

# Nanoporetechniken zur Sequenzierung und Detektion von Nukleinsäuren

Yi-Lun Ying, Junji Zhang, Rui Gao und Yi-Tao Long\*

DNA-Sequenzierung · Einzelmolekülstudien ·  
Ionenkanäle · Membranproteine · Nanoporen

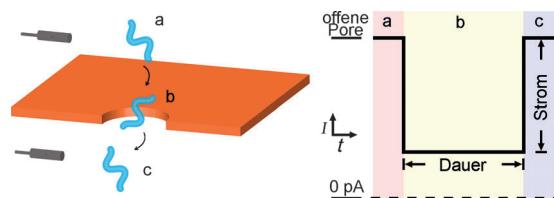
**N**anoporetechniken, die die Funktionen natürlicher Ionenkanäle nachahmen, sind nützliche Methoden für den Einzelmolekülnachweis. Das Verfahren erlaubt die selektive Analyse von Nukleinsäuren in Echtzeit und im Hochdurchsatz. Zwei Arten von Nanoporen finden Anwendung: biologische Nanoporen und Festkörpernanoporen. Dieser Kurzaufsatz beleuchtet die Grundlagen und jüngsten Fortschritte bei der nanoporebasierten Sequenzierung und Detektion von Nukleinsäuren. Außerdem wird eine neuartige, erst kürzlich eingeführte Nanoporetechnik für die Analyse von Biomolekülen vorgestellt.

## 1. Einführung

Natürliche Ionenkanäle regulieren auf selektive Weise den Transport von Biomolekülen, Ionen, Protonen und sogar Elektronen durch Zellmembranen und spielen damit eine entscheidende Rolle für nahezu alle zellulären Ereignisse. Die natürlichen Ionenkanäle dienten als Vorbild für die Erzeugung künstlicher Nanoporen in Membranen für bioanalytische Anwendungen. Der erste nanoporebasierte Biosensor bestand aus einem einzelnen  $\alpha$ -Hämolsin ( $\alpha$ HL) mit einer Porenweite von 1.4 nm an der schmalsten Stelle.<sup>[1]</sup> Der Innendurchmesser von  $\alpha$ HL und dessen Fähigkeit zur wiederholbaren Selbstorganisation sind geeignete Eigenschaften für den Nachweis von Biomolekülen. Die passende Selektivität für ein bestimmtes Biomolekül lässt sich über die Abmessungen der Nanopore festlegen. Dementsprechend wurden verschiedene biologische Membranproteine wie Areolysin,<sup>[2]</sup> Porin A aus *Mycobacterium smegmatis* (MspA),<sup>[3]</sup> ClyA,<sup>[4]</sup> FhuA,<sup>[5]</sup> membranadaptiertes phi29-Motorprotein<sup>[6]</sup> und SP1<sup>[7]</sup> in nanoporebasierten Analysesystemen eingesetzt. Eine andere Art von künstlichen Nanoporen sind Festkörpernanoporen. Bei dieser Methode werden mittels Mikrofertigungstechniken nanometergroße Öffnungen in dünne, isolierende Festkörpermembranen gebohrt, um biologische Nanoporen nachzuahmen. Große Anstrengungen

wurden unternommen, um optische Komponenten, komplexe Elektronikbauteile und eine Vielzahl von Nachweiselementen mit Festkörpernanoporen zu koppeln.<sup>[8]</sup>

Wenn ein Analytmolekül in die Nanopore eintritt, induziert es eine vorübergehende Änderung des Ionenflusses (des Stroms) durch die Pore (Abbildung 1). Nach Zugabe des Analyten (z.B. eines Biomoleküls) in eine der beiden Elektrolytkammern kann eine Abfolge von Blockadeströmen gemessen werden. Die Eigenschaften des Biomoleküls, wie Größe, Struktur, Konformation und Dynamik, können durch Aufzeichnung und statistische Analyse der Blockadeströme, ihrer Dauer und sogar ihrer Form dekodiert werden. Nanoporetechniken ermöglichen den Nachweis von Biomolekülen ohne Markierung, Oberflächenimmobilisierung oder biomolekulare Modifikation. Es sind darum leistungsfähige Methoden für den Nachweis von einzelnen Molekülen,<sup>[9]</sup> insbesondere von einzelnen Nukleinsäuren. Zum Beispiel



**Abbildung 1.** Prinzip der nanoporebasierten Analyse. Ein Nukleinsäurestrang tritt in die Nanopore ein und verursacht einen plötzlichen Abfall des Ionenstroms (a), passiert die Pore und erzeugt einen charakteristischen Blockadestrom mit charakteristischer Blockadedauer (b) und tritt schließlich wieder aus der Pore aus, wodurch der ursprüngliche porenoffene Zustand wiederhergestellt wird (c). Die Potentialdifferenz wird durch zwei Elektroden hergestellt. pA = Pikoampere.

[\*] Y.-L. Ying, Dr. J. J. Zhang, R. Gao, Prof. Y.-T. Long

Key Laboratory for Advanced Materials & Department of Chemistry  
East China University of Science and Technology  
130 Meilong Road, Shanghai 200237 (P. R. China)  
E-Mail: ytlong@ecust.edu.cn

wurden Nanoporentechniken als aussichtsreichste Kandidaten für die DNA-Sequenzierung dritter Generation vorgeschlagen.<sup>[10]</sup> In einem idealen nanoporenbasierten Sequenzierungsexperiment werden die Nukleotide einer einsträngigen DNA (ssDNA) in strikt sequenzieller Reihenfolge durch die Pore gerastert und erzeugen jeweils ein eindeutiges Ausgabesignal, was einer lokalen Sequenzanalyse des Nukleinäurestrangs entspricht. In diesem Kurzaufsatzt betrachten wir zunächst die Fortschritte beim Einzelmolekülnachweis von Nukleinäuren mit biologischen und Festkörpernanoporen. Danach stellen wir die jüngsten Entwicklungen bei neuartigen Nachweissystemen vor.

