

Aerolysin 纳米孔核酸检测灵敏区域的协同相互作用探索研究

李孟寅^a 应佚伦^{a,b} 龙亿涛^{*,a,b}

(^a 华东理工大学化学与分子工程学院 上海 200237)

(^b 南京大学化学化工学院 生命分析国家重点实验室 南京 210023)

摘要 纳米孔单分子检测技术以其简便、快速、高通量及无需标记等特点, 应用于 DNA 及蛋白质测序, 更有望实现单分子动态构象变化的研究. Aerolysin(气单胞菌溶素)纳米孔道由于其特有的较长的 β -桶限域区(β -barrel)及孔内壁丰富的带电荷氨基酸残基, 在单个寡聚核苷酸分子分析中展现出极高的灵敏性. 本设计利用 dA₁₄-4-X, dA₁₄-11-X, dA₁₄-4-X-11-X (X=C, T, G)等单个寡聚核苷酸探针分子, 研究了 Aerolysin 的两个灵敏区域 R1 和 R2, 探索了 R1 灵敏区域对单个碱基弱相互作用的差异, 实现区分单个碱基差异. 进一步实验证明, R1 灵敏区域对单个碱基类型差异的灵敏区分不受 R2 灵敏区域被碱基 A、C、T 占位所影响. 然而, 当 R2 区域被碱基 G 占位时, 会使 R1 区域丧失对整个孔道电流的主导性. 本研究有助于理解 Aerolysin 对单个寡聚核苷酸分子的超灵敏测量机制.

关键词 纳米孔; 单分子界面; 电化学限域; 气单胞菌溶素; 寡聚核苷酸

Unveiling the Synergistic Effect from Key Sensing Regions in Aerolysin-Based Single Oligonucleotide Detection

Li, Mengyin^a Ying, Yilun^{a,b} Long, Yi-Tao^{*,a,b}

(^a School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

(^b State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023)

Abstract Nanopore technology are being developed for large areas in life science, not only in DNA sequencing and protein sequencing, but also in biomolecule detection, bio-interaction measurement and drug screening. Aerolysin is regarded as new powerful tool for oligonucleotide sensing and peptide sensing due to its high charged pore lumen. Applied a transmembrane potential with a pair of Ag/AgCl electrodes, the negatively charged oligonucleotides are driven into the aerolysin nanopore, inducing a series of ionic current blockages, which could distinguish the oligonucleotides with different length or single base variation. However, due to the lack of high-resolution structure of aerolysin nanopore, the mechanism of its high sensing capability is not clear, limiting the further applications of aerolysin. Recently, we presented two sensing regions inside aerolysin, R1 (near R220) and R2 (near K238), having huge influences on oligonucleotide sensing. Especially, the R1 is responsible for distinguished all 4 bases and 2 modified based in the mixture. However, the detailed mechanism of synergistic effect for these two regions in detection of single nucleotides is still unclear. Here, we use dA₁₄-4-X, dA₁₄-11-X, dA₁₄-4-X-11-X (X = C, T, G) as probes to investigate the effects of base types on the sensing ability of R1 and R2. The results show that the A, C or T in R2 region did not change the sensing ability of R1 region, while G in R2 would hinder the base discrimination in R1 region. This may be caused by the large volume of G that would nearly fully occupy the R2 region and the stronger non-covalent interaction between G and R2 region, resulting in determining the residual current of the whole nanopore. Moreover, we evaluated the interaction between different bases with the sensing region. The results show that the interaction is independent with the volume of the bases, which is ordered by A > G > C > T, suggesting the interaction inside the aerolysin lumen is a considerable factor for its sensing capability. These results would guide us to directly design the mutant Aerolysin nanopore that aims for DNA sequencing and peptide sequencing.

Keywords nanopore; single-molecule interface; electro confinement; aerolysin; oligonucleotide

1 引言

纳米孔道单分子检测技术是根据分子穿过限域空间时产生的特征离子流阻断, 在单分子水平上解析分子个体行为及信息的分析方法^[1-3]. 通过对大量单个离子

流阻断信号的统计处理, 读取每个阻断事件的电流变化幅值、阻断持续时间及阻断信号出现的频率, 可实现单个生物分子的个体行为信息解读^[4-8]. 基于纳米孔道技术的快速、高通量、无需标记等特点, 其已被广泛应用

* E-mail: yitaolong@nju.edu.cn

Received June 8, 2019; published July 11, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21834001, 61871183).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21834001, 61871183)资助.

