

ナノポア計測：膜タンパク質ナノポアを用いた電気化学的一分子認識

川野 竜司

東京農工大学・大学院工学研究院・生命機能科学部門
〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16



Nanopore sensing: electrochemically single molecule recognition using pore-forming protein nanopores

Ryuji KAWANO

Division of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo
University of Agriculture & Technology
2-24-16, Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588

This article describes electrochemical single molecule measurement based on biological nanopores embedded in planar lipid bilayer membranes. Pore-forming membrane proteins have been used as the sensing element and they allow label-free detection with a high signal-to-noise ratio at the single molecule level. One of the important things for the nanopore measurement is the stability and reproducibility of the lipid bilayer membranes. To improve the durability of the nanopore sensing with lipid bilayer, we proposed droplet contact method. In this method, a lipid bilayer is formed at the interface between contacting two droplets in an oil/lipid mixture, and the stability and reproducibility of the bilayer membrane are improved using this method. In addition, we also proposed a method for the rapid and highly selective nanopore detection using a DNA aptamer. The DNA aptamer recognizes the target molecule with high selectivity. We successfully detected a low concentration of cocaine within 60 s using a biological nanopore embedded in a lipid bilayer.

1. はじめに

化学の世界で分子を検出・計測するとき、mol 量 (10^{23} 個) の分子の集合状態を観測することになる。核磁気共鳴分光、赤外分光などの分光測定法、CV (サイクリックボルタンメトリー) などの電気化学測定においても、大量の分子から得られたシグナルを解析することで、分子固有の振る舞いを決定する。このような実験を行っているとき自然に「では本当に一分子で計測したらどのような結果が得られるのか？」という疑問が湧いてくる。これまで一分子

計測を行うために様々なアプローチが提案されてきた。特に電子顕微鏡を用いた場合、一分子どころか一原子の描像が得られるようになってきている。しかしながら、電子顕微鏡で一分子を観測するためには試料の前処理が必要になり、また観測には高真空が必要など、測定条件に限られることがあった。電気化学の世界でも一分子計測が試みられていたが、電気化学計測では電解質溶液中、液体に溶解している分子の拡散や酸化還元挙動を一分子で観測することが求められるため、一分子を精度よく検出するの

(平成 26 年 11 月 20 日受理)

