



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107074916 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201580046217.9

(22)申请日 2015.08.25

(30)优先权数据

62/041,587 2014.08.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.02.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2015/050813 2015.08.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/029308 EN 2016.03.03

(71)申请人 艾伯塔大学校董

地址 加拿大艾伯塔省

(72)发明人 卡洛·大卫·蒙泰马尼奥

杰弗里·杰曼 凯尔·米诺

西诺伊·亚伯拉罕 许晓芬 何原

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 关越

(51)Int.Cl.

G07K 14/245(2006.01)

B01D 61/00(2006.01)

C02F 1/44(2006.01)

G07K 14/195(2006.01)

G07K 14/32(2006.01)

G07K 14/39(2006.01)

G07K 14/415(2006.01)

G07K 14/47(2006.01)

G07K 14/705(2006.01)

G07K 17/00(2006.01)

G07K 17/08(2006.01)

G07K 17/12(2006.01)

G07K 19/00(2006.01)

权利要求书7页 说明书19页

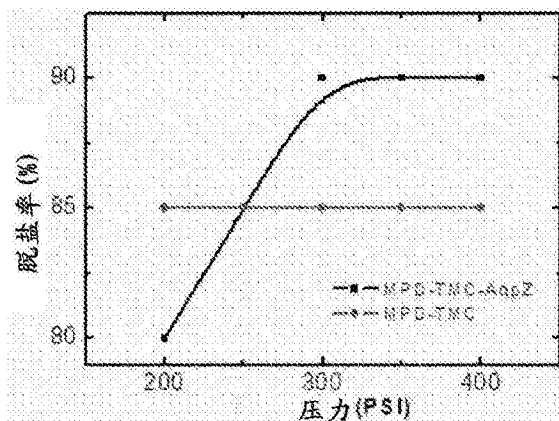
序列表16页 附图17页

(54)发明名称

官能化β折叠肽稳定的膜蛋白、包含其的构建体以及形成和使用其的方法

(57)摘要

提供了具有通过官能化β折叠肽稳定的膜蛋白的构建体。所述构建体可以与支持物缔合或共价连接。所述支持物可以是膜。所述膜可用于选择性地使期望颗粒从膜的一侧移动到另一侧，同时阻止不期望颗粒通过膜。提供了制备和使用这样的构建体和膜的方法。



1. 一种膜,其被配置成用于选择性地使期望颗粒穿过所述膜,其包含:  
支持物;和  
与所述支持物缔合的多个膜蛋白分子,所述膜蛋白分子中的每一个通过多个官能化 $\beta$ 折叠肽稳定。
2. 根据权利要求1所述的膜,其中所述官能化 $\beta$ 折叠肽中的至少一些与所述支持物共价连接。
3. 根据权利要求1或2中任一项所述的膜,其中所述膜蛋白分子选自水通道蛋白、ChIEF、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP酶、OmpG、NaChBAC、细菌视紫红质、丙甲甘肽、溶血素、NADH还原酶、OmpF、RC、NtAPQ1、NtPIP2:1、AQP0、AQP10、SoPIP2、TsX、短杆菌肽A、MloK1、LamB、FhuA、BR、ATP酶、血凝素、Cc0、多粘菌素B、溶血素、天蚕素A和变形菌视紫红质。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的膜,其中所述膜蛋白分子在所述膜中形成通道,以选择性地允许所述期望颗粒从其中通过。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的膜,其中所述膜蛋白分子适于选择性地运输所述期望颗粒穿过所述膜。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的膜,其中所述膜被配置为阻止一种或多种污染物通过所述膜。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的膜,其中所述期望颗粒是选自以下的分子或离子:水分子、电子、质子、钙、钙黄绿素、二氧化碳、核苷、吡啶橙、百草枯、绿脓菌素、乙酰硫代胆碱、烯酮、ELF97、7-ADCA、PGME、氨基青霉素、L-抗坏血酸、CO、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>、ONOO<sup>-</sup>、一价阳离子、钾、二糖、DNA、RNA、磺酰罗丹明B、TMB和NAD。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的膜,其中所述支持物是用于固定所述膜蛋白分子的基质。
9. 根据权利要求1所述的膜,其中所述膜蛋白分子包含水通道蛋白,并且所述期望颗粒包含水分子。
10. 根据权利要求1所述的膜,其中:  
所述膜蛋白分子包含ChIEF,并且所述期望颗粒包含质子、钠离子或钙离子;或  
所述膜蛋白分子包含F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP酶,并且所述期望颗粒包含ATP或质子;或  
所述膜蛋白分子包含OmpG,并且所述期望颗粒包含二糖;或  
所述膜蛋白分子包含NaChBAC,并且所述期望颗粒包含钠离子;或  
所述膜蛋白分子包含 $\alpha$ -溶血素、MspA、OmpF或OmpG,并且所述期望颗粒包含多核苷酸,包括DNA或RNA;或  
所述膜蛋白分子包含丙甲甘肽、溶血素、NADH还原酶、OmpG、OmpF或RC,并且所述期望颗粒包含电子;或  
所述膜蛋白分子包含丙甲甘肽,并且所述期望颗粒包含钙或钙黄绿素;或  
所述膜蛋白分子包含NtAPQ1或NtPIP2:1,并且所述期望颗粒包含二氧化碳;或  
所述膜蛋白分子包含AQP0、AQP10或SoPIP2:1,并且所述期望颗粒包含水;或  
所述膜蛋白分子包含TsX,并且所述期望颗粒包含核苷;或  
所述膜蛋白分子包含OmpF,并且所述期望颗粒包含吡啶橙、百草枯、绿脓菌素、乙酰硫代胆碱、烯酮、ELF97、7-ADCA、PGME、核苷、氨基青霉素、L-抗坏血酸、CO、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>或ONOO<sup>-</sup>;或

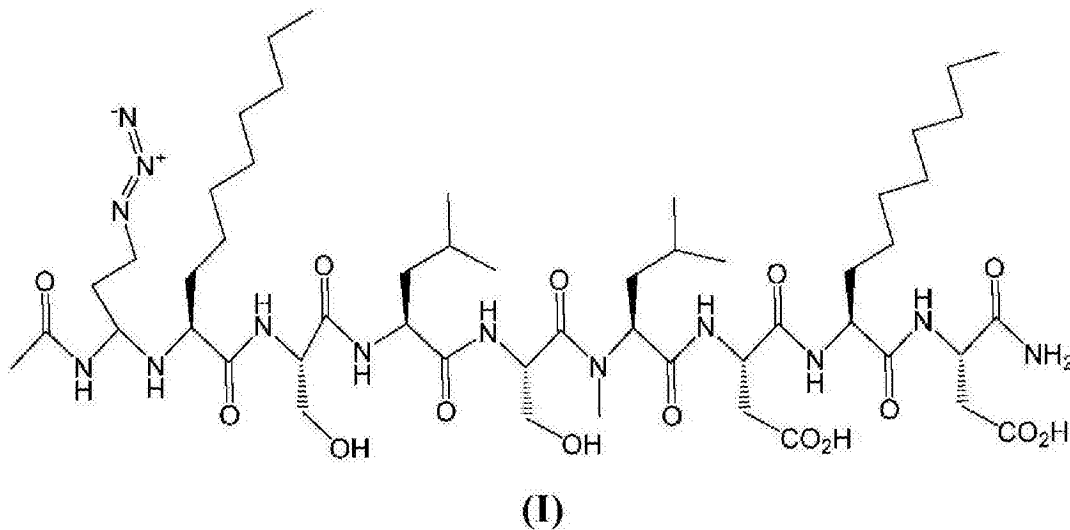
- 所述膜蛋白包含短杆菌肽A,并且所述期望颗粒包含一价阳离子;或  
所述膜蛋白包含LamB,并且所述期望颗粒含糖或DNA;或  
所述膜蛋白包含FhuA,并且所述期望颗粒包含磺酰罗丹明B、TMB、NAD、DNA或钙黄绿素;  
或  
所述膜蛋白包含细菌视紫红质、PR或细菌视紫红质和CcO两者,并且所述期望颗粒包含H<sup>+</sup>;或  
所述膜蛋白包含细菌视紫红质和ATP酶两者,并且所述期望颗粒包含H<sup>+</sup>和电子;或  
所述膜蛋白包含Cco,并且所述期望颗粒包含电子、多粘菌素B或溶血素;或  
所述膜蛋白包含天蚕素A,并且所述期望颗粒包含钙黄绿素。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的膜,其中所述支持物包含聚合物,其中所述聚合物任选地包含聚砜、聚碳酸酯或聚内酯。
12. 根据权利要求11所述的膜,其中所述支持物包含聚砜膜,并且其中在所述聚砜膜形成期间引入成孔剂。
13. 根据权利要求1至10中任一项所述的膜,其中所述支持物包含碳纳米管网。
14. 根据权利要求1至10中任一项所述的膜,其中所述支持物包含纳米晶体纤维素。
15. 根据权利要求1至14中任一项所述的膜,其中所述膜被配置为阻止钠离子、氯离子、氨、尿素、染料、农药、药物废物和其他有机化合物通过,同时选择性地允许水通过所述膜。
16. 一种复合物,其包含通过多个官能化β折叠肽稳定的膜蛋白。
17. 根据权利要求16所述的复合物,其中所述膜蛋白包含水通道蛋白、CHIEF、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP酶、OmpG、NaChBAC、细菌视紫红质、丙甲甘肽、溶血素、NADH还原酶、OmpF、RC、NtAPQ1、NtPIP2:1、AQP0、AQP10、SoPIP2、TsX、短杆菌肽A、MloK1、LamB、FhuA、BR、ATP酶、血凝素、CcO、多粘菌素B、溶血素、天蚕素A、变形菌视紫红质或MspA。
18. 根据权利要求16或17中任一项所述的复合物,其中通过将所述多个官能化β折叠肽中的至少一个上的官能团与所述固体支持物缀合,来将所述复合物固定在固体支持物上。
19. 根据权利要求18所述的复合物,其中所述固体支持物包含聚合物、碳纳米管网或纳米晶体纤维素,并且其中所述聚合物任选地包含聚砜、聚碳酸酯或聚内酯。
20. 根据权利要求1至19中任一项所述的膜或复合物,其中所述官能化β折叠肽包含通用序列(辛基)Gly-Ser-Leu-Ser-Leu-Asp-(辛基)Gly-Asp (SEQ ID NO:1),其中任选地一个或更多个氨基酸包含N-甲基氨基酸。
21. 根据权利要求1至20中任一项所述的膜或复合物,其中所述官能化β折叠肽包含炔官能化β折叠肽,其中所述炔官能团任选地提供在所述官能化β折叠肽的末端处或所述官能化β折叠肽的中间部分中。
22. 根据权利要求21所述的膜或复合物,其中通过在所述官能化β折叠肽中引入炔丙基修饰的氨基酸来提供所述炔官能团。
23. 根据权利要求1至22中任一项所述的膜或复合物,其中所述官能化β折叠肽包含烯官能化β折叠肽,其中所述烯官能团任选地提供在所述官能化β折叠肽的末端处或所述官能化β折叠肽的中间部分中。
24. 根据权利要求23所述的膜或复合物,其中通过在所述官能化β折叠肽中引入乙烯基修饰的氨基酸来提供所述烯官能团。

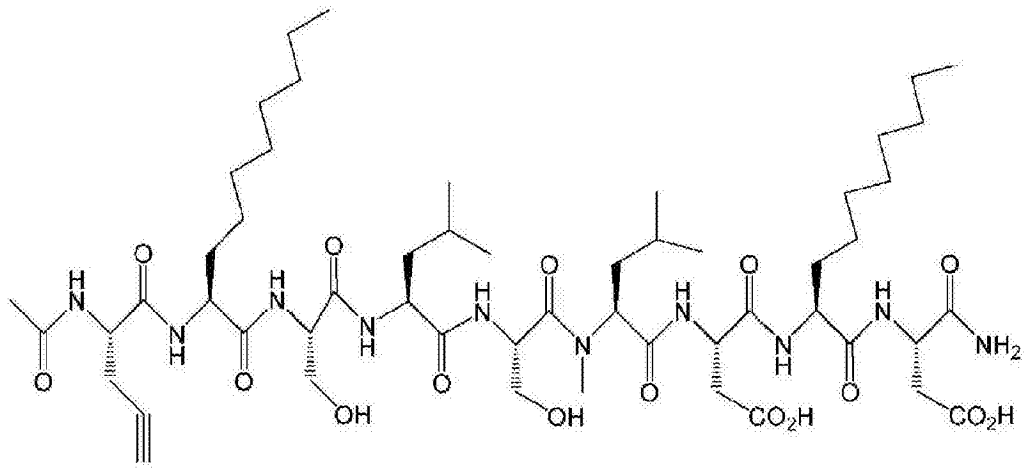
25. 根据权利要求1至24中任一项所述的膜或复合物,其中所述官能化 $\beta$ 折叠肽包含叠氮基官能化 $\beta$ 折叠肽,其中所述叠氮基任选地提供在所述官能化 $\beta$ 折叠肽的末端处或所述官能化 $\beta$ 折叠肽的中间部分中。

26. 根据权利要求25所述的膜或复合物,其中通过在所述官能化 $\beta$ 折叠肽中引入叠氮基修饰的氨基酸来提供所述叠氮基官能团。

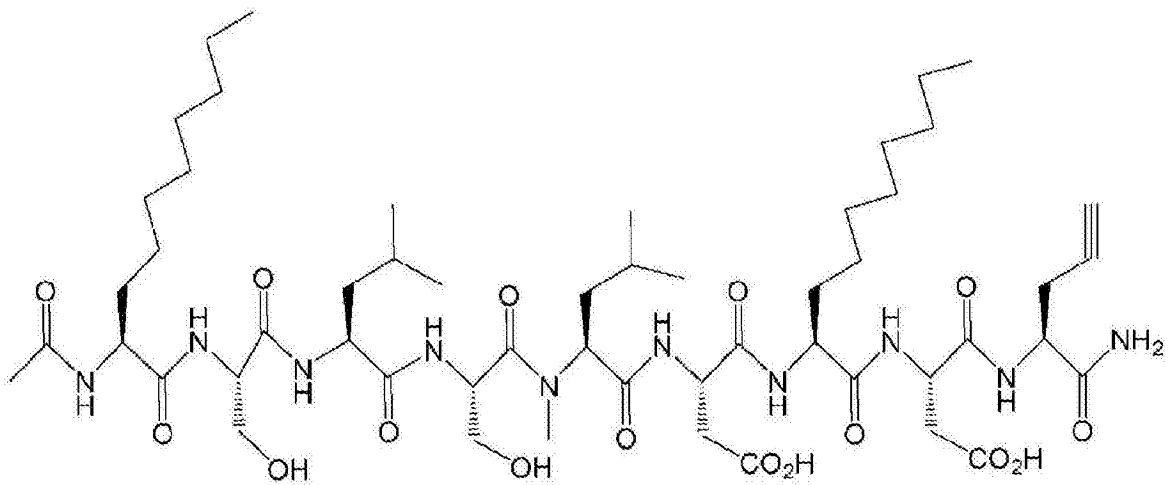
27. 根据权利要求1至20中任一项所述的膜或复合物,其中所述官能化 $\beta$ 折叠肽上的官能团包括叠氮基、炔基、烯基、乙烯基、叠氮基苯基或巯基。

28. 根据权利要求1至20中任一项所述的膜或复合物,其中所述官能化 $\beta$ 折叠肽包含结构(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI):

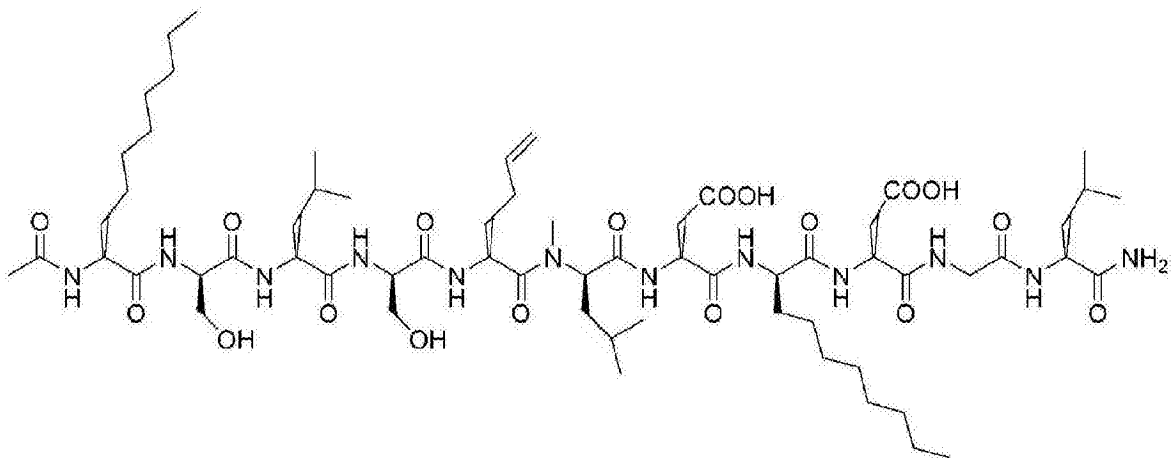




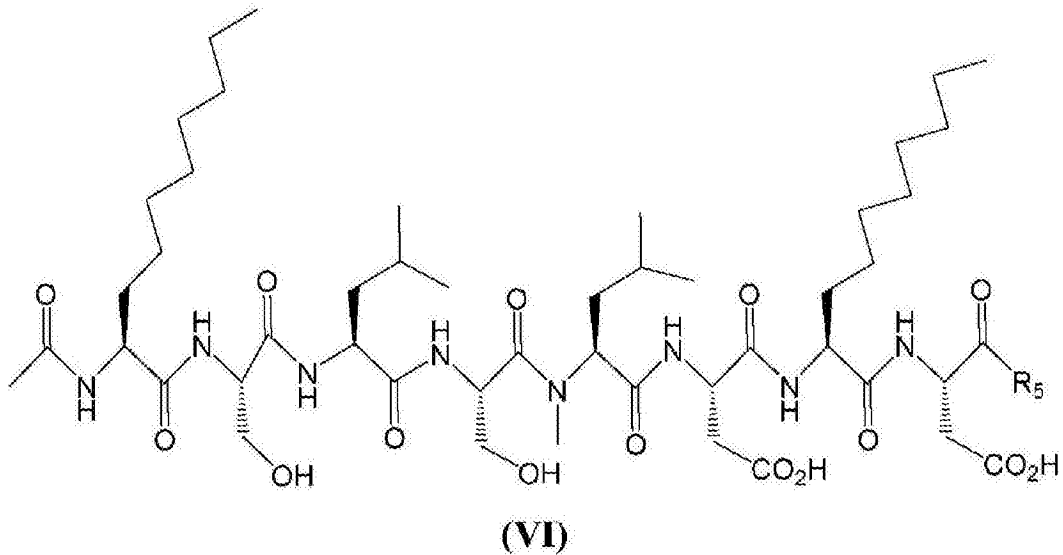
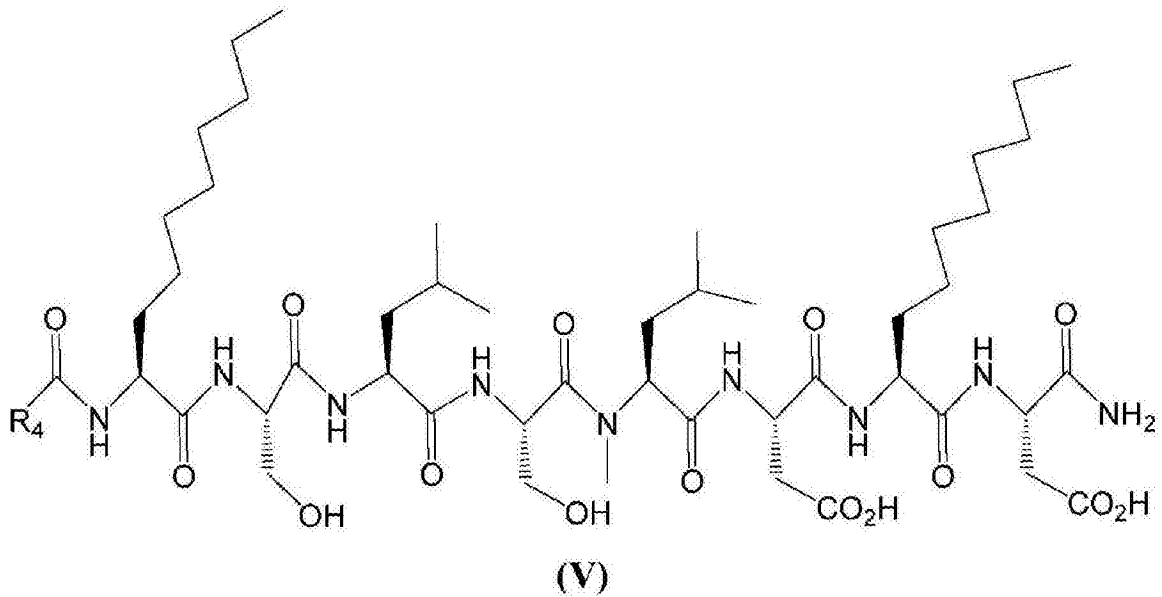
(II)



(III)



(IV)



其中R<sub>4</sub>和R<sub>5</sub>独立地为叠氮基、炔基、烯基、巯基、叠氮基苯基或乙烯基。

29. 根据权利要求28所述的膜或复合物,其中所述官能化β折叠肽在所述肽的N末端和/或C末端处包含一个或多个额外的氨基酸。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的膜或复合物,其中所述官能化β折叠肽包含双官能交联剂。

31. 根据权利要求30所述的膜或复合物,其中所述双官能交联剂包含光反应性官能团。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的膜或复合物,其中所述水通道蛋白包含AqpZ。

33. 一种选择性地使一种或更多种期望颗粒通过膜而同时限制一种或更多种污染物通过所述膜的方法,所述方法包括以下步骤:

提供包含通过多个官能化β折叠肽稳定之膜蛋白的复合物;

进行与所述膜缔合的所述β折叠肽的界面聚合,以提供复合聚酰胺-膜构建体;以及

使包含期望颗粒和一种或更多种污染物的溶液通过所述复合聚酰胺-膜构建体,使得所述膜蛋白选择性地使所述期望颗粒通过所述膜。

34. 一种选择性地使一种或更多种期望颗粒通过膜而同时限制一种或更多种污染物通

过所述膜的方法,所述方法包括以下步骤:

提供包含通过多个官能化 $\beta$ 折叠肽稳定之膜蛋白的复合物;

通过使所述多个官能化 $\beta$ 折叠肽中的至少一个上的至少一个官能团与所述膜反应,将所述膜蛋白偶联至所述膜;以及

使包含期望颗粒和一种或更多种污染物的溶液通过所述膜,使得所述膜蛋白选择性地使所述期望颗粒通过所述膜。

35. 根据权利要求33或34中任一项所述的方法,其中:

所述膜蛋白包含ChIEF,并且所述期望颗粒包含质子、钠离子或钙离子;

所述膜蛋白包含 $F_0F_1$ -ATP酶,并且所述期望颗粒包含质子或ATP;

所述膜蛋白包含OmpG,并且所述期望颗粒包含二糖;或

所述膜蛋白包含NaChBAC,并且所述期望颗粒包含钠离子;或

所述膜蛋白包含 $\alpha$ -溶血素、MspA、OmpF或OmpG,并且所述期望颗粒包含多核苷酸,包括DNA或RNA。

36. 根据权利要求33或34中任一项所述的方法,其中所述膜蛋白包含水通道蛋白,并且所述期望颗粒包含水分子。

37. 根据权利要求33至36中任一项所述的方法,其中所述包含期望颗粒和一种或更多种污染物的溶液包括海水,并且所述方法用于使所述海水脱盐。

38. 根据权利要求33至36中任一项所述的方法,其中所述包含期望颗粒和一种或更多种污染物的溶液包括农业废物流,其中所述一种或更多种污染物任选地包含氨,尿素,农药,合成肥料,重金属,包括铅、砷、硒或汞,来自药物和个人护理产品的有机污染物,或微生物。

39. 根据权利要求33至36中任一项所述的方法,其中所述包含期望颗粒和一种或更多种污染物的溶液包括工业废物流,并且其中所述一种或更多种污染物任选地包含磷酸盐、硝酸盐、石棉、多氯联苯、汞、铅、苛性钠或其他钠化合物、硫、硫酸、油或石油化学品。

