纳米孔——用于单分子蛋白质探测分析的强力工具

蛋白质在生命的各个方面扮演着相当重要的角色，其已经成为生命科学领域的重要研究对象之一。蛋白质存在着静态的一二三级和高级结构，此外，在实际生命活动中，其动态的自身或与其他分子之间的相互作用往往也十分重要。对蛋白质静态、动态结构的分析是其研究领域的重要组成部分。传统的用于蛋白质结构探测的方法已经很多，比如我们使用质谱法求得蛋白质的一级结构；使用核磁共振光谱法或质谱X射线晶体衍射法求得蛋白质的二级结构等。这些传统方法是准确的，然而其往往需要大量的蛋白质样本，花费较多时间；同时其也不能够实现单个蛋白质分子动态结构的探究，而单分子蛋白质探测技术就能够较好地解决上述问题。如今，不断快速发展的纳米孔探测技术已经成为了单分子蛋白质探测技术领域的重要组成部分。其最终目标——实现无修饰的蛋白质单分子探测一旦实现，将为生命科学领域带来更多研究机遇。本文以纳米孔的基本概念、原理为起点，依次介绍纳米孔实验数据的基本特质、纳米孔的应用与其前景。

纳米孔基本概念与原理

纳米孔探测系统以镶嵌在绝缘膜中纳米大小的孔为核心，而绝缘膜两侧是两个充满电解液的腔室。同时，在腔室的两端施加着固定大小的电压，这就使得纳米孔中不断有离子穿过，从而导致电流的形成。而在该电流作用下，生物分子能够受其驱动，穿过纳米孔。当纳米孔中有生物分子穿过时，离子的通过就会受到阻碍，从而导致孔中电流大小发生改变。而当穿过纳米孔的分子的大小、质量、电荷情况发生改变时，其也将引起不同的电流变化，这也就是纳米孔实验获得并用以分析的数据。

纳米孔一般被分成两类：生物孔和合成孔。【1】而两类纳米孔都已经获得了广泛的应用。例如，Henry Brinkerhoff等人使用M2 MspA这一生物孔对蛋白质一级结构进行了探究【2】，而Laura Restrepo-Pérez等人则利用SiN这一固态合成纳米孔对SDS和蛋白质之间的相互作用进行了研究【3】.生物类纳米孔的优势在于其具有便于确定的原子排列三维结构同时其噪音一般小于合成纳米孔【4】；而合成纳米孔则具有更高的可修饰性，同时易与化学、材料等其他学科进行结合。事实上，正是基于材料科学，已经有玻璃纳米孔、2D材料膜纳米孔等新型合成纳米孔出现。【1】

纳米孔实验数据特征

正如前所述，纳米孔实验数据主要即为纳米孔实验过程中电流的改变及其相应时间。为方便对相关信息进行叙述，我们用一个事件代指一个蛋白质分子穿过纳米孔所引起的一次电流变化。因此，一次纳米孔实验就是由多个电流事件组成的。而一次事件的确定是依据自定义量——阻塞电流比实现的，其以符号IB代替。【1】而IB = ib/io，其中，ib指蛋白质通过时的平均电流大小，io是无蛋白质通过时纳米孔中电流大小，即开孔电流。同时，对于每一次电流事件，其还有其他特征，如事件时间、事件振幅等。事件时间是指一次电流事件的总时间；而事件振幅反映了事件的剧烈程度，其一般用事件振幅比代替表示。事件振幅比的计算式为：1 -(ib/io)。

对于上述定义事件特征的使用与研究已经很多，一般说来，对于所有纳米孔实验，在其进行数据处理时都会使用开孔电流、阻塞电流比、事件时间等概念进行作图等处理。而这些量之间的相互关系也已经有很多研究者进行研究，如Sonja Schmid 等人研究了某个固态纳米孔系统电压、离子强度和事件时间的关系【5】；Huang Gang等人研究了FraC纳米孔中蛋白质分子质量和阻塞电流比之间的二次方关系【6】。但是总体说来，这些量之间的相互关系是不易确定的，而且这些关系可能因纳米孔的种类发生改变。

纳米孔应用

在了解了纳米孔的基本原理和实验数据相关概念、特征之后，接下来就可以进入到实际应用环节。纳米孔在蛋白质研究领域的应用已经很广泛，下面的几个研究实例能够向我们展示纳米孔出色的蛋白质感应与探测能力。这几个实例分别关于：纳米孔对蛋白质修饰状况的探测、纳米孔探测蛋白质动态变化、纳米孔蛋白测序。

