

## ПРЯМОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ БИОПОЛИМЕРОВ С ПОМОЩЬЮ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

©2024 г. А. К. БЕРКОВИЧ, О. А. ПЫШКИНА,  
А. А. ЗОРИНА, В. А. РОДИН, Т. В. ПАНОВА,  
В. Г. СЕРГЕЕВ, М. Э. ЗВЕРЕВА

*Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва*

I. Введение. II. Механизм идентификации природы мономерных звеньев и варианты применения нанопорового секвенирования. III. Типы нанопор. IV. Сравнение биологических и синтетических нанопор. V. Коммерческие реализации метода и их применение. VI. Перспективы развития метода для новых направлений исследований. VII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день секвенирование нуклеиновых кислот является основным инструментом биологических исследований (эпи)геномной и постгеномной эры. Секвенирование ДНК – мощный метод характеристики новых геномов, выявления на молекулярном уровне генетических вариаций, таких как инсерции, делеции, полиморфизм отдельных нуклеотидов, изменение числа копий, слияние генов и т. д., которые имеют отношение к генетическим и опухолевым заболеваниям [1]. Ценность секвенирования для понимания механизмов заболеваний, генетических исследований, развития персонализированной медицины очень высока [2].

История развития методов секвенирования генома берет свое начало с 1950 годов, когда последовательное открытие генетичес-

---

*Адрес для корреспонденции:* e-mail – [annber@yandex.ru](mailto:annber@yandex.ru)

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Анализ микробиомов растений и беспозвоночных животных экстремальных мест обитания с целью разработки штаммов-продуцентов новых метаболитов и ферментов» № 075-15-2021-1396 от 26 октября 2021 года.

кого кодирования аминокислотной последовательности белков и строения двойной спирали ДНК стало началом новой бескрайней области геномных исследований. Безусловным первым прорывом стали работы Сэнгера [3, 4], а создание на основе данного метода первого технического решения, открыло возможности определения последовательности нуклеотидов нуклеиновых кислот (секвенирования) для широкого круга исследователей. Благодаря этому к 2001 году был впервые секвенирован геном человека [5]

В 2004 году Национальный институт исследований генома человека (National Human Genome Research Institute, NHGRI) запустил проект «\$1000 Genome» по разработке революционных технологий секвенирования, которые позволили бы снизить стоимость секвенирования одного полного генома млекопитающего до 1000 долларов США. При этом технологии должны отвечать золотым стандартам: (1) высокая точность (менее 1 ошибки на 10 000 оснований), (2) большая длина прочтений, (3) высокая мобильность условий эксперимента и (4) низкая стоимость. Инструменты, разработанные в рамках проекта, относятся к секвенированию нового поколения (next-generation sequencers, NGS). Сотрудники компании Pacific Biosciences [6] предложили классификацию по трем поколениям: сэнгеровское секвенирование – первое поколение, широкомасштабное параллельное секвенирование на основе амплификации – второе, секвенирование отдельных молекул – третье. К последней категории относятся такие технологии как секвенирование синтезом в реальном времени с использованием нанотрубок (nanotag-based real-time sequencing by synthesis (Nano-SBS), от компании Genia Technologies), секвенирование посредством электронного туннелирования (sequencing by electronic tunneling (SBET), Quantum Biosystems), система оптипор (NobleGen Biosciences) [7, 8], идентификация нуклеотидов с помощью электронной микроскопии [9], молекулярной силовой спектроскопии [10], Рамановской усиленной спектроскопии [11]. Среди этих технологий наиболее перспективными с точки зрения соответствия золотым стандартам и реализации прямого приложения методов физической химии к решению современных технологических вызовов геномных исследований являются разработки компании Oxford Nanopores (ONT) в нанопоровом секвенировании [7, 11].

## II. МЕХАНИЗМ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРИРОДЫ МОНОМЕРНЫХ ЗВЕНЬЕВ И ВАРИАНТЫ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

В начале 1990-х гг. исследователи Давид Дремер и Георг Чурч (David Dreamer и George Church) независимо открыли, что одноцепочную ДНК (ssDNA) можно секвенировать путем изменения проводимости раствора при прохождении молекулы биополимера через нанопоры [11]. Нанопоры представляют собой отверстия нанометрового размера, сопоставимого с размерами мономера, в материале органической и неорганической природы. Первые в случае использования природных материалов можно назвать «биологическими», например, поробразующий белок в мембране липидного бислоя, вторые твердотельными (из таких синтетических материалов, как нитрид кремния или графен).

Принцип секвенирования в нанопоровых системах основан на регистрации сигнала электропроводности, изменяющегося во времени при прохождении через нанопору молекулы нуклеиновой кислоты. Величина электропроводности зависит от типа нуклеотида, проходящего в данный момент времени через нанопору: для идентификации нуклеотида в молекуле ДНК или РНК используется физическое различие в геометрии гетероциклических оснований различных нуклеотидов. [12]. В момент прохождения нуклеотида через пору регистрируется изменение электропроводности, при этом каждому типу основания соответствует определенное значение, которое определяется тем, насколько данный нуклеотид перекрывает пору: чем больше уменьшается сечение поры, тем меньше регистрируемая сила тока. Таким образом, измеряя силу тока, можно определить последовательность нуклеотидов в анализируемой молекуле ДНК или РНК. На данный момент фирмой Oxford Nanopore предложены различные модели секвенаторов, отличающиеся мощностью и размерами. Прибор MinION – это самая компактная система для секвенирования размером с флешку (рис. 1). Миниатюрные размеры и возможность автономного использования позволяют проводить эксперименты в полевых условиях, эта модель секвенатора была успешно опробована даже в космосе [13].

В прибор MinION вставляется чип, на который наносят образец ДНК. Чип содержит камеру, разделенную содержащей нанопоры мембраной и заполненную электролитом (KCl). Прибор подключают к компьютеру или ноутбуку, на котором установлено соответствующее программное обеспечение, и запускают процедуру секвенирования. Молекулы ДНК находятся по одну сторону мембраны с порами,

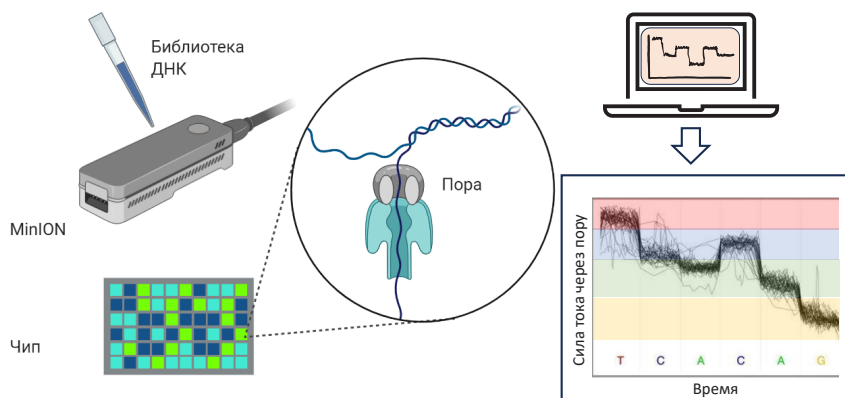


Рис. 1. Схематическое изображение процесса при нанопоровом секвенировании

подходят к поре, закрепляются, двойная спираль расплетается и под действием приложенной разности потенциалов единичная цепь ДНК протягивается через пору. При этом фиксируется изменение величины силы тока, которое регистрируется прибором и в дальнейшем конвертируется в последовательность нуклеотидов исследуемой молекулы ДНК. Сигнал с каждой поры учитывается прибором отдельно, а затем с помощью биоинформатических методов анализируются и сопоставляются данные от всех прочтенных цепей ДНК.

По сравнению с существующими методами секвенирования [14] использование вышеописанного подхода характеризуется рядом преимуществ, такими как низкая стоимость определения одного нуклеотида и простота использования, высокая чувствительность, максимальная длина непрерывного считывания (до десятков тысяч оснований), высокая портативность, быстрый анализ первичных данных и отображение результатов в реальном времени. Наиболее значимым отличием является возможность определения модифицированных мономеров биополимеров, которых на настоящий момент для НК найдено более 100, а их функция в природе недостаточно изучена в следствие ограничений методов исследования. Кроме того, так как метод основан на измерении физико-химических свойств системы без разрушения биополимера это дает возможность повторного использования материала и исключения накопления ошибок, обусловленных работой ферментов, являющихся абсолютно необходимым компонентом в методах секвенирования первого и второго поколений. К недостаткам можно отнести такие свойства, как низкое качество определения нуклеотидов при считывании длинных

последовательностей по сравнению с технологиями секвенирования первого и второго поколений, характеризующихся короткими считываниями, утрата функциональных свойств для биологических пор со временем. Следует отметить также многообразное влияние факторов окружающей среды на скорость считывания последовательности и на ее качество.

Можно выделить несколько основных вариантов использования секвенирования: полногеномное, полноэкзомное и таргетное секвенирование, а также секвенирование транскриптома и синтетических последовательностей НК. Для каждого из вариантов нанопоровое секвенирование имеет свои преимущества и недостатки.

