(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2024 年 7 月 4 日 (04.07.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/138425 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/265 (2006.01) *G01N 27/447* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12Q 1/6869* (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/142827

(22) 国际申请日: 2022 年 12 月 28 日 (28.12.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深 圳 华 大 生 命 科 学 研 究 院 (**BGI SHENZHEN**) [CN/CN]; 中 国 广 东 省 深 圳 市 盐 田 区 盐 田 街 道 北 山 工 业 区 综 合 楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 董宇亮 (**DONG, Yuliang**); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 罗婉婷(**LUO, Wanting**); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 章佳文(**ZHANG, Jiawen**); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 郭斐(**GUO, Fei**); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 曾涛(**ZENG, Tao**); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 王乐乐(**WANG, Lele**); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 季州翔(**JI, Zhouxiang**); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 黎宇翔(**LI, Yuxiang**); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 章文蔚(**ZHANG, Wenwei**); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 徐讯 (**XU, Xun**); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北 京 纪 凯 知 识 产 权 代 理 有 限 公 司 (**JEEKAI&PARTNERS**); 中国北京市丰台区广安路9号5号楼15A层, Beijing 100055 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** NOVEL NANOPORE PROTEIN AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种新型纳米孔蛋白及其应用

(57) **Abstract:** Provided is a nanopore protein BCP22, which is (a), (b) or (c): a) a protein having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1; b) a protein having more than 70% identity to SEQ ID NO: 1 and having the function of SEQ ID NO: 1; and c) a fusion protein obtained by adding a tag to the end of the protein sequence as shown in a) or b), and can be applied to nanopore sequencing for detecting small molecules, DNA, RNA, polypeptides and the like.

(57) 摘要: 提供一种纳米孔蛋白BCP22，是如下(a)、(b)或(c):a)具有如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的蛋白质;b)与SEQ ID NO:1具有70%以上同一性且具有SEQ IDNO:1功能的蛋白质5c)在a)或b)所示蛋白序列的末端添加标签得到的融合蛋白，可应用于纳米孔测序，针对小分子、DNA、RNA及多肽等进行检测。

WO 2024/138425 A1

一种新型纳米孔蛋白及其应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及一种新型纳米孔蛋白及其应用。

背景技术

纳米孔测序是近年来新兴起的第三代测序技术，由于其长读长、高通量、低成本和便携性等优势，给基因测序行业带来了颠覆性的改变。纳米孔测序技术在生命科学基础理论研究以及生物医学临床实践中具有广泛的应用。

该技术可同时应用于 DNA、RNA 及蛋白质测序，通过实时记录待测物逐一通过纳米孔蛋白时产生的连续阻滞产生的电信号，经解析转换为序列信息从而实现测序。该技术在测序速度、通量、便携性、直接 RNA 测序上均有较高优势，近年来获得了广泛关注。

纳米孔测序要求孔道蛋白内部传感区域足够锐利，以在横向与纵向上均有高的空间分辨能力。目前研究的孔道蛋白中，潜在可用于测序的主要有三类：细菌或其它机体产生的破坏细胞膜通透性的成孔毒素（pore-forming toxin）蛋白，作为细胞内外各种生物大分子与小分子物质运输通道的转运（transporter）蛋白，为病毒侵染宿主时提供基因组输运通道的病毒连接体（viral connector）。

天然的纳米孔蛋白一般具有成孔道的能力，但是在重组蛋白的体外表达纯化系统中，重组纳米孔蛋白的孔道稳定性不一定可以满足单分子检测器相关仪器产品的需求。同时，天然纳米孔蛋白的孔径分布范围较广，不一定满足单分子检测的需求，导致测序准确度不够高。天然纳米孔蛋白孔道内壁氨基酸残基的性质，尤其是带电性质，不一定满足特定待测物的性质。

通过基因发掘的方法找到更多优异的测序纳米孔蛋白，仍是一个尚待解决的问题。

发明公开

本发明的目的是提供孔蛋白。

第一个方面，本发明提供了一种孔蛋白，是如下（a）、（b）或（c）：

a）具有如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的蛋白质；

b）与 SEQ ID NO:1 具有 70%以上同一性且具有 SEQ ID NO:1 功能的蛋白质；

c）在 a）或 b）所示蛋白序列的末端添加标签得到的融合蛋白。

上文的孔蛋白中，第一种 b）所示的蛋白为 a）所示蛋白的突变体，其与 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列相比，所述突变体在如下一个或多个位点的氨基酸残基发生突变：66、67、71 和 72。

上文的孔蛋白中，所述各个位点的突变方式如下：

第 66 位的 N 突变为 A, G 或 S （位于 sensor 处）；

第 67 位的 D 突变为 A, G, S, T, N 或 Q （位于 sensor 处）；

第 71 位的 E 突变为 A, G, S, T, N 或 Q（位于 sensor 处）；

第 72 位的 Y 突变为 A, G, S, T, N 或 Q（位于 sensor 处）。

上文的孔蛋白中，第二种 b）所示的蛋白为 a）所示蛋白的突变体，其与 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列相比，所述突变体在如下一个或多个位点的氨基酸残基发生突变：102,111,112, 113, 116, 119, 120, 123,129, 162,170,173, 175, 204,212, 217, 218, 221 和 224。

或，上文的孔蛋白中，所述孔蛋白为与上述第一种 b）所示的蛋白（即与 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列相比，所述突变体在如下一个或多个位点的氨基酸残基发生突变：66、67、71 和 72）相比，进一步在如下一个或多个位点的氨基酸残基发生突变：102,111,112, 113, 116, 119, 120, 123,129, 162,170,173, 175, 204,212, 217, 218, 221 和 224。

上文的孔蛋白中，所述各个位点的突变的方式如下：

第 102 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q（入口处）；

第 111 位的 E 突变为 R ,K, A, G, S, T, N 或 Q （入口处）；

第 112 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q（入口处）；

第 113 位的 K 突变为 A, G, S, T, N 或 Q（入口处）；

第 116 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q（入口处）；

第 119 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q（入口处）；

第 120 位 D 的突变为 A, G, S, T, N 或 Q（入口处）；

第 123 位的 K 突变为 A, G, S, T, N 或 Q（入口处）；

第 129 位的 K 突变为 A, G, S, T, N 或 Q（入口处）；

第 162 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q （桶内壁）；

第 170 位的 S 突变为 A, G, V, L, I, Y, F 或 W （跨膜区）；

第 173 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q （桶内壁）；

第 175 位的 D 突变为 A, G, S, T, N 或 Q（桶内壁） ；

第 204 位的 S 突变为 A, G, V, L, I, Y, F 或 W（跨膜区） ；

第 212 位的 K 突变为 D, E, A, G, S, T, N 或 Q （出口 loop）；

第 217 位的 D 突变为 A, G, S, T,N 或 Q （出口 loop）；

第 218 位的 K 突变为 D, E, A, G, S, T, N 或 Q（出口 loop）；

第 221 位的 E 突变为 A, G, S, T, N 或 Q （桶内壁）；

第 224 位的 T 突变为 A, G, V, L, I, Y, F 或 W （跨膜区）。

上文中的孔蛋白以多聚体的形式存在；

进一步地，所述孔蛋白以 9 聚体的形式存在；

上文中的孔蛋白形成的孔径为 0.5-3 nm；

进一步地，所述孔蛋白形成的孔径为 1-2nm。

第二个方面，本发明提供了编码第一个方面的所述孔蛋白的核酸分子。

第三个方面，本发明提供了含有第二个方面的所述核酸分子的表达盒、重组载体或转基因细胞系。

第四个方面，本发明提供了一种重组菌，其含有第二个方面所述核酸分子。

第五个方面，本发明提供了第二个方面所述核酸分子或第三个方面所述的表达盒、重组载体或转基因细胞系或第四个方面所述重组菌在制备孔蛋白中的应用。

第六个方面，本发明提供了第一个方面所述孔蛋白在制备纳米生物传感器中的应用。

第七个方面，本发明提供了一种纳米生物传感器，包括第一个方面的所述孔蛋白和脂双分子层。

第八个方面，本发明提供了第一个方面所述孔蛋白、第二个方面所述核酸分子或第三个方面所述的表达盒、重组载体或转基因细胞系或第四个方面所述重组菌或第七个方面所述的纳米生物传感器在核酸纳米孔测序

