

NANOPORY: BUDOWA, WŁAŚCIWOŚCI, MODELE, ZASTOSOWANIA

NANOPORES: STRUCTURE, PROPERTIES, MODELS, APPLICATIONS

Anna Stachiewicz, Andrzej Molski

*Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
ul. Grunwaldzka 6, 61-606 Poznań
e-mail: anna.st@amu.edu.pl, amolski@amu.edu.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Budowa nanoporów
 - 1.1. Nanopory białkowe
 - 1.2. Nanopory syntetyczne
2. Właściwości nanoporów
 - 2.1. Prąd jonowy
 - 2.2. Translokacja biopolimerów
 - 2.3. Nanoporowa spektroskopia sił
3. Modele nanoporów
 - 3.1. Metody modelowania
 - 3.2. Prąd jonowy
 - 3.3. Translokacja biopolimerów
 - 3.4. Nanoporowa spektroskopia sił
4. Perspektywy: sekwencjonowanie DNA

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Anna Stachiewicz jest doktorantką w Zakładzie Chemii Fizycznej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, gdzie ukończyła w 2010 roku studia. Obecnie prowadzi badania polegające m.in. na symulacjach komputerowych przepływu niewielkich cząstek przez nanopory. Celem jej pracy zastosowanie modelowania i symulacji komputerowych do wyjaśnienia eksperymentów przepływu jonów oraz translokacji biopolimerów przez nanopory.



Prof. dr hab. Andrzej Molski jest absolwentem Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Od roku 2009 kieruje Zakładem Chemii Fizycznej na Wydziale Chemii. Obecnie prowadzi badania dotyczące modelowania i symulacji dynamiki procesów fizykochemicznych a w szczególności procesów badanych z rozdzielczością do pojedynczych cząsteczek. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

ABSTRACT

Nanopores are small (1–100 nm diameter) holes/channels formed in biological membranes (Fig. 1) or fabricated in synthetic materials (Fig. 2). Permeation of ions and small molecules through nanopores is common in biological systems. The first experiments where nanopores were used as single-molecule sensors were performed in the 90s [1, 2]. The detection principle is based on a monitoring of an ionic current passing through a nanopore as an electric field is applied across the membrane. Electrically charged particles (e.g. DNA) move in the electric field and block the ionic current as they pass through the nanopore. A sudden drop of the ionic current signals a single-molecule translocation event (Fig. 3–5). Nanopore sensors can give an information about the analyte: its size, structure and bonds stability. Today, a major topic of interest is the possibility of nanopore DNA sequencing.

In this work we present an introduction to nanopore technology and to current research related to potential nanopore applications. First, we describe biological and synthetic nanopores: their structure and methods of fabrication. Next, different modes of nanopore experiments are presented. In the third section, we focus on theoretical models and simulations of nanopores. Finally, we present future perspectives for applications with particular reference to DNA sequencing.

Keywords: nanopores, ion current, (bio)-polymer translocation, Poisson-Boltzmann equation, Poisson-Nernst-Planck equation, molecular dynamics

Słowa kluczowe: nanopory, prąd jonowy, translokacja (bio)-polimerów, równanie Poissona-Boltzmann, równanie Poissona-Nernsta-Plancka, dynamika molekularna

WPROWADZENIE

Nanopory są niewielkimi otworami (średnica rzędu 1–100 nm) w błonach biologicznych (np. kanały jonowe, Rys. 1) lub wytworzonymi w membranach syntetycznych (Rys. 2). Przepływ jonów i translokacja biocząsteczek przez nanopory są powszechnymi zjawiskami w układach biologicznych. W roku 1991 Bertowi Sakmannowi i Erwinowi Neherowi przyznano Nagrodę Nobla z medycyny za opracowanie i wykorzystanie metody pomiaru prądu jonowego w kanałach jonowych.

Pierwsze udane eksperymenty wykorzystujące właściwości kanałów jonowych do badania przepływającego przez niego analitu przeprowadzone zostały w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku [1, 2]. Idea tych eksperymentów oparta jest na koncepcji licznika Coultera [3], urządzenia skonstruowanego w latach pięćdziesiątych służącego do pomiaru liczby oraz objętości cząstek, np. komórek, bakterii lub wirusów, umieszczonych w elektrolicie. Układ pomiarowy składa się z dwóch komór wypełnionych elektrolitem, oddzielonych przegrodą z otworem o średnicy niewiele większej od średnicy cząstek analitu. Za pomocą elektrod umieszczonych w komorach przykładane jest napięcie elektryczne, powodujące przepływ jonów przez otwór. Jeżeli w otworze znajdzie się cząstka analitu, ruch jonów zostaje częściowo zablokowany co powoduje, że wartość mierzonego prądu jonowego maleje.

W przypadku badań nanoporów układ pomiarowy wygląda analogicznie. Pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego cząsteczki posiadające ładunek elektryczny poruszają się w kierunku elektrody o ładunku przeciwnym. Jeżeli znajdują się w nanoporze, następuje spadek mierzonego prądu jonowego (Rys. 3–5). Wartość mierzonego prądu zależy od przyłożonego napięcia, geometrii i statycznego ładunku elektrycznego na powierzchni nanoporu. Analiza wartości skoków prądu oraz ich czasu trwania pozwala na uzyskanie informacji na temat analitu, jego rozmiarów, struktury a nawet trwałości wiązań. Eksperymenty z wykorzystaniem nanoporów cieszą się zainteresowaniem m.in. ze względu na możliwość zastosowania w sekwencjonowaniu DNA [4].

W ostatnich latach ukazał się szereg prac przeglądowych omawiających różne aspekty badań i zastosowań nanoporów [4–10]. Niniejsza praca omawia budowę i podstawowe właściwości nanoporów, a także podaje przykłady modeli teoretycznych, które pozwalają zrozumieć wyniki eksperymentalne dotyczące przepływu jonów i translokacji polimerów.

Rysunki przedstawione w niniejszej pracy zostały wykonane na podstawie symulacji komputerowych oraz wizualizacji wykonanych w grupie badawczej dynamiki procesów fizykochemicznych Wydziału Chemii UAM.

1. BUDOWA NANOPORÓW

1.1. NANOPORY BIAŁKOWE

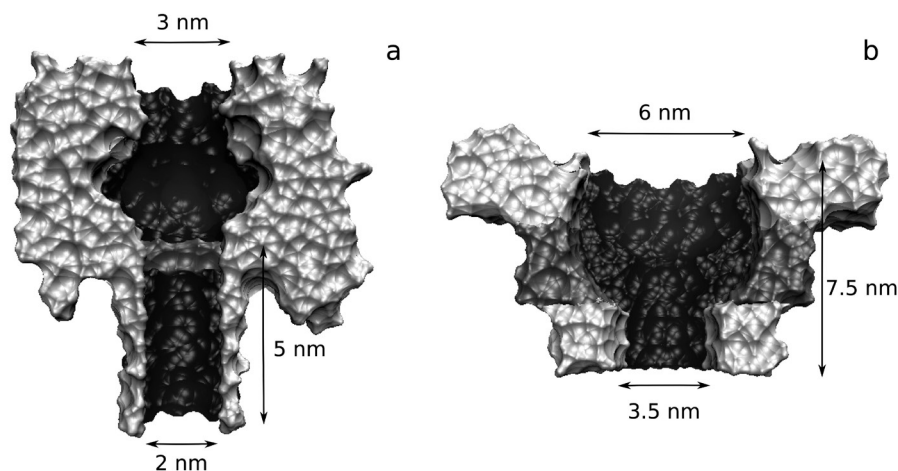
W organizmach żywych występuje wiele rodzajów białkowych nanoporów, regulujących przepływ jonów i cząsteczek do wewnątrz i na zewnątrz komórki. Odgrywają one kluczową rolę w komunikacji zarówno między komórkami, jak i poszczególnymi organellami. Aby nanopor białkowy mógł być stosowany w eksperymentach *in vitro* translokacji biopolimerów, musi spełniać szereg warunków. Po pierwsze, nanopor nie powinien wykazywać dużych fluktuacji prądu jonowego. Po drugie, wymiary nanoporu powinny być odpowiednie dla średnicy analizowanego biopolimeru, aby umożliwić jego translokację. Po trzecie, struktura nanoporu powinna być znana, co umożliwi modyfikacje bez utraty funkcjonalności.

Jeden z pierwszych eksperymentów ukazujących nanopory jako detektory translokacji pojedynczych cząsteczek został przeprowadzony w 1994 roku z użyciem alametycyny [2]. Do najczęściej badanych układów należą konektor phi29 [11] oraz, przede wszystkim, alfa-hemolizyna [1].

1.1.1. Alfa-hemolizyna

Alfa-hemolizyna jest naturalnym kompleksem białkowym wydzielanym przez bakterie *Staphylococcus aureus*. Cząsteczka hemolizyny umieszczona w dwuwarstwie lipidowej, tworzy stabilną strukturę o charakterystycznym, podobnym do grzyba kształcie (Rys. 1a). Cząsteczka hemolizyny składa się z siedmiu identycznych monomerów ułożonych symetrycznie, tworzących wewnątrz kanał o zmiennej średnicy od 1,4 do 4,6 nm. Kanał przebiegający wzdłuż całej cząsteczki, umożliwia przenikanie wody, jonów i niewielkich biocząsteczek. W organizmach żywych, wydzielane przez bakterie monomery alfa-hemolizyny tworzą kanał w błonie zaatakowanej komórki, powodując niekontrolowany przepływ substancji z i do jej wnętrza, doprowadzając w końcu do apoptozy [12].

