



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104936682 B

(45)授权公告日 2017.12.15

(21)申请号 201380068550.0

(22)申请日 2013.10.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104936682 A

(43)申请公布日 2015.09.23

(30)优先权数据
61/718,982 2012.10.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.06.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2013/052767 2013.10.23

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/064444 EN 2014.05.01

(73)专利权人 牛津纳米孔技术公司
地址 英国牛津郡

(72)发明人 安德鲁·约翰·赫伦

詹森·罗伯特·海德

克莱夫·加文·布朗

(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 杨文娟 臧建明

(51)Int.Cl.
B01D 69/00(2006.01)
C12Q 1/68(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)

(56)对比文件
WO 01/32146 A2,2001.05.10,
WO 01/88025 A1,2001.11.22,
CN 1703199 A,2005.11.30,
CN 102460150 A,2012.05.16,
WO 2009/024775 A1,2009.02.26,

审查员 裴雪菲

权利要求书9页 说明书39页
序列表52页 附图4页

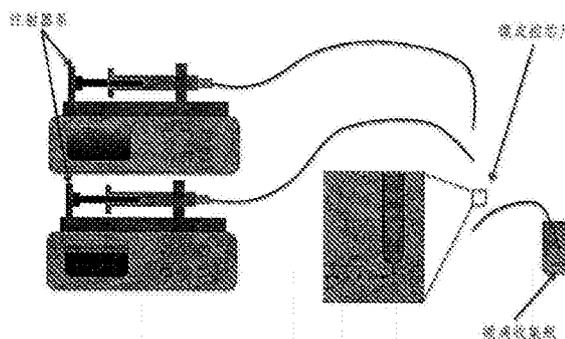
(54)发明名称

微滴界面

(57)摘要

本发明提供了在极性介质的第一体积和极性介质的第二体积之间形成膜的方法,该方法包括:(a)提供包含极性介质的第一体积和包含极性介质的第二体积,二者通过非极性介质相互分离,其中至少一个所述第一和第二体积包含在极性介质和非极性介质之间的界面处的含两亲分子的层,其中每个两亲分子包含第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二外部亲水基团,其中每个第一和第二外部亲水基团连接到疏水核心基团;和(b)使第一和第二体积彼此接触从而在极性介质的第一和第二体积之间形成包含所述两亲分子的膜。本发明也提供了在极性介质的第一体积和极性介质的第二体积之间包含膜的系统,所述膜包含两亲分子,其中极性介质的第一体积在非极性介质中。

CN 104936682 B



1. 在极性介质的第一体积单元和极性介质的第二体积单元之间形成膜的方法,该方法包括:

(a) 提供包含极性介质的第一体积单元和包含极性介质的第二体积单元,所述第一体积单元和第二体积单元通过非极性介质相互分离,

其中至少一个所述第一和第二体积单元包含在所述极性介质和所述非极性介质之间的界面处的含两亲分子的层,

其中每个所述两亲分子包含第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二外部亲水基团,其中每个第一和第二外部亲水基团连接到疏水核心基团;以及

(b) 使所述第一和第二体积单元彼此接触从而在极性介质的所述第一和第二体积单元之间形成含所述两亲分子的膜。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中每个所述第一和第二体积单元包含在所述极性介质和所述非极性介质之间的界面处的含所述两亲分子的层。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一和第二外部亲水基团独立连接到所述疏水核心基团的不同原子。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述第一和第二外部亲水基团连接到疏水核心基团的相对末端。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中每个所述两亲分子进一步包含至少一个额外的疏水或亲水基团。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中每个所述两亲分子进一步包含至少一个额外的疏水基团,所述额外的疏水基团连接到所述第一外部亲水基团或所述第二外部亲水基团。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中每个所述两亲分子进一步包含:连接到所述第一外部亲水基团的第一额外疏水基团;连接到所述第二外部亲水基团的第二额外疏水基团。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中每个额外的疏水基团能够使自身与所述疏水核心基团对齐。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中每个所述两亲分子为包含至少三个聚合物链段的共聚物,其中所述疏水核心基团是内部疏水聚合物链段B,所述第一和第二外部亲水基团是第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中每个所述两亲分子为双极脂类,包含连接到疏水尾部基团的相对末端的两个亲水头部基团,其中每个亲水头部基团可选择地连接至少一个进一步的疏水尾部基团。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述双极脂类是双极磷脂。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述共聚物具有线性或接枝结构,其中所述第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂挂接在所述内部疏水聚合物链段B上。

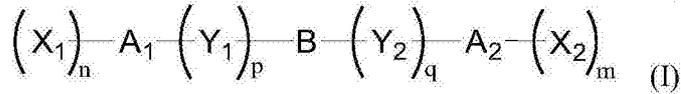
13. 根据权利要求9所述的方法,其中所述第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂连接到所述内部疏水聚合物链段B的相对末端。

14. 根据权利要求9所述的方法,其中所述共聚物进一步包含一个或多个额外的聚合物链段。

15. 根据权利要求9所述的方法,其中所述第一外部亲水聚合物链段A₁,所述第二外部亲水聚合物链段A₂,或A₁和A₂二者直接地或通过一个或多个额外的聚合物链段连接到一个或

多个额外的聚合物链段,和/或其中所述内部疏水聚合物链段B直接地或通过一个或多个额外的聚合物连接到所述第一外部亲水聚合物链段A₁,所述第二外部亲水聚合物链段A₂,或A₁和A₂二者。

16. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,其中所述共聚物是式(I)的嵌段共聚物



其中:

A₁是所述第一外部亲水聚合物链段;

B是所述内部疏水聚合物链段;

A₂是所述第二外部亲水聚合物链段;

X₁, Y₁, Y₂和X₂是额外的聚合物链段;并且

n, p, q和m独立地为0或1。

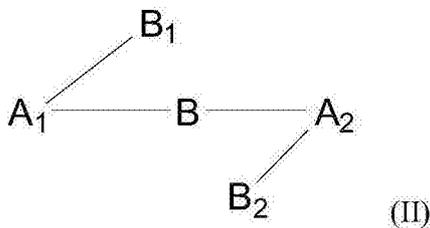
17. 根据权利要求16所述的方法,其中每个所述额外的聚合物链段是相同或不同的,每个所述额外的聚合物链段是额外的亲水聚合物链段或额外的疏水聚合物链段。

18. 根据权利要求16所述的方法,其中X₁和X₂都是额外的亲水聚合物链段或都是额外的疏水聚合物链段,并且Y₁和Y₂都是额外的疏水聚合物链段或都是额外的亲水聚合物链段。

19. 根据权利要求16所述的方法,其中m和n都是1, p和q都是0,所述共聚物是五嵌段共聚物。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中X₁和X₂都是额外的疏水聚合物链段,所述X₁和X₂自身能够与所述内部疏水聚合物链段B对齐。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述共聚物是式(II)的五嵌段共聚物:



其中:

A₁是所述第一外部亲水聚合物链段;

B是所述内部疏水聚合物链段;

A₂是所述第二外部亲水聚合物链段;

B₁是第一额外的疏水聚合物链段;并且

B₂是第二额外的疏水聚合物链段。

22. 根据权利要求9所述的方法,其中所述共聚物是三嵌段共聚物,具有一个是所述内部疏水聚合物链段B的中间聚合物链段和两个是所述第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂的外部聚合物链段。

23. 根据权利要求16所述的方法,其中m, n, p和q都是0,所述共聚物是式(III)的三嵌段共聚物:



其中:

A₁是所述第一外部亲水聚合物链段；

B是所述内部疏水聚合物链段；

A₂是所述第二外部亲水聚合物链段。

24. 根据权利要求17所述的方法,其中所述内部疏水聚合物链段B与当存在时可以相同或不同的每个所述额外的疏水聚合物链段,包含选自以下单体的聚合物:C₁-C₁₈烷基丙烯酸酯、C₃-C₁₈环烷基丙烯酸酯、C₁-C₁₈烷基甲基丙烯酸酯和C₃-C₁₈环烷基甲基丙烯酸酯、C₃-C₁₈烷基丙烯酰胺、C₃-C₁₈烷基甲基丙烯酰胺、丙烯腈、甲基丙烯腈、乙烯基C₁-C₁₈烷酸酯、C₂-C₁₈烯烃、C₂-C₁₈卤代烯烃、苯乙烯、(C₁₋₆烷基)苯乙烯、C₄-C₁₂烷基乙烯基醚、C₂-C₁₀全氟烷基丙烯酸酯、C₂-C₁₀全氟烷基甲基丙烯酸酯、部分氟化的C₂-C₁₀烷基丙烯酸酯、部分氟化的C₂-C₁₀烷基甲基丙烯酸酯、C₃-C₁₂全氟烷基乙基硫代羰基氨基乙基丙烯酸酯、C₃-C₁₂全氟烷基乙基硫代羰基氨基乙基甲基丙烯酸酯、丙烯基羟基烷基硅氧烷和甲基丙烯酰氧基烷基硅氧烷、N-乙基基咪唑、顺丁烯二酸的C₁-C₁₂烷基酯、反丁烯二酸、亚甲基丁二酸、甲基反丁烯二酸、醋酸乙烯酯、丙酸乙烯酯、丁酸乙烯酯、戊酸乙烯酯、乙烯基甲苯、乙烯基乙醚、甲基丙烯酸异冰片酯、甲基丙烯酸三氟乙酯、甲基丙烯酸六氟异丙酯、甲基丙烯酸六氟丁酯、甲基丙烯酰氧丙基三(三甲基硅氧烷基)硅烷和3-甲基丙烯酰氧基丙基五甲基二硅氧烷。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述C₂-C₁₈卤代烯烃选自氯丁二烯、氯乙烯和偏二氯乙烯。

26. 根据权利要求17所述的方法,其中所述内部疏水聚合物链段B与当存在时可以相同或不同的每个所述额外的疏水聚合物链段,包含选自以下的聚合物:聚硅氧烷、聚烯烃、全氟聚醚、全氟烷基聚醚、聚苯乙烯、聚氧丙烯、聚醋酸乙烯酯、聚氧丁烯、聚异戊二烯、聚丁二烯、聚烷基丙烯酸酯、聚烷基甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈、PTHF、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚砜、聚乙烯醚、聚(环氧丙烷)和其共聚物。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述聚烯烃为聚氯乙烯或聚丙烯。

28. 根据权利要求17所述的方法,其中所述内部疏水聚合物链段B与当存在时可以相同或不同的每个额外的疏水聚合物链段,包含选自以下的不饱和聚合物:共轭脂肪族二烯或脂环族二烯的聚合物,其二烯是未经取代的或经卤素或C₁-C₆烷基取代的;炔或二炔的聚合物,其炔或二炔是未经取代的或经C₁-C₆烷基或三甲基硅烷基取代的;共轭二烯和亲水或疏水性乙烯单体的共聚物;及共轭脂肪族二烯或脂环族二烯的聚合物的部分水合衍生物,其二烯是未经取代的或经卤素或C₁-C₆烷基取代的;炔或二炔的聚合物的部分水合衍生物,其炔或二炔是未经取代的或经C₁-C₆烷基或三甲基硅烷基取代的;共轭二烯和亲水或疏水性乙烯单体的共聚物的部分水合衍生物。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述不饱和聚合物是:顺式、反式、异构或间规的聚-1,2丁二烯、聚-1,4丁二烯或聚异戊二烯、聚戊烯、聚氯乙烯或聚间戊二烯;丁二烯共聚物或异戊二烯共聚物,其具有选自丙烯腈、苯乙烯、丙烯酸或羟乙基甲基丙烯酸酯的亲水的或疏水的乙烯单体;或聚-1-三甲代甲硅烷基丙炔。

30. 根据权利要求17所述的方法,其中所述内部疏水聚合物链段B与当存在时每个所述额外的疏水聚合物链段包含聚硅氧烷或聚烯烃。

31. 根据权利要求9所述的方法,其中所述内部疏水聚合物链段B包含具有末端烷撑基团的聚硅氧烷嵌段。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中所述聚硅氧烷是聚二甲基硅氧烷或聚二苯基硅氧烷,其中所述聚烯烃是聚乙烯。

33. 根据权利要求17所述的方法,其中所述内部疏水聚合物链段B与当存在时每个所述额外的疏水聚合物链段的分子量从150到50000。

34. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第一外部亲水聚合物链段A₁,所述第二外部亲水聚合物链段A₂,与当存在时可以相同或不同的每个所述额外的亲水聚合物链段,包含选自以下单体的聚合物:羟基取代的C₁-C₆烷基丙烯酸酯、羟基取代的C₁-C₆烷基甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、(C₁-C₆烷基)丙烯酰胺、(C₁-C₆烷基)甲基丙烯酰胺、N,N-二烷基-丙烯酰胺、乙氧基丙烯酸酯和乙氧基甲基丙烯酸酯、聚乙二醇单甲基丙烯酸酯和聚乙二醇单甲基醚甲基丙烯酸酯、羟基取代的(C₁-C₆烷基)丙烯酰胺、羟基取代的(C₁-C₆烷基)甲基丙烯酰胺、羟基取代的C₁-C₆烷基乙烯基醚、乙烯基磺酸钠、苯乙烯基磺酸钠、2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸、N-乙烯基吡咯、N-乙烯基-2-吡咯烷酮、2-乙烯基恶唑啉、2-乙烯基-4,4'-双烷基恶唑啉基-5-酮、2-乙烯基吡啶、4-乙烯基吡啶、总共具有3-5个碳原子的乙烯化不饱和羧酸、氨基(C₁-C₆烷基)丙烯酸酯、单(C₁-C₆烷基氨基)(C₁-C₆烷基)丙烯酸酯、双(C₁-C₆烷基氨基)(C₁-C₆烷基)丙烯酸酯、氨基(C₁-C₆烷基)甲基丙烯酸酯、单(C₁-C₆烷基氨基)(C₁-C₆烷基)甲基丙烯酸酯、双(C₁-C₆烷基氨基)(C₁-C₆烷基)甲基丙烯酸酯、烯丙醇、3-三甲基铵2-羟丙基甲基丙烯酸酯氯化物、二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯(DMAEMA)、二甲基氨基乙基甲基丙烯酰胺、甘油甲基丙烯酸酯、N-(1,1-二甲基-3-氧代丁基)丙烯酰胺、环亚氨基醚、乙烯基醚、包含环氧衍生物的环境醚、环不饱和醚、N-取代氮杂环丙烷、β-内酯和β-内酰胺、乙烯酮缩醛、乙烯基缩醛和正磷。

35. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第一外部亲水聚合物链段A₁,所述第二外部亲水聚合物链段A₂,和当存在时可以相同或不同的每个所述额外的亲水聚合物链段,包含选自以下单体的聚合物:选自2-甲基恶唑啉、2-恶唑啉和在2号位具有烯基基团的2-恶唑啉,选自甲基乙烯基醚、乙基乙烯基醚和甲氧基乙基乙烯基醚的乙烯基醚。

36. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第一外部亲水聚合物链段A₁,所述第二外部亲水聚合物链段A₂,和当存在时可能相同或不不同的每个所述额外的亲水聚合物链段,包含选自以下的聚合物:聚恶唑啉、聚乙二醇、聚氧化乙烯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚(甲基)丙烯酸酯、聚氧化乙烯-聚环氧丙烷嵌段共聚物、聚(乙烯基醚)、聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)、聚丙烯酸、聚酰基烷撑亚胺、聚羟烷基丙烯酸酯、多元醇和其二者或多者的共聚混合物、天然高分子、聚离子分子、两亲离子分子和其盐及其共聚物。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述聚羟烷基丙烯酸酯选自甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)、丙烯酸羟乙酯和丙烯酸羟丙酯,所述天然高分子选自多糖、多肽,及其共聚物,所述聚离子分子选自聚烯丙基铵、聚乙烯亚胺、聚乙烯基苄基三甲基铵、聚苯胺、磺化聚苯胺、聚吡咯和聚吡咯盐、聚噻吩乙酸、聚苯乙烯磺酸。

38. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第一外部亲水聚合物链段A₁、所述第二外部亲水聚合物链段A₂,与当存在时可以相同或不同的每个所述额外的亲水聚合物链段,包含聚(2-甲基恶唑啉)。

39. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第一外部亲水聚合物链段A₁,所述第二外部亲水聚合物链段A₂,与当存在时每个所述额外的亲水聚合物链段的分子量为从150到

50000。

40. 根据权利要求1所述的方法,其中所述两亲分子包含聚(2-甲基恶唑啉)-嵌段-聚(二甲基硅氧烷)-嵌段-聚(2-甲基恶唑啉)(PMOXA-PDMS-PMOXA)。

41. 根据权利要求1所述的方法,其中在极性介质的所述体积单元之间形成的所述膜含所述两亲分子的单层。

42. 根据权利要求1所述的方法,其中在极性介质的所述体积单元之间形成的所述膜包含第一和第二外部亲水层,所述第一和第二外部亲水层是通过所述两亲分子的所述第一和第二外部亲水基团形成的,并且中间疏水层是通过所述两亲分子的所述疏水核心基团形成的,其中所述第一和第二外部亲水层在所述膜的任意一侧接触极性介质的所述体积单元。

43. 根据权利要求1所述的方法,其中在提供包含极性介质的第一体积单元和包含极性介质的第二体积单元的步骤中,所述第一体积单元和所述第二体积单元通过非极性介质彼此分离,所述步骤包含:

(i) 包含极性介质的第一体积单元接触所述非极性介质;

(ii) 在(i)之前或之后,在所述非极性介质中和/或所述极性介质的第一体积单元中提供所述两亲分子;

(iii) 将包含极性介质的所述第一体积单元与所述非极性介质接触充足的时间,以在所述极性介质和所述非极性介质之间的界面处形成所述两亲分子的层,

在步骤(i)至(iii)中的任一步骤之前,期间或之后,

(iv) 将包含极性介质的第二体积单元接触所述非极性介质。

44. 根据权利要求1所述的方法,其中包含极性介质的所述第一体积单元是微滴或珠子。

45. 根据权利要求43所述的方法,其中所述第一体积单元是微滴或珠子,步骤(i)包括在所述非极性介质中形成或引入极性介质的微滴或珠子。

46. 根据权利要求43所述的方法,其中步骤(iv)包括将极性介质的第二体积单元应用于所述非极性介质的表面。

47. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二体积单元包含被怀疑包含目标分析物的样品。

48. 根据权利要求1所述的方法,其中包含极性介质的所述第一和第二体积单元都是微滴或珠子。

49. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包含:

(a) 提供包含极性介质的至少三个体积单元,所述极性介质通过非极性介质而彼此分离,其中至少一个或每个所述体积单元在所述极性介质和所述非极性介质之间的界面处包含具有所述两亲分子的层,并且

(b) 使每个所述体积单元接触另一个所述体积单元以在极性介质的所述体积单元之间形成包含所述两亲分子的膜。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中每个所述体积单元是微滴或珠子,步骤(b)产生所述微滴或珠子的链或网络。

51. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括:

(a) 提供包含极性介质的多个第一体积单元和包含极性介质的第二体积单元,其中多

个所述第一体积单元通过非极性介质与所述第二体积单元分离，

其中，每个所述第一体积单元都是微滴或珠子，以及

其中，每个所述第一体积单元在所述极性介质和所述非极性介质之间的界面处包含具有所述两亲分子的层，以及

(b) 使所述第二体积单元接触每个所述第一体积单元从而在所述第二体积单元和每个所述第一体积单元之间形成包含所述两亲分子的膜。

52. 根据权利要求51所述的方法，其中所述第二体积单元在所述极性介质和所述非极性介质之间的界面处包含具有所述两亲分子的层。

53. 根据权利要求51所述的方法，其中所述极性介质的第二体积单元包含被怀疑包含目标分析物的样品。

54. 根据权利要求47所述的方法，其中所述目标分析物是金属离子、无机盐、聚合物、氨基酸、肽、蛋白质、核苷酸、多核苷酸、染料、漂白剂、药物、诊断试剂、易爆或环境污染物。

55. 根据权利要求54所述的方法，其中所述肽是多肽，所述多核苷酸是寡核苷酸，所述药物是营养药。

56. 根据权利要求1所述的方法，其中包含极性介质的至少一个所述体积单元，或所述非极性介质，进一步包含膜蛋白，所述膜蛋白能够插入到包含所述两亲分子的膜中。

57. 根据权利要求1所述的方法，其中包含所述两亲分子的所述膜进一步包含膜蛋白。

58. 根据权利要求57所述的方法，其中所述膜蛋白是一种离子通道或孔。

59. 根据权利要求58所述的方法，其中包含极性介质的第一体积单元或所述非极性介质包含表面活性剂。

60. 根据权利要求17所述的方法，其中包含所述两亲分子的所述膜进一步包含膜蛋白，其中所述膜蛋白是离子通道或孔，其中所述包含极性介质的第一体积单元或所述非极性介质包含表面活性剂，且其中所述内部疏水聚合物链段B和当存在时每个所述额外的疏水聚合物链段，包含聚硅氧烷，并且所述表面活性剂是基于有机硅的。

61. 根据权利要求60所述的方法，其中所述非极性介质是硅油。

62. 根据权利要求1所述的方法，进一步包括测定包含极性介质的体积单元以实施涉及发生在所述体积单元之间的膜处或穿过所述体积单元之间的膜的过程的实验。

63. 根据权利要求1所述的方法，进一步包括使电极与极性介质的所述体积单元电接触，并使用所述电极进行电测量。

64. 根据权利要求1所述的方法，其中包含极性介质的至少一个所述体积单元是水介质。

65. 根据权利要求64所述的方法，所述水介质是凝胶。

66. 根据权利要求1所述的方法，其中包含极性介质的至少一个所述体积单元进一步包含氧化还原对或氧化还原对的成员，所述氧化还原对的成员部分地被氧化或被还原以提供所述氧化还原对。

67. 根据权利要求64所述的方法，其中至少一个所述体积单元是所述第一体积单元。

68. 根据权利要求1所述的方法，其中所述非极性介质是油。

69. 根据权利要求1所述的方法，其中所述非极性介质包含烃化合物或硅油或其混合物。

70. 根据权利要求44、45、48、50和51中任一项所述的方法,其中所述微滴或珠子的平均直径为从5 μm 到500 μm 。

71. 一种系统,包括:

极性介质的第一体积单元;

极性介质的第二体积单元,

在所述极性介质的第一和第二体积单元之间的膜,所述膜包含两亲分子,

其中,每个所述两亲分子包含第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二外部亲水基团,其中每个第一和第二外部亲水基团连接到所述疏水核心基团,

其中,所述极性介质的第一体积单元在非极性介质中。

72. 根据权利要求71所述的系统,所述系统进一步包括在所述极性介质的第一体积单元和所述非极性介质之间的界面处的所述两亲分子的层。

73. 根据权利要求71所述的系统,其中所述极性介质的第一体积单元是微滴或珠子。

74. 根据权利要求71所述的系统,其中所述两亲分子被权利要求3-40的任一个定义。

75. 根据权利要求71所述的系统,其中所述膜包含所述两亲分子的单层。

76. 根据权利要求71所述的系统,其中所述膜包含通过所述两亲分子的所述第一和第二外部亲水基团形成的第一和第二外部极性区域,以及通过所述两亲分子的所述疏水核心基团形成的中间非极性区域,其中所述第一和第二外部极性区域与在所述膜的任意一侧的极性介质的所述体积单元接触。

77. 根据权利要求71所述的系统,其中极性介质的每个所述第一和第二体积单元是微滴或珠子。

78. 根据权利要求74所述的系统,其中极性介质的每个所述第一和第二体积单元在所述非极性介质中,所述系统进一步包括:在所述极性介质的所述第一体积单元和所述非极性介质之间的界面处的所述两亲分子的层,以及在所述极性介质的第二体积单元和所述非极性介质之间的界面处的所述两亲分子的层。

79. 根据权利要求71所述的系统,所述系统包括极性介质的一个或多个进一步的体积单元和包含所述两亲分子的一个或多个的进一步的膜,其中极性介质的每个进一步的体积单元与极性介质的另一个体积单元通过所述进一步的膜相互分离,其中所述另一个体积单元是所述第一体积单元、所述第二体积单元,或其他进一步的体积单元。

80. 根据权利要求79所述的系统,其中极性介质的所述第一、第二和进一步的体积单元中的每一个是微滴或珠子。

81. 根据权利要求71所述的系统,所述系统包括在所述非极性介质中的多个第一体积单元,以及在多个第一体积单元和所述第二体积单元之间包含所述两亲分子的多个各自的膜。

82. 根据权利要求81所述的系统,其中极性介质的每个所述第一体积单元是微滴或珠子。

83. 根据权利要求71所述的系统,其中所述第二体积单元包含被怀疑包含目标分析物的样品。

84. 根据权利要求83所述的系统,其中所述目标分析物是金属离子、无机盐、聚合物、氨基酸、肽、蛋白质、核苷酸、多核苷酸、染料、漂白剂、药物、诊断试剂、易爆或环境污染物。

85. 根据权利要求71所述的系统,其中所述膜进一步包含膜蛋白。
86. 根据权利要求85所述的系统,其中所述膜蛋白是离子通道或孔。
87. 根据权利要求71所述的系统,其中极性介质的所述第一和第二体积单元中的至少一个具有与之接触的电极。
88. 根据权利要求71所述的系统,其中所述极性介质是水介质。
89. 根据权利要求71所述的系统,其中所述极性介质是凝胶。
90. 根据权利要求71所述的系统,其中极性介质的至少一个所述体积单元进一步包含氧化还原对或氧化还原对的成员,所述氧化还原对的成员部分地被氧化或被还原以提供所述氧化还原对。
91. 根据权利要求90所述的系统,其中至少一个所述体积单元是所述第一体积单元。
92. 根据权利要求71所述的系统,其中所述非极性介质是油。
93. 根据权利要求71所述的系统,所述系统进一步包括在所述非极性介质中的或极性介质的一个所述体积单元中的表面活性剂。
94. 根据权利要求71所述的系统,其中所述非极性介质包含烃化合物或硅油或其混合物。
95. 根据权利要求93所述的系统,其中所述非极性介质包含硅油,所述表面活性剂基于有机硅,每个所述两亲分子是包含至少三个聚合物链段的共聚物,其中所述疏水核心基团是内部疏水聚合物链段B,且所述第一和第二外部亲水基团是第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂,且其中所述内部疏水聚合物链段B包含聚硅氧烷。
96. 根据权利要求73、77、80和82中任一项所述的系统,其中所述微滴或珠子的平均直径从5 μ m至500 μ m。
97. 一种包含极性介质的体积单元,所述体积单元被置于非极性介质中,所述体积单元在其表面周围、在所述极性介质和所述非极性介质之间具有包含两亲分子的层,其中每个所述两亲分子包含第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二外部亲水基团,其中每个所述第一和第二外部亲水基团连接到所述疏水核心基团,其中每个所述两亲分子是包含至少三个聚合物链段的共聚物,其中所述疏水核心基团是内部疏水聚合物链段B,所述第一和第二外部亲水基团是第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂。
98. 一种用于制备包含极性介质的体积单元的方法,所述体积单元设置在非极性介质中,在其表面周围、在所述极性介质和所述非极性介质之间具有含两亲分子的层,其中每个所述两亲分子包含第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二个外部亲水基团,其中每个所述第一和第二外部亲水基团连接到所述疏水核心基团,其中每个所述两亲分子都是包含至少三个聚合物链段的共聚物,其中所述疏水核心基团是内部疏水聚合物链段B,所述第一和第二外部亲水基团是第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂,
- 该方法包含:
- (i) 将极性介质的体积单元引入到非极性介质中;
- (ii) 在(i)之前或之后,在所述非极性介质中或所述极性介质中或所述非极性介质和极性介质中提供所述两亲分子;以及
- (iii) 将所述极性介质的体积单元停留充足的时间,以在所述极性介质和所述非极性介质之间的界面处形成含所述两亲分子的所述层。

99. 根据权利要求97所述的极性介质的体积单元或权利要求98所述的方法, 其中每个所述两亲分子是如权利要求12-40中任一项所述的共聚物。

100. 根据权利要求97所述的极性介质的体积单元或权利要求98所述的方法, 其中包含极性介质的所述体积单元是所述极性介质的微滴或包含所述极性介质的珠子。

101. 一种表征目标分析物的方法, 所述方法包括:

(a) 将所述目标分析物接触跨膜孔, 所述跨膜孔存在于权利要求71所定义的系统的膜中, (b) 当所述分析物相对于所述孔运动时或当所述孔内存在所述分析物时, 测定一次或多次, 其中所述测定指示所述目标分析物的一中或多种特征, 因此表征了所述目标分析物。

102. 根据权利要求101所述的方法, 其中步骤 (b) 包含测定所述分析物相对所述孔移动时通过所述孔的电流, 其中所述电流指示了所述目标分析物一个或多个特征, 因此表征所述目标分析物。

103. 根据权利要求101所述的方法, 其中所述目标分析物是金属离子、无机盐、聚合物、氨基酸、肽、蛋白质、核苷酸、多核苷酸、染料、漂白剂、药物、诊断试剂、易爆或环境污染物。

104. 根据权利要求103所述的方法, 其中所述目标分析物是目标多核苷酸。

105. 根据权利要求104所述的方法, 其中步骤 (a) 包括将所述目标多核苷酸接触所述孔和多核苷酸结合蛋白质, 所述蛋白质控制所述目标多核苷酸穿过所述孔的运动。

106. 根据权利要求101-105中任一项所述的方法, 其中所述孔是跨膜蛋白孔。

107. 根据权利要求106所述的方法, 其中所述跨膜蛋白孔是:

(a) 选自溶血素、杀白细胞素、耻垢分枝杆菌外膜蛋白A (MspA)、外膜孔蛋白F (OmpF)、外膜孔蛋白G (OmpG)、外膜磷脂酶A、奈瑟氏菌 (Neisseria) 自转运脂蛋白 (NalP) 和WZA;

(b) 由SEQ ID NO:2所示的8个相同的亚基形成的, 或是SEQ ID NO:2的变体, 其中所述亚基中的一个或多个相比于SEQ ID NO:2在整个序列上基于氨基酸同一性具有至少50%的同源性并保留有孔活性; 或者

(c) 由SEQ ID NO:4所示的7个相同的亚基形成的 α -溶血素, 或是SEQ ID NO:4的变体, 其中7个亚基中的一个或多个相比于SEQ ID NO:4在整个序列上基于氨基酸同一性具有至少50%的同源性并保留有孔活性。

108. 一种用于表征目标多核苷酸的形成传感器的方法, 该方法包括在 (a) 存在于如权利要求71所述系统的膜中的孔和 (b) 多核苷酸结合蛋白质之间形成复合物, 因此形成表征所述目标多核苷酸的传感器。

109. 一种用于表征目标多核苷酸的传感器, 包括在 (a) 存在于如权利要求71所述系统的膜中的孔和 (b) 多核苷酸结合蛋白质之间形成的复合物, 因此形成表征所述目标多核苷酸的传感器。

110. 一种用于表征目标多核苷酸的试剂盒, 包括 (a) 存在于如权利要求71所述系统的膜中的孔和 (b) 多核苷酸结合蛋白质, 并因此形成用于表征所述目标多核苷酸的传感器。

111. 一种用于在样品中表征目标多核苷酸的装置, 包括 (a) 存在于如权利要求71所述一个或多个系统的多个膜中的多个孔和 (b) 多个多核苷酸结合蛋白质。

微滴界面

技术领域

[0001] 本发明涉及极性介质的第一和第二体积之间的膜。本发明还涉及形成这种膜的方法。

背景技术

[0002] 脂质双层是由两层脂质分子形成的薄的极性膜。在大多活的生物的细胞膜中发现的脂质双层通常由磷脂组成。它们对大多数的亲水分子和离子是不可渗透的,并通过利用称为离子泵的跨膜蛋白将离子泵送穿过脂质双层以调节它们的盐浓度和pH值。脂质双层,或者更广义的两亲分子的双层,也作为用于广泛的实验研究的优秀平台。Holden等, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 8650-8655 公开了含有在微滴之间提供的脂质双层的水微滴的功能的生物网络的形成。这种网络可以通过将泵、通道和孔结合到双层而作为光传感器、电池和电子元件。Sackmann, *Science, New Series, Vol 271, No. 5245 (Jan 5, 1996)*, pp. 43-48 公开了支撑脂质-蛋白质双层的科研和包括在光电传感器中使用的实际应用的综述。Jung等, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131 (3), 1006-1014 开发了用于检测蛋白质配体结合到支撑双层上的光学分析。文献记载了用于在高阻力两亲性脂质双层的离子通道检测DNA和其他分析物的的规则,参见示例, Bayley等, *Nature, Vol 413, 2001年9月*。在脂质双层的任何一侧提供水溶液,并且在电势梯度下,发生离子流穿过纳米孔。DNA引起了离子通道易位,并且DNA穿过该通道的易位期间的离子流变化被测定。由于该脂质双层的高阻力,离子流动仅在穿过该离子通道时发生。脂质双层可以悬浮穿过基质的孔,并通过本领域熟知的方法例如膜片钳或着色形成。

[0003] W02009/077734 公开了多个独立编址的脂质双层,所述脂质双层跨微孔孔径阵列形成,每个微孔包含电极和与脂质双层接触的水介质。

[0004] W02009/012552 公开了一种两亲脂质分子的双层,所述双层在两个包含两亲分子的分子层的微滴之间形成,所述两亲分子包含亲水介质,在疏水介质中提供所述微滴。用在每个微滴的亲水性内部提供的电极测量穿过脂质双层的离子流。

[0005] 两亲分子可以被认为包含连接非极性疏水区域的极性亲水区域。双层可由两亲分子的两个单层形成的,其中在水溶液中,所述极性基团在双层的任何一侧面朝向亲水介质,而疏水基团朝向内部。

[0006] W02009/024775 公开了一种制备微滴界面双层(DIB)的方法,其中所述微滴通过将油/脂质溶液接触水溶液进行制备,且将最后得到的微滴与含水琼脂糖凝胶支撑层接触。

