
Etude théorique de la translocation de biomolécules à travers un nanopore

Abstract : *Rapport de stage, M2R EP, Timothée Menais, 2011-2012.*

On verra plus tard pour la présentation de l'en-tête.

Mots clés : *ADN, Graphène, Dynamique moléculaire, Physique statistique.*

Stage encadré par :

Dr Arnaud Buhot

arnaud.buhot@cea.fr / tel : ++33 438 78 38 68

Groupe Théorie

Structures et Propriétés d'Architectures Moléculaires

Institut Nanoscience et Cryogénie

17 rue des Martyrs 38054 Grenoble cedex 9 France

http://inac.cea.fr/spram/Phoce/Vie_des_labos/Ast/ast_groupe.php?id_groupe=397



5 juin 2015

Remerciements

Tout plein de gens à remercier arnaud stefano veera iannis tout le créab camille zoéline :) **test**

Introduction

Ce manuscrit de thèse présente les travaux réalisés au sein du groupe CREAB (Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude d'Assemblages Biologiques) et en coopération avec le groupe PCI (Polymères Conducteurs Ioniques), deux groupes du laboratoire SPrAM (Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaires) de l'INAC (Institut Nanosciences et Cryogénie) au sein du CEA (Commissariat à l'énergie atomique) de Grenoble de Novembre 2012 à Novembre 2015.

Le sujet s'intègre dans le cadre de la translocation de biomolécules à travers une membrane fine, thème porté par l'équipe CREAB, étudié avec des outils numériques de dynamique moléculaire, compétences apportées par la collaboration avec le groupe PCI.

La translocation de polymères (notamment l'ADN), est le passage d'un côté à l'autre d'une membrane en traversant un pore situé dans cette dernière. L'étude de ce domaine est très active tant sur le plan expérimentale que théorique. Ceci est principalement dû aux applications potentielles en biotechnologies et en médecine, notamment pour le séquençage du génome. En plus des potentielles applications techniques, ce thème est porteur de question fondamentales très intéressantes d'un point vu physique statistique des polymères.

La dynamique moléculaire est une technique de simulation numérique que nous avons appliquée au problèmes de translocation. Il s'agit de définir les potentiels d'interactions entre les différents sous-systèmes (ou grains) du problème et d'intégrer les équations du mouvement pour obtenir une trajectoire. Cette méthode permet d'envisager des modèles de toutes sortes de complexité, en découpant le système en grain de nature variée, du simple atome à la molécule complète.

Avec ces deux thèmes en tête, nous avons développé un modèle original de polymère adapté à l'étude statistique de la translocation de chaînes structurées (telle l'ADN) à travers des membranes fines. Ce modèle, suffisamment simple pour obtenir des résultats assez nombreux pour être statistiquement significatifs nous a permis de sonder les effets de l'utilisation de membranes fines sur le phénomène de translocation, que ce soit via la vibration et déformabilité du nano-pore ou bien encore la flexibilité de la membrane.

Ce manuscrit est structuré de la manière suivante :

annonce du plan

Table des matières

1	Etat de l'art	5
1.1	Aspect expérimental	5
1.1.1	L'ADN et le séquençage	5
1.1.2	Utilisation de nanopores	9
1.1.3	La translocation de polymères	10

1 Etat de l'art

1.1 Aspect expérimental

1.1.1 L'ADN et le séquençage

Les bio-polymères, et notamment l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), sont les polymères qui constituent le vivant. Ils interviennent dans de nombreux processus clés en biologie. L'ADN, avec l'ARN (Acide RiboNucléique) est le support de l'information génétique du vivant.

L'ADN, généralement contenu dans le noyau des cellules, a été pour la première fois isolé et identifié par Friedrich Miescher en 1869 à partir de globules blancs. En 1953 Francis Crick et James Watson mettent en évidence sa fameuse structure en double hélice [1]. Cette hélice est le reflet de la conformation dite double brin de l'ADN, il s'agit de l'appariement de deux chaînes dites simple brin qui sont complémentaires. Le simple brin d'ADN est une séquence de quatre monomères différents. Ces monomères, appelés nucléotides sont constitués de phosphate, de sucre et d'une des bases azotées, seul élément distinct entre nucléotides : l'adénine, la guanine (deux purines), ainsi que la cytosine et la thymine (deux pyrimidines). Via des liaisons hydrogènes (aussi appelée liaisons Watson-Crick dans le cas de l'ADN), les bases peuvent s'associer à leur complémentaire, adénine avec thymine et cytosine avec guanine. Les liaisons hydrogènes favorisent une forte affinité lors de l'appariement et contribuent avec les interactions orbitales entre cycles aromatiques des bases azotées à stabiliser cette structure hélicoïdale.

