



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104220874 B

(45)授权公告日 2017.05.24

(21)申请号 201380019923.5
 (22)申请日 2013.02.14
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 104220874 A
 (43)申请公布日 2014.12.17
 (30)优先权数据
 61/599,240 2012.02.15 US
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2014.10.14
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/GB2013/050348 2013.02.14
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02013/121201 EN 2013.08.22
 (73)专利权人 牛津纳米孔技术公司
 地址 英国牛津郡
 (72)发明人 丹尼尔·约翰·特纳
 丹尼尔·乔治·福德姆
 罗杰·查尔斯·吉尔
 克莱夫·加文·布朗
 斯图尔特·瑞德
 詹姆斯·安东尼·克拉克
 詹姆斯·怀特
 (74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理
 有限公司 11205
 代理人 臧建明

G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
 (56)对比文件
 CN 101932933 A,2010.12.29,
 US 6426231 B1,2002.07.30,
 WO 2008124107 A1,2008.10.16,
 Langmuir et al.Membrane surface
 dynamics of DNA-threaded nanopores
 revealed by simultaneous single-molecule
 optical and ensemble electrical
 recording.<AMERICAN CHEMICAL SOCIETY>
 .2004,第12卷(第3期),898-905.
 David Stoddart et al.Single-
 nucleotide discrimination in immobilized
 DNA oligonucleotides with a biological
 nanopore.<PNAS>.2009,第106卷(第19期),
 7702-7707.
 Dvir Rotem et al.Protein Detection by
 Nanopores Equipped with Aptamers.
 <American Chemical Society>.2012,2781-
 2787.
 Dvir Rotem et al.Protein Detection by
 Nanopores Equipped with Aptamers.
 <American Chemical Society>.2012,2781-
 2787.

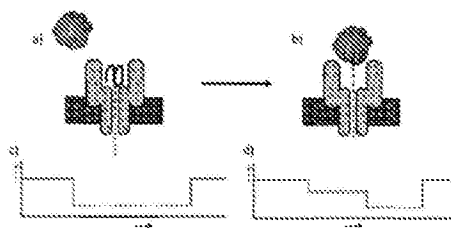
审查员 于园园

(51)Int.Cl.
G01N 33/487(2006.01)

权利要求书4页 说明书34页
 序列表25页 附图16页

(54)发明名称
 适配体方法

(57)摘要
 本发明涉及一种新的用于确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在的方法。本发明由此还涉及用于确定多个分析物组中每个分析物是否存在的多重检测。该检测使用适配体和跨膜孔。



CN 104220874 B

1. 一种确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在的方法,该方法包括:

(a) 使所述样本与跨膜蛋白孔和两个或多个探针的组相接触,

其中,所述组中的探针不偶联到所述跨膜蛋白孔,

其中,每个探针识别所述分析物成员中的一个或多个并包括(i) 适配体,其结合到所述分析物成员中的一个或多个,和(ii) 尾部,其能够进入所述跨膜蛋白孔并根据探针中的所述适配体是否结合到所述分析物成员之一而对流经所述跨膜蛋白孔的电流具有不同影响,

其中每个探针以独特的方式影响流经所述跨膜蛋白孔的电流,并且

其中所述两个或多个分析物的组中的每个分析物成员被所述探针组中的至少一个探针识别;和

(b) 测量流经所述跨膜蛋白孔的电流,以确定——如果有的话——所述探针组中的哪些探针已经结合至分析物成员并由此确定所述样本中一个或多个分析物成员是否存在。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中每个探针在其适配体未结合至所述分析物成员时以不同方式影响流经所述跨膜蛋白孔的电流。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述探针组中的至少一个探针识别所述两个或多个分析物的组中的一类分析物成员并且含有与该类分析物成员结合的适配体。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述探针组中的至少一个探针特异性识别所述分析物成员之一并且含有特异性结合至所述分析物成员的适配体。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述探针组中的每个探针特异性识别所述分析物成员之一并且含有特异性结合至所述分析物成员的适配体。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述尾部包含至少两个区域,所述至少两个区域以不同方式影响流经所述跨膜蛋白孔的电流,一个区域在适配体未结合至所述分析物成员之一时位于所述跨膜蛋白孔中,另一个区域在适配体结合至所述分析物成员时位于所述跨膜蛋白孔中。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述尾部包含聚合物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述聚合物为多核苷酸、多肽或聚乙二醇(PEG)。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述尾部包含至少一个单链多核苷酸。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述尾部包含具有不同核苷酸序列的单链多核苷酸的至少两个区域,所述至少两个区域以不同方式影响流经所述跨膜蛋白孔的电流,一个区域在适配体未结合至所述分析物成员之一时位于所述跨膜蛋白孔中,另一个区域在适配体结合至所述分析物成员时位于所述跨膜蛋白孔中。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述至少两个区域对应于至少两段不同的核苷酸或不同的多核苷酸条形码。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述尾部包含不同聚合物的至少两个区域,所述至少两个区域以不同方式影响流经所述跨膜蛋白孔的电流,一个区域在适配体未结合至所述分析物成员之一时位于所述跨膜蛋白孔中,另一个区域在适配体结合至所述分析物成员时位于所述跨膜蛋白孔中。

13. 根据权利要求8所述的方法,其中所述尾部包含至少一个双链多核苷酸。

14. 根据权利要求8-13中任一项所述的方法,其中所述尾部包含7至70个核苷酸长度的

多核苷酸。

15. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述尾部包含SEQ ID NO:7至23的1-30个残基。

16. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述探针组中的每个探针含有不同的适配体。

17. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述探针组中的每个探针含有不同的单链多核苷酸尾部。

18. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述探针组中的两个或多个探针含有不同的适配体和相同的单链多核苷酸尾部。

19. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述探针组中探针的数目与所述两个或多个分析物的组中分析物成员的数目相同。

20. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述探针组中的两个或多个探针含有相同的适配体和不同的单链多核苷酸尾部。

21. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述探针组中的两个或多个探针含有不同的适配体,所述适配体特异性结合至相同的分析物成员。

22. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述探针组中的每个探针偶联至膜。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中每个探针使用胆固醇偶联至所述膜。

24. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述组具有4至100个分析物成员。

25. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述分析物成员独立地选自金属离子、无机盐、聚合物、氨基酸、肽、多肽、蛋白质、核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸、染料、漂白剂、药物、诊断试剂、消遣性药物、爆炸性污染物和环境污染物质。

26. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述两个或多个分析物的组为可用于诊断或预测疾病或病症的两个或多个生物标志物组。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述疾病或病症为癌症、冠心病、心血管病或脓毒病。

28. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述适配体为肽适配体或寡核苷酸适配体。

29. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中所述跨膜蛋白孔包含前庭和桶状结构。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述桶状结构足够窄使得双链多核苷酸无法穿过所述跨膜蛋白孔。

31. 根据权利要求29所述的方法,其中所述前庭和所述桶状结构各自足够长以含有至少两个核苷酸。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述跨膜蛋白孔源自溶血素、杀白细胞素、耻垢分枝杆菌孔蛋白A (MspA)、外膜磷脂酶A、奈瑟氏菌自转运脂蛋白 (NaIP) 和WZA。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述跨膜蛋白由下述物质形成:

(a) SEQ ID NO:2中所示的七个相同亚基,或 (b) 其变体,其中在整个序列上相比,所述

七个亚基中的一个或多个与SEQ ID NO:2基于氨基酸的同一性具有至少50%的同源性,并且所述变体保留有孔活性。

34. 根据权利要求32所述的方法,其中所述跨膜蛋白为:(a)由SEQ ID NO:4中所示四个相同亚基和SEQ ID NO:6中所示四个相同亚基形成的 γ -溶血素,或(b)其变体,其中在整个序列上相比,所述亚基中的一个或多个与SEQ ID NO:4基于氨基酸的同一性具有至少50%同源性,和/或在整个序列上相比,所述亚基中的一个或多个与SEQ ID NO:6基于氨基酸的同一性具有至少50%同源性,并且所述跨膜蛋白孔保留有孔活性。

35. 根据权利要求1,2和5-13任一项所述的方法,其中对于与所述分析物成员之一结合的那些探针,步骤(b)还包括,比较每个探针在结合和未结合时流经所述跨膜蛋白孔的不同电流。

36. 一种确定样本中两个或多个分析物的组中一个或多个分析物成员浓度的方法,所述方法包括:

(i) 实施权利要求1-35中任一项所述的方法;和

(ii) 针对显示存在于所述样本中的一个或多个分析物成员,在步骤(b)中将流经所述跨膜蛋白孔的电流与每个分析物成员的对照或参考数据进行比较,从而确定所述样本中所述一个或多个分析物成员的浓度。

37. 一种用于确定样本中的两个或多个分析物的组中一个或多个分析物成员是否存在以及存在时的浓度的探针组,所述探针组包含两个或多个探针,

其中每个探针识别所述分析物成员中的一个或多个并包含(i)适配体,其结合至所述分析物成员中的一个或多个,和(ii)尾部,其能进入跨膜蛋白孔并根据所述探针中的适配体是否结合至所述分析物成员之一而对流经所述跨膜蛋白孔的电流具有不同影响,

其中所述探针组中的探针不偶联到所述跨膜蛋白孔,

其中每个探针以独特的方式影响流经所述跨膜蛋白孔的电流,且

其中所述两个或多个分析物的组中的每个分析物成员被所述探针组中的至少一个探针识别。

38. 根据权利要求37所述的探针组,其中每个探针在其适配体未结合至所述分析物成员时以不同方式影响流经所述跨膜蛋白孔的电流。

39. 根据权利要求37或38所述的探针组,其中每个探针还包含使其偶联至膜的化学基团。

40. 一种用于确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在以及存在时的浓度的试剂盒,包含(a)根据权利要求37-39中任一项所述的探针组,和(b)跨膜蛋白孔。

41. 一种用于确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在以及存在时的浓度的分析装置,包含多个跨膜蛋白孔和根据权利要求37-39中任一项所述的探针组。

42. 根据权利要求41所述的分析装置,其中所述分析装置包括:

传感器装置,其能支撑所述多个跨膜蛋白孔,并可操作地使用所述跨膜蛋白孔来表征分析物成员;

至少一个存储器,用于容纳实施表征的物质;

流体学系统,配置成从所述至少一个存储器可控地向所述传感器装置供应物质;和
多个容器,用于接收各样本,所述流体学系统被配置成选择性地从所述容器向所述传感器装置供应所述样本。

适配体方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的确定样本中一组两个或多个分析物中的一个或多个成员是否存在的方法。因此本发明涉及一种用于确定一组多分析物中的每个分析物是否存在的多重检测法。该检测使用适配体和跨膜孔。

背景技术

[0002] 跨膜孔(纳米孔)作为多种分析物,例如聚合物和小分子的直接的电生物传感器,具有很大的潜力。当在纳米孔的两端施加电位时,当分子例如核苷酸或多核苷酸在纳米孔的桶状结构或通道中短暂停留一段时间,电流发生变化。特定的分子,如特定的核苷酸和特定的多核苷酸,给出具有已知识别特征和持续时间的电流变化。这类电流变化可以用于识别所述孔中核苷酸或多核苷酸的存在。

发明内容

[0003] 本发明人已经证明,跨膜孔可以用在多重检测中来确定在两个或多个分析物的组中的每种分析物是否存在。更具体地,本发明人已经证明,可使用跨膜孔和含适配体的探针组来确定各分析物是否存在。通过探针组中的至少一个探针来识别每种感兴趣的分析物。每个探针还包括一个能够进入孔中并影响流经该孔的电流的尾部。每个尾部根据所述孔是否结合至所感兴趣的分析物之一而以不同的独特方式影响流经所述孔的电流。所述探针组中每个探针对流经所述孔的电流的影响也不相同,因此能够检测识别出每个探针。令人惊讶地,适配体和尾部的这种组合通过分析探针尾部对流经所述孔的电流的影响,可以将探针组中结合至感兴趣的分析物的一个或多个甚至全部的探针识别出。

[0004] 相应地,本发明提供了一种确定样本中含两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在的方法,该方法包括:

[0005] (a) 使所述样本与跨膜孔和两个或多个探针的组相接触,

[0006] 其中,每个探针可识别所述分析物成员中的一个或多个并包括(i) 适配体,其结合到所述分析物成员中的一个或多个,和(ii) 尾部,其能够进入所述孔并根据探针中的所述适配体是否结合到分析物成员之一而对流经所述孔的电流具有不同影响,

[0007] 其中每个探针影响以独特的方式流经所述孔的电流,并且

[0008] 其中所述两个或多个分析物的组中的每个分析物成员被所述探针组中的至少一个探针识别;和

[0009] (b) 测量流经所述孔的电流,以确定——如果有的话——探针组中的哪些探针已经结合至分析物成员并由此确定样本中一个或多个分析物成员是否存在。

[0010] 本发明还提供了:

[0011] 一种测定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员浓度的方法,该方法包括:

[0012] (i) 实施本发明的方法;和

[0013] (ii) 针对显示存在于样本中的一个或多个分析物成员,在步骤(b)中将流经所述孔的电流与每个分析物成员的对照试验或参考数据进行比较,从而确定样本中所述一个或多个分析物成员的浓度;

[0014] -用于确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在以及存在时的浓度的探针组,所述探针组包括两个或多个探针,

[0015] 其中,每个探针可识别一个或多个分析物成员并包括(i) 适配体,其结合到一个或多个分析物成员和(ii) 尾部,其能够进入跨膜孔并根据探针中的适配体是否结合到分析物成员之一而对流经所述跨膜孔的电流具有不同影响,

[0016] 其中每个探针影响以不同方式流经所述孔的电流,并且

[0017] 其中所述两个或多个分析物的组中的每个分析物成员被探针组中的至少一个探针识别;和

[0018] -确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在以及存在时的浓度的试剂盒,所述试剂盒包括(a) 本发明的探针组,和(b) 跨膜孔;和

[0019] -用于确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在以及存在时的浓度的分析装置,所述分析装置包括本发明的多个探针以及探针组。

附图说明

[0020] 图1显示了在不存在(a)和存在(b)结合分析物的情况下纳米孔内探针配置的示意代表图。对应不存在(c)和存在(d)结合分析物情况的预期事件迹线展示如下(对于(c)和(d),y轴=电流,x轴=时间)。虚线表示聚合(dA)区域,十字线区域(cross region)表示脱碱基区域(abasic region)。在本实施例中,当脱碱基区域位于所述纳米孔的 β -桶状物(β -barrel)内时,流经通道的电流与聚合(dA)区域位于所述 β -桶状物内时更多。从上部到下部的电流水平的转变指示适配体-分析物复合物的离解。

[0021] 图2示出了在存在(b)和不存在(a)凝血酶的情况下观察到的适配体序列5A15x10A_TBA的不同阻断水平(block level)(对于(a)和(b),y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。a)当在不存在凝血酶的情况下溶液中存在适配体(序列5A15x10A_TBA)时,观察到单独的水平1。b)当溶液中存在适配体(序列5A15x10A_TBA)和凝血酶时,检测到水平1和2(所述水平之间的差是30.5pA)。水平2的外观表明适配体结合至凝血酶,从水平2到水平1的转变表明适配体-凝血酶复合物发生离解。

[0022] 图3示出了凝血酶浓度和所观察到的事件率(仅将凝血酶结合事件的数目与凝血酶结合与未结合事件的数目之和相比)之间的关系。这两个图表明了凝血酶结合事件与事件(凝血酶结合与未结合事件)的总数之间的比率是如何随着凝血酶浓度而变化的。在本实验中使用的探针序列是5A15x10A_TBA,最终浓度为1250nM。使用这些校准曲线图,可以以确定样本中凝血酶的浓度(曲线图(a)中y轴=(结合/非结合的)比率,x轴=凝血酶浓度(nM),曲线图(b)中y轴=比率,x轴= \log_{10} 凝血酶浓度(nM))。

[0023] 图4示出了在凝血酶存在(b)和不存在(a)的情况下观察到的适配体序列15X15A_TBA_{3'} ChoITEG (SEQ ID NO:19,其3'端具有胆固醇TEG)的不同阻断水平(对于(a)和(b),y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。a)当在不存在凝血酶的情况下溶液中存在适配体(序列15x15A_TBA_3' ChoITEG)时,观察到单独的水平1。b)当在存在凝血酶的情况下预培养了适

配体时,检测到水平1和2。水平2的外观表明适配体结合至凝血酶,并且从水平2到水平1的转变表明适配体-凝血酶复合物发生离解。该实验的实施所使用的适配体浓度比实施例2中所使用的低很多。

[0024] 图5示出了如何使用很多不同适配体来检测凝血酶的存在,其中每种适配体产生自己独特的阶梯水平信号。上图(a)示出了检测到的三个适配体信号的事件数目(标记为A部分)和不同适配体尾部结合于凝血酶时每个适配体的信号(标记为B部分)。将适配体15x15A结合到凝血酶的事件标记为1,适配体17x13A结合到凝血酶的事件标记为2,适配体19x11A结合到凝血酶的事件标记为3,适配体5A15x10A结合到凝血酶的事件标记为4。x轴上示出的比率为适配体尾部除以开放的孔水平(二进制大小(bin size)=0.0025)得到的电流量水平,y轴是计数。下图(b,y轴=电流(pA),x轴=时间(s))显示了检测到的每个适配体尾部序列(1-4)的4个不同的阻断信号。未注意到每个适配体的单独识别信号。

[0025] 图6示出了在存在(b)和不存在(a)PDGF的情况下观察到的适配体序列17x8A_PDGF的不同阻断水平(对于(a)和(b),y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。a)当不存在PDGF的情况下溶液中存在适配体(序列17x8A_PDGF)时,观察到单独的水平1。b)当溶液中存在适配体(序列17x8A_PDGF)和PDGF时,检测到水平1和2。水平2的外观表明适配体结合至PDGF,从水平2到水平1的转变表明适配体-PDGF复合物发生离解。

[0026] 图7示出了在存在(b)和不存在(a)PDGF的情况下观察到的适配体序列25x_PDGF的不同阻断水平(对于(a)和(b),y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。a)当不存在PDGF的情况下溶液中存在适配体(序列25x_PDGF)时,观察到单独的水平1。b)当溶液中存在适配体(序列25x_PDGF)和PDGF时,检测到水平1和3。水平3的外观表明适配体结合至PDGF,从水平3到水平1的转变表明适配体-PDGF复合物发生离解。

[0027] 图8示出了PDGF浓度和所观察到的事件率(仅将PDGF结合事件与PDFG结合与未结合事件之和相比)之间的关系。该曲线图(y轴= \log_{10} 事件率,x轴= \log_{10} PDGF浓度(nM))示出了PDGF结合事件和事件总数(PDGF结合和未结合的事件)之间的比率如何随PDGF的浓度而变化。在本实验中使用的探针序列是25x_PDGF。使用该校准曲线可以确定样本中PDGF的浓度。

[0028] 图9示出了在存在(b)和不存在(a)ATP下观察到的适配体序列25x_ATP的不同阻断水平(对于(a)和(b),y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。a)在不存在凝血酶的情况下溶液中存在适配体(序列25x_ATP)时,观察到单独的水平1。b)当溶液中存在适配体(序列25x_ATP)和ATP时,检测到水平1和2。水平2的外观表明适配体结合至ATP,从水平2到水平1的转变表明适配体-ATP复合物发生离解。

[0029] 图10示出了在存在(b)和不存在(a)ATP时所观察到的适配体序列和17x8A_ATP的不同阻断水平(对于(a)和(b),y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。a)当不存在ATP的情况下溶液中存在适配体(序列17x8A_ATP)时,观察到单独的水平3。b)当溶液中存在适配体(序列17x8A_ATP)和ATP时,检测到水平2和3。水平2的外观表明适配体结合至ATP,从水平2到水平3的转变表明适配体-ATP复合物发生离解。

[0030] 图11示出了ATP浓度和所观察到的事件率(仅将ATP结合事件与ATP结合与未结合事件之和相比)之间的关系。该图(y轴=事件率,x轴= \log_{10} ATP浓度(μ M))示出了ATP结合事件与事件(ATP结合与未结合事件)总数之间的比率是如何随着ATP浓度而变化的。在本实验

中使用的探针序列是17x8A_ATP。使用该校准曲线图,可以以确定样本中ATP的浓度。使用适配体17x8A_ATP,观察到当ATP浓度增加时,事件率类似地增加,如在之前凝血酶浓度增加时所观察到的。然而,ATP的Kd值在微摩尔范围内,因此为观察到类似的事件率,需要更高的ATP浓度。

[0031] 图12强调了在同一实验中如何使用探针阵列来检测多于一个的分析物。可以观察到所有三个分析物——ATP (单独的ATP适配体=1,ATP适配体结合至ATP=2),PDGF (单独的PDGF适配体=3,PDGF适配体结合至PDGF=4,b中示出了放大版)和凝血酶 (单独的凝血酶适配体=5,凝血酶适配体结合至凝血酶=6)的结合与未结合的适配体信号。不同分析物可以从它们的特征性的阻断水平和信号形状中检测出。对于迹线a)和b),y轴=以pA计的电流,对于迹线a)和b),x轴=时间(对于a)的总跟踪时间=4秒,对于b)的总跟踪时间=0.1秒)。

[0032] 图13示出了理论计算值(以黑线表示)和实验观测值(以灰色条形图表示)的校准图(事件率(y轴)对凝血酶浓度(nM)(x轴))。从该图中清楚的是,理论值与实验确定值密切匹配。

[0033] 图14示出了在存在(b)和不存在(a)链霉亲和素(streptavidin)时所观察到的适配体序列链球菌探针1(SEQ ID NO:24)的不同阻断水平(对于(a)和(b),y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。a)当不存在链霉亲和素的情况下溶液中存在适配体(链球菌探针1)时,观察到单独的水平1。b)当溶液中存在适配体(链球菌探针1)和链霉亲和素时,检测到水平2。

[0034] 图15示出了在存在(2)和不存在(1)链霉亲和素时所观察到的适配体序列链球菌探针1(SEQ ID NO:24)的不同阻断水平的展开图(对于(a)和(b),y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。为了陈述的目的,已对该数据进行了贝塞尔(Bessel)过滤。

[0035] 图16示出了在20%全兔血在80%的K2EDTA(Harlan Scientific,代码-S.B-0009)缓冲液(625mM KCl,100mM HEPES,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾,pH 8.0)中的溶液中在凝血酶的存在下观察到的适配体序列27x3A_TBA的一示例性阻断水平(y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。当溶液中存在适配体(序列27x3A_TBA)和凝血酶时,检测到水平1和2。水平2的外观表明适配体结合至凝血酶,从水平2到水平1的转变表明适配体-凝血酶复合物发生离解。

[0036] 图17示出了在20%全兔血在80%的K2EDTA(Harlan Scientific,代码-S.B-0009)缓冲液(625mM KCl,100mM HEPES,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾,pH 8.0)中的溶液中在PDGF的存在下观察到的适配体序列17x8A_PDGF的一示例性阻断水平(y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。当溶液中存在适配体(序列17x8A_PDGF)和PDGF时,检测到水平1和2。水平2的外观表明适配体结合至PDGF,从水平2到水平1的转变表明适配体-PDGF复合物发生离解。

[0037] 图18示出了在20%全兔血在80%的K2EDTA(Harlan Scientific,代码-S.B-0009)缓冲液(625mM KCl,100mM HEPES,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾,pH 8.0)中的溶液中在ATP的存在下观察到的适配体序列25x_ATP的一示例性阻断水平(y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。当溶液中存在适配体(序列25x_ATP)和ATP时,检测到水平1和2。水平2的外观表明适配体结合至ATP,从水平2到水平1的转变表明适配体-ATP复合物发生离解。

[0038] 序列表的说明

[0039] SEQ ID NO:1示出了编码 α -溶血素-E111N/K147N(α -HL-NN;(Stoddart,D.S.,et

aI., (2009), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, p7702-7707) 的一个亚基的多核苷酸序列。

[0040] SEQ ID NO:2示出了 α -HL-NN的一个亚基的氨基酸序列。

[0041] SEQ ID NO:3示出了编码 γ -溶血素的LukF亚基的多核苷酸序列。

[0042] SEQ ID NO:4示出了 γ -溶血素的LukF亚基的氨基酸序列。

[0043] SEQ ID NO:5示出了编码 γ -溶血素的HIg2亚基的多核苷酸序列。

[0044] SEQ ID NO:6示出了 γ -溶血素的HIg2亚基的氨基酸序列。

[0045] SEQ ID NO:7至24示出了实施例中使用的序列。

具体实施方式

[0046] 应理解的是,公开的产品和方法的不同应用可以根据本领域的具体需求进行调整。还应理解的是,本文中使用的术语仅仅是为了描述本发明的具体实施方案,不意欲进行限制。

[0047] 另外,如在本说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式的词和“所述”包括复数指代物,除非文中另有明确说明。因此,例如,涉及单数形式的“孔”时包括两个或多个这样的孔,涉及“尾部”时包括两个或多个这样的尾部,涉及“多核苷酸”时包括两个或多个这样的多核苷酸,等。

