

### (12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113686235 B (45) 授权公告日 2022. 09. 16

(21)申请号 202110936068.0

审查员 陶峰

- (22)申请日 2021.08.16
- (65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 113686235 A
- (43) 申请公布日 2021.11.23
- (73) 专利权人 中国科学院力学研究所地址 100190 北京市海淀区北四环西路15号
- (72)发明人 张明焜 龙勉 吕守芹
- (74) 专利代理机构 北京和信华成知识产权代理 事务所(普通合伙) 11390

专利代理师 焦海峰

(51) Int.CI. G01B 7/28 (2006.01)

(54) 发明名称

一种基于纳米孔过孔电流估计蛋白质构象 形貌特征的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于纳米孔过孔电流估 计蛋白质构象形貌特征的方法,所述方法为:基 于纳米孔特征电流,通过一个或多个类球体,对 蛋白质的构象进行形貌估计;其中,对于类球形 蛋白质,采用一个类球体进行形貌特征的估计, 通过解析相对阻塞电流和取向角的关系,获得类 球体的轴长;对于非类球形蛋白,采用多个类球 体的连体进行形貌的估计,通过解析相对阻塞电 流和取向角、各类球体之间角度的关系,获得了 每个类球体的轴长。该方法解决了现有技术中过 孔电流难以反映蛋白质构象形貌特征的问题。 权利要求书2页 说明书8页 附图3页

丁酰胆硷酯酶 正视图 侧视图

5 nm

1.一种基于纳米孔过孔电流估计蛋白质构象形貌特征的方法,其特征在于,所述方法 为:基于纳米孔特征电流,通过一个或多个类球体,对蛋白质的构象进行形貌估计;其中,对 于类球形蛋白质,采用一个类球体进行形貌特征的估计,通过解析相对阻塞电流和取向角 的关系,获得类球体的轴长;对于非类球形蛋白,采用多个类球体的连体进行形貌的估计, 通过解析相对阻塞电流和取向角、各类球体之间角度的关系,获得每个类球体的轴长;

所述方法具体包括:

1)获得蛋白质晶体三维空间结构在纳米孔径向上的投影面积或外接圆的直径最大和 最小的方向作为2个特殊取向;

2)获得所述蛋白质晶体三维空间结构在纳米孔径向上的多个任意取向,并基于所述2 个特殊取向计算任意取向的取向角;

3) 选取与所述蛋白质晶体三维空间结构的尺寸相匹配的纳米孔,获得仅充满电解质溶液的纳米孔的过孔电流 $I_0$ 以及孔内阻塞有不同取向的所述蛋白质晶体三维空间结构时的过孔电流I,获得不同取向下所述蛋白质晶体三维空间结构对纳米孔的相对阻塞电流 $\Delta I/I_0$ ,其中, $\Delta I = I_0$ -I;

4) 对于类球形蛋白质,基于一个类球状体解析相对阻塞电流随取向角单一变量的变化 规律,获得一个类球体的特征尺寸;

对于非类球形蛋白,基于多个类球状体解析相对阻塞电流随取向角、多个类球体之间 夹角的双变量的变化规律,获得各类球体的特征尺寸;

5) 基于最优拟合原则,确定各类球体的形状;

6)获得蛋白质的形貌特征。

2.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法包括:在步骤1)中,特殊取向的 选择方式包括:将所述蛋白质晶体三维空间结构置于三维空间坐标系下,将所述蛋白质晶 体三维空间结构的形心与坐标轴圆点重合,沿三个坐标轴依次、分别步进旋转,最终选择所 有旋转角度下所述蛋白质晶体三维空间结构在X-Y平面上的最大和最小投影面积的方向, 作为特殊取向。

3.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤2)中,所述任意取向的选择方式包括:沿三个坐标轴依次任意旋转,三次旋转的角度不全为360•k°,获得某任意取向,k为正整数。

4.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤2)中,在所述特殊取向下,规定Z轴 的正向为所述蛋白质晶体三维空间结构的法向,当所述蛋白质晶体三维空间结构转动到某 一任意取向时,法向射线随所述蛋白质晶体三维空间结构一起旋转,此时所述法向与Z轴正 向的夹角为取向角。

5.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤3)中,所述纳米孔的直径大于所述 蛋白质晶体三维空间结构在X-Y平面的最大直径。

