_ONLZ18532	16.649	17.790	1.069	0.398
PorBRr-WT-E90T-E92N-E115R-E131R_ONLZ18533	16.837	18.364	1.091	0.400
PorBRr-WT-E90Q-E92N-E115R-E131R_ONLZ18534	16.770	18.203	1.085	0.400
PorBRr-WT-E90N-E92G-E115R-E131R_ONLZ18547	17.110	17.412	1.018	0.409
PorBRr-WT-E90N-E92A-E115R-E131R_ONLZ18548	19.711	18.541	0.941	0.415
PorBRr-WT-E90N-E92V-E115R-E131R_ONLZ18549	19.045	17.212	0.904	0.406
PorBRr-WT-E90N-E92L-E115R-E131R_ONLZ18550	18.107	17.740	0.980	0.408
PorBRr-WT-E90N-E92I-E115R-E131R_ONLZ18551	19.157	17.094	0.892	0.407
PorBRr-WT-E90N-E92F-E115R-E131R_ONLZ18552	14.578	17.290	1.186	0.395
PorBRr-WT-E90N-E92Y-E115R-E131R_ONLZ18553	13.640	16.430	1.205	0.401
PorBRr-WT-E90N-E92S-E115R-E131R_ONLZ18544	17.149	18.626	1.086	0.412
PorBRr-WT-E90N-E92T-E115R-E131R_ONLZ18545	18.104	17.244	0.952	0.408
PorBRr-WT-E90N-E92Q-E115R-E131R_ONLZ18546	17.344	17.123	0.987	0.409
PorBRr-WT-E90N-E92N-T100N-E115R-E131R_ ONLZ18634	17.883	18.840	1.054	0.407
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102A-E115R-E131R_	16.472	16.679	1.013	0.406

[0628]

ONLZ18625				
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102V-E115R-E131R_ ONLZ18626	17.615	16.530	0.938	0.406
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102N-E115R-E131R_ ONLZ18623	17.173	17.054	0.993	0.403
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102Q-E115R-E131R_ ONLZ18624	15.953	15.294	0.959	0.406
PorBRr-WT-E90N-E92N-T104A-E115R-E131R_ ONLZ18629	15.559	16.664	1.071	0.401
PorBRr-WT-E90N-E92N-T104N-E115R-E131R_ ONLZ18627	17.108	17.224	1.007	0.400
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102V-T104N-E115R-E131R_ONLZ18633	17.989	17.103	0.951	0.403
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102N-T104N-E115R-E131R_ONLZ18631	17.045	17.793	1.044	0.398
PorBRr-WT-E90N-E92N-D105A-E115R-E131R_ ONLZ18640	15.378	15.159	0.986	0.399
PorBRr-WT-E90N-E92N-E113R-E115R-E129R-E131R_ONLZ16956	15.739	16.124	1.024	0.402
PorBRr-WT-E90N-E92N-E115R-E131R_ONLZ16955	**16.502**	**16.559**	**1.003**	**0.399**

[0629] 序列表

[0630] SEQ ID NO:1

[0631] catatggcggttgatgatagcaacagcgttgtggatggtggcggtaacacgatcaccgtgagtcagag cgacaccttcatcaacagcgtgtttccgctggatggtagcccactgacccgcgaatggtttcataacggtcgcgcc atcgttgatgtgaccggtccggatgccgaagatttcagcggcaccgtgaccatcggctaccaagttggctatccag ccagtctgggtggcgaactgacctttgactacaccaccccgggtctggaactgggtatcagcagcgcgggtgccgt tagtggcacgctgagcgatgttctgccacaagccggcgttggcgttacgctggaaccgggcccgggtatcgaaacc gttgaagttgcgagtggtgcggccagtggcgcgcataccgaaatccagatcgccaatctgcacggcaccgcgacga aaatcgccggcaatgttagcgtgcgcccatacgtgcaagttgttagcgataatggcgatgtggcgaccacctttgg tcagccttggcggttcaatggtagtggtggtgagaatctgtattttcagggttctggtagtggttctgcgtggtca catcctcaattcgagaaataatga

[0632] SEQ ID NO:2

[0633] MAVDDSNSVVDGGGNTITVSQSDTFINSVFPLDGSPLTREWFHNGRAIVDVTGPDAEDFSGTVTIGYQV GYPASLGGELTFDYTTPGLELGISSAGAVSGTLSDVLPQAGVGVTLEPGPGIETVEVASGAASGAHTEIQIANLHGT ATKIAGNVSVRPYVQVVSDNGDVATTFGQPWRFNGSGGENLYFQGSGSGSAWSHPQFEK

[0634] SEQ ID NO:3

[0635] catatggtggtagatgatcaaaatcgtattgtctcagacggccatgaagtaatcgtaactcaagaaga

tacttttatccagggagttccgccaattggtggatcacctctttcgcgcgagtggttccataacggacgtgggatc
gctaatattgtagggccggatgccgcagatttcgagggatcgacgttccaatttgggtatcaatttgcctggagcg
gcagtttagatgggagcattggggtcgcatggtcttctccgcaggccgaacttgaagttgctccgggggaagtcta
tgaacccgccaccgagactaagacagtagacgggaaagagacggaggtccccgtcacagctccggttttgaatgag
gatggctcgcctattttggacgccgacgggaaaccagttactgagcagctttatcgtatcaagccggacgcaacgg
cgacggagaatacgttgacggttggaggtttattaccacaacttacagctggcattgagcttactcccgctcccgg
cattgaggaacttgtggtggctgagggcgaatttgacggcgatttcaaatctgttcaaatcgccaatgtacacgga
gcggccacaggtgtcattggagctgtgagtgtccgccccttgtgcgtgtcattactgccaacggggataatgtaa
ctacttatggtaaggtttggacgctgggctctgggggagagaatctttacttccaaggctccggcagcggttccgc
ttggtcacatcctcagtttgagaaa

[0636] SEQ ID NO:4

[0637] MVVDDQNRIVSDGHEVIVTQEDTFIQGVPPIGGSPLSREWFHNGRGIANIVGPDAADFEGSTFQFGYQF
AWSGSLDGSIGVAWSSPQAELEVAPGEVYEPATETKTVDGKETEVPVTAPVLNEDGSPILDADGKPVTEQLYRIKPD
ATATENTLTVGGLLPQLTAGIELTPAPGIEELVVAEGEFDGDFKSVQIANVHGAATGVIGAVSVRPFVRVITANGDN
VTTYGKVWTLGSGGENLYFQGSGSGSAWSHPQFEK

[0638] SEQ ID NO:5

[0639] catatggctgtggacgaccagaatcgcatcgtgagcaccgatggttacgaggtggtggttacccaaga
agatacgttcatccaaggcgttccagcgctgggtggtagtccgttcaaccgcgagttcttccacaatggtcgcggc
accgccaatctggttggtgccgatgccgcggatgccgaaggtaccacctttcagttcggctaccagtttgcgtggg
cgggtagcattgatggcgcgatcggcgttacctatagcaccccgggtctggaactggaactgagcgccaaagatgg
cccgaccgcgaccgttaccgatattctgccacaagcctatgcggaactcgaactgaccccagcgccgggcatcgaa
gaactggtggttgcggagggtgaattcgacggcgatttcaagagcgtgcagttcagcaacgtgcatggtaccgcca
gcggtgttctgggtgcggttcaagttcgcccatttgtgcgcgcgatcaccgcgaatggcgacaacgttacaaccta
tggcaaaccttggaccgttggtagtggtggtgagaatctgtattttcagggttctggtagtggttctgcgtggtca
catcctcaattcgagaaataatga

[0640] SEQ ID NO:6

[0641] MAVDDQNRIVSTDGYEVVVTQEDTFIQGVPALGGSPFNREFFHNGRGTANLVGADAADAEGTTFQFGYQ
FAWAGSIDGAIGVTYSTPGLELELSAKDGPTATVTDILPQAYAELELTPAPGIEELVVAEGEFDGDFKSVQFSNVHG
TASGVLGAVQVRPFVRAITANGDNVTTYGKPWTVGSGGENLYFQGSGSGSAWSHPQFEK

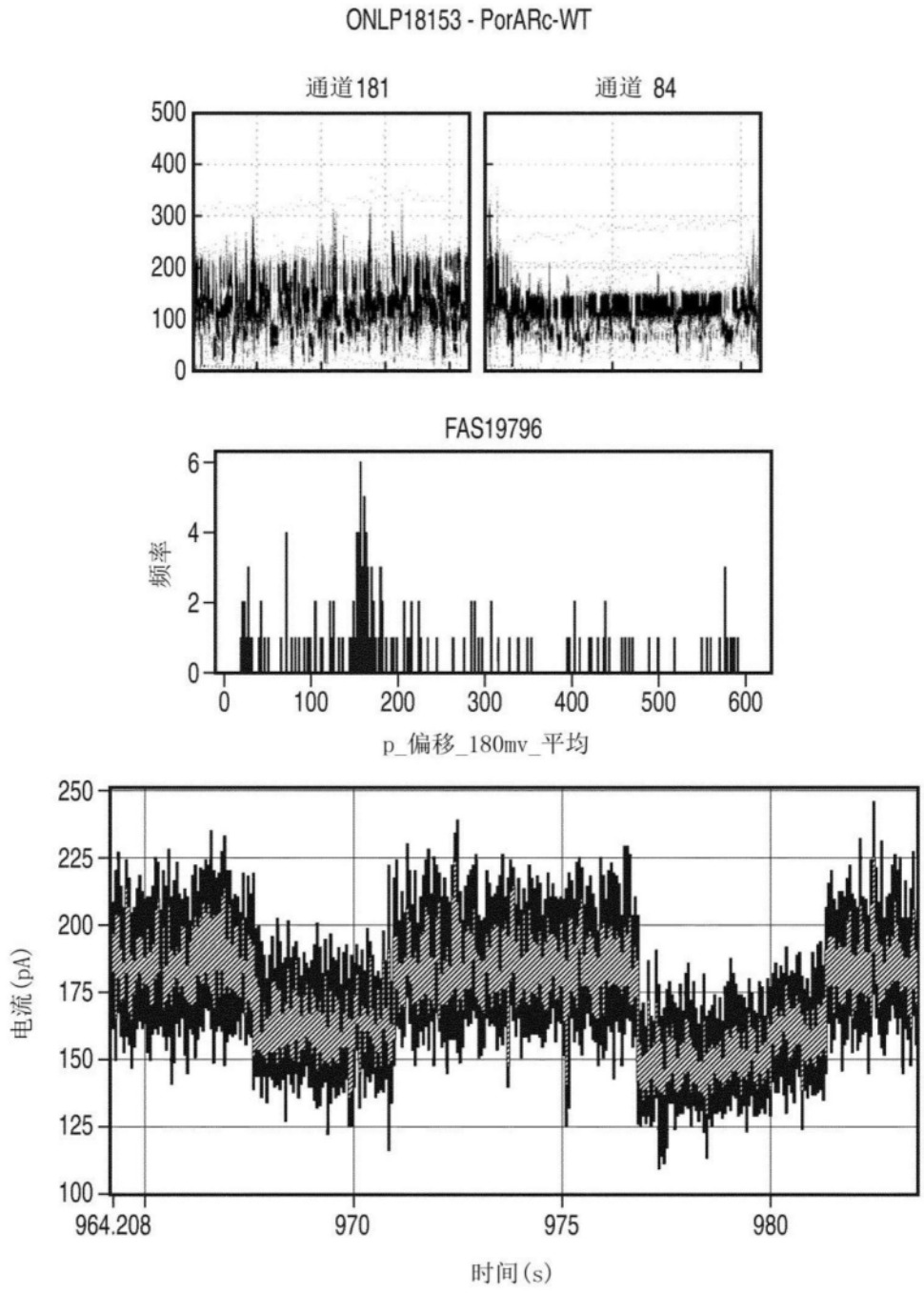
ONLP18153 - PorARc-WT
通道181
通道 84
500
400
300
200
100
0
FAS19796
6
4
2
0
频率
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
250
225
200
175
150
125
100
电流(pA)
964.208
970
975
980
时间(s)

图1

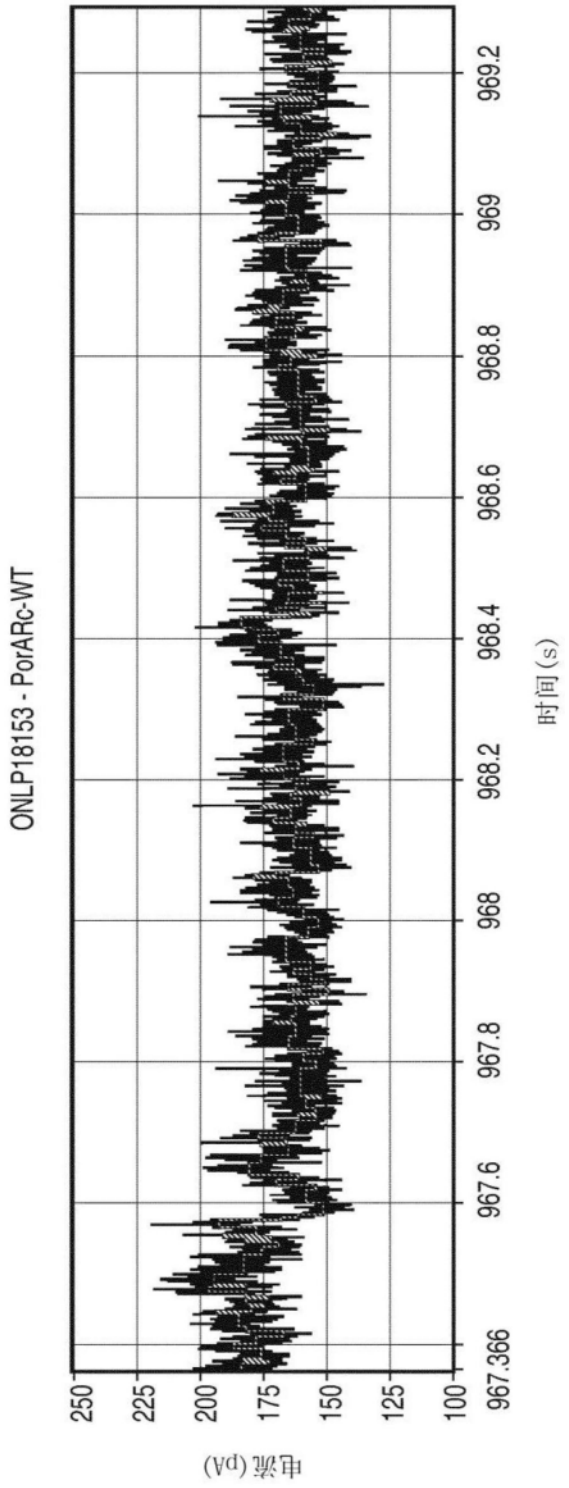
ONLP18153 - PorARc-WT
电流(pA)
250
225
200
175
150
125
100
967.366
967.6
967.8
968
968.2
968.4
968.6
968.8
969
969.2
时间(s)

图1(续)

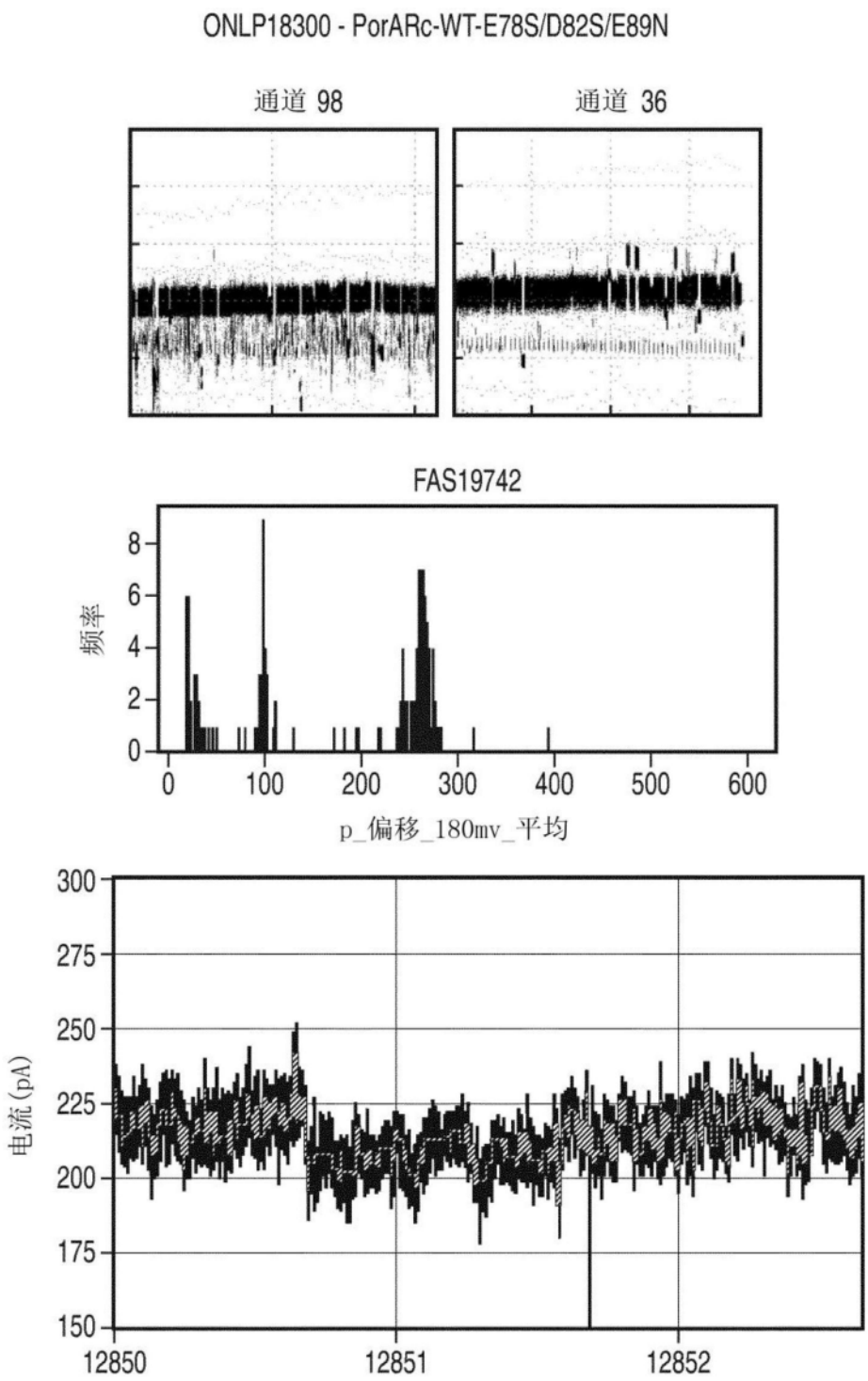
ONLP18300 - PorARc-WT-E78S/D82S/E89N
通道 98
通道 36
FAS19742
频率
8
6
4
2
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
300
275
250
225
200
175
150
电流(pA)
12850
12851
12852

图1(续)

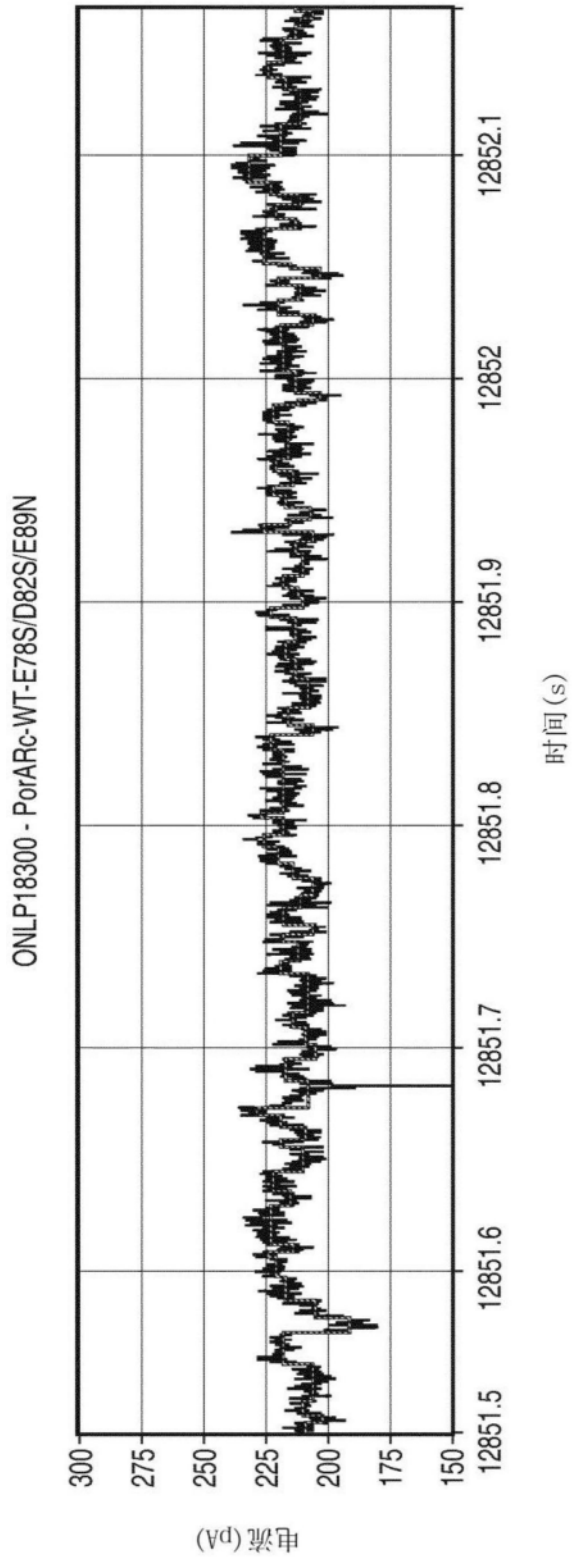
ONLP18300 - PorARc-WT-E78S/D82S/E89N
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
12851.5
12851.6
12851.7
12851.8
12851.9
12852
12852.1
时间 (s)

图1 (续)

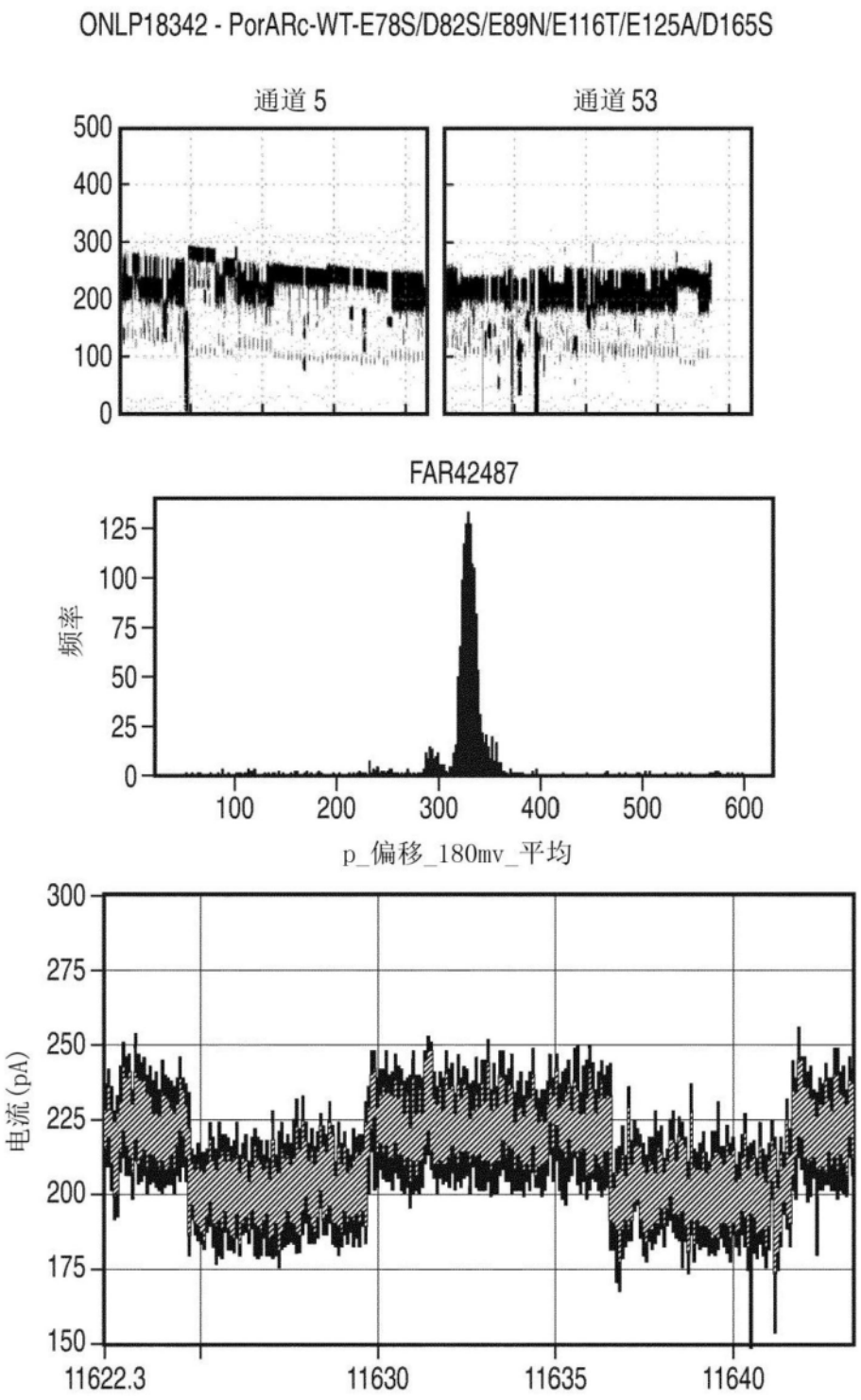
ONLP18342 - PorARc-WT-E78S/D82S/E89N/E116T/E125A/D165S
通道 5
通道 53
500
400
300
200
100
0
FAR42487
频率
125
100
75
50
25
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
300
275
250
225
200
175
150
电流 (pA)
11622.3
11630
11635
11640

图1 (续)

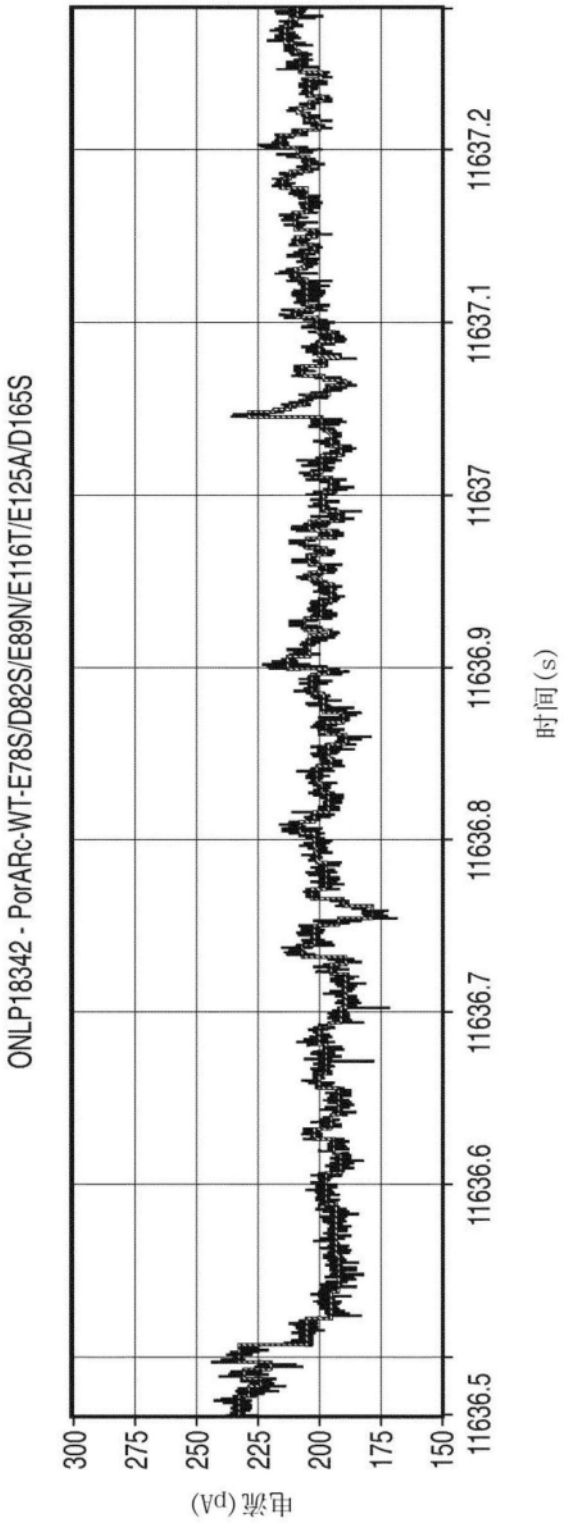
ONLP18342 - PorARc-WT-E78S/D82S/E89N/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
11636.5
11636.6
11636.7
11636.8
11636.9
11637
11637.1
11637.2
时间(s)

图1(续)

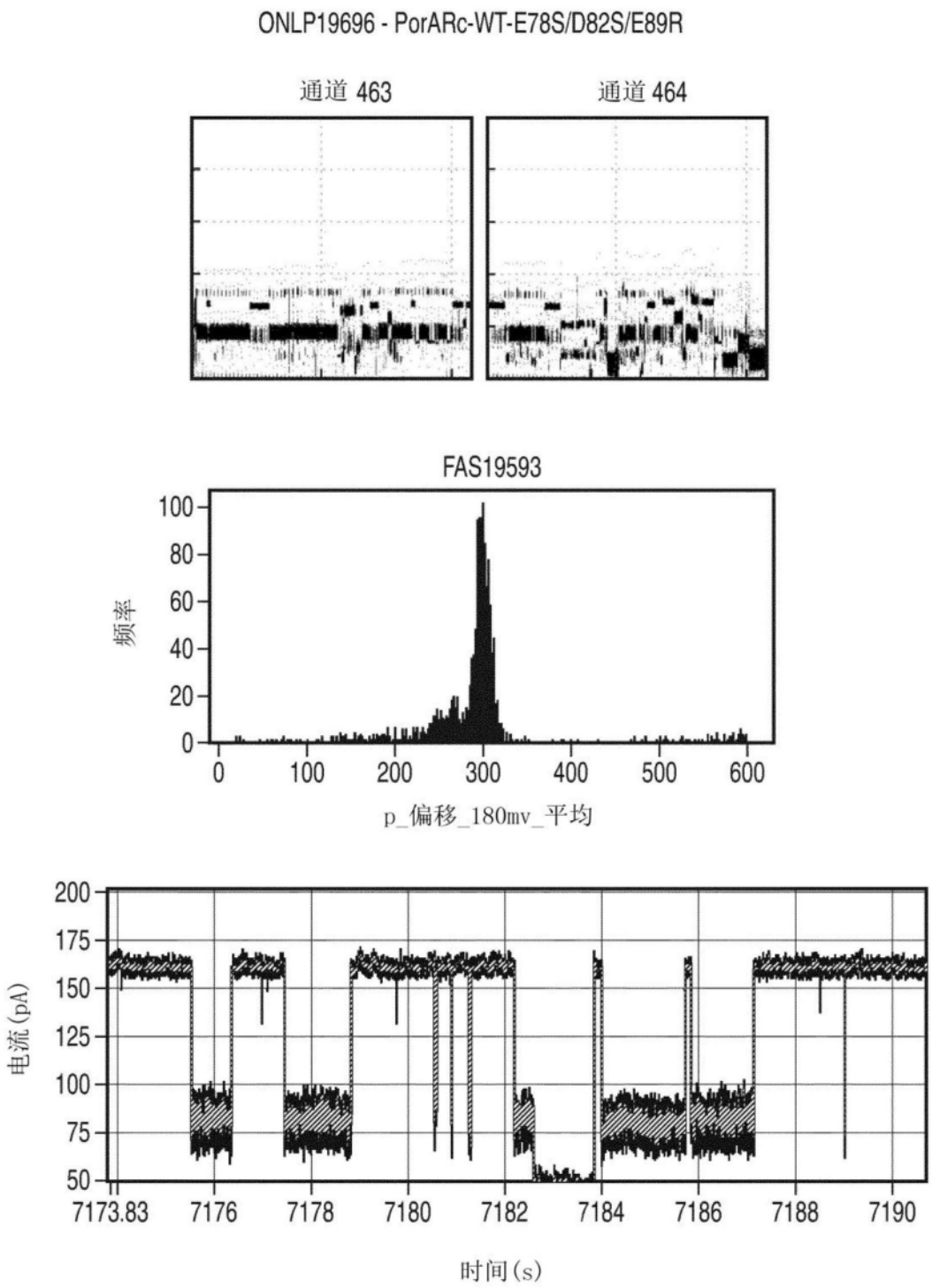
ONLP19696 - PorARc-WT-E78S/D82S/E89R
通道 463
通道 464
FAS19593
频率
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流(pA)
7173.83
7176
7178
7180
7182
7184
7186
7188
7190
时间(s)

图2

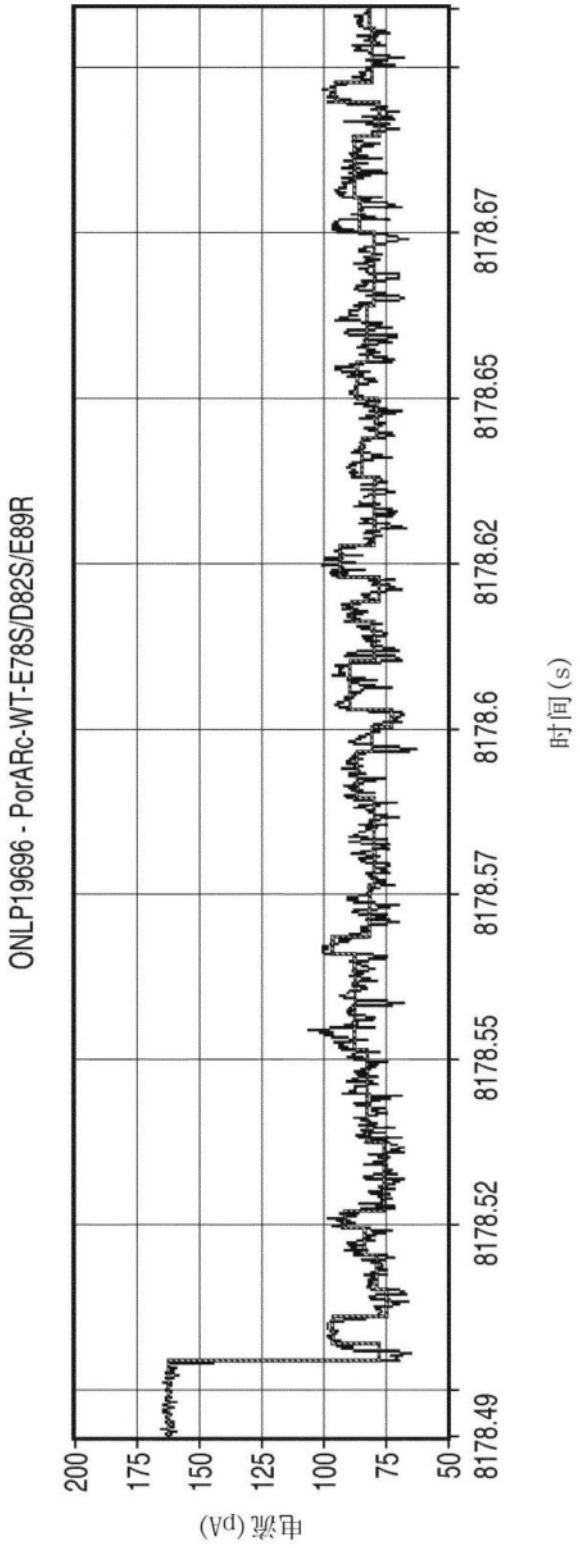
ONLP19696 - PorARc-WT-E78S/D82S/E89R
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
8178.49
8178.52
8178.55
8178.57
8178.6
8178.62
8178.65
8178.67
时间 (s)

图2(续)

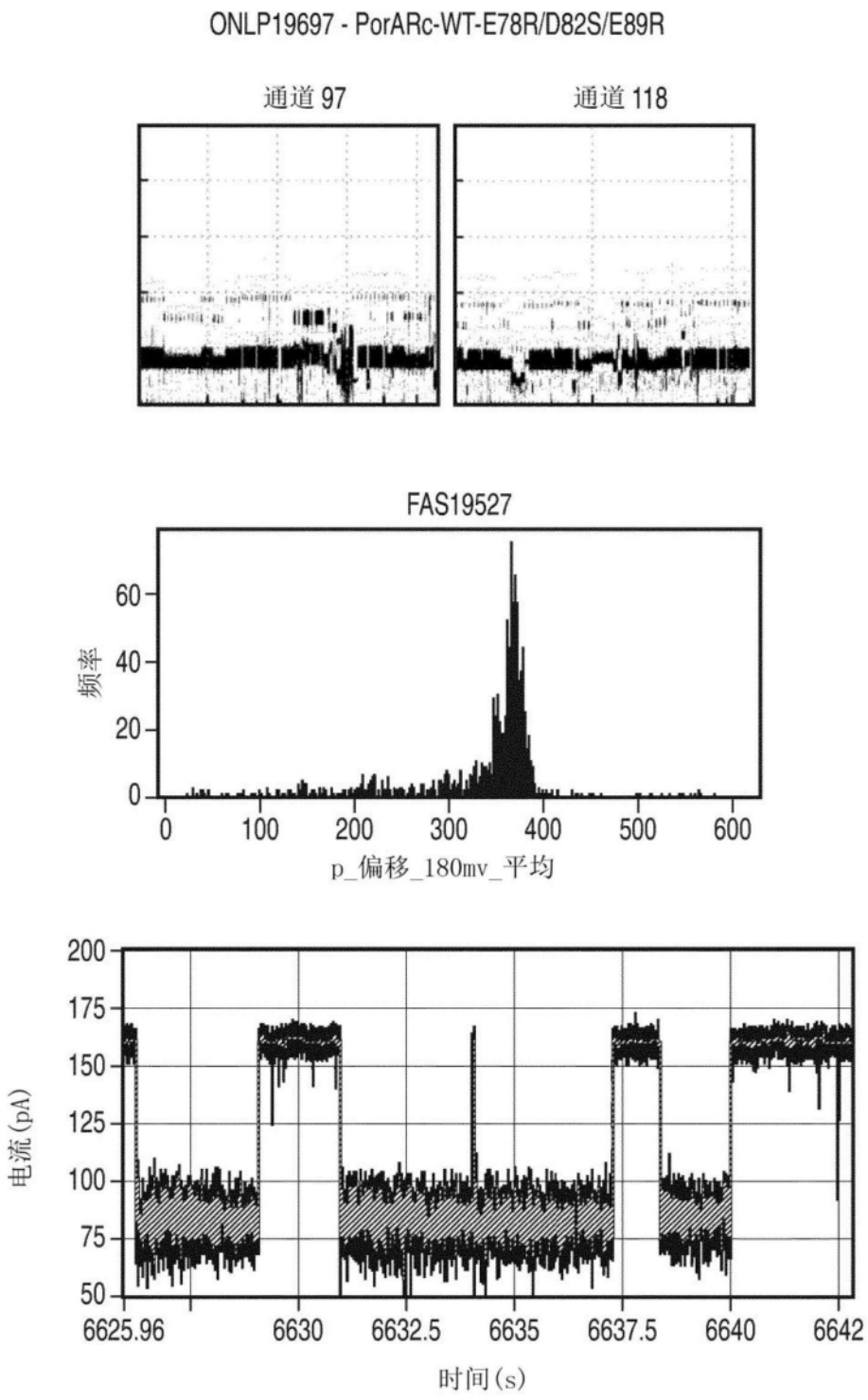
ONLP19697 - PorARc-WT-E78R/D82S/E89R
通道 97
通道 118
FAS19527
频率
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流(pA)
6625.96
6630
6632.5
6635
6637.5
6640
6642
时间(s)

图2(续)

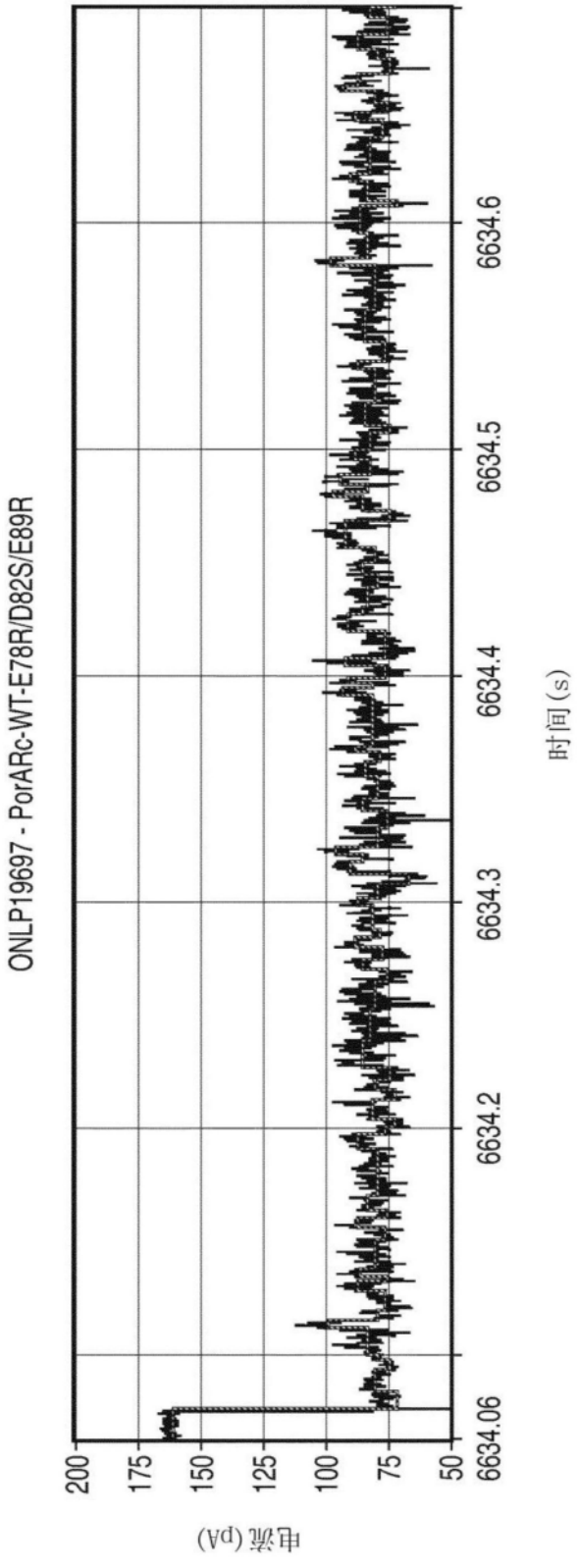
ONLP19697 - PorARc-WT-E78R/D82S/E89R
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
6634.06
6634.2
6634.3
6634.4
6634.5
6634.6
时间 (s)

图2 (续)

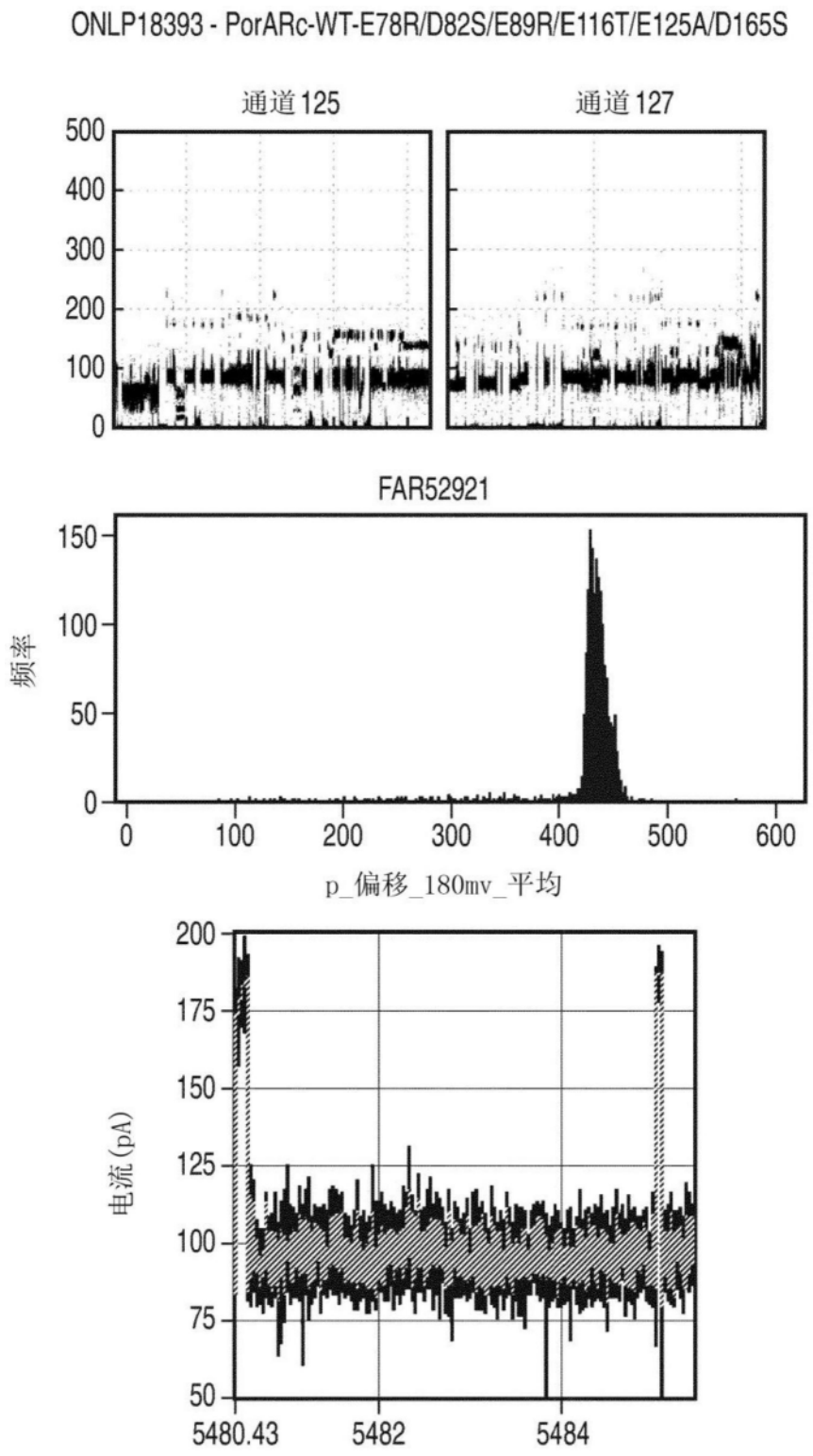
ONLP18393 - PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S
通道125
通道127
500
400
300
200
100
0
FAR52921
150
100
50
0
频率
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流(pA)
5480.43
5482
5484

图2(续)