[0048] 所有在本文中引用的出版物、专利和专利申请,无论前文或后文,均以全文参考的方式纳入本文中。

[0049] 本发明的方法

[0050] 本发明提供了一种确定样本中一组两个或多个分析物中的一个或多个分析物成员是否存在的方法。因此本发明涉及对一组分析物中每个分析物成员的多重检测。预先确定所述组中的所述两个或多个分析物。本发明因此涉及对特定的和预先确定的分析物组中的每个分析物成员的多重检测。

[0051] 所述方法包括,使所述样本与跨膜孔以及两个或多个探针的组相接触。所述探针组中的各个或每个探针识别出所述分析物成员中的一个或多个并且包括(i) 适配体,其结合至所述一个或多个分析物成员,和(ii) 尾部,其能够进入所述跨膜孔并根据探针中的所述适配体是否结合至分析物成员之一而对流经所述跨膜孔的电流具有不同影响。换言之,当适配体未结合至分析物成员之一时,各个或每个探针以一种方式影响流经所述跨膜孔的电流,当适配体结合至该分析物成员时,各个或每个探针以不同的方式影响流经所述跨膜孔的电流。这将在下文进行更详细的论述。所述探针组中的各个或每个探针还会以独特的方式影响流经所述跨膜孔的电流。这使得可对所述探针组中的特定探针进行识别。由于可以测量出对探针的识别及其结合至分析物成员的识别,因此可以确定分析物成员的存在。所述组的两个或多个分析物中的各个或每个分析物成员被所述探针组中的至少一个探针识别。

[0052] 所述方法还包括测量流经所述孔的电流来确定探针组中那些探针——如果有的话——已经结合至分析物成员并由此确定样本中是否存在一个或多个分析物成员。所述电流可以使用本领域中已知的任何方法来测量。具体的方法论述如下。

[0053] 步骤(a)和(b)优选通过跨孔施加电位而实施。所施加的电位可以是电压电位。或

者,所施加的电位可以是化学电位。其一个例子是在跨两性分子层而使用盐梯度。盐梯度在HoI den等人,J Am Chem Soc.2007Jul11;129(27):8650-5中有公开。

[0054] 所述方法具有多个优势。所述方法相比于现有的蛋白测试法快速且便宜,但是仍具有高的特异性。相比于例如抗体而言,含有适配体的探针的制备快速且廉价。能对该测试的输出实时地进行分析,使得当获得足够的信息后能够停止该测试。该方法可以用最少的样本制剂或没有样本制剂的情况下对单个样本中的多个分析物进行检测,例如,所述样本可以是直接来自患者的血液,因此,所述方法能由受到很少的训练或资历很年轻的人来实施。所述方法可用于检测单个样本中的许多分析物,因此不需要对单个样本进行多次测试,分析物的数目仅受探针的多样性及其不同尾部的数目的限制。所述方法通常在未结合的适配体和未结合的分析物的存在下进行,不需要洗涤步骤或除去未结合的实体。

[0055] 样本

[0056] 所述样本可以是任何适宜的样本。本发明通常针对已知含有或怀疑其含有两个或多个分析物的样本进行。本发明可以针对含有两个或多个未进行识别的分析物的样本进行。替代地,本发明可以针对样本实施来确认对已知或期望存在于样本中的两个或多个分析物的识别。

[0057] 所述样本可以是生物样本。本发明可以针对由任何有机体或微生物体获得或提取的样本在体外实施。所述有机体或微生物体通常是古核的(archaeal)、原核的或真核的,并通常属于以下五界之一:植物界、动物界、真菌界、无核原生物界和原生生物界。本发明可以针对由任何病毒获得或提取的样本在体外实施。所述样本优选为液体样本。所述样本通常包括患者的体液。所述样本可以是尿液、淋巴液、唾液、粘液或羊水,但优选为血液、血浆或血清。通常,所述样本来自人,但替代地,其可以是来自其他哺乳动物,例如来自商购的家畜,如马、牛、羊或猪,或替代地,可为宠物,如猫或狗。替代地,源自植物的样本通常获得自经济作物,例如谷类、豆类、水果或蔬菜,如小麦、大麦、燕麦、油菜、玉米、大豆、稻、香蕉、苹果、西红柿、马铃薯、葡萄、烟草、黄豆、扁豆、甘蔗、可可、棉花、茶叶、咖啡。

[0058] 所述样本可以是非生物样本。所述非生物样本优选为液体样本。所述非生物样本的实例包括外科手术液、水,例如饮用水、海水或河水,以及用于实验室测试的试剂。

[0059] 通常在分析前对所述样本进行处理,例如,通过离心或通过膜过滤掉不需要的分子或细胞,诸如红血细胞。所述样本可以在获取后立即进行检测。所述样本通常也可以在分析前储存,优选在低于-70℃储存。

[0060] 分析物

[0061] 本发明的方法是用于确定样本中是否存在两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员。所述两个或多个分析物的组可以含有任何数目的分析物,例如2,5,10,15,20,30,40,50,100或更多分析物。所述组优选具有约4至约100个分析物,例如约5至约80个分析物,约10至约60个分析物或约20至约50个分析物。

[0062] 确定分析物成员中的一个或多个是否存在。换言之,对于一组两个或多个分析物,所述方法确定该组中的每一个分析物成员是否存在。可能存在一个或多个,例如2,5,10,15,20,30,40,50,100或更多个分析物成员,该组中的所有其他分析物成员可能不存在。可能存在所有分析物成员。可能没有分析物成员存在(即,所有分析物成员可能都不存在)。使用本发明方法确定存在的分析物成员的数目与不存在的分析物成员的数目。

[0063] 所述两个或多个分析物优选独立地选自金属离子、无机盐、聚合物、氨基酸、肽、多肽、蛋白质、核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸、染料、漂白剂、药物、诊断试剂、消遣性药物、爆炸性污染物和环境污染物。该组可含有相同类型的两个或多个分析物，例如两个或多个蛋白质，两个或多个核苷酸，或两个或多个药物。替代地，该组可含有不同类型的两个或多个分析物，例如一个或多个蛋白质，一个或多个核苷酸，或一个或多个药物。

[0064] 所述组中的两个或多个分析物可以是细胞分泌的分析物。或者，所述两个或多个分析物可以是存在于细胞内部的分析物，因此在能够实施本发明之前，必须将分析物成员从细胞中提取出。

[0065] 所述组中的两个或多个分析物优选选自氨基酸、肽、多肽和/或蛋白质。所述氨基酸、肽、多肽或蛋白质可以是天然存在的或非天然存在的。它们中的所述多肽或蛋白质可以包括合成或改性的氨基酸。对氨基酸的许多不同类型的改性是本领域已知的。下文参照跨膜孔对适宜的氨基酸及其改性进行论述。对于本发明，应理解的是所述分析物可以通过本领域可利用的任何方法进行改性。

[0066] 所述蛋白质可以是酶、抗体、激素、生物标志物、生长因子或生长调节蛋白，例如细胞活素(cytokine)。细胞活素可以选自白细胞介素，优选IFN-1, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12和IL-13；干扰素，优选IL- γ ；及其他细胞活素，例如TNF- α 。所述蛋白质可以是细菌蛋白、真菌蛋白、病毒蛋白或寄生物衍生的蛋白。

[0067] 所述两个或多个分析物优选选自核苷酸、寡核苷酸和/或多核苷酸。核苷酸通常含有核苷碱基、糖和至少一个磷酸基。核苷碱基通常是杂环的。核苷碱基包括但不限于，嘌呤和嘧啶，更具体地，腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶和胞嘧啶。所述糖通常为戊糖。核苷酸糖包括但不限于，核糖和脱氧核糖。所述核苷酸通常为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。所述核苷酸通常含有单磷酸，二磷酸或三磷酸。磷酸可以连接在核苷酸的5'或3'端。

[0068] 核苷酸包括但不限于，腺苷单磷酸(AMP)、腺苷二磷酸(ADP)、腺苷三磷酸(ATP)、鸟苷单磷酸(GMP)、鸟苷二磷酸(GDP)、鸟苷三磷酸(GTP)、胸苷单磷酸(TMP)、胸苷二磷酸(TDP)、胸苷三磷酸(TTP)、尿苷单磷酸(UMP)、尿苷二磷酸(UDP)、尿苷三磷酸(UTP)、胞苷单磷酸(CMP)、胞苷二磷酸(CDP)、胞苷三磷酸(CTP)、5-甲基胞苷单磷酸、5-甲基胞苷二磷酸、5-甲基胞苷三磷酸、5-羟甲基胞苷单磷酸、5-羟甲基胞苷二磷酸、5-羟甲基胞苷三磷酸、环状腺苷单磷酸(cAMP)、环状鸟苷单磷酸(cGMP)、脱氧腺苷单磷酸(dAMP)、脱氧腺苷二磷酸(dADP)、脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧鸟苷单磷酸(dGMP)、脱氧鸟苷二磷酸(dGDP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧胸苷单磷酸(dTMP)、脱氧胸苷二磷酸(dTDP)、脱氧胸苷三磷酸(dTTP)、脱氧尿苷单磷酸(dUMP)、脱氧尿苷二磷酸(dUDP)、脱氧尿苷三磷酸(dUTP)、脱氧胞苷单磷酸(dCMP)、脱氧胞苷二磷酸(dCDP)和脱氧胞苷三磷酸(dCTP)、5-甲基-2'-脱氧胞苷单磷酸、5-甲基-2'-脱氧胞苷二磷酸、5-甲基-2'-脱氧胞苷三磷酸、5-羟甲基-2'-脱氧胞苷单磷酸、5-羟甲基-2'-脱氧胞苷二磷酸和5-羟甲基-2'-脱氧胞苷三磷酸。所述核苷酸优选选自AMP, TMP, GMP, UMP, dAMP, dTMP, dGMP或dCMP。核苷酸可以是脱碱基的(即缺少核苷碱基)。所述核苷酸可以包含另外的修饰。特别是，适宜的经修饰的核苷酸包括但不限于，2'氨基嘧啶(如2'-氨基胞苷和2'-氨基尿苷)、2'-羟基嘌呤(例如2'-氟嘧啶(例如2'-氟胞苷和2'-氟尿苷)、羟基嘧啶(例如5'- α -P-硼烷基尿苷(borano uridine))、2'-O-甲基核苷酸(例如2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基胞苷和2'-O-甲基尿苷)、4'-硫代嘧啶(例如

4'-硫代尿苷和4'-硫代胞苷),核苷酸具有对核苷碱基的修饰(例如5-戊炔基-2'-脱氧尿苷、5-(3-氨基丙基)-尿苷和1,6-二氨基己基-N-5-氨基甲酰甲基尿苷)。

[0069] 寡核苷酸是短的核苷酸聚合物,通常具有50个或更少的核苷酸,例如40个或更少、30个或更少、20个或更少、10个或更少,或者5个或更少的核苷酸。所述寡核苷酸可以包含上述任何核苷酸,包括脱碱基的和经修饰的核苷酸。

[0070] 所述多核苷酸可以是单链或双链的。至少多核苷酸的一部分可以是双链的。所述多核苷酸可以是核酸,诸如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)。所述多核苷酸可包括与一条DNA链杂交的一条RNA链。所述多核苷酸可以是本领域已知的任何合成核酸、诸如肽核酸(PNA)、甘油核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、锁定核酸(Locked nucleic acid, LNA),或其他具有核苷酸侧链的合成聚合物。所述多核苷酸可包含上述的任何核苷酸,包括经修饰的核苷酸。

[0071] 所述多核苷酸可以是任何长度。例如,所述多核苷酸可以具有至少10,至少50,至少100,至少150,至少200,至少250,至少300,至少400或至少500个核苷酸或核苷酸对的长度。所述多核苷酸可以具有1000或更多个核苷酸或核苷酸对,5000或更多个核苷酸或核苷酸对的长度,或者100000或更多个核苷酸或核苷酸对的长度。

[0072] 所述两个或多个分析物的组可以是任何的分析物组。例如,所述组可以与特定的表型相关。该组可以与特定的细胞类型相关。例如,所述组可以表示细菌细胞。所述组可以表示病毒、真菌或寄生物。所述组可以是特定的娱乐型药物组(例如SAMHSA 5小组测试(paneI test))、爆炸性污染物组或环境污染物组。

[0073] 所述两个或多个分析物的组优选为可用于诊断或预测疾病或病症的两个或多个生物标志物组。所述生物标志物可以是上文提到的任何分析物,例如蛋白质或多核苷酸。适宜的生物标志物组是本领域已知的,例如Edwards, A.V.G.等人(2008) *Mol. Cell. Proteomics* 7, p1824-1837; Jacquet, S.等人(2009), *Mol. Cell. Proteomics* 8, p2687-2699; Anderson N.L.等人(2010) *Clin. Chem.* 56, 177-185中所描述。所述疾病或病症优选为癌症、冠心病、心血管病或脓毒病。

[0074] 如下文更详细论述的,所述组可以包含两个或多个相同分类的分析物。如果分析物具有类似结构,则所述分析物在同一分类范围内。如果所述分析物是蛋白质,当它们在蛋白质结构分类(Structural Classification of Proteins, SCOP)中属于同一分类时,则它们属于相同类别。如果分析物功能相关或系统(phylogenetically)相关的。例如,鸦片制剂,如海洛因、可待因和吗啡,可以被认为属于同一类别的分析物。类似地,白细胞介素1的不同形式,例如,IL-1 α , IL-1 β 和IL-1RA,可以被认为属于同一类别的分析物。在本发明中,一类分析物通常是指具有不同结构但可通过一个适配体而结合的两个或多个分析物。所述方法优选包括使用至少一个探针,所述探针包含结合至一类分析物成员的适配体。例如,这样的实施方式能够确定样本中一个或多个IL-1分析物的存在与否。检测特定类别中一个或多个分析物成员是否存在的能力具有其优势。例如,最初的多重检测可以针对许多分析物类别而实施。一旦已经确定存在一个或多个类别,则可对这些类别实施特定的多重检测,来确定每个类别中的一个或多个分析物成员是否存在。

[0075] 跨膜孔

[0076] 本发明的方法包括使样本与跨膜蛋白孔接触。跨膜孔具有这样的结构:允许通过

施加的电位来驱动水合离子,以使其从膜的一侧流向膜的另一侧。

[0077] 本发明可以使用任何膜。适宜的膜是本领域已知的。所述膜优选为两性分子层。两性分子层是一种由具有至少一个亲水部和至少一个亲脂或疏水部的两性分子例如磷脂形成的层。所述两性分子层可以是合成的或天然存在的。非天然存在的两性分子和形成单层的两性分子是本领域已知的,包括,例如,嵌段共聚物(Gonzalez-Perez等人,Langmuir, 2009, 25, 10447-10450)。嵌段共聚物是两个或多个单体亚基聚合在一起而产生单个聚合物链的聚合材料。嵌段共聚物通常具有每个单体亚基的性能。然而,嵌段共聚物可以具有由单个亚基形成的聚合物所不具有的独特性能。嵌段共聚物是可以设计成,使单体亚基之一为疏水性的(即亲脂性的),而其他亚基在水性介质中时为亲水性的。在此情况下,该嵌段共聚物可以具有两亲性质并且可以形成类似生物膜的结构。该嵌段共聚物可以是二嵌段的(由两个单体亚基构成),但也可以由多于两个的单体亚基构成从而形成与两亲分子行为类似的更复杂排列。所述共聚物可以是三嵌段共聚物、四嵌段共聚物或五嵌段共聚物段。

[0078] 所述两性分子层可以是单层或双层的。所述两性分子层通常为平面脂质双分子层或支撑双分子层。

[0079] 所述两性分子层通常是脂质双分子层。脂质双分子层是细胞膜的模型并被用作多个实验研究的优良平台。例如,脂质双分子层能通过单通道记录而用于对膜蛋白的体外研究。替代地,脂质双分子层可以用作生物传感器来检测多种物质的存在。所述脂质双分子层可以是任何的脂质双分子层。合适的脂质双分子层包括但不限于,平面脂质双分子层,支撑双分子层或脂质体。所述脂质双分子层优选为平面脂质双分子层。适宜的脂质双分子层公开于国际申请PCT/GB08/000563(公布号WO 2008/102121),国际申请No. PCT/GB08/004127(公布号WO 2009/077734)和国际申请No. PCT/GB2006/001057(公布号WO 2006/100484)中。

[0080] 形成脂质双分子层的方法为本领域已知的。合适的方法公开在实施例1中。脂质双分子层通常通过Montal and Mueller(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1972; 69: 3561-3566)的方法形成,其中脂质单分子层负载在水溶液/空气界面上,穿过与该界面垂直的孔的任一侧。

[0081] Montal & Mueller的方法受欢迎的原因是,其成本经济并且是形成适于蛋白孔嵌入的具有良好品质的脂质双分子层的相对简单的方法。其他常规的形成双分子层的方法包括尖端浸渍(tip-dipping)、涂覆双分子层(painting bilayers)和脂质体双分子层的膜片钳(patch-clamping)。

[0082] 在一个优选实施方案中,所述脂质双分子层如国际申请No. PCT/GB08/004127(公布号WO 2009/077734)所述而形成。

[0083] 在另一个优选实施方案中,所述膜为固态层。固态层不来源于生物体。换言之,固态层不是由生物环境(例如有机体或细胞)获得或分离出的,或生物上可获得的结构合成制得的变体。固态层可以由有机和无机材料形成,所述有机和无机材料包括但不限于微电子材料;绝缘材料,例如Si₃N₄, Al₂O₃, 和SiO₂;有机和无机聚合物,例如聚酰胺,塑料如Teflon®或弹性体如双组分加成固化硅橡胶,和玻璃。所述固态层可以由单原子层如石墨烯形成,或只有几个原子厚的层形成。适宜的石墨烯层在国际申请No. PCT/US2008/010637(公布号WO 2009/035647)中公开。两性分子层可以穿过固态孔而形成。这在本领域中可描述为混合孔形成(Hall等人, Nat Nanotechnol., 2010, 5, 874-877)。所述方法通常使用以下物质实施:

(i) 含有孔的人工两性分子层, (ii) 分离出的、天然存在的含有孔的脂质双分子层, 或 (iii) 具有嵌入其中的孔的细胞。所述方法通常使用人工两性分子层例如人工脂质双分子层实施。所述层除孔之外还可以含有其他跨膜和/或膜内蛋白以及其他分子。适合的装置和条件如下所述。本发明的方法通常在体外实施。

[0084] 所述探针组中的一个或多个探针优选偶联至膜。更优选地, 探针组中的每个探针偶联至膜。这可使用任何已知方法完成。如果所述膜为两性分子层, 例如脂质双分子层(如上文详细论述的), 则探针优选通过所述膜中存在的多肽或所述膜中存在的疏水锚偶联至所述膜。所述疏水锚优选为脂质、脂肪酸、固醇、碳纳米管或氨基酸。

[0085] 所述探针可以直接偶联到所述膜。所述探针优选通过连接体(Linker) 偶联到膜。优选的连接体包括但不限于, 聚合物, 例如多核苷酸, 聚乙二醇(PEG) 和多肽。

[0086] 所述偶联可以是稳定的或暂时的。对于某些应用, 优选暂时性的偶联。暂时性的偶联能使永久阻断作用最小化, 使得随时间而更快速地累积的数据不会在手动开启所述孔时丢失。当使用永久偶联时, 两性分子层可能会不稳定, 或者可能导致结合的适配体在顺侧上积聚, 从而改变实验平衡。这些效果可通过暂时偶联而最小化。下文将更详细地描述与膜形成稳定或暂时连接的化学基团。探针可以使用胆固醇或脂肪酰基链暂时偶联到两性分子层, 例如, 脂质双分子层。可以使用具有约6至约30个碳原子长度的任何脂肪酰基链, 例如十六烷酸。

[0087] 在优选的实施方案中, 一个或多个探针或者每个探针偶联到两性分子层。到合成脂质双分子层的偶联已经利用多种不同的拴系策略(tethering strategies) 来实施。这些概述于下表1中。

[0088] 表1

[0089]

连接基团	偶联类型	参考文献
硫醇	稳定的	Yoshina-Ishii, C. and S. G. Boxer (2003). "Arrays of mobile tethered vesicles on supported lipid bilayers." <i>J Am Chem Soc</i> 125 (13): 3696-7.
生物素	稳定的	Nikolov, V., R. Lipowsky, et al. (2007). "Behavior of giant vesicles with anchored DNA molecules." <i>Biophys J</i> 92 (12): 4356-68
胆固醇	暂时的	Pfeiffer, I. and F. Hook (2004). "Bivalent cholesterol-based coupling of oligonucleotides to lipid membrane assemblies." <i>J Am Chem Soc</i> 126 (33): 10224-5
脂质	稳定的	van Lengerich, B., R. J. Rawle, et al. "Covalent attachment of lipid vesicles to a fluid-supported

[0090]

		bilayer allows observation of DNA-mediated vesicle interactions." <u>Langmuir</u> 26 (11): 8666-72
--	--	---

[0091] 在合成反应中探针可以使用改性的亚磷酰胺官能化,使其能容易与反应性基团的加成兼容,所述反应性基团例如硫醇,胆固醇,脂质和生物素基团。这些不同的连接化学成分为探针提供了一系列连接选择。每个不同的改性基团以稍微不同的方式拴系探针并且偶联不总是永久性的,由此使得探针到所述双分子层有不同的停留时间。

[0092] 探针的偶联还可通过很多其他手段实现,条件是反应性基团被加成到所述探针。之前已经报道过将反应性基团加成到DNA任一端。可以使用多核苷酸激酶和ATP γ S在单链DNA的5'端加成硫醇基团(Grant, G.P.和P.Z. Qin (2007). "A facile method for attaching nitroxide spin labels at the 5' terminus of nucleic acids." Nucleic Acids Res 35 (10): e77)。可以使用末端转移酶对更多种不同选择的化学基团,诸如生物素,硫醇和荧光素,进行加成,以将经修饰的寡核苷酸添加到单链DNA的3'端(Kumar, A., P. Tchen, 等人(1988). "Nonradioactive labeling of synthetic oligonucleotide probes with terminal deoxynucleotidyl transferase." Anal Biochem 169 (2): 376-82)。

[0093] 替换地,反应性基团可以被认为是DNA短片段互补性添加到已经偶联到所述双分子层的DNA短片段,使得所述连接可以通过杂交实现。已经报道了使用T4RNA连接酶I来连接单链DNA的短片段(Troutt, A.B., M.G. McHeyzer-Williams, 等人(1992). "Ligation-anchored PCR: a simple amplification technique with single-sided specificity." Proc Natl Acad Sci U S A 89 (20): 9823-5)。替换地,单链DNA或双链DNA可以连接到天然双链DNA,然后通过加热变性或化学变性分开这两条链。对于天然双链DNA,可以在该双链的一个或两个末端添加一段单链DNA,或在所述一个或两个末端添加双链DNA。然后,当双链被解链(melted)时,如果使用单链DNA进行连接,则每条单链将具有5'端或3'端的修饰,或者,如果使用双链DNA进行连接,则每条单链将具有5'端修饰,3'端修饰、或5'端修饰和3'端修饰。如果所述探针含有合成多核苷酸,则所述偶联化学成分可在所述探针的化学合成过程中加入。例如,所述探针可使用连接有反应性基团的引物合成。

[0094] 常规的用于扩增基因组DNA片段的技术是使用聚合酶链反应(PCR)。在该技术中,使用两个合成的寡核苷酸引物,可生成相同DNA片段的大量拷贝,其中对于每个拷贝,双链中的每条链的5'端将是合成的多核苷酸。通过使用具有反应性基团例如胆固醇、硫醇、生物素或脂质的反义引物,扩增的目标DNA的每个拷贝将含有用于偶联的反应性基团。

[0095] 如果所述跨膜孔是下文论述的跨膜蛋白孔,则探针组中的探针优选不偶联到所述孔。如果所述孔是蛋白孔,则探针组中的探针更优选不共价连接到所述孔。

[0096] 所述跨膜孔通常含有前庭(vestibule)和桶状结构或通道。所述桶状结构或通道通常基本为圆柱形,水合离子可穿过所述桶状结构或通道而流经所述膜。所述前庭通常形成至桶状结构或通道的入口并具有与所述桶状结构或通道不同的横截面积。通常地,所述前庭具有比所述桶状结构更大的横截面积。具有前庭和桶状结构或通道的孔的一个良好实例为 α -溶血素(α -HL),下文将更详细地阐述 α -溶血素。含有前庭和桶状结构或通道的孔可

形成在固态层中。优选存在前庭是因为其有利于本发明的方法，见下文更详细的描述。

[0097] 所述桶状结构或通道可以具有任何宽度。通常地，所述桶状结构或通道足够宽，使得每个探针的尾部可以进入所述桶状结构或通道并影响流经所述孔的电流。如下文更详细地论述的，所述尾部优选含有聚合物。所述桶状结构或通道优选足够宽，使得所述聚合物可以进入所述桶状结构或通道并影响流经所述孔的电流。在某些情形下，所述尾部可以含有多核苷酸。所述桶状结构或通道优选足够窄，使得单链多核苷酸可以进入并穿过所述孔，而双链多核苷酸不能进入和穿过所述孔。

[0098] 对于下文更详细论述的原因，所述前庭通常足够宽以使得探针组中的每个适配体能够进入，但是也足够窄以防止每个适配体/分析物成员复合物进入。所述前庭和桶状结构或通道各自通常足够长，以包含至少两个核苷酸，例如共计至少5个、至少10个、至少20个核苷酸，例如前庭中至少8个并且桶状结构中至少12个。

