



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102317310 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 11

- 
- (21) 申请号 200980154651. 3 *C12Q 1/68* (2006. 01)
- (22) 申请日 2009. 11. 13 *G01N 33/68* (2006. 01)
- (30) 优先权数据 *G01N 27/06* (2006. 01)  
0820927. 2 2008. 11. 14 GB
- (85) PCT申请进入国家阶段日  
2011. 07. 14
- (86) PCT申请的申请数据  
PCT/GB2009/002666 2009. 11. 13
- (87) PCT申请的公布数据  
W02010/055307 EN 2010. 05. 20
- (71) 申请人 ISIS 创新有限公司  
地址 英国牛津
- (72) 发明人 G·玛格里亚 J·H·P·贝利
- (74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限  
公司 11285  
代理人 张广育 胡洪慧
- (51) Int. Cl.  
*C07K 14/31* (2006. 01)  
*C12N 15/31* (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 41 页 附图 15 页

---

(54) 发明名称  
增强荷电分析物穿过跨膜蛋白孔的移位的方法

(57) 摘要

本发明涉及增强荷电分析物通过跨膜蛋白孔的移位。移位是通过增加所述孔的桶或通道和 / 或入口的净相反电荷来增强。本发明还涉及根据本发明增强的孔。

1. 一种增强荷电分析物穿过跨膜蛋白孔的移位的方法,所述方法包括:
  - (a) 增加所述孔的桶或通道和 / 或入口的净相反电荷 ;并且
  - (b) 确定所述分析物穿过所述孔的移位是否被增强。
2. 权利要求 1 的方法,其中增加净相反电荷会增加所述分析物穿过所述孔的移位频率。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中增加净相反电荷会降低用于所述分析物穿过所述孔的移位阈值电压。
4. 前述权利要求任一项的方法,其中增加净相反电荷会降低所述分析物穿过所述孔的移位速度。
5. 前述权利要求任一项的方法,其中增加净相反电荷会降低所述分析物和所述孔之间非移位相互作用的数目。
6. 前述权利要求任一项的方法,其中所述分析物是多聚物。
7. 前述权利要求任一项的方法,其中所述分析物是核酸序列
8. 前述权利要求任一项的方法,其中所述孔包含 7 个亚基,所述每个亚基含有 SEQ ID NO :2 或其变体。
9. 权利要求 1-7 任一项的方法,其中所述孔包含 7 个亚基,所述每个亚基包含 SEQ ID NO :4 或其变体。
10. 前述权利要求任一项的方法,其中所述分析物荷负电并且步骤 (a) 包括增加所述净正电荷。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述净正电荷是通过将一个或多个荷正电的氨基酸引入所述孔的桶或通道和 / 或入口中来增加。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述引入通过置换进行。
13. 权利要求 12 的方法,其中所述一个或多个荷正电的氨基酸是组氨酸 (H)、赖氨酸 (K) 和 / 或精氨酸 (R)。
14. 权利要求 10 的方法,其中所述净正电荷是通过用一个或多个不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸置换所述孔的桶或通道和 / 或入口中的荷负电的氨基酸来增加。
15. 前述权利要求任一项的方法,其中所述入口是分析物进入所述桶或通道时所穿过的所述孔的部分。
16. 所述跨膜蛋白孔的桶或通道和 / 或入口的净相反电荷的增加用于增强荷电分析物穿过所述孔的移位的用途。
17. 一种权利要求 1-15 任一项的方法增强的跨膜蛋白孔。
18. 一种跨膜蛋白孔,其中它的桶或通道和 / 或入口的净相反电荷已被增加,以增强荷电分析物穿过所述孔的移位。
19. 权利要求 17 或 18 的跨膜蛋白孔,其中所述孔包含:
  - (a) 至少一个包含 SEQ ID NO :6 或其变体的亚基 ;
  - (b) 至少一个包含 SEQ ID NO :8 或其变体的亚基 ;或
  - (c) 至少一个包含 SEQ ID NO :10 或其变体的亚基。
20. 权利要求 19 的跨膜蛋白孔,其中所述孔是包含 7 个亚基的同七聚体,所述亚基为

SEQ ID NO :6、8 或 10 或它们的变体。

21. 编码权利要求 17-20 任一项的跨膜蛋白孔的多核苷酸。

22. 编码具有 SEQ ID NO :6、8 或 10 或它们的变体序列的跨膜蛋白孔亚基的多核苷酸。

23. 权利要求 22 的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含 SEQ ID NO :5、7 或 9 或它们的变体中显示的序列。

24. 一种确定样本中是否存在分析物的方法,包括:

(a) 将所述样本与权利要求 17-20 任一项的跨膜蛋白孔在如下条件下接触:如果存在所述分析物则使其移位穿过所述孔并与所述孔相互作用;并且

(b) 在所述相互作用过程中测量通过所述孔的电流,从而确定所述分析物是否存在。

25. 一种测序目标核酸序列的方法,包括:

(a) 将所述目标核酸推过或拉过权利要求 17-20 任一项的跨膜蛋白孔,使得所述目标序列中的一部分核苷酸与所述孔相互作用;并且

(b) 在每个相互作用过程中测量通过所述孔的电流,从而确定目标序列的序列。

26. 一种用于测序核酸的试剂盒,包含权利要求 17-20 任一项的跨膜蛋白孔和核酸处理酶。

## 增强荷电分析物穿过跨膜蛋白孔的移位的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及增强荷电分析物穿过跨膜蛋白孔的移位 (translocation)。移位是通过增加所述孔的桶或通道和 / 或入口的净相反电荷来进行增强。本发明还涉及根据本发明增强的孔。

### 背景技术

[0002] 随机检测是一种依赖于对分析物分子与受体之间个体结合事件的观察结果的传感方法。随机传感器可通过如下方式形成：将纳米尺寸的单孔置入绝缘膜中，并且在存在分析物分子的情况下测量电压驱动的穿过所述孔的离子转运。电流波动的发生频率可揭示在所述孔中结合的分析物的浓度。分析物的种类是通过其特征性电流特征，特别是电流阻断的持续时间和程度而揭示 (Braha, O., Walker, B., Cheley, S., Kasianowicz, J. J., Song, L., Gouaux, J. E., and Bayley, H. (1997) *Chem. Biol.* 4, 497-505 ;and Bayley, H., and Cremer, P. S. (2001) *Nature* 413, 226-230)。

[0003] 形成细菌孔的毒素  $\alpha$ -溶血素 ( $\alpha$ -HL) 的基因工程改造形式已用于对许多类型的分子进行的随机检测 (Bayley, H., and Cremer, P. S. (2001) *Nature* 413, 226-230 ;Shin, S.-H., Luchian, T., Cheley, S., Braha, O., and Bayley, H. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 3707-3709 ;Guan, X., Gu, L.-Q., Cheley, S., Braha, O., and Bayley, H. (2005) *ChemBioChem* 6, 1875-1881)。在这些研究的过程中，已发现，对  $\alpha$ -HL 进行改造以直接结合小的有机分析物的尝试是很费力的，并且鲜有成功的实例 (Guan, X., Gu, L.-Q., Cheley, S., Braha, O., and Bayley, H. (2005) *ChemBioChem* 6, 1875-1881)。

### 发明内容

[0004] 当分析物移位穿过跨膜蛋白孔时，它们能够以该分析物特异性的方式影响流经所述孔的电流。这使得能够使用随机传感来检测所述分析物。所述分析物一般通过与所述孔相互作用来影响流经所述孔的电流。每当所述分析物与所述孔相互作用时就有特征性电流流经所述孔。

[0005] 发明人意外地证明了增加孔的桶或通道和 / 或入口的净相反电荷可增强荷电分析物移位通过所述孔。例如，增加孔的桶或通道和 / 或入口的净正电荷可增强荷负电分析物穿过所述孔的移位。增加所述桶或通道和 / 或入口的净相反电荷可增加荷电分析物穿过所述孔的移位频率。它还可降低所述分析物穿过所述孔的移位阈值电压。它还可降低所述分析物移位穿过所述孔的移位速度。此外，其中所述分析物进入所述孔但未被移位的事件几乎被消除。以该方式增强的孔是可用于对荷电分析物的随机传感的有用工具，尤其是用于测序核酸。

[0006] 因此，本发明提供了一种增强荷电分析物移位穿过跨膜蛋白孔的方法，所述方法包括：

[0007] (a) 增加所述孔的桶或通道和 / 或入口的净相反电荷；并且

- [0008] (b) 确定所述分析物穿过所得孔的移位是否被增强。
- [0009] 本发明还提供了：
- [0010] - 跨膜蛋白孔的桶或通道和 / 或入口的净相反电荷的增加用于增强荷电分析物穿过所述孔的移位的用途；
- [0011] - 一种由本发明的方法增强的跨膜蛋白孔；
- [0012] - 一种跨膜蛋白孔, 其中所述桶或通道和 / 或入口的净相反电荷已被增加以增强荷电分析物穿过所述孔的移位；
- [0013] - 编码本发明的跨膜蛋白孔的多核苷酸；
- [0014] - 编码具有序列 SEQ ID NO :6、8 或 10 或者它们的变体序列的跨膜蛋白孔亚基的多核苷酸；
- [0015] - 一种确定在样本中是否存在分析物的方法, 所述方法包括
- [0016] (a) 使所述样本与本发明的跨膜蛋白孔在以下条件下接触: 允许所述分析物 (若存在) 移位穿过所述孔并与所述孔相互作用; 并且
- [0017] (b) 测量在相互作用过程中通过所述孔的电流, 从而确定所述分析物的是否存在;
- [0018] - 一种测序目标核酸序列的方法, 包括:
- [0019] (a) 将所述目标序列推过或拉过本发明的跨膜蛋白孔, 使所述目标序列中的一部分核苷酸与所述孔相互作用; 并且
- [0020] (b) 测量在每个相互作用过程中通过所述孔的电流, 从而确定所述目标序列的序列; 以及
- [0021] - 一种测序核酸的试剂盒, 包含本发明的跨膜蛋白孔和核酸处理酶 (nucleic acid handling enzyme)。

#### 附图说明

[0022] 图 1 示出了通过  $\alpha$ -溶血素 ( $\alpha$ -HL) 纳米孔 (PDB :7AHL) 的截面。(a) 所述 WT  $\alpha$ -HL 纳米孔中的电荷分布。 $\alpha$ -HL 的荷正电氨基酸被涂成蓝色, 荷负电氨基酸被涂成红色。(b) 在该工作中被修饰的  $\alpha$ -HL 纳米孔中的位点。Lys-8 为紫色。由离子对 Glu-111/Lys-147 形成的缩窄处 (constriction) 被涂成绿色。Met-113、Thr-115、Thr-117、Gly-119、Asn-121、Asn-123 和 Thr-125 被涂成橙色。

[0023] 图 2 示出了在 +120mV 下 DNA 穿过所述  $\alpha$ -HL 孔的移位。(a) DNA 与所述 WT  $\alpha$ -HL 孔的五种类型的相互作用。A 类型事件: 简单低振幅事件 (被解释为 DNA 直接通过所述孔); B 类型: 简单中振幅事件 (DNA 被捕获在前厅 (vestibule) 中并从入口一侧——顺侧——出孔); C 类型: 在同一事件中的中振幅信号, 之后是低振幅信号 (DNA 先停留在前厅中, 之后通过所述  $\beta$  桶从反侧出去); D 类型: 在同一事件中的中低振幅信号, 之后是中振幅信号 (DNA 直接进入  $\beta$  桶, 然后缩回前厅并从顺侧出孔); E 类型: 在同一事件中的中振幅信号, 之后是低振幅信号, 之后是第二中振幅信号 (DNA 进入前厅, 穿过  $\beta$  桶, 但又缩回至前厅并从顺侧出孔)。(b) 事件柱状图, 显示 2500 个事件的平均残余电流, 表示为穿过 WT  $\alpha$ -HL 孔的开孔电流的分数。代表 A 类型和 B 类型事件的峰被标识。特征为其平均事件电流的 C、D 和 E 类型事件出现在所述两个主峰之间。(c) A 类型事件的 DNA 移位时间的柱状图。

DNA (0.95  $\mu$  M) 在 1M KCl、100  $\mu$  M EDTA、25mM Tris.HCl (pH 8.0) 中从所述顺侧腔室呈现。

[0024] 图 3 示出了通过突变引入或除去的荷电侧链对 +120mV 下 DNA 移位频率的作用。(a)M113R-WT (0.46  $\mu$  M DNA, 顺侧), (b)E111N-WT (0.47  $\mu$  M), (c)WT (0.53  $\mu$  M), (d)M113R-RL2 (0.74  $\mu$  M), (e)RL2 (0.60  $\mu$  M) 和 (f)M113D-RL2 (2.0  $\mu$  M)。M113D-RL2 显示出在最高达 +300mV 下无电流阻断。其他条件记载在图 2 的说明中。

[0025] 图 4 示出了  $\alpha$ -HL 的  $\beta$  桶中的精氨酸置换对 DNA 在 +120mV 下穿过所述孔的移位频率的作用。DNA 移位的频率被标准化为 1  $\mu$  M DNA。线是 DNA 移位频率相对于表示为残基数目的精氨酸置换距缩窄处的距离的单指数拟合。所述突变以所述 RL2 为背景。其他条件记载在图 2 的说明中。

[0026] 图 5 示出了 DNA 捕获率的电压依赖性。将所述 DNA 移位频率以对数标度绘图并且标准化为 1  $\mu$  M DNA。仅所述移位事件 (即 A 类型和 C 类型) 包含在所述分析中。M113R-WT (红圈)、E111N-WT (蓝色菱形)、M113R-RL2 (黑方块)、WT (绿色下三角) 和 RL2 (蓝色上三角)。所述线示出了用方程式 1 对数据的拟合。

[0027] 图 6 示出了 DNA 穿过所述  $\alpha$ -HL 孔的移位的模型。为了穿过所述孔 (V), DNA 必须首先与所述孔的顺侧入口碰撞 (II), 被转运穿过所述前厅 (III) 并且进入所述  $\beta$  桶 (IV)。所述 DNA 可延长它在所述前厅中的停留时间并且产生对应于 VI 和 VII 的中振幅和低振幅事件。可通过实验方法观察到的过程被标识为事件并且用慢的事件间速率显示。除移位外, 所有步骤都是可逆的。在 A 类型事件中, DNA 与所述孔碰撞, 进入所述前厅, 然后直接移位穿过所述  $\beta$  桶, 从所述孔的反侧出去。在该过程中对所述桶 (III  $\leftrightarrow$  IV) 的采样太快而无法观察。在 B 类型事件中, DNA 进入所述孔, 但不穿过所述  $\beta$  桶, 它与前厅进行长时间的相互作用以产生所述中振幅事件 (I  $\rightarrow$  II  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  VI)。在这种情况下, DNA 从其进入时的同一顺侧入口出孔 (VI  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  II  $\rightarrow$  I)。如 B 类型事件一样, C 类型事件首先显示出中振幅电流 ((I  $\rightarrow$  II  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  VI), 但是之后 DNA 的一个末端进入所述  $\beta$  桶 (VII) 并且出现移位事件 (VII  $\rightarrow$  V  $\rightarrow$  I)。在 D 类型事件中, 所述 DNA 最可能进入所述  $\beta$  桶 (I  $\rightarrow$  II  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  IV), 但随后停止移位 (VII), 缩回到所述前厅中 (VI) 并且从顺侧出孔 (VI  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  II  $\rightarrow$  I)。最后, 在 E 类型事件中, 所述 DNA 如在 C 类型事件中所述开始移位通过所述  $\beta$  桶 (I  $\rightarrow$  II  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  VI  $\rightarrow$  VII  $\rightarrow$  V), 但是随后缩回至所述前厅中 (V  $\rightarrow$  VII  $\rightarrow$  VI), 然后如 D 类型事件中所述从所述顺侧出孔 (VI  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  II  $\rightarrow$  I)。预计给出中振幅事件的中间体被以黄色编号, 但是 II 和 III 太短促而无法观察。预计给出低振幅事件的中间体以红色编号, 但是 IV 太短促而无法观察。

[0028] 图 7 示出了同七聚体突变体  $\alpha$ -HL 孔 E111N-WT 和 M113R-WT 的 DNA 阻断。(a)+200mV 下在 DNA 诱导的阻断过程中通过 E111N-WT 的电流, 表示为相对于在半对数标度上展示的事件持续时间的所述开孔电流的分数。(b)M113R-WT 的对应图。(c)E111N-WT (菱形) 和 M113R-WT (圆形) 的长时阻断, 作为所施加的从 +100 至 +200mV 的电势的总数的百分数。将约 0.5  $\mu$  M 的 DNA 加至所述顺侧腔室; 在每个实验后确定所述提取物的浓度。其他的条件参见图 2 的说明。

[0029] 图 8 示出了多种  $\alpha$ -HL 孔的 DNA 阻断的平均事件电流的振幅柱状图。主峰代表 A 类型事件 (DNA 移位)。每图均包含 1000 个事件。条件记载在图 2 的说明中。

[0030] 图 9 示出了将 DNA (1.0  $\mu$  M) 加入到反侧腔室后 (a)M113R-RL2 和 (b)N121R-RL2 的

电流阻断。施加的电势是  $-120\text{mV}$ 。对于这些突变体,通过所述开孔的电流在负电势下比在正电势下噪声更大。其他条件记载在图 2 的说明中。

[0031] 图 10 示出了  $+120\text{mV}$  下穿过 WT- $\alpha$ -HL 纳米孔的 DNA 移位的罕见 ( $< 1\%$ ) 电流阻断事件,显示在所述中振幅和低振幅状态之间的多重转变。条件记载在图 2 的说明中。

[0032] 图 11 显示了:a) 通过 7R 纳米孔的截面。使用 PyMOL (DeLano Scientific LLC, v 1.0) 软件将所述 WT 纳米孔 (PDB:7AHL) 中位点 113、115、117、119、121、123 和 125 处的氨基酸用精氨酸置换。荷负电的残基被涂成红色,荷正电的残基被涂成蓝色。b) 在所述腔室的顺侧加入  $1\mu\text{M}$  的 ssDNA 后在  $+120\text{mV}$  下 7R (上面) 和 RL2- $\alpha$ -HL 纳米孔 (下面) 的单通道记录。实验是在包含  $100\mu\text{M}$  EDTA (pH 8) 的  $1\text{M}$  KCl  $25\text{mM}$  Tris.HCl 中进行。

[0033] 图 12 示出了穿过 7R 纳米孔的 DNA 移位。a) 显示在所述腔室的顺侧加入  $0.7\mu\text{M}$  的 ssDNA (92mer) 时穿过 7R 孔的移位时间分布的事件柱状图。事件  $< 5\text{ms}$  被归为 7R 纳米孔的短暂门控 (参见 SI)。b) 在 DNA 移位过程中 DNA 移位事件 ( $\tau > 5\text{ms}$ ) 相对于剩余电流的 2-D 分布图。颜色代表如插图所示的事件的密度。c) DNA 穿过 7R 纳米孔的最可能的 DNA 移位速度对所施加的电压的依赖性。红线显示单指数拟合。

[0034] 图 13 示出了  $+120\text{mV}$  下 ssDNA 移位过程中通过 WT 和经修饰的  $\alpha$ -HL 纳米孔的剩余电流。误差表示标准偏差。除了 WT 和 2N,所有纳米孔都以 RL2 为背景。从左起第四个至最后一个柱涉及荷额外正电荷的纳米孔。

[0035] 图 14 示出了所述 DNA 移位速度对 7R 异聚体的内部电荷的依赖性。将数据拟合至单指数曲线 (上图)。异聚体纳米孔是通过混合 RL2 的单体 (空心圆) 和 7R 的单体 (紫色圆) 来获得。以该方式,可形成含有 7 至 49 额外正电的八种不同类的七聚体 ( $7\text{RmRL2n-m}$ ;  $n = 7$ , 亚基总数,  $m = 0 \dots 7$ ) (下图)。

[0036] 图 15 示出了 7R 纳米孔的潜在用途。a) 通过读出通道电流对单链进行测序。所述 7R 通道被纳入用通道探针功能化的固相纳米孔中。测量通过 ssDNA 的横向通道电流以识别单个碱基,所述 ssDNA 移位穿过所述孔。7R 将控制每个核苷酸在所述通道探针之间的停留时间。b) 使用电生理学技术的链测序。将含有内部正电荷的  $\beta$  桶连在所述  $\alpha$ -HL 纳米孔的顺侧入口,用于控制 ssDNA 的速度。单个核苷酸之间的差异是通过由所述 DNA 移位所生成的所述纳米孔电导率变化来测量。

#### [0037] 序列表说明

[0038] SEQ ID NO:1 示出了编码野生型 (WT)  $\alpha$ -溶血素的一个亚基的多核苷酸序列。

[0039] SEQ ID NO:2 示出了 WT  $\alpha$ -溶血素的一个亚基的氨基酸序列。氨基酸 2 至 6、73 至 75、207 至 209、214 至 216 和 219 至 222 形成  $\alpha$ -螺旋。氨基酸 22 至 30、35 至 44、52 至 62、67 至 71、76 至 91、98 至 103、112 至 123、137 至 148、154 至 159、165 至 172、229 至 235、243 至 261、266 至 271、285 至 286 和 291 至 293 形成  $\beta$ -折叠 ( $\beta$ -strand)。所有其他非末端氨基酸,即 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 和 287 至 290 形成环区。氨基酸 1 和 294 是末端氨基酸。

[0040] SEQ ID NO:3 示出了编码  $\alpha$ -溶血素 RL2 的一个亚基的多核苷酸序列。RL2 是半合成基因的产物,所述半合成基因是设计为使编码所述跨膜  $\beta$  桶的序列发生盒式诱变 (Cheley, S., Braha, O., Lu, X., Conlan, S., and Bayley, H. (1999) Protein Sci. 8,

1257-1267)。它在所编码的多肽序列中包含6个沉默限制性位点和5个改变的氨基酸(K8A、V124L、G130S、N139Q和I142L)。D8RL2是具有八天冬氨酸尾的RL2。

[0041] SEQ ID NO :4 示出了  $\alpha$ -溶血素 RL2 的一个亚基的氨基酸序列。与上文针对 SEQ ID NO :2 讨论的氨基酸相同的氨基酸形成  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、环区和末端氨基酸。

[0042] SEQ ID NO :5 示出了编码  $\alpha$ -溶血素 M113R-WT 的一个亚基的多核苷酸序列。

[0043] SEQ ID NO :6 示出了  $\alpha$ -溶血素 M113R-WT 的一个亚基的氨基酸序列。

[0044] SEQ ID NO :7 示出了编码  $\alpha$ -溶血素 E111N-WT 的一个亚基的多核苷酸序列。

[0045] SEQ ID NO :8 示出了  $\alpha$ -溶血素 E111N-WT 的一个亚基的氨基酸序列。

[0046] SEQ ID NO :9 示出了编码在实施例中使用  $\alpha$ -溶血素 A8R-RL2 的一个亚基的多核苷酸序列。

[0047] SEQ ID NO :10 示出了在实施例中使用  $\alpha$ -溶血素 A8R-RL2 的一个亚基的氨基酸序列。

[0048] SEQ ID NO :11 示出了编码在实施例中使用  $\alpha$ -溶血素 M113K-RL2 的一个亚基的多核苷酸序列。

[0049] SEQ ID NO :12 示出了在实施例中使用  $\alpha$ -溶血素 M113K-RL2 的一个亚基的氨基酸序列。

[0050] SEQ ID NO :13 示出了编码在实施例中使用  $\alpha$ -溶血素 M113R-RL2 的一个亚基的多核苷酸序列。

[0051] SEQ ID NO :14 示出了在实施例中使用  $\alpha$ -溶血素 M113R-RL2 的一个亚基的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO :15 示出了在实施例中使用 DNA 序列。

## 具体实施方式

[0053] 应理解,可根据本领域内的具体需要对所公开的产物和方法的不同应用进行调整。还应理解,本文所用的术语只是为了描述本发明的具体实施方案的目的,而非意在进行限制。

[0054] 此外,除非上下文另有清楚的指明,否则本说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”也包括复数指代物。因此,例如,提及“一种分析物”包括“多种分析物”,提及“一个跨膜蛋白孔”包括两个或更多个这类孔,提及“核酸序列”包括两种或多种这样的序列,等等。

[0055] 本文中——无论在上文还是下文——引用的全部出版物、专利和专利申请均以引用的方式全文纳入本文。

### [0056] 增强移位的方法

[0057] 本发明提供了一种增强荷电分析物穿过跨膜蛋白孔的移位的方法。所述跨膜蛋白孔一般被用于通过随机传感来检测所述分析物。随着所述分析物移位通过所述孔,它一般与所述孔相互作用并且以该分析物特异性的方式影响流经所述孔的电流。只要所述分析物与所述孔相互作用,特征性的电流就流经所述孔。这使得可使用随机传感检测所述分析物。