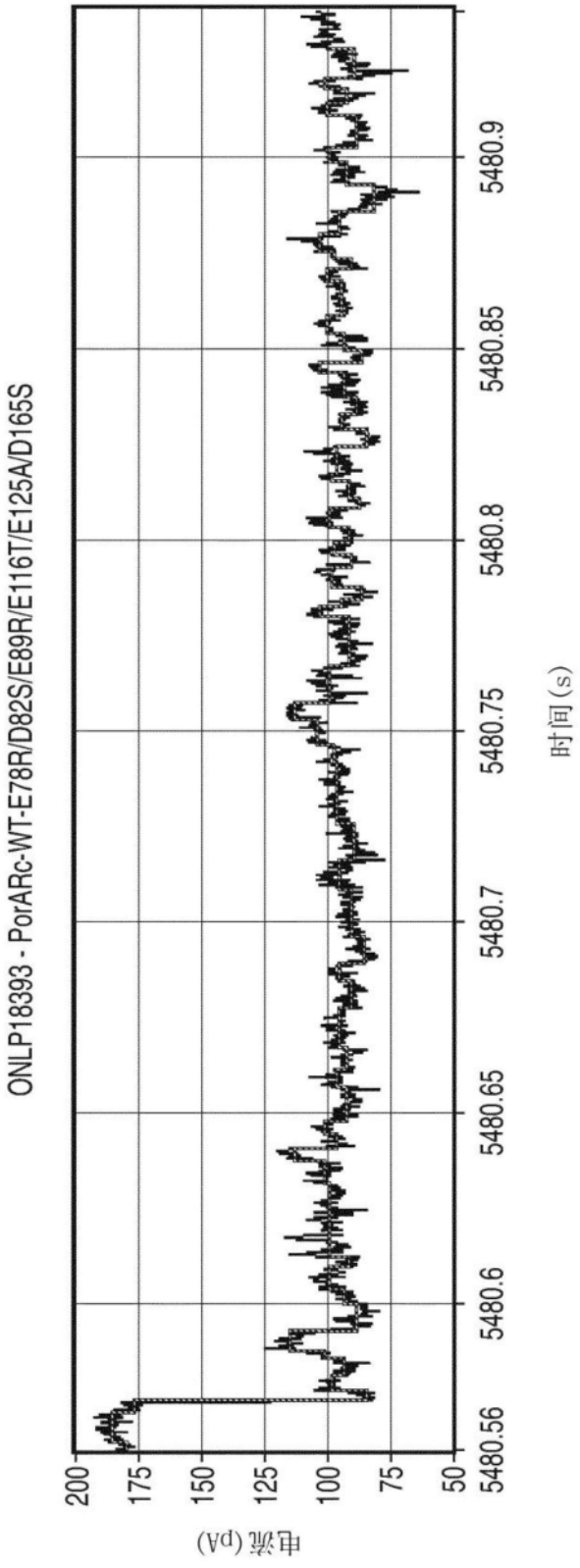
ONLP18393 - PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
5480.56
5480.6
5480.65
5480.7
5480.75
5480.8
5480.85
5480.9
时间 (s)

图2(续)

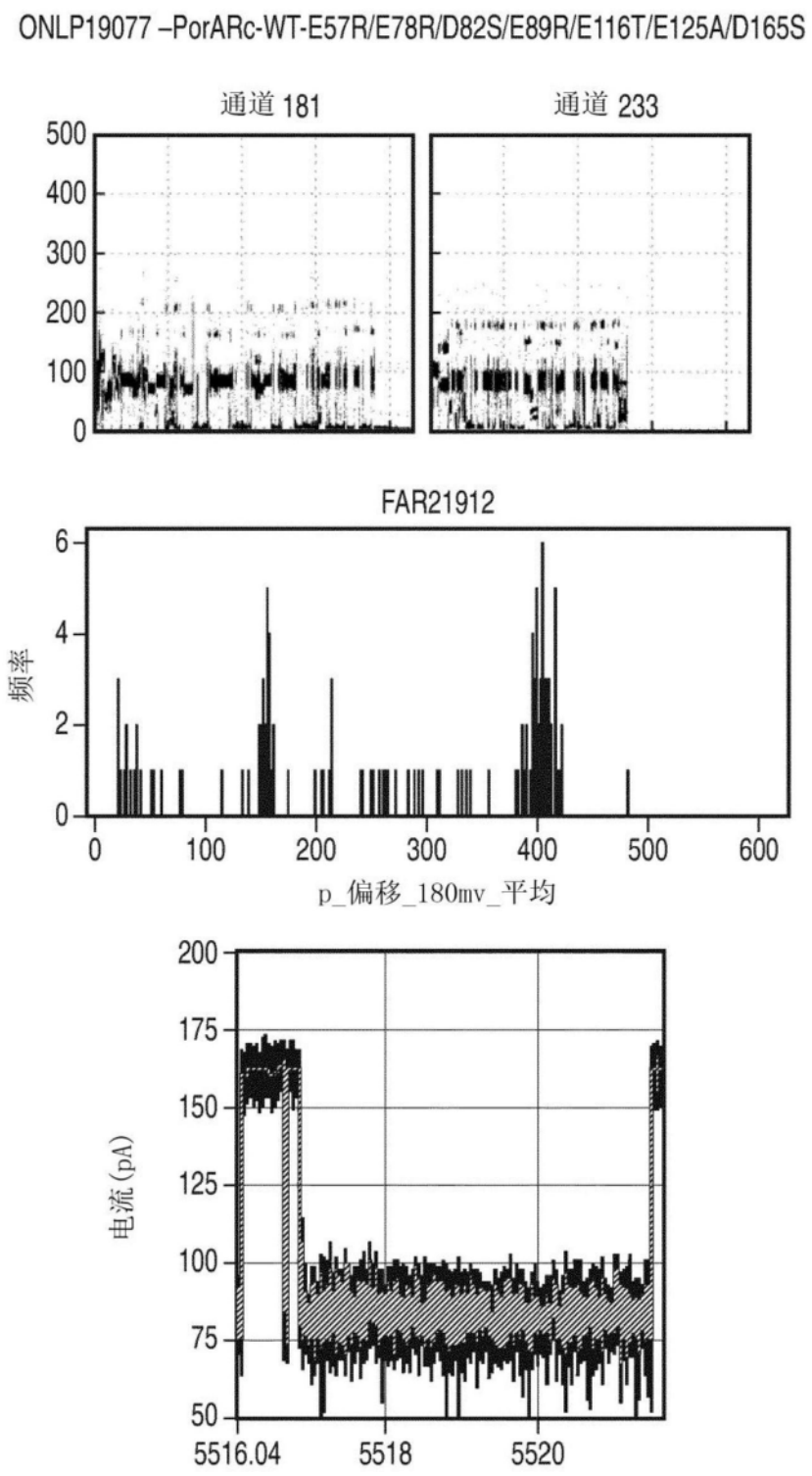
ONLP19077 –PorARc-WT-E57R/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S
通道 181
通道 233
500
400
300
200
100
0
FAR21912
频率
6
4
2
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流(pA)
5516.04
5518
5520

图3

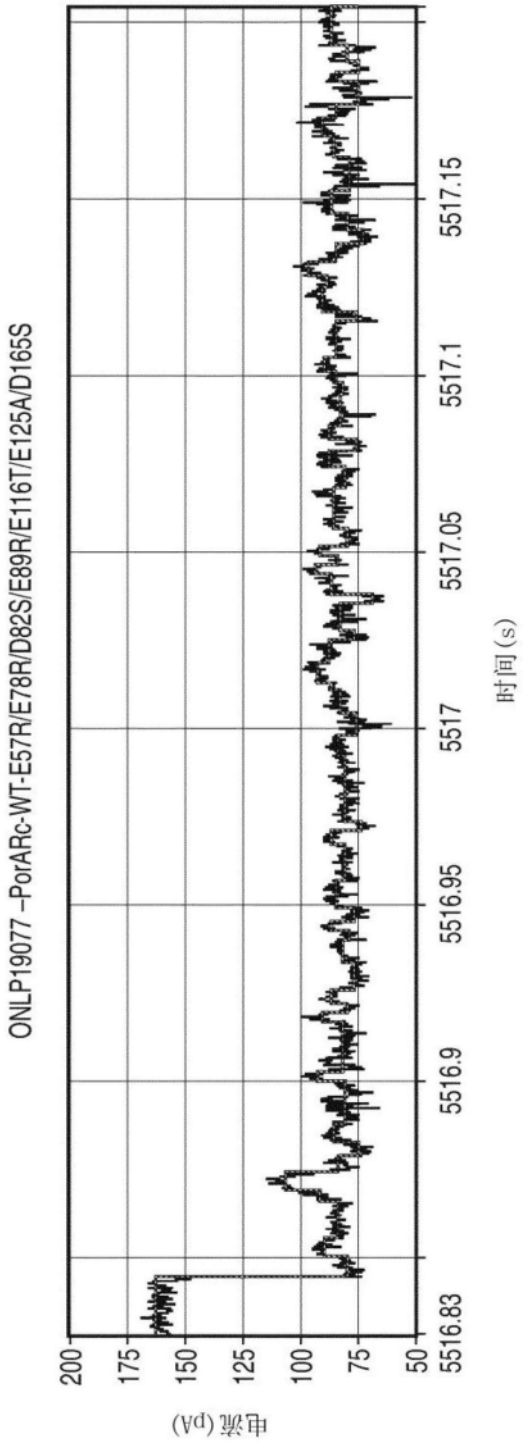
ONLP19077 -PorARc-WT-E57R/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
5516.83
5516.9
5516.95
5517
5517.05
5517.1
5517.15
时间(s)

图3(续)

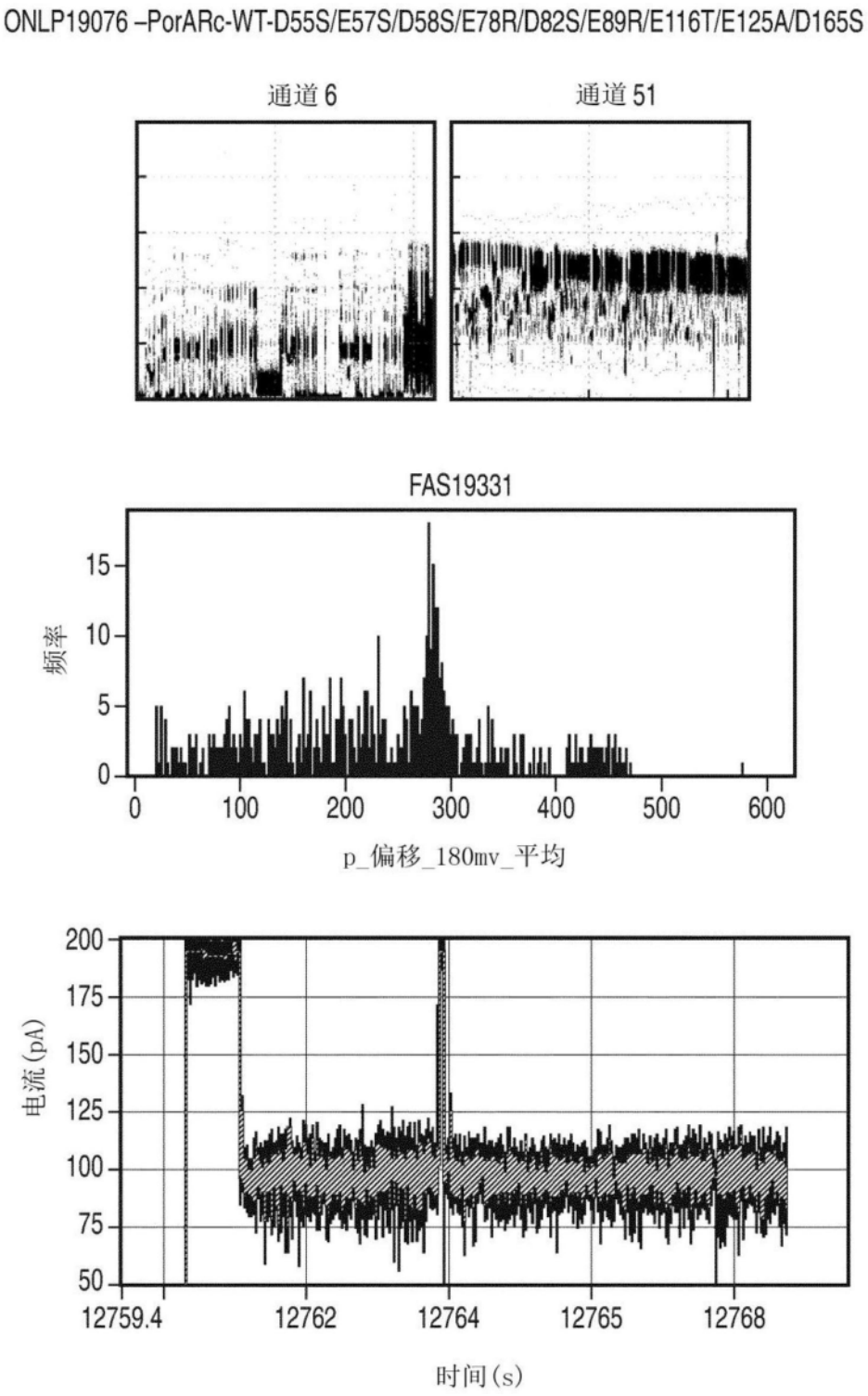
ONLP19076 –PorARc-WT-D55S/E57S/D58S/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S
通道 6
通道 51
FAS19331
频率
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流(pA)
12759.4
12762
12764
12765
12768
时间(s)

图3 (续)

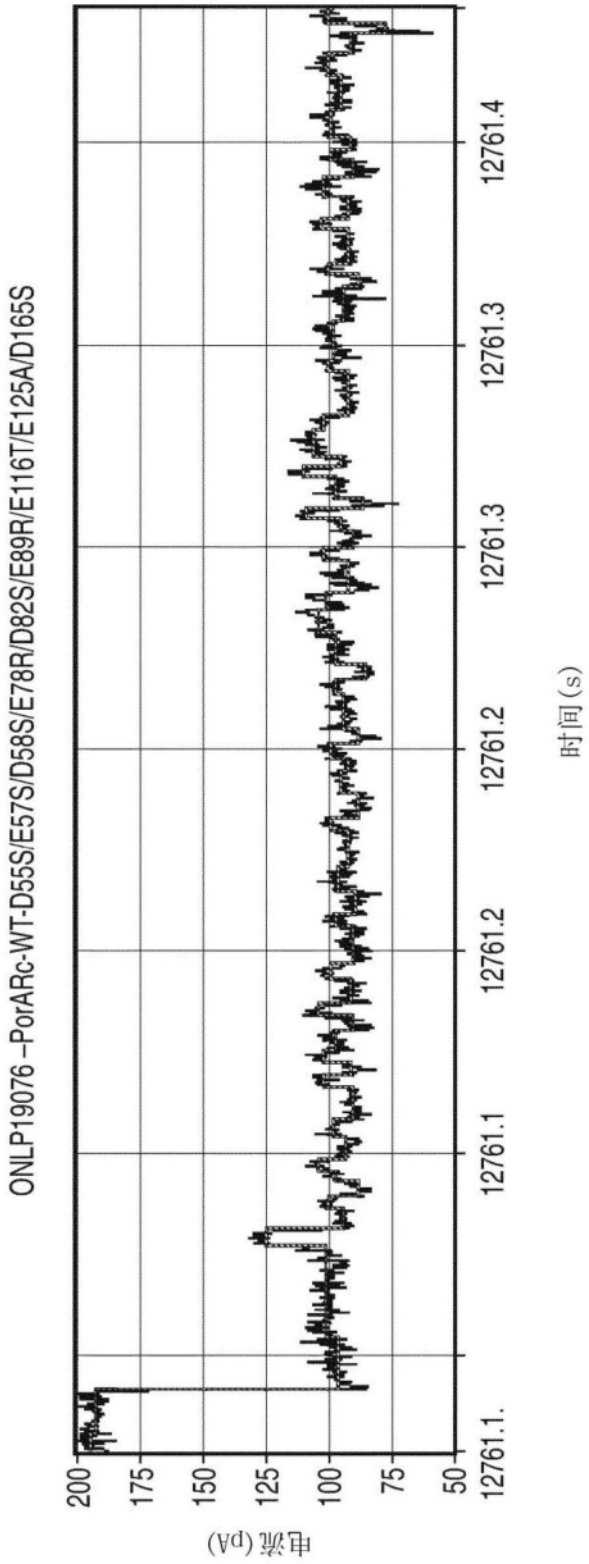
ONLP19076 -PorARc-WT-D55S/E57S/D58S/E78R/D82S/E89R/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
12761.1.
12761.1
12761.2
12761.2
12761.3
12761.3
12761.4
时间(s)

图3(续)

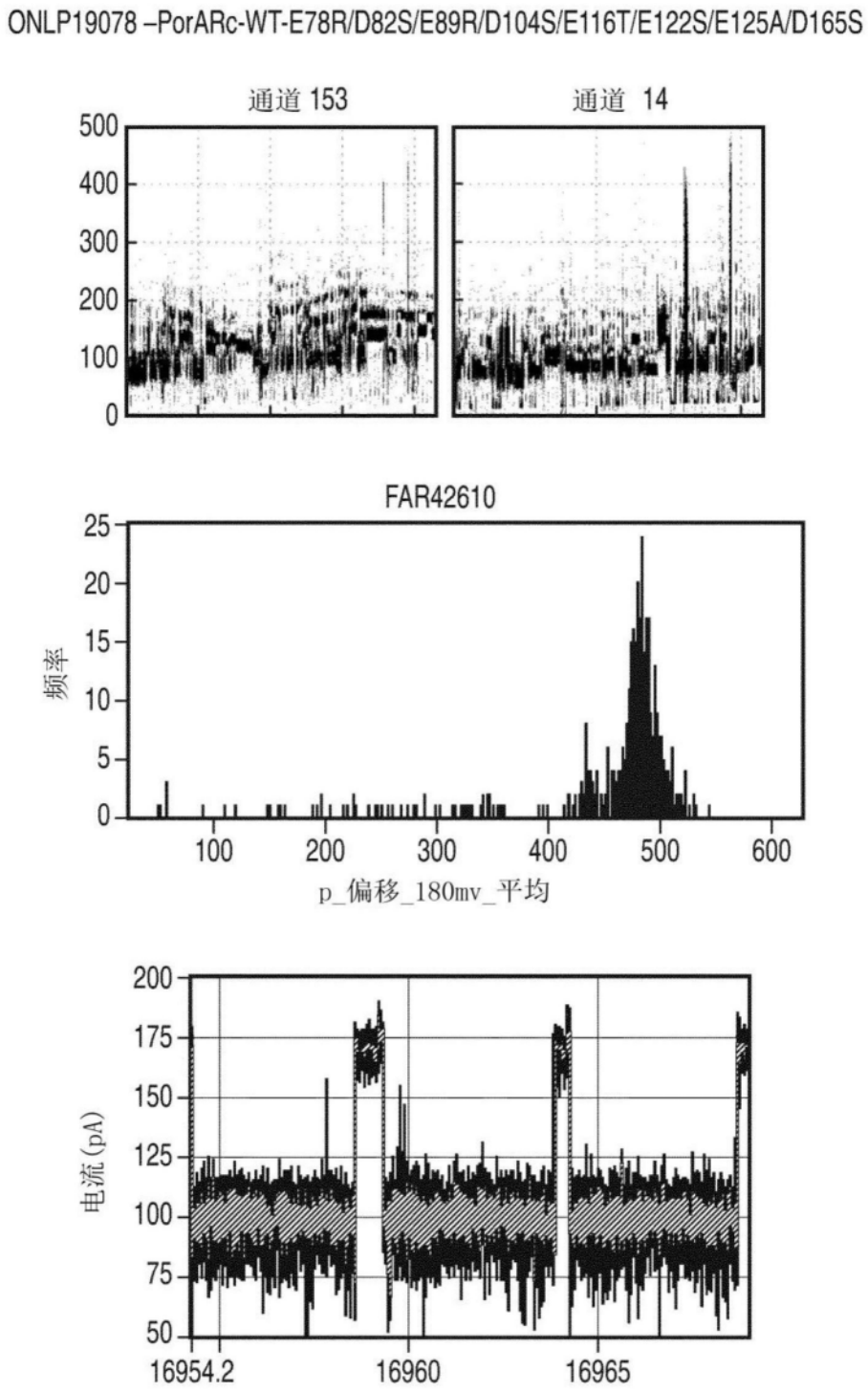
ONLP19078 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S
通道 153
通道 14
500
400
300
200
100
0
FAR42610
25
20
15
10
5
0
频率
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流 (pA)
16954.2
16960
16965

图3 (续)

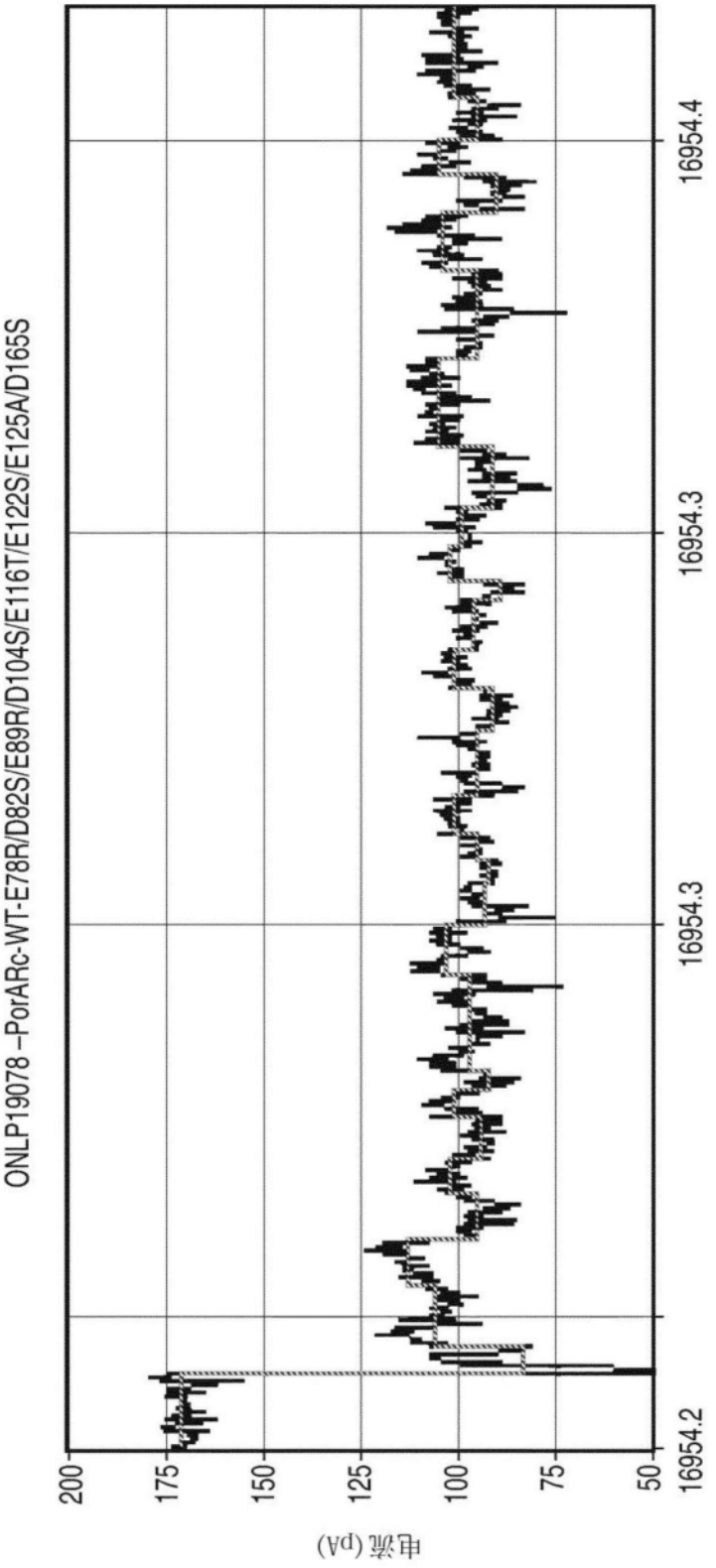
ONLP19078 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
16954.2
16954.3
16954.3
16954.4

图3 (续)

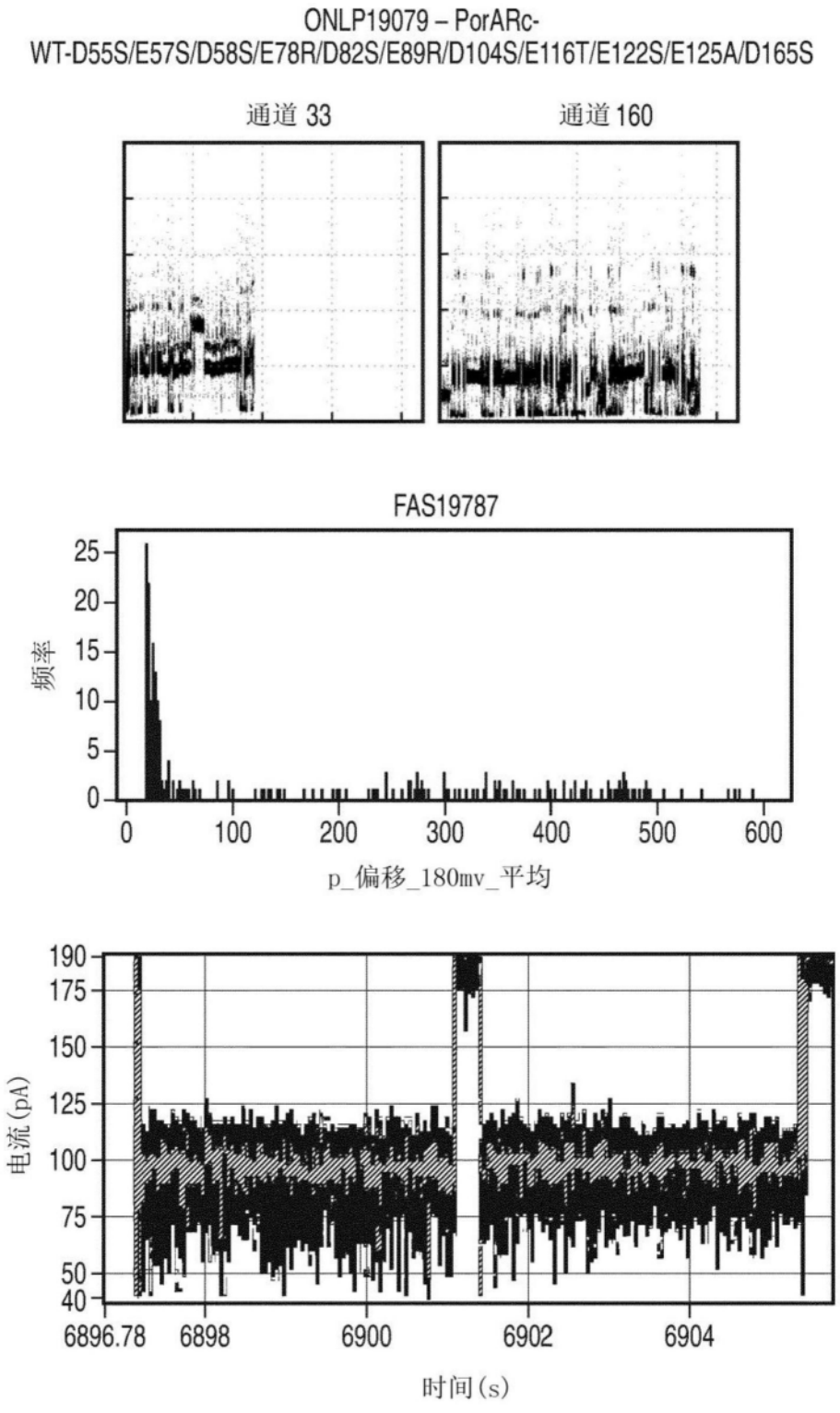
ONLP19079 – PorARc-
WT-D55S/E57S/D58S/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S
通道 33
通道 160
FAS19787
频率
25
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
190
175
150
125
100
75
50
40
电流 (pA)
6896.78
6898
6900
6902
6904
时间 (s)

图4

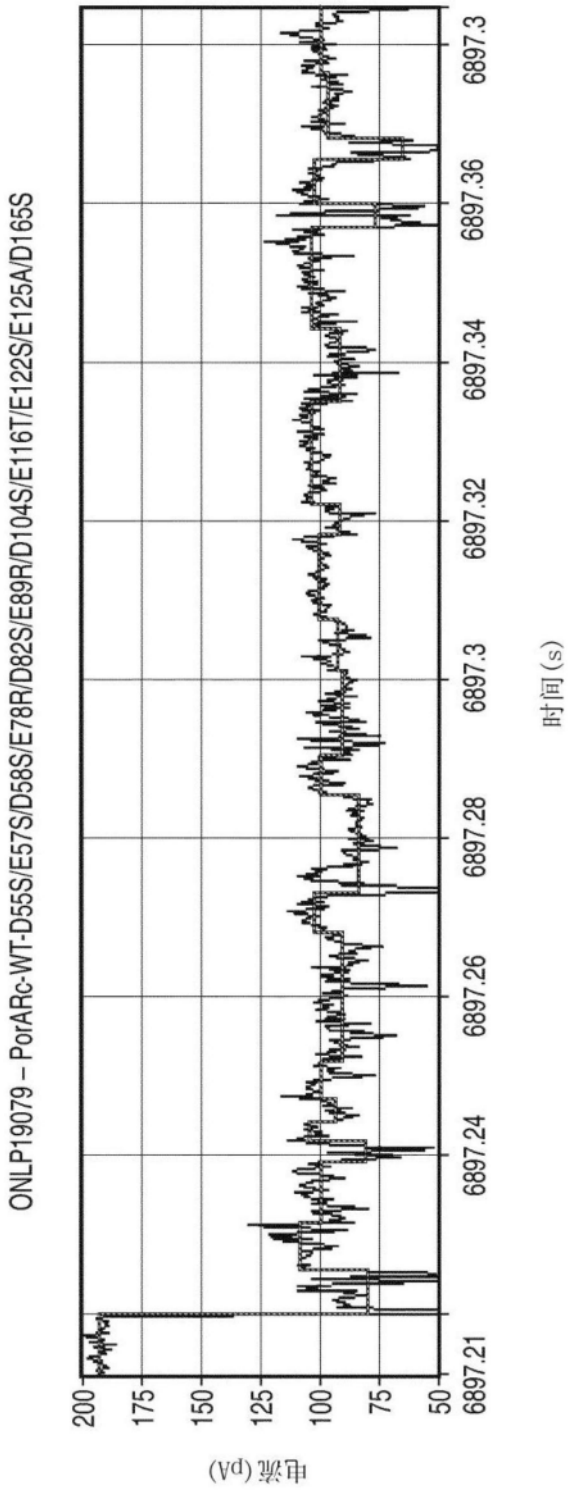
ONLP19079 – PorARc-WT-D55S/E57S/D58S/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
6897.21
6897.24
6897.26
6897.28
6897.3
6897.32
6897.34
6897.36
6897.3
时间 (s)

图4(续)

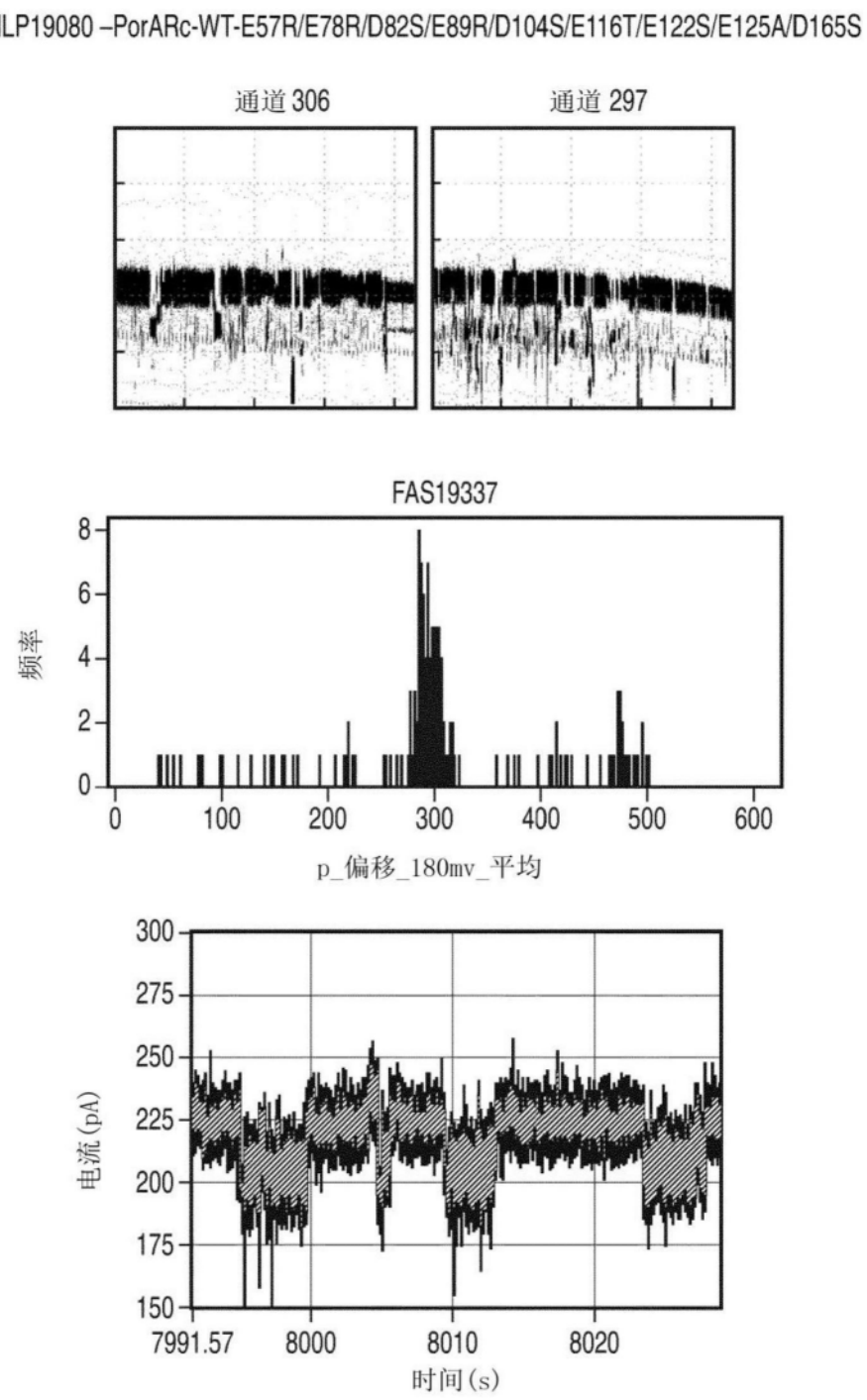
ONLP19080 –PorARc-WT-E57R/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S
通道 306
通道 297
FAS19337
频率
8
6
4
2
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
300
275
250
225
200
175
150
电流 (pA)
7991.57
8000
8010
8020
时间 (s)

图4 (续)

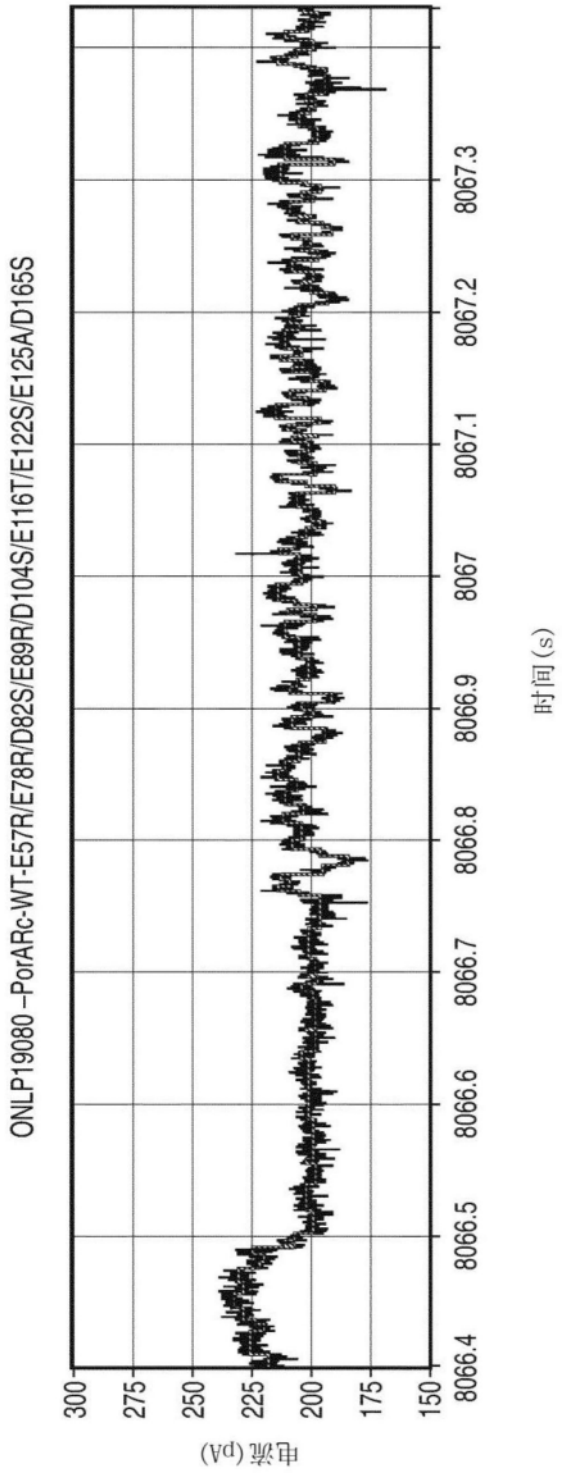
ONLP19080 -PorARc-WT-E57R/E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E122S/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
8066.4
8066.5
8066.6
8066.7
8066.8
8066.9
8067
8067.1
8067.2
8067.3
时间(s)

图4(续)

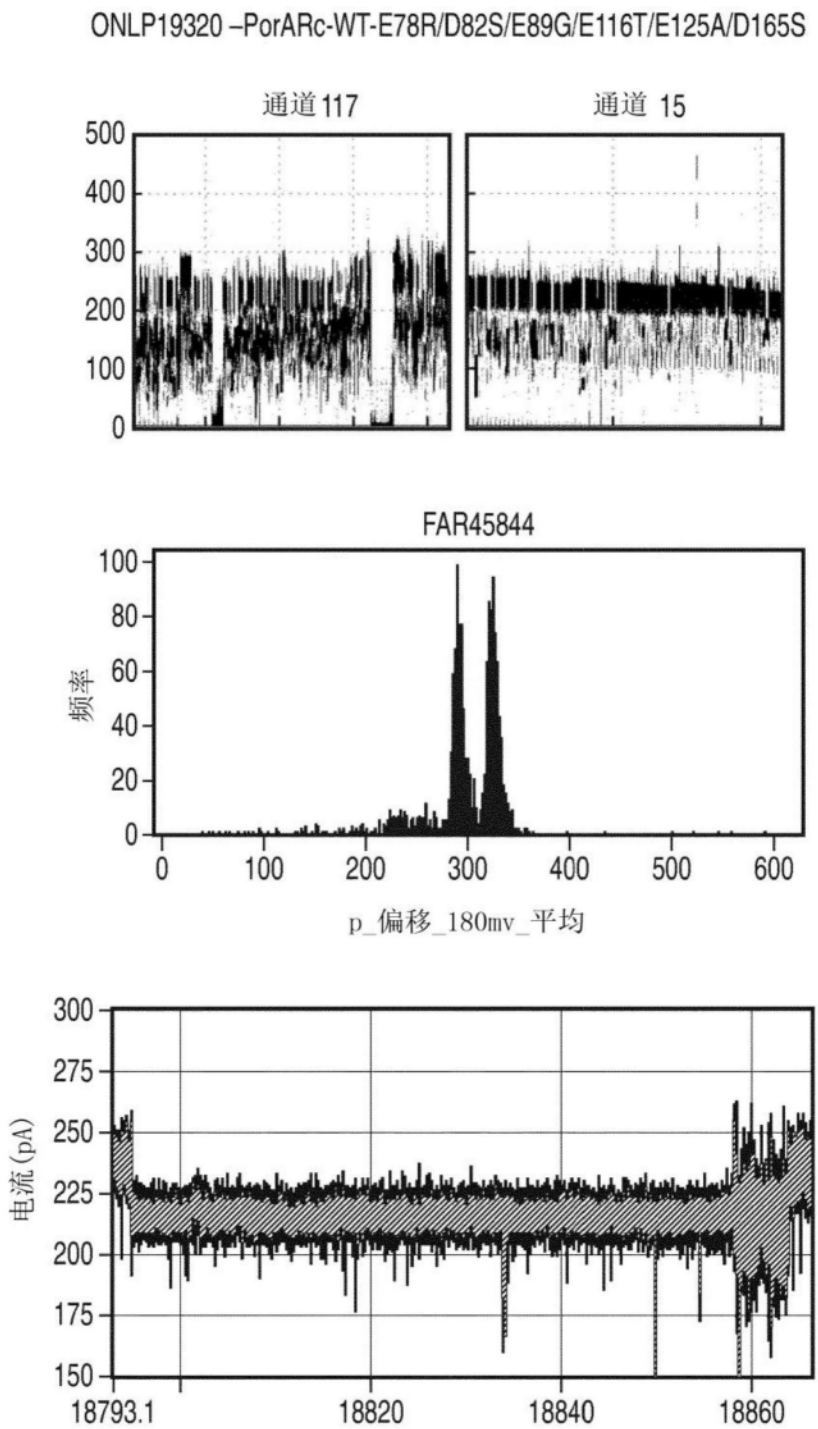
ONLP19320 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89G/E116T/E125A/D165S
通道 117
通道 15
500
400
300
200
100
0
FAR45844
频率
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
18793.1
18820
18840
18860

图5

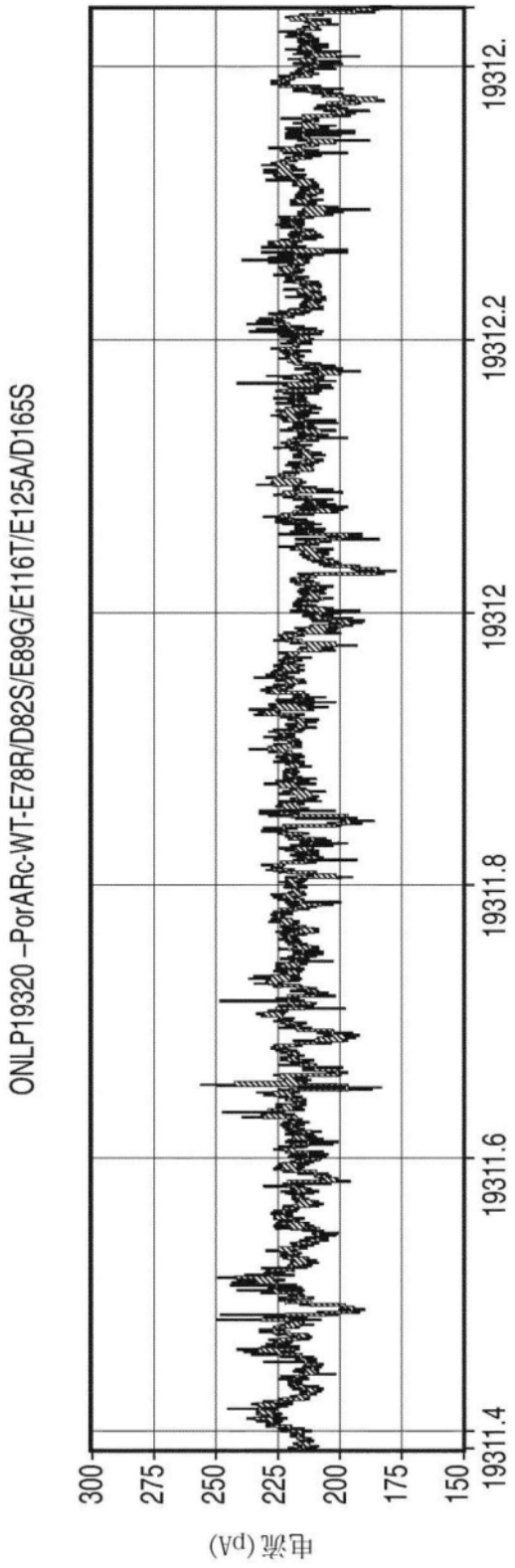
ONLP19320 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89G/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
19311.4
19311.6
19311.8
19312
19312.2
19312.

