

## 基于小电导机械力敏感性通道的生物埃米孔系统

[1].本申请要求 2021 年 08 月 30 日提交的中国发明专利申请【CN2021110062606】、名称为“基于 PaMscS 的用于 dNTPs 和新冠病毒检测的生物纳米孔系统”的优先权，以及，2021 年 08 月 30 日提交的中国发明专利申请【CN2021110042496】、名称为“基于 PaMscS 的用于小分子药物检测 and 全血检测的生物纳米孔系统”的优先权，两个优先权发明专利申请以引用方式全文并入。

### 技术领域

[2].本发明属于纳米孔检测领域，具体涉及一种基于小电导机械力敏感性通道的生物埃米孔系统。

### 背景技术

[3].纳米孔单分子检测技术是一种集操作简单、灵敏度高、检测速度快、无需标记等优点的传感检测技术，广泛应用于蛋白质检测、基因测序和标志物检测等领域。目前，基因检测的费用、灵敏度和精度是该检测技术发展中亟待解决的主要问题，因此开发新型纳米孔材料是解决这些问题的关键手段。

[4].生物纳米孔是一种自然形成纳米尺度的孔，其孔尺寸与许多重要的生物分子的大小相似。当分子通过纳米孔内部的通道时，特定的阻塞电流和易位事件产生。根据分子的阻塞电流和易位频率，可以实现对目标分子的定性和定量分析。因此，通道孔径大小是影响纳米孔的检测能力和应用范围的主导因素。一些具有合适通道孔径的蛋白质纳米孔已被用于纳米生物技术的应用，如 $\alpha$ -溶血素（ $\alpha$ -hemolysin,  $\alpha$ -HL）、MspA、CsgG、气单胞菌溶素（Aerolysin）、phi29 连接器等。这些生物纳米孔主要来自细菌孔蛋白或病毒门，并且有大约为单链 DNA（ssDNA）或双链 DNA（dsDNA）大小的孔径（1.0 nm-3.6 nm）。因此，它们适用于检测核酸，并已被用于 DNA/RNA 测序、核酸生物标记物检测和生物分子相互作用研究。然而，目前需要根据特定的应用需求对生物纳米孔进行局部修饰，如定点诱变或修饰特定的适配体等，才能适应更广泛的测序范围。以 $\alpha$ -HL 为例，其有限的孔径约 1.4nm，因此应用范围仅限制在 ssDNA、RNA 或其他分子的分析中，通过利用环糊精（cyclodextrin）修饰，可用于直接检测单磷酸脱氧核糖核苷 dNMPs，无需荧光标记。但通过修饰手段改变生物纳米孔的孔径需要大量的生物工程技术辅助，此外，与固态纳米孔相比，蛋白质孔在调节尺寸方面的灵活性要差很多。在此意义上，迫切需要找到一种具有灵活结构的纳米孔来高效地检测各种尺寸的分子。

[5].综上所述，为改善现有技术的不足，本发明提供了一种新型的基于小电导机械力敏感性通道的生物埃米孔系统，埃米孔是一种尺寸比纳米孔更小的孔径蛋白质，这种新型蛋白质埃米孔系统无需适配体或修饰，为实时分子传感、基因检测和 DNA 计算提供了一条低成本、高通用的新途径。

### 发明内容

[6].一方面，本发明提供了一种埃米孔系统在检测带电荷分子中的应用，其特征在于，所述埃米孔系统包含埃米孔、绝缘膜、第一介质和第二介质；所述埃米孔被嵌入所述绝缘膜中，所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开，所述埃米孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道，向所述第一介质和所述第二介质之间施加驱动力后，位于所述第一介质的所述带电荷分子与所述埃米孔相互作用；所述埃米孔为 MscS 埃米孔，所述埃米孔具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构，所述七聚体结构包含 7 个侧面开口和 1 个底部开口。

[7].进一步地，所述开口的电荷性质和/或孔径大小是可调节的。

[8].进一步地，所述开口的调节方式包括使所述绝缘膜受到机械力刺激和/或使所述绝缘膜的

物理状态变化。

[9].进一步地,所述机械力刺激包括所述绝缘膜两侧的介质的渗透压差变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激和气压负压对所述绝缘膜的刺激中的一种或多种。所述的绝缘膜的物理状态变化包括所述绝缘膜的厚度变化、所述绝缘膜的组成成分变化、所述绝缘膜的表面曲率变化等。

[10].进一步地,所述开口的孔径可以根据以下方式调节:

- (1) 所述第一介质和所述第二介质的种类选择;和/或
- (2) 所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差。

[11].进一步地,所述埃米孔源自杆菌。

[12].进一步地,所述埃米孔源自铜绿假单胞菌、大肠杆菌、嗜热嗜热厌氧菌和幽门螺杆菌中的一种或多种。

[13].进一步地,所述埃米孔为 MscS 变体。

[14].进一步地,所述 MscS 变体包括侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。

[15].进一步地,所述绝缘膜包括磷脂膜和/或高分子膜。

[16].进一步地,所述带电荷分子包括核苷酸、氨基酸、肽、药物分子中的一种或多种。

[17].进一步地,所述埃米孔为 PaMscS 变体。

[18].进一步地,所述埃米孔包括以下变体的一种或多种: 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P。

[19].进一步地,所述药物分子的摩尔质量小于 1000 g/mol。具体地,所述药物分子可以为焦磷酸、硫酸庆大霉素、硫酸新霉素、西索米星、谷氨酸等。

[20].进一步地,所述第一介质和/或所述第二介质包括氯化钠溶液、氯化锂溶液、氯化铯溶液、氯化钾溶液和溴化钠溶液中的一种或多种。

[21].另一方面,本发明还提供一种生物埃米孔系统,其特征在于,所述生物埃米孔系统包括埃米孔、绝缘膜、第一介质和第二介质,所述埃米孔被嵌入绝缘膜中,所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开,所述埃米孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道;所述埃米孔为 MscS 变体埃米孔,所述埃米孔具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构,所述七聚体结构包含 7 个侧面开口和 1 个底部开口。

[22].进一步地,所述埃米孔为 MscS 的侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。

[23].进一步地,所述绝缘膜包括磷脂膜和/或高分子膜。所述磷脂膜包括 DPHPC、DOPC、E.coli lipid; 所述高分子膜包括三嵌段共聚物高分子膜。

[24].进一步地,所述埃米孔源自杆菌。

[25].进一步地,所述埃米孔源自铜绿假单胞菌、大肠杆菌、嗜热嗜热厌氧菌和幽门螺杆菌中的一种或多种。

[26].进一步地,所述埃米孔为 PaMscS 变体。

[27].进一步地,所述埃米孔包括以下变体的一种或多种: 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P。上述几个变体的突变位点位于胞质端的侧面开口处,具体涉及氨基酸的体积以及电荷性质的改变。通过突变,可以改变被突变的侧孔的孔径(也可以理解为“孔道尺寸”),进而提高对特定分子体积的分子的检测能力;还可以改变被突变的所述侧孔通道的局部电荷特性,进而提高对特定带电荷分子的检测能力;还可以增强所述突变型 PaMscS 埃米孔的蛋白通道电流的稳定性。

[28].进一步地,所述开口的电荷性质和/或孔径大小是可调节的。

[29].进一步地,所述开口的调节方式包括使所述绝缘膜受到机械力刺激和/或使所述绝缘膜的物理状态变化。

[30].进一步地,所述机械力刺激包括所述绝缘膜两侧的介质的渗透压差变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激和气压负压对所述绝缘膜的刺激中的一种或多种。

[31].进一步地,所述开口的孔径可以根据以下方式来调节:

- (1) 所述第一介质和所述第二介质的种类选择;和/或
- (2) 所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差。

[32].另一方面,本发明还提供上述生物埃米孔系统在检测带电荷分子中的应用,其特征在于,所述带电荷分子包括核苷酸、氨基酸、肽、药物分子中的一种或多种。

[33].与现有技术相比,本发明的有益效果:

[34].本发明提供一种埃米孔系统在检测带电荷分子中的应用,其中埃米孔系统包含 MscS 埃米孔。本发明创造性地将小电导机械力敏感性通道 (Mechanosensitive channel of small conductance, MscS) 形成埃米孔系统,并利用机械力敏感性通道蛋白的特性来检测带电荷分子,具体体现为:

[35].1) MscS 埃米孔的孔径狭窄。据估计, MscS 埃米孔的孔径范围为~6-16 埃米,远小于现有技术中常用的纳米孔(例如,  $\alpha$ -溶血素纳米孔的孔径约为 1.4 - 2.4 nm,即 14 - 24 埃米)。

[36].2) MscS 埃米孔的孔径可调(也可以理解为结构灵活)。MscS 埃米孔可在毫秒内将机械刺激转化为电信号或生化信号,从而引发通道构型的调节。利用 MscS 埃米孔对绝缘膜所受到的机械力刺激和/或绝缘膜的物理状态变化的敏感性,可以通过影响绝缘膜来实现对 MscS 埃米孔孔径的调整,无需繁复的化学修饰。例如,可以调整第一介质和第二介质的浓度(即 30 mM NaCl / 300 mM NaCl、100 mM NaCl / 300 mM NaCl 和 300 mM NaCl / 300 mM NaCl)来调整绝缘膜两侧的渗透压差进而调节孔径,实现优化对 dNTPs 的选择性并提高对 dNTPs 的区分。现有技术中的蛋白质纳米孔通常具有固定的通道结构,需要额外的蛋白质工程修饰或者化学修饰等才能实现通道结构调整。而本发明提供的 MscS 埃米孔的孔径只需改变外界条件即可实现可逆原位调整,适用于多种类型、尺寸的分子的直接检测。

[37].3) 本发明提供的埃米孔系统可应用于单分子的传感检测。本发明提供的埃米孔系统适用于多种带电荷分子(理论上只要尺寸小于 MscS 埃米孔的孔径的分子都可以实现传感与检测),例如,核苷酸、氨基酸、肽、药物分子等;而较大尺寸的核酸(例如 ssDNA)和蛋白(例如,全血样本中的蛋白质)无法进入 MscS 埃米孔的通道中并且不会对检测分子造成干扰。

[38].4) 基于上述特点,本发明提供的埃米孔系统的应用场景广阔。例如,可以向 MscS 埃米孔的侧孔引入突变,调整侧孔处氨基酸的体积(例如,将 W 替换为 A、S、P)和电荷(例如,将 W 替换为 H、将 K 替换为 R),以实现对特定带电荷分子和特定尺寸的分子的更优检测。例如,本发明提供的埃米孔系统可直接对单核苷酸进行检测,也可以搭配消耗策略(例如,检测核酸扩增体系的剩余核苷酸)来鉴定样本中目标核酸的存在与否,例如在 SARS-CoV-2 样本的诊断中,展现出良好的特异性和灵敏度。例如,本发明提供的埃米孔系统可以检测复杂样本(例如全血)中的药物分子的存在与否,还能够以摩尔的灵敏度直接测量全血中的药物浓度以及对活体动物血药浓度的连续、实时监测,展现出稳健性和敏感性。例如,本发明提供的埃米孔系统还可对氨基酸和短肽(例如,二肽)进行检测。

[39].另一方面,本发明还提供一种检测样本中核苷酸的方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1 将所述样本加入埃米孔系统,所述埃米孔系统包括:埃米孔、绝缘膜、第一介质、第二介质,其中所述埃米孔被嵌入所述绝缘膜中,所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开,所述埃米孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道,所述埃米孔为 MscS 埃米孔,所述埃米孔具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构,所述七聚体结构包含 7 个侧面开口和 1 个底部开口;所述样本被加入到所述第一介质;

S2 向所述第一介质和所述第二介质施加驱动力,所述样本中的核苷酸与所述埃米孔相互作用并产生电信号;

S3 分析所述电信号,进而识别所述样本中的核苷酸。

[40].进一步地,所述开口的电荷性质和/或孔径大小是可调节的。

[41].进一步地,所述开口的调节方式包括使所述绝缘膜受到机械力刺激和/或使所述绝缘膜的

物理状态变化。

[42].进一步地,所述机械力刺激包括所述绝缘膜两侧的介质的渗透压差变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激和气压负压对所述绝缘膜的刺激中的一种或多种。

[43].进一步地,所述开口的孔径可以根据以下方式调节:

- (1) 所述第一介质和所述第二介质的种类选择;和/或
- (2) 所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差。

[44].进一步地,所述第一介质与所述第二介质之间渗透压差是通过所述第一介质与所述第二介质之间的浓度差来调节的。

[45].进一步地,所述第一介质与所述第二介质之间的浓度差为大约 0-270 mM。

[46].进一步地,所述埃米孔为 MscS 变体埃米孔。

[47].进一步地,所述 MscS 变体包括侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。

[48].进一步地,所述埃米孔源自杆菌。

[49].进一步地,所述埃米孔包括铜绿假单胞菌、大肠杆菌、嗜热嗜热厌氧菌和幽门螺杆菌中的一种或多种。

[50].进一步地,所述埃米孔为 PaMscS 变体埃米孔。所述 PaMscS 变体埃米孔的突变位点位于所述 PaMscS 的胞质区的侧面开口。

[51].进一步地,所述 PaMscS 变体埃米孔包括 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P 中的一种或多种。

[52].进一步地,所述核苷酸包括 dGTP、dATP、dTTP、dCTP、dUTP、GTP、ATP、TTP、CTP、UTP 中的一种或多种。

[53].进一步地,所述绝缘膜包括磷脂膜和/或高分子膜。

[54].进一步地,所述第一介质和/或所述第二介质包括氯化钠溶液、氯化锂溶液、氯化铯溶液、氯化钾溶液和溴化钠溶液中的一种或多种。

[55].另一方面,本发明还提供了一种核苷酸快速检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

- (1) MscS 埃米孔;
- (2) 绝缘膜;
- (3) 电导液。

[56].进一步地,所述 MscS 埃米孔包括 MscS 的侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。

[57].进一步地,所述绝缘膜包括磷脂膜和/或高分子膜。

[58].进一步地,所述电导液包括氯化钠溶液、氯化锂溶液、氯化铯溶液、氯化钾溶液和溴化钠溶液中的一种或多种。

[59].进一步地,所述 MscS 埃米孔包括 PaMscS 变体埃米孔。

[60].进一步地,所述 PaMscS 变体埃米孔包括 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P 中的一种或多种。

[61].与现有技术相比,本发明的有益效果:

[62].本发明提供了一种利用埃米孔系统检测样本中核苷酸的方法,其中埃米孔系统包含 MscS 埃米孔。本发明创造性地利用小电导机械力敏感性通道 (Mechanosensitive channel of small conductance, MscS) 的特性来检测样本中核苷酸,具体体现为:

[63].1) MscS 埃米孔的孔径狭窄。据估计, MscS 埃米孔的孔径范围为~6-16 埃米,远小于现有技术中常用的纳米孔 (例如,  $\alpha$ -溶血素纳米孔的孔径约为 1.4 - 2.4 nm, 即 14 - 24 埃米)。

[64].2) MscS 埃米孔的孔径可调 (也可以理解为结构灵活)。MscS 埃米孔可在毫秒内将机械刺激转化为电信号或生化信号,从而引发通道构型的调节。利用 MscS 埃米孔对绝缘膜所受到的机械力刺激和/或绝缘膜的物理状态变化的敏感性,可以通过影响绝缘膜来实现对 MscS 埃米孔孔径的调整,无需繁复的化学修饰。例如,可以调整第一介质和第二介质的浓度 (即 30 mM NaCl / 300 mM NaCl、100 mM NaCl / 300 mM NaCl 和 300 mM NaCl / 300 mM NaCl) 来