Полногеномное секвенирование включает определение нуклеотидной последовательности всей ДНК генома. Основная сложность для анализа геномов *de novo* состоит в сборке непрерывной последовательности из коротких фрагментов. Именно для облегчения этого процесса незаменимы данные длинных прочтений нанопорового секвенирования. Использование полногеномного секвенирования с диагностическими целями пока ограничивается высокой стоимостью анализа и сложностью биоинформатической обработки полученных данных [15]. Полноэкзомное секвенирование представляет собой анализ белок-кодирующих последовательностей ДНК. Последние составляют около 1% генома, но именно в них локализовано подавляющее число патогенных мутаций. Данный вид исследования оправдан в том случае, когда недостаточно клинических и лабораторных данных для формулирования диагностической гипотезы. Примером могут служить орфанные заболевания, а также болезни, отличающиеся высокой генетической гетерогенностью. Особо следует подчеркнуть, что полноэкзомное секвенирование позволяет выявить мутации не только в известных генах (как таргетное секвенирование), но также и способствует открытию новых генетических элементов, имеющих отношение к развитию заболеваний [16]. Таргетное (целевое) секвенирование – анализ участков ДНК, содержащих конкретные интересующие исследователя гены. Используется, в частности, в диагностике заболеваний, обусловленных одной мутацией из нескольких десятков или сотен возможных при данной патологии – например, в диагностике первичных иммунодефицитов, кардиомиопатий, несиндромальной тугоухости, пигментного ретинита, спиноцеребеллярных атаксий и др. [17]. Сюда относятся и так называемые «клинические экзомы», содержащие большое количество генов, и малые (на один или несколько генов) таргетные панели. Секвенирование транскриптома (РНК-секвенирование, RNA-seq –

определение нуклеотидной последовательности матричной РНК) позволяет оценивать транскрипцию интересующих исследователя генов на разных стадиях онтогенеза, в разных клетках и тканях, в норме и при патологии. Данный вид секвенирования часто применяется в онкологии для классификации новообразований, выявления неоантигенов и новых химерных генов [18].

### III. ТИПЫ НАНОПОР

Нанопоры подразделяют на два основных класса на основании природы поры и мембраны, окружающей пору: «биологические» нанопоры (органические) [19, 20] и твердотельные нанопоры (синтетические или неорганические) [21–23]. Более 10 лет назад появился третий тип нанопор – гибридные нанопоры, представляющие собой комбинацию биологических и твердотельных нанопор [24, 25]. Пример «биологической» нанопоры устроен следующим образом: белок порин нанометрового размера, такой как  $\alpha$ -гемолизин или MspA, встроен в липидную бислойную мембрану, в то время как нанопора в составе твердотельной системы состоит из синтетической мембраны на основе  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , графена,  $\text{MoS}_2$  или  $\text{TiO}_2$ .

#### «БИОЛОГИЧЕСКИЕ» НАНОПОРЫ

В настоящее время в качестве «биологических» нанопор используют различные белки, встроенные в липидную бислойную мембрану (примеры представлены на рис.2). Это порообразующие токсины [26], вирусные поры [27], порины и аквапорины [28]. Белковые порообразующие токсины подразделяются по типу архитектуры их трансмембранного региона:  $\alpha$ -спираль или  $\beta$ -складка как основной элемент вторичной структуры, формирующей ограничивающее пространство поры. Наиболее важными являются такие свойства, как диаметр пор, распределение заряда по внутренней поверхности поры, стабильность поры и простота получения. Кроме того, длина трансмембранного канала и его сенсорного участка оказывают прямое влияние на применимость таких бионанопор для секвенирования. Поперечные сечения и размеры наиболее часто используемых белковых нанопор представлены на рис. 2.

Кратко остановимся на описании некоторых из наиболее часто используемых белковых нанопор.

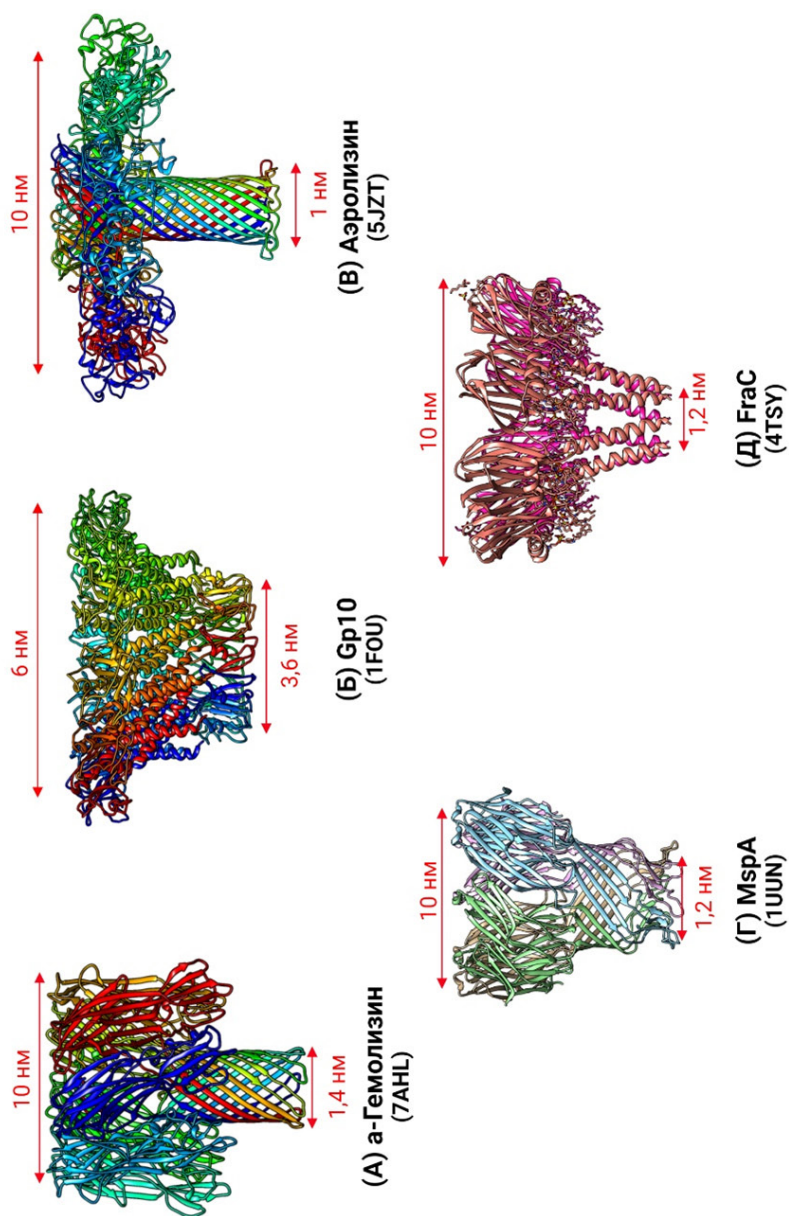


Рис. 2. Поробразующие белки, формирующие «биологические» наногоры. В скобках обозначены номера структур из базы данных PDB. Для создания рисунка была использована программа Biogender.



*α-Гемолизин (рис.2, А)*

α-Гемолизин представляет собой токсин, секретируемый патогеном человека *Staphylococcus aureus* (стафилококк золотистый). Он представляет собой гептамерный канальный белок молекулярной массы 232,4 кДа. Белок включает грибообразную шапочку (длина и диаметр составляют по 10 нм) и ножку (длиной 5,2 нм и шириной 2,6 нм), которая образует трансмембранный канал. Диаметр суженной части канала составляет приблизительно 1,4 нм. Белковые каналы α-гемолизина самопроизвольно встраиваются в липидный бислой. Они термостабильны, способны функционировать при температурах, близких к 100°C [29]. α-Гемолизин сохраняет структуру нанопоры в широком интервале рН (от 2 до 12).

*Белок gp10 бактериофага φ29 (рис.2, Б)*

Соединительный (коннекторный) белок бактериофага φ29 представляет собой первую описанную в литературе бионанопору, которая не является мембранным белком или ионным каналом, которые встраиваются в липидный бислой. Бактериальный вирус φ29, выполняющий функцию упаковывающего ДНК наномотора, содержит сложный комплекс, состоящий из 12 копий белка gp10, которые расположены по окружности и формируют канал. Длина канала (коннектора двух камер растворов) составляет приблизительно 7 нм, а площадь сечения канала составляет 10 нм<sup>2</sup> (диаметр 3,6 нм) в узком конце и 28 нм<sup>2</sup> (диаметр 6 нм) в его более широком конце. Способ встраивания коннектора и закрепления в вирусной капсиде опосредован взаимодействиями белок–белок. В действительности при нанопоровом секвенировании, белок этого бактериофага более часто используют в комбинации с другими биологическими нанопорами в качестве молекулярного мотора.

Белок бактериофага самопроизвольно не встраивается в липидный бислой, поэтому для встраивания используют двух-ступенчатый подход: на первой этапе белок встраивают в липидные везикулы при регидратации липидной пленки, а затем осуществляют слияние везикул с образованием плоского бислоя. Проводимость всех пор практически идентична и линейно зависит от приложенного напряжения. Белки бактериофага являются стабильными в широком интервале экспериментальных условий, включая высокие концентрации соли и экстремальные величины рН [30]. Наиболее значительным преимуществом белка бактериофага φ29, которое отличает его от остальных бионанопор, является наличие в нем большого канала, через который



могут проходить одноцепочечная ДНК, двухцепочечная ДНК, пептиды и возможно небольшие белки. Большая величина поры также является преимуществом, поскольку это облегчает модификацию канала.

