

(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)



(10) 国际公布号
WO 2024/138574 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/00 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01) C12Q 1/6869 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/143631

(22) 国际申请日: 2022年12月29日 (29.12.2022)

(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: 刘珍君 (LIU, Zhenjun); 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)。王宗安 (WANG, Zongan); 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)。王洪涛 (WANG, Hongtao); 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)。孔超娣 (KONG, Chaodi); 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)。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)。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,

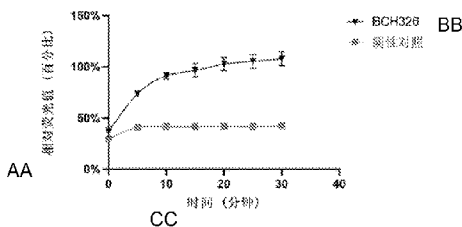
Guangdong 518083 (CN)。季州翔 (JI, Zhouxiang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。黎宇翔 (LI, Yuxiang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。董宇亮 (DONG, Yuliang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。章文蔚 (ZHANG, Wenwei); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。徐讯 (XU, Xun); 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: 北京康信知识产权代理有限公司 (KANGXIN PARTNERS, P.C.); 中国北京市海淀区知春路甲48号盈都大厦A座16层, Beijing 100098 (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。

(54) Title: HELICASE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 解旋酶及其应用



AA Relative fluorescence value (%)
BB Time (min)
CC Negative control

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are a helicase and a use thereof. The helicase has two tower domains and a PIN domain, and the two tower domains are located on the same side of a helicase three-dimensional structure. According to the technical solution of the present invention, a brand-new helicase BCH3X having a special helix characteristic domain is provided, and the helicase has good salt tolerance and stability, can have high unwinding activity in the case of a high salt content, can be used for nucleic acid control and characterization, and is applied to nanopore sequencing.

(57) 摘要: 本发明公开了一种解旋酶及其应用。其中, 该解旋酶具有两个塔结构域和一个销结构域, 两个塔结构域位于解旋酶三维结构的同一侧。应用本发明的技术方案, 提供一类全新的且具有特殊螺旋特征结构域的解旋酶BCH3X, 其具有良好的盐耐受性及稳定性, 能在高盐下具有高解旋活性, 可以用于核酸的控制和表征, 应用于纳米孔测序。

WO 2024/138574 A1

(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))。

解旋酶及其应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体而言，涉及一种解旋酶及其应用。

背景技术

纳米孔测序技术作为新兴起的单分子测序技术，凭借着高通量、读长长、快速度、原位检测和无标记操作等独特优势，给基因测序行业带来了颠覆性的改变。该技术不需借助成像设备来检测，从而使系统可以缩小到便携式水平，满足不同测序场景。并且由于其非扩增直接测序的性质，对可测序的 DNA 没有长度限制，允许进行实时碱基调用，也可实现 RNA、甲基化等修饰的分子，以及其它单分子的直接测序。纳米孔测序技术在分子生物学、医学、流行病学和生态学等许多领域都有着广泛应用价值，比如基因组图谱绘制、疫情等传染病的监测、稀有物种的检测、隐藏中间产物的识别、生物非共价相互作用的动力学监测、促进表观遗传和翻译后修饰的表征以及快速且廉价的蛋白实施测序等。

纳米孔测序技术是基于电信号的测序技术，由一个插在膜上作为信号传感器的纳米孔（蛋白或固态）将两个装有电解液的电解室分开。当电压施加给两个电解室之间时，会产生稳定的穿孔电流，而当待测分子进入纳米孔时会对离子的流动造成阻碍从而等导致电流信号波动，而不同的碱基对电流的影响是不同的。通过实时检测纳米孔的电流波动信号，并借助机器学习分析并解码电流信号，从而实现对待测分子进行实时测序。

在该测序过程中，由于核酸分子穿过纳米孔通道时速度极快，无法精确获得多核苷酸序列信息。因此有效地降低并控制核酸分子的穿孔运动是实现纳米孔测序的关键技术问题。目前，最常见的有效方法是利用解旋酶解旋的思路控制核酸分子的穿孔运动，提高检测精度。并且为了更好地维持测序速度和测序均一性，需要解旋酶在高盐电解质液中具有较好的盐耐受能力及热稳定性。

当前商品化的纳米孔测序仪中的解旋酶为来源于细菌噬菌体 T4 的 Dda 解旋酶，其产量、稳定性及盐耐受性均不佳，特别在盐耐受能力上，高盐会抑制 Dda 解旋酶的解旋活性，使其解旋速度下降，不能充分发挥其解旋能力，从而削弱了其在纳米孔测序应用中的测序速度，降低测序效率。

发明内容

本发明旨在提供一种解旋酶及其应用，以解决现有技术中解旋酶盐耐受性不佳的技术问题。

为了实现上述目的，根据本发明的一个方面，提供了一种解旋酶。该解旋酶具有两个塔结构域和一个销结构域，两个塔结构域位于解旋酶三维结构的同一侧。

进一步地，解旋酶包括以下至少一种：A) BCH326，BCH326 为具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的蛋白质；B) BCH338，BCH338 为具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的蛋白质；C) 在 A) 或 B) 中限定的蛋白质的表面上至少一个半胱氨酸突变为丙氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸或甲硫氨酸的蛋白质；D) 对 A)、B) 和 C) 中任一所限定的蛋白质的氨基酸序列的塔结构域和/或销结构域上至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸，且具有 DNA 解旋能力的蛋白质；和 E) 与 A)、B)、C) 和 D) 中任一所限定的蛋白质的氨基酸序列具有 70% 以上同源性及具有相同功能的蛋白质。

进一步地，C) 包括：将 BCH326 的第 319 位的 C 置换为 A、S、T、V、I、L 或 G 的蛋白质；和将 BCH338 的第 326 位或第 459 位的 C 置换为 A、S、T、V、I、L 或 G 的蛋白质。

进一步地，D) 中，塔结构域和/或销结构域上至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸包括以下至少一种：BCH326 的塔结构域上 S389、R340、K341、S342、N343、K343、S344、I345、V346、I347、D348、K349、D350、G351、K352、A353、K354、E355、F356、L357、R358、K359、F360、L361、N362、F363、A364、K365、I366、Y367、N368、F369、T370、N371、K372、G373、G374、H378、G379、R380、R381、I382、T383、K384、K385、S386、K387、K388、E389、L390 和 W391 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；BCH326 的销结构域上 D87、I88、G89、T90、I91、H92、S93、Y94、F95、D96、I97、K98、P99、D100、I101、D102、D103、N104、G105、N106、R107、V108、F109、K110、P111 或 S112 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；BCH338 的塔结构域上 S405、K406、F407、L408、V409、P410、L411、G412、D413、G414、S415、K416、E417、D418、L419、F420、P421、L422、Y423、K424、E425、A426、V427、F428、D429、I430、A431、K432、T433、M434、N435、N436、Q437、R438、K439、I440、S441、K442、N443、S444、K445、K446、N447、F448 或 W449 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；BCH338 的销结构域上 E93、I94、R95、P96、D97、I98、N99、E100、F101、G102、E103、R104、I105、F106、V107、P108、K109、L110、R111、D112、M113、M114 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；优选地，E) 中，蛋白质与 A)、B)、C) 和 D) 中任一所限定的蛋白质的氨基酸序列具有 70%、80%、90%、95% 或 99% 以上同源性及相同功能。

进一步地，非天然氨基酸选自 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、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]苯基]丙氨酸、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)丙氨酸、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)己酸和O-(2-硝基苄基)-L-酪氨酸或2-硝基苄丙氨酸中的至少一种；优选的，BCH326 引入至少一个非天然氨基酸包括如下至少一种：D100 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、I101 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、D102 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、D103 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、N104 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、G105 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、N106 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、R107 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、D103 引入 4-乙酰基-L-苯丙氨酸、G105 引入 4-乙酰基-L-苯丙氨酸和 N106 引入 4-乙酰基-L-苯丙氨酸；优选的，BCH338 引入至少一个非天然氨基酸包括如下至少一种：A431 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、K432 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、T433 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、M434 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、N435 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、S441 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、K442 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、N443 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸和 S444 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸。

进一步地，在解旋酶的 DNA 结合区的氨基酸位点和/或 ATP 催化活性中心附近的氨基酸位点具有至少一个位点的氨基酸突变，突变包括将原有氨基酸突变为更大侧链氨基酸；优选的，将原有氨基酸突变为更大侧链氨基酸包括以下至少一种：天冬酰胺被谷氨酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸取代；脯氨酸被精氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸或亮氨酸取代；组氨酸被精氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸取代；脯氨酸被精氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺或组氨酸取代；苯丙氨酸被精氨酸、赖氨酸、组氨酸、酪氨酸或色氨酸取代；异亮氨酸被苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸、赖氨酸或精氨酸取代；酪氨酸被精氨酸、赖氨酸、或色氨酸取代；BCH326 的 DNA 结合区氨基酸位点包括：L157、V160、L294、G296、N299、L303、A304、I328、F329、T330、N331、G332、G333 和 E334，ATP 催化活性中心附近的氨基酸位点包括：K211、E212、E213、N214、Y215、K216、A217、P218、L219、K220、D221、I222、N223 和 N224；BCH338 的 DNA 结合区氨基酸位点包括：H89、S90、Y91、F92、E93、I94、R95 和 P96；ATP 催化活性中心附近的氨基酸位点包括：Y152、Q153、L154、P155、P156、V157、F193、L194、I195、K196、E197、Y198、E199、E200 和 N201。

进一步地，在解旋酶表面的与纳米孔结合区相互作用的氨基酸具有至少一个位点的突变，突变包括将原来的氨基酸突变为更短侧链的氨基酸；优选的，将原来的氨基酸突变为更短侧链的氨基酸包括：天冬酰胺被异亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、丝氨酸或甘氨酸取代；赖氨酸被异亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、丝氨酸或甘氨酸取代；精氨酸被异亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、丝氨酸或甘氨酸取代；优选的，BCH326 表面与纳米孔结合区相互作用的氨基酸包括：M1、E2、S3、K4、I5、N6、L7、T8、E9、D10、Q11、L12、K13、I14、I15、K16、I189、I190、R191、T192、Q193、N194、K195、N196 和 S197；BCH338 表面与纳米孔结合区相互作用的氨基酸包括：M1、G2、E3、I4、K5、L6、N7、E8、E9、Q10、Q11、K12、K177、I177、L178、R179、T180、K181、N182、L213、I214、D215、H216、F217、H218、V219、Y220、G221、

D248、L249、T250、D251、S252、T253、E254 和 S255。

根据本发明的另一个方面，提供一种分离的 DNA 分子。该 DNA 分子具有 (a) 编码权利要求 2 至 3 中任一项的解旋酶的核苷酸序列；或 (b) 在严格条件下与 (a) 限定的 DNA 分子杂交的核苷酸序列；或 (c) 具有 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列；或 (d) 与 (a) 至 (c) 中限定的任一种的核苷酸序列具有 70% 以上同源性，且编码与解旋酶具有相同功能的蛋白质的核苷酸序列。

进一步地，DNA 分子具有与 (a) 至 (c) 中限定的任一种核苷酸序列具有 75% 以上，优选 85% 以上，更优选 95% 以上，进一步优选 99% 以上同源性且编码具有相同功能蛋白质的核苷酸序列。