[0058] 所述方法可以任何方式增强所述分析物的移位。所述方法优选可 (1) 增加所述分析物移位通过所述孔的频率, (2) 降低所述分析物移位通过所述孔的阈值电压, (3) 降低所



述分析物移位通过所述孔的速度,或者(4)降低所述分析物和所述孔之间非移位相互作用的数目。非移位相互作用是其中所述分析物进入所述孔并且与所述孔相互作用,但是没有移位通过所述孔的事件。在一些情况下,所述非移位相互作用被消除。所述方法优选可增强(1)和(2);(1)和(3);(1)和(4);(2)和(3);(2)和(4);(3)和(4);(1)、(2)和(3);(1)、(3)和(4);(1)、(2)和(4);或(2)、(3)和(4)。所述方法最优选可增强(1)、(2)、(3)和(4)。换言之,所述方法最优选增强所述分析物移位通过所述孔的频率、降低所述分析物移位通过所述孔的阈值电压、降低所述分析物移位通过所述孔的速度并且降低所述分析物和所述孔之间非移位相互作用的数目。

[0059] 本领域技术人员很容易确定净相反电荷的增加是否会增强所述分析物穿过所述孔的移位。例如,所述分析物可与未增强的或野生型的孔以及其中其桶或通道和/或入口的净相反电荷已增强的相同类型孔相接触,并且可以确定所述两种孔之间分析物移位的任何差异。分析物移位可使用本领域已知的任何方法来测量。一种方法记载于实施例中。

[0060] 通过增强所述分析物移位穿过所述孔的移位,本发明的方法提供了用于随机传感所述分析物的改良孔。增强的穿过所述孔的移位可导致更敏感的系统,所述系统:(1)使得在高浓度和低浓度下均可检测所述分析物;(2)使得可检测甚至在杂质中的所述分析物;(3)使得可更快速地检测所述分析物;(4)减少由非移位相互作用产生的背景噪音;并且(5)使得可在较低电压下检测所述分析物。对于测序核酸序列最重要的是,增强的移位尤其是增加的移位频率,可导致对所述序列中连续核苷酸的读取之间的停滞时间减少。这使得可以更快地对核酸进行测序。降低穿过所述孔的移位速度会增加对所述核酸序列中连续核苷酸的读取时间,并因此使得所述核酸的序列可以被更准确地确定。

#### [0061] 分析物

[0062] 所述分析物可以是任何荷电物质。如果分析物带有净电荷则它是荷电的。所分析物可以荷负电也可以荷正电。如果分析物带有净负电荷则它是荷负电的。如果分析物带有净正电荷则它是荷正电的。

[0063] 合适的分析物包括但不局限于金属离子、无机盐、多聚物(如聚合酸或碱)、染料、漂白剂、药物、诊断剂、消遣性药物(recreational drug)、爆炸物和环境污染物。

[0064] 所述分析物可以是细胞中分泌的分析物。或者,所述分析物可以是存在于细胞内因此必须将其从所述细胞中提取出来的分析物。

[0065] 所述分析物优选是多聚物。所述多聚物优选是核酸序列。核酸是荷负电的。核酸是包含两个或多个核苷酸的大分子。由酶处理的核酸可包含任意核苷酸的任何组合。所述核苷酸可以是天然存在的或人工的。核苷酸一般包含核碱基(nucleobase)、糖和至少一个磷酸基团。所述核碱基一般是杂环的。核碱基包括但不局限于嘌呤和嘧啶,更具体地是腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶和胞嘧啶。所述糖一般是戊糖。核苷酸糖包括但不局限于核糖和脱氧核糖。所述核苷酸一般是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。所述核苷酸一般包含一磷酸、二磷酸或三磷酸。磷酸可连接在核苷酸的5'或3'侧。

[0066] 合适的核苷酸包括但不局限于一磷酸腺苷(AMP)、二磷酸腺苷(ADP)、三磷酸腺苷(ATP)、一磷酸鸟苷(GMP)、二磷酸鸟苷(GDP)、三磷酸鸟苷(GTP)、一磷酸胸苷(TMP)、二磷酸胸苷(TDP)、三磷酸胸苷(TTP)、一磷酸尿苷(UMP)、二磷酸尿苷(UDP)、三磷酸尿苷(UTP)、一磷酸胞苷(CMP)、二磷酸胞苷(CDP)、三磷酸胞苷(CTP)、环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟

苷 (cGMP)、一磷酸脱氧腺苷 (dAMP)、二磷酸脱氧腺苷 (dADP)、三磷酸脱氧腺苷 (dATP)、一磷酸脱氧鸟苷 (dGMP)、二磷酸脱氧鸟苷 (dGDP)、三磷酸脱氧鸟苷 (dGTP)、一磷酸脱氧胸苷 (dTMP)、二磷酸脱氧胸苷 (dTDP)、三磷酸脱氧胸苷 (dTTP)、一磷酸脱氧尿苷 (dUMP)、二磷酸脱氧尿苷 (dUDP)、三磷酸脱氧尿苷 (dUTP)、一磷酸脱氧胞苷 (dCMP)、二磷酸脱氧胞苷 (dCDP) 和三磷酸脱氧胞苷 (dCTP)。所述核苷酸优选选自 AMP、TMP、GMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMP 或 dCMP。

[0067] 所述核酸优选为双链,如 DNA。所述核酸可以是单链,如 cDNA 或 RNA。

[0068] 所述多聚物可以是肽、多肽或蛋白质。所述肽、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在其中包括合成的或经修饰的氨基酸。对氨基酸的很多不同类型的修饰是本领域中已知的。对于本发明,应理解所述分析物可通过本领域中可用的任何方法进行修饰。

[0069] 所述蛋白质可以是酶、抗体、激素、生长因子或生长调节蛋白,如细胞因子。所述细胞因子可选自白细胞介素,优选 IFN-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12 或 IL-13;干扰素,优选 IL- $\gamma$ ;或其他细胞因子,如 TNF- $\alpha$ 。所述蛋白质可以是细菌蛋白、真菌蛋白、病毒蛋白或寄生物衍生的蛋白。在所述蛋白与所述孔接触之前,可将它展开 (unfold) 以形成多肽链,从而使其进入所述孔的桶或通道并且与所述孔相互作用。

[0070] 所述分析物可以是氨基酸。荷电氨基酸是本领域中公知的并且将在下文详细讨论。所述氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。所述氨基酸可以是合成的或经修饰的。对氨基酸的很多不同类型的修饰是本领域中已知的。

[0071] 所述分析物可以是个体核苷酸或单核苷酸。个体核苷酸是未与另一个多核苷酸通过核苷酸键结合的核苷酸。核苷酸键使核苷酸的一个磷酸基团与另一个核苷酸的糖基团连接。个体核苷酸一般是未与具有至少 5 个、至少 10 个、至少 20 个、至少 50 个、至少 100 个、至少 200 个、至少 500 个、至少 1000 个或至少 5000 个核苷酸的另一个多核苷酸序列通过核苷酸键结合的核苷酸。例如,所述个体核苷酸已被从目标多核苷酸序列如 DNA 或 RAN 链中消化出来。核苷酸是荷负电的。所述核苷酸可以是上文讨论的任何核苷酸。

[0072] 所述核苷酸可来自对核酸序列例如核糖核酸 (RNA) 或脱氧核糖核酸的消化。核酸序列可使用本领域中已知的任何方法消化。合适的方法包括但不局限于使用酶或催化剂的方法。对核酸的催化消化公开于 Decketal., Inorg. Chem., 2002 ;41 :669-677 中。

[0073] 来自单核酸序列的个体核苷酸可与所述孔以连续的方式接触,以对所述核酸的全部或一部分进行测序。按照本发明第二个实施方案进行的核酸测序在下文更详细讨论。

[0074] 所述核苷酸一般是未经修饰的,如当所述核苷酸是来自对核酸序列的消化时。或者,所述核苷酸可以是经修饰的或被破坏的。所述核苷酸一般是甲基化的或氧化的。所述核苷酸可用显示性标签标记。所述显示性标签可以是使得所述核苷酸可被检测到的任何合适的标签。合适的标签包括荧光分子、放射性同位素,例如  $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ ,以及接头例如生物素。

[0075] 所述核苷酸一般存在于任意合适的生物样本中。合适的生物样本在下文描述。

[0076] 跨膜蛋白孔

[0077] 跨膜蛋白孔是允许离子顺着施加的电势从所述膜的一侧流到另一侧的多肽。所述孔优选允许所述分析物顺着施加的电势从所述膜的一侧流到另一侧。

[0078] 所述孔一般是低聚物。所述孔优选由一些重复亚基组成,如 6 个、7 个或 8 个亚基。

所述孔更优选是七聚体。所述孔一般包含所述离子可从其中流过的桶或通道。所述孔的亚基一般围绕一个中心轴并且提供跨膜桶或管道或者跨膜  $\alpha$ -螺旋束或通道的链。

[0079] 根据本发明使用的孔可以是  $\beta$ -桶孔或  $\alpha$ -螺旋束孔。 $\beta$ -桶孔包含由  $\beta$ -折叠形成的桶或通道。合适的  $\beta$ -桶孔包括但不限于  $\beta$ -毒素,如  $\alpha$ -溶血素和杀白细胞素;和细菌的外膜蛋白质/通道蛋白(porin),如耻垢分支杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)通道蛋白 A(MspA)、外膜通道蛋白 F(OmpF)、外膜通道蛋白 G(OmpG)、外膜磷脂酶 A 和奈瑟氏球菌属(*Neisseria*)自转运脂蛋白(NaIP)。 $\alpha$ -螺旋束孔包含由  $\alpha$ -螺旋形成的桶或通道。合适的  $\alpha$ -螺旋束孔包括但不限于内膜蛋白和  $\alpha$ -外膜蛋白,如 WZA。

[0080] 本发明中使用的最优选的孔是  $\alpha$ -溶血素或其变体。所述  $\alpha$ -溶血素孔是由 7 个相同亚基形成(即它是七聚体)。野生型  $\alpha$ -溶血素的一个亚基的序列在 SEQ ID NO:2 中示出。 $\alpha$ -溶血素 RL2 的一个亚基的序列在 SEQ IDNO:4 中示出。变体是七聚体孔,所述七聚体孔的七个亚基中的一个或多个具有从 SEQ ID NO:2 或 4 变化而来并且保持孔活性的氨基酸序列。变体可包括有利于与所述分析物相互作用的修饰。

[0081] 变体  $\alpha$ -溶血素中的 1、2、3、4、5、6 或 7 个所述亚基可具有从 SEQ ID NO:2 或 4 变化而来的氨基酸序列。变体孔中的全部 7 个亚基一般相同但也可以不同,特别是如果一个或多个所述亚基被修饰以有利于与所述分析物相互作用。

[0082] 所述变体可以由生物体——例如由葡萄球菌属(*Staphylococcus*)细菌——表达的天然存在变体。变体还包括由重组技术产生的非天然存在变体。在 SEQ ID NO:2 或 4 的氨基酸序列的全长中,以氨基酸同一性计,变体的亚基优选与所述序列具有至少 50% 的同源性。以氨基酸同一性计,所述亚基多肽更优选在全长上可以与 SEQ ID NO:2 或 4 的氨基酸序列具有至少 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 个或更多,例如 230、250、270 或 280 个或更多连续氨基酸的片段中可以有至少 80%,例如至少 85%、90% 或 95% 的氨基酸同一性(“硬同源性(hard homology)”)。优选的变体在 SEQ ID NO:6、8、10、12 和 14 中示出。

[0083] 可对 SEQ ID NO:2 或 4 的氨基酸序列进行氨基酸置换,例如最多达 1、2、3、4、5、10、20 或 30 个置换。可进行保守置换,例如,根据下表 1 进行。

[0084] 表 1- 保守置换

[0085] 在第二列同一格,优选在第三列同一行中的氨基酸可相互置换。

[0086]

非芳香族	非-极性	GAP
		ILV
	极性- 不荷电	CSTM
		NQ
	极性 - 荷电	DE
		HKR
芳香族		HFWY

[0087] SEQ ID NO :2 或 4 的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基可选地或另外地可被缺失。最长达 1、2、3、4、5、10、20 或 30 个残基可被缺失,或更多被缺失。

[0088] 变体可包括由 SEQ ID NO :2 或 4 的片段组成的亚基。这样的片段保持孔形成活性。片段长度可为至少 50、100、200 或 250 个氨基酸。这样的片段可被用于产生嵌合孔。片段优选地包含 SEQ ID NO :2 或 4 的孔形成结构域。

[0089] 变体包括嵌合蛋白孔,所述嵌合蛋白孔包含 SEQ ID NO :2 或 4 的片段或部分。嵌合蛋白孔是由亚基形成的,所述亚基每个均包含 SEQ ID NO :2 或 4 的片段或部分。嵌合蛋白孔的孔或通道部分一般是由 SEQ ID NO :2 或 4 的片段或部分形成。

[0090] 可选地或另外地,一个或多个氨基酸可被加入上文描述的多肽。可在 SEQ ID NO :2 或 4 或者其多肽变体或片段的氨基酸序列的 N- 末端或 C- 末端提供延伸片段。所述延伸片段可以很短,例如长度为 1 至 10 个氨基酸。可选地,所述延伸片段可以较长,例如最长达 50 或 100 个氨基酸。载体蛋白可被融合至本发明的氨基酸序列中。

[0091] 如上所述,SEQ ID NO :2 或 4 的变体是具有从 SEQ ID NO :2 或 4 变化而来并且保持了其形成孔能力的氨基酸序列的亚基。变体一般包含 SEQ ID NO :2 或 4 中负责孔形成的区域。含有  $\beta$ -桶的  $\alpha$ -HL 的孔形成能力由每个亚基中  $\beta$ -折叠提供。SEQ ID NO :2 或 4 的变体一般包含 SEQ ID NO :2 或 4 中形成  $\beta$ -折叠的区域。SEQ ID NO :2 或 4 的氨基酸 22 至 30、35 至 44、52 至 62、67 至 71、76 至 91、98 至 103、112 至 123、137 至 148、154 至 159、165 至 172、229 至 235、243 至 261、266 至 271、285 至 286 和 291 至 293 形成  $\beta$ -折叠。可对 SEQ ID NO :2 或 4 中形成  $\beta$ -折叠的区域进行一种或多种修饰,只要得到的变体保持其形成孔的能力。下文讨论可对本发明的 SEQ ID NO :2 或 4 的  $\beta$ -折叠区域进行的具体修饰。

[0092] SEQ ID NO :2 或 4 的变体优选包含一种或多种修饰,如在其  $\alpha$ -螺旋和/或环区域中的置换、添加或缺失。SEQ ID NO :2 和 4 的氨基酸 2 至 6、73 至 75、207 至 209、214 至 216 和 219 至 222 形成  $\alpha$ -螺旋。SEQ ID NO :2 和 4 的氨基酸 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 和 287 至 290 形成环。氨基酸 1 和 294 是末端氨基酸。下文讨论可对本发明的 SEQ ID NO :2 或 4 的环区域进行的具体修饰。

[0093] 本领域标准方法可用于确定同源性。例如, UWGCG Package 提供可用于计算同源性的 BESTFIT 程序,例如在它们默认设置下使用 (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395)。PILEUP 和 BLAST 算法可用于计算同源性或对比序列(如鉴定等架残基或对应序列)(一般是在它们默认的设置下),例如,如 Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36 :290-300 ;Altschul, S.F et al (1990) J Mol Biol 215 :403-10 中所描述。

[0094] 用于进行 BLAST 分析的软件可以从 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公开获得。所述算法涉及首先通过以下方式鉴定高分值序列配对 (HSP):即在查询序列中鉴定长度为 W 的短字长 (word),所述短字长当与数据库序列中相同长度的字长比对的时候或者匹配或者满足某个正值阈值分数 T。T 是指邻近字长的分数阈值 (Altschul et al, 见上文)。将这些初始邻近字长命中 (word hit) 作为种子启动搜索以发现包含它们的 HSP。沿每条序列的两个方向延伸所述字长命中,到达累积比对分数能够增加的极限。在每个方向上延伸字长命中的停止条件是:所述

累积比对分数从其达到的最大值回落量  $X$  ;所述累积分数达到 0 或小于 0, 原因是一个或多个负得分残基比对的累积 ;或者达到任何一个序列的端点。所述 BLAST 算法的参数  $W$ 、 $T$  和  $X$  决定比对的敏感度和速度。所述 BLAST 程序使用的默认字长 ( $W$ ) 为 11、BLOSUM62 打分矩阵 (参见 Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :10915-10919) 比对 ( $B$ ) 为 50、期望 ( $E$ ) 为 10、 $M = 5$ 、 $N = 4$ , 并且进行双链比较。

[0095] 所述 BLAST 算法可进行两个序列之间的相似性的统计分析 ;参见例如 Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :5873-5877。所述 BLAST 算法提供的一种相似性的测量值是最小和概率 ( $P(N)$ ), 所述最小和概率表示两个氨基酸序列之间出现随机匹配的概率。例如, 如果一个序列与另一个序列比较中的最小和概率小于约 1, 优选小于约 0.1, 更优选小于约 0.01, 最优选小于约 0.001, 那么所述第一序列被认为与所述第二序列相似。

[0096] 跨膜蛋白孔可通过例如以下方式而被修饰 :添加组氨酸或天冬氨酸残基以帮助它们的鉴定或纯化或者通过添加信号序列以促进它们从其中所述多肽天然不含这类序列的细胞中分泌。

[0097] 孔可被显示性标签标记。所述显示性标签可以是使得所述孔可被检测的任何合适标签。合适的标签包括但不限于荧光分子、放射性同位素 (例如  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ )、酶、抗体、多核苷酸和配体, 例如生物素。

[0098] 所述孔可衍生自产生孔的生物体, 如金黄色葡萄球菌, 或者通过合成方法或重组方法制造。例如, 所述孔可通过体外转录和翻译 (IVTT) 而合成。除了下文详细讨论的增加所述孔的桶或通道和 / 或入口的相反电荷的修饰外, 所述孔的氨基酸序列可被修饰以包含非天然存在的氨基酸, 例如以增强所述孔的稳定性。当所述孔通过合成方法产生时, 这样的氨基酸可在产生过程中引入。用于在所述孔中纳入非天然存在的氨基酸的方法是本领域中已知的, 并且在下文中参考增加净相反电荷进行更详细讨论。

[0099] 所述孔还可使用 D-氨基酸来产生。例如, 所述孔可包含 L-氨基酸和 D-氨基酸的混合物。生产这样的蛋白质或肽在本领域中是常规的。

[0100] 所述孔还可在合成或重组生产之后被改变。所述孔可包含其他非特异性修饰, 只要它们不干扰所述分析物的移位。很多非特异性修饰是本领域中已知的并且可对所述孔的侧链进行。这样的修饰包括例如, 通过与乙醛反应, 之后用  $\text{NaBH}_4$  还原的对氨基酸的还原性烷基化 ;用甲基乙酰亚胺酯 (methylacetimidate) 进行的脒基化 (amidination) ;和使用乙烯胺 (ethyleneamine) 的巯基特异性修饰。

[0101] 所述孔可使用本领域中的标准方法生产。编码孔或孔亚基的多核苷酸序列可使用本领域中的标准方法衍生和复制。这样的序列在下文详细介绍。编码孔或孔亚基的多肽序列可使用本领域中的标准技术在细菌宿主细胞中表达。所述孔或孔亚基可通过以下方式在细胞中生产 :即原位表达重组表达载体的多肽。所述表达载体任选带有诱导型启动子以控制所述多肽的表达。

[0102] 孔亚基可通过如下方式大规模产生 :从产生孔的生物体或者在如下文所述的重组表达后通过任何蛋白质液相色谱系统进行纯化。一般的蛋白质液相色谱系统包括 FPLC、AKTA 系统、Bio-Cad 系统、Bio-Rad BioLogic 系统和 Gilson HPLC 系统。随后, 天然存在的或重组产生的孔或孔亚基可被插入天然或人工膜中以用在本发明中。用于将孔插入膜中的

方法在下文讨论。

[0103] 所述跨膜孔可包含分子衔接体,如环糊精、环肽或葫芦脲 (cucurbituril),所述分子衔接体通过改善所述孔和所述分析物的主客化学 (host-guest chemistry) 而有利于所述孔和所述分析物之间的相互作用。合适的衔接体是本领域中已知的。所述分子衔接体可共价连接于所述孔。

#### [0104] 增加净相反电荷

[0105] 本发明的方法包括增加所述孔的桶或通道和 / 或入口的净相反电荷。所述相反电荷是所述分析物电荷的相反电荷。如果分析物荷负电,所述方法涉及增加所述孔的桶或通道和 / 或入口的净正电荷。如果分析物荷正电,所述方法涉及增加所述孔的桶或通道和 / 或入口的净负电荷。所述净相反电荷可通过本领域中已知的任何方式来增加。

[0106] 所述净相反电荷以不干扰所述分析物穿过所述孔的移位的方式增加。所述净相反电荷以不干扰所述分析物与所述孔之间相互作用的方式增加。

[0107] 在一个优选的实施方案中,所述分析物荷负电,所述方法涉及增加所述孔的桶或通道和 / 或入口的净正电荷。所述净正电荷优选地是通过将一个或多个荷正电的氨基酸引入所述孔的桶或通道和 / 或入口来增加。所述一个或多个荷正电的氨基酸可通过添加来引入。所述一个或多个荷正电的氨基酸优选通过置换引入。

[0108] 荷正电的氨基酸是带有净正电荷的氨基酸。所述荷正电的氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。所述荷正电的氨基酸可以是合成的或经修饰的。例如,带净正电荷的经修饰的氨基酸可被特异性地设计用于本发明。对氨基酸的很多不同类型的修饰是本领域中已知的。

[0109] 优选的天然存在的荷正电氨基酸包括但不限于组氨酸 (H)、赖氨酸 (K) 和精氨酸 (R)。可将任意数量和组合的 H、K 和 / 或 R 引入所述孔的桶或通道和 / 或入口中。

[0110] 用于添加或置换天然存在的氨基酸的方法是本领域中已知的。例如,通过在编码所述孔的多核苷酸中的相应位置处将甲硫氨酸的密码子 (ATG) 替换为精氨酸的密码子 (AGA) 来用精氨酸 (T) 置换甲硫氨酸 (M)。随后,所述多核苷酸可如下所讨论的进行表达。

[0111] 用于添加或置换非天然存在的氨基酸的方法也是本领域中已知的。例如,可通过在用于表达所述孔的 IVTT 系统中引入合成的氨酰基-tRNA 来引入非天然存在的氨基酸。或者,它们可通过在特定氨基酸的营养缺陷型大肠杆菌 (*E. coli*) 中并在存在这些特定氨基酸的合成 (即非天然存在的) 类似物的条件下表达所述孔进行引入。如果所述孔是使用部分肽合成生产,它们则还可通过裸露连接来产生。

[0112] 任何氨基酸都可被荷正电的氨基酸置换。一个或多个不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸可被一个或多个荷正电的氨基酸置换。不荷电的氨基酸没有净电荷。合适的不荷电的氨基酸包括但不限于半胱氨酸 (C)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、甲硫氨酸 (M)、天冬酰胺 (N) 和谷氨酰胺 (Q)。非极性氨基酸有非极性的侧链。合适的非极性氨基酸包括但不限于甘氨酸 (G)、丙氨酸 (A)、脯氨酸 (P)、异亮氨酸 (I) 和缬氨酸 (V)。芳香族氨基酸具有芳香族侧链。合适的芳香族氨基酸包括但不限于组氨酸 (H)、苯丙氨酸 (F)、色氨酸 (W) 和酪氨酸 (Y)。优选将一个或多个荷负电的氨基酸用一个或多个荷正电的氨基酸置换。合适的荷负电的氨基酸包括但不限于天冬氨酸 (D) 和谷氨酸 (E)。

[0113] 优选的引入包括但不限于用 R 置换 M、用 H 置换 M、用 K 置换 M、用 R 置换 D、用 H

置换 D、用 K 置换 D、用 R 置换 E、用 H 置换 E、用 K 置换 E、用 R 置换 N、用 R 置换 T 以及用 R 置换 G。

[0114] 可引入任意数目的荷正电的氨基酸。例如,可引入 1、2、5、10、15、20、25 或更多的荷正电的氨基酸。如果所述孔是低聚体,则所述一个或多个荷正电的氨基酸可被引入所述孔的一个、几个或全部亚基中。在  $\alpha$ -HL(即上文讨论的 SEQ ID NO:2 和 4 及它们的变体)的情况下,所述一个或多个荷正电的氨基酸可被引入所述孔的 1、2、3、4、5、6 或 7 个亚基中。在所述 7 个亚基的每一个中,所述一个或多个荷正电的氨基酸可被引入至相同或不同位置处。所述孔优选是同七聚体,并且一个或多个氨基酸被引入至每个亚基中的相同位置处。