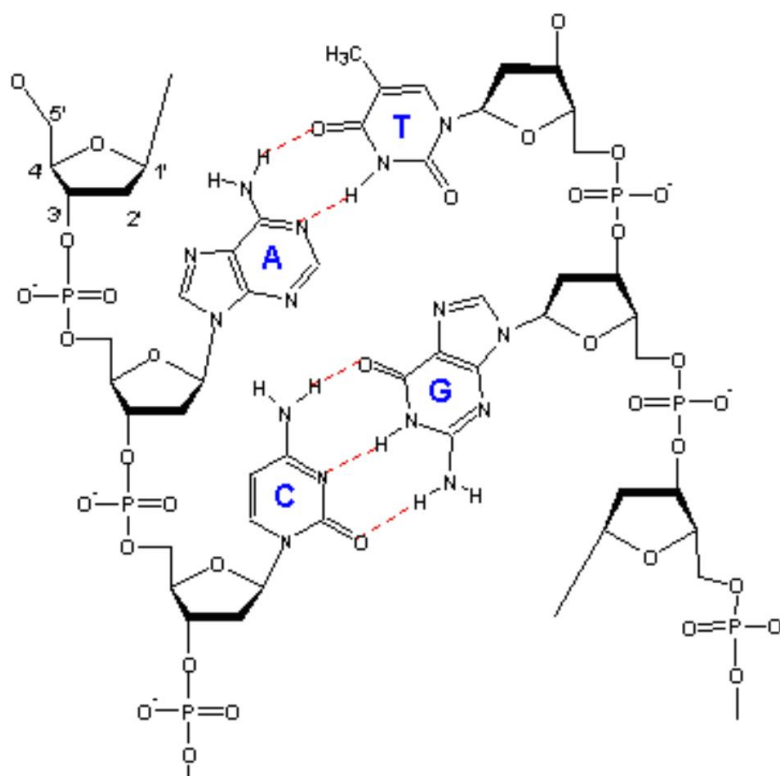


FIGURE 1 – Structure chimique de l'ADN. Le squelette est composé d'une succession de phosphates et de sucres liés entre eux, chacun des sucres est de plus lié à une base azotée. Les bases azotées peuvent interagir par liaisons hydrogènes et interactions orbitales. Les bases s'associent plus facilement avec leur complémentaire (Adénine et Thymine ou Cytosine et Guanine) permettant une certaine variété de structure : repliement d'ADN simple brins ou encore association de deux chaînes complémentaires formant l'hélice caractéristique de l'ADN dit double brins (Image empruntée au cours de Sergei N. Smirnov [2]).

La structure chimique de l'ADN et ses interactions (rappelées sur la figure 1) génèrent des

propriétés qui sont fortement dépendantes de la séquence. L'influence de la séquence et la compréhension du vivant passe par la capacité à séquencer l'ADN, c'est à dire déterminer l'enchaînement des nucléotides.

Les applications sont potentiellement nombreuses : caractérisation d'espèces vivantes [3], identification de souches pathogènes pour les virus ou bactéries [4], diagnostique des maladies génétiques [5], étude de la phylogénie [6], analyse de la résistance aux antibiotiques [7], identification de mutations [8], médecine personnalisée [9], identification d'individu pour la police scientifique [10].

Dès la deuxième moitié des années 70, les premières méthodes de séquençage voient le jour. Il s'agit de la méthode de Sanger [11] (voir figure 2) basée sur une synthèse enzymatique sélective (inspirée des travaux de Wu, R Padmanabhan et al [12]) et de la méthode Maxam et Gilbert [13] basée sur une dégradation chimique sélective. Gilbert et Sanger obtiennent tous deux le prix Nobel de médecine en 1980 pour leurs méthodes. En 1977, grâce à sa méthode, Sanger parvient à séquencer le premier génome complet, il s'agit du bactériophage Φ X174 [14].

