

纳米通道技术及应用

贾帅争* 孙红琰 王全立

(北京输血医学研究所, 北京 100850)

摘要 纳米通道技术是近年来发展的一种直接解读核酸分子编码信息的新方法, 它通过将单链核酸上的核苷酸序列直接转化为电信号, 能以每秒超过 1 000 个碱基的速度对其进行超快速序列分析, 较现有测序方法更简便快速和省钱. 该技术除可用于核酸超快速外, 还在病原体基因诊断、单核苷酸多态性和样品多成分的快速检测等多个领域有重要用途.

关键词 纳米通道, α 溶血素, 核酸测序, 传感器

学科分类号 Q615

纳米通道 (nanopore) 是 1999 年由美国加州大学的 Deamer 和哈佛大学的 Branton 所领导的研究小组共同提出的, 是指由七聚体的 α 溶血素 (α HL) 在双层脂膜上形成的直径在 1.5~2.6 nm 左右的跨膜通道. 它能通过离子、水和其他的低分子质量物质, 从本质上说是一种离子通道.

1 α 溶血素的结构和特性

α HL 为金黄色葡萄球菌分泌的一种毒素, 由于其具有致病作用, 因此其结构功能得以广泛研究. α HL 水溶性单体能结合于人红细胞、血小板、单核细胞等细胞的膜上, 膜结合单体通过组装可形成七聚体的跨膜通道 (图 1). 低浓度的 α HL (nmol/L~ μ mol/L) 即可造成细胞裂解死亡, 主要机制是由于形成的跨膜通道导致细胞膜对离子、水和其他的低分子质量物质通透性增加^[1].

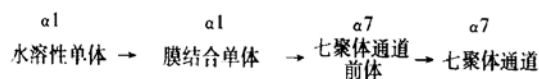


Fig. 1 The assembly of α -hemolysin to form heptameric transmembrane pore

图 1 α 溶血素形成七聚体跨膜通道的过程

α HL 通道形状类似于蘑菇, 轴向长度为 10 nm, 直径变化范围在 1.4~4.6 nm 之间. 通道口为 2.6 nm, 它通向较大的内腔, 通道跨膜区内径为 2.2 nm, 内腔和跨膜区之间为直径 1.5 nm 的限制孔, 它是由 14 个赖氨酸和谷氨酸侧链交替形成的环. 跨膜区由 14 条链形成的反向 β 折叠桶组成, 内部亲水, 外部疏水^[1]. 双链 DNA 分子只能进入通道口, 而直径为 1.5 nm 的限制孔仅容许单

链 DNA 通过.

α HL 可在细胞膜和人工合成的脂膜上组装成跨膜通道, 通道内由水溶液填充, 在中性 pH 和高离子强度下保持开放. 在 100 mV 电压下能通过 100 pA 的稳定电流, 远远大于相同条件下只有几个 pA 的其他生物通道. α HL 通道电导与溶液电导率呈近线性的依赖关系^[1].

2 纳米通道技术研究进展

Kasianowicz 等^[2]最早对多聚核苷酸分子通过 α HL 通道的生物物理学特性进行了研究, 发现电场可以驱动单链 DNA 和 RNA 分子通过脂双层膜上直径为 2.6 nm 离子通道, 穿膜时形成的延伸单链可部分阻断通道, 造成离子电流的短暂下降, 而且其持续时间与多聚分子长度呈正比. 据此提出 α HL 通道可用于对单链 DNA 和 RNA 分子直接高速测序.

在这一光明前景的指引下, 科学家们对单个核苷酸分子通过 α HL 通道的电信号特征进行了系统的研究, 确定了影响核酸分子通过 α HL 通道的若干因素: a. 电压: 电流阻断持续时间与通道两侧所加电压大小呈反比^[2]; b. 核酸分子长度: 电流阻断持续时间与多核苷酸长度呈正比^[2], 较长的多聚体以恒定速度转移, 但随着长度的缩短, 较短多聚体的转移速度增加, 此速度与所加电场呈非线性关系^[3]; c. 温度: 单链 DNA 或 RNA 分子通过 α HL 通道时间与温度大致呈负 2 次方的关系, 这

* 通讯联系人.

