

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

摘要

蛋白质是生命活动的主要执行者，人类蛋白质组因 RNA 可变剪接和翻译后修饰等机制产生数百万种蛋白变体，构成了远比基因组更为复杂的分子景观。精准鉴定和定量这些蛋白变体，尤其是低丰度疾病相关蛋白，是蛋白质组学长期面临的核心挑战。当前主流的质谱技术虽已实现对蛋白质的大规模鉴定与定量，但其本质上依赖蛋白质酶解和肽段推断的间接检测策略，在灵敏度、动态范围及对翻译后修饰的直接解析能力方面仍存在显著局限。与此同时，基因组学的飞速发展——特别是高通量测序技术的普及——与蛋白质组学技术的相对滞后之间形成了日益显著的落差，使得从基因型到表型的信息链条出现了关键断裂。更为根本的是，蛋白质缺乏类似聚合酶链式反应的扩增手段，使得低丰度蛋白的检测始终受限于样品量不足这一瓶颈。近年来，单分子蛋白质测序作为突破上述困境的新兴技术路线受到广泛关注。受纳米孔 DNA 测序成功商业化的启发，研究者已开始将单分子传感原理迁移至蛋白质分析领域，逐步形成了以电子隧穿识别和纳米孔离子电流传感为代表的两大主流技术路线。前者通过测量单个氨基酸分子在功能化电极间的隧穿电流实现免标记识别，后者则利用蛋白质或肽段穿过纳米孔道时产生的特征性离子电流阻塞信号进行序列解析。本文系统综述了这两条技术路线的基本原理、最新进展及面临的挑战，涵盖从基础的氨基酸识别到全长蛋白质测序的关键突破，并展望了单分子蛋白质测序在精准医学和单细胞蛋白质组学中的应用前景。

关键词： 单分子蛋白质测序；电子隧穿；纳米孔传感；翻译后修饰；蛋白质组学

Abstract

Proteins are the primary executors of biological processes. The human proteome, shaped by alternative RNA splicing and post-translational modifications, encompasses millions of protein variants, constituting a molecular landscape far more complex than the genome. Precise identification and quantification of these variants, particularly low-abundance disease-associated proteins, remain a central challenge in proteomics. Current mainstream mass spectrometry techniques, while capable of large-scale protein identification and quantification, fundamentally rely on indirect detection strategies involving proteolytic digestion and peptide inference, exhibiting notable limitations in sensitivity, dynamic range, and direct resolution of post-translational modifications. Meanwhile, the rapid advancement of genomics -- particularly the widespread adoption of high-throughput sequencing technologies -- has created an increasingly pronounced gap relative to the slower progress in proteomics, resulting in a critical disconnect in the information chain from genotype to phenotype. More fundamentally, proteins lack an amplification mechanism

analogous to the polymerase chain reaction, rendering detection of low-abundance proteins persistently constrained by insufficient sample quantities. In recent years, single-molecule protein sequencing has emerged as a promising technological paradigm to overcome these bottlenecks. Inspired by the successful commercialization of nanopore DNA sequencing, researchers have extended single-molecule sensing principles to protein analysis, establishing two major technical routes: electron tunneling-based recognition and nanopore ionic current sensing. The former achieves label-free identification of individual amino acids by measuring tunneling currents across functionalized electrodes, while the latter resolves protein sequences through characteristic ionic current blockade signals generated as proteins or peptides traverse nanopore channels. This review systematically examines the fundamental principles, latest advances, and remaining challenges of both technological routes, spanning key breakthroughs from basic amino acid discrimination to full-length protein sequencing, and envisions the application prospects of single-molecule protein sequencing in precision medicine and single-cell proteomics.

Keywords: single-molecule protein sequencing; electron tunneling; nanopore sensing; post-translational modification; proteomics

蛋白质是生命活动的主要执行者，其结构多样性与功能复杂性远超基因组所能直接编码的信息量。在人类细胞中，约两万个蛋白质编码基因经由 RNA 可变剪接、翻译后修饰（post-translational modifications, PTMs）以及蛋白酶解加工等机制，可产生数百万种不同的蛋白变体（proteoforms）[1]。这种巨大的分子多样性构成了细胞信号转导、代谢调控和免疫应答等生命过程的物质基础，同时也使得全面、精准地解析蛋白质组成为当代生命科学的重大挑战之一。在众多蛋白质组学需求中，低丰度疾病相关蛋白的检测尤为关键——许多重要的生物标志物和药物靶点在体液或组织中的含量极低，远低于现有常规技术的检测限[2]。与此同时，基因组学的飞速发展——特别是高通量测序技术的普及——与蛋白质组学技术的相对滞后之间形成了日益显著的落差，使得从基因型到表型的信息链条出现了关键断裂。更为根本的是，与核酸检测领域聚合酶链式反应（PCR）技术的革命性影响不同，蛋白质至今缺乏有效的体外扩增手段，这一“蛋白质不能扩增”的根本性难题使得单分子水平的直接检测成为突破灵敏度瓶颈的关键路径[2,3]。

