

一种 Pif1-like 解旋酶及其应用

技术领域

本发明涉及基因测序、分子检测以及临床检测技术领域，具体涉及一种经修饰的 Pif1-like 解旋酶、包含 Pif1-like 解旋酶的构建体，以及其在表征目标多核苷酸或控制目标多核苷酸穿过孔的移动中的应用。

背景技术

纳米孔测序技术指以单个核酸分子为测量单元，利用纳米孔对其序列信息进行即时连续读取的基因测序技术。

其利用了可以为离子电流提供通道的纳米孔。电泳驱动多核苷酸通过纳米孔，并且由于多核苷酸穿过纳米孔，因此可以降低通过纳米孔的电流。每个通过的核苷酸或一系列核苷酸获得了特征电流，并且对电流电平的记录对应于多核苷酸序列。在“链测序”方法（如使用解旋酶控制多核苷酸穿过孔的移动）中，单个多核苷酸链穿过所述孔并能实现对核苷酸的鉴定。这种测序技术的优势在于建库简单，无需扩增；读取速度快，对单个分子可以达到每小时上万碱基的读取速度；读长非常长，通常在上千碱基；有可能可以对 RNA 和 DNA 甲基化进行直接测量。这些都是现有的二代测序技术所无法达到的。

但是，纳米孔测序技术也有棘手的问题，需要解决，例如多核苷酸通过纳米孔的易位过快以至于单个核苷酸的电流电平过短而难以分辨。尤其是在面对核苷酸序列很长的情况下，例如 500 个或更多个，控制多核苷酸移动的分子马达可能会从多核苷酸上解脱。这允许多核苷酸在施加的场的方向上以不受控的方式被迅速拉动穿过所述孔。

现有技术中，也有对此问题的解决，例如，专利 WO2013057495A3 公开了一种新的表征目标多核苷酸的方法，所述的方法包括通过 Hel308 解旋酶或分子马达控制目标多核苷酸穿过孔的移动。专利 US20150065354A1 公开了一种使用 XPD 解旋酶表征目标多核苷酸的方法，所述的方法包括通过 XPD 解旋酶控制目标多核苷酸穿过孔的移动。专利 CN107109380A 公开了一种经修饰的酶，该酶为可以控制目标多核苷酸穿过孔的运动的经

修饰的 Dda 解旋酶。上述方法均可以一定程度上控制目标多核苷酸穿过孔的移动。但是，仍然开发新的控制目标多核苷酸穿过孔的移动的解旋酶，且现有技术中没有公开本发明所述的 Pif1-like 解旋酶。

发明内容

为解决多核苷酸穿过纳米孔的易位过快的问题，本发明提供了一种新的经修饰的 Pif1-like 解旋酶，经过修饰后的 Pif1-like 解旋酶可以更长时间保持与多核苷酸的结合，并控制多核苷酸穿过孔的移动。本发明所述的 Pif1-like 解旋酶是链测序过程中控制多核苷酸移动的有用工具，可以使多核苷酸以可控和逐步的方式顺着或逆着由所施加的电压引起的电场进行运动，从而控制多核苷酸通过纳米孔的速度，获得可识别的电流电平。尤其当多核苷酸链长度增加的情况下，例如 500 个或更多个核苷酸，需要具有提高进行性的分子马达时，本发明所述的 Pif1-like 解旋酶依然不会从多核苷酸上解脱，即对于控制 500、1000、5000、10000、20000、50000、100000 或更多个多核苷酸的移动特别有效。基于本发明所述的 Pif1-like 解旋酶在链测序领域控制多核苷酸平稳从孔移动，减少滑移或不规则移动的优势，可以促进核苷酸更精确、读长更长。

本发明的第一方面，提供了一种 Pif1-like 解旋酶，包括在 Pif1-like 解旋酶的塔结构域、销结构域和/或 1A 结构域（RecA 型马达）引入至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸，其中所述解旋酶保留其控制多核苷酸移动的能力。

优选的，包括在下列任一组中引入至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸：

- （a）塔结构域；
- （b）销结构域；
- （c）1A 结构域；
- （d）塔结构域和销结构域；
- （e）塔结构域和 1A 结构域；
- （f）1A 结构域和销结构域；
- （g）塔结构域、销结构域和 1A 结构域。

优选的,可以在塔结构域、销结构域和/或 1A 结构域引入 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或更多个半胱氨酸残基,或者引入 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或更多个非天然氨基酸,或者引入 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或更多个半胱氨酸残基和非天然氨基酸。

优选的,引入半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸后使得该 Pif1-like 解旋酶与多核苷酸的结合更稳定,并增强了控制其移动的能力。

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶选自 Pba-PM2、Aph-Acj61、Aph-PX29、Avi-Aeh1、Sph-CBH8、Eph-Pei26、Aph-AM101、PphPspYZU05、Eph-EcS1、Eph-Cronus2 或 Mph-MP1。野生型的 Pif1-like 解旋酶具体见表 1。

表 1 野生型的 Pif1-like 解旋酶

野生型 Pif1-like 解旋酶		UniProt	长度
Pba-PM2 (SEQ ID NO:1)	Pectobacterium bacteriophage PM2	A0A0A0Q3A4	444
Aph-Acj61 (SEQ ID NO:2)	Acinetobacter phage Acj61	E5E403	441
Aph-PX29 (SEQ ID NO:3)	Aeromonas phage PX29	E5DQH4	452
Avi-Aeh1 (SEQ ID NO:4)	Aeromonas virus Aeh1	Q76YI7	453
Sph-CBH8 (SEQ ID NO:5)	Serratia phage CBH8	A0A1Z1LY03	441
Eph-Pei26 (SEQ ID NO:6)	Edwardsiella phage PEi26	A0A0B6VP37	446
Aph-AM101 (SEQ ID NO:7)	Acinetobacter phage AM101	A0A4Y1NMU3	452

PphPspYZU05 (SEQ ID NO:8)	Pseudomonas phage PspYZU05	A0A2U7NRX4	454
Eph-EcS1 (SEQ ID NO:9)	Escherichia phage EcS1	A0A2Z5ZC85	441
Eph-Cronus2 (SEQ ID NO:10)	Erwinia phage Cronus	A0A2S1GM41	443
Mph-MP1 (SEQ ID NO:11)	Morganella phage vB_MmoM_MP1	A0A192Y9K3	441

所述的 Pif1-like 解旋酶的塔结构域、销结构域、钩结构域、1A 结构域以及 2A 结构域的氨基酸残基位置见表 2。

表 2 鉴定了构成每个 Pif1-like 解旋酶中每个结构域的残基

Pif1-like 解旋酶	SEQ ID NO	1A 结构域	2A 结构域
Pba-PM2	1	M1-L88, M106-V181	E264-P278, N296-A394
Aph-Acj61	2	M1-L88, I106-M180	E265-P279, N297-A392
Aph-PX29	3	M1-L88, K110-V182	T266-P280, N298-S403
Avi-Aeh1	4	M1-L88, K110-V182	T266-P280, N298-S404
Sph-CBH8	5	M1-L84, M103-K177	E260-P274, N292-A391
Eph-Pei26	6	M1-L90, M108-M183	E266-P280, N298-A396
Aph-AM101	7	M1-L99, D117-M191	T276-P290, N308-P402
PphPspYZU05	8	M1-L95, I113-K187	D274-P288, N306-A404
Eph-EcS1	9	M1-L85, M103-K177	E260-P274, N292-A391
Eph-Cronus2	10	M1-L87, I105-K180	E265-P279, H297-A393
Mph-MP1	11	M1-L96, P114-K184	E264-P278, N296-P389

Pif1-like 解旋酶	SEQ ID NO	销结构域	塔结构域	钩结构域
Pba-PM2	1	K89-E105	E264-P278, N296-A394	E277-F295
Aph-Acj61	2	K89-D105	E265-P279, N297-A392	E278-F296
Aph-PX29	3	K89-A109	T266-P280, N298-S403	E279-L297
Avi-Aeh1	4	K89-A109	T266-P280, N298-S404	E279-L297
Sph-CBH8	5	K86-E102	E260-P274, N292-A391	E273-F291
Eph-Pei26	6	K91-E107	E266-P280, N298-A396	E279-F297
Aph-AM101	7	K100-D116	T276-P290, N308-P402	E289-F307
PphPspYZU05	8	K95-E112	D274-P288, N306-A404	G287-Y305
Eph-EcS1	9	K86-E102	E260-P274, N292-A391	E273-F291
Eph-Cronus2	10	K88-E104	E265-P279, H297-A393	E278-F296
Mph-MP1	11	K97-A113	E264-P278, N296-P389	E277-F295

在本发明的一个具体实施方式中，所述的 Pif1-like 解旋酶选自 Mph-MP1、Sph-CBH8、Eph-Pei26 或 PphPspYZU05。

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 11 的变体，其中在塔结构域(残基 E264-P278 和 N296-P389)和/或销结构域(残基 K97-A113)和/或 1A 结构域(残基 M1-L96 和 P114-K184)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸。

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 1 的变体，其中在塔结构域(残基 E264-P278 和 N296-A394)和/或销结构域(残基 K89-E105)和/或 1A 结构域(残基 M1-L88 和 M106-V181)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸；

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 2 的变体，其中在塔结构域(残基 E265-P279 和 N297-A392)和/或销结构域(残基 K89-D105)和/或 1A 结构域(残基 M1-L88 和 I106-M180)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸；

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 3 的变体，其中在塔结构域(残基 T266-P280 和 N298-S403)和/或销结构域(残基 K89-A109)和/或 1A 结构域(残基

M1-L88 和 K110-V182)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸;

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 4 的变体,其中在塔结构域(残基 T266-P280 和 N298-S404)和/或销结构域(残基 K89-A109)和/或 1A 结构域(残基 M1-L88 和 K110-V182)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸;

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 5 的变体,其中在塔结构域(残基 E260-P274 和 N292-A391)和/或销结构域(残基 K86-E102)和/或 1A 结构域(残基 M1-L84 和 M103-K177)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸;

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 6 的变体,其中在塔结构域(残基 E266-P280 和 N298-A396)和/或销结构域(残基 K91-E107)和/或 1A 结构域(残基 M1-L90 和 M108-M183)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸;

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 7 的变体,其中在塔结构域(残基 T276-P290 和 N308-P402)和/或销结构域(残基 K100-D116)和/或 1A 结构域(残基 M1-L99 和 D117-M191)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸;

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 8 的变体,其中在塔结构域(残基 D274-P288 和 N306-A404)和/或销结构域(残基 K95-E112)和/或 1A 结构域(残基 M1-L95 和 I113-K187)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸;

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 9 的变体,其中在塔结构域(残基 E260-P274 和 N292-A391)和/或销结构域(残基 K86-E102)和/或 1A 结构域(残基 M1-L85 和 M103-K177)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸;

