1. Polony芯片

该方法是由瑞士日内瓦雪兰诺制药研究中心的Eric Kawashima、俄罗斯科学院的Alexander Chetverin和当时在美国哈佛大学的密特拉共同开发的。他们制作出了可排列在载玻片或凝胶分子层上的一个个独立的聚合酶群落，成为polony，每一个聚合酶群落里都含有一个DNA模板分子，通过PCR反应就可以获得大量的模板。这些扩增后的聚合酶群落就像菌落一样一个个散布在载玻片或凝胶分子层上，成为polony芯片。每一个polony直径约为1μm，一个芯片上可以承载数十亿个聚合酶群落。

2. 元基因组（metagenomics）

元基因组又称环境基因组学，是指同时被研究的整个微生物群落的DNA。

3. Phred样质量值（Phred-like quality scores）

Phred样质量值最初是被定义用来衡量自动DNA测序质量的。Phred样质量值被广泛用来衡量DNA测序仪的测序质量好坏，并且被用来比较不同测序方法之间的效率高低。

Phred样质量值	在多少个碱基中掺入1个错误碱基数	测序准确率
10	10	90 %
20	100	99 %
30	1,000	99.9 %
40	10,000	99.99 %
50	100,000	99.999 %

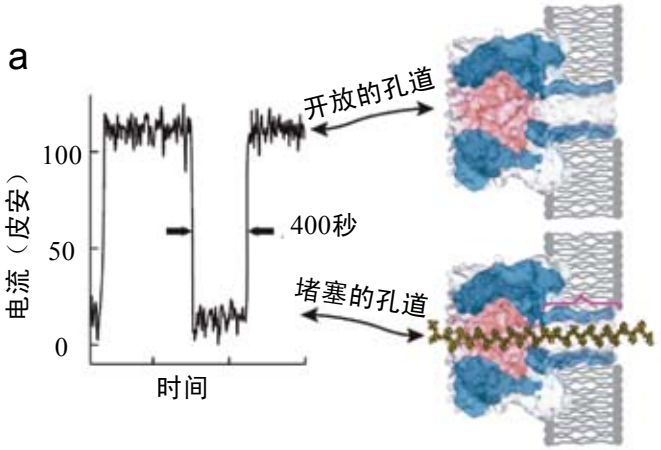
四、新型纳米孔测序技术

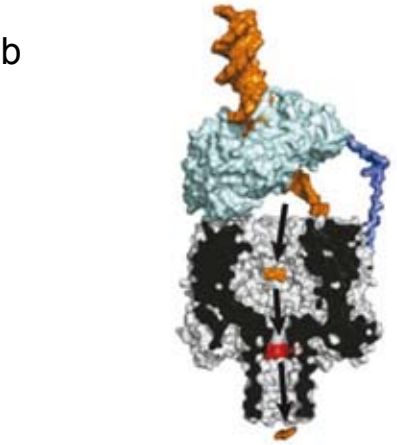
新型纳米孔测序法（nanopore sequencing）是采用电泳技术，借助电泳驱动单个分子逐一通过纳米孔来实现测序的。由于纳米孔的直径非常细小，仅允许单个核酸聚合物通过，因而可以在此基础上使用多种方法来进行高通量检测。此外，纳米级别的孔径保证了检测具有良好的持续性，所以测序的准确度非常高。对于长达1,000个碱基的单链DNA分子、RNA分子或者更短的核酸分子而言，根本无需进行扩增或标记就可以使用纳米孔测序法进行检测，这使得便宜、快速地进行DNA测序成为可能。如果对现有纳米孔测序法进行进一步发展和改进，那么它将有望成为第三代测序技术（也可称为下、下一代测序技术），从而帮助人们实现24小时内只花费1,000美元完成二倍体哺乳动物基因组测序这一目标。

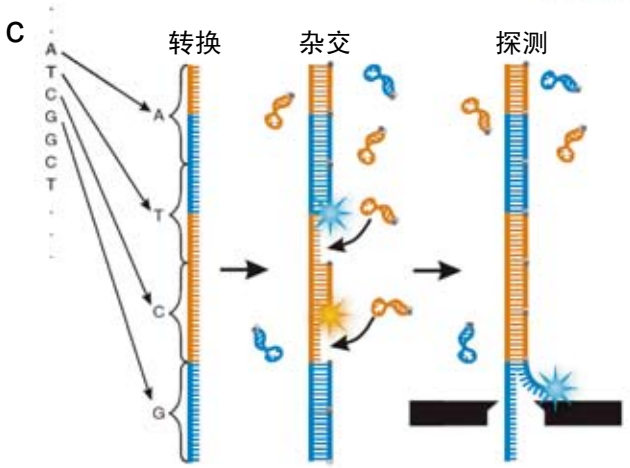
一个盛满电解质溶液的容器被一纳米孔膜隔成两半，如果施以比较小的电压，如约100mV电压，就能使用标准的电生理检测手段测量通过纳米孔的电流大小。很多生物电通道的开关都是靠小肽段分子是否堵塞通道来实现的。基于这个事实，加州大学圣克鲁兹分校（University of California Santa Cruz, UCSC）的Deamer和哈佛大学（Harvard University）的George Church都不约而同地提出一个构想：如果DNA分子或者RNA分子也能堵塞某个通道，那么应该可以运用上述方法来检测电流。接下来，Deamer和Branton等人证明了单链DNA和RNA分子能通过蛋白质组成的孔道，并且能检测到它们通过这种纳米级孔道时所造成的电流改变（图8a）。他们使用的孔道蛋白是金黄色葡萄球菌α溶血素（*Staphylococcus aureus* toxin，α-hemolysin）。这种蛋白以前曾被Bayley小组用作生物传感器。Bayley小组发现，α溶血素蛋白非常稳