[0115] 还可通过用一个或多个不荷电的氨基酸、非极性的氨基酸和 / 或芳香族氨基酸置换一个或多个荷负电的氨基酸的替换来增加所述净正电荷。从所述桶或通道和 / 或入口除去负电荷会增加所述净正电荷。所述不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。它们可以是合成的或经修饰的。上文讨论了合适的不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和芳香族氨基酸。优选的置换包括但不限于用 N 置换 E、用 N 置换 D、用 T 置换 E、用 T 置换 D、用 G 置换 E 以及用 G 置换 D。

[0116] 可将任意数量和组合的不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸置换至所述筒或通道和 / 或入口中。例如,1、2、5、10、15、20、25 个或更多不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸可被置换至所述桶或通道和 / 或入口中。如果所述孔是低聚体,所述不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸可被置换至所述孔的一个、几个或全部亚基中。在  $\alpha$ -HL(即上文讨论的 SEQ ID NO:2 和 4 及它们的变体)的情况下,所述不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸可被置换至所述孔的 1、2、3、4、5、6 或 7 个亚基中。在所述 7 个亚基的每一个中,所述一个或多个不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸可被置换至相同或不同的位置。所述孔优选是同七聚体,并且不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸被置换至每个亚基中的相同位置。荷负电的氨基酸可被用以下氨基酸置换:(1) 不荷电的氨基酸;(2) 非极性氨基酸;(3) 芳香族氨基酸;(4) 不荷电氨基酸和非极性氨基酸;(5) 不荷电氨基酸和芳香族氨基酸;以及 (5) 非极性氨基酸和芳香族氨基酸;或 (6) 不荷电氨基酸、非极性氨基酸和芳香族氨基酸。

[0117] 在另一个实施方案中,所述分析物荷正电,所述方法涉及增加所述孔的桶或通道和 / 或入口的净负电荷。所述净负电荷优选通过将是一个或多个荷负电的氨基酸引入所述孔的桶或通道和 / 或入口增加。所述一个或多个荷负电的氨基酸优选通过添加来引入。所述一个或多个荷负电的氨基酸优选通过置换来引入。用于添加或置换氨基酸的方法是本领域中已知的。

[0118] 上文讨论了合适的荷负电的氨基酸。所述荷负电的氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。所述荷负电的氨基酸可以是合成的或经修饰的。

[0119] 任何氨基酸均可被荷负电的氨基酸置换。一个或多个不荷电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸可被一个或多个荷负电的氨基酸置换。一个或多个荷正电的氨基酸优选被一个或多个荷负电的氨基酸置换。任意数量的荷负电的氨基酸可如上文讨论被引入。

[0120] 还可通过用一个或多个不荷电的氨基酸、非极性的氨基酸和 / 或芳香族氨基酸置换一个或多个荷正电的氨基酸的替换来增加所述净负电荷。一种优选的置换是用 N 置换 K。

从所述桶或通道和 / 或入口除去正电荷会增加所述净负电荷。所述不带电的氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。它们可以是合成的或经修饰的。

[0121] 如上文所述讨论,可将任意数量和组合的不带电氨基酸、非极性氨基酸和 / 或芳香族氨基酸置换至所述桶或通道和 / 或入口中。

[0122] 桶或通道和 / 或入口

[0123] 在一个实施方案中,所述孔的桶或通道的净相反电荷增加。所述孔的桶或通道是其中离子通过其穿过所述孔跨膜的所述孔的部分。所述分析物同样移位通过所述桶或所述通道。所述桶或通道根据孔的类型不同可由  $\alpha$ -螺旋或  $\beta$ -折叠链形成。优选地,所述桶或通道的腔室的净相反电荷增加。

[0124] 如上文所述,所述净相反电荷是通过引入或替换(通过置换一个或多个氨基酸)而增加。氨基酸可在所述桶或通道的任意位置被引入或置换,条件是所述分析物的移位被增强。氨基酸优选在形成所述桶或通道的腔室部分的位置被引入或置换。换言之,氨基酸优选不在所述桶或通道中被埋没在所述孔中或所述腔室中隐藏的位置处被引入或置换。

[0125] 氨基酸优选在朝向其中所述分析物通过其进入所述桶或通道的末端被引入或置换。所述分析物通过其进入所述孔的末端可以是顺侧末端和反侧末端。所述末端优选顺侧末端。氨基酸优选在所述桶或通道的缩窄处附近被引入或置换。氨基酸更优选在所述桶或通道的腔室的缩窄处附近被引入或置换。

[0126] 在另一个实施方案中,所述孔的入口的净相反电荷增加。所述孔的入口是其中分析物通过其进入所述桶或通道中的所述孔的部分。入口一般主要由所述孔中的环区形成。

[0127] 如上文所述,所述净相反电荷是通过引入或替换(通过置换一个或多个氨基酸)来增加。氨基酸可在所述入口的任何位置处被引入或置换,条件是所述分析物的移位被增强。氨基酸优选在形成所述入口的腔室部分的位置处被引入或置换。换言之,氨基酸优选不在所述入口中被埋没在所述孔中或所述腔室中隐藏的位置处被引入或置换。

[0128] 氨基酸可在一个或两个入口中被引入或置换。氨基酸一般在其中分析物经由其进入所述孔的入口附近被引入或置换。氨基酸可在所述桶或通道中或者在一个或两个入口被引入或置换。

[0129] 在 SEQ ID NO :2 和 4 中,氨基酸可在 1 至 22、35 至 41、54 至 59、100 至 155 和 218 至 229 的任意位置处被引入或置换以增加净相反电荷。全部这些位置都形成 SEQ ID NO :2 和 4 的桶或通道的腔室部分或 SEQ ID NO :2 和 4 的入口的腔室部分。位置 111 至 147 形成所述桶或通道的腔室部分。位置 1 至 22、35 至 41、54 至 59、100 至 110、148 至 155 和 218 至 229 形成入口的腔室部分。氨基酸优选在 SEQ ID NO :2 或 4 中位于所述桶或通道缩窄处附近的位置处被引入或置换。这样的位置包括但不限于位置 111、113、115、117、119、121、123、125、127、145 和 147。SEQ ID NO :2 的入口中的优选位置是位置 8。

[0130] 位于 SEQ ID NO :2 或 4 的所述桶或通道的缩窄处附近的优选置换包括但不限于 M113R、E111N、M113K、T115R、T117R、G119R、N121R、N123R、M113D、K147N、D127R、T125R 和 T145R。位于 SEQ ID NO :4 的入口中的优选置换包括但不限于 A8R 和 A8K。

[0131] 本发明的跨膜蛋白孔

[0132] 本发明还提供一种根据本发明增强的跨膜蛋白孔。这样的孔会在其桶或通道和 /



或入口中有净相反电荷增加。净正电荷增加可增强荷负电分析物穿过所述孔的移位。净负电荷的增加可增强荷正电分析物穿过所述孔的移位。可使用上文描述的任何方法增强所述孔。

[0133] 本发明的孔可以是分离的、基本上分离的、纯化的或基本上纯化的。如果本发明的孔完全不含任何其他组分（例如脂质或其他孔），则该孔是分离的或纯化的。如果孔与不干扰其预计用途的载体或稀释剂混合，则该孔是基本上分离的。例如，如果孔以包含小于10%、小于5%、小于2%或小于1%的其他组分（如脂质或其他孔）的形式存在，则该孔是基本分离或基本纯化的。或者，本发明的孔可以存在于脂质双层中。

[0134] 本发明的孔可以作为个体孔或单孔存在。或者，本发明的孔可以存在于两个或多个孔的同源或异源群中。

[0135] 所述跨膜孔优选包含至少一个亚基，所述亚基包含 SEQ ID NO :6、8、10 或它们的变体。所述跨膜孔更优选是包含七个亚基的同七聚体，所述亚基包含 SEQ ID NO :6、8、10 或它们的变体。SEQ ID NO :6、8 和 10 的变体可与 SEQ ID NO :6、8 和 10 不同，其不同程度可与上文描述的 SEQ ID NO :2 和 4 变体的不同程度相同。

[0136] SEQ ID NO :6 的变体必须在位置 113 含有精氨酸 (M113R)。SEQ ID NO :6 的变体优选不是 M113R-RL2 (SEQ ID NO :14)。SEQ ID NO :8 的变体必须在位置 111 含有天冬酰胺 (E111N)。SEQ ID NO :10 的变体必须在位置 8 含有精氨酸 (A8R-RL2)。

#### [0137] 多核苷酸

[0138] 本发明还提供了一种编码本发明跨膜蛋白孔的多核苷酸序列。所述多核苷酸可编码在其桶或通道和 / 或入口中净相反电荷增加的孔。净正电荷增加可增强荷负电分析物穿过所述孔的移位。净负电荷的增加可增强荷正电分析物穿过所述孔的移位。可使用上文描述的任何方法增强所述孔。

[0139] 本发明还提供编码跨膜蛋白孔亚基的多核苷酸序列，所述跨膜蛋白孔亚基具有 SEQ ID NO :6、8 或 10 或其变体的序列。所述多核苷酸序列优选包含 SEQ ID NO :5、7 或 9 或其变体中所示的序列。SEQ ID NO :5、7 或 9 的变体是以核苷酸同一性计与 SEQ ID NO :5、7 或 9 的序列在全长上具有至少 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 同源性的序列。在超过 600 个或更多例如 700、750、850、900 或更多连续核苷酸的片段上具有至少 80%，例如至少 85%、90% 或 95% 的核苷酸同一性（“硬同源性”）。同源性可如上文所述进行计算。基于遗传密码的简并性，所述变体可包含与 SEQ ID NO :5、7 或 9 不同的序列。

[0140] SEQ ID NO :5 的变体必须编码这样的孔亚基，即所述孔亚基在 SEQ ID NO :6 的位置 113 处含有精氨酸 (M113R) 或相当于 SEQ ID NO :6 的位置 113 的位置处含有精氨酸 (M113R)。SEQ ID NO :5 的变体优选不编码 M113R-RL2 (SEQ ID NO :14)。

[0141] SEQ ID NO :7 的变体必须编码这样的孔亚基，即所述孔亚基在 SEQ ID NO :8 的位置 111 处含有天冬氨酸 (E111N) 或相当于 SEQ ID NO :8 的位置 111 的位置处含有天冬氨酸 (E111N)。

[0142] SEQ ID NO :9 的变体必须编码这样的孔亚基，即所述孔亚基在 SEQ ID NO :10 的位置 8 处含有精氨酸 (A8R) 或相当于 SEQ ID NO :10 的位置 8 的位置处含有精氨酸 (A8R)。

[0143] 可以使用本领域中的标准方法衍生和复制多核苷酸序列。染色体 DNA 可从产生孔的生物体例如金黄色葡萄球菌提取。可以使用包括特定引物的 PCR 来扩增编码所述孔亚基

的基因。然后,可以将所扩增的序列整合至可复制的重组载体例如克隆载体中。所述载体可用于在相容性宿主细胞中复制所述多核苷酸。因此,可以通过如下方式制备编码孔亚基的多核苷酸序列:将编码孔亚基的多核苷酸引入可复制载体中,将所述载体引入相容性宿主细胞中,并在可使所述载体进行复制的条件下培养所述宿主细胞。可以从所述宿主细胞回收所述载体。用于克隆编码孔亚基的多核苷酸的合适宿主细胞是本领域中已知的,将在下文中更详细地叙述。

[0144] 可以将编码孔亚基的多核苷酸克隆至合适的表达载体中。在表达载体中,编码孔亚基的多核苷酸一般有效连接于能够允许所述宿主细胞表达所述编码序列的控制序列。这类表达载体可用于表达孔亚基。

[0145] 术语“有效连接”指一种并置关系,在该并置关系中,所描述的组件处于能使它们以其预期的方式发挥功能的关系中。“有效连接”到编码序列的控制序列以这样的方式连接,即在与所述控制序列相容的条件下可实现所述编码序列的表达。可以将多拷贝的相同或不同孔亚基序列引入至所述载体中。

[0146] 然后,可以将所述表达载体引入至合适的宿主细胞中。因此,可以通过如下方式产生孔亚基:将编码孔亚基的多核苷酸插入表达载体中,将所述载体引入相容性细菌宿主细胞中,并在可使编码所述孔亚基的多核苷酸进行表达的条件下培养所述宿主细胞。重组表达的孔亚基可以自组装成所述宿主细胞膜中的孔。或者,可以将以该方式产生的所述重组孔从所述宿主细胞中移出并插入至另一膜中。如果产生的是包含至少两种不同亚基的七聚体孔,那么所述不同亚基可以在如上述的不同宿主细胞中分别表达,将其从所述宿主细胞中移出,并且在单独的膜例如兔细胞膜中装配为孔。

[0147] 所述载体可以是例如具有复制起始点,任选的用于表达所述多核苷酸的启动子,任选的所述启动子的调控子的质粒、病毒或噬菌体载体。所述载体可以包含一种或多种筛选标记物基因,例如四环素抗性基因。可以选择启动子和其他表达调节信号,以使其与这样的宿主细胞相容,即所述表达载体是被设计用于该宿主细胞的。一般可使用 T7、trc、lac、ara 或  $\lambda$  L 启动子。

[0148] 所述宿主细胞一般以高水平表达所述孔亚基。选择用编码孔亚基的多核苷酸序列转化的宿主细胞,以与用于转化所述细胞的表达载体相容。所述宿主细胞一般是细菌,优选大肠杆菌。具有  $\lambda$  DE3 溶素原(例如 C41 (DE3)、BL21 (DE3)、JM109 (DE3)、B834 (DE3)、TUNER、Origami 和 Origami B) 的任何细菌均可表达包含 T7 启动子的载体。

#### [0149] 检测分析物的方法

[0150] 本发明还涉及确定样本中是否存在分析物的方法。所述分析物是荷电的。所述分析物可以是上文讨论的任何分析物。所述方法包括(1)将所述样本与本发明的跨膜蛋白孔在使得所述分析物(若存在)移位通过所述孔并与所述孔相互作用的条件下接触,并且(2)在所述相互作用过程中测量通过所述孔的电流,从而确定是否存在所述分析物。可使用本发明的任何跨膜蛋白孔。上文讨论了与使用本发明的跨膜蛋白孔来检测分析物相关的有利之处。在优选的实施方案中,所述方法还包括如上文所描述增强所述分析物穿过所述孔的移位。所述增强当然是在测定所述分析物前进行。

[0151] 如果电流以所述分析物特异性方式流过所述孔(即,检测到与所述核苷酸相关的特征性电流流过所述孔),则所述分析物存在。如果电流不是以所述分析物特异性方式流过

所述孔,则所述分析物不存在。

[0152] 因此,本发明涉及对分析物的随机传感。本发明可用于区分具有类似结构的分析物,所述区分是基于它们对流经跨膜蛋白孔的电流的不同效应。本发明还可用于测量样本中特定分析物的浓度。

[0153] 在大量传感应用中,本发明还可用于使用很多或数千个本发明的孔的传感器中。

[0154] 所述方法可使用其中本发明的跨膜蛋白孔被插入膜中的任何合适膜 / 孔系统进行。所述方法通常使用下述系统进行:(i) 含有本发明的跨膜蛋白孔的人工膜,(ii) 含有本发明的跨膜蛋白孔的分离的天然膜,或(iii) 表达已经根据本发明修饰的跨膜蛋白孔的细胞。所述方法优选使用人工膜进行。所述膜除含有本发明的跨膜蛋白孔之外,还可含有其他跨膜蛋白和 / 或膜内蛋白,以及其他分子。

[0155] 本发明的方法一般在体外进行。

[0156] 膜

[0157] 所述膜可形成离子、核苷酸和核酸流动的屏障。所述膜优选为脂双层。适用于本发明的脂双层可使用本领域中已知的方法制备。例如,可使用 Montal and Mueller(1972)的方法形成脂双层膜。还可使用国际申请 PCT/GB08/000563 中描述的方法形成脂双层。

[0158] 可使用由任何膜脂形成的脂双层进行本发明的方法,所述膜脂包括但不限于:磷脂、糖脂、胆固醇以及它们的混合物。可使用国际申请 PCT/GB08/000563 中描述的任何脂质。

[0159] 将孔插入膜例如脂双层的方法是本领域中已知的。例如,可将纯化形式的孔悬浮于含有脂双层的溶液中,以使其扩散至脂双层,并通过与脂双层结合并组装为功能状态而插入至脂双层中。或者,可使用 M. A. Holden, H. Bayley. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 6502-6503 和国际申请 PCT/GB2006/001057(作为 WO 2006/100484 发表)所述的“拾取放置 (pick and place)”方法,所述将孔直接插入至所述膜中。

[0160] 本发明的方法一般在体外进行。

[0161] 所述孔和分析物之间的相互作用

[0162] 所述分析物可与所述孔在所述膜两侧的任一侧接触。所述分析物可在所述膜两侧的任一侧被引入所述孔中。可以使所述分析物与所述膜的一侧相接触,使得所述分析物通过所述孔到达所述膜的另一侧。例如,所述分析物与所述孔的末端相接触,该孔在其天然环境下能使得离子或小分子例如分析物进入至所述孔的桶或通道中,使得所述分析物可以穿过所述孔。在这种情况下,所述分析物在其经由所述孔的桶或通道通过所述膜时与所述孔相互作用。或者,所述分析物可与所述膜的侧面接触,所述膜的侧面可使所述分析物与所述孔相互作用,使其与所述孔分离以及停留在所述膜的另一侧。

[0163] 所述分析物可以任何方式并且在任何位点与所述孔相互作用。所述分析物可以可逆地结合于所述孔。

[0164] 在所述分析物与所述孔相互作用的过程中,所述分析物会以该分析物特异性的方式影响流过所述孔的电流。例如,特定分析物会使流过所述孔的电流在特定平均时间段内减少并减少至特定程度。换言之,流经所述孔的电流对特定分析物而言是特征性的。可进行对照实验以测定特定分析物对流过所述孔的电流的效应。然后,可将测试样本实施本发明方法之后所得到的结果与来自这类对照实验的结果相比较,以鉴定样本中的特定分析

物或测定样本中是否存在特定分析物。所述频率（其中流过所述孔的电流以指示特定分析物的形式受到影响）可用于确定所述样本中该分析物的浓度。

#### [0165] 装置

[0166] 所述方法可以使用任何适于研究其中跨膜蛋白孔被插入膜中的膜 / 孔系统的装置来进行。所述方法可使用任何适用于随机传感的仪器来进行。例如,所述装置包括一个含有水溶液的腔室和一个将所述腔室分为两部分的屏障物。所述屏障物具有一个孔洞,在该孔洞中形成含有所述孔的膜。通过将所述分析物引入腔室之中而使所述分析物与所述孔相接触。所述分析物可被引入所述腔室的两个部分中的任一个。

[0167] 所述方法可使用国际申请 PCT/GB08/000562 中描述的装置来进行。

[0168] 本发明方法涉及在所述孔与核苷酸相互作用的过程中测量流过所述孔的电流。因此,所述装置还包括能够施加电势并测量穿过所述膜和孔的电信号的电路。可以使用膜片钳或电压钳进行所述方法。所述方法优选涉及使用膜片钳。实施例公开了一种进行电压钳方法的方式。

#### [0169] 样本

[0170] 所述分析物可存在于任何合适的样本中。本发明通常在已知含有或怀疑含有所述分析物的样本上进行。本发明可在含有一种或多种种类未知的分析物的样本上进行。或者,本发明可在样本中进行以确认所述一种或多种已知存在或预计存在于所述样本中的分析物的种类。

[0171] 所述样本可以是生物样本。本发明可以在获自或提取自任何生物或微生物的样本上在体外进行。所述生物或微生物通常为原核生物或真核生物,并通常属于下述的五界之一:植物界 (plantae)、动物界 (animalia)、真菌界 (fungi)、原核生物界 (monera) 和原生生物界 (protista)。本发明可以在获自或提取自任何病毒的样本上在体外进行。优选地,所述样本为流体样本。所述样本通常包括患者的体液。所述样本可为尿液、淋巴液、唾液、粘液或羊水,但是优选血液、血浆或血清。通常,所述样本来源于人类,但是它或者可以来源于其他哺乳动物,例如来源于市售的农场动物例如马、牛、羊或猪,或者可以是宠物例如猫或狗。

[0172] 所述样本可以是非生物样本。所述非生物样本优选地是流体样本。非生物样本的实例包括手术液、水如饮用水、海水或河水,以及用于实验室试验的试剂。

[0173] 所述样本在分析之前通常要经过处理,例如通过离心或通过透膜过程以滤去不需要的分子或细胞例如红细胞。可在采集后立即测量所述样本。通常也可在测定之前保存所述样本,优选在  $-70^{\circ}\text{C}$  以下保存。

#### [0174] 条件

[0175] 本发明方法涉及在所述孔与所述分析物相互作用的过程中测量流过所述孔的电流。适于测量流过跨膜蛋白孔的离子电流的条件为本领域中已知并在实施例中公开。通过跨所述膜和孔施加电势进行所述方法。所用电压通常为  $-400\text{mV}$  至  $+400\text{mV}$ 。所用电压优选是在具有选自  $-400\text{mV}$ 、 $-300\text{mV}$ 、 $-200\text{mV}$ 、 $-150\text{mV}$ 、 $-100\text{mV}$ 、 $-50\text{mV}$ 、 $-20\text{mV}$  和  $0\text{mV}$  的下限,以及独立选自  $+10\text{mV}$ 、 $+20\text{mV}$ 、 $+50\text{mV}$ 、 $+100\text{mV}$ 、 $+150\text{mV}$ 、 $+200\text{mV}$ 、 $+300\text{mV}$  和  $+400\text{mV}$  的上限的范围内。优选地,所用电压在  $120\text{mV}$  至  $170\text{mV}$  的范围内。增强所述分析物穿过本发明所述孔的移位使得可以使用较低的电压。

[0176] 本发明方法可在存在任何碱金属盐酸盐的条件下进行。在上述示例性装置中,所述盐存在于所述腔室的水溶液中。通常使用氯化钾 (KCl)、氯化钠 (NaCl) 或氯化铯 (CsCl)。优选 KCl。所述盐的浓度通常为 0.1 至 2.5M、0.3 至 1.9M、0.5 至 1.8M、0.7 至 1.7M、0.9 至 1.6M 或 1M 至 1.4M。所述盐的浓度优选为 150 至 500mM。高盐浓度可提供高信噪比,并且使得将指示分析物存在的电流与正常电流波动的背景区分开。当分析物检测是在存在酶的情况下进行时例如当测序核酸时,必须使用较低的盐浓度。所述盐浓度优选为 150 至 500mM。在高于室温的温度(如 30°C 至 40°C)下进行所述方法能够在这些低盐浓度下达到良好的核苷酸分辨。

[0177] 所述方法通常在存在缓冲液的情况下进行。在上述示例性装置中,所述缓冲液存在于所述腔室的水溶液中。在本发明方法中可使用任何缓冲液。一种合适的缓冲液为 Tris-HCl 缓冲液。所述方法通常在下述 pH 值下进行,4.0 至 10.0、4.5 至 9.5、5.0 至 9.0、5.5 至 8.8、6.0 至 8.7、7.0 至 8.8 或 7.5 至 8.5。所使用的 pH 优选为约 7.5。

[0178] 所述方法通常在 0°C 至 100°C、15°C 至 95°C、16°C 至 90°C、17°C 至 85°C、18°C 至 80°C、19°C 至 70°C 或 20°C 至 60°C 下进行。所述方法可在室温下进行。所述方法优选在支持酶功能的温度例如约 37 下进行。如果升高温度,则可在低盐浓度下达到良好的分析物分辨。

[0179] 除了升高所述溶液的温度之外,还有很多其他策略可被用于增加所述溶液的电导率,同时保持适于酶活性的条件,例如在测序核酸时。一种这样的策略是使用脂双层将盐溶液分为两种不同的浓度,在所述酶的一侧为低盐浓度而在另一侧为较高盐浓度。该方法的一个实例是在所述膜的顺侧使用 200mM 的 KCl 而在反侧腔室中使用 500mM KCl。在这些条件下,通过所述孔的电导率预计大约等价于正常条件下的 400mMKCl,而如果将所述酶置于所述顺侧,则只是 200mM。使用不对称盐条件的另一个可能益处是跨所述孔产生的渗透梯度。这种净水流动可被用于将核苷酸拉入所述孔用于检测。使用中性渗透物(如蔗糖、甘油或 PEG)可达到类似的效果。另一种可能是,使用具有相对较低水平 KCl 的溶液并且依赖对酶活性的破坏较小的其他荷电物质。

