

doi: 10.12452/j.fxcxb.26010904

纳米孔单分子传感平台用于G四链体拓扑结构区分

雍伟¹, 赵新佳^{2*}, 常永新², 张佳蓉², 宋艳玲^{1*}, 卿光焱²

(1. 沈阳化工大学 化学工程学院, 辽宁 沈阳 110142; 2. 中国科学院大连化学物理研究所 中药科学研究中心, 辽宁 大连 116023)

摘要: G四链体(G4)的拓扑结构多样性与其生物学功能密切相关, 建立高灵敏度检测方法对解析其结构-功能关系至关重要。该研究系统评估耻垢分枝杆菌孔蛋白A(MspA)、气溶素(AeL)与 α -溶血素(HL)三种纳米孔对G4的检测性能, 成功构建以HL为核心的单分子无标记纳米孔G4传感体系。该体系可高效区分单链DNA(ssAfl7)与平行结构c-Myc、反平行结构TBA及混合型结构H24A等不同拓扑类型的G4。针对c-Myc27bp阻塞时间过长的问题, 通过在序列两端各引入25个腺嘌呤(A)构建c-Myc77bp结构, 该结构在过孔过程中呈现特征性“二级台阶信号”, 显著提升信号辨识度与过孔效率。该研究为G4拓扑结构单分子解析提供新策略, 拓展了纳米孔技术在核酸高级结构分析领域的应用, 可为相关疾病靶向药物的研发提供技术支持。

关键词: 纳米孔技术; G四链体; 单分子传感; 拓扑结构区分; α -溶血素

中图分类号: O657.99; Q52 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)06-0001-07

Nanopore Single-Molecule Sensing Platform for Topological Discrimination of G-Quadruplexes

YONG Wei¹, ZHAO Xin-jia^{2*}, CHANG Yong-xin², ZHANG Jia-rong², SONG Yan-ling^{1*},
QING Guang-yan²(1. College of Chemical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China;
2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: The topological diversity of G-quadruplexes (G4s) is closely related to their biological functions, and establishing a highly sensitive detection method is crucial for elucidating their structure-function relationships. In this study, we systematically evaluated the detection performances of three nanopores—Mycobacterium smegmatis porin A (MspA), Aerolysin (AeL), and α -hemolysin (HL)—for G4s, and successfully constructed a label-free single-molecule nanopore sensing system for G4s with HL as the core. This system can efficiently discriminate single-stranded DNA (ssAfl7) from G4s of different topological types, including parallel c-Myc, antiparallel TBA, and hybrid H24A. To overcome the excessively long dwell time associated with c-Myc27bp, a c-Myc77bp construct was designed by incorporating 25 adenines (A) at both ends of the sequence. During translocation, c-Myc77bp exhibits characteristic "two-step signals", which significantly improves signal discriminability and translocation efficiency. This work provides a novel strategy for the single-molecule analysis of G4 topological structures, expands the application of nanopore technology in the analysis of nucleic acid higher structures, and offers a technical basis for the development of targeted therapeutics against related diseases.

Key words: nanopore technology; G-quadruplex; single-molecule sensing; topological discrimination; α -hemolysin

G四链体(G4)是富G核酸序列通过G-四分体堆叠形成的高级核酸结构, 主要包括平行、反平行及混合型三大拓扑类型^[1]。这种结构多样性是G4行使生物学功能的关键基础, 在端粒维持、癌基因转录

收稿日期: 2026-01-09; 修回日期: 2026-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22174138); 大连化物所医工联合项目(DMU-1&DICP UN202307)

* 通讯作者: 赵新佳: 博士, 助理研究员, 研究方向: 纳米孔单分子检测, E-mail: zhaoxinjia@dicp.ac.cn;

宋艳玲, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物结构改造及生物活性研究, 化学药物合成工艺研究, E-mail: yanlingsong521@126.com

调控等关键生命过程中, G4 正是通过特定拓扑构象与调控蛋白、小分子配体发生特异性相互作用, 进而精准调控生理事件; 而 G4 在 c-Myc、VEGF 等癌基因启动子区域的异常形成, 更与肿瘤的发生、发展密切相关^[2-3]。因此, G4 拓扑结构的精准解析是阐明其结构和功能关系的关键, 也为基于 G4 靶点的疾病诊断与药物研发提供重要理论支撑^[4]。目前 G4 拓扑结构检测主要依赖圆二色谱(CD)、核磁共振(NMR)、荧光光谱等技术^[5]。但这些方法存在明显局限: CD 仅能定性区分, 无法提供单分子水平的动态信息; NMR 与 X 射线晶体衍射需大量高纯度样品, 实验周期长、成本高; 荧光光谱依赖化学标记, 易干扰 G4 天然折叠构象^[6-7]。开发无标记、单分子水平、实时动态的区分技术, 是该领域需要突破的瓶颈。