[0007] 磷脂例如1,2-二植烷基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPhPC)通常用于形成脂质双层。然而,脂质双层有时伴有缺点包括它们并不是特别坚固,且容易破裂,例如,通过酶消化,并且不能承受大的电势差。

[0008] US6,723,814 公开了由具有亲水段和疏水段的两亲共聚物形成的平面膜。该共聚物可以为ABA三嵌段,该三嵌段具有甲基恶唑啉亲水段和二甲基硅氧烷疏水核(PMOXA-PDMS-PMOXA)。从该三嵌段形成的膜相比于脂质膜能够承受更高的电势差(US6,723,814,表

1)。

[0009] US6,916,488描述了由亲水介质(ABA型)中的PMOXA-PDMS-PMOXA中得到的囊泡的制备。两亲性的ABA三嵌段囊泡(在亲水介质中具有亲水内部的微滴)的结构可以被概念化为三嵌段聚合物的单分子层,其中所述聚合物分子具有线性构型,所述构型中的两个亲水‘A’段面对着各自的位于囊壁任何一侧的亲水性溶液。这种结构,在US6,916,488的图1中示出,然而似乎不适合用于稳定油中的水微滴。因此这种ABA分子似乎并不能替代W02009/024775中描述的脂质,用于从油包水系统中制备微滴界面层。

[0010] 因此,相比于传统的脂质双层,用于制造改进了稳定性的介质膜的替代方法是一致需要的双层。

发明内容

[0011] 本发明的研究结果为将极性介质与含有ABA分子的非极性介质接触,导致了在极性介质周围的非极性-极性界面处,自发形成ABA的分子层。而且,当两个这样的极性介质的体积随后聚集在一起时,一个稳定的ABA分子的膜穿过所述非极性介质在第一和第二极性体积之间的界面处形成。

[0012] 最终合成而得到的膜,与传统的脂质系统相比,显示出坚固、稳定和不易被清洁剂和蛋白质降解。所述膜也能够承受施加并穿过其本身的较大的电势差。蛋白质,例如跨膜蛋白孔,可以被插入到所述膜中,并用以表征目标分析物,包括DNA。

[0013] 以这种方式成功形成的稳定的ABA膜是非直观的,事实上ABA分子在极性-非极性界面处自发地形成分子层,然后最终在两个极性相之间产生稳定的膜,这是未预料到的。

[0014] 相应地,本发明的第一个方面提供了一种在极性介质的第一体积和极性介质的第二体积之间形成膜的方法,该方法包括:

[0015] (a) 提供包含极性介质的第一体积和包含极性介质的第二体积,通过非极性介质彼此分离,

[0016] 其中在所述极性介质和所述非极性介质之间的界面处,至少一个所述第一和第二体积包含具有两亲分子的层,

[0017] 其中每个所述两亲分子包含第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二外部亲水基团,其中每个所述第一和第二外部亲水基团连接至所述疏水核心基团;并且

[0018] (b) 使所述第一和第二体积彼此接触,以在极性介质的所述第一和第二体积之间形成含有所述两亲分子的膜。

[0019] 所述非极性介质中可以提供第一体积。

[0020] 另一方面,本发明提供了通过本发明的方法所获得的膜。

[0021] 另一方面,本发明提供了一种系统,所述系统包括:

[0022] 极性介质的第一体积;

[0023] 极性介质的第二体积;以及

[0024] 在极性介质的第一和第二体积之间的膜,该膜包含两亲分子,

[0025] 其中,每个所述两亲分子包括第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二外部亲水基团,其中每个所述第一和第二外部亲水基团连接至所述疏水核心基团,

[0026] 其中所述第一体积在非极性介质中。

[0027] 所述系统可以进一步在所述极性介质和非极性介质的第一体积之间的界面处包含所述两亲分子的层。

[0028] 所述系统可以包括在所述非极性介质中的多个第一体积和在多个第一体积和第二体积之间的多个各自的膜。

[0029] 所述系统可以包括在所述非极性介质中的多个第一体积,多个第二体积,以及在各自的第一和第二体积之间提供的多个膜。在所述非极性介质中也可以提供一个或多个第二体积。

[0030] 本发明还提供了包含所述极性介质的体积,所述体积设置在非极性介质中,所述体积具有包含在其表面周围,介于极性介质和非极性介质之间的两亲分子层,其中每个两亲分子包含第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二外部亲水基团,其中每个第一和第二外部亲水基团连接至所述疏水核心基团,其中每个所述两亲分子都是包含至少三个聚合物链段的共聚物,其中所述疏水核心基团是内部疏水聚合物链段B,所述第一和第二外部亲水基团是第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂。

[0031] 进一步提供了用于制备包含极性介质的体积的方法,该体积设置在非极性介质中,在其表面周围,极性介质和非极性介质之间,具有两亲分子层,其中每个两亲分子包含第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二外部亲水基团,其中每个第一和第二外部亲水基团连接至所述疏水核心基团,其中每个两亲分子都是包含至少三个聚合物链段的共聚物,其中所述疏水核心基团是内部疏水聚合物链段B,第一和第二外部亲水基团是第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂,

[0032] 该方法包括:

[0033] (i) 将极性介质的体积引入到非极性介质中;

[0034] (ii) 在(i)之前或之后,在非极性介质中或极性介质中,或非极性介质和极性介质中提供两亲分子;和

[0035] (iii) 将极性介质的所述体积停留一段充足的时间,用于在所述极性介质和非极性介质之间的界面处形成所述两亲分子层。

[0036] 所述膜可以包括跨膜孔,所述跨膜孔用于测定孔内分析物的存在或用于测定分析物通过所述孔的运动。也可以测定膜中的跨膜孔的存在和/或量。

[0037] 相应地,本发明进一步提供了表征目标分析物的方法,该方法包括:

[0038] (a) 让目标分析物接触跨膜孔,该跨膜孔存在于如本发明所定义的系统的膜中,

[0039] (b) 当分析物相对孔运动时或当孔内存在分析物时,测定一次或多次,其中所述测定表明了所述目标分析物的一种或多种特征,从而表征了该目标分析物。

[0040] 进一步提供了一种用于表征目标多核苷酸形成传感器的方法,所述目标多核苷酸包括在(a)本发明所定义的系统的膜中存在的孔和(b)多核苷酸结合蛋白质之间形成的复合物,从而形成用于表征所述目标多核苷酸的传感器。

[0041] 本发明还提供了用于表征目标多核苷酸的传感器,所述目标多核苷酸包括在(a)本发明所定义的系统的膜中存在的孔和(b)多核苷酸结合蛋白质之间形成的复合物,从而形成用于表征所述目标多核苷酸的传感器。

[0042] 另外,提供了用于表征目标多核苷酸的试剂盒,所述目标多核苷酸包括(a)本发明所定义的系统的膜中存在的孔和(b)多核苷酸结合蛋白质,从而形成用于表征所述目标

多核苷酸的传感器。

[0043] 另一方面,本发明提供了一种用于表征样本中的目标多核苷酸的设备,所述目标多核苷酸包含包括(a)多个本发明所定义的系统的膜中的存在的孔和(b)多个多核苷酸结合蛋白质。

[0044] 所述极性介质可以是亲水介质。所述非极性介质可以是疏水介质。

附图说明

[0045] 图1显示用于产生微滴的设置示意图。所述设置包括两个注射器泵(Elite,哈佛设备),两个气密的注射器(哈密尔顿),峰值管(科学的不锈钢管)和定制的T-连接微流体芯片。

[0046] 图2显示微滴稳定性实验。A)显示了AR20油中的6-33-6聚合物源微滴的随时间的稳定性变化。20小时后,发现这些微滴并没有融合。B)显示了用于说明目的的不稳定的、亚稳定的和稳定的微滴的示例。

[0047] 图3显示用于微滴-界面-双层实验的实验设置。

[0048] 图4显示如何在法拉第笼(faraday cage)内设置微滴-界面-双层实验。A)显示示意图,B)显示从在法拉第笼下面的显微镜中观察到的微滴。

[0049] 图5显示电子轨迹的示例,阐明了AR20油中的两个6-33-6聚合物源微滴的电容是如何随时间增加的。

[0050] 图6显示电子轨迹示例,阐明了当M_{spA}-(B2C)(SEQ ID NO:25,是具有下列突变G75S/G77S/L88N/Q126R的SEQ ID NO:2的变体)插入到AR20油中的6-33-6聚合物源三嵌段共聚物微滴时,如何观测尖锐电流增加的。示例用黑色箭头表示孔插入到三嵌段共聚物中。

[0051] 图7显示了在A)部分中的电子轨迹示例,阐明16烷中的两个6-45PE-6聚合物源微滴的电容是如何随时间增加的,在B)部分中的电子轨迹的示例:当M_{spA}-(B2C)(SEQ ID NO:25,是具有下列突变G75S/G77S/L88N/Q126R的SEQ ID NO:2的变体)插入到AR20油中的6-45PE-6聚合物源三嵌段共聚物微滴时,如何观测尖锐电流增加。示例用黑色箭头表示所述孔插入到三嵌段共聚物中。

[0052] 序列表的详细说明

[0053] SEQ ID NO:1显示了密码子优化的、编码MS-B1突变体M_{spA}单体的多核苷酸序列。该突变体缺少信号序列并包括下列突变:D90N,D91N,D93N,D118R,D134R和E139K。

[0054] SEQ ID NO:2显示了M_{spA}单体的MS-B1突变体的成熟形式的氨基酸序列。该突变体缺少信号序列并包括下列突变:D90N,D91N,D93N,D118R,D134R和E139K。

[0055] SEQ ID NO:3显示了编码 α -溶血素-E111N/K147N(α -HL-NN;Stoddart等,PNAS,2009;106(19):7702-7707)的一个单体的所述多核苷酸序列。

[0056] SEQ ID NO:4显示了 α -HL-NN的一个单体的氨基酸序列。

[0057] SEQ ID NOs:5到7显示了M_{spB},C和D的所述氨基酸序列。

[0058] SEQ ID NO:8显示了编码Phi29DNA聚合酶的所述多核苷酸序列。

[0059] SEQ ID NO:9显示了所述Phi29DNA聚合酶的氨基酸序列。

[0060] SEQ ID NO:10显示了密码子优化的、源自大肠杆菌E.Coli的sbcB基因的多核苷酸序列。它编码源自大肠杆菌E.Coli的核酸外切酶I酶(EcoExo I)。

[0061] SEQ ID NO:11显示了源自大肠杆菌E.Coli的所述核酸外切酶I酶(EcoExo I)的氨基酸序列。

[0062] SEQ ID NO:12显示了密码子优化的、源自大肠杆菌E.Coli的xthA基因的多核苷酸序列。它编码大肠杆菌的核酸外切酶III酶。

[0063] SEQ ID NO:13显示了源自大肠杆菌E.Coli的核酸外切酶III酶的氨基酸序列。所述酶从双链DNA(dsDNA)3'-5'方向上的一个单链的5'核苷单磷酸进行分配的消化。酶在链上启动大约需要4个核苷酸的5'突出部分。

[0064] SEQ ID NO:14显示了密码子优化的、源自嗜热菌T.thermophilus的recJ基因的多核苷酸序列。它编码源自嗜热菌T.thermophilus(TthRecJ-cd)的RecJ酶。

[0065] SEQ ID NO:15显示了源自嗜热菌T.thermophilus(TthRecJ-cd)的RecJ酶的氨基酸序列。所述酶从ssDNA的5'-3'方向的5'核苷单磷酸进行分配的消化。酶在链上启动至少需要4个核苷酸。

[0066] SEQ ID NO:16显示了密码子优化的、源自噬菌体 λ exo(redX)基因的多核苷酸序列。它编码噬菌体 λ 的核酸外切酶。

[0067] SEQ ID NO:17显示了噬菌体 λ 的核酸外切酶的氨基酸序列。该序列是集成三聚体的三个相同亚基之一。该酶在5'-3'方向进行高度前进消化从dsDNA的一个链的核苷酸(<http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0262.asp>)。酶在链上启动优选需要大约4个核苷酸具有5'磷酸的的5'突出端。

[0068] SEQ ID NO:18显示了He1308Mbu的氨基酸序列。

[0069] SEQ ID NO:19显示了He1308Csy的He1308基元。

[0070] SEQ ID NO:20显示了He1308Tga的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO:21显示了He1308Mhu的氨基酸序列。

[0072] SEQ ID NO:22显示了TraI Eco的氨基酸序列。

[0073] SEQ ID NO:23显示了XPD Mbu的氨基酸序列。

[0074] SEQ ID NO:24显示了编码MspA-(B2C)(具有下列突变G75S/G77S/L88N/Q126R的SEQ ID NO:2的变体)的多核苷酸序列。

[0075] SEQ ID NO:25显示了MspA-(B2C)的氨基酸序列(具有下列突变G75S/G77S/L88N/Q126R的SEQ ID NO:2的变体)。

具体实施方式

[0076] 本发明的第一方面的方法是直接执行并产生包含两亲分子的坚固的膜,所述膜可被广泛地用于生物技术领域的研究和应用。该膜与传统的磷脂双层相比不容易降解,也能够承受较大的电势差。相比于传统的用预制的膜提供并储存传感器的脂质双层膜,该膜显示出更坚固和稳定,且具有更长的寿命。还使得包含样本如生物样本的洗涤剂 and 蛋白质直接应用于膜,用于分析物的测定。

[0077] 提供包含极性介质的第一和第二体积的步骤可极易进行,所述极性介质用非极性介质而彼此分离。所述步骤通常包括将包含极性介质的每个体积与非极性介质接触。

[0078] 所述极性介质可以以一个或多个微滴和/或一个或多个珠子的形式提供。微滴可以例如通过注射器或吸液管将极性介质引入到非极性介质而形成。极性介质的微滴也可以

在非极性介质中使用微流体设备形成,例如如下文实施例1所述。微流体设备内的通道大小,以及通过微流体设备的非极性和极性介质的流速可以被改变以控制制备的极性微滴的大小。特别是可以使用微流体设备制备小微滴,例如尺寸(直径)范围从 $5\mu\text{m}$ 到 $500\mu\text{m}$ 。在微流体设备内形成的极性介质的微滴可以被转移到主体非极性介质中,微流体设备的外部,如果需要,用于进一步操控。极性介质的珠子可以与微滴类似的方式在非极性介质中形成。例如,能够形成珠子的极性流动介质,如水凝胶,可以通过吸液管或注射器被引入到非极性介质中。

[0079] 或者,一个或多个包含极性介质的预先形成的珠子可以简单地分散在非极性介质中。这样的例子如非交联型或交联型水凝胶,如琼脂糖或琼脂糖凝胶,或包含极性介质的多孔玻璃或塑料珠子。珠子可以从微滴原位(in-situ)形成,例如通过冷却或用紫外线交联。引入到非极性介质的珠子可以形成微滴,例如通过融化。

[0080] 作为替代,提供在非极性介质中的第二体积,所述第二体积可应用于所述非极性介质的表面。这可以通过任何适合的方法做到。例如,所述极性介质可以通过吸液管或注射器,或者通过使用流式细胞,应用于该非极性介质的表面。在另一方法中,可初始提供极性介质的体积,例如在容器中,非极性介质应用于极性介质的表面。为了提供介于极性介质的两个体积之间的界面,极性介质的第一体积可以随后应用于非极性介质的表面。

[0081] 可在极性介质的多个不连续的体积和极性介质的层之间的界面处提供多个膜。极性介质的体积可以通过非极性介质而彼此分离。

[0082] 在非极性或极性介质中可以提供两亲分子。在非极性介质中提供极性介质的单一体积的情况下,可在非极性和极性介质彼此接触之前或之后提供所述两亲分子。然而,在非极性介质中提供极性介质的多个体积的情况下,例如以乳液的形式,所述两亲分子优选在接触非极性和极性介质之前,在非极性或极性介质中提供。在提供了两亲分子且非极性和极性介质已彼此接触之后,在非极性介质和极性介质之间的界面处,自然地形成包含两亲分子的分子层。两亲分子的层的形成速率取决于实验因素,如存在的两亲分子的浓度,以及它们是否非极性体积或极性体积中提供。形成所述两亲分子层的时间可以有所不同,可以为几分钟或更长。两亲分子可通过将他们溶解于介质中在非极性或极性介质中提供,或例如通过非极性或极性介质中形成所述两亲分子的囊泡而提供。通常所述两亲分子在非极性介质中提供。通常,它们溶解在非极性介质中。

[0083] 不希望被理论束缚,认为在极性介质和非极性介质之间的界面的每层或两亲分子可能是折叠的,使得所述疏水核心基团面向外,远离极性介质并朝向非极性介质,使得第一和第二外部亲水基团面向内,朝向极性介质。因此,可以的情况是,在极性介质和非极性介质之间的界面处的两亲分子的层或各层包含两亲分子的单分子层,以那样的方式折叠。在分子是三嵌段ABA型共聚物的情况下,其中每个A是外部亲水聚合物链段;B是内部疏水链段,该层中的分子可以呈U形,使得所述疏水B基团面向外,远离极性介质并朝向非极性介质,两个亲水A基团面向内,朝向极性介质。

[0084] 用于本发明的第一方面的步骤(b)中的词汇“使得”(causing)意指覆盖,一方面,积极地促使极性介质的两个体积彼此接触,并且,另一方面,使得极性介质的第一和第二体积通过自身而接触,即使得极性介质的两个体积彼此接触并通过自组装形成所述膜。

[0085] 极性介质的体积可以通过多种技术操作。例如,极性介质的微滴或珠子可以通过

在微滴或珠子的内部设置的具有亲水性外表面的锚来移动。所述锚的运动使得微滴或珠子运动,例如使它接触极性介质的另一个体积。这样的操作在如下的实施例2中描述,在图3和图4中,其中具有亲水性的两个电极,琼脂糖包膜触点作为锚。

[0086] 在使得极性介质的第一和第二体积相接触的步骤中,极性介质的第一和第二体积通过介入非极性介质面向彼此进行相对运动,介入非极性介质在两体积之间置换。

[0087] 一旦非极性介质已经充分偏离包含极性介质的第一和第二体积之间,使得第一和第二体积彼此接触,所述两亲分子的膜在第一和第二体积之间形成。

[0088] 形成膜的时间取决于实验条件,可以在几秒到几小时之间变化。可以通过监测极性介质的两体积之间的电容变化,实验地测定极性介质的两体积之间的两亲分子的膜的形成。这样的实验描述在下文实施例2中的2.3节。结果如图5所示,测试的电容随时间而增加阐明了液态缓冲液的两微滴之间的两亲分子的膜的形成。因此,通过监测电容,本领域的技术人员按照本发明的方法,可以验证包含在极性介质的第一和第二体积之间的两亲分子的膜的形成。

[0089] 不希望被理论束缚,认为在极性介质的两体积之间形成的膜,在本发明的方法中,可以包含所述两亲分子的单分子层。特别的,认为所述膜可以包含彼此整齐排列对齐的两亲分子的单层,使得疏水核心基团排列形成中间疏水层,该中间疏水层不与极性介质的两体积的任何一个接触,使得第一和第二外部亲水基团被排列形成第一和第二外部亲水层,该第一和第二外部亲水层接触膜的任何一侧上的极性介质的两个体积。

[0090] 如果情况如此,并且如果,如上文所假设的,在极性介质和非极性介质之间的界面处的两亲分子是折叠的,以便所有的疏水核心基团面向非极性介质,并且所有的第一和第二外部亲水基团面向极性介质,然后有可能根据本发明的方法的膜的形成包扩两亲分子的重排,包括所述两亲分子的展开。

[0091] 另一种可能,然而当实施本发明的方法时,所述两亲分子保持折叠,在极性介质的两个体积之间形成的膜包含双层所述折叠的两亲分子的双层,其中所有的疏水核心基团面向内朝向双层的中部,并且所有的外部亲水基团面向外面,朝向第一和第二极性介质。这样的双层例如可以通过将折叠的两亲分子的两个单层放在一起而形成,通过实施如前所定义的本发明的方法,其中极性介质的每个每个双层第一和第二体积包扩在非极性和极性介质之间的界面处包含两亲分子的层。

[0092] 此处使用的术语双层是指包含两亲分子的两个单层的膜。单层指从两亲分子的单个层形成的膜。

[0093] 术语“珠子”通常是指具有确定形状且通常预制的介质的体积。这样的例子有玻璃或含极性介质的多孔塑料珠子,或者未交联或已交联的水凝胶,例如琼脂糖或琼脂糖凝胶。

[0094] 微滴,另外,指在插入非极性介质之前通常不具有预制的形状的可流动介质的体积。这样的例子如水溶液或水凝胶。所述水凝胶在插入到非极性介质之前可以加热以增加其流动性。所述珠子可以从非极性介质中的微滴原位形成,例如通过冷却或与紫外线交联。添加到非极性介质中的珠子例如通过融化可以随后形成微滴。

[0095] 所述珠子可以具有任何特定的形状如球形、杆形、三角形、方形、六边形或不规则形。

[0096] 超过两个的包含极性介质的体积可以聚集在一起以形成这样体积的链或网络,其

中包含极性介质的每个体积接触相邻的包含极性介质的体积。离子通道可以在各自体积之间提供以提供一种相互连接的离子网络。

[0097] 本发明的方法的优选实施例中,包含极性介质的第二体积在非极性介质的表面提供。所述第二体积可以为假定包含所关注的目标分析物的样本,可以进行测定以表征该分析物。所述第二体积可以是包含目标分析物的样本。

[0098] 所述目标分析物例如可以是金属离子、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、染料、漂白剂、药物、诊断试剂、营养药、易爆或环境污染物。所述蛋白质可以是跨膜蛋白。特别的,所述目标分析物是目标多核苷酸。样本例如可以为生物样本。

[0099] 本发明的方法的一些实施例中,所述第一体积是微滴或珠子,所述第二体积是包含或怀疑包含目标分析物的样本。

[0100] 所述微滴或珠子的平均直径通常从大约5 μm 到大约500 μm 。

[0101] 包含两亲分子的层或每层以及最终产生的膜或在极性介质体积之间形成的膜可以另外包含进一步的分子。

[0102] 所述进一步的分子可以包含功能的分子,如跨膜孔和膜蛋白,其将会在下文进一步详细描述。此外或替换的,所述进一步的分子可以包含额外的两亲分子,即所述两亲分子其自身不包含第一外部极性基团,非极性核心基团,和第二外部极性基团,其中每个所述第一和第二外部极性基团连接至非极性核心基团。因此,所述进一步的分子可以包含如传统的脂质的两亲分子,例如磷脂、脂肪酸、脂肪酰基、甘油酯、甘油磷脂、鞘脂质、固醇脂质、异戊烯醇脂质、糖脂质和聚酮化合物。

[0103] 在所述层中的两亲分子或包含第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二外部亲水基团的膜,不需要所有都为相同的类型。相反,可以存在所述两亲分子的混合物。

[0104] 描述的术语“连接”针对此处定义的所述两亲分子表示直接或通过一个或多个进一步的基团结合。所述一个或多个进一步的基团可以选自连接基团(linker group),进一步的亲水基团(即除了第一和第二外部亲水基团以外的亲水基团),以及进一步的疏水基团(即除了疏水核心基团以外的疏水基团)。因此,在每个两亲分子中,第一外部亲水基团直接或通过一个或多个进一步的基团结合至疏水核心基团,第二外部亲水基团直接或者通过一个或多个进一步的基团结合至疏水核心基团。

[0105] 重要的是,第一和第二外部亲水基团均以这种方式独立地连接至疏水核心基团,因为这确保了从疏水性的角度分子包含至少三个不同区域,即一个内部疏水区域和两个外部亲水区域。因此,重要的是,分子不是一个,其中第一和第二外部亲水基团的唯一一个连接至疏水核心基团,如AAB型分子,其中第一和第二亲水基团彼此结合,这些基团中的唯一一个连接至疏水核心。相反,每个第一和第二外部亲水基团必须独立地连接至疏水核心基团,从疏水性的角度在分子中提供至少三个不同区域。

[0106] 一般来说,出于同样的原因,第一和第二外部亲水基团独立地连接至疏水核心基团的不同区域,使得第一和第二外部亲水基团通过疏水核心基团彼此相互隔开到某种程度。

[0107] 通常,因此第一和第二外部亲水基团独立地连接至疏水核心基团的不同原子。在优选的实施例中,第一和第二外部亲水基团连接至疏水核心基团的相对末端。

[0108] 如前所述,所述两亲分子可以进一步包含至少一个额外的疏水或亲水基团,即除了第一外部亲水基团、疏水核心基团和第二外部亲水基团以外。

[0109] 因此,例如,每个所述两亲分子可以进一步包含至少一个额外的疏水基团,所述疏水基团结合至第一外部亲水基团或第二外部亲水基团。

[0110] 事实上,所述两亲分子可以进一步包含一个或多个额外的疏水基团,而这并不必然表示表示两亲分子不能采用三嵌段型的构型,即从疏水性的角度分子仍具有三个不同区域的构型。例如,当两亲分子具有连接至第一或第二外部亲水基团的额外的疏水基团,这些额外的疏水基团可能向内折叠,以使其自身与疏水核心基团对齐。两亲分子最后得到的构象仍有“三嵌段特性”,因为额外的疏水基团可以向内折叠使其在本质上与疏水核心基团一起成为核心疏水区域的一部分,本质上,因此,这样的两亲分子仍具有一个内部疏水区域和两个外部亲水区域,并且因此,按照本发明的方法,在极性介质的第一和第二体积之间形成膜是非常有用的。

[0111] 在一些实施例中,每个两亲分子进一步包含:第一额外疏水基团,结合至第一外部亲水基团,第二额外疏水基团,结合至第二外部亲水基团。所述两亲分子包含BABAB型的五嵌段分子,其中每个基团B可以是相同或不同的疏水基团,每个基团A可以是相同或不同的亲水性的。通常,每个额外的疏水基团自身都能够与疏水核心基团对齐。正如上文提到的,这表示表示两亲分子可以保留“三嵌段特性”,因此本质上仍具有一个内部疏水区域和两个外部亲水区域,按照本发明的方法为了在极性介质的第一和第二体积之间形成膜的目的,是非常有用的。

[0112] 通常,部分或全部两亲分子是包含至少三个聚合物链段的共聚物分子,其中疏水核心基团是内部疏水聚合物链段B,第一和第二外部亲水基团是第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂。

[0113] 然而,两亲分子除了共聚物外也是设想的,如此,例如,双极的或流星锤(bola)脂质。它们可以天然地存在或者在自然中合成。因此,每个两亲分子都可以是双极脂质,其包含两个结合到疏水尾部基团的相对末端的亲水头部基团。每个亲水头部基团可选择地结合到至少一个进一步的疏水尾部基团。任何适合的这种双极脂质都可以使用。特别适合的双极脂质包含双极磷脂。双极的和流星锤脂质的例子有通过两个疏水C40植烷链连接两个极性头的大环四醚,所述大环四醚发现于嗜酸热硫化叶菌*Sulfolobus acidocaldarius*、极端嗜热古菌*Thermophilic archaeobacterium*,如Brard等*J. Org. Chem.*, 2007, 72 (22), pp 8267-8279公开的双极脂质,如Schubert等*J. Phys. Chem. B*, 2008, 1212, 10041-10044公开的流星锤脂质。

[0114] 双极脂质可利用合成路线被合成,是被有技能的化学家熟知的,并且也是也是商业上可得到的。各种双极脂质的结构及合成描述在综述文章“古细菌双极脂质类似物:结构、合成与溶致性质”(Archaeobacteria bipolar lipid analogues: structure, synthesis and lyotropic properties) Thierry Benvegnu等, *Current Opinion in Colloid&Interface Science*, Volume 8, Issue 6, April 2004, Pages 469-479。

[0115] 通常,然而,每个两亲分子都是包含至少三个聚合物链段的共聚物,其中疏水核心基团是内部疏水聚合物链段B,第一和第二外部亲水基团是第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂。

[0116] 所述共聚物可以具有例如线性或移植 (graft) 结构。第一和第二次外部亲水聚合物链段A₁和A₂, 例如可以悬挂于内部疏水聚合物链段B上。通常, A₁和A₂连接至内部疏水聚合物链段B的相对末端。正如上文提到的, 连接这个术语在上下文中表示表示, 直接或通过一个或多个的进一步的基团的结合。

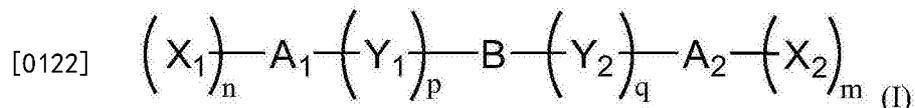
[0117] 共聚物可以进一步包含一个或多个额外的聚合物链段, 即除了A₁、A₂和B的一个或多个进一步的聚合物链段。聚合物链段或每个额外的聚合物链段可以是相同或不同的。通常, 聚合物链段或每个额外的聚合物链段是额外的亲水聚合物链段或额外的疏水聚合物链段。

[0118] 因此, 第一外部亲水聚合物链段A₁可以被结合到一个或多个额外的聚合物链段。同样的, 第二外部亲水聚合物链段A₂被可以结合到一个或多个额外的聚合物链段。在一些实施例中, A₁和A₂都被各自结合到一个或多个额外的聚合物链段。

[0119] 另外, 内部疏水聚合物链段B可以直接地或通过一个或多个额外的聚合物链段结合到第一外部亲水聚合物链段A₁。同样地, 内部疏水聚合物链段B可以直接地或通过一个或多个额外的聚合物链段结合到第二外部亲水聚合物链段A₂。在一些实施例中, 内部疏水聚合物链段B直接结合A₁和A₂。然而, 其他实施例中预想为, 内部疏水聚合物链段B通过一个或多个额外的聚合物链段结合到A₁和A₂。

[0120] 每个这些额外的聚合物链段可以是独立地选自亲水聚合物链段和疏水聚合物链段。

[0121] 相应地, 共聚物可以是如式 (I) 的嵌段共聚物:



[0123] 其中:

[0124] A₁是所述第一外部亲水聚合物链段;

[0125] B是所述内部疏水聚合物链段;

[0126] A₂是所述第二外部亲水聚合物链段;

[0127] X₁, Y₁, Y₂和X₂是额外的聚合物链段; 和

[0128] n, p, q和m是独立地为0或1。

[0129] 额外的聚合物链段或每个额外的聚合物链段X₁、Y₁、Y₂和X₂可以相同或不同。每个这些额外的聚合物链段可以是亲水聚合物链段或疏水聚合物链段。

[0130] 通常, 然而, X₁和X₂均是额外的亲水聚合物链段或X₁和X₂均是额外的疏水聚合物链段。

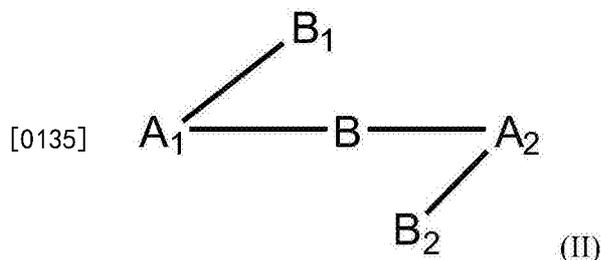
[0131] 另外, 通常, Y₁和Y₂均是额外的疏水聚合物链段或者都是额外的亲水聚合物链段。

[0132] 在一些实施例中, 式 (I) 的嵌段共聚物的m和n都是1, p和q均为0, 因此共聚物是一种五嵌段共聚物。一个优选的五嵌段共聚物是式 (I) 的嵌段共聚物, 其中m和n均为1, p和q均为0, X₁和X₂均为额外的疏水聚合物链段。

[0133] 优选地, 本实施例中, 额外的疏水聚合物链段X₁和X₂都能够使其自身与内部疏水聚合物链段B对齐。例如, X₁和X₂能够向内折叠以使其自身与链段B对齐。这表明表示最后得到的五嵌段分子的构象仍有“三嵌段特性”, 因为疏水聚合物链段X₁和X₂本质上与疏水核心基

团一起成为核心疏水区域的一部分。因此所述共聚物仍具有一个内部疏水区域(包含B和X₁和X₂)和两个外部亲水区域,使得按照本发明的方法在极性介质的第一和第二体积之间形成膜非常有用。

[0134] 因此,在一些实施例中,所述共聚物是式(II)的五嵌段共聚物:



[0136] 其中,

[0137] A₁是所述第一外部亲水聚合物链段;

[0138] B是所述内部疏水聚合物链段;

[0139] A₂是所述第二外部亲水聚合物链段;

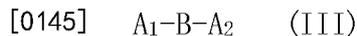
[0140] B₁是第一额外疏水聚合物链段;

[0141] B₂是第二额外疏水聚合物链段。

[0142] B₁和B₂,在本实施例中,通常能够向内折叠使其自身与链段B对齐,这表明表示五嵌段分子可以采用具有“三嵌段特征”的构象,具有一个内部疏水区域(包含相互对齐的B、B₁和B₂)和两个外部亲水区域A₁和A₂,使得所述两亲分子按照本发明的方法在极性介质的第一和第二体积之间形成膜特别有用。

[0143] 通常,然而,所述共聚物是具有一中间聚合物链段的三嵌段共聚物,即所述的内部疏水聚合物链段B;两个外部聚合物链段,其为所述第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂。

[0144] 因此,通常,在式(I)中,m、n、p和q都是0,所述共聚物是式(III)的三嵌段共聚物:



[0146] 其中:

[0147] A₁是所述第一外部亲水聚合物链段;

[0148] B是所述内部疏水聚合物链段;

[0149] A₂是所述第二外部亲水聚合物链段。

[0150] 通常,在这一实施例中,A₁和A₂结合内部疏水聚合物链段B的相对末端。

[0151] 下面的取代基的定义适用于下文中相应的被定义的化合物:

[0152] C₁-C₁₈烷基基团是未经取代的或取代的,直链或支链的具有1到18个碳原子的饱和烃基。通常是C₁-C₁₀烷基,例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基或C₁-C₆烷基,例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、或C₁-C₄烷基,例如甲基、乙基、异丙基、正丙基、叔丁基、仲丁基或正丁基。烷基基团可以然而C₃-C₁₈烷基,或例如C₄-C₁₂烷基基团。当一个烷基基团被取代时,它通常支撑一个或多个取代基,该取代基选自未经取代的C₁-C₁₀烷基、取代或未经取代的芳基(例如苯基)、氰基、氨基、C₁-C₁₀烷氨基、双(C₁-C₁₀)烷氨基、芳氨基、双芳氨基、芳烷氨基、胺基、酰氨基、氧代、环化、酯化、酰基、酰氧基、C₁-C₁₀烷氧基、芳氧基、卤代烷基、C₁-C₁₀烷硫基、巯基、硫代芳基、磺酰基、磷酸酯。特别是如果烷基基团是在亲水基团或亲水聚合物链段内,它可以支撑一个或多个选自羟基、羧基、磺酸、磷酸、膦酸的

取代基。经取代的烷基基团的例子包含卤代烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧烷基和烷芳基基团。此处使用的烷芳基这一术语,属于C₁-C₁₈烷基基团,其中至少一个氢原子被芳基所取代。这些基团的例子包括但不限于,苄基(苯甲基PhCH₂-)、二苯甲基(Ph₂CH-)、三苯甲基(三苯甲基,Ph₃C-)、苯乙基(苯乙基,Ph-CH₂CH₂-)、苯乙烯基(Ph-CH=CH-)、肉桂基(Ph-CH=CH-CH₂-)。通常经取代的C₁-C₁₈烷基基团携带1、2或3个取代基。例如1或2,或者更通常的是1个取代基。通常,然而,此处的烷基基团是未经取代的,除非另有说明。

[0153] 因此乙烯基C₁-C₁₈烷酸酯是式R-C(O)O-CH=CH₂的化合物,其中R是如上定义的C₁-C₁₈烷基基团。

[0154] 除非对此处所定义的“烷基”另有说明,其是如上定义的C₁-C₁₈烷基基团,或例如如上定义的C₁-C₁₀烷基基团或如上定义的C₁-C₄烷基基团。

[0155] C₁-C₁₀全氟烷基基团是具有1到10个碳原子的直链或支链的饱和全氟化烷基。C₂-C₁₀全氟烷基基团是具有2到10个碳原子的直链或支链的饱和全氟化烷基。上下文中的“全氟化”表示表示完全氟化,从而与碳结合的氢原子没有被氟取代。C₂-C₁₂全氟烷基基团的例子有全氟乙基(C₂)、全氟丙基(C₃) (包含全氟正丙基和全氟异丙基)、全氟丁基(C₄) (包含全氟正丁基、全氟仲丁基和全氟叔丁基)、全氟戊基(C₅)、全氟己基(C₆)、全氟庚基(C₇)、全氟辛基(C₈)、全氟壬基(C₉)和全氟癸基(C₁₀),包含其直链和支链的异构体。C₁-C₁₀全氟烷基当然也包含-CF₃。

[0156] “部分氟化”表示表示一个或多个与碳结合的氢原子被氟取代。因此,部分氟化C₁-C₁₀烷基基团是被一个或多个氟原子取代的C₁-C₁₀烷基基团,但不是全氟。同样的,部分氟化C₂-C₁₀烷基基团是被一个或多个氟原子取代的C₂-C₁₀烷基基团,但不是全氟。因此,部分氟化的C₁-C₁₀烷基基团和C₂-C₁₀烷基基团具有至少有一个与碳结合的氢原子被氟取代。

[0157] C₃-C₁₀环烷基基团是未经取代的或取代的烷基基团,其也是环状基团;即,通过将氢原子从碳环化合物的碳环的脂环原子中移除来获得单价部分,这部分具有3到10个碳原子(除非另有说明),包含3到10个环状原子。C₃-C₁₀环烷基基团的基团例子包括C₃-C₇环烷基。当C₃-C₁₀环烷基基团被取代,它通常支撑一个或多个选自以上那些指定的烷基基团的取代基。通常取代的C₃-C₁₀环烷基基团有1、2或3个取代基。例如1或2,或者更通常是1个取代基。通常,然而,此处的环烷基基团是未经取代的,除非另有规定。C₃-C₁₀的环烷基基团的例子包括,但不限于,那些来自饱和单环的烃化合物,C₃-C₁₀环烷基基团是如上定义的未经取代的或取代的:环丙烷(C₃)、环丁烷(C₄)、环戊烷(C₅)、环己烷(C₆)、环庚烷(C₇)、甲基环丙烷(C₄)、双甲基环丙烷(C₅)、甲基环丁烷(C₅)、双甲基环丁烷(C₆)、甲基环戊烷(C₆)、双甲基环戊烷(C₇)、甲基环己烷(C₇)、双甲基环己烷(C₈)和薄荷烷(C₁₀)。

[0158] 芳基基团是取代的或未经取代的,单环或双环芳香族基团,通常包含6到14个碳原子,优选为在环的部分有6到10个碳原子。例子包括苯基、萘基、茛基、茛满基基团。芳基基团可以是未经取代的或取代的,例如,正如上文详细说明了的烷基。通常它有0、1、2或3个取代基。

[0159] C₂-C₁₈烯基是具有2到20个碳原子的直链或支链烯基。卤代基团是氯、氟、溴或碘(氯基、氟基、溴基或碘基)。它通常是氯、氟、溴。因此,C₂-C₁₈卤代烯基是具有2到20个碳原子的直链或支链烯基,其被一个或多个的卤代基团取代。通常其具有0、1、2、3或4个卤代取代基。

[0160] 此处使用的术语氨基代表了式-NH₂的基团。术语C₁-C₆烷氨基代表了式-NHR'的基团,其中R'是如前定义的C₁-C₆烷基基团。术语双(C₁-C₆烷氨基)代表了式-NR'R''的基团,其中R'和R''是相同的或不同的,所述R'和R''代表了如前定义的C₁-C₆烷基基团。

[0161] 上文定义的两亲共聚物分子的内部疏水聚合物链段B通常包含一个或多个单体的聚合物,该单体选自:C₁-C₁₈烷基和C₃-C₁₈环烷基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、C₃-C₁₈烷基丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺、丙烯腈、甲基丙烯腈、乙烯基C₁-C₁₈烷酸酯、C₂-C₁₈烯炔、C₂-C₁₈卤代烯炔、苯乙烯、(C₁₋₆烷基)苯乙烯、C₄-C₁₂烷基乙烯基醚、C₂-C₁₀全氟烷基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯及相应的部分氟化丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、C₃-C₁₂全氟烷基乙硫基羰基氨基乙基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、丙烯酰氧基和甲基丙烯酰氧基烷基硅氧烷、双(C₁-C₆烷基)卤代硅烷、N-乙烯基吡啶、马来酸的C₁-C₁₂烷基酯、富马酸、乌头二酸、中康酸、乙酸乙烯酯、丙酸乙烯酯、丁酸乙烯酯、戊酸乙烯酯、氯丁二烯、氯乙烯、偏二氯乙烯、乙烯基甲苯乙烯基甲苯、乙烯基乙醚、全氟己基乙硫基羰基氨基乙基甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸异冰片酯甲基丙烯酸异冰片酯、甲基丙烯酸三氟乙酯甲基丙烯酸三氟乙酯、甲基丙烯酸六氟异丙酯甲基丙烯酸六氟异丙酯、甲基丙烯酸六氟丁酯甲基丙烯酸六氟丁酯、甲基丙烯酰氧丙基三(三甲基硅氧烷基)硅烷甲基丙烯酸-[三(三甲基硅氧基)甲硅烷基]丙酯(TRIS)和3-甲基丙烯酰氧基丙基五甲基二硅氧烷。因此,内部疏水聚合物链段B可以包含任何上述所列单体之一的聚合物,或者可以包含任何两个或更多个上述所列单体的共聚物。

[0162] 内部疏水聚合物链段B可以例如包含一个或多个C₂-C₁₈烯炔单体的聚合物,例如可以包含一个或多个C₂-C₄烯炔单体的聚合物。

[0163] 或者,疏水聚合物链段B可以例如包含一个或多个双(C₁-C₆烷基)卤代硅烷单体的聚合物,例如二甲基氯硅烷的聚合物。

[0164] 当在共聚物中存在一个或多个额外的疏水聚合物链段,例如当X₁,Y₁,Y₂和X₂的任何一个存在于上述的式(I)中,它是一个额外的疏水聚合物链段,或者例如当共聚物是上述式(II)的五嵌段共聚物时,其包含额外的疏水聚合物链段B₁和B₂,额外的疏水聚合物链段或每个额外的疏水聚合物链段可以相同或不同,通常包含一个或多个选自下列单体的聚合物:C₁-C₁₈烷基和C₃-C₁₈环烷基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、C₃-C₁₈烷基丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺、丙烯腈、甲基丙烯腈、乙烯基C₁-C₁₈烷酸酯、C₂-C₁₈烯炔、C₂-C₁₈卤代烯炔、苯乙烯、(C₁₋₆烷基)苯乙烯、C₄-C₁₂烷基乙烯基醚、C₂-C₁₀全氟烷基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯及相应地部分氟化丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、C₃-C₁₂全氟烷基乙硫基羰基氨基乙基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、丙烯酰氧基和甲基丙烯酰氧基烷基硅氧烷、N-乙烯基吡啶、顺丁烯二酸的C₁-C₁₂烷基酯、反丁烯二酸、亚甲基丁二酸、甲基反丁烯二酸、醋酸乙烯酯、丙酸乙烯酯、丁酸乙烯酯、戊酸乙烯酯、氯丁二烯、氯乙烯、偏二氯乙烯、乙烯基甲苯乙烯基甲苯、乙烯基乙醚、全氟己基乙硫基羰基氨基乙基甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸异冰片酯甲基丙烯酸异冰片酯、甲基丙烯酸三氟乙酯甲基丙烯酸三氟乙酯、甲基丙烯酸六氟异丙酯甲基丙烯酸六氟异丙酯、甲基丙烯酸六氟丁酯甲基丙烯酸六氟丁酯、甲基丙烯酰氧丙基三(三甲基硅氧烷基)硅烷甲基丙烯酸-[三(三甲基硅氧基)甲硅烷基]丙酯(TRIS)和3-甲基丙烯酰氧基丙基五甲基二硅氧烷。这样,额外的疏水聚合物链段或每个额外的疏水聚合物链段可以包含任何上述所列单体之一的聚合物,或可以包含任何两个或多个上述所列单体的共聚物。

[0165] 额外的疏水聚合物链段或每个额外的疏水聚合物链段可以例如包含一个或多个

C₂-C₁₈烯烃单体的聚合物,可以例如一个或多个C₂-C₄烯烃单体的聚合物。额外的疏水聚合物链段或每个额外的疏水聚合物链段可以另外或者替换的包含一个或多个双(C₁-C₆烷基)卤代硅烷单体的聚合物,例如二甲基氯硅烷的聚合物。

[0166] 通常,共聚物中的内部疏水聚合物链段B包含选自下列的聚合物:聚硅氧烷、聚烯烃、全氟聚醚、全氟烷基聚醚、聚苯乙烯、聚氧丙烯、聚乙酸乙烯酯、聚氧丁烯、聚异戊二烯、聚丁二烯、聚氯乙烯、聚烷基丙烯酸酯(PAA)、聚烷基甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈、聚丙烯、PTHF、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚砜、聚乙烯醚、聚(环氧丙烷)及其共聚物。

[0167] 尤其对内部疏水聚合物链段B优选包括聚硅氧烷和聚烯烃。

[0168] 适合的聚硅氧烷包括聚二甲基硅氧烷和聚二苯基硅氧烷。所述内部疏水聚合物链段B可以例如包含具有末端烷撑基团的聚硅氧烷嵌段。因此,内部疏水聚合物链段B可以包含具有末端烷撑基团的聚二甲基硅氧烷嵌段,或例如具有末端烷撑基团的聚二苯基硅氧烷嵌段。

[0169] 或者,内部疏水聚合物链段B可以包含聚烯烃。该聚烯烃可以例如是聚乙烯、聚丙烯或聚丁烯。通常,该聚烯烃是聚乙烯。

[0170] 同样地,当共聚物中存在一个或多个额外的疏水聚合物链段时,例如当任何X₁、Y₁、Y₂和X₂存在于上述式(I)中,它是额外的疏水聚合物链段,或例如当共聚物是上述式(II)的五嵌段共聚物,其包含额外的疏水聚合物链段B₁和B₂,额外的疏水聚合物链段或每个额外的疏水聚合物链段可以是相同或不同的,通常包含选自下列的聚合物:聚硅氧烷、聚烯烃、全氟聚醚、全氟烷基聚醚、聚苯乙烯、聚氧丙烯、聚乙酸乙烯酯、聚氧丁烯、聚异戊二烯、聚丁二烯、聚氯乙烯、聚烷基丙烯酸酯(PAA)、聚烷基甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈、聚丙烯、PTHF、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚砜、聚乙烯醚、聚(环氧丙烷)及其共聚物。尤其对一个或多个额外的疏水聚合物链段优选包括聚硅氧烷和聚烯烃。适合的聚硅氧烷包括聚二甲基硅氧烷和聚二苯基硅氧烷。该聚烯烃可以例如是聚乙烯,聚丙烯,或聚丁烯。通常,该聚烯烃是聚乙烯。

[0171] 通常,因此,内部疏水聚合物链段B,当存在的额外的疏水聚合物链段或每个额外的疏水聚合物链段时,包含聚硅氧烷或聚烯烃。适合的聚硅氧烷包括聚二甲基硅氧烷和聚二苯基硅氧烷。该聚烯烃可以例如是聚乙烯,聚丙烯,或聚丁烯。

[0172] 在一些实施例中,然而,内部疏水聚合物链段B包含不饱和聚合物。不饱和聚合物可以选自:共轭脂肪族或脂环族二烯聚合物,二烯是未经取代的或经卤素或C₁-C₆烷基取代的;炔或二炔聚合物,炔或二炔是未经取代的炔或经C₁-C₆烷基或三甲基甲硅烷基取代的;共轭二烯和亲水或疏水性乙烯单体的共聚物;以及部分其水合衍生物。特别优选的可使用的不饱和聚合物包括:顺式、反式、异构或间规的聚-1,2丁二烯、聚-1,4丁二烯或聚异戊二烯、聚环戊烯、聚氯丁二烯或聚间戊二烯;具有亲水的或疏水的乙烯单体选自丙烯腈、苯乙烯、丙烯酸,或甲基丙烯酸羟乙酯的丁二烯或异戊二烯共聚物;或聚-1-三甲基甲硅烷基丙炔。

[0173] 当存在额外的疏水聚合物链段或每个额外的疏水聚合物链段时,其可以是相同的或不同的,可以包含不饱和聚合物。当额外的疏水聚合物链段或每个额外的疏水聚合物链段包含不饱和聚合物,该不饱和聚合物可以例如选自任何上述所列的内部疏水聚合物链段B。

[0174] 内部疏水聚合物链段B,当存在的额外的疏水聚合物链段或每个额外的疏水聚合物链段时,可以包含单一类型的聚合物或多于一个类型的聚合物,如上文所述的两个或多

个聚合物。

[0175] 内部疏水聚合物链段B的平均分子量通常从大约150到大约50000。在一些实施例中,它是从大约800到大约15000,或例如从大约1000到大约12000。在一些实施例中,它是从大约5000到大约12000,例如从大约4000到大约11000。

[0176] 同样的,当额外的疏水聚合物链段或每个额外的疏水聚合物链段的平均分子量存在时,所述平均分子量通常从大约150到大约50000。在一些实施例中,从大约800到大约15000,或例如从大约1000到大约12000。在一些实施例中,从大约5000到大约12000,例如从大约4000到大约11000。

[0177] 上文所定义的两亲共聚物分子的第一外部亲水聚合物链段A₁和第二外部亲水聚合物链段A₂可以是相同的或不同的。通常,A₁和A₂是相同的或不同的,包含独立选自下列单体的聚合物:羟基取代的C₁-C₆烷基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、(C₁-C₆烷基)丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺、N,N-二烷基-丙烯酰胺、乙氧基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、聚乙二醇单甲基丙烯酸酯和聚乙二醇单甲基醚甲基丙烯酸酯、羟基取代的(C₁-C₆烷基)丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺、羟基取代的C₁-C₆烷基乙烯基醚、乙烯基磺酸钠、苯乙烯基磺酸钠、2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸、N-乙烯基吡咯、N-乙烯基-2-吡咯烷酮、2-乙烯基恶唑啉、2-乙烯基-4,4'-双烷基恶唑啉基-5-酮、2,4-乙烯基吡啶、总共具有3-5个碳原子的乙烯化不饱和羧酸,氨基(C₁-C₆烷基)-、单(C₁-C₆烷基氨基)(C₁-C₆烷基)-和双(C₁-C₆烷基氨基)(C₁-C₆烷基)-丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、烯丙醇、3-三甲基铵甲基丙烯酸2-羟丙基酯氯化物、二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯(DMAEMA)、二甲基氨基乙基甲基丙烯酰胺、甘油甲基丙烯酸酯、N-(1,1-二甲基-3-氧代丁基)丙烯酰胺、环亚氨基醚、乙烯基醚、包含环氧衍生物的环醚、环不饱和醚、N-取代环乙亚胺、β-内酯和β-内酰胺、乙烯酮缩醛、乙烯基缩醛和正磷。因此,每个第一和第二外部亲水聚合物链段A₁和A₂可以包含任何一个上述所列单体的聚合物,或任何两个或多个上述所列单体的共聚物。

[0178] 第一外部亲水聚合物链段A₁和第二外部亲水聚合物链段A₂是相同的或不同的,例如可以包含独立选自下列单体的聚合物:选自2-甲基恶唑啉、2-恶唑啉和在2号位有烯基基团的2-恶唑啉的环亚胺醚,选自甲基乙烯基醚、乙基乙烯基醚和甲氧基乙基乙烯基醚的乙烯基醚。更典型的,A₁和A₂包含选自下列单体的聚合物:2-甲基恶唑啉、2-恶唑啉和在2号位有烯基基团的2-恶唑啉。例如,A₁和A₂的任一或二者可以包含聚(2-甲基恶唑啉)(PMOXA)。

[0179] 同样的,当共聚物中存在一个或多个额外的亲水性聚合物链段,例如当任何X₁、Y₁、Y₂和X₂存在于上述式(1)中时,它是额外的亲水聚合物链段,额外的亲水聚合物链段或每个额外的亲水聚合物链段可以是相同的或不同的,通常包含一个或多个单体选自下列的聚合物:羟基取代的C₁-C₆烷基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、(C₁-C₆烷基)丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺、N,N-二烷基-丙烯酰胺、乙氧基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、聚乙二醇单甲基丙烯酸酯和聚乙二醇单甲基醚甲基丙烯酸酯、羟基取代的(C₁-C₆烷基)丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺、羟基取代的C₁-C₆烷基乙烯基醚、乙烯基磺酸钠、苯乙烯基磺酸钠、2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸、N-乙烯基吡咯、N-乙烯基-2-吡咯烷酮、2-乙烯基恶唑啉、2-乙烯基-4,4'-双烷基恶唑啉基-5-酮、2,4-乙烯基吡啶、总共具有3-5个碳原子的乙烯化不饱和羧酸,氨基(C₁-C₆烷基)-、单(C₁-C₆烷基氨基)(C₁-C₆烷基)-和双(C₁-C₆烷基氨基)(C₁-C₆烷基)-丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯、烯丙醇、3-三甲基铵甲基丙烯酸2-羟丙基酯氯化物、二甲基氨基乙基甲基

丙烯酸酯 (DMAEMA)、二甲基氨基乙基甲基丙烯酰胺、甘油甲基丙烯酸酯、N-(1,1-二甲基-3-氧代丁基)丙烯酰胺、环亚氨基醚、乙烯基醚、包含环氧化物的环醚、环不饱和醚、N-取代环乙亚胺、 β -内酯和 β -内酰胺、乙烯酮缩醛、乙烯基缩醛和正膦。因此,额外的亲水聚合物链段或每个额外的亲水聚合物链段,当存在时,可以包含任何一个上述所列单体的聚合物,或任何两个或多个上述所列单体的共聚物。

[0180] 在一些实施例中,额外的亲水聚合物链段或每个额外的亲水聚合物链段,当存在时,包含选自下列单体的聚合物:选自2-甲基恶唑啉、2-恶唑啉以及在2号位有烯基基团的2-恶唑啉的环亚胺醚,选自甲基乙烯基醚、乙基乙烯基醚和甲氧基乙基乙烯基醚的乙烯基醚。更典型的,额外的亲水聚合物链段或每个额外的亲水聚合物链段包含选自下列单体的聚合物:2-甲基恶唑啉、2-恶唑啉和在2号位有烯基基团的2-恶唑啉。例如,额外的亲水聚合物链段或每个额外的亲水聚合物链段可以包含聚(2-甲基恶唑啉)(PMOXA)。

[0181] 通常,第一外部亲水聚合物链段 A_1 和第二外部亲水聚合物链段 A_2 是相同或不同的,包含选自下列的聚合物:聚恶唑啉、聚乙二醇、聚氧化乙烯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚(甲基)丙烯酸酯、聚氧化乙烯-聚环氧丙烷嵌段共聚物、聚(乙烯基醚)、聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)、聚丙烯酸、聚酰基烷撑亚胺、聚羟烷基丙烯酸酯,如甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA),丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟丙酯、多元醇和其二者或多者混合物共聚聚合物、天然聚合物如多糖和多肽及其共聚物,聚离子分子如聚烯丙基铵、聚乙烯亚胺、聚乙烯基苄基三甲基铵、聚苯胺、磺化聚苯胺、聚吡咯和聚吡咯盐、聚噻吩乙酸、聚苯乙烯磺酸、两性离子分子及其盐和共聚物。

[0182] 用于亲水聚合物链段的聚合物的一特别重要的选择是聚(2-甲基恶唑啉),即PMOXA。因此,通常,第一外部亲水聚合物链段 A_1 和第二外部亲水聚合物链段 A_2 包含聚(2-甲基恶唑啉)。

[0183] 同样的,额外亲水聚合物链段或每个额外亲水聚合物链段,当存在时,当存在超过一个额外亲水聚合物链段时,可以是相同或不同的,包含选自下列的聚合物:聚恶唑啉、聚乙二醇、聚氧化乙烯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚(甲基)丙烯酸、聚氧化乙烯-聚环氧丙烷嵌段共聚物、聚(乙烯基醚)、聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)、聚丙烯酸、聚酰基烷撑亚胺、聚羟烷基丙烯酸酯,如甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA),丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟丙酯、多元醇及其二个或多个的共聚聚合物、天然聚合物如多糖和多肽,及其共聚物,聚离子分子如聚烯丙基铵、聚乙烯亚胺、聚乙烯基苄基三甲基铵、聚苯胺、磺化聚苯胺、聚吡咯和聚吡咯盐、聚噻吩乙酸、聚苯乙烯磺酸、两性离子分子及其盐和共聚物。额外的亲水聚合物链段,当存在时,可以例如包含聚(2-甲基恶唑啉),即PMOXA。

[0184] 第一外部亲水聚合物链段 A_1 和第二外部亲水聚合物链段 A_2 ,当存在,额外的亲水聚合物链段或每个额外的亲水聚合物链段,可以包含单一类型的聚合物或多于一个类型的聚合物,如两个或多个上述聚合物。

[0185] 第一和第二外部亲水聚合物链段 A_1 和 A_2 各自的平均分子量,通常从大约150到大约50000。在一些实施例中,所述平均分子量从大约500到大约15000,或例如从大约1000到大约12000。在一些实施例中,所述平均分子量从大约5000到大约12000,例如从大约4000到11000。

[0186] 同样的,额外的亲水聚合物链段或每个额外的亲水聚合物链段,当存在时,平均分

子量通常从大约150到大约50000。在一些实施例中,所述平均分子量从大约500到大约15000,或例如从大约1000到大约12000。在一些实施例中,所述平均分子量从大约5000到大约12000,例如从大约4000到大约11000。

[0187] 因此,每个第一外部亲水聚合物链段A₁和第二外部亲水聚合物链段A₂的分子量,当存在时,额外的亲水聚合物链段或每个额外的亲水聚合物链段,分子量通常从150到50000。在一些实施例中,所述分子量从大约500到大约15000,或例如从大约1000到大约12000。在一些实施例中,所述分子量从大约5000到大约12000,例如从大约4000到大约11000。

[0188] 该两亲分子可以例如包含三嵌段共聚物聚(2-甲基恶唑啉)-嵌段-聚(二甲基硅氧烷)-嵌段-聚(2-甲基恶唑啉)(PMOXA-PDMS-PMOXA),或例如三嵌段共聚物聚(2-甲基恶唑啉)-嵌段-聚(乙烯)-嵌段-聚(2-甲基恶唑啉)(PMOXA-PE-PMOXA)。

[0189] 两亲分子可以例如包含所述三嵌段共聚物6-33-6 (PMOXA-PDMS-PMOXA), 6-32-6 (PMOXA-PDMS-PMOXA) 或6-45PE-6 (PMOXA-PE-PMOXA)。

[0190] 如上定义的种类的聚合物的两亲分子,即包含一个内部疏水聚合物链段及第一和第二外部亲水聚合物链段的共聚物分子,可以使用本领域已知的标准共聚物合成方法进行合成。该方法描述在美国专利6723814B2和6916488B1中。

[0191] 可以使用任何适合的聚合方法来制备适合的疏水或亲水聚合物链段,所述方法包括例如光致聚合、氧化还原聚合、阴离子聚合、缩合反应、加成反应和链式聚合反应。另外,在两亲嵌段共聚物中用作链段的各种各样的亲水和疏水聚合物都是市售的。

[0192] 例如,通过在适合的功能的疏水段聚合物的存在下聚合适合的亲水单体,亲水和疏水链段可以连接在一起,使得亲水单体的嵌段单元从疏水链段的功能位点增长。或者,适合的疏水单体可以在适合的功能的亲水聚合物链段存在下进行聚合,从而疏水单体的嵌段单元从亲水段的功能位点增长。

[0193] 因此,例如,三嵌段共聚物可以通过在疏水聚合物链段存在下聚合一个或多个适合的亲水单体而制备,其已经功能化两次,从而两个亲水单体的嵌段单元从疏水链段的功能位点增长。

[0194] 功能化链段可以称为大分子引发剂。适合的大分子引发剂可以承受一个或多个热或光化学可激活的阳离子或阴离子功能基团,或者例如一个或多个热或光化学可激活的自由基引发剂基团。也可以使用阴离子聚合、缩聚和加成聚合。优选的光化学可激活的阳离子引发剂基团的具体例子是三氟甲基磺酸(-O-SO₂-CF₃), -I (碘化物), -O-甲磺酰基, -O-甲苯磺酰基和-CI⁺AgSbF₆。所述引发剂基团通常连接到起始链段,以在起始段的末端基团和第一个单体形成增长段之间提供共价键的方式在制备两亲共聚物的接枝共聚阶段,该增长段连接至起始段。接枝表示聚合物链从单体末端或悬挂位置增长至另一预聚物上。

[0195] 引发剂基团可以以任何适合的方式引入到一个预聚物链段中,例如通过将阳离子或热引发剂基团连接到存在于起始单体上的官能基团。三氟甲烷磺酸基团,例如,可以通过将末端的或悬挂的官能羟基基团和活化的三氟甲磺酸衍生物如(CF₃SO)₂O反应而引入。

[0196] 接枝共聚期间是可能改变单体的,这样,例如,第一亲水链段A₁和A₂在预制的疏水段B上生长,然后进一步的疏水链段B₁和B₂连接至早先制备的链段A₁和A₂的末端。这种工艺可以用于本文定义的式(2)的五嵌段共聚物。

[0197] 聚合反应当然可以在有溶剂或没有溶剂的存在下实施,并在适合条件下发生聚

合反应,这是本领域人员所熟知的。适合的溶剂是能溶解使用的单体的所有溶剂,例如,水、醇如低烷醇像乙醇、甲醇,甲酰胺如二甲基甲酰胺,偶极非质子溶剂如二甲基亚砷或甲基乙基酮,酮如丙酮或环己酮等,烃如甲苯,醚如四氢呋喃THF、乙甲氧基乙烷或二氧己环,卤化烃如三氯乙烷,及合适溶剂的混合物如水和酒精的混合物,例如,水/乙醇或水/甲醇的混合物。

[0198] 包含内部疏水聚合物链段的完整的共聚物,及第一和第二外部亲水聚合物链段也是市售的,例如从加拿大、蒙特利尔的Polymer Source™等公司,例如英国、达勒姆的高力研究有限公司High Force Research Limited。

[0199] 可以自由挑选用于目的的在极性介质的第一和第二体积中使用的极性介质(和在任意进一步存在的极性介质的体积中)。它通常是液体或凝胶。在第一和第二体积中使用的极性介质可以相同或不同。

[0200] 在极性介质是水介质的情况下。可以使用任何适合的水介质。水介质可以包含一种或多种溶质。为了调节极性介质的pH值到适合,水介质可以包含缓冲剂。

[0201] 极性介质可以进一步包含氧化还原对,或氧化还原对的成员,所述氧化还原对的成员可以是部分经氧化或经还原从而提供所述氧化还原对。氧化还原对可以选自本领域已知的,例如 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 、二茂铁/二茂铁盐或 $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$ 。这样的例子有铁/铁氰化物、钌六胺和二茂铁羧酸。

[0202] 非极性介质通常是油。油可以是单一化合物,或油可以包含两个或两个以上化合物的混合物。

[0203] 油可以例如包含硅油。适合的硅油包含,例如,聚(苯基甲基硅氧烷)和聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)。硅油可以包含羟基封端的硅油,例如羟基封端的PDMS。

[0204] 所述油可以包含单一硅油,例如聚(苯基甲基硅氧烷)或聚(二甲基硅氧烷)。或者,油可以包含两种或多种不同硅油的混合物,例如聚(苯基甲基硅氧烷)和聚(二甲基硅氧烷)的混合物。

[0205] 另外或替换的,油可以包含烃,例如十六烷。当油包含烃,它可以包含单一烃化合物,或两种及多种的烃的混合物。在一些实施例中,非极性介质是油,是包含下列的混合物(a)一种或多种烃,以及(b)一种或多种硅油。

[0206] 任何适合的烃可以用作油。使用的烃在操作温度下必须当然是液体,即在执行本方法的温度下。通常,这是室温,因此使用的烃通常是一种在室温下是液态的烃。

[0207] 当油包含烃时,烃可以是分支的或未分支的,例如具有5到30个碳原子,或5到20个碳原子(尽管较低分子量的烃需要控制蒸发)的烃。优选的,所述烃在本发明中使用的微滴的操作温度下是液体。适合的例子包含烷烃或烯烃,如十六烷、癸烷、戊烷或角鲨烯。通常,油包含烃。

[0208] 通常,所述烃是未经取代的 C_{10} - C_{20} 烷烃,例如十六烷。

[0209] 在一些实施例中,所述烃是长链烃,例如未经取代的 C_{16} - C_{30} 烷烃,如角鲨烯。

[0210] 其他类型的油也是可能的。例如,所述油可以是氟碳化合物或溴代 C_{10} - C_{30} 烷烃(例如溴代 C_{10} - C_{20} 烷烃,如溴代十二烷)。通常,然而,所述油包含硅油或烃。

[0211] 由于硅油的密度接近水的密度,硅油是有利的,这确保了为液体体积的极性介质的体积在水里近乎自然的漂浮。所述硅油可以例如是聚(苯基甲基硅氧烷),密度约为

$1\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 。

[0212] 当烃用作非极性介质,所述烃通常具有5到20个碳原子($\text{C}_5\text{-C}_{20}$ 烃),更通常的是具有10到20个碳原子($\text{C}_{10}\text{-C}_{20}$ 烃)。通常,它是烷烃或烯烃。因此,烃可以是 $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ 烷烃或 $\text{C}_{10}\text{-C}_{20}$ 烷烃。在另一实施例中,烃可以是 $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ 烯烃或 $\text{C}_{10}\text{-C}_{20}$ 烯烃。所述烃通常是未经取代的。因此,在一优选的实施例中,烃是未经取代的 $\text{C}_5\text{-C}_{20}$ 烷烃,优选的是未经取代的 $\text{C}_{10}\text{-C}_{20}$ 烷烃。烃可以例如是角鲨烯、十六烷或癸烷。在一个实施例中它是十六烷。然而,在一些实施例中,烃可以用卤素原子取代,例如溴。

[0213] 非极性介质可以包括硅油和烃的混合物。在混合物中的硅油和烃可以进一步如上所定义。通常,烃是未经取代的 $\text{C}_{10}\text{-C}_{20}$ 烷烃,优选十六烷。硅油可以例如是聚(苯基甲基硅氧烷)或PDMS。

[0214] 在本发明方法的某些优选实施例中,非极性介质包含十六烷、聚(苯基甲基硅氧烷)或PDMS,两亲分子包括聚(2-甲基恶唑啉)-嵌段-聚(二甲基硅氧烷)-嵌段-聚(2-甲基恶唑啉)(PMOXA-PDMS-PMOXA),或聚(2-甲基恶唑啉)-嵌段-聚(乙烯)-嵌段-聚(2-甲基恶唑啉)(PMOXA-PE-PMOXA),并且极性介质包含水缓冲溶液。