Dla pH 7-9 i w stałej temperaturze natężenie prądu jonowego płynącego przez alfa-hemolizynę jest bardzo stabilne, np. dla 1M KCl i napięcia 120 mV wynosi ok. 120 pA, zaś wahania natężenia są poniżej 2% [13]. W roku 1996 Kasianowicz wraz ze współpracownikami [1] przeprowadzili pierwszy eksperyment translokacji jednoniciowego DNA oraz RNA przez nanopor utworzony przez alfa-hemolizynę umieszczoną w dwuwarstwie fosfolipidowej. Stwierdzono, iż pomiar prądu jonowego umożliwia wyznaczenie długości biopolimeru.



Rysunek 1. (a) Przekrój poprzeczny cząsteczki alfa-hemolizyny. (b) Przekrój poprzeczny cząsteczki konektora phi29

Figure 1. (a) Cross-section of the alpha-hemolysin molecule. (b) Cross-section of the phi29 connector molecule

1.1.2. Konektor phi29

Genomy wirusów znajdują się w białkowych otoczkach zwanych kapsydami. Do utworzenia kapsydu, a także do transportu DNA lub RNA do jego wnętrza potrzebna jest energia uzyskiwana z hydrolizy ATP. Transport odbywa się przez nanopor zwany konektorem phi29 [14].

Konektor phi29 (Rys. 1b), ma kształt stożka, składa się z 12 identycznych monomerów ułożonych symetrycznie wokół nanoporu o średnicy od 3,6 do 6,0 nm i długości ok. 7,5 nm. Powierzchnia cząsteczki w górnej i dolnej części jest hydrofilowa, pomiędzy nimi znajduje się pasmo hydrofobowe [15]. Po modyfikacji struktury w taki sposób, aby zwiększyć hydrofilowość jej górnej i dolnej części, możliwe staje się umieszczenie cząsteczki w dwuwarstwie lipidowej. Otrzymany w ten sposób układ wykazuje stabilną i powtarzalną przewodność [11]. Ze względu na większą średnicę nanoporu, możliwa jest translokacja większych cząsteczek niż przez alfa-hemolizynę, np. dwuniciowego DNA i niektórych białek.

1.2. NANOPORY SYNTETYCZNE

Wraz z postępowaniem w nanotechnologii, coraz większym zainteresowaniem cieszą się nanopory syntetyczne, które są bardziej odporne chemicznie, termicznie i mechanicznie niż nanopory białkowe a także mogą być stosowane w szerokim zakresie pH i napięcia. Metody produkcji nanoporów syntetycznych są wciąż udoskonalane, umożliwiając wytwarzanie na masową skalę nanoporów o różnej śred-

nicy, długości i kształcie (Rys. 2). Do najczęściej stosowanych materiałów należą: polimery, azotek krzemu (Si_3N_4), tlenki krzemu (SiO_2) i glinu (Al_2O_3), oraz – od niedawna – grafen.

1.2.1. Polimery

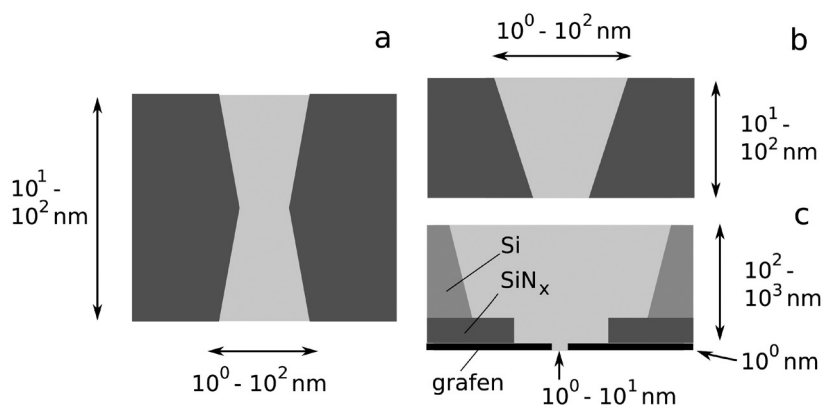
W materiałach polimerowych nanopory wytwarzane są metodą wytrawiania chemicznego. Najpierw membrana bombardowana jest ciężkimi jonami (najczęściej wykorzystywane pierwiastki to Xe, Pb, Au i U) o bardzo wysokiej energii (giga eV), co powoduje uszkodzenie jej powierzchni. Następnie membranę umieszcza się pomiędzy dwiema komorami z elektrodami, wypełnionymi odpowiednio roztworami: kwasu lub soli i silnej zasady. Pod wpływem prądu elektrycznego następuje żłobienie powierzchni membrany od strony zasady, a po przewierceniu jej na wylot następuje zetknięcie obu roztworów i ich zobojętnienie. W przypadku tereftalanu polietylenu [16] oraz poliwęglanu [17] stosowany jest słaby kwas i NaOH, w przypadku poliimidu [18] – KI i NaOCl.

1.2.2. Półprzewodniki

Nanopory w cienkich membranach z materiałów półprzewodnikowych wytwarzane są kilkoma metodami. Jedna z nich [19] polega na żłobieniu nanoporu w azotku krzemu za pomocą strumienia jonów Ar^+ o dużej energii (rzędu kilku keV). Pozwala ona na uzyskanie otworów o średnicy nawet 1,5 nm.

Wiercenie nanoporów w membranie może też nastąpić przy użyciu strumienia elektronów emitowanych przez TEM (elektronowy mikroskop transmisyjny). Metoda ta umożliwia uzyskanie otworów rzędu kilku nanometrów w cienkich i ultracienkich (nawet 10 nm [20]) membranach wykonanych z azotku krzemu, tlenku krzemu, tlenku glinu lub krzemu poddanego utlenieniu. Wytworzony nanopor ma kształt klepsydry lub dwóch połączonych stożków. Zaletą metody z wykorzystaniem TEM jest możliwość sprawdzania wymiarów nanoporu już w trakcie jego wytwarzania.

Do materiałów krzemowych stosuje się żłobienie i wytrawianie metodami chemicznymi [21].



Rysunek 2. Przykładowe kształty i rozmiary nanoporów syntetycznych. (a) Nanopor symetryczny w kształcie podwójnego stożka. (b) Nanopor asymetryczny o kształcie pojedynczego stożka. (c) Nanopor grafenowy

Figure 2. Examples of shapes and dimensions of synthetic nanopores. (a) Symmetric double-conical nanopore. (b) Asymmetric conical nanopore. (c) Graphene nanopore

1.2.3. Grafen

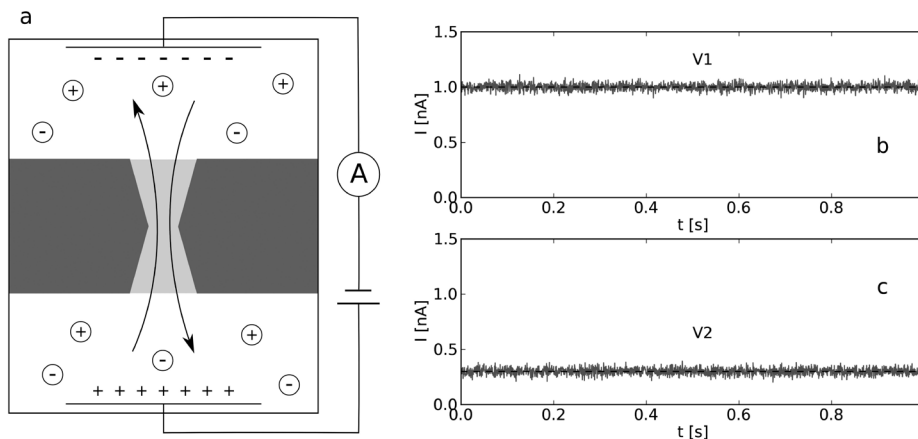
W ostatnich latach popularność zyskały nanopory w grafenie, ultracienkiej membranie o grubości jednego atomu (poniżej 1 nm). Metoda wytwarzania, użyta po raz pierwszy w roku 2008, polegała na umieszczeniu grafenu na membranach z azotku krzemu, a następnie wywierceniu w nich otworów przy pomocy TEM [22]. Uzyskane nanopory (o średnicy 2–25 nm) odznaczają się dużą wytrzymałością.

Nanopory grafenowe badane są głównie pod kątem możliwości wykorzystania w sekwencjonowaniu DNA, zwłaszcza, że grubość pojedynczej warstwy jest porównywalna z odległością między nukleotydami. Przeprowadzone dotychczas eksperymenty [23–25] wykazują jednak, że translokacja DNA następuje zbyt szybko, by możliwy był pomiar natężenia strumienia jonów dla pojedynczych nukleotydów i konieczne są dalsze modyfikacje, pozwalające na spowolnienie ruchu cząsteczki.

2. WŁAŚCIWOŚCI NANOPORÓW

2.1. PRĄD JONOWY

Jednym z najważniejszych parametrów nanoporu jest jego przewodność elektryczna. Nanopor umieszczony jest pomiędzy dwoma izolowanymi elektrycznie pojemnikami z elektrolitem, w każdym z nich umieszczona jest elektroda, np. Ag/AgCl (Rys. 3). Stężenie roztworu (np. KCl) jest dużo wyższe niż fizjologiczne, często rzędu 1 M.



Rysunek 3. (a) Schemat układu do pomiaru prądu jonowego w nanoporze podczas przepływu jonów pod wpływem przyłożonego napięcia. (b, c) Przykład sygnału rejestrowanego dla dwóch różnych napięć $V_1 > V_2$

Figure 3. (a) Scheme of a setup for measuring the ion current in a nanopore during ion flow under applied voltage. (b, c) Example of a signal registered for two different voltages $V_1 > V_2$

Mierzona zależność natężenia prądu od przyłożonego napięcia zależy od geometrii nanoporu, a ta z kolei – od sposobu jego wytworzenia. Nanopory półprzewodnikowe wykonane przy pomocy TEM wykazują liniową zależność natężenia od napięcia [20], obserwowaną dla szerokiego zakresu stężeń [26], co sugeruje, że badane nanopory są symetryczne. Na podstawie zależności przewodności od średnicy nanoporu stwierdzono, że ich kształt jest zbliżony do kształtu symetrycznego podwójnego stożka [27].

