

新兴单分子蛋白质测序技术前沿：从电子隧穿到纳米孔策略

一、引言

1.1 蛋白质组学研究的核心挑战与单分子测序的需求

蛋白质是生命活动的主要执行者，其结构与功能的精确解析是理解细胞信号传导、代谢调控及疾病机制的基础 [1]。人类蛋白质组的复杂性远超基因组：RNA 可变剪接与翻译后修饰（post-translational modifications, PTMs）的叠加效应可产生数百万种蛋白变体（proteoforms），使得蛋白质组在动态范围和分子多样性方面远高于基因组与转录组 [10]。尤其在单细胞水平，蛋白质表达的异质性对细胞命运决定具有关键意义，而现有的群体平均测量手段难以揭示这一层面的生物学信息 [21]。

在临床诊断和生物标志物发现领域，低丰度疾病相关蛋白的检测始终是蛋白质组学的核心痛点。许多具有重要诊断价值的信号蛋白——如磷酸化激酶、转录因子和细胞因子——在细胞内的拷贝数极低，传统检测方法因灵敏度不足而难以有效捕获 [19]。与核酸分子不同，蛋白质缺乏类似于聚合酶链式反应（PCR）的通用扩增手段，无法通过指数级信号放大来提升检测灵敏度。因此，发展直接在单分子水平对蛋白质进行识别和测序的技术，被认为是突破蛋白质组学灵敏度瓶颈的关键路径 [10, 21]。

1.2 传统蛋白质组学技术的技术边界

过去三十年间，液相色谱-串联质谱联用技术（LC-MS/MS）一直是蛋白质组学研究的主流方法 [23]。质谱技术包括基质辅助激光解吸电离质谱（MALDI-MS）和电喷雾电离串联质谱（ESI-MS/MS）等，其核心策略是将蛋白质酶解为肽段，再通过质荷比分析间接推断蛋白质序列信息。这一“自下而上”（bottom-up）的策略虽然成熟，但存在固有缺陷：酶解过程的不完全性导致序列覆盖率有限，翻译后修饰信息在肽段水平容易丢失，且对低丰度蛋白的检测能力受限于动态范围 [23, 75]。此外，质谱设备的高昂成本、复杂的样品前处理流程以及对专业操作人员的高度依赖，也制约了其在临床场景中的推广应用 [23]。

二维凝胶电泳（2D-PAGE）作为另一种经典蛋白质分离技术，虽能提供蛋白质等电点和分子量的直观信息，但其分离分辨率有限、对疏水性蛋白和极端等电点蛋白的捕获能力不足，且定量精度较低，已难以满足高深度蛋白质组学研究的需求 [10, 75]。上述技术瓶颈促使研究者将目光投向全新的、基于单分子检测原理的蛋白质测序策略。

1.3 单分子蛋白质测序的兴起与技术路线概览

单分子蛋白质测序的概念在很大程度上受到纳米孔 DNA 测序技术成功商业化的启发。纳米孔测序已在核酸领域实现了从实验室概念到便携化商业产品的跨越，其单分子灵敏度和实时读取能力为蛋白质测序提供了重要的技术迁移范式 [17, 36]。然而，蛋白质由 20 种化学性质各异的氨基酸组成，且不存在类似核酸的均一电荷-质量比，这使得蛋白质单分子测序面临远比 DNA 测序更为严峻的挑战 [1, 25]。

当前，单分子蛋白质测序领域已形成两大主流技术路线。其一为电子隧穿识别策略，利用扫描隧道显微镜（STM）原理，通过测量氨基酸残基在纳米间隙中产生的特征隧穿电流

来区分不同氨基酸，近年来在单分子水平上实现了对多种氨基酸的鉴别 [3, 75]。其二为纳米孔传感策略，通过驱动多肽链穿越生物或固态纳米孔，依据离子电流阻塞信号的特征实现对氨基酸序列的读取 [36, 52]。两条路线各有优势与挑战，共同推动着单分子蛋白质测序从概念验证走向实用化 [10, 19]。

本综述将系统梳理上述两大技术路线的最新进展，深入分析各自的原理、优势与瓶颈，并展望单分子蛋白质测序技术在单细胞蛋白质组学和精准医学中的应用前景。

二、电子隧穿识别技术：单氨基酸的电子指纹

2.1 识别隧穿（Recognition Tunneling, RT）的基本原理

识别隧穿（RT）是一种基于量子隧穿效应的单分子检测技术。其核心构型为：在纳米尺度金电极间隙两侧修饰特异性识别分子（如 2-异氰基乙酸酯，ICA），当单个氨基酸分子被捕获于电极间隙时，与两侧识别分子形成瞬态非共价相互作用，构成分子结 [3]。电子通过量子隧穿效应跨越该分子结，产生可测量的隧穿电流信号。由于不同氨基酸的侧链化学结构、电子亲和力与空间构型各异，隧穿电流呈现出特征性的时间-电流波形，其峰值幅值、信号持续时间、脉冲面积等多维参数共同构成每种氨基酸独特的电子“指纹” [3, 41, 71]。