*Аэролизин (рис.2, В)*

Аэролизин представляет собой  $\beta$ -порообразующий токсин из *Aeromonas hydrophila*, который можно встраивать в мембрану липидного бислоя с использованием его трансмембранного участка. Форма аэролизина аналогична форме  $\alpha$ -гемолизина за исключением того, что широкий входной участок у него отсутствует. Диаметр области сужения канала аэролизина составляет приблизительно 1,0–1,7 нм, а длина трансмембранного участка сопоставима с аналогичным участком  $\alpha$ -гемолизина. В 2006 г. аэролизин первым использовали в качестве биологической нанопоры для детектирования  $\alpha$ -спиральных пептидов. Затем его использовали для анализа динамики денатурированных белков [31], пептидов [32] и ферментативного разрушения полисахаридов [33]. Затем обнаружение предела чувствительности аэролизина в 2-10 нуклеотидов полидезоксиденина с хорошо различимой блокадой тока оказалось прорывом в чувствительности нанопор [34]. В результате данная нанопора привлекла максимум внимания при исследовании чувствительности нанопор, и затем ее использовали для детектирования последовательности коротких полинуклеотидов.

Однако, основной целью развития нанопорового секвенирования биополимеров стало именно секвенирование геномной ДНК как наиболее востребованное для биомедицинских применений. Основным требованием к этому процессу является безошибочное прочтение длинных цепочек ДНК. На точность прочтения влияют различные факторы, в том числе и используемые для формирования градиента рН в поре растворы. Так, при использовании в качестве электролита солей лития вместо калия, удается повысить длину прочтения в несколько раз.

*Порин А (Mycobacterium smegmatis) (рис.2, Г)*

*Mycobacterium smegmatis* порин А (MspA) представляет собой перспективную нанопору для различного применения в области бионанотехнологии, например, для секвенирования ДНК и РНК. MspA является основным порином *Mycobacterium smegmatis*, поскольку он обеспечивает основной гидрофильный проход через клеточную стенку для транспорта питательных веществ, необходимых для развития микобактериальной клетки. Он представляет собой гомо-окта-

мерный канал бокаловидной формы длиной 9,6 нм и шириной 8,8 нм. Следует отметить, что MspA образует отдельный центральный канал длиной 1 нм и диаметром 1 нм, более узкий по сравнению с каналом  $\alpha$ -гемолизина, что и является причиной его более высокого пространственного разрешения, иными словами пространство внутри канала более плотно перекрывается проходящими сквозь него основаниями, что позволяет получить более выраженный сигнал. MspA можно рассматривать в качестве лучшего кандидата для использования в виде нанопоры вследствие четко выраженного отношения сигнал-шум и чувствительности к определению отдельных нуклеотидов, необходимых для секвенирования ДНК.

Каналы MspA самопроизвольно встраиваются в плоский бислой с образованием нанопоры, аналогично  $\alpha$ -гемолизу. MspA очень прочный и сохраняет канало-образующую активность в интервале рН от 0 до 14, после выдерживания при 100°C в течении 30 мин или при выдерживании при 80°C в присутствии 2% додецилсульфата натрия [35, 36]

#### *Фрагацеатоксин (рис.2, Д)*

Фрагацеатоксин (FraC) принадлежит к актинопориновому семейству порообразующих токсинов. Такие токсины, содержащие  $\alpha$ -спираль, образуют поры в присутствии сфингомиелина. Переход FraC из водорастворимой формы в форму трансмембранной поры осуществляется в результате конформационных изменений N-концевого участка протомера. Пора содержит достаточно узкий трансмембранный регион, соединенный с более широким проходным участком на внеклеточной стороне. Диаметр сужения 1,2 нм. Несмотря на то, что это отверстие является достаточно широким для прохождения одноцепочечной ДНК, прохождение двухцепочечной ДНК остается невозможным и не происходит блокировка канала.

#### *Твердотельные синтетические нанопоры*

Твердотельные нанопоры являются универсальной альтернативой «биологических» нанопор. Они характеризуются четко определенной геометрией и размерами, механической прочностью, простотой модификации и хорошей совместимостью с электронными и оптическими устройствами. Диаметр твердотельных нанопор можно точно контролировать от размеров менее нанометра до сотен нанометров в соответствии с экспериментальными требованиями. Твердотельные нанопоры характеризуются высокой химической и термостабильностью по сравнению с белковыми порами, встроенными в липидный

бислой. [37]. В общем виде твердотельные нанопоры представляют собой калиброванные отверстия, формируемые различными физическими методами в твердых неорганических или полимерных подложках. К настоящему времени разработаны различные методы получения твердотельных нанопор, такие как метод анодного окисления на металлическом алюминии [38], метод ионно-лучевого травления [39], ионно-лучевое моделирование [21] и использование электронного пучка [40–42]. Метод формирования пор подбирают в зависимости от природы подложки и планируемого размера пор. Одним из примеров подложки могут служить тонкие пластинки (пленки) из кремния. На кремниевой подложке с обеих сторон растут покрытия  $\text{SiO}_2$  при повышенной температуре или наносят тонкие слои нитрида кремния методом химического парофазного осаждения при низком давлении. Прямое облучение таких мембран ( $\text{Si}_3\text{N}_4$  или  $\text{SiO}_2$ ) пучком ионов или электронов приводит к образованию нанопор. Диаметр нанопор можно точно контролировать в зависимости от требуемой величины [37, 39]. В некоторых случаях кремниевую подложку используют в комбинации с графеном. Часть графена (содержащего 1–2 слоя углеродного материала) помещают на относительно большую пору, сформированную в мембране  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Затем нанопору пробивают сфокусированной электронно-лучевой обработкой. Диаметр образующейся графеновой нанопоры составляет 2–25 нм. Основное отличие графеновых нанопор от всех остальных заключается в их толщине менее 1 нм, что позволяет добиться большего пространственного разрешения по сравнению с другими порами с большей толщиной [21].

Другим перспективным материалом является оксид алюминия ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). При приложении разницы потенциалов к зеркально отполированному субстрату из оксида алюминия, погруженного в кислый раствор, полученный из серной, фосфорной и щавелевой кислот, начинается рост пор за счет вызванного электрическим полем растворения, контактирующего с жидкостью  $\text{Al}_2\text{O}_3$  и сопутствующего окисления алюминия на дне отверстия. За счет взаимного отталкивания соседних нанопор наблюдается тенденция к самоорганизации нанопор в плотно упакованное гексагональное окружение. При строгом соблюдении условий получения нанопор (рН и плотность тока) образуются однородные по размеру поры с диаметром от 4 нм до 200 нм и плотностью от  $10^{12}$  до  $10^{15}$  пор/м [38].

Полимерные подложки также активно рассматривают для формирования твердотельных нанопор. В качестве полимерных пленок используют отдельные тонкие пленки из поликарбоната или

поли(этилентерефталата). При облучении высокоэнергетическим пучком тяжелых ионов в интервале от МэВ до ГэВ цепи полимера подвергаются локальной деградации, при этом образуются следы повреждений, которые селективно растворяются при помещении мембраны в раствор щелочи. В результате полимерная пленка оказывается пронизана тонкими нанопорами. Форму нанопоры можно контролировать при приложении разницы потенциалов в процессе травления.

#### *Гибридные био-твердотельные нанопоры*

Один из недостатков твердотельных нанопор в настоящее время заключается в том, что они не способны в химическом отношении различать аналиты приблизительно одинакового размера. Такой недостаток химической специфичности удалось преодолеть путем присоединения специфичных узнающих последовательностей и рецепторов на твердотельные нанопоры, получая таким образом гибридные нанопорные структуры, которые способны идентифицировать нуклеотиды при секвенировании [43].

Одним из удачных примеров такой комбинации стала конструкция, когда генетически сконструированный каналный белок  $\alpha$ -гемолизин (рис.2, А) был встроен в нанопору в мембране из нитрида кремния [44]. При взаимодействии длинной двухцепочечной ДНК с  $\alpha$ -гемолизином полученный комплекс электрофоретически встраивают в нанопору из нитрида кремния и получают коаксиально расположенную структуру. Измеренные проводимость нанопоры и время прохождения через нее одноцепочечной ДНК оказались в хорошем соответствии с аналогичными величинами для  $\alpha$ -гемолизина, встроенного в липидный бислой, однако блокадные амплитуды были значительно сниженными, что связано с деформацией бионанопоры и токами утечки. Кроме того, наблюдали возрастание электрического шума, то есть система работает, но эффективность ее существенно ниже, чем при встраивании каналного белка в липидный бислой.

Другим вариантом гибридной нанопоры является гидрофильный портовый белок из термостабильного вируса G20с, электрокинетически встроенный в большую нанопору в подложке из нитрида кремния [44]. Такая гибридная пора является стабильной и процесс ее получения не является сложным, и, что более важно, она характеризуется низкой периферийной утечкой ионного тока, что обеспечивает высокую чувствительность по отношению к различным биомолекулам.

*Нанопоры на основе ДНК оригами*

Другим примером гибридных структур являются конструкции, в которых активную пору формируют на основе специфически уложенных цепей ДНК. Первая нанопора на основе ДНК как материала [45] и сформированная методом ДНК оригами [46] состояла из основной воронкообразной структуры и соединенной с ней двухцепочечной ДНК длиной 2300 пар оснований (примерно 800 нм). Эта структура была встроена в твердотельную нанопору из  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Размеры наноканала воронкообразной структуры составляли: длина – 150 пар оснований (примерно 150 нм), ширина – 9 двухцепочечных спиралей ДНК в основании (примерно 22,5 нм) и 3 двухцепочечных спирали ДНК в кончике (примерно 7,5 нм). Верх основной воронкообразной структуры – квадратная форма шириной 11 двухцепочечных спиралей ДНК (примерно 27 нм).