40. 根据权利要求33或34中任一项所述的方法,其中所述方法用于浓缩所述一种或更多种污染物中的至少一种。

41. 一种形成包含固定化膜蛋白的复合结构的方法,其包括:

(a) 提供多个官能化 $\beta$ 折叠肽;

(b) 形成包含所述膜蛋白和所述官能化 $\beta$ 折叠肽的稳定复合物;以及

(c) 通过使所述多个官能化 $\beta$ 折叠肽中的至少一个上的至少一个官能团与支持物反应将所述膜蛋白偶联至所述支持物,以将所述膜蛋白固定到所述支持物上。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述反应包括在所述多个官能化 $\beta$ 折叠肽中的至少一个与所述支持物之间形成共价键。

43. 根据权利要求41或42中任一项所述的方法,其中所述多个官能化 $\beta$ 折叠肽中的至少一个包含光反应性官能团。

44. 根据权利要求41至43中任一项所述的方法,其中所述偶联包括在预定位置将所述膜蛋白固定在所述支持物上。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中所述偶联是光活化的。

46. 根据权利要求41至45中任一项所述的方法,其中所述形成包括产生所述稳定复合

物的多个单元并将所述单元交联在一起,同时保持所述膜蛋白的功能。

47. 根据权利要求41至46中任一项所述的方法,其中所述膜蛋白是水通道蛋白。

48. 通过权利要求47所述的方法形成的复合结构用于过滤水的用途。



## 官能化 $\beta$ 折叠肽稳定的膜蛋白、包含其的构建体以及形成和使用其的方法

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求于2014年8月25日提交的美国临时专利申请No.62/041587的优先权和权益,其通过引用并入本文用于所有目的。

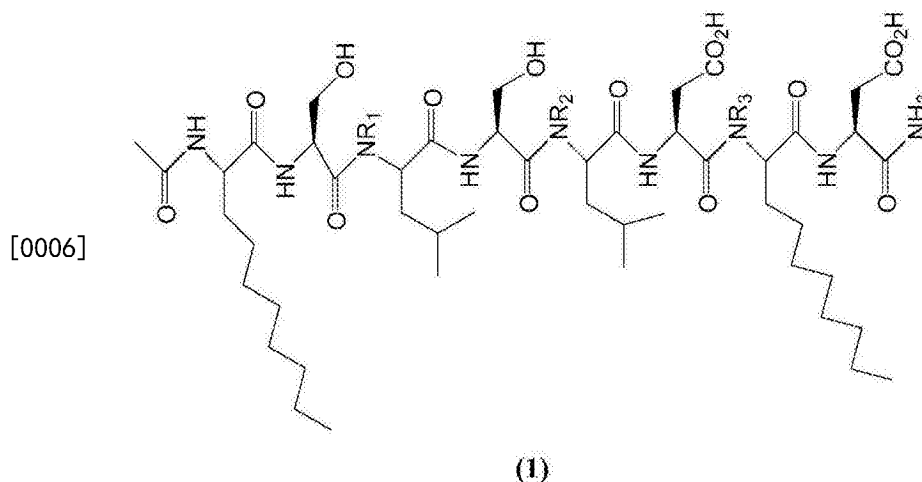
### 技术领域

[0003] 本发明的一些实施方案涉及官能化 $\beta$ 折叠肽(functionalized  $\beta$ -sheet peptide)和官能化 $\beta$ 折叠肽介导的膜蛋白的固定化。本发明的一些实施方案涉及通过这种官能化 $\beta$ 折叠肽稳定的膜蛋白及其用途。本发明的一些实施方案涉及包含通过这种官能化 $\beta$ 折叠肽稳定的蛋白质水通道蛋白(aquaporin)的构建体(construct)及其用途。

### 背景技术

[0004] 膜蛋白(membrane protein,MP)包括三分之一的基因组编码蛋白质,并且执行作为受体、转运蛋白和通道的基本功能。然而,由于其疏水性质,膜蛋白的分离和纯化具有挑战性。常规地,使用洗涤剂从其天然脂质环境中溶解MP并使其在水性缓冲液中稳定<sup>(1)</sup>。然而,取决于浓度、离子强度和其他脂质和蛋白质的存在,大多数洗涤剂表现出复杂的相行为。因此,成功重建膜蛋白的方法依赖于洗涤剂的独特行为。受膜蛋白研究重要性的驱动,过去几十年里已开发了多种两亲性试剂来促进膜蛋白的功能和结构研究,这些两亲性试剂包括两亲性聚合物<sup>(2)</sup>、基于蛋白质的纳米盘<sup>(3)</sup>、基于肽的洗涤剂<sup>(4)</sup>、麦芽糖新戊二醇洗涤剂<sup>(5)</sup>等。

[0005] 在早期的工作中,Tao和同事报道了对三种 $\beta$ 折叠肽( $\beta$ -sheet peptide,BP)(即BP1、BP2和BP3)工程化以稳定膜蛋白<sup>(6)</sup>。Tao参考文献通过引用整体并入本文。这些 $\beta$ 折叠肽是具有交替的极性和非极性残基以及每个末端处的辛基侧链的8氨基酸肽。Tao等的 $\beta$ 折叠肽具有核心结构乙酰基-(辛基)Gly-Ser-Leu-Ser-Leu-Asp-(辛基)Gly-Asp-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:1),并具有不同数目的N-甲基氨基酸,如结构(1)所示:



[0007] Tao等公开的三种构建体BP1、BP2和BP3之间的N-甲基氨基酸的区别如下:对于BP1

(称为结构(2)),  $R_1=R_3=H, R_2=Me$ 。对于BP2(称为结构(3)),  $R_1=R_2=Me, R_3=H$ 。对于BP3(称为结构(4)),  $R_1=R_2=R_3=Me$ 。

[0008] 由于特殊的序列设计,这些 $\beta$ 折叠肽在溶液中自组装成细丝,并在与膜蛋白(MP)缔合后重建为 $\beta$ 桶( $\beta$ -barrel)。所述肽长度为八个氨基酸以跨越脂质双层的疏水区(约3nm的距离),并且不受理论限制,认为通过形成有序、稳定的 $\beta$ -桶状结构来隔离膜蛋白的疏水表面。当在无洗涤剂的缓冲液中稀释时,所得BP:MP复合物阻止膜蛋白聚集。由于链间氢键相互作用,一旦形成BP:MP复合物, $\beta$ 折叠肽就更不可能从膜蛋白解离。

[0009] 水通道蛋白是以优异的选择性和渗透性使水通过细胞膜的一组整合膜蛋白。更具体地,水通道蛋白选择性地使水分子进出细胞,同时阻止离子和其他溶质通过。水分子成纵队穿过通道的孔。水通道的存在提高了膜对水的渗透性,而孔对于带电物质是不可渗透的,这有助于保持膜相对于周围环境的电化学电势差。

[0010] 如图1A所示,水通道蛋白使用两种不同机制的组合来确保仅水分子通过蛋白质。首先,水通道蛋白具有在其中间变窄的沙漏形通道。通道的窄尺寸提供了尺寸限制以帮助控制可以通过通道的分子尺寸。其次,通道内正电荷的存在有助于阻止质子通过通道。水通道蛋白由排列成右旋束的六个跨膜 $\alpha$ -螺旋组成。有五个螺旋间环区域(A-E)。环B和E是疏水环,其含有高度保守的天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸(NPA)基序,所述基序与膜的脂质双层的中间重叠,形成三维沙漏结构,水从其中流过孔。水通道蛋白在细胞膜中形成四聚体,每个单体充当水通道。水可以例如由于水压或渗透压沿任一方向流过水通道蛋白的孔。

[0011] 水通道蛋白是高度保守的。参见,例如,Erbakan,M.等(2014)。在该论文中进行的序列比对示出在图1B中,显示了不同物种中的水通道蛋白之间的高度保守性,包括球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*) ATCC 17023 (RsAqpZ, ABA78939.1, SEQ ID NO:2)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) K12 (EcAqpZ, BAA08441.1, SEQ ID NO:3和G1pF, AFH13815.1, SEQ ID NO:4)、*Methanobacter marburgensis* (AqpM, ADL58146.1, SEQ ID NO:5)、*Syneccoccus elongatus* (SsAqpZ, AAM82672.1 SEQ ID NO:6)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (AQY1, CCA39392.1, SEQ ID NO:7)、菠菜(*Spinacia oleracea*) (SOPIP2;1, AAA99274.2, SEQ ID NO:8)和智人(*Homo sapiens*) (AQP1, NP\_932766.1, SEQ ID NO:9; AQP4, AAH22286.1 SEQ ID NO:10; AQP9, NP\_066190.2, SEQ ID NO:11)。

[0012] 水通道蛋白家族的许多成员(例如来自大肠杆菌的水通道蛋白Z(AqpZ))非常稳定,可以承受苛刻的条件而不丧失其功能。例如,AqpZ抵抗暴露于酸、电压、洗涤剂和热的变性。

[0013] 水通道蛋白天然嵌入在疏水性脂质双层环境中,并且通常是不能充当膜外部游离分子的不稳定蛋白。以前尝试使用水通道蛋白来净化水。例如,设计了一种Langmuir-Blodgett膜,其试图在薄单层中使用水通道蛋白来净化水,但是这样的构造不稳定并且难以规模化(参见例如Sun等,2012)。为了提高稳定性,将单层束缚到支持物基底上并且使用聚合物垫来抑制振动(参见例如Sun等,2013);然而,这些构建体也被证明是不稳定的并且难以生产。

[0014] 相关技术的前述实例及其相关限制旨在是说明性的而非排他性的。在阅读说明书并研究附图之后,相关技术的其他限制对于本领域技术人员将变得明显。

## 发明内容

[0015] 结合系统、工具和方法来描述和示出以下实施方案及其方面,这些系统、工具和方法意在是示例性和说明性的,而不限制范围。在多个实施方案中,上述问题中的一个或多个已被减少或消除,而其他实施方案涉及其他改进。

[0016] 本发明的一个方面提供了一种膜,其被配置为用于选择性地使期望颗粒穿过所述膜。所述膜具有支持物与与所述支持物缔合的多个膜蛋白分子。每个膜蛋白分子通过多个官能化 $\beta$ 折叠肽稳定。官能化 $\beta$ 折叠肽中的至少一些可以共价连接到支持物上。膜蛋白分子可在膜中形成通道,以选择性地允许所述期望颗粒从其中通过。膜蛋白分子可适于选择性地运输期望颗粒穿过膜。在一个示例性实施方案中,膜蛋白分子是水通道蛋白,并且水通道蛋白分子选择性地运输水分子穿过膜。支持物可以是聚砜聚合物膜。

[0017] 本发明的一个方面提供了具有通过多个官能化 $\beta$ 折叠肽稳定之膜蛋白的复合物。可以通过将多个官能化 $\beta$ 折叠肽中的至少一个上的官能团与固体支持物的缀合来将复合物固定在固体支持物上。

[0018] 在一些方面,官能化 $\beta$ 折叠肽具有通用序列(辛基)Gly-Ser-Leu-Ser-Leu-Asp-(辛基)Gly-Asp (SEQ ID NO:1)。氨基酸中的一个或多个可以是N-甲基氨基酸。官能化 $\beta$ 折叠肽可以具有任何合适的官能团,在一些方面,所述官能团可以是叠氨基、炔基、烯基、乙烯基、叠氨基苯基或巯基。官能化 $\beta$ 折叠肽可以提供有双官能交联剂,所述双官能交联剂可以含有光反应性官能团。

[0019] 本发明的一个方面提供了一种选择性地使一种或更多种期望颗粒通过膜而同时限制一种或更多种污染物通过膜的方法。提供包含通过多个官能化 $\beta$ 折叠肽稳定之膜蛋白的复合物。通过使多个官能化 $\beta$ 折叠肽中的至少一个上的至少一个官能团与膜反应,将膜蛋白偶联至膜。使包含期望颗粒和一种或更多种污染物的溶液通过膜,以使得膜蛋白选择性地使期望颗粒通过膜。在一些方面,膜蛋白是水通道蛋白,并且期望颗粒是水分子。在一些方面,所述方法包括浓缩一种或更多种污染物,其通过使包含一种或更多种污染物的溶液从膜的第一侧通过膜到膜的第二侧,从而将一种或更多种污染物浓缩在膜的第一侧。在一些这样的实施方案中,污染物是期望产物。

[0020] 本发明的一个方面提供了形成具有固定的膜蛋白和支持物的复合结构的方法。提供多个官能化 $\beta$ 折叠肽。形成膜蛋白和官能化 $\beta$ 折叠肽的稳定复合物。通过使多个官能化 $\beta$ 折叠肽中的至少一个上的至少一个官能团与支持物反应以将膜蛋白固定在支持物上,将膜蛋白与支持物偶联。

[0021] 除了上述示例性方面和实施方案之外,通过参考附图并研究以下详细描述,另外的方面和实施方案将变得明显。

### [0022] 附图简要说明

[0023] 在附图所引用的图中示出了示例性实施方案。本文公开的实施方案和图旨在被认为是说明性的而不是限制性的。

[0024] 图1A示出了通过水通道蛋白分子的水分子的示意图。图1B示出了显示来自不同物种的水通道蛋白的高度保守性的序列比对。

[0025] 图2A示出了由官能化 $\beta$ 折叠肽介导的示例性膜蛋白的固定的示意图。图2B示出了

由官能化 $\beta$ 折叠肽介导的AqpZ与聚合物缀合的示意图。图2C示意性地示出了当稳定膜蛋白时提出的 $\beta$ 折叠肽的结构。

[0026] 图3示出了制备具有通过官能化 $\beta$ 折叠肽束缚的水通道蛋白的聚砜膜的方法的一个示例性实施方案。

[0027] 图4A和4B示出了在肽的C末端处具有炔官能团之官能化 $\beta$ 折叠肽的表征。图4A示出了这种构建体在磷酸盐缓冲盐水中的TEM(透射电子显微镜)图像。比例尺为10nm。图4B示出了对应于图4A所示图像的构建体的质谱图。图4C示出了本发明人合成的叠氮基官能化 $\beta$ 折叠肽的质谱图。

[0028] 图5示出了HPLC结果,证明了官能化 $\beta$ 折叠肽上炔基的反应。上图示出了与Click-iT试剂反应的炔-FBP的荧光HPLC洗脱曲线。中间图示出了仅Click-iT缓冲液的HPLC洗脱曲线。下图示出了仅Click-iT染料的HPLC洗脱曲线。红色箭头表示在炔-FBP和Click-iT染料之间的点击反应(click reaction)中形成的产物。

[0029] 图6示意性地示出了本发明人在一个示例性实施方案中用于表达AqpZ的pET28a-6His-AqpZ质粒构建体。

[0030] 图7A和7B示出了证明BP1:AqpZ的复合物形成及其稳定性的实验。图7A示出了4周中AqpZ/DDM和BP1:AqpZ的圆二色性(即,-1,第1周;-2,第2周;-3,第3周以及-4,第4周)。图7B示出了3周中AqpZ/DDM和BP1:AqpZ的伪天然12%SDS-PAGE。泳道:D:AqpZ/DDM;P:BP1:AqpZ;L:蛋白质梯。箭头表示四聚体AqpZ(计算的MW:98kDa)。

[0031] 图8A-8C示出了通过CD表征的AqpZ/DDM和BP1:AqpZ的热稳定性。图8A示出了在20-90°C的温度下的AqpZ/DDM的CD光谱。图8B示出了在温度20-90°C下BP1:AqpZ的CD光谱。图8C示出了在192nm下相对于温度绘制的归一化椭圆率。

[0032] 图9A-9E示出了通过三种不同的官能化 $\beta$ 折叠肽稳定各种蛋白质。蛋白质是AqpZ(图9A)、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP酶(图9B)、NaChBac(图9C)、ChIEF-mCitrine(图9D)和OmpG(图9E)。

[0033] 图10A显示当通过 $\beta$ 折叠肽稳定时,F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP酶保持其功能性,图10B显示当通过官能化 $\beta$ 折叠肽稳定时,F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP酶保持其功能性。

[0034] 图11A示出了在具有和不具有AqpZ的情况下,通过用于从水中除去氯化钠的膜的通量。图11B示出了在具有和不具有AqpZ的情况下,用于从水中除去氯化钠的膜的脱盐率(salt rejection)。图11C图示了在250PSI的操作压力下,与引入AqpZ的膜相比,不含蛋白质的膜构建体(“原始”)实现的通量和脱盐率。

## 发明内容

[0035]

[0036] 在下面的说明书中,阐述了具体细节以便为本领域技术人员提供更透彻的理解。然而,可能没有详细地示出或描述周知的元件,以避免不必要地模糊本公开内容。因此,说明书和附图被认为是说明性的,而不是限制性的。

[0037] 许多膜蛋白的固有功能包括识别和/或操纵特异性靶标。这些识别和/或操纵事件通常是高度灵敏和高度选择性的。因此,这样的膜蛋白是用于产生利用特定蛋白质的特定功能的生物传感器或纳米机器的良好候选物。产生这种生物传感器或纳米机器的关键步骤是将膜蛋白有效固定在固体支持物上,如聚合物表面、无机固态表面等。然而,在水性缓冲

液中将疏水性脆性膜蛋白以其天然状态固定在固体支持物上仍然是一个主要的挑战。

[0038] 本发明人现在认为,官能化 $\beta$ 折叠肽(functionalized  $\beta$ -sheet peptide,FBP)可以用作稳定剂和交联剂以介导膜蛋白在固体支持物上的固定,从而产生有用的生物传感器和/或纳米机器。在一些实施方案中,膜蛋白被固定在膜上以提供复合结构,其中膜蛋白选择性地转移或允许一种或更多种期望颗粒从膜的第一侧通过到膜的第二侧。在一些这样的实施方案中,膜阻止或阻碍其他颗粒从膜的第一侧通过到膜的第二侧。在一些实施方案中,其他颗粒包含一种或更多种污染物。在一些实施方案中,其他颗粒包含期望浓缩的组分,并且通过使含有这些颗粒的溶液通过膜来浓缩期望浓缩的组分,使得这些颗粒集中在膜的第一侧,而溶液的其他组分通过到膜的第二侧。

[0039] 如本文所用,术语“颗粒”被广泛使用并且是指期望选择性地穿过膜的任何元素或物质。例如,在一些实施方案中,颗粒是分子,例如水、甘油、二氧化碳、糖、有机化合物、DNA、RNA等。在一些实施方案中,颗粒是离子,例如钙、镁等,或离子物质例如盐。在一些实施方案中,颗粒可以是原子或亚原子颗粒,例如电子。

[0040] 如本文所用,术语“污染物”是指期望不允许通过膜的任何元素或物质。例如,在一些实施方案中,污染物是不期望的颗粒,例如特定离子、有机分子、废弃物等。例如,在期望提供净化水的实施方案中,污染物可以是在海水中发现的氯化钠,或期望从水中除去的工业过程或农业操作的副产物。在一些实施方案中,污染物是期望浓缩的颗粒,例如通过允许水从溶液中出来,而将待浓缩颗粒包含在膜的第一侧,从而浓缩待浓缩颗粒。因此,本文所使用的词“污染物”不限于不期望的颗粒,而是可以包括期望防止通过膜以浓缩和/或收获该颗粒的颗粒。

[0041] 本发明的一个方面提供了官能化 $\beta$ 折叠肽(FBP)。在一些实施方案中,官能化 $\beta$ 折叠肽(FBP)包含 $\beta$ 折叠肽(BP)和连接于所述 $\beta$ 折叠肽(BP)的官能团。例如,可以通过将官能团连接到 $\beta$ 折叠肽上来产生这种官能化 $\beta$ 折叠肽。在一些实施方案中,官能团可以连接到 $\beta$ 折叠肽的C末端或 $\beta$ 折叠肽的N末端。在其他实施方案中,官能团可以连接到位于肽末端之间的部分。在一些实施方案中,多个官能团可以连接到 $\beta$ 折叠肽。例如,官能团可以包括叠氨基、炔基、烯基、乙烯基、叠氨基苯基、巯基或一些其他合适的官能团。在一些实施方案中,通过常规固相肽合成,在肽序列中的期望位点引入具有期望官能团的经修饰氨基酸来合成官能化 $\beta$ 折叠肽。

[0042] 在一些实施方案中,官能化 $\beta$ 折叠肽可以包含与Tao参考文献中公开的三种 $\beta$ 折叠肽不同的 $\beta$ 折叠肽。 $\beta$ 折叠肽可以是例如具有交替的疏水和亲水残基的任何合适长度的任何合适的 $\beta$ 折叠肽。

[0043] 本发明的一个方面提供了由官能化 $\beta$ 折叠肽(FBP)和膜蛋白(MP)形成的复合物。一旦官能化 $\beta$ 折叠肽与膜蛋白形成稳定的复合物,官能化 $\beta$ 折叠肽上的官能团将允许FBP:MP复合物固定在固体支持物上。例如,如图2A所示,通过肽修饰将 $\beta$ 折叠肽20官能化(例如,用叠氨基官能团,如所示将 $N_3$ 添加到肽的C末端)以提供官能化 $\beta$ 折叠肽22。将官能化 $\beta$ 折叠肽22与膜蛋白(示出为条带图)组合,并且不受理论束缚,认为在膜蛋白的疏水性外表面上组装成 $\beta$ 折叠桶,以提供官能化 $\beta$ 折叠肽-膜蛋白(FBP:MP)复合物24。然后将叠氨基-FBP:MP复合物24固定在用炔基预官能化的固体支持物26上。叠氨基和炔基之间的共价键形成将FBP:MP共价固定在固体支持物表面上以提供固定的FBP:MP复合物28。在一些实施方案中,可以

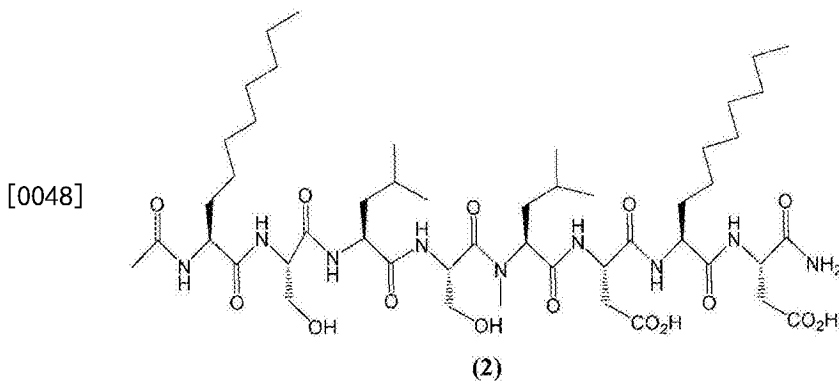
进行进一步的研究,例如使用荧光标记的底物或抗体30进行结合表征。

[0044] 如上所述,固体支持物不限于炔官能化固体支持物26,并且可以是任何合适的聚合物表面(例如在膜中浇铸的聚合物链)、无机表面如金表面、一些其他固态表面或任何其他合适的支持物。如图2B所示,在一些实施方案中,官能化 $\beta$ 折叠肽稳定的膜蛋白可以与膜中浇铸的聚合物链缀合。

[0045] 图2C示意性地示出了官能化 $\beta$ 折叠肽可以如何相互作用以形成 $\beta$ 折叠结构以稳定膜蛋白。不受理论的约束,认为交替的疏水-亲水肽序列的疏水残基与跨膜蛋白的疏水区相互作用。因此,膜蛋白被官能化 $\beta$ 折叠肽稳定化并与其形成稳定的复合物。所得复合物可以通过使官能化 $\beta$ 折叠肽的官能团与支持物上的合适官能团反应而共价锚定于合适的支持物。

[0046] 在一些实施方案中,官能化 $\beta$ 折叠肽包含定制序列。例如,肽内的个别氨基酸可以具有不同的官能团,其可以用于调节FBP:MP复合物的物理化学行为。这些官能团可以用于使FBP:MP复合物彼此交联,同时保持蛋白质的功能。在一个示例性实施方案中,这可以进行以产生紧密堆积和高度有序的蛋白质阵列,或者在另一个示例性实施方案中使用长接头分子来实现松散的网状结构。例如,在一个示例性实施方案中,将乙烯基官能团引入肽序列内以产生乙烯基官能化 $\beta$ 折叠肽。在一个示例性实施方案中,乙烯基官能化 $\beta$ 折叠肽具有以下所示的结构(8)。在膜蛋白:乙烯基-BP1复合物形成后,官能化 $\beta$ 折叠肽上的乙烯基官能团可以被活化以进行交联。这导致形成通过乙烯基官能团交联的蛋白质复合物。