调整绝缘膜两侧的渗透压差进而调节孔径,实现优化对 dNTPs 的选择性并提高对 dNTPs 的区分。现有技术中的蛋白质纳米孔通常具有固定的通道结构,对核苷酸(例如,dNTP 等类似分子)的直接检测通常需要额外的蛋白质工程修饰或者化学修饰引入。而本发明涉及的 MscS 埃米孔的孔径只需改变外界条件即可实现可逆性原位调整,适用于对核苷酸直接地单分子传感识别(也可以理解为对核苷酸的直接检测)。

[65].3) 本发明提供的方法可以直接检测并区分一种或多种核苷酸,还可以与其他策略联用,以进一步检测样本中是否有目标核酸的存在。此外,可以向 MscS 埃米孔的侧孔引入突变,调整侧孔处氨基酸的体积(例如,将 W 替换为 A、S、P)和电荷(例如,将 W 替换为 H、将 K 替换为 R),以实现特定带电荷分子和特定尺寸的分子的更优检测。

[66].另一方面,本发明还提供一种检测样本中的药物分子的方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1 将所述样本加入埃米孔系统,所述埃米孔系统包括:埃米孔、绝缘膜、第一介质、第二介质,其中所述埃米孔被嵌入所述绝缘膜中,所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开,所述埃米孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道,所述埃米孔为 MscS 埃米孔,所述埃米孔具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构,所述七聚体结构包含 7 个侧面开口和 1 个底部开口;所述样本被加入到所述第一介质;

S2 向所述第一介质和所述第二介质施加驱动力,所述样本中的药物分子与所述埃米孔相互作用并产生电信号;

S3 分析所述电信号,进而识别所述样本中的药物分子。

[67].进一步地,所述开口的电荷性质和/或孔径大小是可调节的。

[68].进一步地,所述开口的调节方式包括使所述绝缘膜受到机械力刺激和/或使所述绝缘膜的物理状态变化。

[69].进一步地,所述机械力刺激包括所述绝缘膜两侧的介质的渗透压差变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激和气压负压对所述绝缘膜的刺激中的一种或多种。

[70].进一步地,所述开口的孔径可以根据以下方式调节:

- (1) 所述第一介质和所述第二介质的种类选择;和/或
- (2) 所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差。

[71].进一步地,所述埃米孔为 MscS 变体埃米孔。

[72].进一步地,所述 MscS 变体包括侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。

[73].进一步地,所述埃米孔源自杆菌。

[74].进一步地,所述埃米孔包括铜绿假单胞菌、大肠杆菌、嗜热嗜热厌氧菌和幽门螺杆菌中的一种或多种。

[75].进一步地,所述埃米孔为 PaMscS 变体埃米孔。

[76].进一步地,所述埃米孔包括以下变体的一种或多种:130A、130H、180R、271I、130S 和 130P。

[77].进一步地,所述药物分子的分子量为小于 1000 g/mol。

[78].进一步地,所述药物分子的分子量为 177.98 ~ 712.72 g/mol。

[79].进一步地,所述药物分子的浓度为大于 10 nM。

[80].进一步地,所述样本为体液样本。

[81].进一步地,所述体液样本包括尿液、血液、血清、血浆、淋巴液、囊积液、胸膜液、腹水液、腹膜液、羊水、附睾液、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、母乳、泪液、唾液、痰中的一种或多种。

[82].进一步地,所述体液样本的样本量为大于 10  $\mu$ L。

[83].进一步地,所述体液样本中的药物分子的浓度为大于 10 nM。

[84].进一步地,所述方法进一步包括 S4:将透析装置通过导管与所述第一介质连通,使得所

述血液样本通过所述透析装置进入所述埃米孔系统，其中 S4 先于 S1。

[85].进一步地，所述绝缘膜包括磷脂膜和/或高分子膜。

[86].与现有技术相比，本发明的有益效果：

[87].本发明提供了一种利用埃米孔系统检测样本中药物分子的方法，其中埃米孔系统包含 MscS 埃米孔。本发明创造性地利用小电导机械力敏感性通道（Mechanosensitive channel of small conductance, MscS）的特性来检测样本中的药物分子，具体体现为：

[88].1) MscS 埃米孔的孔径狭窄。据估计，MscS 埃米孔的孔径范围为~6-16 埃米，远小于现有技术中常用的纳米孔（例如， $\alpha$ -溶血素纳米孔的孔径约为 1.4 - 2.4 nm，即 14 - 24 埃米）。

[89].2) MscS 埃米孔的孔径可调（也可以理解为结构灵活）。MscS 埃米孔可在毫秒内将机械刺激转化为电信号或生化信号，从而引发通道构型的调节。利用 MscS 埃米孔对绝缘膜所受到的机械力刺激和/或绝缘膜的物理状态变化的敏感性，可以通过影响绝缘膜来实现对 MscS 埃米孔孔径的调整，无需繁复的化学修饰。例如，可以调整第一介质和第二介质的浓度（即 30 mM NaCl / 300 mM NaCl、100 mM NaCl / 300 mM NaCl 和 300 mM NaCl / 300 mM NaCl）来调整绝缘膜两侧的渗透压差进而调节孔径，实现对分析物的选择性的优化并提高对分析物的区分。现有技术中的蛋白质纳米孔通常具有固定的通道结构，需要额外的蛋白质工程修饰或者化学修饰等才能实现通道结构调整。而本发明涉及的 MscS 埃米孔的孔径只需改变外界条件即可实现可逆性原位调整，适用于多种类型、尺寸的药物分子的直接检测。具体地，例如氨基糖苷类抗生素和谷氨酸等药物分子都可以引起 MscS 埃米孔相应的阻塞电流信号，MscS 埃米孔能在单分子水平上检测药物分子。

[90].3) MscS 埃米孔可以实现对药物分子的定量分析。药物分子的梯度浓度测量在信号频率和药物浓度之间呈现出良好的线性关系，因此 MscS 埃米孔不仅能够检测药物分子还能够实现对药物分子的浓度的检测（定量分析）。

[91].4) MscS 埃米孔具有较强的抗干扰能力。MscS 胞质端为类似筛状的结构，底部 1 个底部开口、侧部 7 个侧面开口，且各个开口（孔）的通道狭窄，这种结构有利于离子和小分子的通过，却能够将大分子物质（例如蛋白质）阻挡在通道外，因此这些生物大分子无法进入通道并无法对通道造成阻塞。因此，MscS 展现出较强的抗干扰能力，并能够对体液样本（例如全血样本）进行直接检测。更具体地，本发明方法还可以与透析装置等装置联用，实现对血药浓度的实时、连续监测。

[92].另一方面，本发明还提供了一种检测样本中目标核酸的存在的方法，其特征在于，包括如下步骤：

S1 将样本置于核酸扩增体系并进行核酸扩增，确定所述核酸扩增体系中底物核苷酸的数量，获得所述样本的核酸扩增产物；

S2 将所述样本的核酸扩增产物加入单通道电生理检测系统，所述单通道电生理检测系统包括：跨膜孔、绝缘膜、第一介质、第二介质，其中所述跨膜孔被嵌入所述绝缘膜中，所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开，所述跨膜孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道，所述样本的核酸扩增产物被加入到所述第一介质；

S3 向所述第一介质和所述第二介质之间施加驱动力，所述样本的核酸扩增产物中剩余核苷酸与所述跨膜孔相互作用并产生电信号；

S4 对所述电信号进行量化，获得所述剩余核苷酸的数量；

S5 将所述剩余核苷酸的数量与所述底物核苷酸的数量进行对比，确定所述样本中所述目标核酸是否存在。

[93].进一步地，所述跨膜孔为 MscS 变体埃米孔。

[94].进一步地，所述 MscS 变体包括侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。

[95].进一步地，所述 MscS 变体埃米孔的开口的电荷性质和/或孔径大小是可调节的。

[96].进一步地，所述开口的调节方式包括使所述绝缘膜受到机械力刺激和/或使所述绝缘膜的

物理状态变化。

[97].进一步地,所述机械力刺激包括所述绝缘膜两侧的介质的渗透压差变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激和气压负压对所述绝缘膜的刺激中的一种或多种。

[98].进一步地,所述开口的孔径可以根据以下方式调节:

- (1) 所述第一介质和所述第二介质的种类选择;和/或
- (2) 所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差。

[99].进一步地,所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差是通过所述第一介质与所述第二介质之间的浓度差来调节的。

[100].进一步地,所述第一介质与所述第二介质之间的浓度差为大约 0-270 mM。

[101].进一步地,所述第一介质和/或所述第二介质包括氯化钠溶液、氯化锂溶液、氯化铯溶液、氯化钾溶液和溴化钠溶液中的一种或多种。

[102].进一步地,所述 MscS 变体埃米孔源自杆菌。

[103].进一步地,所述 MscS 变体埃米孔包括铜绿假单胞菌、大肠杆菌、嗜热嗜热厌氧菌和幽门螺杆菌中的一种或多种。

[104].进一步地,所述 MscS 变体埃米孔为 PaMscS 变体埃米孔。

[105].进一步地,所述 PaMscS 变体埃米孔包括 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P 中的一种或多种。

[106].进一步地,通过聚合酶链反应、连接酶链反应、链置换扩增技术、转录介导的扩增技术、环介导等温扩增技术中的一种或多种进行所述核酸扩增。

[107].进一步地,所述核苷酸包括核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸。

[108].进一步地,所述核苷酸包括 dGTP、dATP、dTTP、dCTP、dUTP、GTP、ATP、TTP、CTP、UTP 中的一种或多种。

[109].进一步地,所述核酸扩增体系进一步包括:

(1) 探针,所述探针包括互补区和重复区,所述互补区包括与所述目标核酸互补配对的序列,所述重复区包括重复同一个碱基的寡核苷酸序列,所述碱基包括 A、T、C、G、U;或者

- (2) 所述目标核酸的特异性引物。

[110].进一步地,所述目标核酸为冠状病毒核酸。

[111].进一步地,所述冠状病毒包括 SARS-CoV-2、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV 和 MERS-CoV 中的一种或多种。

[112].进一步地,所述绝缘膜包括磷脂膜和/或高分子膜。

[113].另一方面,本发明还提供一种病毒快速检测试剂盒,包括:

- (1) MscS 埃米孔;
- (2) 绝缘膜;
- (3) 电导液;
- (4) 所述病毒的核酸的特异性引物或探针。

[114].进一步地,所述 MscS 埃米孔包括 MscS 的侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。

[115].进一步地,所述绝缘膜包括磷脂膜和/或高分子膜。

[116].进一步地,所述电导液包括氯化钠溶液、氯化锂溶液、氯化铯溶液、氯化钾溶液和溴化钠溶液中的一种或多种。

[117].进一步地,所述埃米孔为 PaMscS 变体埃米孔。

[118].进一步地,所述埃米孔包括 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P 中的一种或多种。

[119].与现有技术相比,本发明的有益效果:

[120].本发明提供了一种利用单通道电生理检测系统检测样本中目标核酸的存在的方法。

[121].1) 本发明提供的方法可以快速检测样本中目标核酸的存在。传统的核酸检测方法通常需要对目标核酸进行荧光标记或染色,因此,其依赖昂贵的荧光监测设备或染色体系。目前

基于纳米孔的核酸检测方法，往往需要辅助性的多核苷酸结合蛋白（例如解旋酶、聚合酶）等复杂的体系。本发明提供的方法利用跨膜孔，仅需检测体外核酸扩增体系（例如底物 dNTPs、聚合酶、反转录酶）中底物 dNTPs 的消耗，进而判断核酸扩增体系里是否存在目标核酸，具有快速、成本低、易于高通量检测、特异性和敏感性较佳的优势。本发明涉及的跨膜孔能够检测（或区分）不同核苷酸，且不受核酸扩增体系中的其他物质（例如，扩增出的核酸、酶）的干扰。

[122].2) 作为优选，本发明的跨膜孔为 MscS（小电导机械力敏感性通道）埃米孔，其孔径狭窄、孔径可调（也可以理解为结构灵活）。据估计，MscS 埃米孔的孔径范围为~6-16 埃米，远小于现有技术中常用的纳米孔（例如， $\alpha$ -溶血素纳米孔的孔径约为 1.4 - 2.4 nm，即 14 - 24 埃米）。MscS 埃米孔可在毫秒内将机械刺激转化为电信号或生化信号，从而引发通道构型的调节。利用 MscS 埃米孔对绝缘膜所受到的机械力刺激和/或绝缘膜的物理状态变化的敏感性，可以通过影响绝缘膜来实现对 MscS 埃米孔孔径的调整，无需繁复的化学修饰。例如，可以调整第一介质和第二介质的浓度（即 30 mM NaCl / 300 mM NaCl、100 mM NaCl / 300 mM NaCl 和 300 mM NaCl / 300 mM NaCl）来调整绝缘膜两侧的渗透压差进而调节孔径，实现优化对 dNTPs 的选择性并提高对 dNTPs 的区分。现有技术中的蛋白质纳米孔通常具有固定的通道结构，对核苷酸（例如，dNTP 等类似分子）的直接检测通常需要额外的蛋白质工程修饰或者化学修饰引入。而本发明涉及的 MscS 埃米孔的孔径只需改变外界条件即可实现可逆性原位调整，适用于对核苷酸直接地单分子传感识别（也可以理解为对核苷酸的直接检测）。

[123].如本文所使用，术语“源自”不仅是指所讨论的生物菌株产生的蛋白质，还指由分离自此类菌株的 DNA 序列编码且在含有此类 DNA 序列的宿主生物中产生的蛋白质。

[124].如本文所使用，术语“带电荷分子”是指带有净电荷的、尺寸小于或等于本发明涉及的埃米孔孔径的物质。示例性的带电荷分子包括核苷酸、氨基酸、肽、药物分子和/或其他带电荷小分子（例如短肽）。

## 附图说明

[125].为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作一简单地介绍。显而易见地，下面描述中的附图是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动性的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

[126].图 1 示出了基于 PaMscS 埃米孔的电生理测试和 dNTP 检测；

[127].图 2 示出了不同渗透压差条件下 dNTP 通过 PaMscS1 孔的转运频率；

[128].图 3 示出了基于通过 PaMscS2 实时监测 dNTPs 消耗的 SARS-CoV-2 核酸检测；

[129].图 4 示出了由 PaMscS1 通过 dNTPs 消耗检测 AFP 适配体和 miR21；

[130].图 5 示出了 PaMscS 蛋白（1：野生型 PaMscS；2：W130A 突变体；3：K180R 突变体；4：标记物）的 SDS-PAGE 结果；

