

## 综述

## 面向单分子检测的纳米孔传感特异性增强技术\*

潘钦杰<sup>1)2)</sup> 赵灿东<sup>1)2)</sup> 陈琪<sup>1)2)†</sup> 何毓辉<sup>1)2)</sup> 缪向水<sup>1)2)</sup>

1) (华中科技大学集成电路学院, 信息存储材料及器件研究所, 武汉 430074)

2) (江城实验室, 武汉 430205)

(2024年1月23日收到; 2024年2月27日收到修改稿)

目前, 基于纳米孔的传感器已经成为了分析生物标志物的重要工具, 包括但不限于核酸, 蛋白质以及其他在生命活动中发挥重要作用的分子. 作为一种创新的单分子检测技术, 纳米孔传感本身并不具有特异性, 通过表面官能化以及分子探针技术可以提升纳米孔传感对样本中的目标生物标志物的响应灵敏度. 本文首先介绍了纳米孔传感的原理、分类, 然后讨论了纳米孔表面改性的方法以及近年来纳米孔传感中待测分子特异性增强技术的发展和應用, 特异性增强技术主要包含表面官能化以及分子探针两种形式, 其中表面官能化以官能化分子类别分类, 分子探针以载体形式分类. 最后, 本文总结了纳米孔传感仍然存在的若干挑战, 并对纳米孔未来发展提出了若干建议.

**关键词:** 纳米孔, 特异性, 分子探针, 官能化**PACS:** 87.85.fk, 07.07.Df**DOI:** 10.7498/aps.73.20240159

## 1 引言

纳米孔传感是在薄膜表面制备数百纳米到数纳米直径的通路, 然后在溶液环境中通过热<sup>[1]</sup>、光<sup>[2,3]</sup>、电<sup>[4]</sup>等多种手段驱动生物或化学分子穿过该孔并获得分子信息的一种传感技术. 基于纳米孔的传感提供了一种无标记的方式来对分子进行检测, 是一种有效的单分子检测技术<sup>[5]</sup>. 经过几十年的研究, 纳米孔传感已经在环境检测、疾病诊断、生命科学研究、农业、食品安全<sup>[6,7]</sup>以及数据存储等多个领域中被广泛应用. 在疾病诊断方面, 纳米孔的极高检测灵敏度以及极快检测速度为疾病早期的个性化医疗提供了非常大的帮助<sup>[8-11]</sup>; 在生命科学方面, 纳米孔对核酸的测序做出了巨大的贡献, 被认为是第四代廉价、快速基因测序技术<sup>[12-16]</sup>, 也被用于鉴别其他生物分子如蛋白质<sup>[17,18]</sup>、糖<sup>[19,20]</sup>等, 同时可以用作离子运输的生物离子通道<sup>[21]</sup>. 不仅

如此, 由于纳米孔提供了高度封闭狭小的空间, 孔隙中往往只能存在单个分子, 也极大便利了分子-分子相互作用、动态构象转变和过渡态监测的研究<sup>[22]</sup>.

从构成纳米孔的材料角度区分, 纳米孔分为生物纳米孔和(无机)固态纳米孔, 两者都可以对纳米级待分析物进行检测. 常见的生物纳米孔有 $\alpha$ 构成纳米孔, MspA 纳米孔, Aerolysin 纳米孔等. 生物纳米孔又称为跨膜蛋白通道, 它的主要优势包括可以轻松通过生物学技术对其进行修饰以及可稳定重现的纳米孔结构和尺寸. 然而, 生物纳米孔需要脂质双分子层支撑, 相对而言限制了它的使用条件例如电压、温度、pH等. 尽管大多数生物纳米孔在一些相对极端的pH、温度以及电压下都是稳定的, 但生物纳米孔在脂质双分子层中会横向扩散, 使孔的空间定位不准确, 导致了生物纳米孔与其他传感技术集成的难度大大提高<sup>[23]</sup>.

固态纳米孔主要材料为氮化硅( $\text{SiN}_x$ )、 $\text{SiO}_2$ 等. 相对生物纳米孔, 固态纳米孔的尺寸可在生长

\* 国家自然科学基金(批准号: 62374063)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: chenqi\_wlu@hust.edu.cn

制备过程中调制或较为精确地控制,能批量生产且更容易和微流控系统或者电路系统集成,同时化学稳定性、热稳定性以及机械稳定性更好,但也存在纳米孔易被待测分子堵塞、不易被润湿等问题<sup>[24]</sup>.

纳米孔传感本质上是将被分析物的结构和化学性质转化为可测量的离子电流信号.最基础的纳米孔实验中,承载了纳米孔的薄膜分隔开两个注满电解质溶液的腔室,通过插入腔室的氯化银电极施加偏置电压,驱动离子通过纳米孔通道,形成稳定的离子电流.当有分子通过纳米孔时,会产生阻塞电流(部分离子被过孔的分子阻挡,导致电流减小),通过分析阻塞电流的持续时间以及大小,可以获得过孔分子的一些信息比如大小、电荷等.值得指出的是,待测分子进入纳米孔,不仅仅会因为体积阻挡效应引起过孔离子电流的减小,也有可能因为待测分子自带电荷引发的电双层(electrical double layers)带来过剩反型离子(counterions),从而引起过孔离子电流增大.针对后者,目前也开发出了分子过孔时电导增大(离子电流变大)的传感方法.从传感原理不难看出,精确获得分子信息的重要前提是不同时刻引起离子电流变化的分子只有一个,随着纳米孔制备技术的进步,纳米孔的孔径以及厚度均达到了纳米量级,这与大部分生物分子是相当的,因此可以保证同一时刻只有一个分子在孔隙中,从而实现单分子检测.

纳米孔用作传感器时存在的主要问题包括分子过孔速度过快、特异性差、噪声大、捕获率低等.本文针对特异性差的问题回顾与总结了国内外通过表面官能化以及选择合适的DNA探针、适配体解决该问题的若干代表性工作.

## 2 纳米孔的化学修饰

对纳米孔进行表面修饰以及官能化是纳米孔传感中常用的方法,一般表面修饰用来改变纳米孔的表面特性,官能化用来增强纳米孔传感对某种生物分子的特异性,本节将列举几种涂覆有机涂层的表面修饰方法,然后根据官能化分子的种类(核酸适配体、蛋白质、其他生物分子)对官能化方法进行详细介绍.

### 2.1 改变表面特性的表面修饰

纳米孔表面的成分对分子的过孔(translocat-

ion)过程起着至关重要的作用,不同的表面成分与分子之间的吸附强度不同,还会影响分子与受体的结合.同时不同的表面电荷也会影响电渗透流(electro-osmotic flow),并影响孔隙内的流体运动行为.有鉴于此,若干改变表面特性的方法被不断开发出来<sup>[24]</sup>,例如用硅烷类化合物修饰硅及其衍生物(氮化硅)制备的纳米孔,或者是在纳米孔表面涂覆脂质双分子层等有机涂层.

固态纳米孔的表面不像生物孔具有羧酸等官能团,为了增强传感信号以及延长分子的过孔时间以便检测,通常可以使用涂覆有机涂层实现对固态纳米孔表面共价和非共价的官能化.Wanunu和Meller<sup>[25]</sup>首先引入了使用有机分子的自组装涂层对SiN<sub>x</sub>纳米孔进行化学修饰的方法.他们用有机硅烷在5—20 nm大小的纳米孔上实现了可重现的涂层,并通过非原位(ex-situ)分析方法和原位(in-situ)监测对通过纳米孔的离子电流进行确认.这项工作提出了纳米孔表面化学修饰的框架,自此研究人员对有机涂层对纳米孔内生物分子过孔的影响进行了广泛的研究.如图1所示,Anderson等<sup>[26]</sup>使用3-氨丙基三甲氧基硅烷(APTMS)官能化纳米孔表面,通过调节溶液的pH值,改变了DNA和纳米孔表面的相互作用,进而改变了过孔时间,在低pH值下效果尤为明显.

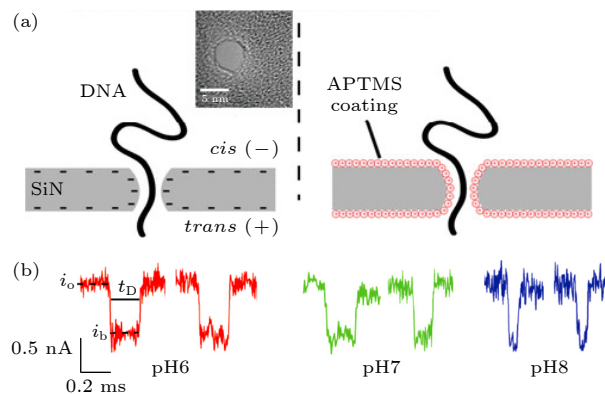


图1 (a) 未被修饰的纳米孔和用APTMS修饰的纳米孔示意图,插图是透射电子显微镜(TEM)拍摄的修饰前5.2 nm纳米孔图像;(b) 1 kbp DNA在pH 6.0, 7.0和8.0条件下通过被修饰的5.2 nm纳米孔电流迹线图, $i_o$ 为开孔电流, $i_b$ 为阻塞电流, $t_D$ 为DNA过孔时间<sup>[26]</sup>

Fig. 1. (a) Schematic of an uncoated and an APTMS-coated nanopore, inset is a TEM image of a 5.2 nm nanopore before coating; (b) 1 kbp DNA translocating through a coated 5.2 nm pore at pH 6.0, 7.0, and 8.0, where  $i_o$  is the open-pore current,  $i_b$  is the blocked-level current, and  $t_D$  is the translocation time<sup>[26]</sup>.

电渗透流的存在可能会降低纳米孔对生物分子的捕获率,但它同样可以减弱电泳对生物分子的作用力,如图2所示, Soni 等<sup>[27]</sup>开发出阴离子表面活性剂(SDS)修饰纳米孔的方法,通过改变孔内表面电荷来微调电渗透流最终延长了DNA的过孔时间.

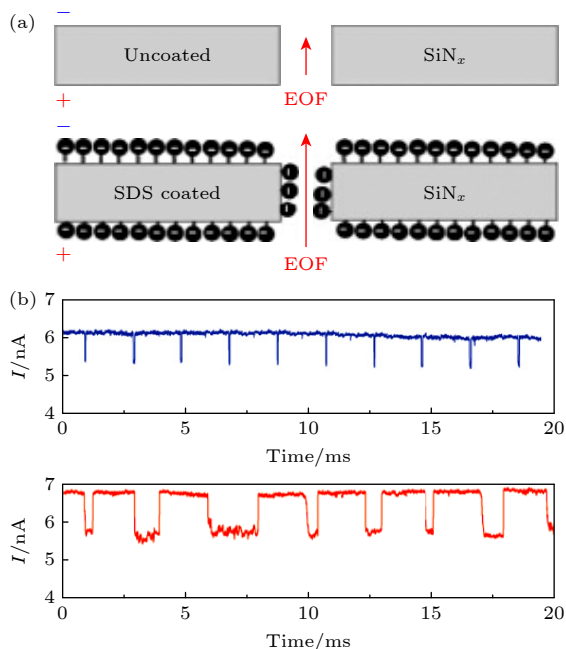


图2 (a) 未被修饰的纳米孔和用 SDS 修饰的纳米孔示意图; (b) 未修饰(蓝线)和 SDS 修饰纳米孔(红线)测得的代表性 DNA 过孔事件<sup>[27]</sup>

Fig. 2. (a) Schematic diagram of the uncoated and SDS coated pore; (b) typical representative translocation event observed with uncoated (blue) and SDS coated nanopore (red)<sup>[27]</sup>.

涂覆有机涂层不仅可以延长 DNA 链的过孔时间,同时还可以减少 DNA 与纳米孔壁的非特异性吸附,避免严重的堵塞<sup>[28,29]</sup>. 例如, Schneider 等<sup>[29]</sup>通过设计专用的自组装单层苾乙二醇(一种 PEG 分子),利用非共价结合的亲水官能团修饰纳米孔,从而减少了石墨烯纳米孔的堵塞. 与共价结合相比,非共价的官能化可以避免石墨烯电子结构的变化,从而维持对于传感有益的电学性能.

在纳米孔表面覆盖一层脂质双分子层也是一种表面改性的方法. 如图3所示, Yusko 等<sup>[30]</sup>用脂质双分子层对固态纳米孔进行修饰,利用该方法不仅可以减少纳米孔的非特异性吸附,避免堵塞,还可以对孔径进行微调并调控蛋白质通过纳米孔的过程,采用该纳米孔,他们可以检测到淀粉样蛋白低聚物和原纤维的过孔事件.

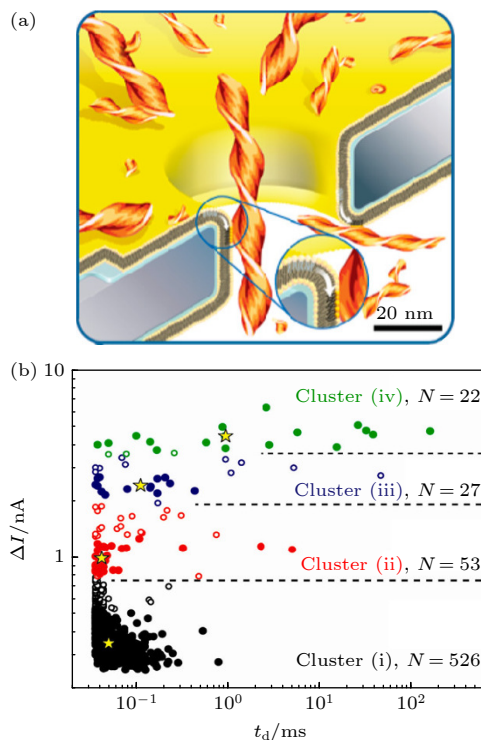


图3 (a) 淀粉样蛋白  $\beta$  通过流体脂质双分子层修饰的纳米孔示意图; (b) 不同聚类待测分子过孔引起的阻塞电流、过孔时间( $\Delta I$ ,  $t_d$ ) 数据产生的散点图,黄色星号表示每种聚类产生的阻塞电流平均值 (i) 球形低聚物, (ii) 短原纤维, (iii) 长原纤维, (iv) 纤维<sup>[30]</sup>

Fig. 3. (a) Schematic representation of amyloid- $\beta$  translocation through a nanopore modified by a fluid lipid bilayer; (b) scattered plot of blocking currents generated by different clusters, with yellow asterisks indicating the average blocking currents generated by each cluster, (i) spherical oligomer, (ii) short protofibril, (iii) long protofibril, (iv) fiber<sup>[30]</sup>.