[0099] 所述跨膜孔优选为跨膜蛋白孔。跨膜蛋白孔为能使水合离子，例如分析物，从膜的一侧流到膜的另一侧的多肽或多肽的集合。在本发明中，所述跨膜蛋白孔能够形成能使水合离子被施加的电位驱动从而从膜的一侧流到另一侧的孔。所述跨膜蛋白孔能使探针从膜，例如脂质双分子层的一侧，流到另一侧，如下文所述。所述跨膜蛋白孔优选使得单链多核苷酸，例如单链DNA或RNA穿过孔而移动。

[0100] 所述跨膜蛋白孔可以为单体或寡聚物。所述孔优选由若干重复亚基，例如6, 7, 8或9个亚基构成。所述孔优选为六聚体、七聚体、八聚体或九聚体的孔。

[0101] 所述跨膜蛋白孔通常含有可使离子流经的桶状结构或通道。所述孔的亚基通常围绕一中心轴并向跨膜 β 桶状结构或通道或跨膜 α -螺旋束或通道提供链。

[0102] 所述跨膜蛋白孔的桶状结构或通道通常含有能促进与尾部，例如尾部中的聚合物单元相互作用的氨基酸。这些氨基酸优选位于所述桶状结构或通道的缢痕 (constriction) 附近。所述跨膜蛋白孔通常包含一个或多个带正电荷的氨基酸，例如精氨酸、赖氨酸或组氨酸，或芳香族氨基酸，例如酪氨酸或色氨酸。这些氨基酸通常可以促进所述孔与尾部中带负电荷的聚合物单元，例如核苷酸之间的相互作用。

[0103] 本发明使用的跨膜蛋白孔可源自 β -桶状孔或 α -螺旋束孔。 β -桶状孔包含由 β -链形成的桶状结构或通道。合适的 β -桶状孔包括但不限于， β -毒素，例如 α -溶血素、炭疽毒素和杀白细胞素，以及细菌的外膜蛋白/孔蛋白，例如耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 孔蛋白 (Msp)，如MspA，外膜磷脂酶A和奈瑟氏菌 (*Neisseria*) 自转运脂蛋白 (NalP)。 α -螺旋束孔包含由 α -螺旋形成的桶状结构或通道。合适的 α -螺旋束孔包括但不限于，内膜蛋白和 α 外膜蛋白，例如WZA和ClpA毒素。所述跨膜孔优选源自 α -溶血素 (α -HL) 或杀白细胞素。

[0104] 所述孔可以是同源寡聚物 (所有单体单元相同) 或异源寡聚物 (两个或多个不同类型的单体)。所述孔可以含有经连接的单体，例如二聚体。

[0105] 所述孔可以含有至少一个二聚体和1, 2, 3, 4, 5, 6, 7或8个单体。所述孔可以含有两个、三个、四个或更多二聚体。这类孔还含有足够的单体用以形成孔。另外的孔仅含有二聚体，例如，可以含有4, 5, 6, 7或8个二聚体。本发明的具体的孔可含有四个二聚体。所述二聚体可低聚为具有下述结构的孔：二聚体中仅一个单体有助于所述孔的桶状结构或前庭。通常，该结构中的其他单体将位于所述孔的桶状结构或前庭的外侧上。例如，孔可以含有5, 6,

7或8个二聚体,其中所述桶状结构或前庭含有8个单体。

[0106] 所述跨膜蛋白孔优选源自 α -溶血素(α -HL)。野生型 α -HL孔由7个相同单体或亚基形成(即其是七聚的)。所述跨膜蛋白孔优选含有7个源自 α -HL的单体。 α -溶血素-NN(即源自 α -HL的孔)的一个单体或亚基的序列示于SEQ 1D NO:2中。 α -溶血素-NN含有置换物E111N和K147N。所述跨膜蛋白孔优选含有7个单体,每个单体含有SEQ 1D NO:2中所示的序列或其变体。SEQ 1D NO:4中的1,7至21,31至34,45至51,63至66,72,92至97,104至111,124至136,149至153,160至164,173至206,210至213,217,218,223至228,236至242,262至265,272至274,287至290和294位氨基酸形成环状区域。SEQ 1D NO:2的残基113和147形成 α -HL的桶状结构或通道的缢痕的一部分。

[0107] 所述孔优选含有七个蛋白质或单体,每个蛋白质或单体含有SEQ 1D NO:2中所示的序列或其变体。所述跨膜蛋白质优选由下述物质形成:(a) SEQ 1D NO:2中所示的七个相同亚基,或(b)其变体,其中所述七个亚基中的一个或多个或者全部为SEQ 1D NO:2的变体并且该变体保留有孔活性。所述七个蛋白质可以相同(均聚七聚物)或不同(杂聚七聚物)。

[0108] SEQ 1D NO:2的变体为具有由SEQ 1D NO:2的氨基酸序列变化而来并保留有其形成孔的能力的氨基酸序列的蛋白质。变体形成孔的能力可通过本领域已知的任何方法检测。例如,可以将所述变体连同其他适合的亚基一起插入两性分子层例如脂质双分子层中,然后可以检测其寡聚形成孔的能力。将亚基插入两性分子层,例如脂质双分子层中的方法是本领域已知的。例如,可以将亚基以纯化的形式悬浮在含有脂质双分子层的溶液中,使得亚基扩散到所述脂质双分子层并通过结合到所述脂质双分子层并装配成功能状态而插入。替代地,亚基可以使用M.A.Holden,H.Bayley.J.Am.Chem.Soc.2005,127,6502-6503和国际申请No.PCT/GB2006/001057(公布号W02006/100484)中描述的“拾取与放置(pick and place)”方法直接插入所述膜中。

[0109] SEQ 1D NO:2的一个优选变体为野生型亚基,即111位的E已经被替换并且147位的K已经被替代的亚基。

[0110] 所述变体可包括促进与另一分子共价连接或相互作用的修饰。所述变体优选含有一个或多个能促进连接的反应性半胱氨酸残基。例如,所述变体可以在8,9,17,18,19,44,45,50,51,237,239和287位点中的一个或多个位点处和/或在SEQ 1D NO:2的氨基或羧基末端包括半胱氨酸。优选的变体包含在SEQ 1D NO:2的8,9,17,237,239和287位残基使用半胱氨酸(A8C,T9C,N17C,K237C,S239C或E287C)的置换。所述变体优选为国际申请No.PCT/GB09/001690(公布号W0 2010/004273),PCT/GB09/001679(公布号W02010/004265)或PCT/GB10/000133(公布号W0 2010/086603)中描述的变体中的任一个。

[0111] 所述变体也可以包括能促进与尾部中聚合物单元,例如核苷酸、氨基酸或环氧乙烷的任何相互作用的修饰。

[0112] 所述变体可以是天然存在的变体,该天然存在的变体由有机体例如,葡萄球菌属(*Staphylococcus*)细菌天然表达。替代地,所述变体可以在体外表达或通过例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)的细菌重组表达。变体还包括非天然存在的由重组技术获得的变体。

[0113] 基于氨基酸的同一性,相比于SEQ 1D NO:2的氨基酸序列的整个长度,变体优选与所述序列具有至少50%的同源性。更优选地,基于氨基酸的同一性,相比于SEQ 1D NO:2的整个序列的氨基酸序列,所述变体可具有至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少

75%，至少80%，至少85%，至少90%且更优选至少95%，97%或99%的同源性。在200或更多，例如230，250，270或280或更大的长度上，可以具有至少80%，例如至少85%，90%或95%的氨基酸同一性，即连续的氨基酸（“严格同一性”）。

[0114] 可使用本领域的标准方法测定同源性。例如UWCGC包提供了BESTFIT程序，其可用于计算同源性，例如使用其默认设置 (Devereux等人(1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395)。PILEUP和BLAST算法可以用于计算同源性或比对序列 (line up sequence) (例如识别等价残基或对应序列 (通常根据其默认设置))，例如Altschul S.F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S.F等人(1990) *J Mol Biol* 215:403-10中所描述的。用于执行BLAST分析的软件可通过美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 而公开获得。

[0115] 除了上述的那些之外，可对SEQ ID NO:2的氨基酸序列进行氨基酸置换，例如多达1, 2, 3, 4, 5, 10, 20或30个置换。保守置换使用其他类似化学结构、类似化学性能或类似侧链体积的氨基酸来置换氨基酸。引入的氨基酸可具有与被置换的氨基酸相似的极性、亲水性、疏水性、碱性、酸性、中性和电荷。替代地，所述保守置换可以引入另外的芳香族或脂肪族氨基酸，替代之前存在的芳香族或脂肪族氨基酸。保守氨基酸的改变是本领域公知的，并可以根据下表2中定义的20个主要氨基酸的性质进行选择。其中，各氨基酸具有相似的极性，这也可以参考表3中的氨基酸侧链的亲水性大小来确定。

[0116] 表2-氨基酸的化学性质

Ala	脂肪族的, 疏水的, 中性的	Met	疏水的, 中性的
Cys	极性的, 疏水的, 中性的	Asn	极性的, 亲水的, 中性的
Asp	极性的, 亲水的, 带负电(-)	Pro	疏水的, 中性的
Glu	极性的, 亲水的, 带负电(-)	Gln	极性的, 亲水的, 中性的
Phe	芳香族的, 疏水的, 中性的	Arg	极性的, 亲水的, 带正电(+)
Gly	脂肪族的, 中性的	Ser	极性的, 亲水的, 中性的
His	芳香族的, 极性的, 亲水的, 带正电(+)	Thr	极性的, 亲水的, 中性的
Ile	脂肪族的, 疏水的, 中性的	Val	脂肪族的, 疏水的, 中性的
Lys	极性的, 亲水的, 带正电(+)	Trp	芳香族的, 疏水的, 中性的
Leu	脂肪族的, 疏水的, 中性的	Tyr	芳香族的, 极性的, 疏水的

[0118] 表3-亲水性大小

	侧链	亲水性
	Ile	4.5
	Val	4.2
	Leu	3.8
	Phe	2.8
[0119]	Cys	2.5
	Met	1.9
	Ala	1.8
	Gly	-0.4
	Thr	-0.7
	Ser	-0.8
	Trp	-0.9
	Tyr	-1.3
	Pro	-1.6
	His	-3.2
	Glu	-3.5
[0120]	Gln	-3.5
	Asp	-3.5
	Asn	-3.5
	Lys	-3.9
	Arg	-4.5

[0121] 另外,SEQ 1D NO:2的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基可以从上述多肽中缺失。可以缺失多达1,2,3,4,5,10,20或30或更多个残基。

[0122] 所述变体可以包括SEQ 1D NO:2的片段。这类片段保留有形成孔的活性。各片段可以至少为50、100、200或250个氨基酸长度。这类片段可用于产生孔。片段优选含有SEQ 1D NO:2的形成孔的结构域。各片段通常包括SEQ 1D NO:2的残基119,121,135,113和139。

[0123] 一个或多个氨基酸可以替代地或另外地添加到上述的多肽。可以在SEQ 1D NO:2或其多肽变体或其片段的氨基酸序列的氨基末端或羧基末端提供一延伸。所述延伸可以是非常短的,例如约1至约10个氨基酸长度。替代地,所述延伸可以更长,例如多达约50或约100个氨基酸。载体蛋白可以融合到本发明的氨基酸序列。

[0124] 如上所述,变体是具有由SEQ 1D NO:2的氨基酸序列变化而来并保留有其形成孔的能力的氨基酸序列的多肽。变体通常含有SEQ 1D NO:2的用于形成孔的区域。含有 β -桶状结构的 α -HL的形成孔的能力是由每个亚基中的 β -链提供的。SEQ 1D NO:2的变体通常含有SEQ 1D NO:2中形成 β -链的区域。SEQ 1D NO:2中形成 β -链的氨基酸如上文所述。对SEQ 1D NO:2中形成 β -链的区域进行一个或多个修饰,只要所得变体保留有其形成孔的能力即可。对SEQ 1D NO:2的 β -链区域进行的特定改性论述如上文。

[0125] SEQ 1D NO:2的变体优选在其 α -螺旋和/或环形区域中包括一个或多个修饰,例如置换、添加或缺失。对形成 α -螺旋和环的氨基酸论述如上文。

[0126] 所述跨膜蛋白孔还优选源自杀白细胞素。杀白细胞素为具有两个不同亚基的异源寡聚物孔,所述亚基中一类为S亚基,一类为F亚基。适宜的杀白细胞素包括,但不限于,含LukF(H1gB)和H1g2(H1gA)的 γ 溶血素(γ -HL),含LukF(H1gB)和LukS(H1gC)的杀白细胞素,

含LukF-PV和LukS-PV的杀白细胞素PV,含LukE和LukD的LukE/LukD孔,和含LukF-1和LukS-1的LukS-1/LukF-1。

[0127] 当所述跨膜蛋白孔为杀白细胞素时,其优选源自 γ 溶血素(γ -HL)。野生型 γ -HL孔是由八个亚基形成(即其是八聚的)并含有LukF的四个亚基和Hlg2的四个亚基。LukF的一个单体或亚基的序列示于SEQ ID NO:4中。Hlg2的一个单体或亚基的序列示于SEQ ID NO:6中。所述跨膜蛋白孔优选含有各自包含SEQ ID NO:4中所示序列或其变体的四个单体并含有各自包含SEQ ID NO:6中所示序列或其变体的四个单体。SEQ ID NO:4的氨基酸109-147和SEQ ID NO:6的氨基酸103-139形成环形区域。

[0128] 所述 γ -溶血素孔优选为:(a)由SEQ ID NO:4中所示四个相同亚基和SEQ ID NO:6中所示四个相同亚基形成的 γ -溶血素,或(b)其变体,其中一个或多个或者全部的亚基为SEQ ID NO:4的变体,和/或一个或多个或者全部的亚基为SEQ ID NO:6的变体,并且所述孔保留有孔活性。这类孔为杂聚八聚体。

[0129] SEQ ID NO:4或6的变体为具有由SEQ ID NO:4或6的氨基酸序列变化而来并且保留有其形成孔的能力的氨基酸序列的蛋白质。变体形成孔的能力可通过本领域已知的任何方法检测。例如,可以将所述变体连同其他适合的亚基一起插入两性分子层例如脂质双分子层中,然后可以确定其寡聚形成孔的能力。将亚基插入两性分子层,例如脂质双分子层中的方法是本领域已知的。适宜的方法如上所述。

[0130] 所述变体可包括促进与另一分子共价连接或相互作用的修饰。所述变体优选含有一个或多个能促进连接的反应性半胱氨酸残基。所述变体还可以包括促进与尾部中的聚合物单元,例如核苷酸、氨基酸或环氧乙烷的任何相互作用的修饰。

[0131] 所述变体可以由有机体天然表达的天然存在的变体,所述有机体例如葡萄球菌属细菌。替代地,所述变体可以在体外表达或通过诸如大肠杆菌的细菌重组表达。变体还包括非天然存在的由重组技术生产的变体。在SEQ ID NO:4或6的氨基酸序列的整个长度上,基于氨基酸的同一性,变体优选与所述序列至少50%同源。更优选地,基于氨基酸的同一性,在SEQ ID NO:4或6的整个序列上,所述变体多肽与该序列可至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%且更优选至少95%,97%或99%同源。在200或更长,例如230,250,270或280或更长长度上,可以具有至少80%,例如至少85%,90%或95%的氨基酸同一性,即连续的氨基酸(“严格同源性”)。同源性可如上所述来确定。

[0132] 除了如上所述的那些,可以对SEQ ID NO:4或6的氨基酸序列进行氨基酸置换,例如多达1,2,3,4,5,10,20或30个置换。可以如上所述进行保守置换。

[0133] SEQ ID NO:4或6的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基可以另外从上述多肽中缺失。可以缺失多达1,2,3,4,5,10,20或30或更多个残基。

[0134] 变体可以是SEQ ID NO:4或6的片段。所述片段保留有形成孔的活性。各片段可以具有至少50,100,200或250个氨基酸长度。该片段优选包含SEQ ID NO:4或6的形成孔的结构域。

[0135] 一个或多个氨基酸可以替代地或另外地添加到上述多肽。可以在SEQ ID NO:4或6或其变体或片段的氨基酸序列的氨基末端或羧基末端提供一个延伸。所述延伸可以是非常短的,例如约1至约10个氨基酸长度。替代地,所述延伸可以更长,例如长达约50或约100个

氨基酸。载体蛋白可以融合到孔或其变体。

[0136] 如上所述,SEQ 1D NO:4或6的变体为具有从SEQ 1D NO:4或6的氨基酸序列变化而来并且保留有其形成孔的能力的氨基酸序列的亚基。变体通常含有SEQ 1D NO:4或6的用于形成孔的区域。含有 β -桶状结构的 γ -HL的形成孔的能力由每个亚基中的 β -链提供。SEQ 1D NO:4或6的变体通常含有SEQ 1D NO:4或6中形成 β -链的区域。形成 β -链的SEQ 1D NO:4或6的氨基酸如上所述。可对SEQ 1D NO:4或6的形成 β -链的区域进行一个或多个修饰,只要所得变体保留其形成孔的能力即可。可以如上所述对SEQ 1D NO:4或6的 β -链区域进行特异性修饰。

[0137] SEQ 1D NO:4或6的变体优选在其 α -螺旋和/或环形区域中包括一个或多个修饰,如置换、添加或缺失。形成 α -螺旋和环的氨基酸如上所述。

[0138] 在一些实施方案中,对所述跨膜蛋白孔进行化学修饰。可对源自 α -HL(即SEQ 1D NO:2或其变体)或 γ -HL(即SEQ 1D NO:4或6或其变体)的单体进行修饰,以帮助对它们的鉴定或纯化,所述修饰例如通过下述进行:通过添加组氨酸残基(hist标签)、天冬氨酸残基(asp标签)、链霉亲和素标签或flag标签,或通过添加信号序列来促进它们从细胞的分泌——当多肽并不天然含有该序列时。引入遗传标签的一个替换方案是通过化学反应将标签连接到所述孔上的天然或工程位点。其一个例子为将凝胶迁移试剂与工程连接在所述孔外部上的半胱氨酸进行反应。这被证明是一种分离 α -HL同源寡聚体的方法(Chem Biol.1997Jul;4(7):497-505)。

[0139] 源自 α -HL或 γ -HL的单体可以使用显示标记物(revealing label)标记。所述显示标记物可以是能使所述孔被检测的任何适宜标记物。适合的标记物包括但不限于,荧光分子、放射性同位素,例如 ^{125}I 、 ^{35}S 、酶、抗体、抗原、多核苷酸和配体,如生物素。

[0140] 源自 α -HL或 γ -HL的单体也可以使用D-氨基酸生产。例如,源自 α -HL或 γ -HL的单体可以含有L-氨基酸和D-氨基酸的混合物。这是本领域生产蛋白质或肽的常规方法。

[0141] 源自 α -HL或 γ -HL的单体可含有一个或多个特异性修饰,以促进与尾部的相互作用。源自 α -HL或 γ -HL的单体也可以含有其他非特异性修饰,只要它们不影响孔的形成即可。很多非特异性侧链修饰是本领域已知的,并可以针对源自 α -HL或 γ -HL的单体的侧链进行。这类修饰包括,例如,通过与醛进行反应然后用 NaBH_4 还原而进行的氨基酸的还原性烷基化,用甲基乙酰亚胺酸甲酯(methylacetimidate)进行的脒基化,或用乙酸酐进行的酰化。

[0142] 源自 α -HL或 γ -HL的单体可使用本领域已知的标准方法生产。源自 α -HL的单体可以合成或通过重组方式制备。例如,所述孔可以通过体外翻译和转录(IVTT)进行合成。用于制备孔的适宜方法在国际申请号PCT/GB09/001690(公布号WO 2010/004273),PCT/GB09/001679(公布号WO2010/004265)或PCT/GB10/000133(公布号WO 2010/086603)中有论述。对将孔插入膜中的方法进行了论述。

[0143] 所述孔可使用本领域已知的标准方法生产。编码孔的多核苷酸序列可使用本领域标准方法得到和复制。编码孔的多核苷酸序列可以使用本领域标准技术在细菌宿主细胞中表达。所述孔可以在细胞中通过重组表达载体得到的多肽的原位表达进行制备。所述表达载体可选地携带有诱导型启动子以控制所述多肽的表达。这些方法在Sambrook, J.和Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版. Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 中有描述。

[0144] 所述孔可以从制备蛋白质的有机体或在重组表达后,通过任何蛋白质液相色谱系统进行纯化,之后进行大规模制备。通常的蛋白质液相色谱系统包括FPLC、AKTA系统、Bio-Cad系统、Bio-Rad生物系统和Gilson HPLC系统。

[0145] 探针组

[0146] 本发明的方法包括使样本与两个或多个探针的组接触。换言之,本发明的方法包括使样本与两个或多个类型探针的组接触。所述探针组可包含任何数目的两个或多个探针,例如2,5,10,15,20,30,40,50,100或更多探针。所述探针组优选具有约4至约100个探针,例如约5个至约80个探针,约10至约60个探针或约20至约50个探针。

[0147] 所述方法使用探针组中各个或每个探针的多种情形(multiple instances),原因在于,如果样本中存在分析物,则几乎可以肯定样本中的分析物存在多种情形。换言之,所述方法使用探针组中各个或每个类型探针的多种情形。

[0148] 两个或多个分析物的组中的各个或每个分析物成员通过探针组中的至少一个探针(即至少一类探针)进行识别。当分析物存在于样本中时,如果其在本发明方法中提供阳性信号,则探针可以识别出该分析物成员。换言之,当分析物存在于样本中时,如果其以独特的方式影响电流,则探针可以识别出该分析物成员。探针通常能识别出分析物成员,原因是它含有与分析物成员结合的适配体。每个分析物成员通过至少一个探针识别出,这使得所述组中每个分析物成员的存在与否可使用本发明方法确定出。下文更详细论述探针识别分析物成员的方式。

[0149] 探针组中的至少一个探针(即至少一类探针)优选识别两个或多个分析物的组中的一类分析物成员并且含有与该类分析物成员结合的适配体。关于确定所述组中某类分析物成员是否存在的优点如上文所述。下文对结合至多于一个的分析物成员的适配体的制备进行论述。

[0150] 探针组中的至少一个探针(即至少一类探针)优选特异性识别一种分析物成员并含有特异结合该分析物成员的适配体。当分析物存在于样本中时,如果其在本发明方法中仅提供阳性信号,则探针能特异性识别出该分析物成员之一。换言之,当分析物存在于样本中时,如果其仅以独特的方式影响电流,则探针能特异性识别出该分析物成员。探针通常特异性识别出分析物成员,原因是它含有能与该分析物成员特异性结合的适配体。下文更详细地论述适配体的特异性结合。在该实施方案中,至少一个探针仅靶向一个分析物成员。探针组中的每个探针(即每种类型的探针)更优选特异性结合分析物成员之一并含有与该分析物成员特异性结合的适配体。在该实施方案中,每个探针仅靶向一个分析物成员。如果仅使用一个探针来检测分析物成员,则本发明的多重检测更简单。特别是,通过测量一个探针对流经孔的电流的独特影响能更简单的测量分析物成员是否存在。

[0151] 探针组中的每个探针(即每种类型的探针)优选含有不同的适配体。换言之,探针组中没有两个探针(即没有两种类型的探针)含有同一适配体。如下文更详细论述的,不同适配体之间的差异可有助于每个探针流经孔的电流的影响的独特性。不同的适配体通常结合至不同的分析物成员,但是可以结合至同一分析物成员。在一个优选的实施方案中,探针组中的两个或多个探针含有特异性结合至同一分析物成员的不同适配体。探针组中的两个或多个探针优选含有不同的适配体和相同的多核苷酸尾部。在该实施方案中,每个探针

对流经孔的电流的影响的独特性通常通常适配体之间的差异提供。

[0152] 探针组中的每个探针(即每种类型的探针)优选含有不同的尾部。如下文更详细论述的,不同尾部之间的差异也可有助于每个探针对流经孔的电流的影响的独特性。探针组中的两个或多个探针优选包含相同的适配体和不同的尾部。在本实施方案中,每个探针对流经孔的电流的影响的独特性通常由尾部之间的差异提供。在本实施方案中,两个或多个探针靶向相同的一个或多个分析物成员,原因是它们享有同一适配体。这可以提供一内部控制,因为需要来自两个探针的阳性信号来断定一个或多个分析物成员之一在样本中的存在。

[0153] 探针组中的每个探针(即每种类型的探针)可包含不同的适配体和不同的多核苷酸尾部。换言之,探针组中没有两个探针(即没有两种类型的探针)包含相同的适配体和相同的尾部。在本实施方案中,不同的适配体和不同的尾部通常都有助于两个或多个探针中的每一个对流经孔的电流的影响的独特性。

[0154] 探针组中探针的数目(即探针的类型)通常与组中分析物成员的数目相同或比其大。探针组中也可能存在比组中分析物成员数目少的探针,因为每个探针可识别一个或多个分析物成员。如果探针组中探针的数目大于组中分析物成员的数目,则两个或多个探针靶向相同的一个或多个分析物成员,并且本发明的方法包括上文所述的内部控制。探针组中探针的数目优选与所述两个或多个分析物的组中的分析物成员数目相同。这是本发明的最简单的实施方案,但是其不包括内部控制。