Другим вариантом нанопоры, сформированной с помощью метода ДНК оригами, являются плоские структуры. В отличие от нанопоры на основе воронкообразной структуры, которую встраивают в твердотельную нанопору, такие плоские структуры фиксируют у входа в твердотельные нанопоры. Сначала такие плоские структуры на основе ДНК оригами квадратной формы 50 нм × 50 нм с варьируемыми размерами пор формировали на нанопорах из  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Затем такие нанопоры стали получать путем комбинирования аналогичных плоских структур на основе ДНК оригами со стеклянными нанокпиллярами [46].

Еще одним вариантом нанопоры на основе ДНК оригами являются белковоподобные нанопоры, встроенные в липидный бислой [47]. Структура состоит из длинной ножки для встраивания в липидный бислой, окруженной бочкообразной чашкой, декорированной у основания 26 холестериновыми звеньями, обеспечивающими их адгезию к липидному бислою. Ножка образует тонкостенную трубку длиной 42 нм и диаметром поры 2 нм. Такие поры встраивают в липидные мембраны и используют аналогично белковым каналам.

#### IV. СРАВНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ НАНОПОР

Сравнение различных подходов к формированию нанопор проводили по многим параметрам, среди которых и воспроизводимость формирования нанопор, устойчивость к внешним воздействиям различной природы, по соотношению сигнал шум, возможности комбинации с детектирующим устройством и конечной стоимости [48–50].

##### ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Природные каналные белки, образующиеся в бактериях, очень точно воспроизводятся на атомном уровне. Несмотря на то, что точность образования нанопор в графене приближается к атомной, воспроизводимость получения твердотельных нанопор далека от бионанопор. Размер и форму твердотельных нанопор можно регулировать на уровне менее нанометра в зависимости от способа применения, однако возможны отклонения от серии к серии. Один из наиболее часто используемых способов получения твердотельных нанопор в очень тонких мембранах, а именно атомно-слоевое осаждение, в настоящее время испытывает затруднения с воспроизведением получения одинаковых нанопор в связи с утечкой ионного тока.

##### СТАБИЛЬНОСТЬ

Химическая и физическая стабильность бислойной липидной подложки бионанопор значительно ниже по сравнению с подложками твердотельных нанопор. Поэтому положение бионанопоры на подложке может меняться за счет ее диффузии по плоскости подложки. Для упрочнения мембраны для бионанопор используют несколько подходов. Один из них включает получение бислойной мембраны из полимеризующихся липидов, встраивания в них бионанопор, таких как  $\alpha$ -гемолизин, с последующей обработкой УФ-облучением [48]. В результате получают ковалентно-связанные полимерные липидные мембраны с повышенной стабильностью и прочностью.

Другой подход к упрочнению липидных мембран для бионанопор заключается в привязывании их к твердым поверхностям [49]. Липиды для таких мембран включают тиольную группу, которая выступает в роли линкера между липидом и поверхностью металла, например, золота. Такие мембраны характеризуются повышенной стабильностью и прочностью.

Третий подход заключается в получении липидных бислоев при контактировании нанокпель с липидными монослоями на поверхности [50]. В такие бислои можно встраивать бионанопоры и полу-

ченная конструкция характеризуется повышенной стабильностью и прочностью.

Описанные выше способы упрочнения липидных мембран для бионанопор можно сопоставить с получением упомянутых выше гибридных био-твердотельных нанопор, при котором бионанопора встраивается в твердотельную нанопору.

Стабильность самих бионанопор значительно ниже стабильности нанопор, сформированных в твердотельных подложках.

#### СТОИМОСТЬ

Биологические поры можно получать в клетках в больших количествах по низкой себестоимости. За счет сверхэкспрессии белков и их растворимости возможно промышленное получение в больших количествах. Цены на получение твердотельных нанопор постепенно снижаются с течением времени, однако способ их получения не прост. С другой стороны, твердотельные нанопоры, в отличие от бионанопор, многократно в применении и не теряют своих свойств со временем.

#### ПОВЕРХНОСТНАЯ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ НАНОПОР И ПОДЛОЖЕК

Поскольку структура часто используемых биологических нанопор хорошо известна, можно использовать сайт-направленный мутагенез для изменения заряда и размера канала. Кроме того, к порам в требуемых участках внутри канала или на поверхности с относительной простотой можно присоединять рецепторы. Синтетическим нанопорам в основном не хватает химической и локальной селективности, но их также можно функционализировать для придания им такой селективности.

#### ВСТРАИВАНИЕ В НАНОУСТРОЙСТВА

Биологические нанопоры обычно трудно встраивать в подложку из-за ее хрупкой бислоидной липидной природы, однако использование гибридных нанопор на основе белков и твердотельных нанопор значительно облегчает этот процесс. Твердотельные нанопоры легко встраиваются в наноустройства.

Таким образом, основные преимущества бионанопор включают: высокую воспроизводимость, низкий уровень шумов, относительную дешевизну и простоту получения и доступность поверхностной функционализации за счет направленного мутагенеза, в то время как основными преимуществами твердотельных нанопор являются высокая стабильность и простота встраивания в наноустройства.



Объединение бионанопор с твердотельными нанопорами приводят к получению гибридных нанопор, которые представляют собой чрезвычайно перспективные нанопоры и реализованы в первых коммерческих устройствах для анализа биополимеров, функционирующих на основе нанопор.

#### **V. КОММЕРЧЕСКИЕ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

Как уже было упомянуто выше, лидером в коммерческой реализации технологии нанопорового секвенирования является компания Oxford Nanopore Technologies. В своих продуктах Oxford Nanopore Technologies использует бактериальный белок CsgG Escherichia coli, поскольку длина формируемого им канала достигает значения 85 Å и позволяет устанавливать сразу два детектора мониторинга сигналов ионного тока [51, 52].

В технологии нанопорового секвенирования важен контроль скорости транслокации нуклеиновой кислоты через канал. Даже при минимальном эффективном напряжении скорость движения молекулы очень высока для детектирования прибором индивидуальных гетероциклических оснований НК. Для решения задачи стабилизации скорости протаскивания ДНК через пору наиболее эффективно использовать фермент (например, полимеразу или хеликазу), прикрепленный к поре. Фермент связывается с полинуклеотидной цепью НК, контролируя скорость последовательного прохождения отдельных нуклеотидов через канал. Авторы [53] показали, что использование ДНК полимеразы phi29 совместно с MspA привело к значительному сокращению флуктуаций в транслокационной кинетике через пору и улучшению точности секвенирования на уровне индивидуальных нуклеотидов.

Технология нанопорового секвенирования в настоящее время активно дорабатывается посредством введения новых поринов, моторных белков, стратегий прочтения последовательностей, протоколов экстракции и пробоподготовки образцов ДНК и РНК, методов анализа данных и пр. Компания Oxford Nanopore Technologies со времени реализации первого коммерческого прибора (MinION, 2014 г.), выпустила восемь версий продукта, отличающихся комбинациями нанопор и моторных белков в функциональных ячейках. Природные или искусственно синтезированные белки, используемые в ячейках R6, R7, R7.3, R10 и R10.3, на сегодняшний день компанией не раскрыты.

В R9, в состав которой входит порин CsgG, выделенный из *Escherichia coli*, заметно увеличилась производительность секвенирования в единицу времени и точность секвенирования (~87%, [54]) по сравнению с ~64% для R7 [55]. Эта ячейка имеет скорость транслокации ~250 оснований в секунду по сравнению с ~70 основаниями в секунду для R7 [56]. Впоследствии мутантный белок CsgG и новый моторный фермент (происхождение не раскрыто) были интегрированы в R9.4 для достижения более высокой точности секвенирования (~85–94% [57]) и более высоких скоростей секвенирования (до 450 оснований в секунду). Версия R9.5 была введена совместно со стратегией секвенирования 1D<sup>2</sup>, позволяющей проводить через пору одну молекулу ДНК дважды. Однако в R9.4 и R9.5 возникают трудности с секвенированием очень длинных гомополимеров, потому что текущий единичный сигнал от детектора, установленного в порине CsgG, определяется примерно пятью последовательными нуклеотидами. Нанопоры R10 и R10.3 имеют две области детектирования в канале, что обеспечивает более высокую точность прочтения гомополимеров [58, 59].