除了以上几种在纳米孔表面涂覆有机涂层的方法外,如图4所示, Li 等<sup>[31]</sup>用半胱氨酸(Cys H)修饰的纳米孔,利用 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺/N-羟基丁二酰亚胺(EDC/NHS) 交联反应,使纳米孔与蛋白质之间形成了比非共价键更加稳定牢固的共价键,显著降低了蛋白质的过孔速度,同时该方法使用的非特异性的耦合作用为开发纳米孔通用蛋白质检测提供了一个全新的思路.

总体来说,在纳米孔表面涂覆有机材料是一种有效改善纳米孔传感效果的方法,涂覆了有机涂层的纳米孔,在待测分子过孔速度,捕获速率以及减弱生物分子与孔壁相互作用等方面都有了明显改善. 当然使用 ALD 沉积无机材料例如  $Al_2O_3$  等也可以改变纳米孔的表面性质(表面电荷、粗糙度).

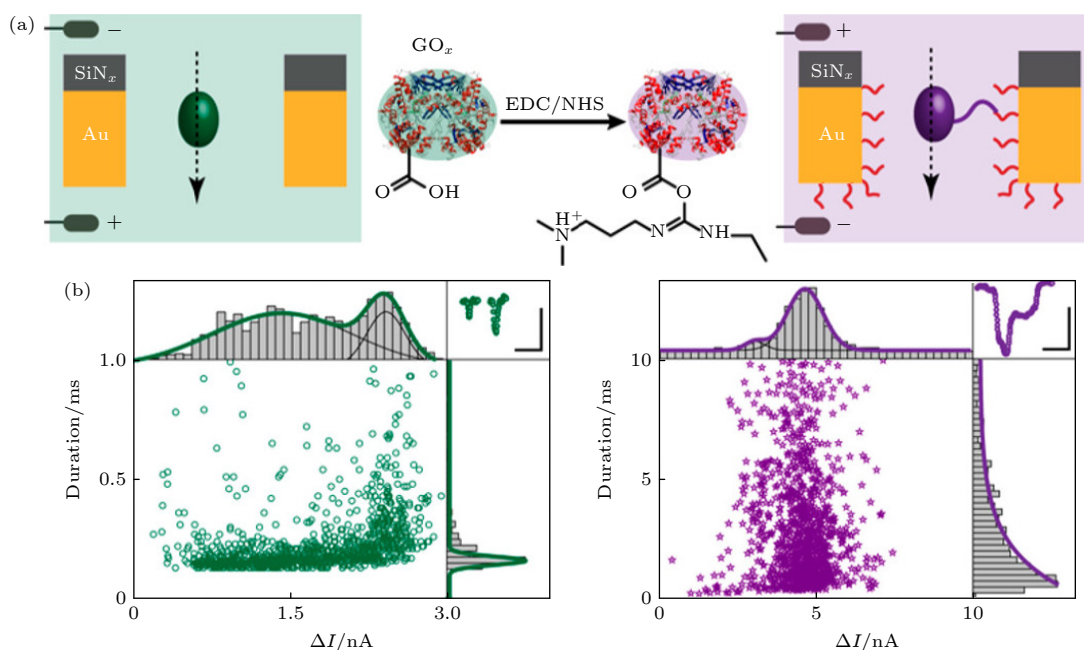


图 4 (a) 葡萄糖氧化酶通过未修饰的纳米孔示意图(左), EDC/NHS 交联反应后葡萄糖氧化酶通过半胱氨酸修饰的纳米孔示意图(右); (b) 两种过孔事件的阻塞电流、过孔时间散点图以及直方图<sup>[31]</sup>

Fig. 4. (a) Glucose oxidase through the unmodified nanopore (left), and glucose oxidase through the cysteine-modified nanopore after EDC/NHS cross-linking reaction (right); (b) blocked current scatter plots and histograms of the two translocation events<sup>[31]</sup>.

## 2.2 用于增强特异性的表面官能化

纳米孔传感可以在单分子水平上检测到分子过孔的信号,但它往往不具有选择性,任何被电泳驱动通过纳米孔的分子都可以引起离子电流的变化,同时这些阻塞电流的信号相似性极高,在不借助其他辅助手段的情况下,很难区分目标生物分子和其他生物分子.解决这个问题对于疾病诊断和个性化医疗都尤为重要,因为不管是识别单一的生物标志物还是筛选人体复杂的体液(血清、脑脊液),都需要离子电流有足够区分度,比如在电流量级或者电流分布等特征上有差别才可以实现区分.增强纳米孔传感的特异性不光可以使目标生物分子的阻塞电流区别于其他分子的,同时还有助于在低浓度下识别筛选出目标生物分子,有利于早期的疾病诊断和筛查.而生物分子普遍具有特异性,例如具有互补碱基对的核酸、抗原和抗体、酶和反应物、适配体和靶分子等都具有特异性的识别或反应<sup>[16]</sup>.鉴于此,已经开发出了若干种方法,通常是将目标生物分子的受体/适配体引入纳米孔中,或是将受体/适配体放入溶液中并与目标生物分子结合从而识别出来(后文进行讨论).

### 2.2.1 基于核酸适配体的特异性增强

用指数富集的配体系统进化技术 (SELEX) 技

术培养和筛选出与目标生物分子有高度亲和力的核酸适配体(一种短的单链 DNA 或 RNA 分子)对纳米孔进行官能化是一种常用的增强纳米孔传感对目标生物分子特异性的方法<sup>[16,32]</sup>,核酸适配体可以被折叠成多种结构,这些结构又可以集合成三维结构来包围和识别目标生物分子<sup>[33]</sup>,三维结构的相互作用包括氢键、范德瓦耳斯力、疏水性、静电相互作用和形状互补等,这些因素都对核酸适配体的结合力以及特异性至关重要<sup>[34]</sup>.凝血酶是一种参与多种生理过程的酶,如出血性疾病、动脉粥样硬化等<sup>[35,36]</sup>,早期纳米孔传感经典的例子之一就是凝血酶的研究.凝血酶的核酸适配体通过二硫化物共价键连接到纳米孔开口附近的半胱氨酸残基上,核酸适配体形成的四链体会和凝血酶结合,最终影响离子电流<sup>[37]</sup>.在此基础上,Rotem 等<sup>[38]</sup>将寡核苷酸作为适配器连接到  $\alpha$  寡核苷酸纳米孔上,通过适配器与各种核酸适配体结合,允许相同的纳米孔结构对多种分析物进行检测,并用该纳米孔对凝血酶浓度进行了定量分析.当前,使用机器学习辅助纳米孔识别是一个可行的方案,如图 5 所示,Reynaud 等<sup>[39]</sup>使用核酸适配体官能化的纳米孔在机器学习的辅助下成功区分了  $\alpha$  凝血酶和  $\gamma$  凝血酶,最高准确率达到了 98.8%.

同样地, 核酸适配体还可以用来对病毒、RNA/DNA 以及其他生物标志物等进行识别<sup>[40]</sup>. Micro-RNA (miRNA) 是一种非编码小分子 RNA, 近几年来, 许多研究发现 miRNA 与肿瘤的发展、转移等现象密切相关<sup>[41]</sup>, 对于该 RNA 的研究热度持续升高. 如图 6 所示, Qiu 等<sup>[42]</sup>将对 miRNA-21 具有特异性识别的 DNA 链通过 Au-S 键结合到纳米孔上, 然后加入与 DNA 链部分互补的 miRNA-21, 再加入两种发夹 DNA(可被 miRNA 打开)并开始 HCR 进程. miRNA-21 的浓度会影响两种发夹 DNA 与纳米孔的结合, 最终影响离子整流比. 通过保持发夹 DNA 浓度和 HCR 反应时间不变,

可以对复杂样品中的 miRNA-21 浓度进行定量分析.

Peinetti 等<sup>[43]</sup>用 SELEX 系统选择合适的可以与具有活性的人腺病毒 (human adenovirus, HAdV) 表面蛋白结合的适配体 (灭活的 HAdV 表面蛋白会有损伤), 并用适配体修饰 PET 纳米孔, 成功区分了传染性以及非传染性 HAdV, 实现了无症状诊断, 如图 7 所示. 新冠疫情对全世界造成了巨大的经济和社会影响, 开发出快速高效的核酸检测方式是前几年的重大热点<sup>[44,45]</sup>. 基于该方法他们还严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2) 进行了传染性和非传染性的区分<sup>[43]</sup>.

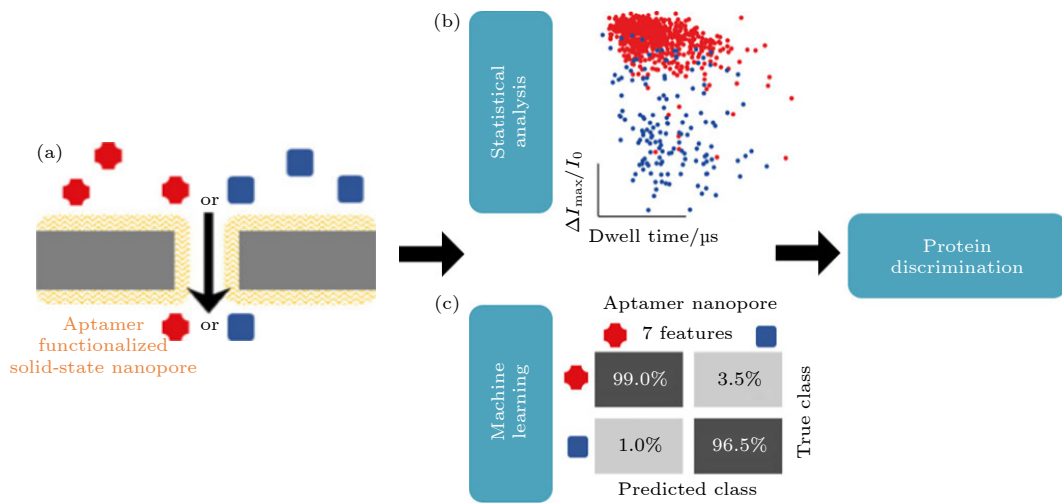


图 5 (a) 两种凝血酶通过官能化纳米孔进行识别示意图; (b) 待测分子引起的相对电流阻塞、孔内停留时间散点图; (c) 采用机器学习方法处理数据后获得的识别率混淆矩阵<sup>[39]</sup>

Fig. 5. (a) Schematic illustration of two thrombin species identified by functionalized nanopores; (b) scatter diagram of relative current obstruction and in-hole residence time caused by molecules to be measured; (c) the recognition rate confusion matrix obtained after processing data using machine learning methods<sup>[39]</sup>.

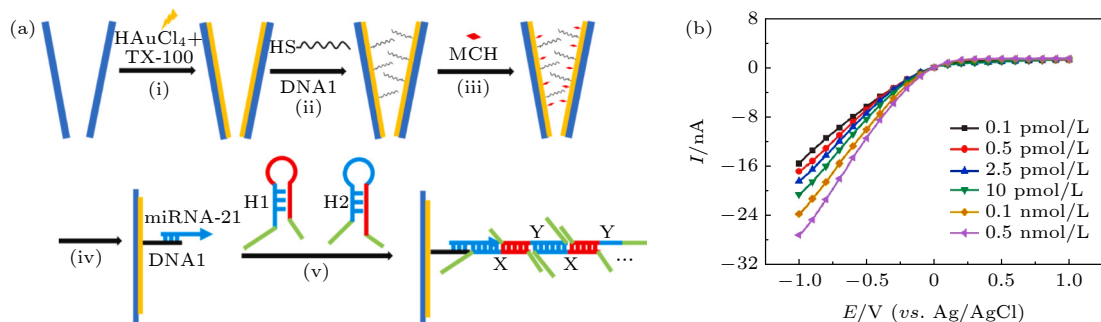


图 6 (a) 使用官能化纳米孔选择性检测 miRNA-21 的方法 (i) 纳米孔内壁采用金膜改性; (ii) 巯基修饰的 DNA1 与纳米孔壁结合; (iii) MCH 阻断活性位点; (iv) DNA1 与纳米孔内壁结合, 特异性识别 miRNA-21; (v) 引入发夹 H1 和 H2 以引发杂化链式反应. (b) 官能化纳米孔在不同浓度 miRNA-21 (0.1 pmol/L—0.5 nmol/L) 下的  $I-E$  曲线 (10 mmol/L KCl)<sup>[42]</sup>

Fig. 6. (a) Strategies for selective detection of miRNA-21 using functionalized nanopore: (i) the inner wall of the bare nanopore was modified with gold film; (ii) the sulfhydryl-modified DNA1 binds to the wall of the nanopore; (iii) the excess active site was blocked with MCH; (iv) DNA1 bound to the inner wall of the nanopore specifically recognized miRNA-21; (v) introducing hairpins H1 and H2 to initiate the hybrid chain reaction. (b)  $I-E$  curves (10 mmol/L KCl) of functionalized nanopore at different concentrations of miRNA-21 (0.1 pmol/L–0.5 nmol/L)<sup>[42]</sup>.

核衣壳蛋白 (N 蛋白) 是冠状病毒中含量最丰富的蛋白, 是病毒粒子的核心成分, 因此除了对病毒进行直接检测外, 还可以通过检测核衣壳蛋白浓度的方式来辅助冠状病毒的检测<sup>[46]</sup>. 如图 8 所示, Ma 等<sup>[47]</sup> 用适配体修饰纳米移液器内部, 在适当的 pH 值下, 适配体带负电, N 蛋白带正电, 两者的特异性相互作用会使空间电荷密度下降并阻塞部分离子输运, 引起离子电流下降. 通过分析离子电流下降的大小和时间, 可以在一定动态范围内对

N 蛋白浓度进行定量分析, 同时, 他们还用混合了其他蛋白质的溶液对纳米孔进行了特异性的测试, 结果表明其他高浓度蛋白质对检测效果影响较小, 因而该方法有望协助冠状病毒的检测.

### 2.2.2 基于蛋白质的特异性增强

除了核酸外, 酶和反应物、抗原和抗体等蛋白质之间的特异性结合也可以被应用到纳米孔传感中, 在本节中将介绍若干基于蛋白质的纳米孔表面修饰方法.