[0155] 适配体

[0156] 探针组中的每个探针(即每种类型的探针)识别一个或多个分析物成员并含有结合至一个或多个分析物成员的适配体。通过探针对分析物成员的识别论述如上。

[0157] 适配体是结合至一个或多个分析物成员的小分子。适配体可以使用SELEX (Stoltenburg,R.等人,(2007),*Biomolecular Engineering* 24,p381-403;Tuerk,C.et al.,*Science* 249,p505-510;Bock,L.C.等人,(1992),*Nature* 355,p564-566)或NON-SELEX (Berezovski,M.等人(2006),*Journal of the American Chemical Society* 128,p1410-1411)制备。

[0158] 适配体能够结合到一个或多个分析物成员。在本实施方案中,包含适配体的探针能够识别所述一个或多个分析物成员。结合到多于一个的分析物成员的适配体可以使用Toggle SELEX (White,R.et al.,(2001),*Molecular Therapy* 4,p567-573)制备。虽然适配体能够结合至一个或多个分析物,但是每个适配体通常仅结合到本发明方法中的一个分析物。这将在下文进行更详细的论述。

[0159] 所述适配体优选结合到两个或多个分析物的组内的一类分析物成员。对分析物成员类别的论述见上文。结合到一类分析物成员的适配体可使用Toggle SELEX制备。

[0160] 所述适配体优选为肽适配体或寡核苷酸适配体。肽适配体可包括任何氨基酸。所述氨基酸可以是上文论述的那些氨基酸中的任何氨基酸。寡核苷酸适配体可以包含任何核苷酸。所述核苷酸可以是上文论述的那些核苷酸中的任何核苷酸。

[0161] 所述适配体可以是任意长度。所述适配体通常具有至少15个氨基酸或核苷酸长度,如约15至约50,约20至约40,或约25至约30个氨基酸或核苷酸的长度。

[0162] 尾部

[0163] 探针组中的每个探针(即每种类型的探针)包含一尾部,所述尾部能够进入所述孔中。所述尾部通常为能够进入并穿过所述孔的桶状结构或通道的直链分子。用于形成尾部的适宜分析将在下文论述。当所述尾部进入所述孔中时,该尾部以下述方式影响流经所述孔的电流:对存在于所述桶状结构或通道中的尾部的一部分具有特异性。

[0164] 所述尾部根据探针中的适配体是否结合到分析物成员之一而对流经所述孔的电流具有不同的影响。当适配体未结合至所述分析物成员时,每个探针的尾部以一种方式影响流经所述孔的电流,当适配体结合至所述分析物成员时,每个探针的尾部以不同的方式影响流经所述孔的电流。这是很重要的,因为它允许使用所述方法确定出所述组中每个分析物成员是否存在。

[0165] 所述尾部根据探针中的适配体是否结合到分析物成员之一而对流经所述孔的电流的不同影响可基于探针移动穿过所述孔所花费的时间来测定。换言之,所述尾部根据探针中的适配体是否结合到分析物成员之一而对流经所述孔的电流的不同影响可基于探针对流经所述孔的电流的影响时间来测定。不希望囿于任何理论地,当探针组与所述孔接触并影响流经所述孔的电流时,每个探针的尾部进入所述孔的桶状结构或通道。本发明的方法中使用了探针的多种情形。在很短一段时间内,通过适配体阻碍整个探针穿过所述孔的运动(即延迟)。所述适配体通常折叠成三维结构并因此通常过大而无法移动穿过所述孔的桶状结构或通道。在很短一段时间之后,所述适配体在电位的影响下展开并使整个探针随着电位穿过所述孔。一旦探针已穿过所述孔,流经所述孔的电流就会恢复到没有探针组时所看到的水平。如果探针的靶分析物成员存在,则所述适配体结合至所述分析物成员并且所述适配体/分析物复合物进一步延迟所述探针移动穿过所述孔。在该实施方案中,在分析物成员存在的情况下探针移动穿过所述孔要比在分析物成员不存在的情况下更缓慢。换言之,在分析物成员存在的情况下探针对流经所述孔的电流的影响时间要比在分析物成员不存在的情况下更长。在本实施方案中,探针之间(即不同类型的探针之间)的独特性可能是由于以下一种或多种或者全部原因:(1) 探针的长度不同,(2) 在每个探针的尾部中是否存在一个或多个双链多核苷酸区域,和(3) 每个探针中不同适配体的不同结合亲合力。上述三种原因可以被改变,使得每个探针影响流经所述孔的电流达特定的时间(“停留时间”)。一个或多个双链多核苷酸区域的存在也可用于保持特定的尾部区域,该区域表示所述桶状结构或通道中的探针,如下文所述。

[0166] 所述尾部优选包括至少两个以不同方式影响流经所述孔的电流的区域,一个区域在适配体未结合至分析物成员之一时位于所述孔中,另一个区域在适配体结合至所述分析物成员时位于所述孔中。所述至少两个区域具有不同的组成并由此以不同的方式影响流经所述孔的电流。例如,一个区域可以是多肽且另一个区域可以是多核苷酸,或者所述至少两个区域可以是具有不同核苷酸序列的多核苷酸。这将在下文更详细地论述。

[0167] 可实施对照实验来确定当探针与分析物成员之一结合与不结合时尾部不同区域对流经所述孔的电流的影响。然后可将测试样本实施本发明方法所得结果与所述对照实验得到的结果进行比较,以确定特定的分析物是否存在于所述测试样本中。

[0168] 仍然不希望囿于理论地,当探针组与所述孔接触并影响流经所述孔的电流时,每个探针的尾部进入所述孔的桶状结构或通道。本发明方法中使用孔的多种情形。在很短一段时间内,通过适配体阻碍整个探针穿过所述孔的运动,原因如上文所述。折叠的适配体通

常过大以至无法移动穿过所述孔的桶状结构或通道。如果探针的靶分析物成员不存在,则适配体无法与分析物成员结合并且尾部的一个区域(第一区域)在适配体阻碍所述探针穿过所述孔的运动时通常保持在所述桶状结构或通道中。所述第一区域基于其组成而以特定方式影响流经所述孔的电流。很短时间之后,所述适配体在电位的影响下展开并使整个探针随着电位移动穿过所述孔。一旦探针已穿过所述孔,流经所述孔的电流就会恢复到没有探针组时所看到的水平。

[0169] 如果探针的靶分析物成员存在于样本中,则每个探针的尾部仍然进入如上所述孔的桶状结构或通道中,但所述适配体/分析物成员复合物通常阻止所述尾部进入,直到所述分析物成员不再存在为止。因此,尾部的一不同区域(第二区域)保持在所述桶状结构或通道中并以与第一区域不同的方式影响流经所述孔的电流。很短时间之后,所述适配体在电位的影响下展开,释放出分析物成员并使整个探针移动穿过所述孔。当探针移动穿过所述孔时,所述第一区域将跟随所述第二区域穿过所述桶状结构或通道并同分析物成员不存在时一样在很短时间内影响流经所述孔的电流。一旦所述探针已穿过所述孔,流经所述孔的电流就会恢复到没有探针组时所看到的水平。其一实例以草图形式示于图1中。

[0170] 在该实施方案中,探针之间(即不同类型的探针之间)的独特性,可能是由于以下一种或多种或者全部原因:(1) 探针的长度不同,(2) 在每个探针的尾部中是否存在一个或多个双链多核苷酸区域,(3) 每个探针中不同适配体的不同结合亲和力,和(4) 每个探针的至少两个区域之间的差异。上述第1至第3种情况可以被改变,使得每个探针影响流经所述孔的电流达特定的时间(“停留时间”)。一个或多个双链多核苷酸区域的存在也可用于保持特定的尾部区域,该区域表示所述桶状结构或通道中的探针,如下文所述。每个探针的所述至少两个区域可以被设计成使得它能在该方法中使用的各个(或每个)探针之间进行简单区分。

[0171] 如上所述,所述孔优选包含前庭。这是有利的,因为前庭通常允许适配体进入,但不允许该适配体/分析物成员复合物进入。这意味着根据适配体是否与分析物成员之一结合,所述尾部进入所述孔的桶状结构或通道中的程度是不同的。这也意味着根据适配体是否与分析物成员之一结合,所述孔的桶状结构或通道中存在尾部的不同区域。对于一个具体的孔,可以简单地设计出适于在探针组中使用的尾部。例如,如果所述孔的前庭及桶状结构或通道的长度是已知的,可以简单地设计出探针尾部。

[0172] 在本发明的方法中,每个适配体分子仅结合分析物成员分子之一,但是它能够结合多于一个的分析物成员。如上所述,整个探针通常在与所述孔接触后立即沿着电位移动穿过所述孔。适配体在移动穿过所述孔之前具有足够的时间结合一个分析物成员。当探针的靶分析物成员不存在时,所述探针在适配体不结合分析物成员的情况下移动穿过所述孔。当探针的靶分析物存在时,探针穿过所述孔的运动可能会稍微延迟,但是不可能被阻止。这将在下面更详细地论述。

[0173] 所述尾部优选包含聚合物。所述聚合物能够进入所述孔并影响流经所述孔的电流。所述聚合物优选为多核苷酸、多肽或聚乙二醇(PEG)。

[0174] 所述多核苷酸可以包括上述的任何核苷酸。但是,所述尾部中的多核苷酸通常包括选自以下的核苷酸:腺苷单磷酸(AMP)、鸟苷单磷酸(GMP)、胸苷单磷酸(TMP)、尿苷单磷酸(UMP)、胞苷单磷酸(CMP)、环状腺苷单磷酸(cAMP),环状鸟苷单磷酸(cGMP)、脱氧腺苷单磷

酸(dAMP)、脱氧鸟苷单磷酸(dGMP)、脱氧胸苷单磷酸(dTMP)、脱氧尿苷单磷酸(dUMP)和脱氧胞苷单磷酸(dCMP)和上述的任何改性核苷酸。所述核苷酸优选包括选自AMP,TMP,GMP,CMP,UMP,dAMP,dTMP,dGMP或dCMP的核苷酸。所述多核苷酸优选包括一个或多个脱碱基的核苷酸。所述尾部中的多核苷酸可以为单链或双链的。所述多核苷酸可以为核酸,例如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)。所述尾部中的多核苷酸可包括与一条DNA链杂交的一条RNA链。所述尾部中的多核苷酸可以是本领域已知的任何合成核酸,例如肽核酸(PNA)、甘油核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、锁定核酸(LNA),或其他具有核苷酸侧链的合成聚合物。

[0175] 通常,所述尾部具有一脱碱基的前导序列,该前导序列是尾部进入所述孔的第一区域。优选所述尾部包含至少2个相邻的脱碱基残基,例如3,4,5,6,7个或更多相邻的脱碱基残基。

[0176] 虽然尾部中的双链多核苷酸通常不能穿过所述孔,但是它们可以用在本发明方法中。例如,所述尾部可以包含一个或多个双链多核苷酸或者多核苷酸区域。这类双链区域的存在不会妨碍探针移动穿过所述孔,而是仅仅是在所述区域中的各链之一在电位影响下脱离探针时延迟了探针穿过所述孔的移动。这样的延迟可以被看作是流经所述孔的电流被测量。与分析物的结合延迟了所述探针穿过所述孔的运动的实施方案如上文所述。因此,每个尾部中包括一个或多个双链多核苷酸区域增加了可从所有尾部获得的可用信号的数目,从而增加了可使用本发明方法测试的分析物成员的数目。双链多核苷酸区域还可以用于保持尾部的特定区域,例如条形码,所述条形码指示所述孔的桶状结构或通道中的探针从而可以根据本发明读出该条形码。所述一个或多个双链区域可以位于尾部上,使得它们在所述至少两个区域之前或之后进入所述孔,所述至少两个区域如上所述指示所述分析物成员是否存在。因此,在一优选实施方案中,所述尾部包含一双链多核苷酸区域和一指示所述探针的特定尾部区域,使得所述双链多核苷酸延迟所述探针穿过所述孔的运动,并保持所述孔的桶状结构或通道中的特定尾部区域。探针之间(即不同类型的探针之间)不同的特定尾部区域通常对流经所述孔的电流具有不同的影响,并因此可以彼此区分开。所述特定尾部区域优选为聚合物。所述聚合物可以是上下文所述的任何聚合物。在这类实施方案中,所述特定尾部区域进入所述孔并通过双链多核苷酸区域保持在所述桶状结构或通道中。这使得可通过所述特定尾部区域对流经所述孔的电流的特定影响而鉴定出所述特定尾部区域。很短时间之后,双链区域中的一条链脱离出并且所述探针在电位的影响下移动穿过所述孔。然后,如上所述,可通过下述来测量探针与分析物成员的结合:通过(a)所述探针穿过所述孔的运动的延迟,和/或(b)在所述尾部中使用至少两个特定区域。

[0177] 所述尾部优选包含至少一条单链多核苷酸或多核苷酸区域。单链多核苷酸可以用在尾部中,因为它们能穿过所述孔并且可以很容易地被分成不同的区域,所述不同的区域以不同方式影响流经所述孔的电流。例如,具有不同序列的多核苷酸的不同区域通常以不同方式影响流经所述孔的电流。所述尾部优选包含至少两个具有不同核苷酸序列的单链多核苷酸区域,所述区域以不同方式影响流经所述孔的电流,一个区域在适配体未结合至一个或多个分析物成员之一时位于所述孔中,另一个区域在适配体结合至所述分析物成员时位于所述孔中。所述至少两个区域优选对应于至少两段不同的核苷酸。例如,多核苷酸可以包含一段腺嘌呤核苷酸和一段脱碱基核苷酸。每一段将以不同方式影响流经所述孔的电流。替代地,所述至少两段不同核苷酸是不同的多核苷酸条形码。多核苷酸条形码是本领域

公知的 (Kozarewa, l. 等人, (2011), Methods Mol. Biol. 733, p279-298)。条形码是以特定和已知方式影响流经所述孔的电流的特定多核苷酸序列。

[0178] 所述尾部中的多肽可以包含任何氨基酸,包括上述的任何氨基酸。不同的氨基酸序列将以不同的方式影响流经所述孔的电流,因此特定的尾部可以如上所述针对多核苷酸进行设计。上文针对多核苷酸论述的任何实施方案均适用于多肽(用氨基酸替代核苷酸)。

[0179] 所述尾部可以包含PEG。PEG会以特定方式影响流经所述孔的电流。PEG可以用于在尾部中形成一个区域,在适配体结合或未结合所述分析物成员之一时存在于所述孔的桶状结构或通道中。除PEG之外的其他物质可以用在尾部的其他区域中,分别在适配体未结合或结合所述分析物成员之一时存在于所述孔的桶状结构或通道中。

[0180] 所述尾部可以包含聚合物的不同组合。所述尾部优选包含不同聚合物的至少两个区域,所述至少两个区域以不同方式影响流经所述孔的电流,一个区域在适配体未结合至分析物成员之一时位于所述孔中,另一个区域在适配体结合至所述分析物成员时位于所述孔中。下表4概述了一些优选组合。

[0181]

	一个区域	另一个区域
1	多核苷酸	不同多核苷酸
2	多肽	不同多肽
3	多核苷酸	多肽
4	多肽	多核苷酸
5	PEG	多核苷酸
6	多核苷酸	PEG
7	PEG	多肽
8	多肽	PEG

[0182] 所述尾部可具有任何长度。所述尾部优选包含约7至约70个核苷酸长度的多核苷酸,例如约10至约60,约20至约50或约30至约40个核苷酸长度的多核苷酸。

[0183] 所述尾部可以包含实施例中使用的任何多核苷酸。特别是,所述尾部优选包含SEQ ID NO:7至23中任一个的1-30个残基。探针组优选包含的尾部总数对应于ID NO:7至23中任一个的1-30个残基。

[0184] 独特电流

[0185] 每个探针(即每种类型的探针)以独特方式影响流过孔的电流。换言之,一个探针影响流经所述孔的电流的方式区别或不同于不同探针影响流经所述孔的电流的方式。这使得可根据本发明来测定识别每个探针(即每种类型的探针)。然后可如上所述测定所述探针与分析物成员的结合。由于对每个探针的识别以及每个探针与分析物成员的结合均可进行测定,因此可以确定每个分析物成员是否存在。

[0186] 优选每个探针(即每种类型的探针)在结合至所述分析物成员之一时以独特的方式影响流经所述孔的电流。换言之,分析物成员与一个探针结合时影响流经所述孔的电流的方式区别或不同于分析物成员与不同探针结合时影响流经所述孔的电流的方式。不同探针可以结合相同的分析物成员。

[0187] 所述独特方式可能与流经所述孔的电流受到影响的程度有关,即与电流流经与探

针结合的孔时的变化和/或由于结合探针而使电流受到影响的时间(“停留时间”)有关。电流中断的值大于停留时间的值,此时电流中断提供更明显的鲜明特征,而停留时间具有更宽的分布时。所述独特方式可能与流经所述孔的电流变化受影响的程度有关。所述变化可由于分析物成员与探针的结合而增加或减少。当探针与分析物成员之一结合时,可实施对照实验以确保不同探针对流经所述孔的电流有不同影响。当所述探针结合至分析物成员时,所述对照实验还可以帮助确定特定探针对流经所述孔的电流的影响。然后可将测试样本实施本发明方法所得结果与由对照实验所得结果进行比较,以确定某一具体分析物是否存在于所述测试样本中。

[0188] 所述探针之间的独特性可通过它们长度的差异来实现。较长的探针将影响流经孔的电流达较长时间,即更长的停留时间。较短的探针将影响流经所述孔的电流达较少的时间,即较短的停留时间。

[0189] 所述探针之间的独特性可通过它们的适配体和/或尾部来实现。例如,不同适配体与分析物结合的程度不同,即具有不同的结合常数。与分析物成员结合越牢固的适配体阻止探针移动穿过所述孔的时间越长,这可通过测量流经所述孔的电流而确定。反之亦然。即,与分析物成员结合越不牢固的适配体阻止探针移动穿过所述孔的时间越短,这可通过测量流经所述孔的电流而确定。

[0190] 在上述优选实施方案中,当适配体结合分析物成员之一时或当尾部中的双链多核苷酸区域进入所述孔时,尾部的特定区域短暂保持在所述孔的桶状结构或通道中。在所述特定区域中,不同探针之间的差异,例如存在不同聚合物,例如单链和双链DNA,或者相同类型聚合物的不同序列,如,其中一个序列是两个或多个相邻的脱碱基残基,也归因于探针之间的独特性。设计具有所需区别的探针组较为简单。

[0191] 每个探针(即每种类型的探针)还优选在其适配体未结合至分析物成员之一时以独特方式影响流经所述孔的电流。换言之,在不存在分析物成员时,每个探针影响流经所述孔的电流的方式区别或不同于不同探针影响流经所述孔的电流的方式。不同探针可以结合相同的分析物成员。这一“不存在”的独特性还可以增强对不同探针的识别并由此增强识别分析物的能力——尤其是当不同探针结合至相同分析物成员时,并因此增强了测试的多重性质。这一优选的独特性也可以如上述来使用对照实验来确定。

[0192] 探针之间的这一优选的“不存在”的独特性可通过探针长度和/或尾部的不同来实现。如上所述,整个探针在不存在分析物成员的情况下移动穿过所述孔并像它原本那样影响流经所述孔的电流。不同探针(即不同类型的探针)将影响流经所述孔的电流达不同的时间,即,将具有不同的停留时间。如上所述,当适配体没有结合分析物成员或双链多核苷酸区域进入所述孔时,尾部的特定区域短暂保持在所述孔的桶状结构或通道中。在这类特定区域中,不同探针之间的差异,例如存在不同聚合物或相同类型聚合物的不同序列,可归因于探针之间的独特性。如上所述,尾部可以包括双链多核苷酸的一个或多个区域。这使得能对不同探针进行识别。例如,不同尾部可以包含不同数目的这类区域和/或这类不同长度的区域。

[0193] 装置和条件

[0194] 电测量可以使用标准单通道记录设备进行,如Stoddart,D.S.等人,(2009), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of

America 106,p7702-7707,Lieberman KR等人,J Am Chem Soc.2010;132(50):17961-72和国际申请W0-2000/28312中所述。替代地,电测量可以利用多通道系统进行,例如国际申请W0-2009/077734和国际申请W0-2011/067559中所述。

[0195] 所述方法可以使用适于研究其中孔被插入膜中的膜/孔系统的任何装置实施。所述方法可以使用适于跨膜孔传感的任何装置实施。例如,所述装置包括一腔室,所述腔室含有水溶液和将该腔室分成两部分的屏障。所述屏障具有一孔洞,含有孔的所述膜形成在所述孔洞中。

[0196] 所述方法可以使用国际申请No.PCT/GB08/000562(WO 2008/102120)中描述的装置实施。

[0197] 所述方法包括测量流经所述孔的电流。因此所述装置也可以包含能跨膜和孔而施加电位并测量穿过该膜和孔的电信号的电路。所述方法可以使用膜片钳或电压钳实施。所述方法优选包括使用电压钳。

[0198] 所述方法可以在硅基孔阵列上实施,其中每个阵列含有128,256,512,1024或更多个孔。

[0199] 本发明方法可包括测量流经孔的电流。适于测量流经跨膜孔的离子电流的条件是本领域已知的并在实施例中公开。所述方法通常用跨膜和孔施加的电压实施。所用电压通常为+2V到-2V,通常为-400mV到+400mV。所用电压优选在具有以下下限和上限的范围内,所述下限选自-400mV,-300mV,-200mV,-150mV,-100mV,-50mV,-20mV和0mV,所述上限独立地选自+10mV,+20mV,+50mV,+100mV,+150mV,+200mV,+300mV和+400mV。所用电压更优选在100mV到240mV范围内,最优选在120mV到220mV范围内。可通过对孔施加提高的电位来增加对不同核苷酸的识别。

[0200] 所述方法通常在任何载荷子例如金属盐(如碱金属盐)、卤盐(如氯化物盐(如碱金属氯化物盐))的存在下实施。载荷子可包括离子液体或有机盐,例如四甲基氯化铵、三甲基苯基氯化铵、苯基三甲基氯化铵或1-乙基-3-甲基氯化咪唑鎓。在上述示例性装置中,所述盐存在于所述腔室的水溶液中。通常使用氯化钾(KCl)、氯化钠(NaCl)或氯化铯(CsCl)。优选KCl。所述盐浓度可以是饱和的。所述盐浓度可以是3M或更低并且通常为0.1-2.5M,0.3-1.9M,0.5-1.8M,0.7-1.7M,0.9-1.6M或1M-1.4M。所述盐浓度优选为150mM-1M。所述方法优选使用至少0.3M,例如至少0.4M,至少0.5M,至少0.6M,至少0.8M,至少1.0M,至少1.5M,至少2.0M,至少2.5M或至少3.0M的盐浓度实施。高的盐浓度提供高的信噪比并使得能在正常电流波动的背景下来识别电流,所述电流指示结合/未结合。

[0201] 所述方法通常在缓冲剂的存在下实施。在上述示例性装置中,所述缓冲剂存在于所述腔室内的水溶液中。本发明方法中可使用任何缓冲剂。通常,所述缓冲剂为HEPES。另一适宜的缓冲剂为三羟甲基氨基甲烷-HCl(Tris-HCl)缓冲液。所述方法通常在4.0-12.0,4.5-10.0,5.0-9.0,5.5-8.8,6.0-8.7或7.0-8.8或7.5-8.5的pH下实施。所用pH优选约为7.5。

[0202] 所述方法可在0°C-100°C,15°C-95°C,16°C-90°C,17°C-85°C,18°C-80°C,19°C-70°C,或20°C-60°C实施。所述方法通常在室温实施。所述方法可选地在能支持酶功能的温度下,例如约37°C实施。

[0203] 样本和探针组可以在所述膜的任一侧与所述孔接触。所述样本和探针组通常在所

述膜的同一侧与所述孔接触。

[0204] 所述样本和探针组可以任何顺序与所述孔接触。优选的是,所述样本在所述探针组之前或与所述探针组同时与所述孔接触。如果所述探针组在所述样本与所述孔接触之前与所述孔接触,则基本可以确保足够的探针可用于结合分析物成员(并且没有全部经过孔而穿过所述膜)。

[0205] 测量浓度的方法

[0206] 本发明方法优选还包括针对结合一个或多个分析物成员的探针,比较每个探针结合和未结合时流经所述孔的不同电流。这有助于确定样本中存在的分析物成员的浓度,所述浓度一般通过参照校准曲线,使用平衡常数或参照对照数据来确定。计算浓度的方法是本领域公知的。

[0207] 本发明还提供一种确定样本中两个或多个分析物的组的一个或多个分析物成员浓度的方法,所述方法包括:

[0208] (i) 如上所述实施本发明的方法;和

[0209] (ii) 针对显示存在于所述样本中的一个或多个分析物成员,在步骤(b)中将流经所述孔的电流与每个分析物成员的对照或参考数据进行比较,从而确定样本中所述一个或多个分析物成员的浓度。步骤(i)优选包括,针对那些结合有一个或多个分析物成员的探针,比较每个探针结合和未结合时流经所述孔的不同电流。对照或参考数据可通过实施对照实验而产生,在所述对照实验中使用分析物成员的已知浓度来校正该测试。这描述于实施例2中。