中的应用。

第九个方面，本发明提供了一种制备生产第一个方面所述孔蛋白的方法，包括如下步骤：培养第四个方面所述重组菌，再进行诱导处理，得到第一个方面所述孔蛋白。

第十个方面，本发明提供了一种试剂盒，包括第一个方面所述孔蛋白。

上文所述试剂盒还包括如下至少一种：含有解旋酶识别位点的接头、解旋酶和带有胆固醇的单链 DNA。

第十一个方面，本发明提供了一种纳米孔测序核酸的方法，包括如下步骤：

1）制备含有解旋酶的测序文库和纳米孔生物传感器；

所述纳米孔生物传感器按照如下方法制备：将第一个方面所述孔蛋白插入脂双分子层中形成纳米孔通道，构建出纳米孔生物传感器；

2）将所述含有解旋酶的测序文库、带有胆固醇的单链 DNA 和测序缓冲液混合后加入所述纳米孔生物传感器中，施加电压，实现捕获测序文库。

上文方法中，所述含有解旋酶的测序文库按照如下方法制备：将待测核酸连接接头，制备测序文库，再将所述测序文库与解旋酶结合，得到含有解旋酶的测序文库；其中，所述接头由两条单链 DNA 分子退火获得，且所述单链 DNA 分子中含有解旋酶结合位点。

在本发明的实施例中，上述接头或含有解旋酶识别位点的接头具体由 SEQ ID No.2 所示的单链 DNA 分子和 SEQ ID No.3 所示的单链 DNA 分子退火后形成；

在本发明的实施例中，上述解旋酶具体为 SEQ ID No.5 所示的 BCH105；

在本发明的实施例中，上述带有胆固醇的单链 DNA 的核苷酸序列具体为 SEQ ID NO：4，且胆固醇连接在 DNA 的 5’端；

在本发明的实施例中，上述测序缓冲液配方具体为：0.47 M KCl、25mM HEPES、1 mM EDTA、5mM ATP、25mM MgCl2、余量为水，pH7.6。

上文方法中，所述纳米孔通道的孔径为 0.5-3 nm。

进一步地，所述孔蛋白形成的孔径为 1-2nm。

下面结合实施例对本发明作进一步地说明。

附图说明

图 1 为 Alphafold2 multimer 预测得到的 BCP22 的三维结构（sideview）。

图 2 为 Alphafold2 multimer 预测得到的 BCP22 的三维结构（top view）。

图 3 为 BCP22 sensor 区的重点氨基酸的 alphafold2 multimer 预测结构示意图。

图 4 为 BCP22 预测结构中 sensor 区的重点氨基酸示意图。

图 5 为 BCP22 预测结构中跨膜区的重点氨基酸示意图。

图 6 为 BCP22 预测结构中入口区的重点氨基酸示意图

图 7 为 BCP22 预测结构中出口区和桶内壁的重点氨基酸示意图。

图 8 为 BCP22 的纯化得到的蛋白。

图 9 为测序文库结构示意图（ a：top strand；b：bottom strand；c：双链目的片段；d：解旋酶 BCH105；e：chol-ssDNA）；图 9A：测序文库示意图；图 9B：chol-ssDNA 与测序文库的结合模式示意图。

图 10 为 BCP22 在磷脂双分子层中的不同电压下的开孔电流。

图 11 为待测 DNA 穿过纳米孔 BCP22 的电流 trace。

实施发明的最佳方式

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

实施例 1、野生型 BCP22 蛋白的发现及 Alphafold2 multimer 的预测结构

发明人从深海宏基因组中挖掘得到一种BCP22蛋白，其氨基酸序列为SEQ ID No.1，该蛋白编码的基因的核苷酸序列为SEQ ID No.7。

利用alphafold2 multimer对BCP22(SEQ ID No.1)进行九聚体的结构预测。

预测结果如图1和图2所示，图1为BCP22预测结构的sideview，图2为BCP22预测结构的top view。从图1和图2可以看出，BCP22蛋白为九聚体形式，且孔径大小为1-2nm。

基于常识，sensor区的氨基酸的组成对于电流信号的产生起到决定性作用。图 3 和图4为BCP22预测结构的sensor区的重要氨基酸的侧链结构，

显示出氨基酸侧链的四个氨基酸分别为N66, D67, E71, Y72。中间数字未两个蛋白单体的这三个氨基酸侧链之间的距离。单位为埃。

基于常识，孔蛋白跨膜区朝向膜方向的氨基酸更加偏好于疏水氨基酸，而带电荷氨基酸和极性氨基酸可能会影响插孔效率。图5展示了BCP22跨膜区存在的三个朝向膜方向的带电荷或极性氨基酸，它们分别为S170, S204, T224。

基于常识，由于核酸带负电，所以如果孔蛋白入口处的氨基酸为正电的话可以增加纳米孔测序的文库捕获率，反之，则可以降低文库捕获率。同时孔蛋白结合强弱对测序速度和测序电流信号也会有一定影响。图6展示了BCP22单体入口区的一些重要的氨基酸，它们分别为; R102, E111, R112, K113, R116, R119, D120, K123, K129。

同时，桶内壁和出口的一些氨基酸对待测物顺利穿孔和离开纳米孔具有影响，图7展示了BCP22单体的桶内壁和出口的一些可能影响待测物顺利穿孔的氨基酸，尤其是带电荷的氨基酸，他们分别是R162, R173, D175, K212, D217, K218, E221。

因此，野生型BCP22蛋白可以在上述关键氨基酸残基进行突变得到突变体，预测其具有野生型BCP22蛋白的功能。

上述突变体可以为在SEQ ID No.1所示蛋白基础上进行如下一个或多个位点的氨基酸残基发生突变：66，67，71，72，102,111,112, 113, 116, 119, 120, 123,129, 162,170,173, 175, 204,212, 217, 218, 221和224；

突变体也可以为在SEQ ID No.1所示蛋白基础上进行如下一个或多个位点的氨基酸残基发生突变得到的突变蛋白：66，67，71，72，再进一步在该突变蛋白的基础上进行如下一个或多个位点的氨基酸残基发生突变：102,111,112, 113, 116, 119, 120, 123,129, 162,170,173, 175, 204,212, 217, 218, 221和224。

实施例2、野生型BCP22蛋白的获得

一、表达野生型 BCP22 蛋白的质粒

表达野生型 BCP22 蛋白的质粒为将野生型 BCP22 蛋白的编码基因(SEQ ID No.7）插入 pET24a 载体的 NdeI 和 XhoI 位点间得到的载体，该载体表达 C 端融合 StrepII 标签的野生型 BCP22 的融合蛋白，StrepII 标签用于

蛋白纯化。

通过定点突变的方法，采用Agilent定点突变试剂盒，以表达野生型BCP22蛋白的质粒为模板，构建相应的突变体.