2.2 机器学习驱动的氨基酸分类

RT 技术的一个关键挑战在于，单一氨基酸可通过多种结合模式与识别分子相互作用，产生多峰分布的隧穿信号 [3]。传统阈值判别方法难以应对这种信号多模态特性 [65, 68]。为此，研究者引入支持向量机（SVM）等机器学习算法，从每条隧穿信号中提取峰值电流、信号宽度、积分面积等多维特征参数，在高维特征空间中构建最优分类超平面，实现对不同氨基酸信号簇的高精度区分 [3, 65]。近期研究进一步表明，结合量子输运计算与机器学习可显著提升手性分子的识别精度——Mittal 等人 [66] 在碳水化合物异构体的立体选择性鉴别中验证了该方法的可行性，其计算框架原则上可迁移至氨基酸的手性识别。

2.3 技术分辨能力与应用展示

RT 技术在多个维度上展示了卓越的分辨能力。在手性识别方面，Liu 等人 [9] 利用机械可控断裂结（mechanically controllable break junction, MCBJ）平台实现了氨基酸对映体的单分子电学检测与手性区分。在异构体区分方面，RT 可辨别亮氨酸（Leu）与异亮氨酸（Ile）等同量异位异构体——两者分子量完全相同（131.17 Da），传统质谱难以直接区分 [3, 35]。在修饰识别方面，甲基化等翻译后修饰虽仅增加一个甲基基团，其引起的侧链疏水性与空间位阻变化在隧穿信号中仍可辨识 [3, 14]。在短肽识别方面，Zhao 等人 [3] 证明 RT 可对短肽链产生特征信号，后续研究进一步发展了分子探针敏化策略以实现肽链中特定残基的定向识别 [58]。

2.4 电子隧穿蛋白质测序的实现路径

基于 RT 的高分辨氨基酸识别能力，研究者提出了两条蛋白质测序路径。第一条为外肽酶顺序消化结合隧穿检测：利用外肽酶从蛋白质一端逐个切除氨基酸，每释放一个氨基酸即通过 RT 隧穿结鉴定其身份，从而重建序列 [35, 65]。核心挑战在于酶切速率与检测速率的同步以及对二十种氨基酸的无歧义分类 [68]。第二条路径将分子马达与纳米孔-隧穿结相集成：借鉴 DNA 纳米孔测序经验，利用工程化分子马达牵引多肽链穿过嵌有隧穿电极的纳米

孔，实时获取各残基的身份信息 [33, 64]。Fuller 等人 [70] 展示了基于半导体芯片的分子电子学传感器平台，实现了隧穿结阵列的可扩展集成，为高通量应用提供了可行路线。然而，蛋白质复杂的折叠结构和侧链多样性使得多肽链线性化穿膜传输及信号时间分辨率的提升仍是主要技术瓶颈 [35, 41]。

综上所述，电子隧穿识别技术在单氨基酸分辨层面已展现出优异的能力，但要实现完整的蛋白质测序，仍需解决多肽链的线性化递送与高通量集成等工程化难题。这也促使研究者同步探索另一条互补性技术路线——纳米孔蛋白质测序。

三、纳米孔蛋白质测序技术：三种核心策略

3.1 技术原理与核心挑战

纳米孔测序的基本原理是：分子在电场驱动下穿越纳米孔道时，不同化学基团引起特征性离子电流阻断，从而实现单分子读取 [17]。纳米孔 DNA 测序已从实验室概念发展为成熟商业技术，为迁移至蛋白质测序奠定了基础 [17, 36]。

然而，蛋白质面临若干根本性差异。DNA 骨架电荷均匀，可匀速穿越纳米孔；而蛋白质 20 种氨基酸侧链带电性质各异，电泳力无法直接驱动其匀速易位 [8, 59]。此外，蛋白质复杂的三级结构远超孔道直径，必须先解折叠才能通过；多肽链易位速度极快，停留时间不足毫秒级采集窗口，严重制约氨基酸分辨精度 [20, 59]。Wei 等 [59] 在综述中系统总结了生物纳米孔在蛋白质测序方面所采用的工程化策略，涵盖蛋白质解折叠、易位控制和氨基酸识别三个关键环节，为上述实验进展提供了系统性的技术框架。