[0210] 探针组和试剂盒

[0211] 本发明还提供一种用于确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在以及存在时的浓度的探针组。所述探针组包含两个或多个探针,

[0212] 其中每个探针识别所述分析物成员中的一个或多个并包含(i)适配体,其结合至所述分析物成员中的一个或多个,和(ii)尾部,其能进入跨膜孔并根据所述探针中的适配体是否结合至所述分析物成员之一而对流经所述孔的电流具有不同影响,

[0213] 其中每个探针以独特的方式影响流经所述孔的电流,且

[0214] 其中所述两个或多个分析物的组中的每个分析物成员通过所述探针组中的至少一个探针进行识别。上述关于本发明方法的任何实施方案同样适用于本发明探针组。所述探针组中的每个探针优选还包括能使所述探针偶联至膜的化学基团。所述化学基团优选为胆固醇。

[0215] 本发明还提供了用于确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在以及存在时的浓度的试剂盒。所述试剂盒包含(a)本发明的探针组,和(b)跨膜孔。上述关于本发明方法的任何实施方案同样适用于所述试剂盒。

[0216] 所述试剂盒还可以包括膜的组分,例如形成两性分子层(如脂质双分子层)所需的磷脂。

[0217] 本发明的试剂盒可另外包括一个或多个能实施上述任何实施方案的其他试剂或仪器。所述试剂或仪器包括以下的一个或多个:合适的缓冲剂(水溶液)、用于从受体获得样本的工具(例如导管或含有针的仪器)、用于扩增和/或表达多核苷酸的工具、上文定义的膜,或者电压钳或膜片钳装置。可以存在于所述试剂盒中的试剂可以是干态的,使得液体样

本使该试剂重悬 (resuspend)。可选地,所述试剂盒还可包括能使该试剂盒在本发明方法中使用的仪器或关于该方法可以用于哪种病人的说明书。可选地,所述试剂盒可包括核苷酸。

[0218] 装置

[0219] 本发明还提供了用于确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在以及存在时的浓度的装置。所述装置包括本发明的多个孔和探针组。所述装置优选还包括用于实施本发明方法的说明书。所述装置可以是用于多核苷酸分析的任何常规装置,例如阵列或芯片。上述关于本发明方法的任何实施方案同样适用于本发明的装置。

[0220] 所述装置优选设置成用于实施本发明方法。

[0221] 所述装置优选包括:

[0222] 传感器装置,能支撑所述膜和多个孔,并可操作地使用所述孔来表征分析物成员;

[0223] 至少一个存储器,容纳用于实施表征的物质;

[0224] 流体学系统,配置成从所述至少一个存储器可控地向所述传感器装置供应物质;
和

[0225] 多个容器,用于接收各样本,所述流体学系统被配置成选择性地从所述容器向所述传感器装置供应所述样本。所述装置可以是国际申请No.PCT/GB08/004127(公布号W0 2009/077734),PCT/GB10/000789(公布号W02010/122293),国际申请No.PCT/GB10/002206(not yet published)或国际申请No.PCT/US99/25679(公布号W0 00/28312)中描述的任何装置。

[0226] 以下实施例用于说明本发明。

[0227] 实施例1

[0228] 该实施例说明了如何使用纳米孔检测蛋白质凝血酶的存在。

[0229] 材料和方法

[0230] 使用镀银的标准128孔硅芯片(规格为75 μ m直径,20 μ m深度和250 μ m节距(pitch))获得各电测量值(WO 2009/077734)。首先用20mL乙醇,然后用20mL dH₂O,然后用20mL乙醇洗涤芯片,之后用CF₄等离子体处理。然后将所用芯片通过浸涂进行预处理,真空密封并在4 $^{\circ}$ C储存。在使用之前,将所述芯片温热至室温至少20分钟。

[0231] 通过将一系列溶解于1M KCl,10mM Tris(三羟甲基氨基甲烷)中的3.6mg/mL 1,2-二植烷酰-甘油-3-磷酸胆碱脂质块(DPhPC,Avanti Polar Lipids,AL,USA)在pH 7.5下以0.45 μ L/s穿过所述芯片而形成双分子层。首先使脂质块(250 μ L)流穿所述芯片,之后使100 μ L的空气团穿过所述芯片。然后进一步使155 μ L和150 μ L的两个脂质溶液在所述芯片上流经,每个脂质溶液由100 μ L的空气团分隔开。双分子层形成之后,将所述腔室用3mL缓冲剂以3 μ L/s的流速冲洗。用1.0pF积分电容在10kHz下对所述双分子层形成物实施电记录。

[0232] 使用 α HL-(E111N/K147N)₇(NN)(SEQ ID NO:2)(Stoddart,D.S.,等人,(2009),Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106,p7702-7707)在1M KCl,25mM Tris pH 7.5下制备生物纳米孔的溶液。施加+180mV的保持电位,并使所述溶液从所述芯片上流过。使孔进入双分子层直到达到10%的占据率(12个单孔)。然后将采样率减小到7kHz,电位减小到零,并使积分电容保持在1.0pF。

[0233] 运行控制程序5分钟,所述控制程序循环经过正保持电位周期之后循环经过未施加电位的休眠期。所述控制程序施加10秒的0mV电位,之后进一步施加50秒的+170mV电位,

并重复该循环多达20次。

[0234] 五分钟后, 停止操作 (script), 并吸量1M KCl, 10mM Tris pH 7.5中的5A15x10A_TBA (SEQ ID NO:7, 1.25 μ M) 移到所述腔室中。然后运行控制程序共计15分钟。其后, 将5A15x10A_TBA (1.25 μ M) 和凝血酶 (1 μ M) (Cat No. T6884, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) ——它们已经一起在1M KCl, 10mM Tris中和pH 7.5下预培养了最少5分钟——流入所述腔室中, 并进一步运行控制程序15分钟。在实验结束时, 停止所述控制程序。

[0235] 讨论

[0236] 使用上述方法可以在凝血酶存在和不存在的条件下检测特征阻断水平。在添加探针5A15x10A_TBA (SEQ ID NO:7) 之后, 仅观察到水平1下的阻断水平 (见图2a)。而当探针5A15x10A_TBA已用凝血酶预培养后, 还检测到另一水平 (水平2; 图2b)。在凝血酶结合至探针5A15x10A_TBA时, 检测到高于平均值的电流, 表明脱碱基区域 (x) 位于 β -桶状结构内。所述两个水平之间的差值为30.5pA (图2b)。用SEQ ID NO:8-18 (8=11x19A_TBA, 9=13x17A_TBA, 10=15x15A_TBA, 11=17x13A_TBA, 12=19x11A_TBA, 13=21x9A_TBA, 14=23x7A_TBA, 15=25x5A_TBA, 16=27x3A_TBA, 17=29x1A_TBA, 18=30x0A_TBA) 实施相同的实验。

[0237] 实施例2

[0238] 该实施例说明了如何使用纳米孔检测溶液中蛋白质凝血酶的浓度。

[0239] 材料和方法

[0240] 使用镀银的标准128孔硅芯片 (规格为75 μ m直径, 20 μ m深度和250 μ m节距) 获得各电测量值 (WO 2009/077734)。为实施确定凝血酶浓度的实验, 实施与实施例1中所述相同的实验过程 (使用纳米孔 α HL- (E111N/K147N)₇ (SEQ ID NO:2) 和缓冲液1M KCl, 10mM TRIS pH 7.5), 运行相同的控制程序 (0mV下10秒, 170mV下50秒——重复多达20次) 5分钟。

[0241] 五分钟之后, 停止操作, 并吸量1M KCl, 10mM Tris pH 7.5中的5A15x10A_TBA (1.25 μ M) 移到所述腔室中。然后运行控制程序共计15分钟。其后, 将5A15x10A_TBA (SEQ ID NO:7, 1.25 μ M) 和凝血酶 (100nM) (Cat No. T6884, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) ——它们已经一起在1M KCl, 10mM Tris中和pH 7.5下预培养了至少5分钟——流入所述腔室中, 并进一步运行控制程序15分钟。然后用5A15x10A_TBA (1.25 μ M) 和凝血酶 (250nM) ——它们已经在1M KCl, 10mM Tris中和pH 7.5下预培养了最少5分钟——的溶液替换在所述芯片上的全部溶液体积, 并进一步运行控制程序15分钟。针对500nM, 750nM和1250nM浓度的凝血酶重复该过程。在实验结束时, 停止所述控制程序。

[0242] 讨论

[0243] 使用上述方法可以测量与凝血酶结合至探针5A15x10A_TBA (SEQ ID NO:7) 相对应的事件频率 (见图2)。然后使用该数据与阻断事件的总数相比, 得到凝血酶vs. 凝血酶结合事件比率的校准曲线 (结合和未结合的组合), 见图3。然后使用这些校准曲线来确定未知凝血酶样本的浓度。

[0244] 实施例3

[0245] 该实施例说明了如何使用纳米孔通过利用明显更低浓度的凝血酶结合探针来检测蛋白质凝血酶的存在。

[0246] 材料和方法

[0247] 使用镀银的标准128孔硅芯片 (规格为75 μ m直径, 20 μ m深度和250 μ m节距) 获得各电

测量值(WO 2009/077734)。为使用低得多的浓度的胆固醇标签的探针实施检测凝血酶的实验(SEQ ID NO:19,其3'端具有胆固醇TEG),实施与实施例1中所述相同的实验过程(使用纳米孔 α HL-(E111N/K147N)₇(NN)(SEQ ID NO:2)和缓冲液1M KCl,10mM Tris pH7.5),运行初始的控制程序(0mV下10秒,170mV下50秒——重复多达20次)5分钟。

[0248] 实施与实施例1中所述相同的操作步骤,不同在于,使用更低浓度的不同适配体(仅适配体的运行=15x15A_TBA_3' CholTEG (100pM)在1M KCl,10mM Tris中和pH 7.5下,适配体加凝血酶的运行=15x15A_TBA_3' CholTEG (100pM)和凝血酶(100nM)(Cat No.T6884, Sigma-Aldrich,Dorset,UK))。

[0249] 讨论

[0250] 使用上述方法可以通过使用明显更低浓度的探针15x15A_TBA_3' CholTEG(SEQ ID NO:19,其3'端具有胆固醇TEG)在存在和不存在凝血酶的情况下测定特征阻断水平。在上述实施例中,可以使用探针15x15A_TBA_3' CholTEG观察到水平1,当用凝血酶预培养探针15x15A_TBA_3' CholTEG时,观察到水平1和2(图4)。仅使用100pM浓度的胆固醇标签的探针15x15A_TBA_3' CholTEG时观察到阶段水平的变化。该浓度比实施例2中所测试的低很多。

[0251] 实施例4

[0252] 该实施例说明了如何使用纳米孔通过利用许多不同的结合凝血酶的探针来检测蛋白质凝血酶的存在,所述探针各自产生自己独特的阶段水平信号。

[0253] 材料和方法

[0254] 使用镀银的标准128孔硅芯片(规格为75 μ m直径,20 μ m深度和250 μ m节距)获得各电测量值(WO 2009/077734)。为了实施使用多种不同的探针来检测凝血酶的实验,实施与实施例1中所述相同的实验过程(使用纳米孔 α HL-(E111N/K147N)₇(NN)(SEQ ID NO:2)和缓冲液1M KCl,10mM Tris pH 7.5),运行相同的初始控制程序(0mV下10秒,170mV下50秒——重复多达20次)5分钟。

[0255] 五分钟之后,停止操作,并吸量在1M KCl,10mM Tris pH 7.5中的探针5A15x10A_TBA(SEQ ID NO:7,310nM),19x11A_TBA(SEQ ID NO:12,310nM),17x13A_TBA(SEQ ID NO:11,310nM)和15x15A_TBA(SEQ ID NO:10,310nM)移到所述腔室中。然后运行控制程序共计20分钟。其后,将分析物5A15x10A_TBA(310nM),19x11A_TBA(310nM),17x13A_TBA(310nM)和15x15A_TBA(310nM)以及凝血酶(1.25 μ M)(Cat No.T6884,Sigma-Aldrich,Dorset,UK)——它们已经一起在1M KCl,10mM Tris中和pH 7.5下预培养了最少5分钟——流入所述腔室中,并进一步运行控制程序20分钟。在实验结束时,停止所述控制程序。

[0256] 讨论

[0257] 使用上述方法可以检测存在和不存在凝血酶的情况下使用的每个探针的独特阶段水平(见图5)。该实验表明,观察到的阶段水平对探针尾部序列具有特异性,因此可以使用多个探针尾部检测多于一个的蛋白质。

[0258] 实施例5

[0259] 该实施例说明了如何使用纳米孔来检测溶液中的血小板衍生生长因子(PDGF)。

[0260] 材料和方法

[0261] 由插入1,2-二植烷酰-甘油-3-磷酸胆碱脂质(Avanti Polar Lipids)双分子层中的单个 α HL-(E111N/K147N)₇(NN)(SEQ ID NO:2)纳米孔获得电测量值。双分子层通过

Montal-Mueller技术穿过20 μ m厚的PTFE中的 \sim 100 μ m直径的孔洞而形成(在常规的Delrin腔室中),分成两个1mL的缓冲溶液(1M KCl,10mM Tris pH 7.5)。通过装配有1440A数字转换器的Axopatch 200B放大器(Molecular Devices)测量单通道电流。将Ag/AgCl电极连接至缓冲溶液,使得顺式隔室(添加有纳米孔、探针和PDGF)被连接到Axopatch headstage的接地端,并且反式隔室连接到所述headstage的活性电极。

[0262] 在所述双分子层中实现单孔之后,在+180mV的施加电位下运行对照实验5分钟。然后停止操作,并将在1M KCl,10mM Tris pH 7.5缓冲剂中的探针17x8A_PDGF (SEQ ID NO: 20,0.5 μ M)添加到电生理学室的顺式隔室中进行20分钟实验。如果检测到长的阻断事件(>15秒),则将电位翻转为-180mV以手动喷出阻断分析物。然后停止操作,然后将探针17x8A_PDGF (0.5 μ M)和PDGF (1 μ M) (Biorbyt,Cat No:orb80544,Cambridge,UK)——它们已经在1M KCl,10mM Tris pH 7.5缓冲液中一起预培养了最少5分钟——添加到顺式隔室,进一步运行该实验20分钟。再通过翻转施加电位除去长期阻断事件。在实验结束时,停止控制程序。

[0263] 讨论

[0264] 使用上述方法可以在PDGF存在和不存在的条件下检测特征阶段水平。通过使用探针17x8A_PDGF (SEQ ID NO:20),观察到水平1下的阻断水平(见图6a)。而当经17x8A_PDGF预培养的PDGF被添加到实验溶液中时,还可以检测到(水平2)(见图6b)。图7a和7b表明,当使用另一探针

[0265] 25x_PDGF (SEQ ID NO:21)时,在存在和不存在PDGF的情况下产生阶段水平。

[0266] 实施例6

[0267] 该实施例说明了如何使用纳米孔来检测溶液中PDGF的浓度。

[0268] 材料和方法

[0269] 使用镀银的标准128孔硅芯片(规格为75 μ m直径,20 μ m深度和250 μ m节距)获得各电测量值(WO 2009/077734)。为实施能确定PDGF的浓度的实验,实施与实施例1中所述相同的实验建立过程(使用纳米孔 α HL-(E111N/K147N)₇(NN) (SEQ ID NO:2)和缓冲液1M KCl,10mM Tris pH7.5),运行相同的初始控制程序(0mV下10秒,170mV下50秒——重复多达20次)5分钟。

[0270] 五分钟之后,停止操作,并吸量在1M KCl,10mM Tris pH 7.5中的25x_PDGF (SEQ ID NO:21,0.5 μ M)移到所述腔室中。然后运行控制程序共计10分钟。其后,将25x_PDGF (0.5 μ M)和PDGF (10nM) (Biorbyt,Cat No:orb80544,Cambridge,UK)——它们已经在1M KCl,10mM Tris pH 7.5中一起预培养了最少5分钟——流入所述腔室中,运行控制程序10分钟。然后用25x_PDGF (0.5 μ M)和PDGF (33nM)——它们已经在1M KCl,10mM Tris中pH 7.5下一起预培养了最少5分钟——的溶液替换在所述芯片上的全部溶液体积,并进一步运行控制程序10分钟。针对100nM,330nM和1 μ M浓度的PDGF重复该过程。在实验结束时,停止所述控制程序。

[0271] 讨论

[0272] 使用上述方法可以测量与PDGF结合至探针25x_PDGF (SEQ ID NO:21,见图7a和图7b)相对应的事件频率。然后使用该数据与阻断事件的总数相比,得到PDGF浓度vs.仅PDGF结合事件比率的校准曲线(PDGF结合和未结合的组合),见图8。然后使用该校准曲线来确定未知PDGF样本的浓度。

[0273] 实施例7

[0274] 该实施例说明了如何使用蛋白纳米孔来检测溶液中ATP的存在。

[0275] 材料和方法

[0276] 按实施例5中所述得到各电测量值,以实现单孔(使用纳米孔 α HL-(E111N/K147N)₇(NN)(SEQ 1D NO:2)和缓冲液1M KCl,10mM Tris pH 7.5)插入到脂质双分子层中,然后在+180mV的施加电位下,实施对照实验5分钟。实施与实施例5中相同的操作步骤,不同在于,使用不同的适配体来检测ATP而不是PDGF。对于仅适配体的运行,在本实施例中使用的适配体为在1M KCl,10mM Tris pH 7.5中的25x_ATP(SEQ 1D NO:22,0.5 μ M),对于适配体加ATP的运行,使用以下浓度的试剂:25x_ATP(SEQ 1D NO:22,0.5 μ M)和ATP(10mM)(Cat No:A6559, Sigma-Aldrich, Dorset, UK)。

[0277] 讨论

[0278] 使用上述方法可以在ATP存在和不存在的条件下检测特征阻断水平。通过使用探针25x_ATP(SEQ 1D NO:22),观察到水平1下的阻断水平(见图9a)。而当用ATP预培养探针25x_ATP后,还检测到另外的水平(水平2;见图9b)。在ATP的情况下,由探针移位产生的事件极短,该事件与结合的ATP相对应并且明显更长(见图9b)。图10a和10b表明,当使用探针17x8A_ATP(SEQ 1D NO:23)时,在存在和不存在ATP情况下产生阶段水平。

[0279] 实施例8

[0280] 该实施例说明了如何使用蛋白纳米孔来检测溶液中ATP的浓度。

[0281] 材料和方法

[0282] 按实施例5中所述得到各电测量值,以实现单孔(使用纳米孔 α HL-(E111N/K147N)₇(NN)(SEQ 1D NO:2)和缓冲液1M KCl,10mM Tris pH 7.5)插入到脂质双分子层中,然后在+180mV的施加电位下,实施对照实验5分钟。然后停止操作,并将在1M KCl,10mM TRIS pH 7.5缓冲液中的探针17x8A_ATP(SEQ 1D NO:23,0.5 μ M)添加到电生理学室的顺式隔室中并进行20分钟实验。如果检测到长的阻断事件(>15秒),则将电位翻转为-180mV以手动喷出阻断分析物。然后停止操作,然后将探针17x8A_ATP(0.5 μ M)和ATP(1 μ M)(Cat No:A6559, Sigma-Aldrich, Dorset, UK)——它们已经在1M KCl,10mM TRIS pH 7.5缓冲液中一起预培养了最少5分钟——添加到顺式隔室,进一步运行该实验10分钟。对3.3 μ M,10 μ M和100 μ M浓度的ATP重复该过程。在实验结束时,停止控制程序。

[0283] 讨论

[0284] 使用上述方法可以测量与ATP结合至探针17x8A_ATP(SEQ 1D NO:23,见图10a和图10b)相对应的事件频率。然后使用该数据与阻断事件的总数相比,得到ATP浓度vs ATP结合事件比率的校准曲线(ATP结合和未结合的组合),见图11。然后使用该校准曲线来确定未知ATP样本的浓度。对作为凝血酶的ATP,观察到类似的事件比率的增加,不同在于,需要添加更高浓度的ATP,因为ATP具有在微摩尔范围内的K_d值(图11)。

[0285] 实施例9

[0286] 该实施例说明了如何使用纳米孔来检测溶液中多于一个的分析物的存在(例如ATP,PDGF和凝血酶)。

[0287] 材料和方法

[0288] 按实施例5中所述得到各电测量值,以实现单孔(使用纳米孔 α HL-(E111N/K147N)₇

(NN) (SEQ ID NO:2) 和缓冲液1M KCl, 25mM Tris pH 7.5) 插入到脂质双分子层中, 然后运行对照程序 (0mV下10秒, +180mV下50秒——重复多达20次) 5分钟。然后停止操作, 并将1M KCl, 25mM TRIS pH 7.5缓冲液中的探针15x15A_TBA (SEQ ID NO:10, 166nM), 17x8A_PDGF (SEQ ID NO:20, 166nM) 和17x8A_ATP (SEQ ID NO:23, 166nM) 添加到电生理学室的顺式隔室中并运行对照程序10分钟。然后将ATP (10mM) (Cat No:A6559, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 添加到所述顺式隔室并进一步运行对照程序10分钟。对1 μ M, PDGF (Biorbyt, Cat No: orb80544, Cambridge, UK) 和0.5 μ M凝血酶 (Cat No. T6884, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 重复该过程。在实验结束时, 停止控制程序。

[0289] 讨论

[0290] 使用上述方法可以检测所有三个分析物在存在于溶液中时的特征阶段水平的变化。在上述实验中注意到了在分别测试时曾观察到的每个分析物的所有三个阶段信号 (见图12)。ATP和PDGF二者均产生比凝血酶短的结合事件, 这很可能是由于缺少与这些分析物的四链体结构 (quadruplex structure)。因此, 使用该方法可以检测未知混合物中的所述三种分析物中的任意一个。

[0291] 实施例10

[0292] 该实施例说明了如何将针对多个浓度的凝血酶确定的实验事件的比率与理论计算事件的比率相比较。

[0293] 材料和方法-实验数据的采集

[0294] 按实施例5中所述得到各电测量值, 以实现单孔 (使用纳米孔 α HL-(E111N/K147N)₇ (NN) (SEQ ID NO:2) 和缓冲液1M KCl, 10mM Tris pH 7.5) 插入到脂质双分子层中, 然后运行对照程序 (0mV下10秒, +180mV下50秒——重复多达20次) 5分钟。其后, 将5A15x10A_TBA (SEQ ID NO:7, 1.25 μ M) 和凝血酶 (10nM) (Cat No. T6884, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) ——它们已经一起在1M KCl, 10mM Tris中和pH 7.5下预培养了至少5分钟——流入所述腔室中, 并进一步运行控制程序15分钟。然后用5A15x10A_TBA (1.25 μ M) 和凝血酶 (33nM) ——它们已经在1M KCl, 10mM Tris中和pH 7.5下一起预培养了最少5分钟——的溶液替换在所述芯片上的全部溶液体积, 并进一步运行控制程序15分钟。针对100nM, 330nM和1000nM浓度的凝血酶重复该过程。在实验结束时, 停止所述控制程序。

[0295] 理论计算

[0296] 使用以下方程式计算解离常数:

$$[0297] \quad K_d = \frac{[P][L]}{[C]}$$

[0298] 其中 [P] = 蛋白质的摩尔平衡浓度, [L] = 适配体的摩尔平衡浓度, [C] = 蛋白质-适配体复合物的摩尔平衡浓度。

[0299] 已知凝血酶与其适配体结合的 K_d 为 \sim 50nM。P和L的起始浓度值是已知的, 可使用它们通过求解以下方程式 (其中 x = 蛋白质-适配体复合物的摩尔数) 来计算摩尔平衡浓度。

$$[0300] \quad K_d = \frac{([P_{\text{初始}}] - x) \cdot ([L_{\text{初始}}] - x)}{x}$$

[0301] 对于P和L的多个初始浓度, 上述二次方程式可以重新排列和求解 (来确定 x 的值)。

然后将这些值绘制得到所述事件比率对凝血酶浓度的理论校准曲线。图13中的校准曲线示出了理论计算值(以黑线示出)和实验观察值(灰色条形图示出)。从该图中清楚看出,理论值与实验确定值紧密吻合。

[0302] 实施例11

[0303] 该实施例说明了如何使用蛋白纳米孔来检测链霉亲和素蛋白质的存在。

[0304] 材料和方法

[0305] 使用标准128孔硅芯片(规格为75 μ m直径,20 μ m深度和250 μ m节距)获得各电测量值(WO 2009/077734),所述芯片在每个孔结构中具有铂电极。为了使用探针实施测定链霉亲和素的实验,实施与实施例1中所述相同的实验(使用纳米孔 α HL-(E111N/K147N)₇(NN)(SEQ ID NO:2)和缓冲液625mM NaCl,100mM HEPES,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾,pH 8.0),运行相同的初始控制程序(0mV下10秒,170mV下50秒——重复多达20次)5分钟。

[0306] 实施与实施例1中所述相同的操作步骤,不同在于,使用不同的适配体(仅适配体的运行=链球菌探针1(SEQ ID NO:24,1.0 μ M)在625mM NaCl,100mM HEPES,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾中和pH 8.0下,适配体加链霉亲和素的运行=链球菌探针1(SEQ ID NO:24,1.0 μ M)和链霉亲和素(5.0nM)(Sigma Aldrich))。