二、孔蛋白BCP22菌株的培养和诱导

将上述一构建好的表达野生型BCP22蛋白的质粒转化到大肠杆菌表达菌株 E.*coli* BL21 (*DE3*)中，得到转化后菌液。再将转化后菌液均匀涂抹在含 50μg/mL 卡那霉素的平板上，37℃过夜培养。次日挑取单菌落于含50μg/mL 卡那霉素的 5ml LB 培养基中，37℃，200rpm，过夜培养。将上述所得菌液,按 1:100 接种于含有 50μg/mL 卡那霉素的 50ml LB 中,37℃，200rpm，培养 4h。将扩大培养的菌液，按 1:100 接种于含有 50μg/mL 卡那霉素的 2L LB 中，37℃，200rpm 培养，待 OD600 值达 0.6-0.8 左右，加入终浓度为 0.5mM 的 IPTG，16℃，200rpm，培养约 18h。将菌液于 8000rpm 离心 10 分钟收集菌体，冻存于-20℃待用，得到孔蛋白 BCP22 菌株。

三、重组型孔蛋白 BCP22 提取及纯化

1、纯化Buffer配制

Buffer A：20mM Tris-HCl，250mM NaCl，1% DDM，余量为水，pH 8.0。

Buffer B：20mM Tris-HCl，250mM NaCl，0.05% DDM，余量为水，pH 8.0。

Buffer C：20mM Tris-HCl，250mM NaCl，0.05% DDM，5mM脱硫生物素，余量为水，pH 8.0。

2、纯化

按1g孔蛋白BCP22菌株菌体加10ml Buffer A的比例充分重悬上述收集的各个菌体，超声破碎细胞至菌体溶液澄清。旋转仪上4℃旋转过夜。次日18000rpm 4℃离心1h，取上清，0.22μm滤膜过滤后于4℃待用。

用AKTA pure将Strep-Tactin beads (IBA Lifesciences) 层析柱用Buffer A平衡5CV后，2ml/min上样。上样完成后，Buffer B冲洗20CV，使用Buffer C 洗脱,收集洗脱液（含有目的蛋白）。

将上述Strep柱亲和层析后的洗脱液（含有目的蛋白）浓缩至1ml，过经buffer B平衡的Superdex 6 increase 10/300GL (Cytiva)柱子，收集目的蛋白，随后储存于-80℃，得到纯合后的目的蛋白溶液。

将纯化后获得的目的蛋白溶液进行SDS-PAGE电泳。

结果如图8所示，2、3泳道分别是煮前和95℃煮后目的蛋白溶液上样液的跑胶条带，结果显示目标蛋白未煮的情况下蛋白条带在点样孔附近，具有较大的分子量，煮后为大小为30 KD左右，与预期目的蛋白相同，这就表明，目标蛋白未煮的情况下为聚体状态，煮后呈现单体状态。

经过检测，目的蛋白溶液的浓度为1.0 mg/mL。

实施例3、BCP22蛋白及其突变体作为孔蛋白在纳米孔测序中的应用

一、文库构建

将两条部分区域互补的DNA链（top strand（SEQ ID No.2，其中Y = iSP18）和 bottom strand （SEQ ID No.3）退火后形成接头（如图 9 所示），再与待测双链目的片段（SEQ ID No.6）利用T4 DNA连接酶在室温下连接并纯化，制备测序文库。然后该测序文库与解旋酶BCH105（SEQ ID No.5）在 25℃孵育 1h（测序文库与解旋酶BCH105的摩尔浓度比 1:8），形成含有BCH105马达蛋白的测序文库（如图9A所示）。在测序时，该测序文库能够进一步与带有胆固醇的单链 DNA（SEQ ID NO：4，胆固醇连接在DNA的5’端）互补配对结合，形成如图9B所示结构。

二、利用孔蛋白BCP22及其突变体构建纳米孔生物传感器

使用膜片钳放大器采集电流信号。Ag/AgCl电极浸润在测序缓冲液中并且电极分别位于电解槽cis和trans区域。测序文库和纳米孔等试剂加入到cis区域中。

使用1xPBS缓冲液将实施例2获得的孔蛋白BCP22稀释一定的倍数后，在外加电场力作用下将单个纳米孔蛋白插入由二脂酰磷脂酰胆碱（DPhPC，1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）组成的磷脂双分子层中，形成纳米孔生物传感器。

施加外加电压，获得单个孔蛋白的电流振幅值。

图10为施加0.02V、0.04V、0.10V、0.14V和0.18V电压时野生型BCP22的纳米孔生物传感电流（从左到后的图依次为0.02V、0.04V、0.10V、0.14V和0.18V电压），表明BCP22蛋白可以插到膜上，然后中间的孔道可以允许离子通过，产生开孔电流，并且开孔电流的噪声比较小。

三、利用孔蛋白BCP22用于DNA测序

将上述一制备的含有 BCH105 马达蛋白的测序文库和带有胆固醇的单

链 DNA(SEQ ID No.4)与测序缓冲液混合并加入上述二制备的纳米孔生物传感器中；施加外加电压 0.14V 或 0.18V 后，观察到 DNA 被纳米孔捕获，产生特征的阻滞电流振幅值。并且随着 DNA 通过纳米孔移动，电流振幅值改变。不同的 DNA 序列产生不同的阻滞电流振幅值。带有胆固醇的单链 DNA 可以与磷脂双分子层进行结合，有助于纳米孔捕获测序文库，降低测序文库上样量。

测序缓冲液：0.47 M KCl、25mM HEPES、1 mM EDTA、5mM ATP、25mM MgCl2、余量为水，pH7.6。

图 11 为在外加电压 0.14V 作用下，文库 DNA 穿过纳米孔蛋白 BCP22 时产生的电流变化，表明了野生型蛋白 BCP22 可以作为纳米孔，用于纳米孔测序。

工业应用

本发明通过计算机辅助结构预测的基因挖掘手段，从深海宏基因组中挖掘得到一种纳米孔蛋白BCP22，通过蛋白制备和纳米孔测序验证，表明其具有应用于纳米孔测序的能力，可以针对小分子、DNA、RNA及多肽等的进行检测。

权利要求

1、一种孔蛋白，是如下（a）、（b）或（c）：

a）具有如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的蛋白质；

b）与 SEQ ID NO:1 具有 70%以上同一性且具有 SEQ ID NO:1 功能的蛋白质；

c）在 a）或 b）所示蛋白序列的末端添加标签得到的融合蛋白。

2、根据权利要求 1 所述的孔蛋白，其特征在于：

b）所示的蛋白为 a）所示蛋白的突变体，其与 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列相比，所述突变体在如下一个或多个位点的氨基酸残基发生突变：66、67、71 和 72。

3、根据权利要求 2 所述的孔蛋白，其特征在于：

所述各个位点的突变方式如下：

第 66 位的 N 突变为 A, G 或 S ；

第 67 位的 D 突变为 A, G, S, T, N 或 Q ；

第 71 位的 E 突变为 A, G, S, T, N 或 Q；

第 72 位的 Y 突变为 A, G, S, T, N 或 Q。

4、根据权利要求 1 所述的孔蛋白，其特征在于：

b）所示的蛋白为 a）所示蛋白的突变体，其与 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列相比，所述突变体在如下一个或多个位点的氨基酸残基发生突变：102,111,112, 113, 116, 119, 120, 123,129, 162,170,173, 175, 204,212, 217, 218, 221 和 224。

5、根据权利要求 2 或 3 所述的孔蛋白，其特征在于：

所述孔蛋白为与权利要求 2 或 3 所述的孔蛋白相比，在如下一个或多个位点的氨基酸残基发生突变：102,111,112, 113, 116, 119, 120, 123,129, 162,170,173, 175, 204,212, 217, 218, 221 和 224。

6、根据权利要求 5 所述的孔蛋白，其特征在于：

所述各个位点的突变的方式如下：

第 102 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q；

第 111 位的 E 突变为 R ,K, A, G, S, T, N 或 Q ；

第 112 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q;

第 113 位的 K 突变为 A, G, S, T, N 或 Q;

第 116 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q;

第 119 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q;

第 120 位 D 的突变为 A, G, S, T, N 或 Q;

第 123 位的 K 突变为 A, G, S, T, N 或 Q;

第 129 位的 K 突变为 A, G, S, T, N 或 Q;

第 162 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q ;

第 170 位的 S 突变为 A, G, V, L, I, Y, F 或 W ;

第 173 位的 R 突变为 A, G, S, T, N 或 Q ;

第 175 位的 D 突变为 A, G, S, T, N 或 Q ;

第 204 位的 S 突变为 A, G, V, L, I, Y, F 或 W ;

第 212 位的 K 突变为 D, E, A, G, S, T, N 或 Q ;

第 217 位的 D 突变为 A, G, S, T,N 或 Q ;