根据本发明的再一个方面，提供一种重组载体。该重组载体包含上述任一种 DNA 分子。

进一步地，重组载体选自质粒、病毒或运载体表达载体；进一步地，重组载体包括用于控制 DNA 分子表达的调控元件；更进一步地，调控元件包括与 DNA 分子可操作地连接的启动子；优选地，启动子包括 T7、trc、lac、ara 或 λ L；更优选地，重组载体选自质粒 PET.28a(+)、PET.21a(+) 或 PET.32a(+)

根据本发明的又一个方面，提供一种宿主细胞。该宿主细胞包含本发明的上述任一种 DNA 分子，或本发明的上述任一种重组载体。

进一步地，宿主细胞包括大肠杆菌；优选地，宿主细胞包括 BL21(DE3)、BL21 Star (DE3) pLysS、Rossata(DE3) 或 Lemo21(DE3)。

根据本发明的再一个方面，提供上述解旋酶在核酸控制或表征中的应用；进一步地，核酸控制包括对核酸穿过纳米孔的速度的控制、对核酸穿孔的稳定性控制或对核酸穿孔的持续性控制；更进一步地，应用包括纳米传感器的应用及单分子纳米孔测序应用。

根据本发明的又一个方面，提供一种纳米孔测序试剂盒。该试剂盒包括解旋酶，该解旋酶为本发明的上述任一种解旋酶。

根据本发明的再一个方面，提供一种纳米孔测序的方法。该方法包括待测序核酸分子在解旋酶的控制下进行测序，该解旋酶为本发明的上述任一种解旋酶。

应用本发明的技术方案，提供一类全新的且具有特殊螺旋特征结构域的解旋酶 BCH3X，其具有良好的盐耐受性及稳定性，能在高盐下具有高解旋活性，可以用于核酸的控制和表征，应用于纳米孔测序。

附图说明

构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 示出了 BCH326 的分子筛 Superdex 200 纯化结果，其中，(A) BCH326 的分子筛 Superdex 200 洗脱图；(B) BCH326 的分子筛洗脱胶图。

图 2 示出了 BCH338 的分子筛 Superdex 200 纯化结果，其中，(A) BCH338 的分子筛 Superdex 200 洗脱图；(B) BCH338 的分子筛洗脱胶图。

图 3 示出了 BCH326 的 Alphafold2 预测结构。

图 4 示出了 BCH338 的 Alphafold2 预测结构。

图 5 示出了 BCH326 蛋白的 ATPase 活性检测。

图 6 示出了 BCH338 蛋白的 ATPase 活性检测。

图 7 示出了 BCH326 蛋白的 dsDNA 解链活性检测（低盐反应缓冲液）。

图 8 示出了 BCH326 蛋白的 dsDNA 解链活性检测（高盐反应缓冲液）。

图 9 示出了 BCH338 蛋白的 dsDNA 解链活性检测（低盐反应缓冲液）。

图 10 示出了 BCH338 蛋白的 dsDNA 解链活性检测（高盐反应缓冲液）。

图 11 示出了限位序列阻滞 BCH326 蛋白解链活性的检测（低盐反应缓冲液）。

图 12 示出了限位序列阻滞 BCH326 蛋白解链活性的检测（高盐反应缓冲液）。

图 13 示出了限位序列阻滞 BCH338 蛋白解链活性的检测（低盐反应缓冲液）。

图 14 示出了限位序列阻滞 BCH338 蛋白解链活性的检测（高盐反应缓冲液）。

图 15 示出了接头示意图（a：上链；b：下链）。

图 16 示出了含有解旋酶测序文库示意图（a：上链；b：下链；c：双链目的片段；d：解旋酶；e：胆固醇标记双链 DNA）。

图 17 示出膜片钳放大器示意图。

图 18 示出了 BCH326 测序电流信号图。

图 19 示出了 BCH338 测序电流信号图。

图 20 示出了 Dda 的结晶结构。

具体实施方式

需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

根据本申请一种典型的实施方式，提供了一类解旋酶，该解旋酶具有两个塔结构域和一

个销结构域，且两个塔结构域位于解旋酶三维结构的同一侧。具有此种结构的解旋酶在纳米孔测序时，塔结构域和销结构域可以交联构建成一个 DNA 的结合区，方便控速测序，增加测序持续性和稳定性，防止 DNA 在测序过程中滑落或波动时引起测序信号的波动；且具有较高的盐耐受能力，在高盐浓度下能够发挥较优的解旋能力，提高测序效率。

根据本申请一种典型的实施方式，提供了一种解旋酶，其基因来源于深海宏基因组，具有较高的盐耐受性。该解旋酶包括以下至少一种：A) BCH326，BCH326 为具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的蛋白质；B) BCH338，BCH338 为具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的蛋白质；C) 在 A) 或 B) 中限定的蛋白质的表面上至少一个半胱氨酸突变为丙氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸或甲硫氨酸的蛋白质；D) 在 A)、B) 和 C) 中任一所限定的蛋白质的氨基酸序列的塔结构域和/或销结构域上至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸，且具有 DNA 解旋能力的蛋白质；和 E) 与 A)、B)、C) 和 D) 中任一所限定的蛋白质的氨基酸序列具有 70% 以上同源性且具有相同功能的蛋白质。

上述 A) 或 B) 限定的解旋酶，来源于深海宏基因组，具有较高的盐耐受性。

上述 C) 限定的解旋酶，通过将该类解旋酶表面的至少一个的半胱氨酸突变为丙氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸或甲硫氨酸，可以提高蛋白的均一性，从而提高测序的均一性等指标。

根据本发明一种典型的实施方式，上述 C) 限定的解旋酶包括：将所述 BCH326 的第 319 位的 C 置换为 A、S、T、V、I、L 或 G 的蛋白质；和将所述 BCH338 的第 326 位或第 459 位的 C 置换为 A、S、T、V、I、L 或 G 的蛋白质。

根据本发明一种典型的实施方式，在 A) 或 B) 限定的序列基础上，对蛋白进行突变将塔结构域与销结构域稳定连接在一起，使得 DNA 在测序过程中固定在两者形成的区域，提高测序的稳定性和持续性。例如，在 A)、B) 和 C) 中任一氨基酸序列的塔结构域和/或销结构域上至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸包括以下至少一种：

BCH326 的塔结构域上 S389、R340、K341、S342、N343、K343、S344、I345、V346、I347、D348、K349、D350、G351、K352、A353、K354、E355、F356、L357、R358、K359、F360、L361、N362、F363、A364、K365、I366、Y367、N368、F369、T370、N371、K372、G373、G374、H378、G379、R380、R381、I382、T383、K384、K385、S386、K387、K388、E389、L390 和 W391 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；

BCH326 的销结构域上 D87、I88、G89、T90、I91、H92、S93、Y94、F95、D96、I97、K98、P99、D100、I101、D102、D103、N104、G105、N106、R107、V108、F109、K110、P111 或 S11 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；

BCH338 的塔结构域上 S405、K406、F407、L408、V409、P410、L411、G412、D413、G414、S415、K416、E417、D418、L419、F420、P421、L422、Y423、K424、E425、A426、

V427、F428、D429、I430、A431、K432、T433、M434、N435、N436、Q437、R438、K439、I440、S441、K442、N443、S444、K445、K446、N447、F448 或 W449 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；

BCH338 的销结构域上 E93、I94、R95、P96、D97、I98、N99、E100、F101、G102、E103、R104、I105、F106、V107、P108、K109、L110、R111、D112、M113、M114 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；

上述突变使塔结构域与销结构域之间能够发生化学连接，包括共价或非共价形式的连接。

另外，F) 中，蛋白质与 A)、B) 和 C) 中任一所限定的蛋白质的氨基酸序列优选具有 70%、80%、90%、95% 或 99% 以上同源性及相同功能。本文使用的术语“同源性”具有本领域通常已知的含义，本领域技术人员也熟知测定不同序列间同源性的规则、标准。本发明用不同程度同源性限定的序列还必须要同时具有解旋酶功能。本领域技术人员可以在本申请公开内容的教导下获得这样的变体序列。

根据本发明一种典型的实施方式，所提及的非天然氨基酸包括但不限于 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、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-酪氨酸或 2-硝基苯丙氨酸等。

在本发明一实施方式中，对上述位置进行突变半胱氨酸或引入非天然氨基酸，并采用一个或多个连接器的一个或多个末端优选将解旋酶的塔结构域和销结构域进行共价连接。如果一端为共价连接，则一个或多个连接器可以瞬时连接上述两个或多个半胱氨酸和/或非天然氨基酸。如果两个或所有末端为共价连接，则一个或多个连接器永久连接两个或多个半胱氨酸和/或非天然氨基酸。其中，连接器是能够产生包含共价作用或非共价作用的介质。这可以是商用交联剂，也可以是一段小蛋白，一段多肽，一个合成的小分子等。其用于连接塔结构域和销结构域，使得 DNA 在结合解旋酶后，两个结构域发生连接，DNA 能在穿孔运动时不脱离该区域，提高纳米孔测序的稳定性和持续性。

其中一个共价连接方式即将该类解旋酶的塔结构域或销结构域上在测序时采用交联剂进

行交联,从而提高测序的持续性和稳定性。合适的化学交联剂是本领域公知的。合适的化学交联剂包括但不限于包括以下官能团的那些化学交联剂:马来酰亚胺、活性酯、琥珀酰亚胺、叠氮化物、炔烃(例如,二苯并环辛炔(DIBO或DBCO)、二氟环炔烃和线性炔烃)、膦(例如,无痕和非无痕施陶丁格结合中使用的那些)、卤代乙酰基(例如,碘乙酰胺)、光气型试剂、磺酰氯化物试剂、异硫氰酸酯、酰基卤化物、肼、二硫化物、乙烯基砷、氮杂环丙烷和光敏试剂(例如,芳基叠氮化物、二氮杂环丙烷)。

另外,本发明还可以对该类解旋酶的DNA结合区氨基酸位点,和ATP催化活性中心附近的氨基酸位点进行突变,突变方向包括但不限于突变为更大侧链氨基酸,从而增加了至少一个氨基酸与ssDNA中一个或多个核苷酸之间的(i)静电相互作用;(ii)氢键和/(iii)阳离子- π (阳离子- π)相互作用;取代增加正电氨基酸,以减少马达蛋白与孔之间的排斥等。

其中,将原有氨基酸突变为更大侧链氨基酸包括以下至少一种:天冬酰胺(N)被谷氨酰胺(Q)、组氨酸(H)、精氨酸(R)或赖氨酸(K)取代;脯氨酸(P)被精氨酸(R)、赖氨酸(K)、苯丙氨酸(F)或亮氨酸(I)取代;组氨酸(H)被精氨酸(R)、赖氨酸(K)、谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)或苯丙氨酸(F)取代;酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代;脯氨酸(P)被(i)精氨酸(R)、赖氨酸(K)、谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)或组氨酸(H)取代;苯丙氨酸(F)被精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)取代;异亮氨酸(I)被苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)或精氨酸(R)取代;酪氨酸(Y)被精氨酸(R)、赖氨酸(K)、或色氨酸(W)取代等。