图5 (续)

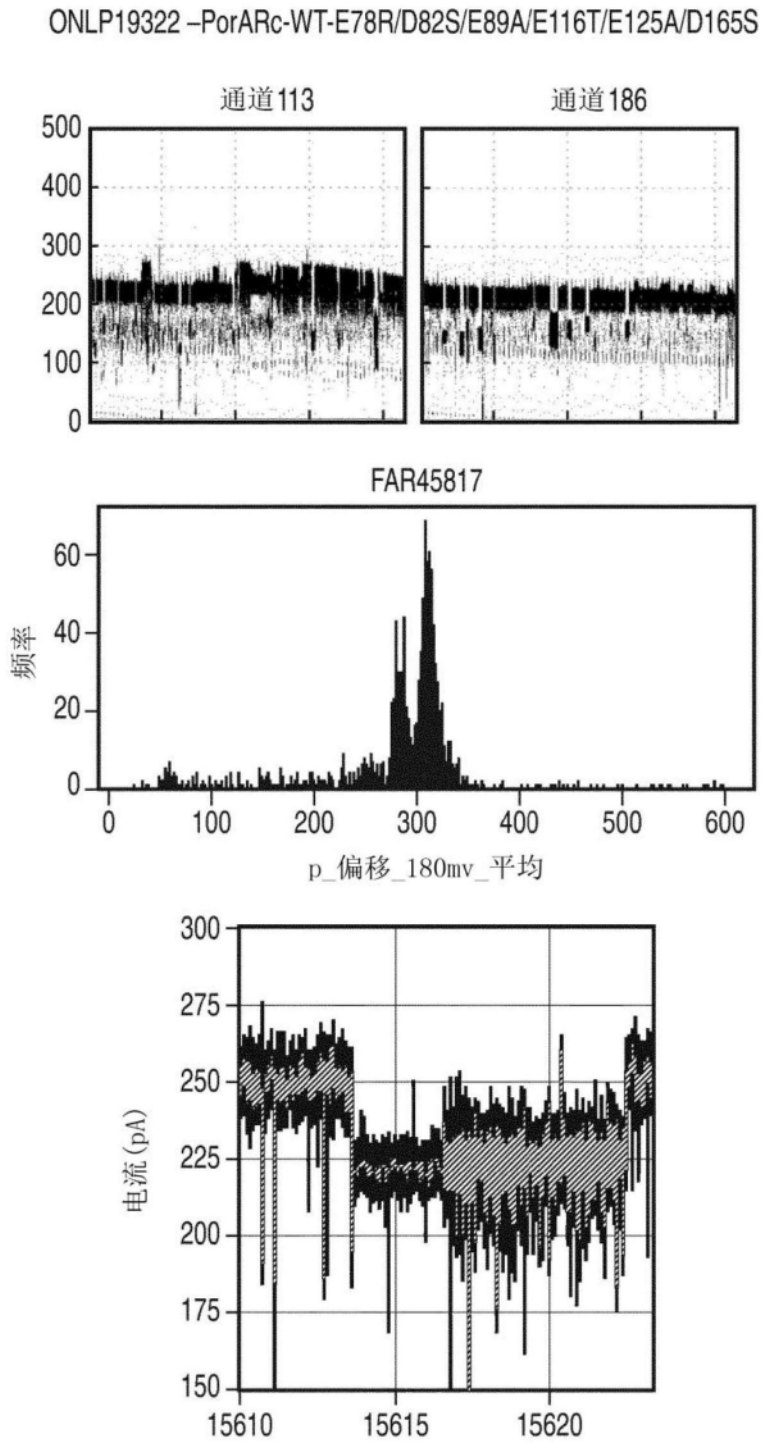
ONLP19322 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89A/E116T/E125A/D165S
通道113
通道186
500
400
300
200
100
0
FAR45817
频率
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
15610
15615
15620

图5(续)

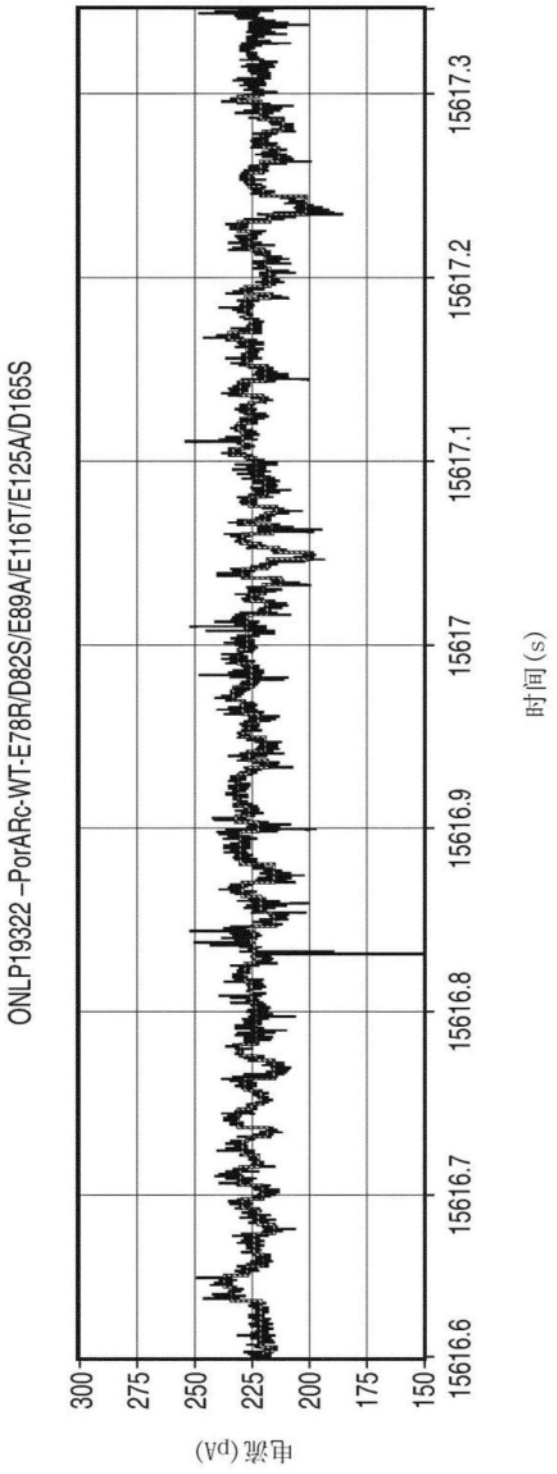
ONLP19322 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89A/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
15616.6
15616.7
15616.8
15616.9
15617
15617.1
15617.2
15617.3
时间(s)

图5(续)

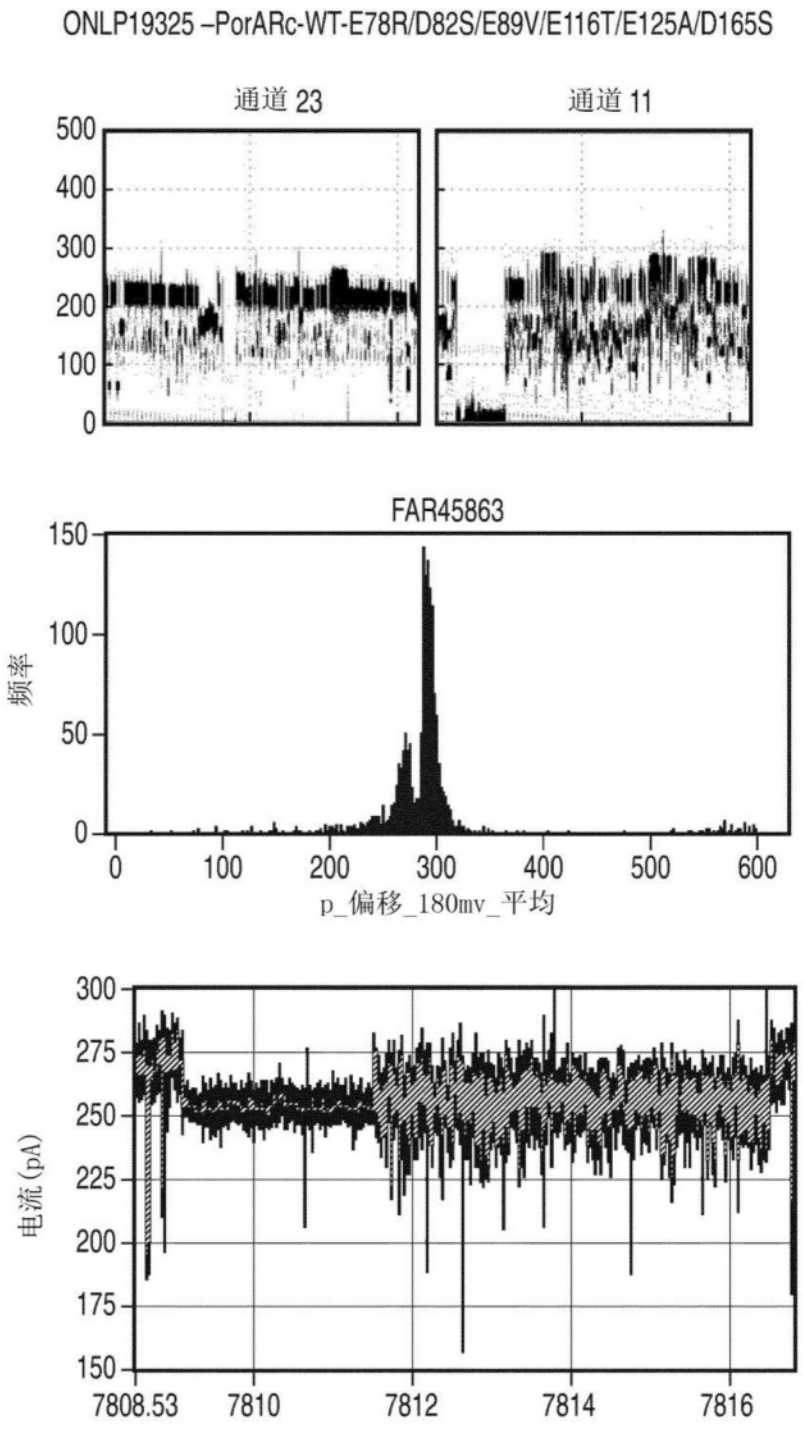
ONLP19325 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89V/E116T/E125A/D165S
通道 23
通道 11
500
400
300
200
100
0
FAR45863
150
100
50
0
频率
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
300
275
250
225
200
175
150
电流(pA)
7808.53
7810
7812
7814
7816

图5(续)

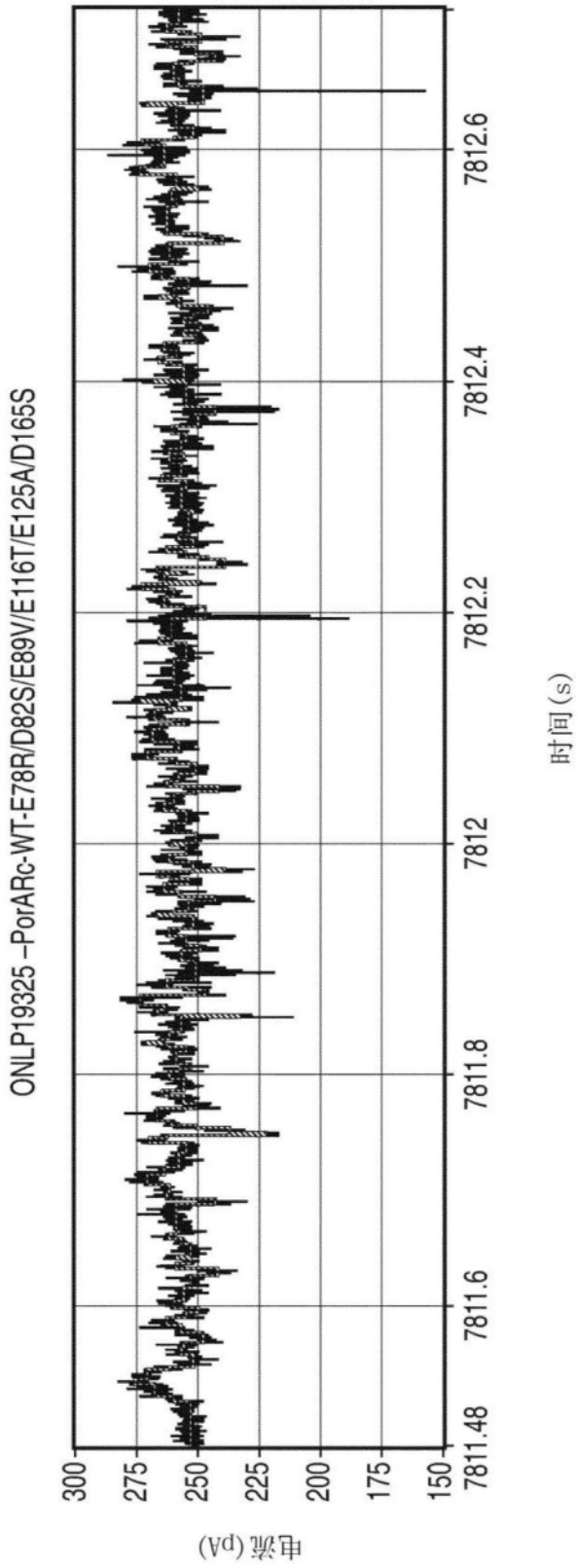
ONLP19325 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89V/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
7811.48
7811.6
7811.8
7812
7812.2
7812.4
7812.6
时间 (s)

图5 (续)

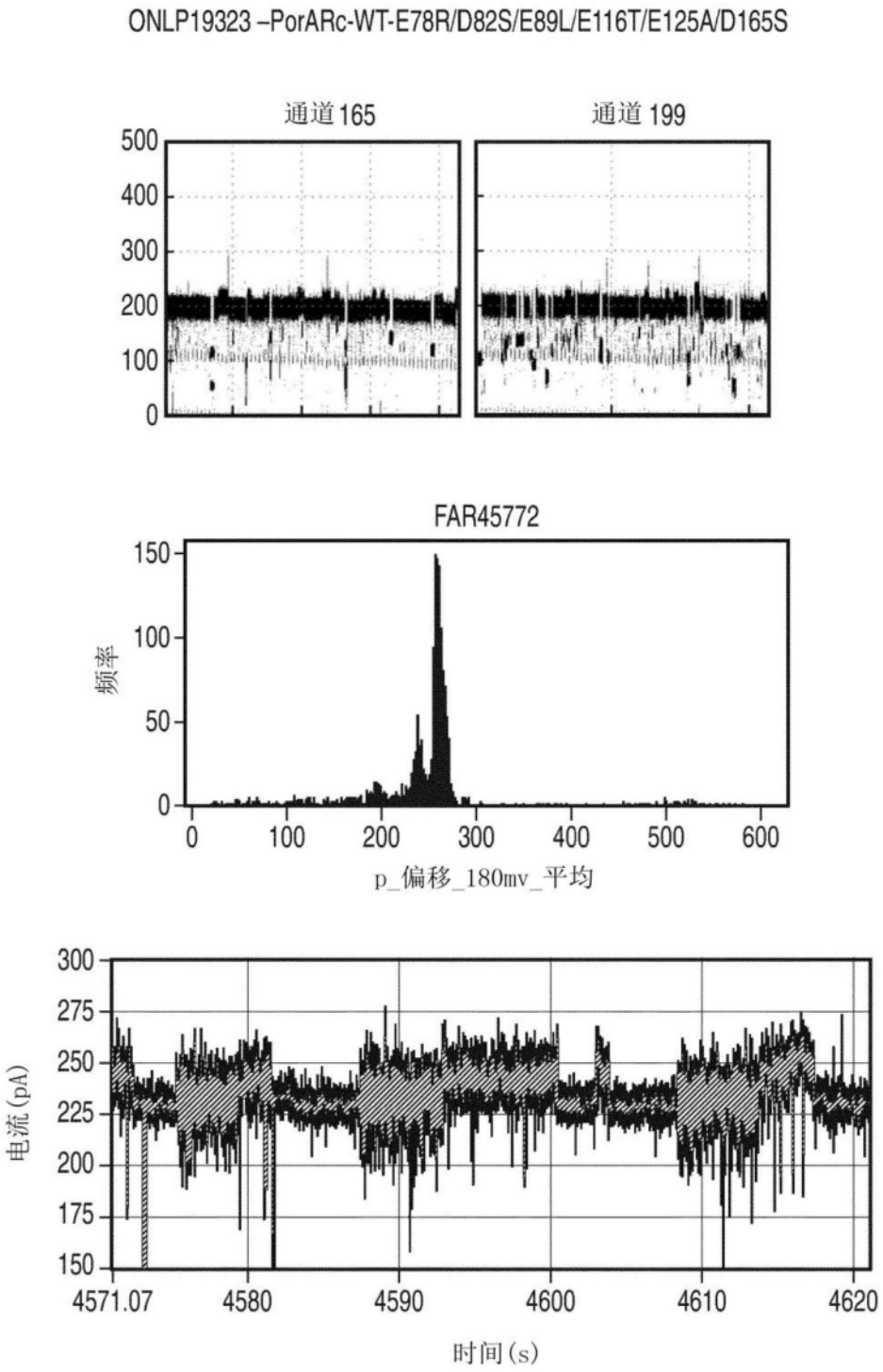
ONLP19323 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89L/E116T/E125A/D165S
通道165
通道199
500
400
300
200
100
0
FAR45772
150
100
50
0
频率
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
300
275
250
225
200
175
150
电流(pA)
4571.07
4580
4590
4600
4610
4620
时间(s)

图6

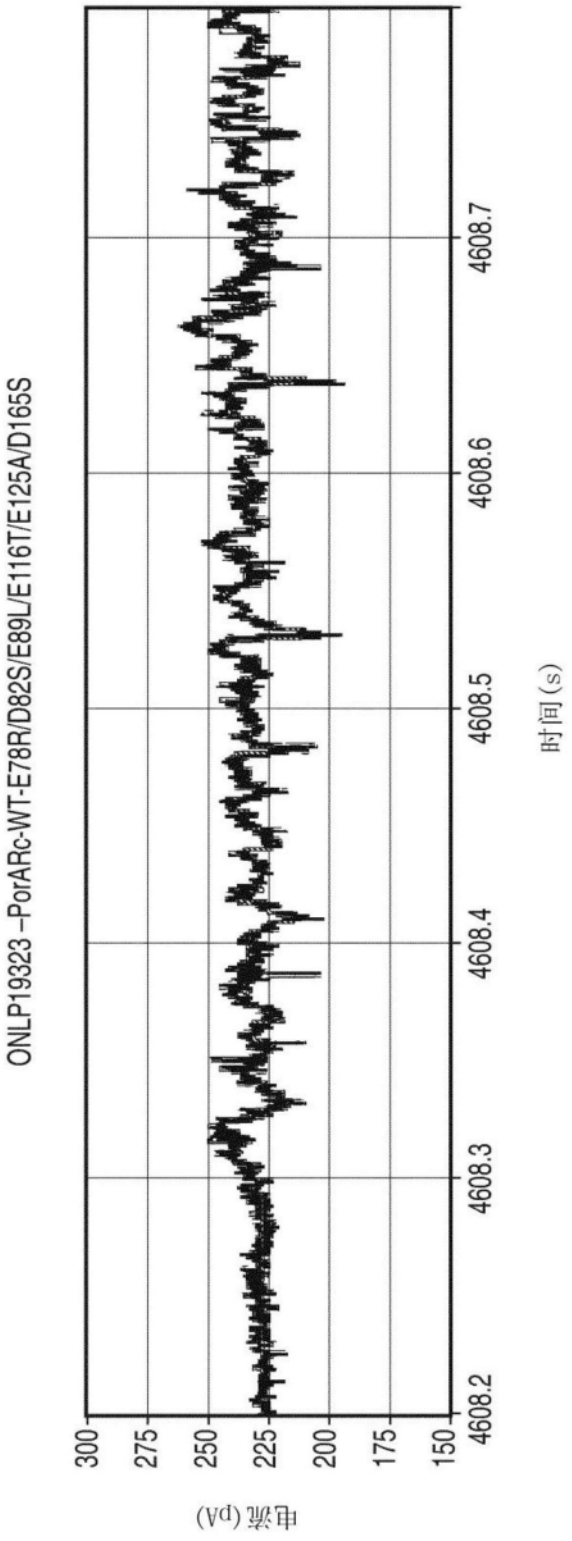
ONLP19323 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89L/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
4608.2
4608.3
4608.4
4608.5
4608.6
4608.7
时间(s)

图6(续)

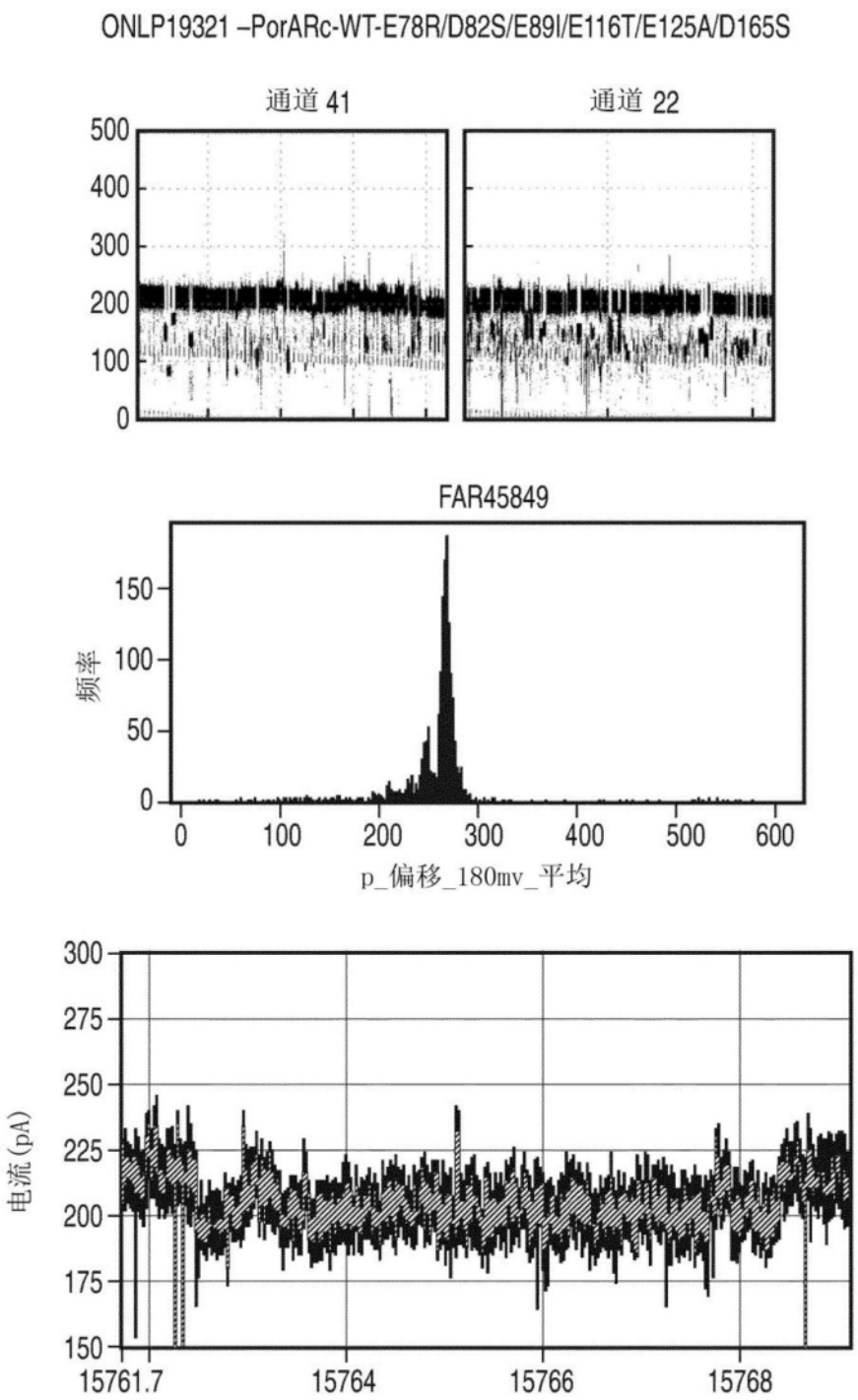
ONLP19321 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89I/E116T/E125A/D165S
通道 41
通道 22
500
400
300
200
100
0
FAR45849
频率
150
100
50
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
15761.7
15764
15766
15768

图6 (续)

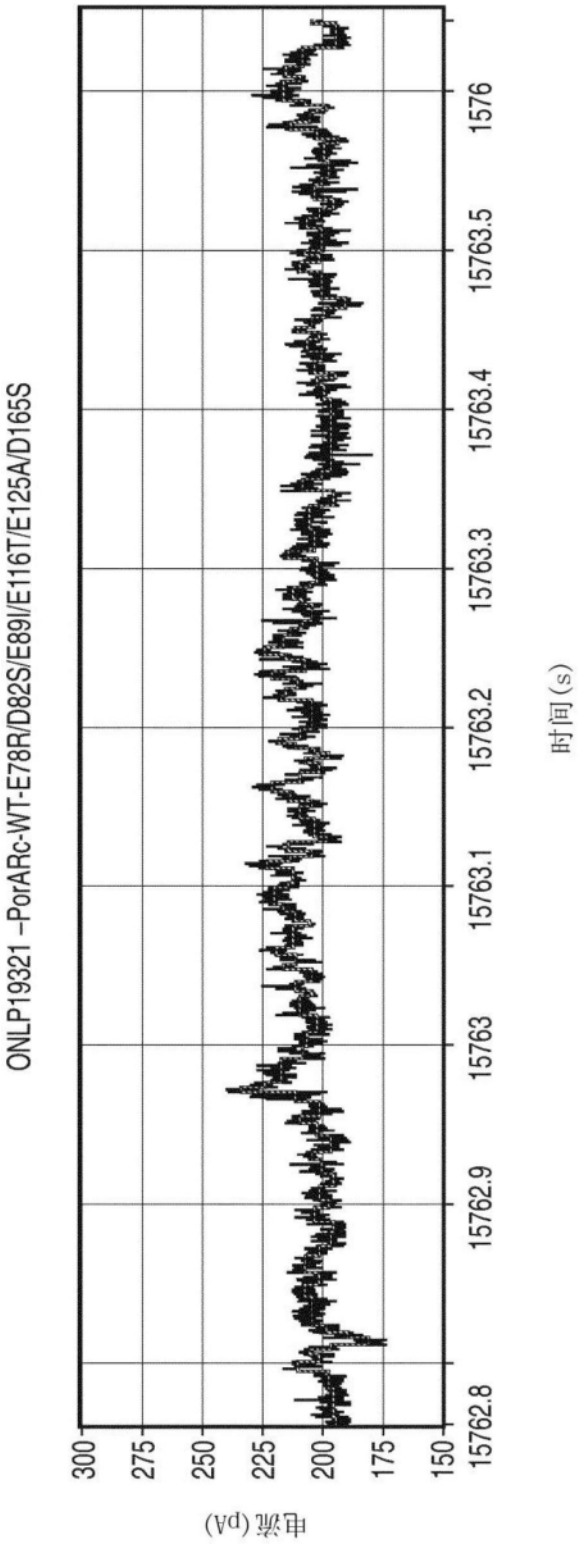
ONLP19321 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89I/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
15762.8
15762.9
15763
15763.1
15763.2
15763.3
15763.4
15763.5
1576
时间(s)

图6(续)

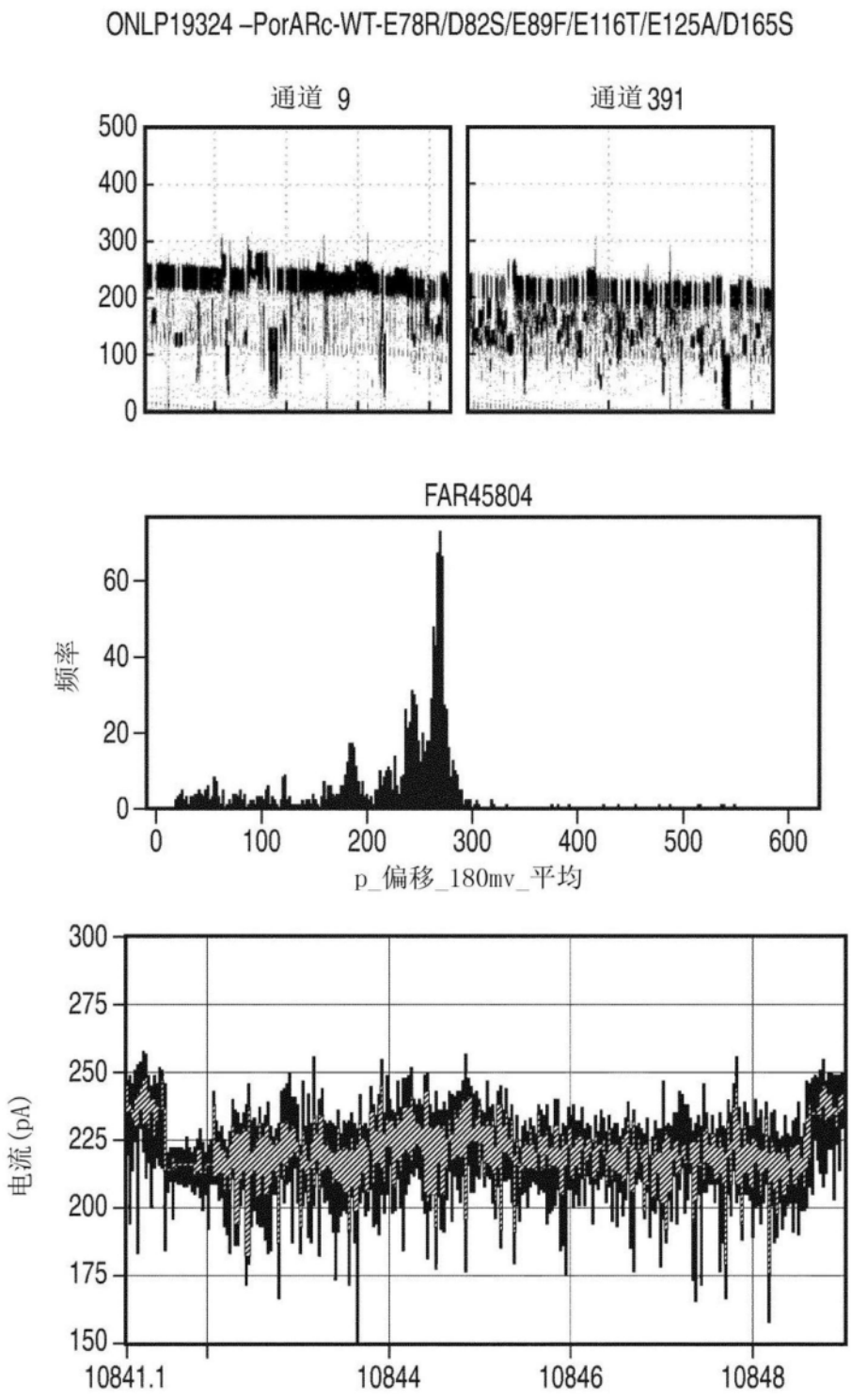
ONLP19324 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89F/E116T/E125A/D165S
通道 9
通道 391
500
400
300
200
100
0
FAR45804
频率
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
10841.1
10844
10846
10848

图6 (续)

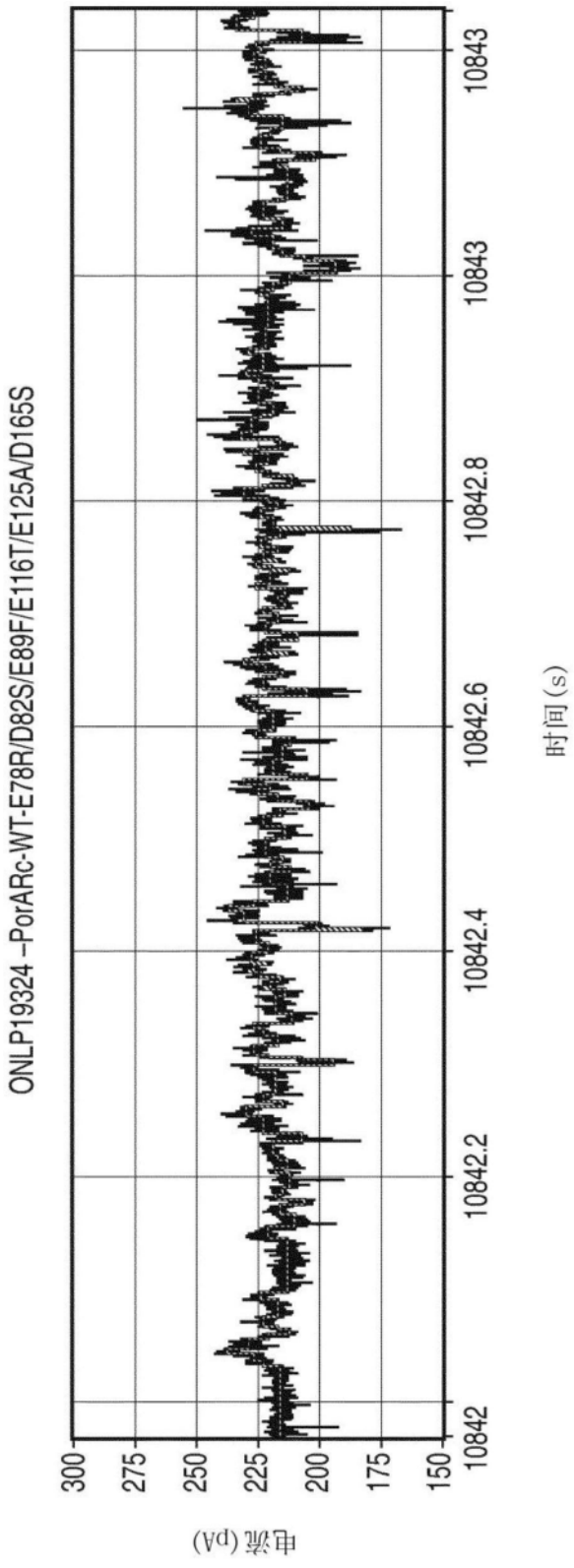
ONLP19324 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89F/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
10842
10842.2
10842.4
10842.6
10842.8
10843
10843
时间(s)

图6(续)

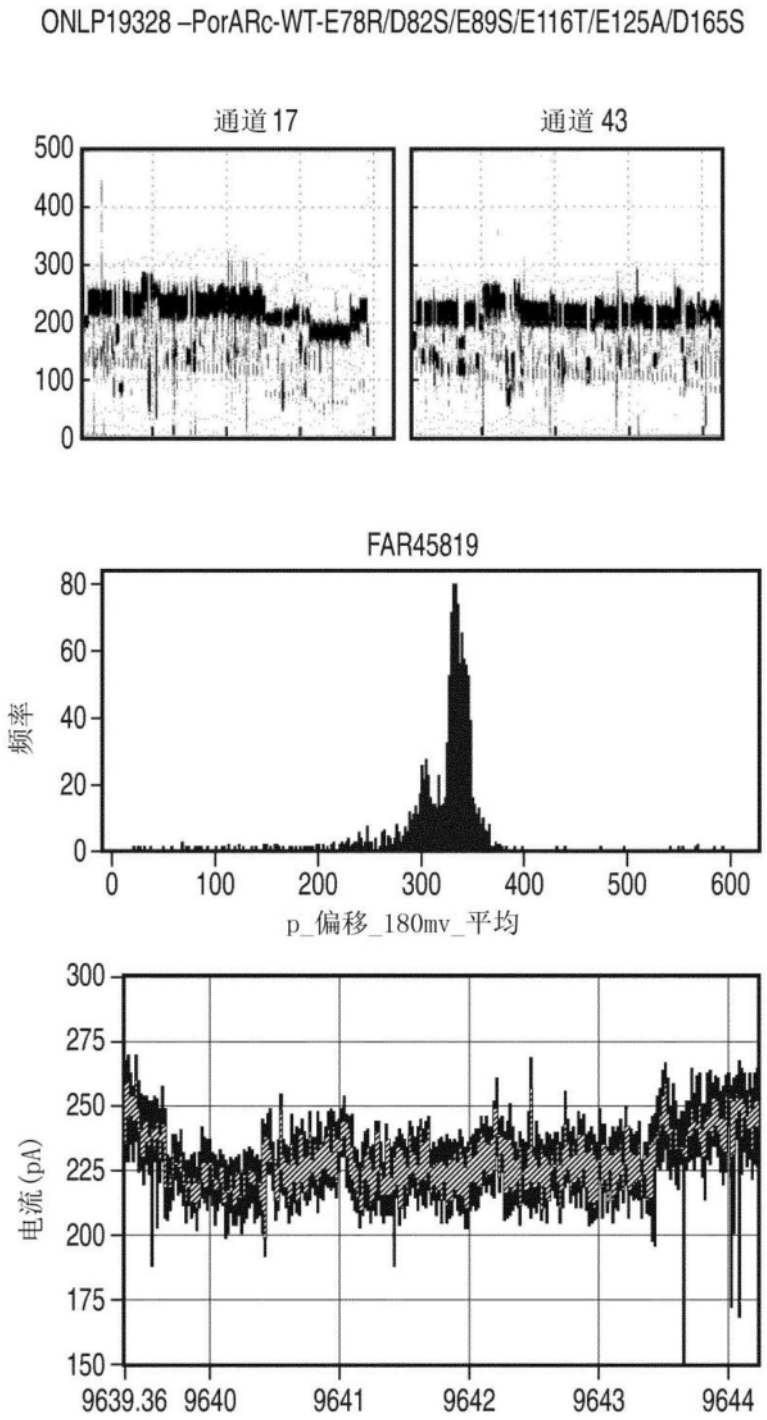
ONLP19328 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89S/E116T/E125A/D165S
通道17
通道43
500
400
300
200
100
0
FAR45819
频率
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
9639.36
9640
9641
9642
9643
9644

图7

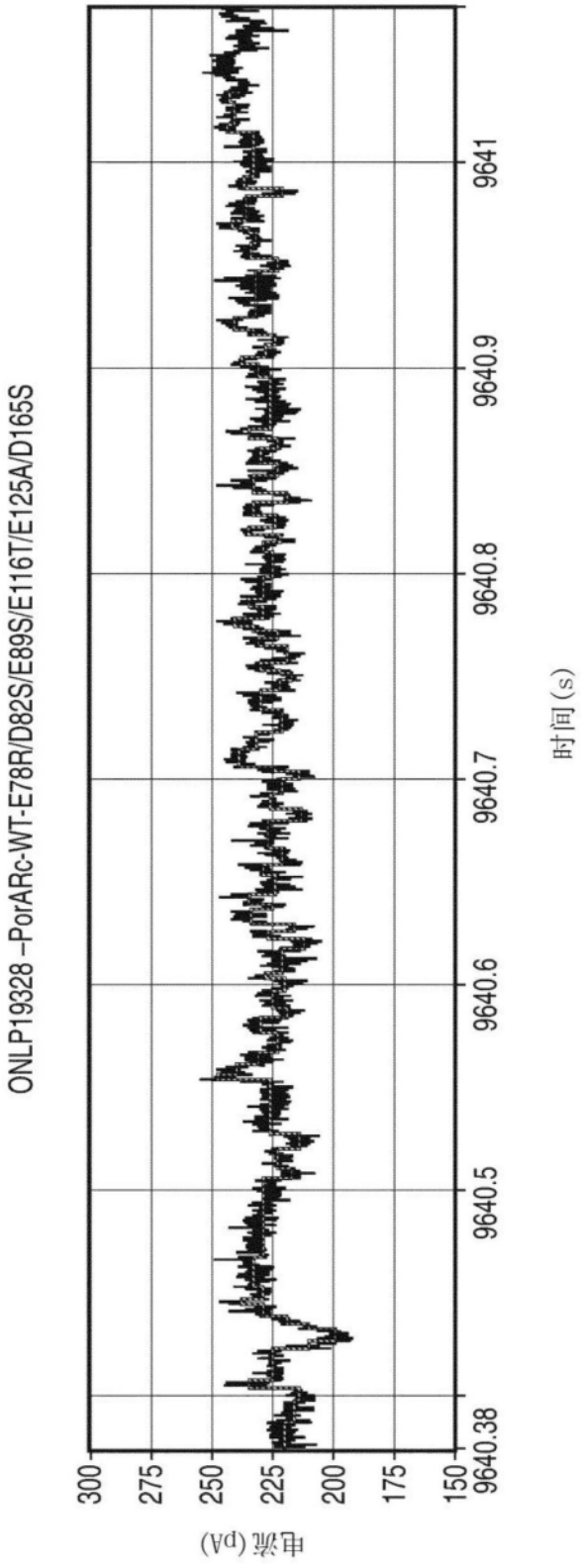
ONLP19328 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89S/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
9640.38
9640.5
9640.6
9640.7
9640.8
9640.9
9641
时间 (s)

图7 (续)

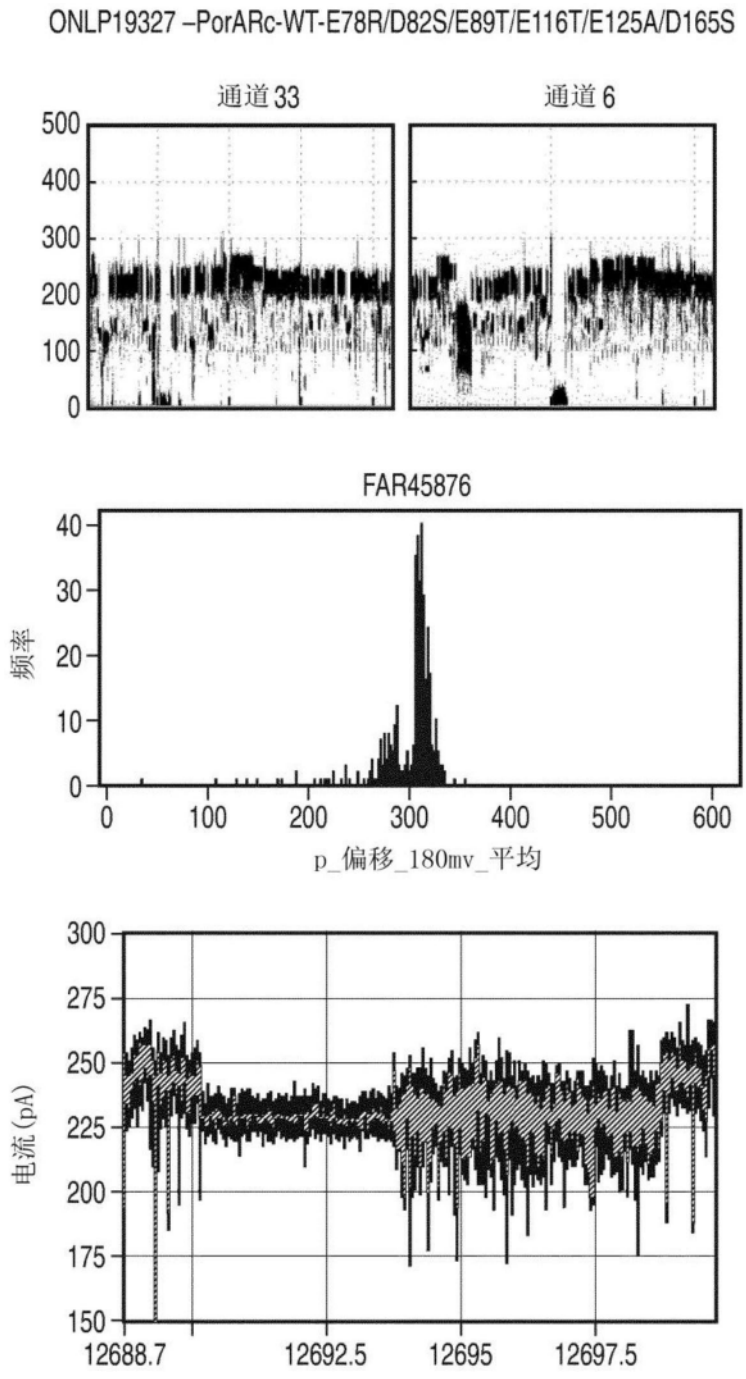
ONLP19327 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89T/E116T/E125A/D165S
通道33
通道6
500
400
300
200
100
0
FAR45876
频率
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
12688.7
12692.5
12695
12697.5

图7 (续)

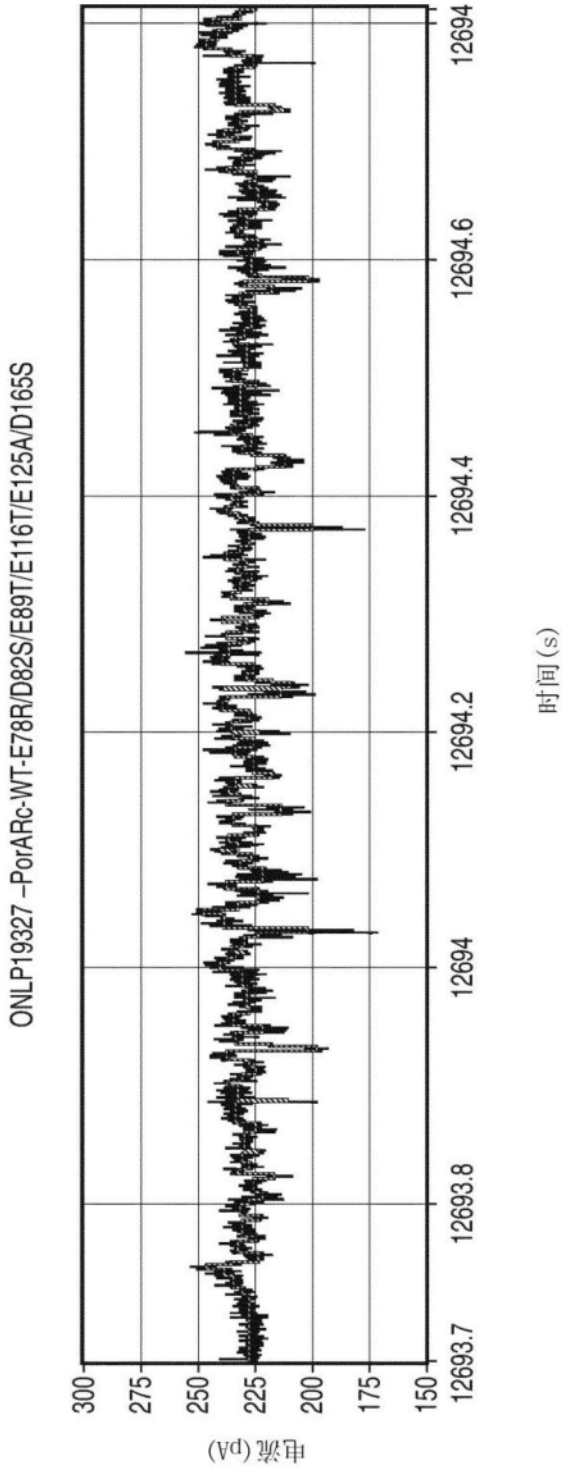
ONLP19327 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89T/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
12693.7
12693.8
12694
12694.2
12694.4
12694.6
12694
时间(s)

图7(续)

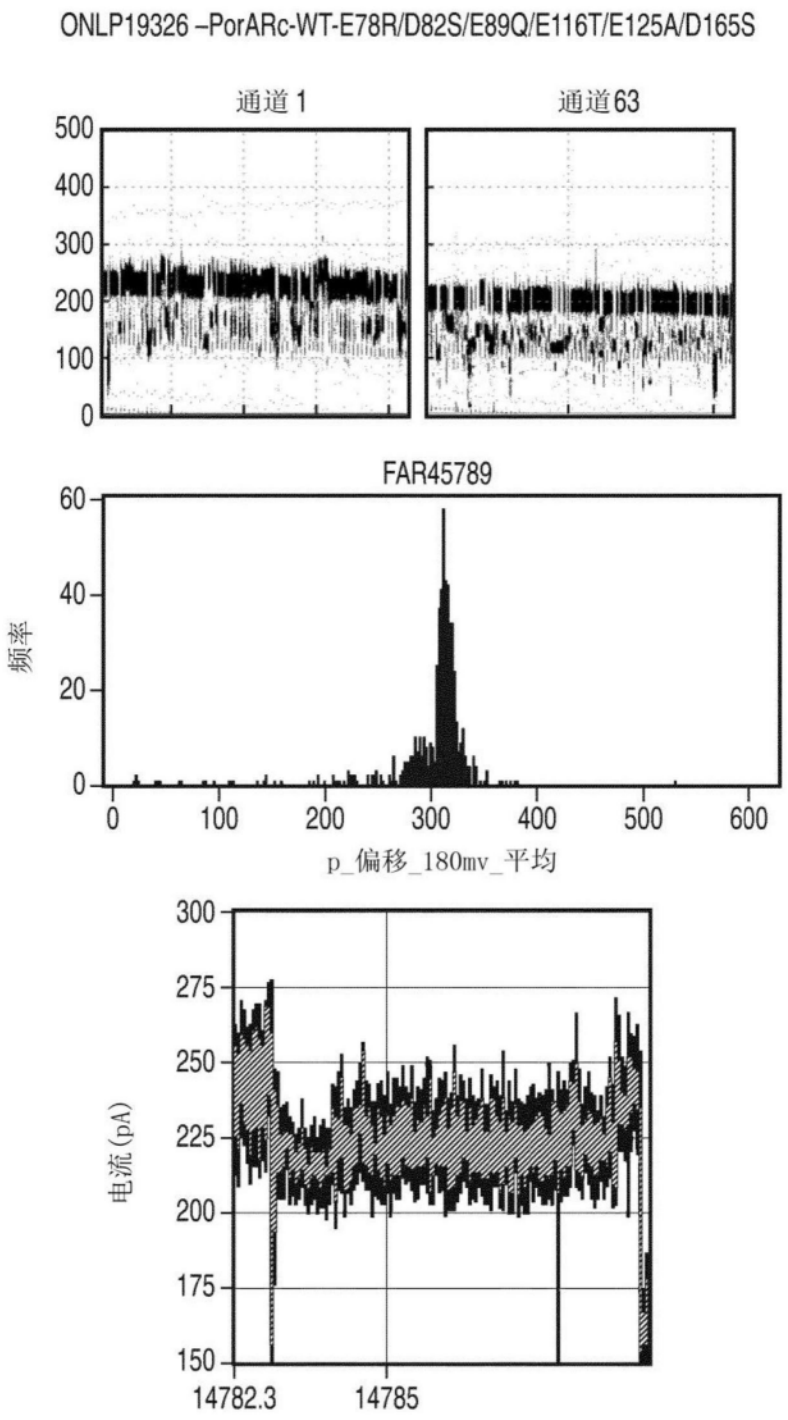
ONLP19326 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89Q/E116T/E125A/D165S
通道 1
通道63
500
400
300
200
100
0
FAR45789
60
40
20
0
频率
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
300
275
250
225
200
175
150
电流(pA)
14782.3
14785

图7(续)

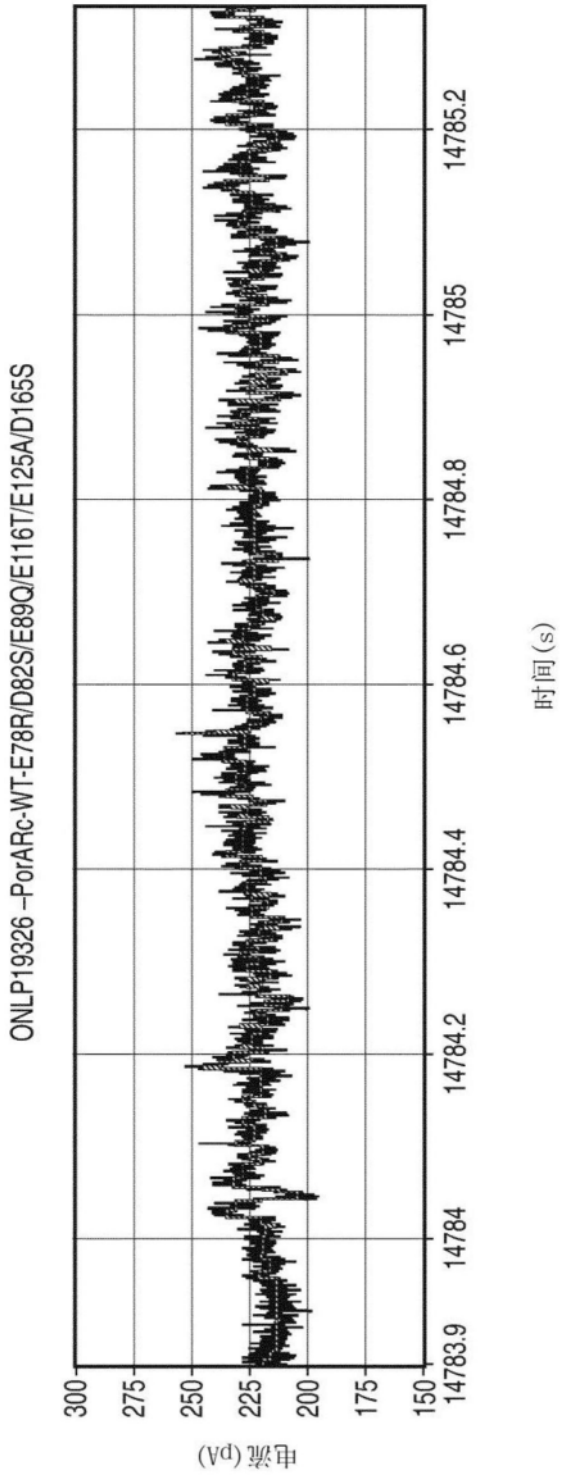
ONLP19326 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89Q/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
14783.9
14784
14784.2
14784.4
14784.6
14784.8
14785
14785.2
时间(s)

