

# 纳米孔在蛋白质单分子水平研究中的应用

武灵芝<sup>1</sup>, 罗星月<sup>1</sup>, 邓浩丰<sup>2</sup>, 马千里<sup>2\*</sup>, 汤丽华<sup>3</sup>

1 南京邮电大学 理学院, 江苏 南京 210023

2 南京邮电大学 集成电路科学与工程学院, 江苏 南京 210023

3 南京邮电大学 计算机学院, 江苏 南京 210023

武灵芝, 罗星月, 邓浩丰, 马千里, 汤丽华. 纳米孔在蛋白质单分子水平研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 92-116.

WU Lingzhi, LUO Xingyue, DENG Haofeng, MA Qianli, TANG Lihua. Research progress and application of nanopores in single-molecule protein sensing[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 92-116.

**摘要:** 蛋白质是生命活动的主要载体, 承担着多种复杂而又精巧的催化、输运、调控等生物学功能。这些功能的发挥与蛋白质折叠过程、配体分子的作用以及自身构象转变有着紧密联系。本文从纳米孔单分子水平出发, 系统总结了蛋白质在纳米孔检测领域的研究内容和最新进展, 包括不同多肽、蛋白质的分子识别, 蛋白质折叠过程的构象变化, 不同蛋白质的 pH 响应性, 蛋白质与不同分子的相互作用以及纳米孔用于蛋白质测序的应用进展。基于纳米孔单分子技术对蛋白质结构和功能进行研究对探究生命活动本质规律, 进而对实现疾病的早期诊断和药物设计的精准治疗具有十分重要的意义。

**关键词:** 纳米孔; 单分子水平; 蛋白质构象; 蛋白质折叠; 蛋白质相互作用

## Research progress and application of nanopores in single-molecule protein sensing

WU Lingzhi<sup>1</sup>, LUO Xingyue<sup>1</sup>, DENG Haofeng<sup>2</sup>, MA Qianli<sup>2\*</sup>, TANG Lihua<sup>3</sup>

1 College of Science, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing 210023, Jiangsu, China

2 College of Integrated Circuit Science and Engineering, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing 210023, Jiangsu, China

3 School of Computer Science, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing 210023, Jiangsu, China

**Abstract:** Proteins are fundamental carriers as the structural elements and biochemically active

资助项目: 江苏省高校实验室研究课题(GS2022YB36); 南京邮电大学研究课题(NY220222)

This work was supported by the Jiangsu University Laboratory Research Project (GS2022YB36) and the Project of Nanjing University of Posts and Telecommunications (NY220222).

\*Corresponding author. E-mail: maql@njupt.edu.cn

Received: 2024-03-17; Accepted: 2024-06-03; Published online: 2024-09-06

entities responsible for catalysis, transport, and regulation. These functions are depending on the protein folding into precise three-dimensional structures, interacting with ligands, and conformational changes. This article reviews the recent progress of nanopores in single-molecule protein sensing, involving the identification of polypeptides and proteins, the conformation changes of protein folding, the molecular structure responsible to the pH of solutions, the molecular interactions, and protein sequencing. These studies provide clues to understand life activities and facilitate the early diagnosis of diseases and design of drugs for precise treatment.

**Keywords:** nanopore; single-molecule level; protein conformation; protein folding; protein interaction

20 世纪 90 年代中期, Kasianowicz 等<sup>[1]</sup>首先利用蛋白质纳米孔实现了 DNA 单双链的识别, 开启了新型的单分子技术——纳米孔传感器的发展。目前以纳米孔为识别功能元件的传感器主要分为生物孔和固态孔两大类。生物孔主要来自生物膜上的蛋白质通道, 可以控制离子和小分子进出细胞以及在亚细胞结构之间的物质和能量交换<sup>[2-3]</sup>, 典型的跨膜通道蛋白包括  $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -hemolysin,  $\alpha$ -HL)、耻垢分枝杆菌孔蛋白 A (*Mycobacterium smegmatis* porin A, MspA)、大肠杆菌外膜蛋白 G (outer membrane protein G, OmpG)和曲霉毒素 C (fragaceatoxin C, FraC)等<sup>[4-7]</sup>。生物纳米孔具有尺寸固定、重复性好和分辨率高等优势, 广泛应用于 DNA 测序, 凭借其高通量低成本的优势, 有望将基因组测序成本降低到 1 000 美元以下<sup>[8]</sup>。固态孔是以绝缘薄膜作支撑, 如无机硅、氮化硅、石墨烯和有机高分子薄膜等, 再通过电子束、离子束以及介电击穿等打孔, 制备纳米级的通道<sup>[9-14]</sup>。2001 年, Li 等<sup>[12]</sup>首次在氮化硅( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )薄膜上制备出了纳米孔, 并实现 DNA 的检测。固态纳米孔尺寸可控、机械稳定性好, 大大扩展了纳米孔的检测范围<sup>[13-15]</sup>。目前纳米孔已经成为一种重要的单分子检测技术, 在核酸、蛋白质等生物分子表征、药物筛选和病毒识别等领域具有广阔的应用前景<sup>[16-20]</sup>。

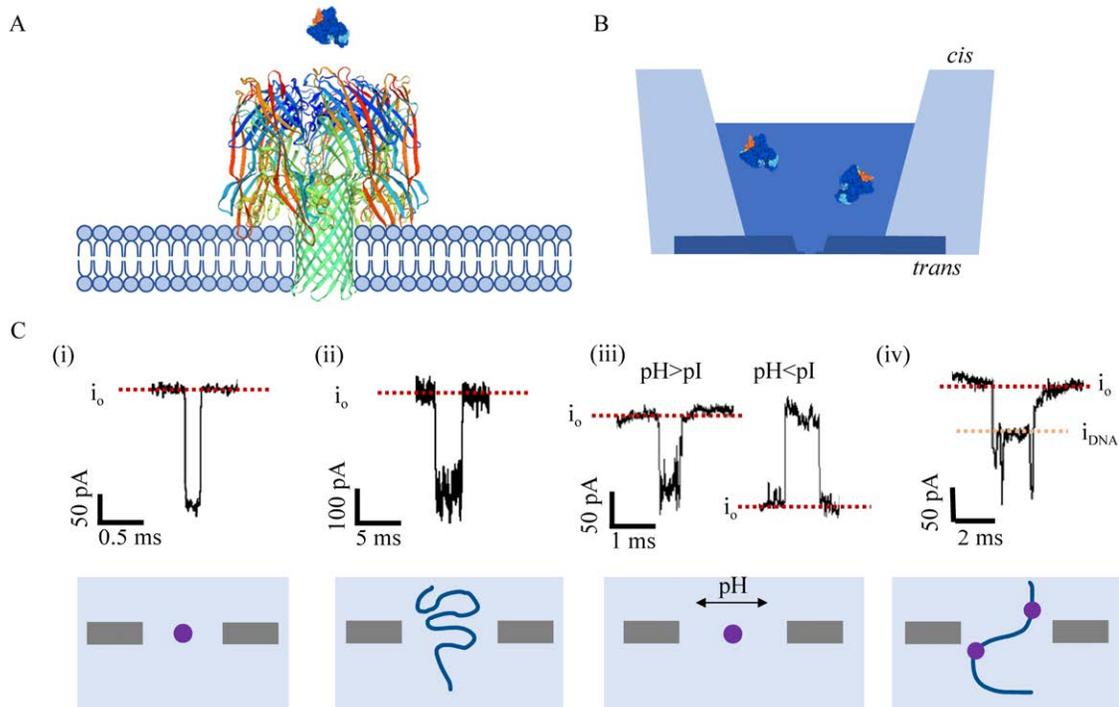
蛋白质是组成生命体的重要生物大分子之

一, 主要参与结构支持、酶催化、信号传递、免疫防御等重要功能<sup>[21-23]</sup>。蛋白质的结构和功能紧密相关, 一旦蛋白质的构象因环境或分子作用等发生变化以及一些不可逆的变性, 会导致蛋白质功能的丧失, 甚至引起疾病, 例如帕金森病等神经退行性疾病<sup>[24-26]</sup>。因此蛋白质构象变化的热力学和动力学信息是研究蛋白质折叠机制以及进行蛋白质结构设计实现蛋白质功能有关的疾病诊疗的重要途径和技术突破口。目前研究蛋白质结构和方法有多种, 如 X 射线晶体学、核磁共振(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)、荧光、圆二色谱(circular dichroism, CD)以及傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)等光谱学技术<sup>[27-30]</sup>。这些技术在一定程度上揭示了蛋白质结构和功能的关系, 但仍有其局限性, 如样品需求量大, 监测的主要是溶液中大量分子相互作用的统计结果, 是测量系统的平均行为, 掩盖了蛋白质构象变化的大量动态细节。因此对于复杂的蛋白质溶液体系急需从单分子水平研究。

作为一个典型的单分子传感平台, 纳米孔能够实现微纳环境下离子通道中目标分子跨膜运输时的超灵敏检测, 提供单分子水平的蛋白质指纹图谱。在纳米孔装置中, 当蛋白质在电场力的驱动下通过纳米孔通道时, 其基线电流会产生瞬时波动, 形成一系列脉冲电信号, 通过对脉冲信号的统计分析, 如电流幅值、易位

时间及事件频率等,对目标物进行分类和识别,从而确定蛋白质的大小、构象、电荷与其他分子相互作用等信息<sup>[31-37]</sup>。图 1A 和 1B 分别为蛋白质在生物孔和固态孔内的易位示意图。不同于线性的核酸分子,蛋白质具有复杂的结构,同时表面荷电不均一,易于与配体等分子作用,在易位过程中存在构象变化,部分解折叠,以及表面吸附、分子间相互作用等现象,因此蛋白质跨膜易位时具有更加多样的形态和结构,从而产生不同的脉冲信号事件。图 1C 展示了蛋白质在生物孔和固态孔内的易位时产生的一些典型的纳米孔易位事件。如(i)是天然态蛋白质在纳米孔内检测到的脉冲事件图,球形蛋白质作为一个紧密的结构通过纳米

孔,引起离子电流的瞬时阻塞。(ii)是蛋白质变性后过孔的易位事件,通过物理化学等因素引起蛋白质结构破坏,由紧密有序到无序松散态,更多的氨基酸暴露在溶剂中,在纳米孔内引起易位时间较长的矩形信号,阻塞幅值伴随变化。(iii)是蛋白质在不同 pH 下引起的易位事件图,不同 pH 下蛋白质表面电荷不同,如  $\text{pH} > \text{pI}$  (isoelectric point,  $\text{pI}$ ) 时蛋白质带负电荷,施加负电压时,阻塞电流信号向上;当  $\text{pH} < \text{pI}$  时,蛋白质带正电荷,施加正电压时,阻塞电流信号向下。(iv)是蛋白质和核酸等作用时通过纳米孔的多级事件信号图,一级阻塞信号代表核酸的易位过程,次级阻塞信号代表蛋白质与 DNA 作用的复合物的易位过程。



**图 1 蛋白质易位示意图** A: 生物孔; B: 固态孔; C: 蛋白质过纳米孔的典型脉冲信号。(i) 天然态蛋白质的易位事件; (ii) 变性态蛋白质的易位事件; (iii) 不同电荷蛋白质的易位事件; (iv) 蛋白质与 DNA 载体结构相互作用的易位事件。

**Figure 1 Schematic view of the protein translocation through nanopores.** A: Biological pores; B: Solid nanopores; C: The typical current events of protein translocation. (i) The native proteins in pores; (ii) The denaturation of proteins in pores; (iii) Proteins with different charges in pores; (iv) The proteins interacting with DNA carriers in pores.

因此, 纳米孔在蛋白质结构和功能的表征方面有着独特的开发潜力, 纳米孔技术可以在单分子水平上研究蛋白质的大小、构象、表面电荷以及分子间相互作用等信息, 解析蛋白质的构象变化和折叠路径, 找出蛋白质折叠和分子识别的机制, 理解蛋白质在单分子水平的生物学功能行为, 从而进行蛋白质结构预测和分子设计, 发展具有新功能的生物纳米材料和分子器件, 为蛋白质残基突变以及错误折叠聚集引起的蛋白质构象病等的诊断和治疗提供理论指导和技术支持, 为开发和设计相关药物提供新的思路。

随着纳米孔逐渐用于蛋白质单分子水平的研究, 本综述系统地总结了蛋白质在纳米孔检测领域的研究内容和最新进展, 包括纳米孔用于研究不同多肽、蛋白质的结构特征, 蛋白质折叠过程的构象调整、中间态变化, 蛋白质与其他分子的相互作用, 以及不同蛋白质的 pH 响应性, 并介绍了纳米孔用于蛋白质测序的最新进展及其在基因组学和蛋白质组学等领域的应用前景。

## 1 蛋白质空间构象的检测

蛋白质是由氨基酸组成的多肽链卷曲折叠形成的生物大分子, 按照分子大小可以分为多肽和蛋白质。多肽一般由数个氨基酸连接形成, 分子量小, 易于生物孔检测。为了研究多肽自组装结构, Sutherland 等<sup>[38]</sup>设计了不同数量的(Gly-Pro-Pro)<sub>n</sub> (n=1, 2, 3)序列的 3 种合成肽, 这一序列的延长重复形成了稳定的三螺旋构象, 预计将产生较大的阻塞电流。如图 2A 所示, 将这 3 种多肽定义为 P1、P2 和 P3, 分别以单螺旋、双螺旋或三螺旋的构象存在, 对其在  $\alpha$ -HL 的阻塞电流和易位时间进行比较, 发现 P1 的阻塞电流和易位时间最短, P2 与 P1 相比易位时间显著增加, 而 P3 的阻塞电流和

易位时间最长, 该研究证明了纳米孔可以区分多肽的结构<sup>[38]</sup>。在此基础上, Stefureac 等<sup>[40-41]</sup>继续完成了锌指蛋白、螺旋肽等多肽分子的跨膜易位研究, 表明通过生物纳米孔可以区别天然和突变的多肽序列。同时多肽的长度, 电荷和序列以及分子间相互作用的自组装引起的结构改变也可用于纳米孔单分子研究<sup>[42-44]</sup>。如 Wang 等<sup>[45]</sup>和 Xin 等<sup>[46]</sup>通过  $\alpha$ -HL 研究了  $\beta$ -淀粉样蛋白 42 ( $\beta$ -amyloid 42, A $\beta$ <sub>42</sub>) 在单分子水平的实时聚集路径, 以及  $\beta$ -环糊精( $\beta$ -cyclodextrin,  $\beta$ -CD) 作为聚集诱导剂和刚果红(congo red, CR) 作为聚集抑制剂对纤维形成动力学过程的影响, 探索 A $\beta$  淀粉样聚集引起阿尔海默茨病的分子机制。该研究有助于理解多肽或蛋白质结构与毒性之间的关系, 同时在药物筛选领域有重大的应用潜力。

不同材料和尺寸的固态纳米孔的出现, 使蛋白质结构和功能的研究更加广泛多样。基于体积阻塞原理, Fologea 等<sup>[47]</sup>利用氮化硅固态孔实现了血清蛋白(bovine serum albumin, BSA) 等较大球形蛋白质在纳米通道中易位的动力学研究, 并利用氮化硅纳米孔识别了血清蛋白和纤维蛋白原等不同结构和电荷分布的蛋白质。Talaga 等<sup>[48]</sup>对电流阻塞的幅值变化  $\Delta I_b(t)$  与孔内易位分子的排阻体积之间的关系进行了定义:

$$\Delta I_b(t) = -\frac{\sigma\phi}{H_{eff}^2} \Lambda(t) \left[ 1 + f\left(\frac{d_m}{D_p}, \frac{l_m}{H_{eff}}\right) \right] \quad (1)$$