6.根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述纳米孔选自固态纳米孔,材料可选自 氮化硅、氧化硅或碳化硅。

7.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤3)中,所述电解质溶液中的电解质 选自氯化钠、氯化钾、氯化锂中的至少一种,并且所述电解质溶液的浓度为0.5-5.0mo1/L。

8.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤3)中,所述纳米孔的两端电势差的

电场强度为-100~100mV/nm。

9.根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述过孔电流I<sub>0</sub>和所述过孔电流I均是基于 分子动力学模拟方法或电导率分布的离散模型方法获得的通过所述纳米孔截面的电流。

10.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤5)中,针对所述变化规律的多个拟 合结果中,选取相关系数的平方最高的拟合结果作为最优拟合结果,将最优拟合结果中类 球体的尺寸作为优选尺寸。

11.根据权利要求10所述的方法,其特征在于,在步骤6)中,根据所述优选尺寸,绘出所述蛋白质晶体三维空间结构的类球三维结构的形状。

12.根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述类球形蛋白质选自丁酰胆硷酯酶、乙酰胆碱酯酶、铁蛋白、血清白蛋白和钙调蛋白中的至少一种;

所述非类球形蛋白选自高亲和态整合素、免疫球蛋白、内向整流型钾离子通道蛋白和 水通道蛋白中的至少一种。

#### 一种基于纳米孔过孔电流估计蛋白质构象形貌特征的方法

#### 技术领域

[0001] 本发明涉及纳米孔生物分子传感技术领域,具体地,涉及一种基于纳米孔过孔电流估计蛋白质构象形貌特征的方法。

#### 背景技术

[0002] 蛋白质的构象是其履行生物学功能的基础。探究蛋白质的构象以及不同构象态之间的变构路径,是阐释其结构-功能关系的关键。随着纳米科技的发展,纳米孔传感技术在生物大分子探测领域中具有重要应用前景。纳米孔传感技术具有单分子、无标记、高通量等优点,已被成功用于蛋白质的研究中。当蛋白质在电泳作用下穿过纳米孔时,会因占位效应而改变纳米孔内的电导,形成特征的电流脉冲。该电流脉冲包含着蛋白质丰富的物理和化学信息,可在单分子层面鉴别蛋白质种类、构象和分子间相互作用。

[0003] 然而,纳米孔传感技术在蛋白质构象检测中仍存在不足。首先,目前区分蛋白质不同构象的指标通常是过孔电流脉冲的强度幅值和时间宽度,难以反映蛋白质构象的形态学特征。其次,在蛋白质易位的过程中,过孔电流也受到蛋白质过孔取向的影响,特定情形下取向对电流的影响往往和构象的影响相当,导致无法直接采用过孔电流特征来区分蛋白质的不同构象。再次,厘清蛋白质取向对过孔电流的调制作用需首先控制蛋白质以不同取向过孔并有效反馈过孔电流,然而在纳米尺度操控蛋白质、在皮安量级探测电流在实验上存在技术难度。

#### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种基于纳米孔过孔电流估计蛋白质构象形貌特征的方法, 以解决现有技术中过孔电流难以反映蛋白质构象形貌特征的问题。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供了一种基于纳米孔过孔电流估计蛋白质构象形貌特征的方法,所述方法为:基于纳米孔特征电流,通过一个或多个类球体,对蛋白质的构象进行形貌估计;其中,对于类球形蛋白质,采用一个类球体进行形貌特征的估计,通过解析相对阻塞电流和取向角的关系,获得类球体的轴长;对于非类球形蛋白,采用多个类球体的 连体进行形貌的估计,通过解析相对阻塞电流和取向角、各类球体之间角度的关系,获得了 每个类球体的轴长。

[0006] 本发明提供了一种基于纳米孔过孔电流估计蛋白质构象形貌特征的方法,其特征 在于,所述方法为:基于纳米孔特征电流,通过一个或多个类球体,对蛋白质的构象进行形 貌估计;其中,对于类球形蛋白质,采用一个类球体进行形貌特征的估计,通过解析相对阻 塞电流和取向角的关系,获得类球体的轴长;对于非类球形蛋白,采用多个类球体的连体进 行形貌估计,通过解析相对阻塞电流和取向角、各类球体之间角度的关系,获得每个类球体 的轴长。