定，即使在接近100℃的情况下也能维持正常的功能。Deamer和Branton等人发现，因为α溶血素蛋白孔径非常小，简直与单链核苷酸的直径相差无几，所以可以将折叠卷曲的核苷酸链解开，并仅允许它以单链的形式通过蛋白孔道。单链核苷酸分子穿过蛋白孔道时会造成局部电流改变，即相比没有分子穿过时的电流强度有所减小。基于这个现象，Deamer和Branton等人猜测，如果核酸分子中每一个核苷酸通过孔道时都能出现一种特定形式的电流改变，那么通过分析电流改变的情况不就能知道核酸的序列了吗？

为了验证这个想法，Deamer小组、Meller和Branton小组使用好几种不同的RNA分子和单链DNA分子进行了研究，以观察它们对电流的影响。结果发现，polyC RNA分子引起的电流强度下降比polyA RNA分子要强得多。此外，他们还发现，由30个A和70个C组成的RNA分子在序列从A转变成C时电流强度也会发生改变。不过不幸的是，这种嘌呤和嘧啶之间的明显差异没能在脱氧核糖核苷酸试验中发现。实际上，在RNA试验中观察到的polyA和polyC引起不同形式的电流改变是由碱基堆积（base stacking）和二级结构上的差异造成的。随后，使用不同DNA同聚物（DNA homopolymer）进行试验发现，脱氧嘌呤寡聚物（deoxypurine oligomer）和脱氧嘧啶寡聚物（deoxypyrimidine oligomer）引起的电流改变差别并不大，只有不足5%。而且这种电流改变差异是由10~15个核苷酸（占据了α溶血素蛋白的跨膜区）引起的，它无法区别单个核苷酸引起的电流改变之间的差异（图8a）。







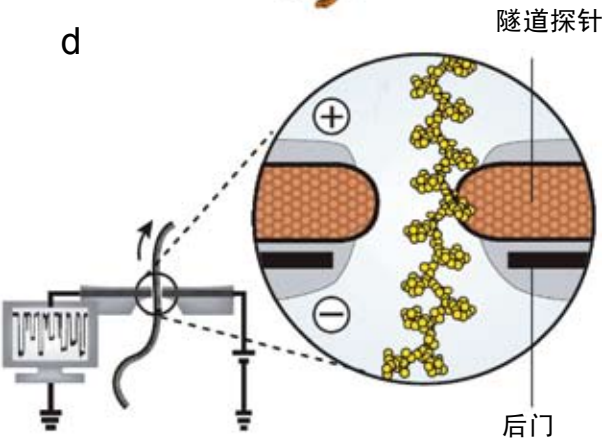


图8 四种纳米孔测序技术示意图。

（a）借助核酸链堵塞纳米孔时引起的电流强度改变来测序。图左侧是典型的电流强度图，从图中可见，纳米孔通道通畅时（右上图）和被DNA链堵塞时（右下图）的电流强度是有明显区别的，但是无法区分堵塞纳米孔通道的12bp核苷酸的组成。（b）核酸外切酶测序。图中淡蓝色的核酸外切酶通过深蓝色的接头连接在α溶血素纳米孔的顶端，外切酶逐个切下DNA链末端的dNMP（金色），然后dNMP进入纳米孔中，通过红色的氨基化环糊精配体，引起相应的电流改变，从而被检测出来。（c）使用合成DNA和光读取技术测序。待测DNA链中的每一个核苷酸都被替换成更长的由橙色和蓝色碱基组成的寡聚体，每一个待测核苷酸都被12bp的寡聚体替代。将这种转换后的新DNA链与分子信标杂交，杂交链在通过纳米孔时分子信标会脱落，释放出荧光，读取这些荧光就可以推测出原始DNA链的序列。（d）借助横向隧穿电流测序。纳米孔中装载有橙色的电极和黑色的后门，当DNA链通过纳米孔时，横向的隧穿电流会发生变化，并且每一种核苷酸都有其各自独特的横向电流，因此可以借助这些电流来测序。