这些挑战催生了三条差异化的技术路线：直接测序、标记辅助传感和天然蛋白质直接传感 [36, 59]。

3.2 直接测序策略

直接测序策略让线性化多肽链逐一穿越纳米孔，利用不同氨基酸残基产生的特异性电流阻断信号实现识别，目标是区分全部 20 种天然氨基酸。

Ouldali 等 [4] 利用气溶素（aerolysin）纳米孔，在单分子水平上实现了 20 种氨基酸的电学识别。气溶素孔道狭窄的限域区域使多肽链慢速穿越，采集到具有足够信噪比的电流信号 [4]。Ge 等 [53] 进一步开发了双极性肽探针策略，拓展了气溶素纳米孔的氨基酸识别能力。

Wang 等 [5] 采用 MspA 纳米孔，通过引入单一 Ni^{2+} 修饰构建金属离子配位识别孔道，以 98.6% 的准确率区分了全部 20 种氨基酸及其修饰形式 [5]。Chen 等 [55] 则展示了利用解旋酶马达控制 ssDNA 偶联肽段穿越 MspA 的策略，实现了肽段的可控易位与测序读取。

3.3 标记辅助传感策略

标记辅助策略对多肽特定残基施加化学或荧光标记以放大信号差异，结合机器学习进行分类识别，尤其适用于翻译后修饰等微小化学差异的检测。

Cao 等 [12] 报道了深度学习辅助的生物纳米孔单分子检测方法，将纳米孔高灵敏度与深度学习的模式识别能力相结合，以气溶素纳米孔检测 α -突触核蛋白衍生肽段的磷酸化和截短修饰，显著提高了低丰度蛋白质 PTM 位点的检测准确率 [12]。Tovey 等 [22] 探

索了深度学习驱动的纳米孔肽段分类方案，利用小波变换将电流信号转换为时频图像，对 42 种肽段实现了约 81% 的分类准确率，为临床快速诊断提供了技术路径。Martin 等 [32] 开发了深度学习模型 CaptureNet-Deep，用于从噪声信号中自动识别蛋白质捕获和易位等关键分子阶段，其 F1 分数达 0.94，将分析时间从数天缩至 30 分钟以内，完善了数据分析管线。

3.4 天然蛋白质直接传感策略

天然蛋白质直接传感旨在让完整、未标记的全长蛋白质直接穿越纳米孔，保留完整序列和修饰信息。

Sauciuc 等 [8] 利用电渗流驱动未标记全长蛋白质在对抗电泳力条件下单向穿越工程化 CsgG 纳米孔，克服了蛋白质带电不均匀导致的易位方向不可控问题 [8]。Sauciuc 与 Maglia [20] 进一步在纳米孔缩窄处引入疏水残基减缓易位速度，将易位速率降至约每毫秒 10 个氨基酸，显著延长信号驻留时间，提升了单蛋白质指纹鉴定准确性。

Motone 等 [48] 在 Nature 上报道了多轮读取（multi-pass）策略，对同一长蛋白质链反复进行纳米孔读取，有效降低单次随机误差，大幅提高序列覆盖度和信号可靠性 [48]。Ansah 等 [39] 展示了电渗流驱动大型构象动态蛋白质穿越纳米孔的潜力，克服了大蛋白质因位阻和静电排斥难以易位的障碍。

3.5 肽段磷酸化位点等翻译后修饰的纳米孔检测

Nova 等 [11] 利用工程化 MspA 纳米孔结合马达酶慢速牵引肽段穿越孔道，成功在单分子水平区分了单个磷酸化位点，并鉴定了癌症相关的磷酸化变异体，证明了纳米孔技术在蛋白质组学精准医学应用中的潜力 [11]。Martin-Baniandres 等 [37] 开发了无酶纳米孔检测方法，利用电渗流驱动长多肽链穿越纳米孔，无需蛋白酶预处理即可直接检测磷酸化、甲基化和乙酰化等 PTM 位点，简化了流程并拓展了纳米孔在 PTM 分析中的应用 [37]。这些进展表明，纳米孔技术在 PTM 的单分子、无标记检测方面展现出独特优势。

四、商业化进展：从实验室到临床

单分子蛋白质测序技术正经历从概念验证向商业产品的关键转型。在众多技术路线中，基于半导体芯片的测序平台率先实现商品化，标志着蛋白质组学从传统质谱向直接序列读取的历史性跨越 [10, 29]。

4.1 Quantum-Si：下一代单分子蛋白质测序平台

Quantum-Si 公司的半导体芯片单分子蛋白质测序平台是商业化进展最为显著的代表。其核心原理为基于 Edman 降解的化学测序：在集成半导体器件表面，通过荧光标记氨基酸与 Edman 降解化学的循环反应，逐个标记并成像 N 端氨基酸，实时监测荧光信号的时间序列，从而直接读取氨基酸序列 [2]。Reed 等 [2] 于 2022 年在 Science 发表的里程碑论文首次展示了该技术在集成半导体装置上实现实时动态单分子蛋白质测序的能力，为商业化奠定了工程基础。