Помимо оптимизации нанопор и моторного белка, осуществлено несколько попыток создания стратегий прочтения последовательностей нуклеиновых кислот, которые позволяли бы повысить точность секвенирования. Так, например, качество данных может быть улучшено путем многократного секвенирования каждой двуцепочечной ДНК для создания консенсусной последовательности, что аналогично стратегии «циклического консенсусного секвенирования» («circular consensus sequencing»), используемой Pacific Biosciences (PacBio) для своей технологии одномолекулярного секвенирования [60]. В ранних версиях приборов Oxford Nanopore Technologies использовался способ подготовки 2D-библиотек, где каждая молекула двуцепочечной ДНК (дцДНК) прочитывалась дважды. Для этого цепи молекулы дцДНК предварительно лигировали с помощью специального адаптера, образующего шпильку между матричной и комплементарной последовательностями дцДНК. Моторный белок направлял одну нить (матричную ДНК) через нанопору, затем прочитывалась последовательность адаптера и вторая нить (комплементарная ДНК) [61]. Например, для нанопор R9.4 средняя точность 2D-ридов составляла 94% против 86% для 1D-ридов [62]. В 2017 году Oxford Nanopore Technologies предложила стратегию 1D<sup>2</sup> совместно с ячейкой R9.5; в этом методе вместо физического соединения двух цепей ДНК с помощью адаптера-шпильки каждая цепь отдельно лигировалась со специальным адаптером. Этот адаптер обеспечивал

высокую вероятность (>60%) того, что комплементарная цепочка будет немедленно захвачена той же нанопорой после прочтения матричной цепи. Средняя точность считывания 1D<sup>2</sup> составляла ~95% (ячейка R9.5) [63]. Таким образом, 2D- и 1D<sup>2</sup>-риды отражают консенсусную последовательность, сгенерированную по анализу «basecalling» (прочтения последовательности) совместно матричной и комплементарной ей цепи ДНК. В отличие от 2D, 1D<sup>2</sup> стратегия не гарантировала, что за каждой из матричных ДНК будет следовать ей комплементарная. Это приводило к несовершенной генерации консенсусной последовательности. ONT больше не поддерживает создание библиотек 2D и 1D<sup>2</sup>, в настоящее время для секвенирования ДНК. ONT предлагает только метод 1D, в котором каждая нить дцДНК лигируется адаптером и секвенируется. Параллельно точность улучшена с помощью новых алгоритмов «basecalling», в том числе многих, разработанных в ходе независимых исследований с использование машинного обучения [64].

Технология нанопорового секвенирования, в первую очередь коммерциализированная в качестве прибора MinION компании Oxford Nanopores, востребована, благодаря низкой стоимости, высокой портируемости и возможности прямого секвенирования очень длинных цепей ДНК.

Существует множество приложений, использующих нанопоровое секвенирование, поскольку оно упрощает изучение генетических и эпигенетических модификаций, а также их роли в экспрессии генов [65]. Кроме того, в области биомедицинских исследований нанопоровое секвенирование может дать представление о механизме различных заболеваний и помочь в диагностировании генетических заболеваний. Не менее важным направлением является обнаружение новых типов вирусов и бактерий, которое становится возможным благодаря высокой эффективности и портативной платформе нанопорового секвенирования.

Структурная изменчивость генома раковых клеток характеризуется большим количеством делеций, амплификации, инверсии, дубликации и транслокации. Изменения в этих последовательности обычно приводят к аномалиям в регуляции генов, таких как слитые гены и изменение количества копий, что может привести к активации или гиперэкспрессии онкогенов и инактивации генов-супрессоров опухолей. Так, показано, что использование нанопорового секвенирования позволяет обнаружить инактивацию генов-супрессоров опухолей из-за структурных изменений, например, при раке поджелудочной железы [66]. Другим проявлением является аномальная активность

факторов транскрипции, что также может быть выявлено при нанопоровом секвенировании [67]. Еще один механизм регулирования экспрессии генов – метилирование оснований ДНК также эффективно регистрируется методом нанопорового секвенирования. В работе [68] показана возможность обнаружения сайтов метилирования, как первого проявления развития рака. Таким образом, применение нанопоровой технологии в клинической практике, станет идеальным инструментом для выявления структурных вариаций, а следовательно, и ранней диагностики, прогнозированию и терапевтическому мониторингу онкологических заболеваний.

Другим интенсивно развивающимся применением данной технологии является анализ вирусов, бактерий и их популяций. В случае вирусов анализ генома является неотъемлемой частью выявления новых видов и, возможно, новых заболеваний, а также контроля возникающих мутаций. Так метод нанопорового секвенирования был активно использован для контроля мутаций SARS-CoV-2 [69], а также выявления его совместно с другими респираторными вирусами [70]. Утверждается, что именно использование длинных прочтений приведет к революции при идентификации патогенов [71] и полностью трансформирует современную геномику [72]. Например, для анализа бактериальных геномов уже показана возможность использования только нанопорового секвенирования при реализации последних разработок по повышению точности метода. Метод позволяет осуществить сборку бактериального генома без референса, а также обнаружить одиночные замены в генах [73]. В отдельное направление развития приложений этого метода можно выделить анализ сообществ бактерий, так как длинные риды позволяют выделить новый тип данных при профилировании сообществ по рибосомным генам [74].

## **VI. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МЕТОДА ДЛЯ НОВЫХ НАПРАВЛЕНИЙ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Впечатляющие успехи в технологии нанопорового секвенирования ДНК, позволяющие секвенировать даже отдельные молекулы ДНК в 2010-х [52, 75–77], породили мечты о новых технологиях секвенирования белков с использованием того же принципа. В настоящее время золотым стандартом секвенирования белков является масс-спектрометрия [78–81]. Однако этот метод имеет довольно существенные недостатки с точки зрения предела обнаружения и динамического диапазона [82]. На сегодняшний день,

подходы, основанные на анализе ионного тока, протекающего через нанопору (резистивный импульс), являются популярными и использовались для анализов белков и пептидов, но не для секвенирования аминокислотной последовательности, а для определения сворачивания из неструктурированного состояния [83, 84], анализа конформационных структурных изменений во времени [85–87] и агрегации [88, 89]. Однако несмотря на все усилия, основные требования, которым должно соответствовать устройство для секвенирования с нанопорами: каждый сигнал должен быть однозначно связан с определенным положением аминокислотного остатка в белковой последовательности и уровень сигнала, связанный с одним аминокислотным остатком (АО), должен позволять однозначно идентифицировать АО, еще не достигнуты. Секвенирование белков с помощью нанопоровой технологии все еще находится на ранней стадии и требует решения нескольких проблем: (а) биологические нанопоры, такие как  $\alpha$ -гемолизин ( $\alpha$ -HL), [90, 91] аэролизин (AeL) [92] и нанопоры Fragaceatoxin C (FraC), [93] имеют слишком маленькое отверстие (диаметром 1–2 нм), т. е. прохождение через такие отверстия крупных вторичных, третичных и четвертичных структур нативных белков невозможно, а основное требование для секвенирования белков на основе биологических нанопор состоит в том, чтобы развернуть трехмерные структуры белка и обеспечить его проход и разделение в пределах нанопор; (б) длительное пребывание одиночных молекул в нанопоре, чтобы обеспечить высокое отношение сигнал-шум для правильного отнесения сигнала к каждому аминокислотному остатку полинуклеотидной цепи. Полипептидная цепь белка проходит через биологические нанопоры с высокой скоростью и современные конструкции с нанопорами не позволяют точно идентифицировать различные элементы отдельных белков [94, 95]. Следовательно, контроль перемещения отдельных белков в сенсорном интерфейсе нанопор, является одной из актуальных задач развития технологии нанопорового секвенирования. Более того, разработка методов секвенирования белков является нетривиальной и из-за сложной природы белков. Белки построены из 20-ти различных аминокислотных остатков, тогда как ДНК состоит только из четырех различных нуклеотидных остатков. Обнаружение и идентификация 20-ти различных сигналов представляет собой отдельную, пока не решенную проблему.

Не менее перспективным является направление, связанное с созданием сенсорных систем различного назначения. Во всех случаях конструкция и принцип работы такого сенсора построены по единой

модели: эти устройства состоят из нанопоры – отверстия нанометрового размера в непроницаемой мембране, мембрана погружена в электролит и разделяет его на два отсека. Нанопора – единственный путь, который соединяет эти два отсека. Когда к мембране прикладывается напряжение, ионы проходят через поры, что приводит к возникновению стационарного ионного тока. Изменения ионного тока по мере того, как анализируемое вещество пересекает пору, несет информацию об анализе, такую как размер, заряд и концентрация.

Такие сенсорные системы можно условно разделить на три основных типа. Первый является естественным приложением метода нанопорового секвенирования и используется для решения узкоспециализированных аналитических задач и высокотехнологичной диагностики, в частности для определения единичных нуклеотидов, [96], коротких НК: искусственно созданных [97] и природных регуляторных РНК, таких как микро РНК [98, 99], а также замены нуклеотидных остатков ДНК в составе генов [100–102]. Два других направления разработок в настоящее время можно разделить на задачи определения единичных молекул и ионов [103–106] и задачи анализа частиц [107–111].

Определение единичных молекул и ионов, как правило, основано на использовании химически-модифицированных биологических нанопор. Так, например, модификация порина А остатком фенилборной кислоты приводит к избирательному связыванию и последующему замедлению прохождения через канал циклических моносахаридов, благодаря чему электрический отклик оказывается чувствительным к структуре моносахарида [103]. Аналогичный подход может быть использован для определения ионов металлов, для этого в биологические нанопоры внедряют сайт распознавания. Так, мутантная форма  $\alpha$ -гемолизина WT<sub>6</sub>N<sub>1</sub>, содержащая кластер боковых имидазольных групп внутри канала позволяет детектировать наномолярные концентрации ионов цинка, кроме того, за счет различного времени удерживания в канале, возможно достоверно различать ионы цинка, меди и кадмия в смеси [104]. Другой подход детектирования малых молекул и ионов с помощью нанопор основан на использовании специфического взаимодействия анализа с пептидными или нуклеиновыми компонентами, добавляемыми в анализируемый раствор. В таком случае детектирование основано на отслеживании транслокации через пору комплекса, отличного по размеру и конформации. Так, например, в работе [105] показано, что образование комплекса уранил иона с пептидом NN<sub>14</sub> позволяет получить выраженный сигнал при прохождении его через единичную

$\alpha$ -гемолизинную пору, при этом чувствительность достигает наномолярных концентраций, а определение возможно на фоне присутствия в растворе разнообразных ионов металлов в концентрациях, существенно превышающих концентрацию уранил-иона.