[0215] 在极性介质的一个或多个体积中提供膜蛋白或跨膜孔,用于插入到通过本发明方法在极性介质体积之间形成的膜或多个膜中。本发明方法不限制膜蛋白的选择。因此,膜蛋白可以是任何类型。已经证明了完整膜蛋白的使用,但同样期待可以使用外周膜蛋白。本发明方法适用于任何包含 β -桶状结构或 α -螺旋束两个主要类别的膜蛋白。一个重要的应用是膜蛋白是孔或通道。除了蛋白孔或通道,进一步可能的膜蛋白包括但不限于,受体、转运蛋白或影响细胞识别或细胞间的相互作用的蛋白质。

[0216] 因此,通常,用于形成膜的本发明方法中,极性介质的体积中的至少一个包含膜蛋白,所述膜蛋白能够插入到包含两亲分子的膜中或多个膜中。适合的膜蛋白包括但不限于,泵、通道(例如离子通道)和/或孔、受体蛋白质、转运蛋白质和/或影响细胞识别或细胞间的相互作用的蛋白质。通常,膜蛋白是泵、通道和/或孔。

[0217] 通常膜蛋白是跨膜孔,例如MspA-(B2C),其在下文实施例2中使用,或例如 α -溶血素(α HL)孔。然而,任何适合的可使用的膜蛋白包含 β -桶状结构或 α -螺旋束两个主要类别。

[0218] 通常,跨膜蛋白孔是:

[0219] (a) 选自溶血素、杀白细胞素、耻垢分枝杆菌Mycobacterium smegmatis膜孔蛋白A(MspA)、外膜孔蛋白F(OmpF)、外膜孔蛋白G(OmpG)、外膜磷脂酶A、奈瑟氏菌(Neisseria)自转运脂蛋白(Na1P)和WZA;

[0220] (b) 由SEQ ID NO:2所示的8个相同的亚基形成,或是其变体,其中基于整个序列中氨基酸同一性,7个亚基中的一个或多个相比于SEQ ID NO:2具有至少50%的同源性并保留有孔活性;或

[0221] (c) 由SEQ ID NO:4所示的7个相同的亚基形成的 α -溶血素,或是其变体,基于整个序列中氨基酸同一性,所述7个亚基中的一个或多个相比于SEQ ID NO:4具有至少50%的同源性并保留有孔活性。

[0222] 通常,当膜蛋白存在于极性介质中时,极性介质中的膜蛋白的浓度等于或大于 1ng mL^{-1} ,例如,等于或大于 10ng mL^{-1} 。通常,极性介质中的膜蛋白的浓度从 10ng mL^{-1} 到 1000ng mL^{-1} ,或例如从 200ng mL^{-1} 到 800ng mL^{-1} 。

[0223] 可以通过存在的表面活性剂辅助所述孔插入到膜中。表面活性剂有利地具有与共聚物相容的化学部分。例如已经证明,基于有机硅的表面活性剂如Silwet®可以协助将蛋白孔如MspA插入到包含硅氧烷的共聚物中。可以在极性介质或非极性介质中提供所述表面活性剂。

[0224] 用于形成膜的本发明的方法可以进一步包含测定极性介质的体积,从而实施实验包括在所述体积之间的膜上或通过体积之间的膜的过程。例如,该方法可以进一步包含将电极与极性介质的体积进行电接触,并使用该电极进行电测量。这样的测定可以用于描述目标分析物,这会在下文中进行进一步的说明。

[0225] 本发明的系统的各种特性可以如用于本发明的方法的上文的进一步定义。

[0226] 在本发明的系统中,极性介质的第一体积可以完全或部分的在非极性介质中。对于所述极性介质的第一体积部分的在非极性介质中的情况,它的一部分可以不与非极性介质接触。膜可以因此可以在包含与第一体积的暴露部分接触的极性介质的第二体积之间形成。

[0227] 因为包含极性介质的第一体积完全地或部分地在非极性介质中,本发明的系统可以进一步包含在极性介质和非极性介质的第一体积之间的界面处的两亲分子的层。

[0228] 本发明系统中的极性介质的第一体积通常是微滴或珠子。在一些实施例中,本发明的系统中的每个第一和第二体积都是微滴或珠子。

[0229] 在一些实施例中,极性介质的每个第一和第二体积都是在所述非极性介质中,所述系统进一步包含:在极性介质和非极性介质的第一体积之间的界面处的所述两亲分子的层,和在极性介质和非极性介质的第二体积之间的界面处的所述两亲分子的层。

[0230] 所述系统可以另外包含极性介质的一个或多个进一步的体积,及一个或多个包括所述两亲分子的进一步的膜,其中极性介质的每个进一步的体积通过包括所述两亲分子的进一步的膜与极性介质的其他的体积分离(其可以是第一或第二体积,或其他进一步的体积)。第一体积、第二体积和极性介质的一个或多个的进一步的体积可以是微滴或珠子。

[0231] 所述系统可以例如包含与第一体积相邻的极性介质的进一步的体积,和进一步的膜,所述进一步的膜包括在极性介质的第一体积和极性介质的进一步的体积之间的两亲分子。

[0232] 同样的,所述系统可以包含与第二体积相邻的极性介质的进一步的体积,和进一步的膜,所述进一步的膜包含在极性介质的第二体积和极性介质的进一步的体积之间的两亲分子。

[0233] 一个重要的设置是系统包含非极性介质中的极性介质的多个第一体积,和在多个第一体积和第二体积之间的多个各自的膜。所述第一体积或每个第一体积可以是微滴或珠子。所述第二体积可以包含样本,所述样本包含或怀疑包含感兴趣的目标分析物。所述目标分析物可以如上文的进一步的定义。

[0234] 在另一种情况中,所述系统可以包含非极性介质中的极性介质的多个第一体积,极性介质的多个第二体积,及在各自的第二和第一体积之间提供的多个膜。也可以在非极性介质中提供一个或多个第二体积。

[0235] 本发明还提供了体积,如上文定义的,包含极性介质,所述体积设置于非极性介质中,所述体积具有包含在其表面周围的两亲分子的层,在极性介质和非极性介质之间。所述

体积可以有效地使用于如文中所定义的本发明的方法中用于形成膜。本文还提供了用于制备所述体积的工艺。

[0236] 本发明的体积的各种特征,和本发明的用于制备所述体积的工艺,可以在本发明的用于形成膜的方法中,或本发明的系统中进一步明确。因此,例如,在本发明的所述体积中,或本发明的用于制备本发明的所述体积的工艺中,两亲共聚物、包含两亲分子的层、极性介质和非极性介质都可以如上文定义用于本发明的方法或系统。通常,所述极性介质的体积是所述极性介质的微滴或珠子。

[0237] 表征分析物的方法

[0238] 本发明提供了一种表征目标分析物的方法。该方法包括将分析物与存在于本发明的系统的膜的孔接触,使得目标分析物移动穿过所述孔。之后通过使用本领域已知的标准方法随着分析物相对孔移动而测定目标分析物的一个或多个特征。优选当所述分析物通过所述孔时测定所述目标分析物的一个或多个特征。步骤(a)和(b)优选施加电势穿过所述孔时实施。如下文的更加详细论述,施加的电势可以导致在所述孔和多核苷酸结合蛋白之间形成复合物。施加的电势可以是电压电势。或者,施加的电势可以是化学电势。这样的一个例子是通过使用盐梯度穿过两亲分子层。Holden等,J Am Chem Soc.2007Jul 11;129(27):8650-5中公开了盐梯度。

[0239] 本发明的方法是用于表征目标分析物。本方法是用于表征至少一个分析物。本方法可以涉及表征两个或多个分析物。本方法可以包括表征任何数量的分析物,如2、5、10、15、20、30、40、50、100或更多的分析物。

[0240] 目标分析物优选的是金属离子、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、染料、漂白剂、药物、诊断试剂、营养药、易爆或环境污染物。本方法可以涉及表征相同类型的两种或多种分析物,例如两种或多种蛋白质,两种或多种核苷酸或两种或多种药物。或者,本方法可以涉及表征不同类型的两种或多种分析物,例如一种或多种蛋白质,一种或多种核苷酸和一种或多种药物。

[0241] 所述目标分析物可以是细胞分泌。或者,目标分析物可以是存在于细胞中的分析物,从而分析物必须在实施本发明之前从细胞中提取出来。

[0242] 所述分析物优选的是氨基酸、肽、多肽和/或蛋白质。所述氨基酸、肽、多肽或蛋白质可以是天然存在的或非天然存在的。所述多肽或蛋白质可以包含在它们中合成或修饰的氨基酸。大量对氨基酸的不同类型的修饰是本领域中已知的。适合的氨基酸和其修饰如上文所述。对于本发明的目的,可以理解的是,所述目标分析物可以通过现有技术中的任何可用的方法修饰。

[0243] 所述蛋白质可以是酶、抗体、激素、生长因子或生长调节蛋白质,如细胞因子。所述细胞因子可以选自白细胞介素,优选IFN-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12和IL-13,干扰素,优选IL- γ ,和其他细胞因子如TNF- α 。所述蛋白质可以是细菌蛋白质、真菌蛋白质、病毒蛋白质或源自寄生虫的蛋白质。

[0244] 所述目标分析物优选的是核苷酸、寡核苷酸或多核苷酸。所述核苷酸通常包含核碱基、糖和至少一个磷酸基团。所述核碱基通常是杂环的。核碱基包括,但不限于,嘌呤和嘧啶,更具体地腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶和胞嘧啶。糖通常是戊糖。核苷酸糖包括,但不限于,核糖和脱氧核糖。所述核苷酸通常是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。所述核苷酸通

常包含单磷酸、二磷酸或三磷酸。磷酸可以连接在核苷酸的5'或3'侧。

[0245] 核苷酸包括,但不限于,单磷酸腺苷(AMP)、二磷酸腺苷(ADP)、三磷酸腺苷(ATP)、单磷酸鸟苷(GMP)、二磷酸鸟苷(GDP)、三磷酸鸟苷(GTP)、单磷酸胸苷(TMP)、二磷酸胸苷(TDP)、三磷酸胸苷(TTP)、单磷酸尿苷(UMP)、二磷酸尿苷(UDP)、三磷酸尿苷(UTP)、单磷酸胞苷(CMP)、二磷酸胞苷(CDP)、三磷酸胞苷(CTP),5-甲基单磷酸胞苷、5-甲基二磷酸胞苷、5-甲基三磷酸胞苷、5-羟甲基单磷酸胞苷、5-羟甲基二磷酸胞苷、5-羟甲基三磷酸胞苷、环单磷酸腺苷(cAMP)、环单磷酸鸟苷(cGMP)、脱氧单磷酸腺苷(dAMP)、脱氧二磷酸腺苷(dADP)、脱氧三磷酸腺苷(dATP)、脱氧单磷酸鸟苷(dGMP)、脱氧二磷酸鸟苷(dGDP)、脱氧三磷酸鸟苷(dGTP)、脱氧单磷酸胸苷(dTMP)、脱氧二磷酸胸苷(dTDP)、脱氧三磷酸胸苷(dTTP)、脱氧单磷酸尿苷(dUMP)、脱氧二磷酸尿苷(dUDP)、脱氧三磷酸尿苷(dUTP)、脱氧单磷酸胞苷(dCMP)、脱氧二磷酸胞苷(dCDP)和脱氧三磷酸胞苷(dCTP),5-甲基-2'-脱氧单磷酸胞苷、5-甲基-2'-脱氧二磷酸胞苷、5-甲基-2'-脱氧三磷酸胞苷、5-羟甲基-2'-脱氧单磷酸胞苷、5-羟甲基-2'-脱氧二磷酸胞苷和5-羟甲基-2'-脱氧三磷酸胞苷。所述核苷酸优选选自AMP,TMP,GMP,UMP,dAMP,dTMP,dGMP或dCMP。所述核苷酸可以是碱基(即缺乏核碱基)。所述核苷酸可以包含额外的修饰。特别的,适合的修饰的核苷酸包括,但不限于,2'-氨基嘧啶(如2'-氨基胞苷和2'-氨基尿苷)、2'-羟基嘌呤(如2'-氟代嘧啶(如2'-氟代胞苷和2'-氟代尿苷)、羟基嘧啶(如5'- α -P-硼烷尿苷)、2'-O-甲基核苷酸(如2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基胞苷和2'-O-甲基尿苷)、4'-硫代嘧啶(如4'-硫代尿苷和4'-硫代胞苷)和具有核碱基的修饰的核苷酸(如5-戊炔基-2'-脱氧尿苷、5-(3-氨丙烷基)-尿苷和1,6-二氨基己基-N-5-氨基甲酰基甲基尿苷)。

[0246] 所述寡核苷酸是短的核苷酸聚合物,通常具有50或更少的核苷酸,如40或更少、30或更少、20或更少、10或更少或5或更少的核苷酸。所述寡核苷酸可以包含任何的上述所述的核苷酸,包含碱基的和修饰的核苷酸。

[0247] 本发明的方法优选用于表征目标多核苷酸。所述多核苷酸,如核酸,是一种包含两个或多个核苷酸的大分子。所述多核苷酸或核酸可以包含任何核苷酸的任何结合。所述核苷酸可以是天然存在的或人造的。所述目标多核苷酸中的一个或多个核苷酸可以被氧化或被甲基化。所述目标多核苷酸中的一个或多个核苷酸可以被破坏。例如,多核苷酸可以包括嘧啶二聚体。该二聚体通常与被紫外线损害相关,是皮肤黑色素瘤的主要诱因。所述目标多核苷酸中的一个或多个核苷酸可以被修饰,例如用标记或标签。适合的标记如上所述。所述目标多核苷酸可以包括一个或多个间隔物。

[0248] 所述核苷酸是如上定义的。存在于多核苷酸中的核苷酸通常包括,但不限于,单磷酸腺苷(AMP)、单磷酸鸟苷单磷酸鸟苷(GMP)、单磷酸胸苷(TMP)、单磷酸尿苷(UMP)、单磷酸胞苷(CMP)、环状单磷酸腺苷(cAMP)、环状单磷酸鸟苷单磷酸鸟苷(cGMP)、脱氧单磷酸腺苷(dAMP)、脱氧单磷酸鸟苷单磷酸鸟苷(dGMP)、脱氧单磷酸胸苷(dTMP)、脱氧单磷酸尿苷(dUMP)和脱氧单磷酸胞苷(dCMP)。所述核苷酸优选选自AMP,TMP,GMP,CMP,UMP,dAMP,dTMP,dGMP,dCMP和dUMP。

[0249] 核苷酸可以是脱碱基的(即缺乏核碱基)。核苷酸也可以是脱核碱基和糖的(即是C3间隔物)。

[0250] 多核苷酸中的核苷酸可以以任何方式彼此连接。所述核苷酸通常通过在核酸中的

它们的糖和磷酸基团被连接。所述核苷酸可以通过在嘧啶二聚体中的它们的碱基连接。

[0251] 所述多核苷酸可以是单链或双链的。所述多核苷酸的至少一部分优选为双链的。单链多核苷酸可以具有一个或多个与其杂交的引物,因此包含双链多核苷酸的一个或多个短区域。所述引物可以是与作为目标多核苷酸的相同类型的多核苷酸或可以是不同类型的多核苷酸。

[0252] 所述多核苷酸可以是核酸,如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)。所述目标多核苷酸可以包含与DNA的一条链杂交的RNA的一条链。所述多核苷酸可以是本领域已知的任何合成的核酸,如肽核酸(PNA)、甘油核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、锁定核酸(LNA),或其他具有核苷酸侧链的合成聚合物。

[0253] 所述目标多核苷酸的整体或仅部分可以使用这种方法表征。所述目标多核苷酸可以是任何长度。例如,所述多核苷酸可以为至少10、至少50、至少100、至少有150、至少200、至少250、至少300、至少400或至少500个核苷酸对的长度。所述多核苷酸可以为1000或更多的核苷酸对、5000或更多的核苷酸对的长度或100000或更多的核苷酸对的长度。

[0254] 目标分析物,如目标多核苷酸,存在于任何适合的样本中。本发明通常针对已知含有或怀疑含有目标分析物的样本实施,如目标多核苷酸。或者,本发明可以在样本上实施,以证明对一个或多个目标分析物的识别,如一个或多个目标多核苷酸,它在样本中的存在是已知的或预期的。

[0255] 所述样本可以是生物样本。本发明可以体外(in vitro)实施由任何生物体或微生物体获得或提取的样本。所述生物或微生物通常是古核的(archaeal)、原核的或真核的,并通常属于以下五界中的一个:植物界、动物界、真菌界、无核原生物界和原生生物界。本发明可以体外实施由任何病毒获得或提取的样本。所述样本优选为液体样本。所述样本通常包含患者的体液。所述样本可以是尿液、淋巴液、唾液、粘液或羊水,但优选为血液、血浆或血清。通常,所述样本是来自人的,但替换的,其可以是来自其他哺乳动物的,例如来自市售饲养的动物例如马,牛,羊或猪,或者为宠物,如猫或狗。或者,源自植物的样本通常从经济作物获取,例如谷类,豆类,水果或蔬菜,例如小麦,大麦,燕麦,油菜籽,玉米,大豆,稻米,香蕉,苹果,西红柿,土豆,葡萄,烟草,豆类,扁豆,甘蔗,可可豆,棉花。

[0256] 所述样本可以是非生物样本。所述非生物样本优选为液体样本。所述非生物样本的例子包括外科手术液体,水如饮用水、海水或河水,以及用于实验室测试的试剂。

[0257] 所述样本在分析前通常被处理,例如通过离心或通过膜过滤掉不需要的分子或细胞,如红细胞。所述样本可以在获取后立即进行检测。所述样本在分析前通常也可以被储存,优选在低于-70°C储存。

[0258] 所述孔存在于本发明的系统的膜中。任何上文论述的涉及本发明的系统的膜的实施例都适用本发明的表征方法。所述分析物,如目标多核苷酸,可以直接偶联到所述膜。所述分析物,如目标多核苷酸,优选为经连接体(linker)偶联到所述膜。优选的连接体包括,但不限于,聚合物,如多核苷酸、聚乙二醇(PEGs)和多肽。如果多核苷酸直接偶联到所述膜,由于所述膜和所述孔的内部之间的距离,表征运行不能持续到所述多核苷酸的末端,将丢失一些数据。如果使用连接体,那么多核苷酸可以被处理至完成。如果使用连接体,连接体可以连接到所述多核苷酸的任何位置。所述连接体优选连接到所述多核苷酸的尾部聚合物。

[0259] 所述偶联可以是稳定的或暂时的。对于某些应用，暂时性的偶联是优选的。如果稳定的偶联分子直接连接到多核苷酸的任一5'或3'端，由于双层和所述孔的内部之间的距离，表征运行不能持续到所述多核苷酸的末端，将丢失一些数据。如果所述偶联是暂时的，那么当偶联的末端任意地变成双层没有双层时，那么多核苷酸可以被处理至完全。与所述膜形成稳定或暂时的连接的化学基团将在下面更详细的描述。所述分析物，如目标多核苷酸，可以是暂时地偶联至两亲层，如使用胆固醇或脂酰链的脂质双层。可以使用任何具有6到30个碳原子的长度的脂肪酰链，如十六烷酸。

[0260] 分析物的偶联，如目标多核苷酸，到合成脂质双层，可以预先用各种不同的共享策略(tethering strategies)实施。这些都概括于表1中。

[0261] 表1

连接基团	偶联的类型	参考文献
硫醇	稳定的	Yoshina-Ishii, C. and S. G. Boxer (2003). "Arrays of mobile tethered vesicles on supported lipid bilayers." <i>J Am Chem Soc</i> 125(13): 3696-7.
生物素	稳定的	Nikolov, V., R. Lipowsky, 等 (2007). "Behavior of giant vesicles with anchored DNA molecules." <i>Biophys J</i> 92(12): 4356-68
胆固醇	暂时的	Pfeiffer, I. and F. Hook (2004). "Bivalent cholesterol-based coupling of oligonucleotides to lipid membrane assemblies." <i>J Am Chem Soc</i> 126(33): 10224-5
脂质	稳定的	van Lengerich, B., R. J. Rawle 等. "Covalent attachment of lipid vesicles to a fluid-supported bilayer allows observation of DNA-mediated vesicle interactions." <i>Langmuir</i> 26(11): 8666-72

[0264] 多核苷酸可以在合成反应中使用经修饰的亚磷酰胺官能化，使其很容易的与添加的反应性基团兼容，所述反应性基团如硫醇、胆固醇、脂质和生物素基团。这些不同的连接化学成分为多核苷酸提供了一系列连接选择。每个不同的修饰基团以略微不同的方式连接到所述多核苷酸，并且所述偶联并非永久的，给予多核苷酸到所述双层有不同的停留时间。暂时性偶联的优点如上所述。

[0265] 多核苷酸的偶联还能通过很多其他手段实现，使得反应性基团被添加到所述多核苷酸。先前已经有在DNA任一端添加反应性基团的报道。可以使用多核苷酸激酶和ATP γ S将硫醇基团添加到ssDNA的5'端 (Grant, G.P. 和 P.Z. Qin (2007). "A facile method for attaching nitroxide spin labels at the 5' terminus of nucleic acids." *Nucleic Acids Res* 35 (10): e77)。化学基团的更多不同选择，例如生物素，硫醇或荧光素，可以使用末端转移酶结合修饰的寡核苷酸被添加到ssDNA的3'端 (Kumar, A., P. Tchen, 等 (1988). "Nonradioactive labeling of synthetic oligonucleotide probes with terminal deoxynucleotidyl transferase." *Anal Biochem* 169 (2): 376-82)。

[0266] 或者,反应性基团可以被认为将DNA短片段的互补的添加至一个已经偶联到所述双层,使得连接可以经杂交实现。使用T4RNA接合酶I进行ssDNA的短片段的接和反应已经被报导(Troutt, A. B., M. G. McHeyzer-Williams等.(1992). "Ligation-anchored PCR: a simple amplification technique with single-sided specificity." Proc Natl Acad Sci U S A 89 (20):9823-5)。或者ssDNA或dsDNA可以被连接到天然dsDNA上,然后通过热变性或化学变性将这两条链分离。对于天然的dsDNA,可以将ssDNA的或将dsDNA的一段添加到所述双链的一个或两个末端,。然后当双链被解链(melted)时,如果ssDNA用于接合,每条链将具有在5'端或3'端的修饰,或者,如果dsDNA用于接合,每条链将具有5'端的修饰,3'端或修饰、或5'端和3'端的修饰。如果所述多核苷酸是合成链,在多核苷酸的化学合成过程中所述偶联化学成分可以被结合。例如,所述多核苷酸能使用具有反应性基团连接其上的引物合成。

[0267] 一种常规的用于扩增基因组DNA片段的技术是使用聚合酶链反应(PCR)。此处,使用两个合成的寡核苷酸引物,可以生成大量DNA的相同片段的复制,对于每个复制,双链的每条链的5'将是合成的多核苷酸。通过使用具有反应性基团的反义引物如胆固醇、硫醇、生物素或脂质,扩增的目标DNA的每个复制将含有用于偶联的反应性基团。

[0268] 跨膜孔是一种某种程度上穿过膜的结构。它使得水合离子通过施加的电势驱动下流动穿过膜或在膜的内部。所述跨膜孔通常穿过整个膜,因此水合离子可以从膜的一侧流到膜的另一侧。然而,所述跨膜孔不是必须跨过膜。它可以在一端封闭。例如,在膜中的孔可以是膜中的井(well),水合离子可以沿着或流入所述井。

[0269] 本发明中可以使用任何跨膜孔。所述孔可以是生物的或人造的。适合的所述孔包括,但不限于,蛋白质孔和多核苷酸孔。

[0270] 跨膜孔优选为跨膜蛋白孔。所述跨膜蛋白孔是多肽或一批多肽,其允许水合离子,如分析物,流过膜或在膜内。在本发明中,所述跨膜蛋白孔优选为能够形成一种允许水合离子被施加的电势的驱动从膜的一侧流到膜的另一侧的孔。所述跨膜蛋白孔允许分析物,如核苷酸,从膜的一侧流到另一侧。所述跨膜蛋白孔允许多核苷酸,如DNA或RNA,移动穿过所述孔。

[0271] 所述跨膜蛋白孔可以是单体或寡聚体。所述孔优选由多个重复的亚基如6、7、8或9个亚基组成。所述孔优选为六聚体、七聚体、八聚体或九聚体的孔。

[0272] 所述跨膜蛋白孔通常包括桶或通道,所述离子可以流动穿过该桶或通道。所述孔的亚基通常围绕中心轴,并向跨膜 β 桶或通道或跨膜 α -螺旋束或通道提供链。

[0273] 所述跨膜蛋白孔的桶或通道通常含有能促进与分析物相互作用的氨基酸,所述分析物如核苷酸、多核苷酸或核酸。这些氨基酸优选位于所述桶或通道的缢痕(constriction)的附近。所述跨膜蛋白孔通常包含一个或多个带正电荷的氨基酸,如精氨酸、赖氨酸、组氨酸或芳香族氨基酸,如酪氨酸和色氨酸。这些氨基酸通常促进所述孔与核苷酸、多核苷酸或核酸之间的相互作用。

[0274] 本发明中使用的跨膜蛋白孔可源自 β -桶状孔或 α -螺旋束孔。 β -桶状孔包含由 β -链形成的桶或通道。适合的 β -桶状孔包含,但不限于, β -毒素,如 α -溶血素、炭疽毒素、杀白细胞素,以及细菌的外膜蛋白/孔蛋白,如耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)孔蛋白(Msp),例如MspA、MspB、MspC或MspD,外膜孔蛋白F(OmpF),外膜孔蛋白G(OmpG),外膜磷脂酶A和奈瑟氏菌(*Neisseria*)自转运脂蛋白(NalP)。 α -螺旋束孔包括由 α -螺旋形成的桶或通道。适合的 α -螺旋束孔包括,但不限于,内膜蛋白和 α 外膜蛋白,如WZA和ClyA毒素。跨膜孔可

以源自Msp或源自 α -溶血素(α -HL)。

[0275] 所述跨膜蛋白孔优选源自Msp,优选源自MspA。这样的孔将是寡聚的,并通常包含7、8、9或10个源自Msp的单体。所述孔可以是源自含相同单体的Msp的同源寡聚孔(homooligomeric pore)。或者,所述孔可以是源自包含至少一个不同于其他单体的Msp的异源寡聚孔。优选所述孔源自MspA或其同源物或其并系同源物(paralog)。

[0276] 所述单体源自通常含有如SEQ ID NO:2所示的序列的Msp或其变体(variant)。SEQ ID NO:2是MspA单体的MS-(B1)8突变体(mutant)。它包含下列突变:D90N,D91N,D93N,D118R,D134R和E139K。SEQ ID NO:2的变体是具有氨基酸序列的多肽且保留有其能力以形成孔,该氨基酸序列不同于SEQ ID NO:2的氨基酸序列。变体形成孔的能力可以通过本领域任何已知方法来分析。例如,所述变体可以和其他适合的亚基一起被插入到两亲层,其寡聚以形成孔的能力可以被检测。将亚基插入膜如两亲层的方法是本领域已知的。例如,亚基可以纯化的形式悬浮在含有脂质双层的溶液中,从而它扩散到脂质双层,并通过结合到脂质双层上被插入并装配成功能状态。或者,亚基可以直接使用拾取和放置(pick and place)”方法插入到所述膜中,该方法描述在M.A.Holden和H.Bayley. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 6502-6503 and 国际申请No. PCT/GB2006/001057 (公布在WO 2006/100484)中。

[0277] 在SEQ ID NO:2的氨基酸序列的整个长度上,变体优选与基于氨基酸同一性的序列具有至少50%的同源性。更优选的,基于氨基酸的同一性,相比于SEQ ID NO:2在其整个长度上的氨基酸序列,所述变体可以具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、更优选至少95%、97%或99%的同源性。在一段100或更多,例如125、150、175或200或更多的连续的氨基酸上(“严格同源性hard homology”),可以具有至少80%,例如至少85%、90%或95%的氨基酸同一性。。

[0278] 可使用本领域的标准方法测定同源性。例如UWGCG软件包提供的BESTFIT程序可以用于计算同源性,例如使用其默认设置(Devereux等(1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395)。PILEUP和BLAST算法可以用于计算同源性或对齐序列(line up sequence)(例如识别等价残基或对应的序列(通常基于其默认设置)),例如如Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S.F等(1990) J Mol Biol 215:403-10中描述的。用于执行BLAST分析的软件是通过国家生物技术信息中心National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公开获得的。

[0279] SEQ ID NO:2是MspA单体的MS-(B1)8突变体。与MspA相比,所述变体可以含有MspB,C或D单体中的任何突变。MspB,C和D的成熟形式如SEQ ID NOs:5到7所示。特别的,所述变体可以包括存在于MspB:A138P上的下列替换。所述变体可以包括一个或多个存在于MspC:A96G,N102E和A138P上的下列替换。所述变体可以包含一个或多个存在于MspD上的下列突变:G1,L2V,E5Q,L8V,D13G,W21A,D22E,K47T,I49H,I68V,D91G,A96Q,N102D,S103T,V104I,S136K and G141A的缺失。所述变体可以包含一个或多个来自于Msp B,C和D的突变和替换的组合。所述变体优选含有突变L88N。具有突变L88N以及MS-B1的所有突变的SEQ ID NO:2的变体被称为MS-B2。本发明中使用的孔优选为MS-(B2)8。具有突变G75S/G77S/L88N/Q126R以及MS-B1的所有突变的SEQ ID NO:2的变体被称为MS-B2C。本发明中使用的孔优选为MS-(B2)8或MS(B2C)8。

[0280] 除了以上所论述的,氨基酸的置换可以发生在SEQ ID NO:2的氨基酸序列上,例如

高达1、2、3、4、5、10、20或30个置换。保守置换使用其他相似化学结构、相似化学性质或相似侧链体积的氨基酸置换氨基酸。被引入的氨基酸与被置换的氨基酸相比具有相似的极性、亲水性、非极性、碱度、酸度、中性或所带电荷。或者,所述保守置换可以引入芳香族的或脂肪族的其他氨基酸,以置换之前存在的芳香族的或脂肪族氨基酸。保守氨基酸改变是本领域已知的,并可以根据下面表2中定义的20个主要氨基酸的性质选择。其中氨基酸具有相似的极性,这也可以通过参考表2中的氨基酸侧链亲疏水性的大小来确定。

[0281] 表2-氨基酸的化学性质

Ala	脂肪族的, 疏水的, 中性	Met	疏水的, 中性
Cys	极性的, 疏水的, 中性	Asn	极性的, 亲水的, 中性
Asp	极性的, 亲水的, 带电荷(-)	Pro	疏水的, 中性
Glu	极性的, 亲水的, 带电荷(-)	Gln	极性的, 亲水的, 中性
Phe	芳香族的, 疏水的, 中性	Arg	极性的, 亲水的, 带电荷(+)
Gly	脂肪族的, 中性	Ser	极性的, 亲水的, 中性
His	芳香族的, 极性的, 亲水的, 带电荷(+)	Thr	极性的, 亲水的, 中性
Ile	脂肪族的, 疏水的, 中性	Val	脂肪族的, 疏水的, 中性
Lys	极性的, 亲水的, 带电荷(+)	Trp	芳香族的, 疏水的, 中性
Leu	脂肪族的, 疏水的, 中性	Tyr	芳香族的, 极性的, 疏水的

[0282]

[0283] 表3-亲水性大小

[0284]

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

[0285]

[0286] SEQ ID NO:2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。多达1、2、3、4、5、10、20或30或者更多个残基可以被缺失。

[0287] 所述变体可以包含SEQ ID NO:2的片段。这些片段保留有孔形成活性。片段可以至少是50、100、150或200个氨基酸长度。这些片段可用于制备孔。片段优选包含SEQ ID NO:2的孔形成结构域。片段必须含有SEQ ID NO:2的残基88、90、91、105、118和134中的一个。通常,片段含有SEQ ID NO:2的残基88、90、91、105、118和134的全部。

[0288] 一个或多个氨基酸可以替换的或另外的添加到上述多肽。可以在SEQ ID NO:2氨基酸序列或其多肽变体或其片段的氨基末端或羧基末端提供延伸。所述延伸可以是非常短的,例如1到10个氨基酸长度。或者,所述延伸可以更长,例如达到50或100个氨基酸长度。根据本发明,载体蛋白可以融合到氨基酸序列上。其他融合蛋白质将在下面更详细地描述。

[0289] 如上所述,变体是具有氨基酸序列的多肽并保留有其形成孔的能力,该氨基酸序列不同于SEQ ID NO:2的氨基酸序列。变体通常含有负责孔形成的SEQ ID NO:2的区域。具有 β -桶的Msp的孔形成能力是由每个亚基中的 β -片层(β -sheet)提供的。SEQ ID NO:2的变体通常包括形成 β -片层的SEQ ID NO:2中的区域。可以对形成 β -片层的SEQ ID NO:2中的区域进行一个或多个修饰,只要最后得到的变体保留有其形成孔的能力。SEQ ID NO:2的变体优选在其 α -螺旋和/或环形区域包含一个或多个修饰,如置换、添加或缺失。

[0290] 源自Msp的单体可以被修饰以帮助对它们的鉴定或纯化,例如通过添加组氨酸残基(hist标签)、天冬氨酸残基(asp标签)、链霉亲和素标签或flag标签,或通过添加信号序列以促进它们从细胞中分泌,所述多肽不是天然地含有该序列。引入遗传标记的替换方案是通过化学反应将标签连接到所述孔的天然或人工位点。一个例子是将凝胶迁移试剂与人工连接在所述孔外的半胱氨酸面进行反应。这已被证明是一种分离溶血素同源寡聚体的方法(Chem Biol.1997Jul;4(7):497-505)。

[0291] 源自Msp的单体可以用显示标记物(revealing label)标记。所述显示标记物可以是允许所述孔被检测的任何适合的标记物。适合的标记物如下所述。

[0292] 源自Msp的单体也可以使用D-氨基酸来制备。例如,源自Msp的单体可以包含L-氨基酸和D-氨基酸的混合物。这是本领域常规的制备这类蛋白质或肽的方式。