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 10 的变体,其中在塔结构域(残基 E265-P279 和 H297-A393)和/或销结构域(残基 K88-E104)和/或 1A 结构域(残基 M1-L87 和 I105-K180)中引入了至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个非天然氨基酸。

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 11 的变体,其包括(i)E105C 和/或 A362C; (ii)E104C 和/或 K360C; (iii)E104C 和/或 A362C; (iv)E104C 和/或 Q363C; (v)E104C 和/或 K366C; (vi)E105C 和/或 M356C; (vii)E105C 和/或 K360C; (viii)E104C 和/或 M356C; (ix)E105C 和/或 Q363C; (x)E105C 和/或 K366C; (xi)F108C 和/或 M356C; (xii)F108C 和/或 K360C; (xiii)F108C 和/或 A362C; (xiv)F108C 和/或 Q363C; (xv) F108C 和/或 K366C; (xvi)K134C 和/或 M356C; (xvii)K134C 和/或 K360C; (xviii)K134C 和/或 A362C; (xix)K134C 和/或 Q363C; (xx)K134C 和/或 K366C; (xxi)(i)到(xx)任一个和 G359C; (xxii)(i)到(xx)任一个和 Q111C; (xxiii) (i)到(xx)任一个和 I138C; (xxiv)(i)

到(xx)任一个和 Q111C 和 I138C; (xxv)E105C 和/或 F377C; (xxvi)Y103L, E105Y, N352N, A362C 和 Y365N; (xxvii)E105Y 和 A362C; (xxviii)A362C; (xxix)Y103L, E105C, N352N, A362Y 和 Y365N; (xxx)Y103L, E105C 和 A362Y; (xxxi)E105C 和/或 A362C, 和 I280A; (xxxii)E105C 和/或 L358C; (xxxiii)E104C 和/或 G359C; (xxxiv)E104C 和/或 A362C; (xxxv)K106C 和/或 W378C; (xxxvi) T102C 和/或 N382C; (xxxvii)T102C 和/或 W378C; (xxxviii)E104C 和/或 Y355C; (xxxix)E104C 和/或 N382C; (xl)E104C 和/或 K381C; (xli)E104C 和/或 K379C; (xlii)E104C 和/或 D376C; (xliii)E104C 和/或 W378C; (xliv)E104C 和/或 W374C; (xlv)E105C 和/或 Y355C; (xlvi)E105C 和/或 N382C; (xlvii)E105C 和/或 K381C; (xlviii)E105C 和/或 K379C; (xlix)E105C 和/或 D376C; (l)E105C 和/或 W378C; (li)E105C 和/或 W374C; (lii)E105C 和 A362Y; (liii)E105C, G359C 和 A362C; 或(liv)I2C, E105C 和 A362C。

优选的, 所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 1-10 中任一个的变体, 其包括在 SEQ ID NO: 11 中的(i)到(liv)的任一个所限定的位置对应的位置处包括一个半胱氨酸残基。

优选的, 所述 Pif1-like 解旋酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1 到 11 所示氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 1 到 11 所示氨基酸序列具有至少 30%、至少 40%、至少 50%、60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或至少 99.9%的同源性并具有控制多核苷酸移动的能力。

在本发明的一个具体实施方式中, 所述的与 SEQ ID NO: 11 的第 105 位和/或第 362 位相应的氨基酸引入半胱氨酸残基, 例如, SEQ ID NO: 2 的第 97 位和/或第 363 位, SEQ ID NO: 3 的第 96 位和/或第 371 位, SEQ ID NO: 5 的第 94 位和/或第 361 位, SEQ ID NO: 6 的第 99 位和/或第 366 位, SEQ ID NO: 8 的第 104 位和/或第 375 位等等。

为提高本发明所述的 Pif1-like 解旋酶与多核苷酸结合的稳定性, 降低从多核苷酸上解脱的能力, 所述引入的半胱氨酸与半胱氨酸之间相互连接、非天然氨基酸与非天然氨基酸之间相互连接之间、引入的半胱氨酸与非天然氨基酸之间相互连接、引入的半胱氨酸与解旋酶上的天然氨基酸之间相互连接、或者引入的非天然氨基酸与解旋酶上的天然氨基酸之间相互连接。

可以使任何数目和组合的两个以上引入的半胱氨酸和/或非天然氨基酸相互连接。

例如,可以使 3, 4, 5, 6, 7, 8 或更多个半胱氨酸和/或非天然氨基酸相互连接。一个或多个半胱氨酸可以与一个或多个半胱氨酸连接。一个或多个半胱氨酸可以与一个或多个非天然氨基酸诸如 Faz 连接。一个或多个非天然氨基酸诸如 Faz 可以与一个或多个非天然氨基酸诸如 Faz 连接。一个或多个半胱氨酸可以与一个或多个解旋酶上的天然氨基酸连接。一个或多个非天然氨基酸诸如 Faz 可以与一个或多个解旋酶上的天然氨基酸连接。

其中,所述的连接可以是任何方式,包括直接相连或者间接相连,优选的,所述的连接可以为短暂的接触,也可以为永久的连接。更进一步优选的,所述的连接可以为非共价连接或共价连接。

在本发明的一个具体实施方式中,所述的共价连接可以采用化学交联剂、线性分子或催化剂连接。所述的化学交联剂包括但不限于马来酰亚胺,活性酯,琥珀酰亚胺,叠氮化物,炔烃(诸如二苯并环辛炔醇(DIBO 或 DBCO), 二氟环炔烃和线性炔烃)等;化学交联剂的长度可以从一个碳(碳酰氯型连接器)到多个埃变化。所述的线性分子包括但不限于聚乙二醇(PEGs), 多肽, 多糖, 脱氧核糖核酸(DNA), 肽核酸(PNA), 苏糖核酸(TNA), 甘油核酸(GNA), 饱和的和不饱和的烃, 聚酰胺。所述的催化剂包括但不限于 TMAD 等任何可以使得半胱氨酸残基之间、非天然氨基酸之间、半胱氨酸残基与非天然氨基酸之间、非天然氨基酸与天然氨基酸之间、或者半胱氨酸残基与天然氨基酸之间产生共价键的催化剂。

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶进一步被修饰去除一个或多个半胱氨酸残基。

优选的,所述 Pif1-like 解旋酶还包括至少一个或多个天然半胱氨酸被取代。进一步优选为丙氨酸、丝氨酸或缬氨酸取代半胱氨酸。

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 5 的变体,并且所述一个或多个被取代的天然半胱氨酸残基为 C109、C114、C136 或 C414 中的一个或多个。

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 1、2、3、4、6、7、8、9、10 和 11 中任一个的变体,并且所述一个或多个被取代的天然半胱氨酸残基对应于 SEQ ID NO: 5 中 C109、C114、C136 或 C414 中的一个或多个。

表 3 示出了与 SEQ ID NO:5 中的 C109, C114, C136 和 C414 对应的 SEQ ID NO:1、2、3、4、6、7、8、9、10 和 11 中的氨基酸位置。

表 3 SEQ ID NO:1-4、6-11 中的相应氨基酸位置

SEQ ID NO:	氨基酸位点			
5	C109	C114	C136	C414
1	C112	C118	C139	C417
2	C113	C117	C139	C415
3	-	-	C143	-
4	-	-	C144	-
6	C114	C119	C141	C420
7	C124	C128	C150	C426
8	C119	C124	C146	
9	C109	C114	C136	C414
10	C111	C116	C138	C416
11	-	C125	-	C412

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶进一步被修饰降低其表面的负电荷。

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶还包括增加净正电荷的取代。进一步优选的，所述的增加净正电荷的取代包括对表面带负电的氨基酸、极性或非极性的氨基酸进行取代或修饰，或者在表面带负电的氨基酸、极性或非极性的氨基酸临近位置引入带正电的氨基酸。更进一步优选的，所述的增加净正电荷的取代包括带正电的氨基酸取代带负电的氨基酸、不带电的氨基酸、芳香族氨基酸、极性或非极性的氨基酸。更进一步优选的，所述的增加净正电荷的取代包括不带电的氨基酸取代带负电的氨基酸、芳香族氨基酸、极性或非极性的氨基酸。适合的带正电荷的氨基酸包括但不限于，组氨酸(H)，赖氨酸(K)和/或精氨酸(R)。不带电荷的氨基酸没有净电荷。适合的不带电荷的氨基酸包括但不限于，半胱氨酸(C)，丝氨酸(S)，苏氨酸(T)，蛋氨酸(M)，天冬酰胺(N)或谷氨酰胺(Q)。非极性氨基酸具有非极性侧链。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)，亮氨酸(L)或缬氨酸(V)。芳香族氨基酸具有芳香族侧链。适合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)或酪氨酸(Y)。

其中，所述的带正电的氨基酸、不带电荷的氨基酸、极性、非极性氨基酸或芳香族氨基酸可以是天然的或非天然的氨基酸，其可以是人工合成的或者经过修饰的天然氨基酸。

优选的取代包括但不限于，用精氨酸(R)取代谷氨酸(E)，用赖氨酸(K)取代谷氨酸(E)，用天冬酰胺(N)取代谷氨酸(E)，用赖氨酸(K)取代天冬氨酸(D)，以及用精氨酸(R)取代天冬氨酸(D)。

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 11 的变体并且所述一个或多个带负电荷的氨基酸为 D5, E9, E24, E87, I65, S58, D209 或 D216 中的一个或多个。可以中和任意数量的这些氨基酸，诸如这些氨基酸中的 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 或 8 个。可以中和任意的组合。

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶包括 SEQ ID NO: 1 到 10 中任一个的变体并且所述一个或多个带负电荷的氨基酸对应于 SEQ ID NO: 11 中的 D5, E9, E24, E87, I65, S58, D209 或 D216 中的一个或多个。对应于 SEQ ID NO: 11 中的 D5, E9, E24, E87, I65, S58, D209 和 D216 的 SEQ ID NO: 1 到 10 中的氨基酸可以使用图 11 中的比对确定。