式(1)中,  $\Delta I_b$  是离子电流与基线电流的阻塞幅值差,  $\sigma$  是电解液的电导率,  $\phi$  是施加电压,  $H_{eff}$  是纳米孔孔径的有效厚度,  $f\left(\frac{d_m}{D_p}, \frac{l_m}{H_{eff}}\right)$  是修正因子。随后 Freedman 等<sup>[49]</sup>对蛋白与孔壁的相互作用进行了详细的研究, 通过优化实验条件来观察 BSA 的电流轨迹变化, 发现低浓度 BSA 与孔壁的相互作用与实验变性条件有关。

在体积阻塞效应的基础上简化计算出不同蛋白质的排阻体积:

$$A \approx \frac{\Delta I_b (H_{eff})^2}{\sigma \phi} \quad (2)$$

式(2)中各参量如上<sup>[49]</sup>。根据此公式,计算出变性态的 BSA 体积大约为 166 nm<sup>3</sup>,符合理论值,构建了纳米孔应用于蛋白质单分子研究的理论基础。

随后更多的蛋白质被玻璃纳米孔等固态孔进行无标记识别<sup>[39,50-56]</sup>。如图 2B 所示, Li 等<sup>[39]</sup>用玻璃纳米孔实现了溶菌酶(lysozyme, LYS),  $\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -lactoglobulin,  $\beta$ -LG), 卵清蛋白(ovalbumins, OA)等蛋白质构象的表征,同时首次研究了与传染性海绵状脑病有关的朊蛋白的构象变化,为蛋白质构象病研究提供了基础。Steinbock 等<sup>[55]</sup>用玻璃纳米孔对跨膜蛋白(competence protein, ComEA)、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)、融合蛋白(fusion protein, FP)、免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)和 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)等多种不同分子量大小的蛋白进行了易位研究,通过电导变化对不同结构

的蛋白质进行定量表征。同时蛋白质易位引起的阻塞电流的变化还和纳米孔的形貌有关。Han 等<sup>[56]</sup>用固态孔对卵清蛋白、牛血清白蛋白和链霉亲和素(streptavidin, SAV)进行了检测;通过统计分析阻塞电流的幅值范围可以发现 OA 和 BSA 都有一个明显的最大值,而 SAV 的分布范围更广。同时 BSA (67 kDa)比 OA (43 kDa)的分子量大,引起更大的阻塞电流幅值<sup>[56]</sup>。Sha 等<sup>[57]</sup>利用固体纳米孔成功识别了刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con.A)和 BSA。这两种蛋白分别是典型的球形和非球形蛋白质,具有不同的分子构象。根据相对阻塞电流的统计分析,发现球形蛋白质事件的统计直方图在不同电压下均只有一个峰值,而非球形蛋白质的纳米孔信号统计图出现典型的双峰信号,通过分析发现非球形蛋白具有各向异性,过孔时动态变化具有多样性<sup>[57]</sup>。因此纳米孔可以识别不同构象的蛋白质,还可以表征蛋白质通过纳米孔时的动态变化。

### 1.1 蛋白质天然态、变性态的研究

蛋白质的结构和功能是紧密相关的,一旦蛋白质发生变性会影响其生物学功能,因此对蛋白质天然态和变性态的研究尤为重要。在某

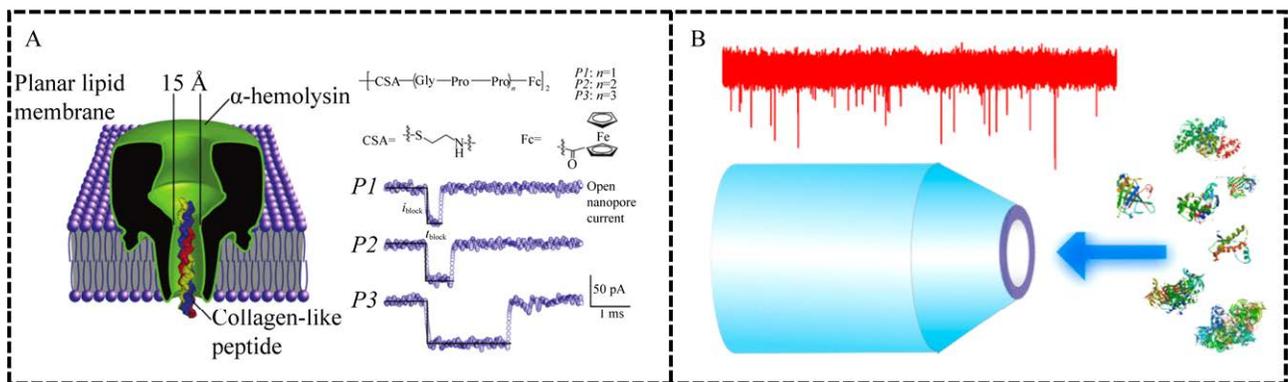


图 2 纳米孔用于检测多肽和蛋白质 A: 生物纳米孔用于线性多肽链易位示意图<sup>[38]</sup>; B: 玻璃纳米孔用于溶菌酶、 $\beta$ -乳球蛋白、卵清蛋白等蛋白质易位的示意图<sup>[39]</sup>。

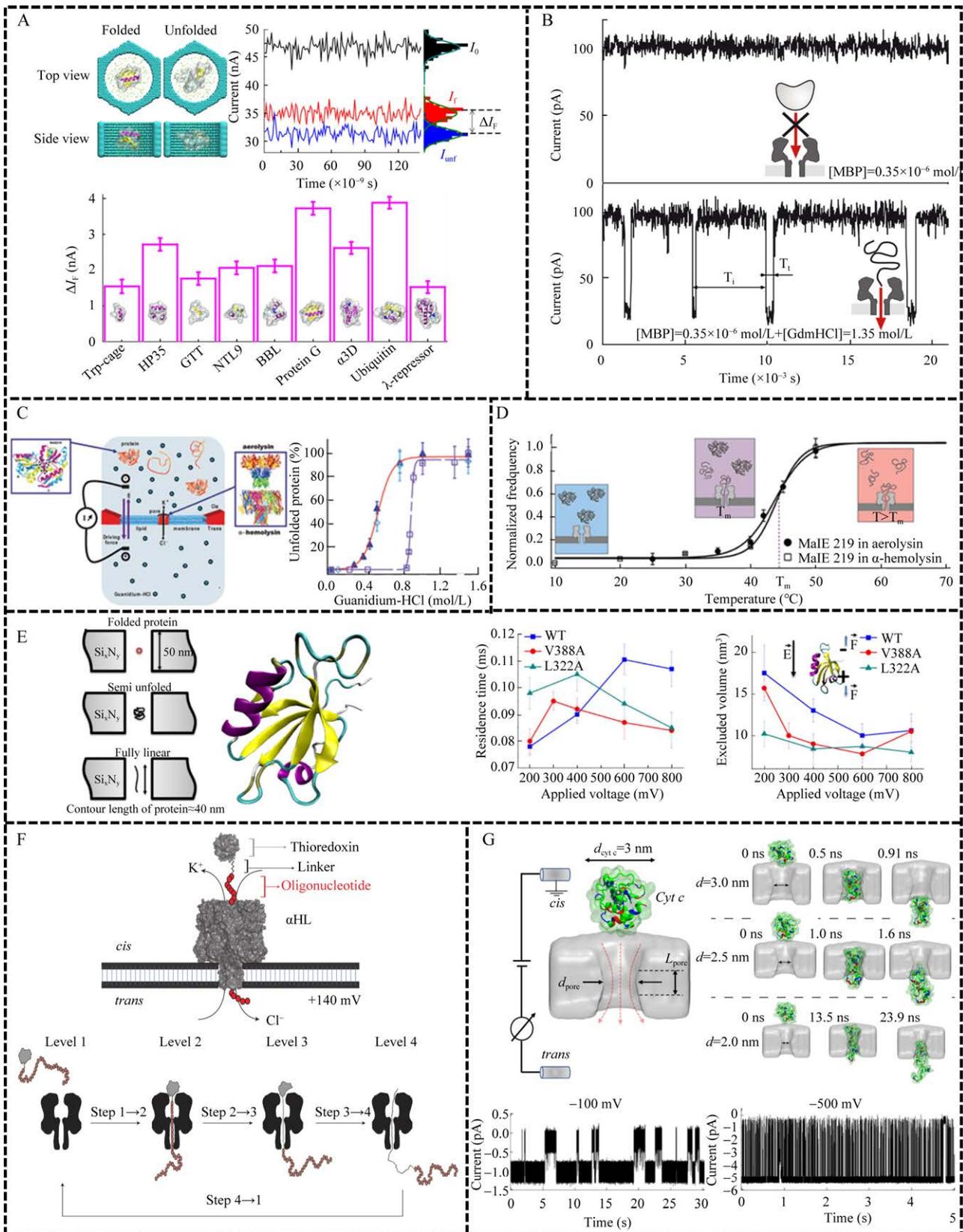
Figure 2 Nanopore sensing for peptides and proteins. A: The linear peptides passing through biological nanopores<sup>[38]</sup>; B: The protein translocations through glass nanopores including lysozyme,  $\beta$ -lactoglobulin, ovalbumins and so on<sup>[39]</sup>.

些实验条件下,蛋白质的结构稳定性是脆弱的,如化学变性剂、温度、pH 值以及机械力、电场力等因素都会引起蛋白质结构破坏和功能丧失<sup>[58-60]</sup>。纳米孔传感模拟跨膜蛋白质通道,在单分子水平观测蛋白质易位过程产生的阻塞电信号,通过易位时间和电流幅值等特征,可以更好地理解单分子水平蛋白质的天然态和变性态的动态变化,揭示蛋白质的结构稳定性和变性机制。

基于纳米孔单分子技术,很多研究实现了对蛋白质的天然态和变性态的实时监测。Si 等<sup>[60]</sup>利用分子动力学模拟研究了 protein G 蛋白变性前后不同构象在纳米通道环境运输的区别,从理论上证明了蛋白质的不同状态通过纳米孔时离子电流的改变不同。如图 3A 所示,黑色的信号  $I_0$  代表在没有蛋白质易位的情况下记录的离子电流,红色  $I_f$  和蓝色  $I_{unf}$  分别表示蛋白质在天然态和变性态下的阻塞电流,观察到天然态下的蛋白产生的阻塞电流明显高于变性态蛋白产生的电流,将其电流幅值差定义为  $\Delta I_f$ , 然后对色氨酸笼(Trp-cage)、绒毛蛋白(villin head piece, HP35)、WW 结构域(GTT)、核糖体蛋白 L9 (NTL9)、BBL 蛋白、三螺旋束蛋白( $\alpha$ 3D)、泛素蛋白(ubiquitin, Ub)和  $\lambda$  抑制因子( $\lambda$ -repressor)这 8 种蛋白质进行模拟验证,发现模拟结果都与理论预测一致,即相比变性态蛋白质通过纳米孔,天然态下蛋白质引起的纳米孔阻塞电流幅值较大,并且不同蛋白质因为构象差异显著对应不同的电流幅值差,确定了纳米孔对于天然态蛋白和变性态蛋白的定量识别能力<sup>[60]</sup>。同理,麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)的变性现象也被研究。例如, Oukhaled 等<sup>[61]</sup>研究了 MBP 进入纳米孔在变性前后所引起的阻塞电流,结果如图 3B 所示,MBP 蛋白的尺寸比生物纳米孔的孔径大,无法直接通过

纳米孔进行易位,所以天然态蛋白质加入纳米孔后,基线电流信号不会发生变化。而在变性态下,蛋白质呈现出松散、无序的多肽链结构,线性多肽链可以通过纳米孔易位,从而引起基线电流瞬时波动变化,产生一系列阻塞信号。这些阻塞信号幅值相近但易位时间有差异,说明 MBP 通过解折叠实现了跨膜运输。同时随着变性剂浓度的增加,阻塞信号的频率不断增加,当达到 1.35 mol/L 盐酸胍(GdmHCl)时,阻塞信号的事件频率与 MBP 的浓度成正比,说明在此变性剂浓度下,MBP 完全解折叠<sup>[61]</sup>。

根据不同蛋白质的结构变化进行纳米孔易位研究可以监测蛋白质天然态和突变体的结构稳定性。如 Merstorf 等<sup>[62]</sup>研究了盐酸胍(GdmHCl)变性条件下,野生型麦芽糖结合蛋白(MalE wt)和突变体(MalE 219)这 2 种蛋白的易位过程。由于  $\alpha$ -HL 生物孔尺寸限制,只有解折叠的蛋白质会进入纳米孔内产生阻塞电流信号。如图 3C 所示, MalE wt 和 MalE 219 随着变性剂浓度的增加都呈现典型的 S 型变性曲线,确定了蛋白质的天然态和变性态的两态变性机制;在较低变性剂浓度下, MalE 219 开始解折叠,随着变性剂浓度增加,迅速完全解折叠。与野生型蛋白质相比,突变体的 S 型变性曲线明显蓝移,说明 MalE wt 比突变体结构更稳定<sup>[62]</sup>。同理 Payet 等<sup>[63]</sup>研究了 MBP 突变体(MalE 219)在  $\alpha$ -HL 和气溶素生物孔中的热变性过程,结果如图 3D 所示,在室温下,天然态的 MalE 219 因尺寸较大难以进入生物孔,易位事件的捕获频率几乎为 0;当温度从 25 °C 升高到 50 °C 时,蛋白质发生变性逐步开始解折叠,尺寸也逐渐变小至可以通过生物孔径的大小,观察到阻塞电流变多,事件频率显著增加;从 60 °C 开始,易位事件频率开始趋于稳定,即 MalE 219 蛋白处于完全的变性态。分析纳米孔



**图 3 蛋白质天然态和变性态的研究** A: Protein G 蛋白的天然态和变性态在纳米孔电信号中的差异以及 Trp-cage、HP35、GTT、NTL9、BBL、 $\alpha$ 3D、ubiquitin 和  $\lambda$ -repressor 的电流幅值差示意图<sup>[60]</sup>; B: 天然态的 MBP 无法易位以及在变性剂作用下 MBP 完全解折叠进入稳定的变性态跨膜运输的示意图<sup>[61]</sup>; C: 野生型(MalE wt)和突变体(MalE 219)在气溶素纳米孔中的易位图和变性曲线图<sup>[62]</sup>; D: MBP 突变体(MalE 219)在  $\alpha$ -HL 和气溶素中的热变性示意图<sup>[63]</sup>; E: 野生型 SAP97 及其突变体在固态纳米孔中受到电场力对易位时间和排阻体积的影响示意图<sup>[64]</sup>; F: V5-C109-oligo(dC)<sub>3</sub> 在  $\alpha$ -HL 中易位原理图及因电场力拉伸成线性链过孔的 4 步过程图<sup>[65]</sup>; G: Cyt c 在电场力作用下解折叠以及在不同电压下通过纳米孔的电流轨迹示意图<sup>[66]</sup>。

Figure 3 Studies of native and denatured proteins. A: The current signals of protein G in native and denaturation states, compared with those of Trp-cage, HP35, GTT, NTL9, BBL,  $\alpha$ 3D, ubiquitin,  $\lambda$ -repressor<sup>[60]</sup>; B: The current traces of native and unfolded MBP in the pores, showing no native MBP entering the nanopores and the unfolded MBP enters into the pore and moves through the pore<sup>[61]</sup>; C: The translocations of MalE wt and MalE 219 in aerolysin and the denaturation diagram<sup>[62]</sup>; D: The thermal denaturation of MBP mutation in  $\alpha$ -HL and aerolysin<sup>[63]</sup>; E: The effect of electric field on the translocation events of wild and mutated SAP97 in solid nanopores<sup>[64]</sup>; F: Diagram of V5-C109-oligo(dC)<sub>3</sub> into  $\alpha$ -HL driven by electric fields<sup>[65]</sup>; G: The current recording of Cyt c translocated through the pores and the unfolding process<sup>[66]</sup>.