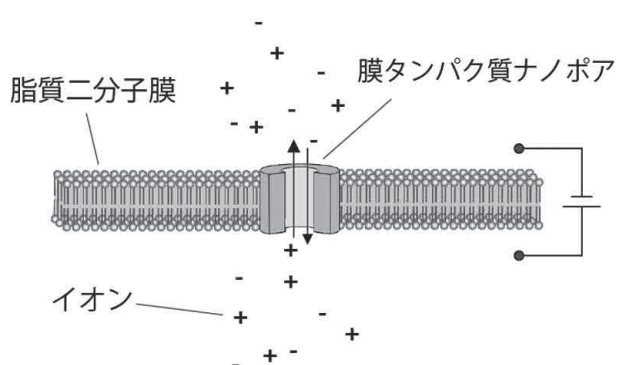


図1 平面脂質二分子膜中に再構成したチャネル膜タンパク質によるナノポア計測の概略図。一つのナノポアを流れるイオンをチャネル電流として計測する。

は難しかった。

1995年 Texas 大学の A.J. Bard 博士らは、ナノサイズの電極を用いることで確率的な一分子の電気化学計測に成功した¹⁾。直径およそ 15 nm の Pt/Ir 作用電極の先端と対極との間にナノギャップを設け、一つの分子が作用電極で酸化されるとすぐにその分子が対極で還元され、また作用極で酸化されるというサイクル反応の電流を観測することで、確率的な一分子の酸化還元挙動を計測した。ちょうど同じ時期の 1996 年、UC Santa Cruz の David Deamer 博士らは膜タンパク質のナノチャネルを用いた一分子 DNA の検出法を提案した²⁾。当時 Deamer 博士は彼らが作製した人工細胞内にエネルギー源である ATP をどのように入れたらよいか悩んでいた。MIT Technology Review の記事によると³⁾、Deamer 博士はカリフォルニア州の高速 5 号線を車で走行中、突然膜タンパク質のナノポアを使えば ATP やその重合体である DNA を細胞内に取り込めるのではないかと思いつき、更には一分子 DNA のシーケンス読み取りまで可能になると考え、急いでノートにメモを取ったと伝えている (Web サイトでその時にメモを取ったノートを見ることができる)。

このナノポアによる一分子計測の概略を図 1 に示す。電解質溶液中に形成した平面脂質膜にチャネルを形成する膜タンパク質を再構成する。この時にタンパク質濃度や諸条件を最適化することで、ひとつのナノポアを再構成することが本方法のキーポイントである。再構成したナノポアの両側に配置した電極により電位勾配を形成し、ナノポアを流れるイオンを電流として検出する。この時、標的分子がこの

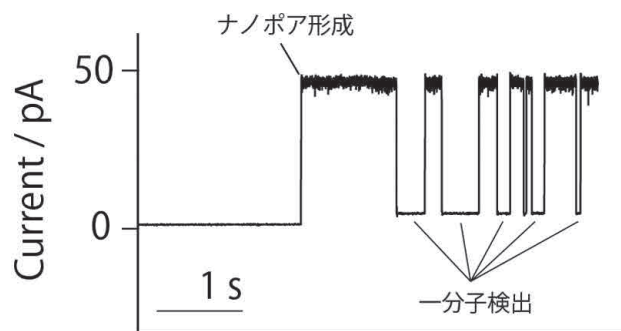


図2 ナノポア計測で得られる典型的な電流—時間のグラフ。ナノポア形成前は絶縁性の脂質膜しかない状態なので電流が流れないが、ナノポアが膜中に形成されるとステップ状の電流が観測される。この一つのステップがタンパク質ナノポアを流れるチャネル電流である。このナノポアを分子が通過するとイオンの流れを遮るため、チャネル阻害電流が観測される。この阻害される電流量、時間から分子固有の情報が得られる。

ナノポアの中に入り通過すると、その通過している間イオンの流れを阻害するので、ナノポアを流れる電流が減少する。ナノポア計測の典型的な電流—時間のグラフを図 2 に示す。用いたチャネル膜タンパク質はナノポア研究で最も広く使われているアルファヘモリシン (α -hemolysin, α HL) という直径 1.4 nm のナノポアを持つチャネル型の膜タンパク質である⁴⁾。 α HL が再構成される前は脂質二分子膜の状態では電流が流れない。 α HL が脂質膜中にナノポアを形成すると、ステップ状の電流が流れる。このチャネル電流はナノポアの体積に依存した電流量となる。ここに標的分子が入ると電流が阻害され、一分子のナノポアへの侵入・脱出が非常に高い signal-to-noise ratio で電気化学的に観測できる。

このナノポアによる一分子計測研究を大きく展開したのが Oxford 大学の Hagan Bayley 博士らのグループである。1999 年 Nature に α HL ポアを用いた有機小分子の検出法を報告すると⁵⁾、金属イオン⁶⁾、光学異性体⁷⁾、膜タンパク質ナノポアの変異導入によるナノポアの機能化⁸⁻¹⁰⁾ など次々に新しいナノポア計測について提案した。また Oxford nanopore 社というナノポアシーケンスの会社を設立し、最近ついにナノポアシーケンサを市場に送り込む予定である。筆者も 2006 年からこのナノポアによる一分子計測研究に取り組んできた^{11,12)}。これ