第 218 位的 K 突变为 D, E, A, G, S, T, N 或 Q;

第 221 位的 E 突变为 A, G, S, T, N 或 Q ;

第 224 位的 T 突变为 A, G, V, L, I, Y, F 或 W 。

7、根据根据权利要求 1-6 中任一所述的孔蛋白，其特征在于：

所述孔蛋白以多聚体的形式存在；

进一步地，所述孔蛋白以 9 聚体的形式存在；

或，所述孔蛋白形成的孔径为 0.5-3 nm;

进一步地，所述孔蛋白形成的孔径为 1-2nm。

8、编码权利要求 1-7 中任一所述孔蛋白的核酸分子。

9、含有权利要求 8 所述核酸分子的表达盒、重组载体或转基因细胞系。

10、一种重组菌，其含有权利要求 8 所述核酸分子。

11、权利要求 8 所述核酸分子或权利要求 9 所述的表达盒、重组载体或转基因细胞系或权利要求 10 所述重组菌在制备孔蛋白中的应用。

12、权利要求 1-7 中任一所述孔蛋白在制备纳米生物传感器中的应用。

13、一种纳米生物传感器，包括权利要求 1-7 中任一所述孔蛋白和脂

双分子层。

14、权利要求 1-7 中任一所述孔蛋白、权利要求 8 所述核酸分子或权利要求 9 所述的表达盒、重组载体或转基因细胞系或权利要求 10 所述重组菌或权利要求 13 所述的纳米生物传感器在核酸纳米孔测序中的应用。

15、一种制备生产权利要求 1-7 中任一所述孔蛋白的方法，包括如下步骤：培养权利要求 10 所述重组菌，再进行诱导处理，得到权利要求 1-7 中任一所述孔蛋白。

16、一种试剂盒，包括权利要求 1-7 中任一所述孔蛋白。

17、根据权利要求 16 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括如下至少一种：含有解旋酶识别位点的接头、解旋酶和带有胆固醇的单链 DNA。

18、一种纳米孔测序核酸的方法，包括如下步骤：

1）制备含有解旋酶的测序文库和纳米孔生物传感器；

所述纳米孔生物传感器按照如下方法制备：将权利要求 1-7 中任一所述孔蛋白插入脂双分子层中形成纳米孔通道，构建出纳米孔生物传感器；

2）将所述含有解旋酶的测序文库、带有胆固醇的单链 DNA 和测序缓冲液混合后加入所述纳米孔生物传感器中，施加电压，实现捕获测序文库。

19、根据权利要求 18 所述的方法，其特征在于：

所述含有解旋酶的测序文库按照如下方法制备：将待测核酸连接接头，制备测序文库，再将所述测序文库与解旋酶结合，得到含有解旋酶的测序文库；其中，所述接头由两条单链 DNA 分子退火获得，且所述单链 DNA 分子中含有解旋酶结合位点。