[0307] 讨论

[0308] 使用上述方法可以在存在(图14b)和不存在(图14a)链霉亲和素的情况下检测特征阻断水平。在添加链球菌探针1(SEQ ID NO:24)后,仅观察到水平1下的阻断水平(见图14a)。而当链球菌探针1已用链霉亲和素进行了预培养时,还检测到另一水平(水平2;图14b)。图15示出了在存在(2)和不存在(1)链霉亲和素的情况下观察到的适配体序列链球菌探针1(SEQ ID NO:24)的不同阻断水平的透视图(对于(a)和(b),y轴=电流(pA),x轴=时间(s))。

[0309] 实施例12

[0310] 该实施例说明了纳米孔如何检测K2EDTA(Harlan Scientific,编码-S.B-0009)中含有20%全兔血的样本中的蛋白质凝血酶、PDGF和ATP的存在。

[0311] 材料和方法

[0312] 使用镀铂的标准128孔硅芯片(规格为75 μ m直径,20 μ m深度和250 μ m节距)获得各电测量值(WO 2009/077734)。为了实施检测K2EDTA(Harlan Scientific,编码-S.B-0009)中含有20%全兔血的样本中的蛋白质凝血酶、PDGF和ATP的存在的实验。实施与实施例1中所述相同的实验过程(使用纳米孔 α HL-(E111N/K147N)₇(NN)和缓冲液625mM KCl,100mM HEPES,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾,pH8.0),运行相同的初始控制程序(0mV下10秒,170mV下50秒——重复多达20次)3分钟。

[0313] 三分钟之后,停止操作,并使27x3A_TBA(SEQ ID NO:16,125nM),17x8A_PDGF(SEQ ID NO:20,125nM)和25x_ATP(SEQ ID NO:22,125nM),凝血酶(1 μ M)(Cat No.T6884,Sigma-Aldrich,Dorset,UK),PDGF(1 μ M)和ATP(10mM)——在添加至所述腔室之前已在20%全兔血、80%K2EDTA(Harlan Scientific,编码-S.B-0009)的缓冲液(625mM KCl,100mM HEPES,75mM亚铁氰化钾,25mM铁氰化钾pH8.0)中一起预培养了最少5分钟——流入所述腔室中,并运行控制程序。在实验结束时,停止所述控制程序。

[0314] 讨论

[0315] 使用上述方法可以检测所有三个分析物在存在于20%全兔血、80%K₂EDTA (Harlan Scientific, 编码-S.B-0009)的缓冲液中时的特征阶段水平的变化。

序列表

	<110> 牛津纳米孔技术公司	
	<120> 适配体方法	
	<130> N.115951A	
	<150> 61/599,240	
	<151> 2012-02-15	
	<160> 24	
	<170> PatentIn version 3.5	
[0001]	<210> 1	
	<211> 885	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> α -溶血素突变体 (E111N/K147N)	
	<400> 1	
	atggcagatt ctgatattaa tattaaaacc ggtactacag atattggaag caatactaca	60
	gtaaaaacag gtgatttagt cacttatgat aaagaaaatg gcatgcacaa aaaagtattt	120
	tatagtttta tegatgataa aaatcacaat aaaaaactgc tagttattag aacaaaaggt	180
	accattgctg gtcaatatag agtttatagc gaagaaggtg ctaacaaaag tggtttagcc	240

	tggecttcag cctttaaggt acagttgcaa ctacctgata atgaagtagc tcaaatact	300
	gattactate caagaaattc gattgataca aaaaactata tgagtacttt aacttatgga	360
	ttcaacggta atgttaactgg tgatgataca ggaaaaattg gcggccttat tgggtcaa	420
	gtttcgattg gtcatacaact gaactatggt caacctgatt tcaaaacaat ttagagagc	480
	ccaactgata aaaaagtagg ctggaaagtg atatttaaca atatggtgaa tcaaaattgg	540
	ggaccatacg atcgagattc ttggaacccg gtatatggca atcaactttt catgaaaact	600
	agaaatgggt ctatgaaage agcagataac ttccttgatc ctaacaaage aagtctct	660
[0002]	ttatcttcag ggttttcacc agacttcgct acagttatta ctatggatag aaaagcatcc	720
	aaacaacaaa caaatataga tgtaataac gaacgagttc gtgatgatta ccaattgcat	780
	tggacttcaa caaattggaa aggtaccaat actaaagata aatggacaga tegtcttca	840
	gaaagatata aaatcgattg ggaaaaagaa gaaatgacaa attaa	885

<210> 2

<211> 293

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -溶血素突变体 (E111N/K147N)

<400> 2

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser
1 5 10 15

Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn
 20 25 30

Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His
 35 40 45

[0003]

Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln
 50 55 60

Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp
65 70 75 80

Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala
 85 90 95

Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Asn Tyr
 100 105 110

Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp
115 120 125

Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His
130 135 140

Thr Leu Asn Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro
145 150 155 160

[0004] Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn
165 170 175

Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp
195 200 205

Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe
210 215 220

Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys
 225 230 235 240

Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr
 245 250 255

Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp
 260 265 270

Lys Trp Thr Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys
 275 280 285

[0005]

Glu Glu Met Thr Asn
 290

<210> 3

<211> 903

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> γ -溶血素的 LukF 亚基

<400> 3

atggcggaag gcaaaatac cccggttagc gtgaaaaaag ttgatgacaa agtgaccctg 60

	tataaaacga cggcgacggc ggatagcgat aaatttaaaa ttagccagat cctgaccttc	120
	aacttcatca aagacaaatc ttatgataaa gacaccctgg ttctgaaage gacgggcaac	180
	atcaatagecg gttttgtcaa accgaacccg aatgattacg acttctcaaa actgtattgg	240
	ggegccaaat acaatgtctc gattagctct cagagtaacg attccgtgaa tgcgggtgac	300
	tatgccccga aaaacaaaaa cgaagaatc caggttcaaa acaccctggg ttacacgttc	360
	ggcggtgata ttcaatctc gaatggcctg agtggcggtc tgaacggtaa taccgcattt	420
	tccgaaacga ttaactataa acaggaaage taccgtacce tgtctcgcaa cacgaattat	480
[0006]	aaaaacgtcg getgggggtgt ggaagegcac aaaatcatga atggetgggg tccgtatggc	540
	cgatgattcct tteaccggac ctacggcaac gaactgttcc tggcaggtcg ccagagttcc	600
	gcgtatgccg gtcaaaaattt tattgtcag catcaaatgc cgtctctgag ccgttetaac	660
	ttaatccgg aattctctc agtctctcag caccgtcagg atcgcgcgaa aaaatctaaa	720
	atcaccgtta cgtaccageg tgaaatggac ctgtaccaaa tccgtggaa tggcttetat	780
	tgggcaggtg ctaactacaa aaattttaa acccgcacgt tcaaatctac ctatgaaatc	840
	gattgggaaa atcacaagt caaactctg gacaccaag aaaccgaaaa caacaaataa	900
	taa	903

<210> 4

<211> 298

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> γ -溶血素的 LukF 亚基

<400> 4

Ala Glu Gly Lys Ile Thr Pro Val Ser Val Lys Lys Val Asp Asp Lys

1 5 10 15

[0007]

Val Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe Lys

20 25 30

Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp

35 40 45

Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys Ala Thr Gly Asn Ile Asn Ser Gly Phe

50 55 60

Val Lys Pro Asn Pro Asn Asp Tyr Asp Phe Ser Lys Leu Tyr Trp Gly

65 70 75 80

Ala Lys Tyr Asn Val Ser Ile Ser Ser Gln Ser Asn Asp Ser Val Asn

85 90 95

Ala Val Asp Tyr Ala Pro Lys Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln

100 105 110

Asn Thr Leu Gly Tyr Thr Phe Gly Gly Asp Ile Ser Ile Ser Asn Gly

115 120 125

[0008]

Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly Asn Thr Ala Phe Ser Glu Thr Ile Asn

130 135 140

Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg Thr Leu Ser Arg Asn Thr Asn Tyr Lys

145 150 155 160

Asn Val Gly Trp Gly Val Glu Ala His Lys Ile Met Asn Gly Trp Gly

165 170 175

Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Phe His Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe

180 185 190

Leu Ala Gly Arg Gln Ser Ser Ala Tyr Ala Gly Gln Asn Phe Ile Ala
195 200 205

Gln His Gln Met Pro Leu Leu Ser Arg Ser Asn Phe Asn Pro Glu Phe
210 215 220

Leu Ser Val Leu Ser His Arg Gln Asp Arg Ala Lys Lys Ser Lys Ile
225 230 235 240

Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu Met Asp Leu Tyr Gln Ile Arg Trp Asn
245 250 255

[0009]

Gly Phe Tyr Trp Ala Gly Ala Asn Tyr Lys Asn Phe Lys Thr Arg Thr
260 265 270

Phe Lys Ser Thr Tyr Glu Ile Asp Trp Glu Asn His Lys Val Lys Leu
275 280 285

Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu Asn Asn Lys
290 295

<210> 5

<211> 849

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> γ -溶血素的 Hlg2 亚基

<400> 5

atggaaaaca aaatcgaaga catcggtcaa ggcgctgaaa tcatcaaacg cacgcaggac 60

attaccteta aacgtctggc tattaaccag aatattcaat tcgatttctg gaaagacaaa 120

aaatacaaca aagatgcact ggtgggtaaa atgcagggtt ttatcagctc tegtaccacg 180

tacagegate tgaaaaaata tccgtacatt aaacgeatga tetggccgtt ccagtacaac 240

[0010]

attagtctga aaaccaaaga ttccaacgtg gacctgatta attacctgcc gaaaaacaaa 300

atcgatagtg cggacgttcc ccagaaactg ggcataaaca ttggcggtaa ttttcaatca 360

gccccgtcga tccggcgtag tggttccttc aattactcaa aaaccatctc gtacaaccag 420

aaaaattacg ttacggaagt cgaaagccaa aactctaaag gcgtgaaatg ggggtgtaaa 480

gcgaattcat ttgtacccc gaacggccag gtgtcggcgt atgatcagta cctgtttgca 540

caagaccega cgggtccggc agcaegtgat tatttcttcc cggacaatca gctgccgccc 600

ctgatcaaaa gcggetttaa cccgtcttcc atcaccacgc tgtcccatga acgtggcaaa 660

ggtgataaaa gcgaatttga aattacctat ggtcgcaca tggatgcaac ctatgettac 720

gttacgcgtc atgcctggc agtcgatcgt aaacacgacg cttcaaaaa cegcaatgc 780

accgtgaaat acgaagtcaa ctggaaaacg cacgaagtca aatcaaaaag tateacgccg 840

aaataataa 849

<210> 6

<211> 280

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0011] <223> γ -溶血素的 HIg2 亚基

<400> 6

Glu Asn Lys Ile Glu Asp Ile Gly Gln Gly Ala Glu Ile Ile Lys Arg
1 5 10 15

Thr Gln Asp Ile Thr Ser Lys Arg Leu Ala Ile Thr Gln Asn Ile Gln
 20 25 30

Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Val Val
 35 40 45

Lys Met Gln Gly Phe Ile Ser Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Asp Leu Lys
50 55 60

Lys Tyr Pro Tyr Ile Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile
65 70 75 80

Ser Leu Lys Thr Lys Asp Ser Asn Val Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Pro
85 90 95

Lys Asn Lys Ile Asp Ser Ala Asp Val Ser Gln Lys Leu Gly Tyr Asn
100 105 110

[0012]

Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Ser Gly Ser
115 120 125

Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Asn Tyr Val Thr
130 135 140

Glu Val Glu Ser Gln Asn Ser Lys Gly Val Lys Trp Gly Val Lys Ala
145 150 155 160

Asn Ser Phe Val Thr Pro Asn Gly Gln Val Ser Ala Tyr Asp Gln Tyr
165 170 175

Leu Phe Ala Gln Asp Pro Thr Gly Pro Ala Ala Arg Asp Tyr Phe Val

180 185 190

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Ile Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser

195 200 205

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Arg Gly Lys Gly Asp Lys Ser Glu

210 215 220

[0013]

Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Ala Thr Tyr Ala Tyr Val

225 230 235 240

Thr Arg His Arg Leu Ala Val Asp Arg Lys His Asp Ala Phe Lys Asn

245 250 255

Arg Asn Val Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu Val

260 265 270

Lys Ile Lys Ser Ile Thr Pro Lys

275 280

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(20)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 7

[0014]

aaaaannnnn nnnnnnnnnn aaaaaaaaaa ggttggtgtg gttgg

45

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(11)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 8

nnnnnnnnnn naaaaaaaaa aaaaaaaaaa ggttggtgtg gttgg

45

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

[0015]

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 9

nnnnnnnnnn nnnaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ggttggtgtg gttgg

45

<210> 10

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 10

nnnnnnnnnn nnnnnnaaaaa aaaaaaaaaa ggttggtgtg gttgg

45

<210> 11

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

[0016]

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(17)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 11

nnnnnnnnnn nnnnnnnaaa aaaaaaaaaa ggttggtgtg gttgg

45

<210> 12
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 各实施例中包含的序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> n = 脱碱基核苷酸

[0017] <400> 12
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnna aaaaaaaaaa ggttggtgtg gttgg 45

<210> 13
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 各实施例中包含的序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 13

nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn naaaaaaaaaa ggttggtgtg gttgg

45

<210> 14

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

[0018]

<220>

<221> misc_featurre

<222> (1)..(23)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 14

nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnaaaaaaaaa ggttggtgtg gttgg

45

<210> 15

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(25)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 15

[0019]

nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnaaaaa ggttggtgtg gttgg

45

<210> 16

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(27)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 16

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnaaa ggttggtgtg gttgg

45

<210> 17

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

[0020] <221> misc_feature

<222> (1)..(29)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 17

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnna ggttggtgtg gttgg

45

<210> 18

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 18

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ggttggtgtg gttgg 45

<210> 19

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工序列

[0021]

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(33)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 19

aaaaaaaaac aaaaaaaaaa aaaannnnnn nnnaaaaaaaa ggttggtgtg gttggaaaaa 60

aaaaaaaaaa caaaaaaaaaa aaaaaacaaa aaaaaaaaaa 100

<210> 20

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(17)

<223> n = 脱碱基核苷酸

[0022]

<400> 20

nnnnnnnnnn mnnnnnnaaa aaaaacaggc tacggcacgt agagcatcac catgatcctg 60

<210> 21

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(25)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 21

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnncaggc tacggcaegt agagcatcac catgatcctg

60

<210> 22

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

[0023]

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(25)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 22

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnacctg ggggagtatt gcggaggaag g

51

<210> 23

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(17)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 23

nnnnnnnnnn nnnnnnnaaa aaaaaacctg ggggagtatt gcggaggaag g 51

<210> 24

[0024] <211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 各实施例中包含的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (63)..(63)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<220>

<221> misc_feature

[0025]

<222> (65)..(65)