纳米孔单分子传感技术凭借无标记、实时监测、单分子分辨率等优势, 已成为核酸结构分析的新兴平台^[3,8]。其通过分子过孔引发的离子电流扰动表征分子特征, 近年来在 G4 检测中已有初步应用, 但仍面临关键问题: 不同纳米孔的 G4 检测适配性缺乏系统评估, 最优孔道选择无统一标准; 不同拓扑 G4 的信号辨识度不足, 区分效果有限; 短链 G4 因过孔驱动力不足, 易出现滞留、信号弥散等问题^[1]。

针对上述瓶颈, 本研究旨在开发高效精准的 G4 拓扑结构单分子检测方案。本研究选取了 3 种具有明确的生物学功能与研究价值, 且均为对应拓扑类型经典模型的 G4 序列, 其中, c-Myc 所形成的 G4 位于原癌基因 c-Myc 启动子区域, 为典型的平行型 G4, 其形成可显著抑制 c-Myc 基因转录, 是肿瘤靶向治疗的重要靶点; TBA(凝血酶适配体)是经典的反平行型 G4, 可通过特异性结合凝血酶发挥抗凝作用, 是血栓疾病诊疗与核酸适配体功能研究的核心模型; H24A 来源于人端粒 DNA 序列, 可形成(3+1)型混合型 G4, 是解析端粒维持机制、研究细胞衰老与肿瘤永生化的经典模型。通过系统筛选适配生物纳米孔, 构建无标记单分子传感体系, 实现单链 DNA 与不同拓扑 G4 的特异性区分, 并解决短链 G4 过孔效率低、信号辨识度不足的问题。本研究可为 G4 拓扑结构解析提供新技术路径, 拓展纳米孔技术在核酸高级结构分析中的应用, 为相关疾病研究与药物研发提供技术支持。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1, 2-二植酰磷脂酰胆碱(纯度 99%, 美国 Avanti Polar Lipids 公司); 正癸烷(纯度 99%, 美国 Thermo Fisher 公司); 胰蛋白酶(T1763)、氯化钾(KCl, 纯度 99%)、氯化锂(LiCl, 纯度 99%)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, 纯度 99.5%)购于美国 Sigma-Aldrich 公司; 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 纯度 99%)购于北京索莱宝科技有限公司, 乙二胺四乙酸二钠(EDTA, 纯度 99%)购于天津市大茂化学试剂厂; 实验所用超纯水为 Milli-Q 制备(电导率 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$, 25°C); 实验所用 DNA 分析物(表 1)购于上海生工生物工程股份有限公司; AeL、MspA 以及 HL 纳米孔的表达、纯化和组装与文献报道一致^[9-11]。

纳米孔微流池购于美国 Warner Instruments 公司; 纳米孔实验装置: Axon Axopatch 200B 电流放大器, Axon Digidata 1550B 数模转换器, Clampex 数据记录软件, ClampFit 数据处理软件(美国 Molecular Devices 公司); Ag/AgCl 电极(自制: 直径 1.0 mm 银丝购于昆山市玉山镇亿瑞隆电子材料经营部, 经阳极氧化法镀 AgCl 层)。

表 1 实验所用 DNA 序列信息

Table 1 Information of DNA sequences used in experiments

| Sequence name | Sequence(5'→3') |
|---------------|--|
| ssDNA(ssAfl7) | CTGACTTGTATATATTCG |
| c-Myc27bp | TGGGGAGGCTGGGGAGGCTGGGGAAGG |
| c-Myc77bp | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGGGGAGGCTGGGGAGGCTGGGGAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |
| H24A | TTCGCTTAGGCTTAGGCTTAGGGA |
| TBA | CGTTGGTGTGGTTGG |
| VEGF | GGGTACCCGGGTGAGGGCCGGGGT |

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制 所有溶液均使用 Milli-Q 超纯水制备, 配制后经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, 4°C 避光保存(蛋白溶液除外)。配制 pH 为 7.5 的 LiCl 电解液, 含 1 mol/L LiCl、 10 mmol/L Tris。配制 pH 为 7.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 含 10 mmol/L Tris、 1 mmol/L EDTA。配制纳米孔蛋白溶液, 将 AeL、HL 蛋白分别