И, наконец, третьим типом сенсорных систем на основе нанопор являются системы анализа размера, формы и деформируемости частиц. Частицами в данном случае могут являться как плотные наночастицы [110, 111], например, металлов, так «мягкие» деформируемые коллоидные частицы, например липосомы [112]. Это направление получило развитие при использовании твердофазных нанопор, размеры которых обычно заметно больше, чем в случае биологических, а в зависимости от их формы возможно существенно варьировать чувствительность метода к различным объектам, воздействию на аналиты электрического поля, а также анализировать деформацию частицы при транслокации через пору. Более того, аналог нанопор – микропоры, т.е. поры диаметром в микрометры, можно с успехом использовать для обнаружения пылицы [107], бактерий [108, 109], что существенно расширяет использование возможности сенсорных систем на основе нанопор. Используя передовые алгоритмы анализа данных и машинного обучения [113–115], ученые добились того, что сенсоры на основе нанопор стали более точные и надежные и способны обнаруживать и характеризовать аналиты на уровне одной молекулы и эта часть исследований продолжает развиваться наиболее интенсивно.

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из проведенного анализа литературных данных можно сделать вывод, что мы уже не только стоим на пороге, а перешагнули в область технологической трансформации геномных исследований в биологических и биомедицинских исследованиях за счет коммерческой реализации технологии прочтения последовательности нуклеиновых кислот большой длины на уровне единичных молекул. Область дальнейшего развития нанопорового секвенирования биополимеров лежит в использовании гибридных технологий, основанных на совмещении преимуществ синтетических твердотельных подложек и искусственно спрогнозированного улучшения «биологических» пор для повышения точности определения последовательности нуклеотидов. Но уже на современном уровне развития технологии видны ее преимущества и возможности развития по сравнению с существующими методами анализа.



Также стоит отметить, что нет фундаментального ограничения для применения подходов, реализованных для нуклеиновых кислот, на основе нанопорового секвенирования к определению аминокислотных последовательностей белков если будет найдено решение для эффективной транслокации полипептидной цепи через пору с постоянной скоростью.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Deeb K.K., Metcalf J.D., Sesock K.M., Shen J., Wensel Ch.A., Rippel L.I., Smith M., Chapman M.S., Zhang S. (2015). The c.1364C>A (p.A455E) Mutation in the CFTR Pseudogene Results in an Incorrectly Assigned Carrier Status by a Commonly Used Screening Platform, *The Journal of Molecular Diagnostics*, **17(4)**, 360–365.
2. Topol E.J. (2014). Individualized Medicine from Prewomb to Tomb, *Cell*, **157(1)**, 241–253.
3. Sanger F., Coulson A. R. (1975) Rapid Method for Determining Sequences in DNA. by Primed Synthesis with DNA Polymerase, *Journal of Molecular Biology*, **94**, 441–448
4. Sanger F., Air G., Barrell B. *et al.* (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA, *Nature*, **265**, 687–695.
5. International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, **409**, 860–921.
6. Schadt E. E., Turner S., Kasarskis A. (2010) A window into third-generation sequencing, *Human Molecular Genetics*, **19(R2)**, R227–R240.
7. Wang Y., Yang Q., Wang. Zh. (2015) The evolution of nanopore sequencing, *Frontiers in Genetics*, **5**, 449.
8. Bell D.C., Thomas W.K., Murtagh K.M., Dionne Ch.A., Graham A.C., Anderson J.E., Glover W.R. (2012) DNA Base Identification by Electron Microscopy, *Microscopy and Microanalysis*, **18(5)**, 1049–1053.
9. Cheng P., Oliver P.M., Barrett M.J., Vezenov D. (2012) Progress toward the application of molecular force spectroscopy to DNA sequencing, *Electrophoresis*, **33(23)**, 3497–3505.
10. Bailo E., Deckert V. (2008). Tip-Enhanced Raman Spectroscopy of Single RNA Strands: Towards a Novel Direct-Sequencing Method, *Angewandte Chemie International Edition* **47(9)**, 1658–1661.
11. Branton D., Deamer D.W., Marziali A., Bayley H., Benner S.A., Butler T., Di Ventra M., Garaj S., Hibbs A., Huang X. (2008) The potential and challenges of nanopore sequencing, *Nature Biotechnology* **26(10)**, 1146–1153.
12. Lu H., Giordano F., Ning Z. (2016) Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **14 (5)**, 265–279.
13. Castro-Wallace S.L., Chiu C.Y., John K.K., *et al.* (2017) Nanopore DNA sequencing and genome assembly on the international space station, *Scientific Reports*, **7(1)**, 18022.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

14. Heather J.M., Chain B. (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA, *Genomics*, **107**(1), 1–8.
15. Suspicyн E.N., Sokolenko A.P. (2013) Primenenie molekulyarnykh tekhnologij novogo pokoleniya v medicinskoj genetike (The use of new generation molecular technologies in medical genetics). St. Petersburg; 22 s.
16. Suspicyн E.N., Tyurin V.I., Imyanitov E.N., i dr. (2016) Full exom sequencing: principles and diagnostic options. *Pediatria*.; **7**(4), 142–146.
17. Suspicyн E.N., Guseva M.N., Sokolenko A.P., i dr. (2017) Next Generation Targeted Sequencing (NGS) in Diagnosing Primary Immunodeficiencies. *Medicinskaya immunologiya*, **19**, 174.
18. Barhatov IM, Predeus AV, Chuhlovin AB. (2016) Sequencing of a new generation and its application in oncohematology, *Onkogematologiya*, **11**(4), 56–63.
19. Song L., Hobaugh M. R., Shustak C., Cheley S., Bayley H. and Gouaux J. E. (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore, *Science*, **274**, 1859–1865.
20. Faller M., Niederweis M., Schulz, G. E. (2004) The structure of a mycobacterial outer-membrane channel, *Science*, **303**, 1189–1192.
21. Li J., Stein D., McMullan C., Branton D., Aziz M. J. and Golovchenko J. A. (2001) Ion-beam sculpting at nanometre length scales, *Nature*, **412**, 166–169.
22. Yanagi I., Akahori R., Hatano T., Takeda K.-I. (2014) Fabricating nanopores with diameters of sub-1 nm to 3 nm using multilevel pulse-voltage injection, *Scientific Reports*, **4**, 5000.
23. Wu L, Liu H, Zhao W, Wang L, Hou C, Liu Q, Lu Z. (2014) Electrically facilitated translocation of protein through solid nanopore, *Nanoscale Research Letters*, **9**(1), 140.
24. Hall A., Scott A., Rotem D. *et al.* (2010) Hybrid pore formation by directed insertion of  $\alpha$ -haemolysin into solid-state nanopores, *Nature Nanotechnology*, **5**, 874–877.
25. Cabello-Aguilar S., Balme S., Chaaya A. A., Bechelany M., Balanzat E., Janot J.-M., Pochat-Bohatier C., Miele P. and Dejardin P. (2013) Slow translocation of polynucleotides and their discrimination by  $\alpha$ -hemolysin inside a single track-etched nanopore designed by atomic layer deposition, *Nanoscale*, **5**, 9582–9586.
26. Kasianowicz J.J., Balijepalli A.K., Etedgui J., Forstater J.H., Wang H., Zhang H., Robertson J.W. (2016) Analytical applications for pore-forming proteins, *Biochimica Biophysica Acta*, **1858**, 593–606.
27. Wendell D., Jing P., Geng J., Subramaniam V., Lee T.J., Montemagno C., Guo P. (2009) Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted  $\phi$ 29 motor protein nanopores, *Nature Nanotechnology*, **4**, 765–772.
28. Laszlo A.H., Derrington I.M., Gundlach J.H. (2016) MspA nanopore as a single-molecule tool: From sequencing to SPRNT, *Methods*, **105**, 75–89.
29. Kang X.F., Gu L.Q., Cheley S., Bayley H. (2005) Single protein pores containing molecular adapters at high temperatures, *Angewandte Chemie International Edition*, **25**, 44–54.
30. Jing P., Haque F., Vonderheide A. P., Montemagno C., Guo P. (2010) Robust properties of membrane-embedded connector channel of bacterial virus phi29 DNA packaging motor, *Molecular Biosystem*, **6**, 1844–1852
31. Pastoriza-Gallego M., Rabah L., Gibrat G., Thiebot B., van der Goot F. G., Auvray L., Betton J.-M., and