[0007] 作为本发明的优选方案,所述方法包括:

[0008] 1)获得蛋白质晶体三维空间结构在纳米孔径向上的投影面积或外接圆的直径最

大和最小的方向作为2个特殊取向;

[0009] 2)获得所述蛋白质晶体三维空间结构在纳米孔径向上的多个任意取向,并基于所述2个特殊取向计算任意取向的取向角;

[0010] 3)选取与所述蛋白质晶体三维空间结构的尺寸相匹配的纳米孔,获得仅充满电解 质溶液的纳米孔的过孔电流I<sub>0</sub>以及孔内阻塞有不同取向的所述蛋白质晶体三维空间结构 时的过孔电流I,获得不同取向下所述蛋白质晶体三维空间结构对纳米孔的相对阻塞电流 ΔI/I<sub>0</sub>,其中,ΔI=I<sub>0</sub>-I;

[0011] 4) 对于类球形蛋白质,基于一个类球状体解析相对阻塞电流随取向角单一变量的变化规律,获得一个类球体的特征尺寸;

[0012] 对于非类球形蛋白,基于多个类球状体解析相对阻塞电流随取向角、多个类球体 之间夹角的双变量的变化规律,获得各类球体的特征尺寸;

[0013] 5) 基于最优拟合原则,确定各类球体的形状;

[0014] 6)获得蛋白质的形貌。

[0015] 作为本发明的优选方案,所述方法包括:在步骤1)中,特殊取向的选择方式包括: 将所述蛋白质晶体三维空间结构置于三维空间坐标系下,将所述蛋白质晶体三维空间结构 的形心与坐标轴圆点重合,沿三个坐标轴依次、分别步进旋转,最终选择所有旋转角度下所 述蛋白质晶体三维空间结构在X-Y平面上的最大和最小投影面积的方向,作为特殊取向。

[0016] 作为本发明的优选方案,在步骤2)中,所述任意取向的选择方式包括:沿三个坐标轴依次任意旋转某角度,三次旋转的角度不全为360 • k°,获得某任意取向,k为正整数。

[0017] 作为本发明的优选方案,在步骤2)中,在所述特殊取向下,规定Z轴的正向为所述 蛋白质晶体三维空间结构的法向,当所述蛋白质晶体三维空间结构转动到某一任意取向 时,法向射线随所述蛋白质晶体三维空间结构一起旋转,此时所述法向与Z轴正向的夹角为 取向角。

[0018] 作为本发明的优选方案,在步骤3)中,所述纳米孔的直径大于所述蛋白质晶体三 维空间结构在X-Y平面的最大直径;

[0019] 作为本发明的优选方案,所述纳米孔选自固态纳米孔,材料可选氮化硅、氧化硅或碳化硅。

[0020] 作为本发明的优选方案,在步骤3)中,所述电解质溶液中的电解质选自氯化钠、氯化钾、氯化锂中的至少一种,并且所述电解质溶液的浓度为0.5-5.0mo1/L。

[0021] 作为本发明的优选方案,在步骤3)中,所述纳米孔的两端电势差的电场强度为-100~100mV/nm。

[0022] 作为本发明的优选方案,所述过孔电流I<sub>0</sub>和所述过孔电流I均是基于分子动力学 模拟方法或电导率分布的离散模型方法获得的通过所述纳米孔的截面的电流。

[0023] 作为本发明的优选方案,在步骤5)中,针对所述变化规律的多个拟合结果中,选取 相关系数的平方最高的拟合结果作为最优拟合结果,将最优拟合结果中类球体的尺寸作为 优选尺寸。

[0024] 作为本发明的优选方案,在步骤6)中,根据所述优选尺寸,绘出所述蛋白质晶体三 维空间结构的类球三维结构的形状;

[0025] 作为本发明的优选方案,所述类球形蛋白质选自丁酰胆硷酯酶、乙酰胆碱酯酶、铁

蛋白、血清白蛋白和钙调蛋白中的至少一种;所述非类球形蛋白选自高亲和态整合素、免疫 球蛋白、内向整流型钾离子通道蛋白和水通道蛋白中的至少一种。

[0026] 在上述技术方案中,本发明针对类球形蛋白质,采用一个类球体进行形貌特征的估计,通过解析相对阻塞电流和取向角的关系,获得类球体的轴长,进而获得蛋白质构象的形貌特征;针对类球形蛋白质,采用一个类球体进行形貌特征的估计,通过解析相对阻塞电流和取向角的关系,获得类球体的轴长;对于非类球形蛋白,采用多个类球体的连体进行形貌的估计,通过解析相对阻塞电流和取向角、各类球体之间角度的关系,获得了每个类球体的轴长,通过多个类球体的连体获得蛋白质构象的形貌特征。