与胰蛋白酶按质量比 50: 1 混合, 37 °C 孵育 4~5 h 活化后, 将上述蛋白及 MspA 蛋白用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至 10 μg/mL (可根据成孔效率调整浓度), 现配现用。配制磷脂溶液, 将 1, 2-二植酰磷脂酰胆碱溶于正癸烷, 配制成 30 mg/mL 的储备液, -20 °C 冰箱避光保存, 使用前恢复至室温并涡旋混匀^[12]。配制 pH 为 7.5 的 Na⁺退火缓冲液, 含 100 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris, 用于诱导 G4 序列折叠。

1.2.2 样本的预处理 将单链 DNA 溶于 Tris-HCl 缓冲溶液, 配制成 0.1 mmol/L 的储备液, 涡旋混匀后以 20 μL/管分装, -20 °C 冷冻保存, 使用前室温解冻。

G4 形成序列: 将 c-Myc27bp、c-Myc77bp、TBA、H24A、VEGF 序列分别溶于退火缓冲液, 配制成 0.1 mmol/L 的储备液, 涡旋混匀后置于金属浴中 95 °C 加热 10 min, 随后缓慢冷却至室温 (约 12 h) 完成退火, 诱导 G4 结构形成^[13-14]。退火后以 20 μL/管分装, -20 °C 冷冻保存, 避免反复冻融。本文所有 G4 样品均采用上述 Na⁺退火方式制备。

1.2.3 生物纳米孔道实验 用无菌毛刷蘸取少量磷脂溶液, 分别在纳米孔微流池的 cis 端 (样品添加端) 和 trans 端的通道表面均匀涂布, 静置 12 min 使磷脂初步铺展。向 cis 端和 trans 端分别注入 1 mol/L LiCl+10 mmol/L Tris 电解液 (pH 7.5), 将一对 Ag/AgCl 电极分别插入 cis 端和 trans 端电解液中, 通过 Clampex 软件监测基线电流, 若无明显电流信号, 说明磷脂层未形成连续覆盖, 需在 cis 端补充涂布少量磷脂溶液。采用经典提拉法操作微流池, 通过膜电容及击穿电压评估双分子层完整性 (目标膜电容为 1~2 μF/cm², 击穿电压 ≥300 mV) 视为合格的磷脂双分子层。向 cis 端检测池中注入 5 μL 纳米孔蛋白溶液, 施加 150 mV 驱动电压, 孵育 5~10 min, 待 Clampex 软件记录到稳定的开孔电流信号 (单孔特征), 即表明单个纳米孔已在磷脂双分子层上自组装形成^[9,15]。在 25 °C、1 mol/L LiCl 电解液、100 mV 电压条件下, 单个 AeL 纳米孔的开孔电流约为 42 pA, 单个 MspA 纳米孔约为 148 pA, 单个 HL 纳米孔约为 95 pA。向 cis 端检测池中加入 5 μL 分装后的 DNA 样品, 混匀后平衡 3 min。在 1 kHz 低通滤波、100 kHz 采样频率下记录离子电流信号, 实验温度控制为 (25±2) °C, 相对湿度为 (60±10)%^[3,16]。

1.2.4 G4 拓扑结构的圆二色谱 (CD) 验证 采用圆二色谱技术对 Na⁺退火后各 G4 序列的拓扑结构进行验证, 确认目标序列经 Na⁺退火后成功折叠形成预期拓扑构象, 为后续纳米孔检测实验提供可靠的样本基础。

实验采集模式与扫描模式均设置为圆二色 (CD) 模式, 扫描波长范围为 190~450 nm, 数据步长 1 nm, 扫描次数 1 次, 单数据点采集时间 1 s, 快门模式设置为扫描时开启, 输出量程分别设置为 300 mD、100 mD, 输出单位为毫度 (Ellipticity, mD)。测试样品为 Na⁺退火后的 c-Myc27bp、TBA、H24A 序列, 样品终浓度为 20 μmol/L, 分散介质与 Na⁺退火缓冲液保持一致 (100 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris, pH 7.5), 以相同空白缓冲液为基线进行信号扣除, 检测温度恒定为 25 °C。