Przewodność nanoporów zależna jest także od ładunku powierzchniowego. Ładunek powierzchniowy nanoporów nieorganicznych jest stosunkowo niewielki, np. dla Si_3N_4 wynosi około $0,1 \text{ e/nm}^2$ [28]. Dla nanoporów z politereftalanu etylenu o niesymetrycznym kształcie pojedynczego stożka i powierzchniowym ładunku elektrycznym rzędu 1 e/nm^2 natężenie prądu wzrasta z napięciem w sposób nieliniowy, oraz preferowany jest ruch kationów w kierunku od wąskiej do szerokiej części nanoporu [16].

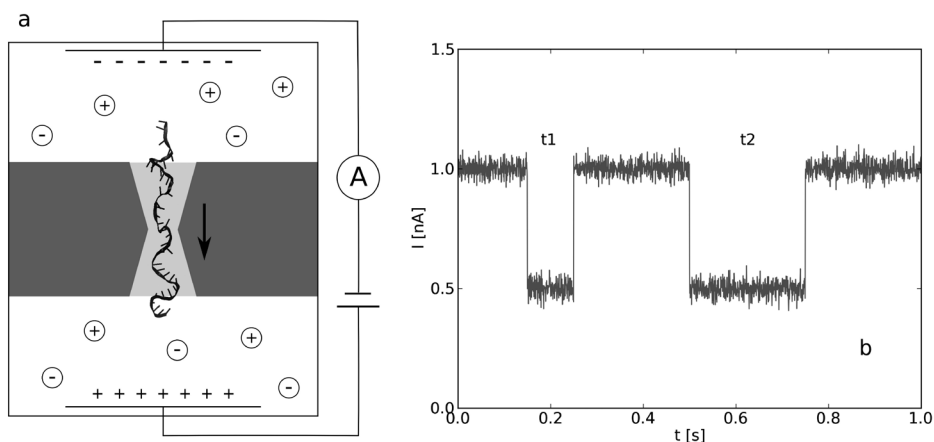
W przypadku azotku krzemu ściany nanoporu są naładowane ujemnie, co powoduje zmniejszenie ruchliwości kationów, szczególnie tych znajdujących się w pobliżu, dlatego też efekt ten jest szczególnie widoczny dla dużych stężeń roztworu [28]. Podobne zachowanie obserwowane jest dla nanoporów z tlenku krzemu [27]. W przeciwieństwie do materiałów krzemowych, ścianki nanoporów wykonanych z tlenku glinu naładowane są dodatnio, dlatego też powodują zmniejszenie ruchliwości jonów oraz spowolnienie ruchu cząsteczek obdarzonych ładunkiem ujemnym, jak np. DNA [29].

Ładunek powierzchniowy jest przyczyną selektywności nanoporów polimerowych: w przypadku ładunku ujemnego, kationy oddziałują ze ściankami nanoporu

i mierzony prąd dla napięć ujemnych (anoda umieszczona po stronie szerszego ujęcia nanoporu) jest większy niż dla dodatnich (anoda umieszczona po stronie węższego ujęcia nanoporu). Jeżeli jednak użyte zostaną kationy wielowartościowe, np. Ca^{2+} lub Co^{3+} , w wyniku oddziaływań przyciągających ze ściankami nanoporu może ich być w jego wnętrzu na tyle dużo, że całkowity lokalny ładunek stanie się dodatni (tzw. inwersja ładunku) i mierzony prąd będzie przyjmował większe wartości dla napięć dodatnich [30].

2.2. TRANSLOKACJA BIOPOLIMERÓW

Nanopory, ze względu na swoją niewielką średnicę, umożliwiają badanie przemieszczających się przez nie pojedynczych cząsteczek. W typowym eksperymencie do membrany z nanoporem, rozdzielającej dwie komory, za pomocą pary elektrod przykładane jest napięcie elektryczne. Ponieważ w komorach znajduje się elektrolit o wysokiej sile jonowej, nawet niewielkie napięcie rzędu 0,1 V wiąże się z powstaniem w nanoporze silnego pola elektrycznego, które powoduje translokację cząsteczki przez otwór. Jeśli w nanoporze znajduje się biopolimer, blokuje on częściowo przepływ jonów, co jest widoczne na otrzymanej trajektorii natężenia prądu jonowego (Rys. 4). Analiza rozkładu czasu, przez jaki cząsteczki blokowały nanopor, pozwala na uzyskanie informacji o ich strukturze [1].



Rysunek 4. (a) Schemat układu do pomiaru prądu jonowego w nanoporze podczas translokacji polimeru pod wpływem napięcia. (b) Przykład rejestrowanego sygnału

Figure 4. (a) Scheme of a setup for measuring the ion current in a nanopore during polymer translocation under applied voltage. (b, c) Example of the registered signal

Eksperymenty z zastosowaniem nanoporów dotyczyły translokacji między innymi: glikolu polietylenowego [2], jonów metali [30], związków kompleksowych [31] a przede wszystkim polinukleotydów [1] i polipeptydów [32].

Kinetyka translokacji biopolimeru zależy od wielu czynników. Szybkość translokacji zwiększa się wraz ze wzrostem średnicy nanoporu, jednak nie w sposób liniowy, lecz logarytmiczny. Oznacza to, że ruch cząsteczki spowalniany jest, oprócz lepkości, także przez oddziaływania ze ściankami nanoporu [33]. Im dłuższy biopolimer, tym dłuższy czas przebywania w nanoporze. Zależność ta również ma charakter logarytmiczny, co również wiąże się z oddziaływaniami cząsteczka – ścianki nanoporu. W przypadku długich łańcuchów wpływ mają także siły działające na zewnątrz nanoporu, zarówno pomiędzy fragmentami polimeru jak i między anionem a membraną [33]. Kluczowa rola oddziaływań międzycząsteczkowych potwierdzona została również eksperymentami przeprowadzonymi dla różnych temperatur, które wykazały, że czas translokacji zmienia się w inny sposób niż wynikałoby to jedynie ze zmian lepkości rozpuszczalnika [33].

Innym ważnym czynnikiem wpływającym na szybkość translokacji jest stężenie elektrolitu. Dzieje się tak w wyniku oddziaływań biopolimeru posiadającego ładunek z jonami o przeciwnym znaku. Na przykład w przypadku DNA o ładunku ujemnym, pole elektryczne wywołujące jego ruch przez nanopor jednocześnie powoduje przepływ kationów w kierunku przeciwnym, co spowalnia translokację. Tak więc wypadkowa szybkość translokacji rośnie wraz ze wzrostem stężenia elektrolitu, jednak efekt ten jest łagodzony przez obecność oddziaływań z poruszającymi się przeciwnie jonami, powodującymi zmniejszenie efektywnego pola elektrycznego [34].

Do najczęściej badanych polimerów organicznych należy glikol polietylenowy (PEG), ze względu na swoje wymiary: średnica cząsteczki umożliwia jej translokację przez alfa-hemolizynę [35, 36]. Po wprowadzeniu PEG do układu, wartości przewodności zmalały, a zmierzona amplituda szumu wzrosła, co świadczy o interakcji cząsteczek PEG z nanoporem [2]. W przypadku alfa-hemolizyny zaobserwowano, że czas przebywania cząsteczki polimeru w nanoporze rośnie wraz z jej długością, od pewnego momentu jednak zaczyna maleć, co powiązano z oddziaływaniem wywieranym przez znajdującą się na zewnątrz częśćią molekuly [35].

Ponieważ średnica nanoporów białkowych umożliwia jedynie translokację polipeptydów i białek po denaturacji, stosowane są głównie nanopory syntetyczne. Za ich pomocą zmierzono objętość między innymi surowiczej albuminy wołowej, owoalbuminy, awidyny, streptawidyny i gonadotropiny kosmówkowej [32], [37]. Możliwe jest także wyznaczenie ładunku, jaki posiada cząsteczka białka, np. w zależności od pH roztworu [38]. Ponieważ objętość molekuly przyjmuje różne wartości dla stanu natywnego, częściowo i całkowicie rozplecionego, można rozróżnić poszczególne konformacje [39]. Za pomocą nanoporów wyznaczana jest także liczba ligandów przyłączonych do cząsteczki białka oraz stała dysocjacji takiego wiązania. Przeprowadza się w tym celu pomiary dla białek przed i po dodaniu ligandu, a z nich możliwe jest wyznaczenie objętości białka lub kompleksu oraz ich stężenia [40].

W ostatnich latach przeprowadzane są eksperymenty translokacji DNA przez nanopor. Pierwsze wyniki, dla alfa-hemolizyny, zostały opublikowane w 1996 roku

przez zespół Kasianowicza [1]. Zaobserwowano, że liczba skokowych spadków natężenia prądu (blokad) rosła wraz ze stężeniem DNA w roztworze, czas blokady nanoporu był proporcjonalny do długości badanej cząsteczki, a amplituda prądu jonowego zależała od rodzaju nukleotydów, z których zbudowany był biopolimer [1]. W przypadku nanoporów syntetycznych, po odpowiednim dobraniu średnicy otworu, możliwe jest badanie zarówno jedno- jak i dwuniciowego DNA. W obu przypadkach kinetyka translokacji zależy od przyłożonego napięcia, długości i konformacji fragmentu DNA [41].

