يقع في مركز بروتين غشاء بكتيري يسمى ألفا هيمولايسين (α-HL)، وهو جزيء له شكل الفطر الأجوف مع رقبة أسطوانية ضيقة يمكن أن تثبت في طبقة غشاء ليبيدية. لقد وجدا أن التيار الأيوني انخفض عند مرور شريطتي الدنا والرنا خلاله، وأنه كلما زاد طول الشريطة طالت الإعاقة. ومع تحسينات أكثر، صرح الباحثان بجرأة في ذلك الوقت بأن "هذه الطريقة يمكن أن تقدم من حيث المبدأ كشفاً مباشراً وبسرعة عالية لتسلسل القواعد في جزيئات الدنا أو الرنا المفردة". ولكن هذه الطريقة لكشف سلسلة الدنا كانت راديكالية لدرجة أن عدداً قليلاً من علماء الوراثة انتبه لها. "العديد اعتقدوا أنها كانت جنوناً"، يقول برانتون.

وفي الوقت نفسه، كان عالم الكيمياء البريطاني هاغان بيلي H. Bayley في جامعة تكساس A&M، والآن في جامعة أوكسفورد، يستكشف استخدام α-HL ككاشف للمواد التي تقع بداخل الثقب. وذكرت مجموعته في العام 1999 أنه عندما يجهز الثقب بمهايئ –جزيء السكر سيكلوديكسترين ذي الشكل الحلقي والذي يتناسب بشكل محكم مع الفتحة– يمكن استخدام التغيرات في التيار الأيوني لتمييز جزيئات عضوية صغيرة متنوعة. ومع أن بيلي كان على دراية بملاحظة ديمر عن سلسلة الجينوم من خلال الثقب النانوي، فإنه يقول بأنه قَبِلَ التحدي فقط في العام 2004 عندما أعلنت المعاهد الوطنية الأمريكية للصحة (NIH) عن مبادرة لتطوير تقنيات تستطيع أن تقدم سلسلة الجينوم البشري مقابل 1000 دولار أمريكي للجينوم. وبمنحة مقدمة من NIH في العام 2005، أظهر بيلي وزملاؤه أن قواعد الدنا يمكن أن تتميز من خلال التوهين المختلف للتيارات الأيونية عندما تمرر شريطة الدنا من خلال α-HL.

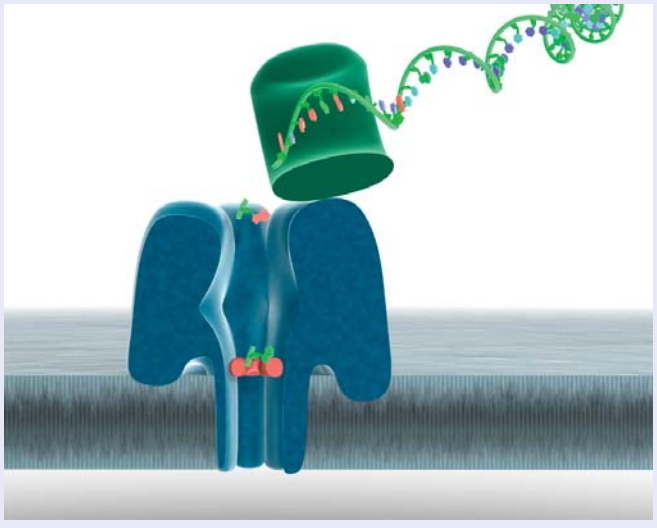
حدود السرعة

ولكن من المحتم أن سلسلة الدنا مع α-HL ليست بهذه البساطة. فمن جهة، إن الرقبة الضيقة لـα-HL تبلغ حوالي 5 نانومترات طولاً، وهذا أطول بكثير من ارتفاع الـ 4 أنغستروم لزوج قاعدي واحد على الدنا، مما يعني أن هناك حاجة لحوالي 10-15 قاعدة لسد الثقب في أية لحظة. ومن جهة أخرى، فإن الرحلان الكهربائي يمسح شريط الدنا بمعدل حوالي 1-10 ميكروثانية لكل قاعدة، وهذا يجعل من المستحيل جمع إشارة كافية لتحديد كل قاعدة بشكل موثوق. وباختصار، هناك حاجة لضبط أكبر لكل من الثقب ذاته وحركة الدنا من خلاله.

يمكن تقليل سرعة مرور الدنا بلصق حبات عليه لخلق قوة سحب أو بتخفيض درجة حرارة المحلول الأيوني. ولكن أحد أكثر الطرائق وعداً يستخدم شرطة السرعة الطبيعية: ما يسمى أنزيمات الدنا الإصلاحية؛ وهذه بروتينات تلتحم مع الدنا وتنتقل عبر الشريط قاعدة قاعدة لتقوم بمهمات مثل الإصلاح، قطع أو تعديل كيميائي. إذا انتخبت هذه الأنزيمات لفحص كل قاعدة بالدور وليس بالضرورة عمل أي شيء لها، فإنها تتقيد بحجم فتحة الثقب، وبالتالي فإن الدنا لا يستطيع المرور عبر الثقب بشكل أسرع من الأنزيم. وبشكل نموذجي، فإن بضعة أجزاء من الألف من الثانية لكل قاعدة، سيخفف الدنا سرعته ثلاث مراتب في القيمة. يقول برانتون: لفرض حدود سرعة على الدنا، فإن "استخدام أنزيمات الدنا الإصلاحية في فم (فتحة) الثقب أو قربه هو أفضل خيار متوفر أعرفه اليوم".

استنبط بيلي طريقة أكثر شدة لضبط السرعة، والتي يمكن أيضاً أن تحل مشكلة وجود قواعد عدة محشورة في الثقب بأية لحظة. بدلاً من سحب شريطة الدنا، يقترح أنها يمكن أن تقص ببعض أنزيمات قطع الدنا المسماة بالنيوكليز الخارجي exonuclease، التي تقطع النيوكليوتيدات من النهاية واحداً بعد الآخر. إذا ربط بالنيوكليز

الشكل 1: منشر (قَضْم) الدنا:



تمسك شريطة الدنا من قبل بروتين النيوكليز الخارجي exonuclease، الذي يقص القواعد الفردية الواحدة تلو الأخرى. ثم تغذى هذه القواعد إلى جزيء بشكل الفطر يدعى α–HL، الذي يتوضع داخل طبقة دهنية مزدوجة مقاومة كهربائياً، ومن خلال جزيء السيكلوديكسترين الأصغر الملتصق بداخلها. تعطي قواعد الدنا المختلفة انقطاعات مميزة في تدفق الأيونات في المحلول الملحي عند عبوره الثقب النانوي. القطبان الكهربائيان المتموضعان أعلى الطبقة الدهنية المزدوجة وأسفلها يسوقان ويكشفان التغير في هذا التيار الأيوني البالغ الصغر، بما يجعل تحديد سلسلة الدنا ممكناً.