



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105358567 B

(45) 授权公告日 2021.12.10

(21) 申请号 201480018571.6

(22) 申请日 2014.03.25

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105358567 A

(43) 申请公布日 2016.02.24

(30) 优先权数据  
1313477.0 2013.07.29 GB (续)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.09.25

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/BE2014/000013 2014.03.25

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02014/153625 EN 2014.10.02

(73) 专利权人 鲁汶天主教大学  
地址 比利时勒芬市

(72) 发明人 乔瓦尼·马利亚  
米哈埃·索斯金尼

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205  
代理人 李艳 臧建明

(51) Int.Cl.  
C07K 14/255 (2006.01)

(56) 对比文件  
US 2002/0094526 A1, 2002.07.18  
CN 101827943 A, 2010.09.08  
Angela Atkins 等, Structure-Function Relationships of a Novel Bacterial Toxin, Hemolysin E.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2000, 第275卷(第52期), 第41150-41155页, 尤其是摘要.

Alistair J. Wallace等, E. coli Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-Ray Crystal Structure of the Toxin and Observation of Membrane Pores by Electron Microscopy.《Cell》.2000, 第100卷第265-276页, 尤其是.

Nora Eifler 等, Cytotoxin ClyA from Escherichia coli assembles to a 13-meric pore independent of its redox-state.《The EMBO Journal》.2006, 第25卷(第11期), 第2652-2661页.

Nahid N. Jetha 等, Nanopore Analysis of Wild-Type and Mutant Prion Protein (PrPC): Single Molecule Discrimination and PrPC Kinetics.《PLOS ONE》.2013, 第8卷(第2期), 第e54982-e54982页.

Minsoung Rhee 等, Nanopore sequencing technology: nanopore preparations.《TRENDS in Biotechnology》.2007, 第25卷(第4期), 第175-181页.

Christine von Rhein 等, ClyA cytolysin from Salmonella: Distribution within the genus, regulation of expression by SlyA, and pore-forming characteristics.《International Journal of Medical Microbiology》.2009, 第299卷第21-35页. (续)

审查员 张林森

权利要求书2页 说明书33页  
序列表16页 附图16页

(54) 发明名称  
用于检测蛋白质和核酸的纳米孔生物传感器

(57) 摘要

本文涉及基于修饰的溶细胞素蛋白质的纳米孔生物传感器。所述纳米孔生物传感器容纳包括蛋白质和核酸的大分子, 并且可以额外地包括具有选择性结合性质的配体。

[转续页]

[接上页]

(30) 优先权数据

61/805,068 2013.03.25 US

(56) 对比文件

Soskine M 等. An engineered ClyA

nanopore detects folded target proteins by selective external association and pore entry.《Nano Lett》.2012,第12卷(第9期),第4895-4900页.

1. 包含多个亚基的修饰的ClyA孔, 其中每个亚基包含由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的多肽, 其中 (i) 精确地只有一个Cys残基被Ala取代; (ii) 精确地只有一个Cys残基被Ala取代且精确地只有一个Cys残基被Ser取代; 或 (iii) 精确地只有一个Cys残基被Ser取代且L99、E103、F166和K294中的一个或多个被其他氨基酸残基取代, 其中所述Cys残基是C87或C285。

2. 如权利要求1所述的修饰的ClyA孔, 其中被Ala取代的Cys残基是C87和/或被Ser取代的Cys残基是C285。

3. 如权利要求1或2所述的修饰的ClyA孔, 其中每个亚基包括至少一个选自L99Q, E103G, F166Y和K294R的额外的氨基酸取代基。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的修饰的ClyA孔, 其中每个亚基包含额外的氨基酸取代基I203V。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的修饰的ClyA孔, 其中每个亚基包含由SEQ ID NO:3的氨基酸序列表示的多肽。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的修饰的ClyA孔, 其中所述修饰的ClyA孔包含至少12个亚基。

7. 如权利要求6所述的修饰的ClyA孔, 其中所述修饰的ClyA孔包含12个亚基。

8. 如权利要求6所述的修饰的ClyA孔, 其中所述修饰的ClyA孔包含13个亚基。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的修饰的ClyA孔, 其中所述修饰的ClyA孔具有至少3.5nm的顺式直径。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的修饰的ClyA孔, 其中所述修饰的ClyA孔具有至少6nm的反式直径。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的修饰的ClyA孔, 其中当穿过所述修饰的ClyA孔的电压范围从+90到-150mV时, 所述修饰的ClyA孔仍保持打开。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的修饰的ClyA孔用于迁移核酸的用途。

13. 一种纳米孔生物传感器, 其包含修饰的ClyA孔和具有选择性结合性质的配体, 所述修饰的ClyA孔包含多个亚基, 每个亚基包含由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的多肽, 其中精确地只有一个Cys残基被Ser取代和/或精确地只有一个Cys残基被Ala取代, 其中所述Cys残基是C87或C285。

14. 如根据权利要求13所述的纳米孔生物传感器, 其中所述经修饰的ClyA孔如权利要求1-13中任一项所限定。

15. 如权利要求13或14的纳米孔生物传感器, 其中所述配体是: (i) 结合到目标蛋白的适配子、抗体、受体或肽; 或 (ii) 目标蛋白的抑制剂, 其抑制目标蛋白到修饰的ClyA孔的结合。

16. 如权利要求1-11中任一项所述的修饰的ClyA孔或权利要求13-15中任一项所述的纳米孔生物传感器用于检测蛋白质的用途。

17. 如权利要求16所述的用途, 其中蛋白质分析物结合到所述修饰的ClyA孔的内腔中。

18. 如权利要求17所述的用途, 其中所述蛋白质分析物与所述修饰的ClyA孔的内腔中的多于一个的位点结合。

19. 如权利要求18所述的用途, 其中所述蛋白质分析物是一种分子量范围在15-70kDa

的蛋白质。

20. 一种检测样品中至少一种蛋白质分析物的存在的方法, 包括:

(a) 使所述样品与修饰的ClyA孔或权利要求13-15中任一项所述的纳米孔生物传感器接触, 所述修饰的ClyA孔包含多个亚基, 每个亚基包含由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的多肽, 其中精确地只有一个Cys残基被Ser取代和/或精确地只有一个Cys残基被Ala取代, 所述纳米孔生物传感器包含修饰的ClyA孔, 其中所述Cys残基是C87或C285;

(b) 穿过所述修饰的ClyA孔施加电势;

(c) 测量穿过所述修饰的ClyA孔的电流; 和

(d) 比较测量的电流与参考电流, 其中电流相对于参考电流的变化表明样品中存在所述蛋白质分析物。

21. 如权利要求20所述的方法, 其中所述修饰的ClyA孔如权利要求1-11中任一项所限定。

22. 一种迁移DNA穿过修饰的ClyA孔的方法, 包括:

(a) 提供包含多个亚基的修饰的ClyA孔, 每个亚基包含由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的多肽, 其中精确地只有一个Cys残基被Ser取代和/或精确地只有一个Cys残基被Ala取代, 其中所述Cys残基是C87或C285;

(b) 施加至少+50mV的电压穿过所述修饰的ClyA孔;

(c) 将包含DNA的样品添加至所述修饰的ClyA孔的顺式开口; 和

(d) 测量流过所述孔的电流。

23. 如权利要求22所述的方法, 其中: (i) DNA是双链DNA; (ii) 电流阻塞表明DNA发生迁移; (iii) 修饰的ClyA孔在高离子强度条件下使用; 或 (iv) 修饰的ClyA孔如权利要求1-11中任一项所限定。

24. 一种用于迁移DNA的装置, 包括: 充满流体的腔室, 其由膜分隔成第一腔室和第二腔室; 能够施加穿过所述膜的电势的电极; 插入所述膜中的一个或多个修饰的ClyA孔, 所述修饰的ClyA孔包含多个亚基, 每个亚基包含由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的多肽, 其中精确地只有一个Cys残基被Ser取代和/或精确地只有一个Cys残基被Ala取代, 其中所述Cys残基是C87或C285; 在所述膜的1个腔室中的高离子强度的溶液, 其中DNA从第一腔室迁移穿过所述一个或多个修饰的ClyA孔到第二腔室。

## 用于检测蛋白质和核酸的纳米孔生物传感器

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基于修饰的溶细胞素蛋白质的纳米孔生物传感器。所述纳米孔生物传感器容纳大分子,所述大分子包括折叠的蛋白质和核酸,所述核酸包括双链(ds) DNA,所述纳米孔生物传感器与其他纳米孔生物传感器相比,显示出增强的活性,溶解性和电性质。

### 背景技术

[0002] 离子或分子穿过生物膜的运输是细胞生命的基本过程,且所述运输被离子通道,转运蛋白(transporter)和孔紧密地调节。最近,研究者在单分子分析中采用生物的,<sup>1</sup>固态的,<sup>2</sup>DNA折纸<sup>3</sup>和混合的<sup>3a,b,4</sup>纳米孔。<sup>5</sup>生物纳米孔与它们的合成对应物相比具有优势,主要是因为它们可以重复制造并以人工纳米孔无法匹敌的原子水平精度修饰。然而,生物纳米孔仍有缺点。生物纳米孔的机械稳定性取决于具体情况。来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 $\alpha$ 溶血素( $\alpha$ HL)纳米孔和来自耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)的孔蛋白A(MspA)纳米孔在脂类双分子层中在高施加电势下保持打开,而且令人惊讶的是能很好地对抗温度,<sup>6</sup>pH<sup>6b,7</sup>和变性剂浓度的极端条件。<sup>6b,8</sup>然而,多数其他孔蛋白和通道不太牢固。然而,可认为地,生物纳米孔最大的不利条件是其固定的尺寸。例如, $\alpha$ HL,MspA或气单胞菌溶素纳米孔的尺寸允许对单链核酸、适配子或小肽进行分析,<sup>9</sup>但是它们较小的内直径( $\sim 1$ nm)妨碍了对其他重要生物系统例如折叠的酶或核酶的直接研究。

[0003] 最近大量的研究对折叠蛋白质迁移穿过人工纳米孔进行了采样。<sup>10</sup>然而,对具有固态纳米孔的蛋白质的研究是困难的,因为蛋白质具有不均匀的电荷分布,它们经常吸附到纳米孔表面而且它们太快迁移而不能合适地取样。<sup>10c</sup>进一步地,由于蛋白质具有紧密折叠结构,纳米孔的直径应该与蛋白质的直径相似。<sup>10b</sup>最近,我们已经介绍了作为第一生物纳米孔的来自伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)的溶细胞素A(ClyA),其能够对天然折叠蛋白质进行研究。<sup>7a</sup> ClyA结构对于这项任务是理想的,因为蛋白质例如凝血酶(37kDa)或苹果酸脱氢酶(二聚体,35kDa单体)可在宽的顺式入口(5.5nm,表1)和窄的反式出口(3.3nm,表1)之间被电泳捕获,并可因此采样若干分钟。因为离子电流穿过ClyA对于前庭环境非常敏感,因此人和牛的凝血酶的阻断可以非常容易被识别。<sup>7a</sup>我们的工作是基于ClyA结构,所述ClyA结构中,ClyA-WT(C87和C285)的两个天然半胱氨酸残基被丝氨酸(ClyA-SS)取代。<sup>7a</sup>然而,当与ClyA-WT单体相比时,ClyA-SS单体显示低的水溶解性和低活性(图S1),且在施加的电势高于+60mV或低于-90mV时,ClyA-SS单体在平面脂类双分子层中自发地打开和关闭(门控(gated))。

[0004] 因此,现有技术中仍需要具有对目标分析物的高灵敏度和在电势范围内具有高水溶性和稳定性的纳米孔生物传感器。所述纳米孔生物传感器应具有良好的寡聚性、电压依赖型门控性和在单通道电流记录中的电噪音性能。本发明涉及工程纳米孔,与ClyA-WT和ClyA-SS相比,在所述纳米孔中对天然半胱氨酸残基和其他残基的特定取代赋予了其额外的性质。

## 发明内容

[0005] 本发明的一个方面涉及包含多个亚基的修饰的ClyA孔,其中每个亚基包含由与SEQ ID NO:1至少80%相同的氨基酸序列表示的多肽,其中精确地只有一个Cys残基被Ser取代。在一些实施方式中,Cys残基是C285。在某些实施方式中,修饰的ClyA孔的每个亚基包括至少一个额外的选自L99Q,E103G,F166Y和K294R的氨基酸取代基。例如,每个亚基可以包含由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的多肽。在某些实施方式中,在每个亚基中精确地只有一个Cys残基被Ala取代。在一些实施方式中,修饰的ClyA孔的每个亚基包括至少一个额外的选自L203V和H207Y的氨基酸取代基。例如,每个亚基可以包含由SEQ ID NO:3的氨基酸序列表示的多肽。

[0006] 在一些实施方式中,修饰的ClyA孔包含至少12个亚基。例如,修饰的ClyA孔可以包含12个亚基或者可以包含13个亚基。在某些实施方式中,修饰的ClyA孔具有至少3.5nm的顺式直径。在某些实施方式中,修饰的ClyA孔具有至少6nm的反式直径。在一些实施方式中,当穿过修饰的ClyA孔的电压范围从-60+90到-150mV时,修饰的ClyA孔保持打开。

[0007] 在一些实施方式中,蛋白质分析物结合到修饰的ClyA孔的内腔中。蛋白质分析物可以结合到修饰的ClyA孔的内腔中的多于一个的位点。在一些实施方式中,蛋白质分析物是一种具有15-70kDa分子量范围的蛋白质。

## 附图说明

[0008] 图1显示了由来自大肠杆菌ClyA结构的同源建模构造的伤寒沙门氏菌ClyA纳米孔(PDB:2WCD,90%序列同一性)的条带代表图。<sup>17</sup>在图1a中,1个原体突出显示,其次级结构元素从N至C端用深灰色遮蔽,其它原体以浅灰色交替显示。通过定向进化实验改变的氨基酸的侧链以球形展示。两个天然半胱氨酸残基和苯丙氨酸166被标记。图1b表明了ClyA-SS、ClyA-CS和ClyA-AS相对于ClyA-WT的序列变化。

[0009] 图2显示了ClyA-WT,ClyA-SS和进化的ClyA变体的寡聚化和纳米孔的形成。图2a显示了ClyA纳米孔的寡聚,所述寡聚通过4-20%的BN-PAGE检测。蛋白质(1mg/ml)在负载到凝胶之前用0.5%DDM在室温预孵化30分钟(40μg/泳道)。泳道1:蛋白质梯度,泳道2:ClyA-WT,泳道3:ClyA-SS,泳道4:ClyA-AS,泳道5:ClyA-CS。图1b显示了单一的纳米孔电导分布,其是由ClyA-WT纳米孔(顶部),ClyA-CS纳米孔(中间)和ClyA-AS纳米孔(底部)在0.5%DDM中预寡聚之后的平面脂质双分子层中重新构成的100个纳米孔获得。在-35mV,15mM Tris.(三羟甲基氨基甲烷)HCl,pH 7.5,150mM NaCl中进行记录,温度为28℃。

[0010] 图3显示了62个ClyA-CS纳米孔的单一电导,所述纳米孔是从在4-20%丙烯酰胺BN-PAGE上分离的ClyA-CS的最低(图3a),第二最低(图3b)和第三最低(图3c)的寡聚带中提取出的。ClyA-CS单体在0.5%DDM中预孵化并负载到图2所描述的BN-PAGE上。切除的带被方框框住并在插图上用箭头标注。在-35mV,28℃的pH=7.5的包含150mM NaCl的15mM Tris.HCl中进行记录。

[0011] 图4显示了在三种类型的ClyA-CS纳米孔上由HT引发的电流阻塞。在图4a中,从左到右,穿过I型,II型和III型ClyA纳米孔(灰色),各所述纳米孔的前庭中包含HT(黑)。II型和III型ClyA纳米孔如在补充信息中所述的被建模为13聚体(13mer)(II型)或14聚体(III型)。图4b显示了-35mV时对I型(左),II型(中)或III型(右)ClyA-CS纳米孔的HT阻塞。对I型

和II型ClyA-CS的HT电流阻塞在L1 ( $IRES_{\%}$  分别=56±1和68±1) 和L2 ( $IRES_{\%}$  分别=23±3和31±1) 电流水平之间切换。阻塞持续若干分钟,所以只显示第一秒的电流轨迹。在I型ClyA-CS中,L1最具代表性的电流阻塞(70%),而在II型ClyA-CS中,L2占大多数(96%)。对于III型ClyA-CS纳米孔的HT电流阻塞只显示L2电流水平( $IRES=32\pm9$ )。在-35mV,15mM Tris.HCl,pH=7.5,150mM NaCl中进行记录。应用2000Hz截止值的贝塞尔低通滤波器(Bessel low-pass filter)进行图4b的收集并在10kHz采样,温度为28℃。

[0012] 图5显示了蛋白质穿过I型和II型ClyA-CS纳米孔的迁移。图5a显示了针对I型(空心圆圈)和II型(填充矩形)ClyA-CS纳米孔所确定的HT阻塞停留时间的电压依赖性。由至少50个阻塞的停留时间建立累积分布( $n\leq 3$ )的单指数拟合计算在各电压下的寿命。线表示对实验点的双指数拟合。图5b显示了在-150mV对于I型(左)和II型(右)ClyA-CS纳米孔的HT电流阻塞。所述阻塞只显示两种纳米孔的L2电流水平(对I型和II型ClyA-CS,分别为 $IRES\%=23\pm2$ 和 $31\pm5$ )。图5c显示了在-150mV,I型ClyA-CS的典型HT电流阻塞,其显示出“肩值”和“尖值”的电流特征。在20nM HT存在下在15mM Tris.HCl,pH=7.5、150mM NaCl中进行记录。应用2000Hz截止值的贝塞尔低通滤波器进行图5b中轨迹的收集,并在10kHz采样。应用10Hz截止值的贝塞尔低通滤波器收集C中的轨迹,并在50kHz采样。温度是28℃。误差以标准偏差给出。

[0013] 图6显示了纯化的ClyA单体的表征。a)通过4-20%的丙烯酰胺BN-PAGE检测纯化的ClyA单体的溶解度。各等量份(40μg)的纯化的ClyA单体(无洗涤剂)用约10%甘油和1倍天然PAGETM电泳缓冲液(1x of Native PAGETM Running Buffer)和1倍的阴极缓冲液添加剂(InvitrogenTM)进行补充并被加载到各泳道:泳道1:标记物,泳道2:ClyA-WT,泳道3:ClyA-SS,泳道4:ClyA-CS,泳道5:ClyA-AS。b)ClyA变体的过表达。各等量份的细菌颗粒进行重悬浮,至约100mg/mL的浓度并通过超声处理进行分裂,然后在20000g离心10分钟(4℃),所述细菌颗粒来源于超量表达ClyA变体的过夜培养物。20μL含有ClyA蛋白质的可溶片段(fraction)的上清液被加载到12%的丙烯酰胺SDS-PAGE的泳道2,4,6,8上。通过添加包含15mM Tris.HCl,pH=7.5、150mM NaCl和2%SDS w/v的溶液将裂解的颗粒回到原始体积。20μL这样的溶液被加载到同样12%丙烯酰胺SDS-PAGE的泳道3、5、7和9上。因此,泳道1:蛋白质标记物,泳道2和3:分别为ClyA-SS的上清液和颗粒片段;泳道4和5:分别为ClyA-WT的上清液和颗粒片段;泳道6和7:分别为ClyA-CS上清液和颗粒片段,泳道8和9:分别为ClyA-AS的上清液和颗粒片段。c)溶血性分析。ClyA单体(0.6μM)用100μL的1%马的红细胞悬浮液孵化(最终体积110μL),浊度的减少在650nm(OD650nm)测量。ClyA-WT显示为粗灰线,ClyA-SS以粗黑线显示,ClyA-CS以细黑线显示,ClyA-AS以虚线显示。d)溶血率(以时间的倒数达到50%的浊度而计算)按蛋白质浓度绘图,ClyA-WT(三角形,粗灰色线),ClyA-SS(正方形、粗黑线),ClyA-AS(圆形,虚线)和ClyA-CS(菱形,细黑线)。

[0014] 图7显示了利用4-20%丙烯酰胺BN-PAGE筛分ClyA变体的寡聚反应的实施例。a)第4轮(Round 4),1泳道和2泳道:ClyA-CS,3泳道和4泳道:4ClyA5,5泳道和6泳道:4ClyA3,7泳道和8泳道:4ClyA1,9泳道和10泳道:4ClyA2,11泳道和12泳道:4ClyA6。按图6中的说明并补充0.05%(偶数泳道数)或0.1%(奇数泳道数)SDS而制备样品。SDS用来对抗样品中大量DDM的“拖尾”效应。b)第5轮。泳道1、2:5ClyA2,泳道3:5ClyA1,泳道4:ClyA-AS。样品补充0.05%SDS。通过添加1%DDM引发寡聚反应,ClyA变体利用方法中所描述的Ni-NTA亲和色谱法进行

部分纯化。

[0015] 图8显示了在-35mV电势下,在150mM NaCl,15mM Tris.HCl中,三种类型ClyA纳米孔的噪音特征。从0.5s轨迹获得I型(短划线),II型(点线)和III型(浅灰色实线)ClyA-CS纳米孔在-35mV的电流功率谱密度。在0mV的电流功率谱密度如黑线所示。每条线对应由针对不同的单通道进行的3组记录计算得到的功率谱的平均值。

[0016] 图9显示了HT (a) 和FP (b) 阻塞在I型ClyA-SS孔上的持续时间。利用设置在2kHz的内部贝塞尔低通滤波器以10kHz采样率记录轨迹。每个绘制的值对应于利用至少3个不同的单通道确定的平均值。误差以标准偏差给出。

[0017] 图10显示了-150mV在I型ClyA上的典型的HT电流阻塞,其显示出“肩值”和“尖值”的电流特征。在15mM Tris.HCl、pH=7.5、150mM NaCl中在20nM HT存在下进行记录。利用具有10,000Hz截止滤光片的高斯低通滤波器过滤轨迹,并在50,000Hz进行采样。

[0018] 图11显示了dsDNA(双链DNA)迁移穿过ClyA纳米孔。在电流轨迹的右边,描绘了ClyA(孔形结构)和中性亲和素(neutravidin)(深灰色),且dsDNA显示为黑线。a)来自伤寒沙门氏菌的ClyA的区段穿过性(sections through),来自伤寒沙门氏菌的ClyA通过来自大肠杆菌ClyA结构的同源建模而构成(PDB:2WCD,90%序列同一性)。<sup>22</sup>ClyA以孔的测量值显示,测量值包括原子的范德瓦尔斯半径,和残基103(WT序列中的丝氨酸)在所示孔上的大致位置。b)在+100mV(水平 $I_{0+100}=1.74\pm0.05\text{nA}$ ),0.12 $\mu\text{M}$ 的290bp dsDNA 1添加到ClyA纳米孔的顺式侧引起了短暂的电流阻塞 $I_{\text{RES}}=0.63\pm0.01$ (水平 $1_{+100}=1.10\pm0.03\text{nA}$ , $n=3$ ),这是由于dsDNA迁移穿过所述孔而致。中性亲和素到顺式腔室的添加将所述短暂的电流阻塞转变为更高导电性和持久的电流阻塞 $I_{\text{RES}}=0.68\pm0.01$ (水平 $1_{+100}=1.19\pm0.01$ ),这是由于DNA穿过所述孔而发生局部迁移。开孔电流通过将电势反转到-100mV(红色星号)而恢复。附图显示了典型的瞬时电流阻塞。c)由于在+100mV顺式准轮烷(pseudorotaxane)的形成而产生的电流阻塞的详情展示。d)在-100mV通过dsDNA:中性亲和素的复合物(见上文)从反式侧螺旋化而实现的反式准轮烷的形成(水平 $1_{-100}=1.02\pm0.03\text{nA}$ , $I_{\text{RES}}=0.62\pm0.01$ , $n=4$ )。在22 $^{\circ}\text{C}$ ,在pH=7.5的2.5M NaCl,15mM Tris.HCl中实施电记录。通过采用10kHz贝塞尔低通滤波器并利用20 $\mu\text{s}$ (50kHz)的采样率记录数据。

[0019] 图12显示了纳米孔-DNA轮烷的形成。a)表示用于形成轮烷的DNA分子的杂化。箭头指示链的3'端。b)轮烷形成。在-100mV将复合有中性亲和素(0.3 $\mu\text{M}$ )和寡核苷酸(oligo)4(1 $\mu\text{M}$ )的DNA杂种3(1 $\mu\text{M}$ )添加到反式腔室之后,ClyA-2的开孔电流( $I_{0-100}=-1.71\pm0.07\text{nA}$ , $n=4$ )减少到水平 $1_{-100}=1.1\pm0.04\text{nA}$ ( $I_{\text{RES}}$ 值为 $0.64\pm0.02$ , $n=4$ ),这表明dsDNA从反式侧使所述孔螺旋化。步进达到+100mV(红色星号)生产 $I_{\text{RES}}=0.77\pm0.04$ (水平 $2_{+100}=1.31\pm0.09\text{nA}$ , $n=4$ )的电流阻塞,这表明DNA在正的施加电势下仍占据该孔。水平2最有可能对应于占据所述孔的前庭的ssDNA。连续切换到正的施加电势不能恢复开孔电流(图16),这证实了轮烷的形成是永久性的。c-e)去除轮烷。c)在+100mV,穿过ClyA-2纳米孔的离子电流显示出大量的快的电流阻塞(图15),这表明在所述孔的顺式入口处连接的ssDNA分子瞬时地占据了所述孔的内腔。d)轮烷形成后(图12b),在+100mV纳米孔显示稳定的离子电流(水平 $2_{+100}$ ),这表明单个DNA分子正占据该孔。e)20mM DTT添加到顺式腔室后20分钟,在ClyA孔上面的DNA分子被移除,开孔电流在+100mV时恢复( $I_{0+100}=1.78\pm0.07$ , $n=4$ )。如图11所描述的进行记录。



[0020] 图13显示了对ClyA-CS的ssDNA阻塞。在+100mV, 2 $\mu$ M生物素化的ssDNA (5a) 在0.6 $\mu$ M中性亲和素存在下添加到ClyA-CS纳米孔的顺式一侧, 引起瞬时电流阻塞 ( $1.24 \pm 0.02$  nA,  $I_{\text{RES}} = 0.69 \pm 0.04$ ,  $n=3$ ), 这表明ssDNA可以进入所述孔的内腔, 但只是暂时性的。随后添加互补的ssDNA链 (5b) 将电流阻塞转变成水平 $1_{+100}$ 阻塞 ( $1.22 \pm 0.13$  nA,  $I_{\text{RES}} = 0.67 \pm 0.01$ ,  $n=3$ ), 这表明dsDNA现在可以迁移穿过所述孔的整个长度。