优选的取代还包括，SEQ ID NO: 1 的变体，并且所述一个或多个带负电荷的氨基酸还包括 S171。

优选的取代还包括 SEQ ID NO: 9 的变体，并且所述一个或多个带负电荷的氨基酸还包括 S173。

优选的，所述非天然氨基酸选自 4-叠氮基-L-苯丙氨酸(Faz)，4-乙酰基-L-苯丙氨酸，3-乙酰基-L-苯丙氨酸，4-乙酰乙酰基-L-苯丙氨酸，O-烯丙基-L-酪氨酸，3-(苯基硒烷基)-L-丙氨酸，O-2-丙炔-1-基-L-酪氨酸，4(二羟基硼基)-L-苯丙氨酸，4-[(乙基硫烷基)羰基]-L-苯丙氨酸，(2S)-2-氨基-3-[4-[(丙烷-2-基硫烷基)羰基]苯基]丙酸，(2S)-2-氨基-3-[4-[(2-氨基-3-硫烷基丙酰基)氨基]苯基]丙酸，O-甲基-L-酪氨酸，4-氨基-L-苯丙氨酸，4-氰基-L-苯丙氨酸，3-氰基-L-苯丙氨酸，4-氟-L-苯丙氨酸，4-碘-L-苯丙氨酸，4-溴-L-苯丙氨酸，O-(三氟甲基)酪氨酸，4-硝基 L-苯丙氨酸，3-羟基-L-酪氨酸，3-氨基-L-酪氨酸，3-碘-L-酪氨酸，4-异丙基-L-苯丙氨酸，3-(2-萘基)-L-丙氨酸，4-苯基-L-苯丙氨酸，(2S)-2-氨基-3-(萘-2-基氨基)丙酸，6-(甲基硫烷基)正亮氨酸，6-氧-L-赖氨酸，D-酪氨酸，(2R)-2-羟基-3-(4-羟基苯基)丙酸，(2R)-2 氨基辛酸酯 3-(2, 2'-二吡啶-5-基)-D-丙氨酸，2-氨基-3-(8-羟基-3-喹啉基)丙酸，4-苯甲酰-L-苯丙氨酸，S-(2-硝基苄基)半胱氨酸，(2R)-2-氨基-3-[(2-硝基苄基)硫烷基]丙酸，(2S)-2-氨基-3-[(2-硝基苄基)氧基]丙酸，O-(4, 5-二甲氧基-2-硝基苄基)-L-丝氨酸，(2S)-2-氨基-6-([(2-硝基苄基)氧基]羰基)氨基己酸，O-(2-硝基苄基)-L-酪氨酸，2-硝基苯丙氨酸，4-[(E)-苯基二氮烯基]-L-苯丙氨酸，4-[3-(三氟甲基)-3H-二吡丙啶基-3 基]-D-苯丙氨酸，2-

氨基-3-[5-(二甲基氨基)-1-萘基]磺酰基氨基]丙酸, (2S)-2-氨基 4-(7-羟基-2-氧-2H-色烯-4-基)丁酸, (2S)-3-[(6-乙酰基萘-2-基)氨基]-2-氨基丙酸, 4(羧基甲基)苯丙氨酸, 3-硝基-L-酪氨酸, O-巯基-L-酪氨酸, (2R)-6-乙酰氨基-2-氨基己酸酯, 1-甲基组氨酸, 2-氨基壬酸, 2-氨基癸酸, L-同质半胱氨酸, 5-巯烷基正缬氨酸, 6-巯烷基-L-正亮氨酸, 5-(甲基巯烷基)-L-正缬氨酸, N6-[(2R, 3R)-3-甲基-3, 4-二氢-2H-吡咯 2-基]羰基]-L-赖氨酸, N6-[(苄基氧基)羰基]赖氨酸, (2S)-2-氨基-6-[(环戊基羰基)氨基]己酸, N6-[(环戊基氧基)羰基]-L-赖氨酸, (2S)-2-氨基-6-[(2R)-四氢呋喃-2-基羰基]氨基]己酸, (2S)-2-氨基-8-[(2R, 3S)-3-乙炔基四氢呋喃-2-基]-8-氧基辛酸, N6-(叔丁氧基羰基)-L-赖氨酸, (2S)-2-羟基-6-([(2-甲基-2-丙烷基)氧基]羰基)氨基]己酸, N6-[(烯丙氧基)羰基]赖氨酸, (2S)-2-氨基-6-([(2-叠氮苄基)氧基]羰基)氨基]己酸, N6L-脯氨酰基-L-赖氨酸, (2S)-2-氨基-6-[(丙-2-炔-1-基氧基)羰基]氨基]己酸或 N6-[(2 叠氮乙氧基)羰基]-L-赖氨酸。

优选的, 所述的 Pif1-like 解旋酶还包括:

(a)至少一个与单链 DNA (ssDNA) 或双链 DNA (dsDNA) 中一个或多个核苷酸相互作用的氨基酸被取代; 和/或,

(b)至少一个与跨膜孔相互作用的氨基酸被取代,

其中, 所述 Pif1-like 解旋酶具有控制多核苷酸移动的能力。

进一步优选的, 在(a)中, 用包含较大侧链(R 基团)的氨基酸取代至少一个与单链或双链 DNA 中一个或多个核苷酸的糖和/或碱基相互作用的氨基酸。

优选的, 所述的 Pif1-like 解旋酶包括, 用包含较大侧链(R 基团)的氨基酸取代至少一个与单链或双链 DNA 一个或多个核苷酸的糖和/或碱基相互作用的氨基酸。可以取代任何数量的氨基酸, 例如, 1 个或更多个、2 个或更多个、3 个或更多个、4 个或更多个、5 个或更多个、或者 6 个或更多个氨基酸。每个氨基酸可以与碱基、糖、或碱基和糖相互作用。可以采用蛋白质建模来鉴定与单链或双链 DNA 中一个或多个核苷酸的糖和/或碱基相互作用的氨基酸。

优选的, 所述的 Pif1-like 解旋酶包含 SEQ ID NO:11 的变体, 其中, 所述至少一个与单链或双链 DNA 中一个或多个核苷酸的糖和/或碱基相互作用的氨基酸是 P73, H93, N99, F109, I280, A161, F130, D132, D162, D163, E277, K415, Q291, H396, Y244 或 P100 中的至少一个。这些数字对应 SEQ ID NO:11 中的相关位点, 并且相比 SEQ ID NO:11 可能需要在—个或多个氨基酸已经在变体中插入或删除的情况下进行改变。如

上所述,本领域技术人员可以确定变体中的相应位点。进一步优选包含 SEQ ID NO:11 的变体,其中,所述至少一个与单链或双链 DNA 中一个或多个核苷酸的糖和/或碱基相互作用的氨基酸是 F109 和一个或多个 P73, H93, N99, F109, I280, A161, F130, D132, D162, D163, E277, K415, Q291, H396, Y244 或 P100。

优选的,所述的 Pif1-like 解旋酶为 SEQ ID NO:1 到 10 中任一变的变体,其中,所述至少一个与单链或双链 DNA 中一个或多个核苷酸的糖和/或碱基相互作用的氨基酸是至少一个与 SEQ ID NO:11 中的 P73, H93, N99, F109, I280, A161, F130, D132, D162, D163, E277, K415, Q291, H396, Y244 或 P100 相对应的氨基酸。进一步优选包含 SEQ ID NO:1 到 10 中任一变的变体,其中,所述至少一个与单链或双链 DNA 中一个或多个核苷酸的糖和/或碱基相互作用的氨基酸是与 SEQ ID NO:11 中 F109 对应的氨基酸和一个或多个与 SEQ ID NO:11 中 P73, H93, N99, F109, I280, A161, F130, D132, D162, D163, E277, K415, Q291, H396, Y244 或 P100 相对应的氨基酸。

表 4 示出了与 SEQ ID NO:11 中的 P73, H93, N99, F109, I280, A161, F130, D132, D162, D163, E277, K415, Q291, H396, Y244 和 P100 对应的 SEQ ID NO:1 至 10 中的氨基酸。

表 4 与 SEQ ID NO:1 至 10 对应的氨基酸位置

SEQ ID NO:	氨基酸位点														
11	P73	H93	N99	P100	F109	F130	D132	A161	D162	D163	Y244	E277	I280	Q291	H396
1	P66	H85	N91	P92	F101	M122	G124	V153	E154	P155	F244	E277	I281	S291	H401
2	P65	H85	N92	P92	F101	M122	D124	V153	A154	P155	F245	E278	M281	T292	H399
3	P65	H85	H91	P92	F101	M126	D128	V157	R158	H159	F246	E279	M282	T293	H410
4	P65	H85	H91	P92	F101	M126	D128	V157	R158	H159	F246	E279	M282	T293	H411
5	P63	H82	S88	P89	F98	M119	D121	V150	S151	P152	F240	E273	M276	N287	H398
6	P67	H88	N93	P94	F103	M124	D126	V155	E156	P157	F246	E279	I283	S293	H403
7	P76	H96	N102	P103	F112	M133	D135	V164	A165	P166	F256	E290	M292	T303	H409
8	P72	H92	S98	P99	F108	M129	D131	V160	S161	P162	Y254	G287	T291	K301	H411
9	P63	H82	S88	P89	F98	M119	D121	V150	S151	P152	Y240	E273	M277	N287	H398
10	P64	H84	N91	P91	F100	M121	D123	V152	E153	L154	Y245	E278	T281	S292	H400

较大侧链(R 基团)优选地(a)包含增加数量的碳原子(b)具有增加的长度(c)具有增加的分子体积和/或(d)具有增加的范德华体积。较大侧链(R 基团)优选(a) ; (b) ; (c) ; (d); (a)和(b); (a)和(c); (a)和(d); (b)和(c); (b)和(d); (c)和(d); (a), (b)和(c); (a), (b)和(d); (a), (c)和(d); (b), (c)和(d); 或(a), (b), (c)和(d)。可以采用本领域中的标

准方法对(a)至(d)中的每一个进行测量。

进一步优选的,所述较大侧链(R基团)增加了所述至少一个氨基酸与所述单链或双链DNA中一个或多个核苷酸之间的(i)静电相互作用;(ii)氢键和/或(iii)阳离子- π ((阳离子- π))相互作用。例如,在(i)中,诸如精氨酸(R)、组氨酸(H)和赖氨酸(K)等带正电荷的氨基酸具有增加静电相互作用的R基团。例如,在(ii)中,诸如天冬酰胺(N)、丝氨酸(S)、谷氨酰胺(Q)、苏氨酸(T)和组氨酸(H)等氨基酸具有增加氢键的R基团。例如,在(iii)中,诸如苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)或组氨酸(H)等芳族氨基酸具有增加阳离子- π (阳离子- π)相互作用的R基团。

包含较大侧链(R)的氨基酸可以是非天然氨基酸。所述非天然氨基酸可以是以下讨论的任何一种。

在本发明的一个具体实施方式中,所述较大侧链(R基团)的氨基酸不是丙氨酸(A)、半胱氨酸(C)、甘氨酸(G)、硒代半胱氨酸(U)、甲硫氨酸(M)、天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)。

在本发明的一个具体实施方式中,所述的Pif1-like解旋酶包含以下取代中的一个或多个:

A) 组氨酸(H)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K);(ii)谷氨酰胺(Q)或天冬酰胺(N);或(iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代。组氨酸(H)更优选被(a)N、Q或W或(b)Y、F、Q或K取代。

B) 天冬酰胺(N)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K);(ii)谷氨酰胺(Q)或组氨酸(H);或(iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代。天冬酰胺(N)更优选被R、H、W或Y取代。

C) 脯氨酸(P)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K);(ii)谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)、苏氨酸(T)或组氨酸(H);(iii)酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)或色氨酸(W);或(iv)亮氨酸(L)、缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)取代。脯氨酸(P)更优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K);(ii)谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)、苏氨酸(T)或组氨酸(H);(iii)苯丙氨酸(F)或色氨酸(W)或(iv)亮氨酸(L)、缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)取代。脯氨酸(P)更优选被(a)F,(b)L、V、I、T或F或(c)W、F、Y、H、I、L或V取代。