## 2. Biologische Nanoporen

### 2.1. DNA-Sequenzierung mit biologischen Nanoporen

1996 entdeckten Kasianowicz et al., dass ssDNA und RNA elektrophoretisch durch eine  $\alpha$ HL-Nanopore gesteuert werden können (Abbildung 1).<sup>[1a]</sup> Nanoporentechniken werden seither als vielversprechende Kandidaten für eine DNA-Sequenzierung dritter Generation gehandelt. Vorher gilt es jedoch, eine ganze Reihe von Herausforderungen zu bewältigen. Ein größeres Hindernis für die Anwendung in der DNA-Sequenzierung ist, dass die Translokation von ssDNA durch den Porenkanal zu schnell ist, um Informationen über einzelne Nukleobasen zu gewinnen. Frühe Studien hatten ergeben, dass Polynukleotide mit einer Geschwindigkeit von 1–10  $\mu$ s/Base translozieren,<sup>[1b,11]</sup> was jenseits der Zeitauflösung kommerzieller Nachweisinstrumente liegt. Eine der wichtigsten Aufgaben bei der Entwicklung einer nanoporenbasierten Sequenzierungstechnik ist daher die Kontrolle der Translokationsgeschwindigkeit der DNA durch die Poren.<sup>[10]</sup>

Verschiedene Strategien wurden hierfür angewendet, z.B. wurde die Viskosität der Probelösung erhöht,<sup>[12]</sup> die Temperatur des Fluids abgesenkt,<sup>[13]</sup> oder mittels Mutagenese wurden „molekulare Bremsen“ in die DNA-Stränge eingeführt.<sup>[14]</sup> Eine der effizientesten Methoden ist die Verwendung von Enzymen als molekulare Motoren zur Translokationskontrolle der DNA. Zum Beispiel katalysiert Polymerase die nukleotidweise Verlängerung eines DNA-Strangs mit einer Umsatzgeschwindigkeit im Bereich von Millisekunden pro erzeugtem Nukleotid.<sup>[15]</sup> Indem das Enzym die ssDNA prozessiert, wird der Strang mit einer sehr viel geringeren Geschwindigkeit durch die Pore gezogen; typische Geschwindigkeiten sind 20 ms mit der T7-DNA-Polymerase und 300 ms mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli*.<sup>[16]</sup> Auch phi29-DNA-Polymerase (phi29-DNAP) wurde in Nanoporestudien verwendet.<sup>[17]</sup> Als eine Polymerase der B-Familie verbleibt phi29-DNAP in der  $\alpha$ HL-Pore rund 10000-mal länger an die DNA gebunden als Polymerasen der A-Familie.<sup>[17]</sup> Akeson und Mitarbeiter demonstrierten, dass phi29-DNAP einen DNA-Strang mit einer Geschwindigkeit von 2.5–40 Basen/s nukleotidweise durch die Pore raster.<sup>[18]</sup> Mit dieser verbesserten Strategie zur Blockierung der Oligomertranslokation war anders als bei früheren Experimenten keine aktive Potentialkontrolle mehr erforderlich, um die Bindung der Polymerase an DNA zu bewirken.<sup>[19]</sup> Die Methode bewirkt eine automatisierte Vorwärts- und Rückwärtsrasterung der DNA-Stränge durch die Pore, was eine präzisere DNA-Sequenzierung ermöglicht (Abbildung 2 a).

Ein anderes Konzept zur Optimierung der nanoporenbasierten DNA-Sequenzierung besteht darin, die Auflösung des Stromsignals zu verbessern. Im Prinzip geht man hierbei so vor, dass der Unterschied zwischen den nukleotidinduzierten Blockadesignalen verstärkt wird, um einen spezifi-



*Yi-Lun Ying studierte an der East China University of Science and Technology (ECUST) und promoviert dort seit 2009 in der Gruppe von Prof. Y.-T. Long. Sie befasst sich mit nanoporenbasierten Einzelmolekülstudien und In-situ-Nanospektroelektrochemie.*



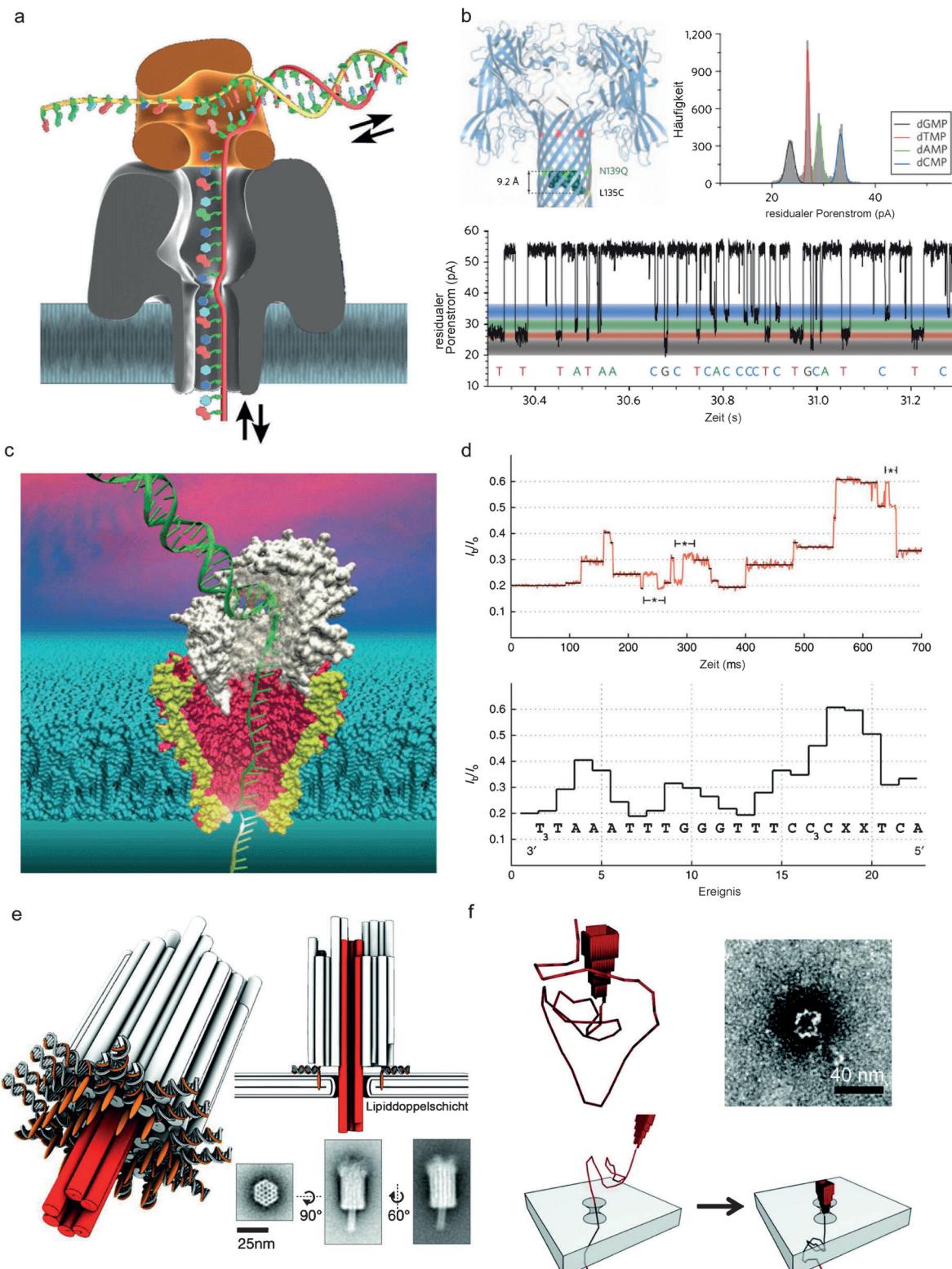
*Rui Gao studierte an der ECUST und promoviert dort seit 2013 in der Gruppe von Prof. Y.-T. Long. Er befasst sich mit der Entwicklung von hochempfindlichen Nachweisystemen für die nanoporenbasierte Analyse.*