[0293] 源自Msp的单体包含一个或多个特异性的修饰以帮助核苷酸的辨别。源自Msp的单体也可以包含其他非特异性的修饰,只要所述非特异性的修饰不妨碍孔形成。许多非特异性侧链修饰是本领域已知的并可用于源自Msp的单体的侧链。所述修饰包含,例如,通过与醛进行反应然后用NaBH₄进行还原的氨基酸的还原性烷基化,用甲基乙酰亚胺酯(methylacetimidate)进行脒基化,或用乙酸酐进行酰化。

[0294] 源自Msp的单体可以使用本领域已知的标准方法来制备。所述源自Msp的单体可以合成或通过重组方法制备。例如,所述孔可以通过体外(in vitro)翻译或转录(IVTT)合成。用于制备孔的适合的方法在国际申请No.PCT/GB09/001690(如WO 2010/004273所公开的),PCT/GB09/001679(如WO 2010/004265所公开的)或PCT/GB10/000133(如WO 2010/086603所公开的)中有论述。上述对将孔插入膜的方法进行了论述。

[0295] 所述跨膜蛋白孔也优选源自 α -溶血素(α -HL)。野生型的 α -HL孔由7个相同单体或亚基形成(即其是七聚体的)。 α -溶血素-NN的一个单体或亚基的序列如SEQ ID NO:4所示。所述跨膜蛋白孔优选包含7个单体,每个单体含有SEQ ID NO:4或其变体的序列。SEQ ID

NO:4的氨基酸1,7至21,31至34,45至51,63至66,72,,92至97,104至111,124至136,149至153,160至164,173至206,210至213,217,218,223至228,236至242,262至265,272至274,287至290以及294形成环形区域。SEQ ID NO:4的残基113和147形成了 α -HL的桶或通道的缢痕部分。

[0296] 在该实施例中,孔包括7个蛋白质或单体,每个包括如SEQ ID NO:4所示的或其变体的序列,优先使用在所述方法中。所述7个蛋白质可以是相同的(同源七聚体)或不同的(异源七聚体)。

[0297] SEQ ID NO:4的变体是一个蛋白质并保留了孔形成能力,其具有不同于SEQ ID NO:4的氨基酸序列。变体形成孔的能力可以使用本领域已知的任何方法检测。例如,所述变体可以与其他适合的亚基一起插入到两亲层中如脂质双层中,其寡聚以形成孔的能力也可以被检测。将亚基插入到两亲层如脂质双层的方法是本领域已知的双层。适合的方法如上所述。

[0298] 所述变体可以包括促进共价连接或与结构相互作用的修饰。所述变体优选包括促进连接到所述结构的一个或多个反应性的半胱氨酸残基。例如,所述变体可以包含位于SEQ ID NO:4的和/或氨基或羧基末端的半胱氨酸,该半胱氨酸位于一个或多个位点8,9,17,18,19,44,45,50,51,237,239和287。优选的变体包括用半胱氨酸(A8C,T9C,N17C,K237C,S239C或E287C)在SEQ ID NO:4的8,9,17,237,239和287位的残基的置换。所述变体优选为国际申请No.PCT/GB09/001690(如WO 2010/004273所公开的),PCT/GB09/001679(如WO2010/004265所公开的)或PCT/GB10/000133(如WO 2010/086603所公开的)中描述的变体中的一个。

[0299] 所述变体还可以包含促进与核苷酸的任何相互作用的修饰。

[0300] 所述变体可以是天然存在的用生物体天然表达的变体,例如用葡萄球菌属(*Staphylococcus*)细菌。或者,所述变体可以在体外表达或通过如大肠杆菌(*Escherichia coli*)重组表达。变体还包括非天然存在的由重组技术制成的变体。在SEQ ID NO:4的整个长度的氨基酸序列上,变体优选与基于氨基酸同一性的序列具有至少50%同源性。更优选的,基于与SEQ ID NO:4的整个序列的氨基酸序列的氨基酸同一性,所述变体多肽具有至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,并且更优选至少95%,97%或99%的同源性。在200或更长的段,例如230,250,270或280或更长长度的连续氨基酸上(“严格同源性”),可以具有至少80%,例如至少85%,90%或95%的氨基酸同一性。同源性如上所述进行测定。

[0301] 除了如上所述的,可以对SEQ ID NO:4的氨基酸序列进行氨基酸置换,例如进行多达1、2、3、4、5、10、20或30个的置换。可以进行如上所述的保守置换。

[0302] SEQ ID NO:4的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基可以被另外地或从上述多肽中缺失。多达1、2、3、4、5、10、20或30或更多个的残基可以被缺失。

[0303] 变体可以是SEQ ID NO:4的片段。该片段保留了形成孔的活性。所述片段可以至少是50、100、200或250个氨基酸长度。该片段优选包括SEQ ID NO:4的孔形成结构域。片段通常包含SEQ ID NO:4的119、121、135、113和139残基。

[0304] 一个或多个氨基酸可以替换地或额外地添加到上述多肽。可以在SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其变体或片段的氨基末端或羧基末端提供一个延伸。所述延伸可以是非常短

的例如1-10个氨基酸长度。或者,所述延伸可以是更长的,例如多达50或100个氨基酸。载体蛋白可以融合到孔或其变体上。

[0305] 如上所述,SEQ ID NO:4的变体是亚基并保留形成孔的能力,该变体具有与SEQ ID NO:4的氨基酸序列不同的氨基酸序列。变体通常含有SEQ ID NO:4的用于形成孔的区域。含有 β -桶的 α -HL的孔形成能力由每个亚基中的 β -链提供。SEQ ID NO:4的变体通常包含SEQ ID NO:4中形成 β -链的区域。形成 β -链的SEQ ID NO:4的氨基酸如上所述。在SEQ ID NO:4的形成 β -链的区域可以进行一个或多个修饰只要得到的变体保留其形成孔的能力。可以对SEQ ID NO:4的 β -链的区域的特异性修饰如上所述。

[0306] SEQ ID NO:4的变体优选在其 α -螺旋和/或环形区域中包括一个或多个修饰,例如置换,添加或缺失。形成 α -螺旋和/或环形区的氨基酸如上所述。

[0307] 所述变体可以进行修饰以帮助对其进行如上所述的鉴定或纯化。

[0308] 源自 α -HL的孔参考源自Msp的孔如上所述可以制备。

[0309] 在一些实施例中,跨膜蛋白孔是经化学修饰的。所述孔可以在任何位点以任何方式进行化学修饰。所述跨膜蛋白孔优选通过将分子连接到一个或多个半胱氨酸(半胱氨酸连接)、将分子连接到一个或多个赖氨酸上,将分子连接到一个或多个非天然氨基酸上、表位的酶修饰或末端修饰,而进行化学修饰。适用于进行这些修饰的方法是本领域已知的。所述跨膜蛋白孔可以通过连接任何分子进行化学修饰。例如,所述孔可以通过连接染料和荧光体进行化学修饰。

[0310] 孔中任何数量的单体都可以被化学修饰。优选一个或多个,诸如2,3,4,5,6,7,8,9或10个所述单体进行如上所述的化学修饰。

[0311] 半胱氨酸残基的反应性可以通过相邻残基的修饰而提高。例如,侧翼精氨酸、组氨酸或赖氨酸残基的碱性基团将改变半胱氨酸硫醇基团的pKa为更大反应性的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。这些保护基团可以在连接体连接之前与孔的一个或多个半胱氨酸残基反应。

[0312] 所述分子(具有经化学修饰的孔)可以直接连接到所述孔或通过国际申请号PCT/GB09/001690(如WO 2010/004273所公开的),PCT/GB09/001679(如WO 2010/004265所公开的)或PCT/GB10/000133(如WO 2010/086603所公开的)中公开的连接体被连接。

[0313] 本文描述的任何蛋白质,如跨膜蛋白孔,可以被修饰以帮助对它们的鉴定或纯化,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,所述多肽不天然含有该序列。引入遗传标记的替换方案是通过化学反应将标签连接到所述孔或结构的天然或人工位点。其一个例子是将凝胶迁移试剂与人工连接在所述孔外的半胱氨酸面进行反应。这已被证明是一种分离溶血素同源寡聚体的方法(Chem Biol.1997Jul;4(7):497-505)。

[0314] 所述孔可以用显示标记物标记。所述显示标记物可以是允许所述孔被检测的任何适宜标记物。适宜标记物包括但不限于,荧光分子、放射性同位素、例如¹²⁵I、³⁵S、酶、抗体、抗原、多核苷酸和配体如生物素。

[0315] 本文中描述的任何蛋白质,如跨膜蛋白孔,可以合成或通过重组方法制备。例如,所述孔可以通过体外翻译和转录(IVTT)合成。所述孔的氨基酸序列可以被修饰为包括非天

然存在的氨基酸或经修饰为提高蛋白质的稳定性。当通过合成手段制备蛋白质时,可以在制备过程引入所述氨基酸。所述孔也可以随着合成或重组制备而改变。

[0316] 所述孔也可以使用D-氨基酸制备。例如,所述孔或结构可以包含L-氨基酸和D-氨基酸的混合物。这是本领域常规的制备这类蛋白质或肽的方式。

[0317] 所述孔也可以含有其他非特异性的修饰,只要所述修饰不妨碍孔形成或结构功能。许多非特异性侧链修饰是本领域已知的,并可以对蛋白质的侧链进行修饰。这些修饰包括,例如,通过与醛进行反应然后用NaBH₄进行还原的氨基酸的还原性烷基化,用甲基乙酰亚胺酯进行脘基化,或用乙酸酐进行酰化。

[0318] 本文中描述的任何蛋白质,如跨膜蛋白孔,可以使用本领域已知的标准方法制备。编码孔或结构的多核苷酸序列可以使用本领域标准方法获得和复制。编码孔或结构的多核苷酸序列可以在细菌宿主细胞中使用本领域的标准技术进行表达。所述孔可以在细胞中通过重组表达载体的多肽的原位表达进行制备。所述表达载体可选的携带有诱导型启动子以控制所述多肽的表达。这些方法在Sambrook, J. 和Russell, D. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY中描述。

[0319] 所述孔大规模制备之后,从制备蛋白质的生物体通过任何蛋白质液相色谱系统进行纯化,或在重组表达后通过任何蛋白质液相色谱系统进行纯化。通常的蛋白质液相色谱系统包含FPLC、AKTA系统、Bio-Cad系统、Bio-RadBioLogic系统和Gilson HPLC系统。

[0320] 用于表征目标多核苷酸的优选方法,包括步骤(a)将所述目标多核苷酸与所述孔和多核苷酸结合蛋白质接触,并且所述蛋白质控制所述目标多核苷酸穿过所述孔的运动。所述目标多核苷酸可以与所述孔和所述多核苷酸结合蛋白质以任何顺序接触。优选的,当所述目标多核苷酸与所述蛋白质和所述孔接触时,所述目标多核苷酸首先与所述蛋白质形成复合体。当对所述孔施加电压时,所述目标多核苷酸/蛋白质复合体与所述孔形成复合体,并控制所述多核苷酸穿过所述孔的运动。

[0321] 所述多核苷酸结合蛋白质可以是能够结合至多核苷酸,并控制所述多核苷酸穿过所述孔的运动的任何蛋白质。在本领域中很直接的确定是否蛋白质结合到多核苷酸上。所述蛋白质通常与多核苷酸相互作用,并且修饰所述多核苷酸的至少一个性质。所述蛋白质可以通过将所述多核苷酸分裂成单个核苷酸或短链的核苷酸,如二聚或三聚核苷酸以修饰所述多核苷酸。部分(moiety)可以通过定向或移动所述多核苷酸到特定的位置,即控制所述多核苷酸的运动修饰所述多核苷酸。

[0322] 所述多核苷酸结合蛋白质优选为多核苷酸处理酶。多核苷酸处理酶是一种能够与多核苷酸相互作用并修饰所述多核苷酸的至少一个性质的多肽。所述酶可以通过将所述多核苷酸分裂成单个核苷酸或短链的核苷酸,如二聚或三聚核苷酸修饰所述多核苷酸。所述酶可以通过定向或移动所述多核苷酸到特定的位置修饰所述多核苷酸。多核苷酸处理酶不需要展示酶的活性,只要它能够结合目标序列并控制其穿过所述孔的运动。例如,所述酶可以被修饰为消除它的酶活性或者所述酶在可以在阻止它作为酶的条件下使用。这样的情况在下面更详细的描述。

[0323] 所述多核苷酸处理酶优选源自溶核酶。在所述酶的结构中使用的多核苷酸处理酶更优选源自酶分类(EC)组3.1.11, 3.1.13, 3.1.14, 3.1.15, 3.1.16, 3.1.21, 3.1.22,

3.1.25,3.1.26,3.1.27,3.1.30和3.1.31的任何一员。所述酶可以是在国际申请PCT/GB10/000133(如WO 2010/086603所公开的)中公开的任何酶。

[0324] 优选的所述酶是聚合酶、核酸外切酶、解旋酶和拓扑异构酶如促旋酶。适合的酶包括但不限于,源自大肠杆菌*E. coli*(SEQ ID NO:11)的核酸外切酶I,源自大肠杆菌*E. coli*(SEQ ID NO:13)的核酸外切酶III,源自嗜热菌*T. thermophilus*(SEQ ID NO:15)的RecJ和噬菌体 λ 核酸外切酶(SEQ ID NO:17)及其变体。含有如SEQ ID NO:15所示的序列或其变体的三个亚基相互作用以形成一个三聚体的核酸外切酶。所述酶优选为Phi29DNA聚合酶(SEQ ID NO:9)或其变体。所述拓扑异构酶优选为酶分类(EC)基团5.99.1.2和5.99.1.3的任何一员。

[0325] 所述酶最优选为源自解旋酶,如Hel308Mbu(SEQ ID NO:18),Hel308Csy(SEQ ID NO:19),Hel308Tga(SEQ ID NO:20);Hel308Mhu(SEQ ID NO:21),TraI Eco(SEQ ID NO:22),XPD Mbu(SEQ ID NO:23)或其变体。

[0326] SEQ ID NOs:9,11,13,15,17,18,19,20,21,22或23的变体是酶并且保留多核苷酸结合能力,所述酶具有不同于SEQ ID NO:9,11,13,15,17,18,19,20,21,22or 23的氨基酸序列的氨基酸序列。这可以使用任何本领域已知方法测定。例如,所述变体可以与多核苷酸接触,它的结合多核苷酸的能力和沿着多核苷酸移动的能力可以测定。所述变体可以包含促进多核苷酸的结合和/或促进它的在高盐浓度和/或室温的活性的修饰。

[0327] 在SEQ ID NO:9,11,13,15,17,18,19,20,21,22or 23的氨基酸序列的整个长度上,,变体优选与基于氨基酸的同一性的序列具有至少50%的同源性。更优选的,基于氨基酸与SEQ ID NO:9,11,13,15,17,18,19,20,21,22or 23的整个长度的氨基酸序列的同一性,所述变体多肽可以具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%,更优选至少95%、97%或99%的同源性。在200或更长,例如230,250,270,280,300,400,500,600,700,800,900或1000或更长的长度的连续氨基酸上(“严格同源性”),可以具有至少80%,例如至少85%,90%或95%氨基酸同一性。同源性按上文所述进行确定。所述变体可参考上文对SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4所论述的方式中的任一种与野生型序列进行区分。酶可以共价的连接到所述孔。可以使用任何方法将所述酶共价的连接到所述孔。主要有两种策略使用纳米孔用于多核苷酸测序,即链测序和核酸外切酶测序。本发明的方法可以涉及链测序或核酸外切酶测序。

[0328] 在链测序中,DNA顺着或逆着施加的电势移位穿过纳米孔。在双链DNA上的表现前进的或倒退的核酸外切酶,在施加的电势下可用于所述孔的顺式cis一侧,以供剩余的单链穿过,或在双链DNA上表现前进的或倒退的核酸外切酶在施加的相反电势下,可用于所述孔的反式trans一侧以供剩余的单链穿过。同样的,也可以类似的方式使用展开双链DNA的解旋酶。也可以使用聚合酶。也有可能为了应用测序需要链逆着施加的电压而移位,但所述DNA在相反或没有电势的条件下必须最先被酶“捕获”。在转换回的电势下,剩余结合的链在通过孔时从顺式变为反式,并通过电流被保持为延伸的构象。单链DNA核酸外切酶或依靠单链DNA的聚合酶可作为分子马达逆着施加的电势以一种可控的逐步方式,从反式到顺式,来拖拽目前移位的单链穿回所述孔。

[0329] 在一实施例中,表征目标多核苷酸的方法包括目标序列与所述孔和解旋酶接触。在本方法中可以使用任何解旋酶。相对于所述孔,所述解旋酶可以以两种模式工作。首先,

所述方法优选使用解旋酶实施,这样它随着施加的电势产生的场将所述目标序列移动穿过所述孔。在这种模式下DNA的5'端首先在所述孔中被捕获,并且所述酶移动DNA进入所述孔,使得所述目标序列在所述场下穿过所述孔直到它最终移位穿过到达双层的反式一侧。或者,所述方法是优选实施,这样解旋酶逆着施加电压产生的所述场移动所述目标序列穿过所述孔。在这种模式下,DNA的3'端首先在所述孔中被捕获,并且所述酶移动DNA穿过所述孔,所述目标序列逆着施加的所述场被从孔中拉出,直到最终被放回到所述双层的顺式一侧。

[0330] 在核酸外切酶测序中,核酸外切酶从目标多核苷酸的一个末端释放单个核苷酸,这些单个核苷酸按如下所述进行鉴定。在另一实施例中,表征目标多核苷酸的方法包括将目标序列与所述孔和所述核酸外切酶接触。在本方法中可以使用如上所述的任何核酸外切酶。所述酶可以按如上所述共价地连接到所述孔。

[0331] 核酸外切酶是通常锁到多核苷酸的一个末端,并从那个末端每次消化序列的一个核苷酸的酶。所述核酸外切酶可以以5'到3'方向或以3'到5'方向消化多核苷酸。所述核酸外切酶结合的多核苷酸的末端通常通过选择使用的酶和/或使用本领域已知方法确定。通常可以使用多核苷酸的任何末端的羟基基团或帽结构以阻止或促进核酸外切酶结合到所述多核苷酸的特定的末端。

[0332] 所述方法包括将多核苷酸与所述核酸外切酶接触,因此核苷酸从多核苷酸的末端以一定的速率被消化,所述速率允许进行表征和鉴定如上所述的核苷酸的比例。这样做的方法是本领域熟知的。例如,使用埃德曼降解(Edman degradation)从多肽的末端连续地消化单一的氨基酸,从而它们可以使用高效液相色谱法(HPLC)被鉴定。本发明中可以使用同源性方法。

[0333] 核酸外切酶作用的速率通常比野生型核酸外切酶的最适速率慢。本发明方法中核酸外切酶的活性的适合速率包括以每秒从0.5到1000个核苷酸、每秒从0.6到500个核苷酸、每秒从0.7到200个核苷酸、每秒从0.8到100个核苷酸、每秒从0.9到50个核苷酸或每秒从1到20或10个核苷酸的速率进行消化。所述速率优选为每秒1,10,100,500或1000个核苷酸。可以以各种方式实现所述核酸外切酶的活性的适合速率。例如,根据本发明,具有降低的最适速率活性的变体核酸外切酶可以被使用。

[0334] 本发明的方法包括测量目标分析物,如目标多核苷酸的一个或多个特征。所述方法可以包括测量所述目标分析物如目标多核苷酸的两个、三个、四个或五个或更多的特征。对于目标多核苷酸,一个或多个特征优选选自:(i)目标多核苷酸的长度;(ii)目标多核苷酸的同源性;(iii)目标多核苷酸的序列;(iv)目标多核苷酸的二级结构;(v)目标多核苷酸是否是经修饰的。可以根据本发明测定(i)到(v)的任何组合。

[0335] 对于(i),多核苷酸的长度可以利用目标多核苷酸和所述孔之间的作用的次数进行测定。

[0336] 对于(ii),多核苷酸的同源性可以通过多种方法来测定。多核苷酸的同源性可以连同目标多核苷酸的序列的测定而进行测定或不连同目标多核苷酸的序列的测定而进行测定。前者是直接的,对所述多核苷酸进行测序,并由此进行鉴定。后者可以多种方式完成。例如,可以测定多核苷酸中特殊模序的存在(不需要测定多核苷酸的其余序列)。或者,在所述方法中特定的电和/或光信号的测定可以鉴定特定来源的目标多核苷酸。

[0337] 对于(iii),多核苷酸的序列可以如前所述进行测定。适合的测序方法,尤其是那些使用电测量的方法,在Stoddart D等,Proc Natl Acad Sci,12;106(19):7702-7,Lieberman KR等,J Am Chem Soc.2010;132(50):17961-72和国际申请WO 2000/28312中有描述。

[0338] 对于(iv),二极结构可以多种方式测定。例如,如果所述方法包含电测量,所述二极结构可以使用穿过孔的停留时间变化或电流变化进行测定。这使得单链和双链多核苷酸区域能够得到识别。

[0339] 对于(v),可以测定任何修饰的存在或不存在。所述方法优选包括确定所述目标多核苷酸是否经甲基化,氧化,损伤进行了修饰,用一个或多个蛋白质或一个或多个标记,标签或间隔物。特定的修饰将导致与孔的特定的相互作用,其可使用下面所述的方法测定。例如,甲基化的胞嘧啶在与每个核苷酸的相互作用过程中可以基于电流穿过孔,与胞嘧啶相区别。

[0340] 本发明还提供了预测目标多核苷酸的序列的方法。本发明进一步提供了目标多核苷酸测序的方法。

[0341] 可以进行各种不同类型的测量。这包括但不限于:电测量和光学测量。可行的电测量包括:电流测量、阻抗测量、隧道测量(tunnelling measurement)(Ivanov AP等,Nano Lett.2011Jan 12;11(1):279-85),和FET测量(国际申请WO 2005/124888)。光学测量可与电测量结合使用(Soni GV等,Rev Sci Instrum.2010Jan;81(1):014301)。所述测量可以是跨膜电流测量,如测量流过孔的离子电流。

[0342] 电测量可以使用标准单通道记录设备进行,如Stoddart D等.,Proc Natl Acad Sci,12;106(19):7702-7,Lieberman KR等,J Am Chem Soc.2010;132(50):17961-72、国际申请号WO-2000/28312中描述的。或者,电测量可以使用多通道系统进行,例如如国际申请WO-2009/077734和国际申请WO-2011/067559中所描述的。

[0343] 在优选的实施例中,步骤(b)包含测定分析物相对于孔移动穿过所述孔的电流,其中所述电流指示了目标分析物的一个或多个特征并因此表征目标分析物。在更优选的实施例中,所述目标分析物是目标多核苷酸,所述方法包括(a)将目标多核苷酸与存在于本发明系统的膜中的跨膜孔和多核苷酸结合蛋白质接触,从而所述蛋白控制了目标多核苷酸穿过所述孔的运动;(b)测定当多核苷酸相对所述孔移动时穿过所述孔的电流,其中所述电流指示了目标多核苷酸的一个或多个特征并因此表征目标多核苷酸。

[0344] 本方法可以使用任何适于研究膜/孔系统的设备实施,其中所述孔插入到本发明系统的膜中。

[0345] 本方法可以包括测定在分析物如目标多核苷酸相对孔移动穿过所述孔的电流。因此所述设备还可以包括能施加电势并能测定穿过膜和所述孔的电信号的电路。所述方法可以使用膜片钳或电压钳实施。所述方法优选包括使用电压钳。

[0346] 本发明的所述方法可以包括测定在分析物如目标多核苷酸相对孔移动穿过所述孔的电流。用于测定离子电流穿过跨膜蛋白孔的适合的条件是本领域已知的并在实施例中公开。所述方法通常通过对膜和孔施加电压实施。使用的电压通常为+2V到-2V,通常为-400mV到+400mV。使用的电压优选范围的下限选自-400mV,-300mV,-200mV,-150mV,-100mV,-50mV,-20mV和0mV,并且上限独立地选自+10mV,+20mV,+50mV,+100mV,+150mV,+

200mV, +300mV和+400mV。使用的电压更优选在100mV到240mV的范围,并最优选在120mV到220mV的范围。可通过对孔施加提高的电势来提高不同核苷酸之间的分辨力。

[0347] 所述方法通常是在任何电荷载体如金属盐(如碱金属盐), 卤盐(如氯化物盐(如碱金属氯化物盐)的存在下实施。电荷载体可以包括离子液体或有机盐, 例如四甲基氯化铵, 三甲苯基氯化铵, 苯基三甲基氯化铵, 或1-乙基-3-甲基咪唑氯化物。在上面论述的示例性设备中, 所述盐存在于所述室的水溶液中。通常使用氯化钾(KCl), 氯化钠(NaCl)或氯化铯(CsCl)。优选KCl。所述盐浓度可以是饱和的。所述盐浓度可以是3M或更低并且通常为0.1M到2.5M、0.3M到1.9M、0.5M到1.8M、0.7M到1.7M、0.9到1.6M或1M到1.4M。所述盐浓度优选为150mM到1M。本方法优选使用至少0.3M, 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的盐浓度实施。高的盐浓度提供高的信号到噪音比例并且使得指示核苷酸存在的电流对抗正常电流波动的背景。

[0348] 所述方法通常在缓冲剂的存在下实施。在上文所述的示例性设备中, 所述缓冲剂存在于所述室的水溶液中。任何缓冲剂均可以在本发明方法中使用。通常, 所述缓冲剂是HEPES。另一种适合的缓冲剂为Tris-盐酸缓冲剂。所述方法通常在4.0到12.0, 4.5到10.0, 5.0到9.0, 5.5到8.8, 6.0到8.7, 7.0到8.8或者7.5到8.5的pH下实施。使用的pH值优选约为7.5。

[0349] 所述方法可以在0°C到100°C, 15°C到95°C, 16°C到90°C, 17°C到85°C, 18°C到80°C, 19°C到70°C或者20°C到60°C下实施。所述方法通常在室温下实施。所述方法可选地在能支持酶功能的温度下如约37°C实施。

[0350] 所述方法通常在存在游离的核苷酸或游离的核苷酸类似物以及促进多核苷酸结合蛋白质如解旋酶或核酸外切酶的功能的辅酶因子的存在下实施。游离的核苷酸可以是上述任意单独核苷酸中的一个或多个。所述游离的核苷酸包括但不限于, 单磷酸腺苷(AMP), 二磷酸腺苷(ADP), 三磷酸腺苷(ATP), 单磷酸鸟苷单磷酸鸟苷(GMP), 二磷酸鸟苷(GDP), 三磷酸鸟苷(GTP), 单磷酸胸苷(TMP), 二磷酸胸苷(TDP), 三磷酸胸苷(TTP), 单磷酸尿苷(UMP), 二磷酸尿苷(UDP), 三磷酸尿苷(UTP), 单磷酸胞苷(CMP), 二磷酸胞苷(CDP), 三磷酸胞苷(CTP), 环状单磷酸腺苷(cAMP), 环状单磷酸鸟苷单磷酸鸟苷(cGMP), 脱氧单磷酸腺苷(dAMP), 脱氧二磷酸腺苷(dADP), 脱氧三磷酸腺苷(dATP), 脱氧单磷酸鸟苷单磷酸鸟苷(dGMP), 脱氧二磷酸鸟苷(dGDP), 脱氧三磷酸鸟苷(dGTP), 脱氧单磷酸胸苷(dTMP), 脱氧二磷酸胸苷(dTDP), 脱氧三磷酸胸苷(dTTP), 脱氧单磷酸尿苷(dUMP), 脱氧二磷酸尿苷(dUDP), 脱氧三磷酸尿苷(dUTP), 脱氧单磷酸胞苷(dCMP), 脱氧二磷酸胞苷(dCDP)和脱氧三磷酸胞苷(dCTP)。所述游离的核苷酸优选选自AMP, TMP, GMP, CMP, UMP, dAMP, dTMP, dGMP或dCMP。所述游离的核苷酸优选为三磷酸腺苷(ATP)。所述辅酶因子为使解旋酶发挥功能的因子。所述辅酶因子优选为二价金属阳离子。所述二价金属阳离子优选为 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} 或 Co^{2+} 。所述辅酶因子最优选为 Mg^{2+} 。

[0351] 形成传感器的方法

[0352] 本发明也提供了形成用于表征目标多核苷酸的传感器的方法。该方法包括在(a)存在于本发明系统的膜中的孔和(b)多核苷酸结合蛋白质如解旋酶或核酸外切酶之间形成复合物。所述复合物可以通过将所述孔与存在于目标多核苷酸中的蛋白质接触, 然后对所述孔施压电势而形成。施加的电势可以是化学电势或如上所述的电压电势。或者, 复合物可

以通过将所述孔共价地连接到蛋白质而形成。用于共价连接的方法是本领域已知的,并公开在例如,国际申请号PCT/GB09/001679(如WO 2010/004265所公开的)和PCT/GB10/000133(如WO 2010/086603所公开的)中。所述复合物是一种用于表征目标多核苷酸的传感器。所述方法优选包括在所述孔和解旋酶之间形成所述复合物。上面论述的任何实施例同样适于这种方法。

[0353] 本发明还提供了用于表征目标多核苷酸的传感器。所述传感器包括在(a)存在于本发明系统的膜中的孔和(b)多核苷酸结合蛋白质之间的复合物。上面论述的任何实施例同样适用于本发明的传感器。

[0354] 试剂盒

[0355] 本发明还提供了用于表征如测序目标多核苷酸的试剂盒。所述试剂盒包括(a)存在于本发明系统的膜中的孔和(b)多核苷酸结合蛋白质,如解旋酶或核酸外切酶。上面论述的任何实施例同样适用于本发明的试剂盒。

[0356] 本发明的试剂盒可以额外的包括一种或多种其他试剂或能使上面描述的任何一种实施方案能实施的仪器。所述试剂或仪器包括以下的一种或多种:适合的缓冲剂(水溶液),从受体获得样本的工具(例如导管或含有针的仪器),用于扩增和/或表达多核苷酸序列的工具,或者电压钳或膜片钳设备。可以存在于所述试剂盒中的试剂可以是干态的,使得液体样本重新悬浮该试剂。所述试剂盒还可以,可选的,包括使该试剂盒能在本发明方法中使用的使用说明或关于该方法可以用于哪种病人的细节。所述试剂盒可以,可选的,包括核苷酸。

[0357] 设备

[0358] 本发明也提供了用于表征,如样本中的目标多核苷酸序列的设备。所述设备可以包括(a)存在于本发明的一个或多个系统的多个膜中的多个孔和(b)多个多核苷酸结合蛋白质,如解旋酶和核酸外切酶。所述设备可以是任何用于分析物分析的常规设备,如阵列(array)或芯片。

[0359] 所述设备优选包括:

[0360] 传感器设备,能承受多个所述孔和多个膜,并可操作的使用所述孔和蛋白质进行多核苷酸的表征或测序;

[0361] 至少一个存储器,存储用于表征或测序的材料;

[0362] 流体系统,配置为从所述至少一个存储器可控地向所述传感器设备提供材料;以及

[0363] 多个容器,用于接收各自的样本,所述流体系统配置为选择性地从所述容器向所述传感器设备提供样本。

[0364] 所述设备可以是那些在国际申请PCT/GB10/000789(如WO 2010/122293所公开的),国际申请号PCT/GB10/002206(尚未公开)或国际申请PCT/US99/25679(如WO 00/28312所公开的)中描述的任一设备。

[0365] 本发明将在下列实施例中进一步描述。

[0366] 实施例1

[0367] 本实施例描述了用于制备三嵌段共聚物微滴的方法,所述三嵌段共聚物用来填充微流控芯片上的相互连接的隔间。

[0368] 材料和方法

[0369] 通过固定纳米孔集合(科学的不锈钢管)作为流体界面,制备T型通道芯片用于生成微滴。

[0370] T型通道内的微滴生成机理很好的记录在文献(Garstecki等,Lab Chip,2006,6,437-446和Thorsen等,Physical Review Letters,86,18,4163-4166)中。考虑到含有的试剂的流体粘性,对于(油和缓冲剂)两种情况,选择的T型通道几何是50 μ m通道宽度。

[0371] 1.1-微滴试剂

[0372] 为了在油中制得水相微滴,使用缓冲剂作为分散相,而硅油(例如AR20)用作连续相。缓冲剂和含油三嵌段共聚物,二者按如下所述制备。

[0373] 通过向10毫升的脱气去离子水中添加298毫克的氯化钾(纯度99.99%,标准差)制备缓冲剂的溶液(缓冲剂1)。向所述缓冲剂的溶液中添加30.35毫克的2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇(99.9%,标准差)。所述溶液使用少量的盐酸和氢氧化钠缓冲到pH 8。添加316.5毫克K₂[Fe(CN)₆](99.9%,Sigma)和82.3毫克K₃(Fe(CN)₆)(99.9%,Sigma)到所述溶液中并搅拌至溶解。

[0374] 通过添加20毫克聚合物(6-33-6,PMOXA-PDMS-PMOXA,高分子聚合物)到1毫升的AR20(99%,Sigma)制备油三嵌段共聚物溶液。将所述聚合物在油中搅拌24小时直到所有的聚合物溶解。

[0375] 1.2-微滴生成设置

[0376] 微滴产生设置的示意图可见于图1。这个设置包括两个注射器泵(Elite,哈佛设备),两个气密的注射器(哈密尔顿),峰值管(科学的不锈钢管),和一个定制的T型通道微流控芯片。一旦所述注射器被填装油和缓冲剂并将其安装在所述注射器泵上,使用所述峰值管与芯片上的端口建立流体连接。油注射器应连接到连续相通道输入口,而缓冲剂应连接到分散相通道输入口。