虽然这些最初的纳米孔实验并没有获得预期结果，但它们至少显示出纳米孔在单分子技术方面的应用优势，例如高度的敏感性，同时也带动了纳米孔核酸分析技术的研究热潮，并在理论及实验方面取得了一些成果。自从发现在电场力作用下，长达1000个碱基的单链DNA分子也能通过纳米孔之后，人们就更加坚信，廉价的纳米孔测序技术一定会成为现实。与此同时，与纳米孔有关的研究更是大大增加。曾有人使用液态双分子层（lipid bilayer）构建蛋白质孔道，最近还出现了固态材料或塑料材料的纳米孔道。事实上，一直为10年内完成1,000美元检测个人基因组这一目标努力的美国国家人类基因组研究所（NHGRI），已经给纳米孔测序研究提供了好几笔经费了（详见http://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFA-HG-04-003.html，图9）。

REVOLUTIONARY GENOME SEQUENCING TECHNOLOGIES -- THE $1000 GENOME

RELEASE DATE: February 12, 2004

RFA Number: RFA-HG-04-003 (This RFA has been reissued, see RFA-HG-05-004)

EXPIRATION DATE: October 15, 2004

Department of Health and Human Services (DHHS)

PARTICIPATING ORGANIZATION:
National Institutes of Health (NIH
(http://www.nih.gov)

COMPONENT OF PARTICIPATING ORGANIZATION:
National Human Genome Research Institute (NHGRI)
(http://www.nhgri.nih.gov)

CATALOG OF FEDERAL DOMESTIC ASSISTANCE NUMBER(S): 93.172

LETTER OF INTENT RECEIPT DATE: March 15, 2004, September 14, 2004
APPLICATION RECEIPT DATE: April 15, 2004, October 14, 2004

图9 1,000美元检测个人基因组项目。图片来源：grants.nih.gov

尽管纳米孔技术是好几项单分子应用技术的基础，但DNA链具有的长度还是成为采用纳米孔技术进行测序的一个障碍。此外，随着目前合成测序法（sequencing by synthesis, SBS）技术正在不断发展，并且费用越来越低，那是否还有必要继续研究纳米孔测序技术呢？这也正是目前大家对纳米孔测序技术的一个疑问，人们希望更多领域的科学家和研究人员可以共同参与讨论，提出合理的解决方法。

1. 纳米孔测序技术的特点

纳米孔测序技术一个最突出的优势就是便宜，尤其是在样品准备阶段几乎不需要耗费什么试剂，而且也不需要像别的测序方法那样使用核苷酸、聚合酶或连接酶等等。因此，纳米孔测序技术要比传统的直接测序（direct strand sequencing）、Sanger合成测序法或其它方法的费用低得多，也比最近开发出的大型高通量测序仪，如罗氏公司的454、Illumina公司的Solexa、Applied Biosystems公司的SOLiD、Helicos公司的HelioScope等要便宜。与上述所有技术都不同，纳米孔测序技术根本无需纯化的荧光素试剂，也无需进行DNA扩增，因此不仅省去了试剂的费用，还省去了克隆、扩增的时间，真正做到了省时又省钱。

一台理想的使用电检测技术的商业化测序仪需要由以下两个部分组成：一次性的检测芯片（disposable detector chip），该芯片整合有纳米孔芯片、微流体系统、电子探针系统等；以及一套可以控制试验操作并分析试验数据的便携式工作系统。假设一个芯片能对一个人的全基因组进行测序，那么这一次检测的费用就只包括制备DNA样品的费用、设备使用费和一次性芯片的费用。

理论上说，使用纳米孔测序仪只需要用不到1μg（即从不到10^6个细胞中提取的不到10^6个基因组拷贝）的基因组DNA样品就可以获得六倍的序列覆盖量。不过，在实际操作过程中可能需要10^8个基因组拷贝，这样才能保证在在25μl~50μl的操作体系中达到足够的检测浓度。

人类10^8个基因组拷贝大约相当于700μg人类二倍体基因组组织，这点DNA可以用商业化的试剂盒直接从血液等组织中抽提出来，抽提一次的费用只需要不到40美元。

在纳米孔测序过程中，长约6×10^9的二倍体哺乳动物基因组会被分割成长约50,000碱基的单链DNA分子分别进行测序。这种一次检测50,000个碱基的能力大大方便了后续序列拼接阶段的工作。如果纳米孔测序技术真的能够只需要一点点样品，同时还不需要对样品进行标记等操作的话，那么检测一次的费用就只包括芯片的费用和仪器使用费，这绝对不会超过1,000美元。不过，要实现这一美好的目标，目前还存在几个问题需要克服。

