

超薄二维材料的核酸识别研究

韩宗悦 鲁俊成 邢晓蕾

苏州城市学院光学与电子信息学院，江苏苏州，215008；

摘要：纳米孔传感是一类用于研究该领域的新型实验技术，其研究的核心与关键就是纳米孔（nanopore）。近年来，纳米孔因具有操作简单、快速、准确，低成本及高通量的特性已成为纳米孔测序的研究热点之一。本论文采用超薄二维 COF 材料进行短链 DNA 的传输行为研究，可以实现两种不同碱基的 DNA 检测，同时可以实现两种碱基易位时间与下降振幅的区分，这为二维纳米孔在测序领域的进一步精确识别打下了良好基础。

关键词：纳米孔传感；二维材料；DNA 检测

DOI：10.69979/3029-2727.25.11.052

引言

二维纳米孔是一种新型的固态纳米孔传感器，由薄的二维膜材料组成的纳米孔结构，单层厚度就像 DNA 碱基对之间的空隙一样。近年来，因其具有薄似单个碱基的厚度，在提高碱基分辨率方面很有优势，且衬底和 2D 材料之间的界面密封良好，防止任何离子泄漏，以最大限度地提高灵敏度，因此在单分子检测领域具有较高的应用前景^[1]。在过去的几年里，科研工作者发展了几种检测策略，以提高单个分子检测的灵敏度，包括扫描探针方法，如原子力显微镜和扫描隧道显微镜不仅能够进行原子分辨率的提高，而且还可以用于进行纳米尺度的表面分析，以提取单个分子的化学、甚至机械特性。与生物纳米孔相比，在氮化硅（SiNx）等绝缘膜中制备的固态纳米孔提供了更好的机械和化学稳定性，并允许在孔径和形状上有更高的灵活性^[2]。然而，目前使用的固态材料膜的厚度通常较厚，通常由几个到十几个纳米的厚度，这便造成了膜上制备的孔传感区域太长，当待测分子通过时，便会出现多个碱基同时存在传感区域，同时检测到多个碱基的电流信号，无法实时准确地对单个碱基检测。基于此，激发了对超薄固体膜材料内纳米孔的广泛研究，特别地，当将膜的厚度降低到和 MspA 孔传感区域的长度相接近，或者和单个碱基厚度相当的二维膜材料。2008 年，由 Drndic 等研究者首先制备出的石墨烯纳米孔极为引人注目^[3]。相对于传统固态纳米孔，利用石墨烯二维平面材料组成的超薄固态纳米孔在厚度上得到了明显改善，其特点为石墨烯具有原子级的厚度（0.334 nm），这一特性在基于 DNA 测序中是及其重要的。因此，固态纳米孔凭借其稳定性高、直径和通道长

度可控、表面性质可调等特点，成为分析化学研究的新方向。但是固态纳米孔仍然存在打孔不均一，重复性差，制备昂贵并且困难的缺点。因此能够简单方便的制备间距可控纳米孔结构已经成为纳米孔研究的热点问题之一。研究发现具有类石墨烯特征的新型二维平面材料 COF，是一种共价有机框架材料，由于其具有稳定的孔道结构，纳米级可调的孔径尺寸，以及其在高效储能和电荷输运方面的优势，近年来引起了人们的极大兴趣，成为研究热点材料之一。共价有机框架材料 COF（Covalent organic frameworks）是一种 2D 或者 3D 的多孔网状材料^[4]，通常表现出可进入的纳米尺寸的空腔或开放的通道，通道大小从几个埃到几个纳米不等。在其各种引人注目的特点中，其良好的晶型结构和极大的比表面积使其在众多多孔材料中脱颖而出，因此在气体储存，传感，催化，药物输送等方面的得到了广泛应用。与 TEM 打孔得到的石墨烯相比，二维 COF 材料具有稳定的孔道结构，孔径均一且可调。通过调研文献发现，对于二维超薄 COF 纳米片的制备可以通过简单的超声即可得到。而由激光拉制仪拉制的锥形纳米毛细管具有制备方法简单，且拉制出的孔径可以精确到几十个纳米而得到广泛应用。而在单孔纳米管尖端制备多孔材料，将纳米管尖端的孔径减小到几个纳米，为研究密闭空间中的离子传质提供了很好的条件。例如，毛细管尖端用 ZIF-90 修饰孔后，南京大学王教授课题组报道在碱性条件下，1M KCl 中表现出高的整流比^[5]。同样^[6]该小组还报道了石墨烯在纳米毛细管尖端的成功组装。另一方面，由于纳米毛细管其微米大小的针尖，可以很容易地操作，并很容易与电生理或微注射装置连接。