**纳米孔探测蛋白质修饰**

蛋白质修饰状况是蛋白质分子的重要特征，其往往与蛋白质分子的独特功能以及其参与的特殊分子机理相联系。因此，探究蛋白质分子的修饰状况是十分重要的。传统用于探测蛋白质修饰的方法是质谱法，其缺点在前文已经有所叙述。如今，已经有数个关于纳米孔用于探测蛋白质修饰的研究发表。比如，Laura Restrepo-Perez等人使用了FraC纳米孔以期分辨合成的具有单个修饰的固定序列的肽段和原始肽段。【7】其将磷酸化和糖苷化的肽段及其相应的原始无修饰的肽段分别通过纳米孔，最终发现修饰后肽段引起的电流事件阻塞电流比与未修饰肽段的相应数据具有明显不同，说明纳米孔识别到修饰。而将两种修饰后肽段与原始肽段混合后通过纳米孔的实验证实了上述结论。此外，Gang Huang等人也使用了同种纳米孔对固定序列肽段的修饰进行探测。【8】其使用的方法和Laura Restrepo-Perez相似，但是其使用了更多种修饰基团进行实验，均证明了纳米孔能够探测区分蛋白质修饰情况。此外，其还探究了单个基团修饰蛋白质通过纳米孔平均电流大小和修饰基团分子大小的关系。

从现状来看，纳米孔探测蛋白质修饰仍然处于早期阶段，但是上述实例已经展示出了纳米孔对蛋白质不同修饰的敏感性和精确性。使用纳米孔探测蛋白质上多个多种修饰基团是可能的。

**纳米孔探测蛋白质动态结构变化**

蛋白质动态变化往往与蛋白质在生物体中所体现的功能相联系，因为蛋白质构象等的动态变化可能对应着蛋白质行使其功能时的与外界的交互过程。因此，探测蛋白质动态变化对揭示蛋白质的分子机理和功能具有重要意义。然而，质谱等传统蛋白质探测方法往往不能达到该目标。近年来，已经有多个研究者利用纳米孔作为探究蛋白质动态变化的工具。在这些实例中，纳米孔展现出了出色的探测能力，它帮助研究人员完成了从前我们不能轻易实现的实验，并取得了重要的研究成果。

例如，Sonja Schmid等人使用SiN固态纳米孔对蛋白质Hsp90的构象变化进行了研究。【4】蛋白质Hsp90易于ADP、ATP、AMP-PNP等物质结合，因为其具有两个核苷酸结合位点。当结合之后，其构象将会发生改变。同时，若核苷酸越多，那么Hsp90结合态构象所占比例就会更大。研究者首先把蛋白质与足量ADP、ATP、AMP-PNP相混合，得到三种不同的混合物。随后，其将三种混合物分别通过纳米孔，将所得电流事件数据进行作图。其最终发现所得数据符合对结果的理论分析预测。此外，Movileanu等人利用FhuA β-barrel纳米孔与某种蛋白质底物结合制成了新式纳米孔。他们通过纳米孔实验观测到了另一种蛋白质反应物与纳米孔所含的蛋白质底物短暂结合时的纳米孔电流信号，该信号与蛋白质穿过纳米孔所产生信号完全不同。【9】

**纳米孔蛋白测序**

纳米孔蛋白测序技术的思想来源于纳米孔DNA测序技术。事实上，正是后者的成功研发应用使得纳米孔蛋白测序成为了可能实现的技术。从现状来看，纳米孔蛋白测序技术仍然处于早期攻关阶段，仍有很多关键问题暂未解决【10】。在这里，本文主要叙述现在纳米孔蛋白测序技术的新进展。

Henry Brinkerhoff等人利用M2 MspA纳米孔和经过特殊处理的肽链解决了蛋白质在纳米孔中步长控制的问题，其同时实现了纳米孔对单个氨基酸替换的分辨和纳米孔对肽段的重读功能实现。【2】Huang G等人则利用FraC纳米孔同样实现纳米孔对单个氨基酸替换的两肽段的分辨。此外，其还探究了蛋白质分子质量和其引起电流事件的平均电流之间的函数关系。【6】Di Muccio等人更进一步，其使用分子动态模拟技术和纳米孔实验，得出氨基酸体积和其对应的电流之间的关系。【11】

从上述几例能够看出利用纳米孔的蛋白质测序技术研发过程中虽然面临很多挑战，但同时该过程也正不断产出丰盛的科研成果。总之，纳米孔蛋白测序技术仍然很有可能被攻克，其研究进展值得我们进行关注。

纳米孔改进

虽然纳米孔技术具有强大的蛋白质探测能力且不断被用于相关科研实验，其仍然具有某些缺点，比如其背景噪声问题和其探测局限性——对于较小的蛋白质，由于其在纳米孔中停留时间过短，纳米孔很难获取其信号。一旦改进这些方面，纳米孔功能将更加强大。

针对背景噪音问题，Alessio Fragasso等人提出了纳米孔噪音来源、分类、计算方法和相关解决办法。【4】而针对纳米孔探测能力的局限，Pierre Stömmer等人应用新型纳米孔辅助技术NEOtrap实现了蛋白质停留时间的倍增。在他们构建的系统中，蛋白质甚至能够在纳米孔中停留数十分钟。【5】而其他相关实验证明了这项技术的可靠性和其对纳米孔性能的改善。【12】此外，Cao Chan等人通过构建新型纳米孔实现了更小、更长的纳米孔，增大了纳米孔探测蛋白质范围，使其能够探测更小的蛋白质.【13】

这些改进使得纳米孔技术能够向着其最终目标迈进，比如蛋白质测序、蛋白质修饰检测等。【14】对于一项正在发展的技术而言，这些改进是不可缺少的，它们能够让纳米孔技术更适于应用，从而拓展其探测能力。