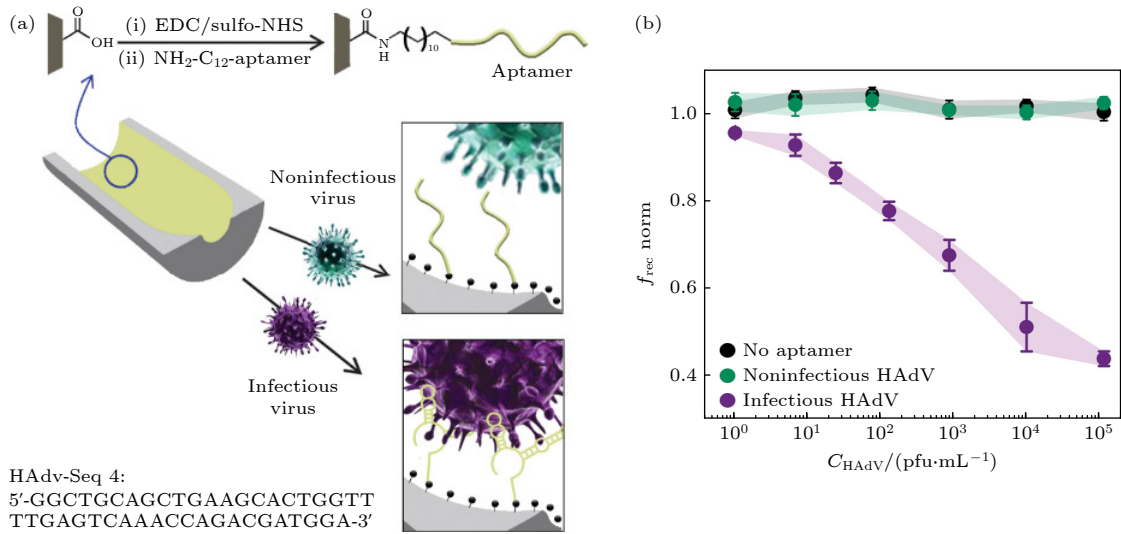


图 7 (a) 纳米孔修饰以及适配体与 HAAdV 样品相互作用示意图; (b) 归一化的电流整流比<sup>[43]</sup>

Fig. 7. (a) Scheme depicting the modification of the nanopore and the interaction of the aptamer with infectious HAAdV samples; (b) normalized current rectification ratio<sup>[43]</sup>.

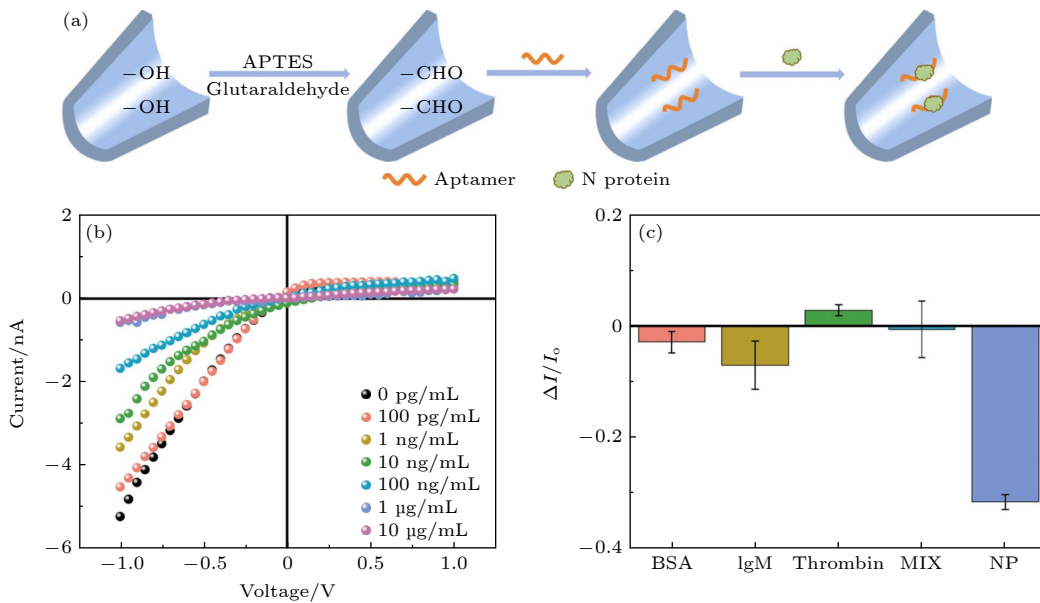


图 8 (a) 纳米移液器共价修饰流程示意图; (b) 检测不同浓度 N 蛋白的纳米移液器的  $I-V$  曲线; (c) 不同蛋白质引起的归一化离子电流变化<sup>[47]</sup>

Fig. 8. (a) Schematic description of the covalent modification procedures of nanopipettes; (b)  $I-V$  curves of the nanopipettes for detecting different concentrations of the N protein; (c) normalized ionic current changes caused by different proteins<sup>[47]</sup>.

甲型流感也是一种传播广泛的呼吸道疾病, 神经氨酸酶 (NA) 是甲型流感病毒 (IAV) 表面的主要蛋白之一, 同时也参与癌症以及心血管疾病的进程 [48]. 如图 9 所示, Kwak 等 [49] 将半乳糖结合蛋白 (GBP) 悬挂在 ClyA-AS 纳米孔壁上实现对纳米孔的官能化, 在溶液中加入半乳糖与唾液酸的聚合物, 当神经氨酸酶 (NA) 存在时, 聚合物会被裂解从而释放出半乳糖, 半乳糖与纳米孔壁上的半乳糖结合蛋白结合后, 会改变其构象, 两种构象引起的阻塞电流持续时间不同, 通过分析电流可以对神经氨酸酶的活性进行检测.

通过抗体进行官能化也是目前比较常用的一

种手段, 如图 10 所示, Zhang 等 [50] 将单链 DNA 偶联到 ClyA 纳米孔上, 再让携带着纳米抗体的互补序列与 DNA 链杂交, 实现了纳米抗体对纳米孔的官能化. 使用纳米抗体 Ty1 修饰的 ClyA 纳米孔, 他们主要对 SARS-CoV-2 刺突蛋白在不同浓度下以及血清中进行了特异性检测. 通过更换官能化的抗体, 也对人表皮生长因子受体-2(HeR2) 以及小鼠尿激酶型纤溶酶原激活物 (muPA) 进行了检测, 证明了这种方法具有普适性. 有趣的是, 大型的蛋白质因为无法进入纳米孔, 当其与抗体结合时, 会使抗体在孔外的动态运动减少, 使开孔电流增加.

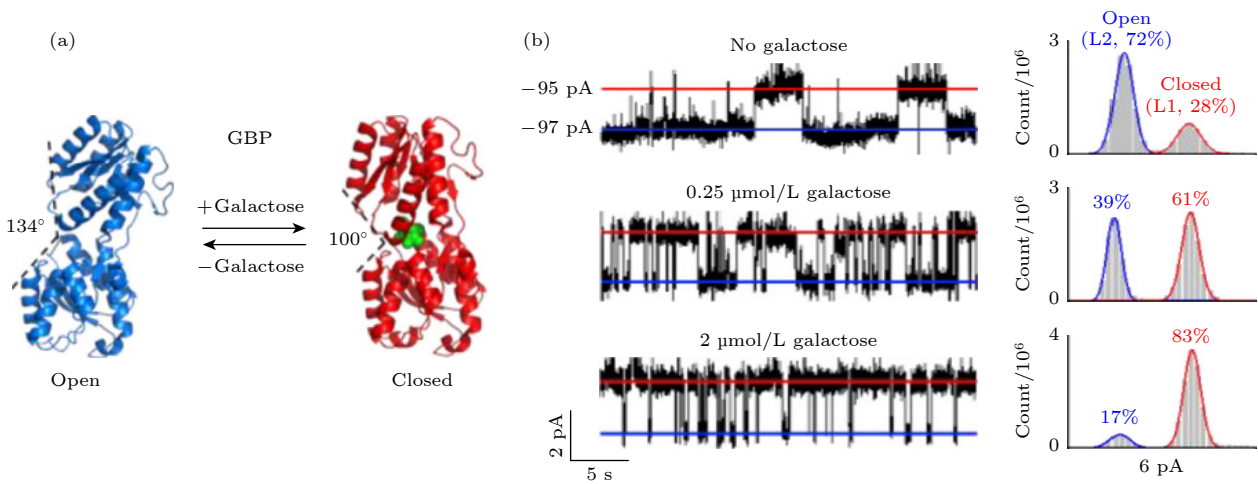


图 9 (a) 未与配体结合 (开放) 和与配体结合 (闭合) 状态下的 GBP 示意图; (b) 不同半乳糖浓度下的电流迹线 (左), 闭合 (L1) 和开放 (L2) 构象在 30 s 内的分布图 (右) [49]

Fig. 9. (a) Schematic diagram of GBP in the ligand-free (open) and ligand-bound (closed) states; (b) current trace at different galactose concentrations (left), histogram of the closed (L1) and open (L2) conformations in 30 s (right) [49].

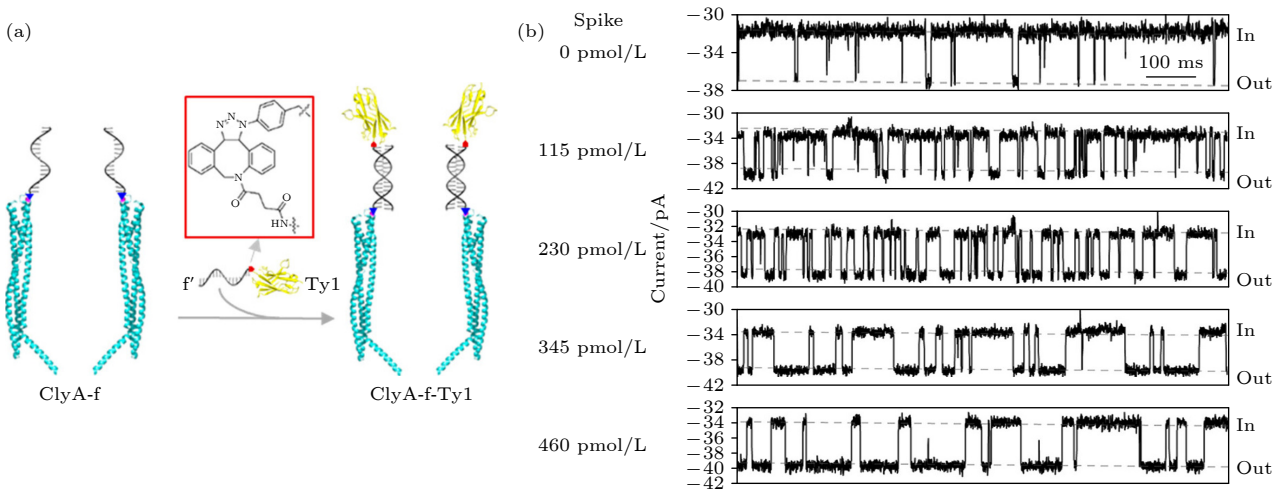


图 10 (a) 通过 DNA 链杂交将 Ty1 固定在 ClyA 纳米孔上的方法示意图; (b) 添加不同浓度的刺突蛋白前后 ClyA-f-Ty1 的代表性电流迹线 [50]

Fig. 10. (a) Schematic diagram of the method of fixing Ty1 on ClyA nanopore by DNA strand hybridization; (b) the representative current trace of ClyA-f-Ty1 before and after the addition of different concentrations of spike protein [50].

Thakur 和 Movileanu<sup>[51]</sup> 基于蛋白质的特异性结合, 利用 t-FhuA 纳米孔开发出了一种新颖的方法对蛋白质的相互作用进行实时的单分子分辨率检测. 如图 11 所示, 他们将目标蛋白质受体 (工作中是 barnase (Bs)) 结合到纳米孔上, 并将一个带有负电荷的肽连接到受体上, 这个肽会与纳米孔相互作用. 当目标蛋白质与受体结合时, 肽会被拉出纳米孔, 导致孔隙电导增大, 从而测量到与结合事件相关的脉冲. 基于这个思路, 他们进一步将这种方法开发为一个在血清中检测目标蛋白质的选择性纳米孔传感器.

### 2.2.3 基于其他有机分子的特异性增强

除了核酸以及蛋白质, 其他小分子也和特定的生物分子具有特异性结合, 可以对纳米孔进行官能化. 如图 12 所示, Ali 等<sup>[52]</sup> 用生物素化的聚烯丙基胺 (b-PAH) 官能化 PET 纳米孔对链霉亲和素进行特异性识别, 与溶菌酶 (Lys) 以及牛血清白蛋白 (BSA) 相比, 链霉亲和素导致的电流下降最为明显, 证明了该方法对链霉亲和素识别的潜力.

手性对映异构体的区分对生物技术以及制药领域具有重要意义, 但手性对映异构体往往只有一些细微的差别, 进行区分有很大的难度<sup>[53,54]</sup>. 目前利用纳米孔对手性分子进行区分的方案展现出了很大的潜力<sup>[55]</sup>.  $\beta$ -环糊精 ( $\beta$ -CD) 被广泛用于 L-His (L-组氨酸) 以及 D-His (D-组氨酸) 的手性识别<sup>[56,57]</sup>, 如图 13 所示, Han 等<sup>[58]</sup> 通过 EDC/NHS 交联反应将带有氨基的  $\beta$ -CD 固定在 PET 纳米孔中, 实验结果表明, 当 L-组氨酸通过纳米孔时, 会阻碍孔隙中的离子运输, 引起电流下降, 而 D-组氨酸或者其他芳香族氨基酸过孔时, 几乎没有对离子电流产生影响. 之后的工作中, Xie 等<sup>[59]</sup> 用  $\beta$ -CD 官能化聚酰亚胺 (PI) 膜制备的纳米孔, 也成功完成了对 L-Trp (色氨酸) 的识别.

