

权 利 要 求 书

1、一种 Mnep 单体变体，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体包含 SEQ ID NO: 1 第 92-104 位任意一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。

2、根据权利要求 1 所述的 Mnep 单体变体，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体包含第 92 位甘氨酸（G）的突变、第 93 位天冬氨酸（D）的突变、第 95 位甘氨酸（G）的突变或第 104 位丙氨酸（A）的突变中的一种或两种以上的组合。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的 Mnep 单体变体，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体包含至少一种如下突变：

G92 突变为：精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）、赖氨酸（K）、苯丙氨酸（F）、丝氨酸（S）、天冬酰胺（N）、半胱氨酸（C），或者，修饰的精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）、赖氨酸（K）、苯丙氨酸（F）、丝氨酸（S）、天冬酰胺（N）、半胱氨酸（C），或者，非天然氨基酸；或者，

D93 突变为：色氨酸（W）、酪氨酸（Y）、苯丙氨酸（F）、甲硫氨酸（M）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、脯氨酸（P）、赖氨酸（K）、精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）或天冬酰胺（N），或者，修饰的色氨酸（W）、酪氨酸（Y）、苯丙氨酸（F）、甲硫氨酸（M）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、脯氨酸（P）、赖氨酸（K）、精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）或天冬酰胺（N），或者，非天然氨基酸；或者，

G95 突变为：脯氨酸（P）、色氨酸（W）、苯丙氨酸（F）、甲硫氨酸（M）、丙氨酸（A）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、赖氨酸（K）、精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）或天冬酰胺（N），或者，修饰的脯氨酸（P）、色氨酸（W）、苯丙氨酸（F）、甲硫氨酸（M）、丙氨酸（A）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、赖氨酸（K）、精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）或天冬酰胺（N），或者，非天然氨基酸；或者，

A104 突变为：脯氨酸（P）、苯丙氨酸（F）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、赖氨酸（K）或精氨酸（R），或者，修饰的脯氨酸（P）、苯丙氨酸（F）、异

亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、缬氨酸 (V)、赖氨酸 (K) 或精氨酸 (R)，或者，非天然氨基酸。

4、根据权利要求 1-3 任一所述的 Mnep 单体变体，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体包含至少一种如下突变：

(1) G92K；(2) D93F；(3) G95L；(4) A104K。

5、根据权利要求 1-4 任一所述的 Mnep 单体变体，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体包含 G92K、D93F、G95L 和 A104K 突变。

6、根据权利要求 1-5 任一所述的 Mnep 单体变体，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体还包含 SEQ ID NO: 1 第 80-91 位和/或 105-120 位任意一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。

7、根据权利要求 1-6 任一所述的 Mnep 单体变体，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体还包含 SEQ ID NO: 1 第 1-79 位和/或 121-191 位任意一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。

8、根据权利要求 1-7 任一所述的 Mnep 单体变体，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体还包含第 125 位天冬氨酸 (D) 的突变、第 141 位谷氨酸 (E) 的突变、第 146 位谷氨酸 (E) 的突变、第 110 位谷氨酸 (E) 的突变、第 76 位甘氨酸 (G) 的突变、第 78 位甘氨酸 (G) 的突变或第 133 位谷氨酰胺 (Q) 的突变中的一种或两种以上的组合。

9、根据权利要求 1-8 任一所述的 Mnep 单体变体，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体包含至少一种如下突变：

D125 突变为：赖氨酸 (K)、谷氨酰胺 (Q)、半胱氨酸 (C) 或天冬酰胺 (N)，或者，修饰的赖氨酸 (K)、谷氨酰胺 (Q)、半胱氨酸 (C) 或天冬酰胺 (N)，或者，非天然氨基酸；或者，

E141 突变为：赖氨酸 (K)、天冬酰胺 (N) 或谷氨酰胺 (Q)，或者，修饰的赖氨酸 (K)、天冬酰胺 (N) 或谷氨酰胺 (Q)，或者，非天然氨基酸；或者，