展望

纳米孔技术是一项极具应用前景的生物探测技术，其在DNA探测方向的成功已经证明了这一点。而纳米孔蛋白质探测技术虽然仍处于早期探索阶段，在该领域也已经有很多成功案例，这正是纳米孔强大的探测能力决定的。当然，纳米孔仍然需要解决很多难题，比如如何控制蛋白质在纳米孔中的运动和步长、如何进一步提高纳米孔探测的敏感度、如何进一步处理纳米孔信号从而进一步理解纳米孔事件等。但是纳米孔技术的应用前景仍然是广泛的，其还能够通过与其他技术相结合的方式进一步扩展自己的应用范围。总之，纳米孔探测技术处于纳米技术和生物领域的前沿，其持续的高速发展将使得我们完成从前触不可及的目标，进而推动众多领域前进。

引用文章

**[1]**Varongchayakul Nitinun,Song Jiaxi,Meller Amit,Grinstaff Mark W. Single-molecule protein sensing in a nanopore: a tutorial.[J]. Chemical Society reviews,2018,47(23).

**[2]**Brinkerhoff Henry,Kang Albert S W,Liu Jingqian,Aksimentiev Aleksei,Dekker Cees. Multiple rereads of single proteins at single-amino acid resolution using nanopores.[J]. Science (New York, N.Y.),2021.

**[3]**Restrepo-Pérez Laura,John Shalini,Aksimentiev Aleksei,Joo Chirlmin,Dekker Cees. SDS-assisted protein transport through solid-state nanopores.[J]. Nanoscale,2017,9(32).

**[4]**Fragasso Alessio,Schmid Sonja,Dekker Cees. Comparing Current Noise in Biological and Solid-State Nanopores.[J]. ACS nano,2020,14(2).

**[5]**Schmid Sonja,Stömmer Pierre,Dietz Hendrik,Dekker Cees. Nanopore electro-osmotic trap for the label-free study of single proteins and their conformations.[J]. Nature nanotechnology,2021,16(11).

**[6]**Huang Gang,Voet Arnout,Maglia Giovanni. FraC nanopores with adjustable diameter identify the mass of opposite-charge peptides with 44 dalton resolution.[J]. Nature communications,2019,10(1).

**[7]**Restrepo-Pérez Laura,Wong Chun Heung,Maglia Giovanni,Dekker Cees,Joo Chirlmin. Label-Free Detection of Post-translational Modifications with a Nanopore.[J]. Nano letters,2019,19(11).

**[8]**Restrepo-Pérez Laura,Huang Gang,Bohländer Peggy R,Worp Nathalie,Eelkema Rienk,Maglia Giovanni,Joo Chirlmin,Dekker Cees. Resolving Chemical Modifications to a Single Amino Acid within a Peptide Using a Biological Nanopore.[J]. ACS nano,2019,13(12).

**[9]**Schmid Sonja,Dekker Cees. Nanopores: a versatile tool to study protein dynamics.[J]. Essays in biochemistry,2020.

**[10]**Alfaro Javier Antonio,Bohländer Peggy,Dai Mingjie,Filius Mike,Howard Cecil J,van Kooten Xander F,Ohayon Shilo,Pomorski Adam,Schmid Sonja,Aksimentiev Aleksei,Anslyn Eric V,Bedran Georges,Cao Chan,Chinappi Mauro,Coyaud Etienne,Dekker Cees,Dittmar Gunnar,Drachman Nicholas,Eelkema Rienk,Goodlett David,Hentz Sébastien,Kalathiya Umesh,Kelleher Neil L,Kelly Ryan T,Kelman Zvi,Kim Sung Hyun,Kuster Bernhard,RodriguezLarrea David,Lindsay Stuart,Maglia Giovanni,Marcotte Edward M,Marino John P,Masselon Christophe,Mayer Michael,Samaras Patroklos,Sarthak Kumar,Sepiashvili Lusia,Stein Derek,Wanunu Meni,Wilhelm Mathias,Yin Peng,Meller Amit,Joo Chirlmin. The emerging landscape of single-molecule protein sequencing technologies.[J]. Nature methods,2021,18(6).

**[11]**Di Muccio Giovanni,Rossini Aldo Eugenio,Di Marino Daniele,Zollo Giuseppe,Chinappi Mauro. Insights into protein sequencing with an α-Hemolysin nanopore by atomistic simulations.[J]. Scientific reports,2019,9(1).

**[12]**Schmid Sonja,Dekker Cees. The NEOtrap – en route with a new single-molecule technique[J]. iScience,2021,24(10).

**[13]**Cao Chan,Cirauqui Nuria,Marcaida Maria Jose,Buglakova Elena,Duperrex Alice,Radenovic Aleksandra,Dal Peraro Matteo. Single-molecule sensing of peptides and nucleic acids by engineered aerolysin nanopores.[J]. Nature communications,2019,10(1).

**[14]**Restrepo-Pérez Laura,Joo Chirlmin,Dekker Cees. Paving the way to single-molecule protein sequencing.[J]. Nature nanotechnology,2018,13(9).