[0047] 在一个示例性实施方案中,官能化 $\beta$ 折叠肽包含序列乙酰基-(辛基)Gly-Ser-Leu-Ser-Leu-Asp-(辛基)Gly-Asp-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:1),其具有通式结构(2)并具有任何合适的官能团。



[0049] 在替选示例性实施方案中,官能化 $\beta$ 折叠肽可以具有具交替的极性和非极性残基和每个末端处的疏水部分的任何合适的序列。在示例的实施方案中在第二个亮氨酸上提供的结构(2)的N-甲基氨基酸在替选实施方案中可以置于不同位置,以任何期望数量组合,或者省略。在一些实施方案中,在特定位置使用的氨基酸可以用具有类似性质的不同的天然存在的氨基酸或经修饰的氨基酸代替。例如,在一些实施方案中,官能化 $\beta$ 折叠肽可以具有这样的序列:其在第一个位置处包含下表1第1栏中列出的任一氨基酸,在第二个位置处包含下表1第2栏中列出的任一氨基酸等等,以提供具有交替的极性和非极性残基和在肽的每个末端处或附近的疏水部分的 $\beta$ 折叠肽。在一些实施方案中,额外的氨基酸可以存在于 $\beta$ 折叠肽的C末端或N末端处。例如,在一些实施方案中,可以在 $\beta$ 折叠肽的C末端或N末端中的任一者或两者处提供额外的氨基酸,并且可以选择这些额外的氨基酸的序列以形成特定的二

级结构而不干扰官能化 $\beta$ 折叠肽对膜蛋白的稳定,和/或可以选择该序列以包含特定的官能团,例如以促进由官能化 $\beta$ 折叠肽稳定的膜蛋白的交联或表面附着。

[0050] 表1.用于构建官能化 $\beta$ 折叠肽的潜在氨基酸序列。

[0051]

位置 1	位置 2	位置 3	位置 4	位置 5	位置 6	位置 7	位置 8
辛基(Gly)	Ser	Leu	Ser	Leu	Asp	辛基(Gly)	Asp
辛基(Ala)	Thr	Ile	Thr	Ile	Asn	辛基(Ala)	Asn
	Cys	Val	Cys	Val	Glu		Glu
					Gln		Gln
					His		His

[0052] 在一些实施方案中,通过将表1中所列序列中的氨基酸之一替换成可以更容易官能化的不同氨基酸来在官能化 $\beta$ 折叠肽上提供官能团,例如,由于Cys含有可容易修饰的游离巯基,所以将位置2的Ser替换成Cys,或将位置4的Ser替换成Cys。

[0053] 在一些实施方案中,通过在合成期间在多肽中引入具有合适的官能团的经修饰氨基酸残基来在官能化 $\beta$ 折叠肽上提供官能团。表2示出了在一些示例性实施方案中如何使用经修饰氨基酸修饰官能化 $\beta$ 折叠肽的序列。表2中所示的示例性修饰氨基酸仅仅是说明性的,并且本领域技术人员将清楚,可以替代地使用其他经修饰氨基酸。

[0054] 表2.用于构建官能化 $\beta$ 折叠肽的示例性的潜在经修饰氨基酸序列。

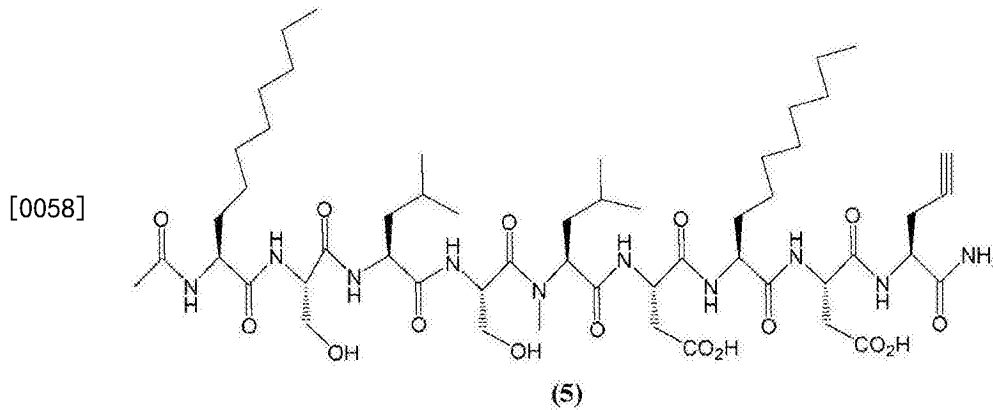
[0055]

位置 1	位置 2	位置 3	位置 4	位置 5	位置 6	位置 7	位置 8
	炔丙基甘氨酸		炔丙基甘氨酸		炔丙基甘氨酸		炔丙基甘氨酸
	烯丙基甘氨酸		烯丙基甘氨酸		烯丙基甘氨酸		烯丙基甘氨酸
	叠氮基戊酸		叠氮基戊酸		叠氮基戊酸		叠氮基戊酸
	叠氮基戊基丙氨酸		叠氮基戊基丙氨酸		叠氮基戊基丙氨酸		叠氮基戊基丙氨酸

[0056] 在一些实施方案中,通过在合成期间将具有例如结构(2)、(3)或(4)的肽的氨基酸单体替换成期望的氨基酸单体,实现序列替换,包括上述示例性序列替换,因为相同的反应化学适用于各种不同的氨基酸(即,在例如使用常规固相肽合成仪的肽合成期间,肽的氨基和进入的氨基酸单体的羧酸基之间形成肽键)。在一些实施方案中,使待修饰氨基酸的选择合理化,使得官能化氨基酸处于溶剂暴露的位置。在一些实施方案中,官能化氨基酸提供在表1所列示例性潜在氨基酸序列的位置2、位置4、位置6或位置8处。在替选实施方案中,多于一个官能化氨基酸可以提供在肽序列内。

[0057] 在一些实施方案中,在肽的N末端或C末端的任一者或两者处添加经修饰的或非天然存在的氨基酸。在这样的实施方案中,官能化 $\beta$ 折叠肽具有长于八个氨基酸的序列,例如九个氨基酸或十个氨基酸。例如,在一个示例性实施方案中,通过常规肽合成方法将炔丙基甘氨酸(市售)添加到具有BP1序列的 $\beta$ 折叠肽的C末端,以制备具有结构(5)的9氨基酸序列,其具有肽序列乙酰基-(辛基)Gly-Ser-Leu-Ser-Leu-Asp-(辛基)Gly-Asp-(炔丙基)Gly-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:12)。结构(5)的N-甲基氨基酸提供在序列内的第二个亮氨酸上,但是在替

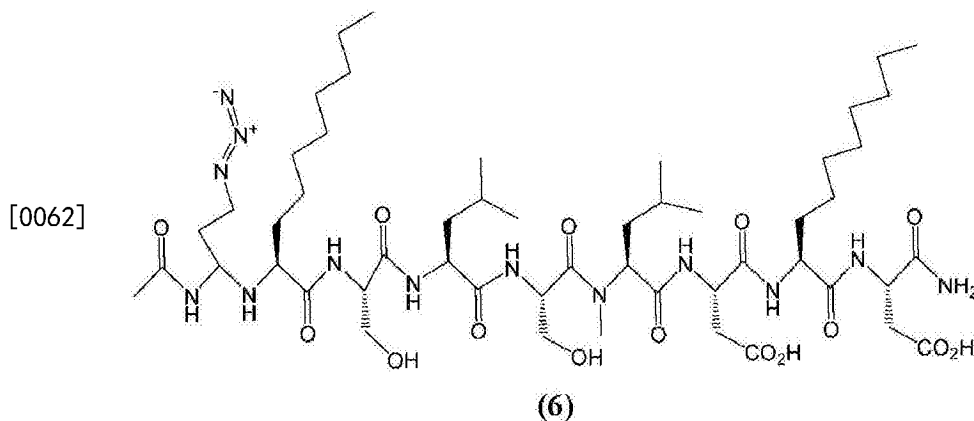
选实施方案中可以提供在任何期望的氨基酸残基上或被省略。在替选实施方案中,可以存在多于一个N-甲基氨基酸。



[0059] 所得序列具有炔丙基官能团并且可以组装成如图4A所示的原纤维结构,其指示了 $\beta$ 折叠的形成。类似地,可以使用相同的策略引入甘氨酸衍生物和其他经修饰氨基酸,例如烯丙基甘氨酸、环丙基甘氨酸、叠氮基戊酸氨基酸等。

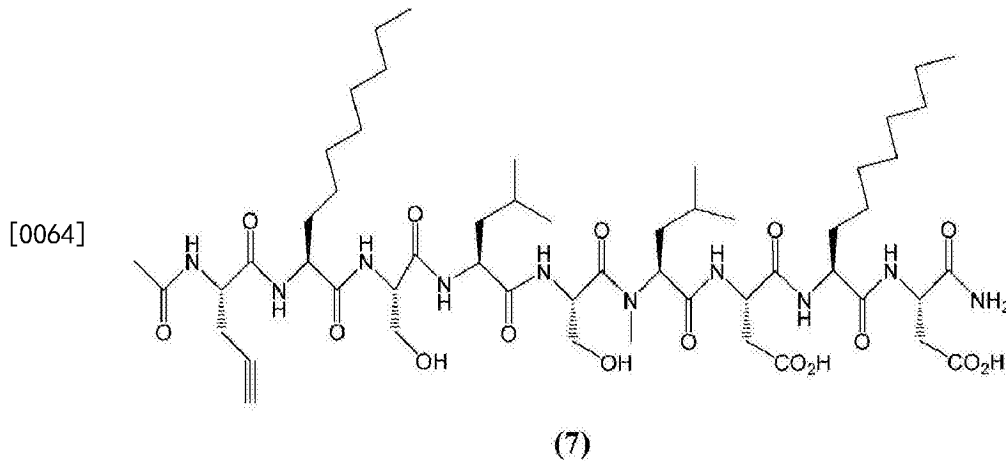
[0060] 在一些实施方案中,将经修饰的或非天然存在的氨基酸插入肽序列内。在一些这样的实施方案中,经修饰的或非天然存在的氨基酸是炔丙基甘氨酸、烯丙基甘氨酸、环丙基甘氨酸、叠氮基-戊酸氨基酸等。在替选实施方案中,除了甘氨酸之外的其他氨基酸也可以被修饰并插入肽中。在一些这样的实施方案中,可以将一个或多个额外的氨基酸添加到肽的N末端或C末端中任一者或两者中。在一些这样的实施方案中,添加一个或多个额外的氨基酸以保持肽的交替的极性残基-非极性残基序列。在这样的实施方案中,由于在肽序列中插入至少两个额外的氨基酸,官能化 $\beta$ 折叠肽具有比八个氨基酸长的序列,例如十个氨基酸。

[0061] 在另一个示例性实施方案中, $\beta$ 折叠肽包含叠氮基末端官能化 $\beta$ 折叠肽。在一个这样的示例性实施方案中, $\beta$ 折叠肽包含具有结构(6)的叠氮基末端官能化 $\beta$ 折叠肽。结构(6)具有通用肽序列乙酰基-叠氮高丙氨酸-(辛基)Gly-Ser-Leu-Ser-Leu-Asp-(辛基)Gly-Asp-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:13)。结构(6)包含九个氨基酸。结构(6)的N末端氨基酸是示例性经修饰氨基酸叠氮高丙氨酸(azidohomoalanine),其是本发明人根据报道的方法合成的。在结构(6)中,N-甲基提供在第二个亮氨酸上。在替选实施方案中,额外的N-甲基可以提供在肽内,或者一个或多个N-甲基可以提供在第二个亮氨酸以外的氨基酸上,或者N-甲基可以全部省略。

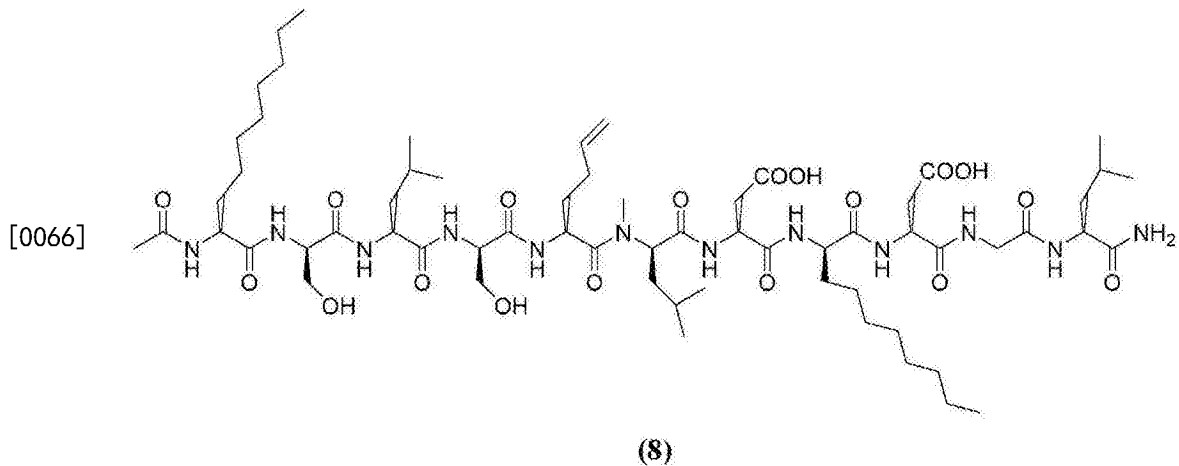




[0063] 在另一个示例性实施方案中,β折叠肽包含炔末端官能化β折叠肽。在一个这样的示例性实施方案中,β折叠肽包含具有结构(7)的炔末端官能化β折叠肽,其中炔末端官能团提供在肽的N末端处。结构(7)具有通用肽序列乙酰基-(炔丙基)Gly-(辛基)Gly-Ser-Leu-Ser-Leu-Asp-(辛基)Gly-Asp-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:14)。结构(7)包含九个氨基酸。在结构(7)中,N-甲基提供在在第二个亮氨酸上。在替选实施方案中,额外的N-甲基可以提供在肽内,或者一个或更多个N-甲基可以提供在第二个亮氨酸以外的氨基酸上,或者N-甲基可以全部省略。



[0065] 在另一个示例性实施方案中,β折叠肽包含烯中间官能化β折叠肽。在一个这样的示例性实施方案中,β折叠肽包含具有结构(8)的烯中间官能化β折叠肽。结构(8)具有通用肽序列乙酰基-(辛基)Gly-Ser-Leu-Ser-氨基己烯酸-Leu-Asp-(辛基)Gly-Asp-Gly-Leu-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:15)。结构(8)包含11个氨基酸。在结构(8)中,在第二亮氨酸上提供N-甲基。在替选实施方案中,额外的N-甲基可以提供在肽内,或者一个或更多个N-甲基可以提供在第二个亮氨酸以外的氨基酸上,或者N-甲基可以全部省略。



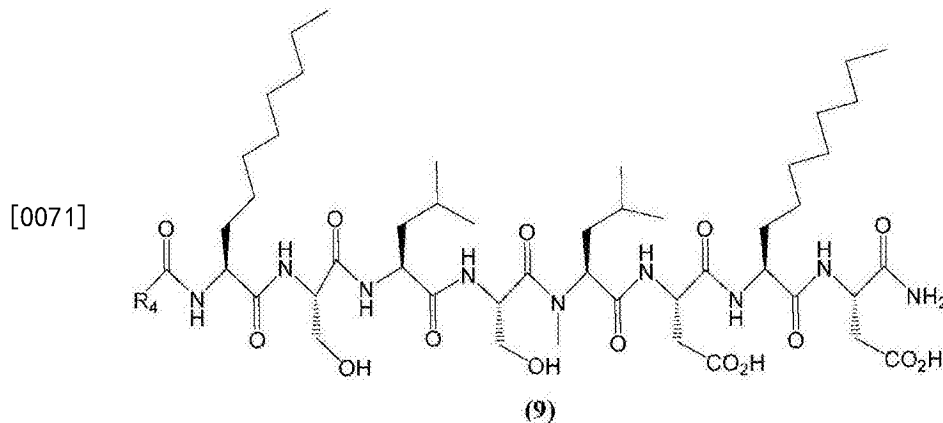
[0067] 在替选实施方案中,通过将用于提供烯中间官能化β折叠肽的乙烯基修饰的氨基酸替换成相应炔丙基修饰的氨基酸,提供炔中间官能化β折叠肽。因此,通过在肽序列内的期望位置处引入相应的经修饰氨基酸,可以使任何合适的官能团位于官能化β折叠肽中的任何期望位置。

[0068] 在一些实施方案中,在通过任何合适的化学反应合成之后将β折叠肽官能化。例如,在一些实施方案中,可以将β折叠肽官能化,使得其将通过其氨基和/或羧基形成共价

键。在一个这样的示例性实施方案中， $\beta$ 折叠肽中的游离氨基与间苯二胺 (MPD) 和均苯三甲酰氯 (TMC) 反应以提供酰胺官能团。酰胺官能团可以与主链羰基反应以将 $\beta$ 折叠肽共价偶联在一起。在另一个这样的示例性实施方案中， $\beta$ 折叠肽的游离羧基可以与间苯二胺 (MPD) 反应以形成酰胺官能团，其可以类似地与肽主链的羰基共价连接以将 $\beta$ 折叠肽共价连接在一起。在一个这样的实施方案中，共价连接的 $\beta$ 折叠肽-膜蛋白复合物形成界面聚合物层，其可以通过氢键相互作用偶联至膜 (例如聚砜膜) 以形成聚酰胺-聚砜界面复合膜 (参见例如，Ghosh等, 2009)。复合膜的聚酰胺和聚砜层之间的氢键相互作用可以例如通过在浇铸膜或调节聚砜膜的表面粗糙度期间添加诸如聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 的成孔剂来调节，其他因素如将聚酰胺层吸附在聚砜上的孔上等也可以增强两层复合膜之间的相互作用。

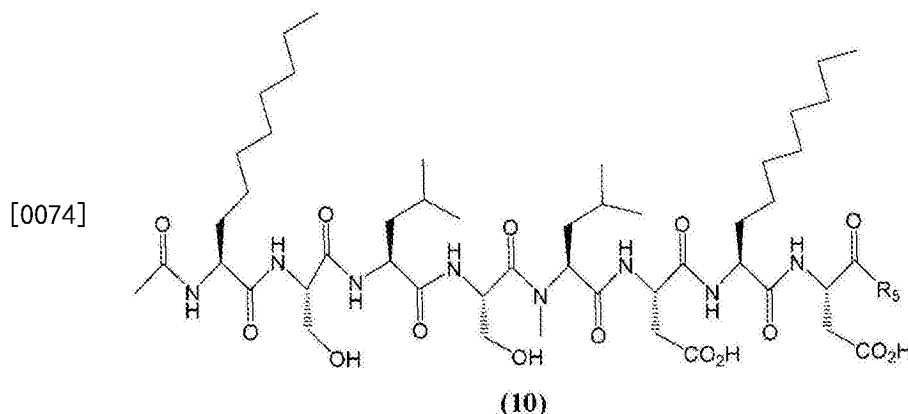
[0069] 在一些实施方案中，官能化 $\beta$ 折叠肽在任何合适的位置具有官能团。在一些实施方案中，官能团是交联官能团。在一些实施方案中，交联官能团是叠氨基、炔基、烯基、巯基、叠氨基苯基、乙烯基等。

[0070] 在一些实施方案中，官能团提供在肽的N末端。例如，在具有核心 $\beta$ 折叠肽结构 (2) 的一个示例性实施方案中，官能团提供在肽的乙酰基上，使得肽具有通用结构 (9)：



[0072] 其中 $R_4$ 可以是任何合适的官能团，包括例如叠氨基、炔基、烯基、巯基、叠氨基苯基、乙烯基等。

[0073] 在一些实施方案中，官能团提供在肽的C末端。例如，在具有核心 $\beta$ 折叠肽结构 (2) 的一个示例性实施方案中，官能团提供在肽的氨基上，使得肽具有通用结构 (10)：



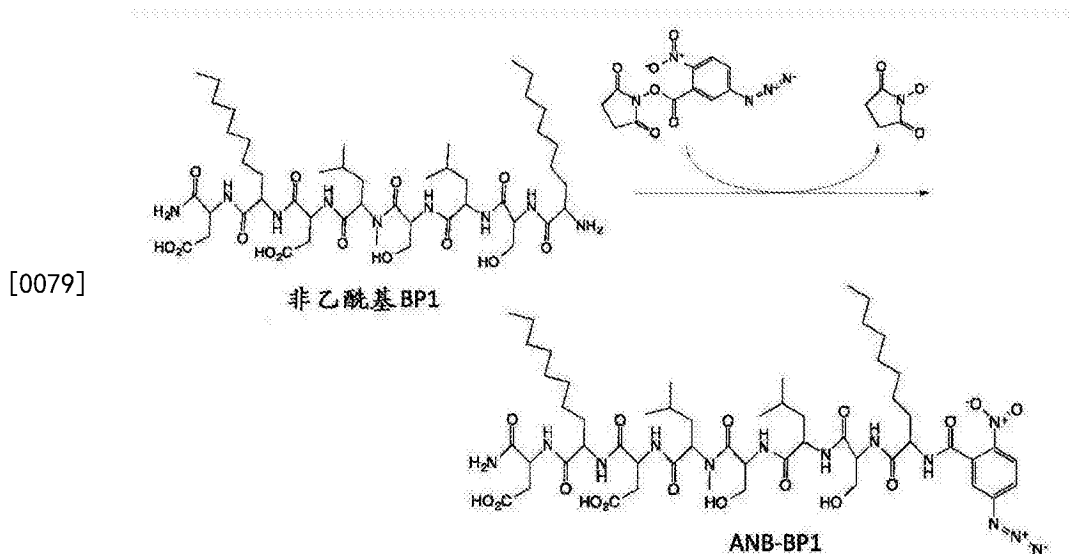
[0075] 其中 $R_5$ 可以是任何合适的官能团，包括例如叠氨基、炔基、烯基、巯基、叠氨基苯基、乙烯基等。

[0076] 除了通过在肽合成期间引入具有特定官能团的侧链来官能化 $\beta$ 折叠肽之外，还可

以通过使β折叠肽在其脱乙酰形式下在N末端的α-胺处与双官能交联剂反应来官能化。多种这样的双官能交联剂是市售的或可以容易地合成,例如6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-NHS-SANPAH, ThermoFisher Scientific)、4,4'-azipentanoate磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-NHS-双吡丙啶(Diazirine), ThermoFisher Scientific)、2-((4,4'-azipentanamido)乙基)-1,3'-二硫代丙酸磺基琥珀酰亚胺酯(NHS-SS-双吡丙啶, ThermoFisher Scientific)等。例如,使脱乙酰基β折叠肽与NHS-双吡丙啶基(SDA)双官能化交联剂(Thermo Scientific Pierce)反应将产生在N末端具有光反应性双吡丙啶官能团的官能化β折叠肽。在与目标膜蛋白形成复合物后,双吡丙啶-FBP:MP可以通过双吡丙啶官能团交联到固体支持物上。此外,由于该具体实例中的官能团(即双吡丙啶官能团)是光反应性的,所以可以通过光掩模将双吡丙啶-FPB:MP固定成期望的图案。

[0077] 使脱乙酰基β折叠肽(其在一个示例性实施方案中具有BP1的序列)与N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOS)(Thermo Scientific Pierce)反应将得到ANB修饰的β折叠肽(例如,方案1中所示ANB-BP1),其在N末端具有光反应性芳基-叠氮基官能团。在与目标膜蛋白形成复合物后,ANB-BP:MP可以通过芳基-叠氮基官能团交联到固体支持物上。此外,由于该具体实例中的官能团(即ANB)是光反应性的,因此可以通过光掩模将ANB-BP:MP复合物固定化成任何期望的图案。