[0021] 图14显示了DNA穿过ClyA纳米孔的转运。a) 表示链置换反应的示意图, 所述链置换反应促进DNA从所述孔的释放。b) 在+50mV且在3 (0.3 $\mu$ M) 存在下, ClyA-2显示了稳定的开孔电流 ( $I_{0+50} = 0.85 \pm 0.01$  nA,  $n=3$ ), 这表明连接到所述孔的ssDNA链没有螺旋穿过所述孔的内腔并阻止dsDNA型溶液的迁移。c) ssDNA链6 (40nM) 添加到顺式腔室产生了持久的 $I_{\text{RES}} = 0.70 \pm 0.02$  (水平 $2_{+50} = 0.59 \pm 0.02$  nA,  $n=5$ ) 的电流阻塞, 这表明dsDNA杂种使所述孔螺旋化。d) 随后将也包含0.3 $\mu$ M中性亲和素的1 $\mu$ M的7添加到反式腔室 (+50mV) 促进了DNA螺旋的释放并恢复了开孔电流。随后, 如多个阻塞电流和开孔电流所示, dsDNA分子顺序地被捕获并释放。为了清楚起见, 附图中未包括中性亲和素。在22 $^{\circ}$ C、pH=7.5的2.5M NaCl和15mM Tris.HCl中进行电记录。通过采用10kHz贝塞尔低通滤波器并利用20 $\mu$ s (50kHz) 的采样率记录数据。对图d中的电流信号在2kHz使用后捕获低通高斯滤波器进行数字滤波。由于在更高的施加电势下, 处于顺式的DNA的捕获非常快, 因此该实验的施加电势设置在+50mV以促进对多个阻塞和释放的观察 (图14d)。

[0022] 图15显示了对比实验的结果, 其显示出图12的所有组分都是形成DNA轮烷所必需的。a) 桥接序列4的缺失会使得ClyA-2和3之间无法进行连接。在-100mV复合物被捕获之后, 在+100mV (星号) 所述复合物容易地被从孔中驱逐出, 正如在+100mV时ClyA-2的开孔电流的典型电流特征所示。b) 当在-100mV被捕获时, 2从孔顶部的缺失 (例如用DTT分裂后) 无法使所述3 • 4DNA杂化以结合到所述孔。在电势反转到+100mV (红色星号) 时, 开孔电流恢复。c) 在+100mV对于ClyA-2纳米孔的典型的电流记录。d) 20秒的a中所示电流轨迹的全点直方图 (5pA面元 (bin) 尺寸)。水平 $I_{0+100} = 1.71 \pm 0.07$  nA, 水平A =  $1.62 \pm 0.12$  nA, 水平B =  $1.43 \pm 0.05$  nA和水平C =  $1.28 \pm 0.06$  nA, 分别对应 $0.94 \pm 0.04$ ,  $0.84 \pm 0.03$ 和 $0.75 \pm 0.03$ 的 $I_{\text{RES}}$ 值。从12个实验计算出的各值可以代表寄宿在ClyA的内腔中的DNA链。

[0023] 图16显示了ClyA-2纳米孔的电流和电压 (IV) 关系, a) 轮烷形成之前 (最浅的灰线) 和之后 (黑线) 的ClyA-2的典型曲线。中度灰色线表示在DNA分子连接到纳米孔之后的该同一纳米孔通过添加DDT被移除。通过施加在4秒内将电压从-100mV转变到+100mV的自动化协议来测量电流记录。b) 从4个实验的平均值计算电流-电压曲线, 该曲线显示出稳态 (1s) 的ClyA-2开孔电流水平 (白球) 和轮烷构型中的ClyA-2开孔电流水平 (黑球)。对于在正偏压和负偏压下的ClyA-2, 从电流-电压曲线的斜率计算的纳米孔的单一电导值是17.1nS, 对于负偏压下的轮烷, 是10.8nS, 对于正偏压下的轮烷, 是13.0nS。轮烷按图12中所述进行制备。

[0024] 图17显示了对于ClyA-CS的dsDNA电流阻塞。在每个电流轨迹的右边, 图案代表了对电流记录的物理解释。a-d) 在不同的施加电势, 用6 • 7杂化 (星号标注) 后的ClyA-2的电流记录。e) 在+50mV, 用6 (40nM) 和2杂化后, 离子电流从 $I_{0+50} = 0.85 \pm 0.01$  nA降到水平 $2_{+50}$ 阻塞 ( $I_{\text{RES}} = 0.70 \pm 0.02$ ), 从而使DNA双链体3 (0.3 $\mu$ M) 被转运穿过所示孔。施加电势反转到-50mV恢复了开孔电流 ( $I_{0-50} = 0.83 \pm 0.00$ )。f) 随后将1 $\mu$ M中性亲和素 (黑色) 添加到反式腔室将DNA螺旋封锁在孔内, 如电势反转至-50mV之后所展示的, 此时观察到孔的阻塞水平

( $I_{\text{RES}} = 0.67 \pm 0.02$ )。

[0025] 图18显示了穿过ClyA-2孔的选择性DNA迁移。a) 左边, 在+50mV, 离子电流穿过ClyA-2纳米孔显示出快速和轻微的电流通阻, 这表明连接在顺式入口处的ssDNA分子可能暂时性的占据孔的内腔。中间, 在dsDNA链1 (50nM) 被添加到顺式腔室之后, 电流信号没有变化, 这表明dsDNA没有使ClyA-2迁移。右边, 在20mM DTT添加到顺式腔室后20分钟, 在ClyA孔上面的DNA分子被移出并所述DNA可以迁移穿过所述孔。b) 与图a中所述相同的实验, 但是在1 $\mu$ M中性亲和素存在下。c) 与图b所述同样的实验, 但是在+100mV。

[0026] 图19显示了ssDNA-dsDNA杂种结构与ClyA-CS孔的相互作用的电压依赖性。a) 图b (左) 和c (右) 描述的实验中所用的DNA分子的介绍。b) 与中性亲和素复合的DNA杂种3 (图a, 左) 在+50mV (左), +70mV (中间) 和+100mV (右) 的电流通阻。c) 与中性亲和素复合的DNA杂种3:6 (图a, 右) 在+50mV (左), +70mV (中间) 和+100mV (右) 的电流通阻。

[0027] 图20显示具有布尔逻辑的链释放。顶部代表OR门, 底部的是AND门。DNA用方向线表示, 其中箭头表示3'端。在同一DNA链内的区段代表DNA域, 所述DNA域用作杂化、分支迁移或解离中的单元。域由字母D后跟数字表示。T代表支点域(toehold domain)。星状域代表与没有星的域的序列互补的域。图14显示了OR门的第一反应的实现。

[0028] 图21显示了DNA穿过ClyA纳米孔的交替转运。a) 通过链置换释放DNA螺旋的示意图, 其显示了如图18中所述的OR门的第二反应的实现。b) 在+35mV的ClyA-2的开孔电流。c) DNA链3 (1 $\mu$ M) 和8 (0.5 $\mu$ M) 添加到顺式腔室产生了持久的电流通阻, 这表明dsDNA杂种正在螺旋化所述孔。d) 随后在+35mV将1 $\mu$ M的9添加到反式腔室促进了DNA螺旋的释放和恢复了开孔电流, 其中该添加也可以包含1 $\mu$ M的中性亲和素。随后, 如电流通阻和开孔电流的循环所示, 其他dsDNA分子被捕获然后再释放。通过采用10kHz低通贝塞尔滤波器并利用20 $\mu$ s (50kHz) 的采样率记录数据。

## 具体实施方式

[0029] 本发明涉及纳米孔生物传感器, 其可以用于多种应用, 包括但不限于蛋白质的检测和定量及DNA的迁移。所述纳米孔是基于形成孔的细菌细胞毒素, 其用作大分子的通道, 所述大分子如蛋白质和核酸。核酸可以包括DNA, 例如单链DNA (ssDNA) 或双链DNA (dsDNA), RNA, 肽核酸和/或核酸类似物。

[0030] 修饰的纳米孔生物传感器

[0031] 本发明的一个方面涉及由修饰的孔蛋白制成的纳米孔生物传感器。例示性孔蛋白包括但不限于溶细胞素, 溶血素, 孔蛋白, DNA包装蛋白, 和动力蛋白。孔蛋白可以是细菌蛋白或病毒蛋白。

[0032] 在某些实施方式中, 修饰的孔蛋白是一种形成孔的细胞毒性蛋白, 例如, 细菌溶细胞素。溶细胞素可以是来自革兰氏阴性细菌如沙门氏菌或大肠杆菌 (*E. coli*) 的溶细胞素A (ClyA)。在一些实施方式中, 修饰的溶细胞素是来自伤寒沙门氏菌 (*S. typhi*) 或副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi*, *S. paratyphi*) 的修饰的ClyA。在一些实施方式中, 修饰的ClyA孔包含多个亚基, 其中每个亚基包含由与SEQ ID NO:1至少80%相同的氨基酸序列表示的多肽。在某些实施方式中, 亚基由与SEQ ID NO:1至少85%相同, 90%相同, 95%相同或100%相同的氨基酸序列表示。所述相同可以指氨基酸同一性, 或也可以指结构和/或功能

同一性。因此,与SEQ ID NO:1相比,可以取代,删除,和/或添加一个或多个氨基酸。修饰可以改变孔内腔,以改变孔的尺寸、结合性和/或结构。修饰也可以改变内腔外面的ClyA孔。

[0033] 在某些实施方式中,每个亚基包含由与SEQ ID NO:1至少80%相同的氨基酸序列表示的多肽,其中精确地只有一个Cys残基被Ser取代。每个亚基可以由与SEQ ID NO:1至少85%,90%,95%,96%,96%,98%或99%相同的氨基酸序列表示,另外,精确地只有一个Cys残基可以被Ser取代。所述Cys残基可以是SEQ ID NO:1中的Cys87和/或Cys285。在一些实施方式中,Cys残基是Cys285。其他的氨基酸残基可以被例如与其具有相似性质如结构、电荷、疏水性或亲水性的氨基酸取代。在某些实施方式中,被取代的残基是L99,E103,F166和K294中的一个或多个。例如,被取代的残基可以是L99Q,E103G,F166Y和K294R中的一个或多个。一个例示的亚基可以包含取代基L99Q,E103G,F166Y,K294R和C285S。因此,每个亚基可以包含由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的多肽。一个例示的含有下述亚基的修饰的ClyA孔被称为ClyA-CS:其中精确地只有一个Cys残基被Ser取代。

[0034] 修饰的ClyA孔可以包含多个亚基,其中每个亚基包含由与SEQ ID NO:1至少80%相同的氨基酸序列表示的多肽,其中精确地只有一个Cys残基被Ala取代。Cys残基可以是Cys87或Cys285。每个亚基可以由与SEQ ID NO:1至少85%,90%,95%,96%,96%,98%或99%相同的氨基酸序列表示,并且精确地只有一个Cys残基可以被Ser取代和/或精确地只有一个Cys残基可以被Ala取代。在一些实施方式中,每个亚基由与SEQ ID NO:1至少85%,90%,95%,96%,96%,98%或99%相同的氨基酸序列表示,并且,另外精确地只有一个Cys残基可以被Ser取代且精确地只有一个Cys残基可以被Ala取代。其他的氨基酸残基可以被例如与其具有相似性质如结构、电荷、疏水性或亲水性的氨基酸取代。在某些实施方式中,被取代的残基是L99,E103,F166,K294,L203和H207Y中的一个或多个。例如,被取代的残基可以是L99Q,E103G,F166Y,K294R,L203V和H207Y。一个例示的亚基可以包括L99Q,E103G,F166Y,K294R,L203V,H207Y和C285S。因此,每个亚基可以包含由SEQ ID No:3的氨基酸序列表示的多肽。一个例示的包含下述亚基的修饰的ClyA孔可以称为ClyA-CS:其中精确地只有一个Cys残基被Ser取代且精确地只有一个Cys残基被Ala取代。

[0035] 本发明进一步涉及编码所述修饰的ClyA孔的核酸。在一些实施方式中,编码修饰的ClyA孔的核酸由与SEQ ID No:4至少80%,90%,95%,96%,96%,98%或99%相同的核苷酸序列表示。核酸可以由SEQ ID No:5或SEQ ID No:6表示。核苷酸序列可以是在合适宿主,例如大肠杆菌中针对表达而优化的密码子。

[0036] 修饰的ClyA孔可以具有至少3nm直径的孔内腔,例如,直径测量值可以是3nm,3.5nm,4nm,4.5nm,5nm,5.5nm,6nm,6.5nm,7nm,或者更大。孔内腔的大小可以取决于待被修饰的ClyA孔检测的分析物。孔内腔的顺式直径可以是至少3.5nm和/或ClyA孔的反式直径可以是至少6nm。一般来说,顺式是指添加有分析物的修饰的ClyA孔的末端;而反式是指分析物迁移穿过孔内腔的长度离开时所通过的修饰的ClyA孔的末端。在人工脂质双分子层中,例如,孔的反式末端可以插入到脂质双分子层中,而孔的顺式末端保持在脂质双分子层的同一侧。因此,孔的顺式直径是孔的顺式末端处开口的直径,分析物添加到所述开口;而孔的反式直径是孔的反式末端处开口的直径,分析物从所述开口离开。

[0037] 孔内腔的大小也取决于在修饰的ClyA孔中的亚基数量。例如,由13或14个亚基构成的大孔可以具有比由7个亚基构成的孔更大的内腔。在一些实施方式中,修饰的ClyA孔包

含12个或更多的亚基。在某些实施方式中,修饰的ClyA孔包含12个亚基。在某些实施方式中,修饰的ClyA孔包含13个亚基,或包含14个亚基。所述亚基可以依据其氨基酸序列优先组装成12聚体和/或13聚体。在一些实施方式中,每个亚基包含如本文所公开的多肽。在单个修饰的ClyA孔中,每个亚基可以是相同的,或者亚基可以是不同的,所以在修饰的ClyA孔中的亚基可以包括与在相同修饰的ClyA孔中的其他多肽亚基的序列不同的序列。在某些实施方式中,本文公开的修饰的ClyA孔,如ClyA-CS孔,根据亚基组成可以形成多于一个的亚型。例如,根据亚基,修饰的ClyA-CS孔可以有至少2种或3种不同亚型(即I型,II型,III型)。与其他亚型相比,每个亚型可以有不同的电导测量。亚型可以由具体多肽序列的亚基优先形成。

[0038] 与在自然界中发现的野生型ClyA孔相比,特定残基的取代基可以赋予修饰的ClyA孔新的性质。在特定电压下,孔的电压依赖性的打开和关闭(门控)是1种性质。在平面脂质双分子层中,例如,在施加电势高于+60mV或低于-90mV时,ClyA-SS自发地打开和关闭。在一些实施方式中,本文所述的修饰的ClyA孔在穿过该孔的电压(即穿过其中有所述修饰的ClyA孔的膜的电压)范围为+90mV到-150mV时保持打开。因此,当穿过孔的电压保持在+90,+85,+80,+75,+70,+65,+60,+55,+50,+45,+40,+35,+30,+25,+20,+15,+10,+5,0,-5,-10,-15,-20,-25,-30,-35,-40,-45,-50,-60,-65,-70,-75,-80,-85,-90,-95,-100,-110,-115,-120,-125,-130,-135,-140,-145,-150mV,和/或穿过孔的电压调整到+90mV到-150mV(包含)之间或在此之间的任何子范围电压时,修饰的ClyA孔可以保持打开。在某些实施方式中,与信号(即测量的电流阻塞)相比,修饰的ClyA孔显示出低电噪音。因此,当使用如本文所述的孔时,修饰的ClyA孔的固有的噪音减少了。在-35mV在150mM NaCl,15mM Tris·HCl,pH 7.5条件下,一个例示的修饰的ClyA孔显示出1.5pA rms到3pA rms的噪音测量值。值得注意的是,可以在测量电流阻塞过程中,通过增加盐浓度和/或改变时间的长度,来减少噪音。

[0039] 在一些实施方式中,修饰的ClyA孔显示了不同于野生型ClyA孔的溶解性质。例如,修饰的ClyA孔的单体可以溶于水和/或不存在表面活性剂如SDS或DDM的其他溶液中。稳定的寡聚体是这样的修饰的ClyA孔:其能够承受穿过插入有所述修饰的ClyA孔的膜或脂质双分子层而施加的+150mV到-150mV的电压。

[0040] 具有配体的纳米孔

[0041] 本发明的另一方面涉及其中修饰的ClyA孔蛋白与具有选择性结合性质的配体结合的纳米孔生物传感器。在一些实施方式中,这些修饰的孔和配体用来识别复杂生物样品中,例如组织和/或体液中的蛋白质分析物。与样品的其他组分相比,所述目标蛋白质分析物可以以低浓度存在。在一些实施方式中,配体还可用于基于分析物的构造或功能性质靶向大分子分析物的亚群。配体的存在可以增加目标蛋白质分析物与修饰的孔的联系。例如,在孔的入口处,配体可以用作选择性过滤器,提高对目标蛋白的捕获,同时拒绝样品中的其他非目标蛋白。

[0042] 例示的配体包括但不限于结合到目标蛋白的适配子,抗体,受体,和/或肽。在一些实施方式中,配体可以是目标蛋白的抑制剂,抑制目标蛋白到修饰的ClyA孔的结合。

[0043] 在某些实施方式中,结合到目标蛋白质分析物的配体在前文所述的检测步骤之前添加到样品中。这一步骤可以为目标蛋白质分析物的存在提供附加确认。因此,用于检测样

品中至少一种目标蛋白的方法可以包括 (a) 使所述样品与结合到目标蛋白的配体接触; (b) 使所述样品与本文所公开的修饰的ClyA孔接触; (b) 穿过所述修饰的ClyA孔施加电势; (c) 测量在一个或多个时间间隔穿过所述修饰的ClyA孔的电流; 和 (d) 比较在一个或多个时间间隔测量的电流与参考电流, 其中相对于参考电流的电流变化表明样品中存在目标蛋白。此外, 电流中的变化可以与在测量穿过所述修饰的ClyA孔的电流之前, 没有与配体接触过的样品比较。如果目标蛋白质分析物确实是存在的, 配体的添加将抑制目标蛋白结合到修饰的ClyA孔, 且不会检测到电流阻塞。相反, 当不添加配体时, 将检测到电流阻塞。将两种结果综合, 可以确定目标蛋白的存在和浓度。例如, 在一个给定的包含许多不同的蛋白质的样品中——所述蛋白质包括目标蛋白质分析物, 样品最初可以每秒给出X个阻塞。当添加过量的特定配体后, 所述样品可以每秒给出 (X-n) 个阻塞。因此, n可以反映每秒由原始样品中的目标蛋白质分析物产生的阻塞, 反过来, 这可以提供关于原始样品中的目标蛋白质分析物的浓度的信息。

[0044] 在某些实施方式中, 可以改变穿过修饰的ClyA孔而施加的电势。例如, 穿过修饰的ClyA孔施加的电势范围可从-90mV到+90mV。所述电势可以是-90mV, -85mV, -80mV, -75mV, -70mV, -65mV, -60mV, -55mV, -50mV, -45mV, -40mV, -35mV, -30mV, -25mV, -20mV, -15mV, -10mV, 5mV, 0mV, +5mV, +10mV, +15mV, +20mV, +25mV, +30mV, +35mV, 40+mV, +45mV, +50mV, +55mV, +60mV, +65mV, +70mV, +80mV, +85mV, 和/或+90mV。对于每个电势, 其电流可以测量并与一个或多个参考电流进行比较。在一些实施方式中, 参考电流在打开的、未阻塞的孔中测量。在一些实施方式中, 参考电流在与已知的蛋白质 (例如, 其存在与否可在溶液中确定的蛋白质) 结合的修饰的ClyA孔中测量。

[0045] 在一些实施方式中, 本文所述的修饰的ClyA孔可以与一个或多个适配子共轭。当多于一个的适配子共轭时, 所述适配子可以是相同的适配子或可以是不同的适配子。所述一个或多个适配子可以与修饰的ClyA孔中的Cys残基共轭。在一些实施方式中, 修饰的ClyA孔包含Cys残基代替孔中的另一个氨基酸残基。这种Cys残基取代可以与相对于野生型孔蛋白所做的其他氨基酸的取代、删除和/或添加结合。例如, 可以设计孔内腔中的修改, 以改变孔的尺寸、结合性质和/或结构。在一些实施方式中, Cys残基被其他氨基酸如丝氨酸残基取代。修饰的孔蛋白可以是包含多个亚基的孔, 例如, 12个亚基, 其中至少一个亚基包含修饰的氨基酸。在某些实施方式中, 修饰的ClyA来自革兰氏阴性细菌如沙门氏菌或大肠杆菌 (*E.coli*)。在一些实施方式中, 修饰的溶细胞素是来自伤寒沙门氏菌 (*S.typhi*) 伤寒或副伤寒沙门氏菌 (*S.paratyphi*) 的修饰的ClyA。在一些实施方式中, 修饰的ClyA孔包括12个亚基, 每个亚基包含SEQ ID No:2中所示的序列。

[0046] 适配子可以是包含DNA, RNA, 和/或核酸类似物的核酸适配子。适配子可以是肽适配子, 例如, 包含两末端连接至骨架 (scaffold) 的可变肽环的肽适配子。可以选择适配子与特定的目标蛋白质分析物结合。在某些实施方式中, 两个或多个适配子与相同修饰的ClyA孔共轭。例如, 5、6、7、8或9个适配子可以与修饰的ClyA孔共轭。或者, 10、11或12个适配子可以与修饰的ClyA孔共轭。如果多于一个的适配子与修饰的ClyA孔共轭, 则适配子可以设置为至少间隔2nm。

[0047] 在某些实施方式中, 本文所描述的修饰的ClyA孔与一个或多个肽配体相结合。肽配体可以通过二硫键, 交联, 和/或化学连接而连接至修饰的ClyA孔。修饰的ClyA孔也可以

设计为融合蛋白,其中一个或多个肽配体融合到修饰的ClyA孔的至少一个亚基。在一些实施方式中,修饰的ClyA孔结合多于一个的肽配体。所述肽配体可以是相同的配体或可以是不同的配体。例示的肽配体包括,但不限于,结合到目标蛋白的受体,抗体,抑制剂,活化剂和/或其他肽配体。

[0048] 目标分析物

[0049] 1. 蛋白质分析物

[0050] 在一些实施方式中,修饰的ClyA孔蛋白被设计成,允许蛋白质分析物结合到孔的内腔中。这种结合介导强的、可再现的电流阻塞,容易与在未结合的孔中测量的未阻塞的离子电流相区别。所述蛋白质分析物的分子量的范围可以为15-70kDa,例如,例示的蛋白质分析物可以具有15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65或70kDa的分子量。分析物可以是较小蛋白质的二聚体或其他多聚体。

[0051] 在一些实施方式中,修饰的ClyA孔蛋白包括蛋白质分析物的多于一个的结合和/或停留位点。例如,修饰的ClyA孔蛋白可以包括两个位点:水平2可以与蛋白质分析物在深的、更多空间受限位点处的停留相关,而水平1可以与蛋白质分析物在接近孔的较宽顺式入口位置处的停留相关。蛋白质分析物可以在两个位点之间移动,从而在同一电流阻塞事件中得出两个电流水平。因此,在结合蛋白质分析物时,修饰的ClyA孔蛋白可以提供多于一个(即2个)的电流水平测量值。

[0052] 在一些实施方式中,文中描述的修饰的ClyA-CS孔能够检测和定量蛋白质分析物。修饰的ClyA孔可以区分相同蛋白质的同系物,例如牛凝血酶和人类凝血酶。

[0053] a. 蛋白质的检测和识别

[0054] 本发明的另一个方面涉及样品中特定蛋白质的检测。在一些实施方式中,用于检测样品中至少一种蛋白质分析物的存在的方法包括(a)使所述样品与本文公开的修饰的ClyA孔接触;(b)穿过所述修饰的ClyA孔施加一个或多个电势;(c)在一个或多个电势中的每一个电势下,测量穿过所述修饰的ClyA孔的电流;和(d)比较测量的电流与参考电流,其中电流相对于参考电流的变化表明样品中存在所述蛋白质分析物。在一些实施方式中,电流的变化是电流减少。在一些实施方式中,目标蛋白的分子量范围为15-50kDa,例如,分子量是15、20、25、30、35、40、45或50kDa。参考电流可以是在不存在配体的情况下测得的穿过修饰的ClyA孔的电流,和/或在参考配体的存在下测得的穿过修饰的ClyA孔的电流。在一些实施方式中,参考配体和蛋白质分析物是相同的。在某些实施方式中,参考配体和蛋白质分析物至少75%,80%,85%,90%或95%相同。因此,在一些实施方式中,用于识别样品中的蛋白质分析物的方法包括(a)使所述样品与本文所述的修饰的ClyA孔接触;(b)穿过所述修饰的ClyA孔施加一个或多个电势;(c)在一个或多个电势中的每一个电势下,测量穿过所述修饰的ClyA孔的电流;和(d)比较测量电流与来自已知配体的一个或多个参考电流,其中测量电流与参考电流之间相匹配表明蛋白质分析物与所述已知配体是相同的。类似地,测量电流与参考电流之间不匹配可以表明,蛋白质分析物与所述已知配体是不相同的。

[0055] 在一些实施方式中,与野生型孔蛋白相比,修饰的ClyA孔包括氨基酸的取代,删除和/或添加。例如,可以设计孔内腔中的修饰以改变孔的大小,结合性质和/或结构。在一些实施方式中,Cys残基被其他氨基酸如丝氨酸残基取代。修饰的孔蛋白可以是包含多个亚基的孔,例如,7至11个亚基,12个亚基,13个亚基,或者14个亚基,其中至少一个亚基包含修饰

的氨基酸。在某些实施方式中,修饰的ClyA来自革兰氏阴性细菌如沙门氏菌或大肠杆菌(E.coli)。在一些实施方式中,修饰的溶细胞素是来自伤寒沙门氏菌(S.typhi)或副伤寒沙门氏菌(S.paratyphi)的修饰的ClyA。在一些实施方式中,修饰的ClyA孔包括12个亚基,每个亚基包含SEQ ID No:1中所示的序列。

[0056] 在某些实施方式中,穿过修饰的ClyA孔施加不同的电势。例如,穿过修饰的ClyA孔施加的电势的范围可以从-90mV到+90mV。电势可以是-90mV,-85mV,-80mV,-75mV,-70mV,-65mV,-60mV,-55mV,-50mV,-45mV,-40mV,-35mV,-30mV,-25mV,-20mV,-15mV,-10mV,-5mV,0mV,+5mV,+10mV,+15mV,+20mV,+25mV,+30mV,+35mV,+40mV,+45mV,+50mV,+55mV,+60mV,+65mV,+70mV,+80mV,+85mV,和/或+90mV。在每个电压下,可以测量电流并与一个或多个参考电流比较。在一些实施方式中,参考电流在打开的、未阻塞的孔中测量。在一些实施方式中,参考电流在结合至已知蛋白的修饰的ClyA孔中测量,所述已知蛋白例如,其存在与否可在溶液中确定的蛋白。