于 DNA 测序^[9,10], RNA 测序^[11], 蛋白质检测^[12~16], microRNA 检测^[17~19], 抗原抗体识别等领域^[20]. 纳米孔技术的选择性及灵敏性很大程度上由纳米孔道自身特点所决定, 包括其孔径、几何结构、电荷密度等^[3,21]. 因此, 一方面, 研究人员通过改变纳米孔关键位置的孔径及电荷组成或探索其灵敏位点来提高或利用纳米孔的分辨能力^[22~24]; 另一方面, 研究人员从多样的成孔毒素及膜蛋白中寻找灵敏性较强的新型纳米孔^[25,26]. 实际上, 由于现有超低电流检测技术的时间分辨率及电流分辨率限制, 纳米孔道检测技术对分子的识别还受限于待测分子在孔内的停留时间^[27]. 因此, 延长待测物在纳米孔内的停留时间成为纳米孔道研究的关键^[28], 在 DNA 测序领域, 研究人员利用 phi29 DNA 聚合酶控制 DNA 的穿孔速度用以实现对单个碱基序列的逐一读取^[10]; 此外, 通过将抗原或抗体修饰在固体纳米孔内, 利用抗原抗体相互作用延长待测分子在孔内的停留时间, 可以实现特异性单分子检测^[20]. 生物纳米孔道其本质是由单个成孔蛋白分子卷曲而成的界面, 这一卷曲的界面提供了一个电化学限域空间, 为待测物分子与界面上的官能团时序性地相互作用提供了基础^[29]. 更重要的是, 这个单分子界面可以通过基因工程定向精准改变界面上的基团, 调控界面的选择性、灵敏性以及界面与待测分子的相互作用.

Aerolysin(气单胞菌溶素)是一类由嗜水气单胞菌产生的 β 成孔毒素, 其能在磷脂双分子层上七聚成环^[30]. Aerolysin 最早于 2006 年作为纳米孔道用于纳米孔单分子检测技术, 用于 α -螺旋的多肽的研究^[31], 随后其被用于多肽检测^[32], 多糖检测^[33]以及单分子质谱^[34]等. 由于 Aerolysin 孔道内壁富含带电荷的氨基酸残基, 实现了区分单个核苷酸长度差异的均聚腺嘌呤脱氧核苷酸, 并实时监测了核酸外切酶 I 对寡聚核苷酸的步步降解过程^[35]. 随后, 研究人员发现 Aerolysin 能够识别具有单个氨基酸差异的赖氨酸多肽均聚物及精氨酸多肽均聚物, 实时监测胰蛋白酶对此类多肽的剪切过程^[14]. 然而, 由于 Aerolysin 对核酸及多肽检测高灵敏测量机制尚不清晰, 限制了对检测界面功能化设计, 以进一步提高其灵敏性或选择性.

本研究以 14 个碱基的腺嘌呤脱氧核酸上单个位点或双位点突变的寡聚核苷酸为探针分子 [dA_{14-4-X} , $dA_{14-11-X}$, $dA_{14-4-X-11-X}$ ($X = C, T, G$)], 探索了 Aerolysin 两个灵敏区域 R1 和 R2 对单个碱基差异的识别测量能力, 及两个灵敏区域之间的协同相互作用影响. 进一步, 本文研究了单个碱基与灵敏区域的影响, 获得了单个碱基与灵敏区域的相互作用大小, 为进一步设计针对特定分子的功能化 Aerolysin 纳米孔道提供了实验及理论指导.