1.2.5 数据分析处理 采用 ClampFit 软件筛选有效事件, 剔除阻断电流小于 5 pA 的噪音, 保留阻断电流大于等于 10 pA 的单分子事件。通过 MOSAIC 软件提取电流阻断比 (I/I_0 , I_0 为开孔电流)、阻断时间 (τ) 等参数。利用 Origin 软件绘制 “阻断比-阻断时间” 二维散点图、统计直方图, 分析分子过孔特性^[17-18]。

2 结果与讨论

2.1 生物纳米孔的系统性筛选

生物纳米孔的孔径尺寸、通道结构及表面电荷是决定 G4 检测性能的核心因素^[7,19]。本研究选取经典平行型 G4 模型序列 VEGF 为检测靶标, 其经 Na⁺退火后折叠形成的 G4 结构稳定、构象均一, 可排除构象异质性对纳米孔适配性评估的干扰, 确保不同纳米孔的性能对比结果客观可靠。同时选取单分子传感领域应用最广泛的 MspA、AeL 与 HL 三种生物纳米孔开展系统对比。

如图 1 所示, 本研究对比了 MspA、AeL 与 HL 三种纳米孔的检测效果: 三者最窄孔径分别为 1.2 nm、1 nm、1.4 nm, 而 G4 分子尺寸大于 2 nm, 过孔时需在孔道限域空间内发生解链或构象调整^[20-21]。实验条件: Na⁺退火、1 mol/L LiCl 电解液 (pH 7.5)、100 mV 电压, 所有样品终浓度均为 200 nmol/L。未添加样品时, 检测基线平稳、噪声信号极少; 添加样品后, 离子电流出现明显扰动。三者孔径尺寸、孔道几何结构上存在显著差异, 通过检测性能的系统性评估, 可明确 G4 单分子检测的最优孔道体系,

为后续不同拓扑结构 G4 的区分实验奠定基础。

如图 1A 所示, MspA 检测信号长短不一, 阻断时间波动大、无特征规律, 信号分布弥散, 无法形成可区分的特征信号簇, 统计结果显示其信号阻断比为 0.385 ± 0.002 , 阻断时间为 42.413 ± 4.176 ms, 信号离散度极大, 无法实现 G4 的稳定检测; 如图 1B 所示, AeL 孔道孔径均一(约 1 nm), 因孔径过窄, G4 难以进入孔道, 有效过孔事件占比极低, 所记录信号多为 G4 在孔口碰撞产生的非特异性扰动, 该类非特异性信号并非 G4 的目标穿孔信号, 其关键特征为: 信号阻断比均大于 0.8, 统计结果为 0.942 ± 0.048 , 阻断时间普遍小于 0.2 ms, 与 HL 孔道中 G4 特异性过孔信号特征存在显著差异; 而 HL 纳米孔孔口呈漏斗状(图 1C 所示), 孔径适配性佳, G4 过孔时可发生可控解链, 信号簇高度集中, 统计结果显示其检测 G4 的特异性过孔信号阻断比为 0.247 ± 0.003 , 阻断时间为 5.290 ± 1.8 ms, 有效事件占比及信噪比均显著优于前两种孔, 因此确定 HL 为后续实验的最优纳米孔。

2.2 不同拓扑结构 G4 的单分子区分

为验证 Na^+ 退火后各 G4 序列的拓扑构象, 本研究采用圆二色谱对 c-Myc27bp、TBA 及 H24A 序列进行表征, 结果如图 2 所示。其中, 平行型 G4 的典型 CD 光谱特征为 260 nm 波长处出现正峰、240 nm 波长处出现负峰, 对应本研究中的 c-Myc27bp 序列; 反平行型 G4 的典型 CD 光谱特征为 290 nm 波长处出现正峰、260 nm 波长处出现负峰, 对应本研究中的 TBA 序列; (3+1) 型混合型 G4 的典型 CD 光谱特征为 290 nm(强)与 260 nm(弱)波长处均出现特征正峰, 对应本研究中的 H24A 序列。CD 表征结果证实, 3 种 G4 序列经 Na^+ 退火后均成功折叠, 形成了与理论预期完全匹配的拓扑构象, 为后续纳米孔区分实验提供了结构明确、构象均一的分析样本。