[0057] 在某些实施方式中,与打开的、为阻塞的孔相比,蛋白质分析物与修饰的ClyA孔之间的相互作用引起了电流阻塞。电流阻塞的幅值可以作为开孔电流的残余电流百分比( $I_{RES}$ )而被测量。在一些实施方式中,特征性的电流阻塞用于识别特定的蛋白质分析物。例如,电流阻塞可以是短的,快速的电流尖值。电流阻塞可以是瞬时的,或者可以持续超过1分钟。电流阻塞可以是浅的或可以是深的。浅的电流水平可以由约41-100%的 $I_{RES}$ 值表示,表明目标蛋白质分析物留下了约为开孔电流的41%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%或100%的残余电流。相反,深的电流水平可以由约0-40%的 $I_{RES}$ 值表示,表明目标分析物留下了约为开孔电流的0%,5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%或40%的残余电流。在一些实施方式中,电流阻塞包含多于一个的电流水平,例如,电流阻塞可以包含浅的电流水平和深的电流水平。在一个例示的修饰的ClyA孔中,目标分析物可以引发 $I_{RES}$ 值约为70%的第一电流阻塞和 $I_{RES}$ 值约为15%的第二电流阻塞。在某些实施方式中,通过来自蛋白质分析物的浅的和深的电流水平与来自参考配体的浅的和深的电流水平的比较来确定蛋白质分析物的存在和/或其同一性。可以比较浅的和深的电流水平之间的相互转换,例如,可以比较 $I_{RES}$ 值,可以比较浅的和深的电流水平之间的转换率,可以比较浅的和深的电流水平的相对持续时间,和/或可以比较浅的和深的电流水平的数量。

[0058] 对任何目标蛋白质分析物,当穿过修饰的ClyA孔的电压变化时,浅的和/或深的电流水平的百分比也可以变化。浅的和/或深的电流水平的分布可以依据目标蛋白质分析物而不同。因此,在一些实施方式中,两个或多个目标分析物根据它们的电流水平测量值而彼此相区别。两个或多个目标蛋白质分析物可以通过它们的电流阻塞的强度和持续时间和/或通过它们的电流水平分布来区别。例如,当增强穿过孔的电压时,第一蛋白可以显示出浅电流水平百分比的大幅度减少,而第二蛋白可以显示更多的逐步减少。

[0059] 在某些实施方式中,两个或多个目标蛋白质约95%,90%,85%,80%,75%或70%相同。在某些实施方式中,两个或多个目标蛋白质或它们的亚基约65%,60%,55%,50%或45%相同。在一些实施方式中,两个或多个目标蛋白质是相同的蛋白质的物种特异形式。

## [0060] 2. 核酸的迁移

[0061] 本发明的一个方面是能够结合、检测、识别、迁移核酸和/或调整核酸的转运的修饰的ClyA孔。迁移穿过修饰的ClyA孔的核酸包括但不限于可以或不可以携带转译后修饰

(如甲基化)的DNA;RNA诸如转移RNA(tRNA),信使RNA(mRNA),核糖体RNA(rRNA),小干扰RNA(siRNA),微小RNA(miRNA),小核仁RNA(snoRNA)、小核RNA(snRNA),细胞外RNA(exRNA),Piwi相互作用RNA(piRNA),以及任何非编码RNA(ncRNA)。核酸类似物如2'-O-甲基取代RNA,锁核酸(LNA),吗啉代,和肽核酸(PNA),双脱氧核苷酸等。

[0062] 在某些实施方式中,修饰的ClyA孔被设计为用于迁移DNA例如ssDNA或dsDNA。虽然由于来自内腔中带负电荷残基的排斥电荷,特别是ssDNA在生理盐条件下可能不能进入修饰的ClyA孔,但是在高离子强度条件下,DNA迁移穿过本文所述的修饰的ClyA孔。在一些实施方式中,高离子强度条件是2.5M NaCl溶液(或等效于2.5M NaCl溶液的离子强度)。在某些实施方式中,高离子强度条件是高于2.5M氯化钠的离子强度,例如,高离子强度条件可以是2.75M,3M,3.25M,3.5M,3.75M,4M,4.25M,4.5M,4.75M,或5M NaCl溶液(或可以等效于上述NaCl溶液的离子强度)和/或可以是(或可以等效于)2.75M,3M,3.25M,3.5M,3.75M,4M,4.25M,4.5M,4.75M或5M KCl溶液。排布在ClyA孔的内腔中的带负电荷的残基可以在这些条件下进行筛选。例如,在+100mV,在pH值为7.5的2.5M NaCl,15mM Tris-HCl中,将dsDNA添加到本文所述的修饰的ClyA孔时,由于dsDNA迁移穿过所述孔,可以产生短暂的电流阻塞。如本文所示,在这些条件下dsDNA迁移穿过修饰的ClyA孔。此外,ssDNA可以迁移穿过修饰的ClyA孔,例如在高离子强度条件下和/或在折叠结构中。ssDNA可以以与dsDNA不同的速度迁移穿过修饰的ClyA孔。

[0063] 因此,本发明的一个方面是用于迁移DNA的方法,例如dsDNA穿过能够迁移DNA的修饰的ClyA孔,所述方法包括以下步骤:获得本文所述的修饰的ClyA孔,施加至少+50mV的电压穿过所述修饰的ClyA孔,将包含DNA的样品添加至所述修饰的ClyA孔的顺式开口,测量流经所述孔的电流。电流阻塞表明DNA发生迁移。通过将电势反转为负电势如-100mV或-50mV可以恢复电流。在一些实施方式中,修饰的ClyA孔在高离子强度条件下使用。

[0064] 在一些实施方式中,用于迁移DNA的修饰的ClyA孔包含本文所述的修饰的ClyA孔。所述修饰的ClyA孔可以设计成用于迁移核酸。例如,所述修饰的ClyA孔可以包含至少12个亚基,其中每个亚基包含由与SEQ ID NO:1至少80%相同的氨基酸序列表示的多肽,其中精确地只有一个Cys残基被Ser取代。每个亚基可以由与SEQ ID NO:1至少85%,90%,95%,96%,96%,98%或99%相同的氨基酸序列表示,另外,精确地只有一个Cys残基可以被Ser取代。所述Cys残基可以是SEQ ID NO:1中的Cys87和/或Cys285。在一些实施方式中,Cys残基是Cys285。其他的氨基酸残基可以被例如与其具有相似性质如结构、电荷、疏水性或亲水性的氨基酸取代。在某些实施方式中,被取代的残基是L99,E103,F166,K294中的一个或多个。例如,被取代的残基可以是L99Q,E103G,F166Y和K294R中的一个或多个。因此,每个亚基可以包含由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的多肽。一个例示的包含下述亚基的修饰的ClyA孔可以被称为ClyA-CS:其中精确地只有一个Cys残基被Ser取代。

[0065] 在一些实施方式中,在固定的跨膜电势下,修饰的ClyA孔识别并伴随特定的DNA分子穿过生物膜。反应机理可以是基于DNA链的置换。例如,一部分DNA可以与纳米孔共轭,以便通过DNA链的置换反应,转运选择的DNA分子穿过所述纳米孔。在某些实施方式中,所述修饰的ClyA孔包括至少12个亚基,其中每个亚基包含C87S,C285S和D103C取代基,并且每个亚基与寡核苷酸共轭。因此,在一些实施方式中,用于迁移dsDNA的方法包含:(a)获得包含至少12个亚基的修饰的ClyA孔,其中每个亚基包含C87S,C285S和D103C取代基并与寡核苷酸



共轭；(b) 施加+50mV的电压穿过本文所述的修饰的ClyA孔，(c) 将包含dsDNA的样品添加至所述修饰的ClyA孔的顺式开口，(d) 将第一单链核酸添加至所述修饰的ClyA孔的顺式开口，所述第一单链核酸包含(i) 与和所述ClyA孔共轭的寡核苷酸的至少15个核碱基互补的序列，和(ii) 与双链DNA的至少12个核碱基互补的序列；测量穿过修饰的ClyA孔的电流，其中步骤(d)之后的电流降低表明双链DNA穿过所述修饰的ClyA孔发生迁移。

[0066] 在一些实施方式中，所述方法可选地包括将第二单链核酸添加至修饰的ClyA纳米孔的反式开口，所述第二单链核酸包含与第一单链核酸互补的序列。在这里，在第二单链核酸添加至修饰的ClyA纳米孔的反式开口之后，穿过修饰的ClyA孔的电流增加，表明双链DNA已经完全迁移穿过所述孔。

[0067] 本发明的另一方面涉及用于迁移DNA的装置，包括：充满流体的腔室，其由膜分隔成第一腔室和第二腔室；能够施加穿过所述膜的电势的电极；插入所述膜中的一个或多个纳米孔；在所述膜的1个腔室中的高离子强度溶液，其中DNA从第一腔室迁移穿过所述纳米孔到第二腔室。在某些实施方式中，DNA是双链DNA。纳米孔可以是ClyA孔，例如，本文所述的修饰的ClyA孔。所述孔，如修饰的ClyA孔，可以具有至少2.2nm的内径。在一些实施方式中，所述膜是人工脂质双分子层。在一些实施方式中，穿过膜的电势的范围从-100mV到+100mV。高离子强度溶液可以包含2.5M NaCl。

#### [0068] 实施例

[0069] 上文已提出了总的发明，下面的实施例帮助说明该总的发明。所包括的这些具体的实施例仅仅是为了说明本发明的某些方面和实施方式，它们并不意在限制任何方面。然而，在实施例中描述的某些一般原则，通常可以适用于本发明的其他方面或实施方式。

#### [0070] 实施例1. 通过定向进化调谐ClyA的性质

[0071] 使用用于剪切具有所需性质的酶的定向进化方法来改善ClyA-SS的活性，原因是能补偿C87S和C285S取代基的有害影响的突变也会增加所述纳米孔在脂质双分子层中的稳定性。通过易错PCR(每轮每个基因约1-4个突变)在ClyA-SS的背景下产生随机库并且针对溶血活性筛选所述随机库(图6)。然后通过Ni-NTA亲和色谱法纯化最活跃的变体并用该变体通过BN-PAGE检测寡聚体的形成(图7)。针对所需的性能(低电噪音和在高施加电势下保持打开的能力)，挑选的纳米孔变体最终在平面脂质双分子层中进行筛选，所述所需的性能作为选择的最终和关键标准。短短4轮筛选后，ClyA-CS变体被分离出来(表1)，其显示出低电噪音(图8)，并在+90到-150的电势下在平面脂质双分子层中保持打开。值得注意的是，在位置87的丝氨酸转换回半胱氨酸，所述半胱氨酸是野生型基因中的原始残基。为了获得适于进行位点特异性化学修饰的半胱氨酸更少的ClyA变体，ClyA-CS在位置87进行饱和诱变，筛选生成的库，并选择具有所需电性能(SI)的半胱氨酸更少的ClyA-AS。与ClyA-SS相比，在可溶片段的大肠杆菌细胞中(图6)和单体中表达的进化的ClyA纳米孔可以通过亲和色谱法进行进一步纯化，这使产量增加了十倍(每10ml培养液约0.6mg)。

#### [0072] 实施例2. 分离具有不同尺寸的ClyA纳米孔

[0073] ClyA寡聚体，由具有0.5%w/v $\beta$ -十二烷基麦芽糖苷(DDM)的ClyA单体孵化而成，在BN-PAGE上显示多个带(图2a)，这表明ClyA可能装配成了几个寡聚体状态。这是特别吸引人的，因为大肠杆菌ClyA寡聚化的确切化学计量是有争议的。ClyA晶体结构(PDB\_ID:2WCD)显示了一个在顺式侧具有5.5nm的开口且在反式入口具有3.3nm的开口(包括氨基酸侧链的范

德瓦尔斯半径)的十二聚体,而早期的冷冻电镜结构显示的是具有 $8^{11}$ 或 $13^{12}$ 个亚基的纳米孔。

[0074] 在平面脂质双分子层中,用DDM预孵化的ClyA-WT显示出开口纳米孔电导跨度大约2nS的宽分布(图2b,顶部),这表明在脂质双分子层中ClyA-WT也可以组装成不同大小和/或几何形状的纳米孔。ClyA-WT单一电导(I型ClyA)分布的主峰仅代表了24%的重组纳米孔并在1.7到1.9nS电导范围中显示出 $1.83 \pm 0.06$ nS的平均电导(-35mV, 15mM Tris.HCl, pH值7.5和150mM NaCl)。ClyA-CS开孔电导的分布显示了两个主峰:第一个包含37%的重组纳米孔,与I型ClyA-CS对应( $1.79 \pm 0.05$ nS);而第二个(II型ClyA-CS)包含23%的纳米孔并显示 $2.19 \pm 0.09$ nS的平均电导(电导范围从2.1-2.4nS,图2b,中间)。ClyA-WT和ClyA-AS也显示了小百分比的II型ClyA(分别为18%和16%)。ClyA-AS的单一电导尤其与对应I型ClyA的52%的重组纳米孔一致(图2b,底部)。

[0075] 为了确定ClyA寡聚体的不同带是否与不同尺寸的纳米孔对应,从BN-PAGE中三个主要的寡聚体带中提取ClyA-CS,对62个纳米孔的单一开孔纳米孔电导进行测量,所述62个纳米孔源自凝胶萃取起两天内的每个带。来自最低带的62%的ClyA-CS寡聚体形成I型ClyA-CS纳米孔( $1.78 \pm 0.04$ nS,图3a),而68%的从第二最低带提取的纳米孔(图3b)重组为II型ClyA-CS纳米孔( $2.19 \pm 2.19$ nS)。感兴趣的是,42%的从第三带提取的纳米孔在脂质双分子层中重组为第三类型纳米孔(III型ClyA),其在2.5-3.0nS电导范围内显示出 $2.81 \pm 0.11$ nS的平均电导(图3c)。

[0076] 综上所述,这些结果表明,在BN-PAGE中观察到的ClyA寡聚体的三个主要带对应于三个不同的具有不同尺寸和不同单一电导的纳米孔类型。这一发现与高阶对称寡聚体结构相对于亚基化学计量经常是自由的<sup>13</sup>这一报道相一致。因此可以推测,I型ClyA最有可能代表晶体结构的12聚体,而II型ClyA可能是在早期冷冻电镜研究中观察到的13聚体。这两种纳米孔都显示了低电噪音(图8)并在宽的施加电势(+90mV到-150mV)范围内保持打开。III型ClyA-CS纳米孔,其显示高于I型和II型纳米孔(图8)的噪音,并经常打开和关闭尤其是在施加的电势低于-40mV和高于+50mV时;所述III型ClyA-CS纳米孔可以对应于之前未观察到的ClyA的14聚体的变体。

[0077] 实施例3. HT作为分子卡尺以测试不同尺寸的ClyA纳米孔

[0078] 使用具有相同氨基酸组成但不同尺寸的纳米孔的能力是生物纳米孔领域的新特性,所述能力是很重要的,因为纳米孔的尺寸限制了其捕获和研究特定分子的能力<sup>10b,14</sup>。之前已经揭示了<sup>7a</sup>, -35mV, HT(人类凝血酶, 37kDa)对于I型ClyA-SS纳米孔造成了非常明确的电流阻塞,其持续了几分钟。阻塞信号在两个电流水平,水平1(开孔纳米孔电流百分比( $I_{RES\%}$ ) =  $56 \pm 1\%$ )和水平2( $I_{RES\%}$  =  $23 \pm 1\%$ ,表1和图4a)之间迅速切换,这反映出HT在ClyA纳米孔的内腔中的两个停留位点。水平2最有可能与HT在深的位点处的停留相关,而水平1与HT在接近纳米孔的顺式入口处的停留相关。<sup>7a</sup>因为凝血酶引起这样非常明确的电流阻塞图案,因此本文使用HT作为分子卡尺来比较不同ClyA纳米孔的几何图形。

[0079] -35mV, HT对I型ClyA-CS纳米孔的电流阻塞与对I型ClyA-SS纳米孔的电流阻塞是相同的(表1),这证实了本文公开的变体中累积的突变最不可能改变ClyA纳米孔的尺寸和几何形状。HT对II型ClyA的电流阻塞也在两个电流水平之间切换,但它们的相对分布是不同的。在I型ClyA-CS中,HT主要停留在更靠近表面的结合位点处(占有率70%),而在II型

ClyA-CS中,HT优选的结合位点在纳米孔内更深处(占有率96%)。这些结果表明,这两种ClyA类型最有可能保持相似的整体纳米孔结构但对HT提供了不同的立体位阻。HT对III型ClyA的阻塞较快( $55 \pm 48\text{ms}$ ),并只显示水平2的电流阻塞( $I_{\text{RES}}\%$ 为 $32 \pm 9\%$ ),这表明III型ClyA足够大,允许HT无位阻地迁移穿过纳米孔(见下文)。

#### [0080] 实施例4. 蛋白质穿过ClyA纳米孔的迁移

[0081] 凝血酶是一种球状蛋白,其分子体积接近直径为4.2nm的球体(SI)。因此,假设I型,II型和III型ClyA对应于具有不同寡聚体状态的纳米孔(见上文),HT应该不容易迁移穿过I型和II型ClyA纳米孔(分别为3.3和3.7nm的反式直径,包括原子的范德瓦尔斯半径,表1)。相反地,HT具有与III型ClyA相同的直径(表1),这表明蛋白质可能能够迁移穿过该纳米孔。一种用于评估分子是否穿过纳米孔的强有效的方法是研究蛋白质电流阻塞的持续时间的电压依赖性。电流阻塞的持续时间随着电势的增加而减少是分子迁移穿过纳米孔的强有力的证据。相比之下,电流阻塞的持续时间随着电压而增加表明,蛋白质被驱到纳米孔中但没有迁移穿过所述纳米孔。<sup>10f,15</sup>从-5mV到-25mV,HT对I型ClyA-SS纳米孔的电流阻塞的停留时间随着施加的电势而增加(图9a),这表明在该电压区间内HT没有迁移穿过纳米孔。利用I型和II型进化而成的ClyA纳米孔在达到-150mV的施加电势下保持打开这一事实,从-60mV到-150mV对I型和II型ClyA-CS纳米孔的HT阻塞进行了特征。对I型ClyA-CS纳米孔施加高于-100mV的电势并对II型ClyA-CS纳米孔施加高于-60mV的电势时,HT电流阻塞的停留时间随着电势的增加而急剧降低(图5a),这表明在此电势范围内HT分子迁移穿过纳米孔。类似地,Dendra2\_M159A(FP,GFP样蛋白,30kDa蛋白质)显示了一初始增加(从-25mV到-40mV),之后电流阻塞(从-50mV到-70mV)的持续时间减少,这表明在电势高于-50mV时FP迁移穿过I型ClyA-SS纳米孔(图9b)。在相同电势下,HT对I型和II型ClyA-CS纳米孔的阻塞的持续时间的比较,显示了HT穿过II型ClyA-CS的迁移比穿过I型ClyA-CS的迁移快了约两个数量级(图5b,表1),这与I型和II型ClyA描述了不同尺寸的纳米孔这一解释相符。

#### [0082] 实施例5. 折叠迁移和展开迁移

[0083] 当分子停留在纳米孔的内腔中时,离子电流阻塞与被分子排除的电解质的原子体积成比例。<sup>10d,10f,16</sup>因此,如果分子以折叠结构迁移穿过纳米孔,则 $I_{\text{RES}}\%$ 在不同施加电压下应保持不变。相反,如果蛋白质在迁移时是展开的,则所述 $I_{\text{RES}}\%$ 预计会变化,这表明展开的多肽链的体积和形状不同于球状蛋白质。在-35mV至-150mV,HT迁移穿过I型和II型纳米孔期间,所述 $I_{\text{RES}}\%$ 值是相同的(水平2,表1),这表明在这个电势范围内,HT在纳米孔内时不展开。感兴趣的是,单独用I型ClyA-CS纳米孔时,在电势低于-90mV时,HT的电流阻塞经常会以更高 $I_{\text{RES}}\%$ 的电流阻塞终止(肩值),之后,电流相对于开孔纳米孔的电流增加(尖值)(图5c和10)。虽然在所述 $I_{\text{RES}}\%$ 值时的肩值可能表明HT在迁移时是展开的,但是蛋白质迁移后的电流尖值则另外表明,ClyA纳米孔可能需要变形以允许折叠的HT穿过I型纳米孔进行迁移。

#### [0084] 实施例6. dsDNA穿过ClyA孔的迁移

[0085] 在这部分工作中,当与野生型ClyA相比时,选择ClyA-CS,因为其在平面脂质双分子层中具有增强的活性、溶解度和有利行为。ClyA十二聚体的内直径(在其狭窄入口处是3.8nm,<sup>17</sup>图11a)大于dsDNA(B型是2.2nm)的直径,这表明dsDNA应容易电泳迁移穿过所述孔。然而,最有可能的是由于排列在ClyA内腔中的带负电荷的残基( $pI=5.1$ ),因此在生理盐浓度下,ssDNA不能进入所述纳米孔。<sup>7a</sup>基于之前对在高碱性pH值下的 $\alpha$ 溶血素( $\alpha$ HL)纳米孔的

研究工作,<sup>7b,7c</sup>在高离子强度下测试了DNA迁移穿过ClyA-CS纳米孔的能力,其中对所述孔的内部电荷进行了筛选。在2.5M NaCl,15m M Tris.HCl,pH 7.5中,且在+100mV施加电势下,由于DNA进入所述孔的内腔的入口,向顺式腔室添加0.12 $\mu$ M生物素化的dsDNA 1(290bp,表2)产生达到开孔电流( $I_0$ )的瞬时电流阻塞( $I_B$ )时,显示出 $0.63 \pm 0.01$ 的残余电流( $I_{RES} = I_B / I_0$ )水平 $1*_{+100} = 1.10 \pm 0.03$ nA,n=3次实验)和 $2.0 \pm 0.6$ 的停留时间(图11b)。随后向顺式腔室添加0.3 $\mu$ M的中性亲和素(其与生物素形成紧密复合物),将瞬时阻塞转换成持久的具有更高残余电流值( $I_{RES} = 0.68 \pm 0.01$ )的电流阻塞(水平 $1_{+100} = 1.19 \pm 0.01$ nA,n=4)。开孔电流可以通过反转施加的电势至-100mV而恢复(图11b)。这些结果表明,通过形成顺式蛋白:DNA复合物,中性亲和素能阻止DNA完全迁移穿过ClyA纳米孔,所述DNA复合物中,DNA占据了所述孔的全长(图11c)。当dsDNA:中性亲和素复合物螺旋穿过反式侧时,在-100mV也可以形成反式复合物(水平 $1_{-100} = 1.02 \pm 0.03$ nA, $I_{RES} = 0.62 \pm 0.01$ ,n=4)(图11d)。

[0086] 实施例7. 轮烷系统捕获ClyA纳米孔内的dsDNA

[0087] 轮烷是超分子联锁系统,其中,线性单元(螺旋状)迁移穿过短周期环并通过两个大的取代基(阻剂(stopper))封端。这种机械连接的分子具有如用作分子电子学的开关或分子机械装置的组分等应用。轮烷是由包括dsDNA<sup>22</sup>在内的多种分子而形成,或通过锁定生物素化的ssDNA分子螺旋穿过 $\alpha$ HL纳米孔而形成,所述 $\alpha$ HL纳米孔的一侧上有抗生蛋白链菌素,另一侧上有DNA发夹(dsDNA不能迁移穿过 $\alpha$ HL)。<sup>23</sup>在此为了证明dsDNA穿过ClyA纳米孔的迁移,建立轮烷系统,其中,添加到ClyA纳米孔反式侧的dsDNA分子,在螺旋穿过纳米孔的内腔后,与顺式侧的第二DNA链杂化。使用ClyA纳米孔ClyA-2,所述ClyA-2包含12个ssDNA分子2(51个碱基,表2,图12a),所述ssDNA分子2在它们的5'端通过二硫键共价连接至在所述孔的顺式入口引入的Cys残基(在位置103,图11a)。2被设计成作为轮烷阻剂。螺旋3是dsDNA分子(59bp,表2),其在5'端具有额外的31个核碱基长度,该长度被设计成用于通过与寡核苷酸6的杂化作用而在顺式侧与阻剂杂化;3'生物素化接头,其用于与中性亲和素在反式侧络合。所述螺旋和阻剂在顺式侧的连接是通过ssDNA桥接分子4介导的(表2,图12a),所述ssDNA桥接分子4与2的最前面的16个核碱基以及3的最后25个核碱基互补。当添加3和4至反式腔室时,在-100mV,DNA螺旋被所述孔捕获并且在电势反转至+100mV(水平 $2_{+100}$ , $I_{RES} = 0.77 \pm 0.04$ ,n=4)时不会从所述孔中释放,这表明形成了DNA轮烷(图12b)。感兴趣的是,在+100mV,所述轮烷的残余电流高于顺式或反式准轮烷螺旋的 $I_{RES}$ 值(分别为 $0.68 \pm 0.01$ , $0.62 \pm 0.01$ ),这表明在此电势下,2的未杂化ssDNA长度可能跨越所述孔(图12b)。所述轮烷可以通过添加20mM DDT至顺式腔室而分解,这会还原2和ClyA之间的二硫键和并恢复在+100mV下的开孔电流(图12c-12e)。

[0088] 选择性迁移穿过ClyA-2孔

[0089] 数据表明,ClyA-2从所述孔的孔腔排除非特异性DNA,这表明连接在孔上的网格状ssDNA分子可能对非螺旋状DNA迁移产生了空间或静电阻碍。此外,连接至孔的DNA常常占据孔内腔(图15c),从而阻止其他DNA分子进入。当特定的DNA分子与ClyA-2杂化时,在正的施加电势下可以观察到快速的DNA捕获。连接至孔的ssDNA的浓度预先估计约20mM。<sup>21</sup>因此,在接近孔开口处的dsDNA浓度的提高可以增强对特定DNA链的捕获。在这种情况下,未杂化的链2可以仍然连接至所述孔,在这种情况下,dsDNA结构可能必须与ssDNA2竞争进入孔内腔。

[0090] 实施例8. 利用链置换反应的纳米孔:DNA设备

[0091] 在高的正施加电势下,ClyA-2纳米孔的离子电流在开孔水平和若干闭孔水平之间波动(图12c,图15和16a),这表明连接至孔顶部的ssDNA分子进入ClyA的内腔但不是永久地螺旋连接至所述孔的反式侧。<sup>1c</sup>进一步表明了该解释;在+100mV,与中性亲和素复合的90聚体ssDNA 5a(表2)添加至ClyA-CS顺式侧引发瞬变电流阻塞(图13),这在随后添加等摩尔浓度的互补ssDNA 5b时转变为持久的DNA迁移事件(表2,图13)。DNA穿过纳米孔的迁移经常在高于阈电势时观察到<sup>24-27</sup>,所述阈电势可以通过调整孔内腔的电荷分布来调节,<sup>26,27</sup>或通过改变溶液的离子强度来调节。<sup>7c,28</sup>因此,最有可能是因为所述孔具有较低电荷密度和/或较高的灵活性,这些发现表明对于DNA的迁移,ssDNA具有比dsDNA更高的阈值(图13)。