Tel: 010-66931222, E-mail: szjia@yahoo.com

收稿日期: 2001-08-15, 接受日期: 2001-10-18

个温度依赖特性与一些分子形成二级结构的趋势密切相关^[4]。

纳米通道技术用于 DNA 或 RNA 分子直接测序的基础是对其组成的 4 种核苷酸进行精确区分。研究证明纳米通道检测器可用于快速区分 RNA 分子中的嘧啶和嘌呤部分, 其中对 poly dT、poly dC、poly C、poly U 和 poly A 这几种核苷酸在微秒水平上的区分已经实现^[5,6]。除此之外, 纳米通道能快速区分低拷贝的长度和组成相似仅有序列不同的非标记 DNA 分子^[4]; 将纳米通道和支持矢量机器 (support vector machine) 相结合可在毫秒时间水平上分析 DNA 发卡分子的特性, 包括发卡中双链长度、错配碱基对和 loop 环长度, 能区分 DNA 发卡分子在一个核苷酸和碱基对的不同^[7]; 通过单链 DNA 寡核苷酸与 α HL 纳米通道的内腔共价偶联, 制作的 DNA 纳米通道传感器可用于单链 DNA 的序列特异性分析, 用此方法检测到 HIV 逆转录酶中控制药物抗性的一个突变, 目前的检测灵敏度为 30 个核苷酸中一个碱基差异^[8]。

3 纳米通道技术的应用前景

3.1 核酸分子超高速测序

带有纳米通道的膜将两个溶液隔开, 当在膜两

边加上电压时, 带电生物分子可通过纳米通道进行迁移。由于中性条件下核酸分子带负电荷, 而且 α HL 通道直径又略大于单链 DNA 或 RNA 的直径, 因此单链核酸分子在电场驱动下可通过脂双层膜上直径为 1.5 nm 的 α HL 通道, 从带负电一侧每次一个核苷酸分子移到带正电一侧, 每个核苷酸通过时可造成电流的短暂、不完全电流阻断。由于每个核苷酸分子通过时的电信号特征 (电流下降幅度和阻断时间) 不同^[6,9], 具体如表 1 所示, 因此通过对核酸分子通过 α HL 纳米通道时产生的电信号进行分析, 从而对核酸序列作出正确的判断 (图 2)。

Table 1 Current signals of different polynucleotides translocating through nanopore

表 1 不同多核苷酸分子通过 α HL 通道造成电流阻断的信号特征 (120mV)

核苷酸	直径/nm	电流下降幅度	平均通过速度 (μ s/nucleotide)
poly A	2	85%	20 (22 $\pm$ 6)
poly C	1.3	90% ~ 95%	6 (5 $\pm$ 2)
poly U		85%	1.4
poly dC		85% ~ 90%	1
poly dA			3