20、根据权利要求 18 或 19 所述的方法，其特征在于：

所述纳米孔通道的孔径为 0.5-3 nm。

图 1

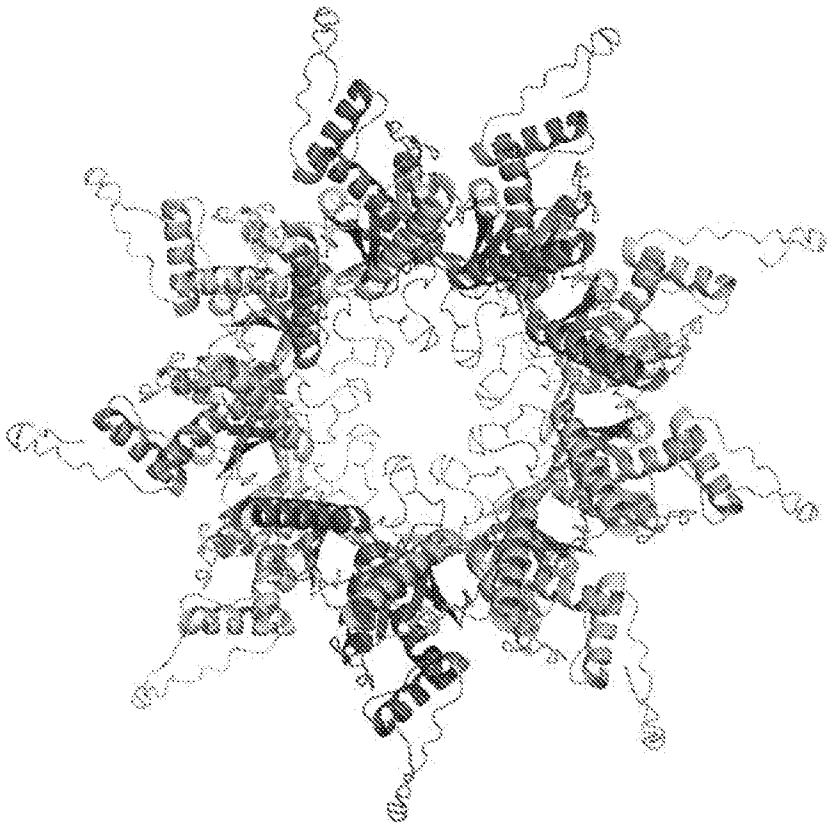


图 2

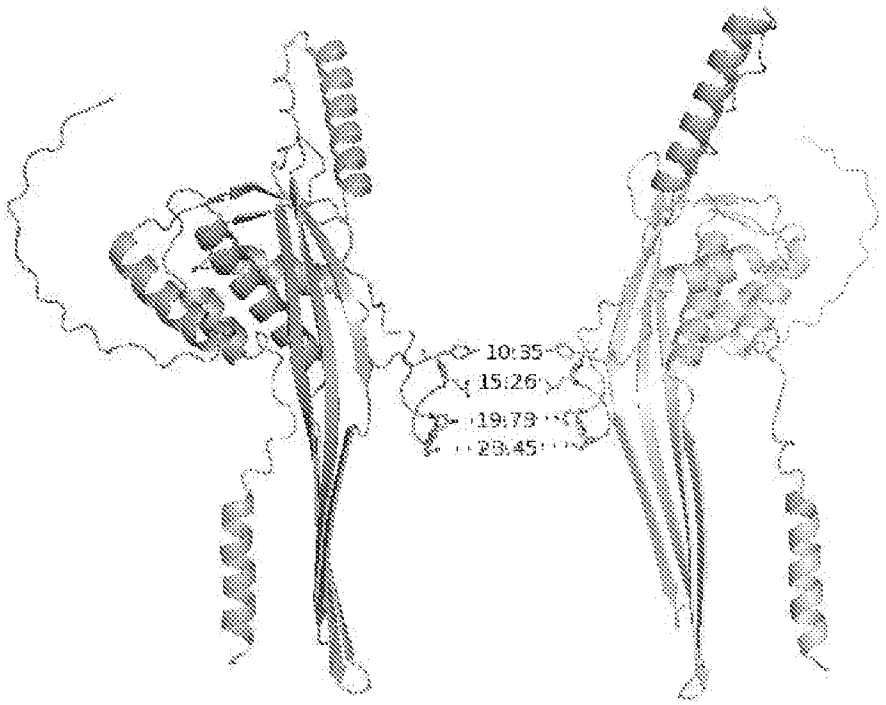


图 3

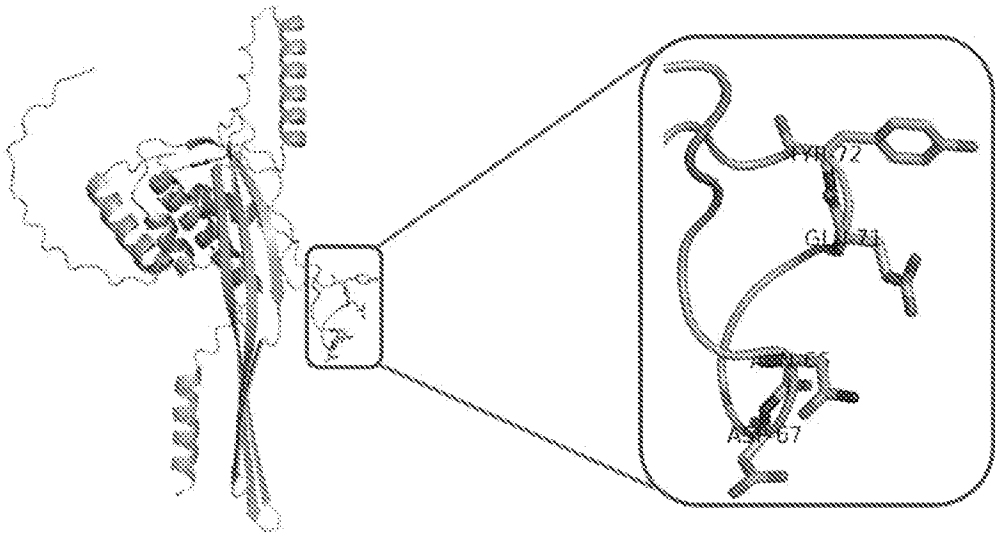


图 4

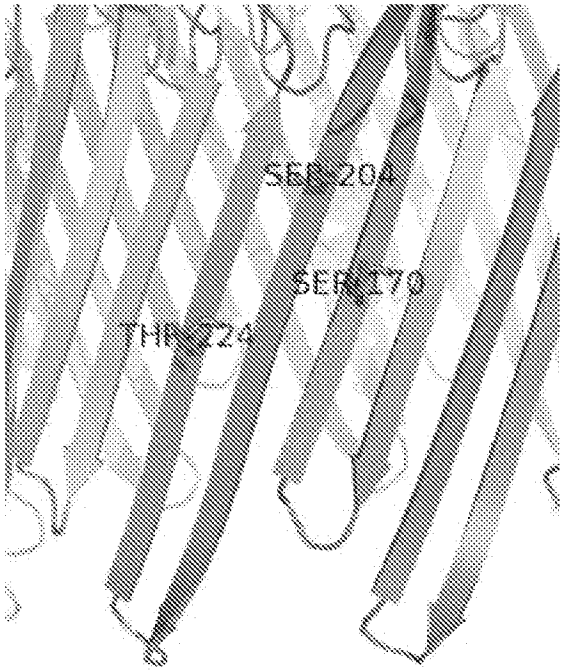


图 5

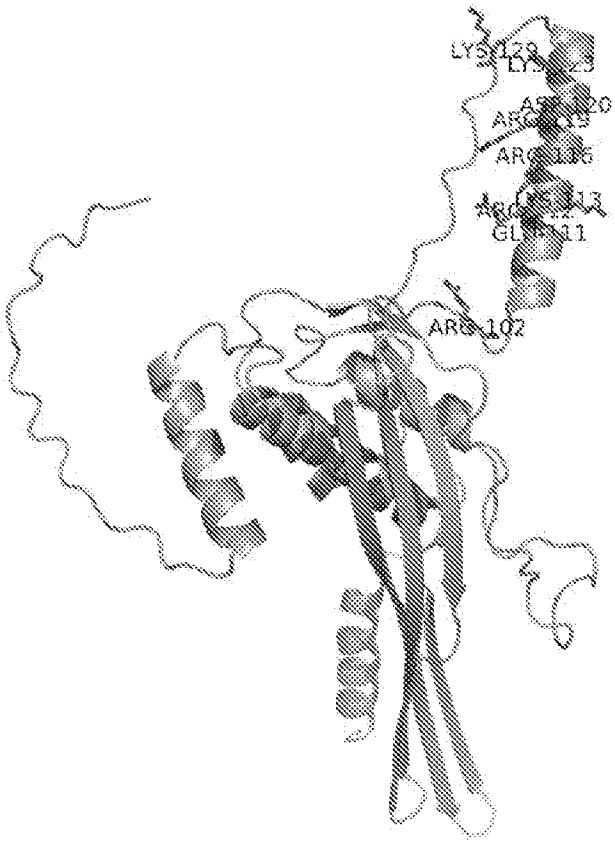


图 6

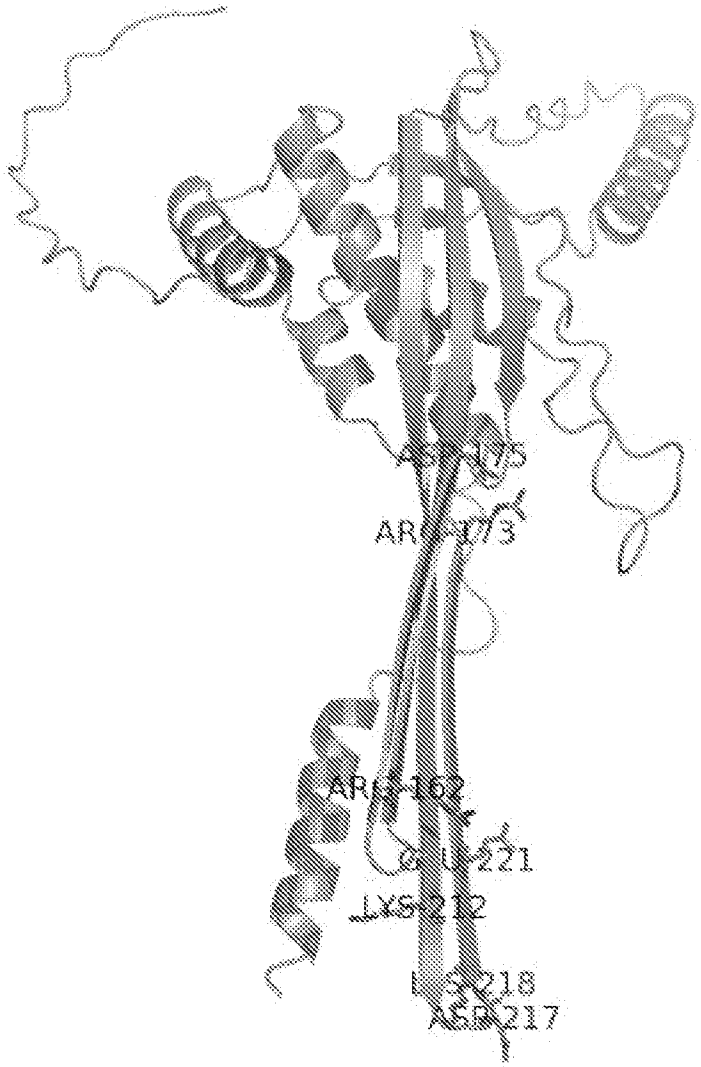

ASP 175
ARG 173
ARG 162
GLU 221
LYS 212
LYS 218
ASP 217

图 7

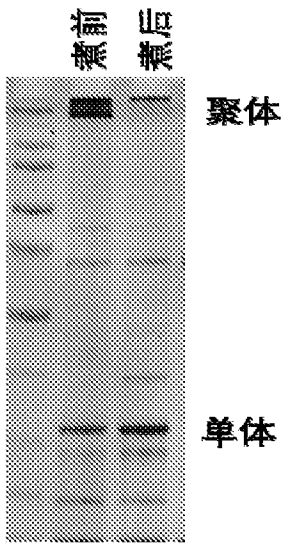
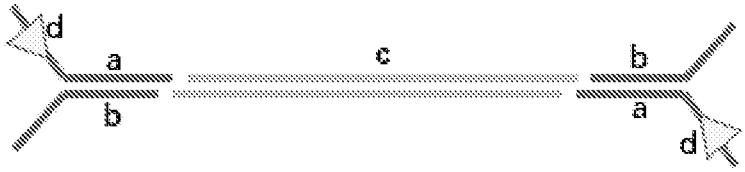