2 结果与讨论

2.1 Aerolysin 的灵敏区域的相互影响

为了探究 Aerolysin 两个灵敏点对寡聚核苷酸检测的影响, 实验设计了 dA_{14-4-X} , $dA_{14-11-X}$, $dA_{14-4-X-11-X}$ ($X = C, T, G$) 等寡聚核苷酸链. 如图 1a 所示, 根据之前的实验及分子动力学模拟结果^[23,36], Aerolysin 对核酸检测具有两个灵敏区域, 分别是位于 R220 附近的 R1 区域(图 1a 中的绿色区域), 及位于 K238 附近的 R2 区域(图 1a 中的红色区域). 基于 Aerolysin 纳米孔道对腺嘌呤寡聚核苷酸的高灵敏分辨, 其具有较长的穿孔时间(约 $0.3 \sim 2.0 \text{ ms} \cdot \text{nt}^{-1}$)^[35], 因此, 本研究选取腺嘌呤为基准碱基. 由于 Aerolysin 纳米孔道 β -barrel 部分长度约为 10 nm ^[30], 相当于 14 个碱基长度^[23], 从而 R1 与 R2 区域分别对应于 14 个碱基长度的寡聚核苷酸的 11 号位碱基和 4 号位碱基(图 1a). 值得注意的是, 由于位阻效应, 寡聚核苷酸在低电压条件下主要以 3'端开始进入 Aerolysin 纳米孔^[23], 因此, 本研究中碱基顺序由寡聚核苷酸的 3'端开始. 由于 Aerolysin 对长链 DNA 的捕获率较低, 而高离子浓度的缓冲溶液能够增加 DNA 的捕获率, 因此本实验采用 3.0 mol/L 的 KCl 缓冲溶液. 为了进一步探索两个灵敏区域的特性及两者之间的互相影响, 首先将 11 号位或 4 号位碱基从腺嘌呤(A)突变为胸腺嘧啶(T), 通过对比碱基突变后不同寡聚核苷酸通过 Aerolysin 纳米孔道时的残余电流(Residual current), 研究两个灵敏位点对不同碱基的分辨能力(图 1b).

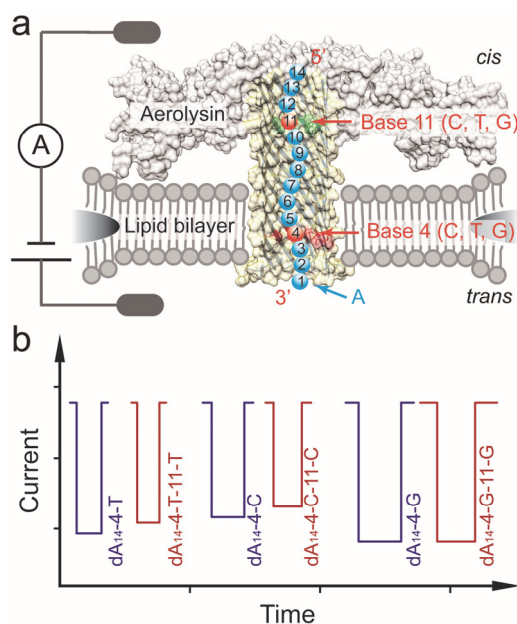


图 1 (a) Aerolysin 纳米孔检测体系示意图、(b)不同寡聚核苷酸穿过 Aerolysin 纳米孔的电流轨迹示意图

Figure 1 (a) Illustration of Aerolysin nanopore sensing system. (b) Diagram of current traces with different oligonucleotides translocating through aerolysin nanopore

The β -barrel of aerolysin was colored yellow, while the two sensing regions were marked green (R1) and red (R2), respectively

如图 2a 所示, 实验结果绘制了寡聚核苷酸 dA₁₄-4-T-11-T 穿过 Aerolysin 纳米孔时残余电流的统计直方图, 其展现出一个高斯分布. 基于 Gaussian 拟合方程

$$y = y_0 + \frac{Ae^{-\frac{4\ln(2)(x-x_c)^2}{w^2}}}{w\sqrt{\frac{\pi}{4\ln(2)}}}$$