去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺是重要的神经递质和激素, 在血管收缩、血压控制和神经冲动传递等活动中起关键作用, 在合成中 D-去甲肾上腺素 (D-N) 和 D-肾上腺素 (D-E) 通常被视为不良产物. 最近, Jia 等<sup>[60]</sup> 报道了一种可编程纳米孔单分子反应器技术 (PNRSS), 该技术巧妙地将官能

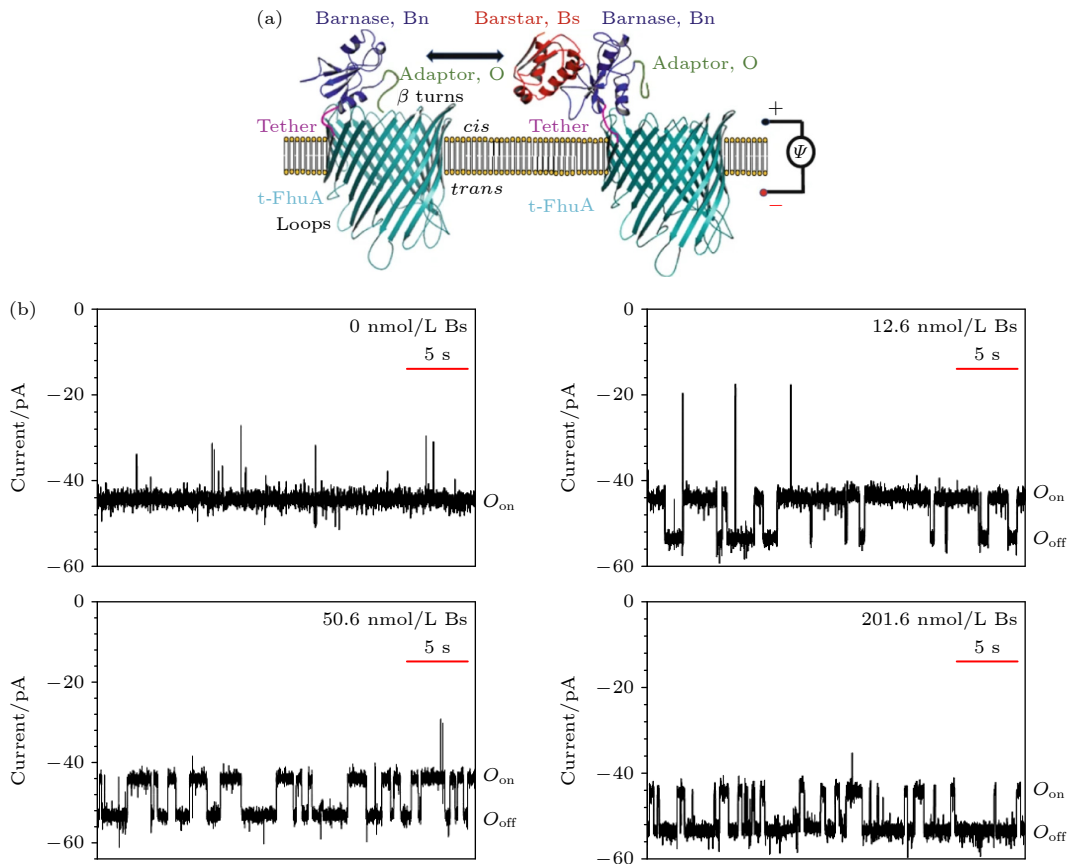


图 11 (a) t-FhuA 纳米孔检测 Bs 的示意图; (b) 不同 Bs 浓度下的纳米孔电流迹线<sup>[51]</sup>

Fig. 11. (a) Schematic diagram of t-FhuA nanopore detection of Bs; (b) nanopore current traces at different Bs concentrations<sup>[51]</sup>.



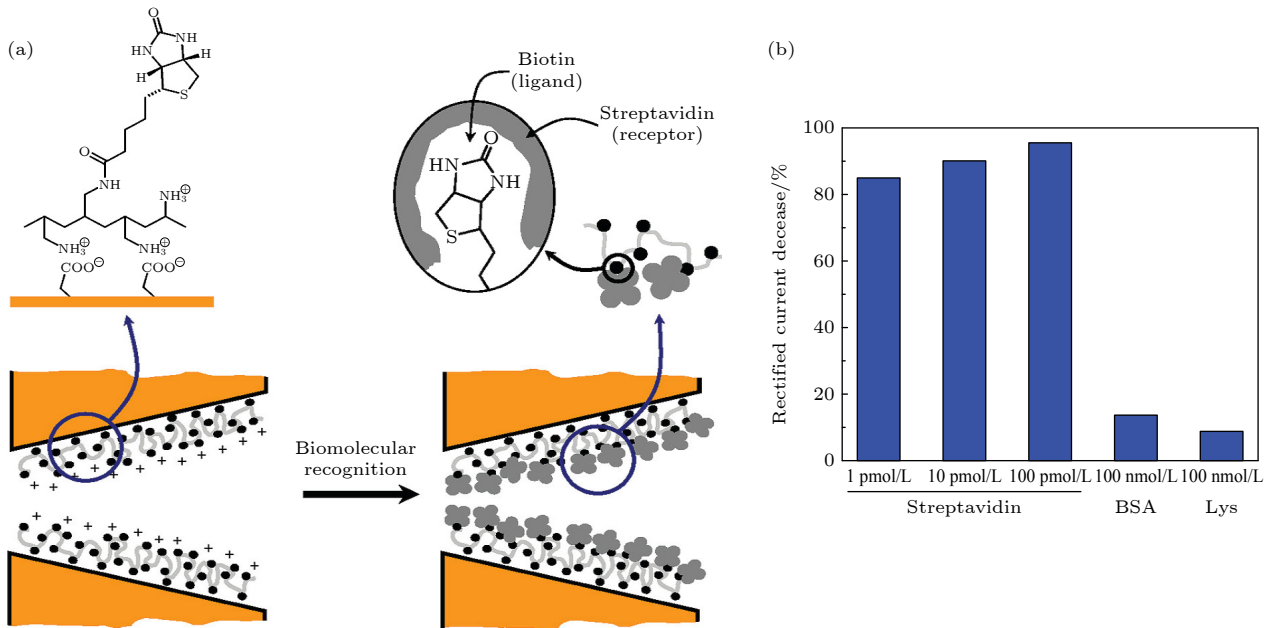


图 12 (a) 锥形纳米孔中生物素和链霉亲和素之间的特异性结合示意图; (b) BSA, Lys 以及不同浓度的链霉亲和素引起的电流下降比例<sup>[52]</sup>

Fig. 12. (a) Schematic diagram of specific binding between biotin and streptavidin in conical nanopore; (b) the proportion of current drop caused by BSA, Lys, and streptavidin at different concentrations<sup>[52]</sup>.

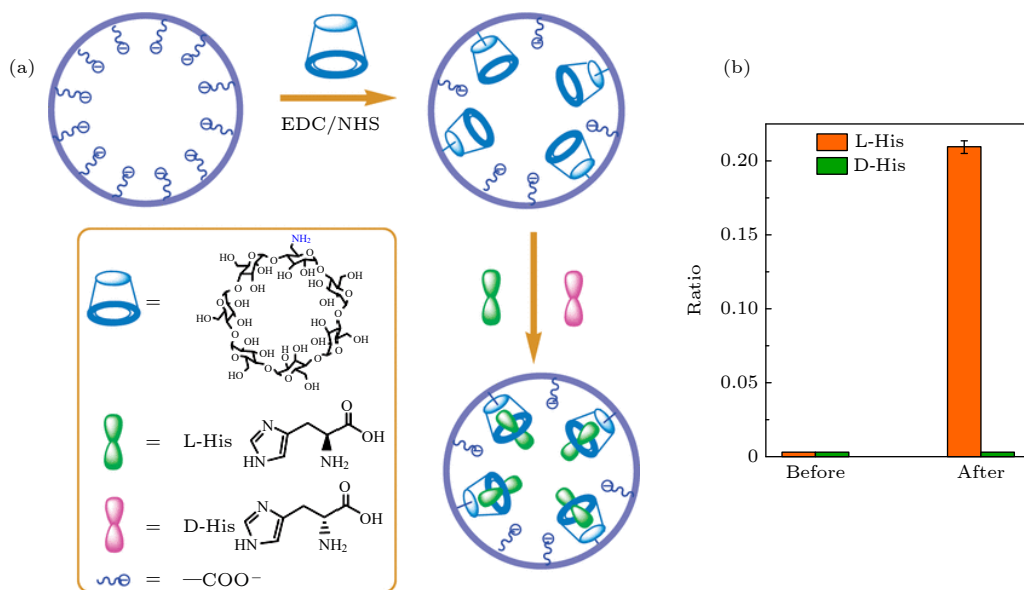


图 13 (a)  $\beta$ -CD 官能化锥形纳米孔的流程及其对映异构体的手性识别示意图; (b) 加入等浓度 L-His 和 D-His 时纳米孔的电流变化比<sup>[58]</sup>

Fig. 13. (a) Process of  $\beta$ -CD functionalized conical nanopore and the chiral recognition diagram of its enantiomers; (b) current change ratio upon addition of L-His and D-His in equal concentration<sup>[58]</sup>.

化反应位点设计在 DNA 链上, 在纳米孔中电场力的作用下将 DNA 链充分拉伸, 并利用亲和素阻挡 DNA 链, 防止 DNA 链穿过孔道, 当分析物过孔时, 会与 DNA 链上的反应位点结合, 产生过孔信号, 这条 DNA 链被定义为 PNRSS 链. 如图 14 所示, 基于这个方法, 黄硕团队在 MspA 纳米孔中引

入苯硼酸 (PBA) 修饰的 PNRSS 链来对去甲肾上腺素 (D-N, L-N) 和肾上腺素 (D-E, L-E) 的对映异构体进行了区分, 在机器学习算法辅助下, 最高的准确率达到 98.2%, 与传统的液相色谱-质谱法相比, 基于纳米孔的方法是一种更快的对映体过量值 (ee 值) 的测定方法<sup>[61]</sup>. 在之后的工作中, 同样

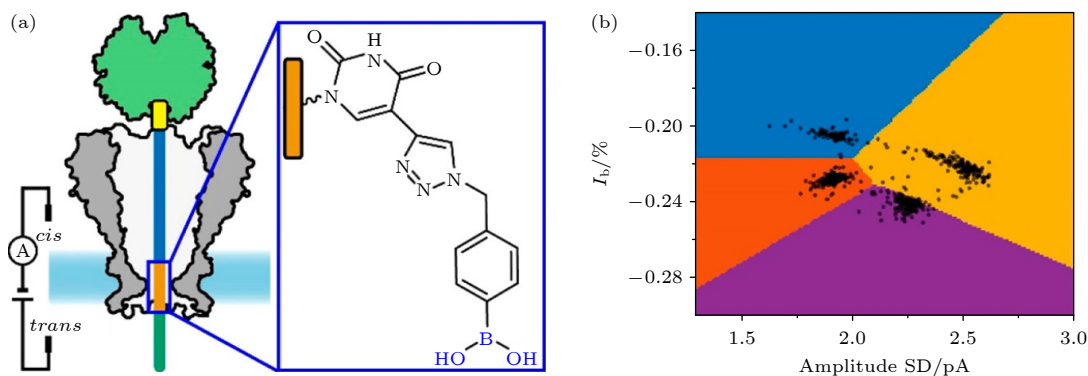


图 14 (a) PNRSS 结构示意图, 孔隙限制处的反应部分 (棕色) 被苯硼酸 (PBA) 修饰. PBA 作为固定反应物, 结合目标分析物 (如儿茶酚胺) 并报告传感事件, 蓝色、绿色和黄色区域分别代表 PNRSS 链的延伸部分、牵引部分和系绳部位; (b) 振幅 SD 与阻塞百分比  $I_b$  的散点图, 蓝色 (L-N)、橙色 (D-N)、黄色 (L-E) 和紫色 (D-E)<sup>[61]</sup>

Fig. 14. (a) PNRSS structure diagram, the reactive portion (brown) at the pore limit is modified by phenylboric acid (PBA). PBA acts as a fixed reactant, binds to target analytes (such as catecholamine) and reports sensing events, the blue, green, and yellow areas represent the PNRSS chain extension, traction, and tether, respectively; (b) scatter plot of amplitude SD versus percentage blockade  $I_b$ , blue (L-N), orange (D-N), yellow (L-E), and purple (D-E)<sup>[61]</sup>.

是用 PBA 修饰 PNRSS 链的 MspA 纳米孔, 借助机器学习算法的辅助, 对 12 种核糖核苷酸进行了区分, 准确率达到了 99.9%<sup>[62]</sup>.

### 3 分子探针传感

分子探针也是常用的纳米孔传感特异性增强技术, 除了和表面官能化一样可以增强纳米孔的特异性之外, 使用分子探针还有其他优点. 第一, 使用分子探针不需要对纳米孔进行官能化修饰, 这有利于纳米孔的通用性, 可以对多个目标检测而无需进行更换, 而且可以通过增加分子探针的浓度来捕获低浓度的目标生物分子. 第二, 纳米孔的信噪比受待测分子和纳米孔孔径比值影响<sup>[63]</sup>, 比值越小信噪比越低, 使用分子探针可以帮助纳米孔检测比自己孔径小的多的目标生物分子, 避免了反复制备不同孔径的纳米孔. 第三, 许多本身不带电荷或带电量小的目标生物分子比如蛋白质<sup>[64]</sup>, 很难直接通过电泳的驱动来被大量捕获, 通过使用 DNA 等含有较高电荷量的分子探针作为载体可以进行有效运输和检测. 第四, 不同的目标生物分子可以结合到探针的不同位置上, 例如 DNA 就可以结合多个目标生物分子从而实现多重分析与识别<sup>[65]</sup>. 从原理上来讲, 样本溶液中分子种类越少, 纳米孔传感的准确率就越高, 而使用分子探针时, 分子探针也会引起离子电流的变化, 这个信号会对后续的分析产生干扰, 不过与前文提到的优点相比, 这个缺

点还是在可接受范围内.

#### 3.1 分子探针直接作为载体

在前文中讨论的 miRNA, 也有工作使用分子探针进行识别, Wanunu 等<sup>[66]</sup>率先使用分子探针以及纳米孔对 miRNA 进行检测. 之后基于链霉亲和素修饰的核酸可以被纳米孔识别出来的原理<sup>[67]</sup>, Zahid 等<sup>[68]</sup>利用链霉亲和素单价变体 (MS) 修饰的 DNA 链作为分子探针, 检测了 miRNA 以及其他特定短序列, 如图 15 所示, 当目标短序列 (miRNA) 与链霉亲和素单价变体 (MS) 修饰的单链 DNA 链 (ssBio34+MS) 结合后, 复合物 (dsBio34+MS) 会在过孔时产生明显的电流信号, 而分子探针 (ssBio34+MS) 在过孔时并没有产生明显电流信号.

类似的, C-反应蛋白 (CRP) 是一种炎症生物标志物, 并被证明与癌症进展具有潜在相关性, 通过检验 CRP 浓度可以监测疾病治疗效果<sup>[69-71]</sup>. 与前文提到的核酸适配体的应用不同, 如图 16 所示, Wu 等<sup>[72]</sup>选择合适的核酸适配体加入溶液中, 使用介电击穿法制备的  $\text{SiN}_x$  纳米孔, 在 pH 为 7.4 的 2 mol/L LiCl 溶液中实现了对 CRP、适配体、CRP-适配体复合物的有效区分, 检测浓度极限达到了 0.3 ng/ $\mu\text{g}$ .