煮沸
煮沸
聚体
单体

图 8

9A


d
a
c
b
b
a
d

9B

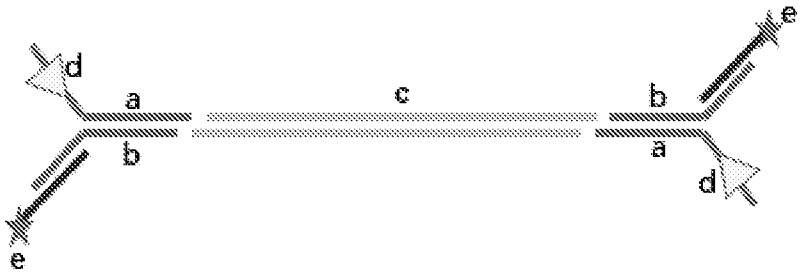

e
d
a
c
b
b
a
d
e

图 9

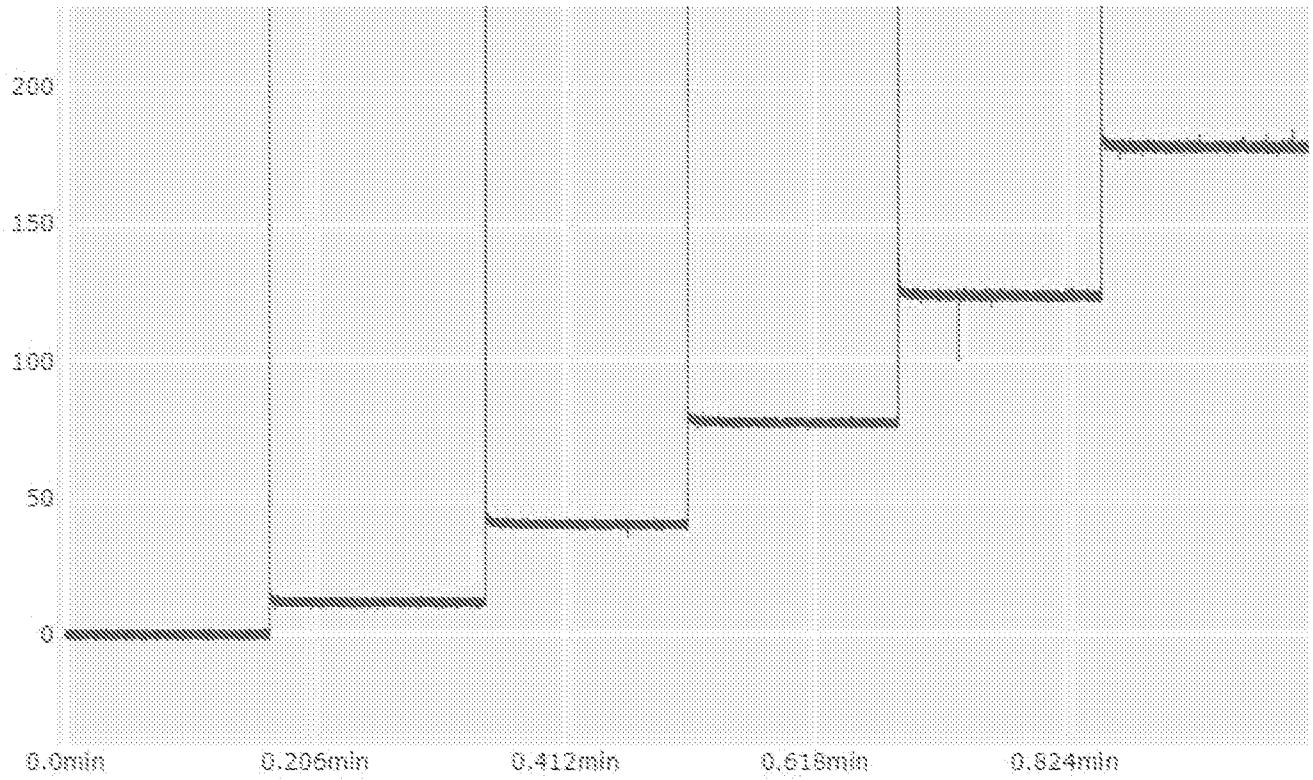

200
150
100
50
0
0.0min
0.206min
0.412min
0.618min
0.824min

图 10

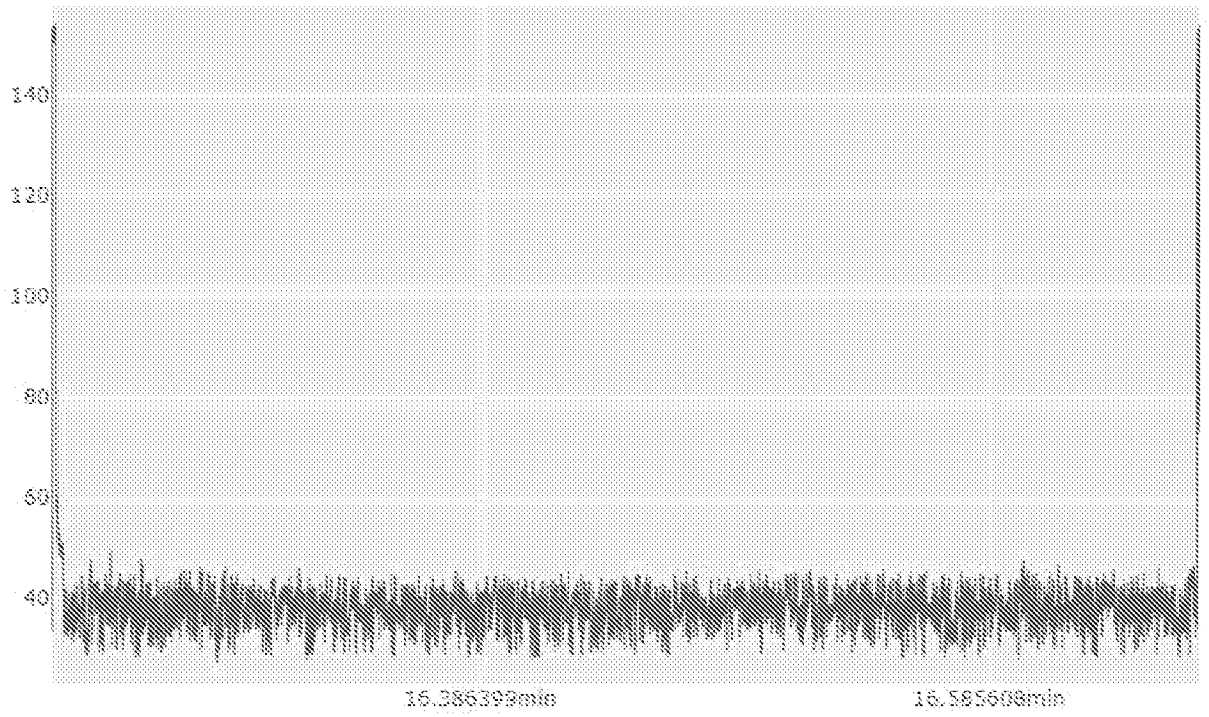


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/142827

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/265(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; G01N27/447(2006.01)i; G01N33/68(2006.01)i; C12Q1/6869(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K C12N G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System, Genbank, EMBL, STN: 孔蛋白, pore, porin, 突变, mutation, mutant, SEQ ID No: 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110914290 A (VIB VZW; VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL; OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LTD.) 24 March 2020 (2020-03-24) abstract, and claims, and embodiments, and sequence tables	1-20
A	CN 113480620 A (CHENGDU QITAN TECHNOLOGY CO., LTD.) 08 October 2021 (2021-10-08) claims, and embodiments, and sequence tables	1-20
A	CN 102216783 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON; THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 12 October 2011 (2011-10-12) claims, and embodiments	1-20
A	CN 108699138 A (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LTD.) 23 October 2018 (2018-10-23) claims, and embodiments	1-20
A	CN 105801676 A (SOUTHEAST UNIVERSITY) 27 July 2016 (2016-07-27) claims, and embodiments	1-20

✓ Further documents are listed in the continuation of Box C.