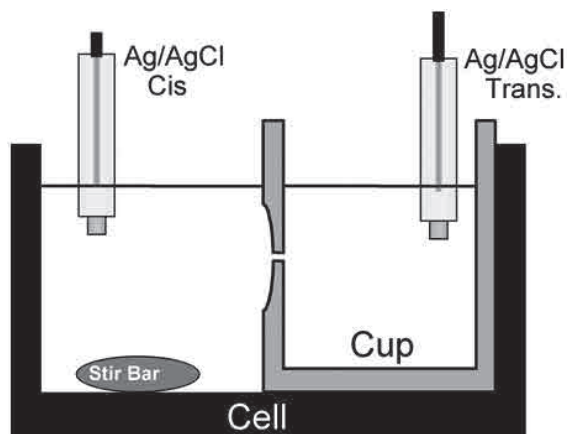


図3 一般的なナノポア計測実験のセットアップ。脂質二分子膜をカップセルに設けた小孔内に形成させる。脂質膜中に再構成したチャンネル膜タンパク質のチャンネル電流を Ag/AgCl 電極により計測する。

までのナノポア計測研究において、平面脂質膜はナノポア形成のプラットフォームであるが、再現良く安定に膜形成することは難しかった。またナノポア計測において分子を選択的に認識する方法に関しても課題があった。本稿では、マイクロ加工技術を用いた安定脂質二分子膜形成法、及び DNA アプタマーを用いた選択的ナノポア計測について概説する。

2. マイクロ加工技術を用いた安定性、再現性の良い脂質膜形成

一般的なナノポア計測のセットアップを図3に示す。カップ型のセルに直径 0.2 mm 程度の穴を設け、その穴の両側に Ag/AgCl 電極を配置する。平面脂質膜はその 0.2 mm 程度の穴の中に形成させる¹³⁾。膜形成法としては、脂質単分子膜貼り合わせ法とペインティング法が知られている。貼り合わせ法では、穴の両サイドにある水相の気液界面に脂質溶液を展開し脂質単分子膜を形成させ、水面をゆっくりと上下させることにより界面の脂質単分子膜を穴中で貼り合わせ二分子膜とする。またペインティング法では、脂質溶液を疎水性のチップで直接穴に塗ることにより脂質二分子膜を形成させる。これらの方法はどちらも脂質膜を形成するのにある程度の習熟が必要になり、また形成した平面膜は直径 0.2 mm の穴に厚さ 5-7 nm という薄膜であるため、機械的振動や印加電圧の切り替えなどにより容易に破壊される。そのためナノポア計測をセンシングに応用するためには、形成する膜の安定性の向上と再現

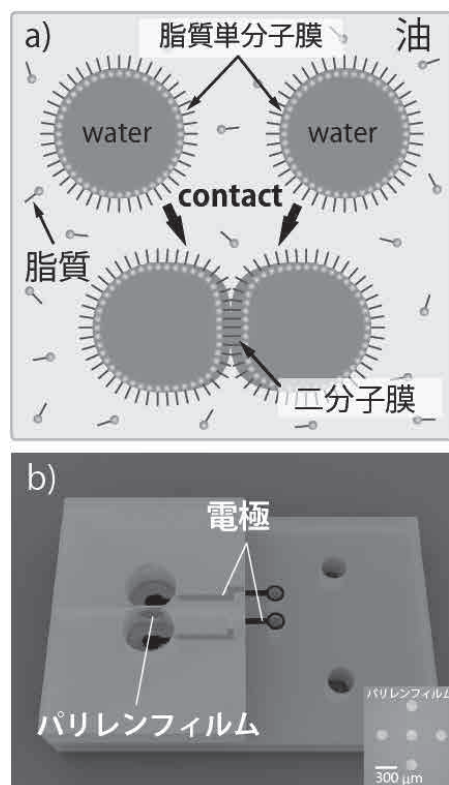


図4 a) 液滴接触法による脂質膜形成の概略図。b) 液滴接触法により安定な脂質膜形成が可能なデバイス。液滴が接触する界面にマイクロ孔を有す高分子フィルムを設けることにより、脂質膜の安定性が向上する。