2.3. NANOPOROWA SPEKTROSKOPIA SIŁ

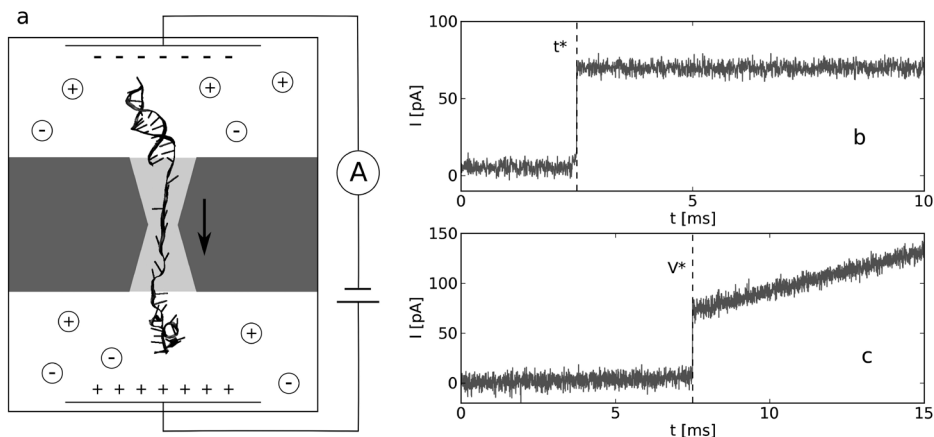
Spektroskopia sił polega na badaniu zachowania biocząsteczek pod wpływem działania zewnętrznej siły. Zaletą nanoporowej spektroskopii sił (NFS) jest możliwość przeprowadzania eksperymentu bez uprzedniego poddawania analitu chemicznym modyfikacjom ani unieruchamiania go, jak to ma miejsce w atomowej spektroskopii sił AFM.

NFS umożliwia badanie cząsteczek, które składają się z dwóch części o różnej średnicy, przy czym tylko węższa może przemieścić się przez nanopor. Ponieważ szersza część nie może przedostać się przez nanopor, powstają naprężenia mechaniczne pomiędzy obiema częściami molekuly, które mogą doprowadzić do zmiany struktury np. do rozpadu kompleksu DNA-białko lub rozplecenia spinki DNA.

Układ pomiarowy jest podobny jak układu stosowanego w przypadku translokacji biopolimeru. Eksperymenty nanoporowej spektroskopii sił przeprowadzane są na dwa sposoby [42]. Po przyłożeniu niewielkiego napięcia początkowego obserwuje się przepływ prądu jonowego i oczekuje się na moment skokowego spadku prądu (blokady), świadczącym o tym, że jakaś cząsteczka dostała się do wnętrza nanoporu. Następnie, przykłada się albo zwiększone napięcie o stałej wartości (rzędu kilkudziesięciu do kilkuset mV), lub też przykłada się napięcie rosnące liniowo (1–10 V/s). Mierząc prąd oczekuje się na zdarzenie polegające na skokowym wzroście prądu (Rys. 5), co jest interpretowane jako odblokowanie nanoporu np. w wyniku dysocjacji kompleksu, którego jeden fragment opuszcza nanopor. Rejestrowany jest czas blokady nanoporu (rzędu ms) lub wartość napięcia krytycznego (rzędu 10^2 mV), przy którym nastąpił skokowy wzrost prądu. Po zajściu zdarzenia napięcie jest obniżane do czasu, aż nastąpi blokada nanoporu przez kolejną cząsteczkę. W eksperymencie rejestruje się wiele (np. kilkaset) zdarzeń, a uzyskane wartości czasów blokady lub napięć krytycznych poddawane są dalszej analizie [42].

Do najczęściej badanych układów należą kompleksy DNA z białkami [32] oraz spinki DNA [43] w nanoporach zarówno syntetycznych, jak i alfa-hemolizynie. DNA używane jest nie tylko ze względu na jego ważną rolę w biologii i biotechnologii, ale też znaczny ładunek ujemny, który ułatwia jego umieszczenie w polu elektrycznym nanoporu. W zależności od badanego układu, odpowiednio dobierana jest średnica otworu. Dla kompleksów DNA z enzymami jest to ok. 3,0 nm, ponieważ średnica

jest na tyle duża, aby mogło się przemieścić dwuniciowe DNA, a jednocześnie zbyt mała aby przepuścić część białkową. W przypadku badania spinek DNA średnica nanoporu to ok. 2,0 nm, co pozwala na translokacje pojedynczej nici DNA, a jednocześnie zatrzymuje np. podwójną helisę [43].



Rysunek 5. (a) Schemat układu do pomiaru prądu jonowego w nanoporze podczas rozplatania spinki DNA pod wpływem napięcia. (b) Przykład sygnału rejestrowanego dla stałego napięcia. (c) Przykład sygnału rejestrowanego dla rosnącego liniowo napięcia

Figure 5. (a) Scheme of a setup for measuring the ion current in a nanopore during hairpin DNA unzipping under applied voltage. (b) Example of a signal measured under constant voltage. (c) Example of a signal measured under voltage ramp

Kompleksy DNA z enzymami badane są ze względu na potencjalne zastosowania w wykrywaniu mutacji DNA. Przykładem mogą być dwa enzymy restrykcyjne: EcoRI (wyzolowana z *E. coli*) oraz BamHI (wyzolowana z *Bacillus amyloliquefaciens*), rozcinające DNA w miejscach o określonej sekwencji nukleotydów w obecności jonów Mg^{2+} . Kompleks enzymu z DNA dysocjuje w nanoporze, jeśli napięcie jest odpowiednio wysokie. Wykazano, że wartość napięcia krytycznego zależy od zastosowanego enzymu [44] oraz jest silnie skorelowana z sekwencją nukleotydów, nawet pojedyncza mutacja powoduje jej obniżenie [44, 45].

Rozplatanie DNA ma miejsce podczas licznych procesów biologicznych, takich jak np. replikacja DNA, transkrypcja i interferencja RNA. Eksperymenty nanoporowej spektroskopii sił pomagają określić mechanizm tego typu procesów. W roku 2003 przeprowadzono pierwszy eksperyment z użyciem alfa-hemolizyny oraz dwuniciowego DNA [43]. Zaobserwowano, że dwuniciowego DNA ulega rozpleceniu i tylko jedna z nici przemieściła się przez nanopor. Eksperymenty przeprowadzone dla trzech różnych struktur spinek DNA i dla szerokiego zakresu napięć wykazały, że rozkład czasów rozplatania można opisać funkcją wykładniczą, co wskazuje na kinetykę reakcji pierwszego rzędu dla procesu rozplatania [46]. W badaniach z nanoporami syntetycznymi można określić wpływ średnicy otworu na kinetykę procesu. Poniżej średnicy 1,0 nm translokacja nie następuje, a dla szerszych nano-

porów rozplatanie następuje powyżej napięcia krytycznego. Jeżeli średnica wynosi więcej niż około 1,5 nm, wartość napięcia krytycznego rośnie, co zinterpretowano jako translokację zniekształconej helisy, kiedy przez nanopor przemieszczają się obie nici jednocześnie [47].

3. MODELE NANOPORÓW

3.1. METODY MODELOWANIA

Modele nanoporów można podzielić na modele fenomenologiczne, które nie uwzględniają struktury molekularnej nanoporu, elektrolitu i membrany oraz modele molekularne uwzględniające dyskretny charakter jonów, atomów i molekuł tworzących układ nanoporowy. Wśród modeli fenomenologicznych można wyróżnić modele stochastyczne stosowane do opisu losowych rozkładów czasu blokady i napięcia krytycznego w nanoporowej spektroskopii sił oraz modele ciągłe wykorzystując równania makroskopowe Poissona, Boltzmana i Nernsta dla obliczenia (zwykle numerycznego) przestrzennego rozkładu potencjału, gęstości ładunku, natężenia prądu jonowego, selektywności i innych wielkości charakteryzujących nanopor. Modele molekularne opisują układ na różnych poziomach szczegółowości: pełnym (ang. *all-atom*) lub uproszczonym (ang. *coarse-grained*), wykorzystując symulacje komputerowe dynamiki molekularnej do wyznaczenia właściwości nanoporów. Metoda dynamiki molekularnej może być zastosowana w przypadkach gdy opis za pomocą równań makroskopowych jest nieadekwatny, np. dla bardzo wąskich nanoporów [48].

3.1.1. Modele stochastyczne

Modele stochastyczne opisują translokacje i rozplatanie polimeru w nanoporze jako błądzenie przypadkowe lub dyfuzję po powierzchni energii swobodnej. Najpierw definiowana jest dyskretna (lub ciągła) współrzędna translokacji lub rozplatania i konstruowana jest powierzchnia potencjału średniej siły U uwzględniająca obecność (stałego lub zmiennego) potencjału zewnętrznego. Współrzędną procesu może być np. liczba nukleotydów po stronie *trans* nanoporu lub liczba rozplecionych par nukleotydów. Dla dyskretnej współrzędnej m losowy skok w kroku czasowym Δt do wartości $m+1$ lub $m-1$ następuje zgodnie ze stosowaniem dobranymi stałymi szybkości $k_+(m)$ i $k_-(m)$, zależnymi od wartości potencjału średniej siły $U(m-1)$, $U(m)$, $U(m+1)$ [49, 50]. Dla ciągłej współrzędnej x , wartość w momencie $t + \Delta t$ obliczana jest zgodnie z równaniem:

$$x(t + \Delta t) = x(t) - \beta D \frac{\partial U(x, t)}{\partial x} \Delta t + r \sqrt{2D\Delta t} \quad (1)$$

gdzie $\beta = 1/kT$ jest odwrotnością iloczynu stałej Boltzmanna k i temperatury T , D oznacza współczynnik dyfuzji, a R liczbę losową z rozkładu normalnego [42]. Z teoretycznego punktu widzenia translokacja i rozplatanie polimerów przedstawiają problem czasu pierwszego przejścia, gdy proces wychodzi w momencie $t = 0$ z punktu m_0 (lub x_0) i w losowym czasie T osiąga współrzędną m_f (lub x_f) oznaczającą pełną translokację lub rozplecenie.

Modele stochastyczne są stosunkowo proste i dlatego czas obliczeń jest dużo krótszy niż np. w symulacjach dynamiki molekularnej. Modele te pozwalają na wyjaśnienie i przewidywanie niektórych wartości eksperymentalnych, jednak ilość dostarczanych informacji jest ograniczona.