图7(续)

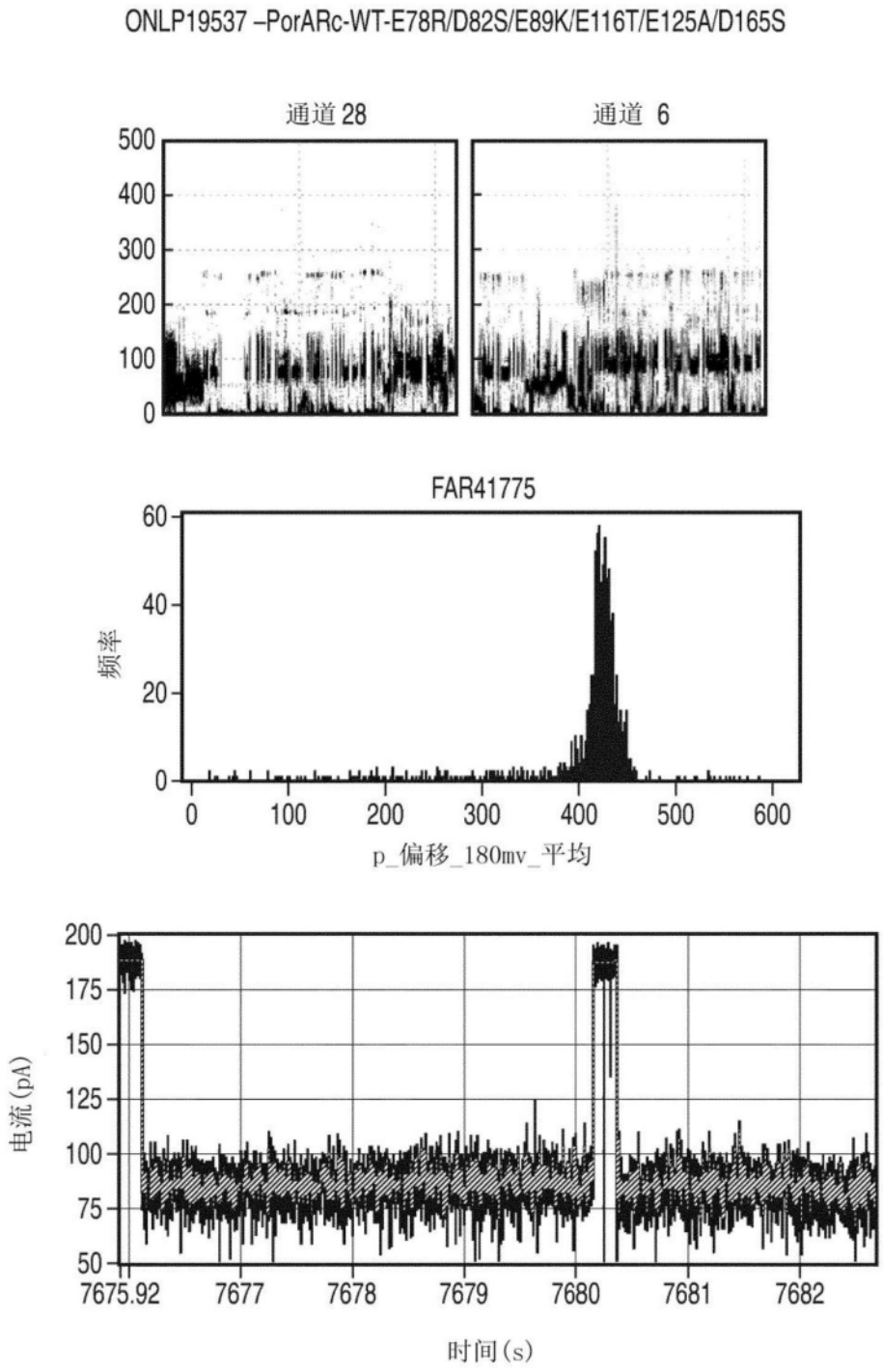
ONLP19537 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89K/E116T/E125A/D165S
通道 28
通道 6
500
400
300
200
100
0
FAR41775
60
40
20
0
频率
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流(pA)
7675.92
7677
7678
7679
7680
7681
7682
时间(s)

图8

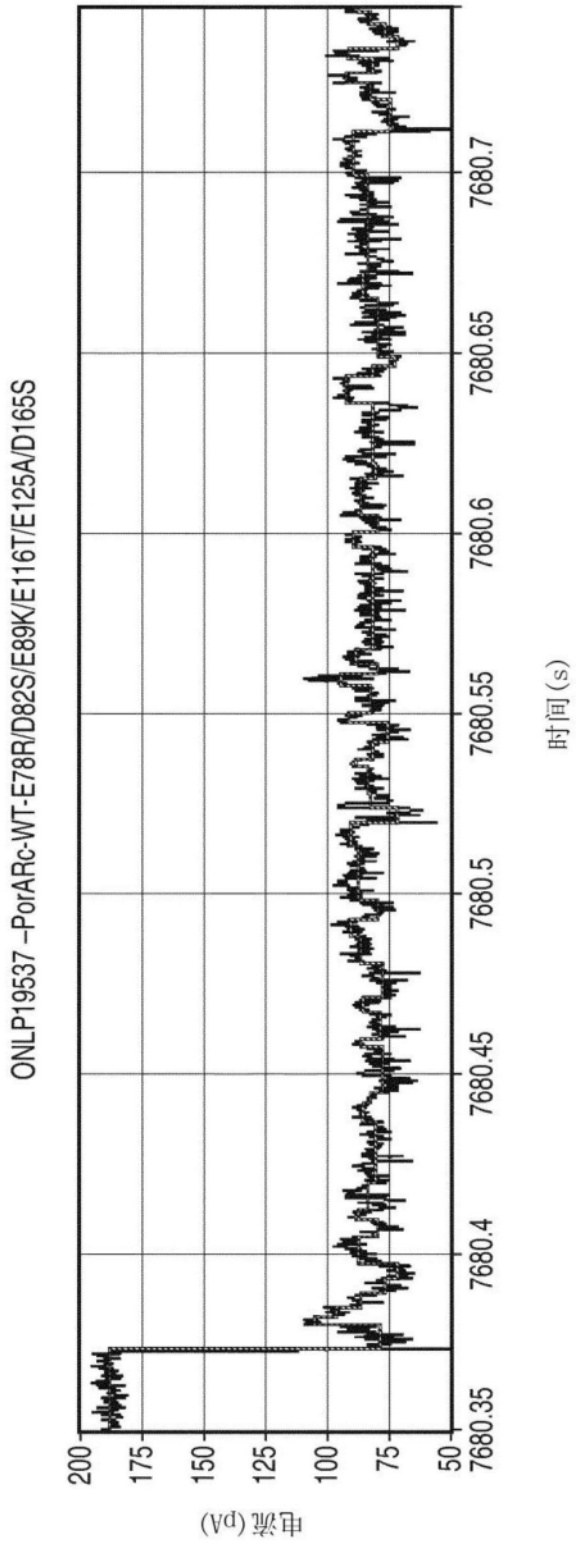
ONLP19537 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89K/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
7680.35
7680.4
7680.45
7680.5
7680.55
7680.6
7680.65
7680.7
时间 (s)

图8 (续)

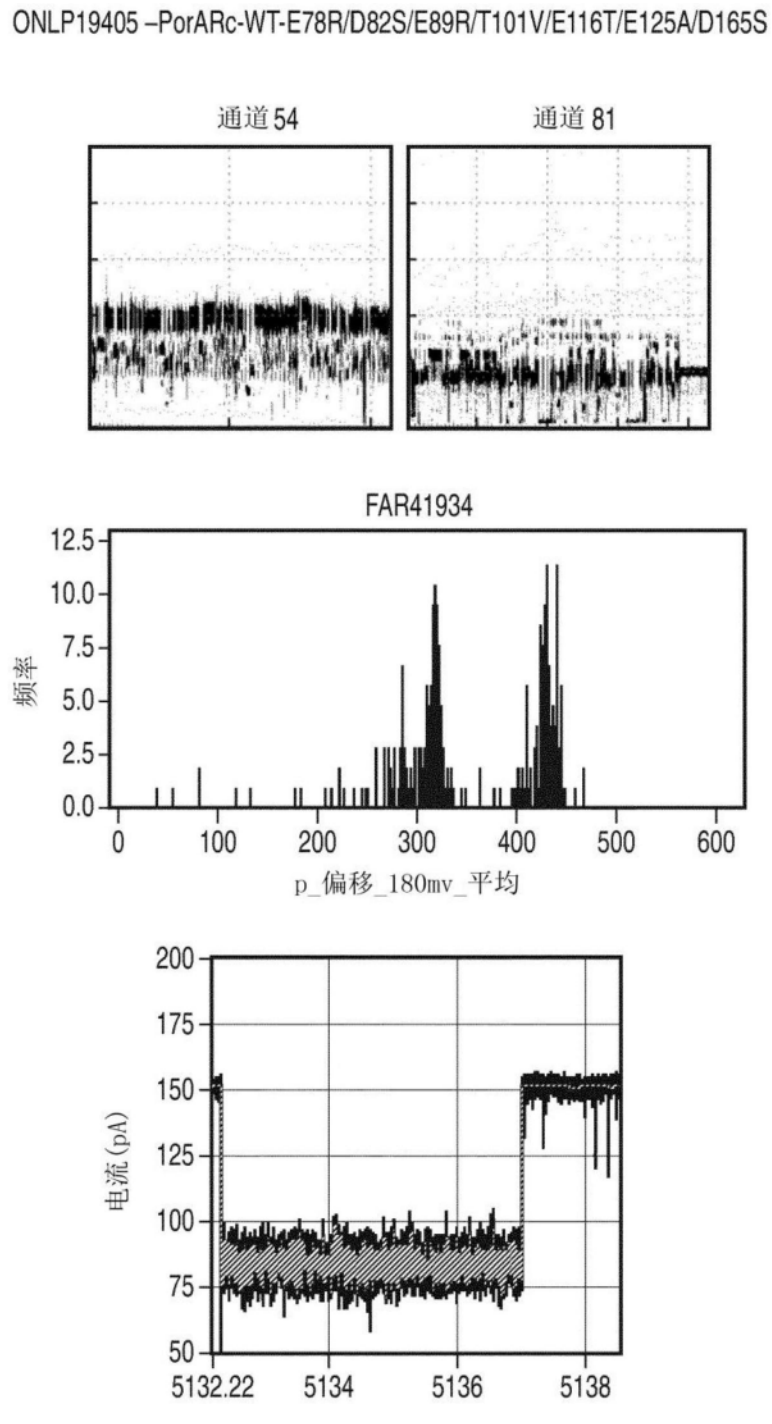
ONLP19405 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/T101V/E116T/E125A/D165S
通道 54
通道 81
FAR41934
频率
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
5132.22
5134
5136
5138

图9

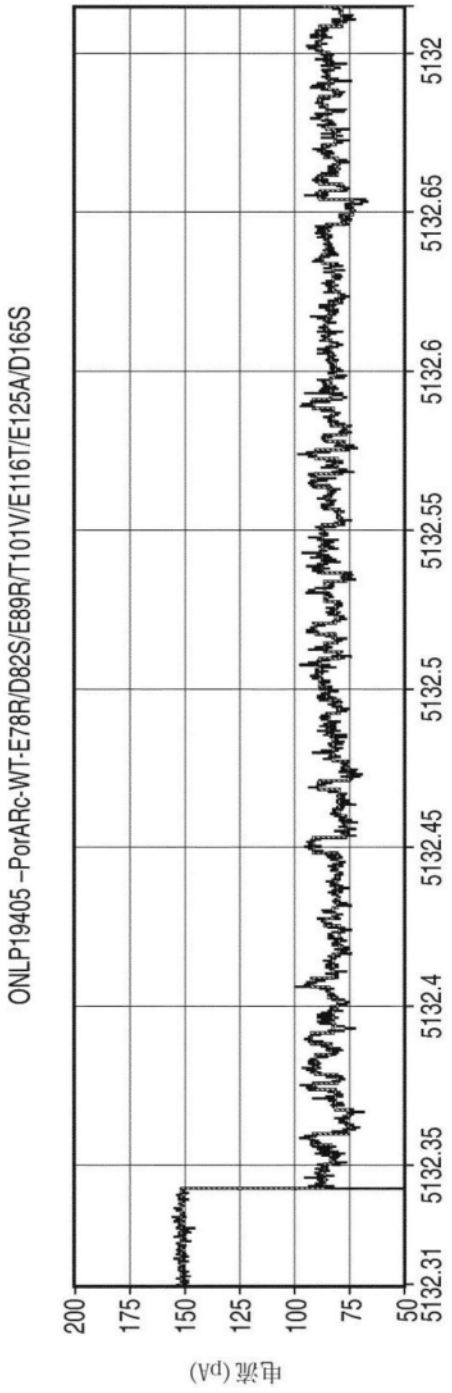
ONLP19405 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/T101V/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
5132.31
5132.35
5132.4
5132.45
5132.5
5132.55
5132.6
5132.65
5132

图9(续)

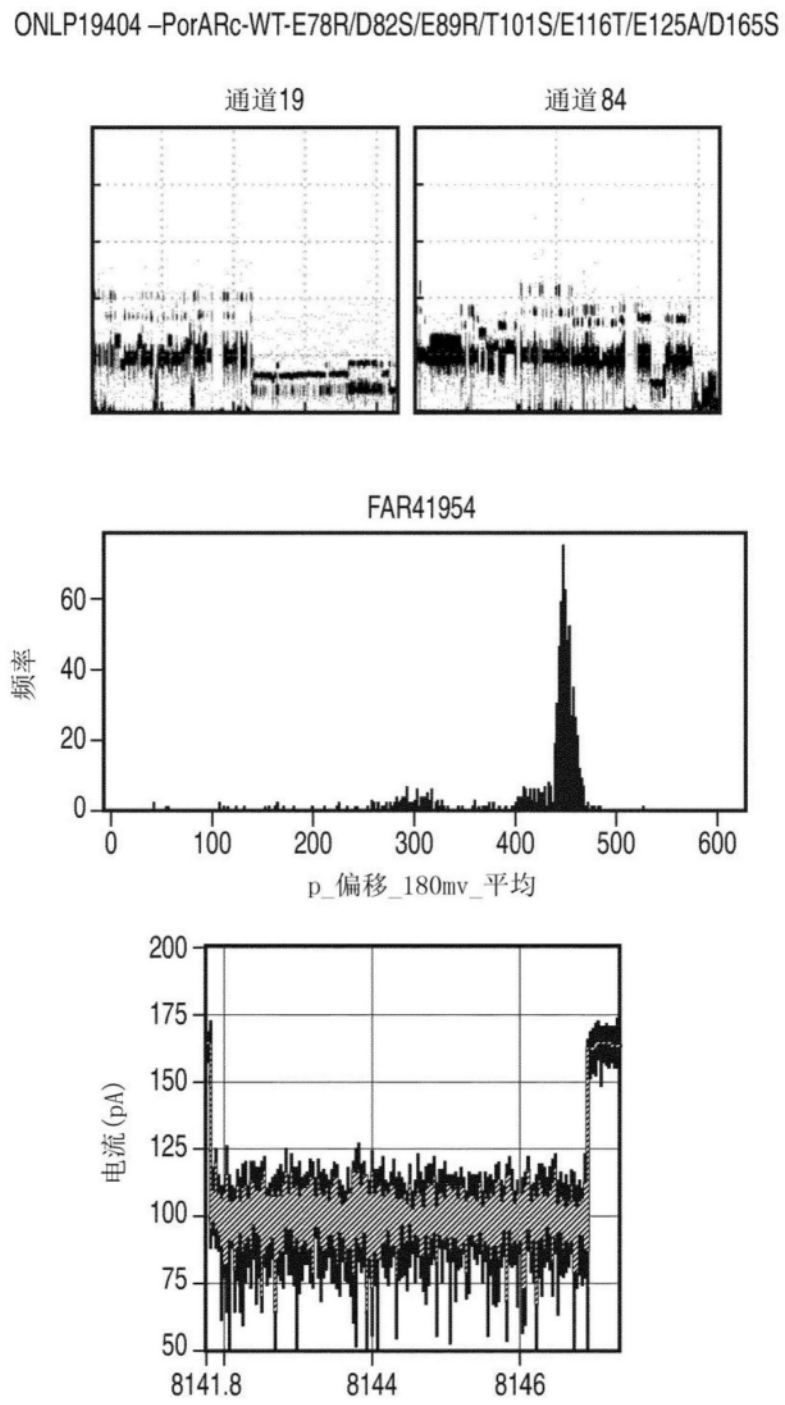
ONLP19404 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/T101S/E116T/E125A/D165S
通道19
通道84
FAR41954
频率
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流(pA)
8141.8
8144
8146

图9(续)

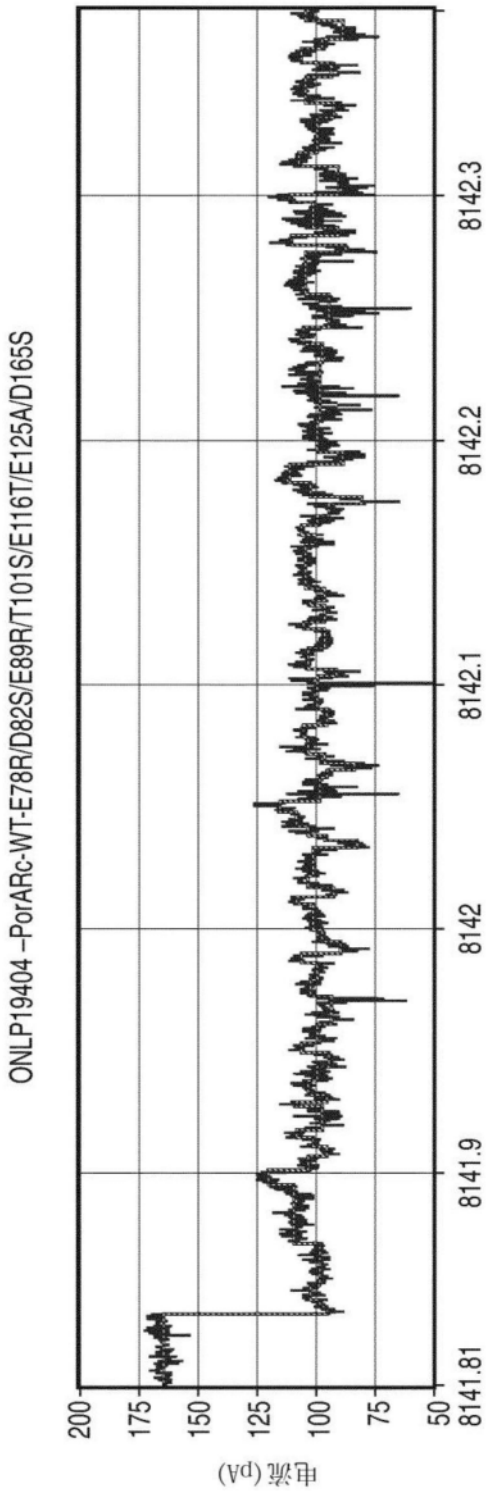
ONLP19404 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/T101S/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
8141.81
8141.9
8142
8142.1
8142.2
8142.3

图9(续)

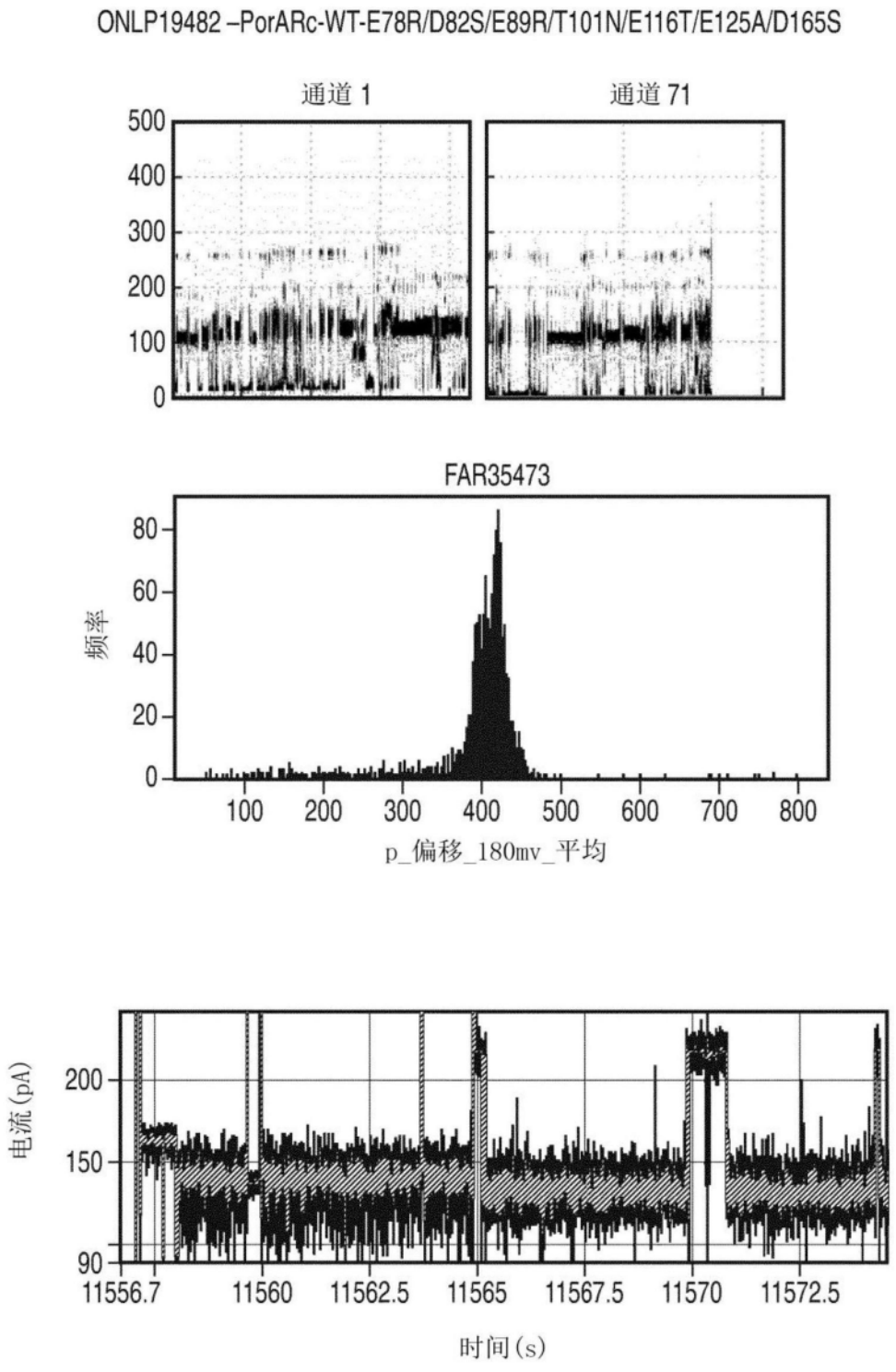
ONLP19482 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/T101N/E116T/E125A/D165S
通道 1
通道 71
500
400
300
200
100
0
FAR35473
频率
80
60
40
20
0
100
200
300
400
500
600
700
800
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
200
150
90
11556.7
11560
11562.5
11565
11567.5
11570
11572.5
时间 (s)

图9 (续)

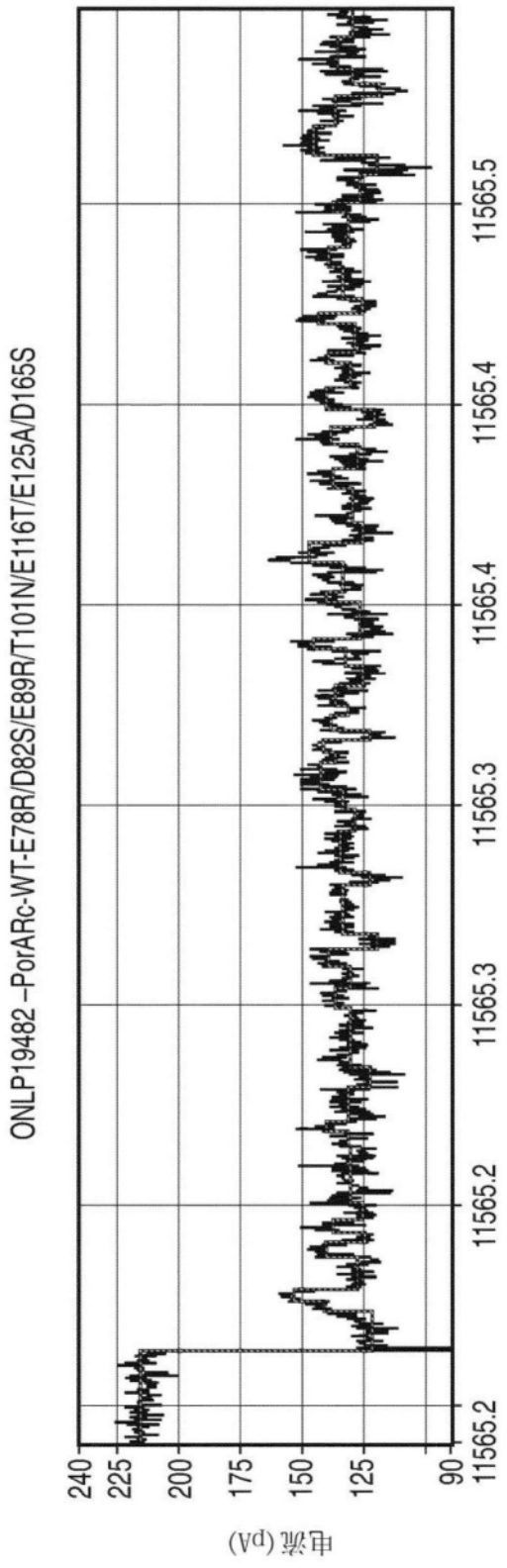
ONLP19482 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/T101N/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
240
225
200
175
150
125
90
11565.2
11565.2
11565.3
11565.3
11565.4
11565.4
11565.5

图9 (续)

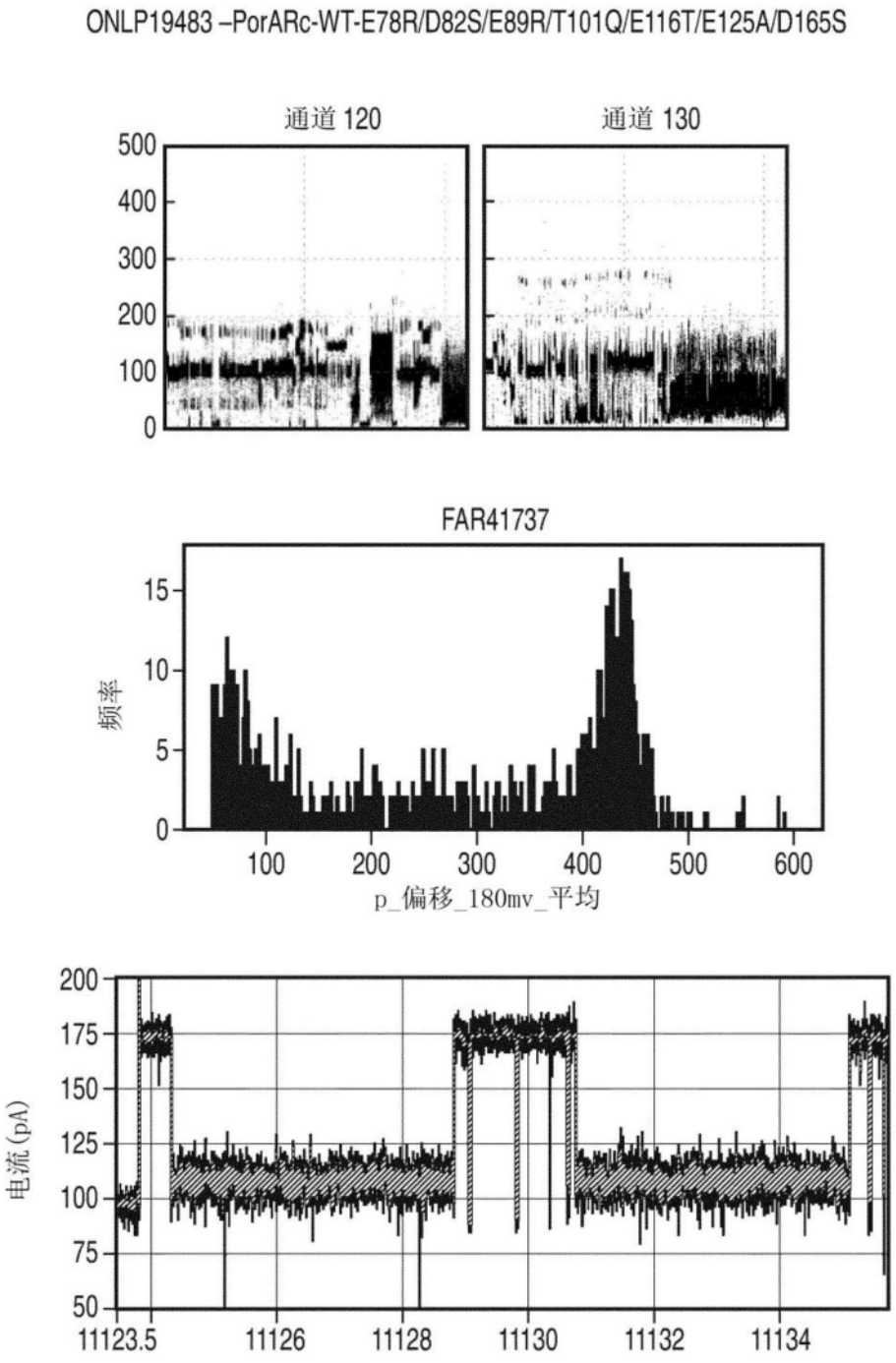
ONLP19483 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/T101Q/E116T/E125A/D165S
通道 120
通道 130
500
400
300
200
100
0
FAR41737
频率
15
10
5
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
11123.5
11126
11128
11130
11132
11134

图10

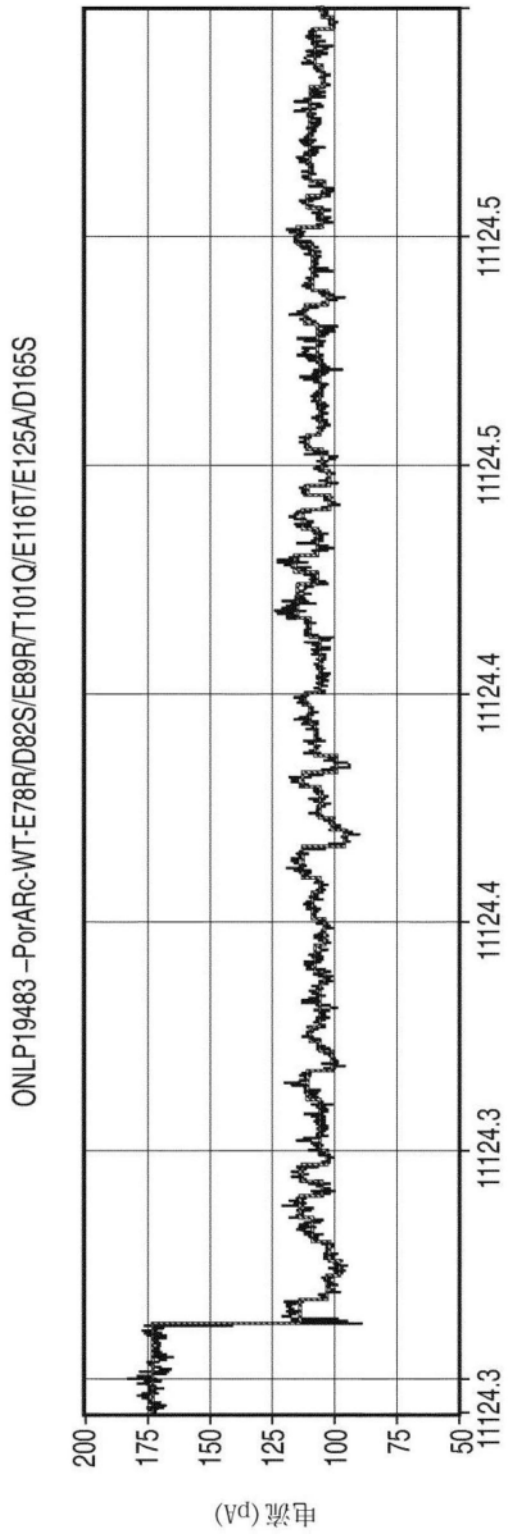
ONLP19483 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/T101Q/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
11124.3
11124.4
11124.5
11124.3
11124.4
11124.5

图10(续)

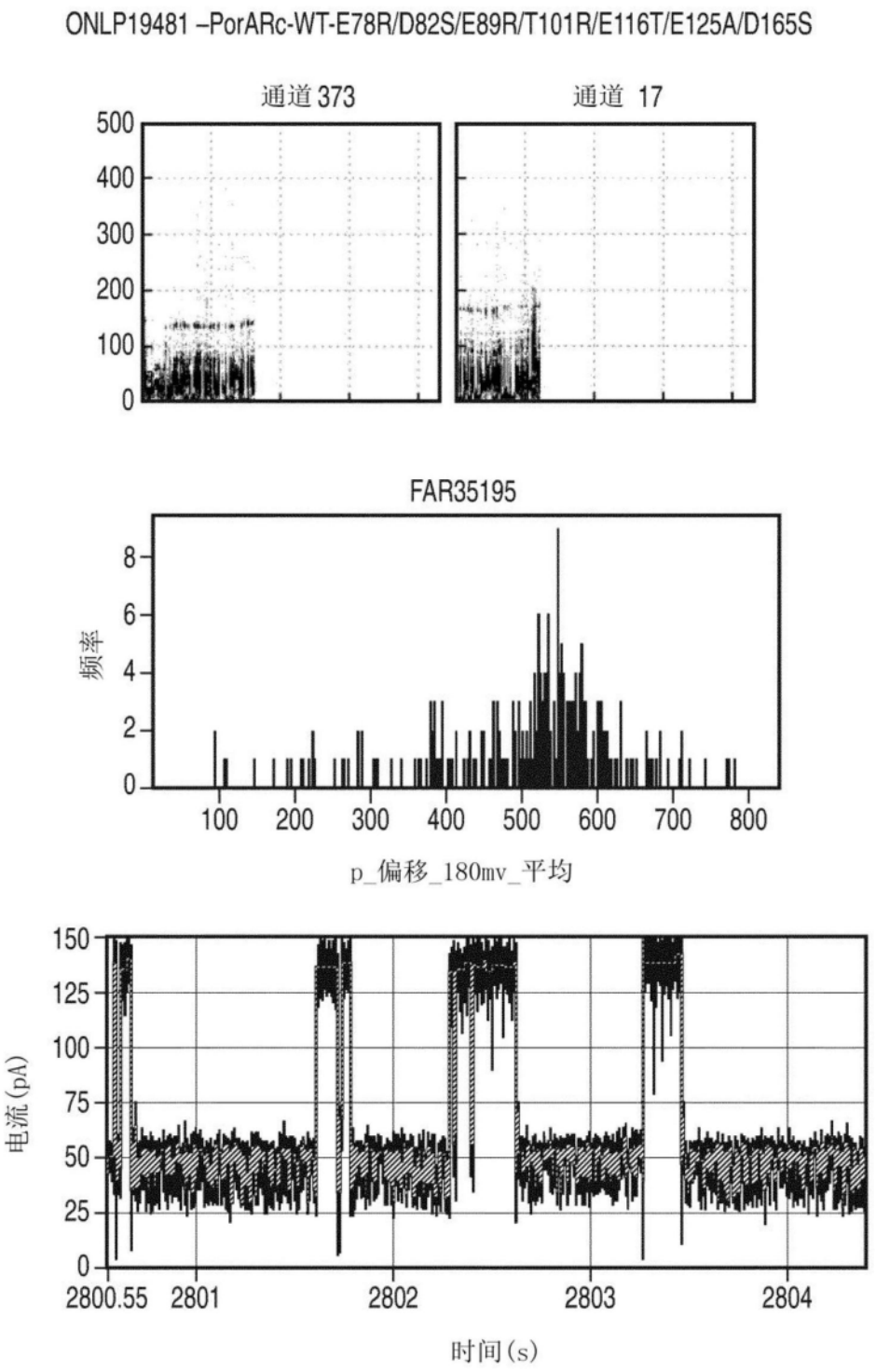
ONLP19481 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/T101R/E116T/E125A/D165S
通道 373
通道 17
500
400
300
200
100
0
FAR35195
频率
8
6
4
2
0
100
200
300
400
500
600
700
800
p_偏移_180mv_平均
150
125
100
75
50
25
0
电流(pA)
2800.55
2801
2802
2803
2804
时间(s)

图10(续)

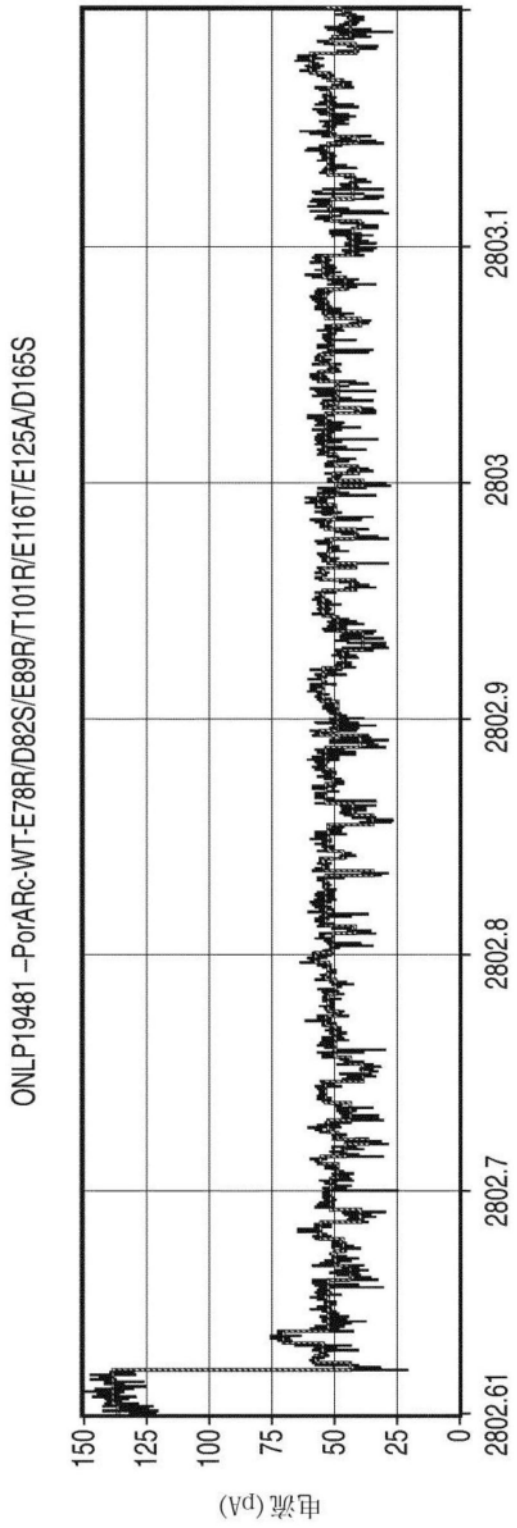
ONLP19481 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/T101R/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
150
125
100
75
50
25
0
2802.61
2802.7
2802.8
2802.9
2803
2803.1

图10(续)

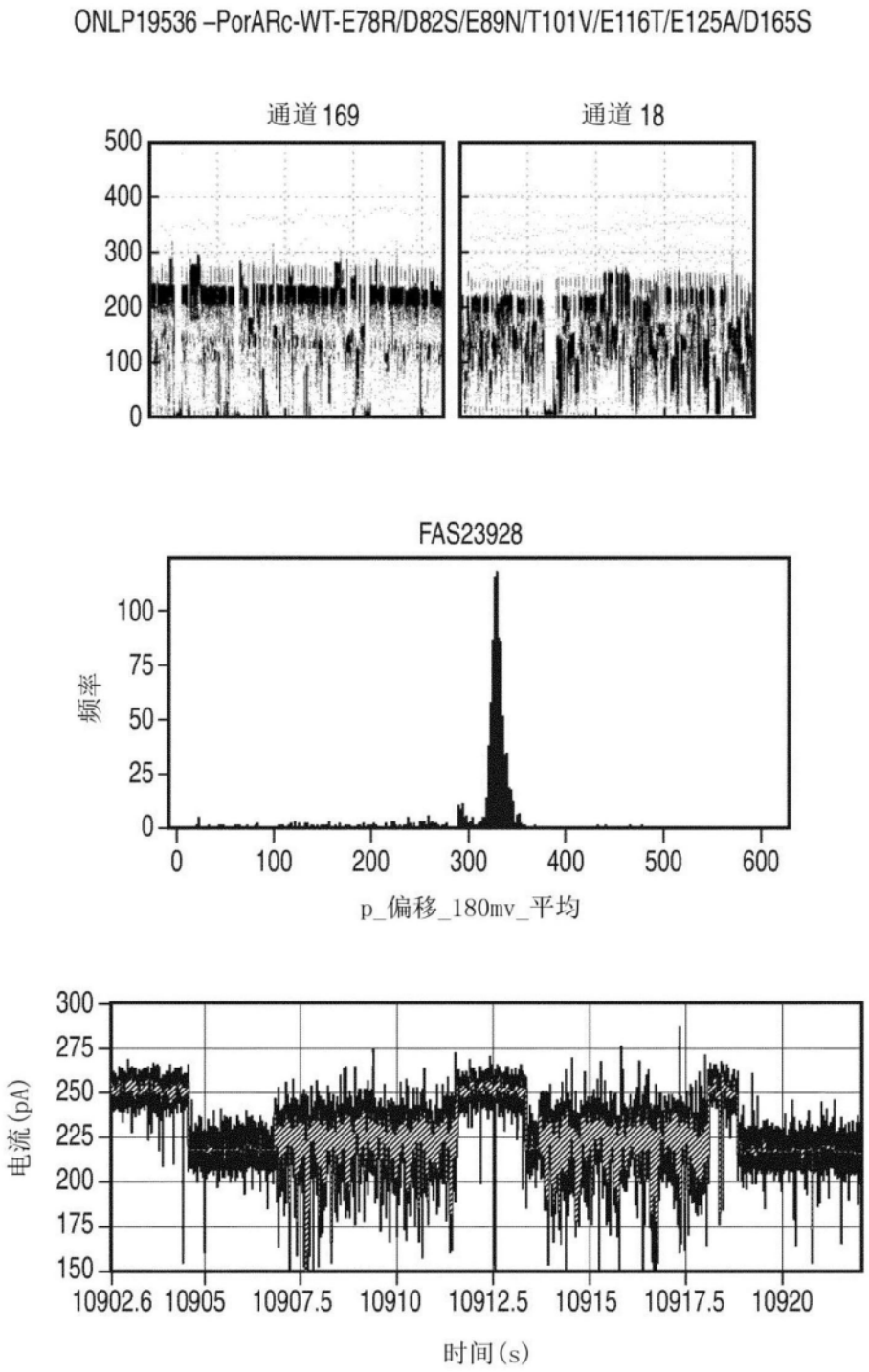
ONLP19536 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89N/T101V/E116T/E125A/D165S
通道 169
通道 18
500
400
300
200
100
0
FAS23928
频率
100
75
50
25
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
10902.6
10905
10907.5
10910
10912.5
10915
10917.5
10920
时间 (s)

图11

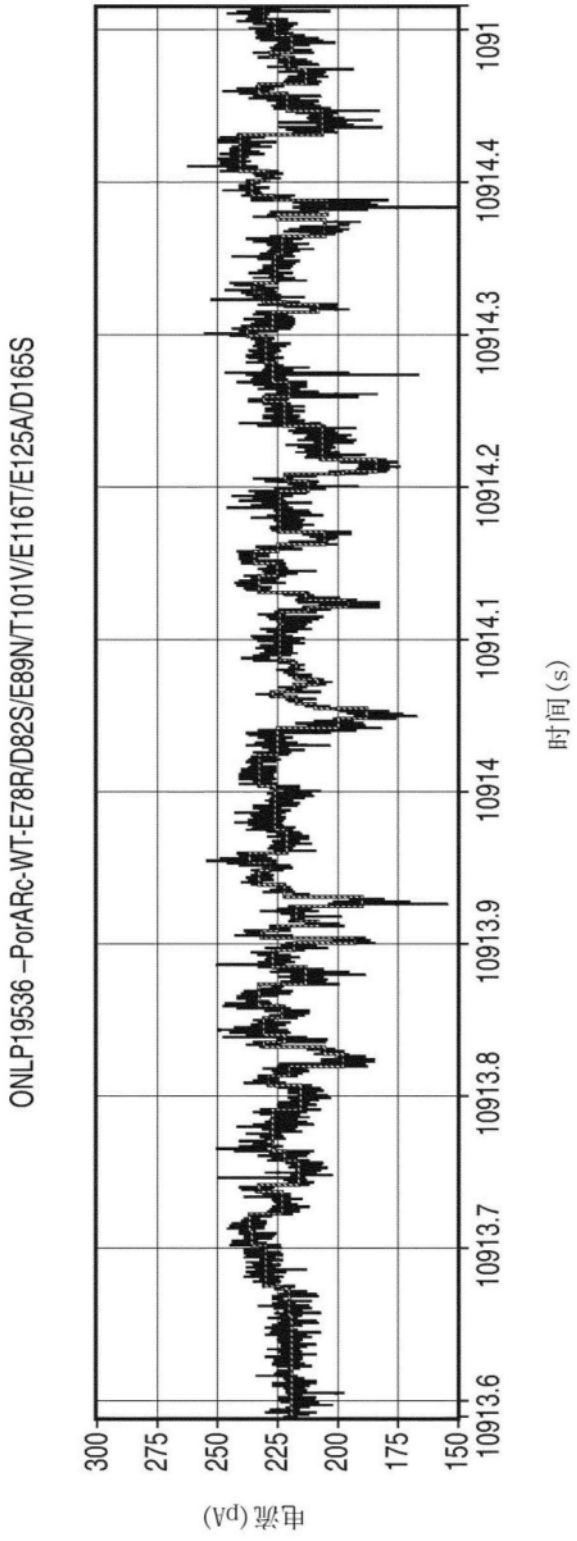
ONLP19536 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89N/T101V/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
10913.6
10913.7
10913.8
10913.9
10914
10914.1
10914.2
10914.3
10914.4
1091
时间(s)

图11(续)