[0078] 方案1. 非乙酰基BP1与ANB-NOS产生可光活化的官能化β折叠肽(FBP1)的反应方案。



[0080] 在一个实施方案中,上述官能化β折叠肽和FBP:MP复合物用于产生区室化反应器,其基于具有特定功能的膜蛋白(即水通道蛋白)阵列以净化水。

[0081] 在一个实施方案中,上述官能化β折叠肽和FBP:MP复合物可用于基于膜的过滤器中。这样的过滤器可以用于水脱盐(例如,使用FBP:水通道蛋白复合物),或用于特殊化学品的受控分离,或者可以是使用pH和/或压力的主动控制的过滤器/阀。

[0082] 在一些实施方案中,使用通过官能化β折叠肽稳定的水通道蛋白提供了表面固定的可能性,允许构建用于水净化应用的新型膜。

[0083] 其上固定有官能化β折叠肽稳定之水通道蛋白的基质或支持物应当选择为与固定的肽-蛋白质复合物相容并促进其固有的功能。在一些实施方案中,其上固定有官能化β折

叠肽稳定之水通道蛋白的基质是经改性的聚合物(例如聚砜、聚碳酸酯、聚内酯等。在一些实施方案中,其上固定有官能化 $\beta$ 折叠肽稳定之水通道蛋白的基质是碳纳米管网或碳纳米管网的复合物。在一些实施方案中,其上固定有官能化 $\beta$ 折叠肽稳定之水通道蛋白的基质是纳米晶体纤维素或纳米晶体纤维素的复合物。

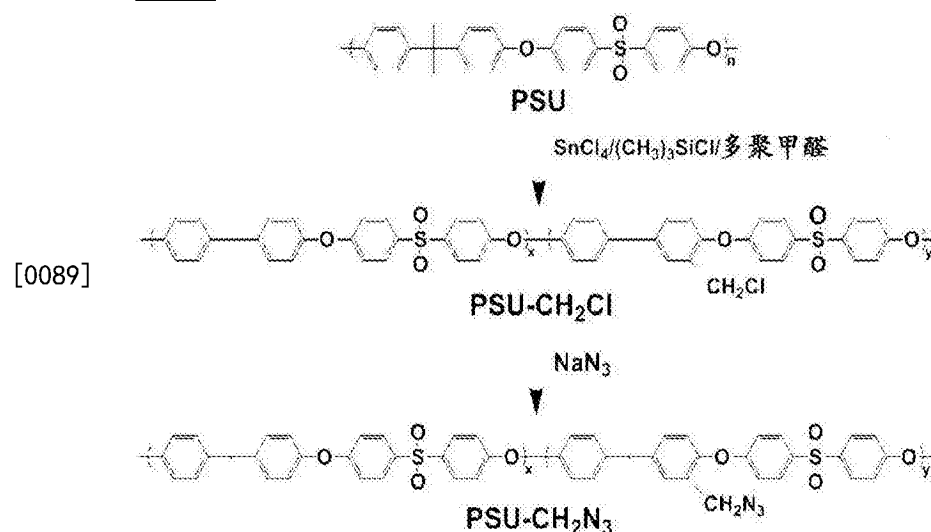
[0084] 在一个示例性实施方案中,其上固定有官能化 $\beta$ 折叠肽稳定之水通道蛋白的基质是聚合物。在一个这样的示例性实施方案中,聚合物是聚砜。聚砜由于其化学相容性和耐久性而在膜工业中是众所周知的,并且其为用于结构改性的良好候选。最初将聚砜官能化以形成叠氮基团,然后与特定比例的天然聚砜浇铸成膜。使用液相诱导相转化技术(liquid-induced phase inversion technique)进行浇铸。在一些实施方案中,在浇铸过程中加入成孔剂以形成具有受控尺寸的孔的膜。在一些实施方案中,成孔剂(pore developing agent)是聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙二醇(PEG)、聚(N,N-甲基丙烯酸二甲氨乙酯(PDMAEMA)等。任何合适的成孔剂(pore forming agent)均可以使用。在一些实施方案中,孔的直径尺寸为约5nm至若干 $\mu\text{m}$ ,例如10 $\mu\text{m}$ ,包括其间的任何值。在一些实施方案中,所形成的孔的直径尺寸为约20nm至约200nm,包括其间的任何值,例如,直径为30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180或190nm。

[0085] 在这样的实施方案中,孔周围的叠氮基官能团提供了官能化 $\beta$ 折叠肽稳定之水通道蛋白的特异性连接的起始点。在一些这样的实施方案中,孔周围的叠氮基官能团提供了用于连接用于稳定水通道蛋白分子的炔丙基修饰的官能化 $\beta$ 折叠肽的起始点。因此,水通道蛋白-官能化 $\beta$ 折叠肽复合物可以通过温和点击化学经由官能化 $\beta$ 折叠肽共价交联至聚砜底物,得到强健且可扩展的载有蛋白质的仿生反渗透膜。

[0086] 在引入孔的一个示例性实施方案中,在官能化 $\beta$ 折叠肽稳定的水通道蛋白已经交联到聚砜底物之后,进行界面聚合以使通过膜中孔的水(或携带一种或更多种污染物的水)的任何泄漏最小化。

[0087] 在一个示例性实施方案中,用于制备叠氮基官能化聚砜膜的PSU- $\text{CH}_2\text{N}_3$ 溶液根据方案2中所述的通用反应制备,例如Evram等中所述。

[0088] 方案2. 用于制作叠氮基官能化聚砜膜的溶液的制备。



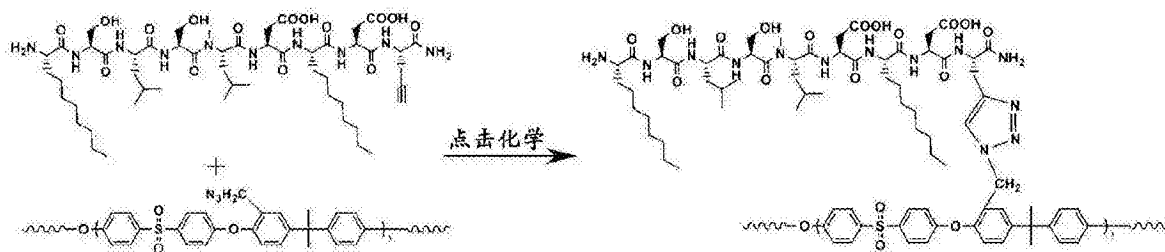
[0090] 在制备PSU- $\text{CH}_2\text{N}_3$ 溶液后,根据图3所示的通用方法制备聚砜膜。在所示实施方案中,将PSU- $\text{CH}_2\text{N}_3$ 与合适的成孔剂(例如在所示实施方案中的PVP)在合适的溶剂(例如N-甲

基-2-吡咯烷酮, NMP) 中组合, 并搅拌合适的时间 (例如在所示实施方案中 24 小时)。将溶液脱气, 以任何合适的方式 (例如通过在所示实施方案中通过自动制膜器) 浇铸成膜, 并冲洗以除去过量的反应物 (例如在所示的实施方案中通过浸渍在去离子水浴中 24 小时)。在一些实施方案中, 省略了成孔剂。

[0091] 在一个示例性实施方案中, 将通过具有 BP1 的通用结构并具有炔丙基官能团 (即具有结构 (5)) 的官能化  $\beta$  折叠肽稳定的水通道蛋白分子通过点击化学偶联到叠氮基官能化的聚砜膜, 如方案 3 所示。使用点击化学进行这种反应在本领域普通技术人员的预期能力范围内。在本发明人进行的一个实例中, 使用硫酸铜 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 和抗坏血酸钠进行聚砜膜和官能化  $\beta$ -肽之间的点击化学。将 1:3 当量的该催化剂与 13 当量的炔丙基官能化  $\beta$  折叠肽在二氯甲烷溶剂中混合。将混合物在氩气氛下在室温下搅拌 12 小时。通过溶剂蒸发回收产物。

[0092] 方案 3. 炔丙基官能化  $\beta$  折叠肽与叠氮基官能化聚砜膜的反应。

[0093]



[0094] 在一个示例性实施方案中, 其上固定有官能化  $\beta$  折叠肽稳定之水通道蛋白的基质是碳纳米管 (CNT) 网。天然碳纳米管在性质上是疏水的, 并且可以通过自身或与复合材料形成网状物而组装成膜, 或者可以通过适当的交联组装。为了利用碳纳米管网作为用于蛋白质引入的基质, 首先进行表面化学以促进缀合反应。在一个示例性实施方案中, 通过酸解或等离子体氧化 (plasmoxidation) 进行氧化以在碳纳米管网的表面上提供游离羧基, 其可以与具有烯基的胺反应以促进对碳纳米管基质的 UV 交联。该策略将在碳纳米管网上提供乙烯基官能化, 以促进与各种官能团的 UV 交联。碳纳米管网与官能化  $\beta$  折叠肽稳定之水通道蛋白的交联可以通过使用具有乙烯基官能团的官能化  $\beta$  折叠肽使用适当的 UV 辐射来实现。例如, 在一些实施方案中, 可以使用具有结构 (8) 的官能化  $\beta$  折叠肽。在一些实施方案中, 所使用的 UV 辐射波长为 300 至 400nm 或其间的任何值, 例如 310、320、330、340、350、360、370、380 或 390nm。在一些实施方案中, 在官能化  $\beta$  折叠肽稳定之水通道蛋白已经偶联到碳纳米管网之后, 可以通过紧密包装碳纳米管纤维来使网致密化, 以避免水通道蛋白周围的任何水泄漏。在一些这样的实施方案中, 可以通过将构建体浸泡在甲醇中并且真空干燥来进行致密化, 注意不要使稳定化水通道蛋白分子的功能破坏的条件。

[0095] 在一个示例性实施方案中, 其上固定有官能化  $\beta$  折叠肽稳定之水通道蛋白的基质是纳米晶体纤维素。类似于使用碳纳米管作为基质, 可以使用已建立的技术如 Fisher 酯化对表面上具有大量羟基的纳米晶体纤维素基质进行表面活化, 以引入羧酸酯官能团, 然后引入胺-烯双官能接头以提供具有乙烯基官能团的表面 (参见例如, Habibi, Y. (2014))。乙烯基官能团可以使用已建立的化学技术与官能化  $\beta$  折叠肽上提供的合适的官能团进一步反应。

[0096] 根据一些实施方案通过利用膜的表面官能团制备膜并使用具有某些修饰的  $\beta$  折叠

肽进行蛋白质稳定化可以使得能够产生能够再现自然选择性的仿生膜,从而选择性地使特定颗粒通过或移动穿过膜。在一些实施方案中,特定颗粒是离子或分子。可以选择膜蛋白以选择性地通过或运输特定颗粒,所述特定颗粒可以是期望的离子、分子例如水、RNA、DNA等。例如,Habel等(2015)中表1中列出的已经使用二嵌段或三嵌段聚合物体系研究过的任何膜蛋白均可以使用官能化 $\beta$ 折叠肽而稳定在膜上,并用于运输其相应的运输物。因此,丙甲甘肽(alamethicin)、溶血素、NADH还原酶、OmpG、OmpF或RC可用于运输电子;丙甲甘肽可用于运输钙或钙黄绿素;NtAPQ1或NtPIP2:1可用于运输二氧化碳,AQP0、AQP10或SoPIP2:1可以用于与在本说明书中已经证明的AqpZ运输水的相同方式运输水;TsX可用于运输核苷;OmpF可用于运输大的有机分子,例如吡啶橙、百草枯、绿脓菌素、乙酰硫代胆碱(actylthiocholine)、烯酮、ELF97、7-ADCA、PGME、核苷、氨苄青霉素、L-抗坏血酸、CO、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、 $\text{ONOO}^-$ ;短杆菌肽A可用于运输一价阳离子;M1oK1可用于运输钾;LamB可用于运输糖,包括麦芽六糖或DNA;FhuA可用于运输较大分子,如磺酰罗丹明B、TMB、NAD、DNA、钙黄绿素;BR、PR或BR&ATP酶可用于运输 $\text{H}^+$ ;BR&Cc0可用于运输 $\text{H}^+$ 和电子;Cc0可用于运输电子,多粘菌素B、溶血素或天蚕抗菌肽A可用于运输钙黄绿素。在一些实施方案中,诸如 $\alpha$ -溶血素、MspA、OmpF或OmpG的蛋白质可用于运输多核苷酸,包括DNA和RNA。如实施例3.0所述,发明人已经证明可以使用官能化 $\beta$ 折叠肽来稳定多种膜蛋白,包括AqpZ、ChIEF-mCitrine、NaChBac、FoF1-ATP酶和OmpG。ChIEF-mCitrine与BR具有非常相似的结构。OmpG与OmpF和FhuA具有非常相似的结构(即,所有三种蛋白质均具有 $\beta$ 折叠桶跨膜结构域)。因此,从本文所述的实验数据并基于与上面列出的其他膜蛋白的结构相似性,可以可靠地预测,除了AqpZ之外,上文列出的蛋白和包括其他水通道蛋白的其他膜蛋白可以使用官能化 $\beta$ 折叠肽稳定并连接至例如任何合适的膜构建体,用于运输或引导蛋白质的相应运输物穿过膜。

[0097] 引入官能化 $\beta$ 折叠肽稳定之水通道蛋白的膜在许多不同的环境中具有潜在的应用。例如,在一些实施方案中,引入官能化 $\beta$ 折叠肽稳定之水通道蛋白的膜可以用于诸如废水处理,油气部门中的水净化,水的脱盐(例如从盐水源提供饮用水)的应用,以及在生物技术和食品饮料部门中的应用,例如在乳品工业中除去细菌或乳清浓缩,水果和蔬菜汁的澄清和浓缩,用于产生淀粉和甜味剂,以及所有行业中的工艺水回收。

[0098] 在一些实施方案中,引入官能化 $\beta$ 折叠稳定之水通道蛋白的膜阻断或阻止钠离子、氯离子、氨、尿素、染料、农药、药物废物或其他有机化合物通过膜,同时选择性地允许水通过膜。

[0099] 在一些实施方案中,使用引入官能化 $\beta$ 折叠稳定之水通道蛋白的膜处理污染的水。在一些实施方案中,污染的水是农业废物流。在一些这样的实施方案中,膜用于除去一种或更多种污染物,包括氨、尿素、农药、合成肥料、重金属(包括铅、砷、硒或汞),来自药物和个人护理产品的有机污染物,或来自废物流的微生物。在一些实施方案中,污染的水是工业废物流。在一些这样的实施方案中,膜用于从废物流中除去一种或更多种污染物,包括磷酸盐、硝酸盐、石棉、多氯联苯、汞、铅、苛性钠或其他钠化合物、硫、硫酸、油或石油化学品。

[0100] 参考以下实施例进一步描述了本发明的一些实施方案,这些实施例旨在是说明性的而不是限制性的。

[0101] 实施例1.0-官能化 $\beta$ 折叠肽(FBP)的制备

[0102] 实施例1.1-固相肽合成仪上FBP的化学合成

[0103] 使用具有炔丙基侧链的氨基酸,本发明人能够在固相肽合成仪上合成在C末端具有炔官能团的官能化 $\beta$ 折叠肽。当在磷酸盐缓冲盐水中稀释时,炔-FBP自组装成丝状结构,这表明炔-FBP保留了 $\beta$ 折叠肽的 $\beta$ 折叠形成倾向。合成的炔-官能化 $\beta$ 折叠肽具有BP1的结构,但具有C末端炔丙基甘氨酸,即具有结构(5)的乙酰基-(辛基)Gly-Ser-Leu-Ser-Leu-Asp-(辛基)Gly-Asp-(炔丙基)Gly-NH<sub>2</sub>, (SEQ ID NO:12)。炔官能化 $\beta$ 折叠肽的自组装示出在图4A中。图4B示出了显示高纯度的炔丙基-BP1的正确分子质量的质谱图。

[0104] 本发明人还使用类似的策略合成了具有结构(6)的叠氮基-FBP1 (SEQ ID NO:13)。显示叠氮基-BP1的正确分子质量的质谱图示于图4C中。

[0105] 实施例1.2-确认FBP1上的炔官能团

[0106] 为了证实在实施例1.1中合成的炔-BP1上的炔基的存在和活性功能,本发明人进行反应以使肽上的炔基与荧光tetraethylrhodamine叠氮化物(Click-iT试剂盒,Life Technology)进行点击反应。然后,发明人在装备有荧光检测器的HPLC上运行反应产物。如预期的,不属于试剂盒组分的另外的荧光峰出现在洗脱曲线上(在图5的上图中用箭头指示的;单独试剂盒和单独染料的HPLC谱分别显示在图5的中间图和下图)。因此,本发明人可以将该峰归属于染料标记的炔官能化 $\beta$ 折叠肽。

[0107] 实施例2.0-膜蛋白纯化和BP:MP复合物的形成

[0108] 发明人已纯化了水通道蛋白(AqpZ)并验证了其功能。AqpZ是大肠杆菌周质膜上的水通道。AqpZ选择性地以高速率并基于跨细胞膜的渗透梯度转移水。如上所述,在水净化应用中使用水通道蛋白的现有尝试尚未完全成功。然而,相信根据本公开内容的FBP:AqpZ复合物将克服与先前尝试有关的至少一些缺点。

[0109] 根据标准分子生物学程序,本发明人已经根据之前的文献<sup>(7)</sup>使用正十二烷基 $\beta$ -D-麦芽糖苷(DDM)作为增溶性洗涤剂优化了大肠杆菌中重组AqpZ的过表达和纯化。使用文献<sup>(7)</sup>中所述的质粒pTrc10HisAqpZ作为模板克隆AqpZ编码基因。向编码基因中引入一个小的修饰,即编码Arg3的密码子从aga改变为cgt,以提高翻译效率。在大肠杆菌中,密码子cgt的使用频率比aga高10倍。将编码基因克隆到市售质粒(即Novagen的pET28a)中,并将所得质粒构建体pET28a-AqpZ用于蛋白质表达。质粒的细节可以在图6中找到,并且质粒的全序列提供为SEQ ID NO.:16。

[0110] 本发明人首次证实,可以使用对应于由Tao等公开的BP1(即,结构(2))的 $\beta$ 折叠肽来用 $\beta$ 折叠肽稳定纯化的AqpZ。AqpZ的结构由六个跨膜螺旋和两个跨半膜螺旋构成<sup>(8)</sup>。对应于该螺旋束结构,DDM溶解的AqpZ的圆二色性(CD)光谱显示特征 $\alpha$ -螺旋吸收带,即在198nm的强正带和在210nm和224nm的负带(图7A)<sup>(9)</sup>,它们是 $\alpha$ -螺旋结构的特征。类似地,BP1:AqpZ也在其具有蓝移峰的CD谱上显示出特征 $\alpha$ -螺旋吸收带。不受理论的束缚,认为吸收峰的蓝移可归因于影响局部光学环境的BP1的结合。此外,在4°C下储存的BP1:AqpZ和AqpZ/DDM保持四周的二级结构(图7A)和至少3周的寡聚状态(图7B,示出伪天然12%SDS-PAGE的结果)。

[0111] 本发明人通过在不同温度下在CD光谱仪上监测其二级结构进一步研究了AqpZ/DDM和BP:AqpZ的热稳定性。如图8A-8C所示,与DDM溶解的AqpZ类似(图8A),BP:AqpZ在高达90°C的温度下保持其二级结构的大部分(约70%) (图8B;图8C所示的DDM稳定的和 $\beta$ 折叠肽稳定的AqpZ在192nm的归一化椭圆率)。这种非凡的热稳定性表明BP1:AqpZ或FBP1:AqpZ将是用于制造仿生水净化膜的良好候选物,其可暴露于苛刻条件的温度或环境污染物(例如

盐、洗涤剂、重金属等)。

#### [0112] 实施例3.0-使用官能化 $\beta$ 折叠肽稳定膜蛋白

[0113] 发明人已经证明,可以使用官能化 $\beta$ 折叠肽稳定膜蛋白。所测试的额外膜蛋白包括具有螺旋束整合膜蛋白的三种膜蛋白(ChIEF-mCitrine、NaChBac和 $F_0F_1$ -ATP酶)以及具有 $\beta$ 折叠整合膜蛋白的一种膜蛋白(OmpG)。AqpZ是螺旋束整合膜蛋白。

[0114] ChIEF是实验室设计的光门控阳离子通道,其在用光刺激时运输质子、钠离子、钙离子等。在该具体实施例中,将荧光标签mCitrine遗传学地连接于所述蛋白质的C末端以促进纯化,产生ChIEF-mCitrine构建体。NaChBac是受膜电位调节的运输钠离子的细菌(耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*))膜蛋白。 $F_0F_1$ -ATP酶是当通过跨细胞膜的质子梯度驱动时合成ATP的ATP合酶(来自芽孢杆菌PS3)。OmpG是能够跨膜运输大的溶质(如二糖)的细菌孔蛋白(大肠杆菌K12)。

[0115] 每种蛋白质的稳定结果分别示于图9A-9E中。通过分别对应于结构(6)、(7)和(8)的具有BP1序列的三种不同的官能化 $\beta$ 折叠肽(叠氨基、炔丙基和乙烯基)稳定上述每种蛋白质。示出了每一种蛋白质的CD谱,未进行蛋白质稳定化(分别对于AqpQ和OmpG的不含DDM或不含OG)或用DDM稳定蛋白质( $F_0F_1$ -ATP酶、NaChBac和ChIEF-mCitrine)。

[0116] 本发明人通过测量其ATP水解活性进一步证明当通过官能化 $\beta$ 折叠肽稳定时, $F_0F_1$ -ATP酶保持其功能。酶促反应中无机磷酸( $P_i$ )的产生作为酶活性的指示剂。使用PiColorLock™磷酸检测试剂盒(Innova Biosciences)按照制造商的说明书进行ATP酶水解活性。

[0117] 如图10A所示,当用BP1或DDM稳定时, $F_0F_1$ -ATP酶的酶活性(通过水解活性表征)类似。如图10B所示,当通过具有结构(6)的官能化 $\beta$ 折叠肽叠氨基-BP1稳定时, $F_0F_1$ -ATP酶也保持水解活性。因此,可以可靠地预测,通过官能化 $\beta$ 折叠肽稳定化并通过官能化 $\beta$ 折叠肽的官能团与膜的反应并入膜中的 $F_0F_1$ -ATP酶可用于产生人工ATP产生系统。当跨容纳 $F_0F_1$ -ATP酶的膜存在质子梯度时,所述酶将从ADP和无机磷酸合成ATP,导致在膜的一侧产生ATP。还可以使酶逆向起作用以从ATP的水解产生质子梯度。因此, $F_0F_1$ -ATP酶可以用于合成ATP,或者替代地将质子从具有其中并入 $F_0F_1$ -ATP酶的膜的一侧泵送到膜的另一侧。

[0118] AqpZ、NaChBac、ChIEF和ATP酶都是具有由螺旋束形成的类似跨膜结构域结构的蛋白质。OmpG代表不同跨膜结构域结构的实例: $\beta$ -折叠桶。基于这样多组的膜蛋白(包括AqpZ)都被官能化 $\beta$ 折叠肽成功稳定的事实,并且基于不同水通道蛋白之间的高度保守性(例如如图1B所示),可以可靠地预测,除AqpZ之外的其他水通道蛋白也可以用官能化 $\beta$ 折叠肽稳定并偶联到膜以从水中去除污染物。还可以进一步可靠地预测,官能化 $\beta$ 折叠肽可以用于稳定和束缚多种膜蛋白以制备有用的蛋白质构建体。如下文实施例4.0所讨论的,根据表明当通过官能化 $\beta$ 折叠肽稳定时 $F_0F_1$ -ATP酶保持其活性以及表明可以使用官能化 $\beta$ 折叠肽将水通道蛋白并入膜中并且用于提高通过膜的水的通量同时限制盐通过膜的结果,可以可靠地预测,当通过官能化 $\beta$ 折叠肽稳定时,其他膜蛋白将保持其功能。

#### [0119] 例如4.0-评估水通过含水通道蛋白膜的运输

##### [0120] 实施例4.1-聚砜膜酶合成

[0121] 按照文献(Yilmaz等,2011)中所述的方案2中所述的通用反应制备叠氨基官能化聚砜膜。在步骤1中,首先在装配有磁力搅拌器、回流冷凝器和温度计的圆底烧瓶中,通过溶



解在氯仿中完成聚砜的氯甲基化。将溶液在氮气氛下在50℃下加热,然后将对甲醛(10g)、三甲基氯硅烷(42.50mL)和氯化锡(IV)(1.75g)加入到聚合物溶液中。一旦反应完成(在50℃下50小时),在搅拌下将混合物倒入甲醇中,过滤聚合物沉淀,然后用甲醇充分洗涤,最后在真空烘箱中在60-65℃干燥24小时。