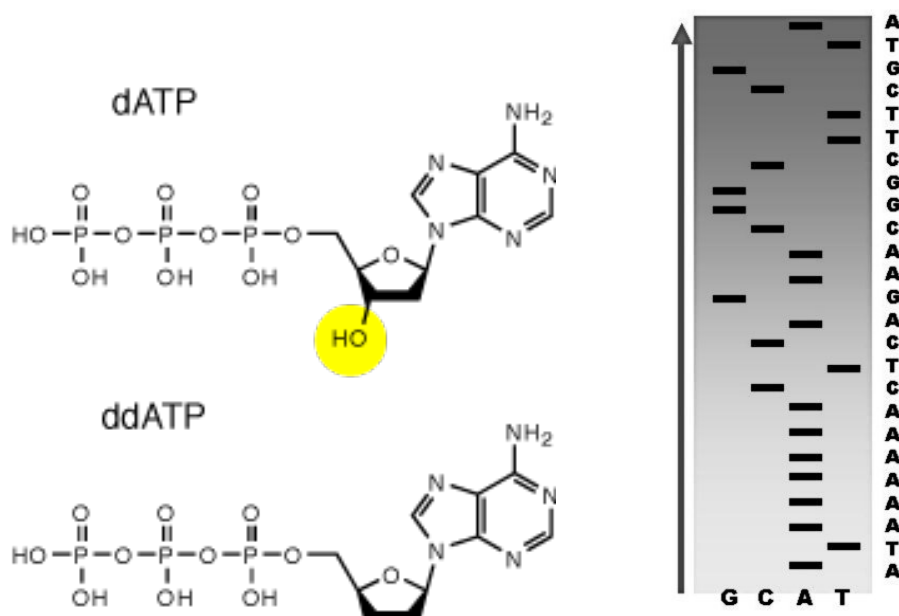


FIGURE 2 – Le séquençage par la méthode de Sanger : Le brin d'ADN à séquencer est répliqué parallèlement dans quatre milieux différents contenant chacun les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Chacun des milieux présente en plus une faible quantité de l'un des didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP), qui une fois incorporé dans la chaîne empêche toute croissance supplémentaire (image de gauche). Chacun des quatre milieux présente alors des chaînes de tailles variées terminant toutes par un même nucléotide. Les milieux sont alors analysés par électrophorèse sur gel, ce qui va trier les chaînes par taille. On peut alors remonter à la séquence par lecture directe sur le gel (image de droite).

La méthode de Sanger est rapidement préférée à celle de Maxam-Gilbert car elle nécessite moins de composés chimiques toxiques et de marqueurs radioactifs. Elle a été utilisée du début des années 80 jusqu'à la moitié des années 2000 avec principalement des avancées techniques : marquage fluorescent [15], électrophorèse capillaire [16] ou encore automatisation des procédures [17]. Afin de séquencer de longs génomes, les techniques les plus souvent utilisées s'inspirent de la méthode dite shotgun, qui reconstruit un génome complet à partir de fragments de séquences moins coûteux et plus simples à séquencer, élaborée par R. Staden [18] (voir figure 3). Ces

techniques impliquent une amplification du signal ADN de départ (par PCR [19, 20]), de lourds traitements algorithmiques et sont sujettes à des erreurs notamment en ce qui concerne les parties de séquences redondantes dont certaines peuvent être omises. Cette première génération de séquençage a permis en 2001 le premier séquençage complet du génome humain [21, 22].

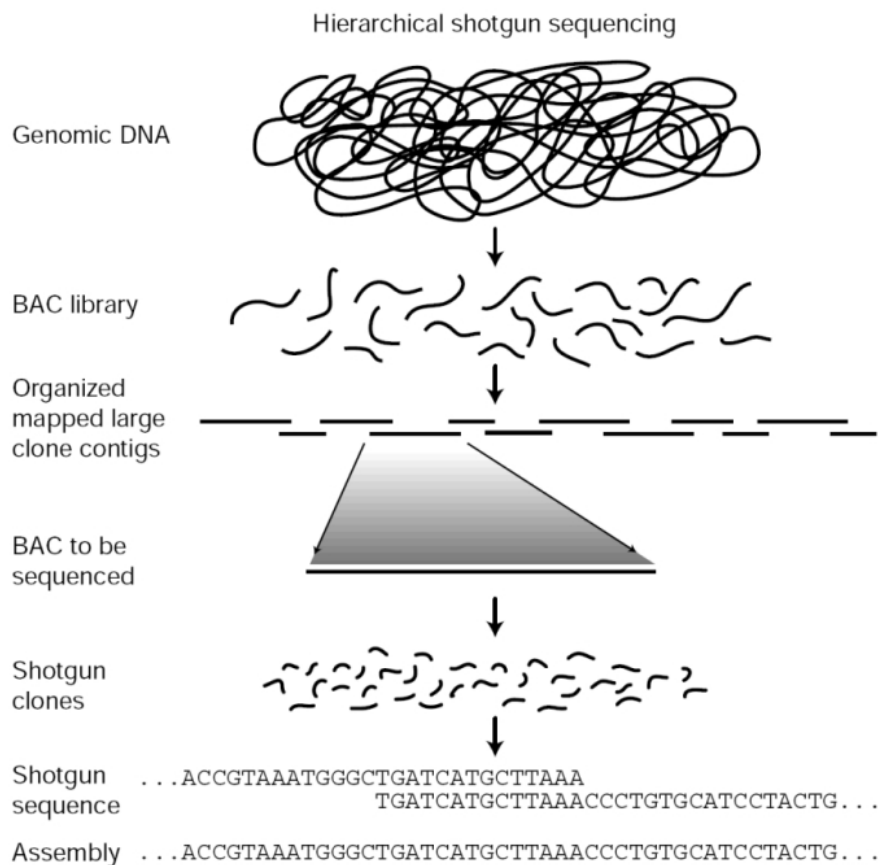


FIGURE 3 – Schéma de principe de la méthode shotgun (emprunt à la review de Eric S. Lander et al.[21]). Le brin étudié est d’abord copié de nombreuses fois par PCR. Les brins sont ensuite fragmentés pour créer des banques de séquences aléatoires plus courtes (et moins compliquées à séquencer). De nombreux clones sont alors séquencés et rassemblés. De lourds traitements informatiques sont employés pour reconstituer la séquence d’origine à partir des parties de génomes qui se chevauchent entre séquences.