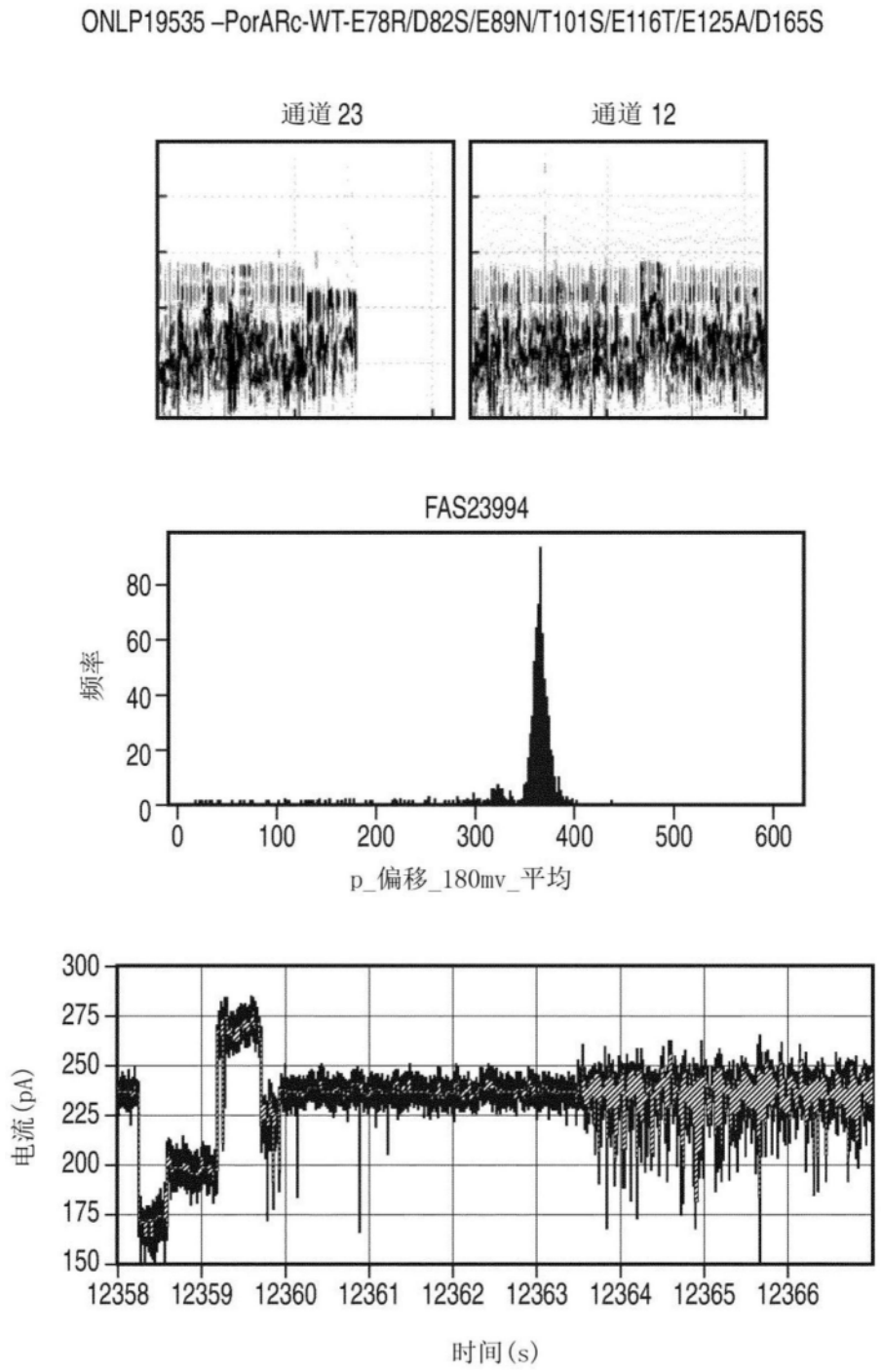
ONLP19535 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89N/T101S/E116T/E125A/D165S
通道 23
通道 12
FAS23994
频率
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
300
275
250
225
200
175
150
电流(pA)
12358
12359
12360
12361
12362
12363
12364
12365
12366
时间(s)

图11(续)

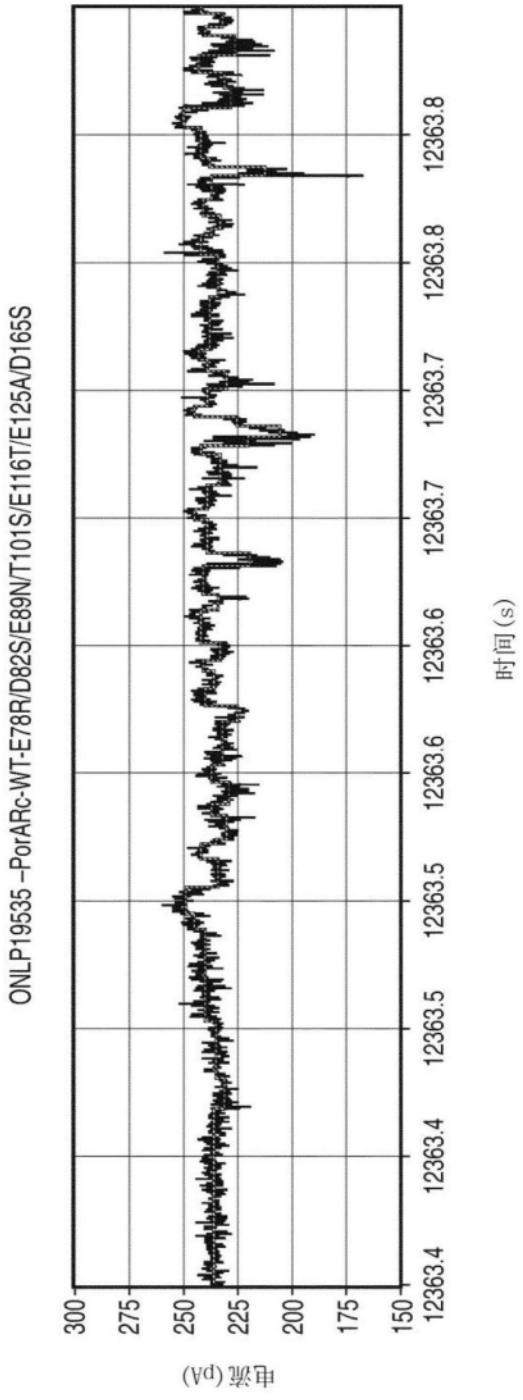
ONLP19535 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89N/T101S/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
12363.4
12363.4
12363.5
12363.5
12363.5
12363.6
12363.6
12363.7
12363.7
12363.8
12363.8
时间(s)

图11(续)

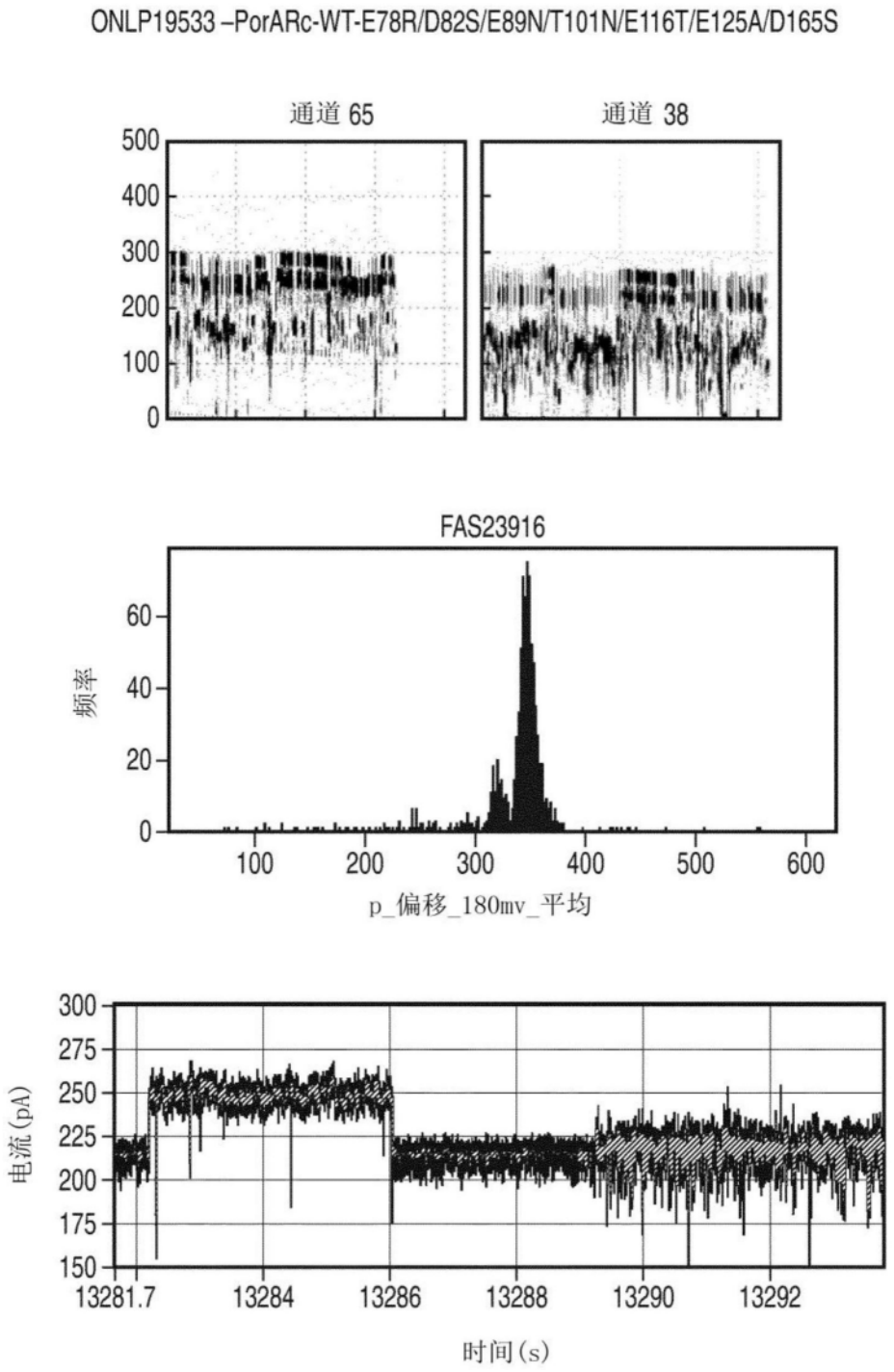
ONLP19533 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89N/T101N/E116T/E125A/D165S
通道 65
通道 38
500
400
300
200
100
0
FAS23916
频率
60
40
20
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
300
275
250
225
200
175
150
电流(pA)
13281.7
13284
13286
13288
13290
13292
时间(s)

图11(续)

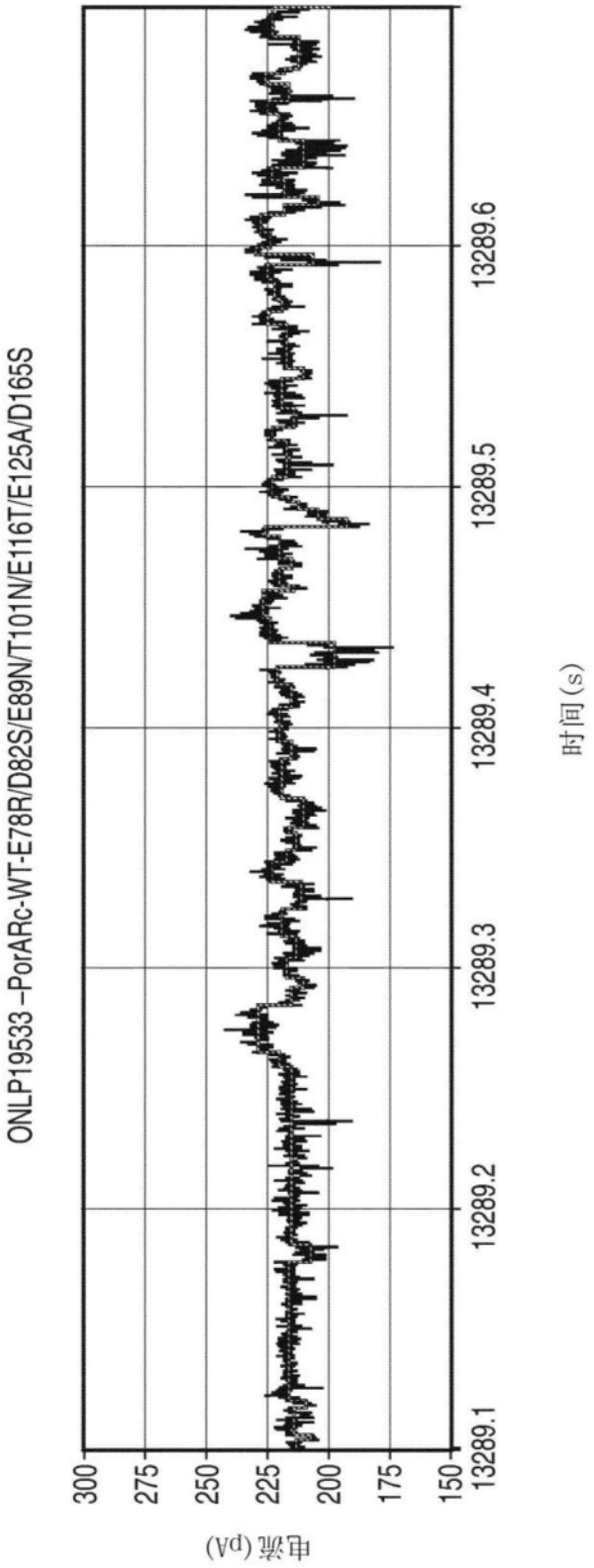
ONLP19533 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89N/T101N/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
13289.1
13289.2
13289.3
13289.4
13289.5
13289.6
时间 (s)

图11(续)

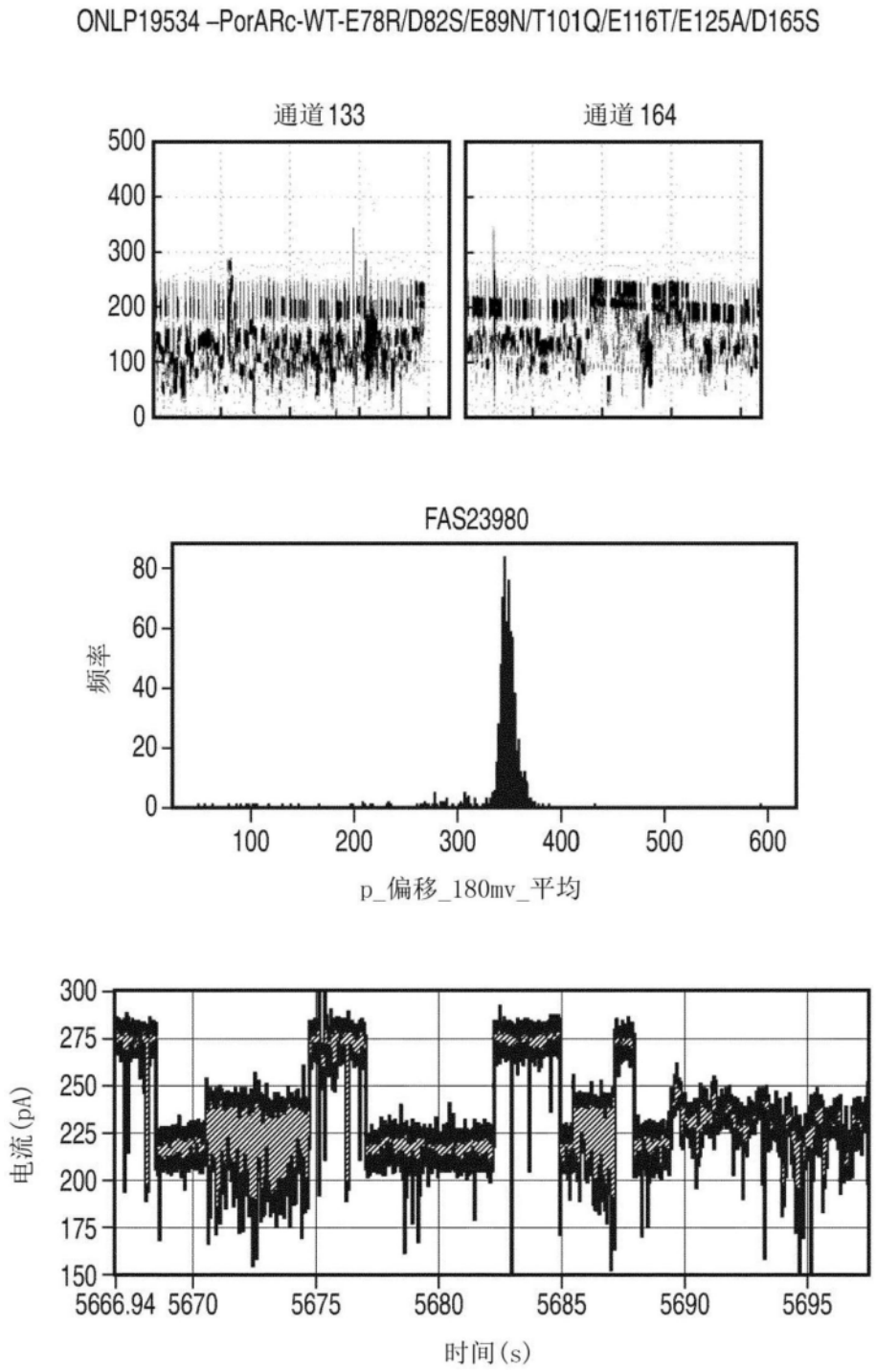
ONLP19534 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89N/T101Q/E116T/E125A/D165S
通道133
通道164
500
400
300
200
100
0
FAS23980
频率
80
60
40
20
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
5666.94
5670
5675
5680
5685
5690
5695
时间(s)

图12

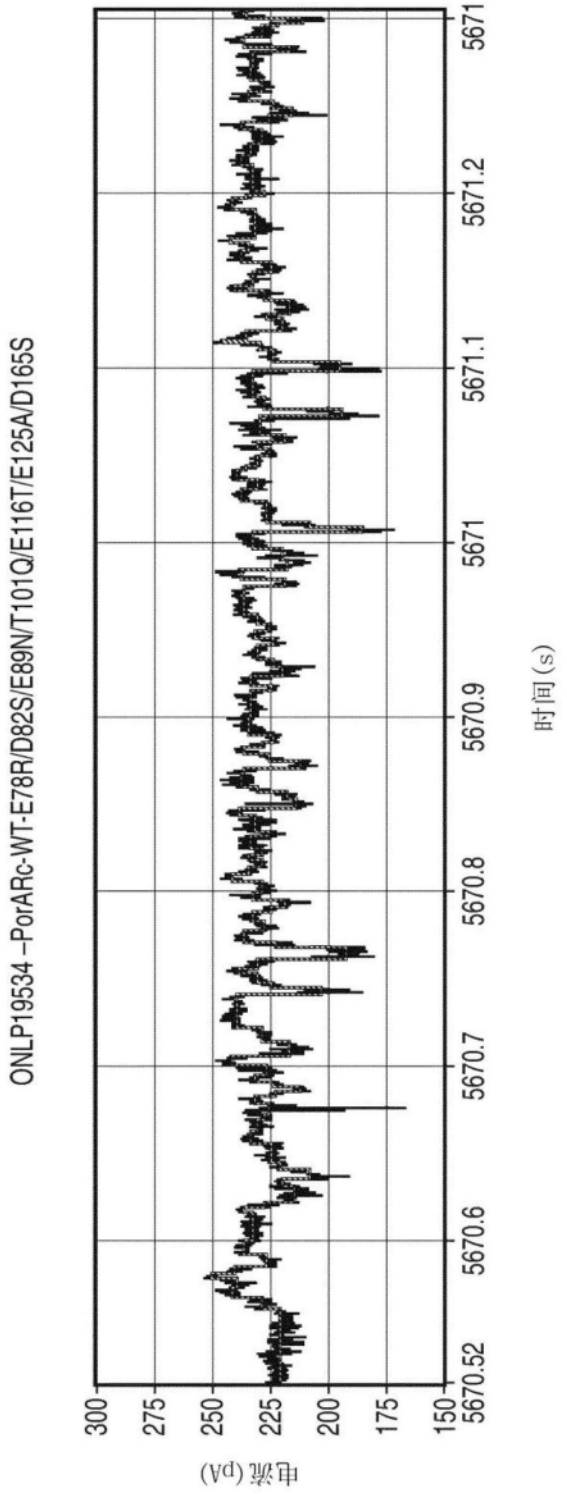
ONLP19534 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89N/T101Q/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
时间(s)
5670.52
5670.6
5670.7
5670.8
5670.9
5671
5671.1
5671.2
5671

图12(续)

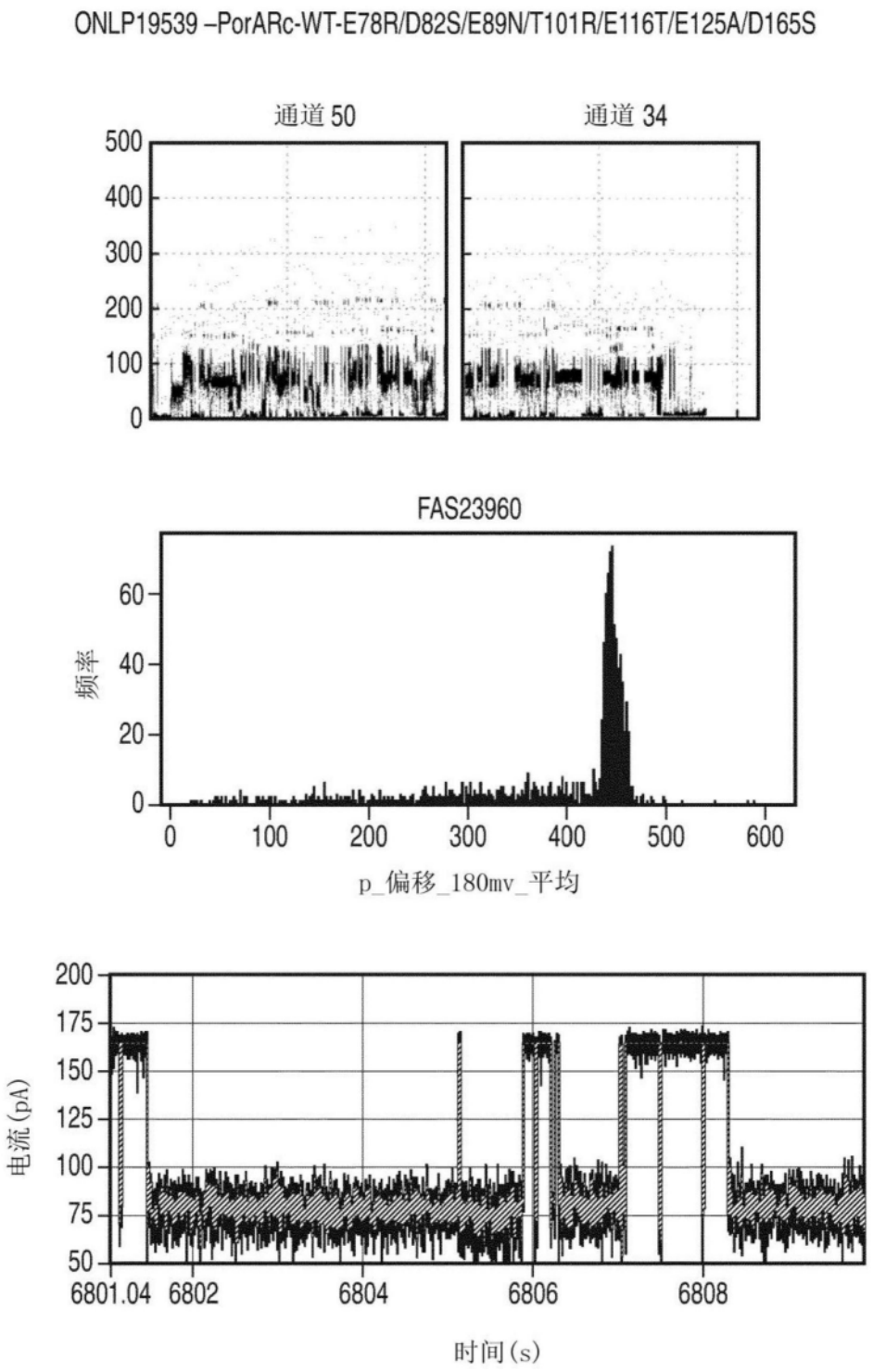
ONLP19539 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89N/T101R/E116T/E125A/D165S
通道 50
通道 34
500
400
300
200
100
0
FAS23960
频率
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流 (pA)
6801.04
6802
6804
6806
6808
时间 (s)

图12 (续)

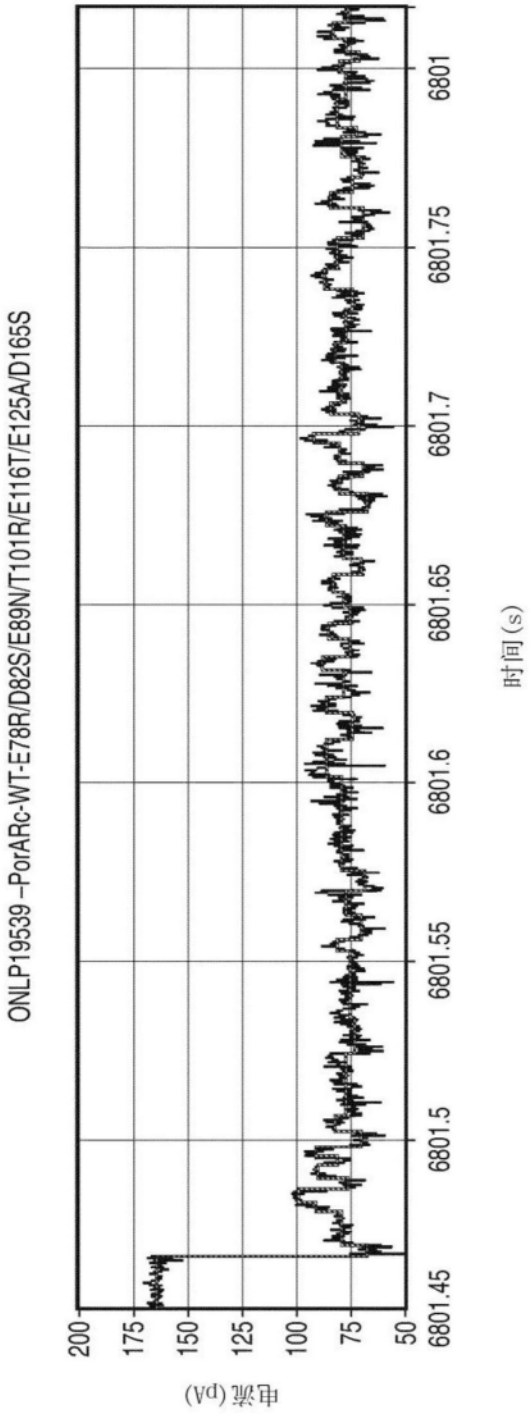
ONLP19539 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89N/T101R/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
6801.45
6801.5
6801.55
6801.6
6801.65
6801.7
6801.75
6801
时间(s)

图12(续)

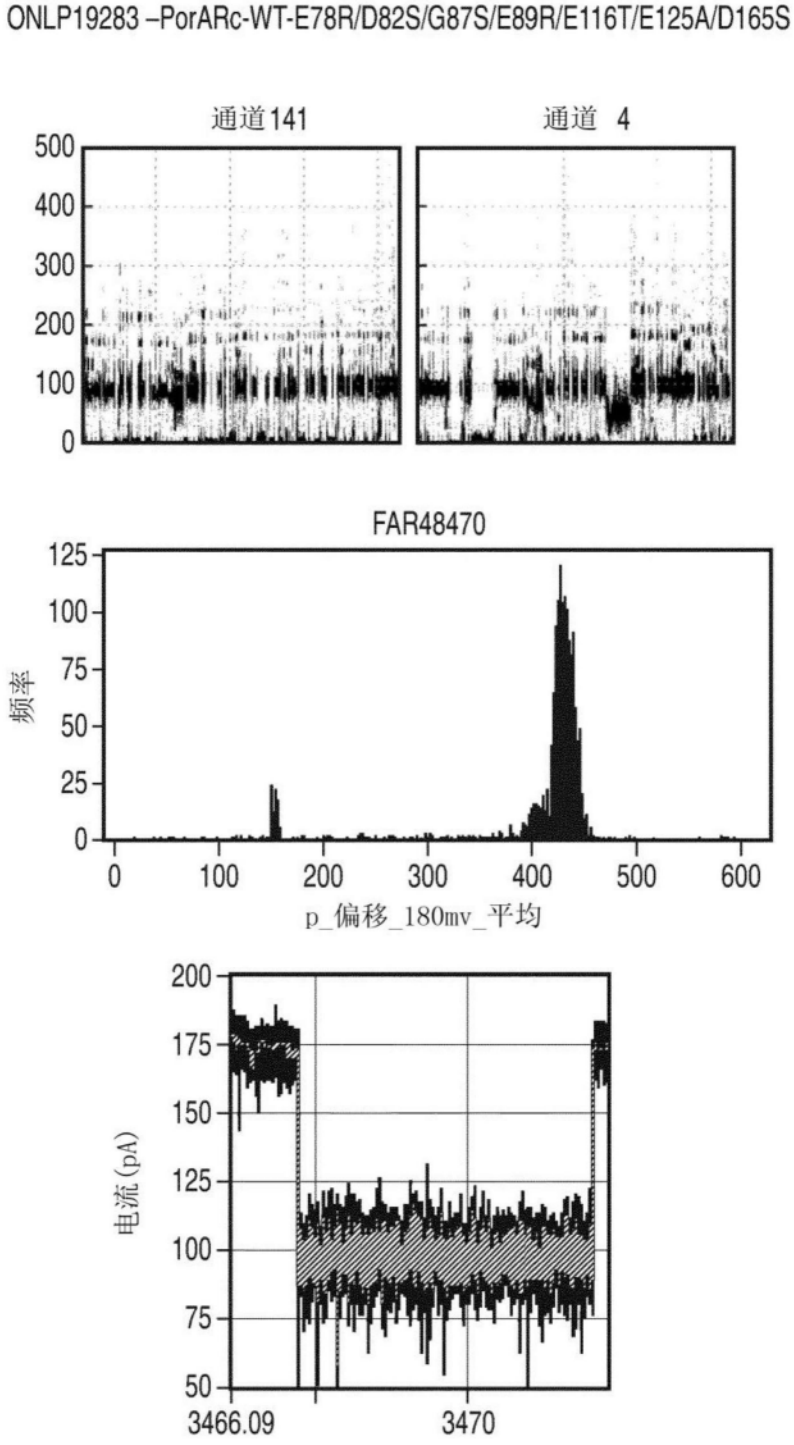
ONLP19283 –PorARc-WT-E78R/D82S/G87S/E89R/E116T/E125A/D165S
通道141
通道 4
500
400
300
200
100
0
FAR48470
频率
125
100
75
50
25
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
3466.09
3470

图13

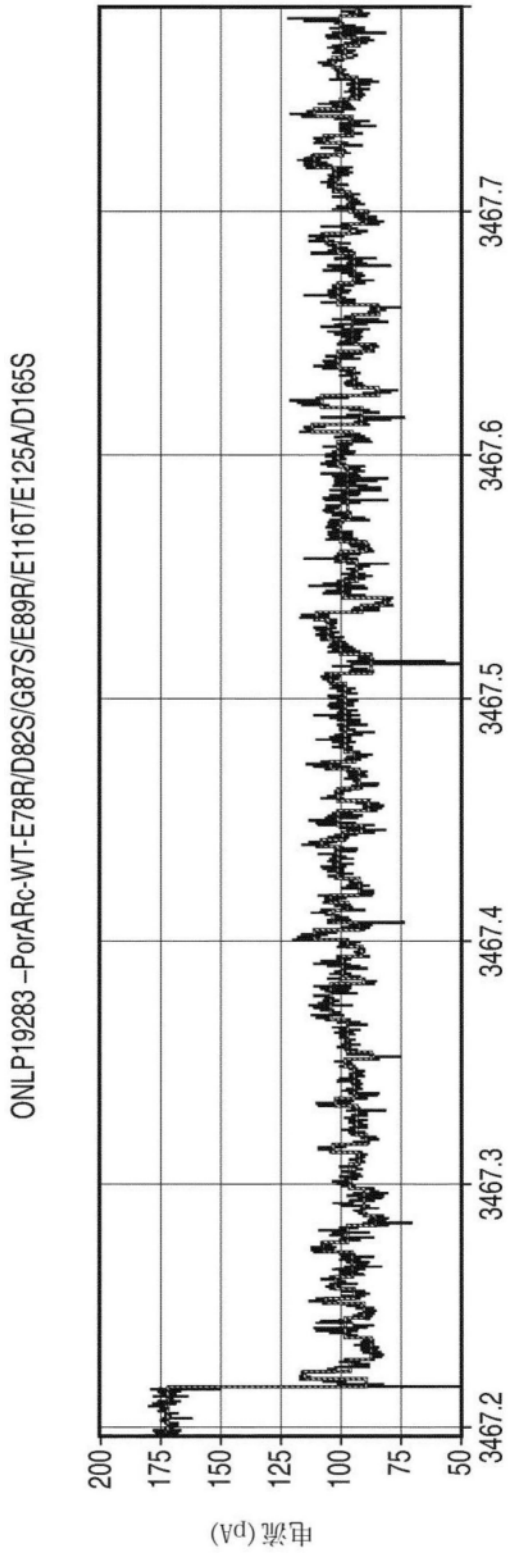
ONLP19283 –PorARc-WT-E78R/D82S/G87S/E89R/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
3467.2
3467.3
3467.4
3467.5
3467.6
3467.7

图13(续)

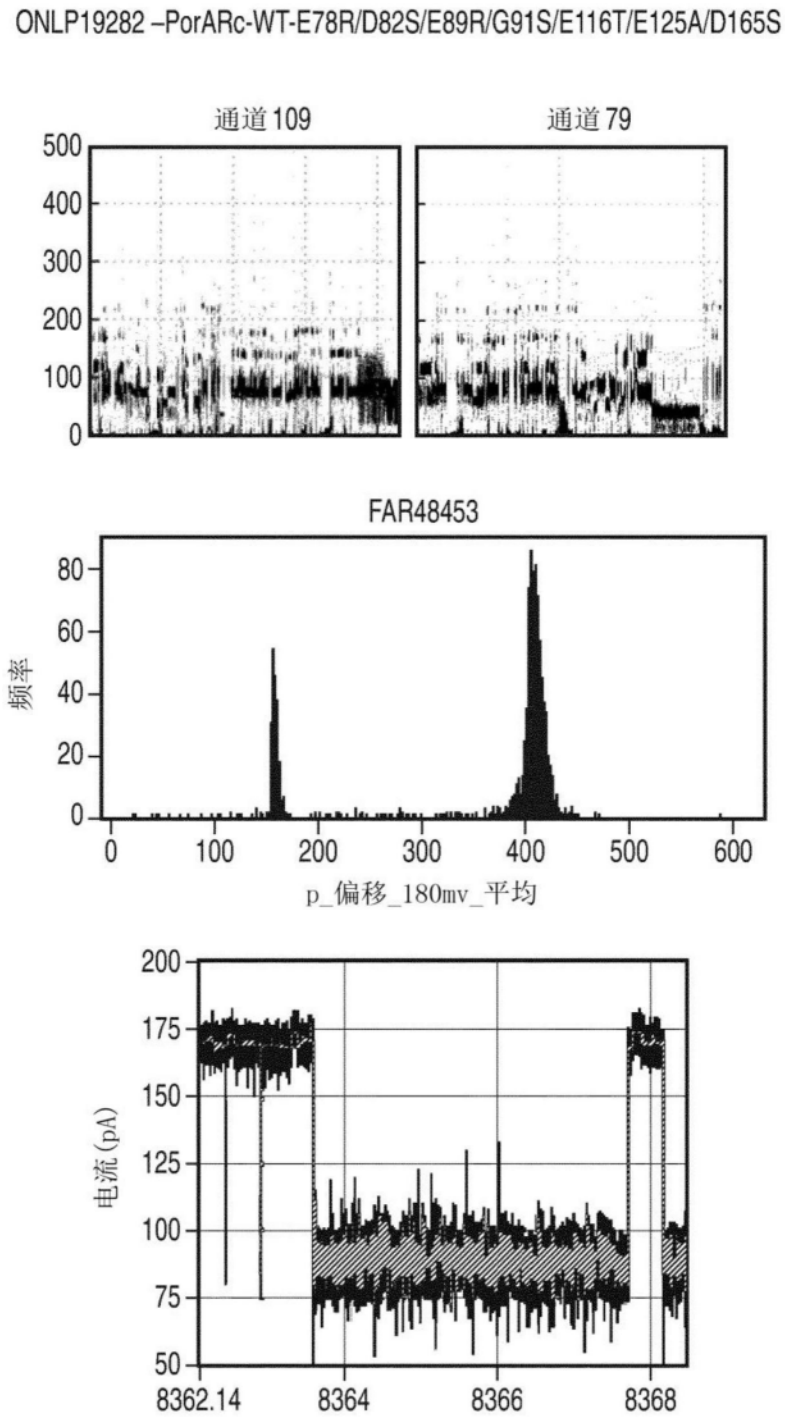
ONLP19282 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/G91S/E116T/E125A/D165S
通道109
通道79
500
400
300
200
100
0
FAR48453
频率
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
8362.14
8364
8366
8368

图13(续)

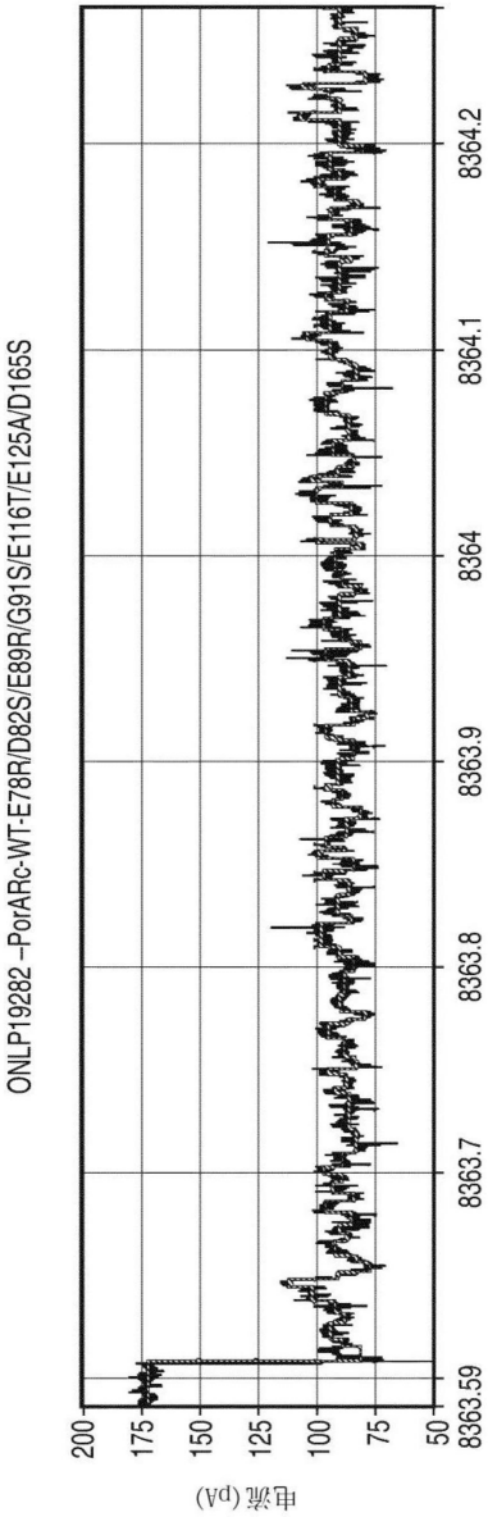
ONLP19282 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/G91S/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
8363.59
8363.7
8363.8
8363.9
8364
8364.1
8364.2

图13(续)

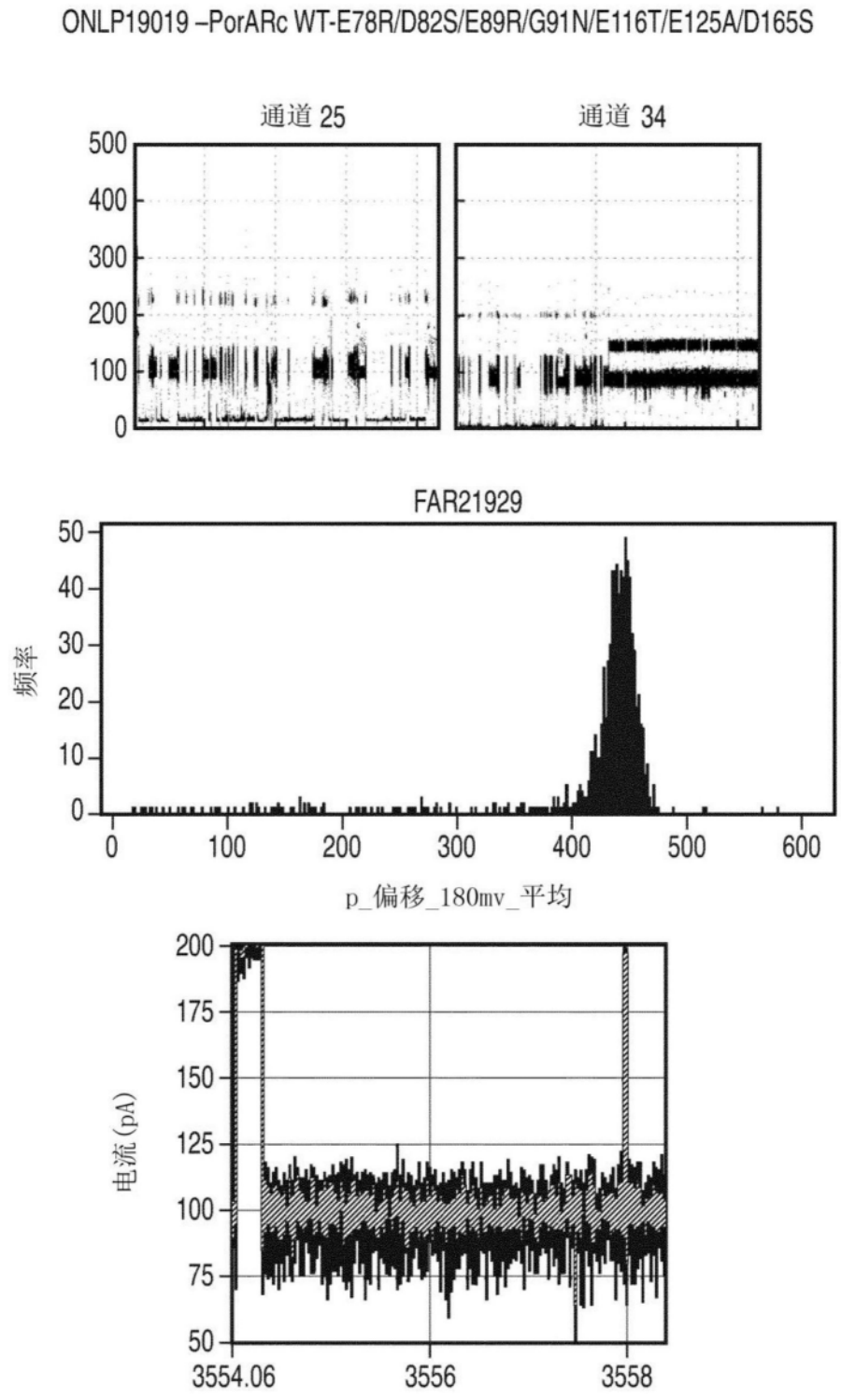
ONLP19019 –PorARc WT-E78R/D82S/E89R/G91N/E116T/E125A/D165S
通道 25
通道 34
500
400
300
200
100
0
FAR21929
频率
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
3554.06
3556
3558

图13 (续)

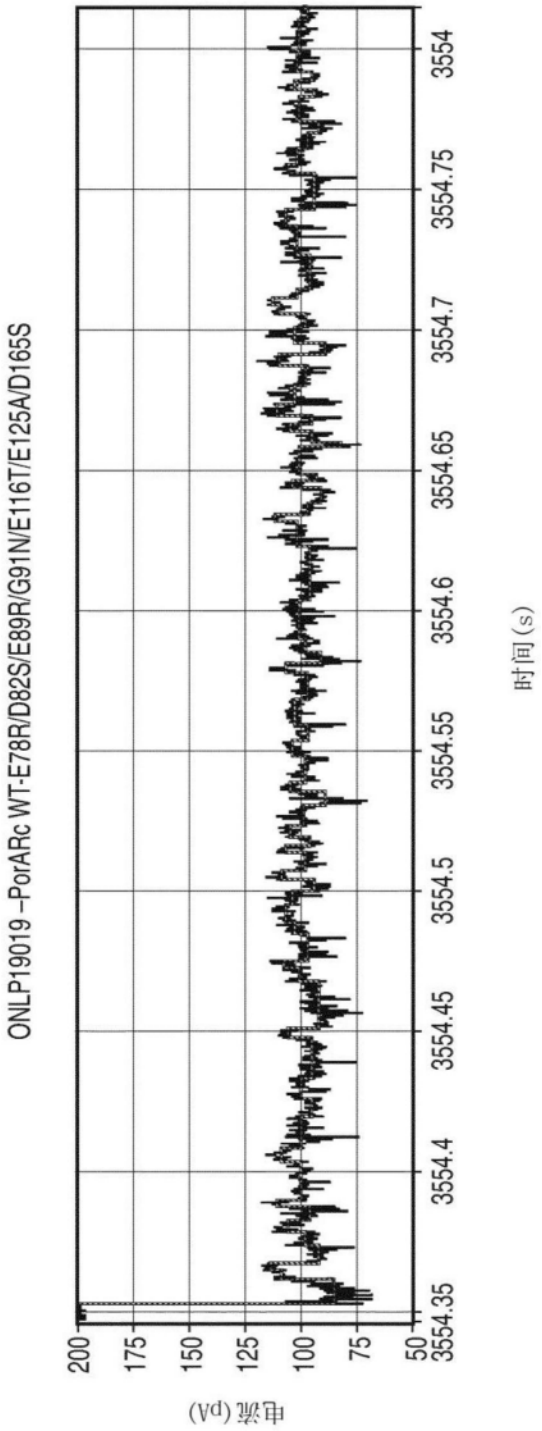
ONLP19019 –PorARc WT-E78R/D82S/E89R/G91N/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
3554.35
3554.4
3554.45
3554.5
3554.55
3554.6
3554.65
3554.7
3554.75
3554
时间(s)

图13(续)

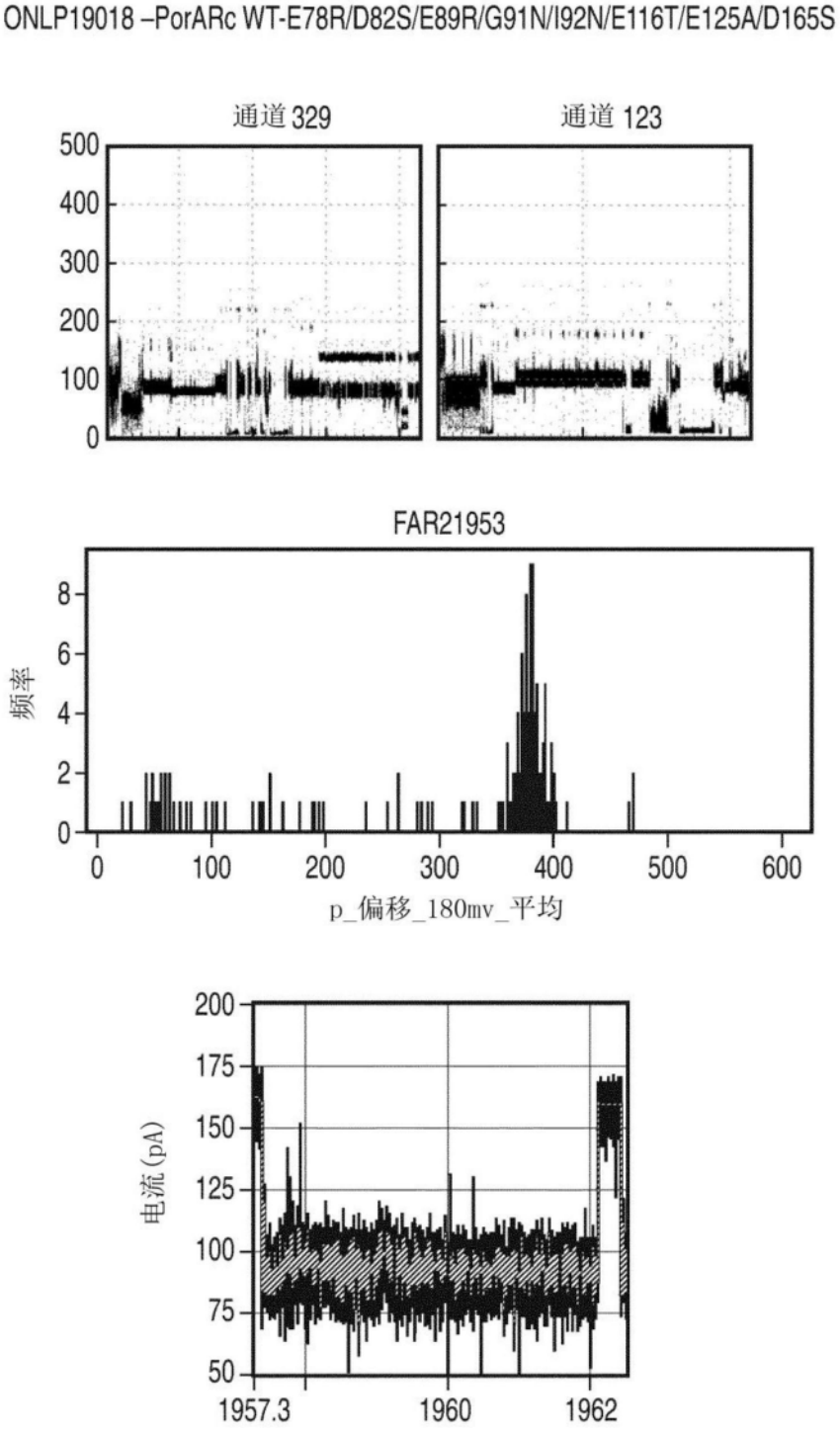
ONLP19018 –PorARc WT-E78R/D82S/E89R/G91N/I92N/E116T/E125A/D165S
通道 329
通道 123
500
400
300
200
100
0
FAR21953
频率
8
6
4
2
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
1957.3
1960
1962