良く膜形成する方法の開発が強く望まれていた¹⁴⁾。

筆者らは脂質膜の安定性向上のため、形成する脂質膜の面積を小さくすることを試みた¹⁵⁾。パリレン (poly(p-xylylene)) という疎水性の高分子をシリコンウェハ上に気相重合し、均一な薄膜を形成する。そこにフォトリソグラフィーの技術により直径 5 μm の穴を作製し、その穴をさらにパリレンをコンフォーマルコーティングすることで直径 400 nm のサブミクロン孔を得た。このサブミクロン孔を用いて脂質二分子膜形成を行ったところ、その安定性が向上した。脂質膜の安定性の指標の一つとして、膜形成後自発的に膜破壊が起こるまでの時間がある。通常数分から数時間で破壊される平面脂質膜が、パリレンサブミクロン孔に形成した場合 120 時間安定に保持することができた。次にこの安定膜をマイクロ流路に組み込み、液体の流れ（フロー）による再現性の高い膜形成法の確立を試みた。脂質溶液と水溶液を交互に流すことで、自発的な脂質膜形成が

可能となり、また膜形成後フローにより膜を保持したまま目的物質の導入が可能であった。しかしながらデバイスを変えるとフローの条件が若干変わることや、シリンジポンプによるフローの制御が煩雑であることなどの問題点があった。

そこで次に液滴接触法による再現性・安定性の高い膜形成法の確立を行った。液滴接触法は、前述の貼り合わせ法を発展させた方法で2006年に竹内らによって初めて報告されている¹⁶⁾。この方法では図4に示すように形状を最適化し、マイクロリングで作製した「∞」型のウェルに脂質溶液、水滴の順に滴下する。この時水滴の表面には脂質の単分子膜が形成され、この二つの水滴が接触することで、脂質の単分子膜同士が貼り合わされ脂質二分子膜を形成する(図4a)。この液滴接触法では最適化された量の脂質溶液と水滴(バッファー溶液)を「∞」型のウェルにピペットで滴下するだけで、簡単に誰でも脂質二分子膜形成が可能である。しかしこの方法において高い再現性はあったが、形成した脂質膜の安定性に問題があった。そこで脂質膜の面積を小さくすると膜が安定するという知見を活かし、液滴が接触する部分を直径100 μmの穴を有すパリレンフィルムで仕切ること、膜形成面積を小さくした(図4b)。この結果、脂質膜の安定性が飛躍的に向上し、およそ二週間膜を保持し続けることが可能であった。また「∞」型のウェルの底部に電極を配線することで、脂質膜中に再構成したペプチドチャンネルや、イオンチャンネルのチャンネル電流の計測も可能になった¹⁷⁾。この液滴接触法による脂質二分子膜形成は、再現性、安定性の面で現在最も優れた方法であると考えている^{18,19)}。

3. DNA アプタマーによる選択的ナノポア計測

これまで膜タンパクチャンネルを用いたナノポア計測では、そのほとんどがαHLというtoxinチャンネルが用いられてきた。αHLは黄色ブドウ球菌の毒素で赤血球などの標的細胞膜中でモノマーが7つ会合し、直径1.4 nmのナノポアを作り溶血を引き起こす⁴⁾。このαHLは安定なタンパク質であり、また再現性の良いポアを形成することからナノポア計測でよく用いられる。また1.4 nmという孔の大きさがsingle-stranded DNA(ssDNA)の直径~1 nmと近いことから、ssDNAの検出、シーケンスに向けて研究が広く展開している²⁰⁾。しかしながら、通常は無機や有機の分子はこのポアサイズと比べてかなり小さく、αHLポアでは直接ポアをブロックする