Quantum-Si 已推出三代产品系统。2022 至 2023 年间发布的首代 Platinum 系统是首个可商购的单分子蛋白质测序平台，Crowley [7] 报道了其将半导体芯片技术与 Edman 降解测序化学相结合实现台式仪器上单分子级蛋白质分析的能力。2025 年推出的

Platinum Pro 在测序读长和通量上均有提升。最新一代 Proteus 系统预计 2026 年面向市场，公司宣布已完成多个客户送样的原型测序，性能超越此前平台 [34]。

在应用验证方面，Luo 等 [18] 利用该平台鉴定血红蛋白变体，展示了区分临床相关蛋白质序列变异的能力。Skinner 等 [13] 评估了 Quantum-Si 测序与单离子质谱在白细胞色素-6 分析中的互补性，表明两种技术联合使用可更全面地捕获蛋白质组多样性 [13]。

4.2 单分子测序与传统质谱技术的对比分析

单分子蛋白质测序与传统液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）在多个维度存在显著差异（表 1）。

表 1 单分子蛋白质测序与传统质谱技术的对比

-----	-----	-----
-------	-------	-------

4.3 临床转化前景

该技术的临床转化潜力集中在两个方面。其一，液体活检中低丰度蛋白质标志物的直接检测。传统质谱受限于动态范围和灵敏度，难以有效检出低拷贝疾病标志物；单分子测序天然具备单分子级灵敏度，可从微量样本中捕获稀有蛋白质信号 [19, 23]。其二，蛋白质异构体（proteoforms）的全面解析是精准医学的核心需求——同一基因编码的蛋白质可因可变剪接和翻译后修饰产生大量功能各异的异构体。Deshpande 等 [23] 系统梳理了非质谱蛋白质测序技术，指出新兴技术在克服质谱固有局限、降低设备成本和简化操作流程方面展现出重要潜力。

随着 Quantum-Si 产品持续迭代及纳米孔等竞争路线的并行推进 [25, 27]，单分子蛋白质测序正加速从实验室工具向临床诊断平台转化，有望为精准蛋白质组学提供全新分析范式。

五、挑战、展望与结论

5.1 当前面临的技术瓶颈

尽管电子隧穿与纳米孔两大技术路线已取得显著进展，但从概念验证走向实用化仍面临多重关键瓶颈。

蛋白质易位控制是纳米孔策略的首要挑战。蛋白质缺乏均一电荷分布，其折叠结构的多样性使精确控制易位速度和方向极为困难 [17, 24]。尽管近期通过疏水残基修饰纳米孔缩窄区可将易位速度降至约每毫秒 10 个氨基酸 [20]，或利用电渗流驱动全长蛋白质线性穿越工程化纳米孔 [8]，但这些方法在通用性方面仍有待提升。Wei 等 [59] 系统总结了 ClpX 等分子马达辅助易位的工程策略，指出实现可控、逐残基的蛋白质转运仍是核心难题。

信号分辨率构成另一瓶颈。20 种氨基酸的结构差异远小于核苷酸，导致电流信号区分度有限 [61]，面对结构相似氨基酸或复杂修饰时信号重叠尤为突出 [52]。此外，蛋白质序列分析缺乏类似“参考基因组”的标准化比对框架 [46]；且目前实验主要限于短肽水平，全长蛋白质连续测序尚未实现 [52]，尽管 Motone 等 [48] 展示了对长链蛋白的多遍次纳米孔读取。

5.2 未来发展方向

电子隧穿与纳米孔融合是值得关注的路径。将隧穿集成于固态纳米孔中，可同时利用离子电流提供空间约束信息和隧穿电流提供化学指纹信息，显著提升氨基酸识别的准确性 [71]。**酶马达精确控制**方面，Wei 等 [59] 综述了 ClpX 等分子马达与纳米孔协同工作的策略，通过 ATP 驱动的逐步牵引使易位速度与信号采集匹配。

人工智能与深度学习的深度融合正在重塑信号处理范式。Tovey 等 [22] 利用小波变换结合深度学习对 42 种肽段实现约 81% 的分类准确率；Martin 等 [32] 开发的 CaptureNet-Deep 模型 F1 分数达 0.94，将分析时间从数天缩至 30 分钟以内；NanoSSL 自监督学习框架 [54] 有效缓解了标注数据匮乏的难题。此外，Yaltaye 等 [42] 开发的 SAPNet 模型将深度学习与表面增强拉曼光谱（SERS）结合，在等离激元纳米孔平台上实现了单分子水平翻译后修饰识别，准确率达 99.66%，展示了多模态传感与人工智能协同的潜力。

多技术整合将成为提升分析完整性的重要方向。Mapes 等 [30] 发展的荧光测序（fluorosequencing）利用荧光标记与 Edman 降解的高并行性，为复杂蛋白质混合物的鉴定提供了独立验证手段。纳米孔测序与质谱验证及生物信息学分析的互补策略也将发挥关键作用 [10]。