图14

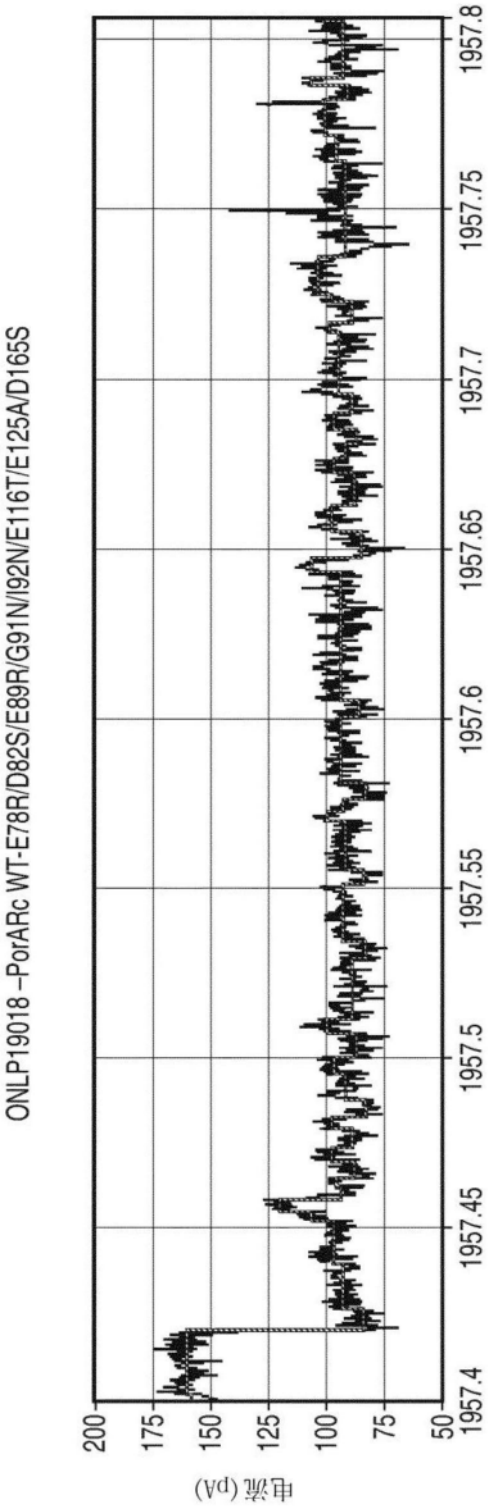
ONLP19018 –PorARc WT-E78R/D82S/E89R/G91N/I92N/E116T/E125A/D165S
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
1957.4
1957.45
1957.5
1957.55
1957.6
1957.65
1957.7
1957.75
1957.8

图14(续)

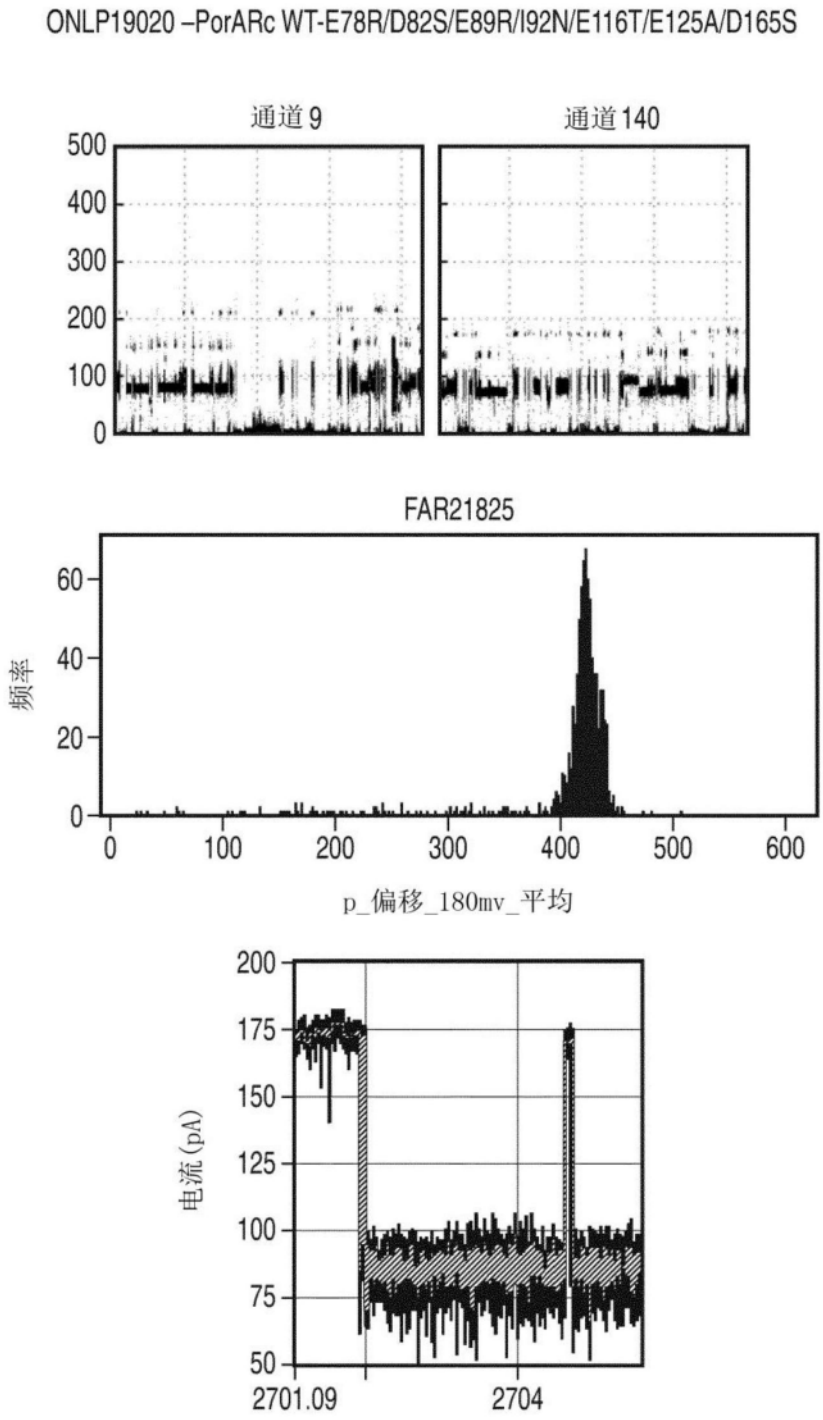
ONLP19020 –PorARc WT-E78R/D82S/E89R/I92N/E116T/E125A/D165S
通道 9
通道 140
500
400
300
200
100
0
FAR21825
频率
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流 (pA)
2701.09
2704

图14(续)

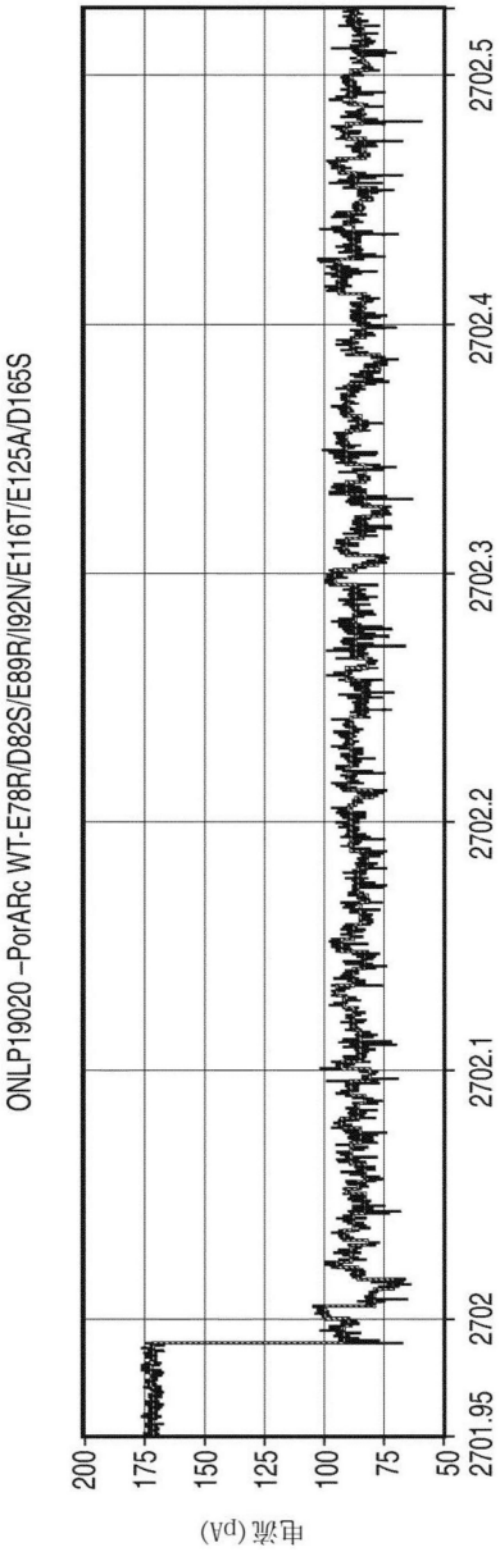
ONLP19020 –PorARc WT-E78R/D82S/E89R/I92N/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
2701.95
2702
2702.1
2702.2
2702.3
2702.4
2702.5

图14(续)

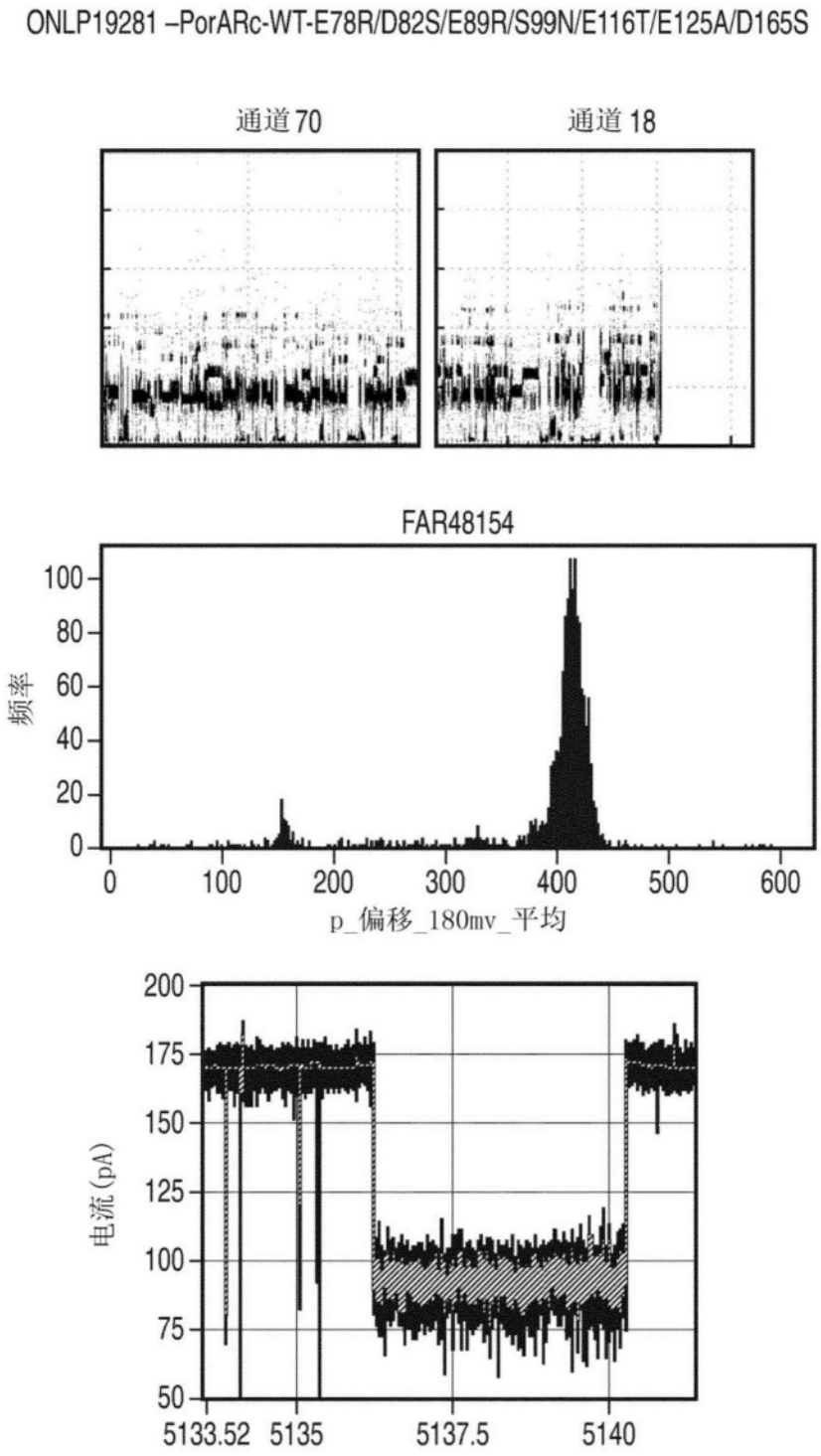
ONLP19281 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/S99N/E116T/E125A/D165S
通道 70
通道 18
FAR48154
频率
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
5133.52
5135
5137.5
5140

图14 (续)

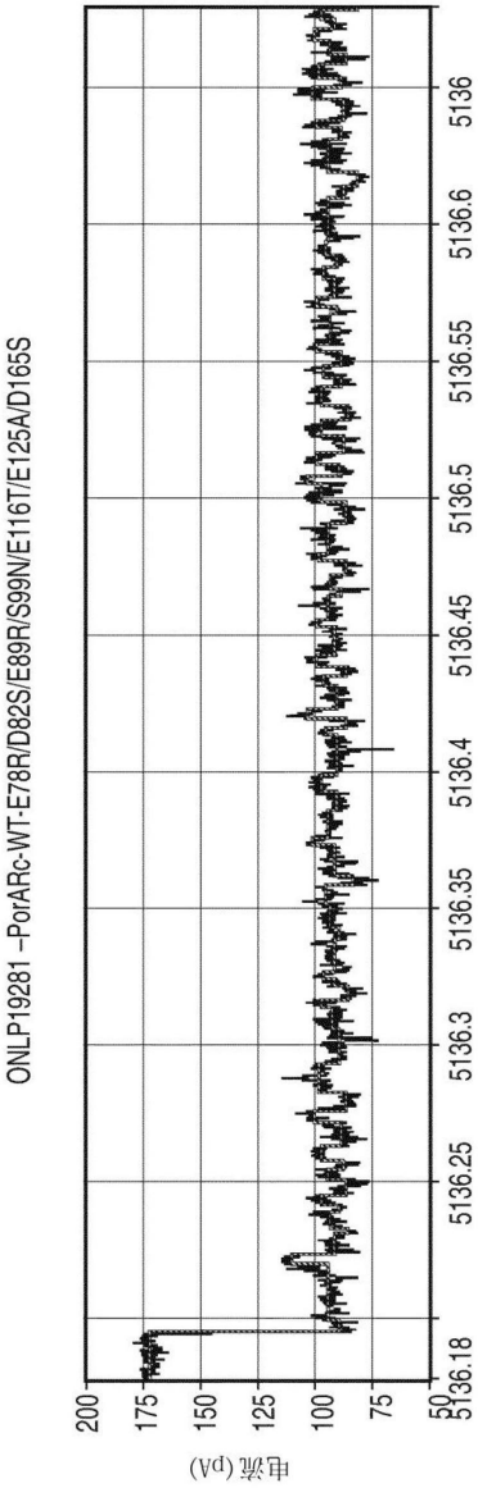
ONLP19281 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/S99N/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
5136.18
5136.25
5136.3
5136.35
5136.4
5136.45
5136.5
5136.55
5136.6
5136

图14(续)

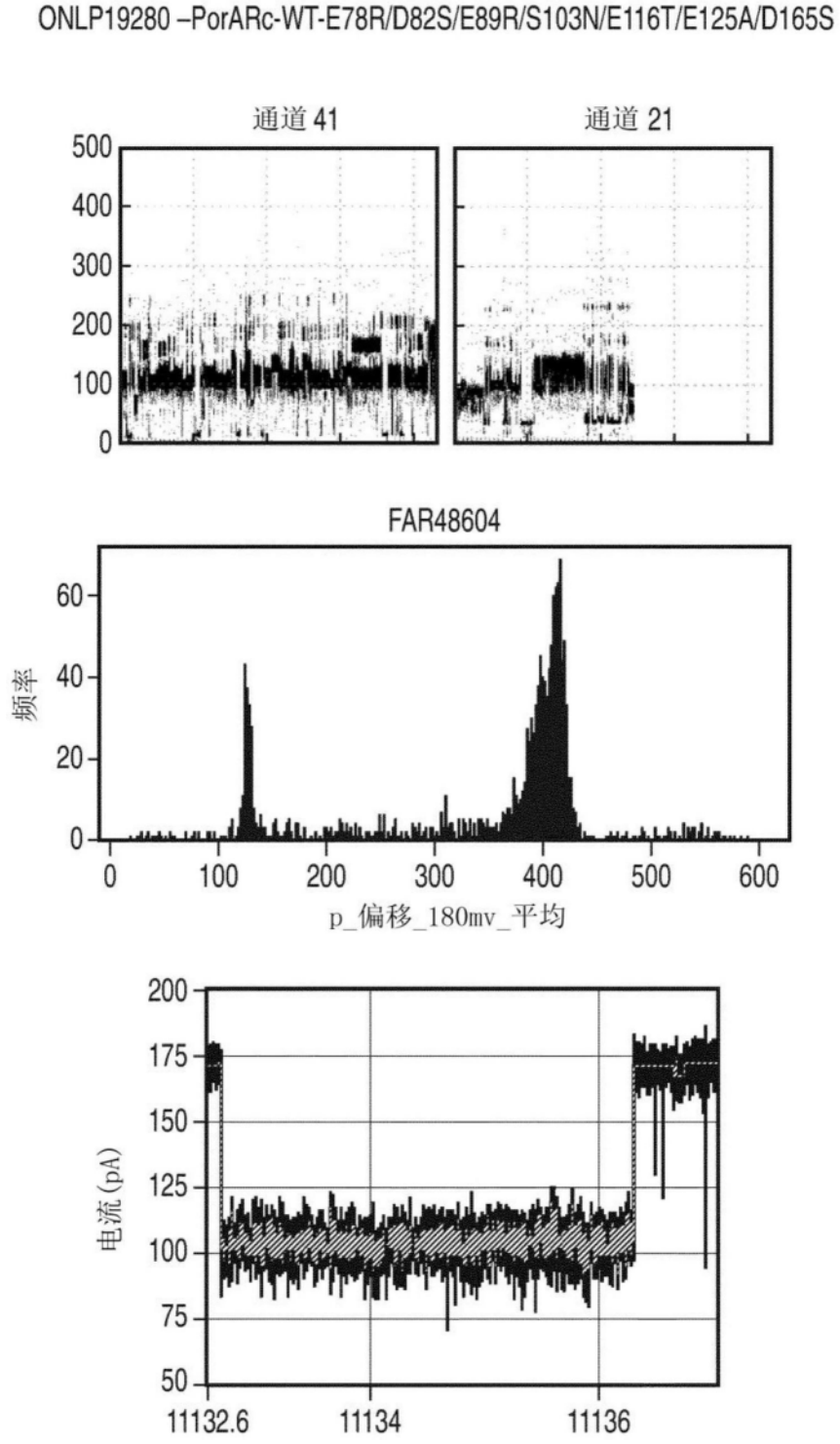
ONLP19280 –PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/S103N/E116T/E125A/D165S
通道 41
通道 21
500
400
300
200
100
0
FAR48604
频率
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流 (pA)
11132.6
11134
11136

图15

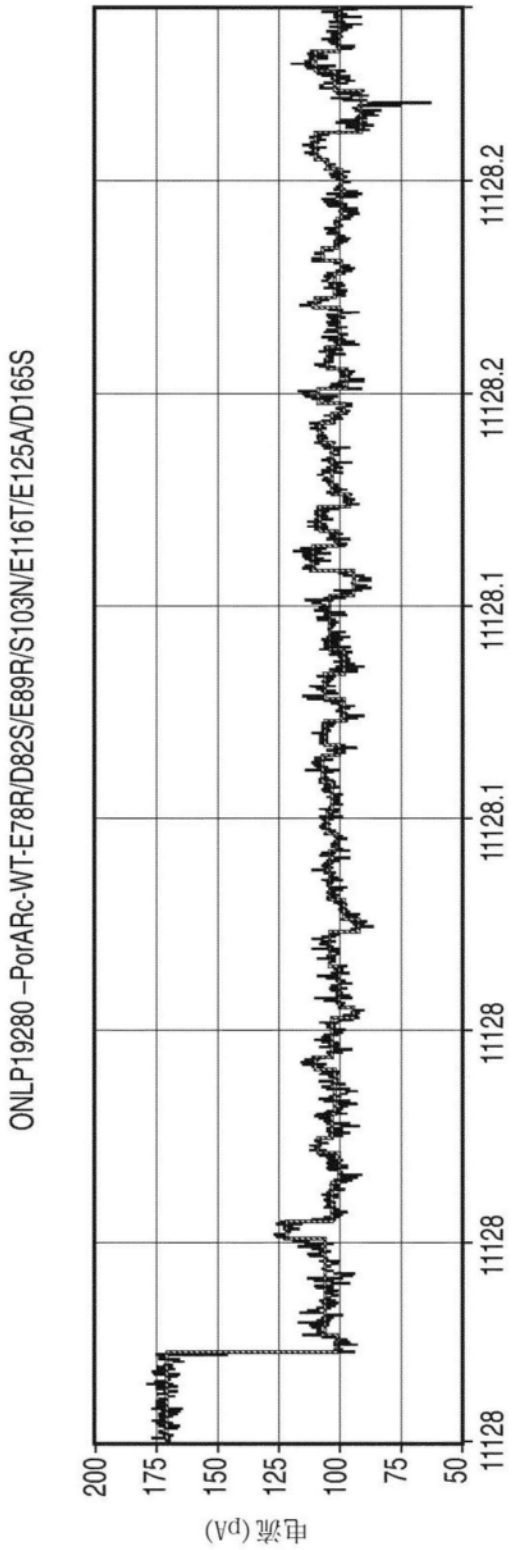
ONLP19280 -PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/S103N/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
11128
11128
11128.1
11128
11128.2
11128.1
11128.2

图15(续)

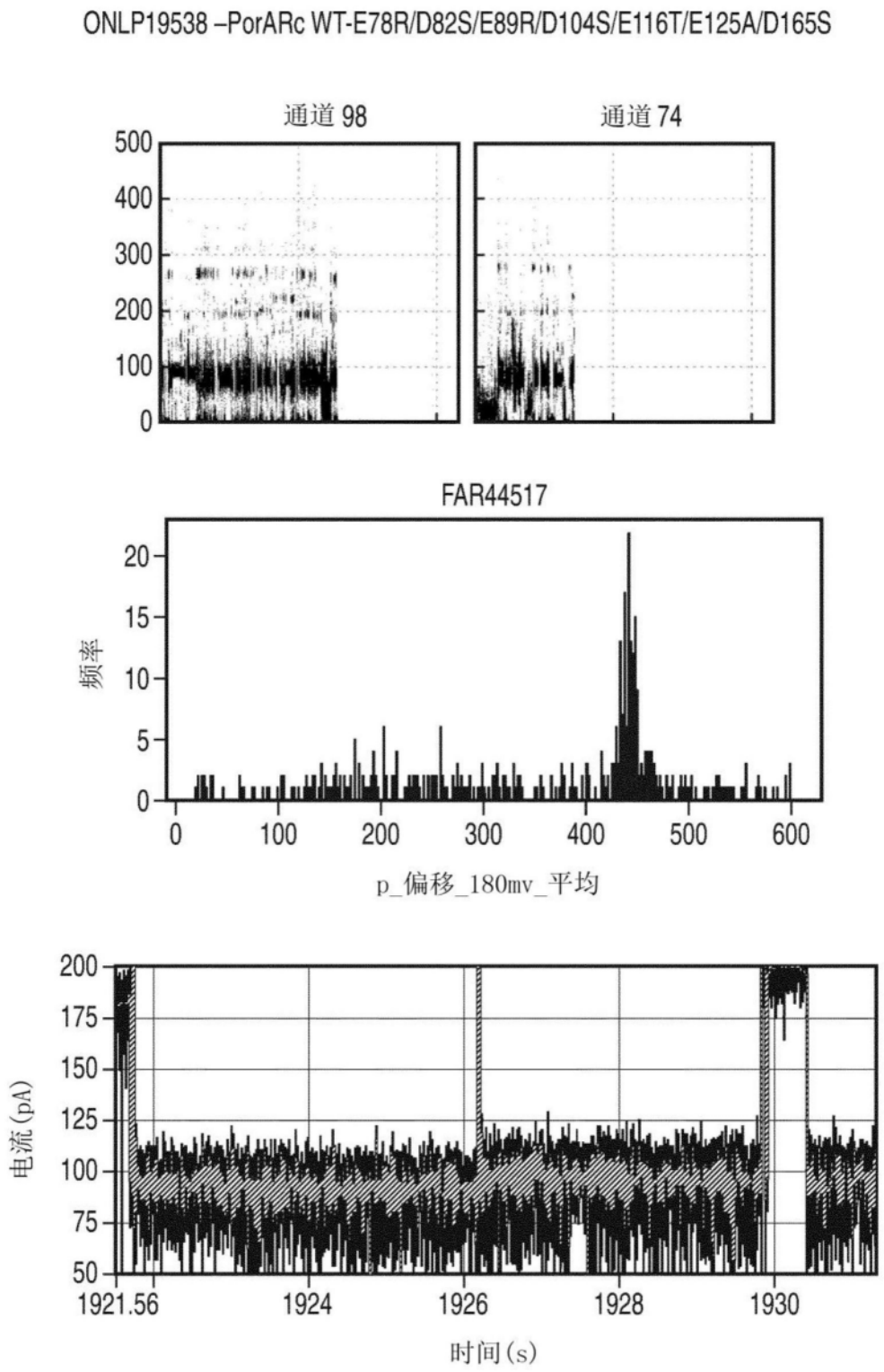
ONLP19538 –PorARc WT-E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E125A/D165S
通道 98
通道 74
500
400
300
200
100
0
FAR44517
频率
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流(pA)
1921.56
1924
1926
1928
1930
时间(s)

图15(续)

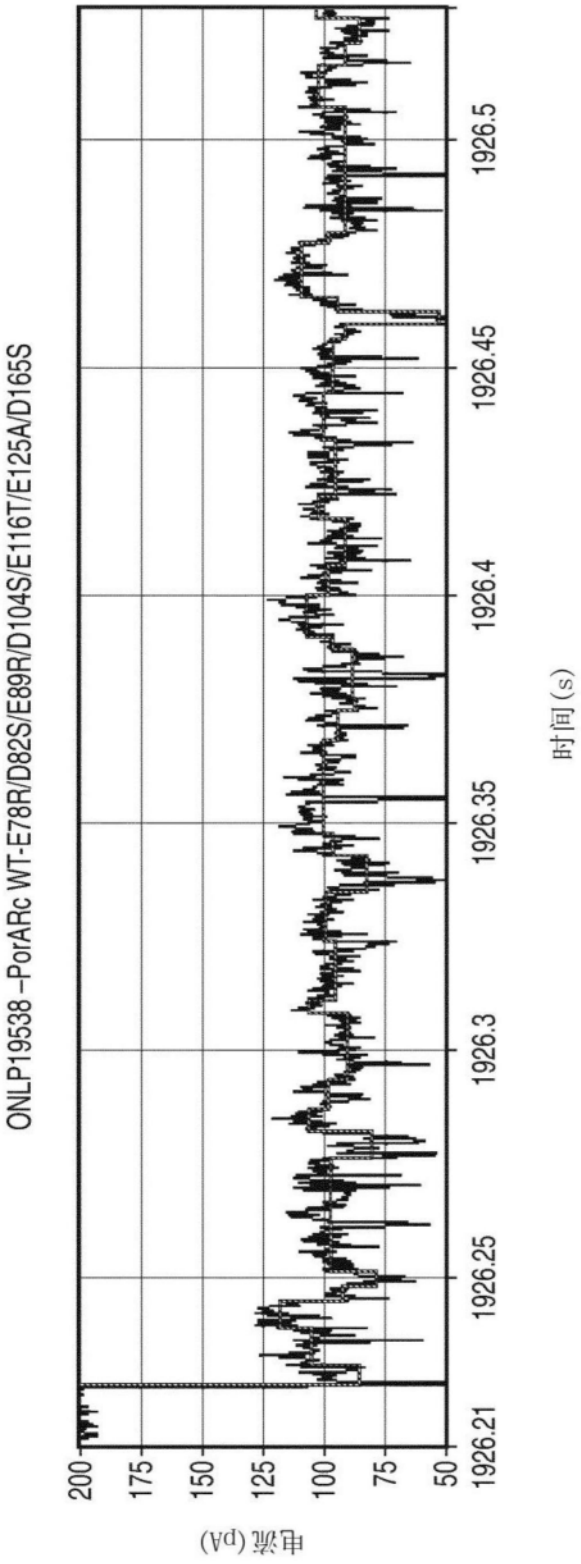
ONLP19538 -PorARc WT-E78R/D82S/E89R/D104S/E116T/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
1926.21
1926.25
1926.3
1926.35
1926.4
1926.45
1926.5
时间 (s)

图15(续)

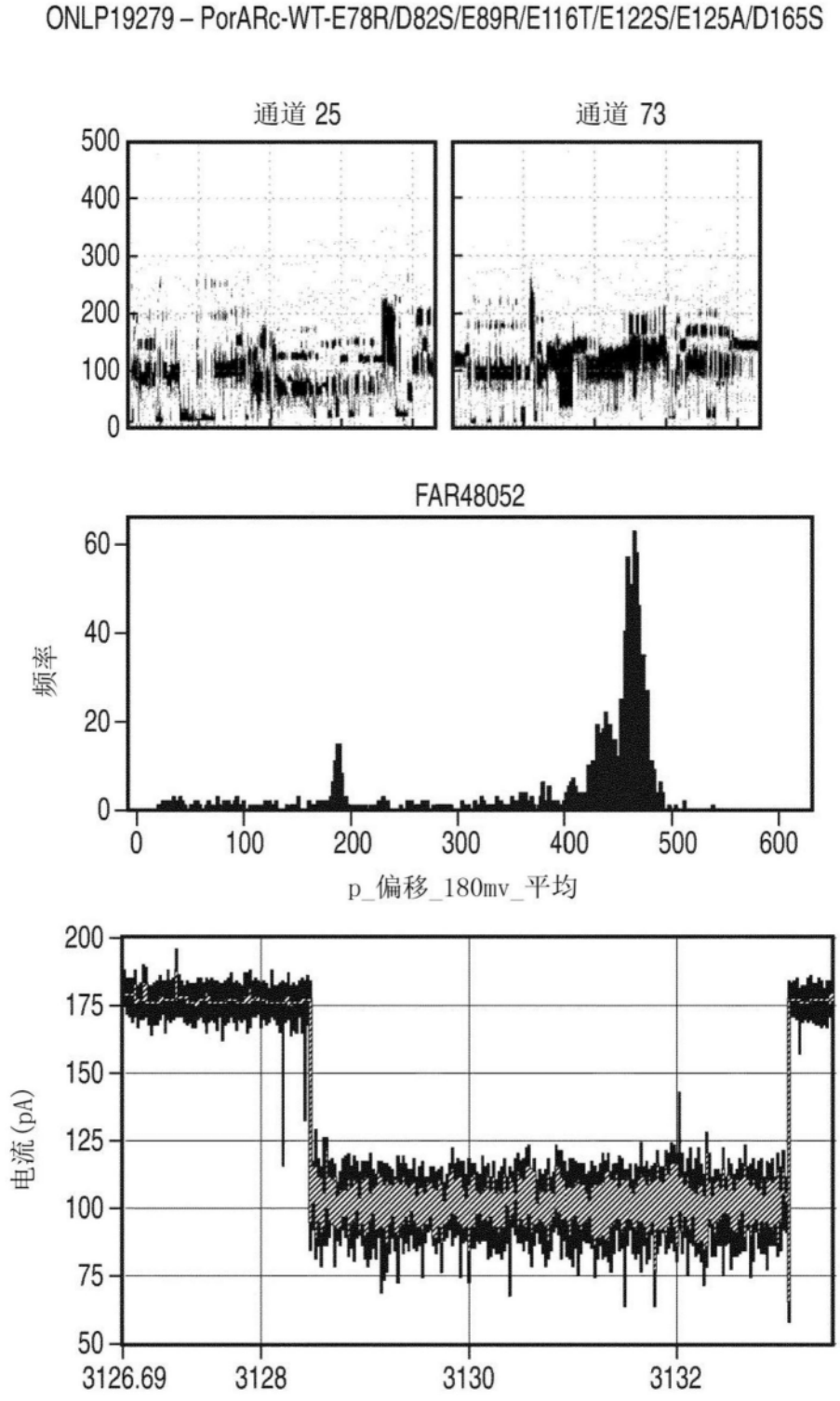
ONLP19279 – PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/E116T/E122S/E125A/D165S
通道 25
通道 73
500
400
300
200
100
0
FAR48052
频率
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
3126.69
3128
3130
3132

图15(续)

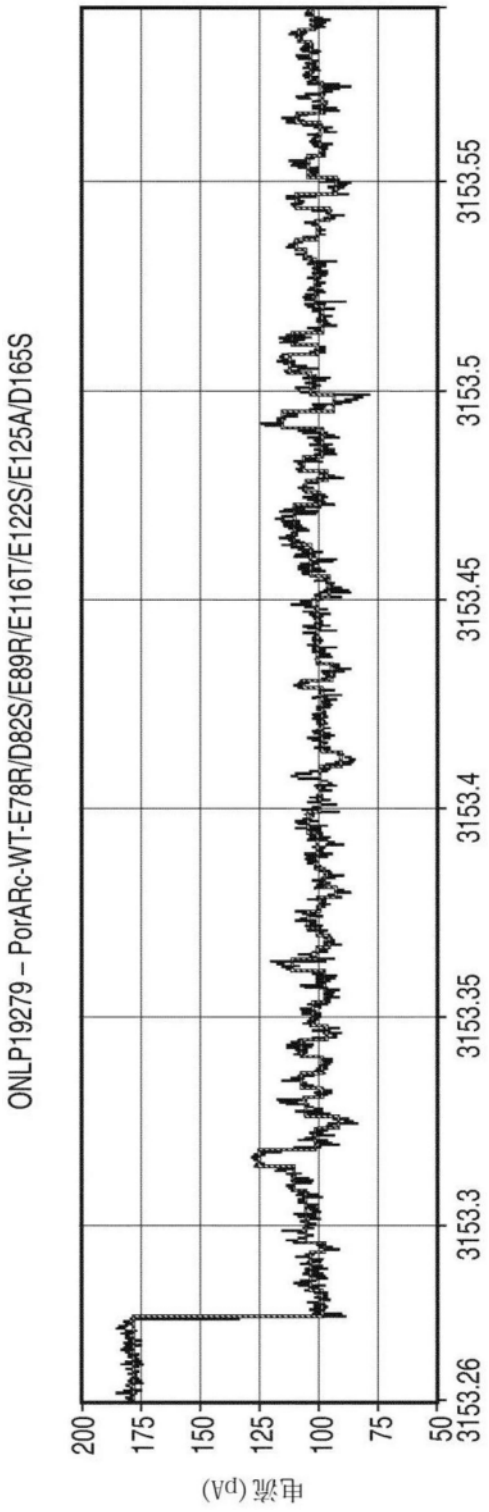
ONLP19279 – PorARc-WT-E78R/D82S/E89R/E116T/E122S/E125A/D165S
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
3153.26
3153.3
3153.35
3153.4
3153.45
3153.5
3153.55

图15(续)

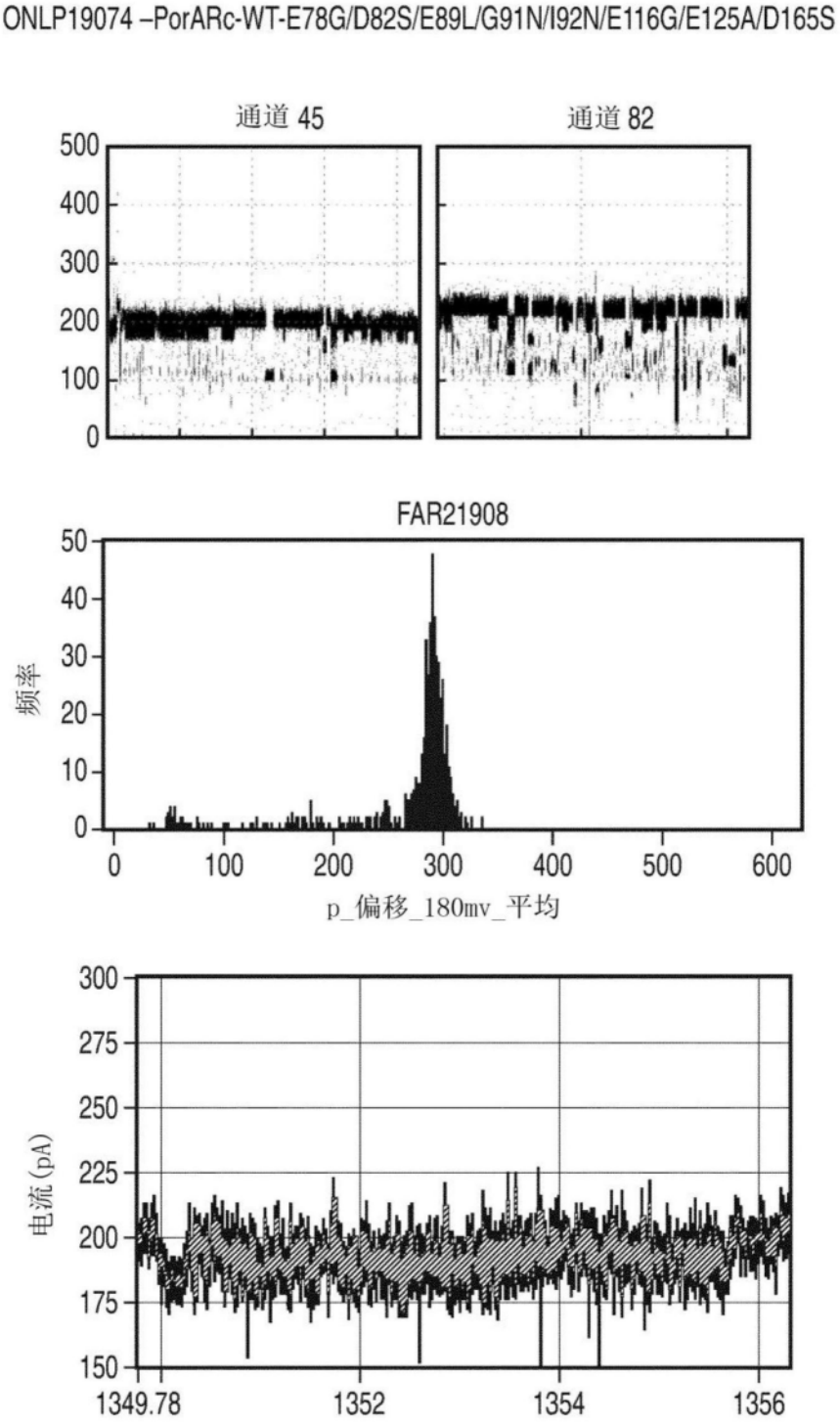
ONLP19074 –PorARc-WT-E78G/D82S/E89L/G91N/I92N/E116G/E125A/D165S
通道 45
通道 82
500
400
300
200
100
0
FAR21908
50
40
30
20
10
0
频率
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
300
275
250
225
200
175
150
电流(pA)
1349.78
1352
1354
1356

图16

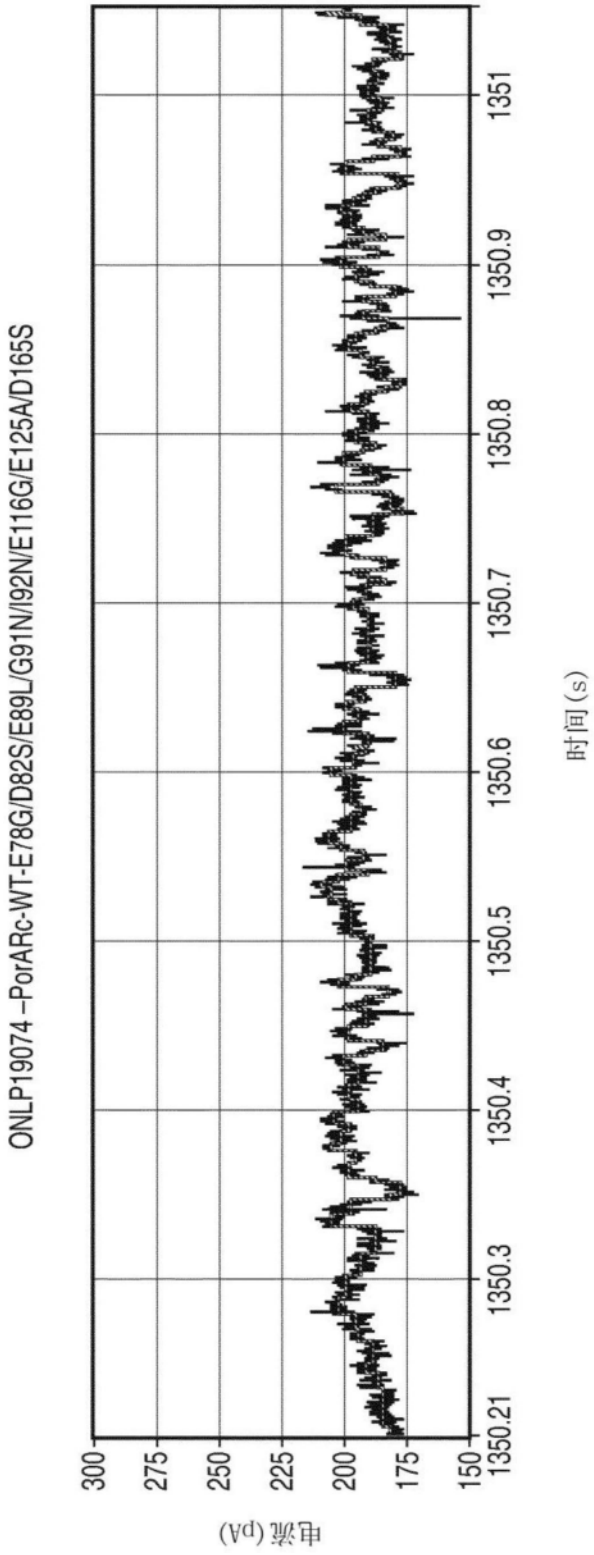
ONLP19074 –PorARc-WT-E78G/D82S/E89L/G91N/I92N/E116G/E125A/D165S
电流 (pA)
300
275
250
225
200
175
150
时间 (s)
1350.21
1350.3
1350.4
1350.5
1350.6
1350.7
1350.8
1350.9
1351

图16(续)

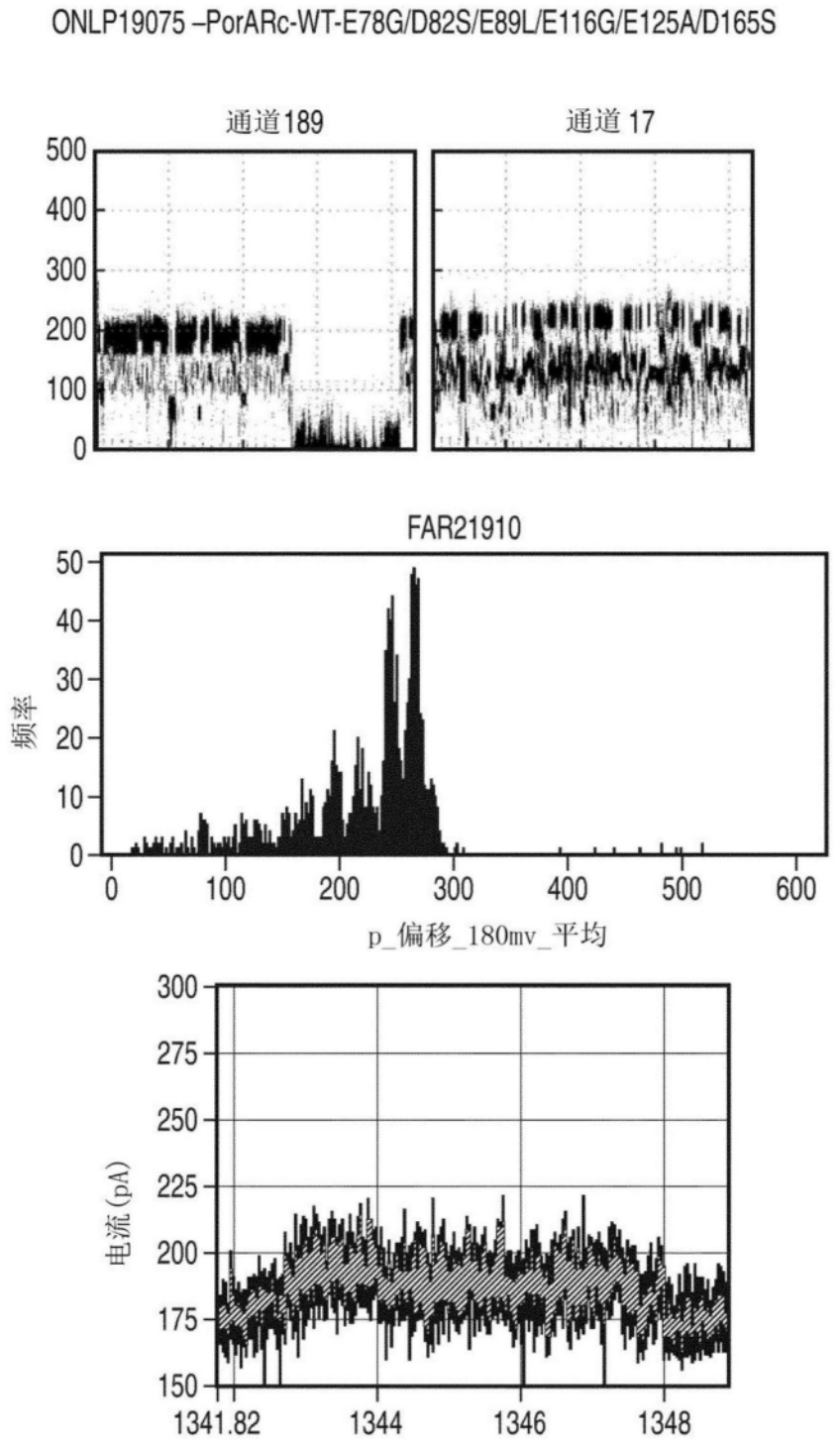
ONLP19075 –PorARc-WT-E78G/D82S/E89L/E116G/E125A/D165S
通道189
通道 17
500
400
300
200
100
0
FAR21910
频率
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
1341.82
1344
1346
1348