如图 3 所示, 基于 HL 纳米孔体系, 以单链 DNA 为对照, 对三种不同拓扑结构的 G4 进行单分子检测。实验条件: Na^+ 退火、HL 纳米孔体系、1 mol/L LiCl 电解液 (pH 7.5)、100 mV 电压, 所有样品终浓度均为 200 nmol/L。图中每列依次为原始电流轨迹、阻断比-阻断时间散点图、阻断比统计直方图、阻断时间统计直方图; 原始电流轨迹中, 橙色三角对应橙色放大的典型单分子事件, 青色三角对应青色放大的典型单分子事件。如图 3A 所示, 单链 DNA 的 $I/I_0 = 0.39 \pm 0.01$, $\tau = 0.44$ ms, 无二级结构的线性核酸链空间位阻小, 可在电场驱动下快速完成跨孔, 因此表现为过孔速度快, 阻断程度低, 信号集中在低阻断比、短阻断时间区域; c-Myc27bp 为平行结构(如图 3B), $I/I_0 = 0.17 \pm 0.01$, $\tau = 122$ ms, 阻断时间显著长于其他分子, c-Myc27bp 折叠形成的平行型 G4, 由 3 个连续的 G-四分体平面通过 π - π 堆积形成高度致密的棒状结构, 热力学稳定性极强, 其平行结构空间构象致密, 解链难度大, 解链能垒显著高于其他拓扑结构, 而 HL 纳米孔的最窄孔径仅 1.4 nm, 小于 G4 的流体力学直径, 该结构需解链为线性单链方可完成跨孔转运, 因此推测这是其过孔时滞留时间久的核心原因; TBA 为反平行结构(如图 3C), 其 $I/I_0 = 0.39 \pm 0.01$, $\tau = 0.47$ ms, 阻断比大于 c-Myc27bp, 阻断时间与单链 DNA 接近, 可能因反平行结构更易解链: TBA 折叠形成的篮状反平行 G4, 仅由 2 个 G-四分体平面堆叠而成, G-四分体间的 π -

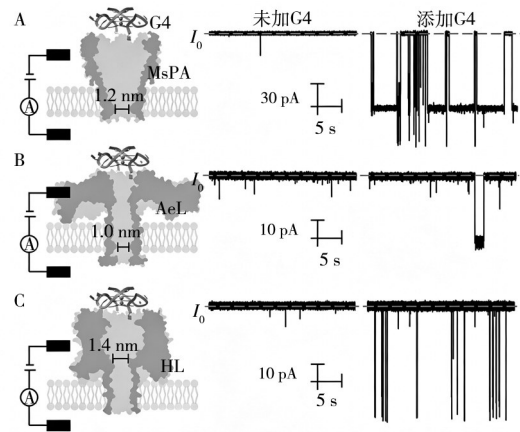


图 1 3 种生物纳米孔的结构及 VEGF 检测信号对比
Fig. 1 Structures and VEGF Detection Signals of Three Biological Nanopores

A: MspA(30 pA); B: AeL(10 pA); C: HL(10 pA); Time scale: 5 s; Experimental conditions: Na^+ annealing, 1 mol/L LiCl(pH 7.5), 100 mV, sample concentration: 200 nmol/L (A: MspA(30 pA); B: AeL(10 pA); C: HL(10 pA)); 时间: 5 s; 实验条件: Na^+ 退火、1 mol/L LiCl(pH 7.5)、100 mV、样品浓度为 200 nmol/L)

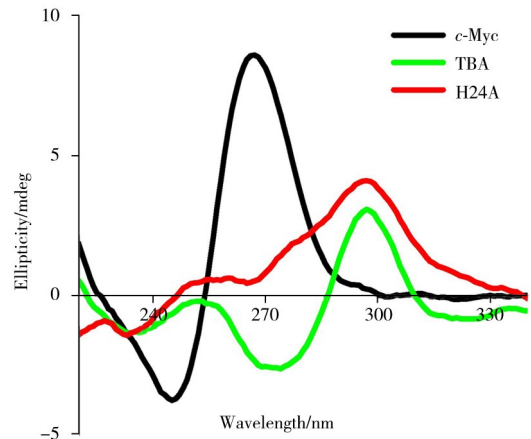


图 2 Na^+ 退火下 c-Myc27bp、TBA 及 H24A 序列的圆二色谱检测图谱

Fig. 2 CD Spectra of c-Myc27bp, TBA and H24A Sequences under Na^+ Annealing

π 相互作用弱,热力学稳定性差、解链能垒低,过孔阻力小,在HL孔道的电场力与限域作用下可快速解链,因此其过孔动力学特征与无二级结构的单链DNA高度接近;H24A为混合型结构(如图3D所示), $I/I_0=0.27\pm 0.003$, $\tau=5.53$ ms,阻断比与阻断时间介于平行与反平行结构之间,该结构的G-四分体的堆叠程度、构象致密程度、热力学稳定性与解链难度介于平行型与反平行型G4之间,其解链所需的电场驱动力与跨孔时间也处于二者之间,充分体现了混合型结构的独特空间特征。