3.1.2. Modele ciągłe

W modelach ciągłych roztwór elektrolitu, ścianki nanoporu oraz membrana przedstawione są jako ośrodki ciągłe, charakteryzujące się określoną względną przenikalnością elektryczną $\varepsilon(r)$, różną w różnych punktach r ośrodka. Jony w roztworze opisane są za pomocą gęstości ładunku elektrycznego ρ . Równanie Poissona:

$$\varepsilon_0 \nabla \cdot (\varepsilon(r) \nabla \varphi(r)) = -(\rho_p + \rho_e) \quad (2)$$

wiąże wartość potencjału φ elektrycznego w punkcie r z gęstością ładunku $\rho = \rho_p + \rho_e$. Indeks p odnosi się do nanoporu, indeks e do elektrolitu, a ε_0 oznacza przenikalność elektryczną próżni. Równanie Poissona pozwala wyznaczyć rozkład potencjału φ jeśli dany jest rozkład ładunku ρ (Rys. 6a,b). W roztworze elektrolitu rozkład gęstości jonów w stanie równowagi można opisać za pomocą równania Boltzmanna:

$$\rho_e = \sum_i z_i e n_{0i} \exp(-z_i e \varphi(r)/kT) \quad (3)$$

Połączenie obu równań daje równanie Poissona-Boltzmann (PB), które dla elektrolitu typu z:z przyjmuje postać:

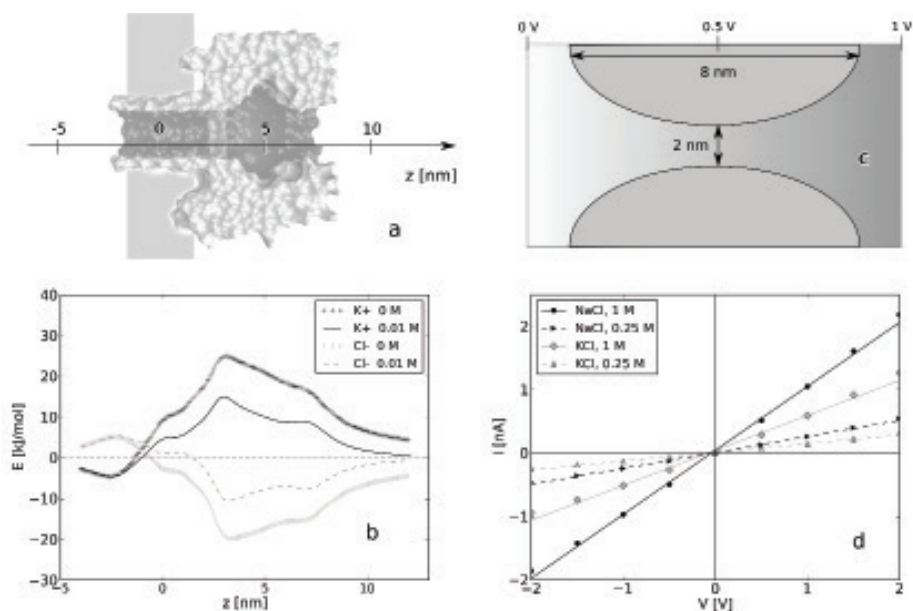
$$\varepsilon_0 \nabla \cdot (\varepsilon(r) \nabla \varphi(r)) = 2ezn_0 \sinh[ze\varphi(r)/kT] - \rho_e \quad (4)$$

gdzie n_0 oznacza gęstość liczbową jonów, a z ich ładunek, k to stała Boltzmanna, a T – temperatura.

Równanie PB opisuje rozkład potencjału φ w stanie równowagi. Jeśli interesuje nas przepływ jonów (Rys. 6c,d) to równanie Nernsta-Plancka:

$$J_i = -D_i \left(\nabla n_i + \frac{z_i e n_i}{kT} \nabla \varphi \right) \quad (5)$$

wiąże strumień J_i dla jonu i z gradientem stężenia n_i oraz z gradientem potencjału φ . D_i jest współczynnikiem dyfuzji jonu i . Połączenie równania Poissona z równaniem Nernsta-Plancka daje równanie Poissona-Nernsta-Plancka (PNP).



Rysunek 6. Przykłady symulacji typu PB/PNP. (a) Model alfa-hemolizyny umieszczonej w membranie lipidowej używany w symulacjach PNP. (b) Obliczona energia oddziaływań elektrostatycznych różnych jonów w alfa-hemolizynie. (c) Model symetrycznego nanoporu używany w symulacjach PNP przepływu jonów. (d) Zależność natężenia prądu jonowego od napięcia dla różnych stężeń i różnych elektrolitów

Figure 6. Examples of PB/PNP simulations. (a) A model of alpha-hemolysin in a lipid membrane used in PNP simulations. (b) The calculated electrostatic energy for different ions in alpha-hemolysin. (c) A model of symmetric nanopore used in PNP simulations of ion flow. (d) An ionic current as a function of an applied voltage for different concentrations and electrolytes

Równania BP i PNP sprawdzają się tylko dla szerokich nanoporów [48]. Dla nanoporów o małych średnicach znacznie zawyżony jest wpływ ekranowania kationów przez aniony i anionów przez kationy, który w rzeczywistości z powodów sterycznych jest znacznie ograniczony. Dla szerokich nanoporów i niskich stężeń oddziaływania jonów ze ściankami nanoporu i między sobą są na tyle niewielkie, że nie wpływają znacząco na wynik. Zaletą metody jest prostota i co za tym idzie krótki czas trwania obliczeń. Wśród programów typu *freeware* służących do symulacji PB/ PNP można wymienić m.in.: 3DPNPSolver [51], APBS [52] oraz PBPNP [53].

3.1.3. Dynamika molekularna

Symulacje komputerowe metodą dynamiki molekularnej wykorzystują opis nanoporów, który uwzględnia istnienie dyskretnych atomów, jonów i cząsteczek. W przypadku dużych układów stosowane są uproszczenia np. tzw. modele ziarniste (ang. *coarse-grained*), w których grupy atomów modelowane są jako jedna cząstka.

W symulacji dynamiki molekularnej trajektorie ruchu poszczególnych atomów oblicza się na podstawie równania Newtona:

$$m_i \ddot{r}_i = -\nabla_i U(\{r_i\}) \quad (6)$$

w którym i to numer cząstki, m jej masa, r położenie. Prawa strona równania (6) przedstawia całkowitą siłę działającą na atom i . W każdym kroku czasowym na podstawie położenia atomów obliczany jest potencjał układu, a z niego, poprzez rozwiązanie równań Newtona (6), nowe położenia atomów. W symulacjach dynamiki molekularnej korzysta się z pól siłowych definiujących ładunki cząstkowe, odległości, kąty i energię wiązań. Oddziaływania niewiążące definiowane są jako suma oddziaływań Coulombowskich i Lennarda-Jonesa. Istnieje szereg programów służących do symulacji dynamiki molekularnej, komercyjnych i typu *freeware*. Z tej ostatniej grupy najpopularniejsze są NAMD [54] i GROMACS [55].

Dynamika brownowska stanowi opis pośredni między modelami ciągłymi a pełną dynamiką molekularną. Jony, ścianki nanoporu i ewentualne inne cząstki znajdujące się wewnątrz nanoporu opisane są jako indywidua o określonej masie, ładunku i położeniu w przestrzeni, natomiast rozpuszczalnik zdefiniowany jest modelem ciągłym. Ruch jonu o masie m , prędkości v i ładunku q jest opisany równaniem Langevina:

$$m \frac{dv}{dt} = -\gamma v + qE + R \quad (7)$$

gdzie γ oznacza współczynnik tarcia, E jest sumą oddziaływań elektrostatycznych działających na jon pochodzących od innych jonów, ścianek nanoporu i przyłożonego napięcia, R opisuje losowe siły działające na jon, przede wszystkim w wyniku zderzeń z rozpuszczalnikiem. Czas trwania obliczeń jest znacznie krótszy niż w pełnej dynamice molekularnej. Do wad metody należą trudności ze zdefiniowaniem oddziaływań w układach o małej średnicy i wysokim ładunku. Ponadto nie są uwzględnione fluktuacje położenia atomów tworzących ścianki nanoporu. Wyniki uzyskane z symulacji metodą dynamiki brownowskiej, w których duże cząsteczki o złożonej strukturze drugorzędowej nie są nieruchome, mogą odbiegać od spodziewanych [56].

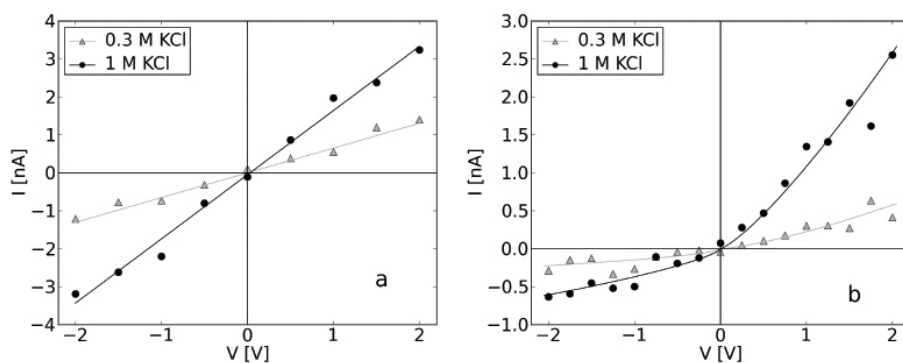
Symulacje dynamiki brownowskiej można przeprowadzać zarówno przy użyciu pakietów do dynamiki molekularnej, np. GROMACS, NAMD, jak i za pomocą programów specjalnie do tego typu symulacji przeznaczonych, np. BD_BOX [57] i GCMC/BD [58].