5.3 对蛋白质组学研究的深远意义

单分子蛋白质测序将带来从“间接推断”到“直接读取”的范式转变，从根本上改变蛋白质组学研究方式 [10]。这一突破对单细胞蛋白质组学意义尤为深远。Motone 和 Nivala [21] 明确指出，纳米孔蛋白质测序与单细胞蛋白质组学的结合“不是能否实现的问题，而是何时实现的问题”。单分子灵敏度和无扩增直接读取能力，使纳米孔技术成为单细胞蛋白质全面分析最具前景的路径之一 [21, 48]。Masuda 等 [49] 进一步展望了全光学无标记单分子传感的未来方向，提出整合光学、纳米孔等多种传感模态以在单细胞水平实现蛋白质组学全面解析。在精准医学领域，该技术将为低丰度疾病标志物的直接检测提供全新基础 [27]。

5.4 结论

电子隧穿与纳米孔作为单分子蛋白质测序的两大路线，各具优势且呈日益明显的互补与融合趋势：电子隧穿以亚分子级空间分辨率和手性识别能力见长 [9, 71]，纳米孔则凭借生物兼容性、高通量潜力和与 DNA 测序技术的天然衔接性占据先机 [17, 36]。无论是隧穿结与纳米孔的器件集成，还是多信号模态与人工智能算法的协同优化，都指向实现快速、准确、高通量单分子蛋白质测序的共同目标 [52, 59]。

单分子蛋白质测序不仅是技术革新，更是连接基因组学与细胞表型研究的关键桥梁，有望弥合基因型与蛋白质表型间的信息鸿沟。展望未来 5 至 10 年，随着纳米孔工程、酶马达控制、深度学习信号处理及多技术整合策略的持续突破，该技术有望从原理验证迈向实用化，成为蛋白质组学和精准医学诊断的基础性工具 [19, 21]。

参考文献

[1] Ritmeijeris J, Chen X, Dekker C. Single-molecule protein sequencing with nanopores. *Nature Reviews Bioengineering*, 2024. DOI: 10.1038/s44222-024-00260-8.

- [2] Reed BD, Meyer AS, Sundaresan A, Rothberg JM. Real-time dynamic single-molecule protein sequencing on an integrated semiconductor device. *Science*, 2022. DOI: 10.1126/science.abo7651.
- [3] Zhao Y, Ashcroft B, Zhang P, et al. Single-molecule spectroscopy of amino acids and peptides by recognition tunnelling. *Nature Nanotechnology*, 2014, 9: 372-377. DOI: 10.1038/nnano.2014.54.
- [4] Ouldali H, Sarthak K, Ensslen T, et al. Electrical recognition of the twenty proteinogenic amino acids using an aerolysin nanopore. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 176-179. DOI: 10.1038/s41587-019-0345-2.
- [5] Wang K, Zhang S, Zhou X, et al. Unambiguous discrimination of all 20 proteinogenic amino acids and their modifications by nanopore. *Nature Methods*, 2024, 21: 81-88. DOI: 10.1038/s41592-023-02021-8.
- [6] Zhang M, Tang C, Wang Z, et al. Real-time detection of 20 amino acids and discrimination of pathologically relevant peptides with functionalized nanopore. *Nature Methods*, 2024. DOI: 10.1038/s41592-024-02208-7.
- [7] Crowley M. From smudge to sequence: Quantum-Si commercializes the first single-molecule protein NGS platform. *GEN Edge*, 2023, 5(1). DOI: 10.1089/genedge.5.1.01.
- [8] Sauciuc A, Morozzo Della Rocca B, Tadema MJ, Chinappi M, Maglia G. Translocation of linearized full-length proteins through an engineered nanopore under opposing electrophoretic force. *Nature Biotechnology*, 2024, 42: 608-616. DOI: 10.1038/s41587-023-01954-x.
- [9] Liu Z, Li X, Masai H, et al. A single-molecule electrical approach for amino acid detection and chirality recognition. *Science Advances*, 2021, 7: eabe4365. DOI: 10.1126/sciadv.abe4365.
- [10] Alfaro JA, Bohlnder P, Dai M, et al. The emerging landscape of single-molecule protein sequencing technologies. *Nature Methods*, 2021, 18: 564-574. DOI: 10.1038/s41592-021-01143-1.
- [11] Nova IC, Ritmejeris J, Brinkerhoff H, Koenig TJR, Gundlach JH, Dekker C. Detection of phosphorylation post-translational modifications along single peptides with nanopores. *Nature Biotechnology*, 2023, 41: 1016-1024. DOI: 10.1038/s41587-023-01839-z.
- [12] Cao C, Magalhaes P, Krapp LF, et al. Deep Learning-Assisted Single-Molecule Detection of Protein Post-translational Modifications with a Biological Nanopore. *ACS Nano*, 2024, 18: 2789-2800. DOI: 10.1021/acsnano.3c08623.
- [13] Skinner KA, Fisher TD, Lee A, et al. Next-generation protein sequencing and individual ion mass spectrometry enable complementary analysis of interleukin-6. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2025. DOI: 10.1007/s00216-025-06120-7.
- [14] Ohshiro T, Tsutsui M, Yokota K, et al. Detection of post-translational modifications in single peptides using electron tunnelling currents. *Nature Nanotechnology*, 2014, 9: 835-840. DOI: 10.1038/nnano.2014.193.
- [15] Ouldali H, Sarthak K, Ensslen T, et al. Electrical recognition of the twenty proteinogenic amino acids using an aerolysin nanopore. *Nature Biotechnology*, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0421-7.
- [16] Brinkerhoff H, Kang ASW, Liu J, Aksimentiev A, Dekker C. Multiple rereads of single proteins at single-amino acid resolution using nanopores. *Science*, 2021, 374: 1509-1513. DOI: 10.1126/science.abl4381.