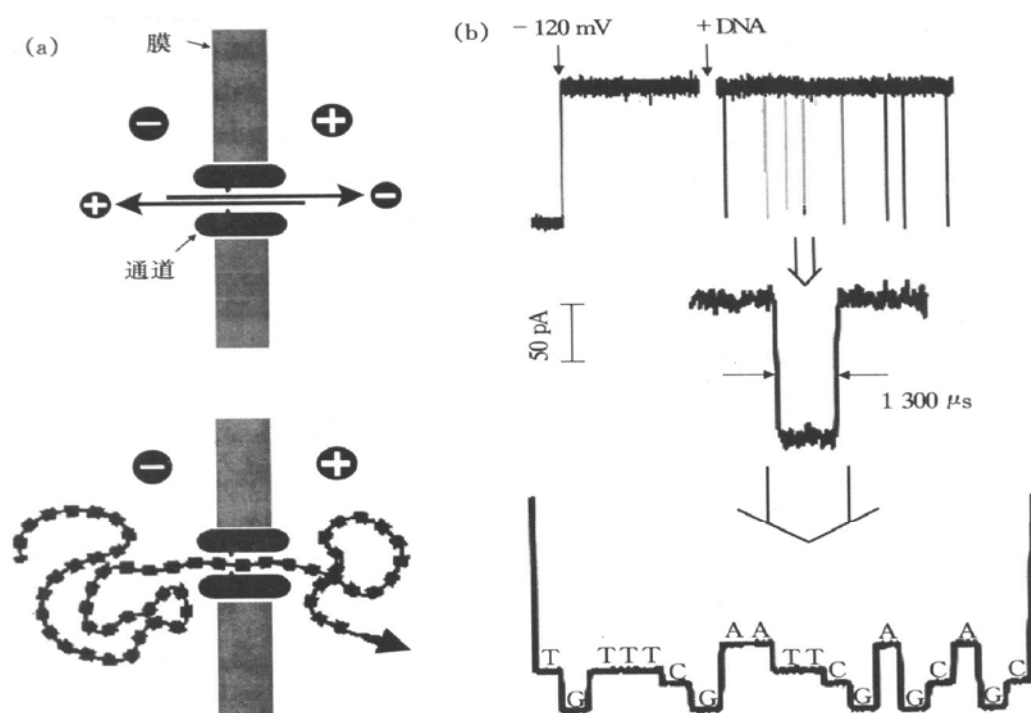


Fig. 2 Principles and components of a high-speed device for sequencing single molecules of DNA

图 2 α HL 纳米通道进行核酸分子测序示意图

纳米通道测序技术代表了直接读取核酸分子编码信息的一种新方法, 它将核酸分子上的核苷酸直接转化为电信号, 从而使直接对单个染色体长度的 DNA 分子进行序列分析成为可能^[6,9]. 它能以每秒超过 1 000 碱基的速度进行核酸序列分析, 单个科学家使用该系统的测序速度可达到现在所有研究人员测序速度的总和, 这较现有方法更快速、简便和省钱. 虽然实验室内已能应用该方法进行测序^[6], 但是要做成实用化仪器尚需如下 4 个基本条件^[10]: a. 能重复制造坚固膜和纳米通道的方法; b. 发展一次能区分一个核苷酸的检测器; c. 证明极长的多核苷酸也能通过纳米通道; d. 使每个核苷酸停留在通道中的时间能够达到准确测量的一种方法. 如今第 1 个条件 (a) 已经实现, 应用离子束雕刻技术在绝缘的 Si_3N_4 固体薄膜上制造了纳米通道, 而且该通道具有 αHL 纳米通道相似的功能^[11].

3.2 SNPs 检测

单核苷酸多态性 (SNPs) 是 DNA 序列中常见的序列变化, 是造成个体之间遗传差异的原因之一. 许多 SNPs 具有重要的临床意义, 例如肿瘤、哮喘、肥胖、糖尿病等疾病都与 SNPs 密切相关, 因此能用于病人 DNA 序列中 SNPs 检测的简便方法具有极其重要的应用价值. 纳米通道技术较现有核酸序列分析方法具有高速、简便的优势, 因此使得它在临床检测 SNPs 方面也具有重要的用途.

3.3 多成分的快速检测

将待分析成分的结合配基与能通过 αHL 通道的多聚体分子 (通常为单链 DNA) 共价融合, 这样由通道、DNA 和待分析成分共同组成纳米通道传感器分析系统, 它可将待分析成分的浓度转换为通道电导的变化. 在无待分析成分存在时, DNA 通过通道造成电流的短时间下降. 检测样品时由于待分析成分与 DNA 多聚体结合, 从而阻止结合分析成分的 DNA 分子进入通道或进入通道但不能通过 (图 3). 阻止结合分析成分的 DNA 分子进入通道将造成单位时间内电流阻断次数减少; 进入通道将造成较长时间的电流阻断, 持续时间为待分析成分与 DNA 复合物平均寿命^[12].

根据上述原理, 可以合成多种多聚体分子 (又叫分子靶信号, molecular bar codes), 用这些信号分子对抗原、抗体或其他生物活性分子标记, 然后与待检样品结合, 用纳米通道传感器进行检测. 由于每种多聚体或 DNA 分子有其独特的电信号特

征, 使得同时对多个分析成分进行测量成为可能. 目前, 应用单个离子通道已能同时对亲和素和溴脱氧尿苷抗体进行检测^[12]. 该检测系统的一个显著的优越性在于检测的快速、简便, 而且仅需微量样品, 在血样分析、病原体检测、饮用水及化学、生物战剂中毒素测定中具有重要应用价值. 该技术能快速瞬时地对多种成分进行定量分析, 代表了传感器技术发展的前沿.

