

权 利 要 求 书

1、一种 Pif1-like 解旋酶，其特征在于，包括在 Pif1-like 解旋酶的塔结构域、销结构域和/或 1A 结构域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 Pif1-like 解旋酶保留其控制多核苷酸移动的能力。

2、根据权利要求 1 所述的 Pif1-like 解旋酶，其中所述 Pif1-like 解旋酶包括：

(a)SEQ ID NO: 1 的变体，其中在塔结构域的 E264-P278 和 N296-A394，和/或销结构域的 K89-E105，和/或 1A 结构域的 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；

(b)SEQ ID NO: 2 的变体，其中在塔结构域的 E265-P279 和 N297-A392，和/或销结构域的 K89-D105，和/或 1A 结构域的 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；

(c)SEQ ID NO: 3 的变体，其中在塔结构域的 T266-P280 和 N298-S403，和/或销结构域的 K89-A109，和/或 1A 结构域的 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；

(d)SEQ ID NO: 4 的变体，其中在塔结构域的 T266-P280 和 N298-S404，和/或销结构域的 K89-A109，和/或 1A 结构域的 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；

(e)SEQ ID NO: 5 的变体，其中在塔结构域的 E260-P274 和 N292-A391，和/或销结构域的 K86-E102，和/或 1A 结构域的 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；

(f)SEQ ID NO: 6 的变体，其中在塔结构域的 E266-P280 和 N298-A396，和/或销结构域的 K91-E107，和/或 1A 结构域的 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；

(g)SEQ ID NO: 7 的变体，其中在塔结构域的 T276-P290 和 N308-P402，和/或销结构域的 K100-D116，和/或 1A 结构域的 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；

(h)SEQ ID NO: 8 的变体, 其中在塔结构域的 D274-P288 和 N306-A404, 和/或销结构域的 K95-E112, 和/或 1A 结构域的 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;

(i)SEQ ID NO: 9 的变体, 其中在塔结构域的 E260-P274 和 N292-A391, 和/或销结构域的 K86-E102, 和/或 1A 结构域的 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;

(j)SEQ ID NO: 10 的变体, 其中在塔结构域的 E265-P279 和 H297-A393, 和/或销结构域的 K88-E104, 和/或 1A 结构域的 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; 或,

(k)SEQ ID NO: 11 的变体, 其中在塔结构域的 E264-P278 和 N296-P389, 和/或销结构域的 K97-A113, 和/或 1A 结构域的 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。

3、根据权利要求 2 所述的 Pif1-like 解旋酶, 其中所述解旋酶包括:

(a)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;

(xliv)E104C 和/或 W378C; (xlv)E104C 和/或 W374C; (xlv)E105C 和/或 Y355C; (xlvii)E105C 和/或 N382C; (xlviii)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; 或者,

(b)SEQ ID NO: 1 到 10 中任一个的变体, 其包括在对应于 SEQ ID NO: 11 的(i)到(liv)中任一个所限定的位置处的半胱氨酸残基。

4、根据权利要求 1-3 任一所述的 Pif1-like 解旋酶, 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。

5、根据权利要求 1-4 任一所述的 Pif1-like 解旋酶, 其特征在于, 所述引入的半胱氨酸与半胱氨酸之间相互连接, 引入的非天然氨基酸与非天然氨基酸之间相互连接, 引入的半胱氨酸与非天然氨基酸之间相互连接, 引入的半胱氨酸与天然氨基酸之间相互连接, 或者引入的非天然氨基酸与天然氨基酸之间相互连接。

6、根据权利要求 1-5 任一所述的 Pif1-like 解旋酶, 其特征在于, 所述 Pif1-like 解旋酶还包括至少一个或多个的半胱氨酸被取代; 优选为丙氨酸、丝氨酸或缬氨酸取代半胱氨酸。

7、根据权利要求 1-6 任一所述的 Pif1-like 解旋酶, 其特征在于, 所述的 Pif1-like 解旋酶包括:

(a)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; 或者,

(b)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。

8、根据权利要求 1-7 任一所述的 Pif1-like 解旋酶, 其特征在于, 所述的 Pif1-like 解旋酶还包括对表面带负电的氨基酸、极性或非极性氨基酸进行取代或修饰; 进一步优选的, 所述的取代包括带正电的氨基酸、不带电荷的氨基酸取代带负电的氨基酸、不带电荷的氨基酸、芳香族氨基酸、极性或非极性氨基酸。

9、根据权利要求 8 所述的 Pif1-like 解旋酶, 其特征在于, 其中所述 Pif1-like 解旋

酶包括：

a) 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；或者，

b) SEQ ID NO: 1 到 10 中任一个的变体，其中，所述一个或多个带负电荷的氨基酸对应于 SEQ ID NO: 11 中 D5, E9, E24, E87, I65, S58, D209 或 D216 中的一个或多个。

10、根据权利要求 9 所述的 Pif1-like 解旋酶，其特征在于，其中所述 Pif1-like 解旋酶还包括：

a) 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；或者，

b) 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。

11、根据权利要求 1-10 任一所述的 Pif1-like 解旋酶，其特征在于，其中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'-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-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-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。

12、根据权利要求 1-11 任一所述的 Pif1-like 解旋酶, 其特征在于, 所述的 Pif1-like 解旋酶还包括:

(a)至少一个与单链 DNA 或双链 DNA 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。

13、根据权利要求 12 所述的 Pif1-like 解旋酶, 其中, 在(a)中, 用包含较大侧链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。