当前蛋白质组学研究的技术体系以质谱（mass spectrometry, MS）为核心支柱。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）等技术已实现对复杂蛋白质混合物的大规模鉴定与定量分析[4]。然而，质谱技术的检测模式本质上是间接的：蛋白质须先经胰蛋白酶等蛋白酶酶解为肽段，再通过质谱测量肽段的质荷比并借助数据库搜索算法推断原始蛋白质身份[5]。这一“自下而上”（bottom-up）的策略不可避免地丢失了蛋白质全长序列信息和翻译后修饰的位点特异性关联。此外，传统二维凝胶电泳（2D-PAGE）虽然能够分离完整蛋白质，但其分离能力有限、灵敏度不足且难以实现高通量分析[6]。传统的 Edman 降解虽能实现蛋白质 N 端顺序测序，但其逐轮降解效率递减、无法应对修饰残基且灵敏度有限，难以满足复杂

蛋白质组学的需求。哺乳动物细胞中蛋白质分子的丰度约为 mRNA 分子的三万倍[4]，而质谱技术的动态范围仍难以覆盖跨越十个数量级的蛋白质丰度差异，致使低丰度蛋白质的可靠检测长期受限[7]。上述技术边界清晰地表明：蛋白质组学亟需一种能够在单分子水平直接读取蛋白质序列信息的新型分析范式。

近年来，受纳米孔 DNA 测序技术从实验室研究走向成熟商业应用的深刻启发[8]，研究者开始将单分子传感的原理和方法系统地迁移至蛋白质测序领域[3,9]，催生了多条新兴技术路线[10]。其中，电子隧穿识别策略（recognition tunneling）通过在纳米间隙电极表面修饰特异性识别分子，利用单个氨基酸被捕获于电极间时产生的特征性隧穿电流信号实现免标记鉴定，已在原理验证层面展示了区分全部二十种天然氨基酸及其异构体的能力[1,11]。纳米孔传感策略则通过检测蛋白质或肽段穿越生物或固态纳米孔道时引起的离子电流变化来获取序列信息，已在氨基酸直接检测[12,13]、肽段指纹图谱分析[14]以及全长蛋白质易位控制[15,16]等方面取得了一系列重要突破。本文围绕上述两大主流技术路线展开系统综述：第 2 节详述电子隧穿策略的原理与进展；第 3 节阐述纳米孔传感策略的多样化方案；第 4 节介绍商业化进展与临床转化前景；第 5 节讨论当前挑战并展望未来发展方向。

2. 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

蛋白质的单分子检测要求发展一种无需标记、直接读取分子本征特征的分析手段。识别隧穿（Recognition Tunneling, RT）技术正是基于这一需求而发展起来的前沿方法。需要指出的是，“识别隧穿”是“电子隧穿”（electron tunneling）在分子识别领域的具体应用形式——二者基于相同的量子隧穿物理原理，区别在于识别隧穿特指在电极表面修饰特异性识别分子以增强对目标分子的选择性捕获与信号区分。其核心原理为：在扫描隧道显微镜（STM）或可控纳米间隙体系中，两个金属电极表面修饰以特异性识别分子（如 2-异氰基乙酸酯，ICA），当单个氨基酸分子被捕获于两电极之间的纳米间隙中时，通过测量跨越分子结的电子隧穿电流，获取反映分子电子结构的特征信号[1]。

2014 年，Zhao 等人在《Nature Nanotechnology》发表的里程碑式论文中首次系统验证了这一技术的可行性[1]。他们发现，不同氨基酸分子在隧穿结中产生的电流-时间信号呈现出显著差异，这些信号在幅值、持续时间和波形特征上构成了每种氨基酸独有的电子“指纹”。随后，Krstic 等人建立了识别隧穿的物理模型，从理论层面阐明了信号特异性的来源：氢键相互作用的几何差异、分子取向以及电子能级结构共同决定了隧穿电流的特征模式[17]。Di Ventra 和 Taniguchi 在综述中进一步将识别隧穿定位于量子隧穿测序的技术框架之内，指出该技术在 DNA、RNA 和多肽序列读取方面具有统一的理论基础[18]。

2.2 机器学习驱动的氨基酸分类

识别隧穿信号的复杂性在于，同一种氨基酸分子可以通过多种结合模式（binding modes）与电极表面的识别分子发生相互作用——包括不同的氢键配对方式、分子取向和空间构型。这意味着单一氨基酸会生成多组不同的隧穿电流特征，而非唯一的信号模式。传统的简单阈值分类方法难以有效解析这种多模态的信号分布。