✓ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 August 2023	**02 September 2023**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110621692 A (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LTD.; VIB VZW; VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL) 27 December 2019 (2019-12-27) claims, and embodiments	1-20
A	CN 111499705 A (SHENZHEN MEILI NANOPORE TECHNOLOGY CO., LTD.) 07 August 2020 (2020-08-07) claims, and embodiments	1-20
A	CN 113195736 A (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LTD.; VIB VZW; VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL) 30 July 2021 (2021-07-30) claims, and embodiments	1-20
A	CN 113735948 A (CHENGDU QITAN TECHNOLOGY CO., LTD.) 03 December 2021 (2021-12-03) claims, and embodiments	1-20
A	CN 113754743 A (CHENGDU QITAN TECHNOLOGY CO., LTD.) 07 December 2021 (2021-12-07) claims, and embodiments	1-20
A	CN 113773373 A (CHENGDU FLUSH TECHNOLOGY CO. LTD.) 10 December 2021 (2021-12-10) claims, and embodiment	1-20
A	CN 113896776 A (CHENGDU QITAN TECHNOLOGY CO., LTD.) 07 January 2022 (2022-01-07) claims, and embodiments	1-20
A	CN 113912683 A (CHENGDU QITAN TECHNOLOGY CO., LTD.) 11 January 2022 (2022-01-11) claims, and embodiments	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/142827

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/142827

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110914290	A	24 March 2020	SG	11201913174	PA	30 January 2020
				CA	3066715	A1	03 January 2019
				EP	3645552	A1	06 May 2020
				EP	3645552	B1	28 June 2023
				AU	2018294660	A1	16 January 2020
				AU	2018294660	B2	19 May 2022
				US	2023079731	A1	16 March 2023
				US	2021147486	A1	20 May 2021
				US	2022024985	A9	27 January 2022
				US	11572387	B2	07 February 2023
				JP	2020530276	A	22 October 2020
				JP	7282697	B2	29 May 2023
				US	2021284696	A1	16 September 2021
				US	2022162264	A9	26 May 2022
				WO	2019002893	A1	03 January 2019
				KR	20200030070	A	19 March 2020
CN	113480620	A	08 October 2021	None			
CN	102216783	A	12 October 2011	CA	2931824	A1	25 March 2010
				CA	2931824	C	08 September 2020
				US	2016137703	A1	19 May 2016
				US	9540422	B2	10 January 2017
				DE	202009019021	U1	24 September 2015
				DK	2344891	T3	06 June 2016
				EP	2344891	A2	20 July 2011
				EP	2344891	A4	22 August 2012
				EP	2344891	B1	16 March 2016
				ES	2576114	T3	05 July 2016
				US	2017218443	A1	03 August 2017
				US	9988679	B2	05 June 2018
				US	2014256913	A1	11 September 2014
				US	9534024	B2	03 January 2017
				CA	2774710	A1	25 March 2010
				CA	2774710	C	02 August 2016
				HUE	029215	T2	28 February 2017
				ES	2781858	T3	08 September 2020
				EP	3686602	A1	29 July 2020
				WO	2010034018	A2	25 March 2010
				WO	2010034018	A3	14 October 2010
				US	2012055792	A1	08 March 2012
				US	8673550	B2	18 March 2014
				EP	3029467	A1	08 June 2016
				EP	3029467	B1	08 January 2020
				US	2014309402	A1	16 October 2014
				US	9170230	B2	27 October 2015
				US	2014308662	A1	16 October 2014
				US	9624275	B2	18 April 2017
				US	2019062825	A1	28 February 2019
				US	10870883	B2	22 December 2020
				US	2021189480	A1	24 June 2021
				US	11634764	B2	25 April 2023

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/142827

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		HK 1211310 A1	20 May 2016
		CA 3092369 A1	25 March 2010
CN 108699138 A	23 October 2018	US 2021317520 A1	14 October 2021
		US 11597970 B2	07 March 2023
		AU 2017225376 A1	13 September 2018
		AU 2017225376 B2	05 March 2020
		JP 2019516346 A	20 June 2019
		JP 6874017 B2	19 May 2021
		AU 2017225374 A1	06 September 2018
		AU 2017225374 B2	05 March 2020
		KR 20180104747 A	21 September 2018
		KR 102222192 B1	02 March 2021
		KR 20180104752 A	21 September 2018
		KR 102222191 B1	02 March 2021
		JP 2019511217 A	25 April 2019
		JP 6776366 B2	28 October 2020
		EP 3423485 A1	09 January 2019
		EP 3423485 B1	29 December 2021
		US 2019330282 A1	31 October 2019
		US 2020299336 A9	24 September 2020
		US 11186868 B2	30 November 2021
		EP 3423487 A1	09 January 2019
		EP 3423487 B1	29 December 2021
		EP 4019542 A1	29 June 2022
		US 2019071721 A1	07 March 2019
		US 10975428 B2	13 April 2021
		EP 4015531 A2	22 June 2022
		EP 4015531 A3	28 September 2022
		CA 3016243 A1	08 September 2017
		CA 3016243 C	25 April 2023
		JP 2019516344 A	20 June 2019
		JP 6799072 B2	09 December 2020
		CA 3016245 A1	08 September 2017
		US 2022119879 A1	21 April 2022
		KR 20180104746 A	21 September 2018
		KR 102222188 B1	02 March 2021
		AU 2017225375 A1	06 September 2018
		AU 2017225375 B2	05 March 2020
		WO 2017149316 A1	08 September 2017
		WO 2017149317 A1	08 September 2017
		WO 2017149318 A1	08 September 2017
		EP 3423486 A1	09 January 2019
		EP 3423486 B1	29 December 2021
		US 2021269872 A1	02 September 2021
		US 2022154269 A9	19 May 2022
		US 11685949 B2	27 June 2023
		US 2019300582 A1	03 October 2019
		US 2020299337 A9	24 September 2020
		US 10995372 B2	04 May 2021
		CA 3016240 A1	08 September 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/142827

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				CA	3016240	C	04 April 2023
				EP	4019543	A1	29 June 2022
CN	105801676	A	27 July 2016		None		
CN	110621692	A	27 December 2019	GB	201707122	D0	21 June 2017
				US	2021147490	A1	20 May 2021
				US	2022024994	A9	27 January 2022
				CA	3062111	A1	22 November 2018
				EP	3892627	A1	13 October 2021
				AU	2018270075	A1	21 November 2019
				AU	2018270075	B2	14 July 2022
				EP	3619224	A1	11 March 2020
				EP	3619224	B1	13 April 2022
				WO	2018211241	A1	22 November 2018
CN	111499705	A	07 August 2020	WO	2020155242	A1	06 August 2020
CN	113195736	A	30 July 2021	US	2022056517	A1	24 February 2022
				AU	2019375476	A1	03 June 2021
				JP	2022518095	A	14 March 2022
				EP	3877547	A1	15 September 2021
				WO	2020095052	A1	14 May 2020
				WO	2020095052	A8	14 May 2021
				CA	3118808	A1	14 May 2020
CN	113735948	A	03 December 2021		None		
CN	113754743	A	07 December 2021		None		
CN	113773373	A	10 December 2021		None		
CN	113896776	A	07 January 2022		None		
CN	113912683	A	11 January 2022		None		

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/142827

A. 主题的分类

C07K14/265(2006.01)i；C12N1/21(2006.01)i；C12N15/70(2006.01)i；G01N27/447(2006.01)i；G01N33/68(2006.01)i；C12Q1/6869(2018.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07K C12N G01N C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI,中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索项：孔蛋白，pore，porin，突变，mutation，mutant，SEQ ID No:1-2