E146 突变为：精氨酸 (R)、天冬酰胺 (N) 或谷氨酰胺 (Q)，或者，修饰的精氨酸

(R)、天冬酰胺(N)或谷氨酰胺(Q),或者,非天然氨基酸;或者,

E110 突变为:苯丙氨酸(F)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、丙氨酸(A)或酪氨酸(Y),或者,修饰的苯丙氨酸(F)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、丙氨酸(A)或酪氨酸(Y),或者,非天然氨基酸;或者,

G76 突变为:丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或精氨酸(R),或者,修饰的丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或精氨酸(R),或者,非天然氨基酸;或者,

G78 突变为:丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或精氨酸(R),或者,修饰的丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或精氨酸(R),或者,非天然氨基酸;或者,

Q133 突变为:天冬酰胺(N)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T),或者,修饰的天冬酰胺(N)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T),或者,非天然氨基酸。

10、一种包含至少一个权利要求 1-9 任一所述 Mnep 单体变体的构建体。

11、根据权利要求 10 所述的构建体,其特征在于,所述的构建体还包括 Mnep 单体野生型。

12、根据权利要求 10 或 11 所述的构建体,其特征在于,所述的构建体包含 1-20 个 Mnep 单体变体,其中,所述的 Mnep 单体变体相同或不同;或者,所述的构建体包含 1-20 个 Mnep 单体野生型。

13、根据权利要求 11 或 12 所述的构建体,其特征在于,所述的 Mnep 单体变体与 Mnep 单体变体、Mnep 单体野生型与 Mnep 单体野生型、Mnep 单体变体与 Mnep 单体野生型之间通过共价连接。

14、根据权利要求 10-13 任一所述的构建体,其特征在于,所述的构建体包含 4-10 个相同或不同的 Mnep 单体变体。

15、一种包含至少一个 Mnep 单体变体的孔蛋白,其特征在于,所述的 Mnep 单体变体包含 SEQ ID NO: 1 第 92-104 位任意一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列,所述突变导致当多聚核苷酸单链通过所述包含至少一个 Mnep 单体变体的孔蛋白时,产生由于不同种类的核苷酸的物理或化学性质的不同而造成的孔内电阻的差异。

16、根据权利要求 15 所述的孔蛋白，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体包含第 92 位甘氨酸（G）的突变、第 93 位天冬氨酸（D）的突变、第 95 位甘氨酸（G）的突变或第 104 位丙氨酸（A）的突变中的一种或两种以上的组合。

17、根据权利要求 15 或 16 所述的孔蛋白，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体包含至少一种如下突变：

G92 突变为：精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）、赖氨酸（K）、苯丙氨酸（F）、丝氨酸（S）、天冬酰胺（N）、半胱氨酸（C），或者，修饰的精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）、赖氨酸（K）、苯丙氨酸（F）、丝氨酸（S）、天冬酰胺（N）、半胱氨酸（C），或者，非天然氨基酸；或者，

D93 突变为：色氨酸（W）、酪氨酸（Y）、苯丙氨酸（F）、甲硫氨酸（M）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、脯氨酸（P）、赖氨酸（K）、精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）或天冬酰胺（N），或者，修饰的色氨酸（W）、酪氨酸（Y）、苯丙氨酸（F）、甲硫氨酸（M）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、脯氨酸（P）、赖氨酸（K）、精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）或天冬酰胺（N），或者，非天然氨基酸；或者，

G95 突变为：脯氨酸（P）、色氨酸（W）、苯丙氨酸（F）、甲硫氨酸（M）、丙氨酸（A）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、赖氨酸（K）、精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）或天冬酰胺（N），或者，修饰的脯氨酸（P）、色氨酸（W）、苯丙氨酸（F）、甲硫氨酸（M）、丙氨酸（A）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、赖氨酸（K）、精氨酸（R）、谷氨酰胺（Q）或天冬酰胺（N），或者，非天然氨基酸；或者，

A104 突变为：脯氨酸（P）、苯丙氨酸（F）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、赖氨酸（K）或精氨酸（R），或者，修饰的脯氨酸（P）、苯丙氨酸（F）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、缬氨酸（V）、赖氨酸（K）或精氨酸（R），或者，非天然氨基酸。