A partir de la moitié des années 90, de nouvelles méthodes sont développées et seront utilisées dans des appareils de séquençage commerciaux, ce qui va populariser l’utilisation du séquençage [23]. Le premier appareil de cette génération, le MPSS (Massively parallel signature sequencing [24]) voit le jour en 2000. Il repose sur une méthode tellement complexe qu’aucun appareil n’a été fourni à des laboratoires indépendants, les séquençage ayant lieu dans les locaux de la compagnie Lynx Therapeutics. D’autres technologies sont développée en parallèle. En 1996 la méthode de pyrosequencing [25] basée sur un brevet de 1991 [26] voit le jour. Cette méthode repose sur la détection de l’activité de l’ADN polymérase par un pyrophosphate. Elle sera utilisée par un appareil commercial de la société 454 Life Sciences en 2005 [27]. Egalement basée sur brevet de Tsien et al [26], la méthode dite de séquençage par colonies d’ADN est brevetée en 1998 [28] puis exploitée commercialement par la société Illumina en 2008 [29]. Une autre technologie communément utilisée par Life Technologies est le séquençage SOLiD [30, 31] (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) , il s’agit de séquençage par ligation,

également proche de la méthode de polony [32] (Ces deux méthodes présentent des erreurs lors de la lecture de séquences palindromiques [33]). Life Technologies utilise aussi le séquençage par semi conducteurs pour détecter les ions hydrogènes relâchés lors de la polymérisation de l'ADN (Ion semiconductor sequencing) [34], ces méthodes sont efficaces, cependant elles rencontrent des problèmes avec les répétition d'homopolymers [34]. Deux méthodes sont développées, DNA nanoball sequencing [35] et Heliscope single molecule sequencing [36], mais restent peu utilisées car elles ne sont utilisables que sur des fragments d'ADN très courts. Ces méthodes nécessitent une PCR par émulsion [20] pour amplifier le signal ADN de départ. Cette étape est source d'erreurs, en effet la PCR peut être biaisée et peut générer des artefacts [37].

Une approche originale est également commercialisée, il s'agit du séquençage en temps réel d'une molécule unique (Single molecule real time sequencing), un marquage fluorescent est détecté lors de la création du brin complémentaire lors de la copie de l'ADN [38]. Cependant plusieurs lectures sont nécessaires pour obtenir une précision suffisante [39].

Certains de ces appareils sont comparés dans le tableau récapitulatif suivant, créé à partir des résultats comparés entre différents appareils [40, 41]. [tableau à faire](#)

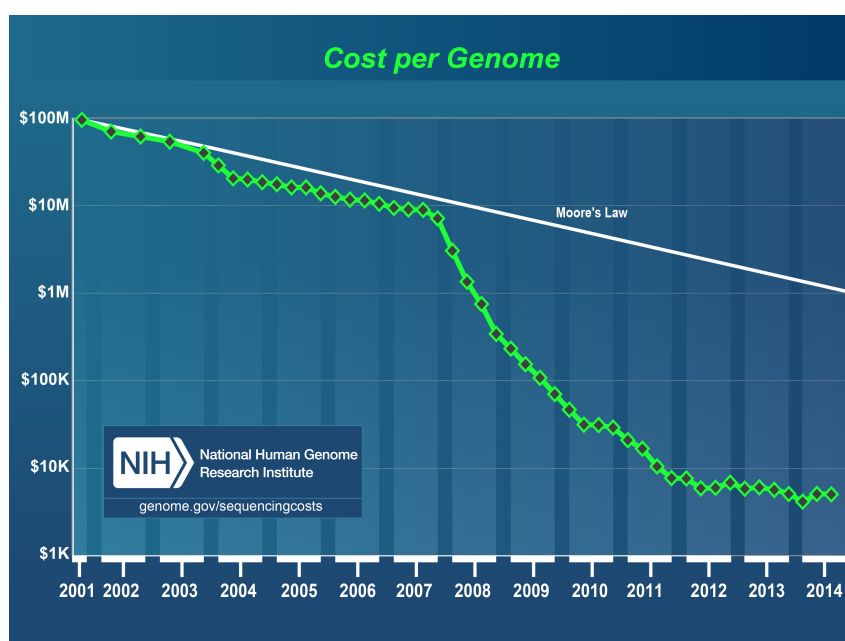


FIGURE 4 – Evolution du coût du séquençage d'un génome complet selon le NIH. On observe au départ une diminution normale du coût suivant une loi de Moore. L'arrivée des premiers appareils commerciaux de next generation sequencing se traduit par une rupture de pente très nette en 2007. Aujourd'hui, un plateau au dessus de l'objectif des 1000 USD pour un génome complet est atteint, d'où la nécessité de développer des méthodes de troisième génération.