的捕获事件频率和温度变化的关系, 可以发现 MalE 219 蛋白在  $\alpha$ -HL 和气溶素这 2 种纳米孔内的热变性过程都符合蛋白质 S 型变性曲线, 说明蛋白质的热变性不依赖于纳米孔的尺寸和净电荷<sup>[63]</sup>。

研究发现纳米孔内电势和电场分布对蛋白质结构的稳定性具有较大影响。电场力是蛋白质在纳米孔内易位的主要驱动力, 同时纳米孔内呈强电场分布, 对蛋白质结构具有一定的破坏作用。如 Oukhaled 等<sup>[67]</sup>通过固态纳米孔研究了 MBP 蛋白质的天然态和变性态随电压变化的动态易位过程, 发现蛋白质在电场驱动力的作用下会被拉伸发生解折叠, 进入变性态。随后, Freedman 等<sup>[64]</sup>研究了固态纳米孔施加不同电压探究电场力对蛋白质构象的影响, 结果如图 3E 所示, 当蛋白质的构象不发生改变, 阻塞电流幅值下降随电压线性增加; 通过控制纳米孔两侧施加电压, 当孔内电场强度达到  $10^6$  V/m 时, 电场力拉扯蛋白质逐步解折叠, 直到完全解折叠; 在此过程中蛋白质解折叠的

构象动态变化可以通过纳米孔电信号的幅值和时间进行表征。同时对野生型 SAP97 PDZ2 (WT)、轻度不稳定突变体(V388A)和高度不稳定突变体(L322A)进行了易位过程动力学研究; 野生型和两种突变体在不同电压下产生了不同特征的易位时间和排阻体积, 通过电流阻塞信号的幅值变化, 发现野生型和 V388A 突变体随着电压增大排阻体积都逐渐减小, 最终这两种蛋白会获得相同的变性态, 但 L322A 突变体的排阻体积随电压增大没有显著变化, 表明其蛋白质稳定性最低且容易被电场力拉扯解折叠<sup>[64]</sup>。

纳米孔独特的尺寸效应和离子通道不仅可以用于蛋白质的构象调整, 同时也可以研究蛋白质如何解折叠进行跨膜运输。如 Rodriguez-Larrea 等<sup>[65]</sup>以突变的硫氧还蛋白(V5-C109)为模型, 通过寡核苷酸标记硫氧还蛋白的末端形成复合物[V5-C109-oligo(dC)<sub>30</sub>], 在电场驱动下通过  $\alpha$ -HL 蛋白孔进行易位研究。由图 3F 可以看出电场力驱动复合物拉伸成线性链通过生物纳米孔进行跨膜运输的动力学过程, 包括 4 个

步骤, 首先蛋白质和核酸复合物在溶液中扩散进入纳米孔捕获区域, 然后带负电荷的核酸链先进入纳米孔, 并拉扯蛋白质进入纳米孔, 接下来蛋白质开始解折叠成链状通过纳米孔, 最后多肽链自发解折叠通过纳米孔, 完成跨膜运输<sup>[65]</sup>。不同于力谱等拉伸实验, 纳米孔易位研究从单分子水平揭示了蛋白质复合物跨膜过程解折叠的机制, 同时提供了蛋白质跨膜的中间态构象和动力学细节。类似地, Wanunu 团队以细胞色素酶 c (cytochrome c, Cyt c) 为模型研究了蛋白质通过氮化硅固态纳米孔时的动力学易位过程<sup>[66]</sup>; 为了研究蛋白质拉伸跨膜机制, 实验使用不同孔径的氮化硅孔(1.5–5.5 nm)进行研究(图 3G)。由于 Cyt c 的尺寸约为 3 nm, 当纳米孔直径为 1.5 nm 和 2.0 nm 时, 蛋白质需要完全解折叠, 克服大的能垒, 以变性态通过纳米孔; 当纳米孔直径为 2.5 nm 时, 在强电场驱动下, 蛋白质可以挤压形变过孔<sup>[66]</sup>。这些研究为蛋白质的跨膜运输、部分解折叠以及电场诱导的构象调整提供了单分子水平图谱, 为细胞内外物质运输和信号传导研究提供了理论依据。

## 1.2 蛋白质中间态的研究

蛋白质在体内的折叠和解折叠是一个非常复杂的过程, 涉及大量的分子作用和中间态过程。在蛋白质从天然态到变性态的相变过程中, 通常认为中间态是蛋白质折叠路径中的关键环节<sup>[68-70]</sup>。蛋白质可能需要经历一个或多个中间态, 最终达到其稳定的三维构象。这些中间态通常与蛋白质折叠的驱动力以及折叠路径紧密相关, 可以更好地理解蛋白质的结构和功能的进化关系以及蛋白质设计的原理, 为药物设计、蛋白质工程等相关领域提供重要的理论指导和技术应用。

纳米孔传感具有高灵敏和实时监测特性, 是研究蛋白质折叠路径和瞬时中间态的重要技

术<sup>[71-72]</sup>。如图 4A 所示, Talaga 等<sup>[47]</sup>利用固态纳米孔研究了尿素变性过程中  $\beta$ -乳球蛋白 ( $\beta$ -lactoglobulin,  $\beta$ -LGA) 的解折叠过程, 揭示了天然态、中间态和变性态的构象特征。在不同浓度变性剂条件下, 蛋白质通过纳米孔时产生不同的电流阻塞信号, 通过聚类分析将其定义为 3 类: (1) 阻塞幅值较低, 如  $\Delta I_b \approx 30-40$  pA,  $\Delta t \approx 70-200$   $\mu$ s; (2) 阻塞幅值增大, 如  $\Delta I_b \approx 100$  pA, 时间分布很广; (3) 阻塞幅值大约是第 2 类事件的 2-3 倍。根据离子电流计算排阻体积得出第 1 类事件是蛋白质完全变性态,  $V^{LGA} \approx 8$  nm<sup>3</sup>; 第 2 类事件是蛋白质的天然态,  $V^{LGA} \approx 20$  nm<sup>3</sup><sup>[47]</sup>。研究发现, 当变性剂浓度增大, 第 2 类事件的事件比例在降低, 当达到最高变性剂浓度时(8 mol/L urea), 第 1 类事件为主; 在中等浓度的变性剂时(5 mol/L urea), 纳米孔信号统计出现了第 3 类事件, 根据实验和理论计算得出, 此时蛋白质构象不同于天然态和变性态, 由于强电场力拉伸, 引起蛋白质部分结构破坏, 更多的残基暴露和表面电荷变化, 部分松散的结构在过孔时引起更大的阻塞电流幅值和更广的易位时间分布, 是一种中间态的存在<sup>[47]</sup>。部分折叠中间态的更多残基暴露, 易于通过二硫键氧化形成蛋白质二聚体<sup>[47]</sup>。Li 等<sup>[74]</sup>也证实了蛋白质在盐酸胍和十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)及二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)变性过程中, 中间态构象存在的实验依据。根据纳米孔阻塞信号聚类分析发现相比变性态, 蛋白质天然态构象在纳米孔内具有最大的排阻体积, 其次部分折叠中间态, 同时蛋白质的构象也会影响蛋白质在孔内的易位时间。

对于蛋白质折叠中间态的存在, Sun 等<sup>[73]</sup>通过固态纳米孔实验进一步研究了蛋白质变性的动力学过程。天然态溶菌酶的易位实验表现为一系列有序的双相脉冲信号, 每个脉冲经历

缓慢下降, 然后快速增加。如图 4B 所示, 在较低的盐酸胍浓度(1–2 mol/L)下, 与天然态相比信号只有轻微的变化, 这意味着少量的变性剂不足以引起其蛋白质构象和电荷状态的显著变化; 当增加变性剂的浓度至 3 mol/L 时, 电流

堵塞信号出现了由蛋白质中间态引起的一些振幅显著增强、易位时间延长的特定双相脉冲<sup>[73]</sup>。当变性剂浓度增加, 特定双相脉冲信号消失, 取而代之的是振幅和持续时间都更小的双相脉冲。而在 6 mol/L 盐酸胍下, 溶菌酶完全解折

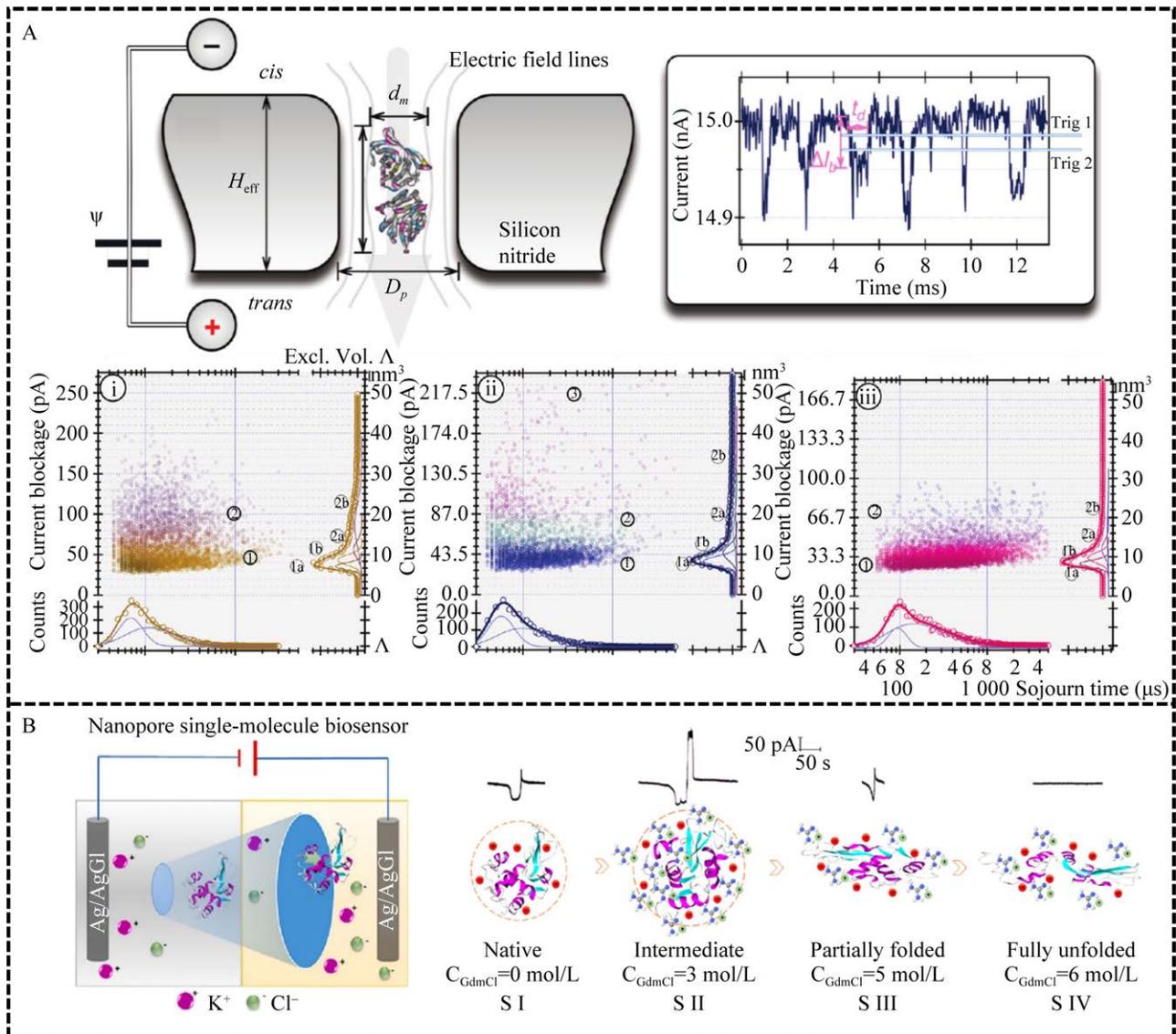


图 4 蛋白质部分折叠中间态的研究 A: 纳米孔检测  $\beta$ -乳球蛋白的电流轨迹示意图, 以及在(i) 0 mol/L、(ii) 5 mol/L、(iii) 8 mol/L 尿素浓度下易位事件散点图<sup>[47]</sup>; B: 纳米孔检测溶菌酶的易位实验示意图, 蛋白质变性过程中的不同中间态构象在易位过程中呈现不同的特征事件<sup>[73]</sup>。

Figure 4 Studies of the partially folded intermediate states. A: The current traces of  $\beta$ -lactoglobulin in nanopores and scatter plots of proteins under different denaturation of urea, (i) 0 mol/L, (ii) 5 mol/L, (iii) 8 mol/L<sup>[47]</sup>; B: The translocation of lysozymes in pores and the varied intermediate states in the unfolding process<sup>[73]</sup>.