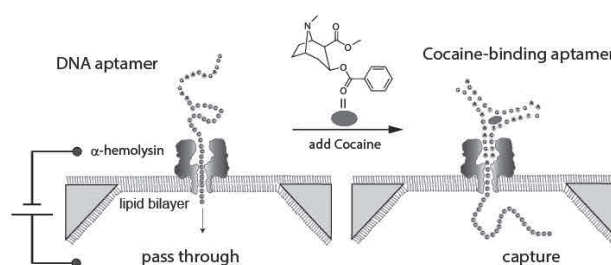


図5 DNA アプタマーを用いた選択的ナノポア計測の概念図。標的分子がないときにはssDNAがナノポアを通過、標的分子が存在すると3次元複合体を形成しナノポアを塞ぎチャンネル電流を阻害する。

阻害電流が観測できなかった。有機小分子を検出するためにBayley博士らのグループは、αHLポアの内部にさらに小さなシクロデキストリンポアを封入した²¹⁾。これによりαHLポアよりもサイズの小さな分子の検出は可能になったが、検出分子の選択性には課題があった。基本的に分子がポアを通過した時に得られる阻害電流の値は、ポアを流れるイオンを阻害した量、すなわちナノポアの体積に対してどの程度の体積を占めるかによって決まる。したがって理論的には体積の異なる分子であればその分子固有の阻害電流が得られるはずであるが、実際の実験ではノイズなどにより、近い体積を持つ分子の区別は難しく選択的な分子認識もこれまでは難しかった。

そこで筆者らはDNAアプタマーを用いることで、ナノポアによる選択的一分子計測法を提案した²²⁾。DNAアプタマーとは、特定の分子と特異的に結合し複合体を形成する塩基配列を持つDNAのことである。このDNAアプタマーを用い、標的分子非存在下ではssDNAがαHLポアを通過、標的分子存在下ではアプタマー複合体を形成しαHLポアを通過できずブロックする、という複合体前後におけるDNAの体積差を利用して一分子の特異的検出を行った(図5)。標的物質として、麻薬として知られるコカインを用いた。コカインに対するアプタマー配列はすでに報告されており²³⁾、この配列を利用しコカイン分子と結合した時にαHLポアをブロックし、且つssDNAのテール部分がαHLポアの膜貫通部分(βバレル)を貫通するDNA配列設計を行った。図6に複合体形成前、形成後の電流-時間のグラフを示す。コカイン非存在下でDNAは複合体形成を行わずssDNAの状態であり、ssDNAがαHLポアを高速で通過する時のスパ

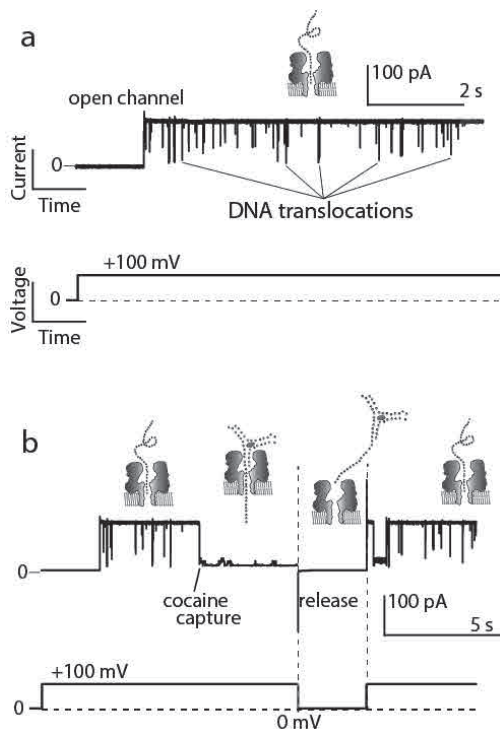


図6 DNA アプタマーによるコカイン計測の典型的な電流—時間グラフ。a) コカイン分子がないとき、ssDNA はナノポアを通過しスパイク状の阻害電流が観測される。b) コカイン分子があるとコカインと DNA は複合体を形成しナノポアを塞ぐ。この時に比較的長い時間の阻害電流が観測される。ナノポアを塞いだアプタマー複合体は電圧印加を除去することで自発的にポアから離れ、電圧の再印加により再びナノポアを阻害する。