La figure 4 présente l'évolution du coût du séquençage d'un génome complet. décrire décrochage next gen. Nous sommes toujours au dessus de l'objectif de 1000 USD [42].

Ces méthodes ont fait leurs preuves mais demeurent trop coûteuses pour envisager leur usage à grande échelle. Une troisième génération de technique de séquençage est aujourd'hui envisagée.

Voici une liste de pistes envisagées pour les appareils de séquençage de troisième génération :

- Le séquençage par hybridation [43]. Ce procédé permet de reconnaître des séquences types par leur hybridation avec des bio-puces à ADN (de courtes séquences), cela nécessite un marquage fluorescent ainsi qu'un nombre important de produits chimiques et d'ADN de base.
- L'utilisation de la spectroscopie de masse [44]. Basée sur la différence de masse entre les nucléotides, cette méthodes semble être adaptées à la détection de substitution de bases

dans différents gènes, mais pas pour séquencer des génomes complets. (Utilité pour la médecine légale [45]).

- La mise au point de techniques de microscopie électronique [46]. Ces techniques sont complexes car elles nécessitent l'utilisation d'atomes lourds.
- La manipulation de bio-molécules avec pinces optiques, magnétiques ou AFM [47, 48].
- La mesure du courant obtenu par effet tunnel lors du passage de l'ADN dans un canal microfluidique [49, 50].
- **Le séquençage par nanopore.**

C'est cette dernière possibilité que nous explorons.

à regarder dans reviewngs2012n2 [41].

1.1.2 Utilisation de nanopores

Le séquençage par nanopore a potentiellement de nombreux avantages sur les systèmes commerciaux déjà existants. En effet, cette technique laisse envisager la lecture de longues séquences (supérieurs à 5000 paires de bases) à vitesse élevée (1 paire de base par nanoseconde) [51, 52]. Aucun marquage chimique n'est nécessaire, l'utilisation d'enzymes est moindre et le signal ADN n'a pas besoin d'être amplifié (pas de PCR).

Exposons dans un premier temps les concepts de bases et définitions du séquençage par nanopore. On envisage de séquencer la séquence ADN au cours de sa translocation. La translocation, c'est le passage d'un polymère d'un côté, appelé cis, d'une membrane à l'autre, appelé trans, à travers un pore (voir figure 5). Cette translocation peut être naturelle (non biaisée) ou pilotée par une force (biaisée). La translocation est un phénomène biologique fréquent, c'est le cas par exemple lorsqu'un virus infecte une cellule en y translocant son ADN.

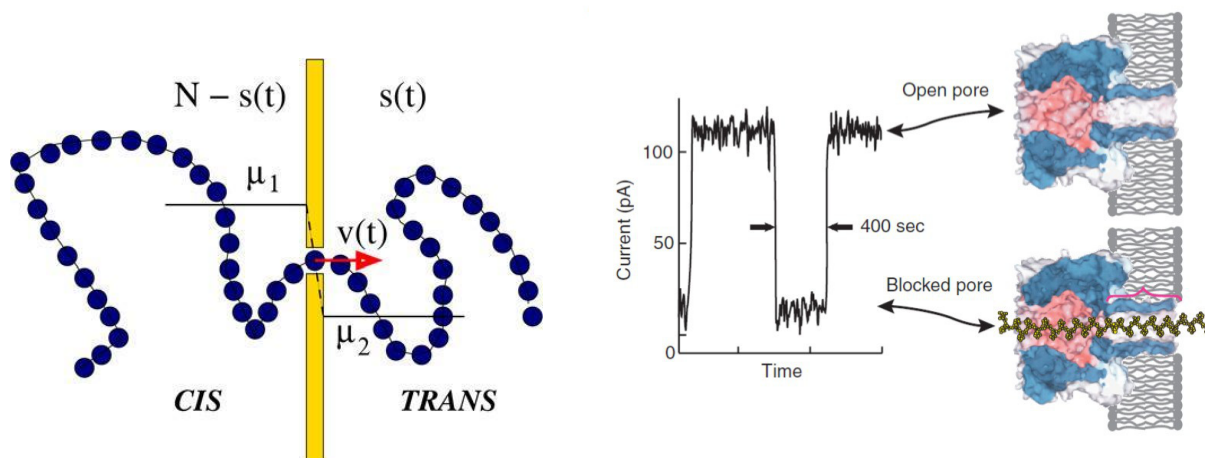


FIGURE 5 – Translocation d'un polymère. A gauche : Illustration de la translocation biaisée d'un polymère par l'application d'une différence de potentiel chimique empruntée à la review de A. Milchev [53]. A droite : Translocation d'ADN à travers un biopore et mesure du courant de translocation illustrés par Branton et al. [52].