这些位点包括但不限于DNA结合区:BCH326:L157、V160、L294、G296、N299、L303、A304、I328、F329、T330、N331、G332、G333、E334;BCH338:H89、S90、Y91、F92、E93、I94、R95、P96;ATP催化活性中心附近的氨基酸位点:BCH326:K211、E212、E213、N214、Y215、K216、A217、P218、L219、K220、D221、I222、N223、N224;BCH338:Y152、Q153、L154、P155、P156、V157、F193、L194、I195、K196、E197、Y198、E199、E200、N201中的一个或多个位点。在本发明中,在ATP催化活性中心附近的氨基酸位点,是本领域技术人员能够理解的,是指在ATP催化活性中心周围的,且对ATP催化活性中心有影响的氨基酸位点。

根据本发明一实施方式,可对该类解旋酶的表面与纳米孔结合区的结合氨基酸位点进行突变处理的长侧链氨基酸突变为短侧链的氨基酸,降低其测序时与纳米孔间的排斥。

常见的突变方向有天冬酰胺(N)被异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(L)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或甘氨酸(G)取代;赖氨酸(K)被异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(L)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或甘氨酸(G)取代;赖氨酸(K)被异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(L)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或甘氨酸(G)取代;精氨酸(R)被异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(L)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)或甘氨酸(G)取代等。优选的,这些氨基酸位点包括但不限于BCH326:M1、E2、S3、K4、I5、N6、L7、T8、E9、D10、Q11、L12、K13、I14、I15、K16、I189、I190、R191、T192、Q193、N194、K195、N196、S197;BCH338:M1、G2、E3、I4、K5、L6、N7、E8、E9、Q10、Q11、K12、K177、

H177、L178、R179、T180、K181、N182、L213、I214、D215、H216、F217、H218、V219、Y220、G221、D248、L249、T250、D251、S252、T253、E254、S255 其中一个或多个位点。

根据本申请一种典型的实施方式，提供了一种分离的 DNA 分子，该 DNA 分子具有 (a) 编码上述任一种解旋酶的核苷酸序列；或 (b) 在严格条件下与 (a) 限定的 DNA 分子杂交的核苷酸序列；或 (c) 具有 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列；或 (d) 与 (a) 至 (c) 中限定的任一种所述核苷酸序列具有 70% 以上（优选 80% 以上，更优选 85% 以上，进一步优选 90% 以上，最优选 95% 以上，比如可以是 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.5%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 以上，甚至 99.9% 以上）同源性且编码与上述解旋酶具有相同功能蛋白质的核苷酸序列。

需要说明的是，本申请中的“同源性”是指任意两个核苷酸序列或氨基酸序列之间进行比较，从相应基因编码的第一个氨基酸到最后一个氨基酸之间的同一性。

本申请中“分离的”是指“通过人工”从其天然状态改变，即，如果它在自然界中发生，则将其改变和/或从其原始环境中分离出来。例如，天然存在于生命有机体中的多核苷酸或多肽不是“分离的”，然而从其天然状态的共存物中分离的相同的多核苷酸或多肽是“分离的”（如在本文中使用的术语）。

本发明中的 DNA 分子在“严格条件下”与本发明的解旋酶编码基因杂交，是指能够通过核酸杂交的方式来鉴定本发明解旋酶编码基因的存在条件。本发明中，如果两个 DNA 分子能形成反平行的双链核酸结构，就可以说这两个 DNA 分子彼此间能够进行特异性杂交。如果两个 DNA 分子显示出完全的互补性，则称其中一个 DNA 分子是另一个 DNA 分子的“互补物”。本发明中，如果两个 DNA 分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在常规的“高度严格”条件下退火且彼此结合，则称这两个 DNA 分子具有“互补性”。从完全互补性中偏离是可以允许的，只要这种偏离不完全阻止两个分子形成双链结构。为了使一个 DNA 分子能够作为引物或探针，仅需保证其在序列上具有充分的互补性，以使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

本发明中，基本同源的序列是一段 DNA 分子，该 DNA 分子在高度严格条件下能够和相匹配的另一段 DNA 分子的互补链发生特异性杂交。促进 DNA 杂交的适合的严格条件，例如，大约在 45°C 条件下用 6.0×氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 处理，然后在 50°C 条件下用 2.0×SSC 洗涤，这些条件对本领域技术人员是公知的。例如，在洗涤步骤中的盐浓度可以选自低度严格条件的约 2.0×SSC、50°C 到高度严格条件的约 0.2×SSC、50°C。此外，洗涤步骤中的温度条件可以从低度严格条件的室温约 22°C，升高到高度严格条件的约 65°C。温度条件和盐浓度可以都发生改变，也可以其中一个保持不变而另一个变量发生改变。优选地，本发明中的严格条件可为在 6×SSC、0.5%SDS 溶液中，在 65°C 下与编码本申请的解旋酶的核苷酸序列发生特异性杂交，然后用 2×SSC、0.1%SDS 和 1×SSC、0.1%SDS 各洗膜 1 次。

根据本申请一种典型的实施方式，提供了一种重组载体，该重组载体包含上述 DNA 分子，即解旋酶表达基因。重组载体选自质粒、病毒或运载体表达载体等；重组载体包括用于控制

上述 DNA 分子表达的调控元件；调控元件包括与所述 DNA 分子可操作地连接的启动子；优选地，启动子包括 T7、trc、lac、ara 或 λ L；更优选地，重组载体选自质粒 PET.28a(+)、PET.21a(+)
或 PET.32a(+)

在重组载体上插入解旋酶表达基因，利用重组载体能够大量自我复制的功能，大量复制解旋酶表达基因。此处的“重组”是指通过将来自一个物种的基因移植或剪接到不同物种的宿主有机体的细胞中而制备的基因工程化的 DNA。这种 DNA 成为宿主基因结构的一部分并被复制。

根据本申请一种典型的实施方式，提供了一种宿主细胞，该宿主细胞转化有上述 DNA 分子，或重组载体。

将上述重组载体转化入宿主细胞中，利用宿主细胞对重组载体上的解旋酶表达基因进行复制、转录、翻译，能够大量产生解旋酶。宿主细胞包括大肠杆菌，可以是 BL21(DE3)、BL21 Star (DE3) pLysS、Rossata (DE3)、Lemo21(DE3)等。本发明的解旋酶在大肠杆菌重组蛋白表达系统中能成功表达，蛋白均一，纯度高。

根据本申请一种典型的实施方式，该类解旋酶在高盐环境下展示出比低盐环境下还优越的解旋活性，能够良好地与单链 DNA 结合，并解旋双链 DNA。该类解旋酶解旋活性很强，限位序列阻滞 Spacer-18 (Sp18)无法完全阻滞其解旋活性，此解旋酶可以用于核酸的控制和表征，并应用于单分子纳米孔测序。核酸控制包括对核酸穿过纳米孔的速度的控制，对核酸穿孔的稳定性控制或对核酸穿孔的持续性控制；更进一步地，该解旋酶的应用包括纳米传感器的应用及单分子纳米孔测序应用。其中，测序稳定性是指待测 DNA 以恒定的速度进入纳米孔，测序的信号平稳且完整，信噪比高，随着测序时间增加，测序质量不会明显下降。测序持续性是指测序信号持续输出，直到待测分子测序结束，文库持续捕获，不会突然中断导致测序的覆盖率和准确率低下。

下面将结合具体的实施例来进一步详细解释本申请的有益效果。

实施例 1

BCH326 和 BCH338 的克隆、表达和纯化

1. BCH326 和 BCH338 的克隆和表达

将全长 BCH326 和 BCH338 的 DNA 序列分别连接入 PET.28a(+)质粒中，使用双酶切位点为 NdeI 和 XhoI，因此表达出来的 BCH326 和 BCH338 蛋白 N 端具有 6*His 标签和 thrombin 酶切位点。

将克隆好的 PET.28a(+)-BCH326 和 PET.28a(+)-BCH328 质粒转化入大肠杆菌表达菌 BL21 (DE3) 或其衍生菌中。挑取单菌落，接入 20mL 含有卡纳抗性的 LB 培养基中，37°C 震荡培养过夜。然后转接入 2L 含有卡纳抗性的 LB 中，37°C 震荡培养至 $OD_{600}=0.6-0.8$ ，降温至 16°C，加入终浓度 500 μ M 的 IPTG 诱导表达过夜。

2. BCH326 和 BCH338 的纯化

Buffer A: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 20 mM 咪唑

Buffer B: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 300 mM 咪唑

Buffer C: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 80 mM NaCl

Buffer D: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1000 mM NaCl

Buffer E: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl

收集表达的 BCH326 和 BCH338 菌体, 使用 Buffer A 重悬菌体, 用细胞破碎仪破碎菌体, 然后离心取上清。将上清与提前用 Buffer A 平衡好的 Ni-NTA 填料混合, 结合 1h。收集填料, 用 Buffer A 大量清洗填料, 直至没有杂蛋白被洗出。接着, 在填料中加入 Buffer B 用于洗脱蛋白。将洗脱得到的蛋白过 Buffer C 平衡好的脱盐柱 (Cytiva, Sephadex G-25), 将蛋白的缓冲液从 Buffer B 更换为 Buffer C。然后, 将通过脱盐柱的蛋白溶液加入到 Buffer C 平衡好的 ssDNA cellulose 填料中, 并加入适量的凝血蛋白酶, 该酶可以特异性识别载体序列 PET28(a)+ 中的凝血酶切割位点氨基酸序列 LVPRG↓S, 从而切除蛋白所带有的亲和 His 标签, 该操作在 4°C 进行, 在旋转摇床上孵育过夜。次日, 收集 ssDNA cellulose 填料, 此时目标蛋白与 ssDNA 填料特异性吸附。用 Buffer C 清洗 ssDNA cellulose 填料 3-4 次, 目的是除去未吸附 ssDNA cellulose 填料的杂蛋白, 然后用 buffer D 洗脱, 破坏目标蛋白与 ssDNA 填料特异性吸附, 将目标蛋白洗脱到溶液中。将 ssDNA cellulose 纯化后的蛋白。将 ssDNA cellulose 纯化后的蛋白通过 30K 的超滤浓缩管 (Merck millipore) 在 4°C 预冷的离心机中浓缩, 参数设置为转速 3000g, 每次离心时间 10min, 反复多次, 将最终蛋白体积浓缩至 2mL。最后经过分子筛 Superdex 200 (Cytiva), 所用分子筛 buffer 为 Buffer E。收集目的蛋白峰, 浓缩, 冻存。由图 1 可见, 经过纯化, 最终可得到大量的纯度良好的 BGH326 蛋白, 该蛋白的峰形均一。平均每 1L 表达菌纯化出目的蛋白 0.28mg, 与解旋酶 Dda 的产量持平 (每 1L 表达菌纯化得到 0.23mg 蛋白)。

由图 2 可见, 经过纯化, 最终可得到较大量的纯度良好的 BGH338 蛋白, 该蛋白的峰形均一。平均每 1L 表达菌纯化出目的蛋白 0.42mg, 比解旋酶 Dda 的产量高 (每 1L 表达菌纯化得到 0.23mg 蛋白)。