イク状の阻害電流が観測される (図 6a)。一方で、コカイン分子存在下では、DNA とコカイン分子で 3 次元複合体を形成し、 α HL ポアを塞ぐことで長時間の阻害電流を示す (図 6b)。 α HL ポアの阻害電流の値は β バレル部分を通るイオン流をどの程度阻害しているかによって決まる²⁴⁾。したがって β バレル部分を貫通する DNA の種類によって阻害電流の値が変化する。本研究では β バレルを貫通するテール部分を 30 塩基のシトシン (全体配列 5'-GGGAGACAAGGAA(C)₃₀) ホモポリマー設計にしており、本コカインアプタマー複合体が示す阻害電流はシトシン 30 mer 由来の阻害電流になる。このテール部分の違いによる阻害電流の変化をラベルとして利用することができ、シトシン以外にもチミンやアデニンにテール部分を変えた数種のアプタ

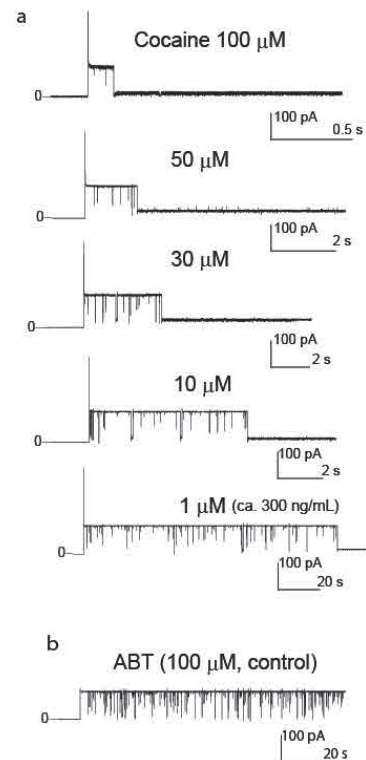


図7 コカインアプタマー計測実験における電流—時間測定の結果。a) コカインアプタマー各濃度における電流—時間グラフ。コカインの濃度が下がるに従いナノポアを阻害するまでの時間が長くなる。b) コカインと類似の分子構造を持つ aminobenzotropine (ABT) を用いた場合、ナノポアを塞ぐ電流は観測されないことから、本測定では高い分子認識能を有することがわかった。

マーを混合することで、複数検体の同時検出が可能となる。コカイン存在下で形成する複合体が α HL ポアを塞ぐまでの時間は、溶液中のコカイン濃度に依存する。図 7 に示すように、濃度が低ければ低いほど α HL ポアを塞ぐまでの時間が長くなっていることがわかる。一般的な分析手法において、分析対象物質の濃度が低くなると得られるシグナルの強度が下がる。面白いことに、ナノポア計測では濃度にかかわらずシグナル強度は変わらない代わりに、シグナルが得られるまでの時間が長くなっていく。したがって原理的には、時間さえかければ非常に薄い溶液からも定量性のあるシグナルが得られることになる。ナノポア計測では、この点が他の分析法と根本的に異なる点である。

コカインのような麻薬物質の検出を行う場合、米国乱用薬物・精神衛生サービス管理局 (SAMHSA)

が推奨する最低検出濃度で検出ができなくては実用的には使えない。コカイン系麻薬においてカットオフ値（検出下限濃度）は 300 ng/mL とされている²⁵⁾。本研究ではマイクロ流路デバイスを用いたナノポア計測において、300 ng/mL のコカイン分子をおよそ一分で検出できた（図 7a）。抗体を用いた一般的なイムノアッセイ法などと比較しても、カットオフレンジにおいて十分短い検出時間であるといえる。また選択性においても、コカインと似た分子構造を有する誘導体 aminobenzotropine を用いた場合アプタマーは複合体を形成せず、阻害電流は観測されなかった（図 7b）。このことより本研究で用いたコカインアプタマーは高い分子認識能を有することがわかった。