疾病往往需要多种生物标志物来实现诊断和预后, 同时对一组生物标志物进行鉴定可以提高效率, 但多个分子探针的存在往往会对信号处理造成较大的挑战, Zou 等<sup>[73]</sup>将对目标生物分子具有特异性的适配体序列组成三螺旋分子开关 (TMS) 并

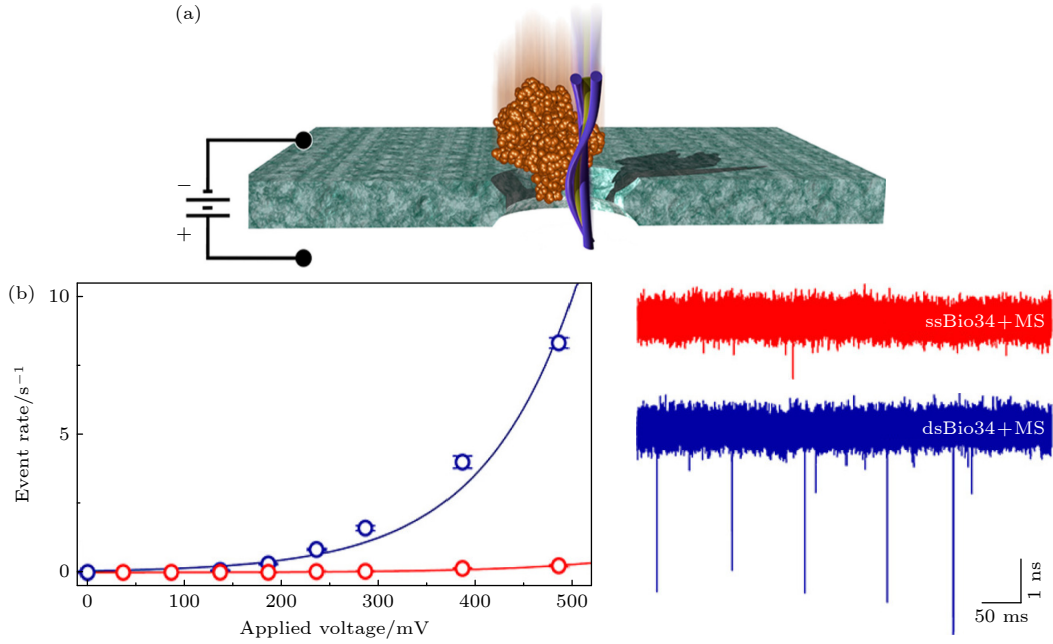


图 15 (a) 与 MS 结合的短双链 DNA 分子通过纳米孔示意图; (b) 与 MS 结合的 ssBio34 (红色) 和 dsBio34 (蓝色) 事件频率与施加电压的关系<sup>[68]</sup>

Fig. 15. (a) Schematic diagram of translocation of short double-stranded DNA molecules bound to MS through nanopores; (b) event rate vs. applied voltage for ssBio34 (red) and dsBio34 (blue) with MS bound<sup>[68]</sup>.

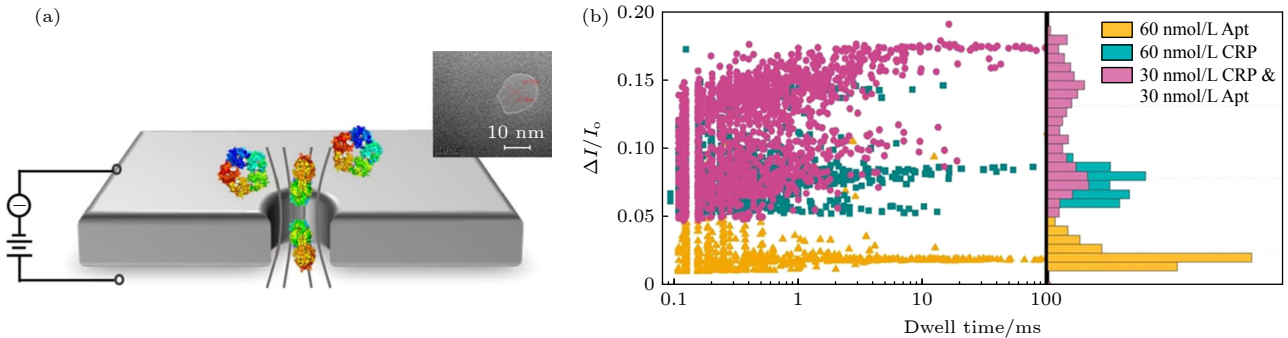


图 16 (a) 固态纳米孔用于 CRP 检测示意图, 右上图为 15 nm 孔径的纳米孔 TEM 图像; (b) CRP、适配体和 CRP-适配体复合物通过纳米孔的阻塞电流比以及过孔时间的散点图与直方图<sup>[72]</sup>

Fig. 16. (a) Schematic diagram of solid-state nanopores used for CRP detection, the up right is a TEM image of an aperture of 15 nm in diameter; (b) scatter plots and histograms of blocking current ratios and times of translocation of CRP, aptamer, and CRP-aptamer complexes through nanopore<sup>[72]</sup>.

作为探针, 该探针尺寸较大, 无法通过孔径较窄的 Aerolysin 纳米孔 (气溶素纳米孔), 因此多个分子探针不会影响电流信号. 当目标生物分子与适配体结合时, TMS 会被分解并释放特定长度的 DNA 链, 不同长度的 DNA 链过孔时就会产生不同的阻塞信号. 如图 17 所示, 利用这种探针, 他们对 Tau 381 (一种 Tau 蛋白)、 $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶 (AAT) 以及  $\beta$  位点淀粉样蛋白前体蛋白裂解酶 1 (BACE1) 3 种生物标志物进行了鉴定, 实验结果表明, 检测浓度极限在飞摩尔量级.

### 3.2 纳米颗粒作为载体

纳米颗粒在许多领域中得到了应用, 例如在传感技术中尤其以使用荧光光谱、拉曼光谱、吸收光谱等光学方法的技术最多<sup>[74,75]</sup>. 在纳米孔传感中, 纳米颗粒因为容易被受体及配体官能化也得到了广泛的关注<sup>[76-82]</sup>.

经典的官能化方法就是在纳米颗粒上产生多个结合位点, 这种操作可以在低浓度下有效浓缩目标生物分子, 增大检测到的信号频率. 针对 miRNA-21, Wang 等<sup>[83]</sup> 使用 PNA 修饰的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au 纳米

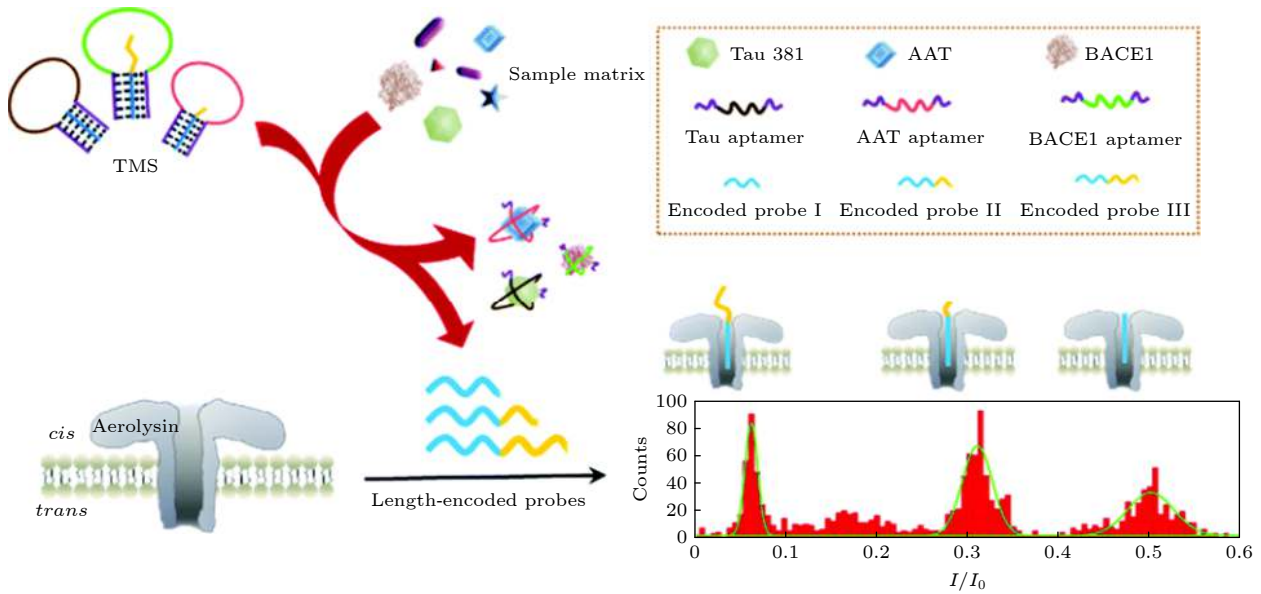


图 17 利用气溶素 (Aerolysin) 纳米孔进行多重生物标志物鉴别以及不同生物标志物引起的相应阻塞电流事件示意图<sup>[73]</sup>

Fig. 17. Schematic illustration of multiplexed biomarker discrimination with the aerolysin nanopore and the corresponding blocking current events induced by different biomarkers<sup>[73]</sup>.

颗粒与 miRNA-21 特异性结合, 使得 miRNA-21 的过孔时间以及阻塞电流大小都大大提高, 并且通过调整合适的电压, 使未结合 miRNA-21 的纳米颗粒不通过纳米孔, 减少了共存纳米颗粒载体的干扰, 降低了信号处理的难度. 同样地, 如图 18 所示, Tang 等<sup>[84]</sup> 用癌胚抗原 (CEA) 的适配体修饰  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$  纳米颗粒, 通过磁分离技术, 使复杂的混合物溶液只剩下纳米颗粒以及纳米颗粒-CEA 复合物, 由于两者的尺寸有明显差异, 可以通过阻塞电流大小进行区分, 并且阻塞电流信号的频率与一定浓度范围内的 CEA 浓度成正比, 因此, 该方法可以实现人血清中的 CEA 定量检测.

甲胎蛋白 (AFP) 也是一个与恶性肿瘤相关的生物标志物, Zhang 等<sup>[85]</sup> 开发出了一种点击化学辅助生物纳米孔检测的方法对 AFP 进行了检测, 检测极限达飞摩尔水平. 如图 19 所示, 首先用 AFP 连接抗体修饰的磁珠以及氧化铜纳米颗粒, 形成夹层结构. 然后通过磁分离技术将纳米颗粒与其他分子分离, 并用盐酸进行酸处理, 使氧化铜纳米颗粒释放二价铜离子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ). 最后对炔烃修饰的单链 DNA 和含叠氮化物的葫芦脲进行铜离子催化的点击反应, 并通过  $\alpha$ . 最后纳米孔对单链 DNA 进行检测. 使用该方法, 他们还检测了铁蛋白以及 CEA 进行了检测, 结果证明同样具有高度的特异性. 该方法优势在于不仅可以高度浓缩目标生物标志物, 还

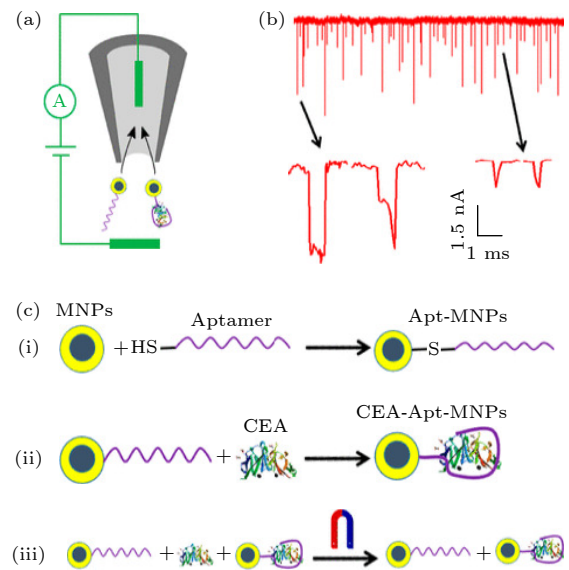


图 18 (a) 石英纳米移液管选择性检测 CEA 分子示意图, 左边的分子代表 Apt-MNPs, 右边的分子代表 CEA-Apt-MNP 复合物; (b) 在 +400 mV 下 1 mol/L KCl 的 CEA 和 Apt-MNP 混合溶液的 CEA-Apt-MNPs (左) 和 Apt-MNP (右) 相应阻塞信号的电流迹线; (c) 使用适配体官能化 MNPs 分离 CEA 的策略<sup>[84]</sup>

Fig. 18. (a) Schematic illustration of selective detection of CEA molecules with a quartz nanopipette, the left molecule represents the Apt-MNPs, and the right one refers to CEA-Apt-MNP complexes; (b) current-time trace for the presence of a mixed solution of CEA and Apt-MNPs with 1 mol/L KCl at +400 mV, the arrow points to the current traces of the corresponding blockage signals of CEA-Apt-MNPs (left) and Apt-MNPs (right); (c) the strategy for separation of CEA using aptamer functionalized MNPs<sup>[84]</sup>.

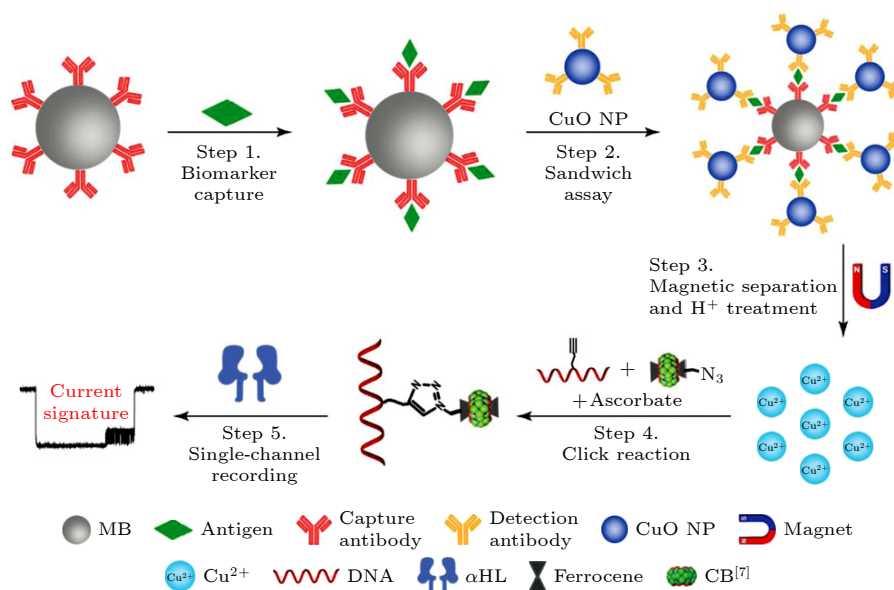


图 19 基于夹心法分析, 点击化学以及纳米孔传感来检测生物标志物的方法示意图<sup>[85]</sup>

Fig. 19. Schematic diagram of a method for detecting biomarkers based on sandwich assay, click chemistry, and nanopore sensing<sup>[85]</sup>.