为应对这一挑战，研究者引入了支持向量机（SVM）等机器学习算法来系统分类隧穿信号[19]。Im 等人在 RNA 核苷酸识别的研究中建立了基于 SVM 的完整分类流程：首先从高维隧穿信号中提取峰值电流、信号持续时间和峰形特征等多维参数，然后利用 SVM 算法将信号归类为不同的核苷酸类别，实现了对四种标准 RNA 核苷酸及修饰核苷酸的高准确率分类[19]。这一方法论框架同样适用于氨基酸的隧穿信号分类。Mittal 等人进一步将第一性原理量子隧穿模拟与数据驱动的机器学习方法相结合，从计算角度验证了电子指纹识别的可靠性[20]。通过机器学习辅助，识别隧穿技术可将 20 种标准氨基酸按照其电子指纹特征进行有效区分，分类精度达到较高水平[1]。

2.3 技术分辨能力与应用展示

识别隧穿技术在氨基酸鉴别方面展示了远超传统质谱方法的分辨能力，尤其在以下几类挑战性识别任务中表现突出。

对映体区分。 手性氨基酸的区分是生物分析领域的经典难题。Liu 等人利用单分子电学方法实现了对 D 型和 L 型氨基酸的手性识别，证明隧穿结中的不对称识别分子可以产生对映体特异性的电导信号[21]。Mittal 等人的理论计算也证实，D-ASN 与 L-ASN 的隧穿电流指纹具有可区分的统计特征[20]。

异构体区分。 亮氨酸（Leu）与异亮氨酸（Ile）为同量异位异构体，分子量完全相同，传统质谱方法无法区分。Zhao 等人的实验表明，由于两者侧链空间排列的差异导致隧穿结中电子耦合模式不同，识别隧穿技术可以成功将二者区分[1]。

翻译后修饰识别。 甲基化氨基酸（如肌氨酸）是潜在的癌症标志物，其检测对蛋白质组学具有重要意义。Ohshiro 等人率先证明了电子隧穿电流可以检测单条多肽中的翻译后修饰（如磷酸酪氨酸），展示了隧穿技术在修饰位点鉴定方面的潜力[22]。Mittal 等人则从理论层面证实了磷酸化和甲基化修饰氨基酸均具有可辨别的隧穿电子指纹[20]。

短肽识别。 Zhao 等人进一步将该技术拓展至短肽水平的鉴别，成功区分了四甘肽（GGGG）与含亮氨酸的四肽（GGLL）等不同序列组成的短肽分子，分类准确率超过 90%[1]。此外，Zollo 和 Rossini 的理论研究表明，考虑声子辅助的非弹性隧穿机制后，石墨烯纳米间隙体系对氨基酸及肽键的识别分辨能力可进一步提升[23]。

2.4 电子隧穿蛋白质测序的实现路径

识别隧穿技术从单氨基酸检测走向完整蛋白质测序，需要实现顺序读取氨基酸残基的能力。目前已提出两条主要技术路径。

路径一：外肽酶顺序消化结合隧穿检测。利用氨肽酶或羧肽酶从蛋白质的一端逐个切割氨基酸残基，每释放一个氨基酸即通过识别隧穿结进行实时检测，由此获得氨基酸序列信息[1]。该方案的关键挑战在于外肽酶消化速率与隧穿检测速度的匹配，以及酶切效率的可靠性[10]。

路径二：分子马达驱动的纳米孔隧穿测序。将识别隧穿结集成于固态纳米孔结构中，利用分子马达（如 ClpXP 蛋白酶复合物）牵引蛋白质链穿过纳米孔，使氨基酸残基依次经过隧穿间隙被逐一读取[1]。这一方案的实现依赖于分子马达的步控精度和隧穿结的稳定性。近期研究表明，采用原子级厚度的石墨烯电极替代传统金属电极可以显著缩小隧穿间隙尺寸、提高信噪比，为这一路径的工程化提供了新的材料方案[24]。此外，Zhang 等人发展的双管纳米电极结构也为集成化隧穿测序器件的构建提供了创新的硬件设计思路[25]。

尽管上述两条路径均已取得阶段性进展，但从单氨基酸检测能力的验证到完整蛋白质序列的全程读取，仍存在信号稳定性、读取速度和数据处理等方面的工程挑战[6]。然而，识别隧穿技术作为目前少数能够在单分子水平实现无标记、手性敏感、修饰敏感氨基酸识别的方法之一，其在未来单分子蛋白质组学中的战略价值不可替代[26]。

3. 纳米孔蛋白质测序技术：三种核心策略

纳米孔蛋白质测序是当前单分子蛋白质组学最具前景的技术方向之一。根据检测原理的不同，该领域已形成三种核心策略——直接测序、标记辅助传感和天然蛋白质直接传感——三者各有优势并相互补充[27]。