#### [0180] 测序核酸的方法

[0181] 本发明还涉及一种测序目标核酸序列的方法。所述方法包括:(a) 将所述目标核酸推过或拉过本发明的跨膜孔,使得所述目标序列中的一部分核苷酸与所述孔相互作用;并且 (b) 测量在每个相互作用过程中通过所述孔的电流从而确定所述目标序列的序列。因此,所述方法涉及当目标核酸序列中的一部分核苷酸以连续的方式通过所述桶或通道时对所述核苷酸的随机传感,以测序所述目标序列。

[0182] 可使用本发明的任何孔。其中所述桶或通道和/或入口的净正电荷已增加的本发明的孔尤其适用于该方法。例如,增强所述荷负电的核酸穿过所述孔的移位可减少非移位事件和所述序列中每个核苷酸读取之间的停滞时间,并且/或者增加所述序列中每个核苷酸的读取时间。在优选的实施方案中,所述方法还包括如上文所述增强所述分析物穿过所述孔的移位。所述增强当然是在测序所述核酸前进行。

[0183] 使用该方法可对所述目标核酸序列的整体或仅一部分进行测序。所述核酸序列可以是任意长度。例如,所述核酸序列的长度可以是至少 10 个、至少 50 个、至少 100 个、至少 150 个、至少 200 个、至少 250 个、至少 300 个、至少 400 个或至少 500 个核苷酸。所述核酸

序列优选是 DNA 或 RNA。所述核酸序列可以是天然存在的或人工的。例如,所述方法可用于验证所制造的寡核苷酸的序列。所述方法一般在体外进行。

[0184] 可使用上文讨论的任何样本、膜 / 孔系统和条件来进行所述方法。

[0185] 所述孔与核苷酸之间的相互作用

[0186] 所述核酸与所述孔可在所述膜两侧的任一侧相接触。所述核酸可在所述膜两侧的任一侧被引入所述孔中。所述核苷酸或核酸一般与其中酶在其上连接至所述孔的膜侧面相接触。这使得所述酶能够在如下文所讨论的方法过程中处理所述核酸。

[0187] 所述目标核酸序列的核苷酸的一部分在其通过所述孔的桶或通道穿过所述膜时与所述孔相互作用。

[0188] 所述核苷酸可与所述孔以任何方式和在任何位点相互作用。如上文所讨论,所述核苷酸优选可逆地结合于所述孔。

[0189] 在所述核苷酸与所述孔相互作用的过程中,所述核苷酸会以该核苷酸特异性的方式影响流过所述孔的电流。例如,特定核苷酸会使流过所述孔的电流在特定平均时间段内减少并减少至特定的程度。换言之,流过所述孔的电流对特定的核苷酸而言是特征性的。可进行对照实验以测定特定核苷酸对流过所述孔的电流的效应。然后,可将测试样本实施本发明方法之后所得到的结果与来自这类对照实验的结果相比较,以鉴定特定核苷酸。

[0190] 将所述核酸推过或拉过所述孔

[0191] 本发明的链测序涉及核酸多聚物受控且逐步地移位通过孔。所述核酸可以本领域技术人员知晓的任何方式被推过或拉过所述孔。例如,可使用电渗透作用将所述核酸推过或者拉过所述孔。优选使用 DNA 处理酶将所述核酸推过或拉过所述孔。

[0192] 大部分核酸处理酶适合用于该应用,条件是它们可水解、聚合或处理单链核酸如 DNA 或 RNA。能够将所述目标核酸序列推过或拉过所述孔的优选酶包括聚合酶、核酸外切酶、解旋酶和拓扑异构酶,如促旋酶。所述聚合酶优选是酶分类 (EC) 组 2.7.7.6、2.7.7.7、2.7.7.19、2.7.7.48 和 2.7.7.49 中任一组的成员。所述聚合酶优选是依赖 DNA 的 DNA 聚合酶、依赖 RNA 的 DNA 聚合酶、依赖 DNA 的 RNA 聚合酶或依赖 RNA 的 RNA 聚合酶。所述解旋酶优选是酶分类 (EC) 组 3.6.1.- 和 2.7.7.- 中任一组的成员。所述解旋酶优选是依赖 ATP 的 DNA 解旋酶 (EC 组 3.6.1.8)、依赖 ATP 的 RNA 解旋酶 (EC 组 3.6.1.8) 或不依赖 ATP 的 RNA 解旋酶。所述拓扑异构酶优选地是酶分类 (EC) 组 5.99.1.2 和 5.99.1.3 中任一组的成员。

[0193] 单链 DNA 测序的两种策略是 DNA 移位通过所述纳米孔,从顺侧到反侧和从反侧到顺侧,可顺或逆施加的电势。链测序的最有利机制是单链 DNA 顺施加的电势受控移位通过所述纳米孔。在双链 DNA 上逐步或连续起作用的核酸外切酶可被用在所述孔的顺侧,以在施加的电势下递送剩余的单链,或者在相反电势下用于反侧。同样地,也可用类似的方式使用解开双链 DNA 的解旋酶。测序应用还可能需逆着施加的电势进行链移位,但是 DNA 必须首先被所述酶在逆电势或无电势的情况下“捕获”。随后,随着在结合之后电势翻转,所述链将穿过所述孔从顺侧至反侧,并且被所述电流保持为展开的构象。所述单链 DNA 核酸外切酶或依赖单链 DNA 的聚合酶可作为分子马达将刚刚移位的单链以受控逐步的方式从反侧至顺侧逆着施加的电势拉回通过所述孔。

[0194] 试剂盒

[0195] 本发明还涉及可用于实施测序目标核酸序列的方法的试剂盒。因此,所述试剂盒

适用于测序核酸。所述试剂盒包含本发明的跨膜孔和核酸处理酶。所述孔和所述酶可以是上文所讨论的任何孔和酶。

[0196] 所述试剂盒还可包括一种或多种可使得上述方法的任何实施方案得以实施的其他试剂或装置。这类试剂或装置包括下述的一种或多种：合适的缓冲液（水溶液）、用于从受试者取样的工具（例如管或带有针头的装置）、用于扩增核酸序列的工具，如上文定义的膜或者电压钳或膜片钳仪器。试剂可以干燥状态存在于所述试剂盒中，这样可以用流体样本重新悬浮所述试剂。任选地，所述试剂盒还可包括使所述试剂盒可用于本发明方法中的说明书，或者关于所述方法适用于哪些患者的详细说明。任选地，所述试剂盒可包括核苷酸。

[0197] 通过下述实施例对本发明进行举例说明：

#### [0198] 实施例 1

[0199] 在该例中，通过增加  $\alpha$ -溶血素孔的内部正电荷并且改变它的分布，发明人使 92-nt 单链 DNA 在 +120mV 下的捕获率比野生型孔增加约 10 倍，并且显著降低了 DNA 移位穿过所述孔的电压阈值，例如对 1 个事件  $s^{-1}mM^{-1}$  降低了 50mV。此外，DNA 进入所述孔但未被移位的事件几乎被消除。这些基因工程改造的纳米孔提供了改进的核酸分析的基础，并且可以帮助进行超高速纳米孔测序。

#### [0200] 1. 材料和方法

##### [0201] 1.1 蛋白质制备

[0202] 如他处 (Cheley S, Braha O, Lu X, Conlan S, Bayley H: A functional protein pore with a "retro" transmembrane domain. *Protein Sci.* 1999, 8:1257-1267) 所述产生  $\alpha$ -HL。  $\alpha$ -HL 的一个亚基的序列在 SEQ ID NO:2 中示出。简言之，所述蛋白质在 [ $^{35}S$ ] 甲硫氨酸存在的情况下在大肠杆菌体外转录和翻译 (IVTT) 系统 (E. coli T7 S30 Extract System for Circular DNA, Cat. #L1130, Promega, Madison, WI) 中表达。将含有  $\alpha$ -HL 单体的 IVTT 反应物 (100  $\mu$ l) 与兔红细胞膜在 37°C 下孵育 1h。将所述溶液在 25000  $\times$ g 下离心并且将含有  $\alpha$ -HL 七聚体的沉淀上样至 5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上。将所述凝胶在 100V 下电泳 4h 并且在 Whatman 3M 滤纸上不加热的真空干燥 3 至 4h。将所述干燥的凝胶暴露于照相胶片 2h，将显影的胶片用于定位所述七聚体在所述凝胶上的位置。将所述凝胶的该区域切下、再水化并在 400  $\mu$ l 含有 100  $\mu$ M EDTA 的 10mM Tris.HCl (pH8.0) 中破碎。在室温下 20 分钟后，通过将所述悬浮液在室温下以 25000  $\times$ g 离心通过纤维素微量离心柱 (Microfilterfuge tubes, Cat. #7016-024, Rainin, Oakland, CA) 7 分钟，除去聚丙烯酰胺。将所纯化的蛋白质的等分试样在 -80°C 下保存。

[0203] 突变体  $\alpha$ -HL 基因可通过使用定点诱变试剂盒 (**QuickChange**<sup>®</sup> II XL, Cat. # 200522-5, Stratagene, Cedar Creek, TX) 或通过盒式诱变 (Cheley S, Gu L-Q, Bayley H: Stochastic sensing of nanomolar inositol 1,4,5-trisphosphate with an engineered pore. *Chem. Biol.* 2002, 9:829-838) 来制备。所述 RL2 基因编码所述桶结构域中的 4 个氨基酸替换 (Val-124  $\rightarrow$  Leu, Gly-130  $\rightarrow$  Ser, Asn-139  $\rightarrow$  Gln, Ile-142  $\rightarrow$  Leu) 和所述孔的氨基门 (amino latch) 区域中的 1 个氨基酸替换 (Lys-8  $\sim$  Ala)。  $\alpha$ -HL-RL2 的一个亚基的序列在 SEQ ID NO:4 中示出。每个新基因的 DNA 序列均被证实。

##### [0204] 1.2 平面双层记录

[0205] 1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的脂双层 (Avanti Polar Lipids) 在将腔室分隔为顺侧和反侧区室的 25- $\mu\text{m}$  厚的聚四氟乙烯薄膜 (Goodfellow Cambridge Limited, Cat. no. FP301200/10, Huntingdon, UK) 中的孔 (直径约 100  $\mu\text{m}$ ) 上形成。两个区室都含有 0.4mL 的含有 100  $\mu\text{M}$  EDTA 的 1M KCl、25mM Tris.HCl (pH 8)。平面双层电流记录是用膜片钳放大器 (Axopatch 200B, Axon Instruments, Foster City, CA) 进行。将蛋白质并且随后将 DNA 加入到接地的所述顺侧区室。所述 DNA 是由英国 Sigma Genosys 制备并进行 PAGE 纯化。所述 DNA 的浓度可通过在每个实验结束时测量所述顺侧腔室内溶液在 260nm 处的吸光度来确定。所述 DNA 序列是 :5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAATTCcccccccccccccccccccccttAAAAAAAAAATTCcccccccccttAAAAAAAAAATTCcccccccc-3' (SEQ ID NO :15)。

[0206] 在超过 +120mV 的外加电势下,对来自通过所述  $\alpha$ -HL 孔的离子电流的放大信号以 50kHz 低通滤波,并用配备有 Digidata 1440A 数字转换器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 的计算机以 250kHz 采样。在 +100mV 和 +80mV 的外加电势下,对所述信号以 40kHz 滤波,而在 +60mV 和 +40mV 下,对所述信号分别以 30kHz 和 20kHz 滤波。采样速率是滤波速率的至少 5 倍。将表 2 中使用的数据用 pClamp 10.1 软件 (Axon Instruments) 通过使用三种不同的电流水平进行分析。水平 0 对应于开放通道电流,水平 1 对应于中振幅事件电流而水平 2 对应于低振幅事件电流。对每个水平的分配经手工核对。

[0207] 表 2- 事件类型的分布 (以全部的百分比表示)。误差是 4 个 (WT、E111N-WT 和 M113R-WT) 或 5 个 (M113R-RL2 和 RL2) 实验的平均值的标准误差。

[0208]

	A 类型	B 类型	C 类型	D 类型	E 类型
WT	67.6±2.9	19.6±2.7	10.2±1.2	2.0±0.5	0.6±0.3
M113R-WT	94.1±1.7	1.2±0.3	3.3±1.2	1.4±0.2	0
E111N-WT	97.5±0.5	0.6±0.1	1.1±0.4	0.8±0.2	0
RL2	84.0±3.2	7.3±2.3	4.8±0.7	3.5±0.7	0.4±0.2
M113R-RL2	91.4±1.3	1.7±0.5	4.1±0.8	2.6±0.2	0.2±0.1

[0209] 将图 2b 中使用的数据使用仅两个水平进行分析和准备用于呈现 :水平 0 被设为开放通道电流,水平 1 被设为介于所述中振幅和低振幅事件电流之间。通过将事件间间隔拟合至单指数 (对数框并法 (logarithmic binning), 10 框 / 十) 并将持续时间的平均值标准化为 1  $\mu\text{M}$  的 DNA 浓度来计算 DNA 的移位频率。可从移位时间分布的柱状图的峰来计算 DNA 移位时间 (Meller A, Nivon L, Brandin E, Golovchenko J, Branton D :Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97 :1079-1084)。

[0210] 1.3 曲线拟合

[0211] 通过使用 Origin 数据分析软件 (OriginLab, Northampton, MA) 将所述 WT 纳米孔和突变的  $\alpha$ -HL 纳米孔的 DNA 移位频率的电压依赖拟合至方程 1 (图 5) 来确定  $f_{\text{max}}$ 、 $b$  和  $V_0$  的值 (表 3)。这些数值中的误差表达为标准误差。通过使用工具加权 (instrumental weight) 对每点的实验误差调整所述曲线拟合。

[0212] 表 3- 各  $\alpha$ -HL 孔的“ $f_{\text{max}}$ ”、“ $b$ ”和“ $V_0$ ”值。通过将所述数据拟合至方程 1 得到所



述值（参见方法）。其他条件在图 2 的说明中描述。

[0213]

	$f_{max}$	b	$V_0$	$V_1^a$
M113R-WT	7,300±2,200	1200±100	-90±7	45
E111N-WT	1,600±200	780±40	-56±3	50
M113R-RL2	990±300	990±90	-67±7	77
WT	300±60	420±40	25±6	100
RL2	300±150	980±130	20±17	151

[0214] 2. 结果与讨论

[0215] 2.1 DNA 移位穿过所述 WT  $\alpha$ -HL 纳米孔的电记录

[0216] 在含有 100  $\mu$ M EDTA 的 1M KCl, 25mM Tris.HCl (pH 8.0) 中进行平面脂双层中的单通道电记录。在这些条件下, 所述 WT  $\alpha$ -HL 孔具有  $1.04 \pm 0.01$  nS (+120mV, n = 23) 的单一电导率 (unitary conductance)。在向所述顺侧区室加入 92- 核苷酸的合成 ssDNA (0.5 至 2.5  $\mu$ M) 后, 通过单孔的电流由于所述 ssDNA 移位产生的短暂阻断而被中断 (Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW: Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93:13770-13773)。在 +120mV 下, DNA 分子与所述 WT 纳米孔之间的相互作用产生了 5 种不同的电流模式 (类型 A、B、C、D 和 E), 所述电流模式是三种电导率水平的组合: 开放状态、中振幅状态和低振幅状态 (图 2a) (Butler TZ, Gundlach JH, Troll MA: Determination of RNA orientation during translocation through a biological nanopore. Biophys J 2006, 90:190-199)。具有少于 10  $\mu$ s 持续时间的事件被断定为代表 DNA 与所述孔的口之间的短暂相互作用并且在发明人的分析中被忽略。如下文所证实的, 在全部 5 种类型的事件中, DNA 都被所述孔捕获, 但仅在类型 A 和 C 事件中 DNA 移位穿过所述孔, 从所述顺侧至反侧。

[0217] 在显示与每个事件相关的平均电流的柱状图中 (图 2b), 所述电流水平被分为两个峰, 分别以所述开孔电流的 0.11 倍 (低振幅) 和 0.58 倍 (中振幅) 处为中心。特征是 0.11 的部分电流 (fractional current) 的所述类型 A 事件 (图 2b) 具有最可能是  $0.14 \pm 0.01$  ms (n = 7) 的持续时间, 这从对所述事件持续时间柱状图的高斯拟合 (Fig2c) 的峰值确定 (Meller A, Nivon L, Brandin E, Golovchenko J, Branton D: Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97:1079-1084)。在 0.58 的部分电流下所述事件柱状图的峰值包含 B 类型电流阻断, 仅显示中状态电流水平 (图 2b)。C、D 和 E 类型事件包含中振幅和低振幅电流水平。C 类型事件对应于事件总数目的 10%, D 类型事件对应于事件总数目的 2%, 显示中-低-中模式的 E 类型事件仅是所述事件总数目的 0.6%。所述 C、D 和 E 类型事件在所述柱状图中分散于两个主峰之间, 反映出它们平均电流的广泛分布。

[0218] 2.2 DNA 与基因工程改造的纳米孔的相互作用

[0219] 发明人制备了多种同源七聚体  $\alpha$ -HL 孔,其中所述腔室内的电荷分布被改变。所检测的孔是同七聚体,因此突变出现在所有七个亚基中,例如, M113R 在位置 113 处具有一个七个荷正电侧链的环。通过使用所述 WT 或 RL2 基因作为模板制备所述突变体。所述 RL2 基因编码所述桶结构域中的 4 个氨基酸替换 (Val-124  $\rightarrow$  Leu, Gly-130  $\rightarrow$  Ser, Asn-139  $\rightarrow$  Gln, Ile-142  $\rightarrow$  Leu) 和所述孔的顺侧入口的 1 个替换 (Lys-8  $\rightarrow$  Ala)。突变体与所述 WT 孔在开孔电流和 DNA 移位事件发生频率方面的性质显著不同 (表 4)。

[0220] 表 4- 穿过所述  $\alpha$  HL 纳米孔的 DNA 移位。 $\tau$  是最可能的移位时间;  $f$  是标准化至  $1 \mu\text{M}$  DNA 的移位频率 (A 和 C 类型事件);  $I_B$  是 A 类型事件过程中所述部分剩余电流,  $I_{+120\text{mV}}$  是  $+120\text{mV}$  下的开孔电流。误差被表示为平均值的标准误差, 实验数目在圆括号内给出。对于  $I_B$ , 误差都在  $\pm 0.01$  内。

	$\tau$ (ms)	$f$ (s <sup>-1</sup> $\mu$ M <sup>-1</sup> )	$I_B$	$I_{+120mV}$ (pA)
WT	0.141±0.004 (n=6)	3.0±0.2 (n=12)	0.11 (n=7)	125±1 (n=23)
RL2	0.147±0.003 (n=4)	0.28±0.04 (n=5)	0.10 (n=4)	124±2 (n=16)
A8R-RL2	0.15±0.01 (n=7)	7.6±0.7 (n=5)	0.10 (n=7)	125±3 (n=10)
A8K-RL2	0.16±0.03 (n=3)	3.0±0.3 (n=3)	0.11 (n=3)	123±3 (n=7)
M113R-WT	0.138±0.003 (n=5)	23±2 (n=9)	0.04 (n=5)	140±2 (n=13)
E111N-WT	0.28±0.04 (n=10)	18±1 (n=9)	0.11 (n=10)	137±3 (n=15)
[0221] M113K-RL2	0.092±0.002 (n=3)	4.0±0.3 (n=3)	0.05 (n=3)	129±2 (n=10)
M113R-RL2	0.141±0.004 (n=4)	4.4±0.6 (n=7)	0.03 (n=5)	131±2 (n=18)
T115R-RL2	0.23±0.02 (n=3)	2.2±0.1 (n=7)	0.02 (n=3)	122±2 (n=16)
T117R-RL2	0.35±0.04 (n=8)	1.6±0.1 (n=7)	0.03 (n=4)	113±6 (n=9)
G119R-RL2	0.292±0.002 (n=4)	1.3±0.1 (n=7)	0.02 (n=4)	111±1 (n=8)
N121R-RL2	0.30±0.01 (n=9)	0.43±0.03 (n=10)	0.03 (n=6)	96±2 (n=13)
N123R-RL2	0.22±0.02 (n=5)	0.43±0.04 (n=8)	0.03 (n=4)	77±2 (n=10)
M113D-RL2	未观察到 (n=3)	未观察到 (n=3)	未观察到 (n=3)	112±3 (n=3)

[0222] 与所述野生型孔相比,从 M113R-WT (SEQ ID NO :6 的 7 个亚基) 和 E111N-WT (SEQ ID NO :8 的 7 个亚基) 形成的同七聚体在 +120mV 下显示出最大的离子电流增加 (分别为 11% 和 9%), 而 N123R-RL2 显示出最大的电流减少 (38%, 表 4)。在 +120mV 下向所述顺侧腔室加入 DNA 后, 除 M113D-RL2 之外的所有测试的突变体都出现了电流阻断, 在 M113D-RL2 的情况下, 加入 2  $\mu$  M DNA 在最高达 +300mV 下都未产生任何阻断 (n = 3)。

[0223] 5 种类型的 DNA 与所述纳米孔的相互作用的分布 (图 2a) 取决于所述突变体 (还参见图 7)。对于 WT、RL2、A8R-RL2 和 A8K-RL2 之外的孔, 捕获而不移位的数目可忽略, 因此

此后使用术语“移位”。但是,在所有的情况下,A和C类型事件的数目均用于确定DNA移位的频率。

[0224] 用带有中性侧链的氨基酸置换 Lys-8(突变体 RL2)增加了A类型事件的相对比例(84%比WT中的68%),并减少了B和C类型事件的相对比例(在RL2中分别为7%和5%,作为对比的是WT中的20%和10%)。在所述中央缩窄处消除电荷或者在所述β桶内部添加正电荷还会增加所述A类型事件的百分比,并且通过与所述WT孔相比清楚呈现出B类型和C类型事件的百分比再次减少(表2)。来自E111N-WT、M113R-WT和M113R-RL2(SEQ ID NO:14的7个亚基)的记录显示超过90%的A类型事件(分别为98%、94%和91%)以及少于6%的B类型和C类型事件(分别为2%、5%和6%)。较少的D类型和E类型事件的分率在WT、RL2和M113R-RL2中均相似,但在M113R-WT和E111N-RL2中更低(表2)。

[0225] DNA穿过所述α-HL纳米孔的移位时间未被所述点突变显著改变。具有最慢平均移位时间的突变体是 $0.35 \pm 0.04$ ms的N117R-RL2,仅为对WT孔观察的平均移位时间的2倍(表4)。所述各种突变体在DNA移位穿过所述孔过程中表现出不同程度的电流阻断(这可从所述A类型事件或最低水平的C类型事件确定)。WT、RL2、A8K-RL2和E111N-WT显示出0.10的所述开放通道电流的部分剩余电流,而在所述β桶中引入正电荷产生了更高层次的阻断(表4)。

#### [0226] 2.3 点突变对所述DNA捕获率的作用

[0227] 在+120mV下检测了荷电氨基酸侧链对DNA穿过所述α-HL孔的作用(图3)。Lys-8是与进入的DNA最接近的荷电残基。用Ala置换Lys-8(在突变体RL2中)减少每单位时间内移位事件的数目达几乎一个数量级的幅度,而用Arg置换(在A8R-RL2中,即SEQ ID NO:10的7个亚基)使所述移位率产生3倍增加(表4)。在RL2上的其他突变(相对于WT)不影响DNA移位,这通过将Lys-8再引入至RL2背景(A8K-RL2,表4和图8)所确证。

[0228] 从所述孔的顺侧入口的除去正电荷与在紧接缩窄处的下方引入正电荷的组合恢复了(M113K-RL2,即SEQ ID NO:12的7个亚单位)或者甚至略微增强了(M113R-RL2)移位频率(图3和表4)。电荷的作用是累积性的,这由M113R-WT与WT相比移位频率增加10倍以及M113R-WT与RL2比较幅度增加两个数量级所表明(图3和表4)。与正电荷的作用相比,将负电荷放置在紧接缩窄处的下方(M113D-RL2)在所有测试的电势下(+100至+300mV)消除了DNA移位。与这些发现一致,从缩窄处的除去负电荷(E111N-WT)使移位频率增加6倍。

[0229] 所述α-HLβ桶内的氨基酸置换也影响了DNA移位的频率。以Arg对位置111、113、115、117、119、121和123处氨基酸的个体替换(在所述RL2背景中)产生了表现出移位频率随着Arg定位于更远离所述顺侧入口处而逐步下降的α-HL孔(图4和表4)。相反,当DNA被加至所述蛋白质的反侧时,所述作用是相反的;DNA分子穿过所述孔的移位被接近所述反侧入口的精氨酸环增强(与缩窄位点附近的环相比)(图9)。