D) 缬氨酸(V)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K);(ii)谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)或组氨酸(H);(iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W);或(iv)异亮氨酸(I)或亮氨酸(L)取代。缬氨酸(V)更优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K);(ii)谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)

或组氨酸(H); (iii)酪氨酸(Y)或色氨酸(W); 或(iv)异亮氨酸(I)或亮氨酸(L)取代。缬氨酸(V)更优选被 I 或 H 或 I、L、N、W 或 H 取代。

E) 苯丙氨酸(F)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K); (ii)组氨酸(H); 或(iii)酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代。苯丙氨酸(F)更优选被(a)W, (b)W、Y 或 H, (c)W、R 或 K 或(d)K、H、W 或 R 取代。

F) 谷氨酰胺(Q)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K)或(iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代。

G) 丙氨酸(A)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K); (ii)谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)或组氨酸(H); (iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)或(iv)异亮氨酸(I)或亮氨酸(L)取代。

H) 丝氨酸(S)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K); (ii)谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)或组氨酸(H); (iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W); 或(iv)异亮氨酸(I)或亮氨酸(L)取代。丝氨酸(S)优选被 K、R、W 或 F 取代。

I) 赖氨酸(K)优选被(i)精氨酸(R)或(iii)酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代。

J) 精氨酸(R)优选被(iii)酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代。

K) 甲硫氨酸(M)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K); (ii)谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)或组氨酸(H)或(iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代。

L) 亮氨酸(L)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K); (ii)谷氨酰胺(Q)或天冬酰胺(N)或(iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代。

M) 天冬氨酸(D)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K); (ii)谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)或组氨酸(H); 或(iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代。天冬氨酸(D)更优选被 H、Y 或 K 取代。

N) 谷氨酸(E)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K); (ii)谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)或组氨酸(H)或(iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代。

O) 异亮氨酸(I)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K); (ii)谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)或组氨酸(H); (iii)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)或(iv)亮氨酸(L)取代。

P) 酪氨酸(Y)优选被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K); 或(ii)色氨酸(W)取代。酪氨酸(Y)更优选被 W 或 R 取代。

在本发明的一个具体实施方式中, 所述的 Pif1-like 解旋酶更优选包含 SEQ ID NO:11 的变体, 其包含:

说明书

P73L;	D163W;	F109W/N99R;
P73V;	D163F;	F109W/N99H;
P73I;	D163Y;	F109W/N99W;
P73E;	D163H;	F109W/N99Y;
P73T;	D163I;	F109W/P100L;
P73F;	D163L;	F109W/P100V;
H93N;	D163V;	F109W/P100I;
H93Q;	Y244W;	F109W/P100E;
H93W;	Y244H;	F109W/P100T;
N99R;	E277G;	F109W/P100F;
N99H;	I280H;	F109W/F130W;
N99W;	I280K;	F109W/F130Y;
N99Y;	I280W;	F109W/F130H;
P100L;	Q291K;	F109W/D132H;
P100V;	Q291R;	F109W/D132Y;
P100I;	Q291W;	F109W/D132K;
P100E;	Q291F;	F109W/A161I;
P100T;	H396N;	F109W/A161L;
P100F;	H396Q;	F109W/A161N;
F130W;	H396W;	F109W/A161W;
F130Y;	K415W;	F109W/A161H;
F130H;	K415R;	F109W/D162H;
D132H;	K415H	F109W/D162Y;
D132Y;	K415Y;	F109W/D162K;
D132K;	F109W/P73L;	F109W/D163W;
A161I;	F109W/P73V;	F109W/D163F;
A161L;	F109W/P73I;	F109W/D163Y;
A161N;	F109W/P73E;	F109W/D163H;
A161W;	F109W/P73T;	F109W/D163I;
A161H;	F109W/P73F;	F109W/D163L;
D162H;	F109W/H93N;	F109W/D163V;
D162Y;	F109W/H93Q;	F109W/Y244W;
D162K;	F109W/H93W;	F109W/Y244H;

F109W/E277G;	F109W/Q291W;	F109W/K415R;
F109W/I280H;	F109W/Q291F;	F109W/K415H;
F109W/I280K;	F109W/H396N;	或者
F109W/I280W;	F109W/H396Q;	F109W/K415Y。
F109W/Q291K;	F109W/H396W;	
F109W/Q291R;	F109W/K415W;	

本发明的解旋酶优选是这样一种解旋酶，即，至少一个与 ssDNA 或 dsDNA 中一个或多个核苷酸的一个或多个磷酸基团相互作用的氨基酸被取代。可以取代任何数量的氨基酸，例如，1 个或多个、2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个或者 6 个或多个氨基酸。ssDNA 中的核苷酸各自包含三个磷酸基团。被取代的每个氨基酸每次可以与任何数量的磷酸基团相互作用，例如，每次一个、两个或三个磷酸基团。与一个或多个磷酸基团相互作用的氨基酸可以采用蛋白质建模来进行鉴定。

取代优选增加所述至少一个氨基酸和所述 ssDNA 或 dsDNA 中一个或多个磷酸基团之间的(i)静电相互作用；(ii)氢键和/或(iii)阳离子- π (阳离子- π)相互作用。以下使用标记(i)、(ii)和(iii)对增加(i)、(ii)和(iii)的优选取代进行讨论。

取代优选增加位点的净正电荷。可以采用本领域已知的方法来测量任何位点处的净电荷。例如，可采用等电点来限定氨基酸的净电荷。通常在约 7.5 处测量净电荷。取代优选是用带正电荷、不带电荷、非极性或芳族的氨基酸取代带负电荷的氨基酸。带负电荷的氨基酸是带有净负电荷的氨基酸。带负电荷的氨基酸包括但不限于天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。带正电荷的氨基酸是带有净正电荷的氨基酸。带正电荷的氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。带正电的氨基酸可以是合成的或修饰的。例如，带有净正电荷的修饰氨基酸可以专门设计用于本发明。对氨基酸进行的多种不同类型的修饰是本领域公知的。优选的天然存在的带正电荷的氨基酸包括但不限于组氨酸(H)、赖氨酸(K)和精氨酸(R)。

不带电荷的氨基酸、非极性氨基酸或者芳族氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。其可以是合成的或修饰的。不带电荷的氨基酸没有净电荷。合适的不带电荷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)。非极性氨基酸具有非极性侧链。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)、亮氨酸(L)和缬氨酸(V)。芳族氨基

酸具有芳族侧链。合适的芳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)。

Pif1-like 解旋酶优选包含 SEQ ID NO:11 的变体, 其中, 至少一个与 ssDNA 或 dsDNA 中一个或多个核苷酸的一个或多个磷酸基团相互作用的氨基酸是 H75, T91, S94, K97, N246, N247, N284, K288, N297, T394 或 K397 中的至少一个。这些数字对应 SEQ ID NO:11 中的相关位点, 并且相比 SEQ ID NO:11 可能需要在在一个或多个氨基酸已经在变体中插入或删除的情况下进行改变。本领域技术人员可以确定如上所述的变体中的相应位点。

Pif1-like 解旋酶优选包含 SEQ ID NO:1 到 10 中任一变的体, 其中, 所述至少一个与 ssDNA 或 dsDNA 中一个或多个核苷酸的一个或多个磷酸基团相互作用的氨基酸是与 SEQ ID NO:11 中的 H75, T91, S94, K97, N246, N247, N284, K288, N297, T394 或 K397 相对应的至少一个氨基酸。

表 5 示出了与 SEQ ID NO:11 中的 H75, T91, S94, K97, N246, N247, N284, K288, N297, T394 和 K397 对应的 SEQ ID NO:1 至 10 中的氨基酸。

表 5 与 SEQ ID NO:11 相应的 SEQ ID NO:1 至 10 中的氨基酸的位置

SEQ ID NO:	氨基酸位点										
11	H75	T91	S94	K97	N246	N247	N284	K288	N297	T394	K397
1	H67	T83	R86	K89	N246	K247	E284	K288	N297	T399	K402
2	H67	T83	S86	K89	N247	K248	K285	K289	N298	T397	K400
3	H67	T83	S86	K89	N248	D249	E286	E290	N299	T408	K411
4	H67	T83	S86	K89	N248	D249	E286	E290	N299	T409	K412
5	H64	T80	S83	K86	N242	K243	E280	K284	N293	T396	K399
6	H69	T85	R88	K91	N248	K249	E286	K290	N299	T401	K404
7	H78	T94	S97	K100	N258	K259	T296	K300	N309	T407	K410
8	H74	T90	S93	K96	N256	K257	T294	K298	N307	T409	K412
9	H64	T80	S83	K86	N242	K243	E280	K284	N293	T396	K400
10	H66	T82	S85	K86	N247	E248	K285	K289	N298	T398	K401

优选的, 所述的 Pif1-like 解旋酶包含以下任一个或多个:

a) 组氨酸(H)被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K); (ii)天冬酰胺(N)、丝氨酸(S)、谷氨酰

胺(Q)或苏氨酸(T); 或(iii)苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)或酪氨酸(Y)取代;

b) 苏氨酸(T)被(i)精氨酸(R)、组氨酸(H)或赖氨酸(K); (ii)天冬酰胺(N)、丝氨酸(S)、谷氨酰胺(Q)或组氨酸(H); 或(iii)苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)或组氨酸(H)取代;

c) 丝氨酸被(i)精氨酸(R)、组氨酸(H)或赖氨酸(K); (ii)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、苏氨酸(T)或组氨酸(H); 或(iii)苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)或组氨酸(H)取代;

d) 天冬酰胺(N)被(i)精氨酸(R)、组氨酸(H)或赖氨酸(K); (ii)丝氨酸(S)、谷氨酰胺(Q)、苏氨酸(T)或组氨酸(H); 或(iii)苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)或组氨酸(H)取代; 和/或,

e) 赖氨酸(K)被(i)精氨酸(R)或组氨酸(H); (ii)天冬酰胺(N)、丝氨酸(S)、谷氨酰胺(Q)、苏氨酸(T)或组氨酸(H); 或(iii)苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)或组氨酸(H)取代。

在本发明的一个具体实施方式中,所述 Pif1-like 解旋酶是 SEQ ID NO:11 的变体,其包含(a)至(k)中的一个或多个,其中,

(a)H75N ,H75Q ,H75K 或 H75F ; (b)T91K ,T91Q 或 T91N ; (c)S94H ,S94N ,S94K ,S94T ,S94R 或 S94Q; (d) K97Q, K97H 或 K97Y; (e)N246H 或 N246Q ; (f)N247Q 或 N247H ; (g)N284H 或 N284Q; (h) K288Q 或 K288H; (i)N297Q ,N297K 或 N297H; (j)T394K ,T394H 或 T394N; 或(k)K397R,K397H 或 K397Y。