可以排除复杂样本中其他分子的干扰, 适用于检测当前医学临床样本. 与该工作类似, 改变磁珠以及氧化铜纳米颗粒表面修饰的抗体, Wang 等<sup>[86]</sup>对结核杆菌的抗原 ESAT-6/CFP-10 复合物进行定量检测, 与临床的“金标准技术”(Xpert MTB/RIF 44.4% 和 Mtb 培养 72.2%) 相比, 敏感度达到了 94.4%, 检测极限也达到了阿摩尔水平. 同时, 纳米孔传感相比其他检测技术成本更低, 对于南非等结核病高发地区具有重要意义.

总体来说, 使用纳米颗粒作为载体, 通过磁分离等手段可以有效提高被分析物的浓度并减少溶液中其他杂质对离子电流信号的干扰, 但值得注意的是, 纳米颗粒的小尺寸以及球形形状会使其过孔速度很快, 会使得信号采集更加困难.

### 3.3 DNA 链作为载体

与纳米颗粒相同, 单链以及双链 DNA 同样可以提供结合位点, 值得一提的是 DNA 链可以同时结合多个目标生物分子, 为多重检测创造了有利的条件. 早期以 DNA 链作为载体的实验主要以线性 DNA 为主<sup>[87,88]</sup>, 例如 Squires 等<sup>[89]</sup>使用 DNA 链作为载体结合转录因子 (TF), Plesa 等<sup>[90]</sup>用 DNA 链结合抗 DNA 抗体.

目前, 线性 DNA 链仍然活跃在单分子检测中并已经可以将分子精准地结合到特定位点上. 帕金森病目前仍然依赖于临床症状进行判断, 很难做到提早的诊断<sup>[91]</sup>,  $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$  突触核蛋白) 浓度被

发现在健康人群和帕金森病患者中存在显著差异<sup>[92]</sup>. 如图 20 所示, Liu 等<sup>[93]</sup>将  $\alpha$ -突触核蛋白的核酸适配体修饰在 DNA 链上, 对不同  $\alpha$ -突触核蛋白浓度的样品进行检测, 通过阻塞电流的大小和过孔时间量化了不同  $\alpha$ -突触核蛋白样品的相对浓度; 同时还制备混合不同蛋白质的样品, 实验证明该纳米孔仅对  $\alpha$ -突触核蛋白具有特异性选择, 表现出明显的特征电流. 该方法与传统的荧光标记以及免疫测定等方法相比, 对样本量要求少且无需荧光标记等容易破坏样品的操作, 相对来说更加快捷.

多重检测可以提高纳米孔传感的效率, 因此以 DNA 链为载体实现多重检测也是一个重要研究课题. 如图 21 所示, Sze 等<sup>[65]</sup>在双链 DNA 上结合了凝血酶以及乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的核酸适配体, 在混合了两者的样品中, 成功区分了两者的阻塞电流, 并在血清中验证了纳米孔对这两种分子的特异性. 当然, 这个工作中, 为了增大阻塞电流的差异, 选择了凝血酶以及 AChE 两种大小差别较大的蛋白质, 使得信号处理以及区分容易了许多. 实际上, 多重检测的信号区分一直是纳米孔传感的一个挑战.

光学手段辅助纳米孔进行多重检测是较为常见的方法, 近期的工作中, Ivankin 等<sup>[94]</sup>将 3 种 RNA 分子 let-7 a, miR-375-3p 和 miR-141-3p 的互补序列制备成分子信标 (两端用荧光基团和淬灭基团标记的寡核苷酸链), 再将分子信标与不同长度的 DNA 链结合. 当 let-7 a, miR-375-3p 和 miR-141-3p

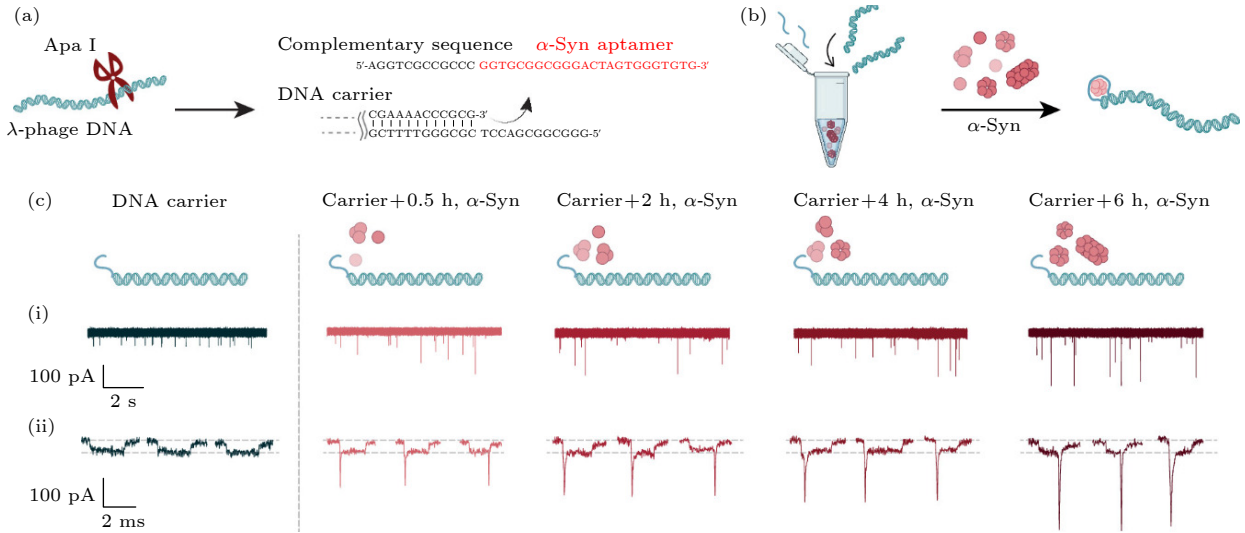


图 20 (a) 载体制备示意图; (b)  $\alpha$ -Syn 低聚物与 DNA 载体结合示意图. (c) DNA 载体与不同  $\alpha$ -Syn 低聚物结合的统计结果 (i) 每个样品的典型电流迹线, 峰值电流随着  $\alpha$ -Syn 低聚物聚合时间的延长而逐渐增大; (ii) 每个样品的 3 个代表性信号<sup>[93]</sup>

Fig. 20. (a) Schematic diagram of carrier preparation; (b) schematic diagram of  $\alpha$ -Syn oligomer binding to DNA carrier; (c) statistical results of binding of DNA vectors to different  $\alpha$ -Syn oligomers: (i) typical current trace for each sample; the peak current increases gradually with the extension of polymerization time of  $\alpha$ -Syn oligomer; (ii) three representative signals for each sample<sup>[93]</sup>.

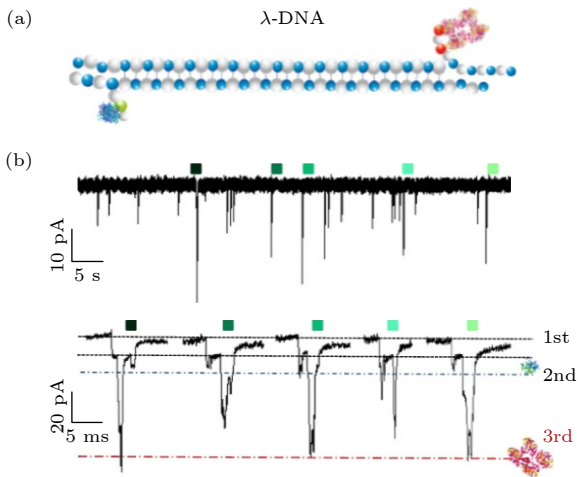


图 21 (a) DNA 载体的 2D 示意图, 具有凝血酶和 AChE 的特异性探针; (b) 在  $-200$  mV 下记录的电流时间迹线, 并在  $5$  kHz 下滤波, 清楚显示 3 个电平, 第 1 个与 DNA 载体相关, 第 2 个与凝血酶相关, 第 3 个与 AChE 相关<sup>[65]</sup>

Fig. 21. (a) 2D schematic of the  $\lambda$ -DNA carrier with two independent aptamer probes specific to thrombin and AChE; (b) typical current-time trace recorded at  $-200$  mV and re-filtered at  $5$  kHz clearly showing three levels, the 1st associated with the DNA carrier, 2nd with thrombin and 3rd from AChE<sup>[65]</sup>.

与分子信标结合时, 分子信标的茎环结构被打开, 荧光基团和淬灭基团分离, 荧光强度增大 (通过荧光显微镜观测), 这个光信号可以被用来确定目标生物分子是否与分子信标结合. 同时, 不同长度的 DNA 链过孔时, 阻塞电流的大小和过孔时间也不

同, 如图 22 所示. 因此通过 DNA 链长度的设计以及借助光学信号的辅助, 实现了同一样品中 let-7a, miR-375-3p 和 miR-141-3p 的多重检测并达到了飞摩尔浓度的检测极限以及单碱基精度的识别<sup>[95]</sup>.

DNA 纳米开关在基于凝胶电泳的核酸传感中被广泛应用<sup>[96,97]</sup>, Zhu 等<sup>[98]</sup> 通过将 DNA 哑铃修饰在 DNA 链上开发出了一种可以对核酸进行多重检测的纳米孔传感方法. 如图 23 所示, 选取一定长度的 DNA 片段, 并在两端修饰上与目标核酸有特异性的分子, 两个 DNA 哑铃在探针两侧与 DNA 链结合. 当样品中存在目标核酸时, 探针会与目标核酸结合形成环状, 并将两个 DNA 哑铃的距离拉近, 引起阻塞电流的变化. 通过该方法, 完成了对 4 个目标核酸序列以及 3 种细菌的 16 S rRNA 的鉴定.

随着 DNA 结构自组装技术的发展, 越来越多的二维、三维 DNA 结构被设计出来<sup>[99]</sup>, 研究者们期望通过多样化的构象来获得更好区分的电流信号<sup>[100,101]</sup>. 最近, Wang 等<sup>[102]</sup> 用 DNA 多面体作为载体实现了对链霉亲和素的特异性识别. 如图 24 所示, DNA 四面体由四条单链 DNA 构成, 其中 S1s 与 S2s 被生物素修饰, 可以和链霉亲和素特异性结合, S3 缺少 24 nt 的碱基, 使其与 S2 的碱基不能完全互补, 形成了有间隙的 DNA 四面体载体 (opTET2). 载体/链霉亲和素复合物的阻塞电流大

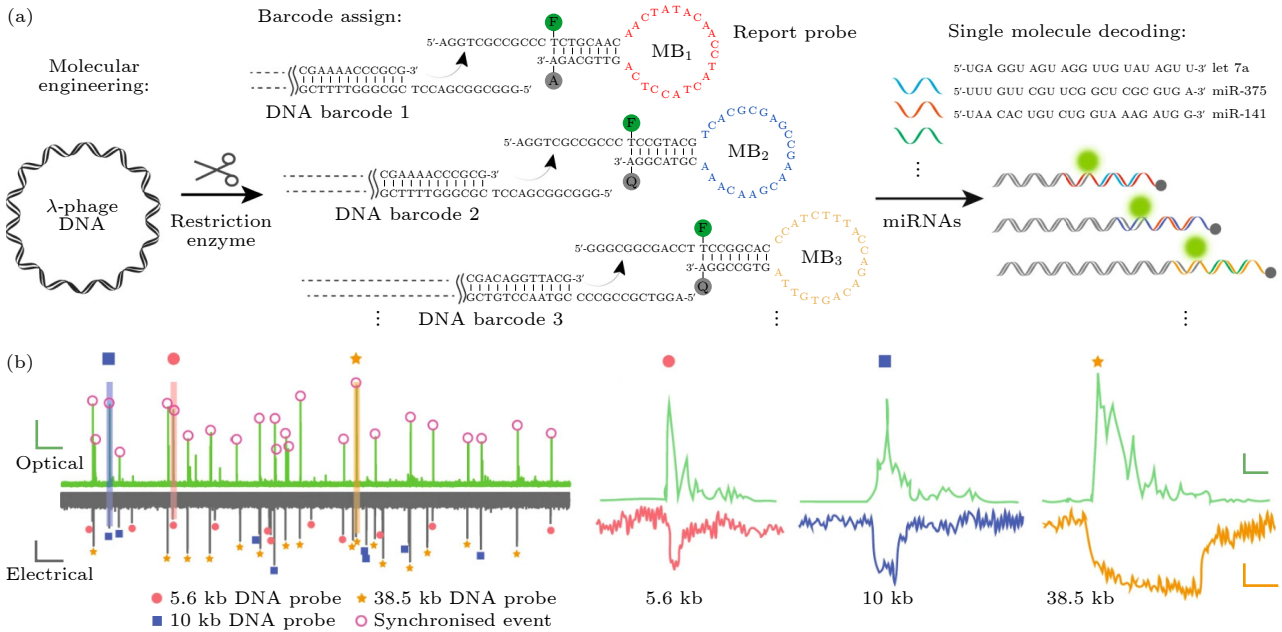


图 22 (a) 带有分子信标的 DNA 载体制备及其与相应 miRNA 结合示意图; (b) 存在 miRNA (let-7a, miR-375-3p 和 miR-141-3p) 的情况下, DNA 载体过孔的代表性光子 and 电流时间迹线, 代表 5.6, 10 和 38.5 kbp DNA 片段长度的过孔事件的 3 个电信号用实心圆、方形和星号标记, 光信号中相应同步事件用圆圈标记<sup>[95]</sup>

Fig. 22. (a) Schematic representation of the preparation of size-coded DNA probes and their binding to respective miRNA targets; (b) representative photon and current time traces of DNA carrier translocations in the presence of miRNAs (let-7a, miR-375-3p, and miR-141-3p), three electrical signals representing translocation events of 5.6, 10, and 38.5 kbp DNA fragment lengths are marked with a filled circle, square, and asterisk, the corresponding synchronization in the optical signal is marked with a circle<sup>[95]</sup>.