2. 发展纳米孔测序技术可能会碰到的问题

现在，基于纳米孔技术已经发展出了好几种检测碱基的方法。下面将列举几种，目的不是介绍测序方法，而是为了详细说明纳米孔测序技术会碰到的主要问题。

当单链DNA穿过生物纳米孔道或固态纳米孔道时检测电流。尽管如上所述，已经有试验清楚证明了可以通过检测电流强度改变的情况来区分不同的多聚核苷酸分子，但到目前为止，还没有一种生物纳米孔或人工纳米孔能有一个非常合适的几何学结构，可以让人们在多聚核苷酸分子穿过纳米孔时检测单个核苷酸造成的电流改变。人们目前可用的这些纳米孔都太长，没有一个长度短于5nm，而太长的纳米孔通道会造成一次有10~15个碱基的单链DNA分子穿过，所以无法对单个碱基分子进行检测。即使“无限短”的通道也无法达到所需的分辨率，这是由于电场区域决定了通道电子读出的区域，电场区域会向通道两侧各扩展大约一个通道直径的长度。因为纳米孔的直径要能允许单链DNA分子（直径约1.5nm）通过，而电流的分辨率只能达到3nm，这就决定了只检测电流强度的变化无法达到“空间”上的分辨率要求。而且单链核苷多聚物在150mV的电场中，以大约1个核苷酸/μs的速度通过纳米孔。但是要达到在皮安（pA）电流水平上检测单个核苷酸的精度就需要延缓单链核酸分子通过纳米孔的速度，至少要超过1msec以上。

虽然使用纳米孔无法区分DNA链中相隔仅0.4nm的相邻核苷酸，但如果纳米孔技术和杂交测序技术结合起来，那么测得的粗略的电流改变信息就能用于核酸分子测序。所谓杂交测序，就是通过大量已知序列的探针与待测样品杂交，然后根据产生的杂交图谱排列出靶DNA的序列。不过在杂交测序时，与待测样品结合的探针的位置和数量都必须弄清楚，但是仅靠杂交测序是不能得到这些信息的。而纳米孔测序技术就很容易区分单链DNA和双链DNA了，所以也就能很好地判断被探针杂交的位置和数目。因此，如果能将这两种技术结合起来，就能实现准确的测序了。实际上，这也正是杂交辅助纳米孔道测序技术（hybridization-assisted nanopore sequencing, HANS）的原理。不过，目前HANS技术还存在两大问题（表12）。

表12 目前HANS技术存在的两大问题

纳米孔技术是否能准确判断杂交区域？
目前在检测与DNA结合的探针上以及将探针准确无误地与待测片段结合上还存在着技术上的限制，那么，究竟应该采用多长的DNA片段进行重组？

依次从DNA链末端切割碱基，以检测这些碱基逐个通过纳米孔道时引起的电流变化，用这种新方法来测序。Keller等人当初认识到可以使用核酸外切酶逐次水解DNA末端的脱氧单磷酸核苷（deoxynucleoside monophosphate, dNMP），然后逐个识别这些dNMP，这样就可以对DNA链进行测序了。但当时苦于没有好的办法确认这些未被标记的dNMP，所以阻碍了这种测序技术的发展。现在，纳米孔技术的发展给这种测序技术带来了重生的曙光。研究发现，α溶血素与一个氨基化环糊精配体（aminocyclodextrin adaptor）结合

之后（即在α溶血素孔道内共价结合上一个环糊精），就可以识别未被标记的碱基了。基于这项研究成果，英国牛津纳米孔技术公司（Oxford Nanopore Technologies）最近成功地将一个氨基化环糊精配体共价结合到了α溶血素孔道内（图8b）。当一个dNMP通过固定于脂质双分子层中的α溶血素氨基化环糊精孔道时，跨孔电流强度会发生四种改变，即每一种dNMP通过纳米孔道时都会引起一种特定形式的电流强度改变，因此，可以通过测量电流强度的改变来判断究竟是哪一种碱基（A、T、G、C）通过了纳米孔。另外，由于电流强度的改变非常明显（因为碱基堵塞纳米孔和未堵塞之间，电流强度差异特别大），所以也就可以准确的判断出有多少个碱基通过纳米孔了。现在，对于这种纳米孔测序技术来说，最重要的是如何保证被核酸外切酶依次切下来的碱基能100%依次通过纳米孔。由于该方法采用纳米孔来识别释放的dNMP，而不是通过对完整的DNA链上的碱基进行鉴别，因此，这种逐次“阅读”碱基的方式能否如实反映DNA链中碱基的真实顺序就显得尤其重要了。最后，选择哪种核酸外切酶也是很重要的一步。可以采用将核酸酶和α溶血素基因剪接在一起的重组片段，或者采用化学方法将核酸酶与α溶血素结合在一起，从而确保释放的dNMP能够通过纳米孔。这种核酸外切酶应该具有可持续性、检测时低噪音，以及同时能在高盐环境下工作的特性。最好这种核酸外切酶能够切割基因组双链DNA，而且易于操作。

纳米孔测序技术使用了信号转换技术和光学读出技术。纳米孔测序技术还有另一个发展方向，就是将DNA序列信息转换成两种颜色的图形信息，然后再通过光学读出技术进行检测、分析。然而，要将荧光探针标记到DNA链中的每一个碱基上是非常困难的工作。于是人们开发出了一种新的方法，用两种不同的12碱基寡聚体（12-mer oligos）——A和B，按照四种不同的组合方式（AB、BA、AA、BB）将A、B组合起来（图8c），这样就可以对DNA链中的每一个核苷酸进行替换了。因为单个核苷酸通过纳米孔的速度实在是太快了，完全无法进行检测，所以将单核苷酸替换成这种长一点的寡聚体，可以减缓通过速度，方便检测。同时，通过这种信号转化还将DNA链中原本的四种信号A、T、G、C简化成了A、B两种信号。