*Junji Zhang promovierte 2012 an der ECUST bei Prof. He Tian und arbeitet derzeit am gleichen Institut als Tutor. Seine Forschungsinteressen gelten der Einzelmolekülanalyse, photochromen Materialien und supramolekularen Schaltern.*



*Yi-Tao Long promovierte 1998 an der Nanjing University mit einem Thema aus der bioelektroanalytischen Chemie. Nach einem Postdoktorat in Heidelberg forschte er an den Universitäten von Saskatchewan und Alberta und am Department of Bioengineering der UC Berkeley. 2007 wurde er Professor an der ECUST. Seine Forschungsinteressen gelten der nanoporenbasierten Einzelmolekülanalyse, der Nanospektroskopie, biologischen Grenzflächen und integrierten Biosensoren.*



**Abbildung 2.** Strategien für die DNA-Sequenzierung mit biologischen Nanoporen. a) Kontrolle der Translokationsgeschwindigkeit eines DNA-Strangs durch eine  $\alpha$ HL-Pore (grau) mittels phi29-DNAP (braun).<sup>[18]</sup> b) Kovalente Anbindung von Cyclodextrin (dunkelblau) an das  $\beta$ -Barrel von mutiertem  $\alpha$ HL (hellblau).<sup>[24]</sup> Das Histogramm der Blockadeströme und Stromspuren der aus ssDNA und Exonuklease I erzeugten Mononukleotide zeigt vier charakteristische Signalhöhen, die den vier Nukleotiden entsprechen. c) Kombiniertes System aus der Polymerase phi29-DNAP und der mutierten Pore MspA für die DNA-Sequenzierung.<sup>[3a, 26]</sup> d) Gemessene Stromspuren (oben) und daraus abgeleitete mittlere Ströme (unten) zur Sequenzierung eines bekannten DNA-Moleküls.<sup>[3a]</sup> e) Ein DNA-Origami-Transmembrananal.<sup>[27]</sup> f) Eine DNA-Origami-Nanopore, die in eine Festkörpernanopore eingeschoben wurde.<sup>[28]</sup> Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [3a, 18, 24, 26, 27].

scheren Nachweis der Nukleobasen zu erreichen. Eine als „Sequenzierung durch Synthese“ bezeichnete Strategie mit Polymerase und Cumarin-PEG-markierten Nukleotiden verstärkt die unterschiedlichen Ströme, die von den vier Nukleobasen erzeugt werden.<sup>[20]</sup> Studien haben gezeigt, dass im β-Barrel der αHL-Nanopore drei Erkennungsstellen für Nukleobasen vorhanden sind.<sup>[21]</sup> Um die Identifizierung der Basen zu verbessern, war es erforderlich, mittels Mutagenese ein oder zwei Erkennungsstellen zu verstärken und die jeweils anderen Stellen auszuschalten.<sup>[22]</sup> Zur weiteren Optimierung wurden die αHL-Poren mit β-Cyclodextrin als molekularem Adapter ausgestattet, da β-Cyclodextrin Mononukleotide bindet und gut in den αHL-Kanal passt.<sup>[23]</sup> Mit einer αHL-Pore mit kovalent gebundenem β-Cyclodextrin konnten die vier aus ssDNA und Exonuklease I produzierten Nukleotide mit einer exzellenten Genauigkeit von 99.8 % identifiziert werden (Abbildung 2 b).<sup>[24]</sup>