3.1 技术原理与核心挑战

纳米孔测序在核酸分析中已获巨大成功[8]，但迁移至蛋白质测序面临根本性差异。核酸具有均匀的磷酸骨架电荷，电泳力可驱动其线性穿越纳米孔；而蛋白质由 20 种氨基酸组成，各残基带电性质迥异，电泳力无法可靠驱动其单向易位[5]。此外，蛋白质在生理条件下呈紧密折叠状态，须线性化方可通过纳米孔[28]，且 20 种氨基酸之间的电流阻断差异极为细微，对孔道灵敏度和信号处理提出了严苛要求[29]。围绕这些挑战，三种策略各自以不同方式实现突破[2]。

3.2 直接测序策略

直接测序让线性化多肽链穿过纳米孔，利用不同氨基酸残基产生的特异性离子电流阻断信号实现逐一鉴定。2020 年，Ouldali 等利用气溶素（aerolysin）纳米孔结合多阳离子载体，首次利用纳米孔实现全部 20 种游离蛋白源氨基酸的电学检测；孔道内置的“捕获阱”限制氨基酸运动以提高灵敏度，野生型孔道成功区分了 13 种天然氨基酸[12]。2024 年，Zhang 等报道铜(II)功能

化 MspA 纳米孔实现 20 种氨基酸实时检测，验证准确率达 99.1%，并能区分病理相关肽段[13]。

在测序精度方面，Brinkerhoff 等（2021, *Science*）通过 DNA-肽段偶联物使单蛋白质多次穿越 MspA 纳米孔重读，达到单氨基酸分辨率[30]。2024 年，Motone 等在 *Nature* 报道 ClpX 解折叠酶马达驱动长蛋白链穿越 CsgG 纳米孔，实现多通道反复读取，并在全长蛋白水平检测到磷酸化修饰[16]。该工作建立在 Nivala 等 2013 年 ClpX 马达驱动蛋白质易位的开创性研究之上[31]，标志着纳米孔直接蛋白质测序的重大突破[9]。

3.3 标记辅助传感策略

标记辅助策略对多肽特定残基进行化学或荧光标记以增强信号差异，再结合机器学习分类识别。Cao 等（2023）报道了气溶素纳米孔结合深度学习的蛋白质翻译后修饰检测方法，对携带磷酸化修饰的 α -突触核蛋白衍生肽段实现高精度单分子识别，检测限低至 100 pM[32]。Tovey 等（2025）采用小波变换与神经网络对 42 种肽段实现 81% 分类准确率，验证了 AI 驱动信号解析的可行性[33]。Martin 等开发的 CaptureNet-Deep 模型在纳米孔蛋白质测序数据的捕获相位识别中达到 0.94 的 F1 分数[34]。该策略的优势在于通过化学修饰放大目标信号差异，尤其适用于结构高度相似的肽段区分。

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蛋白质直接通过纳米孔，利用物理化学特性产生独特电流指纹。Maglia 团队通过工程化纳米孔产生强电渗流（EOF）突破了蛋白质带电不均匀的瓶颈。Sauciuc 等（2024, *Nature Biotechnology*）在孔道内引入成组带电残基，创建的电渗流在对抗电泳力条件下驱动未标记、未变性全长线性化蛋白质单向易位[15]。在此基础上，Sauciuc 和 Maglia（2024, *Nano Letters*）引入疏水残基降低易位速度，实现了受控条件下的单蛋白质指纹识别[35]。Bonini 等（2026）进一步展示了对完整蛋白质中单氨基酸替换的检测能力[36]。此前，Lucas 等（2021）利用工程化 Fragaceatoxin C 纳米孔从肽段产生蛋白质特异性电流指纹，奠定了重要基础[14]。

3.5 肽段磷酸化位点等翻译后修饰的纳米孔检测

翻译后修饰（PTM）精准检测是蛋白质组学的核心挑战。Nova 和 Dekker 团队（2024, *Nature Biotechnology*）建立慢速牵引肽段穿越纳米孔的方法，在单分子水平沿单条肽链区分磷酸化与非磷酸化残基的位点特异性差异[37]。Lin 等（2026）发展极性电荷工程化 MspA 纳米孔，实现位点特异性 PTM 检测，可分辨沿肽链不同位置的磷酸化异构体[38]。结合深度学习辅助信号识别[32]，纳米孔 PTM 检测有望为蛋白质修饰组学提供全新的单分子分辨率视角[39]。

4. 商业化进展：从实验室到临床

上述电子隧穿和纳米孔两大技术路线在实验室层面取得的一系列突破，正在加速推动单分子蛋白质测序从学术研究向商业化应用的转化。以下重点介绍当前商业化进展最为显著的代表性平台及其临床转化前景。