3. BCH326 的氨基酸序列 (SEQ ID NO.1)

MESKINLTEDQLKIIKTVEEDIDNNTFINQKILLTGSAGTGKTTTLIELIKMLEEKTKKNIQV
LTPHQSSIVIHKILQGYNLKRTDIGTIHSYFDIKPDIDDNGNRVFKPSKSDPEIMHDIHIDESS
MIDSVLYGIITKYLAPYPVVFVGVDEYQLPPVKEDFSPVFKYFEEQENLGNTKYIFKLEKIIRTQ
NKNSLIFEKFRLEIKRFKEENYKAPLKDINNLINELQTFSESQFPDFNKYVEERFQNKKNIKI
GTFTNNFTDY YNLHFRRFDNEVKNPDDIYSKGDKLLNGPYNYWNLARDKTKLTSRDFMS
VCNYLKNNGEEIKVNEVIESTLEIKNLSALETAVISFNQDIPDFPNAKEIAKKGKIFEVFNIQGEV
HNPDAPSRKSNKSIVIDKDGKAKEFLRKFLNFAKIYNFTNKGGHGRRITKKSCKELWKLYYT
LFDYFAEVITYTYSSTIHKLQGQTLDEIFIDTRDFNHLYNTDYNLFLRLLYVGITRTSNDVFILK

4. BCH326 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.2)

ATGGAAAGCAAGATTAACCTGACCGAAGATCAGCTGAAAATTATCAAGACCGTTGAGGAAGATATCGACAACAATACCTTCATCAACCAGAAGATCCTGCTGACCGGTAGCGCAGGTACCGGTAACCACCACCCTGATTGAACTGATTAATAATGCTGGAAGAAAAGACCAAGAAGAACATCCAGGTGCTGACCCCGACCCATCAGAGCAGTATTGTTATTCATAAAATCCTGCAGGGCTACAACCTGAAGCGCACCGATATTGGTACCATTATAGCTATTTTGACATCAAGCCGGACATCGATGACAACGGTAACCGCGTTTTTAAACCGAGCAAAAGCGATCCGGAAATTATGCATGATATTTTCATCATCGACGAGAGCAGCATGATTGACAGCGTTCTGTATGGTATTATTACCAAGTACCTGGCCCCGTATCCGGTTGTTTTTGGTTGGTGATGAATATCAGCTGCCGCCGGTTAAAGAAGATTTTAGCCCCGGTTTTTAAATACTTCGAGGAGCAGGAAAACCTGGGCAATACCAAGTATAATCTTTAAGCTGGAAAAGATCATCCGCACCCAGAATAAAAACAGCCTGATCTTTGAGAAGTTCCGCGAGCTGATTAACGCTTCAAAGAAGAGAACTATAAGGCCCCCGTGAAAGATATTAATAACCTGATTAACGAGTTTCAGACCTTCAGCGAAAGCCAGTTTCCGGATTTTTTTAATAAGTACGTGGAGGAGCGCTTCCAGAATAAGAAAACATCAAATCGGCACCTTCACCAACAATTTTACCGACTATTATAACCTGCACCTCCGCCGCTTTGATAACGAAGTTAAAACCCGGACGACATTTATAGCAAGGGCGATAAACTGCTGCTGAATGGTCCGTATAATTATTGGAATCTGGCCCGTGATAAAACCAAGCTGACCAGCCGTGATTTTATGAGCGTTTGTAAATTATCTGAAGAACGGCGAAGAAATCAAGGTGAATGAGGTGATCGAAAGCACCCCTGGAATTAATAATCTGAGCGCACTGGAAACCGCAGTTATTAGCTTTAATCAGGATATCCCGGACTTTCCGAATGCCAAAGAAATGCAAAAAAGGGCATTAAAGTTTCGAGGTGTTCAACATTCAGGGTGAAGTTCACAACCCGGATGCACCGAGCCGTAAAAGCAATAAAAGCATTGTTATTGACAAAGACGGCAAGGCCAAGGAGTTCCCTGCGTAAATTTCTGAATTTTGCCGGTATCTACAACTTCACCAACAAGGGCGGTCATGGCCGTCGCATTACCAAAAAAGCAAAAAAGAGCTGTGGAAGCTGTACTACACCCTGTTTGACTATTTTCGCCGAAGTGACCTATACCTATAGCAGCACCATTATAAACTGCAGGGTCAGACCCTGGATGAAATTTTTATTGATACCCGCGATTTCAACCACCTGTACAATAACCGATTACAACCTGTTCCCTGCGTCTGCTGTATGTTGGTATTACCCGTACCAGCAATGATGTTTTTTATTCTGAAATAACTCGAG。

5. BCH338 的氨基酸序列 (SEQ ID NO.3)

MGEIKLNEEQQKVLEYFKEDPKKLG YGRKLILTGSAGTGKTTTLVELLKMLKEQKRSVQILTPTHQSSIVIHNMLSEQNIKGVNITTIHSYFEIRPDINEFGERIFVPKLRDMMISADFFIIDEIS MIDKDLFWIINKYLKNFDILFIGDPYQLPPVKETRSPIFDEPYDRIVLKKILRTKNDLFEIFEKVRFLIKEYEENKKKAPLSEIVSLIDHFHVYGEFENDFNKFLEHRFGETILPMSVDLTDSTESFSNEKRIKIGSFTNNFVNYYNIHFRRFDPEVKNPDELYSKGDKLIFNAPYNYIVFSNNSNELTDRNLLSTCNIFTNGEETKVIKEPELVTFTLNKIKEFQEVIDRLRKILPDYLA SLKDLYPFLFEDNKASYLLKPIKFNAFLLLTAENKSKFLVPLGDGSKEDLFLYKEAVFDIAKTMNNQRKISKNSKKNFWKFAYNFNDLCADVTYAYASTIHKLQGQTLDEVFIDL RDFINLYETDYNLFLRLLYVGITRTKNNVFVLK。

6. BCH338 的 DNA 序列 (SEQ ID NO.4)

ATGGGTGAAATCAAGCTGAATGAAGAACAGCAGAAAGTGCTGGAATATTTCAAGGAGGACCCGAAAAAACTGGGTACGGTCGTAAACTGATTCTGACCGGTAGCGCAGGTACCG

GTAAAACCACCACCCTGGTTGAACTGCTGAAAATGCTGAAAGAACAGAAACGCAGCGT
 TCAGATTCTGACCCCGACCCATCAGAGCAGCATTGTTATTCATAATATGCTGAGCGAGCA
 GAACATCAAAGGTGTTAATATCACCACCATCCACAGCTATTTTGAGATCCGTCCGGATATT
 AATGAATTCGGCGAACGTATTTTTGTTCCGAAGCTGCGTGATATGATGATCAGCGCAGATT
 TTTTATCATCGACGAGATCAGCATGATCGACAAGGACCTGTTTTGGATCATCAACAAGTA
 TCTGAAAACCTTCGACATCCTGTTTCATCGGCGACCCGTATCAGCTGCCGCCTGTTAAAGA
 AACCCGTAGCCCGATTTTTGATGAACCGTATGATCGTATTGTGCTGAAAAGATCCTGCG
 CACCAAAAATGATCTGTTTCGAAATTTTCGAGAAGGTGCGCTTTCTGATCAAAGAGTACGA
 AGAAAACAAGAAGAAGGCCCGCTGAGCGAAATTGTTAGCCTGATTGATCATTTCACG
 TGTACGGCGAATTTGAGTTTAATGACTTCTTTAACAAGTTCCCTGGAACACCGCTTCGGCG
 AAACCATTTCTGCCGATGGATAGCGTTGATCTGACCGATAGCACCGAAAGCTTTAGCAATG
 AAAACGCATTAAGATCGGGAGCTTCACCAATAACTTTGTGAACTACTATAACATCCACT
 TCCGCCGCTTTGACCCGGAAGTTAAAAATCCGGATGAACTGTATAGCAAGGGCGATAAAC
 TGATTTTCAATGCCCGTATAACTACATCGTTTTTCAGCAACAACAGCAACGAGCTGACCG
 ATCGCAATCTGCTGAGCACCTGTAATATTTTTACCAATGGTGAAGAAACCAAGGTGATCA
 AGGAACCGGAAGTGGTTACCTTTACCCTGAATAAAATTAAGGAGTTCAGGAGGTGATTG
 ACCGCCTGCGTAAAATTTCTGCCGATTATCTGGCAAGCCTGAAAGATCTGTATCCGTTTCT
 GTTTGAAGACAACAAGCCAGCTACCTGCTGAAGCCGATTAATTTAATGCCTTCCTGCT
 GACCGCAGAGAATAAAAGCAAATTCCTGGTTCCGCTGGGTGATGGTAGCAAAGAAGATC
 TGTTTTCCGCTGTATAAAGAGGCCGTTTTTGATATTGCCAAGACCATGAATAATCAGCGCAA
 AATCAGCAAAAATAGCAAGAAAAACTTCTGGAAGTTCGCCTACAATTTCAACGACCTGT
 GTGCAGACGTTACCTATGCCTATGCAAGCACCATTTCATAAACTGCAGGGTCAGACCCTGG
 ATGAAGTTTTTATTGATCTGCGTGATTTTCATCAACCTGTACGAAACCGACTACAATCTGTT
 CCTGCGCCTGCTGTATGTTGGCATTACCCGTACCAAAAATAATGTTTTCTGTGCTGAAGTAA
 CTCGAG。

7. BCH326 和 BCH338 的 AlphaFold2 结构预测

借助 AlphaFold2, 对 BCH326 和 BCH338 分别进行预测, 得出结构图, 蛋白骨架结构的预测值与真实值之间的均方根误差 (RMSD) 分别达到 2.60 Å 和 2.70 Å。如图 3 和图 4 所示。不同的二级结构用不同形状标示出来: 螺旋结构 (helix), 片状结构 (sheet), 环形结构 (loop)。可以看出, 和 Dda 这一类解旋酶 (如图 20 所示, PDB 编号为 3UPU) 对比, 这两个解旋酶分别具有两个塔结构域, 且均位于蛋白的同一侧, 而 Dda 解旋酶只有一个塔结构域。

实施例 2

BCH326 和 BCH338 蛋白的 ATPase 活性检测

1. 制备双链 DNA (ovDNA) 和单链 DNA (ssDNA): 将 SEQ ID NO.5 和 SEQ ID NO.6 退火为 5' 悬挂 20 个 T 的 ovDNA, 退火流程为 95°C 孵育 5 分钟, 0.1°C/s 的降温速度降至 25°C, 继续孵育 30 分钟, 退火配方见表 1。将 100 μM 的 SEQ ID NO.6 用 TE 缓冲液 (pH = 8) 稀释到 10 μM, 作为 ssDNA。

表 1. ovDNA 退火配方

溶液	体积
100 μ M SEQ ID NO.5	5 μ L
100 μ M SEQ ID NO.6	5 μ L
TE 缓冲液 (pH = 8)	40 μ L

2. 配制高盐反应缓冲液 (2 \times): 20mM HEPES (pH8.0)、4mM ATP、4mM MgCl₂、1.0M KCl。
3. 稀释蛋白: 用 1 \times PBS 将 BCH326、BCH338 蛋白稀释到 10 μ M。
4. 进行 ATP 水解反应: 按表 2 的反应体系加入相应试剂, 30 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 80 $^{\circ}$ C 灭活 5 min。其中①②为实验组, ③④⑤⑥为相应的对照组, 每组 3 个重复。