- Pelta J. (2011) Dynamics of unfolded protein transport through an aerolysin pore, *Journal of American Chemical Society*, **133**, 2923–2931.
32. Cressiot B., Braselmann E., Oukhaled A., Elcock A. H., Pelta J. and Clark P. L. (2015) Dynamics and Energy Contributions for Transport of Unfolded Pertactin through a Protein Nanopore, *ACS Nano*, **9**, 9050–9061
33. Fennouri A., Daniel R., Pastoriza-Gallego M., Auvray L., Pelta J., Bacri L. (2013) Kinetics of Enzymatic Degradation of High Molecular Weight Polysaccharides through a Nanopore: Experiments and Data-Modeling, *Analytical Chemistry*, **85**, 8488–8492.
34. Cao, C., Ying, YL., Hu, ZL. *et al.* (2016) Discrimination of oligonucleotides of different lengths with a wild-type aerolysin nanopore, *Nature Nanotechnology*, **11**, 713–718
35. Butler T.Z., Pavlenok M., Derrington I.M., Niederweis M., Gundlach J.H. (2008) Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **105**, 20647.
36. Heinz C., Engelhardt H., Niederweis M. (2003) The core of the tetrameric mycobacterial porin MspA is an extremely stable beta-sheet domain, *Journal of Biological Chemistry* **278**, 8678–8685
37. van den Hout, M. *et al.* (2010) Controlling nanopore size, shape and stability, *Nanotechnology*, **21**, 115304.
38. Yuan J.H., He F.Y., Sun D.C., Xia X.H. (2004) A Simple Method for Preparation of Through-Hole Porous Anodic Alumina Membrane, *Chemistry of Materials*, **16**, 1841.
39. Siwi Z., Gu Y., Spohr H.A., Baur D., Wolf-Reber A., Spohr R., Apel P., Korchev Y.E. (2002) Rectification and voltage gating of ion currents in a nanofabricated pore, *Europhysics Letters*, **60**, 349.
40. Storm A.J., Chen J.H., Ling X.S., Zandbergen H.W., Dekker C. (2003) Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision, *Nature Materials*, **2**, 537–540.
41. Zhao Q., Sigalov G., Dimitrov V., Dorvel B., Mirsaidov U., Sligar S., Aksimentiev A., Timp G. (2007) Detecting SNPs using a synthetic nanopore, *Nano Letters*, **7**, 1680–1685.
42. Heng J.B., Ho C., Kim T., Timp R., Aksimentiev A., Grinkova Y.V., Sligar S., Schulten K., Timp G. (2004) Sizing DNA Using a Nanometer-Diameter Pore, *Biophysical Journal*, **87**, 2905.
43. Cressiot B., Greive S.J., Mojtavavi M., Antson A.A., Wanunu M.. (2018) Thermostable virus portal proteins as reprogrammable adapters for solid-state nanopore sensors, *Nature Communications*, **9**, 4652
44. Hall A.R., Scott A., Rotem D., Mehta K.K., Bayley H., Dekker C. (2010) Hybrid pore formation by directed insertion of  $\alpha$ -haemolysin into solid-state nanopores, *Nature Nanotechnology*, **5**, 874.
45. Зверева М.Э., Малявко А.Н., Донцова О.А. (2012) ДНК как наноматериал, *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*, **54 (7)**, 1106–1115.
46. Bell N.A.W., Engst C.R., Ablay M., Divitini G., Ducati C., Liedl T. and Keyser U.F., (2012) DNA Origami Nanopores, *Nano Letters*, **12(1)**, 512–517.
47. N Bell N.A.W., Keyser U.F. (2014) Nanopores formed by DNA origami: A review, *FEBS Letters*, **588(19)**, 3564–3570
48. Shenoy D.K., Barger W.R., Singh A., Panchal R.G., Misakian M., Stanford V.M., and Kasianowicz J.J. (2005) Functional Reconstitution of Protein Ion Channels into Planar Polymerizable Phospholipid Membranes, *Nano Letters*, **5(6)**, 1181–1185.

49. Schiller S.M., Naumann R., Lovejoy K., Kunz H., Knoll W. (2003) Archaea Analogue Thiolipids for Tethered Bilayer Lipid Membranes on Ultrasmooth Gold Surfaces, *Angewandte Chemie International Edition*, **42(2)**, 208–211.
50. Holden M.A., Needham D., Bayley H. (2007) Functional Bionetworks from Nanoliter Water Droplets, *Journal of American Chemical Society*, **129**, 8650–8655.
51. Van der Verren, S.E., Van Gerven, N., Jonckheere, W. *et al.* (2020) A dual-constriction biological nanopore resolves homonucleotide sequences with high fidelity, *Nature Biotechnology*, **38**, 1415–1420.
52. Deamer D., Akeson M., Branton D. (2016). Author response to John Kasianowicz and Sergey Bezrukov. *Nature Biotechnology*, **34(5)**, 482–482.
53. Goyal P., Krasteva P.V., Van Gerven N., Gubellini F., Van den Broeck I., Troupiotis-Tsaïlaki A., Jonckheere W., Péhau-Arnaudet G., Pinkner, J.S.; Chapman M.R. Hultgren S.J., Howorka S., Fronzes R., Remaut H. (2014). Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG. *Nature*, **516(7530)**, 250–253.
54. Minei R, Hoshina R, Ogura A. (2018) De novo assembly of middle-sized genome using MinION and Illumina sequencers, *Genomics*, **19(1)**, 700.
55. Ashton P., Nair S., Dallman T. *et al.* (2015) MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island, *Nature Biotechnology*, **33**, 296–300.
56. Carter J.M. and Hussain S. (2018) Robust long-read native DNA sequencing using the ONT CsgG Nanopore system [version 3; peer review: 2 approved]. *Wellcome Open Research*, **2**, 23.
57. Wick R.R., Judd L.M. & Holt, K.E. (2019) Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biology*, **20**, 129.
58. Tytgat O., Gansemans Y., Weymaere J., Rubben K., Deforce D, Van Nieuwerburgh F. (2020) Nanopore Sequencing of a Forensic STR Multiplex Reveals Loci Suitable for Single-Contributor STR Profiling. *Genes*, **11(4)**, 381.
59. Huang Y.T., Liu P.Y., Shih P.W. (2021) Homopolish: a method for the removal of systematic errors in nanopore sequencing by homologous polishing, *Genome Biology*, **22(1)**, 95.
60. Rhoads A., Au K.F. (2015) PacBio Sequencing and Its Applications, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **13(5)**, 278–289.
61. Ip C.L.C., Loose M., Tyson J.R., de Cesare M., Brown B.L., Jain M., Leggett R.M., Eccles D.A., Zalunin V., Urban J.M., Piazza P., Bowden R.J., Paten B., Mwaigwisya S., Batty E.M., Simpson J.T., Snutch T.P., Birney E., Buck D., Goodwin S., Jansen H.J., O’Grady J., Olsen H.E. (2015) MinION Analysis and Reference Consortium. MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 1 data release and analysis, *F1000Research*, **15(4)**, 1075.
62. Gong L., Wong C.H., Cheng W.C., Tjong H., Menghi F., Ngan C.Y., Liu E.T., Wei C.L. (2018) Picky comprehensively detects high-resolution structural variants in nanopore long reads, *Nature Methods*, **15(6)**, 455–460.
63. Seki M., Katsumata E., Suzuki A., Sereewattanawoot S., Sakamoto Y., Mizushima-Sugano J., Sugano S., Kohno T., Frith M.C, Tsuchihara K., Suzuki Y. (2019) Evaluation and application of RNA-Seq by MinION, *DNA Research*, **26(1)**, 55–65.
64. Rang F.J., Kloosterman W.P., de Ridder, J. (2018) From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy, *Genome Biology*, **19**, 90.

65. Lee I., Razaghi R., Gilpatrick T., Molnar M., Gershman A., Sadowski N., Sedlazeck F.J., Hansen K.D., Simpson J.T., Timp W. (2020) Simultaneous profiling of chromatin accessibility and methylation on human cell lines with nanopore sequencing. *Nature Methods*, **17**, 1191–1199.
66. Norris A.L., Workman R.E., Fan Y.F., Eshleman J.R., Timp W. (2016) Nanopore sequencing detects structural variants in cancer. *Cancer Biology and Therapy*, **17**, 246–253.
67. Squires A., Atas E., Meller A. (2015) Nanopore sensing of individual transcription factors bound to DNA. *Scientific Reports*, **5**, 11643/
68. Lyko F. (2018) The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Review Genetics*, **19**, 81–92.
69. Chan W.M., Ip J.D., Chu A.W.H., Yip C.C.Y., Lo L.S., Chan K.H., Ng A.C.K., Poon R.W.S., To W.K., Tsang O.T.Y. et al. (2020) Identification of nsp1 gene as the target of SARS-CoV-2 real-time RT-PCR using nanopore whole-genome sequencing. *Journal of Medical Virology*, **92**, 2725–2734.
70. Wang M., Fu A.S., Hu B., Tong Y.Q., Liu R., Liu Z., Gu J.S., Xiang B., Liu J.H., Jiang, W. et al. (2020) Nanopore targeted sequencing for the accurate and comprehensive detection of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses. *Small*, **16**, 15.
71. Amoutzias G.D., Nikolaidis M., Hesketh A. (2022) The Notable Achievements and the Prospects of Bacterial Pathogen Genomics. *Microorganisms*, **10**(5), 1040.
72. Athanasopoulou K., Boti M.A., Adamopoulos P.G., Skourou P.C., Scorilas A. (2021) Third-Generation Sequencing: The Spearhead towards the Radical Transformation of Modern Genomics. *Life*, **12**(1), 30.
73. Khrenova, M.G.; Panova, T.V.; Rodin, V.A.; Kryakvin, M.A.; Lukyanov, D.A.; Osterman, I.A.; Zvereva, M.I. (2022) Nanopore Sequencing for De Novo Bacterial Genome Assembly and Search for Single-Nucleotide Polymorphism. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 8569.
74. Curry K.D., Wang Q., Nute M.G., Tyshaieva A., Reeves E., Soriano S., Wu Q., Graeber E., Finzer P., Mendling W., Savidge T., Villapol S., Dilthey A., Treangen T.J. (2022) Emu: species-level microbial community profiling of full-length 16S rRNA Oxford Nanopore sequencing data. *Nature Methods*, **19**(7), 845–853.
75. Clarke J., Wu H.-C., Jayasinghe L., Patel A., Reid S., Bayley H. (2009) Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology*, **4**, 265–270.
76. Manrao E. A., Derrington I. M., Laszlo A. H., Langford K. W., Hopper M. K., Gillgren N., Pavlenok M., Niederweis M., Gundlach J. H. (2012) Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nature Biotechnology*, **30**, 349–353.
77. Cherf G.M., Lieberman K.R., Rashid H., Lam C.E., Karplus K., Akeson M. (2012) Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-A precision. *Nature. Biotechnology*, **30**(4), 344–348.
78. Steen H. & Mann M. (2004) The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**, 699–711.
79. Yates J. R. (2011) III A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes. *Nature Methods*, **8**, 633–637.
80. Aebersold R. & Mann M. (2016) Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* **537**, 347–355.
81. Walther T. C. & Mann M. (2010) Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *Journal of Cell Biology*, **190**, 491–500.