叠进入变状态, 信号只呈现平稳的特征。该过程证明了溶菌酶变性过程经历天然态-中间态-变状态的 3 态过程<sup>[73]</sup>。通过对这些特征信号的统计分析, 可以更深入地了解中间构象的理化性质, 如球状结构、更大的旋转半径和更强的正电荷密度。

### 1.3 蛋白质的 pH 响应性研究

蛋白质是一种两性电解质, 表面电荷和结构稳定性受 pH 影响。当蛋白质在等电点(pI)时, 表面正负电荷相互抵消, 蛋白质表面的净电荷为零<sup>[75]</sup>。不同 pH 值的电解质溶液中, 蛋白质表面电荷发生变化, 如当  $\text{pH} > \text{pI}$  时蛋白质带负电荷, 而当  $\text{pH} < \text{pI}$  时, 蛋白质带正电荷, 因此不同电荷的蛋白质在纳米孔中受到电场力和电渗力等作用方向不同, 引起构象变化, 从而影响蛋白质的扩散运动和跨膜运输。根据蛋白质在纳米孔通道内不同的易位动力学过程可以识别蛋白质的 pH 响应性。如 Liu 等<sup>[76]</sup>通过氯化钾/氯化钙(KCl/CaCl<sub>2</sub>)非对称的电解质缓冲液形成一个电渗捕获阱, 提高捕获通量, 系统研究了一系列不同 pI 的蛋白质在纳米孔内的易位过程; 如图 5A 所示, 当  $\text{pH}=7.0$  时, 溶菌酶(pI=11)、天然肌红蛋白(holo-MB) (pI=7.3)、脱辅基肌红蛋白(apo-MB) (pI=8.5)和两种天然无序蛋白(ATCR/NCBD)形成的复合物(理论 pI=5.75)具有不同的表面电荷和分子构象。在纳米孔中, 4 种蛋白质均在电场和电渗驱动下高通量地进入纳米孔, 不同蛋白质引起的易位事件的相对电流阻塞和易位时间的统计散点图呈现 4 种不同的分布, 如阻塞电流幅值  $\Delta I/I_0$  分别占比 33.9%、47.4%、51.5%和 68.8%。同时不同电荷的蛋白质在易位过程中具有独特的脉冲事件特征, 如 pH 小于 pI 的溶菌酶(pI=11)的脉冲信号表现为较小的电流阻塞幅值和较短的易位时间; 而 pH 靠近 pI 点的 holo-MB (pI=7.3)

的电流阻塞幅值明显大于溶菌酶, 同时易位时间也延长几倍<sup>[76]</sup>。ATCR (pI=4.1)呈现为无序结构, NCBD (pI=11.1)呈现熔球态, 在纳米孔中快速易位, 形成短时的脉冲信号。当 ATCR 和 NCBD 形成复合物时, 在纳米孔中的易位时间大大延长。同时不同蛋白质易位事件的特征建立机器学习的模型, 实现了表面荷正电的  $\alpha$ -乳白蛋白和表面荷负电的  $\beta$ -乳球蛋白的识别分析, 具有 99.9%的准确率<sup>[76]</sup>。

人血清转铁蛋白(human serum transferrin, hSTf)是血浆中主要的含铁蛋白, 由 N 端和 C 端两个具有高度同源性的结构域组成, 分别含有 2 个铁结合位点。当 pH 值高于蛋白的 pI 时, hSTf 倾向于与 Fe(III)结合, 以 holo 形式为主; 而当 pH 值低于 pI 时, 结构域打开, 不与 Fe(III)结合, hSTf 以 apo 形式存在。Saharia 等<sup>[77]</sup>使用氮化硅纳米孔研究了 hSTf 易位时的电压和 pH 响应性; hSTf 的等电点 pI=5.2-5.6, 如图 5B 所示, 不同 pH 下 hSTf 易位均呈现向下的阻塞电流信号, 但在等电点附近的阻塞电流幅值明显较大<sup>[77]</sup>。通过电压调控, 在不同的 pH 条件下, 蛋白质的结构发生变化甚至解折叠, 以环状、球形、部分展开或完全展开的长链结构通过纳米孔, 从而形成不同的阻塞电流信号。因此在一定 pH 值和施加电压调控下, 可以引起蛋白质的构象变化, 通过纳米孔传感可以识别混合物中蛋白质和配体结合的不同形式。

同时 pH 的变化不仅影响蛋白质的表面电荷和分子构象, 而且还影响纳米孔的表面电荷和电势分布, 从而影响蛋白质的捕获通量和信号特征。如研究报告生物纳米孔如细胞溶素 A (cytolysin A, ClyA)和 FraC, 因表面带负电适合捕获带正电的蛋白质<sup>[4,78]</sup>。 $\alpha$ -HL 纳米孔的孔内壁带正电, 通过调节 pH 可以增强内壁的正电属性, 通过双电层效应使得纳米孔壁对阴离子

的吸附增强,从而增强纳米孔内电渗流<sup>[79-80]</sup>。气单胞菌溶素(aerolysin)的纳米孔道由特有的较长 $\beta$ -桶限域区( $\beta$ -barrel)形成,通道约 10 nm,其孔内壁含有丰富的带电荷氨基酸残基,广泛用于多肽和核酸片段的高灵敏识别<sup>[41,81-83]</sup>。该蛋白质孔道内有 2 个灵敏区域,分别是位于 R220 附近的 R1 区域和位于 K238 附近的 R2 区域,在此基础上通过突变 N226Q/S228K,构建了第 3 个敏感区 R3;突变后的 aerolysin 由于增强了对阴离子的选择性,对带电异质的多肽片段的电渗作用提高了 2 倍,实现了不同多肽的易位研究;同时通过对电泳和电渗作用的调控,可以在生理条件和无需标记的情况下,实现多肽的捕获和减慢易位速度的双重目标<sup>[83-84]</sup>。

蛋白质在纳米孔内易位过程受到电泳和电渗的协同作用,特别是低盐溶液下,电渗的作用加强,通过调控 pH,可以改变蛋白质表面电荷分布,平衡纳米孔内电泳和电渗作用,从而影响蛋白质的易位速度<sup>[75,80,84]</sup>。如 Wang 等<sup>[84]</sup>研究了葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOX)在纳米孔内的输运过程,通过控制溶液 pH,使 GOX (pI=4.8)表面带负电,同时孔壁表面荷负

电,通过电泳和电渗作用力的平衡,有效延长了 GOX 在孔内的易位时间(4 ms),获得更清晰的纳米孔信号(信噪比为 3.3),从而提高蛋白酶在纳米孔内的分辨率,提供了一种超灵敏的蛋白质检测方法。

## 2 蛋白质的相互作用

### 2.1 蛋白质-蛋白质相互作用

蛋白质和蛋白质作用涉及细胞内信号传导的关键调控过程,如细胞分裂,细胞程序性死亡以及肿瘤的发生,因此蛋白质之间的靶向作用(protein-protein interactions, PPI)已成为人类疾病治疗的新兴靶点和策略<sup>[85-89]</sup>。Han 等<sup>[56]</sup>利用纳米孔技术对  $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -human chorionic gonadotropin,  $\beta$ -hCG)的检测表明可以在分子水平上监测两个具有特异性亲和力的蛋白质:激素和抗体在溶液中形成复合物。Oh 等<sup>[90]</sup>使用气溶素纳米孔探测 p53TAD 肽和癌蛋白 MDM2 之间的相互作用及小分子抑制剂的调节动力学过程。p53 是一种诱导细胞周期阻滞和凋亡细胞死亡的肿瘤抑制蛋白,其 N 端的激活结构域(p53TAD)是一个无序蛋白。MDM2

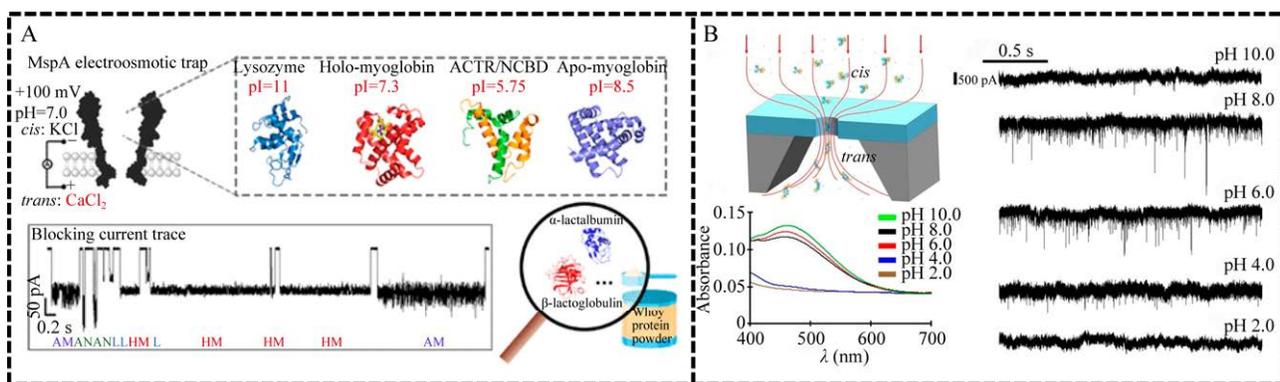


图5 蛋白质的 pH 响应性 A: 不同 pI 的蛋白质在 MspA 纳米孔内易位示意图和捕获的代表性事件<sup>[76]</sup>; B: 固态孔内 hSTf 易位的电压和 pH 响应性易位示意图<sup>[77]</sup>。

Figure 5 Proteins in different pH solution. A: The capture of proteins with varied pI in MspA and the typical current recording<sup>[76]</sup>; B: The translocation diagram of hSTf at varied voltages and pH<sup>[77]</sup>.

是 p53 的关键负调节因子, 在肿瘤中高表达, 对肿瘤的发生和发展起到重要作用<sup>[91]</sup>, 小分子药物 Nutlin-3 和 AMG232 已被报道为有效的 p53TAD/MDM2 相互作用的抑制剂<sup>[92]</sup>。为了提高纳米孔捕获率, 在 p53TAD 肽的 N 端设计 5 个连续的谷氨酸形成新的多肽结构(E<sub>5</sub>-p53<sub>TAD1</sub>), 通过纳米孔研究了 E<sub>5</sub>-p53<sub>TAD1</sub> 多肽和 E<sub>5</sub>-p53<sub>TAD1</sub>/MDM2 复合物在纳米孔中的易位过程<sup>[90]</sup>。如图 6A 所示, 游离的 E<sub>5</sub>-p53<sub>TAD1</sub> 多肽在纳米孔中引起一系列短时易位事件(<100 ms), 而 E<sub>5</sub>-p53<sub>TAD1</sub> 多肽/MDM2 复合物过孔时产生的非常长的阻塞信号, 长达数分钟; 当添加了小分子药物后, 复合物超长时间的易位信号明显减少, 逐渐恢复为短时易位信号<sup>[90]</sup>。与游离的 E<sub>5</sub>-p53<sub>TAD1</sub> 肽不同, 蛋白质作用形成的复合物 E<sub>5</sub>-p53<sub>TAD1</sub>/MDM2 的分子尺寸太大, 无法通过气溶素的窄通道甚至阻塞纳米孔, 因此产生了易位时间显著延长的易位事件; 当添加了小分子药物后, E<sub>5</sub>-p53<sub>TAD1</sub> 多肽与 MDM2 的结合被小分子抑制剂解离, 易位信号以短时效事件为主<sup>[90]</sup>。基于 E<sub>5</sub>-p53<sub>TAD1</sub> 多肽事件频率中 MDM2 浓度依赖性的变化, 可以确定 E<sub>5</sub>-p53<sub>TAD1</sub> 肽/MDM2 相互作用的结合亲和力  $K_d$  值为  $(1.07 \pm 0.09) \mu\text{mol}$ <sup>[90]</sup>。这些研究结果证明气溶素纳米孔能够在单分子水平上快速、实时监测 E<sub>5</sub>p53TAD1 肽与 MDM2 之间及其抑制剂的 PPI, 有助于改善药物发现及药物筛选。

同样地, 血液中抗体的组装过程也适用于纳米孔无标记检测。如 HIV 包膜糖蛋白, 通常被称为 gp120, 在中性条件下带正电荷。gp120 抗体的尺寸略大, 存在单体和二聚体两种形式。Freedman 等<sup>[93]</sup>利用 35 nm 的固态纳米孔研究了 gp120 和抗 gp120 抗体之间的结合, 结果如图 6B 所示, gp120 的纳米孔阻塞电流幅值均低于 400 pA, 没有二聚体或低聚体状态; 然而, 当加入抗体后, 纳米孔信号出现了双峰分布, 一

个峰位在 380 pA, 另一个峰位集中在 680 pA。通过体积对比发现阻塞幅值较小的易位事件分类为抗体单体, 阻塞幅值较大的为抗体二聚体。

为了更好地监测蛋白质作用的瞬时动态, Thakur 等设计了一种工程改造的蛋白孔传感平台用于实时监测蛋白质相互作用<sup>[94]</sup>, 结果如图 6C 所示, 该蛋白包括桶状蛋白质 t-FhuA 形成的蛋白孔支架, 柔性栓系肽链(GGS)<sub>2</sub>, 融合表达的蛋白质受体(RNase, Bn)和 O 肽适配器。当加入配体 barstar (BS)后可以观察到蛋白孔离子电流在开孔 O<sub>on</sub> 和阻塞 O<sub>off</sub> 状态变化。通过 O<sub>on</sub> 和 O<sub>off</sub> 的跃迁对应蛋白质可逆的捕获和释放过程, 从而得到相同位点竞争蛋白质的解离系数<sup>[94]</sup>。

同时纳米孔传感结合纳米等技术可以用于蛋白质作用的研究。Chuah 等<sup>[95]</sup>尝试在氮化硅纳米孔表面修饰前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA), 并与 PSA 抗体(anti-PSA)修饰的磁性纳米颗粒结合, 形成免疫三明治来捕获 PSA 分子, 结果如图 6D 所示, 修饰 anti-PSA 的磁性纳米颗粒扩散到孔内被孔表面的 PSA 分子捕获, 纳米孔被阻塞, 会导致电流的逐级下降。当磁场反转时未结合 PSA 的磁性纳米颗粒被去除, 从而避免了非特异性信号。该方法可以检测血液中低至 0.8 fmol/L 的 PSA<sup>[95]</sup>。相比传统检测技术, 该研究将磁性纳米颗粒和纳米孔阻塞效应结合提供了一种新的纳米孔检测方法, 利用抗原和抗体的相互作用提高了特异性和检测限, 为各种蛋白质或核酸的定量检测提供了重要的参考。

同样地, Rotem 等<sup>[97]</sup>对纳米孔表面修饰来提高纳米孔的传感效率, 用于凝血酶(thrombin, TB)单分子检测。在此基础上, 为了提高蛋白质相互作用的特异性和选择性, Cao 等<sup>[96]</sup>制备了适配体功能化的纳米孔, 作为癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)及其与适配体相互作用的动力学