残余电流峰值为 12.63 pA, 高斯峰的半高宽(FWHM)为 0.53 pA, 体现了 dA₁₄-4-T-11-T 分子穿过 Aerolysin 纳米孔道的行为较为均一. 随后, 在 dA₁₄-4-T-11-T 的体系中加入等量的 dA₁₄-4-T, 在扩散均匀后, 通过 10 min 的离子流恒电压记录, 残余电流统计统计直方图展现出两个明显的高斯分布(图 2b). 经过拟合分析, 其中一个峰(P2)的残余电流依旧位于 12.63 pA 附近, 为 dA₁₄-4-T-11-T 分子过孔产生; 而另一个峰(P1)位于 11.94 pA, 则代表 dA₁₄-4-T 分子过孔的残余电流. 由于两种待测物唯一的区别在于 11 号位置的碱基类型不同, 这一现象表明 Aerolysin 纳米孔能够区分位于 11 号位置的腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T). 结合先前研究中对 dA₁₄-11-T 和 dA₁₄ 的区分^[23], 在 R2 区域碱基为 A 或 T 的情况下, R1 区域依然保有极高的电流分辨率, 能够实现对 R1 区域不同碱基的高灵敏分辨. 为了定量表征这一分辨率, 在此引入分辨率 (Separation) 公式^[37], $S = 2 * (I_2 - I_1) / (W_2 + W_1)$, 其中 I 代表每个峰的残余电流, W 代表每个峰的峰宽, 由此计算可得 Aerolysin 对 dA₁₄-4-T-11-T 和 dA₁₄-4-T 的分辨率 S 为 1.08.

然而, 当上述 dA₁₄-4-T-11-T 和 dA₁₄-4-T 的混合体系

中继续加入等量的 dA₁₄-11-T 后, 残余电流的统计直方图依旧展现出两个高斯峰, 且两个峰的位置几乎没有发生移动(图 2c). 值得注意的是, 虽然两个峰的位置没有移动, 但两个峰的占比却发生了显著的变化. 如图 2d 所示, P1 的占比由 56.17% 减少到 23.82%, 反之, P2 的占比由 43.83% 提升到 76.18%. 该现象表明 dA₁₄-11-T 过孔的残余电流与 dA₁₄-4-T-11-T 重合, 即在此条件下, Aerolysin 纳米孔道无法区分位于 4 号位置的碱基. 因此, Aerolysin 纳米孔中 R1 区域碱基分辨对电流的响应比 R2 区域更灵敏, 且不受 R2 区域的碱基是 A 或 T 的影响. 因此, 可通过设计寡聚核苷酸模板链, 利用 Aerolysin R1 区域进行具有体积差异的碱基及修饰碱基等进行高灵敏检测分辨.

2.2 Aerolysin 灵敏区域对不同碱基的分辨能力

为了进一步探究 Aerolysin 灵敏区域之间在不同碱基条件下的相互影响, 实验设计了在 4 号位置和 11 号位置的胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)的突变. 之前的研究表明 4 号位置为碱基 A 的情况下, Aerolysin 对 11 号位置的 A, T, C, G 均有极高的分辨能力, 而对 4 号位置的 A, T, C, G 分辨能力较弱^[23]. 因此, 本研究进一步探索了 4 号位置为碱基 C 和 G 时, 对 R1 区域分辨能力的影响. 如图 3a 所示, dA₁₄-4-C 的残余电流直方图依然展现出一个高斯峰, 位于 10.51 pA, 其较小的 FWHM 表明了 dA₁₄-4-C 分子穿过 Aerolysin 纳米孔时行为的均一性. 在加入 dA₁₄-4-C-11-C 后, 离子流阻断程度呈现出更为明显的两个峰, 分别位于 10.50 pA 及 11.63 pA, 其 FWHM 值分别为 0.25 pA 与 0.23 pA (图 3b), 证明了 Aerolysin 纳米