82. Domon B. & Aebersold R. (2010) Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy, *Nature Biotechnology*, **28**, 710–721.
83. Oukhaled G., Mathe J., Biance A., Bacri L., Betton J., Lairez D., Pelta J. and Auvray L. (2007) Unfolding of proteins and long transient conformations detected by single nanopore recording, *Physical Review Letters*, **98**, 158101.
84. Talaga D. and Li J. (2009) Single-molecule protein unfolding in solid state nanopores, *Journal of American Chemical Society*, **131**, 9287–9297.
85. Van Meervelt V., Soskine M., Singh S., Schuurman-Wolters G.K., Wijma H.J., Poolman B. and Maglia G. (2017) Real-time conformational changes and controlled orientation of native proteins inside a protein nanoreactor, *Journal of American Chemical Society*, **139**, 18640–18646.
86. Varongchayakul N., Huttner D., Grinstaff M.W. and Meller A. (2018) Sensing native protein solution structures using a solid-state nanopore: unraveling the states of VEGF, *Scientific Reports*, **8**, 1017.
87. Waduge P., Hu R., Bandarkar P., Yamazaki H., Cressiot B., Zhao Q., Whitford P.C. and Wanunu M. (2017) Nanopore- based measurements of protein size, fluctuations, and conformational changes, *ACS Nano*, **11**, 5706–5716.
88. Martyushenko N., Bell N.A., Lamboll R.D. and Keyser U.F. (2015) Nanopore analysis of amyloid fibrils formed by lysozyme aggregation, *Analyst*, **140**, 4882–4886.
89. Giambianco N., Coglitore D., Janot J.-M., Coulon P.E., Charlot B. and Balme S. (2018) Detection of protein aggregate morphology through single antifouling nanopore, *Sensors Actuators B*, **260**, 736–745.
90. Song L., Hobaugh M. R., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux J. E. (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore, *Science*, **274**, 1859–1866.
91. Faller M., Niederweis M., Schulz G. E. (2004) Mycobacterium smegmatis porin A (MspA), *Science*, **303**, 1189–1192.
92. Iacovache I., De Carlo S., Cirauqui N., Dal Peraro M., van der Goot F. G., Zuber B. (2016) Cryo-EM structure of aerolysin variants reveals a novel protein fold and the pore-formation process, *Nature Communication*, **7**, 12062.
93. Tanaka K., Caaveiro J. M. M., Morante K., González-Mañas J. M. & Tsumoto K. (2015) Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid, *Nature Communication*, **6**, 6337.
94. Gu Z., Ying YL. & Long YT. (2018) Nanopore sensing system for high-throughput single molecular analysis, *Science China Chemistry*, **61**, 1483–1485.
95. Kasianowicz J. J., Balijepalli A. K., Eppedgi J., Forstater J. H., Wang H., Zhang H., Robertson J. W. F., (2016) Analytical applications for pore-forming proteins, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1858**, 593–606.
96. Ayub M., Hardwick S.W., Luisi B.F., Bayley H. (2013) Nanopore-Based Identification of Individual Nucleotides for Direct RNA Sequencing, *Nano Letters*, **12**, 6144–6150.
97. Khrenova M., Nikiforova L., Grabovenko F., Orlova N., Sinegubova M., Kolesov D, Zavyalova E., Spiridonova V., Zatsepin T., Zvereva M.. (2022) In vitro Selection of an Aptamer Targeting SARS-CoV-2 Spike Protein with Nanopore Sequence Identification Reveals Discrimination

- Between the Authentic Strain and Omicron. *ChemRxiv. Cambridge: Cambridge Open Engage*.
98. Xi D., Shang J., Fan E., You J., Zhang S., and Wang H. (2016) Nanopore-Based Selective Discrimination of MicroRNAs with Single-Nucleotide Difference Using Locked Nucleic Acid-Modified Probes, *Analytical Chemistry*, **21**, 10540–10546.
  99. Zahid O.K., Wang F., Ruzicka J.A., Taylor E.W., Hall A.R. (2016) Sequence-Specific Recognition of MicroRNAs and Other Short Nucleic Acids with Solid-State Nanopores, *Nano Letters*, **3**, 2033–2039.
  100. Riedl J., Ding Y., Fleming A. M., Burrows C. J., (2015) Identification of DNA lesions using a third base pair for amplification and nanopore sequencing, *Nature Communications*, **1**, 8807.
  101. Shang J., Li Z., Liu L., Xi D., Wang H. (2018) Label-Free Sensing of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase Activity with a Nanopore, *ACS Sensors*, **2**, 512–518.
  102. Wang Y., Tian K., Shi R., Gu A., Pennella M., Alberts L., Gates K.S., Li G., Fan H., Wang M.X., Gu L.Q. (2017) Nanolock–Nanopore Facilitated Digital Diagnostics of Cancer Driver Mutation in Tumor Tissue, *ACS Sensors*, **7**, 975–981.
  103. Zhang Sh., Cao Z., Fan P., Wang Y., Jia W., Wang L., Wang K., Liu Y., Du X., Hu C., Zhang P., Chen H.-Y., Huang S. (2022) A Nanopore-Based Saccharide Sensor. *Angewandte Chemie International Edition*, **61**, e202203769.
  104. Wang H.-Y., Song Z.-Y., Zhang H.-S., Chen S.-P. (2016) Single-molecule analysis of lead(II)-binding aptamer conformational changes in an  $\alpha$ -hemolysin nanopore, and sensitive detection of lead(II), *Microchimica Acta*, **183(3)**, 1003–1010.
  105. Roozbahani G.M., Chen X., Zhang Y., Xie R., Ma R., Li D., Li H., Guan X. (2017) Peptide-Mediated Nanopore Detection of Uranyl Ions in Aqueous Media, *ACS Sensors*, **5**, 703–709.
  106. Roozbahani G.M., Chen X., Zhang Y., Wang L., Guan X. (2020) Nanopore Detection of Metal Ions: Current Status and Future Directions, *Small Methods*, **4**, 2000266.
  107. Tsutsui M., Yokota K., Yoshida T., Hotehama C., Kowada H., Esaki Y., Taniguchi M., Washio T., Kawai T. (2019) Identifying Single Particles in Air Using a 3D-Integrated Solid-State Pore<sup>7</sup>, *ACS Sensors*, **4(3)**, 748–755.
  108. Goyal G., Mulero R., Ali J., Darvish A., Kim M. J. (2015) Low aspect ratio micropores for single-particle and single-cell analysis: Nanoanalysis, *Electrophoresis*, **36(9–10)**, 1164–1171.
  109. Tsutsui, M., Yoshida, T., Yokota, K. *et al.* (2017) Discriminating single-bacterial shape using low-aspect-ratio pores. *Scientific Reports*, **7**, 17371.
  110. Tsutsui M., Hongo S., He Y., Taniguchi M., Gemma N., Kawai T., (2012) Single-Nanoparticle Detection Using a Low-Aspect-Ratio Pore, *ACS Nano*, **6(4)**, 3499–3505.
  111. Taniguchi M., Takei H., Tomiyasu K., Sakamoto O., Naono N. (2022) Sensing the Performance of Artificially Intelligent Nanopores Developed by Integrating Solid-State Nanopores with Machine Learning Methods, *The Journal of Physical Chemistry C*, **126(29)**, 12197–12209.



- 
112. Darvish A., Goyal G., Aneja R., Sundaram R.V.K., Lee K., Ahn C.W., Kim K.-B., Vlahovskaf P.M., Kim M.J. (2016) Nanoparticle mechanics: deformation detection via nanopore resistive pulse sensing, *Nanoscale*, **8**, 14420-14431.
113. Gu Z., Ying Y.-L., Cao C., He P., Long Y.-T. (2015) Accurate Data Process for Nanopore Analysis, *Analytical Chemistry*, **87(2)**, 907-913.
114. Misiunas K., Ermann N., Keyser U. F., (2018) QuipuNet: Convolutional Neural Network for Single-Molecule Nanopore Sensing, *Nano Letters*, **18(6)**, 4040-4045.
115. Shekar S., Chien C.C., Hartel A., Ong P., Clarke O.B., Marks A., Drndic M., Shepard K.L. (2019) Wavelet Denoising of High-Bandwidth Nanopore and Ion-Channel Signals, *Nano Letters*, **19(2)**, 1090-1097.