[131].图 6 示出了野生型或突变型的 PaMscS 的电流信号或电流分布；

[132].图 7 示出了在 0 mV 到+100 mV 的斜坡电压下，通过单个 PaMscS1 埃米孔的电流轨迹；

[133].图 8 示出了不同离子通过 PaMscS1 孔中的转运能力；

[134].图 9 示出了不同电压下 dNTPs 通过 PaMscS1 埃米孔的易位频率统计（n=3）；

[135].图 10 示出了 PaMscS1 检测单核苷酸的电流轨迹和停留时间分布；

[136].图 11 示出了单链 DNA 不能通过 PaMscS1 孔易位；

[137].图 12 示出了通过环介导等温扩增（LAMP）的 SARS-CoV-2 orf1ab 基因的埃米孔检测结果；

[138].图 13 示出了与 miR21 和 AFP 适配体混合的 PCR 试剂的非变性（native）PAGE 电泳的结果；

- [139].图 14 示出了基于 PaMscS3 (V271I) 埃米孔的药物单分子生物传感实验;
- [140].图 15 示出了全血样品的药物浓度测量;
- [141].图 16 示出了通过埃米孔连续监测活体大鼠体内药物浓度的概念验证实验;
- [142].图 17 示出了硫酸庆大霉素的 PaMscS3 (V271I) 埃米孔的连续电流轨迹;
- [143].图 18 示出了硫酸新霉素的 PaMscS3 (V271I) 埃米孔的连续电流轨迹;
- [144].图 19 示出了高浓度硫酸庆大霉素和硫酸新霉素可以长时间阻塞 PaMscS3 (V271I) 埃米孔;
- [145].图 20 示出了 MspA-2NNN 埃米孔可被全血样本 (10  $\mu$ L 全血样本到加入 1mL 端) 频繁阻塞;
- [146].图 21 示出了血液样本中 PaMscS3 (V271I) 埃米孔的连续电流轨迹;
- [147].图 22 示出了通过 PaMscS3 (V271I) 埃米孔直接测量大鼠全血样本的电流轨迹;
- [148].图 23 示出了从 -50 mV 至 -80 mV 通过 PaMscS3 (V271I) 埃米孔的硫酸庆大霉素的电流信号;
- [149].图 24 示出了从 -50 mV 到 -80 mV 通过 PaMscS3 (V271I) 埃米孔的西索米星的电流信号;
- [150].图 25 示出了野生型 EcMscS 的单个通道嵌入电流轨迹 (电压 +100 mV, 电导液 30 mM:300 mM NaCl);
- [151].图 26 示出了野生型 EcMscS 的通道扫描电压 (-100 mV 到 100 mV);
- [152].图 27 示出了野生型 EcMscS 的电导分布;
- [153].图 28 示出了 PaMscS 与其他细菌的 MscS 的序列比对;
- [154].图 29 示出了基于野生型 PaMscS 埃米孔的 dNTP 检测;
- [155].图 30 示出了 PaMscS1 检测谷氨酸的电流轨迹;
- [156].图 31 示出了基于 PaMscS 埃米孔的氨基酸检测方案 and 不同氨基酸阻塞电流分布。

## 具体实施方式

[157].为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[158].需要说明的是,在本文中,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者装置不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者装置所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括一个……”限定的要素,并不排除在包括该要素的过程、方法、物品或者装置中还存在另外的相同要素。

[159].如在本说明书中使用的,术语“大约”,典型地表示为所述值的 $\pm 5\%$ ,更典型的是所述值的 $\pm 4\%$ ,更典型的是所述值的 $\pm 3\%$ ,更典型的是所述值的 $\pm 2\%$ ,甚至更典型的是所述值的 $\pm 1\%$ ,甚至更典型的是所述值的 $\pm 0.5\%$ 。

[160].在本说明书中,某些实施方式可能以一种处于某个范围的格式公开。应该理解,这种“处于某个范围”的描述仅仅是为了方便和简洁,且不应该被解释为对所公开范围的僵化限制。因此,范围的描述应该被认为是已经具体地公开了所有可能的子范围以及在此范围内的独立数字值。例如,范围 1~6 的描述应该被看作已经具体地公开了子范围如从 1 到 3,从 1 到 4,从 1 到 5,从 2 到 4,从 2 到 6,从 3 到 6 等,以及此范围内的单独数字,例如 1, 2, 3, 4, 5 和 6。无论该范围的广度如何,均适用以上规则。

## [161].详细附图说明

[162].图 1: A.电生理测量室示意图。B.在 +50mv 电压下, PaMscS1 和 PaMscS2 埃米孔的单孔插入。C. PaMscS1 和 PaMscS2 埃米孔在电压范围 -50mv 到 +50mv 下的 I-V 关系。D. PaMscS1

和 PaMscS2 埃米孔的电导分布（分别为 N=18）（缓冲条件为-cis 端：300 mM NaCl，-trans 端：30 mM NaCl）。E.通过 PaMscS 突变体埃米孔检测 dNTPs（缓冲条件为-cis 端：300 mM NaCl，-trans 端：30 mM NaCl，并且电压为+50mv）。

[163].图 2：在不同的渗透压差的条件下测试了 dCTP(以橙色表示)和 dGTP(以蓝色表示)的易位频率，对称(A, 300mM NaCl: 300mM NaCl 用于 cis 端: trans 端)，低渗透压差(LOD)(B, 300mM NaCl: 100mM NaCl 用于 cis 端: trans 端)，以及高渗透压差(HOD)(C, 300mM NaCl: 30 mM NaCl 用于 cis 端: trans 端)。四组 dNTPs 浓度，0.5mM、1.0mM、1.5 mM 和 2.0mM，以测试了 dCTP 和 dGTP 的易位。D.在对称、低渗透压差和高渗透压差条件下，易位频率与 dCTP/dGTP 浓度之间的关系(每个数据点 n=3)。E.在 3 种不同的渗透压差条件下， $f_{dCTP}$  和  $f_{dGTP}$  的增加率。

[164].图 3：A.埃米孔检测 SARS-CoV-2 的示意图。B.梯度拷贝数下 SARS-CoV-2 Orf1ab 基因检测结果（缓冲液条件为-cis 端：300 mM NaCl，-trans 端：100 mM NaCl，电压+50 mV，阴性对照（NC）组：n=4， $10^{11}$  拷贝/mL 组：n=4， $10^8$  拷贝/mL 组：n=4， $10^5$  拷贝/mL 组：n=4， $10^3$  拷贝/mL 组：n=3）。C.22 份临床样本检测结果，包括 15 个阳性样本（患者编号：1~15）和 7 个阴性样本（患者编号：16~22），21 份样本的埃米孔检测结果与医院 qPCR 检测结果一致（患者编号：1~15，17~22），1 个阴性样本（患者编号：16）被埃米孔诊断为阳性（缓冲条件为-cis 端：300 mM NaCl，-trans 端：100 mM NaCl，电压为+50 mV）。D.通过 MscS 埃米孔监测 dNTPs 的消耗可以结合核酸扩增技术(NAAT)，如聚合酶链反应(PCR)和链式置换扩增(SDA)。

[165].图 4：A.检测策略示意图。B.无靶标对照组、miR21 组、AFP 适配体组和既有 miR21 又有 AFP 适配体组的电流轨迹。C.4 个检测组的电流分布。D.4 组中 dATP 和 dGTP 信号的相对增加。没有 miR21 和 AFP 适配体的样本不会导致 dNTPs 消耗；有 miR21 的样本会导致更多的 dATP 消耗和相对更低的 dATP 易位频率；有 AFP 适配体的样本会导致更多的 dGTP 消耗和相对更低的 dGTP 易位频率；既有 miR21 又有 AFP 适配体的样本将导致更多的 dATP 和 dGTP 消耗以及相对更低的 dATP 和 dGTP 易位频率（缓冲条件为-cis 端：300 mM NaCl，-trans 端：100 mM NaCl，电压为+50 mV，每个实验 n=3）。

[166].图 6：A.野生型 PaMscS 和突变型 PaMscS1、PaMscS2 的背景信号频率，PaMscS1 和 PaMscS2 的背景噪音频率低于野生型 PaMscS(电压为+50mv,  $n \geq 3$ )。B. PaMscS1 和 PaMscS2 埃米孔插入的时间，PaMscS2 埃米孔具有比 PaMscS1 更高的膜融合效率 ( $n \geq 3$ )。C. PaMscS1 和 PaMscS2 埃米孔的 dNTPs 阻塞电流分布。

[167].图 7：在 0 mV 到+100 mV 的斜坡电压下，通过单个 PaMscS1 埃米孔的电流轨迹：当电压升高到+90 mV 以上时，观察到电压门控（缓冲条件为-cis 端：300 mM NaCl，-trans 端：30 mM NaCl，采样频率：4999hz）。

[168].图 8：缓冲条件为：-cis 侧 300 mM NaCl，-trans 侧 30 mM NaCl，每个数据点  $n \geq 3$ ，平均值  $\pm$  SD。

[169].图 10：停留时间分布：dGTP(A)、dATP(B)、dTTP(C)和 dCTP(D)；每个核苷酸的浓度为 2 mM 且缓冲条件为-cis 端：300mM NaCl，-trans 端：30mM NaCl，电压为+50 mV。

[170].图 11：电压：+50 mV；缓冲条件：cis 侧 300 mM NaCl，trans 侧 30 mM NaCl。ssDNA 的最终浓度为 5  $\mu$ M，序列为 5' TAGCTTATCAGACTGATGTTGA 3'（SEQ ID NO:5）。

[171].图 12：包含  $10^3$  拷贝/mL 至  $10^{11}$  拷贝/mL 的 Orf1ab 基因的样本可被检测。

[172].图 13：1.DNA 模板 1（含 poly T）；2.DNA 模板 2（含 poly C）；3.有 miR21 和 AFP 适配体的 PCR 试剂；4.对照组（没有 miR21 和 AFP 适配体）。

[173].图 14：A.通过 PaMscS3（V271I）埃米孔检测硫酸庆大霉素的结果，包括代表性电流轨迹和阻塞信号。B.通过 PaMscS3 埃米孔检测硫酸新霉素的结果。C.硫酸庆大霉素的定量标准曲线(N=3)和阻塞信号的热图(右, 878 个阻塞事件)。D.硫酸新霉素的定量标准曲线(中间, N=4)

和阻塞信号的热图(右, 883 个阻塞事件)。电解质条件为-cis 端: 300 mM NaCl, -trans 端: 30 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, 药物检测的电压为-50 mV。E. 比较 LC-MS 和 *PaMscS3* 埃米孔之间对 1.5 $\mu$ M 硫酸庆大霉素的检测结果。电解质条件为-cis 端: 130 mM NaCl, -trans 端: 130 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, 药物的检测电压为-50 mV。

[174].图 15: A. 通过 *PaMscS3* (*V271I*) 埃米孔直接检测全血样品, 加入全血样品后 *PaMscS3* 埃米孔保持开放。电解质条件为-cis 端: 130 mM NaCl, -trans 端: 130 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, 电压为-50 mV。B. 加入 20 $\mu$ L 大鼠血液后, -cis 端的电导缓冲液变成红色。C. 全血样本的通道开放的百分比。D. 硫酸庆大霉素的定量标准曲线范围为 0 至 3 $\mu$ M。E. 通过 *PaMscS3* 埃米孔测量注射庆大霉素后不同时间间隔的大鼠的药物浓度。全血埃米孔检测的电解质条件是-cis 端: 130 mM NaCl, -trans 端: 130 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, 电压为-50 mV,  $N \geq 3$ 。

[175].图 16: A. 大鼠药物浓度监测系统的装置。B. 硫酸庆大霉素的定量标准曲线范围从 0 到 30 $\mu$ M。C. 在注射 4 mg/kg 和 20 mg/kg 硫酸庆大霉素的药物浓度监测期间, *PaMscS3* (*V271I*) 埃米孔的典型电流轨迹。D. 以不同剂量的硫酸庆大霉素、通过 *PaMscS3* 埃米孔对大鼠的连续药物血液浓度监测结果( $N=1$ )。灰色数据点表明药物阻塞信号频率高于标准曲线范围内的最高信号频率, 双步信号频繁出现并使定量不准确。电解质条件为-cis 端: 130 mM NaCl, -trans 端: 130 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, 电压为-50 mV。

[176].图 17: 埃米孔背景的电导轨迹和加入硫酸庆大霉素后的轨迹。电解质条件为-cis 端: 300 mM NaCl, -trans 端: 30 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, 电压为-50 mV,  $N=3$ 。

[177].图 18: 埃米孔的背景电导轨迹和添加硫酸新霉素后的轨迹。电解质条件为-cis 端: 300 mM NaCl, -trans 端: 30 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, 电压为-50 mV,  $N=3$ 。

[178].图 19: 在高浓度药物下, 药物的阻塞信号难以统计且 *PaMscS3* (*V271I*) 埃米孔可被长时间阻塞, 导致无法定量计算。电解质条件为-cis 端: 300 mM NaCl, -trans 端: 30 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, 药物检测的电压为-50 mV。

[179].图 20: 电解质条件为-cis 端: 300 mM NaCl, -trans 端: 300 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, 电压为+100 mV,  $N=3$ 。

[180].图 21: 埃米孔背景的电导轨迹和全血样品加入后的轨迹。

[181].图 22: 将 20  $\mu$ L 大鼠全血加入-cis 端 (1 mL), *PaMscS3* (*V271I*) 埃米孔可以在全血样品存在下工作良好。

[182].图 23: 电解质条件为-cis 端: 130 mM NaCl, -trans 端: 130 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0。值得注意的是, 梯度电压中出现了两个峰值。

[183].图 24: 电解质条件为-cis 端: 130 mM NaCl, -trans 端: 130 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0。西索米星的结构接近硫酸庆大霉素的 C1a 组分。在梯度电压下, 只观察到一个阻塞电导峰值。

[184].图 28: MscS 家族的序列比对。图 28d 中红色突出显示的残基在 4 条序列中是相同的; 序列上方的圆柱指定为 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 链。

[185].埃米孔

[186].本发明所使用的埃米孔是小电导机械力敏感性通道 (Mechanosensitive channel of small conductance, MscS), 优选的是 *PaMscS* (铜绿假单胞菌小电导机械力敏感性通道) 或其变体。所述变体 (也可以理解为“突变体”) 可以由生物体 (例如铜绿假单胞菌) 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。在本发明中, “*PaMscS* 变体”、“突变型 *PaMscS*”、“突变体 *PaMscS*”、“*PaMscS* 突变体”表示相同含义, 除非另有说明。

[187].在本发明的一个实施例中, 所述埃米孔可以为 MscS 变体。可以对 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列进行氨基酸取代, 例如对单个或多个氨基酸取代。取代可以是保守取代或非保守取代。作为优选, 可以对 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID

NO:2 或 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的一个或多个位置进行非保守取代,其中被取代的氨基酸残基被化学性质和/或物理尺寸明显不同的氨基酸所替换。进一步地,所述 MscS 变体可分为侧孔体积变体和侧孔电荷变体。侧孔体积变体是指突变位点位于胞质端的侧面开口(也可以理解为“侧孔”)处且通过改变该位点的氨基酸,使得其侧孔体积改变的变体。侧孔电荷变体是指突变位点位于胞质端的侧面开口处且通过改变该位点的氨基酸,使得其侧孔电荷改变的变体。例如,所述侧孔体积变体可以是较大体积的氨基酸(例如,色氨酸(W))替换成较小体积的氨基酸(例如,丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或脯氨酸(P)),或反之。侧孔电荷变体可以是带某种电荷的氨基酸替换成带相反电荷或中性的氨基酸,也可以是将中性的氨基酸替换成带电荷的氨基酸。一般来说,带正电荷的氨基酸的非限定性实例包括组氨酸、精氨酸和赖氨酸;带负电荷的非限定性实例包括天冬氨酸和谷氨酸;中性的非限定性实例包括甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸和色氨酸。氨基酸的保守取代或非保守取代,以及对氨基酸的许多不同类型(删除、置换、添加)等修饰都是本领域公知的,本领域技术人员可根据实际情况来对 MscS 进行修饰,以得到相应 MscS 变体。修饰的手段包括对相应的 DNA 序列进行修改(例如,修改 DNA 序列信息后直接合成相应蛋白质或者利用 PCR 对 DNA 序列进行定点突变),进而得到相应变体(及其对应的 DNA 序列)。

[188].在一个具体实施例中,所述 MscS 变体可以是 PaMscS 变体。所述 PaMscS 变体例如包括 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P 中的一种或多种。PaMscS 的侧孔体积突变体例如包括 130A、130S、130P, PaMscS 的侧孔电荷变体例如包括 130H、180R、271I。这样的修饰可以改变被修饰的侧孔的孔径(也可以理解为“孔道尺寸”),进而提高对特定分子体积的分析物的检测能力;还可以改变被修饰的侧孔通道的局部电荷特性,进而提高对特定带电分析物的检测能力;还可以增强所述 PaMscS 变体的蛋白通道电流的稳定性。