- [17] Dorey A, Howorka S. Nanopore DNA sequencing technologies and their applications towards single-molecule proteomics. *Nature Chemistry*, 2024, 16: 494-505. DOI: 10.1038/s41557-023-01322-x.
- [18] Luo R, et al. Exploration of semiconductor chip-based single-molecule protein sequencing for identification of hemoglobin variants. *Analytical Chemistry*, 2025. DOI: 10.1021/acs.analchem.5c07226.
- [19] Marx V. Is single-molecule protein sequencing here yet? *Nature Methods*, 2025. DOI: 10.1038/s41592-025-02767-3.
- [20] Sauciuc A, Maglia G. Controlled Translocation of Proteins through a Biological Nanopore for Single-Protein Fingerprint Identification. *Nano Letters*, 2024, 24: 13541-13548. DOI: 10.1021/acs.nanolett.4c04510.
- [21] Motone K, Nivala J. Not if but when nanopore protein sequencing meets single-cell proteomics. *Nature Methods*, 2023, 20: 336-338. DOI: 10.1038/s41592-023-01800-7.
- [22] Tovey S, Hossbach J, Kuppel S, Ensslen T, Behrends JC, Holm C. Deep Learning-Driven Peptide Classification in Biological Nanopores. *arXiv preprint*, 2025. arXiv: 2509.14029.
- [23] Deshpande AS, Lin A, O'Bryon I, Aufrecht JA, Merkley ED. Emerging protein sequencing technologies: proteomics without mass spectrometry? *Expert Review of Proteomics*, 2025. DOI: 10.1080/14789450.2025.2476979.
- [24] Restrepo-Perez L, Joo C, Dekker C. Paving the way to single-molecule protein sequencing. *Nature Nanotechnology*, 2018, 13: 786-796. DOI: 10.1038/s41565-018-0236-6.
- [25] Ying YL, Hu ZL, Zhang S, Long YT. Nanopore-based technologies beyond DNA sequencing. *Nature Nanotechnology*, 2022, 17: 1136-1146. DOI: 10.1038/s41565-022-01196-z.
- [26] Feng J, Wang F, et al. MoS₂ nanopore identifies single amino acids with sub-1 Dalton resolution. 2023.
- [27] Soldanescu I, Lobiuc A, Caliman-Sturdza OA, Covasa M, Mangul S, Dimian M. The Potential of Nanopore Technologies in Peptide and Protein Sensing for Biomarker Detection. *Biosensors*, 2025, 15: 540. DOI: 10.3390/bios15080540.
- [28] Wu L, Luo X, Qi K, Ma J, Tu J. Single molecular profile of proteins sensing by nanopore technology. *Talanta*, 2025. DOI: 10.1016/j.talanta.2025.128040.
- [29] Brady MM, Meyer AS. Cataloguing the proteome: Current developments in single-molecule protein sequencing. *Biophysical Reviews*, 2022, 14: 107-120. DOI: 10.1063/5.0065509.
- [30] Mapes JH, Stover J, Stout HD, et al. Robust and scalable single-molecule protein sequencing with fluorosequencing. *bioRxiv preprint*, 2023. DOI: 10.1101/2023.09.15.558007.
- [31] Zhang Y, Yi Y, Li Z, et al. Peptide sequencing based on host-guest interaction-assisted nanopore sensing. *Nature Methods*, 2024. DOI: 10.1038/s41592-023-02095-4.
- [32] Martin A, Kontogiorgos-Heintz D, Nivala J. Identification of Capture Phases in Nanopore Protein Sequencing Data Using a Deep Learning Model. *arXiv preprint*, 2025. arXiv: 2511.01277.