<223> n = 脱碱基核苷酸

<400> 24

ctatactcca ctttgcattt tctcggttcc ttaecgegcc gatcgcaggc tgatgaattg 60

ntntnt 66

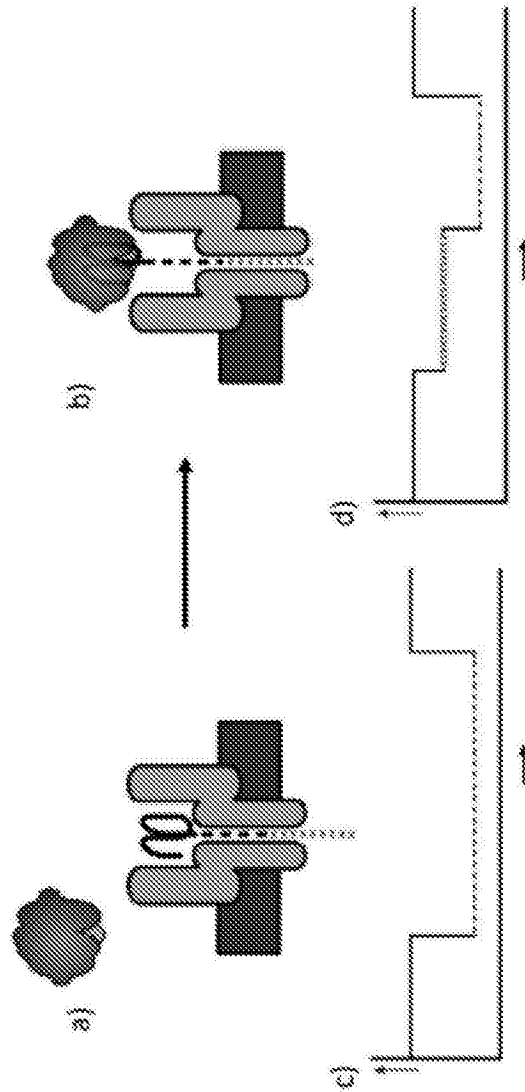


图1

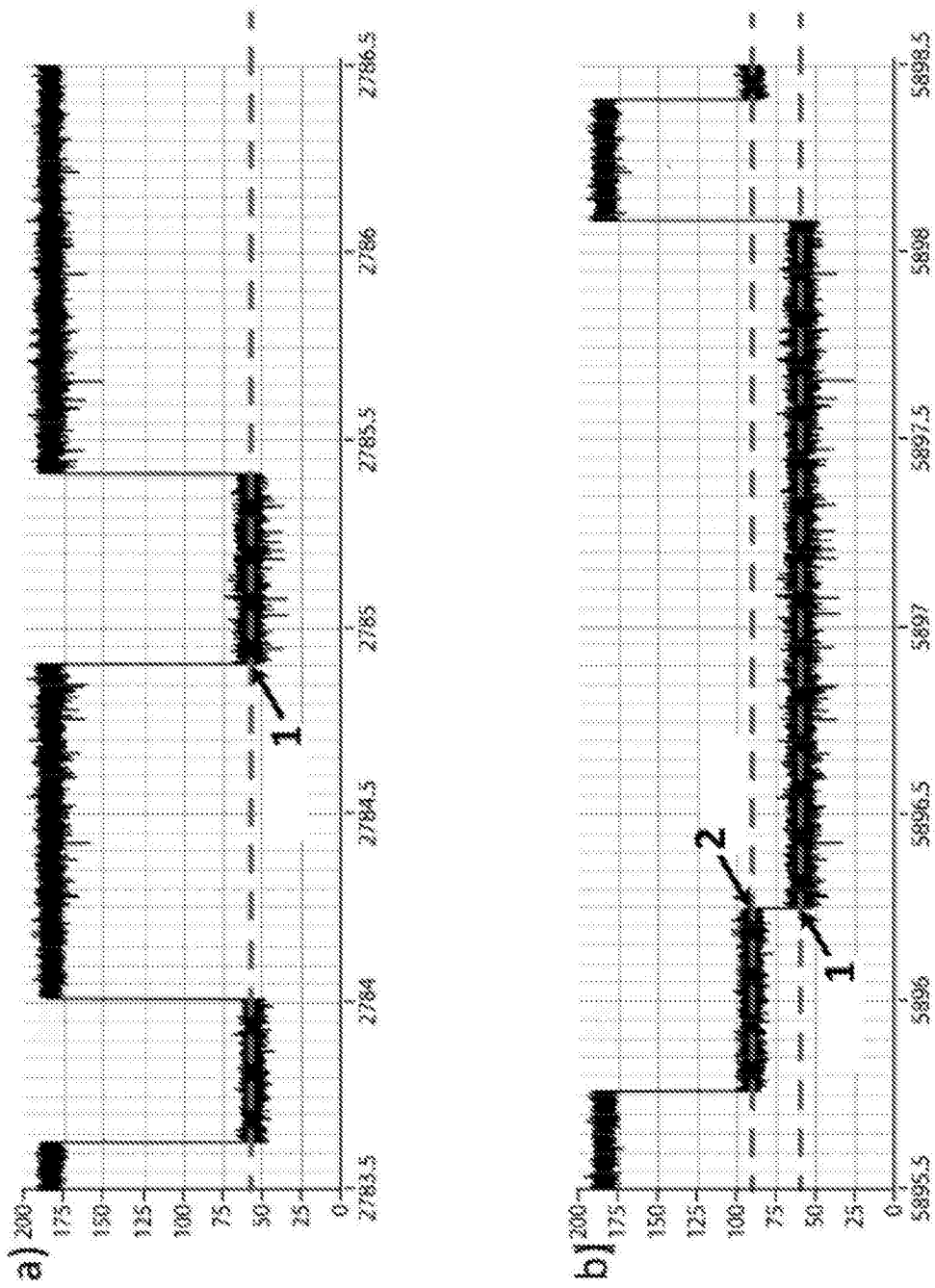


图2

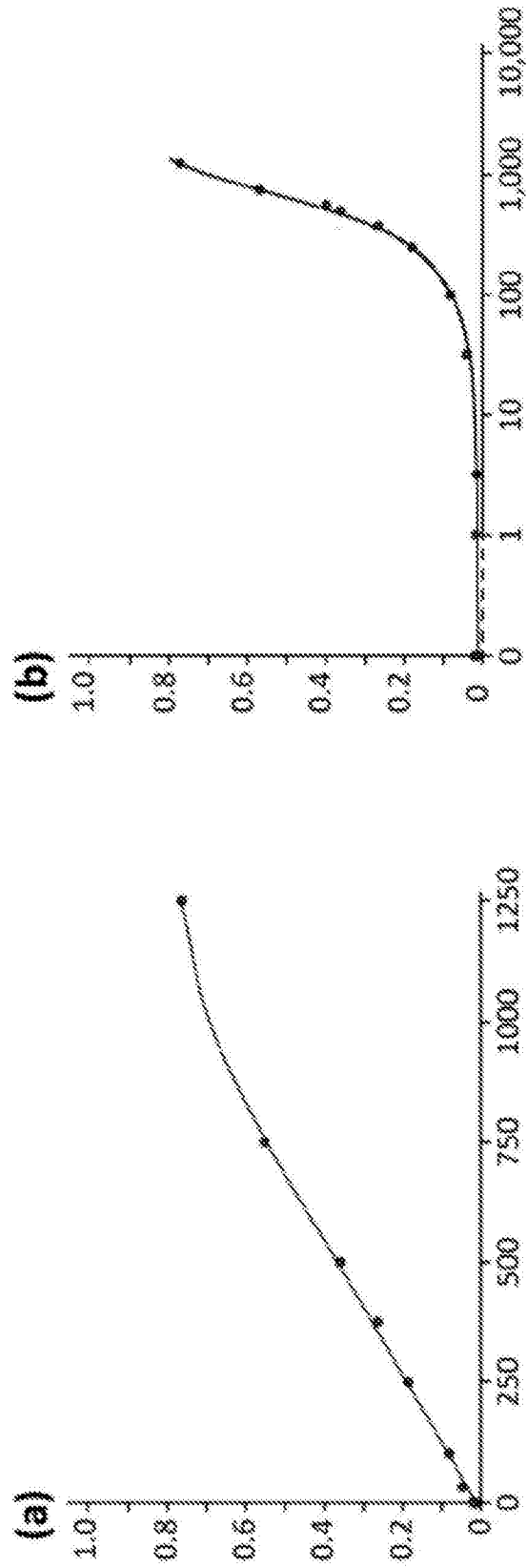


图3

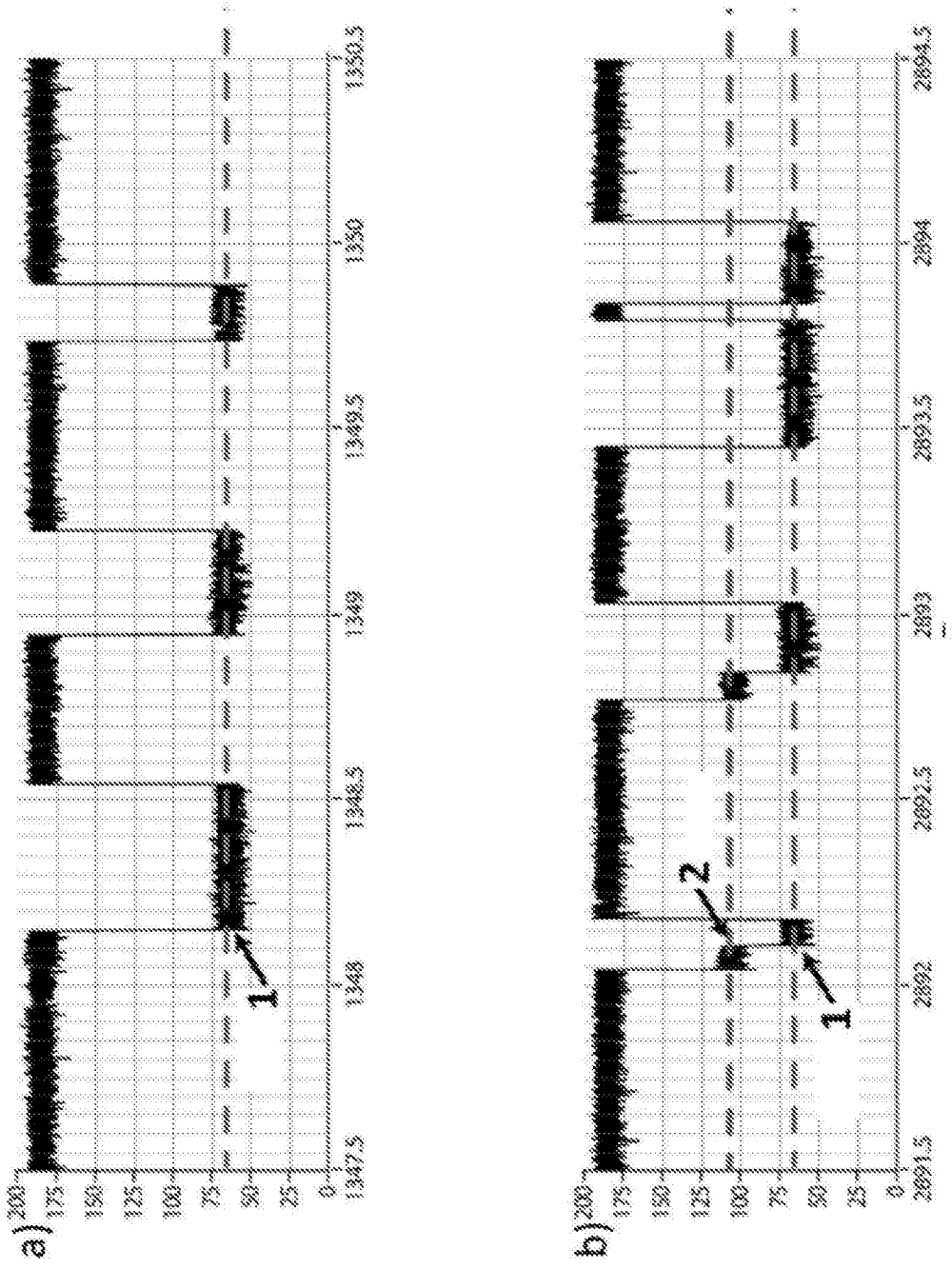


图4

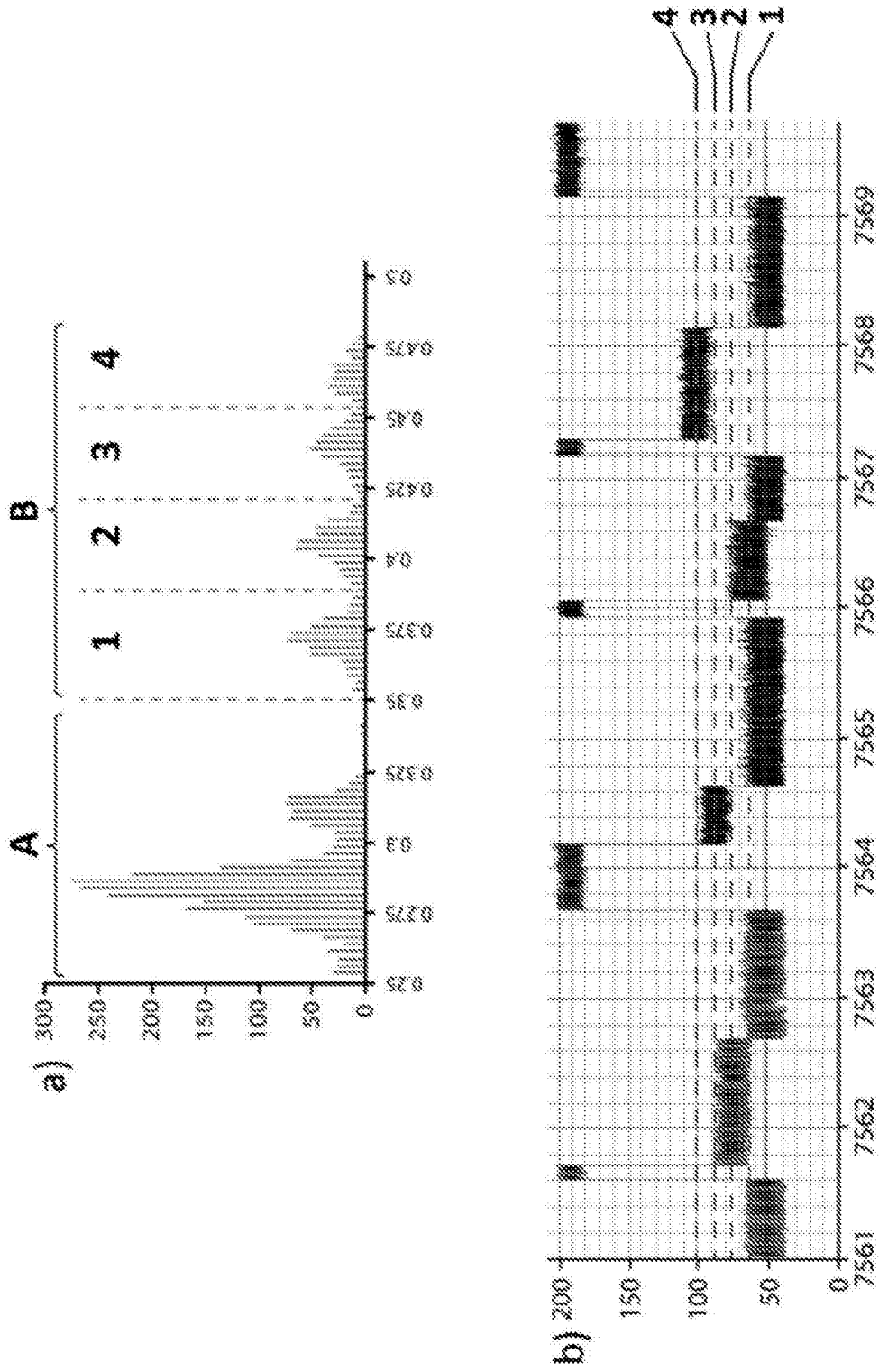


图5

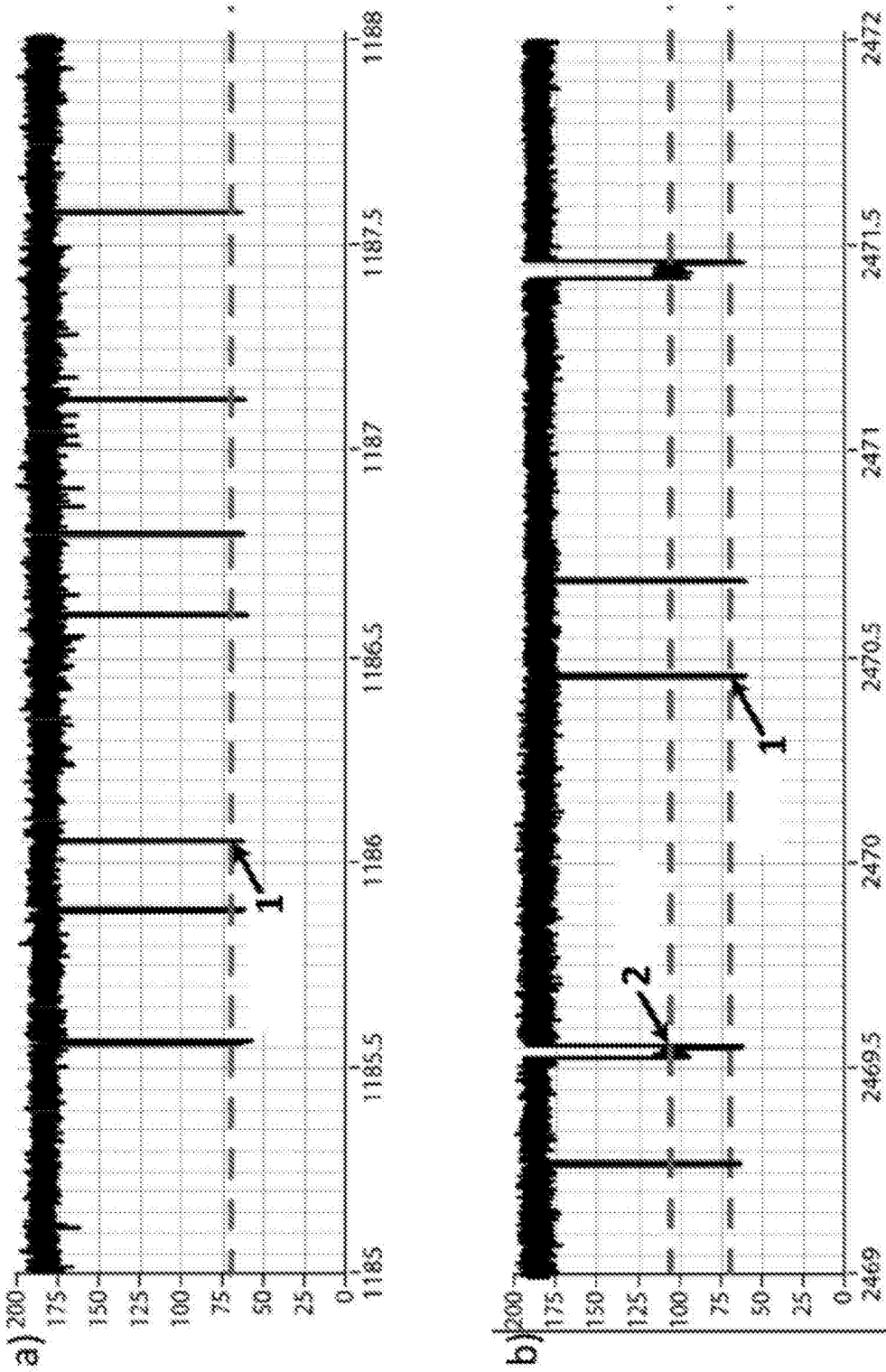


图6

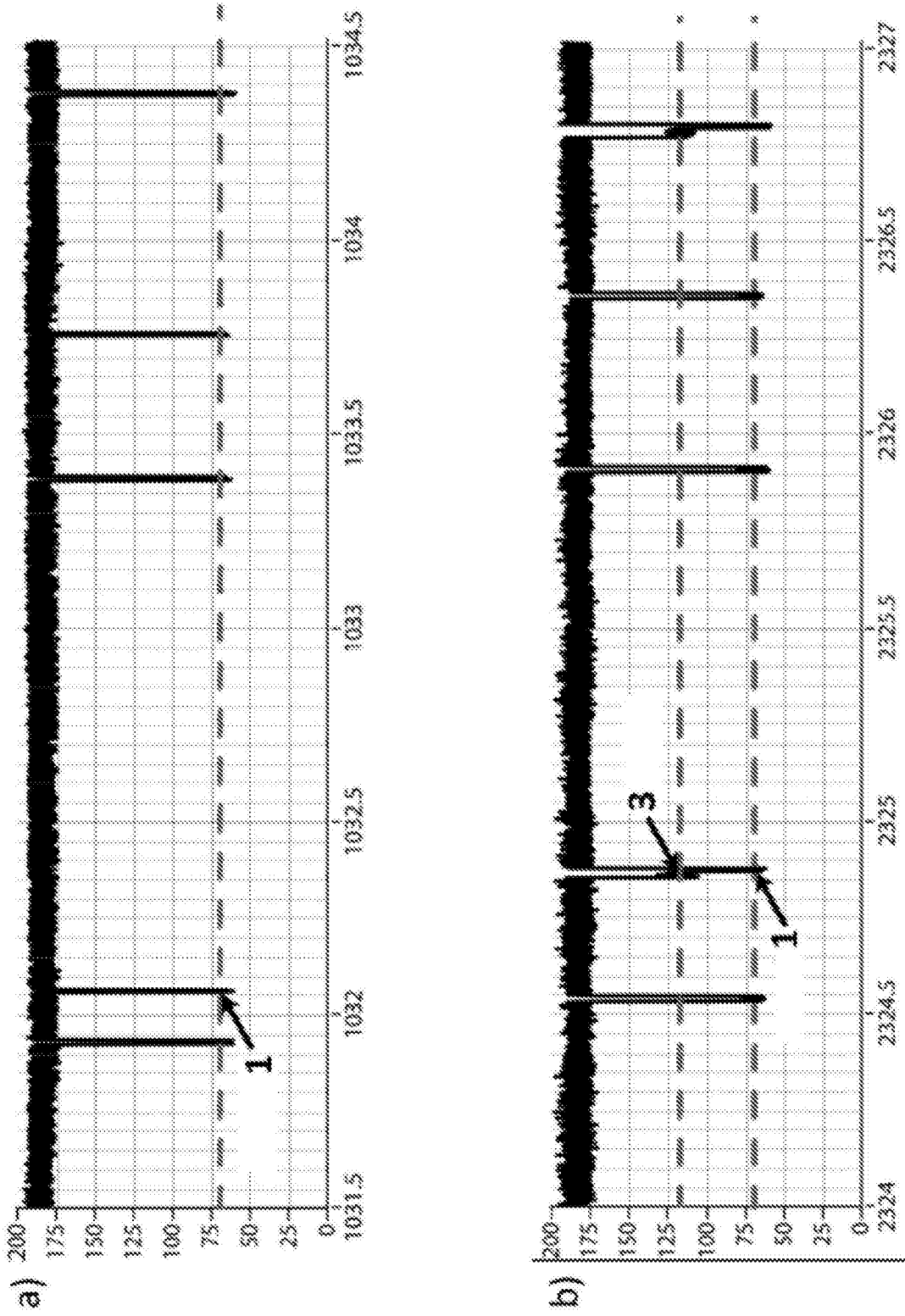


图7

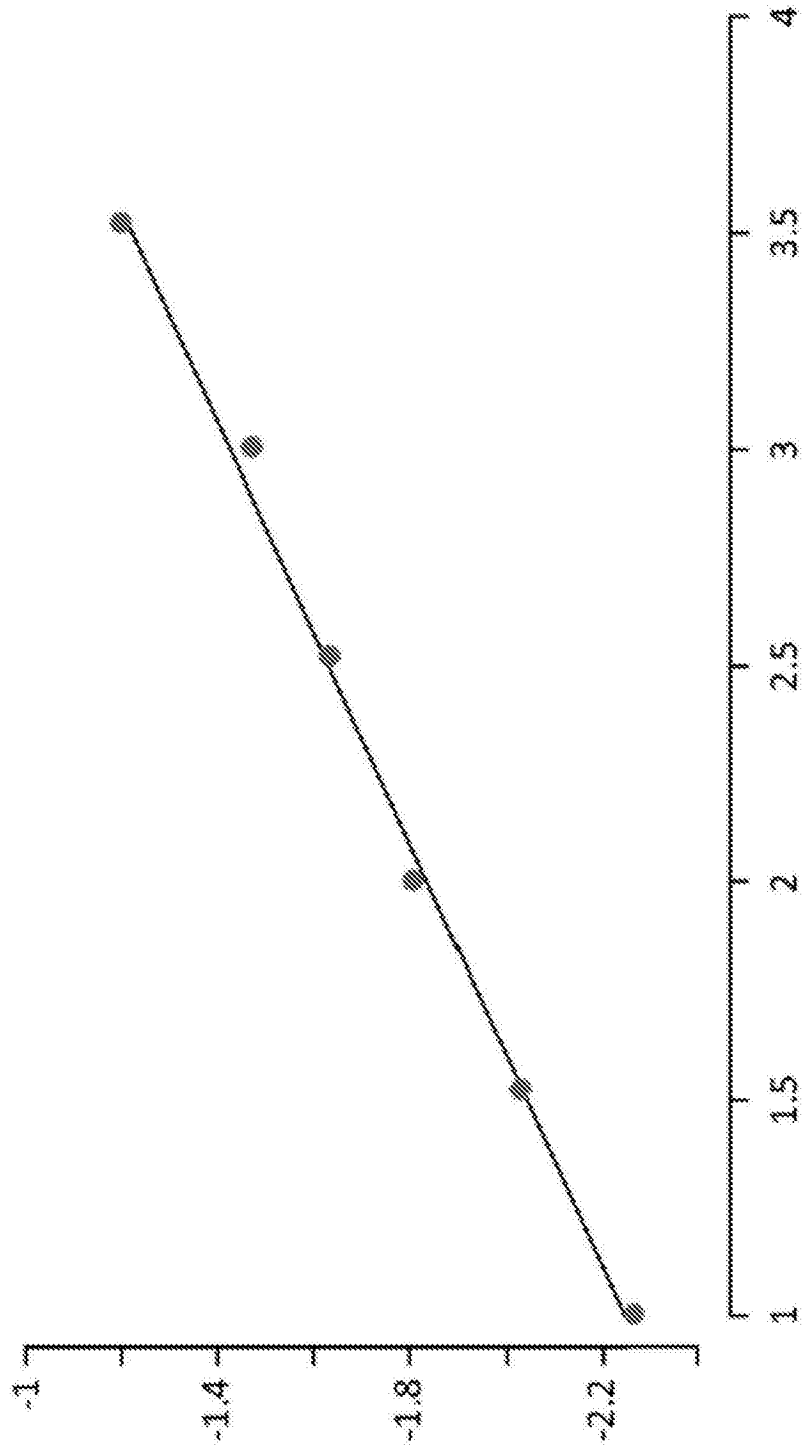


图8

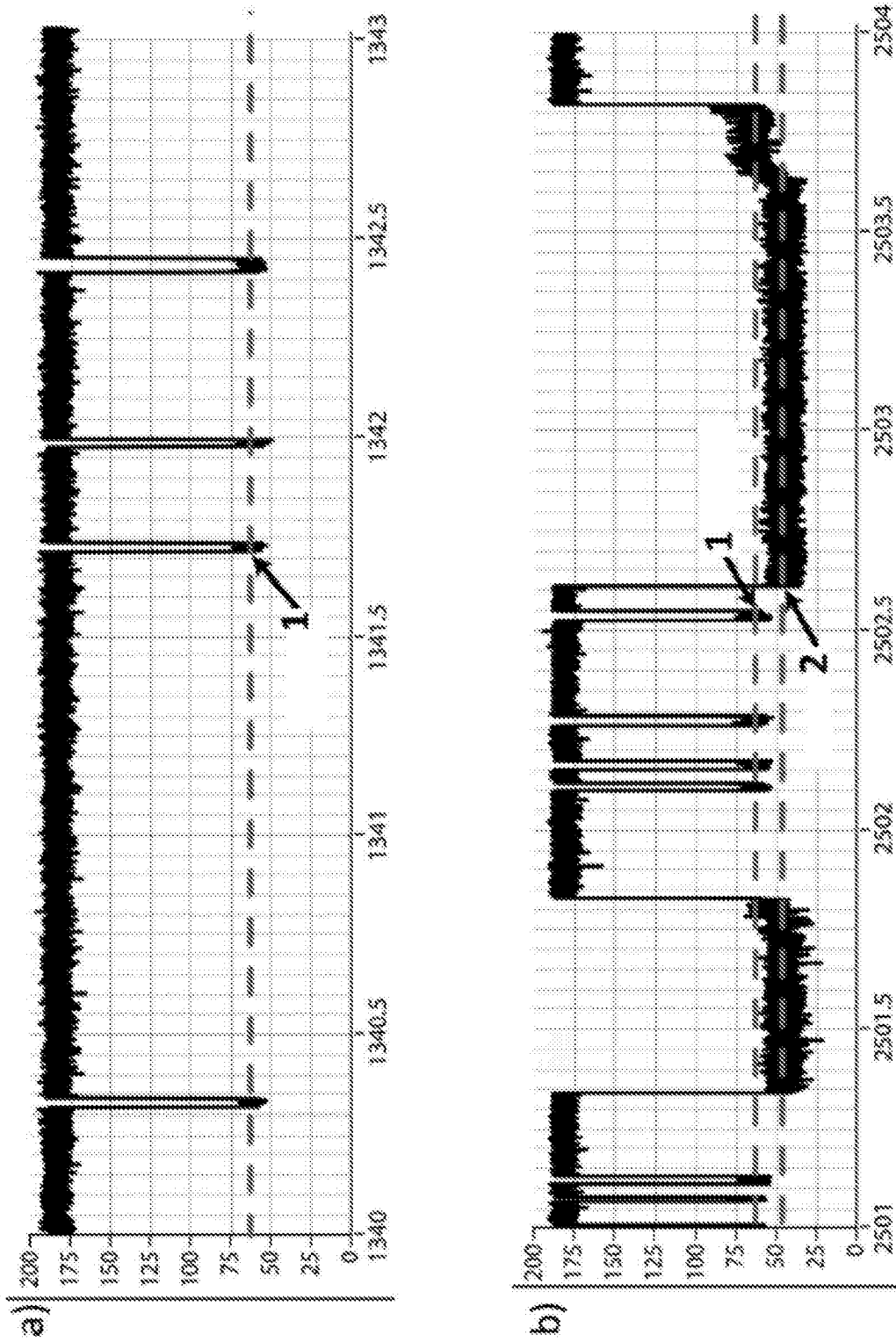


图9

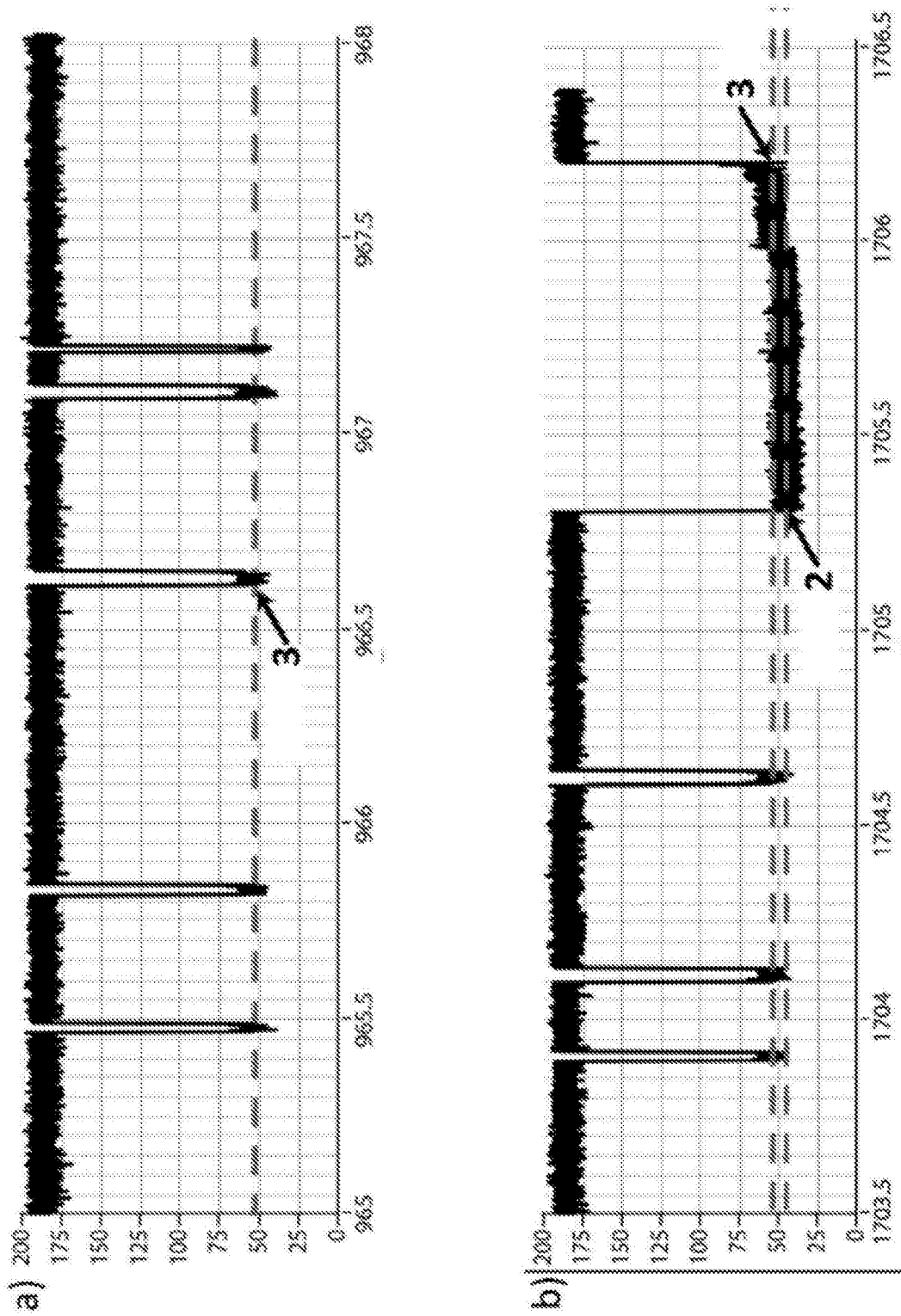


图10

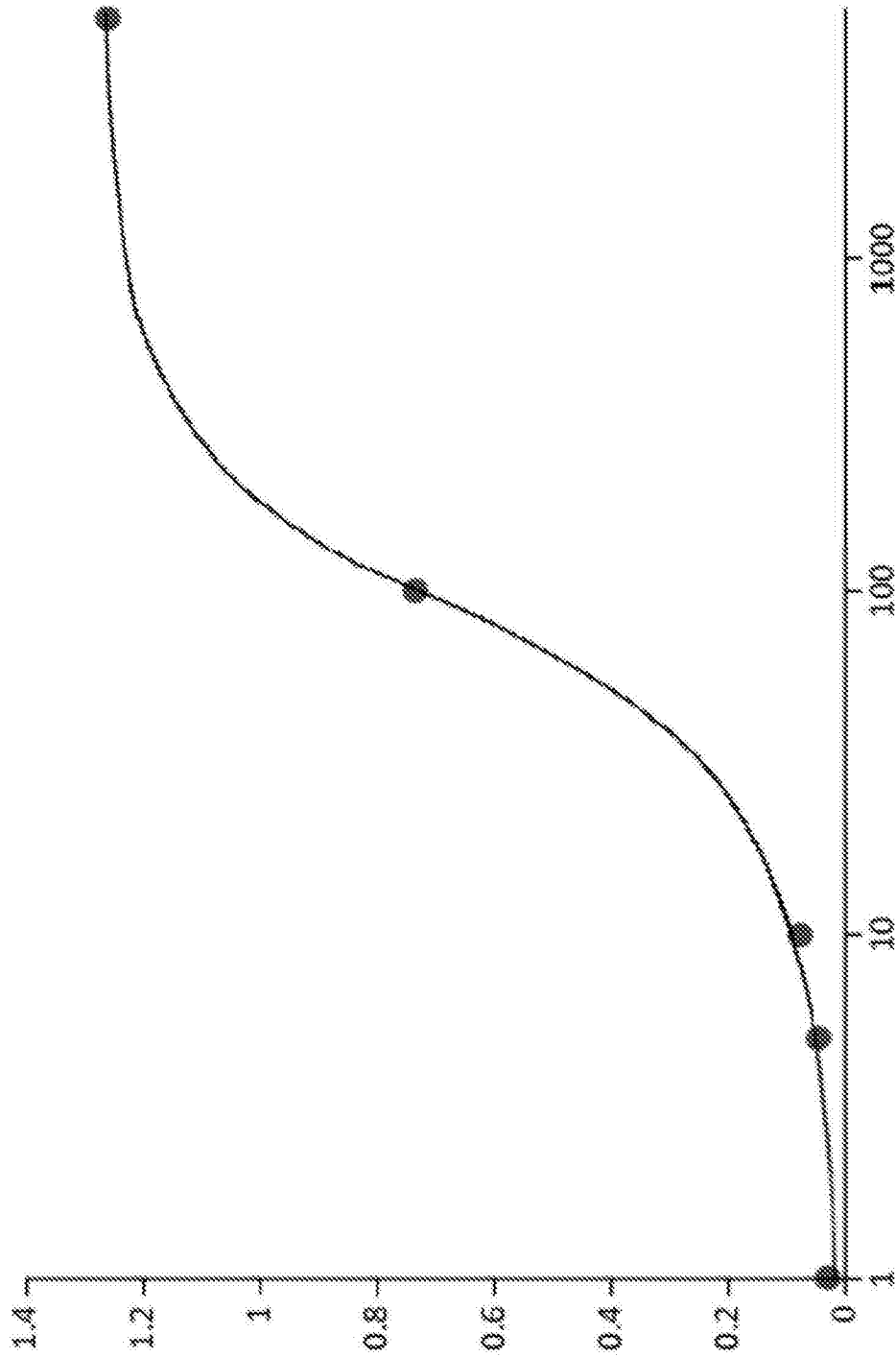


图11

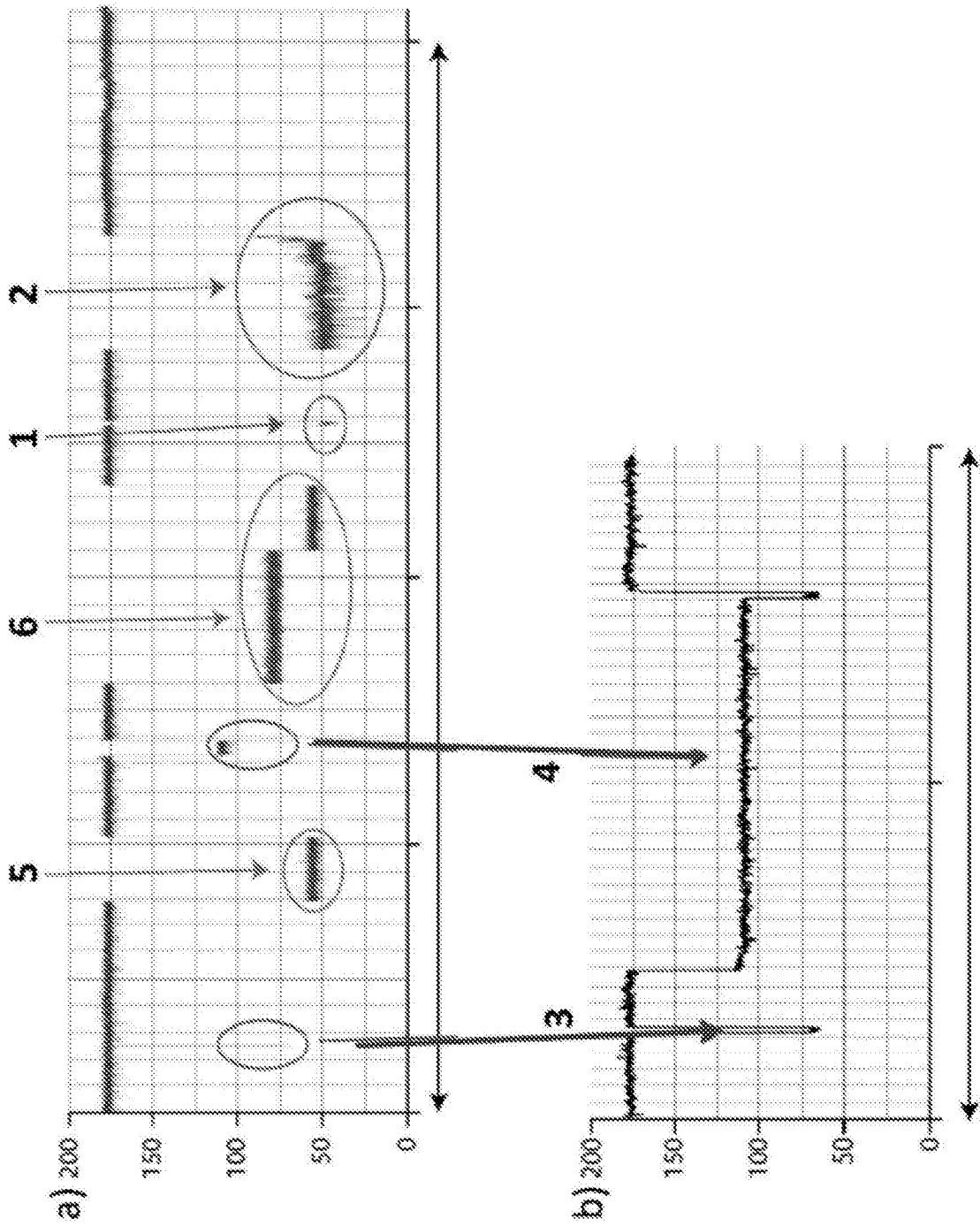


图12

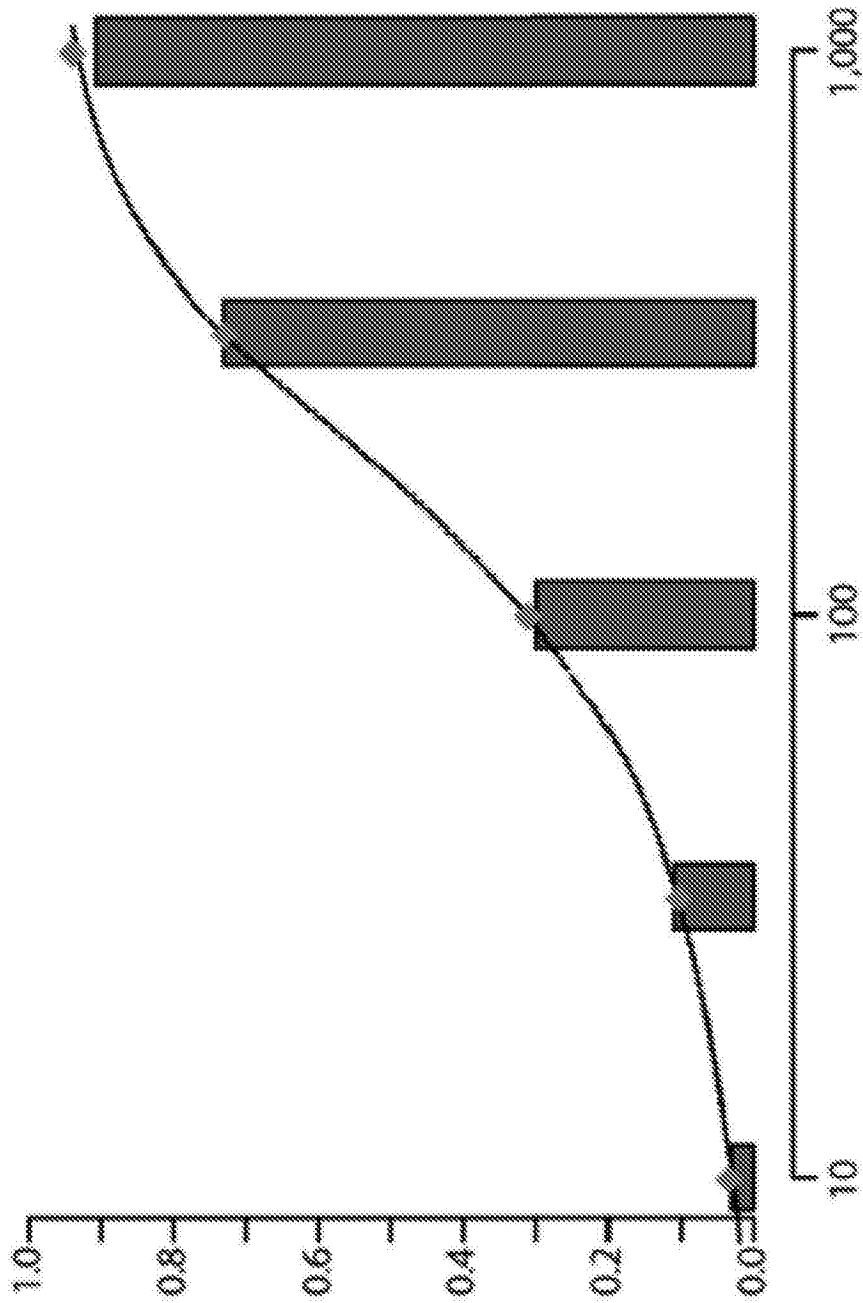


图13

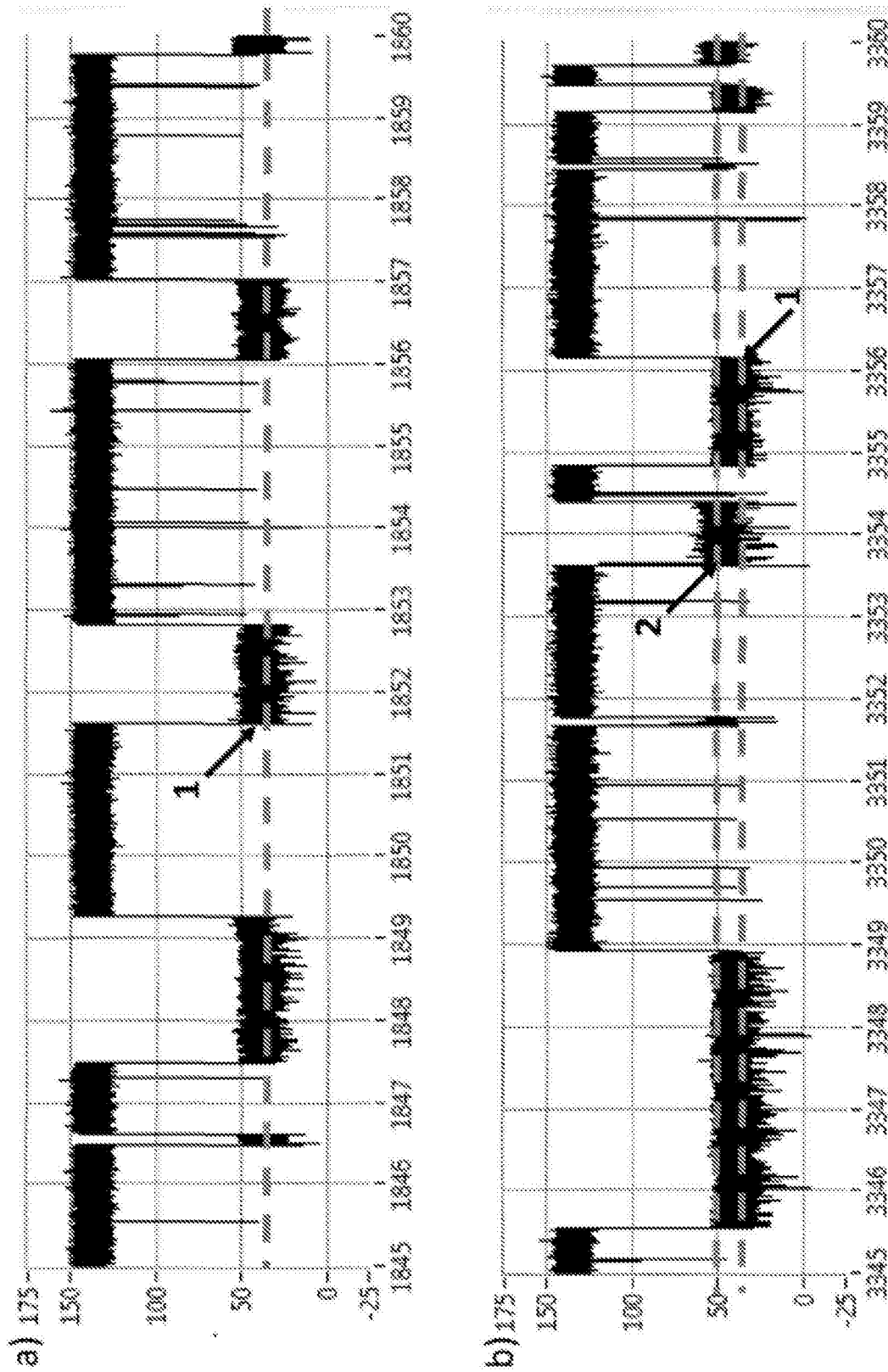


图14

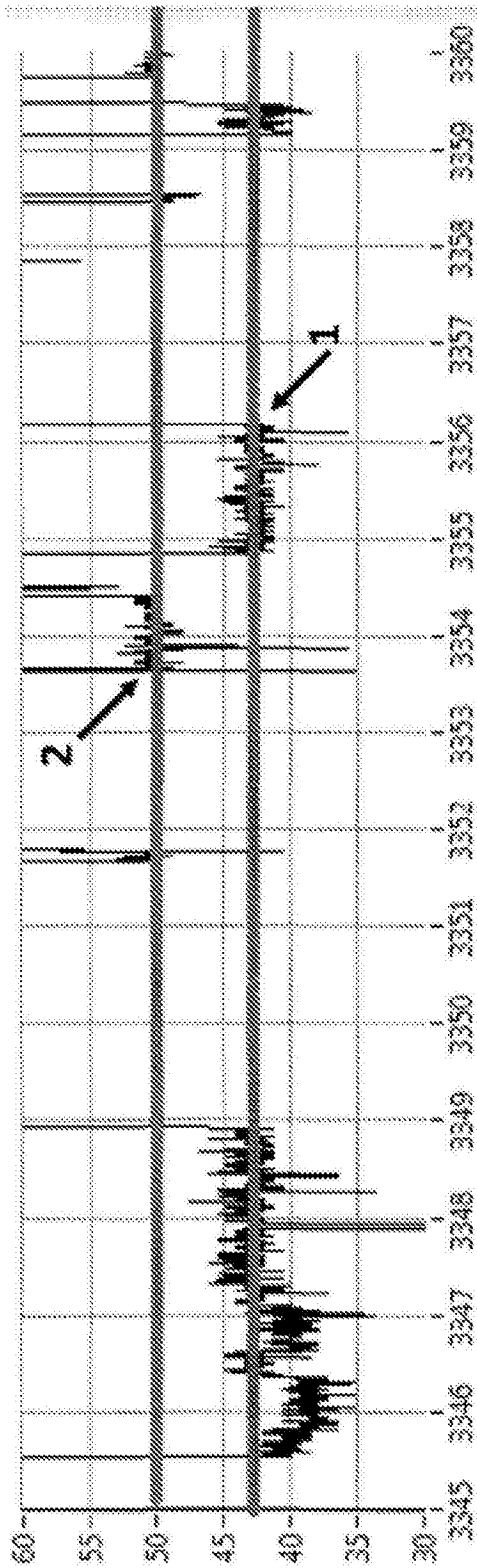


图15

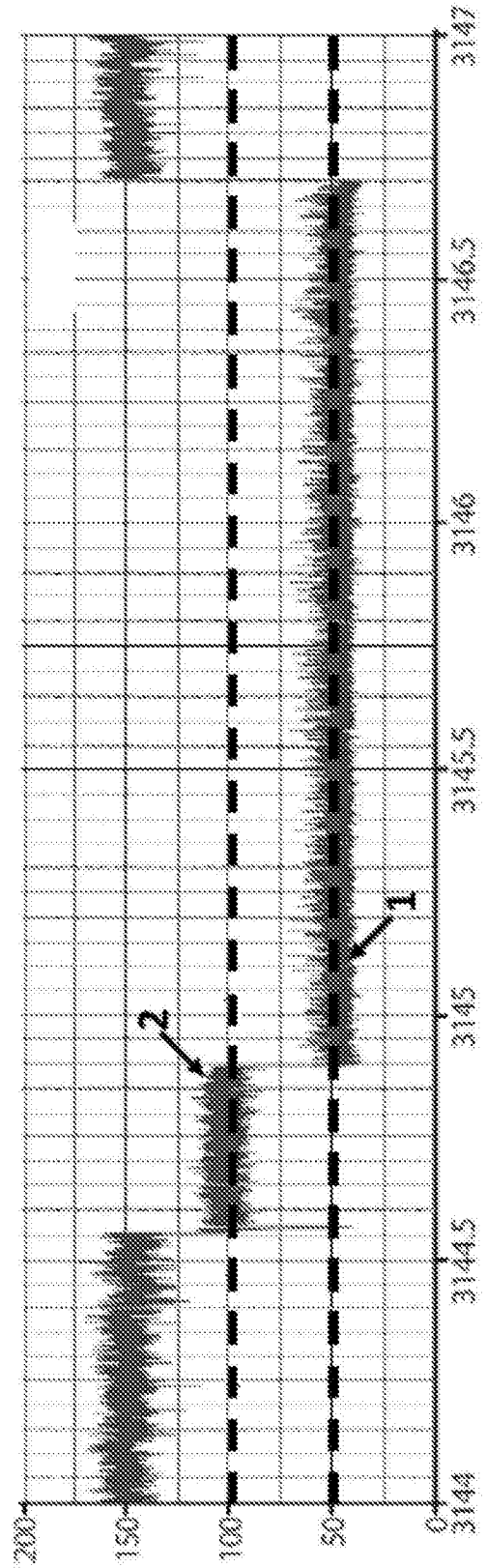