[0122] 在步骤2中,然后在置于热浴的圆底烧瓶中,将氯化聚砜与 $\text{NaN}_3$ 一起溶解在DMF中,并将反应混合物在65℃下搅拌10小时。将反应混合物冷却至室温并在搅拌下倒入甲醇中,过滤分离的聚合物,并用甲醇洗涤。加入聚乙烯吡咯烷酮(PVP)作为成孔剂,之后真空烘箱中在60℃干燥24小时。

[0123] 实施例4.2-合成的仿生膜的分离性质

[0124] 使用根据实施例4.1制备的聚砜膜和具有结构(2)的 $\beta$ 折叠肽制备并入 $\beta$ 折叠肽稳定之AqpZ的膜。为了官能化 $\beta$ 折叠肽以形成聚酰胺-聚砜复合膜结构,将间苯二胺浓度(MPD)(2重量%)与均苯三甲酰氯(TMC)(0.15重量%)以及AqpZ和聚砜膜合并,以在聚砜膜上产生互锁的界面聚合的聚酰胺层。反应时间(在膜上官能化 $\beta$ 折叠肽稳定之蛋白质的界面聚合)为15秒,AqpZ浓度(存在于用于进行界面聚合的蛋白质溶液中)为0.033mg/mL,具有0.064mg/mL的 $\beta$ 折叠肽。除了不存在AqpZ之外,在没有AqpZ的情况下测试的膜的条件相同。

[0125] 在标准交叉流反渗透装置中表征合成的仿生膜的分离性质。简言之,将具有42cm<sup>2</sup>的活性面积的膜试样安装在测试池(CF42 Membrane Cell, Sterlitech)中。以0.8加仑/分钟的恒定交叉流量泵送进料溶液(25℃下1g/L NaCl)(1000ppm)。在样品收集用于水通量和排除测量之前,在期望的测试压力下将膜压紧2小时。使用重量法测定膜渗透通量(Jv),并且基于渗液和给水的电导率测量获得NaCl脱除率(R)。

[0126] 如表3(具有AqpZ)和表4(不具有AqpZ)中所总结的,并如图11A、11B和11C所示(图11C仅示出了250PSI操作压力下的数据),并入水通道蛋白的构建体中通量(升/平方米/小时,或LMH)(即,通过膜的水的流速)增加,并且在较高的操作压力下,当存在水通道蛋白时实现更大的脱盐率。这些结果证明,并入水通道蛋白的膜可用于通过增加通量(即通过膜的水的流速)来增强水与不期望的溶液组份例如氯化钠的分离,同时保持膜对氯化钠的排斥(即,同时继续阻止氯化钠通过膜)。

[0127] 表3. 并入AqpZ的膜构建体的通量和脱盐率。

[0128]

压强 (PSI)	通量 (LMH)	脱盐率 (%)
200	15.35	80
250	19.33	85
300	22.99	90
350	26.52	90
400	29.92	90

[0129] 表4. 没有AqpZ的对照膜构建体的通量和脱盐率。

[0130]

压强 (PSI)	通量 (LMH)	脱盐率 (%)
200	3.74	85
250	4.86	85

300	6.33	85
350	7.52	85
400	8.05	85

[0131] 虽然上面已经讨论了多个示例性方面和实施方案,但是本领域技术人员将认识到其某些修改、置换、添加和子组合。因此,与作为整体的说明书的最宽解释一致,旨在将以下所附权利要求和之后引入的权利要求解释为包括的所有这样的修改、置换、添加和子组合。

[0132] 参考文献

[0133] 以下参考文献对于本文所描述的主题可能是有意义的。为了所有目的,以下参考文献中的每一个明确通过引用整体并入本文。

[0134] 1.S.Gnidehou et al.,Expression in Escherichia coli and purification of human recombinant connexin-43,a four-pass transmembrane protein.Protein expression and purification 78,174 (Aug,2011) .

[0135] 2.C.Tribet,R.Audebert,J.L..Popot,Amphipols:polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions.Proc Natl Acad Sci U S A93, 15047 (Dec 24,1996) .

[0136] 3.T.H.Bayburt,Y.V.Grinkova,S.G.Sligar,Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins.Nano Letters 2,4 (2002) .

[0137] 4.X.Zhao et al.,Designer short peptide surfactants stabilize G protein-coupled receptor bovine rhodopsin.Proc Natl Acad Sci U S A103,17707 (Nov 21,2006) .

[0138] 5.P.S.Chae et al.,Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins.Nature methods 7,1003 (Dec,2010) .

[0139] 6.H.Tao et al.,Engineered nanostructured beta-sheet peptides protect membrane proteins.Nature methods 10,759 (Aug,2013) .

[0140] 7.M.J.Borgnia,D.Kozono,G.Calamita,P.C.Maloney,P.Agre,Functional reconstitution and characterization of AqpZ,the E.coli water channel protein.Journal of molecular biology 291,1169 (Sep 3,1999) .

[0141] 8.D.F.Savage,P.F.Egea,Y.Robles-Colmenares,J.D.O'Connell,3rd, R.M.Stroud,Architecture and selectivity in aquaporins:2.5a X-ray structure of aquaporin Z.PLoS biology 1,E72 (Dec,2003) .

[0142] 9.S.M.Kelly,T.J.Jess,N.C.Price,How to study proteins by circular dichroism.Biochimica et biophysica acta 1751,119 (Aug 10,2005) .

[0143] 10.Erbakan,M.,Shen,Y.-X.,Grzelakowski,M.,Butler,P.J.,Kumar,M.,& Curtis,W.R. (2014) .Molecular cloning,overexpression and characterization of a novel water channel protein from Rhodobacter sphaeroides.PloS One,9(1), e86830.

[0144] 11.Sun,G.,Zhou,H.,Li,Y.,Jeyaseelan,K.,Armugam,A.,&Chung,T.-S. (2012) .A

novel method of AquaporinZ incorporation via binary-lipid Langmuir monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89, 283-288.

[0145] 12. Sun, G., Chung, T.-S., Jeyaseelan, K., & Armugam, A. (2013). A layer-by-layer self-assembly approach to developing an aquaporin-embedded mixed matrix membrane. *RSC Adv.*, 3 (2), 473-481.

[0146] 13. Evram, E., et al. (1997). Polymers with pendant functional group. III. Polysulfones containing viologen group. *J. Macromol. Sci., A Pure Appl Chem* 34:1701-1714.

[0147] 14. Habibi, Y. (2014). Key advances in the chemical modification of nanocelluloses. *Chemical Society Reviews*, 43 (5), 1519-1542.

[0148] 15. Habel, J., Hansen, M., Kynde, S., Larsen, N., Midtgaard, S., Jensen, G., et al. (2015). Aquaporin-Based Biomimetic Polymeric Membranes: Approaches and Challenges. *Membranes*, 5 (3), 307-351.

[0149] 16. Yilmaz, G. et al. (2011). Modification of polysulfones by click chemistry: Amphiphilic graft copolymers and their protein adsorption and cell adhesion properties. *J. Pol. Sci.: Part A: Pol. Chem.*, 49, 110-117.

[0150] 17. Ghosh et al., "Impacts of support membrane structure and chemistry on polyamide-polysulfone interfacial composite membranes", 2009, *J. Mem. Sci.*, 336, 140-148.

[0151] 序列表独立文本

[0152] 本说明书包括电子序列表,其作为本说明书的一部分而明确并入。此序列表包括如下的自由文本:

[0153] • SEQ ID NO:1-BP1-合成肽

[0154] • SEQ ID NO:12-C-炔丙基-BP1-合成肽

[0155] • SEQ ID NO:13-N-叠氮基-BP1-合成肽

[0156] • SEQ ID NO:14-N-炔丙基-BP1-合成肽

[0157] • SEQ ID NO:15-乙烯基-BP1-合成肽

[0158] • SEQ ID NO:16-pET28a-AqpZ-质粒,用于在大肠杆菌中表达AqpZ

## 序列表

<110> 艾伯塔大学校董  
<120> 官能化 $\beta$ 折叠肽稳定的膜蛋白、包含其的构建体以及形成和使用其的方法  
<130> M917 0005/TWB  
<150> US 62/041,587  
<151> 2014-08-25  
<160> 16  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1) .. (1)  
<223> (辛基)Gly  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7) .. (7)  
<223> (辛基)Gly  
<400> 1  
Xaa Ser Leu Ser Leu Asp Xaa Asp  
1                    5  
<210> 2  
<211> 243  
<212> PRT  
<213> 球形红细菌(Rhodobacter sphaeroides)  
<400> 2  
Met Thr Lys Lys Leu Leu Ala Glu Leu Leu Gly Thr Phe Ile Leu Val  
1                    5                    10                    15  
Phe Phe Gly Cys Gly Ala Ala Val Leu Met Gly Pro Gln Ile Gly Met  
                  20                    25                    30  
Leu Gly Ile Ser Leu Ala Phe Gly Leu Ser Ile Val Ala Ala Ala Tyr  
                  35                    40                    45  
Ser Leu Gly Ala Ile Ser Gly Ala His Leu Asn Pro Ala Val Ser Leu  
                  50                    55                    60

Gly Phe Leu Met Ala Gly Arg Met Pro Met Ala Glu Phe Gly Gly Tyr  
65                                   70                                   75                                   80  
Val Leu Ala Gln Ile Ala Gly Ala Leu Leu Gly Ser Leu Val Val Phe  
                                  85                                   90                                   95  
Leu Ile Ala Ser Gly Lys Ala Gly Tyr Val Leu Ala Thr Asp Gly Leu  
                                  100                                   105                                   110  
Gly Gln Asn Gly Phe Gly Ala Gly Tyr Leu Gly Glu Tyr Ser Met Gly  
                                  115                                   120                                   125  
Ala Ala Leu Ile Phe Glu Leu Ile Ala Thr Phe Val Phe Val Ser Val  
                                  130                                   135                                   140  
Ile Leu Ala Ala Thr Ala Ser His Val Ser Ser Ala Ser Thr Ala Leu  
145                                   150                                   155                                   160  
Ala Gly Leu Ala Ile Gly Leu Thr Leu Thr Gly Ile His Leu Val Gly  
                                  165                                   170                                   175  
Ile Asn Val Thr Gly Val Ser Val Asn Pro Ala Arg Ser Leu Ala Pro  
                                  180                                   185                                   190  
Ala Leu Phe Val Gly Gly Lys Ala Leu Ser Asp Leu Trp Val Phe Ile  
                                  195                                   200                                   205  
Val Ala Pro Leu Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Leu Ala His Ala Ser  
                                  210                                   215                                   220  
Gly Phe Phe Arg Pro Gly Gly Ile Glu Pro Ala Pro Ala Thr Gly Ala  
225                                   230                                   235                                   240  
Ala Thr Leu  
<210> 3  
<211> 231  
<212> PRT  
<213> 大肠杆菌  
<400> 3  
Met Phe Arg Lys Leu Ala Ala Glu Cys Phe Gly Thr Phe Cys Leu Val  
1                                   5                                   10                                   15  
Phe Gly Gly Cys Gly Ser Ala Val Leu Pro Ala Gly Phe Pro Glu Leu  
                                  20                                   25                                   30  
Gly Ile Gly Phe Ala Gly Val Ala Leu Ala Phe Gly Leu Thr Val Leu  
                                  35                                   40                                   45  
Thr Met Ala Phe Ala Val Gly His Ile Ser Gly Gly His Phe Asn Pro  
                                  50                                   55                                   60  
Ala Val Thr Ile Gly Leu Trp Ala Gly Gly Arg Phe Pro Ala Lys Glu  
65                                   70                                   75                                   80  
Val Val Gly Tyr Val Ile Ala Gln Val Val Gly Gly Ile Val Ala Ala

	85	90	95
Ala Leu Leu Tyr Leu Ile Ala Ser Gly Lys Thr Gly Phe Asp Ala Ala			
	100	105	110
Ala Ser Gly Phe Ala Ser Asn Gly Tyr Gly Glu His Ser Pro Gly Gly			
	115	120	125
Tyr Ser Met Leu Ser Ala Leu Val Val Glu Leu Val Leu Ser Ala Gly			
	130	135	140
Phe Leu Leu Val Ile His Gly Ala Thr Asp Lys Phe Ala Pro Ala Gly			
145	150	155	160
Phe Ala Pro Ile Ala Ile Gly Leu Ala Leu Thr Leu Ile His Leu Ile			
	165	170	175
Ser Ile Pro Val Thr Asn Thr Ser Val Asn Pro Ala Arg Ser Thr Ala			
	180	185	190
Val Ala Ile Phe Gln Gly Gly Trp Ala Leu Glu Gln Leu Trp Phe Phe			
	195	200	205
Trp Val Val Pro Ile Val Gly Gly Ile Ile Gly Gly Leu Ile Tyr Arg			
	210	215	220
Thr Leu Leu Glu Lys Arg Asp			
225	230		
<210> 4			
<211> 281			
<212> PRT			
<213> 大肠杆菌			
<400> 4			
Met Ser Gln Thr Ser Thr Leu Lys Gly Gln Cys Ile Ala Glu Phe Leu			
1	5	10	15
Gly Thr Gly Leu Leu Ile Phe Phe Gly Val Gly Cys Val Ala Ala Leu			
	20	25	30
Lys Val Ala Gly Ala Ser Phe Gly Gln Trp Glu Ile Ser Val Ile Trp			
	35	40	45
Gly Leu Gly Val Ala Met Ala Ile Tyr Leu Thr Ala Gly Val Ser Gly			
	50	55	60
Ala His Leu Asn Pro Ala Val Thr Ile Ala Leu Trp Leu Phe Ala Cys			
65	70	75	80
Phe Asp Lys Arg Lys Val Ile Pro Phe Ile Val Ser Gln Val Ala Gly			
	85	90	95
Ala Phe Cys Ala Ala Ala Leu Val Tyr Gly Leu Tyr Tyr Asn Leu Phe			
	100	105	110
Phe Asp Phe Glu Gln Thr His His Ile Val Arg Gly Ser Val Glu Ser			

115	120	125
Val Asp Leu Ala Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Pro Asn Pro His Ile Asn		
130	135	140
Phe Val Gln Ala Phe Ala Val Glu Met Val Ile Thr Ala Ile Leu Met		
145	150	155
Gly Leu Ile Leu Ala Leu Thr Asp Asp Gly Asn Gly Val Pro Arg Gly		
165	170	175
Pro Leu Ala Pro Leu Leu Ile Gly Leu Leu Ile Ala Val Ile Gly Ala		
180	185	190
Ser Met Gly Pro Leu Thr Gly Phe Ala Met Asn Pro Ala Arg Asp Phe		
195	200	205
Gly Pro Lys Val Phe Ala Trp Leu Ala Gly Trp Gly Asn Val Ala Phe		
210	215	220
Thr Gly Gly Arg Asp Ile Pro Tyr Phe Leu Val Pro Leu Phe Gly Pro		
225	230	235
Ile Val Gly Ala Ile Val Gly Ala Phe Ala Tyr Arg Lys Leu Ile Gly		
245	250	255
Arg His Leu Pro Cys Asp Ile Cys Val Val Glu Glu Lys Glu Thr Thr		
260	265	270
Thr Pro Ser Glu Gln Lys Ala Ser Leu		
275	280	
<210> 5		
<211> 246		
<212> PRT		
<213> Methanobacter marburgensis		
<400> 5		
Met Val Ser Leu Thr Lys Arg Cys Ile Ala Glu Phe Ile Gly Thr Phe		
1	5	10
Ile Leu Val Phe Phe Gly Ala Gly Ser Ala Ala Val Thr Leu Met Ile		
20	25	30
Ala Ser Gly Gly Thr Ser Pro Asn Pro Phe Asn Ile Gly Ile Gly Leu		
35	40	45
Leu Gly Gly Leu Gly Asp Trp Val Ala Ile Gly Leu Ala Phe Gly Phe		
50	55	60
Ala Ile Ala Ala Ser Ile Tyr Ala Leu Gly Asn Ile Ser Gly Cys His		
65	70	75
Ile Asn Pro Ala Val Thr Ile Gly Leu Trp Ser Val Lys Lys Phe Pro		
85	90	95
Gly Arg Glu Val Val Pro Tyr Ile Ile Ala Gln Leu Leu Gly Ala Ala		

	100		105		110
Phe Gly Ser Phe Ile Phe Leu Gln Cys Ala Gly Ile Gly Ala Ala Thr					
	115		120		125
Val Gly Gly Leu Gly Ala Thr Ala Pro Phe Pro Gly Ile Ser Tyr Trp					
	130		135		140
Gln Ala Met Leu Ala Glu Val Val Gly Thr Phe Leu Leu Met Ile Thr					
145		150		155	160
Ile Met Gly Ile Ala Val Asp Glu Arg Ala Pro Lys Gly Phe Ala Gly					
	165		170		175
Ile Ile Ile Gly Leu Thr Val Ala Gly Ile Ile Thr Thr Leu Gly Asn					
	180		185		190
Ile Ser Gly Ser Ser Leu Asn Pro Ala Arg Thr Phe Gly Pro Tyr Leu					
	195		200		205
Asn Asp Met Ile Phe Ala Gly Thr Asn Leu Trp Asn Tyr Tyr Pro Ile					
210		215		220	
Tyr Val Ile Gly Pro Ile Val Gly Ala Val Leu Ala Ala Leu Thr Tyr					
225		230		235	240
Gln Tyr Leu Thr Ser Glu					
	245				

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 269

&lt;212&gt; PRT

<213> *Synechococcus elongatus*

&lt;400&gt; 6

Met Lys Met Leu Arg Ala Leu Lys His His Trp Pro Glu Tyr Leu Ile					
1	5		10		15
Glu Ala Trp Gly Leu Gly Leu Phe Met Val Ala Ala Gly Val Val Gly					
	20		25		30
Thr Leu Val Phe Tyr Pro Gln Ser Pro Ala Tyr Gln Ala Ile Ala Asp					
	35		40		45
Pro Phe Leu Gln Arg Val Val Met Gly Leu Gly Met Gly Leu Thr Ala					
50		55		60	
Met Ile Ile Met Tyr Ser Pro Trp Gly Lys Arg Ser Gly Ala His Ile					
65		70		75	80
Asn Pro Ala Val Thr Leu Thr Phe Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ala Ala					
	85		90		95
Trp Asp Ala Phe Phe Tyr Val Val Phe Gln Phe Ile Gly Gly Leu Leu					
	100		105		110
Gly Val Val Leu Val Ala Phe Leu Leu Gln Thr Pro Phe Thr Gln Ala					



115	120	125
Pro Val Asn Tyr Val Val Thr Val Pro Gly Lys Gln Gly Ala Ile Val		
130	135	140
Ala Cys Ile Ala Glu Tyr Phe Ile Ala Val Leu Met Met Ser Met Val		
145	150	155
Leu Phe Thr Ser Asn Gln Pro Lys Leu Glu Arg Phe Thr Pro Phe Phe		
	165	170
Ala Gly Cys Leu Ile Val Ser Tyr Val Ile Phe Glu Ser Pro Leu Ser		
	180	185
Gly Phe Gly Met Asn Pro Ala Arg Thr Val Ala Ser Ala Leu Pro Ser		
	195	200
Gly Ile Trp Thr Ala Ile Trp Leu Tyr Phe Leu Ala Pro Ile Ala Gly		
	210	215
Met Leu Thr Ala Ala Glu Leu Tyr Leu Arg Met Ile Gly Pro Arg Lys		
	225	230
Ile Phe Cys Ala Lys Leu Tyr His Asp Pro Leu Tyr Arg Cys Ile His		
	245	250
Cys Gly His Leu Ile His Trp His Arg Pro His Leu Arg		
	260	265
<210> 7		
<211> 279		
<212> PRT		
<213> 巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)		
<400> 7		
Met Pro Asp Ile Glu Asn Gln Ala Ala Asp Gly Gln Ala Glu Ile Lys		
1	5	10
Pro Glu Asp Ala Pro Tyr Ile Thr Asn Ala Tyr Lys Pro Ala Tyr Ala		
	20	25
Arg Trp Gly Phe Gly Ser Asp Ser Val Arg Asn His Phe Ile Ala Met		
	35	40
Ser Gly Glu Phe Val Gly Thr Phe Leu Phe Leu Trp Ser Ala Phe Val		
	50	55
Ile Ala Gln Ile Ala Asn Gln Ala Pro Glu Thr Pro Asp Gly Gly Ser		
65	70	75
Asn Pro Ala Gln Leu Ile Met Ile Ser Phe Gly Phe Gly Phe Gly Val		
	85	90
Met Val Gly Val Phe Ile Thr Tyr Arg Val Ser Gly Gly Asn Leu Asn		
	100	105
Pro Ala Val Thr Leu Ala Leu Val Leu Ala Arg Ala Ile Pro Pro Phe		

115	120	125	
Arg Gly Ile Leu Met Ala Phe Thr Gln Ile Val Ala Gly Met Ala Ala			
130	135	140	
Ala Gly Ala Ala Ser Ala Met Thr Pro Gly Glu Ile Ala Phe Ala Asn			
145	150	155	160
Ala Leu Gly Gly Gly Ala Ser Arg Thr Arg Gly Leu Phe Leu Glu Ala			
165	170	175	
Phe Gly Thr Ala Ile Leu Cys Leu Thr Val Leu Met Leu Ala Val Glu			
180	185	190	
Lys His Arg Ala Thr Trp Phe Ala Pro Phe Val Ile Gly Ile Ala Leu			
195	200	205	
Leu Ile Ala His Leu Ile Cys Ile Tyr Tyr Thr Gly Ala Gly Leu Asn			
210	215	220	
Pro Ala Arg Ser Phe Gly Pro Ala Val Ala Ala Arg Ser Phe Pro Asn			
225	230	235	240
Tyr His Trp Ile Tyr Trp Leu Gly Pro Ile Leu Gly Ala Phe Leu Ala			
245	250	255	
Tyr Ser Ile Trp Gln Met Trp Lys Trp Leu Asn Tyr Gln Thr Thr Asn			
260	265	270	
Pro Gly Gln Asp Ser Asp Ala			
275			
<210> 8			
<211> 281			
<212> PRT			
<213> 菠菜(Spinacia oleracea)			
<400> 8			
Met Ser Lys Glu Val Ser Glu Glu Ala Gln Ala His Gln His Gly Lys			
1	5	10	15
Asp Tyr Val Asp Pro Pro Pro Ala Pro Phe Phe Asp Leu Gly Glu Leu			
20	25	30	
Lys Leu Trp Ser Phe Trp Arg Ala Ala Ile Ala Glu Phe Ile Ala Thr			
35	40	45	
Leu Leu Phe Leu Tyr Ile Thr Val Ala Thr Val Ile Gly His Ser Lys			
50	55	60	
Glu Thr Val Val Cys Gly Ser Val Gly Leu Leu Gly Ile Ala Trp Ala			
65	70	75	80
Phe Gly Gly Met Ile Phe Val Leu Val Tyr Cys Thr Ala Gly Ile Ser			
85	90	95	
Gly Gly His Ile Asn Pro Ala Val Thr Phe Gly Leu Phe Leu Ala Arg			