[189].在本发明的一个实施例中,所述埃米孔可以为野生型 PaMscS,其虽背景噪声较高,但仍具备检测分析物的能力。

[190].在本发明的一个实施例中,所述埃米孔可以为野生型 EcMscS(大肠杆菌小电导机械力敏感性通道)或其变体。EcMscS 与 PaMscS 的结构高度相似,且同样能够形成稳定的通道电流,具备检测分析物的能力。PaMscS 与 EcMscS 的序列相似性为 60%。而对氨基酸的保守取代或非保守取代,以及对氨基酸的许多不同类型(删除、置换、添加)等修饰都是本领域公知的,本领域技术人员可根据实际情况来对 EcMscS 进行修饰,以得到相应 EcMscS 变体。

[191].在本发明另一个实施例中,除大肠杆菌(*Escherichia coli*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)外,所述埃米孔还可以源自其他杆菌,例如嗜热嗜热厌氧菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*)和幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)。PaMscS 与 TtMscS、HpMscS 的结构同样高度相似,而序列相似性分别为 55%、44%。结合 PaMscS 与 EcMscS 的实际电生理检测结果可以看出, MscS 能够作为埃米孔检测分析物的原因在于其高度相似的结构和类似的功能。而对氨基酸的保守取代或非保守取代,以及对氨基酸的许多不同类型(删除、置换、添加)等修饰都是本领域公知的,本领域技术人员可根据实际情况来对 MscS 进行修饰,以得到相应 MscS 变体。

[192].分析物

[193].所述分析物是荷电物质。如果分析物带有净电荷则它是荷电的。所述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。合适的分析物应为尺寸小于或等于所述埃米孔孔径的物质,优选为核苷酸、氨基酸、肽、药物分子。

[194].在本发明的一个实施例中,所述分析物可以为核苷酸。“核苷酸”是指由杂环碱基、糖和磷酸基团组成的单体单元。应当理解,杂环碱基包括天然存在的碱基(鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U))及非天然存在的碱基类似物。糖包括天然存在的

糖（脱氧核糖和核糖）及非天然存在的糖类似物。所述核苷酸包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸，例如 ATP、dATP、CTP、dCTP、GTP、dGTP、UTP、TTP、dUTP、GMP、UMP、TMP、CMP、dGMP、dAMP、dTMP、dCMP、dUMP、ADP、GDP、TDP、UDP、CDP、dADP、dGDP、dTDP、dUDP、dCDP。所述核苷酸包括天然存在的核苷酸和以天然存在的核苷酸相似的方式与核酸杂交的非天然存在的核苷酸类似物。所述核苷酸为游离的（或者，可以理解为“单个”）。作为优选，核苷酸为 ATP、dATP、CTP、dCTP、GTP、dGTP、UTP、TTP、dUTP。

[195].在本发明的一个实施例中，所述分析物可以为氨基酸。“氨基酸”是指蛋白质中发现的 20 种天然存在的氨基酸中的任何氨基酸、天然存在的氨基酸的 D- 立体异构体（例如，D- 苏氨酸）、非天然氨基酸以及化学修饰的氨基酸。这些氨基酸类型中的每一种类型不是相互排斥的。下列缩写用于 20 种天然存在的氨基酸：丙氨酸(Ala; A)、天冬酰胺(Asn; N)、天冬氨酸(Asp; D)、精氨酸(Arg; R)、半胱氨酸(Cys; C)、谷氨酸(Glu; E)、谷氨酰胺(Gln; Q)、甘氨酸(Gly; G)、组氨酸(His; H)、异亮氨酸(Ile; I)、亮氨酸(Leu; L)、赖氨酸(Lys; K)、甲硫氨酸(Met; M)、苯丙氨酸(Phe; F)、脯氨酸(Pro; P)、丝氨酸(Ser; S)、苏氨酸(Thr; T)、色氨酸(Trp; W)、酪氨酸(Tyr; Y)和缬氨酸(Val; V)。氨基酸的具体性质（例如，极性、带电荷、亲水性、平均体积）对本领域技术人员是已知的。在本发明另一个实施例中，所述分析物可以为短肽，例如二肽。

[196].在本发明的一个实施例中，所述分析物可以为药物分子。药物分子可以是一种化合物。更具体地，“药物分子”可以是具有 1000 g/mol 或更低分子量的药物（例如，低于 800、700、600、500、400、300 或 200 g/mol）。作为优选，药物分子可以是氨基糖苷类抗生素。在本发明的另一个实施例中，药物分子包括氨基酸及其盐（包括不能成药的氨基酸）和肽。

[197].埃米孔系统

[198].“埃米孔系统”包括具有埃米级尺寸的孔（简称为“埃米孔”）、绝缘膜、第一介质和第二介质。在本发明的一个实施例中，所述具有埃米级尺寸的孔为小电导机械力敏感性通道（MscS）埃米孔。所述具有埃米级尺寸的孔优选为具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构，所述七聚体结构包含 7 个侧面开口和 1 个底部开口。在本发明的一个实施例中，所述具有埃米级尺寸的孔具有一个径向对称且形状似圆柱体的典型七聚体结构，所述七聚体结构包含 8 个开口，其中 7 个相等的开口分布在侧面，第 8 个开口分布于底部且由 7 个亚基形成；上述 8 个开口孔径大小均可调节。所述具有埃米级尺寸的孔允许所述分析物从所述绝缘膜的一侧易位到另一侧。

[199].在本发明的一个实施例中，所述具有埃米级尺寸的孔被嵌入所述绝缘膜中，所述绝缘膜（也可以理解为，所述埃米级尺寸的孔和所述绝缘膜的复合体）将所述第一介质与所述第二介质分隔开，所述具有埃米级尺寸的孔的孔道提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道；向所述第一介质和所述第二介质之间施加驱动力后，位于所述第一介质的分析物与所述 MscS 埃米孔相互作用以形成电流（即电信号）。在本发明中，“第一介质”是指所述分析物被加入所述埃米孔系统时位于的介质；“第二介质”则是指被所述绝缘膜分隔开的两部分介质中，“第一介质”的另一侧。在本发明中，驱动力是指通过电势、电渗流、浓度梯度等方式驱动分析物与所述埃米孔相互作用的力。

[200].所述第一介质和所述第二介质可以相同或不同，并且所述第一介质和所述第二介质可以包括电导液。所述电导液为碱金属卤化物水溶液，具体为氯化钠(NaCl)、氯化锂(LiCl)、氯化铯(CsCl)、氯化钾(KCl)、溴化钠(NaBr)。在本发明一个实施例中，所述第一介质和所述第二介质含有的电导液的浓度是不同的，换句话说，所述第一介质和所述第二介质中电导液的浓度存在差值，进而使得所述绝缘膜两侧的渗透压存在差值。所述第一介质和/或所述第二介质还可以包括缓冲液，例如 HEPES。所述第一介质和/或所述第二介质的浓度范围可以是 30 mM-3 M。

[201].绝缘膜是指具有搭载埃米孔（或纳米孔）并阻塞非埃米孔（或纳米孔）通过的离子电流

的能力的膜。所述绝缘膜可以包括磷脂膜和/或高分子膜。示例性的磷脂膜包括 DPHPC、DOPC、E.coli lipid，示例性的高分子膜包括三嵌段共聚物高分子膜。

[202].本埃米孔系统可包含本文所描述的任何小电导机械力敏感性通道，例如野生型 PaMscS (SEQ ID NO:1)、野生型 EcMscS (SEQ ID NO:2)、野生型 TtMscS (SEQ ID NO:3) 和野生型 HpMscS (SEQ ID NO:4) 及其相应变体，上述四种 MscS 的具体序列信息如表 4 所示。例如，所述小电导机械力敏感性通道可以为突变体 *PaMscS1* (W130A)、突变体 *PaMscS2* (K180R)、突变体 *PaMscS3* (V271I)。

[203].表 4: 四种 MscS 的氨基酸序列信息

| 名称            | 氨基酸序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 野生型<br>PaMscS | MELNYDRLVQQTESWLPVILEYSGKVALALLTLAIGWWLINTLTGRVGGLLARRSVDRTLQGFVGSLSIVLKILLVSVASMIQTTSFVAAIGAAGLAIGLALQGSANFAGGVLILLFRPFKVGDWIEAQGVAGTVDSILIFHTVLRSGDNKRIIVPNGALSNGTVTNYSAEPVRKVIFDVGIDYDADLKNAQNILLAMADDPRLKDPAPVAVVSNLGESAITLSLRVWVKNADYWDVFMFMFNEKARDALGKEGIGIPFPQRVVKVVGAMAD (SEQ ID NO:1)              |
| 野生型<br>EcMscS | MEDLNVVDSINGAGSWLVANQALLSYAVNIVAALAIIVGLIARMISNAVNRLMISRKIDATVADFLSALVRYGIIAFTLIAALGRVGVQTASVIAVLGAAGLAVGLALQGSLSNLAAGVLLVMFRPFRAAGEYVDLGGVAGTVLSVQIFSTTMRTADGKIIVIPNGKIIAGNIINFSREPVRRNEFIIGVAYDSIDQVKQILTNIQSEDRLKDRMTVRLNELGASSINFVVRVWSNSGDLQNVYWDVLERIKREFDAAGISFPYPQMDVNFKRVEDKAA (SEQ ID NO:2)       |
| 野生型<br>TtMscS | MWADIYHKLVEIYDIKAVKFLDLVLKILIIAFIGIKFADFLIYRFYKLYSKSKIQLPQRKIDTLTSLTKNAVRYIIYFLAGASILKLFNIDMTSLLAVAGIGSLAIGFGAQNVLKDMISGFFIIFEDQFSVG DYVTINGISGTVEEIGLRVTKIRGFSDDLHIIPNGEIKMVTNLTKDSMMAVVNIAFPIDEDVDKIIIEGLQEICEEVKKSRRDDLIEGPTVLGITDMQDSKLVIMVYAKTQPMQKWAVERDIRYRVKKMFDQKNISFPYPRTTVILSEKKTN (SEQ ID NO:3) |
| 野生型<br>HpMscS | MDEIKTLLVDFFPQAKHFGIILIKAVIVFCIGFYFSFFLRNKTMKLLSKKDEILANFVAQVTFILILHTTHALSTLGVQTTSIITVLGTVGIAVALALKDYLSIAGGIILILHPFKKGDIIISGLEGKVEALNFFNTSLRLHDGRLAVLPNRSVANSNIINSNNTACRRIEWWCGVGYGSDIELVHKTIKDVIDTMEKIDKNMPTFIGITDFGSSSLNFTIRVWAKIEDGIFNVRSIELIERIKNALDANHIEIPFNKLDIAIKNQDSSK (SEQ ID NO:4)                |

[204].在本发明的一个具体实施例中，所述埃米孔系统包括两个电解液室，其被绝缘膜分隔开而形成反式 (-trans) 隔室和顺式 (-cis) 隔室，所述埃米孔的孔嵌入绝缘膜中，绝缘膜上只有小电导机械力敏感性通道埃米孔来连通上述两个电解液室。当向上述两个电解液室施加电势时，电解液室中溶液中的电解质离子通过电泳移动并穿过所述埃米孔。

[205].在本发明的一个实施例中，所述小电导机械力敏感性通道 (MscS) 埃米孔可以被嵌入绝缘膜中，但其保留了响应绝缘膜受到的机械力刺激和绝缘膜的物理状态变化而改变蛋白质结构的能力。具体地，机械力刺激包括所述绝缘膜两侧的渗透压变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激、气压负压对所述绝缘膜的刺激等。绝缘膜的物理变化包括所述绝缘膜的厚度变化、所述绝缘膜的组成成分变化、所述绝缘膜的表面曲率变化。所述改变蛋白质结构包括改变 MscS 的开口的电荷性质和/或孔径大小。进一步地，可利用 MscS 埃米孔改变的开口的电荷性质和/或孔径大小来检测不同的分析物。本发明所涉及的埃米孔的孔径的可调节范围可以是 5 - 15 埃米。

[206].所述埃米孔和分析物之间的相互作用

[207].所述分析物可与所述埃米孔在所述绝缘膜两侧的任一侧接触。所述分析物可以与所述绝缘膜两侧中的任一侧相接触，使得所述分析物穿过所述埃米孔的通道以到达所述绝缘膜的另一侧。在这种情况下，所述分析物在其经由所述孔的通道穿过所述绝缘膜时，与所述埃米孔

相互作用。或者，所述分析物可与所述绝缘膜的侧面接触，所述绝缘膜的侧面可使所述分析物与所述埃米孔相互作用，使其与所述埃米孔分离并停留在所述绝缘膜的同一侧。所述分析物可以以任何方式并在任何位点与所述埃米孔相互作用。所述分析物还可以撞击到所述埃米孔，与所述埃米孔相互作用，使其与所述埃米孔分离并停留在所述绝缘膜的同一侧。

[208].在所述分析物与所述埃米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埃米孔的电流，即流经所述埃米孔的电流对特定分析物是特征性的。可进行对照实验以测定特定分析物对流过所述埃米孔的电流的效应，然后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。更具体地，可以根据通过检测分析物所获得的电流模式与在相同的条件下使用已知的分析物获得的已知的电流模式进行比较，以鉴定分析物的存在与否或浓度等。

[209].本发明的埃米孔系统还可以包括一个或多个测量流过所述埃米孔的电流的测量装置，例如膜片钳放大器或数据采集设备。

[210].样本

[211].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。本发明可以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。

[212].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。本发明还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。所述样本通常包括体液。所述样本可以是体液样本，例如尿液、血液、血清、血浆、淋巴液、囊肿液、胸膜液、腹水液、腹膜液、羊水、附睾液、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、母乳、泪液、唾液、痰或其组合。所述样本可以源自人类，也可以源自其他哺乳动物。所述样本可以是非生物样本。所述非生物样本优选地为流体样本，例如饮用水、海水、河水以及用于实验室试验的试剂。

[213].所述样本在分析之前可以不经过处理，例如直接在全血中检测所述分析物。所述样本在分析之前也可以经过处理，例如通过离心、过滤、稀释、沉淀或其他本领域已知的物理手段或化学手段。

[214].在本发明的一个实施例中，所述样本为全血样本。

[215].在本发明一个实施例中，所述样本为核酸扩增产物。

[216].检测样本中核酸的存在的方法

[217].本发明还提供一种检测样本中核酸的存在的方法。所述方法包括：S1 将样本置于核酸扩增体系并进行核酸扩增，确定所述核酸扩增体系中底物核苷酸的数量，获得所述样本的核酸扩增产物；S2 将所述样本的核酸扩增产物加入埃米孔系统，所述埃米孔系统包括：埃米孔、绝缘膜、第一介质、第二介质，其中所述蛋白质埃米孔被嵌入所述绝缘膜中，所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开，所述埃米孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道，所述埃米孔为 MscS 埃米孔，所述埃米孔具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构，所述七聚体结构包含 7 个侧面开口和 1 个底部开口，所述样本的核酸扩增产物被加入到所述第一介质；S3 向所述第一介质和所述第二介质之间施加驱动力，所述样本的核酸扩增产物中剩余核苷酸与所述埃米孔相互作用并产生电信号（电流）；S4 对所述电信号进行量化，获得所述剩余核苷酸的数量；S5 将所述剩余核苷酸的数量与所述底物核苷酸的数量进行对比，确定所述样本中所述目标核酸是否存在。在一些实施例中，S1 可以和 S2 同时进行或在同一体系中进行。在检测前，还可以设置阈值，例如，只有剩余核苷酸中的至少一种的数量低于该阈值时，视为样本中目标核酸存在；或者，只有全部种类的剩余核苷酸的数量高于该阈值时，视为样本中目标核酸不存在。