[0092] 这些结果表明,尽管施加的电势,连接到ClyA顺式入口的ssDNA分子可能取样顺式溶液。另一方面如果DNA分子在正的施加电势下变为双链(例如通过链杂交),则dsDNA链将迁移穿过所述孔和取样反式溶液。因此,纳米孔:DNA设备设计成,在其中特定的DNA链到纳米孔顺式侧的杂化促进DNA杂种穿过所述孔的迁移。之后DNA:纳米孔复合物通过链置换反应而分解(图14a),这将促进DNA穿过双分子层的转运和促进2的返回以采样顺式腔室。方便地,在正的施加电势下,dsDNA分子添加到ClyA-2顺式侧不产生电流阻塞(图18),这表明连接到ClyA-2的ssDNA分子阻止或大大减少了DNA从溶液的迁移。因此,纳米孔顶部的DNA单元可以通过促进特异性DNA分子的迁移同时建立对非特异性DNA迁移的屏障而推断出系统的特异性。在+50mv,将3添加至ClyA-2顺式侧没有产生电流阻塞,这进一步证实,连接至ClyA-2的ssDNA分子阻止了溶液中的DNA进入孔(图14b)。尽管如此,在添加至6的顺式腔室后——所述6与2的最前面15个碱基以及3的最后12个碱基互补(表2),dsDNA杂种纳米孔显示出永久电流阻塞, $I_{RES}=0.70\pm0.02$ (水平 $2_{+50}=0.59\pm0.02$ nA,图14c,n=5),这是DNA捕获的标志。3到反式侧的迁移通过在将中性亲和素添加至反式腔室时轮烷的形成而证实(图14c-d,图17e-f)。至关重要的是,6被设计成包括10个核碱基的5'单链延伸来作为轮烷分解的支点(图14a)。值得注意的是,添加至7——与6互补的ssDNA分子——的反式腔室(表2),能将3通过到所述支点的首次杂化从纳米孔中释放出,然后促进链置换(图14a)。这是通过开孔电流的恢复观察到的,因为在3和6从所述孔中释放后,ssDNA分子连接到返回顺式侧的ClyA上(图14d)。值得注意的是,当DNA货物(cargo)被从顺式腔室捕获、转运穿过纳米孔和释放到反式腔室时,该纳米孔显示出一系列的打开和阻塞的电流水平,这反映出捕获、迁移和释放这一周期(图14d)。

[0093] 在+50mV和+100mV下,在ClyA-2纳米孔顶部的DNA链大幅减少了对非特异性DNA的捕获(图18),这表明在所述孔顶部的DNA阻止来自溶液的dsDNA的迁移。值得注意的是,施加的电势设置为+50mV而不是+100mV,因为在+100mV,ClyA-2偶尔会产生长的电流阻塞,其类似于由对非特异性DNA的捕获引起的典型事件(图18)。在较低施加电势下,这种电流阻塞不太频繁;因此实验是在+50mV(图14)和+35mV(图20)实施。在较低施加电势下起作用的另一原因,如图14的说明中所解释的,是DNA捕获的频率随着电势而减少,因此在较低电势下,捕获和释放的周期更容易观察到。

[0094] ssDNA和dsDNA的迁移

[0095] 在轮烷构造中,在正的施加电势下,ssDNA分子可以跨越孔的整个长度。这很可能是因为在+100mv轮烷的 $I_{RES}$ 值(0.77)高于顺式和反式准轮烷的 $I_{RES}$ 值(分别为0.68和0.62,图11c和11d),所述准轮烷具有固定在所述孔内的dsDNA。此外,由电流-电压曲线的斜率计

算的轮烷单一电导值在正施加电势下 (10.8nS) 比在正偏电压下 (13.0nS, 图16) 低。由于 ssDNA 的直径 ( $d=1\text{nm}$ ) 小于 dsDNA (对于 B 型,  $d=2.2$ ), 这些结果进一步表明在正偏电压下 ssDNA 占据所述孔。为进一步研究 ssDNA 跨越所述孔的能力, 测试了 DNA 杂种 3 迁移穿过 ClyA-CS 孔的能力, 所述 DNA 杂种 3 是通过 59 个核碱基对的 3' 生物素化 dsDNA 段后跟 5' 端的 31 个核碱基的 ssDNA 长度而形成的。在 +100mV, 将与中性亲和素复合的 3 添加到 ClyA-CS 孔的顺式侧引起了持久的电流阻塞,  $I_{\text{RES}}=0.67$  (图19), 顺式准轮烷有相同的  $I_{\text{RES}}$  值 (0.68), 这表明在此电势下, DNA 杂种迁移穿过 ClyA 并且 dsDNA 跨约所述孔的内腔。由于 3 的迁移只能从 ssDNA 末端开始, 这些结果表明, 在 +100mV, ssDNA 的主要序列能够迁移穿过 ClyA 的内腔。感兴趣的是, 在 +50mV 和 +70mV, 电流阻塞只是瞬时的 (图19), 这表明在这个电压下, ssDNA 不能穿过 ClyA 孔。在 +70mV, 链 6——其与 3 的最后 12 个核碱基互补——的添加产生持久的电流阻塞 (图19), 这表明 DNA 迁移的阈值降低。

[0096] 材料与方法

[0097] 筛选 ClyA 纳米孔

[0098] 通过使用 pT7 质粒使 ClyA 在大肠杆菌属 (*E. coli*)<sup>®</sup> 表达体 BL21 (DE3) 细胞 (Lucigen) 中表达。转化体在具有 5% 马血的布鲁氏琼脂 (Brucella Agar) (BBL<sup>™</sup>, Becton, Dickinson and Company) 上预筛选, 并在 96 深孔板上单独生长和过量表达。针对马红细胞 (bioMérieux) 的溶血活性, 对来自细胞裂解物的单体进行第一次筛选, 然后通过使用 Ni-NTA 亲和色谱法进行纯化。纯化后的单体在 0.5%  $\beta$ -十二烷基麦芽糖苷 (GLYCON Biochemicals GmbH)<sup>12</sup> 存在下进行寡聚, 并将其加载到为天然凝胶的电泳凝胶上以检查其寡聚反应。ClyA 寡聚体的电性能在平面脂质双分子层中进行筛选。

[0099] 进化的 ClyA 纳米孔的纯化

[0100] 通过使用 pT7 质粒使 ClyA 在大肠杆菌属<sup>®</sup> 表达体 BL21 (DE3) 细胞中表达。通过使用 Ni-NTA 亲和色谱法纯化单体, 使单体在 0.2%  $\beta$ -十二烷基麦芽糖苷 (GLYCON Biochemicals GmbH) 存在下进行寡聚。

[0101] 电记录

[0102] 离子电流通过来自自由二植烷酰基-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱 (diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) 形成的平面双分子层的记录进行测量。通过膜片钳放大器 (Axopatch 200B, Axon Instruments, 福斯特城, CA) 用 Ag/AgCl 电极测量电流。<sup>18</sup>

[0103] 利用易错 PCR 构建 ClyA 库

[0104] 使用 T7 启动子和 T7 终止子引物通过扩增来自质粒 DNA 的 ClyA 基因构建库 (表3)。我们的第一轮诱变中, 我们使用包含对来自伤寒沙门氏菌的 ClyA-SS 进行编码的合成基因的质粒作为模板。从第二轮诱变起, 我们使用从前一轮选择得到的 DNA 质粒。在 ClyA-SS 中, 通过将两个 Cys 残基 (位置 87 和 285) 用 Ser 取代和通过连接编码 Gly-Ser-Ser 接头的 DNA 然后连接 C-末端六聚组氨酸标签来修饰 WT 序列。<sup>7a</sup>

[0105] DNA 扩增是通过易错 PCR 实现的: 将 400 $\mu\text{L}$  的 PCR 混合物 (200 $\mu\text{l}$  REDTaq 预混液 (ReadyMix), 8 $\mu\text{M}$  正向和反向引物的最终浓度, 约 400ng 的质粒模板和达到 400 $\mu\text{l}$  的 ddH<sub>2</sub>O) 分为 8 个包含 0-0.2mM  $\text{MnCl}_2$  的反应混合物, 并循环 27 次 (在 95 $^{\circ}\text{C}$  预孵化 3 分钟, 然后循环: 在 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 15 秒, 在 55 $^{\circ}\text{C}$  退火 15 秒, 在 72 $^{\circ}\text{C}$  延续 3 分钟)。在最终的库中每个基因在这些条件下通

常产生1-4个突变。PCR产品汇集在一起,进行凝胶纯化(QIA快速凝胶萃取试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit),Qiagen)并通过MEGAWHOP过程克隆进pT7表达质粒(pT7-SC1),所述MEGAWHOP过程为<sup>19</sup>:约500ng纯化PCR产品与约300ng C1yA-SS环状DNA模板混合,在50μL最终体积中利用Phire Hot Start II DNA聚合酶(Finnzymes)实施扩增(在98℃预孵化30秒,然后循环:在98℃变性5秒,在72℃延续1.5分钟,循环30次)。在37℃通过用Dpn I (1FDU) 孵化2小时消除圆形模板。得到的混合物通过琼脂糖凝胶(在Milli-Q水中2.5%琼脂糖)透析而脱盐并通过电穿孔转变为大肠杆菌属®10G细胞(Lucigen)。转变后的细菌在氨苄青霉素(100μg/ml) LB琼脂板上在37℃生长过夜(100μg/mL) 通常产生 $>10^5$ 的菌落,收集转变后的细菌以用于库质粒DNA的制备。

[0106] 在进化的C1yA的位置87构建饱和诱变库

[0107] 为了拥有包含无半胱氨酸的C1yA变体的库,使用87NNS引物(包含在87位置编码全套氨基酸的简并密码子,表3)和T7终止子引物扩增4C1yA4的基因编码(表2)。PCR条件:0.3mL最终体积的PCR混合物(ReadyMix™),所述PCR混合物包含约400ng的模板质粒,循环30次(在95℃预孵化3分钟,然后循环:在95℃变性15秒,在55℃退火15秒,在72℃延续3分钟)。使用4C1yA4圆形模板通过MEGAWHOP过程(见上文)将得到的PCR产品克隆到pT7表达质粒中。

[0108] C1yA-WT的构建

[0109] C1yA-SS基因使用87C和285C引物扩增(表3)。PCR条件:0.3mL最终体积的PCR混合物(150μl的REDTaq ReadyMix,6μM正向和反向引物,约400ng模板质粒),循环27次(在95℃预孵化3分钟,然后循环:在95℃变性15秒,在55℃退火15秒,在72℃延续3分钟)。使用C1yA-SS圆形模板通过上文描述的MEGAWHOP过程将得到的PCR产品克隆到pT7表达质粒中。

[0110] 筛选C1yA库和溶血试验

[0111] 由于C1yA-SS显示“检测边界”的溶血活性,因此在诱变的前两轮中,在具有5%马血的布鲁氏琼脂上,库只对于活性进行筛选。从第三轮选择开始,对在布鲁氏琼脂上显示溶血活性的菌落进一步进行针对马红细胞溶血活性的筛选,所述马红细胞来自过量表达后的粗制裂解物。这项工作的目的是获得C1yA变体,所述C1yA变体在β-十二烷基麦芽糖苷(DDM)中很好地寡聚,并在脂质双分子层中形成具有较低电噪音和均匀的单一电导的纳米孔。因此,单独针对溶血活性的筛选不能作为这类变体的选择的唯一标准(例如WT-C1yA溶血性非常活跃,但是显示不均匀的单一电流分布)。因此,从第四轮开始,利用Ni-NTA亲和色谱法纯化来自粗制裂解物的蛋白质,在DDM中孵化后,在BN-PAGE中测试C1yA的寡聚。很好地寡聚的C1yA纳米孔之后在平面脂质双分子层中进行测试(特别强调的是在高施加电势下,所形成的通道的一致性、低电噪音和稳定性)。

[0112] 在布鲁氏菌马血琼脂板上筛选溶血活性

[0113] 在质粒DNA经电穿孔进入大肠杆菌属®表达体BL21(DE3)细胞(Lucigen)之后,转化体在具有5%马血并补充有100μg/ml氨苄青霉素的布鲁氏琼脂(BBL™,Becton,Dickinson and Company)上进行预筛选,在37℃生长过夜之后通过在菌落周围的裂解光环(lytic aura)观察显示溶血活性的克隆体,所述显示溶血活性的克隆体在37℃通过摇晃在96深孔板上单独生长(包含100μg/mL氨苄青霉素的0.5mL的2xYT介质)。汇聚获得的培养物用于制备质粒DNA(QIAprep,Qiagen)以用作下一轮(第1和2轮)的模板,或用作对于蛋白质过量表达的起子(第3-5轮)。



[0114] 对ClyA过量表达之后粗制裂解物的溶血活性的筛选

[0115] 第3-5轮:50 $\mu$ l来自400-600个克隆体的起子培养物(见上文)接种到在新的96深孔板中的450 $\mu$ l新鲜介质中,所述培养物在37 $^{\circ}$ C生长直到OD<sub>600</sub>约为0.8。然后添加IPTG(0.5mM)以诱导过量表达,温度降低到25 $^{\circ}$ C用于过夜孵化。第二天,在4 $^{\circ}$ C通过在3000x g离心15分钟获得细菌,舍弃上清液,在-70 $^{\circ}$ C孵化颗粒(pellet)几小时来促进细胞破坏。然后颗粒重悬浮在0.3mL的裂解缓冲液中(15mM Tris.HCl pH 7.5,150mM NaCl,1mM MgCl<sub>2</sub>,10 $\mu$ g/ml溶解酵素和0.2单位/mL DNA酶I),并在37 $^{\circ}$ C通过在1300RPM摇晃30分钟裂解。之后将5-30 $\mu$ L裂解液添加到100 $\mu$ L约1%的马红细胞悬浮液中。所述马红细胞悬浮液是通过在4 $^{\circ}$ C在6000x g离心马血(bioMérieux)5分钟来制备,所述颗粒重悬浮在pH=7.5的15mM Tris.HCl,150mM NaCl中(如果上清液显示为红色,将溶液再次离心并将颗粒重悬浮在同样的缓冲液中)。通过在650nm OD随着时间的减少来监控溶血活性(约3-10分钟的间隔,使用Multiskan GO微孔板分光光度计测试,Thermo Scientific)。将克隆体的溶血活性与来自前一轮的在同一板块上生长的作为参考的2-4个亲本克隆体的活性进行比较。

[0116] 对进化的变体的寡聚和其纳米孔的形成进行筛选

[0117] 第4轮:来自相同裂解液的6-12个最具溶血活性的变体进行部分纯化,所述裂解液用于通过Ni-NTA亲和色谱法进行溶血活性的筛选,所述Ni-NTA亲和色谱法:将包含单体型ClyA的0.2mL粗制裂解液用15mM Tris.HCl,pH 7.5,150mM NaCl并补充1%DDM(以触发ClyA寡聚反应)和10mM咪唑而变成1mL,在环境温度孵化20分钟并在4 $^{\circ}$ C在20'000x g离心10分钟。将澄清的裂解液与20 $\mu$ L(珠体积)Ni-NTA琼脂糖珠(Qiagen)通过在4 $^{\circ}$ C温和混合结合1小时。通过在4 $^{\circ}$ C在20'000x g离心10分钟除去未结合的片段(上清液被丢弃)。最后,利用50 $\mu$ L 600mM咪唑在15mM Tris.HCl pH 7.5 150mM NaCl 0.2%DDM中洗提寡聚的ClyA蛋白质。一般,对40 $\mu$ g的ClyA用约10%甘油和1x的NativePAGE™电泳缓冲液和1x阴极缓冲添加剂(Invitrogen™)进行补充,之后装到BN-PAGE上(图7)。在BN-PAG上形成寡聚体的变体在平面脂质双分子层中进行测试(特别强调的是所形成的通道的一致性)。

[0118] 在第5轮,筛选在位置87进行了饱和诱变的ClyA-CS克隆体以获得半胱氨酸较少的、适合于进行位点特异性化学修饰的ClyA变体。因此,如果期望在位置87含有半胱氨酸的克隆体显示最高的活性,则在本轮中,将在粗制裂解液中显示中等到高度的溶血活性的克隆体分离。将ClyA变体按前文所述进行部分纯化和挑选。

[0119] 蛋白质的过量表达和纯化

[0120] 用包含ClyA基因的pT7质粒对大肠杆菌属®表达体BL21(DE3)细胞进行转化。在37 $^{\circ}$ C将转化体在补充100mg/L氨苄青霉素的LB琼脂板上生长过夜。由此产生的菌落汇集到一起并被接种到50mL含有100mg/L氨苄青霉素的介质中。培养物在37 $^{\circ}$ C生长并以200rpm摇动直到其达到0.6到0.8的OD<sub>600</sub>。然后通过添加0.5mM的IPTG诱导ClyA的表达并在20 $^{\circ}$ C继续生长。第二天,通过在6000x g离心10分钟收集细菌,颗粒储存在-70 $^{\circ}$ C。

[0121] 包含单体型ClyA的所述颗粒解冻并重悬浮在20mL清洗缓冲液中(10mM咪唑,150mM NaCl,15mM Tris.HCl,pH 7.5),补充1mM MgCl<sub>2</sub>和0.05单位/mL的DNA酶I,通过声处理使细菌裂解。粗制裂解液通过在6000x g离心20分钟进行澄清,将上清液与用清洗缓冲液预平衡的200 $\mu$ L Ni-NTA树脂(Qiagen)混合。1小时后,树脂加载到柱中(Micro Bio Spin,Bio-Rad)并用约5mL的清洗缓冲液清洗。利用大约0.5mL的包含300mM咪唑的清洗缓冲液洗提ClyA。利



用Bradford法确定蛋白质浓度,纯化的蛋白质在4℃储存。

[0122] ClyA模型的构建

[0123] 13聚体和14聚体的ClyA纳米孔从12聚体晶体结构按如下进行建模(PDB码:2WCD):建立穿过12聚体的全长的中心轴(ax12),测量单体A中残基114的C-α原子(114Ca-A)和ax12之间的距离,得到所述孔的近似半径(r12)。使用在114Ca-A和单体B中的当量原子(114Ca-B)之间的距离(d)来计算12聚体的近似周长( $c12=d \times 12$ ),13聚体的近似周长( $c13=d \times 13$ )和14聚体的近似周长( $c14=d \times 14$ )。然后使用简单的三角函数由周长计算这三个寡聚体的半径(r12,r13,r14)。然后分别在距离中心ax的距离为r12、r13、r14处放置单体来构建12聚体、13聚体和14聚体,并使这些聚体分别旋转 $360^\circ/12$ 、 $360^\circ/13$ 和 $360^\circ/14$ 度。使用这种方法构建的12聚体能完美地复制x射线晶体结构(RMS=0.29Å)的12聚体,这表明了构造更高阶孔的高度的对称性和可行性。<sup>20</sup>

[0124] 纳米孔开口的尺寸是通过增加ClyA的原子的范德瓦尔斯半径直到孔关闭来获得的。然后将范德瓦尔斯半径的增加值作为孔的半径。由与所测蛋白质分子体积对应的球体来计算凝血酶的直径。<sup>20</sup>

[0125] 平面脂质双分子层中的电记录

[0126] 施加的电势是指反式电极的电势。ClyA纳米孔被从顺式腔室插入到脂质双分子层中,所述顺式腔室与地面连接。两个腔室通过25μm厚的包含约100μm直径的孔的聚四氟乙烯膜(Goodfellow Cambridge Limited)隔开。在戊烷中用约5μL的10%十六烷预处理所述孔,通过向两个电生理学腔室添加在戊烷(10mg/mL)中的约10μL的1,2-二植烷酰基-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(DPhPC)形成双分子层。通常,将0.01-0.1ng的寡聚ClyA添加到顺式腔室(0.5mL)足以获得单通道。在pH 7.5,150mM NaCl,15mM Tris.HCl中实施电记录。通过使水循环穿过直接接触记录室的底部和侧面的金属盒,保持记录室的温度在28℃。

[0127] 数据记录和分析

[0128] 来自平面双分子层记录的电信号通过使用Axopatch 200B膜片钳放大器(Axon Instruments)进行放大并利用Digidata 1440A/D转换器(Axon Instruments)进行数字化。使用Clampex 10.2软件(Molecular Devices)记录数据,随后的分析使用Clampfit软件(Molecular Devices)进行实施。开孔电流和HT阻塞通过采用10kHz的贝塞尔低通滤波器并且在50kHz采样(如果没有另外说明)进行记录。对于单一通道电导分布数据的收集,使用200Hz截止值的高斯低通滤波器进一步过滤轨迹。在+35和-35mV确定所有插入的通道的开孔电流以确保能使用沿正确方向插入的孔(当从顺式侧重组时,ClyA的单一电导在正的施加电势下更高)和对应于-35mV的值来构造所述分布。由全点直方图(0.3pA面元大小)的高斯拟合来计算对于ClyA的开孔电流值( $I_0$ )和对于HT的闭孔电流值( $I_B$ )。<sup>3</sup>以至少0.5秒时长由至少10个电流阻塞制作HT和BT阻塞的直方图。残余电流值( $I_{RES}$ )按如下计算: $I_{RES\%} = I_B / I_0 \%$ 。当HT在相同阻塞中产生两个电流水平时,从全点直方图的高斯拟合得到的峰面积推导出它们的相对贡献(图4b中,表1)。<sup>3</sup>通过将至少50次事件的阻塞停留时间的累积分布拟合成单指数来计算HT阻塞寿命。<sup>3</sup>从-5到-20mV,通过采用由3个步骤组成的循环扫描电压协议来测量HT阻塞寿命。在第一步“捕获”步骤中,设置施加的电势为-60mV保持2秒。在第二步“释放”步骤,施加的电势降低到感兴趣的电压(-5到-20mV)保持2至10秒,在此步骤中HT从孔中释放。最后,在“再生”步骤中,电势短暂地反转到+35mV达0.2秒从而再生成新的未阻塞

的开孔状态。计算至少50次扫描的平均值,与释放步骤对应的轨迹的一部分拟合成单指数。偶尔显示水平1和水平2的电流的FP阻塞的持续时间(停留时间)的分布超过两个数量级,不能很好地拟合成指数函数。因此,对于FP采用中值停留时间。以20kHz的采样率和5kHz的内部贝塞尔低通滤波器设置值下记录轨迹。测量在pH 7.5的150mM NaCl,15mM Tris.HCl中进行。利用Origi (OriginLab公司)制造图表,温度设定在28℃。本项工作中引用的所有数值都基于至少三次独立的记录的平均值,除非另有说明。

[0129] 用于DNA迁移的ClyA孔

[0130] DNA的制备

[0131] 从Integrated DNA Technologies (IDT) 购买ssDNA分子。通过PCR制备1,其中两个引物中的一个其5'端是生物素化的。通过孵化两种互补的ssDNA分子形成3,所述ssDNA中的一个在3'端含有生物素部分。然后利用亲和色谱法从过量的ssDNA中纯化DNA杂种。5和6是通过IDT进行HPLC纯化。

[0132] ClyA孔的制备

[0133] 通过使用pT7质粒在大肠杆菌 (DE3) pLysS细胞中表达ClyA。含有C-末端寡聚组氨酸标签的单体在大肠杆菌细胞中和通过Ni-NTA亲和色谱法纯化的可溶片段中表达。通过添加0.2%β-十二烷基麦芽糖苷 (DDM) 形成ClyA十二聚体,所述ClyA十二聚体通过蓝色天然聚丙烯酰胺凝胶电泳从单体中分离。提取最低带的寡聚ClyA-CS并在4℃储存。

[0134] ClyA-2纳米孔通过将2共价连接到ClyA蛋白质进行制备,其中所述ClyA蛋白质的两个WT半胱氨酸残基(位置87和285)被丝氨酸取代(ClyA-SS),半胱氨酸在位置103引入(WT基因中的天冬氨酸;ClyA-SSC<sub>103</sub>)。通过使用Phire®热启动DNA聚合酶 (Finnzymes) 利用大引物(mega-primer)方法<sup>7a</sup>,由ClyA-SS构造ClyA-SSC<sub>103</sub>,所述ClyA-SS也编码连接C-末端的六聚组氨酸标签的Gly-Ser-Ser连接体<sup>7a</sup>。之后DNA(5'-TTTTTTTTTATCTACGAATTCATCAGGGCTAAAGAGTGCAGAGTTACTTAG-3')与ClyA-SSC<sub>103</sub>单体进行如前文所述的共轭,纯化和寡聚,其中所述DNA包含通过C6接头(5ThioMC6-D, IDT) 连接到该DNA链的5'羟基的受保护的硫醇基。纯化后的寡聚体在-80℃储存在20%甘油中。

[0135] DNA的制备

[0136] 使用来自 REDTaq® ReadyMix™ PCR反应混合物 (Sigma) 的Taq DNA聚合酶,通过pT7-ClyA-WT DNA模板的PCR扩增来制备1,其中所述模板使用5'生物素化的正向引物(生物-5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')和未生物素化的反向引物(5'-CATCAGCAGCACTTTGATATCGCCACC-3')。在最大数目的35个周期之后,将24个反应试管(每个试管50μL)的PCR产物通过使用PCR快速纯化试剂盒 (QIAGEN) 进行纯化,利用2%琼脂糖凝胶(TAE缓冲液)检查所述PCR产物的尺寸。通常的样品浓度是约200ng/μL。

[0137] 通过将3'生物素化的ssDNA分子(5'-GGATGACCTGATCCAGATATTTATTATACAGGTCCAGCGCACCGTCAGCCCAATCGCACTTTTCACAAAAGAGAGAGATCGATTACC-3'-生物,3a) 用过量20%的部分互补的ssDNA(5'-GGTAATCGATCTCTCTCTTTTTGTGAAAAGTGCATTGGGCTGACGGTGCCTGGAC-3',3b,表4) 孵化来制备3。温度升高到95℃保持1分钟,然后逐步降低到室温。在估计的退火温度附近,温度以2℃的步阶下降,每个步阶保持1分钟。然后使用包含固定在琼脂糖珠(Thermo Scientific Pierce) 上的单体抗生物素蛋白的生物素结合柱通过亲和色谱法从过量的ssDNA中纯化杂种DNA。根据协议(protocol),3在生物素阻断/洗脱缓冲液中洗提。通

常,获得的DNA浓度约400ng/ $\mu$ L。通过使用在TAE缓冲液中的2%的琼脂糖凝胶检查dsDNA的尺寸。纯化后的dsDNA在1 $\mu$ M EDTA存在下在-20 $^{\circ}$ C存储。

[0138] 电记录

[0139] 如果没有另有说明,利用10KHz贝塞尔滤波器以50KHz采样率收集信号。通过在戊烷中添加1至2 $\mu$ L的10%的1,2-二植烷酰基-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(DPhPC)(w/v)形成脂质双分子层。通过使用浸在琼脂桥(agar bridge)(在2.5MNaCl缓冲液中的3%w/v低熔点琼脂糖)中的Ag/AgCl电极施加电势。施加的电势是指连接到内腔的反式腔室的工作电极的电势。ClyA纳米孔溶液(0.01-0.1ng)添加到顺式腔室,所述顺式腔室连接接地电极。插入单通道后,通过若干轮的灌注除去多余的蛋白质。在pH 8.0,2.5M NaCl,15mM Tris.HCl中在22 $^{\circ}$ C进行电记录。误差表示至少三次独立重复实验的平均值的标准偏差,所述重复实验用字母n表示。

[0140] 通过引用而纳入

[0141] 本文提到的所有出版物和专利均通过全文引用的方式而引入本文,如同每一个独立的出版物或专利被具体地及独立地指明通过引用纳入本文一样。如果存在冲突的情况下,以本申请(包括任何定义)为准。

[0142] 等效物

[0143] 虽然已对本发明的具体实施方式进行了论述,但是上述说明书是说明性的而不是限制性的。在纵观本说明书和下文的权利要求的基础上,本发明的许多变型方案对本领域技术人员而言是显而易见的。本发明的整个范围应参照权利要求连同权利要求的等效物的全部范围以及说明书连同其变型方案来确定。

[0144] 参考文献

[0145] 1. (a) Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W., Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. Proc Natl Acad Sci U S A 1996, 93 (24), 13770-3; (b) Vercoutere, W.; Winters-Hilt, S.; Olsen, H.; Deamer, D.; Haussler, D.; Akesson, M., Rapid discrimination among individual DNA hairpin molecules at single-nucleotide resolution using an ion channel. Nat Biotechnol 2001, 19 (3), 248-52; (c) Howorka, S.; Cheley, S.; Bayley, H., Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. Nat Biotechnol 2001, 19 (7), 636-9.