本发明的解旋酶还是这样一种解旋酶,其中,与跨膜孔相互作用的解旋酶的一部分包含一个或多个修饰,优选一个或多个取代,进一步优选所述解旋酶包括至少一个与跨膜孔相互作用的氨基酸被取代。所述与跨膜孔相互作用的解旋酶的一部分通常是当解旋酶用于控制多核苷酸穿过孔的移动时与跨膜孔相互作用的解旋酶的一部分,例如,以下进行更详细的讨论。当解旋酶用于控制多核苷酸穿过孔的移动时,所述一部分通常包含与孔相互作用或接触的氨基酸。在施加电势下,当解旋酶与正移动穿过孔的多核苷酸结合或连接时,所述一部分通常包含与孔相互作用或接触的氨基酸。

与跨膜孔相互作用的一部分优选包含 SEQ ID NO:11 的变体,其中的位点包含 E196,W202 ,N199 或 G201 上的一个或多个氨基酸被取代,例如,2个、3个、4个或5个。

与跨膜孔相互作用的一部分优选包含 SEQ ID NO:1 至 10 中任一的变体,其包含与 SEQ ID NO:11 在(a)E196; (b)W202; (c); N199; 或(d)G201 位点对应的至少一个

或多个的取代。

表 6 示出了与 SEQ ID NO:11 中的 E196, W202, N199, G201 对应的 SEQ ID NO:1 至 10 中的氨基酸。

表 6 与 SEQ ID NO:11 对应的 SEQ ID NO:1 至 10 中的氨基酸位置

SEQIDNO:	氨基酸位点			
11	E196	W202	N199	G201
1	E193	W199	M196	S198
2	E192	W198	H195	K197
3	K196	W202	N199	G201
4	K196	W202	N199	G201
5	E189	W195	N192	G194
6	D195	W201	T198	G200
7	E203	W209	K206	G208
8	E199	W205	K202	Q204
9	E189	W195	T192	G194
10	S192	W198	T195	G197

在本发明的一个具体实施方式中, 所述的 Pif1-like 解旋酶是 SEQ ID NO.11 的变体, 其包含在以下位点上的取代:

-F109/E196/H75, 例如,

F109W/E196L/H75N, F109W/E196L/H75Q, F109W/E196L/H75K 或者

F109W/E196L/H75F;

-F109/E196/T91, 例如, F109W/E196L/T91K, F109W/E196L/T91Q 或者

F109W/E196L/T91N;

-F109/S94/E196, 例如,

F109W/S94H/E196L, F109W/S94T/E196L, F109W/S94R/E196L, F109W/S94Q/E196L, F109W/S94N/E196L, 或者 F109W/S94K/E196L;

F109/N99/E196, 例如, F109W/N99R/E196L, F109W/N99H/E196L,

F109W/N99W/E196L 或者 F109W/N99Y/E196L;

-F109/S94/E196/I280, 例如, F109W/S94H/E196L/I280K;

-F109/P100/E196, 例如,

F109W/P100L/E196L, F109W/P100V/E196L, F109W/P100I/E196L 或者

F109W/P100T/E196L;

-F109/D132/E196,例如, F109W/D132H/E196L ,F109W/D132Y/E196L 或者 F109W/D132K/E196L;

-F109/A161/E196,例如,

F109W/A161I/E196L ,F109W/A161L/E196L ,F109W/A161N/E196L ,F109W/A161W/E196L 或者 F109W/A161H/E196L;

-F109/D163/E196,例如,

F109W/D163W/E196L ,F109W/D163F/E196L ,F109W/D163Y/E196L ,F109W/D163H/E196L ,F109W/D163I/E196L ,F109W/D163L/E196L 或者 F109W/D163V/E196L;

-F109/Y244/E196,例如, F109W/Y244W/E196L ,F109W/Y244Y/E196L 或者 F109W/Y244H/E196L;

-F109/N246/E196,例如, F109W/N246H/E196L 或者 F109W/N246Q/E196L;

-F109/E196/I280,例如,

F109W/E196L/I280K ,F109W/E196L/I280H ,F109W/E196L/I280W 或者 F109W/E196L/I280R;

-F109/E196/Q291,例如,

F109W/E196L/Q291K ,F109W/E196L/Q291R ,F109W/E196L/Q291W 或者 F109W/E196L/Q291F;

-F109/N297/E196,例如, F109W/N297Q/E196L ,F109W/N297K/E196L 或者 F109W/N297H/E196L;

-F109/T394/E196,例如, F109W/T394K/E196L ,F109W/T394H/E196L 或者 F109W/T394N/E196L;

-F109/H396/E196,例如,

F109W/H396Y/E196L ,F109W/H396F/E196L ,F109W/H396Q/E196L 或者 F109W/H396K/E196L;

-F109/K397/E196,例如, F109W/K397R/E196L ,F109W/K397H/E196L 或者 F109W/K397Y/E196L; 或者,

-F109/Y416/E196,例如, F109W/Y416W/E196L 或者 F109W/Y416R/E196L。

Pif1-like 解旋酶是具有下述氨基酸序列的酶: 所述氨基酸序列从野生型解旋酶的氨基酸序列变化而来并保留多核苷酸结合活性。特别的, SEQ ID NO: 1 到 11 中任一

个的变体是具有下述氨基酸序列的酶：所述氨基酸序列从 SEQ ID NO: 1 到 11 中任一个的氨基酸序列变化而来并保留多核苷酸结合活性。多核苷酸结合活性可使用本领域已知方法确定。合适的方法包括，但不限于荧光各向异性法，色氨酸荧光法和电泳迁移移位试验法(EMSA)。例如，变体结合单链多核苷酸的能力可以如实施例中所描述的进行确定。

基于氨基酸同一性，对于 SEQ ID NO: 1 到 11 中任一个氨基酸序列的整个长度，变体优选与该序列具有至少 20% 的同一性。更优选的是，基于氨基酸同一性，所述变体多肽与 SEQ ID NO: 1 到 11 中任一个氨基酸序列的整个序列，可以具有至少 70%，至少 75%，至少 80%，至少 85%，至少 90% 和更优选至少 95%，97% 或 99% 的同一性。在 100 或更多，例如 150，200，300，400 或 500 或更多个连续氨基酸长度上，可以具有至少为 70%，例如至少 80%，至少 85%，至少 90% 或至少 95% 的氨基酸同一性(严格同源性)。

本发明的第二方面，提供了一种构建体，所述的构建体包含至少一个或多个本发明所述的 Pif1-like 解旋酶。

优选的，所述的构建体还包含多核苷酸结合部分。

优选的，所述的构建体具有控制多核苷酸移动的能力。

优选的，所述的多核苷酸结合部分可以与多核苷酸的碱基结合的部分，和/或与多核苷酸的糖结合的部分，和/或与多核苷酸的磷酸结合的部分。

优选的，组成所述构建体的 Pif1-like 解旋酶与多核苷酸结合部分可以单独制备，后直接连接。与可以通过遗传融合的方式直接制备构建体，例如将编码 Pif1-like 解旋酶与多核苷酸结合部分的核苷酸连接，后转入宿主细胞中表达、纯化获得。

进一步优选的，所述的多核苷酸结合部分为能够与多核苷酸结合的多肽，包括但不限于真核单链结合蛋白、细菌单链结合蛋白、古生菌单链结合蛋白、病毒单链结合蛋白或双链结合蛋白中的一种或两种以上的组合。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的多核苷酸结合部分包括但不限于表 7 所示的任一种：

表 7 与多核苷酸结合的结合部分

名称	分类	来源	UniProt 数	分子量
----	----	----	-----------	-----

			据库	(Da)
SSBEco	ssb	Escherichia coli	P0AGE0	18975
SSBBhe	ssb	Bartonella henselae	Q6G302	19312
SSBCbu	ssb	Coxiella burnetii	Q83EP4	17437
SSBTma	ssb	Thermatogamaritima	Q9WZ73	16298
SSBHp	ssb	Helicobacter pylori	O25841	20043
SSBDra	ssb	Deinococcus radiodurans	Q9RY51	32722
SSBTaq	ssb	Thermus aquaticus	Q9KH06	30029
SSBMsm	ssb	Mycobacterium smegmatis	Q9AFI5	17401
SSBSso	ssb/RPA	Sulfolobus solfataricus	Q97W73	16138
SSBSso7D	ssb	Sulfolobus solfataricus	P39476	7280
SSBMHsm	ssb	Homo sapiens	Q04837	17260
SSBMle	ssb	Mycobacterium leprae	P46390	17701
gp32T4	ssb	Bacteriophage T4	P03695	33506
gp32RB69	ssb	Bacteriophage RB69	Q7Y265	33118
gp2.5T7	ssb	Bacteriophage T7	P03696	25694

本发明的第三方面，提供了一种核酸，所述的核酸编码本发明所述的 Pif1-like 解旋酶或所述的构建体。

本发明的第四方面，提供了一种表达载体，所述的表达载体包含本发明所述的核酸。

优选的，所述的核酸可操作的连接至表达载体中的调控元件，其中所述的调控元件优选为启动子。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的启动子选自 T7、trc、lac、ara 或 λ_L 。

优选的，所述的表达载体包括但不限于质粒、病毒或噬菌体。

本发明的第五方面，提供了一种宿主细胞，所述的宿主细胞包含本发明所述的核酸或所述的表达载体。

优选的，所述的宿主细胞包括但不限于大肠杆菌。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的宿主细胞选自 BL21 (DE3)、JM109 (DE3)、B834 (DE3)、TUNER、C41 (DE3)、Rosetta2 (DE3)、Origami、Origami B 等等。

本发明的第六方面，提供了一种 Pif1-like 解旋酶的制备方法，所述的方法包括提供野生型 Pif1-like 解旋酶，然后对所述的野生型 Pif1-like 解旋酶进行修饰，获得本发明所述的 Pif1-like 解旋酶。

本发明的第七方面，提供了一种 Pif1-like 解旋酶的制备方法，所述的方法包括培养本发明所述的宿主细胞并进行诱导表达，纯化后获得 Pif1-like 解旋酶。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的方法包括根据本发明所述 Pif1-like 解旋酶的氨基酸序列，获得编码 Pif1-like 解旋酶的核酸序列，酶切连接至表达载体后转化至大肠杆菌中，诱导表达和纯化，获得 Pif1-like 解旋酶。

本发明的第八方面，提供了一种控制多核苷酸移动的方法，所述的方法包括将本发明所述的 Pif1-like 解旋酶或所述的构建体与多核苷酸接触。

优选的，所述的控制多核苷酸移动为控制多核苷酸穿过孔的移动。所述的孔为纳米孔，所述的纳米孔为跨膜孔。该孔可以是天然的或人造的，包括但不限于蛋白孔、多核苷酸孔或固态孔。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的跨膜孔选自生物孔、固态孔或生物与固态杂交的孔。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的孔包括但不限于衍生自耻垢分枝杆菌孔蛋白 A、耻垢分枝杆菌孔蛋白 B、耻垢分枝杆菌孔蛋白 C、耻垢分枝杆菌孔蛋白 D、溶血素、胞溶素、白细胞介素、外膜孔蛋白 F、外膜孔蛋白 G、外膜磷脂酶 A、WZA 或奈瑟氏菌自转运脂蛋白等等。