[0027] 由此,本发明实现了将纳米孔传感中的电流脉冲特征与蛋白质的形貌特征直接关联,使得纳米孔传感技术能够直接描述蛋白质的空间三维形貌,促进了纳米孔传感在蛋白质构象鉴定方面的实际应用能力;同时本发明也可作为一种理论预测方法,基于已知的蛋白质晶体结构来验证实验结果,对实验做出合理的指导和预测。

[0028] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0029] 1、可通过纳米孔传感提供的过孔电流,获得蛋白质构象的三维空间形貌特征,提高了纳米孔传感对蛋白质构象的鉴别能力。

[0030] 2、可预测纳米孔检测蛋白质的实验结果。该理论方法可比实验测量更方便地改变 蛋白质的取向,并高灵敏地记录过孔电流的微小变化,对实验结果做出预测。

[0031] 3、对非球形蛋白质采用多个类球体的形貌近似,能够更精细地表征非球状蛋白质的形貌。

[0032] 本发明的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

#### 附图说明

[0033] 附图是用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与下面的具体实施方式一起用于解释本发明,但并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0034] 图1为本发明提供的纳米孔传感技术检测丁酰胆硷酯酶的工作示意图;

[0035] 图2a为实施例1中丁酰胆硷酯酶的相对阻塞电流随蛋白质取向角的变化曲线图;

[0036] 图2b为实施例1中丁酰胆硷酯酶的三维空间形貌结果图;

[0037] 图3a为实施例2中乙酰胆碱酯酶的相对阻塞电流随蛋白质取向角的变化曲线图;

[0038] 图3b为实施例2中乙酰胆碱酯酶的三维空间形貌结果图。

#### 具体实施方式

[0039] 以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0040] 本发明提供了一种基于纳米孔过孔电流估计蛋白质构象形貌特征的方法,所述方法为:基于纳米孔特征电流,通过一个或多个类球体,对蛋白质的构象进行低辨率的形貌估计;其中,对于类球形蛋白质,采用一个类球体进行形貌特征的估计,通过解析相对阻塞电流和取向角的关系,获得类球体的轴长;对于非类球形蛋白,采用多个类球体的连体进行形貌的估计,通过解析相对阻塞电流和取向角、各类球体之间角度的关系,获得了每个类球体的轴长。

[0041] 在本发明中,对所述方法的步骤不作具体限定,但是为了提高基于纳米孔过孔电流估计蛋白质构象形貌特征的精度,优选地,所述方法包括:

[0042] 1)获得蛋白质晶体三维空间结构在纳米孔径向上的投影面积或外接圆的直径最 大和最小的方向作为2个特殊取向;

[0043] 2)获得所述蛋白质晶体三维空间结构在纳米孔径向上的多个任意取向,并基于所述2个特殊取向计算任意取向的取向角;

[0044] 3) 选取与所述蛋白质晶体三维空间结构的尺寸相匹配的纳米孔 (如图1所示),获得仅充满电解质溶液的纳米孔的过孔电流I<sub>0</sub>以及孔内阻塞有不同取向的所述蛋白质晶体 三维空间结构时的过孔电流I,获得不同取向下所述蛋白质晶体三维空间结构对纳米孔的 相对阻塞电流ΔI/I<sub>0</sub>,其中,ΔI=I<sub>0</sub>-I;

[0045] 4)对于类球形蛋白质,基于一个类球状体解析相对阻塞电流随取向角单一变量的 变化规律,获得一个类球体的特征尺寸,即将类球形蛋白质近似为一个类球状三维结构;

[0046] 对于非类球形蛋白,基于多个类球状体解析相对阻塞电流随取向角、多个类球体 之间夹角的双变量的变化规律,获得各类球体的特征尺寸,即将非类球形蛋白近似为多个 类球状三维结构;