Au cours de la translocation de l'ADN, on espère pouvoir séquencer en mesurant le courant de translocation. Le principe est simple, au cours de la translocation, l'occupation du pore entraîne une modification de sa résistance électrique, modification caractéristique de l'entité occupant ce pore. On peut alors espérer déterminer la nature de l'occupant du pore (typiquement la séquence pour séquencer l'ADN) en mesurant le courant ionique de blocage du pore. On dispose déjà de certaines applications de ce procédé, notamment pour le comptage de polymers [54], la détection d'ADN et ARN [55] ou encore la discrimination de certains polynucleotides [56, 57]. illustration les nanopores

naturels *Escherichia coli* (e.g. outer membrane protein F [59, 60]) or *Staphylococcus aureus* (alpha-haemolysin [61]) plus utilisé, disponible commercialement. avantages ; reproductibilité parfaite, propriété modifiable par modification génétiques (réf, ADN bloqué dans pore par autre brin d'ADN [62]) ok pour ADN et ARN simple brins et protéines dépliées [63] sinon trop étroit pour double brin. pb de taille pas réglable.

illustration

artificiel premier [64] focused ion or electron beams (faisceaux concentrés d'ions ou d'électrons) épaisseur quelques nanomètres [65].

illustration

hybrid (alpha machin greffé dans un solid state nanopore [66])

arrivée du graphène et autres cristaux bidimensionnels fins.

1.1.3 La translocation de polymères

Références

- [1] F. H. C. Watson, J. D. ; Crick, "Molecular structure of nucleic acids : A structure for deoxyribose nucleic acid," *Nature*, vol. 171, no. 4356, pp. 737–738, 1953.
- [2] S. N. Smirnov, "Thermodynamics of dna duplex denaturing." <http://web.nmsu.edu/~snsn/classes/chem435/Lab4/>.
- [3] K. W. S. et al, "Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk," *Nat Comms*, vol. 5, may 2014.
- [4] J. M. Janda and S. L. Abbott, "16s rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory : Pluses, perils, and pitfalls," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, pp. 2761–2764, jul 2007.
- [5] C. J. S. et al, "Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units," *Science Translational Medicine*, vol. 4, pp. 154ra135–154ra135, oct 2012.
- [6] S. S. Neves and L. L. Forrest, "Plant DNA sequencing for phylogenetic analyses : From plants to sequences," pp. 183–235, 2011.
- [7] J. Davies and D. Davies, "Origins and evolution of antibiotic resistance," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, pp. 417–433, aug 2010.
- [8] K. Schneeberger, S. Ossowski, C. Lanz, T. Juul, A. H. Petersen, K. L. Nielsen, J.-E. Jørgensen, D. Weigel, and S. U. Andersen, "SHOREmap : simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing," *Nat Meth*, vol. 6, pp. 550–551, aug 2009.
- [9] M. A. Hamburg and F. S. Collins, "The path to personalized medicine," *New England Journal of Medicine*, vol. 363, pp. 301–304, jul 2010.
- [10] M. R. Wilson, J. A. DiZinno, D. Polanskey, J. Replogle, and B. Budowle, "Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis," *International Journal of Legal Medicine*, vol. 108, pp. 68–74, mar 1995.
- [11] F. Sanger and A. Coulson, "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase," *Journal of Molecular Biology*, vol. 94, pp. 441–448, may 1975.
- [12] R. WU, "Nucleotide sequence analysis of DNA," *Nat New Biol*, vol. 236, pp. 198–200, apr 1972.
- [13] A. M. Maxam and W. Gilbert, "A new method for sequencing DNA.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 74, pp. 560–564, feb 1977.
- [14] F. Sanger, G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, J. C. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocombe, and M. Smith, "Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ x174 DNA," *Nature*, vol. 265, pp. 687–695, feb 1977.