优选的，所述的方法可以包含一个或多个的 Pif1-like 解旋酶共同控制多核苷酸的移动。

本发明的第九方面，提供了一种表征目标多核苷酸的方法，所述的方法包括：

I) 将本发明所述的 Pif1-like 解旋酶或所述的构建体，与目标多核苷酸以及孔接触，使得 Pif1-like 解旋酶或构建体控制目标多核苷酸穿过孔的移动；

并 II) 获取目标多核苷酸中的核苷酸与所述孔相互作用时的一个或多个特征，以表征所述目标多核苷酸。

优选的，所述的方法中可以使用任意数量的本发明所述的 Pif1-like 解旋酶。优选可以为一个或多个，更优选为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 个或多个。其中，所述的两个以上本发明所述的 Pif1-like 解旋酶可以相同或不同。也可以包含野生型 Pif1-like 解旋酶或者其他类型的解旋酶。进一步的，两个以上个解旋酶之间可以连接或者只是通过分别结合在多核苷酸上而排列发挥控制多核苷酸移动的功能。

优选的，当在孔施加一种力（如电压），目标多核苷酸通过孔的速率被 Pif1-like 解旋酶或构建体所控制，从而获得一种可识别的稳定的电流水平，用于确定目标多核苷酸的特征。

优选的，重复步骤 I) 和 II) 一次或多次。

优选的，所述的方法还包括横跨与所述解旋酶或构建体，和目标多核苷酸接触的孔施加势差的步骤。

优选的，所述的孔是允许水合离子在施加的电势的驱动下从膜的一侧流向膜的另一层的结构。进一步优选的，所述的孔为纳米孔，所述的纳米孔为跨膜孔。所述跨膜孔为目标多核苷酸的移动提供了通道。

所述的膜可以为任何现有技术中存在的膜，优选为两性分子层，即一种由具有至少一个亲水性部分和至少一个亲脂性或疏水性部分的两性分子诸如磷脂质形成的层，两性分子可以是合成的或天然存在的。进一步优选的，所述的膜为脂质双层膜。

所述的目标多核苷酸可以使用任何已知的方法连接到膜上。如果膜是两性分子层，如脂质双分子层，所述多核苷酸优选通过在所述膜中存在的多肽或通过所述膜中存在的疏水锚被连接到该膜上。其中，疏水锚优选为脂质、脂肪酸、甾醇、碳纳米管或氨基酸。

优选的，所述的孔选自生物孔、固态孔或生物与固态杂交的孔。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的孔包括但不限于衍生自耻垢分枝杆菌孔蛋白 A、耻垢分枝杆菌孔蛋白 B、耻垢分枝杆菌孔蛋白 C、耻垢分枝杆菌孔蛋白 D、溶血素、胞溶素、白细胞介素、外膜孔蛋白 F、外膜孔蛋白 G、外膜磷脂酶 A、WZA 或奈瑟氏菌自转运脂蛋白等等。

当提供了促进移动的所有必要组分时，Pif1-like 解旋酶沿着 DNA 以 5' -3' 的方向移动，但 DNA 在孔中的定向(取决于 DNA 的哪个末端被捕获)意味着酶可以用于逆

着所施加的场的方向将 DNA 移出孔，或顺着施加的场的方向将 DNA 移进孔。

优选的，所述的目标多核苷酸为单链、双链或至少一部分是双链的。

进一步优选的，所述的目标多核苷酸可以通过标签、间隔物、甲基化、氧化或损伤的方式进行修饰。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的目标多核苷酸为至少一部分是双链的。其中所述的双链部分构成 Y 衍体结构，所述的 Y 衍体结构包含优先螺入所述孔的前导序列。

进一步优选的，所述的目标多核苷酸的长度可以为 10-100000 个或更多个。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的目标多核苷酸的长度可以为至少 10 个、至少 50 个、至少 100 个、至少 200 个、至少 300 个、至少 400 个、至少 500 个、至少 1000 个、至少 2000 个、至少 5000 个、至少 10000 个、至少 50000 个或至少 100000 个等等。

优选的，所述的解旋酶结合到单链多核苷酸的内部核苷酸中。

优选的，所述的一个或多个特征选自目标多核苷酸的来源、长度、同一性、序列、二级结构或目标多核苷酸是否被修饰。

优选的，所述的一个或多个特征通过电测量和/或光学测量进行。

进一步优选的，通过电测量和/或光测量产生电信号和/或光信号，而每种核苷酸对应一种信号水平，继而将电信号和/或光信号转化为核苷酸的特征。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的电测量包括但不限于电流测量、阻抗测量、隧道测量、风洞测量或场效应晶体管（FET）测量等等。

本发明所述的电信号选自电流、电压、隧穿、电阻、电位、电导率或横向电测量的测量值。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的电信号为穿过所述孔的电流。

优选的，所述的表征还包括应用改进型维特比算法。

本发明的第十方面，提供了一种表征目标多核苷酸的产品，所述的产品包含本发明所述的 Pif1-like 解旋酶、所述的构建体、所述的核酸、所述的表达载体或所述的宿主细胞，和孔。

优选的，所述的产品中包含多个 Pif1-like 解旋酶和/或多个构建体。

优选的，所述的产品中包含多个孔。进一步优选的，所述的孔为纳米孔，所述的纳米孔为跨膜孔。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的跨膜孔选自生物孔、固态孔或生物与固态杂交的孔。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的孔包括但不限于衍生自耻垢分枝杆菌孔蛋白 A、耻垢分枝杆菌孔蛋白 B、耻垢分枝杆菌孔蛋白 C、耻垢分枝杆菌孔蛋白 D、溶血素、胞溶素、白细胞介素、外膜孔蛋白 F、外膜孔蛋白 G、外膜磷脂酶 A、WZA 或奈瑟氏菌自转运脂蛋白等等。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的产品包含多个 Pif1-like 解旋酶或多个构建体，和多个孔。

优选的，所述的产品选自试剂盒、装置或传感器。

进一步优选的，所述的试剂盒中还包括包含脂质双层的芯片。所述的孔横跨脂质双层。

本发明所述的试剂盒包含一个或多个脂质双层，每个脂质双层包含一个或多个所述的孔。

本发明所述的试剂盒还包括实施表征目标多核苷酸的试剂或装置。优选的，所述的试剂包括缓冲剂、PCR 扩增所需的工具。

本发明的第十一方面，提供了本发明所述的 Pif1-like 解旋酶、所述的构建体、所述的核酸、所述的表达载体、所述的宿主细胞或所述的产品在表征目标多核苷酸或控制目标多核苷酸穿过孔的移动中的应用。

本发明的第十二方面，提供了一种表征目标多核苷酸的试剂盒，所述的试剂盒包含本发明所述的 Pif1-like 解旋酶、所述的构建体或所述的核酸、所述的表达载体或所述的宿主细胞，和孔。

本发明的第十三方面，提供了一种表征目标多核苷酸的装置，所述的装置包含本发明所述的 Pif1-like 解旋酶、所述的构建体或所述的核酸、所述的表达载体或所述的宿主细胞，和孔。

优选的，所述的装置包括支撑所述多个孔并可传输孔与多核苷酸相互作用的信号的传感器，和至少一个用于存储目标多核苷酸的存储器，和实施表征过程中所需的溶液。

优选的，所述的装置包括多个 Pif1-like 解旋酶和/或多个构建体，和多个孔。

本发明的第十四方面，提供了一种表征目标多核苷酸的传感器，所述的传感器包含在所述孔和本发明所述 Pif1-like 解旋酶或所述的构建体之间形成复合物。

优选的，在所述目标多核苷酸存在下使所述孔和解旋酶或构建体接触，并跨所述孔施加电势。所述的电势选自电压电势或化学电势。

本发明的第十五方面，提供了一种形成表征目标多核苷酸的传感器的方法，包括在所述孔和本发明所述 Pif1-like 解旋酶或所述的构建体之间形成复合物，从而形成表征目标多核苷酸的传感器。

本发明的第十六方面，提供了一种与多核苷酸连接的两个或多个解旋酶，其中，所述的两个或多个解旋酶中至少一个为本发明所述的 Pif1-like 解旋酶。

本发明的第十七方面，提供了一种 Pif1-like 解旋酶寡聚体，所述的 Pif1-like 解旋酶寡聚体包含一个或多个的本发明所述的 Pif1-like 解旋酶。

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶寡聚体还可以包含野生型 Pif1-like 解旋酶或其他类型的解旋酶。其中，所述的其他类型的解旋酶可以为 Hel308 解旋酶、XPD 解旋酶、Dda 解旋酶、TraI 解旋酶或者 TrwC 解旋酶等等。

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶与野生型 Pif1-like 解旋酶之间、Pif1-like 解旋酶与 Pif1-like 解旋酶之间、野生型 Pif1-like 解旋酶与野生型 Pif1-like 解旋酶、Pif1-like 解旋酶与其他类型解旋酶之间或者野生型 Pif1-like 解旋酶与其他类型解旋酶之间，可以通过头对头、尾对尾或者头对尾的方式连接或排列。

优选的，所述的 Pif1-like 解旋酶寡聚体包含两个以上的本发明所述的 Pif1-like 解旋酶，其中，所述的 Pif1-like 解旋酶可以是不同的或者相同的。

本发明所述的“Pif1-like 解旋酶”是经过修饰的，所述的修饰是相对于野生型或天然解旋酶是修饰的。

本发明所述的“Pif1-like 解旋酶”、“构建体”或“孔”，均可以被修饰以助于鉴定或纯化，例如通过添加组氨酸残基(His 标签)，天冬氨酸残基(asp 标签)，链霉亲和素标签，Flag 标签，SUMO 标签，GST 标签或 MBP 标签，或通过添加信号序列以促进它们从细胞中分泌，该细胞中的多肽不天然地含有该信号序列。引入遗传标签的替换方式是通过化学反应将标签连到 Pif1-like 解旋酶、孔或构建体上的天然或人工位点。

本发明所述的“核苷酸”包括但不限于：腺苷单磷酸(AMP)、鸟苷单磷酸(GMP)、

胸苷单磷酸(TMP)、尿苷单磷酸(UMP)、胞嘧啶核苷单磷酸(CMP)、环状腺苷单磷酸(cAMP)、环状鸟苷单磷酸(cGMP)脱氧腺苷单磷酸(dAMP)、脱氧鸟苷单磷酸(dGMP)、脱氧胸苷单磷酸(dTMP)、脱氧尿苷单磷酸(dUMP)和脱氧胞苷单磷酸(dCMP)。优选的,所述核苷酸选自AMP、TMP、GMP、CMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMP或dCMP。