[0377] 设置两个注射器泵以10 μ L/min的流速注入,这产生平均微滴尺寸(直径)为129.46 μ m,具有10.87 μ m的标准偏差。所述微滴收集到一个瓶中。

[0378] 实施例2

[0379] 本实施例描述了用于制备微滴-界面-双层(DIBs)的方法,所述方法在不同油中使用许多不同的三嵌段共聚物(实验设置如图3所示)。也研究了形成双层的能力和使得生物纳米孔(如MspA的突变体)插入的能力。

[0380] 材料和方法

[0381] 实验2.1、2.3和2.4将结合三嵌段共聚体和油实施如下。

[0382] 1.-6-33-6 (PMOXA-PDMS-PMOXA) Polysource (20毫克/毫升) 在AR20油中(聚苯基硅氧烷,Sigma Aldrich)。

[0383] 2.-6-33-6 (PMOXA-PDMS-PMOXA) Polysource (20毫克/毫升) 在PDMS-0H65cSt油中(聚二甲基硅氧烷,羟基封端,Sigma Aldrich)。

[0384] 3.-6-45PE-6 (PMOXA-PE-PMOXA,其中PE=聚烃链长度大约45个碳原子)。Polysource (20毫克/毫升) 在十六烷中(99.9%,Sigma Aldrich)。

[0385] 4.-6-32-6 (PMOXA-PDMS-PMOXA) 高力 (20毫克/毫升) 在AR20油中(聚苯基硅氧烷,Sigma Aldrich)。

[0386] 2.1-微滴稳定性实验

[0387] 微滴稳定性通过在各种油中准备缓冲剂和三嵌段ABA型聚合物的溶液进行离线测定。使用聚碳酸酯和玻片(图2)制备小的 0.5cm^2 托盘。所述托盘装满油。添加 $1\mu\text{L}$ 缓冲剂微滴到所述油并监测24小时。仅展示很小融合程度的微滴被处理进入到电DIBs测试。

[0388] 2.2-实验设置

[0389] 实验设备如图3所示设置。膜片钳放大器(700B axopatch)被连接到包含两个微操纵器的隔离箱的内部。整个的法拉第笼设置在倒置显微镜(尼康)上,使得可以从下面观察微滴的操作。这使得微滴在不打开所述法拉第笼的条件下进行移动。

[0390] 在所述法拉第笼内,膜片钳放大器的电极经纯金(Au)电线连接。

[0391] 通过燃烧所述电线末端制备所述今用于在微滴设置中使用,使得所述电线形成小金珠子。所述金电线的洗涤,通过将其浸泡于浓缩的 HNO_3 中30秒并用去离子水彻底清洗。珠子-末端-电线反复地穿过从缓冲液制备的液体琼脂糖溶液,所述缓冲液由(5%重量的低熔点琼脂糖, Lonza/缓冲液400mM氯化钾, 75mM $\text{K}_2(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ (99.9%, Sigma) 和25mM $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ (99.9%, Sigma) 及10mM Tris制备。一旦珠子在末端形成,冷却所述琼脂糖,为了达到平衡,所述电线被存于过剩的缓冲溶液中。

[0392] 将微滴室安装在所述法拉第笼内的平台上,并安装电极,使得两个所述电极都落入所述室的中央部分。设置操纵器,使得通过在所述室的区域内的两电极,实现了X和Y方向上全方位运动。然后所述室被填充AR20三嵌段共聚体溶液到边沿,并静置几分钟。将 $1\mu\text{L}$ 的缓冲液直接移液到每个琼脂糖镶金电线上,并且两个电极被直接移到AR20/三嵌段溶液中。微滴在移动前在溶液中停留30秒。

[0393] 2.3-膜的形成

[0394] 为了形成具有微滴对的膜,除了对电极施加180mV的偏压以外,还向其施加 $\pm 20\text{mV}$ 的波形。监测电流响应作为电容性膜的形成的指标(参见图5用于样本痕迹显示电容随时间的增加)。所述微滴被仔细地聚集到一起,使得两个缓冲剂体积之间进行接触(参见图4(B))。所述微滴保持这种状态直到形成膜(见图5)。在膜增长非常缓慢的情况下,所述微滴沿XY方向移动,这迫使所述微滴之间AR20/三嵌段共聚物排出并促进膜的生长。

[0395] 2.4-纳米孔插入实验

[0396] 为了在膜中插入跨膜孔,向形成阳极电解液的缓冲剂中添加0.0005毫克/毫升的MspA-(B2C)溶液(SEQ ID NO:25,是具有下列突变G75S/G77S/L88N/Q126R的SEQ ID NO:2的变体)。所述孔的插入通过瞬时增加电流观察(见图6)。这是在波形缺失但施加偏置电势下执行。

[0397] 结果

[0398] 研究的不同的三嵌段共聚物和油结合如表4中所示。

[0399] 表4

[0400]

三嵌段共聚物	油	离线稳定性测试	膜的形成	MspA-(B2C)孔插入
6-33-6 Polysource	AR20	形成稳定的微滴	观察到电容性膜生长	孔插入
6-33-6 Polysource	PDMS-O H 65cSt	形成稳定的微滴	观察到电容性膜生长	孔插入
6-45PE-6 Polysource	C16	形成稳定的微滴	观察到电容性膜生长	孔插入
6-32-6 高力	AR20	形成稳定的微滴	观察到电容性膜生长	孔插入

[0401] 所有测试的三嵌段共聚物/油的电容性膜生长和孔插入被观察到。图5和图6显示了所述膜生长和MspA-(B2C)孔插入 (SEQ ID NO:25,是具有下列突变G75S/G77S/L88N/Q126R的SEQ ID NO:2的变体),用于6-33-6Polysource三嵌段共聚物与AR20硅油使用的。图7显示了作为没有PMOXA中央核心结构的三嵌段共聚物的例子,用于十六烷中使用的6-45PE-6Polysource的所述膜生长和孔插入。

[0402] 对于本专利,牛津纳米孔技术有限公司参考的是ONT IP 039。

序列表

	<110>	牛津纳米孔技术公司	
	<120>	微滴界面	
	<130>	NI17476B-W0	
	<150>	US 61/718,982	
	<151>	2012-10-26	
	<160>	25	
	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
	<211>	558	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	MS-B1	
[0001]	<400>	1	
		atgggtctgg ataatgaact gagcctgggtg gacgggtcaag ategtaccct gacgggtgcaa	60
		caatgggata cctttctgaa tggcgttttt ccgctggatc gtaatcgctt gaccctgtaa	120
		tggtttcatt ccggtcgcgc aaaatatatc gtcgcaggcc cgggtgctga cgaattcgaa	180
		ggcacgetgg aactgggta tcagattggc tttccgtggt cactgggcgt tggatacaac	240
		ttctcgtaca ccacgccgaa tattctgac aacaatggta acattaccgc accgccgttt	300
		ggcctgaaca gcgtgattac gccgaacctg tttccgggtg ttagcatctc tgccctctg	360
		ggcaatggte cgggcattca agaagtggca accttagtg tgcgcgtttc cggcgctaaa	420
		ggcgggtctc cgggtgtetaa cgcccacggt accgttacgg gcgcggccgg cgggtgtctg	480
		ctgcgtccgt tcgcgcgctt gattgcctct accggcgaca gcgttacgac ctatggcgaa	540
		ccgtggaata tgaactaa	558
	<210>	2	
	<211>	184	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	

<220>

<223> MS-B1

<400> 2

Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu
1 5 10 15

Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp
20 25 30

Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr
35 40 45

Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu
50 55 60

Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe
65 70 75 80

[0002] Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asn Asn Gly Asn Ile Thr Ala
85 90 95

Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly
100 105 110

Val Ser Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val
115 120 125

Ala Thr Phe Ser Val Arg Val Ser Gly Ala Lys Gly Gly Val Ala Val
130 135 140

Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu
145 150 155 160

Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr
165 170 175

Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn
180

<210> 3
 <211> 885
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> a-HL-NN

<400> 3
 atggcagatt ctgatattaa tattaaaacc ggtactacag atattggaag caaiaactaca 60
 gtaaaaacag gtgatttagt cacttatgat aaagaaaatg gcatgcacaa aaaagtattt 120
 tatagtttta tcgatgataa aaatcacaat aaaaaactgc tagttattag aacaaaaggt 180
 accattgctg gtcaatatag agtttatagc gaagaaggtg ctaacaaaag tggtttagcc 240
 tggccttcag cccttaaggt acagttgcaa ctacctgata atgaagtagc tcaaalatct 300
 gattaactatc caagaaattc gattgataca aaaaactata tgagtacitt aacttatgga 360
 ttcaacggta atgttactgg tgatgataca ggaaaaattg gcggccttat tggtgcaaat 420
 gtttcgattg gtcatacact gaactatggt caacctgatt tcaaaacaat tttagagagc 480
 [0003] ccaactgata aaaaagtagg ctggaaagtg atatttaaca atatggtgaa tcaaaattgg 540
 ggaccatacg atcgagattc ttggaaccog gtatatggea atcaactttt catgaaaact 600
 agaaatggitt ctatgaaage agcagataac ttccttgatc ctaacaaage aagttctcta 660
 ttatcttcag ggtttcacc agacttcget acagttatta ctatggatag aaaagcatcc 720
 aaacaacaaa caaatataga tgtaatatac gaacgagttc gtgatgatta ccaattgcat 780
 tggacttcaa caaattggaa aggtaccaat actaaagata aatggacaga tcgtttctca 840
 gaaagatata aatcgattg ggaaaaagaa gaaatgacaa attaa 885

<210> 4
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> a-HL-NN

<400> 4

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser

1	5	10	15
Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn	20	25	30
Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His	35	40	45
Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln	50	55	60
Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp	65	70	75
Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala	85	90	95
Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Asn Tyr	100	105	110
[0004]			
Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp	115	120	125
Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His	130	135	140
Thr Leu Asn Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro	145	150	155
Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn	165	170	175
Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly	180	185	190
Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp	195	200	205
Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe			

Pro Pro Phe Gly Leu Asn Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly
 100 105 110

Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val
 115 120 125

Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Pro Ala Gly Gly Val Ala Val
 130 135 140

Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu
 145 150 155 160

Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr
 165 170 175

Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn
 180

[0006] <210> 6
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> 耻垢分枝杆菌

<400> 6

Gly Leu Asp Asn Glu Leu Ser Leu Val Asp Gly Gln Asp Arg Thr Leu
 1 5 10 15

Thr Val Gln Gln Trp Asp Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp
 20 25 30

Arg Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Lys Tyr
 35 40 45

Ile Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu
 50 55 60

Gly Tyr Gln Ile Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe
 65 70 75 80

Ser Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Asp Gly Asp Ile Thr Gly
85 90 95

Pro Pro Phe Gly Leu Glu Ser Val Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly
100 105 110

Val Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val
115 120 125

Ala Thr Phe Ser Val Asp Val Ser Gly Pro Ala Gly Gly Val Ala Val
130 135 140

Ser Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu
145 150 155 160

Arg Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr
165 170 175

[0007] Tyr Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn
180

<210> 7

<211> 183

<212> PRT

<213> 耻垢分枝杆菌

<400> 7

Val Asp Asn Gln Leu Ser Val Val Asp Gly Gln Gly Arg Thr Leu Thr
1 5 10 15

Val Gln Gln Ala Glu Thr Phe Leu Asn Gly Val Phe Pro Leu Asp Arg
20 25 30

Asn Arg Leu Thr Arg Glu Trp Phe His Ser Gly Arg Ala Thr Tyr His
35 40 45

Val Ala Gly Pro Gly Ala Asp Glu Phe Glu Gly Thr Leu Glu Leu Gly
50 55 60

Tyr Gln Val Gly Phe Pro Trp Ser Leu Gly Val Gly Ile Asn Phe Ser
 65 70 75 80

Tyr Thr Thr Pro Asn Ile Leu Ile Asp Gly Gly Asp Ile Thr Gln Pro
 85 90 95

Pro Phe Gly Leu Asp Thr Ile Ile Thr Pro Asn Leu Phe Pro Gly Val
 100 105 110

Ser Ile Ser Ala Asp Leu Gly Asn Gly Pro Gly Ile Gln Glu Val Ala
 115 120 125

Thr Phe Ser Val Asp Val Lys Gly Ala Lys Gly Ala Val Ala Val Ser
 130 135 140

Asn Ala His Gly Thr Val Thr Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu Arg
 145 150 155 160

[0008] Pro Phe Ala Arg Leu Ile Ala Ser Thr Gly Asp Ser Val Thr Thr Tyr
 165 170 175

Gly Glu Pro Trp Asn Met Asn
 180

- <210> 8
- <211> 1830
- <212> DNA
- <213> 噬菌体 phi AR29

<400> 8
 atgaaacaca tgccgcgtaa aatgtatagc tgcgcgtttg aaaccacgac caaagtggaa 60
 gattgtcgcg tttgggecta tggctacatg aacatcgaag atcattctga atacaaaate 120
 ggtaacagtc tggatgaatt tatggcatgg gtgctgaaag ttcaggcgga tctgtacttc 180
 cacaacctga aatttgatgg cgcattcatt atcaactggc tggaacgtaa tggctttaaa 240
 tggagcggcg atggtctgcc gaacacgtat aataccatta tctctcgtat gggccagigg 300
 tatatgattg atatctgcct gggetacaaa ggtaaacgca aaatcctaac cgtgatctat 360
 gatagectga aaaaactgcc gtittccggtg aagaaaattg cgaagattt caaactgacg 420

gttctgaaag gggatattga ttaacacaaa gaacgtccgg ttggttacaa aatcaccccg	480
gaagaatacg catacatcaa aaacgatata cagatcateg cagaagcgct gctgattcag	540
tttaaacagg gectggateg catgaccgeg ggcagtgata gectgaaagg ttccaagat	600
atcatcacga ccaaaaaatt caaaaaagtg ticcgcagcg tgagcctggg tctggataaa	660
gaagttcggt atgcctaccg cggeggtttt acctggctga acgatcgttt caaagaaaaa	720
gaaattggcg agggatgggt gttgatggt aatagtctgt atccggcaca gatgtacagc	780
cgctctctgc cgtatggcga accgatcgtg ttcgagggta aatatgtttg ggatgaagat	840
taccgctctgc atattcagea calccgttgt gaatttgaac tgaaagaagg ctatattccg	900
accattcaga tcaaacgtag tcgcttctat aagggtaacg aatacctgaa aagctctggc	960
ggtgaaatcg cggatctgtg gctgagtaac gtggatctgg aactgatgaa agaacactac	1020
gatctgtaca acgttgaala calcagcggc ctgaaattta aagccacgac cggctctgtc	1080
aaagatttca tgataaatg gacctacatc aaaacgacct ctgaaggcgc gattaaacag	1140
ctggccaaac tgatctgaa cagcctgtat ggcaatttcg cctctaatec ggatgtgacc	1200
[0009] ggtaaagtcc cgtacctgaa agaaaatggc gcactgggtt ttcgctggg cgaagaagaa	1260
acgaaagatc cgggtgtatac cccgatgggt gttttcatta cggcctgggc acgttacacg	1320
accatcaccc cggcccaggc atgetatgat cgcattatct actgtgatac cgattctatt	1380
catctgacgg gcaccgaaat cccggatgtg attaaagata tcgttgatcc gaaaaactg	1440
ggttattggg cccacgaaag tacgtttaaa cgtgcaaaat acctgcgcca gaaaacctac	1500
atccaggata tctacatgaa agaagtggat ggcaaacctg ttgaaggttc tccggatgat	1560
tacaccgata tcaaatcag tctgaaatgc gccggcatga cggataaaat caaaaaagaa	1620
gtgaccttcg aaaacttcaa agttggtttc agccgcaaaa tgaaaccgaa accggtgcag	1680
gttccggcgc gtgtggttct ggtgatgat acgtttacca ttaaatctgg cggtagtgcg	1740
tggagccatc cgcagttcga aaaaggcggg gctctggig cggttctgg cggtagtgc	1800
tggagccacc cgcagtttga aaaataataa	1830
<210> 9	
<211> 608	
<212> PRT	

<213> 噬菌体 phi AR29

<400> 9

Met Lys His Met Pro Arg Lys Met Tyr Ser Cys Ala Phe Glu Thr Thr
1 5 10 15

Thr Lys Val Glu Asp Cys Arg Val Trp Ala Tyr Gly Tyr Met Asn Ile
20 25 30

Glu Asp His Ser Glu Tyr Lys Ile Gly Asn Ser Leu Asp Glu Phe Met
35 40 45

Ala Trp Val Leu Lys Val Gln Ala Asp Leu Tyr Phe His Asn Leu Lys
50 55 60

Phe Asp Gly Ala Phe Ile Ile Asn Trp Leu Glu Arg Asn Gly Phe Lys
65 70 75 80

[0010]

Trp Ser Ala Asp Gly Leu Pro Asn Thr Tyr Asn Thr Ile Ile Ser Arg
85 90 95

Met Gly Gln Trp Tyr Met Ile Asp Ile Cys Leu Gly Tyr Lys Gly Lys
100 105 110

Arg Lys Ile His Thr Val Ile Tyr Asp Ser Leu Lys Lys Leu Pro Phe
115 120 125

Pro Val Lys Lys Ile Ala Lys Asp Phe Lys Leu Thr Val Leu Lys Gly
130 135 140

Asp Ile Asp Tyr His Lys Glu Arg Pro Val Gly Tyr Lys Ile Thr Pro
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ala Tyr Ile Lys Asn Asp Ile Gln Ile Ile Ala Glu Ala
165 170 175

Leu Leu Ile Gln Phe Lys Gln Gly Leu Asp Arg Met Thr Ala Gly Ser
180 185 190

Asp Ser Leu Lys Gly Phe Lys Asp Ile Ile Thr Thr Lys Lys Phe Lys
 195 200 205

Lys Val Phe Pro Thr Leu Ser Leu Gly Leu Asp Lys Glu Val Arg Tyr
 210 215 220

Ala Tyr Arg Gly Gly Phe Thr Trp Leu Asn Asp Arg Phe Lys Glu Lys
 225 230 235 240

Glu Ile Gly Glu Gly Met Val Phe Asp Val Asn Ser Leu Tyr Pro Ala
 245 250 255

Gln Met Tyr Ser Arg Leu Leu Pro Tyr Gly Glu Pro Ile Val Phe Glu
 260 265 270

Gly Lys Tyr Val Trp Asp Glu Asp Tyr Pro Leu His Ile Gln His Ile
 275 280 285

[0011] Arg Cys Glu Phe Glu Leu Lys Glu Gly Tyr Ile Pro Thr Ile Gln Ile
 290 295 300

Lys Arg Ser Arg Phe Tyr Lys Gly Asn Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Gly
 305 310 315 320

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Trp Leu Ser Asn Val Asp Leu Glu Leu Met
 325 330 335

Lys Glu His Tyr Asp Leu Tyr Asn Val Glu Tyr Ile Ser Gly Leu Lys
 340 345 350

Phe Lys Ala Thr Thr Gly Leu Phe Lys Asp Phe Ile Asp Lys Trp Thr
 355 360 365

Tyr Ile Lys Thr Thr Ser Glu Gly Ala Ile Lys Gln Leu Ala Lys Leu
 370 375 380

Met Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Lys Phe Ala Ser Asn Pro Asp Val Thr
 385 390 395 400

Gly Lys Val Pro Tyr Leu Lys Glu Asn Gly Ala Leu Gly Phe Arg Leu
 405 410 415

Gly Glu Glu Glu Thr Lys Asp Pro Val Tyr Thr Pro Met Gly Val Phe
 420 425 430

Ile Thr Ala Trp Ala Arg Tyr Thr Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Cys
 435 440 445

Tyr Asp Arg Ile Ile Tyr Cys Asp Thr Asp Ser Ile His Leu Thr Gly
 450 455 460

Thr Glu Ile Pro Asp Val Ile Lys Asp Ile Val Asp Pro Lys Lys Leu
 465 470 475 480

Gly Tyr Trp Ala His Glu Ser Thr Phe Lys Arg Ala Lys Tyr Leu Arg
 485 490 495

[0012] Gln Lys Thr Tyr Ile Gln Asp Ile Tyr Met Lys Glu Val Asp Gly Lys
 500 505 510

Leu Val Glu Gly Ser Pro Asp Asp Tyr Thr Asp Ile Lys Phe Ser Val
 515 520 525

Lys Cys Ala Gly Met Thr Asp Lys Ile Lys Lys Glu Val Thr Phe Glu
 530 535 540

Asn Phe Lys Val Gly Phe Ser Arg Lys Met Lys Pro Lys Pro Val Gln
 545 550 555 560

Val Pro Gly Gly Val Val Leu Val Asp Asp Thr Phe Thr Ile Lys Ser
 565 570 575

Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser
 580 585 590

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 595 600 605

<210>	10	
<211>	1390	
<212>	DNA	
<213>	大肠杆菌	
<400>	10	
	atgatgaacg atggcaaaca gcagagcacc ttectgtttc atgattatga aaccttccgt	60
	accatccgg ccctggatcg tcggcgcag tttgeggcca ttgcaccga tagcgaattc	120
	aatgtgattg gegaaccgga agtgttttat tgcaaacggc ccgatgatta tctgccgcag	180
	ccgggtgcgg tgcctgattac cggattacc ccgcaggaag cgcgcgcgaa aggtgaaaac	240
	gaagcggcgt ttgcgcgcg cattcatagc ctgtttaccg tgcgaaaac ctgcattctg	300
	ggetataaca atgtgcgctt cgatgatgaa gttaccgta atatctttta tctgtaacttt	360
	tatgatccgt atgcgtggag ctggcageat gataacagcc gttgggatct gctggatgtg	420
	atgcgcgcgt gctatgcgct gcgccggaa ggcattaatt gcccgaaaa cgatgatggc	480
	ctgccgagct ttctctgga acatctgacc aaagccaacg gcattgaaca tagcaatgcc	540
	catgatgcga tgccgatgt ttatgcgacc attgcgatgg cgaactggt taaaaccgt	600
[0013]	cagccgcgcc tgtttgatta tctgtttacc caccgtaaca aacacaaact gatggegctg	660
	attgatgttc cgcagatgaa accgctggtg catgtgagcg gcatgtttgg cgcctggcgc	720
	ggcaacacca gctgggtggc ccgctggcc tggeaccggg aaaatcgtaa cgcctgatt	780
	atggttgatc tgccgggtga tattagcccg ctgctggaac tggatagcga taccctgct	840
	gaacgcctgt ataccgcaa aaccgatctg ggcgataatg ccgccgtgcc ggtgaaaactg	900
	gttcacatta acaaatgccc ggtgctggcc caggcgaaca cctgcgccc ggaagatgcg	960
	gatcgtctgg gtattaatcg ccagcattgt ctggataatc tgaaaatcet gcgtgaaaac	1020
	ccgcaggtgc gtgaaaagt ggtggcgatc ttgcgggaag cggaaaccgt caccgccgagc	1080
	gataacgtgg atgcgcagct gtataacggc ttcttttagc atgccgatcg cgcggcgatg	1140
	aaaatcgttc tggaaaccga accgcgcaat ctgccggcgc tggatattac ctttgttgat	1200
	aaacgtattg aaaaactgct gtttaattat cgtgcgcgca atttccggg taccctggat	1260
	tatgccgaac agcagcgttg gctggaacat cgtcgtcagg ttttcaccc ggaatttctg	1320
	cagggttatg cggatgaact gcagatctg gttcagcagt atgccgatga taaagaaaa	1380

gtggcgetgc

1390

<210> 11

<211> 485

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 11

Met Met Asn Asp Gly Lys Gln Gln Ser Thr Phe Leu Phe His Asp Tyr
 1 5 10 15

Glu Thr Phe Gly Thr His Pro Ala Leu Asp Arg Pro Ala Gln Phe Ala
 20 25 30

Ala Ile Arg Thr Asp Ser Glu Phe Asn Val Ile Gly Glu Pro Glu Val
 35 40 45

Phe Tyr Cys Lys Pro Ala Asp Asp Tyr Leu Pro Gln Pro Gly Ala Val
 50 55 60

[0014]

Leu Ile Thr Gly Ile Thr Pro Gln Glu Ala Arg Ala Lys Gly Glu Asn
 65 70 75 80

Glu Ala Ala Phe Ala Ala Arg Ile His Ser Leu Phe Thr Val Pro Lys
 85 90 95

Thr Cys Ile Leu Gly Tyr Asn Asn Val Arg Phe Asp Asp Glu Val Thr
 100 105 110

Arg Asn Ile Phe Tyr Arg Asn Phe Tyr Asp Pro Tyr Ala Trp Ser Trp
 115 120 125

Gln His Asp Asn Ser Arg Trp Asp Leu Leu Asp Val Met Arg Ala Cys
 130 135 140

Tyr Ala Leu Arg Pro Glu Gly Ile Asn Trp Pro Glu Asn Asp Asp Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Ser Phe Arg Leu Glu His Leu Thr Lys Ala Asn Gly Ile Glu
 165 170 175

His Ser Asn Ala His Asp Ala Met Ala Asp Val Tyr Ala Thr Ile Ala
 180 185 190

Met Ala Lys Leu Val Lys Thr Arg Gln Pro Arg Leu Phe Asp Tyr Leu
 195 200 205

Phe Thr His Arg Asn Lys His Lys Leu Met Ala Leu Ile Asp Val Pro
 210 215 220

Gln Met Lys Pro Leu Val His Val Ser Gly Met Phe Gly Ala Trp Arg
 225 230 235 240

Gly Asn Thr Ser Trp Val Ala Pro Leu Ala Trp His Pro Glu Asn Arg
 245 250 255

Asn Ala Val Ile Met Val Asp Leu Ala Gly Asp Ile Ser Pro Leu Leu
 260 265 270

[0015] Glu Leu Asp Ser Asp Thr Leu Arg Glu Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Thr
 275 280 285

Asp Leu Gly Asp Asn Ala Ala Val Pro Val Lys Leu Val His Ile Asn
 290 295 300

Lys Cys Pro Val Leu Ala Gln Ala Asn Thr Leu Arg Pro Glu Asp Ala
 305 310 315 320

Asp Arg Leu Gly Ile Asn Arg Gln His Cys Leu Asp Asn Leu Lys Ile
 325 330 335

Leu Arg Glu Asn Pro Gln Val Arg Glu Lys Val Val Ala Ile Phe Ala
 340 345 350

Glu Ala Glu Pro Phe Thr Pro Ser Asp Asn Val Asp Ala Gln Leu Tyr
 355 360 365

Asn Gly Phe Phe Ser Asp Ala Asp Arg Ala Ala Met Lys Ile Val Leu
 370 375 380

Glu Thr Glu Pro Arg Asn Leu Pro Ala Leu Asp Ile Thr Phe Val Asp
 385 390 395 400

Lys Arg Ile Glu Lys Leu Leu Phe Asn Tyr Arg Ala Arg Asn Phe Pro
 405 410 415

Gly Thr Leu Asp Tyr Ala Glu Gln Gln Arg Trp Leu Glu His Arg Arg
 420 425 430

Gln Val Phe Thr Pro Glu Phe Leu Gln Gly Tyr Ala Asp Glu Leu Gln
 435 440 445

Met Leu Val Gln Gln Tyr Ala Asp Asp Lys Glu Lys Val Ala Leu Leu
 450 455 460

Lys Ala Leu Trp Gln Tyr Ala Glu Glu Ile Val Ser Gly Ser Gly His
 465 470 475 480

[0016] His His His His His
 485

<210> 12
 <211> 804
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌

<400> 12
 atgaaatttg tctcttttaa tatcaacggc ctgcgcgcca gacctacca gcttgaagcc 60
 atcgtcgaaa agcaccaacc ggatgtgatt ggctgcagg agacaaaagt tcatgacgat 120
 atgtttccgc tcgaagaggt ggccaagctc ggctacaacg tgttttatca cgggcagaaa 180
 ggccattatg gcgtggcget gctgacaaa gagacgccga ttgccgtgcg tcgcggcttt 240
 cccggtgacg acgaagagge gcagcggcgg attattatgg cggaaatccc ctcactgctg 300
 ggtaatgtca ccgtgatcaa cggttacttc ccgcagggtg aaagccgcga ccatccgata 360
 aaattccegg caaaagcgca gttttatcag aatctgcaaa actacctgga aaccgaactc 420
 aaacgtgata atccggtact gattatgggc gatatgaata tcagccctac agatctggat 480

atcggcattg gcgaagaaaa ccgtaagcgc tggctgcgta ccggtaaagt ctctttcctg 540
 ccggaagagc gcgaatggat ggacaggctg atgagctggg ggttggtcga taccttccgc 600
 catgcgaate cgcaaacagc agatcgtttc teatggtttg attaccgctc aaaaggtttt 660
 gacgataace gtggtctgcg catcgacctg ctgctcgcca gccaacctgt ggcagaatgt 720
 tgcgtagaaa ccggcatcga ctatgaaatc cgcagcatgg aaaaaccgtc cgatcaagcc 780
 cccgtctggg cgaccttccg ccgc 804

<210> 13
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌

<400> 13

Met Lys Phe Val Ser Phe Asn Ile Asn Gly Leu Arg Ala Arg Pro His
 1 5 10 15

[0017]

Gln Leu Glu Ala Ile Val Glu Lys His Gln Pro Asp Val Ile Gly Leu
 20 25 30

Gln Glu Thr Lys Val His Asp Asp Met Phe Pro Leu Glu Glu Val Ala
 35 40 45

Lys Leu Gly Tyr Asn Val Phe Tyr His Gly Gln Lys Gly His Tyr Gly
 50 55 60

Val Ala Leu Leu Thr Lys Glu Thr Pro Ile Ala Val Arg Arg Gly Phe
 65 70 75 80

Pro Gly Asp Asp Glu Glu Ala Gln Arg Arg Ile Ile Met Ala Glu Ile
 85 90 95

Pro Ser Leu Leu Gly Asn Val Thr Val Ile Asn Gly Tyr Phe Pro Gln
 100 105 110

Gly Glu Ser Arg Asp His Pro Ile Lys Phe Pro Ala Lys Ala Gln Phe
 115 120 125

Tyr Gln Asn Leu Gln Asn Tyr Leu Glu Thr Glu Leu Lys Arg Asp Asn
 130 135 140

Pro Val Leu Ile Met Gly Asp Met Asn Ile Ser Pro Thr Asp Leu Asp
 145 150 155 160

Ile Gly Ile Gly Glu Glu Asn Arg Lys Arg Trp Leu Arg Thr Gly Lys
 165 170 175

Cys Ser Phe Leu Pro Glu Glu Arg Glu Trp Met Asp Arg Leu Met Ser
 180 185 190

Trp Gly Leu Val Asp Thr Phe Arg His Ala Asn Pro Gln Thr Ala Asp
 195 200 205

Arg Phe Ser Trp Phe Asp Tyr Arg Ser Lys Gly Phe Asp Asp Asn Arg
 210 215 220

[0018] Gly Leu Arg Ile Asp Leu Leu Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ala Glu Cys
 225 230 235 240

Cys Val Glu Thr Gly Ile Asp Tyr Glu Ile Arg Ser Met Glu Lys Pro
 245 250 255

Ser Asp His Ala Pro Val Trp Ala Thr Phe Arg Arg
 260 265

<210> 14

<211> 1275

<212> DNA

<213> 嗜热链球菌

<400> 14

atgttttctgtc gtaaagaaga tctggatccg ccgctggcac tctgtccgct gaaaggcctg 60

cgogaagccg ccgcactgct ggaagaagcg ctgcgtcaag gtaaaccgat tctgttctac 120

ggcgactatg atgeggatgg cctgaccggc accgegatcc tggttcgtgg tctggcggcc 180

ctgggtgctgg atgttcatcc gtttateccg caccgcctgg aagaaggcta tgggtgctctg 240

atggaaagcg tcccggaaca tctggaagcc teggacctgt ttctgacctg tgactggcg 300

Thr Gly Thr Ala Ile Leu Val Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gly Ala Asp
 50 55 60

Val His Pro Phe Ile Pro His Arg Leu Glu Glu Gly Tyr Gly Val Leu
 65 70 75 80

Met Glu Arg Val Pro Glu His Leu Glu Ala Ser Asp Leu Phe Leu Thr
 85 90 95

Val Asp Cys Gly Ile Thr Asn His Ala Glu Leu Arg Glu Leu Leu Glu
 100 105 110

Asn Gly Val Glu Val Ile Val Thr Asp His His Thr Pro Gly Lys Thr
 115 120 125

Pro Pro Pro Gly Leu Val Val His Pro Ala Leu Thr Pro Asp Leu Lys
 130 135 140

[0020] Glu Lys Pro Thr Gly Ala Gly Val Ala Phe Leu Leu Leu Trp Ala Leu
 145 150 155 160

His Glu Arg Leu Gly Leu Pro Pro Pro Leu Glu Tyr Ala Asp Leu Ala
 165 170 175

Ala Val Gly Thr Ile Ala Asp Val Ala Pro Leu Trp Gly Trp Asn Arg
 180 185 190

Ala Leu Val Lys Glu Gly Leu Ala Arg Ile Pro Ala Ser Ser Trp Val
 195 200 205

Gly Leu Arg Leu Leu Ala Glu Ala Val Gly Tyr Thr Gly Lys Ala Val
 210 215 220

Glu Val Ala Phe Arg Ile Ala Pro Arg Ile Asn Ala Ala Ser Arg Leu
 225 230 235 240

Gly Glu Ala Glu Lys Ala Leu Arg Leu Leu Leu Thr Asp Asp Ala Ala
 245 250 255

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

Gln Thr Leu Glu Glu Ala Met Leu Arg Lys Leu Leu Pro Gln Ala Asp
 275 280 285

Pro Glu Ala Lys Ala Ile Val Leu Leu Asp Pro Glu Gly His Pro Gly
 290 295 300

Val Met Gly Ile Val Ala Ser Arg Ile Leu Glu Ala Thr Leu Arg Pro
 305 310 315 320

Val Phe Leu Val Ala Gln Gly Lys Gly Thr Val Arg Ser Leu Ala Pro
 325 330 335

Ile Ser Ala Val Glu Ala Leu Arg Ser Ala Glu Asp Leu Leu Leu Arg
 340 345 350

[0021]