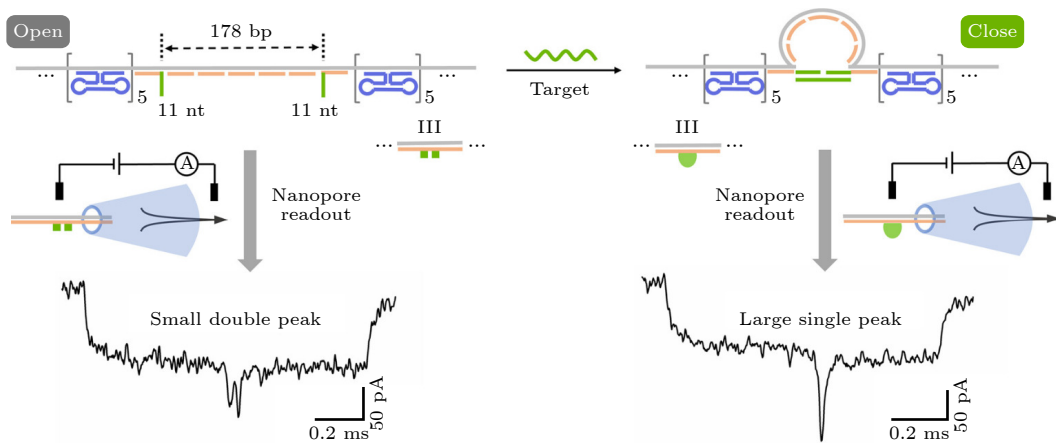


图 23 目标 DNA 存在的情况下, DNA 哑铃纳米开关的拓扑变化从“开放”状态转变到“封闭”状态以及代表性电流迹线示意图<sup>[98]</sup>  
 Fig. 23. Schematic diagram of the topological change of the DNA dumbbell nanoswitch from the “open” state to the “closed” state in the presence of the target nucleic acid and representative current traces<sup>[98]</sup>.

小和时间可以和单一载体的阻塞电流大小以及时间进行区分. 在这项工作中, 他们还使用自组装的 DNA 立方体载体对链霉素和素进行特异性检测, 同样取得了不错的效果.

表 1 列出了本综述中提到的表面官能化以及分子探针在纳米孔传感中应用的工作中所对应的目标生物分子、纳米孔类型以及检测极限供读者参考, 有些工作因为只是从几种分子中进行区分, 因

此没有具体的检测极限.

#### 4 结论和展望

本文介绍了纳米孔传感的原理, 并按照材料对纳米孔进行了分类, 主要总结了表面官能化以及分子探针在纳米孔传感中应用的最新进展. 很明显, 借助这两种技术, 使得特定生物分子在通过纳米孔

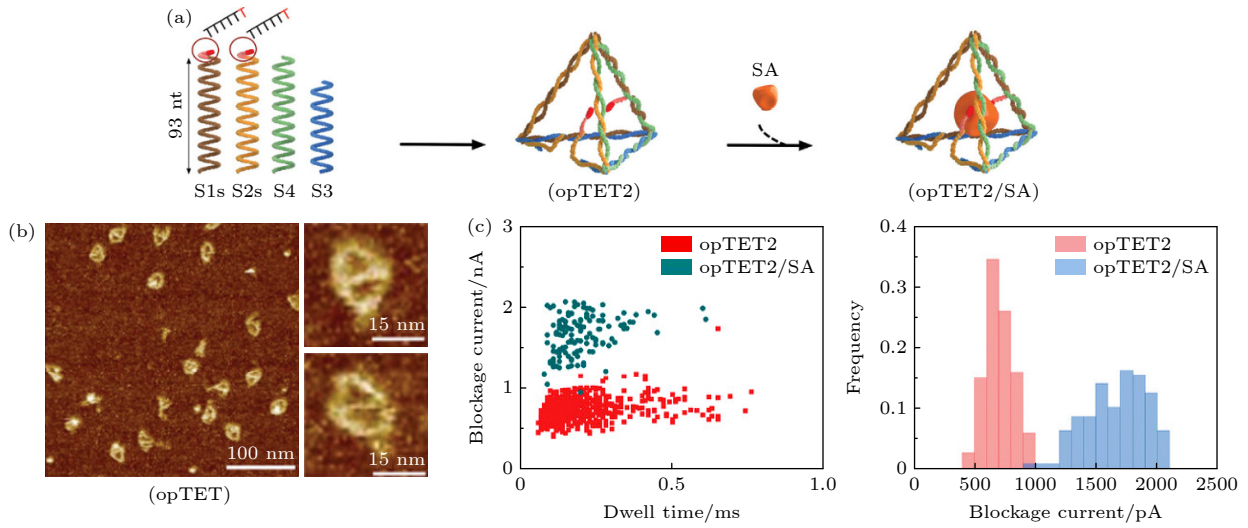


图 24 (a) opTET2 和 opTET2/SA 的原理图, 红色 T 代表碱基的生物素修饰; (b) opTET 结构的原子力显微镜 (AFM) 图像; (c) DNA 四面体 opTET2 和 opTET2/SA 通过 30 nm 纳米孔过孔事件的散点图与直方图<sup>[102]</sup>

Fig. 24. (a) Schematic diagram of opTET2 and opTET2/SA, and the red T representing biotin modification of the base; (b) AFM images of opTET structures; (c) scatter plots and histograms of DNA tetrahedron opTET2 and opTET2/SA translocation events through 30 nm nanopore<sup>[102]</sup>.

表 1 目标生物分子对应的特异性增强技术以及检测极限

Table 1. Specific enhancement techniques and detection limits corresponding to target biomolecules.

特异性增强技术	目标生物分子	纳米孔类型	检测极限
表面官能化	$\alpha$ -thrombin	$\text{SiN}_x$	N/A <sup>[39]</sup>
	$\gamma$ -thrombin		
	miRNA-21	Quartz	0.1 pmol/L <sup>[42]</sup>
	HA $\Delta$ V	PET	6 pfu/mL <sup>[43]</sup>
	SARS-CoV-2		$10^4$ copies/mL <sup>[43]</sup>
	N protein	Nanopipette	73.204 pg/mL <sup>[47]</sup>
	Neuraminidase	ClyA	38 nmol/L <sup>[49]</sup>
	SARS-CoV-2 Spike Protein	ClyA	2.3 nmol/L <sup>[50]</sup>
	Barstar	t-FhuA	12.6 nmol/L <sup>[51]</sup>
	Streptavidin	PET	N/A <sup>[52]</sup>
	L-His, D-His	PET	N/A <sup>[58]</sup>
	L-Trp	PI	N/A <sup>[59]</sup>
	norepinephrine epinephrine	MspA	1 $\mu$ mol/L <sup>[61]</sup>
	ribonucleotide	MspA	N/A <sup>[62]</sup>
分子探针	miR155	$\text{SiN}_x$	10 nmol/L <sup>[68]</sup>
	C-reactive protein	$\text{SiN}_x$	0.3 ng/ $\mu$ L <sup>[72]</sup>
	alpha-1 antitrypsin		77.9 fmol/L <sup>[73]</sup>
	Tau 381	Aerolysin	6.79 fmol/L <sup>[73]</sup>
	BACE1		86.4 fmol/L <sup>[73]</sup>
	miRNA-21	Glass	5 nmol/L <sup>[83]</sup>
	Carcinoembryonic-antigen	Quartz	0.01 nmol/L <sup>[84]</sup>
	alpha fetoprotein	$\alpha$ -HL	1 fmol/L <sup>[85]</sup>
	ESAT-6/CFP-10	$\alpha$ -HL	10 amol/L <sup>[86]</sup>
	$\alpha$ -Syn	Quartz	2.2 pmol/L <sup>[93]</sup>
	Thrombin AChE	Quartz	N/A <sup>[65]</sup>



表 1 (续) 目标生物分子对应的特异性增强技术以及检测极限  
Table 1 (continued). Specific enhancement techniques and detection limits corresponding to target biomolecules.

特异性增强技术	目标生物分子	纳米孔类型	检测极限
	miR-375-3p miR-141-3p	SiN <sub>x</sub>	8 fmol/L <sup>[95]</sup> 5 fmol/L <sup>[95]</sup>
	<i>E. coli</i> DH5α 16 SrRNA <i>Salmonella</i> 16 SrRNA <i>A. Baumannii</i> 16 SrRNA	Glass	N/A <sup>[98]</sup>
	Streptavidin	SiN <sub>x</sub>	N/A <sup>[102]</sup>

时产生了更易被识别的阻塞电流, 增强了纳米孔鉴别不同生物分子的能力, 而且在某些标志物的鉴别上, 检测的最低浓度更是已经超过了传统的方法。

尽管纳米孔传感目前已经在疾病诊断、生命科学等多个领域表现出了极大的潜力, 但仍然有若干需要克服的难点来继续提升检测性能. 首先最重要的是准确率的提高, 相较于其他成熟的方法, 纳米孔传感的准确率不够; 第二, 在复杂样品中阻塞电流的差异不明显, 多重检测在实际应用中可行性差; 第三, 纳米孔孔径在制备时并不均一, 这会影响到纳米孔的批量生产以及与其他系统的集成; 第四, 需要追求更低的检测极限来满足一些应用的特定需求. 针对以上问题, 可以考虑以下几种方案. 在检测方面, 与光学传感结合是一个值得进一步探索的方向, 比如通过光学信号的有无确定生物分子是否过孔或者使用具有不同荧光强度的荧光分子来标记不同的生物分子来辅助多重检测; 同样, 目前已经有了将电极集成到纳米孔中的技术, 也可以考虑采集离子电流信号的同时采集生物分子过孔时的隧穿电流信号, 也许对两种电流信号进行分析可以提高纳米孔传感的准确率. 在信号分析方面, 基于机器学习的分析是一个很有潜力的方向, 比如开发适合电流信号分类的算法等. 在纳米孔制备与集成方面, 寻找新的材料或者打孔方法使固态纳米孔的孔径更加均一, 会有利于纳米孔传感与其他技术的集成. 除此之外, 使用大型的化学基团对分析物进行标记可能也是一种值得探索的特异性增强技术。

鉴于纳米孔过去几十年的发展, 从一开始最简单的 DNA 序列测序, 到现在对各种生物分子进行鉴别等. 随着新材料的发现、官能化技术以及检测方法的发展, 希望纳米孔传感会在更多的领域做出重大贡献。

### 参考文献

[1] Yamazaki H, Hu R, Henley R Y, Halman J, Afonin K A, Yu

D, Zhao Q, Wanunu M 2017 *Nano Lett.* **17** 7067  
 [2] Kim J D, Lee Y G 2014 *Biomed. Opt. Express* **5** 2471  
 [3] Verschueren D, Shi X, Dekker C 2019 *Small Methods* **3** 1800465  
 [4] Fologea D, Gershow M, Ledden B, McNabb D S, Golovchenko J A, Li J 2005 *Nano Lett.* **5** 1905  
 [5] Xue L, Yamazaki H, Ren R, Wanunu M, Ivanov A P, Edel J B 2020 *Nat. Rev. Mater.* **5** 931  
 [6] Elaguech M A, Bahri M, Djebbi K, Zhou D, Shi B, Liang L, Komarova N, Kuznetsov A, Tlili C, Wang D 2022 *Food Chem.* **389** 133051  
 [7] Beamish E, Tabard-Cossa V, Godin M 2019 *ACS Sens.* **4** 2458  
 [8] Wang L, Han Y J, Zhou S, Guan X Y 2014 *Biosens. Bioelectron.* **62** 158  
 [9] Oh S, Lee M K, Chi S W 2019 *ACS Sens.* **4** 2849  
 [10] He L, Tessier D R, Briggs K, Tsangaris M, Charron M, McConnell E M, Lomovtsev D, Tabard-Cossa V 2021 *Nat. Commun.* **12** 5348  
 [11] Chen X H, Zhou S, Wang Y J, Zheng L, Guan S, Wang D Q, Wang L, Guan X Y 2023 *TrAC Trends Anal. Chem.* **162** 117060  
 [12] Ying Y L, Zhang J, Gao R, Long Y T 2013 *Angew. Chem. Int. Ed.* **52** 13154  
 [13] Haque F, Li J H, Wu H C, Liang X J, Guo P X 2013 *Nano Today* **8** 56  
 [14] Li S J, Xia N, Yuan B Q, Du W M, Sun Z F, Zhou B B 2015 *Electrochim. Acta* **159** 234  
 [15] Ali M, Neumann R, Ensinger W 2010 *ACS Nano* **4** 7267  
 [16] Ding D F, Gao P C, Ma Q, Wang D G, Xia F 2019 *Small* **15** 1804878  
 [17] Wang H Y, Gu Z, Cao C, Wang J, Long Y T 2013 *Anal. Chem.* **85** 8254  
 [18] Piguot F, Ouldali H, Pastoriza-Gallego M, Manivet P, Pelta J, Oukhaled A 2018 *Nat. Commun.* **9** 966  
 [19] Liu Y, Zhang S Y, Wang Y Q, Wang L Y, Cao Z Y, Sun W, Fan P P, Zhang P K, Chen H Y, Huang S 2022 *J. Am. Chem. Soc.* **144** 13717  
 [20] Hou G L, Zhang H C, Xie G H, Xiao K, Wen L P, Li S H, Tian Y, Jiang L 2014 *J. Mater. Chem. A* **2** 19131  
 [21] Guo L P, Liu Y C, Zeng H O, Zhang S P, Song R Y, Yang J, Han X, Wang Y, Wang L D 2024 *Adv. Mater.* **36** 2307242  
 [22] Ying Y L, Hu Z L, Zhang S L, Qing Y J, Fragasso A, Maglia G, Meller A, Bayley H, Dekker C, Long Y T 2022 *Nat. Nanotechnol.* **17** 1136  
 [23] Mayer S F, Cao C, Dal Peraro M 2022 *iScience* **25** 104145  
 [24] Lee K, Park K B, Kim H J, Yu J S, Chae H, Kim H M, Kim K B 2018 *Adv. Mater.* **30** 1704680  
 [25] Wanunu M, Meller A 2007 *Nano Lett.* **7** 1580  
 [26] Anderson B N, Muthukumar M, Meller A 2013 *ACS Nano* **7** 1408