- [15] J. Prober, G. Trainor, R. Dam, F. Hobbs, C. Robertson, R. Zagursky, A. Cocuzza, M. Jensen, and K. Baumeister, "A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides," *Science*, vol. 238, pp. 336–341, oct 1987.
- [16] H. Swerdlow, J. Z. Zhang, D. Y. Chen, H. R. Harke, R. Grey, S. Wu, N. J. Dovichi, and C. Fuller, "Three DNA sequencing methods using capillary gel electrophoresis and laser-induced fluorescence," *Anal. Chem.*, vol. 63, pp. 2835–2841, dec 1991.
- [17] T. Hunkapiller, R. Kaiser, B. Koop, and L. Hood, "Large-scale and automated DNA sequence determination," *Science*, vol. 254, pp. 59–67, oct 1991.
- [18] R. Staden, "A strategy of DNA sequencing employing computer programs," *Nucl Acids Res*, vol. 6, no. 7, pp. 2601–2610, 1979.
- [19] R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn, H. Erlich, and N. Arnheim, "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia," *Science*, vol. 230, pp. 1350–1354, dec 1985.
- [20] R. Williams, S. G. Peisajovich, O. J. Miller, S. Magdassi, D. S. Tawfik, and A. D. Griffiths, "Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR," *Nat Meth*, vol. 3, pp. 545–550, jul 2006.
- [21] E. S. L. et al., "Initial sequencing and analysis of the human genome," *Nature*, vol. 409, pp. 860–921, feb 2001.
- [22] J. C. Venter, "The sequence of the human genome," *Science*, vol. 291, pp. 1304–1351, feb 2001.
- [23] S. C. Schuster, "Next-generation sequencing transforms today's biology," *Nat Meth*, vol. 5, pp. 16–18, dec 2007.
- [24] S. Brenner, M. Johnson, J. Bridgham, G. Golda, D. H. Lloyd, D. Johnson, S. Luo, S. McCurdy, M. Foy, M. Ewan, R. Roth, D. George, S. Eletr, G. Albrecht, E. Vermaas, S. R. Williams, K. Moon, T. Burcham, M. Pallas, R. B. DuBridge, J. Kirchner, K. Fearon, J. i Mao, and K. Corcoran, "Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays," *Nat Biotechnol*, vol. 18, pp. 630–634, jun 2000.
- [25] M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlén, and P. Nyren, "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release," *Analytical Biochemistry*, vol. 242, pp. 84–89, nov 1996.
- [26] R. Tsien, P. Ross, M. Fahnestock, and A. Johnston, "Dna sequencing," Apr. 27 1991. WO Patent App. PCT/US1990/006,178.
- [27] M. Margulies and M. E. et al, "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors," *Nature*, jul 2005.
- [28] L. Farinelli, E. Kawashima, and P. Mayer, "Method of nucleic acid amplification," Oct. 8 1998. WO Patent App. PCT/GB1998/000,961.
- [29] D. R. Bentley and S. B. et al., "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry," *Nature*, vol. 456, pp. 53–59, nov 2008.
- [30] K. Mckernan, A. Blanchard, L. Kotler, and G. Costa, "Reagents, methods, and libraries for bead-based squencing," July 5 2007. WO Patent App. PCT/US2006/003,845.
- [31] N. Cloonan and A. R. R. F. et al., "Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing," *Nat Meth*, vol. 5, pp. 613–619, may 2008.
- [32] J. Shendure, "Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome," *Science*, vol. 309, pp. 1728–1732, sep 2005.
- [33] Y.-F. Huang, S.-C. Chen, Y.-S. Chiang, T.-H. Chen, and K.-P. Chiu, "Palindromic sequence impedes sequencing-by-ligation mechanism," *BMC Syst Biol*, vol. 6, no. Suppl 2, p. S10, 2012.
- [34] N. Rusk, "Torrents of sequence," *Nat Meth*, vol. 8, pp. 44–44, dec 2010.

- [35] G. J. Porreca, “Genome sequencing on nanoballs,” *Nat Biotechnol*, vol. 28, pp. 43–44, jan 2010.
- [36] J. F. Thompson and K. E. Steinmann, “Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system,” *Curr Protoc Mol Biol*, vol. Chapter 7, p. Unit7.10, Oct 2010.
- [37] S. G. Acinas, R. Sarma-Rupavtarm, V. Klepac-Ceraj, and M. F. Polz, “PCR-induced sequence artifacts and bias : Insights from comparison of two 16s rRNA clone libraries constructed from the same sample,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, pp. 8966–8969, dec 2005.
- [38] J. Eid, A. Fehr, J. Gray, and K. L. et al., “Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules,” *Science*, vol. 323, pp. 133–138, jan 2009.
- [39] C.-S. Chin, D. H. Alexander, P. Marks, A. A. Klammer, J. Drake, C. Heiner, A. Clum, A. Copeland, J. Huddleston, E. E. Eichler, S. W. Turner, and J. Korlach, “Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data,” *Nat Meth*, vol. 10, pp. 563–569, may 2013.
- [40] M. Quail, M. E. Smith, P. Coupland, T. D. Otto, S. R. Harris, T. R. Connor, A. Bertoni, H. P. Swerdlow, and Y. Gu, “A tale of three next generation sequencing platforms : comparison of ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers,” *BMC Genomics*, vol. 13, no. 1, p. 341, 2012.
- [41] L. Liu, Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong, D. Lin, L. Lu, and M. Law, “Comparison of next-generation sequencing systems,” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, pp. 1–11, 2012.
- [42] E. R. Mardis *Genome Biol*, vol. 7, no. 7, p. 112, 2006.
- [43] J.-H. Zhang, L.-Y. Wu, and X.-S. Zhang, “Reconstruction of DNA sequencing by hybridization,” *Bioinformatics*, vol. 19, pp. 14–21, jan 2003.
- [44] J. R. Edwards, H. Ruparel, and J. Ju, “Mass-spectrometry DNA sequencing,” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 573, pp. 3–12, jun 2005.
- [45] R. Howard, V. Encheva, and J. T. et al., “Comparative analysis of human mitochondrial DNA from world war i bone samples by DNA sequencing and ESI-TOF mass spectrometry,” *Forensic Science International : Genetics*, vol. 7, pp. 1–9, jan 2013.
- [46] D. C. Bell, W. K. Thomas, K. M. Murtagh, C. A. Dionne, A. C. Graham, J. E. Anderson, and W. R. Glover, “DNA base identification by electron microscopy,” *Microsc Microanal*, vol. 18, pp. 1049–1053, oct 2012.
- [47] C. S. Pareek, R. Smoczynski, and A. Tretyn, “Sequencing technologies and genome sequencing,” *J Appl Genetics*, vol. 52, pp. 413–435, jun 2011.
- [48] F. Ding, M. Manosas, M. M. Spiering, S. J. Benkovic, D. Bensimon, J.-F. Allemand, and V. Croquette, “Single-molecule mechanical identification and sequencing,” *Nat Meth*, vol. 9, pp. 367–372, mar 2012.
- [49] T. Ohshiro, K. Matsubara, M. Tsutsui, M. Furuhashi, M. Taniguchi, and T. Kawai, “Single-molecule electrical resequencing of DNA and RNA,” *Scientific Reports*, vol. 2, jul 2012.
- [50] M. D. Ventra, “Fast DNA sequencing by electrical means inches closer,” *Nanotechnology*, vol. 24, p. 342501, jul 2013.
- [51] W. Timp, U. M. Mirsaidov, D. Wang, J. Comer, A. Aksimentiev, and G. Timp, “Nanopore sequencing : Electrical measurements of the code of life,” *IEEE Trans. Nanotechnology*, vol. 9, pp. 281–294, may 2010.
- [52] D. Branton, D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. D. Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. Huang, S. B. Jovanovich, P. S. Krstic, S. Lindsay, X. S. Ling, C. H. Mastrangelo, A. Meller, J. S. Oliver, Y. V. Pershin, J. M. Ramsey, R. Riehn, G. V. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin, and J. A. Schloss, “The potential and challenges of nanopore sequencing,” *Nat Biotechnol*, vol. 26, pp. 1146–1153, oct 2008.