100	105	110
Lys Val Ser Leu Leu Arg Ala Leu Val Tyr Met Ile Ala Gln Cys Leu		
115	120	125
Gly Ala Ile Cys Gly Val Gly Leu Val Lys Ala Phe Met Lys Gly Pro		
130	135	140
Tyr Asn Gln Phe Gly Gly Gly Ala Asn Ser Val Ala Leu Gly Tyr Asn		
145	150	155
Lys Gly Thr Ala Leu Gly Ala Glu Ile Ile Gly Thr Phe Val Leu Val		
165	170	175
Tyr Thr Val Phe Ser Ala Thr Asp Pro Lys Arg Ser Ala Arg Asp Ser		
180	185	190
His Val Pro Ile Leu Ala Pro Leu Pro Ile Gly Phe Ala Val Phe Met		
195	200	205
Val His Leu Ala Thr Ile Pro Ile Thr Gly Thr Gly Ile Asn Pro Ala		
210	215	220
Arg Ser Phe Gly Ala Ala Val Ile Phe Asn Ser Asn Lys Val Trp Asp		
225	230	235
Asp Gln Trp Ile Phe Trp Val Gly Pro Phe Ile Gly Ala Ala Val Ala		
245	250	255
Ala Ala Tyr His Gln Tyr Val Leu Arg Ala Ala Ala Ile Lys Ala Leu		
260	265	270
Gly Ser Phe Arg Ser Asn Pro Thr Asn		
275	280	
<210> 9		
<211> 269		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 9		
Met Ala Ser Glu Phe Lys Lys Lys Leu Phe Trp Arg Ala Val Val Ala		
1	5	10
Glu Phe Leu Ala Thr Thr Leu Phe Val Phe Ile Ser Ile Gly Ser Ala		
20	25	30
Leu Gly Phe Lys Tyr Pro Val Gly Asn Asn Gln Thr Ala Val Gln Asp		
35	40	45
Asn Val Lys Val Ser Leu Ala Phe Gly Leu Ser Ile Ala Thr Leu Ala		
50	55	60
Gln Ser Val Gly His Ile Ser Gly Ala His Leu Asn Pro Ala Val Thr		
65	70	75
Leu Gly Leu Leu Leu Ser Cys Gln Ile Ser Ile Phe Arg Ala Leu Met		

	85	90	95
Tyr Ile Ile Ala Gln Cys Val Gly Ala Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu			
	100	105	110
Ser Gly Ile Thr Ser Ser Leu Thr Gly Asn Ser Leu Gly Arg Asn Asp			
	115	120	125
Leu Ala Asp Gly Val Asn Ser Gly Gln Gly Leu Gly Ile Glu Ile Ile			
	130	135	140
Gly Thr Leu Gln Leu Val Leu Cys Val Leu Ala Thr Thr Asp Arg Arg			
145	150	155	160
Arg Arg Asp Leu Gly Gly Ser Ala Pro Leu Ala Ile Gly Leu Ser Val			
	165	170	175
Ala Leu Gly His Leu Leu Ala Ile Asp Tyr Thr Gly Cys Gly Ile Asn			
	180	185	190
Pro Ala Arg Ser Phe Gly Ser Ala Val Ile Thr His Asn Phe Ser Asn			
	195	200	205
His Trp Ile Phe Trp Val Gly Pro Phe Ile Gly Gly Ala Leu Ala Val			
	210	215	220
Leu Ile Tyr Asp Phe Ile Leu Ala Pro Arg Ser Ser Asp Leu Thr Asp			
225	230	235	240
Arg Val Lys Val Trp Thr Ser Gly Gln Val Glu Glu Tyr Asp Leu Asp			
	245	250	255
Ala Asp Asp Ile Asn Ser Arg Val Glu Met Lys Pro Lys			
	260	265	
<210>	10		
<211>	323		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	10		
Met Ser Asp Arg Pro Thr Ala Arg Arg Trp Gly Lys Cys Gly Pro Leu			
1	5	10	15
Cys Thr Arg Glu Asn Ile Met Val Ala Phe Lys Gly Val Trp Thr Gln			
	20	25	30
Ala Phe Trp Lys Ala Val Thr Ala Glu Phe Leu Ala Met Leu Ile Phe			
	35	40	45
Val Leu Leu Ser Leu Gly Ser Thr Ile Asn Trp Gly Gly Thr Glu Lys			
	50	55	60
Pro Leu Pro Val Asp Met Val Leu Ile Ser Leu Cys Phe Gly Leu Ser			
65	70	75	80
Ile Ala Thr Met Val Gln Cys Phe Gly His Ile Ser Gly Gly His Ile			

	85	90	95
Asn Pro Ala Val Thr Val Ala Met Val Cys Thr Arg Lys Ile Ser Ile			
	100	105	110
Ala Lys Ser Val Phe Tyr Ile Ala Ala Gln Cys Leu Gly Ala Ile Ile			
	115	120	125
Gly Ala Gly Ile Leu Tyr Leu Val Thr Pro Pro Ser Val Val Gly Gly			
	130	135	140
Leu Gly Val Thr Met Val His Gly Asn Leu Thr Ala Gly His Gly Leu			
145	150	155	160
Leu Val Glu Leu Ile Ile Thr Phe Gln Leu Val Phe Thr Ile Phe Ala			
	165	170	175
Ser Cys Asp Ser Lys Arg Thr Asp Val Thr Gly Ser Ile Ala Leu Ala			
	180	185	190
Ile Gly Phe Ser Val Ala Ile Gly His Leu Phe Ala Ile Asn Tyr Thr			
	195	200	205
Gly Ala Ser Met Asn Pro Ala Arg Ser Phe Gly Pro Ala Val Ile Met			
	210	215	220
Gly Asn Trp Glu Asn His Trp Ile Tyr Trp Val Gly Pro Ile Ile Gly			
225	230	235	240
Ala Val Leu Ala Gly Gly Leu Tyr Glu Tyr Val Phe Cys Pro Asp Val			
	245	250	255
Glu Phe Lys Arg Arg Phe Lys Glu Ala Phe Ser Lys Ala Ala Gln Gln			
	260	265	270
Thr Lys Gly Ser Tyr Met Glu Val Glu Asp Asn Arg Ser Gln Val Glu			
	275	280	285
Thr Asp Asp Leu Ile Leu Lys Pro Gly Val Val His Val Ile Asp Val			
	290	295	300
Asp Arg Gly Glu Glu Lys Lys Gly Lys Asp Gln Ser Gly Glu Val Leu			
305	310	315	320
Ser Ser Val			
<210> 11			
<211> 295			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 11			
Met Gln Pro Glu Gly Ala Glu Lys Gly Lys Ser Phe Lys Gln Arg Leu			
1	5	10	15
Val Leu Lys Ser Ser Leu Ala Lys Glu Thr Leu Ser Glu Phe Leu Gly			
	20	25	30

Thr Phe Ile Leu Ile Val Leu Gly Cys Gly Cys Val Ala Gln Ala Ile  
 35 40 45  
 Leu Ser Arg Gly Arg Phe Gly Gly Val Ile Thr Ile Asn Val Gly Phe  
 50 55 60  
 Ser Met Ala Val Ala Met Ala Ile Tyr Val Ala Gly Gly Val Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Gly His Ile Asn Pro Ala Val Ser Leu Ala Met Cys Leu Phe Gly Arg  
 85 90 95  
 Met Lys Trp Phe Lys Leu Pro Phe Tyr Val Gly Ala Gln Phe Leu Gly  
 100 105 110  
 Ala Phe Val Gly Ala Ala Thr Val Phe Gly Ile Tyr Tyr Asp Gly Leu  
 115 120 125  
 Met Ser Phe Ala Gly Gly Lys Leu Leu Ile Val Gly Glu Asn Ala Thr  
 130 135 140  
 Ala His Ile Phe Ala Thr Tyr Pro Ala Pro Tyr Leu Ser Leu Ala Asn  
 145 150 155 160  
 Ala Phe Ala Asp Gln Val Val Ala Thr Met Ile Leu Leu Ile Ile Val  
 165 170 175  
 Phe Ala Ile Phe Asp Ser Arg Asn Leu Gly Ala Pro Arg Gly Leu Glu  
 180 185 190  
 Pro Ile Ala Ile Gly Leu Leu Ile Ile Val Ile Ala Ser Ser Leu Gly  
 195 200 205  
 Leu Asn Ser Gly Cys Ala Met Asn Pro Ala Arg Asp Leu Ser Pro Arg  
 210 215 220  
 Leu Phe Thr Ala Leu Ala Gly Trp Gly Phe Glu Val Phe Arg Ala Gly  
 225 230 235 240  
 Asn Asn Phe Trp Trp Ile Pro Val Val Gly Pro Leu Val Gly Ala Val  
 245 250 255  
 Ile Gly Gly Leu Ile Tyr Val Leu Val Ile Glu Ile His His Pro Glu  
 260 265 270  
 Pro Asp Ser Val Phe Lys Thr Glu Gln Ser Glu Asp Lys Pro Glu Lys  
 275 280 285  
 Tyr Glu Leu Ser Val Ile Met  
 290 295  
 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>

- <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> (辛基) Gly  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> (辛基) Gly  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> (炔丙基) Gly  
 <400> 12  
 Xaa Ser Leu Ser Leu Asp Xaa Asp Xaa  
 1 5  
 <210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> 叠氮高丙氨酸  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> (辛基) Gly  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> (辛基) Gly  
 <400> 13  
 Xaa Xaa Ser Leu Ser Leu Asp Xaa Asp  
 1 5  
 <210> 14  
 <211> 9

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> (炔丙基) Gly  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> (辛基) Gly  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> (辛基) Gly  
 <400> 14  
 Xaa Xaa Ser Leu Ser Leu Asp Xaa Asp  
 1                    5  
 <210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> (辛基) Gly  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> 氨基丙烯酸  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> (辛基) Gly  
 <400> 15  
 Xaa Ser Leu Ser Xaa Leu Asp Xaa Asp Gly Leu



1	5	10	
<210>	16		
<211>	6003		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	用于在大肠杆菌中表达AqpZ的质粒。		
<400>	16		
atccggatat	agttcctcct	ttcagcaaaa	aaccctca
gagccgttta	gaggccca	60	
ggggttatgc	tagttattgc	tcagcgggtg	cagcagccaa
ctcagcttcc	tttcgggctt	120	
tgtagcagc	cggatctcag	tggtgggtgg	ggtgggtgctc
gagtgccgcc	gcaagcttta	180	
atcacgcttt	tccagcaggg	tccggtaa	cagaccaccg
ataatgccgc	cgacaattgg	240	
caccaccag	aagaaccaca	gttgttetaa	tgcccagccg
ccctggaaga	tagcaaccgc	300	
ggtgctgcgc	gccgggttaa	cagaagtgtt	agtcaccgga
ataactaatta	agtgaatcag	360	
ggttaaggcc	agaccaatag	cgatcggcgc	aaaacctgcc
ggcgcgaatt	tgctcggttc	420	
gccgtggatc	accaacagga	aacctgca	caataccagt
tcaactacca	gcgcggaaag	480	
catggaataa	ccgcctgggt	aatgctgc	ataaccgtta
gaagcaaac	cgctggctgc	540	
cgcgtcaaaa	cccgttttac	cactggcaat	taaatacagc
agcgcctg	caacaatacc	600	
gccgacaacc	tgggcaatta	cgtagccaac	gacttctttt
gccggaaaac	gtccgccagc	660	
ccataaacca	atagtgaccg	ccgggttaaa	atgaccacca
gaaatatgac	caacagcaaa	720	
ggccatcgtc	agaacggtea	gaccgaacgc	caacgccacg
ccggcaaac	caatgcctaa	780	
ttccgggaag	cctgcggcca	gtacagca	accacagcca
ccaaaacaa	gccagaaagt	840	
acaaaaacat	tcagctgcta	atcttctgaa	catatggctg
ccgcgcggca	ccaggccgct	900	
gctgtgatga	tgatgatgat	ggctgctgcc	catggtatat
ctccttctta	aagttaaaca	960	
aaattatttc	tagaggggaa	ttgttatccg	ctcacaattc
ccctatagtg	agtcgtatta	1020	
atctcgcggg	atcgagatct	cgatcctcta	cgccggacgc
atcgtggccg	gcatcaccgg	1080	
cgccacaggt	gcggttgctg	gcgctatat	cgccgacatc
accgatgggg	aagatcgggc	1140	
tcgccacttc	gggctcatga	gcgcttgttt	cggcgtgggt
atggtggcag	gccccgtggc	1200	
cgggggactg	ttgggcgcca	tctccttgea	tgcaccattc
cttgccggcg	cggtgctcaa	1260	
cgccctcaac	ctactactgg	gctgcttct	aatgcaggag
tcgcataagg	gagagcgtcg	1320	
agatcccgga	caccatcgaa	tggcgcacaa	ccttccgcgg
tatggcatga	tagcggccgg	1380	
aagagagtca	attcaggggt	gtgaatgtga	aaccagtaac
gttatacgat	gtcgcagagt	1440	
atgccgggtg	ctcttatcag	accgtttccc	gcgtgggtgaa
ccaggccagc	cacgtttctg	1500	
cgaaaaacgcg	ggaaaaaagt	gaagcggcga	tgccggagct
gaattacatt	cccaaccgcg	1560	
tggcacaaca	actggcgggc	aaacagtcgt	tgetgattgg
cgttgccacc	tccagtctgg	1620	
ccctgcacgc	gccgtcgcaa	attgtcgcgg	cgattaaate
tcgcgccgat	caactgggtg	1680	
ccagcgtggg	ggtgtcgatg	gtagaacgaa	gcggcgtcga
agcctgtaaa	gcggcgtgc	1740	
acaatcttct	cgcgcaacgc	gtcagtgggc	tgatcattaa
ctatccgctg	gatgaccagg	1800	
atgccattgc	tgtggaagct	gcctgcaacta	atgttccggc
gttatttctt	gatgtctctg	1860	

accagacacc	catcaacagt	attatTTTTct	cccatgaaga	cggtacgcga	ctgggcgtgg	1920
agcatctggg	cgcatTgggt	caccagcaaa	tcgcgctggt	agcgggceca	ttagttctg	1980
tctcggcgcg	tctgcgtctg	gctggctggc	ataaatatct	cactcgcaat	caaattcagc	2040
cgatagcggg	acgggaaggc	gactggagtg	ccatgtccgg	tttcaacaa	accatgcaaa	2100
tgctgaatga	gggcatcggt	cccactgcga	tgctggttgc	caacgatcag	atggcgctgg	2160
gcgcaatgcg	cgccattacc	gagtcggggc	tgcgcttgg	tgccgatatc	tcggtagtgg	2220
gatacgacga	taccgaagac	agctcatggt	atatcccgcc	gtaaccacc	atcaaacagg	2280
atTTtcgcct	gctggggcaa	accagcgtgg	accgcttget	gcaactctct	cagggccagg	2340
cggtgaaggg	caatcagctg	ttgcccgtct	cactggtgaa	aagaaaaacc	accctggcgc	2400
ccaatacgca	aaccgcctct	ccccgcgct	tgccgatc	attaatgcag	ctggcacgac	2460
aggTTtcccg	actggaaaagc	gggcagtgag	cgcaacgcaa	ttaatgtaag	ttagctcact	2520
cattaggcac	cgggatctcg	accgatgcc	ttgagagcct	tcaaccagct	cagctccttc	2580
cggtgggcgc	ggggcatgac	tatcgtcgcc	gcaettatga	ctgtcttctt	tatcatgcaa	2640
ctcgtaggac	aggtgccggc	agcgetctgg	gtcattttcg	gcgaggaccg	ctttcgctgg	2700
agcgcgacga	tgatcggcct	gtcgettgcg	gtattcggaa	tcttgcacgc	cctcgetcaa	2760
gccttcgtca	ctggtcccgc	cacaaaacgt	ttcggcgaga	agcaggccat	tatcggcgcc	2820
atggcggccc	cacgggtgcg	catgatcgtg	ctcctgtcgt	tgaggaccgc	gctaggctgg	2880
cggggTtggc	ttactggTta	gcagaatgaa	tcaccgatac	gcgagcgaac	gtgaagcgac	2940
tgctgctgca	aaacgtctgc	gacctgagca	acaacatgaa	tggtcttcgg	ttccgctggt	3000
tcgtaaagtc	tggaaacgcg	gaagtcagcg	ccctgcacca	ttatgttccg	gatctgcatc	3060
gcaggatgct	gctggctacc	ctgtggaaca	cctacatctg	tattaacgaa	gcgctggcat	3120
tgaccctgag	tgatTTTTct	ctggtcccgc	cgcatccata	ccgccagttg	ttaccctca	3180
caacgttcca	gtaaccgggc	atgttcatca	tcagtaacce	gtatcgtgag	catcctctct	3240
cgtttcatcg	gtatcattac	ccccatgaac	agaaatcccc	cttacacgga	ggcatcagtg	3300
accaaacagg	aaaaaacgcg	ccttaacatg	gcccgttta	tcagaagcca	gacattaacg	3360
cttctggaga	aactcaacga	gctggacgcg	gatgaacagg	cagacatctg	tgaatcgctt	3420
cacgaccacg	ctgatgagct	ttaccgcagc	tgccctcgcg	gTTtcggtga	tgacggtgaa	3480
aacctctgac	acatgcagct	cccggagacg	gtcacagctt	gtctgtaagc	ggatgccggg	3540
agcagacaag	cccgtcaggg	cgctcagcg	ggtgttggcg	ggtgtcgggg	cgcagccatg	3600
accagtcac	gtagcgatag	cggagtgtat	actggettaa	ctatcgggca	tcagagcaga	3660
ttgtactgag	agtgcacat	atatgcggtg	tgaataaccg	cacagatcg	taaggagaaa	3720
ataccgcac	aggcgtctct	ccgttctctc	gtcactgac	tcgctgcgct	cggctgttctg	3780
gctgcggcga	gcggtatcag	ctcaactcaa	ggcggttaata	cggttatcca	cagaatcagg	3840
ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	3900
ggccgcgttg	ctggcgTTTT	tccatagget	ccgccccct	gacgagcacc	acaaaaatcg	3960
acgctcaagt	cagaggTtggc	gaaacccgac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	4020
tggaagetcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gacctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	4080
ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgttttc	tcatagetca	cgctgtaggt	atctcagttc	4140
ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	cccccgTtc	agccccagcg	4200

ctgcgcctta	tccggttaact	atcgtcttga	gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	4260
actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	4320
gttcttgaag	tggtagccta	actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	4380
tctgctgaag	ccagttacct	tccgaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	4440
caccgctggg	agcgggtggt	tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	4500
atctcaagaa	gatcctttga	tcttttctac	ggggctctgac	gctcagtgga	acgaaaactc	4560
acgttaaggg	attttgggtca	tgaacaataa	aactgtctgc	ttacataaac	agtaatacaa	4620
gggggtgttat	gagccatatt	caacgggaaa	cgtcttgctc	taggccgcga	ttaaattcca	4680
acatggatgc	tgatttata	gggtataaat	gggctcgcga	taatgtcggg	caatcaggtg	4740
cgacaatcta	tcgattgtat	gggaagcccc	atgcgccaga	gttgtttctg	aaacatggca	4800
aaggtagcgt	tgccaatgat	gttacagatg	agatggctag	actaaactgg	ctgacggaat	4860
ttatgcctct	tccgaccatc	aagcatttta	tccgtactec	tgatgatgca	tggttactca	4920
ccactgcgat	ccccgggaaa	acagcattcc	aggtattaga	agaatatect	gattcaggtg	4980
aaaatattgt	tgatgcgctg	gcagtgttcc	tgcgccggtt	gcattcgatt	cctgtttgta	5040
attgtccttt	taacagcgat	cgcgtatttc	gtctcgetca	ggcgcaatca	cgaatgaata	5100
acggtttggg	tgatgcgagt	gattttgatg	acgagcgtaa	tggctggcct	gttgaacaag	5160
tctggaaaga	aatgcataaa	cttttgccat	tctcaccgga	ttcagtcgtc	actcatggtg	5220
atttctcact	tgataacctt	atttttgacg	aggggaaatt	aataggttgt	attgatgttg	5280
gacgagtcgg	aatcgcagac	cgataaccagg	atcttgccat	cctatggaac	tgectcggtg	5340
agttttctcc	ttcattacag	aaacggcttt	ttcaaaaata	tggatttgat	aatcctgata	5400
tgaataaatt	gcagtttcat	ttgatgctcg	atgagttttt	ctaagaatta	attcatgagc	5460
ggatacatat	ttgaatgtat	ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc	5520
cgaaaagtgc	cacctgaaat	tgtaaacgtt	aatattttgt	taaaattcgc	gttaaatttt	5580
tgttaaatca	gctcattttt	taaccaatag	gccgaaatcg	gcaaaatccc	ttataaatca	5640
aaagaataga	ccgagatagg	gttgagtgtt	gttccagttt	ggaacaagag	tccactatta	5700
aagaacgtgg	actccaacgt	caaagggcga	aaaaccgtct	atcagggcga	tggcccacta	5760
cgtgaacctat	caccctaate	aagttttttg	gggtcagagt	gccgtaaagc	actaaatcgg	5820
aaccctaaag	ggagcccccg	atthagagct	tgacggggaa	agccggcgaa	cgtggcgaga	5880
aaggaagggg	agaaaagcgaa	aggagcgggc	gctagggcgc	tggcaagtgt	agcggtcacg	5940
ctgcgcgtaa	ccaccacacc	cgccgcgctt	aatgcgccgc	tacagggcgc	gtcccattcg	6000
cca						6003

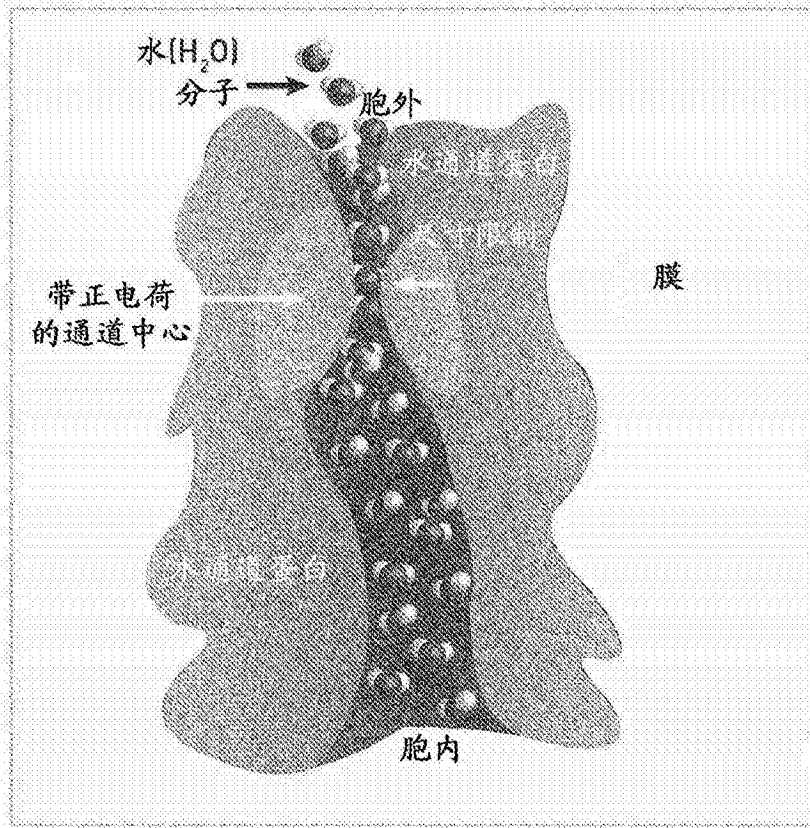


图1A(现有技术)