#### [0230] 2.4 DNA移位的电压依赖性和移位电压阈值的降低

[0231] 发明人发现DNA移位的频率 $f(V)$ 可由下式很好地描述:

$$[0232] \text{ 对于 } V > V_0, f(V) = f_{\max} e^{\frac{b}{V_0 - V}}, \quad (1)$$

[0233] 其中“ $f_{\max}$ ”是假设无限大外加电势下的DNA移位率,“ $V_0$ ”是DNA移位的阈值,较大

的“b”值更快达到“ $f_{\max}$ ”(图5)。更多正电荷产生具有大幅度减少的阈值和更快到达  $f_{\max}$  的孔(表3)。此外,在所述缩窄处没有额外电荷的孔具有较小的  $f_{\max}$  值(对于WT和RL2分别为  $300 \pm 60 \text{s}^{-1} \mu \text{M}^{-1}$  和  $300 \pm 150 \text{s}^{-1} \mu \text{M}^{-1}$ ),而在所述缩窄处和所述顺侧入口的额外正电荷给出大的  $f_{\max}$  值(对于M113R-WT和E111N-WT分别是  $7300 \pm 2200 \text{s}^{-1} \mu \text{M}^{-1}$  和  $1600 \pm 200 \text{s}^{-1} \mu \text{M}^{-1}$ )。所形成的在所述缩窄处具有额外的电荷环但在所述顺侧入口没有电荷的孔(M113R-RL2)表现出中间的  $f_{\max}$  值( $990 \pm 300 \text{s}^{-1} \mu \text{M}^{-1}$ )。

#### [0234] 2.5M113R-WT和E111N-WT的事件的停留时间/振幅分布

[0235] M113R-WT和E111N-WT同七聚体(但不是其他突变体)的事件的停留时间/振幅分布在100至200mV下产生两个明显的电流阻断簇(图7)。所述分布中的两个峰值的相对强度是电压依赖的,较长时的事件随着外加电势而增加(图7c)。第一个峰值包含具有快速移位时间和在+120mV下0.96(对于M113R-WT)和0.89(对于E111N-WT)的部分剩余电流的阻断。第二电流阻断簇包含具有较长停留时间和几乎全电流阻断的事件。不可能将所述两个簇解释为5'穿入(threading)与3'穿入(MathéJ, Aksimentiev A, Nelson DR, Schulten K, Meller A:Orientation discrimination of single-stranded DNA inside the alpha-hemolysin membrane channel. Proc Natl Acad Sci USA 2005,102:12377-12382),原因是停留时间差异太大(约100倍)。

[0236] 在该研究中,在+120mV处的阻断被考虑。在该电势下,所述短时程事件在M113R-WT和E111N-WT的停留时间/振幅分布中占主要地位,并且考虑的正是这些事件——主要是A类型事件(表2)。为了确定DNA移位频率,同时包括了短时和长时事件,但是长时事件的贡献较小。

#### [0237] 2.6 中间体V的指认

[0238] Kasianowicz及其合作者的发现支持了对中间体V的指认,他们证明在正外加电势下,ssDNA的顺侧加入产生所述开孔事件的85-100%的短时程阻断。对所述反侧腔室的PCR分析显示DNA已通过所述 $\alpha$ -HL纳米孔(Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW:Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996,93:13770-13773)。

[0239] 此外, Movileanu和同事观察到,共价连接在所述 $\beta$ 桶内部的个体PEG分子(70%)与它们连接在所述前厅内时(20%)相比可产生更多的所述开孔电流减少(Movileanu L, Cheley S, Howorka S, Braha O, Bayley H:Location of a constriction in the lumen of a transmembrane pore by targeted covalent attachment of polymer molecules. J. Gen. Physiol. 2001,117:239-251)。

[0240] Howorka和Bayley发现,共价连接在所述顺侧入口附近的DNA双链——带有伸进所述 $\beta$ 桶的突出物——可产生使所述开孔电流的约90%的电流降低(Howorka S, Bayley H:Probing distance and electrical potential within a protein pore with tethered DNA. Biophys. J. 2002,83:3202-3210)。最后,作为DNA- $\alpha$ -HL轮烷结构的一部分固定在所述 $\beta$ 桶内部的DNA可引起所述孔电流阻断85%(Sánchez-Quesada J, Saghatelian A, Cheley S, Bayley H, Ghadiri MR:Single molecule DNArrotaxanes of a transmembrane pore protein. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2004,43:3063-3067)。

#### [0241] 2.7 中间水平事件的指认

[0242] 对所述前厅的占据与电导率降低有关（但没有达到所述桶被占据时引起的程度）。例如，当高分子量 PEG 分子 (Movileanu L, Cheley S, Howorka S, Braha O, Bayley H: Location of a constriction in the lumen of a transmembrane pore by targeted covalent attachment of polymer molecules. *J. Gen. Physiol.* 2001, 117 :239-251) 或流体直径为 4.1nm 的 PAMAM 树枝状聚合物 (Martin H, Kinns H, Mitchell N, Astier Y, Madathil R, Howorka S: Nanoscale protein pores modified with PAMAM dendrimers. *J Am Chem Soc* 2007, 129 :9640-9649) 被拴在所述前厅中时，所述电流分别减少达 20% 和 45%。第二，当 DNA 双链被拴在所述前厅中时，观察到所述孔电流减少 38% (Howorka S, Bayley H: Probing distance and electrical potential within a protein pore with tethered DNA. *Biophys. J.* 2002, 83 :3202-3210)。最后，当所述  $\alpha$ -HL 孔经基因工程改造为所述前厅被柔性多肽链填充时，所述电流减少最多达 70%，所述减少依赖于插入的氨基酸数目 (Jung Y, Cheley S, Braha O, Bayley H: The internal cavity of the staphylococcal-hemolysin pore accommodates  $\sim$  175 exogenous amino acid residues. *Biochemistry* 2005, 44 : 8919-8929)。

#### [0243] 2.8 讨论

[0244] 发明人通过使用定点诱变增加了 DNA 分子移位通过所述  $\alpha$  HL 孔的频率。所述腔室内荷电基团的引入或除去对 DNA 移位有很巨大的影响。增加所述中间缩窄处附近的正电荷可使 +120mV 下的 DNA 移位频率几乎增加一个数量级 (图 3)，并且极大地降低了 DNA 移位的阈值电压 (图 5)。相反，消除所述顺侧入口的正电荷使 DNA 的移位频率下降 10 倍。所述缩窄处电荷对 DNA 移位频率的作用是出人意料的，因为所述孔的顺侧入口在 5nm 之外，并且在 1M KCl 的实验条件下德拜长度是 0.3nm。因此，未预计所述缩窄处的荷电残基会对通过延伸至本体溶液中的静电相互作用捕获 DNA 产生影响。相反，必须建议一些形式的“超距作用”——最可能的是本文所讨论的通过来自顺侧区室的 DNA 或电渗从所述孔的腔室中快速、可逆地采样。

#### [0245] DNA 与所述 $\alpha$ -HL 孔相互作用的方案

[0246] 描述了包括对所述腔室可逆采样的 DNA 捕获和移位的方案 (图 6)。在一般的移位事件 (通过中间体 V, 图 6) 之前，DNA 分子首先与所述孔碰撞 (II)。当到达所述前厅时 (III)，所述 DNA 由电泳被运送至所述窄的  $\beta$  桶内 (IV)。由于这里使用的孔是阴离子选择性的，电渗溶剂流会以相同的方向发生 (从顺侧到反侧) 并且协助 DNA 转运。这时，外加电场对所述 DNA 分子的作用最强并且所述多聚物被拉过所述孔而进入所述反侧区室 (V  $\rightarrow$  I)——发明人方案中唯一的不可逆步骤。通过将所述电流突然减少至所述开孔值的 90% (在 A 类型事件和 C 类型事件过程中) 实验地观察所述移位中间体 (V)，这是得到文献中的一些观察结果所支持的指认。例如，Kasianowicz 及其合作者证明了，ssDNA 的顺侧加入可产生所述开孔电流的 85-100% 的短时电流阻断。对所述反侧腔室的 PCR 分析显示了 DNA 已通过所述  $\alpha$  HL 孔 (Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., & Deamer, D. W. (1996) Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13770-13773)。

[0247] 在所述 WT- $\alpha$  HL 孔的情况下，并不是所有的所述电流阻断都是由于直接的 DNA 移位。在三分之一的所述事件中，观察到了中振幅事件 (图 2a)。该电流图形被解释为代表

对所述  $\alpha$ -HL 前厅的长时间占据过程中的 DNA 分子 (中间体 VI, 图 6), 这被以下事实所支持: 对所述前厅的占据与低电导率是相关的, 但电导率没有降低至占据所述桶时所引起的程度。例如, 当 DNA 双链被拴在所述前厅内时, 观察到所述孔电流减少 38% (Howorka, S. & Bayley, H. (2002) Probing distance and electrical potential within a protein pore with tethered DNA. *Biophys. J.* 83, 3202-3210)。在所述前厅中的捕获类似于 Han 和 Craighead 描述的熵受限现象 (Han, J. & Craighead, H. G. (2002) Characterization and optimization of an entropic trap for DNA separation. *Anal Chem* 74, 394-401)。

[0248] 被捕获在所述中振幅构型中的 DNA 分子 (VI, 图 6) 可以从所述顺侧区室离开所述孔 (B 类型事件, 图 2), 或者进入所述  $\beta$  桶, 产生低振幅信号 (中间体 VII)。从该构型中, 所述 DNA 可完全移位穿过所述孔并且从所述双层的反侧出去 (C 类型事件, 图 2a, 经中间体 V, 图 6), 或者可以缩回到所述前厅中并且从顺侧出去 (类型 E 事件, 图 2a)。最后, DNA 可以进入所述前厅, 立即移动至所述  $\beta$  桶以产生低振幅信号, 但是不通过所述孔 (A 类型事件), 而是退回前厅以产生中振幅信号, 之后从所述顺侧出去 (D 类型, 图 2a)。Butler 和同事最近观察到同样的现象并且得到了类似的结论 (Butler TZ, Gundlach JH, Troll MA: Determination of RNA orientation during translocation through a biological nanopore. *Biophys J* 2006, 90:190-199)。为了进一步支持所述方案, 发明人观察了一些具有多个中至低 (**VI**  $\leftrightarrow$  **VII**) 步骤的事件 (图 10)。此外, 发明人观察了具有额外 DNA 的 A-E 类型事件, 所述额外 DNA 有或没有弱的二级结构 (D. Japrun, 未发表的研究)。该研究中使用的所述 92-mer 不可能具有茎-环结构, 但是在单链核酸中螺旋结构的存在仍有争议 (Seol, Y., Skinner, G. M., Visscher, K., Buhot, A., & Halperin, A. (2007) Stretching of homopolymeric RNA reveals single-stranded helices and base-stacking. *Phys Rev Lett* 98, 158103)。

[0249] 所述孔的腔室中电荷的效应

[0250] 在内部缩窄处附近由定点诱变引入的 7 个正电荷的环增加了 DNA 分子的移位频率 (图 3), 并且减少了具有中振幅组分的事件的比例 (图 2ab)。但是, 根据发明人提出的方案, 所述 DNA 在中间体 IV、V 或 VII 时在形成所述缩窄处的残基的德拜长度之内 (图 6), 并且不能从所述本体溶液中感知这些荷电基团。因此, 为了解释所述缩窄处电荷的作用, 发明人提出 DNA 分子进入并快速离开所述  $\beta$  桶的顶端 (采样, **III**  $\leftrightarrow$  **IV**, 图 6) 很多次, 之后再缩回所述顺侧区室或向前至中间体 V、VI 或 VII。所述缩窄处正电荷的增加 (Glu-111  $\rightarrow$  Asn 或 Met-113  $\rightarrow$  Arg) 可在此处增加 DNA 对所述孔的亲合力。因此, 在这些突变体中, 在采样所述  $\beta$  桶后回到所述前厅的分子的数目减少, 并且直接 DNA 移位事件 (A 类型) 发生比率升高。此外, 由于如中间体 III 所耗的时间比例减少, 观察到中振幅事件 (VI) 的可能性减少并且更少出现 B 至 E 类型事件。在 +100mV 下对从拴在所述孔的顺侧入口附近的双链 DNA 伸出的短 DNA 突出物实验性地观察到了 ssDNA 采样所述  $\beta$  桶 (Howorka S, Bayley H: Probing distance and electrical potential within a protein pore with tethered DNA. *Biophys. J.* 2002, 83:3202-3210)。对于没有拴住的 DNA 分子, 发明人认为对所述桶的采样会更快, 并且由于带宽限制而未观察到。

[0251] 在所述 RL2 突变体中, 对所述孔的顺侧入口处电荷的消除 (Lys-8A1a) 减少了 B 类型和 C 类型事件的比例 (表 2), 并且使 DNA 移位的频率减少一个数量级的幅度 (图 3)。发

明人将这些作用归因于 DNA 对所述孔的亲合力下降。在与所述入口碰撞和进入所述前厅的过程中与所述孔的较弱相互作用（中间体 II 和 III）减少了可观察到的捕获的总数目。

[0252] 重要的是，发明人观察到对一些其他 DNA 和 RNA，内部正电荷增加的  $\alpha$ -HL 孔的捕获事件数目增加，如本文对 92-mer 所描述的。因此，发明人描述的现象并非是特定 DNA 序列所独有的。

[0253] 所述  $\beta$  桶的作用

[0254] 通过在多个位置引入精氨酸环研究了 DNA 取样所述  $\beta$  桶（步骤 IV）的深度。当从所述顺侧加入 DNA 时，发明人发现 DNA 移位频率随着所述环从所述孔的所述缩窄处（M113R-RL2）移向反侧入口（N123R-RL2）而大体上以指数下降（图 4），表明 DNA 分子可以很深地采样所述  $\beta$  桶。当从所述顺侧出现时，DNA 必须偶尔接近距离所述缩窄处 2.3nm 的残基 119。因此，当在所述孔的反侧加 DNA 时，当精氨酸环更接近所述反侧入口时可观察到更多的移位事件（在 -120mV 下）（图 9）。当所述电荷环朝向所述反侧入口运动时，所述孔的单一电导率下降约两倍（表 4），但这不太可能完全与超过 10 倍的 DNA 移位频率的剧烈变化相关。此外，在其他情况下看不出该倾向。例如，RL2 具有与所述 WT 孔类似的电导率，但有低得多的移位频率。

[0255] 电渗效应

[0256] 在以上的讨论中，发明人忽略了通过所述各  $\alpha$ -HL 孔的电渗溶剂流的差异。例如，所述 WT  $\alpha$ -HL 孔是轻度阴离子选择性的 ( $P_+/P_- = 0.78$ ，在顺侧 1M NaCl 和反侧 0.2M NaCl 中)，因此在正电压下会有从顺侧至反侧的净水流 (Gu L-Q, Cheley S, Bayley H: Electroosmotic enhancement of the binding of a neutral molecule to a transmembrane pore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100:15498-15503)。所述 M113R-WT 孔与所述 WT 孔相比阴离子选择性更高 ( $P_+/P_- = 0.38$ ，在顺侧 1M NaCl 和反侧 0.2M NaCl 中)，并且该突变体的 DNA 移位频率增加可以至少部分归因为电渗流增强。基于 Gu, L.-Q., Cheley, S., & Bayley, H. (2003) Electroosmotic enhancement of the binding of a neutral molecule to a transmembrane pore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 15498-15503 中方程式 2 的简单计算（假设每个离子负载 5 个水分子）表明，在 1  $\mu$ M DNA 溶液中，对于具有弱离子选择性的孔 ( $P_+/P_- = 0.9$ ) 每秒钟仅有两个额外分子被运送至所述孔的口处。对于具有中度选择性的孔 ( $P_+/P_- = 0.5$ ) 每秒有 23 个额外分子到达，对于具有更强选择性的孔 ( $P_+/P_- = 0.1$ ) 则每秒有 53 个额外分子到达。这些数目与本文所见的效应具有相似的数量级。

[0257] 但是，一些证据链表明电渗对 DNA 在 +120mV 下移位穿过所述  $\alpha$ -HL 孔的频率没有显著效应。例如，E111N-WT 显示出比 M113R-WT 更高的 DNA 移位频率，但是它具有小得多的离子选择性 ( $P_+/P_- = 0.71$ ，在顺侧 1M NaCl 和反侧 0.2M NaCl 中) (Gu L-Q, Cheley S, Bayley H: Electroosmotic enhancement of the binding of a neutral molecule to a transmembrane pore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100:15498-15503)。所述突变体 RL2 具有与 WT  $\alpha$ -HL 孔类似的离子选择性 ( $P_+/P_- = 0.68$ ，在顺侧 0.9M KCl 和反侧 0.3M KCl 中，R. Madathil, 未发表)，但 RL2 的 DNA 移位频率低十倍（表 4）。RL2 还显示出与 N123R-RL2 相同的 DNA 移位频率（图 5），所述 N123R-RL2 具有更高的离子选择性 ( $P_+/P_- = 0.24$ ，在顺侧 0.3M NaCl 和反侧 1.0M NaCl 中，R. Madathil, 未发表)。最后，如果当精氨酸环被放置在



所述  $\beta$  桶内不同的位置时观察到的 DNA 移位频率趋势是由于电渗,那么发明人不会预期当 DNA 从反侧而不是从顺侧穿过时所述趋势会逆转。以前的研究者已经认识到电渗可能影响穿过所述纳米孔的 DNA 移位率的可能性 (Chen P, Mitsui T, Farmer DB, Golovchenko JA, Gordon RG, Branton D: Atomic layer deposition to fine-tune the surface properties and diameters of fabricated nanopores. *Nano Letters* 2004, 4:1333-1337), 而其他人忽略了所述影响 (Meller A: Dynamics of polynucleotide transport through nanometre-scale pores. *J. Phys. :Condens. Matter* 2003, 15:R581-R607) 或者认为在主要条件下它不可能是促成因素 (Gershow M, Golovchenko JA: Recapturing and trapping single molecules with a solid-state nanopore. *Nat Nanotechnol* 2007, 2:775-779)。还可能是,电渗通过促进层流经所述前厅而有减少 B 至 E 类型事件的作用。

[0258] Movileanu 和同事研究了荷正电的肽通过在腔室中有额外附电荷的  $\alpha$ -HL 孔 (Wolfe, A. J., Mohammad, M. M., Cheley, S., Bayley, H., & Movileanu, L. (2007) Catalyzing the translocation of polypeptides through attractive interactions. *J Am Chem Soc* 129, 14034-14041; Mohammad, M. M., Prakash, S., Matouschek, A., & Movileanu, L. (2008) Controlling a single protein in a nanopore through electrostatic traps. *J Am Chem Soc* 130, 4081-4088)。捕获率和移位时间都增加了,他们将其解释为转运障碍减少。核酸(它们的移位时间并未发生较大改变( $\tau$ , 表 4))和肽之间的差异将需要进一步的实验来分析,但是一个明显的不同是核酸有更高的电荷密度。

[0259] DNA 移位的电压依赖性

[0260] 通过所述  $\alpha$ -HL 孔的 DNA 移位事件频率以非线性方式强烈依赖于所施加的电势(图 5a)。在发明人实验的低外加电势下,进入所述前厅(中间体 III, 图 6)的寡核苷酸没有感测到强的电势下降(在 +100mV 的外加电势下 < 10mV; Howorka S, Bayley H: Probing distance and electrical potential within a protein pore with tethered DNA. *Biophys. J.* 2002, 83:3202-3210)。此外,预计来自所述蛋白质中固定电荷的局部电势的贡献较小,即使在有高离子强度的情况下。因此,预计仅中间体 IV 和 V(其中 DNA 位于所述  $\beta$  桶内并处在强电场下)(图 6)可被所施加的电势显著地影响。存在 DNA 移位的电压阈值和在 < 150mV 下移位频率对电势的陡峭依赖性(图 5),表明 DNA 移位的能量屏障很大并且仅有一部到达所述  $\beta$  桶的 DNA 分子(中间体 IV)通过了整个所述孔。增加所述缩窄处附近的电荷可降低所述能量屏障,并且更多的 DNA 分子可以通过所述  $\beta$  桶(参见上文)。所述较低能量的屏障还与 DNA 移位的较低阈值有关(表 3)。其他小组观察到了 WT  $\alpha$ -HL 孔的所述阈值和所述陡峭电压依赖性,并且将他们的观察结果拟合至指数函数 (Henrickson SE, Misakian M, Robertson B, Kasianowicz JJ: Driven DNA transport into an asymmetric nanometer-scale pore. *Phys. Rev. Lett.* 2000, 85:3057-3060)。

[0261] 在较高电压下 ( $V > 150\text{mV}$ ), DNA 移位的电压依赖性不那么过陡峭(图 5)。研究 WT  $\alpha$ -HL 孔的其他小组已经描述了在高电势下的线性依赖性电压 (Meller A: Dynamics of polynucleotide transport through nanometre-scale pores. *J. Phys. :Condens. Matter* 2003, 15:R581-R607), 但在发明人的研究所述依赖更强烈。值得注意的是,  $\alpha$ -HL WT 和所述突变体孔的 DNA 移位最大频率 ( $f_{\max}$ ) 显著不同(图 5), 典型是电渗 (Wong CT, Muthukumar M: Polymer capture by electro-osmotic flow of oppositely charged nanopores. *J*

Chem Phys 2007,126 :164903),其可在这些条件下其起到更大作用。

### [0262] 3. 结论

[0263] 发明人使用了定点诱变以增加 ssDNA 移位通过  $\alpha$ -HL 孔的频率,并且同时 DNA 移位的阈值已被降低。移位率升高的最可能的机制是所述 DNA 对所述孔内部的快速采样(图 6)、电渗流增加(Chen P, Mitsui T, Farmer DB, Golovchenko JA, Gordon RG, Branton D: Atomic layer deposition to fine-tune the surface properties and diameters of fabricated nanopores. Nano Letters 2004,4 :1333-1337)或依赖于所施加的电势的所述两因素的结合。所述新的经工程改造的孔或其衍生物可用于增加  $\alpha$ -HL 作为核酸的生物传感器的敏感性。另外可能的用途是纳米孔测序,其中单 DNA 链在移位过程中被一个接着一个读取。例如,ssDNA 穿过  $\alpha$ -HL 孔的移位频率增加(如本文所证明)可能用于减少读取之间的停滞时间。以此类推,经工程改造的孔还可用于在核酸外切酶测序过程中增加对个体碱基的捕获效率,而这对于精确读取是极其重要的。

### [0264] 实施例 2

[0265] 该例中,发明人证明了 DNA 分子穿过所述  $\alpha$ -HL 生物纳米孔的移位可通过在所述孔的腔室内引入正电荷降低两个数量级。尽管 DNA 移位过程中的离子电流几乎完全被抑制,发明人提出这些纳米孔可用于控制 DNA 移位的速度,这与新出现的 DNA 分析技术结合可导致开发出用于核酸测序的坚实平台。

### [0266] 1. 材料和方法

[0267] 与实施例 1 中所使用的相同材料和方法用在本实施例中。

### [0268] 2. 结果和讨论

#### [0269] 2.1. 通过 $\alpha$ -HL 纳米孔的离子流

[0270] 在含有 100  $\mu$ M EDTA 的 1M KCl,25mM Tris.HCl(pH 8.0)中,在平面脂双层上通过单通道电流记录来检查单个通道。在 +120mV 下,所有的通道均表现出稳定的开孔电流(+120mV),但是,一些所述孔显示出分离的、短时程的电流阻断事件,原因在于所述孔的开放和闭合(Kasianowickz et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1996,见上文)。在这些纳米孔之间,单一电导率值(g)大不相同(表 5)。

[0271] 表 5-+120mV 下 DNA 穿过所述  $\alpha$ -HL 纳米孔的移位。所有的实验都在含有 100  $\mu$ M EDTA 的 1M KCl、25mM Tris.HCl(pH 8.0)中进行。 $\tau_c$ 是最可能的 DNA 移位速度,g 是所述纳米孔的单一电导率而  $I_{RES}$  是 DNA 移位过程中的残基电流百分数。除了 WT 和 2N,所有突变体都是以 RL2 为背景的(SEQ ID NO :3 和 4)。误差以标准误差显示。