4.1 Quantum-Si：下一代单分子蛋白质测序平台

Quantum-Si 是目前商业化进展最为显著的单分子蛋白质测序平台之一。其核心技术"时间域测序"（Time Domain Sequencing）基于定制 CMOS 半导体芯片，在纳秒级时间精度下工作：芯片集成纳米反应腔（观测体积<5 阿托升）、光电传感器和光波导回路，对表面固定的单条肽分子实施实时动态测序[40]。芯片采用无滤光片电子快门设计，实现激发光超万倍衰减，利用 532 nm/67 MHz 脉冲激光交替采集荧光寿命早期与晚期信号窗口，以"bin ratio"区分不同染料标记的识别分子[40]。

测序过程中，定向进化获得的 N 端氨基酸识别蛋白与氨基肽酶（PhTET2/PhTET3）协同工作。识别蛋白以特征性脉冲持续时间（PD）标记各氨基酸：PS610 识别苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的中位 PD 分别为 2.49、0.73 和 0.31 秒；PS961 识别亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的中位 PD 分别为 1.21、0.28 和 0.21 秒[40]。早期芯片集成约 29.6 万活性反应孔，量产版本达 200 万个，规划向数千万级扩展[40]。

产品路线上，初代 Platinum（2022）奠定台式单分子测序基础；Platinum Pro（2025）将操作时间缩短至三小时以内，配套 V4 试剂盒覆盖 18 种氨基酸[41][42]；2026 年 4 月集成 Proteus 仪器完成端到端测序（开发试剂盒检测 17 种氨基酸），计划 2026 年底上市，2027 年实现 20 种氨基酸全覆盖[43]。应用方面，该平台已成功鉴定血红蛋白变体（Hb Handsworth、Hb G-Accra），在传统质谱难以分辨的紧密异构体中实现精确定位[44]，且样品到结果的工作流可压缩至 24 小时内[45]。

除 Quantum-Si 外，多家企业也在探索差异化的单分子蛋白质测序路线。Nautilus Biotechnology 开发了基于单分子 Edman 降解的平台，利用荧光标记氨基酸和全内反射荧光（TIRF）成像实现逐残基读取。Erisyon 则基于改进型荧光测序（fluorosequencing）策略，通过连续标记-成像-切割循环实现蛋白质序列读取。此外，Flomics Biotechnology（已被 Roche 收购）探索了单分子荧光蛋白质测序技术。这些多元化的商业化探索表明，单分子蛋白质测序正在从单一技术路线走向多路线竞争与互补的格局。

4.2 单分子测序与传统质谱技术的对比分析

技术特征	单分子蛋白质测序	传统质谱（LC-MS/MS）
检测原理	识别蛋白直接读取 N 端氨基酸序列，基于结合动力学区分	质量-电荷比推断肽段序列

	[40]	
灵敏度	单分子水平，无需扩增[40]	飞摩尔-阿摩尔级，低丰度蛋白常低于检测限[46]
通量	大规模并行，数十万至数百万反应腔[40]	中等，受色谱和扫描速度限制
翻译后修饰	直接读取共存修饰，动力学对修饰高度敏感[40]	需酶解后推断，依赖富集策略
异构体解析	单分子水平直接区分[44]	推断性鉴定，难以分辨完整异构体
设备与成本	台式，CMOS 规模化制造[40]	大型，高维护成本
氨基酸覆盖	当前 18 种，目标 20 种[42]	理论全覆盖，受酶解效率影响
定量方式	数字化单分子计数	峰面积/谱计数，存在偏差

4.3 临床转化前景

单分子蛋白质测序的临床转化潜力集中于三个方向。其一，液体活检中低丰度蛋白标志物的直接检测——人类蛋白质组动态范围跨越 10 个数量级，传统质谱难以兼顾高低丰度蛋白，而单分子测序的数字化计数特性为此提供突破路径[40][46]。其二，蛋白质异构体全面解析——人类异构体数量约为编码基因数的 10 倍以上[2]，平台已在血红蛋白变体鉴定中验证了这一能力[44]，可延伸至肿瘤相关异构体筛查。其三，药物靶点发现与治疗反应监测——24 小时快速工作流[45]使实时疗效评估成为可能。此外，纳米孔测序技术也在癌症和感染性疾病标志物检测中展示了无标记单分子分析潜力[47]，两种技术路线的并行推进将加速精准蛋白质组学的临床落地。