[0047] 5) 基于最优拟合原则,确定各类球体的形状;

[0048] 6)获得蛋白质的形貌特征。

[0049] 在上述实施方式中,对特殊取向的选择方式不作具体限定,但是为了便于操作,优选地,所述方法包括:在步骤1)中,特殊取向的选择方式包括:将所述蛋白质晶体三维空间结构置于三维空间坐标系下,将所述蛋白质晶体三维空间结构的形心与坐标轴圆点重合, 沿三个坐标轴依次、分别步进旋转,最终选择所有旋转角度下所述蛋白质晶体三维空间结构在X-Y平面上的最大和最小投影面积的方向,作为特殊取向。

[0050] 在上述方法的步骤2)中,所述任意取向的选择方式也可以在宽泛的范围内选择, 但是为了规避在三个坐标轴上的旋转均匀原始方向重合,优选地,在步骤2)中,所述任意取 向的选择方式包括:沿三个坐标轴依次任意旋转某角度,三次旋转的角度不全为360•k°, 获得某任意取向,k为正整数。

[0051] 此外,在本发明中,对任意取向的数量也不作具体规定,如可以是个位数,也可以 是百位数,但是为了提高蛋白质构象形貌特征的估计精度,优选地,任意取向的数量为5-1000次。

[0052] 在上述方法中,取向角的计算方式也具有多种,但是为了进一步便于取向角的大小的确定,优选地,在步骤2)中,在所述特殊取向下,规定Z轴的正向为所述蛋白质晶体三维空间结构的法向,当所述蛋白质晶体三维空间结构转动到某一任意取向时,法向射线随所述蛋白质晶体三维空间结构一起旋转,此时所述法向与Z轴正向的夹角为取向角。

[0053] 在本发明中,对所述纳米孔的规格不作具体限定,但是为了便于蛋白质在纳米孔内变化任意取向,优选地,在步骤3)中,所述纳米孔的直径大于所述蛋白质晶体三维空间结构在X-Y平面的最大直径。

[0054] 在本发明中,对所述纳米孔的种类也不作具体限定,但是为了提高过孔电流的精 准度,优选地,所述纳米孔选自氮化硅纳米孔固态纳米孔,材料可选氮化硅、氧化硅、碳化硅 等。

[0055] 在上述方法中,所述电解质溶液中的电解质是离子电解质,对于具体种类不作要求,但是从成本以及过孔电流的精准度上考虑,优选地,在步骤3)中,所述电解质溶液中的电解质选用氯化钠、氯化钾和氯化锂中的至少一种,并且所述电解质溶液的浓度为0.5-5.0mo1/L。

[0056] 在上述方法中,对所述纳米孔的两端电压强度也不作具体要求,但是从成本以及 过孔电流的精准度上考虑,优选地,在步骤3)中,所述纳米孔两端电势差的电场强度强度 为-100~100mV/nm;即,纳米孔两端所加电压为上述电场强度乘以纳米孔的厚度。

[0057] 同时,在本发明中,过孔电流的获取方式也可以采取多种方式,但是为了提高过孔电流的精度,优选地,所述过孔电流I<sub>0</sub>和所述过孔电流I均是基于全原子分子动力学模拟方法或电导率分布的离散模型方法获得的通过所述纳米孔的截面的电流。

[0058] 此外,在上述步骤5)中,为了进一步提高蛋白质构象形貌特征的估计精度,优选 地,在步骤5)中,针对所述变化规律的多个拟合结果,选取相关系数的平方最高的拟合结果 作为最优拟合结果,将最优拟合结果中类球体的尺寸作为优选尺寸。

[0059] 在上述实施方式的基础上,为了进一步提高蛋白质构象形貌特征的估计精度,优选地,在步骤6)中,根据所述优选尺寸,绘出所述蛋白质晶体三维空间结构的类球三维结构的形状,其中可以采用多个视角描绘三维结构,如正视图和侧视图。

[0060] 最后,在本发明中,对蛋白质的种类不作具体要求,但是为了进一步提高该方法的适用范围,优选地,所述类球形蛋白质选自丁酰胆硷酯酶、乙酰胆碱酯酶、铁蛋白、血清白蛋白、和钙调蛋白中的至少一种;所述非类球形蛋白选自高亲和态整合素、免疫球蛋白、内向整流型钾离子通道蛋白和水通道蛋白中的至少一种。