分析的传感平台, 结果如图 6E 所示, CEA 分子在未修饰的纳米孔中的易位仅产生尖峰样信号(I 型信号), 阻塞电流幅值小(约 20 pA)和易位

时间短。当 CEA 分子通过适配体修饰的纳米孔时, CEA 分子被固定在纳米孔内表面的适配体捕获, 相互作用下产生新的特征信号(II 型信号),

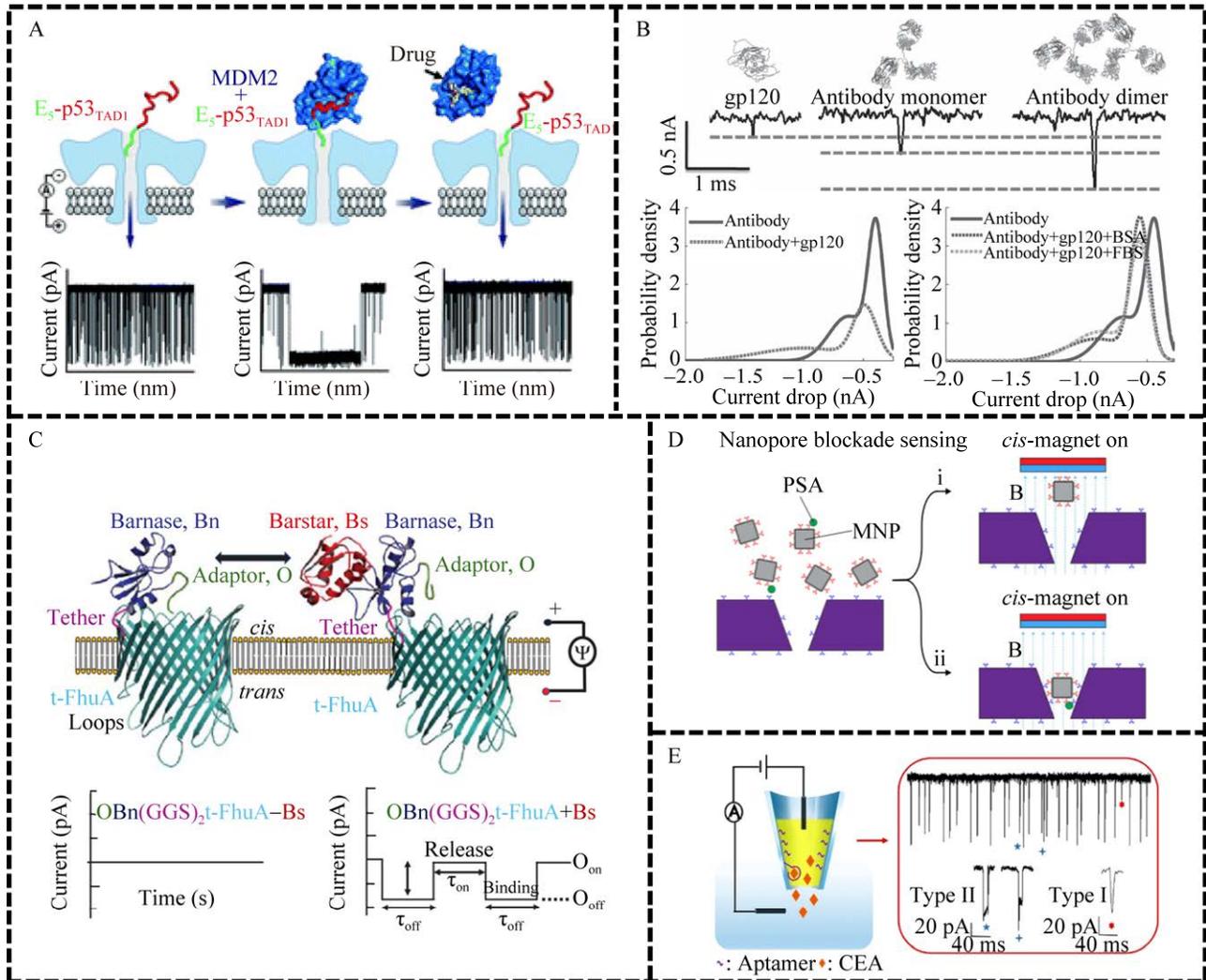


图 6 蛋白质-蛋白质相互作用 A: 气溶素纳米孔探测  $E_5$ -p53<sub>TAD1</sub> 肽和 MDM2 之间的相互作用, 分别以  $E_5$ -p53<sub>TAD1</sub> 肽单独易位过程,  $E_5$ -p53<sub>TAD1</sub> 肽和 MDM2 结合后易位过程, 加入小分子药物后易位过程<sup>[90]</sup>; B: 固态孔中 gp120、抗体单体和抗体二聚体的个性化事件图及概率密度函数<sup>[93]</sup>; C: 基于蛋白质孔作用设计的纳米孔传感示意图以及配体作用后纳米孔电流变化示意图<sup>[94]</sup>; D: 磁场调控下的 PSA 在固态纳米孔中传感示意图<sup>[95]</sup>; E: CEA 分子与适配体功能化的纳米孔特异性结合的示意图和典型事件信号图<sup>[96]</sup>。

Figure 6 Protein-protein interactions. A: The interaction of  $E_5$ -p53<sub>TAD1</sub> and MDM2 sensing by Aerolysin, the translocation events of single  $E_5$ -p53<sub>TAD1</sub>, the complex of  $E_5$ -p53<sub>TAD1</sub> and MDM2 and the complex with drugs<sup>[90]</sup>; B: The typical events of gp120, monomer and dimer in solid nanopores and the probability density of current drop in different solutions<sup>[93]</sup>; C: Design of protein interaction in nanopores, and the current recording with ligands<sup>[94]</sup>; D: diagram of PSA in solid nanopores under the control of magnetic field<sup>[95]</sup>; E: The binding of CEA with aptamers in nanopores and the typical events<sup>[96]</sup>.

具有更大电流阻塞幅值(约 40 pA)和易位时间延长的, 阻塞电流大。该研究还定义了事件的平均间隔时间  $t_{on}$  和平均易位时间  $t_{off}$ , CEA 分子和适配体的结合速率、解离速率分别用  $1/t_{on}=K_{on} \cdot c$  和  $1/t_{off}=K_{off}$  计算。通过对两类事件易位时间的统计分析, 得到 CEA 与适配体的解离常数  $K_D=K_{off}/K_{on}=1.28 \times 10^{-7}$  mol/L<sup>[96]</sup>。因此功能化纳米孔适用于单分子水平上研究蛋白质与适配体之间的动力学。

## 2.2 蛋白质-DNA 的相互作用

生物体内蛋白质与 DNA 相互作用来实现基因表达调控、DNA 复制等多种功能<sup>[98-99]</sup>。早期生长反应蛋白 1 (early growth responsive gene-1, EGR1)与 DNA 的结合域, 是典型的锌指蛋白 zif268, Squires 等<sup>[100]</sup>将其作为研究转录因子(transcription factor, TF)的模型, 在固态纳米孔中对 TF 与 DNA 的结合过程进行探究 ( $0.2$  nmol/L  $< K_D < 5$  nmol/L); 对 TF 和 DNA 结合易位得到的阻塞信号与基线电流的幅值差设置不同的阈值, 可以分为 A、B、C 共 3 个级别, A 对应的幅值差为 0.5 nA 左右, B 对应的幅值差为 0.8 nA 左右, C 则对应 1.3 nA 左右。这 3 种等级以 A、ABA、AC、ABAC 和 AC 共 5 种模式组合出现, 如图 7A 所示, 对易位事件进行统计分析后发现 zif268 通过两种不同的状态与 DNA 结合, 一种是特异性结合状态, 对应 ABA 模式, 此时 zif268 的 3 个位点与 DNA 紧密结合; 另一种是非特异性结合状态, 对应 AC 模式, zif268 与 DNA 的结合力较低, 沿着 DNA 快速易位<sup>[100]</sup>。

这一现象在 Kaur 等<sup>[101]</sup>的研究中进一步得到证实。如 RNA 聚合酶(RNAP)是一种 DNA 结合蛋白, 有 2 个强结合位点和 3 个弱结合位点, 可以与 DNA 的特定碱基结合, 进而将 DNA 信息转录为信使 RNA, 启动基因调控过程<sup>[101]</sup>。

Kaur 等<sup>[101]</sup>利用固态孔研究了 RNAP 在 48.5 kb 的  $\lambda$ -DNA 上的结合位置, 结果如图 7B 所示, 在纳米孔检测的脉冲信号事件, 有 5 个 RNAP 子事件对应于 5 个 RNAP 结合位点, 或者在 1 个  $\lambda$ -DNA 阻塞电流内至少有 2 个 RNAP 子事件对应于 2 个强结合位点。通过分析易位时间和阻塞电流幅值以及子事件的起始时间, 发现在 RNAP 与  $\lambda$ -DNA 分子比例为 6:1 的实验条件下, RNAP 分子与  $\lambda$ -DNA 结合的概率最高, 为 42%。这些结果进一步说明纳米孔可用于研究转录因子与不同蛋白质在 DNA 长链分子上不同位置的组合情况以及不同位点之间的相互作用。同样地, Plesa 等<sup>[104]</sup>利用固态纳米孔对小鼠单克隆 IgG2a 抗体结合  $\lambda$ -DNA 形成的复合物进行纳米孔易位研究。在中性 pH 条件下, 单纯的抗体表面带正电荷, 在正压下不会过孔。一旦抗体与 DNA 结合形成复合物, 复合物的表面电荷发生变化, 才会在正压下通过纳米孔发生易位过程。加入抗体后可以观察到电流轨迹中出现了明显的尖峰状信号, 这是抗体与 dsDNA 结合后过孔的电信号特征。

除了天然蛋白质和核酸的相互作用, 目前 DNA 折纸技术的发展可以形成各种 DNA 载体结构, 因此利用 DNA 载体与蛋白质结合, 可以进行蛋白质的识别和定量研究。如 Bell 等<sup>[105]</sup>通过将近 200 个寡核苷酸与单链 M13mp18 病毒基因组杂交, 构建了 1 条 dsDNA。通过将 DNA 载体中心的特定位置的寡核苷酸进行生物素功能化, 用于捕获链霉亲和素(SAV), 实现了 SAV 与 DNA 载体的协同跨膜运输, 并对 SAV 进行了定量研究<sup>[105]</sup>。在此基础上, Bell 等<sup>[102]</sup>基于 DNA 折纸原理还设计一系列 DNA 纳米载体, 分别用生物素、溴脱氧尿苷 (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)、嘌呤霉素和地高辛素进行修饰, 使每个单元包含 1 个独特的条形码, 通

过存在或不存在 DNA 哑铃发夹来表示,对其分别赋值为“1”和“0”;其中哑铃发夹的第 1 和第 5 区域始终保持不变,作为两个时间标记,标志着条形码读取的开始和结束。如图 7C 所示,通过在纳米孔内电场力驱动 DNA 载体结构通过固态纳米孔,特定的抗体与抗原在 DNA 设计的位置结合,最终设计了 8 个不同的条形码库,其中 001 为生物素,011 为溴脱氧尿苷,101 为嘌呤霉素,111 为地高辛,其余 4 个条形码 000、010、100 和 110 为对照组,这种独特的设计最终实现在纳摩尔浓度水平上同时检测 4 种不同的抗体<sup>[102]</sup>。

DNA 载体和适配体结合可以用于更多蛋白质和核酸复合物的特异性识别。如 Fang 等<sup>[106]</sup>设计了一系列高特异性的双链 DNA (dsDNA) 探针,探针包括捕获臂、cDNA 和固定在磁珠上的靶特异性适配体;该探针上的特异性适配体结合目标蛋白后会促使 DNA 结构的解开,释放捕获臂上的 DNA 杂交链,其单链结构域作为引导使复合体进入  $\alpha$ -HL 纳米孔易位,最终产生的阻塞电流与 DNA 链中的互补碱基对数量相关。在此条件下,不同的探针通过纳米孔实现多种蛋白质的同时检测,这为未来多种分析物的快速测定提供了思路。另外, Sze 等<sup>[103]</sup>通过对 DNA 载体进

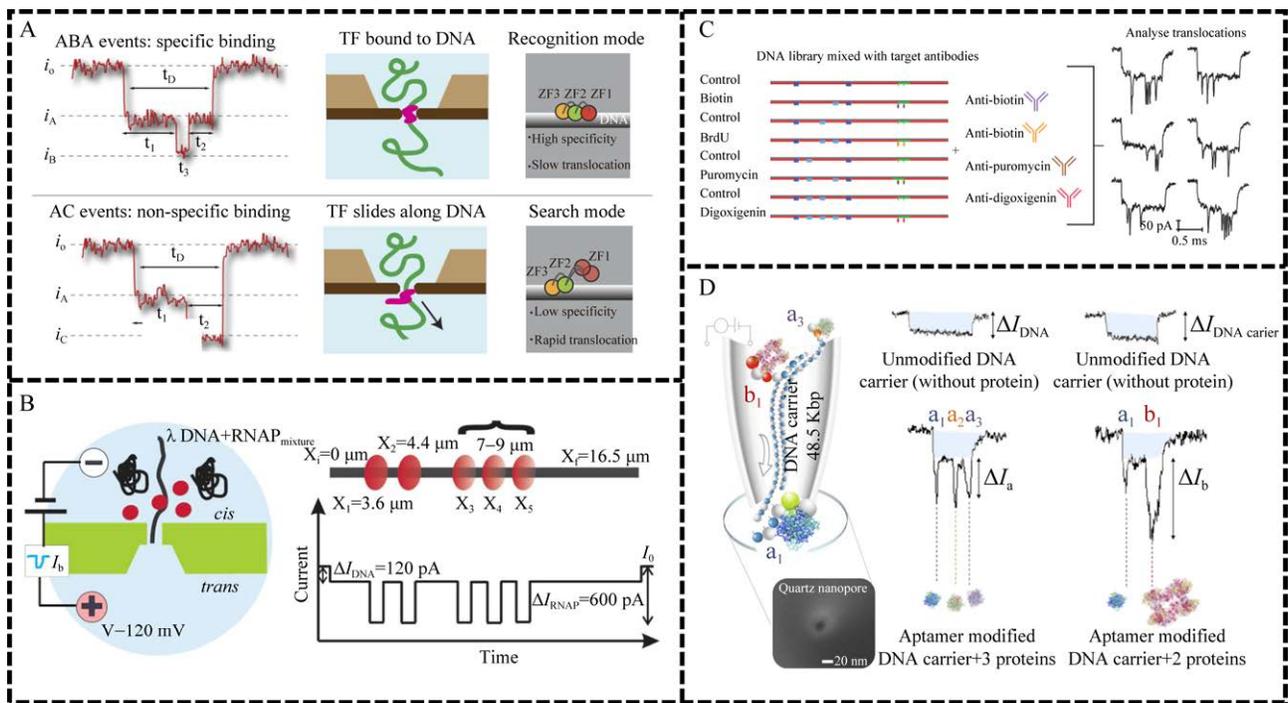


图 7 蛋白质-DNA 的相互作用 A: 固态孔下 TF-DNA 的特异性结合和非特异性结合对应的特征信号示意图<sup>[100]</sup>; B: 固态孔下  $\lambda$ -DNA 和 RNAP 结合易位实验示意图, 预计存在 5 个 RNAP 子事件对应于 5 个结合位点<sup>[101]</sup>; C: 固态孔下利用 DNA 哑铃发卡结构实现生物素、溴脱氧尿苷(BrdU)、嘌呤霉素和地高辛素 4 种抗体选择性检测的事件示意图<sup>[102]</sup>; D: 利用适配体修饰的 DNA 载体和 TB、AChE 结合的易位事件示意图<sup>[103]</sup>。

Figure 7 Protein-DNA interactions. A: The typical signals and dynamic translocations of TF-DNA in nanopores<sup>[100]</sup>; B: The translocation diagram of  $\lambda$ -DNA binding with RNAP, and five predicted sites for RNAPs<sup>[101]</sup>; C: The detection of biotin, BrdU, puromycin and digoxigenin and the typical events<sup>[102]</sup>; D: The translocation and events of TB and AChE bounded in DNA carriers<sup>[103]</sup>.