本发明所述的“保守的氨基酸取代”包括但不限于:丙氨酸与丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、脯氨酸或谷氨酸之间的替换;和/或,天冬氨酸与甘氨酸、天冬酰胺或谷氨酸之间的替换;和/或,丝氨酸与甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸之间的替换;和/或,亮氨酸与异亮氨酸或缬氨酸之间的替换;和/或,缬氨酸与亮氨酸、异亮氨酸之间的替换;和/或,酪氨酸与苯丙氨酸之间的替换;和/或,赖氨酸与精氨酸之间的替换。上述所述的取代基本不会改变本发明所述的氨基酸序列的活性。

本发明所述的“两个以上”包括两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或更多个等等。

本发明所述的“多个”包括但不限于两个以上、三个以上、四个以上、五个以上、六个以上、七个以上、八个以上或更多个等等。

本发明所述的“至少一个”包括但不限于一个以上、两个以上、三个以上、四个以上、五个以上、六个以上、七个以上、八个以上或更多个等等。

本发明所述的“和/或”包括择一列出的项目以及任何数量的项目组合。

本发明所述的“包括”是开放式的描述,含有所描述的指定成分或步骤,以及不会实质上影响的其他指定成分或步骤。

本发明所述的“非天然氨基酸”为不是天然存在于Pif1-like解旋酶中的氨基酸。优选的,包括但不限于4-叠氮基-L-苯丙氨酸(Faz),4-乙酰基-L-苯丙氨酸,3-乙酰基-L-苯丙氨酸,4-乙酰乙酰基-L-苯丙氨酸,O-烯丙基-L-酪氨酸,3-(苯基硒烷基)-L-丙氨酸,O-2-丙炔-1-基-L-酪氨酸,4(二羟基硼基)-L-苯丙氨酸,4-[(乙基硫烷基)羰基]-L-苯丙氨酸,(2S)-2-氨基-3-{4-[(丙烷-2-基硫烷基)羰基]苯基}丙氨酸,(2S)-2-氨基-3-{4-[(2-氨基-3-硫烷基丙酰基)

氨基]苄基}丙酸, O-甲基-L-酪氨酸, 4-氨基-L-苯丙氨酸, 4-氰基-L-苯丙氨酸, 3-氰基-L-苯丙氨酸, 4-氟-L-苯丙氨酸, 4-碘-L-苯丙氨酸, 4-溴-L-苯丙氨酸, O-(三氟甲基)酪氨酸, 4-硝基 L-苯丙氨酸, 3-羟基-L-酪氨酸, 3-氨基-L-酪氨酸, 3-碘-L-酪氨酸, 4-异丙基-L-苯丙氨酸, 3-(2-萘基)-L-丙氨酸, 4-苄基-L-苯丙氨酸, (2S)-2-氨基-3-(萘-2-基氨基)丙酸, 6-(甲基硫烷基)正亮氨酸, 6-氧-L-赖氨酸, D-酪氨酸, (2R)-2-羟基-3-(4-羟基苄基)丙酸, (2R)-2-氨基辛酸酯 3-(2, 2'-二吡啶-5-基)-D-丙氨酸, 2-氨基-3-(8-羟基-3-喹啉基)丙酸, 4-苯甲酰-L-苯丙氨酸, S-(2-硝基苄基)半胱氨酸, (2R)-2-氨基-3-[(2-硝基苄基)硫烷基]丙酸, (2S)-2-氨基-3-[(2-硝基苄基)氧基]丙酸, O-(4, 5-二甲氧基-2-硝基苄基)-L-丝氨酸, (2S)-2-氨基-6-([[(2-硝基苄基)氧基]羰基]氨基)己酸, O-(2-硝基苄基)-L-酪氨酸, 2-硝基苯丙氨酸, 4-[(E)-苄基二氮烯基]-L-苯丙氨酸, 4-[3-(三氟甲基)-3H-二吡丙啶基-3-基]-D-苯丙氨酸, 2-氨基-3-[[5-(二甲基氨基)-1-萘基]磺酰基氨基]丙酸, (2S)-2-氨基 4-(7-羟基-2-氧-2H-色烯-4-基)丁酸, (2S)-3-[(6-乙酰基萘-2-基)氨基]-2-氨基丙酸, 4(羧基甲基)苯丙氨酸, 3-硝基-L-酪氨酸, O-硫基-L-酪氨酸, (2R)-6-乙酰氨基-2-氨基己酸酯, 1-甲基组氨酸, 2-氨基壬酸, 2-氨基癸酸, L-同质半胱氨酸, 5-硫烷基正缬氨酸, 6-硫烷基-L-正亮氨酸, 5-(甲基硫烷基)-L-正缬氨酸, N6-[(2R, 3R)-3-甲基-3, 4-二氢-2H-吡咯 2-基]羰基]-L-赖氨酸, N6-[(苄基氧基)羰基]赖氨酸, (2S)-2-氨基-6-[(环戊基羰基)氨基]己酸, N6-[(环戊基氧基)羰基]-L-赖氨酸, (2S)-2-氨基-6-[(2R)-四氢呋喃-2-基羰基]氨基]己酸, (2S)-2-氨基-8-[(2R, 3S)-3-乙炔基四氢呋喃-2-基]-8-氧基辛酸, N6-(叔丁氧基羰基)-L-赖氨酸, (2S)-2-羟基-6-([[(2-甲基-2-丙烷基)氧基]羰基]氨基)己酸, N6-[(烯丙氧基)羰基]赖氨酸, (2S)-2-氨基-6-([[(2-叠氮苄基)氧基]羰基]氨基)己酸, N6L-脯氨酰基-L-赖氨酸, (2S)-2-氨基-6-[(丙-2-炔-1-基氧基)羰基]氨基]己酸或 N6-[(2-叠氮乙氧基)羰基]-L-赖氨酸。

附图说明

以下, 结合附图来详细说明本发明的实施例, 其中:

图 1: 检测 Pif1-like 解旋酶活性的荧光分析示意图。其中, 荧光底物链具有 5' 端

ssDNA 突出部分, 以及 50 个碱基的杂交的 dsDNA 部分。a) 所示, 包括主链上部 (B) 在 3' 端具有黑洞淬灭剂(BHQ-1)碱基 (E), 并且所述杂交的互补链 (D) 在 5' 端具有羧基荧光素 (C)。还包括, 与荧光底物的较短链 (D) 互补的 0.5 μ M 的捕获链 (F)。如 b) 所示, 在 ATP(5mM)和 MgCl₂(5mM)存在下, 添加到所述底物中的解旋酶(200nM)连接到所述荧光底物的 5' 端部分, 沿着所述主链移动, 并解开所述互补链后, 过量的捕获链优先与互补链 DNA 退火以防止初始底物与丢失荧光重新退火。如 c)所示, 加入过量与主链完全互补的捕获链 (A) 后, 部分未被解旋的 dsDNA 由于过量 A 的存在而产生链解旋效果, 最终所有 dsDNA 被解旋, 荧光值达到最高。

图 2: 荧光分析检测 Pif1-like 解旋酶的解开杂交 dsDNA 的能力, 具体为含有 400mM NaCl 的缓冲液中的时间依赖型 dsDNA 被解旋比例的变化图。

图 3: 显示了针对不同 Pif1-like 解旋酶结合 DNA 能力进行的凝胶测定结果。泳道 1 为预先构建的 dsDNA(SEQ ID NO: 18 与含 5' FAM 修饰的 SEQ ID NO: 19 杂交)。泳道 2-6 分别包含预先连接到 dsDNA 的 Aph Acj61、Aph PX29、Sph CBH8、PphPspYZU05 和 Mph MP1。泳道 7-11 分别包含预先连接到 dsDNA 的 Aph Acj61-D97C/A363C、Aph PX29-D96C/A371C、Sph CBH8-A94C/A361C/C136A、PphPspYZU05-D104C/A375C/C146A 和 Mph MP1-E105C/A362C。条带 A 对应于与 SEQ ID NO: 18 杂交的 SEQ ID NO: 19。标记为 1A、2A、3A、4A、5A 的区域分别对应于 1、2、3、4、5 个解旋酶结合与 SEQ ID NO: 18 杂交的 SEQ ID NO: 19。

图 4: 实施例中所使用的 DNA 构建体的图, 其中 SEQ ID NO: 13(标记为 B)其 5' 末端连接到 20 个 iSpC3 间隔区(标记为 A), 其 3' 末端连接到 4 个 iSpC3 间隔区 (标记为 C), 该间隔区 (标记为 C) 连接到 SEQ ID NO: 14 (标记为 D) 的 5' 末端, 该 SEQ ID NO: 14 (标记为 D) 的 3' 末端连接到 SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 24 (标记为 E), 该构建体的 SEQ ID NO: 15 (标记为 F) 区域与 SEQ ID NO: 16(标记为 G, 其具有 3' 胆固醇系链)杂交。

图 5: 当 Pif1-like 解旋酶(Mph MP1-E105C/A362C(具有突变 E105C/A362C 的 SEQ ID NO: 11))控制 DNA 构建体 A 穿过纳米孔 8MspA(SEQ ID NO: 12)移位时的示例电流轨迹(y 轴坐标=电流(pA, 0 到 250), x 轴坐标=采样频率(hz, 0 到 3.5×10^5))。

图 6: 图 5 电流轨迹图中所示的 Pif1-like 解旋酶控制的 DNA 移动的区域放大图(y 轴坐标=电流(pA, 30 到 100), x 轴坐标=采样频率(hz, 2.346 到 2.366×10^5))。

图 7: 当 Pif1-like 解旋酶(Sph CBH8-A94C/A361C/C136A(具有 A94C/A361C/C136A 突变的 SEQ ID NO: 5))控制 DNA 构建体 B 穿过 MspA 纳米孔移位时的示例电流轨迹(y 轴坐标=电流(pA), x 轴坐标=时间(s))。

图 8: 当解旋酶(Eph Pei26-D99C/A366C/C141A (具有 D99C/A366C/C141A 突变的 SEQ ID NO: 6))控制 DNA 构建体 B 穿过 MspA 纳米孔移位时的示例电流轨迹(y 轴坐标=电流(pA), x 轴坐标=时间(s))。

图 9: 当解旋酶(Pph PspYZU05-D104C/A375C/C146A (具有 D104C/A375C 和 C146A 突变的 SEQ ID NO: 8))控制 DNA 构建体 B 穿过 MspA 纳米孔移位时的示例电流轨迹(y 轴坐标=电流(pA), x 轴坐标=时间(s))。

图 10: 显示了经纯化后的 Mph MP1 (SEQ ID NO:11) SDS-PAGE 凝胶电泳图。其中, M 是 Marker (Kd), 1 道为 Mph MP1 解旋酶的电泳结果图。