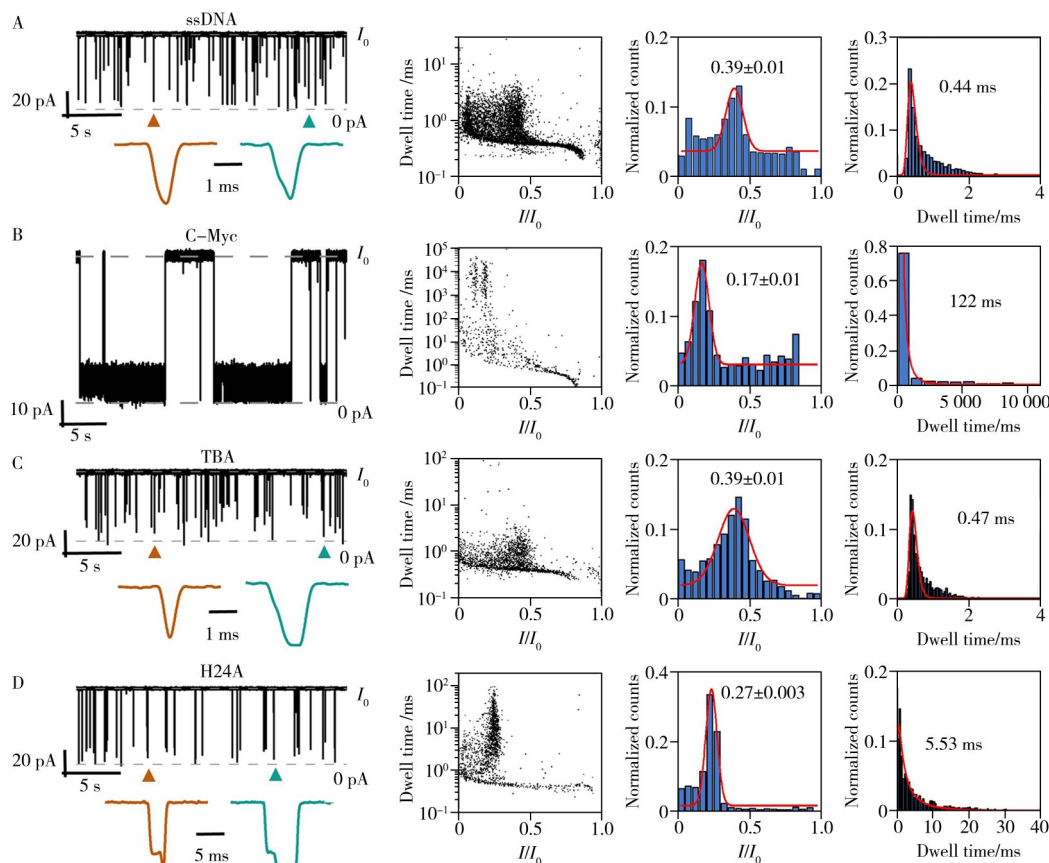


图3 单链DNA与不同拓扑G4的HL纳米孔检测结果

Fig. 3 Comparison of HL nanopore detection signals of ssDNA and different topological G4s

A~D: ssAfl17, c-Myc27bp, TBA, H24A; Columns(from left to right): original traces, scatter plots, blocking ratio histograms, dwell time histograms, A/C/D include enlarged single-molecule events; Experimental conditions: Na^+ annealing, HL nanopore system, 1 mol/L LiCl(pH 7.5), 100 mV, the final concentration of all samples is 200 nmol/L(A~D: ssAfl17, c-Myc27bp, TBA, H24A); 图(从左到右): 原始轨迹、散点图、阻断比直方图、阻断时间直方图, A/C/D含单分子事件放大图; 实验条件: Na^+ 退火、HL纳米孔体系、1 mol/L LiCl(pH 7.5)、100 mV、样品终浓度为200 nmol/L)

上述差异源于不同拓扑G4的空间尺寸、构象致密程度(热力学稳定性)及解链难度(解链动力学行为)不同,进而在HL纳米孔的限域空间内表现出具有显著统计学差异的离子电流特征,证实本体系可通过阻断比与阻断时间两个核心参数实现单链DNA与不同拓扑G4(平行、反平行、混合型)的单分子区分^[22-23],为G4拓扑结构的无标记、高分辨解析提供了可靠的单分子实验方法。