[0146] 2. (a) Dekker, C., Solid-state nanopores. Nat Nanotechnol 2007, 2 (4), 209-15; (b) Li, J.; Stein, D.; McMullan, C.; Branton, D.; Aziz, M. J.; Golovchenko, J. A., Ion-beam sculpting at nanometre length scales. Nature 2001, 412 (6843), 166-9.

[0147] 3. (a) Wei, R.; Martin, T. G.; Rant, U.; Dietz, H., DNA origami gatekeepers for solid-state nanopores. Angew Chem Int Ed Engl 2012, 51 (20), 4864-7; (b) Bell, N. A.; Engst, C. R.; Ablay, M.; Divitini, G.; Ducati, C.; Liedl, T.; Keyser, U. F., DNA origami nanopores. Nano Lett 2012, 12 (1), 512-7; (c) Langecker, M.; Arnaut, V.; Martin, T. G.; List, J.; Renner, S.; Mayer, M.; Dietz, H.; Simmel, F. C., Synthetic lipid membrane channels formed by designed DNA nanostructures. Science 2012, 338 (6109), 932-6.

[0148] 4. Hall, Scott, A.; Rotem, D.; Mehta, K.; Bayley, H.; Dekker, C., Hybrid pore

formation by directed insertion of alpha hemolysin into solid-state nanopores. *Nature Nanotechnology* 2011, In press.

[0149] 5. Venkatesan, B.M.; Bashir, R., Nanopore sensors for nucleic acid analysis. *Nat Nanotechnol* 2011, 6(10), 615-24.

[0150] 6. (a) Jung, Y.; Bayley, H.; Movileanu, L., Temperature-responsive protein pores. *J Am Chem Soc* 2006, 128(47), 15332-40; (b) Heinz, C.; Engelhardt, H.; Niederweis, M., The core of the tetrameric mycobacterial porin MspA is an extremely stable beta-sheet domain. *J Biol Chem* 2003, 278(10), 8678-85.

[0151] 7. (a) Soskine, M.; Biesemans, A.; Moeyaert, B.; Cheley, S.; Bayley, H.; Maglia, G., An Engineered ClyA Nanopore Detects Folded Target Proteins by Selective External Association and Pore Entry. *Nano Lett* 2012, 12(9), 4895-900; (b) Franceschini, L.; Mikhailova, E.; Bayley, H.; Maglia, G., Nucleobase recognition at alkaline pH and apparent pKa of single DNA bases immobilised within a biological nanopore. *Chem Commun (Camb)* 2012, 48(10), 1520-2; (c) Maglia, M.; Henricus, M.; Wyss, R.; Li, Q.; Cheley, S.; Bayley, H., DNA strands from denatured duplexes are translocated through engineered protein nanopores at alkaline pH. *Nano Letters* 2009, 9, 3831-3836.

[0152] 8. (a) Pastoriza-Gallego, M.; Oukhaled, G.; Mathe, J.; Thiebot, B.; Betton, J.M.; Auvray, L.C.; Pelta, J., Urea denaturation of alpha-hemolysin pore inserted in planar lipid bilayer detected by single nanopore recording: Loss of structural asymmetry. *FEBS Lett* 2007, 581(18), 3371-3376; (b) Japrun, D.; Henricus, M.; Li, Q.H.; Maglia, G.; Bayley, H., Urea Facilitates the Translocation of Single-Stranded DNA and RNA Through the alpha-Hemolysin Nanopore. *Biophysical Journal* 2010, 98(9), 1856-1863.

[0153] 9. (a) Mohammad, M.M.; Iyer, R.; Howard, K.R.; McPike, M.P.; Borer, P.N.; Movileanu, L., Engineering a Rigid Protein Tunnel for Biomolecular Detection. *J Am Chem Soc* 2012; (b) Bikwemu, R.; Wolfe, A.J.; Xing, X.; Movileanu, L., Facilitated translocation of polypeptides through a single nanopore. *J Phys Condens Matter* 2010, 22(45), 454117; (c) Wolfe, A.J.; Mohammad, M.M.; Cheley, S.; Bayley, H.; Movileanu, L., Catalyzing the translocation of polypeptides through attractive interactions. *Journal of the American Chemical Society* 2007, 129(45), 14034-14041; (d) Movileanu, L.; Schmittschmitt, J.P.; Scholtz, J.M.; Bayley, H., Interactions of peptides with a protein pore. *Biophys J* 2005, 89(2), 1030-45; (e) Payet, L.; Martinho, M.; Pastoriza-Gallego, M.; Betton, J.M.; Auvray, L.; Pelta, J.; Mathe, J., Thermal unfolding of proteins probed at the single molecule level using nanopores. *Anal Chem* 2012, 84(9), 4071-6; (f) Pastoriza-Gallego, M.; Rabah, L.; Gibrat, G.; Thiebot, B.; van der Goot, F.G.; Auvray, L.; Betton, J.M.; Pelta, J., Dynamics of unfolded protein transport through an aerolysin pore. *J Am Chem Soc* 2011, 133(9), 2923-31; (g) Oukhaled, G.; Mathe', J.; Biance, A.-L.; Bacri, L.; Betton,

J.-M.;Lairez,D.;Pelta,J.;Auvray,L.,Unfolding of Proteins and Long瞬态 Conformations Detected by Single Nanopore Recording.Phys.Rev.Lett.2007,98, 158101; (h) Stefureac,R.I.;Kachayev,A.;Lee,J.S.,Modulation of the translocation of peptides through nanopores by the application of an AC electric field.Chem Commun (Camb) 2012,48 (13),1928-30; (i) Stefureac,R.I.;Lee,J.S.,Nanopore analysis of the folding of zinc fingers.Small 2008,4 (10),1646-50; (j) Stefureac,R.; Waldner,L.;Howard,P.;Lee,J.S.,Nanopore analysis of a small 86-residue protein.Small 2008,4 (1),59-63; (k) Stefureac,R.;Long,Y.T.;Kraatz,H.B.;Howard, P.;Lee,J.S.,Transport of alpha-helical peptides through alpha-hemolysin and aerolysin pores.Biochemistry 2006,45 (30),9172-9.

[0154] 10. (a) Firnkes,M.;Pedone,D.;Knezevic,J.;Doblinger,M.;Rant,U., Electrically Facilitated Translocations of Proteins through Silicon Nitride Nanopores:Conjoint and Competitive Action of Diffusion,Electrophoresis,and Electroosmosis.Nano Letters 2010,10 (6),2162-2167; (b) Plesa,C.;Kowalczyk,S.W.; Zinsmeister,R.;Grosberg,A.Y.;Rabin,Y.;Dekker,C.,Fast Translocation of Proteins through Solid State Nanopores.Nano Lett 2013; (c) Niedzwiecki,D.J.; Grazul,J.;Movileanu,L.,Single-Molecule Observation of Protein Adsorption onto an Inorganic Surface.Journal of the American Chemical Society 2010,132 (31), 10816-10822; (d) Fologea,D.;Ledden,B.;McNabb,D.S.;Li,J.L.,Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore.Applied Physics Letters 2007,91 (5); (e) Han,A.;Creus,M.;Schurmann,G.;Linder,V.;Ward, T.R.;de Rooij,N.F.;Staufer,U.,Label-free detection of single protein molecules and protein-protein interactions using synthetic nanopores.Anal Chem 2008,80 (12),4651-8; (f) Stefureac,R.I.;Trivedi,D.;Marziali,A.;Lee,J.S., Evidence that small proteins translocate through silicon nitride pores in a folded conformation.J Phys Condens Matter 2010,22 (45),454133.

[0155] 12.Eifler,N.;Vetsch,M.;Gregorini,M.;Ringler,P.;Chami,M.;Philippsen, A.;Fritz,A.;Muller,S.A.;Glockshuber,R.;Engel,A.;Grauschopf,U.,Cytotoxin ClyA from Escherichia coli assembles to a 13-meric pore independent of its redox-state.EMBO J 2006,25 (11),2652-61.

[0156] 13. (a) Pogoryelov,D.;Klyszejko,A.L.;Krasnoselska,G.O.;Heller,E.M.; Leone,V.;Langer,J.D.;Vonck,J.;Muller,D.J.;Faraldo-Gomez,J.D.;Meier,T., Engineering rotor ring stoichiometries in the ATP synthase.Proc Natl Acad Sci U S A 2012,109 (25),E1599-608; (b) Bayfield,O.W.;Chen,C.S.;Patterson,A.R.;Luan, W.;Smits,C.;Gollnick,P.;Antson,A.A.,Trp RNA-binding attenuation protein: modifying symmetry and stability of a circular oligomer.PLoS One 2012,7 (9), e44309.

[0157] 14.Niedzwiecki,D.J.;Iyer,R.;Borer,P.N.;Movileanu,L.,Sampling a Biomarker of the Human Immunodeficiency Virus across a Synthetic Nanopore.ACS

Nano 2013.

[0158] 15. (a) Clarke, J.; Wu, H.; Jayasinghe, L.; Patel, A.; Reid, S.; Bayley, H., Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology* 2009, 4, 265-270; (b) Rincon-Restrepo, M.; Mikhailova, E.; Bayley, H.; Maglia, G., Controlled Translocation of Individual DNA Molecules through Protein Nanopores with Engineered Molecular Brakes. *Nano Lett* 2011, 11 (2), 746-50.

[0159] 16. (a) Freedman, K.J.; Jurgens, M.; Prabhu, A.; Ahn, C.W.; Jemth, P.; Edel, J.B.; Kim, M.J., Chemical, thermal, and electric field induced unfolding of single protein molecules studied using nanopores. *Anal Chem* 2011, 83 (13), 5137-44; (b) Niedzwiecki, D.J.; Movileanu, L., Monitoring protein adsorption with solid-state nanopores. *J Vis Exp* 2011, (58); (c) Talaga, D.S.; Li, J., Single-molecule protein unfolding in solid state nanopores. *J Am Chem Soc* 2009, 131 (26), 9287-97.

[0160] 17. Mueller, M.; Grauschopf, U.; Maier, T.; Glockshuber, R.; Ban, N., The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature* 2009, 459 (7247), 726-U135.

[0161] 18. Maglia, G.; Heron, A.J.; Stoddart, D.; Japrun, D.; Bayley, H., Analysis of Single Nucleic Acid Molecules with Protein Nanopores. *Methods in Enzymology*, Vol 475: Single Molecule Tools, Pt B 2010, 474, 591-623.

[0162] 19. Miyazaki, K., MEGAWHOP cloning: a method of creating random诱变 libraries via mega引物PCR of whole plasmids. *Methods Enzymol* 2011, 498, 399-406.

[0163] 20. Delhaise, P.; Bardiaux, M.; Demaeyer, M.; Prevost, M.; Vanbelle, D.; Donneux, J.; Lasters, I.; Vancustem, E.; Alard, P.; Wodak, S.J., The Brugel Package-toward Computer-Aided-Design of Macromolecules. *J Mol Graphics* 1988, 6 (4), 219-219.

[0164] 21. King, N.P. et al. Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy. *Science* 336, 1171-1174 (2012).

[0165] 22. Ackermann, D. et al. A double-stranded DNA rotaxane. *Nat Nanotechnol* 5, 436-442 (2010).

[0166] 23. Sanchez-Quesada, J.; Saghatelian, A.; Cheley, S.; Bayley, H. & Ghadiri, M.R. Single DNA rotaxanes of a transmembrane pore protein. *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 3063-3067 (2004).

[0167] 24. Meller, A.; Nivon, L. & Branton, D. Voltage-driven DNA translocations through a nanopore. *Phys Rev Lett* 86, 3435-3438 (2001).

[0168] 25. Henrickson, S.E.; Misakian, M.; Robertson, B. & Kasianowicz, J.J. Driven DNA transport into an asymmetric nanometer-scale pore. *Phys Rev Lett* 85, 3057-3060 (2000).

[0169] 26. Maglia, G.; Rincon Restrepo, M.; Mikhailova, E. & Bayley, H. Enhanced translocation of single DNA molecules through  $\alpha$ -hemolysin nanopores by

manipulation of internal charge. Proc Natl Acad Sci U S A 105,19720-19725 (2008) .

[0170] 27. Butler, T. Z., Pavlenok, M., Derrington, I. M., Niederweis, M. & Gundlach, J. H. Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore. Proc Natl Acad Sci U S A 105,20647-20652 (2008) .

[0171] 28. Wanunu, M., Morrison, W., Rabin, Y., Grosberg, A. Y. & Meller, A. Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient. Nat Nanotechnol 5,160-165 (2010) .

[0172] 表格

[0173] 表1. ClyA-SS和三种类型ClyA-CS纳米孔的参数。I型ClyA-SS和ClyA-CS的直径来自大肠杆菌ClyA的晶体结构。II型和III型ClyA-CS的直径从模型测得,所述模型是通过将一个(II型)或两个(III型)亚基添加到如补充信息(supplementary information)中所描述的12聚体的ClyA(晶体结构)的结构而建立的。测定纳米孔的直径,包括原子的范德瓦尔斯半径(补充信息)。误差以标准偏差给出。(\*数据来源<sup>7a</sup>)

[0174]

参数	I * 型 ClyA-SS	I 型 ClyA-CS	II 型 ClyA-CS	III 型 ClyA-CS
反式直径, nm	3.3	3.3	3.7	4.2
顺式直径, nm	5.5	5.5	5.9	6.5
在 -35 mV 下的纳米孔电导, nS	1.8±0.1	1.78±0.04	2.19±0.09	2.81±0.11
在-150mV 下的纳米孔电导, nS	NA	1.50±0.03	1.85±0.06	NA
在-35 mV 下的 HT 的 L2 占有率, %	22±5	30±10	96±2	100
在-35 mV 下的 HT 的水平 1, I <sub>RES</sub> %	56±1	56±1	68±1	NA
在-35 mV 下的 HT 的水平 2, I <sub>RES</sub> %	23±1	23±3	31±1	32±9
在-150 mV 下的 HT 的 L2 占有率, %	NA	100	100	NA
HT 的水平 2 (-150 mV), I <sub>RES</sub> , %	NA	23±2	31±5	NA
在-150 mV 下的 HT 停留时间, ms	NA	1.0±0.4	235±186	NA

[0175] 表2. 在ClyA SS基因的各轮定向进化过程中累积的突变

[0176]

轮	名称	克隆 ID	相对于 WT-ClyA 的序列变化
0	<b>ClyA-SS</b>	dSClyA	<b>C87S, C285S</b>
3		3ClyA1	<b>C87S</b> , F166Y, K230R, <b>C285S</b>
3		3ClyA2	Q73R, F166Y, <b>C285S</b>
3		3ClyA3	Q33R,Q56H, <b>C87S</b> ,D122G, <b>C285S</b>
4		4ClyA1	I4T,N128S,S145I, <b>C285S</b>
4		4ClyA2	S110I, <b>C285S</b> , F166Y, T223A
4		4ClyA3	T39I, <b>C285S</b> , F166Y, K230R
4	<b>ClyA-CS</b>	<i>4ClyA4</i>	L99Q,E103G, F166Y, <b>C285S</b> , K294R
4		4ClyA5	I4T, Q73R, <b>C285S</b>
4		4ClyA6	Q73R, F166Y, <b>C285S</b>

[0177]

5		5ClyA1	<b>C87A</b> , L99Q,E103G, <b>C285S</b> , F166Y,N220S, Q289R, K294R, H307Y
5		5ClyA2	<b>C87A</b> , L99Q,E103G, <b>C285S</b> , F166Y, Q289R, K294R, H307Y
5	<b>ClyA-AS</b>	<i>5ClyA3</i>	<b>C87A</b> , L99Q,E103G, <b>C285S</b> , F166Y, I203V, K294R, H307Y

[0178] 表3. 引物:N代表A、G、C或T;S代表G或C,因此NNS密码子编码全套的氨基酸

[0179]

名称	序列	SEQ ID NO
87NNS	GAAGCTACCCAAACGTTTACGAATGGNNSGGTGTG GTTACCCAGCTGCTG	17
T7 启动子	TAATACGACTCACTATAGGG	18
T7 终止子	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19
87C	GTTTACGAATGGTGTGGTGTGGTTACCCAG	20
285C	CGCTGCTGATATTCATTACAGGTATTAATCATTTTC	21

[0180] 表4. 本项工作中使用的DNA分子的介绍。1是通过PCR按方法中所述进行制备。3是通过将3a和过量20%的3b孵化然后利用如方法中所描述的亲和色谱法纯化来制备。在这两个DNA链中的互补序列如斜体所示。



[0181]

名称		DNA 序列	SEQ ID NO
1	1a	生 物 -5' TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTC TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG ACGGGTATCTTTGCGGAACAGACGGTGGAAAGTTGTGAAAAGT GCGATTGAAACGGCTGACGGTGCCTGGACCTGTATAATAAA TATCTGGATCAGGTCATCCCGTGGAAAACCTTTGACGAAACG ATTAAAGAACTGAGCCGTTTCAAACAGGAATACAGTCAAGAA GCGTCCGTCCTGGTGGGCGATATCAAAGTGCTGCTGATG3'	7
	1b	5' CATCAGCAGCACTTTGATATCGCCACCAGGACGGACGCT TCTTGACTGTATTCTGTGTTTGAACGGCTCAGTTCTTTAATCGT TTCGTCAAAGGTTTTCACGGGATGACCTGATCCAGATATTTA TTATACAGGTCCAGCGCACCGTCAGCCGTTTCAATCGCACTTT TCACAACCTCCACCGTCTGTTCGCAAAGATACCCGTCATATG TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGA AACCGTTGTGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA3'	8
2		5' TTTTTTTTATCTACGAATTCATCAGGGCTAAAGAGTGCAG AGTTACTTAG3'	9
3	3a	5' GGATGACCTGATCCAGATATTTATTATACAGGTCCAGCGCA CCGTCAGCCCAATCGCACTTTTCACAAAAAGAGAGAGATCGAT TACC3' -生物	10
	3b	5' GGTAATCGATCTCTCTCTCTTTTTGTGAAAAGTGCGATTGGGCT GACGGTGCGCTGGAC-3'	11
4		5' AATAAATATCTGGATCAGGTCATCCCTAAGTAACTCTGCA	12

[0182]

名称		DNA 序列	SEQ ID NO
		C3'	
5a		5' GGATGACCTGATCCAGATATTTATTATACAGGTCCAGCGC ACCGTCAGCCCAATCGCACTTTTCACAAAAAGAGAGAGAT CGATTACC3' 生物	13
5b		5'GGTAATCGATCTCTCTCTCTTTTTGTGAAAAGTGCGATTGGG CTGACGGTGCGCTGGACCTGTATAATAAATATCTGGATCAGG TCATCC3'	14
6		5' GCCCTATATTATCAGGTCATCCCTAAGTAACTCTGCA3'	15
7		5' TGCAGAGTTACTTAGGGATGACCTGATAATATAGGGC3'	16

[0183] ClyA序列

[0184]

描述	序列	SEQ ID NO
伤寒沙门氏菌 ( <i>S. typhi</i> ) ClyA (ClyA-WT)的蛋白质序列	MTGIFAEQTVEVVKSAIETADGALDLYNKYLDQV IPWKTFDETIKELSRFKQEYSQEASVLVGDIKVL MDSQDKYFEATQTVYEWCGVVTQLLSAYILLFD EYNEKKASAQKDILIRILDDGVKKLNEAQKSLT SQSFNNASGKLLALDSQLTNDFSEKSSYFQSQVD RIRKEAYAGAAAGIVAGPFGLIISYSIAAGVIEGKL IPELNNRLKTVQNFFTSLSATVKQANKDIDAAKL KLATEIAAIGEIKTETETTRFYVDYDDLMLSLK GAAKKMINTCNEYQQRHGKKTLEVPDV	SEQ ID NO:1
具有 C285S 取代的 ClyA (ClyA-CS) 的蛋白质序列	MTGIFAEQTVEVVKSAIETADGALDLYNKYLDQV IPWKTFDETIKELSRFKQEYSQEASVLVGDIKVL MDSQDKYFEATQTVYEWCGVVTQLLSAYIQLFD GYNEKKASAQKDILIRILDDGVKKLNEAQKSLT SQSFNNASGKLLALDSQLTNDFSEKSSYYQSQVD RIRKEAYAGAAAGIVAGPFGLIISYSIAAGVIEGKL IPELNNRLKTVQNFFTSLSATVKQANKDIDAAKL KLATEIAAIGEIKTETETTRFYVDYDDLMLSLK GAAKKMINTSNEYQQRHGRKTLFEVPDVGSSHHH HHH*	SEQ ID NO:2
ClyA-AS 的蛋白质序列	MTGIFAEQTVEVVKSAIETADGALDLYNKYLDQV IPWKTFDETIKELSRFKQEYSQEASVLVGDIKVL MDSQDKYFEATQTVYEWAGVVTQLLSAYIQLFD GYNEKKASAQKDILIRILDDGVKKLNEAQKSLT SQSFNNASGKLLALDSQLTNDFSEKSSYYQSQVD	SEQ ID NO:3

描述	序列	SEQ ID NO
	RIRKEAYAGAAAGIVAGPFLIISYSIAAGVVEGK LIPELNNRLKTVQNFFTSLSATVKQANKDIDAAKL KLATEIAAIGEIKTETETTRFYVDYDDLMLSLLKG AAKKMINTSNEYQQRHGRKTLFEVPDVGSSYHH HHH*	
伤寒沙门氏菌 ClyA 的核苷酸序列	CCTGCGTAGATAAGCAGGAAGCAGGCAGTATT TCCAGCTTCTGGAATGTAAAGCTACAAAAGTT GTCTGGAGGTAATAGGTAAGAATACTTTATAAA ACAGGTACTTAATTGCAATTTATATATTTAAAG AGGCAAATGATTATGACCGGAATATTTGCAGA ACAACTGTAGAGGTAGTTAAAAGCGCGATCG AAACCGCAGATGGGGCATTAGATCTTTATAACA AATACCTCGACCAGGTCATCCCCTGGAAGACCT TTGATGAAACCATAAAAAGAGTTAAGCCGTTTTA AACAGGAGTACTCGCAGGAAGCTTCTGTTTTAG TTGGTGATATTAAAGTTTTGCTTATGGACAGCC AGGACAAGTATTTTGAAGCGACACAACTGTTT ATGAATGGTGTGGTGTGCGTGACGAATTACTCT CAGCGTATATTTTACTATTTGATGAATATAATG AGAAAAAGCATCAGCCCAGAAAGACATTCTC ATTAGGATATTAGATGATGGTGTCAAGAACTG AATGAAGCGCAAAAATCTCTCCTGACAAGTTCA CAAAGTTTCAACAACGCTTCCGGAAGAACTGCTG GCATTAGATAGCCAGTTAACTAATGATTTTTTCG GAAAAAAGTAGTTATTTCCAGTCACAGGTGGAT AGAATTCGTAAGGAAGCTTATGCCGGTGCTGCA GCCGGCATAGTCGCCGGTCCGTTTGGATTAATT ATTCCTATTCTATTGCTGCGGGCGTGATTGAA GGGAAATTGATTCCAGAATTGAATAACAGGCT AAAAACAGTGCAAAATTTCTTTACTAGCTTATC AGCTACAGTGAAACAAGCGAATAAAGATATCG ATGCGGCAAAATTGAAATTAGCCACTGAAATA GCAGCAATTGGGGAGATAAAAACGGAAACCGA AACAACCAGATTCTACGTTGATTATGATGATTT AATGCTTTCTTTATTTAAAGGAGCTGCAAAGAA AATGATTAACACCTGTAATGAATACCAACAAA GACACGGTAAGAAGACGCTTTTCGAGGTTCCCTG ACGTCTGATACATTTTCATTCGATCTGTGTACTT	SEQ ID NO: 4

[0185]

描述	序列	SEQ ID NO
	TTAACGCCCCGATAGCGTAAAGAAAATGAGAGACGGAGAAAAAGCGATATTCAACAGCCCGATAACAAGAGTCGTTACCGGGCTGACGAGGTTATCAGGCGTTAAGCTGGTAG	
具有 C285S 取代的 ClyA (ClyA-CS) 的核苷酸序列	ATGACGGGTATCTTTGCGGAACAGACGGTGGAAGTTGTGAAAAGTGCGATTGAAACGGCTGACGTGCGCTGGACCTGTATAATAAATATCTGGATCAGGTCATCCCGTGGAACCTTTGACGAAACGATTAAAGAACTGAGCCGTTTCAAACAGGAATACAGTCAAGAAGCGTCCGTCCTGGTGGGCGATATCAAAGTGCTGCTGATGGATTCTCAGGACAAATATTTGAAGCTACCCAAACGGTTTACGAATGGTGTGGTGTGGTTACCCAGCTGCTGTCCGCATATATTCAGCTGTTTCGATGGATACAACGAGAAAAAAGCGAGCGCGCAGAAAGACATTCTGATCCGCATTCGGATGACGGCGTGAAAAAACTGAATGAAGCCAGAAATCGCTGCTGACCAGCTCTCAATCATTTAACAAATGCCTCGGGTAAACTGCTGGCACTGGATAGCCAGCTGACGAACGACTTTTCTGAAAAAAGTTCCTATTACCAGAGCCAAGTCGATCGTATTCGTAAAGAAGCCTACGCAGGTGCCGCAGCAGGTATGTGGCCGGTCCGTTTCGGTCTGATTATCTCATATTCGATTGCTGCGGGCGTTATCGAAGGTAAACTGATTCCGGAAGTGAACAATCGTCTGAAAACCGTTCAGAACTTTTTCACCAGTCTGTCTGCTACGGTCAAACAAGCGAATAAAGATATCGACGCCGCAAACTGAAACTGGCCACGGAATCGCTGCGATTGGCGAAATCAAAACCGAAACGGAACACGCGCTTTTATGTTGATTACGATGACCTGATGCTGAGCTGCTGAAAGGTGCCGCAAGAAAATGATTAACTCTCTAATGAATATCAGCAGCGTCACGGTAGAAAAACCTGTTTGAAGTCCCGGATGTGGGCAGCAGCCACCACCATCATCACTACTAAAAGCTTGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAA	SEQ ID NO: 5
ClyA-AS 的核苷酸序列	ATGACGGGTATCTTTGCGGAACAGACGGTGGAAGTTGTGAAAAGTGCGATTGAAACGGCTGACGTGCGCTGGACCTGTATAATAAATATCTGGATCAGGTCATCCCGTGGAACCTTTGACGAAACG	SEQ ID NO:6

[0186]

[0187]