图 11: 显示了 SEQ NO: 1 至 11 的氨基酸序列对应关系。

具体实施方式

以下实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。各实施例中所用的设备和试剂均常规市售可得。

实施例 1 Pif1-like 解旋酶的制备

1、材料和方法

将含有 Pif1-like 解旋酶序列的重组质粒（氨基酸序列 SEQ ID NO:1-11 的变体，其对应核苷酸序列 SEQ ID NO:25-35）通过热击转化到 BL21(DE3)感受态细胞，复苏菌液涂布氨苄抗性固体 LB 平板后在 37℃过夜培养，挑取单克隆菌落，接种至 100ml 含有氨苄抗性的液体 LB 培养基中 37℃培养。按 1%的接种量转接至氨苄抗性的 LB 液体培养基中进行扩大培养，37℃、200rpm 条件下培养，并连续不断的测量其 OD600 值。当 OD600=0.6-0.8 时，将 LB 培养基中的培养液冷却至 18℃，并添加异丙基硫代半乳糖苷（Isopropyl β-D-Thiogalactoside, IPTG）诱导表达，使得终浓度达到 1mM。12-16h 后，18℃收集细菌。高压破碎细菌，通过 FPLC 方法进行纯化，收集样品。

2、结果

图 10 显示了经纯化后的 Mph MP1（SEQ ID NO:11 的变体）SDS-PAGE 凝胶电泳图。

实施例 2

使用荧光分析检测酶活性来阐述 Pif1-like 解旋酶的解开杂交 dsDNA 的能力。

1、材料和方法

如图 1 中的 a) 所示，荧光底物链(终浓度 100nM)具有 5'端 ssDNA 突出部分，以及 50 个碱基的杂交的 dsDNA 部分。包括主链上部在 3'端具有黑洞淬灭剂(BHQ-1)碱基(SEQ ID NO:20--BHQ-3')，并且所述杂交的互补链在 5'端具有羧基荧光素（5'FAM-SEQ ID NO:21）。当杂交的来自荧光素的荧光被局部的 BHQ-1 淬灭时，底物基本上是无荧光的。还包括与荧光底物的较短链互补的 0.5μM 的捕获链（SEQ ID NO:22）。如 b)所示，在 ATP(5mM)和 MgCl₂(5mM)存在下，添加到底物中的 Pif1-like 解旋酶(200nM)连接到所述荧光底物的 5'端部分，沿着所述主链移动，并解开所述互补链后，过量的捕获链优先与互补链 DNA 退火以防止初始底物与丢失荧光重新退火。同时，体系内仍存在一定量的杂交 dsDNA 未被 Pif1-like 解旋酶解旋。如 c)所示，加入过量与主链完全互补的捕获链 A（SEQ ID NO:23）后，部分未被解旋的 dsDNA 由于过量 A 的存在而产生链解旋效果，最终所有

dsDNA 被解旋，荧光值达到最高。

2、结果

图 2 显示了含有 400mMNaCl 的缓冲液中的时间依赖型 dsDNA 被解旋比例的变化图 (10mM Hepes pH8.0, 5mM ATP, 5mM MgCl₂, 100nM 荧光底物 DNA, 0.5μM 捕获 DNA)。

实施例 3

示例性的采用凝胶测定来测量本发明经修饰的 Pif1-like 解旋酶结合 DNA 的能力。

具体的，测量 Aph Acj61-D97C/A363C (具有 D97C/A363C 突变的 SEQ ID NO: 2)，Aph PX29-D96C/A371C (具有 D96C/A371C 突变的 SEQ ID NO: 3)，Sph CBH8-A94C/A361C/C136A (具有 A94C/A361C 和 C136A 突变的 SEQ ID NO: 5) 和 Pph PspYZU05-D104C/A375C/C146A (具有 D104C/A375C 和 C146A 突变的 SEQ ID NO: 8) 以及 Mph MP1-E105C/A362C (具有 E105C/A362C 突变的 SEQ ID NO: 11) 结合 DNA 的能力。

1、材料和方法

将退火的 DNA 复合物(SEQ ID NO: 18 与含 5'FAM 修饰的 SEQ ID NO: 19 杂交)以 (1: 1, 体积/体积)的比例分别与 Aph Acj61, Aph PX29, Sph CBH8, Pph PspYZU05, Mph MP1, Aph Acj61-D97C/A363C, Aph PX29-D96C/A371C, Sph CBH8-A94C/A361C/C136A, Pph PspYZU05-D104C/A375C/C146A, Mph MP1-E105C/A362C 在 10mM HEPE, pH 值 8.0, 400mM 氯化钾中混合，得到 Pif1-like 解旋酶的最终浓度为(600nM)和 DNA 为(30nM)。Pif1-like 解旋酶在室温下结合 DNA 进行 1 小时。将 TMAD 加入各样品中至终浓度 5μM，在室温下培育 1 小时。将样品上样到 4-20%TBE 凝胶上，并在 160V 跑胶 1.5 小时。然后将该凝胶在蓝色荧光下观察 DNA 条带。

2、结果

图 3 显示了 Pif1-like 解旋酶在修饰前后对 DNA 结合能力的影响。泳道 2 至 6 显示大量 DNA 在电泳过程中未被 Pif1-like 解旋酶结合而观察不到明显的结合条带。而泳道 7-11

显示了不同个数酶结合至 DNA 的结合条带，其中泳道 9 和 10 显示了高达 5 个 Pif1-like 解旋酶可以结合到 SEQ ID NO: 18 的单链部分。这表明，Pif1-like 解旋酶在修饰后明显增强了与 DNA 结合的牢固程度。

实施例 4

本实施例以 Mph MP1-E105C/A362C(具有突变 E105C/A362C 的 SEQ ID NO: 11)为例，验证 Pif1-like 解旋酶如何控制整个 DNA 链移动穿过单个 MspA 纳米孔(SEQ ID NO: 12)。

1、材料和方法

制备如图 4 所示的 DNA 构建体 A: SEQ ID NO: 13 其 5'末端连接到 20 个 iSpC3 间隔区，其 3'末端连接到 4 个 iSpC3 间隔区，该间隔区连接到 SEQ ID NO: 14 的 5'末端，该 SEQ ID NO: 14 的 3'末端连接到 SEQ ID NO: 17，该 DNA 构建体的 SEQ ID NO: 15 区域与 SEQ ID NO: 16(其具有 3'胆固醇系链)杂交)。

将制备的 DNA 构建体和 Mph MP1-E105C/A362C 在 25°C 的缓冲液(10mM HEPES, pH 8.0, 400mM NaCl, 5% 甘油, 2mM DTT)中一起预孵育 30 分钟。

由嵌入 1,2-二乙醇酰基-甘油-3-胆碱磷酸脂质双分子层的 MspA 纳米孔获得电测量。通过 Montal-Mueller 技术，在 PTFE 膜上的~25 μ m 直径孔穴形成双分子层，隔开两个约 100 μ L 的缓冲溶液。所有实验在所述缓冲液中进行。使用装配有数字转换器的放大器测定单通道电流。将 Ag/AgCl 电极连接到所述缓冲液中使得顺式隔间连接到放大器的接地端，并且反式隔间连接到活性电极。

在所述双分子层实现单孔之后，将 DNA 多核苷酸和 Pif1-like 解旋酶添加到电生理室的顺式隔间的 70 μ L 缓冲液中以引发解旋酶-DNA 复合体在所述纳米孔的捕获。根据需要通过向所述顺式隔间添加二价金属(5mM MgCl₂)和 NTP(2.86 μ M ATP)激活解旋酶 ATP 酶活性。实验在+180mV 的恒定电势下实施。

2、结果和讨论

结果观察到了 DNA 构建体被 Pif1-like 解旋酶控制的 DNA 移动，Pif1-like 解旋酶控

制的 DNA 移动的结果见图 5。Pif1-like 解旋酶控制的 DNA 移动为 50 秒长并对应于接近 10kB 的 DNA 构建体穿过所述纳米孔的移位。其中，图 6 显示了 Pif1-like 解旋酶控制的 DNA 移动的部分区域的放大图。

实施例 5

本实施例以 Sph CBH8-A94C/A361C/C136A(具有 A94C/A361C/C136A 突变的 SEQ ID NO: 5)和 Eph Pei26-D99C/A366C/C141A(具有 D99C/A366C/C141A 突变的 SEQ ID NO: 6)以及 Pph PspYZU05-D104C/A375C/C146A(具有 D104C/A375C 和 C146A 突变的 SEQ ID NO: 8)为例，验证 Pif1-like 解旋酶如何控制整个 DNA 链移动穿过单个 MspA 纳米孔。

1、材料和方法

制备如图 4 所示的 DNA 构建体 B: SEQ ID NO: 13 其 5'末端连接到 20 个 iSpC3 间隔区，其 3'末端连接到 4 个 iSpC3 间隔区，该间隔区连接到 SEQ ID NO: 14 的 5'末端，该 SEQ ID NO: 14 的 3'末端连接到 SEQ ID NO: 24，该 DNA 构建体的 SEQ ID NO: 15 区域与 SEQ ID NO: 16(其具有 3'胆固醇系链)杂交。该 DNA 构建体 B 与实施例 4 使用的构建体相似，不同在于标记为 E 的区域对应于 SEQ ID NO: 24。

将在缓冲液(在 50mM NaCl 中，10mM Tris pH7.5)中的 DNA 构建体 B 与在缓冲液(50mM KCl，10mMHEPES，pH 8.0)中的 Sph CBH8-A94C/A361C/C136A，Eph Pei26-D99C/A366C/C141A 或 Pph PspYZU05-D104C/A375C/C146A 在室温下预孵育 30 分钟。然后向 DNA/酶预混合物中添加 TMAD 并进一步孵育 30 分钟。最后，向所述预混合物中添加缓冲液(10mMHEPES，600mM KCl，pH 8.0，3mM MgCl₂)和 ATP。

在室温下由嵌入到在缓冲液(10mM HEPES，400mM KCl，pH 8.0)中的嵌段共聚物中的单个 MspA 纳米孔获得电测量值。在实现单个孔插入到嵌段共聚物中后，将 Pif1-like 解旋酶(Sph CBH8-A94C/A361C/C136A，Eph Pei26-D99C/A366C/C141A 或 Pph PspYZU05-D104C/A375C/C146A(1nM 终浓度))，DNA(0.3nM 终浓度)，燃料(ATP 3mM 终浓度)的预混合物添加到单个纳米孔实验系统中。每个实验在保持电势 180mV 下进行 2

小时，并监控 Pif1-like 解旋酶控制的 DNA 移动。

2、结果

对 DNA 构建体 B，观察 Pif1-like 解旋酶控制的 DNA 移动，其 Sph CBH8-A94C/A361C/C136A，Eph Pei26-D99C/A366C/C141A 或 Pph PspYZU05-D104C/A375C/C146A 控制的 DNA 移动的结果分别参见图 7-9。

以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于上述实施方式中的具体细节，在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种简单变型，这些简单变型均属于本发明的保护范围。

另外需要说明的是，在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征，在不矛盾的情况下，可以通过任何合适的方式进行组合，为了避免不必要的重复，本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。