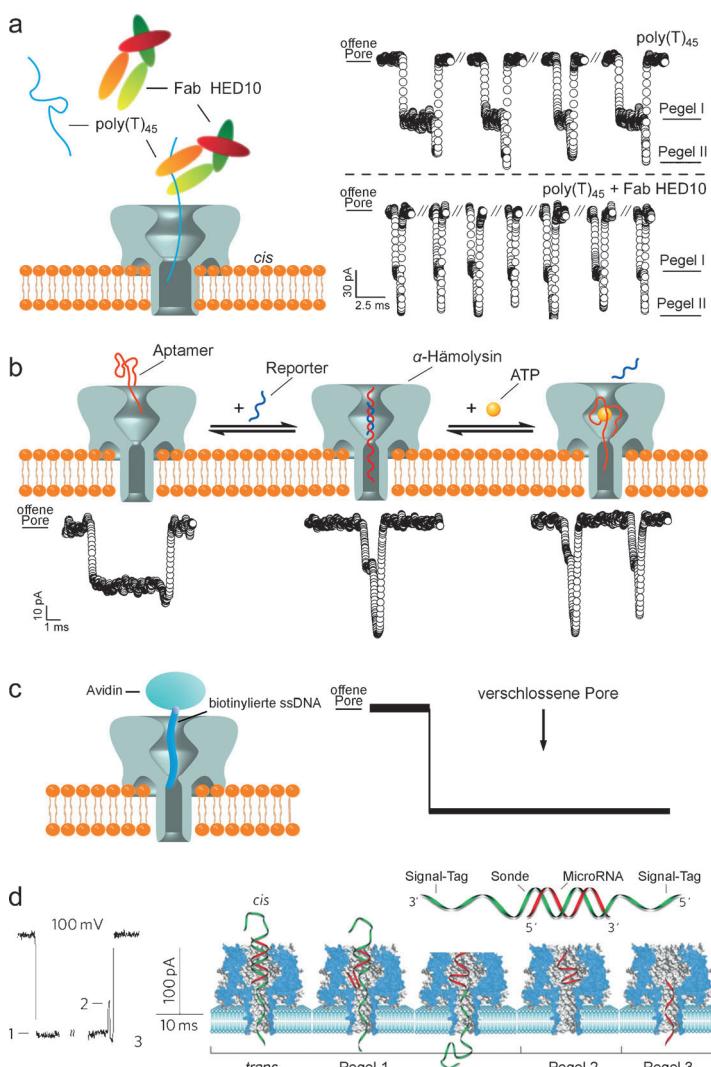
Bisher wurden die meisten nanoporenbasierten Sequenzierungstechniken mit dem gut untersuchten αHL entwickelt. αHL zeichnet sich durch seine leichte Modifizierbarkeit und verlässliche Genauigkeit im Subnanometerbereich aus. Allerdings erstreckt sich das β-Barrel einer αHL-Nanopore über ca. 5.2 nm und kann einen Strang mit rund 20 Nukleotiden aufnehmen.<sup>[25]</sup> Diese strukturelle Gegebenheit resultiert in uneindeutigen Stromsignalen bei der Sequenzanalyse, da es schwierig ist, den präzisen Beitrag jeder Nukleobase zum beobachteten Blockadestrom zu identifizieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurde Porin A aus *Mycobacterium smegmatis* (MspA) als geeigneter Kandidat für die nanoporenbasierte DNA-Sequenzierung untersucht.<sup>[3b, 29]</sup> MspA hat eine einzelne Engstelle mit einem Durchmesser von ca. 1.2 nm und eine Länge von 0.5 nm, was zu gut aufgelösten Stromsignalen für vier benachbarte Nukleotide führt. Mit einem Nachweissystem aus mutiertem MspA und phi29-DNAP wurde ein gut aufgelöster und reproduzierbarer Ionenstrom mit einer mittleren Signaldauer von 28 ms und Stromdifferenzen von bis zu 40 pA beobachtet (Abbildung 2 c).<sup>[3a]</sup> Aufgrund des komplexen Strommusters und der Asynchronität der Polymerase ist es mit dieser Methode bisher nicht möglich, jede einzelne Base in einem Nukleinsäurestrang zu identifizieren (Abbildung 2 d). Dennoch sei hervorgehoben, dass dieses System zwei zentrale Probleme der nanoporenbasierten DNA-Sequenzierung löst: Translokationskontrolle durch die Polymerase und annähernde Einzelnukleotidauflösung durch MspA. Kürzlich entwickelte DNA-Origamitechniken bieten Möglichkeiten für die maßgeschneiderte Einstellung der Gestalt und Oberflächenfunktionalität von Nanoporen mit nahezu atomarer Präzision. Wie in Abbildung 2 e gezeigt ist, wurde durch Selbstorganisation von DNA und DNA-gebundenen Cholesteringruppen ein nanoskaliger Transmembrankanal erzeugt, der der Struktur von αHL nachempfunden ist.<sup>[27]</sup> Diese DNA-Origami-Nanopore verfügt über eine zentrale Öffnung mit einem Durchmesser von 2 nm und kann in eine Festkörpernanopore in einer Doppelschicht eingeschoben werden (Abbildung 2 f).<sup>[28]</sup> Origami-Nanoporen dieser Art sind in der Lage, einzelne DNA-Moleküle nachzuweisen und haben daher das Potential für Anwendungen in der DNA-Sequenzierung. Auch andere selbstorganisierende Nanomaterialien, die sich spezifisch

modifizieren lassen und deren Geometrie mit nanoskaliger Präzision abgestimmt werden kann, kommen für die Entwicklung von Nanoporen für die DNA-Sequenzierung in Betracht.<sup>[30]</sup>

## 2.2. Konformationsabhängige Detektion von Nukleinsäuren mittels αHL-Nanoporen

Obwohl Nukleinsäuren in unterschiedlichen Konformationen in den breiten Vorhof der αHL-Pore eintreten können, kann nur ssDNA in gestreckter Konformation durch die Engstelle translozieren. Ein Polynukleotid (oder sein Komplex) geht im Vorhof des αHL Konformationsänderungen wie z. B. Unzipping- und Entfaltungsprozesse ein, um die Energiebarriere für die nachfolgende Translokation in seiner einsträngigen und gestreckten Form zu senken. Diese Eigenschaft bietet eine interessante Perspektive für die empfindliche und spezifische Nukleotidanalyse auf Einzelmolekül-ebe.

1999 demonstrierten Akeson und Mitarbeiter, dass die αHL-Nanopore einzelne Polynukleotide aufgrund ihrer spezifischen Konformationen unterscheiden kann. Sie zeigten, dass Poly(A) aufgrund seiner helikalen Struktur einen größeren Blockadestrom erzeugt als Poly(C) und Poly(U).<sup>[11]</sup> Unterdessen fanden Kasianowicz und Mitarbeiter, dass eine lockere Kette von Poly(dT) im Vergleich zur starren Struktur von Poly(dC) und Poly(dA) einen charakteristischen doppelstufigen Blockadestrom mit pulsförmigen Signalen induzierte.<sup>[25a, 31]</sup> Ein Antigen-bindendes Fragment, Fab HED10, das als „Steuerruder“ agierte, zwang Poly(dT) in eine gestreckte Konformation und bewirkte eine beträchtliche Absenkung der Energiebarriere (Abbildung 3 a).<sup>[32]</sup> In einer anderen Studie wurde αHL genutzt, um die gefalteten und entfalteten Zustände eines Aptamers zu unterscheiden; die Konformation des Aptamers ist der Schlüssel für die spezifische Bindung eines Zielmoleküls.<sup>[33]</sup> Die G-Quadruplex-Struktur des Aptamers unterliegt einem Entfaltungsprozess im Vorhof des αHL, woraufhin ein veränderter Blockadestrom resultiert.<sup>[33a]</sup> In einer weiteren Untersuchung wurden die molekularen Konformationsänderungen des ATP-binndenden Aptamers bei der Bindung von Zielmolekülen in Echtzeit gemessen (Abbildung 3 b).<sup>[33b]</sup> Die zeitliche Signatur der Aptamerkonformation bei der Bindung des Analytmoleküls bietet somit eine schnelle Methode für den spezifischen Analytnachweis. Zum Beispiel gelang der Nachweis von 300 ng mL<sup>-1</sup> Kokain innerhalb von 60 s durch Aufzeichnung des Bindungsergebnisses zwischen dem Kokain-Aptamer und Kokain.<sup>[33c]</sup> Um die Nachweiseffizienz für native DNA-Nukleobasen zu verbessern, wurden biotinylierte ssDNA-Stränge mit Avidin/Streptavidin verknüpft und auf diese Weise in der αHL-Nanopore immobilisiert. Weil das angehängte Protein zu groß für den αHL-Kanal ist, verursacht es eine längere Aufenthaltszeit des ssDNA-Strangs im αHL (Abbildung 3 c). Diese Strategie ermöglichte die Unterscheidung und Identifizierung einzelner substituierter Basen,<sup>[21, 22, 34]</sup> einer epigenetischen DNA-Modifikation,<sup>[35]</sup> einer oxidativen Einzelbasenläsion<sup>[36]</sup> und abasischer Segmente.<sup>[37]</sup>