描述	序列	SEQ ID NO
	ATTAAAGAACTGAGCCGTTTCAAACAGGAATA CAGTCAAGAAGCGTCCGTCCTAGTGGGCGATAT CAAAGTGCTGCTGATGGATTCTCAGGACAAATA TTTTGAAGCTACCCAAACGGTTTACGAATGGGC GGGTGTGGTTACCCAGCTGCTGTCCGCATATAT TCAGCTGTTTCGATGGATACAATGAGAAAAAAG CGAGCGCGCAGAAAGACATTCTGATCCGCATTC TGGATGACGGCGTGAAAAAACTGAATGAAGCC CAGAAATCGCTGCTGACCAGCTCTCAATCATTT AACAAATGCCTCGGGTAAACTGCTGGCACTGGAT AGCCAGCTGACGAACGACTTTTCTGAAAAAAGT TCCTATTACCAGAGCCAAGTCGATCGTATTCGT AAAGAAGCCTACGCAGGTGCCGCAGCAGGTAT TGTGGCCGGTCCGTTCCGGTCTGATTATCTCATAT TCAATTGCTGCGGGCGTTGTCTGAAGGTAAACTG ATTCCGGAACCTGAACAATCGTCTGAAAACCGTT CAGAACTTTTTACCCAGTCTGTCTGCTACGGTC AAACAAGCGAATAAAGATATCGACGCCGCAAA ACTGAAACTGGCCACGGAAATCGCTGCGATTG GCGAAATCAAAACCGAAACGGAAACCACGCGC TTTTATGTTGATTACGATGACCTGATGCTGAGC CTGCTGAAAGGTGCCGCGAAGAAAATGATTAA TACCTCTAATGAATATCAGCAGCGTCACGGTAG AAAAACCCTGTTTGAAGTCCCGGATGTGGGCAG CAGCTACCACCATCATCACCCTAAAAGCTT	

## 序列表

<110> 比利时鲁汶天主教大学

<120> 检测蛋白质和核酸的纳米孔生物传感器

<130> 913039 AC/fd

<140> PCT/BE(NYK)

<141> 2014-03-25

<150> GB1313477.0

<151> 2013-07-29

<150> US61/805,068

<151> 2013-03-25

<160> 21

[0001]

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 303

<212> PRT

<213> 伤寒沙门氏菌

<400> 1

Met Thr Gly Ile Phe Ala Glu Gln Thr Val Glu Val Val Lys Ser Ala

1 5 10 15

Ile Glu Thr Ala Asp Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Asn Lys Tyr Leu Asp

20 25 30

Gln Val Ile Pro Trp Lys Thr Phe Asp Glu Thr Ile Lys Glu Leu Ser

35 40 45

Arg Phe Lys Gln Glu Tyr Ser Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Gly Asp  
50 55 60

Ile Lys Val Leu Leu Met Asp Ser Gln Asp Lys Tyr Phe Glu Ala Thr  
65 70 75 80

Gln Thr Val Tyr Glu Trp Cys Gly Val Val Thr Gln Leu Leu Ser Ala  
85 90 95

Tyr Ile Leu Leu Phe Asp Glu Tyr Asn Glu Lys Lys Ala Ser Ala Gln  
100 105 110

Lys Asp Ile Leu Ile Arg Ile Leu Asp Asp Gly Val Lys Lys Leu Asn  
115 120 125

[0002]

Glu Ala Gln Lys Ser Leu Leu Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asn Asn Ala  
130 135 140

Ser Gly Lys Leu Leu Ala Leu Asp Ser Gln Leu Thr Asn Asp Phe Ser  
145 150 155 160

Glu Lys Ser Ser Tyr Phe Gln Ser Gln Val Asp Arg Ile Arg Lys Glu  
165 170 175

Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu  
180 185 190

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

Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser  
210 215 220

Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys  
225 230 235 240

Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu  
245 250 255

Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser  
260 265 270

Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Cys Asn Glu Tyr  
275 280 285

[0003]

Gln Gln Arg His Gly Lys Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val  
290 295 300

<210> 2

<211> 312

<212> PRT

<213> 伤寒沙门氏菌

<400> 2

Met Thr Gly Ile Phe Ala Glu Gln Thr Val Glu Val Val Lys Ser Ala  
1 5 10 15

Ile Glu Thr Ala Asp Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Asn Lys Tyr Leu Asp  
20 25 30



Gln Val Ile Pro Trp Lys Thr Phe Asp Glu Thr Ile Lys Glu Leu Ser  
35 40 45

Arg Phe Lys Gln Glu Tyr Ser Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Gly Asp  
50 55 60

Ile Lys Val Leu Leu Met Asp Ser Gln Asp Lys Tyr Phe Glu Ala Thr  
65 70 75 80

Gln Thr Val Tyr Glu Trp Cys Gly Val Val Thr Gln Leu Leu Ser Ala  
85 90 95

Tyr Ile Gln Leu Phe Asp Gly Tyr Asn Glu Lys Lys Ala Ser Ala Gln  
100 105 110

[0004]

Lys Asp Ile Leu Ile Arg Ile Leu Asp Asp Gly Val Lys Lys Leu Asn  
115 120 125

Glu Ala Gln Lys Ser Leu Leu Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asn Asn Ala  
130 135 140

Ser Gly Lys Leu Leu Ala Leu Asp Ser Gln Leu Thr Asn Asp Phe Ser  
145 150 155 160

Glu Lys Ser Ser Tyr Tyr Gln Ser Gln Val Asp Arg Ile Arg Lys Glu  
165 170 175

Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu

	180	185	190
Ile Ile Ser Tyr Ser Ile Ala Ala Gly Val Ile Glu Gly Lys Leu Ile			
	195	200	205
Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser			
	210	215	220
Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys			
225	230	235	240
Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu			
	245	250	255
[0005]	Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser		
	260	265	270
Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Ser Asn Glu Tyr			
	275	280	285
Gln Gln Arg His Gly Arg Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Gly			
	290	295	300
Ser Ser His His His His His His			
305	310		
<210>	3		
<211>	312		
<212>	PRT		
<213>	伤寒沙门氏菌		

&lt;400&gt; 3

Met Thr Gly Ile Phe Ala Glu Gln Thr Val Glu Val Val Lys Ser Ala

1 5 10 15

Ile Glu Thr Ala Asp Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Asn Lys Tyr Leu Asp

20 25 30

Gln Val Ile Pro Trp Lys Thr Phe Asp Glu Thr Ile Lys Glu Leu Ser

35 40 45

Arg Phe Lys Gln Glu Tyr Ser Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Gly Asp

50 55 60

[0006]

Ile Lys Val Leu Leu Met Asp Ser Gln Asp Lys Tyr Phe Glu Ala Thr

65 70 75 80

Gln Thr Val Tyr Glu Trp Ala Gly Val Val Thr Gln Leu Leu Ser Ala

85 90 95

Tyr Ile Gln Leu Phe Asp Gly Tyr Asn Glu Lys Lys Ala Ser Ala Gln

100 105 110

Lys Asp Ile Leu Ile Arg Ile Leu Asp Asp Gly Val Lys Lys Leu Asn

115 120 125

Glu Ala Gln Lys Ser Leu Leu Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asn Asn Ala

130 135 140

Ser Gly Lys Leu Leu Ala Leu Asp Ser Gln Leu Thr Asn Asp Phe Ser  
145 150 155 160

Glu Lys Ser Ser Tyr Tyr Gln Ser Gln Val Asp Arg Ile Arg Lys Glu  
165 170 175

Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu  
180 185 190

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

Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser  
210 215 220

[0007]

Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys  
225 230 235 240

Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu  
245 250 255

Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser  
260 265 270

Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Ser Asn Glu Tyr  
275 280 285

Gln Gln Arg His Gly Arg Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Gly  
290 295 300

Ser Ser Tyr His His His His His		
305	310	
<210> 4		
<211> 1194		
<212> DNA		
<213> 伤寒沙门氏菌		
<400> 4		
	cctgcgtaga taagcaggaa gcaggcagta ttccagctt ctggaatgtt aaagctacaa	60
	aagttgtctg gaggtaatag gtaagaatac ttataaaac aggtacttaa ttgcaattta	120
	tatatttaa gaggc aaatg attatgaccg gaattttgc agaacaaact gtagaggtag	180
	ttaaagcgc gatcgaaacc gcagatgggg cattagatct ttatacaaa tacctcgacc	240
[0008]	aggatcatccc ctggaagacc ttgatgaaa ccataaaaga gttaagccgt tttaaacagg	300
	agtactcgca ggaagcttct gtttagttg gtgatattaa agttttgctt atggacagcc	360
	aggacaagta tttgaagcg acacaaactg ttatgaatg gtgtggtgtc gtgacgcaat	420
	tactctcagc gtatatttta ctattgatg aatataatga gaaaaaagca tcagcccaga	480
	aagacattct cattaggata ttagatgatg gtgtcaagaa actgaatgaa gcgcaaaaat	540
	ctctcctgac aagttcacia agtttcaaca acgcttccgg aaaactgctg gcattagata	600
	gccagttaac taatgatatt tcggaaaaaa gtagtatttt ccagtcacag gtggatagaa	660
	ttcgtaagga agcttatgcc ggtgctgcag ccggcatagt cgccggtccg ttggattaa	720
	ttatttccta ttctattgct gcgggcgtga ttgaaggga attgattcca gaattgaata	780
	acaggctaaa aacagtgcaa aatttcttta ctagcttatc agctacagtg aaacaagcga	840

	ataaagatat cgatgcggca aaattgaaat tagccactga aatagcagca attggggaga	900
	taaaaacgga aaccgaaaca accagattct acgttgatta tgatgattta atgctttctt	960
	tattaaaagg agctgcaaag aaaatgatta acacctgtaa tgaataccaa caaagacacg	1020
	gtaagaagac gcttttcgag gttcctgacg tctgatacat ttccattcga tctgtgtact	1080
	tttaacgccc gatagcgtaa agaaaatgag agacggagaa aaagcgatat tcaacagccc	1140
	gataaacaag agtcgttacc gggctgacga ggttatcagg cgtaagctg gtag	1194
	<210> 5	
	<211> 971	
	<212> DNA	
	<213> 伤寒沙门氏菌	
[0009]	<400> 5	
	atgacgggta tctttgcgga acagacgggtg gaagtgtga aaagtgcgat tgaacggct	60
	gacggtgcgc tggacctgta taataaatat ctggatcagg tcatcccgtag gaaaaccttt	120
	gacgaaacga ttaaagaact gagccgttgc aaacaggaat acagtcaaga agcgtccgtc	180
	ctggtgggcg atatcaaagt gctgctgatg gattctcagg acaaatattt tgaagctacc	240
	caaacgggtt acgaatggtg tgggtgtggtt acccagctgc tgcgcgata tattcagctg	300
	ttcgatggat acaacgagaa aaaagcgagc gcgcagaaag acattctgat ccgcattctg	360
	gatgacggcg tgaaaaaact gaatgaagcc cagaaatcgc tgctgaccag ctctcaatca	420
	tttaacaatg cctcgggtaa actgctggca ctggatagcc agctgacgaa cgactttct	480
	gaaaaaagt cctattacca gagccaagtc gatcgtattc gttaaagaagc ctacgcaggt	540
	gccgcagcag gtattgtggc cggtcggttc ggtctgatta tctcatattc gattgctgcg	600

	ggcgttatcg aaggtaaact gattccggaa ctgaacaatc gtctgaaaac cgttcagaac	660
	ttttcacca gtctgtctgc tacggtcaaa caagcgaata aagatcga cgccgcaaaa	720
	ctgaaactgg ccacggaaat cgctgcgatt ggcgaaatca aaaccgaaac ggaaaccacg	780
	cgcgtttatg ttgattacga tgacctgatg ctgagcctgc tgaaaggtgc cgcaagaaa	840
	atgattaata cctctaata atacagcag cgtcacgta gaaaaaccct gtttgaagtc	900
	ccggatgtgg gcagcagcca ccacatcat caccactaaa agcttgatc cggtgctaa	960
	caaagcccga a	971
[0010]	<210> 6	
	<211> 945	
	<212> DNA	
	<213> 伤寒沙门氏菌	
	<400> 6	
	atgacgggta tctttgcgga acagacgggtg gaagtgtga aaagtgcgat tgaaacggct	60
	gacggtgcgc tggacctgta taataaatat ctggatcagg tcatcccggtg gaaaaccttt	120
	gacgaaacga ttaaagaact gagccgtttc aaacaggaat acagtcaaga agcgtccgtc	180
	ctagtgggcg atatcaaagt gctgctgatg gattctcagg acaaatattt tgaagctacc	240
	caaacggttt acgaatgggc ggggtgtggtt acccagctgc tgtccgcata tattcagctg	300
	ttcgatggat acaatgagaa aaaagcgagc gcgcagaaag acattctgat ccgcattctg	360
	gatgacggcg tgaaaaaact gaatgaagcc cagaaatcgc tgctgaccag ctctcaatca	420
	tttaacaatg cctcgggttaa actgctggca ctggatagcc agctgacgaa cgacttttct	480
	gaaaaaagt cctattacca gagccaagtc gatcgtattc gtaaagaagc ctacgcaggt	540

gccgcagcag gtattgtggc cggtccttc ggtctgatta tctcatattc aattgctgcg 600  
ggcgttgcg aaggtaaact gattccggaa ctgaacaatc gtctgaaaac cgttcagaac 660  
ttttcacca gtctgtctgc tacggtcaaa caagcgaata aagatatcga cgccgcaaaa 720  
ctgaaactgg ccacggaaat cgctgcgatt ggcgaaatca aaaccgaaac ggaaaccacg 780  
cgcttttatg ttgattacga tgacctgatg ctgagcctgc tgaaagggtc cgcaagaaa 840  
atgattaata cctctaata gaatcagcag cgtcacggta gaaaaaccct gtttgaagtc 900  
ccggatgtgg gcagcagcta ccaccatcat caccactaaa agctt 945

<210> 7  
<211> 290  
<212> DNA  
<213> 人工序列

[0011]

<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 7  
taatacgact cactataggg agaccacaac ggttccttc tagaataat ttgtttaac 60  
ttaagaagg agatatacat atgacgggta tctttgcgga acagacggtg gaagttgtga 120  
aaagtgcgat tgaacggct gacggtgcgc tggacctgta taataaatat ctggatcagg 180  
tcatcccgta gaaaaccttt gacgaaacga ttaaagaact gagccgttc aaacaggaat 240  
acagtcaaga agcgtccgtc ctggtgggag atatcaaagt gctgctgatg 290

<210> 8  
<211> 290  
<212> DNA  
<213> 人工序列



	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	8	
	catcagcagc actttgatat cgcccaccag gacggacgct tcttgactgt attcctgttt		60
	gaaacggctc agttcttttaa tcgtttcgtc aaaggttttc cacgggatga cctgatccag		120
	atatttatta tacagggtcca gcgcaccgtc agccgtttca atcgcacttt tcacaacttc		180
	caccgtctgt tccgcaaaga taccggtcat atgtatatct ccttcttaaa gttaaacaaa		240
	attatttcta gagggaaacc gttgtgggtct ccctatagtg agtcgtatta		290
	<210>	9	
	<211>	51	
	<212>	DNA	
[0012]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	9	
	tttttttta tctacgaatt catcagggtt aaagagtgc gagttactta g		51
	<210>	10	
	<211>	90	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	10	
	ggatgacctg atccagatat ttattataca ggtccagcgc accgtcagcc caatcgcaact		60

	tttcacaaaa agagagagag atcgattacc	90
	<210> 11	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 11	
	ggtaatcgat ctctctctct tttgtgaaa agtgcgattg ggctgacggt gcgctggac	59
	<210> 12	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0013]	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 12	
	aataaatatc tggatcaggt catccctaag taactctgca c	41
	<210> 13	
	<211> 90	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 13	
	ggatgacctg atccagatat ttattatata ggccagcgc accgtcagcc caatcgact	60
	tttcacaaaa agagagagag atcgattacc	90

	<210> 14	
	<211> 90	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 14	
	ggtaatcgat ctctctctct tttgtgaaa agtgcgattg ggctgacggt gcgctggacc	60
	tgataataa atatctggat caggtcatcc	90
	<210> 15	
	<211> 37	
	<212> DNA	
[0014]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 15	
	gccctatatt atcaggtcat ccctaagtaa ctctgca	37
	<210> 16	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 16	
	tgacagagtta cttagggatg acctgataat atagggc	37

<210> 17  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<220>  
<221> 混杂特征 (misc\_feature)  
<222> (28)..(29)  
<223> n 为 a, c, g 或 t

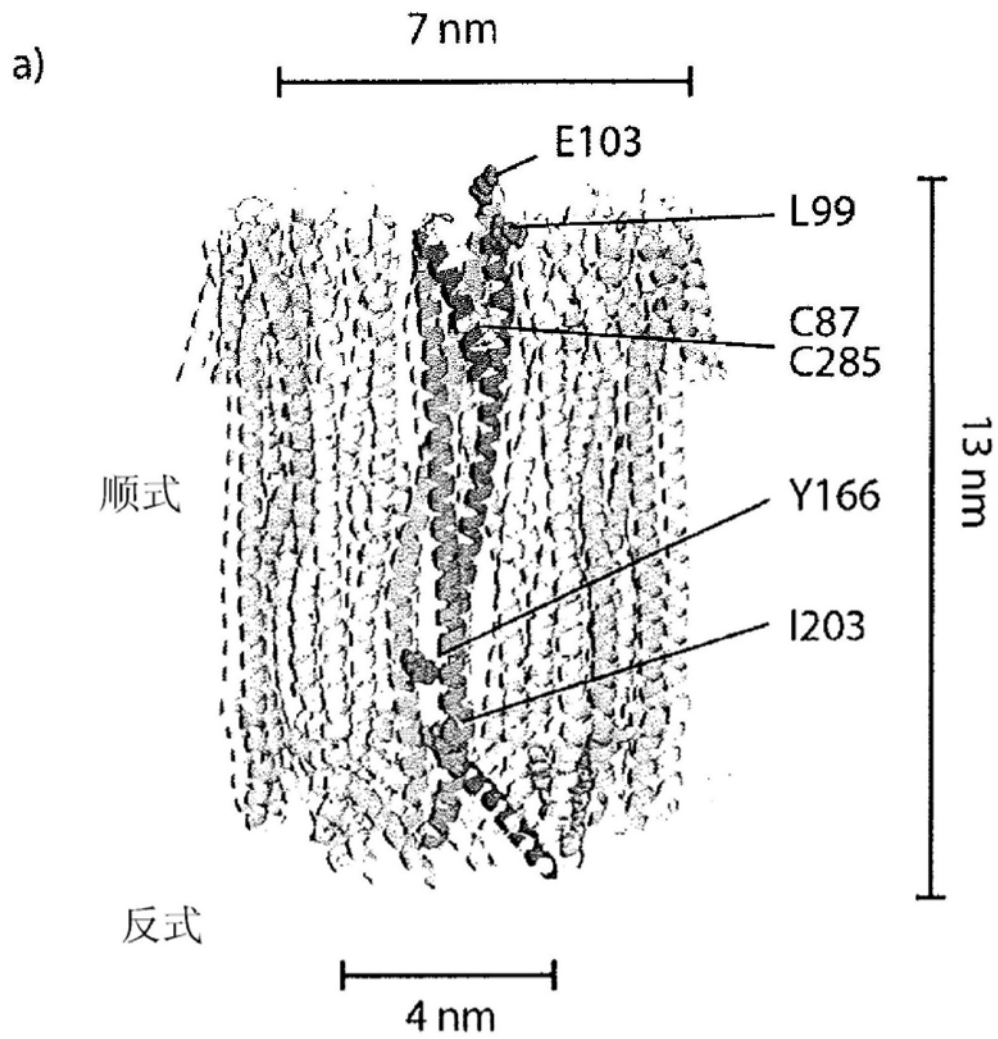
<400> 17  
gaagctaccc aaacgggtta cgaatgggns ggtgtgggta cccagctgct g 51

[0015] <210> 18  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

<400> 18  
taatacgact cactataggg 20

<210> 19  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成的寡核苷酸

	<400> 19	
	gctagttatt gctcagcgg	19
	<210> 20	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
[0016]	<400> 20	
	gtttacgaat ggtgtggtgt ggttaccag	30
	<210> 21	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 21	
	cgctgctgat attcattaca ggtattaatc atttc	36



b)

轮	名称	序列变化
0	ClyA-SS	C87S, C285S
4	ClyA-CS	L99Q, E103G, F166Y, C285S, K294R
5	ClyA-AS	C87A, L99Q, E103G, F166Y, I203V, C285S, K294R, H307Y