孔	$\tau_G$ ( $\mu\text{s}/\text{base}$ )	$I_{\text{RES}}$	$g$ , nS (+120mV)
WT*	1.52±0.00 (n=6)	9.5 (n=5)	1.04±0.01 (n=23)
RL2*	1.63±0.00 (n=4)	10.5 (n=4)	1.03±0.02 (n=16)
2N (E111N-K147N)	2.01±0.07 (n=4)	26.5 (n=4)	1.07±0.05 (n=4)
M113R-RL2*	1.53±0.10 (n=4)	3.0 (n=5)	1.19±0.06 (n=8)
N123R-RL2*	2.39±0.22 (n=5)	3.0 (n=4)	0.64±0.02 (n=10)
2R $\diamond$ (M113R-N123R)	2.99±0.15 (n=5)	2.0 (n=4)	0.98±0.05 (n=6)
2R $\bullet$ (N123R-D127R)	4.43±0.23 (n=5)	2.5 (n=4)	0.57±0.03 (n=5)
2R $\dagger$ (M113R-T145R)	4.49±0.69 (n=5)	2.0 (n=5)	1.06±0.06 (n=5)
[0272] 3R (T115R-G119R-123R)	16.0±4.0 (n=7)	0.5 (n=6)	0.87±0.06 (n=7)
4R (T115R-G119R- N123R-D127R)	29.0±5.5 (n=4)	0.5 (n=4)	0.70±0.09 (n=6)
7R (M113R-T115R-T117R- G119R-N121R-N123R- T125R)	269 ±14 (n=6)	0.5 (n=6)	0.87±0.02 (n=6)
7R $_6$ RL2 $_1$	100±35 (n=7)	0.5 (n=5)	0.91±0.02 (n=7)
7R $_5$ RL2 $_2$	66.6±10.1 (n=5)	0.5 (n=5)	0.88±0.09 (n=5)
7R $_4$ RL2 $_3$	51.2±6.1 (n=5)	0.5 (n=5)	0.86±0.05 (n=5)
7R $_3$ RL2 $_4$	21.4±8.8 (n=7)	1.0 (n=5)	0.94±0.05 (n=7)
7R $_2$ RL2 $_5$	9.89±2.15 (n=5)	1.5 (n=5)	0.93±0.07 (n=5)
7R $_1$ RL2 $_6$	5.95±1.10 (n=5)	4.0 (n=4)	0.99±0.05 (n=5)

[0273] \* - 来自实施例 1 和 Maglia, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008 (见上文) 的数据

[0274] 除了 WT 和 2N(E111N-K147N), 本研究中的所有纳米孔都通过使用 RL2 基因 (SEQ ID NO:3) 作为模板制备, 所述 RL2 基因编码所述孔的  $\beta$  桶区域的 4 个氨基酸突变 (Val-124  $\rightarrow$  Leu, Gly-130  $\rightarrow$  Ser, Asn-139  $\rightarrow$  Gln, Ile-142  $\rightarrow$  Leu) 和顺侧入口中的一个氨基酸突变 (Lys-8  $\rightarrow$  Ala) (SEQ ID NO:4; Cheley, Protein Sci., 1999, 见上文)。与所述 WT 孔相比, 将正电荷引入至所述缩窄处附近增加了所述纳米孔的离子流, 这在 M113R 和

M113R-T145R 形成的同七聚体中被观察到。相反地,当正电荷被引入至所述  $\alpha$ -HL 孔的反侧出口时,离子电流显著减少 (Maglia et al., (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105 (50) : 19720-19725)。N123R 和 N123R-D127R 孔显示出最大程度的离子电流下降,单一电导率值分别是  $0.64 \pm 0.02 \text{ nS}$  ( $n = 10, +120 \text{ mV}$ ) 和  $0.57 \pm 0.03$  ( $n = 5, +120 \text{ mV}$ ) (表 5)。以在 +50 下的离子电流值除以 -50 下的电流计算出的电流整流比 (rectification ratio) 也依赖于所述电荷的位置而变化。在所述反侧出口 (位置 121 之后) 附近引入了额外正电荷的纳米孔显示出小于 1 的电流整流 (例如,它们在负的外加电势下比在正的外加电势下显示出更高的电流),而在所述顺侧附近引入正电荷的突变体表现出与 WT- $\alpha$ -HL 类似的整流行为 (大于 1)。在另一方面,在所述中央缩窄处无电荷的纳米孔表现出几乎无整流行为 ( $R \sim 1$  in 2N)。这些结果表明,与之前的结果 (Wolfe, J Am Chem Soc, 2007, supra; Maglia et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, 见上文) 一致,分子 (例如,离子) 穿过相对小尺寸的所述  $\alpha$ -HL 纳米孔的转运可通过在所述孔的  $\beta$  桶区域内引入荷电残基强来加以改变。

### [0275] 2.2 DNA 穿过 $\alpha$ -HL 纳米孔的移位

[0276] 在正的外加电势下在所述腔室的顺侧加入短 ssDNA (本研究中为 92 个碱基核苷酸) 可激发由单链 DNA 分子的移位引起的电流阻断 (Kasianowicz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 见上文)。最可能的移位时间  $\tau_c$  被定义为对事件持续时间柱状图进行高斯拟合的峰值 (图 11a)。对于所述 WT 纳米孔,在 +120mV 下 DNA 通过所述孔的  $\tau_c$  是  $0.141 \pm 0.004 \text{ ms}$ ,对应于  $1.53 \pm 0.00 \mu \text{ s/nt}$  ( $n = 6$ ) 的移位速度。对所述孔的桶中电荷的操控改变了 DNA 与所述孔之间的相互作用。然而,由 DNA 引起的所述电流阻断停留时间的指数递减 (如 7R 纳米孔的实例所示 (图 12b)) 表明 DNA 也移位通过所述改变的纳米孔。

[0277] 在所述中央缩窄处除去电荷 (E111N/147N) 或者在所述孔腔室中引入单个 (1R) 或两个 (2R) 精氨酸环对 DNA 穿过所述孔的移位速度几乎没有作用 (在所述 2R- $\alpha$ -HL 突变体中最可能的移位速度仅比 WT- $\alpha$ -HL 降低 2-3 倍)。在所述纳米孔的桶中引入 3 个 (3R- $\alpha$ -HL) 或 4 个 (4R) 精氨酸环使最可能移位速度分别降低约 10 倍和约 20 倍。在所述孔的腔室内加入 7 个精氨酸残基环 (7R) 时观察到了最强的作用,使得 DNA 穿过所述孔的移位速度与所述 WT 和 RL2  $\alpha$ -HL 孔相比降低超过两个数量级 ( $269 \pm 14 \mu \text{ s/nt}$ , 表 5)。

### [0278] 2.3 通过 $\alpha$ -HL 纳米孔的剩余电流

[0279] DNA 分子移位通过  $\alpha$ -HL 纳米孔过程中的剩余电流 ( $I_{\text{RES}}$ ) 被定义为阻断的孔电流 ( $I_{\text{B}}$ ) 除以所述开孔电流 ( $I_0$ ),以百分数表示。WT 纳米孔显示出 11% 的部分剩余电流。在 DNA 纳米孔测序中,  $I_{\text{RES}}$  是重要的,因为它是单个碱基在移位通过所述孔时被区分开来的最可能工具。遗憾的是,尽管引入精氨酸残基使得可控制 DNA 穿过  $\alpha$ -HL 纳米孔的移位,但 DNA 移位时的剩余电流大幅度下降 (表 5)。所述孔的腔室中的单个和两个精氨酸置换分别降低所述剩余电流至 4% 和 2% (Maglia, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, 见上文,以及表 5),而所述桶中三个或更多个精氨酸环将  $I_{\text{RES}}$  降低至 0.5% (表 5)。相反,用较小的不荷电天冬酰胺残基替换所述缩窄处的荷电残基 (E111N-K147N) 增加所述部分剩余电流至 26%。

[0280] 所述孔的桶内氨基酸修饰对通过所述  $\alpha$ -HL 孔的剩余电流 (当 DNA 在所述孔中时) 的作用最可能归因为位阻效应和静电效应的结合。精氨酸具有较大的体积 ( $173.4 \text{ \AA}^3$ ),并且当替换苏氨酸 ( $116.1 \text{ \AA}^3$ ) 或甘氨酸 ( $60.1 \text{ \AA}^3$ ) 残基时会减小所述孔的直径并因此减小  $I_{\text{RES}}$ 。类似地,用天冬酰胺 ( $117.4 \text{ \AA}^3$ ) 在所述缩窄处置换谷氨酸

( $138.4\text{\AA}^3$ )和赖氨酸( $166.7\text{\AA}^3$ )会略微增大所述缩窄处的直径并因此增大  $I_{\text{RES}}$ 。然而,静电相互作用可能起很大的作用。在所述 WT 和突变体中,仅体积的减小不能解释所述孔的桶中的正电荷还对阳离子通过产生额外的能量屏障,所述阳离子在 DNA 移位过程中提供大部分的离子电流。

[0281] 2.4 DNA 移位穿过  $\alpha$ -HL 异七聚体

[0282] 通过将 C 末端含有 D8 尾的 7R 单体与 RL2 单体在兔血红细胞上混合来制备异七聚体  $\alpha$ -HL 孔,并通过 SDS-PAGE 来分离单衍生化 (mono-derivatized) 的七聚体 (SI)。因此,所述经修饰的孔包含沿着所述孔的桶从所述缩窄处延伸至所述孔的反侧出口处的单精氨酸残基线,形成指导 DNA 移位穿过所述  $\alpha$ -HL 孔的导轨。曾希望所述精氨酸残基会通过以下方式减少 DNA 移位:与 DNA 的磷酸基团强烈相互作用,同时仍然允许  $\text{K}^+$  离子通过所述孔,从而使得可以识别碱基。然而,衍生化的七聚物显示出与荷有类似正电荷的同七聚体在所述桶中的情况非常相似的残基电流和 DNA 移位速度(表 5)。值得注意的是, DNA 穿过所述孔的移位速度指数性地依赖于所述桶的内部电荷(图 14),表明有强的多聚物-孔相互作用 (Wanunu, M. Sutin, J. McNally, B. Chow, A. and A. Meller (2008), *Biophys. J.*, 95, 4716-25; Luo et al., (2007), *Phys. Rev. Lett.*, 99(14):148102)。

[0283] 以下表 6 至 13 显示序列信息。

[0284]

表 6 - SEQ ID NO: 1 和 2 - 来自金黄色葡萄球菌的野生型  $\alpha$ -溶血素

ATGGCAGATTCTGATATTAATATTTAAAACCGGTTACTACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAA  
 AAACAGGTGATTTAGTCACTTATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAAGTATTTTATAGTTT  
 TATCGATGATAAAAATCACAATAAAAACTGCTAGTTATTAGAACAAAAGGTACCATTGCTGGT  
 CAATATAGAGTTTATAGCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTA  
 AGGTACAGTTGCAACTACCTGATAATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCAAGAAATTC  
 GATTGATACAAAAGAGTATATGAGTACTTTAACTTATGGATTCAACGGTAATGTTACTGGTGAT  
 GATACAGGAAAAATTGGCGGCCTTATTGGTGCAAATGTTTCGATTGGTCATACACTGAAATATG  
 TTCAACCTGATTTCAAACAATTTTAGAGAGCCCAACTGATAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGAT  
 ATTTAAACAATATGGTGAATCAAATTTGGGACCATACGATCGAGATTCTTGGAACCCGGTATAT  
 GGCAATCAACTTTTCATGAAAAGTAGAAAATGGTTCTATGAAAGCAGCAGATAACTTCCTTGATC  
 CTAACAAAGCAAGTTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTACCAGACTTCGCTACAGTTATTACTAT  
 GGATAGAAAAGCATCCAACAACAACAATATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGAT  
 TACCAATTGCATTGGACTTCAACAATTTGGAAAGGTACCAATACTAAAGATAAATGGACAGATC  
 GTTCTTCAGAAAGATATAAAATCGATTGGGAAAAGAAGAAATGACAAAT

ADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTGDLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLLVIRTKGTIAGQ  
 YRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEYMSTLLTYGFNGNVTGDD  
 TGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYG  
 NQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDY  
 QLHWTSTNWKGTNTKDKWTDRSSERYKIDWEKEEMTN

[0285]

[0286]

表 7 - SEQ ID NO: 3 和 4 -  $\alpha$ -溶血素 RL2

ATGGCAGATTCTGATATTAATATTGCAACCGGTACTACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAA  
AAACAGGTGATTTAGTCACTTATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAAGTATTTTATAGTTT  
TATCGATGATAAAAATCACAATAAAAAACTGCTAGTTATTAGAACAAAAGGTACCATTGCTGGT  
CAATATAGAGTTTATAGCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTA  
AGGTACAGTTGCAACTACCTGATAATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCGCGGAATTC  
GATTGATACAAAAGAGTATATGAGT

ACGTTAACGTACGGATTCAACGGTAACCTTACTGGTGATGATACTAGTAAAATTGGAGGCCTTA  
TTGGGGCCCAGGTTTCCCTAGGTCATACACTTAAGTATGTTCAACCTGATTTCAAACAATTCT  
CGAGAGCCCAACTGATAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGATATTTAACAATATGGTGAATCAAAT  
TGGGGACCATACGATCGAGATTCTTGAACCCGGTATATGGCAATCACTTTTCATGAAAATA  
GAAATGGTTCTATGAAAGCAGCAGATAACTTCCTTGATCCTAACAAAGCAAGTTCTCTATTATC  
TTCAGGGTTTTCCACCAGACTTCGCTACAGTTATTACTATGGATAGAAAAGCATCCAAACAACAA  
ACAAATATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGATTACCAATTGCATTGGACTTCAACAA  
ATTGGAAAGGTACCAATACTAAAGATAAATGGACAGATCGTTCTTCAGAAAGATATAAAATCGA  
TTGGGAAAAAGAAGAAATGACAAATTAA

ADSDINIATGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQ  
YRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNSIDTKEYMSTLTYGFNGLTGDD  
TSKIGGLIGAQVSLGHTLKYVQPDFKFILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYG  
NQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIIDVIYERVRDDY  
QLHWTSTNWKGTNTKDKWTDRSSERYKIDWEKEEMTN

[0287]

表 8 - SEQ ID NO: 5 和 6 -  $\alpha$ -溶血素 M113R-WT

ATGGCAGATTCTGATATTAATATTTAAAACCGGTACTACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAA  
AAACAGGTGATTTAGTCACTTATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAAGTATTTTATAGTTT  
TATCGATGATAAAAATCACAATAAAAAACTGCTAGTTATTAGAACAAAAGGTACCATTGCTGGT  
CAATATAGAGTTTATAGCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTA  
AGGTACAGTTGCAACTACCTGATAATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCAAGAAATTC  
GATTGATACAAAAGAGTATAGGAGTACTTTAACTTATGGATTCAACGGTAATGTTACTGGTGAT  
GATACAGGAAAAATTGGCGGCCTTATTGGTGCAAATGTTTCGATTGGTCATACACTGAAATATG  
TTCAACCTGATTTCAAACAATTTTAGAGAGCCCAACTGATAAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGAT  
ATTTAACAATATGGTGAATCAAATTTGGGGACCATACGATCGAGATTCTTGGAACCCGGTATAT  
GGCAATCAACTTTTCATGAAAAC TAGAAATGGTTCTATGAAAGCAGCAGATAACTTCCTTGATC  
CTAACAAAGCAAGTTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCCACGACTTCGCTACAGTTATTACTAT  
GGATAGAAAAGCATCCAAACAACAACAATATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGAT  
TACCAATTGCATTGGACTTCAACAATTTGGAAAGGTACCAATACTAAAGATAAATGGACAGATC  
GTTCTTCAGAAAGATATAAAATCGATTGGGAAAAAGAAGAAATGACAAATTAA

ADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTGDLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQ  
YRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNSIDTKEYSTLTYGFNGNVTGDD  
TGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYG  
NQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIIDVIYERVRDDY  
QLHWTSTNWKGTNTKDKWTDRSSERYKIDWEKEEMTN

[0288]

[0289]



表 9 - SEQ ID NO: 7 和 8 -  $\alpha$ -溶血素 E111N-WT

ATGGCAGATTCTGATATTAATATTTAAAACCGGTACTACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAA  
AAACAGGTGATTTAGTCACTTATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAAGTATTTTATAGTTT  
TATCGATGATAAAAAATCACATAAAAAACTGCTAGTTATTAGAACAAAAGGTACCATTGCTGGT  
CAATATAGAGTTTATAGCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTA  
AGGTACAGTTGCAACTACCTGATAATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCAAGAAATTC  
GATTGATACAAAAACTATATGAGTACTTTAACTTATGGATTCAACGGTAATGTTACTGGTGAT  
GATACAGGAAAAATTGGCGGCCTTATTGGTGCAAATGTTTCGATTGGTCATACACTGAAATATG  
TTCAACCTGATTTCAAACAATTTTAGAGAGCCCAACTGATAAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGAT  
ATTTAACAATATGGTGAATCAAATTTGGGGACCATACGATCGAGATTCTTGGAACCCGGTATAT  
GGCAATCAACTTTTCATGAAAAGTAGAAATGGTTCTATGAAAGCAGCAGATAAAGTTCCTTGATC  
CTAACAAAGCAAGTTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCCACCAGACTTCGCTACAGTTATTACTAT  
GGATAGAAAAGCATCCAAACAACAAACAATATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGAT  
TACCAATTGCATTGGACTTCAACAAATTGGAAAGGTACCAATACTAAAGATAAATGGACAGATC  
GTTCTTCAGAAAGATATAAAATCGATTGGGAAAAAGAAGAAATGACAAATTA

ADSDINIKTGTDDIGSNTTVKTGDLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQ  
YRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKYMSLTLYGFNGNVTGDD  
TGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYG  
NQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDY  
QLHWTSTNWKGTNTKDKWTDRSSERYKIDWEKEEMTN

[0290]

[0291]

表 10 - SEQ ID NO: 9 和 10 -  $\alpha$ -溶血素 A8R-RL2

ATGGCAGATTCTGATATTAATATTTAAAACCGGTACTACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAA  
 AACAGGTGATTTAGTCACTTATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAAGTATTTTATAGTTT  
 TATCGATGATAAAAAATCACAATAAAAAACTGCTAGTTATTAGAACAAAAGGTACCATTGCTGGT  
 CAATATAGAGTTTATAGCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTA  
 AGGTACAGTTGCAACTACCTGATAATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCGCGGAATTC  
 GATTGATACAAAAGAGTATATGAGTACGTAAACGTACGGATTCAACGGTAACCTTACTGGTGAT  
 GATACTAGTAAAATTGGAGGCCTTATTGGGGCCCAGGTTTCCCTAGGTCATACACTTAAGTATG  
 TTCAACCTGATTTCAAACAATTCTCGAGAGCCCAACTGATAAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGAT  
 ATTTAACAATATGGTGAATCAAATTTGGGGACCATACGATCGAGATTCTTGGAACCCGGTATAT  
 GGCAATCAACTTTTCATGAAAAGTAGAAATGGTTCTATGAAAGCAGCAGATAACTTCCTTGATC  
 CTAACAAAGCAAGTTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTACCAGACTTCGCTACAGTTATTACTAT  
 GGATAGAAAAGCATCCAACAACAACAATATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGAT  
 TACCAATTGCATTGGACTTCAACAATTTGGAAAGGTACCAATACTAAAGATAAATGGACAGATC  
 GTTCTTCAGAAAGATATAAAATCGATTGGGAAAAGAAGAAATGACAAATTAA

ADSDINI **L** TGTTDIGSNTTVKTGDLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQ  
 YRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNSIDTKEY**MSTLTYGFNGNLT**GDD  
 TSKIGGLIGAQVSLGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYG  
 NQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI DVIYERVRDDY  
 QLHWTSTNWKGTNTKDKWTD RSSERYKIDWEKEEMTN

[0292]

表 11 - SEQ ID NO: 11 和 12 -  $\alpha$ -溶血素 M113K-RL2

ATGGCAGATTCTGATATTAATATTGCAACCGGTACTACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAA  
AAACAGGTGATTTAGTCACTTATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAGTATTTTATAGTTT  
TATCGATGATAAAAATCACAATAAAAAACTGCTAGTTATTAGAACAAAAGGTACCATTGCTGGT  
CAATATAGAGTTTATAGCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTA  
AGGTACAGTTGCAACTACCTGATAATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCGCGGAATTC  
GATTGATACAAAAGAGTATAAGAGTACGTTAACGTACGGATTCAACGGTAACCTTACTGGTGAT  
GATACTAGTAAAATTGGAGGCCTTATTGGGGCCCAGGTTTCCCTAGGTCATACACTTAAGTATG  
TTCAACCTGATTTCAAACAATTCTCGAGAGCCCAACTGATAAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGAT  
ATTTAACAATATGGTGAATCAAAATGGGGACCATACGATCGAGATTCTTGAACCCGGTATAT  
GGCAATCAACTTTTCATGAAAAGTAGAAATGGTTCTATGAAAGCAGCAGATAACTTCCTTGATC  
CTAACAAAGCAAGTTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCCACGACTTCGCTACAGTTATTACTAT  
GGATAGAAAAGCATCCAAACAACAACAATATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGAT  
TACCAATTGCATTGGACTTCAACAAATTGGAAAGGTACCAATACTAAAGATAAATGGACAGATC  
GTTCTTCAGAAAGATATAAAATCGATTGGGAAAAAGAAGAAATGACAAATTAA

ADSDINIATGTTDIGSNTTVKTGDLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQ  
YRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEY **STLTYGFNGNLT**GDD  
TSKIGGLIGAQVSLGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYG  
NQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIIDVIYERVRDDY  
QLHWTSTNWKGTNTKDKWTRSSERYKIDWEKEEMTN

[0293]

[0294]

**表 12 - SEQ ID NO: 13 和 14 -  $\alpha$ -溶血素 M113R-RL2**

ATGGCAGATTCTGATATTAATATTGCAACCGGTACTACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAA  
 AACAGGTGATTTAGTCACTTATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAAGTATTTTATAGTTT  
 TATCGATGATAAAAATCACAATAAAAAACTGCTAGTTATTAGAACAAAAGGTACCATTGCTGGT  
 CAATATAGAGTTTATAGCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTA  
 AGGTACAGTTGCAACTACCTGATAATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCGCGGAATC  
 GATTGATACAAAAGAGTATAGAAGTACGTTAACGTACGGATTCAACGGTAACCTTACTGGTGAT  
 GATACTAGTAAAATTGGAGGCCTTATTGGGGCCCAGGTTTCCCTAGGTCATACACTTAAGTATG  
 TTCAACCTGATTTCAAACAATTCTCGAGAGCCCAACTGATAAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGAT  
 ATTTAACAAATATGGTGAATCAAATTTGGGGACCATACGATCGAGATTCTTGGAACCCGGTATAT  
 GGCAATCAACTTTTCATGAAAAGTAGAAATGGTTCTATGAAAGCAGCAGATAACTTCCTTGATC  
 CTAACAAAGCAAGTTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCCACCAGACTTCGCTACAGTTATTACTAT  
 GGATAGAAAAGCATCCAAACAACAACAATATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGAT  
 TACCAATTGCATTGGACTTCAACAAATTGGAAAGGTACCAATACTAAAGATAAATGGACAGATC  
 GTTCTTCAGAAAGATATAAAAATCGATTGGGAAAAAGAAGAAATGACAAATTA

ADSDINIATGTTDIGSNTTVKTDGLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQ  
 YRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYSTLTYGFNGNLTGDD  
 TSKIGGLIGAQVSLGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYG  
 NQLFMKTRNGSMKAADNFDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIIDVIYERVRDDY  
 QLHWTSTNWKGTNTKDKWTDRSSERYKIDWEKEEMTN

[0295]