4. おわりに

これまでナノポアによる一分子計測法では、分子の特異的認識は難しかった。我々は、分子認識能を有す DNA アプタマーを用いることにより、膜タンパク質ナノポアによる特異的な一分子計測を提案した。原理としては単純で、分子認識の前後でナノポアのサイズを跨ぐ体積変化を利用する。したがって本原理は、DNA のみならず分子認識をして結合し、複合体の体積が大きくなる抗体やペプチドアプタマーへの展開も可能である。しかしながら、実際のセンサとして用いることを考えた場合、まだ課題が多く残る。アプタマーの課題としては、標的物質との結合定数が抗体と比べて低い場合が多いということがあげられる。今後進化学的手法により、さらに高結合能を有す DNA 配列が探索されることを期待する。また膜タンパク質ナノポアを用いる場合、脂質膜を形成後、ナノポアを再構成してはじめて計測が可能になる。センシングする毎にこの手順を行うのは煩雑になるため、より簡易化が求められる。Oxford nanopore 社の開発した次世代ナノポアシーケンサでは、 α HL ポアを脂質膜ではなく高分子薄膜に埋め込むことで測定手順の簡易化に成功している。またまだナノポアのサイズ等に課題はあるが、窒化ガリウムなどの薄膜に電子ビームで形成した固体ナノポアを用いると、より安定なナノポア計測が期待できる²⁶⁾。

ナノポアによる電気化学計測は、これまでの分析化学や電気化学では難しかった一分子のシグナルを定量的に得る事が可能なユニークな方法である。筆者も初めて一分子がナノポアを通過する阻害電流を見た時に、一分子からの信号がこんなにはっきりと

見ることができるとはすごい！と感動したことを覚えている。ナノポア研究はまだまだ日本では知られていないので、ぜひ多くの方に知ってもらえればと思う。

5. 謝辞

本研究の大部分は筆者の前所属である公益法人神奈川科学技術アカデミー竹内プロジェクト及び東京大学生産技術研究所の竹内昌治研究室での仕事です。本研究は、竹内昌治教授をはじめ、研究室の方々との共同成果でありここに謝意を記します。

参考文献

- 1) Fan, F. R. F. & Bard, A. J. Electrochemical Detection of Single Molecules. *Science* 267, 871-874, (1995).
- 2) Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D. & Deamer, D. W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13770-13773, (1996).
- 3) Regalado, A. Radical New DNA Sequencer Finally Gets into Researchers' Hands (<http://www.technologyreview.com/news/530746/radical-new-dna-sequencer-finally-gets-into-researchers-hands/>), (2014).
- 4) Song, L. Z., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H. & Gouaux, J. E. Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274, 1859-1866, (1996).
- 5) Gu, L. Q., Braha, O., Conlan, S., Cheley, S. & Bayley, H. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* 398, 686-690, (1999).
- 6) Braha, O., Gu, L. Q., Zhou, L., Lu, X. F., Cheley, S. & Bayley, H. Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions. *Nature Biotechnology* 18, 1005-1007, (2000).
- 7) Kang, X. F., Cheley, S., Guan, X. Y. & Bayley, H. Stochastic detection of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society* 128, 10684-10685, (2006).
- 8) Wu, H. C., Astier, Y., Maglia, G., Mikhailova, E. & Bayley, H. Protein nanopores with covalently