图16(续)

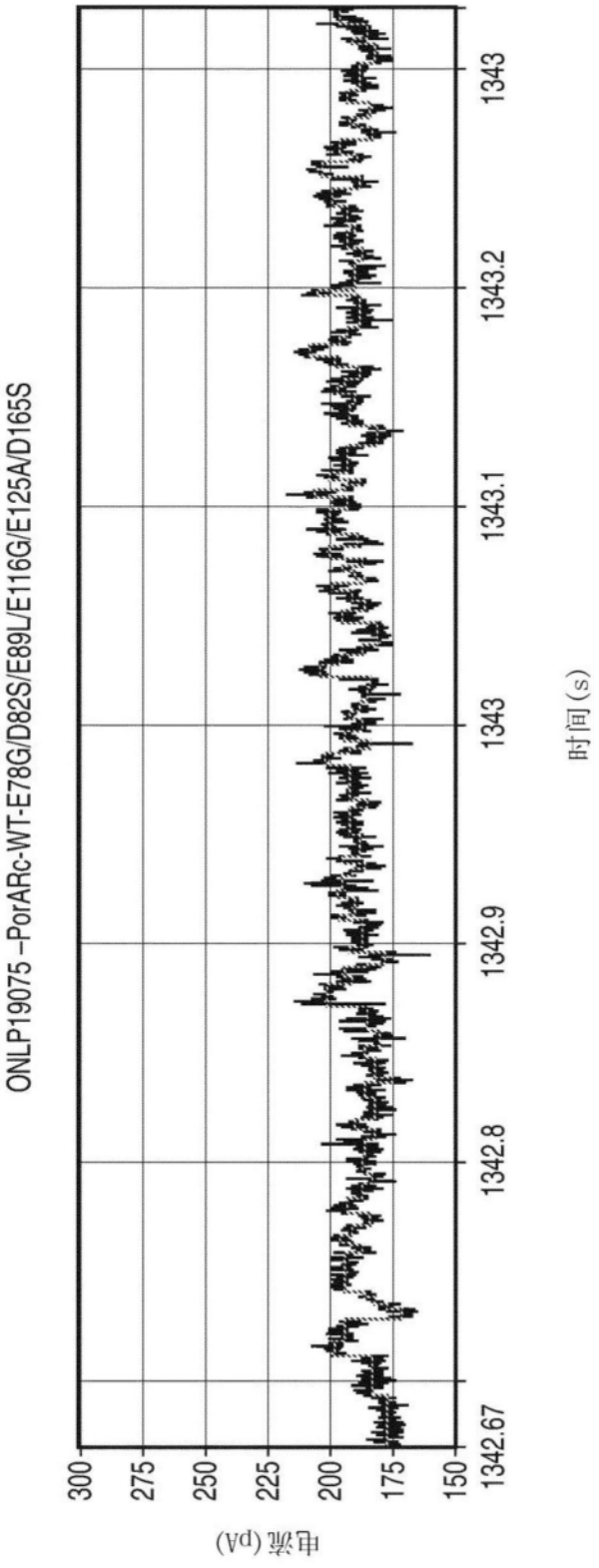
ONLP19075 –PorARc-WT-E78G/D82S/E89L/E116G/E125A/D165S
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
1342.67
1342.8
1342.9
1343
1343.1
1343.2
1343
时间(s)

图16(续)

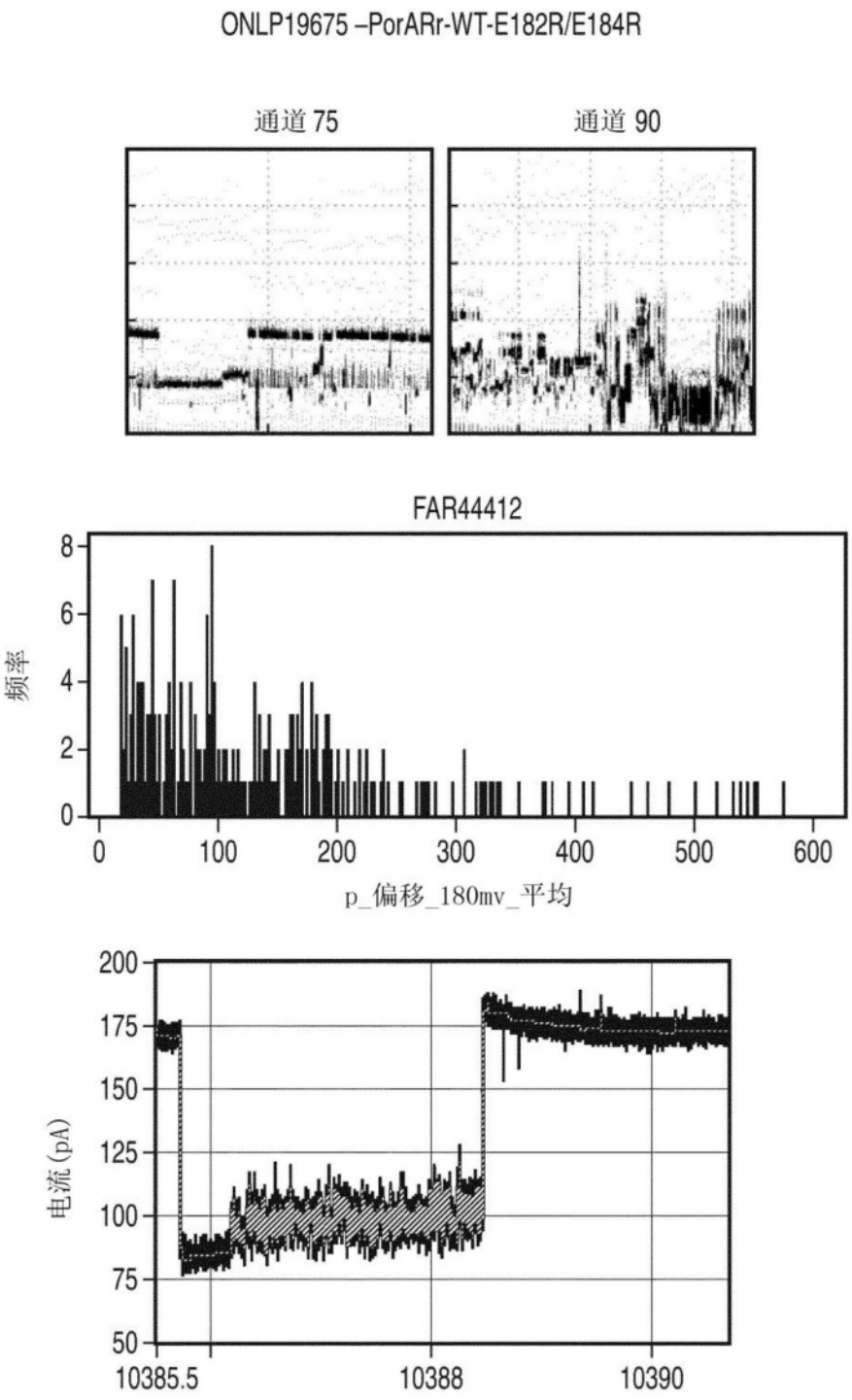
ONLP19675 –PorARr-WT-E182R/E184R
通道 75
通道 90
FAR44412
频率
0
2
4
6
8
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
10385.5
10388
10390

图17

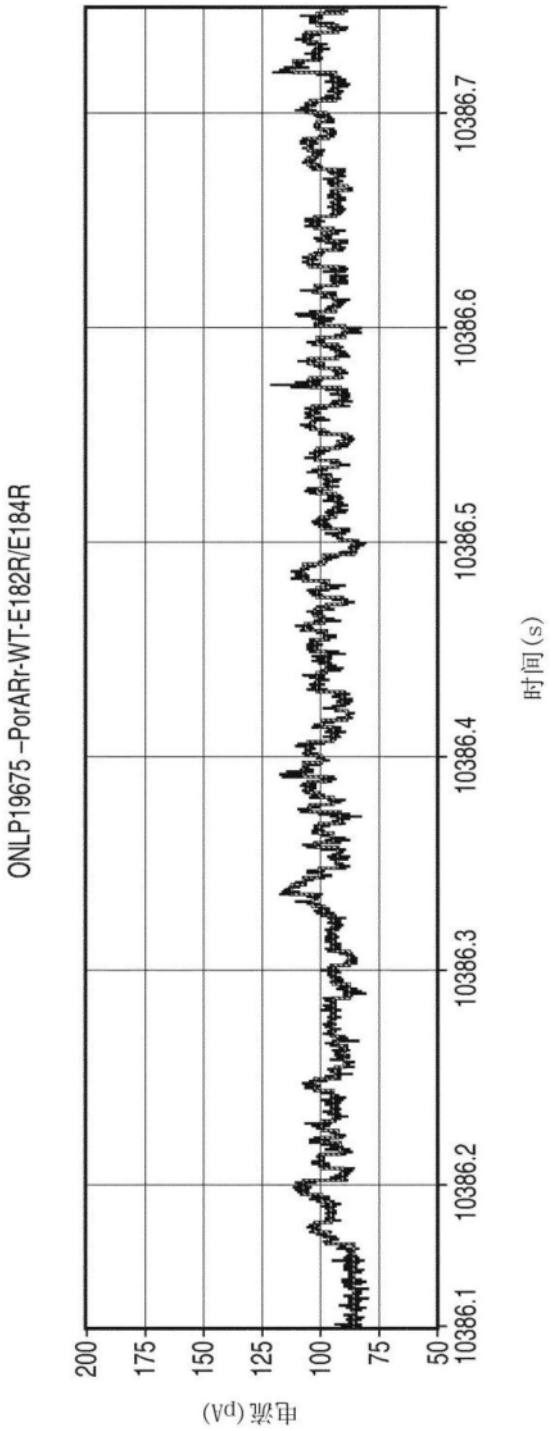
ONLP19675 –PorARr-WT-E182R/E184R
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
10386.1
10386.2
10386.3
10386.4
10386.5
10386.6
10386.7
时间 (s)

图17 (续)

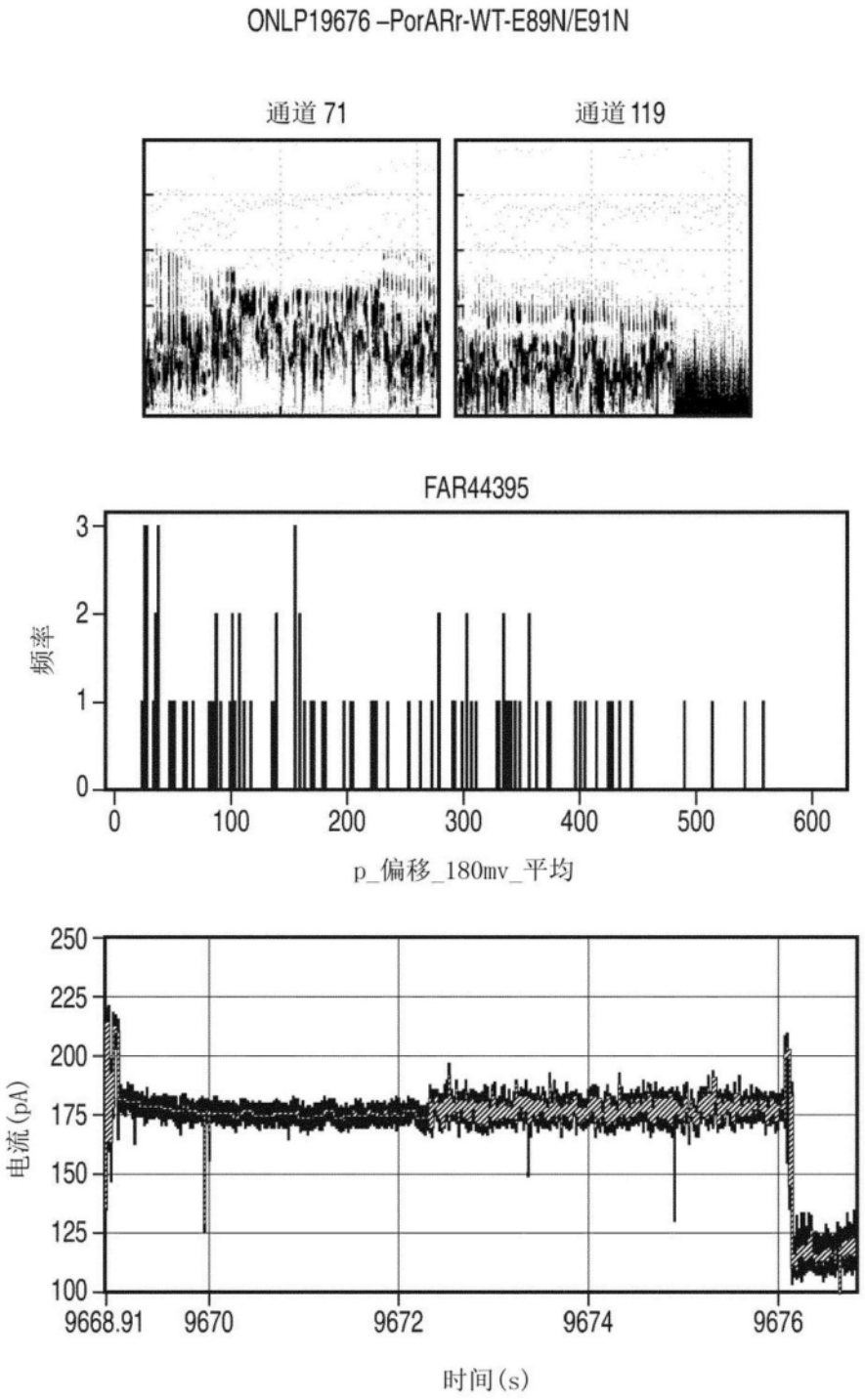
ONLP19676 –PorARr-WT-E89N/E91N
通道 71
通道 119
FAR44395
频率
3
2
1
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
250
225
200
175
150
125
100
电流(pA)
9668.91
9670
9672
9674
9676
时间(s)

图17(续)

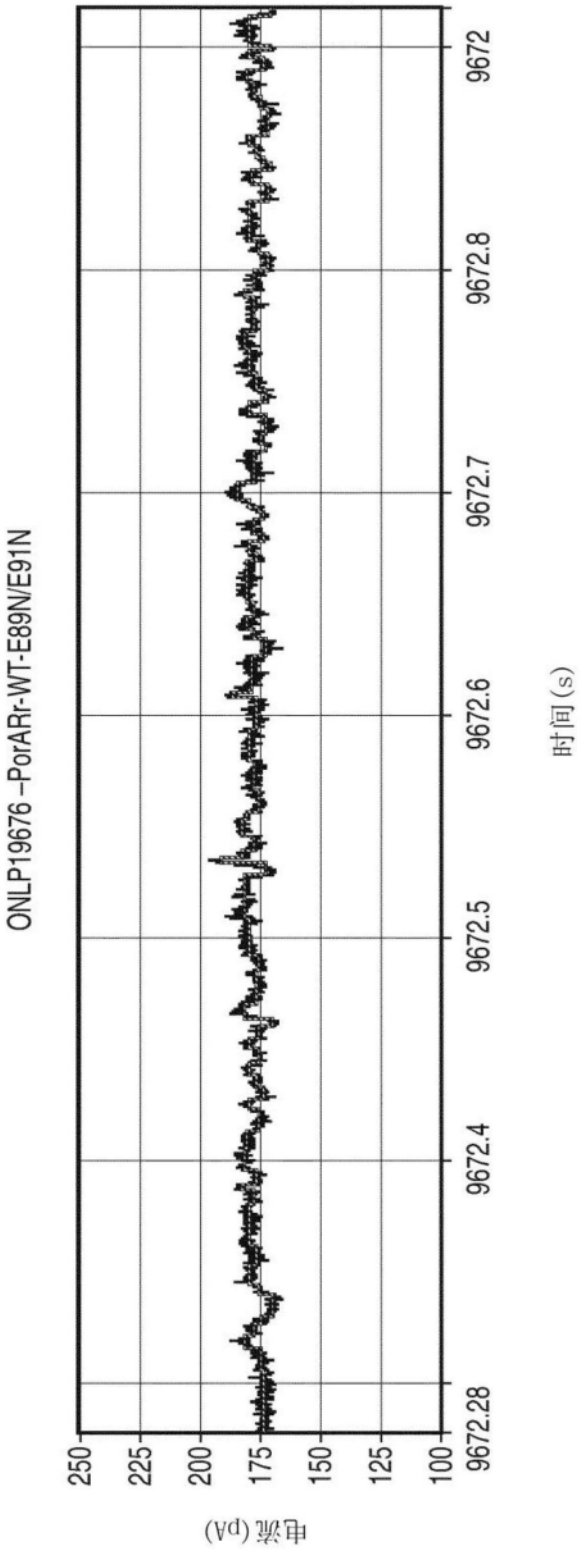
ONLP19676 –PorARr-WT-E89N/E91N
电流 (pA)
250
225
200
175
150
125
100
9672.28
9672.4
9672.5
9672.6
9672.7
9672.8
9672
时间 (s)

图17 (续)

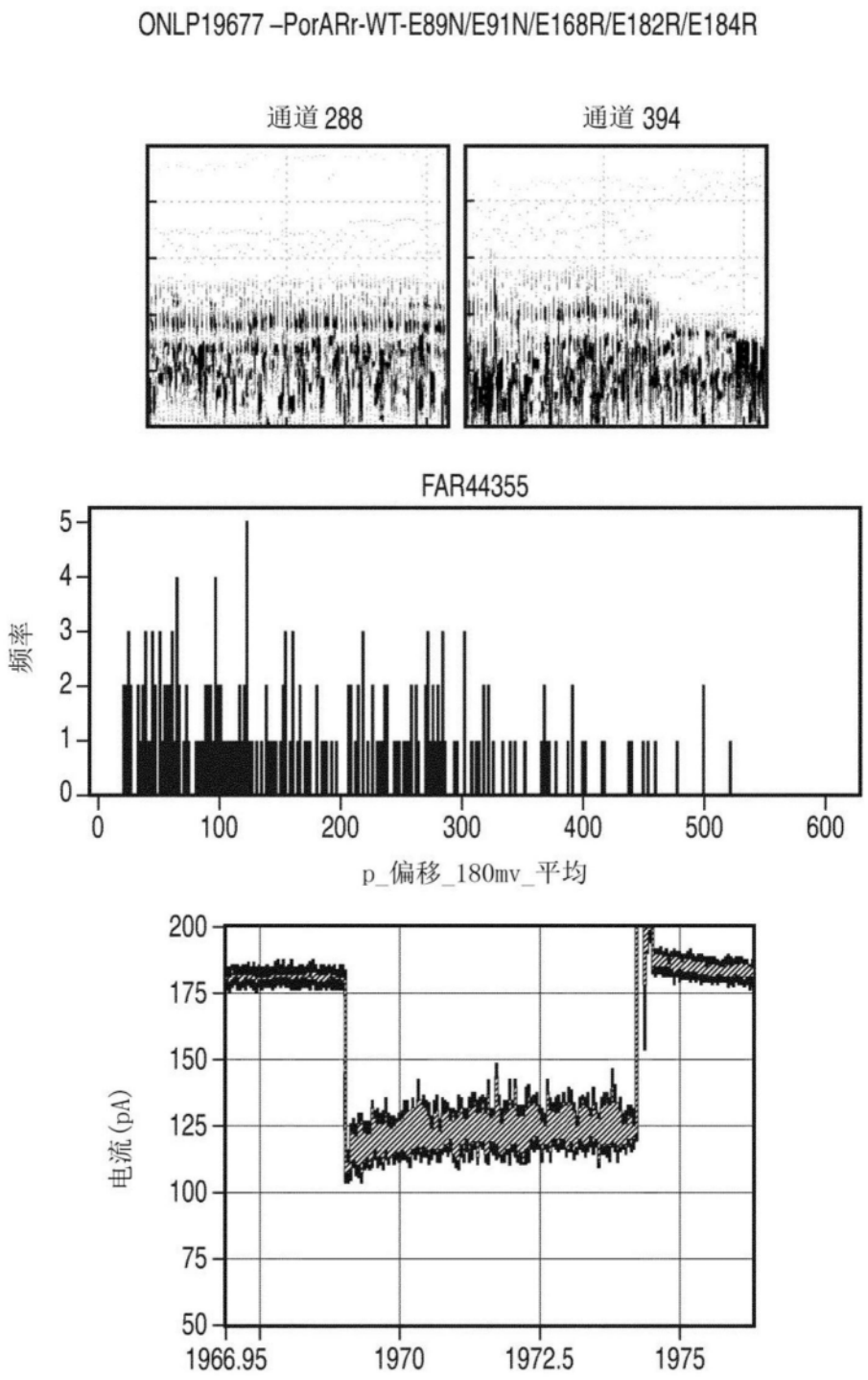
ONLP19677 –PorARr-WT-E89N/E91N/E168R/E182R/E184R
通道 288
通道 394
FAR44355
频率
0
1
2
3
4
5
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
1966.95
1970
1972.5
1975

图17 (续)

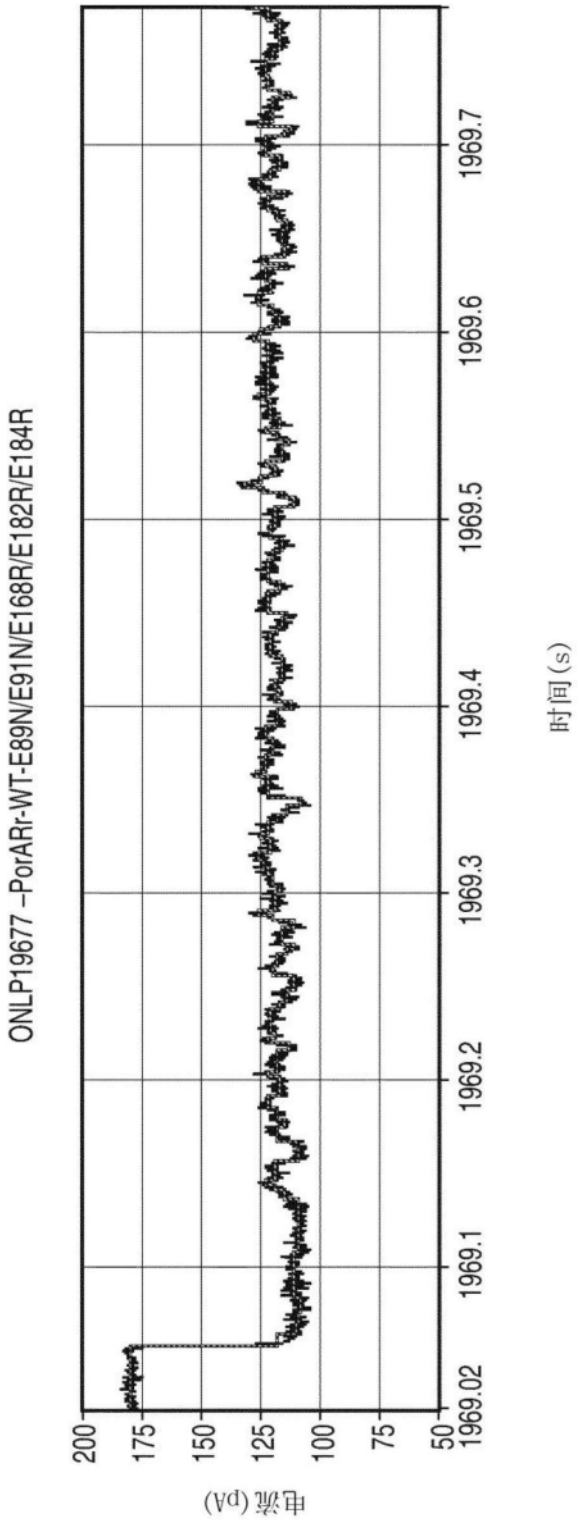
ONLP19677 –PorARr-WT-E89N/E91N/E168R/E182R/E184R
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
1969.02
1969.1
1969.2
1969.3
1969.4
1969.5
1969.6
1969.7
时间(s)

图17(续)

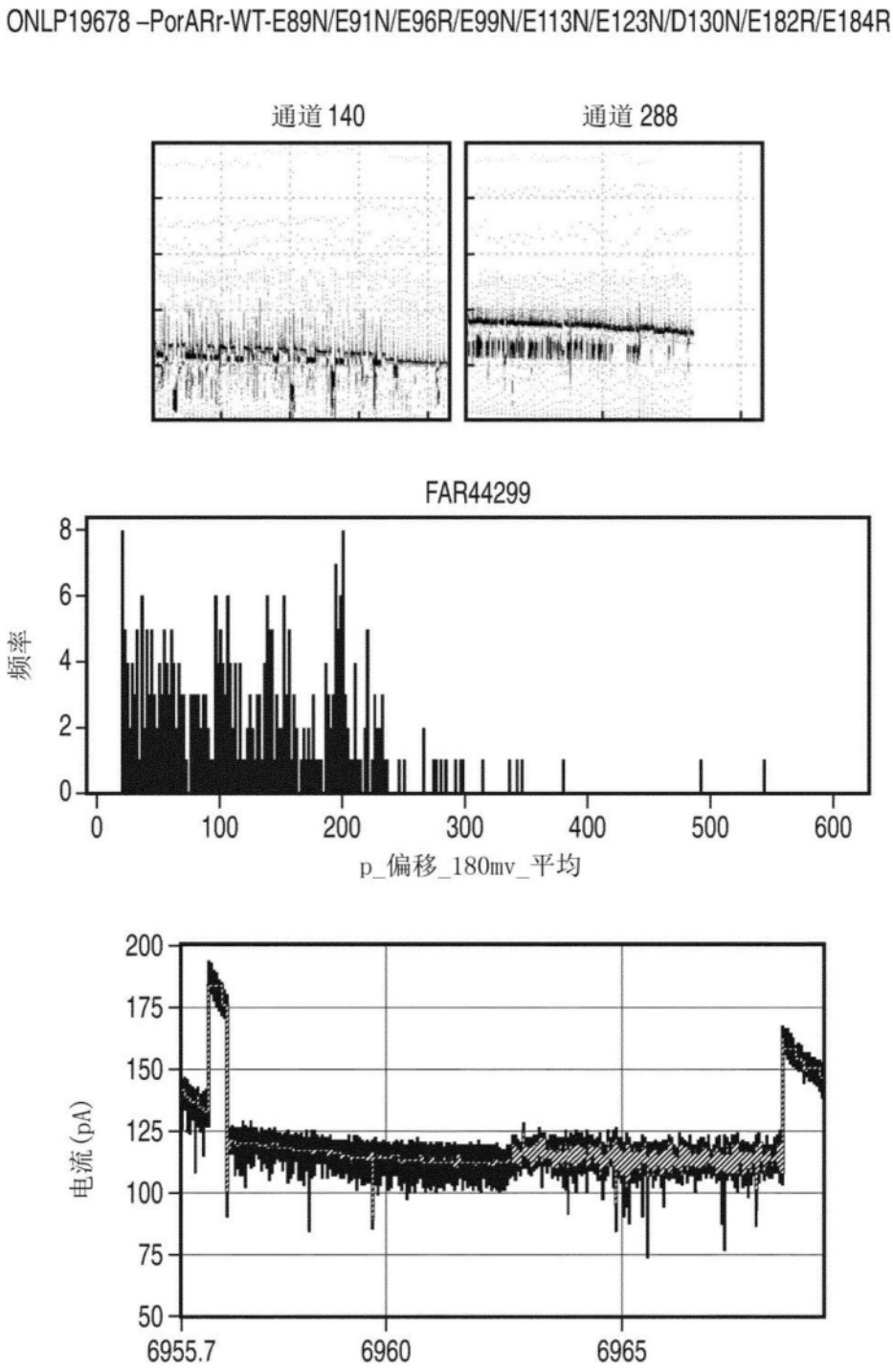
ONLP19678 –PorARr-WT-E89N/E91N/E96R/E99N/E113N/E123N/D130N/E182R/E184R
通道 140
通道 288
FAR44299
频率
8
6
4
2
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
6955.7
6960
6965

图18

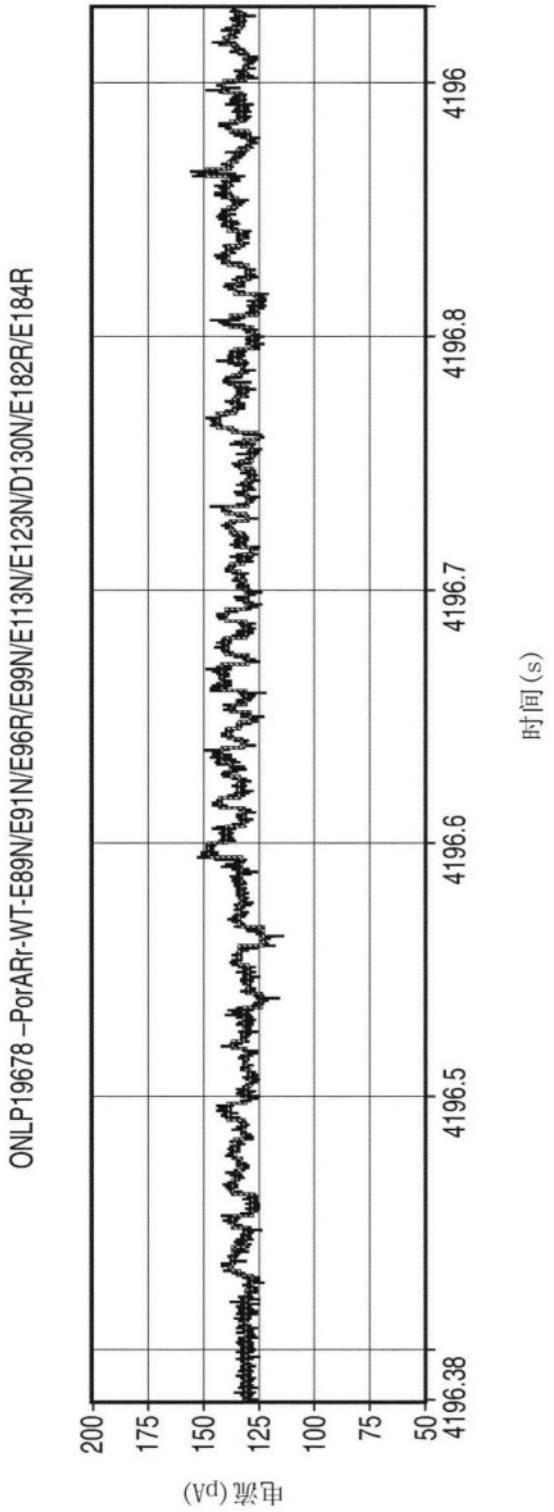
ONLP19678 -PorARr-WT-E89N/E91N/E96R/E99N/E113N/E123N/D130N/E182R/E184R
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
4196.38
4196.5
4196.6
4196.7
4196.8
4196
时间 (s)

图18(续)

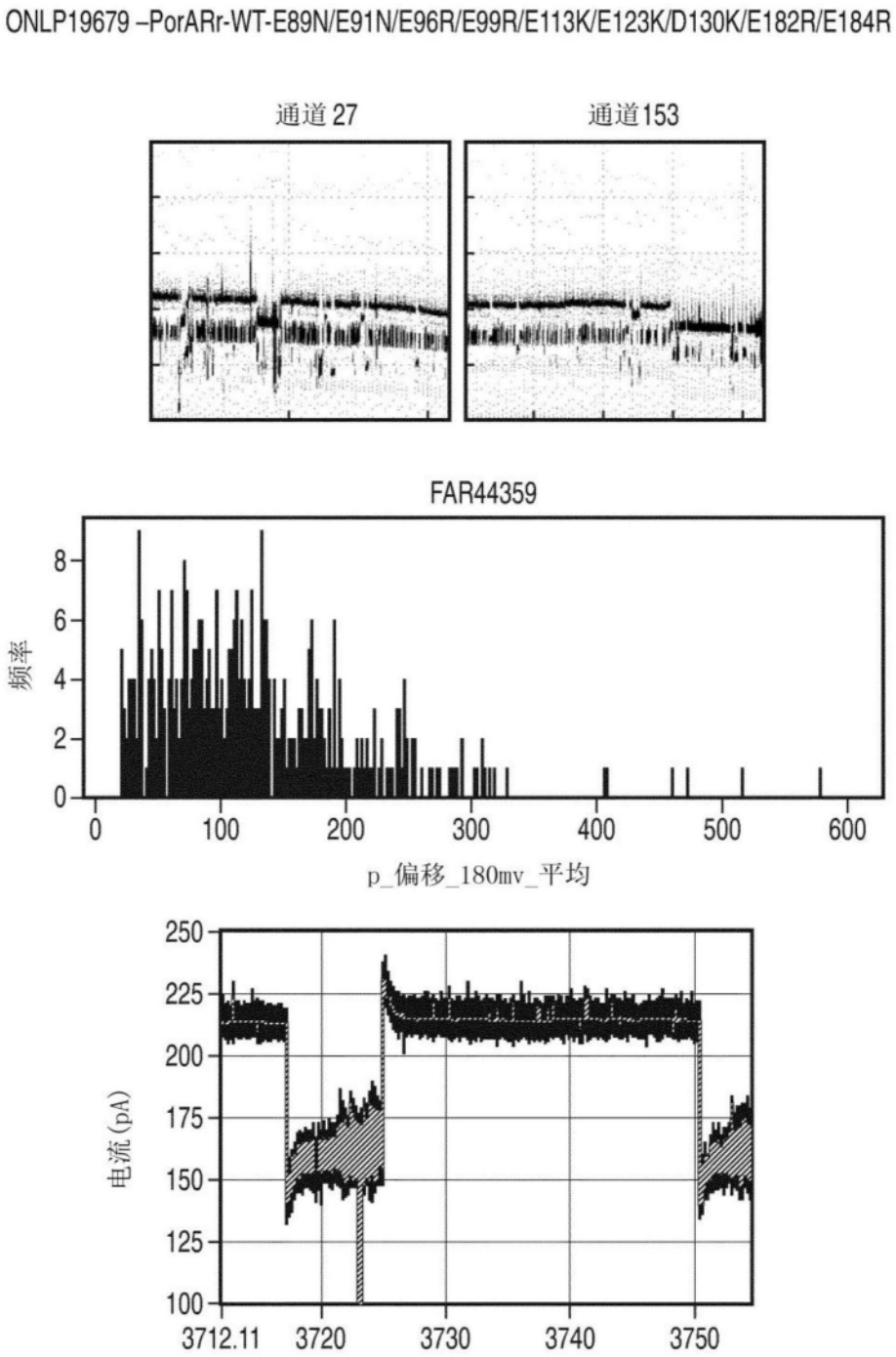
ONLP19679 –PorARr-WT-E89N/E91N/E96R/E99R/E113K/E123K/D130K/E182R/E184R
通道 27
通道153
FAR44359
频率
0
2
4
6
8
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
100
125
150
175
200
225
250
3712.11
3720
3730
3740
3750

图18(续)

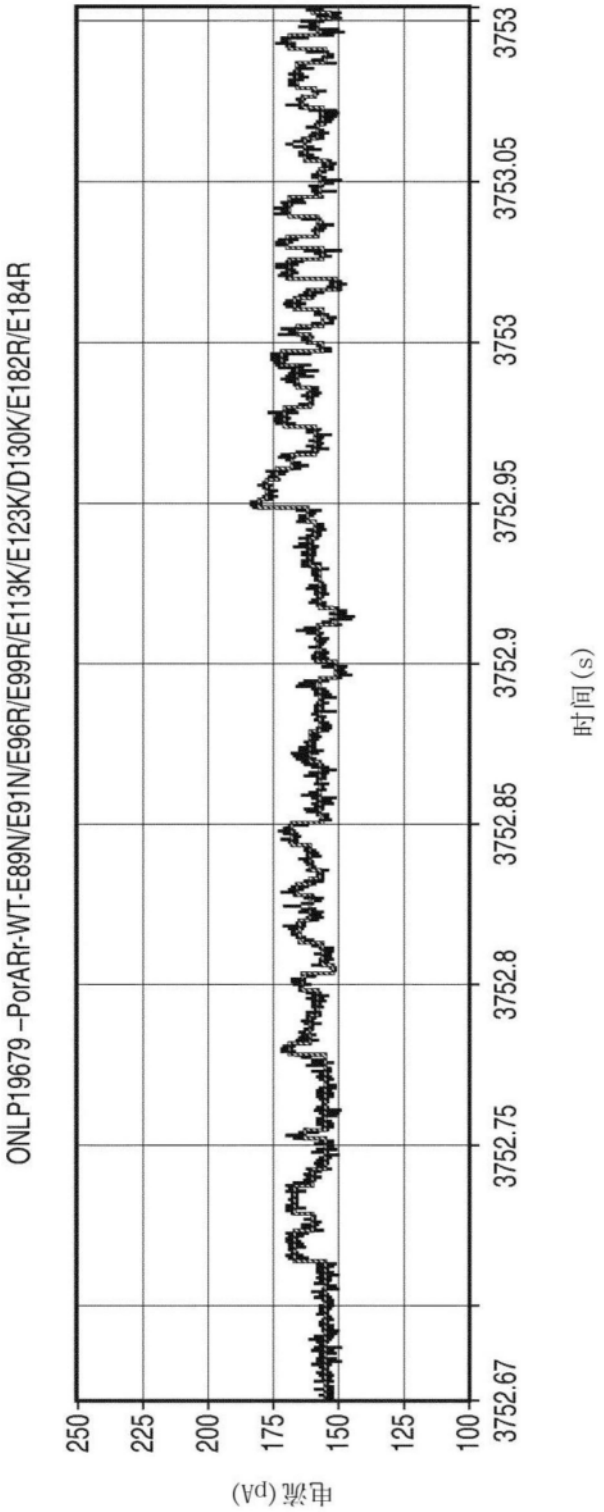
ONLP19679 -PorARr-WT-E89N/E91N/E96R/E99R/E113K/E123K/D130K/E182R/E184R
电流(pA)
250
225
200
175
150
125
100
3752.67
3752.75
3752.8
3752.85
3752.9
3752.95
3753
3753.05
3753
时间(s)

图18(续)

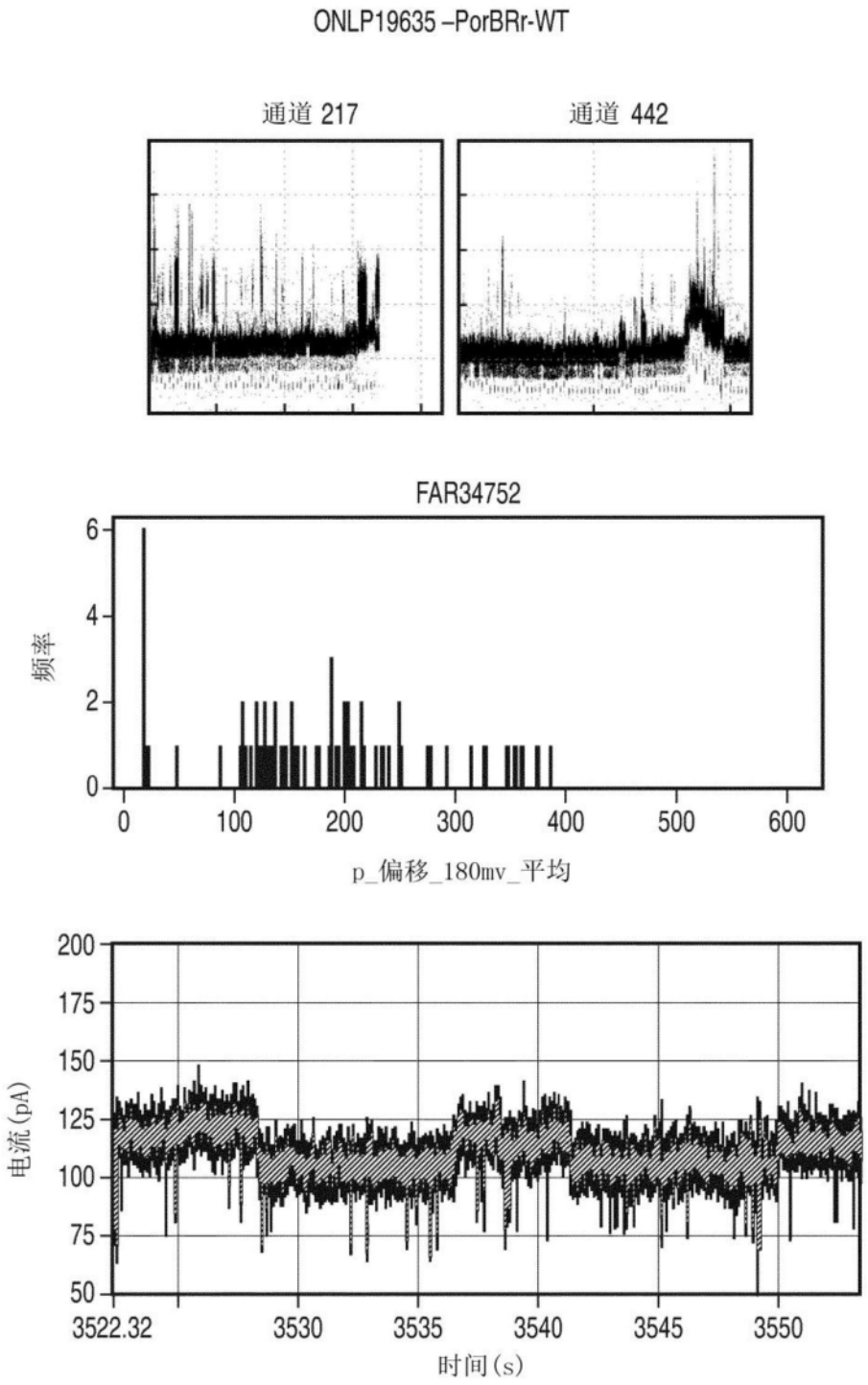
ONLP19635 –PorBRr-WT
通道 217
通道 442
FAR34752
频率
0
2
4
6
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
50
75
100
125
150
175
200
3522.32
3530
3535
3540
3545
3550
时间 (s)

图19

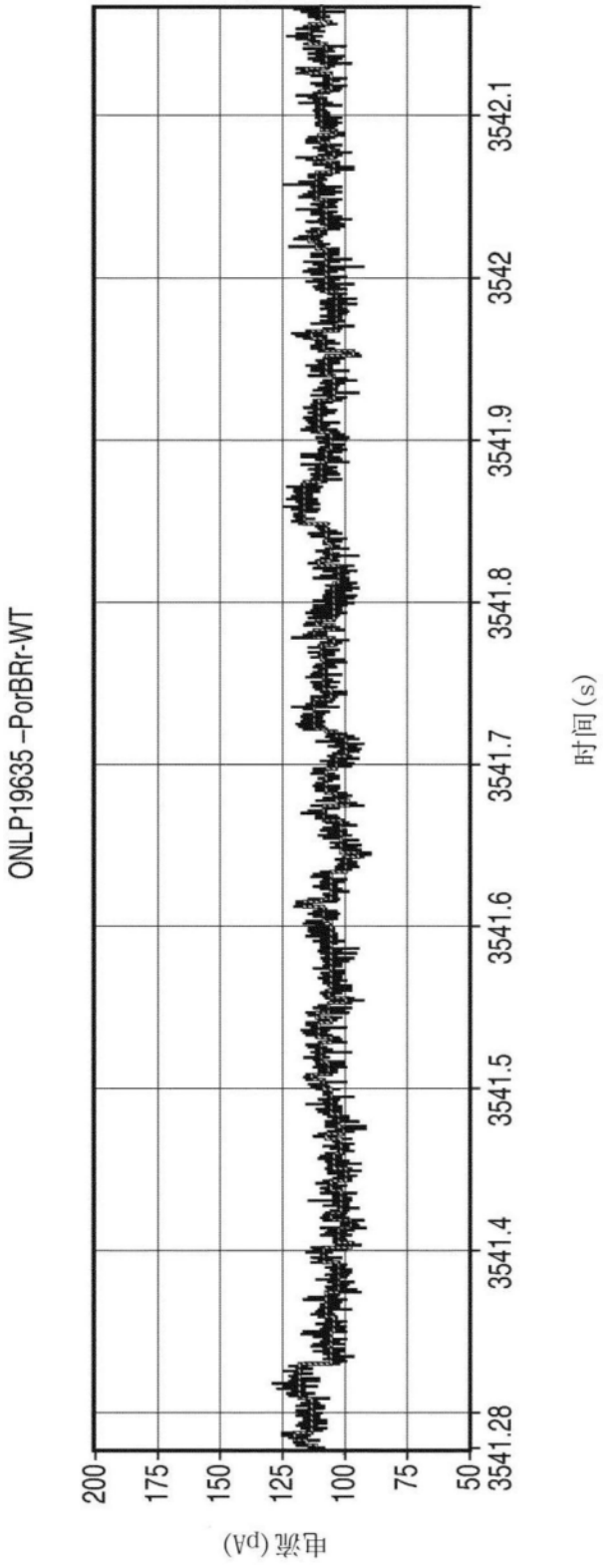
ONLP19635-PorBRr-WT
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
3541.28
3541.4
3541.5
3541.6
3541.7
3541.8
3541.9
3542
3542.1
时间(s)

图19(续)

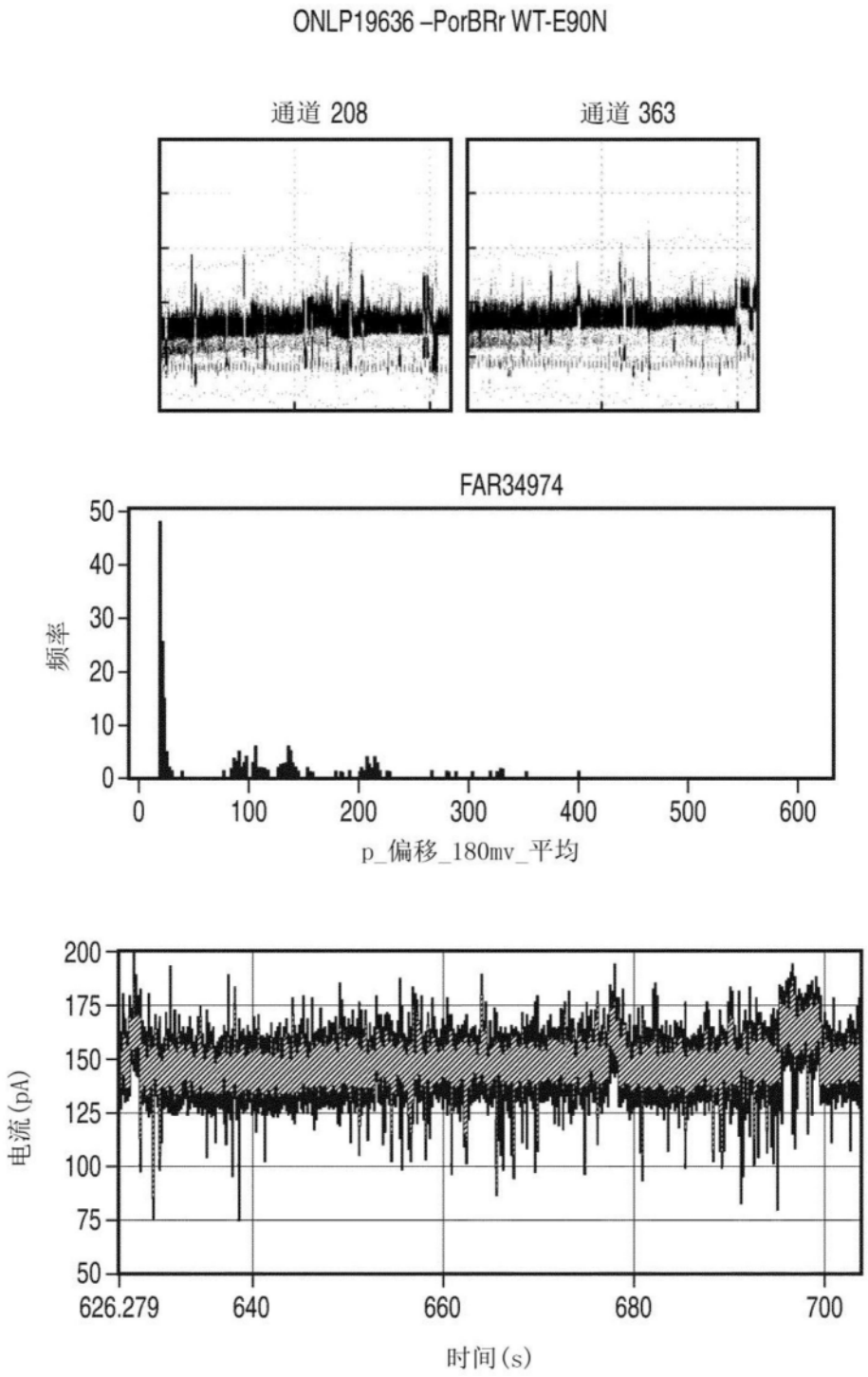
ONLP19636 –PorBRr WT-E90N
通道 208
通道 363
FAR34974
频率
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流(pA)
626.279
640
660
680
700
时间(s)