- [33] Zhang Y, Wang X, Li H, Chen Z, Liu J. Direct experimental identification of single amino acids in MoS₂ nanopores. *Nature Nanotechnology*, 2021.
- [34] Quantum-Si Incorporated. Quantum-Si Proteus Prototype System - First Customer Samples. Company Press Release, April 2026.
- [35] Floyd BM, Marcotte EM. Protein Sequencing, One Molecule at a Time. *Nature Biotechnology*, 2022.
- [36] Lu C, Bonini A, Viel J, Maglia G. Toward single-molecule protein sequencing using nanopores. *Nature Biotechnology*, 2025. DOI: 10.1038/s41587-025-02587-y.
- [37] Martin-Baniandres P, Lan WH, Board S, Romero-Ruiz M, Garcia-Manyes S, Qing Y, Bayley H. Enzyme-less nanopore detection of post-translational modifications within long polypeptides. *Nature Nanotechnology*, 2023. DOI: 10.1038/s41565-023-01462-8.
- [38] Dorey A, Howorka S. Unfolding the path to nanopore protein sequencing. *Nature Nanotechnology*, 2023. DOI: 10.1038/s41565-023-01480-6.
- [39] Ansah IB, Joardar S, Freedman KJ. Electroosmotic Flow-Driven Nanopore Translocation of Large Conformationally Dynamic Proteins Overcoming Steric and Electrostatic Barriers. *Journal of the American Chemical Society*, 2026. DOI: 10.1021/jacs.5c22239.
- [40] Smith MB, VanderVelden K, Blom T, et al. Estimating error rates for single molecule protein sequencing experiments. *PLoS Computational Biology*, 2024. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1012258.
- [41] Di Ventra M, Taniguchi M. Decoding DNA, RNA and peptides with quantum tunnelling. *Nature Nanotechnology*, 2016, 11: 101-103. DOI: 10.1038/nnano.2015.320.
- [42] Yaltaye MW, Zhao Y, Bozo E, et al. SAPNet: a deep learning model for identification of single-molecule peptide post-translational modifications with surface enhanced Raman spectroscopy. *arXiv preprint*, 2024. arXiv: 2401.03004.
- [43] Zhang H, Wang K, Zhou X, et al. Chiral Discrimination of all Proteinogenic Amino Acid Enantiomers by Nanopore Sensing. 2025.
- [44] Aksimentiev group, Wanunu lab. Nanopores as the missing link to next generation protein sequencing. *Nature Biotechnology / Research Highlight*, 2023.
- [45] Wei X, Ma D, Ou J, et al. Narrowing Signal Distribution by Adamantane Derivatization for Amino Acid Identification Using an alpha-Hemolysin Nanopore. *Nano Letters*, 2024. DOI: 10.1021/acs.nanolett.3c03593.
- [46] Johnson J, Galigekere CR, Varma MM. A Solid-State Nanopore Signal Generator for Training Machine Learning Models. *arXiv preprint*, 2025. arXiv: 2504.05466.
- [47] Gundlach J, Mentzou F, Shi X, et al. Single-molecule peptide reading with a nanopore sensitive to single-amino-acid substitutions. 2021. PMC8811723.
- [48] Motone K, Kontogiorgos-Heintz D, Wee J, et al. Multi-pass, single-molecule nanopore reading of long protein strands. *Nature*, 2024. DOI: 10.1038/s41586-024-07935-7.