SEQ ID NO:2	RsAqp2	FILVFFG--CGSAVLMG-----PQIG-----MLGISLAFGLSIVAAAYS-	49
SEQ ID NO:3	EcAqp2	FCLVFFG--CGSAVLPAGFP-----ELGIG-----FAGVALAFGLTVLTMFAFA-	53
SEQ ID NO:4	GlpF	GLLIFFG--VGCVAALRV-----AGASFG--QWETISVIWGLGVAMAITYL-	58
SEQ ID NO:5	AqpM	FILVFFG--AGSAAVTLMIASGGTSPNPFNIGIGLLGGLGDWVAIGLAFGPAIAASIYA-	72
SEQ ID NO:6	SsAqp2	GLFMVAAGVVGTLVFFYPQSPAYQA-----IADPFLQRVVMGLGMGLTAMIIMYSP	71
SEQ ID NO:7	AQY1	FLPLWSA--FVIAQTANQAP-----E--T--PDGGSMPAQLIMI SFGFCGVMVGVFI-	102
SEQ ID NO:8	SOP1;2	LLFLYIT--VATVIGESK-----E--T--VVCGSVGLLGIAWAFGGMIFVLVYC-	91
SEQ ID NO:9	AQP1	TLFVFIS--IGSALGFKY-----FVGN--NQTAVQDNVVKVSLAFGLSIATLAQS-	66
SEQ ID NO:10	AQP4	LIPVLLS--LGSTINWG-----GT--EKPLFVDMLISLCFGLSIATMVQC-	87
SEQ ID NO:11	AQP9	FILIVLG--CCGVAQAIL-----SRGRFGGVITINVGFSAVAMAIYV-	74
: : : : :			
RsAqp2		LGAI SGAHLNPAVSLGFLMAGRMPMAEFGGYVLAQIAGALLGSLVVFLIASG-----	101
EcAqp2		VGHISGGHENPAVTIGLNWAGGRFFAREVVGVIQAVVGGIVAAALLYLIASG-----	105
GlpF		TAGVSGAHLNPAVTIALNLWLFACFDKRVIPFIVSQVAGAFCAALVYGLYYLFPDFEQT	118
AqpM		LGNI SGC HINPAVTIGLWSVKKFPGRVVFYIIAQLLGAAFGSIFLQCA--G-----	123
SsAqp2		WGRRS GAHINPAVTLTFYRLKKAIAWDAFFYVVFQF IGGLLGVVLVAFLLQPFPT---QA	128
AQY1		TYRVSGGNLNPVTLALVLRARIPFPFSGILMAFTQIVAGMAAAGAASAMTPG-----	154
SOP1;2		TAGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLLRALVYMTAQCLGAI CGVGLVKAFMRGP-----	144
AQP1		VGHISGAHLNPAVTLGLLSQIISIFRALMYIIAQCVGAI VATAISGIT--SS-----	118
AQP4		FGHISGGHINPAVTVMNVC TRKISIAKSVFYIAAQLGAIIGAGILYLVTF--FP-----	139
AQP9		AGGVSGGHINPAVSLAMCLFGRMKWFLLFFYVGAQLGAFVGAATVFGIYDGLMSFAGG	134
* . : * * * * . : *			
RsAqp2		KAGYVLTADGLGQNGPGAGYLG--EYSMGAALIFELIATFVFFVSVILAATASHVSSAS---	157
EcAqp2		RTGFDAASGFASNGYGENSPG--GYSML SALVVELVLSAGFLLVHIGATDK---FAP---	158
GlpF		HHIVRGSVESVDLAGTFSTYFNPHINVFQAFVEMVITAILMGLILALTDGNGVFR---	175
AqpM		IG---AAF--VGGLGATAPPF--GISYQAMLAEVVGTFLLMITINGIA--VDERAP---	171
SsAqp2		PVNYV-----VTVFGKQ--GAI VACTAETFF IAVLMMSMVLF TSN--Q---PKL	169
AQY1		-----EIAFANALGGGASRTRGLFLEAFGTAILCLTVLMLAVEKHRA-----	196
SOP1;2		-----YMQFGGANGVALGYNKGTALGAEIIGTFVLYTVFSATDPKRSARDSHV	194
AQP1		-----LTGNSLGRNDLADGVNSGQLGIEIIGTTLQLVLCVLAFTDRRRDLG---	165
AQP4		-----SYVGGGLGVTMVRGNLTAGSGLLVELIITFQLVFTTFASCDSKRTDVT---	186
AQP9		KLLIVGENA---TAHIFATYFAPYLELANAFADQVATMILLIIVFAIFDSRNLGAP---	188
. : : : :			
RsAqp2		TALAGLAIGLTLTGHLVGINVTGVSVNPARSLAPALFVGG--K-----ALSDLNVFIV-	209
EcAqp2		AGFAPLAIIGLALTLHLSIPVTNTSVNPARSTAVAFQGG--W-----ALEQLNFFVW-	210
GlpF		GPLAPLIGLLI AVIGASMGPLTCFAMNPARDFGPKVF AWLAGWGNVAF TGGRDIPYFLV	235
AqpM		RGEAGLIGLTVAGIITLGNISGSSLNPARTFGPVLNDMI--F-----AGTNLWNYPI	224
SsAqp2		ERFTPFACGLIVSYVIFESPLSCFCGMNPARVASALPFG-----IWTAIWLXFL-	219
AQY1		TWFAPFVIGIALLIAHLICIIYTGAGLNPARSFGPAVAARS-----FPNYHWIYWL-	247
SOP1;2		PILAPLPIGFAVTMVHLATIPITGTGINPARSFGAAVIFNSNK-----VWDDQWI PWV-	247
AQP1		--GSAPLAIGLSVALGHLAIDYTGCGINPARSFGSAVITH-----NFSNHWIPWV-	214
AQP4		--GSIALAIGFSVAIGHLFAINYTCASMNPARSFCPAVIMG-----MWNHWIYVW-	235
AQP9		RGLEFIAIGLLIIVIASLGLNSCCAMNPARDLSPRLF TALACWGFVFPAGNN--PWWI	246
: * : : : * * * * : :			

图1B (现有技术)