- attached molecular adapters. *Journal of the American Chemical Society* 129, 16142-16148, (2007).
- 9) Maglia, G., Heron, A. J., Hwang, W. L., Holden, M. A., Mikhailova, E., Li, Q. H., Cheley, S. & Bayley, H. Droplet networks with incorporated protein diodes show collective properties. *Nature Nanotechnology* 4, 437-440, (2009).
 - 10) Maglia, G., Restrepo, M. R., Mikhailova, E. & Bayley, H. Enhanced translocation of single DNA molecules through alpha-hemolysin nanopores by manipulation of internal charge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 19720-19725, (2008).
 - 11) Ervin, E., Kawano, R., White, R. & White, H. Simultaneous alternating and direct current readout of protein ion channel blocking events using glass nanopore membranes. *Analytical Chemistry* 80, 2069-2076, (2008).
 - 12) Kawano, R., Schibel, A., Cauley, C. & White, H. Controlling the Translocation of Single-Stranded DNA through alpha-Hemolysin Ion Channels Using Viscosity. *Langmuir* 25, 1233-1237, (2009).
 - 13) Montal, M. & Mueller, P. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, 3561-3566, (1972).
 - 14) Sugawara, M. & Hirano, A. Fundamental studies on chemical sensing based on receptor-incorporated bilayer lipid membranes. *Bunseki Kagaku* 47, 903-917, (1998).
 - 15) Kawano, R., Osaki, T., Sasaki, H. & Takeuchi, S. A Polymer-Based Nanopore-Integrated Microfluidic Device for Generating Stable Bilayer Lipid Membranes. *Small* 6, 2100-2104, (2010).
 - 16) Funakoshi, K., Suzuki, H. & Takeuchi, S. Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Analytical Chemistry* 78, 8169-8174, (2006).
 - 17) Kawano, R., Tsuji, Y., Sato, K., Osaki, T., Kamiya, K., Hirano, M., Ide, T., Miki, N. & Takeuchi, S. Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels. *Scientific Reports* 3, (2013).
 - 18) Tsuji, Y., Kawano, R., Osaki, T., Kamiya, K., Miki, N. & Takeuchi, S. Droplet-based lipid bilayer system integrated with microfluidic channels for solution exchange. *Lab on a Chip* 13, 1476-1481, (2013).
 - 19) Tsuji, Y., Kawano, R., Osaki, T., Kamiya, K., Miki, N. & Takeuchi, S. Droplet Split-and-Contact Method for High-Throughput Transmembrane Electrical Recording. *Analytical Chemistry* 85, 10913-10919, (2013).
 - 20) Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X. H., Jovanovich, S. B., Krstic, P. S., Lindsay, S., Ling, X. S. S., Mastrangelo, C. H., Meller, A., Oliver, J. S., Pershin, Y. V., Ramsey, J. M., Riehn, R., Soni, G. V., Tabard-Cossa, V., Wanunu, M., Wiggin, M. & Schloss, J. A. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 26, 1146-1153, (2008).
 - 21) Bayley, H. & Cremer, P. S. Stochastic sensors inspired by biology. *Nature* 413, 226-230, (2001).
 - 22) Kawano, R., Osaki, T., Sasaki, H., Takinoue, M., Yoshizawa, S. & Takeuchi, S. Rapid detection of a cocaine-binding aptamer using biological nanopores on a chip. *Journal of the American Chemical Society* 133, 8474-8477, (2011).
 - 23) Stojanovic, M. N., de Prada, P. & Landry, D. W. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *Journal of the American Chemical Society* 123, 4928-4931, (2001).
 - 24) Deamer, D. W. & Branton, D. Characterization of nucleic acids by nanopore analysis. *Accounts of Chemical Research* 35, 817-825, (2002).
 - 25) Moeller, K. E., Lee, K. C. & Kissack, J. C. Urine drug screening: Practical guide for clinicians. *Mayo Clinic Proceedings* 83, 66-76, (2008).
 - 26) Healy, K., Schiedt, B. & Morrison, A. P. Solid-state nanopore technologies for nanopore-based DNA analysis. *Nanomedicine* 2, 875-897, (2007).