2.3 短链G4过孔行为的调控与优化

根据“2.2”的研究结果显示, c-Myc27bp短链G4的阻断时间长达122 ms,显著偏离其他分子的过孔特性,推测其结构过于紧密,解链能垒高,在电场驱动下难以快速解链,可能存在孔道内部打转、未有效穿过孔道的现象。为解决该问题,在c-Myc27bp序列两端各添加25个A构建c-Myc77bp,利用修饰拖拽序列增强电场作用力。在实验条件为: Na^+ 退火、HL纳米孔体系、1 mol/L LiCl电解液(pH 7.5)、100 mV电压,所有样品终浓度均为200 nmol/L时,对比了c-Myc27bp与c-Myc77bp的纳米孔检测信号,结果如图4所示。

图4A展示了c-Myc27bp的G4结构,纳米孔实验的电流轨迹如图4B所示,呈现出单一阻塞台阶信号。通过图4C所展示的c-Myc27bp的电流统计分布图可以观测到,基线电流的统计分布峰值约为75

pA, 且该结构的阻塞电流统计分布峰值分布较宽。图 4D 展示了 c-Myc77bp 的 G4 结构, 其电流轨迹如图 4E 所示, c-Myc77bp 过孔时呈现特征性“二级台阶信号”。图 4F 展示了 c-Myc77bp 的电流统计分布进一步证实了这一现象, 除基线电流的 75 pA 的统计分布峰值外, 该结构在 20 pA 及 0 pA 左右还呈现出两个独立的电流统计分布峰值。此现象很可能源于 c-Myc77bp 结构的特殊过孔动力学行为: 第一级台阶对应其一端长链的初始跨孔过程——该长链进入孔道后发生构象调整与短暂滞留, 最终完成跨孔; 第二级台阶对应 G4 核心结构的解链及后续转运过程, 借助已跨孔长链的驱动力, G4 核心与另一端长链依次通过孔道, 对应阻断电流的幅值更低(即阻塞程度弱于第一级台阶)。该双台阶信号成为 c-Myc77bp 的特异性“指纹标识”, 解决了短链 c-Myc27bp 过孔驱动力不足的问题。同时, 25A 序列的添加未影响 c-Myc27bp G4 的折叠稳定性, 确保了结构完整性^[24]。

3 结 论

本研究围绕 G4 拓扑结构的单分子检测展开, 构建了“纳米孔优选-结构区分-过孔调控”的完整技术链条。通过对比三类纳米孔的适配性, 确定 HL 为 G4 检测的最优孔道, 据此建立无标记单分子传感体系, 实现了单链 DNA 与平行、反平行、混合型 G4 的单分子精准区分。针对短链 c-Myc27bp 过孔驱动力不足的问题, 通过两端引入 25A 拖拽序列构建 c-Myc77bp, 其跨孔呈现特征性双台阶信号, 既提升了信号辨识度, 也验证了分子的完整过孔, 为短链核酸高级结构检测提供了普适性动力学调控策略。该方案具有无标记、实时监测、单分子分辨率高等优势, 为 G4 拓扑结构解析提供了新工具, 也为纳米孔在核酸高级结构分析中的应用提供了新策略, 可支撑 G4 相关病理研究与靶向药物筛选。后续可优化孔道修饰、拓展至 G4 与配体互作监测, 推动其生物学场景应用。

参考文献:

- [1] Farag M, Mouawad L. *Nucleic Acids Res.*, **2024**, 52(7): 3522 - 3546.
- [2] Khurana S, Kukreti S, Kaushik M. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2023**, 253: 126835.
- [3] Ji N, Shi H Q, Fang X Y, Wu Z Y. *Anal. Chim. Acta*, **2020**, 1106: 126-132.
- [4] Dell' Oca M C, Quadri R, Bernini G M, Menin L C, Grasso L, Rondelli D, Yazici O, Sertic S, Marini F, Pelliccioli A, Muzi-Falconi M, Lazzaro F. *Int. J. Mol. Sci.*, **2024**, 25(6): 3162.
- [5] Li H H, Jin Z L, Gao S X, Kuang S, Lei C Y, Nie Z. *Chem. Sci.*, **2025**, 16(23): 10083 - 10105.
- [6] Reddy Sannapureddi R K, Mohanty M K, Gautam A K, Sathyamoorthy B. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2020**, 11(23): 10016 - 10022.
- [7] Shivalingam A, Izquierdo M A, Le Marois A, Vyšniauskas A, Suhling K, Kuimova M K, Vilar R. *Nat. Commun.*, **2015**, 6: 8178.
- [8] Zhuo L X, Wang Y, Zhang C P, Duan J, Zhang Y N. *China Biotechnol.* (卓丽霞, 王莹, 张春萍, 段静, 张亚妮. 中国生物工程杂志), **2017**, 37(1): 53-57.
- [9] Hao W Y, Wu H C. *J. Instrum. Anal.* (郝文英, 吴海臣, 分析测试学报), **2025**, 44(9): 1723-1726.
- [10] Heinz C, Niederweis M. *Anal. Biochem.*, **2000**, 285(1): 113 - 120.
- [11] Long Y, Cao C. Hu Y X. *EP. 3252166B1*. 2017-06-12.
- [12] Lu Y, Hu Z L, Ying Y L, Long Y T. *J. Instrum. Anal.* (路瑶, 胡正利, 应佚伦, 龙亿涛. 分析测试学报), **2019**, 38(2): 129-133.
- [13] You J, Li H, Lu X M, Li W, Wang P Y, Dou S X, Xi X G. *Biosci. Rep.*, **2017**, 37(4): BSR20170771.
- [14] Yang C, Liu L, Zeng T, Yang D W, Yao Z Y, Zhao Y L, Wu H C. *Anal. Chem.*, **2013**, 85(15): 7302-7307.
- [15] Zhang L, Zhang K X, Rauf S, Dong D, Liu Y, Li J H. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(8): 4533-4540.
- [16] Zhao X J, Qin H J, Tang M L, Zhang X Y, Qing G Y. *Trac Trends Anal. Chem.*, **2024**, 173: 117658.

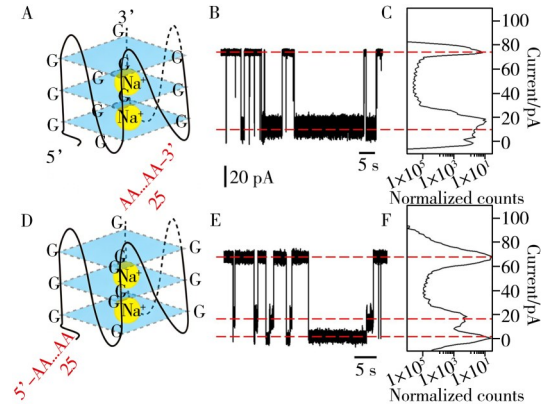


图 4 c-Myc27bp(A-C)与 c-Myc77bp(D-F)的纳米孔检测结果对比

Fig. 4 Comparison of Nanopore Detection Results of c-Myc27bp and c-Myc77bp

A, D: structural schematics, B, E: original current trace diagrams, C, F: current statistical distribution diagrams; the experimental conditions are the same as those in Fig. 2(A, D为结构示意图, B、E为原始电流轨迹图, C、F为电流统计分布图; 实验条件同图2)

- [17] Flynn C D, Chang D R, Lee Y, Isaacson S E, Wu Z W, Rivnay J, Kelley S O. *J. Am. Chem. Soc.*, **2025**, 147(38): 34204–34210.
- [18] Shim J, Gu L Q. *Methods*, **2012**, 57(1): 40–46.
- [19] An N, Fleming A M, Middleton E G, Burrows C J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2014**, 111(40): 14325–14331.
- [20] Zhu J B, Bošković F, Keyser U F. *Nano Lett.*, **2022**, 22(12): 4993–4998.
- [21] Henderson A, Wu Y, Huang Y C, Chavez E A, Platt J, Johnson F B, Brosh R M, Sen D, Lansdorp P M. *Nucleic Acids Res.*, **2014**, 42(2): 860–869.
- [22] Biffi G, Tannahill D, McCafferty J, Balasubramanian S. *Nat. Chem.*, **2013**, 5(3): 182–186.
- [23] Lam E Y N, Beraldi D, Tannahill D, Balasubramanian S. *Nat. Commun.*, **2013**, 4: 1796.
- [24] Schaffitzel C, Berger I, Postberg J, Hanes J, Lipps H J, Plückthun A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, 98(15): 8572–8577.

(责任编辑: 胡雪玉, 龙秀芬)