基于以上的文献调研以及资料查阅发现,玻璃纳米毛细管具有制备方法简单,易于操作,而 COF 材料具有结构稳定,孔径可调等特点。本文旨在通过电泳的方法在玻璃纳米毛细管尖端组装 COF 纳米片,从而将开口 500 nm 孔径的玻璃纳米毛细管的孔径降低到 1.3 nm 进行 DNA 的易位识别研究,来实现具有高时间分辨率的 DNA 易位行为研究,利用玻璃纳米毛细管尖端纳米片的组装构建二维 COF 纳米孔器件,还可以提高空间分辨率。

1 实验目标

本研究利用超声剥离的方法制备具有单层结构的 2D COF 纳米片,然后把 2D COF 纳米片组装在玻璃纳米毛细管尖端构建二维 COF 纳米孔器件进行相关单分子特性研究。这种超薄二维纳米片层结构具有的稳定的孔径性质可以作为进行核酸分子传输行为研究的控制条件。本研究通过电泳组装 2D COF 纳米片层与玻璃纳米毛细管,电化学装置图如图 1 所示,其工作原理是:通过在电解池中加入电解液,当施加电压后,在电场作用力的驱动下,电解池溶液中的阴阳离子会形成定向移动,产生电流,从而带动溶液中的待测分析物(核酸分子)移动,实现成功组装。单分子特性研究采用具有 Digidata 1550B 低噪音数据采集系统的 Axopatch 200B 集成膜片钳电流放大器进行核酸分子易位行为分析。

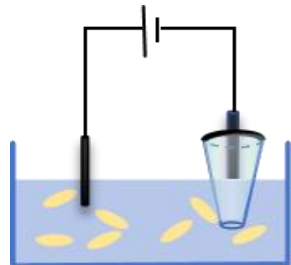


图 1. 电化学组装示意图

1.1 COF 纳米片的制备

通过调研文献,本研究中我们的制备方法是采用超声剥离的方法制备目标纳米片,并通过调整超声功率和时间,得到具有纳米级厚度的薄的片层结构。制备过程如图 2 所示,当把 COF 材料超声剥离一个小时,即可得到薄的 COF 纳米片层结构。

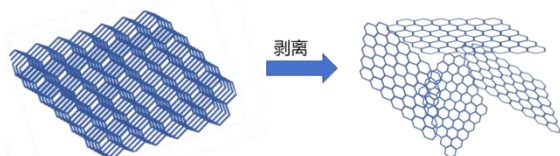


图 2. COF 纳米片的制备

1.2 纳米毛细管的拉制

要实现 COF 纳米片与玻璃纳米毛细管的组装,我们需要通过激光拉制仪完成玻璃纳米毛细管的制备,拉制示意图如图 3 上所示。通过调节仪器参数,我们拉制得到尖端直径为 50nm 左右的玻璃纳米管,如图 3 下所示。其独特的锥形结构赋予了纳米毛细管极强的可操作性,所以有望作为基底材料制备尺寸更小,功能更全面的纳米孔。

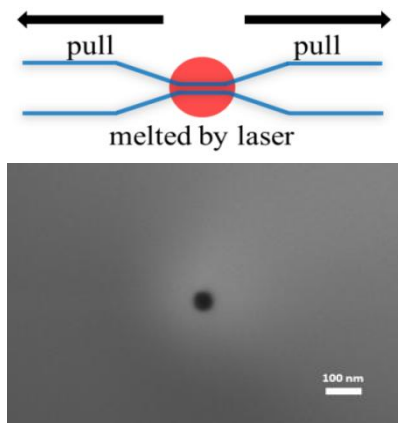


图 3. 纳米毛细管拉制示意图(上)和裸纳米毛细管 SEM 图(下)

2 二维 COF 纳米孔与纳米毛细管组装

我们将 COF 纳米片以电泳的方式驱动到玻璃纳米毛细管尖端完成组装构建二维 COF 纳米孔器件。具体步骤如下:首先,向玻璃纳米毛细管内注入 10 mM KCl 溶液,并将其浸入到含有 10 mM KCl 与 0.02 mg/mL COF 纳米片的混合溶液中;随后,将两根 Ag/AgCl 电极分别插入到玻璃纳米毛细管内和外部溶液中,并施加-1 V 的偏压以驱使 COF 纳米片向管内移动;与此同时,利用电化学工作站对过孔电流进行检测。若过孔电流发生瞬间电流降低,如图 4 所示,并在低电流下维持稳定一段时间即意味着 COF 纳米片在管尖的成功组装,此时关闭外加电场并将玻璃纳米毛细管取出进行下一步实验。