**Abbildung 3.** Konformationsabhängiger Nachweis von Nukleinsäuren mittels einer  $\alpha$ HL-Pore. a) Die Translokationszeit von Poly(dT)<sub>45</sub> durch eine  $\alpha$ HL-Pore ist in Gegenwart von Fab HED10 verkürzt.<sup>[32]</sup> b) Die  $\alpha$ HL-Pore ermöglicht den Nachweis des ATP-bindenden Aptamers in Form seines gefalteten, linearen Doppelstrangs und von ATP gebundenen Konformationen.<sup>[33b]</sup> c) Mit Avidin komplexierte, biotinylierte ssDNA bleibt in der  $\alpha$ HL-Pore stecken und bewirkt eine Langzeitblockade. d) Typisches Signalmuster für die Translokation von gespalterner MikroRNA durch eine  $\alpha$ HL-Pore.<sup>[38d]</sup> Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [32, 33b, 38d].

Eine doppelsträngige DNA (dsDNA), die mit ihrer Führungssequenz in der  $\alpha$ HL-Nanopore immobilisiert ist, wird unter einem anliegenden Potential im Vorhof der  $\alpha$ HL aufgespalten.<sup>[38]</sup> Der Spaltvorgang der DNA dauert erheblich länger, wenn die ssDNA mit dem perfekt komplementären Strang hybridisiert ist, als wenn der Komplementärstrang ein einzelnes falsches Nukleotid enthält.<sup>[38a]</sup> Die Strategie konnte somit erfolgreich zum Nachweis einzelner Nukleotidfehlpaarungen genutzt werden. Durch Messung der Spaltungskinetik von oxidativ geschädigter dsDNA gelang es, einzelne Abschnitte mit Oxidationsschäden zu lokalisieren.<sup>[38c,f]</sup> Um MikroRNA in Plasmaproben von Lungenkrebspatienten zu analysieren, wurde die Ziel-MikroRNA mit einer ssDNA-Sonde mit Führungssequenzen an beiden Enden hybridisiert

(Abbildung 3d).<sup>[38d]</sup> Durch Aufzeichnung der spezifischen Signaturen war es möglich, subpinkomolare Konzentrationen von krebsassoziierten MikroRNAs mittels  $\alpha$ HL-Nanoporen zu quantifizieren. Die Aufspaltung einer Haarnadelstruktur wurde weiterhin zum Nachweis von  $Hg^{2+}$  mit einer Nachweisgrenze von 7 nm genutzt.<sup>[38e]</sup>

### 3. Festkörpernanoporen

#### 3.1. DNA-Nachweis mit Festkörpernanoporen

Li et al. entwickelten die erste synthetische Festkörpernanopore, die erfolgreich für den DNA-Nachweis eingesetzt wurde.<sup>[39]</sup> Eine Nanopore mit Durchmesser 5 nm wurde mit einem Ionenstrahl in eine SiN-Schicht gebohrt. Ein deutlicher Abfall des Ionenstroms wurde gemessen, wenn eine 500 bp lange dsDNA unter einem anliegenden Potential von 120 mV durch die Pore gesteuert wurde. Eine Nanopore mit einem Durchmesser von 2–20 nm in einer Elektrolytlösung befolgt unter anliegender Spannung näherungsweise das Ohmsche Gesetz. Der offenporige Strom  $I_0$  lässt sich mit Gleichung (1) beschreiben.

$$I_0 = \frac{VA_p}{\rho H_{\text{eff}}} \quad (1)$$

$\rho$  ist der Widerstand der Elektrolytlösung,  $V$  ist die angelegte Spannung über die Membran,  $H_{\text{eff}}$  ist die effektive Membrändicke und  $A_p$  ist die mittlere Querschnittsfläche der Nanopore.<sup>[9d]</sup>

Ein mögliches Problem bei künstlich hergestellten Festkörpernanoporen sind uncharakterisierte Oberflächeneigenschaften, die das Sensorverhalten der Pore beeinträchtigen können. Verglichen mit biologischen Nanoporen haben Festkörpernanoporen einen höheren elektrischen Rauschpegel, was die mögliche Signalauflösung limitiert. In früheren Studien<sup>[40]</sup> wurde festgestellt, dass das Funkelrauschen (flicker noise; 1/f) in Festkörpernanoporen von Ladungsfluktuationen an der Nanoporenoberfläche, Fluktuationen der Ladungsträgergesamtzahl und nanometergroßen gasförmigen Bläschen im Inneren der Pore verursacht wird.

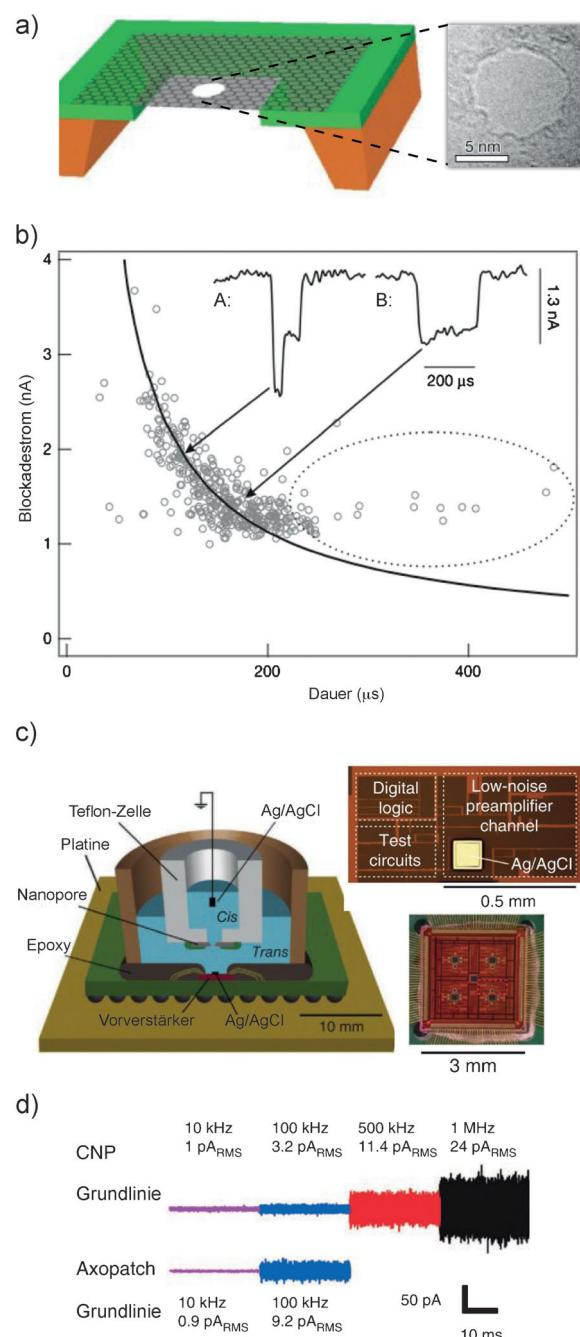
Das 1/f-Rauschen konnte durch Feinabstimmung der Oberflächeneigenschaften von SiN-Nanoporen mittels Atomlagenabscheidung (ALD) von Aluminiumoxid deutlich reduziert werden.<sup>[41]</sup> Darüber hinaus zeigen  $Al_2O_3$ -Nanoporen verringertes Hochfrequenzrauschen, hohe Signal-Rausch-Verhältnisse und erhöhte Empfindlichkeit in DNA-Translokationsexperimenten.<sup>[42]</sup> Die Behandlung eines Siliciumträgerchips mit Piranha-Lösung reduziert ebenfalls das 1/f-Rauschen.<sup>[40e]</sup> Ferner lassen sich die Nanobläschen entfernen, indem man die Lösung zuerst gegen Wasser und dann Ethanol austauscht, bevor man schließlich wieder den Elektrolytpuffer einsetzt.<sup>[40d]</sup>