表 2. ATP 水解反应体系

编号	反应缓冲液 (2 \times)	DNA	蛋白	H ₂ O
①	10 μ L	1 μ L (ovDNA)	1 μ L	8 μ L
②	10 μ L	1 μ L (ssDNA)	1 μ L	8 μ L
③	10 μ L	——	1 μ L	9 μ L
④	10 μ L	1 μ L (ovDNA)	——	9 μ L
⑤	10 μ L	1 μ L (ssDNA)	——	9 μ L
⑥	10 μ L	——	——	10 μ L

5. 检测反应剩余 ATP: 按照生产商说明, 使用 ATP 检测试剂盒 (碧云天, S0026B) 测定反应剩余 ATP 浓度。
6. 实验结果: 如图 5、图 6 所示, 在高盐条件下, BCH326、BCH338 均具有水解 ATP 的活性。

实施例 3

BCH326 和 BCH338 蛋白的 dsDNA 解链活性检测

1. 制备双链 DNA (ovDNA): 将 SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.8 退火为 5'悬挂 20 个 T 的 ovDNA, 退火流程为 95 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟, 0.1 $^{\circ}$ C/s 的降温速度降至 25 $^{\circ}$ C, 孵育 30 分钟, 退火配方见表 3。

表 3. ovDNA 退火配方

溶液	体积
100 μM SEQ ID NO.7	5 μL
100 μM SEQ ID NO.8	5 μL
TE 缓冲液 (pH = 8)	40 μL

2. 配制反应缓冲液：低盐反应缓冲液 1 为 100 mM HEPES (pH=8.0)、1 mg/mL BSA、10 mM MgCl_2 、150 mM KCl；高盐反应缓冲液 2 为 100 mM HEPES (pH=8.0)、1 mg/mL BSA、10 mM MgCl_2 、500 mM KCl。

3. 配制反应液：取 3 μL 10 μM 退火好的 ovDNA、6 μL 100 μM SEQ ID NO.9 (作为竞争 DNA, 去捕获解旋后的单条 DNA 链)、6 μL 100 mM ATP 到 585 μL 低盐反应缓冲液或高盐反应缓冲液中, 作为实验反应液。取 1 μL 10 μM SEQ ID NO.8、2 μL 100 μM SEQ ID NO.9、2 μL 100 mM ATP 到 195 μL 低盐反应缓冲液或高盐反应缓冲液中, 作为阳性对照液。

4. 稀释蛋白：用 1 \times PBS 将 BCH326、BCH338 蛋白稀释到 4.8 μM 。

5. 配制解链反应：分为实验组①、阴性组②、阳性组③, 按表 4 加入相应试剂, 使用酶标仪在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下检测反应 30min 内荧光强度的动力学变化, 每组 3 个重复。

6. 数据分析：计算实验组、阴性对照组的荧光值相对于阳性对照组荧光值的百分比。

表 4. 解链反应配方

编号	溶液 1	溶液 2
①	58.5 μL 实验反应液	1.5 μL 蛋白
②	58.5 μL 实验反应液	1.5 μL 反应缓冲液
③	58.5 μL 阳性对照液	1.5 μL 反应缓冲液

7. 实验结果：

在误差范围和仪器波动允许情况下, 通过计算测定到的荧光值与阳性对照测定的荧光值的比例, 绘制实验结果图 (因仪器灵敏度的关系, 阴性对照组有荧光吸收读取)。从实验结果可以看出, 每个实验中的阴性对照组在测定过程中一直保持不变, 而实验组荧光值随反应时间的增加而逐渐增大, 则表明该具有解旋双链 DNA 的活性, 且解旋方向为 5'-3'。

如图 7 和图 8 所示, 在低盐 (KCl 终浓度为 150 mM) 和高盐 (KCl 终浓度为 500 mM) 条件下, BCH326 有解旋 dsDNA 的活性, 且随着盐浓度升高, BCH326 解旋 dsDNA 的活性增强。如图 9 和图 10 所示, 在低盐和高盐条件下, BCH338 有解旋 dsDNA 的活性, 且随着盐浓度升高, BCH338 解旋 dsDNA 的活性增强。

实施例 4

限位序列阻滞 BCH326、BCH338 解链活性检测

1. 制备含有限位序列的双链 DNA (ovDNA): 将 SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.10 退火为 5' 悬挂 20 个 T 的 ovDNA (含有限位序列), 退火流程为 95°C 孵育 5 分钟, 0.1°C/s 的降温速度降至 25°C, 孵育 30 分钟, 退火配方见表 5。

表 5. ovDNA (含有限位序列) 退火配方

溶液	体积
100 μ M SEQ ID NO.7	5 μ L
100 μ M SEQ ID NO.10	5 μ L
TE 缓冲液 (pH = 8)	40 μ L

2. 配制反应缓冲液: 低盐反应缓冲液为 100 mM HEPES (pH=8.0)、1 mg/mL BSA、10 mM MgCl₂、150 mM KCl; 高盐反应缓冲液为 100 mM HEPES (pH=8.0)、1 mg/mL BSA、10 mM MgCl₂、500 mM KCl。

3. 配制反应液: 取 3 μ L 10 μ M 退火好的 ovDNA (含有限位序列)、6 μ L 100 μ M SEQ ID NO.9 (20 倍竞争 DNA)、6 μ L 100 mM ATP 到 585 μ L 低盐反应缓冲液或高盐反应缓冲液中, 作为实验反应液。取 1 μ L 10 μ M SEQ ID NO.11、2 μ L 100 μ M SEQ ID NO.9 (20 倍竞争 DNA)、2 μ L 100 mM ATP 到 195 μ L 低盐反应缓冲液或高盐反应缓冲液中, 作为阳性对照液。

4. 稀释蛋白: 用 1 \times PBS 将 BCH326、BCH338 蛋白稀释到 4.8 μ M。

5. 配制解链反应: 分为实验组①、阴性组②、阳性组③, 按表 6 加入相应试剂, 使用酶标仪在 30 °C 条件下检测反应 30min 内荧光强度的动力学变化, 每组 3 个重复。

6. 数据分析: 计算实验组、阴性对照组的荧光值相对于阳性对照组荧光值的百分比。

表 6. 解链反应配方

编号	溶液 1	溶液 2
①	58.5 μ L 实验反应液	1.5 μ L 蛋白
②	58.5 μ L 实验反应液	1.5 μ L 1 \times PBS
③	58.5 μ L 阳性对照液	1.5 μ L 1 \times PBS

7. 实验结果:

如图 11-图 12 所示, 在低盐 (KCl 终浓度为 150 mM) 和高盐 (KCl 终浓度为 500 mM) 条件下, 限位序列均削弱了 BCH326 解旋 dsDNA 的活性, 但不能完全阻滞其解旋活性, 且在

高盐条件下 BCH326 仍具有持续的解旋活性趋势。如图 13 所示，在低盐条件下，限位序列几乎完全阻滞 BCH338 解旋 dsDNA；如图 14 所示，在高盐条件下，限位序列可以削弱 BCH338 解旋 dsDNA 的活性，但不能完全阻滞其解旋 dsDNA。

实施例 5

BCH326 和 BCH338 蛋白的纳米孔测序应用

1. 将两条部分区域互补的 DNA 链（top strand, SEQ ID NO.11 和 bottom strand, SEQ ID NO.12）退火形成接头，与待测双链目的片段利用 T4 DNA 连接酶在室温下连接并纯化，制备测序文库。图 15 示出了接头示意图（a：上链；b：下链）。

2. BCH326 或者 BCH338 蛋白分别与测序文库在 25℃ 孵育 1h（摩尔浓度比 1:8），形成含解旋酶的测序文库。图 16 示出了含有解旋酶测序文库示意图（a：上链；b：下链；c：双链目的片段；d：解旋酶；e：胆固醇标记双链 DNA）。

3. 含解旋酶的测序文库与 5' 端含有胆固醇的单链 DNA（ssDNA-chol, SEQ ID NO.13）在室温下孵育 10min。ssDNA-chol 序列与接头 bottom strand 其中一部分区域互补，胆固醇结合磷脂膜后能够降低文库上样量，提高捕获率。

4. 使用膜片钳放大器或其他电信号放大器（如图 17 所示）采集电流信号。中间有微米级小孔的（直径 50-200 μm）Teflon 膜将电解池分为两个腔室，cis 腔室和 trans 腔室；在 cis 腔室和 trans 腔室各放置一对 Ag/AgCl 电极；在两个腔室的微孔处形成一层双分子磷脂膜后加入纳米孔蛋白 CsgG-Eco-(Y51A/F56Q/R97W/R192D-StrepII(C))；待单个纳米孔蛋白插入磷脂膜后获得了电测量；加入步骤 3 的反应产物，施加 180 mV，测序文库被纳米孔所捕获并在解旋酶的控制下核酸穿过纳米孔。该实验所用缓冲液为：0.47M KCl，25 mM HEPES，1 mM EDTA，5 mM ATP，25 mM MgCl₂，pH 7.6，测序温度是 28℃。

5. 利用 BCH326 进行测序实验，测序电信号如图 18 所示。利用 BCH338 进行测序实验，测序电信号如图 19 所示。结果可见，随着解旋酶控制 DNA 单链进入纳米孔，部分电流被阻碍，电流变小。由于不同核苷酸大小不同，阻碍的电流大小也因此不同，所以可以看到波动的电流信号。且图 18 和 19 均具有完整的接头信号和回复信号，信噪比高，说明测序信号的稳定性好。

SEQ ID NO.5: 5'-GCGTCGAAAAGCAGTACTTAGGCATT-3'

SEQ ID NO.6: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATGCCTAAGTACTGCTTTTCGACGC-3'

SEQ ID NO.7: 5'-BHQ-1-GCGTCGAAAAGCAGTACTTAGGCATT-3'

SEQ ID NO.8: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATGCCTAAGTACTGCTTTTCGACGC-FAM-3'

SEQ ID NO.9: 5'-AATGCCTAAGTACTGCTTTTCGACGC-3'

SEQ ID NO.10: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTNNNAATGCCTAAGTACTGCTTTTC
GACGC-FAM-3' (N=iSP18)

SEQ ID NO.11: 5'-TTNNNGGTT
GTTTCTGTTGGTGCTGATATTGCT-3' (N= iSP18)

SEQ ID NO.12: 5'-GCAATATCAGCACCAACAGAAACAACCTTTGAGGCGAGCGGTC
AA-3'

SEQ ID NO.13: 5'-cholesterol-TTGACCGCTCGCCTC-3'。

以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

1. 一种解旋酶，其特征在于，所述解旋酶具有两个塔结构域和一个销结构域，两个所述塔结构域位于所述解旋酶三维结构的同一侧。
2. 根据权利要求1所述的解旋酶，其特征在于，所述解旋酶包括以下至少一种：
 - A) BCH326，所述 BCH326 为具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的蛋白质；
 - B) BCH338，所述 BCH338 为具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的蛋白质；
 - C) 在 A) 或 B) 中限定的蛋白质的表面上至少一个半胱氨酸突变为丙氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸或甲硫氨酸的蛋白质；
 - D) 对 A)、B) 和 C) 中任一所限定的蛋白质的氨基酸序列的所述塔结构域和/或所述销结构域上至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸，且具有 DNA 解旋能力的蛋白质；和
 - E) 与 A)、B)、C) 和 D) 中任一所限定的蛋白质的氨基酸序列具有 70% 以上同源性且具有相同功能的蛋白质。
3. 根据权利要求2所述的解旋酶，其特征在于，所述 C) 包括：