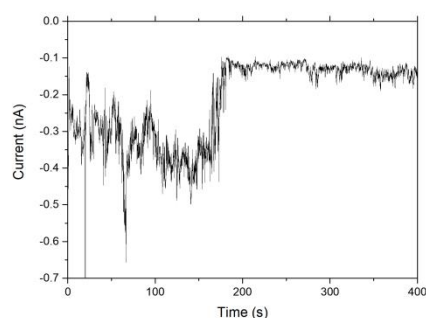


图 4. 电化学组装示意图

2.1 二维 COF 纳米孔单分子特性研究

制备好二维 COF 纳米孔器件以后,我们采用电化学方法检测 COF 纳米片组装的玻璃纳米毛细管中单链 DNA 的传输行为。本研究中,我们使用 30 个碱基的单链 DNA 作为目标研究分子,通过记录电流轨迹来验证 DNA 分子通过 COF 纳米孔的传输行为,其中,1M KCl 作为电解质盐溶液。这里,我们首先做了孔径为 50 nm 左右的裸的纳米毛细管的没有加入 DNA 的电流轨迹图,如图 5 左边所示,随后加入 200nM 的单链 DNA 分子,可以观察到在施加 300 mV 的偏压下可以观察到很多的 DNA 分子穿过纳米孔产生的易位行为,如图 5 右边所示。

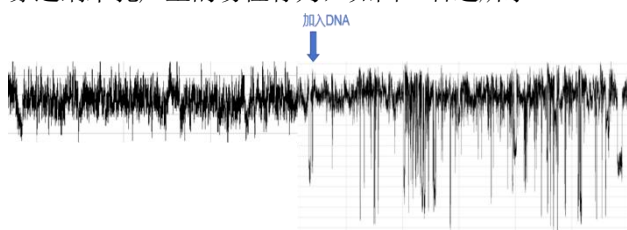


图 5. 裸纳米毛细管的电流轨迹图

对于 COF-1.3 nm 组装的玻璃纳米毛细管,在记录了 30 min 的电流轨迹数据中,观察到 DNA 穿过纳米孔产生的易位行为,如图 6 所示。可以看出,组装 COF 纳米片以后的 DNA 易位时间明显增加,说明 COF 纳米片与核酸分子之间有较强的相互作用力,COF 纳米片的组装可以减缓 DNA 的过孔速度,进而提高检测分辨率。随后我们进行了不同碱基的过孔行为研究,调研文献发现,腺嘌呤均聚物和胞嘧啶均聚物在结构上存在差异,所以我们进行了腺嘌呤均聚物和胞嘧啶均聚物的过孔行为研究。本研究中我们采用 300 mV 的电压进行 30 个碱基的腺嘌呤均聚物和胞嘧啶均聚物的传输行为研究。数据统计分析结果显示,我们在 300 mV 电压下可以收集到大量数据,图 7a 和 d 分别为 30 个碱基腺嘌呤均聚物和 30 个碱基的胞嘧啶均聚物的数据散点图,把两种碱基均聚物的易位时间散点图进行统计分析,如图 7b 和 e 所示,结果显示,30 个碱基腺嘌呤均聚物的易位时间明显慢于 30 个碱基的胞嘧啶均聚物的易位时间,较慢的过孔速度说明 DNA 与 COF 纳米孔之间存在强的相互作用。其易位时间数据的统计数据如表 1 所示:30 个碱基腺嘌呤均聚物的易位时间为 9.09 ms,30 个碱基的胞嘧啶均聚物的易位时间 8.33 ms。与此同时,我们还比较了两种均聚物过孔行为的下降振幅,振幅的统计结果如图 7c 和 f 所示。其数据的统计数据如表 1 所示:30 个

碱基腺嘌呤均聚物的下降振幅为 105.87 pA,30 个碱基的胞嘧啶均聚物的下降振幅为 73.04 pA。通过 30 个碱基腺嘌呤均聚物和 30 个碱基的胞嘧啶均聚物的易位时间和下降振幅的比较可知,30 个碱基腺嘌呤均聚物的易位时间和下降振幅均优于 30 个碱基的胞嘧啶均聚物的易位时间和下降振幅,这可能是由于碱基结构自身的差异,查阅其结构可知,腺嘌呤中嘌呤的尺寸略大于胞嘧啶和中嘧啶的尺寸,较大的尺寸会导致 DNA 均聚物分子在穿过 COF-1.3 纳米孔的过程中产生更大的尺寸排斥效应,从而产生较大的电流下降振幅。