Eine der verbleibenden Herausforderungen für die Verwendung von Festkörpernanoporen in der DNA-Sequenzie-

rung ist die hohe Translokationsgeschwindigkeit, die das Auslesen der Sequenzinformation aus den Stromkurven schwierig macht.<sup>[9c]</sup> Bashir und Mitarbeiter berichteten, dass die Translokationsgeschwindigkeit in gesputterten  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Poren aufgrund der Bildung positiv geladener Domänen verringert wird.<sup>[42b]</sup> Dekker und Mitarbeiter tauschten das Anion der Pufferlösung aus und fanden, dass die Translokationszeit eines dsDNA/ssDNA-Moleküls durch eine Festkörpernanopore mit kleiner werdendem Anion ( $\text{K}^+ \rightarrow \text{Na}^+ \rightarrow \text{Li}^+$ ) stark ansteigt.<sup>[43]</sup> Dank der geringen Dicke von festen, klassisch hergestellten Membranen im Nanometerbereich sind darin befindliche Festkörpernanoporen direkt für die DNA-Sequenzierung mit Einzelbasenauflösung geeignet. Zum Beispiel entspricht eine 30 nm dicke siliciumbasierte Membran ungefähr 60 Nukleobasen in einem ssDNA-Molekül. Graphen ist aufgrund seiner außerordentlich kleinen Schichtdicke (0.34–0.68 nm), die mit dem Abstand zwischen benachbarten Nukleotiden in ssDNA vergleichbar ist (0.32–0.52 nm), schnell ins Rampenlicht der Forscher gerückt.<sup>[44]</sup> Die erste einzelne Nanopore in suspendiertem Graphen wurde von Fischbein und Drndic hergestellt.<sup>[45]</sup> Später wurden einzelne dsDNA-Moleküle durch Graphen-Nanoporen gesteuert (Abbildung 4a,b)<sup>[46]</sup> und Translokationssignale der DNA erhalten, was das enorme Potential von Graphen-Nanoporen in der DNA-Sequenzierung bestätigte. Das hohe 1/f-Rauschen in Graphen-Nanoporen verhinderte den direkten Nachweis von einzelnen Nukleotiden durch Auslesen des Ionenstroms. Studien zeigten, dass mehrlagige Graphen/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Nanolaminatmembranen einen geringeren elektrischen Rauschpegel haben als Nanoporen in reinem Graphen.<sup>[44]</sup> Trotz gewisser Fortschritte müssen noch etliche Probleme gelöst werden, bevor mit Festkörpernanoporesystemen eine DNA-Sequenzierung mit Einzelbasenauflösung gelingen wird.

### 3.2. Elektrochemische Nachweissysteme

Ein klassisches Nachweissystem für die nanoporenisierte Analyse besteht aus einem Patch-Clamp-Verstärker und einem Analog/Digital-Wandler. Axopatch 200B, der sich als der beste Patch-Clamp-Verstärker für Nanoporenexperimente erwiesen hat, verfügt über eine Zeitauflösung von etwa 4  $\mu\text{s}$ . Allerdings sind die derzeitigen Translokationsgeschwindigkeiten von Festkörpernanoporen so hoch (1–100 Nukleotide  $\text{ms}^{-1}$ ), dass eine Detektorbandbreite im MHz-Bereich erforderlich wäre und die Messung von Pikoamperestufen im Ionenstrom unmöglich ist. Das klassische Patch-Clamp-System muss auf Bandbreiten von rund 100 kHz begrenzt werden, da bei Frequenzen ab etwa 10 kHz der Rauschpegel des Verstärkers zu hoch wird. Es gilt daher, einen optimalen Kompromiss zwischen möglichst niedrigem Rauschen und möglichst hoher Zeitauflösung zu finden. Ein kürzlich vorgestelltes Nanoporesystem (CNP; CMOS-integrated nanopore system) mit integriertem komplementärem Metalloxidhalbleiter (CMOS; complementary metal oxide semiconductor), das über einen rauscharmen Stromvorverstärker in Kombination mit einer SiN-Festkörpernanopore verfügt, arbeitet bei einer Bandbreite von 1 MHz bei einem



**Abbildung 4.** a) Diagramm und TEM-Bild einer dünnen Schicht von Graphen-Nanoporen.<sup>[45a]</sup> b) Streukurven des Blockadestroms als Funktion der Blockadedauer zur Unterscheidung zwischen gefalteter (A) und entfalteter DNA (B).<sup>[45a]</sup> c) Aufbau des CNP (links), eines Vorverstärkerkanals (rechts, oben) und eines 8-Kanal-CMOS-Stromvorverstärkers (rechts, unten).<sup>[8b]</sup> d) Grundrauschen des CNP-Systems und des Axopatch 200B.<sup>[8b]</sup> Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [8b] und [45a].

Rauschpegel von 24 pA<sub>RMS</sub> (Abbildung 4c).<sup>[8b]</sup> Dieses System besitzt die bisher höchste Bandbreite in der nanoporenisierten Analyse. Der Verstärker wird direkt in der Flüssigkeitskammer unterhalb der SiN-Poren platziert. Diese Bauform ermöglicht eine erhebliche Verringerung parasitärer elektrischer Kapazitäten bei hoher Frequenz. Zum Beispiel beträgt das Grundrauschen des CNP nur 3.2 pA<sub>RMS</sub> bei

100 kHz, im Vergleich zu 9 pA<sub>RMS</sub> beim Axopatch (Abbildung 4d).