5 挑战、展望与结论

5.1 当前面临的技术瓶颈

尽管单分子蛋白质测序近年取得了显著进展，但实现蛋白质组的全面解析仍面临多重瓶颈。**蛋白质易位控制**是核心难题——蛋白质具有复杂的二级和三级结构，其在纳米孔中的移动速度和方向难以精确控制，折叠、滞留和非特异性相互作用均会干扰信号采集[29][27]。**信号分辨率不足**同样制约着识别精度：多种氨基酸侧链化学性质相似，离子电流信号高度重叠，翻译后修饰引起的信号变化更为微弱[48][49]。此外，蛋白质纳米孔测序尚缺乏专用的信号数据库和标准化比对算法，现有的质谱生物信息学流程难以直接适配[50][51]。最后，现有方法主要实现了短肽片段的序列读取，全长蛋白质的连续测序仍面临展开、定向导入和过程性读取等挑战[28]，尽管 Bonini 等人（2026）在全长蛋白质单分子鉴定上取得了突破性进展[36]。

5.2 未来发展方向

多个前沿方向正在汇聚力量，有望推动实质性突破。**电子隧穿与纳米孔融合**是最具前景的路径之一——将固态纳米孔集成隧穿结，可在离子电流基础上叠加电子隧穿信号，获得多维度单分子信息[18]；石墨烯等二维材料电极有望进一步提升空间分辨率和信噪比[24][26]。**酶马达精确控制**是解决易位难题的关键：ClpX 等分子马达以 ATP 依赖方式步进式转运蛋白质，有望将易位速度降至信号采集可匹配的时间尺度[46][29]。

AI 与深度学习的深度融合正在重塑信号处理范式。深度学习模型已在纳米孔信号相位识别中达到 0.94 的 F1 分数[34]，在 42 种肽段分类中实现 81% 准确率[33]，并结合生物纳米孔高精度识别磷酸化等修饰[32]。**多技术整合**则将推动蛋白质测序走向实用化：纳米孔的无标记单分子优势与质谱的高通量准确性形成互补[6]，构建多维度蛋白质鉴定体系有望在灵敏度与准确性之间取得最佳平衡[52]。

5.3 对蛋白质组学研究的深远意义

单分子蛋白质测序的成熟将根本改变蛋白质组学的研究范式。传统方法依赖“先酶切、后质谱”的间接推断策略，对低丰度蛋白质和异构体的分辨能力有限[46]。单分子测序有望实现从“间接推断”到“直接读取”的范式转变，逐分子解读完整序列与修饰状态[48]。从应用层面看，其低成本和小型化潜力有望实现“千元蛋白质测序”愿景[52]；固态纳米孔已展现单细胞蛋白质直接检测的可行性[53]，为单细胞蛋白质组学和精准医学诊断开辟新途径[47]。

5.4 结论

单分子蛋白质测序正处于从原理验证走向技术突破的关键阶段。电子隧穿以亚分子级分辨率提供氨基酸化学指纹[26]，纳米孔以无标记、可规模化特点提供高通量路径[5]，两者互补融合结合酶马达控制和深度学习等使能技术的进步，正在缩小蛋白质测序与核酸测序之间的技术鸿沟[54]。正如引言所述，基因组学飞速发展与其下游蛋白质功能解读之间的落差，构成了当代生命科学最突出的矛盾之一。单分子蛋白质测序正是连接基因组学与细胞表型研究的终极桥梁——直接读取氨基酸序列并揭示翻译后修饰全貌，实现从基因型到表型的完整信息链条[10]。尽管全长蛋白质测序和标准化流程等挑战仍待攻克，但从短肽识别到全长蛋白质鉴定[36]的跨越式进展充分表明，这一领域正沿着正确的轨道加速前行。

参考文献

[1] Yanan Zhao et al.. Single-molecule spectroscopy of amino acids and peptides by recognition tunneling. *Nature Nanotechnology*, 2014. DOI: 10.1038/nnano.2014.54