3.2. PRĄD JONOWY

W celu lepszego wyjaśnienia zjawiska selektywności nanoporów oraz zmian natężenia strumienia jonów dla układów o różnej geometrii przeprowadzane są symulacje różnych typów. Obliczenia oparte na równaniach PNP pozwalają na opis

asymetrycznej zależności prądu jonowego od napięcia w nanoporach o kształcie stożka [59] a także wpływu długości nanoporu i napięcia na selektywność jonów [60]. Symulacje Monte Carlo dostarczają więcej szczegółów na temat mechanizmów obu zjawisk. Za ich pomocą pokazano m.in. w jaki sposób selektywność nanoporu zależy od jego średnicy i stałej dielektrycznej [61]. Symulacje dynamiki Browna przepływu jonów przez alfa-hemolizynę dają wyniki porównywalne z wartościami eksperymentalnymi, wartości przewodności uzyskane z modelu PNP są jednak zawyżone [62].

Symulacje dynamiki molekularnej dostarczają najwięcej informacji o przepływie elektrolitu przez nanopory, trajektoriach jonów i ich oddziaływaniach z innymi jonami, rozpuszczalnikiem i ściankami nanoporu. Symulacje dynamiki molekularnej posłużyły np. do opisu właściwości nanoporu – alfa-hemolizyny umieszczonej w dwuwarstwie lipidowej [63]. Zbadana została selektywność w zależności od przyłożonego napięcia, opracowane zostały także mapy potencjału elektrostatycznego. W innej pracy wykazano, że uproszczenie układu, poprzez pozostawienie jedynie trzonu alfa-hemolizyny i zastąpienie błony lipidowej unieruchomioną warstwą metanu umożliwia uzyskanie wyników zbliżonych do wartości eksperymentalnych przy jednoczesnym znacznym skróceniu czasu obliczeń [64].



Rysunek 7. Przykładowe wykresy zależności natężenia prądu jonowego od napięcia dla nanoporu (a) symetrycznego (średnica 2,2 nm) (b) asymetrycznego (1,3 nm) wydrążonego w azotku krzemu, uzyskane w symulacjach dynamiki molekularnej w programie NAMD

Figure 7. Examples of an ionic current as a function of an applied voltage for (a) a symmetric (2,2 nm diameter) and (b) an asymmetric (1,3 nm) nanopore cut in silicon nitride, obtained from MD simulations in AMD

W przypadku nanoporów wykonanych z substancji nieorganicznych kształt krzywych natężenie – napięcie zależy nie tylko od geometrii układu (Rys. 7) i materiału, w którym nanopory zostały utworzone, lecz także struktury materiału. W symulacjach dynamiki molekularnej, zarówno podczas przepływu jonów przez cylindryczne kanały wytworzone z krzemionce krystalicznej jak i amorficznej, zaobserwowano asymetrię wykresu zależności prądu jonowego od przyłożonego napię-

cia, malejącą wraz ze wzrostem szerokości nanoporu. Dla stopionej krzemionki, ponieważ ścianki nanoporu są gładkie, asymetria nie występuje [65].

Model nanoporu utworzonego w materiale polimerowym powstał stosunkowo niedawno [66], ponieważ trudnym zagadnieniem było odtworzenie struktury ścianek nanoporu, będącej istotnym czynnikiem określającym właściwości transportowe. Model ten został opracowany w celu wyjaśnienia zjawisk zachodzących w nanoporach asymetrycznych, na przykładzie politereftalanu etylenu. Symulacje dynamiki molekularnej wykazały, że pH, a co za tym idzie, stopień sprotonowania grup karboksylowych polimeru wpływa na selektywność nanoporu. Selektywność występuje tylko wtedy, gdy pH jest na tyle wysokie, że następuje dysocjacja protonów z grup karboksylowych. Zaobserwowano także, że w przypadku obecności w układzie kationów wapnia, ich powinowactwo do ścianek nanoporu jest wyższe niż kationów potasu, co pomaga w wyjaśnieniu mechanizmu zjawiska inwersji ładunku [66].

3.3. TRANSLOKACJA BIOPOLIMERÓW

Aby dokładniej zrozumieć mechanizmy procesów, którym podlegają biomolekuły w nanoporach, konieczne jest opracowanie modeli teoretycznych, opisujących w szczególności oddziaływania pomiędzy poszczególnymi składnikami układu. Dzięki takim modelom możliwe jest też opracowanie lepszych metod detekcji cząsteczek i manipulacji nimi.

Jeden z modeli, oparty o równania Poissona-Nernsta-Plancka, zakłada, że w obecności cząsteczki polimeru, np. glikolu polietylenowego w nanoporze następuje spadek prądu jonowego poprzez zmniejszenie ilości jonów w nanoporze z przyczyn sterycznych oraz w wyniku oddziaływań z analitem – ujemnie naładowana biocząsteczka powoduje zmniejszenie ruchliwości kationów. Model ten pozwala na wyznaczenie wartości spadku prądu jonowego oraz czasu blokady w zależności od przyłożonego napięcia oraz stężenia elektrolitu. Możliwe jest także obliczenie energii oddziaływania jonu z cząsteczką polimeru [67].

Symulacje przeprowadzone dla polipeptydów, opisujące ich translokację na poziomie ruchu po powierzchni potencjału, wykazały, że bariera energetyczna w przypadku molekuł pozbawionych struktury drugorzędowej jest bardzo niska, odpowiadająca sile 2–6 pN. Możliwe jest także wyznaczenie zależności oddziaływań analitu z nanoporem w zależności od jego średnicy. Symulacje pozwoliły również na zbadanie mechanizmu rozplatania w nanoporze bardziej złożonych struktur [68].

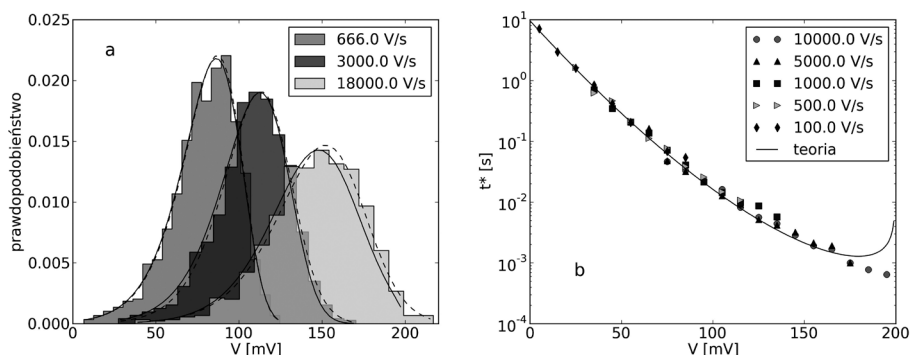
Do najczęściej badanych struktur należą polinukleotydy. Porównane zostały np. wyniki symulacji dynamiki molekularnej według modelu uwzględniającego wszystkie atomy, w tym rozpuszczalnika, oraz symulacji dynamiki Browna, w których rozpuszczalnik jest obecny jedynie jako uproszczony model, co pozwala na znaczne skrócenie czasu obliczeń. Badanym układem była para zasad wewnątrz nanoporu, poddana działaniu pola elektrycznego. Stwierdzono, że rozkład jonów

wokół nukleotydów oraz prąd jonowy wyznaczone obiema metodami są zbliżone i zgodne z wartościami eksperymentalnymi, a uzyskane wyniki mogą ułatwić interpretację danych doświadczalnych [69].

W celu obliczenia pól elektrostatycznych powstałych w membranie półprzewodnikowej zanurzonej w roztworze elektrolitu, następnie zbadania ich wpływu na translokację polimeru, użyto dwóch modeli. W równaniach Poissona wyznaczono charakterystykę pól elektrostatycznych i rozkład jonów w układzie, a następnie za pomocą dynamiki Browna modelowano translokację polimeru. Wykazano, że membrana złożona z naprzemiennie naładowanych warstw półprzewodnika umożliwia kontrolę ruchu polinukleotydu, co może znaleźć potencjalne zastosowanie w sekwencjonowaniu DNA [70].

3.4. NANOPOROWA SPEKTROSKOPIA SIŁ

Nanoporowa spektroskopia sił (NFS) dostarcza informacje o strukturze, dynamice i oddziaływaniach na poziomie pojedynczych cząsteczek.



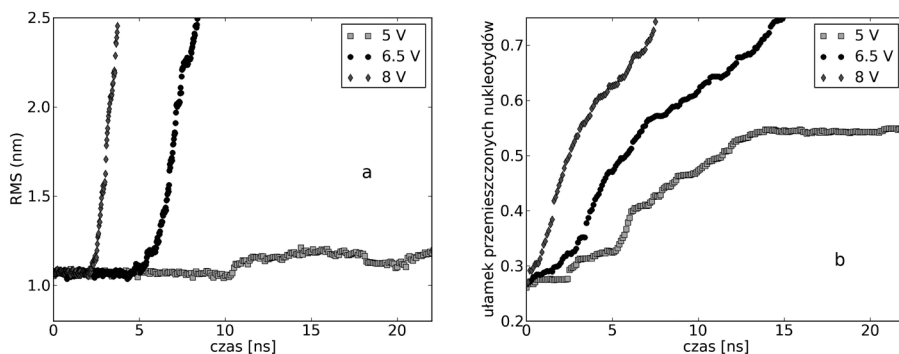
Rysunek 8. Przykład analizy danych uzyskanych z symulacji rozplatania spinki DNA w nanoporze. (a) Histogramy napięć rozplecenia, krzywe teoretyczne (linie ciągłe) i dopasowania (linie przerywane). (b) Histogramy napięć rozplecenia przekształcone do histogramów czasów rozplecenia

Figure 8. An exemplary analysis of data obtained from hairpin DNA unzipping in a nanopore. (a) Unzipping voltage histograms, theoretical curves (solid lines) and fits (dotted lines). (b) Unzipping voltage histograms transformed to unzipping time histograms

Do wyznaczania parametrów kinetycznych z eksperymentów spektroskopii sił stosowano modele stochastyczne. Jeżeli eksperyment prowadzony jest przy stałym napięciu, otrzymuje się zestaw czasów potrzebnych na dysocjację kompleksu lub rozplecenie spinki. W przypadku eksperymentów przy rosnącym liniowo napięciu, uzyskiwane są wartości napięcia rozplecenia (Rys. 8). Opracowany został model umożliwiający uzyskanie parametrów kinetycznych (czas życia układu, położenie maksimum bariery energetycznej oraz jej wysokość) z obu typów eksperymentów [42]. Model ten zakłada, że pod wpływem przyłożonego napięcia następuje nie-

odwracalna przemiana w układzie, polegająca na przekroczeniu przez cząsteczkę bariery energetycznej w maksimum powierzchni energii średniej siły. Im większe jest przyłożone napięcie, tym bariera jest niższa.