行适配体修饰,修饰后的适配体位点可以与凝血酶(TB)和乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)实现特异性识别。与TB相比,AChE同样与适配体具有较强的亲和力,但尺寸较大。定义a1、a2和a3为结合TB的适配体位点,b1则是结合AChE的适配体位点。如图7D所示,该DNA载体分别结合不同的蛋白质时会对阻塞电流造成显著差异,信号清楚地显示出3级水平,其中一级水平指DNA载体,次峰水平对应与TB结合的适配体位置,3级水平则对应与AChE结合的适配体位置,由此可以实现蛋白质位置和大小区分<sup>[103]</sup>。这些研究表明,通过自主设计DNA载体结构可以提高纳米孔对蛋白质的捕获率和识别能力。

### 2.3 蛋白质-其他配体的相互作用

生物体内,蛋白质常与不同配体作用,通过构象调整,发挥不同的生物学功能。钙调蛋白是广泛存在于细胞内的一种信号系统调控蛋白,参与多种生理活动的调控。作为一类高度保守的钙离子结合蛋白,钙调蛋白(calmodulin, CaM)和钙离子结合前后存在两种不同的构象——钙结合构象(Ca-CaM)和无钙构象(Apo-CaM)。早期Waduge等<sup>[107]</sup>通过纳米孔研究发现Apo-CaM的易位时间较长,而Ca-CaM的相对电流阻塞幅值较大,说明蛋白和钙离子的相互作用引起蛋白质构象变化。Liu等<sup>[108]</sup>则利用MspA对CaM构象变化进行了系统的单分子研究,重点研究了蛋白质与钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )相互作用的动态变化。如图8A所示,该

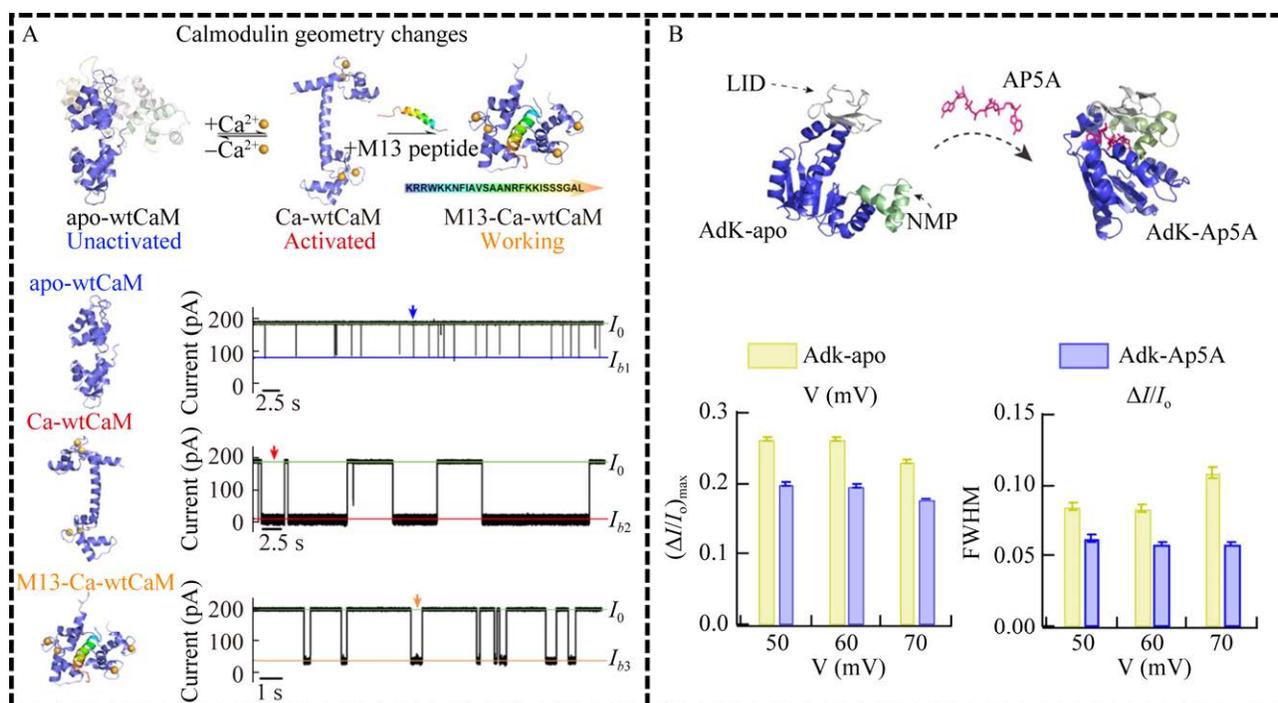


图8 蛋白质-其他配体的相互作用 A: CaM的 $\text{Ca}^{2+}$ 游离态(apo-wtCaM)、 $\text{Ca}^{2+}$ 结合态(Ca-wtCaM)和靶肽结合态(M13-Ca-wtCaM)构象改变的示意图和对应的典型信号图<sup>[108]</sup>; B: Adk-apo结合Ap5A前后构象示意图和相对电流阻塞直方图<sup>[109]</sup>。

Figure 8 Protein-other ligand interactions. A: The conformational changes of apo-wtCaM, Ca-wtCaM and M13-Ca-wtCaM, and the typical current recordings<sup>[108]</sup>; B: The histogram of current blockages induced by Adk-apo and Ap5A with varied conformations<sup>[109]</sup>.

研究定义 CaM 存在 3 种构象, 包括  $\text{Ca}^{2+}$  游离态 (apo-wtCaM)、 $\text{Ca}^{2+}$  结合态 (Ca-wtCaM) 和靶肽结合态 (M13-Ca-wtCaM), 在 MspA 孔内都被明确地检测区分。apo-wtCaM 快速易位产生易位时间极短的脉冲信号, 加入  $\text{Ca}^{2+}$  后, 易位时间显著变长且阻塞电流幅值变深的脉冲信号, 添加 M13 多肽后, 形成 M13-Ca-wtCaM 复合物, 出现新特征的阻塞电流<sup>[108]</sup>。这些结果揭示了钙调蛋白和钙离子以及多种靶标复合物的相互作用和构象调整, 为研究细胞内信号传导提供了重要的理论依据。

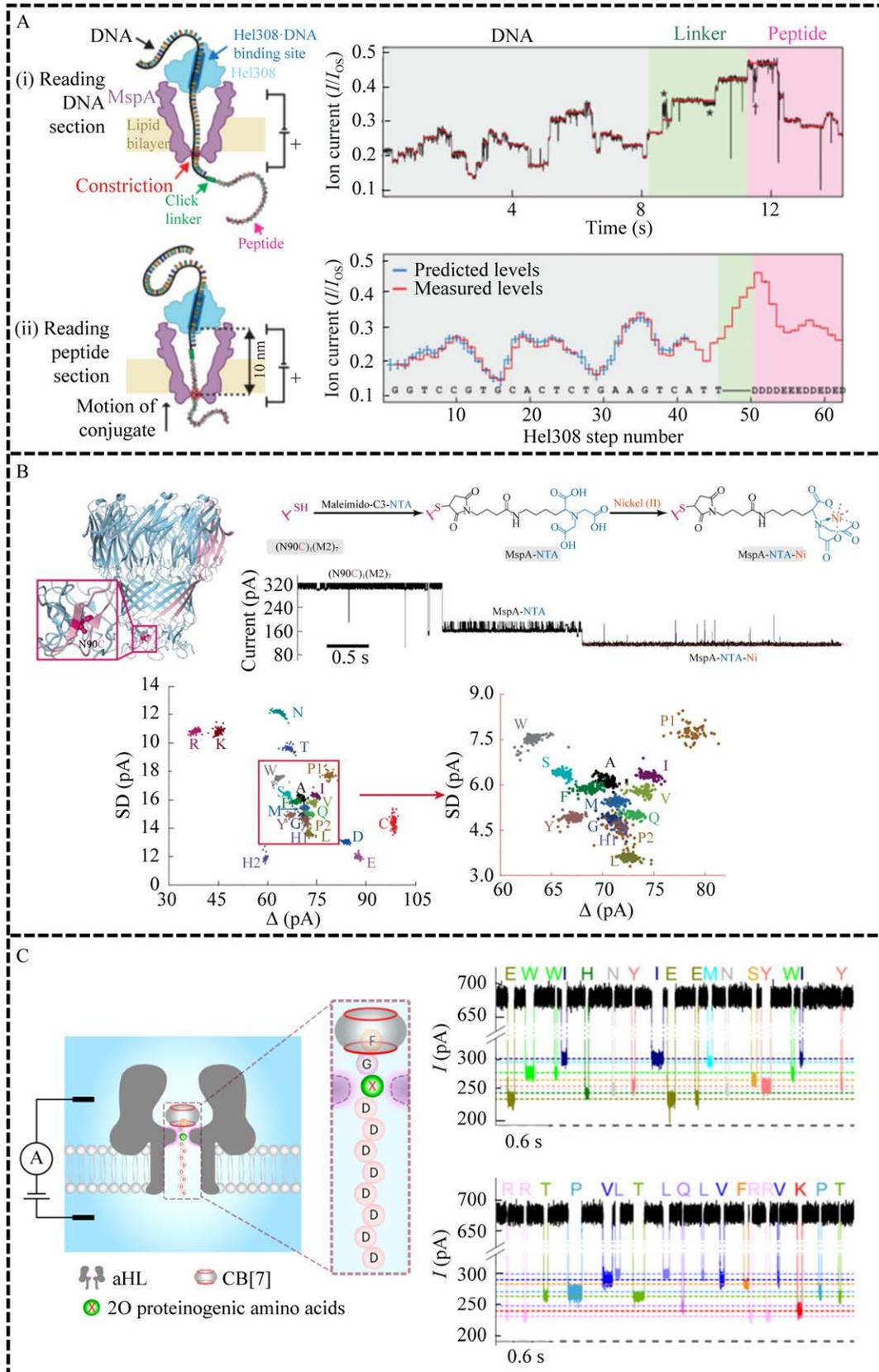
Hu 等<sup>[109]</sup>研究了腺苷酸激酶 (adenylate kinase, AdK) 的构象和柔韧性变化是通过结合底物诱导的。AdK 是一种丰富的单磷酸核苷 (NMP) 激酶, 可催化单磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP) 和 ADP 向 ATP 的可逆转化, 产物二磷酸腺苷 (Ap5A) 与 ATP 具有高亲和力结合。如图 8B 所示, AdK 与底物 Ap5A 结合后, 通过对易位时间和电流阻塞幅值统计分析可以观察到蛋白质的大小和构象的变化。在未结合的 Adk 蛋白 (AdK-apo) 中能观察到较大的相对电流阻塞和半峰宽, 说明 Ap5A 结合蛋白 (AdK-Ap5A) 具有更紧密的蛋白结构, 但 AdK-apo 具有更灵活的柔性构象。这些研究为蛋白质与配体结合的结构和功能研究提供了新思路。

### 3 蛋白质测序

作为重要的生物大分子, 蛋白质的结构和功能复杂多样, 具有不同的层次, 其中一级序列是形成三维空间结构的基础, 同时分子的空间结构又影响其生物学功能。因此对蛋白质一级序列信息的解读是了解蛋白质的结构和功能的重要途径。长期以来得益于基因测序技术的发展, 研究人员通常根据基因序列和氨基酸密

码子来“破译”蛋白质的氨基酸序列。由于转录和翻译后修饰等调控过程, 氨基酸序列破译结果并非完全正确, 甚至与真实序列有很大差异, 因此直接读取蛋白质的一级结构信息仍然面临挑战。目前只有少数技术如 Edman 降解和质谱技术有能力确定蛋白质的氨基酸序列<sup>[110]</sup>。凭借无标记和高通量的优势, 纳米孔单分子技术已成功用于 DNA/RNA 测序领域<sup>[111-112]</sup>, 目前纳米孔用于蛋白质检测与氨基酸测序的研究也日益增多, 成为一种极具潜力的蛋白质测序技术<sup>[113-117]</sup>。

利用纳米孔离子电流信号表征蛋白质的氨基酸序列, 常见的思路如同 DNA 测序, 将解折叠的多肽链通过纳米孔直接读取长链的氨基酸信息<sup>[118-123]</sup>。如 Brinkerhoff 等<sup>[118]</sup>开发了一种高精度纳米孔蛋白测序法, 直接对蛋白质的氨基酸序列进行读取, 利用纳米孔读取肽链中的单个氨基酸的特征。如图 9A 所示, 该研究通过 MspA 纳米孔开发出了一种肽“阅读器”。在 Hel308 DNA 解旋酶的作用下, 当解旋酶沿着 DNA 移动时, 它会将 DNA-肽复合物拉过 MspA 纳米孔, 先读取 DNA 部分, 然后连接序列, 最后读取目标多肽序列, 此时纳米孔会在离子电流中产生独特的阶梯状电流信号。根据电流变化读取线性化的氨基酸序列, 可以区分单个氨基酸的变化, 并且次级解旋酶会变成新一轮的初级解旋酶实现反复读取单个蛋白以提高准确率<sup>[118]</sup>。近期 Yu 等<sup>[123]</sup>提出了一种无酶辅助拉伸的蛋白质肽链全长线性进入生物纳米孔 ( $\alpha$ -HL), 从而读取蛋白质序列和编码信息。该工作利用盐酸胍使蛋白质解折叠, 通过增强电渗效应驱动蛋白质以可控的速度单向运动过孔。通过电信号可以区分蛋白质以 N 端和 C 端过孔, 以及在 N 端和 C 端标记不同的编码标签, 有助于蛋白质测序以及分子指纹图谱的识别和定量分析<sup>[123]</sup>。



**图 9 蛋白质测序** A: Hel308 解旋酶拖动连接多肽的肽核酸分子进入纳米孔, 通过电信号读取多肽的氨基酸序列<sup>[118]</sup>; B: 基于 Ni-NTA 修饰的 MspA 纳米孔构建示意图以及不同氨基酸易位事件的  $\Delta I$  与 SD 的散点图<sup>[124]</sup>; C: 基于  $\alpha$ -溶血素纳米孔与宿主分子 CB[7]构建的纳米孔传感器示意图, 不同氨基酸 X 附着在探针 FGXD8 上<sup>[125]</sup>。

Figure 9 Protein sequencing. A: The helicase (Hel308) walks along the DNA and reads the amino acids through pores<sup>[118]</sup>; B: Construction of a Ni-NTA-modified nanopore for amino acid sensing and scatter plots of  $\Delta I$  versus SD from varied amino acids<sup>[124]</sup>; C: The translocation of FGXD8-CB[7] through WT  $\alpha$ HL with different FGXD8 peptides<sup>[125]</sup>.

这种纳米孔肽阅读器可以区分不同氨基酸序列的变化, 具有高保真度和高通量潜力, 不过由于多肽链相位移动的控制和氨基酸序列组合的多样性, 目前多肽链的长时阅读仍存在困难。另一种方法是通过水解方法对蛋白质进行测序, 即将分解的氨基酸片段或单个氨基酸进行信号识别<sup>[124-127]</sup>。最近相关的进展不断报道。如 Wang 等<sup>[126]</sup>提出了一种基于 MspA 纳米孔对 RNA 修饰物鉴定方法。MspA 蛋白孔具有锥形结构, 具有更高的空间分辨率。通过引入苯硼酸(phenylboronic acid, PBA)适配体到纳米孔腔内, 利用 PBA 与顺式二醇可形成共价键的特性, 实现了对多种表观遗传修饰核苷酸单磷酸(nucleoside monophosphates, NMPs)的鉴定。在此基础上, 受亲和层析的启发, Wang 等<sup>[124]</sup>进一步构建了一种工程化 MspA 纳米孔, 在孔道的收缩区域引入将镍-硝基三乙酸适配器(Ni-NTA), 利用氨基酸和金属镍离子的配位相互作用, 用于不同氨基酸的信号识别(图 9B)。通过比较阻塞信号( $\Delta I$ )和噪声幅值(noise amplitude, SD), 20 个氨基酸特征事件被很好地区分开。同时在机器学习的辅助下, 最终重构出氨基酸序列图与原始肽序列完全一致, 从而实现蛋白质氨基酸的直接检测和区分, 区分准确率高达 98.8%<sup>[124]</sup>。

同样基于 MspA 纳米孔的高分辨, 近期 Zhang 等<sup>[127]</sup>通过引入铜离子功能化的 MspA 纳

米孔, 与 N91H 突变结合, 根据电流信号的特征实现了对 20 种氨基酸的鉴定, 并在 nmol 级别上进行超灵敏的氨基酸定量。研究结果表明, 该方法的验证准确率达到 99.1%, 信号恢复率为 30.9%; 此外, 该方法成功应用于 2 类代表性的翻译后修饰, 如非天然氨基酸和不同序列合成肽段的实时分析<sup>[127]</sup>。

此外, Zhang 等<sup>[125]</sup>提出了一种基于酶切和宿主-客体相互作用辅助纳米孔传感的肽段测序的替代方法<sup>[125]</sup>。如图 9C 所示, 利用环类分子的结构优势, 将葫芦脲 CB[7]作为宿主嵌入  $\alpha$ -溶血素纳米孔, 并设计合成与宿主分子 CB[7]作用的客体——肽段探针(FGXD8), 其中 X 代表 20 种蛋白氨基酸之一。利用肽段探针上苯丙氨酸与宿主的作用, 使其通过  $\alpha$ -溶血素纳米孔时易位过程发生变化, 实现探针特定位置上的不同氨基酸的识别, 可以实现从混合物中鉴定单个肽段结构<sup>[125]</sup>。该方法和工程化 MspA 纳米孔实现氨基酸的特异性识别引起了广泛关注, 两种不同策略结合可以更好地提高纳米孔测序的分辨率, 进而实现蛋白质测序技术的突破<sup>[128]</sup>。