- [27] Soni N, Chandra Verma N, Talor N, Meller A 2023 *Nano Lett.* **23** 4609
- [28] Tang Z P, Lu B, Zhao Q, Wang J J, Luo K F, Yu D P 2014 *Small* **10** 4332
- [29] Schneider G F, Xu Q, Hage S, Luik S, Spoor J N H, Malladi S, Zandbergen H, Dekker C 2013 *Nat. Commun.* **4** 2619
- [30] Yusko E C, Prangkio P, Sept D, Rollings R C, Li J, Mayer M 2012 *ACS Nano* **6** 5909
- [31] Li Q, Ying Y L, Liu S C, Lin Y, Long Y T 2019 *ACS Sens.* **4** 1185
- [32] Feng S L, Chen C T, Wang W, Que L 2018 *Biosens. Bioelectron.* **105** 36
- [33] Wilson D S, Szostak J W 1999 *Annu. Rev. Biochem.* **68** 611
- [34] Zhou J, Rossi J 2016 *Nat. Rev. Drug Discovery* **16** 181
- [35] Negrier C, Shima M, Hoffman M 2019 *Blood Rev.* **38** 100582
- [36] Jaberi N, Soleimani A, Pashirzad M, Abdeahad H, Mohammadi F, Khoshakhlagh M, Khazaei M, Ferns G A, Avan A, Hassanian S M 2018 *J. Cell. Biochem.* **120** 4757
- [37] Bock L C, Griffin L C, Latham J A, Vermaas E H, Toole J J 1992 *Nature* **355** 564
- [38] Rotem D, Jayasinghe L, Salichou M, Bayley H 2012 *J. Am. Chem. Soc.* **134** 2781
- [39] Reynaud L, Bouchet-Spinelli A, Janot J M, Buhot A, Balne S, Raillon C 2021 *Anal. Chem.* **93** 7889
- [40] Cao M Y, Zhang L J, Tang H R, Qiu X, Li Y X 2022 *Anal. Chem.* **94** 17405
- [41] Chou J, Shahi P, Werb Z 2014 *Cell Cycle* **12** 3262
- [42] Qiu X, Dong J Y, Dai Q S, Huang M M, Li Y X 2023 *Biosens. Bioelectron.* **240** 115594
- [43] Peinetti A S, Lake R J, Cong W, Cooper L, Wu Y, Ma Y, Pawel G T, Toimil-Molares M E, Trautmann C, Rong L, Mariñas B, Azzaroni O, Lu Y 2021 *Sci. Adv.* **7** eabh2848
- [44] Wu D, Wu T T, Liu Q, Yang Z C 2020 *Int. J. Infect. Dis.* **94** 44
- [45] Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y M, Wang W, Song Z G, Hu Y, Tao Z W, Tian J H, Pei Y Y, Yuan M L, Zhang Y L, Dai F H, Liu Y, Wang Q M, Zheng J J, Xu L, Holmes E C, Zhang Y Z 2020 *Nature* **579** 265
- [46] Kim D, Lee J Y, Yang J S, Kim J W, Kim V N, Chang H 2020 *Cell* **181** 914
- [47] Ma W H, Xie W Y, Tian R, Zeng X Q, Liang L Y, Hou C J, Huo D Q, Wang D Q 2023 *Sens. Actuators B* **377** 133075
- [48] Albrecht C, Kuznetsov A S, Appert-Collin A, Dhaidh Z, Callewaert M, Bershatsky Y V, Urban A S, Bocharov E V, Bagnard D, Baud S, Blaise S, Romier-Crouzet B, Efremov R G, Dauchez M, Duca L, Gueroult M, Maurice P, Bennisroune A 2020 *Front. Cell Dev. Biol.* **8** 611121
- [49] Kwak D K, Kim J S, Lee M K, Ryu K S, Chi S W 2020 *Anal. Chem.* **92** 14303
- [50] Zhang X, Galenkamp N S, van der Heide N J, Moreno J, Maglia G, Kjems J 2023 *ACS Nano* **17** 9167
- [51] Thakur A K, Movileanu L 2018 *Nat. Biotechnol.* **37** 96
- [52] Ali M, Yameen B, Neumann R, Ensinger W, Knoll W, Azzaroni O 2008 *J. Am. Chem. Soc.* **130** 16351
- [53] Liu Y, Xuan W M, Cui Y 2010 *Adv. Mater.* **22** 4112
- [54] Fortuna A, Alves G, Falcão A 2013 *Biomed. Chromatogr.* **28** 27
- [55] Wang J, Prajapati J D, Gao F, Ying Y L, Kleinekathöfer U, Winterhalter M, Long Y T 2022 *J. Am. Chem. Soc.* **144** 15072
- [56] Ramirez J, He F, Lebrilla C B 1998 *J. Am. Chem. Soc.* **120** 7387
- [57] Kim B Y, Yang J, Gong M, Flachsbarth B R, Shannon M A, Bohn P W, Sweedler J V 2009 *Anal. Chem.* **81** 2715
- [58] Han C P, Hou X, Zhang H C, Guo W, Li H B, Jiang L 2011 *J. Am. Chem. Soc.* **133** 7644
- [59] Xie G H, Tian W, Wen L P, Xiao K, Zhang Z, Liu Q, Hou G L, Li P, Tian Y, Jiang L 2015 *Chem. Commun.* **51** 3135
- [60] Jia W D, Hu C Z, Wang Y Q, Gu Y M, Qian G, Du X Y, Wang L, Liu Y, Cao J, Zhang S Y, Yan S, Zhang P K, Ma J, Chen H Y, Huang S 2021 *Nat. Commun.* **12** 5811
- [61] Jia W D, Hu C Z, Wang Y Q, Liu Y, Wang L Y, Zhang S Y, Zhu Q, Gu Y M, Zhang P K, Ma J, Chen H Y, Huang S 2022 *ACS Nano* **16** 6615
- [62] Wang Y Q, Fan P P, Zhang S Y, Wang L Y, Li X Y, Jia W D, Liu Y, Wang K F, Du X Y, Zhang P K, Huang S 2022 *ACS Nano* **16** 21356
- [63] Talaga D S, Li J 2009 *J. Am. Chem. Soc.* **131** 9287
- [64] Firnkes M, Pedone D, Knezevic J, Döblinger M, Rant U 2010 *Nano Lett.* **10** 2162
- [65] Sze J Y Y, Ivanov A P, Cass A E G, Edel J B 2017 *Nat. Commun.* **8** 1552
- [66] Wanumu M, Dadosh T, Ray V, Jin J, McReynolds L, Drndić M 2010 *Nat. Nanotechnol.* **5** 807
- [67] Carlsen A T, Zahid O K, Ruzicka J A, Taylor E W, Hall A R 2014 *Nano Lett.* **14** 5488
- [68] Zahid O K, Wang F, Ruzicka J A, Taylor E W, Hall A R 2016 *Nano Lett.* **16** 2033
- [69] Iktac A, Kalkan S, Caliskan S 2020 *Int. J. Clin. Pract.* **75** e13935
- [70] Mosquera-Sulbaran J A, Pedreañez A, Carrero Y, Callejas D 2021 *Rev. Med. Virol.* **31** e2221
- [71] Tatsuoka T, Okuyama T, Takeshita E, Oi H, Noro T, Mitsui T, Yoshitomi H, Oya M 2020 *Surgery Today* **51** 397
- [72] Wu J, Liang L Y, Zhang M K, Zhu R, Wang Z, Yin Y J, Yin B H, Weng T, Fang S X, Xie W Y, Wang L, Wang D Q 2022 *ACS Appl. Mater. Interfaces* **14** 12077
- [73] Zou Z, Yang H, Yan Q, Qi P, Qing Z H, Zheng J, Xu X, Zhang L H, Feng F, Yang R H 2019 *Chem. Commun.* **55** 6433
- [74] Saha K, Agasti S S, Kim C, Li X, Rotello V M 2012 *Chem. Rev.* **112** 2739
- [75] Wang H, Yang R H, Yang L, Tan W H 2009 *ACS Nano* **3** 2451
- [76] Billinge E R, Broom M, Platt M 2013 *Anal. Chem.* **86** 1030
- [77] Blundell E L C J, Vogel R, Platt M 2016 *Langmuir* **32** 1082
- [78] Hernández-Neuta I, Pereiro I, Ahlford A, Ferraro D, Zhang Q, Viovy J L, Descroix S, Nilsson M 2018 *Biosens. Bioelectron.* **102** 531
- [79] Kühnemund M, Nilsson M 2015 *Biosens. Bioelectron.* **67** 11
- [80] Rosen C B, Rodriguez-Larrea D, Bayley H 2014 *Nat. Biotechnol.* **32** 179
- [81] Zhang Z H, Wang X Q, Wei X J, Zheng S W, Lenhart B J, Xu P S, Li J, Pan J, Albrecht H, Liu C 2021 *Biosens. Bioelectron.* **181** 113134
- [82] Karhanek M, Kemp J T, Pourmand N, Davis R W, Webb C D 2005 *Nano Lett.* **5** 403
- [83] Wang H, Tang H R, Yang C, Li Y X 2019 *Anal. Chem.* **91** 7965
- [84] Tang H R, Wang H, Yang C, Zhao D D, Qian Y Y, Li Y X 2020 *Anal. Chem.* **92** 3042
- [85] Zhang Z H, Li T, Sheng Y Y, Liu L, Wu H C 2018 *Small* **15** 1804078
- [86] Wang X Q, Wei X J, van der Zalm M M, Zhang Z H, Subramanian N, Demers A M, Ghimenton Walters E, Hesselting A, Liu C 2023 *ACS Nano* **17** 21093

- [87] Japrun D, Bahrami A, Nadzeyka A, Peto L, Bauerdick S, Edel J B, Albrecht T 2014 *J. Phys. Chem. B* **118** 11605
- [88] Bell N A W, Keyser U F 2015 *J. Am. Chem. Soc.* **137** 2035
- [89] Squires A, Atas E, Meller A 2015 *Sci. Rep.* **5** 11643
- [90] Plesa C, Ruitenbergh J W, Witteveen M J, Dekker C 2015 *Nano Lett.* **15** 3153
- [91] Kulenkampff K, Wolf Perez A-M, Sormanni P, Habchi J, Vendruscolo M 2021 *Nat. Rev. Chem.* **5** 277
- [92] van Steenoven I, Majbour N K, Vaikath N N, Berendse H W, van der Flier W M, van de Berg W D J, Teunissen C E, Lemstra A W, El-Agnaf O M A 2018 *Movement Disorders* **33** 1724
- [93] Liu Y X, Wang X Y, Campolo G, Teng X Y, Ying L M, Edel J B, Ivanov A P 2023 *ACS Nano* **17** 22999
- [94] Ivankin A, Henley R Y, Larkin J, Carson S, Toscano M L, Wanunu M 2014 *ACS Nano* **8** 10774
- [95] Cai S, Pataillot-Meakin T, Shibakawa A, Ren R, Bevan C L, Ladame S, Ivanov A P, Edel J B 2021 *Nat. Commun.* **12** 3515
- [96] Chandrasekaran A R, MacIsaac M, Vilcapoma J, Hansen C H, Yang D, Wong W P, Halvorsen K 2021 *Nano Lett.* **21** 469
- [97] Koussa M A, Halvorsen K, Ward A, Wong W P 2015 *Nat. Methods* **12** 123
- [98] Zhu J B, Tivony R, Bošković F, Pereira-Dias J, Sandler S E, Baker S, Keyser U F 2023 *J. Am. Chem. Soc.* **145** 12115
- [99] Al-Zarah H, Serag M F, Abadi M, Habuchi S 2023 *ACS Appl. Nano Mater.* **6** 9515
- [100] Ding T L, Yang J, Wang J, Pan V, Lu Z H, Ke Y G, Zhang C 2022 *Biosens. Bioelectron.* **195** 113658
- [101] Kim S H, Kim K R, Ahn D R, Lee J E, Yang E G, Kim S Y 2017 *ACS Nano* **11** 9352
- [102] Yang J, Wang J, Liu X, Chen Y M, Liang Y, Wang Q, Jiang S X, Zhang C 2023 *Small* **19** 2303715

## REVIEW

## Nanopore sensing specific enhancement technique for single molecule detection\*

Pan Qin-Jie<sup>1)2)</sup> Zhao Can-Dong<sup>1)2)</sup> Chen Qi<sup>1)2)†</sup> He Yu-Hui<sup>1)2)</sup>

Miao Xiang-Shui<sup>1)2)</sup>

1) (*Institute of Information Storage Materials and Devices, School of Integrated Circuits, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China*)

2) (*Hubei Yangtze Memory Laboratories, Wuhan 430205, China*)

( Received 23 January 2024; revised manuscript received 27 February 2024 )

### Abstract

Nanopore sensors have become important tools for analyzing biomarkers, including but not limited to nucleic acids, proteins, and other biomolecules that play important roles in life. Though the nanopores themselves have no selectivity towards target molecules, higher sensitivity of nanopore sensing to the target biomarkers could be achieved with the help of the specificity enhancement technology. In this work, the basic principles of nanopore sensing are first introduced, then methods of modifying nanopore surface as well as the development and application of those selectivity enhancement technologies of nanopore sensing in recent years are reviewed. These enhancement technologies primarily fall into two categories: surface functionalization and molecular probes. Surface functionalization is further categorized based on the types of functional molecules used, while molecular probes are classified according to carrier forms. Finally, in this paper several challenges that nanopore sensing continues to encounter are discussed and some suggestions are made for its future development.

**Keywords:** nanopore, specificity, molecular probe, functionalization

**PACS:** 87.85.fk, 07.07.Df

**DOI:** 10.7498/aps.73.20240159

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 62374063).

† Corresponding author. E-mail: chenqi\_wlu@hust.edu.cn

## 面向单分子检测的纳米孔传感特异性增强技术

潘钦杰 赵灿东 陈琪 何毓辉 缪向水

### Nanopore sensing specific enhancement technique for single molecule detection

Pan Qin-Jie Zhao Can-Dong Chen Qi He Yu-Hui Miao Xiang-Shui

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 73, 108702 (2024) DOI: 10.7498/aps.73.20240159

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.73.20240159>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

---

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 官能化对五边形石墨烯力学性能的影响及机理研究

Investigation of effects of functionalization on mechanical properties of penta-graphene

物理学报. 2021, 70(22): 226201 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20210764>

#### 纳米金刚石的分散、修饰及载药应用研究

Disintegration, functionalization and drug-delivery application of nanodiamond

物理学报. 2018, 67(16): 166801 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180862>

#### 单分子表面增强拉曼散射的光谱特性及分析方法

Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy (SM-SERS): characteristics and analysis

物理学报. 2021, 70(13): 137401 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20201447>

#### 单分子光学探针揭示易混聚合物受限纳米区域的动力学

Single-molecule probes revealed dynamics of confined nano-regions in miscible polymer blends

物理学报. 2019, 68(14): 148201 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190423>

#### 单分子尺度的光量子态调控与单分子电致发光研究

Single-molecule electroluminescence and its relevant latest progress

物理学报. 2018, 67(22): 223301 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20181718>

#### 基于受激辐射信号的谱域光学相干层析分子成像方法

Stimulated-emission based spectral domain optical coherence tomography for molecular contrast imaging

物理学报. 2018, 67(17): 174201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20171738>