[0061] 以下将通过实例对本发明进行详细描述。ID指的是取向编号。

[0062] 实施例1

[0063] 本实施例为基于纳米孔传感技术估计丁酰胆硷酯酶的形貌特征,原理如图1所示。

[0064] 获得丁酰胆硷酯酶投影面积最大和最小的两个方向作为2个特殊取向。将丁酰胆硷酯酶晶体 (PDBID:1P0I) 三维空间结构置于三维空间坐标系下,将蛋白质形心与坐标轴圆点重合,沿Z、Y、X坐标轴,以1°的角度步进沿三个坐标轴分别依次旋转,最终获得蛋白质晶体在X-Y平面的最大投影面积取向 (ID:73-133-110) 和最小投影面积取向 (ID:0-16-37) 这两个特殊取向。

[0065] 获得丁酰胆硷酯酶晶体三维空间结构的任意取向5个。沿三个坐标轴任意旋转一组不全为360•k°(k为整数)的随机数组,获得5个任意取向,分别为ID:236-238-289,43-286-252,165-283-144,72-13-232,158-344-345。

[0066] 特殊取向的取向角为0°或90°,基于两个特殊取向计算其他任意取向的取向角。基 于形状叠合算法计算随机取向下蛋白质法向与Z轴正向的夹角。获得基于73-133-110取向 的取向角 $\theta$ ,分别为 $\theta_{73-133-110} = 0^{\circ}$ 、 $\theta_{236-238-289} = 15^{\circ}$ 、 $\theta_{43-286-252} = 30^{\circ}$ 、 $\theta_{165-283-144} = 45^{\circ}$ 、  $\theta_{72-13-232} = 60^{\circ}$ 、 $\theta_{158-344-345} = 75^{\circ}$ 、 $\theta_{0-16-37} = 90^{\circ}$ ;获得基于0-16-37取向的取向角 $\theta$ ,分别为  $\theta_{73-133-110} = 90^{\circ}$ 、 $\theta_{236-238-289} = 87^{\circ}$ 、 $\theta_{43-286-252} = 86^{\circ}$ 、 $\theta_{165-283-144} = 61^{\circ}$ 、 $\theta_{72-13-232} = 69^{\circ}$ 、 $\theta_{158-344-345} = 21^{\circ}$ 、 $\theta_{0-16-37} = 0^{\circ}$ 。

[0067] 选取与丁酰胆硷酯酶尺寸相匹配的纳米孔。选用直径d<sub>p</sub>为15nm,厚1<sub>p</sub>为10nm的氮化 硅纳米孔;纳米孔中的电解质为1mo1/L的氯化钾溶液。纳米孔两端加500mV的电压(即50mV/

nm的电场强度)。

[0068] 获得仅充满电解质溶液的纳米孔的过孔电流以及孔内阻塞有不同取向的丁酰胆 硷酯酶晶体结构时的过孔电流。基于全原子分子动力学模拟,获得上述电流。

[0069] 获得不同取向丁酰胆硷酯酶对纳米孔的相对阻塞电流。采用仅充满电解质溶液的 纳米孔的过孔电流I<sub>0</sub>减去孔内阻塞有不同取向的蛋白质晶体结构时的过孔电流I的差值 Δ I,再除以I<sub>0</sub>,结果如图2a所示。

[0070] 基于一个回转椭球体形状近似模型解析相对阻塞电流随蛋白质取向角的变化规律。取向角的和相对阻塞电 Δ I/I<sub>0</sub>的关系此时为

$$\begin{bmatrix} 0071 \end{bmatrix} \quad \frac{\Delta I}{I_0} = = \frac{2AB^2 f}{3d_p^2 l_p} \left[ 1 - 0.8 \left( \frac{A+B}{2d_p} \right)^3 \right]^{-1}$$
(1)

 $[0072] \quad f = f_{\perp} + (f_{\parallel} - f_{\perp}) \cos^2 \theta \qquad (2)$ 

[0073] 上式中f为孔内蛋白质的电型因子,与取向角θ有关,f<sub>⊥</sub>指的是蛋白质法向与纳米 孔轴向垂直时取向的电型因子,f<sub>||</sub>指的是蛋白质法向与纳米孔轴向平行时取向的电型因 子;联立式(1)、式(2)即可通过拟合获得回转椭球体的特征尺寸A和B,A指的是回转椭球体 的旋转轴,B指的是回转椭球体的赤道轴。