Inny model pozwala na oszacowanie czasów translokacji spinek DNA o różnej strukturze. Na podstawie wyników eksperymentalnych skonstruowany został model powierzchni potencjału, zależny od sekwencji par zasad, opisany dwoma parametrami: ładunkiem efektywnym przypadającym na jedną parę nukleotydów, oraz stałą szybkości określającą szybkość translokacji cząsteczki. Wyznaczone czasy translokacji są zbieżne z wartościami eksperymentalnymi, możliwe jest także obliczenie czasów dla nowych struktur [49]. Symulacje z zastosowaniem algorytmu błędzenia losowego traktują rozplatanie DNA jako ruch po powierzchni potencjału zależny od siły zmieniającej się w czasie, w trakcie którego dysocjacji ulegają kolejne pary zasad. Wykazano w ten sposób, że na rozplatanie wpływają fluktuacje termiczne. Stwierdzono także, że czas translokacji nie zawsze wzrasta wraz ze stabilnością podwójnej helisy [50].



Rysunek 9. Wyniki przykładowych symulacji dynamiki molekularnej rozplatania spinki DNA w nanoporze o średnicy 1,3 nm. (a) Zmiana średniej odległości (RMS) między atomami C1' sparowanych zasad w czasie. (b) Zależność liczby nukleotydów znajdujących się poniżej przewężenia nanoporu od czasu. Dla 8 V i 6,5 V następuje całkowite rozplecenie spinki. Napięcie 5 V jest zbyt niskie, aby rozplecenie można było zaobserwować w czasie 25 ns

Figure 9. Results of sample MD simulations of hairpin DNA unzipping in 1,3-diameter nanopore. (a) An average distance (RMS) between C1' atoms of paired bases as a function of time. (b) The number of nucleotides below nanopore constriction as a function of time. For 8 V and 6,5 V hairpin unzips completely. The 5 V voltage is too low to observe unzipping during 25 ns

Symulacje dynamiki molekularnej dostarczają informacji niemożliwych do uzyskania eksperymentalnie. Pozwalają oszacować, w jaki sposób analit oddziałuje z nanoporem, jaką przyjmie konformację, a także w jakiej kolejności mogą nastąpić poszczególne przemiany (Rys. 9). Symulacje takie pozwoliły na odtworzenie wyników eksperymentu dysocjacji kompleksu enzym-DNA w nanoporze. Stwierdzono także, że enzym znajduje się na zewnątrz nanoporu, a geometria układu znacznie odbiega od równowagowej. Zidentyfikowane także zostały pary zasad najmocniej wiążące się z cząsteczką enzymu [4]. Przeprowadzone zostały również symulacje

rozplatania spinki DNA. Potwierdziły one hipotezy dotyczące konfiguracji analitu w zależności od szerokości nanoporu. Im średnica nanoporu większa, tym większe prawdopodobieństwo, że spinka zamiast rozpleceniu ulegnie tylko zniekształceniu i obie nici jednocześnie ulegną translokacji. Podczas symulacji rozplatania, pary zasad ulegają kolejno dysocjacji, zaczynając od znajdujących się najbliżej pojedynczej nici [47].

4. PERSPEKTYWY: SEKWENCJONOWANIE DNA

Eksperymenty z wykorzystaniem nanoporów, w tym przede wszystkim translokacja polinukleotydów, cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na możliwość zastosowania nanoporów do sekwencjonowania DNA [5]. Zastosowanie nanoporów w sekwencjonowaniu wydaje się możliwe, ponieważ wartość mierzonego prądu jonowego przyjmuje wartości nie tylko zależne od średnicy nanoporu, stężenia elektrolitu i przyłożonego napięcia, lecz co najważniejsze od rodzaju nukleotydu.

Badane są zarówno nanopory białkowe jak i syntetyczne. Modyfikacja alfa-hemolizyny poprzez umieszczenie w jej trzonie cyklodekstryny umożliwia utrzymywanie nukleotydu w miejscu przez czas na tyle długi, aby zmierzyć prąd jonowy. Najpierw egzonukleaza powoduje hydrolizę nici na poszczególne nukleotydy, a następnie trafiają one do nanoporu [71]. Metoda ta ma jednak zasadniczą wadę, ponieważ nukleotydy mogą przechodzić przez nanopor w innej kolejności, niż występowały w nici DNA. Kolejne ograniczenia to niewielki zakres modyfikacji, którym można poddawać alfa-hemolizynę, nie zmieniając jednocześnie jej właściwości oraz mała wytrzymałość mechaniczna i chemiczna układu.

W przeciwieństwie do nanoporów białkowych, nanopory syntetyczne mogą mieć dowolną geometrię, są także dużo bardziej wytrzymałe. Ich wadą z kolei jest szybkie przemieszczanie się DNA, powyżej jednej pary nukleotydów w ciągu 10 nanosekund, nawet dla niskich napięć (200 mV) [72], co bardzo utrudnia zarejestrowanie prądu jonowego z wystarczającą rozdzielczością. Zaproponowano wiele rozwiązań tego problemu [73–76]. Niektóre polegają na zastosowaniu elektronicznych czujników, inne – na modyfikacji struktury badanej cząsteczki.

Metody oparte na modyfikacji cząsteczki wymagają jej wcześniejszego przygotowania do eksperymentu. W jednej z metod [73] badana cząsteczka DNA najpierw jest przetwarzana za pomocą enzymu na polimer, każdy nukleotyd jest kodowany fragmentem składającym się z dwóch jednostek po 10 par zasad każda, należących do dwóch typów. W ten sposób powstają cztery możliwe kombinacje jednostek, każda koduje inny nukleotyd. Na utworzony w ten sposób polimer nakładane są komplementarne fragmenty oznakowane fluorescencyjnie, które oddzielają się kolejno podczas translokacji przez nanopor, emitując promieniowanie o dwóch barwach, których rejestracja pozwala na identyfikację kolejnych nukleotydów wyjściowego DNA [73]. Inna metoda [74] polega na nałożeniu na nić DNA jednakowych,

krótkich oligonukleotydów o znanej sekwencji. Ponieważ prąd jonowy przyjmuje inną wartość dla struktury jedno- i dwuniciowej, jego pomiar umożliwia określenie, do którego odcinka nici przyłączony jest dany fragment, a tym samym jaką ma on sekwencję. Poprzez zastosowanie kolejno różnych oligonukleotydów możliwa jest identyfikacja całej sekwencji [74].

Dzięki zastosowaniu czujnika elektronicznego możliwe jest badanie cząsteczki bez poddawania jej modyfikacjom. W metodzie poprzecznego transportu elektronowego stosuje się drugą parę elektrod, prostopadłą do osi DNA. Identyfikacja nukleotydów następuje na podstawie zmian mierzonego prądu tunelowego następujących w miarę przesuwania się nici [75]. Innym rozwiązaniem jest użycie półprzewodnikowego kondensatora nanoporowego. Ruch naładowanej elektrycznie cząsteczki DNA powoduje zmiany rejestrowanego napięcia na kondensatorze [76]. Obie metody mają jednak wadę – wymagają kontroli nad ruchem cząsteczki w nanoporze, gdyż ma on duży wpływ na wynik pomiaru.

Ruch cząsteczki może być kontrolowany na kilka sposobów. Szybkość translokacji może zostać zmniejszona przez zwiększenie lepkości roztworu, przyłożenie słabszego pola elektrycznego, rozcieńczenie elektrolitu i obniżenie temperatury [77]. Powoduje to jednak osłabienie rejestrowanego sygnału. Możliwe jest także użycie pęsety optycznej. Do jednego końca DNA przyłączana jest kulka, której ruch kontroluje się za pomocą promienia laserowego. Na podstawie pomiarów położenia kulki wyliczana jest siła działająca na DNA. Kontrola położenia kulki pozwala na regulowanie szybkości ruchu DNA [78]. W podobny sposób działa pęseta magnetyczna. Kulka przyłączana do jednego z końców polinukleotydu ma właściwości magnetyczne. Poprzez zastosowanie pola magnetycznego kontrolowany jest ruch kulki, a co za tym idzie ruch cząsteczki DNA [79]. Ponieważ gradient pola magnetycznego można zastosować względem określonej powierzchni, technikę tę można zastosować nie tylko do pojedynczych nanoporów, ale też do całych matryc. Metoda „ tranzystora DNA ” polega na użyciu membrany złożonej z pięciu warstw kolejno metalu i dielektryka (m/d/m/d/m). Poprzez odpowiednie zmiany napięcia przykładanego do środkowej warstwy metalu, możliwe jest wymuszenie ruchu DNA w sposób skokowy, o wartość równą odległości dwóch zasad [80].