Tyr Gly Gly His Lys Glu Ala Ala Gly Phe Ala Met Asp Glu Ala Leu
 355 360 365

Phe Pro Ala Phe Lys Ala Arg Val Glu Ala Tyr Ala Ala Arg Phe Pro
 370 375 380

Asp Pro Val Arg Glu Val Ala Leu Leu Asp Leu Leu Pro Glu Pro Gly
 385 390 395 400

Leu Leu Pro Gln Val Phe Arg Glu Leu Ala Leu Leu Glu Pro Tyr Gly
 405 410 415

Glu Gly Asn Pro Glu Pro Leu Phe Leu
 420 425

<210> 16

<211> 738

<212> DNA

<213> 噬菌体 lambda

<400> 16

```

tccggaageg gctctggtag tggttctggc atgacacogg acattatcct gcagcgtacc      60
gggatcgatg tgagagctgt cgaacagggg gatgatgcgt ggcacaaaatt acggctcggc      120
gtcatcaccg cttcagaagt tcacaacgtg atagcaaaac cccgctccgg aaagaagtgg      180
cctgacatga aaatgtecta ctccacacacc ctgcttgcgt aggtttgcac cgggtgtggct      240
ccggaagtta acgctaaagc actggcctgg ggaaaacagt acgagaacga cgccagaacc      300
ctgtttgaat tcacttcggg cgtgaatgtt actgaatecc cgatcateta tcgcgacgaa      360
agtatgcgta ccgctgctc tcccgatggt ttatgcagtg acggcaacgg ccttgaactg      420
aaatgcccggt ttacctcccg ggatttcatg aagtccgggc tcggtggttt cgaggccata      480
aagtcagctt acatggccca ggigcagtac agcatgtggg tgacgcgaaa aaatgcctgg      540
tactllgcca actatgacce gcgtatgaag cglgaaggec tgcattatgt cglgaltgag      600
cgggatgaaa agtacatggc gagttttgac gagatcgtgc cggagtccat cgaaaaaatg      660
gacgaggcac tggtgaaat tggttttgta tttggggagc aatggcgatc tggctctggt      720
tccggcagcg gttccgga                                                    738

```

[0022]

<210> 17
<211> 226
<212> PRT
<213> 噬菌体 lambda

<400> 17

Met Thr Pro Asp Ile Ile Leu Gln Arg Thr Gly Ile Asp Val Arg Ala
1 5 10 15

Val Glu Gln Gly Asp Asp Ala Trp His Lys Leu Arg Leu Gly Val Ile
 20 25 30

Thr Ala Ser Glu Val His Asn Val Ile Ala Lys Pro Arg Ser Gly Lys
 35 40 45

Lys Trp Pro Asp Met Lys Met Ser Tyr Phe His Thr Leu Leu Ala Glu
 50 55 60

Val Cys Thr Gly Val Ala Pro Glu Val Asn Ala Lys Ala Leu Ala Trp
65 70 75 80

Gly Lys Gln Tyr Glu Asn Asp Ala Arg Thr Leu Phe Glu Phe Thr Ser
85 90 95

Gly Val Asn Val Thr Glu Ser Pro Ile Ile Tyr Arg Asp Glu Ser Met
100 105 110

Arg Thr Ala Cys Ser Pro Asp Gly Leu Cys Ser Asp Gly Asn Gly Leu
115 120 125

Glu Leu Lys Cys Pro Phe Thr Ser Arg Asp Phe Met Lys Phe Arg Leu
130 135 140

Gly Gly Phe Glu Ala Ile Lys Ser Ala Tyr Met Ala Gln Val Gln Tyr
145 150 155 160

Ser Met Trp Val Thr Arg Lys Asn Ala Trp Tyr Phe Ala Asn Tyr Asp
165 170 175

[0023] Pro Arg Met Lys Arg Glu Gly Leu His Tyr Val Val Ile Glu Arg Asp
180 185 190

Glu Lys Tyr Met Ala Ser Phe Asp Glu Ile Val Pro Glu Phe Ile Glu
195 200 205

Lys Met Asp Glu Ala Leu Ala Glu Ile Gly Phe Val Phe Gly Glu Gln
210 215 220

Trp Arg
225

<210> 18

<211> 760

<212> PRT

<213> 伯顿甲烷拟球菌

<400> 18

Met Met Ile Arg Glu Leu Asp Ile Pro Arg Asp Ile Ile Gly Phe Tyr
1 5 10 15

Glu Asp Ser Gly Ile Lys Glu Leu Tyr Pro Pro Gln Ala Glu Ala Ile
 20 25 30

Glu Met Gly Leu Leu Glu Lys Lys Asn Leu Leu Ala Ala Ile Pro Thr
 35 40 45

Ala Ser Gly Lys Thr Leu Leu Ala Glu Leu Ala Met Ile Lys Ala Ile
 50 55 60

Arg Glu Gly Gly Lys Ala Leu Tyr Ile Val Pro Leu Arg Ala Leu Ala
 65 70 75 80

Ser Glu Lys Phe Glu Arg Phe Lys Glu Leu Ala Pro Phe Gly Ile Lys
 85 90 95

Val Gly Ile Ser Thr Gly Asp Leu Asp Ser Arg Ala Asp Trp Leu Gly
 100 105 110

[0024] Val Asn Asp Ile Ile Val Ala Thr Ser Glu Lys Thr Asp Ser Leu Leu
 115 120 125

Arg Asn Gly Thr Ser Trp Met Asp Glu Ile Thr Thr Val Val Val Asp
 130 135 140

Glu Ile His Leu Leu Asp Ser Lys Asn Arg Gly Pro Thr Leu Glu Val
 145 150 155 160

Thr Ile Thr Lys Leu Met Arg Leu Asn Pro Asp Val Gln Val Val Ala
 165 170 175

Leu Ser Ala Thr Val Gly Asn Ala Arg Glu Met Ala Asp Trp Leu Gly
 180 185 190

Ala Ala Leu Val Leu Ser Glu Trp Arg Pro Thr Asp Leu His Glu Gly
 195 200 205

Val Leu Phe Gly Asp Ala Ile Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys Lys Ile
 210 215 220

Ile Val Asn Gly Phe Ala Ser Thr Arg Gln Glu Leu Phe Asp Phe Phe
 435 440 445

Gly Ala Thr Phe Phe Ala Tyr Gln Gln Asp Lys Trp Met Leu Glu Glu
 450 455 460

Val Ile Asn Asp Cys Leu Glu Phe Leu Ile Asp Lys Ala Met Val Ser
 465 470 475 480

Glu Thr Glu Asp Ile Glu Asp Ala Ser Lys Leu Phe Leu Arg Gly Thr
 485 490 495

Arg Leu Gly Ser Leu Val Ser Met Leu Tyr Ile Asp Pro Leu Ser Gly
 500 505 510

Ser Lys Ile Val Asp Gly Phe Lys Asp Ile Gly Lys Ser Thr Gly Gly
 515 520 525

[0026] Asn Met Gly Ser Leu Glu Asp Asp Lys Gly Asp Asp Ile Thr Val Thr
 530 535 540

Asp Met Thr Leu Leu His Leu Val Cys Ser Thr Pro Asp Met Arg Gln
 545 550 555 560

Leu Tyr Leu Arg Asn Thr Asp Tyr Thr Ile Val Asn Glu Tyr Ile Val
 565 570 575

Ala His Ser Asp Glu Phe His Glu Ile Pro Asp Lys Leu Lys Glu Thr
 580 585 590

Asp Tyr Glu Trp Phe Met Gly Glu Val Lys Thr Ala Met Leu Leu Glu
 595 600 605

Glu Trp Val Thr Glu Val Ser Ala Glu Asp Ile Thr Arg His Phe Asn
 610 615 620

Val Gly Glu Gly Asp Ile His Ala Leu Ala Asp Thr Ser Glu Trp Leu
 625 630 635 640

Met His Ala Ala Ala Lys Leu Ala Glu Leu Leu Gly Val Glu Tyr Ser
645 650 655

Ser His Ala Tyr Ser Leu Glu Lys Arg Ile Arg Tyr Gly Ser Gly Leu
660 665 670

Asp Leu Met Glu Leu Val Gly Ile Arg Gly Val Gly Arg Val Arg Ala
675 680 685

Arg Lys Leu Tyr Asn Ala Gly Phe Val Ser Val Ala Lys Leu Lys Gly
690 695 700

Ala Asp Ile Ser Val Leu Ser Lys Leu Val Gly Pro Lys Val Ala Tyr
705 710 715 720

Asn Ile Leu Ser Gly Ile Gly Val Arg Val Asn Asp Lys His Phe Asn
725 730 735

[0027] Ser Ala Pro Ile Ser Ser Asn Thr Leu Asp Thr Leu Leu Asp Lys Asn
740 745 750

Gln Lys Thr Phe Asn Asp Phe Gln
755 760

<210> 19

<211> 707

<212> PRT

<213> 海绵共生古菌

<400> 19

Met Arg Ile Ser Glu Leu Asp Ile Pro Arg Pro Ala Ile Glu Phe Leu
1 5 10 15

Glu Gly Glu Gly Tyr Lys Lys Leu Tyr Pro Pro Gln Ala Ala Ala Ala
20 25 30

Lys Ala Gly Leu Thr Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Ser Ala Pro Thr
35 40 45

Ala Ser Gly Lys Thr Leu Ile Ala Ala Ile Ala Met Ile Ser His Leu
50 55 60

Ser Arg Asn Arg Gly Lys Ala Val Tyr Leu Ser Pro Leu Arg Ala Leu
65 70 75 80

Ala Ala Glu Lys Phe Ala Glu Phe Gly Lys Ile Gly Gly Ile Pro Leu
85 90 95

Gly Arg Pro Val Arg Val Gly Val Ser Thr Gly Asp Phe Glu Lys Ala
100 105 110

Gly Arg Ser Leu Gly Asn Asn Asp Ile Leu Val Leu Thr Asn Glu Arg
115 120 125

Met Asp Ser Leu Ile Arg Arg Arg Pro Asp Trp Met Asp Glu Val Gly
130 135 140

[0028] Leu Val Ile Ala Asp Glu Ile His Leu Ile Gly Asp Arg Ser Arg Gly
145 150 155 160

Pro Thr Leu Glu Met Val Leu Thr Lys Leu Arg Gly Leu Arg Ser Ser
165 170 175

Pro Gln Val Val Ala Leu Ser Ala Thr Ile Ser Asn Ala Asp Glu Ile
180 185 190

Ala Gly Trp Leu Asp Cys Thr Leu Val His Ser Thr Trp Arg Pro Val
195 200 205

Pro Leu Ser Glu Gly Val Tyr Gln Asp Gly Glu Val Ala Met Gly Asp
210 215 220

Gly Ser Arg His Glu Val Ala Ala Thr Gly Gly Gly Pro Ala Val Asp
225 230 235 240

Leu Ala Ala Glu Ser Val Ala Glu Gly Gly Gln Ser Leu Ile Phe Ala
245 250 255

Asp Thr Arg Ala Arg Ser Ala Ser Leu Ala Ala Lys Ala Ser Ala Val
 260 265 270

Ile Pro Glu Ala Lys Gly Ala Asp Ala Ala Lys Leu Ala Ala Ala Ala
 275 280 285

Lys Lys Ile Ile Ser Ser Gly Gly Glu Thr Lys Leu Ala Lys Thr Leu
 290 295 300

Ala Glu Leu Val Glu Lys Gly Ala Ala Phe His His Ala Gly Leu Asn
 305 310 315 320

Gln Asp Cys Arg Ser Val Val Glu Glu Glu Phe Arg Ser Gly Arg Ile
 325 330 335

Arg Leu Leu Ala Ser Thr Pro Thr Leu Ala Ala Gly Val Asn Leu Pro
 340 345 350

[0029] Ala Arg Arg Val Val Ile Ser Ser Val Met Arg Tyr Asn Ser Ser Ser
 355 360 365

Gly Met Ser Glu Pro Ile Ser Ile Leu Glu Tyr Lys Gln Leu Cys Gly
 370 375 380

Arg Ala Gly Arg Pro Gln Tyr Asp Lys Ser Gly Glu Ala Ile Val Val
 385 390 395 400

Gly Gly Val Asn Ala Asp Glu Ile Phe Asp Arg Tyr Ile Gly Gly Glu
 405 410 415

Pro Glu Pro Ile Arg Ser Ala Met Val Asp Asp Arg Ala Leu Arg Ile
 420 425 430

His Val Leu Ser Leu Val Thr Thr Ser Pro Gly Ile Lys Glu Asp Asp
 435 440 445

Val Thr Glu Phe Phe Leu Gly Thr Leu Gly Gly Gln Gln Ser Gly Glu
 450 455 460

Ser Thr Val Lys Phe Ser Val Ala Val Ala Leu Arg Phe Leu Gln Glu
 465 470 475 480

Glu Gly Met Leu Gly Arg Arg Gly Gly Arg Leu Ala Ala Thr Lys Met
 485 490 495

Gly Arg Leu Val Ser Arg Leu Tyr Met Asp Pro Met Thr Ala Val Thr
 500 505 510

Leu Arg Asp Ala Val Gly Glu Ala Ser Pro Gly Arg Met His Thr Leu
 515 520 525

Gly Phe Leu His Leu Val Ser Glu Cys Ser Glu Phe Met Pro Arg Phe
 530 535 540

Ala Leu Arg Gln Lys Asp His Glu Val Ala Glu Met Met Leu Glu Ala
 545 550 555 560

[0030] Gly Arg Gly Glu Leu Leu Arg Pro Val Tyr Ser Tyr Glu Cys Gly Arg
 565 570 575

Gly Leu Leu Ala Leu His Arg Trp Ile Gly Glu Ser Pro Glu Ala Lys
 580 585 590

Leu Ala Glu Asp Leu Lys Phe Glu Ser Gly Asp Val His Arg Met Val
 595 600 605

Glu Ser Ser Gly Trp Leu Leu Arg Cys Ile Trp Glu Ile Ser Lys His
 610 615 620

Gln Glu Arg Pro Asp Leu Leu Gly Glu Leu Asp Val Leu Arg Ser Arg
 625 630 635 640

Val Ala Tyr Gly Ile Lys Ala Glu Leu Val Pro Leu Val Ser Ile Lys
 645 650 655

Gly Ile Gly Arg Val Arg Ser Arg Arg Leu Phe Arg Gly Gly Ile Lys
 660 665 670

Gly Pro Gly Asp Leu Ala Ala Val Pro Val Glu Arg Leu Ser Arg Val
675 680 685

Glu Gly Ile Gly Ala Thr Leu Ala Asn Asn Ile Lys Ser Gln Leu Arg
690 695 700

Lys Gly Gly
705

<210> 20

<211> 720

<212> PRT

<213> 科超嗜热古菌

<400> 20

Met Lys Val Asp Glu Leu Pro Val Asp Glu Arg Leu Lys Ala Val Leu
1 5 10 15

Lys Glu Arg Gly Ile Glu Glu Leu Tyr Pro Pro Gln Ala Glu Ala Leu
20 25 30

[0031]

Lys Ser Gly Ala Leu Glu Gly Arg Asn Leu Val Leu Ala Ile Pro Thr
35 40 45

Ala Ser Gly Lys Thr Leu Val Ser Glu Ile Val Met Val Asn Lys Leu
50 55 60

Ile Gln Glu Gly Gly Lys Ala Val Tyr Leu Val Pro Leu Lys Ala Leu
65 70 75 80

Ala Glu Glu Lys Tyr Arg Glu Phe Lys Glu Trp Glu Lys Leu Gly Leu
85 90 95

Lys Val Ala Ala Thr Thr Gly Asp Tyr Asp Ser Thr Asp Asp Trp Leu
100 105 110

Gly Arg Tyr Asp Ile Ile Val Ala Thr Ala Glu Lys Phe Asp Ser Leu
115 120 125

Leu Arg His Gly Ala Arg Trp Ile Asn Asp Val Lys Leu Val Val Ala

	340		345		350
Phe Gly Trp Thr Asp Ile Pro Val Leu Glu Ile Gln Gln Met Met Gly					
	355		360		365
Arg Ala Gly Arg Pro Arg Tyr Asp Lys Tyr Gly Glu Ala Ile Ile Val					
	370		375		380
Ala Arg Thr Asp Glu Pro Gly Lys Leu Met Glu Arg Tyr Ile Arg Gly					
	385		390		395
					400
Lys Pro Glu Lys Leu Phe Ser Met Leu Ala Asn Glu Gln Ala Phe Arg					
		405		410	415
Ser Gln Val Leu Ala Leu Ile Thr Asn Phe Gly Ile Arg Ser Phe Pro					
		420		425	430
Glu Leu Val Arg Phe Leu Glu Arg Thr Phe Tyr Ala His Gln Arg Lys					
		435		440	445
[0033]					
Asp Leu Ser Ser Leu Glu Tyr Lys Ala Lys Glu Val Val Tyr Phe Leu					
	450		455		460
Ile Glu Asn Glu Phe Ile Asp Leu Asp Leu Glu Asp Arg Phe Ile Pro					
	465		470		475
					480
Leu Pro Phe Gly Lys Arg Thr Ser Gln Leu Tyr Ile Asp Pro Leu Thr					
		485		490	495
Ala Lys Lys Phe Lys Asp Ala Phe Pro Ala Ile Glu Arg Asn Pro Asn					
		500		505	510
Pro Phe Gly Ile Phe Gln Leu Ile Ala Ser Thr Pro Asp Met Ala Thr					
	515		520		525
Leu Thr Ala Arg Arg Arg Glu Met Glu Asp Tyr Leu Asp Leu Ala Tyr					
	530		535		540
Glu Leu Glu Asp Lys Leu Tyr Ala Ser Ile Pro Tyr Tyr Glu Asp Ser					

545	550	555	560
Arg Phe Gln Gly Phe Leu Gly Gln Val Lys Thr Ala Lys Val Leu Leu	565	570	575
Asp Trp Ile Asn Glu Val Pro Glu Ala Arg Ile Tyr Glu Thr Tyr Ser	580	585	590
Ile Asp Pro Gly Asp Leu Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Ala Asp Trp Leu	595	600	605
Met Tyr Ser Leu Ile Glu Leu Tyr Lys Leu Phe Glu Pro Lys Glu Glu	610	615	620
Ile Leu Asn Tyr Leu Arg Asp Leu His Leu Arg Leu Arg His Gly Val	625	630	635
Arg Glu Glu Leu Leu Glu Leu Val Arg Leu Pro Asn Ile Gly Arg Lys	645	650	655
[0034]			
Arg Ala Arg Ala Leu Tyr Asn Ala Gly Phe Arg Ser Val Glu Ala Ile	660	665	670
Ala Asn Ala Lys Pro Ala Glu Leu Leu Ala Val Glu Gly Ile Gly Ala	675	680	685
Lys Ile Leu Asp Gly Ile Tyr Arg His Leu Gly Ile Glu Lys Arg Val	690	695	700
Thr Glu Glu Lys Pro Lys Arg Lys Gly Thr Leu Glu Asp Phe Leu Arg	705	710	715
<210> 21			
<211> 799			
<212> PRT			
<213> 亨氏甲烷螺菌 JF-1			
<400> 21			
Met Glu Ile Ala Ser Leu Pro Leu Pro Asp Ser Phe Ile Arg Ala Cys	1	5	10
			15

His Ala Lys Gly Ile Arg Ser Leu Tyr Pro Pro Gln Ala Glu Cys Ile
 20 25 30

Glu Lys Gly Leu Leu Glu Gly Lys Asn Leu Leu Ile Ser Ile Pro Thr
 35 40 45

Ala Ser Gly Lys Thr Leu Leu Ala Glu Met Ala Met Trp Ser Arg Ile
 50 55 60

Ala Ala Gly Gly Lys Cys Leu Tyr Ile Val Pro Leu Arg Ala Leu Ala
 65 70 75 80

Ser Glu Lys Tyr Asp Glu Phe Ser Lys Lys Gly Val Ile Arg Val Gly
 85 90 95

Ile Ala Thr Gly Asp Leu Asp Arg Thr Asp Ala Tyr Leu Gly Glu Asn
 100 105 110

[0035] Asp Ile Ile Val Ala Thr Ser Glu Lys Thr Asp Ser Leu Leu Arg Asn
 115 120 125

Arg Thr Pro Trp Leu Ser Gln Ile Thr Cys Ile Val Leu Asp Glu Val
 130 135 140

His Leu Ile Gly Ser Glu Asn Arg Gly Ala Thr Leu Glu Met Val Ile
 145 150 155 160

Thr Lys Leu Arg Tyr Thr Asn Pro Val Met Gln Ile Ile Gly Leu Ser
 165 170 175

Ala Thr Ile Gly Asn Pro Ala Gln Leu Ala Glu Trp Leu Asp Ala Thr
 180 185 190

Leu Ile Thr Ser Thr Trp Arg Pro Val Asp Leu Arg Gln Gly Val Tyr
 195 200 205

Tyr Asn Gly Lys Ile Arg Phe Ser Asp Ser Glu Arg Pro Ile Gln Gly
 210 215 220

Lys Thr Lys His Asp Asp Leu Asn Leu Cys Leu Asp Thr Ile Glu Glu
 225 230 235 240

Gly Gly Gln Cys Leu Val Phe Val Ser Ser Arg Arg Asn Ala Glu Gly
 245 250 255

Phe Ala Lys Lys Ala Ala Gly Ala Leu Lys Ala Gly Ser Pro Asp Ser
 260 265 270

Lys Ala Leu Ala Gln Glu Leu Arg Arg Leu Arg Asp Arg Asp Glu Gly
 275 280 285

Asn Val Leu Ala Asp Cys Val Glu Arg Gly Ala Ala Phe His His Ala
 290 295 300

Gly Leu Ile Arg Gln Glu Arg Thr Ile Ile Glu Glu Gly Phe Arg Asn
 305 310 315 320

[0036] Gly Tyr Ile Glu Val Ile Ala Ala Thr Pro Thr Leu Ala Ala Gly Leu
 325 330 335

Asn Leu Pro Ala Arg Arg Val Ile Ile Arg Asp Tyr Asn Arg Phe Ala
 340 345 350

Ser Gly Leu Gly Met Val Pro Ile Pro Val Gly Glu Tyr His Gln Met
 355 360 365

Ala Gly Arg Ala Gly Arg Pro His Leu Asp Pro Tyr Gly Glu Ala Val
 370 375 380

Leu Leu Ala Lys Asp Ala Pro Ser Val Glu Arg Leu Phe Glu Thr Phe
 385 390 395 400

Ile Asp Ala Glu Ala Glu Arg Val Asp Ser Gln Cys Val Asp Asp Ala
 405 410 415

Ser Leu Cys Ala His Ile Leu Ser Leu Ile Ala Thr Gly Phe Ala His
 420 425 430

Asp Gln Glu Ala Leu Ser Ser Phe Met Glu Arg Thr Phe Tyr Phe Phe
 435 440 445

Gln His Pro Lys Thr Arg Ser Leu Pro Arg Leu Val Ala Asp Ala Ile
 450 455 460

Arg Phe Leu Thr Thr Ala Gly Met Val Glu Glu Arg Glu Asn Thr Leu
 465 470 475 480

Ser Ala Thr Arg Leu Gly Ser Leu Val Ser Arg Leu Tyr Leu Asn Pro
 485 490 495

Cys Thr Ala Arg Leu Ile Leu Asp Ser Leu Lys Ser Cys Lys Thr Pro
 500 505 510

Thr Leu Ile Gly Leu Leu His Val Ile Cys Val Ser Pro Asp Met Gln
 515 520 525

[0037] Arg Leu Tyr Leu Lys Ala Ala Asp Thr Gln Leu Leu Arg Thr Phe Leu
 530 535 540

Phe Lys His Lys Asp Asp Leu Ile Leu Pro Leu Pro Phe Glu Gln Glu
 545 550 555 560

Glu Glu Glu Leu Trp Leu Ser Gly Leu Lys Thr Ala Leu Val Leu Thr
 565 570 575

Asp Trp Ala Asp Glu Phe Ser Glu Gly Met Ile Glu Glu Arg Tyr Gly
 580 585 590

Ile Gly Ala Gly Asp Leu Tyr Asn Ile Val Asp Ser Gly Lys Trp Leu
 595 600 605

Leu His Gly Thr Glu Arg Leu Val Ser Val Glu Met Pro Glu Met Ser
 610 615 620

Gln Val Val Lys Thr Leu Ser Val Arg Val His His Gly Val Lys Ser
 625 630 635 640

Glu Leu Leu Pro Leu Val Ala Leu Arg Asn Ile Gly Arg Val Arg Ala
645 650 655

Arg Thr Leu Tyr Asn Ala Gly Tyr Pro Asp Pro Glu Ala Val Ala Arg
660 665 670

Ala Gly Leu Ser Thr Ile Ala Arg Ile Ile Gly Glu Gly Ile Ala Arg
675 680 685

Gln Val Ile Asp Glu Ile Thr Gly Val Lys Arg Ser Gly Ile His Ser
690 695 700

Ser Asp Asp Asp Tyr Gln Gln Lys Thr Pro Glu Leu Leu Thr Asp Ile
705 710 715 720

Pro Gly Ile Gly Lys Lys Met Ala Glu Lys Leu Gln Asn Ala Gly Ile
725 730 735

[0038] Ile Thr Val Ser Asp Leu Leu Thr Ala Asp Glu Val Leu Leu Ser Asp
740 745 750

Val Leu Gly Ala Ala Arg Ala Arg Lys Val Leu Ala Phe Leu Ser Asn
755 760 765

Ser Glu Lys Glu Asn Ser Ser Ser Asp Lys Thr Glu Glu Ile Pro Asp
770 775 780

Thr Gln Lys Ile Arg Gly Gln Ser Ser Trp Glu Asp Phe Gly Cys
785 790 795

<210> 22

<211> 1756

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 22

Met Met Ser Ile Ala Gln Val Arg Ser Ala Gly Ser Ala Gly Asn Tyr
1 5 10 15

Tyr Thr Asp Lys Asp Asn Tyr Tyr Val Leu Gly Ser Met Gly Glu Arg
 20 25 30

Trp Ala Gly Lys Gly Ala Glu Gln Leu Gly Leu Gln Gly Ser Val Asp
 35 40 45

Lys Asp Val Phe Thr Arg Leu Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp Gly Ala
 50 55 60

Asp Leu Ser Arg Met Gln Asp Gly Ser Asn Lys His Arg Pro Gly Tyr
 65 70 75 80

Asp Leu Thr Phe Ser Ala Pro Lys Ser Val Ser Met Met Ala Met Leu
 85 90 95

Gly Gly Asp Lys Arg Leu Ile Asp Ala His Asn Gln Ala Val Asp Phe
 100 105 110

[0039] Ala Val Arg Gln Val Glu Ala Leu Ala Ser Thr Arg Val Met Thr Asp
 115 120 125

Gly Gln Ser Glu Thr Val Leu Thr Gly Asn Leu Val Met Ala Leu Phe
 130 135 140

Asn His Asp Thr Ser Arg Asp Gln Glu Pro Gln Leu His Thr His Ala
 145 150 155 160

Val Val Ala Asn Val Thr Gln His Asn Gly Glu Trp Lys Thr Leu Ser
 165 170 175

Ser Asp Lys Val Gly Lys Thr Gly Phe Ile Glu Asn Val Tyr Ala Asn
 180 185 190

Gln Ile Ala Phe Gly Arg Leu Tyr Arg Glu Lys Leu Lys Glu Gln Val
 195 200 205

Glu Ala Leu Gly Tyr Glu Thr Glu Val Val Gly Lys His Gly Met Trp
 210 215 220

Glu Met Pro Gly Val Pro Val Glu Ala Phe Ser Gly Arg Ser Gln Ala
 225 230 235 240

Ile Arg Glu Ala Val Gly Glu Asp Ala Ser Leu Lys Ser Arg Asp Val
 245 250 255

Ala Ala Leu Asp Thr Arg Lys Ser Lys Gln His Val Asp Pro Glu Ile
 260 265 270

Arg Met Ala Glu Trp Met Gln Thr Leu Lys Glu Thr Gly Phe Asp Ile
 275 280 285

Arg Ala Tyr Arg Asp Ala Ala Asp Gln Arg Thr Glu Ile Arg Thr Gln
 290 295 300

Ala Pro Gly Pro Ala Ser Gln Asp Gly Pro Asp Val Gln Gln Ala Val
 305 310 315 320

[0040] Thr Gln Ala Ile Ala Gly Leu Ser Glu Arg Lys Val Gln Phe Thr Tyr
 325 330 335

Thr Asp Val Leu Ala Arg Thr Val Gly Ile Leu Pro Pro Glu Asn Gly
 340 345 350

Val Ile Glu Arg Ala Arg Ala Gly Ile Asp Glu Ala Ile Ser Arg Glu
 355 360 365

Gln Leu Ile Pro Leu Asp Arg Glu Lys Gly Leu Phe Thr Ser Gly Ile
 370 375 380

His Val Leu Asp Glu Leu Ser Val Arg Ala Leu Ser Arg Asp Ile Met
 385 390 395 400

Lys Gln Asn Arg Val Thr Val His Pro Glu Lys Ser Val Pro Arg Thr
 405 410 415

Ala Gly Tyr Ser Asp Ala Val Ser Val Leu Ala Gln Asp Arg Pro Ser
 420 425 430

Leu Ala Ile Val Ser Gly Gln Gly Gly Ala Ala Gly Gln Arg Glu Arg
 435 440 445

Val Ala Glu Leu Val Met Met Ala Arg Glu Gln Gly Arg Glu Val Gln
 450 455 460

Ile Ile Ala Ala Asp Arg Arg Ser Gln Met Asn Leu Lys Gln Asp Glu
 465 470 475 480

Arg Leu Ser Gly Glu Leu Ile Thr Gly Arg Arg Gln Leu Leu Glu Gly
 485 490 495

Met Ala Phe Thr Pro Gly Ser Thr Val Ile Val Asp Gln Gly Glu Lys
 500 505 510

Leu Ser Leu Lys Glu Thr Leu Thr Leu Leu Asp Gly Ala Ala Arg His
 515 520 525

[0041] Asn Val Gln Val Leu Ile Thr Asp Ser Gly Gln Arg Thr Gly Thr Gly
 530 535 540

Ser Ala Leu Met Ala Met Lys Asp Ala Gly Val Asn Thr Tyr Arg Trp
 545 550 555 560

Gln Gly Gly Glu Gln Arg Pro Ala Thr Ile Ile Ser Glu Pro Asp Arg
 565 570 575

Asn Val Arg Tyr Ala Arg Leu Ala Gly Asp Phe Ala Ala Ser Val Lys
 580 585 590

Ala Gly Glu Glu Ser Val Ala Gln Val Ser Gly Val Arg Glu Gln Ala
 595 600 605

Ile Leu Thr Gln Ala Ile Arg Ser Glu Leu Lys Thr Gln Gly Val Leu
 610 615 620

Gly His Pro Glu Val Thr Met Thr Ala Leu Ser Pro Val Trp Leu Asp
 625 630 635 640

Ser Arg Ser Arg Tyr Leu Arg Asp Met Tyr Arg Pro Gly Met Val Met
 645 650 655

Glu Gln Trp Asn Pro Glu Thr Arg Ser His Asp Arg Tyr Val Ile Asp
 660 665 670

Arg Val Thr Ala Gln Ser His Ser Leu Thr Leu Arg Asp Ala Gln Gly
 675 680 685

Glu Thr Gln Val Val Arg Ile Ser Ser Leu Asp Ser Ser Trp Ser Leu
 690 695 700

Phe Arg Pro Glu Lys Met Pro Val Ala Asp Gly Glu Arg Leu Arg Val
 705 710 715 720

Thr Gly Lys Ile Pro Gly Leu Arg Val Ser Gly Gly Asp Arg Leu Gln
 725 730 735

[0042] Val Ala Ser Val Ser Glu Asp Ala Met Thr Val Val Val Pro Gly Arg
 740 745 750

Ala Glu Pro Ala Ser Leu Pro Val Ser Asp Ser Pro Phe Thr Ala Leu
 755 760 765

Lys Leu Glu Asn Gly Trp Val Glu Thr Pro Gly His Ser Val Ser Asp
 770 775 780

Ser Ala Thr Val Phe Ala Ser Val Thr Gln Met Ala Met Asp Asn Ala
 785 790 795 800

Thr Leu Asn Gly Leu Ala Arg Ser Gly Arg Asp Val Arg Leu Tyr Ser
 805 810 815

Ser Leu Asp Glu Thr Arg Thr Ala Glu Lys Leu Ala Arg His Pro Ser
 820 825 830

Phe Thr Val Val Ser Glu Gln Ile Lys Ala Arg Ala Gly Glu Thr Leu
 835 840 845

Leu Glu Thr Ala Ile Ser Leu Gln Lys Ala Gly Leu His Thr Pro Ala
 850 855 860

Gln Gln Ala Ile His Leu Ala Leu Pro Val Leu Glu Ser Lys Asn Leu
 865 870 875 880

Ala Phe Ser Met Val Asp Leu Leu Thr Glu Ala Lys Ser Phe Ala Ala
 885 890 895

Glu Gly Thr Gly Phe Thr Glu Leu Gly Gly Glu Ile Asn Ala Gln Ile
 900 905 910

Lys Arg Gly Asp Leu Leu Tyr Val Asp Val Ala Lys Gly Tyr Gly Thr
 915 920 925

Gly Leu Leu Val Ser Arg Ala Ser Tyr Glu Ala Glu Lys Ser Ile Leu
 930 935 940

[0043] Arg His Ile Leu Glu Gly Lys Glu Ala Val Thr Pro Leu Met Glu Arg
 945 950 955 960