[218].本发明的“消耗策略”实际上适用于多种跨膜孔，而并不局限于本发明的埃米孔。跨膜孔是在某种程度上穿过膜的结构。它允许由施加的驱动力驱动的分析物流过膜或膜内。跨膜

孔通常穿过整个膜，使得分析物可以从膜的一侧流到膜的另一侧。然而，跨膜孔不是必须得穿过膜。它的一端可以封闭。例如，孔可以是膜中的阱、间隙、通道、沟槽或狭缝，分析物可以沿着它流动或流入其中。可以使用任何跨膜孔来实施本发明“消耗策略”。跨膜孔可以是生物的或人造的。合适的孔可以是蛋白质孔、多核苷酸孔和固态孔。本发明中的跨膜孔至少应具备检测和区分多种核苷酸的能力，优选为跨膜蛋白孔。换句话说，本发明涉及的跨膜蛋白孔能够允许由驱动力驱动的分析物从膜的一侧流到另一侧。

[219].本领域技术人员可以在理解本发明的基础上，选择其他能够检测（和区分）不同核苷酸的跨膜孔来检测目标核酸的存在与否。

[220].“核酸”是指以单链或双链形式存在的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物。目标核酸的“核酸扩增”是指体外构建与目标核酸序列至少一部分相同或互补的核酸链的过程，仅当该目标核酸存在于样本中时才可能发生核酸扩增过程。在核酸扩增过程，通常利用酶（例如核酸聚合酶、转录酶）来产生目标核酸或者其片段的多个拷贝，或者与该目标核酸或者其片段互补的序列的多个拷贝。发生核酸扩增过程后，核酸扩增体系的底物核苷酸会随拷贝数的增加而相应地减少。图3和图4为核酸扩增的示例。

[221].本发明方法的原理基于体外核酸扩增技术，以消耗核酸扩增体系中的底物核苷酸，因此常见的体外核酸扩增技术，例如聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、链置换扩增技术(SDA)、转录介导的扩增技术(TMA)、环介导等温扩增技术(LAMP)都可以配合本发明提供的方法所使用。

[222].在一个具体实施例中，本发明提供的方法可以检测样本中是否存在新冠病毒核酸。

[223].在一个具体实施例中，本发明提供的方法可以检测样本中是否存在单链核酸。

[224].在本发明的一个实施例中，本发明通过构建合适的引物（例如，SARS-CoV-2核酸的特异性引物）并将所述引物引入到核酸扩增体系（包括底物dNTPs、聚合酶、反转录酶）。如果样本中存在该新冠病毒核酸，则所述新冠病毒核酸在合适的条件下核酸扩增，消耗底物dNTPs并生成所述核酸的多个拷贝。而将所述样本的核酸扩增产物加入本发明提供的埃米孔系统后，所述核酸扩增体系中的大分子物质（例如，酶、多核苷酸等）无法穿过埃米孔，也就是说，所述核酸扩增体系中只有游离的单核苷酸能够穿过所述埃米孔并产生特异性电流，进而确定剩余核苷酸的数量，以判断样本中是否存在目标新冠病毒核酸（即如果样本中无目标新冠病毒核酸，则剩余核苷酸的数量更接近核酸扩增前的底物核苷酸数量；如果样本中存在新冠病毒核酸，则剩余核苷酸的数量显著低于核酸扩增前的底物核苷酸数量，更具体地，底物核苷酸中可能至少一种核苷酸被完全消耗）。

[225].在本发明的一个实施例中，本发明通过构建合适的探针（例如，所述探针包括与目标核酸序列互补配对的序列和多聚核苷酸序列）并将所述探针引入到核酸扩增体系（包括底物dNTPs、聚合酶）。如果样本中存在该目标核酸序列，则所述目标核酸序列在合适的条件下核酸扩增，消耗底物dNTPs并生成所述目标核酸序列的多个拷贝；更具体地，由于探针还具有多聚核苷酸序列（例如，Poly T、Poly A、Poly C、Poly G），因此，所述目标核酸序列与所述探针结合后，还会大量消耗与多聚核苷酸序列相对应的底物核苷酸，因此可以从某种底物核苷酸的特异性消耗来判断样本中是否存在目标核酸序列。将所述样本的核酸扩增产物加入本发明提供的埃米孔系统后，所述核酸扩增体系中的大分子物质（例如，酶、多核苷酸等）无法穿过埃米孔，也就是说，所述核酸扩增体系中只有游离的单核苷酸能够穿过所述埃米孔并产生特异性电流，进而确定剩余核苷酸的数量，以判断样本中是否存在目标核酸序列（即如果样本中无目标核酸序列，则剩余核苷酸的数量更接近核酸扩增前的底物核苷酸数量；如果样本中存在目标核酸序列，则剩余核苷酸的数量显著低于核酸扩增前的底物核苷酸数量且探针中所对应的多聚核苷酸被大量消耗。基于此，可设计不同的探针在同一个核酸扩增体系中同时检测不同的目标核酸序列。

[226].检测样本中的药物分子的方法

[227].本发明还提供一种检测样本中的药物分子的方法，所述方法包括：S1 将所述样本加入埃米孔系统，所述埃米孔系统包括：埃米孔、绝缘膜、第一介质、第二介质，其中所述埃米孔被嵌入所述绝缘膜中，所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开，所述埃米孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道，所述埃米孔为 MscS 埃米孔，所述埃米孔具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构，所述七聚体结构包含 7 个侧面开口和 1 个底部开口；所述样本被加入到所述第一介质；S2 向所述第一介质和所述第二介质施加驱动力，所述样本中的药物分子与所述埃米孔相互作用并产生电信号；S3 分析所述电信号，进而识别所述样本中的药物分子。

[228].在本发明的一个实施例中，所述样本为体液样本。所述体液样本可以是尿液、血液、血清、血浆、淋巴液、囊积液、胸膜液、腹水液、腹膜液、羊水、附睾液、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、母乳、泪液、唾液、痰或其组合。所述样本在分析之前可以不经处理，例如直接在全血中检测所述分析物。当然，所述样本在分析之前也可以经过处理，例如通过离心、过滤、稀释、沉淀或其他本领域已知的物理手段或化学手段。本发明所指的样本包括不经处理的样本和经过处理的样本。

[229].在本发明的一个实施例中，所述药物分子的可检测范围可以是大于 10 nM（也可以理解为检测下限为 10 nM）。作为优选，所述药物分子的可检测范围可以是 10 nM~1 mM。如果药物分子的浓度远大于 10 nM（例如 10 mM），可以将其浓度稀释至 10 nM~1 mM。

[230].在本发明的一个实施例中，所述药物分子是一种化合物。更具体地，“药物分子”可以是具有 1000 g/mol 或更低分子量的药物（例如，低于 800、700、600、500、400、300 或 200 g/mol）。作为优选，药物分子可以是氨基糖苷类抗生素，例如硫酸庆大霉素、硫酸新霉素、西索米星等。在本发明的另一个实施例中，药物分子包括氨基酸及其盐（包括不能成药的氨基酸）和肽。

[231].在本发明的一个实施例中，本发明检测体液样本中的药物分子，其中药物分子的检测限为 10 nM。换句话说，体液样本中的所述药物分子的可检测范围可以是大于 10 nM。

[232].在本发明的一个实施例中，本发明检测全血样本（也可以理解为“血液样本”）中的药物分子。将所述全血样本加入本发明提供的埃米孔系统后，所述全血样本中的细胞（例如，红细胞、白细胞、血小板）和大分子物质（例如蛋白质）无法穿过埃米孔，也就是说，所述全血样本中的细胞和大分子物质不会使本发明提供的埃米孔堵塞。而存在于所述全血样本中的药物分子能够穿过所述埃米孔并产生特异性电流，本发明提供的埃米孔可以灵敏地识别较低浓度的所述药物分子，进而判断全血样本中所述药物分子的存在及浓度。

[233].在本发明的一个实施例中，本发明提供的方法可以用于对受试者体内的药物分子的血药浓度的连续监测。

[234].在本发明的一个实施例中，采用 PaMscS2（K180R）和 PaMscS3（V271I）埃米孔来检测全血样本中的药物分子，但其他 MscS 及其相应变体也包含在本发明的保护范围之内，依据是上述变体均有对药物分子进行传感检测的能力。

[235].**具体实施举例：**

[236].**实施例一**

[237].**材料与方法：**

[238].氯化钠(NaCl, >99.0%, CAS#7647-14-5)、dNTP 混合物(>99.0%)、dATP(>97%, CAS#1927-31-7)、dCTP(>98%, CAS#102783-51-7)、dGTP(>98%, CAS#93919-41-6)、dTTP(>98%, CAS#18423-43-3) 购自 Sangon Biotech。酵母提取物(CAS#8013-01-2)、胰蛋白酶(CAS#73049-73-7)、氨苄青霉素钠盐(≥98.5%, CAS#69-52-3)、Tris(≥99.9%, CAS#77-86-1)、咪唑(Imidazole)(≥99%, CAS#288-32-4)、十二烷基-β-D-麦芽糖苷(n-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside, DDM)(≥99%, CAS#69227-93-6)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)(≥99%, CAS#367-93-1)、苯甲磺酰氟

(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) ( $\geq 99\%$ , CAS#329-98-6)、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸 (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES) ( $>99.5\%$ , CAS#7365-45-9) 购自 Sigma-Aldrich。大肠杆菌提取磷脂购自 Avanti。PrimeSTAR HS DNA 聚合酶购自 TaKaRa。pUC57 载体质粒、DNA 模板、miRNA-21、AFP 适配体由 Sangon Biotech 合成, 其序列信息于表 1 列出。

[239].表 1 miR21 和 AFP 适配体的序列

| 内容                    | 序列                                  |
|-----------------------|-------------------------------------|
| miR21 (SEQ ID NO:5)   | TAGCTTATCAGACTGATGTTGA              |
| AFP 适配体 (SEQ ID NO:6) | TCAGGTGCAGTTCTCGACTCGGTCTTGATGTGGGT |

[240].野生型和突变体 PaMscS 的表达和纯化:

[241].使用基因特异性引物通过聚合酶链反应(PCR)扩增出来自铜绿假单胞菌基因组 DNA 中 PaMscS 的基因。使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit(Vazyme)将基因插入质粒中。将包含 PaMscS 基因的质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)细胞在 37°C、存在 50  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 Luria-Bertani(LB)培养基中培养并表达纯化。通过 SDS-PAGE 分析确定峰值。特别说明, 本发明中野生型和突变型蛋白的表达纯化步骤一样, 只是由于野生型蛋白与突变型蛋白存在序列差异, 因此在质粒合成阶段有差异。

[242].本发明实验团队通过建模揭示了该蛋白质埃米孔的结构, 其为径向对称且类似圆柱体的典型七聚体。它包含 8 个开口, 7 个在侧面, 1 个在底部。N-末端残基 1-13 太过灵活, 无法在模型中解析。在拓扑结构上, PaMscS 可分为 2 个部分, 跨膜区和大的胞质部分。每个单体产生三个 N-末端跨膜螺旋, 包括 TM1 (残基 17~52)、TM2 (残基 58~83) 和 TM3 (残基 90~122)。C-末端胞质区可分为中间 $\beta$ 结构域和 COOH 末端结构域。每个亚单位中的 TM1 和 TM2 以反平行方向排列在一起, TM1 穿过通道外侧的双层膜并且 TM2 形成中心层, 从而形成围绕通道轴的渗透路径。TM3 螺旋可以描述为两个螺旋片段, TM3a 和 TM3b, 在 Gly108 处被一个明显的扭结 (kink)  $\sim 53^\circ$  分开, 其在同源性是保守的残基。TM3a 像 TM1 一样, 以不同的偏转穿过该膜, 而 TM3b 则返回细胞质, 与胞质区域相互作用。此外, 7 个亚基形成一个半径为 $\sim 3.7\text{\AA}$ 的中心孔, 其感受张力并与构象变化有关。比较铜绿假单胞菌和大肠杆菌的 MscS 结构, 前者的 TM1 和 TM2 的倾斜角度小于后者, 这导致 TM 区域的大偏转, 尤其是 TM1 和 TM2 之间的环。在胞质区, 中间 $\beta$ 结构域 (残基 123~172) 包含 5 条 $\beta$ 链, 其与其他不同亚基的 $\beta$ 链紧密相连。并且 C 末端结构域 (177~273 残基) 以 5 条 $\beta$ 链和 2 条 $\alpha$ 螺旋组成, 其为混合结构。在相邻单体的这两个结构域之间, 在侧面有 7 个相等的开口, 清晰可见, 半径约为  $3.2\text{\AA}$ , 其被提出认为是 EcMscS 中的离子渗透的原因。除这些入口外, 第 8 个开口存在于蛋白质底部, 其通过 7 条 $\beta$ 链表现, 最窄半径为 $\sim 3.4\text{\AA}$ 。在所有尺寸中, 延伸至 $\sim 127\text{\AA}$ 的 PaMscS2 平行于七倍轴, 并在垂直方向宽度为 $\sim 88\text{\AA}$ 。PaMscS 的结构类似于关闭状态 (PDB:2OAU) 下的 EcMscS, TM 结构域有超过 101 个 rmsd 为  $8.3\text{\AA}$  的  $\text{C}_\alpha$  原子, 但在开放状态 (PDB:2VV5) 下, TM 区域存在较大差异, rmsd 为  $11.3\text{\AA}$ 。这些结果表明 PaMscS 在结构上的构象反映了关闭状态。总的来说, PaMscS 埃米孔独特而精细的结构显示出用于检测的巨大潜力。

[243].位点突变:

[244].对相应的氨基酸位点所对应的 DNA 序列进行修改 (包括 DNA 序列修改后直接送合成或者 PCR 突变), 将目标突变位点所在的 DNA 序列修改为突变蛋白所对应的 DNA 序列。突变型 PaMscS 蛋白埃米孔的突变蛋白可以包括 130A、130H、180R、271I、130S 或 130P。

[245].膜的合并和单通道记录:

[246].实验在由华纳仪器 (Warner instrument) 提供的垂直样品池中进行, 如果没有特别提到, 所有的电流痕迹都由采样频率为 9900 Hz 的 HEKA EPC 10 USB 膜片钳放大器记录。 $1\mu\text{L}$  的 25mg/mL 大肠杆菌膜被预涂在杯子的  $150\mu\text{m}$  孔口上, 然后将 1mL 的电解质溶液(-trans 端:

100mM NaCl, 10mM HEPES, pH7.0; -cis 端: 300mM NaCl, 10mM HEPES, pH7.0)分别加入到样品池的两面。然后用 1mL 吸管从-cis 端吸出样品池的大约 2/3 的电解质溶液。当平均电流接近 0 pA 时, 电解质溶液被驱动到样品池的-cis 侧, 以形成一个平面磷脂双分子膜。磷脂膜形成后, PaMscS1 蛋白溶液被加入到-cis 端中。当 PaMscS1 被嵌入到平面磷脂双分子膜中时, 电流有明显的变化。蛋白质被嵌入后, 更换 1 mL 溶液, 然后进行后续实验。

[247].单核苷酸检测:

[248].通过 MscS 埃米孔检测不同组的扩增产物。将不同的样品加入-cis 端, 在+50 mV 下记录并观察 20 分钟。当平面磷脂膜上形成稳定的 PaMscS1 埃米孔时, 将待检测的单核苷酸加入样品孔的-cis 端, 然后施加电压, 记录电流信号。