18、根据权利要求 15-17 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体包含至少一种如下突变：

(1) G92K；(2) D93F；(3) G95L；(4) A104K。

19、根据权利要求 15-18 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体还包含 G92K、D93F、G95L 和 A104K 突变。

20、根据权利要求 15-19 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体还包含 SEQ ID NO: 1 第 80-91 位和/或 105-120 位任意一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。

21、根据权利要求 15-20 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体还包含 SEQ ID NO: 1 第 1-79 位和/或 121-191 位任意一个或多个氨基酸突变的氨基酸序列。

22、根据权利要求 15-21 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体还包含第 125 位天冬氨酸(D)的突变、第 141 位谷氨酸(E)的突变、第 146 位谷氨酸(E)的突变、第 110 位谷氨酸(E)的突变、第 76 位甘氨酸(G)的突变、第 78 位甘氨酸(G)的突变或第 133 位谷氨酰胺(Q)的突变中的一种或两种以上的组合。

23、根据权利要求 15-22 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体包含至少一种如下突变：

D125 突变为：赖氨酸(K)、谷氨酰胺(Q)、半胱氨酸(C)或天冬酰胺(N)，或者，修饰的赖氨酸(K)、谷氨酰胺(Q)、半胱氨酸(C)或天冬酰胺(N)，或者，非天然氨基酸；或者，

E141 突变为：赖氨酸(K)、天冬酰胺(N)或谷氨酰胺(Q)，或者，修饰的赖氨酸(K)、天冬酰胺(N)或谷氨酰胺(Q)，或者，非天然氨基酸；或者，

E146 突变为：精氨酸(R)、天冬酰胺(N)或谷氨酰胺(Q)，或者，修饰的精氨酸(R)、天冬酰胺(N)或谷氨酰胺(Q)，或者，非天然氨基酸；或者，

E110 突变为：苯丙氨酸(F)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、丙氨酸(A)或酪氨酸(Y)，或者，修饰的苯丙氨酸(F)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、丙氨酸(A)或酪氨酸(Y)，或者，非天然氨基酸；或者，

G76 突变为：丝氨酸（S）、苏氨酸（T）或精氨酸（R），或者，修饰的丝氨酸（S）、苏氨酸（T）或精氨酸（R），或者，非天然氨基酸；或者，

G78 突变为：丝氨酸（S）、苏氨酸（T）或精氨酸（R），或者，修饰的丝氨酸（S）、苏氨酸（T）或精氨酸（R），或者，非天然氨基酸；或者，

Q133 突变为：天冬酰胺（N）、丝氨酸（S）或苏氨酸（T），或者，修饰的天冬酰胺（N）、丝氨酸（S）或苏氨酸（T），或者，非天然氨基酸。

24、根据权利要求 15-23 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的孔蛋白包含 1-20 个 Mnep 单体变体，其中，所述的 Mnep 单体变体相同或不同。

25、根据权利要求 15-24 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的孔蛋白包含 Mnep 单体野生型。

26、根据权利要求 15-25 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的孔蛋白包含 1-20 个 Mnep 单体野生型。

27、根据权利要求 15-26 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的孔蛋白包含 4-10 个相同或不同的 Mnep 单体变体。

28、根据权利要求 15-27 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述的 Mnep 单体变体与 Mnep 单体变体、Mnep 单体野生型与 Mnep 单体野生型、Mnep 单体变体与 Mnep 单体野生型之间通过共价连接。

29、根据权利要求 15-28 任一所述的孔蛋白，其特征在于，所述孔蛋白的狭窄区孔道直径小于 18.7Å，优选的，所述的孔蛋白的狭窄区孔道直径小于 17.2Å。

30、一种编码权利要求 1-9 任一所述的 Mnep 单体变体、权利要求 10-14 任一所述构建体或者权利要求 15-29 任一所述的孔蛋白的核苷酸序列。

31、一种包含权利要求 30 所述核苷酸序列的载体。

32、根据权利要求 31 所述的载体，其特征在于，所述的载体包含与权利要求 1-9 任一所述的 Mnep 单体变体或者权利要求 10-14 任一所述构建体或者编码权利要求 15-29 任一所述的孔蛋白的核苷酸序列可操作性连接的启动子。