Schnelle Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierungen erfordern die Entwicklung von nanoporenbasierten Mehrkanalsystemen. Das planare Design des CNP-Verstärkers ist für parallelisierte Anwendungen mit Mehrkanal detektion gut geeignet und bietet Potential für portable Geräte.<sup>[3b]</sup> Dunbar et al. entwickelten einen miniaturisierten Rückkopplungswiderstand basierend auf einem Metalloxidhalbleiter vom N-Typ mit tiefer N-Wanne für die Verwendung in Nanoporenarrays.<sup>[47]</sup> Das gesamte Nachweissystem wurde in einem 0.35 µm CMOS-Prozess gefertigt. Bei einer Größe des CMOS-Verstärkers inklusive Kontaktstück von 0.4 mm<sup>2</sup> können auf einer Platine von 600 mm<sup>2</sup> 1500 Kanäle integriert werden.<sup>[48]</sup> Damit könnte ein portabler Nanoporearray mit hoher Zeitauflösung und niedrigem Hintergrundrauschen konstruiert werden. Durch die Kombination von neuartigen Nachweissystemen mit neuen experimentellen Strategien könnte es schlussendlich gelingen, Einzelnukleotidauflösung mit Festkörpernanoporen zu erreichen.

#### 4. Schlussfolgerungen

Die aktuellen Nanoporetechniken zum DNA-Nachweis sind in der Lage, die charakteristischen Stromkurven bekannter DNA-Stränge abzubilden<sup>[3a]</sup> – die Analyse unbekannter Sequenzen ist jedoch problematisch. Obgleich eine direkte Anwendung von Nanoporesensoren in der DNA-Sequenzierung noch nicht möglich ist, sind biologische und Festkörpernanoporen exzellente Einzelmolekülsensoren in der Biophysik und der Nanobiotechnologie. Die Kombination von Festkörpernanoporen mit anderen Einzelmolekületechniken bietet einen multimodalen Ansatz für den Nachweis kleiner Strukturmerkmale entlang eines einzelnen DNA-Moleküls. Zukünftige Fortschritte bei den experimentellen Strategien, den Mikrofertigungstechniken und den Elektronikkomponenten sollten Nanoporetechniken für den erschwinglichen und personalisierten DNA-Nachweis zugänglich machen, insbesondere für DNA-Sequenzierungen. Darüber hinaus haben wir keinen Zweifel, dass sich Nanoporetechniken zu Routinewerkzeugen in Einzelmolekülstudien sowie auch in der medizinischen Diagnostik entwickeln werden.

*Die Autoren danken dem National Base Research 973 Program (2013CB733700) für finanzielle Unterstützung. Y.-T.L. dankt dem National Science Fund of China (21125522, 21327807 und SKLEAC201305), und Y.-L.Y. dankt dem Sino-UK Higher Education Research Partnership for PhD Studies.*

Eingegangen am 25. April 2013

Online veröffentlicht am 8. November 2013

[1] a) J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13770–13773; b) L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J. E. Gouaux, *Science* **1996**, *274*, 1859–1866.

- [2] a) R. Stefureac, Y. Long, H. B. Kraatz, P. Howard, J. S. Lee, *Biochemistry* **2006**, *45*, 9172–9179; b) M. Pastoriza-Gallego, L. Rabah, G. Gibrat, B. Thiebot, F. van der Goot, L. Auvray, J.-M. Betton, J. Pelta, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2923–2931.
- [3] a) E. A. Manrao, I. M. Derrington, A. H. Laszlo, K. W. Langford, M. K. Hopper, N. Gillgren, M. Pavlenok, M. Niederweis, J. H. Gundlach, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 349–353; b) T. Z. Butler, M. Pavlenok, I. M. Derrington, M. Niederweis, J. H. Gundlach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 20647–20652.
- [4] M. Soskine, A. Biesmans, B. Moeyaert, S. Cheley, H. Bayley, G. Maglia, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 4895–4900.
- [5] M. M. Mohammad, R. Iyer, K. R. Howard, M. P. McPike, P. N. Borer, L. Movileanu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9521–9531.
- [6] a) D. Wendell, P. Jing, J. Geng, V. Subramaniam, T. J. Lee, C. Montemagno, P. Guo, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 765–772; b) F. Haque, J. Geng, C. Montemagno, P. Guo, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 373–392.
- [7] H. Y. Wang, Y. Li, L. X. Qin, A. Heyman, O. Shoseyov, I. Willner, Y. T. Long, H. Tian, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1741–1743.
- [8] a) U. Keyser, J. Van der Does, C. Dekker, N. Dekker, *Rev. Sci. Instrum.* **2006**, *77*, 105105; b) J. K. Rosenstein, M. Wanunu, C. A. Merchant, M. Drndic, K. L. Shepard, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 487–492; c) B. McNally, A. Singer, Z. Yu, Y. Sun, Z. Weng, A. Meller, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2237–2244.
- [9] a) B. N. Miles, A. P. Ivanov, K. A. Wilson, F. Doğan, D. Japrung, J. B. Edel, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 15–28; b) J. E. Reiner, A. Balijepalli, J. W. Robertson, J. Campbell, J. Suehle, J. J. Kasianowicz, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6431–6451; c) B. M. Venkatesan, R. Bashir, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 615–624; d) J. Li, J. A. Golovchenko in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 544 (Hrsg.: J. W. Lee, R. S. Foote), Humana Press, **2009**, S. 81–93.
- [10] D. Branton, D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. Di Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. Huang, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1146–1153.
- [11] M. Akeson, D. Branton, J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Deamer, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 3227–3233.
- [12] a) R. Kawano, A. E. P. Schibel, C. Cauley, H. S. White, *Langmuir* **2009**, *25*, 1233–1237.
- [13] A. Meller, L. Nivon, E. Brandin, J. Golovchenko, D. Branton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 1079–1084.
- [14] M. Rincon-Restrepo, E. Mikhailova, H. Bayley, G. Maglia, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 746–750.
- [15] L. Blanco, A. Bernad, J. M. Lázaro, G. Martin, C. Garmendia, M. Salas, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8935–8940.
- [16] a) N. Hurt, H. Wang, M. Akeson, K. R. Lieberman, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3772–3778; b) B. Gyarfas, F. Olasagasti, S. Benner, D. Garalde, K. R. Lieberman, M. Akeson, *ACS Nano* **2009**, *3*, 1457–1466.
- [17] K. R. Lieberman, G. M. Cherf, M. J. Doody, F. Olasagasti, Y. Kolodji, M. Akeson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17961–17972.
- [18] G. M. Cherf, K. R. Lieberman, H. Rashid, C. E. Lam, K. Karplus, M. Akeson, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 344–348.
- [19] F. Olasagasti, K. R. Lieberman, S. Benner, G. M. Cherf, J. M. Dahl, D. W. Deamer, M. Akeson, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 798–806.
- [20] S. Kumar, C. Tao, M. Chien, B. Hellner, A. Balijepalli, J. W. Robertson, Z. Li, J. J. Russo, J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz, J. Ju, *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 684.
- [21] D. Stoddart, A. J. Heron, E. Mikhailova, G. Maglia, H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 7702–7707.
- [22] D. Stoddart, G. Maglia, E. Mikhailova, A. J. Heron, H. Bayley, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 566–569; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 556–559.
- [23] L. Q. Gu, O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, H. Bayley, *Nature* **1999**, *398*, 686–690.
- [24] J. Clarke, H. C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid, H. Bayley, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 265–270.