挪威Lingvitae公司（http://www.lingvitae.com/DPTutorial.php）已经成功开发出了一种自动化的、大规模并行处理方法。该方法可以在24小时内将一个人类基因组序列转化成由24bp寡聚体序列组成的“新”序列。现在，他们还在继续努力，希望能开发出更便宜、出错率更低、寡聚体片段更长，同时耗时更短的信号转化方法。进行这种信号转化看起来是增加了一个步骤，这好像与纳米孔测序的初衷（不需要进行标记等额外操作步骤）相悖，但实际情况是，由于增加了这个步骤极大地简化了后续的信号（序列）读取工作，而这点恰恰是令其它测序方法头疼不已的大麻烦。

使用两种能分别与A、B互补的12bp长的“分子信标”（molecular beacon）（详见http://www.molecular-beacons.org/Introduction.html，杂交过程见图10）与经过上述信号转化之后形成的新DNA链杂交。分子信标由于自我猝灭（self-quenching）机制的作用，在溶液中的荧光背景信号极低（图8c）。

同样，当分子信标与新DNA链杂交之后，由于临近信标间存在相互猝灭作用，所以荧光信号依然很弱（图8c）。但当杂交链通过直径不到2nm的纳米孔时，与新DNA链互补结合的寡聚体会脱落，并释放出荧光信号，只需依次检测这些荧光信号就能对原始DNA链进行测序。将高密度纳米孔芯片技术、光学读取

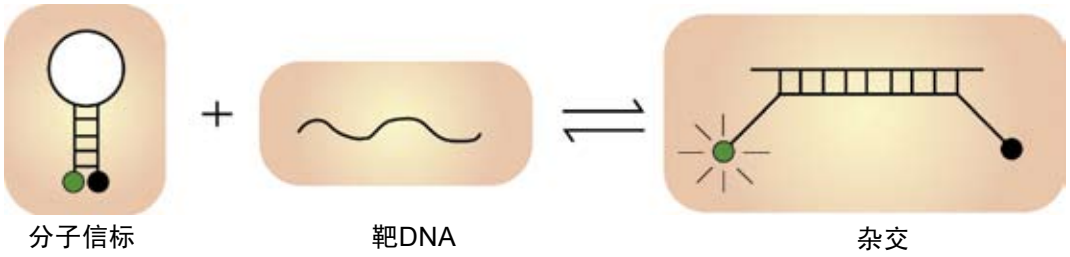


图10 分子信标与DNA链杂交示意图。图片来源：molecular-beacons.org

技术、高分辨率电子倍增电荷偶联摄像技术（high resolution electron-multiplying charge-coupled device camera）结合起来，就可以同时并行处理大量数据，大大提高测序速度。由于纳米孔不需要借助电子吸附（electrical contact）、表面修饰（urface modification）或转位过程（translocation process）等步骤就可以装载到芯片上，因此可以得到极高密度的纳米孔芯片。现在的纳米加工技术（nanofabrication）已经可以达到上述要求了。不过，目前要生产出直径在1.7nm~2.0nm的高密度纳米孔芯片还存在一定困难。

当单链DNA通过嵌有探针的固态纳米孔时检测横向隧穿电流或电容。有这样一种理论认为，当单链DNA通过嵌有探针的固态纳米孔时，通过每一个碱基的横向电流都各不相同，故根据电流情况判断出是哪种碱基通过，也就能对ssDNA进行测序了（图8d）。这种方法与前面所述的因为每种碱基堵塞了纳米孔道导致电流减小的幅度不同来对碱基进行判断的方法不同，它是检测横向装载在纳米孔道中的一对电极对通过纳米孔的碱基施加的横向电流来判断究竟是哪种碱基通过的。虽然在试验中该方法的效果很不错，但是还是要介绍一下有关该方法的几种不同观点。

与在扫描隧道显微镜（scanning tunneling microscope, STM）中一样，使用合适的探针（电极），可以得到纳安级（nano-ampere）的电子隧穿电流。使用这种纳安级的电流检测碱基的速度比在直径不到3nm的纳米孔中使用皮安级的电流检测要快得多。虽然这种方法只需使用纳米孔和电流检测设备，并有望成为最便宜、最快速的测序技术，但它也面临着四种主要的挑战（表13）。