33、根据权利要求 32 所述的载体，其特征在于，所述的启动子为诱导型启动子或组成型启动子，其中，所述的诱导型启动子为乙酰胺诱导型启动子。

34、根据权利要求 31-33 任一所述的载体，其特征在于，所述编码孔蛋白的核苷酸序列包含编码 Mnep 单体变体的核苷酸序列。

35、根据权利要求 34 所述的载体，其特征在于，所述编码孔蛋白的核苷酸序列还包含至少一条编码 Mnep 单体变体和/或 Mnep 单体野生型的核苷酸序列。

36、根据权利要求 35 所述的载体，其特征在于，所述编码 Mnep 单体变体的核苷酸序列与编码 Mnep 单体变体的核苷酸序列，编码 Mnep 单体变体的核苷酸序列与编码 Mnep 单体野生型的核苷酸序列，或者，编码 Mnep 单体野生型的核苷酸序列与编码 Mnep 单体野生型的核苷酸序列之间通过编码氨基酸连接体序列连接。

37、一种表达权利要求 1-9 任一所述的 Mnep 单体变体、权利要求 10-14 任一所述构建体或权利要求 15-29 任一所述的孔蛋白的突变细菌，其特征在于，所述的细菌包含：

(a) Mnep 单体野生型的缺失；和 (b) 权利要求 31-36 任一所述的载体。

38、根据权利要求 37 所述的突变细菌，其特征在于，所述的细菌为新金色分枝杆菌。

39、一种产生 Mnep 孔蛋白的方法，其特征在于，所述的方法包括用包含权利要求 31-36 任一所述的载体转化权利要求 37-38 任一所述的细菌，诱导细菌表达 Mnep 孔蛋白。

40、一种表征目标多核苷酸的方法，其特征在于，包括：

(a) 将目标多核苷酸与权利要求 15-29 任一所述的孔蛋白接触，使得所述目标多核苷酸序列穿过孔蛋白；和

(b) 获取目标多核苷酸穿过孔蛋白时核苷酸与孔蛋白相互作用的一个或多个特征，以表征所述目标多核苷酸。

41、根据权利要求 40 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (a) 中还包括目标多核苷酸与核酸结合蛋白、解旋酶、聚合酶、反转录酶、转位酶、核酸外切酶、端粒酶和/或拓扑异构酶中的一种或两种以上的组合接触的步骤，使得所述目标多核苷酸序列穿过孔蛋白的转位速度小于核酸结合蛋白、解旋酶、聚合酶、反转录酶、转位酶、核酸外切酶、端粒酶

和/或拓扑异构酶不存在时的转位速度。

42、根据权利要求 40 或 41 所述的方法，其特征在于，所述的方法还包括横跨目标多核苷酸接触的孔蛋白施加电势差的步骤。

43、一种权利要求 15-29 任一所述的孔蛋白、权利要求 1-9 任一所述的 Mnep 单体变体、权利要求 10-14 任一所述构建体、权利要求 30 所述的核苷酸序列、权利要求 31-36 任一所述的载体或者权利要求 37-38 任一所述的突变细菌在表征目标多核苷酸中的应用。

44、一种表征目标多核苷酸的试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒包括权利要求 15-29 任一所述的孔蛋白、权利要求 1-9 任一所述的 Mnep 单体变体、权利要求 10-14 任一所述构建体、权利要求 30 所述的核苷酸序列、权利要求 31-36 任一所述的载体或者权利要求 37-38 任一所述的突变细菌。

45、一种表征目标多核苷酸的装置，其特征在于，所述的装置包括权利要求 15-29 任一所述的孔蛋白、权利要求 1-9 任一所述的 Mnep 单体变体、权利要求 10-14 任一所述构建体、权利要求 30 所述的核苷酸序列、权利要求 31-36 任一所述的载体或者权利要求 37-38 任一所述的突变细菌。