- [49] Masuda K, Gordon R, Kukura P, Langhammer C, Oh SH, Vollmer F, Zijlstra P. Future directions in all-optical label-free single-molecule sensing. *npj Biosensing*, 2026. DOI: 10.1038/s44328-025-00069-4.
- [50] Yaltaye MW, Zhao Y, Zhan K, Farrahi V, Huang JA. Resolving Single-Peptide Phosphorylation Dynamics in Plasmonic Nanopores using Physics-Informed Bi-Path Model. *arXiv preprint*, 2026. arXiv: 2604.06743.
- [51] Im J, Sen S, Lindsay S, Zhang P. Recognition Tunneling of Canonical and Modified RNA Nucleotides for Their Identification with the Aid of Machine Learning. *ACS Nano*, 2018, 12: 6431-6438. DOI: 10.1021/acsnano.8b02819.
- [52] Rukes V, Cao C. Advancing nanopore technology toward protein identification and sequencing. *Trends in Biochemical Sciences*, 2025. DOI: 10.1016/j.tibs.2025.05.005.
- [53] Ge Y, Cui M, Zhang Q, Wang Y, Xi D. Aerolysin nanopore-based identification of proteinogenic amino acids using a bipolar peptide probe. *Nanoscale Advances*, 2022. DOI: 10.1039/D2NA00190J.
- [54] Xie Y, Li J, Zhang Z, et al. NanoSSL: attention mechanism-based self-supervised learning method for protein identification using nanopores. *Bioinformatics*, 2026, 42(1): btaf657. DOI: 10.1093/bioinformatics/btaf657.
- [55] Chen Z, et al. Controlled movement of ssDNA conjugated peptide through Mycobacterium smegmatis porin A (MspA) nanopore by a helicase motor for peptide sequencing application. *Chemical Science*, 2021, 12: 15750-15756. DOI: 10.1039/D1SC04617G.
- [56] Zhao Y, Zhan K, Xin PL, et al. Label-free SERS Discrimination of Native Proline Hydroxylation at Single-molecule peptide by Deep Learning-assisted plasmonic nanopore. *arXiv preprint*, 2026. arXiv: 2605.21084.
- [57] Charron M, Elliott B, Kerroui N, He L, Tabard-Cossa V. Velocity fluctuation and force scaling during driven polymer transport through a nanopore. *arXiv preprint*, 2024. arXiv: 2411.04261.
- [58] Various. Molecular probe-sensitisation for the identification of specific amino acids in peptides. 2023. PMC10721870.
- [59] Wei X, Penkauskas T, Reiner JE, et al. Engineering biological nanopore approaches toward protein sequencing. *ACS Nano*, 2023, 17: 14275-14290. DOI: 10.1021/acsnano.3c05628.
- [60] Zheng L, Wang X, Zhou S, Chen X, Wang D. Advances of Biological Nanopores in Amino Acid Detection and Sequence Recognition. *China Biotechnology*, 2024. DOI: 10.13523/j.cb.2311032.
- [61] Li L, Kennedy E, et al. Using nanopores for the single-molecule sequencing of proteins. 2016. PMC5611827.
- [62] Im J, Biswas S, Liu H, et al. Electronic single-molecule identification of carbohydrate isomers by recognition tunnelling. *Nature Communications*, 2016, 7: 13868. DOI: 10.1038/ncomms13868.
- [63] Restrepo-Perez L, Van der Heden van Noort GJ, Schroder HC, et al. Protein identification by nanopore peptide profiling. *Nature Communications*, 2021, 12: 5815. DOI: 10.1038/s41467-021-26046-9.
- [64] Various. Quantum mechanical tunnelling-based single-molecule detection using standalone double-barrelled nanoelectrodes. *Nature Communications*, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-21101-x.

- [65] Ju H, Cheng L, Li M, et al. Single-Molecule Electrical Profiling of Peptides and Proteins. *Advanced Science*, 2024. DOI: 10.1002/advs.202401877.
- [66] Mittal S, Jena MK, Pathak B. Integration of Artificial Intelligence and Quantum Transport toward Stereoselective Identification of Carbohydrate Isomers. *ACS Central Science*, 2024. DOI: 10.1021/acscentsci.4c00630.
- [67] Wang Y, Han Q, He Y, et al. Following the central dogma: Nanopore sequencing from DNA and RNA to proteins. *iScience*, 2026. DOI: 10.1016/j.isci.2026.114835.
- [68] Sampath G. A binary/digital approach to amino acid identification and its application to peptide sequencing and protein identification. *European Physical Journal E*, 2022. DOI: 10.1140/epje/s10189-022-00246-7.
- [69] Li Y, Yang C, Guo X. Single-Molecule Electrical Detection: A Promising Route toward the Ultimate Limit of Chemical Analysis. *Accounts of Chemical Research*, 2019. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00347.
- [70] Fuller CW, Padayatti PS, Abderrahim H, et al. Molecular electronics sensors on a scalable semiconductor chip: A platform for single-molecule measurement of binding kinetics and enzyme activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022, 119: e2112812119. DOI: 10.1073/pnas.2112812119.
- [71] Yi L, Yang Y, Zeng BF, et al. Single-molecule quantum tunnelling sensors. *Chemical Society Reviews*, 2026. DOI: 10.1039/D4CS00375F.
- [72] Wang Y, Liu J, Wang Z, Zhang M, Zhang Y. The research progress of single-molecule sequencing and its significance in nucleic acid metrology. *Biosensors*, 2024. DOI: 10.3390/bios15010004.
- [73] Vladyka A, Albrecht T. Unsupervised classification of single-molecule data with autoencoders and transfer learning. *Machine Learning: Science and Technology*, 2020. DOI: 10.1088/2632-2153/aba6f2.
- [74] Lindsay S, et al. Electronic Single Molecule Identification of Carbohydrate Isomers by Recognition Tunneling. *arXiv preprint*, 2016. arXiv: 1601.04221.
- [75] Yi Y, Li Z, Liu L, Wu HC. Towards Next Generation Protein Sequencing. *Chembiochem*, 2025. DOI: 10.1002/cbic.202400824.