- [25] a) S. E. Henrickson, M. Misakian, B. Robertson, J. J. Kasianowicz, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 3057–3060; b) T. Z. Butler, J. H. Gundlach, M. Troll, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3229–3240.
- [26] E. Pennisi, *Science* **2012**, *336*, 534–537.
- [27] M. Langecker, V. Arnaut, T. G. Martin, J. List, S. Renner, M. Mayer, H. Dietz, F. C. Simmel, *Science* **2012**, *338*, 932–936.
- [28] N. A. Bell, C. R. Engst, M. Ablay, G. Divitini, C. Ducati, T. Liedl, U. F. Keyser, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 512–517.
- [29] I. M. Derrington, T. Z. Butler, M. D. Collins, E. Manrao, M. Pavlenok, M. Niederweis, J. H. Gundlach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 16060–16065.
- [30] a) M. D. Ward, P. R. Raithby, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1619–1636; b) R. Shenthal, T. B. Norsten, V. M. Rotello, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 657–669; c) O. Wilner, I. Willner, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2528–2556.
- [31] J. J. Kasianowicz, S. E. Henrickson, H. H. Weetall, B. Robertson, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2268–2272.
- [32] Y. L. Ying, D. W. Li, Y. Li, J. S. Lee, Y.-T. Long, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5690–5692.
- [33] a) J. W. Shim, L. Q. Gu, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8354–8360; b) Y. L. Ying, H. Y. Wang, T. C. Sutherland, Y. T. Long, *Small* **2011**, *7*, 87–94; c) R. Kawano, T. Osaki, H. Sasaki, M. Takinoue, S. Yoshizawa, S. Takeuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8474–8477.
- [34] a) R. F. Purnell, J. J. Schmidt, *ACS Nano* **2009**, *3*, 2533–2538.
- [35] E. V. Wallace, D. Stoddart, A. J. Heron, E. Mikhailova, G. Maglia, T. J. Donohoe, H. Bayley, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8195–8197.
- [36] A. E. Schibel, N. An, Q. Jin, A. M. Fleming, C. J. Burrows, H. S. White, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17992–17995.
- [37] N. An, A. M. Fleming, H. S. White, C. J. Burrows, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11504–11509.
- [38] a) A. F. Sauer-Budge, J. A. Nyamwanda, D. K. Lubensky, D. Branton, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 238101; b) T. C. Sutherland, M. J. Dinsmore, H. B. Kraatz, J. S. Lee, *Biochem. Cell Biol.* **2004**, *82*, 407–412; c) A. E. P. Schibel, A. M. Fleming, Q. Jin, N. An, J. Liu, C. P. Blakemore, H. S. White, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14778–14784; d) Y. Wang, D. Zheng, Q. Tan, M. X. Wang, L. Q. Gu, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 668–674; e) S. Wen, T. Zeng, L. Liu, K. Zhao, Y. Zhao, X. Liu, H. C. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18312–18317; f) Q. Jin, A. M. Fleming, C. J. Burrows, H. S. White, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11006–11011; g) K. Tian, Z. He, Y. Wang, S.-J. Chen, L.-Q. Gu, *ACS Nano* **2013**, *7*, 3962–3969.
- [39] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. Aziz, J. Golovchenko, *Nature* **2001**, *412*, 166–169.
- [40] a) D. P. Hoogerheide, S. Garaj, J. A. Golovchenko, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*, 256804; b) R. Smeets, N. Dekker, C. Dekker, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 095501; c) R. M. M. Smeets, U. F. Keyser, N. H. Dekker, C. Dekker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 417; d) R. Smeets, U. Keyser, M. Wu, N. Dekker, C. Dekker, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 88101; e) V. Tabard-Cossa, D. Trivedi, M. Wiggin, N. N. Jetha, A. Marziali, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 305505.
- [41] a) P. Chen, T. Mitsui, D. B. Farmer, J. Golovchenko, R. G. Gordon, D. Branton, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1333–1337; b) P. Chen, J. Gu, E. Brandin, Y. R. Kim, Q. Wang, D. Branton, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2293–2298.
- [42] a) B. M. Venkatesan, B. Dorvel, S. Yemencioglu, N. Watkins, I. Petrov, R. Bashir, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 2771–2776; b) B. M. Venkatesan, A. B. Shah, J. M. Zuo, R. Bashir, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 1266–1275.
- [43] S. W. Kowalczyk, D. B. Wells, A. Aksimentiev, C. Dekker, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 1038–1044.
- [44] B. M. Venkatesan, D. Estrada, S. Banerjee, X. Jin, V. E. Dorgan, M. H. Bae, N. R. Aluru, E. Pop, R. Bashir, *ACS Nano* **2012**, *6*, 441–450.
- [45] M. D. Fischbein, M. Drndic, *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *93*, 113107.
- [46] a) S. Garaj, W. Hubbard, A. Reina, J. Kong, D. Branton, J. Golovchenko, *Nature* **2010**, *467*, 190–193; b) C. A. Merchant, K. Healy, M. Wanunu, V. Ray, N. Peterman, J. Bartel, M. D. Fischbein, K. Venta, Z. Luo, A. C. Johnson, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2915–2921.
- [47] J. Kim, K. Pedrotti, W. B. Dunbar, *Sens. Actuators B* **2013**, *176*, 1051–1055.
- [48] R. D. Maitra, J. Kim, W. B. Dunbar, *Electrophoresis* **2012**, *33*, 1–11.