将所述 BCH326 的第 319 位的氨基酸 C 替换为 A、S、T、V、I、L 或 G 的蛋白质；

和

将所述 BCH338 的第 326 位或第 459 位的氨基酸 C 替换为 A、S、T、V、I、L 或 G 的蛋白质。
4. 根据权利要求2所述的解旋酶，其特征在于，所述 D) 中，所述塔结构域和/或所述销结构域上至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸包括以下至少一种：

所述 BCH326 的塔结构域上 S389、R340、K341、S342、N343、K343、S344、I345、V346、I347、D348、K349、D350、G351、K352、A353、K354、E355、F356、L357、R358、K359、F360、L361、N362、F363、A364、K365、I366、Y367、N368、F369、T370、N371、K372、G373、G374、H378、G379、R380、R381、I382、T383、K384、K385、S386、K387、K388、E389、L390 和 W391 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；

所述 BCH326 的销结构域上 D87、I88、G89、T90、I91、H92、S93、Y94、F95、D96、I97、K98、P99、D100、I101、D102、D103、N104、G105、N106、R107、V108、F109、K110、P111 或 S112 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；

所述 BCH338 的塔结构域上 S405、K406、F407、L408、V409、P410、L411、G412、D413、G414、S415、K416、E417、D418、L419、F420、P421、L422、Y423、K424、E425、A426、V427、F428、D429、I430、A431、K432、T433、M434、N435、N436、Q437、R438、K439、I440、S441、K442、N443、S444、K445、K446、N447、F448 或 W449 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；

所述 BCH338 的销结构域上 E93、I94、R95、P96、D97、I98、N99、E100、F101、G102、E103、R104、I105、F106、V107、P108、K109、L110、R111、D112、M113、M114 中的至少一个位点的氨基酸突变成半胱氨酸或引入至少一个非天然氨基酸；

优选地，所述 E) 中，所述蛋白质与 A)、B)、C) 和 D) 中任一所限定的蛋白质的氨基酸序列具有 70%、80%、90%、95% 或 99% 以上同源性及相同功能。

5. 根据权利要求 2 至 4 任一项所述的解旋酶，其特征在于，所述非天然氨基酸选自 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、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-(苯基硫烷基)-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)氨基己酸和 O-(2-硝基苄基)-L-酪氨酸或 2-硝基苯丙氨酸中的至少一种；

优选的，所述 BCH326 引入至少一个非天然氨基酸包括如下至少一种：D100 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、I101 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、D102 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、D103 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、N104 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、G105 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、N106 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、R107 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、D103 引入 4-乙酰基-L-苯丙氨酸、G105 引入 4-乙酰基-L-苯丙氨酸和 N106 引入 4-乙酰基-L-苯丙氨酸；

优选的，所述 BCH338 引入至少一个非天然氨基酸包括如下至少一种：A431 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、K432 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、T433 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、M434 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、N435 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、S441 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、K442 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸、N443 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸和 S444 引入 4-叠氮基-L-苯丙氨酸。

6. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的解旋酶，其特征在于，在所述解旋酶的 DNA 结合区的氨基酸位点和/或 ATP 催化活性中心附近的氨基酸位点具有至少一个位点的氨基酸突变，所述突变包括将原有氨基酸突变为更大侧链氨基酸；

优选的，所述将原有氨基酸突变为更大侧链氨基酸包括以下至少一种：天冬酰胺被谷氨酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸取代；脯氨酸被精氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸或亮氨酸取代；组氨酸被精氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸取代；脯氨酸被精氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺或组氨酸取代；苯丙氨酸被精氨酸、赖氨酸、组氨酸、酪氨酸或色氨酸取代；异亮氨酸被苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸、赖氨酸或精氨酸取代；酪氨酸被精氨酸、赖氨酸、或色氨酸取代；

BCH326 的 DNA 结合区氨基酸位点包括：L157、V160、L294、G296、N299、L303、A304、I328、F329、T330、N331、G332、G333 和 E334，ATP 催化活性中心附近的氨基酸位点包括：K211、E212、E213、N214、Y215、K216、A217、P218、L219、K220、D221、I222、N223 和 N224；

BCH338 的 DNA 结合区氨基酸位点包括：H89、S90、Y91、F92、E93、I94、R95 和 P96；ATP 催化活性中心附近的氨基酸位点包括：Y152、Q153、L154、P155、P156、V157、F193、L194、I195、K196、E197、Y198、E199、E200 和 N201。

7. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的解旋酶，其特征在于，在所述解旋酶表面的与纳米孔结合区相互作用的氨基酸具有至少一个位点的突变，所述突变包括将原来的氨基酸突变为更短侧链的氨基酸；

优选的，所述将原来的氨基酸突变为更短侧链的氨基酸包括：天冬酰胺被异亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、丝氨酸或甘氨酸取代；赖氨酸被异亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、丝氨酸或甘氨酸取代；赖氨酸被异亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、丝氨酸或甘氨酸取代；精氨酸被异亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、丝氨酸或甘氨酸取代；

优选的，BCH326 表面与纳米孔结合区相互作用的氨基酸包括：M1、E2、S3、K4、I5、N6、L7、T8、E9、D10、Q11、L12、K13、I14、I15、K16、I189、I190、R191、T192、Q193、N194、K195、N196 和 S197；

BCH338 表面与纳米孔结合区相互作用的氨基酸包括：M1、G2、E3、I4、K5、L6、N7、E8、E9、Q10、Q11、K12、K177、I177、L178、R179、T180、K181、N182、L213、I214、D215、H216、F217、H218、V219、Y220、G221、D248、L249、T250、D251、S252、T253、E254 和 S255。

8. 一种分离的 DNA 分子，其特征在于，所述 DNA 分子具有

(a) 编码权利要求 2 至 3 中任一项所述的解旋酶的核苷酸序列；或

- (b) 在严格条件下与 (a) 限定的 DNA 分子杂交的核苷酸序列；或
- (c) 具有 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列；或
- (d) 与 (a) 至 (c) 中限定的任一种所述的核苷酸序列具有 70% 以上同源性，且编码与所述解旋酶具有相同功能的蛋白质的核苷酸序列。
9. 根据权利要求 8 所述的 DNA 分子，其特征在于，所述 DNA 分子具有与 (a) 至 (c) 中限定的任一种所述核苷酸序列具有 75% 以上，优选 85% 以上，更优选 95% 以上，进一步优选 99% 以上同源性且编码具有相同功能蛋白质的核苷酸序列。
10. 一种重组载体，其特征在于，所述重组载体包含权利要求 8 或 9 所述的 DNA 分子。
11. 根据权利要求 10 所述的重组载体，其特征在于，所述重组载体选自质粒、病毒或运载体表达载体；
- 进一步地，所述重组载体包括用于控制所述 DNA 分子表达的调控元件；
- 更进一步地，所述调控元件包括与所述 DNA 分子可操作地连接的启动子；
- 优选地，所述启动子包括 T7、trc、lac、ara 或 λ L；
- 更优选地，所述重组载体选自质粒 PET.28a(+)、PET.21a(+) 或 PET.32a(+)。
12. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包含有权利要求 8 或 9 所述的 DNA 分子，或权利要求 10 或 11 所述的重组载体。
13. 根据权利要求 12 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包括大肠杆菌；
- 优选地，所述宿主细胞包括 BL21(DE3)、BL21 Star (DE3) pLysS、Rossata(DE3) 或 Lemo21(DE3)。
14. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的解旋酶在核酸控制或表征中的应用；
- 进一步地，所述核酸控制包括对核酸穿过纳米孔的速度的控制、对核酸穿孔的稳定性控制或对核酸穿孔的持续性控制；
- 更进一步地，所述应用包括在纳米传感器中的应用和/或在单分子纳米孔测序中的应用。
15. 一种纳米孔测序试剂盒，包括解旋酶，其特征在于，所述解旋酶为如权利要求 1 至 7 中任一项所述的解旋酶。
16. 一种纳米孔测序的方法，包括待测序核酸分子在解旋酶的控制下进行测序，其特征在于，所述解旋酶为如权利要求 1 至 7 中任一项所述的解旋酶。