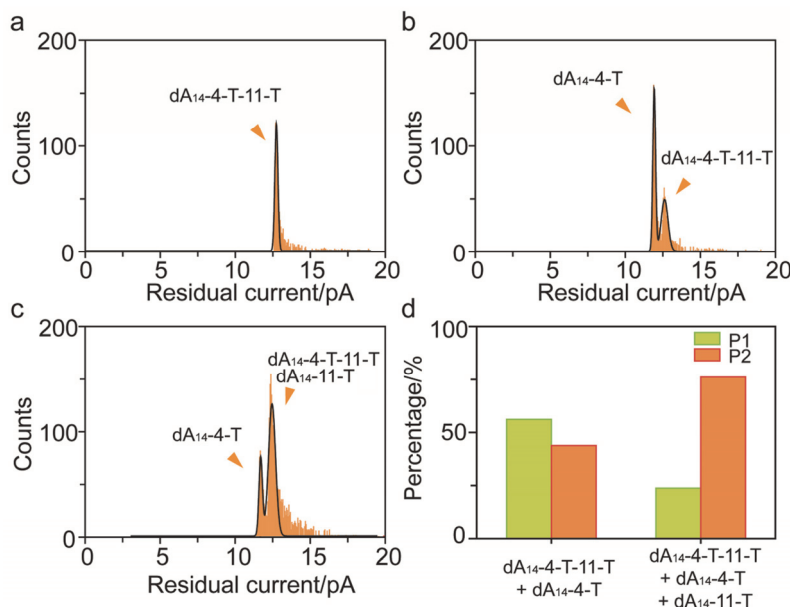


图 2 (a) dA₁₄-4-T-11-T, (b) dA₁₄-4-T-11-T 和 dA₁₄-4-T 的混合物、(c) dA₁₄-4-T-11-T、dA₁₄-4-T 和 dA₁₄-11-T 的混合物的残余电流直方图、(d)在加入 3.0 μmol/L dA₁₄-11-T 前后 P1、P2 两个峰的占比

Figure 2 Histogram of residual current of (a) dA₁₄-4-T-11-T, (b) the mixture of dA₁₄-4-T-11-T and dA₁₄-4-T, (c) the mixture of dA₁₄-4-T-11-T, dA₁₄-4-T and dA₁₄-11-T. (d) Percentage of P1 and P2 before and after the addition of 3.0 μmol/L dA₁₄-11-T

All data were acquired in 3.0 mol/L KCl, 10 mmol/L TRIS, 1.0 mmol/L EDTA at pH 8.0 at the applied voltage of 100 mV. The final concentration of each oligonucleotide is 3.0 μmol/L. The current was sampled at 100 kHz and filtered at 5 kHz

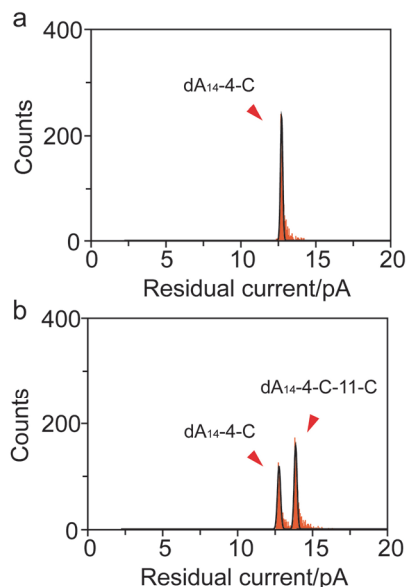


图3 (a) dA₁₄-4-C、(b) dA₁₄-4-C 和 dA₁₄-4-C-11-C 混合物的残余电流直方图

Figure 3 Histogram of residual current of (a) dA₁₄-4-C and (b) the mixture of dA₁₄-4-C and dA₁₄-4-C-11-C

All data were acquired in 3.0 mol/L KCl, 10 mmol/L TRIS, 1.0 mmol/L EDTA at pH 8.0 at the applied voltage of 100 mV. The final concentration of each oligonucleotide is 3.0 μ mol/L. The current was sampled at 100 kHz and filtered at 5 kHz

孔可通过电流直接读取实现灵敏区分 dA₁₄-4-C 及 dA₁₄-4-C-11-C. 因此, 在 R2 区域为碱基 C 的情况下, R1 区域对 A 和 C 的分辨率 S 可达到 2.75, 与之前报道的 dA₁₄ 和 dA₁₄-11-C 的分辨率相近, 即 R2 区域为碱基 C 也不显著影响 R1 区域的分辨能力.

进一步, 当 R2 区域为碱基 G 时, 如图 4a 所示, dA₁₄-4-G-11-G 仅展现出一个残余电流高斯峰, 位于 10.59 pA. 然而, 在加入 dA₁₄-4-G 后, 残余电流直方图变化并不明显, 仅在原有的峰右侧显示出一个峰, 且展现出非常严重的重合性(图 4b). 经由 Gaussian 拟合并计算得到, 两个峰的分辨率 S 仅为 0.53, 远小于之前研究报道的 dA₁₄-11-G 与 dA₁₄ 的分辨率($S=1.54$). 该结果表明, R2 区域为碱基 G 时, 会显著降低 R1 区域对 A 和 G 的分辨, 其原因可能在于 G 的体积比 A 更大, 以及 G 能够与 R2 区域内的赖氨酸等产生更强的氢键相互作用. 当 R2 区域被 G 占据后, 决定整个 Aerolysin 孔道离子流的区域从 R1 区域变成了 R2 区域, 因此, R1 区域内碱基的变化难以体现在残余电流上.