## 4 总结

纳米孔作为一种新型的传感技术, 具有无需标记、灵敏度高、检测速度快、实时监测、操作简单等优点, 广泛应用于基因测序、多肽和蛋白质、生物标记物等的检测。因此, 基于

纳米孔单分子技术的优点, 本文系统介绍了其在蛋白质结构识别、折叠构象、分子作用以及序列检测等方面的应用。不同于传统技术从对蛋白质溶液状态中群体系综平均效应的观测结果, 纳米孔传感研究利用电流变化的强度、频率和周期能够提供单分子水平蛋白质在溶液中的体积、浓度以及构象、表面荷电、配体作用或者酶的活性特性, 更好地揭示了蛋白质结构和功能的关系。这些研究表明纳米孔单分子检测技术不仅可以应用于多肽、蛋白质指纹图谱的广泛识别和蛋白质相关靶标的高灵敏检测, 同时为蛋白质测序提供了新的思路。

## REFERENCES

- [1] KASIANOWICZ JJ, BRANDIN E, BRANTON D, DEAMER DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(24): 13770-13773.
- [2] FRAGASSO A, SCHMID S, DEKKER C. Comparing current noise in biological and solid-state nanopores[J]. ACS Nano, 2020, 14(2): 1338-1349.
- [3] CAO C, MAGALHÃES P, KRAPP LF, BADA JUAREZ JF, MAYER SF, RUKES V, CHIKI A, LASHUEL HA, dal PERARO M. Deep learning-assisted single-molecule detection of protein post-translational modifications with a biological nanopore[J]. ACS Nano, 2024, 18(2): 1504-1515.
- [4] HUANG G, WILLEMS K, SOSKINE M, WLOKA C, MAGLIA G. Electro-osmotic capture and ionic discrimination of peptide and protein biomarkers with FraC nanopores[J]. Nature Communications, 2017, 8: 935.
- [5] PEREZ-RATHKE A, FAHIE MA, CHISHOLM C, LIANG J, CHEN M. Mechanism of OmpG pH-dependent gating from loop ensemble and single channel studies[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(3): 1105-1115.
- [6] YU RJ, YING YL, GAO R, LONG YT. Confined nanopipette sensing: from single molecules, single nanoparticles, to single cells[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58(12): 3706-3714.
- [7] YAN SH, ZHANG JY, WANG Y, GUO WM, ZHANG SY, LIU Y, CAO J, WANG YQ, WANG LY, MA FB, ZHANG PK, CHEN HY, HUANG S. Single molecule ratcheting motion of peptides in a *Mycobacterium smegmatis* porin A (MspA) nanopore[J]. Nano Letters, 2021, 21(15): 6703-6710.
- [8] DEAMER D, AKESON M, BRANTON D. Three decades of nanopore sequencing[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34: 518-524.
- [9] KWOK H, BRIGGS K, TABARD-COSSA V. Nanopore fabrication by controlled dielectric breakdown[J]. PLoS ONE, 2014, 9(3): e92880.
- [10] WAUGH M, BRIGGS K, GUNN D, GIBEAULT M, KING S, INGRAM Q, JIMENEZ AM, BERRYMAN S, LOMOVTSSEV D, ANDRZEJEWSKI L, TABARD-COSSA V. Solid-state nanopore fabrication by automated controlled breakdown[J]. Nature Protocols, 2020, 15: 122-143.
- [11] LIU HS, ZHOU Q, WANG W, FANG FZ, ZHANG JF. Solid-state nanopore array: manufacturing and applications[J]. Small, 2023, 19(6): e2205680.
- [12] LI JL, STEIN D, McMULLAN C, BRANTON D, AZIZ MJ, GOLOVCHENKO JA. Ion-beam sculpting at nanometre length scales[J]. Nature, 2001, 412: 166-169.
- [13] XUE L, YAMAZAKI H, REN R, WANUNU M, IVANOV AP, EDEL JB. Solid-state nanopore sensors[J]. Nature Reviews Materials, 2020, 5: 931-951.
- [14] LEE K, PARK KB, KIM HJ, YU JS, CHAE H, KIM HM, KIM KB. Recent progress in solid-state nanopores[J]. Advanced Materials, 2018, 30(42): e1704680.
- [15] ZHANG XJ, DAI Y, SUN JL, SHEN JL, LIN MH, XIA F. Solid-state nanopore/nanochannel sensors with enhanced selectivity through pore-in modification[J]. Analytical Chemistry, 2024, 96(6): 2277-2285.
- [16] ZHU R, QIN FP, ZHENG XC, FANG SX, DING JJ, WANG DQ, LIANG LY. Single-molecule lipopolysaccharides identification and the interplay with biomolecules via nanopore readout[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2023, 240: 115641.
- [17] WU YF, GOODING JJ. The application of single molecule nanopore sensing for quantitative analysis[J]. Chemical Society Reviews, 2022, 51(10): 3862-3885.
- [18] ROZEVSKY Y, GILBOA T, van KOOTEN XF, KOBELT D, HUTTNER D, STEIN U, MELLER A. Quantification of mRNA expression using single-molecule nanopore sensing[J]. ACS Nano, 2020, 14(10): 13964-13974.
- [19] DOREY A, HOWORKA S. Nanopore DNA sequencing technologies and their applications towards single-molecule proteomics[J]. Nature Chemistry, 2024, 16: 314-334.
- [20] ARIMA A, TSUTSUI M, WASHIO T, BABA Y, KAWAI T. Solid-state nanopore platform integrated with machine learning for digital diagnosis of virus infection[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(1): 215-227.
- [21] GONG JT, CHEN YB, PU F, SUN PP, HE F, ZHANG L, LI YW, MA ZQ, WANG H. Understanding membrane protein drug targets in computational perspective[J]. Current Drug Targets, 2019, 20(5): 551-564.
- [22] TSUBOYAMA K, DAUPARAS J, CHEN J, LAINE E, MOHSENI BEHBAHANI Y, WEINSTEIN JJ, MANGAN NM, OVCHINNIKOV S, ROCKLIN GJ. Mega-scale experimental analysis of protein folding stability in biology and design[J]. Nature, 2023, 620: 434-444.
- [23] BLACK DL. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology[J]. Cell, 2000, 103(3): 367-370.
- [24] SOTO C, PRITZKOW S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases[J]. Nature Neuroscience, 2018, 21: 1332-1340.
- [25] RESTREPO-PÉREZ L, JOO C, DEKKER C. Paving the way to single-molecule protein sequencing[J]. Nature

- Nanotechnology, 2018, 13: 786-796.
- [26] LARIMI MG, MAYSE LA, MOVILEANU L. Interactions of a polypeptide with a protein nanopore under crowding conditions[J]. ACS Nano, 2019, 13(4): 4469-4477.
- [27] HU YF, CHENG K, HE LC, ZHANG X, JIANG B, JIANG L, LI CG, WANG G, YANG YH, LIU ML. NMR-based methods for protein analysis[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(4): 1866-1879.
- [28] VARONGCHAYAKUL N, SONG JX, MELLER A, GRINSTAFF MW. Single-molecule protein sensing in a nanopore: a tutorial[J]. Chemical Society Reviews, 2018, 47(23): 8512-8524.
- [29] SAYERS Z, AVŞAR B, CHOLAK E, KARMOUS I. Application of advanced X-ray methods in life sciences[J]. Biochimica et Biophysica Acta General Subjects, 2017, 1861(1 Pt B): 3671-3685.
- [30] GROTEVENT MJ, YAKUNIN S, BACHMANN D, ROMERO C, VÁZQUEZ de ALDANA JR, MADI M, CALAME M, KOVALENKO MV, SHORUBALKO I. Integrated photodetectors for compact Fourier-transform waveguide spectrometers[J]. Nature Photonics, 2023, 17: 59-64.
- [31] HARTEL AJW, SHEKAR S, ONG P, SCHROEDER I, THIEL G, SHEPARD KL. High bandwidth approaches in nanopore and ion channel recordings-a tutorial review[J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1061: 13-27.
- [32] WU XY, LI MY, YANG SJ, JIANG J, YING YL, CHEN PR, LONG YT. Controlled genetic encoding of unnatural amino acids in a protein nanopore[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2023, 62(29): e202300582.
- [33] JIANG J, LI MY, WU XY, YING YL, HAN HX, LONG YT. Protein nanopore reveals the renin-angiotensin system crosstalk with single-amino-acid resolution[J]. Nature Chemistry, 2023, 15: 578-586.
- [34] WANG JJ, PRAJAPATI JD, GAO F, YING YL, KLEINEKATHÖFER U, WINTERHALTER M, LONG YT. Identification of single amino acid chiral and positional isomers using an electrostatically asymmetric nanopore[J]. Journal of the American Chemical Society, 2022, 144(33): 15072-15078.
- [35] LI Q, YING YL, LIU SC, LIN Y, LONG YT. Detection of single proteins with a general nanopore sensor[J]. ACS Sensors, 2019, 4(5): 1185-1189.
- [36] WANG JJ, YING YL, ZHONG CB, ZHANG LM, YAN F, LONG YT. Instrumentational implementation for parallelized nanopore electrochemical measurements[J]. The Analyst, 2021, 146(13): 4111-4120.
- [37] ZHONG CB, MA H, WANG JJ, ZHANG LL, YING YL, WANG R, WAN YJ, LONG YT. An ultra-low noise amplifier array system for high throughput single entity analysis[J]. Faraday Discussions, 2022, 233(0): 33-43.
- [38] SUTHERLAND TC, LONG YT, STEFUREAC RI, BEDIKO-AMOA I, KRAATZ HB, LEE JS. Structure of peptides investigated by nanopore analysis[J]. Nano Letters, 2004, 4(7): 1273-1277.
- [39] Li W, Bell NAW, Hernández-Ainsa S, Thacker VV, Thackray AM, Bujdoso R, Keyser UF. Single protein molecule detection by glass nanopores[J]. ACS Nano, 2013, 7(5): 4129-4134.
- [40] STEFUREAC RI, LEE JS. Nanopore analysis of the folding of zinc fingers[J]. Small, 2008, 4(10): 1646-1650.
- [41] STEFUREAC R, LONG YT, KRAATZ HB, HOWARD P, LEE JS. Transport of  $\alpha$ -helical peptides through  $\alpha$ -hemolysin and aerolysin pores[J]. Biochemistry, 2006, 45(30): 9172-9179.
- [42] LI S, CAO C, YANG J, LONG YT. Detection of peptides with different charges and lengths by using the aerolysin nanopore[J]. ChemElectroChem, 2019, 6(1): 126-129.
- [43] HOUGHTALING J, LIST J, MAYER M. Nanopore-based, rapid characterization of individual amyloid particles in solution: concepts, challenges, and prospects[J]. Small, 2018, 14(46): e1802412.
- [44] ZHAO QT, JAYAWARDHANA DA, WANG DQ, GUAN XY. Study of peptide transport through engineered protein channels[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2009, 113(11): 3572-3578.
- [45] WANG HY, YING YL, LI Y, KRAATZ HB, LONG YT. Nanopore analysis of  $\beta$ -amyloid peptide aggregation transition induced by small molecules[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(5): 1746-1752.
- [46] XIN KL, HU ZL, LIU SC, LI XY, LI JG, NIU HY, YING YL, LONG YT. 3D blockage mapping for identifying familial point mutations in single amyloid- $\beta$  peptides with a nanopore[J]. Angewandte Chemie (International Ed in English), 2022, 61(44): e202209970.
- [47] FOLOGEA D, LEDDEN B, McNABB DS, LI JL. Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore[J]. Applied Physics Letters, 2007, 91(5): 539011-539013.
- [48] TALAGA DS, LI JL. Single-molecule protein unfolding in solid state nanopores[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(26): 9287-9297.
- [49] FREEDMAN KJ, JÜRGENS M, PRABHU A, AHN CW, JEMTH P, EDEL JB, KIM MJ. Chemical, thermal, and electric field induced unfolding of single protein molecules studied using nanopores[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(13): 5137-5144.
- [50] CHAU CC, RADFORD SE, HEWITT EW, ACTIS P. Macromolecular crowding enhances the detection of DNA and proteins by a solid-state nanopore[J]. Nano Letters, 2020, 20(7): 5553-5561.
- [51] ZHAN LJ, JIN TH, ZHOU JT, XU W, CHEN YF, MEZZENGA R. Fast probing amyloid polymorphism via nanopore translocation[J]. Nano Letters, 2023, 23(21): 9912-9919.
- [52] FUJINAMI TANIMOTO IM, CRESSIOT B, JARROUX N, ROMAN J, PATRIARCHE G, Le POUFLE B, PELTA J, BACRI L. Selective target protein detection using a decorated nanopore into a microfluidic device[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2021, 183: 113195.
- [53] ZHANG HS, ZHAO T, HUANG PF, WANG QS, TANG H, CHU X, JIANG JH. Spatiotemporally resolved protein detection in live cells using nanopore biosensors[J]. ACS Nano, 2022, 16(4): 5752-5763.
- [54] AHMAD M, HA JH, MAYSE LA, PRESTI MF, WOLFE AJ, MOODY KJ, LOH SN, MOVILEANU L. A generalizable nanopore sensor for highly specific protein detection at single-molecule precision[J]. Nature Communications, 2023, 14: 1374.
- [55] STEINBOCK LJ, KRISHNAN S, BULUSHEV RD, BORGEAUD S, BLOKESCH M, FELETTI L, RADENOVIC A. Probing the size of proteins with glass nanopores[J]. Nanoscale, 2014, 6(23): 14380-14387.
- [56] HAN AP, CREUS M, SCHÜRMAN G, LINDER V, WARD TR, de ROOIJ NF, STAUFER U. Label-free