- [53] A. Milchev, “Single-polymer dynamics under constraints : scaling theory and computer experiment,” *Journal of Physics : Condensed Matter*, vol. 23, p. 103101, feb 2011.
- [54] S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, and V. A. Parsegian, “Counting polymers moving through a single ion channel,” *Nature*, vol. 370, pp. 279–281, jul 1994.
- [55] J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer, “Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, pp. 13770–13773, nov 1996.
- [56] M. Akeson, D. Branton, J. J. Kasianowicz, E. Brandin, and D. W. Deamer, “Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules,” *Biophysical Journal*, vol. 77, pp. 3227–3233, dec 1999.
- [57] A. Meller, L. Nivon, E. Brandin, J. Golovchenko, and D. Branton, “Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, pp. 1079–1084, feb 2000.
- [58] N. Ashkenasy, J. Snchez-Quesada, H. Bayley, and M. R. Ghadiri, “Recognizing a single base in an individual DNA strand : A step toward DNA sequencing in nanopores,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 44, pp. 1401–1404, feb 2005.
- [59] C. Danelon, E. M. Nestorovich, M. Winterhalter, M. Ceccarelli, and S. M. Bezrukov, “Interaction of zwitterionic penicillins with the OmpF channel facilitates their translocation,” *Biophysical Journal*, vol. 90, pp. 1617–1627, mar 2006.
- [60] C. Chimerele, L. Movileanu, S. Pezeshki, M. Winterhalter, and U. Kleinekathöfer, “Transport at the nanoscale : temperature dependence of ion conductance,” *Eur Biophys J*, vol. 38, pp. 121–125, aug 2008.
- [61] S. Bhakdi and J. Tranum-Jensen, “Alpha-toxin of staphylococcus aureus,” *Microbiological Reviews*, vol. 55, no. 4, pp. 733–751, 1991.
- [62] S. Howorka, L. Movileanu, O. Braha, and H. Bayley, “Kinetics of duplex formation for individual DNA strands within a single protein nanopore,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, pp. 12996–13001, oct 2001.
- [63] L. Movileanu, J. P. Schmittschmitt, J. M. Scholtz, and H. Bayley, “Interactions of peptides with a protein pore,” *Biophysical Journal*, vol. 89, pp. 1030–1045, aug 2005.
- [64] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. J. Aziz, and J. A. Golovchenko *Nature*, vol. 412, pp. 166–169, jul 2001.
- [65] M. Wanunu, T. Dadosh, V. Ray, J. Jin, L. McReynolds, and M. Drndić, “Rapid electronic detection of probe-specific microRNAs using thin nanopore sensors,” *Nature Nanotech*, vol. 5, pp. 807–814, oct 2010.
- [66] A. R. Hall, A. Scott, D. Rotem, K. K. Mehta, H. Bayley, and C. Dekker, “Hybrid pore formation by directed insertion of α -haemolysin into solid-state nanopores,” *Nature Nanotech*, vol. 5, pp. 874–877, nov 2010.