表13 使用纳安级电流检测碱基的速度的方法存住的四种主要挑战

需要优化偏置电压（voltage bias）和溶液条件，以便能最大化地区分四种不同的碱基，达到高准确度和高分辨率；
必须有一套机制保证每一个碱基都以一定的方式穿过电极，因为隧穿电流非常敏感，哪怕是在方向和距离上发生原子级的改变都会引起隧穿电流的变化；
必须严格控制核酸链单向通过纳米孔时的速度，确保每一个碱基能在电极处至少停留0.1ms，以保证检测的准确性（消除背景噪声和分子运动带来的干扰）。这种跨孔速度能保证对每一个碱基的检测时间都要比用最新型的前置放大器检测纳安级电流所需的时间高出两个数量级；
人们现在还不清楚横向隧穿电流除了能区分四种碱基之外，是否还能辨别碱基之间的空隙（gap）。如果能辨别gap，那么在测序未知DNA时就能够很好地区分前后碱基之间的顺序了。

不过，现在使用单壁碳纳米管（single-walled carbon nanotube）就有望解决上述第二和第三个挑战，如果对碳纳米管进行合适的改造甚至还能解决第一个挑战。纳米管能以一种独特的方式和方向与碱基结合，而且每一个碱基的结合活化焓（binding activation enthalpie）为了便于控制DNA链通过纳米管的速度，也都处于可被温度、离子强度或偏置电压调控的范围之内。

要借助横向隧穿电流来分辨碱基还有一种方法，就是在化学修饰的金属电极和待测碱基之间形成碱基特异性的氢键。Ohshiro和Umezawa发现，在STM中如果金属探针（电极）被A、G、C、U的硫氢基（thiol）修饰之后，电极和碱基之间的隧穿电流会被极大地放大。他们发现，使用经胞嘧啶修饰过的探针（电极），可以区分出序列TTTTTTTTGTTTTTTTTT和序列TTTTTTTGGTTTTTTTTT。基于Ohshiro和Umezawa的工作，Lindsay等人猜想，是否可以使用经两种不同化学修饰方法加工过的电极，令其中一组电极能结合核苷酸的磷酸基团，而另一对电极能结合核苷酸的碱基基团（图11）。这样，在每一个核苷酸通过纳米孔中的“阅读器（电极）”时就会通过“电流距离”（current-distance）而不是通过静态的“隧穿电流”而被检测出来。A、C、G、T四种“阅读器”中的每一种都会借助上面的功能基团与通过纳米孔的同一种碱基形成氢键。将这四种阅读器链接在一起形成“DNA链”就可以对dsDNA链进行测序了。不过，要同时将四条dsDNA链穿过四个阅读器还是一大难题。

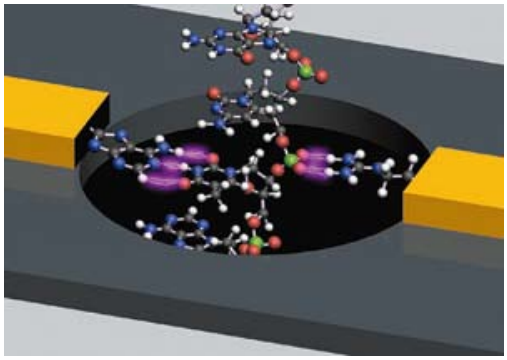


图11 被化学修饰过的纳米孔探测器。
当一段DNA链通过纳米孔时，一个电极上的“磷酸基捕获器”和另一个电极上的“碱基捕获器”都会与DNA链之间形成氢键。

还有人提出可以将金属氧化硅电容和纳米孔技术结合在一起通过对DNA进行静电检测以达到测序的目的。透射电镜（transmission electron microscope, TEM）发射的电子束可以将纳米孔固定到两层掺杂硅构成的膜上（中间被厚约5nm的SiO_2绝缘层隔开）。当有DNA链穿过纳米孔时，可以检测到两层硅膜间电容的静电势和电压发生了改变。仿真结果表明，A、C、G、T都有其各自独特的电容信号，因此从理论上来说也可以通过这种方法进行测序。在早期的一次试验中发现能够检测到DNA链通过纳米孔时引起的电压变化，但是由于时间太短，还无法区分出单个的碱基。目前，该方法面临的主要问题也是如何控制碱基通过纳米孔时的速度和方向。

3. 获取较长的测序长度

纳米孔测序技术还有一个非常吸引人的优势，那就是测序距离长。因为纳米孔测序仪对通过的每个碱基进行测序，与前后的测序结果都无关。因此从原则上来说，使用纳米孔测序技术，只要DNA链不发生断裂，并且能一直通过纳米孔，就可以一直检测下去。到目前为止，人们已经证明，长达25kb的ssDNA能够一次性通过生物纳米孔，长达5.4kb的ssDNA能够一次性通过固态纳米孔。因此，如果检测技术能得到进一步的改善（能检测快速通过纳米孔的碱基），纳米孔测序技术还是具有非常好的应用前景的。虽然现在还无法确切获悉纳米孔测序技术的准确度有多高，但可以确定插入、缺失等序列错误不会影响片段的读出长度，因为相移在独立的单分子读序中并不是一个问题。只要所测序列是随机的，而不是系统的或具有位点依赖性的，那么足够高的序列覆盖率便可以保证任何水平的准确度。