- detection of single protein molecules and protein-protein interactions using synthetic nanopores[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(12): 4651-4658.
- [57] SHA JJ, SI W, XU B, ZHANG S, LI K, LIN KB, SHI HJ, CHEN YF. Identification of spherical and nonspherical proteins by a solid-state nanopore[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(23): 13826-13831.
- [58] ACHARYA S, EDWARDS S, SCHMIDT J. Research highlights: nanopore protein detection and analysis[J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(17): 3424-3427.
- [59] YUAN R, ZHANG Z, WU G, ZHANG Y, SHA J, CHEN Y, SI W. Unfolding of protein using MoS<sub>2</sub>/SnS<sub>2</sub> heterostructure for nanopore-based sequencing[J]. *Nanotechnology*, 2024, 35(13): 135501.
- [60] SI W, AKSIMENTIEV A. Nanopore sensing of protein folding[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(7): 7091-7100.
- [61] OUKHALED G, MATHÉ J, BIANCE AL, BACRI L, BETTON JM, LAIREZ D, PELTA J, AUVRAY L. Unfolding of proteins and long transient conformations detected by single nanopore recording[J]. *Physical Review Letters*, 2007, 98(15): 158101.
- [62] MERSTORF C, CRESSIOT B, PASTORIZA-GALLEGO M, OUKHALED A, BETTON JM, AUVRAY L, PELTA J. Wild type, mutant protein unfolding and phase transition detected by single-nanopore recording[J]. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(4): 652-658.
- [63] PAYET L, MARTINHO M, PASTORIZA-GALLEGO M, BETTON JM, AUVRAY L, PELTA J, MATHÉ J. Thermal unfolding of proteins probed at the single molecule level using nanopores[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(9): 4071-4076.
- [64] FREEDMAN KJ, HAQ SR, EDEL JB, JEMTH P, KIM MJ. Single molecule unfolding and stretching of protein domains inside a solid-state nanopore by electric field[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1638.
- [65] RODRIGUEZ-LARREA D, BAYLEY H. Multistep protein unfolding during nanopore translocation[J]. *Nature Nanotechnology*, 2013, 8: 288-295.
- [66] OUKHALED A, CRESSIOT B, BACRI L, PASTORIZA-GALLEGO M, BETTON JM, BOURHIS E, JEDE R, GIERAK J, AUVRAY L, PELTA J. Dynamics of completely unfolded and native proteins through solid-state nanopores as a function of electric driving force[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(5): 3628-3638.
- [67] TRIPATHI P, BENABBAS A, MEHRAFROOZ B, YAMAZAKI H, AKSIMENTIEV A, CHAMPION PM, WANUNU M. Electrical unfolding of cytochrome c during translocation through a nanopore constriction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(17): e2016262118.
- [68] BALDWIN AJ, KNOWLES TPJ, TARTAGLIA GG, FITZPATRICK AW, DEVLIN GL, SHAMMAS SL, WAUDBY CA, MOSSUTO MF, MEEHAN S, GRAS SL, CHRISTODOULOU J, ANTHONY-CAHILL SJ, BARKER PD, VENDRUSCOLO M, DOBSON CM. Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(36): 14160-14163.
- [69] MAYOR U, GUYDOSH NR, JOHNSON CM, GROSSMANN JG, SATO S, JAS GS, FREUND SMV, ALONSO DOV, DAGGETT V, FERSHT AR. The complete folding pathway of a protein from nanoseconds to microseconds[J]. *Nature*, 2003, 421: 863-867.
- [70] LAGANOWSKY A, CLEMMER DE, RUSSELL DH. Variable-temperature native mass spectrometry for studies of protein folding, stabilities, assembly, and molecular interactions[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2022, 51: 63-77.
- [71] DOBSON CM. Protein folding and misfolding[J]. *Nature*, 2003, 426: 884-890.
- [72] TRIPATHI P, FIROUZBAKHT A, GRUEBELE M, WANUNU M. Direct observation of single-protein transition state passage by nanopore ionic current jumps[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2022, 13(25): 5918-5924.
- [73] SUN H, YAO C, YOU KB, CHEN C, LIU SS, XU ZH. Nanopore single-molecule biosensor in protein denaturation analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1243: 340830.
- [74] LI JL, FOLOGEA D, ROLLINGS R, LEDDEN B. Characterization of protein unfolding with solid-state nanopores[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2014, 21(3): 256-265.
- [75] FARAJPOUR N, FREEDMAN KJ. Nanopore current enhancements lack protein charge dependence and elucidate maximum unfolding at protein's isoelectric point[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(7): 3063-3073.
- [76] LIU Y, WANG KF, WANG YQ, WANG LY, YAN SH, DU XY, ZHANG PK, CHEN HY, HUANG S. Machine learning assisted simultaneous structural profiling of differently charged proteins in a *Mycobacterium smegmatis* porin A (MspA) electroosmotic trap[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(2): 757-768.
- [77] SAHARIA J, BANDARA YMNDY, GOYAL G, LEE JS, KARAWDENIYA BI, KIM MJ. Molecular-level profiling of human serum transferrin protein through assessment of nanopore-based electrical and chemical responsiveness[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(4): 4246-4254.
- [78] WILLEMS K, RUIĆ D, BIESEMANS A, GALENKAMP NS, van DORPE P, MAGLIA G. Engineering and modeling the electrophoretic trapping of a single protein inside a nanopore[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(9): 9980-9992.
- [79] ASANDEI A, SCHIOPU I, CHINAPPI M, SEO CH, PARK Y, LUCHIAN T. Electroosmotic trap against the electrophoretic force near a protein nanopore reveals peptide dynamics during capture and translocation[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(20): 13166-13179.
- [80] FIRNKES M, PEDONE D, KNEZEVIC J, DÖBLINGER M, RANT U. Electrically facilitated translocations of proteins through silicon nitride nanopores: conjoint and competitive action of diffusion, electrophoresis, and electroosmosis[J]. *Nano Letters*, 2010, 10(6): 2162-2167.
- [81] PIGUET F, OULDALI H, PASTORIZA-GALLEGO M, MANIVET P, PELTA J, OUKHALED A. Identification of single amino acid differences in uniformly charged homopolymeric peptides with aerolysin nanopore[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 966.
- [82] LI MY, YING YL, LONG YT. Unveiling the synergistic effect from key sensing regions in aerolysin-based single oligonucleotide detection[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2019, 77(10): 984.
- [83] NIU HY, LI MY, YING YL, LONG YT. An engineered

- third electrostatic constriction of aerolysin to manipulate heterogeneously charged peptide transport[J]. *Chemical Science*, 2022, 13(8): 2456-2461.
- [84] WANG YY, MA H, LONG YT, YING YL. Electrochemical analysis of single glucose oxidase with a nanopipette[J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2024, 40(2): 272-278.
- [85] HAYES S, MALACRIDA B, KIELY M, KIELY PA. Studying protein-protein interactions: progress, pitfalls and solutions[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44(4): 994-1004.
- [86] HWANG HJ, KIM JS, LEE J, MIN JS, JEONG KB, KIM E, LEE MK, CHI SW. Single-molecule sensing of an anticancer therapeutic protein-protein interaction using the chemically modified OmpG nanopore[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(21): 7449-7454.
- [87] KUMAR V, SOOD A, MUNSHI A, GAUTAM T, KULHARIA M. Geometrical and electro-static determinants of protein-protein interactions[J]. *Bioinformatics*, 2021, 17(10): 851-860.
- [88] JEONG KB, RYU M, KIM JS, KIM M, YOO J, CHUNG M, OH S, JO G, LEE SG, KIM HM, LEE MK, CHI SW. Single-molecule fingerprinting of protein-drug interaction using a funneled biological nanopore[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 1461.
- [89] MAYSE LA, IMRAN A, LARIMI MG, COSGROVE MS, WOLFE AJ, MOVILEANU L. Disentangling the recognition complexity of a protein hub using a nanopore[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 978.
- [90] OH S, LEE MK, CHI SW. Single-molecule analysis of interaction between p53TAD and MDM2 using aerolysin nanopores[J]. *Chemical Science*, 2021, 12(16): 5883-5891.
- [91] HARRIS SL, LEVINE AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops[J]. *Oncogene*, 2005, 24(17): 2899-2908.
- [92] ZHAN CY, VARNEY K, YUAN WR, ZHAO L, LU WY. Interrogation of MDM2 phosphorylation in p53 activation using native chemical ligation: the functional role of Ser17 phosphorylation in MDM2 reexamined[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(15): 6855-6864.
- [93] FREEDMAN KJ, BASTIAN AR, CHAIKEN I, KIM MJ. Solid-state nanopore detection of protein complexes: applications in healthcare and protein kinetics[J]. *Small*, 2013, 9(5): 750-759.
- [94] THAKUR AK, MOVILEANU L. Real-time measurement of protein-protein interactions at single-molecule resolution using a biological nanopore[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37: 96-101.
- [95] CHUAH K, WU YF, VIVEKCHAND SRC, GAUS K, REECE PJ, MICOLICH AP, GOODING JJ. Nanopore blockade sensors for ultrasensitive detection of proteins in complex biological samples[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2109.
- [96] CAO MY, ZHANG LJ, TANG HR, QIU X, LI YX. Single-molecule investigation of the protein-aptamer interactions and sensing application inside the single glass nanopore[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(50): 17405-17412.
- [97] ROTEM D, JAYASINGHE L, SALICHOU M, BAYLEY H. Protein detection by nanopores equipped with aptamers[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(5): 2781-2787.
- [98] DING TL, CHEN AK, LU ZH. The applications of nanopores in studies of proteins[J]. *Science Bulletin*, 2019, 64(19): 1456-1467.
- [99] VALENZUELA-GÓMEZ F, ARECHAGA I, RODRÍGUEZ-LARREA D, CABEZÓN E. Nanopore sensing reveals a preferential pathway for the co-translocational unfolding of a conjugative relaxase-DNA complex[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(13): 6857-6869.
- [100] SQUIRES A, ATAS E, MELLER A. Nanopore sensing of individual transcription factors bound to DNA[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11643.
- [101] KAUR H, NANDIVADA S, ACHARJEE MC, McNABB DS, LI JL. Estimating RNA polymerase protein binding sites on  $\lambda$  DNA using solid-state nanopores[J]. *ACS Sensors*, 2019, 4(1): 100-109.
- [102] BELL NAW, KEYSER UF. Digitally encoded DNA nanostructures for multiplexed, single-molecule protein sensing with nanopores[J]. *Nature Nanotechnology*, 2016, 11: 645-651.
- [103] SZE JYY, IVANOV AP, CASS AEG, EDEL JB. Single molecule multiplexed nanopore protein screening in human serum using aptamer modified DNA carriers[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1552.
- [104] PLESA C, RUITENBERG JW, WITTEVEEN MJ, DEKKER C. Detection of individual proteins bound along DNA using solid-state nanopores[J]. *Nano Letters*, 2015, 15(5): 3153-3158.
- [105] BELL NAW, KEYSER UF. Specific protein detection using designed DNA carriers and nanopores[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(5): 2035-2041.
- [106] FANG Z, LIU LP, WANG Y, XI DM, ZHANG SS. Unambiguous discrimination of multiple protein biomarkers by nanopore sensing with double-stranded DNA-based probes[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(2): 1730-1737.
- [107] WADUGE P, HU R, BANDARKAR P, YAMAZAKI H, CRESSIOT B, ZHAO Q, WHITFORD PC, WANUNU M. Nanopore-based measurements of protein size, fluctuations, and conformational changes[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(6): 5706-5716.
- [108] LIU Y, PAN TZ, WANG KF, WANG YQ, YAN SH, WANG LY, ZHANG SY, DU XY, JIA WD, ZHANG PK, CHEN HY, HUANG S. Allosteric switching of calmodulin in a *Mycobacterium smegmatis* porin A (MspA) nanopore-trap[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2021, 60(44): 23863-23870.
- [109] HU R, RODRIGUES JV, WADUGE P, YAMAZAKI H, CRESSIOT B, CHISHTI Y, MAKOWSKI L, YU DP, SHAKHNOVICH E, ZHAO Q, WANUNU M. Differential enzyme flexibility probed using solid-state nanopores[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(5): 4494-4502.
- [110] AEBERSOLD R, MANN M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function[J]. *Nature*, 2016, 537: 347-355.
- [111] YING YL, HU ZL, ZHANG SL, QING YJ, FRAGASSO A, MAGLIA G, MELLER A, BAYLEY H, DEKKER C, LONG YT. Nanopore-based technologies beyond DNA sequencing[J]. *Nature Nanotechnology*, 2022, 17: 1136-1146.
- [112] AHSAN MU, GOURU A, CHAN J, ZHOU WD, WANG

- K. A signal processing and deep learning framework for methylation detection using Oxford Nanopore sequencing[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 1448.
- [113] OHAYON S, GIRSAULT A, NASSER M, SHEN-ORR S, MELLER A. Simulation of single-protein nanopore sensing shows feasibility for whole-proteome identification[J]. *PLoS Computational Biology*, 2019, 15(5): e1007067.
- [114] TRAN NH, QIAO R, XIN L, CHEN X, LIU CY, ZHANG X, SHAN BZ, GHODSI A, LI M. Deep learning enables *de novo* peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry[J]. *Nature Methods*, 2019, 16: 63-66.
- [115] ZHAO YQ, IAROSSO M, de FAZIO AF, HUANG JN, de ANGELIS F. Label-free optical analysis of biomolecules in solid-state nanopores: toward single-molecule protein sequencing[J]. *ACS Photonics*, 2022, 9(3): 730-742.
- [116] HUANG SH, WYLDER AC, PAN T. Simultaneous nanopore profiling of mRNA m<sup>6</sup>A and pseudouridine reveals translation coordination[J]. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(12): 1831-1835.
- [117] WEI XJ, PENKAUSKAS T, REINER JE, KENNARD C, ULINE MJ, WANG Q, LI S, AKSIMENTIEV A, ROBERTSON JWF, LIU C. Engineering biological nanopore approaches toward protein sequencing[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(17): 16369-16395.
- [118] BRINKERHOFF H, KANG ASW, LIU JQ, AKSIMENTIEV A, DEKKER C. Multiple rereads of single proteins at single-amino acid resolution using nanopores[J]. *Science*, 2021, 374(6574): 1509-1513.
- [119] MARTIN-BANIANDRES P, LAN WH, BOARD S, ROMERO-RUIZ M, GARCIA-MANYES S, QING YJ, BAYLEY H. Enzyme-less nanopore detection of post-translational modifications within long polypeptides[J]. *Nature Nanotechnology*, 2023, 18: 1335-1340.
- [120] WANG YH, ZHAO Y, BOLLAS A, WANG YR, AU KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39: 1348-1365.
- [121] ZHANG SL, HUANG G, VERSLOOT RCA, BRUININKS BMH, de SOUZA PCT, MARRINK SJ, MAGLIA G. Bottom-up fabrication of a proteasome-nanopore that unravels and processes single proteins[J]. *Nature Chemistry*, 2021, 13: 1192-1199.
- [122] STRACK R. Reading proteins with nanopores[J]. *Nature Methods*, 2022, 19: 31.
- [123] YU LN, KANG XQ, LI FJ, MEHRAFROOZ B, MAKHAMREH A, FALLAHI A, FOSTER JC, AKSIMENTIEV A, CHEN M, WANUNU M. Unidirectional single-file transport of full-length proteins through a nanopore[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41: 1130-1139.
- [124] WANG KF, ZHANG SY, ZHOU X, YANG X, LI XY, WANG YQ, FAN PP, XIAO YQ, SUN W, ZHANG PK, LI WF, HUANG S. Unambiguous discrimination of all 20 proteinogenic amino acids and their modifications by nanopore[J]. *Nature Methods*, 2024, 21: 92-101.
- [125] ZHANG Y, YI YK, LI ZY, ZHOU K, LIU L, WU HC. Peptide sequencing based on host-guest interaction-assisted nanopore sensing[J]. *Nature Methods*, 2024, 21: 102-109.
- [126] WANG YQ, ZHANG SY, JIA WD, FAN PP, WANG LY, LI XY, CHEN JL, CAO ZY, DU XY, LIU Y, WANG KF, HU CZ, ZHANG JY, HU J, ZHANG PK, CHEN HY, HUANG S. Identification of nucleoside monophosphates and their epigenetic modifications using an engineered nanopore[J]. *Nature Nanotechnology*, 2022, 17: 976-983.
- [127] ZHANG M, TANG C, WANG ZC, CHEN SC, ZHANG D, LI KJ, SUN K, ZHAO CJ, WANG Y, XU MY, DAI LZ, LU GW, SHI HB, REN HY, CHEN L, GENG J. Real-time detection of 20 amino acids and discrimination of pathologically relevant peptides with functionalized nanopore[J]. *Nature Methods*, 2024, 21: 609-618.
- [128] BONINI A, SAUCIUC A, MAGLIA G. Engineered nanopores for exopeptidase protein sequencing[J]. *Nature Methods*, 2024, 21: 16-17.