Val Pro Gly Glu Leu Met Glu Thr Leu Thr Ser Gly Gln Arg Ala Ala
 965 970 975

Thr Arg Met Ile Leu Glu Thr Ser Asp Arg Phe Thr Val Val Gln Gly
 980 985 990

Tyr Ala Gly Val Gly Lys Thr Thr Gln Phe Arg Ala Val Met Ser Ala
 995 1000 1005

Val Asn Met Leu Pro Ala Ser Glu Arg Pro Arg Val Val Gly Leu
 1010 1015 1020

Gly Pro Thr His Arg Ala Val Gly Glu Met Arg Ser Ala Gly Val
 1025 1030 1035

Asp Ala Gln Thr Leu Ala Ser Phe Leu His Asp Thr Gln Leu Gln
 1040 1045 1050

Gln Arg Ser Gly Glu Thr Pro Asp Phe Ser Asn Thr Leu Phe Leu
1055 1060 1065

Leu Asp Glu Ser Ser Met Val Gly Asn Thr Glu Met Ala Arg Ala
1070 1075 1080

Tyr Ala Leu Ile Ala Ala Gly Gly Gly Arg Ala Val Ala Ser Gly
1085 1090 1095

Asp Thr Asp Gln Leu Gln Ala Ile Ala Pro Gly Gln Ser Phe Arg
1100 1105 1110

Leu Gln Gln Thr Arg Ser Ala Ala Asp Val Val Ile Met Lys Glu
1115 1120 1125

Ile Val Arg Gln Thr Pro Glu Leu Arg Glu Ala Val Tyr Ser Leu
1130 1135 1140

[0044] Ile Asn Arg Asp Val Glu Arg Ala Leu Ser Gly Leu Glu Ser Val
1145 1150 1155

Lys Pro Ser Gln Val Pro Arg Leu Glu Gly Ala Trp Ala Pro Glu
1160 1165 1170

His Ser Val Thr Glu Phe Ser His Ser Gln Glu Ala Lys Leu Ala
1175 1180 1185

Glu Ala Gln Gln Lys Ala Met Leu Lys Gly Glu Ala Phe Pro Asp
1190 1195 1200

Ile Pro Met Thr Leu Tyr Glu Ala Ile Val Arg Asp Tyr Thr Gly
1205 1210 1215

Arg Thr Pro Glu Ala Arg Glu Gln Thr Leu Ile Val Thr His Leu
1220 1225 1230

Asn Glu Asp Arg Arg Val Leu Asn Ser Met Ile His Asp Ala Arg
1235 1240 1245

	Glu Lys Ala Gly Glu Leu Gly Lys Glu Gln Val Met Val Pro Val	
	1250	1255 1260
	Leu Asn Thr Ala Asn Ile Arg Asp Gly Glu Leu Arg Arg Leu Ser	
	1265	1270 1275
	Thr Trp Glu Lys Asn Pro Asp Ala Leu Ala Leu Val Asp Asn Val	
	1280	1285 1290
	Tyr His Arg Ile Ala Gly Ile Ser Lys Asp Asp Gly Leu Ile Thr	
	1295	1300 1305
	Leu Gln Asp Ala Glu Gly Asn Thr Arg Leu Ile Ser Pro Arg Glu	
	1310	1315 1320
	Ala Val Ala Glu Gly Val Thr Leu Tyr Thr Pro Asp Lys Ile Arg	
	1325	1330 1335
[0045]	Val Gly Thr Gly Asp Arg Met Arg Phe Thr Lys Ser Asp Arg Glu	
	1340	1345 1350
	Arg Gly Tyr Val Ala Asn Ser Val Trp Thr Val Thr Ala Val Ser	
	1355	1360 1365
	Gly Asp Ser Val Thr Leu Ser Asp Gly Gln Gln Thr Arg Val Ile	
	1370	1375 1380
	Arg Pro Gly Gln Glu Arg Ala Glu Gln His Ile Asp Leu Ala Tyr	
	1385	1390 1395
	Ala Ile Thr Ala His Gly Ala Gln Gly Ala Ser Glu Thr Phe Ala	
	1400	1405 1410
	Ile Ala Leu Glu Gly Thr Glu Gly Asn Arg Lys Leu Met Ala Gly	
	1415	1420 1425
	Phe Glu Ser Ala Tyr Val Ala Leu Ser Arg Met Lys Gln His Val	
	1430	1435 1440

	Gln Val Tyr Thr Asp Asn Arg	Gln Gly Trp Thr Asp	Ala Ile Asn
	1445	1450	1455
	Asn Ala Val Gln Lys Gly Thr	Ala His Asp Val Leu	Glu Pro Lys
	1460	1465	1470
	Pro Asp Arg Glu Val Met Asn	Ala Gln Arg Leu Phe	Ser Thr Ala
	1475	1480	1485
	Arg Glu Leu Arg Asp Val Ala	Ala Gly Arg Ala Val	Leu Arg Gln
	1490	1495	1500
	Ala Gly Leu Ala Gly Gly Asp	Ser Pro Ala Arg Phe	Ile Ala Pro
	1505	1510	1515
	Gly Arg Lys Tyr Pro Gln Pro	Tyr Val Ala Leu Pro	Ala Phe Asp
	1520	1525	1530
[0046]	Arg Asn Gly Lys Ser Ala Gly	Ile Trp Leu Asn Pro	Leu Thr Thr
	1535	1540	1545
	Asp Asp Gly Asn Gly Leu Arg	Gly Phe Ser Gly Glu	Gly Arg Val
	1550	1555	1560
	Lys Gly Ser Gly Asp Ala Gln	Phe Val Ala Leu Gln	Gly Ser Arg
	1565	1570	1575
	Asn Gly Glu Ser Leu Leu Ala	Asp Asn Met Gln Asp	Gly Val Arg
	1580	1585	1590
	Ile Ala Arg Asp Asn Pro Asp	Ser Gly Val Val Val	Arg Ile Ala
	1595	1600	1605
	Gly Glu Gly Arg Pro Trp Asn	Pro Gly Ala Ile Thr	Gly Gly Arg
	1610	1615	1620
	Val Trp Gly Asp Ile Pro Asp	Asn Ser Val Gln Pro	Gly Ala Gly
	1625	1630	1635

Asn Gly Glu Pro Val Thr Ala Glu Val Leu Ala Gln Arg Gln Ala
1640 1645 1650

Glu Glu Ala Ile Arg Arg Glu Thr Glu Arg Arg Ala Asp Glu Ile
1655 1660 1665

Val Arg Lys Met Ala Glu Asn Lys Pro Asp Leu Pro Asp Gly Lys
1670 1675 1680

Thr Glu Leu Ala Val Arg Asp Ile Ala Gly Gln Glu Arg Asp Arg
1685 1690 1695

Ser Ala Ile Ser Glu Arg Glu Thr Ala Leu Pro Glu Ser Val Leu
1700 1705 1710

Arg Glu Ser Gln Arg Glu Arg Glu Ala Val Arg Glu Val Ala Arg
1715 1720 1725

[0047] Glu Asn Leu Leu Gln Glu Arg Leu Gln Gln Met Glu Arg Asp Met
1730 1735 1740

Val Arg Asp Leu Gln Lys Glu Lys Thr Leu Gly Gly Asp
1745 1750 1755

<210> 23

<211> 726

<212> PRT

<213> 布氏拟甲烷球菌

<400> 23

Met Ser Asp Lys Pro Ala Phe Met Lys Tyr Phe Thr Gln Ser Ser Cys
1 5 10 15

Tyr Pro Asn Gln Gln Glu Ala Met Asp Arg Ile His Ser Ala Leu Met
20 25 30

Gln Gln Gln Leu Val Leu Phe Glu Gly Ala Cys Gly Thr Gly Lys Thr
35 40 45

Leu Ser Ala Leu Val Pro Ala Leu His Val Gly Lys Met Leu Gly Lys
 50 55 60

Thr Val Ile Ile Ala Thr Asn Val His Gln Gln Met Val Gln Phe Ile
 65 70 75 80

Asn Glu Ala Arg Asp Ile Lys Lys Val Gln Asp Val Lys Val Ala Val
 85 90 95

Ile Lys Gly Lys Thr Ala Met Cys Pro Gln Glu Ala Asp Tyr Glu Glu
 100 105 110

Cys Ser Val Lys Arg Glu Asn Thr Phe Glu Leu Met Glu Thr Glu Arg
 115 120 125

Glu Ile Tyr Leu Lys Arg Gln Glu Leu Asn Ser Ala Arg Asp Ser Tyr
 130 135 140

[0048] Lys Lys Ser His Asp Pro Ala Phe Val Thr Leu Arg Asp Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Lys Glu Ile Asp Ala Val Glu Glu Lys Ala Arg Gly Leu Arg Asp Arg
 165 170 175

Ala Cys Asn Asp Leu Tyr Glu Val Leu Arg Ser Asp Ser Glu Lys Phe
 180 185 190

Arg Glu Trp Leu Tyr Lys Glu Val Arg Ser Pro Glu Glu Ile Asn Asp
 195 200 205

His Ala Ile Lys Asp Gly Met Cys Gly Tyr Glu Leu Val Lys Arg Glu
 210 215 220

Leu Lys His Ala Asp Leu Leu Ile Cys Asn Tyr His His Val Leu Asn
 225 230 235 240

Pro Asp Ile Phe Ser Thr Val Leu Gly Trp Ile Glu Lys Glu Pro Gln
 245 250 255

Glu Thr Ile Val Ile Phe Asp Glu Ala His Asn Leu Glu Ser Ala Ala
 260 265 270

Arg Ser His Ser Ser Leu Ser Leu Thr Glu His Ser Ile Glu Lys Ala
 275 280 285

Ile Thr Glu Leu Glu Ala Asn Leu Asp Leu Leu Ala Asp Asp Asn Ile
 290 295 300

His Asn Leu Phe Asn Ile Phe Leu Glu Val Ile Ser Asp Thr Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Arg Phe Lys Phe Gly Glu Arg Glu Arg Val Arg Lys Asn Trp Tyr
 325 330 335

Asp Ile Arg Ile Ser Asp Pro Tyr Glu Arg Asn Asp Ile Val Arg Gly
 340 345 350

[0049] Lys Phe Leu Arg Gln Ala Lys Gly Asp Phe Gly Glu Lys Asp Asp Ile
 355 360 365

Gln Ile Leu Leu Ser Glu Ala Ser Glu Leu Gly Ala Lys Leu Asp Glu
 370 375 380

Thr Tyr Arg Asp Gln Tyr Lys Lys Gly Leu Ser Ser Val Met Lys Arg
 385 390 395 400

Ser His Ile Arg Tyr Val Ala Asp Phe Met Ser Ala Tyr Ile Glu Leu
 405 410 415

Ser His Asn Leu Asn Tyr Tyr Pro Ile Leu Asn Val Arg Arg Asp Met
 420 425 430

Asn Asp Glu Ile Tyr Gly Arg Val Glu Leu Phe Thr Cys Ile Pro Lys
 435 440 445

Asn Val Thr Glu Pro Leu Phe Asn Ser Leu Phe Ser Val Ile Leu Met
 450 455 460

Ser Ala Thr Leu His Pro Phe Glu Met Val Lys Lys Thr Leu Gly Ile
 465 470 475 480

Thr Arg Asp Thr Cys Glu Met Ser Tyr Gly Thr Ser Phe Pro Glu Glu
 485 490 495

Lys Arg Leu Ser Ile Ala Val Ser Ile Pro Pro Leu Phe Ala Lys Asn
 500 505 510

Arg Asp Asp Arg His Val Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Leu Asp
 515 520 525

Ser Ile Glu Asn Ser Lys Gly Asn Val Ile Leu Phe Phe Gln Ser Ala
 530 535 540

Phe Glu Ala Lys Arg Tyr Tyr Ser Lys Ile Glu Pro Leu Val Asn Val
 545 550 555 560

[0050] Pro Val Phe Leu Asp Glu Val Gly Ile Ser Ser Gln Asp Val Arg Glu
 565 570 575

Glu Phe Phe Ser Ile Gly Glu Glu Asn Gly Lys Ala Val Leu Leu Ser
 580 585 590

Tyr Leu Trp Gly Thr Leu Ser Glu Gly Ile Asp Tyr Arg Asp Gly Arg
 595 600 605

Gly Arg Thr Val Ile Ile Ile Gly Val Gly Tyr Pro Ala Leu Asn Asp
 610 615 620

Arg Met Asn Ala Val Glu Ser Ala Tyr Asp His Val Phe Gly Tyr Gly
 625 630 635 640

Ala Gly Trp Glu Phe Ala Ile Gln Val Pro Thr Ile Arg Lys Ile Arg
 645 650 655

Gln Ala Met Gly Arg Val Val Arg Ser Pro Thr Asp Tyr Gly Ala Arg
 660 665 670

Ile Leu Leu Asp Gly Arg Phe Leu Thr Asp Ser Lys Lys Arg Phe Gly
 675 680 685

Lys Phe Ser Val Phe Glu Val Phe Pro Pro Ala Glu Arg Ser Glu Phe
 690 695 700

Val Asp Val Asp Pro Glu Lys Val Lys Tyr Ser Leu Met Asn Phe Phe
 705 710 715 720

Met Asp Asn Asp Glu Gln
 725

- <210> 24
- <211> 555
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> MspA-(B2C)

<400> 24

[0051]

atgggtcttg ataatgaaet gagectggtg gacggtaag atcgtaccet gacggtgcaa 60
 caatgggata cctttctgaa tggegttttt ccgctggatc gtaatcgeet gaccctgaa 120
 tggtttcatt cggtegegc aaaatatatc gtcgcaggcc cgggtgctga cgaattcgaa 180
 ggcacgctgg aactgggta tcagattggc ttccctgggt caetgagcgt tagtatcaac 240
 ttctegtaca ccacccgaa tattaacatc aacaatggta acattaccgc accgccgttt 300
 ggctgaaca gcgtgattac gccgaacctg ttcccggtg ttagcatctc tgcccgtctg 360
 ggcaatggtc cgggcattcg cgaagtggca accttttagtg tgccgcttcc cggcgctaaa 420
 ggccgctcgc cgggtcttaa cggccacggc accgttacgg gcggggccgg cgggtgctctg 480
 ctgctcctct tcggcgcct gattgcctct accggcgaca gcgttaagac ctatggcgaa 540
 ccgtggaata tgaac 555

- <210> 25
- <211> 185
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

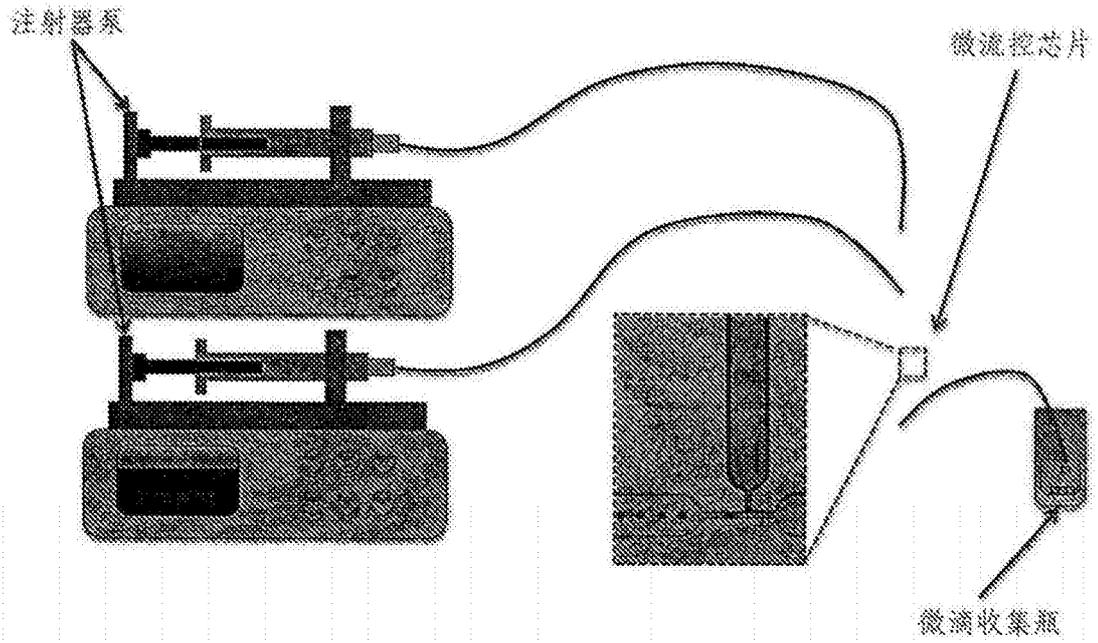


图1

6-33-6 (Polymersource) 在AR20油中

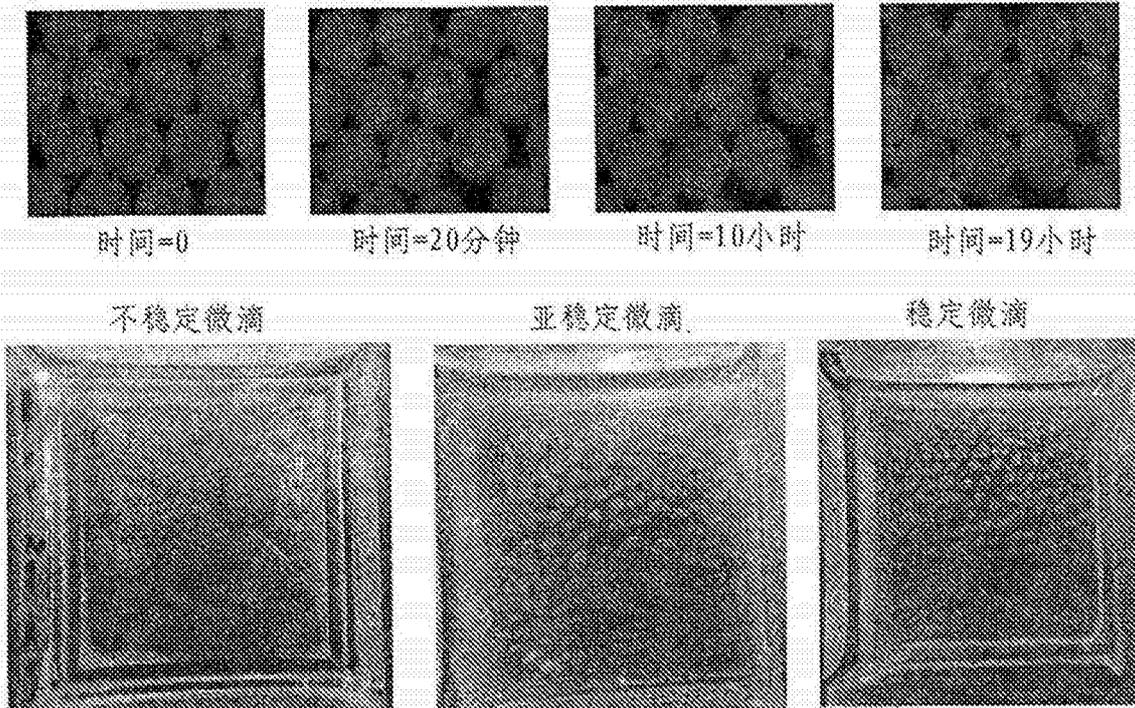


图2

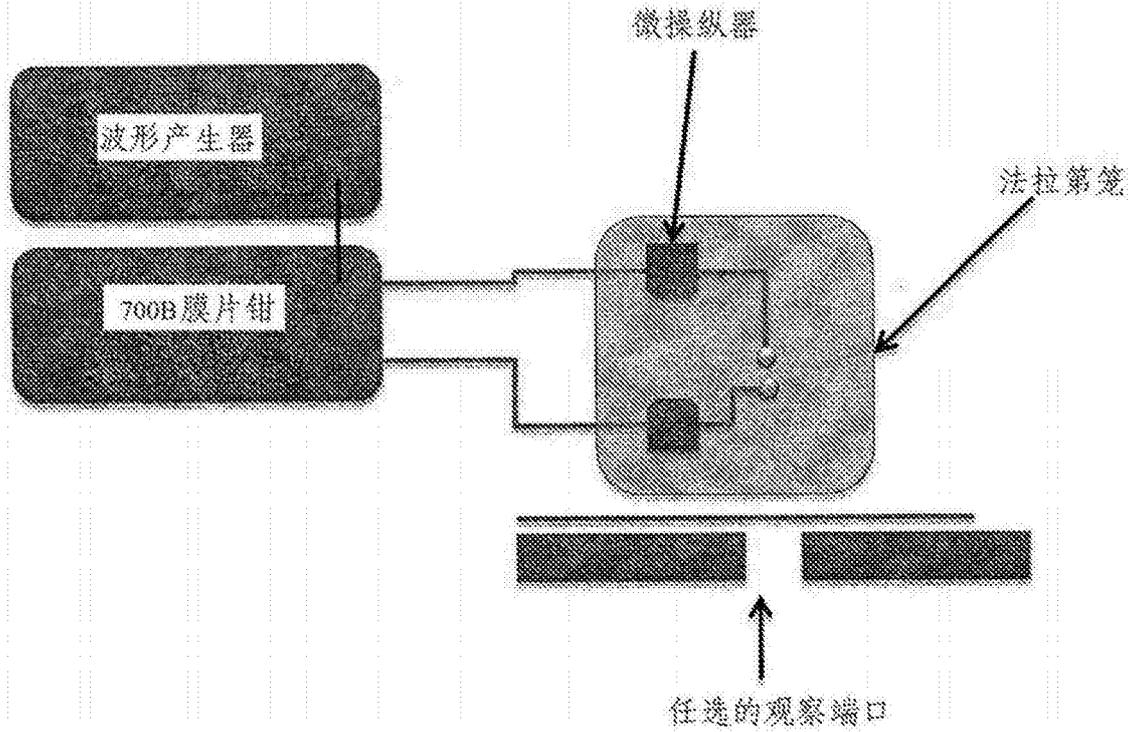


图3

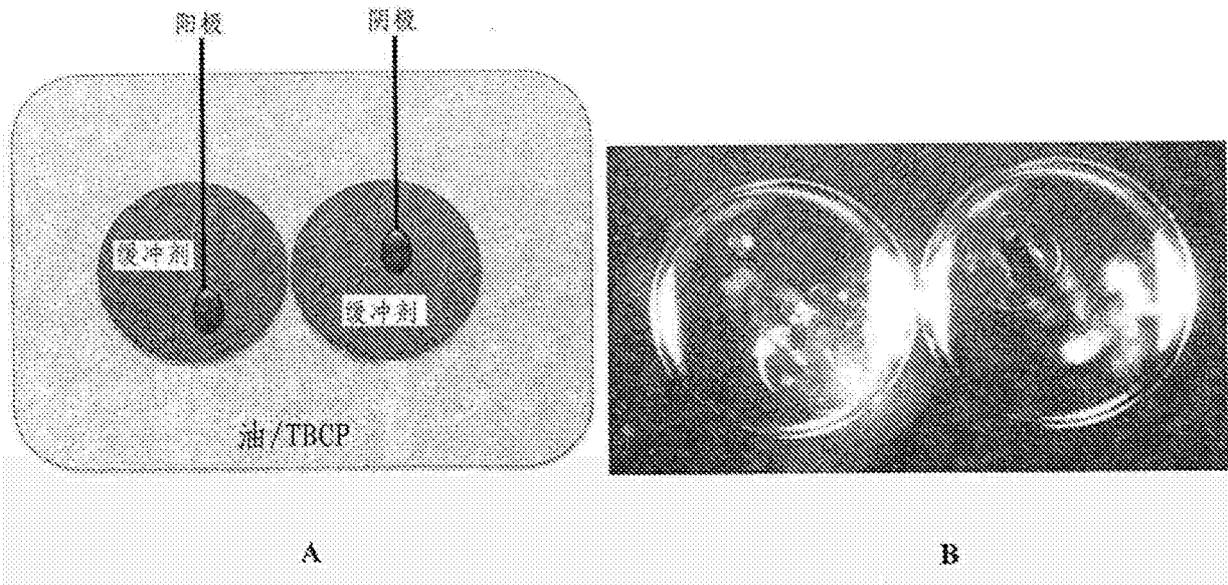


图4

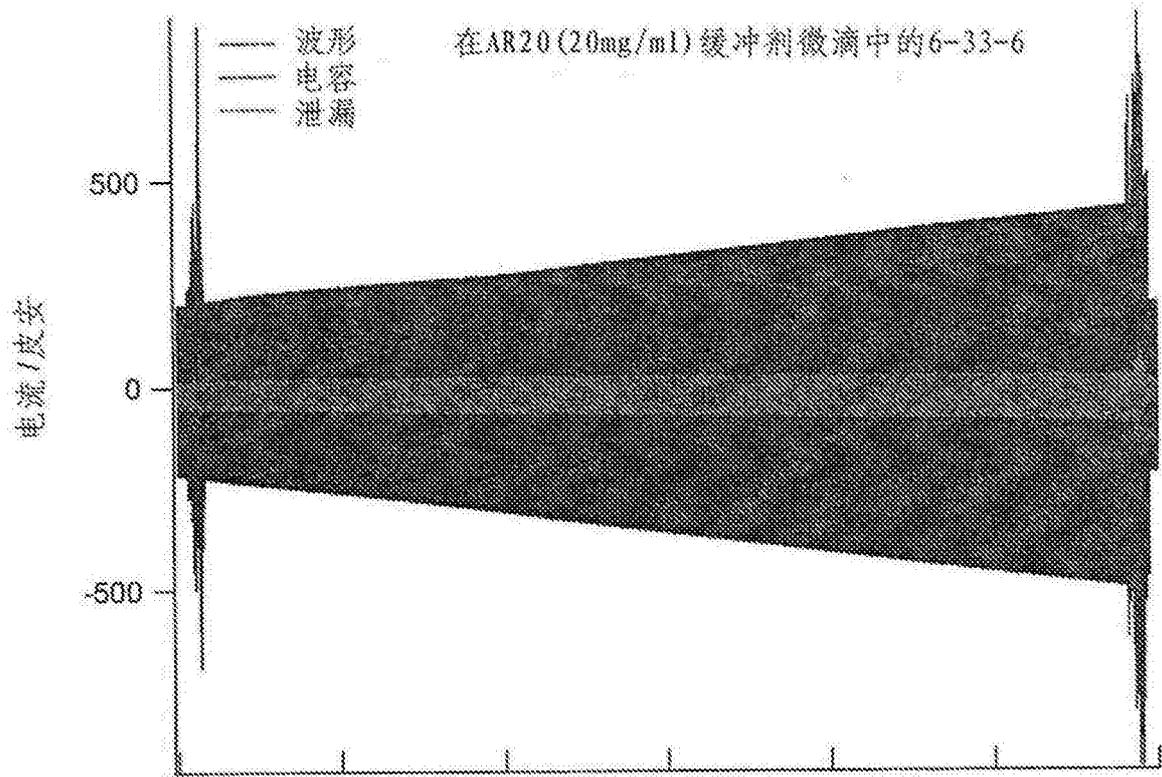


图5

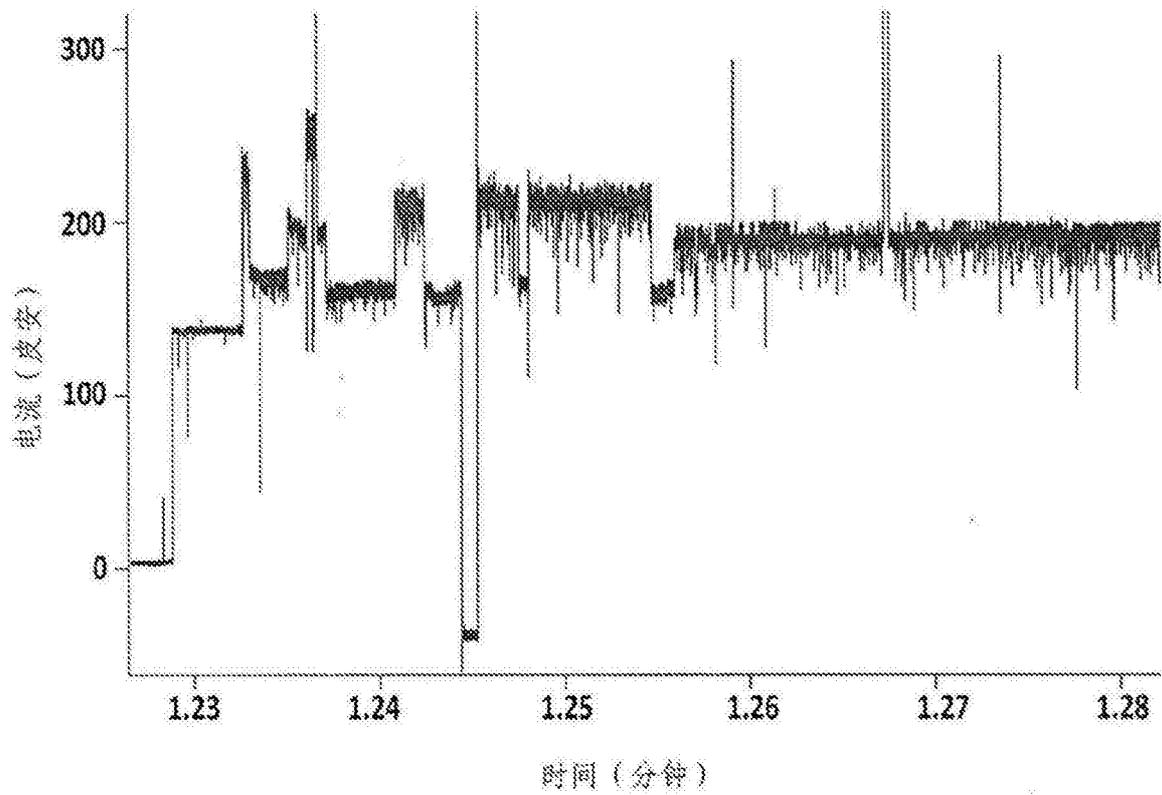
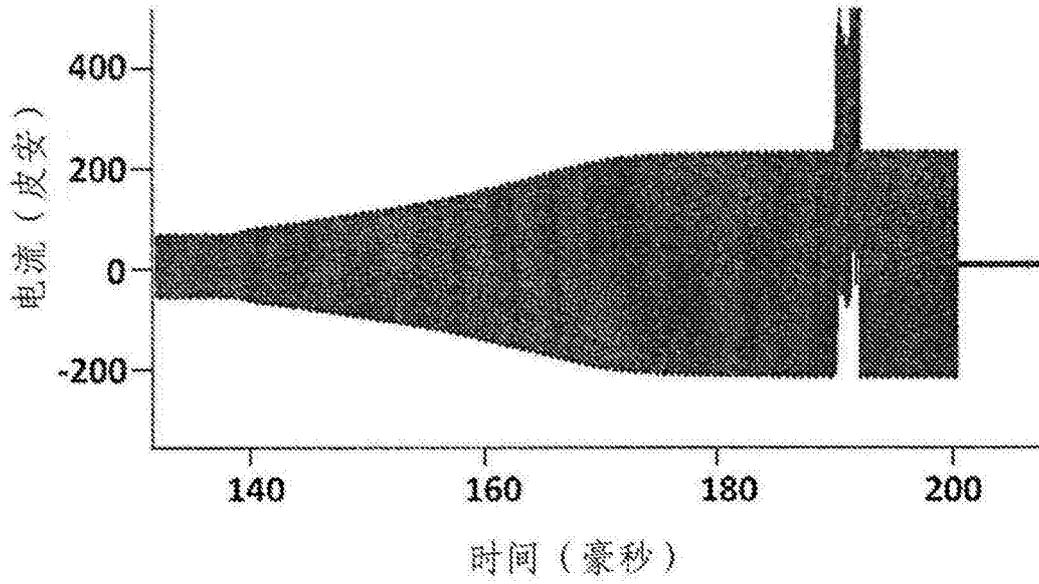
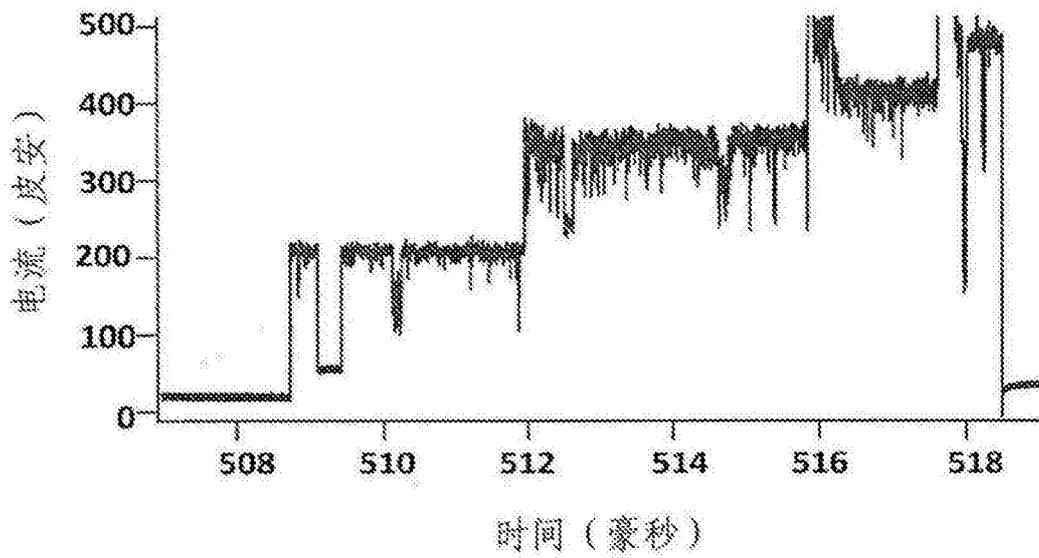


图6



A



B

图7