图16

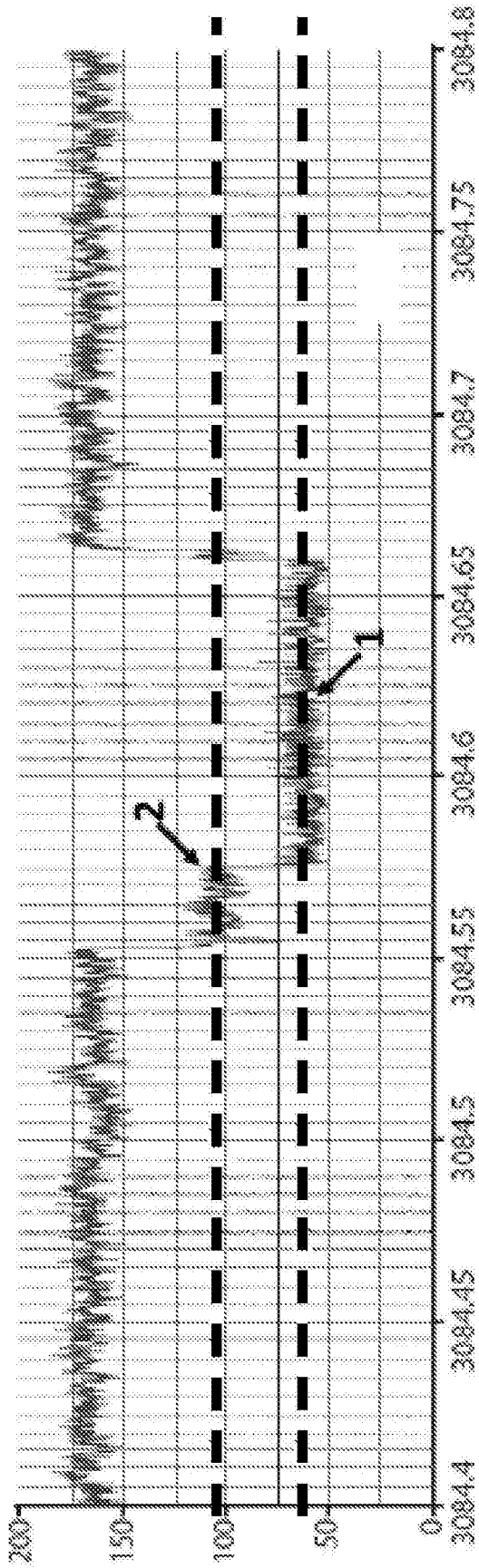


图17

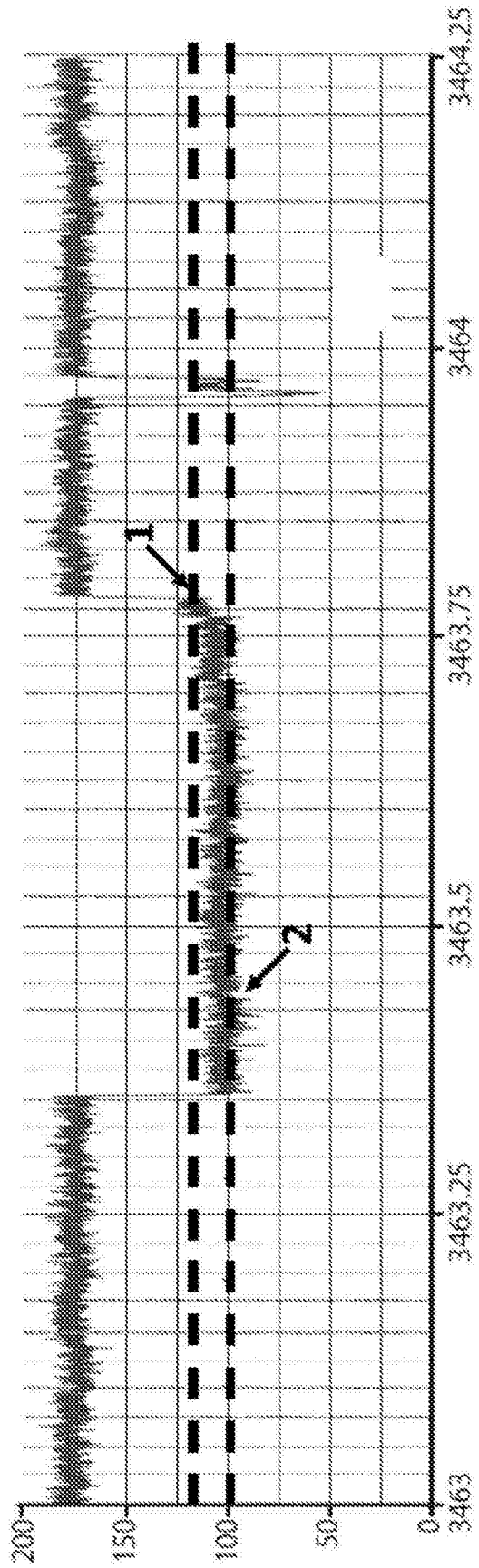


图18

专利名称(译)	适配体方法		
公开(公告)号	CN104220874B	公开(公告)日	2017-05-24
申请号	CN201380019923.5	申请日	2013-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	牛津楠路珀尔科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	牛津纳米孔技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	牛津纳米孔技术公司		
[标]发明人	丹尼尔约翰特纳 丹尼尔乔治福德姆 罗杰查尔斯吉尔 克莱夫加文布朗 斯图尔特瑞德 詹姆斯安东尼克拉克 詹姆斯怀特		
发明人	丹尼尔·约翰·特纳 丹尼尔·乔治·福德姆 罗杰·查尔斯·吉尔 克莱夫·加文·布朗 斯图尔特·瑞德 詹姆斯·安东尼·克拉克 詹姆斯·怀特		
IPC分类号	G01N33/487 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N2333/705 C12N15/115 G01N33/54386 G01N2333/36 G01N2333/49 G01N2333/96463		
审查员(译)	于园园		
优先权	61/599240 2012-02-15 US		
其他公开文献	CN104220874A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种新的用于确定样本中两个或多个分析物的组中的一个或多个分析物成员是否存在的方法。本发明由此还涉及用于确定多个分析物组中每个分析物是否存在的多重检测。该检测使用适配体和跨膜孔。