2.3 Aerolysin 灵敏区域与不同碱基的相互作用

此外, 为了研究 Aerolysin 灵敏区域与不同碱基的相互作用, 实验进一步测量了 dA₁₄-4-G-11-G, dA₁₄, dA₁₄-4-T-11-T 与 dA₁₄-4-C-11-C 从 3'端穿过 Aerolysin 纳米孔的时间. 由于寡聚核苷酸与 Aerolysin 内壁氨基酸残基之间不同的非共价相互作用, 不同寡聚核苷酸展现

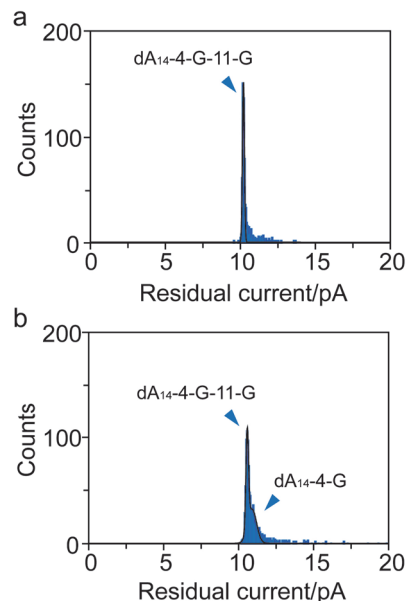


图4 (a) dA₁₄-4-G-11-G、(b) dA₁₄-4-G-11-G 和 dA₁₄-4-G 混合物的残余电流直方图

Figure 4 Histogram of residual current of (a) dA₁₄-4-G-11-G and (b) the mixture of dA₁₄-4-G-11-G and dA₁₄-4-G

The data were acquired in 3.0 mol/L KCl, 10 mmol/L TRIS, 1.0 mmol/L EDTA at pH 8.0 at the applied voltage of 100 mV. The final concentration of each oligonucleotide is 3.0 μ mol/L. The current was sampled at 100 kHz and filtered at 5 kHz

出不同的穿孔时间. 需要提及的是, 本研究暂未考虑 4 号位置与 11 号位置碱基的改变引起的寡聚核苷酸结构微小变化对阻断时间的影响. 如图 5 所示, 在灵敏位点的碱基种类显著影响寡聚核苷酸的阻断时间, 具体体现为 $A>G>C>T$. 这一过孔阻断时间的顺序与碱基的分子量大小并不完全一致(分子量大小为 $G>A>T>C$), 从而证实了碱基与灵敏区域的相互作用的确会对其穿孔时间产生较大影响. 而碱基 A 所体现出的最强的相互作用与 Aerolysin 对于均聚腺嘌呤脱氧核苷酸展现出的超灵敏分辨相一致^[35], 揭示了 Aerolysin 与待测物较强的相互作用有助于对该分子的检测分辨.

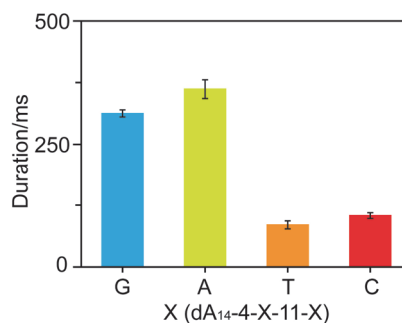


图5 待测物 dA₁₄-4-X-11-X (X=G, A, T, C) 的穿孔时间对比图

Figure 5 Translocation duration of dA₁₄-4-X-11-X (X=G, A, T, C)

The data were acquired at the applied voltage of 100 mV in 3.0 mol/L KCl, 10 mmol/L TRIS, 1.0 mmol/L EDTA at pH 8.0. The error bars were based on at least three separated experiments