[249].冠状病毒临床样本的收集和处理:

[250].SARS-CoV-2 患者的临床样本通过咽拭子(患者编号: 1~15)和血液(患者编号: 16~22)采集, 经反转录后获得 cDNA。

[251].RNA 反转录和 PCR 扩增:

[252].本发明 SARS-CoV-2 RNA 反转录扩增系统如下: 随机六聚体(60μM)和锚 poly T(23): 1μL, dNTP 混合物(各 10mM): 1μL, RNA 样品: 11μL。将反应在热循环仪中、于 65°C 孵育 5 分钟。立即将样品放在冰上快速冷却>1 分钟。然后, 在一个干净的预 PCR 罩中, 将下列试剂与样品混合: 5X SuperScript IV 缓冲液: 4μL, DTT(100mM): 1μL, RNaseOUT RNase 抑制剂: 1μL, Superscript IV 逆转录酶: 1μL。使用 42°C 50 分钟和 70°C 10 分钟的程序将样品在热循环仪中孵化后获得 cDNA。本发明实验中的 cDNA PCR 扩增系统如下: ddH<sub>2</sub>O: 26.5 μL, 5×PrimeSTAR 缓冲液(Mg<sup>2+</sup> Plus): 10 μL, dNTP 混合物(2.5 mM): 4 μL, 引物 1(正向引物 ORF P1, 10 μM): 2 μL, 引物 2(反向引物 ORF P2, 10 μM): 2 μL, PrimeSTAR HS DNA 聚合酶(2.5 U/μL): 0.5 μL, cDNA 样品: 5 μL。扩增程序如下: 95°C 预热 5 分钟, 98°C 热变性 10 秒。55°C 折射退火 15 秒, 然后 72°C 延伸 12 秒。重复所述循环, 共 35 次。上述引物由本研究团队自主合成, 序列如下:

ORF P1: TTGTTTGAATAGTAGTTGTCTGA (SEQ ID NO:7)

ORF P2: TCAACTCAATATGAGTATGGTACTG (SEQ ID NO:8)

[253].逆转录酶环状介导的等温扩增(RT-LAMP)和检测:

[254].进行包含以下体系的 RT-LAMP 反应: ddH<sub>2</sub>O: 4.1 μL, WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA): 12.5 μL, F3 (20 μM): 0.2 μL, B3 (20 μM): 0.2 μL, FIP (20 μM): 1 μL, BIP (20 μM): 1 μL, LoopF (20 μM): 0.5 μL, LoopB (20 μM): 0.5 μL, 模板: 5 μL。LAMP 反应在 60°C 下运行 30 分钟。

[255].核酸扩增和检测:

[256].本发明的核酸扩增体系如下: ddH<sub>2</sub>O: 64.6 μL, 5×PrimeSTAR 缓冲液 (Mg<sup>2+</sup>+Plus): 20μL, dNTP 混合物 (各 10mM): 6μL, 引物 1 (miRNA21, 100μM): 0.4μL, 引物 2 (AFP 适配体, 10μM): 4μL, 模板 1 (提取, poly T): 2μL, 模板 2 (poly C, 1μM): 2μL, PrimeSTAR HS DNA 聚合酶 (2.5 U/μL): 1μL。扩增程序如下: 95°C 预热 5min 且 98°C 热变性 10s。60°C 折射退火 15 秒, 然后 68°C 延伸 23 秒。共重复循环 30 次, 核酸扩增结果如图 13 所示。

[257].电生物学数据分析:

[258].在本发明中, 电生物学数据由 Clampfit 软件处理, 并用 Origin 软件绘图。

## [259].实施例二

[260].基于 PaMscS 埃米孔的电生理检测和 dNTP 检测:

[261].MscS 的基本功能是对机械刺激(如渗透压期间的膜张力变化)反应的快速开/关的开关。MscS 的胞质结构域功能为在渗透适应(osmoadaptation)过程中平衡渗透剂的损失的分子筛。本发明的蛋白质埃米孔中, 来自胞质区的 7 个侧孔在离子和溶质的易位(translocation)过程中起着关键作用。因此, 侧孔突变体 *PaMscS1* (W130A) 和 *PaMscS2* (K180R) 由于低背景

噪音而被选择用于后续研究(图5、图6A-C)。在电生理实验中,将纯化的蛋白质加入到电生理装置的 $-cis$ 端中(图1A)。当PaMscS突变体通道嵌入双层脂质膜(BLM,绝缘膜的一种)时,在+50 mV的电压下可以观察到稳定的通道电流跳跃(图1B)。在范围从-50 mV至+50 mV的电压下,PaMscS1的通道电导保持稳定(图1C),并且当电压高于+90 mV时,PaMscS1的门控概率增加(图7)。PaMscS1埃米孔的电导为 $0.64 \pm 0.02$  nS( $n=91$ ,高斯拟合的峰值 $\pm$ SD,  $-cis$ 端: 300 mM NaCl,  $-trans$ 端: 30 mM NaCl), PaMscS2埃米孔的电导分布为 $34.9 \pm 7.0$  pA(平均值 $\pm$ SD, 来自18个独立插入事件)(图1D)。PaMscS1的离子转运结果表明,PaMscS1对Br<sup>-</sup>具有更好的选择性(图8)。

[262].在BLM中插入PaMscS1埃米孔,并在 $-cis$ 端中存在dNTPs的情况下,在正电压下可以观察到dNTPs的易位信号。dNTPs的易位频率随着电压的增加而增加(图9)。PaMscS1和PaMscS2都被分析用于dNTP混合物检测(dNTPs浓度: 0.2mM, 电压: +50 mV,  $-cis$ 端: 300 mM NaCl,  $-trans$ 端: 30 mM NaCl)。在两个突变体之间可以观察到阻塞电流分布的明显差异,表明dNTPs的易位与PaMscS埃米孔的侧孔有关(图1E),即,在同样的检测条件下,PaMscS1和PaMscS2埃米孔对于dNTPs阻塞电流的分布呈现出不同的情况。具体表现为PaMscS1埃米孔对于四种dNTPs混合物阻塞率呈现3个峰,而PaMscS2埃米孔对于四种dNTPs混合物阻塞率呈现2个峰。因为PaMscS1和PaMscS2突变的差异在于侧孔氨基酸的差异,因此推测dNTPs的检测信号与侧孔相关。由于PaMscS1对dNTP混合物有更好的区分效果,它更适合用于dNTPs混合物的区分。而对于PaMscS2,它表现出更稳定的通道电导和相对更高的膜融合效率,因此它更适合用于接着的快速诊断(图6A-C)。野生型PaMscS埃米孔对于四种dNTPs混合物阻塞率呈现2个峰(图29)。PaMscS1检测单核苷酸的电流轨迹和停留时间分布如图10A-D所示。

[263].与目前报道的含有am7 $\beta$ CD、MoS<sub>2</sub>和 $\alpha$ -Hederin的纳米孔 $\alpha$ -溶血素相比,虽然PaMscS1埃米孔的检测准确度低于报道的含有am7 $\beta$ CD结合物(即利用 $\alpha$ 溶血素突变蛋白与6-氨基-6脱氧- $\beta$ -环糊精适配体构建)的最佳生物纳米孔,但易位速度与固态纳米孔相当。在单链DNA(ssDNA)检测实验中,50 $\mu$ M的ssDNA在30 mM NaCl/300 mM NaCl的缓冲条件下和+50 mV偏置电压下进行检测,而由于其通道尺寸较窄,因此未观察到易位事件(图11)。因此,PaMscS突变体埃米孔有潜力成为一种有用的小分子传感器。

### [264].实施例三

[265].PaMscS1埃米孔的选择性调整用于优化的dNTPs检测:

[266].考虑到PaMscS1埃米孔的机械力敏感性,实验人员通过应用不同的渗透压差来调节PaMscS1埃米孔的选择性。为了在不同的渗透压差下保持dCTP和dGTP的恒定电荷特性,实验人员将 $-cis$ 端的电导缓冲液浓度保持在300mM并改变 $-trans$ 端的电导液浓度来改变渗透压差。在3种渗透压差条件下测试了PaMscS1埃米孔对大分子dGTP和小分子dCTP的检测能力,包括对称(symmetric)条件(图2A, 300mM NaCl/300mM NaCl, +50mV偏置电压),低渗透压差条件(图2B, 100 mM NaCl / 300 mM NaCl, +50 mV偏置电压)和高渗透压差条件(图2C, 30 mM NaCl / 300 mM NaCl, +50 mV偏置电压)。在对称渗透压条件下,dCTP的易位频率从 $0.16 \pm 0.03$  s<sup>-1</sup>增加到 $0.22 \pm 0.07$  s<sup>-1</sup>,而dGTP从 $0.09 \pm 0.02$  s<sup>-1</sup>变化到 $0.07 \pm 0.003$  s<sup>-1</sup>。在低渗透压差(LOD)条件下,dCTP的易位频率从 $0.34 \pm 0.1$  s<sup>-1</sup>增加到 $0.67 \pm 0.14$  s<sup>-1</sup>,而dGTP从 $0.06 \pm 0.01$  s<sup>-1</sup>增加到 $0.3 \pm 0.04$  s<sup>-1</sup>。在高渗透压差(HOD)条件下,dCTP的易位频率从 $0.12 \pm 0.04$  s<sup>-1</sup>增加到 $0.22 \pm 0.07$ s<sup>-1</sup>,而dGTP从 $0.37 \pm 0.08$  s<sup>-1</sup>增加到 $1.12 \pm 0.12$  s<sup>-1</sup>(图2D, 每个实验n=3,平均值 $\pm$ S.E.M)。图2E总结了dGTP和dCTP的检测,并且它总结为低渗透压差条件显示dCTP的最高的易位事件增加,而高渗透压差条件显示最高的dGTP的易位事件增加(图2E)。与高渗透压条件的dCTP的降低的捕获效率相比,低渗透压差条件显示对dCTP和dGTP二者的平衡的捕获能力。鉴于dGTP和dCTP的大小和电荷特性在给定的实验条件下保持恒定,且MscS家族(例如EcMscS、HpMscS、AtMsl1蛋白等)的通道大小在不同的压力、渗

透压条件或膜电位下可以变化, 实验人员可以得出结论: *PaMscS1* 埃米孔对 dNTPs 的选择性差异是由不同渗透压差条件下的通道大小的变化引起的。

[267].**实施例四:**

[268].通过 *PaMscS2* 检测 SARS-CoV-2 临床样本:

[269].对 SARS-CoV-2 核酸进行快速而简单的检测是对 SARS-CoV-2 流行的重要预防方法。在此, 实验人员使用 SARS-CoV-2 Orf1ab(cDNA) 的特异性引物进行 SARS-CoV-2 的检测(图 3A)。由于 *PaMscS2* 埃米孔具有较高的膜融合效率, 因此被应用于检测。目标序列为 172bp, 且扩增产物的片段分析表明引物可用于目标基因的扩增(表 2)。合成了 SARS-CoV-2 Orf1ab 基因并检测了 SARS-CoV-2 Orf1ab 基因的梯度浓度。在  $10^3$  拷贝数/mL 至  $10^{11}$  拷贝数/mL 的浓度范围内, 合成的 SARS-CoV-2 Orf1ab 基因可以被检测到(图 3B)。然后, 对 22 个临床样本进行了检测, 包括 15 个确诊病人的样本和 7 个健康对照组的样本。通过埃米孔检测的 15 个阳性样本和 6 个阴性样本(病人编号: 1~15, 17~22)都显示出与临床检测一致的结果(表 3), 1 个阴性样本被诊断为假阳性结果(病人编号: 16)。本方法的特异性为 86%, 灵敏度为 100%(图 3C)。作为核酸扩增监测的纳米设备, *PaMscS* 突变体埃米孔系统可以与如聚合酶链式反应和链式置换扩增等各种 NAAT (Nucleic Acid Amplification Tests, 核酸扩增检测)(图 12)相结合, 进行目标基因的检测(图 3D), 该孔还具有监测逆转录过程的潜力, 其可以实现对目标 RNA 的快速且无扩增的检测。

[270].表 2: 片段长度和扩增产物浓度

| 病人编号 | 片段长度 (bp) | 浓度 (ng/μl) |
|------|-----------|------------|
| 1    | 165       | 6.20       |
| 2    | 169       | 3.88       |
| 3    | 170       | 2.94       |
| 4    | 172       | 2.17       |
| 5    | 171       | 2.55       |
| 6    | 173       | 0.62       |
| 7    | 169       | 3.95       |
| 8    | 166       | 6.12       |
| 9    | 168       | 2.73       |
| 10   | 169       | 3.53       |
| 11   | 168       | 2.70       |
| 12   | 168       | 3.31       |
| 13   | 170       | 3.66       |
| 14   | 169       | 2.74       |
| 15   | 171       | 2.99       |

[271].表 3: Ct 值和临床样本的埃米孔检测结果

| 病人编号 | Ct (ORF) | $\Delta f$ (n/min) |
|------|----------|--------------------|
| 1    |          | 0.2916             |
| 2    | 25.23    | 1.6038             |
| 3    | 34.46    | 0.89838            |
| 4    | 34.12    | 2.4474             |
| 5    | 34.7     | 2.5854             |
| 6    | 34.8     | 2.9292             |
| 7    | 32.8     | 2.4654             |
| 8    | 18       | 2.3778             |
| 9    | 25.5     | 0.7806             |

|    |      |         |
|----|------|---------|
| 10 | 24.8 | 2.88834 |
| 11 | 35.8 | 1.33744 |
| 12 | 29.7 | 4.50845 |
| 13 | 21   | 1.79424 |
| 14 | 33.2 | 1.05842 |
| 15 | 32.8 | 0.15648 |
| 16 | -    | 5.67524 |
| 17 | -    | 6.71373 |
| 18 | -    | 8.7     |
| 19 | -    | 6.50264 |
| 20 | -    | 6.54    |
| 21 | -    | 6.46829 |
| 22 | -    | 7.30806 |

[272].**实施例五：**

[273].通过 PaMscS1 埃米孔检测多种生物标记物：

[274].实验人员设计了一种 dNTP 条形码探针的区分策略，并通过 PaMscS1 埃米孔验证了其在多种生物标记物检测中的应用。设计了两个探针以结合目标 DNA 序列并且在链式聚合反应中引起特异性 dNTPs 消耗，其中 miR21 探针（探针 A）：包括与一条与 miR21 互补配对的序列和一条 polyT 的条形码序列；AFP 适配体探针（探针 B）：包括一条与 AFP 适配体互补配对的序列和一条 poly C 的条形码序列。当样品中存在探针 A 或探针 B 时，聚合酶链反应可被激活，消耗反应体系中的 dATP 或 dGTP（图 4A）。检测无目标序列的对照样品、有 miR21 的样品、有 AFP 适配体的样品和既有 miR21 还有 AFP 适配体的样品。相应的电流轨迹和阻塞电流分布如图 4B 和 4C 所示。可以观察到，在对照组（没有 miR21 和 AFP 适配体的样品）中，dATP ( $\delta f_{dATP} = f_{dATP} / f_{背景}$ ) 的易位事件频率的相对增加为  $1.7 \pm 0.2$ （平均值  $\pm$  S.E.M），dGTP ( $\delta f_{dGTP} = f_{dGTP} / f_{背景}$ ) 的易位事件频率的相对增加为  $1.8 \pm 0.03$ 。在有 miR21 的样品中， $\delta f_{dATP}$  显著低于对照组 ( $1.4 \pm 0.1$ ，平均值  $\pm$  S.E.M)，同时有 AFP 适配体的样品中， $\delta f_{dGTP}$  降至  $1.0 \pm 0.3$ （平均值  $\pm$  S.E.M）。对于既有 miR21 又有 AFP 适配体的样品，与对照组相比， $\delta f_{dATP}$  ( $1.1 \pm 0.2$ ，平均值  $\pm$  S.E.M) 和  $\delta f_{dGTP}$  ( $1.3 \pm 0.2$ ，平均值  $\pm$  S.E.M) 均降低（图 4D）。这些结果表明，PaMscS1 可以同时检测单个或多个生物标记物（每个实验  $n \geq 3$ ）。