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 110914290 A (弗拉芒区生物技术研究所 布鲁塞尔自由大学 牛津纳米孔技术公司) 2020年3月24日 (2020-03-24) 摘要，权利要求书，实施例，序列表	1-20
A	CN 113480620 A (成都齐碳科技有限公司) 2021年10月8日 (2021-10-08) 权利要求书，实施例，序列表	1-20
A	CN 102216783 A (华盛顿大学 UAB研究基金会) 2011年10月12日 (2011-10-12) 权利要求书，实施例	1-20
A	CN 108699138 A (牛津纳米孔技术公司) 2018年10月23日 (2018-10-23) 权利要求书，实施例	1-20
A	CN 105801676 A (东南大学) 2016年7月27日 (2016-07-27) 权利要求书，实施例	1-20
A	CN 110621692 A (牛津纳米孔技术公司 弗拉芒区生物技术研究所 布鲁塞尔自由大学) 2019年12月27日 (2019-12-27) 权利要求书，实施例	1-20

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
"D" 申请人在国际申请中引证的文件
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年8月7日	2023年9月2日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 王翔宇 电话号码 (+86) 010-62089318

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 111499705 A (深圳市梅丽纳米孔科技有限公司) 2020年8月7日 (2020-08-07) 权利要求书，实施例	1-20
A	CN 113195736 A (牛津纳米孔科技公司 弗拉芒区生物技术研究所 布鲁塞尔自由大学) 2021年7月30日 (2021-07-30) 权利要求书，实施例	1-20
A	CN 113735948 A (成都齐碳科技有限公司) 2021年12月3日 (2021-12-03) 权利要求书，实施例	1-20
A	CN 113754743 A (成都齐碳科技有限公司) 2021年12月7日 (2021-12-07) 权利要求书，实施例	1-20
A	CN 113773373 A (成都齐碳科技有限公司) 2021年12月10日 (2021-12-10) 权利要求书，实施例	1-20
A	CN 113896776 A (成都齐碳科技有限公司) 2022年1月7日 (2022-01-07) 权利要求书，实施例	1-20
A	CN 113912683 A (成都齐碳科技有限公司) 2022年1月11日 (2022-01-11) 权利要求书，实施例	1-20

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/142827

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

   a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

   b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

      ☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/142827

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110914290	A	2020年3月24日	SG	11201913174	PA	2020年1月30日
				CA	3066715	A1	2019年1月3日
				EP	3645552	A1	2020年5月6日
				EP	3645552	B1	2023年6月28日
				AU	2018294660	A1	2020年1月16日
				AU	2018294660	B2	2022年5月19日
				US	2023079731	A1	2023年3月16日
				US	2021147486	A1	2021年5月20日
				US	2022024985	A9	2022年1月27日
				US	11572387	B2	2023年2月7日
				JP	2020530276	A	2020年10月22日
				JP	7282697	B2	2023年5月29日
				US	2021284696	A1	2021年9月16日
				US	2022162264	A9	2022年5月26日
				WO	2019002893	A1	2019年1月3日
				KR	20200030070	A	2020年3月19日
CN	113480620	A	2021年10月8日		无		
CN	102216783	A	2011年10月12日	CA	2931824	A1	2010年3月25日
				CA	2931824	C	2020年9月8日
				US	2016137703	A1	2016年5月19日
				US	9540422	B2	2017年1月10日
				DE	202009019021	U1	2015年9月24日
				DK	2344891	T3	2016年6月6日
				EP	2344891	A2	2011年7月20日
				EP	2344891	A4	2012年8月22日
				EP	2344891	B1	2016年3月16日
				ES	2576114	T3	2016年7月5日
				US	2017218443	A1	2017年8月3日
				US	9988679	B2	2018年6月5日
				US	2014256913	A1	2014年9月11日
				US	9534024	B2	2017年1月3日
				CA	2774710	A1	2010年3月25日
				CA	2774710	C	2016年8月2日
				HUE	029215	T2	2017年2月28日
				ES	2781858	T3	2020年9月8日
				EP	3686602	A1	2020年7月29日
				WO	2010034018	A2	2010年3月25日
				WO	2010034018	A3	2010年10月14日
				US	2012055792	A1	2012年3月8日
				US	8673550	B2	2014年3月18日
				EP	3029467	A1	2016年6月8日
				EP	3029467	B1	2020年1月8日
				US	2014309402	A1	2014年10月16日
				US	9170230	B2	2015年10月27日
				US	2014308662	A1	2014年10月16日
				US	9624275	B2	2017年4月18日
				US	2019062825	A1	2019年2月28日
				US	10870883	B2	2020年12月22日
				US	2021189480	A1	2021年6月24日
				US	11634764	B2	2023年4月25日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/142827

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				HK	1211310	A1	2016年5月20日
				CA	3092369	A1	2010年3月25日
CN	108699138	A	2018年10月23日	US	2021317520	A1	2021年10月14日
				US	11597970	B2	2023年3月7日
				AU	2017225376	A1	2018年9月13日
				AU	2017225376	B2	2020年3月5日
				JP	2019516346	A	2019年6月20日
				JP	6874017	B2	2021年5月19日
				AU	2017225374	A1	2018年9月6日
				AU	2017225374	B2	2020年3月5日
				KR	20180104747	A	2018年9月21日
				KR	102222192	B1	2021年3月2日
				KR	20180104752	A	2018年9月21日
				KR	102222191	B1	2021年3月2日
				JP	2019511217	A	2019年4月25日
				JP	6776366	B2	2020年10月28日
				EP	3423485	A1	2019年1月9日
				EP	3423485	B1	2021年12月29日
				US	2019330282	A1	2019年10月31日
				US	2020299336	A9	2020年9月24日
				US	11186868	B2	2021年11月30日
				EP	3423487	A1	2019年1月9日
				EP	3423487	B1	2021年12月29日
				EP	4019542	A1	2022年6月29日
				US	2019071721	A1	2019年3月7日
				US	10975428	B2	2021年4月13日
				EP	4015531	A2	2022年6月22日
				EP	4015531	A3	2022年9月28日
				CA	3016243	A1	2017年9月8日
				CA	3016243	C	2023年4月25日
				JP	2019516344	A	2019年6月20日
				JP	6799072	B2	2020年12月9日
				CA	3016245	A1	2017年9月8日
				US	2022119879	A1	2022年4月21日
				KR	20180104746	A	2018年9月21日
				KR	102222188	B1	2021年3月2日
				AU	2017225375	A1	2018年9月6日
				AU	2017225375	B2	2020年3月5日
				WO	2017149316	A1	2017年9月8日
				WO	2017149317	A1	2017年9月8日
				WO	2017149318	A1	2017年9月8日
				EP	3423486	A1	2019年1月9日
				EP	3423486	B1	2021年12月29日
				US	2021269872	A1	2021年9月2日
				US	2022154269	A9	2022年5月19日
				US	11685949	B2	2023年6月27日
				US	2019300582	A1	2019年10月3日
				US	2020299337	A9	2020年9月24日
				US	10995372	B2	2021年5月4日
				CA	3016240	A1	2017年9月8日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/142827

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				CA	3016240	C	2023年4月4日
				EP	4019543	A1	2022年6月29日
CN	105801676	A	2016年7月27日		无		
CN	110621692	A	2019年12月27日	GB	201707122	D0	2017年6月21日
				US	2021147490	A1	2021年5月20日
				US	2022024994	A9	2022年1月27日
				CA	3062111	A1	2018年11月22日
				EP	3892627	A1	2021年10月13日
				AU	2018270075	A1	2019年11月21日
				AU	2018270075	B2	2022年7月14日
				EP	3619224	A1	2020年3月11日
				EP	3619224	B1	2022年4月13日
				WO	2018211241	A1	2018年11月22日
CN	111499705	A	2020年8月7日	WO	2020155242	A1	2020年8月6日
CN	113195736	A	2021年7月30日	US	2022056517	A1	2022年2月24日
				AU	2019375476	A1	2021年6月3日
				JP	2022518095	A	2022年3月14日
				EP	3877547	A1	2021年9月15日
				WO	2020095052	A1	2020年5月14日
				WO	2020095052	A8	2021年5月14日
				CA	3118808	A1	2020年5月14日
CN	113735948	A	2021年12月3日		无		
CN	113754743	A	2021年12月7日		无		
CN	113773373	A	2021年12月10日		无		
CN	113896776	A	2022年1月7日		无		
CN	113912683	A	2022年1月11日		无		