**表 13 - SEQ ID NO: 15 - 实施例 1 中使用的 DNA 序列**

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTTAAAAAAAAAATCCCCC  
 CCCCTTAAAAAAAAAATCCCCCCCCC

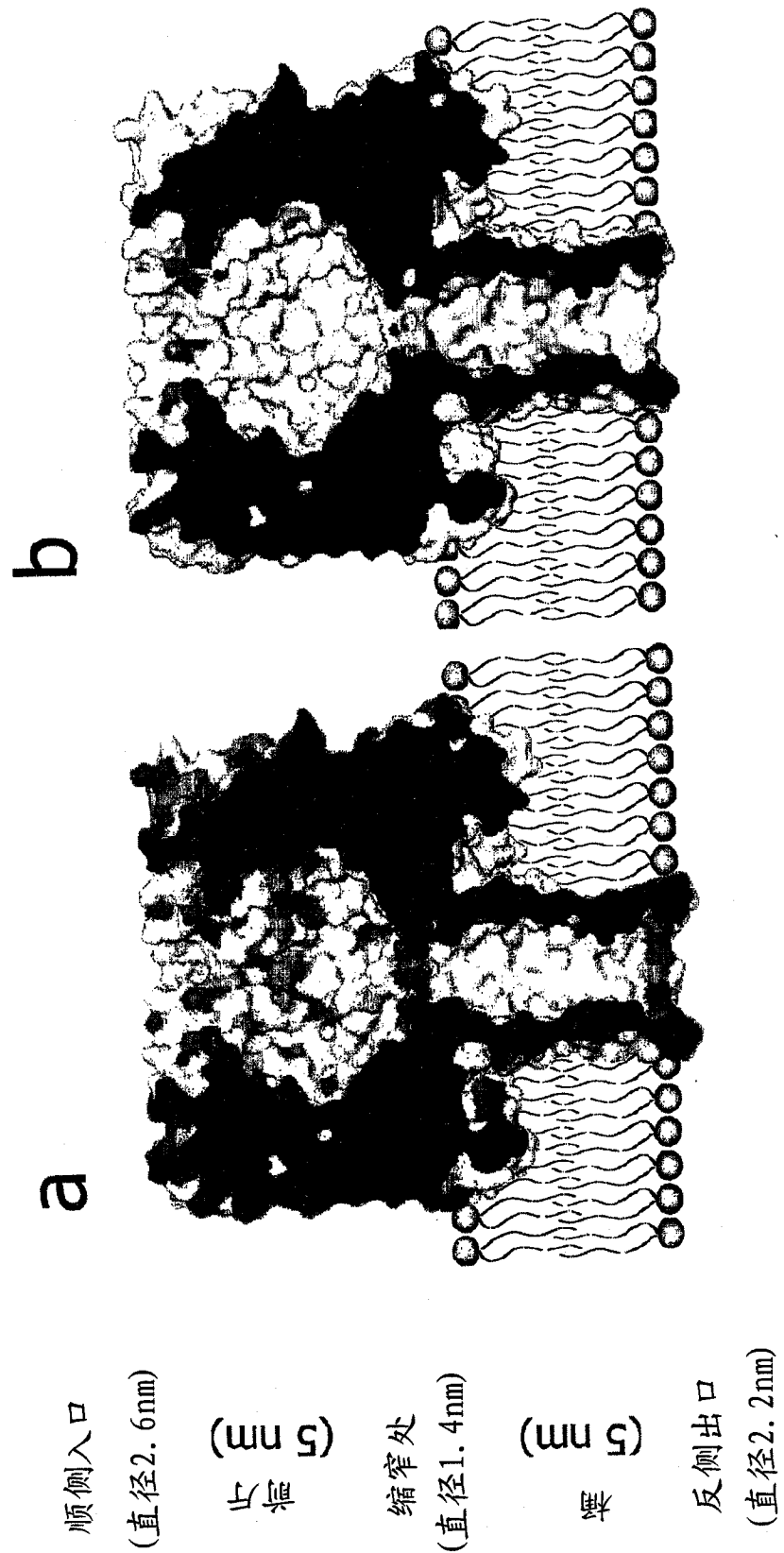


图 1

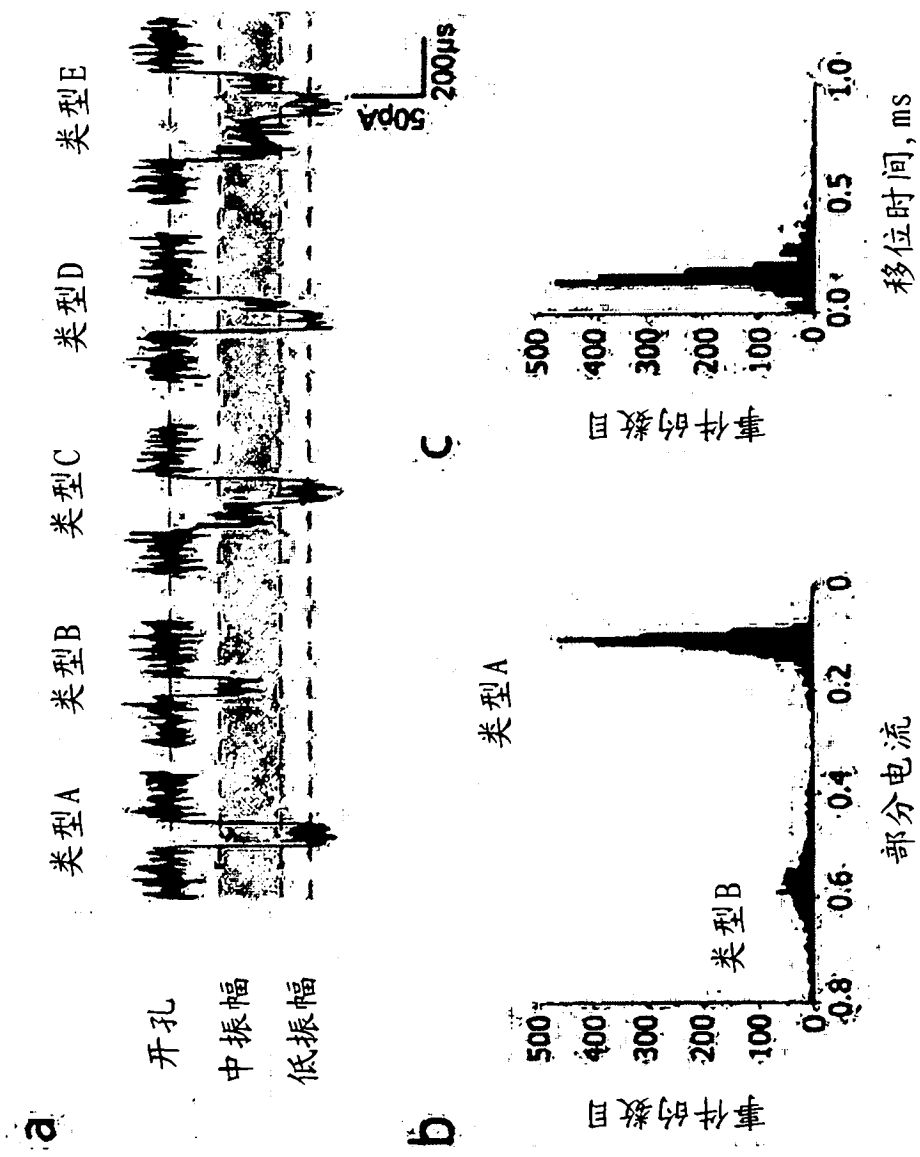


图 2

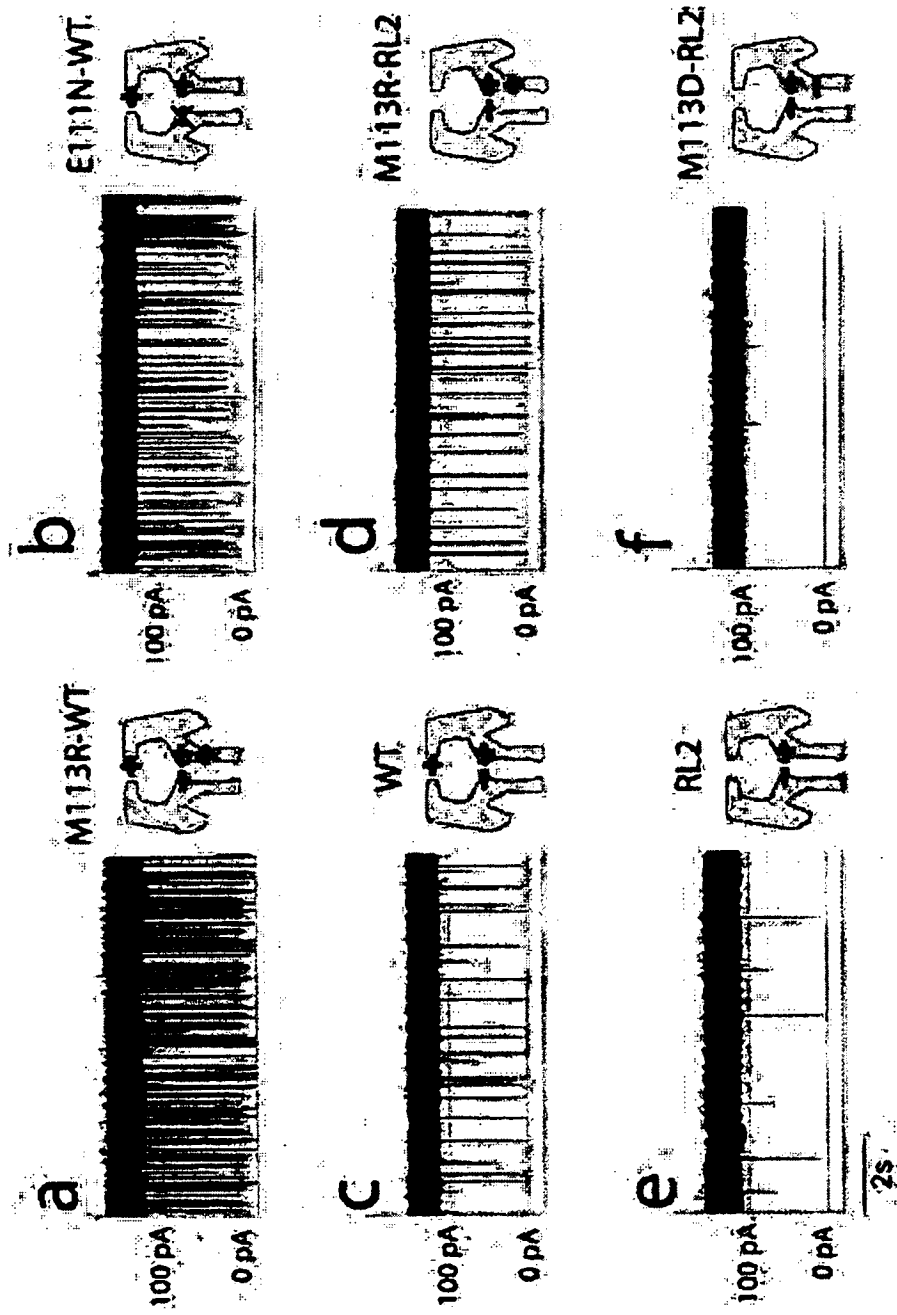


图 3

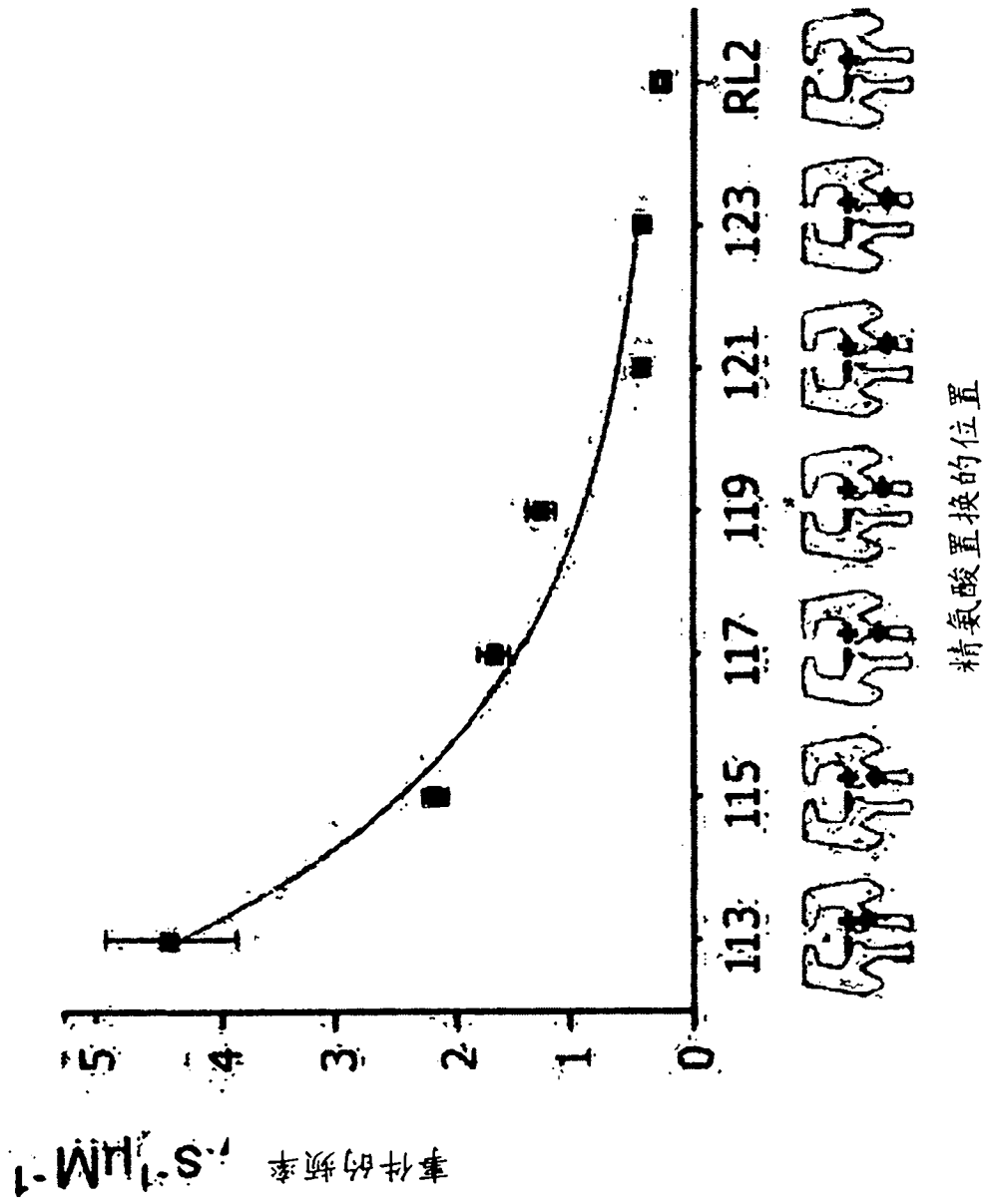


图 4



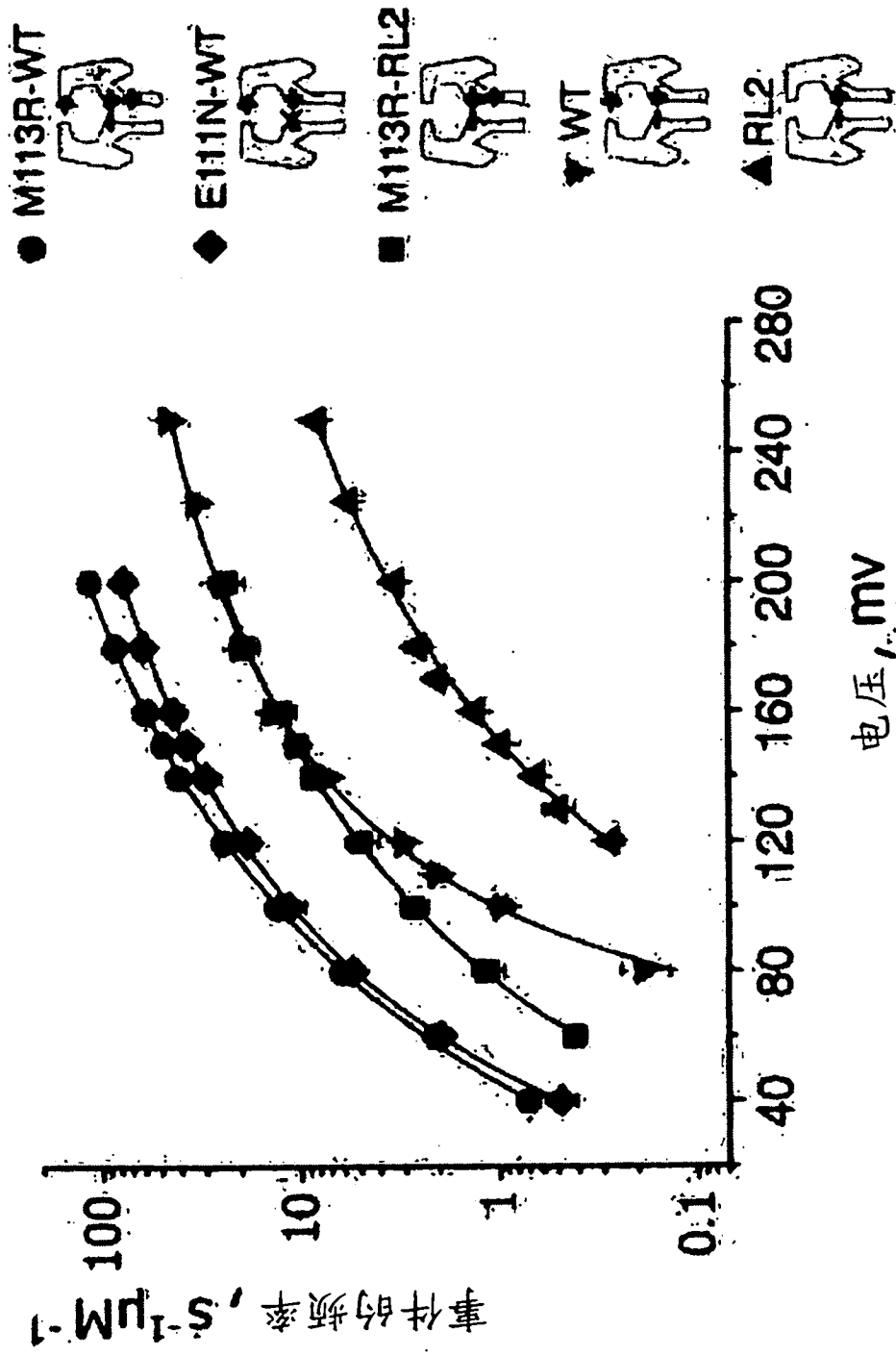


图 5

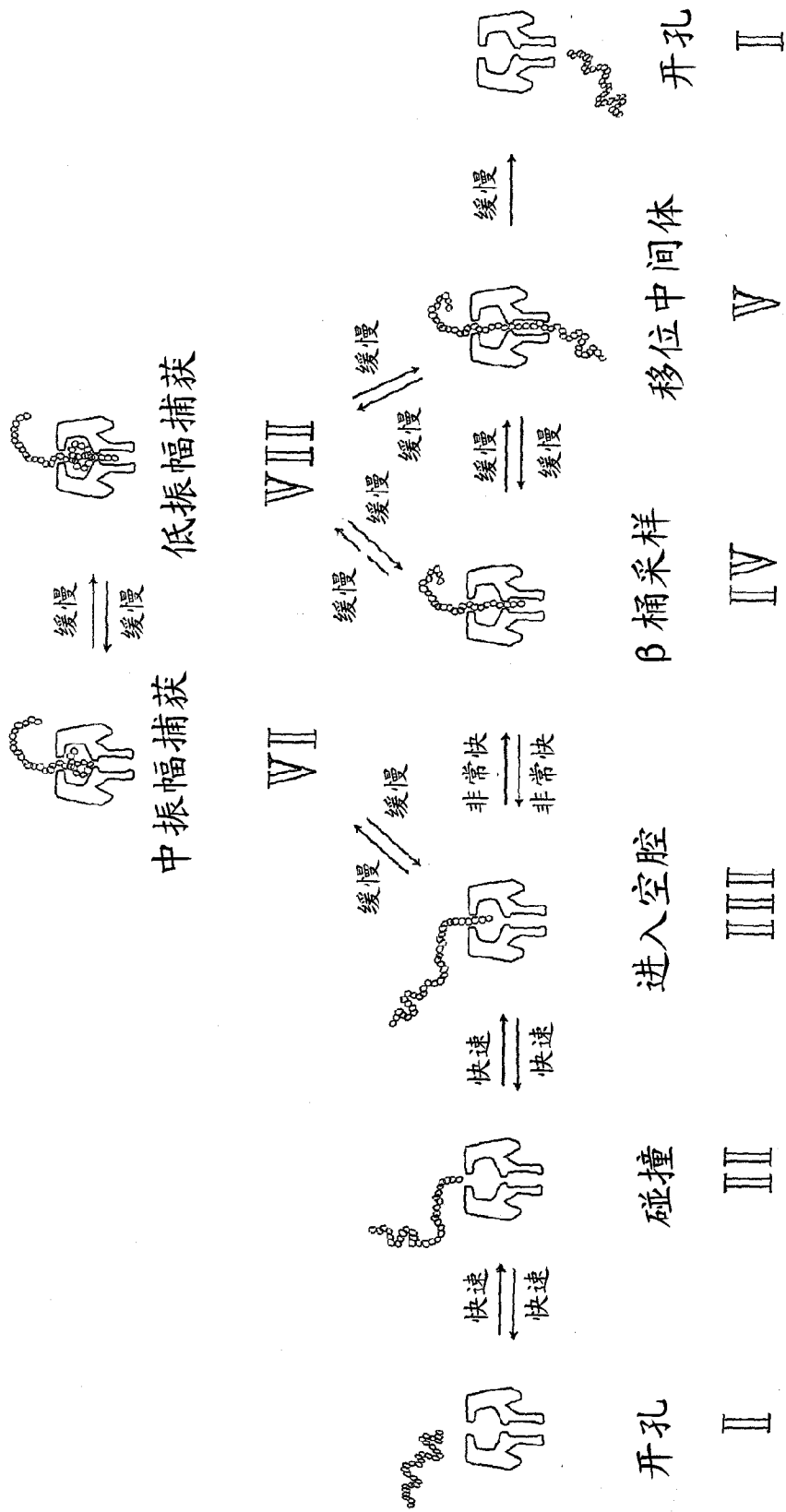


图 6