[0074] 当蛋白质被近似为扁椭球时,A=4.2nm,B=6.3nm,拟合决定系数 $R_o^2 = 0.85$ 。当蛋白质被近似为长椭球时,A=16.7nm,B=11.0nm,拟合决定系数 $R_p^2 = 0.65$ 。

[0075] 确定该蛋白质的优选的类球状近似形状。从上一步可以看出,由于  $R_o^2 > R_p^2$ ,所以将扁椭球结构的特征尺寸作为优选尺寸。

[0076] 通过将扁椭球结构近似模拟丁酰胆硷酯酶构象的三维形貌,绘出蛋白质三维形貌的类球状近似的正视图和侧视图,如图2b所示。

[0077] 实施例2。

[0078] 本实施例为基于纳米孔传感技术估计乙酰胆碱酯酶的形貌特征。

[0079] 获得乙酰胆碱酯酶投影面积最大和最小的两个方向作为2个特殊取向。将乙酰胆碱酯酶晶体 (PDBID:3LII) 三维空间结构置于三维空间坐标系下,将蛋白质形心与坐标轴圆 点重合,沿Z、Y、X坐标轴任意旋转,获得1000个取向。在这1000个随取向里,找出蛋白质晶体 在X-Y平面的最大投影面积取向 (ID:65-214-290) 和最小投影面积取向 (ID:134-144-185) 这两个特殊取向。

[0080] 获得乙酰胆碱酯酶晶体三维空间结构的任意取向998个。在上述步骤中,除掉投影面积最大和投影面积最小的取向(ID:65-214-290,134-144-185),剩余的988个取向即为该实施例中的任意取向。

[0081] 特殊取向的取向角为0°或90°,基于两个特殊取向计算其他任意取向的取向角。基 于形状叠合算法计算随机取向下蛋白质法向与Z轴正向的夹角。获得分别基于65-214-290 取向和134-144-185取向的取向角θ。

[0082] 选取与乙酰胆碱酯酶尺寸相匹配的纳米孔。选用直径d<sub>p</sub>为30nm,厚1<sub>p</sub>为30.5nm的氮化硅纳米孔;纳米孔中的电解质为1mo1/L氯化钾溶液。纳米孔两端加1525mV的电压(即

50mV/nm的电场强度)。

[0083] 获得仅充满电解质溶液的纳米孔的过孔电流以及孔内阻塞有不同取向的乙酰胆碱酯酶晶体结构时的过孔电流。

[0084] 基于分子动力学模拟结合离散模型,获得上述电流。实施步骤为:

[0085] 1) 通过VMD (Visual Molecular Dynamics) 软件计算,获得仅充满电解质溶液的纳米孔的径向电导率分布随径向距离的关系。

[0086] 2) 通过VMD软件计算,获得乙酰胆碱酯酶周围的电导率分布随远离蛋白质表面距离的关系。

[0087] 3)将纳米孔内空间离散成1Å<sup>3</sup>的连续的立方体单元,根据上述1)、2)中得到的电导率和空间位置坐标的关系,确定每个离散单元的电导率。

[0088] 4)确定每个离散单元的电导G<sub>ii</sub>,

$$[0089] \quad G_{ij} = \frac{\sigma(r_{ij})S_{ij}}{l_{ij}} \tag{3}$$

[0090] 其中, $l_{ij}$ 和S<sub>ij</sub>分别指立方体单元的长度和横截面积, $\sigma(r_{ij})$ 指的是 $r_{ij}$ 的离散立方体单元的电导率, $r_{ij}$ 指的是X方向为i序位、Y方向为j序位;

[0091] 5)确定纳米孔整体的电导G。根据电导串并联关系,

$$[0092] \quad G = \sum_{r=1}^{M} G_{r} \tag{4}$$

[0093] 其中,M是同轴圆柱形环的数量,G,指的是径向方向r序位同轴圆柱形环的电导。

[0094] 获得不同取向乙酰胆碱酯酶对纳米孔的相对阻塞电流。用仅充满电解质溶液的纳 米孔的过孔电流I<sub>0</sub>减去孔内阻塞有不同取向的蛋白质晶体结构时的过孔电流I的差值 △ I, 再除以I<sub>0</sub>,结果如图3a所示。