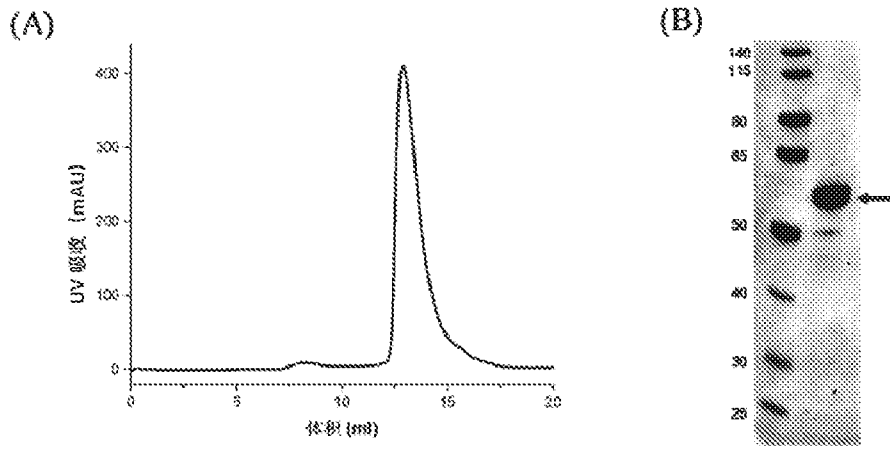


图 1

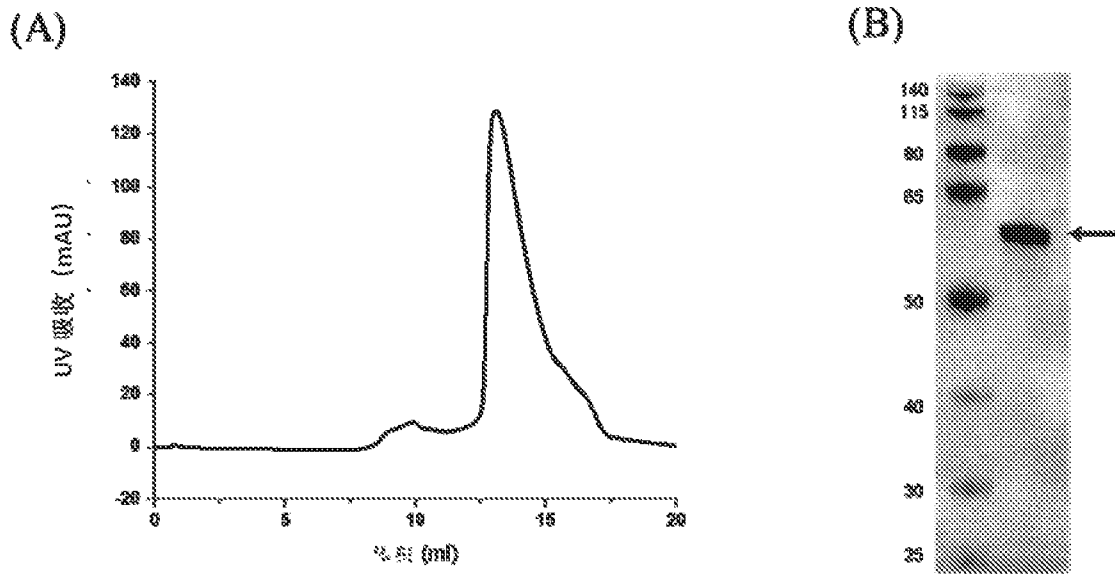


图 2

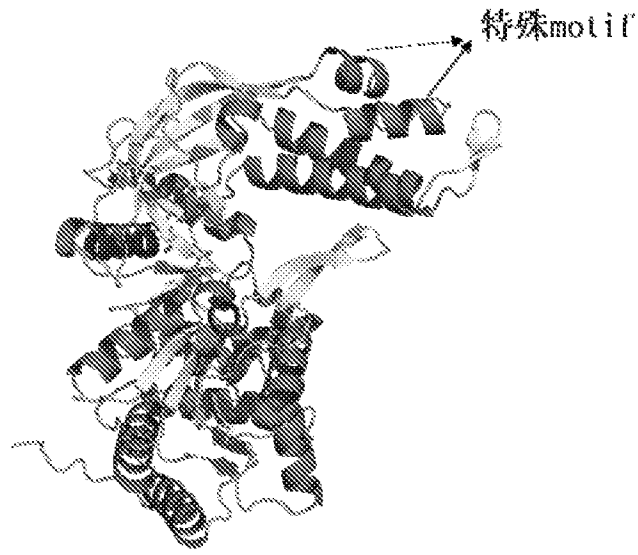


图 3

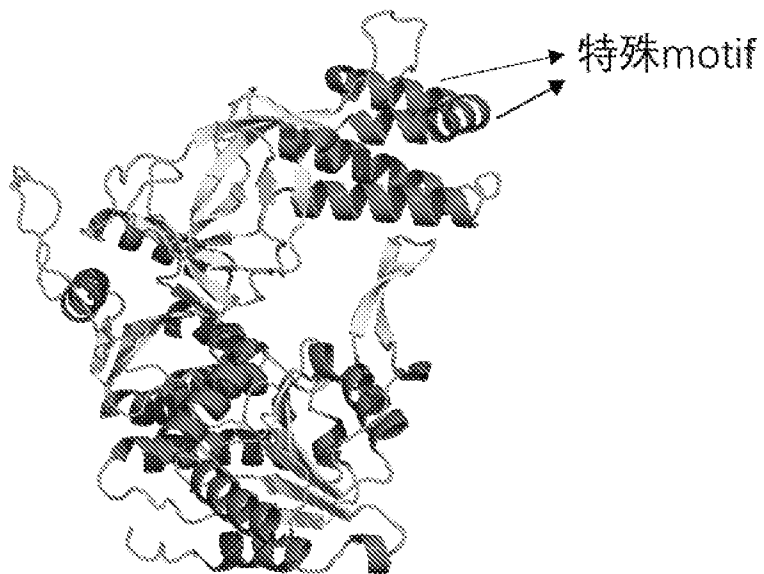


图 4

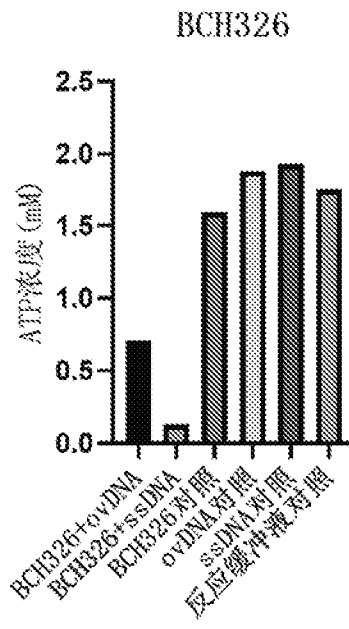


图 5

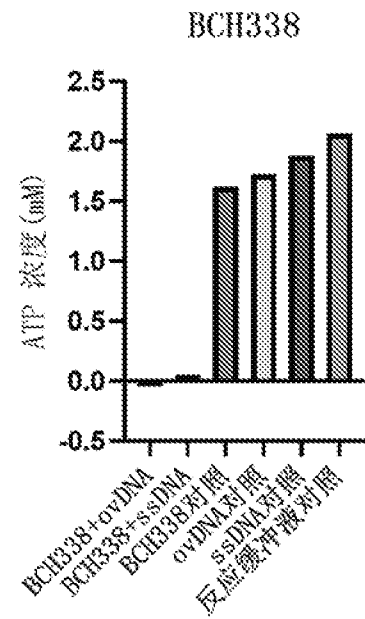


图 6

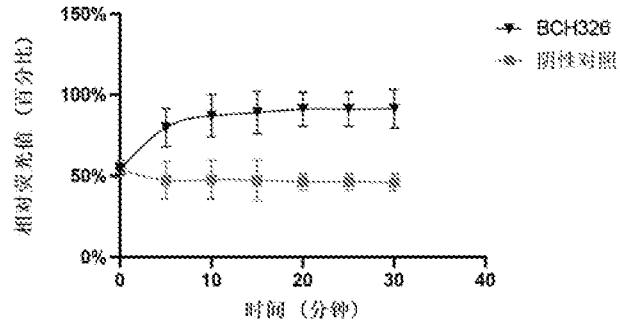


图 7

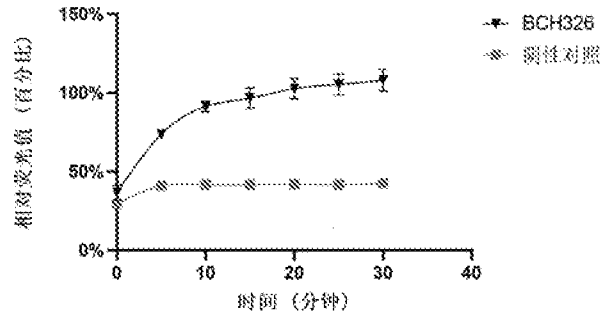


图 8

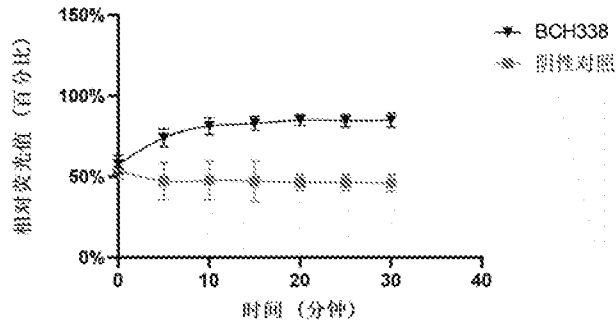


图 9

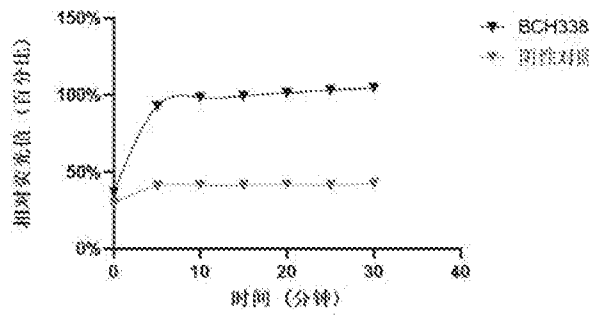


图 10

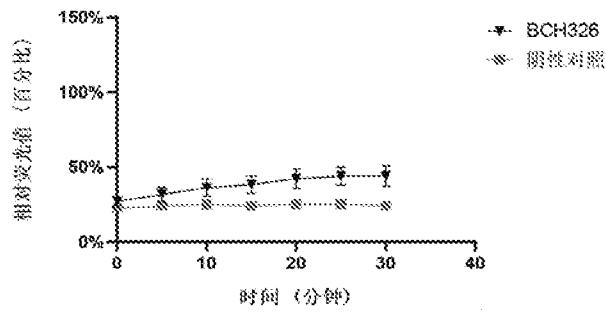


图 11

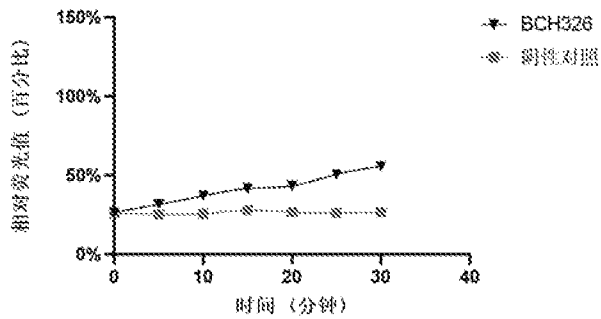


图 12

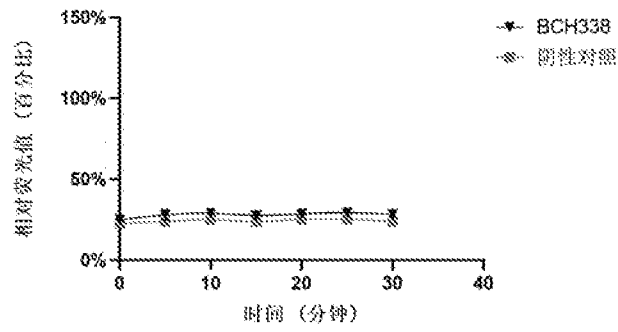


图 13

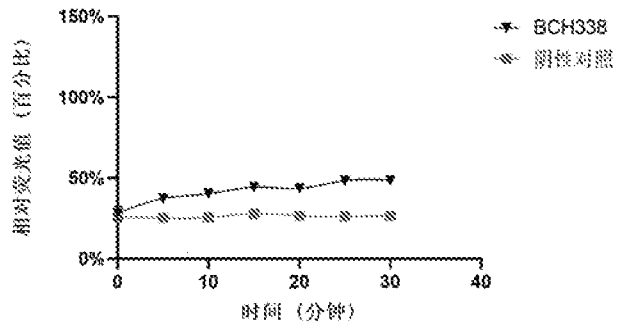


图 14

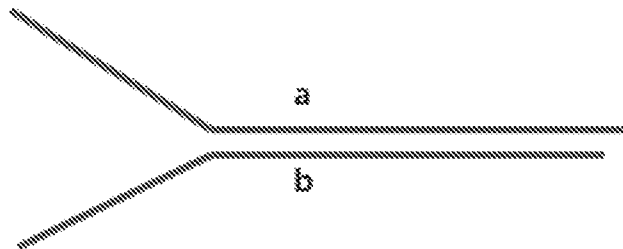


图 15

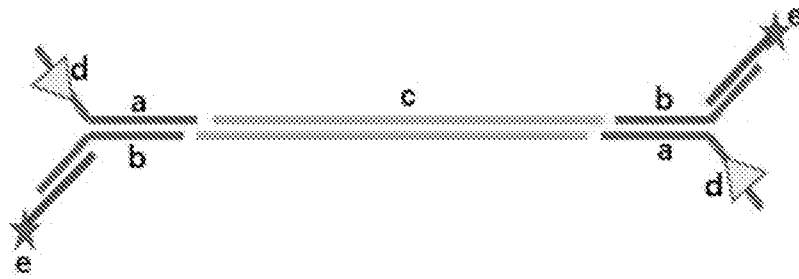


图 16

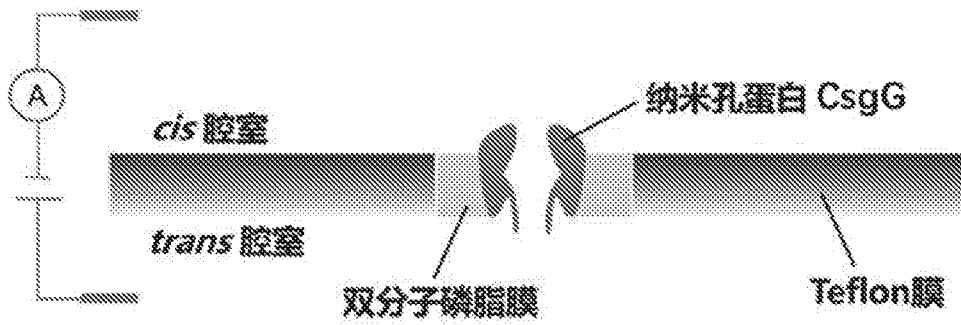


图 17

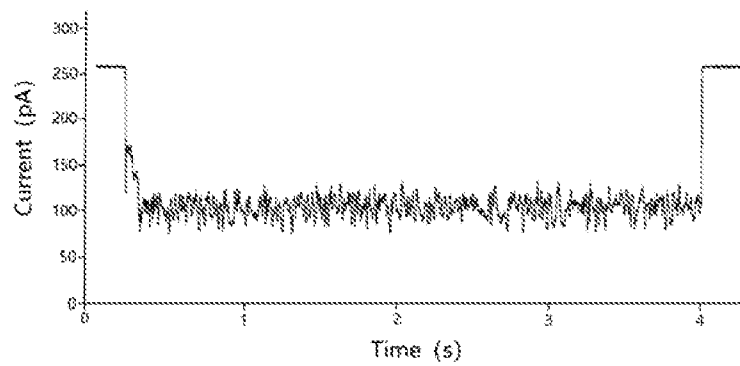


图 18

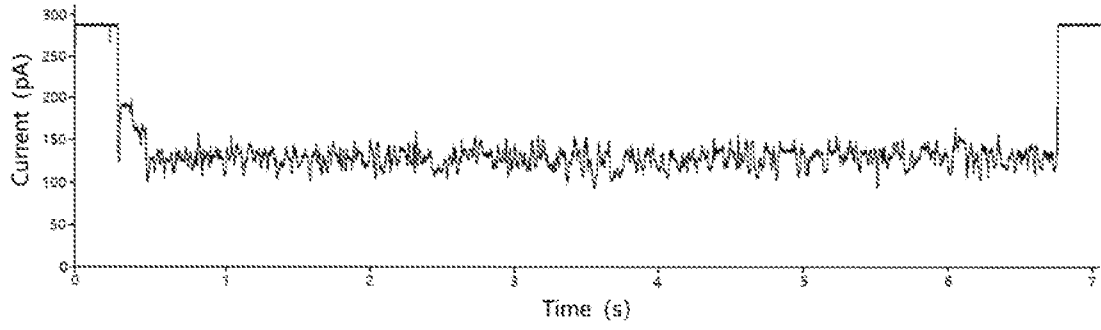


图 19

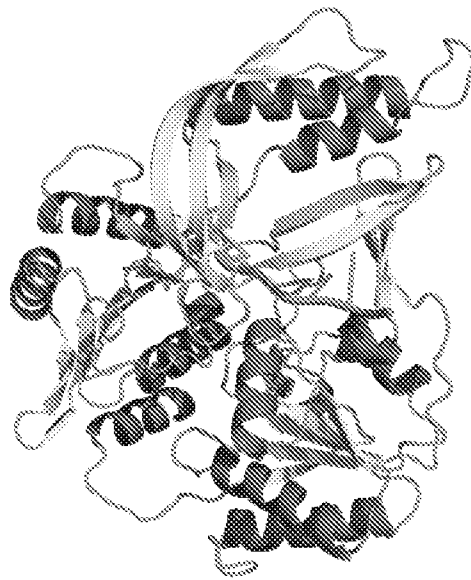


图 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/143631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/00(2006.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12Q 1/6869(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)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
IPC: C12N, C12Q

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

CNTXT, DWPI, USTXT, EPTXT, WOTXT, ENTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG Database, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 解旋酶, 测序, 纳米孔, helicase, sequencing, nanopore; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NOS: 1-4的序列检索, GenBank+EMBL+China Patents Biological Sequence Search System: sequence search for SEQ ID NOS: 1-4.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107109380 A (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES LTD.) 29 August 2017 (2017-08-29) see claims 1-56, and SEQ ID NOS:12 and 14;	1-16
A	CN 114599666 A (BEIJING QITAN TECHNOLOGY CO., LTD.) 07 June 2022 (2022-06-07) see abstract	1-16
A	US 2017335297 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 23 November 2017 (2017-11-23) see claims 1-83	1-16
A	GenBank. "WP_104412940.1" NCBI Reference Sequence, 27 July 2021 (2021-07-27), see sequence and related information thereof	1-16

 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

15 September 2023

Date of mailing of the international search report

24 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	李燕杰 等 (LI, Yanjie et al.). "丙型肝炎病毒解旋酶在大肠杆菌中的表达研究 (Study on the Expression of Helicase of HCV in E.coli)" <i>胃肠病学和肝病学杂志 (Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology)</i> , 31 December 2001 (2001-12-31), pages 315-317, see abstract	1-16
A	CHEN, Zhijie et al. "Controlled movement of ssDNA conjugated peptide through Mycobacterium smegmatis porin A (MspA) nanopore by a helicase motor for peptide sequencing application" <i>Chemical Science</i> , 12 November 2021 (2021-11-12), pages 15750-15756, see abstract	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/143631

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 13ter.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/CN2022/143631

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107109380	A	29 August 2017	US	2022135956	A1	05 May 2022
				EP	3204406	A2	16 August 2017
				EP	3204406	B1	06 July 2022
				US	2018179500	A1	28 June 2018
				US	11180741	B2	23 November 2021
				KR	20170063889	A	08 June 2017
				KR	102436445	B1	24 August 2022
				JP	2017535256	A	30 November 2017
				JP	6843042	B2	17 March 2021
				GB	201417712	D0	19 November 2014
				WO	2016055777	A2	14 April 2016
				WO	2016055777	A3	16 June 2016
				EP	4108679	A1	28 December 2022

CN	114599666	A	07 June 2022	None			

US	2017335297	A1	23 November 2017	US	11198855	B2	14 December 2021