图1

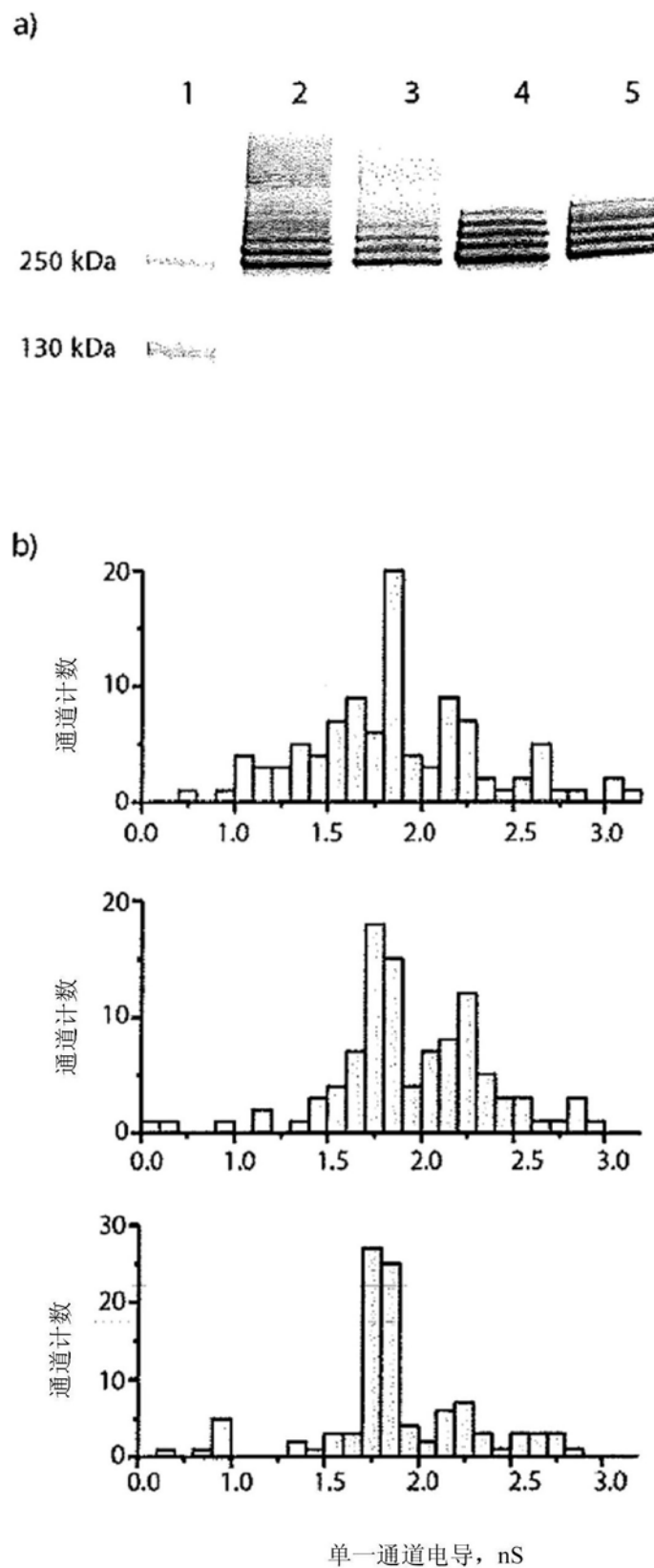


图2

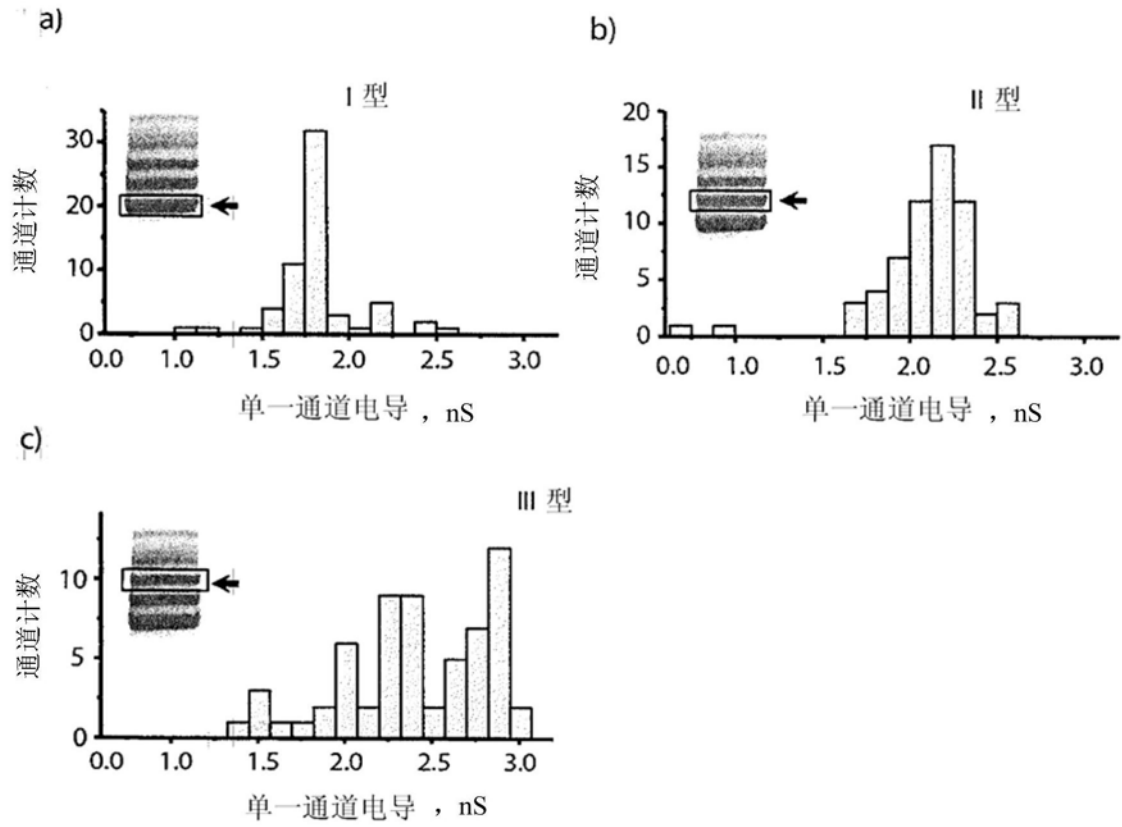


图3

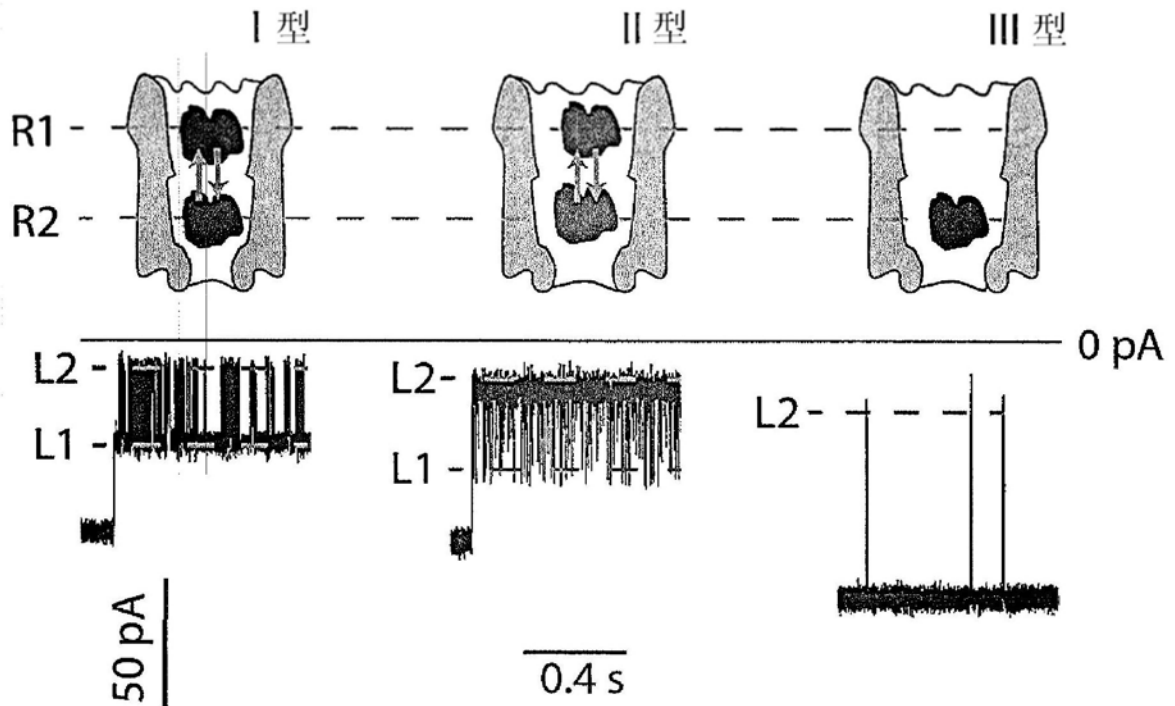


图4



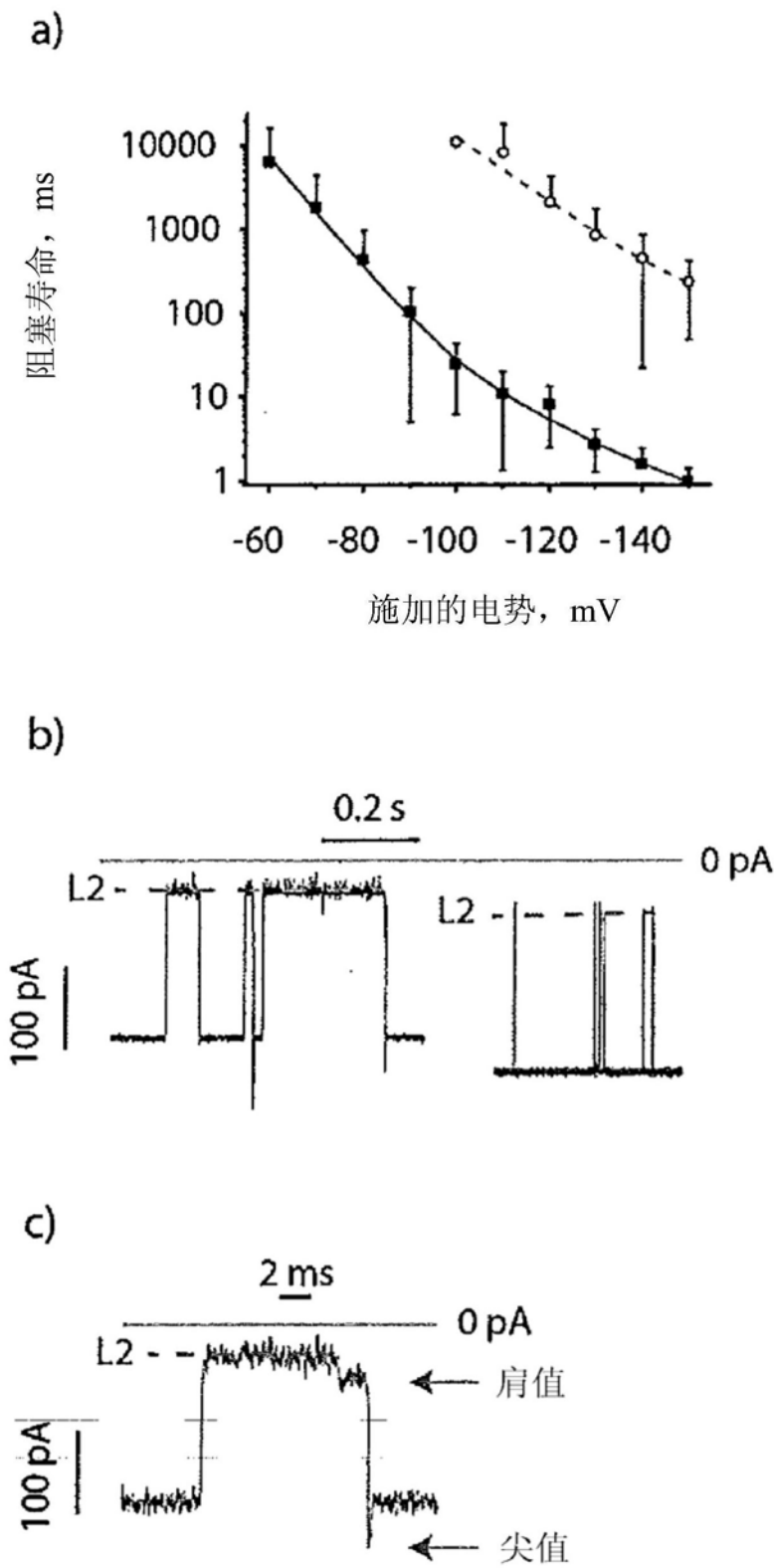


图5

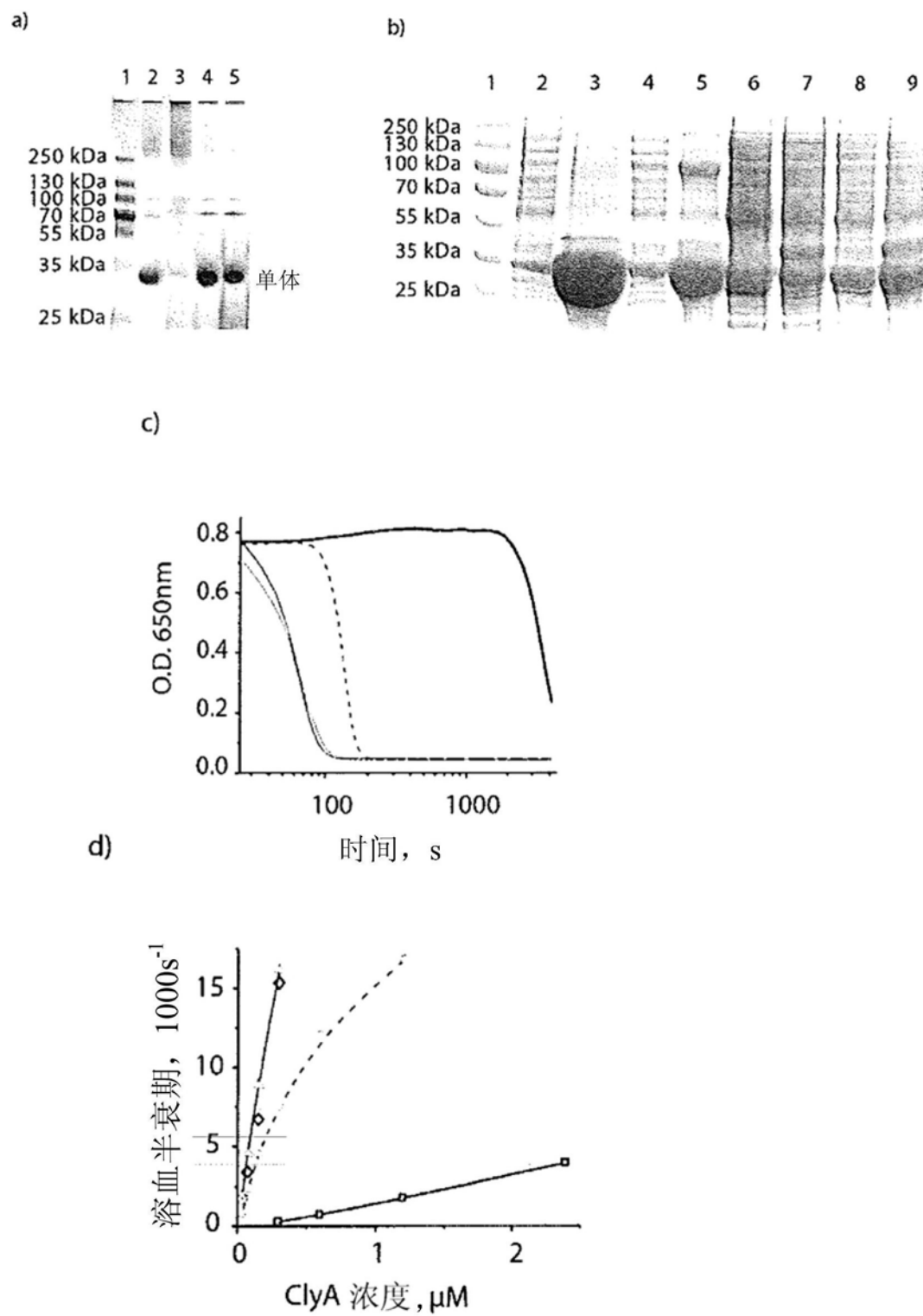


图6

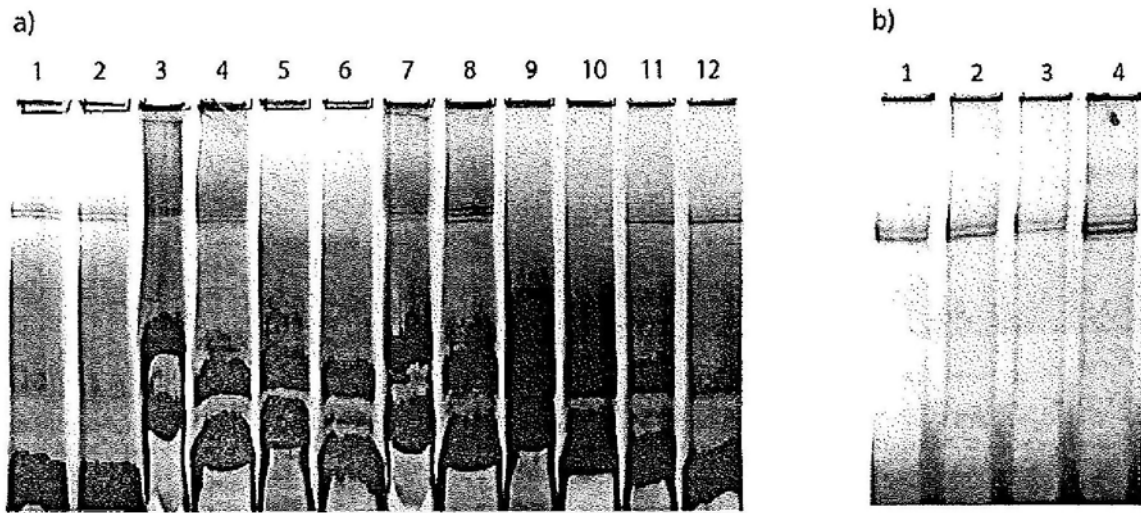


图7

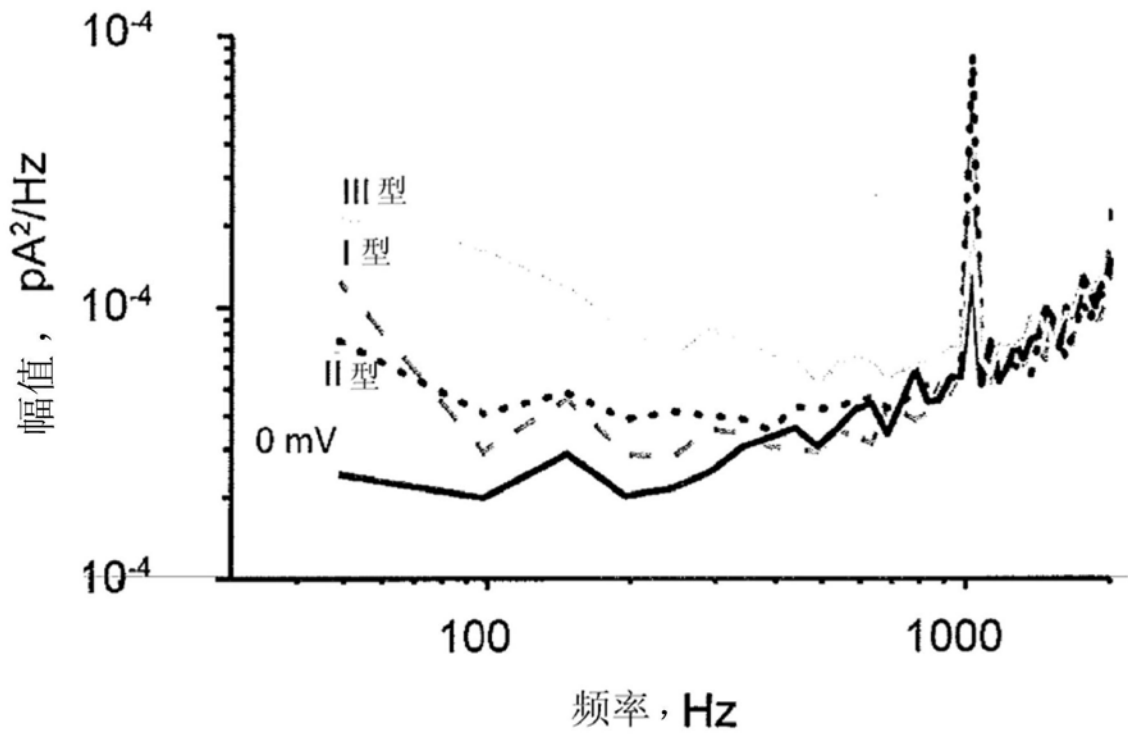


图8

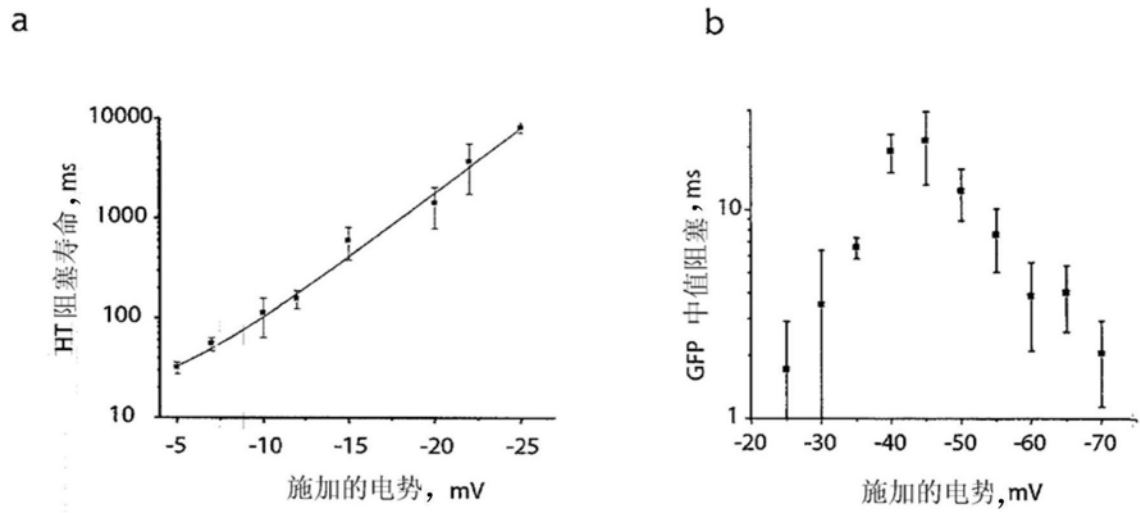


图9

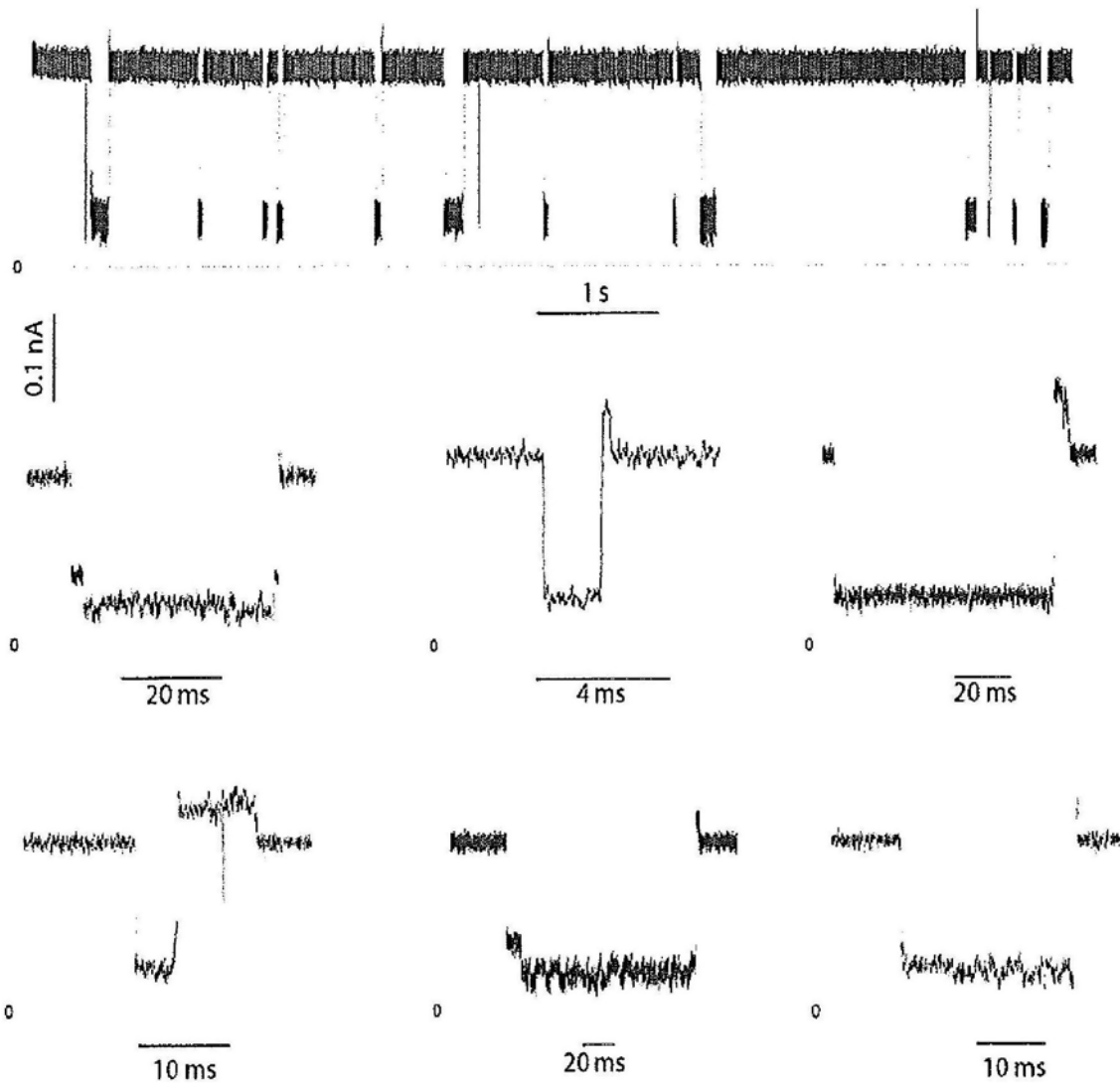


图10

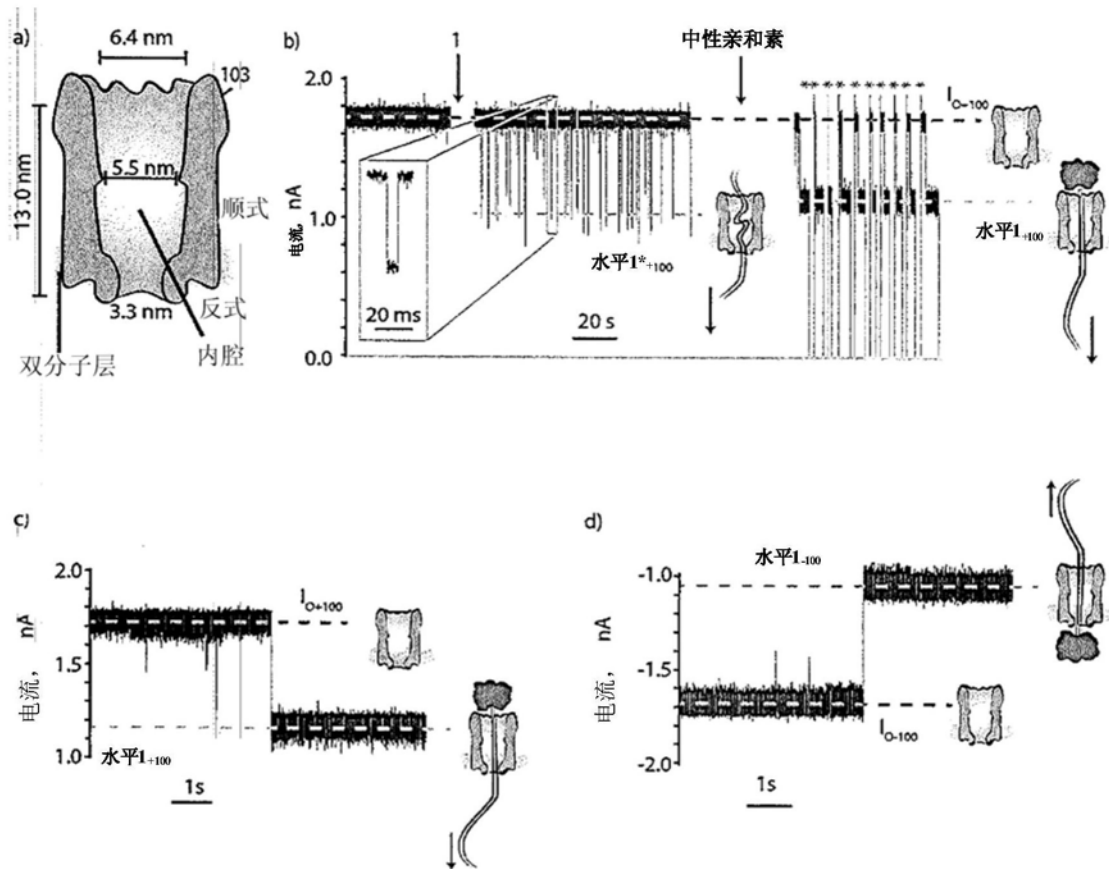


图11