14、根据权利要求 13 所述的 Pif1-like 解旋酶, 其中, 所述 Pif1-like 解旋酶包括:

(a) 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; 或者,

(b) SEQ ID NO:1 到 10 中任一变体的变体, 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对应于 SEQ ID NO:11 中的 P73, H93, N99, F109, I280, A161, F130, D132, D162, D163, E277, K415, Q291, H396, Y244 或 P100 中的至少一个。

15、根据权利要求 13 或 14 所述的 Pif1-like 解旋酶, 其中, 所述较大侧链包括增加数目的碳原子, 具有增加的长度, 增加的分子体积和/或具有增加的范德华体积。

16、根据权利要求 13-15 任一所述的 Pif1-like 解旋酶, 其中, 所述较大侧链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 相互作用。

17、根据权利要求 13-16 任一所述的 Pif1-like 解旋酶，其中，所述较大侧链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)。

18、根据权利要求 12-17 任一所述的 Pif1-like 解旋酶，其中，

A) 组氨酸(H)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；

B) 天冬酰胺(N)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；

C) 脯氨酸(P)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；

D) 苯丙氨酸(F)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；

E) 天冬氨酸(D)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；

F) 缬氨酸(V)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；

G) 丝氨酸(S)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；和/或，

H) 酪氨酸(Y)被(i)精氨酸(R)或赖氨酸(K)；或(ii)色氨酸(W)取代。

19、根据权利要求 12-18 任一所述的 Pif1-like 解旋酶，其特征在于，所述 Pif1-like 解旋酶是 SEQ ID NO:11 的变体，并且包含：

P73L;	H93W;	P100E;
P73V;	N99R;	P100T;
P73I;	N99H;	P100F;
P73E;	N99W;	F130W;
P73T;	N99Y;	F130Y;
P73F;	P100L;	F130H;
H93N;	P100V;	D132H;
H93Q;	P100I;	D132Y;

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

20、根据权利要求 12-19 任一所述的 Pif1-like 解旋酶，其中，在(a)中，至少一个与单链 DNA 或双链 DNA 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。

21、根据权利要求 20 所述的 Pif1-like 解旋酶，其中，所述 Pif1-like 解旋酶包括：

(a)SEQ ID NO:11 的变体，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 H75, T91, S94, K97, N246, N247, N284, K288, N297, T394 或 K397 中的至少一个；或者，

(b)SEQ ID NO:1 到 10 中任一的变体，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。

22、根据权利要求 21 所述的 Pif1-like 解旋酶，其中，

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。

23、根据权利要求 20-22 任一所述的 Pif1-like 解旋酶，其中，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。

24、根据权利要求 12-23 任一所述的 Pif1-like 解旋酶，其中，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：

(a)SEQ ID NO:11 的变体，其中，所述 Pif1-like 解旋酶包含在 (a)E196(b)W202(c)N199 或(d)G201 上的一个或多个取代；或者，

(b)SEQ ID NO:1 到 10 中任一的变体，其中，所述 Pif1-like 解旋酶包含在 (a)E196(b)W202(c)N199 或(d)G201 相对应的至少一个取代。

25、根据权利要求 1-24 任一所述的 Pif1-like 解旋酶，其中，所述 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。

26、一种构建体,其特征在于,所述的构建体包含至少一个权利要求 1-25 任一所述的 Pif1-like 解旋酶。

27、根据权利要求 26 所述的构建体,其特征在于,所述的构建体还包含多核苷酸结合部分。

28、一种核酸,其特征在于,所述的核酸编码权利要求 1-25 任一所述的 Pif1-like 解旋酶或权利要求 26-27 任一所述的构建体。

29、一种表达载体,其特征在于,所述的表达载体包含权利要求 28 所述的核酸。

30、一种宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞包含权利要求 28 所述的核酸或权利要求 29 所述的表达载体。

31、一种控制多核苷酸移动的方法,其特征在于,所述的方法包括将权利要求 1-25 任一所述的 Pif1-like 解旋酶或权利要求 26-27 任一所述的构建体与多核苷酸接触。

32、一种表征目标多核苷酸的方法，其特征在于，所述的方法包括：

I) 将权利要求 1-25 任一所述的 Pif1-like 解旋酶或权利要求 26-27 任一所述的构建体，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。

33、根据权利要求 32 所述的方法，其特征在于，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，所述的孔选自生物孔、固态孔或生物与固态杂交的孔。

34、根据权利要求 32 或 33 所述的方法，其特征在于，所述的目标多核苷酸为单链、双链或至少一部分是双链的。

35、根据权利要求 32-34 任一所述的方法，其特征在于，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。

36、一种表征目标多核苷酸的产品，其特征在于，所述的产品包含权利要求 1-25 任一所述的 Pif1-like 解旋酶、权利要求 26-27 任一所述的构建体、权利要求 28 所述的核酸、权利要求 29 所述的表达载体或权利要求 30 所述的宿主细胞，和孔。

37、根据权利要求 36 所述的产品，其特征在于，所述的产品选自试剂盒、装置或传感器。

38、权利要求 1-25 任一所述的 Pif1-like 解旋酶、权利要求 26-27 任一所述的构建体、权利要求 28 所述的核酸、权利要求 29 所述的表达载体、权利要求 30 所述的宿主细胞或权利要求 36-37 任一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。