3 结论

综上所述,本研究利用特定位点突变的寡聚核苷酸探针分子,探索了 Aerolysin 纳米孔道两个灵敏位点的作用及其之间的协同相互作用对单碱基分辨的影响。结果表明, Aerolysin 纳米孔 R1 区域(R220 附近)能够与碱基形成特定的弱相互作用,识别该位置的单个碱基的差异,而 R2 区域(K238 附近)对碱基变化较不敏感。进一步, R2 区域为 A、C、T 不会影响 R1 区域对碱基的分辨能力。而当 R2 区域被 G 占据时,可能由于 G 更大的分子量及体积,导致 R2 区域成为决定整个孔道离子流的主要区域,使得 R1 区域的离子流无法显著影响孔道离子流,难以实现对不同碱基的区分。此外,寡聚核苷酸过孔时间表明,除了分子量之外,碱基与灵敏位点氨基酸残基的相互作用也会影响寡聚核苷酸的穿孔行为,而相互作用并不决定于碱基大小。由于碱基 A 与 Aerolysin 极强的相互作用, Aerolysin 展现出对均聚腺嘌呤脱氧核苷酸的超灵敏分辨。可见,通过合理设计 Aerolysin 通道内的氨基酸序列,增强 Aerolysin 单分子界面与特殊分子的非共价相互作用有助于其对于特定单分子的识别,有望实现多肽测序、药物筛选和分子动态构象研究等应用。