[275].**实施例六：**

[276].一种增强信号的策略：

[277].A. 通过离子调控增强对于待检测物的检测限，具体为对于 dNTPs，通过在本发明涉及的埃米孔的胞质端加入镍离子、钴离子等二价阳离子，可以提高对于 dNTPs 的检测下限；B. 通过电导液渗透差异的调节增强信噪比，具体为通过提高电导液浓度，可以提高对于结构类似药物分子的区分能力，通过提高磷脂膜两侧电导液的渗透差异，可以提高对于 dGTP 的检测效果。

[278].**实施例七：**

[279].药物检测

[280].1. 通过 LC-MS 的药物测量：

[281].LC-MS 和 LC-MS/MS 分析是在岛津超快速液相色谱系统(UFLC，岛津)和 AB SCIEX Qtrap 5500 质谱仪上进行的，配备了 Turbo 喷雾离子源（Turbo Spray ion source）。色谱和质谱数据的收集和分析由 Analyst 1.6.2 软件(AB SCIEX, USA)完成。

[282].色谱分离是在 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 柱(2.1 mm  $\times$  100 mm I.D., 1.7  $\mu$ m)上实现的。流动相由水(A)和乙腈(B)组成，梯度洗脱如下：0-1.0 分钟，10-90%B；1-2.0 分钟，90%B。流速为 0.5mL/min。柱温和自动进样器的温度分别保持在 35°C 和 15°C。注射量为 1  $\mu$ L。

[283].在 MS/MS 分析中,采用正电离模式用于样品检测,以如下的优化质谱参数:离子喷雾电压,5500V;去簇电压,100V;温度,500°C。选择 MRM(多反应监测)模式定量来硫酸庆大霉素和 IS(内标),离子对分别为 450.2-160.1、464.2-160.1、478.2-157.1 和 265.2-232.2。

[284].2. 从连接到活体大鼠血管的透析装置中连续监测硫酸庆大霉素:

[285].雄性 Sprague-Dawley 大鼠(250-300 g)由成都达硕实验动物有限公司提供,本发明中的所有动物实验都得到了四川大学华西医院伦理委员会的批准(批准号 2021885A)。

[286].大鼠(n=1)用 2%戊巴比妥麻醉,且左股静脉被分离并插入导管以提供一个静脉注射口。接下来,通过该导管注入最初的 0.4 mL 肝素溶液(250 U/mL),然后每 40 分钟周期注射 0.1 mL 以防止监测期间血块的形成。然后分离左股动脉,插入导管,并立即通过预先设计的带透析膜的管连接到设备。设备中的空气被血流排出后,管与静脉导管相连,形成一个稳定的循环。对于连续监测,首先记录没有目标药物时的基线信号,然后通过静脉导管以缓慢的速度注入特定浓度的硫酸庆大霉素。对于血液浓度的间隔测量,建立一个类似的循环,既无设备也无透析膜。从动脉导管收集 0、15、30、45 和 60 分钟的血液样本,并用 PaMscS3 (V271I) 埃米孔测量药物浓度。每次实验结束后,大鼠由颈椎脱臼处死。

[287].3. 全血检测:

[288].采大鼠血液 10 微升,加入到融合有埃米孔的样品槽中(-cis 端),施加偏置电压,记录加样一定时间内的信号频率,随后将该信号频率减去空白血液对照频率,根据所检测分子的标准曲线,计算获得该分子对应的浓度。

[289].结果:

[290].1. 基于 PaMscS 埃米孔的药物单分子生物传感:

[291].根据 PaMscS 埃米孔的通道结构,选择小分子药物(摩尔质量小于 1000 g/mol)用于检测。硫酸庆大霉素(gentamicin sulphate; 分子量 MW: 561.65)和硫酸新霉素(neomycin sulphate; 分子量 MW: 712.72)被测试用于定量测定,因为它们在大临床上的大规模使用,表明迫切需要便利的 TDM(therapeutic drug monitoring, 治疗药物监测)。硫酸庆大霉素和硫酸新霉素的检测实验是在 300mMNaCl(-cis 端)和 30mMNaCl(-trans 端)、10mM HEPES、pH 7.0 的电解质条件下进行的,药物检测的电压为-50 mV。药物加入检测系统后出现了明显的阻塞电流信号(图 14A、14B, 图 17、图 18)。硫酸庆大霉素的标准曲线显示线性检测范围为 10 nM 至 10  $\mu$ M(N=3),典型的硫酸庆大霉素信号的 2D 密度图显示峰值阻塞电流为  $11.57 \pm 0.02$  pA,峰值停留时间为  $1.33 \pm 0.02$  ms(图 14C, 高斯拟合的峰值, 878 次阻塞事件)。硫酸新霉素的标准曲线显示线性检测范围为 100 nM 至 100  $\mu$ M(N=3),典型硫酸新霉素信号的 2D 密度图显示峰值阻塞电流为  $9.44 \pm 0.02$  pA,峰值停留时间为  $1.06 \pm 0.01$  ms(图 14D, 高斯拟合的峰值, 883 次阻塞事件)。更高的药物浓度可能导致通道的严重阻塞,并且使药物浓度计算变得困难(图 19)。除硫酸庆大霉素和硫酸新霉素之外,PaMscS 埃米孔还可以单分子传感其他药物,例如西索米星(MW: 447.53)、焦磷酸(MW: 177.975)。

[292].为了评估 PaMscS3 (V271I) 埃米孔对药物的检测精确度,使用 LC-MS 来测量硫酸庆大霉素的浓度。对于 1.5 $\mu$ M 的硫酸庆大霉素样品,PaMscS3 (V271I) 埃米孔和 LC-MS 呈现出相似的检测结果,表明 PaMscS3 (V271I) 埃米孔的检测具有良好的精确度(图 14E)。

[293].2. 全血样本的药物浓度测量:

[294].血液是治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, 简称 TDM)的主要介质,但全血成分复杂,其会对纳米孔检测造成严重干扰。常用的纳米孔 MspA-2NN 在-cis 端中加入 10 $\mu$ L 全血样本后被阻塞(-cis 端和-trans 端的体积为 1mL),300 s 内+100 mV 下开放通道的概率仅为 5% $\pm$ 4.7%(图 20, 电解质条件为-cis 端: 300 mM NaCl, -trans 端: 300 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH7.0, N=3)。相比之下,PaMscS2 埃米孔即使在-cis 端中加入 20 $\mu$ L 全血,也可以保持通道的开放,在 300 s 内、+100 mV 下开放通道的概率为 99% $\pm$ 1%(图 15A、15B、15C, 电解质条件为-cis 端: 130 mM NaCl, -trans 端: 130 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.0, N=3)。考虑

到 PaMscS3 (V271I) 埃米孔的稳健检测能力, 在注射 4 mg/mL 硫酸庆大霉素后的不同时间间隔(0 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟和 60 分钟, 图 21、图 22), 直接测量大鼠的硫酸庆大霉素血药浓度。硫酸庆大霉素标准曲线范围从 0 到 3 $\mu$ M, 用于计算药物浓度(图 15D,  $N \geq 3$ )。在 5 个监测点中, 15 分钟的药物浓度最高, 60 分钟的浓度降低到注射前水平(0 分钟)(图 15E,  $N \geq 3$ )。PaMscS3 (V271I) 埃米孔测得的药物浓度趋势符合药物代谢动力学规律, 表明 PaMscS 埃米孔可以准确测量活体大鼠体内药物浓度的变化。有趣的是, 硫酸庆大霉素的阻塞电流分布显示, 在 130mM NaCl 的缓冲液中、在较高的负电压下的两个峰值(图 23), 而单组分的西索米星 (sisomicin) 在相同条件下显示一个阻塞电流峰值(图 24), 这表明硫酸庆大霉素的两个阻塞电流峰值可能与其多组分有关。

[295].3. 连接到活体大鼠血管的透析装置对药物的连续监测:

[296].由于不同的病人, 特别是危重病人之中的药物代谢率有很大的差异, 用间隔的 TDM 技术很难满足精准医疗的需要。因此, 对药物浓度的连续监测是非常必要的。为了实现对活体动物药物浓度的长时间监测, 实验人员引入了透析膜以避免血液消耗。在 TDM 过程中, 少量的血液通过导管流向透析装置, 然后再流回体内。血液中的小分子药物可以通过透析装置渗透到-cis 端的导电液体中, 而血液基本上没有消耗(图 16A)。硫酸庆大霉素的标准曲线范围从 0 到 30 $\mu$ M, 用于连续监测的药物浓度计算(图 16B)。在活体大鼠的可行性验证实验中, 基于简单的透析装置, 可以连续观察到硫酸庆大霉素的明显信号, 直至注射后 3 小时(图 16C)。对大鼠的不同剂量的硫酸庆大霉素, 包括 4 mg/kg 和 20 mg/kg, 可以通过埃米孔监测装置区分(图 16D)。这些结果表明, 该系统可以连续监测活体动物的药物浓度, 损失极少。

[297].**实施例八:**

[298].基于 EcMscS 埃米孔的电生理检测

[299].当野生型 EcMscS 通道嵌入双层脂质膜 (BLM) 时, 在+100 mV 的电压下可以观察到稳定的通道电流跳跃 (图 25)。在范围从-100 mV 至+100 mV 的电压下, 野生型 EcMscS 通道电流保持稳定(图 26)。野生型 EcMscS 埃米孔的电导为  $0.334 \pm 0.028$  nS(-cis 端: 300 mM NaCl, -trans 端: 30 mM NaCl) (图 27)。图 28a-c 分别显示了 EcMscS、TtMscS 和 HpMscS 的结构, 其与 PaMscS 的结构高度相似, 即都为径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构。此外, 图 28a-c 和图 28d 进一步比较了 PaMscS 与 EcMscS、TtMscS、HpMscS 的序列, 结果表明 EcMscS、TtMscS、HpMscS 与 PaMscS 具有一定的同源性, 但这种同源性并非高度同源。EcMscS 和 PaMscS 的相似性仅为 60%, 但其二者都有检测分析物的能力。因此, 本领域技术人员可以理解, 决定细菌的 MscS 能够作为埃米孔检测分析物的关键在于其径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构和通道孔径, 并非仅仅在于同源性。

[300].**实施例九:**

[301].基于 PaMscS 埃米孔的氨基酸检测

[302].本实施例以 PaMscS1 为例进行氨基酸的检测。谷氨酸 (10mM) 的检测实验是在 300mMNaCl(-cis 端)和 30mMNaCl(-trans 端)、10mM HEPES、pH 7.0 的电解质条件下进行的, 药物检测的电压为-50 mV。谷氨酸的电流轨迹如图 30 所示。

[303].除单个氨基酸外, 本发明涉及的埃米孔还可以检测短肽 (例如, 二肽)。如图 31 左图所示, 将待测氨基酸与天冬氨酸载体脱水缩合, 形成二肽, 在 300mMNaCl(-cis 端)和 30mMNaCl(-trans 端)、10mM HEPES、pH 7.0 的电解质条件下检测形成的二肽, 并将其产生的电流信号与已测的氨基酸的特定电流信号比较, 以判断待测氨基酸的种类。

[304].**总结:**

[305].本发明中, 实验人员研究了作为单分子传感的亚纳米通道 PaMscS 的新类别。野生型和突变型 PaMscS 埃米孔的结构信息和电生理学验证了直接检测 dNTPs 的能力。根据分析物的尺寸, 可以在原位调整埃米孔的选择性以获得最佳的检测效率。与 NAAT 中增加的合成的核酸产物的监测对比, PaMscS 埃米孔可用于直接测定 DNA 扩增过程中 DNA 组分的消

耗,其变化量显著大于 DNA 产物。根据此策略,检测 SARS-CoV-2 临床标本,其特异性和敏感性分别为 86%和 100%。用此策略、通过 dNTP 条形码探针还同时检测到包括 miR21 和 AFP 适配体的两种靶生物标记物,表明 PaMscS 埃米孔可用于多种生物标记物的编码检测。这种埃米级孔还有能实现对低分子量分子(如氨基酸、药物)的直接检测。

[306].上面结合附图对本发明的实施例进行了描述,但是本发明并不局限于上述的具体实施方式,上述的具体实施方式仅仅是示意性的,而不是限制性的,本领域的普通技术人员在本发明的启示下,在不脱离本发明宗旨和权利要求所保护的范围情况下,还可做出很多形式,这些均属于本发明的保护之内。

#### [307].参考文献

1. Liu, H. & Johnston, A. P. R. A Programmable Sensor to Probe the Internalization of Proteins and Nanoparticles in Live Cells. *Angewandte Chemie International Edition***52**, 5744–5748 (2013).
2. Li, X. *et al.* Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews***90**, 157–166 (2015).
3. Wilson, P. M. *et al.* A novel fluorescence-based assay for the rapid detection and quantification of cellular deoxyribonucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Research***39**, e112–e112 (2011).
4. Fuller, C. W. *et al.* Real-time single-molecule electronic DNA sequencing by synthesis using polymer-tagged nucleotides on a nanopore array. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***113**, 5233–5238 (2016).
5. Butler, T. Z., Pavlenok, M., Derrington, I. M., Niederweis, M. & Gundlach, J. H. Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore. *Proceedings of the National Academy of Sciences***105**, 20647–20652 (2008).
6. Goyal, P. *et al.* Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG. *Nature***516**, 250–253 (2014).
7. Cao, C. *et al.* Mapping the sensing spots of aerolysin for single oligonucleotides analysis. *Nature Communications***9**, 2823 (2018).
8. Wendell, D. *et al.* Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted phi29 motor protein nanopores. *Nature Nanotechnology***4**, 765–772 (2009).
9. Manrao, E. A. *et al.* Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nature Biotechnology***30**, 349–353 (2012).
10. Bowden, R. *et al.* Sequencing of human genomes with nanopore technology. *Nature Communications***10**, 1869 (2019).
11. Wang, Y., Zheng, D., Tan, Q., Wang, M. X. & Gu, L.-Q. Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients. *Nature Nanotechnology***6**, 668–674 (2011).
12. Thakur, A. K. & Movileanu, L. Real-time measurement of protein–protein interactions at single-molecule resolution using a biological nanopore. *Nature Biotechnology***37**, 96–104 (2019).
13. Astier, Y., Braha, O. & Bayley, H. Toward single molecule DNA sequencing: Direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter. *Journal of the American Chemical Society***128**, 1705–1710 (2006).
14. Clarke, J. *et al.* Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature nanotechnology***4**, 265–70 (2009).
15. Jeong, K.-B. *et al.* Alpha-Hederin Nanopore for Single Nucleotide Discrimination. *ACS Nano***13**, 1719–1727 (2019).
16. Venta, K. *et al.* Differentiation of Short, Single-Stranded DNA Homopolymers in Solid-State Nanopores. *ACS Nano***7**, 4629–4636 (2013).
17. Garaj, S. *et al.* Graphene as a subnanometre trans-electrode membrane. *Nature***467**, 190–193 (2010).
18. Booth, I. R. & Blount, P. The MscS and MscL Families of Mechanosensitive Channels Act as Microbial Emergency Release Valves. *Journal of Bacteriology***194**, 4802–4809 (2012).
19. Akitake, B., Anishkin, A. & Sukharev, S. The “Dashpot” Mechanism of Stretch-dependent Gating in MscS. *The Journal of General Physiology***125**, 143–154 (2005).
20. Bass, R. B. Crystal Structure of Escherichia coli MscS, a Voltage-Modulated and Mechanosensitive Channel. *Science***298**,

1582–1587 (2002).