图19(续)

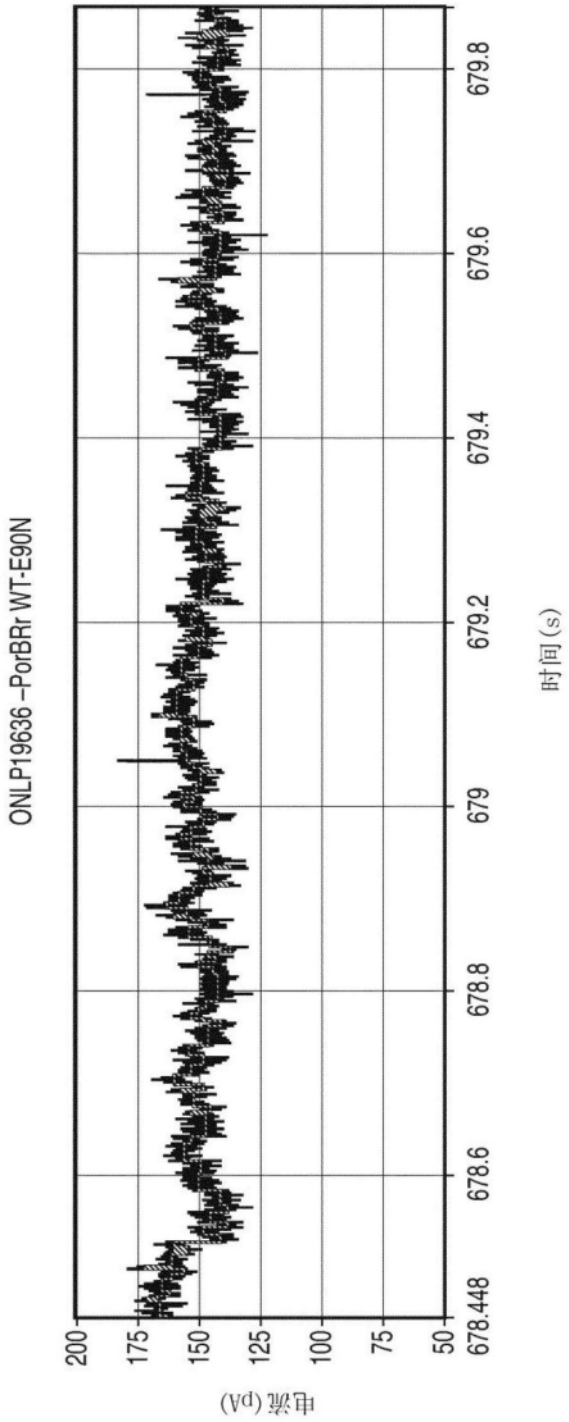
ONLP19636 -PorBRr WT-E90N
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
678.448
678.6
678.8
679
679.2
679.4
679.6
679.8
时间(s)

图19(续)

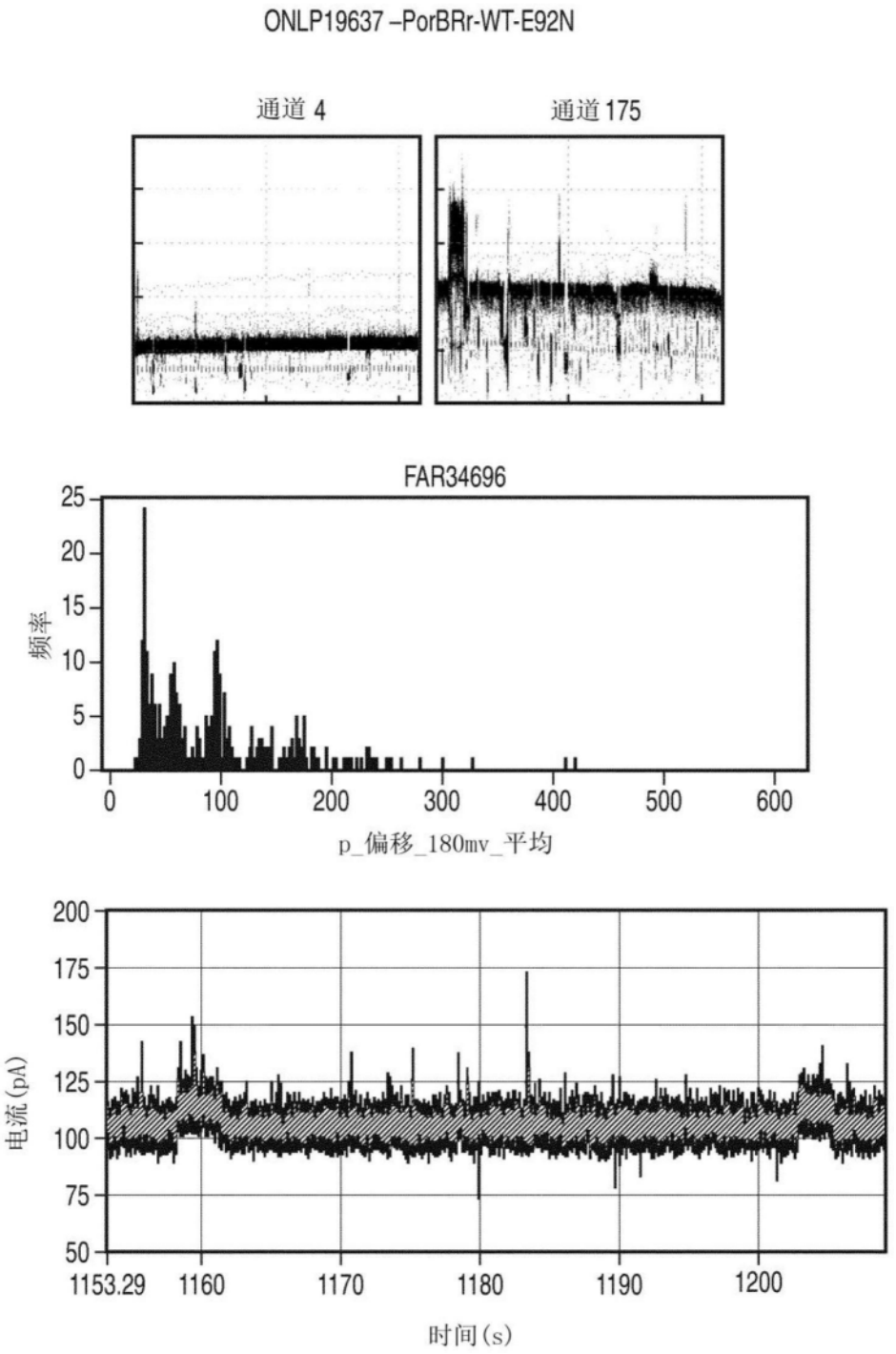
ONLP19637 –PorBRr-WT-E92N
通道 4
通道 175
FAR34696
频率
25
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
200
175
150
125
100
75
50
电流(pA)
1153.29
1160
1170
1180
1190
1200
时间(s)

图19(续)

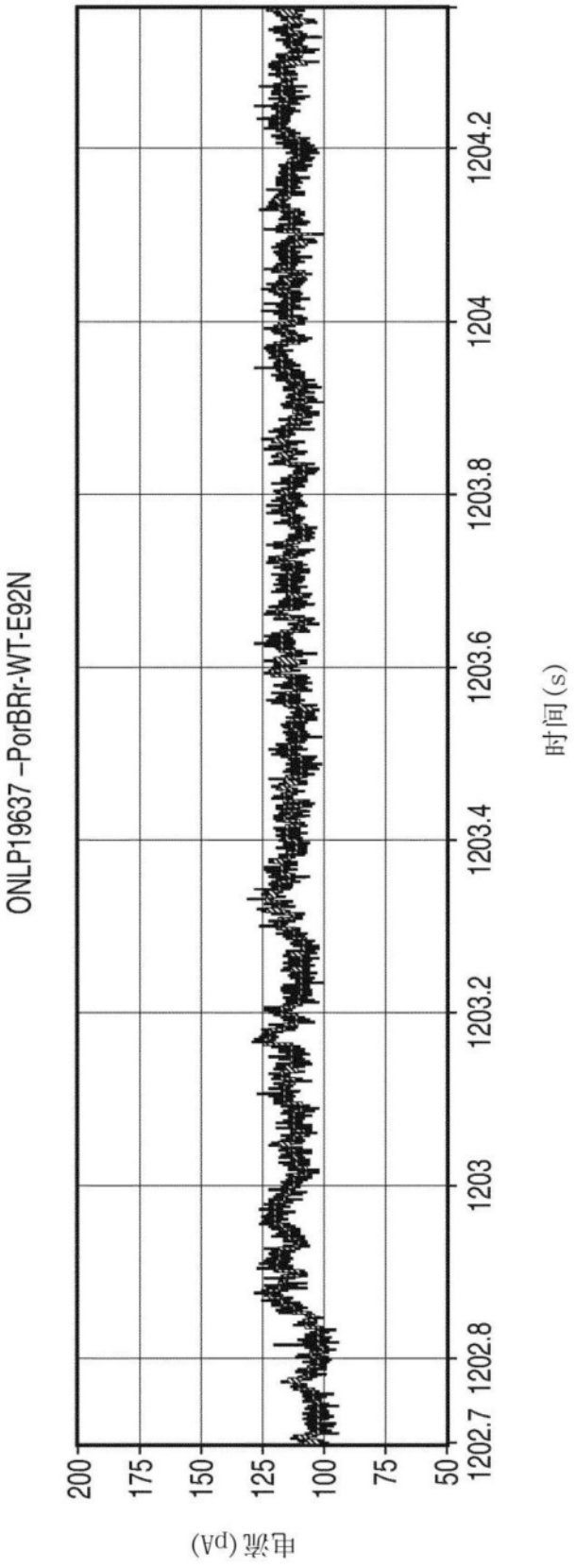
ONLP19637 -PorBRr-WT-E92N
电流(pA)
200
175
150
125
100
75
50
1202.7
1202.8
1203
1203.2
1203.4
1203.6
1203.8
1204
1204.2
时间(s)

图19(续)

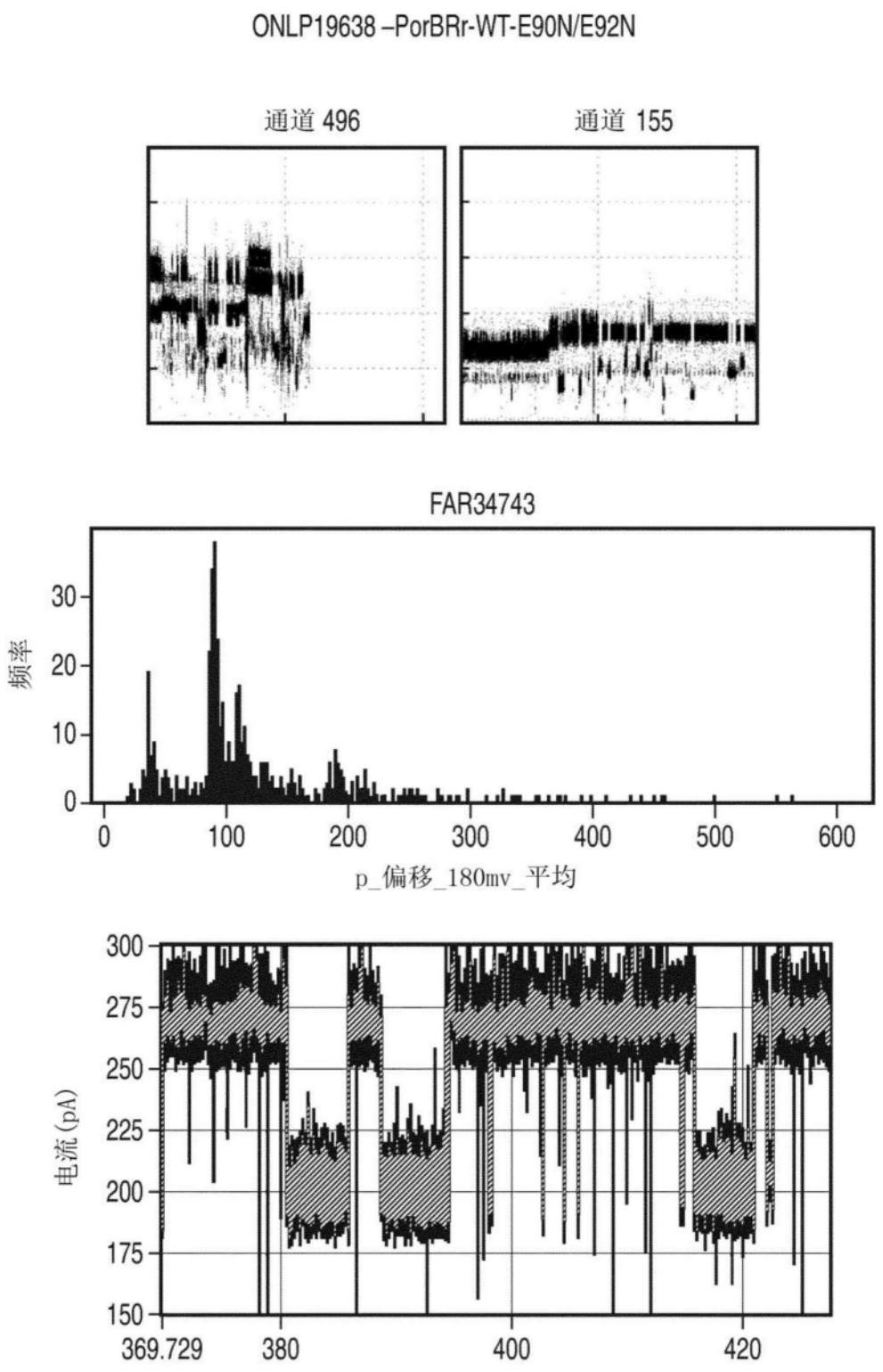
ONLP19638 –PorBRr-WT-E90N/E92N
通道 496
通道 155
FAR34743
频率
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
369.729
380
400
420

图20

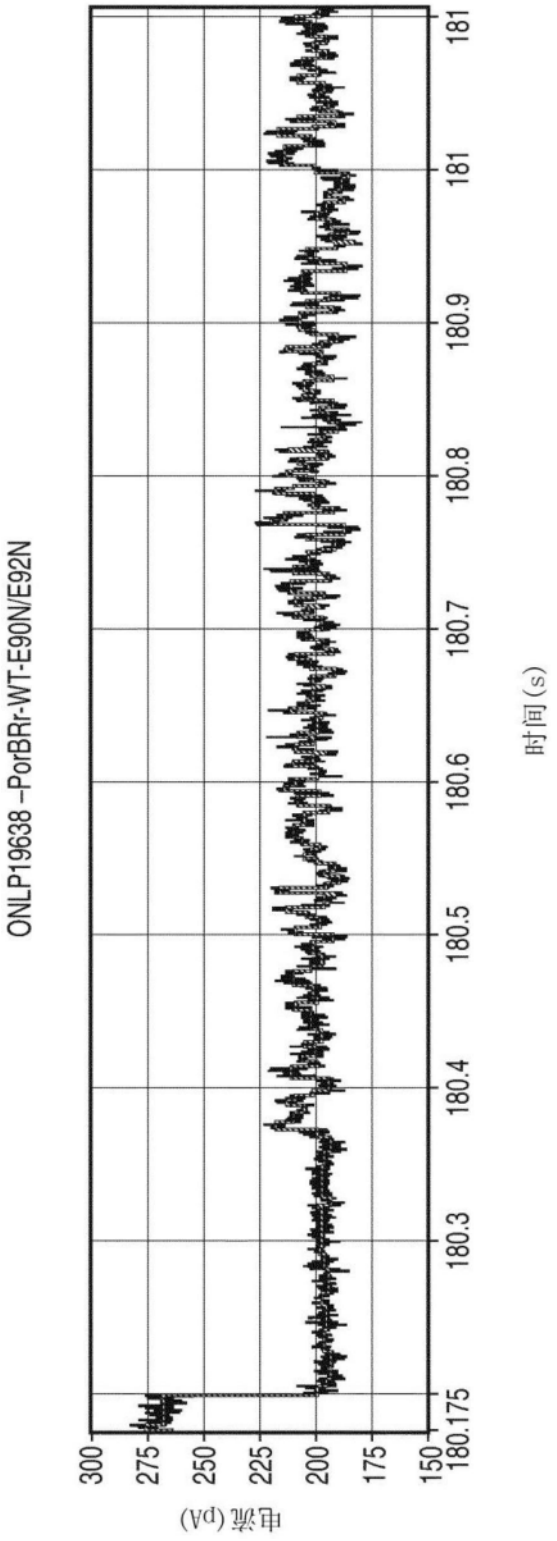
ONLP19638 -PorBRr-WT-E90N/E92N
电流(pA)
300
275
250
225
200
175
150
180.175
180.3
180.4
180.5
180.6
180.7
180.8
180.9
181
181
时间(s)

图20(续)

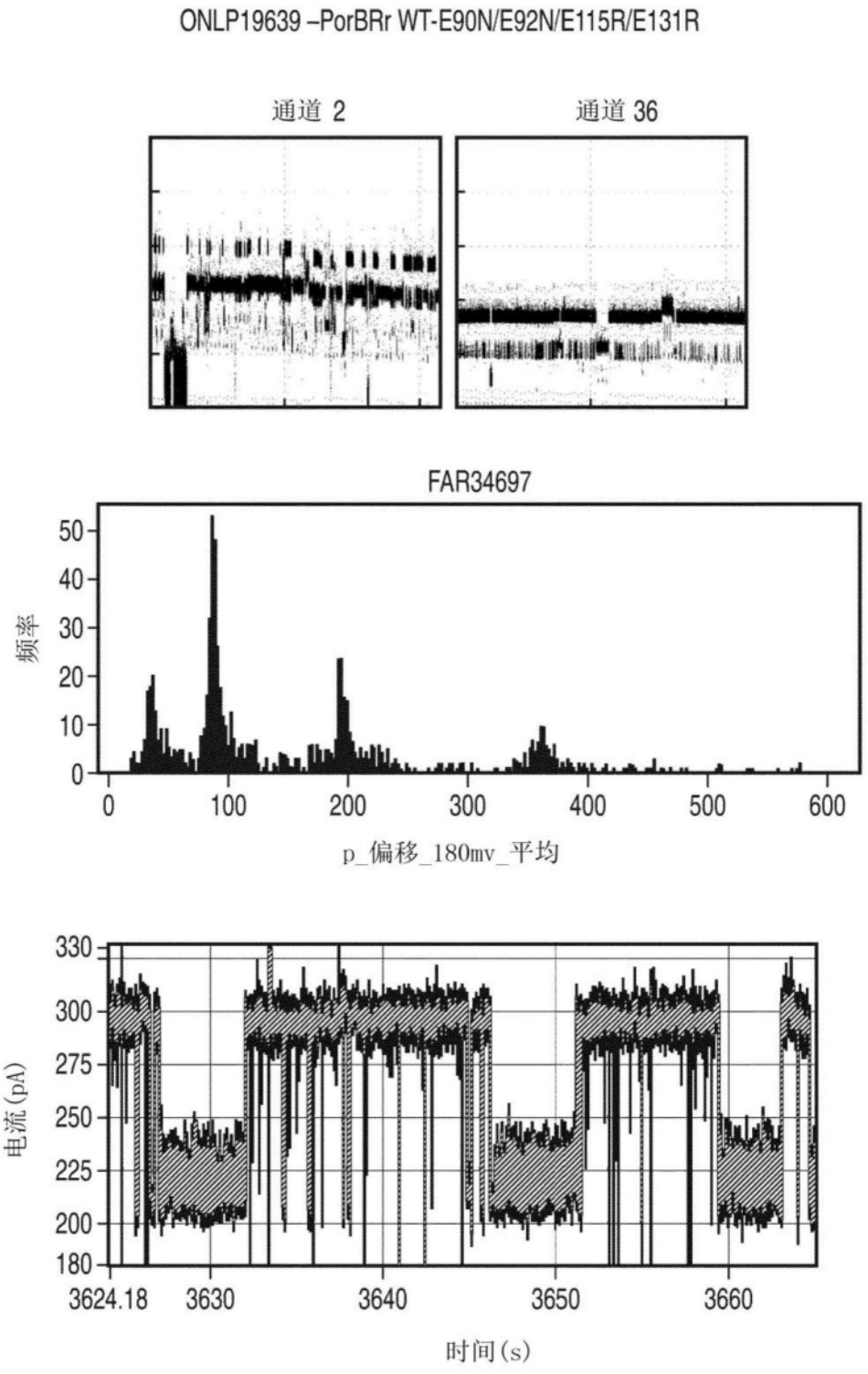
ONLP19639 –PorBRr WT-E90N/E92N/E115R/E131R
通道 2
通道 36
FAR34697
频率
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
330
300
275
250
225
200
180
电流(pA)
3624.18
3630
3640
3650
3660
时间(s)

图20(续)

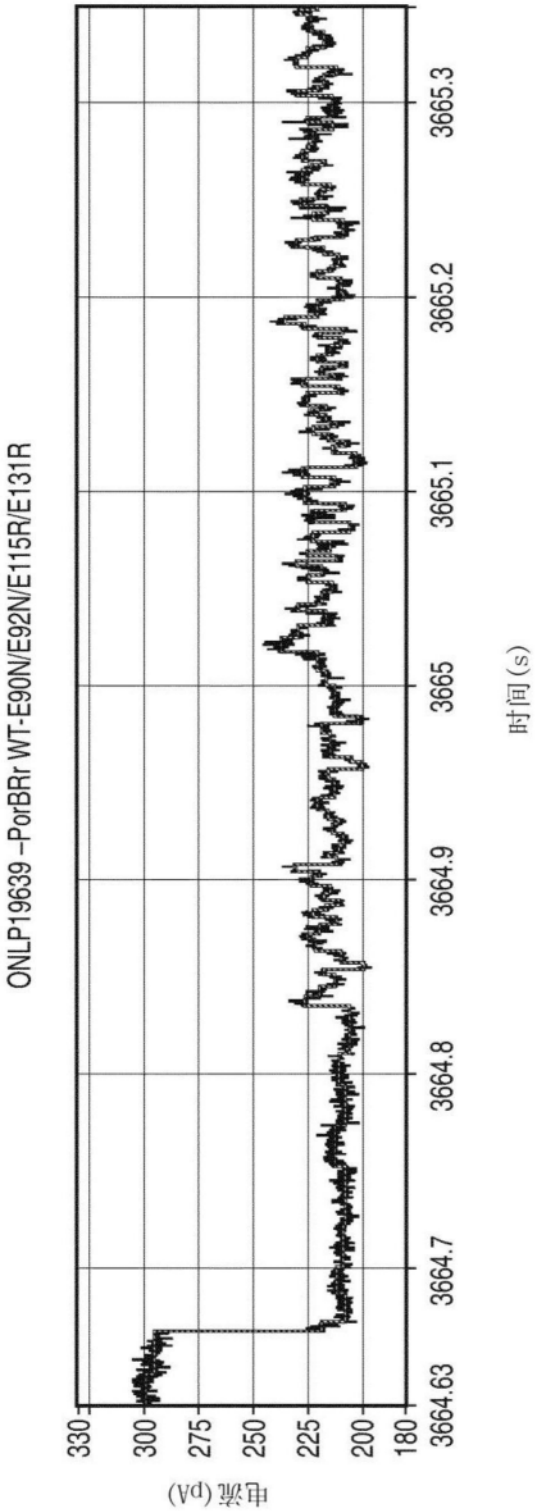
ONLP19639 –PorBRr WT-E90N/E92N/E115R/E131R
电流(pA)
330
300
275
250
225
200
180
3664.63
3664.7
3664.8
3664.9
3665
3665.1
3665.2
3665.3
时间(s)

图20(续)

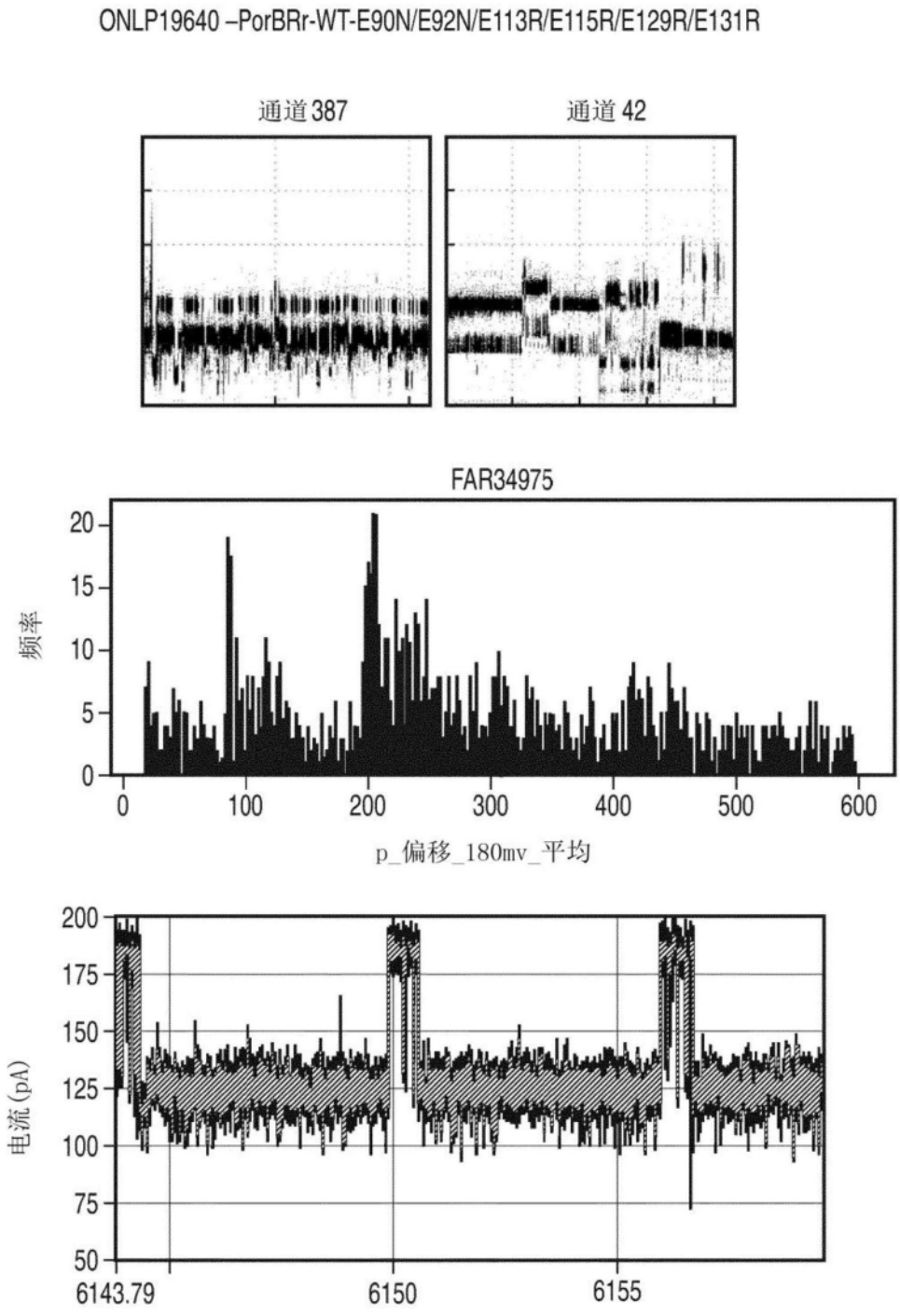
ONLP19640 –PorBRr-WT-E90N/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R
通道 387
通道 42
FAR34975
频率
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
600
p_偏移_180mv_平均
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
6143.79
6150
6155

图20 (续)

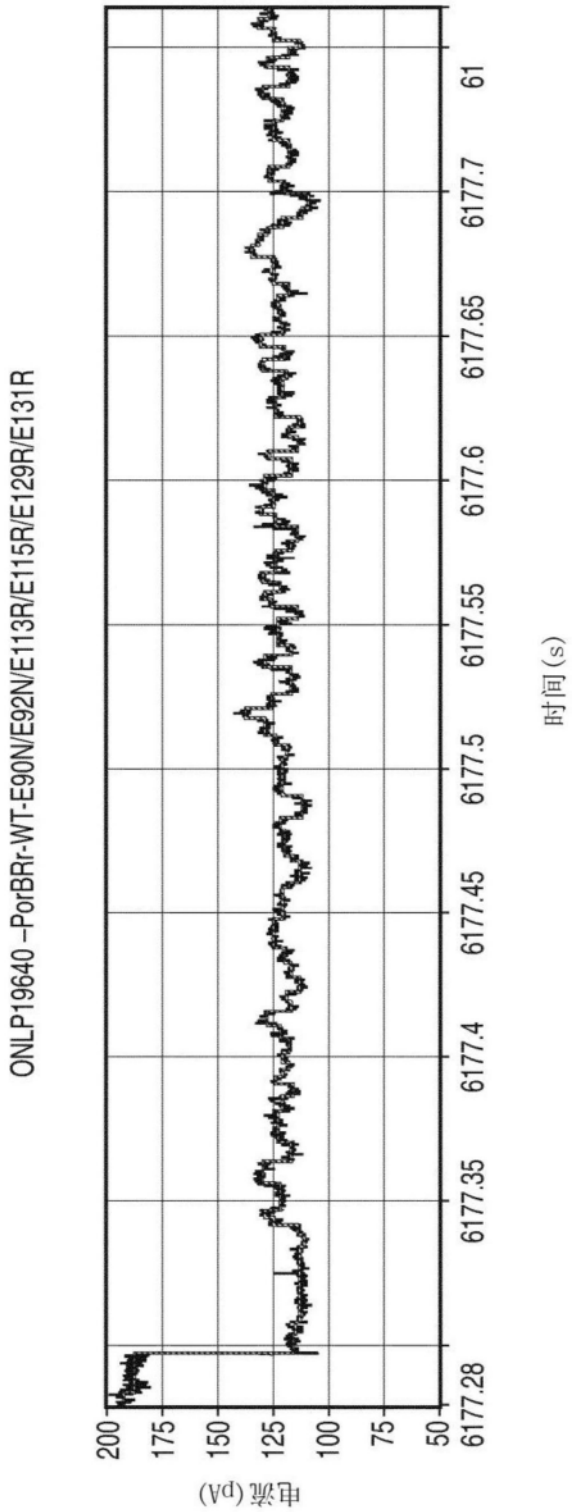
ONLP19640 –PorBRr-WT-E90N/E92N/E113R/E115R/E129R/E131R
电流 (pA)
200
175
150
125
100
75
50
6177.28
6177.35
6177.4
6177.45
6177.5
6177.55
6177.6
6177.65
6177.7
61
时间 (s)

图20(续)

PorARr-WT-E182R-E184R
PorARr-WT-E89N-E91N-E96R-E99R-E113K-E123K-D130K-E182R-E184R
PorBRr-WT-E90N-E92N
PorBRr-WT-E90N-E92N-E115R-E131R
PorBRr-WT-E90N-E92N-E113R-E115R-E129R-E131R
PorARc-WT-E78S-D82S-E89N-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78S-D82S-E89R
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-D55S-E57S-D58S-E78R-D82S-E89R-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-D104S-E116T-E122S-E125A-D165S
PorARc-WT-D55S-E57S-D58S-E78R-D82S-E89R-D104S-E116T-E122S-E125A-D165S
PorARc-WT-E57R-E78R-D82S-E89R-D104S-E116T-E122S-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89G-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89A-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89V-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89L-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89I-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89F-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89S-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89T-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89Q-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89K-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-T101V-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-T101S-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82R-E89R-T101N-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-T101Q-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-T101R-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89N-T101V-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89N-T101S-E116T-E125-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89N-T101N-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89N-T101Q-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89N-T101R-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-G87S-E89R-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-G91S-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-G91N-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-G91N-I92N-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-I92N-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-S99N-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-S103N-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-D104S-E116T-E125A-D165S
PorARc-WT-E78R-D82S-E89R-E116T-E122S-E125A-D165S
PorARc-WT-E78G-D82S-E89L-G91N-I92N-E116G-E125A-D165S
PorARc-WT-E78G-D82S-E89L-E116G-E125A-D165S

图21

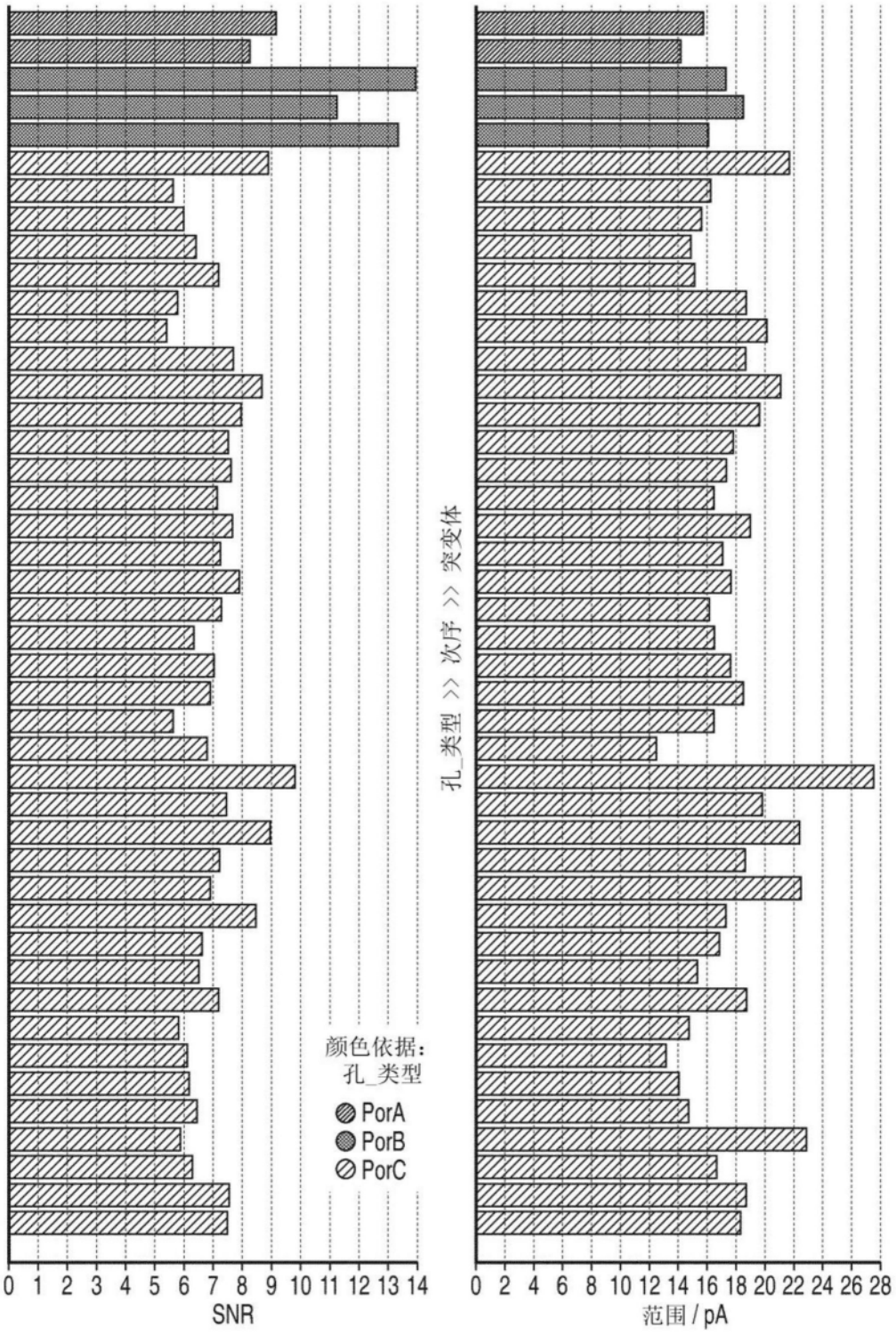
孔_类型 >> 次序 >> 突变体
颜色依据:
孔_类型
PorA
PorB
PorC
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
SNR
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
范围 / pA

图21(续)

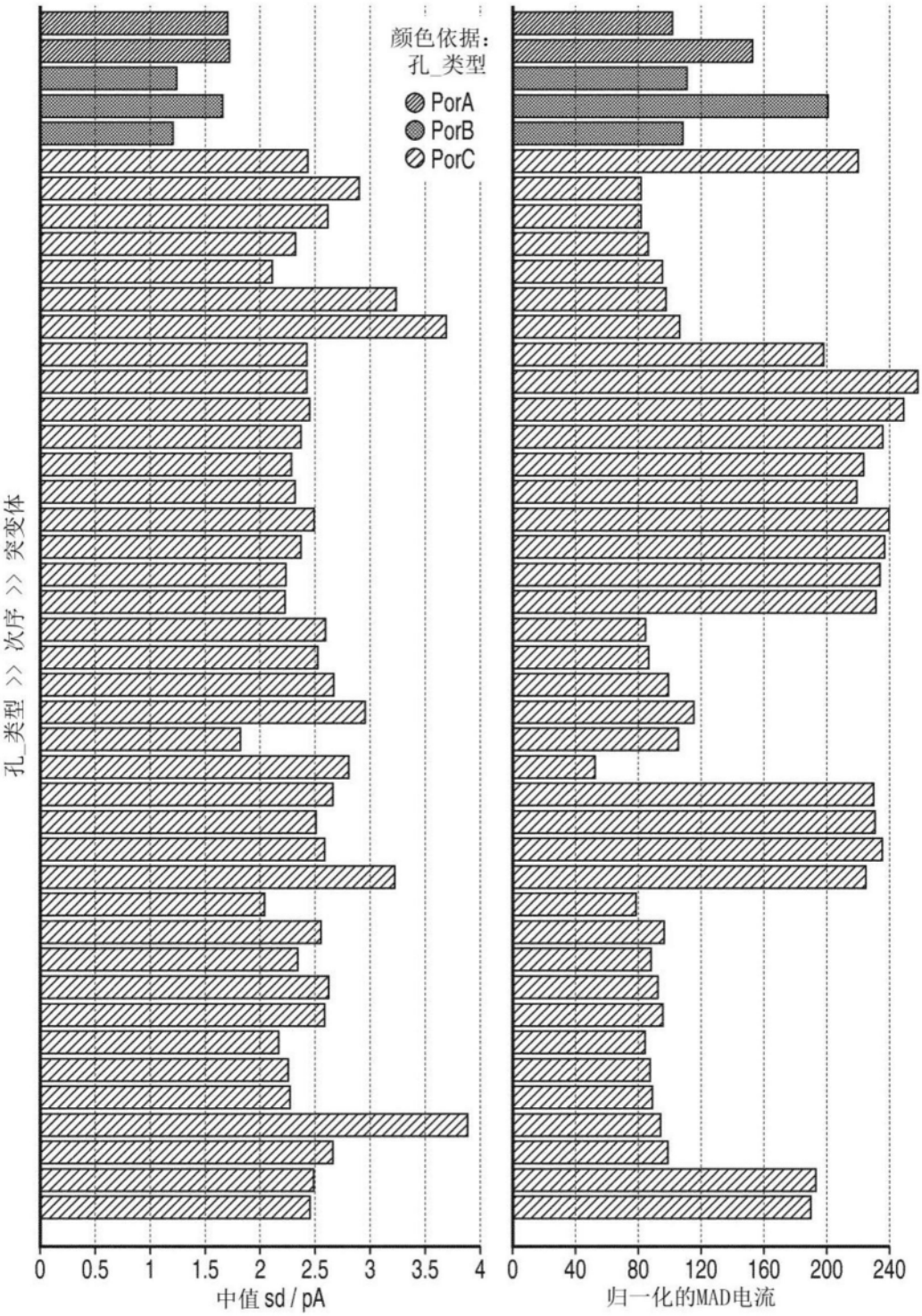
颜色依据：
孔_类型
PorA
PorB
PorC
孔_类型 >> 次序 >> 突变体
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
中值 sd / pA
0
40
80
120
160
200
240
归一化的MAD电流

图21(续)

PorBRr-WT-E90G-E92N-E115R-E131R_ONLZ18535
PorBRr-WT-E90A-E92N-E115R-E131R_ONLZ18536
PorBRr-WT-E90V-E92N-E115R-E131R_ONLZ18537
PorBRr-WT-E90L-E92N-E115R-E131R_ONLZ18538
PorBRr-WT-E90I-E92N-E115R-E131R_ONLZ18539
PorBRr-WT-E90F-E92N-E115R-E131R_ONLZ18540
PorBRr-WT-E90Y-E92N-E115R-E131R_ONLZ18541
PorBRr-WT-E90S-E92N-E115R-E131R_ONLZ18532
PorBRr-WT-E90T-E92N-E115R-E131R_ONLZ18533
PorBRr-WT-E90Q-E92N-E115R-E131R_ONLZ18534
PorBRr-WT-E90N-E92G-E115R-E131R_ONLZ18547
PorBRr-WT-E90N-E92A-E115R-E131R_ONLZ18548
PorBRr-WT-E90N-E92V-E115R-E131R_ONLZ18549
PorBRr-WT-E90N-E92L-E115R-E131R_ONLZ18550
PorBRr-WT-E90N-E92I-E115R-E131R_ONLZ18551
PorBRr-WT-E90N-E92F-E115R-E131R_ONLZ18552
PorBRr-WT-E90N-E92Y-E115R-E131R_ONLZ18553
PorBRr-WT-E90N-E92S-E115R-E131R_ONLZ18544
PorBRr-WT-E90N-E92T-E115R-E131R_ONLZ18545
PorBRr-WT-E90N-E92Q-E115R-E131R_ONLZ18546
PorBRr-WT-E90N-E92N-T100N-E115R-E131R_ONLZ18634
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102A-E115R-E131R_ONLZ18625
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102V-E115R-E131R_ONLZ18626
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102N-E115R-E131R_ONLZ18623
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102Q-E115R-E131R_ONLZ18624
PorBRr-WT-E90N-E92N-T104A-E115R-E131R_ONLZ18629
PorBRr-WT-E90N-E92N-T104N-E115R-E131R_ONLZ18627
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102V-T104N-E115R-E131R_ONLZ18633
PorBRr-WT-E90N-E92N-T102N-T104N-E115R-E131R_ONLZ18631
PorBRr-WT-E90N-E92N-D105A-E115R-E131R_ONLZ18640
PorBRr-WT-E90N-E92N-E113R-E115R-E129R-E131R_ONLZ16956
PorBRr-WT-E90N-E92N-E115R-E131R_ONLZ16955

图22

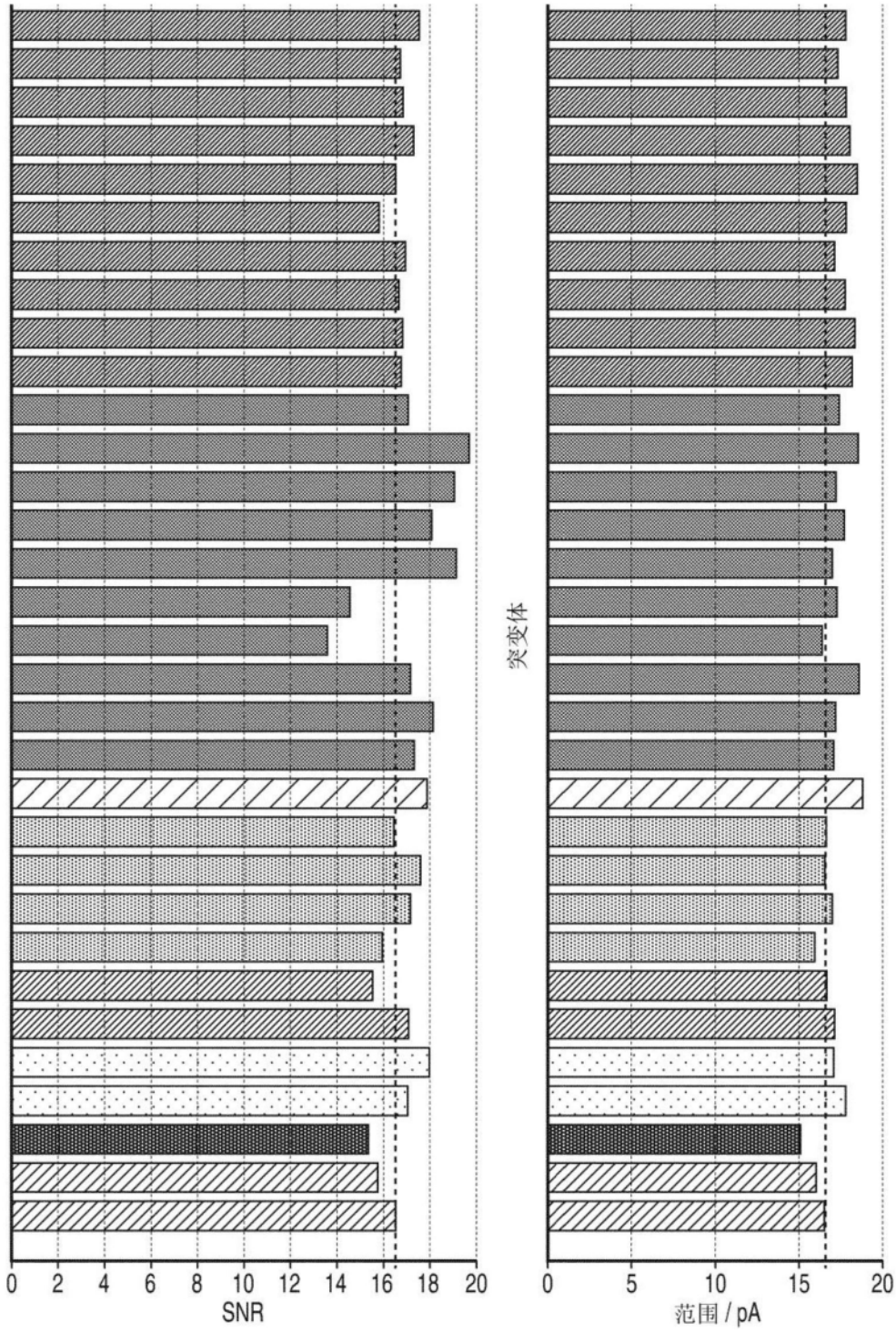

图22(续)

突变体
0 0.2 0.4 0.6 0.8 1 1.2
中值 sd / pA
突变体
0.35 0.36 0.37 0.38 0.39 0.4 0.41
归一化的MAD电流

图22(续)