				US	2022259576	A1	18 August 2022
				CA	2967036	A1	19 May 2016
				WO	2016077763	A1	19 May 2016
				EP	3218467	A1	20 September 2017
				EP	3218467	A4	11 April 2018

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/00(2006.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>IPC: C12N, C12Q</p> <p>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))</p> <p>CNXTX, DWPI, USTXT, EPTXT, WOTXT, ENTXT, CNKI, 万方数据库, WEB OF SCIENCE, PUBMED; 解旋酶, 测序, 纳米孔, helicase, sequencing, nanopore; GenBank+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NOs:1-4的序列检索。</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 107109380 A (牛津纳米孔技术公司) 2017年8月29日 (2017 - 08 - 29) 参见权利要求1-56、SEQ ID NOs:12和14;</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 114599666 A (北京齐碳科技有限公司) 2022年6月7日 (2022 - 06 - 07) 参见摘要</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2017335297 A1 (UNIV ILLINOIS) 2017年11月23日 (2017 - 11 - 23) 参见权利要求1-83</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>GenBank. "WP_104412940.1" NCBI Reference Sequence, 2021年7月27日 (2021 - 07 - 27), 参见序列及其相关信息</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>李燕杰 等. "丙型肝炎病毒解旋酶在大肠杆菌中的表达研究" 胃肠病学和肝病杂志, 2001年12月31日 (2001 - 12 - 31), 第315-317页, 参见摘要</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 107109380 A (牛津纳米孔技术公司) 2017年8月29日 (2017 - 08 - 29) 参见权利要求1-56、SEQ ID NOs:12和14;	1-16	A	CN 114599666 A (北京齐碳科技有限公司) 2022年6月7日 (2022 - 06 - 07) 参见摘要	1-16	A	US 2017335297 A1 (UNIV ILLINOIS) 2017年11月23日 (2017 - 11 - 23) 参见权利要求1-83	1-16	A	GenBank. "WP_104412940.1" NCBI Reference Sequence, 2021年7月27日 (2021 - 07 - 27), 参见序列及其相关信息	1-16	A	李燕杰 等. "丙型肝炎病毒解旋酶在大肠杆菌中的表达研究" 胃肠病学和肝病杂志, 2001年12月31日 (2001 - 12 - 31), 第315-317页, 参见摘要	1-16
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	CN 107109380 A (牛津纳米孔技术公司) 2017年8月29日 (2017 - 08 - 29) 参见权利要求1-56、SEQ ID NOs:12和14;	1-16																		
A	CN 114599666 A (北京齐碳科技有限公司) 2022年6月7日 (2022 - 06 - 07) 参见摘要	1-16																		
A	US 2017335297 A1 (UNIV ILLINOIS) 2017年11月23日 (2017 - 11 - 23) 参见权利要求1-83	1-16																		
A	GenBank. "WP_104412940.1" NCBI Reference Sequence, 2021年7月27日 (2021 - 07 - 27), 参见序列及其相关信息	1-16																		
A	李燕杰 等. "丙型肝炎病毒解旋酶在大肠杆菌中的表达研究" 胃肠病学和肝病杂志, 2001年12月31日 (2001 - 12 - 31), 第315-317页, 参见摘要	1-16																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p>																				
<p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"D" 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年9月15日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年9月24日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p>		<p>授权官员</p> <p>吴汀晨</p> <p>电话号码 (+86) 010-62089319</p>																		

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	Zhijie Chen 等. "Controlled movement of ssDNA conjugated peptide through Mycobacterium smegmatis porin A (MspA) nanopore by a helicase motor for peptide sequencing application" Chemical Science, 2021年11月12日 (2021 - 11 - 12), 第15750 - 15756页, 参见摘要	1-16

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/CN2022/143631

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	107109380	A	2017年8月29日	US	2022135956	A1	2022年5月5日
				EP	3204406	A2	2017年8月16日
				EP	3204406	B1	2022年7月6日
				US	2018179500	A1	2018年6月28日
				US	11180741	B2	2021年11月23日
				KR	20170063889	A	2017年6月8日
				KR	102436445	B1	2022年8月24日
				JP	2017535256	A	2017年11月30日
				JP	6843042	B2	2021年3月17日
				GB	201417712	D0	2014年11月19日
				WO	2016055777	A2	2016年4月14日
				WO	2016055777	A3	2016年6月16日
				EP	4108679	A1	2022年12月28日
CN	114599666	A	2022年6月7日	无			
US	2017335297	A1	2017年11月23日	US	11198855	B2	2021年12月14日
				US	2022259576	A1	2022年8月18日
				CA	2967036	A1	2016年5月19日
				WO	2016077763	A1	2016年5月19日
				EP	3218467	A1	2017年9月20日
				EP	3218467	A4	2018年4月11日