此外，虽然目前的新一代测序仪的测序长度较短，但它们具有高通量的优势，因此可以将纳米孔测序技术和这些新一代测序技术结合起来，以弥补新一代测序仪在测序长度方面的不足。

考虑到在未来的测序技术发展趋势中，测序长度是至关重要的一个指标，因此还需要进一步研究，以弄清纳米孔测序技术在检测ssDNA时测序的极限长度是多少。纳米孔测序技术在检测单链寡聚物（不到50个碱基）时可以进行高通量检测，此时核酸链通过α溶血素纳米孔的速度大约是5.8个低聚物/sec μM。因为核酸链大分子穿过纳米孔的速度与其在溶液中的摩尔浓度有关，而摩尔浓度又不能太高以免溶液太粘稠，因此还需要进行试验验证50kb长的ssDNA是否能以一个合适的速度通过纳米孔。已经有几篇论文报道指出，使用直径约3nm~6nm的纳米孔能够检测长约3kb~10kb的ssDNA及dsDNA片段（核酸分子的浓度在10nM~20nM之间），不过文章中都没有提及核酸分子通过纳米孔的速度。此外，虽然Branton等人已经证实了48kb的λ-DNA可以通过纳米孔，但是使用最新的纳米孔捕获及再捕获技术对长基因片段进行测序时的效率更高。纳米孔捕获及再捕获技术对于提高测序质量非常重要，因为借助这种技术就可以对同一个碱基进行反复测序。当碱基初次通过纳米孔时，如果检测信号质量不高，实时监测软件就会“命令”该碱基再次通过纳米孔并重新接受检测，直至获得满意的信号为止，而不需要重新准备样品，从头再测一次。

All-in-One™ miRNA Q-PCR Detection Kit

复能基因的产品策略

我们客户的策略	合作	拒绝
合作	便宜：PAP+ 染色法；大规模筛查：适合多样本检测单种miRNA	还价低于优惠价2980元
拒绝	诱惑1：优惠期送4条miRNA验证引物。诱惑2：近期检测试剂打折	选择TaqMan；价格过高；鉴定用，单样本多miRNA 放弃筛查计划

原理

- micorRNA+nATP $\xrightarrow{\text{PAP加尾酶}}$ nPPi+microRNA(A)n
- microRNA(A)n+ndNTP +primer(oligo-dT+adptor序列) $\xrightarrow{\text{M-MLV 反转录酶}}$ microRNA(A)n反转录产物

GeneCopoeia™
Expressway to Discovery

GeneCopoeia, Inc.
19520 Amaranth Drive
Germantown, Maryland 20874
USA
Tel: 301-515-6982
Fax: 301-515-6983
Web: http://www.genecopoeia.com

复能基因
FulenGen

广州复能基因有限公司
地址：广州科学城国际企业孵化器D座8楼 510663
电话：(020)32052376、32052410、32290874
传真：(020)32052877
网址: http://www.fulengen.com
服务热线：020-32068595　020-32052376-666
电子信箱：sales@fulengen.com

4. 控制DNA通过纳米孔

DNA高速通过纳米孔的特性使得高速测序成为可能，但同时这种高速度也正是很多纳米孔测序技术的“阿喀琉斯之踵（‘Achilles’ heel，意即弱点）”。因为速度太快，检测的信号质量就不高，甚至很多小的信号根本就检测不到。在120mV的条件下，DNA会以每个碱基/1μs~20μs的速度通过α溶血素纳米孔。这就需要探测器的检测带宽达到MHz级，才能检测到皮安级的电流强度。

当DNA在电泳作用下通过纳米孔时，由于扩散作用的影响，降低了测序的质量。由于DNA分子的随机运动使得它通过纳米孔的时间，即通过时间（transit time）的跨度非常大（这一点从理论上和试验上都已经证实了），因此，人们无法判断有多少碱基通过了纳米孔。而且，由于跨孔DNA分子与纳米孔表面间存在的非特异性的相互作用还会受到非连续性的粘滑现象（discontinuous stick-slip phenomena）影响，所以相互作用会发生改变。这种相互作用改变的本质和频率会引起“逃避时间（escape time，解离时间）”发生非泊松分布（non-Poisson distribution），于是，同一种碱基分子通过纳米孔时的通过时间也会不同。而且，如果碱基分子通过纳米孔的时间小于平均通过时间，那么它极有可能被漏检。

鉴于此，对于纳米孔测序技术来说，最为重要的一点就是如何控制并减慢DNA分子通过纳米孔的速度，同时尽量消除由于纳米孔表面相互作用给DNA分子跨孔动力学上造成的波动现象。降温和增加溶液的粘稠度可以在一定程度上减慢DNA分子通过纳米孔的速度，但这两种方法都不能消除因纳米孔表面相互作用造成的跨孔动力学波动现象。真正能降低DNA跨孔速度的方法见表14。

表14 真正能降低DNA跨孔速度的方法

DNA酶，它能与DNA链结合，减缓其通过纳米孔的速度（受酶催化速度限制）；
持续解链的DNA寡聚体（successive unzipping of DNA oligos），这也是跨孔的限速步骤。