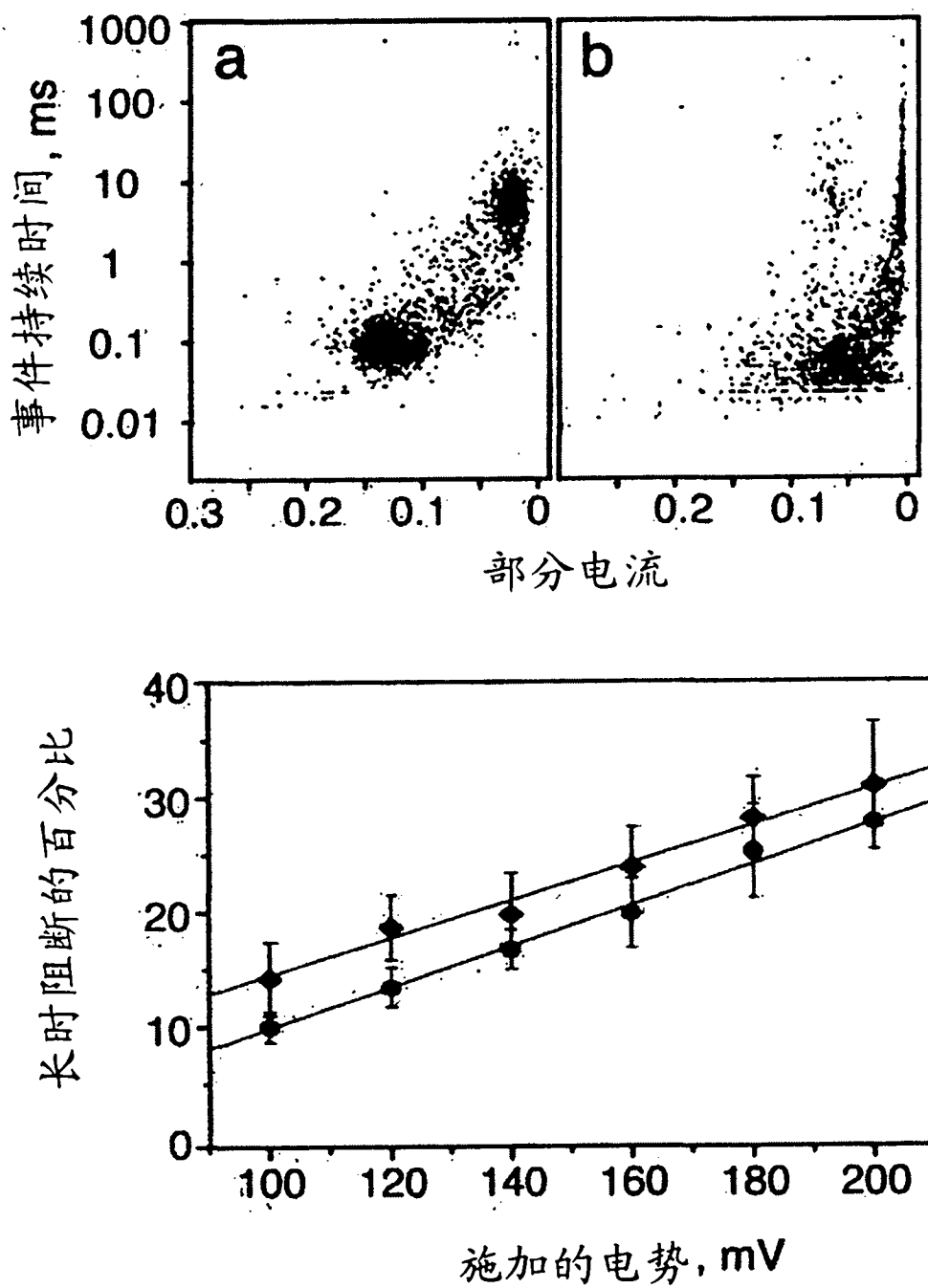


图 7

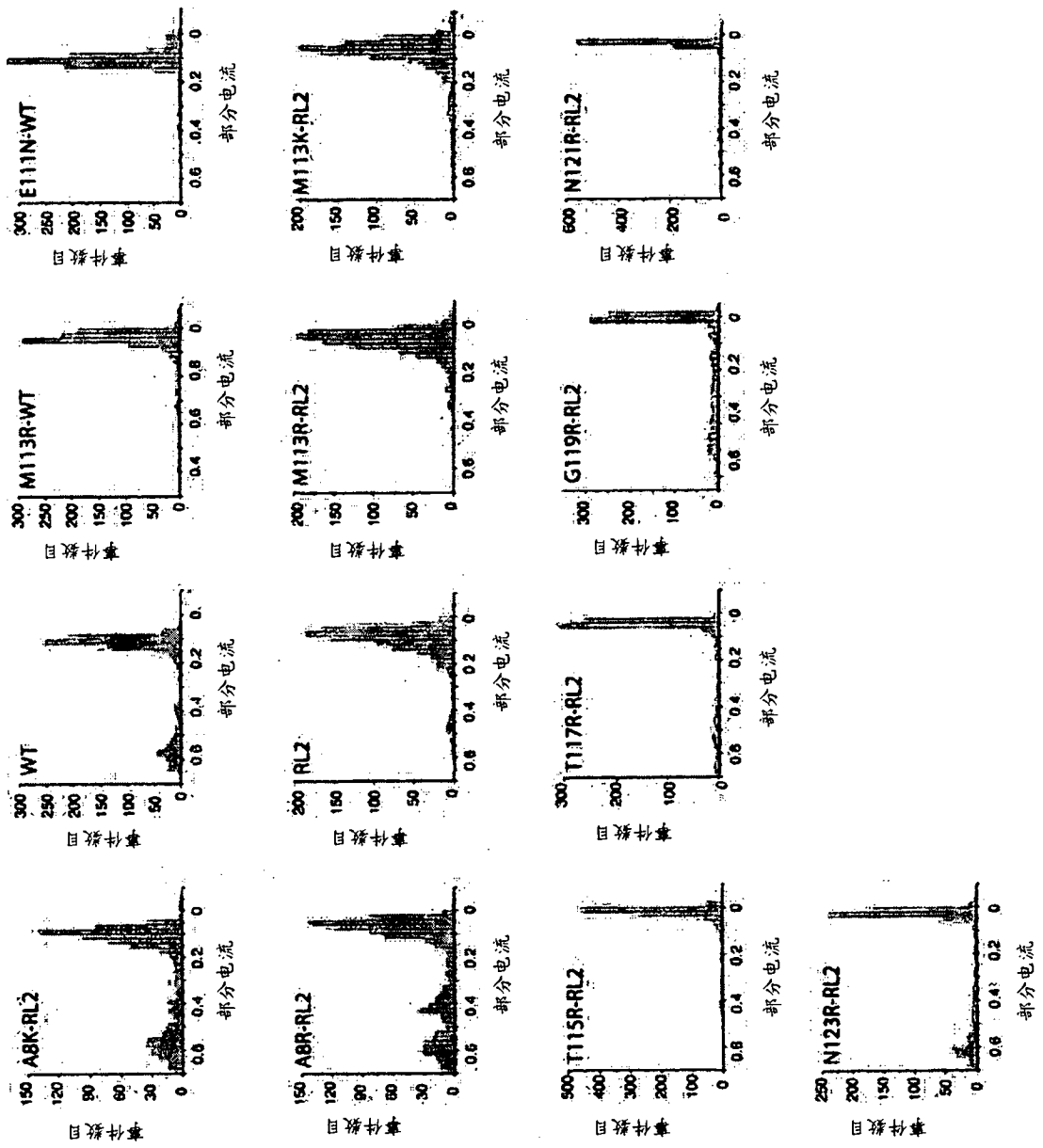


图 8

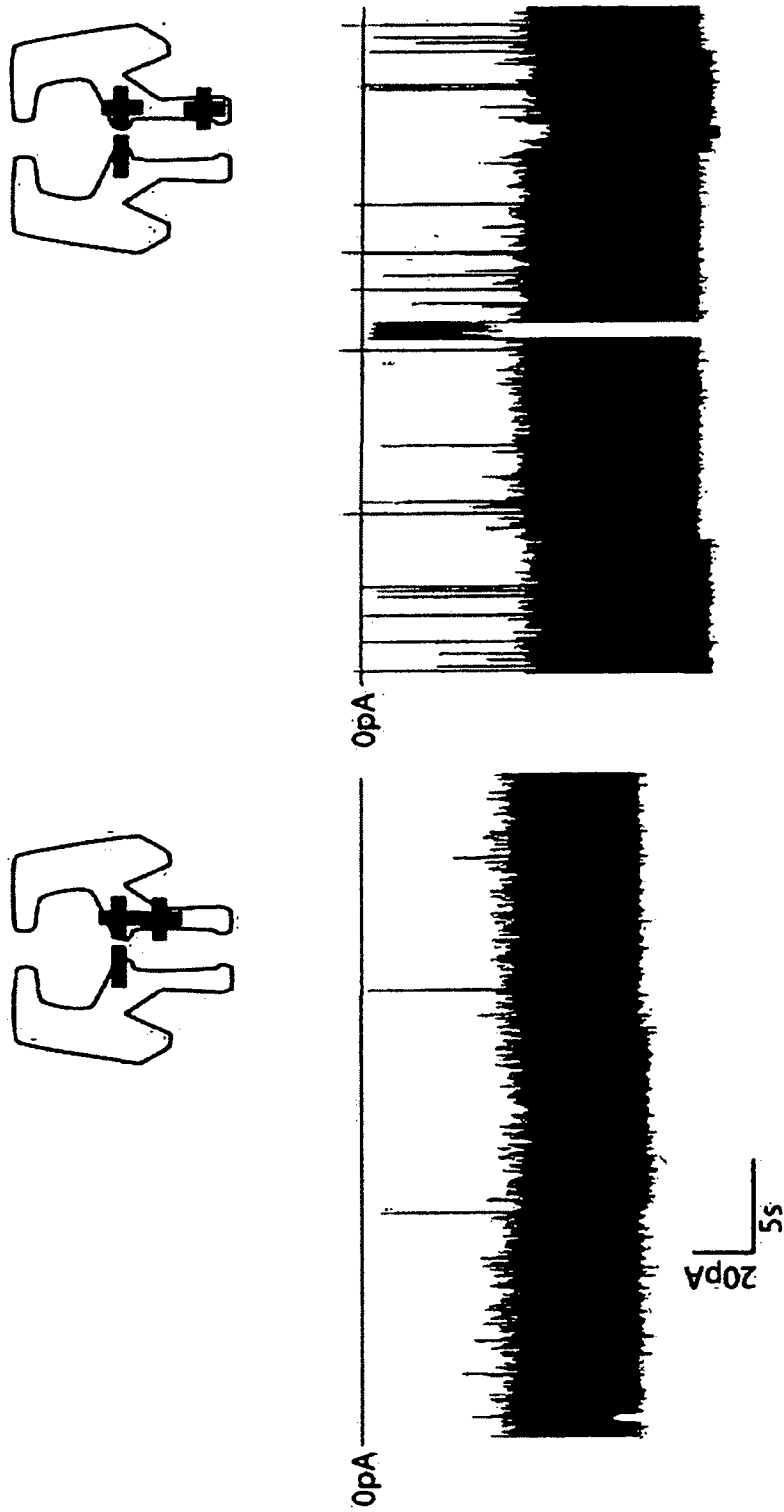


图 9

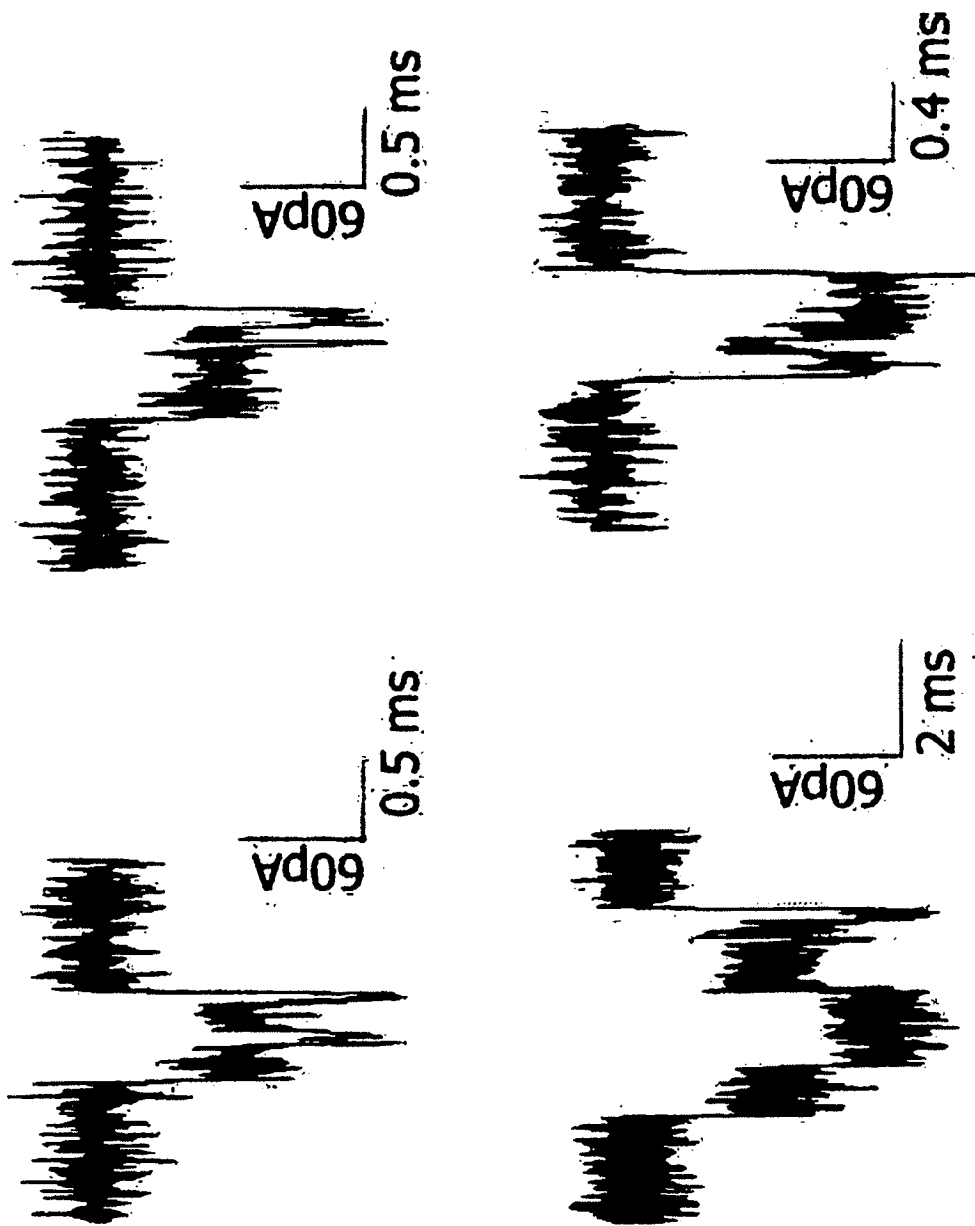


图 10

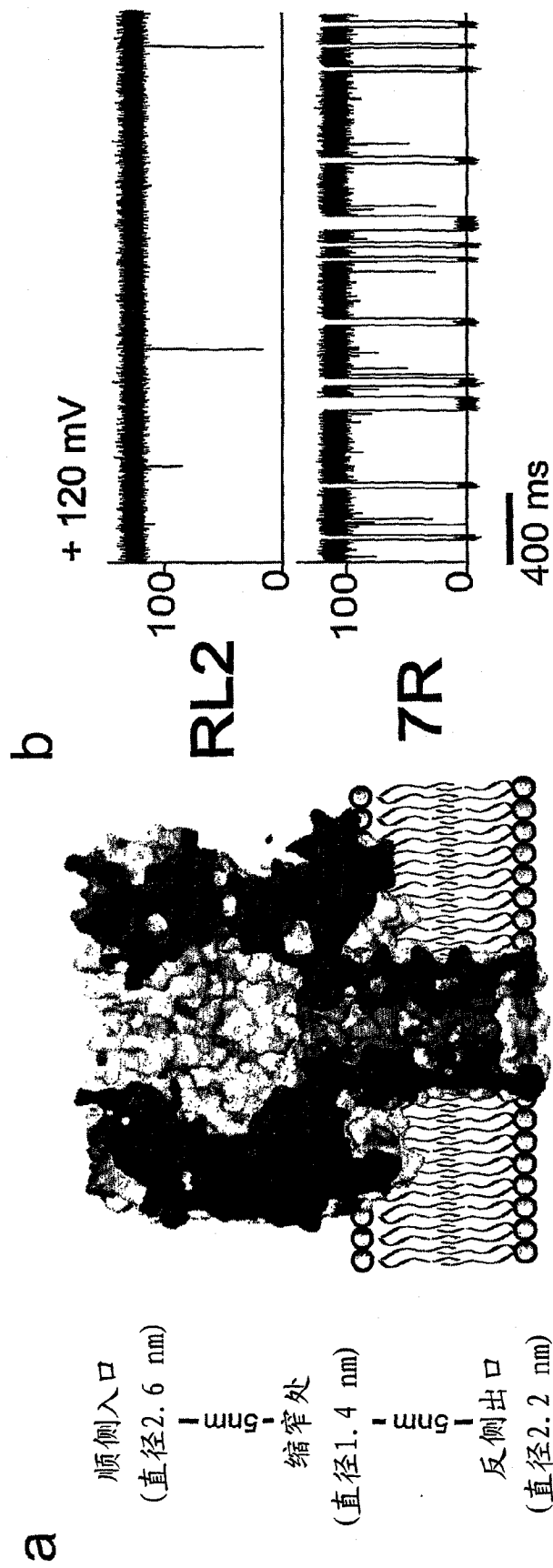


图 11

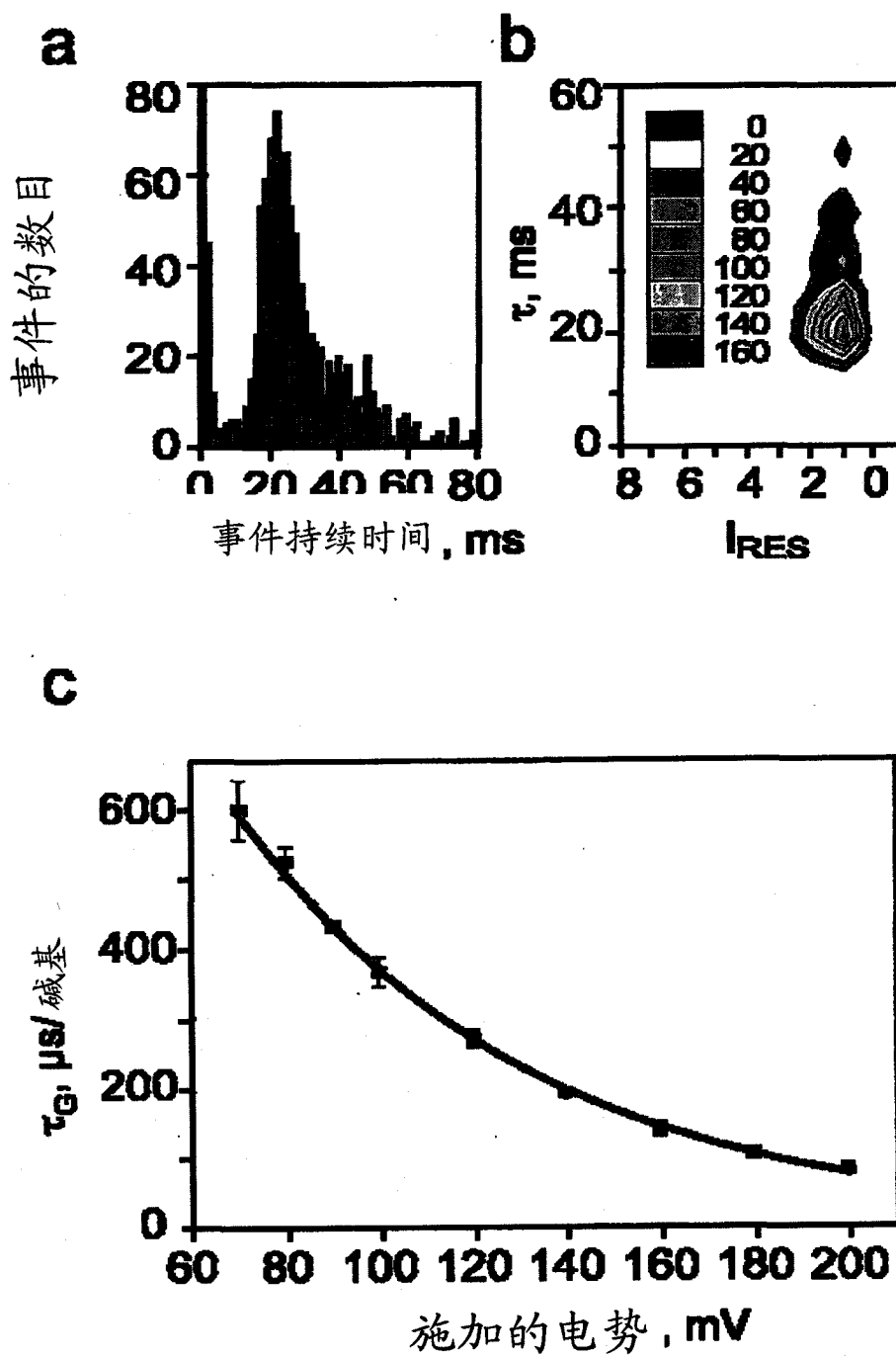


图 12



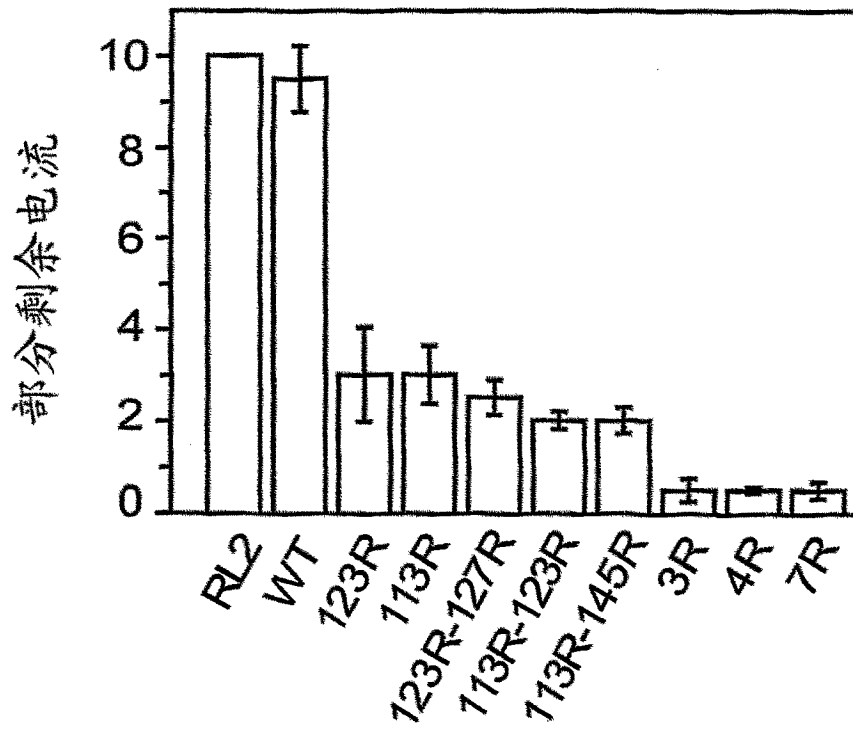


图 13

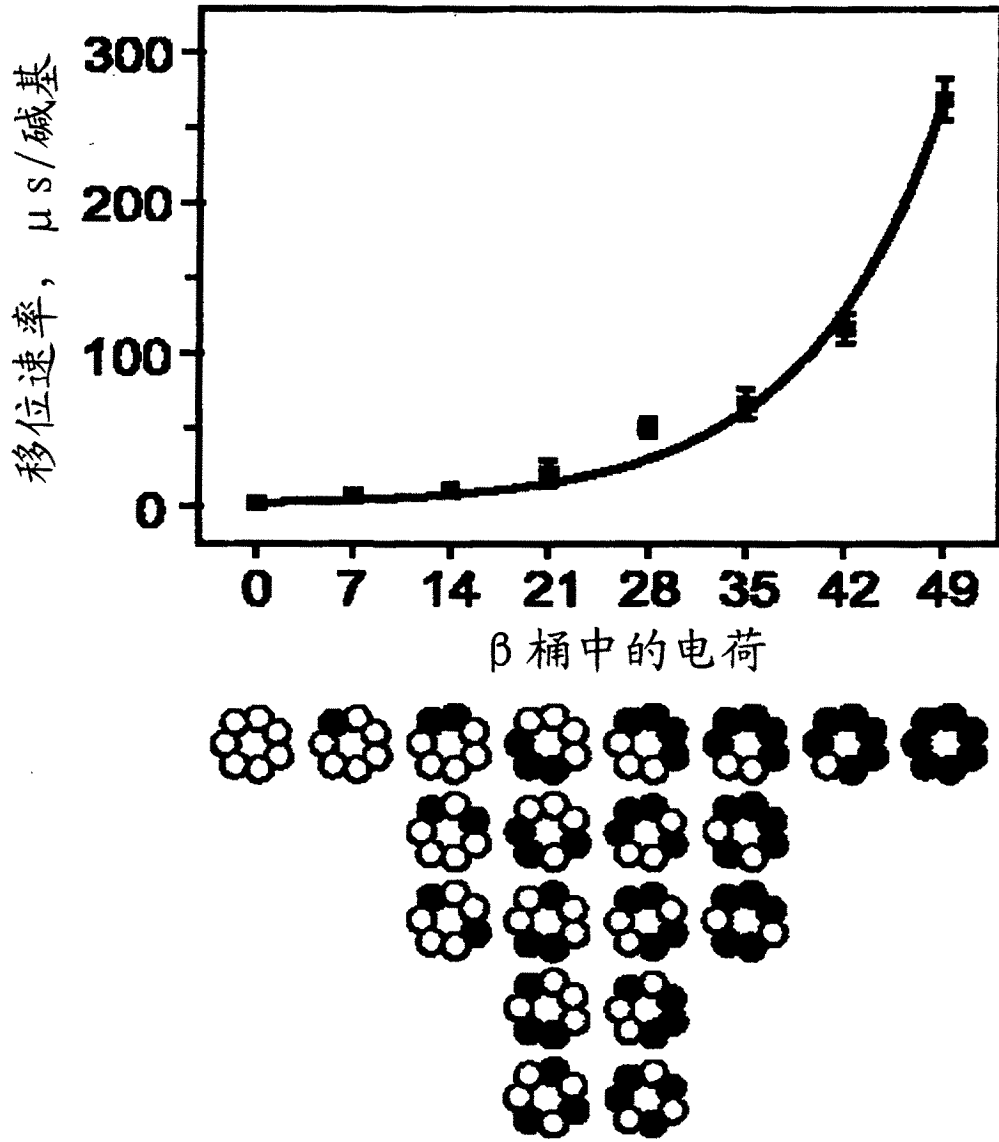


图 14

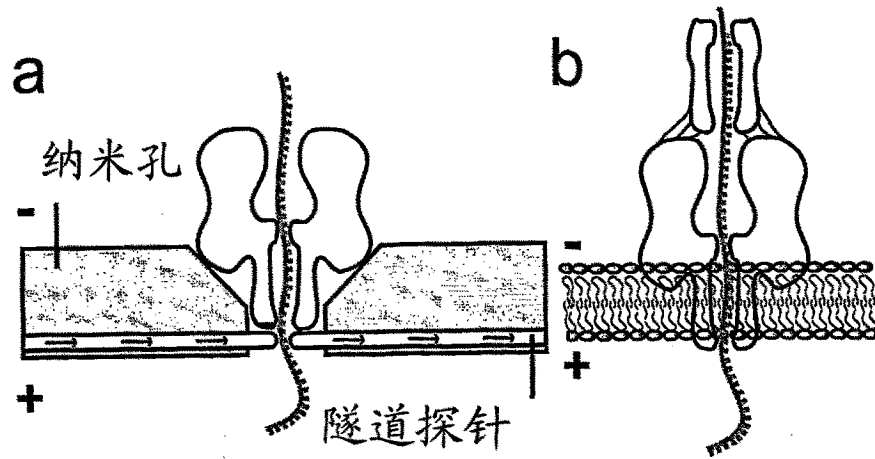


图 15