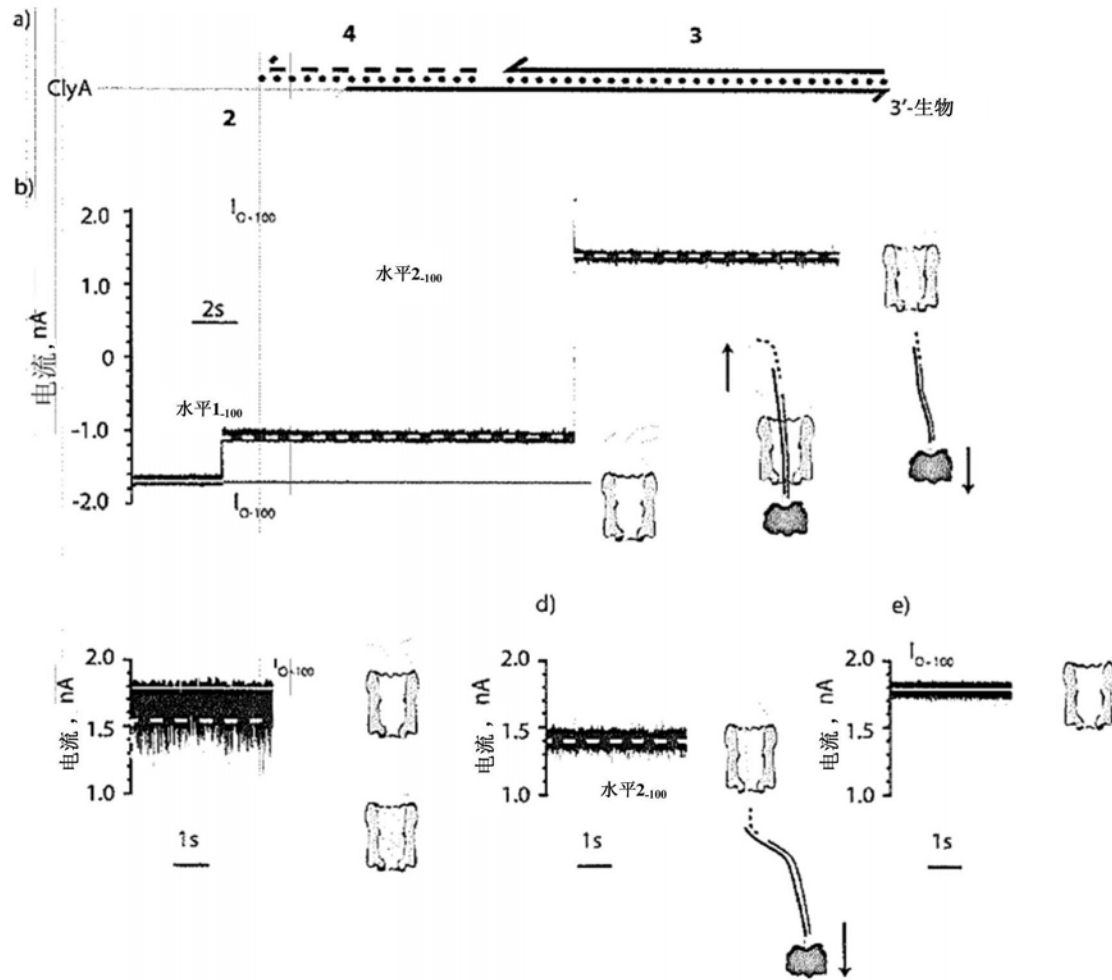


图12

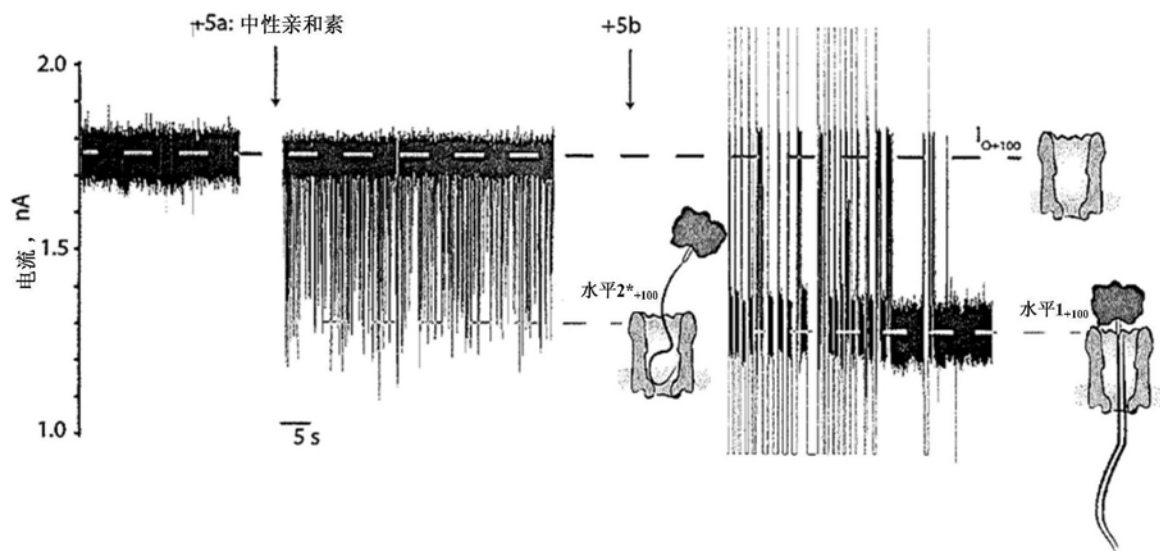


图13

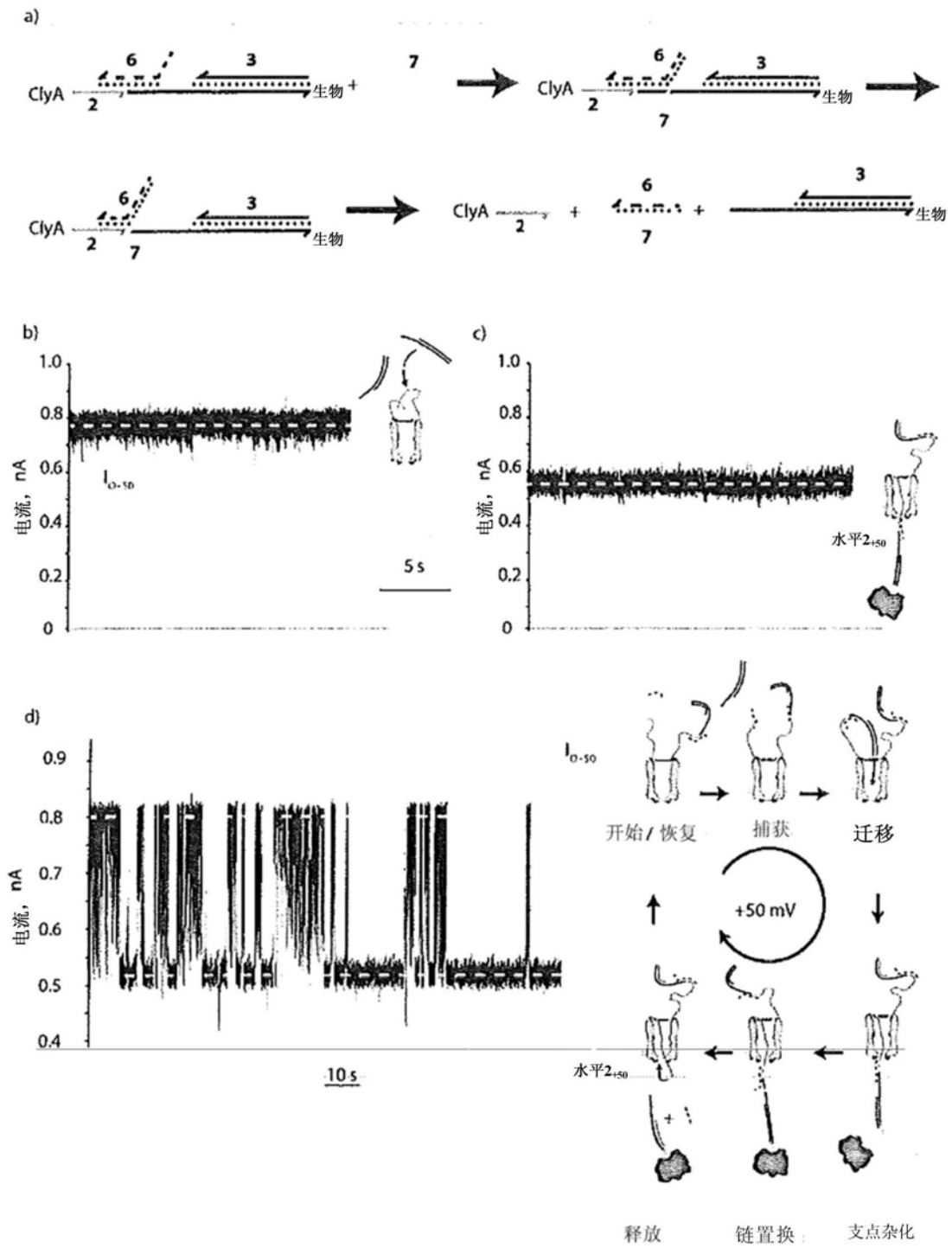


图14

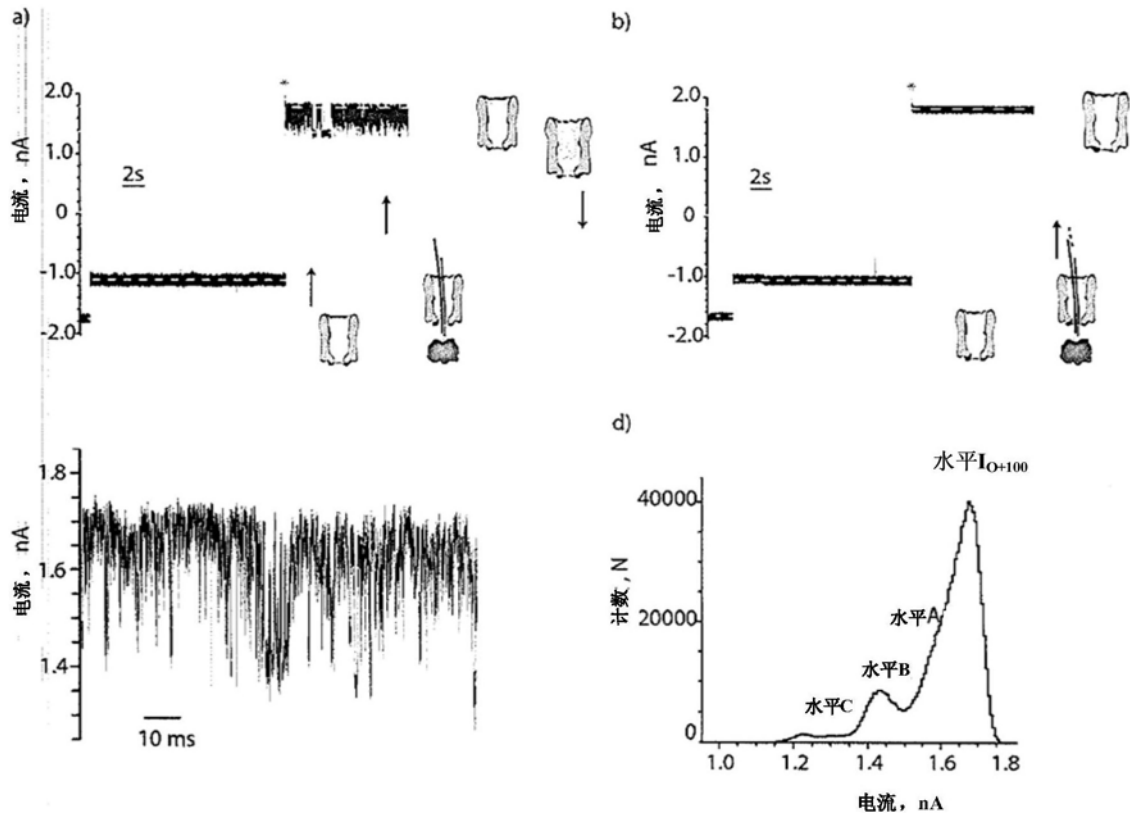


图15

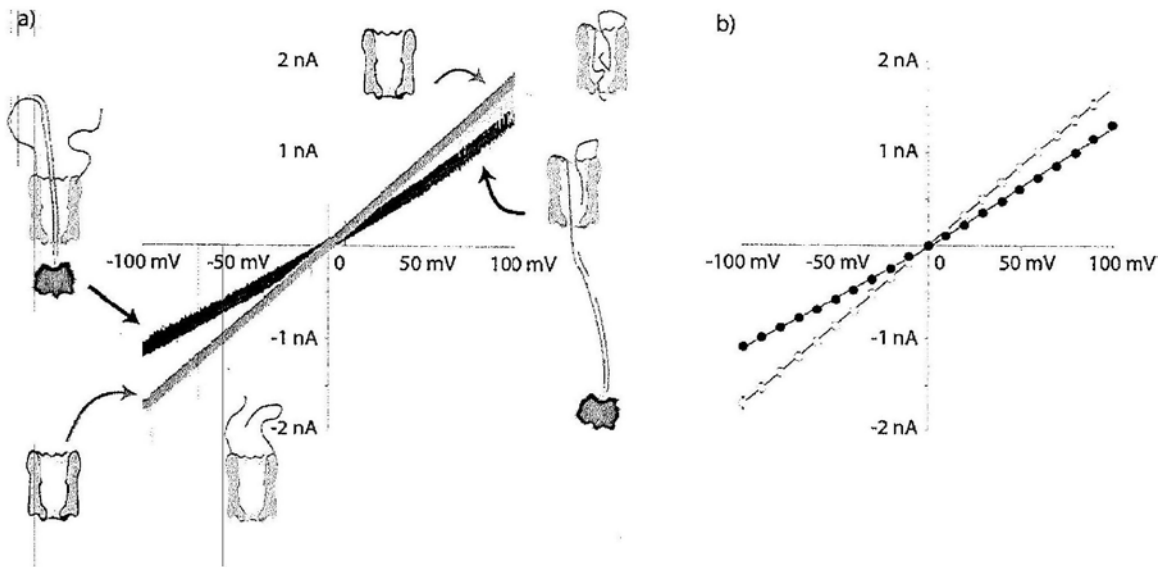


图16



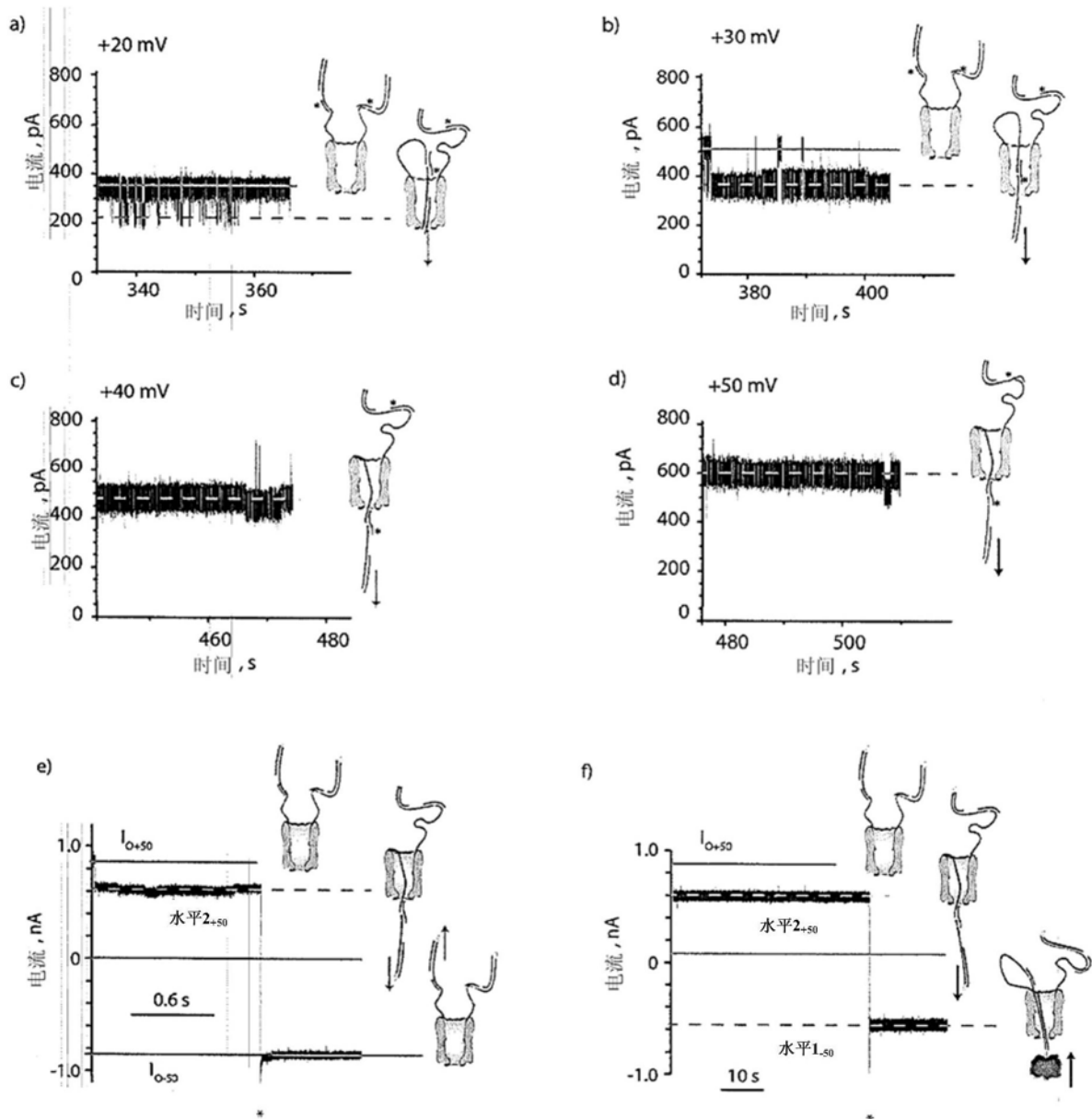


图17

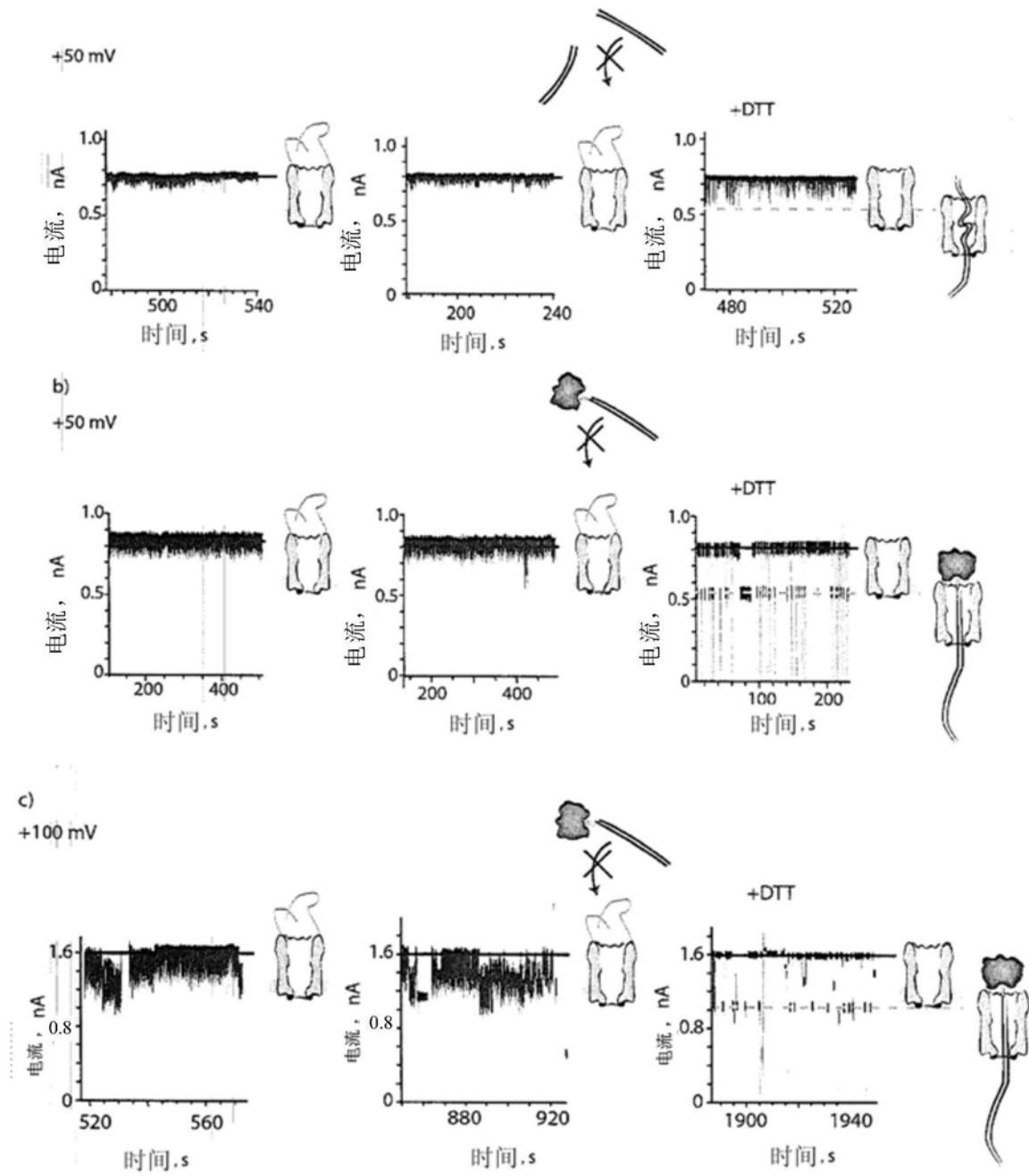


图18

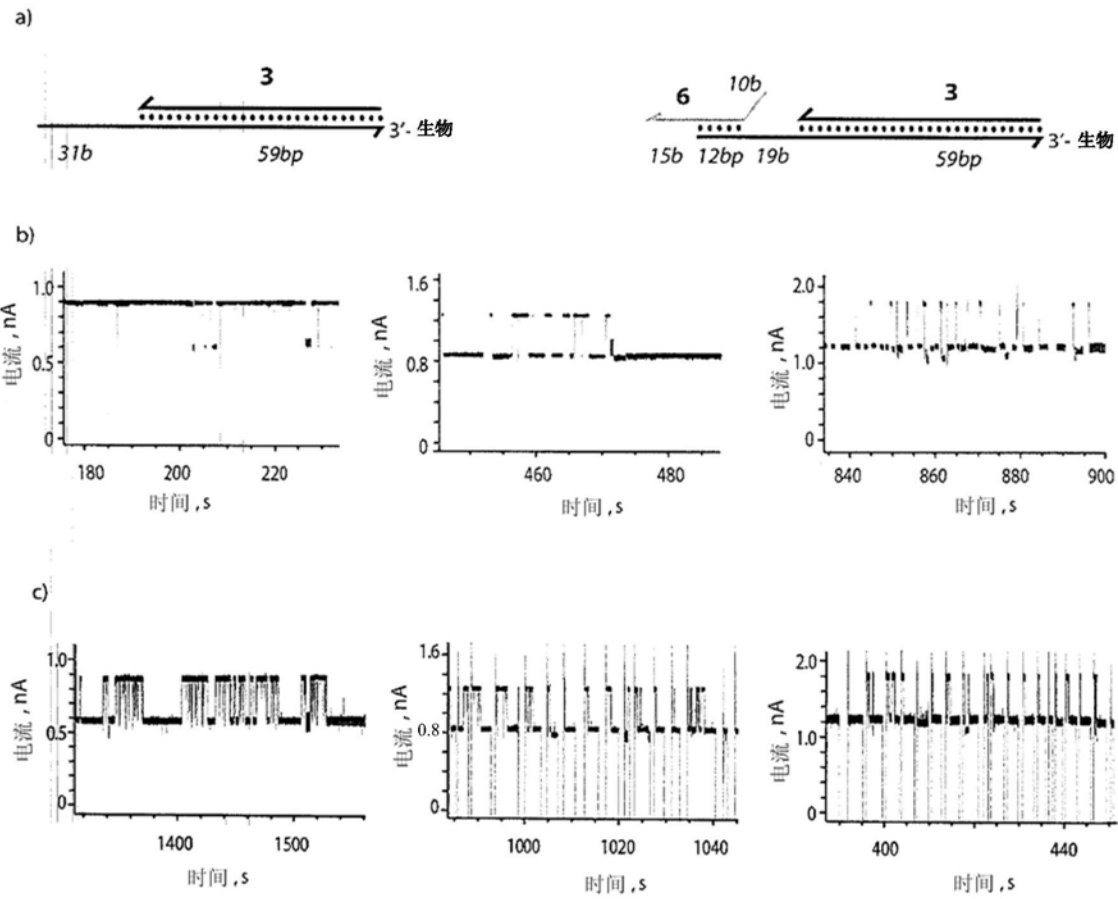


图19

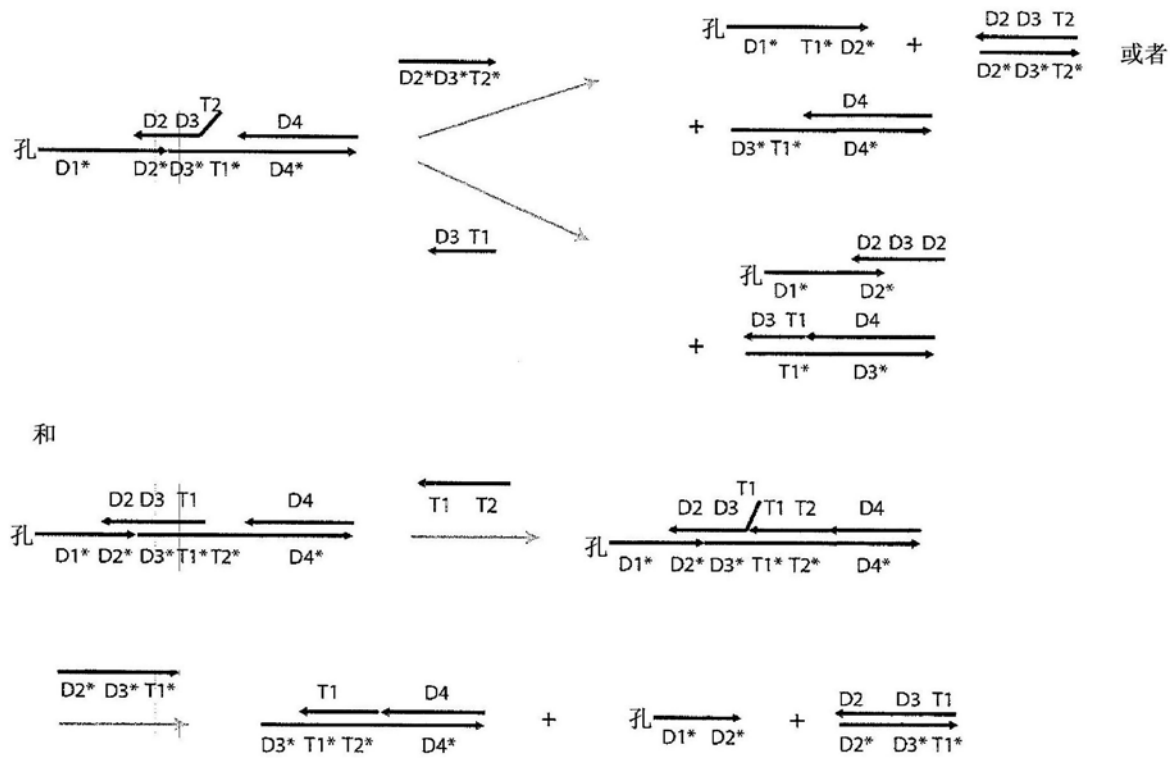


图20

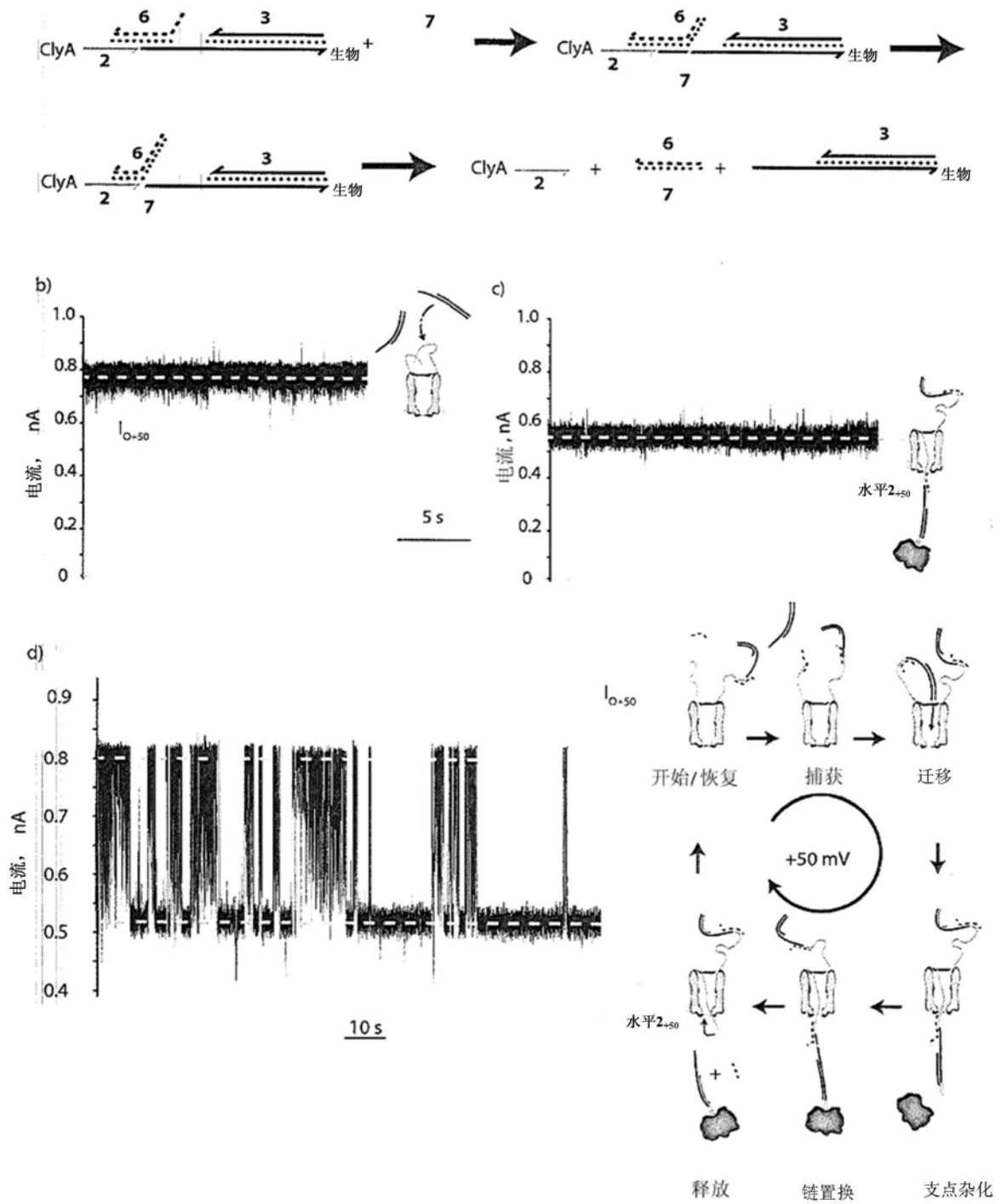


图21