上述这些限速步骤所达到的速度都在每个碱基/数毫秒级，同时还都会受到离子强度、温度以及跨孔偏置电压的影响。

最理想的状态是，如果能发现一种电信号来代表碱基间的“空隙”，那就能清楚地知道有多少个碱基通过了纳米孔了。这种信号对于分析跨孔动力学和碱基孔内停留时间等都具有很高的使用价值，而且可以据此来决定测序仪的检测带宽和其它参数。但在该信号出现之前，人们还需弄清楚DNA的跨孔动力学，同时还要开发出控制DNA跨孔速度的办法。纳米孔制造技术的发展使得我们能够制造出特殊的纳米孔，这些纳米孔的背景噪声很低，而且能够调控DNA与纳米孔表面的相互作用。最终，将DNA跨孔速度控制技术、高带宽技术、低噪声检测技术结合在一起，就能制造出高速纳米孔测序仪了。

5. 生物纳米孔的稳定性问题和固态纳米孔的制造问题

溶血素七聚体（hemolysin heptamer）是最常用于在脂质双分子层中制造生物纳米孔的材料，它性质非常稳定。但脂质双分子层的性质却不那么稳定，尤其是液态脂质双分子层，制造起来极难且费时。

Bayley等人发现包裹在两层薄琼脂糖中的装载有α溶血素纳米孔的双分子层非常稳定，可以被装到特氟隆薄膜（Teflon film）中储存数周之久。同时他们还发现，α溶血素纳米孔可以被顶端是琼脂糖的塑料或玻

璃探针装载到上述双分子层组成的芯片上。另一种稳定双分子层的方法是使用纳米级的孔径而不是微米级的孔径。试验证明，在玻璃毛细管末端的直径为100nm~1,000nm的双分子层在包被有特殊硅烷化剂（silanizing agent）的条件下能保持稳定达两周以上。

使用离子束雕刻（ion beam sculpting）、电子束钻孔（e-beam drilling）和原子层沉积（atomic layer deposition）等方法可以在氮化硅、氧化硅或其它金属氧化物等介质上“制作出”稳定的、有功能的固态纳米孔，不过要得到直径在1.5nm~2.0nm的纳米孔芯片还是一件非常困难的工作。现在，人们已经可以制作出装载有用于检测隧穿电流探针的纳米孔，但是目前的纳米孔制作工艺非常繁琐，速度慢又耗费人力，而且制作出的产品还常常无法达到应用的要求。毫无疑问，随着纳米电子学领域的不断发展，人们一定会制造出高质量的纳米孔芯片。但是，直到纳米孔测序技术被证明是可行的那一天为止，纳米孔测序研究领域的科学家都会一直面临一个问题，那就是只能使用科研设备，而不可能使用大量生产的商业化设备。

对于某些纳米孔测序技术来说，最稳定的纳米孔可能是固态纳米孔和α溶血素纳米孔的“杂交体”，即在氮化硅之类的人工膜上做出5nm左右的纳米孔，同时也装载上α溶血素纳米孔。如果这种方法可行，那么该杂交纳米孔就既有高度的重复性又有无限的稳定性。

6. 结论

如果纳米孔测序技术能够成功，那么它将是非常好的一种新的测序技术，因为它具有以下优点（表15）。

表15 纳米孔测序技术的优点

样品准备极其简单；
不需要借助碱基、多聚酶、连接酶等就能进行测序，而且测序的长度可以达到10,000~50,000 nt。

因此，一个成功的纳米孔测序仪其测序费用应该非常低廉，极有可能达到NIH设定的只用1,000美元就能完成个人基因组测序的目标。同时，纳米孔测序仪本身不会太贵。如果能在一个测序芯片上整合100个纳米孔以及相应的微流体系统和电子探针系统，那么对一个人类基因组进行六倍覆盖率的测序也只需要一天的时间。不过，纳米孔测序技术还是面临着很大的问题。短期内的一个主要问题就是如何减慢DNA通过纳米孔的速度，使每一个碱基通过纳米孔的时间从微秒级上升至毫秒级。

最近，有研究结果表明DNA酶处理能起到减缓的作用。如果纳米孔测序仪用到了溶血素七聚体，那么就还需要与之相配套的稳定载体。目前，这方面的工作也取得了一定的进展。不过从长远来说，人工合成的固态纳米孔似乎更适合商用。人们可以通过监测隧穿电流或电容的改变来“读取”每一个通过纳米孔的碱基，不过这种方法是否切实可行还需要进一步验证。还有一个一直存在的问题是：不论用哪种检测方法，DNA分子在通过纳米孔时发生的随机运动都会增加背景噪声。

综上所述，纳米孔测序技术具有非常诱人的应用前景，因此我们还得继续努力研究下去。而且随着研究的深入，我们越来越坚信，纳米孔测序技术一定会成功的。

原文检索：Daniel Branton, David W Deamer, Andre Marziali et al. (2009) The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 26(10): 1146-1153.

筱玥/编译