21. Lee, J.-Y., Na, I. Y., Park, Y. K. & Ko, K. S. Genomic variations between colistin-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates and their effects on colistin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy***69**, 1248–1256 (2014).
22. Machiyama, H., Tatsumi, H. & Sokabe, M. Structural changes in the cytoplasmic domain of the mechanosensitive channel MscS during opening. *Biophysical journal***97**, 1048–57 (2009).
23. Feng, J. *et al.* Identification of single nucleotides in MoS2 nanopores. *Nature Nanotechnology***10**, 1070–1076 (2015).
24. Gamini, R., Sotomayor, M., Chipot, C. & Schulten, K. Cytoplasmic Domain Filter Function in the Mechanosensitive Channel of Small Conductance. *Biophysical Journal***101**, 80–89 (2011).
25. Perozo, E. & Rees, D. C. Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels. *Current Opinion in Structural Biology***13**, 432–442 (2003).
26. Maksaev, G. & Haswell, E. S. MscS-Like10 is a stretch-activated ion channel from *Arabidopsis thaliana* with a preference for anions. *Proceedings of the National Academy of Sciences***109**, 19015–19020 (2012).
27. Rozevsky, Y. *et al.* Quantification of mRNA Expression Using Single-Molecule Nanopore Sensing. *ACS nano* acsnano.0c06375 (2020). doi:10.1021/acsnano.0c06375
28. Ouldali, H. *et al.* Electrical recognition of the twenty proteinogenic amino acids using an aerolysin nanopore. *Nature biotechnology***38**, 176–181 (2020).
29. LEI, J. & FRANK, J. Automated acquisition of cryo-electron micrographs for single particle reconstruction on an FEI Tecnai electron microscope. *Journal of Structural Biology***150**, 69–80 (2005).
30. Zheng, S. Q. *et al.* MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nature Methods***14**, 331–332 (2017).
31. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nature Methods***14**, 290–296 (2017).
32. Punjani, A., Zhang, H. & Fleet, D. J. Non-uniform refinement: Adaptive regularization improves single particle cryo-EM reconstruction. *bioRxiv* 2019.12.15.877092 (2019). doi:10.1101/2019.12.15.877092
33. Wang, W. *et al.* The Structure of an Open Form of an *E. coli* Mechanosensitive Channel at 3.45 Å Resolution. *Science***321**, 1179–1183 (2008).
34. Jurcik, A. *et al.* CAVAR Analyst 2.0: analysis and visualization of channels and tunnels in protein structures and molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics (Oxford, England)***34**, 3586–3588 (2018).
35. Smart, O. S., Goodfellow, J. M. & Wallace, B. A. The pore dimensions of gramicidin A. *Biophysical journal***65**, 2455–60 (1993).
36. Kefauver, J.M., Ward, A.B. & Patapoutian, A. Discoveries in structure and physiology of mechanically activated ion channels. *Nature* **587**, 567–576 (2020).
37. Hurst AC, Petrov E, Kloda A, Nguyen T, Hool L, Martinac B. MscS, the bacterial mechanosensitive channel of small conductance. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(4):581-585.
38. Malcolm, H.R. and Maurer, J.A. (2012), The Mechanosensitive Channel of Small Conductance (MscS) Superfamily: Not Just Mechanosensitive Channels Anymore. *ChemBioChem*, 13: 2037-2043.

- 1.一种埃米孔系统在检测带电荷分子中的应用,其特征在于,所述埃米孔系统包含埃米孔、绝缘膜、第一介质和第二介质;所述埃米孔被嵌入所述绝缘膜中,所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开,所述埃米孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道,向所述第一介质和所述第二介质之间施加驱动力后,位于所述第一介质的所述带电荷分子与所述埃米孔相互作用;所述埃米孔为 MscS 埃米孔,所述埃米孔具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构,所述七聚体结构包含 7 个侧面开口和 1 个底部开口。
- 2.如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述开口的电荷性质和/或孔径大小是可调节的;所述开口的调节方式可选地包括使所述绝缘膜受到机械力刺激和/或使所述绝缘膜的物理状态变化,所述机械力刺激可选地包括所述绝缘膜两侧的介质的渗透压差变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激和气压负压对所述绝缘膜的刺激中的一种或多种。
- 3.如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述开口的孔径可以根据以下方式调节:
  - (1) 所述第一介质和所述第二介质的种类选择;和/或
  - (2) 所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差。
- 4.如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述埃米孔源自杆菌,可选地包括铜绿假单胞菌、大肠杆菌、嗜热嗜热厌氧菌和幽门螺杆菌中的一种或多种。
- 5.如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述埃米孔为 MscS 变体,所述 MscS 变体可选地包括侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。
- 6.如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述带电荷分子包括核苷酸、氨基酸、肽、药物分子中的一种或多种。
- 7.如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述埃米孔为 PaMscS 变体,可选地包括以下变体的一种或多种: 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P。
- 8.一种生物埃米孔系统,其特征在于,所述生物埃米孔系统包括埃米孔、绝缘膜、第一介质和第二介质,所述埃米孔被嵌入绝缘膜中,所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开,所述埃米孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道;所述埃米孔为 MscS 变体埃米孔,所述埃米孔具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构,所述七聚体结构包含 7 个侧面开口和 1 个底部开口,所述埃米孔可选地为 MscS 的侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。
- 9.如权利要求 8 所述的生物埃米孔系统,其特征在于,所述埃米孔源自杆菌,可选地包括铜绿假单胞菌、大肠杆菌、嗜热嗜热厌氧菌和幽门螺杆菌中的一种或多种。
- 10.如权利要求 8 所述的生物埃米孔系统,其特征在于,所述埃米孔为 PaMscS 变体,可选地包括以下变体的一种或多种: 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P。
- 11.如权利要求 8 所述的生物埃米孔系统,其特征在于,所述开口的电荷性质和/或孔径大小是可调节的;所述开口的调节方式可选地包括使所述绝缘膜受到机械力刺激和/或使所述绝缘膜的物理状态变化,所述机械力刺激可选地包括所述绝缘膜两侧的介质的渗透压差变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激和气压负压对所述绝缘膜的刺激中的一种或多种。
- 12.如权利要求 8 所述的生物埃米孔系统,其特征在于,所述开口的孔径可以根据以下方式调节:
  - (1) 所述第一介质和所述第二介质的种类选择;和/或
  - (2) 所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差。
- 13.权利要求 8-12 任一项所述的生物埃米孔系统在检测带电荷分子中的应用,其特征在于,所述带电荷分子包括核苷酸、氨基酸、肽、药物分子中的一种或多种。
- 14.一种检测样本中核苷酸的方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1 将所述样本加入埃米孔系统,所述埃米孔系统包括:埃米孔、绝缘膜、第一介质、第二介质,其中所述埃米孔被嵌入所述绝缘膜中,所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开,所述埃米孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道,所述埃米孔为 MscS 埃米孔,所述埃米孔具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构,所述七聚体结构包含 7 个侧面

面开口和 1 个底部开口；所述样本被加入到所述第一介质；

S2 向所述第一介质和所述第二介质施加驱动力，所述样本中的核苷酸与所述埃米孔相互作用并产生电信号；

S3 分析所述电信号，进而识别所述样本中的核苷酸。

15.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述开口的电荷性质和/或孔径大小是可调节的；所述开口的调节方式可选地包括使所述绝缘膜受到机械力刺激和/或使所述绝缘膜的物理状态变化，所述机械力刺激可选地包括所述绝缘膜两侧的介质的渗透压差变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激和气压负压对所述绝缘膜的刺激中的一种或多种。

16.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述开口的孔径可以根据以下方式来调节：

(1) 所述第一介质和所述第二介质的种类选择；和/或

(2) 所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差。

17.如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差是通过所述第一介质与所述第二介质之间的浓度差来调节的，所述第一介质与所述第二介质之间的浓度差可选地为大约 0-270 mM。

18.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述埃米孔为 MscS 变体埃米孔，所述 MscS 变体可选地包括侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。

19.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述埃米孔源自杆菌，可选地包括铜绿假单胞菌、大肠杆菌、嗜热嗜热厌氧菌和幽门螺杆菌中的一种或多种。

20.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述埃米孔为 PaMscS 变体埃米孔，可选地包括以下变体的一种或多种：130A、130H、180R、271I、130S 和 130P。

21.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述核苷酸包括 dGTP、dATP、dTTP、dCTP、dUTP、GTP、ATP、TTP、CTP、UTP 中的一种或多种。

22.一种核苷酸快速检测试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括：

(1) MscS 埃米孔，所述 MscS 埃米孔可选地包括 MscS 的侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体；

(2) 绝缘膜，可选地包括磷脂膜和/或高分子膜；

(3) 电导液，所述电导液可选地包括氯化钠溶液、氯化锂溶液、氯化铯溶液、氯化钾溶液和溴化钠溶液中的一种或多种。

23.如权利要求 22 所述的试剂盒，其特征在于，所述埃米孔为 PaMscS 变体埃米孔，可选地包括 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P 中的一种或多种。

24.一种检测样本中的药物分子的方法，其特征在于，包括如下步骤：

S1 将所述样本加入埃米孔系统，所述埃米孔系统包括：埃米孔、绝缘膜、第一介质、第二介质，其中所述埃米孔被嵌入所述绝缘膜中，所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开，所述埃米孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道，所述埃米孔为 MscS 埃米孔，所述埃米孔具有径向对称且形状似圆柱体的七聚体结构，所述七聚体结构包含 7 个侧面开口和 1 个底部开口；所述样本被加入到所述第一介质；

S2 向所述第一介质和所述第二介质施加驱动力，所述样本中的药物分子与所述埃米孔相互作用并产生电信号；

S3 分析所述电信号，进而识别所述样本中的药物分子。

25.如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述开口的电荷性质和/或孔径大小是可调节的；所述开口的调节方式可选地包括使所述绝缘膜受到机械力刺激和/或使所述绝缘膜的物理状态变化，所述机械力刺激可选地包括所述绝缘膜两侧的介质的渗透压差变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激和气压负压对所述绝缘膜的刺激中的一种或多种。

26.如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述开口的孔径可以根据以下方式来调节：

(1) 所述第一介质和所述第二介质的种类选择；和/或

(2) 所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差。

- 27.如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述埃米孔为 MscS 变体埃米孔,所述 MscS 变体可选地包括侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。
- 28.如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述埃米孔源自杆菌,可选地包括铜绿假单胞菌、大肠杆菌、嗜热嗜热厌氧菌和幽门螺杆菌中的一种或多种。
- 29.如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述埃米孔为 PaMscS 变体埃米孔,可选地包括以下变体的一种或多种:130A、130H、180R、271I、130S 和 130P。
- 30.如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述药物分子的分子量为小于 1000 g/mol,可选地为 177.98 ~ 712.72 g/mol;所述药物分子的浓度可选地为大于 10 nM。
- 31.如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述样本为体液样本,所述体液样本可选地包括尿液、血液、血清、血浆、淋巴液、囊积液、胸膜液、腹水液、腹膜液、羊水、附睾液、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、母乳、泪液、唾液、痰中的一种或多种。
- 32.如权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述体液样本的样本量可选地为大于 10  $\mu$ L;所述体液样本中的药物分子的浓度可选地为大于 10 nM。
- 33.如权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括 S4:将透析装置通过导管与所述第一介质连通,使得所述血液样本通过所述透析装置进入所述埃米孔系统,其中 S4 先于 S1。
- 34.一种检测样本中目标核酸的存在的方法,其特征在于,包括如下步骤:  
S1 将样本置于核酸扩增体系并进行核酸扩增,确定所述核酸扩增体系中底物核苷酸的数量,获得所述样本的核酸扩增产物;  
S2 将所述样本的核酸扩增产物加入单通道电生理检测系统,所述单通道电生理检测系统包括:跨膜孔、绝缘膜、第一介质、第二介质,其中所述跨膜孔被嵌入所述绝缘膜中,所述绝缘膜将所述第一介质与所述第二介质分隔开,所述跨膜孔提供连通所述第一介质与所述第二介质的通道,所述样本的核酸扩增产物被加入到所述第一介质;  
S3 向所述第一介质和所述第二介质之间施加驱动力,所述样本的核酸扩增产物中剩余核苷酸与所述跨膜孔相互作用并产生电信号;  
S4 对所述电信号进行量化,获得所述剩余核苷酸的数量;  
S5 将所述剩余核苷酸的数量与所述底物核苷酸的数量进行对比,确定所述样本中所述目标核酸是否存在。
- 35.如权利要求 34 所述的方法,其特征在于,所述跨膜孔为 MscS 变体埃米孔,所述 MscS 变体可选地包括侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体。
- 36.如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述 MscS 变体埃米孔的开口电荷性质和/或孔径大小是可调节的;所述开口的调节方式可选地包括使所述绝缘膜受到机械力刺激和/或使所述绝缘膜的物理状态变化,所述机械力刺激可选地包括所述绝缘膜两侧的介质的渗透压差变化、微针对所述绝缘膜的直接物理刺激和气压负压对所述绝缘膜的刺激中的一种或多种。
- 37.如权利要求 36 所述的方法,其特征在于,所述开口的孔径可以根据以下方式调节:  
(1)所述第一介质和所述第二介质的种类选择;和/或  
(2)所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差。
- 38.如权利要求 37 所述的方法,其特征在于,所述第一介质与所述第二介质之间的渗透压差是通过所述第一介质与所述第二介质之间的浓度差来调节的,所述第一介质与所述第二介质之间的浓度差可选地为大约 0-270 mM。
- 39.如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述 MscS 变体埃米孔源自杆菌,可选地包括铜绿假单胞菌、大肠杆菌、嗜热嗜热厌氧菌和幽门螺杆菌中的一种或多种。
- 40.如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述 MscS 变体埃米孔为 PaMscS 变体埃米孔,可选地包括以下变体的一种或多种:130A、130H、180R、271I、130S 和 130P。
- 41.如权利要求 34 所述的方法,其特征在于,所述核苷酸包括核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸。

酸，所述核苷酸可选地包括 dGTP、dATP、dTTP、dCTP、dUTP、GTP、ATP、TTP、CTP、UTP 中的一种或多种。

42.如权利要求 34-41 任一项所述的方法，其特征在于，所述核酸扩增体系进一步包括：

(1) 探针，所述探针包括互补区和重复区，所述互补区包括与所述目标核酸互补配对的序列，所述重复区包括重复同一个碱基的寡核苷酸序列，所述碱基包括 A、T、C、G、U；或者

(2) 所述目标核酸的特异性引物。

43.如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述目标核酸为冠状病毒核酸，所述冠状病毒可选地包括 SARS-CoV-2、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV 和 MERS-CoV 中的一种或多种。

44.一种病毒快速检测试剂盒，包括：

(1) MscS 埃米孔，所述 MscS 埃米孔可选地包括 MscS 的侧孔体积变体和/或侧孔电荷变体；

(2) 绝缘膜，可选地包括磷脂膜和/或高分子膜；

(3) 电导液，所述电导液可选地包括氯化钠溶液、氯化锂溶液、氯化铯溶液、氯化钾溶液和溴化钠溶液中的一种或多种；

(4) 所述病毒的核酸的特异性引物或探针。

45.如权利要求 44 所述的试剂盒，其特征在于，所述埃米孔为 PaMscS 变体埃米孔，可选地包括 130A、130H、180R、271I、130S 和 130P 中的一种或多种。