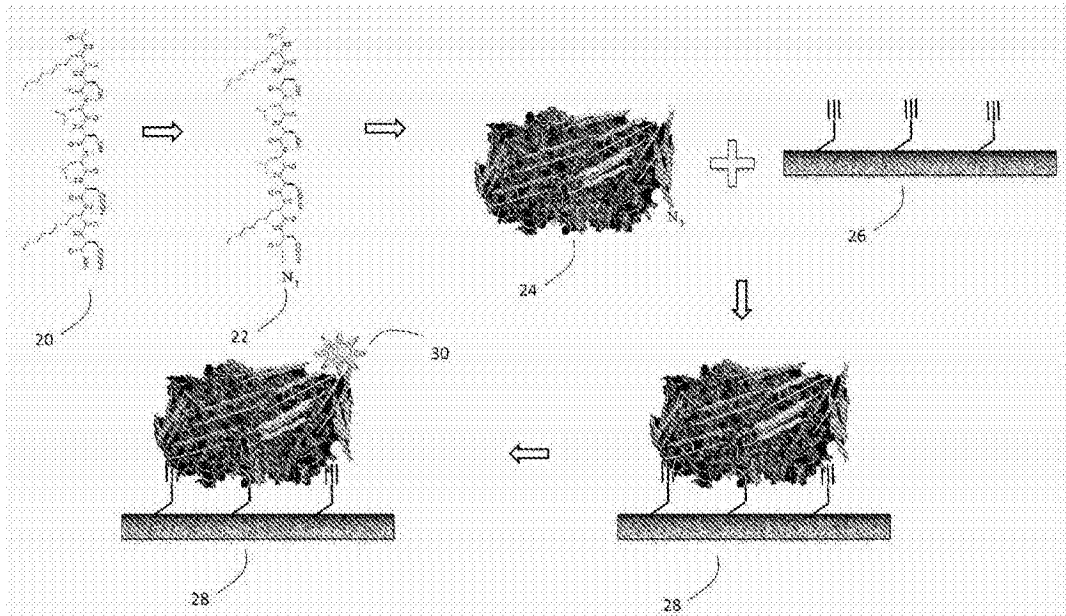


图2A

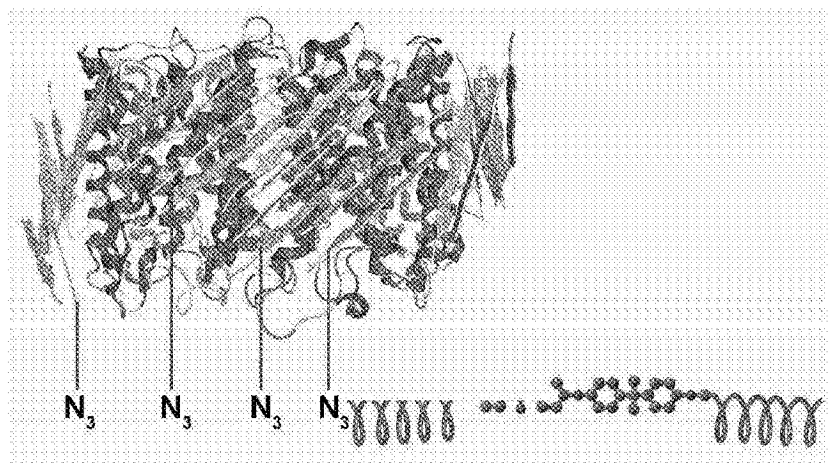


图2B

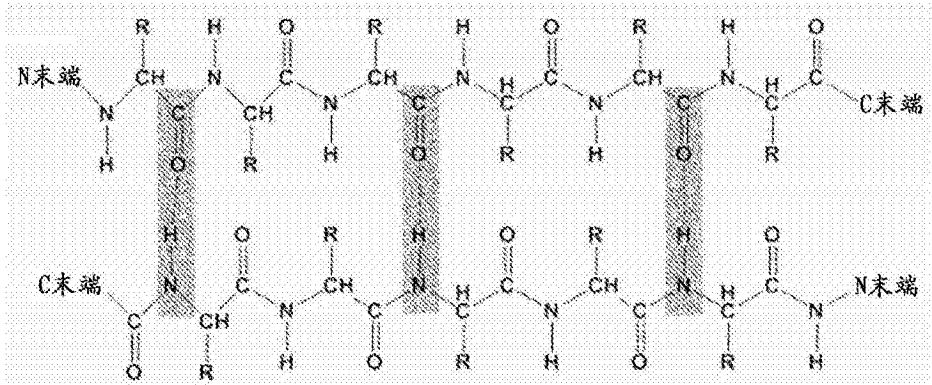


图2C

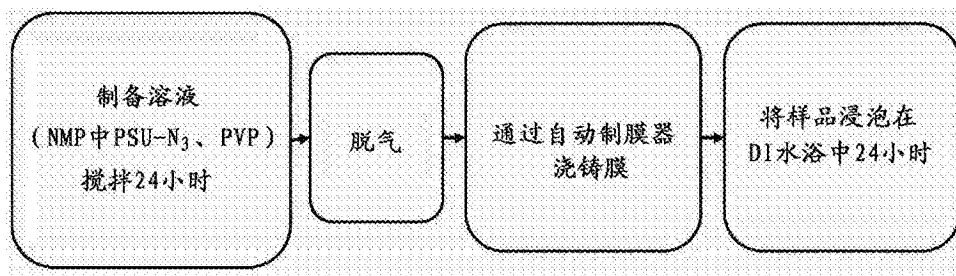


图3

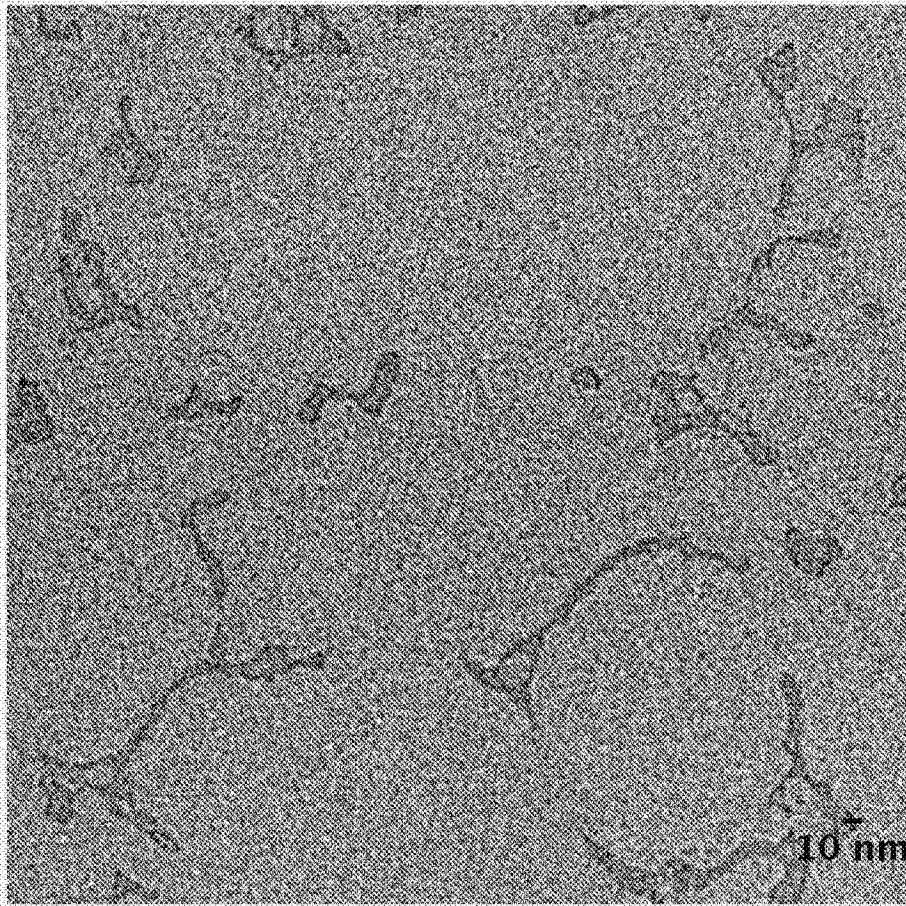


图4A

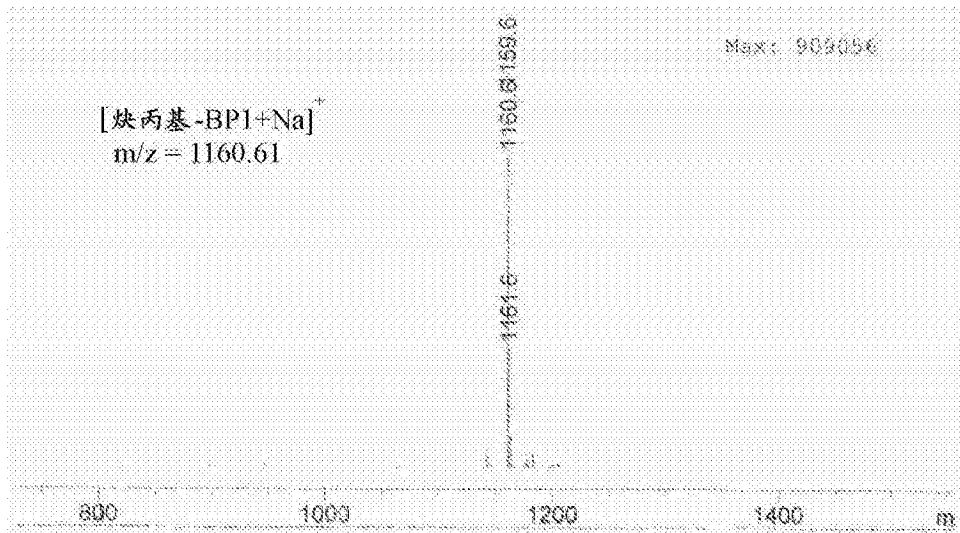


图4B



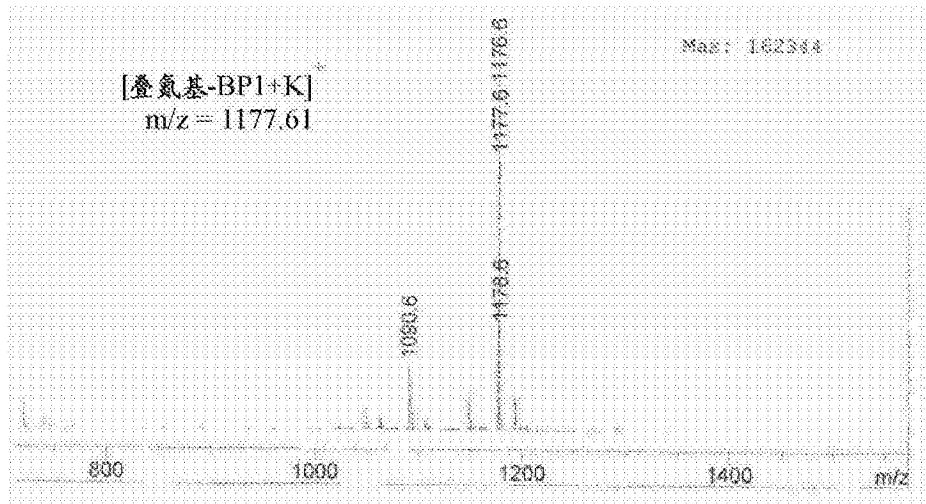


图4C

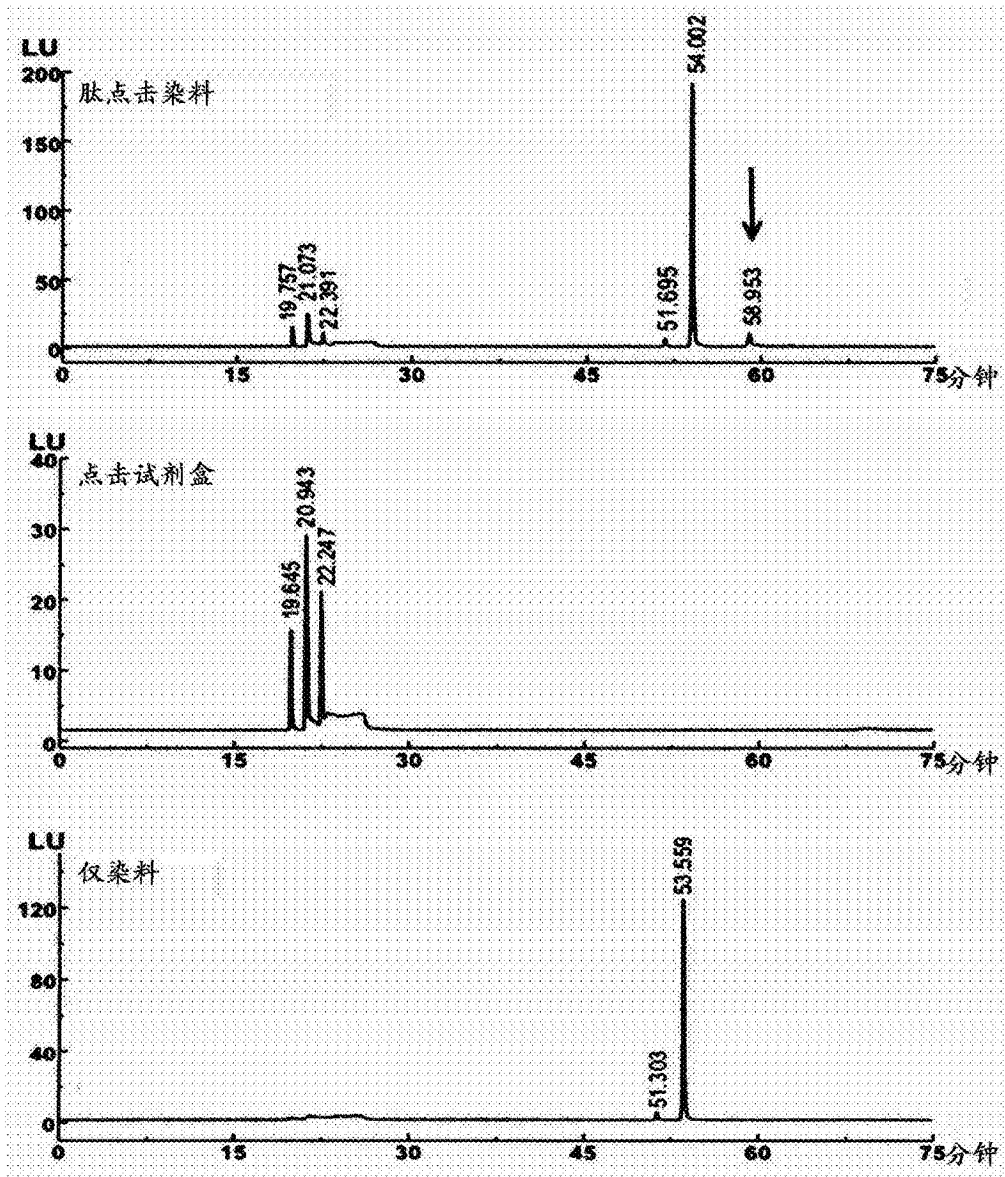


图5

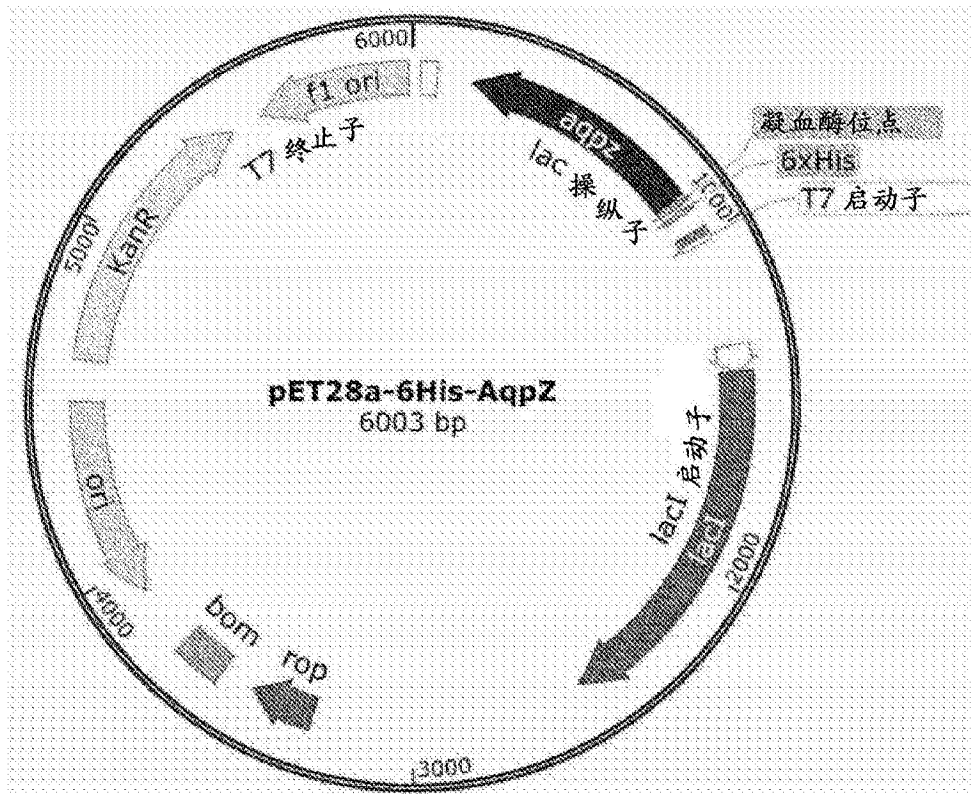


图6

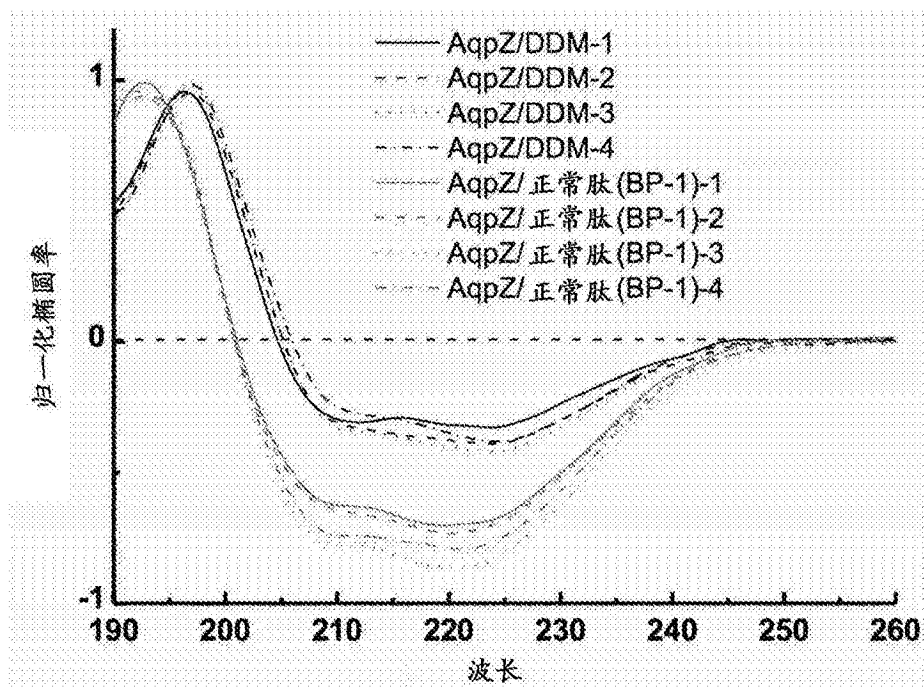


图7A

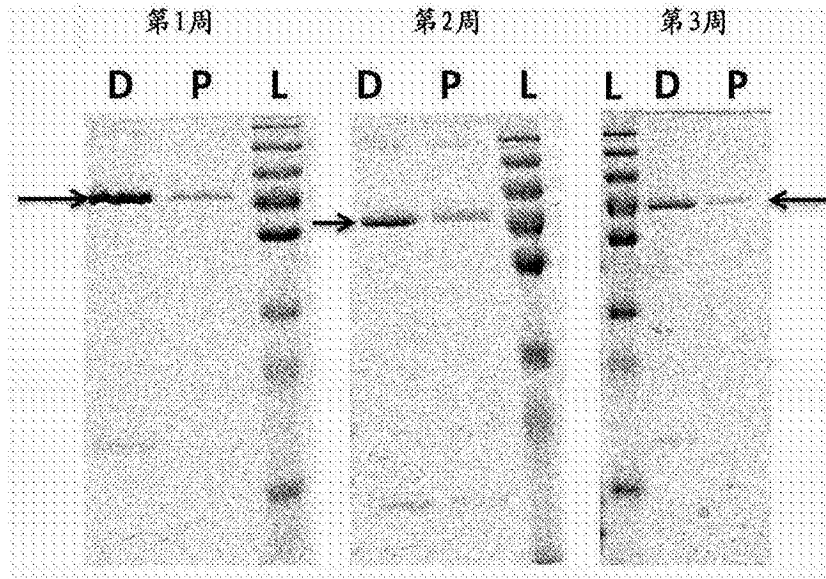


图7B

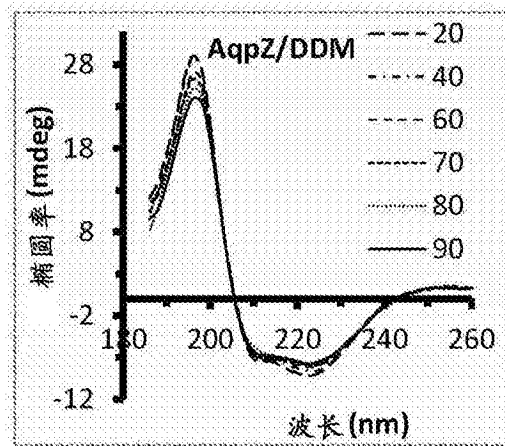


图8A

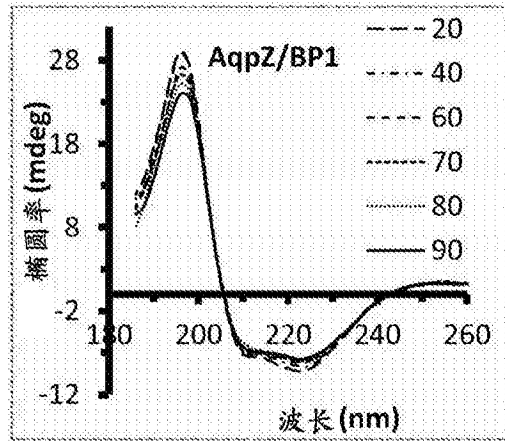


图8B

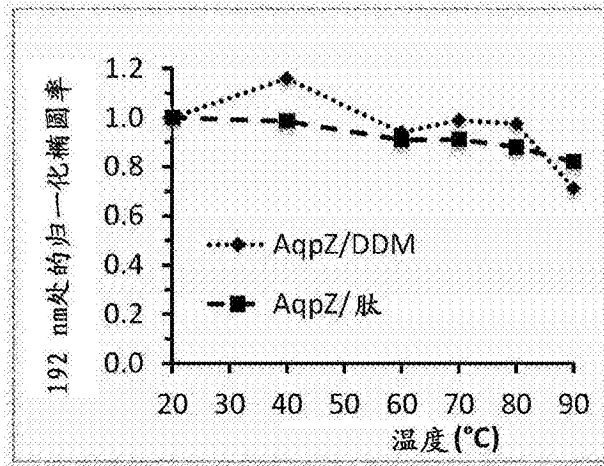


图8C

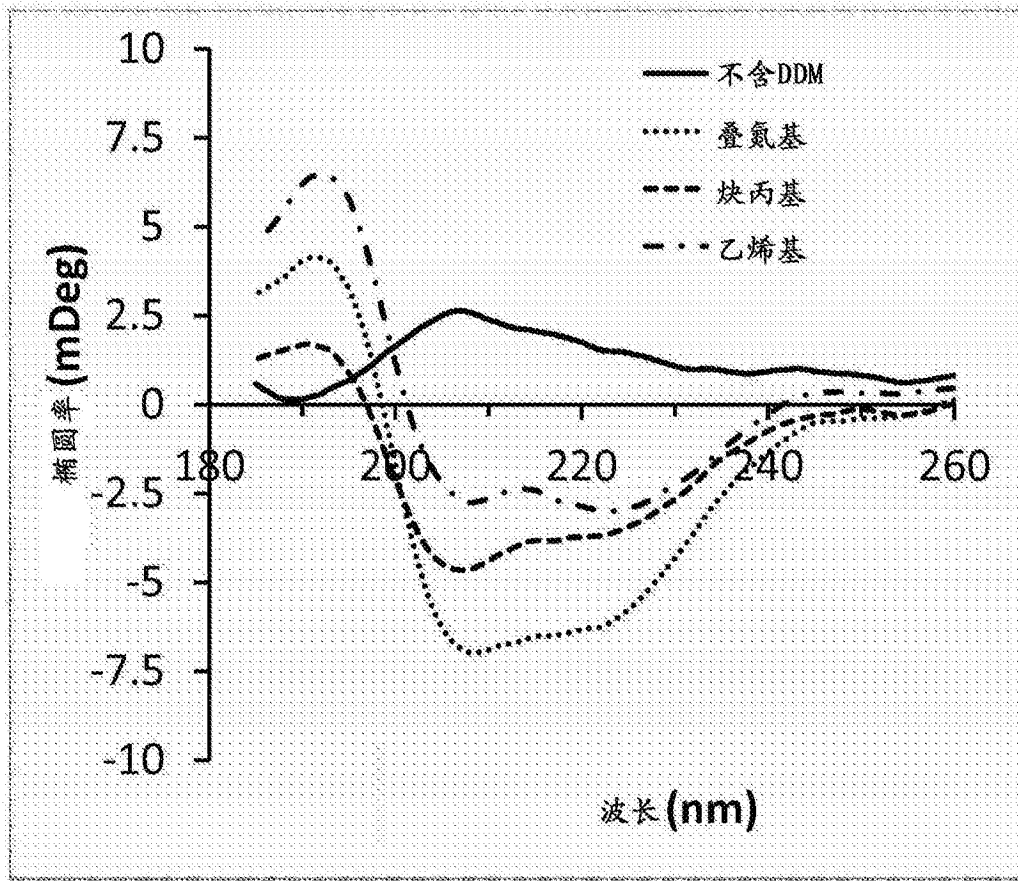


图9A

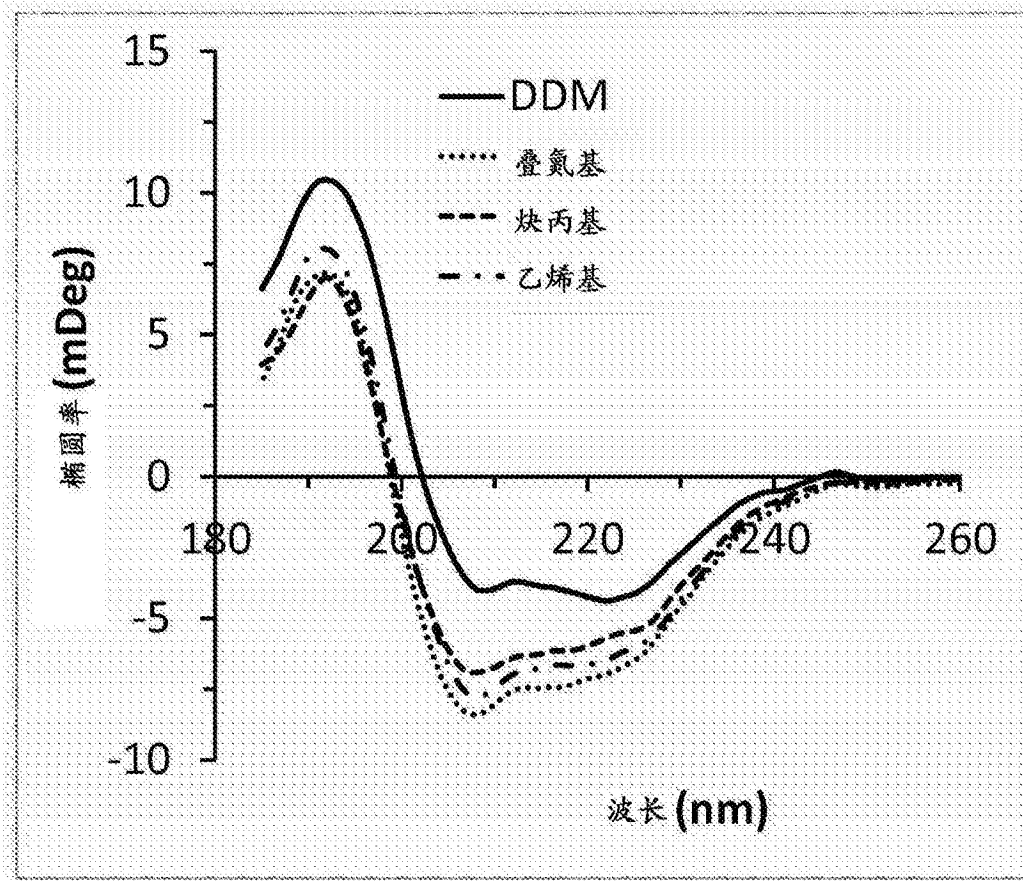


图9B

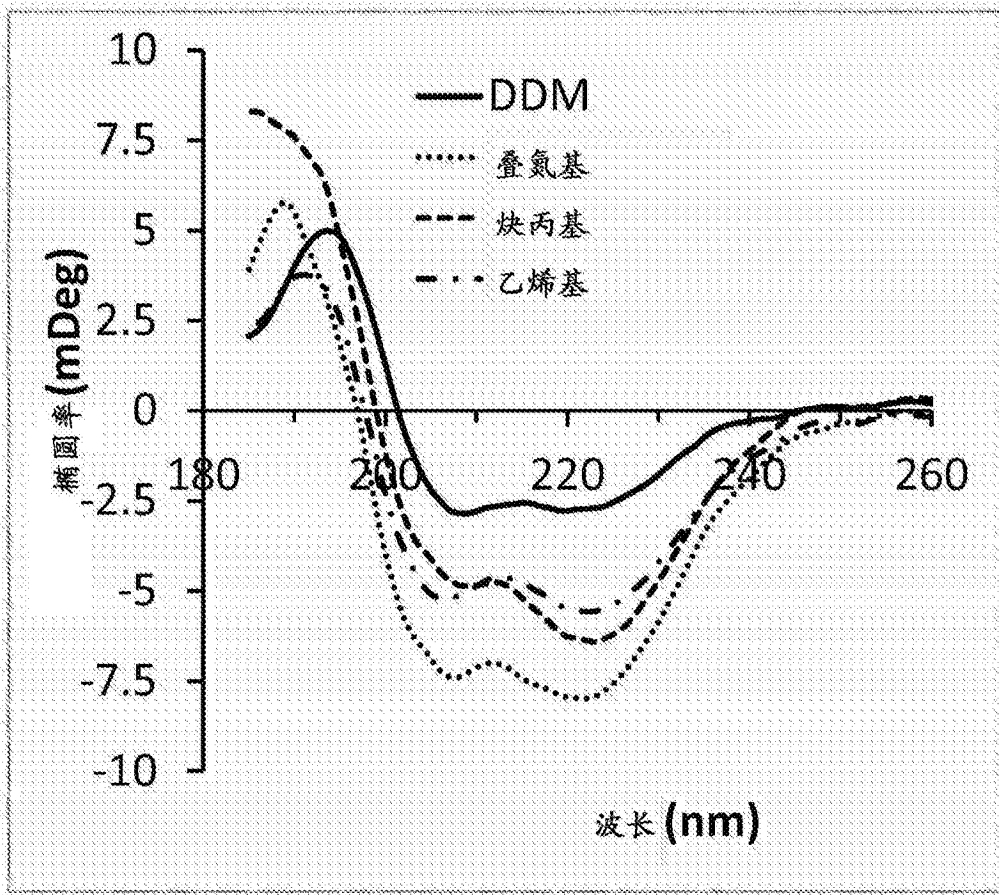


图9C



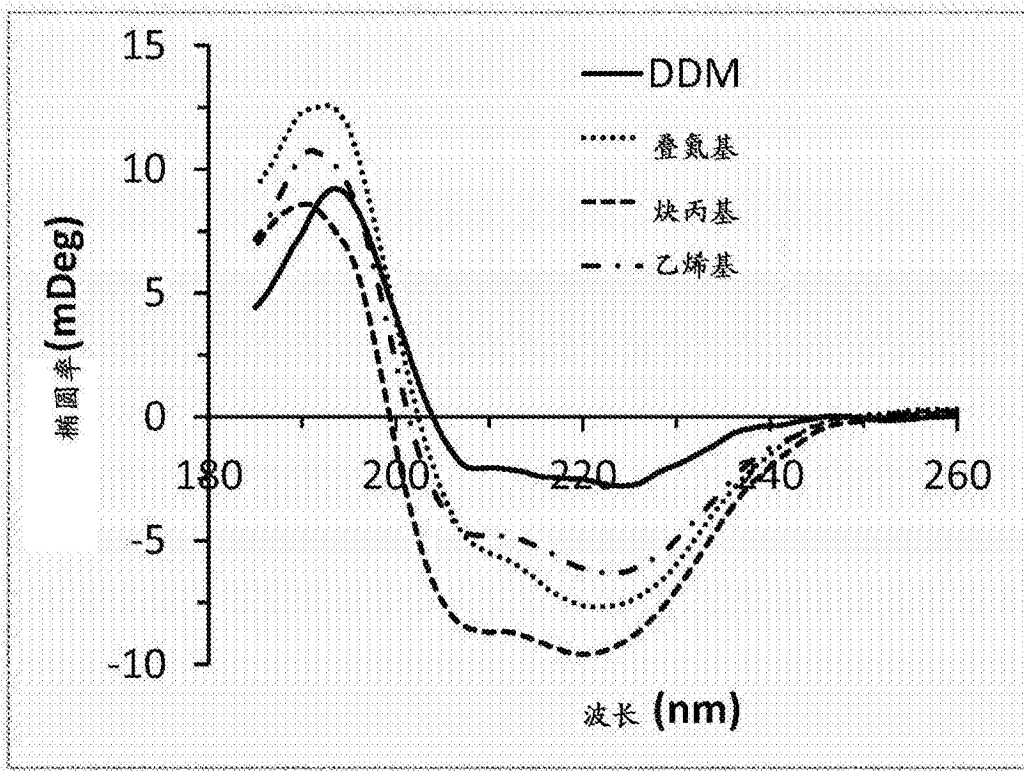


图9D

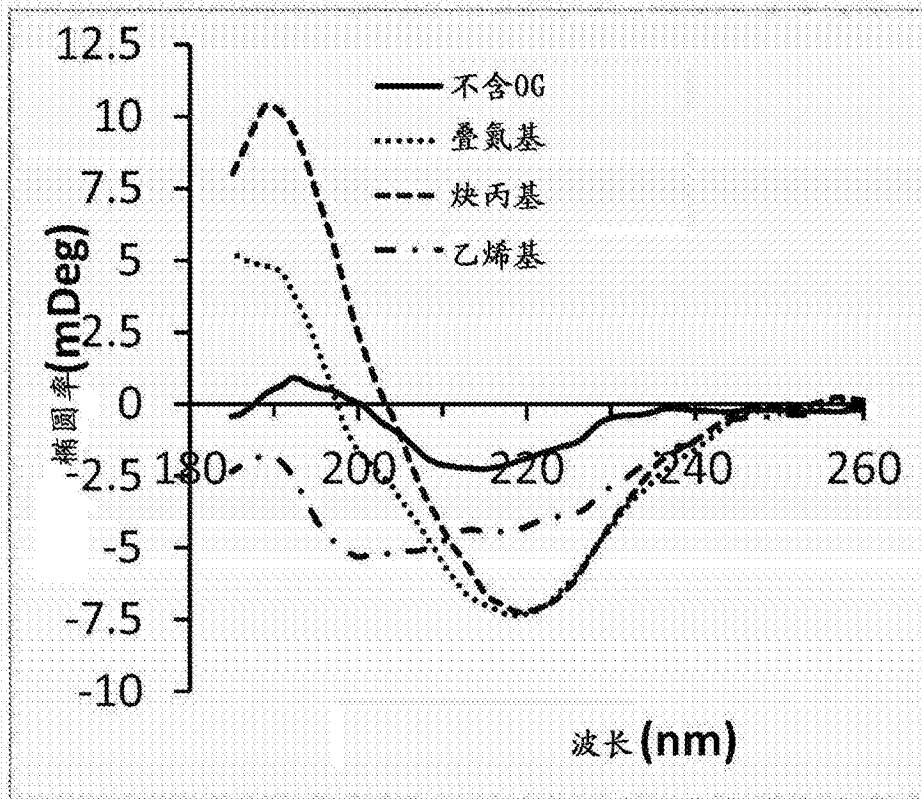


图9E

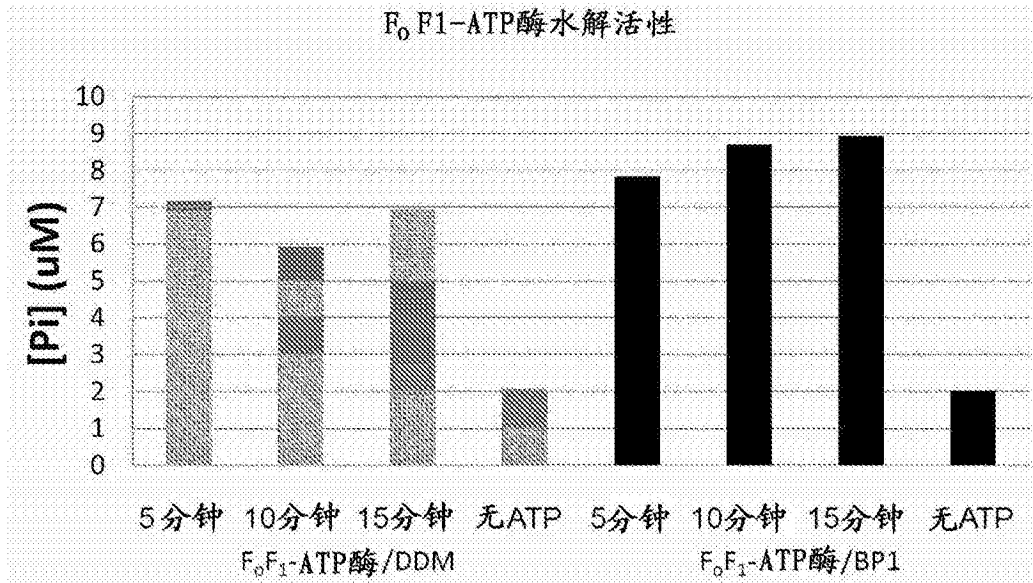


图10A

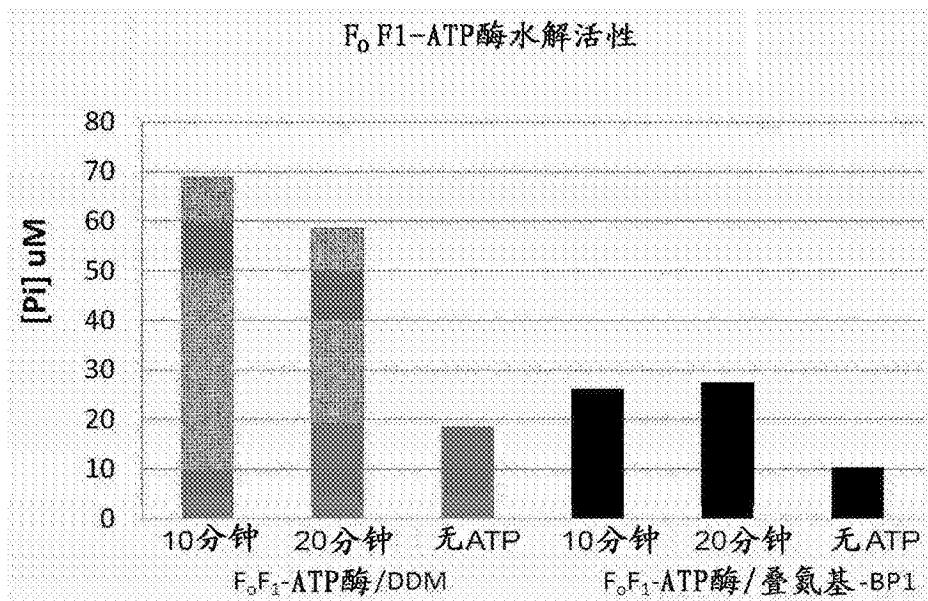


图10B

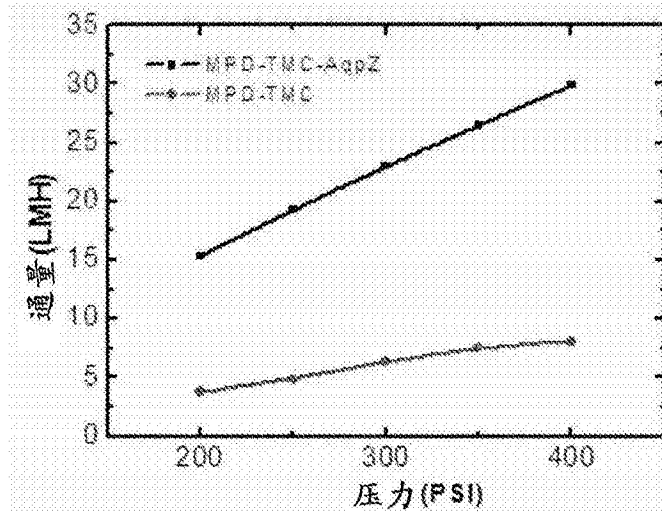


图11A

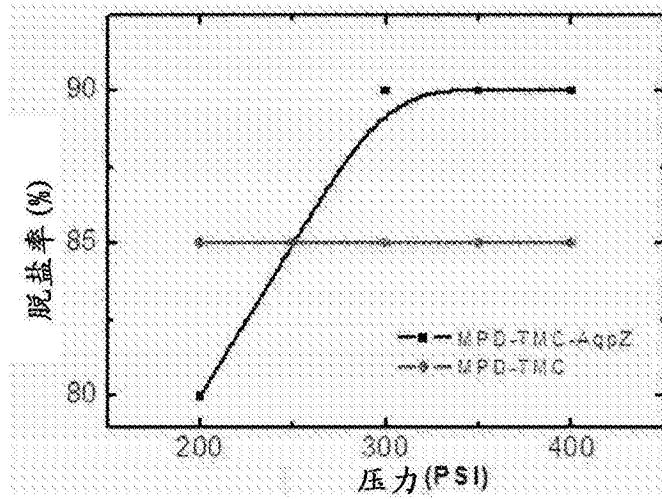


图11B

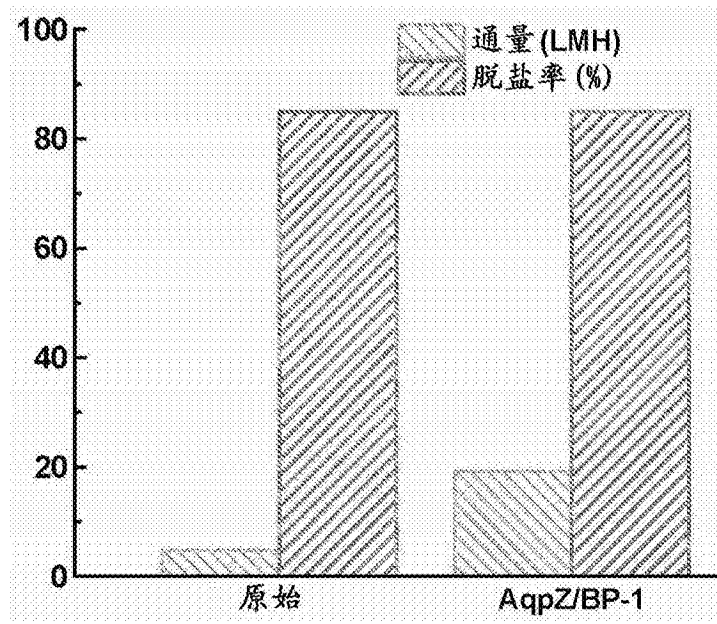


图11C