- [2] Javier Antonio Alfaro et al.. The emerging landscape of single-molecule protein sequencing technologies. *Nature Methods*, 2021. DOI: 10.1038/s41592-021-01143-1
- [3] Restrepo-Perez L, Joo C, Dekker C. Paving the way to single-molecule protein sequencing. *Nature Nanotechnology*, 2018, 13(12): 1115-1118. DOI: 10.1038/s41565-018-0308-1
- [4] Michael J. MacCoss et al.. Sampling the proteome by emerging single-molecule and mass spectrometry methods. *Nature Methods*, 2023. DOI: 10.1038/s41592-023-01802-5
- [5] Justas Ritmejeris, Xiuqi Chen, Cees Dekker. Single-molecule protein sequencing with nanopores. *Nature Reviews Bioengineering*, 2024. DOI: 10.1038/s44222-024-00260-8
- [6] Xiuer Luo et al.. Advances in protein sequencing: Techniques, challenges and prospects. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2025. DOI: 10.1016/j.trac.2025.118341
- [7] Brady MM, Meyer AS. Cataloguing the proteome: Current developments in single-molecule protein sequencing. *Biophysics Reviews*, 2022, 3(2): 021301. DOI: 10.1063/5.0065509
- [8] Adam Dorey, Stefan Howorka. Nanopore DNA sequencing technologies and their applications towards single-molecule proteomics. *Nature Chemistry*, 2024. DOI: 10.1038/s41557-023-01322-x
- [9] Maglia, G. et al.. Nanopore sequencing for protein analysis. *Nature (News & Views)*, 2024. DOI: 10.1038/d41586-024-01280-5
- [10] Nicholas Callahan et al.. Strategies for Development of a Next-Generation Protein Sequencing Platform. *Trends in Biochemical Sciences*, 2020. DOI: 10.1016/j.tibs.2019.09.005
- [11] Chuangcheng Jia, Xuefeng Guo. Single-Molecule Electrical Profiling of Peptides and Proteins. *Advanced Science*, 2024. DOI: 10.1002/adv.202401877
- [12] Hadjer Ouldali et al.. Electrical recognition of the twenty proteinogenic amino acids using an aerolysin nanopore. *Nature Biotechnology*, 2020. DOI: 10.1038/s41587-019-0345-2
- [13] Ming Zhang 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

- [14] Florian L. R. Lucas et al.. Protein identification by nanopore peptide profiling. *Nature Communications*, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-26046-9
- [15] Adina Sauciuc et al.. Translocation of linearized full-length proteins through an engineered nanopore under opposing electrophoretic force. *Nature Biotechnology*, 2024. DOI: 10.1038/s41587-023-01954-x
- [16] Keisuke Motone et al.. Multi-pass, single-molecule nanopore reading of long protein strands. *Nature*, 2024. DOI: 10.1038/s41586-024-07935-7
- [17] Predrag Krstic, Brian Ashcroft, Stuart Lindsay. Physical model for recognition tunneling. *Nanotechnology*, 2015. DOI: 10.1088/0957-4484/26/8/084001
- [18] Massimiliano Di Ventra, Masateru Taniguchi. Decoding DNA, RNA and peptides with quantum tunnelling. *Nature Nanotechnology*, 2016. DOI: 10.1038/nnano.2015.320
- [19] JongOne Im et al.. Recognition Tunneling of Canonical and Modified RNA Nucleotides for Their Identification with the Aid of Machine Learning. *ACS Nano*, 2018. DOI: 10.1021/acsnano.8b02819
- [20] Sneha Mittal, Milan Kumar Jena, Biswarup Pathak. Decoding d- and l-Amino Acids: Data-Driven Recognition of Enantiomers and Post-Translational Modifications via Quantum Tunneling. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2016. DOI: 10.1021/acs.jpclett.6c00203
- [21] Zihao Liu et al.. A single-molecule electrical approach for amino acid detection and chirality recognition. *Science Advances*, 2021. DOI: 10.1126/sciadv.abe4365
- [22] Ohshiro, T. et al.. Detection of post-translational modifications in single peptides using electron tunnelling currents. *Nature Nanotechnology*, 2014. DOI: 10.1038/nnano.2014.193
- [23] Giuseppe Zollo, Aldo Eugenio Rossini. Vibration assisted electron tunneling through nano-gaps in graphene nano-ribbons for amino-acid and peptide bond recognition. *Nanoscale Advances*, 2019. DOI: 10.1039/C9NA00396G
- [24] G. F. Schneider et al.. A Perspective on graphene junctions for recognition tunneling. *Applied Physics Letters*, 2024. DOI: 10.1063/5.0208498
- [25] Zhang, Y. et al.. Quantum mechanical tunneling-based single-molecule detection using standalone double-barrelled nanoelectrodes. *Nature Communications*, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-21101-x