References

- [1] Kasianowicz, J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 13770.
- [2] Bayley, H.; Cremer, P. *Nature* **2001**, *413*, 226.
- [3] Cao, C.; Long, Y.-T. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *5*, 331.
- [4] Ying, Y.; Zhang, X.; Liu, Y.; Xue, M.; Li, H.; Long, Y.-T. *Acta Chim. Sinica* **2013**, *71*, 44. (应佚伦, 张星, 刘钰, 薛梦竹, 李洪林, 龙亿涛, 化学学报, **2013**, *71*, 44.)
- [5] Gao, P.; Ma, Q.; Ding, D.; Wang, D.; Lou, X.; Zhai, T.; Xia, F. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4557.
- [6] Cao, C.; Liao, D.-F.; Ying, Y.-L.; Long, Y.-T. *Acta Chim. Sinica* **2016**, *74*, 734. (曹婵, 廖冬芳, 应佚伦, 龙亿涛, 化学学报, **2016**, *74*, 734.)
- [7] Deamer, D.; Branton, D. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 817.
- [8] Li, Q.; Lin, Y.; Ying, Y.-L.; Liu, S.-C.; Long, Y.-T. *Sci. Sin. Chim.* **2017**, *47*, 1445. (李巧, 林瑶, 应佚伦, 刘少创, 龙亿涛, 中国科学: 化学, **2017**, *47*, 1445.)
- [9] Clarke, J.; Wu, H.-C.; Jayasinghe, L.; Patel, A.; Reid, S.; Bayley, H. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 265.
- [10] Manrao, E. A.; Derrington, I. M.; Laszlo, A. H.; Langford, K. W.; Hopper, M. K.; Gillgren, N.; Pavlenok, M.; Niederweis, M.; Gundlach, J. H. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 349.
- [11] Garalde, D. R.; Snell, E. A.; Jachimowicz, D.; Sipos, B.; Lloyd, J. H.; Bruce, M.; Pantic, N.; Admassu, T.; James, P.; Warland, A.; Jordan, M.; Ciccone, J.; Serra, S.; Keenan, J.; Martin, S.; McNeill, L.; Wallace, E. J.; Jayasinghe, L.; Wright, C.; Blasco, J.; Young, S.; Brocklebank, D.; Juul, S.; Clarke, J.; Heron, A. J.; Turner, D. J. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 201.
- [12] Sutherland, T. C.; Long, Y.-T.; Stefureac, R.-I.; Bediako-Amoa, I.; Kraatz, H.-B.; Lee, J. S. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1273.
- [13] Yang, J.; Li, S.; Wu, X.-Y.; Long, Y.-T. *Chin. J. Anal. Chem.* **2017**, *45*, 1766. (杨洁, 李爽, 武雪原, 龙亿涛, 分析化学, **2017**, *45*, 1766.)
- [14] Pigue, F.; Ouldali, H.; Pastoriza-Gallego, M.; Manivet, P.; Pelta, J.; Oukhaled, A. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 966.
- [15] Li, S.; Cao, C.; Yang, J.; Long, Y.-T. *ChemElectroChem* **2018**, *6*, 126.
- [16] Si, W.; Aksimentiev, A. *ACS Nano* **2017**, *11*, 7091.
- [17] Hu, Z.; Du, J.; Ying, Y.; Peng, Y.; Cao, C.; Long, Y.-T. *Acta Chim. Sinica* **2017**, *75*, 1087. (胡正利, 杜冀晖, 应佚伦, 彭岳一, 曹婵, 龙亿涛, 化学学报, **2017**, *75*, 1087.)
- [18] Wanunu, M.; Dadosh, T.; Ray, V.; Jin, J.; McReynolds, L.; Drndić, M. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 807.
- [19] Xi, D.; Shang, J.; Fan, E.; You, J.; Zhang, S.; Wang, H. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 10540.
- [20] Uram, J.; Ke, K.; Hunt, A.; Mayer, M. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2339.
- [21] Jiang, Y.; Feng, Y.; Su, J.; Nie, J.; Cao, L.; Mao, L.; Jiang, L.; Guo, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 18739.
- [22] Stoddart, D.; Heron, A. J.; Mikhailova, E.; Maglia, G.; Bayley, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 7702.
- [23] Cao, C.; Li, M.-Y.; Cirauqui, N.; Wang, Y.-Q.; Peraro, M.; Tian, H.; Long, Y.-T. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2823.
- [24] Maglia, G.; Restrepo, M.; Mikhailova, E.; Bayley, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 19720.
- [25] Derrington, I.; Butler, T.; Collins, M.; Manrao, E.; Pavlenok, M.; Niederweis, M.; Gundlach, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 16060.
- [26] Duan, J.; Zhuo, S.; Yao, F.-J.; Zhang, Y.-N.; Kang, X.-F. *Chin. J. Anal. Chem.* **2016**, *44*, 1801. (段静, 卓莎, 姚付军, 张亚妮, 亢晓峰, 分析化学, **2016**, *44*, 1801.)
- [27] Gao, R.; Ying, Y.-L.; Yan, B.-Y.; Long, Y.-T. *Chin. Sci. Bull.* **2014**, *59*, 4968.
- [28] Zhang, Z.; Li, T.; Sheng, Y.; Liu, L.; Wu, H.-C. *Small* **2019**, *15*, 1804078.
- [29] Ying, Y.-L.; Chao, C.; Hu, Y.-X.; Long, Y.-T. *Natl. Sci. Rev.* **2018**, *5*, 450.
- [30] Iacovache, I.; Carlo, S.; Cirauqui, N.; Peraro, M.; van der Goot, G.; Zuber, B. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12062.
- [31] Stefureac, R.; Long, Y.-T.; Kraatz, H. B.; Howard, P.; Lee, J. S. *Biochemistry* **2006**, *60*, 9172.
- [32] Cressiot, B.; Braselmann, E.; Oukhaled, A.; Elcock, A. H.; Pelta, J.; Clark, P. L. *ACS Nano* **2015**, *9*, 9050.
- [33] Fennouri, A.; Daniel, R.; Pastoriza-Gallego, M.; Auvray, L.; Pelta, J.; Bacri, L. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8488.
- [34] Baaken, G.; Halimeh, I.; Bacri, L.; Pelta, J.; Oukhaled, A.; Behrends, J. *ACS Nano* **2015**, *9*, 6443.
- [35] Cao, C.; Ying, Y.-L.; Hu, Z.-L.; Liao, D.-F.; Tian, H.; Long, Y.-T. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 713.
- [36] Wang, Y.-Q.; Li, M.-Y.; Qiu, H.; Cao, C.; Wang, M.-B.; Wu, X.-Y.; Huang, J.; Ying, Y.-L.; Long, Y.-T. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 7790.
- [37] Hu, Z.-L.; Li, Z.-Y.; Ying, Y.-L.; Zhang, J.; Cao, C.; Long, Y.-T.; Tian, H. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 4268.

(Cheng, F.)