PODZIĘKOWANIA

Praca powstała przy wsparciu grantu NN204 166736 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D. Deamer, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1996, **93**, 13770.
- [2] S. Bezrukov, I. Vodyanoy, V. Parsegian, Nature, 1994, **370**, 279.
- [3] W. Coulter, United States Patent 2656508, 1953.
- [4] S. Iqbal, R. Bashir, *Nanopores: sensing and fundamental biological interactions*, Springer, 2011.
- [5] B. Venkatesan, R. Bashir, Nat. Nanotechnol., 2011, **6**, 615.
- [6] C. Dekker, Nat. Nanotechnol., 2007, **2**, 209.
- [7] O. Hayden, K. Nielsch, *Molecular- and Nano-Tubes*, Springer, 2011.
- [8] P. Hinterdorfer, A. van Oijen, Handbook of Single-Molecule Biophysics, Springer, 2009
- [9] N. Modi, M. Winterhalter, U. Kleinekathofer, Nanoscale, 2012, **4**, 6166.
- [10] C. Maffeo, S. Bhattacharya, J. Yoo, D. Wells, A. Aksimentiev, Chem. Rev., 2012, **112**, 6250.
- [11] D. Wendell, P. Jing, J. Geng, V. Subramaniam, T. Lee, C. Montemagno, P. Guo, Nat. Nano, 2009, **4**, 765.
- [12] D. Jonas, I. Walev, T. Berger, M. Liebetrau, M. Palmer, S. Bhakdi, Infect. Immun., 1994, **62**, 1304.
- [13] S. Winters-Hilt, BMC Bioinformatics, 2007, **8**, S9.
- [14] V. Rao, M. Feiss, Annu. Rev. Genet., 2008, **42**, 647.
- [15] A. Simpson, P. Leiman, Y. Tao, Y. He, M. Badasso, P. Jardine, D. Anderson, M. Rossmann, Acta Cryst. D, 2001, **57**, 1260.
- [16] Z. Siwy, A. Fulinski, Am. J. Phys., 2004, **72**, 567.
- [17] C. Harrell, Z. Siwy, C. Martin, Small, 2006, **2**, 194.
- [18] Z. Siwy, D. Dobrev, R. Neumann, C. Trautmann, K. Voss, Appl. Phys. A Mater. Sci. Process., 2003, **76**, 781.
- [19] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. Aziz, J. Golovchenko, Nature, 2001, **412**, 166.
- [20] J. Heng, C. Ho, T. Kim, R. Timp, A. Aksimentiev, Y. Grinkova, S. Sligar, K. Schulten, G. Timp, Biophys. J., 2004, **87**, 2905.
- [21] S. Park, H. Peng, X. Ling, Small, 2007, **3**, 116.
- [22] M. Fischbein, M. Drndic, Appl. Phys. Lett., 2008, **93**, 113107.
- [23] C. Merchant, K. Healy, M. Wanunu, V. Ray, N. Peterman, J. Bartel, M. Fischbein, K. Venta, Z. Luo, A. Johnson, M. Drndic, Nano Lett., 2010, **10**, 2915.
- [24] G. Schneider, S. Kowalczyk, V. Calado, G. Pandraud, H. Zandbergen, L. Vandersypen, C. Dekker, Nano Lett., 2010, **10**, 3163.
- [25] S. Garaj, W. Hubbard, A. Reina, J. Kong, D. Branton, J. Golovchenko, Nature, 2010, **467**, 190.
- [26] B. Venkatesan, B. Dorvel, S. Yemencioğlu, N. Watkins, I. Petrov, R. Bashir, Adv. Mater., 2009, **21**, 2771.
- [27] R. Smeets, U. Keyser, D. Krapf, M. Wu, N. Dekker, C. Dekker, Nano Lett., 2006, **6**, 89.
- [28] C. Ho, R. Qiao, J. Heng, A. Chatterjee, R. Timp, N. Aluru, G. Timp, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, **102**, 10445.
- [29] B. Venkatesan, A. Shah, J. Zuo, R. Bashir, Adv. Funct. Mater., 2010, **20**, 1266.
- [30] Y. He, D. Gillespie, D. Boda, I. Vlassioug, R. Eisenberg, Z. Siwy, J. Am. Chem. Soc., 2009, **131**, 5194.
- [31] B. Hornblower, A. Coombs, R. Whitaker, A. Kolomeisky, S. Picone, A. Meller, M. Akeson, Nature Mater., 2007, **4**, 315.
- [32] A. Han, G. Schurmann, G. Mondin, R. Bitterli, N. Hegelbach, N. de Rooij, U. Staufer, Appl. Phys. Lett., 2006, **88**, 093901.
- [33] M. Wanunu, J. Sutin, B. McNally, A. Chow, A. Meller, Biophys. J., 2008, **108**, 140475.
- [34] M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Grosberg, A. Meller, Nat. Nanotechnol., 2010, **5**, 160.
- [35] L. Movileanu, H. Bayley, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, **98**, 10137.

- [36] O. Krasilnikov, C. Rodrigues, S. Bezrukov, *Phys. Rev. Lett.*, 2006, **97**, 018301.
- [37] A. Han, M. Creus, G. Schurmann, V. Linder, T. Ward, N. de Rooij, U. Staufer, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 4651.
- [38] D. Fologea, B. Ledden, D. McNabb, J. Li, *Appl. Phys. Lett.*, 2007, **91**, 053901-1.
- [39] D. Talaga, J. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 9287.
- [40] J. Uram, M. Mayer, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 1556.
- [41] J. Li, M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, J. Golovchenko, *Nat. Mater.*, 2003, **2**, 611.
- [42] O. Dudko, J. Mathe, A. Meller, *Methods in enzymology*, 2010, **475**, 565.
- [43] A. Sauer-Budge, J. Nyamwanda, D. Lubensky, D. Branton, *Phys. Rev. Lett.*, 2003, **90**, 238101.
- [44] Q. Zhao, G. Sigalov, V. Dimitrov, B. Dorvel, U. Mirsaidov, S. Sligar, A. Aksimentiev, G. Timp, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 1680.
- [45] B. Dorvel, G. Sigalov, Q. Zhao, J. Comer, V. Dimitrov, U. Mirsaidov, A. Aksimentiev, G. Timp, *Nucl. Acids Res.*, 2009, **37**, 4170.
- [46] J. Mathe, A. Arinstein, Y. Rabin, A. Meller, *Europhys. Lett.*, 2006, **73**, 130.
- [47] J. Comer, V. Dimitrov, Q. Zhao, G. Timp, A. Aksimentiev, *Biophys. J.*, 2009, **96**, 593.
- [48] S. Chung, B. Corry, *Soft Matter*, 2005, **1**, 417.
- [49] S. Schink, S. Renner, K. Alim, V. Arnaut, F. Simmel, U. Gerland, *Biophys. J.*, 2012, **102**, 85.
- [50] V. Viasnoff, N. Chiaruttini, J. Muzard, U. Bockelmann, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2010, **22**, 454122.
- [51] W. Dyrka, A. Augousti, M. Kotulska, *J. Comput. Chem.*, 2008, **29**, 1876.
- [52] N. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. Holst, J. McCammon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 10037.
- [53] W. Im, B. Roux, *J. Mol. Biol.*, 2002, **322**, 851.
- [54] J. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. Skeel, L. Kale, K. Schulten, *J. Comput. Chem.*, 2005, **26**, 1781.
- [55] H. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, *Comput. Phys. Commun.*, 1995, **91**, 43.
- [56] R. Zhou, B. Berne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 12777.
- [57] M. Długosz, P. Zieliński, J. Trylska, *J. Comput. Chem.*, 2011, **32**, 2734.
- [58] W. Im, S. Seefeld, B. Roux, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 788.
- [59] H. White, A. Bund, *Langmuir*, 2008, **24**, 2212.
- [60] I. Vlassioug, S. Smirnov, Z. Siwy, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 1978.
- [61] D. Boda, M. Valisko, B. Eisenberg, W. Nonner, D. Henderson, D. Gillespie, *Phys. Rev. Lett.*, 2007, **98**, 168102.
- [62] S. Noskov, W. Im, B. Roux, *Biophys. J.*, 2004, **87**, 2299.
- [63] A. Aksimentiev, K. Schulten, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 3745.
- [64] P. Bond, A. Guy, A. Heron, H. Bayley, S. Khalid, *Biochemistry*, 2011, **50**, 3777.
- [65] E. Cruz-Chu, A. Aksimentiev, K. Schulten, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 1850.
- [66] E. Cruz-Chu, T. Ritz, Z. Siwy, K. Schulten, *Faraday Discuss.*, 2009, **143**, 47.
- [67] J. Reiner, J. Kasianowicz, B. Nablo, J. Robertson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, **107**, 12080.
- [68] D. Makarov, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 281.
- [69] J. Comer, A. Aksimentiev, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 3376.
- [70] D. Melnikov, A. Nikolaev, J. Leburton, M. Gracheva, *Methods Mol. Biol.*, 2012, **870**, 187.
- [71] J. Clarke, H. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid, H. Bayley, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, **4**, 265.
- [72] A. Storm, C. Storm, J. Chen, H. Zandbergen, J. Joanny, C. Dekker, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 1193.
- [73] G. Soni, A. Meller, *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 1996.
- [74] X. Ling, B. Bready, A. Pertsinidis, USPTO Patent Application No. 20070190542, 2006.
- [75] J. Lagerqvist, M. Zwolak, M. Di Ventra, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 779.
- [76] M. Gracheva, A. Xiong, A. Aksimentiev, K. Schulten, G. Timp, J. Leburton, *Nanotechnology*, 2006, **17**, 622.
- [77] D. Fologea, J. Uplinger, B. Thomas, D. McNabb, J. Li, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 1734.

- [78] U. Keyser, B. Koeleman, S. van Dorp, *Nat. Phys.*, 2006, **2**, 473.
- [79] H. Peng, X. Ling, *Nanotechnology*, 2009, **20**, 185101.
- [80] S. Polonsky, S. Rossnagel, G. Stolovitzky, *Appl. Phys. Lett.*, 2007, **91**, 153103.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 listopada 2012