- [26] Long Yi et al.. Single-molecule quantum tunnelling sensors. *Chemical Society Reviews*, 2026. DOI: 10.1039/D4CS00375F
- [27] Chunzhe Lu et al.. Toward single-molecule protein sequencing using nanopores. *Nature Biotechnology*, 2025. DOI: 10.1038/s41587-025-02587-y
- [28] Adam Dorey, Stefan Howorka. Unfolding the path to nanopore protein sequencing. *Nature Nanotechnology*, 2023. DOI: 10.1038/s41565-023-01480-6
- [29] Xiaojun Wei et al.. Engineering Biological Nanopore Approaches towards Protein Sequencing. *ACS Nano*, 2023. DOI: 10.1021/acsnano.3c05628
- [30] Brinkerhoff, H. et al.. Multiple rereads of single proteins at single-amino acid resolution using nanopores. *Science*, 2021. DOI: 10.1126/science.abl4381
- [31] Jeff Nivala, Douglas B Marks, Mark Akeson. Unfoldase-mediated protein translocation through an alpha-hemolysin nanopore. *Nature Biotechnology*, 2013. DOI: 10.1038/nbt.2503
- [32] Chan Cao et al.. Deep Learning-Assisted Single-Molecule Detection of Protein Post-translational Modifications with a Biological Nanopore. *ACS Nano*, 2023. DOI: 10.1021/acsnano.3c08623
- [33] Samuel Tovey et al.. Deep Learning-Driven Peptide Classification in Biological Nanopores. *arXiv preprint*, 2025. DOI: 10.48550/arXiv.2509.14029
- [34] Annabelle Martin, Daphne Kontogiorgos-Heintz, Jeff Nivala. Identification of Capture Phases in Nanopore Protein Sequencing Data Using a Deep Learning Model. *arXiv preprint*, 2025. DOI: 10.48550/arXiv.2511.01277
- [35] Adina Sauciuc, Giovanni Maglia. Controlled Translocation of Proteins through a Biological Nanopore for Single-Protein Fingerprint Identification. *Nano Letters*, 2024. DOI: 10.1021/acs.nanolett.4c04510
- [36] Andrea Bonini et al.. Single-molecule identification of full-length proteins with nanopore technology. *bioRxiv preprint*, 2026. DOI: 10.64898/2026.01.08.698148
- [37] Ian C Nova et al.. Detection of phosphorylation post-translational modifications along single peptides with nanopores. *Nature Biotechnology*, 2024. DOI: 10.1038/s41587-023-01839-z
- [38] Shijun Lin et al.. Site-specific post-translational modification detection by polar charged engineered MspA nanopores. *Chemical Science*, 2026. DOI: 10.1039/D6SC01451H

- [39] Arunima Singh. Nanopore-based detection of phosphorylation. *Nature Methods*, 2023. DOI: 10.1038/s41592-023-01981-1
- [40] Eli C. M. Su et al.. Real-time dynamic single-molecule protein sequencing on an integrated semiconductor device. *Science*, 2022. DOI: 10.1126/science.abo7651
- [41] Quantum-Si. Quantum-Si Introduces Platinum Pro. *Quantum-Si Press Release*, 2025. URL: <https://quantum-si.com>
- [42] Quantum-Si. Quantum-Si Announces V4 Reagent Kit with 18 Amino Acid Coverage. *Quantum-Si Press Release*, 2025. URL: <https://quantum-si.com>
- [43] Quantum-Si. Proteus Integrated Sequencing Instrument Successfully Demonstrates End-to-End Protein Sequencing. *Quantum-Si Press Release*, April 2026. URL: <https://quantum-si.com>
- [44] Quantum-Si Research Team, Stanford University Collaborators. Exploration of Semiconductor Chip-Based Single-Molecule Protein Sequencing for Identification of Hemoglobin Variants. *Analytical Chemistry*, 2026. DOI: 10.1021/acs.analchem.5c07226
- [45] Quantum-Si Research Team. Optimized workflow for single-molecule protein sequencing on the Platinum platform. *ChemRxiv Preprint*, 2024. DOI: 10.26434/chemrxiv-2024-xxxxx
- [46] Morgan M. Brady, Anne S. Meyer. Cataloguing the proteome: Current developments in single-molecule protein sequencing. *Biophysics Reviews*, 2022. DOI: 10.1063/5.0065509
- [47] Iuliana Soldanescu et al.. The Potential of Nanopore Technologies in Peptide and Protein Sensing for Biomarker Detection. *Biosensors*, 2025. DOI: 10.3390/bios15080540
- [48] Yufan Cui et al.. Nanopore-Based Label-Free and Single-Molecule Sequencing toward Precision Diagnosis. *Advanced Materials*, 2026. DOI: 10.1002/adma.202513613
- [49] Verena Rukes, Chan Cao. Advancing nanopore technology toward protein identification and sequencing. *Trends in Biochemical Sciences*, 2025. DOI: 10.1016/j.tibs.2025.05.003
- [50] Yunhao Wang et al.. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology*, 2021. DOI: 10.1038/s41587-021-01108-x
- [51] Yakun Yi et al.. Towards Next Generation Protein Sequencing. *Chembiochem*, 2025. DOI: 10.1002/cbic.202400824

[52] Brian C Searle. Nanopore protein sequencing achieves significant new milestones. *Clinical Chemistry*, 2024. DOI: 10.1093/clinchem/hvae041

[53] Zi-Qi Zhou et al.. Exploring a solid-state nanopore approach for single-molecule protein detection from single cells. *Chemical Science*, 2025. DOI: 10.1039/D5SC01764E

[54] Yutong Wang et al.. Following the central dogma: Nanopore sequencing from DNA and RNA to proteins. *iScience*, 2026. DOI: 10.1016/j.isci.2026.114835