[0095] 基于一个回转椭球体形状近似模型解析相对阻塞电流随蛋白质取向角的变化规律。

[0096] 联立式(1)、式(2)即可通过拟合获得回转椭球体的特征尺寸A和B。该式(1)、式(2) 与实施例1中式(1)、式(2)相同;当蛋白质被近似为扁椭圆时,A=6.7nm,B=7.6nm,拟合决 定系数 $R_0^2 = 0.17$ 。当蛋白质被近似为长椭圆时,A=8.9nm,B=6.6nm,拟合决定系数  $R_n^2 = 0.54$ 。

[0097] 确定该蛋白质的优选的类球状近似形状。从上一步可以看出,由于  $R_0^2 < R_p^2$ ,所以将扁椭球结构的特征尺寸作为优选尺寸。

[0098] 通过一个长椭球来近似乙酰胆碱酯酶构象的三维形貌,绘出蛋白质三维形貌的类球状近似的正视图和侧视图,如图3b所示。

[0099] 实施例3

[0100] 本实施例为基于纳米孔传感技术估计高亲和态整合素的形貌特征。

[0101] 获得高亲和态整合素投影面积最大和最小的两个方向作为2个特殊取向。将整合素蛋白质(PDBID:3k6s)经拉伸分子动力学处理,获得其高亲和态的构象。将高亲和态的构

象的三维空间结构置于三维空间坐标系下,蛋白质形心与坐标轴圆点重合,沿Z、Y、X坐标轴,以1°的角度步进沿三个坐标轴分别依次旋转,最终获得蛋白质晶体在X-Y平面的最大投影面积取向和最小投影面积取向这两个特殊取向。

[0102] 获得高亲和态整合素晶体三维空间结构的任意取向5个。沿三个坐标轴任意旋转 一组不全为360 • k°(k为整数)的随机数组,获得5个任意取向。

[0103] 特殊取向的取向角为0°或90°,基于两个特殊取向计算其他任意取向的取向角。基于形状叠合算法计算随机取向下蛋白质法向与Z轴正向的夹角。

[0104] 选取与高亲和态整合素尺寸相匹配的纳米孔。选用直径d<sub>p</sub>为30nm,厚1<sub>p</sub>为30.5nm的 氮化硅纳米孔;纳米孔中的电解质为1mo1/L氯化钾。纳米孔两端加762.5mV的电压(即25mV/ nm的电场强度)。

[0105] 获得仅充满电解质溶液的纳米孔的过孔电流以及孔内阻塞有不同取向的高亲和态整合素晶体结构时的过孔电流。基于全原子分子动力学模拟,获得上述电流。

[0106] 获得不同取向高亲和态整合素对纳米孔的相对阻塞电流。采用仅充满电解质溶液的纳米孔的过孔电流I<sub>0</sub>减去孔内阻塞有不同取向的蛋白质晶体结构时的过孔电流I的差值 ΔI,再除以I<sub>0</sub>。

[0107] 基于两个回转椭球体形状近似模型解析相对阻塞电流随蛋白质取向角的变化规律。拟合取向角θ、两个椭球体之间的夹角α和相对阻塞电ΔI/I<sub>0</sub>的关系。

[0108] 通过拟合获得两个回转椭球体的特征尺寸A<sub>1</sub>和B<sub>1</sub>,A<sub>2</sub>和B<sub>2</sub>,A<sub>1</sub>指的是1号回转椭球体的旋转轴,B<sub>1</sub>指的是1号回转椭球体的赤道轴,A<sub>2</sub>指的是2号回转椭球体的旋转轴,B<sub>2</sub>指的是2号回转椭球体的赤道轴。

[0109] 确定该蛋白质的优选的类球状近似形状,将长椭球结构的特征尺寸作为两个类球状体的优选尺寸。

[0110] 通过两个长椭球的连体来近似高亲和态整合素的三维形貌。

[0111] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0112] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛 盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可 能的组合方式不再另行说明。







图2a

# 丁酰胆硷酯酶





侧视图

5 nm

图2b



图3a

## 乙酰胆碱酯酶

正视图

侧视图





5 nm

图3b