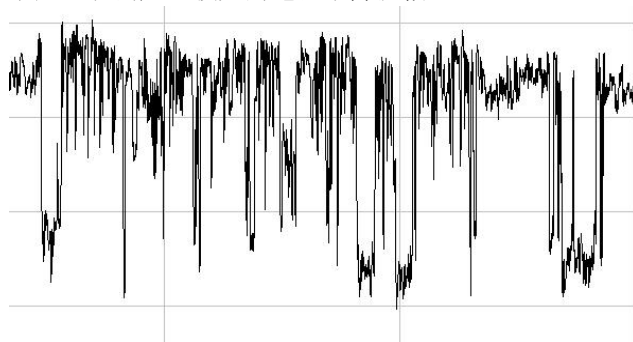


图 6. COF-1.3 nm 组装的纳米毛细管的电流轨迹图

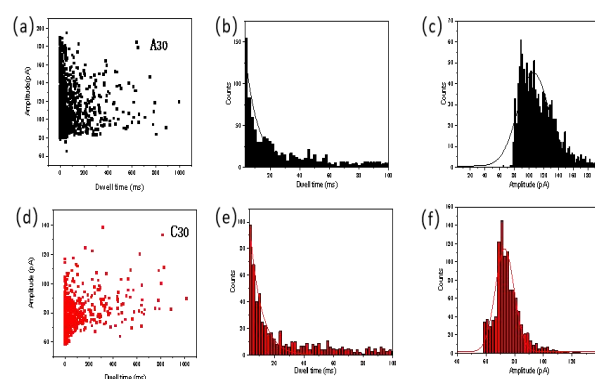


图 7. 腺嘌呤均聚物 (a-c) 和胞嘧啶均聚物 (d-f) 的数据统计分析图

表 1: 不同碱基 DNA 易位时间和下降振幅对比

DNA 类型 \ 电压	A ₃₀		C ₃₀	
	易位时间 (ms)	下降振幅 (pA)	易位时间 (ms)	下降振幅 (pA)
300mV	9.09±0.33	105.87±1.06	8.33±0.24	73.04±0.33

调研文献发现,当把电解质溶液由 1M 的 KCl 溶液换成 4M 的 LiCl 作为电解液时,DNA 的易位时间会得到进一步的增加。所以接下来我们进行了改变电解质溶液的 DNA 过孔行为的研究。得到的轨迹图如图 8 所示,通过对易位事件分析,得到了同样类似于在 KCl 作为电解液的数据图,但是易位时间提高了 1~2 倍左右,说明使用 LiCl 作为电解质溶液,有利于易位时间的进一步增

加,从而有利于 DNA 过孔时间分辨率的提高。

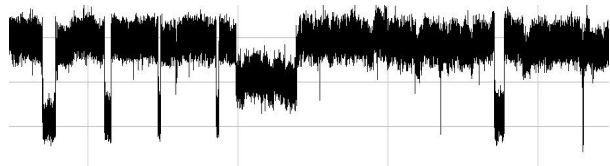


图 8. LiCl 作为电解液的电流轨迹图

3 总结

本文提出了采用新型二维 COF 材料进行纳米孔检测的策略,进行了两种碱基的识别研究,结果表明制备的纳米孔可以进行两种碱基的易位时间和下降振幅的区分。相比于传统纳米孔材料,新型二维 COF 材料不仅在材料的厚度上得到了优化,同时也减缓了 DNA 过孔的易位时间。新型材料的使用,为纳米孔测序的开发和基本机制的研究提供了新途径,这为实现纳米孔进行 DNA 的单分子检测提供了基础。

参考文献

- [1] 谭聃,欧铜. 第三代测序技术的研究进展与临床应用[J]. 生物工程学报,2022,38(09):3121-3130.
- [2] 陈山川,闫汉,唐鹏,等. 固态纳米孔检测不同结构 D

NA 分子[J]. 微纳电子技术,2022,59(07):702-709.

[3] M. D. Fischbein and M. Drndić, Applied Physics Letters, 2008, 93.

[4] 边宇,张百超,郑红. 多级孔 COF 材料的设计、合成及应用[J]. 化工进展,2022,41(9):4866-4883.

[5] Z. Y. Jiang, H. L. Liu, S. A. Ahmed, S. Hanif, S. B. Ren, J. J. Xu, H. Y. Chen, X. H. Xia and K. Wang, Angew and te Chemie International Edition, 2017, 56, 4767-4771.

[6] Z. Pan, X. Nie, J. Yang, H. Liu, J. Li and K. Wang, Journal of Electroanalytical. 2019, 840, 182-186.

作者简介:韩宗悦(2005.09—),女,汉族,河南信阳人,苏州城市学院本科生,主要研究方向:单分子检测与分析。

鲁俊成(2003.08—),男,汉族,江苏扬州人,苏州城市学院本科生,主要研究方向:单分子检测与分析。

邢晓蕾(1990.10—),女,汉族,河南新乡人,主要研究方向:单分子检测与分析。

基金项目:江苏省大学生创新创业项目(项目编号:202413983094Y)。