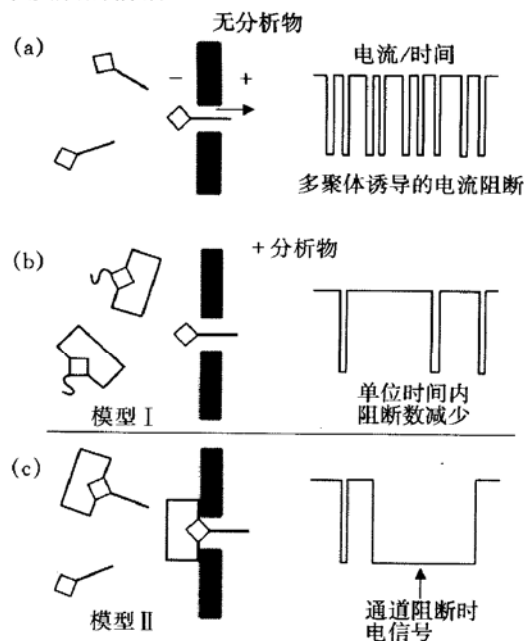


Fig. 3 Analytical sensor based on nanometer-scale pores and polymers

图 3 纳米通道传感器的分析原理示意图

(a) 无分析物时, 多聚体自由通过通道, 造成短暂的电流阻断; (b) 分析物与多聚体结合阻止多聚体进入通道; (c) 分析物与多聚体结合阻断通道.

3.4 其他用途

由于纳米通道技术的超高速测序功能, 决定了它在病人遗传背景分析、病原体基因诊断和基因组分析等破译遗传信息方面具有其他方法所无可比拟的优越性. 它能提供更多的病人信息, 使医生能针对病人采取个性化的药物和治疗方案. 除此之外, 通过靶信号多聚体分子与各种生物活性分子结合用于样品检测, 在医学、工业、科研、军事等领域也有极其广泛的用途.

4 展 望

纳米通道技术涉及到的学科包括分子生物学、生物化学、电子学、材料科学和信息学等多个学科, 但由于其潜在用途非常广泛, 该研究曾得到美

国国家自然科学基金、NIH、宇航局、科学院等多家单位的资助。我国在该方面研究尚属空白，因此更应该集中各学科优势力量奋起直追，才能使我们和国外在此领域的差距不致更大。

参 考 文 献

- 1 Song L, Hobaugh M R, Shustak C, *et al.* Structure of staphylococcal α hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, 1996, **274** (5294): 1859~ 1865
- 2 Kasianowicz J J, Brandin E, Branton D, *et al.* Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (24): 13770~ 13773
- 3 Meller A, Nivon L, Branton D. Voltage-driven DNA translocations through a nanopore. *Phys Rev Lett*, 2001, **86** (15): 3435~ 3438
- 4 Meller A, Nivon L, Brandin E, *et al.* Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (3): 1079~ 1084
- 5 Akeson M, Branton D, Kasianowicz J J, *et al.* Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophys J*, 1999, **77** (6): 3227~ 3233
- 6 Deamer D W, Akeson M. Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing. *Trends Biotechnol*, 2000, **18** (4): 147~ 151
- 7 Vercoutere W, Winters-Hilt S, Olsen H, *et al.* Rapid discrimination among individual DNA hairpin molecules at single nucleotide resolution using an ion channel. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** (3): 248~ 252
- 8 Howorka S, Cheley S, Bayley H. Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** (7): 636~ 639
- 9 <http://golgi.harvard.edu/branton/nanopore.html>
- 10 <http://www.cstl.nist.gov/nist831/NAT099/abstracts/brant.html>
- 11 Li J, Stein D, McMullan C, *et al.* Ion-beam sculption at nanometer length scales. *Nature*, 2001, **412** (6843): 166~ 169
- 12 Kling J. Multipurpose nanopore sensors. *Anal Chem*, 2001, **73** (11): 306~ 307

Nanopore Technology and Its Applications

JIA Shuai-Zheng^{*}, SUN Hong-Yan, WANG Quan-Li

(*Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China*)

Abstract Nanopore technology is a new method developed in recent years to directly decipher genetic information of nucleic acids. It can sequence more than 1 000 bases per second by converting strings of nucleotides directly into electronic signatures. Nanopore sequencing is more quickly, easily and cost-effectively than existing technologies. Besides prospects for nucleic acids ultrarapid sequencing, this technology can also be used for gene diagnosis of pathogen, detection of single nucleotide polymorphisms, rapid, simultaneous multianalyte detection and other areas.

Key words nanopore, α -hemolysin, nucleic acid sequencing, sensor

^{*} Corresponding author. Tel: 86-10-66931222, E-mail: szjia@yahoo.com

Received: August 15, 2001 Accepted: October 18, 2001